

Slutrapport: Reduktion av näringsutsläpp från växthusodling med mikroalger, en möjlighet till vinst för både miljön och ekonomin



Anslagsgivare: SLF, FoU Trädgård; Anslagsnummer: H1156010
Anslagsmottagare: Malin Hultberg, SLU, Alnarp, Malin.Hultberg@slu.se

Sammanfattning

Hantering av använd näringslösningen från växthusodling, dräneringslösning, är problematiskt ur ett miljöperspektiv i de fall recirkulering inte är möjlig eftersom den är mycket näringsrik. I projektet har möjligheten att reducera näringsnivåerna i använd näringslösning från växthusproduktion med hjälp av mikroalger undersökts. Mikroalgen *Chlorella vulgaris* hade en god förmåga att tillväxa i dräneringslösning från växthus och en signifikant reduktion av halten kväve och fosfor uppmättes. Den biomassa som producerats innehöll dock en förhållandevis låg halt av fettsyror. Detta beror troligtvis på de höga kvävenivåerna i dräneringslösningen. Mikroalger som är möjliga att producera i dräneringslösning från trädgårdsindustrin bör kunna odlas selektivt i relativt enkla system, tåla höga näringsnivåer samt producera intressanta metaboliter. En potentiell mikroalg att inrikta framtida arbete på är *Spirulina* som främst är intressant för sitt höga proteininnehåll.

Bakgrund

I många moderna växthusföretag odlar man i dag i näringslösning s.k. hydrokultur. Näringslösningen baseras på ett vatten av god kvalitet som sedan berikas med makro- och mikronäringsämnen. Näringsämnena kommer att till högre eller mindre grad tas upp av växten. Ur miljösynpunkt är det är önskvärt att odlaren har ett slutet system dvs återcirkulerar näringslösningen efter att den kompletterats med näringsämnen (Bergstrand, 2010). Alla odlare har dock inte möjlighet att ha ett slutet system, exempelvis pga. dålig råvattenkvalitet, och även de som huvudsakligen använder ett slutet system har i sista delen av säsongen näringslösning som en avfallsprodukt.

Använd näringslösning kan näringsmässigt jämföras med ett avloppsvatten som också är mycket rikt på kväve och fosfor (Pufelski et al, 2010). Att rena avloppsvatten från dessa näringsämnen med hjälp av alger är en väletablerad teknik där man har sett goda resultat (Perry, 2010). Alger representerar en stor och varierad grupp av organismer som innehåller komplexa flercelliga organismer, makroalger, och mikroalger som består av encelliga organismer (Barsanti & Gualtieri, 2006). Möjligheten att använda inte bara makroalger utan även mikroalger för rening av avloppsvatten har man känt till sedan 50 år tillbaka (Oswald et al, 1957). Odling av mikroalger är en globalt växande industri med stor potential där fokus inte enbart ligger på reningsfunktionen. Det finns även tillämpningar inom livsmedel, foder, biovetenskap och förnybara bränslen för den biomassa (mikroalger) som producerats under reningsprocessen (Mata et al, 2010).

Möjligheten att reducera näringsinnehållet i använd näringslösning med hjälp av grönalger har undersökts i denna studie. Även metaboliterna hos den biomassa som bildats har studerats. Grönalgen *Chlorella vulgaris* producerar omättade fettsyror (Plaza et al, 2009) och grönalgen *Haematococcus pluvialis* producerar astaxanthin. Detta är ett pigment, en karotenoid, som har en kraftfullt antioxiderande effekt och kan skydda cellen från fria radikaler (Guerin et al, 2003).

Material och metod

Mikroalger: Chlorella vulgaris CCAP 211/11 och *Haematococcus pluvialis* CCAP34/7 från SAMS-CCAP (The Scottish Association for Marine Science - Culture Collection of Algae and Protozoa) har använts i försöken.

Näringslösning: Två olika dräneringslösningar från kommersiell tomatodling har använts i försöken. Näringsammansättningen hos lösning 1 var (mg/l): N-NO₃ 350.0, N-NH₄ 6.2, P 15.9, K 501.0, Mg 100.0, S 136.0, Ca 308.0, Na 66.2, Cl 98.0, Fe 2.91, Mn 0.61, B 0.55, Zn 0.56, Cu 0.14, Mo 0.13 och pH 7.5. Näringsammansättningen av näringslösning 2 var (mg/l): N 383, N-NH₄ 3.6, P 33.9, K 387, Mg 67, S 36, Ca 335, Na 22.4, Cl 13.9, Fe 2.15, Mn 0.358, B 0.330, Zn 0.500, Cu 0.169, Mo 0.083 and pH 6.3. Även en artificiell näringslösning, baserad på de analyser som presenteras i Christensen et al (2010), har inkluderats i försöken. Denna näringslösning hade följande näringsammansättning (mg/l): N-NO₃ 520.0, P 63.6, K 442.0, Mg 44.7, S 88.2, Ca 499.0, Na 99.0, Cl 9.2, Fe 4.06, Mn 1.10, B 0.12, Zn 0.75, Cu 0.12, Mo 0.10 and pH 6.4.

Odlingsuppställning: Försöken har genomförts i växthus i 20 °C och kontinuerlig luftning (0.3 vvm) för att tillåta gasutbyte och för att förhindra att cellerna sedimenterar. Tilläggsbelysning med 100 µE m⁻² s⁻¹ har skett med 16 timmars ljus och 8 timmars natt för *C. vulgaris*. *H. pluvialis* har odlats med tilläggsbelysningen 20 µE m⁻² s⁻¹ med samma fotoperiod som *C. vulgaris* under dess gröna tillväxtfas (10 dagar). Därefter har skuggningen tagits bort och belysningen ökats till 100 µE m⁻² s⁻¹.

Experimentuppställning: Näringslösningen har filtrerats (10 µm) respektive lämnats obehandlad. Vid försöksstarten har *C. vulgaris* ympats in i en koncentration av 10⁵ celler per ml och jämförts med en oympad kontrollbehandling. I försöken har också tillväxten i standard medium för algodling, Z8 (NIVA, 1976), följts. Försöken har avslutats efter 9 dagars tillväxt. Varje behandling har omfatta fyra replikat och upprepats över tid.

Produktion av biomassa samt reduktion av näringsnivåer: Biomassan har bestämts som torrsvikt efter frystorkning. Även cellräkning i hemocytometer har genomförts i sterilfiltrerad dräneringslösning. Även förändringar av pH över tid följdes i detta försök. För näringsanalys har algbiomassan separerats med filtrering genom ett GF/C filter (Whatman 1822). Näringskoncentrationen i näringslösningen har därefter bestämts enligt ISO 11885:2009 "Water quality. Determination of selected elements by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES)". Denna analys har gjorts på det kommersiella laboratoriet LMI, Helsingborg.

Analys av metaboliter: För analys av fettsyror har fettsyrorna extraherats från den frystorkade biomassan och sedan analyserats på gaskromatograf enligt Thomæus et al (2001). Sammanfattningsvis har extraktionen skett med metanol med en tillsats av 2.5% svavelsyra och 94 °C under 1 timme. Därefter har fettsyrorna extraherats över i en hexanfas. Fettsyran 17:0 har

använts som internstandard och en total algbiomassa om 5 mg har använts för analysen. För extraktion av pigment från *Haematococcus pluvialis* har den frystorkade biomassan extraheras med aceton och total mängd karotenoider bestämts med spektrofotometer enligt Lichtenthaler & Welburn (1983). Proverna förbreddes genom att cellerna centrifugerades ner (3000 g under 15 min) och pelleten frystes för att fördärva cellstrukturen. Därefter blandades pelleten med 1,3 ml aceton (80 %). Efter att aceton tillsatts hanterades proverna så långt det var möjligt i mörker. Proverna inkuberades över natt (12 h) i mörker och noll grader (isbad). Därefter behandlades proverna i ett (ultrasonic) bad i 90 s och centrifugerades sedan i 5 min på 10 000 rpm. Analysen gjordes sedan på supernatanten.

Statistisk analys: Resultaten för biomassan och metabolitproduktion har analyserat med Anova följt av Tukey's test. För analys av näringsreduktionen har parat t-test använts. Signifikans är angiven vid $P \leq 0.05$ och Minitab version 16.0 har använts för analysen.

Resultat

Mikroalger: De båda mikroalgerna skilde sig åt i förmåga att etablera sig i näringslösning. *Chlorella vulgaris* visade god förmåga att tillväxa medan *Haematococcus pluvialis* endast kunde etablera sig i steril näringslösning. Även i den sterila näringslösningen var tillväxten låg och ingen signifikant reduktion av näringsnivåer kunde mätas. Resultat- och diskussionsdelen kommer därför att fokusera på *C. vulgaris*.

Tillväxt av Chlorella vulgaris i dräneringslösning: Tillväxten hos *C. vulgaris* i näringslösning respektive i Z8 (algodlingsmedium) jämfördes i sterilfiltrerad näringslösning genom cellräkning i mikroskop. Generellt var cellstorleken större hos de celler som odlats i Z8 jämfört med de celler som odlats i dräneringslösning. Den exponentiella tillväxten startade senare i dräneringslösningen men efter 4 dagar sågs en likartad utveckling där stationär fas uppnåddes efter ca 7 dagars tillväxt med en ungefärlig celltäthet på log 7.0 celler per ml i båda odlingsmedierna (Fig. 1). Mätningar av pH visade en kraftig stigning av pH i Z8 där pH i samtliga replikat låg mellan 10.0 till 11.0 när försöket avslutades. I dräneringslösningen var pH stigningen långsammare och samtliga replikat låg mellan 8.5 till 9.5 när försöket avslutades. Tillväxten hos *C. vulgaris* i de båda dräneringslösningarna skilde sig mycket lite åt. De resultat som presenteras i tabell 1 kommer från försök gjorda i lösning 1.

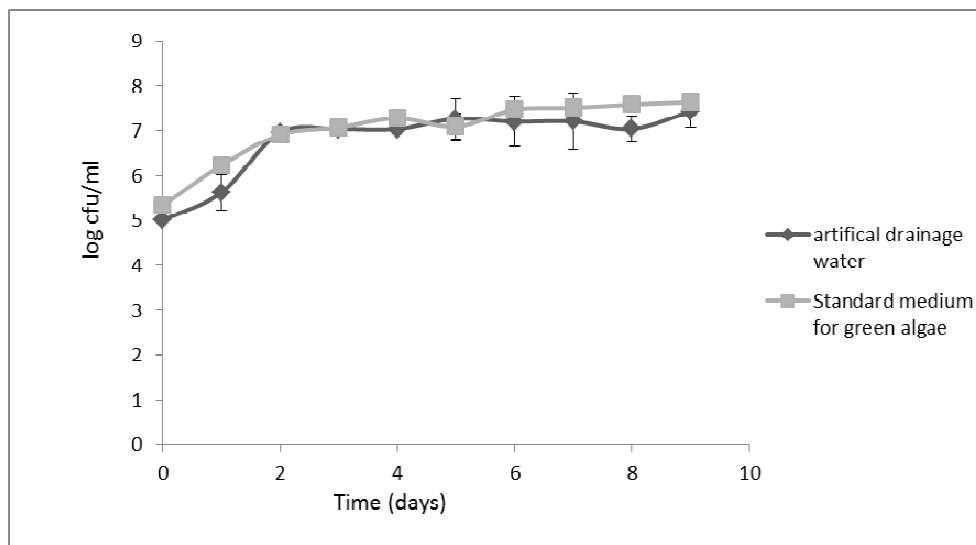


Fig. 1. Tillväxtkurva för *Chlorella vulgaris* då den odlas i standard medium för grönalger samt i dräneringslösning från växthus.

Produktion av biomassa och lipid: Den biomassa som producerats under nio dagars tillväxt presenteras i tabell 1. Det fanns inga signifikanta skillnader mellan mängd biomassa producerad i dräneringslösning respektive mängd biomassa producerad i Z8. Däremot var biomassan signifikant högre i den behandling som inte filtrerats men inokulerats med *C. vulgaris* jämfört med ofiltrerad dräneringslösning som inte inokulerats med *C. vulgaris*. Mängden fettsyror var signifikant högre i biomassa som producerat i Z8 jämfört med den biomassa som producerats i dräneringslösning. Inga signifikanta skillnader fanns inom de olika behandlingarna i dräneringslösning med avseende på fetthalt.

Tabell 1. Biomassa, mg (torrvikt) per liter, samt den procentuella andelen fett i biomassan av mikroalger som odlats i dräneringslösning från tomatodling samt i standardmedium för odling av grönalg.

Filtrering	Odlingsmedium	<i>C. vulgaris</i>	Biomassa (mg/l)	Fetthalt (%)
+	Dräneringslösning	+	250.1±51.0ab**	2.9a
+	Dräneringslösning	-	288.6±37.6ab	3.1a
-	Dräneringslösning	+	321.1±17.3a	4.3.a
-	Dräneringslösning	-	222.6±25.1b	3.2.a
-	Z8*	+	269.0±68.9ab	10.1b

*Sterilt medium

**Värden inom en kolumn som följs av olika bokstäver är signifikant skiljt åt (P=0.05).

I algbiomassan som odlats i dräneringslösning var koncentrationen av lipid ca 3-4% av total torrvikt. Detta kan jämföras med en total mängd på 10% av total torrvikt för den biomassa som odlats i standardmedium. Också

fettsyraprofilen påverkades av det medium som algen odlats i vilket kan ses i tabell 2. Andelen av de fleromättade fettsyrorerna linolensyra (18:3) och hexadecatrienoic syra (16:3) i algbiomassan odlad i dräneringslösning var cirka 18% av den totala mängden fettsyror. Detta var signifikant lägre jämfört med den andel av dessa fettsyror i algbiomassan odlad i standardmedium, vilket var cirka 46% av den totala mängden.

Tabell 2. Fördelning av huvudsakliga fettsyror i *Chlorella vulgaris* odlad i standard medium för grönalg samt i en filtrerad (10 µm) dräneringslösning från kommersiell växthusproduktion. Resultaten för de enskilda fettsyrorna uttrycks som procent i förhållande till total mängd fettsyror.

Fettsyra	Standardmedium	Dräneringslösning
14:0	0.2±0.1	0.7±0.1
16:0	19.9±2.0	32.6±1.9
16:1	1.7±0.2	4.6±0.3
16:2	1.4±0.3	1.1±0.1
16:3	12.1±3.0	1.2±0.2
18:0	0.9±0.4	0.8±0.0
18:1	18.9±8.1	24.9±1.2
18:2	10.5±1.1	8.7±0.4
18:3	34.1±7.1	16.8±2.0

Reduktion av näringsnivåer: Nivåerna av fosfor och kväve reducerades signifikant genom alg-tillväxten. Kvävereduktionen låg mellan 35-75 mg/L efter nio dagars tillväxt. Dock är dräneringsvattnet från växthus mycket näringsrikt och den procentuella reduktionen av kväve var mellan 15-30% oavsett behandling. Däremot uppmättes en mycket hög procentuell reduktion, mellan 70-100% jämfört med ursprungskoncentrationen, av fosfor. Den behandling där reduktion av kväve och fosfor var högst var den behandling där mest biomassa bildats dvs dräneringslösning som inte filtrerats och där *C. vulgaris* ympats in. Även för magnesium, kalcium, järn, mangan och zink sågs en signifikant minskning av koncentrationen efter algodlingen. I tabell 2 visas reduktion av samtliga näringsämnen i dräneringslösningen.

Tabell 2. Koncentrationen (mg/l) av samtliga makro- och mikronäringsämnen i dräneringslösning före behandling, efter algodling samt den procentuella reduktionen.

Näringsämne	Startvärde (mg/l)	Slutvärde (mg/l)	Reduktion (%)
N-NO ₃ *	350.0	291.7±7.5	16.7
N-NH ₄	6.2	7.4±0.5	-19.4**
P*	15.9	0.5±0.1	96.9
K	501.0	460.9±43.3	8.0
Mg*	100.0	90.9±1.9	9.1
S	136.0	127.0±15.5	6.6
Ca*	308.0	212.0±7.5	31.2
Na	66.2	62.8±9.9	5.1
Cl	98.0	89.5±12.9	8.7
Fe*	2.91	0.006±0.001	99.8
Mn*	0.61	0.02±0.002	96.7
B	0.55	0.53±0.02	3.0
Zn*	0.56	0.28±0.02	49.6
Cu*	0.14	0.10±0.01	28.6
Mo	0,13	0.11±0.02	15.3

*Signifikant effekt på näringsämnets koncentration av behandlingen (P=0.05).

**Negativt värde indikerar en ökning i förhållande till ursprungskoncentration beroende på kväveminalisering.

Diskussion

Mikroalgen *Haemotococcus pluvialis* blev utkonkurrerad av den naturligt förekommande mikroalgspopulationen och endast kunde etablera sig, och då i låga nivåer, i steril näringslösning. Troligtvis var saltsammansättningen i näringslösningen ofördelaktig för dess tillväxt. Däremot visade det sig att dräneringslösning från växthusodling har en god förmåga att stödja tillväxt av mikroalgen *C. vulgaris*. I jämförelse med ett standardmedium för algodling kom algerna senare in i den logaritmiska tillväxtfasen men efter nio dagars tillväxt uppnåddes samma biomassa i de båda odlingsmedierna. En trolig förklaring till den senare tillväxtstarten är att mikroalgerna kontinuerligt odlades i standardmediet och därför var anpassade till detta medium. Om mikroalgerna upprepade gånger ympats in dräneringslösningen skulle troligtvis den exponentiella tillväxtfasen starta tidigare.

I detta projekt testades filtrering med en porstorlek på 10 µm och syftet var att reducera större heterotrofa organismer som konsumerar de mindre autotrofa mikroalgerna. Den högsta biomassan uppnåddes i ofiltrerad dräneringslösning som inokulerats med *C. vulgaris*. Biomassan i ofiltrerad näringslösning som inte inokulerats med *C. vulgaris* utan där den naturliga

mikroalgspopulationen fått växa till var signifikant sänkt jämfört med den behandling som nämns ovan. Resultaten var inte helt tydliga men tyder på att filtrering kan ha en effekt när den naturliga mikroalgspopulationen ska tillväxa. Den är däremot inte nödvändig om en så pass snabbväxande alg som *C. vulgaris* ympas in.

En signifikant sänkning av kväve och fosfor i dräneringslösningen uppmättes i dräneringslösningen när att algerna nått den stationära fasen efter nio dagars tillväxt. Den faktiska reduktionen ligger väl i linje med de resultat som rapporterats från likande försök med avloppsvatten (Shi et al, 2007; Li et al, 2011; Zhou et al, 2012). Jämfört med avloppsvatten innehåller dock dräneringslösning så pass höga koncentrationer av kväve att vidare behandling behövs innan algbehandlad dräneringslösningen kan släppas ut i omgivningen. Endast en sänkning av nitratkväve sågs medan däremot en mindre, icke-signifikant, ökning av ammoniumkväve uppmättes. Syrekoncentrationen i ett algodlingsmedium är hög eftersom syrgas produceras under algernas fotosyntes. Detta innebär att ingen denitrifieringsprocess kan förväntas ske (Larsdotter, 2006). Den reduktion av kväve som skett beror alltså i första hand på assimilering av kväve hos algerna.

En mycket hög reduktion av fosforkoncentrationen uppmättes. Detta beror inte på att mikroalgerna tar upp extremt mycket fosfor i förhållande till kväve även om de har kapacitet att stimuleras till ökat fosforupptag (Fogg, 1975). I mångt och mycket beter sig mikroalgen som en växt i näringsavseende dvs. de tar upp en viss proportion kväve och en mindre proportion fosfor (Grobbelaar, 2004). Den stora reduktionen av fosfor beror i stället främst på att pH i dräneringslösningen påverkats då mikroalgen tillväxt eftersom koldioxid löst i vatten konsumerats. Konsumtion av koldioxid leder till att pH stiger och i den basiska miljön som bildas reagerar fosfat gärna med andra joner, som exempelvis kalcium, och fälls ut som ett fast salt (Song et al, 2002). Detta stöds av de resultat som visas i tabell 2 dvs att en signifikant sänkning även ses av flertalet av de joner som bildar ett svårlösning salt med fosfatjonen. Eftersom fosfor är en ändlig resurs som det kommer att bli allt viktigare att återvinna kan detta vara ett intressant resultat att fortsätta med. Att reduktionen av fosfor är så pass hög i förhållande till kväve kan dock påverka den fortsatta kvävereningen.

Den totala mängden fettsyror i algbiomassan var signifikant högre i standardmedium för algodling jämfört med biomassa producerad i dräneringslösningen (tabell 1). Fetthalten i mikroalger påverkas av odlingsmiljön med näringskoncentrationer som en viktig faktor (Guschina & Harwood, 2006). Det sker mycket forskning kring möjligheten att inducera fettproduktion hos mikroalger, bl.a. för att kunna producera biodiesel från biomassan. För *C. vulgaris* finns det visat att kvävebrist i odlingsmediet ökar fettproduktionen (Sharma et al, 2012). Möjligen kan de höga näringsnivåerna i dräneringslösningen vara en förklaring till det signifikant sänkta fettinnehållet.

Sammanfattningsvis visar denna studie att mikroalgen *Chlorella vulgaris* tillväxer väl i dräneringslösning från växthus och att det sker en stor reduktion av de viktiga näringsämnena kväve och fosfor. Det är uppenbart att mikroalger har potential att användas mer i den gröna näringen för att skapa kretslopp och hållbara lösningar. För trädgårdsindustrin är mikroalger som är möjliga att odla selektivt i relativt enkla system, tål höga näringsnivåer samt producerar värdefulla metaboliter intressanta. En potentiell mikroalg att inrikta framtida arbete när det gäller ett så pass näringsrikt odlingsmedium som dräneringslösning är Spirulina. Detta är en ätbar mikroalg med mycket hög proteinhalt som är lättskördad och kan odlas i förhållandevis enkla algodlingssystem (Vonshak, 1997). Odling av Spirulina kan vara en möjlighet att tillgodose behovet av högkvalitativt protein till foder på ett ekologiskt och ekonomiskt hållbart sätt samtidigt som övergödningen minskas.

Spridning av resultaten i projektet

En vetenskaplig artikel med delar av detta projekt har publicerats i tidskriften "Bioresource Technology" under hösten 2012.

- Hultberg M, Carlsson A, Gustafsson S. 2013. Treatment of drainage solution from hydroponic greenhouse production with microalgae. *Bioresource Technology* 136: 401-406.

Även ett faktablad, som innehåller vissa delar av detta projekt, har publicerats i LTJ-fakultetens serie under 2013.

- Hultberg M, Carlsson AS, Gustafsson S (2013) Mikroalger i växthuset – ett redskap för minskat näringsläckage. *LTJ-Fakultetens Faktablad* 6.

En populärvetenskaplig presentation av projektet har publicerats i tidskriften *Viola*, trädgårdsindustrins branschtidning.

- Hultberg M, Gustafsson S (2013) Mikroalger i växthus. *Viola* 8: 10-11

Tre examensarbeten har genomförts och publicerats under detta projekt.

Dessa examensarbeten finns tillgängliga via <http://stud.epsilon.slu.se>.

- Embla Ardal (2012) Odling av mikroalger inom trädgårdsnäringen. Kandidatarbete 15 hp, SLU Alnarp.
- Stina Månsson (2012) Cultivation of *Chlorella vulgaris* in nutrient solution from greenhouse tomato production. Mastersarbete 30 hp, SLU Alnarp.
- Anna Persson (2012) Effekt av LED-ljus på tillväxt och pigmentproduktion hos mikroalgen *Haematococcus pluvialis*. Kandidatarbete 15 hp, SLU Alnarp.

Litteratur

- Barsanti L, Gualtieri P (2006) *Algae, Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*. Taylor & Francis Group LCC.
- Bergstrand KJ (2010) Approaches for mitigating the environmental impact of greenhouse horticulture. Dissertation, Acta Universitatis Agriculturae Sueciae 93.
- Christensen I, Hansson T, Svensson SE (2010) Gödsling i slutet odlingsystem i växthus – underlag till utbildningsmodul. Rapportserie Landskap Trädgård Jordbruk 15
- Fogg GE (1975) *Algal cultures and phytoplankton ecology*. 2nd ed, The University of Wisconsin Press.
- Grobbelaar JU (2004) Algal Nutrition, mineral nutrition. In *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology*, ed. Richmond A. Blackwell Publishing. pp. 97-115.
- Guerin M, Huntley ME, Olaizola M (2003) Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends Biotechnol* 21: 210-216.
- Gushina LA, Harwood JL (2006) Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Prog. Lipid Res.* 45, 160-185.
- Larsdotter K, 2006. Wastewater treatment with microalgae – a literature review. *Vatten* 62, 31-38.
- Li Y, Chen YF, Chen P, Min M, Zhou W, Martinez B, Zho J, Ruan R (2011) Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 102, 5138-5144.
- Lichtenthaler HK, Wellburn AR (1983) Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions* 11, 591 - 592.
- Mata TM, Martins AA, Caetano NS (2010) Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew Sustain Energy Rev* 14: 217-232.
- NIVA (1976) Estimation of algal growth potential. Norwegian Inst. For Water Research, Publ D2-25.
- Perry A (2010) Algae, a mean green cleaning machine. *Agricultural Research*, may-june, pp. 20-21.
- Plaza M, Herrero M, Cifuentes A, Ibanez E (2009) Innovative natural functional ingredients from microalgae. *J Agric Food Chem* 57: 7159-7170.
- Pufelski N, Aravinthan V, Yusaf T (2010) How effective is microalgae treatment of nursery wastewater for nutrient removal. Southern Region Engineering Conference, 11-12 Nov, Toowoomba, Australia. SREC2010-T1-4.
- Oswald WJ, Gootas HB, Golueke CG, Kellen WR (1957) Algae in waste treatment. *Sewage Ind Waste* 29: 437-455.
- Sharma KK, Schuhmann H, Schenk PM (2012) High lipid induction in microalgae for biodiesel production. *Energies* 5: 1532-1553.
- Song Y, Hahn HH, Hoffmann E (2002) Effects of solution conditions on the precipitation of phosphate for recovery, a thermodynamic evaluation. *Chemosphere* 48: 1029-1035.
- Shi J, Podola, B, Melkonian M (2007) Removal of nitrogen and phosphorus from wastewater using microalgae immobilized on twin layer: an experimental study. *J. Appl. Phycol.* 19, 417-423.
- Thomæus S, Carlsson AS, Stymne S (2001) Distribution of fatty acids in polar and neutral lipids during seed development in *Arabidopsis thaliana* genetically engineered to produce acetylenic, epoxy and hydroxyl fatty acids. *Plant Science* 161: 997-1003
- Vonshak A (1997) *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell biology and Biotechnology*, ed. Vonshak A. London, Taylor and Francis.
- Zhou W, Li Y, Min M, Hu B, Zhang H, Ma X, Li L, Cheng Y, Chen P, Ruan R (2012) Growing wastewater-born microalgae *Auxenochlorella protothecoides* UMN280 on concentrated municipal wastewater for simultaneous nutrient removal and energy feedstock production. *Appl. Energy* 98: 433-440.