

Removal of Nitrogen and Phosphorus from Saravan Landfill Leachate by *Chlorella Vulgaris* Microalgae

SEYEDEH ELHAM SAADAT¹, NASRIN GHORBANZADEH^{2*}, MOHAMMAD BAGHER FARHANGI¹, MAHMOOD FAZELI SANGANI¹

1. Department of Soil Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

2. Department of Soil Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, and Department of Water Engineering and Environment, Caspian Sea Basin Research Center, Rasht, Iran.

(Received: May. 18, 2020- Revised: July. 11, 2020- Accepted: July. 25, 2020)

ABSTARCT

The aim of this study was to evaluate the removal of phosphate, nitrate and ammonium from Saravan landfill leachate by *chlorella vulgaris*. The effect of leachate on growth characteristics of *chlorella vulgaris*, including dry cell weight, chlorophyll and carotenoids content was also investigated. The experiment was performed as repeated measures in a completely randomized design with three replications. Leachate levels were considered as main plot (zero leachate (L0), diluted leachates of 1:1 (L11) and 2:1 (L21)) and sampling time (0, 2, 4, 6, and 8 days) as sub-plot. Total chlorophyll in L0 treatment was the maximum and in L11 treatment was significantly more than the one in L21 treatment ($p < 0.05$). Microalgae dry cell weight and nutrient removal increased over time, so that the highest amount of dry cell weight and the lowest amount of nutrients in leachate (L11) was observed at 8th day after incubation. The percentage removal of phosphate, nitrate and ammonium at the end of 8th day of incubation was 92.76, 56.94 and 98.70, respectively. The kinetic equation of biomass production was also determined in relation to phosphate, nitrate and ammonium removal. The results showed that the nutrient removal followed the first-order model, and Monod's equation was able to well describe the growth of microalgae under restricted substrate conditions. The R^2 values of Lineweaver-Burk for phosphate and ammonia were 0.97 and 0.99, respectively. Therefore, this equation can be used to remove phosphate and ammonium. Finally, it seems that *chlorella vulgaris* can be used for bioremediation of Saravan leachate.

Keywords: Ammonium, Leachate Treatment, Monod's Equation, Phosphate, Waste.

حذف نیتروژن و فسفر از شیرابه دفن گاه پسماند سراوان با ریز جلبک کلرلا ولگاریس

سیده الهام سعادت^۱، نسرین قربانزاده^{۲*}، محمدباقر فرهنگی^۱، محمود فاضلی سنگانی^۱

۱. گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

۲. گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان و عضو وابسته پژوهشی گروه مهندسی آب و

محیطزیست، پژوهشکده حوضه آبی دریای خزر، رشت، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۲/۲۹ - تاریخ بازنگری: ۱۳۹۹/۴/۲۱ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۹/۵/۴)

چکیده

این پژوهش با هدف بررسی زدایش فسفات، نیترات و آمونیوم از شیرابه دفن گاه پسماند سراوان با ریزجلبک کلرلا ولگاریس انجام شد. همچنین پیامد شیرابه بر ویژگی‌های رشدی ریزجلبک شامل وزن خشک یاخته، کلروفیل و کارتنوئید بررسی شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی به روش اندازه‌های تکرار شده در زمان و با سه تکرار انجام شد. شیرابه در سه سطح (بدون شیرابه، شیرابه با رقت ۱:۱ و شیرابه با رقت ۲:۱) به‌عنوان کرت اصلی و زمان نمونه‌برداری (صفر، ۲، ۴، ۶ و ۸ روز) به‌عنوان کرت فرعی در نظر گرفته شد. اندازه کلروفیل کل در تیمار بدون شیرابه بیشترین بود و در تیمار شیرابه ۱:۱ با تفاوت آماری معنی‌دار بیشتر از تیمار شیرابه ۲:۱ بود ($p < 0.05$). وزن خشک ریزجلبک با گذشت زمان افزایش یافت و با افزایش رشد ریزجلبک، درصد زدایش مواد مغذی نیز افزایش پیدا کرد، به‌گونه‌ای که بیشترین اندازه وزن خشک و کمترین اندازه مواد مغذی در شیرابه با رقت ۱:۱ در روز ۸ انکوباسیون دیده شد. درصد زدایش فسفات، نیترات و آمونیوم در پایان ۸ روز انکوباسیون به ترتیب ۹۲/۷۶، ۵۶/۹۴ و ۹۸/۷ بود. معادله سینتیکی ساخت زیست‌توده در رابطه با کاهش غلظت فسفات، نیترات و آمونیوم نیز بررسی شد. نتایج نشان داد زدایش مواد مغذی از مدل درجه اول پیروی می‌کند و معادله موود به‌خوبی توانست رشد ریزجلبک در شرایط محدودکننده با سوبسترا را نشان دهد. اندازه R^2 طرح لینه‌یور-برک برای فسفات و آمونیوم ۰/۹۹۲ و ۰/۹۷۲ به دست آمد. بنابراین می‌توان از این معادله برای زدایش فسفات و آمونیوم بهره‌گیری کرد. در نهایت به نظر می‌رسد ریزجلبک کلرلا ولگاریس می‌تواند برای پالایش زیستی شیرابه سراوان به‌کار رود.

واژه‌های کلیدی: آمونیوم، پسماند، تصفیه شیرابه، فسفات، معادله موند.

مقدمه

نشود، می‌تواند منجر به آلودگی جدی محیط شود (Kim and Owens, 2010; Luo et al., 2019). پساب‌ها و شیرابه‌ها خاستگاهی سرشار از مواد آلی و کانی بوده که مایه بهبود رشد ریزجلبک‌ها و پدیده شکوفایی جلبکی^۱ می‌شوند (Glibert, 2020). از میان این مواد کانی می‌توان به آمونیوم، نیترات و فسفات اشاره کرد که در فرایند یوتریفیکاسیون^۲ منابع آبی نقش ویژه‌ای دارند (Brennan and Owende, 2010). یوتریفیکاسیون منابع آبی می‌تواند بر ساختار و عملکرد زیست‌بوم تأثیرگذار باشد و حتی می‌تواند با تأثیر بر گوناگونی زیستی آن پایداری و هماهنگی زیست‌بوم را به هم بریزد. از سوی دیگر، با توجه به دگرش ساختار زیست‌بوم، ورود گونه‌هایی که بومی نیستند افزایش یافته و مایه از میان رفتن گونه‌های بومی و دگرش ژنتیکی آبریان در آن می‌شود (Padedda et al., 2017). بنابراین انجام کارهای بهسازی در شیرابه ساخته‌شده در این گونه

رشد روزافزون جمعیت جهان و گسترش فعالیت‌های صنعتی و کشاورزی برای برآوردن نیاز خوراکی مردم مایه پیدایش ضایعات و پساب فراوانی شده است که چگونگی رهاسازی آن‌ها از چالش‌های مهم در زمان کنونی است (Sayadi et al., 2012). یکی از مهم‌ترین عوامل آلوده‌کننده منابع آب، نشت شیرابه از مکان‌های دفن پسماند و ورود آن به منابع آب روزمینی و زیرزمینی است. راه یافتن شیرابه ناشی از پسماندهای دفن شده به آب‌های زیرزمینی مایه آلودگی منابع آبی نزدیک جایگاه دفن پسماند می‌شود و چنین آلودگی‌هایی در منابع آبی، آسیب بسیار بزرگی برای مردم بومی و محیط‌زیست دارد (Mishra et al., 2018).

یکی از روش‌های رایج دفع پسماند در کشورهای در حال توسعه دفن آن در خاک است که اگرچه ساده‌ترین و نسبتاً ارزان‌ترین روش دفع به شمار می‌رود اما اگر به‌درستی مدیریت

* نویسنده مسئول: nghorbanszadeh@guilan.ac.ir

شیرابه دفن‌گاه سراوان که جایگاه دفن پسماندهای شهر رشت و شهرهای پیرامون است، از راه رودخانه سیاه‌رود و سپس زرجوب و پیربازار وارد تالاب انزلی می‌شود و از این راه در ایجاد پدیده یوتروفیکاسیون و تخریب زیست‌بوم تالاب انزلی نقش دارد. هدف از این پژوهش بررسی زدايش يون‌های آمونیوم، فسفات و نیترات از شیرابه دفن‌گاه سراوان با ریزجلبک کلرلا و لگاریس و بررسی مدل سینتیکی رشد این ریزجلبک است.

مواد و روش

آماده کردن و بازکشت ریزجلبک

ریز جلبک کلرلا و لگاریس از بخش زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه گیلان آماده و در آزمایشگاه بیولوژی خاک بازکشت شد. برای بازکشت ریزجلبک از کشتگاه BG-11 با $pH=7/2$ بهره‌گیری شد. ریزجلبک در ارلن‌های ۱۰۰۰ میلی‌لیتری دارای ۵۰۰ میلی‌لیتر کشتگاه سترون BG-11 در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و زیر نور فلورسنت سفید (۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) برای ۱۰ روز بازکشت شد (Andersen, 2005). برای هوادهی پیوسته محیط کشت ریزجلبک نیز از پمپ هوا بهره‌گیری شد.

نمونه‌برداری از شیرابه و کاربرد تیمارها

نمونه‌برداری شیرابه از دفن‌گاه پسماند سراوان در نزدیکی شهر رشت انجام شد. منطقه جنگلی سراوان در فاصله ۲۰ کیلومتری جنوب شهر رشت (۴۹° و ۳۷' شرقی و ۳۷° و ۴' شمالی) در استان گیلان واقع شده است و از سال ۱۳۶۳ در آن پسماند دفن می‌شود. ارتفاع دفن‌گاه از سطح دریا ۷۰ متر است. میانگین بارندگی و دمای سالانه شهر رشت به ترتیب ۱۳۵۹ میلی‌متر و ۱۵/۹ درجه سلسیوس می‌باشد. پرباران‌ترین و کم‌باران‌ترین فصل در رشت به ترتیب پاییز و تابستان می‌باشد. روزانه بیش از ۷۰۰ تن پسماند بدون هیچ‌گونه تیمار اولیه در دفن‌گاه سراوان دفن می‌شود. این دفن‌گاه پذیرنده پسماندهای شهر رشت، فومن، شفت، صومعه‌سرا، خشکبیجار، کوچصفهان و لشت‌نشا است. سهم شهر رشت حدود ۶۵۰ تن پسماند در روز است که حدود ۹۰ درصد پسماند انتقال یافته به محل دفن را شامل می‌شود. شیرابه تولیدشده از پسماندها در این دفن‌گاه به رودخانه زرجوب می‌ریزد. افزون بر این، با توجه به بالا بودن سطح آب زیرزمینی در منطقه احتمالاً شیرابه به آب‌های زیرزمینی نیز نشت کرده و مایه آلودگی آنها می‌شود (Shariatmadari et al., 2018).

نمونه شیرابه در فصل تابستان که بارندگی کم و غلظت

دفن‌گاه‌ها برای مهار و کاهش آلودگی نیتروژن و فسفر و رساندن غلظت آن‌ها به زیر آستانه پذیرفته شده برای ورود به زیست‌بوم-های آبی ضروری است (Camargo and Alanso, 2006) تاکنون روش‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی گوناگونی برای زدایش نیتروژن (بیشتر آمونیوم و نیترات) و فسفات از شیرابه و پساب‌های پسماندها بکار رفته است ولی نیاز است که بهره‌گیری از روش‌های بهسازی زیستی و به‌کارگیری توان ریز جانداران گوناگون مانند ریزجلبک‌ها در زدایش آلاینده‌ها از شیرابه همانند یک روش با کارایی بالا، ارزان و سازگار با محیط‌زیست بیشتر بررسی شود (Chen et al., 2012; Kim et al., 2013).

ریزجلبک‌های میکسوتروف^۱ توان انباشت زیستی و زدایش آلاینده‌هایی مانند عناصر کانی (نیتروژن و فسفر)، فلزهای سنگین و آلاینده‌های آلی مانند فنل‌ها، آفت‌کش‌ها و... از آب‌های آلوده را دارند (Chen et al., 2015; Xiong et al., 2016). پرکاربردترین ریزجلبک‌ها برای بهسازی فاضلاب گونه‌های کلرلا^۲، سندسموس^۳ و اسپیرولینا^۴ هستند. ریزجلبک کلرلا و لگاریس^۵ رشد تندی داشته و در فلور بیشتر آب‌های جهان یافت می‌شود و بویژه به دلیل مقاومت بالا در برابر آلاینده‌های آلی و همچنین رشد پایدار در فاضلاب‌های مختلف شناخته شده است (Borowitzka, 2018). Wang et al. (2010) توانایی ریزجلبک کلرلا و لگاریس را در زدایش عناصر مغذی از پساب مورد بررسی قرار دادند و کارایی زدایش مواد مغذی را ۸۳ درصد برای نیتروژن معدنی و ۹۰ درصد برای فسفر معدنی گزارش کردند. Sayadi et al. (2016) نیز زدایش ۸۹/۸ درصدی نیترات و ۸۸ درصدی فسفات از محلول آبی را با ریزجلبک کلرلا و لگاریس گزارش کردند. کشت ریزجلبک‌ها در پساب‌های شهری نیز برای دستیابی هم‌زمان به دو هدف کاهش عناصر مغذی و ساخت زیست‌توده پیشنهاد شده است (Markou and Georgakakis, 2011).

رشد ریزجلبک‌ها و در پی آن، کاهش نیتروژن و فسفات تا اندازه‌ی زیادی وابسته به شرایط محیطی مانند در دسترس بودن مواد مغذی، شدت نور و دمای محیط است. به همین دلیل تعیین معادلات سینتیکی که پیش‌بینی عملکرد ریزجلبک‌ها در محیط را شدنی می‌کند دارای اهمیت زیادی است. مدل‌های سینتیک رشد ریزجلبک‌ها، شناختی از ساخت زیست‌توده و میزان مصرف مواد مغذی ارائه می‌دهند. ارائه یک مدل سینتیکی رشد در پیش-بینی زدایش مواد مغذی، رشد زیست‌توده و بهینه‌سازی شرایط کاربرد برای کشت ریزجلبک‌ها در پساب‌ها بسیار مهم است (Eze et al., 2018).

4. *Spirulina* sp.

1. Mixotroph

2. *Chlorella* sp.

3. *Scenedesmus* sp.

$$\mu = \frac{\ln N_2 - \ln N_0}{t_2 - t_0} \quad (\text{رابطه ۱})$$

که در این رابطه μ نرخ رشد ویژه (d^{-1})، N_2 وزن خشک یاخته ($g L^{-1}$) در زمان t_2 (d) و N_0 وزن خشک یاخته ($g L^{-1}$) در زمان t_0 (d) است.

اندازه‌گیری کلروفیل و کارتنوئید

برای اندازه‌گیری کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کارتنوئید، ۱۰ میلی‌لیتر از کشتگاه دارای ریزجلبک در زمان‌های موردنظر برداشته شد و در دستگاه سانتیفریوژ با ۴۵۰۰ دور در دقیقه برای ۱۰ دقیقه قرار گرفت. سپس محلول رویی دور ریخته شد و با بهره‌گیری از ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۰ درصد دوباره حالت سوسپانسیون ایجاد شد. این سوسپانسیون برای ۱۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سلسیوس انکوباسیون و دوباره برای ۱۰ دقیقه سانتیفریوژ شد. پس از سانتیفریوژ جذب محلول رویی با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۶۵ و ۶۵۲ و ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری و غلظت کلروفیل a و b و کارتنوئید به ترتیب از روابط ۲، ۳ و ۴ محاسبه شد (Pancha et al., 2015).

(رابطه ۲)

$$\text{Chlorophyll a (mg L}^{-1}\text{)} = 16.82 A_{665} - 9.28 A_{652}$$

(رابطه ۳)

$$\text{Chlorophyll b (mg L}^{-1}\text{)} = 36.92 A_{652} - 16.54 A_{665}$$

(رابطه ۴)

$$C_{\text{carotenoid}} \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = (1000 A_{470} - 1.91 C_a - 95.15 C_b) / 225$$

که در این روابط A نشان‌دهنده‌ی جذب در طول موج مورد نظر است.

غلظت فسفات، آمونیوم و نیترات موجود در محیط نیز با دستگاه یون کروماتوگرافی مدل (IC850- Metrohm) اندازه‌گیری شد.

سینتیک رشد ریزجلبک

برای بررسی سینتیک رشد ریزجلبک کلرلا ولگاریس از معادله مونود بهره‌گیری شد (Monod, 1949) که در آن سرعت رشد به‌عنوان تابعی از یکی از سه ماده مغذی اساسی (کربن، نیتروژن و فسفر) در نظر گرفته می‌شود. به‌طورکلی سرعت رشد ریزجانداران در مدل مونود می‌تواند به محض کاهش غلظت سوبسترا محدود شود. از این رو محدودیت مواد مغذی می‌تواند بیشینه سرعت رشد ریزجلبک‌ها را تعیین کند و این موضوع را می‌توان با بهره‌گیری از سینتیک مونود در رابطه (۵) شرح داد.

$$\mu = \frac{\mu_{\text{max}} \cdot S}{K_s + S} \quad (\text{رابطه ۵})$$

در این معادله، μ سرعت رشد ویژه (day^{-1})، μ_{max} بیشینه سرعت رشد ویژه (day^{-1}) و K_s ضریب مونود (ثابت نیمه سرعت)،

عناصر معدنی هدف (نیترات، آمونیوم و فسفات) در بالاترین اندازه بود گرفته شده و به آزمایشگاه رسانده شد. در آزمایشگاه غلظت فسفات، سولفات، کلراید، نیترات، سدیم، آمونیوم، پتاسیم و منیزیم در شیرابه به‌وسیله دستگاه یون کروماتوگرافی مدل (IC850-Metrohm) اندازه‌گیری شد. pH شیرابه به روش پتانسیومتری و با بهره‌گیری از pH متر (مدل ORION 420A American Public Health Association,) اندازه‌گیری شد (1995). اندازه کل ترکیب‌های فنلی نیز با بهره‌گیری از شناساگر فولین سیوکالتیو (Hayouni et al., 2007) تعیین شد.

برای بررسی توانایی ریزجلبک کلرلا ولگاریس در پالایش زیستی، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی به روش اندازه‌های تکرار شده در زمان و در سه تکرار انجام شد. فاکتورهای آزمایش شامل سه اندازه شیرابه (بدون شیرابه (همراه با کشتگاه ریزجلبک)، نسبت ۱:۱ و نسبت ۲:۱) و پنج زمان نمونه‌برداری (صفر، ۲، ۴، ۶ و ۸ روز) بود. نخست شیرابه با نسبت‌های ۱:۱ (۱ یکان شیرابه و ۱ یکان آب مقطر) و ۲:۱ (۲ یکان شیرابه و ۱ یکان آب مقطر) آماده و سپس اندازه ۵۰۰ میلی‌لیتر از شیرابه به ظروف آزمایش افزوده شد. نمونه گواه همراه با شیرابه و بدون ریزجلبک نیز در این آزمایش بکار رفت. ریزجلبک که از پیش کشت داده شده بود (با غلظت ۱۰ درصد حجمی)، به ظروف مایه‌زنی شد. ظروف دارای تیمارها در اتاقک کشت با دمای ۲۸ درجه سلسیوس و نوردهی و هوادهی پیوسته قرار داده شدند. در طول دوره آزمایش (۸ روز) ویژگی‌های رشد ریزجلبک شامل وزن خشک یاخته^۱، اندوخته‌ی کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل، کارتنوئید و همچنین غلظت یون‌های فسفات، آمونیوم و نیترات موجود در محیط هر ۴۸ ساعت یک‌بار اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری ویژگی‌های رشد ریزجلبک

اندازه‌گیری وزن خشک یاخته

برای اندازه‌گیری وزن خشک یاخته، به‌اندازه ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون ریزجلبک از کاغذ پاله گذر داده شد. کاغذ پاله برای ۲۴ ساعت در دمای ۸۰ درجه سلسیوس در آون خشک شد و سپس وزن آن پس از رسیدن به دمای محیط اندازه‌گیری شد. با کم کردن وزن کاغذ پاله، وزن خشک یاخته‌های ریزجلبک در طول مدت ۸ روز انکوباسیون بر پایه گرم در لیتر بدست آمد. (Gao et al., 2011).

اندازه‌گیری نرخ رشد ویژه

نرخ رشد ویژه ریزجلبک (μ) با بهره‌گیری از مقادیر وزن خشک و از رابطه ۱ برای هر فاصله زمانی که نمونه‌برداری انجام گرفته شده بود، محاسبه شد (Xiong et al., 2016).

خشک یاخته و کلروفیل b و کلروفیل کل معنی‌دار نشد ($P > 0.05$).

وزن خشک ریزجلبک

تغییرات وزن خشک ریزجلبک در سطوح مختلف شیرابه و زمان-های گوناگون در شکل (۱) نشان داده شده است. وزن خشک یاخته در سطوح مختلف شیرابه اختلاف آماری معنی‌داری با یکدیگر داشتند. بیشترین اندازه وزن خشک یاخته در تیمار L0 (شاهد بدون شیرابه) و کم‌ترین اندازه وزن خشک یاخته در تیمار L11 (شیرابه با نسبت ۱:۱) دیده شد. همچنین اندازه وزن خشک در تیمار L21 (شیرابه با نسبت ۲:۱) بیشتر از تیمار L11 بود (شکل ۱-الف) که این موضوع ممکن است به دلیل بیشتر بودن اندازه مواد مغذی موردنیاز ریزجلبک در تیمار L21 باشد. ریزجلبک در تیماری که اندازه مواد مغذی مانند فسفات و نیترات در آن زیادتر است رشد بیش‌تری داشته و در نتیجه زیست‌توده بیشتری نیز می‌سازد. وزن خشک در روزهای مختلف نیز اختلاف آماری معنی‌داری را نشان داد و با گذشت زمان روند صعودی داشت (شکل ۱-ب). کمترین وزن خشک در روز صفر و بیشترین اندازه وزن خشک در روز ۸ انکوباسیون (۲ گرم بر لیتر) به دست آمد که این موضوع نشان‌دهنده سازگار شدن ریزجلبک با محیط شیرابه و همچنین جذب بیشتر مواد مغذی با گذشت زمان است که وارد یاخته‌های ریزجلبک شده است. این اندازه وزن خشک یاخته‌ای نسبت به مقادیر گزارش شده با Kim et al. (2013) و Shariati and Taheri (2016) در رابطه با وزن خشک ریزجلبک در پساب‌ها کمتر است که با توجه به تفاوت زیاد میان ترکیب‌های موجود در شیرابه و پساب امری بدیهی است. بیشتر بودن اندازه وزن خشک یاخته‌ای در تیمار L21 نسبت به L11 ممکن است به دلیل وجود ترکیب‌های فنلی بیشتر در تیمار L21 باشد. حضور ترکیب‌های فنلی مایه افزایش فرایند رشد و تکثیر یاخته‌ای ریزجلبک می‌شود که این موضوع ممکن است به دلیل نقش فنل در انتقال سیگنال‌های درون و برون‌یاخته‌ای و فعال‌سازی فرایند درون‌یاخته‌ای مانند تقسیم در ریزجاندارن باشد (Mandal et al., 2010). Akbari and Madadkar haghjou (2016) گزارش کردند که برخی از غلظت‌های ترکیب فنلی وانیلین سبب ساخت تعداد یاخته بیشتر نسبت به شاهد می‌شود که این موضوع نشان‌دهنده تأثیر تحریک‌کننده ترکیب‌های فنلی بر رشد یاخته‌ای است. ریزجلبک‌ها همچنین با قابلیت ترشح قند، اسیدهای آمینه، گلیکولیپید و آنزیم‌ها قادر به غیرفعال کردن اثرات سمی ترکیب‌های فنلی می‌باشند (Seckbach, 2012). Miazek et al. (2013) نیز اثر مثبت ترکیب فنلی وانیلین را بر روی رشد ریزجلبک کلرلا گزارش کردند که با توجه به اندازه ۵۱۶ میلی‌گرم

غلظت سوبسترا در نصف بیشینه سرعت ویژه مصرف سوبسترا ($mg L^{-1}$) است. همچنین S غلظت سوبسترا (غلظت نیترات، آمونیوم و فسفات) ($mg L^{-1}$) است. دو پارامتر K_s و μ_{max} با بهره‌گیری از طرح لینیویر-برک^۱ که معادله اصلی مونود به صورت خطی است، بر اساس ترسیم $1/\mu$ در مقابل $1/s$ تعیین شد که در رابطه (۶) نشان داده شده است.

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_s}{\mu_{max}} \frac{1}{s} + \frac{1}{\mu_{max}} \quad (\text{رابطه ۶})$$

μ جهت رسم منحنی لینیویر-برک نیز بر اساس رابطه ۱

محاسبه شد.

تحلیل آماری

داده‌های مربوط به پیامد سطوح شیرابه و زمان بر ویژگی‌های زیستی ریزجلبک در قالب طرح کاملاً تصادفی به روش اندازه‌های تکرار شده در زمان و نتایج حاصل از پیامد زمان بر زدایش مواد مغذی در قالب طرح کاملاً تصادفی آنالیز شدند. در بخش مربوط به ویژگی‌های ریزجلبک فاکتور اصلی آزمایش شیرابه در سه سطح (بدون شیرابه، شیرابه با رقت ۱:۱ و شیرابه با رقت ۲:۱) و فاکتور فرعی زمان‌های نمونه‌برداری (صفر، ۲، ۴، ۶ و ۸ روز) بود. آنالیز نتایج پژوهش با بهره‌گیری از نرم‌افزار SAS9.4 و مقایسه میانگین داده‌ها نیز با آزمون کمترین تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. نمودارها نیز با نرم‌افزار Excel رسم شدند.

نتایج و بحث

نتایج بدست آمده از آزمایش شیرابه نشان داد که غلظت آنیون-های فسفات، نیترات، سولفات، کلراید در شیرابه به ترتیب ۳۹/۰۵، ۱۴/۷۳، ۱۸۴/۳۷ و ۳۱۲/۰۶ میلی‌گرم بر لیتر و غلظت کاتیون-های آمونیوم، منیزیم، سدیم و پتاسیم به ترتیب ۳۴۷۵/۶۵، ۱۳۱/۱۲، ۹۶۱۹/۷۲، ۲۶۵۶/۲۸ میلی‌گرم بر لیتر بود که نشان‌دهنده غلظت بیش از مرز پذیرفتنی آنیون‌هایی چون فسفات و نیترات و کاتیون آمونیوم در شیرابه برای رهاسازی در آب‌های روزمینی و همچنین برای کاربرد در کشاورزی و آبیاری است (Environmental regulations for reuse and recycling of waste water, 2010). اندازه pH و رسانندگی الکتریکی در شیرابه به ترتیب ۶/۶۸ و 20 dS m^{-1} بود. اندازه کل ترکیبات فنلی در شیرابه ۵۱۶ میلی‌گرم بر لیتر بود.

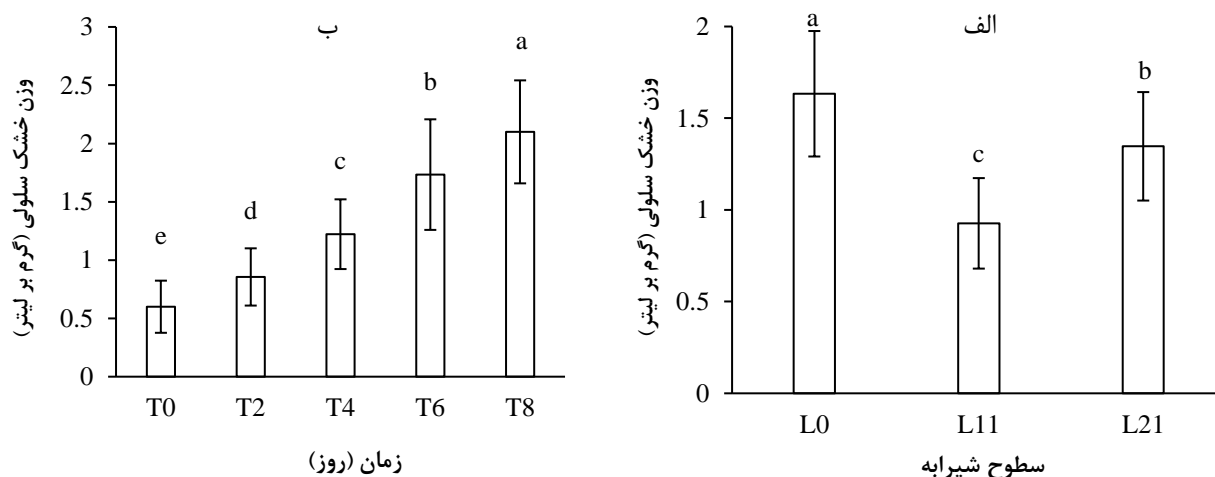
در جدول (۱) نتایج تجزیه واریانس پیامد سطوح شیرابه و زمان بر ویژگی‌های ریزجلبک کلرلا و لگاریس نشان داده شده است. پیامد شیرابه و زمان بر تمام ویژگی‌های مورد مطالعه معنی‌دار بود ($P < 0.01$). پیامد سطوح شیرابه و برهم‌کنش آن با زمان تنها بر وزن

بر لیتر فنل در ترکیب شیرابه مورد مطالعه نتایج مشابه دور از انتظار نیست.

جدول ۱- تجزیه واریانس پیامد سطوح شیرابه و زمان بر ویژگی‌های بررسی شده

میانگین مربعات					درجه آزادی	منبع تغییرات
کلروفیل <i>a</i>	کلروفیل <i>b</i>	کلروفیل کل	کارتنوئید	وزن خشک سلول		
۰/۰۴۳ ^{ns}	۰/۰۱۳ ^{ns}	۰/۰۱۱ ^{ns}	۰/۰۰۷۲ ^{ns}	۰/۰۳۴۸ ^{ns}	۲	تکرار (R)
۴/۶ ^{**}	۰/۷۳ ^{**}	۵/۶۹ ^{**}	۰/۱۲ ^{**}	۱/۸۹ ^{**}	۲	شیرابه (L)
۰/۰۸۵ ^{ns}	۰/۰۷۱ ^{ns}	۰/۲۶۴ ^{ns}	۰/۰۱۴ ^{ns}	۰/۰۲۱ ^{ns}	۴	L×R
۰/۶۰۵ ^{**}	۲/۵۱ ^{**}	۱/۹۵ ^{**}	۰/۶۱۹ ^{**}	۳/۴۲ ^{**}	۴	زمان (T)
۰/۲۶ [*]	۰/۰۴۹ ^{ns}	۰/۲۳۷ ^{ns}	۰/۰۷۱ ^{**}	۰/۰۴۸ ^{ns}	۸	L×T
۰/۰۷۸	۰/۰۵۹	۰/۲۰۷	۰/۰۱۲	۰/۰۲۸	۲۴	خطا (Error)

^{**}، ^{*} به ترتیب بیان‌گر معنی‌داری در سطح ۱ و ۵ درصد و ^{ns} بیان‌گر معنی‌دار نبودن در سطح آماری ۵ درصد است.



شکل ۱- پیامد سطوح شیرابه (الف) و زمان (ب) بر وزن خشک یاخته در ریز جلبک کلرلا و لگاریس. بودن حداقل یک حرف مشترک روی ستون‌ها نشان‌دهنده نبودن تفاوت آماری معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است. نوارهای خطا نشان‌دهنده انحراف از معیار هستند. مقادیر میانگین ۳ تکرار هستند. بدون شیرابه (L0)، شیرابه با رقت ۱:۱ (L11) و شیرابه با رقت ۲:۱ (L21)

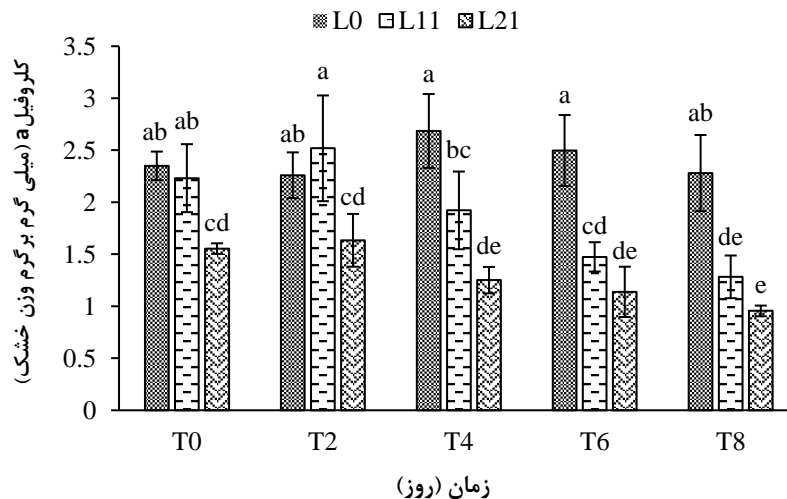
کلروفیل *a*

دما، شوری، کمبود مواد مغذی و... می‌توانند در طول دوره‌ی آنکوباسیون بر فتوسنتز یاخته تأثیر بگذارند و مایه انباشت بیش از حد گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر (OH^- ، HO_2^- ، O_2^- و...) در میتوکندری، کلروپلاست و پراکسی‌زوم یاخته‌های ریز جلبک شود. ویژگی اکسیدکنندگی قوی این گونه‌ها مایه آسیب جدی به اجزای یاخته‌ای و در نهایت مرگ یاخته می‌شود (Kabra et al., 2014). در این میان نور مهم‌ترین عاملی است که بر رشد اتوتروفیک و فعالیت فتوسنتزی ریز جلبک‌ها تأثیر می‌گذارد. افزایش اندوخته‌ی کلروفیل در یاخته‌ها می‌تواند به‌عنوان یک سازوکار حفاظتی برای از میان بردن گونه‌های واکنش‌پذیر با اکسیژن در کلروپلاست باشد. ریز جلبک‌ها برای فتوسنتز کارآمد به شرایط روشنایی بهینه نیاز دارند. دوره‌ی نوری، شدت نور و طول موج نور برخی از عوامل مهم و مؤثر بر میزان فتوسنتز هستند (Cetin and Kendirlioglu, 2017). بنابراین به نظر می‌رسد رنگ موجود در شیرابه در تیمارهای L11 و L21 بر فتوسنتز

پیامد برهم‌کنش سطوح مختلف شیرابه در زمان بر اندازه کلروفیل *a* در ریز جلبک کلرلا و لگاریس در شکل (۲) نشان داده شده است. اندازه کلروفیل *a* در تیمار L0 در روزهای مختلف اختلاف آماری معنی‌داری با یکدیگر نشان نداد. بیشترین اندازه کلروفیل *a* در تیمارهای L21 و L11 در روز دوم آنکوباسیون و در تیمار L0 در روز چهارم آنکوباسیون به دست آمد. بیشتر بودن اندازه کلروفیل *a* در روزهای ابتدایی در تیمار L11 و L21 نسبت به انتهای دوره آزمایش ممکن است به دلیل تنش حاصل از وجود مقادیر بالای ترکیب‌های فنلی موجود در شیرابه باشد. نتایج این پژوهش با نتایج Miazek و همکاران (2013) که تأثیر مثبت ترکیب فنلی را بر میزان کلروفیل ریز جلبک کلرلا گزارش کردند، مطابقت دارد. اندازه کلروفیل *a* در تیمار L11 و L21 از شروع آزمایش تا ۴۸ ساعت بعد از آن روند افزایشی و سپس تا پایان دوره آنکوباسیون روند کاهشی داشت. عوامل تنش‌زای غیرزیستی مانند شدت نور،

شیرابه کاهش می‌یابد. رشد ریزجلبک می‌تواند تحت تأثیر کاهش مواد مغذی معدنی در محیط محدود شود و تحت تأثیر این تنش قرار گیرد. پژوهش‌ها نشان دادند که اندازه نیتروژن بر اندوخته‌ی کلروفیل *a* تأثیرگذار است و در صورت کمبود نیتروژن، اندوخته‌ی کلروفیل در یاخته‌ها به شدت کاهش می‌یابد (Mutlu *et al.*, 2011). در شرایط محدودیت نیترات، کمپلکس پروتئین-کلروفیل که در غشاء تیلاکوئید وجود دارد، کاهش می‌یابد (Drotch and Conway, 1984). نقش این کمپلکس انتقال انرژی نورانی به مرکز واکنش فتوسیستم‌های نوری است. بنابراین کاهش نیترات مایه ایجاد اختلال در انتقال انرژی نورانی و در نتیجه کاهش اندوخته‌ی کلروفیل در یاخته می‌شود.

تأثیر گذاشته و مانع از زیاد شدن کلروفیل *a* شده است که در تیمار L21 که رنگ شیرابه بیشتر بوده محسوس‌تر است. در صورتی که افزایش تراکم ریزجلبک در محیط مایه ایجاد تاریکی و نرسیدن نور کافی به سلول‌های دیگر ریزجلبک شده و در نهایت مایه مهار رشد و کاهش راندمان فتوسنتزی می‌شود (Abdel-Raouf *et al.*, 2012). (Martinez *et al.*, 2000). گزارش کردند که افزایش تعداد یاخته‌های جلبکی در کشتگاه، مایه ایجاد تاریکی شده و مانع از رشد و فتوسنتز یاخته‌ها می‌شود. کاهش اندازه کلروفیل *a* با گذشت زمان، ممکن است به دلیل کاهش مواد مغذی در دسترس ریزجلبک نیز باشد. با گذشت زمان، ریزجلبک مواد مغذی موجود در شیرابه مانند فسفات، آمونیوم و نیترات را جذب کرده و در نهایت مقدار این مواد در



شکل ۲- پیامد برهم‌کنش سطوح مختلف شیرابه در طول زمان بر اندازه کلروفیل *a* ریزجلبک کلرلا و لگاریس در طول ۸ روز انکوباسیون.

بودن حداقل یک حرف مشترک روی ستون‌ها نشان‌دهنده نبودن تفاوت آماری معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است. نوارهای خطا نشان‌دهنده انحراف از معیار هستند. مقادیر میانگین ۳ تکرار هستند. بدون شیرابه (L0)، شیرابه با رقت ۱:۱ (L11) و شیرابه با رقت ۲:۱ (L21)

کلروفیل *b*

اندازه کلروفیل *b* با گذشت زمان روند افزایشی نشان داد که نشان-دهنده کارآمد بودن کلروفیل *b* نسبت به کلروفیل *a* در شرایط تاریکی است. در ریزجلبک‌ها مکانیسم عمل کلروفیل *a* و *b* مکمل یکدیگرند. اندازه کلروفیل *b* از روند کاهشی یا افزایشی یکنواختی پیروی نمی‌کند و بیشتر تحت تأثیر میزان فتوسنتز ریزجلبک است (Eggink *et al.*, 2001).

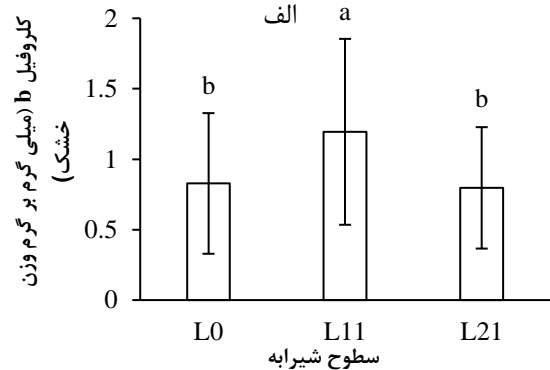
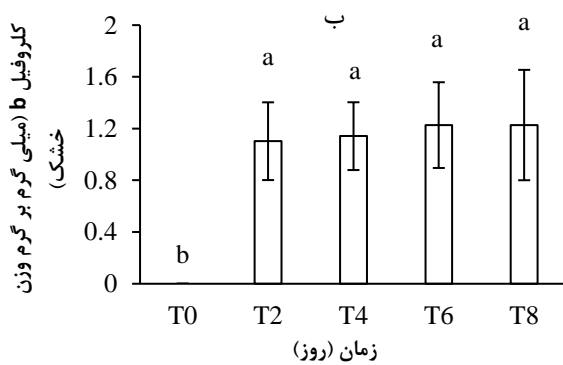
کلروفیل کل

پیامد سطوح شیرابه و زمان بر اندازه کلروفیل کل ریزجلبک کلرلا و لگاریس در شکل (۴) نشان داده شده است. اندازه کلروفیل کل در تیمارهای L0 و L11 اختلاف آماری معنی‌داری با یکدیگر نشان ندادند و اندازه کلروفیل کل در تیمار L21 به طور معنی‌داری کمتر از دو تیمار دیگر بود (شکل ۴-الف). بیشترین اندازه کلروفیل در

پیامد سطوح شیرابه و زمان بر اندازه کلروفیل *b* ریزجلبک کلرلا و لگاریس در شکل (۳) نشان داده شده است. اندازه کلروفیل *b* در تیمار L11 با اختلاف آماری معنی‌دار بیشتر از دو تیمار L0 و L21 بود (شکل ۳-الف). اندازه کلروفیل *b* در زمان‌های مختلف اختلاف آماری معنی‌داری را نشان نداد (شکل ۳-ب). کلروفیل *a* رنگدانه اصلی فتوسنتز و کلروفیل *b* رنگدانه جانبی است که انرژی را برای انتقال کلروفیل *a* به کلروپلاست جمع‌آوری می‌کند. افزایش تراکم ریزجلبک و همچنین رنگ تیره شیرابه مایه ایجاد شرایط تاریکی برای برخی از سلول‌های ریزجلبک و نرسیدن نور به آن‌ها می‌شود. برخلاف اندازه کلروفیل *a* که با گذشت زمان روند کاهشی داشت،

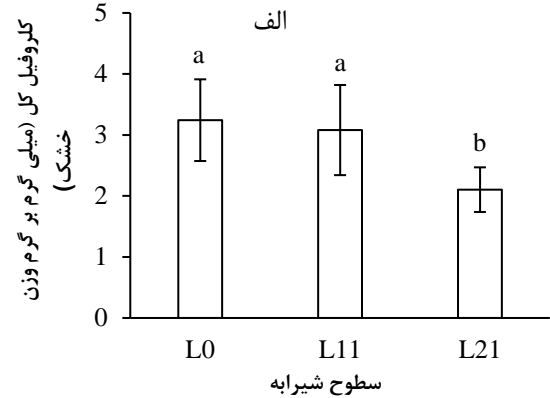
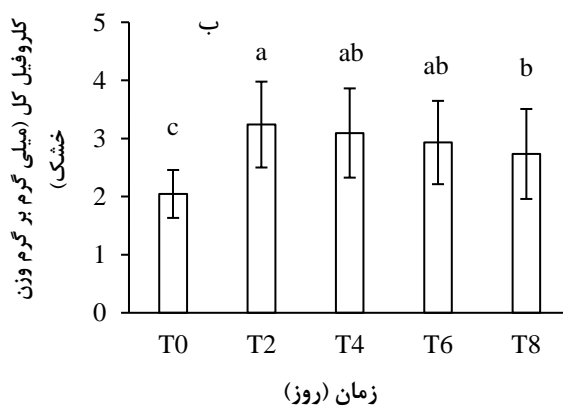
فتوسنتز به طور مؤثر استفاده کنند که به نظر می‌رسد در این پژوهش نیز مقدار زیاد نیتروژن آمونیومی در تیمار L21 دلیلی بر مقادیر کمتر کلروفیل کل در ریزجلبک است. کمترین اندازه کلروفیل کل در زمان شروع آزمایش و بیشترین اندازه نیز در روز دوم انکوباسیون دیده شد (شکل ۴-ب). به طور کلی تغییرات کلروفیل در این پژوهش از روند خاصی پیروی نمی‌کند. کلروفیل یک جزء ضروری برای دریافت نور و انتقال انرژی در فتوسنتز است و واکنش‌های فتوسنتزی که شامل واکنش‌های نوری، چرخه کلوین و سنتز نشاسته است را شامل می‌شود. ساخت کلروفیل در ریزجلبک فرایند پیچیده‌ای شامل ۱۶ واکنش کاتالیستی است که در صورت اختلال یا کامل انجام نشدن هر کدام از این واکنش‌ها فرایند ساخت کلروفیل با مشکل روبرو می‌شود. همچنین قرار گرفتن در معرض تنش‌های محیطی مانع رشد ریزجلبک شده و مایه تغییر متابولیسم کلروفیل می‌شود (Nie *et al.*, 2008).

تیمار L0 دیده شد که می‌تواند در اثر شفاف بودن محیط به دلیل نبود شیرابه و نفوذ کامل نور به تمام سلول‌های ریزجلبک در این تیمار باشد. البته اندازه کلروفیل کل در تیمار L0 و L11 اختلاف آماری معنی‌داری را نشان نداد که می‌تواند به سبب غلظت مناسب یون منیزیم در تیمار L11 باشد. زیرا منیزیم در فتوسنتز بسیار حیاتی و اتم مرکزی در کلروفیل است و سطح آن در کلروپلاست می‌تواند فعالیت آنزیم‌های درگیر در این فرایند را تحت تأثیر قرار دهد (Shaul, 2001). از طرفی Choi *et al.* (2013) گزارش کردند که فعالیت فیزیولوژیکی کلرلا و لگاریس در غلظت‌های بالای نیتروژن آمونیومی کاهش می‌یابد. نیتروژن آمونیومی زیاد در ابتدا می‌تواند به اندام‌های فتوسنتزی آسیب برساند و کارایی فتوشیمیایی را کاهش دهد و همچنین به طور چشمگیری توانایی کلروپلاست‌ها را در مصرف انرژی اضافی افزایش می‌دهد. بنابراین آن‌ها نمی‌توانند از انرژی جذب شده توسط رنگدانه‌ها برای



شکل ۳- پیامد سطوح شیرابه (الف) و زمان (ب) بر کلروفیل b در ریزجلبک کلرلا و لگاریس

بودن حداقل یک حرف مشترک روی ستون‌ها نشان‌دهنده نبودن تفاوت آماری معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است. نوارهای خطا نشان‌دهنده انحراف از معیار هستند. مقادیر میانگین ۳ تکرار هستند. بدون شیرابه (L0)، شیرابه با رقت ۱:۱ (L11) و شیرابه با رقت ۲:۱ (L21)



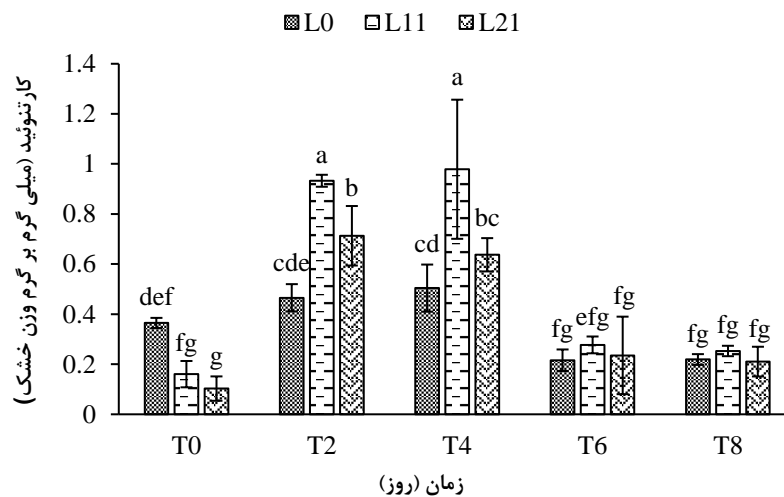
شکل ۴. پیامد سطوح شیرابه (الف) و زمان (ب) بر اندازه کلروفیل کل در ریزجلبک کلرلا و لگاریس

بودن حداقل یک حرف مشترک روی ستون‌ها نشان‌دهنده نبودن تفاوت آماری معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است. نوارهای خطا نشان‌دهنده انحراف از معیار هستند. مقادیر میانگین ۳ تکرار هستند. بدون شیرابه (L0)، شیرابه با رقت ۱:۱ (L11) و شیرابه با رقت ۲:۱ (L21)

کارتنوئید

کارتنوئیدها به عنوان گیرنده‌های فرعی نور عمل کرده و نورهای مرئی با طول موج ۴۰۰-۵۰۰ نانومتر را جذب می‌کنند. در تنش‌های شیمیایی نظیر کمبود مواد غذایی و شوری زیاد و در تنش‌های حاصل از افزایش نور، برخی از جلبک‌ها قادر به افزایش ساخت و تجمع کارتنوئید می‌باشند (Xiong *et al.*, 2017). ساخت کارتنوئیدها به اندازه نیتروژن نیز بستگی دارد. هنگامی که نیتروژن در محیط رشد تأمین نشود، تقسیم یاخته‌ای در ریزجانداران متوقف می‌شود زیرا نیتروژن نیاز اصلی برای کلیه فعالیت‌های متابولیکی است. نیتروژن برای ساخت لوتئین که یک کارتنوئید طبیعی است ضروری بوده و بر تجمع آن تأثیر می‌گذارند و در صورت کاهش اندازه نیتروژن، لوتئین نیز به طرز چشم‌گیری کاهش می‌یابد (Cordero *et al.*, 2011). بنابراین کاهش اندازه کارتنوئید در ریز جلبک در روزهای پایانی را می‌توان به کاهش نیترات در شیرابه نسبت داد.

پیامد برهم‌کنش سطوح مختلف شیرابه در طول زمان بر اندازه کارتنوئید ریزجلبک کلرلا و لگاریس در شکل (۵) نشان داده شده است. اندازه کارتنوئید در تیمار L0 و L11 از زمان شروع آزمایش تا روز چهارم روند افزایشی و بعد از آن روند کاهشی نشان داد. اما اندازه کارتنوئید در تیمار L21 تا روز دوم افزایش و سپس تا پایان دوره آزمایش روند کاهشی نشان داد. افزایش اندازه کارتنوئید در یاخته‌های ریزجلبک ممکن است یک سازوکار دفاعی در برابر تغییرات فیزیولوژیک ایجاد شده در شرایط تنش و تشکیل بیش از حد رادیکال‌های آزاد باشد (Jalal *et al.*, 2013). افزایش اندازه کارتنوئید در پاسخ به تنش‌های محیطی نتیجه برهم خوردن تعادل میان کربن و نیتروژن یاخته طی شرایط نامطلوب محیطی است (Hu, 2004). نور و شوری از عوامل مهمی هستند که نوسان آن‌ها در اندازه کلروفیل، کارتنوئید و رشد یاخته تأثیرگذار است.



شکل ۵- پیامد سطوح مختلف شیرابه در طول زمان بر اندازه کارتنوئید ریزجلبک کلرلا و لگاریس در طول ۸ روز انکوباسیون.

بودن حداقل یک حرف مشترک روی ستون‌ها نشان‌دهنده نبودن تفاوت آماری معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است. نوارهای خطا نشان‌دهنده انحراف از معیار هستند. مقادیر میانگین ۳ تکرار هستند. بدون شیرابه (L0)، شیرابه با رقت ۱:۱ (L11) و شیرابه با رقت ۲:۱ (L21)

رشد ریزجلبک و زدایش مواد مغذی

یون کروماتوگرافی، تیمار L11 با رنگ کمتر در این بخش مورد بررسی قرار گرفت. در جدول (۲) نتایج حاصل از تجزیه واریانس تأثیر زمان بر زدایش مواد مغذی با ریزجلبک در تیمار L11 نشان داده شده است. پیامد زمان بر زدایش هر سه ماده مغذی فسفات، نیترات و آمونیوم معنی‌دار بود ($p < 0.01$).

نتایج عنوان شده در رابطه با ویژگی‌های ریزجلبک نشان داد اندازه کلروفیل در تیمار L11 بیشتر بود که به نظر می‌رسد رنگ کمتر در شیرابه عامل آن باشد. بنابراین برای دقت بیشتر برای اندازه‌گیری اندازه نیترات، آمونیوم و فسفات با دستگاه

جدول ۲- جدول تجزیه واریانس تأثیر زمان بر زدایش فسفات، نیترات و آمونیوم با ریزجلبک در تیمار L11

منبع تغییرات	میانگین مربعات			درجه آزادی	زمان (T)
	فسفات	نیترات	آمونیم		
خطا (Error)	۰/۷۵۲	۰/۰۲۷	۴۱۷۵۱۱/۱۲**	۴	خطا (Error)
				۵	

** بیان‌گر معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۱ درصد است.

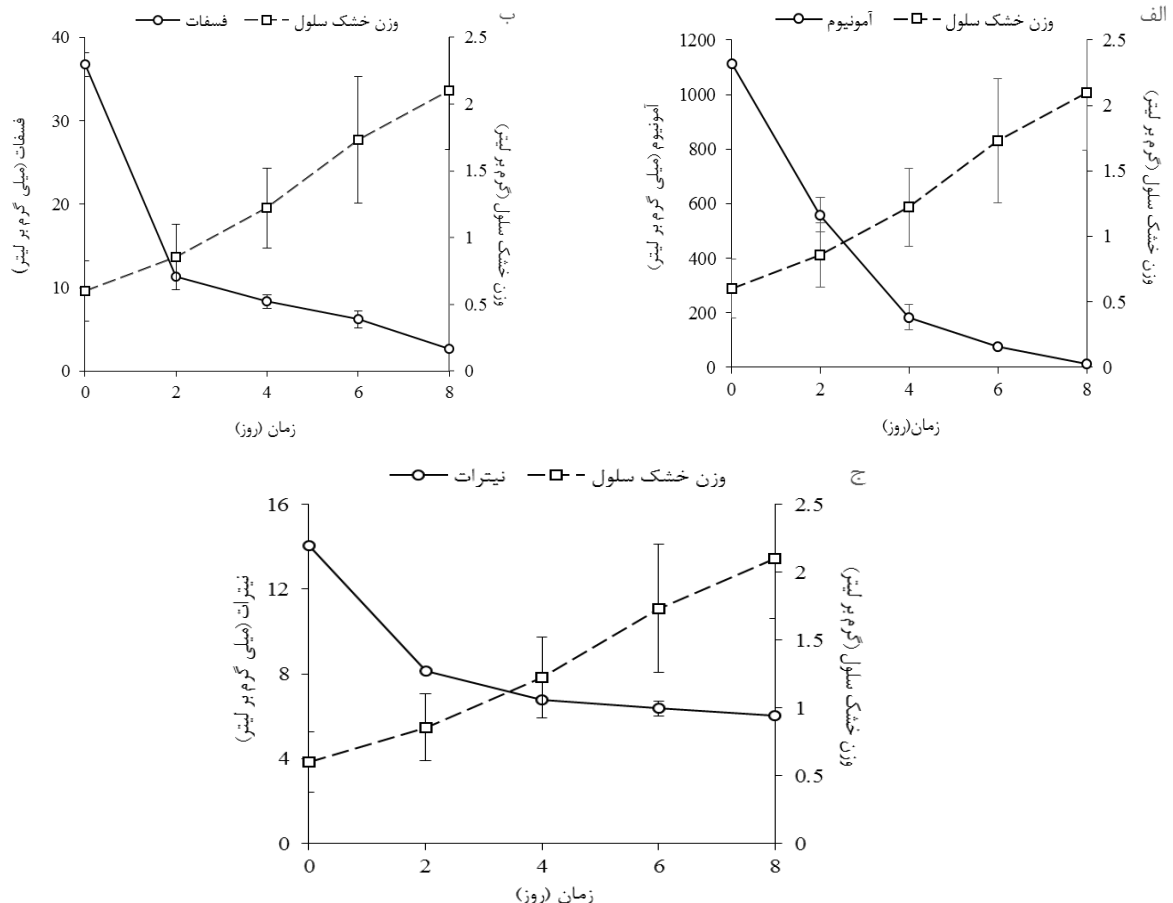
تغییرات رشد ریزجلبک کلرلا و لگاریس و آمونیوم، فسفات و نیترات موجود در شیرابه با گذشت زمان در شکل (۶) نشان داده شده است. غلظت مواد مغذی با گذشت زمان کاهش پیدا کرد به گونه‌ای که کمترین غلظت آمونیوم (۱۴/۳۸)، فسفات (۲/۶۶) و نیترات (۶/۰۴) بر حسب میلی‌گرم بر لیتر در روز ۸ آزمایش دیده شد که نشان‌دهنده زدایش ۹۸/۷۰ درصد آمونیوم (شکل ۶-الف)، ۹۲/۷۶ درصد فسفات (شکل ۶-ب) و ۵۶/۹۴ درصد نیترات (شکل ۶-ج) از شیرابه است. بیشترین وزن خشک ریزجلبک (۲ گرم در لیتر) در روز ۸ به دست آمد. مقدار وزن خشک ریزجلبک در پایان روز هشتم ۱/۵ گرم افزایش داشت و مقدار آمونیوم در پایان این زمان ۱۰۹۹/۵ میلی‌گرم در لیتر کاهش پیدا کرد، بنابراین به ازای هر گرم وزن خشک ریزجلبک ۷۳۳ میلی‌گرم آمونیوم زدایش شده است، این عدد برای فسفات ۲۲/۷۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک ریزجلبک و برای نیترات ۵/۳۲ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک ریزجلبک بود. در طول زمان انکوباسیون اندازه وزن خشک ریزجلبک افزایش یافته که نشان‌دهنده سازگاری ریزجلبک با محیط موجود و همچنین جذب مواد غذایی از شیرابه است که وارد جرم یاخته‌ای ریزجلبک شده است. اندازه زدایش مواد مغذی نیز با افزایش وزن خشک در طول زمان افزایش یافته است. (Kwon et al., 2018) نیز بیشترین اندازه وزن خشک یاخته ریزجلبک (۰/۵۷ گرم در لیتر) و زدایش ۹۹/۸ درصد نیتروژن و ۶۲/۵ درصد فسفر از فاضلاب را در انتهای دوره آزمایش گزارش کردند. یافته‌های پژوهش ابوالحسنی و همکاران (۱۳۹۵) نیز وجود همبستگی مثبت میان زدایش فسفات و نیترات پساب با وزن خشک یاخته ریزجلبک را نشان دادند و گزارش کردند که با افزایش وزن خشک یاخته در انتهای دوره آزمایش، درصد فسفات و نیترات زوده شده از پساب نیز افزایش یافت که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد. کارایی زدایش فسفر و نیتروژن وابسته به ترکیب محیط رشد و شرایط محیطی مانند غلظت اولیه ماده غذایی، شدت نور، نسبت نیتروژن به فسفر، چرخه روشنائی به تاریکی یا گونه ریزجلبک است (Aslan and Kapdan, 2006). به‌طور کلی نیتروژن عنصر موردنیاز برای رشد ریزجلبک است و جز اصلی پروتئین‌ها، کلروفیل و آنزیم‌های درگیر در فتوسنتز ریزجلبک است اما در غلظت‌های بالای نیتروژن مانند شرایط موجود در شیرابه راندامان رشد ریزجلبک کاهش پیدا می‌کند. با توجه به این که کارایی زدایش نیتروژن آمونیومی توسط ریزجلبک و رشد آن به ترکیب و شرایط محیطی مانند غلظت اولیه ماده مغذی، شدت نور، چرخه تاریکی/روشنائی، نسبت مولی N/P و گونه‌های ریزجلبک بستگی دارد، امکان رشد آن در شرایط با

مقادیر زیاد نیتروژن نیز وجود دارد (Li et al., 2011). عربیان و امیری (۱۳۹۶) زدایش نیتروژن آمونیومی و ارتوفسفات از پساب شهری با استفاده از یاخته‌های تثبیت شده کلرلا و اووسیستس را گزارش کردند و اعلام نمودند که کلرلا کارایی بالایی در زدایش غلظت‌های بالای نیتروژن آمونیومی دارد. (Li et al., 2011) نیز توانایی رشد دو ریزجلبک کلرلا و سندسموس را در غلظت‌های بالای آمونیوم و نیترات گزارش کردند که با پژوهش حاضر مطابقت دارد. به‌طور کلی ریزجلبک کلرلا و لگاریس قابلیت سازگاری با غلظت زیاد نمک‌های مختلف را دارد و پژوهش‌ها مقاومت گونه‌های ریزجلبک کلرلا به شوری را نشان داده‌اند (Figler et al., 2019). (Chiu et al., 2008) ریزجلبک کلرلا را در محیط کشت شبیه‌سازی شده- آب دریا رشد دادند و مقدار نرخ رشد ویژه آن را (d^{-1}) ۰/۲۳ گزارش کردند که با نرخ رشد ویژه ریزجلبک در این پژوهش که در روزهای ۲، ۴، ۶ و ۸ مقادیر (d^{-1}) ۰/۲۶، ۰/۲۱، ۰/۱۸ و ۰/۱۱ برآورد شد مطابقت دارد. نتایج نشان داد که ریزجلبک کلرلا و لگاریس آمونیوم را به‌اندازه بیشتری نسبت به فسفات و فسفات را به‌اندازه بیشتری نسبت به نیترات از شیرابه می‌زداید. نیتروژن آمونیومی جذب‌شده توسط کلرلا می‌تواند مستقیماً مورد استفاده قرار گیرد، اما نیتروژن نیتراتی جذب‌شده نخست بایستی کاهش یابد و به نیتروژن آمونیومی تبدیل شود و سپس مورد استفاده قرار گیرد که این فرایند نیاز به صرف انرژی دارد. بنابراین نیتروژن آمونیومی می‌تواند به‌سرعت در مراحل اولیه رشد استفاده شود (Choi et al., 2013). زدایش نیترات نسبت به فسفات فرایند پیچیده‌تری دارد زیرا در ارتباط با آمونیوم موجود در شیرابه است. شیب خط در معادلات سینتیکی آمونیوم و فسفات نیز نشان می‌دهد که ساخت زیست‌توده به آمونیوم بیشتر از فسفات وابسته است. (Figler et al., 2019) نیز گزارش کردند که غلظت بالای نمک کلرید سدیم اثر بسیار ضعیفی را در زدایش فسفات توسط ریزجلبک کلرلا و لگاریس دارد. اما سهم نیترات زدایش شده با افزایش غلظت نمک کاهش پیدا کرد که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. از طرفی با توجه به اهمیت فسفر که به‌طور عمومی عامل محدودیت رشد ریزجلبک‌ها است جذب بیشتر آن نسبت به نیترات با توجه به این که بخش عمده تأمین نیتروژن از شکل آمونیومی نیتروژن بوده است دور از انتظار نیست.

در محیط کشت استاندارد (L0) نیز در پایان روز هشتم مقدار جذب آمونیوم، نیترات و فسفات اندازه‌گیری شد و مقدار زدایش این یون‌ها به ترتیب ۸۲/۴۵، ۹۹/۵ و ۹۶/۸۳ درصد برآورد شد که به سبب متفاوت بودن مقادیر اولیه این یون‌ها در محیط

مختلف نمونه‌برداری با زمان صفر اختلاف معنی‌دار را نشان نداد، بنابراین تغییرات ایجادشده در این سه ماده مغذی مربوط به ریزجلبک می‌باشد.

کشت استاندارد و محیط شیرابه اختلافات مشاهده‌شده بدیهی است. لازم به ذکر است که در نمونه گواه دارای شیرابه بدون ریزجلبک، تغییرات نیترات، آمونیوم و فسفات در زمان‌های



شکل ۶- تغییرات رشد ریزجلبک کلرلا و زدایش آمونیوم (الف)، فسفات (ب) و نیترات (ج) در طول ۸ روز انکوباسیون

محیطی تغییر می‌کند. در مطالعه‌ای که Kim و همکاران (2013) برای تعیین معادله سینتیکی زدایش فسفر و نیتروژن از پساب فاضلاب شهری با ریزجلبک کلرلا و لگاریس انجام دادند، در معادله سینتیکی زدایش فسفات 0.99 mg L^{-1} را گزارش کردند. شریعتی و طاهری (۱۳۹۵) نیز Ks در معادله مونود برای زدایش فسفات را 10.33 mg L^{-1} گزارش نمودند. با توجه به این که معادلات سینتیکی بر اساس گونه جلبک و شرایط محیطی و کشتگاه جلبک تغییر می‌کند به دست آمدن یافته‌های متفاوت قابل پیش‌بینی است.

دو پارامتر μ_{\max} و Ks برای آمونیوم به ترتیب day^{-1} 0.243 و 15.71 mg L^{-1} محاسبه و معادله مونود نیز طبق رابطه ۸ به دست آمد.

$$\mu = \frac{0.243 \cdot s}{15.71 + s} \quad (\text{رابطه ۸})$$

رابطه ۸ نشان می‌دهد که به ازای هر واحد سرعت رشد

معادلات سینتیکی زدایش فسفات و آمونیوم با ساخت زیست‌توده

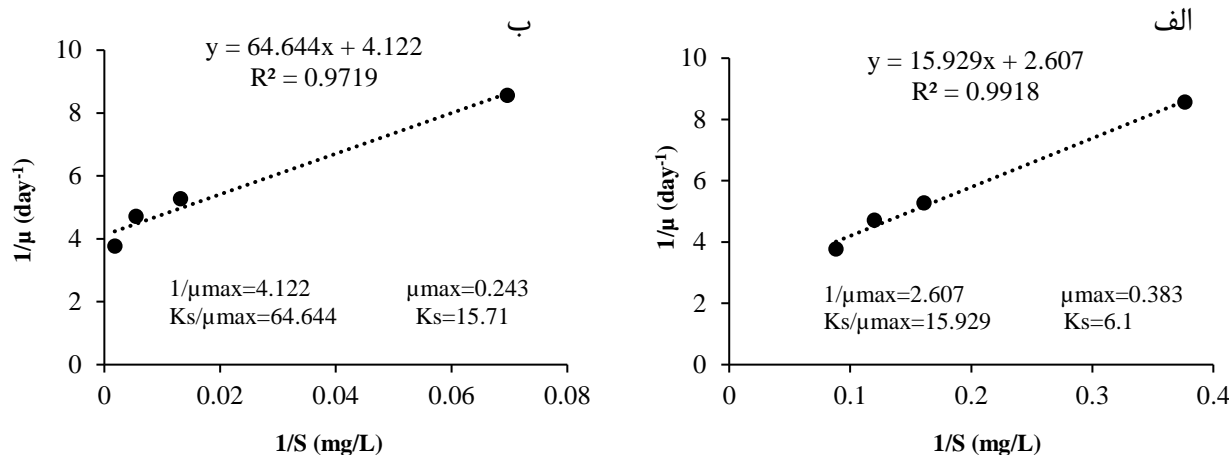
در این پژوهش رابطه ساخت زیست‌توده و زدایش نیترات منطبق با معادله مونود نبود که می‌تواند به دلیل رفتار ریزجلبک و محیط رشد آن باشد اما زدایش آمونیوم و فسفات با معادله مونود منطبق شد. معادله سینتیکی ساخت زیست‌توده جلبک و زدایش فسفات و آمونیوم در شکل (۷) نشان داده شده است. بر اساس داده‌ها، μ_{\max} و Ks برای فسفات به ترتیب 0.383 day^{-1} و 6.1 mg L^{-1} به دست آمد. معادله مونود نیز طبق رابطه ۷ برای فسفات محاسبه شد.

$$\mu = \frac{0.383 \cdot s}{6.1 + s} \quad (\text{رابطه ۷})$$

این معادله به این معنا است که به ازای هر واحد سرعت رشد ویژه 6.1 mg L^{-1} فسفات توسط ریزجلبک از شیرابه زدایش شده است. معادلات سینتیکی بر اساس نوع جلبک و شرایط

آمد که بیانگر این است که داده‌ها با معادله موند برآزش خوبی دارند و می‌توان از این معادله برای زدایش فسفات و آمونیوم بهره‌گیری کرد.

ویژه، $15/71 \text{ mg L}^{-1}$ آمونیوم از شیرابه زدوده می‌شود. با توجه به تعریف K_s به نظر می‌رسد ریزجلبک آمونیوم را بهتر از فسفات زدایش می‌کند. اندازه R^2 حاصل از برآزش رابطه لینیویر-برک برای فسفات و آمونیوم به ترتیب $0/9918$ و $0/9719$ به دست



شکل ۷- تعیین بیشینه سرعت رشد ویژه (day^{-1}) و ضرب موند (mg L^{-1}) فسفات (الف) و آمونیوم (ب) بهره‌گیری از طرح لینیویر-برک بر اساس ترسیم $1/\mu$ در مقابل $1/S$

معادله موند به خوبی توانست رشد ریزجلبک در شرایط محدودکننده با سوپسترا را توصیف کند. در کل، ریزجلبک آمونیوم را بیشتر از فسفات از شیرابه زدود. بنابراین به نظر می‌رسد ریزجلبک کلرلا و لگاریس پتانسیل استفاده در پالایش زیستی شیرابه سراوان را داشته باشد و کاربرد کلرلا در کنار سایر ریزجلبک‌های شناخته شده‌ی دیگر به منظور مقایسه و بررسی افزایش کارایی فرایند پالایش پیشنهاد می‌شود.

"هیچ‌گونه تعارض منافع بین نویسندگان وجود ندارد"

نتیجه‌گیری

در این پژوهش رشد و زدایش مواد مغذی در شیرابه با ریزجلبک کلرلا و لگاریس مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که میان زدایش آمونیوم، فسفات و نیترات و زیست‌توده ریزجلبک رابطه معنی‌داری وجود دارد و با افزایش وزن خشک یاخته درصد زدایش مواد مغذی نیز افزایش یافت. ریزجلبک در این پژوهش توانست $98/7$ درصد آمونیوم، $92/76$ درصد فسفات و $56/94$ درصد نیترات را از شیرابه بزداشد. نتایج حاصل از مدل سینتیکی نشان داد که زدایش مواد مغذی از مدل درجه اول پیروی می‌کند و

REFERENCES

- Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A. A., and Ibraheem, I. B. M. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19, 257-275.
- Akbari, F., and Madadkar haghjou, M. (2016). Increased biomass and growth of *Dunaliella* microalgae under the influence of vanillin treatment. *Journal of Plant Process and Function*, 7(24), 211-228. (In Farsi).
- American Public Health Association, A.P.H.A. (1995). *Standard methods for the examination of water and wastewater* (Vol. 21). Washington, DC: American public health association.
- Andersen, R.A. 2005. *Algal Culturing Techniques*. Oxford: Elsevier Academic Press.
- Aslan, S., and Kapdan, I. K. (2006). Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecological Engineering*, 28, 64-70.
- Borowitzka, M. A. (2018). *Biology of Microalgae*. In *Microalgae in Health and Disease Prevention*, Academic Press, 23-72.
- Brennan, L., and Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae—a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), 557-577.
- Camargo, J. A., and Alonso, A. (2006). Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: a global assessment. *Environment International*, 32: 831-849.
- Cetin, A. K., and Kendirlioglu, G. (2017). Effect of different wavelengths of light on growth, pigment content and protein amount of *Chlorella vulgaris*. *Fresenius Environmental Bulletin*, 26, 7974-7980.

- Chen, R., Li, R., Deitz, L., Liu, Y., Stevenson, R. J., and Liao, W. (2012). Freshwater algal cultivation with animal waste for nutrient removal and biomass production. *Biomass and Bioenergy*, 39: 128-138.
- Chen, J., Zheng, F., and Guo, R. (2015). Algal feedback and removal efficiency in a sequencing batch reactor algae process (SBAR) to treat the antibiotic cefradine. *Public Library of Science*, 10, 1-11.
- Chiu, S. Y., Kao, C. Y., Chen, C. H., Kuan, T. C., Ong, S. C., and Lin, C. S. (2008). Reduction of CO₂ by a high-density culture of *Chlorella* sp. in a semicontinuous photobioreactor. *Bioresource Technology*, 99(9), 3389-96.
- Choi, H. J., and Lee, S. M. (2013). Performance of *Chlorella vulgaris* for the removal of ammonia-nitrogen from wastewater. *Environmental Engineering Research*, 18(4), 235-239.
- Cordero, B. F., Couso, I., Leon, R., Rodríguez, H., and Vargas, M. A. (2011). Enhancement of carotenoids biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* by nuclear transformation using a phytoene synthase gene isolated from *Chlorella zofingiensis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91, 341-351.
- Dortch, Q., and Conway, H. L. (1984). Interactions between nitrate and ammonium uptake: variation with growth rate, nitrogen source and species. *Marine Biology*, 79, 151-164.
- Eggink, L. L., Park, H., and Hooper, J. K. (2001). Role of chlorophyll b in photosynthesis: hypothesis. *Journal of BMC Plant Biology*, 2, 1471-2229.
- Environmental regulations for reuse and recycling of waste water. (2010). Bulten No 535, Deputy Director of Strategic Control, Ministry of Energy, Iran.
- Eze, V. C., Velasquez-Orta, S. B., Hernandez-García, A., Monje-Ramírez, I., and Orta-Ledesma, M. T. (2018). Kinetic modelling of microalgae cultivation for wastewater treatment and carbon dioxide sequestration. *Algal Research*, 32, 131-141.
- Figler, A., B-Béres, V., Dobronoki, D., Márton, K., Nagy, S. A., and Bácsi, I. (2019). Salt tolerance and desalination abilities of nine common green microalgae isolates. *Water*, 11, 2527.
- Gao, Q. T., Wong, Y. S., and Tam, N. F. Y. (2011). Removal and biodegradation of nonylphenol by different *Chlorella* species. *Marine Pollution Bulletin*, 63, 445-451.
- Glibert, P. M. (2020). Harmful algae at the complex nexus of eutrophication and climate change. *Harmful Algae*, 91, 101583.
- Hayouni, E. A., Abedrabba, M., Bouix, M., and Hamdi, M. (2007). The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Journal of Food Chemistry*, 105(3), 1126-1134.
- Hu, Q. (2004). Environmental effects on cell composition. *Handbook of Microalgal Culture. Biotechnology and Applied Phycology*, 83-93.
- Jalal, K. C. A., Shamsuddin, A. A., Nurzatul, N. Z., and Rozihan, M. (2013). Growth and total carotenoid chlorophyll a and chlorophyll b of tropical microalgae (*Isochysis* sp.) in laboratory cultured condition. *Journal of Biological Sciences*, 13(1), 10-17.
- Kabra, A. N., Ji, M. K., Choi, J., Kim, J. R., Govindwar, S. P., and Jeon, B. H. (2014). Toxicity of atrazine and its bioaccumulation and biodegradation in a green microalga *Chlamydomonas Mexicana*. *Journal of Environmental Science and Pollution Research*, 21, 12270-12278.
- Kim, J., Liu, Z., Lee, J. Y., and Lu, T. (2013). Removal of nitrogen and phosphorus from municipal wastewater effluent using *Chlorella vulgaris* and its growth kinetics. *Desalination and Water Treatment*, 51(40-42), 1-7.
- Kim, K., and Owens, R. G. (2010). Potential for enhanced phytoremediation of landfills using biosolids – a review. *Journal of Environmental Management*, 91(4), 791-797.
- Kwon, G., Nam, J. H., Kim, D. M., Song, C., and Jahang, D. (2018). Growth and nutrient removal of *chlorella vulgaris* in ammonia-reduced raw and anaerobically-digested piggery wastewater. *Environmental Engineering Research*, 25(2), 135-146.
- Li, Y., Chen, Y., and Chen, P. (2011). Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. *Bioresource Technology*, 102, 5138-5144.
- Luo, H., Zeng, Y., Cheng, Y., He, D., and Pan, X. (2019). Recent advances in municipal landfill leachate: A review focusing on its characteristics, treatment, and toxicity assessment. *Science of the Total Environment*, 135468.
- Mandal, S. M., Chakraborty, D., and Dey, S. (2010). Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. *Plant Signaling and Behavior*, 5(4), 359-368.
- Markou, G., and Georgakakis, D. (2011). Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: a review. *Applied Energy*, 88, 3389-3401.
- Martinez, M., Sánchez, S., Jimenez, J., El Yousfi, F., and Munoz, L. (2000). Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, 73(3), 263-72.
- Miazek, K., Goffin, D., and Richel, A. (2013). The effect of vanillin on *Chlorella* growth. *Life Sciences: Agriculture and Agronomy*.
- Mishra, S., Tiwary, D., and Ohri, A. (2018). Leachate characterization and evaluation of leachate pollution potential of urban municipal landfill sites. *International Journal of Environment and Waste Management*, 21, 217.
- Monod, J. (1949). The growth of bacterial cultures. *Annual Reviews in Microbiology*, 3 (1), 371-394.
- Mutlu, Y. B., Isik, O., Uslu, L., Koç, K., and Durmaz, Y. (2011). The effects of nitrogen and phosphorus

- deficiencies and nitrite addition on the lipid content of *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae). *African Journal of Biotechnology*, 10, 453-456.
- Nie, X., Xiang, W., Chen, J., Vladimir, Z., and An, T. (2008). Response of the freshwater alga *Chlorella vulgaris* to trichloroisocyanuric acid and ciprofloxacin. *Journal of Environmental Toxicology and Chemistry*, 27, 168-173.
- Pancha, I., Chokshi, K., Maurya, R. K., Trivedi, K., Patidar, S. K., Ghosh, A., and Mishra, S. (2015). Salinity induced oxidative stress enhanced biofuel production potential of microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresource Technology*, 189, 341-348.
- Padedda, B. M., Sechi, N., Lai, G. G., Mariani, M. A., Pulina, S., Sarria, M., and Luglie, A. (2017). Consequences of eutrophication in the management of water resources in Mediterranean reservoirs: A case study of Lake Cedrino (Sardinia, Italy). *Global Ecology and Conservation*, 12, 21-35.
- Sayadi, M. H., Kargar, R., Doosti, M. R., and Salehi, H. (2012). Hybrid constructed wetlands for wastewater treatment: a worldwide review. *Proceedings of the international academy of ecology and environmental sciences*, 2(4), 204-222.
- Sayadi, M. H., Ahmadpour, N., Fallahi-capoorchali, M., and Rezaei, M. R. (2016). Removal of nitrate and phosphate from aqueous solution by microalgae: An experimental study. *Global Journal of Environmental Science and Management*, 2(3), 357-364.
- Seckbach, J. (2012). Evolutionary pathways and enigmatic algae: *Cyanidium caldarium* (Rhodophyta) and related cells. Springer Science and Business Media 91.
- Shariati, M., and Taheri, R. (2016). Removal of nitrogen and phosphate from municipal wastewater by *Chlorella vulgaris* and determination of its kinetic growth equation. *Applied Biology*, 29(2), 117-130. (In Farsi).
- Shariatmadari, N., Lasaki, B. A., Eshghinezhad, H. and Alidoust, P. (2018). Effects of landfill leachate on mechanical behavior of adjacent soil: a case study of Saravan landfill, Rasht, Iran. *International Journal of Civil Engineering*, 16(10), 1503-1513.
- Shaul, O. (2002). Magnesium transport and function in plants: the tip of the iceberg. *Biometals*, 15, 307-321.
- Wang, L., Min, M., Li, Y., Chen, P., Chen, Y., Liu, Y., Wang, Y., and Ruan, R. (2010). Cultivation of green Algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. *Journal of Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162, 1174-1186.
- Xiong, J. Q., Kurade, M. B., Shanab, R. A. I., Ji, M. K., Choi, J., Kim, J. O., and Jeon, B. H. (2016). Biodegradation of carbamazepine using freshwater microalgae *Chlamydomonas mexicana* and *Scenedesmus obliquus* and the determination of its metabolic fate. *Bioresource Technology*, 205, 183-190.
- Xiong, J. Q., Kurade, M. B., Kim, J. R., Roh, H. S., and Jeon, B. H. (2017). Ciprofloxacin toxicity and its co-metabolic removal by a freshwater microalga *Chlamydomonas mexicana*. *Journal of Hazardous Materials*, 323, 212-219.