

XÁC ĐỊNH THÀNH PHẦN SINH HÓA CỦA SINH KHỐI *SPIRULINA PLATENSIS* CHỨNG BM THU ĐƯỢC KHI NUÔI TRONG MÔI TRƯỜNG NƯỚC THẢI CHĂN NUÔI HEO SAU XỬ LÝ KỊ KHÍ

Nguyễn Thị Liên⁽¹⁾

(1) Trường Đại học Thủ Dầu Một

Ngày nhận bài 17/8/2024; Chấp nhận đăng 30/3/2025

Email liên hệ: liennt@tdmu.edu.vn

Tóm tắt

Nghiên cứu đã đánh giá được hàm lượng chlorophyll, carotene và cacbonhydrate của sinh khối *Spirulina platensis* BM thu được khi nuôi trong nước thải chăn nuôi heo sau biogas ở các mức nồng độ nước thải khác nhau. Kết quả cho thấy nước thải chăn nuôi heo sau biogas là nguồn cung cấp N phù hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của tảo xoắn *Spirulina platensis* chủng BM. Thành phần N của nước thải: 1,51mg/l N_{NO₃⁻}; 157mg/l N_{NH₄⁺}; 192mg/l tổng Nito. Kết quả đánh giá thành phần sinh hóa trong tảo cho thấy ở tỷ lệ nước thải 60% cho cho hàm lượng carotene, chlorophyll và cacbonhydrate cao nhất lần lượt là 3,98mg/g, 8,34mg/g và 35,43%.

Từ khóa: sử dụng nước thải chăn nuôi heo sau xử lý kỵ khí nuôi vi tảo, thành phần sinh hóa của *Spirulina platensis*

Abstract

EVALUATION OF BIOACTIVE COMPOSITION FOR *SPIRULINA PLATENSIS* BM GROWN UNDER AQUEOUS CONDITION USING EFFLUENT FROM ANAEROBICALLY TREATED PIG WASTEWATER

The study evaluated chlorophyll, carotene and cacbonhydrate content from *Spirulina platensis* BM grown under aqueous conditions using effluent from anaerobically treated pig wastewater at different wastewater concentrations. The results showed that anaerobically treated pig wastewater was a suitable source of N for the growth and development of *Spirulina platensis* BM. N composition of wastewater: 1.51mg/l N_{NO₃⁻}; 157mg/l N_{NH₄⁺}; 192mg/l total Nito. The results of evaluation of carotene, chlorophyll and cacbonhydrate content in algae showed that at 60% wastewater rate, the highest carotene, chlorophyll and cacbohydrate content was 3.98mg/g; 8.34mg/g and 35.43 % respectively.

1. Đặt vấn đề

Vi tảo được nghiên cứu từ nhiều năm nay với những đặc tính hữu ích kèm giá trị dinh dưỡng cao, nó có dạng sợi xoắn màu xanh lục, sinh trưởng được cả ở vùng nước mặn lẫn nước ngọt. Vi tảo chứa một lượng lớn các chất dinh dưỡng rất tốt cho hệ miễn dịch của cơ thể con người bao gồm: protein, acid béo không bão hòa, phycobiliprotein, carotenoid, polysaccharide, vitamin và khoáng chất. Vì vậy, nó được coi là thực phẩm

bổ sung để chống lại tình trạng thiếu hụt dinh dưỡng ở các nước đang phát triển. Hiện nay những chế phẩm từ vi tảo đang ngày càng được quan tâm và đón nhận nhiều hơn, vừa an toàn về nguồn gốc lại vừa đảm bảo được giá trị dinh dưỡng cao. Trong đó, đáng chú ý là *Spirulina* bởi vì nó dễ phát triển và sinh trưởng trong môi trường nước, có thể thu hoạch và chế biến dễ dàng. Thành phần dinh dưỡng của *Spirulina* có chứa đầy đủ khoáng đa lượng và vi lượng, axit amin thiết yếu, protein, lipid, vitamin, khoáng chất và chất chống oxy hóa với hàm lượng rất cao. Trong những năm gần đây, *Spirulina* đã thu hút được sự chú ý rất lớn từ cộng đồng nghiên cứu cũng như các ngành công nghiệp như là một nguồn dược phẩm và thực phẩm chức năng đang phát triển. Những nghiên cứu về kỹ thuật nuôi trồng cũng như những ứng dụng của *Spirulina* cũng ngày càng được quan tâm và phát triển mạnh hơn (Sony và ctv., 2017).

Hiện nay nguồn thực phẩm chính của con người từ thịt, sữa, trứng, cá đều được cung cấp hoàn toàn từ ngành chăn nuôi. Ở Việt Nam, đây được xem là một trong những ngành có vai trò quan trọng không những cho sự phát triển kinh tế mà còn tạo công ăn việc làm, tăng thu nhập cho người lao động. Các hình thức chăn nuôi phổ biến là trang trại ngày càng phát triển và mở rộng nhằm đáp ứng đủ nhu cầu cầu về nguồn thực phẩm ngày một gia tăng của của người dân. Trong đó ngành chăn nuôi heo là phân ngành lớn và chiếm tỷ trọng cao nhất, đứng thứ hai là chăn nuôi gia cầm. Song song với sự phát triển của ngành chăn nuôi heo thì kéo theo một khối lượng lớn chất thải từ hoạt động chăn nuôi như nước rửa và vệ sinh chuồng trại, phân và nước tiểu hằng ngày từ heo, chất thải từ thức ăn chăn nuôi dư thừa thải cần phải được xử lý trước khi thải ra môi trường. Nước thải chăn nuôi heo thông thường được xử lý bằng hệ thống biogas nhằm xử lý phần lớn các hợp chất hữu cơ khó phân hủy trong nước thải từ chăn nuôi heo. Tuy nhiên hàm biogas không hiệu quả trong việc xử lý hàm lượng tổng N, P trong nước thải. Do đó, để đảm bảo tiêu chuẩn xả thải, cần phải sử dụng hệ thống xử lý sinh học sau khi nước thải đã xử lý bằng hệ thống hàm biogas. Gần đây, có rất nhiều nghiên cứu sử dụng nguồn nước thải chăn nuôi heo để làm môi trường nuôi tảo mang lại hiệu quả cao. Việc sử dụng nước thải chăn nuôi heo sau biogas vừa giúp loại bỏ N, P vừa mang lại nguồn sinh khối có giá trị được sử dụng như làm nguồn thức ăn bổ sung cho nuôi trồng thủy sản như làm thức ăn cho cá, tôm hay chiết xuất các hợp chất có hoạt tính sinh học (Baharuddin và ctv., 2016; Sharma và ctv., 2022; Lim và ctv., 2016).

Do những nguyên nhân trên đề tài “Xác định thành phần sinh hóa của sinh khối chủng *Spirulina platensis* BM thu được khi nuôi trong môi trường nước thải chăn nuôi heo sau xử lý kỵ khí” được thực hiện.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Vật liệu nghiên cứu:

Chủng vi tảo được mua từ Phòng Công nghệ Tảo của Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Nước thải chăn nuôi heo sau xử lý kỵ khí được cung cấp từ trại chăn nuôi heo thuộc huyện Phú Giáo, tỉnh Bình Dương.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp phân tích hàm lượng caroten của chủng *Spirulina* BM

Phương pháp thực hiện:

Xác định hàm lượng sắc tố caroten sử dụng acetone 80% theo phương pháp của Wellburn và Lichtenthaler (1984). Quá trình xác định hàm lượng sắc tố caroten được thực hiện trong điều kiện lạnh và tránh ánh sáng.

1. Sử dụng màng lọc sợi thủy tinh để lọc một thể tích nhất định (ml) của dịch tảo, màng lọc sợi thủy tinh chứa sinh khối tảo sau lọc được cho vào cối sứ để nghiền. Quá trình nghiền kết thúc khi sinh khối tảo và màng lọc được nghiền thành một hỗn hợp mịn.

2. Tiếp tục cho thêm 5ml acetone 80% sau đó cho hỗn hợp vào ống đựng mẫu (ống đựng mẫu được bọc lại bằng túi đen hoặc giấy để tránh tiếp xúc với ánh sáng).

3. Sử dụng acetone 80% để tráng cối, hỗn hợp được giữ tối thiểu trong 2 giờ.

4. Sử dụng màng lọc sợi thủy tinh để lọc hỗn hợp thu được ở bước 2 và 3. Tiếp theo, cho thêm acetone 80% để đạt được thể tích 10ml và cho vào ống nghiệm.

5. Sử dụng máy quang phổ để đo mật độ quang tại OD_{460nm}

Công thức tính toán:

$$\text{Nồng độ carotenoid (A = 200) (mg/g)} = \frac{OD_{460} \cdot V_{ml}}{A_{carotenoid} \cdot m_{SKK}}$$

Trong đó:

OD: Mật độ quang học của dung dịch

V: Thể tích (ml)

m_{SKK}: Khối lượng sinh khối khô (g)

2.2.2. Phương pháp xác định hàm lượng chlorophyll của chủng *Spirulina BM*

Phương pháp thực hiện:

Xác định nồng độ caroten sử dụng acetone 80% theo phương pháp của Wellburn và Lichtenthaler (1984). Quá trình xác định hàm lượng sắc tố caroten được thực hiện trong điều kiện lạnh và tránh ánh sáng.

1. Sử dụng màng lọc sợi thủy tinh để lọc một thể tích nhất định (ml) của dịch tảo, màng lọc sợi thủy tinh chứa sinh khối tảo sau lọc được cho vào cối sứ để nghiền mịn. Quá trình nghiền kết thúc khi sinh khối tảo và màng lọc được nghiền thành một hỗn hợp mịn.

2. Tiếp tục cho thêm 5ml dung môi acetone 80% sau đó cho hỗn hợp vào ống đựng mẫu (ống đựng mẫu được bọc lại bằng túi đen hoặc giấy để tránh tiếp xúc với ánh sáng).

3. Sử dụng dung môi acetone 80% để tráng cối, hỗn hợp được giữ tối thiểu trong 2 giờ.

4. Sử dụng màng lọc sợi thủy tinh để lọc hỗn hợp thu được ở bước 2 và 3. Tiếp theo, cho thêm acetone 80% để đạt được thể tích 10ml và cho vào ống nghiệm.

5. Sử dụng máy quang phổ để đo mật độ quang tại OD_{662nm}

Công thức tính toán:

$$\text{Nồng độ chlorophyll (A = 82,4) (mg/g)} = \frac{OD_{662} \cdot V_{ml}}{A_{chlorophyll} \cdot m_{SKK}}$$

Trong đó:

OD: Mật độ quang học của dung dịch

V: Thể tích (ml)

m_{SKK}: khối lượng sinh khối khô (g)

2.2.3. Xác định carbohydrate bằng phương pháp DNS (Dubois và ctv., 1956)

Nguyên tắc:

Phương pháp này dựa trên cơ sở phản ứng tạo màu giữa đường khử với thuốc thử acid dinitrosalicylic (DNS). Cường độ màu của hỗn hợp phản ứng tỷ lệ thuận với nồng độ đường khử trong một phạm vi nhất định. So màu tiến hành ở bước sóng 540nm. Dựa theo đồ thị đường chuẩn của glucose tinh khiết với thuốc thử DNS sẽ tính được hàm lượng đường khử của mẫu nghiên cứu.

Các bước thực hiện:

1. Cho 10ml HCl có nồng độ 2,5M vào m(g) tảo khô đã được nghiền thành bột mịn. Tiếp theo, hỗn hợp sẽ được đun ở nhiệt độ 100°C trong 30 phút (lưu ý đun cách thủy). Sau đó, hỗn hợp sẽ được để nguội ở nhiệt độ phòng. Lấy 5,1ml NaOH 5M cho vào hỗn hợp sau khi nguội để pH nằm trong khoảng từ 7 đến 8. Cho thêm nước cất để đạt được thể tích 25mL. Dùng micropipet lấy 1ml mẫu đem ly tâm lạnh trong 5 phút với tốc độ 12.000 vòng/phút, hỗn hợp sau ly tâm thu dịch bỏ cặn.

2. Cho acid dinitrosalicylic (DNS) 1% và dịch sau ly tâm trộn với nhau theo tỷ lệ 1:1, hỗn hợp sau trộn cho vào eppendorf (lưu ý eppendorf này được khoét 1 lỗ nhỏ trên nắp). Sau đó, hỗn hợp được đun sôi trong thời gian 10 phút. Hỗn hợp sau đun sôi được để ở nhiệt độ phòng khoảng 30 phút đến 1h đến khi hỗn hợp nguội hoàn toàn. Hỗn hợp được pha loãng rồi đo quang phổ ở bước sóng 540nm

Tính toán

Sau khi đo mẫu ở bước sóng OD_{540nm} máy sẽ dựa vào đường chuẩn có sẵn, độ pha loãng để tính toán ra hàm lượng đường khử có trong mẫu (mg/ml)

2.2.4. Phương pháp phân tích độ ẩm (TCVN 1867:2001)

Nguyên tắc: Tỷ số giữa khối lượng mất đi của mẫu thử và khối lượng của nó tại thời điểm lấy mẫu; độ ẩm được tính bằng %.

Thực hiện:

Lấy mẫu đem đi cân được m₁ (g), sau đó mẫu cho vào tủ sấy, sấy tại nhiệt độ 105°C ± 2°C, sấy đến khối lượng không đổi. Mẫu sau sấy được cân lại m₂ (g)

Tính toán kết quả:

Độ ẩm (X) của mẫu được tính theo công thức sau :

$$X = \frac{m_1 - (m_3 - m_2)}{m_1} \times 100\%$$

Trong đó: m₁: khối lượng mẫu ban đầu (g).

m₂: khối lượng của của giấy bạc (g).

m₃: khối lượng mẫu và giấy bạc sau khi sấy (g).

2.2.5. Phân tích hàm lượng N trong nước thải

Xác định hàm lượng amoni bằng phương pháp TCVN 6179-1:1996

Xác định hàm lượng nitrat bằng phương pháp SMEWW 4500-NO₃⁻ E:2012

Xác định hàm lượng N_{ts} (Nitơ tổng số) theo phương pháp TCVN 6638:2000

2.2.6. Phương pháp xử lý số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Xử lý thống kê bằng phần mềm Statgraphics

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Đánh giá thành phần N trong nước thải chăn nuôi heo sau biogas trước khi nuôi tảo xoắn *Spirulina platensis*

Bảng 1. Kết quả đánh giá thành phần N trong nước thải

STT	Chỉ tiêu	Kết quả đợt (mg/L)
1	Nitrat (N_NO ₃ ⁻)	1,51
2	Amoni (N_NH ₄ ⁺)	157
3	Tổng Nitơ (N)	192

Phân tích kết quả thành phần nitrogen trong nước thải sau xử lý kỵ khí bằng biogas cho thấy nước thải sau xử lý có hàm lượng nitrogen khá cao trong đó đặc biệt phải kể đến là nồng độ của NH₄⁺ đạt 157mg/l. Nồng độ nitơ cao hay thấp có ảnh hưởng đáng kể đến sự phát triển của vi tảo và các thành phần sinh hóa của chúng. Nồng độ nitơ cao hay thấp có ảnh hưởng đáng kể đến sự phát triển của vi tảo và các thành phần sinh hóa của chúng. Khi môi trường bị thiếu hụt nguồn nitơ trong môi trường thì sẽ làm giảm tốc độ tăng trưởng nhưng đồng thời tăng hàm lượng lipid (Zhu và ctv., 2014). Nitơ là một chất dinh dưỡng quan trọng cho sự phát triển của vi tảo đóng vai trò quan trọng trong việc tạo ra nhiều loại chất sinh học như peptide, protein, enzyme, diệp lục, phân tử truyền năng lượng và vật liệu di truyền. Vi tảo có thể đồng hóa nitơ ở các dạng nitrat, nitrit, urê và amoni. Tuy nhiên, dạng amoni là nguồn nitơ được vi tảo sử dụng nhiều nhất hơn các dạng khác do đòi hỏi ít năng lượng hơn. Bên cạnh đó, chỉ khi tiêu thụ hết amoni thì vi tảo mới sử dụng đến dạng nitrat và các dạng khác (Tan và ctv., 2016; Vooren và ctv., 2012). Vì vậy nước thải chăn nuôi heo sau biogas được xem là nguồn dinh dưỡng phù hợp cho tảo đồng hóa để xây dựng tế bào.

3.2. Đánh giá thành phần carotene trong tảo xoắn được nuôi ở những tỷ lệ nước thải khác nhau

Ảnh hưởng của tỷ lệ nước thải đến hàm lượng carotene của sinh khối tảo thu được. Kết quả được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Kết quả phân tích carotene của tảo xoắn *Spirulina platensis*

Tỷ lệ nước thải (%)	Hàm lượng caroten (mg/g)
60	3,98±0,53 ^a
70	2,63±0,47 ^b
80	1,96±0,27 ^b

* Các giá trị được đánh dấu bằng những ký tự khác nhau thể hiện sự khác biệt hàm lượng caroten có ý nghĩa về mặt thống kê theo phân tích ANOVA ($\alpha = 0,05$)

Sử dụng môi trường nước thải chăn nuôi heo sau biogas để nuôi tảo ở mỗi tỷ lệ nước thải sẽ cho hàm lượng carotene khác nhau. Bảng 2 cho thấy ở chủng BM (tỷ lệ nước thải 60%) cho kết quả cao nhất 3,98mg/g. Tiếp theo là đến BM (tỷ lệ nước thải 70%) có 2,63mg/g và tỷ lệ nước thải 90% cho hàm lượng là 1,96mg/g. Điều đó chứng tỏ rằng sự giới hạn về nguồn dinh dưỡng sẽ làm tăng hàm lượng caroten. Vì vậy tỷ lệ 60% cho hàm lượng carotene cao nhất.

Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Li và ctv. (2022), khi nồng độ nitơ càng thấp thì hàm lượng astaxanthin càng cao. Hàm lượng N giảm thì sẽ thích thích sự hình thành caroten trong tế bào vi tảo *Haematococcus pluvialis*.

3.3. Đánh giá thành phần chlorophyll trong tảo được nuôi ở những tỷ lệ khác nhau

Bảng 3. Kết quả phân tích chlorophyll của tảo *Spirulina platensis*

Tỷ lệ nước thải (%)	Chlorophyll (mg/g)
60	8,34±0,36 ^a
70	6,57±0,40 ^b
80	4,04±0,45 ^c

* Các giá trị được đánh dấu bằng những ký tự khác nhau thể hiện sự khác biệt hàm lượng chlorophyll có ý nghĩa về mặt thống kê theo phân tích ANOVA ($\alpha = 0,05$)

Nhìn vào bảng 3 ta thấy sử dụng môi trường nước thải chẵn nuôi heo sau biogas để nuôi tảo ở tỷ lệ nước thải sẽ cho hàm lượng chlorophyll khác nhau. Nồng độ 60% cho kết quả cao nhất 8,34mg/g, gấp 2 lần so với nồng độ 80%. Như vậy hàm lượng NH₄⁺ (94,2mg/l); NO₃⁻ (0,906mg/l); N tổng (115,2mg/l) phù hợp cho sự hình thành chlorophyll trong tảo.

3.4. Đánh giá thành phần cacbonhydrate trong tảo xoắn được nuôi ở những tỷ lệ nước thải khác nhau

Bảng 4. Kết quả phân tích cacbonhydrate của tảo xoắn *Spirulina platensis*

Tỷ lệ nước thải (%)	Hàm lượng cacbonhydrate (%)
60	35,43±1,51 ^a
70	31,02±0,97 ^b
80	27,21±1,33 ^c

* Các giá trị được đánh dấu bằng những ký tự khác nhau thể hiện sự khác biệt hàm lượng cacbonhydrate có ý nghĩa về mặt thống kê theo phân tích ANOVA ($\alpha = 0,05$)

Kết quả phân tích cacbonhydrate cho thấy khi tỷ lệ nước thải tăng thì phần trăm thành phần cacbonhydrate có xu hướng giảm dần. Nồng độ cacbonhydrate cao nhất (35,43%) thu được tại tỷ lệ nước thải 60%. Như vậy ở nồng độ N thấp thì hàm lượng cacbonhydrate cao và ở nồng độ N cao hơn thì hàm lượng cacbonhydrate lại thấp hơn, cụ thể ở tỷ lệ nước thải 80% (tương đương 125,6mg/l N-NH₄⁺; 153,6mg/l tổng nito) thì hàm lượng cacbonhydrate chỉ đạt 27,21% trong khi ở tỷ lệ nước thải 70% (tương đương 109,9mg/l N-NH₄⁺; 134,4mg/l tổng nito) thì hàm lượng cacbonhydrate đạt được là 31,02%. Zhu và ctv. (2019, 2024) cũng cho kết quả tương tự.

Nitrogen là một trong những nguồn dinh dưỡng thiết yếu có ảnh hưởng lớn không những tới sự sinh trưởng, phát triển của vi tảo mà còn làm thay đổi hàm lượng một số thành phần có hoạt tính sinh học trong vi tảo. Nito tham gia vào cấu tạo của protein và acid nucleic. Việc thiếu hụt N sẽ làm gia tăng sự tích lũy cacbonhydrate trong tế bào tảo (Zarrinmehr và ctv., 2019; Zhu và ctv., 2014). Theo Zhu và ctv. (2014) và Zarrinmehr và ctv. (2019) khi nuôi cấy tế bào của *Isochrysis galbana* trong điều kiện bị giới hạn nồng độ nito thì sự sinh trưởng của *Isochrysis galbana* giảm nhưng ngược lại hàm lượng cacbonhydrate và lipid được gia tăng cao lần lượt là 47% và 75%.

4. Kết luận

Nước thải chẵn nuôi heo sau biogas là nguồn cung cấp N phù hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của tảo xoắn *Spirulina platensis* chủng BM. Thành phần N của nước thải: 1,51mg/l N-NO₃⁻ 157mg/l N-NH₄⁺; 192mg/l tổng Nito. Kết quả đánh giá thành phần sinh

hóa trong tảo cho thấy ở tỷ lệ nước thải 60% cho kết quả cao nhất của hàm lượng carotene, chlorophyll và carbohydrat cao lần lượt là 3,98mg/g; 8,34mg/g và 35,43%.

Kết quả của đề tài cho thấy nước thải chăn nuôi heo sau xử lý kỵ khí hoàn toàn phù hợp là nguồn nitrogen cho sự phát triển của *S. platensis* chủng BM. Tuy nhiên vì còn nhiều hạn chế về kinh phí, nhân lực cũng như thời gian nên còn nhiều vấn đề cần tiếp tục được làm rõ và nghiên cứu sâu hơn cho những hướng nghiên cứu tiếp theo, cụ thể là:

Đánh giá thêm một số thành phần sinh hóa khác của tảo: lipid, protein

Nghiên cứu thêm ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường đến thành phần sinh hóa và sự tăng trưởng của vi tảo trong môi trường nước thải chăn nuôi sau biogas

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Baharuddin N.N.D.E.; Azizi N.S.; Sohif H.N.; Karim W.A.B.; Al-Obaidi J.R. and Basiran M.N, (2016). Marine microalgae flocculation using plant: the case of *Nannochloropsis oculata* and *Moringa oleifera*. *Pak. J. Bot.* 48, 831-840.
- [2] Dubois G., Gilles K. A., Hamilton S. K., Rebers P. A. and Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem*, 28(3), 350-356.
- [3] Li F., Cai M., Wu Y., Lian Q., Qian Z., Luo J., Zhang Y., Zhang N., Li C. and Huang X. (2022). Effects of Nitrogen and Light Intensity on the Astaxanthin Accumulation in Motile Cells of *Haematococcus pluvialis*.
- [4] Lim, S.J., Kim, T.H., Kim, J.Y., Shin, I.H. and Kwak H.S. (2016). Enhanced treatment of swine wastewater by electron beam irradiation and ion-exchange biological reactor. *Sep. Purif. Technol.* 157, 72-79.
- [5] Sharma R., Mishra A., Pant D. and Malaviya P. (2022). Recent advances in microalgae-based remediation of industrial and non-industrial wastewaters with simultaneous recovery of value-added products. *Bioresource Technology*, 344(B), 126129.
- [6] Soni R. A., Sudhakar K. and Rana R. S. (2017). *Spirulina* – From growth to nutritional product: A review. 69(A), 157-171
- [7] Tan, X.B., Zhang, Y.L., Yang, L.B., Chu, H.Q., Guo, J. (2016). Outdoor cultures of *Chlorella pyrenoidosa* in the effluent of anaerobically digested activated sludge: the effects of pH and free ammonia. *Bioresour. Technol*, 200, 606-615.
- [8] Vooren, G.V.; Grand, F.L.; Legrand, J.; Cui n , S.; Peltier, G.; Pruvost, J (2012). Investigation of fatty acids accumulation in *Nannochloropsis oculata* for biodiesel application. *Bioresour. Technol*, 124, 421-432.
- [9] Wellburn A. R. and Lichtenthaler H. (1984). *Advances in Photosynthesis Research*, Vol. 2, ISBN : 978-90-247-2943-2
- [10] Zarrinmehr M.J., Farhadian O., Heyrati F.P., Keramat J., Koutra E., Kornaro M. and Daneshvar E. (2019). Effect of nitrogen concentration on the growth rate and biochemical composition of the microalga, *Isochrysis galbana*. *Egypt. J. Aquat Res.* 46, 1687-4285. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2019.11.003>
- [11] Zhu S.; Huang, W.; Xu, J.; Wang, Z.; Xu, J.; Yuan, Z. (2014). Metabolic changes of starch and lipid triggered by nitrogen starvation in the microalga *Chlorella zofingiensis*. *Bioresour. Technol*, 152, 292-298