



تأثیر آلودگی فاضلاب شهری بندرعباس ورودی به خور گورسوزان بر رشد و ترکیبات

شیمیایی ریز جلبک *Tetraselmis chuii*مرتضی قلندری هرمزی^۱، جواد قاسم زاده^{۱*}، فاطمه لواجو بلگوری^۲^۱ دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، دانشکده علوم دریایی، گروه شیلات^۲ دانشگاه هرمزگان، دانشکده علوم و فنون دریایی، گروه زیست شناسی دریا

نوع مقاله:

چکیده

پژوهشی

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۹۸/۱۲/۰۵

اصلاح: ۹۹/۰۷/۰۷

پذیرش: ۹۹/۰۹/۰۲

کلمات کلیدی:

آلودگی

تصفیه فاضلاب

فسفات

نیترات

Tetraselmis chuii

فاضلاب شهری دارای مقادیر متناهی مواد مغذی نظیر ترکیبات نیتروژن و فسفر است. ریزجلبکها می توانند در فرآیند تصفیه و حذف مواد مغذی از فاضلاب به کار گرفته شوند. مطالعه حاضر، تأثیر غلظت های مختلف فاضلاب شهری خورگورسوزان بندرعباس را بر میزان رشد و ترکیبات شیمیایی ریزجلبک *Tetraselmis chuii* در شرایط آزمایشگاهی طی یک دوره ۱۴ روزه بررسی نمود. رشد ریزجلبک *T. chuii* در ۶ تیمار (با ۳ تکرار) با ترکیب غلظت های مختلف فاضلاب شهری و محیط کشت F2 روندی افزایشی داشت، و بیشینه میزان جذب نوری آن (تراکم سلولی Optical density=1/4)، در تیمار ۵ (حاوی ۶۰٪ محیط کشت F2 + ۴۰٪ فاضلاب شهری) در روز چهاردهم مشاهده شد. به علاوه حداکثر میزان نیترات و فسفات (۰/۰۰۳±۰/۰۰۰۶ و ۰/۰۰۲±۰/۰۰۰۲ میکروگرم/لیتر)، کلروفیل a و b (۰/۱۹±۰/۰۰۲ و ۰/۰۰۳±۰/۰۰۰۳ میلی گرم/گرم)، پروتئین (۰/۰۴±۰/۰۰۱۳ میلی گرم/گرم) و اسیدهای چرب EPA و DHA (۰/۰۹±۰/۰۳۳۶٪ و ۰/۱۲±۰/۳۱۷۶٪ میلی گرم/گرم) نیز در این تیمار اندازه گیری گردید. نتایج دلالت بر این دارد که، ریزجلبک *T. chuii* قادر به حذف ترکیبات آلی (نیترات و فسفات) از فاضلاب شهری است و استفاده از محیط کشت تیمار ۵ (شامل ۶۰٪ محیط کشت F2 + ۴۰٪ فاضلاب شهری)، به دلیل تأثیر بیشتر در تکثیر ریزجلبکها و تولید ذی توده غنی از اسیدهای چرب غیراشباع، می تواند برای تصفیه ثانوی و احیای فاضلاب شهری توصیه شود.

مقدمه

فاضلاب شهری نمونه بارزی از آلاینده های محیطی حاصل از فعالیت های انسانی است که حاوی مقادیر بسیار بالایی از مواد مغذی، از جمله ترکیبات نیتروژن و فسفر می باشد. در شرایط طبیعی، ورود مقادیر کم از این مواد مغذی در اکوسیستم های آبی، طی فرآیند شناخته شده ای به نام اوتروفیکاسیون (Eutrofication) باعث افزایش تراکم و ذی توده تولیدکنندگان اولیه همانند جلبکها و سیانوباکتری ها می شوند و در نتیجه افزایش جمعیت مصرف کنندگان اولیه، از قبیل زئوپلانکتون ها و سپس ماهی های گیاه خوار را به دنبال خواهند داشت (Dalrymple et al., 2013). ریزجلبکها موجوداتی اتوتروف هستند که با انجام فتوسنتز و استفاده از انرژی نور خورشید و مواد مغذی موجود در آب قادر خواهند بود ترکیبات با ارزشی از جمله لیپیدها، پروتئین ها، کربوهیدرات ها و رنگدانه ها را تولید کنند (Markou and Nerantzis, 2013). بسیاری از گونه های جلبکی، نسبت به

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: jghasemz@gmail.com

آلودگی‌های موجود در فاضلاب‌ها مقاومند و نه تنها سریعاً در محیط غنی از ترکیبات نیتروژن و فسفر مستقر و سازگار می‌شوند بلکه با استفاده از این مواد جهت رشد و تکثیر، موجب کاهش و حذف ترکیبات آلی نیتروژن و فسفر موجود در فاضلاب می‌شوند. از طرف دیگر، ذی‌توده جلبکی نیز به عنوان تولیدکنندگان اولیه محیط آب، مورد استفاده مصرف‌کنندگان قرار می‌گیرد. این نشان می‌دهد که از سیستم پرورش ریزجلبک‌ها می‌توان به عنوان جایگزین فرایند تصفیه ثانویه فاضلاب به منظور حذف مواد مغذی از آن‌ها استفاده نمود (Sayadi *et al.*, 2011). آلودگی‌های ناشی از توسعه اقتصادی و گسترش صنایع، و همچنین پساب‌های غنی از مواد مغذی و کودهای شیمیایی و آلی بخش کشاورزی که وارد چرخه حیاتی اکوسیستم‌های آبی می‌شوند در بیشتر مواقع سبب بروز شکوفایی یا بلوم پلانکتونی می‌شوند. شکوفایی حاصله موجب اختلال در توازن زی‌توده پلانکتون‌های گیاهی و جانوری و مصرف‌کنندگان سطوح بالاتر زنجیره غذایی گردیده و متعاقب آن عدم توازن بین اکسیژن و گاز کربنیک محلول در آب به خصوص در روزهای ابری و ساعات پایانی شب که در اثر عدم انجام فرایند فتوسنتز میزان اکسیژن محلول در آب به حداقل می‌رسد به وجود خواهد آمد. در این حالت اکسیژن محلول در آب پاسخگوی نیاز اکسیژنی ذیتوده گیاهی و جانوری نبوده و سبب خفگی و بروز تلفات ماهی و سایر آبزیان می‌شود که علاوه بر اتلاف پروتئین تولیدی ماهی و سایر آبزیان اثرات مخرب زیست‌محیطی، نیز در پی خواهد داشت (Lavajoo *et al.*, 2015). فاضلاب‌های شهری حاوی مواد مغذی (به خصوص ازت و فسفر) به عنوان عامل اصلی افزایش بیش از حد این عناصر و تخریب طبیعی آب‌ها در طبیعت شناخته شده‌اند که باید قبل از تخلیه و ورود به منابع آبی طبیعی تصفیه شوند. اثرات مخرب فاضلاب‌های صنعتی، شهری و کشاورزی را می‌توان در فرایند رشد و تقسیم سلولی، تکثیر مهار نشده اولیه و سرعت رشد زیاد جلبک‌ها و ازدیاد متعاقب پلانکتون‌های جانوری دانست. این مسئله سبب بالا بردن نیاز اکسیژن تنفسی ذیتوده جانوری و گیاهی به خصوص در شب و مقارن با اوج شکوفایی جلبکی که گاهی توأم با ترشح سموم توسط برخی جلبک‌ها می‌باشد گردیده و تلفات و مرگ دسته جمعی ماهیان و سایر آبزیان را به دنبال خواهد داشت. شکوفایی پلانکتونی و افزایش تراکم آن‌ها باعث جلوگیری از نفوذ نور خورشید به لایه‌های پایین‌تر آب شده و کاهش فتوسنتز و مرگ تدریجی جلبک‌ها و ته‌نشین شدن آن‌ها و کاهش کدورت آب را به دنبال خواهد داشت. تثبیت نیتروژن، فسفر و کربن از مهم‌ترین نقش‌های طبیعی و ذاتی ریزجلبک‌ها است (Moreno-Garrido, 2008). رشد و ارزش غذایی ریزجلبک‌ها تحت تأثیر عوامل مختلفی همانند غلظت مواد مغذی و شرایط فیزیکیوشیمیایی آب قرار دارد (Seyfabadi *et al.*, 2011). نیتروژن از مهم‌ترین مواد مغذی مورد نیاز است که نقش مهمی را در ساختار و تولید ترکیباتی همانند اسیدهای آمینه، اسید نوکلئیک و کلروفیل ایفا می‌کند. بنابراین نوسانات غلظت نیتروژن تغییراتی را در میزان رشد و وضعیت بیوشیمیایی ریزجلبک‌ها به همراه دارد. ریزجلبک‌ها پاسخ‌های فیزیولوژیکی متفاوتی را به غلظت‌های مختلف نیتروژن نشان می‌دهند. به طور مثال در شرایط کمبود نیتروژن ترکیبات غنی از کربن همانند چربی‌ها و پلی‌ساکاریدها افزایش یافته و میزان پروتئین‌ها کاهش می‌یابد (Griffiths *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2008). سیستم‌های تصفیه جلبکی می‌توانند برای تصفیه فاضلاب انسانی و پساب‌های کشاورزی و صنعتی مورد استفاده قرار گیرند. امروزه از فیتوپلانکتون‌ها برای تصفیه فاضلاب کارخانه‌های فرآوری مواد غذایی به عنوان یک سیستم تصفیه‌کننده ثانویه بهره می‌برند (Abdel-Raouf *et al.*, 2012). ریزجلبک‌ها علاوه بر توانایی جذب مواد مغذی مانند نیتروژن، فسفر و کربن، قادر به جذب و حذف فلزات سنگین موجود در فاضلاب نیز می‌باشند و غالباً به عنوان شاخص زیستی برای ارزیابی آلودگی آب‌های دریایی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرند (Munoz and Guieysse, 2006; Olaizola and Huntley, 2003). ریزجلبک *Tetraselmis chuii* یک فیتوپلانکتون تاژکدار دریایی است که حرکت کند آن توسط ۴ تاژک منشعب از بخش قدامی آن صورت می‌گیرد (Brown, 1991). از مطالعات انجام شده بر روی قابلیت حذف نیترات و فسفات فاضلاب توسط ریزجلبک‌ها می‌توان به مطالعه نقش ریزجلبک *Spirollina platensis* در تصفیه فاضلاب و افزایش محتوای اسیدهای چرب موجود در آن اشاره کرد (Li *et al.*, 2011a). اسیدهای چرب از اجزای تشکیل‌دهنده اصلی چربی‌ها هستند که بدن انسان قادر به تولید برخی از انواع ضروری آن نظیر امگا ۳ و امگا ۶ نیست، لذا باید از طریق ماده غذایی تأمین گردند. دو نوع اسید چرب امگا ۳ یا ۳- Ω وجود دارد: دوکوزاهگزنوئیک اسید (DHA) و ایکوزاپنتانوئیک اسید (EPA) که هر دوی آن‌ها بیشتر در غذاهای دریایی یافت می‌شوند (Li *et al.*, 2011b). چربی‌های طبیعی، مثل تری گلیسریدها، به عنوان منبع ذخیره‌کننده انرژی در سلول‌ها هستند،

و چربی‌هایی مثل فسفولیپیدها، گلیکولیپیدها و لیپیدهای قطبی علاوه بر نقش ساختاری در غشای سلولی، به عنوان میانجی انتقال انرژی در سلول نیز عمل می‌کنند (Thompson, 1996). ریزجلبک تتراسلمیس منبع مطلوبی از اسیدهای چرب چند اشباعی (PUFAs) به‌ویژه ایکوزا پنتانوئیک اسید به شمار می‌رود و توانایی آن در سنتز و تجمع مقادیر زیادی از اسیدهای چرب چنداشباعی یا امگا ۳ بالاست و به همین دلیل به عنوان منبع غذایی ارزشمندی در صنعت آبزی‌پروری بسیار مورد استفاده قرار می‌گیرد (Meseck *et al.*, 2005; Zaki and Saad, 2010). Changani و همکاران در سال ۲۰۱۵ در تحقیقی نشان دادند که این ریزجلبک در فاضلاب‌های غنی از مواد غذایی رشد می‌کند و به عنوان جایگزینی برای تصفیه ثانویه مناسب می‌باشد. مطالعه حاضر، نقش ریزجلبک تتراسلمیس در حذف آلاینده‌های نیترات و فسفات ناشی از فاضلاب ورودی به خور گورسوزان و تأثیر این عناصر در مقادیر ترکیبات اسیدهای چرب این ریزجلبک را مورد بررسی قرار داده است.

مواد و روش‌ها

استوک ریزجلبک *Tetraselmis chuii* از آزمایشگاه کشت جلبک پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان در بندرعباس تهیه و به آزمایشگاه دانشگاه هرمزگان منتقل شد. نمونه فاضلاب هم از فاضلاب شهری ورودی به خور گورسوزان واقع در بندرعباس تهیه گردید و مقداری از آن سریعاً برای سنجش میزان اولیه فسفات و نیترات به آزمایشگاه محیط زیست بندرعباس منتقل شد. فاضلاب شهری قبل از استفاده به عنوان محیط کشت توسط کاغذ واتمن و فیلتر صافی تصفیه و سپس به منظور رفع آلودگی احتمالی اتوکلاو شد. لوازم و ظروف مورد نیاز برای کشت میکروجلبک نیز ابتدا اتوکلاو شده و سپس جهت ضدعفونی کامل به همراه لوازم کشت در معرض اشعه ماوراءبنفش نیز قرار داده شدند. برای کشت ریزجلبک *T. Chuii*، از محیط کشت F2 (Guillard, 1975) و فاضلاب شهری استفاده شد. شرایط آزمایشگاهی فایکولب در طول دوره کشت میکروجلبک *Tetraselmis chuii* مطابق با: نور با شدت (۳۵۰۰ لوکس) و طول دوره تاریکی به روشنایی (۱۲:۱۲ ساعت) و دما (۲۵-۲۸°C) و pH (۷/۵) تنظیم و نگهداری شد (Khatoon *et al.*, 2014; Janarthanam *et al.*, 2012). تراکم سلولی (Optical density) میکروجلبک بعد از اضافه کردن استوک به سوسپانسیون ابتدا با لام نئوبار و سپس با دستگاه اسپکتروفتومتر UV/ Vis مدل Alpha-1506 در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری و ثبت گردید. از ابتدای کشت جلبک به منظور جلوگیری از آلودگی و حصول تراکم سلولی مطلوب، در پایان هر هفته از فرآیند نمونه‌گیری مجدد (زیر نمونه‌گیری Sub-sampling) و تجدید کشت ریزجلبک استفاده شد و این روند طی یک ماه جهت حصول محلول با حجم ۳ لیتر و تراکم سلولی (Optical Density=۱) از ریزجلبک ادامه یافت. سپس تیماربندی این تحقیق متشکل از شش تیمار به شرح زیر انجام شد:

تیمار ۱: ۱۰۰ درصد محیط کشت F/2

تیمار ۲: ۱۰۰ درصد محیط کشت فاضلاب شهری.

تیمار ۳: ۲۰ درصد محیط کشت F/2 و ۸۰ درصد محیط کشت فاضلاب شهری.

تیمار ۴: ۴۰ درصد محیط کشت F/2 و ۶۰ درصد محیط کشت فاضلاب شهری.

تیمار ۵: ۶۰ درصد محیط کشت F/2 و ۴۰ درصد محیط کشت فاضلاب شهری.

تیمار ۶: ۸۰ درصد محیط کشت F/2 و ۲۰ درصد محیط کشت فاضلاب شهری.

پس از تیماربندی و شروع آزمایش نیز شمارش و تراکم سلولی ریزجلبک *T. chuii* با فواصل سه روزه با نمونه‌برداری از تمام تیمارها با ۳ تکرار و با استفاده از لام نئوبار انجام و تراکم سلولی با استفاده از فرمول زیر محاسبه و ثبت شد (Banerjee *et al.*, 2002). برای افزایش دقت کار، میزان جذب نوری با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۵۴۰ نانومتر هم اندازه‌گیری شد. جذب نوری اولیه در روز اول برای تمامی تیمارها (OD540nm) ۰/۴ در نظر گرفته شد.

(تعداد بلوک‌ها) / (تعداد کل سلول‌های شمارش شده) = (میلی لیتر) / سلول $\times 10^4$

اندازه‌گیری محتوای کلروفیل a, b و کاروتنوئید

در این مرحله ۱۴ میلی‌لیتر از هر نمونه ریزجلبک *T. chuii* در یک لوله آزمایش با دور ۳۰۰۰ در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد؛ سپس بخش بالایی آن حذف و لوله‌های آزمایش حاوی ریزجلبک به منظور حفظ کلروفیل و ایجاد شرایط تاریکی مطلق با فویل آلومینیم پوشانده شد. مقدار ۲ میلی‌لیتر استون ۹۵ درصد به داخل هر لوله آزمایش ریخته و به مدت ۱ دقیقه تکان داده شد. بعد از استخراج کلروفیل، لوله‌های آزمایش دوباره با دور ۴۰۰۰ در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. میزان کلروفیل a و b و کاروتنوئید کل به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر مدل UNICO در طول موج‌های بین ۶۶۳ و ۶۴۵ نانومتر و ۵۱۰ و ۴۸۰ نانومتر اندازه‌گیری و با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه شدند (Jeffrey and Humphrey, 1975):

$$\text{Chlorophyll a} = 11.47A_{664} - 0.040A_{630}$$

$$\text{Chlorophyll b} = 27.05 A_{646} - 11.21 A_{662}$$

$$\text{Total chlorophyll} = \{(20.2 A_{645}) + (8.02 A_{663}) \times 5\} / (1000 \times 0.25)$$

$$\text{Carotenoid} = \{(7.6 A_{480}) - (14.9 A_{510}) \times 5\} / (1000 \times 0.25)$$

$$A = \text{میزان جذب}$$

اندازه‌گیری میزان نیترات و فسفات

مقادیر نیترات و فسفات موجود در محیط کشت نیز با روش استاندارد اسپکتروفتومتری (طول موج ۲۲۰ نانومتر برای نیترات و ۶۹۰ نانومتر برای فسفات) در روز اول و روز چهاردهم دوره کشت، اندازه‌گیری شدند (APHA, 1915).

اندازه‌گیری پروتئین

مقدار پروتئین ریزجلبک *T. chuii* در تیمارهای مختلف نیز در روز چهاردهم دوره کشت طبق روش ماکروکجدال اندازه‌گیری شد (James, 1995).

$$\frac{\text{مقدار مصرف اسید سولفوریک } 0.1 \text{ نرمال} \times \text{میلی‌اکی والان ازت که برابر با } 0.14 \times \text{نرمالیتت اسید سولفوریک} \times 6/25 \times 100}{\text{وزن نمونه}} = \text{پروتئین}$$

در روز چهاردهم دوره کشت، به منظور تهیه نمونه جلبکی لازم جهت اندازه‌گیری پروتئین و آنالیز اسیدهای چرب، جمع‌آوری و تهیه ریزجلبک خالص از تیمارهای مختلف به‌طور جداگانه و با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ با دور ۶۵۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. این فرآیند زمانی متوقف شد که از هر تیمار حدود ۵ گرم وزن تر جلبک به دست آمد.

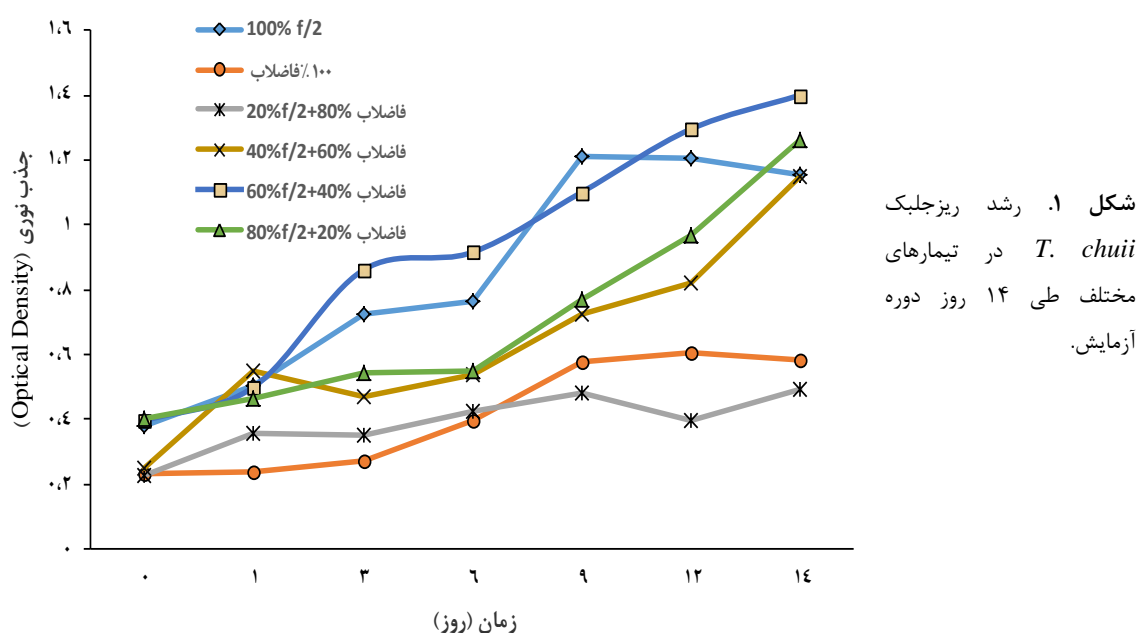
آنالیز اسید چرب: در این مرحله برای سنجش پروفیل اسیدهای چرب، به ازای هر یک گرم وزن تر ریزجلبک خالص، ۱۰ میلی‌لیتر پترولیوم اتر، به نمونه اضافه گردید (Dieffnbacher and Pocklington, 1992). در گام بعدی جهت آنالیز اسید چرب، از عصاره به دست آمده مقدار ۰/۲ میکرولیتر به دستگاه کروماتوگرافی گازی Phillips GC-PU4400 با مشخصات ستون (BPX70, 60m×0.32mmID, 0.25µm film thickness, SGM, Victoria) تزریق شد. دمای انژکتور و FID به ترتیب ۲۴۰ و ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد بود (Eggers and Schwudke, 2016).

تجزیه و تحلیل آماری: نرمال بودن پراکنش تمام داده‌ها با آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شد. داده‌ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس بررسی شدند. محاسبه داده‌ها و رسم نمودارها با نرم افزار SPSS (نسخه ۲۲) و Excel (نسخه ۲۰۱۳) انجام گرفت.

نتایج

تأثیر تیمارهای مختلف بر رشد ریزجلبک *T. chuii*

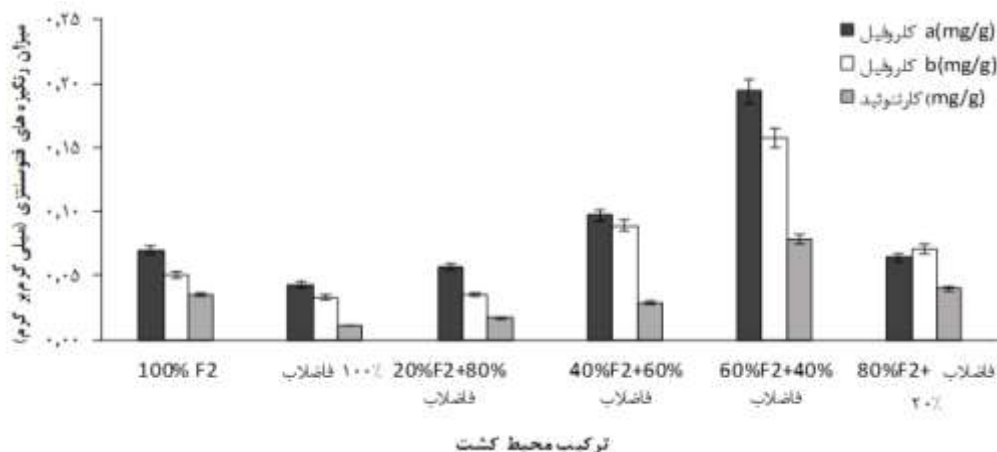
بررسی اثرات متقابل نوع محیط کشت و زمان (روزهای پرورش) بر میزان رشد ریزجلبک *T. chuii* از طریق آنالیز واریانس دو طرفه (Two way- ANOVA) نشان داد که، نوع محیط کشت و مدت زمان پرورش با اثرات متقابل خود بر میزان رشد ریزجلبک *T. chuii* اثر معنی‌داری داشته است ($p < 0/5$). نکته مهمی که در این تحقیق، در مورد محیط کشت ریزجلبک شهری) و تیمار ۶ ($F2 \ 20\% + F2 \ 80\%$ فاضلاب شهری) میزان رشد روند ثابت افزایشی را نسبت به بقیه تیمارها نشان داد و این مؤید آن است که محیط کشت ترکیبی می‌تواند در افزایش رشد و بازدهی ریزجلبک *T. chuii* محیط مناسب‌تری باشد (شکل ۱).



شکل ۱. رشد ریزجلبک *T. chuii* در تیمارهای مختلف طی ۱۴ روز دوره آزمایش.

تأثیر تیمارهای مختلف بر محتوای رنگی‌های فتوسنتزی کلروفیل ریزجلبک *T. chuii*

نتایج حاصل از تغییرات میزان کلروفیل a، b و کاروتنوئید در روز چهاردهم دوره کشت، در تیمارهای مختلف نشان داد که محدوده تغییرات غلظت کلروفیل a در محیط کشت‌های انتخابی ریزجلبک *T. chuii* برابر با $0/19-0/43$ میلی‌گرم/گرم بود درحالی‌که محدوده تغییرات کلروفیل b $0/15-0/33$ میلی‌گرم/گرم و در مورد رنگدانه کاروتنوئید، بین $0/78-0/11$ میلی‌گرم/گرم متغیر بود (شکل ۲). همچنین، بالاترین مقدار رنگدانه‌های کلروفیل a ($0/19$ میلی‌گرم/گرم) و کلروفیل b ($0/16$ میلی‌گرم/گرم) و کمترین مقدار کاروتنوئید ($0/11$ میلی‌گرم/گرم) در تیمار ۵ ($F2 \ 40\% + F2 \ 60\%$ فاضلاب شهری)، با بالاترین میزان رشد ریزجلبک، اندازه‌گیری شد. بالاترین میزان رنگدانه کاروتنوئید ($0/78$ میلی‌گرم/گرم) نیز در تیمار ۲ (100% فاضلاب شهری) مشاهده شد.



شکل ۲. مقادیر کلروفیل a, b و کاروتنوئید جلبک *T. chuii* در محیط کشت تیمارهای مختلف

مقادیر نیترات و فسفات جذب شده در ریزجلبک *T. chuii*

جدول (۱) مقادیر نیترات و فسفات جذب شده در ریزجلبک *T. chuii* در همه تیمارهای مورد مطالعه در روز چهاردهم از دوره رشد را نشان می‌دهد که حاکی از وجود تفاوت معنی‌دار در تیمارهای مختلف است ($p < 0.05$). هم‌چنین بیشترین مقدار نیترات و فسفات در تیمارهای ۵ (۶۰٪ F2 + ۴۰٪ فاضلاب شهری) و تیمار ۴ (۴۰٪ F2 + ۶۰٪ فاضلاب شهری) ثبت شد.

تأثیر تیمارهای مختلف بر محتوای پروتئین ریزجلبک *T. chuii*

نتایج مقدار پروتئین اندازه‌گیری شده در ریزجلبک *T. chuii* در تیمارهای مختلف در شکل (۳) نشان داده شده است. با آنکه بیشترین مقدار پروتئین (انحراف معیار \pm میانگین) معادل 0.04 ± 0.03 میلی‌گرم/گرم) در تیمار ۵ (۶۰٪ F2 + ۴۰٪ فاضلاب شهری) مشاهده شد، آنالیز واریانس یک‌طرفه One way-ANOVA در تأثیر تیمارهای مختلف بر میزان پروتئین ریزجلبک *T. chuii* تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ($p < 0.05$).

تأثیر تیمارهای مختلف بر محتوای اسید چرب ریزجلبک *T. chuii*

نتایج مربوط به تأثیر غلظت‌های مختلف محیط کشت F2 و فاضلاب شهری بر محتوای اسید چرب ریزجلبک *T. chuii* (جدول ۲) نشان داد که اسیدهای چرب موجود در این ریزجلبک در تیمارهای مختلف شامل C14:0 (اسید مریستیک)، C15:0 (پنتادسایکلیک اسید)، C16:0 (اسید پالمیتیک)، C18:0 (اسید استئاریک)، C16:1 (پالمیتیک اسید)، C18:1 (اولئیک اسید)، C18:2 (لینولئیک اسید)، C18:3 (لینولنیک اسید)، C20:4 (آراشیدونیک اسید)، C20:5 (EPA)، C22:6 (DHA) و C22:6 (دکوزاهگزانوئیک اسید) بوده و مقادیر این اسیدهای چرب در تیمارهای مختلف متفاوت است (جدول ۲). آنالیز واریانس یک‌طرفه (One way-ANOVA) در تأثیر تیمارهای مختلف بر میزان اسیدهای چرب ریزجلبک *T. chuii* تفاوت معنی‌داری را بین تیمارهای مختلف این مطالعه نشان داد ($p < 0.05$). در تحقیق حاضر بیشترین مقدار اسیدهای چرب اشباع شده در تمام تیمارها را اسید پالمیتیک (C16:0) و اسید استئاریک (C18:0) تشکیل می‌دهند. اولئیک اسید C18:1 (n9) و لینولئیک اسید C18:2 (n6) به ترتیب مهم‌ترین اسیدهای چرب غیراشباع تک پیوندی و چندپیوندی در این تحقیق می‌باشند. بیشترین مقدار اسیدهای چرب کل ($116/87 \pm 2/12$) میلی‌گرم/گرم در تیمار ۴ (۶۰٪ F2 + ۴۰٪ فاضلاب شهری)، مشاهده شد که حاوی مقدار (۵۳) $50/23 \pm 0/53$ میلی‌گرم/گرم اسید چرب اشباع (ΣSFA) بود. این در حالی است که بیشترین مقدار اسید چرب غیراشباع تک پیوندی ($\Sigma MUFA$) و چند پیوندی ($\Sigma PUFA$) در این تیمار به ترتیب معادل ($41/33 \pm 0/91$) و ($25/31 \pm 0/68$) میلی‌گرم/گرم اندازه‌گیری و ثبت شد (جدول ۲).

جدول ۱. میزان نیترات و فسفات جذب شده در ریزجلبک *T. chuii* در تیمارهای مختلف در روز چهاردهم از دوره کشت

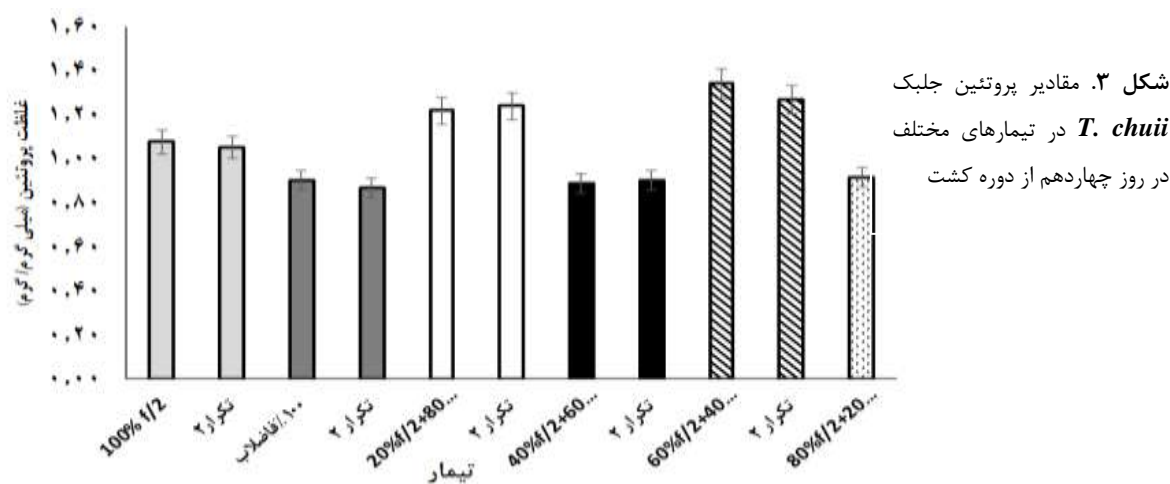
تیمار	نیترات (میکروگرم/لیتر)	فسفات (میکروگرم/لیتر)
(تیمار ۱) (۱۰۰٪ محیط کشت F2)	0.001 ± 0.0004^b	0.009 ± 0.0002^b
(تیمار ۲) (۱۰۰٪ فاضلاب شهری)	0.0007 ± 0.0002^c	0.006 ± 0.0002^c
(تیمار ۳) (۸۰٪ فاضلاب شهری + F2/۲۰)	0.003 ± 0.0001^a	0.013 ± 0.0007^a
(تیمار ۴) (۶۰٪ فاضلاب شهری + F2/۴۰)	0.001 ± 0.0005^b	0.008 ± 0.0001^b
(تیمار ۵) (۶۰٪ فاضلاب شهری + F2/۶۰)	0.003 ± 0.0006^a	0.010 ± 0.0002^a
(تیمار ۶) (۲۰٪ فاضلاب شهری + F2/۸۰)	0.001 ± 0.0004^b	0.005 ± 0.0002^c

حروف مشابه بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار است ($p < 0.05$).جدول ۲. ترکیب اسیدهای چرب ریزجلبک *T. chuii* (درصد اسید چرب برحسب وزن خشک نمونه) در تیمارهای مختلف در روز چهاردهم از

دوره کشت

اسید چرب	F2 ٪۱۰۰	٪۱۰۰ فاضلاب	٪۸۰ فاضلاب + F2/۲۰	٪۶۰ فاضلاب + F2	٪۴۰ فاضلاب + F2	٪۲۰ فاضلاب + F2/۸۰
C14:0	$3/12 \pm 0/9^c$	$2/86 \pm 0/49^d$	$3/01 \pm 0/03^c$	$3/92 \pm 2/27^d$	$2/72 \pm 0/06^d$	$8/89 \pm 0/54^d$
C15:0	$0/29 \pm 0/05^d$	$2/54 \pm 0/03^d$	$1/60 \pm 0/31^c$	-	$3/46 \pm 0/07^d$	$5/63 \pm 0/27^d$
C16:0	$27/53 \pm 0/17^b$	$25/99 \pm 0/32^b$	$25/51 \pm 3/31^a$	$28/71 \pm 0/49^a$	$25/95 \pm 0/14^b$	$24/01 \pm 0/27^b$
C18:0	$14/87 \pm 0/15^c$	$32/22 \pm 0/46^a$	$18/56 \pm 1/82^b$	$26/33 \pm 0/11^a$	$18/10 \pm 0/26^c$	$33/38 \pm 0/10^a$
Σ SFA	$45/81 \pm 1/27$	$62/61 \pm 1/3$	$48/68 \pm 5/44$	$58/96 \pm 2/87$	$50/23 \pm 0/53$	$71/91 \pm 1/18$
C16:1	$5/88 \pm 0/06^d$	$2/54 \pm 0/03^d$	$1/60 \pm 0/31^c$	-	$3/46 \pm 0/07^d$	$5/63 \pm 0/27^d$
C18:1(n9)	$39/5 \pm 0/34^a$	$15/66 \pm 0/41^c$	$29/18 \pm 4/22^a$	$21/03 \pm 0/24^{ab}$	$37/87 \pm 0/87^a$	$17/39 \pm 0/44^c$
Σ MUFA	$45/38 \pm 0/4$	$18/20 \pm 0/44$	$30/78 \pm 4/53$	$21/02 \pm 0/24$	$41/33 \pm 0/91$	$23/02 \pm 0/71$
C18:2(n6)	$6/25 \pm 0/23^d$	$10/88 \pm 0/4^c$	$18/34 \pm 1/19^b$	$17/35 \pm 0/09^b$	$15/49 \pm 0/29^c$	$8/03 \pm 0/34^d$
C18:3 ω 3	$1/68 \pm 0/04^d$	$2/83 \pm 0/01^d$	$2/87 \pm 0/24^c$	$3/55 \pm 0/03^c$	$2/70 \pm 0/18^d$	$3/00 \pm 0/12^d$
C20:4(n6) ARA	$0/41 \pm 0/01^d$	-	-	-	-	-
C20:5(n3) EPA	$0/31 \pm 0/06^d$	$0/64 \pm 0/001^d$	-	-	$3/36 \pm 0/09^d$	$0/24 \pm 0/001^d$
C22:6(n3) DHA	$1/51 \pm 0/02^d$	-	-	-	$3/76 \pm 0/12^d$	-
Σ PUFA	$10/16 \pm 0/45$	$14/35 \pm 0/43$	$21/21 \pm 1/43$	$20/9 \pm 0/12$	$25/31 \pm 0/68$	$11/27 \pm 0/46$
Σ (n-3)	$3/5 \pm 0/12$	$6/94 \pm 0/01$	$2/87 \pm 0/24$	$3/55 \pm 0/03$	$9/82 \pm 0/29$	$3/24 \pm 0/12$
Σ (n-6)	$6/78 \pm 0/02$	$10/88 \pm 0/04^c$	$18/34 \pm 1/19$	$17/35 \pm 0/09$	$15/49 \pm 0/29$	$8/03 \pm 0/34$
Total fatty acid	$100/35 \pm 2/12$	$96/16 \pm 2/17$	$100/67 \pm 11/4$	$100/89 \pm 3/23$	$116/87 \pm 2/12$	$106/2 \pm 2/12$

حروف مشابه بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار است ($p < 0.05$).



بحث

رشد چشمگیر جلبک‌ها در آب‌های غنی از مواد غذایی یک پدیده عمومی است که نقش مهمی در حذف انواع مواد معدنی و مواد حاصل از فعالیت‌های متابولیکی موجودات زنده دارد (Geetha et al., 1994). در تحقیق حاضر به نظر می‌رسد که یکی از عوامل اصلی و تأثیرگذار بر نوسانات رشد ریزجلبک *T. chuii*، تغییرات حاصله در میزان ترکیبات آلی و معدنی مورد نیاز رشد در تیمارهای مختلف بوده است. به طوری که از جدول ۱ و شکل ۱ استنباط می‌گردد بیشینه رشد ریزجلبک *T. chuii* در تیمارهای مختلف، اکثراً تا زمانی ادامه می‌یابد که مواد قابل دسترس در محیط کشت به اندازه کافی در اختیار آن باشد. در تیمارهای ۲ و ۳ (شکل ۱) مشاهده شد که با گذشت زمان به دلیل کاهش مواد غذایی لازم در محیط کشت در انتهای دوره پرورش، میزان رشد جلبک، کاهش قابل توجهی داشت. در محیط طبیعی و همچنین شرایط آزمایشگاهی، جلبک‌ها تا زمانی قادر به ازدیاد و رشد صعودی هستند که علاوه بر وجود شرایط محیطی مطلوب، مواد غذایی کافی و قابل دسترس نیز در اختیار آن‌ها قرار داشته باشد و تعادل بین نسبت برخی عناصر مثل نیتروژن و فسفر نیز برقرار باشد. فسفر نقش مؤثری در تولید و انتقال انرژی متابولیکی (ATP) در سلول‌های جلبکی ایفا نموده و بر نرخ رشد و تکثیر آن تأثیر می‌گذارد. فسفر همچنین در سنتز فسفولیپیدها مؤثر است اما هنگامی که نیتروژن در شرایط قحطی یا کمبود قرار گیرد، رشد سلول کاهش می‌یابد و نیاز و تقاضا برای فسفر به عنوان یک ماده مغذی نیز کاهش می‌یابد. در شرایط قحطی و کمبود فسفر نیز سرعت رشد و تکثیر جلبک با شدت بیشتری تحت تأثیر قرار می‌گیرد و تراکم سلولی و غلظت ذیتوده آن کاهش می‌یابد به طوری که منجر به توقف رشد جلبک و سقوط تدریجی جمعیت و تراکم آن و نهایتاً صاف و شفاف شدن محیط کشت می‌گردد (Delgadillo-Mirquez et al., 2016). بنابراین تمام شدن مواد مغذی یکی از مهم‌ترین عوامل محدود کننده رشد در کشت‌های متراکم است. ریزجلبک‌ها قادر به جذب مواد مغذی (نیتروژن و فسفر) از پساب‌ها و تبدیل آن‌ها به ذیتوده و تولید زیستی هستند، به این ترتیب این فرآیند می‌تواند سبب جذب و دفع مازاد مواد مغذی ورودی به پساب‌ها و بهبود و تصفیه آن‌ها گردد (Li et al., 2011a). در مطالعه‌ای که توسط Lavajoo و Taherizadeh در سال ۲۰۱۶ بر تأثیر فاضلاب شهری بر روی رشد دو ریزجلبک *Spiroulina plantensis* و *Chaetoceros muelleri* انجام گرفت، نتایج نشان داد که هر دو ریزجلبک توانایی ترمیم و تصفیه فاضلاب شهری را دارند اما کارایی ریزجلبک *C. muelleri* بیشتر از *S. plantensis* بود. مطالعات انجام شده توسط Tom و Wong در سال ۱۹۹۴ نیز نشان داد که جلبک‌هایی نظیر *Chlorella sp.* را می‌توان در غلظت‌های مختلف پساب جهت حذف بخشی از مواد موجود در آن پرورش داد. در تحقیق مذکور به این نتیجه رسیدند که جلبک *Chlorella sp.* می‌تواند در غلظت بالای آمونیاک به رشد خود ادامه دهد و باعث کاهش غلظت مواد ازته به خصوص آمونیاک موجود در پساب شود. Sayadi و همکاران در تحقیق خود در سال ۲۰۱۱ به این نتیجه رسیدند که افزایش رشد و تراکم میکروجلبک‌ها هم‌جهت و به موازات افزایش غلظت نیترات و فسفات در محیط کشت است، به نحوی که بیشترین نرخ رشد در غلظت ۰/۴۵ گرم در لیتر نیترات و فسفات صورت می‌گیرد؛ اما توانایی تکثیر و رشد گونه‌های مختلف جلبک در

غلظت‌های مختلف این مواد مغذی متفاوت است. نتایج مطالعات آن‌ها نشان داد که جلبک *Euglena viridis* و *Chlorella sorokiniana* قادر به رشد در پساب‌های رقیق هستند؛ در حالی که جلبک *Scenedesmus obliquus* قابلیت رشد در پساب‌های با ۸ بار رقت را نیز دارد ولی این موضوع در ریزجلبک *Spirulina platensis* مشاهده نشد. مطالعات دیگر نیز مؤید آن بود که ریزجلبک‌های *Euglena viridis* و *Chlorella sorokiniana* توانایی حذف نیتروژن و فسفر به ترتیب ۳۵٪ و ۶۵٪ را در پساب ۸ بار رقیق شده نیز دارند (De-Godos *et al.*, 2010; Sriram and Seenivasn, 2012). بالا رفتن غلظت نیتروژن منجر به افزایش میزان کلروفیل، بهبود فرآیند فتوسنتز و در نتیجه منجر به افزایش سنتز پروتئین سلولی و نهایتاً تقسیم و تراکم سلولی می‌شود (Ördög *et al.*, 2012; Solovchenko *et al.*, 2008).

ملاحظه شکل ۱ نشان می‌دهد که در تیمار ۲ (۱۰۰٪ فاضلاب شهری) با وجود افزایش نیترات و فسفات، جذب این دو عنصر رشد قابل ملاحظه‌ای ندارد. دلیل این امر را می‌توان به نتایج تحقیق Xu و همکاران در سال ۲۰۰۶ نسبت داد که در آن غلظت بالای نیتروژن به دلیل تأثیر بر نسبت C:N و N:P موجب کندی رشد در ریزجلبک *Nanochloropsis sp.* گردید. از طرفی افزایش نیتروژن در محیط کشت، منجر به تحریک فعالیت یک سری از آنزیم‌ها همانند رودکتاز و نیتريت رودکتاز در سلول و تولید آمونیوم و نیتريت می‌شود که این ترکیبات برای سلول‌ها سمی بوده و باعث کاهش رشد در جلبک‌ها می‌گردند (Jeanfils *et al.*, 1993).

نتایج مربوط به غلظت کلروفیل در مطالعه حاضر اختلاف معنی‌داری را بین تیمارهای مختلف نشان داد و بیشترین میزان کلروفیل a و b در تیمار ۵ مشاهده شد که حاکی از افزایش تراکم جلبکی در این تیمار بوده است. کلروفیل a و b از رنگدانه‌های اصلی در ریزجلبک‌ها محسوب می‌گردند که در فرایند فتوسنتز نقش اساسی را ایفا می‌کنند. لذا به عنوان یک شاخص جهت برآورد تولیدات اولیه در منابع آبی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Strickland and Parson, 1972). کلروفیل یک ترکیب غنی از نیتروژن با ۴ اتم نیتروژن در هر مولکول است. هنگامی که مقدار نیتروژن در محیط کم است سلول شروع به استفاده از منبع نیتروژن داخل خود جهت فرآیند فتوسنتز و تقسیم بیشتر سلولی می‌کند. به نظر می‌رسد کلروفیل یکی از قابل دسترس‌ترین ذخیره و انبار نیتروژن داخل سلولی باشد و هنگامی که تأمین نیتروژن خارجی کم شود، سلول‌ها شروع به استفاده از آن می‌کنند (Li *et al.*, 2008). وقتی که شرایط قحطی و کمبود نیتروژن حاکم شود، این وضعیت منجر به کاهش نرخ فتوسنتز می‌گردد که نتیجتاً بر وضعیت رنگدانه‌ها نیز تأثیر گذاشته و کاهش غلظت کلروفیل a و b و افزایش غلظت کاروتنوئید را به دنبال خواهد داشت. چنین نتیجه‌ای در مطالعه حاضر نیز مشاهده شد؛ به نحوی که مقدار رنگیزه کاروتنوئید اندازه‌گیری شده در تیمار ۶ (۲۰٪ F2 + ۸۰٪ فاضلاب شهری) در مقایسه با سایر تیمارها بیشترین مقدار را نشان داد (شکل ۲).

نیتروژن عنصر ساختاری کلروفیل و پروتئین است و بر روی تجمع کلروفیل و نرخ فتوسنتز تأثیر می‌گذارد. فسفر بر روی پایداری کلروفیل در سلول‌های جلبکی تأثیر می‌گذارد و شرایط کمبود فسفر باعث مهار رشد سلول جلبکی و سنتز کلروفیل می‌شود (Bojović *et al.*, 2005). هنگامی که ریزجلبک‌ها تحت شرایط استرس مواد مغذی قرار گیرند میزان کلروفیل آن‌ها کاهش و برعکس مقدار کاروتنوئید افزایش می‌یابد و در نتیجه باعث افزایش نسبت کاروتنوئید به کلروفیل می‌شود (Sharma *et al.*, 2012).

تغییرات و به عبارتی کاهش میزان نیتروژن، جریان کربن سلولی را از سنتز پروتئین به سمت سنتز چربی سوق می‌دهد (Mujtaba *et al.*, 2012). وقتی که مقدار نیتروژن پایین‌تر از حد نرمال باشد یا شرایط قحطی نیتروژن حاکم باشد، رشد سلولی کم شده و سبب کاهش دیتوده جلبکی و تراکم سلولی می‌شود. بسیاری از محققان تغییر در محتوای اسیدهای چرب ریزجلبک‌ها در واکنش به غلظت‌های مختلف نیتروژن را گزارش کرده‌اند (Pal *et al.*, 2011; Nigam *et al.*, 2011). نتایج مطالعه حاضر هم نشان داد که مقادیر اسیدهای چرب در تیمارهای مختلف متفاوت است (جدول ۲). تأثیر غلظت‌های مختلف نیتروژن بر اسیدهای چرب جلبک‌های تک سلولی اساساً پیچیده بوده و در گونه‌های مختلف اغلب نتایج متفاوتی را به همراه دارد. در مطالعه حاضر بیشترین میزان اسیدهای چرب غیراشباع تک پیوندی و چندپیوندی در تیمار ۴ (۴۰٪ F2 + ۶۰٪ F2) بود.

فاضلاب شهری) مشاهده شد. بنابراین تیمار ۴ با تولید بالاترین میزان اسیدهای چرب غیراشباع تک و چند پیوندی در ریزجلبک *T. chuii* می‌تواند بهترین گزینه ترکیب محیط کشت F2 و فاضلاب شهری باشد.

اسیدهای چرب غیراشباع دارای زنجیره‌های طویل چند پیوندی (PUFAs) به‌ویژه امگا ۳ و امگا ۶ مثل ایکوزاپنتانوئیک اسید (EPA) و دکوزاهگزانوئیک اسید (DHA) و اسید آراشیدونیک (AA) از لحاظ تغذیه یا درمانی حائز اهمیت هستند (Pulz and Gross, 2004) و جهت درمان بیماری‌های پوستی و قلبی عروقی، عفونت‌ها و سرطان کاربرد بسیار دارند (Barrow and Shahidi, 2008). در مطالعه حاضر، بیشترین میزان اسیدهای چرب ایکوزاپنتانوئیک اسید (EPA) و دکوزاهگزانوئیک اسید (DHA) در تیمار ۵ با مقادیر به ترتیب $(3/36 \pm 0/09)$ درصد و $(3/76 \pm 0/12)$ درصد) اندازه‌گیری و ثبت شد (جدول ۲). مطالعات قبل نیز نشان داده است که محتوی چربی و اسید چرب ریزجلبک‌ها تحت تأثیر شرایط محیط کشت، گونه ریزجلبک و مرحله یا فاز رشد آن و شرایط محیطی متفاوت است (Xu et al., 2006; Petkov and Garcia, 2007; Li et al., 2011b).

در مطالعه حاضر تاثیر تیمارهای مختلف بر میزان اسیدهای چرب به‌ویژه آراشیدونیک اسید، ایکوزاپنتانوئیک اسید و دکوزاهگزانوئیک اسید تفاوت‌های چشم‌گیری را نشان داد و آراشیدونیک اسید و دکوزاهگزانوئیک اسید حساس‌ترین اسید چرب نسبت به تغییرات مقادیر مواد مغذی موجود در محیط کشت بودند. میزان اسید چرب ایکوزاپنتانوئیک اسید در تیمار ۱ ($1/10 \pm 0/06$) برابر $(3/31 \pm 0/09)$ درصد و در تیمار ۵، معادل $(3/36 \pm 0/09)$ درصد بود که افزایش تقریباً ۱۰ برابری را در این تیمار نشان می‌دهد و اسید چرب دکوزاهگزانوئیک اسید در تیمار ۱ برابر $(1/51 \pm 0/02)$ درصد و در تیمار ۵ معادل $(3/76 \pm 0/12)$ درصد) ثبت شد که افزایش تقریبی سه برابر را نشان می‌دهد (جدول ۲).

سنتز پروتئین نه تنها نیاز به نیتروژن کافی دارد، بلکه در شرایط فقر مواد مغذی، باعث تحریک تجمع چربی شده و ریزجلبک از چربی به عنوان انبار ذخیره انرژی استفاده می‌کند (Merzlyak et al., 2007). نیتروژن در شرایط کمبود مواد مغذی مثل فسفر، سولفور و آهن نیز به عنوان مهم‌ترین فاکتور محدود کننده تغذیه‌ای عمل نموده و جریان متابولیسمی فرآیند فتو بیوسنتز را منجر به بیوسنتز اسیدهای چرب و تجمع چربی در سلول‌های ریزجلبکی می‌نماید (Merzlyak et al., 2007).

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که از ریزجلبک *Tetraselmis chuii* می‌توان به عنوان یک عامل مؤثر و کارآمد به منظور تصفیه و حذف ترکیبات آلی و مواد مغذی اضافی از فاضلاب شهری استفاده نمود. این ریزجلبک توانایی جذب نیترات و فسفات از فاضلاب شهری که با افزایش رشد و تکثیر آن همراه است را دارد. برای بهره‌برداری از این ریزجلبک برای مصارف دیگر همچون تغذیه آبزیان تیمار ۵ (تیمار حاوی ۶۰ درصد محیط کشت F2 + ۴۰٪ فاضلاب شهری) بهترین محیط کشت برای رشد ریزجلبک *T. chuii* است. این ریزجلبک در محیط کشت تیمار ۵ بیشترین مقدار نیترات و فسفات را جذب و حذف نمود و همچنین بیشینه مقادیر اسیدهای چرب غیراشباع چند پیوندی EPA و DHA و پروتئین را تولید نمود.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار به خاطر حمایت مالی از این پروژه قدردانی می‌شود. از آزمایشگاه کشت جلبک پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان در بندرعباس که استوک جلبک مورد نیاز را در اختیارمان گذاشتند و از ریاست محترم دانشکده علوم و فنون دریایی دانشگاه هرمزگان که امکان استفاده از آزمایشگاه این دانشکده را فراهم نمودند و همچنین از کارکنان این آزمایشگاه تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A.A., Ibraheem, I.B.M. 2012. Microalgae and wastewater treatment. Saudi Journal of Biological Sciences. 19(3): 257-275.

- APHA. 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater 19th edition. American Public Health Association. pp. 83-113.
- Banerjee, A., Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U.C. 2002. *Botryococcus braunii*: a renewable source of hydrocarbons and other chemicals. *Critical Reviews in Biotechnology*. 22(3): 245-279.
- Bojović, B.M., Stojanović, J. 2005. Chlorophyll and carotenoid content in wheat cultivars as a function of mineral nutrition. *Archives of Biological Sciences*. 57(4): 283-290.
- Barrow, C.J., Shahidi, F. 2008. Marine nutraceuticals and functional foods. xii ill. Boca Raton, Fla.: CRC; London. 494 p.
- Brown, M.R. 1991. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 145(1): 79-99.
- Changani, Z., Almodares, A., Afsharzadeh, S. 2015. Wastewater treatment by using the microalgae *Sirulina platensis*. The first Iranian National Conference on Wastewater Treatment by Plants. Kerman, Iran. (in Persian)
- Dalrymple, O.K., Halfhide, T., Udom, I., Gilles, B., Wolan, J., Zhang, Q., Ergas, S. 2013. Wastewater use in algae production for generation of renewable resources: a review and preliminary results. *Aquatic Biosystems*. 9(1): 8-18.
- De Godos, I., Vargas, V.A., Blanco, S., González, M.C.G., Soto, R., García-Encina, P.A., Becares, E., Muñoz, R. 2010. A comparative evaluation of microalgae for the degradation of piggery wastewater under photosynthetic oxygenation. *Bioresource Technology*. 101(14): 5150-5158.
- Delgadillo, L., Lopes, F.A., Taidi, B., Pareu, D. 2016. Nitrogen and phosphate removal from wastewater with a mixed microalgae and bacteria culture. *Biotechnology Reports*. 11(C): 18-26.
- Dieffnbacher, A., Pocklington, W. 1992. Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives. 1st Supplement. 7th Revised and Enlarged Edition. Blackwell Scientific Oxford. 1: 171-198.
- Eggers, L.F., Schwudke, D. 2016. Liquid Extraction: Folch. In: Wenk, M. (ed.). *Encyclopedia of Lipidomics*. Springer, Dordrecht.
- Geetha, B., Mathew, K., Augusti, T. 1994. Hypoglycemic effects of leucodelphinidin derivative isolated from *Ficus bengalensis* (Linn). *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*. Vol. 38(3): 220-222.
- Griffiths, M.J., van Hille, R.P., Harrison, S.T. 2012. Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions. *Journal of Applied Phycology*. 24(5): 989-1001.
- Guillard, R.R. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Springer US. pp: 29-60.
- Janarthanan, S., Ditah, I., Adler, D.G., Murray, N.E. 2012. Clostridium difficile-associated diarrhea and proton pump inhibitor therapy: a meta-analysis. *American Journal of Gastroenterology*. 107(7): 1001-1010.
- James, C.S. 1995. *Analytical Chemistry of Foods*. Springer USA. 178 p.
- Jeanfils, J., Canisius, M.F., Burlion, N. 1993. Effect of high nitrate concentrations on growth and nitrate uptake by free-living and immobilized *Chlorella vulgaris* cells. *Journal of Applied Phycology*. 5(3): 369-374.
- Jeffrey, S.W., Humphrey, G.F. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochimie und Physiologie der Pflanzen*. 167(2): 191-194.
- Khatoun, H., Rahman, N.A., Banerjee, S., Harun, N., Suleiman, S.S., Zakaria, N.H., Lananan, F., Hamid, S.H.A., Endut, A. 2014. Effects of different salinities and pH on the growth and proximate composition of *Nannochloropsis* sp. and *Tetraselmis* sp. isolated from South China Sea cultured under control and natural condition. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 95: 11-18.
- Lavajoo, F., Thaherizade, M., Dehghani, M. 2015. The absorption of nitrate and phosphate from urban sewage by blue-green algae (*Spiroulina platensis*), (an alternative medium) as application for removing the pollution. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*. 19(3): 353-356.

- Lavajoo, F., Taherizadeh, M. 2016. Determination of the growth rates of *Spirolina* and *Cheatoceeros* algae in urban waste sewage and their capability to deplete nitrate and phosphate content in the sewage. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*. 20(3): 691-699.
- Li, Y., Horsman, M., Wu, N., Lan, C.Q., Dubois-Calero, N. 2008. Biofuels from microalgae. *Biotechnology Progress*. 24(4): 815-820.
- Li, Y., Chen, Y.F., Chen, P., Min, M., Zhou, W., Martinez, B., Ruan, R. 2011a. Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrate municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. *Bioresource Technology*. 102(8): 5138-5144.
- Li, G., Sinclair, A.J., Li, D. 2011b. Comparison of lipid content and fatty acid composition in the edible meat of wild and cultured freshwater and marine fish and shrimps from China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59(5): 1871-81.
- Markou, G., Nerantzis, E. 2013. Microalgae for high-value compounds and biofuels production: a review with focus on cultivation under stress conditions. *Biotechnology Advances*. 31(8): 1532-1542.
- Merzlyak, M.N., Chivkunova, O.B., Gorelova, O.A., Reshetnikova, I.V., Solovchenko, A.E., Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z. 2007. Effect of nitrogen starvation on optical properties, pigments, and arachidonic acid content of the unicellular green alga *Parietochloris incisa* (Trebouxiophyceae: Chlorophyta). *Journal of Phycology*. 43(4): 833-843.
- Meseck, S.L., Alix, J.H., Wikfors, G.H. 2005. Photoperiod and light intensity effects on growth and utilization of nutrients by the aquaculture feed microalga, *Tetraselmis chui* (PLY429). *Aquaculture*. 246(1-4): 393-404.
- Moreno-Garrido, I. 2008. Microalgae immobilization: current techniques and uses. *Bioresource Technology*. 99(10): 3949-3964.
- Mujtaba, G., Choi, W., Lee, C.G., Lee, K. 2012. Lipid production by *Chlorella vulgaris* after a shift from nutrient-rich to nitrogen starvation conditions. *Bioresource Technology*. 123: 279-283.
- Munoz, R., Guieysse, B. 2006. Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review. *Water Research*. 40(15): 2799-2815.
- Nigam, S., Rai, M.P., Sharma, R. 2011. Effect of nitrogen on growth and lipid content of *Chlorella pyrenoidosa*. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 7(3): 124-129.
- Olaizola, M., Huntley, M.E. 2003. Recent advances in commercial production of astaxanthin from microalgae. In: Fingerman, M., Nagabhushanam, R. (eds.). *Biomaterials and Bioprocessing*. Science Publishers.
- Ördög, V., Stirk, W.A., Bálint, P., van Staden, J., Lovász, C. 2012. Changes in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogen-stressed *Chlorella minutissima* cultures. *Journal of Applied Phycology*. 24(4): 907-914.
- Pal, D., Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z., Boussiba, S. 2011. The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 90(4): 1429-1441.
- Petkov, G., Guillermo, G. 2007. Which are fatty acids of the green alga *Chlorella vulgaris*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 35(5): 281-285.
- Pulz, O., Gross, W. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 65(6): 635-648.
- Sayadi, M.H., Ghatnekar, S.D., Kaviani, M.F. 2011. Algae a promising alternative for biofuel. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*. 1(2): 112-124.
- Seyfabadi, J., Ramezani, Z., Khoeyi, Z.A. 2011. Protein, fatty acid, and pigment content of *Chlorella vulgaris* under different light regimes. *Journal of Applied Phycology*. 23(4): 721-726.
- Sharma, K.K., Schuhmann, H., Schenk, P.M. 2012. High lipid induction in microalgae for biodiesel production. *Energies*. 5(5): 1532-1553.
- Solovchenko, A.E., Khozin-Goldberg, I., Didi-Cohen, S., Cohen, Z., Merzlyak, M.N. 2008. Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incisa*. *Journal of Applied Phycology*. 20(3): 245-251.
- Sriram, S., Seenivasan, R. 2012. Microalgae cultivation in wastewater for nutrient removal. *Algal Biomass Utiln*. 3(2): 9-13.

- Strickland, J.D.H., Parson, T.R. 1972. A practical handbook for the analysis of seawater. Fisheries Research Board of Canada Bulletin. 2nd edition. 310 p.
- Tam, N.F.Y., Wong, Y.S. 1994. Nutrient and heavy metal retention in mangrove sediment receiving wastewater. Water Science and Technology. 29(4): 193-200.
- Thompson, G.A. 1996. Lipids and membrane function in green algae. Biochimica et Biophysica Acta. 1302(1):17-45.
- Xu, H., Miao, X., Wu, Q. 2006. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. Journal of Biotechnology. 126(4): 499-507.
- Zaki, M., Saad, H.J.B. 2010. Comparative study on growth and survival of larval and juvenile *Dicentrarchus labrax* rearing on rotifer and Artemia enriched with four different microalgae species. EurAsian Journal of BioSciences. 9(24): 3676-3688.