

"مقاله پژوهشی"

استفاده از پساب لبنی در پرورش ریز جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس (*Spirulina platensis*)

هانیه السادات میرامینی^{۱*}، سید عباس حسینی^۱، رسول قربانی^۱، فرزانه نوری^۲، حسن رضایی^۳

۱- گروه تولید و بهره‌برداری آبزیان، دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۲- پژوهشکده آرتیمیا و آبی پروری ارومیه، گروه بیولوژی و تکثیر و پرورش، دانشکده شیلات، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۳- گروه محیط‌زیست، دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۹/۲۷

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۷/۱

چکیده

یکی از الزامات اصلی در تصفیه پساب، نیاز به حذف مواد مغذی مخصوصاً نیتروژن و فسفر می‌باشد که می‌تواند در صورت تخلیه در منابع آبی منجر به یوتریفیکاسیون این منابع شود. بسیاری از محققان پساب را به‌عنوان منبع مواد مغذی جهت کشت ریز جلبک‌ها دانسته، که منجر به کاهش آلودگی پساب تا سرحد استاندارد تخلیه می‌گردد. در این بررسی، کاربرد پساب لبنی در کشت ریز جلبک *Spirulina platensis* باهدف تصفیه و حذف مواد مغذی و همچنین میزان زیتوده تولیدی مورد مطالعه قرار گرفت و به‌این ترتیب، دو غلظت از ریز جلبک *S. platensis* (۰/۰۵ و ۰/۱ گرم بر لیتر) در سه رقت از (۲۵، ۵۰، ۷۵ درصد) پساب لبنی کشت داده شد. نتایج نشان داد که هر دو فاکتور غلظت‌های متفاوت ریز جلبک و رقت‌های مختلف پساب نقش مؤثری در جذب مواد مغذی و تولید زیتوده ریز جلبک داشته‌اند. بالاترین درصد حذف نیترات، فسفات، آمونیاک (۹۸/۰۳، ۷۴/۱۴، ۹۷/۴۴ درصد) و همچنین حداکثر میزان زیتوده (۰/۹۲۰±۰/۰۱ گرم بر لیتر) مربوط به رقت ۲۵ درصد پساب و غلظت ثانویه ریز جلبک بود. در واقع، غلظت ثانویه ریز جلبک (۰/۱ گرم بر لیتر) نسبت به غلظت اولیه (۰/۰۵ گرم بر لیتر) عملکرد بهتری ارائه داده و موفق به حذف مقادیر بیش تری از مواد مغذی شد. به‌این ترتیب، پساب لبنی محیط کشت مناسبی جهت رشد ریز جلبک *S. platensis* بوده و با کاهش درصد رقیق‌سازی از ۷۵٪ به ۲۵٪ و افزایش میزان مواد مغذی در دسترس، میزان زیتوده حاصل افزایش می‌یابد.

کلمات کلیدی: پساب، صنایع لبنی، *Spirulina platensis*، تصفیه

مقدمه

در بین کلیه فعالیت‌های صنعتی، صنایع غذایی بیش‌ترین مقادیر آب را مصرف کرده و بالاترین میزان پساب را به ازای هر واحد تولید می‌کنند (Ramjeawon, 2000). در سطح جهانی، پساب‌هایی که از سیستم‌های تصفیه فاضلاب تخلیه می‌شوند، از بزرگ‌ترین منابع آلودگی به حساب آمده و تأثیرات منفی این پساب‌ها بر روی اکوسیستم‌های آبی و انسان، به جهت مواد مضر موجود در آنها، هم در سطح ملی و هم در سطح بین‌المللی به اثبات رسیده است که برخی از این تأثیرات شامل مرگ‌ومیر موجودات آبی، شکوفایی جلبکی، تخریب زیستگاه‌ها در اثر رسوب‌گذاری و افزایش جریان آب و سایر سمیت‌های کوتاه و بلندمدت در اثر آلاینده‌های شیمیایی؛ همراه با تجمع شیمیایی و بزرگ‌نمایی در سطوح بالاتر زنجیره‌ی غذایی می‌باشد (Canada, 2010). لبنیات یکی از انواع این صنایع بوده که پساب‌های حاصل از آنها حاوی مقادیر زیادی از بار آلی با سطوح بالای پروتئین، نیتروژن، فسفر، قندهای محلول و مواد مغذی هستند که تجدید پذیر بوده و یک تهدید جدی زیست‌محیطی به علت (Chemical Biological Oxygen Demand) و COD (Oxygen Demand) و BOD (Demand) بالا به شمار می‌آید (Zhu et al., 2013). به‌طور کلی در صنایع غذایی - کشاورزی فناوری‌های زیادی جهت تصفیه‌ی پساب‌ها به‌صورت فیزیکی، شیمیایی یا زیستی برای از بین بردن فرم‌های آلی و معدنی مواد مغذی به‌خصوص فسفات و نیتروژن دخیل هستند (Nurdogan and Oswald, 1995). مشکل عمده‌ی اکثر پساب‌های لبنی، غلظت بالای مواد مغذی، به‌خصوص نیتروژن و فسفر کل بوده که نیازمند تصفیه‌های شیمیایی گران‌قیمت جهت از بین بردن این

مواد مغذی می‌باشد (Gasperi et al., 2009). همچنین تصفیه پساب‌ها به معرف‌های شیمیایی یا امکانات مکمل نیاز دارد (Ahn, 2006) و مقادیر زیادی برق جهت هوادهی در طی فرایند لجن فعال مصرف می‌شود (Oswald, 2003). در نتیجه، کشت ریز جلبک‌ها در بسیاری از انواع پساب‌ها جهت بهبود کیفیت آب برای سال‌ها انجام گرفته است. به‌خصوص رشد ریز جلبک‌ها در پساب‌های کشاورزی - صنعتی که غنی از آلاینده‌های نیتروژن و فسفر بوده، و می‌توان از آنها برای کاهش بار آلی و غیر آلی این نوع پساب‌ها با حداقل هزینه استفاده کرد (Wang et al., 2013). به‌طور کلی، انواع مختلفی از ریز جلبک‌ها شامل کلرلا و لگاریس، سندسموس ابلیکوس و اسپیرولینا پلاتنسیس جهت حذف مواد مغذی مورد استفاده قرار گرفته است (Ebrahimian et al., 2014) که در این میان، اسپیرولینا پلاتنسیس (*Spirulina platensis*) یکی از شناخته‌شده‌ترین آنها بوده و قادر به جذب نیتروژن و فسفر موجود در پساب از طریق غشای سلول می‌باشد (Chaiklahan et al., 2010). علاوه بر این، یکی از مزایای ویژه‌ی اسپیرولینا پلاتنسیس ترجیح آن برای رشد در محیطی به‌شدت قلیایی است که از آلودگی خارجی جلوگیری کرده و سبب به‌کارگیری این ریز جلبک در کاربردهای زیست‌محیطی شده است (Olguin et al., 1997). در همین راستا Rajkumar و Takriff (۲۰۱۵) با پرورش اسپیرولینا پلاتنسیس در پساب روغن زیتون مقادیر TN و TP را به ترتیب تا ۹۱٪ و ۹۶/۸۰٪ کاهش دادند. همچنین Phang و همکاران (۲۰۰۰) نیز گزارش کردند با کشت *Spirulina platensis* در پساب کارخانه‌ی نشاسته درصد حذف فسفات و آمونیاک به ترتیب تا ۹۹/۴٪ و

مواد و روش‌ها

کشت ریز جلبک

ابتدا استوک جلبک *S. platensis* از کلینیک تخصصی ریز جلبک کاسپین ساری تهیه و به آزمایشگاه فایکولب دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل و سایر مراحل کشت جلبک در این آزمایشگاه انجام شد. کشت جلبک‌ها در اتاق کشت با دمای 2 ± 30 درجه سانتی‌گراد و شدت نور 4670 ± 350 لوکس و دوره نوری (تاریکی: روشنایی) (۱۲:۱۲) طی ۱۴ روز انجام گرفت (حسین زاده و همکاران، ۱۳۹۳). برای استریل فضای داخلی آزمایشگاه و اتاق کشت، روزانه ۱۵ دقیقه لامپ‌های فرابنفش (UV) روشن و هم‌چنین میزهای کشت روزانه با الکل پاک‌سازی می‌شدند. قبل از شروع کشت، ارلن مایرهای مورد استفاده بعد از شست‌وشو، به مدت یک ساعت در دمای ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد در آون خشک و سپس کلیه ظروف حاوی محیط کشت، آلات هوادهی، و پیپت پاستورهای مورد استفاده برای هوادهی، داخل اتوکلاو مدل پکولب ساخت ایران به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد استریل شدند. محیط کشت، پس از خارج شدن از اتوکلاو در اتاق کشت قرار داده شد تا به دمای اتاق رسیده و در نهایت برای معرفی جلبک آماده باشد. در این تحقیق، از محیط کشت زاروک (Manirafasha et al., 2018) برای کشت اولیه جلبک استفاده شد.

تهیه نمونه پساب

جهت انجام این آزمایش، نمونه پساب توسط ظروف پلاستیکی (پلی اتیلنی) به جهت حفظ کیفیت آن

۹۹٪ کاهش پیدا کرد. به این ترتیب، کشت *S. platensis* می‌تواند جایگزین امیدوارکننده‌ای برای از بین بردن نیتروژن و فسفر غیر آلی باشد (Olguin et al., 2003; Chuntapa et al., 2003; Wang). همکاران (۲۰۱۶) به استفاده از پساب آبی‌پروری در کشت *S. platensis* پرداخته و در ادامه گزارش کردند بیومس حاصل از تصفیه می‌تواند به‌طور موفقیت‌آمیزی به‌عنوان کود کشاورزی مورد استفاده قرار گیرد. Nur و Buma (۲۰۱۸) جهت پرورش ریز جلبک از پساب کارخانه‌ی روغن خرما استفاده کرده و بیان کردند کنار بحث تصفیه، بیومس حاصل می‌تواند به‌عنوان محصول ارزشمند مورد استفاده قرار گیرد. نیتروژن و فسفر از عناصر اساسی رشد ریز جلبک‌ها بوده (Chisti, 2008) و کارایی حذف عمدتاً وابسته به تولید ریز جلبک‌ها است و هراندازه مقادیر بیش‌تری از این مواد مغذی از پساب حذف شود زیتوده بیش‌تری نیز تولید می‌گردد. این زیتوده حاصل از تصفیه، غنی از مواد آلی و غیر آلی بوده و می‌تواند به‌عنوان خوراک دام (در پرورش طیور، ماهی و روتیفرها)، به‌عنوان کود برای غنی‌سازی خاک با مواد مغذی و هم‌چنین جهت استخراج رنگ‌دانه‌های ارزشمند، آنتی‌اکسیدان هاو غیره مورد استفاده قرار گیرد (Spolaore et al., 2006). هدف از انجام این تحقیق امکان استفاده از پساب به‌عنوان محیط کشت جهت رشد ریز جلبک *S. platensis* و هم‌چنین تعیین شرایط بهینه‌ی این ریز جلبک جهت حذف مواد مغذی در محیط کشت پساب لبنی همراه با تولید زیتوده می‌باشد. لزوم انجام تحقیق حاضر نیز، تصفیه‌ی زیستی پساب با هزینه‌ی کم‌تر و باصرفه اقتصادی بیش‌تر و تولید انبوه ریز جلبک *S. platensis* بدون نیاز به آب و زمین فراوان است.

تهیه غلظت‌های مورد استفاده (۲۵، ۵۰، ۷۵ درصد) به ترتیب شامل نیترات (۵۴/۲۲، ۴۵/۷۱، ۴۱/۲ گرم بر لیتر)، فسفات (۷۶۱، ۷۰۵، ۵۸۲ گرم بر لیتر) و آمونیاک (۳۶/۷۲، ۳۲/۵۱، ۲۸/۴۳ گرم بر لیتر) گزارش شد.

برای آنالیز حذف مواد مغذی از فرمول زیر استفاده شد:

$$W\% = (C_i - C_0) / C_0 \times 100\%$$
 که در این معادله: $W\%$: درصد جذب؛ C_0 : غلظت در زمان آغازین t_0 ؛ C_i : غلظت در زمان t_i (Han et al., 2015).

برآورد نرخ رشد

با توجه به اندازه‌های متفاوت رشته‌های مارپیچی ریز جلبک *S. platensis*، این تفاوت اندازه می‌تواند شمارش زیست‌توده این ریز جلبک را دچار خطا و مشکل سازد (El-Kassas et al., 2015). بنابراین، رشد ریز جلبک *S. platensis* به صورت یک روز در میان با اندازه‌گیری جذب (Optical density - OD) نمونه کشت در اسپکتوفتومتر با طول موج ۶۸۰ نانومتر (OD680nm) (Manirafasha et al., 2018) اندازه‌گیری شد و با استفاده از معادله کالیبراسیون (بر اساس رابطه‌ای بین OD اسپیرولینا پلاتنسیس در ۶۸۰ نانومتر و زیست‌توده خشک شده ریز جلبک مورد نظر) به وزن خشک سلولی (g/l) تبدیل شد.

$$\text{Dry weight (g L}^{-1}\text{)} = 0.318 \text{ OD}_{680} - 0.074 \text{ (R}^2 = 0.99\text{)}$$

تجزیه و تحلیل آماری

این آزمایش با استفاده از طرح کاملاً تصادفی در قالب فاکتوریل با استفاده از دو فاکتور شامل: فاکتور اول رقت پساب در ۳ سطح (۷۵، ۵۰، ۲۵ درصد) و فاکتور دوم غلظت جلبک *S. platensis* در دو سطح (۰/۱، ۰/۰۵ گرم بر لیتر) در سه تکرار انجام شد. ابتدا

و حمل و نقل آسان‌تر به صورت تصادفی از کارخانه‌ی لبنیات پگاه جمع‌آوری شد و در دمای ۴ درجه سانتی-گراد نگهداری و به آزمایشگاه منتقل گردید (Gao et al., 2014). بعد از انتقال در ابتدا توسط کاغذ صافی جهت حذف ذرات بزرگ تر فیلتر و سپس در اتوکلاو استریل گشت تا از عدم وجود بار میکروبی پساب اطمینان حاصل شود. در مرحله‌ی بعدی، پساب به وسیله‌ی آب مقطر در رقت‌های ۲۵، ۵۰، ۷۵ درصد (Kothari et al., 2013) رقیق‌سازی و ریز جلبک *S. platensis* در دو غلظت ۰/۱ و ۰/۲ گرم بر لیتر (Costa et al., 2004) در آن کشت داده شد تا مقادیر نیترات و فسفات و آمونیاک موجود در آن مورد ارزیابی قرارگیرد.

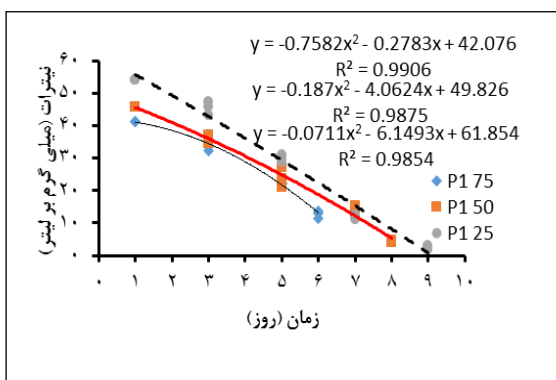
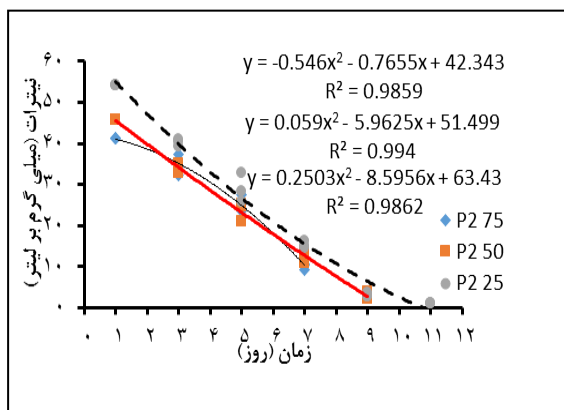
تیمارهای آزمایشی

در این تحقیق P_1 ۲۵، ۵۰، ۷۵ درصد به ترتیب شامل پساب رقیق شده با ۲۵، ۵۰، ۷۵ درصد آب با غلظت اولیه ۰/۰۵ گرم بر لیتر ریز جلبک (Costa et al., 2004) و P_2 ۲۵، ۵۰، ۷۵ درصد به ترتیب شامل پساب رقیق شده با ۲۵، ۵۰، ۷۵ درصد آب با غلظت ثانویه ۰/۱ گرم بر لیتر (Costa et al., 2004) ریز جلبک *S. platensis* بود.

اندازه‌گیری مواد مغذی

جهت اندازه‌گیری مواد مغذی، شاخص‌های کیفیت آب (شامل: فسفات، نیترات، آمونیاک) با استفاده از کیت‌های شرکت وگتک (ساخت انگلستان) و دستگاه فتومتر مدل S12 ساخت کشور انگلستان به صورت یک روز در میان سنجش شد. همچنین مقادیر ابتدایی نیترات، فسفات و آمونیاک پساب صنایع لبنی پس از

لیتر جلبک در رقت‌های مختلف به‌طور معنی‌داری ($p < 0/05$) روند کاهشی داشته است.



شکل ۱: میزان نیترات اندازه‌گیری شده در طول آزمایش در غلظت‌های مختلف p_1 و p_2

فسفات

با توجه به شکل ۲ (سمت راست) بیش‌ترین شیب کاهش مربوط به رقت ۲۵٪ می‌باشد. بررسی روند تغییرات کاهش فسفات نشان می‌دهد، تیمار ۷۵٪ از روز اول تا ششم آزمایش مقادیر کم‌تری نسبت به سایر تیمارها نشان داد. اما در تیمار ۵۰٪ و ۲۵٪ به ترتیب در روزهای هشتم و نهم آزمایش به پایین‌ترین سطح خود رسید با توجه به این نکته که در تیمار ۲۵٪ از روز سوم تا هفتم آزمایش مقادیر کم‌تری از نیترات نسبت به تیمار ۵۰ درصد مشاهده شد که این مقادیر در مورد نیترات به

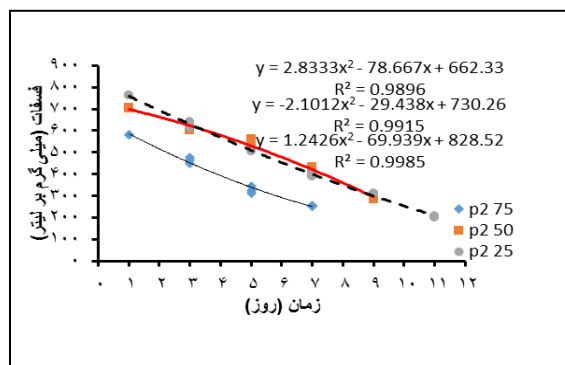
نرمال بودن داده‌های خام با آزمون کولموگروف-اسمیرنوف (Kolmogorov-smirnow) مورد مطالعه قرار داده شد و داده‌های نرمال با تجزیه واریانس دوطرفه (Two-way Anova) بررسی شد و برای مقایسه میانگین تیمارهای مختلف از آزمون LSD در سطح اطمینان ۹۵٪ استفاده شد. بررسی روند حذف مواد آلی در زمان از آزمون رگرسیون و جهت بررسی ارتباط بین پارامترهای مورد اندازه‌گیری از آزمون هم‌بستگی توسط نرم‌افزار SPSS-17 و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel-2010 انجام گرفت.

نتایج

نیترات

با توجه به شکل ۱ (بالا) بیش‌ترین شیب کاهش مربوط به رقت ۲۵ درصد می‌باشد. بررسی روند تغییرات کاهش نیترات نشان می‌دهد، روند تغییرات در تیمارهای پساب ۷۵ و ۵۰٪ تا روز پنجم آزمایش روند مشابه‌ای داشته ولی در تیمار ۷۵٪ مقادیر نیترات کم‌تر بوده است. تیمار ۵۰٪ و ۲۵٪ به ترتیب در روزهای هشتم و نهم آزمایش نزدیک به صفر رسید با این تفاوت که این مقدار در تیمار ۲۵٪ کمتر بود. میزان نیترات در غلظت اولیه جلبک ۰/۰۵ گرم در لیتر پساب در رقت‌های مختلف به‌طور معنی‌داری ($p < 0/05$) روند کاهشی داشته است.

با توجه به شکل ۱ (پایین) بیش‌ترین شیب کاهش مربوط به رقت ۲۵ درصد می‌باشد. هم‌چنین بررسی روند تغییرات نیترات نشان می‌دهد که تیمار ۵۰ و ۲۵ درصد به ترتیب در روز نهم و یازدهم آزمایش به صفر متمایل شده ولی در رقت ۷۵ درصد به صفر نمی‌رسد میزان نیترات در طول آزمایش در غلظت ۰/۱ گرم بر

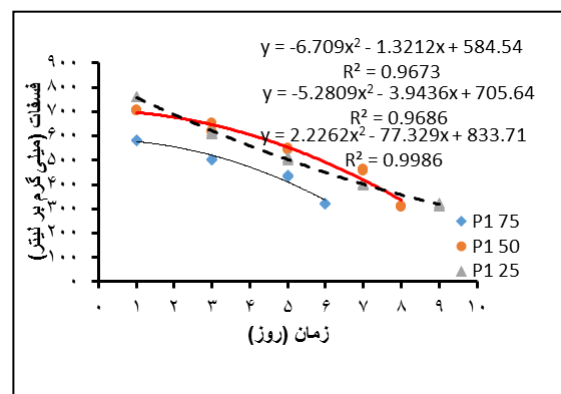


درصد به ترتیب در روز هشتم و نهم آزمایش به کمترین مقدار خود رسید و این مقدار در رقت ۲۵٪ کم تر بود و به صفر متمایل شد که از این نظر مشابه تیمار ۲۵٪ نیترات عمل کرد ولی در رقت ۷۵٪ به صفر نرسید. میزان آمونیاک در غلظت اولیه جلبک ۰/۰۵ گرم در لیتر پساب در رقت های مختلف به طور معنی داری ($p < 0/05$) روند کاهشی داشته است.

با توجه به شکل ۳ (پایین) بیشترین شیب کاهش آمونیاک مربوط به تیمار ۲۵٪ بود. بررسی روند تغییرات کاهش نشان می دهد که از نقطه نظر آمونیاک، تیمار ۷۵٪ از روز اول تا پنجم مقادیر بیشتری از کاهش آمونیاک را نشان داد که این روند در روز هفتم تقریباً مشابه با سایر تیمارها بود. تیمارهای ۲۵٪ و ۵۰٪ به ترتیب در روزهای نهم و یازدهم آزمایش کمترین مقادیر خود را داشته که این مورد در تیمار ۲۵٪ به صفر میل کرد که از این نظر مشابه تیمار ۲۵٪ نیترات بود. با توجه به شکل میزان آمونیاک در طول آزمایش در رقت های مختلف پساب و غلظت ثانویه جلبک (۰/۱ گرم بر لیتر) به طور معنی داری روند کاهشی داشته است.

صفر رسیده بود. میزان فسفات در غلظت اولیه جلبک ۰/۰۵ گرم در لیتر پساب در رقت های مختلف به طور معنی داری ($p < 0/05$) روند کاهشی داشته است.

با توجه به شکل ۲ (سمت چپ) بیشترین شیب کاهش مربوط به غلظت ۷۵٪ می باشد. تیمار ۷۵٪ از روز اول تا هفتم آزمایش مقادیر کمتری نسبت به سایر تیمارها نشان داد. اما تیمار ۵۰٪ و ۲۵٪ تا روز نهم آزمایش روند تقریباً مشابه ای را طی کرده و به ترتیب در روزهای نهم و یازدهم آزمایش کمترین میزان خود را نشان دادند که این مقدار در رقت ۲۵٪ کم تر بود با این تفاوت که در مورد نیترات تیمارهای ۲۵٪ و ۵۰٪ به صفر میل کرده بودند. میزان فسفات در طول آزمایش در غلظت ۰/۱ گرم بر لیتر جلبک در رقت های مختلف به طور معنی داری ($p < 0/05$) روند کاهشی داشته است.



شکل ۲: میزان فسفات اندازه گیری شده در طول آزمایش در غلظت های مختلف p_1 و p_2

آمونیاک

با توجه به شکل ۳ (بالا) بیشترین شیب کاهش مربوط به غلظت ۲۵٪ می باشد. هم چنین بررسی روند تغییرات آمونیاک نشان می دهد که تیمار ۲۵٪ و ۵۰٪

جدول ۱: درصد حذف نیترات، فسفات و آمونیاک در تیمارهای آزمایشی در غلظت اولیه جلبک (۰/۰۵ گرم بر لیتر)

تیمار	P _۱ ۲۵٪	P _۱ ۵۰٪	P _۱ ۷۵٪
نیترات	۹۵/۶۲ ^A	۹۰/۶۳ ^B	۶۹/۲۴ ^C
فسفات	۵۸/۳۶ ^A	۵۶/۰۲ ^B	۴۴/۷۵ ^C
آمونیاک	۹۱/۰۳ ^A	۸۱/۰۴ ^B	۶۳/۸۸ ^C

حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار در طول آزمایشی در سطح $\alpha=0/05$ است

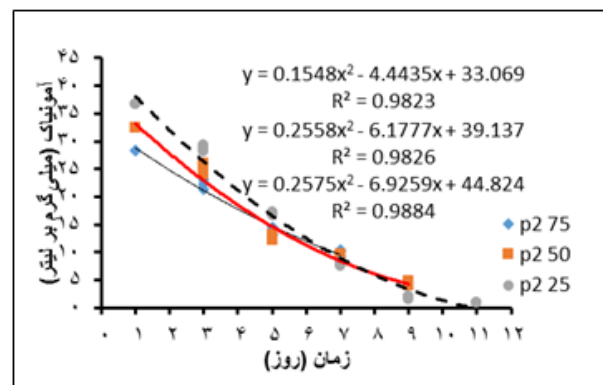
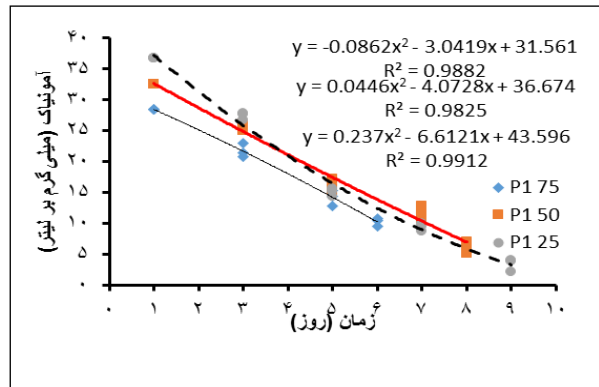
جدول ۲: درصد حذف نیترات، فسفات و آمونیاک در تیمارهای آزمایشی در غلظت اولیه جلبک (۰/۱ گرم بر لیتر)

تیمار	P _۲ ۲۵٪	P _۲ ۵۰٪	P _۲ ۷۵٪
نیترات	۹۸/۰۳ ^A	۹۴/۱۲ ^B	۷۵/۶۱ ^C
فسفات	۷۳/۱۴ ^A	۵۸/۰۲ ^B	۵۶/۲۶ ^C
آمونیاک	۹۷/۴۴ ^A	۸۶/۶۳ ^B	۶۵/۱۲ ^C

حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار در طول آزمایشی در سطح $\alpha=0/05$ است.

بحث

کارایی حذف مواد مغذی بسته به ترکیب محیط کشت و شرایط محیطی شامل غلظت اولیه مواد مغذی، شدت نور، نسبت نیتروژن به فسفر، دوره نوری (روشنایی/ تاریکی)، و گونه‌های جلبک متفاوت است (Aslan and Kapdan, 2006). نیترات از عناصر ضروری جهت رشد ریز جلبک *S. platensis* می‌باشد. با توجه به نتایج، در غلظت اولیه‌ی ریز جلبک (۰/۰۵ گرم بر لیتر)، تیمار P_۱ ۲۵٪ با ۹۵/۶۲٪ در حذف نیترات مؤثرتر عمل کرده و بیشترین درصد حذف را نشان داد. همچنین در غلظت ثانویه‌ی ریز جلبک (۰/۱ گرم بر لیتر) نیز، تیمار P_۲ ۲۵٪ با ۹۸/۰۳٪ حداکثر درصد حذف نیترات را نشان داد که نسبت به غلظت اولیه‌ی ریز جلبک بالاتر بود. به این ترتیب، عملکرد ریز



شکل ۳: میزان آمونیاک اندازه‌گیری شده در طول آزمایش در غلظت‌های مختلف P_۱ و P_۲

جدول ۱ نشان می‌دهد بیشترین و کمترین درصد جذب نیترات، فسفات، آمونیاک به ترتیب (۹۵/۶۲، ۵۸/۳۶، ۹۱/۰۳ درصد) و (۶۹/۲۴، ۴۴/۷۵، ۶۳/۸۸ درصد) مربوط به تیمارهای P_۱ ۲۵٪ و P_۱ ۷۵٪ می‌باشد. همچنین بین درصد جذب نیترات، فسفات، آمونیاک تفاوت معنی‌داری (p < 0/05) وجود دارد. در همین راستا جدول ۲ نیز نشان می‌دهد بیشترین و کمترین درصد جذب نیترات، فسفات، آمونیاک به ترتیب (۹۸/۰۳، ۷۳/۱۴، ۹۷/۴۴ درصد) و (۵۸/۰۲، ۷۵/۶۱، ۵۶/۲۶ درصد) مربوط به تیمارهای P_۲ ۲۵٪ و P_۲ ۷۵٪ می‌باشد و بین درصد جذب نیترات، فسفات، آمونیاک تفاوت معنی‌داری (p < 0/05) وجود دارد.

گزارش شد که درصد حذف نیترات در مطالعه‌ی ما نیز بالای ۹۰٪ بود.

یکی از فاکتورهای موثر در زمینه ارزیابی کارایی ریز جلبک‌های مختلف در بهبود کیفیت پساب میزان فسفات در آب است (پیریگی و همکاران، ۱۳۹۶). فسفات شکل اصلی فسفر در پساب می‌باشد (Duenas Ruiz et al., 2003; et al., 2003). بیشترین جذب فسفات در غلظت اولیه (۰/۰۵ گرم بر لیتر) در تیمارهای مربوط به پساب برابر با ۵۸/۳۶٪ در رقت ۲۵٪ می‌باشد و کم‌ترین درصد جذب نیز، ۴۴/۷۵٪ بود که در رقت ۷۵٪ مشاهده شد. علاوه بر این در غلظت ثانویه‌ی ریز جلبک نیز، شرایط به همین ترتیب بوده و حداکثر جذب فسفات در پساب به ترتیب در رقت ۲۵٪ برابر با ۷۳٪/۱۴ و حداقل مقدار آن نیز در رقت ۷۵٪ برابر با ۵۶٪/۲۶ گزارش شد. به این ترتیب همانند نیترات، درصد حذف فسفات در تیمارهای رقیق‌تر کم‌تر گزارش شد که می‌تواند به علت مقادیر پایین‌تر مواد مغذی در این رقت‌ها باشد. Brar و همکاران (۲۰۱۹) درصد حذف فسفات را در پساب لبنی در سه جلبک *Chlorella*، *Anabaena ambigua*، *pyrenoidosa* و *Scenedesmus abundans* به ترتیب برابر با ۷۹/۰۲٪، ۸۳٪/۸۷، ۸۶٪/۵۱ و ۸۶٪/۵۱ گزارش کردند که در این بررسی با افزایش درصد پساب لبنی کارایی حذف فسفات افزایش یافت که مشابه این روند در مطالعه‌ی ما نیز مشاهده شد. Sandeep و همکاران (۲۰۱۵) میزان حذف فسفات در محیط کشت آب دریا به وسیله *S. platensis* را ۶۰٪ بیان کردند و هم‌چنین Cheunbarn و همکاران (۲۰۱۰) نیز، این میزان را در تصفیه‌ی پساب خوکی با *S. platensis* ۶۷٪ اعلام کردند که تقریباً در راستای نتایج مطالعه‌ی حاضر بود. Kulkarni و همکاران (۲۰۱۶) در

جلبک *S. platensis* در حذف نیترات در رقت‌های پایین‌تر بهتر گزارش شد که این مهم می‌تواند به علت شرایط مناسب‌تر رشد در رقت‌های پایین‌تر به دلیل میزان مواد مغذی بیشتر در محیط کشت باشد. هم‌چنین نکته‌ی قابل‌توجه این است که در این رقت (۲۵٪)، میزان نیترات تقریباً نزدیک به صفر شد. احتمالاً با وجود کاهش درصد رقیق‌سازی و به دنبال آن کاهش میزان نفوذ نور، نور کافی جهت فتوسنتز ریز جلبک اسپروولینا در طول دوره فراهم بوده و میزان مواد مغذی موجود در پساب نقش مهم‌تری داشته است. در همین راستا Kothari و همکاران (۲۰۱۳) باهدف تولید بیودیزل و حذف مواد مغذی با کشت جلبک *Chlamydomonas polypyrenoides* در پساب لبنی ۷۵٪ با بالاترین میزان پساب نسبت به سایر تیمارها، در طی ۱۰ روز سطح نیترات را تا ۹۰٪ کاهش دادند در واقع به نظر می‌رسد در این تحقیق نیز مشابه نتایج ما با افزایش میزان پساب لبنی کارایی حذف نیترات افزایش یافته است. Hena و همکاران (۲۰۱۵) در تحقیق خود درصد حذف نیترات در پساب لبنی به وسیله‌ی کنسرسیون جلبکی را تا ۹۹/۴٪ گزارش کردند که با مطالعه حاضر مطابقت دارد. Saraf و Khemka (۲۰۱۷) در مطالعه‌ی خود پتانسیل سیانوباکتری *Desertifilum tharense* را جهت تصفیه‌ی پساب‌های لبنی و غنی‌سازی زیست‌توده مورد مطالعه قرار داده و گزارش کردند سطح نیترات ۹۴٪ کاهش یافته است. هم‌چنین میزان کاهش نیتروژن پساب لبنی توسط گونه‌های جلبکی *Phormidium*، *Oscillatoria* و *Consortium* در تحقیق Jayesh و همکاران (۲۰۱۸) بعد از ۱۸ روز به ترتیب برابر با ۸۶٪ و ۹۴٪ و ۹۰/۶۶٪

بالاتر می‌شود. Qin و همکاران (۲۰۱۵) به کشت کنسرسیوم جلبکی در پساب لبنی به منظور ارتقا پتانسیل حذف مواد مغذی و تولید بیودیزل پرداخته و گزارش کردند در مدت چهار روز درصد حذف آمونیاک تقریباً به ۱۰۰٪ رسید. Olguin و همکاران (۲۰۰۳) با کشت ریز جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس در پساب خوکی میزان آمونیاک را بین ۹۶٪-۸۴٪ کاهش دادند که تقریباً هم سو با مطالعه‌ی حاضر اعلام شد. Chang و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که *S. platensis* میزان آمونیاک را تا ۹۷٪ در ادرار کاهش داد. Sandeep و همکاران (۲۰۱۵) مقادیر حذف آمونیاک در محیط‌های مبتنی بر آب دریا توسط اسپیرولینا پلاتنسیس را ۱۰-۲۰٪ اعلام کردند که بسیار کم‌تر از حداقل میزان حذف آمونیاک در این تحقیق بود.

حداکثر مقدار زیتوده در غلظت اولیه و ثانویه ریز جلبک در رقت ۲۵٪ در پساب، به ترتیب برابر با $0/01 \pm 45/01$ و $0/92 \pm 0/01$ گرم بر لیتر گزارش شد. Celekli و همکاران (۲۰۱۶) در مدت‌زمان ۱۵ روز به پرورش *S. platensis* در پساب گاوی با سدیم نترات و نمک پرداخته و میزان زیتوده را برابر با $0/06 \pm 0/99$ گرم بر لیتر گزارش کردند که در راستای تحقیق ما بود. میزان زیتوده در روز اول در غلظت اولیه و ثانویه پساب، در تمامی تیمارها تفاوت معنی‌داری نشان نداده و از روز سوم شروع به افزایش معنی‌دار نمود که تا اواسط دوره ادامه داشت و در اواخر مطالعه تقریباً ثابت شد. در همین راستا تحقیقات Zhou و همکاران در سال ۲۰۱۷ بر روی پتانسیل ریز جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس در تصفیه پساب آب‌شور که به صورت مخلوطی از آب دریا با آب شیرین در نسبت‌های ۷:۳ و ۵:۵ آماده‌سازی شده بود، یک‌روند تقریباً مشابه با نتایج ما به‌خصوص

مطالعه‌ی خود بیان کردند که حداکثر درصد حذف فسفات بعد از تصفیه‌ی ریز جلبک *S. platensis* ۹۵/۶۷٪ در غلظت ۷/۵٪ پساب لبنی و حداقل مقدار آن ۷۸/۴۶٪ در غلظت ۱٪ این پساب مشاهده شد که با نتایج مطالعه‌ی حاضر مغایرت داشت. به این صورت که بیش‌ترین درصد حذف فسفات در مطالعه‌ی ما برابر با ۷۳/۱۴٪ بود که نزدیک به کم‌ترین میزان حذف در این مطالعه بود.

حذف نیتروژن آمونیاکی می‌تواند تا حدودی ناشی از جذب جلبک‌ها باشد (Li et al., 2011). در بررسی‌های انجام‌شده، در غلظت اولیه‌ی ریز جلبک (۰/۰۵ گرم بر لیتر) در تیمار P_۱ ۲۵٪ فرآیند حذف آمونیاک بالاتر از نود درصد بوده و این مقدار با ۹۱/۰۳٪ بالاترین کارایی حذف آمونیاک را نشان داد. هم‌چنین در غلظت ثانویه‌ی ریز جلبک (۰/۱ گرم بر لیتر) نیز، تیمار P_۲ ۲۵٪ به ترتیب با ۹۷/۴۴٪ بیش‌ترین و تیمار P_۳ ۷۵٪ با ۶۵/۱۲٪ کم‌ترین میزان حذف آمونیاک را داشته که همانند غلظت اولیه (۰/۰۵ گرم بر لیتر)، با کاهش رقیق‌سازی میزان کارایی حذف آمونیاک افزایش‌یافته است اگرچه غلظت ثانویه‌ی (۰/۱ گرم بر لیتر) ریز جلبک نسبت به غلظت اولیه (۰/۰۵ گرم بر لیتر)، مؤثرتر عمل کرده در واقع می‌توان چنین نتیجه گرفت که افزایش زیتوده ریز جلبک می‌تواند نقش مؤثری در فرایند حذف آمونیاک داشته باشد که این روند کم‌وبیش در مورد نترات و فسفات نیز مشاهده شد که در واقع بیانگر وجود یک ارتباط بین میزان مصرف مواد مغذی و افزایش زیتوده ریز جلبک‌ها می‌باشد. در همین راستا Prajapati و همکاران در تحقیقات خود (۲۰۱۳) بیان کردند غلظت بالاتر مواد مغذی منجر به رشد ریز جلبک‌ها در یک پتانسیل رشد

(۱۳۹۵) بیان کردند جلبک کلرلا وولگاریس در تیمار- های مختلف غنی از مواد مغذی نیتروژن دار و فسفردار رشد کرده و باتوجه به میزان بقای بالا و رشد مناسب، این گونه نیروی بالقوه مناسبی برای تصفیه زیستی پساب دارد. در مجموع می توان چنین نتیجه گرفت که ریز جلبک *S. platensis* قادر به حذف (نیترات، فسفات، آمونیاک) از پساب صنایع لبنی می باشد به این ترتیب این ریز جلبک می تواند با موفقیت در پساب لبنی رشد کرده و جهت کشت ریز جلبک مورد استفاده قرار گیرد. هم چنین، مقادیر بالاتر ریز جلبک ابتدایی سب عملکرد بهتر کارایی حذف شده که در همین راستا میزان زیتوده و حذف مواد مغذی در غلظت ثانویه ریز جلبک (۰/۱ گرم بر لیتر) *S. platensis* نسبت به غلظت اولیه (۰/۰۵ گرم بر لیتر) آن بیش تر صورت گرفت. حداکثر درصد جذب فسفات، آمونیاک و نیترات نیز در هر دو غلظت ریز جلبک (۰/۱ و ۰/۰۵ گرم بر لیتر) در رقت ۲۵٪ با بالاترین میزان پساب لبنی صورت گرفته است.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه با عنوان تصفیه پساب و فاضلاب صنایع لبنی با استفاده از ریز جلبک *Spirulina platensis* و تولید پروتئین و اسید آمینه حاصل از آن در مقطع دکترا می باشد که با حمایت دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان اجرا شده است.

منابع

۱. ابوالحسنی، م. ه.، حسینی، س. ع.، قربانی، ر.، وینسه، ا.، ۱۳۹۵. امکان سنجی تولید زیست توده و

در تیمار ۲۵٪ P_2 نشان داد. به این صورت که ریز جلبک *S. platensis* در دو روز اول در فاز تأخیری (Lag Phase) به سر برده و سپس نرخ رشد معنی داری را از خود بروز داده و رشد سلولها تا روز دهم ادامه پیدا کرد و سپس در این نقطه به فاز ساکن (Stationary Phase) رسید. هم چنین میزان زیتوده نهایی در این دو نسبت ۳:۷ و ۵:۵ پساب به ترتیب برابر با ۰/۷۴ و ۰/۸۱ گرم بر لیتر بیان شد که تقریباً مشابه با حداکثر میزان زیتوده در پساب بود. در مجموع در غلظت ثانویه نیز روند کلی مشابه غلظت اولیه بود با این تفاوت که تقریباً در تمامی تیمارها، زیتوده در غلظت ثانویه مقادیر بسیار بیش تری نسبت به غلظت اولیه نشان داد که می تواند بیانگر ارتباطی قوی بین غلظت ابتدایی تزریقی و زیتوده نهایی ریز جلبک مورد نظر باشد به این صورت که با افزایش غلظت ابتدایی ریز جلبک، جذب مواد مغذی در پساب های مختلف و به دنبال آن میزان زیتوده نهایی افزایش می یابد (Shen et al., 2017). Pham و همکاران (۲۰۲۰) باهدف بررسی کارایی حذف مواد مغذی از فاضلاب کود گیاهی، غلظت های ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۶۰ میلی گرم بر لیتر جلبک سندسموس را به عنوان زیتوده ابتدایی مورد مطالعه قرار داده و به دنبال آن غلظت ۶۰ میلی گرم بر لیتر این ریز جلبک را به عنوان بهترین تیمار معرفی کردند. در واقع این محققان در یک نتیجه گیری کلی بیان کردند که در راستای مطالعات پیشین صورت گرفته با افزایش زیتوده ابتدایی ریز جلبک، جذب مواد مغذی در فاضلاب های مختلف افزایش می یابد. در این تحقیق نیز، با افزایش زیتوده ابتدایی ریز جلبک از ۰/۰۵ به ۰/۱ گرم بر لیتر، جذب مواد مغذی (نیترات، فسفات، آمونیاک) در پساب لبنی افزایش یافته است. هم چنین ابوالحسنی و همکاران

- Microbiology and Biotechnology, 20(3), 609-614.
10. Chang, Y., Wu, Z., Bian, L., Feng, D., Leung, D.Y.C., 2013. Cultivation of *Spirulina platensis* for biomass production and nutrient removal from synthetic human urine. *Applied Energy*, 102, 427-431.
 11. Cheunbarn, S., Peerapornpisal, Y., 2010. Cultivation of *Spirulina platensis* using anaerobically swine wastewater treatment effluent. *International Journal of Agriculture and Biology*, 12(4), 586-590.
 12. Chisti, Y., 2008. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology*, 26(3), 126-131.
 13. Chuntapa, B., Powtongsook, S., Menasveta, P., 2003. Water quality control using *Spirulina platensis* in shrimp culture tanks. *Aquaculture*, 220(1-4), 355-366.
 14. Costa, J.A.V., Colla, L.M., Duarte, P.F., 2004. Improving *Spirulina platensis* biomass yield using a fed-batch process. *Bioresource Technology*, 92(3), 237-241.
 15. Duenas, J.F., Alonso, J.R., Rey, A.F., Ferrer, A.S., 2003. Characterisation of phosphorous forms in waste water treatment plants. *Journal of Hazardous Materials*, 97(1-3), 193-205.
 16. Ebrahimian, A., Kariminia, H.R., Vosoughi, M., 2014. Lipid production in mixotrophic Cultivation of *Chlorella vulgaris* in a mixture of primar and secondary municipal wastewater. *Elsevier Renewable. Energy*, 71, 502-508.
 17. El-Kassas, H.Y., Heneash, A.M.M., Hussein, N.R., 2015. Cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* using confectionary wastes for aquaculture feeding. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 13(2), 145-155.
 18. Gao, f., Yang, Z.H., Li, C., Wang, Y.J., Jin, W.H., Deng, Y.B., 2014. Concentrated microalgae cultivation in treated sewage by membrane photobioreactor operated in batch flow mode. *Bioresource Technology*, 167, 441-446.
 19. Gasperi, J., Cladiere, M., Rocher, V., Moilleron, R., 2009. Combined Sewer Over flow Quality and EU Water Framework Directive. *Urban waters*, 1, 124-128.
- حذف فسفات و نیترات از پساب شهری به وسیله کشت جلبک کلرلا وولگاریس (*Chlorella vulgaris*)، نشریه توسعه آبی‌زی پروری، ۱۰(۲)، ۸-۱۰.
۲. پیریگی، ع.، حسینی، س.ع.، قربانی، ر.، رضائی، ح.، وینسه، ا.، ۱۳۹۶. استفاده از سیستم کشت پیوسته ریز جلبک *Scenedesmus obliquus* جهت تصفیه زیستی فاضلاب شهری. نشریه توسعه آبی‌زی- پروری، ۱۱(۴)، ۱۳-۲۷.
۳. حسین زاده، خ.، خناری، گ.ع.، جعفری، س.م.، ۱۳۹۳. بررسی تأثیر غنی‌سازی آب حوضه جنوبی دریای خزر بر پارامترهای رشد ریز جلبک *Spirulina platensis*. فصلنامه تغذیه و بیوشیمی آبزیان، ۱(۱)، ۷۱-۸۱.
4. Ahn, Y.H., 2006. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: a review. *Process Biochemistry*, 41(8), 1709-1721.
 5. Aslan, S., Kapdan, I.K., 2006. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecological Engineering*, 28(1), 64-70.
 6. Brar, A., Kumar, M., Pareek, N., 2019. Comparative appraisal of biomass production, remediation, and bioenergy generation potential of microalgae in dairy wastewater. *Frontiers in Microbiology*, 10, 678.
 7. Canada, G., 2010. proposed wastewater systems effluent regulations. *Regulatory Impact Analysis Statement*, 144, 12.
 8. Celekli, A., Topyurek, A., Markou, G., Bozkurt, H., 2016. A multivariate approach to evaluate biomass production, biochemical composition and stress compounds of *Spirulina platensis* cultivated in wastewater. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 180(4), 728-739.
 9. Chaiklahan, R., Chirasuwan, N., Siangdung, W., Paithoonrangarid, K., Bunnag, B., 2010. Cultivation of *Spirulina platensis* using pig wastewater in a semicontinuous process. *Journal*

28. Nur, M.M.A., Buma, A.G.J., 2018. Opportunities and challenges of microalgal cultivation on wastewater, with special focus on palm oil mill effluent and the production of high value compounds. *Waste and Biomass Valorization*, 10 (8), 2079-2097.
29. Nurdogan, Y., Oswald, W.J., 1995. Enhanced nutrient removal in high-rate ponds. *Water Science Technology*, 31(12), 33-43.
30. Olguin, E.J., Galicia, S., Camacho, R., Mercado, G., Perez, T., 1997. Production of *Spirulina* sp. in sea water supplemented with anaerobic effluents in outdoor raceways under temperate climatic conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48(2), 242-247.
31. Olguin, E.J., Galicia, S., Mercado, G., Perez, T., 2003. Annual productivity of *Spirulina* (*Arthrospira*) and nutrient removal in a pig wastewater recycling process under tropical conditions. *Journal of Applied Phycology*, 15(2-3), 249-257.
32. Oswald, W.J., 2003. My sixty years in applied algology. *Journal of Applied Phycology*, 15(2), 99-106.
33. Phang, S.M., Miah, M.S., Yeoh, B.G., Hashim, M.A., 2000. *Spirulina* cultivation in digested sago starch factory wastewater. *Journal of Applied Phycology*, 12(3-5), 395-400.
34. Pham, T.L., Bui, M.H., 2020. Removal of nutrients from fertilizer plant wastewater using *Scenedesmus* sp.: Formation of Bioflocculation and Enhancement of Removal Efficiency. *Journal of Chemistry*, 1-9.
35. Prajapati, S.K., Kaushik, P., Malik, A., Vijay, V.K., 2013. Phycoremediation and biogas potential of native algal isolates from soil and wastewater. *Bioresource Technology*, 135: 232-238.
36. Qin, L., Wang, Z., sun, Q., Feng, P., Zhu, L., Xu, J., Yuan, Z., 2016. Microalgae consortia cultivation in dairy wastewater to improve the potential of nutrient removal and biodiesel feedstock production. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(9), 1-9.
20. Han, L., Pei, H., Hu, W., Jiang, L., Ma, G., Zhang, S., Han, F., 2015. Integrated campus sewage treatment and biomass production by *Scenedesmus quadricauda* SDEC-13. *Bioresource Technology*, 175(1-3), 262-268.
21. Hena, S., Fatimah, S., Tabassum, S., 2015. Cultivation of algae consortium in a dairy farm wastewater for biodiesel production. *Water Resources and Industry*, 10, 1-4.
22. Jayesh, H., Kabariya and Vimal M, Ramani., 2018, Dairy wastewater treatment by cyanobacteria for removal of nutrients with extraction of high value compounds from biomass, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7:1527-1538.
23. Khemka, A., Saraf, M., 2017. Strategic enhancement of *Desertifilum tharensis* MSAK01 on dairy wastewater: An integrated approach for remediation and biomass production. *Applied Water Science*, 1-7.
24. Kothari, R., Prasad, R., Kumar, V., Singh, D.P., 2013, Production of biodiesel from microalgae *Chlamydomonas polypyrenoideum* grown on dairy industry wastewater. *Bioresource Technology*, 144, 499-503.
25. Kulkarni, S.D., Auti, T., Saraf, S., 2016. Bioremediation study of dairy effluent by using *Spirulina platensis*. *Research Journal of Life Sciences Bioinformatics Pharmaceutical and Chemical Sciences*, 1, 317.
26. Li, Y., Chen, Y.F., Chen, P., Min, M., Zhou, W., Martinez, B., Zhu, J., Ruan, R., 2011. Characterization of a microalga *Chlorella* sp. Well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. *Bioresource Technology*, 102(8), 5138-5144.
27. Manirafasha, E., Murwanashyaka, T., Ndikubwimana, T., Rashid Ahmed, N., Liu, J., Lu, Y., Zeng, X., Ling, X., Jing, K., 2018. Enhancement of cell growth and phycocyanin production in *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* by metabolic stress and nitrate fed-batch. *Bioresource Technology*, 255, 293-301.

37. Rajkumar, R., Takriff, M. S., 2015. Nutrient Removal from Anaerobically Treated Palm Oil Mill Effluent by *Spirulina Platensis* and *Scenedesmus Dimorphus*. Der Pharmacia Lettre, 7(7), 416–421.
38. Ramjeawon, T., 2000. Cleaner Production in Mauritian Cane-sugar factories. Journal of Cleaner Production, 8(6), 503–510.
39. Ruiz, G., Jeison, D., Chamy, R., 2003. Nitrification with high nitrite accumulation for the treatment of wastewater with high ammonia concentration. Water Research, 37(6), 1371-1377.
40. Sandeep, B.P.S., Virmani, M., Malik, R.K, Gyan, S., 2015. Effect of vitamin e on the seminal and biochemical parameters of Murrah buffalo bull semen during different stages of freezing. Veterinary Practitioner, 16 (1), 33-35.
41. Shen, Y., Gao, J., Li, L., 2017. Municipal wastewater treatment via coimmobilized microalgal-bacterial symbiosis: microorganism growth and nutrients removal, Bioresource Technology, 243, 905–913.
42. Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., sambert, A., 2006. Commercial applications of microalgae. Journal of Bioscience and Bioengineering, 101(2), 87–96.
43. Wang, S., Wang, X., Poon, K., Wang, Y., Li, S., Liu, H., Lin, S., Cai, Z., 2013. Removal and reductive dechlorination of triclosan by *Chlorella pyrenoidosa*. Chemosphere, 92(11), 1498–1505.
44. Wuang, S.C., Khin, M.C., Qlang, P., Chua, D., Luo, Y.D., 2016. Use of Spirulina biomass produced from treatment of aquaculture wastewater as agricultural fertilizers. Algal Research, 15, 59-24.
45. Zhu, L., Wang, Z., Shu, Q., Takala, J., Hiltunen, E., Feng, P., Yuan, Z., 2013. Nutrient removal and biodiesel production by integration of freshwater algae cultivation with piggery wastewater treatment. Water Research, 47(13), 4294–4302.
46. Zhou, W., Li, Y., Gao, Y., Zhao, H., 2017. Nutrients removal and recovery from saline wastewater by *Spirulina platensis*. Bioresource Technology, 245(1), 10-17.