



جداسازی مواد مغذی از پساب شهری از طریق کشت جلبک *Chlorella vulgaris* در سیستم متوالی

عارف پیریگی^{۱*}، سید عباس حسینی^۱، رسول قربانی^۱، حسن رضایی^۱، اردگ وینسه^۲

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

^۲انستیتو زیست‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی و صنایع غذایی، دانشگاه مجارستان غربی

نوع مقاله:	چکیده
پژوهشی	ورود مواد مغذی به محیط می‌تواند سبب یوتریفیکاسیون اکوسیستم‌های آبی گردد. از اینرو مطالعه حاضر در پاییز سال ۱۳۹۴ در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان به منظور بررسی تاثیر غلظت‌های اولیه نیتروژن و فسفر بر روی نرخ جداسازی مواد مغذی توسط جلبک <i>Chlorella vulgaris</i> انجام شد. برای این منظور، با افزودن آب مقطر به پساب، چهار تیمار آزمایشی تهیه شد (۰٪، ۲۵٪، ۵۰٪ و ۷۵٪). مقدار مشخصی از سلول‌های کلرلا به هر یک از تیمارها که شامل پساب با مقادیر اشاره شده بودند اضافه شد و تغییرات در مقادیر فسفات، نترات، آمونیوم، pH، COD، BOD و تعداد سلول‌ها طی یک دوره آزمایشی ۲۸ روزه پایش گردید (دو روز یکبار). طی مدت آزمایش، دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ثابت 24 ± 1 درجه سانتی‌گراد اعمال گردید. نتایج نشان داد که تیمار با رقت ۵۰٪ بهترین کارایی را در حذف فسفات (۹۴/۴٪) و تیمار با رقت ۷۵٪ بهترین کارایی را در حذف نترات (۹۹/۸۴٪) داشتند. BOD، COD و آمونیوم در پایان کاهش ولی مقادیر کلروفیل a، تعداد سلول‌ها و pH افزایش یافتند. می‌توان نتیجه گرفت کلرلا می‌تواند نقش مؤثری در حذف مواد مغذی پساب شهری داشته باشد.
تاریخچه مقاله: دریافت: ۹۵/۰۸/۱۰ اصلاح: ۹۵/۱۲/۱۵ پذیرش: ۹۶/۰۲/۱۵	
کلمات کلیدی:	
پساب شهری تصفیه سیستم متوالی کلرلا وولگاریس نترات	

مقدمه

اگرچه در حال حاضر اهمیت استراتژیک آب سالم در سرتاسر دنیا بیشتر شناخته شده است اما منابع آب با خطرات جدی رو به رو هستند. افزایش آلودگی، صنعتی شدن و توسعه سریع اقتصادی سبب به خطر انداختن کیفیت منابع آبی در بسیاری از نقاط دنیا شده‌اند (Abdel-Raouf et al., 2012). در بسیاری از مناطق هنوز پساب شهری و خانگی مستقیماً و بدون هیچ گونه فرایند تصفیه سازی وارد محیط‌های آبی می‌شود (Abdel-Raouf et al., 2012)، بنابراین تصفیه پساب یک موضوع بسیار حیاتی قلمداد می‌شود و تصفیه خانه‌های فراوانی در اکثر نقاط دنیا تأسیس گردیده است. در این مراکز، پس از جداسازی مواد بزرگ جامد، پساب وارد تانک‌های ته‌نشینی می‌گردد تا جامدات قابل ته‌نشینی آن با نیروی گرانش جدا گردند. یک تانک ته‌نشینی مناسب قادر است تا ۴۰ درصد BOD را در قالب جامدات ته‌نشینی شده کاهش دهد (Horan, 1990). فرایند تصفیه ثانویه مرحله بعد می‌باشد که هدف آن کاهش BOD آزاد شده از طریق کاهش مواد آلی می‌باشد (Abdel-Raouf et al., 2012). هدف فرایند تصفیه ثالثه پساب، جداسازی تمام یون‌های ارگانیک می‌باشد. این فرایند می‌تواند بیولوژیک و یا شیمیایی

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: Pirbeigiaref@yahoo.com

باشد. فرایند بیولوژیکی به دلیل هزینه بسیار پایین تر و عدم ایجاد آلودگی ثانویه محیط، بسیار مناسب تر به نظر می‌رسد (Oswald, 1988). هدف نهایی این فرایند، جداسازی کامل آمونیوم، نیترات و فسفات می‌باشد چرا که افزایش ورود مواد مغذی به ویژه نیتروژن و فسفر به درون محیط‌های طبیعی می‌تواند سبب یوتروفیکاسیون اکوسیستم‌های آبی گردد و بدین ترتیب سبب از دست رفتن گونه‌های موجود و اختلال در عملکرد سیستم گردد (Aslan and Kapdan, 2006; Abdel-Raouf *et al.*, 2012).

کاربرد ریز جلبک‌ها برای تصفیه پساب‌ها دارای مزایای متعددی است که از مهمترین آن‌ها می‌توان به عدم ایجاد آلودگی ثانویه در صورت استفاده از بیوماس تولیدی، عدم ایجاد خطرات زیست محیطی با تکیه بر اصول اکوسیستم‌های طبیعی و توانایی ریز جلبک‌ها در بازچرخش مؤثر مواد مغذی موجود در پساب‌های ثانویه اشاره کرد (Ahmadpour *et al.*, 2015). بسیاری از گونه‌های جلبکی به آلودگی‌های موجود در پساب‌ها مقاوم‌اند و سریعاً در محیط غنی از نیتروژن و فسفر مستقر می‌شوند و با استفاده از این مواد جهت رشد می‌توانند موجب حذف نیتروژن و فسفر پساب گردند. این امر نشان می‌دهد که سیستم پرورش ریزجلبک‌ها می‌تواند به عنوان جایگزین فرایند تصفیه ثالثه پساب به منظور حذف مواد مغذی از آن‌ها به کار گرفته شود (Martinez *et al.*, 1999; Sayadi *et al.*, 2011). برخی از گونه‌های جلبکی که به صورت گسترده جهت جداسازی مواد مغذی به کار گرفته شده‌اند، شامل گونه‌های کلرلا (*Chlorella*) (Chlorella) (Lee and Lee, 2001) و اسپیرولینا (*Spirulina*) (Spirulina) (Olguin *et al.*, 2003) می‌باشند. جلبک‌های سبز تک سلولی از جمله جنس کلرلا، به دلیل کلونیزه شدن در داخل استخر، رشد سریع، کشت ساده و توانایی بالا در جداسازی مواد مغذی به طور عمده‌ای جهت تصفیه فاضلاب‌ها به کار رفته‌اند (Chevalier *et al.*, 2000). کلرلا و دیگر جلبک‌های سبز می‌توانند از آمونیوم و نیترات به عنوان منابع نیتروژن برای رشد خود استفاده کنند.

به منظور کشت جلبک‌ها در پساب از سیستم‌های مختلفی از جمله سیستم‌های بچ و متوالی استفاده می‌شود. سیستم‌های بچ سیستم‌هایی بسته و سیستم‌های متوالی سیستم‌هایی باز می‌باشند. به طور کلی گونه‌های جلبکی زمانی که در سیستم‌های متوالی یا نیمه متوالی کشت داده می‌شود تمایل به تولید بیوماس پروداکتیویته بالاتری نسبت به سیستم بچ دارند (Sun *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2009). به همین دلیل در این مطالعه از سیستم متوالی به منظور کشت جلبک *Chlorella vulgaris* استفاده شد تا میزان حذف نیترات، فسفات و آمونیوم پساب شهری مشخص گردد و همچنین میزان تولید کلروفیل a در آن برآورد گردد.

مواد و روش‌ها

آماده سازی جلبک

از استوک‌های خالص شده جلبک *Chlorella vulgaris* موجود در آزمایشگاه کشت جلبک دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان برای انجام این تحقیق استفاده گردید. استوک *C. vulgaris* در ارلن مایرهای ۲ لیتری که هر کدام حاوی ۴۰۰ میلی لیتر از محیط کشت zinder که به اختصار Z₈+N نامیده می‌شود، به مدت ۱۴ روز کشت داده شد تا ذخیره‌ی اولیه جلبک برای آزمایش فراهم شود (Komarek, 1973; Miller *et al.*, 1978). دوره‌ی نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی برای کشت این جلبک در نظر گرفته شد (Piri and Ordog, 1997). طی این دوره نرخ رشد ویژه جلبک با روش ارائه شده توسط Omori و Ikeda (1984) به صورتی که بعداً توضیح داده خواهد شد، محاسبه گردید.

جمع‌آوری فاضلاب

برای انجام این آزمایش، نمونه پساب شهری در پاییز سال ۱۳۹۴ از تصفیه‌خانه‌ی مرکزی شهر گرگان واقع در جاده‌ی آق قلا و پس از آخرین مرحله تصفیه گرفته شد و به آزمایشگاه کشت جلبک دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل گردید. در آزمایشگاه، پساب جمع‌آوری شده توسط بافت توری چند بار فیلتر گردید تا ذرات بزرگ، و مواد جامد نامحلول آن جدا گردند. سپس پساب (سوپرناتانت) باقی‌مانده به مدت ۲۰ دقیقه و در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شد (Martinez *et al.*, 2000).

تیمارهای به کار رفته در این آزمایش شامل پساب‌هایی با ۰٪ رقت (پساب خالص)، ۲۵٪ رقت (یک قسمت آب مقطر و سه قسمت پساب)، ۵۰٪ رقت (دو قسمت آب مقطر و دو قسمت پساب) و ۷۵٪ رقت (سه قسمت آب مقطر و یک قسمت پساب) بود که میزان ترکیبات مغذی آن‌ها طبق روش‌های استاندارد سنجش گردید و مقادیر آن‌ها در جدول (۱) آورده شده است (APHA, 2005).

جدول ۱. مقادیر اولیه برخی پارامترهای پساب شهری پس از تهیه غلظت‌های مورد استفاده در این آزمایش (بر حسب میلی‌گرم در لیتر)

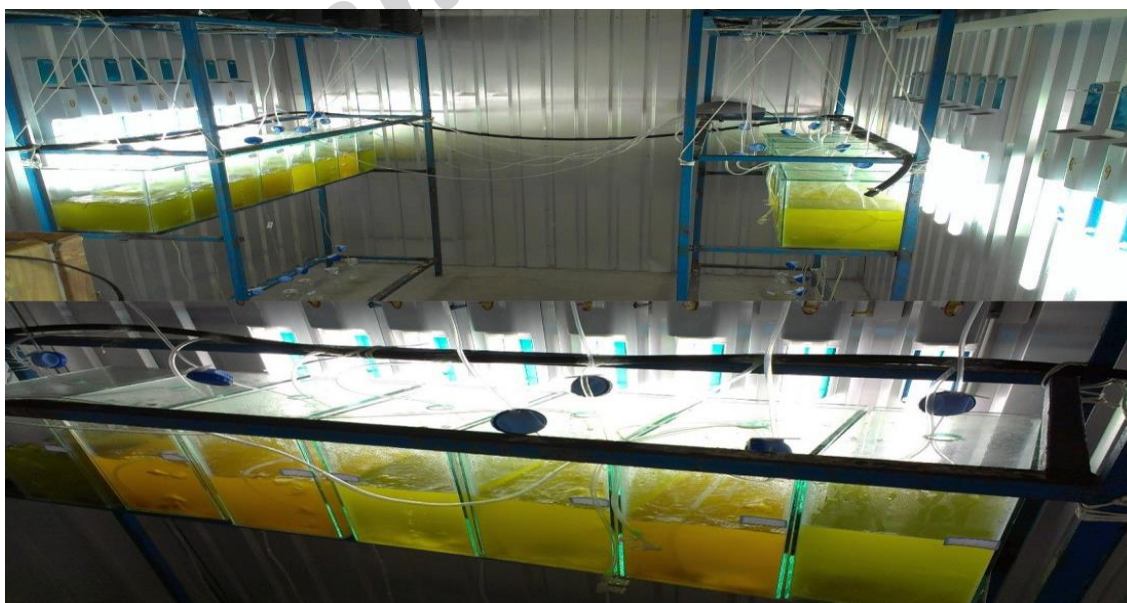
PH	BOD	COD	آمونیم	نیترات	فسفات	ویژگی‌ها
						پساب
۶/۷۲±۰/۰۲	۲۸/۶۶±۰/۰۲	۷۳/۹۸±۰/۱۳	۱۸/۵۷±۰/۱۲	۳۲/۴۷±۰/۰۲	۲۱/۵۹±۰/۰۳	رقت ۰٪
۶/۸۵±۰/۰۵	۲۲/۴۴±۰/۰۵	۶۱/۱۲±۰/۱	۱۵/۲۱±۰/۰۹	۲۶/۵۱±۰/۲۶	۱۶/۴۹±۰/۰۳	رقت ۲۵٪
۷/۰۷±۰/۰۶	۱۶/۳۲±۰/۱۲	۳۹/۴۶±۰/۰۵	۱۰/۶۱±۰/۰۲	۱۸/۳±۰/۰۵	۱۲/۷۶±۰/۰۷	رقت ۵۰٪
۷/۱۲±۰/۰۳	۸/۷۳±۰/۰۶	۲۲/۴۲±۰/۰۸	۶/۳±۰/۰۱	۱۰/۴±۰/۰۲	۷/۶۱±۰/۰۴	رقت ۷۵٪

طراحی آزمایش

آکواریوم‌های ۱۰ لیتری دارای مخازن ورودی و خروجی با سرعت یکسان (سرعت آن توسط شیرهای کنترل تنظیم گردید) به عنوان سیستم کشت متوالی در نظر گرفته شدند (شکل ۱).

برای هر تیمار ۳ تکرار (۳ سیستم متوالی) در نظر گرفته شد. به هر یک از آکواریوم‌های ۱۰ لیتری و مخزن ورودی آن‌ها پساب با رقت‌های از پیش تعیین‌شده اضافه گردید. همچنین جلبک *C. vulgaris* با مقدار اولیه ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر (حدود ۲۰۰۰۰ سلول در میلی‌لیتر) نیز به مخازن ۱۰ لیتری اضافه گردید (Gao et al., 2014). سپس شیر ورودی و خروجی به میزان مشخص (بر اساس نرخ ورودی روزانه (F)) باز شدند و از یک طرف پساب وارد سیستم می‌گردید و از طرف دیگر پساب از سیستم خارج می‌گردید به طوری که سطح پساب در داخل آکواریوم ۱۰ لیتری ثابت باقی می‌ماند. در سیستم متوالی، نرخ ورودی روزانه (F) از فرمول زیر تعیین می‌شود (Dickinson et al., 2014):

$$D(d-1) = F(L d-1) / V(L)$$



شکل ۱. سیستم متوالی کشت جلبک طراحی شده برای این آزمایش

در این فرمول، D ، نرخ رقت و V ، حجم محیط کشت موجود در سیستم می‌باشد. اما برای محاسبه نرخ رقت نیز بایستی از فرمول $\mu(d-1) = D(d-1)$ استفاده کرد. بر اساس این فرمول، نرخ رقت با سرعت رشد ویژه جلبک در سیستم بیج برابر است. دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی (Piri and Ordog, 1997)، با استفاده از لامپ‌های فلئورسنت ۱۶ واتی اعمال گردید. دمای محیط از طریق کولر اسپلیت در تمام طول آزمایش ثابت نگه داشته شد (24 ± 1 درجه سانتی‌گراد). هوادهی دائمی از انتهای آکواریوم به منظور اکسیژن‌رسانی به جلبک‌ها و جلوگیری از انباشته شدن آن‌ها انجام گردید. آزمایش ۲۸ روز به طول انجامید.

بررسی پارامترها

در ابتدا نرخ رشد ویژه (SGR) در سیستم بیج با استفاده از رابطه $SGR = (\ln N_2 - \ln N_1) / \Delta t$ محاسبه شد (Omori and Ikeda, 1984)، که در آن N_2 تعداد سلول‌های جلبک در انتهای آزمایش و N_1 تعداد سلول‌های جلبک در ابتدای آزمایش و Δt مدت زمان انجام آزمایش است (Omori and Ikeda, 1984). طی دوره کشت، شمارش جلبکی هر روز با استفاده از لام هموسیستمتر نئوبار و میکروسکوپ اینورت انجام گردید (Song et al., 2013). به منظور سنجش میزان جداسازی مواد مغذی، هر دو روز یکبار ۵۰ میلی‌لیتر از پساب خارج شده از آکواریوم‌ها جدا و سپس به میزان ۱۰ دقیقه و با سرعت ۴۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ می‌گردید. پس از این فرایند، سوپرناتانت به دست آمده برای سنجش نیترات (NO_3-N)، فسفات (PO_4-P) و آمونیوم (NH_4-N) استفاده شد (Han et al., 2015). سپس نرخ جداسازی بر اساس فرمول $Removal\ efficiency = (C_i - C_0) / C_0 \times 100\%$ محاسبه گردید. در این فرمول C_i بیانگر غلظت در زمان t_i و C_0 بیانگر غلظت اولیه می‌باشد (Han et al., 2015). سنجش نیترات، فسفات و آمونیوم با استفاده از کیت‌های شرکت پالین تست و دستگاه فتومتر و گتک انجام گردید. اندازه‌گیری BOD و COD هر دو روز یکبار با استفاده از روش کار استاندارد برای آزمایش آب ارائه شده توسط انجمن بهداشت عمومی آمریکا (APHA) (۲۰۰۵) انجام گردید. مقادیر اکسیژن (با اکسیژن متر مدل AD630) و pH (با pH متر مدل con200) به صورت روزانه سنجش گردید. اندازه‌گیری کلروفیل a نیز هر دو روز یکبار با روش Parsons و همکاران (۱۹۸۴) انجام گرفت.

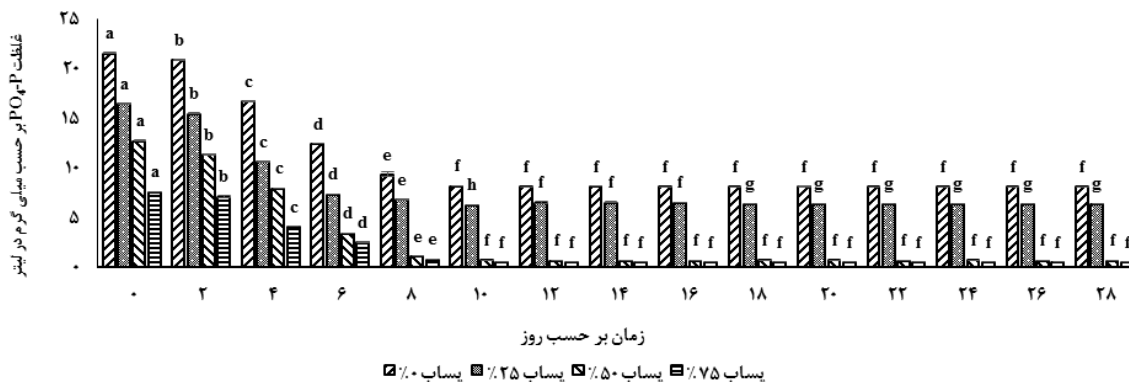
تجزیه و تحلیل آماری

این تحقیق شامل ۴ تیمار که همگی دارای ۳ تکرار بودند به صورت طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. از آزمون واریانس یک‌طرفه (One way Anova) و تست دانکن در سطح معنی‌داری ۵ درصد به منظور بررسی معنی‌دار بودن تفاوت‌های مشاهده شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS استفاده گردید. برای رسم نمودارها نیز از نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۰ استفاده گردید.

نتایج

نرخ رشد ویژه جلبک *C. vulgaris* در سیستم بیج برابر با ۰/۴ در روز محاسبه شد. نتایج تجزیه و تحلیل واریانس یک‌طرفه برای بررسی تغییرات یک پارامتر در روزهای مختلف در طول آزمایش نشان داد که تیمارهای مختلف آزمایشی بر پارامترهای مختلف اندازه‌گیری شده تأثیر معنی‌داری دارند ($p \leq 0.05$).

با توجه به شکل ۲، بیشترین میزان فسفات در ابتدای آزمایش (روز صفر) و در پساب ۰٪ مشاهده شد (افزایش رقت باعث کاهش میزان فسفات اولیه گردید). با گذشت زمان میزان فسفات در تمام تیمارها کاهش یافت. در تیمارهای ۰٪، ۲۵٪، ۵۰٪ و ۷۵٪ به ترتیب مقادیر فسفات در ابتدای آزمایش از ۲۱/۵۹، ۱۶/۴۹، ۱۲/۷۶ و ۷/۶۱ میلی‌گرم در لیتر به ۸/۱۲، ۶/۴۲، ۰/۷۱ و ۰/۵۲ میلی‌گرم در لیتر در انتهای آزمایش رسید. در تیمارهای پساب با رقت ۰٪، ۵۰٪ و ۷۵٪ از روز دهم به بعد، میزان فسفات تغییرات معنی‌داری را نشان نداد (تا روز دهم تغییرات معنی‌دار بود). در تیمار پساب با رقت ۲۵٪، این ثبات از روز هجدهم به بعد مشاهده شد. کمترین میزان فسفات در پایان آزمایش در تیمار با رقت ۷۵٪ مشاهده شد. همچنین نتایج نشان داد که در تمام روزهای آزمایش میان تیمارهای با رقت‌های مختلف اختلاف معنی‌داری در میزان فسفات وجود دارد ($p \leq 0.05$). تنها در روز دهم در تیمارهای پساب با رقت ۵۰٪ و ۷۵٪ اختلاف معنی‌داری در میزان فسفات مشاهده نگردید.



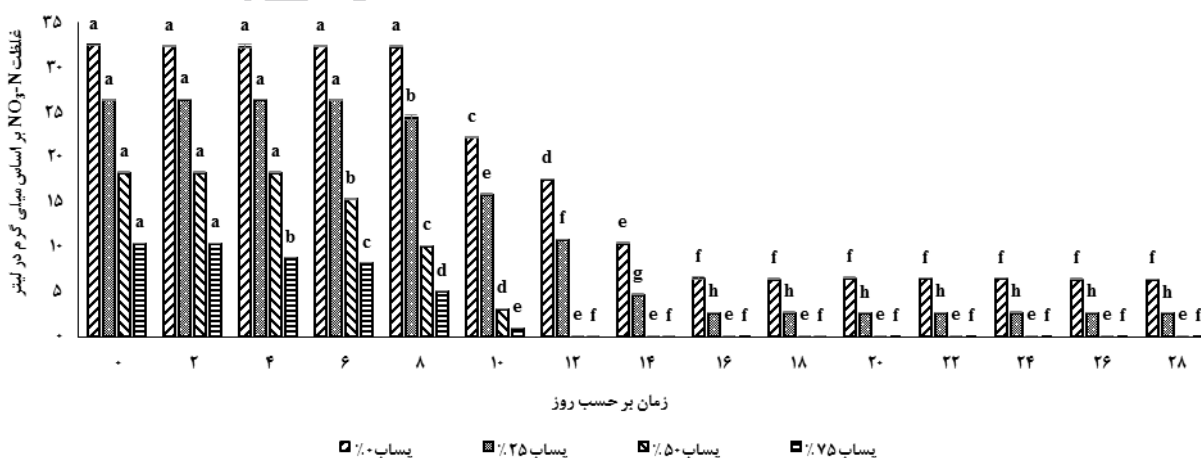
شکل ۲. تغییرات فسفات در تیمارهای به کار رفته در این آزمایش طی ۲۸ روز

با توجه به شکل ۳، بیشترین میزان نیترات در ابتدای آزمایش (روز صفر) و در پساب با رقت ۰٪ مشاهده شد (همانند فسفات). در تیمارهای ۰٪، ۲۵٪، ۵۰٪ و ۷۵٪ به ترتیب مقادیر نیترات از ۳۲/۴۸، ۲۶/۳۷، ۱۸/۳ و ۱۰/۴ میلی‌گرم در لیتر در ابتدای آزمایش به ۶/۴۱، ۲/۶۴، ۰/۱۰۸۶ و ۰/۱۷ میلی‌گرم در لیتر در انتهای آزمایش رسید. در تیمارهای با رقت ۰٪، ۲۵٪، ۵۰٪ و ۷۵٪ به ترتیب تا روزهای هشتم، ششم، چهارم و دوم تغییر معنی‌داری در میزان نیترات مشاهده نشد اما پس از آن ابتدا یک روند کاهشی و سپس یک روند تقریباً ثابت در تمام تیمارهای آزمایشی مشاهده گردید، به طوری که در تیمارهای پساب با رقت‌های ۰٪ و ۲۵٪ روند کاهشی نیترات در روز شانزدهم به انتها رسید و میزان نیترات به حالت ثابت در آمد (۶/۵۲). در تیمارهای پساب با رقت‌های ۵۰٪ و ۷۵٪ بعد از روز دوازدهم میزان نیترات تغییر معنی‌داری نشان نداد. کمترین میزان نیترات در پایان آزمایش در تیمار با رقت ۷۵٪ مشاهده شد.

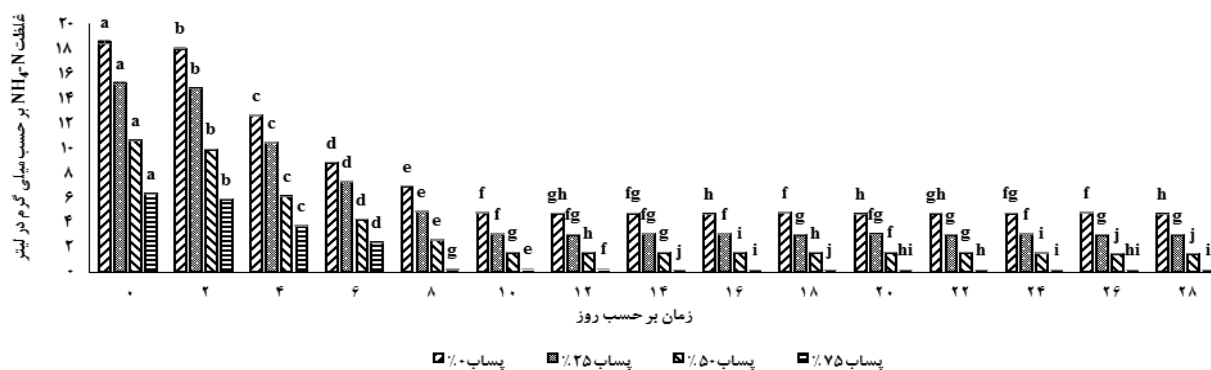
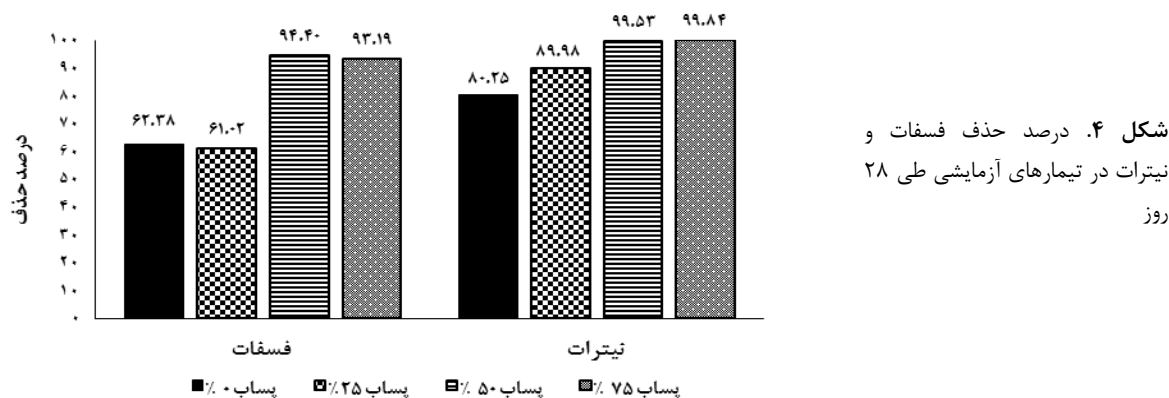
در مورد نیترات فقط تیمارهای پساب با رقت ۵۰٪ و ۷۵٪ در روز بیست و دوم دارای اختلاف معنی‌دار نمی‌باشند و در روزهای دیگر میان میزان نیترات در تمام تیمارها اختلاف معنی‌دار وجود دارد.

کارایی جذب فسفات و نیترات در شکل ۴ نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل مشخص است، تیمار پساب با رقت ۵۰٪ بهترین کارایی را در جذب فسفات و تیمارهای با رقت ۷۵٪ و ۵۰٪ بهترین کارایی را در جذب نیترات دارا می‌باشند.

میزان آمونیموم در تیمارهای با رقت ۰٪، ۲۵٪ و ۵۰٪ از همان روز دوم یک کاهش تدریجی را نشان داد و از روز چهارم این کاهش شدت بیشتری گرفت و تا روز دهم ادامه داشت اما پس از آن تغییرات تا حدی یکسان در میزان آمونیموم مشاهده گردید. در تیمار با رقت ۷۵٪ نیز شرایط همانند تیمارهای دیگر بود با این تفاوت که روند کاهشی شدید تا روز هشتم ادامه داشت و پس از آن روند تقریباً یکسانی دیده شد (شکل ۵).



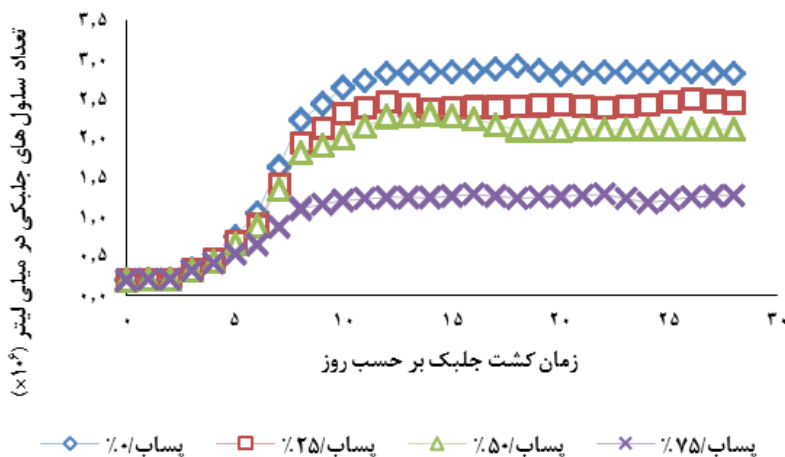
شکل ۳. تغییرات نیترات در تیمارهای به کار رفته در این آزمایش طی ۲۸ روز



شکل ۵. تغییرات آمونیم در تیمارهای به کار رفته در این آزمایش طی ۲۸ روز

تغییرات ایجاد شده در تعداد سلول‌های جلبکی در شکل ۶ آورده شده است. همان‌طور که مشخص است در روز آغازین آزمایش تفاوت معنی‌داری در تعداد سلول‌ها در بین تیمارهای مختلف مشاهده نگردید. بیشترین میانگین تعداد سلول جلبکی به دست آمده در تیمار پساب با رقت ۰٪ ($2/923 \times 10^6$ سلول در میلی‌لیتر) و در روز هجدهم ثبت گردید. در تیمار با رقت ۰٪ روند تقریباً ثابتی در تعداد سلول‌های کلرلا از روز نوزدهم مشاهده شد. با این حال تعداد سلول‌ها در تمام مدت آزمایش دارای تفاوت معنی‌دار بود ($p \leq 0.05$). در تیمار با رقت ۲۵٪ بیشترین تعداد سلول‌ها ($2/512 \times 10^6$) در روز بیست و ششم مشاهده شد و در روزهای قبل و بعد روند ثابتی نشان نداد و دارای تغییرات معنی‌داری در طول آزمایش بود. بیشترین تعداد سلول‌ها در تیمار پساب با رقت ۵۰٪ در روز چهاردهم و برابر با $2/314 \times 10^6$ سلول اندازه‌گیری شد. در این تیمار تا روز بیستم تغییرات معنی‌داری بین تعداد سلول‌ها مشاهده شد اما پس از آن روند تقریباً ثابتی مشاهده شد و تغییرات معنی‌دار نبود. بیشترین تعداد سلول در تیمار با رقت ۷۵٪ در روز بیست و دوم مشاهده شد که برابر با $1/292 \times 10^6$ بود و میان روزهای مختلف آزمایش تفاوت‌های معنی‌داری در تعداد سلول‌ها مشاهده شد. تعداد سلول‌ها در روز بیست و هشتم در تیمارهای ۰٪، ۲۵٪، ۵۰٪ و ۷۵٪ به ترتیب برابر با $2/831 \times 10^6$ ، $2/465 \times 10^6$ ، $2/118 \times 10^6$ و $1/284 \times 10^6$ بود.

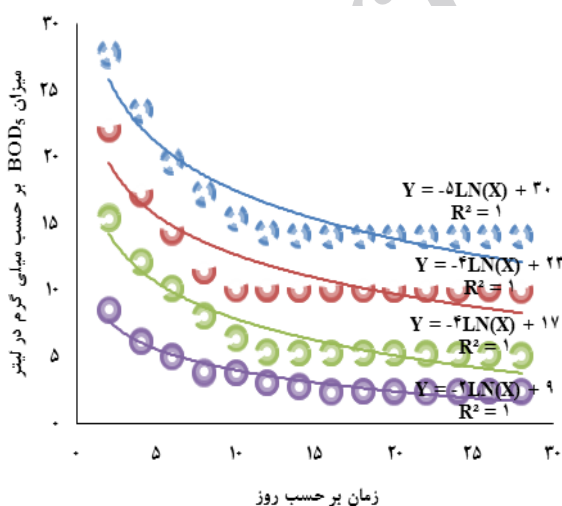
نتایج نشان داد که میزان COD در تمام تیمارهای آزمایشی تا یک زمان خاص دارای کاهش معنی‌دار بود (شکل ۷ الف). در تیمار پساب با رقت ۰٪، تا روز چهاردهم کاهش معنی‌دار و از آن به بعد تقریباً روند ثابتی ثبت گردید و تغییرات معنی‌داری مشاهده نگردید. کاهش معنی‌دار در تیمار با رقت ۲۵٪ تا روز هشتم مشاهده شد و پس از آن تغییر معنی‌داری مشاهده نشد. در تیمارهای پساب با رقت ۵۰٪ و ۷۵٪، روند کاهشی عمده تا روز دهم مشاهده شد و پس از آن تنها نوسانات جزئی در میزان COD ثبت گردید. درصد حذف COD در تیمارهای ۰٪، ۲۵٪، ۵۰٪ و ۷۵٪ به ترتیب برابر با $38/25$ ، $53/32$ ، $64/12$ و $80/04$ ٪ ثبت شد.



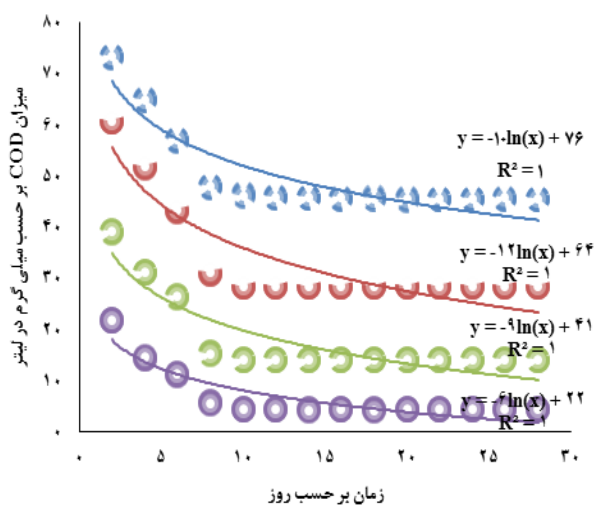
شکل ۶. روند تغییرات تعداد سلول‌های جلبکی در تیمارهای به کار رفته در این آزمایش طی ۲۸ روز

میزان BOD نیز همانند COD تا یک زمان مشخص دارای روند کاهشی بود و پس از آن روند تقریباً ثابتی را در تمام تیمارهای آزمایشی دنبال کرد (شکل ۷ ب). در تیمار پساب با رقت ۰٪، از روز چهاردهم، در تیمار پساب با رقت ۲۵٪ از روز دوازدهم، در تیمار پساب با رقت ۵۰٪ از روز دوازدهم و در تیمار با پساب ۷۵٪ از روز شانزدهم روند تقریباً ثابتی در میزان BOD مشاهده شد. درصد کاهش BOD در تیمارهای ۰٪، ۲۵٪، ۵۰٪ و ۷۵٪ به ترتیب برابر با ۵۰/۶۴٪، ۵۵/۰۳٪، ۶۸/۱۸٪ و ۷۲/۰۱٪ محاسبه گردید. نرخ جداسازی COD و BOD در شکل ۸ نشان داده شده است. نتایج نشان داد (شکل ۹) که پساب شهری با تمام غلظت‌های استفاده شده سبب افزایش میزان کلروفیل a در جلبک‌های *C. vulgaris* شده است.

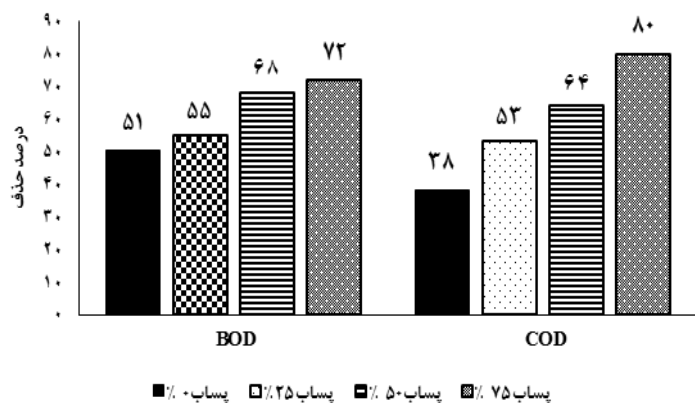
در تیمار پساب با رقت ۰٪، میان میزان کلروفیل a در روزهای دوازدهم و بیستم، روزهای شانزدهم، هجدهم و بیست و هشتم و همچنین روزهای بیست و دوم و بیست و ششم تفاوت معنی‌داری وجود ندارد اما سایر روزها دارای تفاوت معنی‌داری با یکدیگر هستند. بیشترین میزان کلروفیل a در پساب با رقت ۰٪ و در روز بیست و چهارم مشاهده شد. در تیمار پساب با رقت ۲۵٪ میزان کلروفیل a در روزهای دهم، دوازدهم و بیست و ششم و در روزهای شانزدهم، هجدهم و بیست و هشتم تفاوت معنی‌داری را نشان نداد و بیشترین میزان کلروفیل a در روز چهاردهم مشاهده شد (۵/۹۶ میلی‌گرم در لیتر). در تیمار پساب با



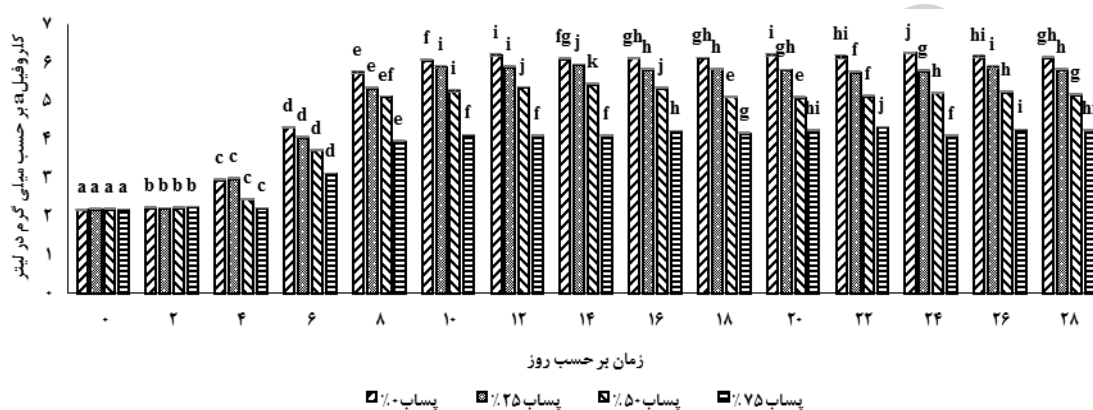
شکل ۷ الف. تغییرات BOD در تیمارهای به کار رفته در این آزمایش طی ۲۸ روز (غلظت‌ها از بالا به پایین به ترتیب ۰٪، ۲۵٪، ۵۰٪ و ۷۵٪)



شکل ۷ ب. تغییرات COD در تیمارهای به کار رفته در این آزمایش طی ۲۸ روز (غلظت‌ها از بالا به پایین به ترتیب ۰٪، ۲۵٪، ۵۰٪ و ۷۵٪)



شکل ۸. درصد حذف COD و BOD در تیمارهای آزمایشی طی ۲۸ روز



شکل ۹. تغییرات کلروفیل a در تیمارهای به کار رفته در این آزمایش طی ۲۸ روز



شکل ۱۰. تغییرات pH در تیمارهای به کار رفته در این آزمایش طی ۲۸ روز

رقت ۵۰٪ نیز بیشترین میزان در روز چهاردهم مشاهده شد (۵/۴۶ میلی گرم در لیتر) و در بسیاری از روزها تفاوت در میزان کلروفیل a معنی دار بود. در تیمار با رقت ۷۵٪، در روزهای دهم، دوازدهم، چهاردهم، بیستم، بیست و چهارم و بیست و هشتم تفاوت عمده‌ای در میزان کلروفیل a مشاهده نگردید و بیشترین میزان آن در روز بیست و دوم مشاهده شد که برابر با ۴/۳۳ میلی گرم در لیتر بود. تغییرات pH در طول آزمایش و هر دو روز یکبار بررسی گردید. در تمام تیمارها، در ابتدای آزمایش تغییرات زیادی در مقادیر pH مشاهده نشد (شکل ۱۰).

pH محیط از مقادیر اولیه ۶/۷۲، ۶/۸۵، ۷/۰۷ و ۷/۱۲ در روز صفر به مقادیر ۹/۴۷، ۸/۶۵، ۸/۴۸ و ۸/۴۶ در روز بیست و هشتم به ترتیب در تیمارهای ۰٪، ۲۵٪، ۵۰٪ و ۷۵٪ افزایش یافت.

بحث

حذف مواد مغذی توسط سلول‌های ریزجلبکی مطابق با تراکم سلولی و فعالیت متابولیکی آن‌ها می‌باشد. جذب نیتروژن توسط ریزجلبک‌ها در طی فعالیت‌های متابولیکی از فرآیندهای اصلی است. در واقع نیتروژن دومین ماده مغذی بسیار مهم برای ریزجلبک می‌باشد (پس از کربن) که می‌تواند بیش از ۱۰٪ بیوماس را شامل شود (Koenig and Demacedo, 2004). فرایند سیستم متوالی تصفیه پساب و جلبک بدین صورت است که پساب غنی از نیتروژن و فسفر به همراه نور، فراهم‌کننده شرایط مناسب برای رشد و تکثیر ریزجلبک‌ها می‌باشد که سرانجام منجر به تولید زیست توده مفید جلبکی و کاهش نیتروژن و فسفر پساب خواهد شد. زیست توده تولید شده نیز به نوبه خود موجب افزایش تولیدات زیستی و سوخت زیستی می‌شود (Tam and Wong, 1989). یافته‌های این تحقیق نشان داد که جلبک *C. vulgaris* در تیمارهای دارای مقادیر مختلف نیترات و فسفات به خوبی رشد کرده و نقش مؤثری در تصفیه پساب‌های به کار رفته داشته است. بیشترین جذب فسفات در تیمار پساب با رقت ۷۵٪ رخ داد. کمترین درصد جذب که ۶۲/۰۳٪ بود در تیمار پساب با رقت ۲۵٪ مشاهده شد، در واقع درصد حذف فسفات در تیمارهای رقیق‌تر بیشتر بود. کارایی حذف نیتروژن و فسفر در مطالعات مختلف متغیر و وابسته به ترکیب محیط کشت و شرایط محیطی از قبیل غلظت اولیه مواد مغذی، شدت نور، نسبت نیتروژن به فسفر، سیکل تاریکی-روشنایی و گونه جلبکی می‌باشد (Aslan and Kapdan, 2006; Abolhasani et al., 2016). برای مثال درصد حذف فسفر توسط ریزجلبک *C. kessleri* ۲۰-۸٪ بود (Lee and Lee, 2001). اگرچه Dumas و همکاران (۱۹۹۸) حذف کامل فسفر توسط سیانوباکتر *Phormidium bohneri* را گزارش کردند اما در آن مطالعه غلظت اولیه فسفات تنها در حدود ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر بود که در مقایسه با مقادیر به کار رفته در این مطالعه پایین‌تر بود. در همین راستا Ahmadpour و همکاران (۲۰۱۵) به مقایسه کارایی دو ریزجلبک *C. vulgaris* و *Spirulina platensis* در حذف فسفات از پساب فاضلاب شهری پرداختند، نتایج آن‌ها بیانگر آن بود که ریزجلبک کلرلا توانایی بالاتری در مقایسه با ریزجلبک اسپیرولینا در حذف فسفات طی ۸ روز مواجهه با پساب شهری را دارا بوده است و میزان جذب در طی یک پروسه ۸ روزه برای این دو جلبک به ترتیب برابر با ۷۲/۲۱٪ و ۴۲/۷۹٪ بود که میزان جذب توسط کلرلا در آن مطالعه کمتر از پایین‌ترین درصد جذب در این مطالعه بود. همچنین در مطالعه‌ای که توسط Kothari و همکاران (۲۰۱۲) انجام شد، گونه *C. pyrenoidosa* کشت داده شده در پساب توانست روزانه ۸۰-۸۵٪ فسفر را از پساب حذف کند. بررسی Valderrama و همکاران (۲۰۰۲) بر روی جلبک *C. vulgaris* نشان داد که زمانی که غلظت اولیه فسفات ۳/۵-۱/۵ میلی‌گرم در لیتر بود، این جلبک توانست تنها ۲۸٪ فسفات پساب را حذف نماید. Dickinson و همکاران (۲۰۱۴) به بررسی ظرفیت ریزجلبک سندسموس در جذب زیستی مواد مغذی پساب شهری در سیستم متوالی طی ۴۲ روز پرداختند. در آن مطالعه از دو گروه تیمار استفاده شد (گروه اول شامل پساب شهری تصفیه شده و گروه دوم شامل پساب شهری تصفیه شده با مقادیر نیتروژن بیشتر نسبت به گروه اول). نتایج نشان داد که بیومس پروداکتیویته با افزایش مواد مغذی افزایش یافت اما هنگامی که تعداد سلول‌ها زیاد شد به دلیل محدودیت در رسیدن نور، بیومس پروداکتیویته محدود شد. آمونیوم و فسفات در تمام تیمارها کاملاً حذف شدند. بر اساس نتایج حاصل شده در این تحقیق و سایر تحقیقات می‌توان بیان کرد که سیستم متوالی نقش مفیدی در حذف فسفات پساب را دارا می‌باشد و رقیق‌تر کردن پساب نیز سبب کاهش درصد فسفات پساب و جذب سریع‌تر آن می‌گردد اما بایستی رقیق‌سازی به حدی باشد که بتواند مواد مغذی مورد نیاز رشد جلبک‌ها را فراهم نماید. مزیت این روش نسبت به سیستم بچ ادامه‌دار بودن آن و پایدار بودن حذف در آن می‌باشد.

در این مطالعه با افزایش تعداد سلول‌های جلبکی میزان آمونیوم در تمام تیمارها کاهش یافت و هنگامی که تعداد جلبک‌ها به یک روند با تغییرات کم رسید میزان آمونیوم نیز تغییرات کمی را از خود نشان داد. این موضوع بیانگر وجود یک ارتباط بین میزان مصرف آمونیوم و افزایش تعداد جلبک‌ها می‌باشد. Gao و همکاران (۲۰۱۴) به بررسی نقش جلبک *C. vulgaris* در حذف مواد مغذی پساب در فتوبیوراکتور و با روش بچ پرداختند و نشان دادند که آمونیوم طی مدت آزمایش دارای یک روند کاهشی بود. بررسی‌ها نشان داده که جلبک‌ها ترجیح می‌دهند نیتروژن را به صورت آمونیوم جذب کنند چرا که روش خوبی برای جذب می‌باشد و جذب آن نیاز به انرژی کمتری نسبت به جذب نیترات دارد (Sharma and Shakeel, 2013). حذف نیتروژن به ویژه به فرم آمونیوم توسط کشت جلبکی عمدتاً توسط دو فاکتور متأثر می‌شود، استفاده مستقیم نیتروژن توسط

جلبک و تخلیه NH_3 . فرایند دوم به معنای حذف آمونیاک با استفاده از هوایی است که برای هوادهی به کار گرفته می‌شود. Reeves (۱۹۷۲) دریافت که تخلیه NH_3 فقط تحت شرایط بسیار قلیایی و در دمای بالا رخ می‌دهد. در این تحقیق، بیشترین جذب نیترات ($۰.۹۹/۸۴$) در تیمار پساب با رقت ۰.۷۵ مشاهده شد. کمترین جذب نیترات نیز در تیمار پساب با رقت $۰.۸۰/۲۵$ بود. Kothari و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند گونه *C. pyrenoidosa* کشت داده شده در پساب قادر است $۶۰-۸۰$ نیتروژن را از پساب حذف کند. Mousavi و همکاران (۲۰۱۰) در تحقیقات خود بر روی جلبک کلرلا توانستند بیش از ۸۰ نیترات پساب شهری را طی ۱۴ روز کاهش دهند. همچنین Ahmad Khan و همکاران (۲۰۱۳) توانستند تا ۹۷ ٪ از نیترات پساب شهری را با استفاده از جلبک کلرلا حذف نمایند. همانند فسفات، درصد حذف نیترات در تیمارهای رقیق‌تر بیشتر از تیمارهای غلیظ‌تر در این مطالعه و بسیاری از مقادیر گزارش شده توسط سایر محققان می‌باشد. در این مطالعه روند کاهشی نیترات تقریباً از زمانی آغاز شد که آمونیوم در حال کاهش بود. به نظر می‌رسد که گونه کلرلا در ابتدا آمونیوم را به عنوان منبع نیتروژنی برای رشد ترجیح می‌دهد (Tam et al., 1994). مطالعات دیگری نیز نشان داده‌اند که نیترات زمانی توسط جلبک مورد استفاده قرار می‌گیرد که میزان آمونیوم از یک سطح مشخص کمتر شود و یا محیط کاملاً خالی از آمونیوم گردد (Przytocka-Jusiak et al., 1984; Maestrini et al., 1986). شاید دلیل این امر این باشد که برخی از آنزیم‌ها از قبیل نیترات ردوکتاز جلبکی نیاز به زمان دارند تا ساخته شوند و جلبک بتواند از نیترات استفاده نماید (Gao et al., 2014)، که سرعت ساخت این آنزیم‌ها و استفاده از نیترات در این مطالعه در تیمارهای رقیق‌تر بیشتر بود. کلرلا و دیگر گونه‌های جلبک‌های سبز می‌توانند از آمونیوم و نیترات به عنوان منابع نیتروژن برای رشد خود استفاده کنند (Bloom et al., 1992). شاید بتوان درصد حذف بیشتر نیترات نسبت به فسفات در این مطالعه را به همین موضوع نسبت داد. نرخ جداسازی COD در میان تیمارهای مختلف تفاوت داشت. با افزایش رقت پساب، درصد حذف COD نیز افزایش یافت به طوری که رقیق‌ترین تیمار بیشترین درصد حذف COD را نشان داد. کاهش COD نشان‌دهنده جذب مواد آلی توسط جلبک می‌باشد. جلبک‌ها قادرند از کربن آلی طی متابولیسم هتروتروفیک و یا میکسوتروفیک استفاده کنند (Abeliovich and Weisman, 1978). حذف COD در مطالعات متعدد دیگری نیز گزارش شده است (Gutzeit et al., 2005). جذب COD در این مطالعه از روز هشتم کاهش یافت. Su و همکاران (۲۰۱۱) پس از بررسی کشت هم‌زمان جلبک و باکتری به منظور تصفیه پساب شهری نیز نتایج مشابهی به دست آوردند. دو دلیل برای کاهش COD مطرح می‌باشد، اولاً، منابع کربن باقی‌مانده در سیستم پس از ۸ روز بسیار کاهش یافته است. دوماً، کربن باقی‌مانده ممکن است کلوئیدی باشد و به آرامی به مواد قابل تجزیه تبدیل شود. معمولاً در هنگام کشت جلبک برای تصفیه پساب، کربن عامل محدود کننده می‌باشد. با این حال زمانی که میزان کربن موجود در پساب برای فتوسنتز جلبکی کافی نباشد، جلبک‌ها می‌توانند CO_2 را از هوا در یک سیستم باز به دست آورند (Oswald, 1988; Gonzalez et al., 2008a).

تغییرات در pH نیز به منظور بررسی اثرات آن در تغییرات مواد مغذی پایش گردید. فتوسنتز در سلول‌های جلبکی می‌تواند سبب افزایش pH محیط گردد (Munoz and Guieysse, 2006). افزایش pH نشان‌دهنده بالا رفتن قلیانیت و در نتیجه کاهش آمونیوم است و همچنین می‌تواند منجر به کاهش فسفات گردد، که این امر به بالا رفتن کارایی حذف مواد مغذی کمک می‌کند. افزایش pH در پساب ۰.۷۵ که دارای بیشترین سلول جلبکی بود، بیشتر از سایر تیمارها بود و به ترتیب با افزایش رقت و کاهش تعداد سلول جلبکی، میزان pH کمتری در انتهای آزمایش مشاهده گردید. رشد جلبکی سبب کاهش دی اکسید کربن می‌گردد که به نوبه خود باعث افزایش pH می‌گردد (Gonzalez et al., 2008b).

میزان کلروفیل a در تیمار با کمترین رقت (دارای بیشترین میزان اولیه نیترات و فسفات) بالاتر از سایر تیمارها بود. به طوری که با افزایش رقت، میزان کلروفیل a نهایی کاهش یافت. Dickinson و همکاران (۲۰۱۴) پس از بررسی ظرفیت ریزجلبک سندسموس در جذب زیستی مواد مغذی پساب شهری در سیستم متوالی طی ۴۲ روز بیان کردند که کلروفیل a در تیمار دارای بیشترین ماده مغذی $۲/۵$ برابر تیمار با کمترین ماده مغذی بود. افزایش مشاهده شده در کلروفیل a می‌تواند به دلیل در دسترس بودن نور کافی در آغاز آزمایش باشد. اما با گذشت زمان افزایش تعداد سلول‌های جلبکی مانع از نفوذ کامل نور به برخی سلول‌ها باشد که این نتایج با نتایج به دست آمده توسط Blier و همکاران (۱۹۹۶) مطابقت دارد. در مطالعه‌ای که

توسط Heidari و همکاران (۲۰۱۲) به منظور بررسی تولید زیست‌توده و حذف آمونیاک و نیتريت از پساب کارگاه پرورش ماهی به وسیله کشت جلبک سبز *Scenedesmus quadricauda* انجام گردید مشخص شد که این جلبک در تیمارهای مختلف غنی از نیتروژن رشد کرده و با توجه به میزان بقای بالا و رشد مناسب، این گونه نیروی بالقوه مناسبی برای تصفیه زیستی پساب‌های غنی از نیتروژن دارد، همچنین بالاترین زیست‌توده، تعداد سلول و میزان رشد ویژه در جلبک *S. quadricauda* و همچنین بالاترین کارایی حذف نیتريت و آمونیاک در تیمار پساب رقیق شده و همراه محیط کشت حاصل شد. Koening و Demacedo (۲۰۰۴) از پساب ثانویه شهری به عنوان محیط کشت جهت پرورش ریزجلبک *Tetraselmis chuii* و ریزجلبک *Dunaliella viridis* استفاده نمودند. آن‌ها قابلیت رشد و حذف را در غلظت‌های متفاوت پساب شهری (۰.۱٪، ۰.۲٪، ۰.۳٪ و ۰.۴٪) مورد بررسی قرار دادند. در این آزمایش‌ها بیشترین کاهش در غلظت نیتريت، نیترات و فسفات در تیمار با رقت ۰.۴٪ مشاهده شد. همچنین در مطالعه‌ای که توسط Abolhasani و همکاران (۲۰۱۶) به منظور امکان‌سنجی تولید زیست‌توده و حذف فسفات و نیترات از پساب شهری به وسیله کشت جلبک *C. vulgaris* در سه رقت مختلف پساب شهری انجام شد، بالاترین زیست‌توده، تعداد سلول و میزان رشد ویژه در تیماری که رقیق نشده بود مشاهده شد. همچنین بیشترین جذب فسفات و نیترات به ترتیب در تیمارهای با بیشترین رقت (رقت ۰.۵٪) مشاهده شد. با توجه به نتایج به دست آمده از این مطالعه و مقایسه با مطالعات مشابه می‌توان اظهار نمود که کارایی جلبک *C. vulgaris* در حذف مواد مغذی پساب در تیمارهای رقیق‌تر بهتر می‌باشد و می‌تواند به عنوان یک جاذب مؤثر برای حذف فسفات و نیترات از محلول‌های آبی در سیستم متوالی استفاده شود.

منابع

- Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A.A., Ibraheem, I.B.M. 2012. Microalgae and wastewater treatment. Saudi Journal of Biological Sciences. 19: 257-275.
- Abeliovich, A., Weisman, D. 1978. Role of heterotrophic nutrition in growth of the alga *scenedesmus obliquus* in high-rate oxidation ponds. Applied and Environmental Microbiology. 35(1): 32-37.
- Abolhasani, M.H., Hosini, S.A., Ghorbani, R., Vince, O. 2016. Phosphate and nitrate removal from municipal wastewater by algae *Scenedesmus obliquus* cultivation and production of algal biomass. Journal of Aquatic Ecology. 5(4): 33-39.
- Ahmad Khan, A.U., Yaser, A. 2013. The potential of *Chlorella Vulgaris* for waste water treatment and biodiesel production. Pakistan journal of Biotechnology. 45: 461-465.
- Ahmadpour, N., Sayadi, M.H., Falahi Kapour Chali, M., Rezaee, M.R. 2015. Removal of phosphate by microalgae from municipal wastewater effluents: Lab Experiment. Biotechnology Tarbiat Modares University. 6(2): 40-50.
- APHA. 2005. Standard Methods for The Examination of water and wastewater, 21th ed. American Public Health Association, Washington, DC.
- Aslan, S., Kapdan, L.K. 2006. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. Ecological Engineering. 2(8): 64-70.
- Blier, R., Laliberte, G., de la Noue, J. 1996. Production of the cyanobacterium *Phormidium bohneri* in parallel with epuration of a dairy anaerobic effluent. Process Biochemistry. 31(6): 587-593.
- 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.
- Chevalier, P., Proulx, D., Lessard, P., Vincent, W.F., Dela Nouë, J. 2000. Nitrogen and phosphorus removal by high latitude mat-forming cyanobacteria for potential use in tertiary wastewater treatment. Journal of Applied Phycology. 12: 105-112.
- Dickinson, K.E., Bjornsson, W.J., Garrison, L.L., Whitney, C.G., Park, K.C., Banskota, A.H., McGinn, P.J. 2014. Simultaneous remediation of nutrients from liquid anaerobic digestate and municipal wastewater by the microalga *Scenedesmus* sp. AMDD grown in continuous chemostats. Journal of Applied Microbiology. 118: 75-83.
- Dumas, A., Laliberte, G., Lessard, P., Nouë, J. 1998. Biotreatment of fish farm effluents using the cyanobacterium *Phormidium bohneri*. Aquaculture Engineering. 17: 57-68.

- Gao, F., Yang, Z.H., Li, C., Wang, Y.J., Jin, W.H., Deng, Y.B. 2014. Concentrated microalgae cultivation in treated sewage by membrane photobioreactor operated in batch flow mode. *Bioresource Technology*. 167: 441-446.
- 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.
- Gonzalez, C., Marciniak, J., Villaverde, S., Garcia-Encina, P.A., Munoz, R. 2008a. Microalgae-based processes for the biodegradation of pretreated piggery wastewaters. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 80(5): 891-898.
- Gonzalez, C., Marciniak, J., Villaverde, S., Leon, C., Garcia, P.A., Munoz, R. 2008b. Efficient nutrient removal from swine manure in a tubular biofilm photo-bioreactor using algae-bacteria consortia. *Water Science and Technology*. 58(1): 95-102.
- Gutzeit, G., Lorch, D., Weber, A., Engels, M., Neis, U. 2005. Bioflocculent algal-bacterial biomass improves low-cost wastewater treatment. *Water Science and Technology*. 52(12): 9-18.
- 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.
- Heidari, S., Farhadian, O., Soofiani, N. 2012. Biomass Production and Ammonia and Nitrite Removal from Fish Farm Effluent by *Scenedesmus Quadricauda* Culture. *Journal of Environmental Studies*. 59: 15-28.
- Horan, N.J. 1990. *Biological Wastewater Treatment Systems. Theory and operation*. John Wiley and Sons Ltd. Baffins Lane, Chichester. West Sussex PO 191 UD, England.
- Koenig, L.M., Demacedo, J.S. 2004. Urban secondary sewage: an alternative medium for the culture of *Tetraselmis chuii* (Prasinophyceae) and *Dunaliella viridis* (Chlorophyceae). *Brazilian Archives of Biology and Technology. An International Journal*. 47(3): 451-459.
- 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.
- Kothari, R., Pathak, V.V., Kumar, V., Singh, D.P. 2012. Experimental study for growth potential of unicellular alga *Chlorella pyrenoidosa* on dairy waste water: an integrated approach for treatment and biofuel production. *Bioresource Technology*. 116: 466-470.
- Lee, K., Lee, C.G. 2001. Effect of light/dark cycles on wastewater treatments by microalgae. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 6: 194-199.
- Maestrini, S.Y., Robert, J.M., Leftley, J.W., Collos, Y. 1986. Ammonium thresholds for simultaneous uptake of ammonium and nitrate by oyster-pond algae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 102: 75-98.
- Martinez, M.E., Castillo, J.M., Yousfi, E.F. 1999. Photoautotrophic consumption of phosphorus by *Scenedesmus obliquus* in a continuous culture. Influence of light intensity. *Process Biochemistry*. 34: 811-818.
- Martinez, M.E., Sánchez, S., Jiménez, J.M., Yousfi, F.E., Muñoz, L. 2000. Nitrogen and phosphorus removal from Municipal 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.
- Mousavi, S.A., Yahyavi, M., Taherzadeh, M.R. 2010. The study on growth of *Chlorella Vulgaris* and its nutrient levels in Municipal wastewater. *Journal of Aquatic Animals and Fisheries*. 1(1): 64-72.
- Munoz, R., Guieysse, B. 2006. Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review. *Water Research*. 40(15): 2799-2815.
- Olguín, E.J., Galicia, S., Mercado, G., Perez, T. 2003. Annual productivity of *Spirulina* (Arthrospira) and nutrient removal in a pig wastewater recycle process under tropical conditions. *Journal of Applied Phycology*. 15: 249-257.
- Omori, M., Ikeda, T. 1984. *Methods in marine zooplankton ecology*. John Wiley, New York. 332 p.
- Oswald, W.J. 1988. In: Borowitzka, M.B.L. (ed.). *Micro-Algae and Waste-water Treatment*. Cambridge, pp. 305-328.

- 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.
- Przytocka-Jusiak, M., Duszota, M., Matusiak, K., Mycielski, R. 1984. Intensive culture of *Chlorella vulgaris*/ AA as the second stage of biological purification of nitrogen industry wastewaters. Journal of Water Research. 18: 1-7.
- Reeves, T. 1972. Nitrogen removal: A literature review. Journal of Water Pollution Control Federation. 44:1895-1908.
- Sayadi, M.H., Ghatnekar, S.D., Kavian, M.F. 2011. Algae a promising alternative for biofuel. Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences. 1(2): 112-124.
- Sharma, G.K., Shakeel, A.K. 2013. Bioremediation of Sewage Wastewater Using Selective Algae for Manure Production. International Journal of Environmental Engineering and Management. 4(6): 573-580.
- Song, M., Pei, H., Hu, W., Ma, G. 2013. Evaluation of the potential of 10 microalgal strains for biodiesel production. Bioresource Technology. 141: 245-251.
- Su, Y., Mennerich, A., Municipal, B. 2011. Municipal wastewater treatment and biomass accumulation with a wastewater-born and settleable algal-bacterial culture. Water Research. 45: 3351-3358.
- Sun, L., Zhang, S., Wang, C., Shi, L. 2009. Effects of renewal regime on consumption of nitrogen and phosphorus, biomass and polysaccharide production by *Porphyridium cruentum* in semicontinuous culture, 3rd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, iCBBE.
- Tam, N.F.Y., Lau, P.S., Wong, Y.S. 1994. Wastewater Inorganic N and P Removal by Immobilized *Chlorella vulgaris*. Water Science and Technology. 30: 369-374.
- Tam, N.F.Y., Wong, Y.S. 1989. Wastewater nutrient removal by *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus* sp. Environmental Pollution. 58: 19-34.
- Valderrama, L.T., Del Campo, C.M., Rodriguez, C.M., De-Bashan, L.E., Bashan, Y. 2002. Treatment of recalcitrant wastewater from ethanol and citric acid production using the micro alga *Chlorella vulgaris* and macrophyte *Lemna minuscula*. Water Research. 36: 4185-4192.
- Wang, L., Wang, Y., Chen, P., Ruan, R. 2010. Semi-continuous cultivation of *Chlorella vulgaris* for treating undigested and digested dairy manures. Applied Biochemistry and Biotechnology. 162: 2324-2332.