

بِسْمِ اللّٰهِ الرَّحْمٰنِ الرَّحِیْمِ



دانشکده کشاورزی

بخش مهندسی بیوتکنولوژی

پایان نامه تحصیلی برای دریافت درجه کارشناسی ارشد مهندسی بیوتکنولوژی کشاورزی

بررسی قابلیت جلبک‌ها در زیست‌پالایی بُر از پساب‌های صنعتی

مؤلف:

زینب سالاری

استاد راهنما:

دکتر مهدی سرچشمه‌پور

استاد مشاور:

دکتر جعفر ذوالعلی

بهمن ۱۳۹۱



این پایان نامه به عنوان یکی از شرایط درجه کارشناسی ارشد به

بخش مهندسی بیوتکنولوژی

دانشکده کشاورزی

دانشگاه شهید باهنر کرمان

تسلیم شده است و هیچگونه مدرکی به عنوان فراغت از تحصیل دوره مزبور شناخته نمی شود.

دانشجو: زینب سالاری

استاد راهنما: دکتر مهدی سرچشمه پور

استاد مشاور: دکتر جعفر ذوالعلی

داور ۱: دکتر شهرام پورسیدی

داور ۲: دکتر حمیدرضا کاوسی

نماینده تحصیلات تکمیلی: دکتر غلامحسین شهیدی

معاونت پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشکده: دکتر مجید رحیم پور

حق چاپ محفوظ و مخصوص به دانشگاه شهید باهنر کرمان است.

تقدیم به

پدر

مادر

و برادر عزیزم

تشکر و قدردانی

سپاس خداوندی را که همه کس و همه چیز اوست، سپاس بر معبود مهربان و بخشنده‌ام، سپاس و تعظیم بر عشق مطلق، تنها کسی را که هیچ‌گاه توان فراموش کردنش را ندارم.

بر خود لازم می‌دانم از استاد راهنما جناب آقای دکتر سرچشمه‌پور و استاد مشاور جناب آقای دکتر ذوالعلی که در طول تحقیق راهنمایم بودند و از هیچ لطف و مرحمتی دریغ نمودند تشکر و قدردانی نمایم و از خداوند بزرگ سلامت و سعادت ایشان را خواهانم.

از داوران محترم، جناب آقای دکتر پورسیدی و جناب آقای دکتر کاوسی و نماینده محترم تحصیلات تکمیلی جناب آقای دکتر شهیدی تشکر و قدردانی می‌نمایم.

چکیده

جذب بیولوژیکی فلزات سنگین یک روش موثر برای پالایش فلزات سنگین از محیط‌های آبی و پساب‌های صنعتی می‌باشد. در این تحقیق ابتدا یک جلبک از بین چندین گونه جلبکی با توجه به فراوانی و توانایی مقاومت به غلظت‌های بالای بُر انتخاب شد و سپس توانایی آن در کاهش میزان بُر مورد مطالعه دقیق‌تر قرار گرفت. تیمارهای آزمایش شامل دو سطح مختلف بیوماس جلبک (۲ و ۴ گرم)، در ۵ زمان متفاوت انکوباسیون (۲، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) در مقادیر مختلف بُر تحت غلظت‌های (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۵ و ۱۰۰ پی‌پی‌ام) بود. آزمایش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام گردید و نتایج نشان داد که در غلظت‌های ۵ و ۱۰ پی‌پی‌ام بُر و ساعات ۱۲ و ۲ بیشترین میزان جذب بُر توسط سلول‌های جلبک صورت می‌گیرد. همچنین میزان جذب بُر در سطح ۴ گرم جلبک بیشتر بود. مرحله شناسایی مورفولوژیکی از طریق مشاهده میکروسکوپی انجام گرفت که با توجه به وجود فیلامنت‌های غیر منشعب و منفرد و باندهای مارپیچی کلروپلاست به عنوان دو مشخصه اختصاصی، جلبک انتخاب شده اسپروژیرا تشخیص داده شد و در نهایت استخراج DNA و انجام PCR به منظور شناسایی مولکولی انجام شد.

کلمات کلیدی: جذب بیولوژیکی، فلز سنگین، پساب صنعتی، بیوماس جلبک، بُر، اسپروژیرا

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
	فصل اول: مقدمه
۱-۱-۱-۱	مقدمه
۲	اهداف تحقیق
	فصل دوم: مروری بر منابع
۱-۲-۱-۱	آلودگی
۱-۲-۱-۱-۱	آلودگی آبها
۱-۲-۱-۲	طبقه بندی آبهای آلوده
۱-۲-۱-۳	منابع آلودگی
۱-۲-۱-۴	آلایندهها
۱-۲-۱-۵	انواع آلایندهها
۱-۲-۱-۶	نقش فلزات در آلودگی
۱-۲-۱-۷	عنصر بُر
۱-۲-۱-۸	سمیت آلودگی بُر
۱-۲-۱-۹	پالایش بُر
۱-۲-۲	زیست پالایی
۱-۲-۲-۱	جذب زیستی
۱-۲-۲-۲	مکانیسم جذب

- ۲۳.....انواع زیست پالایی ۳-۲-۲
- ۲۳.....گیاه پالایی ۱-۳-۲-۲
- ۲۵.....زیست پالایی میکروبی ۲-۳-۲-۲
- ۲۶.....زیست پالایی قارچی و مخمر ۱-۲-۳-۲-۲
- ۲۸.....زیست پالایی باکتریایی ۲-۲-۳-۲-۲
- ۳۰.....زیست پالایی جلبکی ۳-۲-۳-۲-۲
- ۳۶.....جلبک ها ۳-۲
- ۳۶.....مورفولوژی جلبک ها ۱-۳-۲
- ۳۶.....مشخصات تال در جلبک ها ۱-۱-۳-۲
- ۳۷.....دیواره یاخته ای ۲-۱-۳-۲
- ۳۷.....کلروپلاست ۳-۱-۳-۲
- ۳۷.....تاژک ۴-۱-۳-۲
- ۳۸.....تولید مثل در جلبک ها ۲-۳-۲
- ۳۸.....عوامل موثر در رشد جلبک ها ۳-۳-۲
- ۳۹.....چرخه زندگی جلبک ها ۴-۳-۲
- ۳۹.....رده بندی جلبک ها ۵-۳-۲
- ۳۹.....اساس طبقه بندی ۱-۵-۳-۲
- ۴۰.....سطوح طبقه بندی ۲-۵-۳-۲
- ۴۰.....جلبک های سبز ۳-۵-۳-۲
- ۴۱.....جلبک های قرمز ۴-۵-۳-۲

- ۴۱..... ۵-۵-۳-۲- جلبک‌های قهوه ای
- ۴۱..... ۶-۵-۳-۲- سیانوفیت‌ها
- ۴۲..... ۷-۵-۳-۲- اوگلنوفیتا
- ۴۲..... ۸-۵-۳-۲- کاروفیتا
- ۴۲..... ۹-۵-۳-۲- کریستوفیتا
- ۴۲..... ۱۰-۵-۳-۲- دینوفیتا
- ۴۳..... ۶-۳-۲- اهمیت جلبک‌ها
- ۴۳..... ۷-۳-۲- روش‌های تهیه جلبک
- ۴۳..... ۱-۷-۳-۲- خریداری از مراکز فروش
- ۴۳..... ۲-۷-۳-۲- غربالگری
- ۴۴..... ۳-۷-۳-۲- جمع آوری نمونه از محیط‌های آبی
- ۴۴..... ۸-۳-۲- شناسایی جلبک‌های جدا شده
- ۴۴..... ۱-۸-۳-۲- مطالعه میکروسکوپی نمونه‌ها
- ۴۵..... ۲-۸-۳-۲- شناسایی مولکولی به کمک آنالیز مولکولی

فصل سوم: مواد و روش‌ها

- ۴۷..... ۱-۳- نمونه برداری
- ۴۷..... ۲-۳- خالص سازی
- ۴۷..... ۱-۲-۳- شستشوی سلول
- ۴۷..... ۲-۲-۳- صاف کردن

- ۳-۲-۳- استفاده از آنتی بیوتیک ۴۷
- ۳-۳- آزمایش تعیین میزان تحمل اولیه ۴۷
- ۳-۴- انتخاب جدایه ۴۸
- ۳-۵- بررسی کارایی جدایه انتخاب شده در کاهش بر ۴۸
- ۳-۶- جدایه انتخاب شده ۴۸
- ۳-۷- محلول ۴۹
- ۳-۸- تلقیح ۴۹
- ۳-۹- اندازه گیری بُر ۴۹
- ۳-۱۰- شناسایی مورفولوژیکی جدایه انتخاب شده ۵۰
- ۳-۱۱- شناسایی مولکولی جدایه انتخاب شده ۵۰
- ۳-۱۱-۱- استخراج DNA ژنومی ۵۰
- ۳-۱۱-۲- ارزیابی کمی و کیفی DNA ۵۱
- ۳-۱۱-۳- آغازگر ۵۲
- ۳-۱۱-۴- واکنش PCR ۵۲

فصل چهارم: نتایج و بحث

- ۴-۱- جدا سازی و شناسایی مقدماتی جلبک‌ها ۵۶
- ۴-۲- انتخاب جدایه برتر ۵۸
- ۴-۳- بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف بُر بر رشد جلبک ۵۸
- ۴-۴- کارایی جدایه انتخاب شده جلبک در کاهش بُر ۵۹

۶۰	۵-۴- بررسی اثرات تیمارها
۶۰	۴-۵-۱- اثرات مقدار جلبک
۶۱	۴-۵-۲- اثر غلظت بُر
۶۲	۴-۵-۳- اثر زمان
۶۳	۴-۵-۴- اثر متقابل مقدار جلبک در زمان
۶۳	۴-۵-۵- اثر متقابل غلظت در مقدار جلبک
۶۴	۴-۵-۶- اثر متقابل زمان در غلظت
۶۶	۴-۵-۷- اثر متقابل زمان در غلظت در مقدار جلبک
۶۹	۴-۶- شناسایی مورفولوژیکی جدایه انتخاب شده
۷۰	۴-۷- شناسایی مولکولی جدایه انتخاب شده
۷۱	نتیجه گیری
۷۲	پیشنهادات
۷۳	فصل پنجم: منابع

فهرست جداول

- ۳-۱- نوع و سطح فاکتورهای مورد آزمایش ۴۸
- ۳-۲- ژن و آغازگرهای نوکلئوتیدی مورد استفاده ۵۲
- ۳-۳- ترکیب واکنش PCR تکثیر اختصاصی ژن rbcl جلبک اسپروژیرا ۵۲
- ۳-۴- برنامه PCR ۵۳
- ۴-۱- تاثیر غلظت بُر بر رشد جلبک ۵۸
- ۴-۲- نتایج تجزیه واریانس تاثیر تیمارهای مختلف بر میزان بُر باقیمانده در محلول ۵۹
- ۴-۳- اثر متقابل مقدار جلبک در زمان بر میزان بُر باقیمانده ۶۳
- ۴-۴- اثر متقابل مقدار جلبک در غلظت بر میزان بُر باقیمانده ۶۴
- ۴-۵- اثر متقابل زمان در غلظت بر میزان بُر باقیمانده ۶۵
- ۴-۶- اثر متقابل جلبک، زمان و غلظت بر میزان بُر باقیمانده ۶۶

فهرست شکل‌ها

- ۴-۱- شکل ناویکولا..... ۵۶
- ۴-۲- شکل کلادوفورا..... ۵۶
- ۴-۳- شکل زیگنما..... ۵۷
- ۴-۴- شکل اسپروژیرا..... ۵۷
- ۴-۵- نمودار تاثیر مقدار جلبک در کاهش میزان بُر..... ۶۰
- ۴-۶- نمودار اثر غلظت در کاهش میزان بُر..... ۶۱
- ۴-۷- نمودار اثر زمان بر کاهش میزان بُر..... ۶۲
- ۴-۸- شکل باندهای ماریچی و فیلامنت غیر منشعب در اسپروژیرا..... ۶۹
- ۴-۹- شکل باند DNA ژنومی..... ۷۰

فصل اول

مقدمه

امروزه آلودگی محیط زیست به انواع ترکیبات شیمیایی، آلی و معدنی به دلیل توسعه سریع صنایع شیمیایی و ورود انواع ترکیبات سمی و خطرناک به منابع طبیعی به یک تهدید جدی تبدیل شده و فلزات سنگین^۱ مشکلات بسیار جدی را برای محیط زیست انسان‌ها و سایر موجودات ایجاد کرده است. این عناصر از طریق بیولوژیکی قابل تجزیه نبوده و اکثراً دارای تحرک و قابلیت تجمع زیاد در بافت‌های موجودات زنده هستند. فلزات سنگین از آلاینده‌های پایدار غیر قابل تجزیه بیولوژیکی هستند که می‌توانند در محیط زیست به آب و خاک وارد شده و پس از جذب توسط گیاه، وارد زنجیره غذایی انسان و دام شوند. بنابراین برای هر کدام از فلزات سنگین حدود استاندارد و آستانه سمیت تعیین شده که بالاتر از آن می‌تواند سمی و خطرناک باشد. بُر^۲ از عناصر ضروری ریزمغذی برای رشد گیاهان (Warington 1923) و برخی حیوانات (Rowe et al. 1998) است و میزان مجاز آن در آب آشامیدنی ۵ میلی گرم در لیتر می‌باشد. این عنصر همچنین یکی از آلاینده‌های پایدار غیر قابل تجزیه بیولوژیکی است که می‌تواند در سطوح بالاتر از حد مجازی که توسط موسسات استاندارد و محیط زیست تعیین می‌شود، باعث سمیت گیاه، حیوان، انسان و آلودگی محیط زیست شود.

امروزه سازمان‌هایی که حفاظت محیط زیست را بر عهده دارند، با وضع قوانینی از ورود بی‌رویه این عناصر به طرق مختلف به محیط زیست جلوگیری می‌کنند. از جمله راه‌های ورود این عناصر به محیط زیست، پساب فاضلاب تصفیه شده یا تصفیه نشده برخی صنایع است که در فرایند فراوری از این عناصر استفاده می‌کنند. روش‌های معمول جهت حذف فلزات سنگین از چنین پساب‌هایی، رسوب دهی شیمیایی به صورت هیدروکسید یا سولفید و تعویض یونی می‌باشد. این روش‌ها علاوه بر هزینه بالا، مشکل تولید لجن حاصل از رسوبات شیمیایی را نیز به دنبال دارند که خود سبب خودداری صاحبان صنایع از کاربرد چنین روش‌هایی می‌شود. در این حالت مشکل موجود در محیط‌آبی تبدیل به یک مشکل جدید در قسمت مواد زاید می‌شود که سازگار با محیط زیست نیستند. چنین مشکلاتی سبب شده که روش حذف بیولوژیکی^۳ به عنوان گزینه‌ای اقتصادی و سازگار با محیط زیست، مورد توجه بیشتری قرار گیرد.

¹ - Heavy metals

² - Boron

³ - Biological removal

حذف بیولوژیکی توسط زیست توده‌ها^۱ به دو صورت جذب بیولوژیکی^۲ و تجمع بیولوژیکی^۳ انجام می‌شود. در جذب بیولوژیکی، فلزات سنگین بدون اینکه ضرری برای جرم بیولوژیکی داشته باشند بر روی سلول‌های زیست توده باند می‌شوند. در تجمع بیولوژیکی حذف فلزات سنگین در زمان تماس طولانی سلول‌های زنده زیست توده با محلول فلزی از طریق داخل سلولی صورت گیرد. پایین بودن هزینه راهبری، پایین بودن لجن بیولوژیکی و شیمیایی دفعی، راندمان بالای حذف فلزات از پساب و همچنین عدم نیاز به مواد مغذی از مزایای این روش هستند که سبب شده جاذب‌های بیولوژیکی بعنوان یک روش جدید به منظور حذف فلزات سنگین از پساب‌های صنعتی مورد استفاده قرار گیرند. ظرفیت مربوط به حذف یک جاذب بیولوژیکی با ظرفیت جذب جاذب‌های سنتتیک تجاری برابر است. در جاذب‌های بیولوژیکی تمام یون‌های فلزی قبل از دسترسی به غشای پلاسمایی و سیتوپلاسم باید از میان دیواره سلولی بگذرند که خود این دیواره سلولی حاوی پلی ساکارید و پروتئین‌های مختلفی است و لذا سایت‌های فعالی که قابلیت باند کردن فلزات را داشته باشند، در اختیار دارند. مواد پلیمری خارج سلولی نیز می‌توانند به صورت انتخابی یون‌های فلزی را با پتانسیل تجمعی بالا باند کنند و اغلب به صورت کپسول‌ها و یا به صورت مجموعه‌های متراکم در اطراف سلول قرار دهند. در میان اتوتروف‌ها، جلبک‌ها به دلیل توانایی ایجاد توده ضخیم مورد استفاده قرار گرفته‌اند و ظرفیت جذب بیولوژیکی زیادی نشان داده‌اند. در دهه اخیر جاذب‌های کم هزینه مورد بررسی بیشتر قرار گرفته و مشخص شده که جلبک‌ها بسیار مفید بوده و به عنوان جاذب‌های بسیار خوب مطرح می‌باشند. توانایی جلبک‌ها در جذب مواد به واسطه خصوصیات دیواره سلولی آنهاست که دارای پلیمرهای پکتین و گالاکترونیك اسید می‌باشد که به طور عمده ای مسئول کلاته کردن فلزات سنگین می‌باشد.

قابلیت استفاده جلبک‌ها برای کاهش یا حذف بُر از پساب‌های صنعتی از جمله مواردی است که باید مورد توجه بیشتری قرار گیرد.

¹ -Biomass

² - Biosorption

³ - Accumulation

۲-۱- اهداف تحقیق

به طور کلی اهداف این تحقیق را می توان به شرح زیر خلاصه کرد:

۱- تعیین کارایی برخی جلبک ها در کاهش میزان بُر

۲- انتخاب جدایه برتر

۳- تهیه کلنی خالص جلبک

۴- بررسی تاثیر غلظت های مختلف بُر بر رشد جلبک

۵- بررسی تاثیر پساب معدنی بر رشد جلبک

۶- شناسایی مورفولوژیکی جدایه انتخاب شده

۷- شناسایی مولکولی جدایه انتخاب شده

فصل دوم

مروری بر منابع

۲-۱-آلودگی^۱

از آنجا که مصرف فلزات در جهان رشد زیادی داشته صنایع معدنی، به طور فزاینده ای با لزوم فراوری ترکیبات به دست آمده از عملیات بهره برداری و همچنین حذف آلودگی‌های زیست محیطی و مواد شیمیایی غیرفلزی که به طور فزاینده‌ای محیط زیست را در معرض خطر قرار داده اند مواجه بوده اند.

فلزات سنگین^۲ از جمله آلاینده‌های زیست محیطی هستند که مواجهه انسان با بعضی از آنان از طریق آب و مواد غذایی می‌تواند مسمویت‌های مزمن و بعضاً حاد و خطرناکی را ایجاد نمایند، که از جمله آنها می‌توان به فلزاتی نظیر سرب، کادمیوم، جیوه، نیکل و روی در انواع نان و سرب، کادمیوم، جیوه، آلومینیوم، آرسنیک، روی، مس، آهن و بُر در انواع نمک‌ها اشاره کرد. در دهه گذشته ورود آلاینده‌ها با منشاء انسانی مانند فلزات سنگین به داخل محیط‌های آبی، به مقدار زیادی افزایش یافته است که به عنوان یک خطر جدی برای حیات محیط‌های آبی به شمار می‌آیند. فلزات سنگین در یک مقیاس وسیع، از منابع طبیعی و انسان ساخت وارد محیط زیست می‌شوند. میزان ورود این فلزات سنگین به داخل محیط زیست، بسیار فراتر از میزانی است که به وسیله فرایندهای طبیعی برداشت می‌شوند. بنابراین تجمع فلزات سنگین در محیط زیست قابل ملاحظه است. سیستم‌های آبی به طور طبیعی دریافت کننده‌ی نهایی این فلزات هستند. آلاینده‌هایی که در آب یافت می‌شوند، ناشی از پساب‌های خانگی، تخلیه محصولات شیمیایی، سموم، حشره کش‌ها و علف کش‌ها، تخلیه صنعتی، پساب‌های رادیواکتیو، هیدروکربن‌های نفتی و رنگی می‌باشند.

۱-۱-۲-آلودگی آب‌ها

آلودگی آب افزایش مقدار هر معرف اعم از شیمیایی، فیزیکی یا بیولوژیکی است که موجب تغییر خواص و نقش اساسی آن در مصارف ویژه‌اش گردد. تصفیه آب و جلوگیری از آلودگی و به هدر رفتن آن از مسائل بسیار مهم زمان ما به حساب می‌آید. آلودگی آب‌ها، معضل بزرگ زیست محیطی محسوب می‌شود که به علت پیشرفت صنایع و تکنولوژی، هر روزه با پیشرفت روزافزون آن مواجه هستیم. کانی‌های موجود در معادن سطحی در اثر تغییر و تبدیل به عامل آلوده کننده تبدیل می‌شوند. مثلاً آب جاری سطحی (حاصل از باران و...) هنگام عبور از معادن زغال

¹-Pollution

²-Heavy metals

سنگ، دی سولفید آهن همراه با زغال سنگ را در خود حل کرده و سپس در اثر واکنش آن را به اسید سولفوریک تبدیل می‌کند. اسید حاصل ضمن عبور از لایه‌های مختلف مخازن زیرزمینی، موجب آلوده شدن آن می‌شود. جمع شدن فاضلاب‌های شهری به ویژه اگر در یک حوزه آهکی یا شنی وارد شوند، از آن جا که در معرض باکتری‌ها قرار می‌گیرند و تجزیه می‌شوند، مستقیماً و به راحتی به مخازن زیرزمینی نفوذ پیدا کرده و موجب آلوده شدن آن‌ها می‌شوند.

ضایعات رادیواکتیوی یکی از عوامل مهم آلوده کننده منابع آبی زیرزمینی هستند و رفع آنها در حقیقت مشکل بزرگی برای صاحبان تکنولوژی هسته‌ای نیز به شمار می‌رود که امروزه دفن آن‌ها در زیر زمین است. علاوه بر دفن ضایعات رادیواکتیو در زیر زمین، همه انفجارهای هسته‌ای زیر زمینی نیز موجب آلوده شدن آب‌های زیر زمینی می‌شود. فاضلاب‌های صنعتی و کشاورزی و خانگی حاوی مواد خطرناکی هستند که می‌توانند زندگی انسان و دیگر جانوران را دچار مخاطره کنند. ازت و فسفر موجود در کودهای شیمیایی، سرب موجود در بنزین، جیوه و دیگر عناصر شیمیایی موجود در فاضلاب صنعتی، میکروب‌ها و انگل‌های شیرابه زباله‌ها چنانچه وارد آب‌های مورد استفاده انسان شوند، منجر به بیماری‌های خطرناک و گاهی غیرقابل درمان می‌شوند. انواع سرطان از جمله بیماری‌هایی هستند که مواد شیمیایی در ایجاد آنها دخالت دارند. بیماری‌های وبا، حصه، اسهال خونی و بسیاری از بیماری‌های عفونی دیگر از طریق آب آلوده منتقل می‌شوند.

۲-۱-۲- طبقه بندی آب‌های آلوده

۱- آب‌های آلوده‌ای که در کارخانجات و مراکز صنعتی تولید شده، به شدت سمی بوده و نمی‌توان آنها را برای مصارف خانگی استفاده کرد که برای برگشت دوباره به محیط زیست باید به صورت دقیق تصفیه شوند.

۲- آب‌هایی که مصارف خاصی داشته، قابل استفاده مجدد نمی‌باشند. مانند آب‌های صنایع نوشابه سازی

حدود ۶۹٪ آب مصرفی جهان، صرف کشاورزی و عموماً آبیاری می‌شود. ۲۳٪ به مصرف صنایع می‌رسد و مصارف خانگی تنها حدود ۸٪ را شامل می‌شود. در کشورهای توسعه یافته، کشاورزی و صنایع بیشترین مصرف آب را داشته، بالاترین نقش را در آلودگی آب‌ها دارد.