



## کارایی ریز جلبک *Scenedesmus obliquus* در حذف فسفات و نیترات از پساب مزارع پرورش میگو گمیشان

میلاذ کبیر\*، سید عباس حسینی، رسول قربانی، حدیثه کشیری

گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

### چکیده

نوع مقاله:

پژوهشی

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۹۵/۰۴/۲۲

اصلاح: ۹۵/۱۰/۱۸

پذیرش: ۹۶/۰۸/۱۸

کلمات کلیدی:

پرورش میگو

پساب

ریز جلبک

کلروفیل a

در این تحقیق اثر ریز جلبک سندسموس ابلیگوس در کاهش بار آلودگی مزارع پرورش میگو گمیشان مورد بررسی قرار گرفت. ترکیبات سمی نیترات و فسفات از سیستم‌های پرورش به‌خصوص پرورش متراکم حاصل می‌شود. برای ارزیابی اثرات استفاده از این ریز جلبک، ابتدا گونه‌های ذکر شده از مزارع پرورش میگوی گمیشان تهیه و خالص‌سازی شد. سپس پساب خروجی مزارع تهیه و فاکتورهای فیزیکی شیمیایی آب، فسفات و نیترات قبل و بعد از مواجه شدن پساب با جلبک، در هر ۲۴ ساعت به مدت ۱۰ روز اندازه‌گیری گردید. همچنین شاخص‌های زیستی و تولیدی جلبک شامل تراکم، کلروفیل a و زیست‌توده خشک اندازه‌گیری شد. نتایج این تحقیق نشان داد که میزان ماده خشک و کلروفیل در طول دوره افزایش معنی‌داری پیدا نموده است ( $p \leq 0/01$ ) و میزان فسفات P و  $PO_4$  کاهش معنی‌داری در طول دوره از خود بروز داده‌اند ( $p \leq 0/05$ ). اما تأثیر معنی‌داری بر نیترات N و  $NO_3$  نداشته‌اند ( $p \geq 0/05$ ). از جهت دیگر تعداد سلول جلبک و میزان نرخ رشد ویژه نیز تغییر معنی‌داری در طول دوره داشته‌اند ( $p \leq 0/05$ ). نتایج این تحقیق نشان داد ریز جلبک سندسموس ابلیگوس قابلیت بالایی در زمینه زیست و حذف ترکیبات فسفات پساب مزارع پرورش میگو را دارد.

### مقدمه

کلروفیتا<sup>۱</sup> یا جلبک‌های سبز یکی از پرتعدادترین، پراکنده‌ترین و از دید مورفولوژیک متنوع‌ترین شاخه‌های جلبک‌ها به شمار می‌روند. جلبک سبز *Scenedesms obliquus* نیز از کلروفیتا بوده که ساکن آب‌های شیرین و شاخص زیستی این محیط‌ها می‌باشد. سلول‌های این جلبک غیر متحرک و فاقد تاژک است و گاهی اوقات تشکیل کلنی می‌دهد (Riahi, 2002). از آنجایی که در کشور ما هیچ‌گونه استاندارد معینی برای پساب‌های خروجی کارگاه‌های تکثیر و پرورش وجود ندارد، این موضوع سبب شده تا به دور از هر گونه ضابطه‌ای بر تعداد مراکز تکثیر و پرورش آبریزان به ویژه در مسیر رودخانه‌هایی که بخشی از آن‌ها در حال حاضر مورد شرب قرار می‌گیرد، اضافه شود. از سوی دیگر فعالیت‌های پرورش آبریزان همراه با استفاده از انواع کودهای شیمیایی، مواد غذایی با ترکیبات مختلف، انواع داروها و سموم است که هرکدام بر آبریزان، انسان و محیط‌زیست تأثیر متفاوتی دارد (Esmaili Sari, 2004). پساب نتیجه فعالیت‌های انسان در عرصه‌های مختلف شهری، کشاورزی و یا صنعتی است (Lim et al., 2010). سیستم‌ها و روش‌های مختلفی جهت تصفیه پساب‌ها طراحی شده‌اند که هر

\* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: [mld.kabir.17@gmail.com](mailto:mld.kabir.17@gmail.com)

<sup>1</sup> Chlorophyta

یک مزایا و معایب خاص خود را دارند. برای فائق آمدن بر بخشی از مشکلات ذکر شده، یکی از راه‌ها استفاده از فرآیند بیولوژیکی در تصفیه کارآمد آب محیط‌های پذیرنده است (Campbell, 1999). اصطلاح تصفیه زیستی آلاینده‌ها<sup>۲</sup> با استفاده از جلبک‌ها، به استفاده از جلبک‌ها برای تیمار و تصفیه مواد آلاینده از پساب‌هایی با منشأ مختلف و یا تبدیل آلودگی‌هایی مثل زئوبیوتیک‌ها<sup>۳</sup> از پساب‌ها اشاره دارد که در مقیاس وسیعی در سیستم‌های تصفیه فاضلاب مورد استفاده قرار گرفته است (Aziz, 1993).

سیستم‌های کشت ریز جلبک‌ها می‌توانند نقش ارزنده‌ای را در تصفیه پساب‌ها ایفا نمایند (De la Noue and Proulx, 1988)؛ زیرا ریز جلبک‌ها قادرند برداشت و حذف مواد مغذی به خصوص نیتروژن، فسفر، فلزات سنگین، مواد آلی و پاتوژن را از پساب افزایش دهند (Tam and Wong, 1989 ; De la Noue and Proulx, 1988). ریز جلبک‌هایی مانند سندسموس، به علت رشد بالا و مقاومت‌شان به دست‌کاری در سیستم‌های پرورشی و همچنین فناوری ساده و ارزان تولید، می‌توانند در تصفیه پساب مفید باشند (Chevalier and De la Noue, 1985). از این‌رو جلبک‌های جنس سندسموس در بسیاری از مطالعات به منظور جداسازی نیتروژن و فسفر به کار گرفته شده و نتایج مثبتی نیز از به کار گیری آن به دست آمده است.

Mohamed (1994) بیان نمود که حضور گونه *Scenedesmus sp.* در بدنه اکثر آب‌های شیرین به طور معمول وجود دارد که نقش مهمی به عنوان تولید کننده اولیه بر عهده دارد و در خالص‌سازی آب‌های یوتروف مشارکت می‌نماید. این نویسنده بیان نمود حضور یا عدم حضور گونه‌های به خصوص *Scenedesmus sp.* برای ارزیابی کیفیت آب مورد استفاده قرار می‌گیرد. این محقق به منظور تصفیه پساب شهری از جلبک *Scenedesmus quadricauda* استفاده کرد و مشخص گردید که نرخ جداسازی فسفر و نیتروژن توسط این جلبک به ترتیب برابر با ۱۰۰ و ۷۰ درصد بود و آمونیوم نیز طی ۵ روز آغازین این مطالعه کاملاً مصرف گردید.

Heidari و همکاران (2011) به بررسی امکان حذف آمونیاک و نیتريت از پساب کارگاه پرورش ماهی به وسیله جلبک سبز *Scenedesmus quadricauda* پرداختند. نتایج بررسی‌های آن‌ها نشان داد که جلبک *Scenedesmus quadricauda* می‌تواند برای حذف آمونیاک و نیتريت و نیز تولید زیست‌توده جلبکی در سیستم‌های پالایش پساب خروجی کارگاه‌های پرورش ماهی قبل از ورود به محیط‌های طبیعی مورد استفاده قرار گیرد. همچنین بیان نمودند پساب کارگاه می‌تواند به عنوان محیط کشتی مناسب برای تولید انبوه این جلبک استفاده شود. Abolhasani و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که جلبک سندسموس ابلیگوس می‌تواند برای حذف فسفات و نیترات و نیز تولید زیست‌توده جلبکی در سیستم‌های پالایش پساب شهری مورد استفاده قرار گیرد.

با توجه به مطالب ذکر شده این تحقیق به جهت برآورد کاربرد پساب‌های خروجی مزارع پرورش میگو گمیشان به عنوان محیط کشتی مناسب برای پرورش و تولید زیست‌توده ریز جلبک سندسموس و بررسی کارایی ریز جلبک سندسموس در حذف ترکیبات آلاینده از پساب کارگاه پرورش میگو صورت پذیرفت.

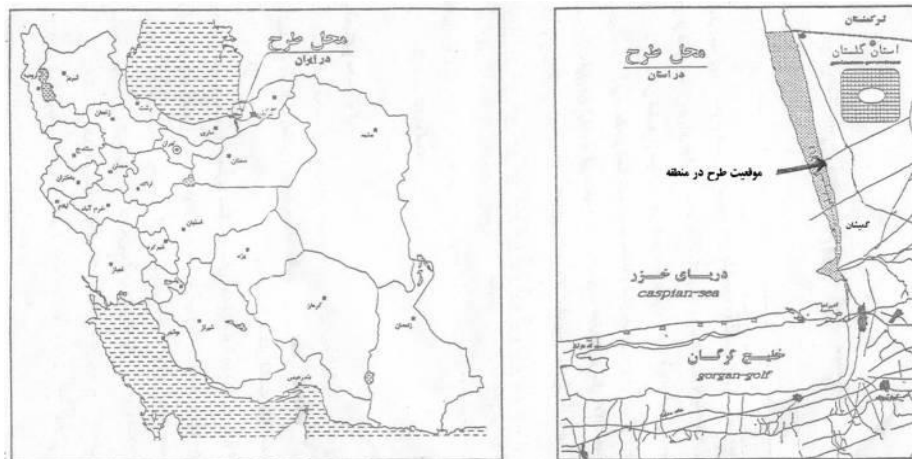
## مواد و روش‌ها

به منظور ارزیابی اثر سویه‌های مختلف جلبکی بر پساب‌های غنی از ترکیبات آلی و معدنی، آزمایش با ۲ تیمار (۱. تصفیه فاضلاب توسط جلبک *Scenedesmus obliquus*؛ ۲. فاضلاب بدون جلبک) و ۶ تکرار صورت پذیرفت.

برای انجام آزمایش، از پساب خروجی مزارع پرورش میگو گمیشان (مرداب با مساحت ۲۴ هکتار) نمونه آب تهیه گردید و با استفاده از پساب این مراکز، تیمارهای آزمایش تنظیم شد. مزارع پرورش میگو گمیشان در فاصله ۱۷ کیلومتری شمال گمیشان و در جنوب شرقی دریای خزر قرار دارد (شکل ۱).

<sup>2</sup> Phycoremediation

<sup>3</sup> Xenobiotic



شکل ۱. محل مزارع پرورش میگو در منطقه گمیشان استان گلستان

جهت شناسایی جلبک‌ها از کلیدهای شناسایی Bellinger, 1992 استفاده گردید. پس از جداسازی، شناسایی و خالص‌سازی گونه‌های مورد نظر یک استوک از جلبک سندسموس به صورت مجزا در محیط کشت جامد (پلیت آگار حاوی ۲ درصد آگار) برای استفاده در صورت بروز آلودگی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تهیه و نگهداری شد.

در ادامه این تحقیق، نمونه آب تهیه شده از مرداب را توسط صافی‌های میکرو فیبر (اندازه مش = ۰/۵ میلی‌متر) فیلتر کرده تا ذرات بزرگ‌تر جدا شود و بعد از آن ۲۰ دقیقه در اتوکلاو استریل گردید و ارلن مایر ۰/۵ لیتری که برای تیمارهای ذکر شده در نظر گرفته شده بود به میزان ۴۷۵ میلی لیتر آب مرداب مزارع پرورش میگو اضافه گردید. سپس به هر یک از ارلن‌ها به میزان ۲۵ میلی لیتر از جلبک سندسموس اضافه شد. تلاش گردید که شرایط کشت جلبک (فاکتورهای شیمیایی و فیزیکی) مطابق با محدوده قابل تحمل رشد این ریز جلبک باشد (Esmaeili Sari, 2000). بدین منظور برای تأمین نور، اکسیژن و دمای مناسب از اتاق کشت کولر دار مجهز به میز کشت که دارای ۲۰ عدد لامپ فلورسنت بود استفاده شد و هر ارلن با استفاده از پمپ هوا، هوادهی گردید. محیط کشت ریز جلبک برای انجام این آزمایش محیط کشت زایندر<sup>۴</sup> بود. طول دوره آزمایش ۱۰ روز بود، که در هر ۲۴ ساعت نمونه‌برداری صورت پذیرفت و برای این منظور ۱۰ میلی لیتر از محیط کشت جلبکی جدا گشته و سپس به میزان ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد و با ۴۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از این فرآیندها، سوپرناتانت به دست آمده برای سنجش نیترات و فسفات استفاده گردید. این آزمایش‌ها در ۶ تکرار انجام شد. سپس نرخ جداسازی بر اساس فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{Removal efficiency} = (C_i - C_0) / C_i \times 100\%$$

در این فرمول  $C_i$  بیانگر غلظت در زمان  $t_i$  و  $C_0$  بیانگر غلظت اولیه می‌باشد (Han et al., 2015).

در طول آزمایش و روزانه تعداد سلول‌های جلبک، زیست‌توده خشک، کلروفیل A و اکسیژن، pH و دما مورد ارزیابی قرار گرفت (Heidari et al., 2011). زیست‌توده خشک جلبک‌ها را با استفاده از روش پیشنهاد شده Sargeloos و Lavens (1996) با توزین حجم معینی از جلبک‌های شمارش شده به دست آمد. بر طبق این روش در هر روز ۱۰ میلی لیتر از محیط کشت حاوی جلبک از کاغذ صافی به کمک پمپ و کیوم عبور داده می‌شود و کاغذ صافی در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ روز نگهداری و پس از خنک شدن در دسیکاتور وزن می‌شود. تفاوت وزن اولیه و ثانویه کاغذ صافی بیانگر میزان زیست‌توده خشک جلبک می‌باشد. میزان رشد ویژه ( $^5$ SGR) با استفاده از رابطه  $\text{SGR} = (\ln N_2 - \ln N_1) / \Delta t$  محاسبه گردید که در آن  $N_2$  تعداد سلول‌های جلبک در انتهای آزمایش و  $N_1$  تعداد سلول‌های جلبک در ابتدای آزمایش و  $\Delta t$  مدت زمان انجام آزمایش

<sup>4</sup> Z-8

<sup>5</sup> Specific Growth Rate

است (Omori and Ikeda, 1984). اندازه‌گیری نیترات با استفاده از روش APHA (1992) اندازه‌گیری فسفات از روش رنگ سنجی به وسیله‌ی کاهش اسیداسکوربیک (Healey, 1978) صورت می‌گیرد. برای سنجش اکسیژن و pH و دما به ترتیب از اکسیژن متر و pH متر و دماسنج استفاده شد. شمارش ریز جلبک‌ها بسته به نوع سلول و زمان تقسیم شدن به صورت روزانه توسط لام نئوبار (هماسیتومتر) انجام گردید. برای شمارش تعداد سلول‌ها به روش زیر عمل شد (Martinez et al., 2000):

ضریب رقت  $\times 10^4 \times$  میانگین تعداد سلول‌های شمارش شده = تعداد سلول در یک میلی‌لیتر از نمونه

سنجش کلروفیل A با استفاده از روش Parsons و همکاران (1984) و بر اساس فرمول زیر صورت پذیرفت:

$$\text{Chlorophyll a} = 11.85 (\text{OD}_{664}) - 1.54 (\text{OD}_{647}) - 0.08 (\text{OD}_{630})$$

### آنالیز آماری

این آزمایش با استفاده از طرح کاملاً تصادفی در قالب اسپلیت پلات در زمان (در ۱۱ سطح شامل ۰، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶، ۱۲۰، ۱۴۴، ۱۶۸، ۱۹۲، ۲۱۶ و ۲۴۰ ساعت) با یک فاکتور (نوع جلبک شامل جلبک *Scenedesmus*) در ۶ تکرار انجام شد. همچنین برای بررسی روند تغییرات هر یک از پارامترهای اندازه‌گیری شده در زمان از آزمون رگرسیون استفاده گردید. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با آزمون تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون Duncan در سطوح اطمینان ۰.۵٪ و ۱٪ صورت پذیرفت (Zar, 1984). آنالیز آماری لازم با استفاده از نرم افزار SPSS17 انجام گردید.

### نتایج

همان‌طور که جدول ۱ نشان می‌دهد و در قسمت مواد و روش اشاره شد، تلاش گردیده است که تا حد امکان در طول دوره آزمایش میزان دما، نور و اکسیژن محلول در مقایسه با شاهد ثابت بماند.

جدول ۱. میزان دما، pH و اکسیژن محلول در طول آزمایش

خصوصیت	دما (۲۴/۷±۰/۰ شاهد)	pH (۵/۷±۰/۰ شاهد)	اکسیژن (۳/۲۱±۰/۰۸ شاهد)
اول	۲۴/۶±۰/۱۷ <sup>BCD</sup>	۵/۷±۰/۰۶	۳/۲±۰/۰۱ <sup>AB</sup>
دوم	۲۴/۵±۰/۳۰ <sup>BCD</sup>	۵/۷±۰/۰۶	۳/۲±۰/۰۱۶ <sup>AB</sup>
سوم	۲۴/۸±۰/۱۵ <sup>ABC</sup>	۵/۹±۰/۱۷	۳/۲±۰/۰۸ <sup>AB</sup>
چهارم	۲۵/۰±۰/۲۵ <sup>AB</sup>	۵/۸±۰/۱۵	۳/۵±۰/۰۱۲ <sup>Aa</sup>
پنجم	۲۵/۲±۰/۳۲ <sup>A</sup>	۵/۹±۰/۱۱	۳/۲±۰/۰۱۸ <sup>AB</sup>
ششم	۲۴/۷±۰/۱۵ <sup>ABC</sup>	۵/۷±۰/۳۶	۳/۳±۰/۰۲۱ <sup>AB</sup>
هفتم	۲۴/۳±۰/۴۲ <sup>CDE</sup>	۶/۰±۰/۲۱	۲/۹±۰/۰۳۳ <sup>B</sup>
هشتم	۲۳/۹±۰/۵۰ <sup>EF</sup>	۵/۹±۰/۰۶	۳/۱±۰/۰۳۷ <sup>AB</sup>
نهم	۲۳/۷±۰/۵۲ <sup>F</sup>	۶/۰±۰/۳۲	۳/۳±۰/۰۲۶ <sup>AB</sup>
دهم	۲۴/۱±۰/۲۶ <sup>DEF</sup>	۵/۹±۰/۴۶	۳/۳±۰/۰۲۴ <sup>AB</sup>

تذکر: حرف بزرگ متفاوت بیانگر اختلاف به صورت ستونی است.

مقایسه به صورت عمودی و افقی با آنالیز واریانس یک طرفه و تست دانکن

همان‌طوری که جدول ۱ نشان می‌دهد، با توجه به تمهیدات در نظر گرفته (استفاده از اتاق کشت کاملاً ایزوله و سیستم خنک کننده و هوادهی دایمی)، در روزهای یکسان و تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری بین شاخص‌های دما، pH و اکسیژن محلول مشاهده نشد با تیمار شاهد مشاهده نشد ( $p \geq 0.05$ ). در اکثر روزها بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ( $p \geq 0.05$ ). روند تغییرات دمایی در طول روزهای مختلف به صورت افزایشی و کاهش‌ی بوده ( $P \leq 0.05$ ) اما میزان pH هیچ تغییری نداشته ( $p \geq 0.05$ ) و میزان اکسیژن محلول نیز مقداری افزایش و سپس کاهش یافته است ( $P \leq 0.05$ ).

جدول ۲. تغییرات میزان ماده خشک و کلروفیل در طول مدت آزمایش

خصوصیت	ماده خشک (۰/۰۰±۰/۰) (شاهد)	کلروفیل (۰/۰۰±۰/۰) (شاهد)
اول	۱/۱۷±۰/۱۵ <sup>BC**</sup>	۰/۴۹۰±۰/۰۵۰ <sup>CD**</sup>
دوم	۱/۲±۰/۱۰ <sup>BC**</sup>	۰/۶۶۲±۰/۰۶۰ <sup>C**</sup>
سوم	۱/۶±۰/۲۶ <sup>AB**</sup>	۰/۹۹۶±۰/۱۰۱ <sup>B**</sup>
چهارم	۱/۸۷±۰/۶۷ <sup>A**</sup>	۱/۶۱۳±۰/۴۷۵ <sup>A**</sup>
پنجم	۱/۵۷±۰/۴۲ <sup>AB**</sup>	۱/۸۱۹±۰/۲۲۳ <sup>A**</sup>
ششم	۱/۶۳±۰/۱۱ <sup>AB**</sup>	۱/۷۹۰±۰/۲۴۵ <sup>A**</sup>
هفتم	۰/۸۷±۰/۰۶ <sup>CD**</sup>	۰/۲۷۳±۰/۰۲۴ <sup>DE**</sup>
هشتم	۰/۴±۰/۱۰ <sup>D**</sup>	۰/۱۰۰±۰/۰۲۷ <sup>E**</sup>
نهم	۰/۰±۰/۰ <sup>D</sup>	E.۰/۰±۰/۰
دهم	۰/۰±۰/۰ <sup>D</sup>	E.۰/۰±۰/۰

تذکر: حرف بزرگ متفاوت بیانگر اختلاف به صورت ستونی است.  
مقایسه به صورت عمودی و افقی با آنالیز واریانس یک طرفه و تست دانکن  
\*مقایسه با شاهد با تست دانت

نتایج جدول ۲ نشان می‌دهد که میزان ماده خشک و کلروفیل در تمامی روزها به غیر از دو روز آخر با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری دارد ( $P \leq 0/01$ ) و هر دو شاخص تا روز ششم روند افزایشی را طی نموده است.

جدول ۳. میزان فسفر P، PO<sub>4</sub> و نیتروژن N، NO<sub>3</sub> آب در طول مدت آزمایش

خصوصیت	فسفر P (۰/۰۶±۰/۰۱) (شاهد)	فسفر PO <sub>4</sub> (۰/۱۴±۰/۰۲) (شاهد)	نیتروژن N (۱/۳۶±۰/۱۲) (شاهد)	نیتروژن NO <sub>3</sub> (۱/۶۵±۰/۲۹) (شاهد)
اول	۰/۰۵±۰/۰۱ <sup>A</sup>	۰/۱۴±۰/۰۱ <sup>A</sup>	۱/۱۹±۰/۱۰ <sup>C</sup>	۱/۴۵۳±۰/۱۷۴
دوم	۰/۰۴±۰/۰۱ <sup>AB*</sup>	۰/۱۲±۰/۰۱ <sup>B</sup>	۱/۴۱±۰/۱۹ <sup>CD</sup>	۱/۶۵۵±۰/۲۹۸
سوم	۰/۰۴±۰/۰۱ <sup>BC**</sup>	۰/۰۹±۰/۰۱ <sup>C**</sup>	۱/۶۸±۰/۱۸ <sup>AB</sup>	۱/۲۸۸±۰/۰۸۴
چهارم	۰/۰۳±۰/۰۱ <sup>CD**</sup>	۰/۰۸±۰/۰۲ <sup>C**</sup>	۱/۲۱±۰/۱۷ <sup>Cb</sup>	۱/۵۹۴±۰/۳۰۲
پنجم	۰/۰۲±۰/۰۱ <sup>D**</sup>	۰/۰۴±۰/۰۱ <sup>D**</sup>	۱/۵۲±۰/۱۸ <sup>ABC</sup>	۱/۴۸۵±۰/۴۲۴
ششم	۰/۰۱±۰/۰۱ <sup>D**</sup>	۰/۰۲±۰/۰۱ <sup>E**</sup>	۱/۵۱±۰/۱۶ <sup>ABC</sup>	۱/۴۶۰±۰/۲۹۴
هفتم	۰/۰۲±۰/۰۱ <sup>D**</sup>	۰/۰۴±۰/۰۱ <sup>D**</sup>	۱/۶۳±۰/۲۸ <sup>AB</sup>	۱/۳۷۳±۰/۰۷۲
هشتم	۰/۰۲±۰/۰۱ <sup>D**</sup>	۰/۰۴±۰/۰۱ <sup>D**</sup>	۱/۷۰±۰/۱۲ <sup>AB</sup>	۱/۳۷۸±۰/۲۱۰
نهم	۰/۰۲±۰/۰۱ <sup>D**</sup>	۰/۰۴±۰/۰۱ <sup>DE**</sup>	۱/۸۶±۰/۲۰ <sup>A*</sup>	۱/۷۳۹±۰/۱۲۰
دهم	۰/۰۲±۰/۰۱ <sup>D**</sup>	۰/۰۴±۰/۰۱ <sup>DE**</sup>	۱/۵۴±۰/۳۵ <sup>ABC</sup>	۱/۴۸۳±۰/۲۴۲

تذکر: حرف بزرگ متفاوت بیانگر اختلاف به صورت ستونی است.  
مقایسه به صورت عمودی و افقی با آنالیز واریانس یک طرفه و تست دانکن  
\*مقایسه با شاهد با تست دانت

همان‌طوری که جدول ۳ نشان می‌دهد جلبک سندموس توانسته است در مدت ۶ روز میزان فسفات را به میزان ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر کاهش دهد و به‌صورت معنی‌داری میزان آن را نسبت به تیمار شاهد کاهش دهد ( $P \leq 0/01$ ). در بین روزهای مختلف نیز روند کاهشی تا روز ششم مشاهده می‌شود که پس از آن روند افزایشی دیده می‌شود. میزان نیترات N و NO<sub>3</sub> در طی این دوره‌ی ۱۰ روزه روند افزایشی و کاهشی معنی‌داری را طی نمود و در هیچ روزی اختلاف معنی‌داری را با گروه شاهد از خود بروز نداد ( $P \geq 0/05$ ).

جدول ۴. روند تغییرات تعداد سلول و رشد ویژه در طول مدت آزمایش

خصوصیت	تعداد سلول ( $2/7 \times 10^6 \pm 0/16 \times 10^6$ شاهد)	رشد ویژه SGR ( $0/42 \pm 0/53$ شاهد)
اول	$5 \times 10^6 \pm 0/8 \times 10^6$ <sup>BCb**</sup>	$0/43 \pm 0/22$ <sup>AB</sup>
دوم	$7/6 \times 10^6 \pm 0/7 \times 10^6$ <sup>Bb*</sup>	$0/63 \pm 0/2$ <sup>A</sup>
سوم	$14/6 \times 10^6 \pm 3/4 \times 10^6$ <sup>Ab*</sup>	$0/13 \pm 0/11$ <sup>Bb</sup>
چهارم	$15/2 \times 10^6 \pm 2/2 \times 10^6$ <sup>Ab**</sup>	$0/06 \pm 0/06$ <sup>B</sup>
پنجم	$16/3 \times 10^6 \pm 1/6 \times 10^6$ <sup>Ab**</sup>	$0/02 \pm 0/03$ <sup>B</sup>
ششم	$16/1 \times 10^6 \pm 1/4 \times 10^6$ <sup>Ac**</sup>	$-1/34 \pm 0/36$ <sup>C**</sup>
هفتم	$4/3 \times 10^6 \pm 1/3 \times 10^6$ <sup>CDb**</sup>	$-0/92 \pm 0/37$ <sup>C*</sup>
هشتم	$1/9 \times 10^6 \pm 1/0 \times 10^6$ <sup>DE**</sup>	$-2/4 \pm 0/4$ <sup>Db**</sup>
نهم	$0/1 \times 10^6 \pm 0/11 \times 10^6$ <sup>Eb**</sup>	Nc
دهم	$0 \pm 0$ <sup>E</sup>	Nc

تذکر: حرف بزرگ متفاوت بیانگر اختلاف به صورت ستونی است.

مقایسه به صورت عمودی و افقی با آنالیز واریانس یک طرفه و تست دانکن

\*مقایسه با شاهد با تست دانکن - Nc: غیرقابل اندازه‌گیری

روند تغییرات تعداد سلول‌ها که در جدول ۴ نمایش داده شده است نشان می‌دهند که سندسموس روند کاهشی نداشته و از ابتدا تا روز ششم روند افزایشی از خود نشان داده و در تمامی روزها اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد دارند ( $p \leq 0/01$ ). روند تغییرات نرخ رشد ویژه که ناشی از تعداد سلول است؛ حاکی از مثبت بودن این روند تا روز پنجم می‌باشد که تا این نقطه نیز اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد ندارد و از روز ششم به بعد با نرخ رشد منفی روبرو می‌شویم که در نتیجه با شاهد دارای اختلاف معنی‌دار می‌گردد ( $p \leq 0/05$ ).

## بحث

### بیوماس (ماده خشک) و کلروفیل

تحقیقات نشان داده است که افزایش و کاهش بیوماس در درجه اول به میزان مواد مغذی موجود در محیط (به ویژه غلظت نیتروژن) و سپس نور مرتبط است (Saamori *et al.*, 2013) با توجه به اینکه میزان نور در محیط در طول دوره تغییر نداشته است پس کاهش بیوماس در محیط را می‌توان به کم شدن مواد مغذی محیط نسبت داد. با توجه به اینکه تا روز ششم میزان ترکیبات نیتروژن دار به صفر نرسید ولی میزان فسفات بسیار به صفر نزدیک شد، می‌توان بیان نمود که فسفر به‌عنوان عامل محدود کننده سبب کاهش رشد و مرگ و میر سلول‌ها و در نتیجه کاهش میزان ماده خشک گردیده است. Tang و همکاران (2011) بیان کردند که دامنه بیوماس جلبک *Scenedesmus obliquus* مابین  $0/083$  -  $0/155$  گرم در لیتر در روز می‌باشد که پایین‌تر از نتایج استحصالی شده در این مطالعه است. علت این امر این است که این محققین با کنترل میزان  $CO_2$  از این فاکتور به عنوان عامل محدود کننده استفاده نمودند و مانع از رشد بدون محدودیت جلبک سندسموس گردیدند.

پس از بررسی روند تغییرات هر یک از تیمارها در طول دوره ۱۰ روزه به این نتیجه رسیدیم که مابین روزهای اول و دوم تغییر معنی‌دار در میزان کلروفیل و ماده خشک مشاهده نگردید. از روز دوم تا چهارم در تمامی تیمارها افزایش معنی‌داری مشاهده گردید ( $p \leq 0/05$ ) که علت این امر را می‌توان رفتن جلبک‌ها به فاز تکثیر و سازگاری کامل آن‌ها با محیط کشت جدید مرتبط

دانست. در روزهای پنجم و ششم جلبک‌ها سیکل ثابتی را تقریباً طی کرده‌اند که نشان می‌دهد میزان تکثیر آن‌ها با مرگ و میرشان یکسان است و از روز ششم تا روز هشتم در تمامی تیمارها با کاهش معنی‌دار در میزان ماده خشک و کلروفیل مواجه شدیم که نشان‌دهنده آن است که جلبک‌ها وارد مرحله مرگ و میر شده‌اند و تعداد آن‌ها به سرعت کاهش پیدا کرده است. از روز ۹ به بعد میزان ماده خشک و کلروفیل به صفر رسیده است که نشان‌دهنده آن است که تمامی جلبک‌ها از بین رفته‌اند. با توجه به اینکه در تیمار شاهد جلبکی وجود نداشت میزان ماده خشک و کلروفیل در آن‌ها صفر بود که در نتیجه بین تیمار شاهد با تمامی تیمارها تا روز ۸ اختلاف معنی‌داری وجود داشت ( $p \leq 0.05$ ) اما در روزهای ۹ و ۱۰ با توجه اینکه میزان ماده خشک و کلروفیل دوباره صفر گردید در دو روز آخر با تیمار شاهد یکسان بود.

#### فسفات P و $PO_4$

میزان P و  $PO_4$  در شروع دوره و در تیمار شاهد به ترتیب برابر با  $0.06 \pm 0.01$  و  $0.14 \pm 0.02$  میلی‌گرم در لیتر بود که با گذشت زمان مقدار آن به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد ( $p \leq 0.05$ ) و در روز ۶ به میزان حداقل خود یعنی  $0.01$  میلی‌گرم در لیتر رسید. در ادامه و در طی روزهای ۷ تا ۱۰ میزان فسفات با شیب ملایم معنی‌دار افزایش پیدا کرد و در انتهای روز دهم به ترتیب به  $0.02$  و  $0.04$  میلی‌گرم در لیتر رسید ( $p \leq 0.05$ ). ریز جلبک‌های سندسموس با تیمار شاهد در اکثر روزها، اختلاف معنی‌داری از خود نشان دادند ( $p \leq 0.05$ ). در راستای نتایج، Gonzales و همکاران (1997) نشان دادند جلبک‌های *Chlorella vulgaris* و *Scenedesmus dimorphus* می‌توانند تا  $55\%$   $PO_4$  پساب کشاورزی را حذف نمایند که نتایج این محققین پایین‌تر از نتایج به دست آمده در پژوهش پیش رو بود. Martinez و همکاران (2000) بیان کردند جلبک سندسموس می‌تواند تا  $97\%$   $PO_4$  آب را با غلظت اولیه  $11/8$  میلی‌گرم در لیتر حذف نماید، در حالی که این عدد در این تحقیق  $85/7\%$  با غلظت اولیه فسفات  $0.14 \pm 0.02$  بود. نتایج تحقیقات Tam و Wong (1996) و Fierro و همکاران (2007) نشان داد که کاربرد یا وجود ریزجلبک در حذف ارتوفسفات از پساب تأثیرگذار می‌باشد. Ruiz-Marin و همکاران (2010) پس از بررسی جلبک‌های کلرلا و سندسموس به این نتیجه رسیدند که جلبک سندسموس توانایی بالاتری در جذب  $PO_4$  آب را داراست. از این رو جلبک کلرلا  $70\%$  و جلبک سندسموس  $85\%$  قابلیت کاهش فسفات آب را داشتند که مطابقت بالایی با نتایج مطالعه‌ی حاضر دارد.

#### نیتрат N و $NO_3$

اثر جلبک سندسموس بر میزان نیترات N و  $NO_3$  روند ثابتی را طی نمی‌نماید و نشان می‌دهد که در این تحقیق، این جلبک‌ها در مقادیر ذکر شده توانایی چندانی برای جذب نیترات آب ندارند و به نظر می‌رسد عوامل دیگری در افزایش و کاهش نیترات آب مؤثرند ( $p \geq 0.05$ ). البته طبق تحقیقات به عمل آمده مشخص گردید آزمایش‌های Ruiz-Marin و همکاران (2010) نیز در مورد جلبک سندسموس با نتایج حاضر مطابقت دارد که این محققین پیشنهاد نمودند که نیتروفیکاسیون محدود گردیده است و جلبک‌های سندسموس تمایل به جذب آمونیوم در مقایسه با دیگر اشکال نیتروژن موجود در آب دارند. یکی از دلایلی دیگری که جلبک‌ها نتوانستند بعضی از مواد مغذی را جذب نمایند یا جذب ناقصی در زمینه بعضی از مواد مغذی از خود بروز دادند را می‌توان به افزایش بیش از حد تراکم جلبکی نسبت داد. این افزایش بیش از حد ممکن است سبب کاهش قابلیت جلبک در حذف مواد مغذی آب باشد زیرا شدت نور رسیده را کاهش می‌دهد.

#### تعداد سلول‌های جلبک‌ها

از اطلاعات جدول ۴ این‌طور می‌توان استنباط نمود که ریز جلبک سندسموس فاقد فاز تأخیری می‌باشد که نشان از تطبیق سلول‌های سندسموس با محیط جدید است. از این رو از تیمار شاهد ( $1.06 \times 10^6 \pm 0.27 \times 10^6$ ) به روزهای بعد افزایش تعداد سلول به طور معنی‌داری صورت پذیرفت.

روند تغییرات سلول‌های جلبک سندسموس مشابه با روند تغییرات مشاهده شده در کلرلا در تحقیقات Wang و همکاران (2010) بود. این محققین نیز طی بررسی روند رشد سلول‌های جلبک کلرلا مشاهده نمودند که فاز تأخیری در این جلبک وجود نداشت. محققین دیگری نیز بیان نمودند که گونه سندسموس ویژگی‌های سازگاری بهتری نسبت به سایر گونه‌ها در

ورود به محیط کشت جدید دارد (Ruiz-Marin et al., 2010; Martinez et al., 2000). در تأیید نتایج این تحقیق Ruiz-Marin و همکاران (2010) رشد و حذف مواد مغذی پساب شهری را توسط جلبک‌های *Scenedesmus obliquus* و *Chlorella vulgaris* بررسی نمودند و نشان دادند فاز تأخیری و مرحله قبل از تکثیر در جلبک کلرلا ۲۰ ساعت ولی در جلبک سندسموس ۸ ساعت بود. وجود تفاوت در زمینه تعداد سلول جلبک در تیمار شاهد یک امر معمول می‌باشد. نکته مهم این است که زمان تزریق اولیه از استوک برای تکثیر در هر دو گونه یکسان باشد و از لحاظ حجمی میزان یکسانی تزریق صورت گیرد زیرا یکسان نمودن دقیق تعداد سلول در تیمار شاهد امکان‌پذیر نیست.

### رشد ویژه SGR

با توجه به اینکه نرخ رشد ویژه بر اساس تعداد سلول در طی دو روز متوالی محاسبه شده است و تعداد سلول در روز اول نسبت به تیمار شاهد کاهش داشته است، نرخ رشد ویژه برای تیمار شاهد برابر با  $0.42 \pm 0.53$  می‌باشد. مقایسه روند تغییرات روزانه نشان می‌دهد که تا روز سوم میزان رشد ویژه حدود  $0.5$  بوده است که نشان می‌دهد هر روزه  $0.5$  واحد به تعداد سلول‌های روز قبل اضافه شده است و جلبک‌ها در مرحله تکثیر می‌باشند و در روزهای چهارم و پنجم این عدد به نزدیک صفر کاهش می‌یابد که نشان از مرحله سکون جلبک‌ها دارد که تعداد مرگ و میر با تکثیر جلبک‌ها برابر می‌باشد و از روز ششم میزان رشد ویژه جلبک‌ها در تمامی تیمارها منفی بوده که مشخصاً نمایانگر رو به زوال بودن جلبک‌هاست. با توجه به اینکه در روز دهم تمامی جلبک‌ها از بین رفتند، میزان رشد ویژه برای روزهای نهم و دهم غیرقابل محاسبه است. Ruiz-Marin و همکاران (2010) نیز نرخ رشد برای جلبک کلرلا ولگاریس و سندسموس ابلیگوس را به ترتیب  $0.377$  و  $0.401$  گرم در روز محاسبه کردند که با نتایج حاضر در روزهای رشد جلبک هم‌خوانی دارد. Saamori و همکاران (2013) بیان کردند که میزان رشد ویژه جلبک *Desmodesmus communis*  $0.48$  در روز می‌باشد که متناسب با نتایج حاضر می‌باشد. این محققین علت نرخ رشد ویژه پایین را به غلظت پایین مواد مغذی (N و P) مرتبط دانستند که برای رشد جلبک ناکافی بوده است.

### BOD و COD

واضح است که رشد جلبک به سبب نیاز بالاتر به اکسیژن بایستی میزان BOD و COD آب کاهش پیدا کند (Tam and Wong, 1989). جدول نشان می‌دهد که تغییرات BOD و COD در تیمارهای مختلف در روزهای یکسان و در طول دوره ۱۰ روزه این تحقیق روند یکسان و دقیقی را طی نموده است. به طوری که در هر دو شاخص ذکر شده شاهد کاهش معنی‌دار روزانه تا روز ششم بوده‌ایم ( $p \leq 0.05$ ) و از روز ششم بدون تغییر معنی‌دار ولی با افزایش ملایم تا انتهای دوره باقی مانده‌اند ( $p \geq 0.05$ ). زمانی که این شاخص را در کنار جذب نیترات و فسفات آب مقایسه می‌کنیم می‌بینیم که در روزهایی که بیشترین کاهش در میزان جذب مواد مغذی آب داشتیم، شاهد کمترین میزان BOD و COD آب نیز بوده‌ایم یعنی جلبک‌ها به سبب جذب مواد مغذی داشتند سبب کاهش این دو فاکتور در آب گردیده‌اند.

نتایج این تحقیق نشان داد که مقادیر BOD و COD به دست آمده در تیمار شاهد ( $29.35 \pm 0.60$  و  $74.92 \pm 0.50$ ) و طول دوره (به ترتیب در دامنه  $15.89 \pm 0.97$  -  $27.98 \pm 0.42$  و  $44.50 \pm 0.50$  -  $74.99 \pm 0.27$  قرار دارد)، پایین‌تر از استاندارد کیفیت محیط‌زیست می‌باشد (Anonymous, 2000). بر این اساس مقادیر استاندارد برای میزان BOD و COD محیط‌زیست به ترتیب برابر با ۸۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد. Mostagerian و همکاران (2006) به بررسی روند تغییرات BOD و COD در اثر مواجهه با جلبک‌های *Spirogyra*، *Oscillatoria* و *Anabaena* پرداختند. نتایج تحقیقات آن‌ها نشان داد که جلبک آنابنا بیشترین تأثیر و جلبک اسپروژیر کمترین تأثیر در کاهش BOD و COD آب در بین جلبک‌های ذکر شده دارد. همچنین بیان نمودند که با گذشت زمان میزان BOD به طور معنی‌داری کاهش پیدا می‌کند ( $p \leq 0.01$ ). نکته دیگری که از تحقیقات این محققین بر می‌آید این است که در تیمار بدون جلبک میزان BOD و COD پس از ۵۵ روز به ترتیب  $44.8$  و  $47.6$ ٪ کاهش یافت و افزودن جلبک به پساب کارخانه قند بعد از ۱۵ و ۵۵ روز به ترتیب سبب  $36.2$ ٪،  $7.3$ ٪ و  $4.5$ ٪،  $2.5$ ٪

کاهش BOD و COD شد. در حالی که در آزمایش‌هایمان بعد از گذشت ۱۰ روز تقریباً ۴۰٪ شاهد کاهش میزان BOD و ۳۷٪ COD آب بودیم.

از نتایج این تحقیق می‌توان دریافت که ریزجلبک سندسموس قابلیت تطبیق بالایی با پساب مزارع پرورش میگو گمیشان را داراست. کاهش بسیاری از فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب در طی پروسه شش روزه اولیه مشاهده گردید و از روز ششم تا انتهای دوره دیگر جلبک‌ها در تمامی تیمارها قابلیت خود را در جذب مواد آلی و معدنی آب از دست دادند و درصدی از ترکیبات فسفاتی جذب شده را در اثر مرگ و میر به محیط منتشر نمودند. علت عدم توانایی ریزجلبک به تکثیر و پرورش بیشتر از بازه زمانی ذکر شده را می‌توان هم به کاهش بیش از حد فسفر به عنوان عامل محدود کننده و هم به کم بودن سایر مواد مغذی پساب مزارع پرورش میگو گمیشان مرتبط دانست.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود واجب می‌دانند که از همکاری‌های صمیمانه جناب آقای دکتر عارف پیر بیگی تشکر و قدردانی نمایند.

### منابع

- Abolhasani, M.H., Hoseini, S.A., Ghorbani, R., Vinse, A. 2016. Removal of phosphate and nitrate from urban waste water by algae *Scenedesmus obliquus* and production of algal biomass. Journal of Aquatic Ecology. 5(4): 33-39. (in Persian)
- Anonymous. 2000. National Environmental Quality Standards (NEQS). 2000. The Gazette of Pakistan. Ministry of Environment, Local Government and Rural Development. Government of Pakistan. S.R.O. 549 (I)/2000.
- APHA, (American Public Health Association). 1992. Metodos normalizados para el analisis de aguas potables yresiduales. Dōaz de Santos, Madrid.
- Aziz, M.A. 1993. Industrial wastewater treatment using an activated algae reactor. Journal of Water Science and Technology. 28 (7): 71- 76.
- Bellinger, E.G. 1992. A key to common Algae, 4<sup>th</sup>edn. The institution of water and environmental management, London.
- Campbell, W.H. 1999. Nitrate Reductase structure, function and regulation: bridging the gap between biochemistry and physiology. Annul Reviews Plant Physiology. Plant Molecullar Biology. 50: 277-303.
- Chevalier, P., De la Noue, J. 1985. Efficiency of immobilized hyper concentrated algae for ammonium and orthophosphate removal from wastewaters. Biotechnology Letters. 7: 395-400.
- De la Noue, J., Proulx, D. 1988. Biological tertiary treatment of urban wastewaters with chitosanimmobilized Phormidium. Applly Microbiology and Biotechnology. 29: 292-297.
- Esmaeili Sari, E. 2000. Hydrochemical basis of aquaculture. Aslani Publications. 249 pp. (in Persian).
- Esmaeili Sari, E. 2004. Bacteria, fungi, algae and freshwater invertebrates. Iranian Fisheries Research Organization. 769 p. (in Persian)
- Fierro, S. Sanchez-Saavedra, M.D.P., Copalca, C. 2007. Nitrate and phosphate removal by chitosan immobilized *scenedemus*. Bioresource Technology. 99(5): 1274-1279.
- 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.
- Han, F., Pei, P.Y., Hu, W.R., Song, M.M., Ma, G.X. 2015. Optimization and lipid production enhancement of microalga culture by efficiently changing the conditions along with the growth-state. Energy Conversion and Management. 90: 315-322.
- Healey, F.P., 1978. Phosphate uptake. In: Hellebust, J.A., Craigie, J.S. (Ed.), Handbook of Phycological Methods, Physiological and Biochemical Methods. Cambridge University Press, Cambridge. 411-417 pp.

- Heidari, S., Farhadian, A., Mahbobi Sofiani, N. 2011. Biomass production and wastewater treatment to remove ammonia from the fish farm by green algae *Scenedesmus quadricauda*. Ecology. 37(59): 15-28. (in Persian)
- Lavens, P., Sargeloos, P. 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper. 361: 295p.
- Lim, S., Chu, W., Phang, S., 2010. Use of *Chlorella vulgaris* for bioremediation of textile wastewater. Journal Bioresource Technology. 101:7314-7322.
- Martinez, M.E., Sanchez, S., Jimenez, J.M., El Yousfi, F., Munoz, L. 2000. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. Bioresource Technology. 73: 263-272.
- Mohamed, N.A. 1994. Application of algal ponds for wastewater treatment and algal production. M.Sc. Thesis, (Cairo University.) Bani-Sweef Branch.
- Mostagerian, A., Yahyaabadi, S., Emtiazi, G. 2006. Reducing industrial waste contamination by green algae *Spirogyra*, *Oscillatoria* and *Anabaena*. Journal of Water and Sewage. 57: 37-46. (in Persian)
- Omori, M., Ikeda, T. 1984. Methods in marine zooplankton ecology. John Wiley and Sons Inc, 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.
- Riahi, H. 2002. Phycology. Alzahra University Publication, Tehran. 256 p.
- Ruiz-Marin, A., Mendoza-Espinosa, L.G., Stephenson, T. 2010. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. Bioresource Technology. 101: 58-64.
- Saamori, G., Samori, C., Guerrini, F. Pistocchi, R. 2013. Growth and nitrogen removal capacity of *Desmodesmus communis* and of a natural microalgae consortium in a batch culture system in view of urban wastewater treatment: Water Research (I). 47: 791-801.
- Tam, N.F.Y., Wong, Y.S. 1996. Effect of ammonia concentrations on growth of *Chlorella vulgaris* and nitrogen removal from media. Bioresource Technology. 57: 59-66.
- Tam, N.F.Y., Wong, Y.S. 1989. Wastewater nutrient removal by *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus* sp. Environment Pollution. 58: 19-34.
- Tang, D., Han, W., Li, P., Miao, X., Zhong, J. 2011. CO<sub>2</sub> biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO<sub>2</sub> levels. Bioresource Technology. 102: 3071-3076.
- Wang, L., Min, M., Li, Y. Chen, P., Chen, Y., Liu, Y., Wang, Y., Ruan, R. 2010. Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. Applied Biochemical and Biotechnology. 162: 1174-1186.
- Zar, J.H. 1984. Bio statistical analysis. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall. 620 p.