Archive of SID

امکان سنجی تولید زیست توده و حذف فسفات و نیترات از پساب شهری به وسیله کشت جلبک کلرلا وولگاریس(*Chlorella vulgaris*)

محمد هادی ابوالحسنی*[۱]، سید عباس حسینی[۱]، رسول قربانی[۱]، اردگ وینسه[۳]

۱- گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران، صندوق پستی: ۳۸۶

۲- موسسه زیست شناسی گیاهی، گودولو، مجارستان

تاریخ دریافت: ۴ آذر ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: ۲۷ فروردین ۱۳۹۵

چکیده

مواد مغذی نیترات و فسفات به وفور در پساب‌های شهری وجود دارد. برای ارزیابی کارایی جلبک سبز کلرلا وولگاریس در حذف نیترات و فسفات از پساب شهری و همچنین کاربرد آن به عنوان یک محیط کشت مناسب برای جلبک کلرلا وولگاریس، نمونه‌های آب خروجی از تصفیه‌خانه‌ی مرکزی شهرستان گرگان جمع‌آوری شد. ۲ تیمار و ۱ شاهد این آزمایش که هر کدام شامل ۶ تکرار بود پساب‌هایی با ۱۰۰٪، ۵۰٪ و ۰٪ رقت بودند. نتایج نشان داد که جلبک کلرلا وولگاریس به خوبی می‌تواند در پساب‌ها رشد کرده و ۱۰۰٪ فسفات (تیمار C0) و ۹۹/۳۷ ٪ نیترات (تیمار C50) را حذف کند. بیش‌ترین میزان زیست توده تولیدی (۰/۲۵ گرم در لیتر)، میزان کلروفیل a (۳/۳۴ میلی‌گرم در لیتر)، تعداد سلول ($۱/۴\times۱۰^{۶}$ سلول در *میلی‌لیتر*) در تیمار C0 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: کلرلا وولگاریس، زیست توده، نیترات، فسفات، پساب شهری.

* عهده‌دار مکاتبات (✉).hadi.mha2001@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

زباله‌های شهری نظیر مواد دفعی، استفاده از آب در زندگی روزمره، مواد شوینده و ... به مقدار زیادی از فعالیت‌های انسان در محل سکونت آن‌ها تولید می‌شود. فعالیت‌های انسان به خصوص ساخت‌وساز و کشاورزی نیز مقدار زیادی نیتروژن و فسفر داخل اکوسیستم‌های آبی وارد می‌کنند این غنی شدن توسط مواد مغذی و یوتریفیکاسیون منابع آبی می‌توانند روی ساختار و عملکرد اکوسیستم تاثیرگذار باشد و حتی می‌تواند روی تنوع زیستی آن اکوسیستم نیز مؤثر و پایداری و تعادل آن اکوسیستم را به هم بریزد. از دید دیگر با توجه به تغییر ساختار اکوسیستم، ورود گونه‌های غیر بومی افزایش یافته و باعث از بین رفتن گونه‌های بومی و تداخلات ژنتیکی آبزیان در آن اکوسیستم می‌شود (Piri and Ordog, 1997). به هر حال باید روی مقدار نیتروژن و فسفر در اکوسیستم‌های آبی کنترل بیش‌تری انجام گیرد و اجازه تجاوز از مقدار مناسب داده نشود. یکی از روش‌های کاهش غلظت مواد مغذی مانند نیتروژن و فسفر استفاده از روش بیولوژیکی است که ریز جلبک‌ها دارای توانایی بالایی برای تصفیه فاضلاب هستند (De la Noiie and Proulx, 1988). تصفیه فاضلاب توسط ریز جلبک‌ها دارای مزایایی است همچون باز چرخ مواد مغذی نیتروژن و فسفر، تولید زیست توده ارزشمند که می‌توان از آن برای تولید سوخت زیستی، مواد آرایشی-بهداشتی، مواد غذایی،... مورد استفاده قرار داد و همچنین عدم تولید آلودگی ثانویه است (Yalcin *et al*., 2006; Voltolina *et al*., 2004). جلبک کلرلا وولگاریس جلبک سبز تک سلولی است که به طور گسترده در آب‌های جهان وجود دارد (Lee and Lee, 2001; Li *et al*., 2010). این مطالعه در غلظت‌های مختلفی از فاضلاب شهری انجام شده است، به دلیل اینکه کمبود یا مازاد مواد مغذی می‌تواند نقش بازدارندگی برای رشد جلبک و کارایی آن‌را در جذب مواد مغذی داشته باشد (Kong *et al*., 2010) هدف از انجام این مطالعه تعیین کارایی و میزان رشد جلبک کلرلا وولگاریس در جذب مواد مغذی فاضلاب شهری در غلظت‌های مختلف بوده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری جلبک کلرلا وولگاریس از آب استخرهای خاکی سیجوال در استان گلستان صورت گرفت. جلبک کلرلا پس از مشاهده با میکروسکوپ اینورت مدل ستی ساخت بلژیک به کمک کلیدهای موجود شناسایی شد و با استفاده از روش Lavens و Sorgeloos (۱۹۹۶) با کشت بر روی آگار خالص‌سازی شد. بعد از حصول اطمینان از خالص بودن جلبک‌های جداسازی شده، آن‌ها را در ارلن مایرهای ۲ لیتری درون محیط کشت Zinder که به اختصار Z_8+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 (Piri and Ordog, 1997). به منظور بررسی ارزیابی اثر کارایی جلبک کلرلا وولگاریس بر پساب شهری غنی از ترکیبات نیتروژن‌دار و فسفردار، آزمایشی با ۴تیمار و ۶ تکرار در طرح کاملاً تصادفی انجام شد. برای انجام این آزمایش، نمونه پساب شهری از تصفیه خانه‌ی مرکزی شهر گرگان واقع در جاده‌ی آق قلا و پس از آخرین مرحله تصفیه گرفته شد. با توجه به اینکه تیمارهای این

www.SID.ir

Archive of SID

آزمایش پساب‌هایی با ۱۰۰٪، ۵۰٪ و ۰٪ رقت بود برای تهیه پساب تیمارهای با ۱۰۰٪ و ۵۰٪ رقت به ترتیب از نسبت ۱:۱ و ۱:۲ پساب آورده شده: آب مقطر استریل استفاده شد که میزان ترکیبات نیترژن‌دار و فسفردار آن در جدول شماره (۱) آورده شده است. در جریان آزمایش ۲۴ ارلن مایر ۵۰۰ میلی‌لیتری برای تیمارها در نظر گرفته شد که درون هر کدام ۳۰۰ میلی‌لیتر پساب مربوط به هر تیمار و ۲ میلی‌لیتر جلبک کلرلا (با غلظت ۸×۱۰^{۶} سلول در *میلی‌لیتر*) از قبل کشت داده شده، اضافه شد.

جدول ۱: مقادیر مختلف نیترات، فسفات در پساب‌های مختلف برای کشت جلبک کلرلا وولگاریس

نوع پساب	نیترات	فسفات
پساب ۱۰۰٪رقیق شده(C100)	۱۵/۶	۶/۹
پساب ۵۰٪ رقیق شده(C50)	۲۴/۱۵	۸
پساب ۰٪ رقیق شده (C0)	۲۸/۲۸	۱۷/۴

(غلظت‌ها براساس شکل نیتروژنی نیترات و فسفات 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 لام هموسیتومتری و با روش پیشنهاد شده‌ی Martinez و همکاران در سال ۲۰۰۰ انجام شد. زیست توده خشک جلبک‌ها با استفاده از روش پیشنهاد شده 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 $SGR=(lnN2-lnN1)/t$ محاسبه شد که در آن N2 تعداد سلول‌های جلبک در انتهای آزمایش و t مدت زمان انجام آزمایش است. زمان دو برابر شدن جمعیت جلبک‌ها با استفاده از رابطه‌ی $DT=ln2/SGR$ محاسبه شد (Omori and Ikeda, 1984). میزان نیترات، فسفات توسط کیت‌های اندازه‌گیری شرکت وکتگ به دست آمد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با تجزیه واریانس یکطرفه (one way ANOVA) انجام شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح معنی داری ۵٪ استفاده شد کارهای آماری لازم با استفاده از نرم افزار آماری SAS نسخه ۹.۲ صورت گرفت.

نتایج

نتایج تجزیه وتحلیل واریانس یک طرفه، در طول آزمایش نشان داد که تیمارهای مختلف آزمایشی بر مشخصه‌های مختلف اندازه‌گیری شده تأثیر بسیار معنی‌داری دارد (جدول ۲، $P < ۰/۰۱$). میانگین زیست توده، تعداد سلول، میزان کلروفیل a، میزان رشد ویژه و زمان دو برابر شدن کشت‌های کلرلا وولگاریس در تیمارهای مختلف پساب در شکل‌های ۱و ۲ ارائه شده است.

بیشترین میانگین زیست توده کلرلا وولگاریس در ۵ روز اول در تیمار C0 (۰/۲۵ گرم در لیتر)، در ۵ روز دوم کم‌ترین میزان در تیمار C100 (۰/۱ گرم در لیتر)، و در ۵ روز سوم تفاوت معنی‌داری بین تیمارها دیده نشد. نتایج ارائه شده در شکل شماره ۱ نشان داد که بیش‌ترین میانگین تعداد سلول جلبکی بدست آمده در ۵ روز اول، دوم و سوم از تیمار C0 (به ترتیب $۱/۴ \times ۱۰^{۶}$، $۰/۰۹۸ \times ۱۰^{۶}$، $۰/۰۷۴ \times ۱۰^{۶}$ سلول در میلی‌لیتر)

www.SID.ir

Archive of SID

بود. میزان کلروفیل a به دست آمده، در ۵ روز اول و دوم بین تیمارهای مختلف تفاوت معنی داری را نشان نداد ولی در ۵ روز سوم بیش‌ترین میزان در تیمار C0(۲/۶۵ میلی‌گرم در لیتر) دیده شد. بیش‌ترین میزان رشد ویژه و کم‌ترین زمان دو برابر شدن جمعیت کلرلا وولگاریس در طول دوره در تیمار C0 (به ترتیب ۰/۶۱ در روز، ۱/۱۲ روز) بود (شکل ۲). در شکل ۳ میزان فسفات و نیترات باقی مانده در محیط کشت در تیمارهای مختلف نشان داده شده است. براساس شکل ۴ در انتهای دوره‌ی ۱۵ روزه بیش‌ترین میزان درصد حذف فسفات در تیمار C0 به میزان ۱۰۰ ٪ و بیش‌ترین میزان درصد حذف نیترات در تیمار C50 به میزان ۹۹/۳۷ ٪ دیده شد. به طور کلی با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان بیان کرد که با این که جلبک کلرلا وولگاریس بر روی تمامی تیمارهای آزمایش شده از پساب به خوبی رشد کرده و میزان فسفات و نیترات پساب را کاهش می‌دهد.

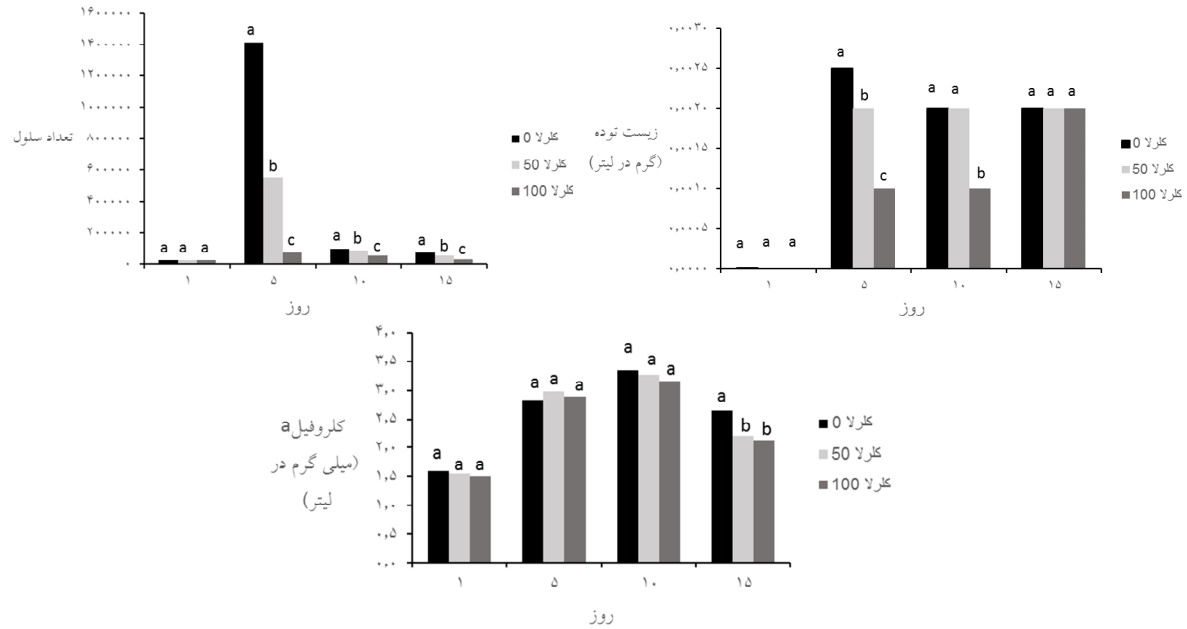
جدول۲: تجزیه وتحلیل واریانس مشخصه‌های اندازه‌گیری شده در تیمارهای مختلف آزمایشی طی دوره ۱۵ روزه‌ی پرورش جلبک کلرلا وولگاریس

شاخص	منابع تنوع	درجه آزادی	۵ روز اول		۵ روز دوم		۵ روز سوم	
			میزان F	سطح معنی‌دار	میزان F	سطح معنی‌دار	میزان F	سطح معنی‌دار
تعداد سلول	تیمارها	۲	۵۳۱۲	**	۶۸۴/۶	**	۶۱۲/۱	**
	خطاها	۶						
	کل	۸						
زیست توده	تیمارها	۲	۴/۲	_	۱۲/۱	_	۰/۱۲	_
	خطاها	۶						
	کل	۸						
کلروفیل a	تیمارها	۲	۰/۰۷	_	۴۷/۸۳	**	۲۳/۸۹	**
	خطاها	۶						
	کل	۸						
فسفات	تیمارها	۲	۹۷/۷۲	**	۰/۵۲	_	۵/۰۷	_
	خطاها	۶						
	کل	۸						
نیترات	تیمارها	۲	۴۷۱/۸۹	**	۱۳۰/۷۳	**	۷۵/۹۷	**
	خطاها	۶						
	کل	۸						

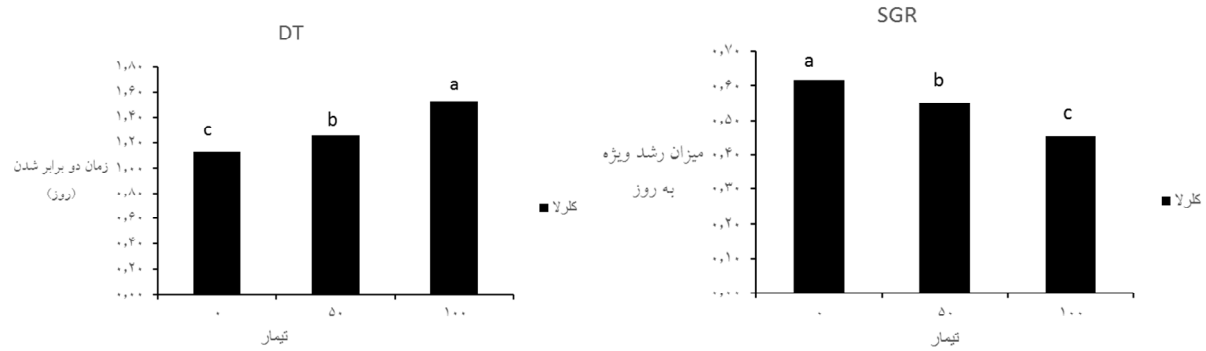
معنی‌داری در سطح ۰/۰۱ **، معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ *

www.SID.ir

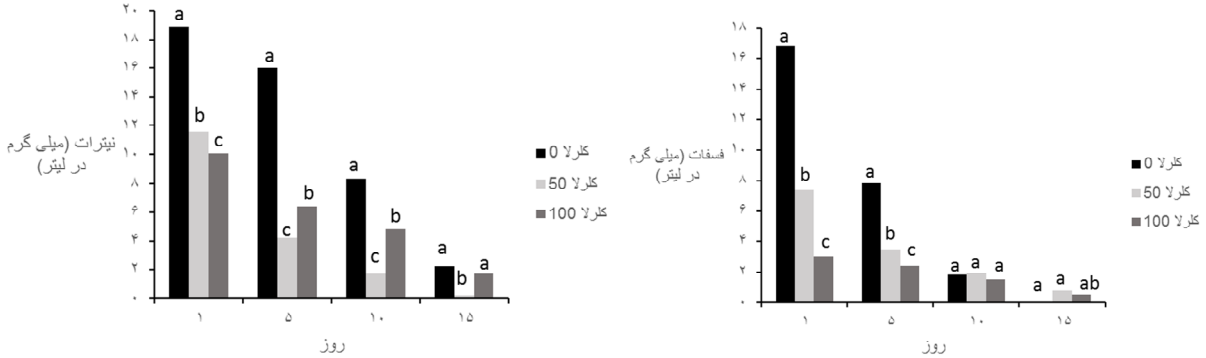
Archive of SID



شکل ۱: تأثیر تیمارهای مختلف پساب بر میانگین شاخص‌های زیستی(زیست توده، تعداد سلول، کلروفیل a) جلبک کلرلا وولگاریس 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).



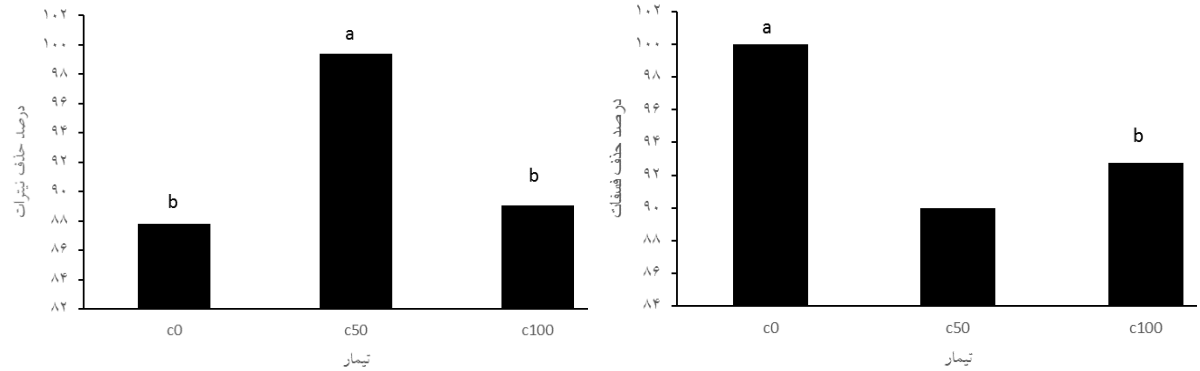
شکل ۲: تأثیر تیمارهای مختلف پساب بر میانگین شاخص‌های رشد جلبک کلرلا وولگاریس درپایان دورهٔ آزمایش (روز ۱۵) ستون دارای یک حرف مشترک در سطح احتمال ۵ درصد فاقد اختلاف معنی دار هستند (آزمون دانکن).



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).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۴: درصد حذف فسفات و نیترات طی ۱۵ روز پرورش جلبک کلرلا وولگاریس در تیمارهای مختلف آزمایشی (ستون دارای یک حرف مشترک در سطح احتمال ۵ درصد فاقد اختلاف معنی‌دار 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). مقدار مواد باز چرخ 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 باز چرخ کنندگان مواد غذایی شود (Voltolina *et al*, 2004). در فرایند سیستم ادامه‌دار (Continious) پساب و جلبک بدین صورت است که پساب غنی از نیتروژن و فسفر به همراه دی اکسیدکربن و انرژی خورشیدی، فراهم کنندهٔ شرایط مناسب برای رشد و تکثیر میکروآلگ‌ها است که سرانجام منتج به تولید زیست تودهٔ مفید جلبکی و کاهش نیتروژن و فسفر پساب خواهد شد. زیست توده تولید شده به نوبه خود موجب افزایش تولیدات زیستی و سوخت زیستی می‌شود که از این نظر یکی از کاراترین جذب‌کنندگان دی اکسیدکربن اتمسفری که در نتیجه به حفاظت از محیط زیست نیز کمک می‌کند و همچنین ابزار تولید انرژی از طریق سوخت گیاهی است (Tam and Wong, 1989). یافته‌های این تحقیق نشان داد که جلبک کلرلا وولگاریس در تیمارهای مختلف غنی از مواد مغذی نیتروژن‌دار و فسفردار رشد کرده و با توجه به میزان بقای بالا و رشد مناسب، این گونه نیروی بالقوه مناسبی برای تصفیه زیستی پساب دارد. بالاترین زیست توده، تعداد سلول و میزان رشد ویژه در جلبک کلرلا وولگاریس در تیمار C0 و همچنین بالاترین کارایی جذب فسفات در تیمار C0 (۱۰۰٪) و بیش‌ترین کارایی جذب نیترات در تیمار C50 (۹۹/۳۷ ٪) مشاهده شد. بر اساس نتایج می‌توان گفت جلبک کلرلا وولگاریس در تیمارهایی که غلظت مواد مغذی در آن‌ها بیش‌تر باشد توانایی رشد بیش‌تری دارند و میزان زیست توده‌ی با ارزشی را تولید کرده و در جذب مواد مغذی موجود در پساب با موفقیت عمل می‌کند. سایر مطالعات نیز از کارایی بالای جلبک‌ها در جذب مواد مغذی نشان می‌دهد. *Chlorella sp.* و دیگر گونه‌های جلبک‌های سبز می‌توانند از آمونیوم و نیترات به عنوان منابع نیتروژن برای رشد خود استفاده کند (Bloom *et al*., 1992). Geetha و همکاران (۱۹۹۴) گزارش دادند که

www.SID.ir

Archive of SID

جلبک سبز کلرلا بخوبی در پساب‌هایی که دارای مواد مغذی است رشد کرده و زیست توده چشمگیری تولید می‌کند و همچنین باعث کاهش آمونیاک (بیشتر از ۹۰٪) به مدت ۱۰ روز می‌شود. Sreesai و Pakpain (۲۰۰۷) اعلام کردند که گونه *Chlorella vulgaris* ۵۵٪ میزان فسفر کل را از محیط کشت در انتهای دوره حذف کرد.

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 وتعداد سلول جلبکی، درصد فسفات و نیترات حذف شده از پساب افزایش می‌یابد. Dhar وSingh در سال ۲۰۰۷ نیز همبستگی معنی‌داری بین کارایی حذف نیتروژن با وزن خشک جلبک در دو گونه جلبک نوستوک موسکوروم و آنابنا واریابیلیس گزارش کرده است. امروزه با توجه به افزایش ورود پساب‌ها به اکوسیستم‌های آبی و خطر یوتریفیکاسیون در آن‌ها و در ادامه تغییر ساختار اکوسیستم با توجه به وجود مواد فسفاته و نیتراته در پساب‌ها، می‌توان از حوضچه‌های کشت جلبک برای جذب مواد مغذی پساب‌ها استفاده کرد.

سپاسگزاری

در اینجا بر خود لازم می‌دانیم از زحمات کلیه کسانی که مارا در انجام این تحقیق یاری نمودند سپاسگزاری نماییم.

منابع

1. Bloom, A.J., Sukrapanna, S.S., Warner, R.L, 1992. Root respiration associated with ammonium and nitrate absorption and assimilation by barley. Plant Physiology, 99, 1294–1301.
2. De la Noiie, J., Proulx, D, 1988. Biological tertiary treatment of urban wastewaters with chitosan- immobilized Phormidium. Applied Microbiology and Biotechnology. 29, 292-297.
3. Geetha, P.K., Martinez, M.E., Proulx, D, 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, 306-312.
4. Komarek, J, 1973. Culture collections. In: Carr N.G. and Whitton B.A. The biology of blue-green algae. Blackwell Scientific publication. 519-524.
5. Kong, Q.X., L. Li, B. Martinez, P. Chen., R. Ruan, 2010. Culture of microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* in wastewater for biomass feedstock production. Applied Biochemistry and Biotechnology, 160, 9-18.
6. Lavens, P., Sorgeloos, P., 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fisheries Technical, 295 P.
7. Lee, K., Lee, C.G, 2001. Effect of light/dark cycles on wastewater treatments by microalgae. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 6, 194–199.
8. 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 Biotechnol, 27, 59-63.
9. Martinez, M.E., Sánchezb, S., Jiméneza, J.M., Yousfic, F El., Muñoza, L., 2000. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalgae *Scenedesmus obliqus*. Bioresource Technology, 73:263-272.
10. Miller, D.E., Green, J.C., Shiroyama, T., 1978. The selenustrum capricornatum printz algal assay bottle test: Experimental design, application and interoperation protocol, P.126.Us Epa 600 / 9.
11. Omori, M., Ikeda, T., 1984. Methods in marine zooplankton ecology. John Wiley and Sons Inc, New York, 332 P.
12. Parsons, T.R., Maita, Y., Lalli, C.M., 1984. A manual of chemical and biological methods for seawater analysis. Pergamum Press, Oxford, 173 P.
13. Piri, Z.M., Ordog, V., 1997. Effect of some herbicides commonly used in Iranian agriculture on aquatic food chian, Ph.D. Thesis. University of Godollo, Hungary. 9-30.
14. Voltolina, D., Gmez-Villa, H., Correa, G., 2004. Biomass production and nutrient removal in semicontinuous cultures of *Scenedesmus* sp. (Chlorophyceae) in artificial

www.SID.ir

Archive of SID

wastewater, under a simulated day-night cycle. Vie Milieu, 54, 21-25.
15. Singh, N.K., Dhar, D.W., 2007. Nitrogen and phosphorous scavenging potential in microalgae. Indian Journal of Biotechnology, 6, 52-56.
16. Sreesai,S., Pakpain, P., 2007. Nutrient recycling by *Chlorella vulgaris* from septage effluent of the Bangkok city, Thailand. Sciences of Asia, 33, 293-299.
17. Tam, N.F.Y., Wong, Y.S., 1989. Wastewater nutrient removal by *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus* sp. Environmental Pollution, 58:19-34.
18. 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.

www.SID.ir