نسخه قبل از انتشار

ارزیابی نرخ سنتز و تجمع پروتئین ریز جلبک اسپیرولینا (*Spirulina platensis*) کشت یافته در پساب صنایع لبنی

۱-نویسنده مسئول، فاطمه زهرا جعفری، دانشجوی دکتری صید و بهره برداری آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی
گرگان، ایران .رایانامه: Jafarizahra293@gmail.com
۲- سید عباس حسنی، استاد گروه تولید و بهره برداری آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
رایانامه: seyedabbas_hosseini@yahoo.com
۳- معظمه کردجزی،استادیار گروه عمل آوری محصولات شیلاتی ، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
رایانامه: kordjazi.m@gmail.com
۴-حدیثه کشیری، استادیار گروه تولید و بهره برداری آبزیان ، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
رایانامه: hadiskashiri@gmail.com

چکیده

ریزجلبک‌ها، میکروارگانیسم‌های فتوسنتزکننده هستند که به دلیل داشتن ترکیبات با ارزش پروتئینی، لیپیدی و کربوهیدرات، مورد توجه قرار می‌گیرند. آنها قادر به رشد در محیط‌های غنی از مواد آلی و معدنی هستند و می‌توانند در تصفیه پساب‌های صنعتی نقش بسیار موثری داشته باشند. هدف اصلی این مطالعه بررسی تأثیر نسبت رقیق‌سازی فاضلاب بر ذخیره پروتئین در جلبک اسپیرولینا بود و با تغییر نسبت رقیق‌سازی فاضلاب در محیط کشت، تأثیر آن بر فرآیندهای سنتز و تجمع پروتئین در اسپیرولینا مورد ارزیابی قرار گرفت. مطالعه شامل ۴ تیمار و یک گروه شاهد بود، در نهایت، میزان مواد مغذی از جمله نیترات، فسفات و آمونیاک در نمونه‌های پساب و محیط کشت اندازه‌گیری شد. برای آنالیز پروتئین و اسیدآمینه، نمونه‌های ریز جلبک *S. platensis* توسط سانتریفیوژ جدا شدند و سپس بیوماس جلبک خشک شد. نمونه‌ها در دمای مناسب فریز شدند. سپس میزان پروتئین کل هر نمونه اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری پروتئین خام، نمونه‌ها هضم شدند و سپس پروتئین خام محاسبه شد. سپس پروفایل اسیدهای آمینه تیمار جلبکی با بیشترین میزان پروتئین مشخص شد . نتایج نشان داد که تیمار ۱۰۰ درصد(۱۰۰٪ پساب) بیشترین مقدار نیترات، فسفات، آمونیاک، زیست توده و پروتئین را داشت و تیمار ۲۵ درصد(۲۵٪پساب) کمترین مقدارها را نشان داد. همچنین، در تیمارهای ۷۵ و ۵۰ درصد، روند مشابهی در تغییرات زیست توده مشاهده شد. در بررسی اسیدآمینه‌ها نیز، مقادیر مختلف در تیمارهای مختلف تفاوت داشتند، به طوری که اس‌ارتیک اسید بیشترین میزان و ارنیتین کمترین میزان را نشان می‌دهند. به طور کلی، نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از پساب به عنوان منبع آب در کشت جلبک اسپیرولینا پلاسنتیس می‌تواند بهبودهای قابل توجهی در رشد و تولید مواد مغذی و ترکیبات بیوشیمیایی این جلبک به همراه داشته باشد. همچنین، برای استفاده بهینه از پساب، می‌توان نسبت غلظت‌های مختلف پساب را تنظیم کرده و مطالعات بیشتری در زمینه بهبود شرایط کشت و تغییرات بیوشیمیایی جلبک‌ها انجام داد.

کلمات کلیدی: ریزجلبک‌ها،اسپیرولینا پلتنسیس، تصفیه پساب‌ها، رشد

مقدمه

ریزجلبک‌ها میکروارگانیسم‌های تک‌سلولی یوکاریوتی میکروسکوپی و فتوسنتز کننده هستند و دارای اجزای مشابهی مانند کلروپلاست و هسته هستند (۱). آنها می‌توانند به صورت سلول‌های جداگانه یا گروهی از سلول‌های چسبیده به یکدیگر وجود داشته باشند. بعضی از ریزجلبک‌ها می‌توانند به شکل فتوتروفیک یا هتروتروفیک وجود داشته باشند. اکثر ریزجلبک‌ها فتوتروف هستند و با استفاده از آب، نور و مواد مغذی، کربن غیرآلی مانند کربن دی‌اکسید را به مولکول‌های آلی تبدیل کرده و اکسیژن را آزاد می‌کنند. جلبک‌های فتوتروف در تبدیل نور خورشید به بیوماس، تأثیر بیشتری از گیاهان خشکی دارند (۲). اسپیرولینا (*Spirulina platensis*) یک جلبک سبز-آبی است که در محیط‌های مختلفی مانند خاک، شن و ماسه، لجن‌زار، آب‌شور، آب دریا و آب شیرین یافت می‌شود. این جلبک از رشته‌های سلولی استوانه‌ای منظم تشکیل شده است و در تریکوم‌های مارپیچی غیرمنشعب و اندازه‌های میکروسکوپی مشاهده می‌شود. اسپیرولینا قابلیت حرکت دارد و در طول محورشان حرکت کرده و هتروسیست نیستند (۳). این ریزجلبک در شرایط پی اچ ۳/۸ تا ۱۱ و دمای بالای ۲۰ درجه سانتی‌گراد بهترین رشد را دارد و قادر است در پساب رشد کرده و با دوره مواد مغذی، پروتئین تولید کند و آلاینده‌های معدنی و مواد زائد را از آب حذف کند (۴). اسپیرولینا در صنایع غذایی سالم جایگاه ویژه‌ای دارد و به عنوان مکمل پروتئین و ویتامین در جیره‌های غذایی آبزی‌پروری استفاده می‌شود. این جلبک در آب رشد می‌کند و به راحتی قابل برداشت و فرآوری است. همچنین، اسپیرولینا دارای مقادیر زیادی مواد مغذی ماکرو و میکرو است. تحلیل فواید تغذیه‌ای این جلبک نشان می‌دهد که در حدود ۶۰ تا ۷۰ درصد وزن خشک آن از مواد مغذی تشکیل شده است. اسپیرولینا همچنین دارای پروتئین‌های با کیفیتی است که حاوی اسیدهای آمینه ضروری و متعادل هستند (۵).

تصفیه پساب‌ها چند هدف اصلی دارد که شامل حذف اجزای مختلف می‌شود. این اجزا شامل حذف اکسیژن بیوشیمیایی، جامدات معلق، مواد مغذی (نیترات، نیتریت، آمونیوم و فسفات)، باکتری‌های کلیفرم و سمیت هستند. در فرآیند حذف اکسیژن بیوشیمیایی، اکسیژن مولکولی توسط میکروارگانیسم‌ها برای تبدیل مواد آلی به کربن دی‌اکسید و آب به عنوان عوامل اکسید کننده استفاده می‌شود. اما این فرآیند می‌تواند باعث تخلیه اکسیژن محلول در بدنه آبی پساب شده و در نتیجه باعث از بین رفتن موجودات هوازی، از جمله ماهی‌ها، می‌شود (۶). بنابراین، حذف اکسیژن بیوشیمیایی به عنوان هدف اصلی و مهمترین هدف در تصفیه پساب مورد توجه قرار می‌گیرد. جامدات معلق که در پساب وجود دارند، از طریق رسوب‌گذاری فیزیکی از پساب جدا می‌شوند. در طراحی سیستم‌های تصفیه پساب، جداکردن مواد مغذی و حذف نیتروژن و فسفر محلول معمولاً به عنوان یک گام مهم محسوب می‌شود. آزاد شدن مواد مغذی به سیستم‌های آبی حساس می‌تواند باعث رشد ناخواسته گیاهان، از جمله جلبک‌ها و ماکروفیت‌های آبزی، و در نتیجه یوترفیکاسیون شود (۷). علاوه بر این، آزاد شدن ترکیبات نیتروژنی به محیط‌های آبی می‌تواند به سمیت آمونیاک یونیزه نشده برای ماهیان و سایر آبزیان منجر شود، به خصوص در صورت وجود غلظت زیاد نیترات در آب آشامیدنی (بیش از ۴۵ گرم در متر مکعب) که مضر است (۸).

در صنایع لبنی، پساب‌هایی تولید می‌شود که حاوی مواد آلی بسیار زیادی هستند. به همین دلیل، آب‌های متعفن با میزان اکسیژن کمتری به عنوان فاضلاب خروجی تولید می‌شوند. این پساب‌های لبنی، در صورت تخلیه به منابع آبی، می‌توانند باعث از بین رفتن آبزیان و سایر موجودات دریایی شوند. این وضعیت باعث افزایش جمعیت موجودات میکروبی در آب شده و به تبدیل بیشتری از

مواد غذایی برای این جامعه میکروبی منجر می‌شود (۹). صنایع لبنی برای تصفیه پساب‌ها از روش‌های هوازی و بی‌هوازی یا ترکیبی از هر دو استفاده می‌کنند. کشت ریزجلبک‌ها در بسیاری از پساب‌ها، باعث بهبود شرایط کیفیت آب می‌شود، به ویژه در پساب‌های کشاورزی–صنعتی که غنی از آلاینده‌های نیتروژن و فسفر هستند (۱۰).

در مطالعه ای به منظور بررسی امکان سنجی جایگزینی بیومس جلبکی ***Scenedesmus almeriensis*** به دست آمده از تصفیه ی فاضلاب کود خوکی با پودر ماهی در غذای قزل آلای رنگین کمان، طراحی و اجرا شد که در این پژوهش میزان پروتئین بیومس جلبکی ۴۶/۷ درصد اعلام شد که با توجه به نتایج این مطالعه، افزودن ریزجلبک ***Scenedesmus almeriensis*** به عنوان منبع پروتئین در سطوح قابل آزمایش برای رشد ماهی قزل آلای رنگین کمان، قابل قبول اعلام شد (۱۱).

در پژوهشی دیگر رشد و تجمع بیومس ***Spirulina subsalsa*** در محیط کشت اصلاح شده زاروک تکمیل شده با فاضلاب مختلط (کارخانه مونوسدیم گلوتامات) در غلظت های مختلف پرداخته شد. نتایج این آزمایش نشان از این داشت که فاضلاب مختلط می تواند یک جایگزین مناسب برای کشت ***Spirulina subsalsa*** جهت صرفه جویی در مصرف آب و مواد مغذی باشد(۱۲).

در این مطالعه فرضیه بر این است که تعیین شرایط بهینه‌ای برای کشت جلبک اسپیرولینا در پساب صنایع لبنی، می‌تواند به افزایش نرخ سنتز و تجمع پروتئین در این جلبک‌ها منجر شود. لذا هدف اصلی این مطالعه بررسی تأثیر نسبت رقیق‌سازی فاضلاب بر میزان ذخیره پروتئین در جلبک اسپیرولینا است. با تغییر نسبت رقیق‌سازی فاضلاب در محیط کشت جلبک، تأثیر آن بر فرآیندهای سنتز و تجمع پروتئین در اسپیرولینا مورد بررسی قرار می‌گیرد.

مواد و روش ها

کشت ریز جلبک

جهت انجام این مطالعه، ریزجلبک ***S. platensis*** از استوک موجود، تهیه و به آزمایشگاه فایکولب دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل شد. قبل از شروع کشت، اتاق کشت با استفاده از لامپ UV به مدت نیم ساعت استریل شد. همچنین، تمامی وسایل مورد استفاده، از جمله آون، در دمای ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت خشک شده و محیط کشت در ارلن مایرهای حاوی محیط کشت به طور کامل استریل شدند. روش کشت جلبک، شامل قرار دادن جلبک در محیط کشت زاروک با دمای ۲۲ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد، شدت نور ۳۵۰۰±۳۵۰ لوکس و دوره نوری به مدت ۱۲ ساعت روشنی و ۱۲ ساعت تاریکی، در ارلن مایرهای ۵۰۰ میلی‌لیتر، به مدت ۱۴ روز انجام شد. پس از رشد، جلبک‌ها با استفاده از آب مقطر دیونیزه شستشو داده شدند تا واسطه‌هایی که باعث رشد آنها شده بودند، از جلبک جدا شوند.

آزمایش حاضر به صورت یک طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار و یک گروه شاهد طراحی شد. هر تیمار و گروه شاهد به تعداد ۳ تکرار انجام شد. تیمارها عبارت بودند از: تیمار ۱ که پساب را به میزان ۲۵ درصد از حجم کل (۲۵ میلی‌لیتر) با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. تیمار ۲ که پساب را به میزان ۵۰ درصد از حجم کل (۵۰ میلی‌لیتر) با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. تیمار ۳ که پساب را به میزان ۷۵ درصد از حجم کل (۷۵ میلی‌لیتر) با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. و در نهایت، تیمار ۴ که پساب را به میزان ۱۰۰ درصد از حجم کل (۱۰۰ میلی‌لیتر) استفاده شد. گروه شاهد نیز فقط با استفاده از محیط کشت زاروک بود. تمامی تیمارها و گروه شاهد به مدت ۱۴ روز کشت داده شدند. قبل از شروع آزمایش، محیط کشت باید استریل شده و حداقل ۲۴ ساعت قبل از استفاده آماده شده باشد.

تهیه پساب

نمونه پساب از کارخانه پگاه در استان گلستان، شهرستان گرگان، تهیه شده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای حذف ذرات بزرگ، از یک صافی میکروفیبر (واتمن سایز ۴۲) استفاده شد. سپس، نمونه پساب به آزمایشگاه منتقل شده و برای استریل شدن، در دستگاه اتوکلاو قرار گرفت. به منظور افزایش شفافیت، نمونه پساب از طریق سانتریفیوژ اصلاح شد. سپس، رقت های مورد نیاز ساخته شده و با استفاده از دستگاه pH متر، مقدار pH مورد نظر اندازه‌گیری شد. در صورت نیاز، با افزودن محلول NaoH(با غلظت ۰/۱ مولار)، مقدار pH در بازه ۸/۵ تا ۸/۸ تنظیم شد.

اندازه‌گیری مواد مغذی

برای اندازه‌گیری مواد مغذی نیترات و فسفات، از کیت‌های شرکت وگتک (ساخت انگلستان) و دستگاه فتومتر مدل ستی استفاده شد. این فرآیند روزانه انجام می‌شد. برای اندازه‌گیری نیترات، ابتدا یک حجم ۱۰ سی‌سی از نمونه آب را به عنوان بلانک برای تنظیم دستگاه اسپکتوفتومتر استفاده شد. سپس، ۲۰ سی‌سی از نمونه آب را در یک ظرف قرار دادیم و قرص نیترات موجود در کیت را به آن اضافه کردیم. سپس، پس از گذشت ۵ دقیقه، از کاغذ صافی واتمن ۴۲ عبور دادیم. در نهایت، ۱۰ سی‌سی از محلول نمونه را در سل‌های مخصوص دستگاه فتومتر ریختیم و آن را در دستگاه قرار دادیم. سپس، میزان نیترات را اندازه‌گیری کردیم. برای اندازه‌گیری فسفات، ۱۰ سی‌سی از نمونه آب را در سل قرار دادیم. سپس، با اضافه کردن قرص مربوطه به آن، و پس از گذشت ۱۰ دقیقه، آن را در دستگاه قرار دادیم. سپس، مقدار فسفات را اندازه‌گیری کردیم. برای اندازه‌گیری مقدار آمونیاک، ابتدا نمونه‌ها را سانتریفیوژ کردیم. سپس، جلبک‌ها را حذف کرده و معرفی به باقی مانده اضافه کردیم. سپس، با ساخت محلول استاندارد و نگهداشت آن‌ها در یک محیط تاریک و خنک به مدت یک ساعت، میزان جذب نوری هر کدام را در طول موج ۶۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر یادداشت کردیم. همچنین، یک شاهد آب مقطر استفاده شد و با رسم منحنی استاندارد، مقدار آمونیاک را اندازه‌گیری کردیم. برای اندازه‌گیری مقدار آمونیاک، در فرآیند نمونه‌برداری از نمونه‌ها، معرف‌های زیر به آب اضافه شد. معرف ۱ شامل ۸۰ گرم سدیم سالسیلات، ۰/۷ گرم سدیم نیتروپروساید و ۲۲۷ سی‌سی آب مقطر بود. معرف ۲ شامل ۷/۴ گرم سدیم هیدروکسید، ۴۰ گرم سدیم سیترات ۲ آبه و ۴۰۰ سی‌سی آب مقطر بود. همچنین، معرف ۳ شامل ۱۸ سی‌سی از محلول معرف ۲ به علاوه ۲ سی‌سی سدیم هیپوکلرید بود (۱۰).

آنالیز مواد مغذی:

در آنالیز حذف مواد مغذی، از فرمول زیر برای محاسبه درصد جذب استفاده می‌شود:

$$W\% = (Ci - C0) / C0 \times 100\%$$

در این فرمول، متغیرها به شرح زیر تعریف شده‌اند:

W٪: درصد جذب مواد مغذی

C0: غلظت مواد مغذی در زمان آغازین t

Ci: غلظت مواد مغذی در زمان ti

این فرمول براساس مقایسه غلظت مواد مغذی در زمان‌های مختلف، اندازه‌گیری جذب مواد مغذی را به صورت درصدی نسبت به غلظت ابتدایی (در زمان آغازین) محاسبه می‌کند (۱۳).

افزودن جلبک

به منظور اضافه کردن جلبک در هر تیمار، از یک قاعده تعداد یکسان برای هر تیمار استفاده شد. برای این منظور، از غلظت معینی جلبک (۰/۱ گرم بر لیتر) استفاده شد. در هر بطری ۱۰۰۰ میلی‌لیتری (که پیش‌تر با استفاده از اتوکلاو استریل شده بود)، یک مقدار ۱۰۰۰ میلی‌لیتر پساب با غلظت ۰/۱ گرم بر لیتر اضافه شد. براساس محاسبات و فرمول مربوطه، غلظت ۰/۱ گرم بر لیتر برابر با ۱۶۶ و ۸۳ سی‌سی تعیین شد. این مقدار از محیط کشت مادر جدا شده و به ظروف مورد استفاده برای رشد جلبک در محیط‌های پساب لبنی اضافه شد.

آماده سازی جهت اندازه‌گیری پروتئین و اسیدآمینه

برای آنالیز پروتئین و اسیدهای آمینه، نمونه‌های ریز جلبک *S. platensis* توسط سانتریفیوژ در سرعت ۷۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه از محیط کشت جدا شدند. سپس بیوماس جلبک در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت دو ساعت در آون خشک شد. نمونه‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد فریز و ذخیره شدند تا برای آنالیز پروتئین و اسیدهای آمینه آماده شوند.

اندازه گیری میزان پروتئین

بعد از رسیدن ریزجلبک به فاز لگاریتم، میزان پروتئین کل هر یک از نمونه‌ها اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری پروتئین خام نمونه، از دستگاه میکروکژلدال استفاده شد. ۰/۵ گرم پودر جلبک خشک را به همراه ۳ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ و قرص هضم در لوله‌های مخصوص قرار داده و به مدت ۴ ساعت ایجاد هضم کردیم. سپس نمونه‌ها را با استفاده از اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال تیتر کردیم. در نهایت، پروتئین خام را با ضرب مقدار ازت در عدد ثابت ۶/۲۵ محاسبه کردیم. پس از اندازه‌گیری میزان پروتئین، پروفایل اسیدهای آمینه تیمار جلبکی که بیشترین میزان پروتئین را داشت، در این مرحله مشخص شد و وارد مرحله بعدی آنالیز گردید.

اندازه‌گیری اسیدهای آمینه

برای بررسی نحوه هضم نمونه‌ها، ابتدا ماده خشک هر نمونه را توزین کرده و به ویال‌های کوارتز مخصوص دستگاه ماکروویو Ethos Up Milestone قرار دادیم. سپس ۲۵۰ میکرو لیتر اسید HCl۶ نرمال به نمونه اضافه شد. در مرحله بعد، نمونه‌ها تحت برنامه دمایی زیر پرج با ازت قرار گرفتند:

مرحله (۱): ۱۰ دقیقه با دمای ۱۶۰ درجه سانتیگراد و قدرت ۸۰۰ وات

مرحله (۲): ۲۰ دقیقه با دمای ۱۶۰ درجه سانتیگراد و قدرت ۷۰۰ وات

در این مراحل، هضم کامل پروتئین‌های ساختاری به اسیدهای آمینه تشکیل‌دهنده انجام شد. سپس برای آماده‌سازی و رقیق‌سازی نمونه‌ها جهت تزریق، pH نمونه‌های هضم شده در ۲۵۰ میکرو لیتر اسید HCl۶ نرمال با افزودن آب و NaOH در محدوده ۱/۲ تا ۵/۲ تنظیم شد. حجم نهایی رقیق‌سازی برای هر نمونه، ۲۰ میلی‌گرم در ۱۵ میلی‌لیتر بود. قبل از تزریق، هر نمونه از فیلتر ۰,۴۵ میکرونی عبور داده شد. حجم تزریق برای هر نمونه، ۲۰ میکرو لیتر بود.

برای آنالیز اسیدآمینه، از دستگاه Knauer HPLC آلمان با مشخصات زیر استفاده شد. سیستم شامل Smartline Manager 5000 و Smartline Pump 1000 بود. برای انجام آنالیز، از ستون Li Ion-exchange با ابعاد ۴.۶*۷۵ میلی‌متر با بازدهی بالا استفاده شد. همچنین، برای تشخیص اسیدآمینه‌ها از دو دتکتور UV با طول موج ۴۴۰ و ۵۷۰ نانومتر استفاده شد. جهت مشتق‌سازی پس از ستون، از دستگاه PICKERING آمریکا استفاده شد. برای انجام آنالیز، از کیت PICKERING LABORATORIES آمریکا با نام ۷۰-minute physiological fluid sample kit و برنامه گرادیانت مطابق

دستورالعمل شرکت استفاده شد. فاز متحرک مورد استفاده در این آنالیز شامل Lithium Eluant 1700-1125، Lithium Eluant Li365، Lithium Eluant Li375 و RG3 lithium column regenerant بود.

پس از خروج نمونه از ستون، مشتق‌سازی پس از ستون (post-column) با استفاده از دستگاه Pinnacle PCX و کیت Ninehydrin reagent TRIONE انجام شد. در این روش، نمونه با استفاده از دستگاه Pinnacle PCX و با استفاده از کیت Ninehydrin reagent TRIONE ترکیب شد. مشخصات فنی مشتق‌سازی پس از ستون عبارتند از:

نرخ جریان Eluant: ۰/۵۵ میلی‌لیتر در دقیقه

نرخ جریان ریاکتور (Reactor): ۰/۳ میلی‌لیتر در دقیقه

دمای اولیه ستون: ۳۴ درجه سانتی‌گراد

دمای راکتور: ۱۳۰ درجه سانتی‌گراد

برای محاسبه غلظت نهایی اسیدهای آمینه، از مقادیر غلظت محاسبه شده در نرم‌افزار با توجه به منحنی کالیبراسیون استاندارد، ضریب رقیق‌سازی و جرم مولی هر اسیدآمینه برحسب میلی‌گرم در گرم ماده خشک استفاده شد.

استخراج عصاره

در روش استخراج عصاره، ۵۰۰ میلی‌گرم از زیست توده جلبک با استفاده از ۳ میلی‌لیتر متانول ۱۰۰ درصد به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق استخراج شد. سپس نمونه سانتریفیوژ شد و مایع رویی به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در آون در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا خشک شود. سپس ۳ میلی‌لیتر دیگر از متانول روی بقایای ریز جلبک ریخته شده و استخراج مجدد انجام شد. در نهایت، تمام مواد رویی را در آون قرار دادیم تا کاملاً خشک شوند و وزن مورد نظر را به دست آوردیم.

تجزیه و تحلیل آماری

در آزمایش مذکور، از یک طرح کاملاً تصادفی با سه فاکتور پساب و غلظت آن‌ها در چهار سطح (۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد) و با استفاده از جلبک در سه تکرار استفاده شد. داده‌ها با استفاده از آزمون یک طرفه آنوا (One-way ANOVA) تجزیه و تحلیل شدند و میانگین‌ها با استفاده از آزمون پشتیبان LSD در سطح اطمینان ۵ درصد مقایسه شدند. برای انجام این تجزیه و تحلیل، از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ استفاده شد.

نتایج و بحث

در صنایع لبنی، یکی از مشکلات اساسی پساب‌ها غلظت بالای مواد مغذی، به ویژه نیتروژن و فسفر کل است. تصفیه شیمیایی این پساب‌ها اغلب هزینه‌بر است. علاوه بر این، غلظت بالای نیتروژن و فسفر می‌تواند منجر به یوتریفیکاسیون و اختلال در تعادل اکوسیستم شود (۱۴). ریزجلبک‌ها می‌توانند با رشد در این شرایط، تأثیر قابل توجهی در تصفیه پساب و کاهش هزینه‌ها داشته باشند. فرایند حذف در واقع به تولید ریزجلبک‌ها وابسته است و هر چقدر میزان بیشتری نیتروژن و فسفر از پساب حذف شود، تولید بیومس افزایش می‌یابد (۱۵).

نیترات

مقادیر نیترات برای تیمارهای مختلف در جدول ۱ نشان داده شده است. طبق نتایج، بیشترین مقدار نیترات در روز اول به تیمار ۱۰۰ درصد و کمترین مقدار آن به تیمار ۲۵ درصد تعلق داشت که بین این دو تیمار تفاوت معنادار مشاهده شد ($P<۰/۰۵$).

همچنین، بیشترین مقدار نیترات در روز سوم به تیمار ۱۰۰ درصد و کمترین مقدار آن به تیمار ۲۵ درصد مربوط بود که نیز تفاوت معناداری بین این دو تیمار وجود داشت (P<۰/۰۵). در روز پنجم، بیشترین مقدار نیترات در تیمار ۱۰۰ درصد و کمترین مقدار آن در تیمار ۵۰ درصد نشان داده شد و بین این دو تیمار تفاوت معناداری مشاهده شد (P<۰/۰۵). در روز هفتم، بیشترین مقدار نیترات در تیمار ۱۰۰ درصد و کمترین مقدار آن در تیمار ۲۵ درصد مشاهده شد که تفاوت معناداری بین این دو تیمار وجود داشت (P<۰/۰۵). در روز نهم، بیشترین مقدار نیترات در تیمار ۱۰۰ درصد و کمترین مقدار آن در تیمار ۲۵ درصد مشاهده شد که بین این دو تیمار تفاوت معناداری وجود داشت (P<۰/۰۵).

جدول ۱- آزمون اثرات محیط کشت، غلظت جلبک و رقت روی میزان حذف نیترات. حروف کوچک متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارها می باشد (P<۰/۰۵).

تیمار (٪)	روزاول	روزسوم	روزپنجم	روز هفت	روزنهم
۲۵	۳۹/۲٤±۱/٦٤^{d}	۳۲/۸±۱/۱۷^{c}	۲٤/۸٤±۰/۳٤^{c}	۱۲/٥٦±۱/۷۱^{c}	-
٥۰	٤٦/٦±۱/۸۱^{c}	۳٤/۳٤±۱/٤٦^{c}	۲۳/٥±۱/۱۸^{c}	۱٤/۷۷±۱/۰٥^{ab}	۲±۰/٦۳^{b}
۷٥	٥۳/۸٦±۱/۱۳^{b}	۳۹/۲٦±۱/٤۳^{b}	۳۰/۳۳±۱/۹۰^{b}	۱٦/٥۱±۱/٦۱^{b}	۱/۹٦±۰/٦۸^{b}
۱۰۰	٥۷/۷۱±۱/٤۲^{a}	٤٥/۱۷±۱/۱۷^{a}	۳۳/۳٤±۱/۲٤^{a}	۲۲/۲۹±۱/۳۷^{a}	۱۳/۳۲±۱/۷۲^{a}

جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس برای رشد خود به نیترات و آمونیوم نیاز دارد و قادر است نیتروژن را از منابع مختلف مانند نیترات، اوره، آمونیاک، اسیدهای آمینه، پپتون، عصاره مخمر و پورین جذب کند (۱۶). در تحقیقاتی که انجام شده است، اسپیرولینا پلاتنسیس با تیمارهای دارای غلظت متفاوت نیترات و فسفات، به طور قابل توجهی رشد کرده و نقش مهمی در تصفیه پساب داشته است. نتایج این تحقیق نشان داده است که در تیمارهای با رقت ۵۰ و ۷۵ درصد پساب و فاضلاب، بیش از ۹۰ درصد از نیترات پس از فرایند تصفیه حذف می‌شود. اما در تیمارهای با رقت ۱۰۰ و ۲۵ درصد، این مقدار کمتر است. بنابراین، به نظر می‌رسد که پساب در رقت‌های میانی، شرایط مناسبی برای رشد اسپیرولینا را فراهم می‌کند به دلیل وجود مواد مغذی لازم در محیط کشت. همچنین، مشاهدات نشان می‌دهند که در تیمارهای با رقت ۵۰ و ۷۵ درصد، میزان نیترات به تقریب صفر می‌رسد (۱۶). احتمالاً به دلیل کاهش نور و کاهش نفوذ نور در این تیمارها، نور کافی برای فتوسنتز جلبک اسپیرولینا فراهم می‌شود و میزان مواد مغذی موجود در پساب نقش مهمتری را ایفا می‌کند. در یکی از تحقیقاتی که توسط Sandeep و همکاران (۲۰۱۵) انجام شد(۱۷)، نشان داده شد که افزایش تولید بیومس اسپیرولینا پلاتنسیس، منجر به افزایش حذف نیتروژن می‌شود. همچنین، تحقیقات انجام شده توسط نشان داد که سیانوباکتری *Desertifilum tharense* قابلیت حذف تا ۹۴ درصد نیترات را دارد. همچنین، مطالعه‌های نشان دادند که استفاده از ریزجلبک‌های *Oscillatoria*، *Phormidium* و *Consortium* می‌تواند منجر به کاهش مقدار نیتروژن در فاضلاب لبنی به ترتیب ۸۶، ۹۴ و ۹۰/۶۶ درصد شود(۱۹). تحقیقات بیشتر نیز نشان دادند که با کشت اسپیرولینا پلاتنسیس در فاضلاب لبنی، میزان حذف نیترات تا ۹۹/۶ درصد ممکن است و بیشترین میزان حذف در این تحقیق ۸۵/۹۹ درصد بود.(۱۰)

فسفات

مطابق با نتایج، در جدول ۲ مقادیر فسفات برای تیمارهای مختلف آورده شده است. بیشترین میزان نیترات در روز اول مربوط به تیمار ۱۰۰ درصد و کمترین میزان نیترات مربوط به تیمار ۲۵ درصد بوده است و بین این دو تیمار اختلاف معنی‌دار مشاهده شده است (P<۰/۰۵). همچنین، بیشترین میزان فسفات در روز سوم مربوط به تیمار ۱۰۰ درصد و کمترین میزان فسفات مربوط به تیمار ۲۵ درصد مشاهده شده است و بین این دو تیمار نیز اختلاف معنی‌دار مشاهده شده است (P<۰/۰۵). در روز پنجم، بیشترین میزان فسفات در تیمار ۱۰۰ درصد و کمترین میزان فسفات در تیمار ۵۰ درصد مشاهده شده است و بین این دو تیمار نیز اختلاف معنی‌دار مشاهده شده است (P<۰/۰۵). همچنین، در روز هفتم بیشترین میزان فسفات در تیمار ۱۰۰ درصد و کمترین میزان فسفات در تیمار ۲۵ درصد مشاهده شده است و بین این دو تیمار نیز اختلاف معنی‌دار وجود داشت (P<۰/۰۵). در روز نهم نیز بیشترین میزان فسفات در تیمار ۱۰۰ درصد و کمترین میزان فسفات در تیمار ۵۰ درصد مشاهده شده است و بین این دو تیمار نیز اختلاف معنی‌دار وجود داشت (P<۰/۰۵).

جدول ۲- آزمون اثرات محیط کشت، غلظت جلبک و رقت روی میزان حذف فسفات. حروف کوچک متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارها می باشد (P<۰/۰۵).

تیمار (٪)	روزاول	روزسوم	روزپنجم	روز هفت	روزنهم
۲۵	٥/٧٤± ٤/٥٨^{d}	٤/٥٩±١/٥٢ ^{d}	٣/٢٣±٢/٥١^{d}	٣/٠٥±٢/٥١^{d}	-
٥٠	٦/٩٦±٦/٠٢^{c}	٥/٩٨±٢/٦٤ ^{c}	٥/٢٧±٢/٥١^{b}	٤/٥± ٣/٠٦^{b}	٤/٠٤±٢/٥٨^{c}
٧٥	٧/٥٦±٤/٥^{b}	٦/١٨±٣ ^{b}	٥/٠٥± ٣/٠٥^{c}	٤± ٢/٨٦^{c}	٣/٤±١/٠٥^{b}
١٠٠	٨/٠١±٣/٥^{a}	٧/٠٧±٢/٦٤ ^{a}	٥/٦٧±٣/٥١^{a}	٥/٣٦±٣^{a}	٤/٥٨±٢/٥١^{a}

فسفر یکی از آلاینده‌های معدنی موجود در فاضلاب است که به‌عنوان یکی از مشکل‌ترین عناصر برای حذف در نظر گرفته می‌شود. روش‌های حذف فسفر شامل جامد سازی و ته‌نشینی می‌باشد (۲۰). علاوه براین، در شرایط هوازی، می‌توان فسفر را به وسیله جذب مستقیم سلولی از فاضلاب حذف کرد. فسفر به عنوان یک محدودکننده در رشد جلبک‌ها شناخته شده است، بنابراین سلول‌های جلبکی می‌توانند آن را از محیط جذب و ذخیره کرده و باعث کاهش آن در پساب شوند. در این مطالعه، مشاهده شد که میزان حذف فسفر در تیمارهای رقیق‌تر کمتر از تیمارهای غلیظتر است و در کل، روند کلی حذف فسفر مشابه نیترات است (Almomani et al., 2019). به‌طور کلی، به‌نظر می‌رسد که ریزجلبک اسپیرولینا در حذف نیترات و فسفر به‌طور مشابه عمل می‌کند. Olguin و همکاران (۲۰۰۳) با کشت اسپیرولینا پلاتنسیس در فاضلاب خوکی، میزان حذف فسفات را تا ۷۲-۸۷٪ کاهش دادند که با نتایج مطالعه ما مشابه است(۲۱). در تصفیه فاضلاب خوکی با استفاده از جلبک ***S. platensis***، درصد حذف فسفات را ۶۷٪ گزارش کردند. در تحقیقی که انجام شد(۲۲)، مشاهده شد که بیشترین درصد حذف فسفات پس از تصفیه با جلبک ***S. platensis*** در غلظت ۷/۵٪ پساب لبنی بود که معادل ۹۵/۶۷٪ بود و کمترین درصد حذف فسفات در غلظت ۱٪ این پساب بود که معادل ۷۸/۴۶٪ بود.

آمونیاک

با توجه به نتایج جدول ۳، مشاهده می‌شود که بیشترین میزان آمونیاک در روز اول به تیمار ۱۰۰ درصد تعلق داشته و کمترین میزان آن مربوط به تیمار ۲۵ درصد است. بین این دو تیمار، اختلاف معنی‌داری وجود دارد (P<۰/۰۵). همچنین، در روز سوم نیز بیشترین میزان آمونیاک به تیمار ۱۰۰ درصد و کمترین میزان آن به تیمار ۲۵ درصد تعلق دارد و بین این دو تیمار نیز اختلاف

معنی‌داری وجود دارد (P<۰/۰۵). در روز پنجم، بیشترین میزان آمونیاک در تیمار ۱۰۰ درصد و کمترین آن در تیمار ۵۰ درصد مشاهده می‌شود و بین این دو تیمار نیز اختلاف معنی‌داری وجود دارد (P<۰/۰۵). در روز هفتم، بیشترین میزان آمونیاک در تیمار ۱۰۰ درصد و کمترین میزان آن در تیمار ۲۵ درصد مشاهده می‌شود و بین این دو تیمار نیز اختلاف معنی‌دار وجود دارد (P<۰/۰۵). در روز نهم، بیشترین میزان آمونیاک در تیمار ۱۰۰ درصد و کمترین میزان آن در تیمار ۵۰ درصد مشاهده می‌شود و بین این دو تیمار نیز اختلاف معنی‌داری وجود دارد (P<۰/۰۵).

جدول ۳- آزمون اثرات محیط کشت، غلظت جلبک و رقت روی میزان حذف آمونیاک. حروف کوچک متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارها می باشد (P<۰/۰۵).

تیمار (٪)	روزاول	روزسوم	روزپنجم	روز هفت	روزنهم
۲۵	۲۷/۳۷±۱/۰۹^{d}	۲۰/۵۳±۰/۷۹ ^{d}	۱۲/۳۳±۱/۱۶^{c}	۸/۵۵±۱/۲۶^{b}	-
۵۰	۳۱/۹۴±۱/۵۵^{c}	۲۴/۳±۰/۷۱ ^{c}	۱۲/۶۲±۰/۶۱^{c}	۸/۶۵±۰/۶۹^{b}	۴/۵۲±۰/۷۹^{a}
۷۵	۳۷/۵۷±۰/۸۵^{b}	۲۹/۰۳±۰/۹۶ ^{b}	۱۷/۶۶±۰/۷۳^{b}	۹/۱۵±۱/۱۴^{b}	۱/۹۲±۰/۲۸^{b}
۱۰۰	۴۱/۸۴±۱/۴۸^{a}	۳۲/۸۶±۱/۱۷ ^{a}	۲۰/۸۳±۱/۱۳^{a}	۱۲/۷۳±۱/۱۶^{a}	۵/۵۱±۰/۶^{a}

آمونیاک درpH های بالا، عمدتاً به صورت غیریونیزه (NH3) و سمی است، در حالی که درpH های پایین، میزان سمیت آن کمتر بوده و به صورت یونیزه (+NH4) حضور دارد. افزایش pH و دما باعث جذب و حذف آمونیاک می‌شود (۲۳). همچنین، افزایش غلظت آمونیاک در محیط منجر به سمیت برای سیانوباکتری‌ها و ریزجلبک‌ها می‌شود، و در چنین مواردی، مقدار زیادی آمونیاک به جو آزاد می‌شود. با این حال، سمیت در ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس کمتر است. رشد ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس در فاضلاب حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک متوقف می‌شود (۲۴). سیانوباکتری‌ها قادرند گاز نیتروژن را درون آمونیاک تثبیت کنند و می‌توانند آن را در ترکیبات نیتروژنی مانند آمینواسیدها یافت کنند. در غیر این صورت، گاز نیتروژن به بیرون دفع می‌شود. افزایش غلظت آمونیاک می‌تواند منجر به توقف جذب نیترات شود؛ زیرا آمونیاک باعث توقف تولید نیترات ردوکتاز می‌شود. همچنین، افزایش غلظت نیترات نیز می‌تواند منجر به توقف جذب آمونیاک گردد. Hena و همکاران (۲۰۱۵) گزارش دادند که غلظت آمونیاک در فاضلاب لبنی با غلظت اولیه ۰/۹۹۸ میلی‌گرم بر لیتر، با کشت کنسرسیوم جلبکی و افزایش بیومس، طی ۱۸ ساعت به صفر می‌رسد(۱۰). در یک مطالعه دیگر توسط Hena و همکاران (۲۰۱۸)، آمونیاک موجود در فاضلاب لبنی با استفاده از ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس به نسبت ۱۰۰٪ حذف شد(۲۵). Olguin و همکاران (۲۰۰۳) با کشت ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس در فاضلاب خوکی، میزان آمونیاک را بین ۸۴ تا ۹۶٪ کاهش دادند(۲۶)، که با نتایج تحقیق حاضر سازگار است. همچنین، بالاترین درصد حذف آمونیاک در تحقیق حاضر ۹۵٪ است. Chang و همکاران (۲۰۱۳) نیز اعلام کردند که اسپیرولینا پلاتنسیس باعث کاهش ۹۷٪ آمونیاک در ادرار می‌شود. در مطالعهSandeep و همکاران (۲۰۱۵) نیز میزان حذف آمونیاک در آب دریا با استفاده از ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس را بین ۱۰ تا ۲۰٪ گزارش کردند(۱۷)، که این میزان کمترین میزان حذف آمونیاک در این مطالعه بود. Markou و همکاران (۲۰۱۵) با کشت ریزجلبک‌های اسپیرولینا پلاتنسیس و کلرلا ولگاریس در فاضلاب مرغی، درصد حذف آمونیاک و فسفات را بیش از ۹۹٪ گزارش کردند. مطالعه توسط Jiang و همکاران (۲۰۲۰) نشان داد که جلبک‌ها تنها زمانی می‌توانند از نیترات استفاده کنند که مقدار آمونیوم صفر یا کمتر از یک حد مشخص باشد. این به دلیل نیاز به زمان برای تولید آنزیم‌هایی مانند نیترات ردوکتاز جلبکی است که برای استفاده از نیترات به آن نیاز دارند(۲۷).

زیست توده

بررسی نتایج جدول ۴ نشان می‌دهد که تیمارهای ۷۵ و ۵۰ درصد دارای روند مشابه در تغییرات زیست توده بوده‌اند. در واقع، تیمار ۵۰ درصد در روز هفتم و تیمار ۷۵ درصد در روز نهم آزمایش حداکثر مقدار زیست توده را نشان داده‌اند. به عبارت دیگر، در این دو تیمار، زیست توده به مقدار بیشینه خود رسیده است. در مقابل، تیمار ۱۰۰ درصد از ابتدای آزمایش با تفاوت، مقادیر بیشتری از زیست توده را نسبت به سایر تیمارها نشان داده است و در نهایت به حداکثر مقدار خود رسیده است. همچنین، مطالعه نشان می‌دهد که در طول آزمایش، میزان زیست توده در رقت‌های مختلف پساب و در غلظت اولیه جلبک (با مقدار ۰/۰۱ گرم بر لیتر) به‌طور قابل توجهی و معنی‌داری افزایش یافته است ($P<0/05$). بیشترین شیب افزایش مربوط به تیمار ۲۵ درصد مشاهده شده است. از نظر زیست توده، تیمارهای ۷۵ و ۵۰ درصد دارای روند مشابهی بوده‌اند، به این معنی که تغییرات زیست توده در این دو تیمار به شکل مشابهی رخ داده است.

جدول ۴- آزمون اثرات محیط کشت، غلظت جلبک و رقت روی میزان زیست توده. حروف کوچک متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارها می باشد ($P<0/05$).

تیمار (٪)	روز اول	روز سوم	روز پنجم	روز هفت	روز نهم
۲۵	۰/۱±۰/۰۰۱^{a}	۰/۱٤±۰/۰۰٤^{b}	۰/۳٦±۰/۰۰٤^{a}	۰/۳۸±۰/۰۰۳^{d}	-
۵۰	۰/۱±۰/۰۰۳^{a}	۰/۱٦±۰/۰۰۳^{b}	۰/۲۳±۰/۰۰٤^{d}	۰/٤۲±۰/۰۰٦^{c}	۰/٤۱±۰/۰۰۳^{c}
۷۵	۰/۱±۰/۰۰۲^{a}	۰/۲۱±۰/۰۰٤^{a}	۰/۳۱±۰/۰۰۵^{c}	۰/۷±۰/۰۰٤^{b}	۰/۸۹±۰/۰۰۸^{b}
۱۰۰	۰/۱۱±۰/۰۱^{a}	۰/۲۵±۰/۰٤^{a}	۰/۳۳±۰/۰۰٤^{a}	۰/۸۱±۰/۰۰۵^{a}	۰/۹۱±۰/۰۰۷^{a}

میزان حذف عمده به تولید ریزجلبک بستگی دارد. هر چه حذف نیتروژن و فسفر از فاضلاب بیشتر باشد، زیست توده بیشتری تولید می‌شود. با این حال، در ادامه، به دلیل کاهش مواد مغذی یا عوامل دیگر، این روند کاهش می‌یابد (۲۸). همچنین، Sukumaran و همکاران (۲۰۱۴) با کشت اسپیرولینا پلاتنسیس در پساب کارخانه روغن‌زیتون، متوجه شدند که مقدار زیست توده اسپیرولینا در رقت ۱ درصدی پساب به ۱/۸ گرم بر لیتر زیست توده و ۰/۲۱۶ گرم بر لیتر فیکوسیانین رسید(۲۹). این نتایج با مطالعه ما همخوانی دارد. تحقیقات Zhou و همکاران (۲۰۱۷) برای بررسی پتانسیل ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس در تصفیه فاضلاب شور، که ترکیبی از آب دریا و آب شیرین به نسبت‌های ۳:۷ و ۵:۵ بود(۳۰)، با نتایج مطالعه حاضر همخوانی داشت. همچنین، Syaichurrozi و همکاران (۲۰۱۷) تأثیر پساب توفو بر رشد اسپیرولینا پلاتنسیس را مورد بررسی قرار دادند و متوجه شدند که پساب با نسبت ۶ درصد نسبت به سایر تیمارها، بیشترین تولید زیست توده را به همراه داشت. در تحقیق انجام شده توسط Lu و همکاران (۲۰۱۷)، ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس به مدت ۵ روز در رقت‌های ۱۰٪، ۲۰٪ و ۵۰٪ فاضلاب آبجو کشت شد. نتایج حاکی از آن بود که فاضلاب با غلظت ۵۰٪ به دلیل حجم زیاد و کدورت بالا که باعث نفوذ نور نمی‌شود، فتوسنتز را کاهش داده و برای رشد ریزجلبک مناسب نیست. همچنین در رقت ۱۰٪، رقیق‌سازی باعث کاهش غلظت مواد مغذی و کاهش بعضی از این مواد شده و باعث کاهش رشد اسپیرولینا پلاتنسیس می‌شود. در تحقیق دیگری که توسط Pham و همکاران (۲۰۲۰) انجام شد، به منظور بررسی کارایی حذف مواد مغذی از فاضلاب کود گیاهی، غلظت‌های مختلفی از جلبک سندسموس (۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر) به عنوان زیست توده ابتدائی استفاده شد. نتایج نشان داد که غلظت ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر این ریزجلبک بهترین تیمار برای حذف مواد مغذی بود. همچنین، با افزایش زیست توده ابتدائی ریزجلبک، جذب مواد مغذی در

فاضلاب افزایش یافته است. به عنوان مثال، با افزایش زیست توده ابتدائی ریزجلبک از ۰/۵ به ۰/۱ گرم بر لیتر، جذب مواد مغذی مانند نیترات، فسفات و آمونیاک در فاضلاب لبنی افزایش یافته است.

اسید آمینه و نرخ سنتز و تجمع پروتئین

با توجه به نتایج جدول ۵، مشاهده می‌شود که با افزایش درصد رقیق‌سازی پساب، میزان پروتئین افزایش می‌یابد. به عبارت دیگر، درصد رقیق‌سازی مستقیماً به میزان پروتئین موجود در پساب تأثیر می‌گذارد. به عنوان مثال، تیماری که از پساب با غلظت ۱۰۰ درصد استفاده شده است، مقدار بیشتری پروتئین نسبت به تیماری که از پساب با غلظت ۲۵ درصد استفاده شده است، دارد. میزان پروتئین در روز آخر آزمایش در تمامی تیمارها تفاوت معنی‌داری را نشان داد ($P<۰/۰۵$). لذا محیط کشت پساب می‌تواند به عنوان یک محیط مناسب برای تولید پروتئین استفاده شود.

جدول۴-۶-اثر محیط کشت، غلظت جلبک و رقت روی میزان پروتئین. حروف کوچک متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارها می باشد ($P<۰/۰۵$).

تیمار	رقت۲۵٪	رقت۵۰٪	رقت ۷۵٪	رقت ۱۰۰٪
مقدار پروتئین	۲۱/۱۱±۱/۷٤^{c}	۳۸/۷۲±۲/٦۷^{b}	٤۸/۷٦±۱/۳٥^{a}	٥۲/٦٦±۳/۲۰^{a}

بر اساس نتایج جدول ۶، مشاهده گردیدکه سطوح اسیدآمینه‌های جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس در روز آخر آزمایش در رقت و غلظت‌های مختلف پساب متفاوت هستند. اسیدآمینه‌های Aspartic acid و Ornithine به ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین میزان خود را با اختلاف فراوان در مقایسه با سایر اسیدآمینه‌ها در هر رقت نشان داده‌اند. به‌علاوه، مقادیر Ornithine در تیمار رقت ۲۵ درصد فاضلاب به صفر گزارش شده است. در اکثر اسیدهای آمینه، بیش‌ترین و کم‌ترین میزان آمینواسید به ترتیب در رقت‌های ۱۰۰ درصد و ۲۵ درصد پساب مشاهده شده است.

جدول ۶- اثر محیط کشت، غلظت جلبک و رقت روی مقدار اسیدآمینه. حروف کوچک متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارها می باشد ($P<۰/۰۵$).

تیمار	رقت۲۵٪	رقت۵۰٪	رقت۷۵٪	رقت۱۰۰٪
Aspartic acid	۸/۲۸ ±۰/٦۳^{c}	۹/۲٤ ±۰/٤٤^{c}	۱۳/٥۱ ±۰/۸٥^{b}	۱٦/۳۳ ±۰/٥۹^{a}
Threonine	۱/۱٥ ±۰/۱۱^{c}	۱/٤۲ ±۰/۰٥^{c}	۱۰/٤۱ ±۰/۷۳^{b}	۱۱/۳٥ ±۰/۳۳^{a}
Serine	۱/۲۱ ±۰/۰٦^{c}	۱/٤۷ ±۰/۰٦^{c}	۲/٤۹ ±۰/۰٦^{b}	۳/۲۰ ±۰/۳۰^{a}
Glutamic acid	۹/۲٤ ±۰/۳٦^{c}	۹/۸۲ ±۰/٥٥^{a}	۲/٦۸ ±۰/۰۸^{c}	۳/۹۲ ±۰/۰۷^{b}
Glycine	۱/۳۱ ±۰/۱٤^{c}	۲/۳۱ ±۰/۰۹^{b}	۱۱/۱۹ ±۰/۲٥^{a}	۱۰/۹۹ ±۰/۳۹^{a}
Alanine	٤/۲٤ ±۰/۰۷^{c}	٦/۲۹ ±۰/۰٤^{a}	٤/۱۷ ±۰/۰٤^{c}	٤/۸۲ ±۰/۰٥^{b}
Valine	۲/۱۰ ±۰/۰۳^{d}	٤/۱۱ ±۰/۰۳^{c}	۸/۷ ±۰/۰۹^{a}	۷/۸ ±۰/۱۲^{b}
Cystine	۰/۱۲ ±۰/۰۱^{d}	۰/۲٥ ±۰/۰۲^{c}	٦/۸۷ ±۰/۰۸^{b}	۷/۹ ±۰/۰٥^{a}
Methionine	۰/۸ ±۰/۰۳^{c}	۱/۰٥ ±۰/۰٤^{b}	۰/۸٤ ±۰/۰٥^{c}	۱/٥۸ ±۰/۰۹^{a}
Tryptophan	۰/۰٦ ±۰/۰۰٥^{d}	۰/٦۷ ±۰/۰۲^{c}	۱/٦۷ ±۰/۰۳^{b}	۲/۷٥ ±۰/۰۲^{a}
Leucine	۳/۱۹ ±۰/۰۱^{b}	٦/۰۷ ±۰/۰۳^{a}	۰/۹ ±۰/۰۲^{d}	۱/٦ ±۰/۰٥^{c}
Tyrosine	۳۱/±۹۲ ٥۳/۷^{a}	۲/٥۱ ±۰/۰۳^{a}	٤/۸۹ ±۰/۰۲^{a}	٤/۹٤ ±۰/۰۳^{a}
Phenylealanine	۱/۰٤ ±۰/۰٤^{d}	۲/٤۲ ±۰/۰۲^{c}	۳/۸۳ ±۰/۰۳^{b}	٤/۷۷ ±۰/۰۲^{a}
Ornithine	۰	۰/۰۳ ±۰/۰۰٥^{c}	۰/۰۷ ±۰/۰۱^{b}	۱/۰٥ ±۰/۰۳^{a}
Lysine	۰/٥۱ ±۰/۰۳^{b}	۲/۸۹ ±۰/۰٤^{a}	۰/۰۷ ±۰/۰۱^{b}	۰/۳٤ ±۰/٤٦^{b}
Histidine	۰/۳۱ ±۰/۲۳^{d}	۱/۳۱ ±۰/۰٦^{c}	٤/۰۷ ±۰/۰۷^{b}	٥/٦۱ ±۰/۱۰^{a}
Arginine	۲/٤٦ ±۰/٦٥^{b}	۳/٤٥ ±۰/۱۰^{a}	۲/۱۳ ±۰/۱۲^{b}	۳/٦٦ ±۰/۱۱^{a}
Hydroxyproine	۰/۰٦ ±۰/۰۱^{d}	۰/۳٦ ±۰/۰٥^{c}	٥/۳ ±۰/۱۲^{a}	٤/۷۰ ±۰/۰۸^{b}

Proline	۲/۳ ±۰/۰۹^{b}	۳/۱۸ ±۰/۱۹^{a}	۰/٦٦ ±۰/۰۸^{d}	۱/٥٤ ±۰/۰۸^{c}

اسپیرولینا پلاتنسیس به عنوان یک ریز جلبک می‌تواند جایگزین مناسبی برای منابع پروتئینی باشد و به عنوان یک مکمل غذایی با ارزش افزوده بالا مورد استفاده قرار گیرد (Andrade et al., 2018). این جلبک به دلیل داشتن میزان زیادی پروتئین در وزن خشک خود و هضم مناسب، اهمیت بالایی دارد (Shanthi et al., 2021). در واقع، اسپیرولینا پلاتنسیس با داشتن تقریباً ۴۶-۶۳ درصد پروتئین و همچنین حاوی اسیدهای آمینه ضروری، به عنوان یکی از بهترین منابع پروتئینی شناخته می‌شود و این مقادیر با گوشت و سویا قابل مقایسه است (Ramírez-Rodrigues et al., 2021). اگرچه همه پروتئین‌ها از ۲۱ اسیدآمینه اولیه تشکیل می‌شوند، اما بعضی از پروتئین‌ها یک یا تعدادی از این اسیدهای آمینه را ندارند. همچنین، حضور و مقدار اسیدهای آمینه در پروتئین‌ها، کیفیت آنها را نشان می‌دهد (Koyande et al., 2019). به طور کلی، برای بازیابی پروتئین‌های ارزشمند از پساب‌های لبنی، تحقیقات زیادی صورت گرفته است. پروتئین‌های لبنی محصولات با ارزشی هستند و دارای خواص تغذیه‌ای فراوانی می‌باشند (Terzioğlu et al., 2023). با توجه به نتایج در مورد میزان پروتئین در رقت‌ها و افزایش درصد رقیق‌سازی پساب، مشاهده می‌شود که مقدار پروتئین با افزایش درصد رقیق‌سازی پساب کاهش می‌یابد. به عبارت دیگر، تیماری که از پساب با غلظت ۱۰۰ درصد استفاده شده است، مقدار بیشتری پروتئین نسبت به تیماری که از پساب با غلظت ۲۵ درصد استفاده شده است، دارد. می‌توان ادعا کرد که حضور ترکیبات نیتروژنی مانند آمونیاک و نیترات، برای تولید پروتئین در سلول‌های جلبک اسپیرولینا ضروری است (۱۰). در مطالعه انجام شده توسط Lu و همکاران (۲۰۱۵)، ترکیب فاضلاب لبنی با فاضلاب کشتارگاهی مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که میزان پروتئین در زیست توده ریزجلبک اسپیرولینا با افزودن این ترکیبات تا ۹۸/۵۵-۶۶/۹۱ درصد افزایش می‌یابد. این زیست توده حاصل می‌تواند برای تغذیه جانداران استفاده شود. نتایج این مطالعه با تحقیق حاضر سازگاری دارد. در مطالعه Cruz-Martínez و همکاران (۲۰۱۵)، با استفاده از آمونیوم نیترات به عنوان منبع نیتروژن در کشت ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس، به نتیجه رسیده شد که شرایط بهینه برای مقدار پروتئین در زیست توده جلبک با شرایطی که رشد سلول را به حداکثر می‌رساند، یکسانیست. بیشترین مقدار پروتئین در این مطالعه برابر با ۶۳/۲ درصد بود. از بین اسیدهای آمینه مورد آنالیز، گلوتامیک اسید، آسپارتیک اسید، آلانین و لوسین به ترتیب به میزان ۴۳/۱۵٪ و ۴۵/۵۴٪ از پروفایل اسیدهای آمینه در زیست توده اسپیرولینا پلاتنسیس در ۱۰۰٪ پساب وجود داشت. مقدار کمترین اسید آمینه متعلق به اسید آمینه اورنیتین بود. در مطالعه دیگری نیز که توسط Lu و همکاران (۲۰۱۶) انجام شد، پرورش جلبک در سه نوع فاضلاب لبنی شامل مایع مادر، آب‌پنیر نمکی و آب‌پنیر مایع مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیشترین مقدار پروتئین به ترتیب در ۲۰ برابر رقیق‌سازی فاضلاب مایع مادر (۱۴/۴۹ درصد)، ۵ برابر رقیق‌سازی فاضلاب آب‌پنیر نمکی (۸۹/۴۳ درصد) و ۵ برابر رقیق‌سازی فاضلاب آب‌پنیر مایع (۱۶/۴۳ درصد) حاصل شد. این نتایج نیز با تحقیق فعلی در مورد افزایش مقادیر پروتئین با کاهش میزان رقیق‌سازی در فاضلاب آب‌پنیر نمکی و آب‌پنیر مایع سازگار است. در مطالعه Deshmane و همکاران (۲۰۱۶)، تصفیه پساب کارخانه قند و شکر با استفاده از ریزجلبک اسپیرولینا برای تولید پروتئین مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که هرچه میزان نیتروژن در دسترس بیشتر باشد، مقادیر پروتئین ریزجلبک بیشتر و در نتیجه زیست توده نهایی افزایش می‌یابد. آنها همچنین بیان کردند که تولید پروتئین می‌تواند به صنعت کمک کند تا درآمدزایی و بازپرداخت هزینه‌های تصفیه پساب را بهبود بخشد. Salla و همکاران (۲۰۱۶) بیان نمودند رقیق‌سازی محیط کشت زاروک به مقدار ۲۰ و ۳۰ درصد، باعث کاهش غلظت تمام مواد مغذی مثل نیتروژن می شود در واقع به دلیل کمبود مواد مغذی جهت سنتز پروتئین به ویژه نیتروژن، مقدار پروتئین ریز جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس کم می شود. در مطالعه حاضر هم با رقیق‌تر کردن محیط کشت زاروک و به دنبال آن کم شدن مواد مغذی میزان پروتئین نیز کم می شود. Lu و همکاران (۲۰۱۷) با توجه به این که اسپیرولینا پلاتنسیس اکثرا به دلیل میزان پروتئین بالای خود مورد توجه می باشد به بررسی میزان پروتئین اسپیرولینا پلاتنسیس رشد یافته در فاضلاب رقیق‌شده آبجو و محیط کشت مصنوعی پرداختند و بیان

کردند زیست توده رشد یافته در محیط کشت مصنوعی(۴۹/۸۵ درصد) مقادیر پروتئین بیش‌تری نسبت به فاضلاب رقیق‌شده (۳۷/۱۴ درصد) دارد. Wuang و همکاران (۲۰۱۶) کاربرد زیست توده اسپیرولینا پلاتنسیس تولیدشده از تصفیه فاضلاب آبزی‌پروری را به عنوان کود کشاورزی بررسی کردند و دریافتند که زیست توده حاصل حاوی ۴۸/۵ درصد پروتئین می‌باشد که نزدیک به حداکثر میزان پروتئین در رقت ۲۵ درصد پساب (۴۶/۳۵ درصد) بود. در تحقیق حاضر نیز با افزایش فاضلاب لبنی، میزان پروتئین از ۲۸/۹۸ درصد به ۵۶/۲۳ درصد افزایش یافت. Manjula و Subasri (۲۰۱۸) در بررسی ها ی خود بیان کردند بیشترین مقدار پروتئین اسپیرولینا پلاتنسیس (۵۹/۶ درصد) در تیمار حاوی ۲۰ میلی لیتر پساب کارخانه‌ی برنج و کمترین پروتئین (۵۵/۳ درصد) در تیمار حاوی ۱۰ میلی لیتر پساب کارخانه‌ی برنج بود(۳۱). بنابراین هرچه میزان پساب افزایش یابد، درصد پروتئین نیز افزایش می یابد که در تحقیق حاضر نیز به همین نتیجه رسیدیم.

نتیجه گیری

با افزایش زیست توده، مقادیر بیشتری از مواد مغذی استفاده می‌شود و توانایی سلول‌ها برای جذب مواد مغذی و رشد سلولی افزایش می‌یابد. به عبارت دیگر، کارایی پساب به عنوان محیط کشت جلبک به مقدار جلبکی که تزریق می‌شود بستگی دارد. با کاهش درصد رقیق‌سازی محیط کشت (پساب) و افزایش میزان مواد مغذی در دسترس، زیست توده ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس افزایش می‌یابد. به نظر می‌رسد محیط کشت پساب، برای تولید پروتئین و درصد اسیدهای آمینه ضروری، مناسب است. همچنین، غلظت ثانویه ریزجلبک نسبت به غلظت اولیه، عملکرد بهتری را ارائه می‌دهد و با کاهش درصد رقیق‌سازی، میزان پروتئین ریزجلبک افزایش می‌یابد. بنابراین، این ریزجلبک‌ها می‌توانند به عنوان منبع پروتئین برای تغذیه جانداران در پساب صنایع غذایی کشت شوند. البته، برای استفاده انسانی از این محصول، به دلیل احتمال حضور فلزات سنگین و آلودگی باکتریایی در زیست توده جلبکی حاصل از فاضلاب، توصیه می‌شود احتیاط لازم و آزمایش‌های استاندارد مربوطه انجام شود. با این حال، نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که مقادیر پروتئین و اسیدهای آمینه ضروری در پساب در سطح قابل قبولی قرار دارند.

منابع

1. Garrido-Cardenas, J. A., Manzano-Agugliaro, F., Acien-Fernandez, F. G., & Molina-Grima, E. (2018). Microalgae research worldwide. *Algal research*, *35*, 50-60.
2. Torres-Tiji, Y., Fields, F. J., & Mayfield, S. P. (2020). Microalgae as a future food source. *Biotechnology advances*, *41*, 107536.
3. Soni, R. A., Sudhakar, K., & Rana, R. S. (2019). Comparative study on the growth performance of Spirulina platensis on modifying culture media. *Energy Reports*, *5*, 327-336.
4. Soni, R. A., Sudhakar, K., & Rana, R. S. (2017). Spirulina–From growth to nutritional product: A review. *Trends in food science & technology*, *69*, 157-171.
5. Ramírez-Rodrigues, M. M., Estrada-Beristain, C., Metri-Ojeda, J., Pérez-Alva, A., & Baigts-Allende, D. K. (2021). Spirulina platensis protein as sustainable ingredient for nutritional food products development. *Sustainability*, *13*(12), 6849.
6. Zhang, F., Man, Y. B., Mo, W. Y., & Wong, M. H. (2020). Application of Spirulina in aquaculture: a review on wastewater treatment and fish growth. *Reviews in Aquaculture*, *12*(2), 582-599.
7. Bhatt, P., Bhandari, G., Turco, R. F., Aminikhoei, Z., Bhatt, K., & Simsek, H. (2022). Algae in wastewater treatment, mechanism, and application of biomass for production of value-added product. *Environmental Pollution*, *309*, 119688.

8. Wollmann, F., Dietze, S., Ackermann, J. U., Bley, T., Walther, T., Steingroewer, J., & Krujatz, F. (2019). Microalgae wastewater treatment: Biological and technological approaches. *Engineering in Life Sciences*, *19*(12), 860-871.
9. Kaur, N. (2021). Different treatment techniques of dairy wastewater. *Groundwater for Sustainable Development*, *14*, 100640.
10. Hena, S., Znad, H., Heong, K. T., & Judd, S. (2018). Dairy farm wastewater treatment and lipid accumulation by Arthrospira platensis. *Water research*, *128*, 267-277.

11. Hassanzadeh, H., Lotfi, P., & Qanbarzadeh, B. (2018). An overview of the applications of Spirulina platensis algae in improving the nutritional and functional properties of dairy products and its use in the recycling of dairy industry waste. *Iranian Journal of Food Sciences and Industries*, *20*(141), 176-199.
12. Jiang, L., Ma, G., Zhang, S., Han, F. 2015. Integrated campus sewage treatment and biomass production by *Scenedesmus quadricauda* SDEC-13. *Bioresource Technology*. 175: 262–268.

13. Han, L., Pei, H., Hu, W., Jiang, L., Ma, G., Zhang, S., Han, F. 2015. Integrated campus sewage treatment and biomass production by Scenedesmus quadricauda SDEC-13. Bioresource Technology. 175: 262–268.

14. Ashekuzzaman, S. M., Forrestal, P., Richards, K., & Fenton, O. (2019). Dairy industry derived wastewater treatment sludge: Generation, type and characterization of nutrients and metals for agricultural reuse. *Journal of Cleaner Production*, *230*, 1266-1275.
15. Costa, J. A. V., Cruz, C. G., & da Rosa, A. P. C. (2021). Insights into the technology utilized to cultivate microalgae in dairy effluents. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *35*, 102106.
16. Lim, H. R., Khoo, K. S., Chew, K. W., Chang, C. K., Munawaroh, H. S. H., Kumar, P. S., ... & Show, P. L. (2021). Perspective of Spirulina culture with wastewater into a sustainable circular bioeconomy. *Environmental Pollution*, *284*, 117492.

17. Jiang, X., Shan, X., & Li, F. (2023). Improving the Quality of Reclaimed Water via Applying Spirulina platensis to Eliminate Residual Nitrate. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *20*(3), 2117.
18. Sandeep, K. P., Shukla, S. P., Vennila, A., Purushothaman, C. S., & Manjulekshmi, N. (2015). Cultivation of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* in low cost seawater based medium for extraction of value added pigments. Indian Journal of Geo-Marine Sciences (IJMS), 44(3), 384-393.
19. Kabariya, J. H., & Ramani, V. M. (2018). Dairy wastewater treatment by cyanobacteria for removal of nutrients with extraction of high value compounds from biomass. *Int J Curr Microbiol App Sci*, *7*, 1527-1538.
20. Liang, C., Zhang, N., Pang, Y., Li, S., Shang, J., Zhang, Y., ... & Fei, H. (2023). Cultivation of Spirulina platensis for nutrient removal from piggery wastewater. *Environmental Science and Pollution Research*, *30*(36), 85733-85745.
21. Cheunbarn, S., & Peerapornpisal, Y. J. I. J. A. B. (2010). Cultivation of Spirulina platensis using anaerobically swine wastewater treatment effluent. *Int. J. Agric. Biol*, *12*(4), 586-590.
22. Kulkarni, S. D., Auti, T., & Saraf, S. (2016). Bioremediation study of dairy effluent by using Spirulina platensis. *Res. J. Life Sci. Bioinform. Pharm. Chem. Sci*, *1*(6), 325.

23. Abdelfatah, A. G. E., Ali, M. A., & Abdelbary, K. M. (2022). Recent Used Techniques and Promised Solutions for Biofiltration Treatment of Fish Wastewater. *Egyptian Journal of Chemistry*, *65*(11), 181-197.
24. Ashour, M., Alprol, A. E., Heneash, A. M., Saleh, H., Abualnaja, K. M., Alhashmialameer, D., & Mansour, A. T. (2021). Ammonia bioremediation from aquaculture wastewater effluents using

arthrospira platensis niof17/003: Impact of biodiesel residue and potential of ammonia-loaded biomass as rotifer feed. *Materials*, *14*(18), 5460.
25. Hena, S., Znad, H., Heong, K. T., & Judd, S. (2018). Dairy farm wastewater treatment and lipid accumulation by Arthrospira platensis. *Water research*, *128*, 267-277.
26. Olguín, E. J., Galicia, S., Mercado, G., & Pérez, T. (2003). Annual productivity of Spirulina (Arthrospira) and nutrient removal in a pig wastewater recycling process under tropical conditions. *Journal of applied phycology*, *15*, 249-257.
27. Jiang, X., Gao, G., Zhang, L., Tang, X., Shao, K., & Hu, Y. (2020). Denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium in freshwater lakes of the Eastern Plain, China: Influences of organic carbon and algal bloom. *Science of the Total Environment*, *710*, 136303.
28. Araujo, G. S., Santiago, C. S., Moreira, R. T., Neto, M. P. D., & Fernandes, F. A. (2021). Nutrient removal by Arthrospira platensis cyanobacteria in cassava processing wastewater. *Journal of Water Process Engineering*, *40*, 101826.
29. Sukumaran, P., Nulit, R., Zulkifly, S., Halimoon, N., Omar, H., & Ismail, A. (2014). Potential of fresh POME as a growth medium in mass production of Arthrospira platensis. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, *3*(4), 235-250.
30. Zhou, W., Li, Y., Gao, Y., & Zhao, H. (2017). Nutrients removal and recovery from saline wastewater by Spirulina platensis. *Bioresource technology*, *245*, 10-17.
31. Manjula, M., & Subasri, J. (2018). Biochemical analysis of spirulina platensis (single cell protein, scp) under in different concentration of rice mill effluent. *International Journal of Current Research in Life Sciences*, *7*(04), 1539-1541.

Assessment of Protein Synthesis and Accumulation Rate in Cultivated Spirulina (*Spirulina platensis*) Microalgae in Dairy Industry Wastewater

Abstract

Microalgae, photosynthetic microorganisms, are highly valued due to their protein, lipid, and carbohydrate compounds. They are capable of thriving in environments rich in organic and mineral substances, making them highly effective in industrial wastewater treatment. Moreover, microalgae possess antioxidant, anti-inflammatory, and antimicrobial properties. The main objective of this study was to investigate the impact of wastewater dilution ratio on protein accumulation in Spirulina microalgae. By altering the wastewater dilution ratio in the cultivation medium, the effect on protein synthesis and accumulation processes in Spirulina was evaluated. The study consisted of 4 treatments and a control group, where the treatments involved different levels of wastewater utilization, and the control group utilized only the culture medium without wastewater. Furthermore, nutrient levels including nitrates, phosphates, and ammonia were measured in both wastewater samples and the culture medium. For protein and amino acid analysis, the *S. platensis* microalgae samples were separated using centrifugation and then the algal biomass was dried. The samples were stored at an appropriate freezing temperature. The total protein content of each sample was measured. For measuring crude protein, the samples were digested, and then the crude protein content was calculated. Subsequently, the amino acid profile of the microalgal treatment with the highest protein content was determined and prepared for the next phase of analysis. The results indicated that the 100% treatment had the highest levels of nitrates, phosphates, ammonia, biomass, and protein, while the 25% treatment showed the lowest levels. Additionally, similar trends in biomass variations were observed in the 75% and 50% treatments. In the analysis of amino acids, different levels were observed among the different treatments, with Aspartic acid showing the highest amount and Ornithine showing the lowest amount. Overall, the results of this study demonstrated that the use of wastewater as a water source in the cultivation of Spirulina platensis microalgae can lead to significant improvements in growth and the production of nutrients and biochemical compounds in these algae. Furthermore, for optimal utilization of wastewater, adjusting the concentration ratios of different wastewater components can be considered, and further studies can be conducted to enhance cultivation conditions and investigate the biochemical changes in microalgae.

Keywords: Microalgae, *Spirulina platensis*, Wastewater Treatment, Growth