The possibility of *Chlorella vulgaris* green algae culture in secondary treated wastewater

Dr. George Deeb*
Ali A. Bkdash **

(Received 18 / 2 / 2020. Accepted 15 / 6 /2020)

□ ABSTRACT □

Abundance has been studied Green algae growth in secondary treated wastewater and changes in pH values, healthy at different lighting spells (light shift 24 light / 0 dark, light shift 16 light / 8 dark, light 8 light / 16 dark) compared to the liquid culture medium Chu-10.

The average number of cells in secondary treated wastewater at a light spell was 24 light / 0 darkness 1370972.40 and at a light spell 16 light / 8 darkness, the average number of cells was 168,2596, while record 1403757.80 at light shift 8 light / 16 darkness, and the highest number of algae cells was 2919934 cells / At a light fit, ml was 16 light / 8 dark, and the value of pH was decreased as the number of cells increased.

Keywords: Green algae - Chlorella vulgaris - wastewater - plantation medium - Chu-10 - lighting fits - secondary treated.

* **Professor - Department of Plant Biology - Faculty of Science - Tishreen University - Lattakia - Syria.**
** **MA student - Department of Plant Biology - Faculty of Science - Tishreen University - Lattakia - Syria.**

إمكانية استزراع الطحلب الأخضر وحيد الخلية *Chlorella vulgaris* في مياه الصرف الصحي المعالجة ثانوياً

د. جورج ديب*

علي عبد السلام بكداش**

(تاريخ الإيداع 18 / 2 / 2020. قبل للنشر في 15 / 6 / 2020)

□ ملخّص □

تمت دراسة غزارة نمو الطحلب الأخضر وحيد الخلية *Chlorella vulgaris* في مياه الصرف الصحي المعالجة ثانوياً وتغيرات قيم pH، الصحي عند نوبات إضاءة مختلفة (نوبة ضوئية 24 ضوء/0 ظلام، نوبة ضوئية 16 ضوء/8 ظلام، ضوئية 8 ضوء/16 ظلام) مقارنة مع الوسط الزرعي السائل Chu-10.

بلغ معدل عدد الخلايا في مياه الصرف الصحي المعالجة ثانوياً عند نوبة ضوئية 24 ضوء/0 ظلام 1370972.40 وعند نوبة ضوئية 16 ضوء/8 ظلام كان معدل عدد الخلايا 1682596 بيمنا سجل 1403757.80 عند نوبة ضوئية 8 ضوء/16 ظلام، وكان أعلى عدد لخلايا الطحلب 2919934 خلية/مل عند نوبة ضوئية 16 ضوء/8 ظلام، أما قيمة pH فكانت تنخفض مع ازدياد عدد الخلايا.

الكلمات المفتاحية: طحالب خضراء – *Chlorella vulgaris* – مياه صرف صحي – وسط زرعي صناعي – Chu-10 – نوبات إضاءة – معالجة ثانوية.

*أستاذ – قسم علم الحياة النباتية – كلية العلوم – جامعة تشرين – اللاذقية – سورية.

**طالب ماجستير– قسم علم الحياة النباتية – كلية العلوم – جامعة تشرين – اللاذقية – سورية.

مقدمة

تعد العوالق النباتية phytoplankton كائنات دقيقة ذاتية التغذية ضوئياً، تعيش في الطبقات العليا من عمود الماء في الأوساط المائية (بحار، أنهار، بحيرات، مستنقعات) ضمن المنطقة التي تخترقها الأشعة الشمسية بوضوح

وتعتبر المصدر الرئيسي لإنتاج المادة العضوية والأوكسجين نتيجة احتواء خلاياها على الصباغ اليخضوري الذي يمكنها من امتصاص الأشعة الضوئية والقيام بعملية التركيب الضوئي وبالتالي تشكل هذه النباتات القاعدة الأساسية للسلسة الغذائية في جميع الأوساط المائية (ديب، 1991).

كما بينت الدراسات والأبحاث أهمية استزراع العوالق النباتية حيث تنتج كثيراً من المواد الكيميائية ولها مردود اقتصادي وذات تطبيقات عملية في مجالات متعددة كالزراعة والصناعة والطب (ديب وآخرون، 2017 ; Kim *etal*., 2006) إضافة لدورها في تنقية المياه من المعادن السامة والفضلات ومعالجة مياه الصرف الصحي، حيث تستوعب أشكالًا مختلفة من الفوسفات و النيتروجين غير العضوي من مياه الصرف الصحي وتحويلها إلى مصادر عضوية مطلوبة للبروتين والحمض النووي وتخليق الخلايا وإنتاج O2 كمنتج ثانوي وبالتالي تنقي المياه من هذه المواد الضارة بصحة الإنسان والمسببة له الكثير من الأمراض (Walsh, 1978 ; Premazzi & Ispra, 1980 ; Pizarro *etal*., 2006 ; Atici *etal*., 2008 ; Conley *etal*., 2009 ; Hoseinizadeh *etal*., 2011 ; ; عوض وآخرون، 2000)

أهمية البحث وأهدافه:

يُعاني العالم اليوم من مشكلة استنزاف الموارد الطبيعية، وقد تفاقمت في السنوات الأخيرة أزمات المياه والطاقة والغذاء، ولعل حل المشكلة يكمن في استزراع العوالق النباتية فهي تُعد مصدراً غنياً بالبروتينات والسكريات والفيتامينات والأملاح المعدنية ومضادات الأكسدة ولها دور كبير في التنقية الذاتية للمياه و مصدر متجدد لإنتاج الوقود الحيوي.

من هنا تأتي أهمية بحثنا الذي يهدف إلى:

1- عزل الطحلب الأخضر *Chlorella vulgaris* من إحدى المسطحات المائية.

2- دراسة غزارة نمو الطحلب الأخضر *Chlorella vulgaris* في مياه الصرف الصحي، عند نوبات إضاءة مختلفة مع إمكانية استخدام مياه الصرف الصحي بدلاً من الأوساط الصنعية باهظة الثمن لاستزراع الطحالب.

طرائق البحث ومواده:

1. موقع جمع العينات:

- النهر الكبير الشمالي.
- محطة المعالجة لمياه الصرف الصحي في جامعة تشرين .

الشكل رقم(1): قناة ري من مياه النهر الكبير الشمالي

الشكل رقم(2): محطة المعالجة الثانوية في جامعة تشرين

2. جمع العينات:

جمعت العينات من موقع النهر الكبير الشمالي وذلك باستخدام عبوات من البولي اتيلين سعة 500 مل، ثم نقلت إلى المختبر بهدف دراستها بيولوجياً وعزل الطحلب الأخضر *Chlorella vulgaris*.

ثم أخذت عينات من مياه الصرف الصحي المعالجة ثانوياً من محطة المعالجة الثانوية في جامعة تشرين وذلك باستخدام عبوات من البولي اتيلين سعة 500 مل، ثم نقلت إلى المختبر بهدف الدراسة الفيزيائية–الكيميائية والبيولوجية.

3. عزل واستزراع الطحلب الأخضر *Chlorella vulgaris* باستخدام الوسط الزرعي Chu-10 :

تهدف طرائق العزل الطحلبية إلى الحصول على عزلات تحتوي على طحلب واحد وتسمى عزلات وحيدة الطحلب Unialgal cultures، ولغرض الحصول على عزلات وحيدة الطحلب اتبع مايلي(Chu, 1942 ; Stein, 1973):

أولاً: ترشيح حجم معين من المياه التي جمعت من النهر الكبير الشمالي باستخدام ورق ترشيح قطر فتحاته 0.45 مايكرومتر، وأخذ ما تبقى في ورق الترشيح ويفحص تحت المجهر الضوئي للتأكد من وجود الطحلب الأخضر *Chlorella vulgaris* بالاعتماد على بعض المراجع التصنيفي (Belcher & Swale, 1976 ; Cassie, 1983).

ثانياً: زرع العينات على الوسط الزرعي الصلب Chu-10 (المحضر بإضافة الآغار بنسبة 1% إلى الوسط السائل Chu-10 ويوضح الجدول رقم (1) مكوناته وبعد التعقيم يصب الوسط في أطباق بتري) بطريقة التخطيط Streak plate method (توضع قطرة أو قطرتان من العينة المائية المراد عزل الطحلب منها في حافة طبق بتري، و تعمل عدة خطوط متوازية من القطرة الموجودة في حافة طبق بتري وذلك باستعمال عروة زرع معقمة بعدها يغلق الطبق) وتحضن في غرفة الاستزراع التابعة لقسم علم الحياة النباتية تحت ظروف الزرع الملائمة من درجات حرارة وإضاءة (حرارة 25 ±2 مْ، وشدة إضاءة 2500 لوكس، ونوبة ضوئية 16ضوء/8 ظلام) لمدة من الزمن (3~4) أسابيع مع تكرار الزرع للحصول على عزلات وحيدة الطحلب Unialgal cultures .

الجدول رقم (1) يوضح مكونات الوسط الزرعي Chu-10 :

H_2O	1litre
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	20.0mg
KH_2PO_4	6.0mg
$MgSO_4.7H_2O$	25.0mg
Na_2CO_3	20.0mg
Na_2SiO_3	25.0mg
Normal HCI	0.25ml
H_3BO_3	2.5mg
$MnCl_2.4H_2O$	1.5mg
$(NH_4)_6M_{O7}O_{24}.4H_2O$	1.0mg

ثالثاً: نقل جزء من الوسط الصلب وما يحتويه من الخلايا الطحلبية برفق إلى حوجلات زجاجية سعة 250 مل حاوية على 150 مل من الوسط الزرعي السائل Chu-10 وقبل هذه الخطوة تفحص مجموعة من الأطباق تحت المجهر لغرض التأكد من الحصول على الخلايا الطحلبية النقية.

4. استزراع الطحلب الأخضر *Chlorella vulgaris* باستخدام مياه الصرف الصحي المعالجة ثانوياً:

اجريت القياسات الفيزيائية والكيميائية لمياه الصرف الصحي ثم تمت إضافة 20 مل من الطحلب الأخضر *Chlorella vulgaris* بغزارة 879137 خلية/مل إلى 1 لتر من مياه الصرف الصحي المعالجة ثانوياً بعد تعقيمها بجهاز الأوتوكلاف وطبقت مخبرياً في غرفة الاستزراع التابعة لقسم علم الحياة النباتية تحت ظروف زرع ثابتة (شدة إضاءة 2500 لوكس، حرارة 25 ±2 مْ) و نوبات إضاءة مختلفة (نوبة ضوئية 24 ضوء/0 ظلام، نوبة ضوئية 16 ضوء/8 ظلام، ضوئية 8 ضوء/16 ظلام) مع اجراء عدة مكررات وأخذ عينة شاهدة من الوسط الزرعي السائل Chu-10.

5. تحديد غزارة الطحلب الأخضر *Chlorella vulgaris*:

حددت غزارة الطحلب الأخضر *Chlorella vulgaris* باستخدام صفيحة Komorek Burkera حسب طريقة (Edler, 1979) وتكون هذه الصفيحة مقسمة إلى 12 صف من المربعات أفقياً و12 صف عمودياً فيكون عدد المربعات الإجمالي144 مربعاً، ويكون حجم المربع الواحد $1/250\ mm^3$، يتم عدّ الخلايا في جميع المربعات، ثم يحسب عدد الخلايا في المربع الواحد من القانون: $Ns = \frac{\text{العدد الإجمالي}}{144}$

واعتباراً منه يحسب عدد الخلايا في العينة مقدراً بـ (خلية/مل) بتطبيق القانون:

$$N.\,ml^{-1} = 250.\,Ns.\,1000$$

النتائج والمناقشة:

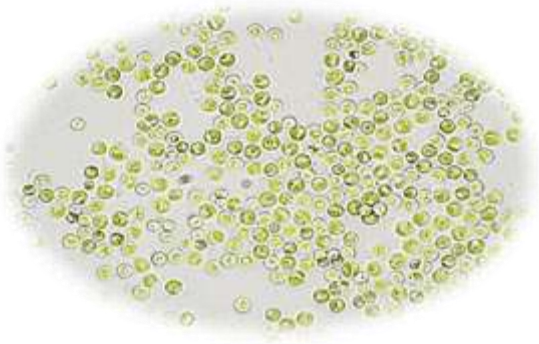
1. استزراع الطحلب الأخضر *Chlorella vulgaris*:

يعد الطحلب *Chlorella vulgaris* من الطحالب الخضراء وحيدة الخلية، خليته كروية قطرها من 4–8 ميكرون تحتوي على صانعة خضراء واحدة جدارية كأسية الشكل، تغزر في المياه العذبة جيدة الإضاءة، يتكاثر إعاشياً بانقسام كل خلية إلى خليتين بنتين، ولا جنسياً بتكوين الأبواغ الساكنة ويبن الشكل(3) الطحلب *Chlorella vulgaris* تحت المجهر ويوضح الشكل(4) و (5) نمو الطحلب *Chlorella vulgaris* على الوسط الصلب و الوسط السائل.

2. عدد الخلايا:

بعد دراستنا لعدد الخلايا الطحلبية لاحظنا أن عددها يتزايد مع زمن القياس ويختلف باختلاف النوبة الضوئية وهذا يتفق مع نتائج العلاوي (2018) وآخرون.

وبينت الدراسة الإحصائية أن قيمة P (دلالة إحصائية لخلايا الطحلب *Chlorella vulgaris*) بالنسبة لعدد خلايا الطحلب *Chlorella vulgaris* في مياه الصرف الصحي والوسط الزرعي Chu-10 كانت أكبر من a=0.05 وبالتالي لايوجد فروق ذات دلالة إحصائية بين عدد الخلايا كما يبين الجدول رقم (2) وجود تفاوت في عدد الخلايا باختلاف مدة الإضاءة، حيث كانت الإضاءة المستمرة هي الأمثل للنمو خلال الأسبوع الأول من الاستزراع كما في الشكل رقم(6) أما بعد هذه الفترة من الزمن كانت النوبة الضوئية 16 ضوء/8 ظلام هي الأمثل كما يوضحه الشكل رقم(7) ويلاحظ من الشكل رقم (8) انخفاض تزايد عدد الخلايا مع انخفاض فترة الإضاءة وفي الضوء المستمر بعد الأسبوع الأول، ويفسر ذلك بأن الطحالب تحتاج إلى نظام من تعاقب الضوء والظلام فهي تحتاج إلى الضوء لإنتاج ATP والكوأنزيم المستخدم كحامل للطاقة في الخلايا و NADPH وتحتاج إلى الظلام من أجل مرحلة تركيب المواد البيوكيميائية من أجل عملية النمو(Bouterfas *etal*., 2006)، كما أن الإضاءة المستمرة تؤدي إلى إجهاد الخلية، وتوافقت نتائجنا هذه مع (Sharma *etal*., 2012)، وتوافقت مع ما وجده (Harun *etal*., 2014) حيث لاحظوا أن أفضل نمو للطحلب *Isochrysis sp.* وجد في مرحلة تعاقب الضوء والظلام، كما لوحظ أن الطحلب *Nannochloropsis sp.* أعطى نمواً أفضل في مرحلة تعاقب الإضاءة والظلام بمعدل 18 ضوء / 6 ظلام (Wahidin *etal*., 2013).



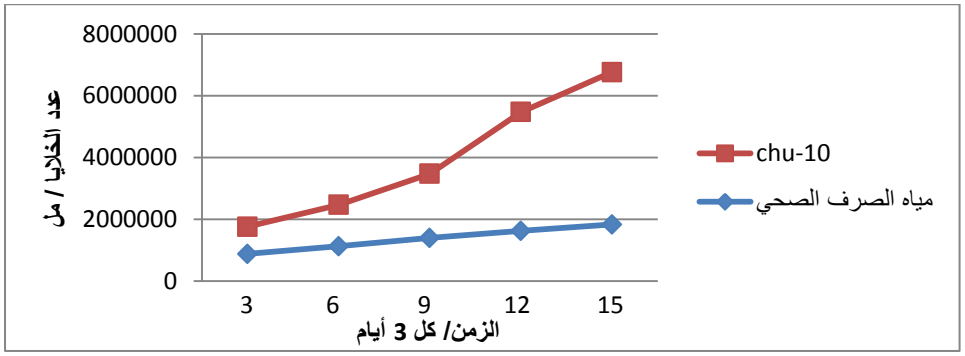
الشكل رقم(3): الطحلب *Chlorella vulgaris* تحت المجهر

الشكل رقم(4): نمو الطحلب على الوسط الزرعي الصلب

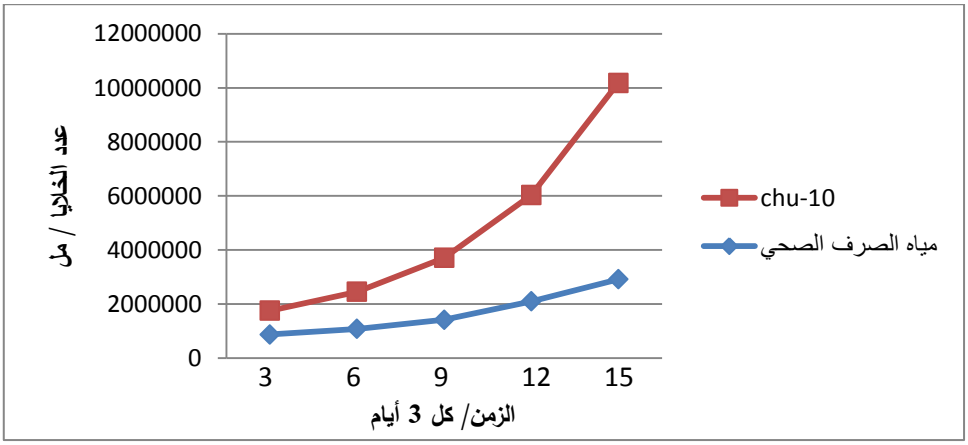
الشكل رقم(5): نمو الطحلب في الوسط الزرعي السائل

الجدول رقم (2): يوضح عدد خلايا الطحلب *Chlorella vulgaris* عند نوبات إضاءة مختلفة

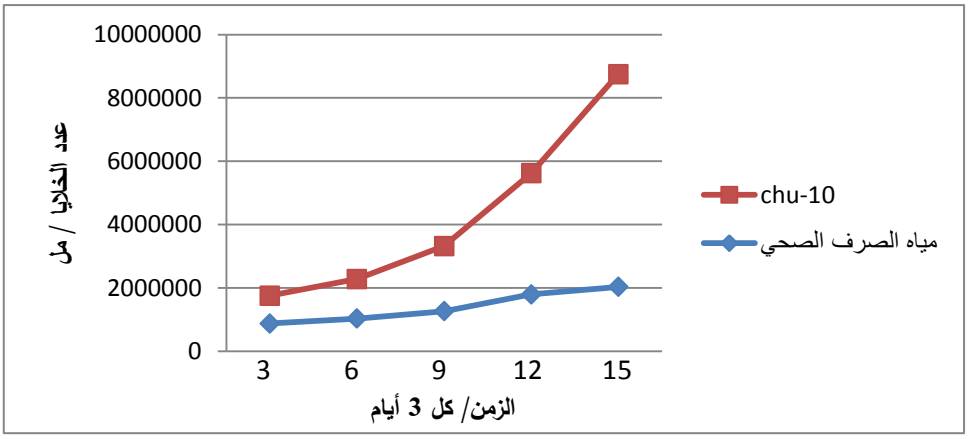
الأيام	عدد الخلايا/مل					
	نوبة ضوئية 24 ضوء/0 ظلام		نوبة ضوئية 16 ضوء/8 ظلام		نوبة ضوئية 8 ضوء/16 ظلام	
	Chu-10	مياه الصرف الصحي	Chu-10	مياه الصرف الصحي	Chu-10	مياه الصرف الصحي
1	879137	879137	879137	879137	879137	879137
4	1343566	1123498	1368790	1087523	1246670	1037568
7	2076465	1395521	2288731	1423841	2053243	1269872
10	3844856	1624588	3930874	2102545	3826924	1797523
13	4925578	1832118	7258723	2919934	6713984	2034689



الشكل رقم (6): يوضح عدد خلايا الطحلب *Chlorella vulgaris*
في مياه الصرف الصحي والوسط الزرعي Chu-10عند نوبة ضوئية 24 ضوء/0 ظلام



الشكل رقم(7): يوضح عدد خلايا الطحلب *Chlorella vulgaris*
في مياه الصرف الصحي والوسط الزرعي Chu-10 عند نوبة ضوئية 16 ضوء/8 ظلام



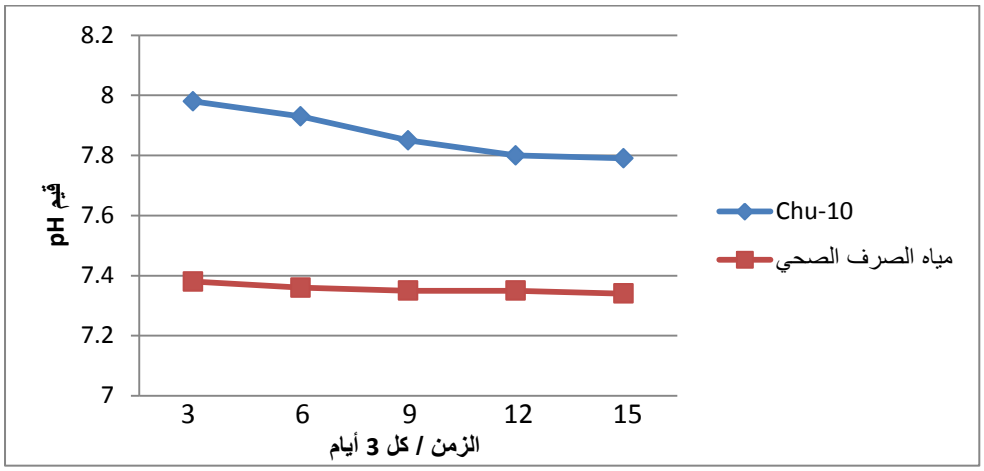
الشكل رقم(8): يوضح عدد خلايا الطحلب *Chlorella vulgaris*
في مياه الصرف الصحي والوسط الزرعي Chu-10 عند نوبة ضوئية 8 ضوء/16 ظلام

3. درجة الـpH:

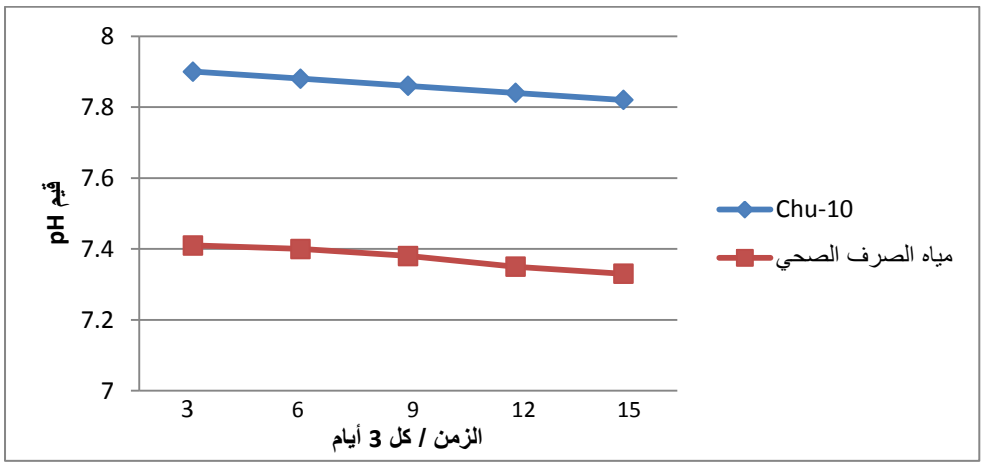
من الدارسة التي قمنا بها تبين لنا أنّ قيم الـpH وفق الجدول رقم (3) تتناقص تناقص طفيف بالوسط الزرعي السائل Chu-10 (وضع كشاهد) وذلك يعزى إلى التفاعل الحاصل بين الـCO2 والماء لأن ناتج هذا التفاعل هو حمض الكربون الذي يجعل من الوسط حمضياً نتيجة لعدد الخلايا الطحلبية التي عددها يتزايد بشكل مستمر خاصة عند نوبة ضوئية 16 ضوء/8 ظلام كما يوضحه الشكل رقم (10)، أما في مياه الصرف الصحي سجلت قيم متفاوتة من قيم الـ pH ويعزى ذلك لعدم وجود الأعداد الكافية من الخلايا الطحلبية لتحد من استهلاك الأوكسجين وانتاج الـCO2 فهذه العوامل تلعب دوراً في جعل الوسط حمضياً نتيجة التفاعل السابق بين الـ CO2 وهي بالعموم منخفضة كما توضحه الأشكال رقم(9)، رقم (10)، رقم(11) حيث بينت الدراسة الإحصائية أن قيمة P بالنسبة لقيم الـpH أكبر من a=0.05 وبالتالي لايوجد فروق ذات دلالة إحصائية بين قيم الـpH في مياه الصرف الصحي والوسط الزرعي Chu-10 وتوافقت دراستنا مع Assemany وآخرون عام 2015.

الجدول رقم (3) يوضح تغيرات قيم pH خلال نمو الطحلب *Chlorella vulgaris* عند نوبات إضاءة مختلفة

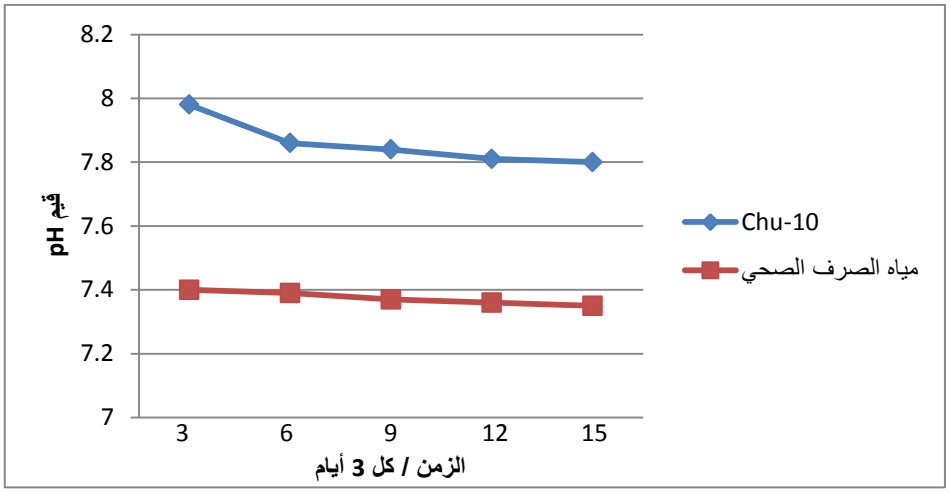
الأيام	قيم pH					
	نوبة ضوئية 24 ضوء/0 ظلام		نوبة ضوئية 16 ضوء/8 ظلام		نوبة ضوئية 8 ضوء/16 ظلام	
	Chu-10	مياه الصرف الصحي	Chu-10	مياه الصرف الصحي	Chu-10	مياه الصرف الصحي
1	7.98	7.38	7.90	7.41	7.98	7.40
4	7.93	7.36	7.88	7.40	7.86	7.39
7	7.85	7.35	7.86	7.38	7.84	7.37
10	7.80	7.35	7.84	7.35	7.81	7.36
13	7.79	7.34	7.82	7.33	7.80	7.35



الشكل رقم(9): يوضح تغيرات قيم pH خلال نمو الطحلب *Chlorella vulgaris*
في مياه الصرف الصحي والوسط الزرعيChu-10 عند نوبة ضوئية 24 ضوء/0 ظلام



الشكل رقم(10): يوضح تغيرات قيم pH خلال نمو الطحلب *Chlorella vulgaris*
في مياه الصرف الصحي والوسط الزرعي Chu-10 عند نوبة ضوئية 16 ضوء/8 ظلام



الشكل رقم(11): يوضح تغيرات قيم pH خلال نمو الطحلب *Chlorella vulgaris*
في مياه الصرف الصحي والوسط الزرعي Chu-10 عند نوبة ضوئية 8 ضوء/16 ظلام

الاستنتاجات والتوصيات:

نستنتج من خلال بحثنا إمكانية استخدام مياه الصرف الصحي بدلاً من الأوساط باهظة الثمن لاستزراع الطحالب، كما يمكننا استخدام الطحلب *Chlorella vulgaris* في عملية التنقية الذاتية للمياه والإستفادة من الكتلة الحيوية الغنية بالمواد الكربوهيدراتية والبروتينة واللبيدية في تطبيقات مختلفة لذلك من الأهمية بمكان زيادة الأبحاث في هذا المجال بهدف الاستفادة من هذه الكائنات في مجالات الحياة كافة ، والتوجه نحو استزراعها حقلياً والبحث عن الظروف البيئية المناسبة للوصول إلى أعلى إنتاجية من هذه الكائنات، لتكون رديفاً وبديلاً للنباتات البرية في المستقبل القريب.

references:

- DEEB, GEORGE. *Morphological and biological characteristics of flour cultivated on highly productive agricultural media*. Publications of the University of Moldova, 1991.
- DEEB, GEORGE ; ABBAS, ASIF ; TAKLA, MAHMOUD. *The effect of the water extract of algae Ulva fasciata and Colpomenia sinuosa inthe germination of tomato and tobacco seeds*. Al-Baath University Journal, Volume 93, Issue 13, 2017, 67-90.
- AL-ALAWI, AHMED ; AL-ABD RABO, WALEED ; AL-HAMDANI, IBRAHIM. *Aseptic dairy wastewater treatment using two types of algae Chlorella and Lyngebia*. Tikrit University, Iraq, 2018.
- AWAD, ADEL; HAMMOUD, NADIM; SHAHEEN, HAITHAM. *Study the evolution of algae species in oxidation lakes for biological treatment of wastewater in Al-Salamiyah city*. Damascus University Journal, Volume 16, Issue 2, 2000, 57-93.
- ARIYADEJ, C. ; TANSAKUL, R. ; TANSAKUL, P. ; ANGSUPANICH, S. *Phytoplankton diversity and its relationships to the physico-chemical environment in the Banglang Reservoir, Yala Province*. Songklanakarin Journal of Science and Technology, 26(5), 2004, 595-607.

- ASSEMANY, P. P. ; CALIJURI, M. L. ; DO COUTO, E. D. A. ; DE SOUZA, M. H. B.; SILVA, N. C. ; DA FONSECA S. A. ; DE SIQUEIRA C. J. *Algae/bacteria consortium in high rate ponds: influence of solar radiation on the phytoplankton community*. Ecological engineering, 77, 2015, 154-162.
- ATICI, T. ; AHISKA, S. ; ALTINDAG, A. ; AYDIN, D. *Ecological effects of some heavy metals (Cd, Pb, Hg, Cr) pollution of phytoplanktonic algae and zooplanktonic organisms in Saryýar Dam Reservoir in Turkey*. African Journal of Biotechnology, 7(12), 2008
- BELCHER, H. ; SWALE, E. *A beginner's guide to freshwater algae*. HMSO, 1976.
- BOUTERFAS, R. ; BELKOURA, M. ; DAUTA, A. *The effects of irradiance and photoperiod on the growth rate of three freshwater green algae isolated from a eutrophic lake*. Limnetica, 25(3), 2006, 647-656.
- CASSIE, V. *A guide to algae in oxidation ponds in the Auckland district*. Tane, 29, 1983, 119-132.
- CHU, S. P. *The influence of the mineral composition of the medium on the growth of planktonic algae: part I. Methods and culture media*. The Journal of Ecology, 30, 1942, pp284-325.
- CONLEY, D. J. ; PAERL, H. W. ; HOWARTH, R. W. ; BOESCH, D. F. ; SEITZINGER, S. P. ; HAVENS, K. E., ... ; LIKENS, G. E. *Controlling eutrophication: nitrogen and phosphorus.* Sci., 123, 2009, 1014-5.
- EDLER, L. *Recommendations for marine biological studies in the Baltic Sea: phytoplankton and chlorophyll.* Baltic Mar. Biol., 5, 1979, 1-38.
- HARUN, I. ; YAHYA, L. ; CHIK, M. N. ; KADIR, N. N. A. ; PANG, M. A. M. A. (). *Effects of natural light dilution on microalgae growth. International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 5(2), 2014, 112.
- HOSEINIZADEH, G. R. ; AZARPOUR, E. ; ZIAEIDOUSTAN, H. ; MORADI, M. ; AMIRI, E. *Phytoremediation of heavy metals by hydrophytes of Anzali Wetland (Iran*). World Applied Sciences Journal, 12(9), 2011, 1478-1481.
- JASPRICA, N. ; HAFNER, D. *Taxonomic composition and seasonality of diatoms in three Dinaric karstic lakes in Croatia*. Limnologica, 35(4), 2005, 304-319.
- KIM, P. ; DONG, J. ; LEE, C. G. *Influence of extracellular products from H. P. on growth and bacteriocin production bythree species of Lactobacillus*. Microbiol. Biotechnol, 16(6), 2006, 849-854.
- MUKHERJEE, B. ; NIVEDITA, M. ; MUKHERJEE, D. *Plankton diversity and dynamics in a polluted eutrophic lake, Ranchi*. Journal of Environmental Biology, 31(5), 2010, 827.
- PIZARRO, C. ; MULBRY, W. ; BLERSCH, D. ; KANGAS, P. *An economic assessment of algal turf scrubber technology for treatment of dairy manure effluent.* Ecological engineering, 26(4), 2006, 321-327.
- PREMAZZI, G. ; ISPRA, E. *Phytoplankton productivity in Lake Lugano before water treatment*. Aquatic Sciences-Research Across Boundaries, 42(2), 1980, 155-170.
- SHARMA, R. ; SINGH, G. P. ; SHARMA, V. K. *Effects of culture conditions on growth and biochemical profile of Chlorella vulgaris*. J Plant Pathol Microb, 3(5), 2012
- SUNDA, W. ; HUNTSMAN, S. *Interrelated influence of iron, light and cell size onmarine phytoplankton growth*. Nature,1997, 389-392.

STEIN, J. R. *Hand book of phycologicalmethods*. Cambridge University. press. Cambridge, U.K, 1973.

WAHIDIN, S. ; IDRIS, A. ; SHALEH, S. R. M. *The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae Nannochloropsis sp.* Bioresource technology, 129, 2013, 7-11.

WALSH, G. E. *Toxic effects of pollutants on Plankton*. Principles of Ecotoxicology. John Wiley & Sons, Inc., New York, U.K, 1978, 257-274.