



Available online: <http://ijhe.tums.ac.ir>

مقاله پژوهشی

تصفیه جلبکی مخلوطی از پساب شهری و ویناس با استفاده از ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس

مه‌نوش قلی‌زاده، محسن نصرتی*

گروه مهندسی بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده	اطلاعات مقاله:
زمینه و هدف: تصفیه جلبکی پساب یک فناوری جدید و ارزان جهت حذف و بازیابی مواد مغذی از پساب است. به منظور بررسی اثر ویناس بر میزان رشد و بررسی اثر رشد ریزجلبک در حذف نیترژن، فسفات و COD در مخلوطی از پساب شهری و ویناس به بررسی رشد اسپیرولینا پلاتنسیس پرداخته شد.	تاریخ دریافت: ۹۸/۰۴/۲۹ تاریخ ویرایش: ۹۸/۰۷/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۷/۲۳ تاریخ انتشار: ۹۸/۰۹/۳۰
روش بررسی: توانایی رشد اسپیرولینا در پساب شهری و اثر ویناس بر میزان رشد با محاسبه زیست‌توده به‌دست آمده بررسی شد. همچنین اثر غلظت ویناس، شدت نور و دوره روشنایی تاریکی بر میزان رشد توسط نرم افزار DESIGN EXPERT و روش مکعب مرکزی (CCD) مورد بررسی قرار گرفت. با انتخاب شرایط بهینه، میزان حذف نیترژن، فسفات و COD در انتهای مرحله رشد بررسی شد.	واژگان کلیدی: اسپیرولینا پلاتنسیس، پساب شهری، تصفیه جلبکی، ویناس
یافته‌ها: نتایج به‌دست آمده نشان داد افزودن ویناس به پساب باعث افزایش رشد ریزجلبک شده و بیشترین میزان زیست‌توده در جریان ته‌نشینی به همراه ۰/۲۵ درصد ویناس به میزان ۳/۱۹ mg/mL به‌دست آمد. با بررسی اثر فاکتورهای مختلف مانند غلظت ویناس، شدت نور و دوره روشنایی-تاریکی بر میزان رشد، شرایط بهینه در غلظت ویناس (۷/۷) ۰/۴ درصد، شدت نور ۵۰۰۰ lux و دوره روشنایی ۱۰ h، با ۴۸۰ (mg/L) زیست‌توده به‌دست آمد. همچنین در این شرایط درصد حذف نیترژن، فسفات و COD به ترتیب برابر با ۶۳، ۹۷ و ۷۳ درصد بود.	پست الکترونیکی نویسنده مسئول: mnosrati20@modares.ac.ir
نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان‌دهنده پتانسیل بالقوه پساب شهری و ویناس برای جایگزینی محیط کشت زاروک به‌منظور رشد ریزجلبک اسپیرولینا است. همچنین این ریزجلبک توانایی حذف درصد بالایی از مواد مغذی موجود در پساب را داشت.	

مقدمه

افزایش جمعیت، توسعه صنایع و مصرف بیش از حد سوخت‌های فسیلی باعث شروع دوره‌ای از بحران انرژی شده است. همچنین استفاده از سوخت‌های فسیلی و به دنبال آن افزایش انتشار گازهای گلخانه‌ای و گرمایش کره زمین، باعث توجه بیشتر بشر به منابع انرژی پایدار و تجدیدپذیر با انتشار آلودگی کمتر شده است (۱).

آب به‌عنوان یکی از ضروری‌ترین منابع طبیعی زمین، که بدون آن زندگی کردن ممکن نخواهد بود، در حال سیر روند کاهش است (۲). بنابراین افزایش مصرف آب و تقاضای انرژی باعث نگرانی‌های زیادی در مورد امنیت انرژی و تصفیه فاضلاب و استفاده مجدد از آنها به‌منظور برگشت آب به چرخه طبیعت شده است. رشد روز افزون فعالیت‌های صنعتی و به دنبال آن عدم رعایت الزامات زیست محیطی سبب شده است تا طی چند دهه اخیر مقادیر زیادی از آلاینده‌ها وارد محیط زیست شده و مشکلات فراوانی را به‌وجود آورند (۳).

سیانوباکتری‌ها همچون *اسپیرولینا پلاتنسیس* در سال‌های اخیر به دلیل پتانسیل استفاده از آنها در صنایع بیوتکنولوژی بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند (۴). ایده استفاده از سیانوباکتری‌ها در صنعت اولین بار در حدود شش دهه قبل مطرح شد و بعد از آن گزارش‌های متعددی در مورد استفاده از آنها در فرایند تصفیه زیستی آب و فاضلاب و خاک‌های آلوده به آلاینده‌ها گزارش شده است (۳).

ریزجلبک‌ها شامل فعالیت‌های مختلف و متنوع تعادل محیطی برای کنترل آلودگی در محیط زیست هستند. آنها نه تنها به‌عنوان عاملی برای حذف گازهای گلخانه‌ای از جو زمین عمل می‌کنند، بلکه می‌توانند برای تصفیه فاضلاب و کنترل آلودگی محیط زیست نیز استفاده شوند. برای غلبه بر نقایص مربوط به روش‌های معمول تصفیه فاضلاب، تصفیه بیولوژیکی با استفاده از ریزجلبک‌ها در دهه‌های گذشته به‌طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است (۵). بسیاری از مطالعات نشان داده که ریزجلبک‌ها پتانسیل زیادی برای حذف نیتروژن و فسفر دارند. مکانیسم اصلی حذف مواد مغذی جلبک از فاضلاب، شامل

جذب درون سلول و حذف آمونیاک از طریق افزایش pH است (۶). Mcginn و همکاران در سال ۲۰۱۲، با کشت ریزجلبک سندسموس در پساب خروجی بعد از مرحله UV تصفیه‌خانه فاضلاب به حذف ۹۰ درصد از آمونیاک و ۹۰ درصد از فسفات دست یافتند (۷).

در واقع، راندمان حذف بالایی از نیتروژن و فسفر در حدود ۸۰-۱۰۰ درصد از فاضلاب در منابع مختلف (به‌عنوان مثال، کشاورزی، صنعتی و شهری) توسط ریزجلبک‌ها گزارش شده است. در سال ۲۰۱۲، Mennerich و همکاران، با کشت مخلوطی از سه گونه جلبکی شامل *کلامایدوموناس رینهاردی*، سندسموس و *کلرلا وگاریس* در فاضلاب شهری تصفیه شده به مدت ۵ تا ۱۴ روز در سیستمی ناپیوسته به حجم ۵ L قادر به حذف ۴۱/۲-۱۰۰ درصد نیتروژن و ۱۰۰-۱۲/۲ درصد فسفات شدند (۸). همچنین Qin و همکاران با کشت *کلرلا* در سیستمی ناپیوسته از فاضلاب شهری به حذف ۹۹/۳ درصد نیتروژن و ۹۵/۲ درصد فسفر دست یافتند (۹). علاوه‌بر این، استفاده از ریزجلبک‌ها برای حذف مواد مغذی چندین مزیت دارد: ۱- نیتروژن و فسفر جذب شده توسط ریزجلبک‌ها، می‌تواند توسط تولید کود از زیست‌توده ریزجلبکی بازیافت شود. ۲- زیست‌توده حاصل می‌تواند برای تولید انرژی زیستی، غذا، خوراک حیوانات و داروها استفاده شود و ۳- پساب حاوی اکسیژن به منابع آبی تخلیه می‌شود (۱۰). یکی دیگر از پساب‌های بالقوه برای کشت ریزجلبک‌ها، ویناس نیشکر است. ویناس، یکی از محصولات جانبی کارخانه‌های تخمیر ملاس است که دفع آن دشوار بوده و باعث نگرانی شدید زیست‌محیطی شده و تهدیدی برای کیفیت آب محسوب می‌شود (۱۱). استفاده از ویناس برای تولید زیست‌توده ریزجلبکی پیش از این پیشنهاد شده است، اما مطالعات نشان داده که استفاده از ویناس نیشکر، حتی در غلظت‌های پایین، می‌تواند رشد ریزجلبک‌ها را مهار کند (۱۲). ویناس علاوه بر محتوای بار آلی بالا، حاوی مواد مغذی همچون نیتروژن، فسفر و پتاسیم است. ترکیبات آن نشان می‌دهد که استفاده از ویناس برای کشت *اسپیرولینا*

مواد و روش‌ها

- تهیه، کشت و نگهداری ریزجلبک *اسپیروولینا پلاتنسیس* در این مطالعه تجربی نمونه خالص ریزجلبک *اسپیروولینا پلاتنسیس* از کلکسیون ریزجلبکی پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه تهران تهیه شد. ریزجلبک *اسپیروولینا* در محیط کشت اختصاصی زاروک شامل ترکیبات $16/8 \text{ g/L}$ NaNO_3 ، $2/5 \text{ g/L}$ K_2HPO_4 ، $0/5 \text{ g/L}$ NaHCO_3 ، $0/1 \text{ g/L}$ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، $0/2 \text{ g/L}$ CaCl_2 ، $0/04 \text{ g/L}$ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، 1 g/L K_2SO_4 ، $0/08 \text{ g/L}$ EDTA و 1 mL از محلول A (شامل $2/86 \text{ g/L}$ H_3BO_3 ، $1/81 \text{ g/L}$ CuSO_4 ، $0/22 \text{ g/L}$ ZnSO_4 ، $0/22 \text{ g/L}$ $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ، $0/1 \text{ g/L}$ MoO_3 است) کشت داده شد.

برای تهیه محیط کشت جامد به منظور نگهداری بلند مدت ریزجلبک‌ها، در یک لیتر از محیط کشت مایع تهیه شده، 15 g پودر آگار اضافه شده و ظرف حاوی محیط کشت و آگار بسته و اتوکلاو می‌شود. سپس در زیر هود و شرایط استریل محیط کشت قبل از سرد شدن درون پلیت‌های استریل ریخته شده و پس از سرد شدن و سفت شدن آگار، محیط کشت جامد آماده کشت ریزجلبک‌ها است. بعد از کشت دادن، پلیت‌ها در یخچال در دمای 4°C نگهداری شد. به منظور افزایش ریزجلبک مورد نظر و به‌دست آوردن مقدار کافی از آن برای انجام مراحل بعدی آزمایش، نمونه‌های خالصی از ریزجلبک *اسپیروولینا* در ارلن 250 mL کاملاً استریل که دهانه آنها با پنبه و فویل استریل پوشیده شده است در محیط کشت زاروک در دمای $30-25^\circ \text{C}$ در شیکر با سرعت 200 rpm کشت داده شد.

- بررسی توانایی رشد *اسپیروولینا* در پساب

برای بررسی توانایی رشد *اسپیروولینا* در پساب خام شهری به همراه ویناس و بررسی اثر ویناس به عنوان مکمل بر روی میزان رشد، پساب خروجی ته نشینی اولیه یکی از تصفیه خانه‌های تهران به همراه ویناس یک شرکت الکل‌سازی تهیه شد. مشخصات پساب شهری در جدول ۱ ارائه شده است.

پلاتنسیس، می‌تواند یک فرایند ارزش افزوده باشد که تاثیرات محیطی آن را کاهش دهد (۱۳). به‌منظور بهبود چنین سناریویی، لازم است که منابع جایگزین مواد مغذی برای رشد جلبک‌ها پیدا شود. یک پیشنهاد عملی این است که کشت جلبک‌های مربوطه را با تصفیه فاضلاب مرتبط سازیم. ادغام تولید زیست‌توده جلبکی با تصفیه فاضلاب امروزه به عنوان یک راه‌حل برای حمایت اقتصادی از این صنعت به رسمیت شناخته شده است. در گستره مطالعات انجام شده تا به حال تصفیه جلبکی پساب شهری و ویناس با استفاده از ریزجلبک *اسپیروولینا پلاتنسیس* به صورت همزمان گزارش نشده است. در همین راستا در این پژوهش تصفیه همزمان پساب شهری و ویناس و کاهش آلودگی‌های زیست‌محیطی با تولید زیست‌توده جلبکی به کمک ریزجلبک *اسپیروولینا پلاتنسیس* انجام شده است.

لازم به ذکر است که این پژوهش از دو دیدگاه زیست‌محیطی و ارزش اقتصادی بازیابی مواد مغذی موجود در پساب، حائز اهمیت است: ضرورت اجرای طرح از دیدگاه زیست‌محیطی از آن جهت است که پساب شهری حاوی مواد مغذی همچون نیتروژن، فسفر و مواد آلی مورد نیاز برای رشد ریزجلبک‌ها بوده که در تصفیه‌خانه طبق فرایند فیزیکی، شیمیایی و زیستی حذف می‌شوند. همچنین ویناس علاوه بر محتوای بار آلی بالا، حاوی مواد مغذی همچون نیتروژن، فسفر و پتاسیم است که دفع آن دشوار بوده و به یکی از نگرانی‌های شدید زیست‌محیطی و تهدیدی برای کیفیت مسیل‌های آب تبدیل شده است. هزینه‌های دفع و تصفیه این دو پساب لزوم استفاده از روش‌های جایگزین کم هزینه و اقتصادی را دوچندان می‌کند.

ضرورت اجرا از دیدگاه ارزش و کاربرد مواد مغذی موجود در پساب به‌منظور تولید زیست‌توده جلبکی، به جهت رویکرد اجباری بشر در تصفیه کم هزینه فاضلاب و تولید زیست‌توده به‌عنوان منبعی برای تولید سوخت زیستی، هرگونه تحقیق یا اقدامی برای نیل به بازده بیشتر، قابل حمایت و استقبال است.

جدول ۱- مشخصات شیمیایی پساب خام شهری

محدوده غلظت (mg/L)	پارامتر
۲۰۴-۴۴۰	COD کل
۱۰۵-۳۷۲	COD محلول
۵۰/۳-۱۳۰	کربن آلی کل
۲۳/۱-۵۶/۲	کربن آلی حل شده
۵۰-۷۰	نیترژن کل
۱۰-۱۴	فسفر کل

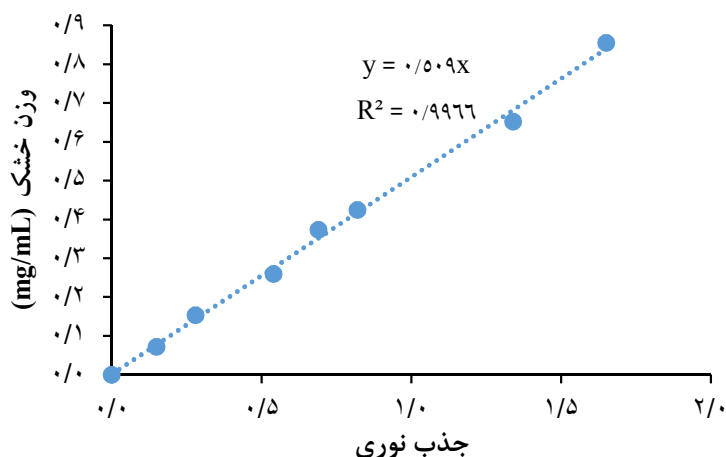
جدول ۲- مشخصات ویناس شرکت الکل سازی

مقدار (mg/L)	ماده و ترکیب	ردیف
۱۷±۲	کربن آلی	۱
۲/۴±۰/۴	نیترژن کل	۲
۲±۰/۳	نیترژن آلی	۳
۰/۰۶±۲	فسفر (P ₂ O ₅)	۴
۶/۴±۰/۲	پتاسیم	۵
۲/۶±۰/۲	سدیم	۶
۲/۳±۰/۲	کلراید	۷
۰/۶±۰/۱	کلسیم	۸
۰/۱±۰/۰۵	منیزیم	۹

شیکر انکوباتور در دمای ۳۰ °C و تحت تابش دائمی نور قرار گرفتند.

اندازه‌گیری رشد توسط خواندن جذب نمونه‌ها به صورت روزانه در طول موج ۶۸۰ nm توسط دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد. برای اندازه‌گیری وزن خشک از منحنی استاندارد رسم شده وزن خشک بر حسب تراکم نوری استفاده شد (نمودار ۱). میزان جرم توده زیستی به دست آمده از تیمار زاروک، ته‌نشینی، ته‌نشینی به همراه ۰/۱ و ۰/۲۵ درصد حجمی ویناس به ترتیب ۲/۳۷، ۰/۶۹۰۲، ۲/۴۳ و ۳/۱۹ mg/mL به دست آمد.

هر دو پساب با فیلتر واتمن شماره ۴۲ فیلتر شده و سپس در اتوکلاو به مدت ۲۰ min در دمای ۱۲۰ °C استریل شدند. در ابتدا به منظور بررسی توانایی رشد در پساب و تاثیر ویناس بر رشد، به نسبت ۱۰ درصد حجمی از مایه جلبک به داخل تیمارهایی به حجم ۱۰۰ mL از ته‌نشینی اولیه، ته‌نشینی به همراه ۰/۱ و ۰/۲۵ درصد حجمی ویناس و همچنین محیط کشت زاروک به‌عنوان شاهد در ارلن‌های ۲۵۰ mL تلقیح شده و طی ۱۴ روز کشت داده شد. مشخصات ویناس در جدول ۲ ارائه شده است. برای اندازه‌گیری پارامترهای رشد، تیمارها در



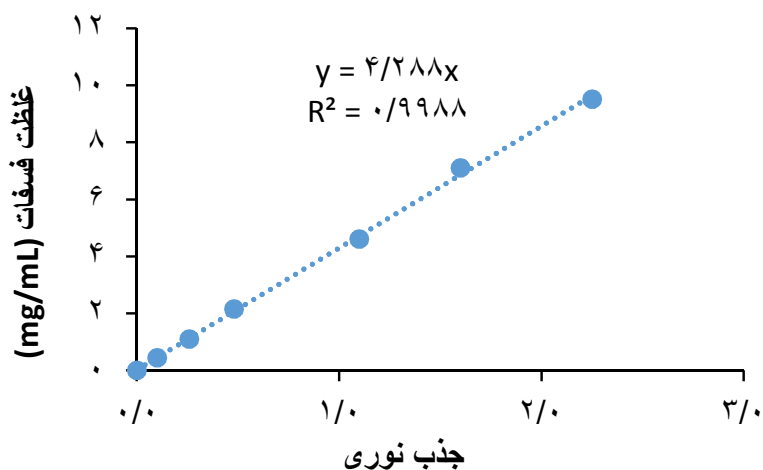
نمودار ۱- منحنی کالیبراسیون استاندارد وزن خشک / تراکم نوری برای اسپیرولینا

– بررسی توانایی اسپیرولینا پلاتنسیس در حذف ازت، فسفات و COD از فاضلاب

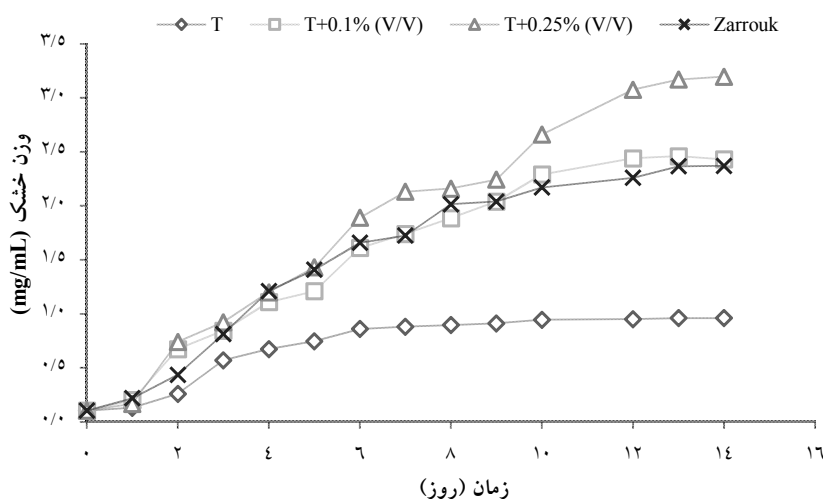
به منظور بررسی اثر رشد ریزجلبک بر روی حذف برخی از پارامترهای پساب بعد از اتمام دوره کشت، زیست‌توده به‌دست آمده از شرایط بهینه رشد حاصل از طراحی آزمایش با سانتریفیوژ در سرعت ۶۰۰۰ rpm و مدت ۵ min از محیط کشت جدا شد. سپس به‌وسیله کاغذواتمن شماره ۴۲ فیلتر شد تا نمونه محیط کشت یا پساب عاری از زیست‌توده ریزجلبکی به‌دست آید (۱۴). در این حالت پساب برای اندازه‌گیری تغییرات میزان ازت، فسفات و COD آماده شد. همچنین در ابتدای آزمایش و قبل از تلقیح ریزجلبک‌ها نیز، این پارامترها اندازه‌گیری و میزان آنها مشخص شد. برای اندازه‌گیری میزان فسفات با روش کالریمتری، ۱۰ mL از نمونه جلبکی برداشته و در سرعت ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ min سانتریفیوژ شد. ۵ mL از محلول رویی را به‌صورت جدا با ۰/۱ mL محلول اسیدسولفوریک ۱۱ N و ۲ mL محلول آمونیوم مولیبدات-آنتیموان پتاسیم تارتارات آمیخته و سپس ۱۰ min صبر کرده و جذب نمونه‌ها در ۶۵۰ nm خوانده شد. میزان فسفات با استفاده از منحنی استاندارد به‌دست آمد (نمودار ۲). اندازه‌گیری نیتروژن کل و COD به‌روش فتومتر با استفاده از کیت‌های مخصوص اندازه‌گیری شدند.

– بررسی اثر غلظت ویناس، شدت نور و دوره روشنایی تاریکی بر میزان رشد

بعد از مشاهده اثر ویناس بر رشد، به بررسی اثر غلظت ویناس، شدت نور و دوره روشنایی-تاریکی به‌عنوان ۳ پارامتر تاثیرگذار بر میزان وزن خشک به‌دست آمده پرداخته شد. از نرم‌افزار Design Expert و روش مکعب مرکزی (Central Composite Design) به منظور بهینه‌سازی پارامترهای موثر بر رشد استفاده شد. نتایج حاصل از طراحی آزمایش با استفاده از تحلیل آماری به منظور شناسایی پارامترهای مهم که بر میزان رشد ریزجلبک اثرگذارند، مورد بررسی قرار گرفتند. با انتخاب ۳ فاکتور، ۵ سطح و ۴ نقطه مرکزی ۱۸ آزمایش به‌صورت تصادفی انتخاب شدند. غلظت ویناس (A) در محدوده ۰/۱-۰/۵ (v/v) درصد، شدت نور (B) در محدوده ۲۰۰۰-۶۰۰۰ lux و دوره روشنایی-تاریکی (C) در محدوده ۸-۱۶ h در نظر گرفته شد. در این راستا ریزجلبک‌ها به ۱۰۰ mL از تیمارها در شرایط انتخاب شده تلقیح شده و طی ۱۴ روز کشت داده شد. در انتها تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) انجام گرفت.



نمودار ۲- منحنی استاندارد فسفات بر حسب جذب نوری



نمودار ۳- منحنی وزن خشک بر حسب زمان (روز)

یافته‌ها

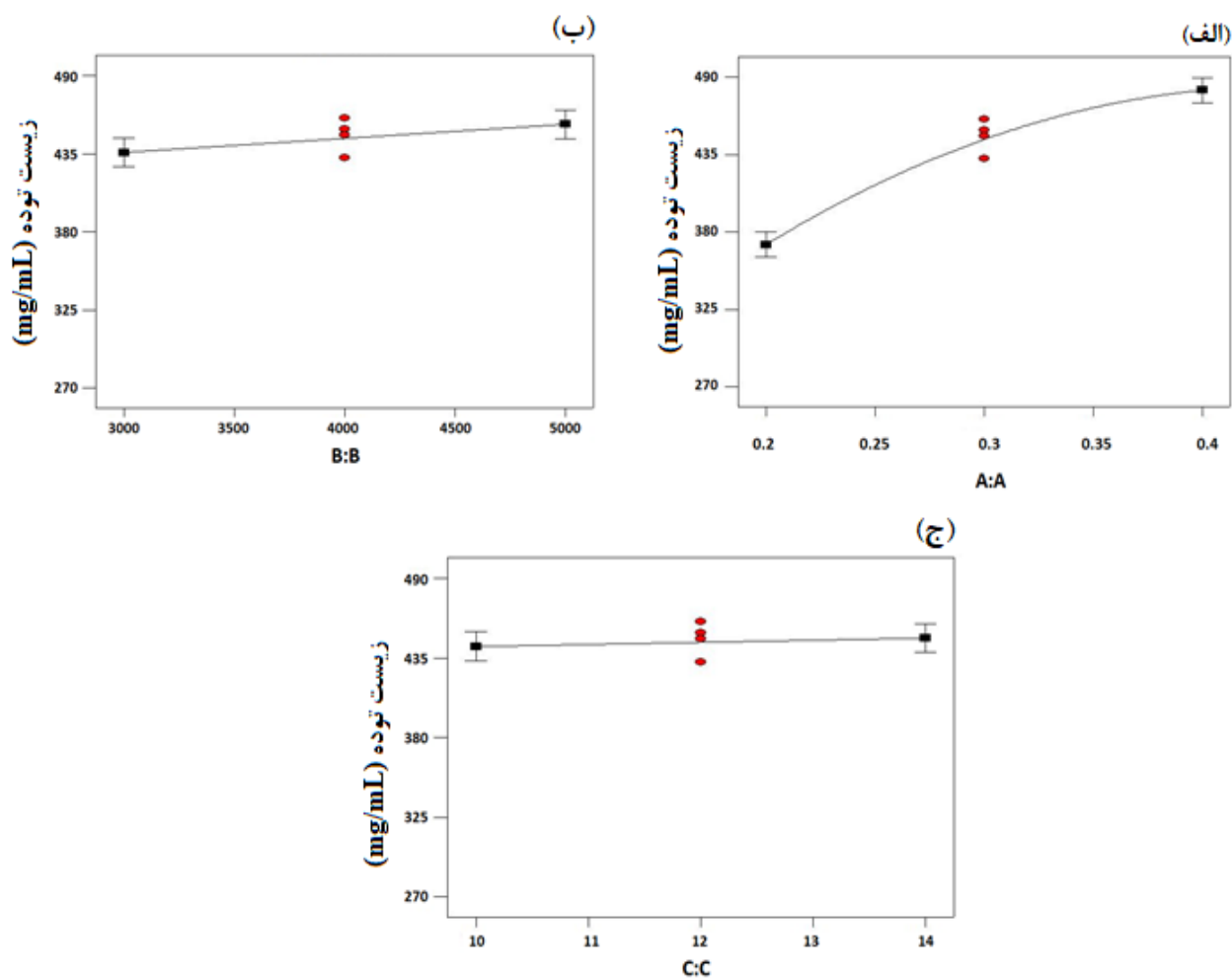
- نتایج حاصل از رشد اسپیرولینا پلاتنسیس در تیمارهای مختلف

اسپیرولینا در همه تیمارها توانایی رشد قابل مقایسه‌ای با تیمار شاهد از خود نشان داد. روند رشد اسپیرولینا در تیمارهای مختلف در نمودار ۳ و وزن خشک زیست توده به دست آمده در جدول ۳ نشان داده شده است.

در بررسی اثر تیمارهای مختلف با یکدیگر و تیمار شاهد مشخص شد که میانگین وزن خشک سلولی اسپیرولینا در تیمارهای مختلف متفاوت است. بررسی تاثیر تیمارهای مختلف نشان داد که بیشترین میزان رشد در کل آزمایش مربوط به تیمار با پساب ته‌نشینی اولیه به همراه ۰/۲۵ (v/v) درصد ویناس با میزان زیست توده (mg/mL) ۳/۱۹ و کمترین میزان مربوط به ته‌نشینی با میزان زیست توده (mg/mL) ۰/۹۶۰۲ است.

جدول ۳- وزن خشک سلولی در تیمارهای مختلف

تیمار	وزن خشک زیست‌توده (mg/mL)
زاروک	۲/۳۷
ته‌نشینی	۰/۹۶۰۲
ته‌نشینی + ۰/۱ (v/v)	۲/۴۳
ته‌نشینی + ۰/۲۵ (v/v)	۳/۱۹



نمودار ۴- منحنی (الف) اثر غلظت ویناس (A)، (ب) شدت نور (B) و (ج) دوره روشنایی-تاریکی (C) بر زیست‌توده

با توجه به نتایج به‌دست آمده تغییر میزان کمی از غلظت ویناس می‌تواند به‌طور قابل توجهی بر روند رشد تاثیرگذار باشد. همچنین در مقایسه بین تیمار پساب ته‌نشینی و محیط کشت اختصاصی زاروک مشخص شد که میزان رشد و زیست‌توده تولیدی در محیط کشت زاروک بیشتر از تیمار ته‌نشینی بوده است.

با توجه به نتایج به‌دست آمده تغییر میزان کمی از غلظت ویناس می‌تواند به‌طور قابل توجهی بر روند رشد تاثیرگذار باشد. همچنین در مقایسه بین تیمار پساب ته‌نشینی و محیط کشت

و ترکیبات آلی در انتهای دوره رشد پرداخته شد تا توانایی گونه جلبکی در تصفیه پساب مشخص گردد. نتایج در نمودار ۵ نشان داده شد. در طی ۸ روز از فرایند رشد ریزجلبک، میزان حذف نیتروژن کل و فسفات به ترتیب برابر با ۶۳ و ۹۷ درصد بود. همچنین میزان COD در ابتدا 470 mg/L بوده که در پایان آزمایش مقدار آن به 26 mg/L رسید که با محاسبات انجام شده درصد حذف ترکیبات آلی ۷۳ درصد به دست آمد. ثابت شده است که ریزجلبک‌ها قادر به استفاده از هر دو شکل از منبع نیتروژنی به فرم آمونیاک و نیترات هستند. با توجه به بررسی‌های به عمل آمده توسط Sunjin Kim و همکاران، در استفاده از مقدار یکسانی از نیترات و آمونیاک به عنوان منبع نیتروژن، مشاهده شد که در هنگام استفاده از نیترات میزان زیست‌توده بیشتری در مقایسه با آمونیاک به دست آمد. همچنین مشاهده شد که تولید زیست‌توده تا مقدار 80 mg/L نیترات افزایش یافته و بعد از آن کاهش یافت. اما با افزایش آمونیاک در بازه $160-10 \text{ mg/L}$ میزان زیست‌توده افزایش پیدا کرد. همچنین نرخ مصرف آمونیاک بیشتر از نیترات بود. این نتایج به دلیل تاثیر اولویت استفاده از منبع خاصی از نیتروژن و تغییر pH در نتیجه فرایندهای متابولیسمی مختلف بسته به منبع نیتروژن مورد استفاده است. ریزجلبک‌ها به نوعی از آمونیاک کاهش یافته برای جذب ترکیبات آلی حاوی نیتروژن نیازمند هستند. برای حذف آمونیاک (یا بطور کلی نیتروژن) توسط فرایندهای بیولوژیکی نیتروژن باید به شکل آمونیاک آمونیوم یا

– نتایج حاصل از بررسی اثر غلظت ویناس، شدت نور و دوره روشنایی-تاریکی بر میزان رشد

بعد از به اثبات رسیدن اثر ویناس بر میزان رشد در بخش اول آزمایش‌ها، با انجام طراحی آزمایش شرایط بهینه رشد با بیشترین میزان زیست‌توده در طی ۱۴ روز محقق شد. با توجه به نمودار ۴ شرایط بهینه رشد برای ریزجلبک اسپیرولینا در غلظت ویناس (V/V) ۰/۴ درصد، شدت نور 5000 lux و دوره روشنایی 10 h حاصل شد.

میزان زیست‌توده به دست آمده در شرایط بهینه 480 mg/L بوده که این نتایج به مقادیر پیش‌بینی شده توسط نرم‌افزار با میزان $481/963 \text{ mg/L}$ نزدیک بود. با توجه به نتایج ANOVA که در جدول ۴ آورده شده است غلظت ویناس و بعد از آن شدت نور موثرترین پارامترها بر روی رشد بوده ($p < 0/05$) و دوره روشنایی-تاریکی ($p > 0/05$) کمترین تاثیر را بر روی رشد داشته است. با توجه به نتایج به دست آمده در شدت نور بالاتر از 5000 lux و غلظت ویناس بیش از (V/V) ۰/۴ درصد میزان زیست‌توده کاهش یافته است.

– نتایج حاصل از رشد اسپیرولینا پلاتنسیس بر پارامترهای پساب

همزمان با رشد ریزجلبک در پساب، تصفیه زیستی نیز انجام می‌شود. بعد از به دست آوردن شرایط بهینه رشد حاصل از طراحی آزمایش، به بررسی میزان حذف نیتروژن کل، فسفات

جدول ۴- ANOVA مرتبط با اثر پارامترها بر میزان رشد

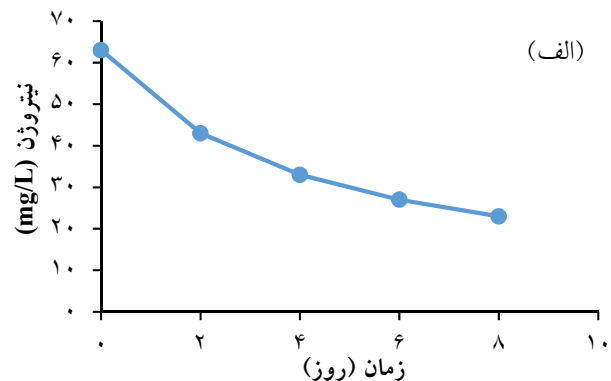
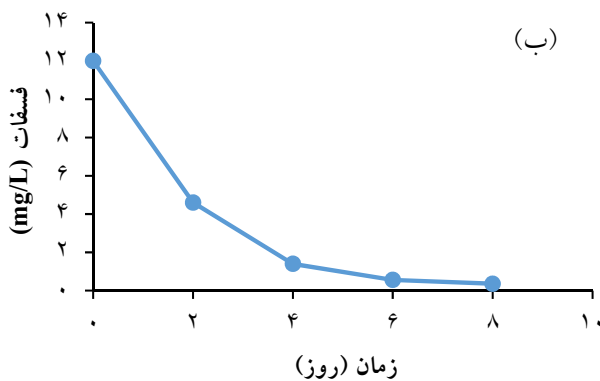
تفسیر معنی‌داری	آماره F	سطح معنی‌داری	پارامتر
Significant	۴۸/۹۸	$< 0/0001$	مدل
	۱۵۹/۲۲	$< 0/0001$	A
	۵/۴۷	$0/0360$	B
	۰/۴۰	$0/5363$	C
	۳۰/۸۴	$< 0/0001$	A ²
Not significant	۲/۵۱	$0/2427$	Lack of Fit

توانایی رشد ریزجلبک‌ها در فاضلاب از منابع مختلف را گزارش کرده‌اند (۱۰). همچنین ویناس حاوی مواد آلی همچون کربن، نیتروژن و فسفر و برخی از فلزات شامل منیزیم و پتاسیم بوده که می‌تواند برای رشد ریزجلبک‌ها استفاده شوند (۱۷). ترکیبات آن نشان می‌دهد که استفاده از ویناس برای کشت اسپیرولینا پلاتنسیس ممکن است یک فرایند ارزش افزوده باشد که می‌تواند تاثیرات محیطی آن را کاهش دهد. - Barr cal و همکاران در سال ۲۰۱۰ با افزایش ویناس تنها ۱/۴ برابر افزایش رشد را گزارش کردند (۱۸). همچنین با توجه به نمودار ۲ مشاهده می‌شود که میزان رشد و تولید زیست‌توده در پساب ته‌نشینی کمتر از محیط کشت اختصاصی زاروک بوده است. بازه pH برای رشد اغلب ریزجلبک‌ها بین ۷ تا ۹ است. دلیل رشد کمتر در ته‌نشینی نسبت به زاروک می‌تواند نیازمندی اسپیرولینا به محیطی قلیایی و pH بهینه برابر با ۹ تا ۱۱ باشد که به دلیل اینکه پساب معمولاً pH برابر با ۶-۷ داشته، در ابتدای فرایند مناسب برای رشد گونه اسپیرولینا نبوده اما با گذر زمان و رشد جلبک pH محیط افزایش پیدا می‌کند (۱۹). همچنین یکی دیگر از دلایل آن می‌تواند کمبود مواد مغذی مورد نیاز و در دسترس موجود در پساب ته‌نشینی اولیه نسبت به محیط کشت اختصاصی زاروک باشد. اما با افزودن ویناس به عنوان مکمل این کاستی‌ها برطرف شده و میزان رشد چندین برابر افزایش پیدا می‌کند. بنابراین مشاهده می‌شود که

نیترات تا نهایتاً بصورت گاز نیتروژن از جریان فاضلاب متصاعد شود. فرایندهای بیوشیمیایی هوازی نیتروژن کربنی و آلی را به آمونیاک (NH_3) یا یون آمونیوم (NH_4^+) تبدیل می‌کنند که یک فرایند کاهش است. شکل نیتروژن به pH محیط بستگی دارد. در ارتباط با نیترات، جذب نیتروژن بعد از احیای نیترات به آمونیاک اتفاق افتاده، در حالی که آمونیاک به صورت مستقیم جذب سلول می‌شود. بنابراین مقدار حذف آمونیاک به‌عنوان یک فرم مطلوب از نیتروژن نسبت به نیترات، بیشتر گزارش شده است (۱۵).

بحث

با توجه به نمودار ۳ مشاهده می‌شود که ریزجلبک اسپیرولینا در همه تیمارهای مورد پژوهش توانایی رشد داشته و ترکیب ویناس به تیمار ته‌نشینی باعث افزایش چشمگیری در میزان رشد شده است. در آزمایش‌های گذشته به بررسی توانایی رشد گونه‌های جلبکی در پساب و تاثیر ویناس به عنوان مکمل رشد بر روی محیط کشت اختصاصی پرداخته شده است (۱۳). مواد مغذی اصلی مورد نیاز برای رشد ریزجلبک‌ها کربن، نیتروژن و فسفر است. فاضلاب‌های تصفیه شده حاوی مقادیر زیاد مواد مغذی (نیتروژن و فسفر) و انواع عناصر کمیاب (Mg, Ca, K, Fe, Cu و Mn) هستند که مواد ضروری برای متابولیسم و رشد ریزجلبک‌ها هستند (۱۶). از این رو مطالعات متعددی



نمودار ۵- (الف) منحنی تغییرات نیتروژن (ب) منحنی تغییرات فسفات بر حسب زمان

از پساب ته‌نشینی به همراه ویناس می‌توان برای افزایش رشد و دستیابی به مقدار بیشتری از زیست‌توده در صنعت برای کاهش هزینه‌های مرتبط با کشت استفاده کرد.

با بررسی پارامترهای تاثیرگذار بر میزان رشد اثر هر پارامتر در جدول ۴ نشان داده شده است. مهمترین پارامترهای موثر این تحقیق، غلظت ویناس و سپس شدت نور ($p < 0/05$) بودند. دوره روشنایی-تاریکی به‌طور چشمگیری بر مقدار زیست‌توده تاثیر نمی‌گذارد. شرایط بهینه رشد ریزجلبک در غلظت ویناس $0/4 (v/v)$ درصد، شدت نور 5000 lux و دوره روشنایی 10 h بود. میزان زیست‌توده به‌دست آمده در شرایط بهینه 480 mg/L به‌دست آمد. ریزجلبک از نور به‌عنوان منبع انرژی برای سنتز پروتوپلاسم سلولی استفاده می‌کند (۲۰). همانطور که مشاهده می‌شود هنگامی که ریزجلبک‌ها در معرض شدت نوری بالاتر از حد اشباع قرار می‌گیرند قادر به استفاده از مازاد آن نیستند. افزایش شدت نور رشد را بهبود بخشیده اما هنگامی که شدت نور بیشتر از شدت نور اشباع شود رشد ریزجلبک‌ها مهار می‌شود (۲۱). همچنین مقدار ناکافی از نور در محدوده 2000 lux سرعت رشد را کاهش می‌دهد. در شدت نور بالا رشد سریع‌تر بوده و به این ترتیب نیازی به افزایش چرخه روشنایی-تاریکی نور نخواهد بود (۲۲). همچنین ویناس حاوی مواد مغذی مورد نیاز برای رشد ریزجلبک شامل مواد آلی، نیتروژن، فسفر و مواد معدنی همچون سولفات، کلرید، پتاسیم و منگنز است (۱۷). با توجه به نمودار ۴-الف اثر مثبت بر روی پارامترهای رشد در غلظت‌های پایین‌تر ویناس و اثر منفی در غلظت‌های بالاتر ویناس قابل مشاهده است. اثر منفی ویناس بنابر گزارش‌های موجود، ممکن است به دلیلی تغییرات فشار اسمزی باشد (۲۳). همچنین غلظت بالای ویناس ممکن است از جذب آب و مواد مغذی جلوگیری کرده و بنابراین برخی از فعالیت‌های متابولیکی به‌عنوان مثال فتوسنتز و تنفس و به دنبال آن رشد را کاهش دهد. استفاده از ویناس برای تولید زیست‌توده جلبکی طبق مطالعاتی که انجام شده است حتی در غلظت‌های پایین می‌تواند بازدارندگی ایجاد کند. ویناس به دلیل رنگ تیره و سمی بودن در هنگام استفاده ضروری

است که برای کشت ریزجلبک رقیق شود (۱۲). Kadiogl و همکار در سال ۱۹۹۲ گزارش نمودند که اثرات سمی ویناس در غلظت‌های بالا از مواد آلی و مواد معدنی مسئول هدایت الکتریکی بالای برخی از مواد و دانه‌ها همچون رنگدانه‌های فتوسنتزی از سیتوپلاسم به محیط کشت بوده که این پدیده ممکن است باعث ایجاد مشکلات اسمزی برای موجودات آب شیرین و سبب تخریب سلول‌ها شود (۲۴). همچنین همزمان با رشد ریزجلبک در محیط پساب، تصفیه زیستی پساب انجام می‌شود. بعد از به‌دست آوردن شرایط بهینه رشد، به بررسی میزان حذف نیتروژن کل و فسفات در شرایط بهینه و در انتهای دوره رشد پرداخته شد تا توانایی گونه جلبکی در تصفیه پساب مشخص گردد. همانطور که مشاهده شد در طی ۸ روز فرایند رشد ریزجلبک، میزان حذف نیتروژن کل در ارتباط با جلبک *اسپیروولینا پلاتنسیس* ۶۳ درصد و حذف فسفر ۹۷ درصد بود. در بررسی‌های به‌عمل آمده توسط Jun Zhai و همکاران در سال ۲۰۱۷ راندمان حذف نیتروژن و فسفر از فاضلاب شهری توسط ریزجلبک *اسپیروولینا* به ترتیب ۸۱/۵۱ و ۸۰/۵۲ درصد و راندمان حذف نیتروژن و فسفر کل ۹۲/۵۸ و ۹۴/۱۳ درصد در کشت اتوتروف بود (۲۵). همچنین Mezzomo و همکاران در سال ۲۰۱۰، حذف ۸۴/۳ درصد COD و ۴۱/۶ درصد از فسفر در فاضلاب خوک را گزارش کردند (۲۶). Kong و همکاران در سال ۲۰۱۰ با آزمایش بر روی کلامایدوموناس در فاضلاب شهری به حذف ۴۳ درصد نیتروژن کل و ۴۳ درصد فسفر دست یافتند (۲۷). این مشاهده ثابت می‌کند که یکی از مواد مغذی ضروری برای رشد ریزجلبک‌ها نیتروژن بوده که در فاضلاب شهری به میزان زیادی یافت می‌شود. بنابراین جلبک‌ها در هنگام رشد در پساب، نیتروژن را مصرف کرده و باعث کاهش مقدار آن در پساب می‌شوند. نیتروژن موجود در فاضلاب به مصرف رشد جلبک رسیده و عدم انجام نیتریفیکاسیون و دنیتریفیکاسیون به‌منظور تصفیه پساب به این ترتیب جبران می‌شود. در آزمایش دیگری که توسط Koreiviene و همکاران انجام شد، دو گونه ریزجلبک شامل *کلرلا ولگاریس* و *سندسموس* در پساب گرفته شده از ته‌نشینی اولیه تصفیه خانه شهری به صورت

رشد و مقایسه نتایج می‌توان نتیجه گرفت که غلظت ویناس و شدت نور بیشترین اثر و دوره روشنایی-تاریکی کمترین اثر را بر رشد داشته است. افزایش غلظت ویناس ممکن است از جذب آب و مواد مغذی جلوگیری کرده و برخی از فعالیت‌های متابولیکی همانند فتوسنتز و تنفس و به دنبال آن رشد را کاهش دهد. همچنین رشد ریزجلبک در پساب منجر به حذف درصد بالایی از پارامترهای پساب همچون نیتروژن و فسفات شد. در طی ۸ روز میزان حذف نیتروژن، فسفات و COD به ترتیب برابر با ۶۳، ۹۷ و ۷۳ درصد بود. به‌طور کلی، نتایج این پژوهش بیانگر بازیافت موفقیت‌آمیز مواد مغذی موجود در پساب با استفاده از روش سبز و دوستدار محیط‌زیست تصفیه زیستی با استفاده از ریزجلبک *اسپیروولینا پلاتنسیس* بوده است که می‌تواند مورد توجه پژوهشگران و صنعتگران در این زمینه قرار گیرد.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان کلیه نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه با عنوان "بررسی تجربی آبکافت زیست‌توده جلبکی برای استخراج کربوهیدرات و پروتئین" در مقطع کارشناسی ارشد سال ۱۳۹۵ است که با حمایت دانشگاه تربیت مدرس اجرا شده است.

سیستم بسته و به حجم 0.23 L طی ۲۱ روز کشت داده شد. نتایج حاصل نشان‌دهنده $96/4-88/6$ درصد حذف فسفر و $99/9-99/7$ درصد حذف نیتروژن بود (۲۸). Gouveia و همکاران در سال ۲۰۱۶ در فاضلاب شهری مخلوطی از دو گونه جلبکی کلرلا و لگاریس و سندسموس *ابلیکوس* را کشت دادند. این پژوهشگران با تولید $900-100 \text{ mg/L.day}$ زیست‌توده موفق به حذف $98-84$ درصد نیتروژن کل، $100-92$ درصد فسفر و $64-32$ درصد COD شدند. مقایسه نتایج حاصل از پژوهش‌های گذشته با نتایج به‌دست آمده از آزمایش انجام گرفته حاکی از توانایی بالقوه ریزجلبک‌ها در استفاده از مواد مغذی پساب و تولید همزمان زیست‌توده است (۲۹).

نتیجه‌گیری

در حال حاضر مطالعات زیادی بر روی تصفیه زیستی پساب از طریق جلبک‌ها انجام شده است. آزمایش‌های انجام شده بر روی ریزجلبک *اسپیروولینا پلاتنسیس* نشان داد که این گونه قادر به رشد در پساب بوده و با افزایش ویناس به‌عنوان مکمل رشد، میزان رشد چندین برابر افزایش پیدا می‌کند. بیشترین میزان زیست‌توده مربوط به پساب ته‌نشینی به‌همراه $0.25 (v/v)$ درصد ویناس به میزان $3/19 \text{ mg/mL}$ بود. با انجام طراحی آزمایش برای بررسی اثر غلظت ویناس، شدت نور و دوره روشنایی-تاریکی، شرایط بهینه رشد برای ریزجلبک *اسپیروولینا* در غلظت ویناس $0/4 (v/v)$ درصد، شدت نور 5000 lux و دوره روشنایی 10 h حاصل شد. میزان زیست‌توده در این شرایط 480 mg/L به‌دست آمد. با بررسی پارامترهای موثر بر

References

1. Malakootian M, Hatami B, Dolatshahi S, Rajabzadeh A. Survey of Solvent type and drying of biomass effects on lipid extraction from *Nannochloropsis Oculata* for biodiesel production. Iranian Journal of Health and Environment. 2014;7(1):11-20 (in Persian).
2. Ghoreishi B, Aslani H, Dolatkah A, Abdoli Seilabi A, Mosafieri M. Evaluation of Microbial Quality in Biosolids Generated from Municipal Wastewater

- Treatment Plants. Iranian Journal of Health and Environment. 2016;9(1):81-90 (in Persian).
3. Safari M, Ahmady-Asbchin S, Soltani N. The potential of cyanobacterium *Schizothrix vaginata* ISC108 in biodegradation of crude oil. Iranian Journal of Health and Environment. 2014;7(3):363-74 (in Persian).
4. Abed RM, Dobretsov S, Sudesh K. Applications of

- cyanobacteria in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology*. 2009;106(1):1-12.
5. Maity JP, Bundschuh J, Chen C-Y, Bhattacharya P. Microalgae for third generation biofuel production, mitigation of greenhouse gas emissions and wastewater treatment: Present and future perspectives—A mini review. *Energy*. 2014;78:104-13.
 6. Aslan S, Kapdan IK. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecological Engineering*. 2006;28(1):64-70.
 7. McGinn PJ, Dickinson KE, Park KC, Whitney CG, MacQuarrie SP, Black FJ, 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*. 2012;1(2):155-65.
 8. Su Y, Mennerich A, Urban B. Coupled nutrient removal and biomass production with mixed algal culture: impact of biotic and abiotic factors. *Bioresource Technology*. 2012;118:469-76.
 9. Qin L, Wang Z, Sun Y, Shu Q, Feng P, Zhu L, et al. Microalgae consortia cultivation in dairy wastewater to improve the potential of nutrient removal and biodiesel feedstock production. *Environmental Science and Pollution Research*. 2016;23(9):8379-87.
 10. Goncalves AL, Pires JC, Simoes M. A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. *Algal Research*. 2017;24:403-15.
 11. Coca M, Peña M, González G. Chemical oxidation processes for decolorization of brown-colored molasses wastewater. *Ozone: Science and Engineering*. 2005;27(5):365-69.
 12. dos Santos RR, Araújo OdQF, de Medeiros JL, Chaloub RM. Cultivation of *Spirulina maxima* in medium supplemented with sugarcane vinasse. *Bioresource Technology*. 2016;204:38-48.
 13. Coca M, Barrocal VM, Lucas S, González-Benito G, García-Cubero MT. Protein production in *Spirulina platensis* biomass using beet vinasse-supplemented culture media. *Food and Bioprocess Technology*. 2015;94:306-12.
 14. Wang L, Min M, Li Y, Chen P, Chen Y, Liu Y, et al. Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2010;162(4):1174-86.
 15. Kim S, Lee Y, Hwang S-J. Removal of nitrogen and phosphorus by *Chlorella sorokiniana* cultured heterotrophically in ammonia and nitrate. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2013;85:511-16.
 16. Aravantinou AF, Theodorakopoulos MA, Manariotis ID. Selection of microalgae for wastewater treatment and potential lipids production. *Bioresource Technology*. 2013;147:130-34.
 17. Deng X, Gao K, Addy M, Chen P, Li D, Zhang R, et al. Growing *Chlorella vulgaris* on mixed wastewaters for biodiesel feedstock production and nutrient removal. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2018;93(9):2748-57.
 18. Barrocal VM, García-Cubero MT, González-Benito G, Coca M. Production of biomass by *Spirulina maxima* using sugar beet vinasse in growth media. *New Biotechnology*. 2010;27(6):851-56.
 19. Colla LM, Reinehr CO, Reichert C, Costa JAV. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. *Bioresource Technology*. 2007;98(7):1489-93.
 20. Wahidin S, Idris A, Shaleh SRM. The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp. *Bioresource Technology*. 2013;129:7-11.
 21. Chen X, Goh QY, Tan W, Hossain I, Chen WN, Lau R. Lumostatic strategy for microalgae cultivation utilizing image analysis and chlorophyll a content as design parameters. *Bioresource Technology*. 2011;102(10):6005-12.
 22. Jadhav U, Hocheng H. A review of recovery of metals from industrial waste. *Journal of Achievements in Materials and Manufacturing Engineering*. 2012;54(2):159-67.
 23. Ramirez NNV, Farenzena M, Trierweiler JO. Growth of microalgae *Scenedesmus* sp in ethanol vinasse. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2014;57(5):630-35.
 24. Kadioğlu A, Algur ÖF. Tests of media with vinasse for *Chlamydomonas reinhardtii* for possible reduction in vinasse pollution. *Bioresource Technology*. 1992;42(1):1-5.
 25. Zhai J, Li X, Li W, Rahaman MH, Zhao Y, Wei B,

- et al. Optimization of biomass production and nutrients removal by *Spirulina platensis* from municipal wastewater. *Ecological Engineering*. 2017;108:83-92.
26. Mezzomo N, Saggiorato AG, Siebert R, Tatsch PO, Lago MC, Hemkemeier M, et al. Cultivation of microalgae *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) from biological treatment of swine wastewater. *Food Science and Technology*. 2010;30(1):173-78.
27. Kong Q-x, Li L, Martinez B, Chen P, Ruan R. Culture of microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* in wastewater for biomass feedstock production. *Applied biochemistry and Biotechnology*. 2010;160(1):9.
28. Koreivienė J, Valčiukas R, Karosienė J, Baltrėnas P. Testing of *Chlorella/Scenedesmus* microalgae consortia for remediation of wastewater, CO₂ mitigation and algae biomass feasibility for lipid production. *Journal of Environmental Engineering and Landscape Management*. 2014;22(2):105-14.
29. Gouveia L, Graça S, Sousa C, Ambrosano L, Ribeiro B, Botrel EP, et al. Microalgae biomass production using wastewater: treatment and costs: scale-up considerations. *Algal Research*. 2016;16:167-76.



Available online: <http://ijhe.tums.ac.ir>

Original Article



Algal treatment of a mixture of urban wastewater and Vinasse using *Spirulina platensis* microalgae

M Gholizadeh, M Nosrati*

Department of Biotechnology Engineering, School of Chemical Engineering, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

ARTICLE INFORMATION:

Received: 20 July 2019

Revised: 9 October 2019

Accepted: 15 October 2019

Published: 21 December 2019

Keywords: *Spirulina platensis*, Urban wastewater, Algae treatment, Vinasse

***Corresponding Author:**
mnosrati20@modares.ac.ir

ABSTRACT

Background and Objective: Algal wastewater treatment is a new and economic technology to remove and recycle nutrients from wastewater. In order to investigate the effect of vinasse on microalgae growth and also the effect of its growth on nitrogen and phosphate removal in a mixture of urban wastewater and vinasse, the growth of *Spirulina platensis* was studied.

Materials and Methods: Growth ability of *spirulina* in the urban wastewater and the effect of vinasse on growth rate was investigated by the calculation of biomass. The effect of concentration of vinasse, intensity of light and light-dark cycle on growth rate were studied by DESIGN EXPERT and CCD method. By selecting the optimized conditions, rates of nitrogen, phosphate and COD removal was investigated at the end of the growth period.

Results: The results showed that adding vinasse to wastewater increased the growth rate and the highest amount of biomass of 3.19 mg/mL was obtained in the sedimentary stream containing 0.25% vinasse. By evaluating the effect of vinasse concentration, intensity of light and light-dark cycle on growth rate, optimal conditions at vinasse concentration 0.4% (v/v), light intensity of 5000 lux and light period of 10 hours, 480 (mg/L) of biomass was obtained. The percentage of removal of nitrogen, phosphate and COD was 63%, 97% and 73% respectively.

Conclusion: The results of this study indicated the capability of urban wastewater and vinasse in order to replace Zarouk's culture medium for growth of *Spirulina* microalgae. These microalgae were able to remove high percentage of nutrients in the wastewater.