مجله علمی شیلات ایران ۳۲(۲) ۱۳-۲۵ (DOI): 10.22092/ISFJ.2023.129176

CC BY

مقاله علمی – پژوهشی:

ارزیابی زی‌توده، رشد، زنده‌مانی و ترکیبات بیوشیمیایی جلبک *Tetraselmis tetrathele* با استفاده از پساب‌های لبنیات و مخمر

امیدوار فرهادیان*[۱]، شیرین سلطانی سامانی[۱]، فاطمه رستمی[۱]، امید بیرقدار کشکولی[۱]

*omfarhad@iut.ac.ir

۱- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: آذر ۱۴۰۰ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۴۰۲

چکیده

جلبک تک‌سلولی *Tetraselmis tetrathele* یکی از گونه‌های آب شور است که به علت ارزش غذایی زیاد و ترکیبات زیست‌فعال و سهولت در کشت، استفاده گسترده‌ای در صنعت و آبزی‌پروری دارد. در این مطالعه کشت انبوه جلبک *T. tetrathele* با استفاده از پساب کارخانه‌های شیر و مخمر با هدف ارزیابی رشد، زنده‌مانی و ترکیبات بیوشیمیایی (پروتئین، چربی، کربوهیدرات) مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش به صورت یک طرح کاملاً تصادفی با ۶ تیمار شامل؛ کانوی، پساب‌های خام شیر و مخمر به عنوان محیط کشت هر کدام در دو حالت رقیق (۵ میلی‌لیتر به ازاء هر لیتر از محیط کشت) و غلیظ (۱۰ میلی‌لیتر به ازاء هر لیتر از محیط کشت)، طی یک دوره ۱۱ روزه انجام شد. نتایج نشان داد که این گونه از توانایی رشد در پساب خام شیر و مخمر برخوردار است، اما بیشترین تراکم‌سلولی در تیمار کانوی رقیق (تراکم $۹/۱۲\times۱۰^{۶}$ سلول در هر میلی‌لیتر و رشد ویژه ۰/۸۷ در روز) و بیشترین میزان رشد ویژه جلبک در تیمار مخمر رقیق (تراکم $۶/۶۸\times۱۰^{۶}$ سلول در هر میلی‌لیتر و رشد ویژه ۲/۸۴ در روز)، مشاهده شد. این در حالی است که تیمار پساب خام شیر رقیق زنده‌مانی بیشتری نسبت به سایر تیمارها داشت. بیشترین میزان پروتئین و چربی در تیمار پساب خام شیر غلیظ (به‌ترتیب ۴۴/۶ درصد و ۹/۷۱ درصد از وزن خشک) و بیشترین مقدار کربوهیدرات نیز در تیمار مخمر غلیظ (۳۱/۴۹ درصد از وزن خشک) به‌دست آمد. براساس میزان رشد ویژه، زنده‌مانی و ترکیبات بیوشیمیایی می‌توان نتیجه‌گیری کرد که پساب‌های شیر و مخمر می‌توانند به عنوان محیط کشت مناسب نیمه‌صنعتی در پرورش انبوه این جلبک به‌کار برود و برای تولید ترکیبات زیست‌فعال و سوخت‌های زیستی از زی‌توده حاصله توصیه می‌گردد.

لغات کلیدی: پساب، ترکیب بیوشیمیایی، شیر و مخمر، رشد، *Tetraselmis tetrathele*

*نویسنده مسئول

مقدمه

جلبک‌ها، تولید کنندگان اولیه غالب در اکثر محیط‌های آبی هستند و قسمت اعظم انرژی را برای بسیاری از شبکه‌های غذایی آبی فراهم می‌کنند (فرهادیان و جعفری، ۱۳۹۴). ریزجلبک‌ها نه‌تنها در تغذیه انسان نقش مهمی دارند بلکه منابع غذایی بسیار مناسبی برای صنایع آبزی‌پروری و تغذیه آبزیان پرورشی هستند (Amini Khoeyi *et al*., 2012). استفاده از ریزجلبک‌ها به عنوان یک منبع غذایی برای پرورش آبزیان دارای این فایده است که بدون تأثیرپذیری از تغییرات اقلیمی و آلودگی محیط‌زیست، در مخزن‌های بسته به صورت کاملاً بهداشتی کشت می‌شوند و در صنایع گوناگون به‌ویژه آبزی‌پروری مورد استفاده قرار می‌گیرند. ریزجلبک دریایی *Tetraselmis tetrathele* متعلق به رده کلروفیسه‌هاست که حاوی ۳۱ درصد پروتئین، ۱/۱۲ درصد کربوهیدرات و ۱۷ درصد چربی است (Helena *et al*., 2018). این ریزجلبک دامنه ۴۰-۵ درجه سانتی‌گراد را تحمل می‌کند و از توانایی رشد در پساب‌ها و در آبهای شور با شوری ۷۵ گرم در لیتر برخوردار است. تمامی این خصوصیات نشان می‌دهند که این گونه می‌تواند به طور موفقیت‌آمیزی در مقیاس صنعتی رشد یابد (Schüler *et al*., 2020). ریزجلبک‌ها می‌توانند به صورت چشمگیری دارای ارزش غذایی متفاوت باشند (Brown *et al*., 1997). محتوای پروتئین و اسیدهای چرب غیراشباع عامل اصلی تعیین‌کننده ارزش غذایی ریزجلبک‌ها و داشتن خواص آنتی اکسیدانی مناسب و قابل ملاحظه از دیگر مزایای استفاده از آنهاست (Knuckey *et al*., 2002; صفری و همکاران ۱۴۰۱). همچنین عوامل متعددی ازجمله؛ اندازه و شکل جلبک، هضم‌پذیری مربوط به ساختار دیواره سلولی، ترکیب بیوشیمیایی (ترکیبات انباشته، آنزیم‌ها و سموم) و نیازهای خاص موجودات زنده هدف، در ارزش تغذیه‌ای یک ریزجلبک تاثیرگذارند.

ریزجلبک‌ها دارای پتانسیل زیادی برای تصفیه پساب‌هایی هستند که نتیجه فعالیت‌های انسان در عرصه‌های مختلف شهری، کشاورزی یا صنعتی است (Abdel-Raouf *et al*., 2012، حیدری و همکاران، ۱۳۹۰). حذف عناصر مغذی موجود در پساب‌ها مانند نیترات و فسفات با استفاده از جلبک‌ها، به علت وجود مزایایی چون تولید زی‌توده ارزشمند، عدم تولید آلودگی، باز چرخ مواد مغذی، فناوری ساده، کارآیی زیاد و هزینه کم، بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Velichkova *et al*., 2014). از سوی دیگر، امروزه تاکید زیادی بر جمع‌آوری و رفع آلودگی از انواع پساب‌ها می‌گردد، زیرا پساب‌ها توانایی بالقوه‌ای در آلوده‌سازی منابع غذایی و آبها دارند و محیط بسیار مساعدی برای رشد انواع مختلف میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا به‌شمار می‌روند (Campbell, 1999). برای نمونه، پساب تولیدی خمیر مایه یا مخمر، مخلوطی پیچیده و دارای COD، نیتروژن و سولفات زیاد، رنگ تیره و آلاینده‌های غیرقابل تجزیه بیولوژیک است. پساب رهاشده از این صنعت به علت وجود ترکیبات رنگی مقاوم به تجزیه و محلول به نام Melanoidins منبع اصلی آلودگی آب و خاک است. همچنین ملاس، محصول جانبی تولید شکر، به طور اصلی به عنوان مواد اولیه اصلی در تولید مخمر استفاده می‌شود (Kobya and Delipinar, 2008). ملاس دارای ۵۰-۴۵ درصد قند،۲۰-۱۵ درصد مواد آلی غیر آروماتیک، ۱۵-۱۰ درصدخاکستر (مواد معدنی) و حدود ۲۰ درصد آب است (Kalyuzhnyi and Murray 2005). قسمت اصلی مواد غیر قندی ملاس که در تولید خمیرمایه استفاده نشده بدون تغییر به پساب تخلیه می‌شود که جزو مواد زائد اصلی پساب خمیرمایه یا مخمر است. این پساب همچنین شامل مواد شیمیایی مثل نمک‌های مختلف، کف زداها، اسید پروپیونیک، آب و متابولیت‌های تخمیری است (Blonskaja and Zub, 2009). ملاس به علت هزینه کم، یکی از مهم‌ترین مواد خام مورد استفاده در صنایع تخمیر است. یکی دیگر از منابع مهم و عمده پساب‌ها، مربوط به صنایع لبنی به‌ویژه شیر است. این صنعت لبنی به‌طور متوسط ۱۱/۲-۳/۷ میلیون مترمکعب پساب در سال تولید می‌کند (Wang *et al*., 2006). برخی از مواد آلی موجود در پساب‌های لبنی، قابل‌تجزیه به‌وسیله باکتری‌ها نیستند و باید با استفاده از

روش‌های شیمیایی تجزیه شوند (Carvalho *et al*., 2011). حجم و قدرت جریان پساب به علت تفاوت در تولید و نیز میزان و غلظت پساب در واحد تولیدی روزبه‌روز تغییر می‌کند (Wang *et al*., 2016).

با توجه به حجم پساب‌های تولیدی کارخانه‌های لبنیات و مخمر در ایران و با توجه به وجود منابع آب شور در سواحل جنوب کشور می‌توان تولید جلبک‌های آب شور را با استفاده از پساب‌های لبنیات و مخمر انجام داد و تولید زی‌توده جلبکی با ارزشی نمود که کاربردهای گوناگون دارد. در این مطالعه هدف اصلی تولید جلبک *T. tetrathele* با استفاده از دو نوع پساب کارخانه لبنیات و مخمر در دو غلظت متفاوت با تاکید بر رشد و تراکم و ترکیب بیوشیمیایی جلبک در شرایط کنترل‌شده آزمایشگاهی بود.

مواد و روش کار

اندازه‌گیری ویژگی‌های پساب مورد استفاده برای پرورش ریزجلبک *T. tetrathele*

پساب‌های خام شیر از شهرک صنعتی شهر سامان و پساب مخمر از کارخانه خمیرمایه نانوایی در نزدیکی شهر ناغان در استان چهارمحال و بختیاری جمع‌آوری گردید. میزان COD، BOD، TSS، فسفات و نیترات نمونه‌ها بر اساس روش‌های استاندارد اندازه‌گیری شد (Rice *et al*., 2017). میزان COD با استفاده از دی کرومات پتاسیم و سولفات نقره و راکتور COD با قرائت مقدار جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر تعیین شد. مقدار BOD پنج روزه با اندازه گیری مقدار اکسیژن محلول در ابتدا و انتها (روز پنج) برآورد شد. مقدار کل جامدات معلق (TSS) با استفاده از کاغذ واتمن ۴۲ و قرار گرفتن به مدت یک ساعت در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد و سپس توزین نمونه محاسبه گردید. اندازه گیری کل جامدات محلول (TDS) با استفاده از کاغذ صافی و با توجه به وزن اولیه کاغذ صافی (واتمن ۴۲) و وزن نهایی پس از خشک شدن در دمای ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد به‌دست آمد. اندازه‌گیری فسفات با استفاده از اسید سولفوریک، پتاسیم آنتیمونی تارتارات، آمونیوم مولیبدات و آسکوربیک اسید و قرائت نمونه‌ها در طول موج ۸۸۰ نانومتر تعیین شد. اندازه گیری نیتروزن کل نیز بر اساس روش کلدال با استفاده از جیوه و اسید سولفوریک غلیظ انجام شد.

تهیه ذخیره اولیه ریزجلبک *T. tetrathele*

نمونه خالص ریزجلبک *T. tetrathele* از ایستگاه تحقیقاتی نرم‌تنان بندر لنگه واقع در جنوب کشور تهیه و در آزمایشگاه فایکولب دانشگاه صنعتی اصفهان مورد استفاده قرار گرفت. جهت اطمینان از خالص بودن استوک، مشاهده آن با میکروسکوپ اینورت (مدل CETA ساخت بلژیک) انجام شد و کلیدهای شناسایی برای اطمینان مورد استفاده قرار گرفت.

محیط کشت کانوی در پرورش ریزجلبک *T. tetrathele*

ریزجلبک *T. tetrathele* در ارلن‌مایرهای پنج لیتری با استفاده از محیط کشت کانوی (تیمار ۱) در آب دریا با شوری ۲۵ گرم در لیتر کشت گردید. آب دریا از پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان با شوی ۳۵ گرم در لیتر تهیه شد که با افزودن آب شیرین به شوری ۲۵ گرم در لیتر رسانده شد. ترکیبات مورد استفاده جهت تهیه محیط کشت کانوی در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱: محیط کشت کانوی مورد استفاده (میلی‌گرم در لیتر) برای کشت ریزجلبک *T. tetrathele*

Table 1: Conway medium used for used for cultivation of *T. tetrathele*

نام ماده شیمیایی	غلظت مورد استفاده در هر لیتر آب دریا (گرم)
$NaNO_3$	۱۰۰/۰
Disodium EDTA ($C_{10}H_{16}N_2O_8$)	۴۵/۰
H_3BO_3	۳۳/۶
$NaH_2PO_4.4H_2O$	۲۰/۰
$FeCl_3.6H_2O$	۱/۳
$MnCl_2.4H_2O$	۰/۳۶
Trace metal solution	۱ میلی‌لیتر
$ZnCl_2$	۲/۱
$CoCl_3.6H_2O$	۲/۰
$(NH4)_2\ 6MO_7O_2.4H_2O$	۰/۹
thiamine	۰/۲
Cynocobalamin B_{12}	۰/۰۱
Potassium nitrate (KNO_3)	۲۰/۰

روش انجام آزمایش

جهت انجام آزمایش، کشت جلبک با استفاده از محیطهای کشت کانوی، پساب شیر و مخمر در دو حالت رقیق (۵ میلی‌لیتر در لیتر) و غلیظ (۱۰ میلی‌لیتر در لیتر)، هر کدام در سه تکرار انجام شد. محیط کشت در غلظت‌های کم (رقیق) مقدار ۵ میلی‌لیتر در لیتر (۰/۵ درصد) و در غلظت‌های زیاد (غلیظ) مقدار ۱۰ میلی‌لیتر در لیتر (۱ درصد) به ازای هر لیتر از کشت جلبک *T. tetrathele* استفاده گردید. آزمایش در ارلن مایرهای شیشه‌ای پنج لیتری در شرایط آزمایشگاهی در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد، شوری ۲۵ گرم بر لیتر و pH تقریباً ۸ انجام شد. استوک جلبکی به میزان ۵ درصد حجمی اضافه شد. هوادهی و نور مناسب نیز با استفاده از پمپ هواده مرکزی و لامپ‌های فلورسنت فراهم گردید. جهت شمارش تعداد سلول‌های ریزجلبک هر روز و با استفاده از لام هموسیتومتر و با روش پیشنهاد شده‌ی Martinez و همکاران (۲۰۰۰) انجام شد. میزان رشد ویژه (SGR) با استفاده از رابطه ذیل محاسبه شد (Omori and Ikeda, 1984):

$$SGR=(\ln N2-\ln N1)/t$$

N2: تعداد سلول‌های جلبک در انتهای آزمایش، N1: تعداد سلول‌های جلبک در ابتدای آزمایش و t: مدت زمان انجام آزمایش

برای محاسبه زنده‌مانی از روش رنگ‌آمیزی با رنگ ایوانس آبی ($C_{34}H_{24}N_6Na_4O_{14}S_4$، دارای وزن مولکولی ۹۶۰/۸ گرم) استفاده گردید. میزان یک گرم رنگ در ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد تا استوک تهیه گردد. از هر تیمار ۵ میلی‌لیتر نمونه جلبک گرفته شد و به لوله‌های آزمایش انتقال یافت. سپس به هر لوله چند قطره رنگ برای تثبیت کردن نمونه‌ها اضافه گردید و پس از تثبیت شدن جهت انجام عملیات شمارش سلولی مورد استفاده قرار گرفت. در این حالت سلول‌های مرده آبی رنگ و سلول‌های زنده بی‌رنگ مشاهده شد. درصد زنده‌مانی ریزجلبک‌ها بر اساس رابطه ذیل محاسبه گردید:

زنده‌مانی (درصد) = (سلول‌های زنده/کل سلول‌های جلبکی) ×۱۰۰

در پایان آزمایش جلبک‌ها با استفاده از دستگاه سانتریفوژ با ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه برداشت گردید و

سپس با استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی، خشک گردید و زی‌توده برای اندازه‌گیری‌های بیوشیمیایی مورد استفاده قرار گرفت.

اندازه‌گیری ترکیبات بیوشیمیایی

برای اندازه‌گیری ترکیبات بیوشیمایی ابتدا ۵ میلی‌گرم از زی‌توده خشک‌شده درون لوله آزمایش پودر شده و سپس ۰/۵ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه می‌شود و آنقدر تکان داده تا حل شود. آنگاه محلول را درون لوله آزمایش ۲۰ میلی لیتری ریخته و به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده می‌شود و در یخچال جهت اندازه‌گیری پروتئین، چربی و کربوهیدرات استفاده می‌شود. برای اندازه‌گیری محتوای پروتئین، ابتدا مقدار ۱/۵ میلی‌لیتر از عصاره تهیه شده ریزجلبک درون لوله‌های آزمایش ریخته شد و سپس مقدار ۳ میلی‌لیتر از محلول NaOH به آن اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. نمونه‌ها با دور ۵۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. در مرحله بعد، ۲ میلی‌لیتر از محلول در لوله آزمایش ریخته و به آن یک میلی‌لیتر محلول رنگ (۱۵ گرم NaOH را در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده و به آن ۱۱۰ میلی‌گرم $CuSO_4$ اضافه می‌گردد) اضافه شد و پس از ۵ دقیقه میزان جذب نور نمونه‌ها در طول موج ۳۱۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل JENWAY 6400) قرائت شد. برای اندازه‌گیری کربوهیدرات، زی‌توده خشک جلبک *Tetraselmis* ابتدا ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره تهیه شده درون لوله آزمایش ریخته شد و ۰/۵ میلی‌لیتر فنول به آن اضافه گردید. سپس ۲/۵ میلی‌لیتر سولفوریک اسید به آن اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه تکان داده شد. در نهایت، میزان جذب نور نمونه‌ها در طول موج ۴۹۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. به منظور اندازه‌گیری محتوای چربی، مقدار ۰/۳ میلی‌لیتر از عصاره تهیه شده را درون لوله آزمایش ریخته و سپس ۱/۷ میلی‌لیتر سولفوریک اسید به آن اضافه گردید و به مدت ۲۰ دقیقه درون آون با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از سرد شدن نمونه، به‌خوبی تکان داده شد. ۰/۳ میلی‌لیتر از محلول تهیه شده به لوله آزمایش دیگری انتقال داده شد و ۳/۴۵ میلی‌لیتر محلول وانیلا به آن اضافه گردید و به محلول به مدت ۳۰ دقیقه فرصت داده شد. در نهایت میزان جذب نور نمونه‌ها در طول موج ۵۴۶ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد (Meyer and Walther, 1988).

روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی انجام شد. جهت آنالیز داده‌ها از تجزیه واریانس یک‌طرفه ANOVA و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح خطای ۵ درصد انجام شد. از نرم‌افزار آماری SPSS 24 برای انجام آزمون‌های آماری استفاده گردید. نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel 2010 رسم گردید.

نتایج

به منظور استفاده از پساب خام کارخانه شیر و مخمر درکشت انبوه جلبک *T. tetrathele* پساب‌های خام جمع‌آوری‌شده از کارخانه شیر و مخمر استان چهارمحال و بختیاری مورد بررسی قرارگرفت. برخی ویژگی‌های پساب‌های مورد آزمایش در جدول ۲ ارائه شده است. نتایج نشان داد که میزان ذرات محلول در پساب خام شیر ۳۵/۸ میلی‌گرم در لیتر و در پساب مخمر ۳۰/۱۵ میلی گرم در لیتر بود. میزان COD و BOD در پساب شیر به‌ترتیب ۳۴۹/۷ و ۱۹۰/۴ میلی‌گرم در لیتر درحالی‌که در مخمر ۱۲۱/۵ و ۱۵۶/۳ میلی‌گرم در لیتر بود (جدول ۲).

جدول ۲: برخی ویژگی‌های پساب خام کارخانه شیر و مخمر مورد استفاده (میلی گرم در لیتر) برای کشت جلبک *T. tetrathele*

Table 2: Some characteristics of dairy and yeast wastewater (mg/l) used for cultivation of *T. tetrathele*

پارامترهای اندازه گیری‌شده	پساب خام شیر	پساب خام مخمر
کل جامدات محلول (TDS)	۳۵/۸	۳۰/۲
اکسیژن خواهی شیمیایی (COD)	۳۴۹/۷	۱۲۱/۵
اکسیژن خواهی بیولوژیک (BOD)	۱۹۰/۴	۱۵۶/۳
فسفات	۲۶/۳	۱/۷
نیترات	۱۵۰	۹۳۶
pH	۷/۳	۵/۶

میزان تراکم، رشد ویژه و زی‌توده و زنده‌مانی جلبک *T. tetrathele*

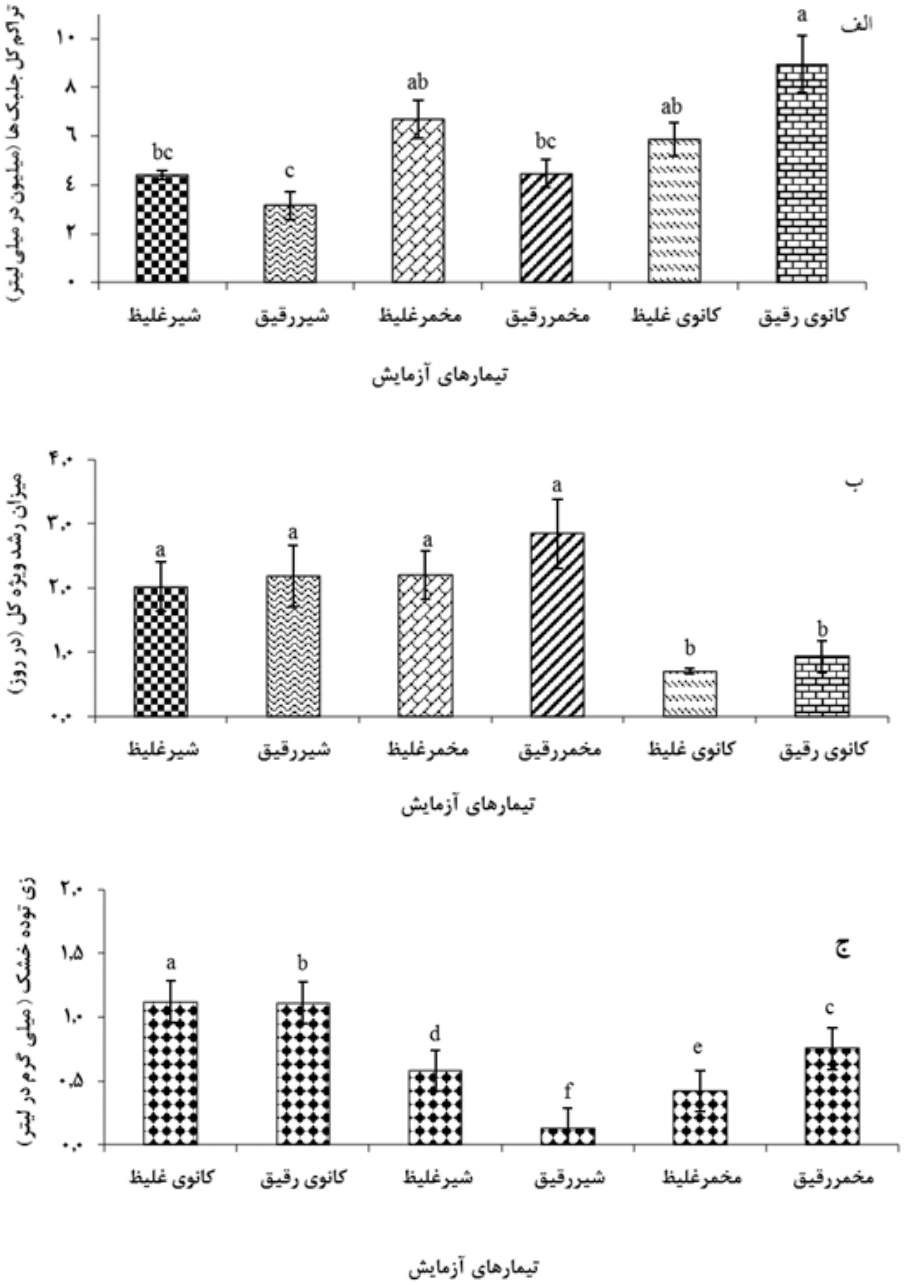
میانگین تراکم سلولی و میزان رشد ویژه پس از ۱۱ روز پرورش جلبک سبز *T. tetrathele* در آغاز ورود به مرحله فاز ثابت رشد[1] در تیمارهای مختلف در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج تجزیه و تحلیل واریانس یک طرفه در طول آزمایش نشان داد که تیمارهای مختلف آزمایشی بر مشخصه‌های مختلف اندازه‌گیری شده تاثیر معنی‌داری دارند ($p<۰/۰۵$). بر اساس نتایج به‌دست آمده در انتهای آزمایش، بیشترین تراکم سلولی در تیمار کانوی رقیق و بیشترین میزان رشد ویژه جلبک (۲/۸۴ در روز) در تیمار مخمر رقیق مشاهده شد. کمترین میزان تراکم سلولی مربوط به تیمار شیر رقیق بود و کمترین میزان رشد ویژه در تیمار کانوی غلیظ مشاهده شد. همچنین بیشترین میزان زی‌توده خشک جلبک سبز *T. tetrathele* در تیمارکانوی (غلیظ و رقیق) و کمترین میزان آن در تیمار شیر رقیق در پایان دوره پرورش (روز ۱۱ پرورش) به‌دست آمد.

میانگین زنده‌مانی سلولی تیمارها پس از ۱۱ روز پرورش جلبک سبز *T. tetrathele* در شکل ۲ نشان داده شده است. در تیمارهای مختلف از نظر زنده‌مانی سلولی تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$) اما تیمار کانوی رقیق زنده‌مانی بیشتری (۱۰۰ درصد) نسبت به سایر تیمارها نشان داد.

ترکیبات بیوشیمیایی

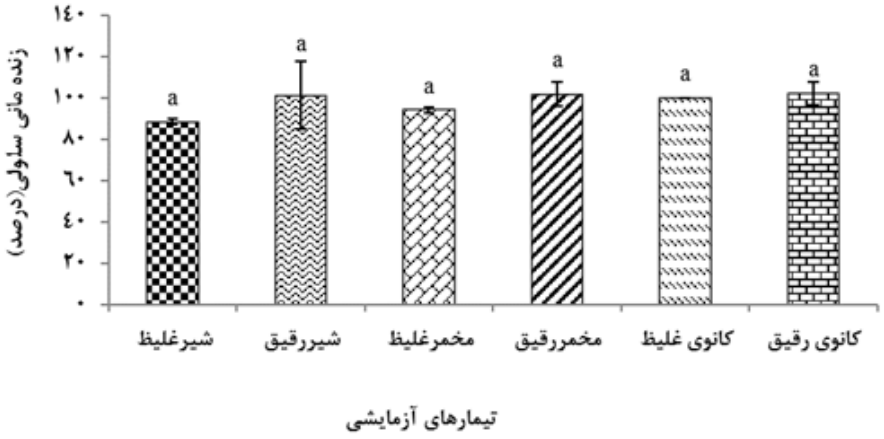
در این تحقیق ترکیبات بیوشیمایی اندازه‌گیری شده در جلبک *T. tetrathele* مربوط به زی‌توده به‌دست آمده در روز ۱۱ از دوره پرورش (در آغاز ورود به دوره ثابت رشد) در هر تیمار است. میزان پروتئین، چربی و کربوهیدرات جلبک *T. tetrathele* رشد یافته در تیمارهای مختلف آزمایشی برحسب درصد از وزن خشک در شکل ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که بیشترین میزان چربی و پروتئین در تیمار شیر غلیظ (به‌ترتیب ۴۴/۶ و ۹/۷ درصد) به‌دست آمد. همچنین تیمار مخمر غلیظ دارای بیشترین میزان کربوهیدرات (۳۱/۵ درصد) بود. به طور کلی، میزان پروتئین، چربی و کربوهیدرات جلبک *T. tetrathele* به‌ترتیب دامنه‌های۴۴/۵-۱۰/۷، ۹/۷-۲/۹ و ۳۱/۴-۵/۹ درصد را نشان داد.

[1] Stationary phase



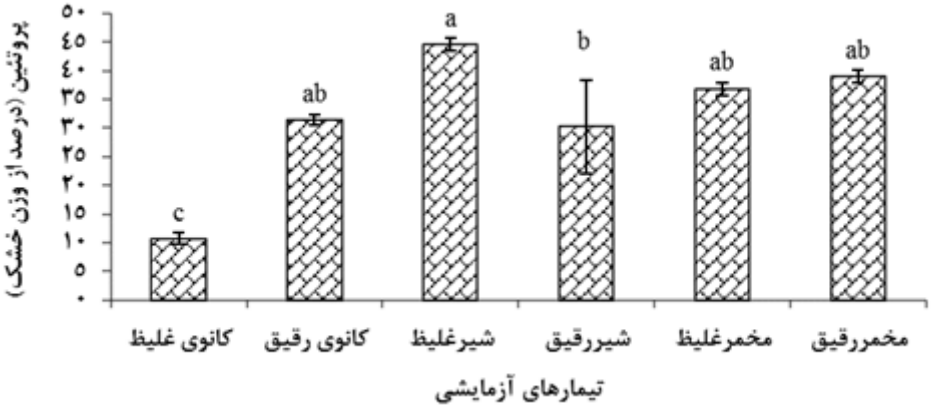
شکل ۱: میانگین (± خطای استاندارد) تراکم (الف)، رشد ویژه (ب) و میزان زی‌توده خشک (ج) جلبک *T. tetrathele* در تیمارهای مختلف. تیمارهای رقیق و غلیظ به‌ترتیب دارای ۵ و ۱۰ میلی‌لیتر در لیتر از محیط کشت بودند. میانگین‌های دارای حداقل یک حروف مشابه از نظر آماری در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند (p >۰/۰۵)

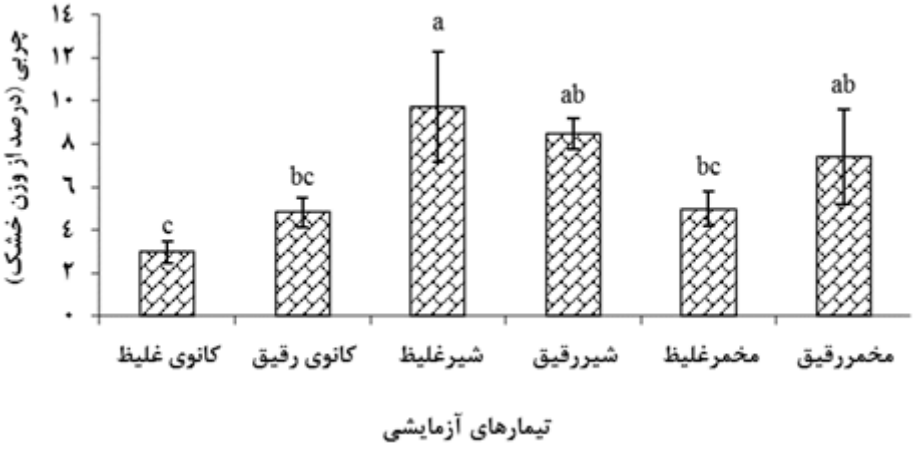
Figure 1: Mean (± SE) of density (a), specific growth rate (b) and amount of dry biomass (c) of *T. tetrathele* in different treatments. Dilute and concentrated treatments have 5 and 10 ml/ l of culture medium, respectively. Means with at least one similar letter were not statistically significant at the 5% level (p>0.05)

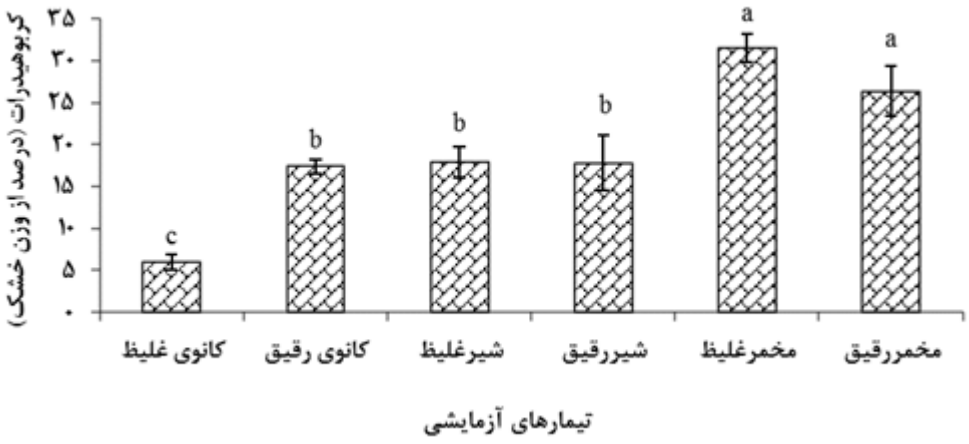


شکل ۲: میانگین زنده‌مانی سلولی پس از ۱۱ روز پرورش جلبک سبز *T. tetrathele* در تیمارهای مختلف. تیمارهای رقیق و غلیظ به‌ترتیب دارای ۵ و ۱۰ میلی‌لیتر در لیتر از محیط کشت بودند. میانگین‌های دارای حداقل یک حروف مشابه از نظر آماری در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند (p>۰/۰۵)

Figure 2: Mean of cell viability after 11 days of *T. tetrathele* cultivation in different treatments. Dilute and concentrated treatments have 5 and 10 ml/ l of culture medium, respectively. Means with at least one similar letter were not statistically significant at the 5% level (p>0.05)







شکل ۳: میانگین (± خطای استاندارد) پروتئین، چربی و کربوهیدرات جلبک سبز *T. tetrathele* پرورش‌یافته در تیمارهای مختلف. تیمارهای رقیق و غلیظ به‌ترتیب دارای ۵ و ۱۰ میلی‌لیتر در لیتر از محیط کشت بودند. میانگین‌های دارای حداقل یک حروف مشابه از نظر آماری در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند (p>۰/۰۵)

Figure 3: Mean (± SE) of protein, fat and carbohydrate of green algae *T. tetrathele* grown in different treatments. Dilute and concentrated treatments have 5 and 10 ml/ l of culture medium, respectively. Means with at least one similar letter were not statistically significant at the 5% level (p>0.05)

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از دو نوع پساب لبنیات و مخمر با تولید مناسبی از جلبک تتراسلمیس همراه بود. بیشترین میزان تراکم سلول‌های جلبکی و زی‌توده خشک طی دوره یازده روزه کشت جلبک در پساب کانوی رقیق به‌دست آمد، اما بیشترین میزان رشد ویژه مربوط به تیمار مخمر رقیق بود. Mercado-Blanco و همکاران (۲۰۰۴) درمطالعات خود بیان کردند که پساب غنی از نیتروژن و فسفر به همراه CO_2 و انرژی خورشیدی فراهم‌کننده شرایط مناسب برای کشت ریزجلبک‌ها هستند که سرانجام منتهی به تولید زی‌توده مفید جلبکی و کاهش نیتروژن و فسفر خروجی پساب می‌شود. Almomani و **Örmeci** (۲۰۱۶) عنوان داشتند که افزایش وزن خشک و کاهش سرعت رشد در طول پیشرفت هر آزمایش می‌تواند به دلایل مختلفی از جمله نفوذ نور به محیط کشت، چگالی یا محدودیت کربن غیرآلی و تراکم جلبکی نسبت داده شود. با افزایش مواد مغذی رشد بیشتر ریزجلبک‌ها مورد انتظار است و این امر چگونگی اثر گذاری غلظت محیط کشت بر میزان رشد ویژه و وزن خشک را توجیه می‌کند. در مطالعه Daneshvar و همکاران (۲۰۱۹) به بررسی دو دوره پرورش میگزوتروف و یک دوره پرورش هتروتروف گونه *Scenedesmus quadricauda* آب شیرین و گونه *Tetraselmi suecica* آب شور در پساب فراورده‌های لبنی پرداختند. نتایج آنها نشان داد که پس از دوره اول در کشت میگزوتروف (۱۲ روز) وزن خشک *S. quadricauda*، ۰/۴۳گرم در لیتر و در گونه *T. suecica* ۰/۵۸ گرم در لیتر و پس از دوره دوم (۲۴ روز) وزن خشک به‌ترتیب به ۰/۳۶ و ۰/۶۵گرم در لیتر رسید.

در مطالعه حاضر، از نظر زنده‌مانی تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد. شاید علت بهبود زنده‌مانی سلول‌های جلبکی این باشد که پساب‌ها اثر سوء و سمی بر سلول‌های جلبکی نداشته‌اند. همچنین جلبک *Tetraselmis* گونه‌ای است که از توانایی سازگاری و زنده‌مانی در شرایط سخت و پیچیده برخوردار است.

نتایج آنالیز ترکیبات بیوشیمیایی نیز در این مطالعه نشان داد که بیشترین میزان پروتئین و چربی (به‌ترتیب ۴۴/۶ و ۹/۷ درصد) در تیمار شیر غلیظ و بیشترین میزان کربوهیدرات (۳۱/۵ درصد) در تیمار مخمر غلیظ به‌دست آمد. با توجه به این‌که ترکیب بیوشیمیایی بسیاری از جلبک‌ها می‌تواند متاثر از عوامل غیر زنده باشد، لذا در این

تحقیق با توجه به ثابت بودن همه شرایط به‌جز محیط کشت این گونه می‌توان استنباط نمود که تفاوت اصلی بین تیمارهای آزمایشی به طور اصلی به ترکیبات محیط کشت به‌ویژه عناصر غذایی رشد مرتبط باشند. برای مثال، Liu و همکاران (۲۰۰۸) بیان کردند که کمیت و کیفیت چربی‌های سلولی تحت شرایط مختلف رشد مانند دما، شدت نور، مواد مغذی، تراکم نیتروژن، فسفر و آهن تغییر می‌کند. Fabregas و همکاران (۱۹۹۸) عنوان کردند که ترکیبات بیوشیمیایی جلبک‌ها از جمله چربی‌ها به‌وسیله مواد مغذی در دسترس، تاثیر می‌پذیرند. همچنین Shifrin و Chisholm (۱۹۸۱) نشان دادند که در برخی گونه‌های جلبکی تجمع چربی‌ها تحت شرایط کمبود نیتروژن افزایش می‌یابند. هنگامی‌که کشت در فاز رشد ثابت قرار می‌گیرد، ترکیب تقریبی ریزجلبک‌ها به طور قابل‌توجهی تغییر می‌کند. برای نمونه، اگر مقدار نیترات و کربوهیدرات کم باشد، باعث می‌شود که پروتئین بیشتری مصرف شود (Harrison and Stein, 1990). در مطالعه Chokshi و همکاران (۲۰۱۶) ریزجلبک *Acutodesmus dimorphus* در پساب خالص صنایع لبنی بدون هیچ‌گونه رقیق‌سازی مورد بررسی قرار گرفت. وزن زی‌توده خشک در روزهای ۴ و ۸ پرورش به‌ترتیب به ۸۴۰ و ۷۹۰ میلی‌گرم در لیتر رسید که این میزان ۶-۵ برابر بیشتر از زمانی بود که این ریزجلبک در محیط کشت تجاری BG-11 پرورش داده شد. همچنین درشت مغذی‌هایی چون چربی و کربوهیدرات زی‌توده‌ی حاصل از کشت این ریزجلبک در پساب لبنی به‌ترتیب شامل ۲۵ درصد و ۳۰ درصد بود که تفاوت معنی‌داری باگروه کنترل نداشت، اما با توجه به این‌که تولید زی‌توده بسیار بیشتر از گروه کنترل بود، پیشنهاد شد که چربی و کربوهیدرات زی‌توده‌ی حاصله در پساب لبنی می‌توانند به عنوان منبع بیودیزل و بیواتانول، مورد استفاده قرار گیرند. در مطالعه Ji و همکاران (۲۰۱۵) نیز مشخص شد که استفاده از پساب مواد غذایی به منظور کشت ریزجلبک *Scenedesmus obliquus* می‌تواند در افزایش رشد، تولید چربی و حذف مواد آلی از پساب موثر واقع گردد به‌طوری‌که وقتی *S. obliquus* تحت شرایط میگزوتروف (وجود کربن آلی وکربن معدنی به صورت توأم) با نسبت‌های مختلف (۲-۰/۵ درصد) از پساب شهری با پساب مواد غذایی ترکیب شده و از گاز CO_2 به میزان ۱۴-۱۰ درصد در این کشت استفاده شود، می‌تواند بیشترین رشد (۰/۴۴ -۰/۴۲ گرم در لیتر)، حذف مواد مغذی (۲۱-۲۲ میلی‌گرم نیترون کل در لیتر) و تولید چربی (۱۰-۱۱ میلی‌گرم در لیتر در روز) را پس از ۶ روز از پرورش به ارمغان آورد. بنابراین، در این بررسی محققان بیان کردند که کشت ریزجلبک‌ها در پساب مواد غذایی تحت شرایط میگزوتروف می‌تواند به عنوان روشی مناسب و مقرون به‌صرفه جهت تولید زی‌توده‌ای با تراکم زیاد از ریزجلبک‌ها به‌کار گرفته شود.

به طور کلی، براساس میزان رشد ویژه، زنده‌مانی و ترکیبات بیوشیمیایی مشاهده شده در این آزمایش می‌توان نتیجه‌گیری کرد که پساب شیر با غلظت ۱۰ میلی‌لیتر در لیتر (شیر غلیظ) و مخمر با غلظت ۵ میلی‌لیتر در لیتر (مخمر رقیق) می‌تواند به عنوان مناسب‌ترین محیط کشت مناسب نیمه‌صنعتی در پرورش انبوه جلبک *T. tetrathele* به‌کار رود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشگاه صنعتی اصفهان برای فراهم نمودن شرایط و امکانات لازم برای انجام این تحقیق و آقایان دکتر سعید اسدالهی و دکتر ابراهیم متقی تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

حیدری، ص.، فرهادیان، ا. و صوفیانی، ن.، ۱۳۹۰. تولید زیست توده و حذف آمونیاک و نیتریت از پساب کارگاه پرورش ماهی به‌وسیلهٔ کشت جلبک سبز سندسموس کوادریکوادا. مجله محیط شناسی، ۵۹: ۲۸-۱۵.

صفری، ر.، میربخش، م.، غفاری، ه.، ، ریحانی پول، س. و رحمتی ، ر.، ابراهیم زاده، مجید. ۱۴۰۱. اثر فاکتورهای دما ،pH و زمان بر پایداری و فعالیت آنتی اکسیدانی آستاگزانتین استخراج شده ازمیکروجلبک هماتوکوکوس *Haematococcus pluvialis* . مجله علمی شیلات ایران،۱۲۰-۱۰۹ (۱)۳۱.

فرهادیان، ا. و جعفری، ا.، ۱۳۹۴. تاثیر سختی محیط کشت بر خالص سازی و تشکیل کلونی در جلبک سبز

Scenedesmus quadricauda. مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست شناسی ایران)، ۲۸(۵): ۱۰۷۶-۱۰۶۶.

Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A. and Ibraheem, I., 2012. Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19(3): 257-75. Doi: 10.1016/j.sjbs.2012.04.005

Almomani, F.A. and Örmeci, B., 2016. Performance of *Chlorella Vulgaris*, *Neochloris oleoabundans*, and mixed indigenous microalgae for treatment of primary effluent, secondary effluent and centrate. *Ecology Engineering*, 95: 280-289. Doi: 10.1016/j.ecoleng.2016.06.038

Amini Khoeyi, Z., Seyfabadi, J. and Ramezanpour, Z., 2012. Effect of light intensity and photoperiod on biomass and fatty acid composition of the microalgae, *Chlorella vulgaris*. *Aquaculture International*, 20: 41-49. Doi: 10.1007/s10499-011-9440-1

Blonskaja, V. and Zub, S., 2009. Possible ways for post treatment of biologically treated wastewater from yeast factory. *Journal of Environmental Engineering and Landscape Management*, 17: 189-197. Doi: 10.3846/1648-6897.2009.17.189-197

Brown, M.R., Jeffrey, S.W., Volkman, J.K. and Dunstan, G.A., 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151: 315-331. DOI: 10.1016/S0044-8486(96)01501-3

Campbell, W.H., 1999. Nitrate reductase structure, function and regulation: bridging the gap between biochemistry and physiology. *Annual Review of Plant Biology*, 50(1):277-303. Doi: 10.1146/annurev.arplant.50.1.277

Carvalho, A.P., Silva, S.O., Baptista, J.M. and Malcata, F.X., 2011. Light requirements in microalgal photobioreactors: an overview of biophotonic aspects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89: 1275-1288. Doi: 10.1007/s00253-010-3047-8

Chokshi, K., Pancha, I., Ghosh, A. and Mishra, S., 2016. Microalgal biomass generation by phycoremediation of dairy industry wastewater: An integrated approach towards sustainable biofuel production. *Bioresource Technology*, 221: 455–460. Doi: 10.1016/j.biortech.2016.09.070

Daneshvar, E., Zarrinmehr, M. J., Koutra, E., Kornaros, M., Farhadian, O. and Bhatnagar, A., 2019. Sequential cultivation of microalgae in raw and recycled dairy wastewater: Microalgal growth, wastewater treatment and biochemical composition. *Bioresource Technology*, 273: 556-564. Doi: 10.1016/j.biortech.2018.11.059

Fábregas, J., Otero, A., Morales, E.D., Arredondo-Vega, B.O. and Patiño, M., 1998. Modification of the nutritive value of *Phaeodactylum tricornutum* for *Artemia* sp. in semicontinuous cultures. *Aquaculture*, 169:167–176. Doi: 10.1016/s0044-8486(98)00376-7

Harrison, R.K. and Stein, R.L., 1990. Substrate specificities of the peptidyl prolyl

Hazardous Materials, 154:1133-1140. Doi: 10.1016/j.jhazmat.2007.11.019.

Liu, Z.Y., Wang, G.C. and Zhou, B.C., 2008. Effect of iron on growth & lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 99: 4717- 4722. Doi: 10.1016/j.biortech.2007.09.073

Martinez, M.E., Sanches, S., Jimenes, J.M., Yousfi, F.E. and Munoz, L., 2000. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalgae *Scenedesmus obliqus*. *Bioresource Technology*, 73: 263-272. Doi: 10.1016/S0960-8524(99)00121-2

Mercado-Blanco, J., Rodrıguez-Jurado, D., Hervás, A. and Jiménez-Dıaz, R.M., 2004. Suppression of *Verticillium* wilt in olive planting stocks by root-associated fluorescent *Pseudomonas* spp. *Biological Control*, 30: 474-486. Doi: 10.1016/j.biocontrol.2004.02.002

Meyer, E. and Walther, A., 1988. Methods for the estimation of protein, lipid, carbohydrates and chitin levels in freshwater invertebrates. *Arch Hydrobiol*, 113: 161-177.

Omori, M. and Ikeda, T., 1984. Methods in Marine Zooplankton Ecology. John Wiley, New York. 332 P.

Rice, E.W., Bird. R.B. and Eaton, A.D., 2017. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 23rd Edition. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, 724 P.

cis-trans isomerase activities of cyclophilin and FK-506 binding protein: evidence for the existence of a family of distinct enzymes. *Biochemistry*, 29: 3813-3816. Doi: 10.1021/bi00468a001

Helena, K., Haris, H., Abdu, R.N. and Mimi, Z., 2018. Growth, Proximate Composition and Pigment Production of *Tetraselmis chuii* Cultured with Aquaculture Wastewater. *Journal of Ocean University of China*. 17: 641–646. Doi: 10.1007/s11802-018-3428-7

Ji, M.K., Yun, H.S., Park, Y.T., Kabra, A.N., Oh, I.H. and Choi, J., 2015. Mixotrophic cultivation of a microalga *Scenedesmus obliquus* in municipal wastewater supplemented with food wastewater and flue gas CO2 for biomass production. *Journal of Environmental Management*. 159: 115–120. Doi: 10.1016/j.jenvman.2015.05.037

Kalyuzhnyi, G. and Murray, R.W., 2005. Ligand effects on optical properties of CdSe nanocrystals. *The Journal of Physical Chemistry* B, 109: 7012-7021. Doi: 10.1021/jp045352x

Knuckey, R.M., Brown, M.R., Barrett, S.M. and Hallegraeff, G.M., 2002. Isolation of new nanoplanktonic diatom strains and their evaluation as diets for juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*, 211: 253-274. Doi: 10.1016/S0044-8486(02)00010-8

Kobya, M. and Delipinar, S., 2008. Treatment of the baker's yeast wastewater by electrocoagulation. *Journal of*

Schüler, L.M., Santos, T., Pereira, H., Duarte, P. and Gangadhar, K.N., 2020. Improved production of lutein and β - carotene by thermal and light intensity upshifts in the marine microalga *Tetraselmis* sp. CTP4 45.*Algal Research*, 45: 101732. Doi: 10.1016/j.algal.2019.101732

Shifrin, N.S. and Chisholm, S.W., 1981. Phytoplankton lipids: interspecific differences andeffects of nitrate, silicate and light dark cycles. *Phycology*, 17: 372-384. Doi: 10.1111/j.1529-8817.1981.tb00865.x

Velichkova, K., Sirakov, I. and Stoyanova, S., 2014. Biomass production and wastewater treatment from aquaculture with *Chlorella vulgaris* under different carbon sources. *Scientific Bulletin: Series F, Biotechnologies*, 18: 83-88.

Wang, L.K., Hung, Y-T., Lo, H.H. and Yapijakis, C., 2006. Waste Treatment in the Food Processing Industry. Boca Raton: CRC Press, Florida, USA, 344 P.

Wang, Z., Zhao, Y., Ge, Z., Zhang, H. and Sun, S., 2016. Selection of microalgae for simultaneous biogas upgrading and biogas slurry nutrient reduction under various photoperiods. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 91(7):1982-89. Doi: 10.1002/jctb.4788

Evaluation of biomass, growth, viability, and biochemical composition of *Tetraselmis tetrathele* using dairy and yeast wastewaters

Farhadian O.[1*]; Soltani Samani Sh.[1]; Rostami F.[1]; Beyraghdar Kashkooli O.[1]

*omfarhad@iut.ac.ir

1- Department of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

Abstract

Tetraselmis tetrathele is a species of saltwater that is widely used in industry and aquaculture due to its high nutritional value, bioactive compounds, and ease of cultivation. In this study, mass cultivation of this species was evaluated using effluent from dairy and yeast factories to evaluate growth, viability, and biochemical compounds (protein, fat, carbohydrate). The experiment was performed in a completely randomized design with six treatments; Conway, raw milk and yeast effluents as culture media, each in two modes, diluted (5 ml per liter of culture medium) and concentrated (10 ml per liter of culture medium) for 11 days. The results showed that this species was able to grow on dairy and yeast wastewaters, but the highest cell density in diluted Conway (9.12×10^6 cells per ml and 0.87 per day) and the highest specific growth rate in diluted yeast (6.68×10^6 cells per ml and 2.84 per day) were measured. However, the diluted raw dairy treatment had more survival than other treatments. The highest amount of protein and fat was obtained in the concentrated dairy treatment (44.6% and 9.71% of dry weight, respectively) and the highest amount of carbohydrates was obtained in the concentrated yeast treatment (31.49% of dry weight). Based on the specific growth rate, viability, and biochemical compositions it can be concluded that dairy and yeast wastewaters can be used as a suitable semi-industrial culture medium for mass cultivation of this species and it is recommended for the production of bioactive compounds and biofuels from the obtained biomass.

Keywords: Wastewater, Biochemical composition, Dairy and yeast, Growth, *Tetraselmis tetrathele*

[*]Corresponding author