

Name of Candidate : Tariel El-Sayed Mohamed Badawy                      Degree : Doctor of Philosophy  
Title of Thesis : PHYSIOLOGICAL STUDIES ON SOME GREEN ALGAE  
Supervisors: Prof.Dr. Eglal Mohamed Zaki Harb ---- Prof.Dr .Mohamed Khalil Khalil El-Doadoa  
Prof.Dr. Nabil Fahmy Abd El-hakim  
Department : Agric. Botany                      Branch : Plant Physiology                      Approval :

## ABSTRACT

### Results obtained could be Summarized as follows :

Growth response of Chlorella sorokiniana and scenedesmus dimorphus to Physiological factors :

1-The results show clearly that the growth parameters of Chlorella at 22°C was more intense than other temperature degrees , which recorded maximum production during the period of 6 days of culture age , while growth of Scenedesmus at 17°C which recorded the best results were increasing until the end of incubation periods . The relative high temperature at 32°C led to a depression in growth of Chlorella sorokiniana and Scenedesmus dimorphus.

2- The results showed that growth parameters of Chlorella and Scenedesmus at 12000 Lux was reached highest represented as total cell count , yield and accumulation of pigments which compared with the other treatments, which recorded maximum production during the period 4 – 6 days of experimental periods , also the growth parameters of Scenedesmus at 5000 Lux were increasing until 6 days followed by drop in Chlorophyll accumulation .

3-The results showed that growth parameters of Chlorella at Continuous light treatment (24L\0D Light-dark cycle) was increasing yield , which recorded maximum production at 4 days of incubation periods compared with the other treatments, as well as there was Scenedesmus at the same treatment ,which recorded maximum production during the period of 4 days of culture age , it is also obvious that these growth parameters recorded their highest at 10 L\ 14 D treatment at the end of incubation periods ( 8 days ) represented as total cell count , weight gain and pigments content , this phenomenon could be explained highly at 12L\ 12D of 4 days , while that was accumulation of pigments increased intensified at 6 days .

4- The results showed that growth parameters of Chlorella at treatment two T<sub>2</sub> : B.B.M medium supplemented with BA at a concentration of 0.25 mg/L medium was increasing yield expressed as total cell count during the period 6 days of incubation periods compared with other treatments , also obvious that pigments accumulated recorded their highest values at the end of incubation periods (8 days), while the growth parameters of examined algae was more intensive at treatment one T<sub>1</sub> : B.B.M medium supplemented with BA at a concentration of 0.5 mg/L which recorded maximum production during the period of 4 days .

5- The results showed that growth parameters of Chlorella at four Lines was more highest represented as cell numbers , yield gain and Chlorophyll content compared with the other treatments, which recorded maximum production during the period of 6 days of incubation periods , but revealed drop in Carotenoids content , while growth Scenedesmus recorded maximum production at control treatment (one lines) of 6 days of culture age represented as total cell count, but also the yield and pigments accumulation which recorded highest values until the end of incubation periods ( 8 days ).

### Key words :-

Green algae – Physiological factors – Enviroment-  
Chlorella – Scenedesmus- Heavy metals .

\*The results showed that mass production of examined algae in outdoor conditions which recorded maximum production of 4 days of outdoor cultivation .The Crude protein content of Chlorella sorokiniana was 46.7 % ,The Crude fat content was 14.8 %, Total Carbohydrate content was 11.6 % , Ash was 17.5 % , Crude Fiber 9.30 %, Nucleic acid content ( RNA 2.63 % and DNA 1.72 % ),and Vitamins group antioxidant B6 ,B12 ,E ,C ,B-carotene (  $\mu\text{g/g}$  ) were found to be 0.05, 0.08, 2.20, 16.0 and 0.01 . While the Chemical composition of Scenedesmus dimorphus were found 52.3 %,12.20 %,10.06%, 14.92%, 8.83%,( 3.16 and 1.43), 0.27 ,0.78 ,0.01 ,21.8 and 238.5 respectively .

\* *Scenedesmus sp.* and *Chlorella sp.* were compared for their use in the removal and toxicity bioassays of Cu and Fe. A decrease in toxicity with regard to growth and uptake of  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  was immobilized cells had higher uptake rates of Cu and Fe suggesting that immobilization offers protection against metal toxicity. greater efficiency for metal removal . This reduction in removal efficiency was, however, more pronounced for Fe and Cu with harvesting and potential for repeated use makes the immobilized cells good tools for scavenging heavy metals from metal-contaminated environments. Results of heavy metals concentration in tissue muscle revealed that differences among the treatments control treatment, inoculated with *Chlorella* treatment and inoculated with *Scenedesmus* treatment which recorded at 12 days represented as Fe, Zn, Cu and Pb. 7.32, 13.52, 2.61 and 1.06 & 4.21, 9.64, 1.07 and 0.50 & 3.82, 8.74, 0.94 and 0.96  $\mu\text{g/g}$  respectively .The results showed that the drainage water treated with examined algae creates a more appropriate environment for fishes condition factor is essentially a measure of relative muscle to bone growth because the aquatic environment with its water quality is considered the main factor controlling fish health and the use of water source of a good quality is the key for successful fish production. So, the primary goal of this study was to determine agriculture drainage could be suitable for fish culture used for safe human consumption.

\* This study clarify the beneficial role which the phytoplankton performs in such circumstances, where it uptakes the nitrogenous compounds, thus maintaining healthy conditions to the fish and other organisms. This phytoplankton function is helpful in resisting pollutants in water, The results show clearly that the agriculture drainage water and sewage waste water were appropriate for fish production because it is reached with inorganic nutrient but this fish are not safe for human consumption especially which heavy metals analysis revealed that highest concentration did not comply with the standards levels recommended by WHO and USEPA , must be avoided used sewage wastewater in fish culture ponds potential adverse health effects while were potential used agriculture drainage water is sufficiently treated before used by examined microalgae as mentioned in this research . Moreover ,the treated of drainage water with microalgae was the best for treatment , where it gave better water quality and fish safety adverse health human effects .

Eglael Hark

لقد اتجهت الانظار عالمياً الى دراسة الطحالب وهي النباتات المائية الثالثية حيث لها أهمية كبيرة في عديد من المجالات ، والدور الهام الذي تلعبه هذه الكائنات في التخلص من العناصر السامة المتواجدة في البيئة المائية، ولذلك كان الهدف من هذه الدراسة اعادة استخدام المياه المنصرفة بعد معالجتها بيولوجيا عن طريق انتاج وتكثيف بعض الطحالب الخضراء وحيدة الخلية وقد اشتملت الدراسة على المراحل التالية:-

**المرحلة الأولى:-** دراسة تأثير بعض الظروف البيئية الفسيولوجية على النمو الفسيولوجي للطحالب الخضراء وحيدة الخلية كلوريلا سوروكونياتا ، سندزمس ديمورفين، وكانت أهم نتائج التجارب التي تمت في هذه المرحلة تتمثل على النقاط التالية :-

١- تم استخدام اربعة معاملات من درجات الحرارة هي ١٧، ٢٢، ٣٢، ٥٠°C ومعاملة الكنترول ، لكل معاملة ثلاثة مكرارات وقد اوضحت النتائج استجابة طلب الكلوريلا لدرجة حرارة ٢٢°C حيث سجلت أعلى قيم لها في اليوم السادس من فترة التجارب بينما ططلب السندزمس اظهر نمواً متميزاً عند درجة حرارة ٣٢°C حيث سجلت النتائج تزايداً ملحوظاً حتى نهاية فترة التجارب ، وقد ثبتت من التجربة ان درجة حرارة ٣٢°C هي صاحبة اسوء ظروف نمو وقد ادت الى انخفاض حاد (تبطيط) في نمو خلايا طحلب الكلوريلا والسدزمس.

٢- تم استخدام اربعة معاملات مختلفة هي ٣٥٠٠، ٥٥٠٠، ٧٥٠٠، ١٢٠٠٠ لاكس ومعاملة الكنترول ، وكل معاملة ثلاثة مكرارات ، وقد اوضحت النتائج ان النمو للطحالب ممثلاً في عدد الخلايا ، الوزن، محتوى الصبغات كان مميزاً الى حد كبير عند شدة الإضاءة (الاشعاع الضوئي) ١٢٠٠٠ لاكس وخاصة في فترة التجارب من اليوم الرابع الى اليوم السادس حيث سجلت أعلى قيم لقياسات النمو ، وكذلك قد اظهرت معاملة الكنترول ٥٠٠٠ لاكس تأثيراً واضحاً على النمو وخاصة ططلب السندزمس حيث كانت القياسات تتزايد بمرور فترة التجارب ابداً صبغات الكلوروفيل تناقصت بعد اليوم السادس من التجارب.

٣- تم استخدام اربعة معاملات مختلفة هي ١٤، ١٦، ١٨، ٢٤ ساعة اضاءة ظلام ، ١٤، ١٦، ١٨، ٢٤ ساعة اضاءة مستمرة ومعاملة الكنترول وكل معاملة ثلاثة مكرارات ، وقد سجلت النتائج أعلى انتاج للطحالب في المعاملة الرابعة (اضاءة متصلة ) حيث سجلت نتائج نمو الطحالب أعلى قيم لها عند اليوم الرابع مماثلة في عدد الخلايا ، الوزن الربط والجاف ، محتوى الصبغات حيث كان النمو متميزاً عند هذا اليوم من فترة التجارب وكذلك اظهرت النتائج ايضاً في المعاملة الأولى (١٤، ١٦، ١٨، ٢٤) تزايداً ملحوظاً يستمر حتى نهاية فترة التجارب، وقد اتضحت من النتائج انه كلما زادت ساعات الاضاءة كلما زاد التمثيل الحيوي والتراكمي للصفات الخضراء (الكلوروفيلات) حيث سجلت المعاملة الثالثة فيما عالية عند اليوم الرابع وكذلك اظهرت المعاملة الثانية (١٤، ١٦، ١٨، ٢٤) زيادة واضحة عند اليوم السادس خاصة في نمو ططلب السندزمس بينما كان التمثيل الحيوي والتراكمي للأكاروتينات عند اليوم الثامن من التجارب في المعاملة الأولى لطلب الكلوريلا وفي معاملة الكنترول للسندزمس.

٤- تم استخدام اربعة معاملات ( تركيزات) مختلفة ،المعاملة الأولى اضافة ٥،٠ ملجم من مادة بنزيل ادينين / لتر بيئة غذائية ، المعاملة الثانية وفيها يضاف ٢٥،٠ ملجم من مادة بنزيل ادينين / لتر بيئة غذائية، المعاملة الثالثة وفيها يضاف ٥،٥ ملجم من مادة كينيتين / لتر بيئة غذائية، والمعاملة الرابعة وفيها يضاف ٢٥،٠ ملجم من مادة كينيتين / لتر بيئة غذائية ، معاملة الكنترول وكل معاملة ثلاثة مكرارات ، وقد سجلت النتائج أعلى قيمة لنمو ططلب الكلوريلا مماثلة في عدد خلايا الططلب تحت ظروف المعاملة الثانية عند اليوم السادس من التجارب بينما كان النمو اكثراً تميزة عند اليوم الرابع للمعاملة الأولى ، وبصفة عامة قد اوضحت النتائج استجابة خلايا ططلب الكلوريلا للمعاملة الثالثة ( تركيز ٢٥،٠ ملجم من مادة بنزيل ادينين / لتر بيئة) حيث سجلت أعلى قيم للنمو مماثلة في عدد الخلايا ، الوزن، الكلوروفيلات بينما اوضحت النتائج ان الكاروتينات سجلت أعلى قيمة لها في معاملة الكنترول عند نهاية فترة التجارب اما ططلب السندزمس فقد ابدى استجابته للمعاملة الثالثة والرابعة حيث كانت اعداد الخلايا تزيد بمرور وقت التجارب حتى اليوم الثامن وكذلك اظهرت تميزة عند المعاملة الأولى (٥،٠ ملجم من مادة بنزيل ادينين / لتر بيئة غذائية) في اليوم الرابع من التجارب .

٥- تم استخدام ثلاثة معاملات مختلفة هي استخدام خط تهوية ، خط تهوية ، خط تهوية ومعاملة الكنترول ، وكان لكل معاملة ثلاثة مكرارات، وقد اتضحت من النتائج ان أعلى معدلات النمو بالنسبة لطلب الكلوريلا كانت عند تيار الهواء العالى في المعاملة الثالثة ( خط ) حيث كانت تتزايد قياسات النمو مماثلة في عدد الخلايا والوزن وصفات الكلوروفيل بمرور وقت التجارب وسجلت أعلى قيم لها عند اليوم السادس من التجارب، ولكن انخفضت قيمة الكاروتينات عند هذه المعاملة وسجلت أعلى قيمة لها في معاملة الكنترول بينما اوضحت النتائج ان نمو ططلب السندزمس مماثل في عدد الخلايا قفط يزيد حتى اليوم السادس من التجارب في المعاملة الثالثة واوضحت النتائج ان أعلى قيم سجلت بالنسبة للوزن ومحتوها من الصبغات كانت في معاملة الكنترول حيث تتزايد بمرور فترة التجارب الى اليوم الثامن للتجربة .

الكلمات الدالة :-

الطحالب الخضراء - فسيولوجيا النمو - البيئية -  
كلوريلا - سندزمس - العناصر السامة .

**المرحلة الثانية:- الاسترداد المكثف خارج المعمل لطحلبي كلوريلا سورينيتياتا وستنزم من ديمور فس تحت الظروف البيئية المصرية**

- ان تغذية هذه الطحالب على بعض المواد التي تعتبر ملوثات بيئية هدفا من الاهداف الكبرى في هذا البحث حيث تعتبر هذه المركبات بيئية غنية لنمو الطحالب ممثل ذلك في انها مصدر عالي للكربون والعناصر المعدنية مما يؤثر ذلك على التوازن البيئي وكذلك على تنقية المياه من العناصر السامة التي قد تراكم في نسجة الاحياء المائية . وفيما يلى اهم نتائج هذه المرحلة المتحصل عليها:-

١- ثبتت النتائج أن بيضة الاستراغال الخارجي (OI) التي يضاف إليها مادة البنزيل ادين بمعدل ٢٥ جم/١٠٠ لتر من مياه الحفظ هو أفضل وسط غذائي للانتاج المكافئ لطحالي الكلوريللاوستندر مس (السلالات المستخدمة في الدرامة) خارج المعمل في الاستراغ المفتوح للحصول على أعلى نمو في فترة زمنية قصيرة حيث حصلنا على أعلى كثافة طحلبية لهذه السلالات في نهاية اليوم الثالث (بداية اليوم الرابع) وكان ذلك بعد مرور ٢٣ ساعة من بداية التحضير، وكان الاستراغ في تكاثف فيبر جلاس سعة ١٥٠٠ لتر واستخدم حجم الترقيق (١متر مكعب من المياه).

٢- اوضحت النتائج ان النسبة المئوية لمحتوى البروتين فى طلحي الكلوريللا والستندرز مس كانت ٤٦,٧ & ٥٢,٣ % على التوالى، محتوى الدهون كانت ١٤,٨ & ١٢,٢ % على التوالى ، محتوى الكربوهيدرات ١١,٦ & ١٠,٦ % على التوالى وبذلك قان اعلى نسبة بروتين متحصل عليها كانت فى سلالة الستندرز من.

٣- دلت النتائج ايضاً احتواء سلالة طحلب السندرمس ديمورفون على نسبة مؤية عالية من مجموعة الفيتامينات المضادة للأكسدة بالمقارنة بطلح كلوريللا سوروكينيالا حيث سجلت النتائج ان كمية فيتامين ب٦، ب١٢، ج (حمض الاسكوربيك) ، فيتا كاروتين (بادىء فيتامين أ) في سلالة السندرمس هي ٢٧، ٠٠، ٧٨، ٠٠، ٨١، ٠٠، ٢١، ٠٠، ٥٢٨، ٠٥ (ميکروجرام / جم وزن جاف) على التوالي بينما سلالة الكلوريللا هي ٠٠٠٨، ٠٠٠١، ٠٠١٦، ٠٠٠٠، ٠٠٠٨، ٠٠٠٠ (ميکروجرام / جم وزن جاف) على التوالي.

**المرحلة الثالثة:** اشتملت على الناحية التطبيقية للبحث وكانت نتاج هذه المرحلة كالتالي:-

CH<sub>2</sub>X<sub>2</sub>)

## ***LIST OF CONTENTS***

Subjects	Page
<b>1- INTRODUCTION .....</b>	1-4
<b>2- REVIEW OF LITRATURE .....</b>	5
2.1.Physiological factors .....	5
2.1.1.Nutritional factors .....	6
2.1.2.Enviromental factors .....	10
2.2.Outdoor cultivation of algae .....	14
2.2.1.Chemical composition of microalgae .....	16
2.2.2.Economic of algae production .....	21
2.3.Algae and water supply .....	23
2.3.1.Eutrophication .....	23
2.3.2.Microalgae dynamics .....	25
2.3.3.Removel N,P and heavy metals by biological treatments .....	26
2.3.4.Algae in aquatic ecosystem outside .....	30
2.3.4.1.Temperature .....	31
2.3.4.2.Dissolved oxygen .....	31
2.3.4.3.pH .....	32
2.3.4.4.Alkalinity and hardness .....	32
2.3.4.5.Salinity ( total dissolved solids) .....	32
2.3.4.6.Ammonia .....	33
2.3.4.7.Nitrite and Nitrate .....	33
2.3.4.8.Total phosphorus .....	33
2.3.4.9.Heavy metals .....	34
2.3.4.9.1.Iron .....	34
2.3.4.9.2.Copper .....	34
2.3.4.9.3.Zinc .....	35
2.3.4.9.4.Lead .....	36
2.3.5.Phytoplankton (microalgae) and environment.....	36
2.4.Biology and ecology of silver carp.....	37
2.4.1.Aquaculture world production .....	39
<b>3. MATERIALS AND METHODS .....</b>	42
3.1.Isolation, Purification and Identification of unicellular green algae .....	42
3.1.1.Source of algae strains .....	43

Subjects	Page
3.1.3.Basic medium .....	44
3.1.4.Laboratory conditions .....	45
3.1.5.Select and identify of unicellular green algae .....	45
3.2.Mass cultivation of algae and biomass.....	47
3.2.1.Nutrients for outdoor algae cultures.....	48
3.2.2.Algal biomass harvesting and drying.....	48
3.2.3.Concentrated algal suspension.....	49
3.2.4.Continuous algal production (Upscaling).....	49
3.2.5.Sufficient secondary flasks cultures.....	49
3.3.Experimental design .....	50
3.3.1.Indoor experiments.....	50
3.3.1.1.Growth curve experiment .....	50
3.3.1.2.Temperature degrees experiment.....	50
3.3.1.3.Light intensities experiment.....	50
3.3.1.4.Photoperiods experiment.....	50
3.3.1.5.Growth regulators experiment.....	50
3.3.1.6.Lines of aeration experiment.....	50
3.3.2.Outdoor experiments.....	51
3.3.2.1.Mass Production.....	51
3.3.2.2.Experiment of fish in aquaria.....	52
3.4.Measurement of growth parameters.....	52
3.4.1.Total cell count.....	52
3.4.2.Determination of (F.W and D.W).....	53
3.5.Biochemical analysis.....	54
3.5.1.Determination of Pigments.....	54
3.5.2.Crude Protein.....	54
3.5.3.Total Carbohydrate.....	55
3.5.4.Nucleic acid contents.....	55
3.6.Algae and water Supply.....	56
3.6.1.Physical analysis of water.....	57
3.6.2.Chemical and biological of water quality analyses.....	60
3.6.2.1.Nitrate nitrogen ( $\text{NO}_3 - \text{N}$ ).....	60
3.6.2.2.Nitrite ( $\text{NO}_2$ ).....	60
3.6.2.3.Ammonia nitrogen ( $\text{NH}_4$ ).....	60
3.6.2.4.Total nitrogen (T.N).....	61
3.6.2.5.Total Phosphorus (T.P).....	61
3.6.2.6.Calcium (Ca).....	61
3.6.2.7.Sodium (Na).....	61
3.6.2.8.Potassium (K).....	61
3.6.2.9.Magnesium (Mg).....	61

Subjects	Page
3.6.3.Heavy metals in water .....	62
3.6.3.1.Iron (Fe).....	62
3.6.3.2.Zinc (Zn).....	62
3.6.3.3.Copper (Cu).....	62
3.6.3.4.Lead (Pb).....	62
3.6.4.Biological analysis of water.....	63
3.6.4.1.Phytoplankton estimation.....	63
<b>4. RESULTS AND DISCUSSION .....</b>	<b>64</b>
4.1.Effect of Physiological factors on growth parameters of <i>Chlorella sorokiniana</i> and <i>Scenedesmus dimorphus</i>	
4.1.1.Growth curve experiment.....	64
4.1.2.Growth response of <i>Chlorella sorokiniana</i> & <i>Scenedesmus dimorphus</i> to various temperature degrees.....	69
4.1.3. Growth response of <i>Chlorella sorokiniana</i> & <i>Scenedesmus dimorphus</i> to Light intensities .....	86
4.1.4. Growth response of <i>Chlorella sorokiniana</i> & <i>Scenedesmus dimorphus</i> to various Photoperiods.....	103
4.1.5. Plant growth regulators (Cytokinins) effects on <i>Chlorella sorokiniana</i> & <i>Scenedesmus dimorphus</i>	119
4.1.6. Growth response of <i>Chlorella sorokiniana</i> & <i>Scenedesmus dimorphus</i> at different Lines of aeration.....	135
4.2. Mass Production of <i>Chlorella sorokiniana</i> & <i>Scenedesmus dimorphus</i> under Egyption Conditions	
4.2.1.Chemical composition of algae .....	152
4.2.2. Effect of drying methods on moisture % and Protein % .....	158
4.2.3.Total costs of producing algae .....	
4.3. Experiment of aquaria .....	162
4.3.1.Minerales and heavy metals.....	167
4.3.2.Physico-chemical analysis .....	
4.3.3.Heavy metals concentration of <i>silver carp</i> .....	167
4.3.4.Biochemical composition of <i>silver carp</i> .....	167
4.3.5.Growth characteristics of green algae examined was cultivated in agriculture drainage water.....	171
4.3.6.Elements and heavy metals of examined algae...	171

Subjects	Page
4.4. Algae in aquatic ecosystem outside .....	176
4.4.1. Water temperature .....	176
4.4.2. Dissolved oxygen.....	176
4.4.3. Hydrogen ions (pH).....	177
4.4.4. Salinity.....	177
4.4.5. Total solids (T.S.).....	177
4.4.6. Total suspended solids (T.S.S.).....	178
4.4.7. Total alkalinity .....	178
4.4.8. Total hardness.....	178
4.4.9. Ammonium values ( $\text{NH}_4$ ).....	179
4.4.10. Unionized ammonia ( $\text{NH}_3$ ).....	179
4.5. Heavy metals and biological properties of water.....	180
4.5.1. Iron concentration (Fe).....	180
4.5.2. Copper concentration (Cu).....	181
4.5.3. Zinc concentration (Zn).....	182
4.5.4. Lead concentration (Pb).....	183
4.5.5. Phytoplankton density .....	185
4.5.6. Chlorophyll "a" concentration.....	186
<b>5. CONCLUSION.....</b>	<b>194</b>
<b>6. SUMMARY .....</b>	<b>197</b>
<b>7. REFERENCES.....</b>	<b>205</b>
<b>8. ARABIC SUMMARY.....</b>	