



اثر تنش شوری بر رشد و چربی کل و پروفیل اسیدهای چرب ریز جلبک *Dunaliella bardawil* به عنوان کاندید منبع تولید سوخت زیستی

گیلان عطاران فریمان^{۱*}، محمد روزی طلب^۱، حسن زاد عباس شاه‌آبادی^۱، سلیم شریفیان^۲

^۱گروه زیست دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم دریایی و دریانوردی چابهار، چابهار

^۲گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم دریایی و دریانوردی چابهار، چابهار

نوع مقاله:

چکیده

پژوهشی

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۹۳/۰۴/۱۹

اصلاح: ۹۳/۰۸/۲۰

پذیرش: ۹۳/۰۸/۲۴

کلمات کلیدی:

اسید چرب

زیست‌توده

سوخت زیستی

چابهار

جلبک‌های تک‌سلولی به عنوان منبعی سرشار از اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع، رنگ‌دانه‌ها و متابولیت‌های دارویی و غذایی، اخیراً بسیار مورد توجه محققان قرار گرفته‌اند. میزان و ترکیب اسید چرب تولیدشده توسط ریز جلبک‌ها به مقدار زیست‌توده تولیدی و عوامل محیطی مانند تغییرات شوری، نور و میزان دسترسی به مواد مغذی بستگی دارد. در این مطالعه ریز جلبک سبز *Dunaliella bardawil* جداسازی شده از خلیج چابهار در محیط کشت Conway و تحت شوری‌های مختلف (۳۵، ۷۰ و ۱۰۵ گرم بر لیتر) کشت داده شد. کلیه تیمارها در دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی با پمپ هوادهی شدند. اثر شورهای مختلف بر میزان رشد، تولید چربی و پروفیل اسید چرب زیست‌توده جلبکی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که بیشترین میزان زیست‌توده و چربی تولیدشده در هر لیتر در شوری ۷۰ ppt حاصل شد که به ترتیب ۹۳۳ و ۲۰۶ میلی‌گرم در لیتر است. بیشترین و کمترین درصد چربی زیست‌توده جلبک *D. bardawil* به ترتیب در شوری ۱۰۵ و ۳۵ با مقادیر ۲۴/۵ و ۱۹ درصد مشاهده گردید. به دلیل کاهش تراکم سلولی در شوری ۱۰۵ گرم بر لیتر چربی تولیدشده در واحد لیتر به ۶۵ mg/L کاهش یافت. نتایج این تحقیق نشان داد که گونه *D. bardawil* خالص‌سازی شده از سواحل چابهار دارای درجه غیر اشباعی بین ۹۵-۷۳ پتانسیل زیادی جهت تولید سوخت زیستی دارد.

مقدمه

ریز جلبک‌ها اهمیت تجاری و زیست‌محیطی زیادی به عنوان پایه زنجیره غذایی و تولیدکننده اکسیژن دارند و همچنین یک منبع طبیعی از ترکیبات با ارزش مانند اسیدهای چرب، آستروئیدها و کاروتنوئیدها هستند (Lee et al., 2014). ترکیب چربی ریز جلبک‌ها برای مقاصد مختلفی مورد بررسی قرار می‌گیرد، در اقیانوس‌شناسی به دلیل نقش آن‌ها در ایجاد کشنده‌های سمی و نشانگر زیستی، در آبی‌پروری به دلیل تغذیه آبریان در مراحل لاروی و در نهایت برای تولید سوخت زیستی مورد بررسی قرار می‌گیرند (Gordillo et al., 1998). در حال حاضر مهم‌ترین نگرانی دولت‌های جهان تولید غذا و سوخت پایدار است. میکروارگانیسم‌های اتوتروف مانند جلبک‌های فتوسنتز کننده، راه‌حلی امیدوارکننده برای برآورده کردن این نیازها به نظر می‌رسند. محتوای هیدروکربنی جلبک‌ها مانند اسیدهای چرب و آسید گلیسرول‌ها توانایی جایگزین شدن سوخت‌های فسیلی را دارند (Talebi et al., 2013a). تلاش برای پیدا کردن جایگزینی برای سوخت‌های فسیلی از دهه ۱۹۷۰، به دلیل

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: Gilan.attaran@gmail.com

افزایش قیمت سوخت‌های فسیلی و بالا رفتن گازهای گلخانه‌ای اتمسفر حاصل از سوخت‌های فسیلی رو به افزایش است (Halim *et al.*, 2012; Juneja *et al.*, 2013). ابتدا منابع حیوانی و دانه‌های پرچرب گیاهی برای این منظور استفاده شد؛ اما افزایش روزافزون نیاز غذایی جوامع انسانی، محدودیت زمین‌های زراعی و آب شیرین مانع از گسترش استفاده از این نوع سوخت زیستی می‌شود (Li *et al.*, 2008b; Mohan and Devi, 2014; Song *et al.*, 2013). در مقابل میزان بالای چربی ریز جلبک‌های دریایی و عدم نیاز آن‌ها به زمین‌های حاصل خیز برای پرورش، انرژی بالاتر، ویسکوزیته و چگالی پایین‌تر ریز جلبک‌ها را به گزینه مناسب‌تری به جای منابع زمینی جهت تولید سوخت زیستی معرفی می‌کند (Gouveia, 2011; Rawat *et al.*, 2013).

ریز جلبک‌ها قادرند با شرایط مختلف محیطی سازگار شوند. بنابراین امکان یافتن شرایط محیطی مناسب‌تر از لحاظ رشد و تولید چربی در گونه‌های مختلف ریز جلبکی بیشتر است. درحالی‌که امکان چنین تغییری در سایر منابع سوخت زیستی مانند سویا، کلزا و آفتاب‌گردان وجود ندارد (Halim *et al.*, 2012). تغییر شرایط محیطی علاوه بر تأثیر بر میزان رشد و تولید چربی می‌تواند بر کیفیت لیپید ریز جلبک‌ها نیز اثرگذار باشد (Azachi *et al.*, 2002; کیائی و همکاران ۱۳۹۲). ترکیب چربی جلبک‌ها تا حد زیادی به عوامل ژنتیکی و محیطی بستگی دارد (Nuzzo *et al.*, 2013).

ریز جلبک‌ها ترکیبی از اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع ۱۲ الی ۲۲ کربنه تولید می‌کنند که برخی از آن‌ها از خانواده‌های امگا ۳ و امگا ۶ می‌باشند (Mata *et al.*, 2010). ترکیب اسیدهای چرب ریز جلبک‌ها تأثیر بسیاری بر کیفیت سوخت زیستی تولید شده دارد و تا حد زیادی به نسبت اسیدهای چرب اشباع به غیراشباع بستگی دارد (Mata *et al.*, 2010; Nascimento *et al.*, 2013; Radakovits *et al.*, 2010). پارامترهایی که به منظور سنجش کیفیت بیودیزل استفاده می‌شوند عبارت‌اند از: چگالی، ویسکوزیته، عدد ستان، نقطه ابری شدن، نقطه ریزش و ارزش حرارتی (کیائی و همکاران، ۱۳۹۲).

با وجود اینکه شاخص‌های دیگری برای ارزیابی بیودیزل وجود دارد اما عدد ستان شاخص اصلی سنجش کیفیت بیودیزل است. این عدد مفهومی مانند عدد اکتان در بنزین را دارد. عدد ستان برای اندازه‌گیری زمان تأخیر اشتعال به کار می‌رود. با افزایش عدد ستان زمان اشتعال سوخت زیستی کاهش پیدا می‌کند (Knothe, 2005). با افزایش درصد اسیدهای چرب اشباع در بیودیزل میزان عدد ستان نیز افزایش پیدا کرده و درجه غیراشباعی (Degree Unsaturation) کاهش پیدا می‌کند. بر اساس استاندارد (UNE-EN 14214) حداقل عدد ستان در بیودیزل ۵۱ و حداکثر درجه غیراشباعی ۱۳۷ باید باشد (Ramos *et al.*, 2009).

Dunaliella bardawil یک جلبک سبز تک‌سلولی از رده Chlorophyceae و راسته Chlamydomonadales، بدون دیواره سلولی، متحرک و شوری پسند است که می‌تواند در شوری‌های مختلف (۰/۵ تا ۵/۵ مولار) به رشد خود ادامه دهد (Chen *et al.*, 2009; Hounslow, 2010; Vo and Tran, 2014). *D. bardawil* با تولید و حذف گلیسرول و تنظیم غلظت یون‌های درون‌سلولی قادر است در شوری‌های بالا به رشد خود ادامه دهد (Talebi *et al.*, 2013 b; Thompson, 1994).

در سال‌های اخیر مطالعات زیادی جهت شناسایی ترکیب اسیدهای چرب ریز جلبک‌ها در سراسر جهان انجام شده است (Khotimchenko and Yakovleva, 2005; Kumari *et al.*, 2013; Viron *et al.*, 2000). در ایران نیز مطالعاتی بر روی ترکیب اسیدهای چرب ریز جلبک‌ها در شرایط معمولی صورت گرفته است (Talebi *et al.*, 2013a; عطاران فریمان، ۱۳۹۳). کیائی و همکاران در سال ۱۳۹۲، شرایط بهینه رشد و ترکیب اسید چرب سیانو باکتری *Synechococcus* را به عنوان میکروارگانسمی با پتانسیل بالا جهت تولید بیودیزل در مقادیر متفاوت pH و غلظت‌های مختلف نیترژن محیط کشت مورد بررسی قرار دادند. با این وجود مطالعات اندکی بر روی تغییرات ترکیب اسید چرب ریز جلبک‌ها در تنش شوری‌های مختلف

انجام گرفته است. هدف از مطالعه حاضر یافتن شوری مناسب به منظور بالا بردن تولید چربی و اسیدهای چرب در گونه بومی جدادشه از دریای عمان است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌ی خالص ریز جلبک *D. bardawil* از مرکز تحقیقات شیلات و آب‌های دور چابهار تهیه گردید. این ریز جلبک سبز از حوضچه‌های اطراف ساحل لیپار در نزدیکی شهر چابهار با شوری بالا خالص‌سازی شده است و در بانک ژن با کد *D. bardawil* CHPD2 ثبت گردیده است (عطاران فریمان، ۱۳۹۳).

آب دریا دارای شوری ppt ۳۵ است. جهت تهیه شوری ppt ۷۰ و ۱۰۵ نمک طبیعی دریا تهیه شده و به آب دریا اضافه شد و توسط شوری سنج چشمی مدل mt-110 اندازه‌گیری گردید. آب دریا با شوری‌های ppt ۱۰۵ و ۷۰، ۳۵ پس از گذراندن از فیلتر، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد استریل گردید. پس از سرد شدن آب دریای استریل شده و رسیدن آن به دمای اتاق، به ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری منتقل شد.

برای کشت *D. bardawil* از محیط کشت Conway (Walne, 1970) استفاده گردید. شرایط فایکولب با روشنایی LUX ۱۰۰۰۰، دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد دوره‌ی تاریکی روشنایی (۱۲:۱۲ ساعت) تنظیم گردید.

بررسی میزان رشد

برای ارزیابی میزان رشد، در فواصل زمانی ۴۸ ساعت از ریز جلبک‌های فعال از ظروف کشت نمونه‌برداری شد. تراکم سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری مدل Nikon ECLIPSE 50i و لام Neubauer (Marienfeld GMBH and Co. Germany) محفظه شمارش به عمق ۰/۱ میلی‌متر شمارش شد. کلیه آزمون‌ها ۳ بار تکرار شدند. برای جلوگیری از حرکت سلول‌ها ۲ درصد محلول لوگول (۵٪ ید و ۱۰٪ پتاسیم یدید) به نمونه اضافه شد. تعداد سلول‌ها به وسیله فرمول زیر محاسبه گردید.

$$10^6 \times \text{تعداد سلول‌های شمارش شده} = \text{تعداد سلول‌ها در یک لیتر}$$

اندازه‌گیری زیست‌توده تولیدشده

به منظور اندازه‌گیری زیست‌توده تولید شده در انتهای دوره کشت، ۱۵ ml نمونه برداشته و داخل لوله آزمایش با وزن مشخص (W_1) انتقال یافته و به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. آب فوقانی جداسازی شده و ریز جلبک‌های ته‌نشین شده قبل از انجماد در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد دو بار با آب مقطر شستشو داده شدند. سپس به مدت ۲۴ ساعت درون دستگاه Freeze dryer مدل JFD 2L ساخت شرکت JAL TEB در دمای ۳۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا پلیت‌ها به طور کامل آب خود را از دست بدهند. بعد از خشک شدن کامل ریز جلبک‌ها، لوله‌های آزمایش دوباره وزن شدند (W_2)، کلیه آزمایش‌ها سه بار تکرار شد.

بررسی میزان تولید چربی

به منظور استخراج چربی از روش (Bligh and Dyer, 1959) استفاده گردید. بعد از ۱۴ روز تیمارها سانتریفیوژ شده و توسط دستگاه Freeze dryer در دمای ۳۰- درجه سانتی‌گراد خشک گردیدند. ۱۰۰ میلی‌گرم نمونه خشک شده جلبک را برداشته و ۳ میلی‌لیتر محلول متانول / کلروفرم با نسبت ۱:۲ اضافه کرده و به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد هم زده شد. سوسپانسیون حاصل به مدت ۳ دقیقه با سرعت ۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردیده، لایه کلروفرمی جدا و به درون لوله آزمایش توزین شده انتقال داده شد. در مرحله آخر لوله‌های آزمایش به مدت ۲ ساعت درون آون با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا کلروفرم تبخیر شود. لوله‌های آزمایش دوباره توزین شدند. سپس درصد چربی زیست‌توده محاسبه گردید (Nigam et al., 2011).

بررسی پروفیل اسید چرب

روش ترانس استریفیکاسیون مستقیم جهت بررسی ترکیب اسید چرب ریز جلبک استفاده گردید (Talebi et al., 2013a). ابتدا ۳۰۰ μl محلول بافر استخراج به ۸ میلی گرم زیست توده خشک جلبک اضافه شد و به مدت ۲ ساعت در دمای ۷۵ درجه سانتی گراد و ۲۰۰ rpm انکوبه گردید. سپس به ترتیب ۳۰۰ μl آب حاوی ۹/۰٪ NaCl و ۳۰۰ μl n-hexzane به محلول فوق اضافه و به آرامی مخلوط گردید. سپس نمونه‌ها به مدت ۳ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد با سرعت ۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. لایه فوقانی هگزان برای آنالیز توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC) جداسازی و استفاده شد. آنالیز اسید چرب توسط دستگاه GC مدل Shimadzu-2014 مجهز به آشکارساز FID با ستون استاندارد اسید چرب (FAMQ-005) ساخت شرکت Accu Standard آمریکا به عنوان استاندارد جهت شناسایی استرهای متیله شده استفاده شد.

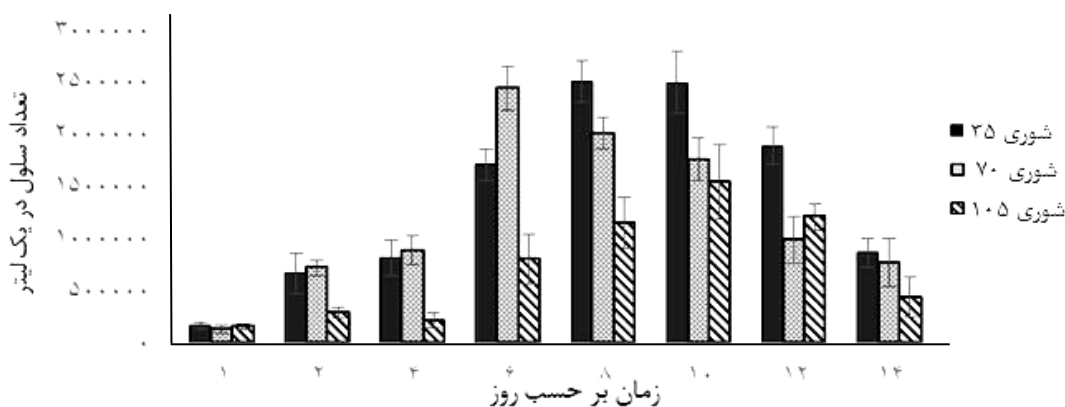
تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌های حاصل از اندازه‌گیری میزان رشد، چربی کل و ترکیب اسید چرب با نرم افزار (Version 21) SPSS انجام پذیرفت. جهت بررسی نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگروف اسمیرنوف استفاده شد. جهت بررسی تأثیر تغییرات شوری بر میزان رشد، چربی کل و ترکیب اسید چرب از آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) و آزمون دانکن و جهت ترسیم نمودارها از نرم افزار (2013) EXCEL استفاده گردید.

نتایج

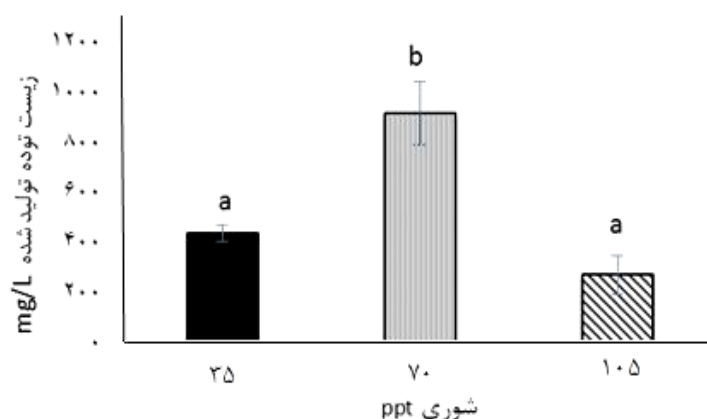
بررسی میزان رشد

بیشترین تعداد سلول در شوری ۷۰ ppt و کمترین تعداد شوری ۱۰۵ ppt مشاهده شدند. شکل (۱) فراوانی سلول‌های *D. bardawil* را در سه شوری متفاوت نشان می‌دهد. نتایج همچنین نشان داد که فاز تأخیری رشد ۴ روز بود و پس از روز چهارم جلبک‌ها به صورت لگاریتمی رشد کردند. بالاترین میزان رشد ریز جلبک‌ها در شوری‌های متفاوت در شوری ۷۰ گرم در لیتر مشاهده شد.



شکل ۱. تغییرات تعداد سلول‌های *D. bardawil* در تیمارهای مختلف شوری

بعد از رسیدن به اوج رشد به دلیل کاهش مواد مغذی و بالا رفتن تراکم سلول و عدم نفوذ نور در آن‌ها رشد کند شده و در نهایت بعد از روز دهم به دلیل اتمام مواد مغذی شیب نمودار منفی می‌شود. همچنین شکل ۲ میزان زیست توده تولید شده را در تیمارهای مختلف بر حسب mg/L در انتهای روز چهاردهم نشان می‌دهد. نتایج حاصل از بررسی میزان رشد روزانه *D. bardawil* نشان داد که جلبک در شوری ۷۰ نسبت به تیمارهای دیگر رشد چشمگیری از خود نشان می‌دهد. در مقابل، شوری ۱۰۵ ppt و ۳۵ دارای وزن خشک یکسانی بودند و نتایج با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشت ($P > 0.05$) (شکل ۲).



شکل ۲. میزان زیست توده کل تولید شده در شوری های مختلف

بررسی میزان تولید چربی

جدول ۱ میزان چربی کل در واحد حجم و وزن خشک *D. bardawil* را در شوری های مختلف نشان می دهد. با افزایش شوری میزان چربی کل افزایش یافت و بیشترین درصد چربی در شوری ۱۰۵ ppt با میزان ۲۴/۴٪ و کمترین میزان چربی در شوری ۳۵ با میزان ۱۹٪ درصد مشاهده شد و در بین شوری های مختلف، بین شوری ۱۰۵ و ۳۵ از نظر درصد چربی اختلاف معنی داری وجود داشت ($P \leq 0.05$). میزان چربی در شوری ۷۰، ۲۲/۵ درصد بود که با هیچ کدام از تیمارها اختلاف معنی داری نداشت ($P > 0.05$).

جدول ۱. تأثیر غلظت های مختلف شوری بر میزان چربی کل جلبک *D. bardawil* در انتهای دوره کشت

تیمار	میزان چربی جلبک	
	میلی گرم در یک گرم وزن خشک	درصد در وزن خشک
۳۵ ppt شوری	۸۲/۹±۰/۸۲ ^a	۱۹ ^a
۷۰ ppt شوری	۲۰۶±۴ ^b	۲۲ ^{a, b}
۱۰۵ ppt شوری	۶۵/۹±۰/۵ ^a	۲۴/۴ ^b

مقایسه میانگین ها در سطح ۵٪ انجام شده است، تیمارهایی که دارای حروف مشترک نیستند؛ اختلاف معنی داری با یکدیگر دارند (Duncan^a)

همان طور که در جدول ۱ نشان داده شده است برخلاف اینکه در شوری ۱۰۵ ppt بیشترین درصد چربی در واحد جرم مشاهده شده اما کارایی تولید چربی در واحد حجم به دلیل تولید زیست توده کم در شوری ۱۰۵ ppt بسیار کاهش یافته و کمترین مقدار را به خود اختصاص داد. از نظر کارایی تولید چربی شوری ۷۰ به دلیل تولید زیست توده بالا بهترین کمیت را نشان داد.

بررسی پروفیل اسید چرب

در این تحقیق ۱۴ نوع اسید چرب متفاوت در بررسی ترکیب اسیدهای چرب *D. bardawil* شناسایی شدند که نوع و میزان تغییرات آن در جدول ۲ آورده شده است. اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع عمده مشاهده شده عبارتند از: اسیدهای چرب اشباع: دودکانوئیک اسید (C12:0)، مرستیک اسید (C14:0)، پالمیتیک اسید (C16:0)، استریک اسید (C18:0) و اسیدهای چرب غیراشباع: پالمیتوئیک اسید (C16:1)، اوکتادکنوئیک اسید (C18:1)، لینولئیک اسید (C18:2n-6)، لینولئیک اسید

(C18:3n-6)، ایکوزونوئیک اسید (C20:1)، ایکوزوساترنوئیک اسید (C20:5)، دوکوزانوئیک اسید (C22:1) و دوکوزاترانوئیک اسید (C22:4). جدول ۳ میزان اسیدهای چرب اشباع و غیر اشباع و نسبت بین آن‌ها در سه شوری مختلف نشان می‌دهد.

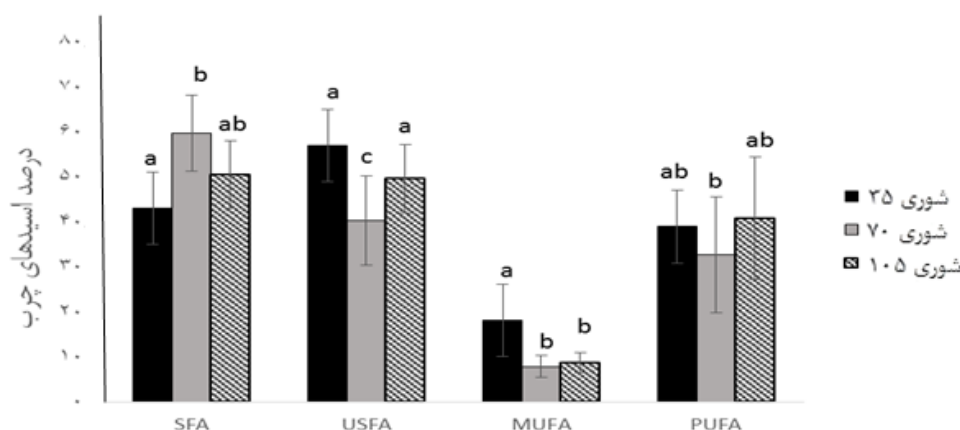
جدول ۲. ترکیب اسیدهای چرب در شوری های مختلف

شوری	۳۵ ppt	۷۰ ppt	۱۰۵ ppt
اسید چرب			
Dodecanoic acid (C12:0)	۱/۳۸±۰/۰۴	۱/۱۳±۰/۲۸	۱/۱۶±۰/۳۷
Tetradecanoic acid (C14:0)	۰/۷۲±۰/۲۸	۹/۹۸±۰/۰۸	۵/۴۶±۰/۹۷
pentadecanoic acid (C15)	۱/۲۲±۰/۴۳	۰/۸۹±۰/۲۴	۱/۲۲±۰/۲۴
Hexadecanoic acid (C16:0)	۲۴/۲۳±۰/۲۳	۲۵/۷۷±۳/۴۶	۳۳/۷۴±۰/۷۷
Palmitoleic acid (C16:1)	۴/۳۲±۰/۱۵	۲/۲۳±۰/۶۶	۳/۱۴±۰/۲۲
Octadecanoic acid (C18:0)	۱۵/۳۸±۰/۱۱	۱۹/۹۸±۳/۶۸	۷/۱۵±۰/۶۲
Octadecenoic acid (C18:1)	۱/۷±۰/۴۵	۵/۰۲±۱/۰۶	۳/۷۰±۱/۰۷
Linoleic acid (C18:2)	۱۲/۴۸±۰/۲۴	۱۰/۲۹±۱/۳۹	۲/۷۷±۲/۸۲
Linolenic Acid (C18:3)	۰/۹۳±۰/۰۱	۰/۵۲±۰/۰۲	۱/۹۶±۰/۴۵
Stearidonic acid (C18:4n)	۲/۱۶±۰/۲۶	۱۸/۲۸±۱/۸۸	-
Eicosanoic acid (C20:0)	۰/۱±۰/۰۵	۱/۸۶±۰/۳۸	۱/۰۱±۰/۱۱
Eicosenoic acid (C20:1)	۱/۹۷±۰/۸۷	۰/۵۵±۰/۰۵	۱/۸۳±۰/۳
Eicosatrienoic acid(C20:4)	۱/۵۷±۰/۰۸	۱/۱۶±۰/۱۳	-
Ecisoapentanoicacid(C20:5)	۳/۱۷±۰/۱۴	۲/۱۵±۰/۳۸	۳/۸۶±۰/۴۲
Docosanoic acid (C22:1)	۰/۱۱	-	-
docosatetraenoicacid(C22:4)	۰/۱۳±۰/۰۱	۰/۲۲±۰/۰۲	۲/۲۹±۰/۰۶

جدول ۳. میزان اسیدهای چرب به تفکیک اشباع و غیر اشباع

	۳۵ ppt	۷۰ ppt	۱۰۵ ppt
میزان کل SFA	۴۳/۰۳	۵۹/۶۲	۵۰/۴۵
میزان کل USFA	۵۶/۹۷	۴۰/۲۱	۴۹/۵۵
میزان کل MUFA	۱۸/۱۱	۷/۸	۸/۶۷
میزان کل PUFA	۳۸/۸۶	۳۲/۵۸	۴۰/۷۶
نسبت SFA / USFA	۰/۷۶	۱/۴۸	۱/۰۲
درجه غیراشباعی (DU)	۹۵/۸۴	۷۲/۹۶	۹۰/۲

میزان اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع در شرایط مختلف در این پژوهش متفاوت بود. فقط در شوری ۷۰ ppt میزان اسیدهای چرب اشباع به غیراشباع نسبت به سایر شوری‌ها بیشتر بود (شکل ۳). در کل تیمارها میزان اسیدهای چرب با پیوند چندگانه نسبت به اسیدهای چرب با پیوند تک گانه، بیشتر بود. شکل ۳ میزان اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع را در شوری‌های مختلف نشان می‌دهد.



شکل ۳. تغییرات درصد اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع در شوریه‌های مختلف

بحث

از بایودیزل به عنوان یک سوخت پاک یاد می‌شود زیرا عاری از هر نوع ترکیب آروماتیک و سولفوری است. در سال‌های اخیر به منظور پایین آوردن هزینه تولید بایودیزل مطالعات زیادی در زمینه استخراج سوخت زیستی از ریز جلبک‌ها در سراسر جهان انجام گرفته است. آنها در مقایسه با دانه‌های پرچرب خشکی، دارای بازده فتوسنتزی و تولید زیست‌توده بیشتر و رشد سریع‌تری هستند. همچنین درصد بالای اسیدهای چرب اشباع و MUFA در چربی ریز جلبک‌ها باعث افزایش کیفیت بایودیزل می‌گردد (Atadashi *et al.*, 2012).

تولید سوخت زیستی از ریز جلبک‌ها تحت تأثیر دو عامل میزان زیست‌توده تولید شده و درصد وزنی چربی تولید شده قرار دارد (Liang *et al.*, 2009). روش‌های مختلفی برای افزایش تولید زیست‌توده و چربی توسط ریز جلبک‌ها وجود دارد. (Chen *et al.*, 2011). برای این منظور ریز جلبک‌ها را در شرایط استرس مانند شرایط کمبود نیتروژن، افزایش آهن و دی‌اکسیدکربن محیط کشت، کشت ریز جلبک به صورت میکسوتروف (Mixotroph) و افزایش شوری آب قرار می‌دهند (Liang *et al.*, 2009; Venkata Mohan and Devi, 2014; Wan *et al.*, 2013).

در این مطالعه میزان رشد، چربی کل و ترکیبات اسید چرب *D. bardawil* در شوریه‌های مختلف با دما و دوره نوری ثابت مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین زیست‌توده تولید شده در شوری ۷۰ گرم بر لیتر (۱/۲ M/L NaCl) به میزان 933 ± 106 mg/L مشاهده شد. زیست‌توده تولید شده در سایر شوریه‌ها تفاوت محسوسی با این شوری نشان داد ($P \geq 0.05$) (شکل ۲). اگرچه تعداد سلول‌ها در شوری ۱۰۵ گرم در لیتر بسیار کمتر از تعداد سلول‌ها در شوری ۳۵ گرم در لیتر بود (شکل ۱)، با این وجود این اختلاف در مقدار زیست‌توده تولید شده مشاهده نشد. دلیل این امر را می‌توان به بزرگ‌تر شدن سلول‌های *Dunaliella* در پاسخ به افزایش شوری نسبت داد (García *et al.*, 2007) با در نظر گرفتن این مطلب به نظر می‌رسد میزان زیست‌توده تولیدی نسبت به تعداد سلول‌ها، معیار مناسب‌تری برای سنجش میزان رشد است.

گونه‌های خانواده *Dunaliella* ارگانسیم‌هایی هستند که شوریه‌های بالا را تحمل می‌کنند و همین امر آنها را نماینده مناسبی جهت بررسی تأثیر شوری بر جلبک‌ها می‌سازد (Azachi *et al.*, 2002; Takagi *et al.*, 2006; Xu and Beardall, 1997). گونه‌های مختلف *Dunaliella* در شوریه‌های مختلف نرخ رشد متفاوتی دارند (Borowitzka and Siva, 2007). مناسب‌ترین غلظت شوری برای رشد *Dunaliella* در مطالعات مختلف، متفاوت است. Talebi و همکاران در سال ۲۰۱۳ مناسب‌ترین شوری جهت رشد *D. salina* را یک مول بر لیتر (۵۸ ppt) گزارش کردند (Talebi *et al.*, 2013b). نتایج مطالعه حاضر با گزارش Talebi در سال ۲۰۱۳ همسو است. با این‌وجود Heidari و همکاران (۲۰۰۰) بالاترین میزان رشد این جلبک جداسازی شده از دریاچه ارومیه را ۱/۸ و ۲/۶ مول بر لیتر (۱۵۲-۱۰۵ ppt) گزارش کرد. همچنین Nikookar و همکاران

(۲۰۰۴) نشان دادند که بالاترین میزان رشد *D. salina* جداسازی شده از دریاچه مهارلو در شوری یک و دو مول بر لیتر (ppt) ۵۸/۵ و ۱۱۶ است. دلیل این تفاوت می‌تواند به میزان نور و pH محیط کشت بستگی داشته باشد. دلیل دیگر این اختلاف می‌تواند به دلیل سازگار شدن استرین‌های دریاچه‌ای به شوری‌های بالا طی زمان طولانی باشد.

مطالعات نشان می‌دهد که *Nannochloropsis salina* در شوری ۲۲ و ۳۴ به ترتیب دارای بیشترین رشد و میزان چربی است و در شوری‌های بالاتر و پایین‌تر میزان رشد و چربی به شدت کاهش پیدا می‌کند (Bartley et al., 2013). همچنین Takagi و همکاران (۲۰۰۶) در مطالعات خود بیان کردند که با افزایش شوری آب از ۰/۵ M به ۳/۵ M (۲۹ ppt به ۲۰۰)، میزان چربی کل *D. salina* افزایش پیدا می‌کند. در مطالعه حاضر نیز با افزایش شوری از ۳۵ گرم بر لیتر ۱۰۵ گرم بر لیتر میزان چربی کل از ۱۹ درصد به ۲۴/۴ درصد رسید (جدول ۱). اما بررسی‌های Al-Hasan و همکاران (۱۹۸۷) نشان داد که با افزایش شوری از ۲/۵ به ۲۰ درصد میزان چربی کل *D. salina* کاهش پیدا می‌کند. در مطالعات دیگر نیز درصد وزنی چربی کل این جلبک بین ۷ تا ۶۷ درصد گزارش شده است (Abd El-Baky et al., 2004; Schwenk et al., 2013; Takagi et al., 2013a; Talebi et al., 2013a; Lee et al., 2010). وجود تفاوت در مقدار چربی کل ریز جلبک می‌تواند به دلیل روش استخراج (Lee et al., 2010)، زمان برداشت ریز جلبک جهت استخراج چربی (Salim et al., 2013) و تأثیر تفاوت شرایط محیطی؛ مانند شدت نور، میزان هوادهی، میزان مواد مغذی و شوری باشد (Takagi et al., 2006; Li et al., 2008a).

در بین انواع اسید چربی‌های شناسایی شده، اسید پالمیتیک (C16:0) در هر سه شوری بیشترین مقدار را به خود اختصاص داد (جدول ۲). همچنین جدول ۲ نشان می‌دهد که با افزایش شوری، بر میزان اسید پالمیتیک (C16:0) از اسیدهای چرب اشباع، لینولئیک (C18:2) و لینولنیک اسید (C18:3) از چربی‌های غیراشباع افزوده شد (جدول ۲)؛ و با افزایش شوری قسمت عمده اسیدهای چرب شناسایی شده در اعضای این خانواده را اسیدهای چرب C18 غیراشباع و C16 اشباع تشکیل می‌دهند (Abd El-Baky et al., 2006; Lee et al., 2014; Takagi et al., 2006; El-Baky et al., 2004). که همسو با نتایج مطالعه حاضر است. در مقابل Vanitha و همکاران (۲۰۰۷) در مقایسه‌ی ترکیب اسید چرب دو وارته *D. salina* و *D. bardawil* بیان کرد که میزان اسیدهای چرب C22 و C18:2 به ترتیب در وارته بارداویل و سالینا دارای بیشترین مقدار بودند.

از میان اسیدهای چرب ۱۸ کربنه نیز میزان لینولئیک اسید (C18:2) و استریدونیک اسید (C18:4) بیشتر از سایر ترکیبات ۱۸ کربنه شناسایی شده بود (جدول ۲) که با نتایج مطالعه Talebi و همکاران در سال ۲۰۱۳ مطابقت دارد (Talebi et al., 2013a). در جدول شماره ۴ ترکیب اسیدهای چرب این گونه با سایر گونه‌های این جنس در داخل و خارج از ایران مورد مقایسه قرار گرفته است.

میزان اشباع یا غیراشباع بودن اسیدهای چرب تشکیل‌دهنده چربی‌ها یا به عبارت دیگر ترکیب اسیدهای چرب بر کیفیت سوخت زیستی به دست آمده از منابع مختلف چربی تأثیر بسزایی دارد (Rasoul-Amini et al., 2011; Redel-Macías et al., 2012; Talebi et al., 2013a). هر چقدر اسیدهای چرب اشباع در چربی کل افزایش پیدا کند، چربی کندتر اکسید شده و پایداری حرارتی بیشتر می‌شود و به طور کلی سرعت تخریب چربی کندتر می‌شود (Lin and Lin, 2012). در مقابل با افزایش چربی‌های غیراشباع نقطه انجماد کاهش پیدا می‌کند (Bowen, 2010).

Schenk و همکاران در سال ۲۰۰۸ بیان کردند که بهترین کیفیت بیودیزل هنگامی حاصل می‌شود که نسبت ۱/۴/۵ بین C14:0/ C18:1/C16:1 وجود داشته باشد. در این مطالعه شوری ۱۰۵ ppt نزدیکترین اعداد را به این نسبت با میزان ۲/۲/۳/۱ نشان داد. بیشترین اختلاف نیز در شوری ۳۵ ppt با مقدار ۷/۵/۱۰/۱ مشاهده گردید. در مطالعه حاضر ریز جلبک *D. bardawil* در سه شوری مختلف کشت داده شد. نتایج نشان داد که با افزایش شوری از ۳۵ ppt به ۷۰ ppt میزان SFA افزایش پیدا می‌کند با وجود اینکه در شوری ۱۰۵ ppt از میزان اسیدهای چرب اشباع کاسته شد؛ اما همچنان نسبت به شوری ۳۵ ppt میزان SFA بیشتر است (شکل ۳). اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع ۱۴، ۱۶ و ۱۸ کربنه از اسید چرب‌های مهم در سوخت‌های زیستی می‌باشند (Rasoul-Amini et al., 2011; Tang et al., 2011). در این مطالعه نیز مقدار این اسید چرب‌ها

نسبت به سایر ترکیبات چربی شناسایی شده فراوان تر مشاهده شد که با نتایج حاصل از مطالعات عطاران (۱۳۹۳)، Tang و همکاران (۲۰۱۱)، Tornabene و همکاران (۱۹۸۰) مطابقت دارد. میزان بالای ترکیبات ۱۴-۱۸ کربنه در ترکیب اسید چرب *D. bardawil* می‌تواند دلیل دیگری بر مناسب بودن چربی حاصل از این جلبک به عنوان منبع سوخت زیستی باشد. طول زنجیره، درجه غیراشباع، و نسبت چربی کل با تری گلیسرید ساخته شده خصوصیات مهم چربی جلبک برای تولید بیودیزل است و ممکن است کیفیت بیودیزل را تحت تاثیر قرار دهد (Borowitzka, 1992).

در بین اسیدهای چرب غیر اشباع نیز لینولیک اسید (۱۸:۲) و استرادیونیک اسید (۱۸:۴) بیشتر از سایر چربی‌های غیراشباع اندازه‌گیری شد (جدول ۲).

جدول ۴. تفاوت‌های موجود در ترکیب اسید چرب در گزارش‌های مختلف

منبع	AbdEl-Baky et al., 2004	Al-Hasan et al., 1987	Talebi et al., 2013a*	Talebi et al., 2013a*	Rasoul-Amini et al., 2014*	مطالعه حاضر
	<i>D. salina</i> ^a	<i>D. salina</i> ^a	<i>D. salina</i> (Persian Gulf)	<i>D. salina</i> (Shariati)	<i>D. salina</i>	<i>D. bardawial</i> ^a
C8:0	۰/۱۷-۰/۴۱	NR	NR	NR	NR	NR
C12:0	۰/۱۸-۰/۱۳	NR	NR	NR	۴/۱	۱/۱۳-۱/۳۸
C14:0	۱۱/۱۲-۲/۱۸	۵/۲-۲/۳	NR	NR	۲۳/۳	۹/۹۸-۰/۷۲
C15:0	NR	NR	NR	NR	NR	۰/۸۹-۱/۲۲
C16:0	۱/۴۳-۲۵/۲۲	۲۰/۱-۱۹/۲	۹/۱۹±۱/۵	۱۲/۲±۱/۵	۲۳/۷	۳۳/۷-۲۴/۲
C16:1	۲/۵۷	۳/۸-۲/۲	۰/۸±۰/۳	۴/۴۵±۰/۲	NR	۲/۲۳-۴/۳۲
C18:0	NR	۱/۸-۱/۷	۴/۲۷±۱/۲	۱/۹±۰/۶	۷/۳	۷/۱-۱۹/۹
C18:1	۵/۷-۰/۳۱	Trace	۲۲/۵۱±۰/۷	۲۳/۶۷±۲/۱	NR	۵/۰۲-۱/۷
C18:2	۵/۷-۰/۱	۹-۷/۸	۳/۸۴±۰/۵	۲/۲۸±۰/۶	NR	۱۲/۲۷-۲/۸
C18:4	۶۳/۲۴-۱۴/۸	۳۷/۲-۲۵/۹	۴۴/۳۱±۲/۴	۴۰/۳۶±۱/۹	NR	۱/۹۶-۰/۵
C20:0	۱/۲۳-۰/۵۳	Trace	۱/۴۲±۰/۳	۱/۴±۰/۱	۴/۶	۱۸/۸-۲/۱۶
C20:4	۴/۱۷-۲/۸	Trace	NR	NR	NR	۰/۵-۱/۹۷
C20:5	NR	Trace	NR	NR	NR	۳/۸۶-۲/۱۵
C22:0	۲/۴۱	Trace	NR	NR	۷/۱	NR
C22:4	۲/۱۱	Trace	NR	NR	NR	۰/۱۳-۲/۲۹

* مطالعات انجام شده در ایران، **a**: اندازه گیری شده در شوری های متفاوت، **NR**: گزارش نشده

به طور کلی، ریزجلبک *D. bardawil* خالص سازی شده از خلیج چابهار به دلیل تولید زیست توده بالا، میزان بالای ترکیبات شیمیایی تجاری مانند انواع لیپیدها و عدم نیاز به زمین های زراعی و آب شیرین (Oren, 2005) و با داشتن چربی کل، SFA (۴۳/۰۳ الی ۵۹/۶۲) درصد و PUFA (۳۲/۵ الی ۴۰/۷۶) پتانسیل زیادی برای تولید سوخت زیستی در سراسر کشور دارد. در مناطق جنوبی کشور با آب و هوای گرم که احتمال اکسیداسیون سوخت زیستی بیشتر است، باید درصد اسیدهای چرب اشباع متیله شده در سوخت زیستی بالاتر باشد. در مقابل در مناطق سردسیر ایران می‌توان از اسیدهای چرب غیراشباع متیله شده به عنوان سوخت زیستی استفاده کرد، زیرا نقطه انجماد پایین تری دارند. مطابق نتایج این تحقیق ریز جلبک *D. bardawil* در محیط‌های با غلظت شوری متفاوت، درصد اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع خود را تغییر می‌دهد. این ویژگی موجب می‌شود تا مطابق با شرایط اقلیمی مناطق از چربی این ریز جلبک به عنوان منبع سوخت زیستی استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

از همکاری صمیمانه مسئولین آزمایشگاه کنترل کیفیت منطقه آزاد چابهار به ویژه سرکار خانم عباسی و باقری و همچنین مسئولین محترم آزمایشگاه علوم دریایی و دریانوردی چابهار سپاس‌گزاری می‌شود.

منابع

- عطاران فریمان، گ. ۱۳۹۳. شناسایی جلبک های میکروسکوپی بومی دریای عمان و ارزیابی آن‌ها به عنوان غذای زنده در آبی پروری، گزارش نهایی مؤسسه تحقیقات شیلات ایران. ۱۶۱ ص.
- کیائی، ا.، سلطانی، ن.، مظاهری اسدی، م.، خاوری نژاد، ر.، دزفولیان، م. ۱۳۹۲. بررسی شرایط بهینه به منظور استفاده از سیانوباکتری *Synechococcus sp.* ISC106 به عنوان کاندید تولید بیودیزل. مجله بوم شناسی آذربایجان، سال چهارم، شماره ۲، صفحات ۵۱-۴۰.
- Abd El-Baky, H.H., El Baz, F.K., El-Baroty, G.S. 2004. Production of lipids rich in omega 3 Fatty Acids from the halotolerant alga *Dunaliella salina*. Biotechnonology. 3(1): 102-108.
- Al-Hasan, R.H., Ghannoum, M.A., Sallal, A.K., Abu-Elteen, K.H., Radwan, S.S. 1987. Correlative changes of growth, pigmentation and lipid composition of *Dunaliella salina* in response to halostress. Journal of General Microbiology. 133(9): 2607-2616.
- Atadashi, I.M., Aroua, M.K., Abdul Aziz, A.R., Sulaiman, N.M.N. 2012. Production of biodiesel using high free fatty acid feedstocks. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 16(5): 3275-3285.
- Azachi, M., Sadka, A., Fisher, M., Goldshlag, P., Gokhman, I., Zamir, A. 2002. Salt Induction of Fatty Acid Elongase and Membrane Lipid Modifications in the Extreme Halotolerant Alga *Dunaliella salina*. Plant Physiology. 129(3): 1320-1329.
- Bartley, M.L., Boeing, W.J., Corcoran, A.A., Holguin, F.O., Schaub, T. 2013. Effects of Salinity on Growth and Lipid Accumulation of biofuel microalga *Nannochloropsis salina* and invading organisms. Biomass and Bioenergy. 54(0): 83-88 .
- Bligh, E.G., Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and production. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. 37(8): 911-917.
- Borowitzka, M.A. 1992. Algal biotechnology products and processes matching science and economics. Journal of Applied Phycology. 4: 267-79.
- Borowitzka, M., Siva, C. 2007. The taxonomy of the genus *Dunaliella* (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species. Journal of Applied Phycology. 19(5): 567-590.
- Bowen, D. 2010. Effect of Fatty Acid Structure on Biodiesel. <http://biodieselisgood.org/chemistry/effect-of-fatty-acid-structure-on-biodiesel/>.
- Chen, H., Jiang, J.G., Wu, G.H. 2009. Effects of Salinity Changes on the Growth of *Dunaliella salina* and Its Isozyme Activities of Glycerol-3-phosphate Dehydrogenase. Agriculture and food chemistry. 57: 6178-6182.
- Chen, M., Tang, H., Ma, H., Holland, T.C., Ng, K.Y.S., Salley, S.O. 2011. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. Bioresource Technology. 102(2): 1649-1655.
- García, F., Freile-Pelegri, Y., Robledo, D. 2007. Physiological characterization of *Dunaliella sp.* (Chlorophyta, Volvocales) from Yucatan, Mexico. Bioresource Technology. 98(7): 1359-1365.
- Gordillo, F. J. L., Goutx, M., Figueroa, F.L., Niell, F.X. 1998. Effects of light intensity, CO2 and nitrogen supply on lipid class composition of *Dunaliella viridis*. Applied Phycology. 10: 135-144.
- Gouveia, L. 2011. Microalgae as a Feedstock for Biofuels. First edition. Springer. 68 p.
- Halim, R., Danquah, M.K., Webley, P.A. 2012. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. Biotechnology Advances. 30(3): 709-732.
- Heidari, R., Riahi, H., Saadatmand, S. 2000. Effect of salt and irradiance stress on photosynthetic pigments and proteins in *Dunaliella salina* Teodoresco. Journal of Sciences Islamic Republic Of Iran. 11(2): 73-77.
- Hounslow, E. 2010. Optimum salinity conditions for producing lipids from *Dunaliella salina* for biofuels production. Mini-project report. Energy Futures University of Sheffield. 1-8.
- Juneja, A., Ceballos, R.M., Murthy, A.G.S. 2013. Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: A Review Energies. 6: 4607-4638.

- Khotimchenko, S.V., Yakovleva, I.M. 2005. Lipid composition of the red alga *Tichocarpus crinitus* exposed to different levels of photon irradiance. *Phytochemistry*. 66(1): 73-79.
- Knothe, G. 2005. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Processing Technology*. 86(10): 1059-1070.
- Kumari, P., Bijo, A.J., Mantri, V.A., Reddy, C.R.K., Jha, B. 2013. Fatty acid profiling of tropical marine macroalgae: An analysis from chemotaxonomic and nutritional perspectives. *Phytochemistry*. 86(0): 44-56.
- Lee, J.Y., Yoo, C., Jun, S.Y., Ahn, C.Y., Oh, H.M. 2010. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology*. 101(1, Supplement): 75-77.
- Lee, S.Y., Kim, S.H., Hyun, S.H., Suh, H.W., Hong, S.J., Cho, B.K., Choi, H.K. 2014. Fatty acids and global metabolites profiling of *Dunaliella tertiolecta* by shifting culture conditions to nitrate deficiency and high light at different growth phases. *Process Biochemistry*. 49(6): 996-1004.
- Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N., Lan, C. 2008a. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 81(4): 629-636.
- Li, Y., Horsman, M., Wu, N., Lan, C.Q., Dubois-Calero, N. 2008b. Biofuels from microalgae. *Biotechnology Progress*. 24: 815-820.
- Liang, Y., Sarkany, N., Cui, Y. 2009. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology Letters*. 31(7): 1043-1049.
- Lin, C.Y., Lin, Y.W. 2012. Fuel characteristics of biodiesel produced from a high-acid oil from soybean soapstock by supercritical-methanol transesterification. *Energies*. 5(7): 2370-2380.
- Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, N.S. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 14(1): 217-232.
- Mohan, S.V., Devi, M.P. 2014. Salinity stress induced lipid synthesis to harness biodiesel during dual mode cultivation of mixotrophic microalgae. *Bioresource Technology*. 165: 288-294.
- Nascimento, I., Marques, S., Cabanelas, I., Pereira, S., Druzian, J., de Souza, C., Nascimento, M. 2013. Screening microalgae strains for biodiesel production: Lipid productivity and estimation of fuel quality based on fatty acids profiles as selective criteria. *Bioenergy Research*. 6(1): 1-13.
- Nigam, S., Rai, M.P., Sharma, R. 2011. Effect of nitrogen on growth and lipid content of *Chlorella pyrenoidosa*. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 7: 124-129.
- Nikookar, K., Moradshahi, A., Kharati, M. 2004. Influence of salinity on the growth, pigmentation and ascorbate peroxidase activity of *Dunaliella Salina* isolated from Maharlu Salt Lake in Shiraz. *Iranian Journal of Science and Technology*. 28: 117-125.
- Nuzzo, G., Gallo, C., Ippolito, G., Cutignano, A., Sardo, A., Fontana, A. 2013. Composition and Quantitation of Microalgal Lipids by ERETIC 1H NMR Method. *Marine Drugs*. 11(10): 3742-3753.
- Oren, A. 2005. A hundred years of *Dunaliella* research: 1905–2005. *Aquatic Biosystems*. 1(2): 1-14.
- Radakovits, R., Jinkerson, R.E., Darzins, A., Posewitz, M.C. 2010. Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production. *Eukaryotic Cell*. 9(4): 486-501.
- Rasoul-Amini, S., Montazeri-Najafabady, N., Mobasher, M.A., Hoseini-Alhashemi, S., Ghasemi, Y. 2011. *Chlorella* sp. A new strain with highly saturated fatty acids for biodiesel production in bubble-column photobioreactor. *Applied Energy*. 88(10): 3354-3356.
- Rasoul-Amini, S., Mousavi, P., Montazeri-Najafabady, N., Mobasher, M.A., Mousavi, S.B., Vosough, F., Ghasemi, Y. 2014. Biodiesel properties of native strain of *Dunaliella Salina*. *International Journal of Renewable Energy Research*. 4(1): 39-41.
- Ramos, M.J., Fernández, C.M., Casas, A., Rodríguez, L., Pérez, Á. 2009. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresource Technology*. 100(1): 261-268.
- Rawat, I., Kumar, R.R., Mutanda, T., Bux, F. 2013. Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. *Applied Energy*. 103: 444-467.
- Redel-Macías, M.D., Pinzi, S., Ruz, M.F., Cubero-Atienza, A.J., Dorado, M.P. 2012. Biodiesel from saturated and monounsaturated fatty acid methyl esters and their influence over noise and air pollution. *Fuel*. 97(0): 751-756.

- Salim, S., Shi, Z., Vermuë, M.H., Wijffels, R.H. 2013. Effect of growth phase on harvesting characteristics, autoflocculation and lipid content of *Ettlia texensis* for microalgal biodiesel production. *Bioresource Technology*. 138(0): 214-221.
- Schenk, P., Thomas-Hall, S., Stephens, E., Marx, U., Mussgnug, J., Posten, C., Hankamer, B. 2008. Second generation biofuels: High-Efficiency microalgae for biodiesel production. *BioEnergy Research*. 1(1): 20-43.
- Schwenk, D., Seppälä, J., Spilling, K., Virkki, A., Tamminen, T., Oksman-Caldentey, K.M., Rischer, H. 2013. Lipid content in 19 brackish and marine microalgae: influence of growth phase, salinity and temperature. *Aquatic Ecology*. 47(4): 415-424.
- Song, M., Pei, H., Hu, W., Ma, G. 2013. Evaluation of the potential of 10 microalgal strains for biodiesel production. *Bioresource Technology*. 141: 245-251.
- Tang, H., Abunasser, N., Garcia, M.E.D., Chen, M., Simon Ng, K.Y., Salley, S.O. 2011. Potential of microalgae oil from *Dunaliella tertiolecta* as a feedstock for biodiesel. *Applied Energy*. 88(10): 3324-3330.
- Takagi, M., Karseno, Yoshida, T. 2006. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglycerides in marine microalgae *Dunaliella* cells. *Bioscience and Bioengineering*. 3: 223-226.
- Talebi, A.F., Mohtashami, S.K., Tabatabaei, M., Tohidfar, M., Bagheri, A., Zeinalabedini, M., Bakhtiari, S. 2013a. Fatty acids profiling: A selective criterion for screening microalgae strains for biodiesel production. *Algal Research*. 2(3): 258-267.
- Talebi, A.F., Tabatabaei, M., Mohtashami, S.K., Tohhifar, M., Moradi, F. 2013b. Comparative salt stress study on intracellular ion concentration in marine and salt-adapted freshwater strains of microalgae. *Notulae Scientia Biologicae*. 5: 309-315.
- Thompson, G.A. 1994. Mechanisms of osmoregulation in the green alga *Dunaliella salina*. *Experimental Zoology*. 268: 127-132.
- Tornabene, T.G., Holzer, G., Peterson, S.L. 1980. Lipid profile of the halophilic alga, *Dunaliella salina*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 96(3): 1349-1356.
- Vanitha, A., Narayan, M.S., Murthy, K.N.C., Ravishankar, G.A. 2007. Comparative study of lipid composition of two halotolerant alga, *Dunaliella bardawil* and *Dunaliella salina*. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 58(5): 373-382.
- Venkata Mohan, S., Devi, M.P. 2014. Salinity stress induced lipid synthesis to harness biodiesel during dual mode cultivation of mixotrophic microalgae. *Bioresource Technology*. 165(0): 288-294.
- Viron, C., Saunois, A., André, P., Perly, B., Lafosse, M. 2000. Isolation and identification of unsaturated fatty acid methyl esters from marine micro-algae. *Analytica Chimica Acta*. 409(1-2): 257-266.
- Vo, T., Tran, D. 2014. Effects of salinity and light on growth of *Dunaliella* Isolates. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*. 2(5): 208-211 .
- Walne, P. 1970. Studies on the food value of nineteen genera of algae to juvenile bivalves of the genera *Ostrea*, *Crassostrea*, *Mercenaria*, and *Mytilis*. *Fish Invest*. 26: 1-62.
- Wan, C., Bai, F.W., Zhao, X.Q. 2013. Effects of nitrogen concentration and media replacement on cell growth and lipid production of oleaginous marine microalga *Nannochloropsis oceanica* DUT01. *Biochemical Engineering Journal*. 78(0): 32-38.
- Xu, X.Q., Beardall, J. 1997. Effect of salinity on fatty acid composition of a green microalga from an antarctic hypersaline lake. *Phytochemistry*. 45(4): 655-658.