

# تأثیر نانوماده آمینوکلئینیزیم (MgAC) بر رشد ریز جلبک بومی *Chlorella Sorokiniana pa.91* در محیط کشت فاضلاب شهر ساری

معصومه پنبه کار بیشه<sup>۱</sup> حسن امینی راد<sup>۲\*</sup>

۱. دانشجوی دکتری تخصصی عمران و محیط زیست، دانشکده عمران و محیط زیست، دانشگاه صنعتی

نوشیروانی بابل

۲. استادیار دانشکده عمران و محیط زیست، دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل

h.a.rad@nit.ac.ir<sup>۲</sup>

تاریخ پذیرش ۱۴۰۱/۰۳/۲۵

تاریخ دریافت ۱۴۰۰/۱۲/۰۸

## چکیده

کشت ریز جلبک به دلیل توده زیستی بالا، تولید چربی، حذف کربن، کشت در اراضی غیرقابل استفاده و طیف گسترده‌ای از محصولات نهایی مورد توجه قرار گرفته است و تحقیق در خصوص افزایش بهره‌وری و کاهش هزینه‌ها، تجاری‌سازی موجب تسهیل کشت این موجودات می‌شود. امروزه به دلیل هزینه بالای سنتز محیط کشت در مقیاس صنعتی از فاضلاب به عنوان محیط کشت ارزان و قابل دسترس استفاده شده و همچنین تصفیه فاضلاب و تولید بیودیزل از مزیت‌های دیگر این سیستم است. هدف این پژوهش بهینه‌سازی رشد و کیفیت زیست‌توده ریز جلبک بومی کلرلا سوروکینیانبا با استفاده از نانو ماده آمینوکلئینیزیم در محیط کشت فاضلاب شهر ساری بود. در این تحقیق تجربی با بهره‌گیری از روش پاسخ سطح - طراحی مرکزی<sup>۱</sup> (RSM-CCD) تأثیر سه فاکتور دما، شدت نور و غلظت نانو ماده بر وزن خشک زیست‌توده، نرخ رشد مخصوص، مقادیر کلروفیل و کارتنوئید در محیط کشت فاضلاب در ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت خاموشی مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز نتایج نشان از افزایش وزن خشک زیست‌توده، نرخ رشد مخصوص، کلروفیل و کارتنوئید به ترتیب معادل ۴۷/۱۳، ۳۰/۲۶، ۸۱/۳۳ و ۳۶/۴۷ درصد در شرایط بهینه دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد، شدت تابش ۲۰۰۰ لوکس و مقدار ۰/۰۵ گرم در لیتر نانو ماده آمینوکلئینیزیم نسبت به نمونه شاهد حاصل شد. همچنین به منظور قابلیت اجرایی بودن پژوهش حاضر شرایط آزمایش در فاضلاب واقعی انجام شد.

**واژگان کلیدی:** کلرلا سوروکینیانبا، فاضلاب شهری، نانو ماده آمینوکلئینیزیم، RSM-CCD

## ۱. مقدمه

۲۰۳۰ در سطح جهان ۴۰ درصد کمبود آب وجود خواهد داشت [2]. روش‌های معمول تصفیه فاضلاب (فیلترچکنده و لجن فعال) با صرف انرژی بالا برای تصفیه بار آلی طراحی شده است. بنابراین نیازمند یک روش مقرون به صرفه باهدف

آب یکی از منابع مهم در زمین است اما فعالیت‌های بشر موجب افزایش آلودگی‌های شیمیایی و بیولوژیکی در سیستم آب و محیط‌زیست شده است [1]. پیش‌بینی می‌شود در سال

1. Response surface methodology-central composite design

تصفیه مؤثر، انتشار کم کربن و بهینه‌سازی بازیابی منابع هستیم [1].

کشت ریزجلبک‌ها به سبب نیاز کمتر به آب، امکان استفاده از زمین‌های غیرمزروعی، عدم مداخله در تولید غذا، داشتن نرخ رشد نمایی بالا، تولید چربی، حذف کربن، عدم نیاز به کاربرد سموم، قابلیت کشت در تمام طول سال و بهره‌وری بالا مورد توجه بسیاری از پژوهش‌ها قرار گرفته است [3]. ریزجلبک‌ها از پلی‌ساکاریدها، پروتئین‌ها، لیپیدها، اسیدهای نوکلئیک و رنگدانه‌ها تشکیل شده‌اند و به آنها امکان می‌دهد به عنوان خوراک اولیه برای انواع محصولات نهایی اعم از مواد مغذی، دارویی، مواد آرایشی و سوخت‌های زیستی استفاده شوند [4]. پتانسیل تجزیه‌زیستی ریزجلبک از فاضلاب برای اولین بار توسط Oswald و Golueke در سال ۱۹۵۰ پیشنهاد شده است. ریزجلبک می‌تواند نور فراوان خورشید را که روی سطح فاضلاب می‌افتد به عنوان منبع انرژی برای رشد و به طور هم‌زمان حذف آلاینده (نیترژن، فسفر، ترکیبات دارویی و آفت‌کش‌ها و کاهش دی‌اکسیدکربن) مورد استفاده قرار دهد. پساب‌های لبنی و فاضلاب شهری به عنوان محیط کشت مناسب میکسوتروفیک ریزجلبک بوده و موجب تولید چربی برای سنتز بیودیزل می‌شوند [5]. در فرآیندهای لجن فعال موجود معمولاً انرژی تولید اکسیژن  $1 \text{ kWh/kg}$  اکسیژن مورد نیاز بیوشیمیایی (BOD) لازم است. برای تولید ۱ کیلو زیست توده ریزجلبک باید  $1/83$  کیلوگرم دی‌اکسیدکربن مصرف شود و کشت ریزجلبک در فاضلاب نیاز به تامین اکسیژن ندارد و در عوض زیست توده ریزجلبک در هاضم بی‌هوایی  $1 \text{ kWh/kg}$  BOD تولید می‌کند. بنابراین قابلیت رشد، جذب و شرایط سمی مقاوم ریزجلبک در فاضلاب آن را یک ارگانیزم همه‌کاره برای انواع مختلف تصفیه فاضلاب در صنایع مختلف و کشاورزی تبدیل کرده است [6].

انواع محیط کشت Zarrrouk, F/2, WC, BBM, BG11 و غیره برای کشت ریزجلبک مورد استفاده قرار می‌گیرد. امروزه به دلیل هزینه بالای سنتز محیط کشت در مقیاس صنعتی از فاضلاب به عنوان محیط کشت ارزان و قابل دسترس استفاده می‌شود [7]. بسیاری از مطالعات نشان می‌دهد تولید بیودیزل

توسط ریزجلبک‌ها می‌تواند با تصفیه فاضلاب شهری همراه باشد. تولید بیودیزل از ریزجلبک همراه با تصفیه فاضلاب می‌تواند از نظر زیست‌محیطی مقرون به صرفه و سودآورتر باشد. ریزجلبک‌ها برای تصفیه فاضلاب دارای مزیت‌هایی مانند حذف مواد مغذی، سازگاری با انواع مختلف فاضلاب و آب و هوای محلی و همچنین سرعت رشد بالا هستند همچنین کشت ریزجلبک در فاضلاب می‌تواند آثار تخلیه فاضلاب را کاهش داده و چندین آلاینده را از بین برده و موجب حذف مواد مغذی شود [8].

در سال‌های اخیر کاربرد مواد در مقیاس نانویی در افزایش رشد ریزجلبک‌ها به دلیل سطح ویژه بالای ذرات، قدرت جذب منحصر به فرد نور و خاصیت الکتریکی به طور ویژه‌ای مورد توجه قرار گرفته است. از نانومواد فلزی در مقادیر مختلف به عنوان مکمل غذایی سلول‌های ریزجلبک برای بهبود رشد و تولید چربی استفاده شده است. به طور کلی محیط‌های کشت ریزجلبک دارای مواد معدنی مانند کلسیم و فسفر هستند اما مقدار آنها برای رشد ریزجلبک کافی نیستند. با اضافه کردن نانومواد به فاضلاب کمبود مواد مغذی جبران می‌شود. همچنین نانومواد موجود در محیط کشت را می‌توان به عنوان رقبای جذب مواد مغذی در نظر گرفت و باعث تحریک جذب سریع مواد مغذی در ریزجلبک‌ها و در نهایت تجمع چربی می‌شود. به عنوان نمونه نانوذرات  $\text{TiO}_2$  ممکن است مواد مغذی مانند Zn و P را جذب کند که دسترسی آنها را توسط ریزجلبک محدود می‌کند. از مزایای دیگر استفاده از نانومواد، خواص ضد باکتریایی آنها است و از رشد جمعیت میکروبی و قارچی به عنوان رقبای تغذیه‌ای ریزجلبک‌ها جلوگیری می‌کند [5].

در دهه گذشته به دلیل افزایش پدیده صنعتی شدن و شهرنشینی تقاضای زیادی برای تولید گسترده نانومواد شده است در مواجهه با محدودیت‌های مختلف فناوری تجاری‌سازی سوخت‌های زیستی بر مبنای ریزجلبک استفاده از مهندسی نانومواد به عنوان یکی از راه‌حل‌های پیشنهادی مشکلات مربوط به هر یک از فرآیندهای پایین دستی پیشنهاد شده است [9]. به تازگی استفاده از نانومواد به عنوان ابزاری بالقوه در تجاری‌سازی سوخت‌های زیستی مبتنی بر ریزجلبک‌ها پیشنهاد شده است.

ریز جلبک *Chlorella vulgaris* شدند [15]. Khanra و همکاران (۲۰۲۰) با استفاده از نانوماده تیتانیوم موجب افزایش ذخایر چربی در سه ریز جلبک *Scenedesmus sp.*, *Chlorococcum sp.* و *Euglena sp.* شدند [16]. Salehi و همکاران (۲۰۱۹) با استفاده از نانوماده ZnO موجب افزایش رشد در دو گونه ریز جلبک *Chlorella vulgaris* و *Dunaliella tertiolecta* شده و قادر به حذف ۸۰ تا ۱۰۰ درصد هیدروکربن از فاضلاب روغنی شدند [17].

با وجود بررسی اثر نانوماده بر ریز جلبک در تحقیقات گذشته هیچ گونه بررسی از لحاظ تاثیر شدت تابش نور و تغییرات دما به همراه افزودن نانوماده آمینوکلینیوم بر رشد این نوع ریز جلبک بومی *Chlorella sorokiniana pa.91* در محیط کشت فاضلاب خام نشده است. با توجه به اینکه در خصوص بهینه‌سازی شرایط کشت ریز جلبک‌ها، شرایط بهینه برای گونه‌های مختلف ریز جلبک‌ها می‌تواند متفاوت باشد، بنابراین در این پژوهش با بهره‌گیری از روش سطح پاسخ - طرح مرکب (RSM-CCD) به بررسی اثر سه فاکتور دما، میزان شدت تابش و غلظت آمینوکلینیوم در محیط کشت فاضلاب شهر ساری و روی کمیت و کیفیت زیست توده تولیدی ریز جلبک کلرلا سوروکینینا پرداخته شد و با به کارگیری اندرکنش غلظت آمینوکلینیوم در ارتقای بهره‌وری کلی فرآیند شد. بنابراین هدف پژوهش حاضر، بهینه‌سازی رشد و کیفیت زیست توده ریز جلبک کلرلا سوروکینینا با تغییر شرایط ذکر شده بود.

## ۲. مواد و روش

در پژوهش تجربی حاضر، نمونه ریز جلبک *Chlorella sorokiniana pa.91* استخراج شده از پساب تصفیه‌خانه لبنی گلا واقع در شهرک صنعتی آمل مورد استفاده قرار گرفت [11]. به منظور تهیه بانک، ریز جلبک کلرلا سوروکینینا در محیط مایع و در ارلن مایرهای ۲۵۰ میلی‌لیتری با حجم کاری ۱۰۰ میلی‌لیتر و درون شیکر انکوباتور (در دمای ۲۸°C و دور rpm ۱۲۰ و همچنین شدت نور وارد شده بر سطح ارلن مایرها توسط لامپ LED به طور متوسط برابر ۲۸۰۰ لوکس (معادل ۵۱/۸ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه و با دوره روشنایی - تاریکی ۱۲-

بازیافت مجدد نانومواد موجب کاهش هزینه‌های فرآیند تولید می‌شود [4]. از نانومواد ترکیب شده با آمینوکلینیوم برای افزایش بازده استخراج لیپید از طریق بی‌ثبات‌سازی دیواره‌های سلولی یا تولید رادیکال‌های هیدروکسیل برای اختلال در سلول استفاده می‌شود. از نانوکاتالیست‌های مختلف برای افزایش عملکرد برداشت و استخراج چربی استفاده شده است [10].

Vasistha و همکاران با افزودن نانومواد ZnO به محیط فاضلاب ته‌نشینی اولیه و ثانویه به مقدار زیست‌توده ۳/۴۳ گرم در لیتر و افزایش چربی ۳۶ درصد رسیدند. آنها همچنین کیفیت اسیدهای چرب استخراجی از ریز جلبک را بررسی و برای تولید بیودیزل مناسب دانستند. سرعت کاهش مواد مغذی پارامترهای اکسیژن شیمیایی (COD)، نیتروژن کل (TN)، فسفر کل (TP)، و کل کربن آلی (TOC) توسط ریز جلبک در PTW در مقایسه با STWW هنگامی که با ZnO - NPs تلفیق شد بالاتر بود [1].

ریز جلبک *Chlorella sorokiniana pa.91* در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و شدت نور بهینه ۷۵۰۰ لوکس در محیط کشت فاضلاب ته‌نشینی اولیه و ثانویه به ترتیب نرخ رشد  $\frac{gr}{L.day}$  ۰/۲۳۳ و ۰/۱۸۵ اندازه‌گیری شد. همچنین راندمان حذف نیترات، فسفات، آمونیاک و COD بیش از ۸۰ درصد مشاهده شد [11]. ریز جلبک *Chlorella sorokiniana pa.91* در دما و شدت نور بهینه ۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۷۵۰۰ لوکس و مقدار sCOD با غلظت  $211/481 \text{ mgrL}^{-1}$  بیشترین زیست توده  $2/346 \text{ grL}^{-1}$  و همچنین میزان حذف نیترات و فسفات در این شرایط بیش از ۹۴ درصد مشاهده شد [12]. کیم و همکاران (۲۰۲۰) با مطالعه روی ریز جلبک *Microcystis.sp KW* و استفاده از نانوماده آمینوکلینیوم در راکتور به قطر ۵ و ارتفاع ۴۰ سانتی‌متر در محیط کشت BG11، شدت تابش ۵۴۰۰ لوکس (معادل ۱۰۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه) و در انکوباتور با سرعت ۱۲۵ دور بر دقیقه با دوره روشنایی به تاریکی ۱۲ به ۱۲ ساعت موجب افزایش ۲۰ درصدی زیست توده تولیدی شدند [13]. Eroglu و همکاران (۲۰۱۳) با استفاده از نانومواد نقره و طلا موجب افزایش بیش از ۳۰ درصد رشد ریز جلبک *Chlorella vulgaris* شدند [14]. Sarma و همکاران (۲۰۱۴) با استفاده از نانوماده  $\text{MgSO}_4$  موجب افزایش فتوسنتز و در نتیجه افزایش رشد

سنتز نانوماده آمینوکلکی منیزیم با روش سل - ژل انجام شد. سل - ژل را می‌توان متداول‌ترین روش تولید نانوذرات در فاز مایع با رویکرد پایین به بالا دانست؛ چراکه برای تولید نانوذرات با این روش نیاز به تجهیزات ویژه‌ای نیست و محصولات آن متنوع هستند. به منظور سنتز آمینوکلکی منیزیم (MgAC) ابتدا مقدار ۱/۶ گرم هگزا هیدرات کلرید منیزیم<sup>۱</sup> (MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O) به ۴۰ میلی‌لیتر اتانول در دمای اتاق اضافه شد و بعد از ده دقیقه مقدار ۲/۶ میلی‌لیتر آمینوپروپیل‌تری‌اتوکسی‌سیلان<sup>۲</sup> (APTES) به صورت قطره‌ای و آرام افزوده شد و به مدت ۸ ساعت هم‌زدن ادامه می‌یابد. سپس ژل مورد نظر در سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. بعد از دور ریختن سوپرناتانت، ماده مورد نظر دو بار توسط اتانول به منظور از بین رفتن کاتیون‌های اضافی فلزی شسته شد. در نهایت با قرار دادن نانو ماده در آون با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شبانه روز خشک شد. برای تایید لایه لایه شدن MgAC در آب، ۱۰ میلی‌گرم MgAC در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب به مدت ۵ دقیقه در حمام فراصوت قرار داده شد و بعد از حل شدن کامل ظاهر شفاف آن مشاهده شد و در نهایت در یخچال با دمای ۴ درجه سلسیوس ذخیره شد [13]. نانوماده سنتز شده با استفاده از تکنیک‌های اسپکتروسکوپی و میکروسکوپی شامل اسپکترومتر<sup>۳</sup> FT-IR، میکروسکوپ الکترونی روبشی<sup>۴</sup> (FE-SEM) و طیف سنجی پراش اشعه ایکس<sup>۵</sup> (XRD) مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام آنالیز FE-SEM و FT-IR نمونه ماده سنتز شده به آزمایشگاه بیم گستر تابان ارسال شد و آنالیز XRD توسط آزمایشگاه دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل با استفاده از دستگاه اشعه ایکس و مدل PW1730 (کمپانی PHILIPS) انجام شد.

## ۲-۱. طراحی آزمایش و آنالیز آماری :

به منظور بررسی آثار فصلی بر تولید زیست توده، در این پژوهش شرایط نور (شدت تابش) و دما مورد ارزیابی قرار گرفت. با توجه به اینکه دما و شدت تابش بهینه برای رشد ریزجلبک به ترتیب بین ۱۵ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۰۰۰ تا

۱۲ ساعت) کشت داده شد سپس در اواسط فاز لگاریتمی (بعد از یک هفته) محتویات ارلن‌ها به یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انتقال داده شد. به منظور بررسی پارامترهای مورد نظر ریزجلبک کلرلا سوروکینینا در محیط مایع و در ارلن مایه‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری با حجم کاری ۲۰۰ میلی‌لیتر در دما، نور، غلظت‌های مختلف نانوماده و توان هوادهی ۲۰۰ میلی‌لیتر بر دقیقه کشت داده شد (شکل ۱). محیط کشت ریزجلبک (فاضلاب شهری) قبل از تلقیح سوپه، ابتدا در اتوکلاو در دما ۱۲۱°C و به مدت ۱۵ دقیقه استریل شده و سپس برای حفظ شرایط استریل زیر هود آزمایشگاهی عمل تلقیح ۱۰٪ حجمی انجام شد.

شکل ۱. پایلوت کشت ریزجلبک

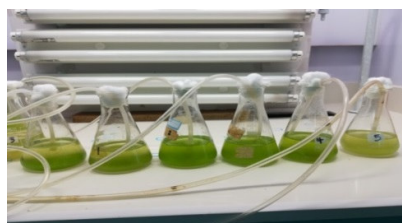


Fig. 1. The pilot for microalgae culture

مشخصات فاضلاب به عنوان محیط کشت ریزجلبک در جدول (۱) ارائه شده است. قبل از هر آزمایش، ذرات جامد موجود در فاضلاب با استفاده از سانتریفیوژ در ۳۵۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه از نمونه مورد نظر جدا شد.

جدول ۱. کیفیت جریان ورودی فاضلاب، واحد ته‌نشینی اولیه و ثانویه تصفیه خانه ساری

Parameter	Units	Entrance to the treatment plant	Preliminarily treated effluent	Secondary treated effluent
TSS	mgL <sup>-1</sup>	275	102	2
BOD5	mgL <sup>-1</sup>	205	136	58
COD	mgL <sup>-1</sup>	410	272	16
TN	mgL <sup>-1</sup>	35	35	0.8
TP	mgL <sup>-1</sup>	3	3	1.5
pH	-	7.8	7.8	8.1
Turbidity	FAU	112	102	7.6

Table 1- Quality of wastewater inlet flow, primary and secondary sedimentation unit of Sari treatment plant

4. Field emission - Scanning electron microscopy

5. X-ray Diffraction

1. Magnesium chloride hexahydrate

2. Aminopropyltriethoxysilane

3. Fourier Transform Infrared

(۱)

Y: نشان دهنده پاسخ مورد بررسی (نرخ رشد مخصوص، زمان دوبرابردن و راندمان حذف)  
 $C_0$ : جمله مستقل بیانگر میانگین نتایج آزمایشات  
 $C_1, C_2$  و  $C_3$ : نماینده ضریب خطی و بیانگر تاثیرگذاری هریک از پارامترها  
 $C_{12}, C_{13}$  و  $C_{23}$ : ضریب رگرسیون و بیانگر اندرکنش بین متغیرها  
 $C_{11}, C_{22}, C_{33}, C_{112}, C_{113}, C_{122}$  و  $C_{123}$ : نشان دهنده

ضرایب رگرسیون درجه دوم

L, T و N: به ترتیب نماینده فاکتورهای گذشته شدت تابش، دما و غلظت نانوماده هستند.

جدول ۳ مقادیر سه فاکتور شدت تابش نور، دما، و غلظت نانوماده آمینوکلینی منیزیم (MgAC) در تیمارهای مختلف را نشان می‌دهد.

## ۲-۲. روش‌های تحلیل و سنجش

سنجش شدت تابش به وسیله لوکس متر (Lutron) LX-103؛ تایوان) صورت گرفت. سنجش وزن خشک بر اساس قرائت یک روز در میان چگالی نوری در طول موج ۶۸۰ نانومتر دستگاه اسپکتروفتومتر (Analytin) AJS-1500، آلمان) و با استفاده از کالیبراسیون وزن خشک - جذب (رابطه ۲) انجام شد [11].

$$CDW = 1.824OD_{680} + 0.043, (R^2=0.9889) \quad (2)$$

۶۰۰۰ لوکس است مقادیر مناسب برای طراحی انتخاب شد [11]، [12]. با طراحی آزمایش RSM-CCD و منظورکردن آلفا معادل ۲ در نرم افزار Design Expert 11، مقادیر سه فاکتور دما، شدت تابش نور و غلظت نانوماده آمینوکلینی منیزیم (MgAC) در تیمارهای مختلف منظور شد (جدول ۲). در این طراحی نقطه مرکزی با ۵ بار تکرار (آزمایش‌های ۱، ۳، ۷، ۸، ۱۵ و ۱۸)، نقاط فاکتوریل (آزمایش‌های ۵، ۶، ۹، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۴ و ۱۹) و نقاط محوری (آزمایش‌های ۲، ۴، ۱۰، ۱۶، ۱۷ و ۲۰) مورد بررسی قرار گرفتند.

جدول ۲. حدود متغیرهای وابسته

Factors	Coded factor levels					
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$	
Temperature (°C)	X <sub>1</sub>	15	20	25	30	35
Light intensity ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	X <sub>2</sub>	1000	2000	3000	4000	5000
MgAC ( $\text{g L}^{-1}$ )	X <sub>3</sub>	0	0.05	0.1	0.15	0.2

Table 2. Levels and coded factors for optimal microalgae growth

به عنوان نمونه در آزمایش شماره ۲، مقادیر  $X_1 = 3000$  Lux،  $X_2 = 1500$  و  $X_3 = 0.1$  gr/lit به معنای شدت تابش ۳۰۰۰ لوکس (معادل ۵۵/۵ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه)، دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد و غلظت نانوماده آمینوکلینی منیزیم به مقدار ۰/۱ گرم در لیتر بود. در واقع این تیمار در طول مدت کشت پی در پی تحت هوادهی و سیکل روشنایی ۱۲ ساعت و ۱۲ تاریکی قرار داشت.

در مجموع مدت ۱۴ روزه کشت مانند همه تیمارها به صورت شبانه‌روزی هوادهی شد. با استفاده از رگرسیون خطی به صورت رابطه زیر (۱) و با تلاش برای برازش کمترین درجه چندجمله‌ای، پاسخ‌های مختلف مورد بررسی، مدل شدند:

$$Y = C_0 + C_1L + C_2T + C_3N + C_{12}LT + C_{13}LN + C_{23}TN + C_{11}L^2 + C_{22}T^2 + C_{33}N^2 + C_{123}LTN + C_{112}L^2T + C_{113}T^2N + C_{122}LT^2$$

جدول ۳. نتایج طراحی با استفاده از روش سطح پاسخ برای ریزجلبک *Chlorella sorokiniana* pa.91

No of Runs	Light (lux)	Temperature (°C)	MgAC (gL <sup>-1</sup> )	CDW <sub>14</sub> (mg/mlit)	Growth rate (day <sup>-1</sup> )	Chlorophyll (μgr/mlit)	Carotenoid (μgr/mlit)
1	3000	25	0.1	0.448444	0.178527	2.31716	0.830672
2	3000	15	0.1	0.314745	0.152946	2.15132	0.928695
3	3000	25	0.1	0.448444	0.178527	2.31716	0.830672
4	3000	25	0	0.165906	0.106314	0.3466	0.270766
5	4000	20	0.05	0.503894	0.186931	3.01296	1.00138
6	2000	20	0.05	0.326236	0.155542	1.98352	0.386604
7	3000	25	0.1	0.448444	0.178527	2.31716	0.830672
8	3000	25	0.1	0.448444	0.178527	2.31716	0.830672
9	2000	20	0.15	0.345753	0.159746	2.02248	0.277557
10	5000	25	0.1	0.461394	0.18058	2.85392	0.514067
11	4000	20	0.15	0.320764	0.154318	2.28464	0.955331
12	2000	30	0.05	0.486383	0.184382	2.79052	0.324844
13	4000	30	0.05	0.457564	0.179979	2.69516	0.652959
14	2000	30	0.15	0.394454	0.16927	2.31092	0.283799
15	3000	25	0.1	0.448444	0.178527	2.31716	0.830672
16	3000	35	0.1	0.370012	0.164649	2.35004	0.470351
17	3000	25	0.2	0.501705	0.186617	2.8904	0.685637
18	3000	25	0.1	0.448444	0.178527	2.31716	0.830672
19	4000	30	0.15	0.450815	0.178908	2.39436	1.02385
20	1000	25	0.1	0.310367	0.151931	1.90372	0.749776

Table 3. Designed experimental runs and its responses for *Chlorella sorokiniana* pa.91

خشک روز چهاردهم (CDW<sub>14</sub>)، میزان کلروفیل (Chl) و کارتنوئید (Car) صورت گرفت.

سرعت رشد ویژه ( $\mu, d^{-1}$ ) و مقادیر کلروفیل ( $\mu g/ml$ )، کارتنوئید ( $\mu g/ml$ ) با روش بیکر [15] و به کمک قرائت جذب نمونه آماده شده توسط اسپکتروفتومتر انجام شد (روابط ۳ تا ۶).

$$\mu = \ln(C_f/C_0) / (t_f - t_0) \quad (3)$$

$$Chl - a (\mu g/ml) = 16.72A_{660} - 9.16A_{650} \quad (4)$$

$$Chl - b (\mu g/ml) = 34.09A_{650} - 15.28A_{660} \quad (5)$$

$$Carotenoid (\mu g/ml) = (1000A_{470} - 1.63 Chla - 104.9Chlb) / 221 \quad (6)$$

$C_0$ : نشان دهنده غلظت اولیه زیست توده (گرم بر لیتر)

$C_f$ : نشان دهنده غلظت اولیه زیست توده (گرم بر لیتر)

$t_0$ : نشان دهنده زمان اولیه فاز رشد سلولی (روز)

$t_f$ : نشان دهنده زمان نهایی فاز رشد سلولی (روز)

$A_a$ : نشان دهنده جذب نمونه در طول موج مورد نظر

### ۳. یافته‌ها و بحث

#### ۳-۱. نتایج آنالیز نانوماده آمینوکلئول منیزیم

تصاویر تهیه شده توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی از نانومواد آمینوکلئول منیزیم (MgAC) با بزرگ‌نمایی ۲۰۰ نانومتر در شکل (۲) ارائه شده است و با استفاده از آن می‌توان مورفولوژی سطح و هندسه نانوذرات سنتز شده را مورد ارزیابی قرار داد. اندازه بیشتر ذرات تولیدی در محدوده ۶۰-۳۰ نانومتر مشاهده شد. با توجه به آزمایشات سایر پژوهشگران که در بسیاری از آن‌ها قطر نانوماده آمینوکلئول منیزیم در محدوده ۱۰۰-۳۰ نانومتر ذکر شده است [6, 17, 18]، اندازه نانوذرات در این تحقیق در محدوده مناسب‌تری قرار دارد. تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (FE-SEM) از آمینوکلئول منیزیم بیانگر مجموعه‌ای از ساختار لایه‌ای با ابعاد گسترش یافته میکرونی در

تجزیه و تحلیل داده‌ها برای بررسی تاثیر نانوماده آمینوکلئول بر زیست توده بر پاسخ‌های نرخ رشد مخصوص (SGR)، وزن

جهت مختلف را نشان می‌دهد. اندازه این لایه‌ها ۳۰ تا ۱۵۰ نانومتر با ضخامت ۲ تا ۴ نانومتر است و ممکن است به صورت تک یا چندین لایه وجود داشته باشد.

شکل ۲. تصاویر Fe-SEM از نانوماده آمینوکلئ منیزیم

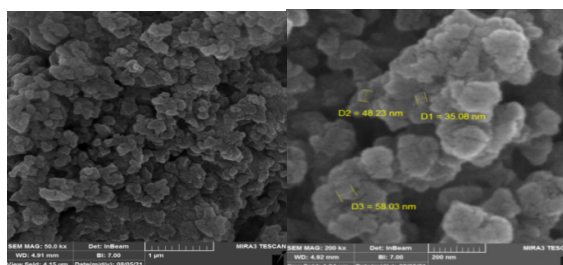


Fig. 2. Fe-SEM images of the magnesium aminoclay nanomaterial (MgAC)

FTIR تکنیکی شیمیایی است و برای شناسایی گروه‌های عاملی از آن استفاده می‌کنند. این تکنیک می‌تواند میزان شدت طیف مادون قرمز را بر اساس طول موج جذبی رسم نماید. در آنالیز FT-IR اطلاعات حاصل از جذب مادون قرمز به صورت یک طیف به نمایش گذاشته می‌شود. شکل‌های (۳) طیف مادون قرمز نانومواد سنتز شده در این تحقیق را نشان می‌دهند. گروه‌های عاملی آلی Si-C, N-H, Mg-O, C-H2, O-H, Mg-O-Si, O-Si, Si-O-Si, Si-OH, Si-O-C به ترتیب با طول موج‌های ۱۱۲۵، ۳۴۰۷، ۵۶۶/۳۲، ۳۰۳۴/۴۸، ۳۴۲۸/۷۱، ۸۵۵/۹۵، ۷۹۰/۷۲، ۱۰۴۵/۸۴، ۹۳۹/۰۸ و ۲۰۲۱/۷۳ بر سانتی‌متر تشکیل شده است (شکل ۳ قسمت الف).

شکل ۳. نتایج آنالیز FT-IR نانو ماده آمینوکلئ منیزیم (الف) طیف نانوماده به همراه پیک‌های تشخیص داده شده (ب) مواد آلی احتمالی موجود بر اساس استانداردها و پیک‌های طیف

(الف)

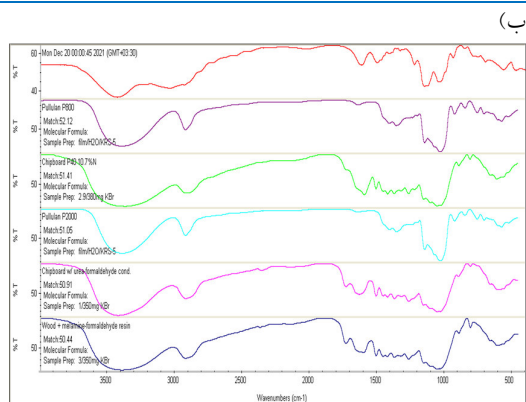
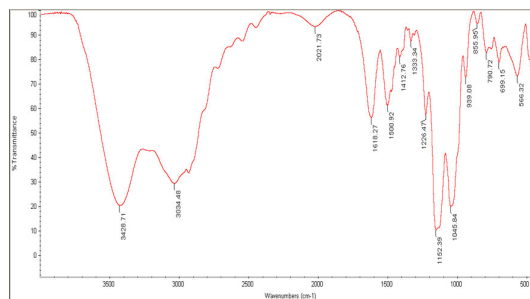
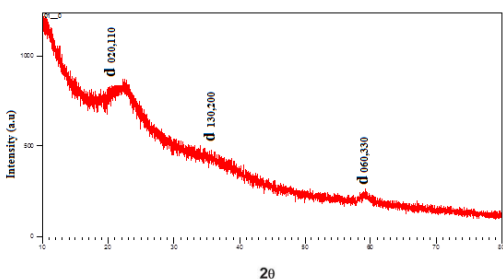


Fig. 3. Results of FT-IR analysis of MgAC a) Peaks detected in nanomaterial spectrum, b) Possible organic matter based on spectrum standards and peaks

بر اساس پیک‌های تشخیص داده شده و مقایسه آن‌ها با پیک‌های استاندارد ارائه شده در شکل (۳ قسمت ب) می‌توان نتیجه گرفت ترکیبات آلی در ساختارهای سنتز شده وجود دارد. با توجه به گروه‌های عاملی Si-C, N-H, N-H3 پیوند کووالانسی در بین ترکیبات آمینوپروپیل وجود دارد. همچنین وجود گروه‌های عاملی Si-O-Si, Mg-O, Si-O-Si حاکی از ساختار فیلوسیلیکات نانوماده آمینوکلئ منیزیم است. با توجه به گروه‌های عاملی موجود، ریزجلبک بخشی از میکرونوترین مورد نیاز خود را با استفاده از نانوماده آمینوکلئ منیزیم دریافت می‌کند. نتایج مشابهی توسط سایر پژوهشگران گزارش شده است [19, 20, 21, 22]. در شکل (۴) نتایج آنالیز پراش اشعه ایکس (XRD) نانومواد سنتز شده در این تحقیق ارائه شده است. پیک اصلی نانوماده MgAC در مقدار ۲θ بین ۲۰ تا ۳۰ و معادل ۲۱/۸۳ درجه با مقدار فاصله ۴/۰۷ انگستروم اتفاق افتاد (شکل ۴ الف).

شکل ۴. نتایج XRD نانوماده آمینوکلئ منیزیم (MgAC) (الف) ساختار تشخیص داده شده؛ (ب) فازهای تشخیص داده شده

(الف)



۹۳ و ۹۹ درصد در شکل (۵) ارائه شده است. مقدار ارزش P در پارامترهای مختلف شدت نور، دما و غلظت نانوماده آمینوکلئ منیزیم در وزن خشک زیست توده به ترتیب ۰/۰۰۹۲، ۰/۲۱۵۶ و ۰/۰۰۰۲ و در نرخ رشد ۰/۳۳۱، ۰/۳۳۴ و ۰/۰۰۰۲؛ و در مقادیر کلروفیل و کارتونوئید ۰/۳۷۲، ۰/۵۹۷۳ و ۰/۰۰۰۴؛ ۰/۰۰۵۸، ۰/۰۰۰۲ و ۰/۰۰۰۳ است و بیان‌گر قابلیت تأثیر بیشتر نانوماده آمینوکلئ منیزیم در دما و شدت نورهای مختلف است. پارامترهای شدت نور و غلظت نانوماده در تمامی پاسخ‌ها در سطح احتمالی ۰/۰۵ معنی‌دار هستند. معادلات چندجمله‌ای درجه دوم برای تمامی پاسخ‌های طراحی از ضریب همبستگی ( $R^2$ ) جهت برازش مدل چند جمله‌ای و از مقدار F برای تشخیص معنادار بودن آماری آن استفاده شد.

با افزایش شدت تابش میزان وزن خشک زیست توده افزایش یافت. تأثیر شدت تابش بر محیط کشت ریزجلبک برای وزن خشک زیست توده ( $DW_{14}$ , mg/mlit)، نرخ سرعت رشد ویژه ( $\mu$ ,  $d^{-1}$ ) و کلروفیل (Chl,  $\mu\text{gr/mlit}$ ) مثبت و بر کارتونوئید (Car,  $\mu\text{gr/mlit}$ ) منفی بود. بیشترین وزن خشک زیست توده (۵/۰۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر)، نرخ رشد (۰/۱۸۶ روزانه)، کلروفیل (۳/۰۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و مقدار کارتونوئید (۱/۰۰۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در شدت تابش ۴۰۰۰ لوکس (معادل ۷۴ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه)، دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و غلظت نانوماده آمینوکلئ منیزیم (MgAC) ۰/۰۵ گرم در لیتر مشاهده شد. با افزایش شدت تابش از ۲۰۰۰ لوکس (معادل ۳۷ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه) به ۴۰۰۰ لوکس (معادل ۷۴ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه) و مقدار ۰/۱ گرم در لیتر نانوماده آمینوکلئ منیزیم در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد مقدار زیست توده خشک ریزجلبک از ۰/۴۰۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ۰/۴۷۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و نرخ رشد از ۰/۱۷ به ۰/۱۸۴ روزانه افزایش و میزان کلروفیل و کارتونوئید به ترتیب از ۲/۱۷۵ به ۲/۶۴۸؛ ۰/۸۲۷ به ۰/۷۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر افزایش و کاهش ناچیز یافت (شکل‌های ۶ تا ۹).

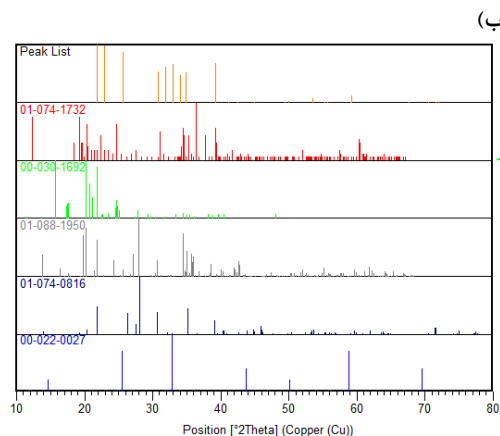


Fig. 4. XRD spectra of MgAC, a) detected structure; b) Detected phases

در ساختار کریستالی نانوماده MgAC ساختار اکسید شده مواد هیدروکسید سیلیکات منیزیم، نیتريت دی‌سیکلو‌هگزلامین<sup>۲</sup>، هیدرات هیدروکسید سیلیکات منیزیم<sup>۳</sup>، سیلیکات منیزیم<sup>۴</sup> و استات آمونیاک منیزیم<sup>۵</sup> با مقدار مقدار استاندارد JCPDS به ترتیب ۰۱-۰۷۴-۱۷۳۲، ۰۱-۰۳۰-۱۶۹۲، ۰۰-۰۸۸-۱۹۵۰، ۰۱-۰۸۸-۱۹۵۰، ۰۱-۰۷۴-۰۸۱۶ و ۰۰-۰۲۲-۰۰۲۷ مشاهده شد (شکل ۴ ب). بر اساس نتایج به دست آمده نانوماده MgAC تشکیل شده است. سایر محققان نیز نتایج مشابهی گزارش کردند [۲۳، ۲۴، ۲۵ و ۲۶]. سطح لایه لایه شدن بالا و توزیع اندازه بسیار کوچک (در حد نانومتر) و شکل ورقه‌ای شفاف در محلول به عنوان بلوک‌های بار کاتیونی از طریق برهم‌کنش‌های منحصربه‌فرد با مولکول‌های بیولوژیکی با بار منفی و قابلیت ایجاد محیط استرس‌زا اکسیداتیو و کنترل باکتریایی موجب می‌شود نانوماده آمینوکلئ منیزیم گزینه مناسبی برای کشت ریزجلبک در محیط‌های میکسوتروفیک باشد.

### ۳-۲. نتایج طراحی آزمایش و پاسخ‌های طراحی

به منظور تعیین اثر هر یک از پارامترها در پاسخ‌های طراحی تحلیل واریانس انجام شد. نتایج واریانس (ANOVA) مدل سطح پاسخ بر میزان وزن خشک زیست توده، سرعت نرخ رشد ویژه، کلروفیل و کارتونوئید با سطح اطمینان به ترتیب ۰/۹۶، ۰/۹۵،

4. Magnesium Silicate  
5. Ammonia Magnesium Acetate

1. Magnesium Silicate Hydroxide  
2. Dicyclohexylamine nitrite  
3. Magnesium Silicate Hydroxide Hydrate



شدت نور و ویژگی طول موج تا حد زیادی بر فتوسنتز ریزجلبک تأثیر می‌گذارد. با توجه به نتایج به دست آمده نانوماده آمینوکلئینیزیم به دلیل وجود مواد سیلیسی در لایه‌های بیرونی آن قدرت جذب نور در محیط کشت را افزایش داده و تأثیر مستقیم بر رشد ریزجلبک می‌گذارد. همچنین تأثیر هم‌زمان افزایش شدت تابش و افزایش مقدار نانوماده آمینوکلئینیزیم بر میزان وزن خشک زیست توده، نرخ رشد، کلروفیل و کارتنوئید مثبت مشاهده شد.

با افزایش شدت تابش، دما و غلظت نانوماده آمینوکلئینیزیم میزان وزن خشک زیست توده افزایش یافته است. نتایج نشان می‌دهد با افزایش شدت نور، تولید زیست توده به طور قابل توجهی بهبود یافته است، اما بازده رشد تحت شدت نور ۶۰۰۰ لوکس کاهش یافته می‌یابد [27]. در شدت نور بالا، رشد ممکن است به دلیل سفید شدن کلروفیل (ناحیه مهار نور) کاهش یابد، یا به دلیل جمعیت زیاد سلولی در شدت نور بالا، سایه‌ای توسط لایه نزدیک به سطح، روی سلول‌ها ایجاد شود؛ سایه مانع از نفوذ نور به عمق محیط کشت شده و نور محدودی به ریزجلبک منتقل می‌شود (خود سایه‌زنی) و در نتیجه رشد ریزجلبک را محدود می‌کند [24].

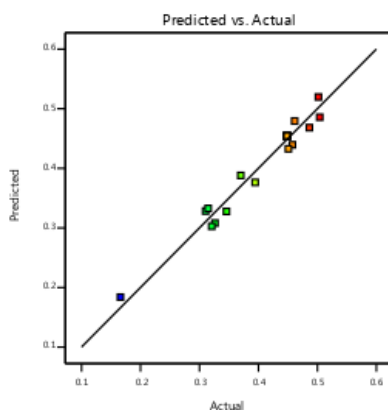
این نتایج حاکی از آن بود که نانوماده آمینوکلئینیزیم (*MgAC*) می‌تواند رشد ریزجلبک *Chlorella sorokiniana* را در شرایط میکسوتروفیک فعلی افزایش دهد، اما دوزهای بالای *MgAC* به ویژه بیش از ۰/۵ گرم در لیتر بر فعالیت متابولیک آنها تأثیر منفی می‌گذارد.

میزان افزایش دما به همراه افزایش آمینوکلئینیزیم تأثیر بیشتری از افزایش نور بر افزایش پارامترهای مورد نظر داشته است و این موضوع اهمیت دمای کشت محیط ریزجلبک و تأثیر شدت نور را نشان می‌دهد. به دلیل تأثیر مثبت هم‌زمان آمینوکلئینیزیم و دما بر رشد ریزجلبک می‌توان کمبود نور در ساعاتی از روز را توسط نانوماده جبران نمود پس پیشنهاد می‌شود که ساعت روشنایی از ۱۲ به ۹ ساعت کاهش یابد.

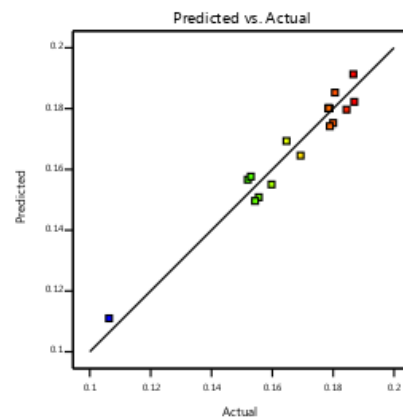
با افزایش شدت تابش از ۲۰۰۰ لوکس به ۴۰۰۰ لوکس و مقدار ۰/۱ گرم در لیتر نانوماده آمینوکلئینیزیم در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد مقدار زیست توده خشک ریزجلبک از ۰/۴۰۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ۰/۴۷۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و نرخ رشد از ۰/۱۷ به ۰/۱۸۴ روزانه افزایش و میزان کلروفیل و کارتنوئید به ترتیب از ۲/۱۷ به ۲/۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر افزایش و از ۰/۸۲۷ به ۰/۷۰۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر کاهش ناچیز یافت.

شکل ۵. نتایج واریانس - تشخیص مدل برای پاسخ‌های مختلف: الف) وزن خشک سلول، ب) سرعت رشد، ج) کلروفیل و د) کاروتنوئید

(الف)



(ب)



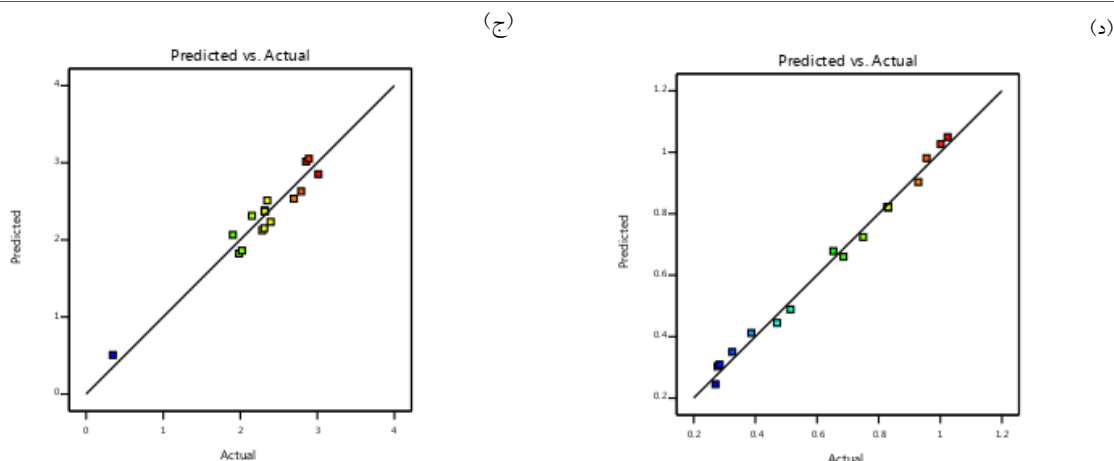


Fig. 5. Normal plot of residuals - model diagnosis for various responses: a) cell dry weight, b) growth rate, c) chlorophyll and d) carotenoid

میزان کلروفیل از  $0.807$  به  $0.934$  میکروگرم بر میلی لیتر افزایش و کارتنوئید از  $1.028$  به  $0.384$  میکروگرم بر میلی لیتر کاهش یافت. دما یکی از پارامترهای بسیار مهم بر رشد جلبک است و همچنین سرعت واکنش‌های شیمیایی در ریزجلبک را کنترل می‌کند [29]. دمای بهینه برای رشد جلبک‌ها بین  $15$  تا  $30$  درجه سانتی گراد است. با این حال، برخی از سویه‌ها می‌توانند درجه حرارت بالا را تحمل کنند. با قرار گرفتن سلول‌های ریزجلبک در معرض تابش نور کم فتوسنتز با شدت نور متناسب بوده و به دما بستگی ندارد. اما با قرار گرفتن در تابش نور زیاد فتوسنتز به میزان زیادی به دما بستگی دارد [30].

بنابراین افزایش بیش از حد شدت نور، عاملی بازدارنده برای رشد ریزجلبک محسوب می‌شود. در واقع رابطه رشد ریزجلبک و میزان شدت نور همیشه یک رابطه مستقیم نیست و از طرف دیگر با اتلاف انرژی همراه بوده و از لحاظ اقتصادی چندان مقرون به صرفه نخواهد بود [28].

با افزایش دما از  $20$  تا  $30$  درجه سانتی‌گراد در شدت تابش  $3000$  لوکس (معادل  $55/5$  میکرومول بر مترمربع بر ثانیه) و غلظت نانوماده آمینوکلئول منیزیم  $0.1$  گرم در لیتر مقدار زیست توده خشک ریزجلبک از  $0.234$  میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به  $0.242$  میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و نرخ رشد از  $0.131$  به  $0.135$  روزانه و

شکل ۶. تأثیر برهم کنش پارامترها بر وزن خشک زیست توده (سه بعدی؛ الف) شدت تابش و دما، (ب) شدت تابش و نانوماده (ج) دما و نانوماده

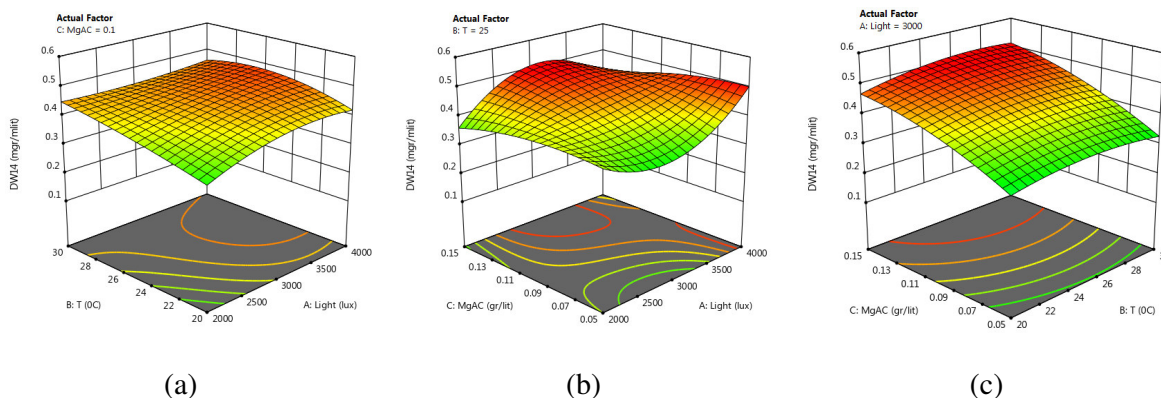


Fig. 6. Significant interaction between input variables and cell dry weight responses for C.S pa.91.; (a) – Interaction between light intensity and temperature; (b) – Interaction between light intensity and MgAC; (C) – Interaction between temperature and MgAC.

شکل ۷. تاثیر برهم کنش پارامترها بر سرعت رشد ویژه (سه بعدی؛ الف) شدت تابش و دما، ب) شدت تابش و نانوماده، ج) دما و نانوماده

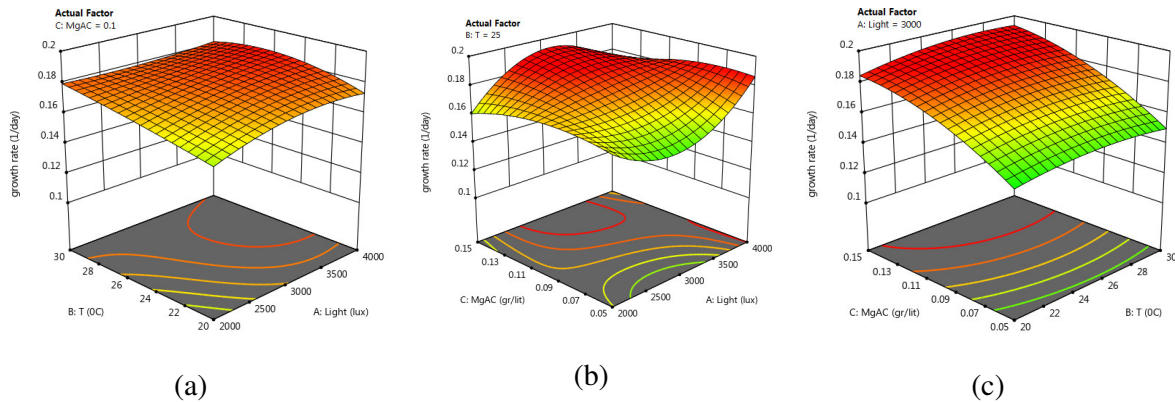


Fig. 7. Significant interaction between input variables and growth rate responses for C.S pa.91.; (a) – Interaction between light intensity and temperature; (b) – Interaction between light intensity and MgAC; (C) – Interaction between temperature and MgAC.

شکل ۸. تاثیر برهم کنش پارامترها بر کلروفیل (سه بعدی؛ الف) شدت تابش و دما، ب) شدت تابش و نانوماده، ج) دما و نانوماده

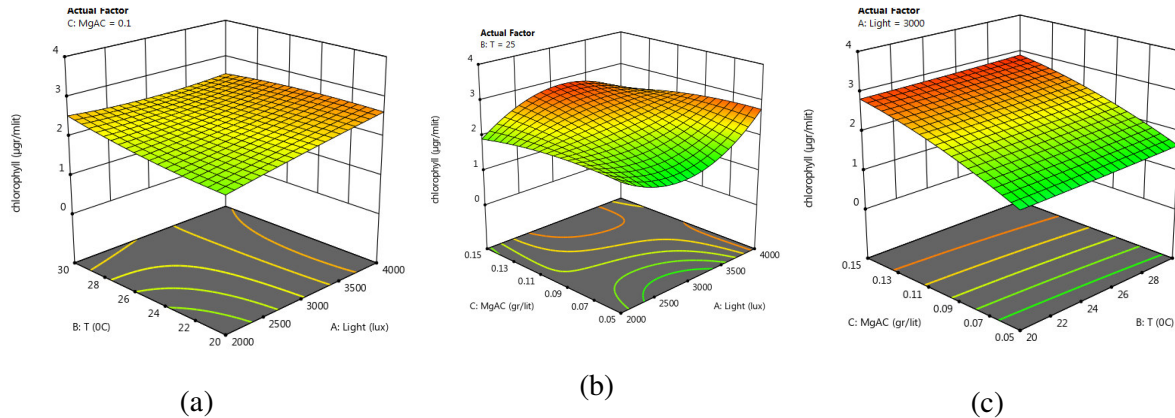


Fig. 8. Significant interaction between input variables and chlorophyll responses for C.S pa.91.; (a) – Interaction between light intensity and temperature; (b) – Interaction between light intensity and MgAC; (C) – Interaction between temperature and MgAC.

شکل ۹. تاثیر برهم کنش پارامترها بر کارتنوئید (سه بعدی؛ الف) شدت تابش و دما، ب) شدت تابش و نانوماده، ج) دما و نانوماده

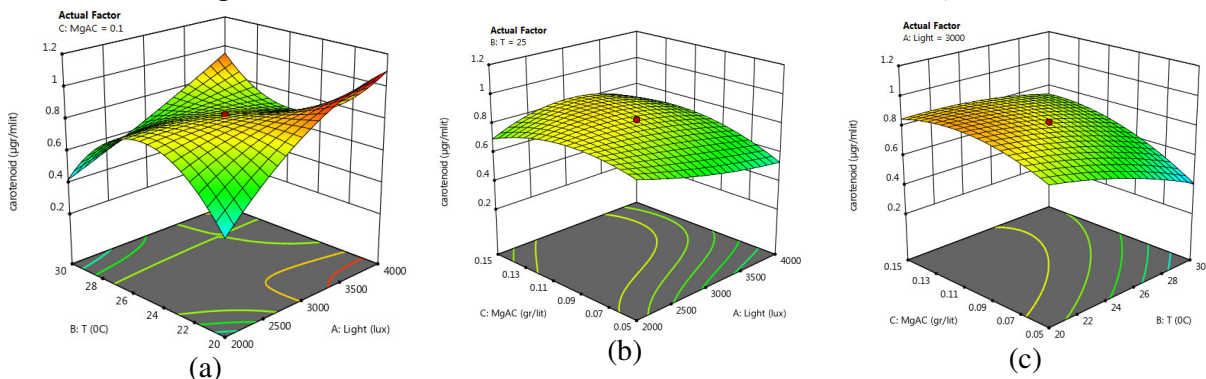


Fig. 9. Significant interaction between input variables and carotenoid responses for C.S pa.91.; (a) – Interaction between light intensity and temperature; (b) – Interaction between light intensity and MgAC; (C) – Interaction between temperature and MgAC.

با افزایش غلظت نانوماده آمینوکلینی منیزیم از ۰/۰۵ تا ۰/۱۵ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه) و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد مقدار زیست توده خشک ریزجلبک از ۰/۱۹۴ میلی‌گرم بر گرم در لیتر در شدت تابش ۳۰۰۰ لوکس (معادل ۵۵/۵

گروه  $\text{NH}_3$ -تبدیل شده و به راحتی پروتون به آن اضافه می‌شود [34].

دو مسیر کاملاً متفاوت می‌تواند دیواره‌های سلولی را از طریق جاذبه الکترواستاتیکی بین بار مثبت خود و مولکول‌های زیستی با بار منفی دیواره سلولی را ناپایدار کند. با این حال، باید توجه داشت که سمیت زیستی MgAC به شدت وابسته به گونه و دوز است. به عنوان نمونه، در ۵۰ میلی گرم بر لیتر MgAC، هیچ اثر مضر برای گونه ریزجلبک *Nan-nochloropsis sp* ندارد در حالی که رشد ریزجلبک *Chattonella marina* تا ۵۰ درصد و *Heterosigma akashiwo* به طور کامل متوقف شده است [29]. علاوه بر این، نانوذرات آمینوکلئول منیزیم در غلظت‌های کمتر از ۱۰۰ میلی گرم در لیتر، سایر ارگانسیم‌ها از جمله زئوپلانکتون‌ها را تحت تأثیر قرار نداده یا فقط تحت تأثیر خفیف قرار می‌دهند [28]. به عنوان یک محرک رشد، جزء آمین MgAC می‌تواند با  $\text{CO}_2$  واکنش نشان دهد و تبدیل آن به بی‌کربنات را تسریع کند، بنابراین محتوای کربن معدنی محلول (DIC) را افزایش می‌دهد و در آینده می‌تواند برای رشد فتوسنتزی ریزجلبک‌ها استفاده شود [35].

شکل ۱۰. تغییرات وزن خشک زیست توده در شرایط بهینه و فاضلاب واقعی

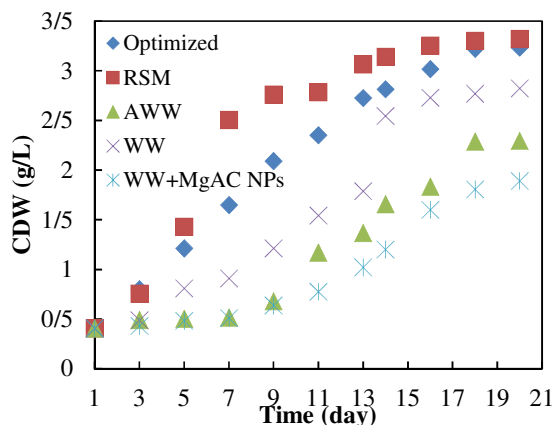


Fig. 10. cell dry weight change under optimal and real conditions

شرایط بهینه به دست آمده از تحلیل به صورت شدت تابش نور ۲۰۰۰ لوکس (معادل ۳۷ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه)، دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و غلظت نانوماده ۰/۰۵ گرم در لیتر به دست آمد. آزمایش برای تعیین میزان وزن خشک زیست توده، سرعت رشد ویژه، کلروفیل و کارتنوئید در شرایط بهینه

میلی لیتر به ۰/۲۸۱ میلی گرم بر میلی لیتر و نرخ رشد از ۰/۰۸۹ به ۰/۱۶۴ روزانه و میزان کلروفیل از ۰/۵۰۷ به ۱/۵۵۱ میکروگرم بر میلی لیتر افزایش و کارتنوئید به ترتیب؛ ۰/۸۱۳ به ۰/۵۹۹ میکروگرم بر میلی لیتر کاهش یافت. kim و همکاران با بررسی تأثیر آمینوکلئول منیزیم بر روی ریزجلبک *Microcystis sp.KW* در محیط کشت BG11، شدت تابش ۵۴۰۰ لوکس (معادل ۹۹/۹ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه) در انکی باتور با سرعت ۱۲۵ دور در دقیقه و غلظت‌های کمتر از ۰/۱ گرم در لیتر تأثیر مثبت بر نرخ رشد مشاهده کردند [13]. همچنین Farooq و همکاران با بررسی تأثیر آمینوکلئول منیزیم بر روی ریزجلبک *Chlorella vulgaris* در محیط کشت BG11، شدت تابش ۵۴۰۰ لوکس (معادل ۹۹/۹ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه) در انکی باتور با سرعت ۱۲۵ دور در دقیقه و غلظت‌های کمتر نرخ رشد بیشتری مشاهده کردند [19]. افزودن نانوماده در مرحله کشت ریزجلبک می‌تواند عملکرد جذب  $\text{CO}_2$  از جو را بهبود بخشیده و حتی می‌تواند تبدیل نور مؤثر در راکتور را به طور قابل توجهی افزایش و همچنین تجمع ترکیب داخل سلولی و رشد ریزجلبک‌ها را افزایش دهد [31]. به طور کلی، محیط‌های کشت ریزجلبک دارای مواد معدنی مانند کلسیم و فسفر هستند اما به منظور رشد کافی ریزجلبک‌ها به میزان کافی در محیط کشت موجود نیستند. علاوه بر این، به منظور کاهش هزینه‌های تهیه محیط کشت‌های صنعتی استفاده از نانومواد در فاضلاب به منظور جبران کمبود مواد مغذی راه حل بسیار مناسبی است و موجب تحریک جذب سریع مواد مغذی در ریزجلبک‌ها و بعضاً تجمع چربی می‌شود [32]. آمینوکلئول منیزیم به عنوان فیلوسیلیکات منیزیم ۳- آمینوپروپیل ترکیبی غنی از آمینه است. با توجه به خواص فیزیکی و شیمیایی منحصر به فرد آمینوکلئول منیزیم مانند؛ سطح لایه سازی بالا و توزیع اندازه کوچک و شفاف در محلول به عنوان یک بار کاتیونی با مولکول‌های بیولوژیکی دارای بار منفی فعل و انفعالات انجام داده و به عنوان یک افزودنی به ریز جلیک اضافه می‌شود و قابلیت ایجاد استرس اکسیداتیو در محیط کشت‌های میکسوتروفیک را دارد [33]. آمینوکلئول منیزیم ساختار انعطاف‌پذیری دارد. در صورت حل شدن در حلال قطبی مانند آب گروه‌های عاملی  $\text{NH}_2$ - به

تحت تاثیر نانوماده آمینوکلینیوم را دارد. در این تحقیق غلظت‌های مختلف نانوماده آمینوکلینیوم بر نرخ رشد ریزجلبک، میزان کلروفیل و کارتنوئید در دما، شدت تابش‌های مختلف از فاضلاب بررسی شد. با توجه به نتایج به دست آمده مقادیر وزن خشک زیست توده (۰/۳۱۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، نرخ رشد مخصوص (۰/۱۵۲/روزانه)، کلروفیل (۱/۸۵۴ میلی‌گرم بر گرم) و مقدار کارتنوئید (۰/۴۲۵ میلی‌گرم بر گرم) در شرایط بهینه دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد، شدت تابش ۲۰۰۰ لوکس (معادل ۳۷ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه) و مقدار ۰/۰۵ گرم در لیتر نانوماده آمینوکلینیوم حاصل شد این نتایج نشان می‌دهد با تاثیر مثبت مقادیر کم نانوماده آمینوکلینیوم بر روی ریزجلبک *C.S pa.91* برای تصفیه بیولوژیکی فاضلاب بسیار مناسب بوده و بهینه‌سازی رشد و کیفیت توده‌زیستی این نوع ریزجلبک بومی با استفاده از نانوماده آمینوکلینیوم قابل انجام است. از محدودیت‌های پژوهش حاضر می‌توان به عدم امکان ثبت آن‌لاین داده‌ها اشاره کرد تا از این طریق با ارزیابی پارامتر زمان، بهینه‌سازی این فاکتور صورت گیرد. به توجه به کاربردهای متعدد ریزجلبک، در صورت امکان اندازه‌گیری (مالی و تجهیزاتی) میزان اسیدچرب، فرآیند بهینه‌سازی معطوف به کاربری خاص قابل انجام خواهد بود. همچنین به دلیل یکتا بودن شرایط کشت و نیز اندرکنش مؤثر فاکتورهای مورد نظر، لازم است پیش از تعمیم نتایج به سایر شرایط محیطی و کشت‌های مشابه بررسی‌های لازم صورت پذیرد.

#### ۵. تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل که زمینه انجام این تحقیق را فراهم کردند سپاسگزار می‌شود.

#### ۶. اعلام تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ نوع تعارض منافی وجود ندارد.

#### ۷. مراجع

- [1] Vasistha, S., Khanra, A., & Rai, M. P. 2020. Journal of Water Process Engineering Influence

انجام شد. در این شرایط میزان وزن خشک زیست توده، سرعت نرخ رشد ویژه، کلروفیل و کارتنوئید به ترتیب معادل ۳/۱۴۳ گرم در لیتر، ۰/۱۵۲/روزانه، ۲/۲۱۹، ۰/۵۱۷ و ۰/۸۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. همچنین به منظور قابلیت اجرایی بودن پژوهش حاضر شرایط آزمایش در فاضلاب واقعی انجام شد (شکل‌های ۱۰ تا ۱۲).

شکل ۱۱. تغییرات نرخ سرعت رشد ویژه در شرایط بهینه و فاضلاب واقعی

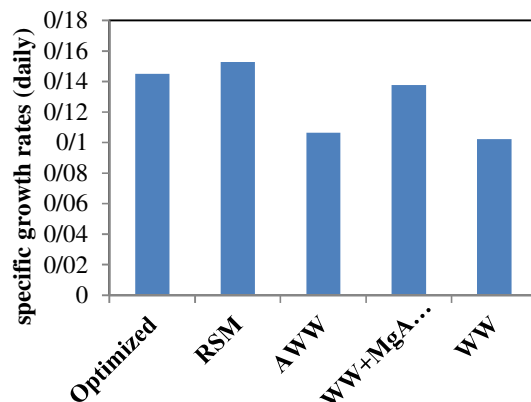


Figure 11. Changes in specific growth rate under optimal conditions and real wastewater

شکل ۱۲. تغییرات کلروفیل و کارتنوئید در شرایط بهینه و فاضلاب واقعی

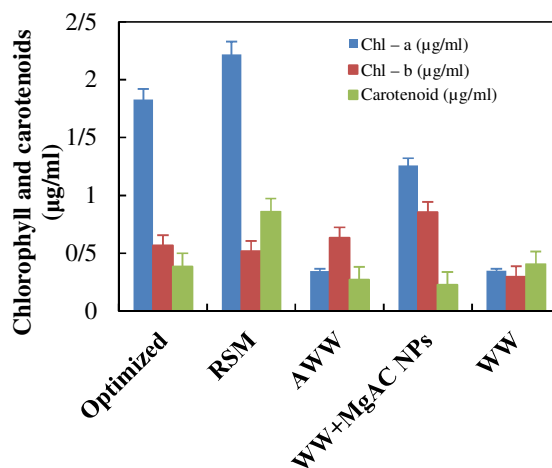


Fig. 12. Changes in chlorophyll and carotenoids in optimal conditions and actual wastewater

#### ۴. نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد ریزجلبک *Chlorella sorokiniana* پتانسیل بسیار خوبی برای تولید غلظت زیست توده بالا

- [11] Asadi Pariya & Amini Rad Hassan & Qaderi Farhad, 2019. Comparison of *Chlorella vulgaris* and *Chlorella sorokiniana* pa.91 in post treatment of dairy wastewater treatment plant effluents, *Environmental Science and Pollution Research*, Accepted: 23 July 2019, Times 26(28),29473-29489 <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06051-8>.
- [12] Yaqoubnejad, P., Amini, H., & Taghaviyelouidar, M. (2021). Development a novel hexagonal airlift flat plate photobioreactor for the improvement of microalgae growth that simultaneously enhance CO<sub>2</sub> bio-fixation and wastewater treatment. *Journal of Environmental Management*, 298(July), 113482. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113482>
- [13] Kim, M., Moon, J., & Lee, Y. 2020. Biomass and Bioenergy Loading effects of low doses of magnesium aminoclay on microalgal *Microcystis* sp . KW growth , macromolecule productions , and cell harvesting. *Biomass and Bioenergy*, 139(May), 105619. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105619>.
- [14] Eroglu, E., Eggers, P.K., Winslade, M., Smith, S.M., Raston, C.L., 2013. Enhanced accumulation of microalgal pigments using metal nanoparticle solutions as light filter devices. *Green Chem.* 15, 3155–3159.
- [15] Sarma, S. J. et al. (2014). Application of magnesium sulfate and its nanoparticles for enhanced lipid production by mixotrophic cultivation of algae using biodiesel waste. *Energy*. 78, 16–22.
- [16] Khanra, A., Vasistha, S., Kumar, P., & Rai, M. P. (2020). Role of C/N ratio on microalgae growth in mixotrophy and incorporation of titanium nanoparticles for cell flocculation and lipid enhancement in economical biodiesel application. *3 Biotech*, 10(8), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02323-0>.
- [17] Salehi, M., Biria, D., Shariati, M., & Farhadian, M. (2019). Treatment of normal hydrocarbons contaminated water by combined microalgae – Photocatalytic nanoparticles system. *Journal of Environmental Management*, 243(April), 116–126. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.04.131>.
- [18] Ogbonna, J. C., Nweze, N. O., & Ogbonna, C. N. 2021. Effects of light on cell growth , chlorophyll , and carotenoid contents of *Chlorella sorokiniana* and *Ankistrodesmus falcatus* in poultry dropping medium. 9(2), 157–163. <https://doi.org/10.7324/JABB.2021.9215>.
- of microalgae-ZnO nanoparticle association on sewage wastewater towards efficient nutrient removal and improved biodiesel application : An integrated approach. *Journal of Water Process Engineering*, June, 101711. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101711>.
- [2] Al-jabri, H., Das, P., Khan, S., Thaher, M., & Abdulquadir, M. 2021. Treatment of Wastewaters by Microalgae and the Potential Applications of the Produced Biomass — A Review.
- [3] Brennan, L., & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), 557–577. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>.
- [4] SHandilya, K., Pattarkine, K. M., Vikram, 2019. Using microalgae for treating wastewater, *Advances in feedstock conversion technologies for alternative fuels and bioproducts*. Elsevier, [doi.org/10.1016/B978-0-12-817937-6.00007-2](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817937-6.00007-2).
- [5] Maryjoseph, S., & Ketheesan, B. 2020. Case Studies in Chemical and Environmental Engineering Microalgae based wastewater treatment for the removal of emerging contaminants : A review of challenges and opportunities. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, 2(August), 100046. <https://doi.org/10.1016/j.cscee.2020.100046>.
- [6] Sukla, L. B., Subudhi, E., & Pradhan, D. 2019. The Role of Microalgae in Wastewater Treatment. In *The Role of Microalgae in Wastewater Treatment*. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-1586-2>.
- [7] de Carvalho, J. C., Sydney, E. B., Assú Tessari, L. F., & Soccol, C. R. (2019). Culture media for mass production of microalgae. In *Biofuels from Algae (Second Edition)*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-64192-2.00002-0>.
- [8] Sukla, L. B., Subudhi, E., & Pradhan, D. (2019). The Role of Microalgae in Wastewater Treatment. Library of Congress Control Number: 2018956307 <https://doi.org/10.1007/978-981-13-1586-2>.
- [9] Seo, J. Y., Kim, M. G., Lee, K., & Lee, Y. 2017. Multifunctional Nanoparticle Applications to Microalgal Biorefinery. 59–87. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-45459-7>
- [10] Ingle, A. P., Chandel, A. K., Philippini, R., Martiniano, S. E., & Silv, S. 2020. SS symmetry Advances in Nanocatalysts Mediated Biodiesel Production : A Critical Appraisal. 1–21.

- Bioengineering, 101(2), 87–96. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>
- [28] Lee, Y., Uk, H., Lee, K., Kim, B., Yeun, S., Choi, M., Farooq, W., Seok, J., Park, J., Lee, J., Oh, Y., & Suk, Y. 2014. Aminoclay-conjugated TiO<sub>2</sub> synthesis for simultaneous harvesting and wet-disruption of oleaginous *Chlorella* sp. *Chemical Engineering Journal*, 245, 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.02.009>
- [29] Lee, Y., Kim, B., Farooq, W., Chung, J., Han, J., Shin, H., Hwa, S., Park, J., Lee, J., & Oh, Y. 2013. Harvesting of oleaginous *Chlorella* sp. by organoclays. *Bioresource Technology*, 132, 440–445. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.102>
- [30] Lee, Y. C., Park, W. K., & Yang, J. W. 2011. Removal of anionic metals by amino-organoclay for water treatment. *Journal of Hazardous Materials*, 190(1–3), 652–658. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.03.093>
- [31] Chaneva G, Furnadzhieva S, Minkova K, Lukavsky J. 2007. Effect of light and temperature on the cyanobacterium *Arthrocnemum africanum* – a prospective phycobiliprotein-producing strain. *J Appl Phycol* 19:537–544. <https://doi.org/10.1007/s10811-007-9167-6>.
- [32] Wang, S., Hou, W., Dong, H., 2013. Control of temperature on microbial community structure in Hot Springs of the Tibetan Plateau. *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062901>.
- [33] Rangel-Basto, Y.A., García-Ochoa, I.E., Suarez-Gelvez, J.H., Zuurro, A., Barajas-Solano, A.F., Urbina-Suarez, N.A., 2018. The effect of temperature and enzyme concentration in the transesterification process of synthetic microalgae oil, *Chem. Eng. Trans.* 64 : 331–336, <https://doi.org/10.3303/CET1864056>.
- [34] Vargas-Estrada, L., Torres-Arellano, S., Longoria, A., Dulce M.Arias., Okoye, P.U., Sebastian, P.J., 2020. Role of nanoparticles on microalgal cultivation: A review, *Fuel* 280 : 118598, *Fuel* 280 : 118598
- [35] Datta, K. K. R., Achari, A., and Eswaramoorthy, M., 2014. Aminoclay : A Functional Layered Material with Multifaceted Applications Aminoclay : a functional layered material with multifaceted applications. June 2013. <https://doi.org/10.1039/c3ta00100h>
- [19] Farooq, W., Lee, H., SukHuh, Y. , Lee, Y.Ch., 2016. *Chlorella vulgaris* cultivation with an additive of magnesium-aminoclay, *Algal Research* 17 211–216, <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2016.05.004>.
- [20] Liu, P., Wang, T., Yang, Z., Hong, Y., Xie, X., Hou, Y., 2019. Effects of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticle Fabrication and Surface Modification on *Chlorella* sp. Harvesting Efficiency of Civil and Environmental Engineering Georgia Institute of Technology, . *Science of the Total Environment*, 135286. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135286>
- [21] Kim, B., Khac, V., Bui, H., Farooq, W., Jeon, S. G., & Oh, Y. (n.d.). 2018. Magnesium Aminoclay-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (MgAC-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) Hybrid Composites for Harvesting of Mixed Microalgae. 4, 1–10. <https://doi.org/10.3390/en11061359>
- [22] Li, J., Qiao, S., Tan, G., Yu, Y., Liu, D., & Pan, W. 2019. A Non-innocent Magnesium Organoclay-Based Drug Vehicle for Improving the Cancer Therapy Effect of Methotrexate. *AAPS PharmSciTech*, 20(8). <https://doi.org/10.1208/s12249-019-1456-2>.
- [23] Nguyen, M. K., Moon, J., Khac, V., Bui, H., Oh, Y., & Lee, Y. (2019). Recent advanced applications of nanomaterials in microalgae biorefinery. *Algal Research*, 41(April), 101522. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101522>.
- [24] Fernandes, T. M., Gomes, B. B., & Lanfer-Marquez, U. M. (2007). Apparent absorption of chloro- phyll from spinach in an assay with dogs. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(3), 426–432.
- [25] Datta, KKR., (2014). Aminoclay : A Functional Layered Material with Multifaceted Applications Aminoclay : a functional layered material with multifaceted applications. June 2013. <https://doi.org/10.1039/c3ta00100h>.
- [26] Begum, H., Yusoff, F. M. D., Banerjee, S., Khatoon, H., & Shariff, M. (2016). Availability and Utilization of Pigments from Microalgae. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(13), 2209–2222. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.764841>
- [27] Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and*

# The effect of Magnesium Aminoclay (MgAC) nanomaterials on *Chlorella sorokiniana pa.91* native microalgae growth in Sari culture medium

Masumeh panbehkarbisheh<sup>1</sup>, Hasan amini rad<sup>2\*</sup>

1. Student of PhD in Civil Engineering and Environment, Faculty of Civil Engineering and Environment, Noshirvani University of Technology, Babol, Iran
2. PhD in Civil Engineering and Environment, Faculty of Civil Engineering and Environment, Noshirvani University of Technology, Babol, Iran

[h.a.rad@nit.ac.ir](mailto:h.a.rad@nit.ac.ir)

## Abstract

Nanoscience is one of the most important borders and the development of research in modern science. Nanoparticles (NPs) offers many advantages because of their unique physical size and nature. Because the extensive NPs application in biomedical, biotechnology, engineering, material science, and environmental fields, a lot of attention has been given to prepare for various types of NP. Water is one of the maximum critical basis in our life that need to be conserved due to the increased population. Industrial and human activity causes an increase in biological and chemical contaminants. Availability of water and its utilization by 2030 may be a 40% water deficit. Conventional methods are generally applied to wastewater treatment through dripping filters and efficient activated mud eliminates organic pollutants but is not practical for inorganic problems. However, it is necessary to develop a profitable approach to treat wastewater and reach nutritional recovery. Due to considerable carbon removal, high on-site biomass, and lipid production compared to traditional agriculture, and a wide range of final products, recent research has focused on the facile commercialization of Microalgae by increasing productivity and cost-effectiveness. Nowadays, wastewater is used as an inexpensive and easy-accessible culture medium rather than expensive culture medium synthesis on large scale, therefore, simultaneous wastewater treatment and production of biodiesel from microalgae can be considered sustainable, cost-effective, and environmentally friendly approach. The advantage of using microalgae is that they grow in watery media and unsavory water on non-arable ground, have fast growth possible and many species have an oil amount in the dry weight range of 20 to 50% biomass, bio fixation of waste CO<sub>2</sub>, obtained nutrients from wastewater. The magnesium amino clay (MgAC) nanoparticle, which Mann introduced, is attractive among other nanoparticles in enhancing microalgae growth due to the functionality of propyl amine, structure, and high disparity in water. In this regard, the present study is aimed to optimize the growth and biomass quality of *Chlorella sorokiniana pa.91* microalgae from Sari wastewater culture medium using Magnesium Aminoclay nanomaterial (MgAC). In this study by application of the surface response method - central design, the effect of temperature, light intensity, and nanomaterial concentration was investigated on the parameters including the dry weight of biomass on the seventh day, specific growth rate, chlorophyll, and carotenoids in wastewater after 12 h exposure to visible light. Under 37  $\mu\text{mol photons, m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  radiation intensity, and in the presence of 0.05 g/L of magnesium aminoclay NM at 20 °C, the optimal condition including biomass dry weight, specific growth rate, chlorophyll, and carotenoids increased by 47.13, 30.26, 81.33 and 36.47% respectively compared to the control sample. Also, to make the present study feasible, the test conditions were performed in real wastewater. Producing high biomass concentrations under the influence of MgAC-NPs. By using MgAC-NPs in small amounts, in addition to increasing the growth rate, we obtained the treatment of wastewater and increased microalgae lipids. Furthermore, the mechanism for pigment production as specific production per cell, and lipid extraction is explained based on physiological characteristics and *C. S P.A 91*. In addition, by using MgAC-NPs and reducing the temperature and light intensity, we also saved energy.

**Key words:** *Chlorella Sorokiniana pa.91*, waste water, MgAC, RSM-CCD