



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

محمد هادی ابوالحسنی<sup>۱\*</sup>، سید عباس حسینی<sup>۱</sup>، رسول قربانی<sup>۱</sup>، اردگ وینسه<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

<sup>۲</sup> موسسه زیست‌شناسی 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 ابلیکوس، پساب تصفیه شده از خروجی تصفیه‌خانه‌ی مرکزی شهرستان گرگان جمع‌آوری 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 ابلیکوس 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<sup>۶</sup> 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 تصفیه‌خانه 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 یوتروفیکاسیون 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 Noije and Proulx, 1988). جلبک‌ها توانایی جذب مواد مغذی نیتروژن‌دار و فسفردار را به منظور فتوسنتز، 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). جلبک سندسموس ابلیکوس جلبکی غیر متحرک از شاخه‌ی جلبک‌های سبز است که به طور

\* 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 (۲۰۱۰) با استفاده از جلبک سندسموس توانستند مواد نیترا ته 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 بازدارندگی برای رشد جلبک و کارایی آن در جذب مواد مغذی داشته باشد (Kong et al., 2010). از این رو، 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

جمع‌آوری 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 (۱۹۹۶)، با کشت بر روی آگار خالص سازی شد. بعد از حصول اطمینان از خالص بودن جلبک‌های جداسازی شده، آنها را در ارلن مایرهای ۲ لیتری درون محیط کشت Zinder (به اختصار Z8+N) 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 فلوروسنت در فاصله ۲۰ میلی متری ستون قرار داده شد که تولید کننده‌ی ۲۵۰۰ لوکس نوری بود. همچنین دما  $24 \pm 2$  تنظیم شد (Piri and Ordog, 1997). به منظور بررسی ارزیابی اثر کارایی جلبک *S. obliquus* بر پساب شهری غنی از ترکیبات نیتروژن دار و فسفردار، آزمایشی با ۴ تیمار و ۶ تکرار در طرح کاملاً تصادفی انجام شد. برای انجام این آزمایش، پساب شهری از تصفیه‌خانه‌ی 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 (۱ واحد پساب و ۱ واحد آب مقطر) و ۱:۲ (۲ واحد پساب و ۱ واحد آب مقطر) استفاده شد که میزان ترکیبات نیتروژن دار و فسفردار آن در جدول شماره (۱) آورده شده است. در جریان آزمایش، ۲۴ ارلن 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  $10^5 \times 8$  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*

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

(غلظت‌ها براساس شکل نیتروژنی نیترات (NO<sub>3</sub>-N) و فسفات (PO<sub>4</sub>) بر حسب میلی گرم 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 لام هموسیتومتر و با روش پیشنهاد شده‌ی Martinez و همکاران در سال ۲۰۰۰ انجام گرفت. زیست توده خشک جلبک‌ها با استفاده از روش پیشنهاد شده‌ی Sorgeloos 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  $SGR = (\ln N_2 - \ln N_1) / t$  محاسبه شد که در آن N<sub>2</sub> 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). میزان نیترات،

فسفات در ابتدا با استفاده از سانتریفیوژ زی توده جدا شده سپس توسط کیت‌های اندازه‌گیری شرکت وکتگ<sup>۱</sup> به دست آمد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از تجزیه واریانس یکطرفه (one way ANOVA) در نرم افزار آماری SAS نسخه ۹٫۲ انجام گرفت. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح معنی داری ۰/۵ استفاده شد.

## نتایج

نتایج تجزیه و تحلیل واریانس یک طرفه، در طول آزمایش نشان داد که تیمارهای مختلف آزمایش بر مشخصه‌های 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 کشت‌های *S. obliquus* در تیمارهای مختلف پساب در اشکال شماره (۱ و ۲) ارایه 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 ۰/۵ و ۰/۶ 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  $0/11 \times 10^6$ ،  $0/23 \times 10^6$ ،  $0/13 \times 10^6$  سلول در میلی لیتر) بود. کمترین میانگین تعداد سلول نیز در تیمار S100 (به ترتیب  $0/11 \times 10^6$ ،  $0/23 \times 10^6$ ،  $0/13 \times 10^6$  سلول در میلی لیتر) دیده شد.

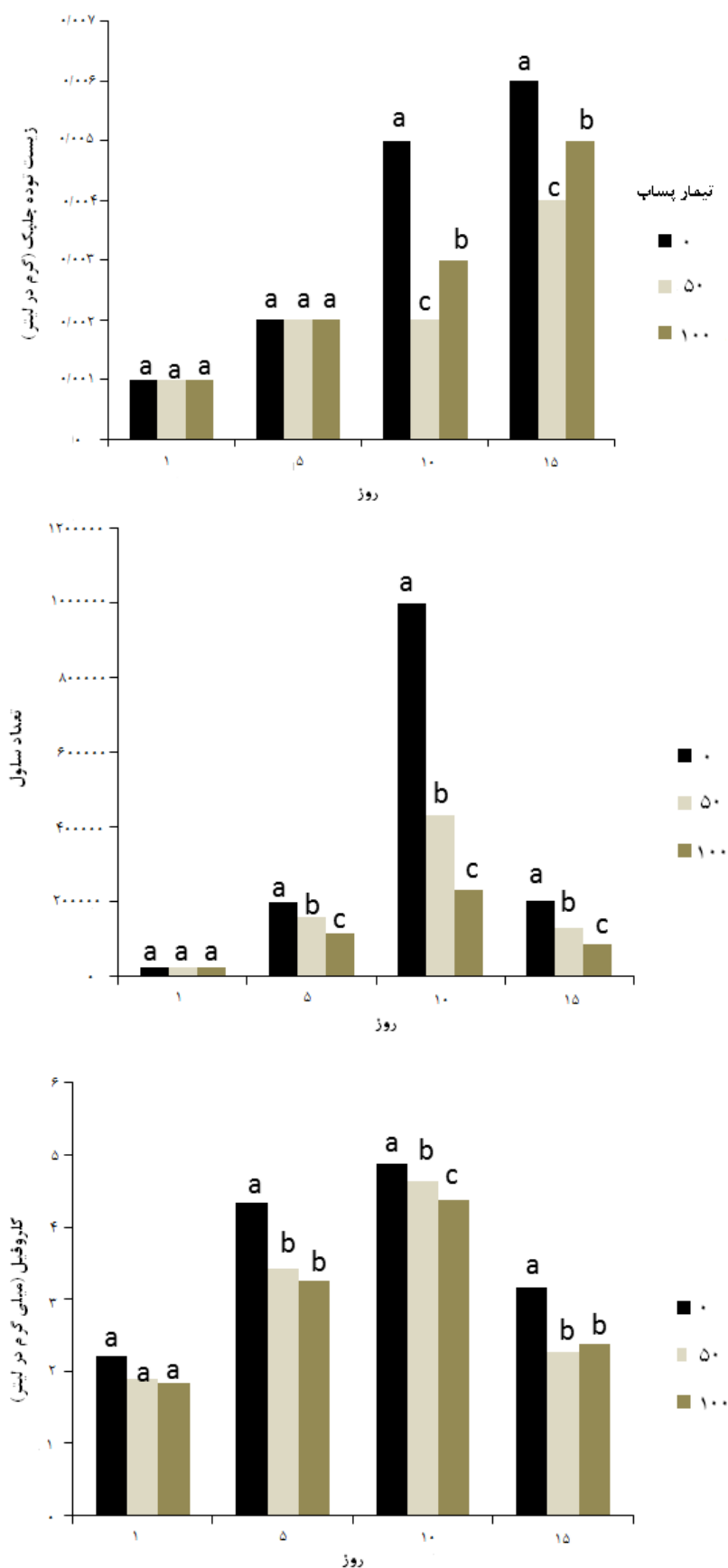
جدول ۲. آنالیز واریانس مشخصه‌های اندازه گیری شده در تیمارهای مختلف آزمایشی طی دوره ۱۵ روزهی پرورش جلبک *Scenedesmus obliquus*

شاخص	منابع تنوع	درجه آزادی	۵ روز اول		۵ روز دوم		۵ روز سوم	
			سطح معنی دار	F	سطح معنی دار	F	سطح معنی دار	F
تعداد سلول	تیمارها	۲	**	۲۰۴۲	**	۲۸۶۴	**	۳۹۰/۳
	خطاها	۶						
	کل	۸						
زیست توده	تیمارها	۲	—	۰	**	۲۸	*	۱۲
	خطاها	۶						
	کل	۸						
کلروفیل a	تیمارها	۲	**	۱۰۰/۴۴	**	۲۸/۰۳	**	۷۳
	خطاها	۶						
	کل	۸						
فسفات	تیمارها	۲	**	۲۶/۹۱	*	۱۷/۸۵	—	۲/۷۷
	خطاها	۶						
	کل	۸						
نیترات	تیمارها	۲	**	۵۹/۶۴	—	۰/۵۱	—	۰
	خطاها	۶						
	کل	۸						

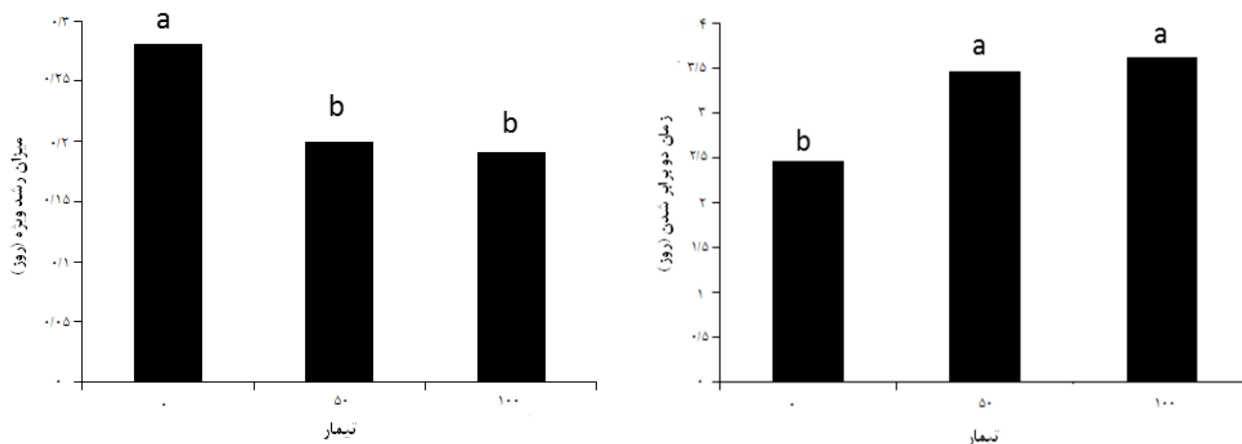
معنی داری در سطح ۰/۰۱ \*\*، معنی داری در سطح ۰/۰۵ \*

بیشترین میزان کلروفیل a به دست آمده در ۵ روز اول، دوم و سوم در تیمار S0 (به ترتیب ۴/۳۳، ۴/۸۷، ۳/۱۷ 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 ۰/۲۸ در روز و ۲/۴۶ 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 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 می‌توان 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 می‌دهد.

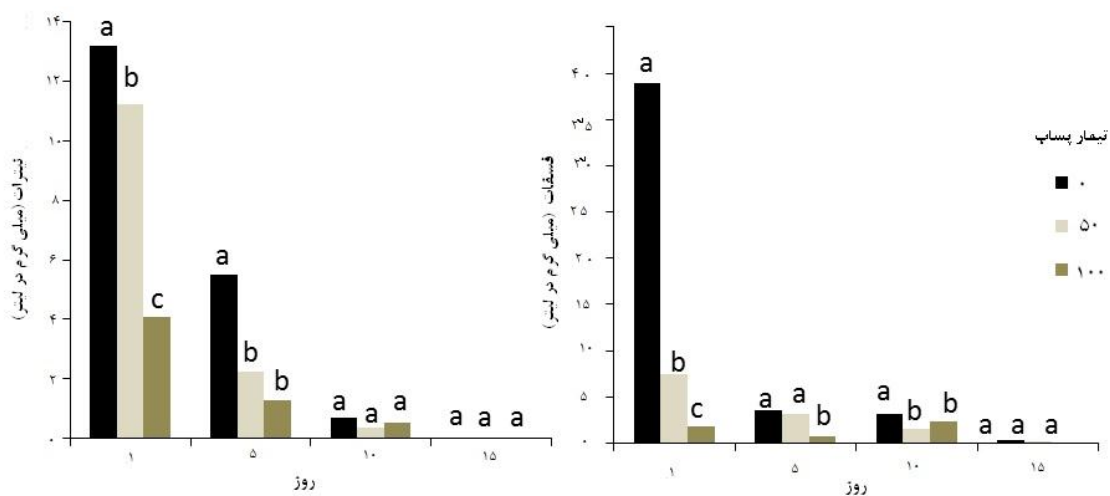
<sup>1</sup> Wacteg



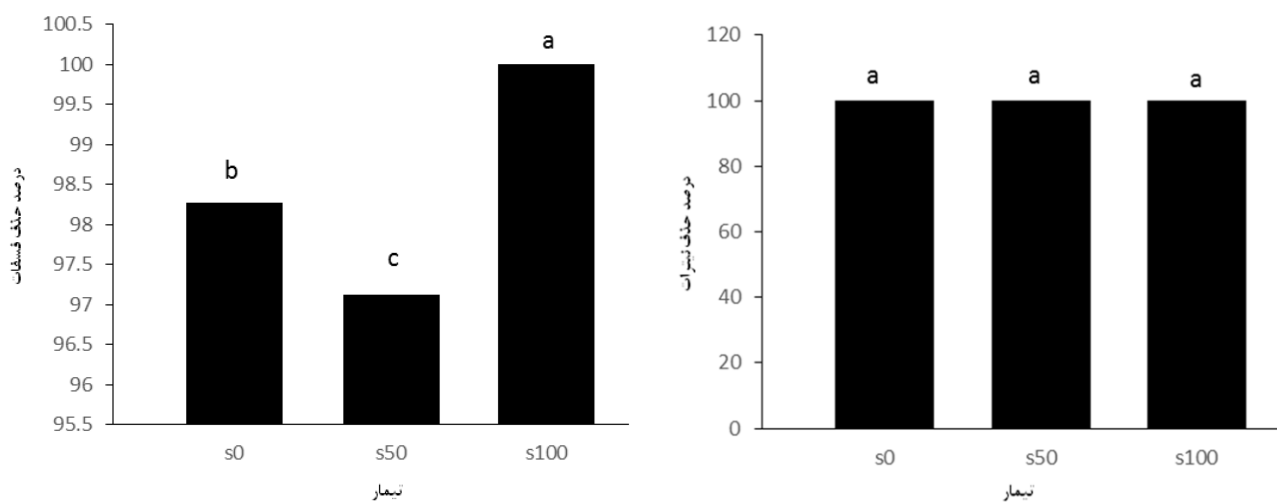
شکل ۱. تاثیر تیمارهای مختلف پساب (۰، ۵۰، ۱۰۰٪ رقت) بر میانگین شاخص‌های زیستی (زیرت توده، تعداد سلول، کلروفیل) جلیبک *Scenedesmus obliquus* در روزهای مختلف آزمایش (۱، ۵، ۱۰، ۱۵). ستون دارای یک حرف مشترک در سطح احتمال ۵ درصد فاقد اختلاف معنی‌دار هستند (آزمون دانکن).



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 بازیافت‌کنندگان مواد مغذی شود (Voltolina et al., 2004). سیستم ادامه‌دار<sup>۲</sup> تصفیه پساب توسط جلبک به این صورت است که پساب غنی از نیتروژن و فسفر به همراه دی‌اکسیدکربن و انرژی خورشید، شرایط مناسب برای رشد و تکثیر ریزجلبک‌ها 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 دی‌اکسیدکربن 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 مغذی 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 مغذی در آنها بیشتر باشد توانایی رشد بیشتری دارد و میزان زیست توده‌ی با ارزشی را تولید کرده و در جذب مواد مغذی موجود در پساب با موفقیت عمل می‌کند. سایر مطالعات نیز کارایی بالای جلبک‌ها در جذب مواد مغذی را نشان می‌دهد. Martin و همکاران (۱۹۸۵)، حذف روزانه ۲ میلی‌گرم در لیتر از آمونیوم در کشت‌های دارای جلبک سندسوموس 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 سبز *S. obliquus* توان فوق‌العاده‌ای برای رشد داخل پساب‌ها دارد، زیرا قادر به تحمل محدوده وسیعی از دما و pH است. Sreesai و Pakpain (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 مغذی 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 یوتریفیکاسیون در آنها که منجر به تغییر ساختار اکوسیستم می‌شود، می‌توان از حوضچه‌های کشت جلبک برای جذب مواد مغذی پساب‌ها استفاده کرد.

## منابع

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

<sup>2</sup> continious

<sup>3</sup> 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 1<sup>st</sup> 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 microalgae *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*. Bioresource Technology. 73: 263-272.
- Miller, D.E., Green, J.C., Shiroyama, T. 1978. The selenostrum 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.* Environmental 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.