نشریه فیزیولوژی محیطی گیاهی، سال چهاردهم، شماره ۵۳، بهار ۱۳۹۸ / صفحات: ۴۶-۳۰

بررسی خصوصیات فیزیولوژیک جلبک‌های سبز به منظور استفاده از آن‌ها به عنوان سوخت بیودیزل

فاطمه ملک‌احمدی[۱]، رمضانعلی خاوری‌نژاد[۱*]، ندا سلطانی[۲]، فرزانه نجفی[۳]، طاهرنژاد ستاری[۱]

[۱]گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران

[۲]گروه پژوهشی میکروبیولوژی نفت، پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی، تهران، ایران

[۳]گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۷/٤/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۷/۸/۱۲

چکیده

گرم شدن تدریجی زمین به‌دلیل استفاده بی‌رویه از سوخت‌های فسیلی، افزایش قیمت، آلودگی‌های زیست‌محیطی و تولید گازهای گلخانه‌ای سبب شده تا دانشمندان درصدد تولید سوختی تجدیدپذیر و جایگزین سوخت‌های فسیلی باشند. این مطالعه با هدف بررسی پتانسیل چهار گونه جلبک سبز به عنوان مواد خام تولید کننده چربی برای سنتز بیودیزل انجام شد. بعد از خالص‌سازی، نمونه‌هادر محیط کشت BBM و N_8 در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تحت نور دائمی و pH ۷ نگهداری شدند. نرخ رشد، میزان رنگیزه‌های کلروفیل، کاروتنوئیدها و میزان لیپید نمونه‌ها اندازه‌گیری شدند. میزان کل اسیدهای چرب با کمک دستگاه FTIR و پروفایل اسیدهای چرب با استفاده ازدستگاه GC-Mass سنجیده شد. نتایج نشان داد بالاترین میزان رشد و تولید بیومس و کمترین زمان تقسیم و همچنین بیشترین میزان تولید لیپید مربوط به جلبک سبز *Scenedesmus* sp ISC 94 می‌باشد. در جلبک سبز *Scenedesmus* sp ISC 94، پالمتیک اسید (۴۲/۷۴ درصد)، استئاریک اسید (۲۹/۵۶ درصد)، پالمیتولئیک اسید (۱۰/۲ درصد)، اولئیک اسید (۶/۷۲ درصد)، لینولئیک اسید (۱/۷۲ درصد)، α- لینولنیک اسید (۱/۶۳۶ درصد) اندازه‌گیری شد. به علاوه، آنالیز لیپیدها نشان داد که ۸۰ درصد اسیدهای چرب از نوع اشباع و غیراشباع با یک پیوند دوگانه بودند. همچنین پالمیتیک اسید و اولئیک اسید مهم‌ترین اسیدهای چرب جداسازی شده می‌باشند. بنابراین *سندسموس* به‌دلیل تولید بالاترین و بهترین محتوای لیپیدی می‌تواند به‌عنوان یک کاندید مناسب برای سوخت بیودیزل معرفی گردد.

واژه‌های کلیدی: سوخت زیستی، جلبک‌های سبز، درصد اسیدهای چرب و کروماتوگرافی گازی.

مقدمه

امروزه افزایش قیمت و نیز مصرف بیش از پیش و رو به اتمام منابع انرژی و سوخت‌های فسیلی، افزایش گازهای گلخانه‌ای، انگیزهٔ استفاده از منابع بیولوژیک و بهره‌برداری از میکروارگانیسم‌ها را به‌منظور تهیه سوخت‌های زیستی و جایگزین بوجود آورده و موجب شده است که محققین به کمک تکنیک‌های بیوشیمیایی، بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک در صدد یافتن میکروارگانیسم‌های مفید و بهینه و راه حل مناسب و با صرفه اقتصادی برای این منظور باشند (Ghasemi et al., 2012). افزایش تقاضا برای انرژی و گرم شدن کره زمین دو مشکل مهمی است که جامعه مدرن با آن مواجه است، به همین دلیل در سال‌های اخیر انرژی حاصل از منابع تجدید پذیر بسیار مورد

*مسئول مکاتبه: ra.khavarinejad@gmail.com

Archive of SID

www.SID.ir

توجه قرار گرفته است و محققان بر روی توسعه منابع انرژی جایگزین مانند خورشید، باد، آب و سوخت‌های زیستی تمرکز کرده اند. ذخایر سوخت فسیلی زمین به سرعت در حال اتمام است و نیاز به منابع انرژی تجدید پذیر به ویژه سوخت‌های زیستی افزایش یافته است (Unpaprom et al., 2015). بیودیزل اخیرا توجه خاصی را به‌عنوان سوختی با آلودگی کم و تجدید پذیر به خود جذب کرده است. در بین منابع مختلف تولید بیودیزل، جلبک به علت محتوای بالای چربی و رشد سریع جایگاه ویژه‌ای را کسب کرده است. ریزجلبک‌ها بخش مهمی از اکوسیستم خاک، شامل ۲۷ درصد از بیوماس میکروبی کل خاک را تشکیل می‌دهند. به علاوه جلبک‌های سبز پراکنش بیشتری از سایر میکروارگانیزم‌های فتوسنتز کننده و تثبیت کننده نیتروژن دارند و معمولاً قادر به رشد در شرایط سخت محیطی نیز می‌باشند. برای رشد به نور، قندها، CO_2، ازت، فسفر و پتاسیم نیاز داشته و در مدت زمان کوتاهی انواع لیپیدها، هیدرات‌های کربن و پروتئین‌ها را به‌عنوان محصولات متابولیکی به مقادیر قابل ملاحظه‌ای تولید می‌نمایند. بخش عمده این محصولات متابولیکی در غالب سوخت‌های زیستی حائز اهمیت‌اند (Damiani MC, 2010).

جنس‌های گوناگون *Scenedesmus* sp. به‌عنوان منابع بالقوه مواد اولیه برای تولید گازوئیل پیشنهاد شده و محتوای بیشتر ماده و اسید چرب به میزان رشد آن بستگی دارد (Damiani et al., 2014). با کاربرد گونه‌های *Secenedesmus* که بخشی از اکوسیستم اطراف ماست محیطی دوستانه تر با سوختی تجدید پذیر ایجاد می شود. در تولید روغن توسط گونه‌های جلبکی مذکور، جنس‌های *Scenedesmus* به‌عنوان گونه‌ای برای تولید روغن به کار می‌روند که دارای رشد سریع و محتوای رطوبتی نسبتاً بالایی است، تحقیقات نشان داده که استفاده از روغن خالص در موتور، مناسب نمی‌باشد. بنابراین لازم است تا ساختار زنجیره‌های هیدروکربنی روغن به اجزای ساده‌تری شکسته شوند که این کار به روش‌های مختلفی مانند پیرولیز، میکروامولسیون و ترانس استریفیکاسیون انجام می‌گیرد. از بین این روش‌ها، روش ترانس استریفیکاسیون به لحاظ سادگی کاربرد بیشتری دارد. این فرآیند شبیه به فرآیند هیدرولیز بوده با این تفاوت که به جای آب، الکل جایگزین می‌شود. بدین منظور مولکول‌های ترکیبات روغن یا چربی با یک الکل مانند متانول و یا اتانول در حضور یک کاتالیزور اسیدی یا قلیایی شرکت کرده و OH الکل مورد استفاده جایگزین زنجیره هیدروکربنی موجود در روغن می‌شود (Bux et al., 2011). لیپیدهای ذخیره‌ای از طریق فرایند شیمیایی ترانس استریفیکاسیون به اسیدهای چرب آزاد، متیل استر اسیدهای چرب و نظایر آن تبدیل می‌شوند. هیدروکربن‌های حاصل از این فرایند می‌توانند به شکل بیودیزل به عنوان سوخت به کار روند (Quintana et al., 2011).

گرم شدن تدریجی زمین به‌دلیل استفاده از سوخت‌های فسیلی، خطر کاهش تدریجی منابع این قبیل سوخت‌ها و آلودگی‌های زیست محیطی ناشی از مصرف آنها و تولید گازهای گلخانه‌ای از قبیل دی اکسید کربن، دی اکسید گوگرد و اکسید نیتروژن سبب شده است تا دانشمندان درصدد تولید سوختی مناسب و جایگزین جهت جلوگیری از عواقب ناشی از مصرف سوخت‌های فسیلی باشند. اخیراً به‌دلیل افزایش در قیمت نفت و محدود شدن منابع فسیلی تمرکز برای تهیه سوخت‌های زیستی و از جمله سوخت زیستی بنام بیودیزل که از روغن گیاهی، چربی‌های حیوانی و جلبک‌ها به‌دست می‌آید مورد توجه قرار گرفته است. بیوانرژی، سوخت به‌دست

Archive of SID

www.SID.ir

آمده از منابع بیولوژیکی (زیست توده) است که به عنوان سوخت زیستی (biofuel) می‌گویند. زیست توده، به هر ماده آلی به‌دست آمده از اشکال زنده و یا محصولات به‌دست آمده از سوخت و ساز آنها گفته می‌شود. سوخت‌های زیستی (بیودیزل یا اتانول زیستی) در حال حاضر تنها منابع انرژی جایگزین قابل استفاده به‌عنوان سوخت‌های حمل و نقل در وسایل نقلیه امروزی بدون انجام تغییرات عمده در موتورهای خودرو می‌باشند. بیودیزل و بیواتانول به‌دست آمده از محصولات خوراکی، با استفاده از تکنولوژی امروز، به‌دلیل هزینه‌های بالای تولید و استفاده از زمین‌های کشت محصولات خوراکی جایگزین موثری برای سوخت معمولی نمی‌باشند. بنابراین، بعد از نسل اول (محصولات خوراکی) و نسل دوم (زیست توده لیگنوسلولزی حاصل از محصولات غیر خوراکی مانند علف و ضایعات کشاورزی)، نسل سوم از سوخت‌های زیستی، از جمله ریز جلبک‌ها، یک گزینه امیدوار کننده برای تولید سوخت‌های زیستی پایدار هستند (Kaygusuz, 2009).

تنش‌هایی نظیر کمبود N و P میزان محتوی لیپیدی را در بسیاری از گونه‌های جلبکی افزایش می‌دهد (Dean et al., 2010). بیودیزل دارای هیچ سولفور یا ترکیبات آروماتیکی سوخت فسیلی نمی‌باشد و تقریباً دارای ۱۰٪ اکسیژن می‌باشد که آن را به‌عنوان سوخت اکسیژن دار معرفی می‌نماید که به احتراق آن در شرایط غنی از سوخت کمک می‌کند. تولید بیودیزل طی واکنش‌های شیمیایی روغن با الکل‌ها در حضور کاتالیزورها صورت می‌گیرد. محصولات نهایی متیل استرها (که در واقع بیودیزل می‌باشد) و گلیسرول (به‌عنوان محصول فرعی) می‌باشد که به این فرایند ترانس استریفیکاسیون گویند. کاتالیزورها به‌صورت قلیایی میباشند و می‌توان از کاتالیزورهای اسیدی استفاده نمود که در این صورت واکنش بسیار آهسته صورت می‌گیرد، همچنین از آنزیم‌ها نیز می توان به عنوان کاتالیزور استفاده نمود که البته بسیار گران می‌باشند (Guana et al., 2011). بسیاری از تحقیقات در گزارش‌های بسیاری مزیت‌های ریز جلبک‌ها را برای تولید بیودیزل در مقایسه با دیگر منابع سوختی شرح می دهند. از نقطه نظر تجربی آنها به راحتی کشت شده و نرخ رشد آنها بسیار بالا است؛ همچنین به‌دلیل دارا بودن میزان بالای چربی برای تولید سوخت مناسبند. ریز جلبک‌ها در بیشتر مکان‌ها نسبت به دیگر محصولات کشاورزی و دیگر گیاهان آبزی دارای توانایی رشد بوده، همچنین جلبک‌ها قادر به انجام فتوسنتز بوده و انرژی خورشیدی را به انرژی شیمیایی تبدیل می‌کنند (Matat et al., 2010). ریزجلبک‌ها از جمله جلبک‌های سبز به دلیل توانایی شان در جذب انرژی نورانی خورشید (فتوسنتز) و کاربردشان به عنوان موجودات پرمحصول در مراحل کشت و بهره برداری تولید محصول در ابعاد صنعتی و بازدهی اقتصادی به‌عنوان ارگانیسم‌های خاص و با ارزشی‌اند که در قرن بیست و یکم توجه بسیار زیادی به آنها شده است. اگرچه در گذشته بیشتر به فرآیند کشت و پرورش این موجودات و شناسایی گونه‌هایشان پرداخته می‌شد ولی در حال حاضر بیشتر با هدف افزایش بهره وری و تولید محصول با استفاده از مهندسی ژنتیک و فنآوری زیستی مد نظر هستند (Sivakumar, 2012; Mutanda et al., 2013).

ریز جلبک‌ها دارای توانایی لازم برای تولید میزان زیادی لیپید بوده که می تواند برای تولید بیودیزل و یا بیواتانول مورد استفاده قرار گیرد (Dean and Pittman, 2010). در حال حاضر بیودیزل با (۱۰-۲ درصد) با روغن خام بدون نیاز به هرگونه تغییرات در موتورهای موجود تا زمانی که اختلافی در فشار بخار، گرانروی، چگالی، عدد اکتان/متان نباشد استفاده

Archive of SID

www.SID.ir

می‌شود. بررسی‌ها نشان داده است که با توجه به نیاز رو به رشد بشر به منابع انرژی، این نوع سوخت‌ها می‌توانند جایگزین مناسب و با ارزشی برای سوخت‌های فسیلی باشند (Oncel, 2013; Chen et al., 2009). در زمینه بررسی توانایی جلبک‌های سبز برای تولید بیودیزل تحقیقات وسیعی در دنیا در حال انجام می باشد. بهینه سازی شرایط رشد جلبک‌های سبز پیچیده بوده و به عوامل مختلفی مرتبط می‌باشد که هر کدام می‌توانند بازدارنده یا تحریک کننده باشند که از آن جمله می‌توان به مواد غذایی، دما، هوادهی، تغییرات گازی، میزان تابش نور، شوری و تراکم سلولی اشاره کرد (Gardner et al., 2011). جنس‌های مربوط به جلبک‌های سبز مورد مطالعه در این پژوهش عبارتند از: *سندسموس*، *کلرلا*، *کلامیدوموناس* و *تتراسلمیس*.

در بین ریزجلبک‌ها جنس‌های *سندسموس* و *کلرلا* خصوصیات بسیار مناسبی را دارا هستند و کاندیداهای مناسبی برای بیودیزل هستند (Unpaprom et al., 2015).

ایران کشوری دارای ذخایر منابع طبیعی مانند نفت خام و گاز طبیعی می‌باشد. با این حال، استفاده از این منابع طبیعی محدود بوده و مهم تر از آن، سوخت مایع تجدیدپذیری مورد نیاز است که در نهایت جایگزین سوخت حمل و نقل حاصل از نفت گردد. از سوی دیگر، منابع انرژی تجدیدپذیر در ایران هنوز به‌طور موثری استفاده نشده و در صورت استفاده می‌توان برای سوخت وسایل نقلیه، تولید برق و غیره به کار برد. اگر آب به میزان کافی وجود داشته باشد، یک سوم از مساحت کل ایران را می توان برای تولید محصولات کشاورزی کشت نمود. با این حال، تنها ۱۲ درصد از مساحت کل زمین‌ها برای کاشت محصولات کشاورزی استفاده می‌گردد. بنابراین، با وجود نیاز روز افزون به مواد غذایی، نیاز به کشت محصولات برای تولید انرژی اجتناب ناپذیر است (Najafi et al., 2009). به نظر می‌رسد برای غلبه بر این چالش دو گزینه پیش رو باشد، ابتدا مدیریت باقیمانده‌های محصولات کشاورزی و تولید انرژی از این مواد (مانند اتانول زیستی، بیوگاز، و غیره) که سهم بزرگی از ذخیره منابع انرژی در ایران خواهد داشت. گزینه دوم سرمایه‌گذاری در کاشت گیاهان غیر خوراکی مانند Jatropha و همچنین جلبک‌ها و سیانوباکتری‌ها برای تولید سوخت بیو دیزل می‌باشد. Jatropha، شیری، ساقه‌دار، درختچه چند ساله، غنی از دانه‌های روغن بوده که به راحتی قابل تبدیل به بیو دیزل می‌باشند بسیاری از جنس‌ها و گونه‌های جلبک‌های سبز به‌طور چشم‌گیری غنی از روغن بوده و می‌توانند با استفاده از تکنولوژی‌های موجود به بیودیزل تبدیل شوند (Foidl et al., 1996).

هدف از این مطالعه نیز بررسی برخی از جنس‌های جلیک‌های سبز در راستای تولید بیودیزل می‌باشد که تحت تاثیر برخی تنش‌های محیطی میزان این سوخت افزایش می‌یابد.

مواد و روش‌ها

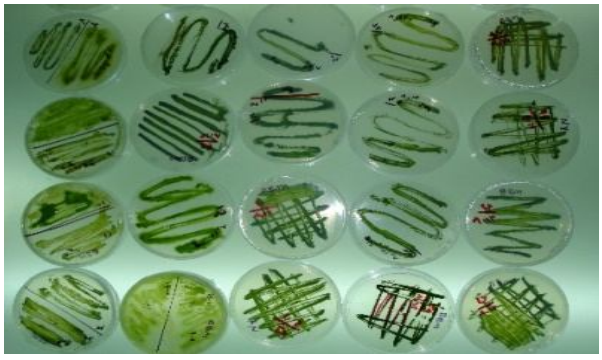
تهیه نمونه: در اکثر کشورهای پیشرفته بانک‌های مختص جلبک‌ها وجود دارد. بنابراین تهیه جلبک‌های مورد نیاز از این طریق تسهیل می‌گردد. ولی به‌دلیل عدم دست‌یابی مستقیم به جنس‌ها یا گونه‌های جلبکی بومی، برای تهیه کلنی خالص از یک گونه خاص شخصا به جمع‌آوری و تخلیص گونه مورد نظر از سواحل دریاچه خزر نمودم.

خالص‌سازی: هنگام بررسی بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی، مولکولی و مورفولوژیک کشت‌های خالص مورد نیاز می‌باشد، تهیه این گونه کشت‌ها تا حدی دشوار است و نیاز به توجه و تکرار عمل می‌باشد (Kaushik, 1987). برای جداسازی جلبک‌ها

Archive of SID

www.SID.ir

از روش پلیت آگاراستفاده شد (Belcher and Swale, 1989).



شکل ۱: جداسازی جلبک‌های سبز مورد مطالعه به روش پلیت آگار

انتقال به محیط کشت جامد و مایع: در این پژوهش برای جداسازی جلبک‌های سبز *Scenedesmus*، hlorella, Tetraselmiss, Chlamydomonas از روش پلیت آگار استفاده گردید و پس از حصول اطمینان از عاری بودن کلنی‌ها از باکتری، کلنی‌ها به درون محیط مایع انتقال یافت. کشت‌ها بطور طبیعی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تحت نور دائمی (۴۰ تا ۶۰) میکرو مول انشتین بر مترمربع بر ثانیه گرماگذاری می‌شدند. در زمان گرماگذاری کشت‌ها در معرض هوادهی به مدت ۸ ساعت در شبانه روز قرار گرفتند (Siegelman et al., 1987). نمونه‌ها در این شرایط نوری کشت داده و جذب آن‌ها در فواصل معین توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۵۰ نانومتر خوانده می‌شد تا قبل از انتقال به محیط‌های رشد به حد مطلوب برسد. پس از کشت جلبک‌ها و خواندن جذب آنها در روزهای مشخص، سنجش‌های مورفولوژیکی، میزان نرخ رشد، وزن خشک، رنگیزه کلروفیل و کاروتنوئید، محتوای لیپید کل و پروفایل اسید چرب آن‌ها اندازه گیری شد.

سنجش‌های مورفولوژیک: از جلبک‌های سبز کشت داده شده برای بررسی تغییرات مورفولوژی روزانه عکس‌هایی از ارلن‌های مایع و پلیت‌ها تهیه گردید. جهت شناسایی و سنجش‌های بیو متریک، عکس‌هایی با میکروسکوپ نوری و الکترونی SEM گرفته شد.

عکسبرداری: برای مطالعه مورفولوژی سلول‌ها از یک میکروسکوپ نوری دوربین دار Olympus CX 40 و برای آنالیز تصاویر از نرم‌افزار Olympus Dp Soft version 4.0 software استفاده شد. عکسبرداری با میکروسکوپ فلورسانس نیز انجام گرفت.

تهیه عکس‌های میکروسکوپ الکترونی SEM: برای تهیه عکس با استفاده از میکروسکوپ الکترونی (SEM)، مقدار ۱/۵ میلی‌لیتر از نمونه‌ها به‌مدت ۴ ساعت در ۱ میلی‌لیتر گلوتارآلدهید ۳٪ فیکس شدند و در ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات (PBS) در طی سه مرتبه شستشو داده شدند. سپس نمونه‌ها سانتریفوژ شده و در غلظت‌های متوالی الکل (۱۰، ۳۰، ۵۰، ۷۰، ۹۰ و ۱۰۰ درصد) آبگیری شدند. در نهایت، تمام نمونه‌ها بر روی قطعات فلزی گذاشته شده و با لایه‌ای از طلا پوشش داده شدند (Diestra et al., 2007).

Archive of SID

www.SID.ir

شکل ۳-۸: تهیه عکس میکروسکوپ الکترونی SEM

سنجش‌های فیزیولوژیک

اندازه‌گیری وزن خشک: در این پژوهش بررسی میزان رشد جلبک‌های سبز از طریق اندازه‌گیری وزن خشک مطابق روش Leganes و همکاران (۱۹۸۷) انجام شد. استخراج لیپید با استفاده از روش (Bligh and Dyer, 1995) انجام گرفت. به ۱۰۰ میلی‌گرم از بیومس خشک شده هر یک از نمونه‌ها ۶ میلی‌لیتر محلول کلروفرم – متانول به نسبت ۱:۲ افزوده گردید. پس از ورتکس و مخلوط شدن کامل تخریب سلولی از طریق سونیکاسیون به مدت ۳۰ ثانیه با شدت بالا انجام گرفت. در ادامه نمونه‌ها به‌مدت ۱ ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس ۲ میلی‌لیتر کلروفرم و ۳/۶ میلی‌لیتر محلول ابی کلرید سدیم ۱ درصد به نمونه‌ها افزوده شد. به گونه‌ای که نسبت کلروفرم- متانول – آب در محلول نهایی ۱: ۱: ۰/۹ گردید. در ادامه پس از ورتکس و یکنواخت کردن محلول جهت جداسازی فاز آلی محتوای لیپید از فاز ابی به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰rpm سانتریفیوز انجام شد. پس از سانتریفیوژ محلول دو فازی گردید. فاز آلی پائینی با کمک سرنگ خارج شد و درون ویال تمیز وزن شده از قبل ریخته شد. ویال‌ها در آون خشک و بار دیگر وزن شدند. محتوای لیپید اندازه‌گیری شده به‌صورت میلی‌گرم لیپید تولید شده از ۱۰۰ میلی‌گرم توده خشک بر اساس درصد گزارش شد.

سنجش میزان کلروفیل: برای سنجش میزان کلروفیل از روش Marker (۱۹۷۲) استفاده شد. بدین‌ترتیب که ابتدا ۱ میلی‌لیتراز سوسپانسیون جلبکی به‌مدت ۵ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰ rpmسانتریفیوژ شد، سپس محلول رویی جدا شده و با ۱ میلی‌لیتر متانول خالص جایگزین شد. نمونه‌ها به مدت یک روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. به‌منظور جداسازی عصاره‌ی متانولی از سانتریفیوژ استفاده شد. سپس جذب نوری این عصاره در طول موج ۶۶۵ nm اندازه‌گیری شد و با استفاده از رابطه‌ی زیر مقدار کلروفیل بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد:

$$Chl=13.14\times OD\ 665$$

سنجش میزان کاروتنوئیدها: برای اندازه‌گیری میزان کاروتنوئیدها نیز از روش (Chamovits et al., 1993) استفاده شد. بدین‌منظور از یک میلی‌لیتر سوسپانسیون جلبکی که کاملاً با پوترهموژن شد، استفاده گردید. سوسپانسیون یاد شده ۱۰ دقیقه با حداکثر سرعت سانتریفیوژ و بخش رویی آن خارج شد. یک میلی‌لیتر استن ۸۰ درصد پلیت باقی‌مانده اضافه شد و با شدت بالا ورتکس شد. نمونه‌ها ۵ دقیقه با حداکثر سرعت سانتریفیوژ شدند و طیف جذبی بخش رویی با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۴۶۱ و ۶۶۵ نانومتر در مقابل شاهد استن ۸۰ درصد ثبت شد. غلظت کاروتنوئیدها با استفاده از فرمول زیر برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد.

$$Car=[OD_{461}-(0.046\times OD_{665})]\times 4$$

Archive of SID

www.SID.ir

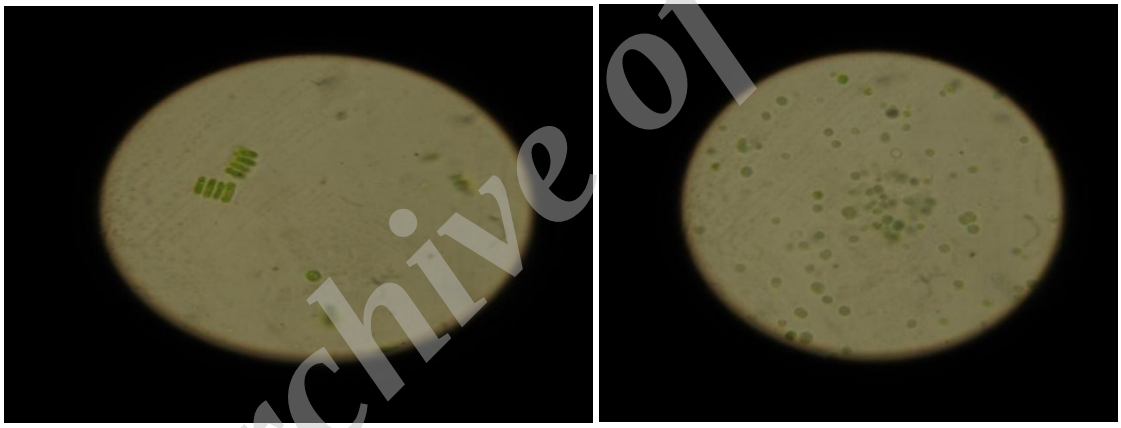
گاز کروماتوگرافی: به‌منظور بررسی پروفایل اسید چرب، ۰/۰۲۵ گرم ماده خشک را داخل ویال ۲ میلی‌لیتر ریخته و به آن ۵۰۰ میکرولیتر از محلول متانول اسیدی اضافه شد. سپس در ویال‌ها را با پارافیلم به دقت پوشانده تا از تبخیر متانول جلوگیری گردد. ویال‌ها به‌مدت ۲۰ ثانیه ورتکس شد، به‌مدت ۲ ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد و دور ۷۵۰ rpm داخل ترموسیکلر و سپس ۵ دقیقه در دمای اتاق سرد شد. در مرحله بعد ۳۰۰ میکرولیتر از محلول سدیم کلراید ٪ ۰/۹ و ۱۵۰ میکرولیتر هگزان اضافه و به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس شدند. ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد دور ۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ کرده تا دو فاز تشکیل گردد. از فاز رویی هگزان یک میکرولیتر به دستگاه گاز کروماتوگرافی تزریق شد (Lu et al., 2011) و با استفاده از روش (Pittman et al., 2010) میزان کل اسیدهای چرب محاسبه شد. نرخ رشد جلبک‌های سبز بر اساس فرمول زیر محاسبه شد.

$$\mu = (Ln_{(dw\,10^{th})} - Ln_{(dw\,8^{th})}) / t_2 - t_1$$

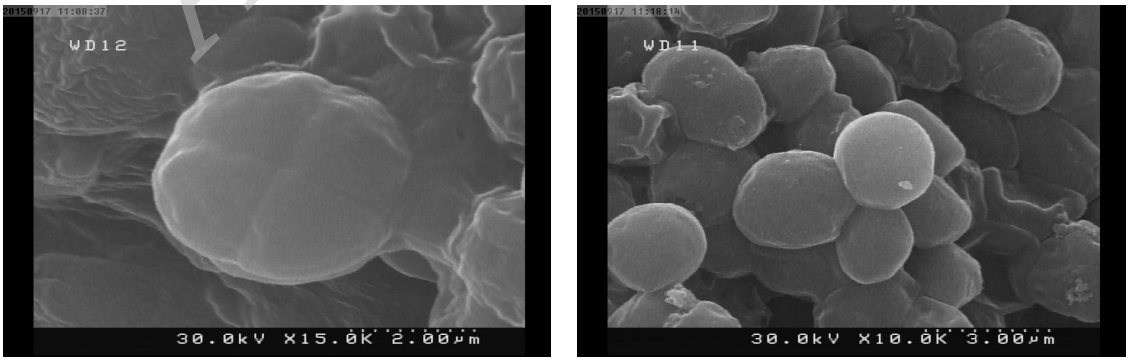
به منظور انجام آنالیزهای آماری از نرم‌افزار SPSS Ver 22 و Excel 2010 و طرح آماری Tukey HSD و از تست‌های Oneway ANOVA با چهار تکرار استفاده گردید.

نتایج

بررسی نتایج مورفولوژی



شکل ۲: عکس‌های گرفته شده با میکروسکوپ نوری در دوجنس *کلرلا* در سمت *راست* و *سندسموس* در سمت چپ



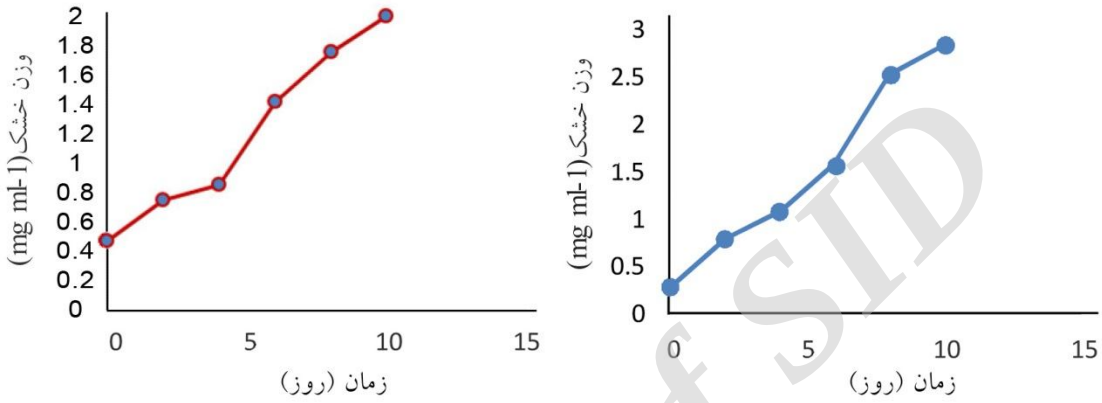
شکل ۳: عکس‌های گرفته شده با میکروسکوپ الکترونی دردو جنس *کلرلا* در سمت *راست* و *سندسموس* درسمت چپ

Archive of SID

www.SID.ir

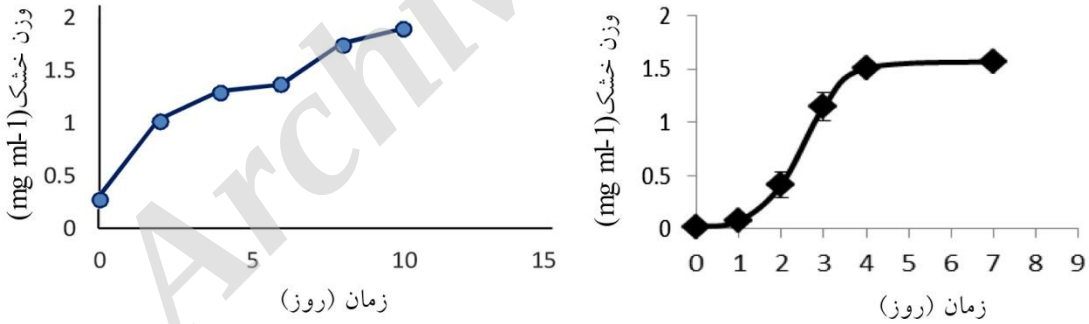
بررسی نتایج فیزیولوژیک

خالص‌سازی و کشت جلبک‌های سبز: مراحل متعدد خالص‌سازی با استفاده از روش پلیت آگار انجام شد. پس از ۲ تا ۳ هفته نگهداری از پلیت‌ها در اتاق کشت، تحت تابش دائمی نور، جلبک‌های سبز به میزان کافی رشد یافتند. به منظور یافتن برترین جلبک سبز به‌عنوان کاندیدای بیودیزل، سرعت رشد جلبک‌های سبز به صورت روزانه بررسی شد. این مقایسه بر اساس وزن خشک نمونه‌ها محاسبه گردید و سپس منحنی رشد هریک از آن‌ها بر اساس وزن خشک آن‌ها رسم شد.



شکل ٤: منحنی رشد *کلرلا* و *سندسموس* در مدت ۱۵ روز در شرایط دمای اتاق در محیط کشت BBM و N8 به‌ترتیب از چپ به راست

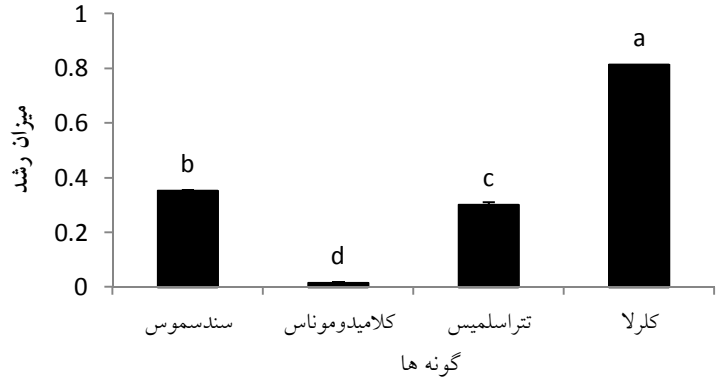
BBM: Bold's Basal Medium



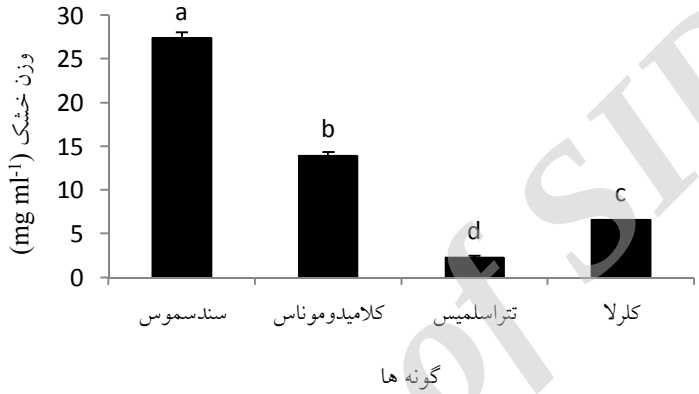
شکل ٥: منحنی رشد تتراسلمیس و *کلامیدوموناس* در مدت ۱۵ روز در شرایط دمای اتاق در محیط کشت BBM و N8 به‌ترتیب از چپ به راست

BBM: Bold's Basal Medium

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ٦: وزن خشک جلبک‌های سبز در مدت ۱۵ روز در شرایط دمای اتاق در محیط کشت BBM



شکل ۷: نمودار رشد جلبک‌های سبز در مدت ۱۵ روز در شرایط دمای اتاق در محیط کشت BBM

بررسی نمودار رشدی این جلبک‌های سبز نشان داد که رشد آنها به استثناء *کلامیدوموناس* به صورت لگاریتمی بوده و بیشترین رشد آنها در روزهای دهم تا پانزدهم اتفاق افتاده و بعد از آن رشد ریزجلبک به‌دلیل کاهش مواد مغذی و همچنین بالارفتن غلظت محیط کشت و عدم نفوذ نور در آن کند شده و در روزهای پانزدهم به بعد شیب خط تقریباً افقی شده است. با توجه به شکل ۷ جنس *Scenedesmus* و *Chlorella* بالاترین میزان رشد را نشان دادند. بیشترین میزان تولید زیست توده *Scenedesmus* به میزان ۱/۸۶۳ میلی‌لیتر بر میلی‌گرم در روز ۱۵ به‌دست آمد. در حالی که زیست توده جلبک سبز *Chlorella* در روز ۱۵ به میزان۱/۸۳۶ و *Tetraselmis* و *Chlamydomonas* در روز ۱۵ به‌ترتیب ۱/۸۴۵ و ۱/۵۷۲ محاسبه شد.

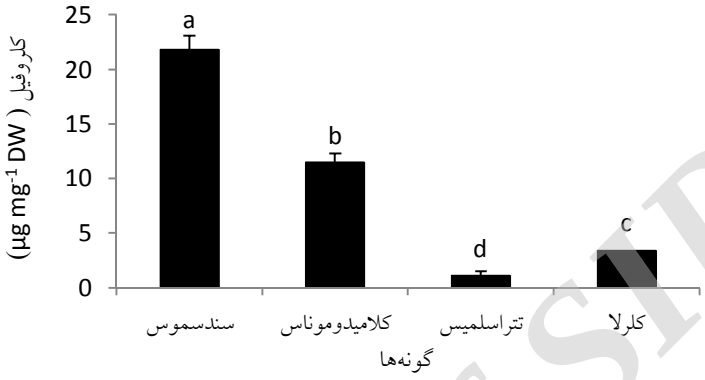
جدول ۱: کینتیک رشد، نرخ رشد و لیپید کل در جنس‌های متفاوت جلبک سبز

انواع جلبک‌های سبز	لیپید کل (%dw)	نرخ رشد	میزان رشد اختصاصی (d^{-1})
Scenedesmus	۲/۱۰۸	۰/۳۵۸۲	۱/۸۶۳
Chlorella	۰/۲۳۵	۲/۹۱۷۱	۲/۸۳۶
Tetraselmis	۰/۲۱۵	۰/۳۲	۱/۸۴۵
Chlamydomonas	۱/۳۴۵	۰/۱۷۸	۱/۵۷۲

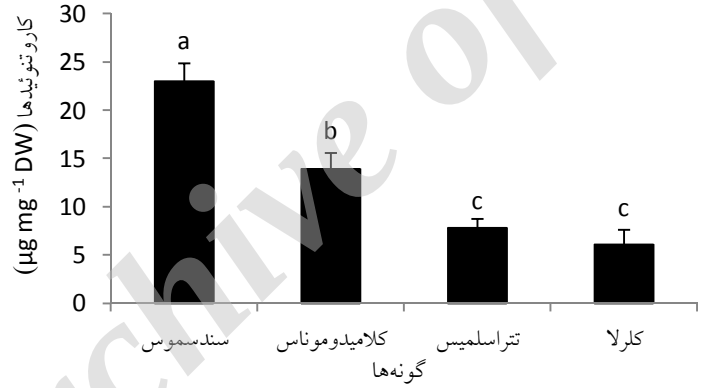
Archive of SID

www.SID.ir

بیشترین نرخ رشد و کمترین زمان تقسیم در جلبک سبز *Chlorella* محاسبه شد. یافته‌های ما نشان داد که زمان دو برابر شدن بالا متناسب با نرخ رشد کم است. کمترین میزان رشد نیز به *Chlamydomonas* اختصاص یافت. همچنین نتایج حاکی از آن است که بیشترین میزان لیپید کل مربوط به جلبک *Scenedesmus* و کمترین میزان لیپید کل نیز مربوط به جلبک سبز *Tetraselmis* بود. غلظت رنگدانه‌های فتوسنتزی در چهار گونه مختلف از جلبک‌های سبز در فاز صعودی رشد اندازه‌گیری شد.



شکل ۸: منحنی مقادیر کلروفیل *a* جلبک‌های سبز مورد مطالعه

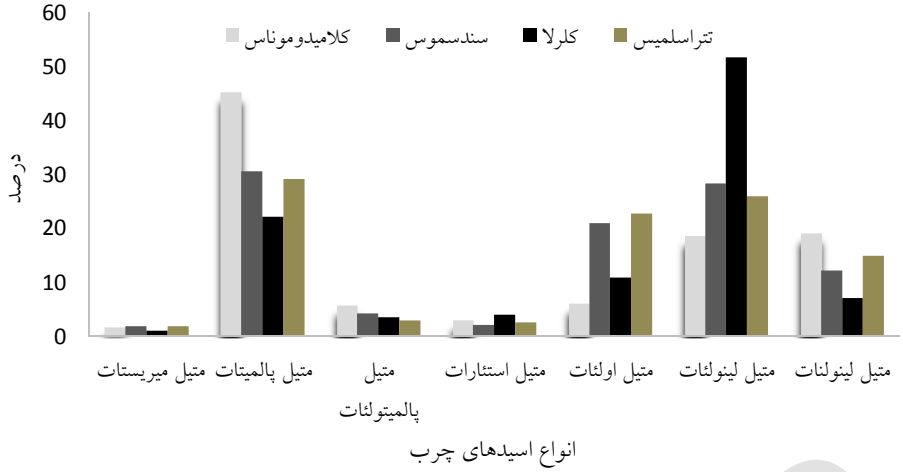


شکل ۹: منحنی مقادیر کاروتنوئید جلبک‌های سبز مورد مطالعه

بیشترین مقدار کلروفیل، متعلق به جنس *Scenedesmus* و کمترین میزان کلروفیل متعلق به جنس *Tetraselmis* بود. بر اساس نتایج آنالیز آماری، اختلاف در میزان کلروفیل در جلبک‌های مختلف معنی‌دار بوده است ($P<0.05$). بالاترین غلظت کاروتنوئیدها در *Scenedesmus* و کمترین غلظت کاروتنوئیدها در جنس *Chlorella* مشخص شد. با توجه به نتایج آنالیز آماری بین مقادیر کاروتنوئیدها در جلبک‌های سبز اختلاف معنی‌داری مشاهده شده است ($P<0.05$).

Archive of SID

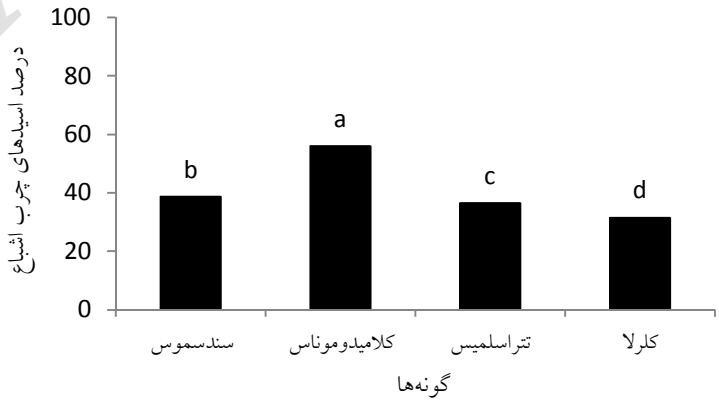
www.SID.ir



شکل ۱۰: پروفایل اسیدهای چرب (درصد) در۴ گونه جلبک سبز

پروفایل اسیدهای چرب جلبک‌های سبز در شکل ۱۰ نشان داده شده است. اسید لینولئیک، اسید چرب غیر اشباع غالب در بسیاری از عصاره‌های چربی جلبک‌های سبز بود. بیشترین درصد مربوط به *Chlamydomonas* حدود ۵۱/۶۳ درصد و کمترین درصد مربوط به *Chlorella* حدود ۱۷/۶۷ به‌دست آمد. بیشترین میزان اسیدهای چرب اشباع شامل میرستیک اسید، پالمتیک اسید و استئاریک اسید در جلبک سبز *Scenedesmu sp.* مشاهده شد.

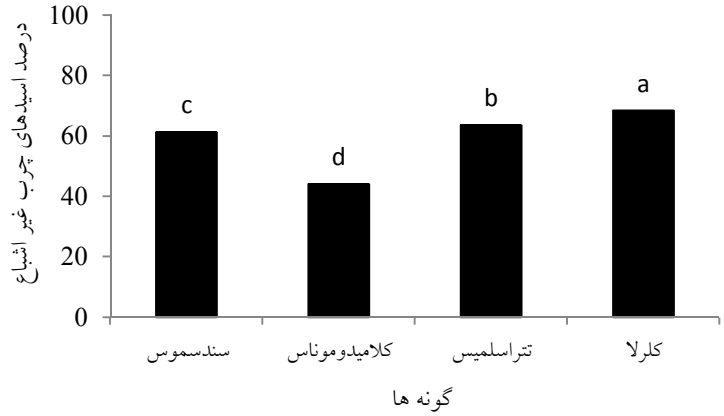
شکل ۱۱: درصد اسیدهای چرب اشباع در زیست توده خشک جلبک های سبز



شکل ۱۲: میزان لیپید کل در زیست توده خشک جلبک‌های سبز

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱۳: درصد اسیدهای چرب غیراشباع با یک و یا بیش از چند پیوند دوگانه در زیست توده خشک جلبک‌های سبز

انتخاب جلبک بهینه: پس از اندازه‌گیری‌های پارامترهای گفته شده در بالا، به‌منظور یافتن جلبک بهینه در زمینه تولید بیودیزل، میزان بهره‌وری چربی برای هریک از جنس‌های گفته شده از طریق رابطه زیر محاسبه شد:

میزان بهره‌وری چربی × میزان لیپید = نرخ رشد

با استفاده از رابطه مربوطه که در بالا گفته شد، جلبک سبز *سندسموس* به دلیل میزان بهره‌وری بیشتر به عنوان جنس بهینه در زمینه تولید بیودیزل انتخاب شد. با توجه به نتایج به‌دست آمده و محاسبه میزان بهره‌وری لیپید که شاخص مهمی جهت ارزیابی و انتخاب جنس کاندیدای بیودیزل می باشد، جنس *Scenedesmus* sp. ISC 94 با ۱/۴۴ درصد و بیشترین میزان بهره‌وری لیپید، به عنوان جلبک کاندیدای بیودیزل انتخاب شد.

بحث

با توجه به محدودیت منابع انرژی فسیلی، اثرات نامطلوب مصرف آنها بر محیط زیست و تهدید آینده صادرات مواد نفتی استفاده ازانرژی‌های تجدیدپذیر اهمیت دارد. سوخت‌های با منشاء مواد آلی از جمله بیودیزل به دلایلی از جمله شباهت به سوخت رایج، به‌عنوان سوخت جایگزین در موتورهای دیزلی مطرح می‌باشند. در سال‌های اخیر تحقیقات گسترده‌ای در جهت یافتن منبع مناسب تولید سوخت‌های زیستی از جمله بیودیزل انجام گرفته است. دو پارامتر بسیار مهم در مطالعه جلبک‌های سبز برای تعیین کاندید مناسب برای تولید سوخت‌های زیستی، نرخ رشد و درصد روغن (%dwt) می‌باشد (Griffith and Harrison., 2009). با این حال، رشد سریع به ندرت با بهره‌وری چربی بالا همراه است. حتی زمانی که محتوای چربی جلبک بالا است، نرخ رشد پایین و یا اندازه کوچک سلول، موجب کاهش بهره‌وری زیست توده می‌گردد (Rodolfi et al., 2009). بنابراین، تنها زمانی که بهره‌وری چربی مناسب باشد، عملکرد زیست توده به عنوان یک معیار مناسب برای تولید بیودیزل در نظرگرفته می‌شود (Griffith and Harrison., 2009). به همین دلیل، برای تصمیم‌گیری در انتخاب گونه برای تولید سوخت زیستی، بهره‌وری حجمی و کیفیت ترکیب چربی باید به عنوان پارامترهای مهم در نظر گرفته شوند (Huerlimann et

Archive of SID

www.SID.ir

al., 2010) ریز جلبک *Scenedesmus* sp. بهره‌وری زیست توده ۲۲۰ میلی‌گرم بر لیتر در روز و محتوای چربی ۹/۵ درصد وزنی داشت (Rodolfi et al., 2009). بهره‌وری زیست توده جلبک سبز *Scenedesmus obliquus* ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر در روز و محتوای چربی ۱۲/۷ درصد وزنی بود (Mallick, Mandal 2009). با این حال، محققان دیگر نشان دادند که محتوای چربی انباشته شده توسط جلبک‌های سبز بسته به نوع گونه و شرایط محیطی، از جمله مواد مغذی و شدت نور می‌تواند بین ۴۵-۳۸ درصد وزنی متفاوت باشد (Gunstone et al., 2007). در این تحقیق نیز، بهره‌وری زیست توده جلبک سبز *Scenedesmus* sp. بالاترین میزان بهره‌وری لیپید را در بین سایر گونه‌های جلبک سبز نشان داد. تحقیقات نشان دادند که گونه‌های محتوی چربی کمتر رشد سریع‌تری نسبت به سایر گونه‌ها دارند (Briggs, Vasudevan and 2008). علاوه بر بهره‌وری چربی مطلوب، اسیدچرب گونه‌های انتخاب شده باید به گونه‌ای باشد تا خواص فیزیکی و شیمیایی مورد نیاز برای تولید بیودیزل را فراهم نماید. در پژوهش Torkiyan و همکاران (۱۳۹۰) اسیدهای چرب لینولئیک اسید، پالمتیک اسید، لینولنیک اسید و اولئیک اسید به‌ترتیب با ۴۷/۳۳، ۲۰/۵، ۱۹ و ۷/۱ درصد بیشترین سهم در بیودیزل تولیدی از *Chorella vulgaris* را داشتند. *Synechococcus* sp. PCC7942، ۲۹/۶ درصد اسیدهای چرب اشباع و ۶۹/۴ درصد اسیدهای چرب غیر اشباع نشان داد. اسیدهای اولئیک ۳۱/۵ درصد، لینولئیک ۳۰/۹ درصد و پالمتیک ۲۳/۵ درصد بودند. در زیست توده *Chlorella* sp. CENA170 میزان اسیدهای چرب اشباع ۳۳ درصد (پالمتیک ۱۵/۴ درصد و لوریک ۸/۷ درصد) و اسیدهای چرب غیراشباع ۶۵/۷ درصد (از جمله لینولئیک ۲۹/۴ درصد و اولئیک ۲۸/۸ درصد) به‌دست آمد. این نتایج، مطالعات گذشته در رابطه با توانایی سیانو باکتری‌ها و جلبک‌های سبز را در سنتز اسیدهای چرب ساده تر نسبت به ریزجلبک‌های یوکاریوتی تأیید می‌کند (Gunstone et al., 2007). اکثر جلبک‌های سبز مطالعه شده مقادیر بالایی از اسیدهای چرب مانند پالمتیک اسید (C16:0 – اسیدچرب اشباع)، اولئیک اسید (C18: 1 – غیراشباع با یک پیوند دوگانه) و لینولئیک اسید (C18:2– غیراشباع با دو پیوند دوگانه) را دارا هستند. گونه جلبک سبز مورد بررسی در این مطالعه نیز مشخصات اسیدهای چرب اشباع و غیر اشباع شبیه به دانه‌های روغنی که با موفقیت به عنوان مواد خام چربی برای سنتز بیودیزل استفاده می شوند، را نشان داد (Da Ros et al., 2013) سوخت‌ها عمدتاً از اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع با یک پیوند دوگانه تشکیل شده‌اند. نسبت بالای اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع با یک پیوند دوگانه در روغن جلبک‌های سبز از جمله گونه *کلرلا*، ممکن است مشکلات کمتری با پلیمریزاسیون سوخت در حین احتراق ایجاد کند (Canakci and Sanli, 2008). نتایج مدل سازی نشان داد که اسیدهای چرب اشباع با زنجیره هیدروکربنی کوتاه، یعنی استئارات و پالمتیک اسید تاثیر بیشتری بر تولید توان موتور نسبت به اسیدهای چرب غیراشباع با زنجیره هیدروکربنی بلند، یعنی لینولنات و لینولئات (Kenyon et al.,1972). همچنین، نتایج نشان داد که با افزایش مقدار اسیدهای چرب غیر اشباع دارای سه پیوند دوگانه به مقدار زیادی توان موتور کاهش می‌یابد. اسید چرب گونه‌های جلبک سبز تحت شرایط مختلف رشد تغییر می‌یابند. گونه‌های تک سلولی انتخاب مناسب برای

Archive of SID

www.SID.ir

تولید بیودیزل با کیفیت بالا هستند چرا که آن‌ها به میزان زیادی حاوی اسیدهای چرب با یک پیوند دو گانه می‌باشند (Kenyon et al., 1972). نتایج ما نیز یافته‌های قبلی را تایید می‌کند. در برخی از تحقیقات بین محتوای چربی و تولید زیست‌توده همبستگی معکوس گزارش شده است. یکی از دلایل آن می‌تواند هزینه بالای سوخت و ساز بیوسنتز چربی باشد (Rodolfi et al., 2009). با این حال، بر اساس نتایج غربال‌گری در این مطالعه، چنین نتیجه‌ای تایید نمی‌شود. در زمینه بررسی توانایی جلبک‌های سبز برای تولید بیودیزل تحقیقات وسیعی در دنیا در حال انجام می‌باشد. بهینه سازی در بسیاری از گونه‌های جلبکی مورد بررسی، افزایش تری آسیل‌گلیسرول‌ها اغلب در طی فاز سکون مشاهده می‌گردد (Lu et al., 2006) به عنوان مثال، در *Parietochloris incise* میزان تری آسیل‌گلیسرول‌ها را از ۴۳ درصد (کل اسیدهای چرب) در فاز لگاریتمی به ۷۷ درصد در فاز سکون، و در دینوفلاژل دریایی .*Gymnodinium* sp، نسبت تری آسیل گلیسرول‌ها از ۸ درصد در فاز رشد لگاریتمی به ۳۰ درصد در طول فاز سکون افزایش داد. افزایش هم‌زمان در میزان نسبی اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع با یک پیوند دو گانه (C16:0) و (C18:1) و کاهش در نسبت اسیدهای چرب با بیش از یک پیوند دوگانه در چربی کل نیز با تغییر مرحله رشد از فاز لگاریتمی به فاز ثابت همراه است (Bigogno et al., 2002).

ترکیبات اسید چرب در سه گونه فوق و تعیین لیپیدها در همه ریز جلبک‌ها بیان کننده حضور (۸۰٪-۶۳) اسیدهای غیر چرب اشباع و (۳۰٪-۱۹/۵) اسید چرب غیر اشباع بوده که اسید پالمیتیک (C16:0) فرم غالب اسید چرب اشباع در بین سایر اسیدها می‌باشد. در بین اسیدهای چرب غیر اشباع (PUFA) نیز اسید لینولنیک (C۱۸:۳) و اولئیک اسید (C۱۸:۱ ٪۱۷/۵) بالاترین میزان را از خود نشان داد. به‌طورکلی Kiaei و همکاران (۱۳۹۳) نشان دادند که نسبت اسید چرب اشباع و غیر اشباع در ریز جلبک‌ها به عنوان کاندیدای بیودیزل بسیار مهم است. اسیدهای چرب (FA) و پروفایل آن‌ها بوسیله GC آنالیز شد. نتایج انالیز مربوط به FA در *Scenedesmus Abundans* نشان داد که این جلبک شامل اسیدهای چرب با زنجیره کربن بلند نظیر C16 و C18 می باشد که عبارتند از: اولئات (C۱۸:۱)، پالمیتات (C16:0)، لینولنات (C18:3)، لینولئات (C18:2)، پالمیتولئات (C16:1) و استئارات (C18:0) می‌باشد (Unpaprom et al., 2015). خصوصیات بیودیزل به شدت به مقدار زیادی تحت تاثیر پرو فایل اسید چرب جلبک می باشد (Unpaprom et al., 2015). نتایج GC-mass نشان داد که پالمیتیک اسید بیشترین میزان (۳۵٪) را در جلبک *سندسموس* در مقایسه با *تتراسلمیس و کلامیدوموناس* (۳۳/۳٪) و *کلرلا* (۳۱/۷٪) نشان داد. نتایج فوق حاکی از اهمیت ترکیبات اسید چرب نظیر پالمیتیک اسید در *سندسموس* است که نتایج قبلی نیز موید این مطالب می باشد (Girisha et al., 2014).

نتیجه‌گیری نهایی

جلبک‌های سبزدر جهت تولید انرژی تجدیدپذیر مورد استفاده قرار می گیرد. در این پژوهش گونه‌های متفاوت ریزجلبک‌ها مورد مطالعه قرار گرفتند که در بین آن‌ها *Scenedesmus* sp. 94 دارای خصوصیات بیولوژیکی قابل توجهی است که بسیار مورد توجه قرار گرفته است و در مقابل گونه‌های دیگر جلبک‌های سبز میزان چربی بیشتری تولید کرد. کشت

Archive of SID

www.SID.ir

بسیاری از جنس‌ها و گونه‌های جلبک‌های‌سبز را می توان با استفاده از فناوری‌های موجود برای تولید بیودیزل از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نمود. به غیر از بیودیزل، جلبک‌های سبز می‌توانند به عنوان یک منبع با ارزش برای تولید انواع مختلف از سوخت‌های زیستی تجدیدپذیر مانند اتانول زیستی، متان و بیوهیدروژن به‌کار گرفته شوند.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله، از همکاران در پژوهشکده جهاد دانشگاهی دانشگاه شهید بهشتی و معاونت پژوهشی فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات که در انجام این پروژه ما را یاری کردند، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

Bigogno, C., Khozin-Goldberg, I., Boussiba, S., Vonshak, A. and Cohen, Z. (2002). Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous alga Parietochloris incisa, the richest plant source of arachidonic acid. Phytochemistry, 60 (5):497–503.

Canakci, M. and Sanli, H. (2008). Biodiesel production from various feedstocks and their effects on the fuel properties. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 35(5):431-441.

Chen, W., Zhang, C., Song, L., Sommerfeld, M. and Hu, Q., (2009). A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. Journal Microbiology Method, 77(1):41–47.

Da Ros, P.C. M., Silva, C.S. P., Silva-Stenico, M.E., Fiore, M.F. and De Castro, H.F. (2013). Assessment of Chemical and Physico-Chemical Properties of cyanobacterial lipids for Biodiesel Production. Marine Drugs. 11(7):2365-2381.

Damiani M.C. (2010). Popovich CA., Constenla., Leonardi PI lipid analysis in *Haematococcus pluvialis* to assess its potential use as a biodiesel feedstock. Bioresource Technology. 101: 3801–7.

Damiani, M.C., Popovich, C.A., Constenla, D., Martínez, A.M., Doria, E., Longoni, P. and Leonardi, P.I. (2014). Triacylglycerol content, productivity and fatty acid profile in *Scenedesmus acutus* PVUW12. Journal of Applied Phycology, 26(3): 1423-1430.

Dean, A.P., Sigee, D.C., Estrada, B., and Pittman, J.K. (2010). Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae. Bioresource technology, 101(12): 4499-4507.

Diestra, E., Esteve, I., Castell, O. and Sole, A. (2007). Ultra structural changes in *Microcoleus chthonoplastes* growing in the presence of crude oil. Applications for ecological studies. Modern Research and Educational Topics in Microscopy, 3: 453-460.

Fenton, O. (2012). Agricultural nutrient surpluses as potential input sources to grow third generation biomass (microalgae): a review. Algal Research, 1(1): 49-56.

Foidl, N., Foidl, G., Sanchez, M., Mittelbach, M. and Hackel, S. (1996). *Jatropha curcas* L. as a source for the production of biofuel in Nicaragua. Bioresource Technology, 58(1):77–82.

Gardner, R., Peters, P., Peyton, B., and Cooksey, K.E. (2011). Medium pH and nitrate concentration effects on accumulation of triacylglycerol in two members of the chlorophyta.Journal of Applied Physiology, *23*(6), 1005-1016.

Ghasemi, Y., Rasoul_Amini, S., Naseri, A. T., Montazeri_Najafabady, N., Mobasher, M.A. and Dabbagh, F. (2012). Microalgae biofuel potentials (Review). Applied Biochemistry and Microbiology, 48(2):126–144.

Girisha, S.T., Krishnappa, R., Venkatachalapathy, G., and Mrunalini, B. R. (2014). Growing of *Chlorella*, *Scenedesmus* and *Botryococcus* in sewage water for biodiesel production. Archives of Applied Science Research, 6(1): 131-138.

Guana, W., Zhao, H., Lu, X., Wang, C., Yang, M., and Bai, F. (2011). Quantitative analysis of fatty-acid-based biofuels produced by wild-type and genetically engineered cyanobacteria bygaschromatography–mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1218(45), 8289-8293. (1): 131-138.

Gunstone, F.D., Harwood, J.L., and Dijkstra, A.J. (2007). The lipid handbook with CD-ROM. CRC press.

Archive of SID

www.SID.ir

Huerlimann, R., de Nys, R. and Heimann, K. (2010). Growth, lipid content, productivity and fatty-acid composition of tropical microalgae for scale-up production. Biotechnology and Bioengineering, 107 (2):245–257.

Kenyon, C.N., Rippka, R. and Stanier, R.Y. (1972). Fatty acid composition and physiological properties of some filamentous blue-green algae. Archives of Microbiology, 83(3):216-236.

Kiaei, E., Soltani, N., Mazaheriasadi., M,Khavari-Nejad, R and Dezfolian., M. (2014). Study on physiological characteristics of different temperature on cyanobacteria as a candidate for biodiesel production. Journal of Iranian plant Ecophysiological Research, 34:185-195.

Leganes, F., Sanchez-Maeso, E. and Fernandez-Valiente, E. (1987). Effect of Indoleacetic Acid on Growth and Dinitrogen Fixation in Cyanobacteria. Plant Cell Physiology, 28(3): 529-533.

Lu, X., Guana, W., Zhao, H., Wanga, C., Yanga, M. and Baia, F. (2011). Quantitative analysis of fatty-acid-based biofuels produced by wild-type and genetically engineered cyanobacteria by gas chromatography–mass spectrometry. Journal of Chromatography, 1218: 8289– 8293.

Lu, Y.J., Zhang, Y.M, Grimes, K.D., Qi, J., Lee, R.E., and Rock, C.O. (2006). Acylphosphates initiate membrane phospholipid synthesis in gram-positive pathogens. Molecular Cell, 23 (5): 765-22.

Mandal, S. and N. Mallick, (2009). Microalga *Scenedesmus* obliquus as a potential source for biodiesel production. Applied. Microbiology. Biotechnology. 84: 281-291.

Fedorov et al., 2005, Kapadan & Kargi, 2006; Matat., martin A and Caetano N. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications (Review). Renewable and Sustainable Energy Reviews 14: 217-232.

Mutanda, T., Ramesh, D., Karthikeyan, S., Kumari, S., Anandraj, A., and Bux, F. (2011). Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. Bioresource Technology, 102(1): 57-70.

Najafi, G., Ghobadian, B., Tavakoli, T. and Yusaf T. (2009). Potential of bioethanol production from agricultural wastes in Iran. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 13(6):1418-1427.

Oncel, S.S. (2013). Microalgae for a macroenergy world. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 26: 241-264.

Pittman, K.J., Estrada, B., Sigee, D.C. and Dean, A.P. (2010). Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae. Bioresource Technology, 101:4499–4507.

Quintana, N., Van der Kooy, F., Van de Rhee, M.D., Voshol, G.P. and Verpoorte, R. (2011). Renewable energy from Cyanobacteria: energy production optimization by metabolic pathway engineering. Applied Microbiology and Biotechnology, 91(3):471–490.

Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G. and Tredici, M.R. (2009). Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. Biotechnology and Bioengineering, 102(1): 100-112.

Sivakumar, G. (2012). Thompson. R and Randol. P. Integrated green algal technology for bioremediation and biofuel. Bioresource Technology. 107: 1-9

Tabatabaeia, M., Tohidfara, M., Salehi Jouzania, G., Safarnejada, MR. and Pazoukib, M. (2011). Biodiesel production from genetically engineered microalgae: Future of bioenergy in Iran. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 15:1918–1927.

Unpaprom, Y., Tipnee, S., and Ramaraj, R. (2015). Biodiesel from green alga *Scenedesmus* acuminatus. International Journal of Sustainable and Green Energy. Special Issue: Renewable Energy Applications in the Agricultural Field and Natural Resource Technology, 4(1-1): 1-6.

Vasudevan, P.T., and Briggs, M. (2008). Biodiesel production-current state of the art and challenges. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 35(5): 421–430.

Violet Makarevičienė, Vaida Andrulevičiūtė, Virginija Skorupskaitė and Jūratė Kasperovičienė. (2011). Cultivation of Microalgae Chlorella sp. and Scenedesmus sp. as a Potential Biofuel Feedstock Environmental Research, Engineering and Management, 3(57): 21–27.

Archive of SID

www.SID.ir

Zhu, L., Wang, Z., Shu, Q., Takala, J., Hiltunen, E., Feng, P., and Yuan, Z. (2013). Nutrient removal and biodiesel production by integration of freshwater algae cultivation with piggery wastewater treatment. Water Research, 47(13): 4294-4302.

Archive of SID

www.SID.ir