

حذف نیتروژن و فسفات از فاضلاب شهری توسط ریز جلبک (*Chlorella vulgaris*) و تعیین معادله سینتیکی رشد آن

منصور شریعتی^{۱*}، رضا طاهری

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۱/۷

تاریخ تصویب: ۹۳/۳/۵

چکیده

ریز جلبک کلرلا ولگاریس *Chlorella vulgaris* به منظور تولید زیست توده و حذف نیتروژن و فسفات در فاضلاب شهری کشت گردید. تغییرات زیست توده، غلظت نیترات، آمونیوم و فسفات اندازه گیری شد. بیشترین مقدار تولید زیست توده ۲ گرم وزن خشک در لیتر بود. مقدار زیست توده با کاهش مقدار نیتروژن ($p < 0.01$) و فسفر ($p < 0.05$) رابطه معنی داری نشان داد. ۱۰ میلی گرم در لیتر (معادل ۶۵٪) از غلظت نیترات، ۱/۴ میلی گرم در لیتر (معادل ۷۸٪) از غلظت آمونیوم و ۵/۸ میلی گرم در لیتر (معادل ۴۵/۵٪) از غلظت فسفات کاهش یافت. این بدین معنا است که به ازای تولید هر گرم زیست توده جلبکی ۴/۷ میلی گرم در لیتر نیترات، ۰/۷ میلی گرم در لیتر آمونیوم و ۲/۹ میلی گرم فسفات از پساب حذف گردید.

* استاد، گروه زیست شناسی، دانشگاه اصفهان (نویسنده مسئول mansour@sci.ui.ac.ir)

معادله سینتیکی، تولید زیست توده در رابطه با تغییرات غلظت نیترات، آمونیوم و فسفات نیز تعیین گردید. نیترات و فسفات معادله اشباع و آمونیوم از معادله درجه اول تبعیت می نماید.

واژه های کلیدی: بیوماس، فاضلاب شهری، کلرلا ولگاریس، معادلات سینتیکی

مقدمه

مناسبی برای حذف آنها است (Chen et al., 2012); Kim et al., (2010); Kim et al., (2013). هنگامی که جلبکها در پساب کشت می شوند، نیتروژن و فسفات که دو عنصر غذایی پرمصرف آنها هستند (Chevalier et al., (2000) کاهش یافته و در ازای آن زیست توده جلبکی تولید می شود (Chaumont, (1993); Fabregas et al., (1986); Holland (et al., (2011)). این زیست توده می تواند جهت کود کشاورزی و یا تولید سوخت های زیستی مورد استفاده قرار گیرد (المدرس و همکاران، ۱۳۹۰). این بدین معنی است که کشت جلبکها در پساب های شهری می تواند باعث دستیابی همزمان به هر دو هدف یعنی کاهش مواد مغذی و تولید زیست توده جلبکی گردد (Chen et al., (2012). اما باید به این نکته اشاره شود که میزان رشد ریز جلبکها و متعاقب آن، کاهش نیتروژن و فسفات تا حدود زیادی تابعی از شرایط محیطی منطقه است (Chevalier et al., (2000). به همین دلیل تعیین معادلات سینتیکی که باعث قابل پیش

همزمان با بروز پدیده خشکسالی در مناطق وسیعی از کشور، بهره گیری از آب های غیر متعارف مانند پسابها هر روز به طور جدی تری مطرح می شود (خزانه داری و همکاران، ۱۳۸۸). روزانه حجم وسیعی پساب در مناطق شهری و صنعتی تولید می شود، که با در نظر گرفتن تمهیداتی می تواند در بخش کشاورزی مورد استفاده قرار گرفته و یا به منابع آب های پذیرنده منتقل گردد. ورود اینگونه پسابها به منابع پذیرنده آب می تواند سبب بروز پدیده پرغذایی (Utrification) شود که در صورت نادیده گرفته شدن، آسیب به اکوسیستم را در پی خواهد داشت (Powell, (2009). دلیل اصلی بروز این پدیده، مقدار نسبتا بالای نیتروژن (معمولا آمونیوم و نیترات) و فسفات است (Shi et al., (2007). روش های فیزیکی - شیمیایی برای حذف نیتروژن و فسفات وجود دارد اما مطالعات متعددی نشان داده است جلبکها از جمله ریز جلبک سبز تک سلولی کلرلا ولگاریس *Chlorella vulgaris* گزینه

۱۰۰ دور در دقیقه و در شرایط محیطی شامل، [۱۴ ساعت روشنایی (دمای ۳۰ °C) / ۱۰ ساعت تاریکی (دمای ۲۰ °C)]، شدت تابش نور ۷۰ میکرو مول فوتون در ثانیه بر متر مربع کشت شد.

اندازه گیری رشد و زیست توده جلبکی

رشد کلرلا و لگاریس با دو شاخص زیست توده و کلروفیل a اندازه گیری شد. برای اندازه گیری زیست توده، سوسپانسیون جلبکی در فالكونهاى با حجم ۵۰ میلی لیتر و وزن (W₁) ریخته شده و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد (مدل IEC HN-S). پس از حذف سوپرناتانت فالكونها به همراه زیست توده حاصله وزن شده (W₂) و مقدار زیست توده تر از رابطه W₁-W₂ محاسبه گردید. سپس، فالكونها ۲۴ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد قرار گرفته و توزین گردیدند (W₃). وزن خشک زیست توده از رابطه W₁-W₃ محاسبه شد. برای اندازه گیری کلروفیل بر اساس روش بیکر، ۱۹۹۳ عمل گردید (Becker 1993). ۱۰ میلی لیتر از سوسپانسیون جلبکی با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شده و پس از حذف سوپرناتانت به رسوب حاصله ۳ میلی لیتر متانول اضافه شده و ورتکس گردید. سپس سانتریفوژ شده و محلول رویی در دو طول موج ۶۵۰ و ۶۶۵ نانومتر قرائت شدند. مقدار کلروفیل a از معادله زیر محاسبه گردید Chlorophyll a (mg/L)=(16.5×A665)-

بینی شدن عملکرد جلبکها می گردد حائز اهمیت زیادی است Aslan and Kapdan (2006). ریز جلبک کلرلا و لگاریس دارای رشد سریع بوده و در فلور بیشتر حوضچه های تثبیت در تصفیه خانه های کشور وجود دارد عزیزخانی و همکاران، (۱۳۹۱). بنابراین در این پژوهش عملکرد جلبک کلرلا و لگاریس برای کاهش نیتروژن و فسفات از فاضلاب تصفیه خانه فولاد شهر اصفهان و تعیین معادلات سینتیکی آن در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

نمونه پساب

تصفیه خانه فولادشهر اصفهان به عنوان محل مورد مطالعه انتخاب گردید. این تصفیه خانه در جنوب غرب اصفهان در موقعیت $30^{\circ}29'N$ و $51^{\circ}26'E$ واقع شده و دارای ۸ برکه ته نشینی، شش برکه تکمیلی بی هوازی و دو برکه تکمیلی هوازی است. نمونه ها (فاضلاب) از حوضچه سوم تصفیه خانه فولادشهر برداشته شده و به آزمایشگاه منتقل و پس از عبور از کاغذ صافی و اتوکلاو به عنوان محیط کشت استفاده شد.

شرایط کشت

جلبکها در اتاقک کشت در ارلن ۲۵۰ میلی لیتری، بر روی شیکر و با سرعت چرخش

(8.3×A650)

محاسبات آماری

آزمایشها در طرح کاملاً تصادفی انجام گردید. نسخه (شماره ۶) نرم افزار Minitab و MS- Excel برای رسم منحنی و انجام محاسبات استفاده گردید.

معادلات کینتیکی رشد

معادله شناخته شده مونود (معادله ۱) جهت توضیح رشد در رابطه با منبع سوبسترا استفاده گردید.

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S} \quad (\text{معادله ۱})$$

در این معادله، μ سرعت رشد ویژه و واحد آن (time^{-1}) ، μ_{\max} بیشینه سرعت رشد ویژه و واحد آن K_s ، (time^{-1}) ضریب مونود و واحد آن (mg/L) است. همچنین S غلظت سوبسترا (غلظت نیترات، آمونیوم و فسفات) و واحد آن (mg/L) می باشد که بر اساس معادله ۲ محاسبه گردید.

$$\mu = \frac{\mu_{\max} K_s}{\mu_{\max} - \mu} \quad (\text{معادله ۲})$$

معادله لینیوبرگ (معادله ۳) بر اساس $\mu/1$ در مقابل $S/1$ ترسیم شده و جهت محاسبه μ_{\max} و K_s استفاده گردید.

$$\frac{1}{S} - \frac{1}{K_s} = \frac{\mu_{\max}}{K_s \mu} \quad (\text{معادله ۳})$$

μ جهت رسم منحنی لینیوبرگ بر اساس

۲-۴ اندازه گیری نیترات، آمونیوم و فسفات برای اندازه گیری نیترات از روش رنگ سنجی بر اساس روش ایتون و همکاران، ۲۰۰۵ عمل شد (Eaton et al. 2005). ۵۰ میلی لیتر از محیط کشت جلبکی به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شده و به سوپرناتانت حاصله ۱ میلی لیتر HCl نرمال اضافه شده و در دو طول موج ۲۲۰ و ۲۷۵ نانومتر با استفاده از اسپکتروفوتومتر UV- Visible Shimadzu 160A قرائت گردید و مقدار نیترات بر اساس حاصل تفاضل مقدار جذب دو طول موج ذکر شده محاسبه گردید. مقدار آمونیوم بر اساس (Smith 1980) اندازه گیری شد. پس از سانتریفوژ محیط کشت جلبکی، ۰/۲ میلی لیتر از سوپرناتانت حاصله به حجم ۲ میلی لیتر رقیق شده و به هر یک از آنها ۱۰۰ میکرولیتر هیپوکلریت سدیم ۱۰٪ و ۱۰۰ میکرولیتر از معرفهای مربوطه اضافه شده و در ۶۴۰ نانومتر قرائت گردید. برای اندازه گیری فسفات بر اساس روش وانادا مولیبدات فسفریک اسید (Eaton et al. 2005) اقدام گردید. بر این اساس، به ۵۰ میلی لیتر از سوپرناتانت حاصله از سانتریفوژ محیط کشت جلبک، ۱۰ میلی لیتر از معرف وانادا مولیبدات اضافه شده و پس از ۱۰ دقیقه در طول موج ۴۰۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفوتومتر UV- Visible Shimadzu 160A قرائت گردید.

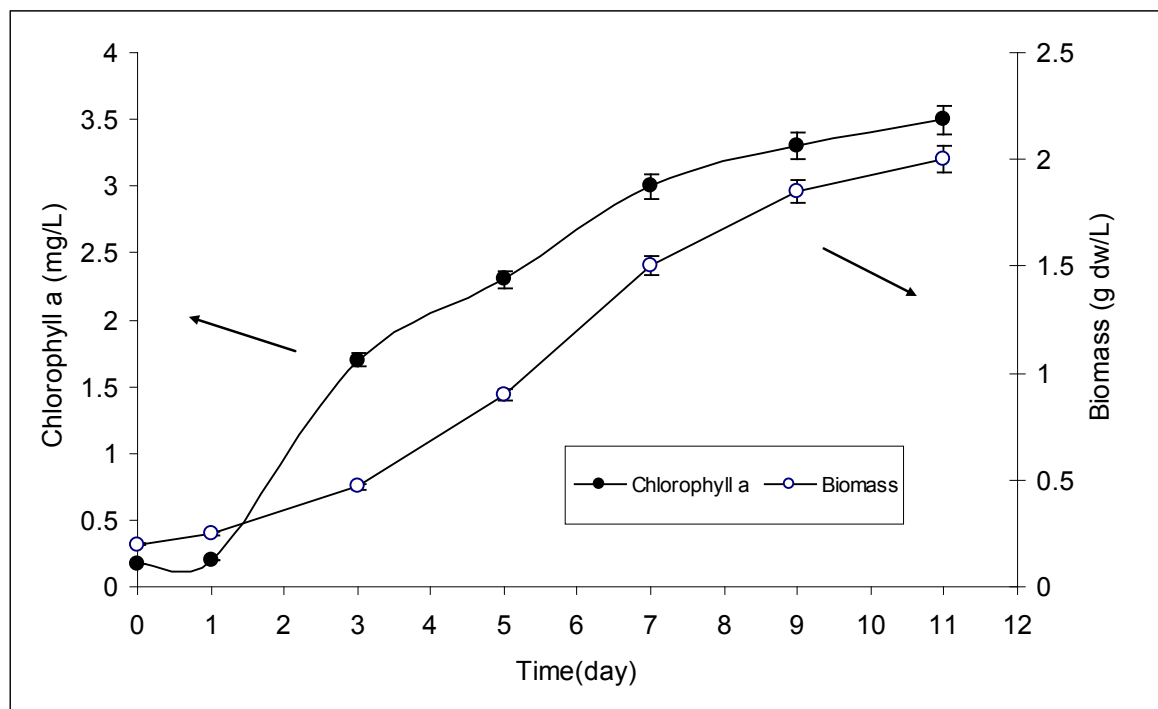
وارد مرحله رشد توانی گردید. به دلیل اینکه تغییرات این دو شاخص (میزان کلروفیل a و زیست توده) الگوی نسبتاً مشابهی را نشان دادند در ادامه از شاخص زیست توده استفاده شد. بیشترین مقدار تولید زیست توده در روز یازدهم و به مقدار ۲ گرم وزن خشک در لیتر رسید. این میزان نسبت به گزارش کیم و همکاران، ۲۰۱۳ کمتر می باشد (Kim et al., 2013) که با توجه به تفاوت زیاد بین ترکیبات موجود در پساب تصفیه خانه‌ها امری رایج محسوب می شود. (شکل ۲) نشان می دهد که رشد جلبک، با قلیایی شدن محیط همراه است که دلیل این امر می تواند تجزیه بیکربنات های موجود

معادله ۴ محاسبه گردید. در این معادله t_2 و t_1 به ترتیب زمانهای ۲ و ۱ و biomass t_2 و biomass t_1 به ترتیب زیست توده در زمانهای t_1 و t_2 است.

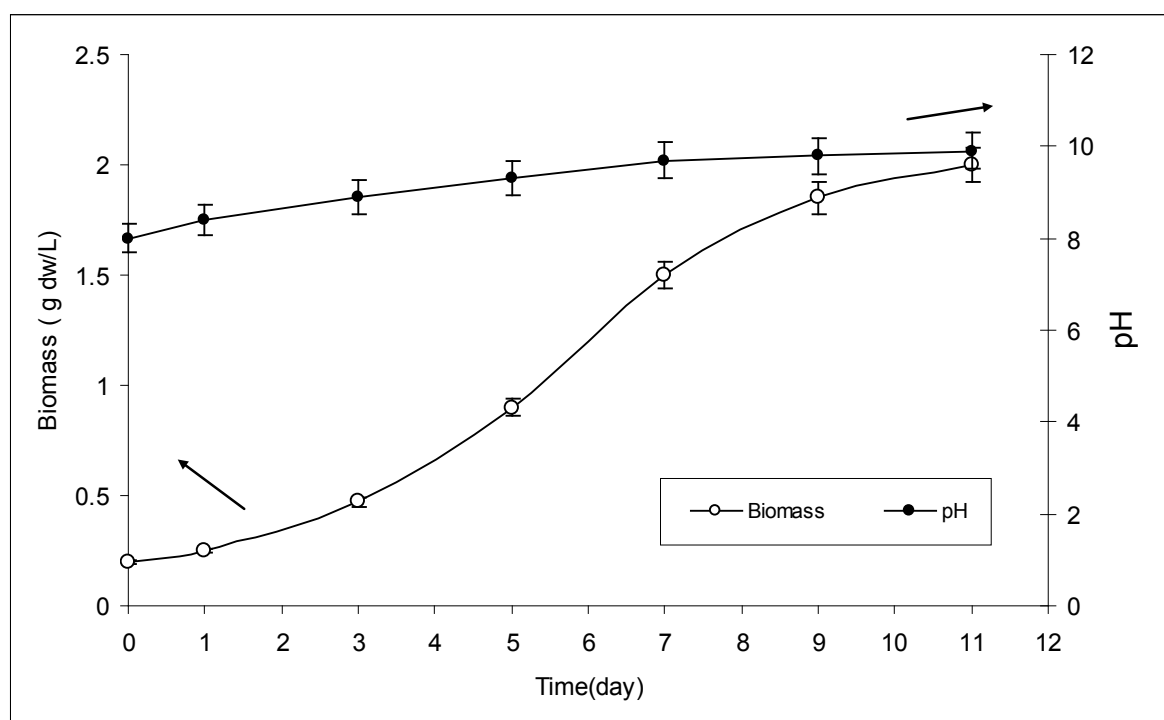
$$\mu = \frac{\ln \text{biomass } t_2 - \ln \text{biomass } t_1}{t_2 - t_1} \quad (\text{معادله ۴})$$

نتایج و بحث

رشد ریز جلبکها بر اساس اهداف آزمایش با شاخصهای مختلفی مانند تعداد سلولها، مقدار کلروفیل a زیست توده بیان می شود. شکل ۱ نشان می دهد مرحله سازگاری یک روز پس از تلقیح به طول انجامید و جلبک



شکل ۱: رشد جلبک کلرلا ولگاریس بر مبنای وزن خشک زیست توده و میزان کلروفیل a. مقادیر میانگین سه تکرار می باشد.

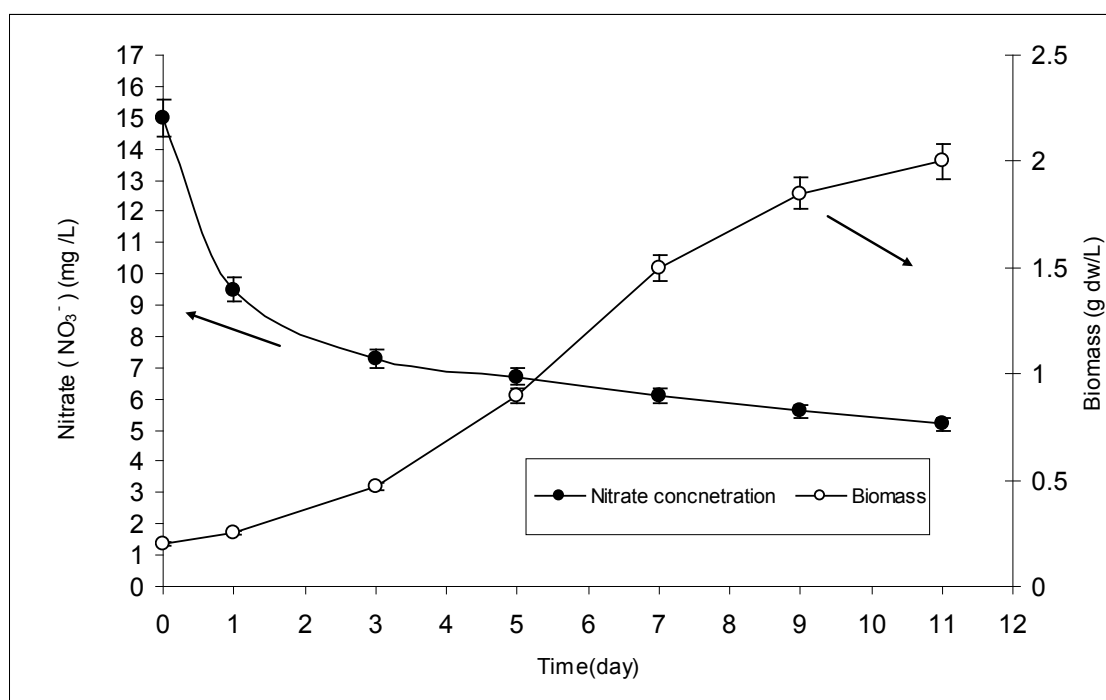


شکل ۲: تغییرات pH محیط در رابطه با رشد جلبک کلرلا ولگاریس. مقادیر میانگین سه تکرار می باشد.

حذف نیتروژن و فسفات

وابستگی جلبک برای تولید زیست توده به منابع نیتروژن و فسفات مشابه نیست (Kong et al., 2010) از همین رو آزمون رگرسیون برای تعیین ارتباط و همبستگی بین تولید زیست توده با فسفات و نیتروژن انجام گردید و نتایج (داده‌ها نشان داده نشده) حاکی از معنی دار بودن همبستگی بین رشد با نیتروژن ($p < 0.01$) و فسفات ($p < 0.05$) بود. روند کاهش نیترات در رابطه با تولید زیست توده جلبک کلرلا در (شکل ۳) نمایش داده شده است. داده‌ها نشان می دهد روند کاهش مقدار نیترات در دو روز اول بیشتر از روزهای بعدی است در حالیکه روند افزایش زیست

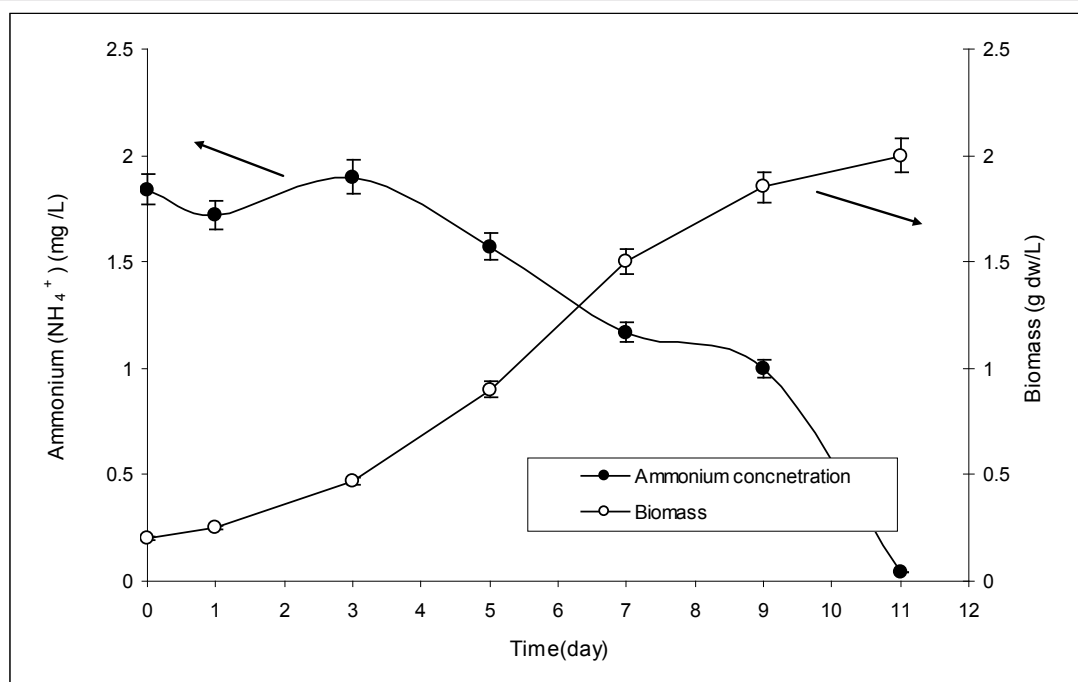
در آب و تولید CO_2 و OH^- توسط آنزیم آنهیدراز باشد. این فرآیند باعث تولید CO_2 شده که به عنوان منبع کربن فتوسنتز توسط جلبک مصرف می گردد. به همین دلیل در شکل ۲ الگوی افزایش pH از افزایش زیست توده تبعیت می کند. در pH های بازی، جذب بسیاری از عناصر کاهش یافته و همین امر نیز باعث کاهش تولید زیست توده می شود. این موضوع در مورد جلبک *Dunaliella tertiolecta* نیز به عنوان مهمترین عامل محدود کننده تولید زیست توده گزارش گردیده است (Taheri and Shariati, 2013).



شکل ۳: رابطه حذف نیترات و تولید زیست توده جلبک کلرلا ولگاریس. مقادیر میانگین سه تکرار می باشد.

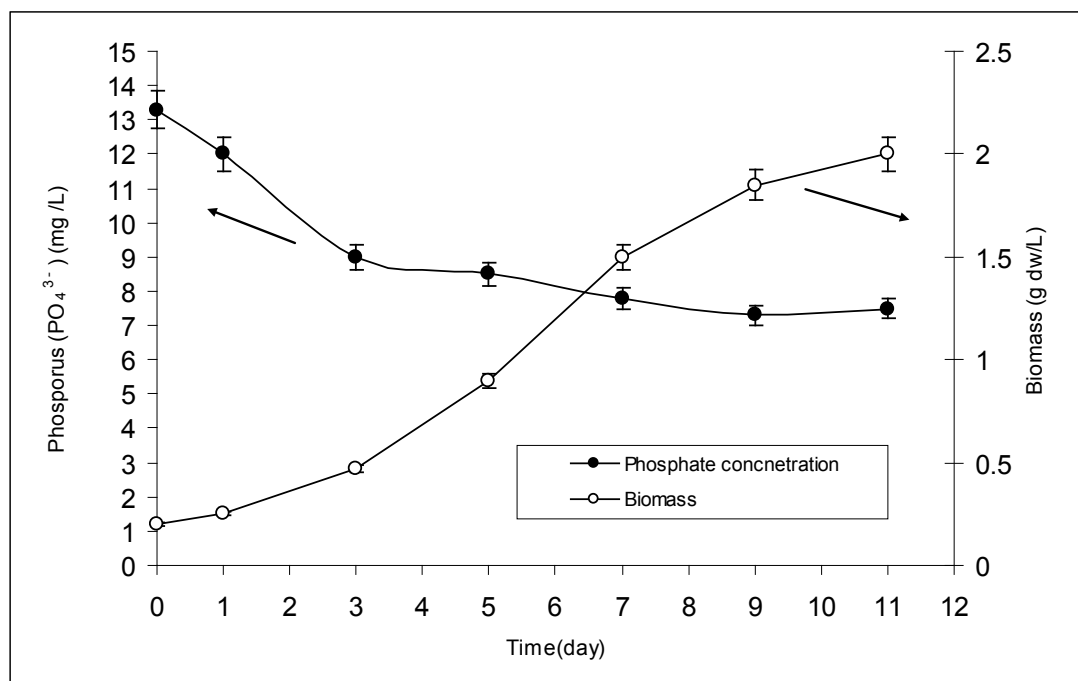
نیترات مشابه هم نیست و در این خصوص واکنش متقابل این دو مطرح می شود به نحوی که رفتار جلبک هنگامی که یکی از این دو و یا هر دو آنها در دسترس باشد و بسته به غلظت آنها متفاوت است (Dortch, 1990). مقایسه شکل ۳ و ۴ نشان می دهد که سرعت جذب آمونیوم در روزهای آخر که غلظت نیترات کم شده است به سرعت افزایش می یابد. مسئله واکنش متقابل نیترات و آمونیوم برای تغذیه جلبک *Nannochloropsis* بررسی شده است (Hii et al., 2011). نتایج آنها نشان داده است که این جلبک، آمونیوم را به نیترات ترجیح می دهد. نتایج ما به دلیل اینکه غلظت آمونیوم و نیترات یکسان نیست با گزارش ذکر شده متفاوت است و جلبک کلرلا تا زمانی که مقدار زیادی از نیترات در

توده الگوی معکوسی را نشان می دهد به نحوی که زیست توده در روزهای اولیه با سرعتی کم و در روزهای ۶ تا ۱۰ با سرعت بیشتر افزایش می یابد. این نتایج با گزارش Kim et al., (2010) مطابقت دارد. در پایان روز یازدهم ۹/۴ میلی گرم در لیتر معادل ۶۵٪ از نیتروژن کاهش یافته است. این بدین معنا است که به ازای تولید هر گرم زیست توده جلبکی ۴/۷ میلی گرم نیتروژن از محیط حذف شده است. شکل ۴ نحوه حذف آمونیوم را نشان می دهد. در پایان روز یازدهم ۱/۴ میلی گرم در لیتر از غلظت آمونیوم (معادل ۷۸٪) کاهش یافته است. این بدین معنا است که به ازای تولید هر گرم زیست توده جلبکی ۰/۷ میلی گرم آمونیوم از محیط حذف شده است. میزان مصرف جلبک از آمونیوم و



شکل ۴: رابطه حذف آمونیوم و تولید زیست توده جلبک کلرلا ولگاریس. مقادیر میانگین سه تکرار می باشد.

دسترس است، مقدار کمی آمونیوم را جذب می نماید. نکته قابل ذکر دیگر این است که جلبکها در برکه های تثبیت به خاطر عمق زیاد آنها ممکن است در شرایط تاریکی و گاه بی هوایی کامل قرار گیرند، در این صورت جلبکها منابع نیتروژن آلی را نیز می توانند جذب نمایند (ندافی و نودهی، ۱۳۷۵). نتایج (شکل ۵) نشان داد کاهش فسفات از الگوی مشابه نیترات تبعیت می کند، اگرچه میزان کاهش آن کمتر از نیترات است. در پایان روز

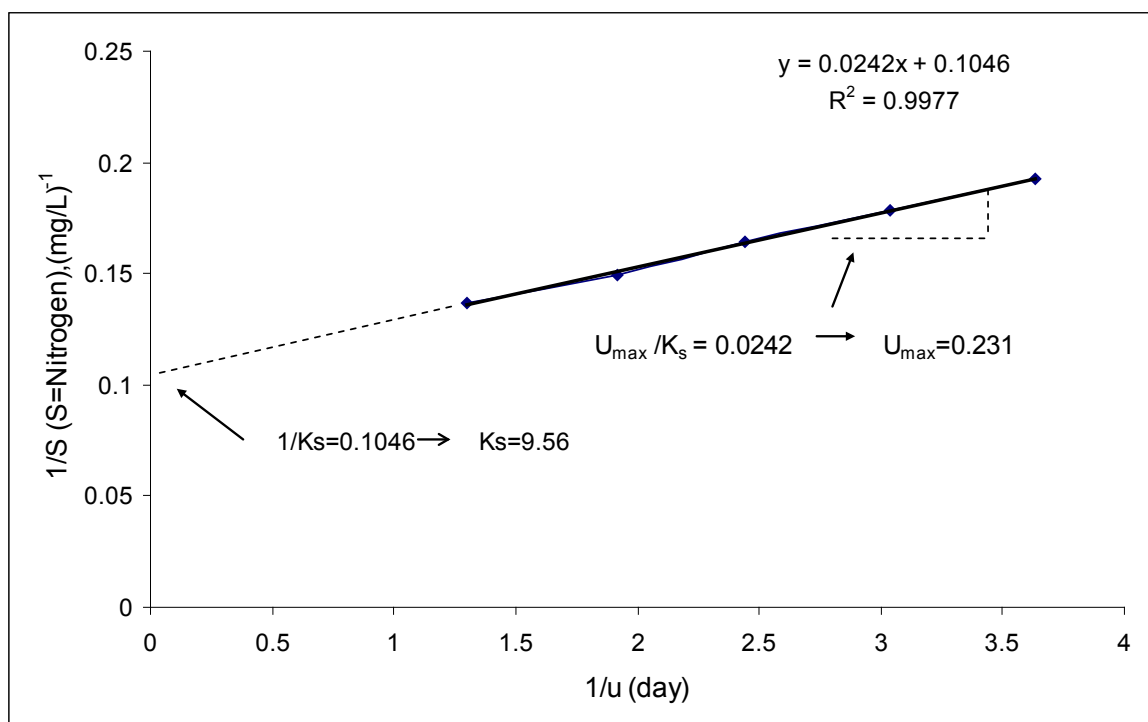


شکل ۵: رابطه حذف فسفات و تولید زیست توده جلبک کلرلا ولگاریس. مقادیر میانگین سه تکرار می باشد.

شده است. بر اساس داده‌های ارائه شده μ_{max} برابر 0.231 day^{-1} و K_s برابر $56/9 \text{ mg/L}$ می باشد. به این ترتیب معادله مونود برای نیتروژن محاسبه گردید (معادله ۵). این معادله به این معنا است که با افزایش هر واحد μ معادل $56/9 \text{ mg/L}$ نیتروژن حذف گردیده است. با توجه به اینکه معادلات کینتیکی بر اساس نوع جلبک و شرایط محیطی تغییر می کند بررسی معادلات دیگر می تواند تفاوت شرایط یا مناسب بودن شرایط را تفسیر کرده و نتایج را قابل پیش بینی نماید. کیم و همکاران (Kim et al., (2013) معادله کینتیکی حذف نیتروژن را بررسی کرده و K_s را برابر $5/59$ گزارش کرده‌اند.

یازدهم، $45/5$ درصد معادل $5/8$ میلی گرم در لیتر از فسفات موجود کاهش یافت. به عبارت دیگر به ازای هر گرم زیست توده تولید شده، $2/25$ میلی گرم فسفات از پساب حذف شده است. در فاضلاب‌های شهری مقدار فسفات معمولاً کمتر از منابع نیتروژن است و از طرفی نیاز جلبک‌ها به نیتروژن بیشتر از فسفات است نتایج ارائه شده نیز تأیید کننده این مطلب می باشد. نتایج ارائه شده با گزارش (Aslan and Kaplan, (2006) مطابقت دارد.

معادلات کینتیکی حذف نیتروژن و فسفات با تولید زیست توده
معادله سینتیکی تولید زیست توده جلبکی و حذف نیتروژن در (شکل ۶) ارائه شده است

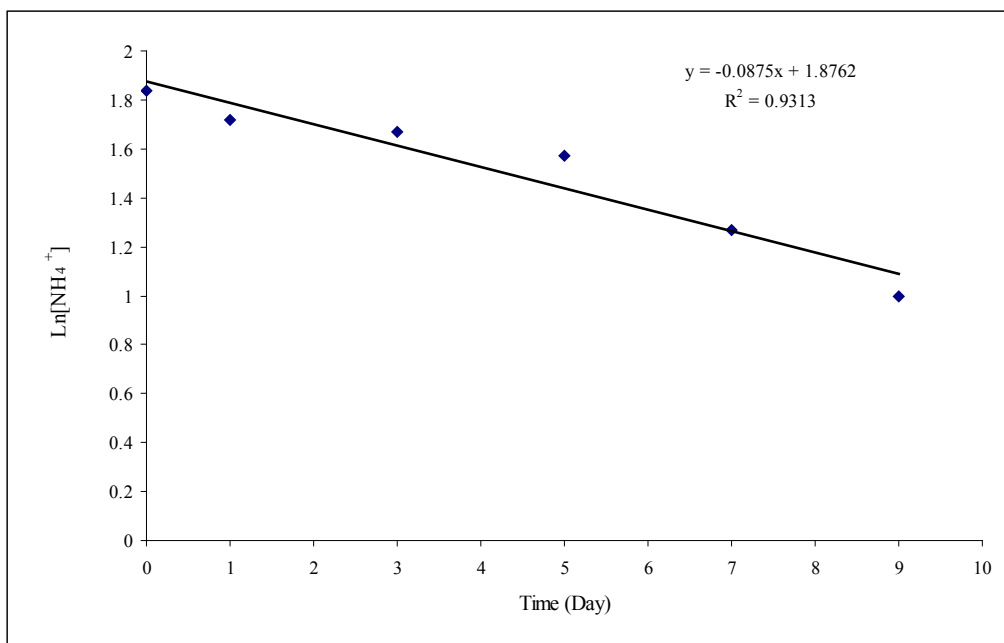


شکل ۶: تعیین اجزا معادله مونود K_s و μ_{max} برای حذف نیترات و رشد جلبک کلرلا ولگاریس.

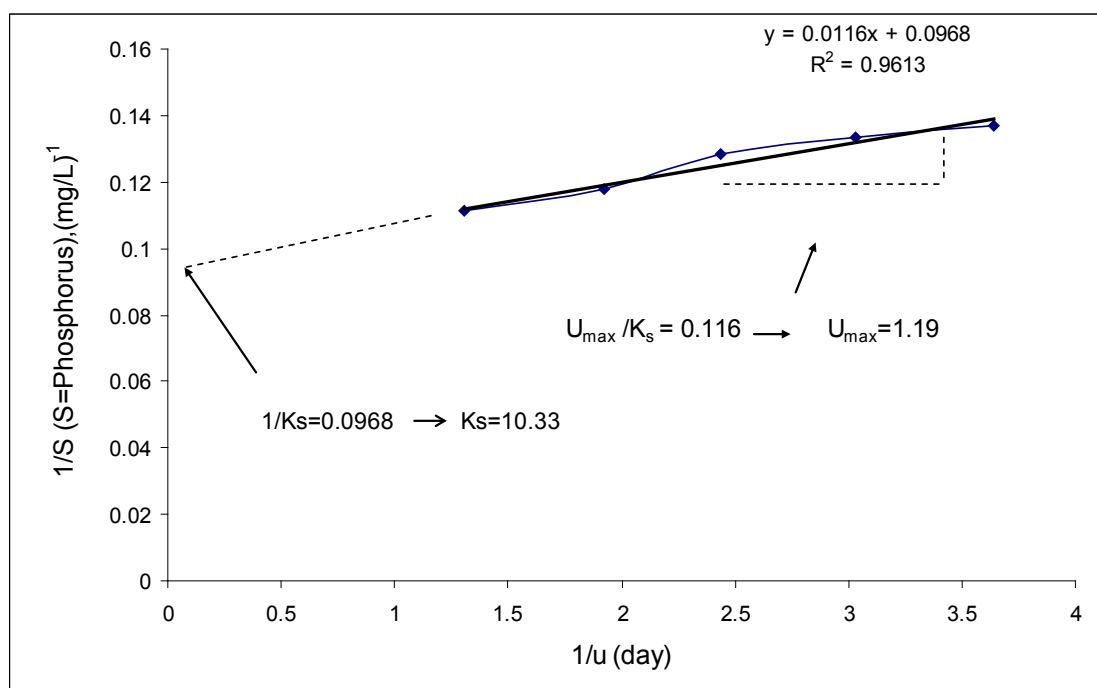
که معادله اشباع بهترین برآزش را بر آنها داشت، آمونیوم از معادله درجه اول تبعیت می کند. معادله مونود برای رشد جلبک و حذف فسفر در (شکل ۸) توضیح داده شده است. بر اساس داده‌های ارائه شده μ_{max}

$$S = \frac{9.56 \mu}{0.231 - \mu} \text{ (معادله ه)}$$

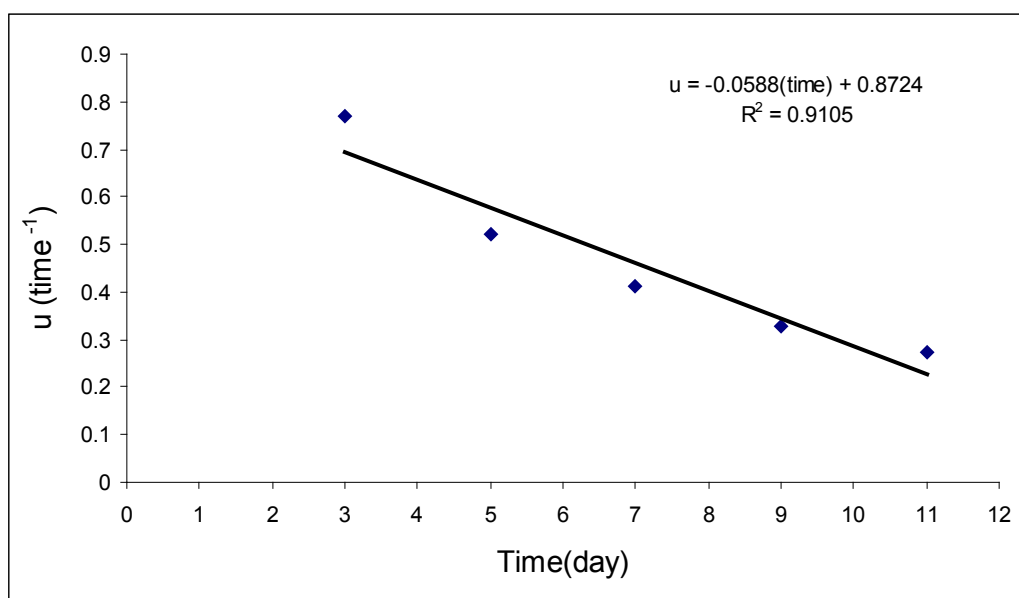
(شکل ۷) معادله سینتیکی حذف آمونیوم را نشان می‌دهد. بر خلاف نیترات و فسفات



شکل ۷: تعیین معادله سینتیکی حذف آمونیوم و رشد جلبک کلرلا ولگاریس.



شکل ۸: تعیین اجزا معادله مونود K_s و μ_{max} برای حذف فسفر و رشد جلبک کلرلا ولگاریس.



شکل ۹: رابطه رشد (μ) جلبک کلرلا ولگاریس با زمان

روز ۱۴/۷ تقریباً صفر خواهد شد. با توجه به نتایج به دست آمده می توان نتیجه گیری نمود جلبک کلرلا ولگاریس می تواند نیترات را با حجم بیشتری نسبت به فسفات از پساب حذف نماید بطوریکه در شرایط آزمایشگاهی انجام گرفته ۷۸٪ نیترات و ۵/۴۵٪ فسفات حذف گردید. حذف نیترات، نسبت به فسفات فرایند پیچیده تری دارد زیرا میزان حذف نیترات در ارتباط با میزان وجود آمونیوم در محیط نیز می باشد. از طرفی با توجه به شیب زاویه حاصله در معادلات سینتیکی، به نظر می رسد تولید زیست توده به مقدار نیتروژن بیشتر از فسفات وابسته است. همچنین می توان بیان نمود که از جلبک کلرلا ولگاریس می توان برای تولید زیست توده و حذف مواد غذایی از پساب استفاده نمود و در این خصوص عواملی که

برابر $19/1 \text{ day}^{-1}$ و $33/10 \text{ mg/L}$ برابر Ks می باشد. به این ترتیب معادله مونود برای فسفر طبق معادله ۶ محاسبه گردید.

$$S = \frac{10.33 \mu}{1.19 - \mu} \text{ (معادله ۶)}$$

جهت ارزیابی عملکرد جلبک با استفاده از معادله ۵ نیاز به تعیین رابطه تولید زیست توده و کاهش نیترات و فسفات با زمان است. (شکل ۹) رابطه زمان با رشد μ را نشان می دهد. بر اساس (شکل ۹) معادله ۷ نشان دهنده رابطه بین زمان و رشد (μ) خواهد بود.

$$\mu = -0.059(\text{time}) + 0.87 \text{ (معادله ۷)}$$

بر اساس معادله ۵ مقدار نیتروژن پس از

باعث افزایش سرعت رشد سلولهای جلبکی می شوند می توانند به افزایش کارایی و کاهش زمان ماند منجر شوند. تحقیق قدردانی می گردد. نویسندگان مقاله از قطب تنش های گیاهی در دانشگاه اصفهان نیز تشکر و قدردانی می نمایند. علاوه بر این، این پژوهش طی قرارداد شماره ۱۳۴۳۷-۱۹/۴/۹۲ توسط شرکت مهندسی آب و فاضلاب استان اصفهان مورد حمایت قرار گرفته است.

سپاسگزاری

بدین وسیله از تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان به خاطر حمایت مالی در انجام این

منابع

- المدرس، ع. انتشاری، ج و طاهری، ر. (۱۳۹۰). سوخت زیستی و منابع آن. تهران، انتشارات آئیژ خزانه داری، ل. زابل عباسی، ف. قندهاری، ش. کوهی، م. و ملبوسی، ش. (۱۳۸۸). دورنمایی از وضعیت خشکسالی ایران طی سی سال آینده. جغرافیا و توسعه ناحیه‌ای. سال ۷ شماره ۱۲. ۸۳-۹۸
- عزیزخانی، م. باغستانی، م. نیک منش، ه و فخری، م. (۱۳۹۱). بررسی به کارگیری ریزجلبک های اسپیرولینا پلتنسیس و کلرلا ولگاریس در بایوفیلترها به منظور حذف ترکیبات فلزات سنگین از فاضلاب های صنعتی. مجله علوم پزشکی کاشان (فیض). ۱۶(۷)، ۷۱۸-۷۱۷
- ندافی، ک. و نبی زاده نودهی، ر. (۱۳۷۵) برکه های تثبیت فاضلاب: اصول طراحی و اجرا. موسسه علمی فرهنگی نص

Aslan, S. and Kapdan, I. K. (2006). Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecological Engineering*. 28(1), 64-70

Becker, E. W. (1993). *Microalgae: biotechnology and microbiology*. Cambridge University Press. Cambridge

Chaumont, D. (1993). Biotechnology of algal biomass production: a review of systems for outdoor mass culture. *Journal of Applied Phycology*. 5(6), 593-604

Chen, R., Li, R., Deitz, L., Liu Y., Stevenson, R. J. and Liao, W. (2012). *Freshwater*

- algal cultivation with animal waste for nutrient removal and biomass production. *Biomass and Bioenergy*. 39 128-138 Chevalier, P., Proulx, D., Lessard, P., Vincent, W. and De La Noüe J. (2000).
- Nitrogen and phosphorus removal by high latitude mat-forming cyanobacteria for potential use in tertiary wastewater treatment. *Journal of Applied Phycology*. 12(2), 105-112
- Dortch, Q. (1990). The interaction between ammonium and nitrate uptake in phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series*. Oldendorf. 61(1), 183-201
- Eaton, A. D., Franson, M. A. H., Association, A. P. H., Association, A. W. W. and Federation, W. E. (2005). Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th edition. American Public Health Association. Washington DC. pp: 817-819: 769-771
- Fabregas, J., Herrero, C., Abalde, J., Liano, R. and Cabezas, B. (1986). Biomass production and biochemical variability of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) with high nutrient concentrations. *Aquaculture*. 53(3-4), 187-199
- Hii, Y., Soo, C., Chuah, T., Mohd-Azmi, A. and Abol-Munafi, A. (2011). Interactive effect of ammonium and nitrate of the nitrogen uptake by *Nannochloropsis* sp. *Journal of Sustainability Science and Management*. 6(1), 60-68
- Holland, A. D., Dragavon, J. M. and Sigeo, D. C. (2011). Intrinsic autotrophic biomass yield and productivity in algae: Experimental methods for strain selection. *Biotechnology Journal*. 6(5), 572-583
- Kim, J., Lingaraju, B. P., Rheame, R., Lee, J. Y. and Siddiqui, K. F. (2010). Removal of Ammonia from Wastewater Effluent by *Chlorella vulgaris*. *Tsinghua Science and Technology*. 15(4), 391-396
- Kim, J., Liu Z., Lee J.-Y. and Lu, T. (2013). Removal of nitrogen and phosphorus from municipal wastewater effluent using *Chlorella vulgaris* and its growth kinetics. *Desalination and Water Treatment*. 51(40-42), 1-7
- Kong Q., Li L., Martinez B., Chen P. and Ruan R. (2010). Culture of microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* in wastewater for biomass feedstock

- production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 160(1), 9-18
- Powell, N. (2009). Biological phosphorus removal by microalgae in waste stabilisation ponds. PhD thesis. Massey University, New Zealand.
- Shi, J., Podola, B. and Melkonian, M. (2007). Removal of nitrogen and phosphorus from wastewater using microalgae immobilized on twin layers: an experimental study. *Journal of Applied Phycology*.19(5), 417-423
- Smith, V. (1980). A phenol hypochlorite manual determination of ammonium nitrogen in Kjeldahl digests of plant tissue. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*.11(7), 709-722
- Taheri, R. and Shariati, M. (2013). Study of the inhibitory effect of the media culture parameters and cell population to increase the biomass production of *Dunaliella tertiolecta*. *Progress in Biological Science*. 3(2), 123-133