



پتانسیل کاهش آلودگی نفت خام توسط جلبک سبز *Chlorella vulgaris* و پاسخ‌های فیزیولوژیک ناشی از آن

رویا غفاری^۱، ندا سلطانی^{۱*}، مهناز مظاهری اسدی^۲

^۱ پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی، گروه میکروبیولوژی نفت، تهران

^۲ سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده زیست فناوری، تهران

نوع مقاله:	چکیده
پژوهشی	در سال‌های اخیر یکی از مهم‌ترین مشکلات جهانی، مسئله آلودگی‌های محیطی ناشی از فعالیت‌های صنعتی و اجتماعی می‌باشد. متأسفانه در کشورهای تولیدکننده نفت از جمله در ایران، این ماده به عنوان یکی از اصلی‌ترین آلاینده‌های محیط زیست به شمار می‌رود. در این مطالعه تاثیر نفت خام بر برخی از پاسخ‌های فیزیولوژیکی جلبک تک سلولی کلرلا ولگاریس مانند میزان رنگیزه فتوسنتزی کلروفیل و فتوسنتز، نرخ رشد و نیز توانایی جلبک مورد نظر در تجزیه این ماده مورد بررسی قرار گرفت. جهت افزایش بیومس جلبکی، پس از خالص‌سازی به روش پلیت آگار، کلنی‌ها به محیط کشت مایع N ₈ منتقل شدند. پس از قرار گرفتن نمونه جلبکی در فاز لگاریتمی، محیط کشت بدون کربن در نظر گرفته شد و با نفت خام ۱٪ تیماردهی گردید. مقادیر کلروفیل با روش اسپکتروفتومتری و نرخ فتوسنتز به وسیله دستگاه اکسی ویوو و میزان تجزیه نفت توسط جلبک با روش آنالیز گاز کروماتوگرافی مورد ارزیابی قرار گرفتند. بررسی‌های فیزیولوژیک نشان داد، نرخ رشد این جلبک در تیمار نفت خام افزایش چشمگیری داشت در حالی که بیشترین میزان کلروفیل و فتوسنتز در نمونه شاهد بوده است. همچنین نتایج حاکی از آن بود که جلبک <i>Chlorella vulgaris</i> قادر به تجزیه درصد قابل توجهی از نفت خام بوده است. این نتایج بیانگر توانمندی جلبک <i>Chlorella vulgaris</i> در تجزیه آلودگی‌های زیستی از جمله آلودگی‌های نفتی می‌باشد.
تاریخچه مقاله: دریافت: ۹۳/۰۲/۰۱ اصلاح: ۹۳/۰۵/۱۹ پذیرش: ۹۳/۰۵/۲۶	
کلمات کلیدی: اسپکتروفتومتری آلودگی نفتی رنگیزه فتوسنتزی کروماتوگرافی گازی کلروفیل	

مقدمه

در سال‌های اخیر در کشورهای تولیدکننده نفت از جمله ایران، این ماده به عنوان اصلی‌ترین آلاینده زیست‌محیطی به شمار می‌رود. بنابراین با افزایش آلودگی‌های نفتی و ارزش حفظ اکوسیستم‌های طبیعی، مطالعات پیرامون تجزیه زیستی ترکیبات نفتی و میکروارگانیسم‌های دخیل در این امر اهمیت پیدا کرده است (Megharaj *et al.*, 2013). میکروارگانیسم‌های متعددی از جمله باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرها از نظر توانمندی تجزیه هیدروکربن‌ها مورد بررسی قرار گرفته‌اند (Chaillan *et al.*, 2006). اثرات هیدروکربن‌های نفتی به ویژه نفت خام در جلبک‌های دریا و آب شیرین مطالعه شده است (Agbozu and Opuene, 2011; Kumar *et al.*, 2009; Dubey *et al.*, 2009). میکروارگانیسم‌ها از لحاظ متابولیسمی توانایی استفاده از منابع هیدروکربنی را داشته بنابراین می‌توانند در این خاک‌های آلوده زندگی کنند. آلودگی‌ها معمولاً به عنوان منابع انرژی برای این

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: soltani6@yahoo.com

میکروارگانیسم‌ها هستند. عمل پاکسازی آلودگی‌ها توسط موجودات زنده که زیست پالایی نام دارد، فرآیندی است که از توانایی‌های کاتابولیکی ارگانیسم‌های زنده برای تقویت سرعت حذف آلودگی‌ها استفاده می‌کند. زیست پالایی از طریق استفاده از پتانسیل‌های متابولیکی موجود در میکروارگانیسم‌ها و عملکردهای کاتابولیکی یا از طریق معرفی ژن‌های کد کننده‌ی این عملکردها به تجزیه دست می‌آید (Ilynia et al., 2003). این ترکیبات به طور کامل تجزیه می‌شوند و به ترکیبات معدنی مثل دی اکسید کربن تبدیل می‌شوند و سپس هضم می‌گردند. گستره‌ی وسیعی از میکروب‌ها به ویژه سیانوباکتری‌ها، قارچ‌های ریشه‌ای و مخمرها برای حذف هیدروکربن در دریا مهم شناخته شده‌اند. تجزیه نفت در محیط دریا با جمعیتی مخلوط از میکروب‌های آن محل یا با استفاده از توده‌های میکروبی گزارش شده است. ریزجلبک‌ها اکسیداسیون هیدروکربن‌های آروماتیک تحت شرایط رشد فتواتوتروفی را نشان دادند (Raghukumar et al., 2001). این فرایند با اکسیداسیون آن‌ها به اجزایی با وزن مولکولی کمتر یا با تغییر آن هیدروکربن به اجزایی با قطبیت بیشتر انجام می‌پذیرد (Gamila et al., 2003).

جلبک‌ها اولین زنجیره در گروه‌های مختلف ارگانیسم‌ها را تشکیل می‌دهند که زنجیره غذایی زمین را شامل می‌شود. جلبک *Chlorella vulgaris* که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفته است، از دسته جلبک‌های سبز تک‌سلولی و غیر متحرک است که در سطح خاک مرطوب، درون آب‌های شیرین و آب شور یافت می‌شود. این جلبک اولین بار در سال ۱۹۸۰، به وسیله یک میکروبیولوژیست هلندی به نام Beijerinck به صورت خالص در آزمایشگاه کشت داده شد. این جلبک تک‌سلولی، کروی شکل بوده و دارای دیواره نسبتاً نازک، کلروپلاست بزرگ و فنجان‌ی شکل فاقد پیرونوئید و یا با پیرونوئید و سیتوپلاسم بی‌رنگ که در درون آن هسته نسبتاً درشتی در بالای کلروپلاست قرار گرفته است، می‌باشد. این جلبک از نمونه جلبک‌هایی است که در بسیاری از آزمایشات فتوسنتز، بیوشیمیایی و حتی ژنتیک مورد استفاده قرار می‌گیرد (Sharma, 1986). El-Sheekh و همکارانش در سال ۲۰۱۳ به بررسی توانمندی تجزیه غلظت‌های مختلف نفت خام توسط جلبک تک‌سلولی *C. vulgaris* و اثر آن‌ها بر پاسخ‌های فیزیولوژیک این جلبک از جمله نرخ رشد پرداختند. همچنین اثر هیدروکربن‌های نفتی نظیر نفتالن و تولوئن بر میزان رشد جلبک *C. vulgaris* توسط Singh و Gaur در سال ۱۹۹۰ و Qingxia Kong در سال ۲۰۱۰ مورد ارزیابی قرار گرفتند.

هدف از این پژوهش، بررسی میزان تجزیه نفت خام توسط جلبک *C. vulgaris* جداسازی شده از سواحل جزیره خارک و اثر این ماده آلی بر میزان رشد و رنگیزه فتوسنتزی کلروفیل و نیز نرخ فعالیت فتوسنتزی بوده است.

مواد و روش‌ها

نمونه جلبک *C. vulgaris* از سواحل جزیره خارک جمع‌آوری شد و پس از انتقال به آزمایشگاه طی پاساژهای متوالی بر روی پلیت‌های آگار کلنی‌های خالص نمونه جداسازی و پس از خالص‌سازی بر روی پلیت‌های جداگانه کشت گردید (Andersen, 2005).



شکل ۱. تصویر میکروسکوپی نمونه جلبکی

سپس نمونه‌های خالص به محیط کشت تخصصی مایع N_8 جهت افزایش بیومس، منتقل شدند. ترکیب شیمیایی محیط کشت N_8 عبارتند از (مقادیر بر اساس میلی‌گرم در لیتر): $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, ۲۶۰؛ KH_2PO_4 , ۷۴۰؛ $CaCl_2$, ۱۰؛ $FeEDTA$, ۱۰؛ $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, ۵۰؛ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, ۱۰۰۰؛ KNO_3 , ۳/۵۸؛ $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$, ۱۲/۹۸؛ $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, ۱/۸۳؛ $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, ۳/۲؛ پس از آن نفت خام به میزان ۱٪ به محیط کشت مایع N_8 به‌عنوان تیمار افزوده شد و تحت شرایط مطلوب کشت از نظر دما $30 \pm 2^\circ C$ ، نور ۶۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه، pH ۷ و هوادهی قرار گرفتند.

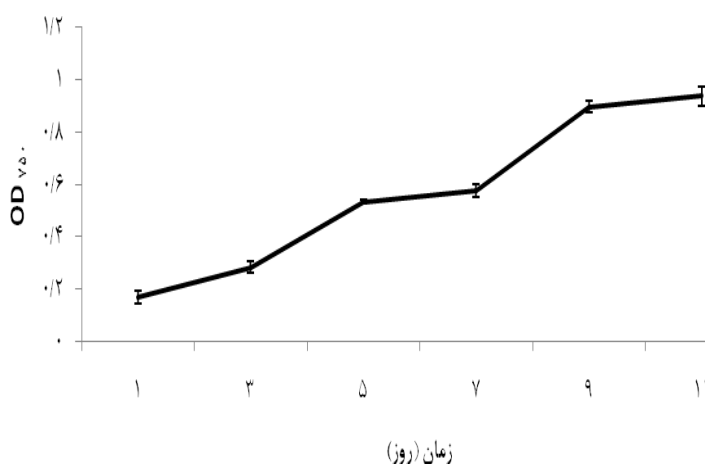
شوری آب دریا در جزیره خارک اندازه‌گیری گردید (۳۸ گرم در لیتر). رشد نمونه جلبکی از طریق میزان جذب نوری در طول موج ۷۵۰ nm طی ۱۱ روز، هر دو روز یک‌بار اندازه‌گیری شد. سپس منحنی رشد جلبک مذکور رسم شد و نرخ رشد نمونه بر این اساس محاسبه گردید. برای سنجش مقدار کلروفیل از روش Marker (۱۹۷۲) استفاده شد، به این منظور پس از عصاره‌گیری با متانول، جذب نوری در طول موج ۶۶۵ nm خوانده شد و مقدار کلروفیل محاسبه گردید. جهت اندازه‌گیری نرخ فعالیت فتوسنتزی، دستگاه اکسی ویو مورد استفاده قرار گرفت. در این روش از تزریق ۲ mL سوسپانسیون جلبک استفاده شد و میزان تصاعد اکسیژن در ۱ دقیقه محاسبه شد (Dodds, 1989).

به منظور بررسی میزان تجزیه نفت خام توسط جلبک *C. vulgaris* از آنالیز گاز کروماتوگرافی توسط دستگاه گاز کروماتوگرافی، با استفاده از ستون‌ها و استانداردهای تخصصی مربوط به نفت خام، بهره گرفته شد. دستگاه گاز کروماتوگرافی مورد استفاده در این پژوهش Shimadzu 15A، دارای دتکتور یونیزاسیون شعله‌ای (FID) و ستون RTX-5Ms به طول ۳۰ متر و قطر ۰/۲۵ میلی‌متر بوده است. پس از گذشت ۱۴ روز از افزودن نفت خام ۱٪ به محیط کشت جلبک، آنالیز GC انجام شد.

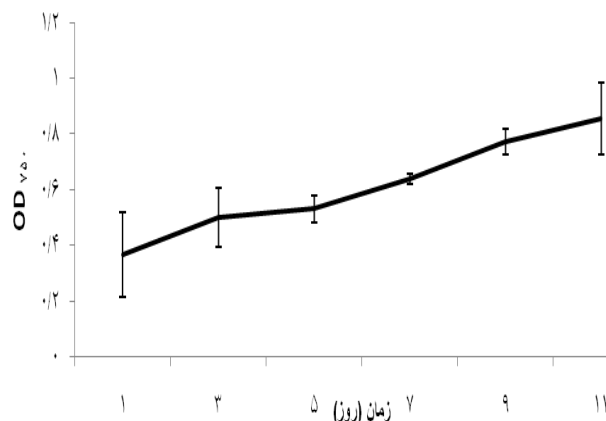
به منظور آنالیز فیزیولوژیکی، اطلاعات به دست آمده توسط نرم‌افزارهایی مانند Excel و SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. آنالیزهای آماری بر اساس سه تکرار در هر آزمون و آنالیز واریانس یکطرفه ANOVA و طرح Tukey انجام شد.

نتایج

ماکزیمم نرخ رشد نمونه جلبکی در این مطالعه مربوط به نمونه شاهد و به میزان $0.25 d^{-1}$ بوده است (شکل ۲) که این میزان بر اساس آنالیز آماری، اختلاف معنی‌داری با نرخ رشد تحت تیمار ۱٪ نفت خام به میزان $0.18 d^{-1}$ (شکل ۳) از خود نشان داده است.



شکل ۲. منحنی رشد جلبک *C. vulgaris* در نمونه شاهد

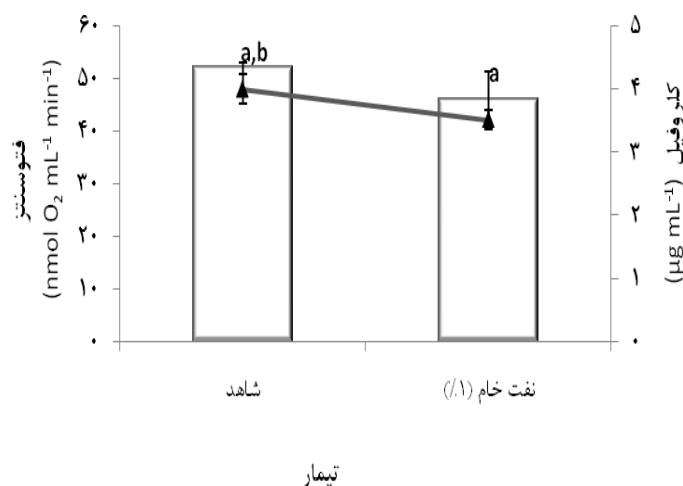


شکل ۳. منحنی رشد جلبک *C. vulgaris* تحت تیمار ۱٪ نفت خام

نتایج فیزیولوژیکی رشد حاکی از آن است که رشد جلبک در مقایسه با شاهد روندی افزایشی از خود نشان داده است در واقع این نمونه جلبکی، از نفت خام به عنوان منبع کربن استفاده نموده و در حضور این ترکیب آلی قادر به رشد مطلوب بوده است.

شکل ۴، نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان کلروفیل را در نمونه شاهد و نیز تحت تیمار نفت خام در نمونه *C. vulgaris* نشان می‌دهد. بیشترین محتوای کلروفیل با میزان $4/34 \mu\text{g mL}^{-1}$ در نمونه شاهد مشاهده شده است. طبق نتایج آنالیز آماری، کاهش میزان کلروفیل در تیمار نفت خام نسبت به نمونه شاهد، معنی‌دار نبوده است.

همچنین در این پژوهش بالاترین میزان فعالیت فتوسنتزی در نمونه جلبکی مربوط به نمونه شاهد بود و تحت تیمار نفت خام کاهش ملایمی داشت که نتایج آنالیز آماری حاکی از آن بود که اختلاف معنی‌داری بین نمونه شاهد و تیمار نفت خام در این خصوص وجود ندارد ($P < 0.05$).



شکل ۴. میزان کلروفیل و فتوسنتز نمونه *C. vulgaris* در نمونه شاهد و تیمار ۱٪ نفت خام

در این پژوهش به بررسی میزان توانمندی جلبک *C. vulgaris* در تجزیه نفت خام نیز پرداخته شد که از آنالیز گاز کروماتوگرافی جهت انجام این آزمایش استفاده گردید. همان‌گونه که در شکل ۵ مشاهده می‌گردد این جلبک قادر به تجزیه نفت خام به میزان (۶۲/۸۶٪) بوده است.



شکل ۵. میزان تجزیه نفت خام توسط جلبک *C. vulgaris*

بحث

میزان رشد جلبک مورد آزمایش در این تحقیق بر اساس جذب نوری در طول موج ۷۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شده است. بر اساس نتایج به دست آمده افزودن نفت خام به میزان ۱٪ در مقایسه با شاهد سبب افزایش رشد جلبک مذکور شده است که مطابق با یافته‌های Gamila و همکاران (۲۰۰۳) در سویه‌های *Anabaena* و *Oscillatoria* تحت تیمار نفت خام می‌باشد. در سویه‌های مذکور افزایش زی‌توده نسبت به نمونه شاهد در پی افزودن یک درصد نفت خام دیده شده، این در حالی است که رشد بیشینه متفاوت بوده است. اگرچه میزان جذب نوری و در نتیجه رشد جلبک در تیمار نفت خام افزایش داشت اما این افزایش از روز سوم پس از تیماردهی ایجاد شده است. این امر مطابق با نتیجه مطالعه Kumar و همکاران (۲۰۰۸) می‌باشد که اظهار داشتند پس از ۷-۱۵ روز از تیماردهی، تمام سلول‌های تیمار داده شده شروع به رشد در این محیط کشت کردند این می‌تواند به دلیل تحریک تغییرات باشد که سلول‌ها را قادر به تنظیم تغییرات در شرایط فیزیولوژیکی متفاوت کرده است. پس می‌توان نتیجه گرفت که جلبک *C. vulgaris* به مدت سه روز در حال سازگار شدن با شرایط ایجاد شده در پی افزودن نفت خام به محیط کشت خود بوده است. El-Sheekh و همکاران نیز در سال ۲۰۱۳ اثر غلظت‌های مختلف نفت خام را بر میزان رشد دو جلبک سبز *Scenedesmus obliquus* و *C. vulgaris* مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج نشان داد بیشترین میزان نرخ رشد برای جلبک *C. vulgaris* در تیمار ۲٪ نفت خام و برای *Scenedesmus obliquus* در حضور ۰/۵ درصد نفت خام بود. نتایج این پژوهش مبین نتایج حاصل از پژوهش حاضر نیز می‌باشد که نشان داد در جلبک تک‌سلولی *C. vulgaris* بیشترین میزان رشد مربوط به غلظت ۱٪ نفت خام بوده است.

بر اساس نتایج به دست آمده از سنجش محتوای کلروفیل تحت تیمار نفت خام، میزان این رنگیزه فتوسنتزی در پی افزودن ۱٪ نفت خام در جلبک *Chlorella vulgaris* کاهش یافته است. کاهش در محتوای کلروفیل می‌تواند به دلیل مهار بیوسنتز کلروفیل باشد که با مهار آلفا آمینولولونیک اسید دهیدروژناز و پروتوکلروفیلید ردوکتاز ایجاد شده باشد. این نتایج با یافته‌های Sundaram و Soumya (۲۰۰۱) مطابقت دارد که نشان داده آلاینده‌های محیطی از قبیل بنزن و تولوئن در غلظت‌های بالا منجر به کاهش مقدار کلروفیل و غیرفعال شدن فرآیندهای حیاتی از قبیل فتوسنتز و جذب نیتراژ شوند.

نتایج به دست آمده از تاثیر ۱٪ نفت خام بر میزان فعالیت فتوسنتزی جلبک *C. vulgaris* نشان داد که نرخ فعالیت فتوسنتزی در این نمونه پس از تیماردهی دارای اختلاف کاهشی معناداری در مقایسه با شاهد بوده است. اثر تحریک‌کنندگی یا مهار فتوسنتز توسط آلاینده‌های نفتی ممکن است به دلیل تغییرات در نفوذپذیری غشاء باشد. غلظت‌های پایین موجب افزایش نفوذپذیری غشاء می‌شوند در حالی که غلظت‌های بالای هیدروکربن‌های نفتی در نفوذپذیری غشاء اختلال ایجاد می‌کنند. این نتیجه مطابق با نتایج مطالعه Sundaram و Soumya در سال ۲۰۰۱ مبنی بر بررسی اثر افزودن تولوئن، بنزن و زایلن به محیط کشت سیانوباکتری‌ها است. همچنین نتایج حاصل از پژوهش Kabli (۱۹۹۸) اثر کاهشی در میزان تصاعد اکسیژن در سه گونه از جلبک‌های دریایی

تحت تیمار نفتالن و نفت خام را نشان داد. Soto و همکاران نیز در سال ۱۹۷۴ دریافتند که افزایش ۱۰۰٪ نفتالن به محیط کشت *Chlamydomonas angulosa* باعث توقف کامل و بلافاصله فعالیت فتوسنتزی می‌شود. مهار فتوسنتز در میزان بالای نفت خام همچنین با مهار واکنش‌های نوری به‌ویژه در فتوسیستم II توضیح داده شده است (Singh and Gaur, 1988). نتایج حاصل از انجام گاز کروماتوگرافی در تشخیص میزان توانمندی این جلبک در تجزیه ۱٪ نفت خام نیز نتایج حاصل از دیگر پژوهش‌ها را تایید می‌کند. به‌طور مثال El-Sheekh در سال ۲۰۱۳ به بررسی توانایی تجزیه نفت خام توسط دو جلبک سبز *Scenedesmus obliquus* و *C. vulgaris* پرداخت. نتایج نشان داد بیشترین میزان تجزیه توسط این دو جلبک در حضور ۰/۵ و ۱ درصد نفت خام بوده است. همچنین بابایی (۱۳۹۰) نیز به بررسی توانایی سیانوباکتری ISC55 *Anabaena sp.* در تجزیه غلظت‌های مختلف نفت خام و اثر آن‌ها در پاسخ‌های فیزیولوژیک سیانوباکتری مربوطه پرداخت و نتایج نشان داد بیشترین میزان تجزیه در غلظت ۱٪ نفت خام رخ داد در حالی که رشد بهینه متعلق به غلظت‌های بالاتر بود. نتایج این دو پژوهش مبین نتایج حاصل از پژوهش حاضر نیز می‌باشد. نشان داده شد در جلبک تک‌سلولی *C. vulgaris* بیشترین میزان تجزیه نفت خام مربوط به غلظت ۱٪ نفت خام بوده است بنابراین بیشترین میزان تجزیه زیستی در غلظت‌های پایین هیدروکربن‌های نفتی و نفت خام رخ می‌دهد.

از آنجایی که نفت یک فرآورده سمی برای سیستم‌های بیولوژیک و یکی از آلوده‌کننده‌های اصلی اکوسیستم‌های زیستی محسوب می‌شود، نتایج حاصل از این آزمایش می‌تواند بیانگر پتانسیل این جلبک برای استفاده از آن به عنوان شاخصی جهت تجزیه زیستی آلودگی‌های نفتی در مناطق آلوده باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از شرکت پایانه‌های نفتی ایران و نیز پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی به خاطر حمایت جهت انجام این تحقیق تشکر می‌نمایند.

منابع

بابایی، ث. ۱۳۹۰. بررسی اثرات نفت خام بر رشد، فتوسنتز و فعالیت آنزیم نیتروژناز در سیانوباکتری *Anabaena sp.* پایان‌نامه کارشناسی ارشد زیست‌شناسی. دانشکده علوم. دانشگاه تربیت معلم تهران.

- Agbozu, I.E., Opuene, K. 2009. Occurrence and diagenetic evolution of perylene in the sediments of Oginigba Creek, Southern Nigeria. *International Journal of Environmental Research*. 3 (1): 117-120.
- Andersen, R.A. 2005. *Algal culturing techniques*. Elsevier Academic Press. 578 p.
- Chaillan, F., Gugger, M., Saliot, A., Coute, A., Oudot, J. 2006. Role of cyanobacteria in the biodegradation of crude oil by a tropical cyanobacterial mat. *Chemosphere*. 26: 1574-1582.
- Dodds, W.K. 1989. Microscale Vertical Profiles of N₂ Fixation, Photosynthesis, O₂, Chlorophyll *a* and Light in a Cyanobacterial Assemblage. *Applied and Environmental Microbiology*. 55: 882-886.
- Dubey, S.K., Dubey, J., Mehra, S., Tiwari, P., Bishwas, A.J. 2011. Potential use of cyanobacterial species in bioremediation of industrial effluents. *African journal of Biotechnology*. 10(7): 1125-1132.
- El-Sheekh, M.M., Hamouda, R.A., Nizam, A.A. 2013. Biodegradation of crude oil by *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris* growing under heterotrophic conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 82: 67-72.
- Gamila, H.A., Ibrahim, M.B.M., Abd El-Ghafar, H.H. 2003. The Role of Cyanobacteria Isolated Strains in the Biodegradation of Crude Oil. *International Journal of Environmental Studies*. 60: 435-444.
- Gaur, J.P., Singh, A.K. 1990. Growth, Photosynthesis and Nitrogen Fixation of *Anabaena doliolum* Exposed to Assam Crude Extract. *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology*. 44: 494-500.
- Ilynia, A., Castillo Sanchez, M.I., Villarreal Sanchez, J.A., Ramirez Esquivel, G., Candelas Ramirez, J. 2003. Isolation of Soil Bacteria for Bioremediation of Hydrocarbon Contamination. *Вестник Московского университета. Серия*. 44(1): 88-91.

- Kabli, S.A. 1998. Effect of crude oil and naphthalene on the evolution of oxygen by three species of marine algae. *Meteorology, Environment and Arid Land Agriculture Sciences*. 9: 137-144.
- Kumar, S., Habib, K., Fatma, T. 2008. Endosulfan induced biochemical changes in nitrogen – fixing cyanobacteria. *Science of Total Environment*. 403: 130-138.
- Kumar, S., Muralitharan, G., Thajuddin, N. 2009. Screening of hypersalin cyanobacterium, *Phormidium tenue*, for the degradation of aromatic hydrocarbons: naphthalene and anthracene. *Biotechnology Letters*. 150: 1997-2008.
- Marker, A.F.H. 1972. The use of acetone and methanol in the estimation of chlorophyll in the presence of phaeophytin. *Freshwater Biology*. 2: 361-385.
- Megharaj, M., Ramakrishnan, B., Subashchandrabose, S.R., Venkateswarlu, K., Naidu, R. 2013. Mixotrophic cyanobacteria and microalgae as distinctive biological agents for organic pollutant degradation. *Environment International*. 51: 59-72.
- Qingxia, K., Lizhong, Z., Xueyou S. 2010. Effect of nutrient conditions on the toxicity of naphthalene to *Chlorella pyrenoidosa*. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*. 23(2): 307-314.
- Raghukumar, C., Vipparthy, V., David, J.J. 2001. Degradation of crude oil by marine cyanobacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 57 (3): 433-436.
- Sharma, O.P. 1986. *Text Book of Algae*. Tata McGraw. New delhi. pp. 158-163.
- Singh A.K., Gaur J.P. 1988. Effect of Assam crude oil on photosynthesis and associated electron transport system in *Anabaena doliolum*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 41: 776-780.
- Soto, C., Hellebust, J.A., Hutchinson, T.C. 1974. Effect of naphthalene and aqueous crude oil extracts on the green flagellate *Chlamydomonas angulosa* II, Photosynthesis and the uptake and release of naphthalene. *Canadian Journal of Botany*. 53: 118-126.
- Sundaram, S., Soumya, K.K. 2001. Study of Physiological Alterations in Cyanobacterium under Organic Stress. *American Journal of Plant Physiology*. 6(1): 1-16.