

بررسی نقش ریزجلبک دریایی *Fischerella* sp. در کاهش نیتрат و فسفات محیط

لادن بافته چی^۱، حمید سبحانیان^۱، ندا سلطانی^۲، غلامرضا بخشی خانیکی^۱، مهر روز دزفولیان^۳

۱- گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، ص.پ. ۱۹۳۹۵-۴۶۹۷، تهران، ایران

۲- گروه میکروبیولوژی نفت، پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران

۳- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج

ladanbaftechi@yahoo.com

چکیده:

پساب‌های حاصل از فعالیت صنایع و بخش‌های گوناگون بدلیل دارا بودن ترکیبات متفاوت از جمله نیترات و فسفات اثرات زیان‌باری را بر اکوسیستم‌ها و محیط زیست وارد می‌کنند. حذف و تصفیه این ترکیبات با روش‌های متفاوت فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی امکان‌پذیر است. ریزجلبک‌ها میکروارگانیسم‌هایی هستند که توانایی زیادی در حذف و پاکسازی پساب‌ها خصوصاً از نظر نیترات و فسفات دارند. این پژوهش به بررسی پتانسیل ریزجلبک دریایی *Fischerella* sp. در کاهش میزان نیترات و فسفات محیط می‌پردازد. نمونه مورد نظر *Fischerella* sp. ISC 123 از کلکسیون پژوهشکده علوم پایه کاربردی تهیه شد. این نمونه در محیط کشت BG110 به همراه مقادیر متفاوتی از NaNO_3 (۵۰-۲۰۰۰ mg/l)، K_2HPO_4 (۶-۵۰۰ mg/l) و NaCl (۵-۱٪) در ۱۵ ران که با نرم افزار Design expert طراحی شده بود کشت داده شد. میزان رشد، کلروفیل و تغییرات نیترات و فسفات مورد ارزیابی قرار گرفت. در اکثر ران‌ها میزان نیترات با مقادیر متفاوت کم شده که بیشینه آن در تیمار NaCl 5%, NaNO_3 1800, K_2HPO_4 77 mg/L به میزان ۴۰٪ مشاهده شد. بیشترین میزان کاهش فسفات (۱۷٪) در تیمار NaCl 1%, NaNO_3 1075, K_2HPO_4 248.5 و بیشترین میزان رشد و کلروفیل در تیمار NaCl 0.17%, NaNO_3 1075, K_2HPO_4 248.5 و 350, K_2HPO_4 77mg/L مشاهده شد. به این ترتیب نتیجه‌گیری می‌شود که ریزجلبک دریایی *Fischerella* sp. در محیط‌های شور (۵ تا ۱۰٪ NaCl) از پتانسیل خوبی در کاهش میزان نیترات برخوردار است ولی بیشینه رشد، میزان کلروفیل و کاهش فسفات در محیط‌های حاوی ۱٪ NaCl مشاهده می‌شود.

کلمات کلیدی: پساب، تصفیه، ریز جلبک، شوری، فسفات، نیترات.

مقدمه

در سال‌های اخیر، رشد سرسام‌آور جمعیت و گسترش شهرنشینی در شهرهای بزرگ و صنعتی شدن به همراه تمرکز جمعیت در قطب‌های محدود سبب بالا رفتن سرانه مصرف شده و بالطبع، فشار زیادی بر منابع گوناگون به ویژه منابع آب وارد شده است. شهرها غالباً منابع آب پیرامون را که پیش از آن در کشاورزی مصرف می‌شد، تا شعاع دور به تصرف درآورده و استفاده می‌کنند. آب‌هایی که برای مصارف گوناگون در شهرها استفاده می‌شوند یا در صنایع برای خنک کردن دستگاه‌ها و دیگر کاربردها مصرف می‌شوند، ناگزیر به شکل فاضلاب درمی‌آیند و پس از جمع‌آوری در شبکه‌های فاضلاب به پیرامون شهرها هدایت می‌شوند.

سطوح نفوذناپذیر و سنگفرش شده شهرها سبب می شود تا هرز آب های جاری شده در جریان بارش، سطوح شهری را که آغشته به انواع مواد آلاینده چون روغن و چربی، سرب، آزبست و اشیای آلوده است شستشو دهند و با جریان یافتن در جوی ها و کانال ها به خارج از شهرها سرازیر شوند. انتقال آب های آلوده و به ویژه استفاده از آن ها در آبیاری زمین های کشاورزی که در بسیاری از مناطق عمومیت دارد، آلودگی را به همه جا سرایت می دهد و تمام اجزای محیط زیست از جمله آب، هوا و خاک تحت تأثیر منفی فعالیت های انسانی و توسعه شهری - صنعتی قرار می گیرند [1].

عدم تصفیه و یا تصفیه ناکافی این فاضلاب ها که معمولاً حاوی ترکیبات مختلفی خصوصاً نیتروژن و فسفر به فرم های نترات، نیتريت، آمونیاک یا آمونیوم و فسفر هستند، منجر به پدیده یوتروفیکاسیون^۱ در آبیگرها می شود که از تهدیدات جدی محیط زیست و اکوسیستم ها محسوب می شوند [16]. از این رو تصفیه پساب ها از اهمیت بسزایی برخوردار است اما این امر پدیده ای هزینه بر است. امروزه تکنولوژی های گوناگونی جهت حل این معضل به کار گرفته می شوند که از مهمترین آن ها می توان به روش های فیزیکوشیمیایی، روش های هیبریدی و نیز روش های بیولوژیکی اشاره کرد [5]. گیاه بالایی^۲ از مهمترین روش های پاکسازی بیولوژیکی است که با استفاده از گیاهان یا میکروارگانیسم ها (ریز جلبک ها، سیانوباکتری ها، باکتری ها و قارچ ها) جهت حذف آلاینده ها (مواد مغذی، ترکیبات آلی و فلزات سنگین) از پساب ها به کار می روند [14].

ریز جلبک ها بدلیل پتانسیل های بالقوه خود از توان زیستی بالایی^۳ در انواع محیط ها با ترکیبات مختلف آلوده کننده برخوردار هستند. این موجودات با انجام فتوسنتز اکسیژنیک نقش مهمی در کاهش گازهای گلخانه ای از جو زمین دارند. علاوه بر این برای تصفیه فاضلاب ها و کنترل آلودگی محیط زیست نیز استفاده می شوند. در سال های اخیر تصفیه بیولوژیکی با استفاده از ریز جلبک ها به طور گسترده بررسی و مورد توجه بوده است [9]. مطالعات زیادی نشان داده اند که گونه های مختلف ریز جلبکی پتانسیل زیادی برای حذف نیتروژن و فسفر دارند [15], [11]. استفاده از ریز جلبک ها برای حذف مواد مغذی مزیت های زیادی دارد: ۱- نیتروژن و فسفر جذب شده در ریز جلبک ها می تواند توسط تولید کود از زیست توده جلبکی بازیافت شود. ۲- زیست توده^۴ حاصل می تواند برای تولید انرژی زیستی، غذا، خوراک حیوانات و داروها استفاده شود و ۳- پساب حاوی اکسیژن به منابع آبی تخلیه می شود [4].

در این پژوهش ریز جلبک دریایی *Fischerella* sp. مورد بررسی قرار گرفته و در محیط های حاوی مقادیر متفاوتی از نترات و فسفات و نمک کشت داده شده است. قابلیت رشد و پتانسیل کاهش نترات و فسفات محیط کشت مورد ارزیابی قرار گرفته است تا معیاری جهت استفاده و کاربرد این ریز جلبک جهت تصفیه و بهبود شرایط پساب ها و آب های آلوده باشد.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- تهیه نمونه و کشت

نمونه مورد نظر *Fischerella* sp. ISC 123، از کلکسیون جلبکی پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی تهیه شد. این نمونه از دریای خزر در استان مازندران (سلمانشهر) تهیه شده بود. پس از کشت های متعدد جامد به روش پلیت آگار [3] جهت

^۱ - Eutrophication

^۲ -Phytoremediation

^۳ -Viability

^۴ -Biomass

ازدیاد حجم به محیط کشت مایع [7] BG110 منتقل شده و در اتاق کشت با شرایط نوری روشنایی ۱۶/۸ تاریکی و دمای $25 \pm 2^\circ \text{C}$ قرار گرفته و هوادهی آن‌ها با پمپ هوای آکواریوم انجام شد.

۲-۲- طراحی تیمارها

طراحی تیمارها با نرم افزار Design expert V.7 انجام شد. به این ترتیب برای سه فاکتور (NaNO_3 (۵۰-۲۰۰۰ mg/l) ، K_2HPO_4 (۶-۵۰۰ mg/l) و NaCl (۱-۵٪) ، ۵ سطح و ۴ نقطه مرکزی، ۱۵ ران با روش RSM° طراحی شد [12] (جدول ۱).

جدول ۱-مقادیر ران های طراحی شده جهت تیمار

RUN	NaCl (%)	NaNO ₃ (mg/L)	K ₂ HPO ₄ (mg/L)
۱	۳	۲۱۰۰	۲۴۸/۵
۲	۰/۱۷	۱۰۷۵	۲۴۸/۵
۳	۵	۳۵۰	۴۲۰
۴	۵/۸۳	۱۰۷۵	۲۴۸/۵
۵	۳	۴۹/۷	۲۴۸/۵
۶	۱	۱۸۰۰	۴۲۰
۷	۵	۱۸۰۰	۷۷
۸	۳	۱۰۷۵	۲۴۸/۵
۹	۳	۱۰۷۵	۵/۹۶
۱۰	۳	۱۰۷۵	۲۴۸/۵
۱۱	۳	۱۰۷۵	۲۴۸/۵
۱۲	۳	۱۰۷۵	۲۴۸/۵
۱۳	۳	۱۰۷۵	۲۴۸/۵
۱۴	۱	۳۵۰	۷۷
۱۵	۳	۱۰۷۵	۴۹۱

^۰- RSM, Response surface Method

نمونه های جلبکی در ران های تهیه شده کشت مایع و در اتاق کشت نگهداری شدند.

۲-۳- سنجش رشد و میزان کلروفیل

سنجش رشد بر اساس تغییرات بیومس به روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۷۵۰ نانومتر از روز اول کشت تا روز ۲۵، هر دو روز یک بار انجام شد [13].

آنالیز میزان کلروفیل نمونه‌ها با استخراج عصاره متانولی و اندازه گیری میزان جذب نوری در طول موج ۶۶۵ نانومتر به روش Marker [10] و بر اساس رابطه (۱) زیر صورت گرفت.

(۱)

$$\text{Chl. } (\mu\text{g/ml}) = 13.14 \times \text{O.D } 665 \text{ nm}$$

میزان کلروفیل نیز همزمان با سنجش رشد هر دو روز یک بار سنجیده شد.

۲-۴- سنجش نیترات و فسفات محیط

سنجش نیترات و فسفات محیط در ابتدا (قبل از افزودن نمونه های جلبکی) و در روز ۱۴ کشت (فاز رشد تصاعدی) انجام شد. به این منظور محیط کشت نمونه ها توسط کاغذ صافی صاف شده و سنجش نیترات به روش St. Method 4500-NO₃⁻ B و سنجش فسفات به روش St. Method 4500 P- C انجام شد.

۲-۵- آنالیزهای آماری

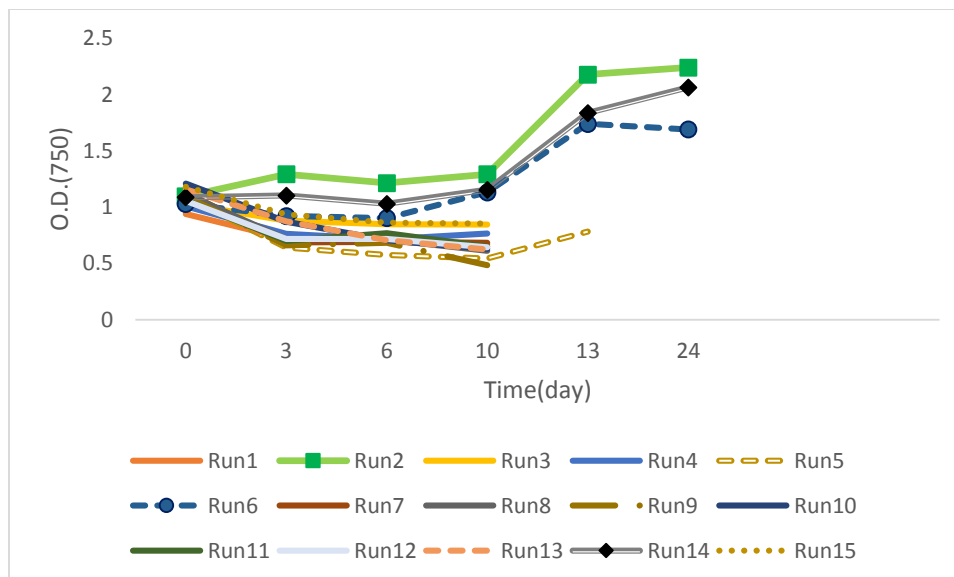
آنالیزهای آماری با نرم افزار Design expert V.7 صورت گرفت.

۳- نتایج

۳-۱- نتایج رشد و تغییرات کلروفیل در تیمارهای مختلف

بررسی نتایج مربوط به رشد نمونه ها در تیمارهای مختلف نشان می دهند که *Fischerella* sp. در سه ران ۲، ۶ و ۱۴ از رشد بسیار خوبی برخوردار بوده است دو ران ۲ و ۱۴ اختلاف معنی داری را با سایر ران ها ($p \leq 0.05$) از روز سوم کشت دارند و از روز ششم کشت اختلاف ران ششم نیز با سایر ران ها معنی دار شده است ($p \leq 0.05$). بیشترین میزان رشد در ران ۲، ۰.۱۷٪ NaCl (NaNO_3 1075, K_2HPO_4 248.5 mg/L) مشاهده شده است (شکل ۱) این در حالی است که در بقیه ران ها رشد نمونه ها روند

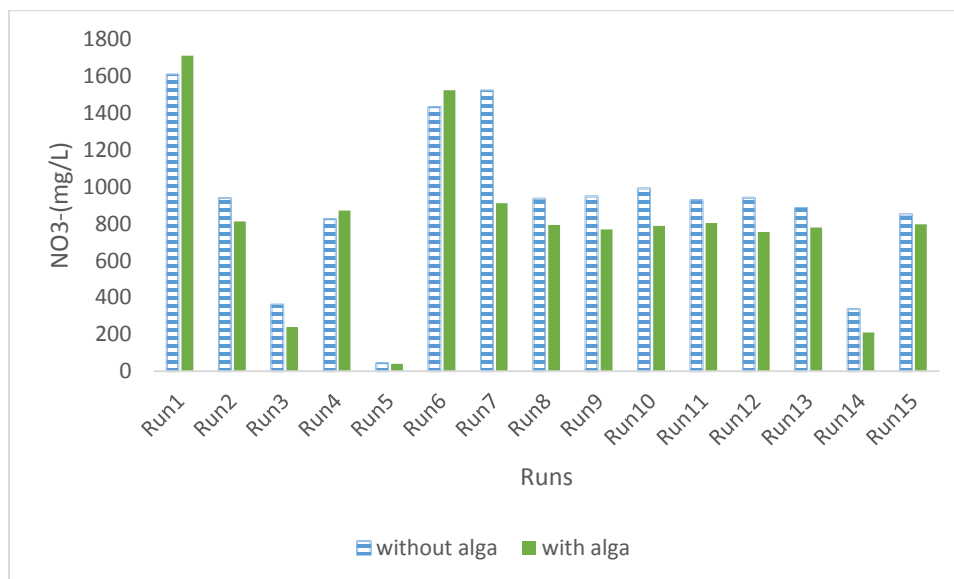
کاهشی دارند. نتایج مربوط به تغییرات کلروفیل ران های مختلف نیز مطابق نتایج رشد می باشد به این ترتیب بیشترین میزان کلروفیل در سه ران ۲، ۶ و ۱۴ بوده و میزان کلروفیل سایر ران ها کاهش قابل ملاحظه ای دارد.



شکل ۱- بررسی میزان رشد *Fischerella* sp. در ران های مختلف

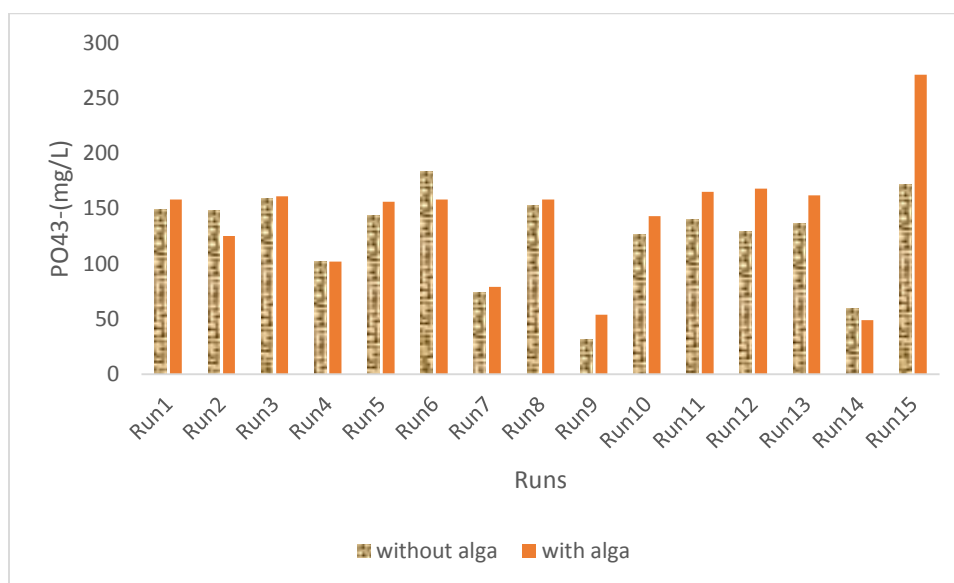
۳-۲- نتایج تغییرات نیتрат و فسفات در تیمارهای مختلف

نتایج مربوط به تغییرات نیترات و فسفات در محیط نشان می دهند که بجز سه ران ۱، ۴ و ۶ در بقیه ران ها میزان نیترات کاهش یافته است. بیشترین میزان کاهش نیترات محیط در ران ۷ با شرایط NaCl 5%, NaNO_3 1800, K_2HPO_4 77mg/L (۴۰٪) مشاهده شده است (شکل ۲). بررسی های آماری نشان می دهند که میزان نیترات، برهم کنش NaCl و NaNO_3 و K_2HPO_4 و همچنین بر هم کنش NaNO_3 و K_2HPO_4 در کاهش میزان نیترات تاثیر معنی داری دارند ($p \leq 0.05$).



شکل ۲- بررسی تغییرات نیترات محیط در ران های مختلف بدون افزودن جلبک و ۱۴ روز پس از کشت جلبک

بررسی نتایج مربوط به تغییرات فسفات محیط نیز نشان می دهد که در سه ران ۲، ۶ و ۱۴ میزان فسفات محیط کاهش یافته که بیشترین میزان کاهش در ران ۱۴ (۱۷٪) مشاهده شد (شکل ۳). بررسی های آماری در خصوص کاهش میزان فسفات محیط نشان می دهند که تنها NaCl و K_2HPO_4 در کاهش میزان آن تاثیر معنی داری دارند ($p \leq 0.05$).



شکل ۳- بررسی تغییرات فسفات محیط در ران های مختلف بدون افزودن جلبک و ۱۴ روز پس از کشت جلبک

۴- بحث و نتیجه گیری

بررسی نتایج مربوط به رشد *Fischerella* sp. در تیمارهای مختلف، بیانگر بیشینه رشد در ران های ۲، ۶ و ۱۴ بود. ران ۲ حاوی ۰/۱۷٪ NaCl و دو ران ۶ و ۱۴ دارای ۱٪ NaCl بودند. این در حالی است که با افزایش NaCl (۳ و ۵٪)، میزان رشد و کلروفیل ران‌ها کاهش قابل توجهی داشت. هر چند که برهم کنش دو فاکتور دیگر (NaNO_3 , K_2HPO_4) نیز در این امر دخیل است، اما به نظر می‌رسد که نقش NaCl مهم تر و کلیدی تر باشد. بررسی یافته‌های سایر محققین در خصوص رشد ریز جلبک‌ها در شوری‌های مختلف نیز موید این نکته است. به عنوان مثال در پژوهش انجام شده توسط Hoang Nhat و همکاران [5] در خصوص ریز جلبک‌های دریایی *Stichococcus* sp. و *Chlorella* sp. در مقادیر مختلف NaCl (۱/۰ و ۳/۰ و ۵٪)، بیشترین میزان رشد و کلروفیل در شوری‌های ۱/۰ و ۱٪ گزارش شده است. همچنین یافته‌های ایرانشاهی و همکاران [6] در خصوص رشد ریز جلبک‌های *Nostoc* و *Anabaena* sp. در شوری‌های مختلف نیز نشان دهنده بیشترین میزان رشد این دو نمونه در ۱٪ NaCl بوده است. به این ترتیب نتیجه گیری می‌شود که بجز برخی نمونه‌های خاص مانند *Spirulina platensis* [17]، و *Actodesmus obliquus* [8] اکثر ریز جلبک‌ها از جمله *Fischerella* sp. بیشترین میزان رشد و کلروفیل خود را در ۱٪ NaCl و یا کمتر دارند.

نتایج کاهش نیترات در محیط نشان می‌دهند که بیشتر ران‌ها حتی در شوری‌های بالا (۳ و ۵٪) قابلیت کاهش نیترات را دارند و بر اساس نتایج این پژوهش بیشترین میزان کاهش نیترات (۴۰٪) در ران ۷ با شوری ۵٪ مشاهده شد. اما کاهش فسفات تنها در ران های ۲، ۶ و ۱۴ با بیشینه ۱۷٪ در ران ۱۴ مشاهده شد. با توجه به یافته‌های اخیر نتیجه گیری می‌شود که *Fischerella* sp. پتانسیل بالایی در مصرف و استفاده از ترکیبات نیتروژن (نیترات) حتی در شوری‌های بالا دارد که البته بر هم کنش بین مقادیر مختلف NaCl , NaNO_3 و K_2HPO_4 نیز در این امر دخیل هستند. درحالی‌که در خصوص فسفر (ترکیبات فسفاتی) به این شدت نبوده و تنها در شرایط شوری‌های پایین (۱٪) که رشد نمونه بهینه است (ران های ۲، ۶ و ۱۴) قادر به مصرف ترکیبات فسفاتی می‌باشد.

بررسی‌های انجام شده در خصوص استفاده از ریز جلبک‌ها در تصفیه فاضلاب‌ها خصوصاً از نظر ترکیبات نیترات و فسفات نشان می‌دهند که این میکروارگانیسم‌ها از پتانسیل خوبی در این خصوص برخوردارند. در این زمینه می‌توان به پژوهش‌های انجام شده توسط قلی زاده [2] در استفاده از ریز جلبک *Spirulina* sp. در تصفیه فاضلاب‌ها و توان آن در کاهش نیترات و فسفات اشاره کرد. یافته‌های حاضر نیز نشان می‌دهند که سیانوباکتری *Fischerella* sp. از جمله ریز جلبک‌های کارا با پتانسیل خوب در کاهش نیترات و فسفات محیط است که با انجام تغییراتی در محیط کشت می‌توان پتانسیل آن را در این زمینه افزایش داد. به این ترتیب این نمونه بعنوان نمونه‌ای مناسب جهت تصفیه و بهبود کیفیت آب‌ها و پساب‌ها قابلیت کاربرد دارد.

۵- منابع

۱. فصیحی، حبیب‌ا...؛ بررسی منابع و پیامدهای جریان فاضلاب‌های شهری و صنعتی در روستاهای بخشی از حریم جنوبی تهران، پژوهش‌های روستایی، دوره ۵ شماره ۴، زمستان ۱۳۹۳، صفحات ۹۳۶-۹۱۱.
۲. قلی زاده، مهرنوش و نصرتی، محسن؛ تصفیه جلبکی مخلوطی از پساب شهری و ویناس با استفاده از ریز جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس، مجله سلامت و محیط زیست، دوره دوازدهم، شماره سوم، پاییز ۱۳۹۸، صفحات ۴۲۳-۴۳۶.

۳. Belcher H, et al. - Culturing algae, a guide for school and colleges. Tilus Wilson & son LTD. 1982.
۴. Goncalves AL, et al. - A review on the use of microalgae consortia for wastewater treatment, Algal research, 24, 2017, pp.403-415.
۵. Hoang Nhat Phong Vo, et al. - Microalgae for saline wastewater treatment: a critical review, Critical reviews in environmental science and technology, 2019, <https://doi.org/10.1080/10643389.2019.1656510>.
۶. Iranshahi Sh, et al. - The effect of salinity on morphological and molecular characters and physiological response of *Nostoc* sp. ISC 101. Iranian journal of fisheries science 13(4), 2014, pp. 907-917.
۷. Kaushik B.D. - Laboratory methods for blue-green algae. Associated publishing company, 1987.
۸. Kim H. C. et al. - Treating high-strength saline piggery wastewater using the heterotrophic cultivation of *Acutodesmus obliquus*. Biochem. Eng. J., 110(supplement C), 2016, pp.51-58.
۹. Maity JP, et al. - Microalgae for third generation biofuel production, mitigation of greenhouse gas emissions and waste water treatment: present and future perspectives- a mini review, Energy, 78, 2014, pp.104-113.
۱۰. Marker A.F.H. - The use of acetone and methanol in the estimation of chlorophyll in the presence of phaeophytin, Freshwater biology 2(4), 1972, pp. 361-385.
۱۱. McGinn, P.J. et al. -Assessment of the bioenergy and bioremediation potentials of the microalga *Scenedesmus* sp. AMDD cultivated in municipal wastewater effluent in batch and continuous mode, Algal Research, 1(2), 2012, pp.155-165.
۱۲. Morshedi A. et al. - Application of response surface methodology: Design of experiments and optimization: A minie review, Computer science, 2014, corpus ID: 44681660.
۱۳. Soltani, N, et al. -Variation of nitrogenase activity, photosynthesis and pigmentation of cyanobacterium *Fischerella ambigua* strain FS18 under different irradiance and pH. World J. Microb. Biotech. 22, 2006, pp. 571-576.
۱۴. Sood Anjuli, et al. - Cyanobacteria as potential option for wastewater treatment, Phytoremediation: management of environmental contaminants, 2, 2015, Springer international publishing.
۱۵. Su Y., Mennerich A. et al. - coupled nutrient removal and biomass production with mixed algal culture: impact of biotic and abiotic factors, Bioresource Technology, 118, 2012, pp.469-476.
۱۶. Yang XE. Et al. - Mechanisms and assessment of water eutrophication, J. Zhejiang Univ. Sci B, 9, 2008, pp.197-209.
۱۷. Zhou W, et al. - Nutrients removal and recovery from saline wastewater by *Spirulina platensis*, Bioresour. Technol., 245(part A), 2017, pp. 10-17.



سومین کنفرانس ملی جلبک شناسی ایران

دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

۱۷ و ۱۸ اسفند ماه ۱۴۰۰

