

* قابلية الطحليين *Cladophora fracta* و *Spirogyra majuscula* على النمو بتراكيز مختلفة لمياه الصرف الصحي وإنتاج الإيثانول الحيوي

زيد سالم عواد العوادي

رائد كاظم عبد الأسدي

raid.al-asady@qu.edu.iq

جامعة الؤادسية/ كلية التربية/ قسم علوم الحياة

الخلاصة

هدفت الدراسة الحالية إختبار قابلية نوعين من الطحالب الخضر الخيطية (*Spirogyra majuscula* Kützing (1849) و *Cladophora fracta* Kützing (1843) على النمو بتراكيز مختلفة لمياه الصرف الصحي وإنتاج الإيثانول الحيوي، ولتحقيق ذلك تم عزل الطحليين من مياه نهر الديوانية / مركز المدينة ومن ثم إكثارهما في مزارع كتلوية للحصول على كتل حيوية بغية التحليل الكيميائي وإنتاج الإيثانول الحيوي.

تم تنمية الطحليين على الوسط الأساس (Chu-10) وبشدة الإضاءة المثلى للنمو (1800 لوكس)، من خلال تحديد منحني النمو وثابت النمو النسبي (K) ومعدل زمن التضاعف (G) لكل طحلب، بعدها تم إختبار نمو الطحليين في خمسة تراكيز لمياه الصرف الصحي، والتي هي عبارة عن مجموعة من التخافيف لمياه الصرف الصحي بالماء المقط وبالنسب التالية: 10% و 20% و 40% و 80% و 100% (مياه صرف صحي فقط)، لتتم بعد ذلك عملية إنتاجهما بكتل حيوية لغرض الكشف عن محتوَاهما الجاف من الكربوهيدرات الكلية وقابليتهما على إنتاج الإيثانول الحيوي من عملية التخمر للكربوهيدرات وتحديد تراكيز ه عند جميع تراكيز مياه الصرف الصحي لكلا الطحليين على التوالي، وأظهرت النتائج أن معدل زمن التضاعف للطحليين على التوالي عند الوسط الأساس بلغ 0.97 و 1.08 مقارنةً بالتراكيز المختلفة لمياه الصرف الصحي التي لم تعطِ تأثيراً معنوياً لثابت النمو النسبي ومعدل زمن التضاعف للطحليين قيد الدراسة بالرغم من إحراز الطحلب *C. fracta* أعلى ثابت للنمو النسبي عند جميع تراكيز مياه الصرف الصحي مقارنةً بالطحلب *S. majuscula* عدا التركيز 40% الذي سَجَل تعوقاً للطحلب الأخير (0.297) على حساب الطحلب الأول (0.253)، في حين كان معدل زمن التضاعف أعلى عند جميع التراكيز للطحلب *S. majuscula* ما عدا التركيز 40% الذي كان فيه تعوق معدل زمن التضاعف لصالح الطحلب *C. fracta* والذي بلغ (1.014 و 1.190) على التوالي. وأظهر التحليل الكيميائي للمحتوى الجاف للطحليين *S. majuscula* و *C. fracta* الناميين عند الوسط الأساس وكذلك عند تراكيز مياه الصرف الصحي زيادة طردية في محتوَاهما من الكربوهيدرات الكلية الذي زاد مع زيادة تراكيز مياه الصرف الصحي وصولاً إلى التركيز الخام (100%) إذ بلغت أعلى نسبة له من الكربوهيدرات الكلية (26.19 و 30.29%) على التوالي عند التركيز 100% مع التعوق الواضح لطحلب *C. fracta* في محتواه الكربوهيدراتي على الطحلب *S. majuscula* عند التراكيز ذاتها. وأظهر الإيثانول الحيوي الناتج من تخمر الكربوهيدرات للطحليين قيد الدراسة بتأثير التراكيز المختلفة لمياه الصرف الصحي تغايراً واضحاً بين الطحليين من حيث الإنتاجية وتراكيز الوسط إذ بلغ أعلى محتوًاً لطحلب *S. majuscula* 33.44% عند التركيز 20% بينما أعطى التركيز 40% أعلى محتوًاً للطحلب *C. fracta* بلغ 35.33% مقارنةً بالمحتوى ذاته عند معاملة المقارنة (الوسط الأساس) والذي بلغ (32.29 و 27.13%) على التوالي أو بالمقارنة مع أقل محتوى للإيثانول الحيوي سَجَل عند التركيز 40% إذ بلغ (18.60 و 8.52%) للطحليين على التوالي.

كلمات مفتاحية: طحالب، مياه الصرف الصحي، الإيثانول الحيوي.

* البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الثاني.

سلالات الخلايا الطحلبية الخيطية كـ *Spirogyra* sp. و *Spirulina* sp. والتي تُعد من أكثر الأنواع الواعدة لإنتاج الإيثانول الحيوي نظراً لإرتفاع نسبة الكربوهيدرات في تكوينها، كما أن العمليات التقليدية لإنتاج الإيثانول الحيوي باستخدام التحلل والتخمير تطبّق بشكل جيد على الكثير من المواد الأولية إلا إنها لم تحقق التحويل الأمثل بعد للكتلة الحيوية الطحلبية إلى إيثانول حيوي ، وعلى نحو مماثل لإستخراج الدهون فإن المرحلة الأولى في هذه العملية هي تدوير خلايا الكتلة الحيوية باستخدام العديد من التقنيات بما فيها ال تعقيم بواسطة الموصدة أو التجفيف بواسطة الميكروويف أو المعاملة بالحامض أو القاعدة القوية (11). وتبدأ الخطوة الأولى هنا بتحويل الخلايا الحاوية على الكربوهيدرات والنشويات إلى السكريات باستخدام التحلل الإنزيمي أو الحامضي، وبعد التحلل يتم تخمير السكريات مع الخميرة التي عادةً ما تكون *Saccharomyces cerevisiae* أو *Saccharomyces bayanus* إذ تعطي وسطاً سائلاً حاوياً على ما يصل إلى 17% (ح/ح) إيثانول إتماداً على تركيز السكريات في حين تكون الخطوة التالية لإنتاج الإيثانول هي بإستخلاص الوسط السائل لإنتاج تركيز الإيثانول م ن نحو 98% (ح/ح)، وبعد العديد من عمليات التنقية للإيثانول يُنتج الوقود الذي يمكن أن يستخدم كمادة مضافة للمحركات التقليدية بنسبة 85% كحد أقصى في محركات E85 المتخصصة Specialized E85 Engines (12). وتُستعمل طريقة التخمير على المستوى التجاري في العديد من البلدان المختلفة لإنتاج الإيثانول من المحاصيل السكرية والنشوية (13)، إذ من المعروف أن بعض الطحالب تحتوي على كمية كبيرة (أكثر من 50% من وزنها الجاف) من النشاء والسليلوز والكلايكوجين، والتي هي المواد الخام لإنتاج الإيثانول، كما أن غياب اللكتين Lignin يحفز إنزيمات التحلل المائي على جعل السليلوز الطحلي بسيط جداً (14). ولإنتاج الإيثانول توجد هنالك حاجة أولية لمعالجة الكتلة الحيوية الطحلبية التي تحتاج إلى تحرير الكربوهيدرات الموجودة في الخلايا ليتم بعد ذلك ف ي وقت لاحق إنتاج الإيثانول من تخمر الكربوهيدرات (15)، وصولاً إلى المرحلة الأخيرة وهي عملية الفصل والتنقية عن طريق التقطير (16). علاوة على ما ذكر فإن الطحالب قادرة أيضاً على إنتاج الإيثانول الحيوي من خلال تحطيم جزيئات النشاء بعملية الأيض اللاهوائي Anaerobic metabolism (10). لذا

تتصف الطحالب بكونها مجموعة من الكائنات الحية ذاتية التغذية تتراوح أحجامها بين دقيقة التركيب Microscopic إلى كبيرة Macroscopic، ووحيدة الخلية إلى متعددة الخلايا ؛ إذ تقوم بتحويل الطاقة الشمسية إلى نواتج كيميائية مفيدة مثل الزيت (1). ويُعد الماء الوسط الأساس لتلك الكائنات (الطحالب) كونها تفتقر إلى التنظيم المورفولوجي المعقد (2). كما تتصف بكونها مجموعة مختلفة من الكائنات الحية، وتُعد من النباتات البسيطة التي تفتقر إلى الأوراق الحقيقية والساق والجذر وإلى نظام النقل ولا تحاط الأعضاء التكاثرية بأنسجة، وهي تعد بكتلتا نوعيها الكبيرة (الطحالب البحرية) والدقيقة (الطحالب الدقيقة) من مُنتجات الأوكسجين بعملية البناء الضوئي (3). وبما أنها تمتلك (الطحالب إما الكبيرة أو الدقيقة منها) إمكانات كبيرة لإنتاج الوقود الحيوي كونها مجموعة متنوعة من الكائنات وحيدة الخلية فإنها قادرة على تقديم مجموعة من الحلول لمتطلبات الطاقة لدينا من خلال طرقٍ عدة (4). فالطحالب تمتاز بكفاءة إستخدام غاز CO₂ من الغلاف الجوي، وإنها مسؤولة عن أكثر من 50% من إجمالي تثبيت الكربون العالمي (5). تُزرع الطحالب على المستوى التجاري لغرض إنتاج عددٍ من المواد المختلفة بما في ذلك المكملات الغذائية البشرية والحيوانية والمواد الكيموحيوية ، فضلاً على ذلك فإن الكتلة الحيوية للطحالب تكون قادرة على تقديم مجموعة واسعة من المنتجات مثل؛ الطاقة الحيوية Bioenergy والوقود الحيوي Biofuel والمنتجات الحيوية الأساسية Bio-based products (البلاستيك الحيوي Bio-plastics ومستحضرات التجميل الحيوية Bio-cosmetics والمذيبات الحيوية Bio-solvents) (6 و 7). ويُعد الوقود الطحلي Algal fuel أو ما يُعرف بالوقود الحيوي الطحلي Algal biofuel هو أحد منتجاتها وبديلاً للوقود الأحفوري السائل Liquid fossil fuel (8 و 9). إذ تقوم العديد من الشركات والهيئات الحكومية بتمويل الجهود الرامية إلى خفض التكاليف الرأسمالية والتشغيلية وجعل إنتاج الوقود من الطحالب قابلاً للتطبيق على المستوى التجاري (10).

يُعد الإيثانول الحيوي البديل الأفضل لإنتاج الوقود الحيوي؛ إذ يتم إنتاجه من الكربوهيدرات والنشويات في الخلايا الطحلبية إتماداً على نوع السلالة الطحلبية وتكوينها والتي بإستطاعتها إنتاج الإيثانول من كتلتها الحيوية ، وهي مثل

18) وحسب الطريقة الموضحة في (19).
filters at 0.22µm

2- تشخيص الطحالب

تم الإعتماد في تشخيص الطحالب الواردة في أدناه بحسب (19).



Cladophora fracta Spirogyra majuscula
شكل 1: التشخيص المجهرى لطحلي الدراسة (X10)

3- زراعة الطحالب وإنتاج الكتلة الحية

تم زراعة الطحالب لغرض إنتاج الكتلة الحية منها بنظام زراعة الـ Batch culture إذ تم أخذ 10 مل من العزلة الطحلبية النقية وأضيفت إلى دورق مخروطي حاوي على 100 مل من وسط Chu-10 وحُضِنَ لمدة 14 يوماً في حاضنة الزرع Cultivate cabinet بعدها نُقِلَ النمو الزرعي إلى دورق حاوي على 1000 مل من وسط Chu-10 وحُضِنَ لمدة 14 يوم، وفي النهاية نُقِلَ النمو الزرعي إلى أحواض زجاجية سعة 5 لتر مع التهوية والإضاءة بنظام (16 ساعة إضاءة : 8 ساعة ظلام) وبشدة إضاءة ثابتة 1800 لوكس (محددة مسبقاً كشدة إضاءة مثلى للنمو) عند درجة حرارة (25 ± 2)°م (20 و 21).

4- تنمية الطحالب في تراكيز مختلفة لمياه الصرف الصحي

جُمعت عينات من مياه الصرف الصحي لمدينة الديوانية من مركز الماء والمجاري الواقع في حي خيري جنوب مدينة الـ ديوانية (180 كم جنوب العاصمة بغداد / العراق)، وتُركت لأكثر من ساعة في أسطوانة زجاجية لكي تستقر الفضلات الصلبة في الأسفل ثم بعد ذلك ترشيحها بورق الترشيح من نوع Whattman-1 تعقبها عملية تمريرها من خلال أوراق ترشيح دقيقة بقطر 0.22 مايكرومتر في ظروف معقمة لغرض التخلص من الشوائب والتعقيم التام ليُعمل بعد ذلك منها بوساطة تخفيفها بالماء المقطر المعقم عدة تراكيز لمياه الصرف الصحي (10 و 20 و 40 و 80

هدفت الدراسة الحالية إلى عزل وتنقية الطحلبين *Spirogyra majuscula* و *Cladophora fracta* من بيئاتهم المحلية وتمييزهم بتركيز مختلفة من مياه الصرف الصحي وتأثيره على بناء كتلته الحيوية وإنتاج الكربوهيدرات والإيثانول الحيوي، وبالتالي فإن هذه الدراسة هي خطوة هامة إلى الأمام في استخدام الطحالب كمصدر للطاقة المتجددة.

المواد وطرائق العمل

1- جمع عينات الطحالب، عزلها وتنقيتها

أُخذت عينات المياه الحاوية على الطحالب من منطقة نهر الديوانية الذي يمر وسط مدينة الديوانية / محافظة القادسية (180 كم جنوب العاصمة بغداد / العراق)، حيث جُمعت من مناطق مختلفة من النهر وبصورة عشوائية، ويهدف الحصول على مزرعة وحيدة الطحالب Unialgal culture استُعملت طريقة التخفيف المتسلسل Serial dilution وذلك بأخذ جزء من المزرعة بواسطة ماصة ووضعها في الدورق الحاوي على الوسط المعقم (الوسط الأساس Chu-10) ثم تركه في الظلام لمدة 24 ساعة بعدها تؤخذ منه مجموعة من الخيوط الطحلبية وتوضع في قنينة أخرى حاوية على الوسط الزرعي السائل والمعقم وتترك في الظلام مرة أخرى لمدة 2 - 3 ساعات ثم تتم بعد ذلك عملية الترسيب بواسطة جهاز النبذ المركزي بسرعة 3000 دورة/ دقيقة لمدة 5 دقائق ليتم بعد ذلك التخلص من الراشح، في حين يؤخذ الراسب (الخلايا الطحلبية) ويُغسل بالماء المقطر المعقم، وتعاد هذه العملية من ترسيب وغسل برمتها لعشرة مرات متتالية لتتم بعد ذلك زراعة الخلايا الطحلبية في أطباق على الوسط الزرعي الصلب Nutrient agar الخاص باختبار البكتريا؛ إذ حُضِنَت الأطباق في الحاضنة عند درجة الحرارة 33°م لمدة 72 ساعة للتأكد من خلوها من البكتريا (17). وللتأكد أيضاً من نقاوة العزلات الطحلبية استُعملت أيضاً طريقة إختبار الحساسية للجراثيم الموجودة في المزرعة الطحلبية تجاه المضادات الحيوية (Chloramphenicol و Neomycin و Penicillin-G و Streptomycinsulphate و Tetracycline hydrochloride) التي أُذِيبَت في الوسط الزرعي بالتراكيز (600 و 0.05 و 1.6 و 6.0 و 1.0) ملغم / لتر على التوالي وجرى تعقيمها بعملية الترشيح بإستعمال أوراق ترشيح دقيقة ذات فتحات بقطر 0.22 مايكرومتر (Millipore

و 100%)، وإستعملت مزارع أحادية الطحلب لكل من *S. majuscula* و *C. fracta* النامية على الوسط الزراعي الأساس Chu-10 في طور اللوغارتمي لغرض زراعتها في التراكيز المختلفة لمياه الصرف الصحي بعد تعديل الدالة الحامضية لتراكيز مياه الصرف الصحي من (7 - 8).

5- تقدير منحنى النمو الطحلي

تم تقدير نمو للطحالب قيد الدراسة بإتباع الطرق القياسية الموضحة في (22) وذلك من خلال قياس الكثافة الضوئية (Optical density) بوساطة جهاز المطياف الضوئي وعلى طول موجي 650 نانومتر من خلال عزل المادة الطحلبية من الوسط الزراعي بطريقة النبذ المركزي على سرعة 3000 دورة/دقيقة لمدة 30 دقيقة لغرض تكثيف الخيوط إلى خلاياها، وبعد إهمال الراسب أخذ الراشح وقيست كثافته الضوئية. وحُسب معدل النمو وعُيّن عنه بثابت النمو النسبي (K) وكذلك زمن التضاعف (G) بحسب المعادلتين التاليتين:

$$K = \frac{\log OD_t - \log OD_0}{t} \times 3.322 \quad (23)$$

$$G = \frac{0.301}{K} \quad (24)$$

إذ إن:

t = الوقت (يوم) OD_t = الكثافة الضوئية بعد (t) يوم
OD₀ = الكثافة الضوئية عند بداية الوقت

6- تقدير المحتوى الكربوهيدراتي الكلي (%)

تم تقدير الكربوهيدرات الكلية بحسب طريقة الفينول-حامض الكبريتيك Phenol-Sulfuric Acid وذلك بسحق 10 ملغم من عينة الطحالب الجافة مع 10 مل من الماء المقطر بعدها فُصلت الكربوهيدرات المُذابة في الراشح عن الراسب بإستعمال جهاز الطرد المركزي بسرعة 5000 دورة/دقيقة لمدة 5 دقائق وكُررت العملية عدة مرات لإستخلاص الراسب وتركيز الراشح بعدها أخذ 1 مل من الراشح ووضع في أنبوبة زجاجية سعة 10 مل ثم أُضيف لها 1 مل من الفينول (5% وزن/حجم) و 5 مل من H₂SO₄ (96%) وبعد 10 دقائق حُركت العينة بشكلٍ مستمر ثم وضعت الأنبوبة الزجاجية في حمام مائي لمدة 10 دقائق بدرجة حرارة 25 - 30°م. تم قياس الكثافة المرئية للعينة عند الطول الموجي 490 نانومتر بإستعمال جهاز المطياف الضوئي، وبالإستعانة بالمنحنى القياسي لسكر الكلوكوز تم حساب تركيز الكربوهيدرات الكلية (25).

7- تقدير إنتاج الإيثانول الحيوي

• عملية التحلل المائي Hydrolysis Process: تم أخذ 50 مل من كل معاملة (المقارنة وتراكيز مياه الصرف الصحي) للطحالب قيد الدراسة ووضعها في دوارق زجاجية سعة 500 مل على صفيحة التسخين بدرجة حرارة 100°م لمدة (2 - 4) ساعات بعدها تترك لتستقر درجة حرارتها عند 45°م (26) ثم يضاف لكل دوارق إنزيم α -amylase بتركيز 0.06 غم / 50 مل وتحضن الدوارق لمدة 80 دقيقة (27). يتم ترشيحها بإستعمال ورق الترشيح ويؤخذ الرائق (السائل الطافي) ويهمل الراسب ويتم نبذ السائل الرائق بسرعة 9000 دورة/دقيقة لمدة 15 دقيقة، وعملية نبذ الرائق تلك تعتبر تعقيم وأساس للمادة الأساس الداخلة في العملية التالية (التخمير).

• عملية التخمير Fermentation Process: تضاف خميرة الخبز *Saccharomyces cerevisiae* بتركيز 10% (كثافته الضوئية = 0.5 عند طول موجي 600 نانومتر) إلى قنينة التخمير (100 مل) الحاوية على 50 مل من المادة الأساس لكل طحلب (الفقرة السابقة) وتحضن بدرجة حرارة الغرفة (30±°م) لمدة 120 ساعة. ويتم ملاحظة مستويات الإيثانول التي إذا ظهرت بتزايد فأن عملية التخمير ما زالت مستمرة أما إذا حدث العكس فتعد دليلاً على إنتهاء العملية (26).

• عملية تحليل الإيثانول Ethanol Analysis Process: العينات الناتجة من عملية التخمير تم ترشيحها بوساطة أوراق ترشيح دقيقة بقطر 0.45 مايكرومتر، ليتم بعد ذلك تحديد تراكيزها بوساطة تقنية السائل اللوني عالي الأداء High Performance Liquid Chromatography (HPLC) من خلال تحديد إرتفاع المنحنيات ومساحتها النسبية للنموذج القياسي ومن ثم مقارنته بالعينات قيد الدراسة (28) ضمن الظروف الواردة في الجدول (1) والخاصة بطريقة عمل الجهاز. ومن خلال معرفة المساحة النسبية للنموذج القياسي والمساحة النسبية لنماذج العينات قيد الدراسة تم حساب تركيز الإيثانول وفقاً للمعادلة التالية:

[تركيز النموذج (%) = (مساحة القمة للنموذج القياسي / المساحة الكلية للقمة) × 100]

جدول 1: ظروف الفصل للإيثانول المنتج من الطحالب
قيد الدراسة بإستعمال تقنية السائل اللوني

عالي الأداء (HPLC)

Shimadzu – Germany (2004)	نوع ومنشأ جهاز HPLC المستخدم
Injector Rheodyne (7125)	الحاقن
Automatic system controller (S11 – 6A)	جهاز السيطرة
Injection loop (5 µl)	كمية النموذج المستخدم بالحقن
Two Shimadzu model (LC – 6A Pumps)	نوع وعدد المضخات
T ₁ = 80°C. 2 Min ⁻¹	درجة حرارة العمود الابتدائية
T ₂ = 150°C. 2 Min ⁻¹	درجة حرارة العمود النهائية
34°C.Min ⁻¹	معدل إرتفاع درجة الحرارة
Injector temperature = 18°C	درجة حرارة الحاقن
Detector temperature = 40°C	درجة حرارة الكاشف
Carrier gas = 1.0 ml. Min ⁻¹	معدل جريان غاز النتروجين الحامل
ODS2 C ₁₈ (4 di × 250 mm)	نوع العمود وأبعاده
On column injection	حقن مباشر للعمود
Acetonitrile + H ₂ O (2:2) (V:V) HPLC grade	الطور السائل
Solid phase C ₁₈	الطور الصلب
213)×Attenuation (10 ³	حساسية الجهاز
(1cm. Min ⁻¹)	سرعة ورقة التسجيل
Equipped with flow 0.5 ml/min, UV detection at 210 nm.	نوع الكاشف

أقل فرق معنوي (LSD) Least Significant Difference عند مُستوى إحتمال 0.05 (29).

النتائج

1- معدل النمو الطحلي عند الوسط الأساس (Chu-10) يُظهر منحنى النمو الطحلي (شكل 2) عند الوسط الأساس أن طور النمو الأسّي بدأ بعد اليوم الثالث وإستقر عند اليوم التاسع لكلا النوعين ثم بدأ طور التناقص بعد اليوم 18 بالنسبة لطحلب *S. majuscula* وبعد اليوم 21 بالنسبة لطحلب *C. fracta*، وبلغ ثابت النمو النسبي لكلا الطحليين (0.31 و 0.28) ومعدل زمن التضاعف (0.97 و 1.08)، على التوالي.

2- معدل النمو الطحلي عند التراكيز المختلفة لهياه الصرف الصحي

منحنى النمو الطحلي بدلالة الكثافة الضوئية للنوع *S. majuscula* (شكل 3) إختلف بإختلاف التراكيز المستعملة من مياه الصرف الصحي؛ إذ يُلاحظ أن الطور الأسّي لنمو الطحلب بتأثير جميع التراكيز قيد الدراسة بدأ بعد اليوم الثالث عدا التركيز 100% والذي بدأ بعد اليوم السادس وإستقر عند اليوم 12 ثم بدأ بالتناقص بعد اليوم 15 وهو ما يشابه نوعاً ما تأثير التركيز 80%، فضلاً عن ذلك فإن باقي التراكيز إختلفت في فترات ثباتها وتناقصها وكما هي واردة في الشكل ذاته.

أما منحنى النمو للنوع *C. fracta* (شكل 4) فإختلف أيضاً بإختلاف التراكيز المستعملة من مياه الصرف الصحي إلا أن الطور الأسّي لغالبيةها بدأ بعد اليوم السادس وإستقر عند اليوم 12 بالرغم من بعض الإختلاف الظاهر في الشكل ذاته وكذلك الإختلاف في تأثير جميع التراكيز على بداية طور التناقص في منحنى النمو والذي بدأ مبكراً مع التراكيز (10% و 40% و 80%) بعد اليوم 15 ومتأخراً مع التركيزين (20% و 100%).

ولم تُظهر بيانات الشكل (5) الخاصة بمعدل ثابت النمو النسبي للطحليين قيد الدراسة بتأثير التراكيز المختلفة لمياه الصرف الصحي أي تأثير معنوي فيما بينهما بالرغم من تفوق ثابت النمو النسبي لطحلب *C. fracta* بتأثير جميع التراكيز المستعملة قيد الدراسة على مثيله لطحلب *S. majuscula* عدا التركيز 40% الذي زاد فيه ثابت النمو

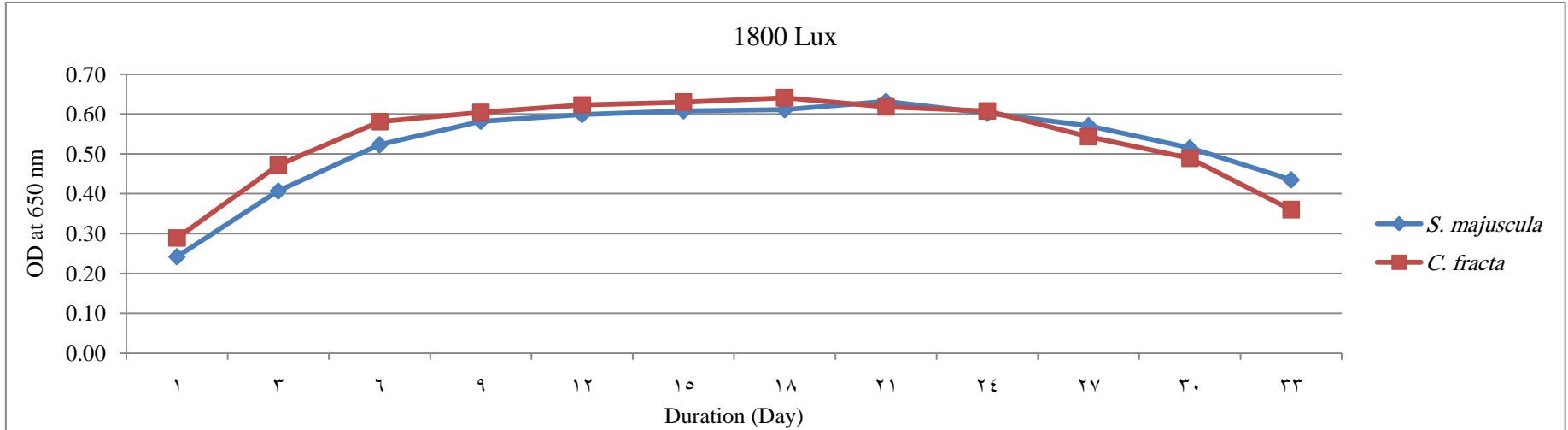
8- التحليل الإحصائي Statistical Analysis

صُممت التجربة بالتصميم العشوائي التام Complete Randomized Design (CRD)؛ إذ تضمنت نوعين من الطحالب تم تنمية كلٍ منهما بخمسة تراكيز من مياه الصرف الصحي فضلاً عن معاملة المقارنة لكلٍ منهما وبثلاث مكررات لكل معاملة ، وُخّلت بيانات النتائج إحصائياً بإستعمال إختبار تحليل التباين Analysis of variance الذي نُفِّدَ في برنامج (Microsoft Excel 2010) بإستعمال أداة تحليل البيانات Data Analysis، وقورنت متوسطات المُعاملات عندما كانت الفروق بينها معنوية بإستعمال إختبار

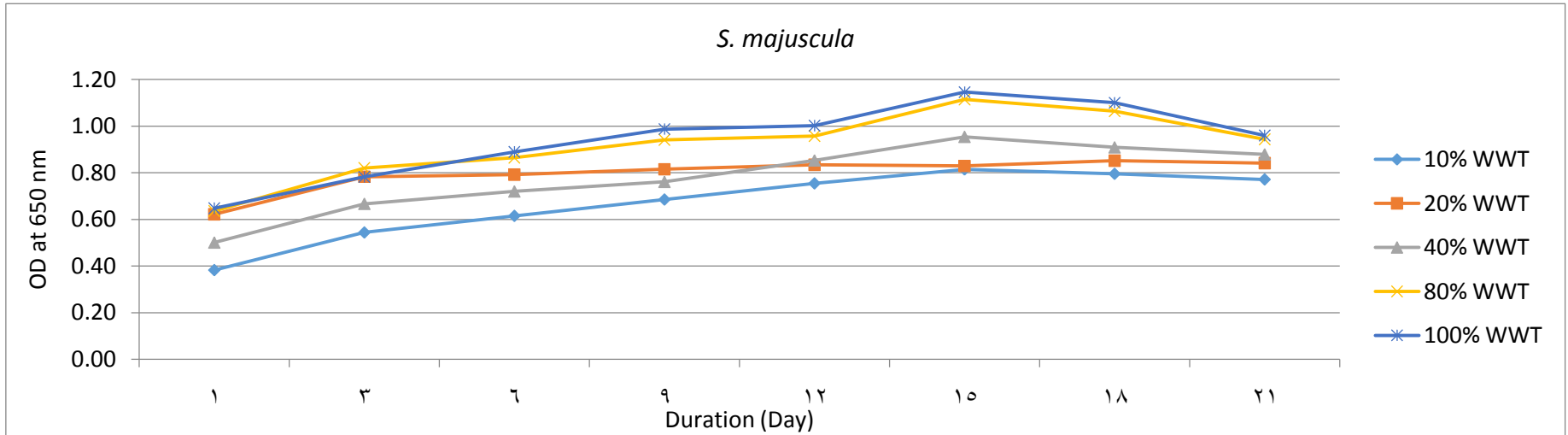
النسبي لطحلب *S. majuscula* على مثيله للطحلب الآخر . وإختلف الحال مع زمن التضاعف (شكل 6) الذي بالرغم من عدم وجود فرق معنوي بين تأثير التراكيز المختلفة لمياه الصرف الصحي على زمن التضاعف للطحلبين قيد الدراسة إلا إنَّ زمن التضاعف لطحلب *S. majuscula* تفوَّق على مثيله للطحلب *C. fracta* عند جميع التراكيز قيد الدراسة عند التركيز 40% الذي أعطى العكس لما سبق ذكره.

3- المحتوى الجاف للطحلبين من الكربوهيدرات الكلية (%)
المحتوى الكربوهيدراتي الكلي (شكل 7) للطحلبين *S. majuscula* و *C. fracta* زاد بشكلٍ طردي مع زيادة تركيز وسط النمو من مياه الصرف الصحي وصولاً إلى أعلى محتوى عند التركيز 100% بلغ (26.19 و 30.29)% على التوالي ، ومن جهة أخرى فأن محتوى الطحلبين عند معاملة المقارنة لم يختلف معنوياً فيما بينهما بقدر التفوق المعنوي ($P<0.05$) لمحتوى *C. fracta* الكربوهيدراتي على نظيره لـ *S. majuscula* عند جميع تراكيز مياه الصرف الصحي عدا التركيز 80% والذي لم يختلف عنده معنوياً محتوى كلا الطحلبين قيد الدراسة.

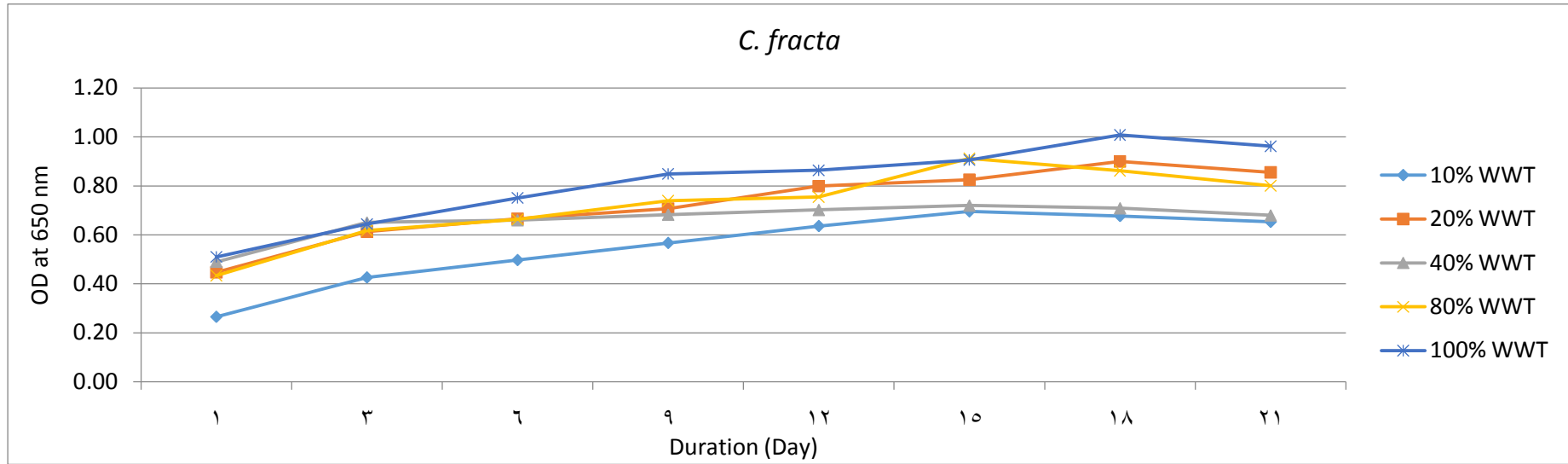
4- المحتوى الجاف للطحلبين قيد الدراسة من الإيثانول الحيوي (%)
الوقود الحيوي الطحلي دائماً ما يُحسب على شكل نسبة مئوية تأتي من حاصل قسمة المساحة النسبية للمادة القياسية على المساحة النسبية الكلية للمادة المراد إختبارها ومن ثم ضربها في 100. وعند النظر إلى الشكل (8) نلاحظ أن قدرة طحلبا الدراسة على إنتاج الإيثانول الحيوي تكاد تكون متساوية بتأثير وسط النمو 10% و 100% مياه صرف صحي مقارنةً بطحلبيّ المقارنة اللذان لم يختلفا عن بعضهما معنوياً بالرغم من الإنتاجية العالية لطحلب *S. majuscula* والتي بلغت 32.29% مقابل 27.13% للطحلب الآخر ، هذا وأن التغيرات في إنتاجية الإيثانول فيما بين الطحلبين عند أوساط النمو (20% و 40% و 80%) تُظهر التفوَّق المعنوي للطحلب *S. majuscula* على نظيره *C. fracta* عند التركيزين (40% و 80%) مياه صرف صحي مقابل العكس عند التركيز 20% مياه صرف صحي.



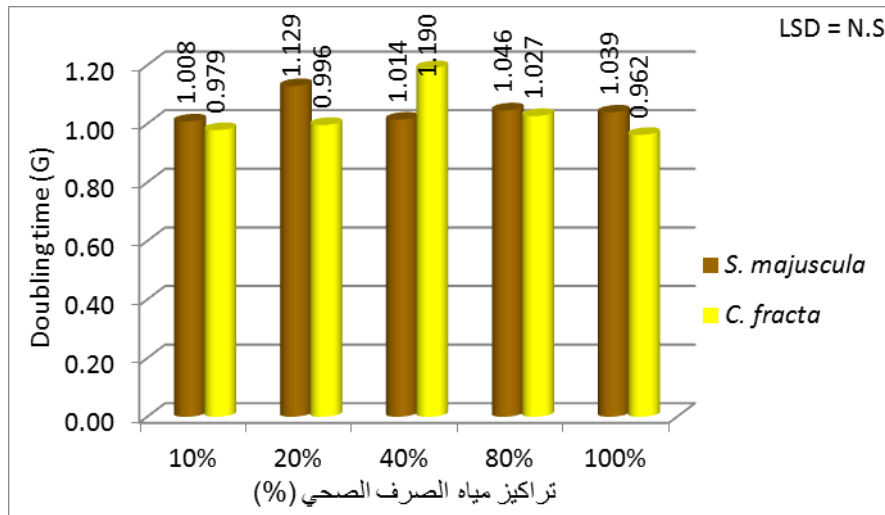
شكل 2: منحنى الكثافة الضوئية للنمو الطحلي عند الوسط الأساس (Chu-10)



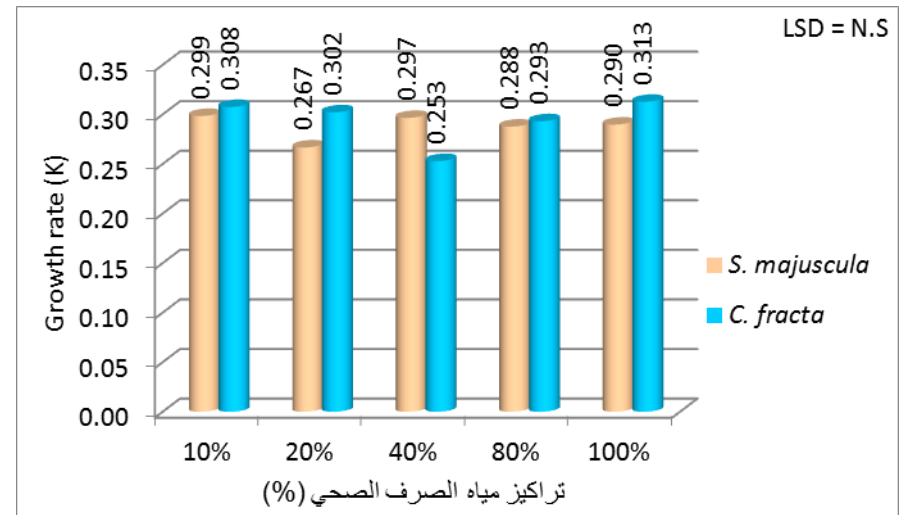
شكل 3: منحنى الكثافة الضوئية لنمو طحلب *S. majuscula* عند التراكيز المختلفة لمياه الصرف الصحي



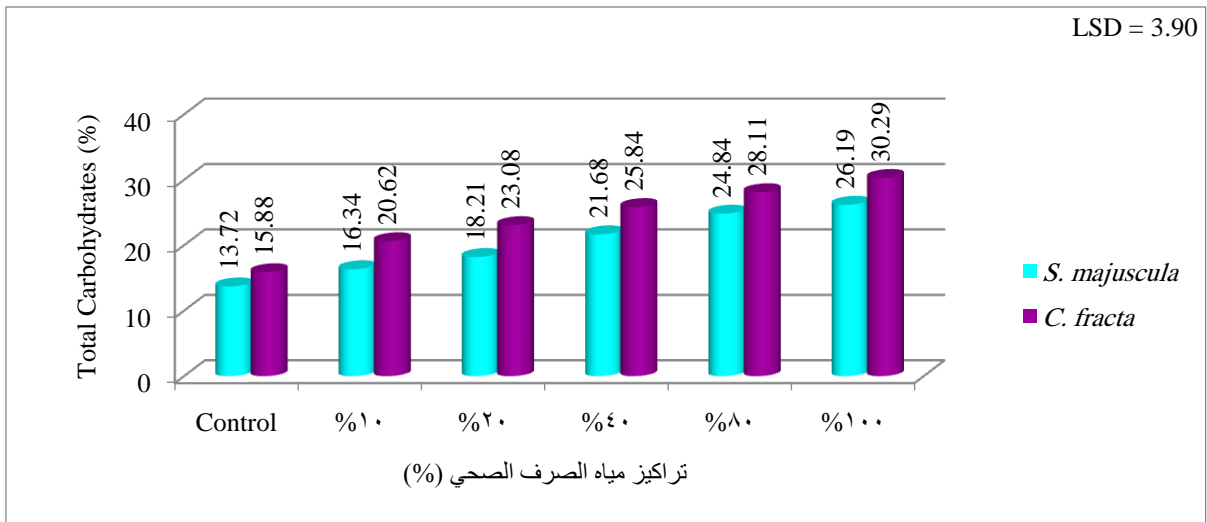
شكل 4: منحنى الكثافة الضوئية لنمو طحلب *C. fracta* عند التراكيز المختلفة لمياه الصرف الصحي



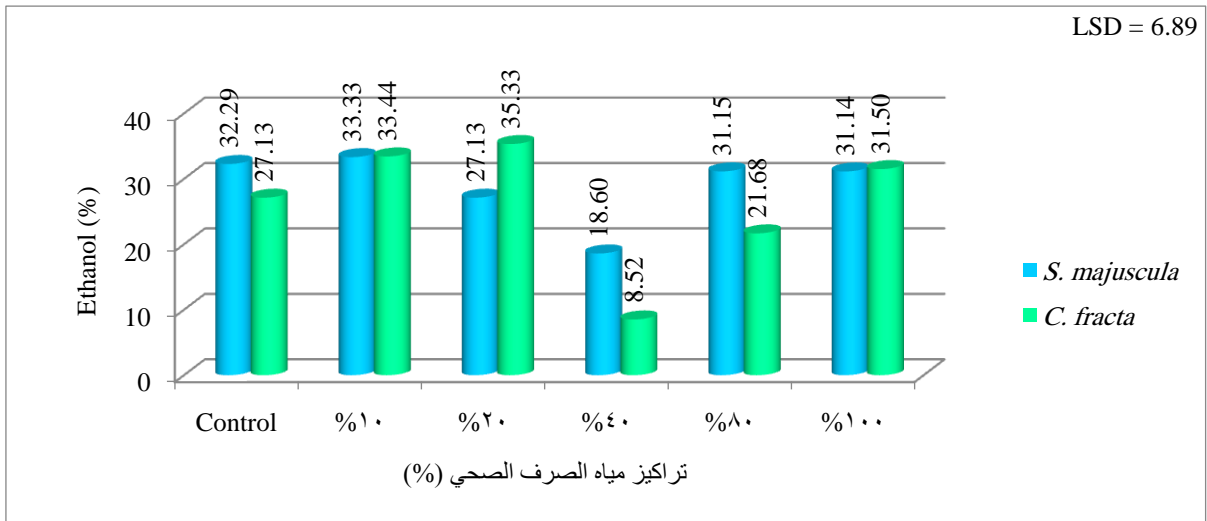
شكل 6: معدل زمن التضاعف (G) للطحلين عند التراكيز المختلفة لمياه الصرف الصحي



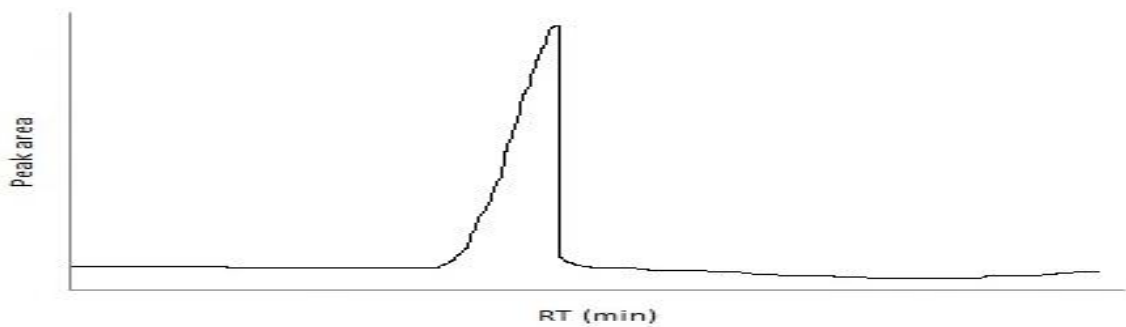
شكل 5: ثابت النمو النسبي (K) للطحلين عند التراكيز المختلفة لمياه الصرف الصحي



شكل 7: محتوى الطحليين من الكربوهيدرات الكلية (%) عند التراكيز المختلفة لمياه الصرف الصحي



شكل 8: محتوى الطحليين من الإيثانول الحيوي (%) عند التراكيز المختلفة لمياه الصرف الصحي



Standard Peak	Retention time (min)	Height (mAU)	Area (mAU)
1	1.676	108.496	1042.642

شكل 9: منحنى الإيثانول القياسي المستخدم في الدراسة الحالية والمقاس بتقنية (HPLC)

جرى أيضاً في الدراسة الحالية) بالمقارنة مع الفضلات غير المعالجة، والسبب في ذلك يُعزى إلى إن المغذيات غير العضوية متوفرة لتلك الطحالب والتي هي في الوقت ذاته غير قادرة على إستعمال العديد من المكونات أو المركبات العضوية المعقدة في مياه المجاري الخام غير المعاملة.

وخلال عملية البناء الضوئي تقوم الطحالب فقط بإستخدام الضوء والمغذيات (من الوسط) فتنتج والكربوهيدرات (شكل 7) فضلاً عن الدهون Lipids أو الزيوت Oils، وإن الكميات النسبية لهذه المنتجات الأيضية ترتبط ارتباطاً وثيقاً بالظروف البيئية والغذائية بما في ذلك كمية وشدة أشعة الشمس ومستويات CO₂ و pH والحرارة والمغذيات المتاحة ووجودها أو عدمه في الكائنات الحية الأخرى (33). ومن جانب آخر فإن المغذيات اللازمة لدعم نمو الطحالب يمكن أن تتحقق من خلال مجموعة متنوعة من المصادر، ولكن المواد الخام من المرجح أن تكون مكلفة للغاية لجعل الوقود المشتق من الطحالب قادراً على المنافسة إقتصادياً مع أنواع الوقود الأخرى، كما أن توفير المغذيات (أساساً من الكربون والنيتروجين والفسفور) بإستخدام النفايات جعل من نظام الإنتاج أكثر قابلية للإستمرار، وبهذه الطريقة فإن زراعة الطحالب حلت المشاكل البيئية المتعلقة بكيفية إنتاج الوقود أو المواد الكيماوية المفيدة الأخرى؛ فعلى سبيل المثال إستخدم المختبر الوطني للطاقة المتجددة National Renewable Energy Laboratory (NREL, Golden, CO) في الولايات المتحدة الأمريكية المياه المتدفقة من محطة توليد الكهرباء لإلتقاط إنبعاثات CO₂ (34). في حين تشير العديد من التقارير إلى أن تكاليف الوقود الحيوي المستخرج من الطحالب يمكن أن تُخفّض بإستخدام مياه الصرف الصحي (35 و 36). وإقترح العديد من المختصين في مجال إنتاج الوقود أن إستخدام زراعة الطحالب لن تكون قادرة على المنافسة من دون إستخدام مجاري النفايات (37 و 38 و 39). وأضاف (37) بأن المعالجة الحيوية ستكون ذات أهمية قصوى عندما يُنتج الوقود الحيوي

إن زراعة الطحالب في أوساط بديلة للوسط الزراعي الأساس تعد وسيلة من وسائل إختزال كلف زراعة وإنتاج الطحالب؛ ذلك لكون كلف العناصر المغذية للوسط الزراعي تشكل نسبة كبيرة من كلف الإنتاج، لذا كان هناك إهتمام واضح في هذا الموضوع من قبل العديد من الباحثين (30 و 31) في إستعمال المخلفات الزراعية والصناعية والحيوانية في تجاربهم.

وإن العمل بنظام بديل لإنتاج الوقود الحيوي الطحلي يكون بشكل نظام يجمع بين إنتاج الكتلة الحيوية للطحالب ومعالجة مياه الصرف الصحي من خلال تحويل الكتلة الحيوية إلى وقود حيوي. وكما هو ملاحظ من النتائج قيد الدراسة زيادة جميع المؤشرات المدروسة مما أعطى ن مواءم سريعاً للطحالب في مياه الصرف الصحي، لسبب يُعزى إلى تراكم معظم المغذيات في الكتلة الحيوية مما أثار بالإيجاب على إنتاجها للكربوهيدرات فضلاً عن ذلك فإن النظام الحيوي للطحالب في معالجة مياه الصرف الصحي يسمح بإعادة تدوير المغذيات لدورات متعددة لنمو الطحالب من جدي، ويمكن تأكيد ذلك من خلال ملاحظة قيم ثابت النمو النسبي (K) للطحالب النامية في وسط مياه الصرف الصحي (شكل 5) التي كانت أقرب من الأوساط الأخرى إليها من الوسط الأساس، وهي عموماً كانت عالية في وسط مياه الصرف الصحي الخام (100%) عند مقارنتها مع الوسط الأساس (Chu-10)، أما معدل زمن التضاعف (G) للطحالب قيد الدراسة (شكل 6) فبلغ أعلاه لطحلب *S. majuscula* 1.129 عند التركيز 20% من وسط مياه الصرف الصحي مقابل أعلى قيمة له بلغت 1.190 لطحلب *C. fracta* عند التركيز 40% من الوسط ذاته، إذ قد يعود ذلك إلى الإختلاف في آلية الإستجابة بين الطحلبين بالرغم من توفر متطلبات النمو غير العضوية وإتاحتها لكلا الطحلبين في الوسط ذاته، ويتفق ذلك مع (32) عندما لاحظوا نمواً جيداً للطحالب على مياه الفضلات المعالجة (بالترسيب والترشيح ومن ثم التعقيم، وهو ما

- Applied Phycology, Blackwell Science, P: 178-214.
- 7- Ometto, F. (2014). Microalgae to energy: biomass recovery and pre-treatments optimization for biogas production integrated with wastewater nutrients removal. PhD. Thesis, School of Applied Sciences, Cranfield University.
 - 8- Darzins, A.; Pienkos, P. and Edye, L. (2010). Current status and potential for algal biofuels production. IEA Bioenergy Task 39.
 - 9- Scott, S.A.; Davey, M.P.; Dennis, J.S.; Horst, I.; Howe, C.J.; Lea-Smith, D.J. and Smith, A.G. (2010). Biodiesel from algae: Challenges and prospects. Current Opinion in Biotech., 21(3): 277–286.
 - 10- Oncel, S.S. (2013). Microalgae for a macroenergy world. Renew and Sustainable Energy Rev., 26: 241-264.
 - 11- Aitken, D. and Antizar-Ladislao, B. (2012). Achieving a green solution: limitations and focus points for sustainable algal fuels. Energies, 5(5): 1613-1647.
 - 12- Hromadko, J.; Hromadko, J.; Miler, P.; Honig, V. and Sterba, P. (2011). Use of bioethanol in combustion engines. Chemicke Listy, 105(2): 122-128.
 - 13- Demirbas, A. H. (2011a). Biodiesel from algae, biofixation of carbon dioxide by microalgae: A solution to pollution problems. Appl. Energy, 88(10): 3541-3545.
 - 14- Singh, A. and Olsen, S.I. (2011). A critical review of biochemical conversion, sustainability and life cycle assessment of algal biofuels. Appl. Energy, 88: 3548-3555.
 - 15- Demirbas, M.F. (2011b). Biofuels from algae for sustainable development. Appl. Energy, 88(10): 3473-3480.
 - 16- Suali, E. and Sarbatly, R. (2012). Conversion of microalgae to biofuel. Renew Sustain Energy Rev., 16(6): 4316-4342.
 - 17- Andersen, R.A. and Kawachi, M. (2005). Traditional Microalgae Isolation Techniques In: Andersen, R. A. [Ed.], Algal Culturing Techniques. Academic Press, San Diego, p: 578.
 - 18- Provasoli, L. (1958). Nutrition and ecology of protozoa and algae. Rev. Microbiol., 12: 279-308.

فقط من تلك العملية؛ إذ قَدَّرت التحليلات الإقتصادية الأخيرة لتكاليف إنتاج الزيت الطحلي أنه يكون قادراً على المنافسة مع النفط عند سعر 60 دولار/ برميل⁽⁴⁰⁾ أو 64 دولار/ برميل⁽³⁹⁾ بشرط فرض الإلتزام على عمليات المعالجة لمكونات مياه الصرف الصحي. وأخيراً فإن إزالة الكتلة الحيوية الطحلية للملوثات من بيئتها (مياه الصرف الصحي) بالاستغلال عالي الفعالية من حيث التكلفة لتوليد المصادر Upstream / والنواتج Downstream تُعد في الوقت الحالي تحدياً بسبب التنوع الجيني الكبير للطحالب والتي إذا تحسنت بشكل ملحوظ فيمكن أن توفر جيلاً جديداً من الطاقة النظيفة البديلة؛ إذ يمكن للنظام الطحلي المتكامل خفض من تكاليف إعادة تدوير ومعالجة المياه الملوثة وكذلك خفض من تكاليف إنتاج الوقود المستخرج من النباتات مما يجعل منه وقوداً ذا تكلفة تنافسية. وبالمثل، فإن نظم الإنتاج الطحلي قد تقلل من الآثار السلبية الناتجة عن CO₂ وتلوث المياه مما تسمح بتحقيق فرص عدة لحياة أكثر إستدامة.

المصادر

- 1- Schenk, P.M.; Thomas-Hall, S.R.; Stephens, E.; Marx, U.C.; Mussgnug, J.H.; Posten, C.; Kruse, O. and Hankamer, B. (2008). Second generation biofuels: High-efficiency microalgae for biodiesel production. Bioenergy Res., 1: 20-43.
- 2- Barsanti, L. and Gualtieri, P. (2005). Algae: Anatomy, Biochemistry and Biotechnology, 1st ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA.
- 3- Lee, R.E. (2008). Phycology. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- 4- Bala, B.K. (2006). Studies on biodiesel from transformation of vegetable oils for diesel engines. Energy Edu. Sci. Technol., 15: 1-45.
- 5- Feng, P.Z. (2011). Lipid accumulation and growth of *Chlorella zofingiensis* in flat plate photobioreactors outdoors. Biores. Technol., 102(22): 10577-10584.
- 6- Tomaselli, L. (2007). The Microalgal Cell. In: Richmond, A. (Ed): Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and

- 30- Al-Aarajy, M. (1996). Studies on the mass culture of some microalgae as food for fish larvae. Ph.D. Thesis, Univ. Basrah, Iraq.
- 31- Mulbry, W.; Westhead, E.K.; Pizarro, C. and Sikora, L. (2005). Recycling of manure nutrients: use of algal biomass from dairy manure treatment as a slow release fertilizer. *Biores. Technol.*, 96(4): 451-458.
- 32- Stephen, U.A.; Abiodun, F.; Osahon, O. and Ewaen, E. (2009). Mineral composition, antioxidant and antimicrobial activities of freshwater algae. *J. Biol. Sci.*, 9: 63- 67.
- 33- Morris, I.; Glover, H. and Yentsch, C. (1974). Products of photosynthesis by marine phytoplankton: The effect of environmental factors on the relative rates of protein synthesis. *Mar. Biol.*, 27: 1-9.
- 34- Sheehan, J.; Dunahay, T.; Benemann, J. and Roessler, P. (1998). A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae, A Report to U.S. Department of Energy's Office of Fuels development. National Renewable Energy Institute, 328 P.
- 35- Grant, B. (2009). Biofuels made from algae are the next big thing on the alternative energy horizon. But can they free us from our addiction to petroleum? *The Scientist*, 23: 36-44.
- 36- Pittman, J.K.; Dean, A.P. and Osundeko, O. (2011). The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Biores. Technol.*, 102: 17-25.
- 37- van Beilen, J.B. (2010). Why Microalgal fuels won't save the internal combustion machine. *Biofuels, Bioprod. Biorefining*, 4: 41-52.
- 38- Park, J.B.K.; Craggs, R.J. and Shilton, A.N. (2011). Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Biores. Technol.*, 102: 35-42.
- 39- Feng, Y.; Li, C. and Zhang, D. (2011). Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultures in artificial wastewater medium. *Biores. Technol.*, 102: 101-105.
- 40- Chisti, Y. (2008). Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotech.*, 26: 126-131.
- 19- Prescott, G. (1975). Algae of the western great lake areas. Ellion, C. Brown, Co., Pub. Dugugue, Iowa, 977p.
- 20- Kawaguchi, K. (1980). Microalgae production systems in Asia algae biomass. *J. Biomed. Press, Amsterdam*, 4: 25-33.
- 21- Tredici, M.R. (2004). Mass Production of Microalgae: Photobioreactors. In: Richmond, A. Eds. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Oxford: Blackwell Science.
- 22- Stein, J. (1973). *Handbook of Phycological Method*. Cambridge Univ. Press. Cambridge, 445p.
- 23- Huang, X.H.; Li, C.L.; Liu, C.W. and Zeng, D.Q. (2002a). Studies on the ecological factors of *Oocystis borgei*. *J. Zhanjiang Ocean Univ.*, 22(3): 8-12.
- 24- Huang, X.H.; Li, C.L.; Liu, C.W.; Wang, Z.D. and Chen, J.J. (2002b). Studies on the N and P nutrient demand if *Nannochloris oculata*. *Marine Sci. (China)*, 26(8): 13-17.
- 25- Herbert, D.; Philips, P. J. and Strange, R. E. (1971). Determination of Total Carbohydrates, In: *Methods in Microbiology*. Norris. J. R. and Robbins. D. W. (Eds.). Acad. Press, New York, USA.
- 26- Zhang, K. and Feng, H. (2010). Fermentation potential of *Zymomonas mobilis* and its application in ethanol production from low-cost raw sweet potato. *Afric. J. Biotech.*, 9: 37-42.
- 27- Sulfahri, A.; Nurhidayati, T. and Nurhatika, S. (2011). Aerobic and anaerobic processes of *Spirogyra* extract using different doses *Zymomonas mobilis*. *J. Appl. Environ. Biol. Sci.*, 1: 1-6.
- 28- Chen, H.Z.; Liu, Z.H. and Dai, S.H. (2014). A novel solid state fermentation coupled with gas stripping enhancing the sweet sorghum stalk conversion performance for bioethanol. *J. Biotech. Biofuels*, 7: 53-62.
- 29- Steel, R.G.D.; Torrie, J.H. and Dickey, D.A. (1997). *Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach*, 3rd Ed. McGraw Hill Book Co. Inc., New York, USA.

* Feasibility of *Spirogyra majuscula* and *Cladophora fracta* Algae on Growth with Different Concentrations of Sewage and Bioethanol Production

Raid K. Abed Alasady

Zaid S. Awad Alawady

raid.al-asady@qu.edu.iq

University of Al-Qadisiyah/ College of Education/ Department of Biology

Abstract

The current study targeted test the feasibility of two types of filamentous green algae [*Spirogyra majuscula* and *Cladophora fracta*] on growth with different concentrations of sewage and the production of bio-ethanol, and to achieve that algae were isolated from the water of Al-Diwaniyah River/ city center and then reproduction in mass cultures for biomass in order to chemical analysis and bioethanol production.

Algae were growth and development on (Chu-10) and optimum intensity of illumination for growth (1800 lux "Previous work") specific, by selecting the growth curve, a constant relative growth (K) and the rate of doubling time (G) for each alga, then algae were test growth on five concentrations of sewage, which is a collection of sewage with distilled water and the following percent: 10%, 20%, 40%, 80% and 100% (sewage water only), is then their production process of batch culture for the purpose of detecting dry their contents of total carbohydrates and susceptibility on the production of bio-ethanol from the fermentation of carbohydrates process and determine the concentrations at all sewage concentration to both algae respectively, the results showed that the rate of doubling time of algae, respectively, at the Chu-10 amounted to 0.97 and 1.08 compared to different concentrations of sewage, which did not give a significant effect of constant relative growth rate and rate of doubling time of algae under study while *C. fracta* gave higher relative to growth at all concentrations of sewage compared with *S. majuscula* except 40% concentration who recorded superior to last algae (0.297) compared with first algae (0.253), while the rate doubling time were higher in all concentrations in *S. majuscula* except concentration of 40% which was higher than the rate doubling time for the superior of *C. fracta*, which amounted to (1.014 and 1.190), respectively. Chemical analysis showed that of dry content of algae (*S. majuscula* and *C. fracta*) were grow on Chu-10 and the concentrations of sewage increase in their content of total carbohydrates, which increased with increasing concentrations of sewage down to the stock concentrate (100%) as the highest percentage of total carbohydrate were (26.19 and 30.29%), respectively, at 100% concentration with a superiority of *C. fracta* in the carbohydrate content of the *S. majuscula* at the same concentrations. Bioethanol output of fermentable carbohydrates to under study algae showed that the effect of different concentrations of sewage heterogeneous between algae in of productivity and the concentrations of the medium, reaching the highest content of *S. majuscula* is 33.44% when the concentration of 20%, while the 40% concentration giving higher content to *C. fracta* reached 35.33% compared to the same content when control treatment (Chu-10), which recoded (32.29 and 27.13)%, respectively, or compared with less content of bio-ethanol reached when 40% concentration where recorded (18.60 and 8.52)% to both algae respectively.

Keywords: Algae, Sewage, Bio-Ethanol.

* The research is a part of Ms.C. Thesis in the case of the second researcher.