

WYKORZYSTANIE ŚCIEKÓW PO WSTĘPNYM OCZYSZCZANIU BEZTLENOWYM W PROCESIE HODOWLI MIKROGLONÓW *PLATYMONAS SUBCORDIFORMIS*

Magda Dudek¹, Marcin Dębowski¹, Marcin Zieliński¹, Anna Nowicka¹

¹ Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Wydział Nauk o Środowisku, Katedra Inżynierii Środowiska, ul. Warszawska 117, 10-720 Olsztyn, e-mail: magda.dudek@uwm.edu.pl

STRESZCZENIE

Przeprowadzone badania miały na celu określenie możliwości zastosowania ścieków mleczarskich po wstępnym oczyszczeniu beztlenowym do produkcji biomasy mikroglonów z gatunku *Platymonas subcordiformis*. Proces hodowli i namnażania testowanej kultury glonów prowadzono w fotobioreaktorach rurowych o orientacji pionowej. Badania podzielono na serie w zależności od ilości ścieków wprowadzanej do układu technologicznego. W trakcie hodowli prowadzono analizy koncentracji biomasy mikroglonów w bioreaktorach oraz zmian zawartości głównych komponentów medium hodowlanego. Określono potencjał produkcji biomasy *Platymonas subcordiformis* w oparciu o medium hodowlane sporządzone na bazie ścieków beztlenowo oczyszczonych.

Słowa kluczowe: mikroglony, *Platymonas subcordiformis*, ścieki, proces beztlenowy

USE OF A WASTEWATER AFTER ANAEROBIC PRETREATMENT TO *MICROALGAE PLATYMONAS SUBCORDIFORMIS* GROWTH

ABSTRACT

The study aimed to determine the possibility of using dairy sewage after the initial treatment anaerobic biomass production of microalgae species *Platymonas subcordiformis*. The process of growing and propagation of algae culture test was carried out in fotobioreaktorach piping vertical orientation. The study was divided into a series of depending on the amount of waste water introduced into the process system. During the breeding carried out the analysis of concentration of biomass mikroglonów in bioreactors and changes the contents of the main components of the growth medium. We identified the potential of biomass production *Platymonas subcordiformis* based on a culture medium prepared on the basis of wastewater anaerobically treated.

Keywords: microalgae, *Platymonas subcordiformis*, dairy wastewater, anaerobic treatment

WPROWADZENIE

Z uwagi na konieczność ograniczenia kosztów pozyskiwania biomasy mikroglonów poszukuje się rozwiązań pozwalających na zmniejszenie nakładów związanych z preparowaniem medium hodowlanego i uproszczeniem techniki jego przygotowania. Związki azotu i fosforu obecne w ściekach mogą stanowić cenne źródło substancji pokarmowych dla hodowanej biomasy glonów. Ścieki powstające w procesach beztlenowych z uwagi na wysokie stężenia związków biogenych kierowane są do dalszych procesów technologicznych pozwalających na ich usunię-

cie do poziomu bezpiecznego dla środowiska. Metody usuwania biologicznego azotu takie jak nityfikacja czy denityfikacja oraz procesy chemicznego wytrącania i usuwania fosforu mimo iż charakteryzują się wysoką efektywnością są drogie i skomplikowane technologicznie [Gao i in. 2016, Cheah i in. 2016].

Mikroalgi w procesach fotosyntezy mogą skutecznie przekształcić substancje odżywcze zawarte w ściekach w komponenty organiczne takie jak białka, węglowodany czy lipidy stanowiące substrat w technologiach farmaceutycznych, kosmetycznych i energetycznych. Standardowe media hodowlane prezentowane w większości

badania oraz publikacji naukowych preparowane są na bazie wody dejonizowanej oraz reagentów chemicznych, co zwiększa koszty produkcji surowca jaki stanowią glony. W przypadku hodowli specyficznych gatunków mikroglonów ukierunkowanych na produkcję wodoru czy kwasów tłuszczowych istotne jest minimalizowanie kosztowności procesów produkcji biomasy, tak by mogły one znaleźć szersze zastosowanie [Yao i in. 2013, Oncel i Vardar-Sukan 2009].

Doniesienia literaturowe świadczące o możliwości wykorzystania biomasy mikroglonów *Platymonas subcordiformis* w celu pozyskiwania cennych surowców takich jak cukry, tłuszcze świadczą o wysokim potencjale energetycznym tego gatunku [Yao i in. 2013, Khatoon i in. 2014, Day i Tsavalos 1996]. Oprócz pozyskania samej biomasy gatunek ten jest również wykorzystywany w procesach bezpośredniej biofotolizy i produkcji wodoru. Istotną przewagą nad wieloma innymi gatunkami mikroglonów jest możliwość prowadzenia hodowli w oparciu o media hodowlane o różnej charakterystyce fizyczno-chemicznej w tym ściekach przemysłowych i komunalnych. Związane jest to z wysokim stopniem przystosowania komórek glonów do warunków środowiskowych, szybkim tempem wzrostu biomasy oraz odpornością na różnego rodzaju zanieczyszczenia [Guo i in. 2013, Chinnasamy i in. 2010].

Celem badań było określenie możliwości zastosowania ścieków po wstępnym oczyszczeniu beztlenowym do produkcji biomasy mikroglonów *Platymonas subcordiformis*.

METODYKA

W badaniach wykorzystano morski gatunek fitoplanktonowy *Platymonas subcordiformis*. W odpowiednich warunkach technologicznych charakteryzuje się on wysoką efektywnością przyrostu biomasy. W badaniach wykorzystana została kultura własna hodowana w Katedrze Inżynierii Środowiska.

Proces hodowli prowadzono w fotobioreaktorach rurowych o orientacji pionowej. Medium hodowlane oparte było na wykorzystaniu ścieków pochodzących z reaktora beztlenowego oczyszczającego ścieki mleczarskie. Eksperyment podzielony na 5 serii badawczych, których kryterium wyodrębnienia był udział ścieków w medium hodowlanym (seria 1 – medium preparowane na wodzie destylowanej i reagentach che-

micznych, seria 2 – 25% ścieków, seria 3 – 50% ścieków, seria 4 – 75% ścieków, seria 5 – 100% ścieków) (tabela 2 i 3).

Reaktor beztlenowy stanowiący źródło ścieków to reaktor hybrydowy o przepływie labiryntowym i objętości czynnej 70 dm³, łączący złoża biologiczne oraz osad zawieszony. Urządzenie pracuje w skali ułamkowej – technicznej w warunkach mezofilowych (36 ± 1°C). Do reaktora doprowadzane są syntetyczne ścieki mleczarskie preparowane na bazie proszku serwatkowego. Obciążenie objętości reaktora ładunkiem związków organicznych jest na poziomie 10 g ChZT/dm³·d (rys. 1).

Przed rozpoczęciem procesu hodowli mikroglonów przeprowadzono charakterystykę ścieków pozyskiwanych z reaktora pod kątem potencjalnego wykorzystania w procesie namnażania glonów *Platymonas subcordiformis* (tabela 1).

Tabela 1. Charakterystyka ścieków oczyszczonych
Table 1. Characteristics of the effluent

Parametr	Jednostka	Wartość
ChZT	mg/dm ³	1098±15,56
N _{og.}	mg/dm ³	270±2,82
P _{og.}	mg/dm ³	40,8±2,82
PO ₄ ³⁻	mg/dm ³	51,1±1,83
NO ₃ ⁻	mg/dm ³	58,57±1,22
NO ₃ ⁻ -N	mg/dm ³	0,261±0,004
NO ₂ ⁻	mg/dm ³	0,38±0,04
NO ₂ ⁻ -N	mg/dm ³	0,111±0,005
NH ₄ ⁺	mg/dm ³	209,6±4,53
pH	mg/dm ³	7,74

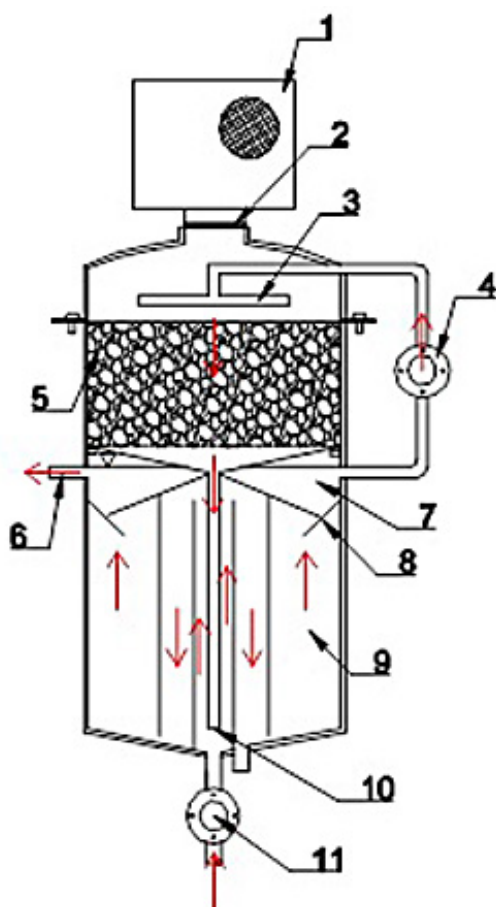
Tabela 2. Skład pożywki syntetycznej stosowanej w serii I do hodowli glonów *Platymonas subcordiformis*

Table 2. Composition of the synthetic medium used in a series of I to grow algae *Platymonas subcordiformis*

Składnik	Jednostka	Seria I
FeCl ₃	mg/dm ³	1,30
MnCl ₂	mg/dm ³	0,36
H ₃ BO ₃	mg/dm ³	33,60
EDTA	mg/dm ³	45,00
NaH ₂ PO ₄	mg/dm ³	20,00
NaNO ₃	mg/dm ³	100,00
ZnCl ₂	mg/dm ³	0,21
CoCl ₂	mg/dm ³	0,20
(NH ₄) ₄ Mo ₇ O ₂₄	mg/dm ³	0,09
CuSO ₄	mg/dm ³	0,20
VB12	µg/dm ³	0,10
VB1	µg/dm ³	1,00

Tabela 3. Skład medium hodowlanego w kolejnych seriach badań**Table 3.** The composition of the culture medium in the next series of studies

Składnik	Jednostka	Seria II	Seria III	Seria IV	Seria V
ChZT	mg/dm ³	267,47±7,68	587±14,36	811±10,63	1074±12,22
N _{og.}	mg/dm ³	62±1,47	115±5,8	162±5,06	249±25,64
P _{og.}	mg/dm ³	10,09±0,84	19,62±0,95	30,74±1,21	36,95±1,38
PO ₄ ³⁻	mg/dm ³	12,41±0,87	26,4±1,33	34,6±2,04	50,6±1,67
NO ₃ ⁻	mg/dm ³	14,62±2,04	27,52±2,67	42,31±3,61	55,13±2,04
NO ₃ ⁻ -N	mg/dm ³	0,067±0,001	0,131±0,002	0,197±0,003	0,258±0,004
NO ₂ ⁻	mg/dm ³	0,11±0,02	0,18±0,02	0,26±0,02	0,37±0,04
NO ₂ ⁻ -N	mg/dm ³	0,037±0,001	0,069±0,003	0,081±0,003	0,112±0,005
NH ₄ ⁺	mg/dm ³	53,8±2,04	108,4±1,97	161,4±4,12	211,2±3,38



Rys. 1. Schemat reaktora hybrydowego: 1 – generator mikrofal, 2 – uszczelnienie generatora mikrofal, 3 – rozprowadzenie ścieków, 4 – pompa recyrkulacyjna, 5 – wypełnienie reaktora, 6 – odpływ, 7 – odpływ ścieków wyklarowanych, 8 – separator osadu, 9 osad zawieszony, 10 – central pipe, 11 – pompa dozująca substrat

Fig. 1. Scheme of a hybrid reactor: 1 – microwave generator, 2 – insert for microwave generator sealing, 3 – distribution of wastewater, 4 – upper recirculation pump, 5 – upper section of bed, 6 – outflow with the water closure, 7 – lower section; zone of sludge clarifying, 8 – sludge trap, 9 – lower section; zone of suspended sludge, 10 – rura centralna, 11 – pump for substrate dosing

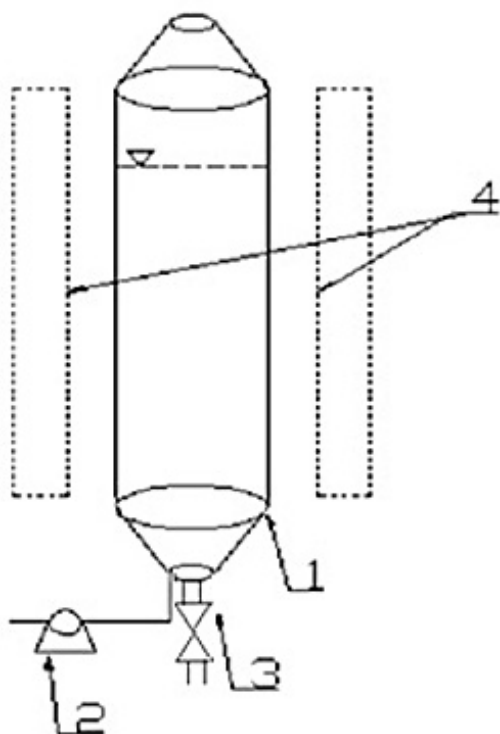
Ścieki zostały poddane procesowi filtracji w celu usunięcia zawieszin mogących zakłócać rozwój komórek glonów.

Hodowlę prowadzono w reaktorach rurowych o objętości czynnej 2,5 dm³ w temperaturze 25±1°C, wyposażonych w pompy umożliwiające intensywne napowietrzanie z wydajnością 150 dm³/h. Zapewniało to mieszanie hodowanej biomasy glonów oraz dostarczanie ditlenku węgla do medium hodowlanego (rys. 2). Fotobioreaktory pracowały przy cyklicznie zmieniającym się oświetleniu światłem białym (14 h oświetlenia i 10 h zaciemnienia). Z uwagi na specyficzne wymagania testowanej kultury glonów układ technologiczny pracował przy zasoleniu na poziomie 30–33 ppt oraz pH w zakresie 8,0–8,3. W fazie jasnej fotobioreaktor były oświetlane światłem białym o natężeniu 5 klux.

Początkowe stężenia biomasy mikroglonów charakteryzowane stężeniem suchej masy organicznej w eksploatowanych reaktorach zapewniono na poziomie 200 mg_{s.m.org.}/dm³. We wszystkich założonych seriach badawczych hodowlę *Platymonas subcordiformis* prowadzono przez okres 15 dni. Próbkę do analiz pobierano co 48 godzin. Ścieki wprowadzono do reaktorów jednorazowo na początku eksperymentu.

METODY ANALITYCZNE I ANALIZA STATYSTYCZNA

W trakcie hodowli mikroglonów *Platymonas subcordiformis* prowadzono analizy zawartości suchej masy, suchej masy organicznej i mineralnej, które określono metodą grawimetryczną. Analizę taksonomiczną biomasy glonów wykonywano stosując mikroskopowe powiększenia: 1,25 x 10 x 40 lub 1,25 x 10 x 10 przy użyciu mikroskopu biologicznego MF 346 z kamerą Optech



Rys. 2. Fotobioreaktor rurowy: 1 – kolumna reaktora, 2 – pompa napowietrzająca, 3 – zawór spustowy, 4 – źródło światła

Fig. 2. Photobioreactor tube: 1 – column reactor, 2 – aeration pump, 3 – valve, 4 – light source

3MP. Analizę medium hodowlanego pod względem stężenia głównych komponentów oraz efektywności ich zużywania przez mikroorganizmy w trakcie prowadzenia hodowli przeprowadzono metodą zminimalizowanych próbek firmy Hach Lange przy wykorzystaniu spektrofotometru UV/VIS DR 5000 Hach Lange. Zasolenie medium badano przy użyciu Marine Control Digital firmy Aqua Medic. Natężenie światła mierzono za pomocą luksometru firmy HANNA HI 97500.

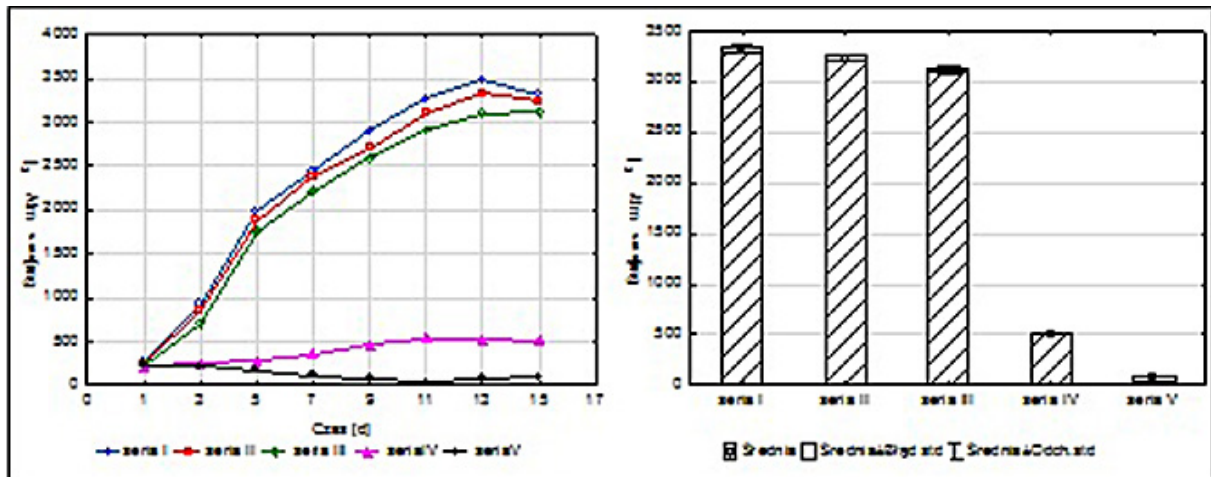
Analizę statystyczną uzyskanych wyników oraz współczynniki determinacji R^2 wykonano w oparciu o pakiet STATISTICA 10.0 PL. Weryfikację hipotezy dotyczącej rozkładu każdej badanej zmiennej określono na podstawie testu W Shapiro–Wilka. W celu stwierdzenia istotności różnic między zmiennymi przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA). Sprawdzenia jednorodności wariancji w grupach dokonano z wykorzystaniem testu Levene’a. W celu określenia istotności różnic między analizowanymi zmiennymi test RIR Tukeya. W testach przyjęto poziom istotności $p = 0,05$.

WYNIKI I DYSKUSJA

W trakcie namnażania testowanych mikroglonów związki biogenne zawarte w ściekach były efektywnie wykorzystywane do wzrostu i budowy materiału komórkowego, co pozwoliło na ich usunięcie przy jednoczesnym przyroście biomasy.

Najwyższą efektywność przyrostu biomasy *Platymonas subcordiformis* na zakończenie procesu hodowli odnotowano dla serii I, w której medium hodowlane stanowiła woda dejonizowana wraz z reagentami chemicznymi. Najwyższe stężenie pozyskanej w tej serii badań biomasy po 13 dniach prowadzenia eksperymentu kształtowało się na poziomie $3471,33 \pm 27,32 \text{ mg}_{\text{s.m.org.}}/\text{dm}^3$ (Rys. 3). W przypadku serii II charakteryzującej się zawartością ścieków na poziomie 25% nie odnotowano statystycznie istotnych różnic związanych z efektywnością wzrostu populacji *Platymonas subcordiformis*. Istotne statystycznie różnice ($p = 0,005$) między seriami badawczymi udowodniono po analizie stężenia suchej masy organicznej w bioreaktorach przy zwiększeniu objętości ścieków do 50%. W przypadku serii II odnotowano maksymalne stężenie komórek *Platymonas subcordiformis* na poziomie $3321,33 \pm 69,97 \text{ mg}_{\text{s.m.org.}}/\text{dm}^3$, natomiast w serii III było to $3099,33 \pm 26,05 \text{ mg}_{\text{s.m.org.}}/\text{dm}^3$ (rys. 3). Istotnie niższą efektywność przyrostu testowanej biomasy mikroglonów zaobserwowano w przypadku dwóch ostatnich serii doświadczalnych. W serii IV, w której zastosowano dodatek ścieków w ilości 75% objętości medium hodowlanego odnotowano koncentracje biomasy na poziomie $528,0 \pm 14,74 \text{ mg}_{\text{s.m.org.}}/\text{dm}^3$ co stanowiło jedynie 15% wartości uzyskanej w pierwszej serii badań. W serii ostatniej w której 100% objętości reaktora zastosowanego do hodowli glonów stanowił odciek, zawartość suchej masy organicznej była na poziomie $95,33 \pm 7,37 \text{ mg}_{\text{s.m.org.}}/\text{dm}^3$ (rys. 3).

Efektywność usuwania związków biogenych z układu technologicznego różniła się istotnie w zależności od serii badawczej i ilości ścieków wykorzystanych do sporządzenia medium hodowlanego. Najwyższe efektywności zużycia azotu i fosforu przez biomasę glonów odnotowano w trzech pierwszych seriach badawczych co korelowało bezpośrednio z wyższą koncentracją komórek *Platymonas subcordiformis* zaobserwowaną w serii I, II i III. W serii kontrolnej namnożona biomasa wykorzystwała dostępne w me-



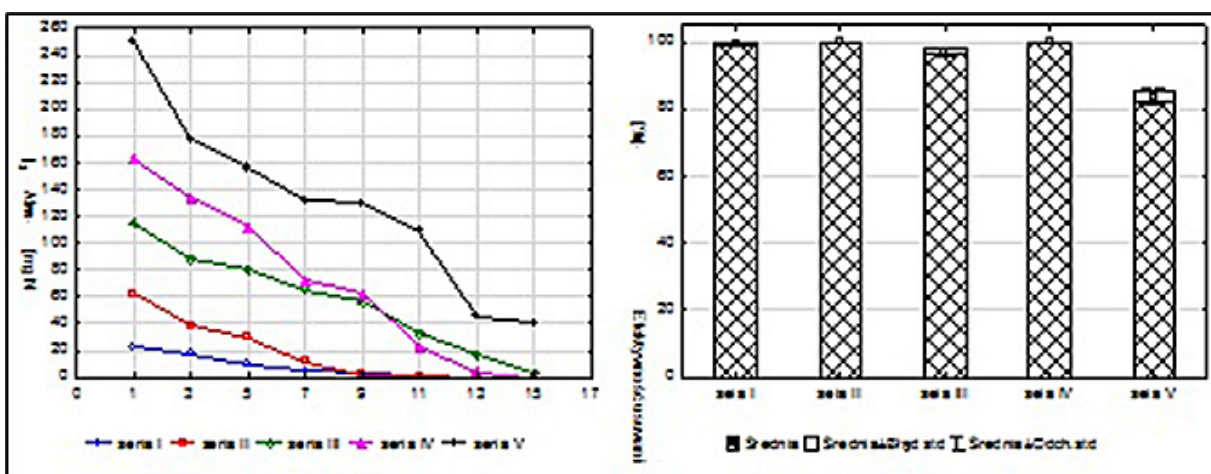
Rys. 3. Zmiany koncentracji suchej masy organicznej w medium hodowlanym w kolejnych seriach eksperymentu

Fig. 3. Changes in the concentration of dry organic matter in the culture medium in the next series of research

dium związku azotu i fosforu kolejno w 99,3% oraz 99,7% co na zakończenie procesu hodowli skutkowało stężeniem na poziomie $0,17 \pm 0,06$ mg $N_{og.}/dm^3$ oraz $0,01 \pm 0,006$ mg $P_{og.}/dm^3$. Równie wysokie efektywności na poziomie 99,9% i 97,07% azotu oraz 98,8% i 99,4% fosforu ogólnego zaobserwowano kolejno w serii II oraz w serii III. Seria IV, w której zastosowano zwiększoną dawkę ścieków na poziomie 75% objętości medium hodowlanego charakteryzowała się również wysoką efektywnością usuwania związków azotu na poziomie 99,8%, natomiast fosfor został pozyskany przez mikroorganizmy jedynie w 76,5% co przełożyło się na jego zawartość w układzie technologicznym na zakończenie procesu hodowli na poziomie $7,22 \pm 0,2$ mg $P_{og.}/dm^3$ (rys. 4,

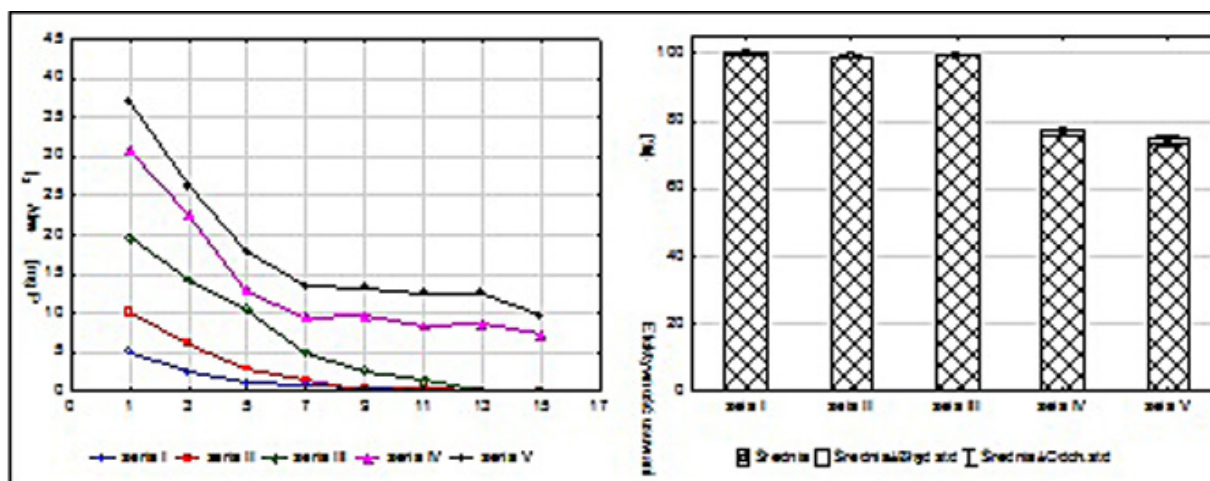
rys. 5). Kolejne zwiększenie dawki ścieków w serii V skutkowało załamaniem procesu hodowli. Uzyskane efektywności na poziomie 83,8% azotu i 74,08% fosforu świadczą o mało wydajnym usuwaniu tych związków z medium hodowlanego (rys. 4, rys. 5).

W literaturze pojawiają się coraz częściej doniesienia o możliwości zastosowania różnego rodzaju ścieków w procesach namnażania biomasy glonów. Cheah i in. w swojej pracy opisują możliwość zastosowania w procesie hodowli różnych gatunków glonów między innymi ścieki rolno-spożywczych, komunalnych czy odcieków ze składowisk odpadów. Jak wykazują badania zastosowanie w różnym stopniu tego typu mediów hodowlanych bądź ich częściowe wzboga-



Rys. 4. Efektywność usuwania azotu ogólnego przez *Platymonas subcordiformis* w zależności od etapu eksperymentu

Fig. 4. Removal efficiency of total nitrogen by *Platymonas subcordiformis* depending on the series of the experiment



Rys. 5. Efektywność usuwania fosforu ogólnego przez *Platymonas subcordiformis* w zależności od etapu eksperymentu

Fig. 5. The efficiency of removal of phosphorus by *Platymonas subcordiformis* depending on the series of the experiment

cenie w dodatek ścieków może się przyczynić do uzyskanie wysokiej koncentracji glonów (1000 – 5000 mg/dm³) jak również do zwiększenia konwersji pozyskanej biomasy do energii poprzez np. wyższą produkcję lipidów przez komórki glonów [Cheah i in. 2016].

Gao i in. prowadzili hodowlę mieszanej kultury mikroglonów *Chlorella vulgaris* oraz *Scenedesmus obliquus* przy wykorzystaniu ścieków pochodzących z akwakultury. Hodowla prowadzona była w fotobioreaktorze membranowym MPBR wyposażonym w moduł membranowy umożliwiającym zatrzymanie biomasy wewnątrz reaktora przy przepływie ścieków. Autorzy osiągnęli koncentracje biomasy na poziomie 42,6 mg/dm³·d przy jednoczesnej redukcji związków azotu na poziomie 86,1% oraz fosforu 82,7% uzyskując końcowe stężenia wymienionych biogenów kolejno na poziomie 1,30 mg/dm³ oraz 0,12 mg/dm³ [Gao i in. 2016]. Wykorzystanie mikroglonów z gatunku *Platymonas subcordiformis* w procesie oczyszczania ścieków pochodzących z akwakultury w swoich badaniach wykazali również Guo i in.. dowiedziano iż efektywność usuwania związków azotu na poziomie 87,0 -95,0% oraz fosforu na poziomie 98,0 – 99,0%. Pojawiły się także doniesienia potwierdzające możliwość namnażania glonów z rodzaju *Platymonas sp.* w warunkach, w których jako medium zastosowano mieszaninę ścieków komunalnych i ścieków przemysłowych

pochodzących z przemysłu włókienniczego [Chinnasamy 2010]. Ścieki zawierające różnego rodzaju toksyczne związki organiczne, pozostałości antybiotyków i soli nieorganicznych prowadzą do potencjalnego ryzyka dla środowiska. Literatura podaje możliwości wykorzystania mikroglonów między innymi do usuwania specyficznych zanieczyszczeń takich jak antybiotyki przy jednoczesnej produkcji biomasy i biopaliw [Guo i in. 2016].

Mimo wielu zalet jakie wynikają z wykorzystania ścieków do hodowli biomasy takich jak oczyszczanie ścieków, zmniejszenie zużycia energii, niższe koszty przygotowania pożywki, pozyskanie biomasy, która może zostać wykorzystana wielokierunkowo pojawia się nadal równie dużo problemów. Należą do nich m.in. zmiana składu ścieków co wiąże się ze zmiennymi stężeniami składników odżywczych, ustalenie szybkości przepływu ścieków, odpowiednie natężenie światła i jego dostęp do wszystkich komórek (zwłaszcza w przypadku ścieków barwnych), stężenie CO₂, konstrukcje i eksploatawanie fotobioreaktorów, dobranie odpowiedniego gatunku glonów, aspekty ekonomiczne budowy i eksploatacji układów technologicznych, zawartość związków toksycznych w ściekach, konieczność wstępnego kondycjonowania ścieków oraz ich suplementacji jak również tolerancja danego gatunku glonów w odniesieniu do stresu środowiskowego oraz warunków uprawy.

WNIOSKI

Przeprowadzone badania miały na celu określenie możliwości zastosowania ścieków po wstępnym oczyszczaniu beztlenowym w procesie namnażania biomasy mikroglonów *Platymonas subcordiformis*. Najwyższe efekty technologiczne osiągnięto dla serii II oraz III w których ilość ścieków wykorzystanych do sporządzenia medium hodowlanego była na poziomie 25% oraz 50%. Obserwowane stężenie biomasy kształtowało się na poziomie powyżej 3000 mg_{s.m.org.}/dm³ i było porównywalne z wynikami uzyskanymi w serii kontrolnej. Zwiększenie ilości ścieków wprowadzanych do układu technologicznego do 75% skutkowało istotnym pogorszeniem osiągniętych efektów technologicznych związanych ze stężeniem komórek *Platymonas subcordiformis* w układzie technologicznym. Koncentracja biomasy w tej części badań wynosiła 528,0 ± 14,74 mg_{s.m.org.}/dm³. Seria ostatnia skutkowała całkowitym załamaniem procesu namnażania biomasy.

Najwyższą efektywność wykorzystywania związków biogenych, która kształtowała się na poziomie 99,9% w przypadku azotu i 98,8% w przypadku fosforu obserwowano w serii II. W serii III stwierdzono natomiast 97,07% usuwania azotu oraz 99,4% fosforu. Kolejna seria badawcza charakteryzowała się równie wysoką efektywnością usuwania azotu na poziomie 99,8%, natomiast w przypadku fosforu było to 76,5%. Seria V, w której ilość ścieków stanowiła 100% efektywności te były najniższe i kształtowały się na poziomie 83,8% w przypadku związków azotu oraz 74,08% dla fosforu.

Podziękowania

Badania zostały zrealizowane w ramach tematu badawczego Nr WSC/2016/6 realizowanego w ramach działalności statutowej na prowadzenie badań naukowych lub prac rozwojowych oraz zadań z nimi związanych, służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich.

LITERATURA

1. Cheah W.Y., Ling T.C., Show P.L., Juan J.C., Chang J.S., Lee D.J. 2016. Cultivation in wastewaters for energy: A microalgae platform. *Applied Energy*, 179: 609–625.
2. Chinnasamy S, Bhatnagar A, Hunt R.W., Das K.C. 2010. Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. *Bioresource Technology*, 101(9): 3097–3105.
3. Day J.G., Tsavalos A.J. 1996. An investigation of the heterotrophic culture of the green alga *Tetraselmis*. *Journal of Applied Phycology*, 8: 73–77.
4. Gao F., Li C., Yang Z.H., Zeng G.M., Feng L.J., Liu J.Z., Liu M., Cai H.W. 2016. Continuous microalgae cultivation in aquaculture wastewater by amembrane photobioreactor for biomass production and nutrients removal. *Ecological Engineering* 92: 55–61.
5. Guo W.Q., Zheng H.S., Li S., Du J.S., Feng X.C., Yin R.L., Wu Q.L., Ren N.Q., Chang J.S. 2016. Removal of cephalosporin antibiotics 7-ACA from wastewater during the cultivation of lipid-accumulating microalgae. *Bioresource Technology* 221: 284–290.
6. Guo Z., Liu Y., Guo H., Yan S., Mu J. 2013. Microalgae cultivation using an aquaculture wastewater as growth medium for biomass and biofuel production. *Journal of Environmental Sciences*, 25: 85–88.
7. Khatoon H., Rahman N.A., Banerjee S., Harun N., Suleiman S.S., Zakaria N.H., Lananan F, Hamid S.H.A., Endut A. 2014. Effects of different salinities and pH on the growth and proximate composition of *Nannochloropsis* sp. and *Tetraselmis* sp. isolated from South China Sea cultured under control and natural condition. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 95: 11–18.
8. Oncel S., Vardar-Sukan F. 2009. Photo-bioproduction of hydrogen by *Chlamydomonas reinhardtii* using a semi-continuous process regime. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(18): 7592–7602.
9. Yao C.H., Ai J.N., Cao X.P., Xue S. 2013. Salinity manipulation as an effective method for enhanced starch production in the marine microalga *Tetraselmis subcordiformis*. *Bioresource Technology*, 146: 663–671.