

# KHẢ NĂNG XỬ LÝ NƯỚC THẢI TỪ HẦM BIOGAS CỦA VI TẢO *CHLORELLA VULGARIS* TRONG ĐỊNH HƯỚNG SẢN XUẤT NHIÊN LIỆU SINH HỌC

## POSSIBILITY OF ANAEROBIC DIGESTER EFFLUENT TREATMENT THROUGH MICROALGAE *CHLORELLA VULGARIS* CULTIVATION IN ORIENTATION OF BIOFUEL PRODUCTION

Nguyễn Thị Thanh Xuân, Đặng Kim Hoàng, Võ Thị Thương

Trường Đại học Bách khoa, Đại học Đà Nẵng; Email: nttxuan@dut.udn.vn

**Tóm tắt:** Bài báo nghiên cứu nuôi trồng vi tảo *Chlorella Vulgaris* trong môi trường nước thải từ hầm ủ biogas của các trang trại chăn nuôi nhằm đánh giá khả năng xử lý nước thải của chủng vi tảo này trong định hướng sản xuất nhiên liệu sinh học. Nhóm nghiên cứu đã tối ưu hóa các điều kiện nuôi trồng bao gồm: tốc độ sục khí CO<sub>2</sub>, cường độ chiếu sáng,... Kết quả phân tích thành phần nước thải trước và sau khi nuôi trồng vi tảo cho thấy hàm lượng Nitơ (N) tổng và Phốt pho (P) tổng trong nước thải giảm đáng kể, cụ thể là 80,9% đối với N và 58,7% đối với P. Việc nuôi trồng vi tảo được thực hiện trong hệ thống dàn ống thẳng đứng dung tích 50 lít. Mô hình này phù hợp với mọi quy mô nuôi trồng, có thể tận dụng nguồn nước thải từ hầm biogas cũng như nguồn CO<sub>2</sub> từ việc sử dụng khí biogas để sản xuất vi tảo. Sinh khối tảo thu hồi có nhiệt trị cháy tương đối cao và có thành phần lipid hoàn toàn phù hợp cho định hướng sản xuất nhiên liệu sinh học.

**Từ khóa:** nuôi trồng vi tảo *Chlorella Vulgaris*; nước thải chăn nuôi; phân hủy kỵ khí; nhiên liệu sinh học; loại bỏ N; loại bỏ P

**Abstract:** This paper investigated *Chlorella vulgaris* microalgae cultivation in wastewater milieu from anaerobic digester effluent at livestock farms in order to assess the ability of algae strains in wastewater treatment coupling with biofuels production. We have optimized culture conditions including aeration rate of CO<sub>2</sub>, light intensity, which are the factors affecting the growth of microalgae. The analytical results of wastewater composition before and after cultivating microalgae showed total nitrogen (N) and total phosphorus (P) contents in the effluent decreased significantly, concretely 80.9% and 58.7 % for N and P respectively. We used a vertical cylinder of 50-liter bioreactor system. This model is suitable for all farming scale, making use of wastewater from biogas digester and CO<sub>2</sub> from the use of biogas to produce microalgae. Algae biomass has the relatively high calorific value and its lipid composition is perfectly suitable for the biofuel production in the future.

**Key words:** *Chlorella vulgaris* microalgae; cultivation; wastewater; anaerobic digester; biofuels; removal of nitrogen and phosphorus

### 1. Đặt vấn đề

Hiện nay, việc nghiên cứu các phương pháp giảm ô nhiễm môi trường và phát triển bền vững là vấn đề cấp thiết không chỉ ở Việt Nam mà cả toàn thế giới. Nguồn nước thải từ các trang trại chăn nuôi có chứa nhiều tác nhân ô nhiễm, đặc biệt là chất hữu cơ, nitơ và phốt pho. Chúng đến từ các sinh hoạt hằng ngày của đàn heo và vệ sinh chuồng trại, có tác động đến các tầng nước mặt, nước ngầm và trở thành nguyên nhân trực tiếp phát sinh dịch bệnh cho gia súc, con người, ảnh hưởng đến hệ sinh thái. Việc nuôi trồng vi tảo *Chlorella vulgaris* từ nguồn nước thải chăn nuôi này cho phép làm giảm hàm lượng Nitơ, Phốt pho, các chất hữu cơ trong nước thải, làm giảm ô nhiễm môi trường [1, 2].

Mặt khác, cùng với sự phát triển của nền công nghiệp, lượng CO<sub>2</sub> phát thải ngày càng tăng, ảnh hưởng mạnh đến sự nóng lên của trái đất và nhiều hiện tượng tự nhiên bất lợi khác. Việc nuôi trồng vi tảo *Chlorella vulgaris* cho phép tận dụng nguồn CO<sub>2</sub> công nghiệp, làm giảm “hiệu ứng nhà kính”, cân bằng khí hậu [3].

Ngoài ra, sinh khối tảo thu được còn có thể sử dụng để sản xuất nhiên liệu sinh học [4,5]. Đây là một vấn đề rất cấp thiết trong giai đoạn hiện nay, khi mà nguồn nhiên liệu hóa thạch đang ngày càng cạn kiệt. Hiện nay, ở Việt Nam, các loại nhiên liệu sinh học như bioethanol được sản xuất từ ngô, sắn, mía... Tuy nhiên, các nguồn nguyên liệu này chiếm mất một phần lớn diện tích đất nông nghiệp, gây ảnh hưởng đến an ninh lương thực.

Với những ý nghĩa như trên, bài báo giới thiệu các kết quả thu được từ việc nghiên cứu khả năng xử lý nước thải

của vi tảo *Chlorella vulgaris* trong định hướng chuẩn bị nguồn sinh khối cho việc sản xuất nhiên liệu sinh học phù hợp với điều kiện Việt Nam.

### 2. Vật liệu và phương pháp

#### 2.1. Môi trường nuôi trồng

Môi trường nuôi trồng vi tảo là nước thải từ bể phân hủy kỵ khí biogas tại trang trại chăn nuôi Hòa Phú – Thành phố Đà Nẵng. Thành phần hữu cơ của nước thải dao động theo từng thời điểm lấy mẫu, tuy nhiên nhìn chung, nguồn nước thải này có các chỉ số ô nhiễm lớn, vượt xa tiêu chuẩn nước thải. Cụ thể là hàm lượng Nitơ tổng và Phốt pho tổng nằm trong khoảng tương ứng là 300 ÷ 550 mg/l và 120 ÷ 260 mg/l, tổng rắn lơ lửng khoảng 800 ÷ 900 mg/l.

#### 2.2. Tảo giống

Nguồn tảo giống được sử dụng là chủng *Chlorella vulgaris* với kích thước tế bào từ 5-10 μm, là một trong các chủng vi tảo được nghiên cứu nhiều nhất cho mục tiêu sản xuất biodiesel [6]. Giống tảo thuần chủng được mua từ phòng công nghệ Tảo thuộc viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, được bảo quản và nhân giống trong môi trường Antoine trước khi đưa vào nuôi trồng trong môi trường nước thải [7].

#### 2.3. Phương pháp khảo sát sự sinh trưởng

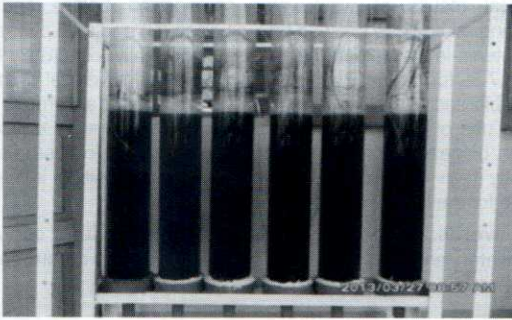
Để khảo sát sự sinh trưởng của vi tảo, nhóm nghiên cứu chọn phương pháp đo nồng độ Chlorophyll a theo Avigad Vonshak [8]. Nguyên tắc của phương pháp này là dựa vào khả năng hấp thụ ánh sáng của Chlorophyll a ở những bước sóng nhất định để xác định hàm lượng của chúng có trong

mẫu sau khi chiết bằng dung môi thích hợp. Mẫu được ly tâm 6000 vòng/phút ở 24°C trong 5 phút để thu sinh khối mẫu. Gạn bỏ dịch nổi, giữ lại phần kết tủa. Bổ sung 1ml acetone vào ống eppendorf đựng dịch tủa trên. Sau đó đem ly tâm 8000 vòng/phút ở 4°C trong 5 phút. Lấy dịch nổi và đo ở bước sóng 664 nm, 647 nm. Áp dụng công thức xác định nồng độ chlorophyll a [8]:

$$\text{Chlorophyll a } (\mu\text{g/ml}) = 11,93 \cdot E_{664} - 1,93 \cdot E_{647}$$

#### 2.4. Phương pháp nuôi trồng

Tiến hành nuôi trồng vi tảo trong hệ thống ống thẳng đứng ở điều kiện tối ưu tìm được: tốc độ sục khí CO<sub>2</sub> là 70ml/ph tương ứng với thể tích dịch nuôi là 7 lít cho mỗi ống trong môi trường nước thải chăn nuôi không pha loãng và để ngoài ánh sáng tự nhiên [7]. Việc nuôi trồng vi tảo trong hệ thống ống thẳng đứng có ưu điểm là tiết kiệm diện tích nuôi trồng (Hình 1).



Hình 1. Hệ thống nuôi trồng vi tảo

Thể tích giống cho vào chiếm 10% thể tích môi trường. Giống sử dụng là giống cấp 2 được nhân trong vòng 7 ngày. Khảo sát sự sinh trưởng của vi tảo bằng cách đo nồng độ chlorophyll a ở cùng một thời điểm trong từng ngày nuôi trồng. Tiến hành thu hoạch sinh khối và trích ly lipid khi pha sinh trưởng đi vào giai đoạn suy vong (tương ứng với 2 ngày giảm trên đường cong sinh trưởng).

### 3. Kết quả nghiên cứu

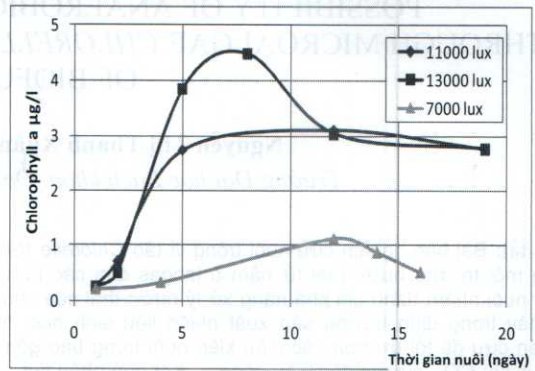
#### 3.1. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của vi tảo trong môi trường nước thải chăn nuôi

##### 3.1.1. Ảnh hưởng của cường độ ánh sáng

Chu kỳ sáng tối thích hợp nhất cho sự sinh trưởng và tích lũy lipid đối với vi tảo *Chlorella Vulgaris* là 16h sáng: 8h tối [9]. Cường độ ánh sáng là một trong những yếu tố ảnh hưởng quan trọng nhất đến sự quang hợp của tảo. Khảo sát trên 3 mẫu với cường độ ánh sáng 7000, 11000 và 13000 lux, các mẫu thí nghiệm đều không sục không khí và CO<sub>2</sub>, nhóm nghiên cứu nhận thấy rằng trong quá trình nuôi, cường độ ánh sáng càng mạnh thì tảo sinh trưởng càng tốt, mẫu 13000 lux có tốc độ sinh trưởng lớn nhất (Hình 2).

Nồng độ Chlorophyll a đo được cho thấy vi tảo sinh trưởng tốt trong môi trường nước thải ở cường độ ánh sáng cao hơn so với môi trường cơ bản [7]. Nguyên nhân là do nước thải có màu đục, cường độ ánh sáng lớn mới có thể xuyên qua nước thải, giúp tảo hấp thu tốt. Ở mức 13000 lux là cường độ ánh sáng tương đương ngoài trời, vì vậy chúng tôi quyết định thử nghiệm nuôi vi tảo bằng ánh sáng tự nhiên ngoài trời thay vì dùng ánh sáng nhân tạo từ đèn huỳnh quang. Hơn nữa theo kết quả khảo sát của Siranee

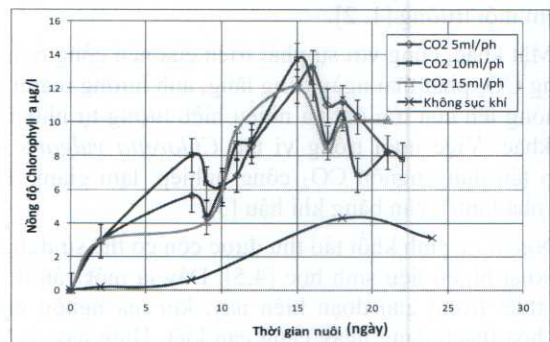
Sreesai and Preeda Pakpain [10] nuôi tảo *Chlorella vulgaris* bằng ánh sáng tự nhiên với cường độ ánh sáng dao động từ 2500÷9000 lux cho sinh khối cao hơn nuôi ở cường độ ánh sáng cố định 3000 lux, 5000 lux và 8000 lux.



Hình 2. Tốc độ sinh trưởng của vi tảo thay đổi theo cường độ ánh sáng

##### 3.1.2. Ảnh hưởng của CO<sub>2</sub>

Đối với vi tảo, CO<sub>2</sub> đóng vai trò quan trọng đặc biệt trong quá trình quang hợp, nó có thể được cung cấp bởi nguồn CO<sub>2</sub> trong khí quyển, từ khói thải của nhà máy, trong các muối carbonate hòa tan như NaHCO<sub>3</sub> [11]. Để khảo sát ảnh hưởng của CO<sub>2</sub> đối với sự sinh trưởng của vi tảo đồng thời xác định nồng độ sục CO<sub>2</sub> phù hợp, chúng tôi tiến hành thực nghiệm trên 4 mẫu dưới ánh sáng 13000 lux, tốc độ sục không khí giữ cố định 650 ml/phút cho tất cả các mẫu; nồng độ CO<sub>2</sub> thay đổi lần lượt cho các mẫu theo tốc độ sục là 0, 5, 10 và 15 ml/ph. Kết quả khảo sát cho thấy mẫu sục CO<sub>2</sub> với tốc độ 10ml/ph sinh trưởng tốt nhất, nồng độ Chlorophyll a đạt cao nhất là 14 µg/l và chu kỳ sinh trưởng là 12 ngày, ngắn hơn so với các mẫu khác (Hình 3). Nồng độ CO<sub>2</sub> quá cao hoặc quá thấp sẽ hạn chế quá trình sinh trưởng của vi tảo, điều này được giải thích do khi ta tăng nồng độ CO<sub>2</sub>, ban đầu cường độ quang hợp sẽ tăng tỉ lệ thuận với nồng độ CO<sub>2</sub> nhưng khi nồng độ CO<sub>2</sub> đạt đến giá trị bão hòa thì cường độ quang hợp giảm dần. Nếu ta tiếp tục tăng tốc độ sục khí thì sẽ ảnh hưởng gây ức chế sự sinh trưởng của tảo. Kết quả này cũng phù hợp khi khảo sát sự sinh trưởng của tảo trong môi trường cơ bản [7].



Hình 3. Ảnh hưởng của nồng độ CO<sub>2</sub>

#### 3.2. Đánh giá khả năng xử lý nước thải của vi tảo *Chlorella vulgaris*

Quá trình quang hợp thực vật cần nhiều vật chất dinh dưỡng để tổng hợp chất hữu cơ và sinh trưởng. Bên cạnh carbon, nitơ và photpho là hai nguồn dinh dưỡng cần

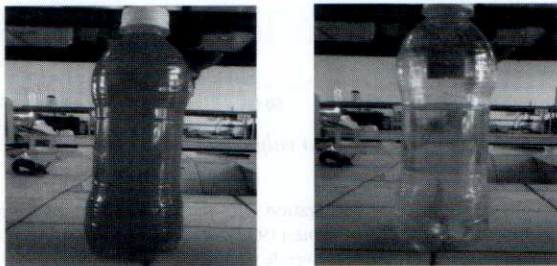
thiết cho quá trình phát triển của vi tảo và tỷ lệ N:P thường được đề nghị là 6:1. Đối với *Chlorella* nguồn nitơ sử dụng là muối amonium, nitrate và urea trong đó amonium cho kết quả tốt nhất [12]. Tùy loài *Chlorella* mà

có sự tích lũy acid béo hoặc tinh bột khác nhau. Riêng *C. Vulgaris*, việc hấp thụ nitơ, photpho sẽ làm tăng cả về carbon và acid béo [13].

**Bảng 1.** Thành phần nước thải trước và sau khi thu hoạch vi tảo

Thông số phân tích	Phương pháp	Kết quả phân tích mẫu nước thải hữu cơ	
		Mẫu trước khi nuôi	Mẫu sau khi nuôi
Tổng cặn rắn lơ lửng	TCVN 6625-2000	881,3 mg/l	143,0 mg/l
Nitơ tổng	TCVN 6202-1996	540,7 mg/l	96,39 mg/l
Photpho tổng	TCVN 5987-1995	264,1 mg/l	109,1 mg/l

Kết quả khảo sát khả năng xử lý nước thải từ hầm ủ biogas cho thấy mẫu nước thải thu được sau 12 ngày nuôi trồng vi tảo đã cải thiện đáng kể về màu sắc (Hình 4 a và b) và mùi đặc trưng.



(a) Trước khi nuôi

(b) Sau khi nuôi

**Hình 4.** Nước thải trước (a) và sau khi nuôi trồng vi tảo *Chlorella vulgaris* (b)

Để đánh giá cụ thể khả năng loại bỏ thành phần hữu cơ thông qua quá trình hấp thụ dinh dưỡng của vi tảo *Chlorella vulgaris* chúng tôi tiến hành đo hàm lượng Nitơ tổng (TKN) và Photpho tổng (TP) trong nước. Kết quả phân tích thành phần nước thải trước và sau khi nuôi trồng vi tảo thể hiện trong Bảng 1 cho thấy hàm lượng TKN và TP trong thành phần nước thải giảm đáng kể. Cụ thể là giảm 80,9% đối với TKN và 58,7% đối với TP. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Sirance Sreesai and Preeda Pakpain [10] khi khảo sát khả năng xử lý nước thải của vi tảo này trong môi trường tự nhiên, với các giá trị lần lượt là 88% TKN và 68% TP.

Theo Karin Larsdotter [14], sự hấp thụ N, P của vi tảo giảm tùy thuộc theo mùa, nhưng nhìn chung, hiệu suất giảm khoảng 40% cho phần lớn các khoảng thời gian trong năm. Qua đó có thể khẳng định vi tảo *Chlorella vulgaris* hoàn toàn có khả năng hấp thụ tốt N và P để tổng hợp protein và lipid. Như vậy, việc nuôi trồng vi tảo trong môi trường nước thải chẵn nuôi cho phép tận dụng chất dinh dưỡng để đảm bảo cho sự sinh trưởng của vi tảo. Đồng thời góp phần xử lý đáng kể nước thải, giảm ô nhiễm môi trường.

### 3.3. Đánh giá tiềm năng của sinh khối vi tảo cho mục đích năng lượng

Việc xử lý nước thải hữu cơ thông qua nuôi trồng vi tảo *Chlorella vulgaris* thực sự có ý nghĩa về mặt kinh tế xã hội nếu kết hợp được với việc ứng dụng nguồn sinh khối vi tảo này để sản xuất năng lượng. Trong bài báo này, chúng tôi đánh giá tiềm năng sản xuất năng lượng

của sinh khối vi tảo *Chlorella vulgaris* thông qua khảo sát hai chỉ tiêu là nhiệt trị cháy và thành phần lipid.

#### 3.3.1. Nhiệt trị của sinh khối vi tảo

Sinh khối vi tảo sau khi thu hoạch được sấy khô và đem phân tích nhiệt trị cháy tại Phòng hóa nghiệm công ty xăng dầu khu vực 5 (Vilas 27). Kết quả phân tích tương ứng là 15,930 kJ/kg. So sánh với một số loại sinh khối làm chất đốt thông dụng như củi khô, vỏ trấu, rơm rạ, gỗ có thể thấy giá trị nhiệt trị của sinh khối vi tảo tương đối lớn (Bảng 2). Cụ thể là nhiệt trị của sinh khối vi tảo lớn gấp 1,5 lần củi khô, lớn hơn vỏ trấu và rơm rạ. Nếu chỉ đơn giản ứng dụng nguồn sinh khối này như “chất đốt xanh” (green fuel) cũng có thể thấy nguồn sinh khối này có tiềm năng đáp ứng nhu cầu chất đốt trong tương lai.



**Hình 5.** Sinh khối vi tảo

**Bảng 2.** So sánh nhiệt trị cháy của một số nguồn sinh khối thông dụng

Nguồn sinh khối	Nhiệt trị cháy (kJ/kg)
Củi khô	10,106
Vỏ trấu	15,048
Rơm rạ	15,082
Vi tảo	<b>15,930</b>
Gỗ	17,514

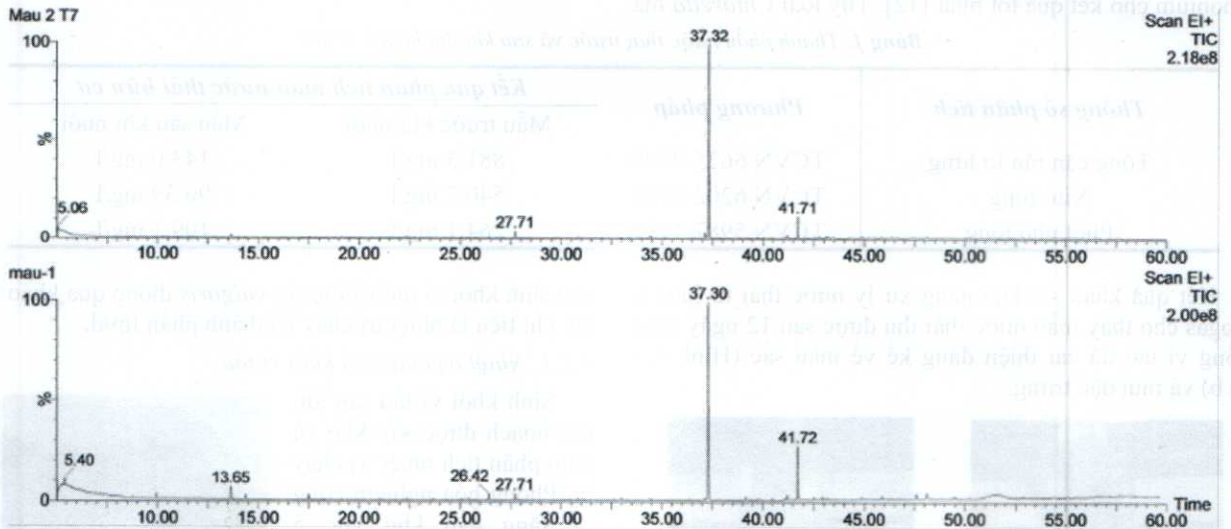
#### 3.3.2. Kết quả phân tích thành phần lipid trích ly từ sinh khối tảo

Để đánh giá tiềm năng sản xuất nhiên liệu sinh học, cụ thể là dầu diesel sinh học từ sinh khối vi tảo *Chlorella vulgaris* nuôi trồng trong môi trường nước thải, chúng tôi phân tích thành phần lipid được trích ly từ 2 mẫu sinh khối vi tảo nuôi trồng trong điều kiện khác nhau: Mẫu 1 nuôi trong môi trường nước thải pha loãng theo tỷ lệ nước thải: nước cất là 4:1, sục không khí và CO<sub>2</sub> tốc độ 10ml/ph; Mẫu 2 nuôi trong môi trường nước thải 100%, sục không khí và CO<sub>2</sub> 10ml/ph. Phép phân tích được tiến hành trên máy sắc ký khối phổ GCMS.

Dựa trên sắc ký đồ thu được, nhận thấy ở cả 2 mẫu đều có sự xuất hiện rõ ràng của 2 peak 37,3 và 41,71 (Hình 6). Bảng phép phân tích khối phổ cho hai peak này,

kết quả cho thấy peak 37,3 tương ứng với khối phổ của methyl ester của acid palmetic C16:0 và peak 41,71 tương ứng với khối phổ của acid oleic C<sub>18</sub>:1. Kết quả này hoàn

toàn tương tự như thành phần lipid của sinh khối vi tảo thu được khi nuôi trồng trong môi trường cơ bản [7].



Hình 6. Sắc ký đồ thành phần lipid thu được từ sinh khối vi tảo *Chlorella vulgaris*

Đây là 2 loại acid béo rất phù hợp để sản xuất biodiesel vì đảm bảo được tiêu chuẩn điểm chảy và độ ổn định oxy hóa của sản phẩm. Kết quả phân tích này khẳng định lipid trích ly từ vi tảo *Chlorella Vulgaris* được nuôi trồng trong môi trường nước thải từ hầm ủ biogas hoàn toàn có triển vọng cho mục tiêu sản xuất biodiesel.

#### 4. Kết luận

Kết quả thực nghiệm cho thấy vi tảo *Chlorella Vulgaris* sinh trưởng tốt trong môi trường nước thải giàu hữu cơ từ hầm ủ biogas. Chúng vi tảo này hấp thụ rất tốt thành phần Nitơ và Phốt pho trong nước thải (cụ thể là giảm 80,9% đối với TKN và 58,7% đối với TP), để tích lũy protein và lipid, từ đó làm giảm nồng độ hữu cơ trong nước, góp phần xử lý nước thải. Bên cạnh đó, nguồn sinh khối vi tảo thu được có thành phần lipid phù hợp cho mục tiêu sản xuất biodiesel. Với giá trị nhiệt trị cháy tương đối cao (15,930 kJ/kg), sinh khối vi tảo cũng có thể được tận dụng cho mục tiêu sản xuất chất đốt. Kết quả nghiên cứu này đã mở ra thêm nhiều hướng đi mới như: Khảo sát sự sinh trưởng của vi tảo *Chlorella vulgaris* trong một số loại nước thải giàu hữu cơ khác như nước thải tại các cơ sở nuôi trồng và chế biến thủy hải sản; các lò giết mổ gia súc,... nhằm mở rộng các hướng nuôi trồng. Bên cạnh đó, vi tảo hấp thụ một lượng lớn CO<sub>2</sub> nên có thể sử dụng khối thải từ việc sử dụng nhiên liệu chất đốt để cung cấp CO<sub>2</sub> cho vi tảo. Như vậy vừa có thể đảm bảo sự sinh trưởng của vi tảo, vừa kết hợp xử lý ô nhiễm môi trường.

#### Tài liệu tham khảo

[1] Karin Larsdotter, Wastewater treatment with microalgae – A literature review, *Vatten* 62: 31–38. Lund 2006.  
 [2] Luz Estela González, Rosa Olivia Cañizares, Sandra Baena, Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a Colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*, *Bioresource Technology* 60(1997)

259–262.

- [3] Benemann, J.R., CO<sub>2</sub> mitigation with microalgae systems, *Energy Conversion and Management*, (1997) Vol. 38, p. 475–479.  
 [4] Liam Brennan, Philip Owende, Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14 (2010) 557–577.  
 [5] Jasvinder Singh, Sai Gu, Commercialization potential of microalgae for biofuels production, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14 (2010) 2596–2610.  
 [6] Yusuf Chisti, Research review paper - Biodiesel from microalgae, *Biotechnology Advances* 25 (2007) 294–306.  
 [7] Nguyen Thi Thanh Xuan, Dang Kim Hoang, Nguyen Minh Tuan, Le Thi Bich Yen, Nguyen Hoang Minh, A study of *Chlorella vulgaris* microalgae cultivation for biodiesel production, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Đại học Đà Nẵng* – số 8(57).2012, quyển III.  
 [8] Jiri Masojidek, Avigad Vonshak, Giuseppe Torzillo, Chlorophyll Fluorescence Applications in Microalgal Mass Cultures, Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and Applications, *Developments in Applied Phycology Volume 4*, 2010, pp 277–292.  
 [9] D.Sasi and G.A.Hill, “Effect of light intensity on growth of *Chlorella Vulgaris* in a novel Circulating loop photobioreactor”, *Doctor of philosophy, Department of Chemical Engineering, University of Saskatchewan, Canada*, 2009.  
 [10] Siranee Sreesai and Preeda Pakpain, Nutrient Recycling by *Chlorella vulgaris* from Septage Effluent of the Bangkok City, Thailand, *Science Asia* 33 (2007): 293–299, doi: 10.2306/scienceasia1513-1874.2007.33.293  
 [11] G.Gacheva (2008), “The resistance of a new strain *Chlorella* sp R-06/2 isolated from an extreme habitat to environmental stress factors”, *General and Applied Plant Physiology, Special Issue*, vol 34, 3–4, page 347–360.  
 [12] Attilio Converti, Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production, *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, (2009), 48 1148–1151  
 [13] Shantanu Wahal, Nutrient utilization from anaerobic digester effluent through algae cultivation, *Doctor of philosophy, Utah State University Logan, Utah*, 2010.  
 [14] Karin Larsdotter (2006), Microalgae for phosphorus removal from wastewater in a Nordic climate, *the School of Biotechnology, Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden*.