

استفاده از سیستم کشت پیوسته ریز جلبک *Scenedesmus obliquus* جهت تصفیه زیستی فاضلاب شهری

عارف پیریگی*^۱، سید عباس حسینی^۱، رسول قربانی^۱، حسن رضایی^۲، وینسه اردگی^۳

۱- گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران، صندوق پستی: ۴۹۱۸۹۴۳۴۶۴

۲- گروه محیط زیست، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران، صندوق پستی: ۴۹۱۸۹۴۳۴۶۴

۳- موسسه زیست شناسی گیاهی، گودولو، مجارستان، صندوق پستی: ۹۲۰۰

تاریخ دریافت: ۸ خرداد ۱۳۹۶

تاریخ پذیرش: ۱۶ آبان ۱۳۹۶

چکیده

در مطالعه حاضر ظرفیت جداسازی مواد مغذی از فاضلاب شهری توسط ریز جلبک *Scenedesmus obliquus* و همچنین تاثیرات غلظت‌های به کار رفته از فاضلاب بر روی رشد جلبکی، میزان کلروفیل a، BOD₅، COD، pH محیط کشت بررسی گردید. برای این منظور پس از کشت جلبک *Scenedesmus obliquus* در سیستم ثابت (Batch) و محاسبه نرخ رشد ویژه آن، این گونه با روش پیوسته (Continuous) در ۴ رقت (۰، ۲۵، ۵۰ و ۷۵٪) از فاضلاب شهری به مدت ۲۸ روز کشت داده شد. طی مدت آزمایش روشنایی دائمی و دمای ثابت 24 ± 1 درجه سانتی‌گراد اعمال گردید. تمام سنجش‌ها به غیر از شمارش جلبکی هر دو روز یکبار انجام شد. بر اساس نتایج، نرخ رشد ویژه در این مطالعه برابر با ۰/۲۷ در روز محاسبه شد. مقادیر فسفات، نیترات، آمونیاک، COD و BOD₅ در انتهای آزمایش کاهش معنی‌داری را نشان دادند. با افزایش رقت فاضلاب، میزان کلروفیل a و تعداد سلول‌های جلبکی دارای افزایش معنی‌داری بودند. یافته‌های این تحقیق حاکی از بالاتر بودن کارایی تیمار با رقت ۷۵٪ در حذف نیترات و فسفات می‌باشد. به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که جلبک به کار رفته دارای نقش موثری در جداسازی مواد مغذی فاضلاب در سیستم پیوسته می‌باشد.

کلمات کلیدی: فاضلاب شهری، تصفیه، سیستم پیوسته، *Scenedesmus obliquus*، فسفات، نیترات.

مقدمه

در حال حاضر، بسیاری از کشورهای دنیا حجم زیادی از پساب‌های صنعتی و شهری تولید می‌کنند. این پساب‌ها نباید مستقیماً و قبل از تصفیه ضمنی وارد منابع آبی شوند بلکه باید ابتدا مواد مضر آن‌ها به مقادیر پایین تری برسد. بنابراین تصفیه پساب یک موضوع بسیار حیاتی قلمداد می‌شود و تصفیه خانه‌های فراوانی در اکثر نقاط دنیا تاسیس گردیده است. پساب‌هایی که در مراکز تصفیه فاضلاب تا مرحله ثانویه تصفیه می‌گردند هنوز شامل مواد مغذی از جمله فسفات، نیترات و آمونیاک می‌باشند که به عنوان عوامل اصلی غنی شدن محیط و شکوفایی محیط‌های آبی شناخته شده‌اند. از اینرو پساب‌ها بایستی قبل از وارد شدن به محیط‌های آبی، مرحله دیگری از تصفیه را نیز بگذرانند تا مواد مغذی آن‌ها جدا شود. روش‌های گوناگونی برای جداسازی مواد مغذی پساب مطرح شده است اما بسیاری از آن‌ها پرهزینه می‌باشند و سبب تولید مقادیر زیادی لجن می‌گردند. ریز جلبک‌ها به عنوان یک روش زیستی مناسب برای تصفیه پساب پیشنهاد شده‌اند (Mallick, 2002; Uma et al., 2002). ریز جلبک‌ها دارای پتانسیل اقتصادی و صنعتی بالایی به عنوان منابع با ارزش برای ساخت غذاهای سالم، داروها، کارتنوئیدها، رنگ‌ها، سوخت زیستی و مواد دیگر می‌باشند (Faulkner, 1986; Liu et al., 2000; Park and Lee, 2001). گذشته از این موارد، آن‌ها ممکن است قادر به حل مشکلات محیطی پدیدار شده از جمله اثر گلخانه‌ای باشند (Nagase et al., 1998). همچنین ریز جلبک‌ها از طریق فتوسنتز سبب تثبیت دی‌اکسید کربن می‌گردند و مواد مغذی اضافی را به صورت موثر و با هزینه‌ای کم جدا می‌نمایند (Lee and

Lee, 2001). اکسیژن حاصل از فرایند فتوسنتز می‌تواند تقاضای اکسیژن بیولوژیک (BOD_5) در پساب را کاهش دهد. ریز جلبک‌ها قادر به جذب انواع فرم‌های نیتروژن (Kim et al., 2000)، فلزات سنگین (Kim and Smith, 2001) و فسفر نیز می‌باشند (Adamsson et al., 1998). در نتیجه با استفاده از ریز جلبک‌ها هم می‌توان با هزینه‌ای پایین مواد مغذی پساب را جدا نمود و از غنی شدن اکوسیستم‌های آبی جلوگیری کرد و هم اینکه خود زیتوده تولیدی جلبک‌ها دارای کاربردهای فراوانی می‌باشد. از جمله مطالعات انجام شده بر روی قابلیت حذف نیتروژن و فسفر پساب توسط ریز جلبک‌ها می‌توان به مطالعات Gonzales و همکاران (۱۹۹۷) اشاره کرد که نشان دادند گونه *Scenedesmus dimorphus* قادر به حذف ۹۵٪ از آمونیاک موجود در پساب می‌باشد. Martin و همکاران (۱۹۸۵) حذف روزانه ۲ میلی‌گرم در لیتر از آمونیوم را توسط جلبک سندسموس گزارش کردند. Martinez و همکاران (۲۰۰۰) پس از مطالعه جداسازی نیتروژن و فسفر پساب شهری توسط جلبک سبز *Scenedesmus obliquus* گزارش کردند که این گونه توان بالایی برای رشد داخل پساب‌ها دارد. برخی از گونه‌های جلبکی که به صورت گسترده جهت جداسازی مواد مغذی به کار رفته‌اند شامل گونه‌های کلرلا (Gonzales et al., 1997; Lee and Lee, 2001)، سندسموس (Martinez et al., 1999) و اسپیرولینا (Olguin et al., 2003) می‌باشند. ریز جلبک سبز *Scenedesmus obliquus* واکنش فوق‌العاده‌ای در پساب‌های شهری نشان داده است به طوری که نرخ رشد آن در پساب‌ها در بسیاری مواقع مشابه یک محیط کشت کامل بوده است. این جلبک آب شیرین قادر به

به مدت ۱۴ روز کشت داده شد تا ذخیره‌ی اولیه جلبک برای آزمایش فراهم شود (Komarek, 1973). دوره‌ی نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی برای کشت این جلبک در نظر گرفته شد (Piri and Ordog, 1997). نرخ رشد ویژه (SGR) در سیستم Batch با استفاده از رابطه $SGR = (\ln N_2 - \ln N_1) / \Delta t$ محاسبه شد که در آن N_2 تعداد سلول‌های جلبک در انتهای آزمایش و N_1 تعداد سلول‌های جلبک در ابتدای آزمایش و Δt مدت زمان انجام آزمایش است (Omori and Ikeda, 1984).

جمع‌آوری فاضلاب

برای انجام این آزمایش، نمونه فاضلاب شهری از تصفیه‌خانه‌ی مرکزی شهر گرگان واقع در کیلومتر ۳ جاده گرگان-آق قلا و پس از آخرین مرحله تصفیه جمع‌آوری و با استفاده از ظروف درب بسته به آزمایشگاه کشت جلبک دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل گردید. در آزمایشگاه، فاضلاب جمع‌آوری شده توسط صافی با اندازه چشمه ۰/۴۵ میکرون به منظور جداسازی کامل مواد معلق فیلتر گردید. تیمارهای به کار رفته در این آزمایش شامل پساب‌هایی با رقت ۰٪ (پساب خالص)، ۲۵٪ (یک قسمت آب مقطر و سه قسمت پساب)، ۵۰٪ (دو قسمت آب مقطر و دو قسمت پساب) و ۷۵٪ (سه قسمت آب مقطر و یک قسمت پساب) بود که میزان ترکیبات مغذی آن‌ها طبق روش‌های استاندارد سنجش گردید و مقادیر آنها در جدول ۱ آورده شده است.

تحمل دامنه وسیعی از تغییرات دمایی و pH می‌باشد که آن را به یک گونه مناسب برای تصفیه پساب تبدیل می‌نماید (Kessler, 1991). به منظور کشت جلبک‌ها در پساب از سیستم‌های مختلفی از جمله سیستم‌های بسته و باز استفاده می‌شود. سیستم‌های Batch سیستم‌هایی بسته و سیستم‌های پیوسته سیستم‌هایی باز می‌باشند. McGinn و همکاران (۲۰۱۲) دریافتند که زیتوده تولیدی جلبک جنس سندسموس زمانی که در یک سیستم پیوسته کشت یافت برابر با ۱۳۰ میلی گرم در لیتر در روز بود که این میزان دوبرابر بیش‌تر از زمانی بود که این جلبک در سیستم Batch کشت داده شد. به طور کلی گونه‌های جلبکی زمانی که در سیستم‌های پیوسته یا نیمه پیوسته کشت داده می‌شوند تمایل به تولید زیتوده بالاتری نسبت به سیستم Batch دارند (Wang et al., 2010). به همین دلیل در این مطالعه از سیستم پیوسته به منظور کشت جلبک *Scenedesmus obliquus* استفاده شد تا میزان حذف نیترات، فسفات و آمونیاک پساب شهری مشخص گردد و همچنین میزان تولید کلروفیل a در آن برآورد گردد.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی جلبک

از ذخیره‌های خالص شده جلبک *Scenedesmus obliquus* موجود در آزمایشگاه کشت جلبک دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان برای انجام این تحقیق استفاده گردید. استوک این گونه در ارلن مایرهای ۲ لیتری که هر کدام حاوی ۴۰۰ میلی لیتر از محیط کشت Zinder که به اختصار Z_8 نامیده می‌شود،

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

ویژگی‌ها	فسفات	نیترات	آمونیاک	COD	BOD ₅	pH	پساب
	۲۱/۶±۰/۰۱۸	۳۲/۴۴±۰/۰۲۶	۱۸/۶۳±۰/۰۹۴	۷۳/۹۲±۰/۰۱۷	۲۸/۵۷±۰/۰۱۶	۶/۷۴±۰/۰۰۵	%۰
	۱۶/۴۴±۰/۰۵۸	۲۶/۵۷±۰/۰۱۱	۱۵/۱۳±۰/۰۴۷	۶۰/۹۷±۰/۰۱۱	۲۲/۵±۰/۰۱۳	۶/۸۴±۰/۰۰۷	%۲۵
	۱۲/۸۱±۰/۰۳۲	۱۸/۲۸±۰/۰۳۶	۱۰/۶۱±۰/۰۰۵	۳۹/۳۸±۰/۰۱	۱۶/۳۲±۰/۰۰۷	۷/۰۷±۰/۰۰۵	%۵۰
	۷/۶±۰/۰۸۳	۱۰/۳۹±۰/۰۱۵	۶/۲۷±۰/۰۲۸	۲۲/۴۵±۰/۰۰۸	۸/۷۴±۰/۰۰۳	۷/۱۲±۰/۰۰۵	%۷۵

طراحی آزمایش

۱۲ مخزن شیشه‌ای ۱۰ لیتری دارای مخازن ورودی و خروجی با سرعت یکسان (سرعت آن توسط شیرهای کنترل تنظیم گردید) به عنوان سیستم کشت پیوسته در نظر گرفته شدند. برای هر تیمار ۳ تکرار (۳ سیستم پیوسته) در نظر گرفته شد. به هر یک از مخازن شیشه‌ای ۵ لیتر و به مخزن ورودی آن‌ها ۱۰ لیتر پساب با رقت‌های از پیش تعیین شده اضافه گردید. همچنین ریز جلبک *Scenedesmus obliquus* با مقدار اولیه حدود ۲۰۰۰۰۰ سلول در میلی‌لیتر نیز به مخازن شیشه‌ای اضافه گردید (Gao et al., 2014). سپس شیر ورودی و خروجی به میزان مشخص (بر اساس نرخ ورودی روزانه (F)) باز گردید و از یک طرف پساب وارد سیستم و از طرف دیگر پساب از سیستم خارج شد به طوری که سطح پساب در داخل مخازن شیشه‌ای ثابت باقی ماند. در سیستم پیوسته، نرخ ورودی روزانه (F) از فرمول زیر تعیین می‌شود (Dickinson et al., 2014):

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

در این فرمول، D، نرخ رقت و V، حجم محیط کشت موجود در سیستم می‌باشد. اما برای محاسبه نرخ رقت نیز بایستی از فرمول $\mu(d-1) = D(d-1)$ استفاده

کرد. بر اساس این فرمول، نرخ رقت با سرعت رشد ویژه جلبک در سیستم Batch برابر است. روشنایی به صورت ۲۴ ساعته و با استفاده از لامپ‌های فلوروسنت ۱۶ واتی کاملاً چسبیده به مخازن شیشه‌ای اعمال گردید. دمای محیط از طریق کولر در تمام طول آزمایش ثابت نگه داشته شد (۱±۲۴ درجه سانتی‌گراد). هوادهی دائمی از انتهای مخازن شیشه‌ای به منظور اکسیژن رسانی به جلبک‌ها و جلوگیری از انباشته شدن آنها انجام گردید. میزان اکسیژن موجود در مخازن شیشه‌ای توسط دستگاه اکسیژن متر مدل AD630 به منظور اطمینان از یکسان بودن مقادیر اکسیژن سنجش گردید. آزمایش ۲۸ روز به طول انجامید.

پارامترهای زیستی و غیرزیستی

طی دوره کشت، شمارش جلبکی هر روز با استفاده از لام‌نوبار و میکروسکوپ اینورت انجام گردید (Song et al., 2013). به منظور سنجش میزان جداسازی مواد مغذی، هر دو روز یک‌بار ۵۰ میلی‌لیتر از پساب خارج شده از مخازن شیشه‌ای جدا و سپس به میزان ۱۰ دقیقه و با سرعت ۴۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ می‌گردید. پس از این فرایند، سوپرناتانت به دست آمده برای سنجش نیترات، فسفات و آمونیاک

پارامترهای مختلف اندازه گیری شده تأثیر معنی داری دارند ($P < 0/05$). با توجه به جدول ۲، افزایش رقت باعث کاهش میزان فسفات اولیه گردید. در تمام تیمارها تغییرات عمده در میزان فسفات تا روز دهم مشاهده گردید به طوری که در تیمار با رقت صفر میزان فسفات از ۲۱/۶ میلی گرم در لیتر در روز اول به ۶/۲ میلی گرم در لیتر در روز دهم رسید و پس از آن روندی با تغییرات کم را نشان داد به طوری که در روز آخر آزمایش میزان آن به ۶/۲۸ میلی گرم در لیتر رسید. در تیمارهای ۰/۲۵، ۰/۵۰ و ۰/۷۵٪ میزان فسفات در روز اول به ترتیب برابر با ۱۶/۴۴، ۱۲/۸۱ و ۷/۶۲ میلی گرم در لیتر بود که به ۳/۱۳، ۱/۱ و ۰/۶۴ میلی گرم در لیتر در روز دهم رسید. مقادیر فسفات در تیمارهای ۰/۲۵، ۰/۵۰ و ۰/۷۵٪ در انتهای آزمایش به ترتیب برابر با ۳/۱۳، ۱/۰۹ و ۰/۶۴ میلی گرم در لیتر ثبت گردید.

همانطور که در شکل ۱ مشخص است، در تیمارهای ۰٪ و ۰/۲۵٪ به ترتیب تا روزهای هشتم و ششم تغییر عمده‌ای در میزان نیترات مشاهده نگردید. در تیمارهای ۰/۵۰٪ و ۰/۷۵٪ میزان نیترات تا روز چهارم فاقد تغییرات عمده بود. پس از این زمان، ابتدا یک کاهش معنی دار و سپس روندی با تغییرات اندک در میزان نیترات در تمام تیمارهای آزمایش تا انتهای آزمایش مشاهده گردید. در تیمارهای ۰٪، ۰/۲۵٪، ۰/۵۰٪ و ۰/۷۵٪ به ترتیب مقادیر نیترات از ۳۲/۴۴، ۲۶/۵۷، ۱۸/۲۸ و ۱۰/۳۹ میلی گرم در لیتر در ابتدای آزمایش به ۱/۸۴، ۰/۰۷ و ۰/۰۹ میلی گرم در لیتر در انتهای آزمایش رسید.

استفاده شد (Han et al., 2015). سپس نرخ جداسازی بر اساس فرمول

$$\text{Removal efficiency} = (C_i - C_0)/C_0 \times 100\%$$

محاسبه گردید. در این فرمول، C_i بیانگر غلظت در زمان t_i و C_0 بیانگر غلظت اولیه می‌باشد (Han et al., 2015). سنجش نیترات، فسفات و آمونیاک با استفاده از کیت‌های شرکت Palintest و دستگاه فتومتر Wagtech انجام گردید. اندازه گیری BOD_5 و COD هر دو روز یک‌بار انجام گردید. مقادیر اکسیژن (با اکسیژن متر مدل AD630) و pH (با pH متر مدل con200) به صورت روزانه سنجش گردید. اندازه گیری کلروفیل a نیز هر دو روز یک‌بار با روش Parsons و همکاران (۱۹۸۴) انجام گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری

این تحقیق که شامل ۴ تیمار با ۳ تکرار بود در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. جهت مقایسه بین تیمارها از آزمون واریانس یک طرفه (One way Anova) استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد با استفاده از نرم افزار SPSS16 صورت پذیرفت. برای رسم نمودارها نیز از نرم افزار اکسل ۲۰۱۰ استفاده گردید.

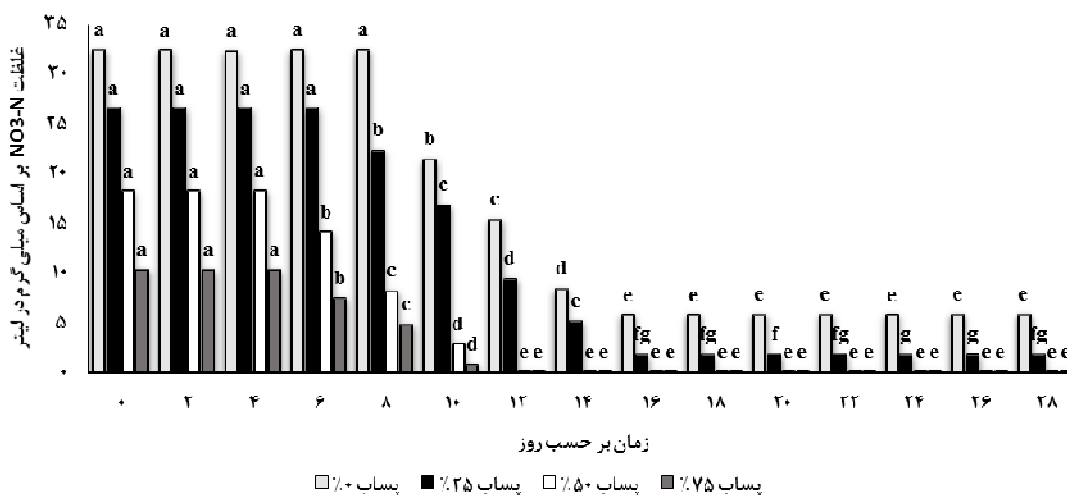
نتایج

نرخ رشد ویژه جلبک *Scenedesmus obliquus* در سیستم Batch برابر با ۰/۲۷ در روز محاسبه شد. نتایج تجزیه و تحلیل واریانس یک طرفه برای بررسی تغییرات یک پارامتر در روزهای مختلف در طول آزمایش نشان داد که تیمارهای مختلف آزمایشی بر

جدول ۲: تغییرات فسفات در تیمارهای به کار رفته در این آزمایش طی ۲۸ روز (بر حسب میلی‌گرم در لیتر)

روز	درصد رقت			
	۷۵	۵۰	۲۵	۰
۰	۷/۶۲±۰/۰۸۳ ^{aD}	۱۲/۸۱±۰/۰۳۳ ^{aC}	۱۶/۴۴±۰/۰۵۹ ^{aB}	۲۱/۶±۰/۰۱۸ ^{aA}
۲	۷/۰۲±۰/۰۱۸ ^{bD}	۱۰/۸۶±۰/۰۲۸ ^{bC}	۱۴/۲۶±۰/۰۲۲ ^{bB}	۲۰/۲۵±۰/۰۰۶ ^{bA}
۴	۳/۶۱±۰/۰۰۹ ^{cD}	۷/۲±۰/۰۰۸ ^{cC}	۱۰/۹۴±۰/۰۱۱ ^{cB}	۱۴/۹±۰/۰۱۲ ^{cA}
۶	۲/۰۵±۰/۰۰۴ ^{dD}	۵/۵۵±۰/۰۰۵ ^{dC}	۷/۵۷±۰/۰۰۵ ^{dB}	۹/۴±۰/۰۱۸ ^{dA}
۸	۰/۹۵±۰/۰۰۳ ^{eD}	۳/۰۵±۰/۰۰۳ ^{eC}	۷/۱±۰/۰۰۵ ^{eB}	۷/۶±۰/۰۱۲ ^{eA}
۱۰	۰/۶۴±۰/۰۰۳ ^{fD}	۱/۱±۰/۰۰۱ ^{fghC}	۳/۱۳±۰/۰۰۳ ^{fgB}	۶/۲±۰/۰۰۳ ^{ghA}
۱۲	۰/۶۷±۰/۰۰۲ ^{fD}	۱/۱۱±۰/۰۰۸ ^{fC}	۳/۱±۰/۰۰۲ ^{gB}	۶/۱۵±۰/۰۰۲ ^{hA}
۱۴	۰/۶۶±۰/۰۰۲ ^{fD}	۱/۱±۰/۰۰۴ ^{fgC}	۳/۱۲±۰/۰۰۲ ^{gB}	۶/۱۵±۰/۰۰۳ ^{hA}
۱۶	۰/۶۸±۰/۰۰۳ ^{fD}	۱/۰۷±۰/۰۰۲ ^{fghC}	۳/۰۹±۰/۰۰۳ ^{gB}	۶/۱±۰/۰۰۶ ^{iA}
۱۸	۰/۶۵±۰/۰۰۳ ^{fD}	۱/۰۶±۰/۰۰۱ ^{hC}	۳/۱۱±۰/۰۰۲ ^{gB}	۶/۱۷±۰/۰۰۵ ^{ghA}
۲۰	۰/۶۶±۰/۰۰۱ ^{fD}	۱/۰۶±۰/۰۰۵ ^{ghC}	۳/۱۷±۰/۰۰۴ ^{fB}	۶/۱۷±۰/۰۰۴ ^{ghA}
۲۲	۰/۶۴±۰/۰۰۶ ^{fD}	۱/۱±۰/۰۰۷ ^{fgC}	۳/۱۵±۰/۰۰۵ ^{fgB}	۶/۲۱±۰/۰۰۴ ^{gA}
۲۴	۰/۶۷±۰/۰۰۵ ^{fD}	۱/۰۷±۰/۰۰۲ ^{fghC}	۳/۱۴±۰/۰۰۲ ^{fgB}	۶/۲۸±۰/۰۰۳ ^{fA}
۲۶	۰/۶۲±۰/۰۰۲ ^{fD}	۱/۱±۰/۰۰۶ ^{fC}	۳/۱۳±۰/۰۰۳ ^{fgB}	۶/۲۹±۰/۰۰۳ ^{fA}
۲۸	۰/۶۵±۰/۰۰۶ ^{fD}	۱/۱±۰/۰۰۱ ^{fghC}	۳/۱۳±۰/۰۰۴ ^{fgB}	۶/۲۸±۰/۰۰۶ ^{fA}

تذکر: حروف افقی (بزرگ) جهت مقایسه مقادیر روزانه به تفکیک تیمار و حروف عمودی (کوچک) جهت مقایسه مقادیر یک تیمار به تفکیک روز است.



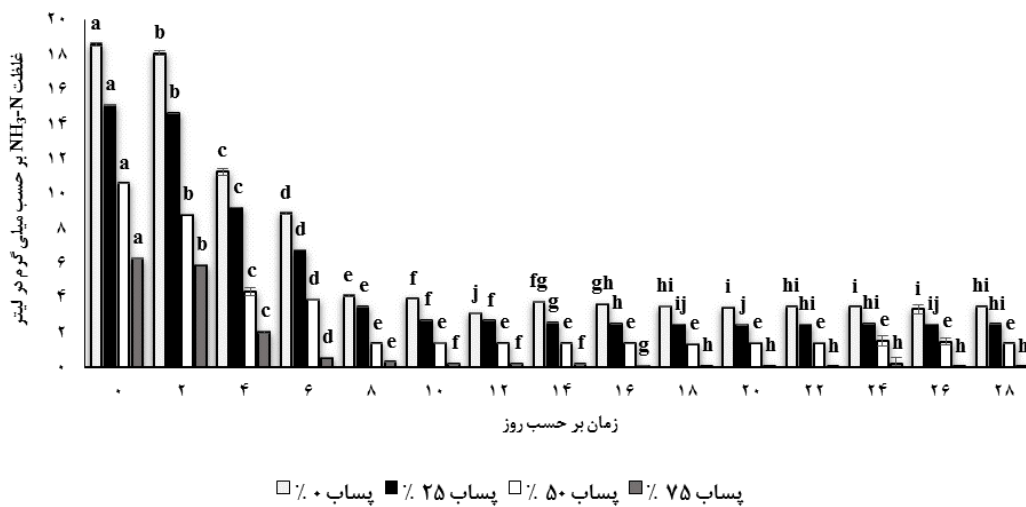
شکل ۱: تغییرات نیترات در تیمارهای به کار رفته در این آزمایش طی ۲۸ روز

تدریجی را نشان داد و در روز چهارم این کاهش شدت بیش تری گرفت. در تیمار ۰٪، از روز چهاردهم میزان

با توجه به شکل ۲، میزان آمونیاک در تمام تیمارهای آزمایشی از همان روز دوم یک کاهش

آمونیاک تقریباً بدون تغییر باقی ماند. در تیمارهای ۰، ۲۵٪، ۵۰٪ و ۷۵٪ نیز به ترتیب از روزهای دهم، هشتم و ششم روند تقریباً ثابتی در میزان آمونیاک مشاهده گردید. شکل ۳ تغییرات تعداد سلول‌های *Scenedesmus obliquus* را نشان می‌دهد. در ابتدای آزمایش تعداد سلول‌های جلبکی در تمام تیمارها برابر بود و تا روز دوم نیز تغییر عمده‌ای در میزان سلول‌های جلبکی در هیچ کدام از تیمارهای آزمایشی دیده نشد. با این حال تعداد سلول‌ها در تمام تیمارها از روز سوم به بعد در تمام مدت آزمایش دارای تفاوت معنی‌دار بود ($P < 0.05$). بیش‌ترین میانگین تعداد سلول جلبکی بدست آمده در تیمار ۰٪ در روز دوازدهم

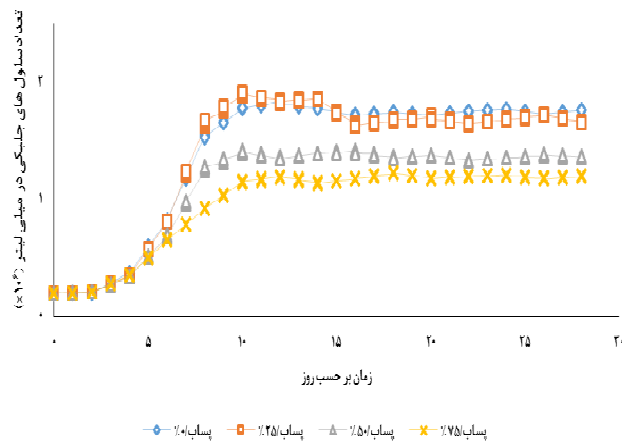
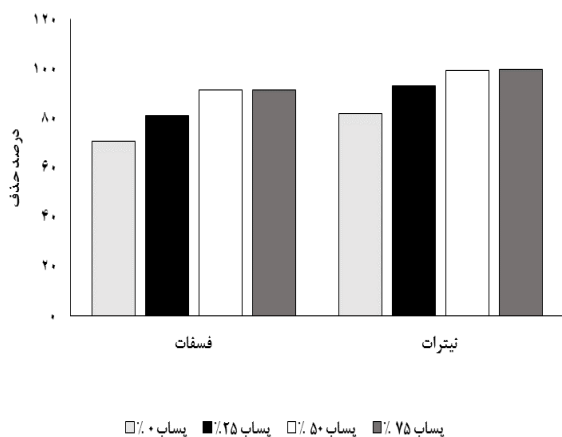
مشاهده گردید. در تیمارهای ۰، ۲۵٪، ۵۰٪ و ۷۵٪ نیز بیش‌ترین تعداد سلول‌های جلبکی به ترتیب برابر با 1.9×10^6 ، 1.41×10^6 و 1.23×10^6 سلول در میلی‌لیتر و در روزهای دهم، شانزدهم و هجدهم مشاهده شد. در تمام تیمارها پس از چند روز روند تقریباً ثابتی در میزان سلول‌ها ثبت گردید و افزایش آنها به اندازه‌ی روزهای ابتدایی آزمایش نبود. کارایی جذب فسفات و نترات در شکل ۴ نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل مشخص است، تیمارهای پساب با رقت ۵۰٪ و ۷۵٪ بهترین کارایی را در جذب فسفات و نترات دارا می‌باشند.



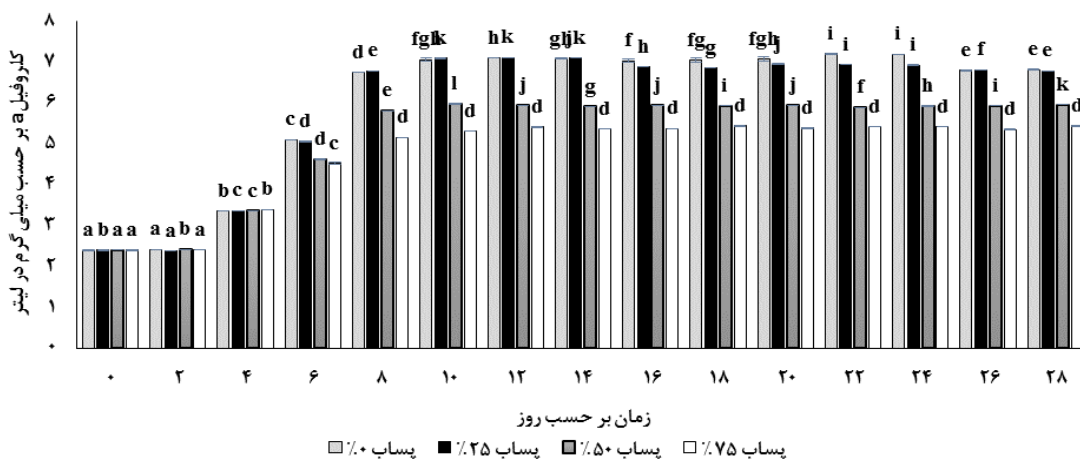
شکل ۲: تغییرات آمونیاک در تیمارهای به کار رفته در این آزمایش طی ۲۸ روز

روزهای پایانی نیز میزان کلروفیل a اندکی کاهش یافت. در پساب ۲۵٪، در روز دوم اندکی کاهش در میزان کلروفیل a مشاهده گردید و سپس روند افزایشی تا روز دهم در آن مشاهده شد، از روز دهم به بعد نیز یک روند تقریباً ثابت دیده شد. در پساب ۵۰٪ از ابتدای آزمایش تا روز هشتم روند افزایشی و پس از آن روند ثابتی در میزان کلروفیل a مشاهده شد.

نتایج نشان داد (شکل ۵) که پساب شهری با تمام غلظت‌های استفاده شده سبب افزایش میزان کلروفیل a در جلبک‌های *Scenedesmus obliquus* گردیده است. در تیمار ۰٪، میزان کلروفیل a تا روز دوم تغییر معنی‌داری را نشان نداد اما از روز دوم تا روز دهم دارای افزایش عمده‌ای بود ($P < 0.05$). از روز دهم تا بیست و چهارم روند تقریباً ثابتی ثبت گردید و در



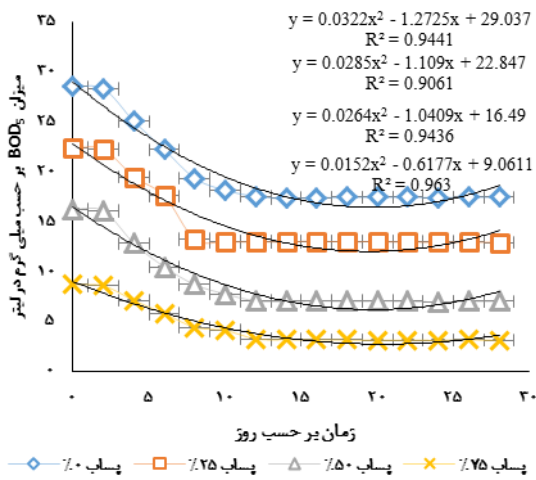
شکل ۳: روند تغییرات تعداد سلول‌های جلبکی در تیمارهای به کار رفته در این آزمایش طی ۲۸ روز
 شکل ۴: درصد حذف فسفات و نیترات در تیمارهای آزمایشی طی ۲۸ روز



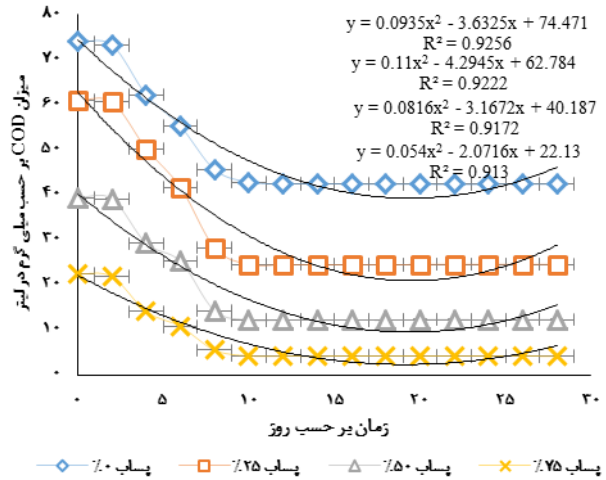
شکل ۵: تغییرات کلروفیل a در تیمارهای به کار رفته در این آزمایش طی ۲۸ روز

ترتیب به مقادیر ۴۲/۳۳، ۲۴/۴۸، ۱۲/۲۲ و ۴/۱۳ میلی‌گرم در لیتر در روز بیست و هشتم رسید. میزان BOD₅ نیز همانند COD تا روز دوم تغییر اندکی را نشان داد با این حال این تغییر معنی‌دار بود (P<۰/۰۵) (شکل ۶ ب). نرخ جداسازی COD و BOD₅ در شکل ۷ نشان داده شده است. با افزایش رقت پساب، درصد حذف COD و BOD₅ افزایش یافت و تیمار با رقت ۷۵٪ کاراترین تیمار برای کاهش این دو متغیر بود.

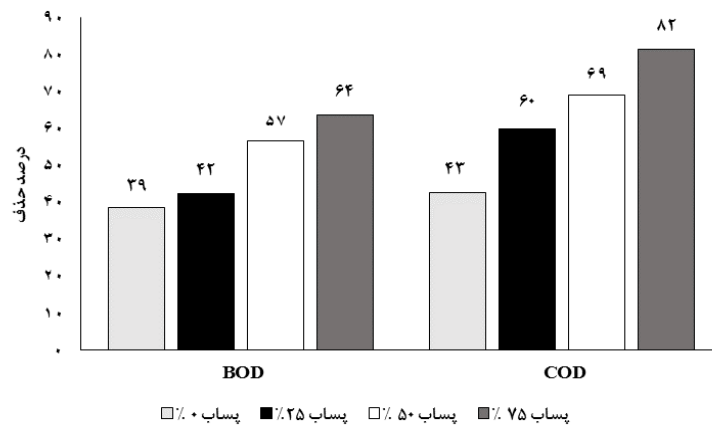
در پساب ۷۵٪ نیز تا روز دوم تغییر عمده‌ای مشاهده نگردید ولی از روز دوم تا روز دهم روند افزایشی و سپس روند ثابتی در میزان کلروفیل a مشاهده گردید. بیش‌ترین میزان کلروفیل a به ترتیب در تیمارهای پساب با رقت ۰٪ و ۲۵٪ به ثبت رسید. شکل ۶ الف نشان می‌دهد که میزان COD در تمام تیمارهای آزمایشی تا روز دهم دارای کاهش معنی‌دار می‌باشد، در تیمارهای ۰٪، ۲۵٪، ۵۰٪ و ۷۵٪ میزان COD از مقادیر اولیه ۷۳/۹۲، ۶۰/۹۷، ۳۹/۳۸ و ۲۲/۴۵ میلی‌گرم در لیتر به



شکل ۶ ب: تغییرات BOD₅ در تیمارهای به کار رفته در این آزمایش طی ۲۸ روز



شکل ۶ الف: تغییرات COD در تیمارهای به کار رفته در این آزمایش طی ۲۸ روز



شکل ۷: درصد حذف COD و BOD₅ در تیمارهای آزمایشی طی ۲۸ روز

بحث

تصفیه زیستی آب‌های زاید با استفاده از جلبک‌ها به منظور حذف مواد مغذی و ایجاد اکسیژن برای باکتری‌های هوازی سال‌هاست که آغاز شده است. تحقیقات متعددی در آزمایشگاه‌های مختلف و با استفاده از سیستم‌های متنوع در این زمینه صورت پذیرفته است (Shi et al., 2007; Zhu et al., 2008). فرایند سیستم پیوسته تصفیه پساب و جلبک بدین

در تمام تیمارها ابتدا تغییر عمده‌ای در میزان pH دیده نشد ولی پس از آن میزان pH افزایش یافت. از اواسط آزمایش نیز تغییرات pH دارای روند تقریباً ثابتی بود. در تیمارهای ۰٪، ۲۵٪، ۵۰٪ و ۷۵٪ به ترتیب میزان pH از ۶/۷۴، ۶/۸۴، ۷/۰۷ و ۷/۱ در ابتدای آزمایش به ۹/۳۲، ۸/۴۸، ۸/۲۸ و ۸/۲۶ در انتهای آزمایش رسیده است.

بالا با نرخ رقت نزدیک به بیش‌ترین نرخ رقت بحرانی استفاده گردد. Martinez و همکاران (۲۰۰۰) پس از بررسی جداسازی نیتروژن و فسفر پساب شهری توسط جلبک سبز *Scenedesmus obliquus* گزارش کردند که این گونه توان بالایی برای رشد داخل پساب‌ها دارد زیرا قادر به تحمل محدوده وسیعی از دما و pH است. اگرچه Dumas و همکاران (۱۹۹۸) حذف کامل فسفر توسط سیانوباکتر *Phormidium bohneri* را گزارش کردند اما در آن مطالعه غلظت اولیه فسفات تنها در حدود ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر بود که در مقایسه با مقادیر به‌کار رفته در این مطالعه پایین‌تر بود. Dickinson و همکاران (۲۰۱۴) به بررسی ظرفیت ریزجلبک سندسموس در جذب زیستی مواد مغذی پساب شهری در سیستم پیوسته طی ۴۲ روز پرداختند. در آن مطالعه از تیمارهایی شامل پساب شهری تصفیه شده تا مرحله دوم و پساب شهری تصفیه شده تا مرحله دوم با مقادیر ۱/۶ و ۲/۴ برابر نیتروژن بیش‌تر از خود پساب شهری استفاده شد. نتایج نشان داد که آمونیاک و فسفات در تمام تیمارها کاملاً حذف شدند. بر اساس نتایج حاصل شده در این تحقیق و سایر تحقیقات می‌توان بیان کرد که سیستم پیوسته نقش مفیدی در حذف فسفات پساب را دارا می‌باشد و رقیق کردن پساب نیز سبب کاهش درصد فسفات و جذب سریع‌تر آن می‌گردد اما باید رقیق‌سازی به‌حدی باشد که بتواند مواد مغذی مورد نیاز رشد جلبک‌ها را فراهم نماید. مزیت این روش نسبت به سیستم Batch ادامه دار بودن آن و پایدار بودن حذف می‌باشد. در این مطالعه با افزایش تعداد سلول‌های جلبکی میزان آمونیاک در تمام تیمارها کاهش یافت و هنگامی که تعداد جلبک‌ها به یک روند با تغییرات کم رسید میزان آمونیاک نیز

صورت است که پساب غنی از نیتروژن و فسفر به همراه نور فراهم کننده شرایط مناسب برای رشد و تکثیر ریزجلبک‌ها است که سرانجام منتج به تولید زیست توده مفید جلبکی و کاهش نیتروژن و فسفر پساب خواهد شد (Tam and Wong, 1989). یافته‌های این تحقیق نشان داد که جلبک *Scenedesmus obliquus* در تیمارهای دارای مقادیر مختلف نترات و فسفات به خوبی رشد کرده و نقش موثری در تصفیه پساب به کار رفته داشته است. یکی از فاکتورهای موثر در زمینه ارزیابی کارایی ریزجلبک‌های مختلف در بهبود کیفیت پساب میزان فسفات در آب است. بیش‌ترین و کم‌ترین درصد جذب فسفات به ترتیب در تیمارهای پساب با رقت ۷۵٪ و ۰٪ مشاهده شد. در واقع درصد حذف فسفات در تیمارهای رقیق‌تر بیش‌تر بود. کارایی حذف مواد مغذی در مطالعات مختلف متغیر و وابسته به ترکیب محیط کشت و شرایط محیطی از قبیل غلظت اولیه مواد مغذی، شدت نور، نسبت نیتروژن به فسفر، سیکل تاریکی-روشنایی و گونه جلبکی می‌باشد (Aslan and Kapdan, 2006). برای مثال، Ruiz-Marín و همکاران (۲۰۱۰) پس از بررسی جلبک‌های کلرلا و سندسموس به این نتیجه رسیدند که جلبک سندسموس توانایی بالاتری در جذب فسفات آب را داراست به‌طوری‌که جلبک کلرلا ۷۰٪ و جلبک سندسموس ۸۵٪ فسفات آب را کاهش دادند. در مطالعه‌ای که توسط Martinez و همکاران (۱۹۹۹) به منظور بررسی رشد و نرخ جداسازی فسفر توسط *Scenedesmus obliquus* در یک فتوبیوراکتور متوالی انجام شد، تاثیر شدت تابش نور بر رقت‌های مختلف محیط کشت بررسی شد. نتایج نشان داد که برای موثر بودن میزان جداسازی فسفر بهتر است که از شدت نور

نیترا ت تقریباً از زمانی آغاز شد که آمونیاک در حال کاهش بود. مطالعات دیگری نیز نشان داده‌اند که نیترا ت زمانی توسط جلبک مورد استفاده قرار می‌گیرد که میزان آمونیوم از یک سطح مشخص کم‌تر شود و یا کاملاً محیط خالی از آمونیوم گردد (Przytocka- (Jusiak et al., 1984; Maestrini et al., 1986. شاید دلیل این امر این باشد که برخی از آنزیم‌ها از قبیل نیترا ت ردوکتاز جلبکی نیاز به زمان دارند تا ساخته شوند و جلبک قادر به استفاده از نیترا ت گردد (Gao et al., 2014). جلبک‌های سبز می‌توانند از آمونیوم و نیترا ت به عنوان منابع نیتروژن برای رشد خود استفاده کنند (Bloom et al., 1992). شاید بتوان درصد حذف بیش‌تر نیترا ت نسبت به فسفات در این مطالعه را به همین موضوع نسبت داد. واضح است که با رشد جلبک به سبب نیاز بالاتر به اکسیژن بایستی میزان BOD_5 و COD آب کاهش پیدا کند (Tam and Wong, 1989). با افزایش رقت پساب، درصد حذف COD نیز افزایش یافت به طوری که رقیق‌ترین تیمار بیش‌ترین درصد حذف COD را نشان داد. کاهش COD نشان دهنده جذب مواد آلی توسط جلبک می‌باشد. جلبک‌ها قادرند از کربن آلی طی متابولیسم هتروتروفیک و یا میکسوتروفیک استفاده کنند (Abeliovich and Weisman, 1978). حذف COD در مطالعات متعدد دیگری نیز گزارش شده است (Gutzeit et al., 2005). جذب COD در این مطالعه از روز هشتم کاهش یافت. Su و همکاران (۲۰۱۱) پس از بررسی کشت همزمان جلبک و باکتری به منظور تصفیه پساب شهری نیز نتایج مشابهی به دست آوردند. دو دلیل برای کاهش COD مطرح می‌باشد، اولاً، منابع کربن باقی مانده در سیستم پس از ۸ روز بسیار کاهش یافته است. دوماً، کربن باقی

تغییراتی کمی را از خود نشان داد. این موضوع بیانگر وجود یک ارتباط بین میزان مصرف آمونیاک و افزایش تعداد جلبک‌ها می‌باشد. Gonzales و همکاران (۱۹۹۷) نشان دادند که گونه *Scenedesmus dimorphus* ۹۵٪ از آمونیاک موجود در فاضلاب را حذف می‌کند و نسبت به گونه *Chlorella vulgaris* در حذف آمونیاک پساب در طول تصفیه زیستی کارایی بالاتری دارد. در مطالعه‌ای که توسط حیدری و همکاران (۱۳۹۰) به منظور بررسی تولید زیست‌توده و حذف آمونیاک و نیترا ت از پساب کارگاه پرورش ماهی به وسیله کشت جلبک سبز *Scenedesmus quadricauda* انجام گردید، مشخص شد که این جلبک در تیمارهای مختلف غنی از نیتروژن رشد کرده و با توجه به میزان بقای بالا و رشد مناسب، نیروی بالقوه مناسبی برای تصفیه زیستی پساب‌های غنی از نیتروژن دارد. بررسی‌ها نشان داده که جلبک‌ها ترجیح می‌دهند نیتروژن را به صورت آمونیوم جذب کنند چرا که جذب آن نسبت به جذب نیترا ت نیاز به انرژی کم‌تری دارد (Sharma and Shakeel, 2013). حذف نیتروژن به ویژه به فرم آمونیوم توسط کشت جلبکی عمدتاً توسط دو فاکتور متاثر می‌شود، استفاده مستقیم نیتروژن توسط جلبک و تخلیه آمونیاک. فرایند دوم به معنای حذف آمونیاک با استفاده از هوایی است که برای هوادهی به کار گرفته می‌شود. Reeves (۱۹۷۲) دریافت که تخلیه آمونیاک فقط تحت شرایط بسیار قلیایی و در دمای بالا رخ می‌دهد. در این تحقیق، بیش‌ترین و کم‌ترین جذب نیترا ت به ترتیب در تیمارهای پساب با رقت ۷۵٪ و ۰٪ مشاهده شد. همانند فسفات، درصد حذف نیترا ت در تیمارهای رقیق‌تر بیش‌تر از تیمارهای غلیظ‌تر می‌باشد. روند کاهشی

Dickinson و همکاران (۲۰۱۴) پس از بررسی ظرفیت ریز جلبک سندسموس در جذب زیستی مواد مغذی پساب شهری در سیستم پیوسته طی ۴۲ روز بیان کردند که کلروفیل a در تیمار دارای بیش‌ترین ماده مغذی ۲/۵ برابر تیمار با کم‌ترین ماده مغذی بود. نرخ ورود مواد مغذی به سیستم نیز یکی از موارد مهم در سیستم پیوسته می‌باشد. در مطالعه‌ای که توسط Liu و همکاران (۲۰۱۶) انجام شد نرخ ورود فاضلاب تاثیر عمده‌ای بر تولید زیست توده و جداسازی نیتروژن داشت، با این حال میزان حذف فسفر به میزان کم‌تر تحت تاثیر این پارامتر قرار گرفت. افزایش مشاهده شده در کلروفیل a می‌تواند به دلیل در دسترس بودن نور کافی در آغاز آزمایش باشد. اما با گذشت زمان افزایش تعداد سلول‌های جلبکی مانع از نفوذ کامل نور به برخی سلول‌ها می‌گردد که این نتایج با نتایج به دست آمده توسط Blier و همکاران (۱۹۹۶) مطابقت دارد. یافته‌های این پژوهش حاکی از وجود همبستگی بین حذف نیترات و فسفات و آمونیاک پساب با تعداد سلول جلبکی است، به طوری که با افزایش تعداد سلول‌های جلبکی، درصد حذف مواد مغذی افزایش می‌یابد. همچنین این تحقیق نشان داد که سیستم پیوسته کشت جلبک می‌تواند کارایی مناسبی در حذف مواد مغذی داشته باشد و حذف مواد مغذی را به صورت مستمر انجام دهد. در مطالعه‌ای که توسط ابوالحسنی و همکاران (۱۳۹۵) به منظور امکان‌سنجی تولید زیست‌توده و حذف فسفات و نیترات از پساب شهری به وسیله کشت جلبک *Chlorella vulgaris* در سه رقت مختلف پساب شهری انجام شد، بالاترین زیست‌توده، تعداد سلول و میزان رشد ویژه در تیماری که رقیق نشده بود و بیش‌ترین جذب فسفات و نیترات در تیمار با

مانده ممکن است کلونیدی باشد و به آرامی به مواد قابل تجزیه تبدیل شود. معمولاً در هنگام کشت جلبک برای تصفیه پساب، کربن عامل محدودکننده می‌باشد. با این حال زمانی که میزان کربن موجود در پساب برای فتوسنتز جلبکی کافی نباشد، اگر سیستم باز باشد جلبک‌ها می‌توانند دی‌اکسید کربن را از هوا به دست آورند (Oswald, 1988; Gonzalez *et al.*, 2008a). تغییرات در pH نیز به منظور بررسی اثرات آن در تغییرات مواد مغذی پایش گردید. فتوسنتز در سلول‌های جلبکی می‌تواند سبب افزایش pH محیط گردد. افزایش pH نشان‌دهنده‌ی بالا رفتن قلیائیت و در نتیجه کاهش آمونیوم است و همچنین می‌تواند منجر به کاهش فسفات گردد، که این امر به بالا رفتن کارایی حذف مواد مغذی کمک می‌کند (افشاری و همکاران، ۱۳۹۰). افزایش pH در پساب ۰٪ که دارای بیش‌ترین سلول جلبکی بود، بیش‌تر از سایر تیمارها بود و به ترتیب با افزایش رقت و کاهش تعداد سلول جلبکی، میزان pH کم‌تری در انتهای آزمایش مشاهده گردید. رشد جلبکی سبب کاهش دی‌اکسید کربن می‌گردد که به نوبه خود باعث افزایش pH می‌گردد (Gonzalez *et al.*, 2008b). تعداد سلول‌های جلبک سندسموس تا روز دوم تغییر چندانی نداشت و فاز تاخیری آن ۴۸ ساعت به طول انجامید. Ahmad Khan و همکاران (۲۰۱۳) پس از بررسی پتانسیل جلبک *Chlorella vulgaris* در تصفیه پساب نشان دادند که جلبک کلرلا در دو روز اول در فاز تأخیری به سر می‌برد. این امر بیانگر این می‌باشد که ۴۸ ساعت طول می‌کشد تا سلول به شرایط جدید سازش پیدا کند. میزان کلروفیل a در تیمار با رقت ۰٪ بالاتر از سایر تیمارها بود. به طوری که با افزایش رقت، میزان کلروفیل a نهایی کاهش یافت.

- Tetraselmis suecica* در تصفیه پساب ثانویه شهری، مجله آبریان و شیلات، ۲(۸)، ۱-۸.
۳. حیدری، ص.ا.، فرهادیان، ا.، محبوبی صوفیانی، ن.، ۱۳۹۰. تولید زیست توده و حذف آمونیاک و نیتريت از پساب کارگاه پرورش ماهی به وسیله کشت جلبک سبز سندسموس کوادریکوادا، مجله محیط شناسی، ۳۷(۵۹)، ۱۵-۲۸.
4. Abeliovich, A., Weisman, D., 1978. Role of heterotrophic nutrition in growth of the alga *Scenedesmus obliquus* in high-rate oxidation ponds. Applied and Environmental Microbiology, 35(1), 32-37.
5. Adamsson, M., Dave, G., Forsberg, L., Guterstam, B., 1998. Toxicity identification evaluation of ammonia, nitrite and heavy metals at the Stensund Wastewater Aquaculture plant, Sweden. Water Science and Technology, 38(3), 151-157.
6. Ahmad Khan, A.U., Yaser, A., 2013. The potential of *Chlorella vulgaris* for wastewater treatment and biodiesel production. Pakistan journal of Biotechnology, 45(S1), 461-465.
7. Aslan, S., Kapdan, L.K., 2006. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. Ecological Engineering, 2(8), 64-70.
8. Blier, R., Laliberte, G., de la Noue, J., 1996. Production of the cyanobacterium *Phormidium bohneri* in parallel with epuration of a dairy anaerobic effluent. Process Biochemistry, 31(6), 587-593.
9. Bloom, A.J., Sukrapanna, S.S., Warner, R.L., 1992. Root respiration associated with ammonium and nitrate absorption and assimilation by barley. Plant Physiology, 99(4), 1294-1301.
10. Borowitzka, M.A., 1999. Commercial production of microalgae: Ponds, tanks, tubes and fermenters. Journal of Biotechnology, 70(1), 313-321.
11. Dickinson, K.E., Bjornsson, W.J., Garrison, L.L., Whitney, C.G., Park, K.C., Banskota, A.H., McGinn, P.J., 2014. Simultaneous remediation of nutrients from liquid anaerobic digestate and municipal wastewater by the microalga *Scenedesmus* sp. AMDD grown in continuous chemostats. Journal of Applied Microbiology, 118(1), 75-83.
12. Dumas, A., Laliberte, G., Lessard, P., Noue, J., 1998. Biotreatment of fish farm effluents using the cyanobacterium *Phormidium bohneri*. Aquaculture Engineering, 17(1), 57-68.

بیشترین رقت (۵۰٪) مشاهده شد که با مطالعه حاضر همخوانی دارد. فاضلاب شهر گرگان حاوی آلاینده-های خانگی متنوعی از جمله شوینده ها (دارای مقادیر بالای ازت و فسفر) می باشد و پس از تصفیه حدود ۷۰ درصد آن در بخش کشاورزی (محصولاتی که به صورت خام مصرف نمی شود نظیر گندم و برنج) مورد استفاده قرار می گیرد. بنابراین به کارگیری سیستم پیوسته که سبب حذف ۱۰۰ درصدی مواد مغذی پساب نمی گردد می تواند از یک سو به غنی کردن محصولات کشاورزی که با آب تصفیه شده از این تصفیه خانه کشت داده می شوند کمک کند و از سوی دیگر مقادیر این مواد مغذی در حدی نباشد که به محیط آسیب بزند و سبب شکوفایی های جلبکی گردد. در نتیجه می توان در انتهای تصفیه خانه بخشی تعبیه نمود که پساب پس از رقیق شدن به آرامی به جلبک ها اضافه گردد و سپس از آن خارج گردد.

سپاسگزاری

در اینجا بر خود لازم می دانیم از زحمات کلیه کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند سپاسگزاری نماییم.

منابع

۱. ابوالحسنی، م.ه.، حسینی، س.ع.، قربانی، ر.، وینسه، ا.، ۱۳۹۵. حذف فسفات و نترات از پساب شهری به وسیله کشت جلبک *Scenedesmus obliquus* و تولید زیست توده جلبکی، مجله بوم شناسی آبریان، ۱۰(۲)، ۳۳-۳۹.
۲. افشاری، ع.ر.، یحوی، م.، سجادی، م.م.، شیبک، ح.، عبدالعلیان، ع.، ۱۳۹۰. بررسی قابلیت ریزجلبک

- microalgae. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 6(3), 194-199.
25. Liu, B.H., Zhang, D.H., Lee, Y.K., 2000. Effects of nutrient levels on cell growth and secondary carotenoids formation in the freshwater green alga, *Chlorococcum* sp. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 10(2), 201-207.
 26. Liu, J., Danneels, B., Vanormelingen, P., Vyverman, W., 2016. Nutrient removal from horticultural wastewater by benthic filamentous algae *Klebsormidium* sp., *Stigeoclonium* spp. and their communities: From laboratory flask to outdoor Algal Turf Scrubber (ATS). *Water Research*, 92(91), 61-68.
 27. Maestrini, S.Y., Robert, J.M., Leftley, J.W., Collos, Y., 1986. Ammonium thresholds for simultaneous uptake of ammonium and nitrate by oyster-pond algae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 102(1), 75-98.
 28. Mallick, N., 2002. Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: a review. *Biometals*, 15(4), 377-390.
 29. Martin, C., De la Noue, J., Picard, G., 1985. Intensive cultivation of freshwater microalgae on aereated pig manure. *Biomass*, 7(4), 254-259.
 30. Martinez, M.E., Castillo, J.M., Yousfi, E.F., 1999. Photoautotrophic consumption of phosphorus by *Scenedesmus obliquus* in a continuous culture. Influence of light intensity. *Process Biochemistry*, 34(8), 811-818.
 31. Martinez, M.E., Sánchez, S., Jiménez, J.M., Yousfi, F.E., Muñoz, L., 2000. Nitrogen and phosphorus removal from Municipal wastewater by the microalgae *Scenedesmus obliquus*. *Bioresour Technol*, 73(1), 263-272.
 32. McGinn, P.J., Dickinson, K.E., Park, K.C., Whitney, C.G., MacQuarrie, S.P., Black, F.J., Frigon, J., Guiot, S.R., O'Leary, S.J.B., 2012. 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), 155-165.
 33. Nagase, H., Eguchi, K., Yoshihara, K., Hirata, K., Miyamoto, K., 1998. Improvement of microalgal NOx removal in bubble column and airlift reactors. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 86(4), 421-423.
 34. Olguín, E.J., Galicia, S., Mercado, G., Perez, T., 2003. Annual productivity of *Spirulina* (*Arthrospira*) and nutrient removal in a pig
 13. Faulkner, D.J., 1986. Marine natural products. *Natural Product Reports*, 3(1), 1-31.
 14. Gao, F., Yang, Z.H., Li, C., Wang, Y.J., Jin, W.H., Deng, Y.B., 2014. Concentrated microalgae cultivation in treated sewage by membrane photobioreactor operated in batch flow mode. *Bioresour Technol*, 167(1), 441-446.
 15. Gonzales, L.E., Canizares, R.O., Baena, S., 1997. Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a Colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. *Bioresour Technol*, 60(3), 259-262.
 16. Gonzalez, C., Marciniak, J., Villaverde, S., Garcia-Encina, P.A., Munoz, R., 2008a. Microalgae-based processes for the biodegradation of pretreated piggery wastewaters. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(5), 891-898.
 17. Gonzalez, C., Marciniak, J., Villaverde, S., Leon, C., Garcia, P.A., Munoz, R., 2008b. Efficient nutrient removal from swine manure in a tubular biofilm photo-bioreactor using algae bacteria consortia. *Water Science and Technology*, 58(1), 95-102.
 18. Gutzeit, G., Lorch, D., Weber, A., Engels, M., Neis, U., 2005. Biofloculent algal-bacterial biomass improves low-cost wastewater treatment. *Water Science and Technology*, 52(12), 9-18.
 19. Han, L., Pei, H., Hu, W., Jiang, L., Ma, G., Zhang, S., Han, F., 2015. Integrated campus sewage treatment and biomass production by *Scenedesmus quadricauda* SDEC-13. *Bioresour Technol*, 175(1), 262-268.
 20. Kessler, E., 1991. *Scenedesmus*: problems of a highly variable genus of green algae. *Botanica Acta*, 104(3), 169-171.
 21. Kim, M.K., Smith, R.E.H., 2001. Effect of ionic copper toxicity on the growth of green alga, *Selenastrum capricornutum*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11(2), 211-216.
 22. Kim, M.H., Chung, W.T., Lee, M.K., Lee, J.Y., Ohh, S.J., Lee, J.H., Park, D.H., Kim, D.J., Lee, H.Y., 2000. Kinetics of removing nitrogenous and phosphorus compounds from swine waste by growth of microalga, *Spirulina platensis*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 10(1), 455-461.
 23. Komarek, J., 1973. Culture collections. In: Carr, N.G., Whitton, B.A. (eds.). *The biology of blue-green algae*. Blackwell Scientific Publication, 519-524.
 24. Lee, K.Y., Lee, C.G., 2001. Effect of light/dark cycles on wastewater treatments by

- Selective Algae for Manure Production. International Journal of Environmental Engineering and Management, 4(6), 573-580.
44. Shi, J., Podola, B., Melkonian, M., 2007. Removal of nitrogen and phosphorus from wastewater using microalgae immobilized on twin layers: an experimental study. Journal of Applied Phycology, 19(5), 417-423.
 45. Song, M., Pei, H., Hu, W., Ma, G., 2013. Evaluation of the potential of 10 microalgal strains for biodiesel production. Bioresource Technology, 141(1), 245-251.
 46. Su, Y., Mennerich, A., Municipal, B., 2011. Municipal wastewater treatment and biomass accumulation with a wastewater-born and settleable algal-bacterial culture. Water Research, 45(11), 3351-3358.
 47. Tam, N.F.Y., Wong, Y.S., 1989. Wastewater nutrient removal by *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus* sp. Environmental Pollution, 58(1), 19-34.
 48. Uma, L., Selvaraj, K., Subramanian, G., Nagarkar, S., Manjula, R., 2002. Biotechnological potential of marine cyanobacteria in wastewater treatment - Disinfection of raw sewage by *Oscillatoria willei* BDU 130511. Journal of Microbial Biotechnology, 12(4), 699-696.
 49. Wang, L., Wang, Y., Chen, P., Ruan, R., 2010. Semi-continuous cultivation of *Chlorella vulgaris* for treating undigested and digested dairy manures. Applied Biochemistry and Biotechnology, 162(8), 2324-2332.
 50. Zhu, G., Peng, Y., Li, B., Guo, J., Yang, Q., Wang, S., 2008. Biological removal of nitrogen from wastewater. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 192(1), 159-195.
 - wastewater recycle process under tropical conditions. Journal of Applied Phycology, 15(2-3), 249-257.
 35. Omori, M., Ikeda, T., 1984. Methods in marine zooplankton ecology. John Wiley, New York, 332 p.
 36. Oswald, W.J., 1988. In: Borowitzka, M.B.L., (Ed.), Micro-Algae and Waste-water Treatment. Cambridge, 305-328.
 37. Park, E.K., Lee, C.G., 2001. Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under various light intensities and wavelengths. Journal of Microbiology and Biotechnology, 11(6), 1024-1030.
 38. Parsons, T.R., Maita, Y., Lalli, C.M., 1984. A manual of chemical and biological methods for seawater analysis. Pergamon Press, Oxford, 173 p.
 39. Piri, Z.M., Ordog, V., 1997. Effect of some herbicides commonly used in Iranian agriculture on aquatic food chain. PhD thesis to the Hungarian Academy of Science, 19-130.
 40. Przytocka-Jusiak, M., Duszota, M., Matusiak, K., Mycielski, R., 1984. Intensive culture of *Chlorella vulgaris* AA as the second stage of biological purification of nitrogen industry wastewaters. Journal of Water Research, 18(1), 1-7.
 41. Reeves, T., 1972. Nitrogen removal: A literature review. Journal of Water Pollution Control Federation, 44(10), 18-95.
 42. Ruiz-Marin, A., Mendoza-Espinosa, L.G., Stephenson, T., 2010. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. Bioresource Technology, 101(1), 58-64.
 43. Sharma, G.K., Shakeel, A.K., 2013. Bioremediation of Sewage Wastewater Using