



حذف فسفات و نیترات از پساب شهری به وسیله کشت جلبک و تولید زیست توده *Scenedesmus obliquus*

محمد هادی ابوالحسنی^{۱*}، سید عباس حسینی^۱، رسول قربانی^۱، اردگ وینسه^۲

^۱ گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

^۲ موسسه زیست شناسی گیاهی مجارستان

نوع مقاله:

پژوهشی

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۹۴/۰۲/۰۴

اصلاح: ۹۴/۰۵/۲۹

پذیرش: ۹۴/۰۷/۱۰

چکیده

پساب‌های شهری دارای مقدار زیادی فسفات و نیترات هستند. برای ارزیابی کارایی جلبک سبز *Scenedesmus obliquus* در حذف نیترات و فسفات از پساب شهری و نیز کاربرد آن به عنوان یک محیط کشت مناسب برای جلبک سندسموس ابليکوس، پساب تصفیه شده از خروجی تصفیه خانه مرکزی شهرستان گرگان جمع آوری شد. سه تیمار این آزمایش که هر کدام شامل ۶ تکرار بود پساب‌هایی با ۱۰۰٪ (S100)، ۵۰٪ (S50) و ۰٪ (S0) رقت بودند. نتایج نشان داد که جلبک سندسموس ابليکوس به خوبی می‌تواند در پساب‌ها رشد کرده و ۱۰۰٪ فسفات (تیمار S100) و ۱۰۰٪ نیترات (در هر ۳ تیمار) را حذف کند. بیشترین میزان زیست توده تولیدی (۰/۶ گرم در لیتر)، میزان کلروفیل a (۴/۸۷ میلی گرم در لیتر) و تعداد سلول (۱۰^۶ سلول در میلی لیتر) در تیمار S0 دیده شد. با توجه به نتایج این تحقیق به نظر می‌رسد که این جلبک می‌تواند برای حذف فسفات و نیترات و نیز تولید زیست توده جلبکی در سیستم‌های پالایش پساب شهری قبل از ورود به محیط طبیعی مورد استفاده قرار گیرد. همچنین پساب تصفیه خانه شهری می‌تواند به عنوان محیط کشتی مناسب برای تولید انبوه این جلبک استفاده شود.

کلمات کلیدی:

پساب شهری

زیست توده

نیترات

مقدمه

مواد دفعی، استفاده از آب در زندگی روزمره، مواد شوینده و سایر فعالیت‌های انسانی به خصوص ساخت و ساز و کشاورزی مقدار زیادی نیتروژن و فسفر را به اکوسیستم‌های آبی وارد می‌کند. این غنی شدن توسط مواد مغذی و یوتیریفیکاسیون منابع آبی می‌تواند روی ساختار و عملکرد اکوسیستم اثر گذاشته و علاوه بر آسیب به تنوع زیستی، پایداری و تعادل آن اکوسیستم را نیز به هم بریزد. این آلودگی‌ها در نهایت مضرات زیادی برای خود انسان خواهد داشت. به همین دلیل باید با روشی مناسب از ورود مواد مغذی مازاد به اکوسیستم‌های آبی جلوگیری کرد. سیستم‌های کشت جلبک می‌تواند کارایی‌های زیادی نظیر تولید غذا برای موجودات مختلف، تصفیه فاضلاب و جذب مواد مغذی و تولید مواد شیمیایی و آرایشی- بهداشتی داشته باشد (De la Noiie and Proulx, 1988). جلبک‌ها توانایی جذب مواد مغذی نیتروژن‌دار و فسفردار را به منظور فتوسنترز، تولید رنگدانه و پروتئین دارند. جلبک‌هایی مانند *Scenedesmus obliquus* به دلیل داشتن مقاومت در برابر تغییرات دما و pH، توانایی جذب مواد مغذی حتی در غلظت پایین را دارند و همچنین دارای فناوری ساده و ارزان تولید هستند (Yalcin et al., 2006; Voltolina et al., 2004).

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: Hadi.mha2001@yahoo.com

گسترده در آب‌های جهان وجود دارد (Lee *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2010). Li و همکاران (2010) با استفاده از جلبک سندسموس توانستند مواد نیتراته موجود در پساب را حذف کنند و اعلام کردند که این جلبک توانایی زیستن و جذب مواد را تحت دستکاری و سیستم‌های پرورشی دارد. این مطالعه در غلظت‌های مختلفی از فاضلاب شهری انجام شده است. کمبود یا مازاد مواد مغذی می‌تواند نقش بازدارنده‌گی برای رشد جلبک و کارایی آن در جذب مواد مغذی داشته باشد (Kong *et al.*, 2010). از این‌رو، هدف از انجام این مطالعه بررسی کارایی و میزان رشد جلبک *S. obliquus* در جذب مواد مغذی فاضلاب شهری در غلظت‌های مختلف می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع آوری جلبک *S. obliquus* از آب استخرهای خاکی سیچوال در استان گلستان صورت گرفت. جلبک سندسموس پس از مشاهده با میکروسکوپ اینورت مدل CETI ساخت بلژیک به کمک کلیدهای موجود شناسایی شد و با استفاده از روش Lavens و Sorgeloos (1996)، با کشت بر روی آگار خالص سازی شد. بعد از حصول اطمینان از خالص بودن جلبک‌های جداسازی شده، آنها را در اrlen مایرهای ۲ لیتری درون محیط کشت Zinder (به اختصار N+Z8) کشت داده تا ذخیره‌ی اولیه جلبک برای آزمایش به دست آمد (Komarek 1973; Miller *et al.*, 1978). دوره‌ی نوری برای کشت جلبک ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در نظر گرفته شد. برای منبع نوری ۲ لامپ فلوروستنت در فاصله ۲۰ میلی‌متری ستون قرار داده شد که تولید کننده‌ی ۲۵۰۰ لوکس نوری بود. همچنین دما 24 ± 2 تنظیم شد (Piri and Ordog, 1997).

به منظور بررسی ارزیابی اثر کارایی جلبک *S. obliquus* بر پساب شهری غنی از ترکیبات نیتروژن‌دار و فسفردار، آزمایشی با ۴ تیمار و ۶ تکرار در طرح کاملاً تصادفی انجام شد. برای انجام این آزمایش، پساب شهری از تصفیه خانه‌ی اصلی شهر گرگان واقع در جاده‌ی آق قلا و پس از آخرین مرحله تصفیه (بعد از مرحله کلرزنی) گرفته شد. با توجه به اینکه تیمارهای این آزمایش پساب‌هایی با ۱۰۰٪، ۵۰٪ و ۰٪ رقت بود برای تهیه پساب تیمارهایی با ۱۰۰٪ و ۵۰٪ رقت به ترتیب از نسبت ۱:۱ واحدهای پساب و ۱ واحد آب قطره (۱:۲ واحد پساب و ۱ واحد آب قطره) استفاده شد که میزان ترکیبات نیتروژن‌دار و فسفردار آن در جدول شماره (۱) آورده شده است. در جریان آزمایش، ۲۴ اrlen مایر ۵۰۰ میلی لیتری برای تیمارها در نظر گرفته شد که درون هر کدام ۳۰۰ میلی لیتر پساب مربوط به هر تیمار و ۲ میلی لیتر جلبک سندسموس (با غلظت 10^5 سلول در میلی لیتر) از قبل کشت داده شده، اضافه شد.

جدول ۱. مقادیر مختلف نیترات و فسفات در پساب‌های مختلف برای کشت جلبک *Scenedesmus obliquus*

فسفات	نیترات	نوع پساب
۶/۹	۱۵/۶	پساب ۱۰۰٪ رقیق شده (S100)
۸	۲۴/۱۵	پساب ۵۰٪ رقیق شده (S50)
۱۷/۴	۲۸/۲۸	پساب ۰٪ رقیق شده (S0)

(غلظت‌ها براساس شکل نیتروژنی نیترات ($\text{NO}_3\text{-N}$) و فسفات (PO_4^{3-}) بر حسب میلی‌گرم در لیتر آورده شده است)

طول دوره‌ی آزمایش ۱۵ روز بود که اندازه‌گیری تعداد سلول جلبک هر روز و زیست توده‌ی خشک، کلروفیل a، نیترات و فسفات هر ۴۸ ساعت یکبار اندازه‌گیری شد. شمارش جلبک‌ها با استفاده از لام‌هموستومتری و با روش پیشنهاد شده‌ی Sorgeloos و همکاران در سال ۲۰۰۰ انجام گرفت. زیست توده خشک جلبک‌ها با استفاده از روش پیشنهاد شده Martinez و Lavens در سال ۱۹۹۶ با توزین حجم معینی از جلبک‌های شمارش شده به دست آمد. اندازه‌گیری کلروفیل a نیز با روش Parsons و همکاران (۱۹۸۴) انجام گرفت. میزان رشد ویژه (SGR) با استفاده از رابطه‌ی $\text{SGR} = (\ln N_2 - \ln N_1)/t$ محاسبه شد که در آن N_2 تعداد سلول‌های جلبک در انتهای آزمایش و t مدت زمان انجام آزمایش است (Omori and Ikeda, 1984). زمان دو برابر شدن جمعیت جلبک‌ها با استفاده از رابطه‌ی $DT = \ln 2 / SGR$ محاسبه شد (Omori and Ikeda, 1984).

فسفات در ابتدا با استفاده از سانتریفیوژ زی توده جدا شده سپس توسط کیت های اندازه گیری شرکت وکتگ^۱ به دست آمد. تجزیه و تحلیل آماری داده ها با استفاده از تجزیه واریانس یک طرفه (one way ANOVA) در نرم افزار آماری SAS نسخه ۹,۲ نسخه SAS انجام گرفت. برای مقایسه میانگین ها از آزمون دانکن در سطح معنی داری ۵٪ استفاده شد.

نتایج

نتایج تجزیه و تحلیل واریانس یک طرفه، در طول آزمایش نشان داد که تیمارهای مختلف آزمایش بر مشخصه های مختلف اندازه گیری شده تأثیر بسیار معنی داری دارد ($P < 0.01$) (جدول ۲). میانگین زیست توده، تعداد سلول، میزان کلروفیل a، میزان رشد ویژه و زمان دو برابر شدن کشت های *S. obliquus* در تیمارهای مختلف پساب در اشکال شماره (۱ و ۲) ارزیه شده است. میزان زیست توده *S. obliquus* در ۵ روز اول تفاوت معنی داری را بین تیمارها نشان نداد ولی بیشترین میزان زیست توده در ۵ روز دوم و سوم در تیمار S0 (به ترتیب 0.05×10^6 و 0.06×10^6 گرم در لیتر) بود. نتایج ارائه شده در شکل ۱ نشان داد که بیشترین میانگین تعداد سلول جلبکی به دست آمده در ۵ روز اول، دوم و سوم از تیمار S0 (به ترتیب 0.019×10^6 ، 0.016×10^6 ، 0.013×10^6 میلی لیتر) بود. کمترین میانگین تعداد سلول نیز در تیمار S100 (به ترتیب 0.011×10^6 ، 0.010×10^6 ، 0.0083×10^6 میلی لیتر) دیده شد.

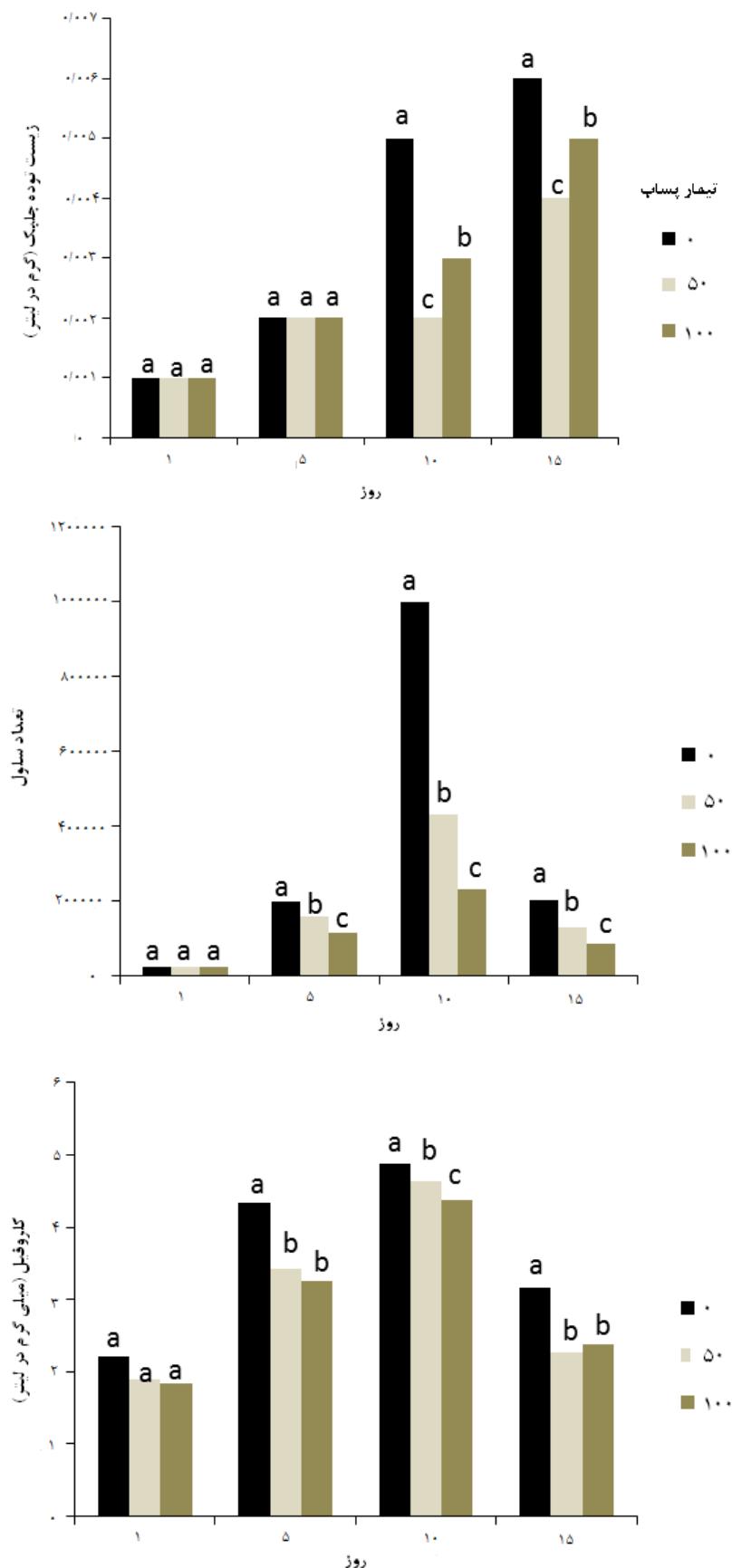
جدول ۲. آنالیز واریانس مشخصه های اندازه گیری شده در تیمارهای مختلف آزمایشی طی دوره ۱۵ روزه‌ی پرورش جلبک *Scenedesmus obliquus*

	شاخص	منابع تنوع	درجه آزادی	۵ روز اول			۵ روز دوم			۵ روز سوم		
				میزان F	سطح معنی دار	میزان F	سطح معنی دار	میزان F	سطح معنی دار	میزان F	سطح معنی دار	
**	تیمارها	تعداد سلول	۲									
			۶									
			۸									
*	تیمارها	زیست توده	۲									
			۶									
			۸									
**	تیمارها	کلروفیل a	۲									
			۶									
			۸									
—	فسفات	نیترات	۲									
			۶									
			۸									
—	نیترات	کل	۲									
			۶									
			۸									

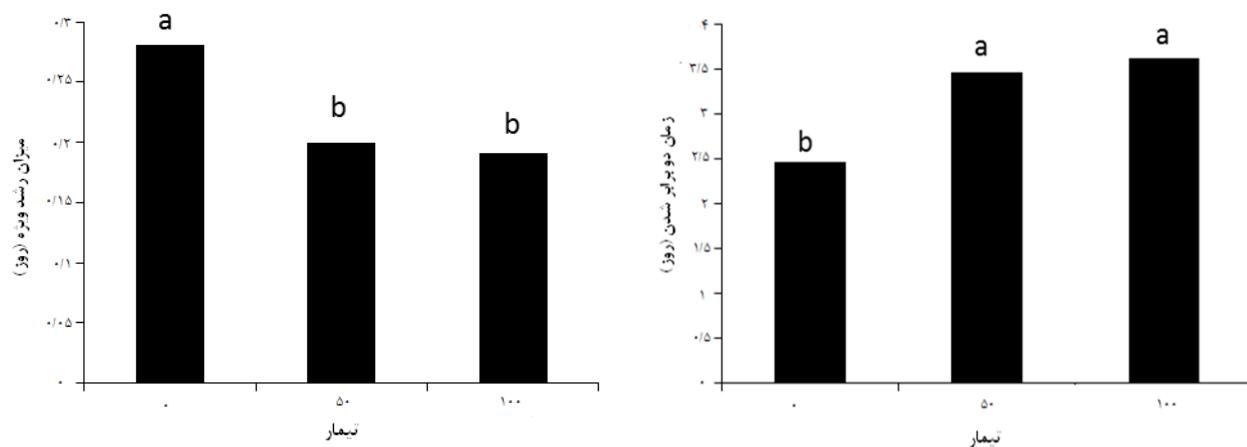
معنی داری در سطح 0.01 **، معنی داری در سطح 0.05 *

بیشترین میزان کلروفیل a به دست آمده در ۵ روز اول، دوم و سوم در تیمار S0 (به ترتیب 0.017×10^6 ، 0.018×10^6 ، 0.013×10^6 میلی گرم در لیتر) بود. بیشترین میزان رشد ویژه و کمترین زمان دو برابر شدن جمعیت *S. obliquus* در طول دوره در تیمار S0 (به ترتیب 0.028×10^6 در روز و 0.046×10^6 در روز) بود (شکل ۲). در شکل ۳ میزان فسفات و نیترات باقی مانده در محیط کشت در تیمارهای مختلف نشان داده شده است. بر اساس شکل ۴ در انتهای دوره ۱۵ روزه بیشترین میزان درصد حذف فسفات در تیمار S100 به میزان ۱۰۰٪ بود ولی در میزان درصد حذف نیترات در انتهای دوره ۱۵ روزه بین تیمارها تفاوت معنی داری دیده نشد. به طور کلی با توجه به نتایج به دست آمده می توان بیان کرد که جلبک *S. obliquus* بر روی تمام تیمارهای آزمایش شده از پساب به خوبی رشد کرده و میزان فسفات و نیترات پساب را کاهش می دهد.

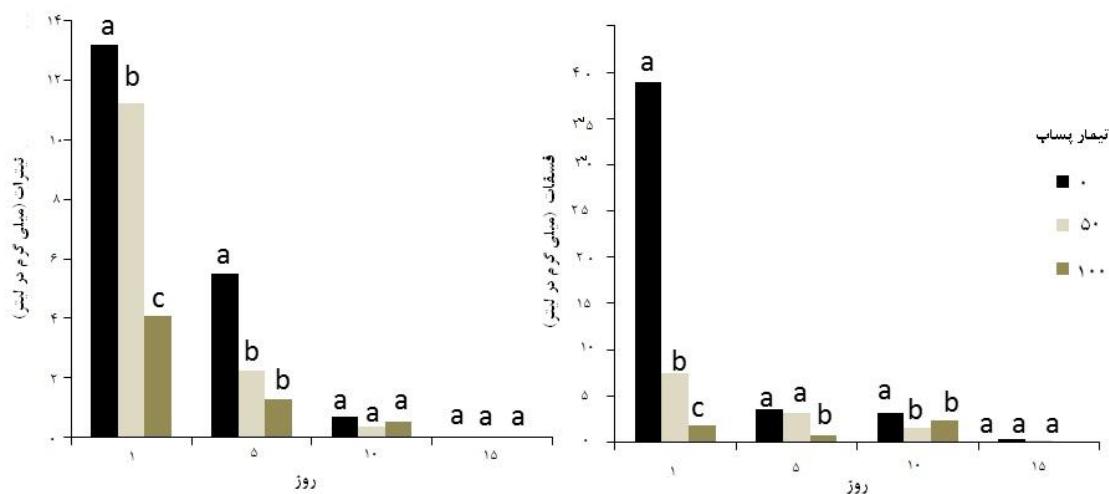
¹ Wacteg



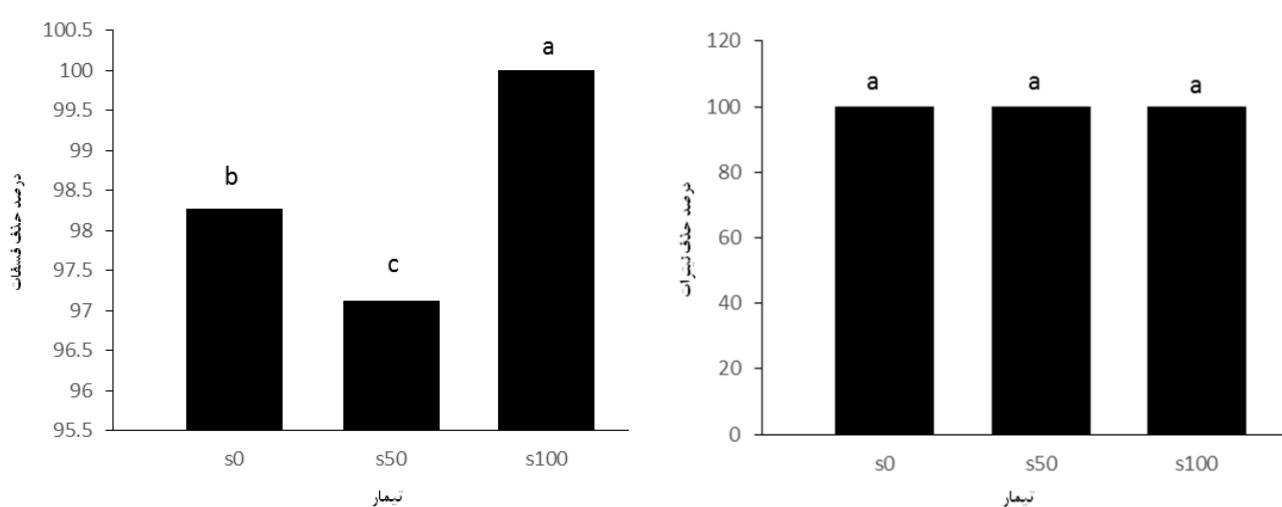
شکل ۱. تاثیر تیمار های مختلف پساب (۰٪، ۵۰٪ و ۱۰۰٪ رقت) بر میانگین شاخص های زیستی (زیست توده، تعداد سلول، کلروفیل a) جلبک *Scenedesmus obliquus* در روزهای مختلف آزمایش (۱، ۵، ۱۰، ۱۵). ستون دارای یک حرف مشترک در سطح احتمال ۵ درصد فاقد اختلاف معنی دار هستند (آزمون دانکن).



شکل ۲. تاثیر تیمارهای مختلف پساب بر میانگین شاخص‌های رشد جلبک *Scenedesmus obliquus* در پایان دوره آزمایش (روز ۲۱). ستون دارای یک حرف مشترک در سطح احتمال ۵ درصد فاقد اختلاف معنی دار هستند (آزمون دانکن).



شکل ۳. میانگین باقیمانده فسفات و نیترات در تیمارهای مختلف پساب در روزهای مختلف آزمایش. ستون دارای یک حرف مشترک در سطح احتمال ۵ درصد فاقد اختلاف معنی دار هستند (آزمون دانکن).



شکل ۴. درصد حذف فسفات و نیترات طی ۱۵ روز پرورش جلبک *Scenedesmus obliquus* در تیمارهای مختلف آزمایشی. ستون دارای یک حرف مشترک در سطح احتمال ۵ درصد فاقد اختلاف معنی دار هستند (آزمون دانکن)

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). مواد بازچرخش شده به زیست توده جلبکی تبدیل می‌شود که به همراه میزان فعالیت‌های بیولوژیکی و اثر آن بر روی کیفیت آب باید مورد ارزیابی دقیق قرار گیرد. مقایسه ساده غلظت‌های ابتدایی و نهایی مواد غذایی می‌تواند منجر به ارزیابی جلبک‌ها به عنوان بازیافت کنندگان مواد معدنی شود (Voltolina *et al.*, 2004). سیستم ادامه‌دار^۲ تصفیه پساب توسط جلبک به این صورت است که پساب غنی از نیتروژن و فسفر به همراه دی اکسیدکربن و انرژی خورشید، شرایط مناسب برای رشد و تکثیر ریز جلبک‌ها را فراهم می‌کند که سرانجام منتج به تولید زیست توده مفید جلبکی و کاهش نیتروژن و فسفر پساب خواهد شد. زیست توده تولید شده علاوه بر کاربرد در تولید سوخت زیستی به دلیل کارا بودن در جذب دی اکسیدکربن هوا به حفاظت محیط زیست نیز کمک می‌کند (Tom and Wong, 1989). یافته‌های این تحقیق نشان داد که جلبک *S. obliquus* در تیمارهای مختلف غنی از مواد معدنی نیتروژن‌دار و فسفردار رشد کرده و با توجه به میزان بقای بالا و رشد مناسب، این گونه قابلیت خوبی برای تصفیه زیستی پساب دارد. بالاترین زیست توده، تعداد سلول و میزان رشد ویژه در جلبک *S. obliquus* در تیمار S0 دیده شد. البته با کاهش تعداد سلول در ۵ روز سوم انتظار کاهش زیست توده می‌رود ولی به دلیل اینکه با گذشت زمان سلول‌های مرده نیز افزایش پیدا می‌کند احتمال دارد به دلیل وجود سلول‌های مرده زیست توده افزایش پیدا کرده باشد. همچنین بالاترین کارایی جذب فسفات در تیمار S100 (۱۰۰٪) مشاهده شد و کارایی جذب نیترات در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری نشان ندادند. براساس نتایج می‌توان گفت جلبک *S. obliquus* در تیمارهایی که غلظت مواد معدنی در آنها بیشتر باشد توانایی رشد بیشتری دارد و میزان زیست توده‌ی با ارزشی را تولید کرده و در جذب مواد معدنی موجود در پساب با موفقیت عمل می‌کند. سایر مطالعات نیز کارایی بالای جلبک‌ها در جذب مواد معدنی را نشان می‌دهد. Martin و همکاران (۱۹۸۵)، حذف روزانه ۲ میلی گرم در لیتر از آمونیوم در کشت‌های دارای جلبک سندسموس را در محیط‌های تحت کنترل گزارش کردند. Gonzales و همکاران (۱۹۹۷)، نشان دادند که گونه *Scenedesmus dimorphus* نسبت به گونه *Chlorella vulgaris* در حذف آمونیاک پساب در طول تصفیه زیستی، کارایی بالاتری دارد. Martinez و همکاران (۲۰۰۰)، نشان دادند که جلبک سیز *S. obliquus* توان فوق العاده‌ای برای رشد داخل پساب‌ها دارد، زیرا قادر به تحمل محدوده وسیعی از دما و pH است. Pakpaine و Sreesai (۲۰۰۷)، اعلام کردند که گونه *Chlorella vulgaris* ۵۵٪ میزان فسفر کل را از محیط کشت در انتهای دوره حذف کرد. Li و همکاران (۲۰۱۰)، نشان دادند که Scenedesmus sp. با وجود غلظت‌های پایین فسفات توانایی رشد و جذب همان مقدار فسفات را داراست ولی سرعت جذب با میزان مواد معدنی موجود در محیط رابطه مستقیم دارد.

یافته‌های این پژوهش حاکی از وجود همبستگی بین حذف نیتروژن پساب با وزن خشک و تعداد سلول جلبکی است، به طوری که با افزایش وزن خشک و تعداد سلول جلبکی، درصد فسفات و نیترات حذف شده از پساب افزایش می‌یابد. Dhar و Singh در سال ۲۰۰۷ نیز همبستگی معنی‌داری بین کارایی حذف نیتروژن با وزن خشک جلبک در دو گونه جلبک *Nostoc moscorom* و *Anabaena variabilis* گزارش کردند.

امروزه با توجه به افزایش ورود پساب‌های حاوی مواد فسفاته و نیتراته به اکوسیستم‌های آبی و خطر یوتوفیکاسیون در آنها که منجر به تغییر ساختار اکوسیستم می‌شود، می‌توان از حوضچه‌های کشت جلبک برای جذب مواد معدنی پساب‌ها استفاده کرد.

منابع

De la Noiee, J., Proulx, D. 1988. Biological tertiary treatment of urban wastewaters with chitosan-immobilized Phormidium. Applied Microbiol Biotechnology. 29: 292-297.

² continuous

³ batch culture

- Geetha, P.K., Baena, S., Green, J.C. 1994. Rubber effluent treatment in a high-rate algal pond system. In: Phang, S.M., Lee, Y.K., Borowitzka, M., Whitton, B. (eds.). Proceeding of the 1st Asia-Pacific Conference on algal Biotechnology. University of Malaya, Kuala Lumpur. pp. 306-312.
- Gonzales, L.E., Canizares, R.O., Baena, S. 1997. Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a Colombian agroindustrial wastewater by the microlagae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. Bioresource Technology. 60: 259-262.
- Komarek, J. 1973. Culture collections. In: Carr, N.G., Whitton, B.A. (eds.). The biology of blue-green algae. Blackwell Scientific Publication. pp. 519-524.
- Kong, Q.X., Li, L., Martinez, B., Chen, P., Ruan, R. 2010. Culture of microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* in wastewater for biomass feedstock production. Applied Biochemistry and Biotechnology. 160: 9-18.
- Lavens, P., Sorgeloos, P. 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fisheries Technical. 295 p.
- Lee, K., Lee, C.G. 2001. Effect of light/dark cycles on wastewater treatments by microalgae. Biotechnology and Bioprocess Engineering. 6: 194-199.
- Li, X., Hu, H.Y., Yang, J. 2010. Lipid accumulation and nutrient removal properties of a newly isolated freshwater microalga, *Scenedesmus sp.* LX1, growing in secondary effluent. New Biotechnology. 27: 59-63.
- Martin, C., De la Noun, J., Picard, G. 1985. Intensive cultivation of freshwater microalgae on aerated pig manure. New Biotechnology. 7: 245-259.
- Martinez, M.E., Yang, J., Correa, G. 2000. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalgae *Scenedesmus obliquus*. Bioresoure Technology. 73: 263-272.
- Miller , D.E., Green, J .C., Shiroyama,T. 1978. The selenustrum capricornatum printz algal assay bottle test : Experimental design, application and interpretation protocol. 126 p.
- Omori, M., Ikeda, T. 1984. Methods in marine zooplankton ecology. John Wiley, New York. 332 p.
- Parsons, T.R., Maita, Y., Lalli, C.M. 1984. A manual of chemical and biological methods for seawater analysis. Pergamon Press, Oxford.173 p.
- Piri, Z.M., Ordog, V. 1997. Effect of some herbicides commonly used in Iranian agriculture on aquatic food chain. PhD thesis to the Hungarian Academy of Science. pp. 19-130.
- Voltolina, D., Gmez-Villa, H., Correa, G. 2004. Biomass production and nutrient removal in semicontinuous cultures of *Scenedesmus* sp. (Chlorophyceae) in artificial wastewater, under a simulated day-night cycle. Vie Milieu Life and Environment. 54: 21-25.
- Singh, N.K., Dhar, D.W. 2007. Nitrogen and phosphorous scavenging potential in microalgae. Indian Journal Biotechnology. 6: 52-56.
- Sreesai, S., Pakpain, P. 2007. Nutrient recycling by *Chlorella vulgaris* from septage effluent of the Bangkok city, Thailand. Science Asia. 33: 293-299.
- Tam, N.F.Y., Wong, Y.S. 1989. Wastewater nutrient removal by *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus* sp. Enviromental Pollution. 58: 19-34.
- Yalcin, T., Naz, M., Turkmen, M. 2006. Utilization of different nitrogen sources by cultures of *Scenedesmus acuminatus*. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 6: 123-127.