

## **Investigating the production of biodiesel from *Dunaliella salina* grown in Guillard medium (f/2) modified with trace elements**

**Sakineh Yeganeh** 

\*Corresponding author. Professor, Department of Fisheries, Faculty of Animal Science & Fisheries, Sari Agricultural Sciences & Natural Resources University, Sari, Iran. E-mail address: skyeganeh@gmail.com

**Saeid Vahdat** 

Post-doc Student, Department of Fisheries, Faculty of Animal Science & Fisheries, Sari Agricultural Sciences & Natural Resources University, Sari, Iran. E-mail address: saeidvahdat1989@gmail.com

**Manizheh Biabani Asrami** 

PhD, Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries & Environmental sciences, Gorgan Agricultural Sciences & Natural Resources University, Gorgan, Iran. E-mail address: m\_biabani@ymail.com

**Mehdi Nikoo** 

Associate Professor, Department of Pathobiology and Quality Control, Artemia and Aquaculture Research Institute, Urmia University, Urmia Iran. E-mail address: mehdi.nikoo@ymail.com

---

### ***Abstract***

#### **Objective**

This study was conducted to evaluate the effects of trace elements on growth, oils content, fatty acid profiles, and biodiesel properties of *Dunaliella salina*.

#### **Materials and methods**

Algae cells were grown in Guillard medium (f/2) with a salinity of 117 g/L and with 19 nutrient treatments containing different concentrations of trace elements (25, 50 and 75% of the initial concentration of Guillard medium), with 3 repetitions. At the end of the experiment, dry weight and some selected growth parameters, lipids content, fatty acids, and biodiesel fuel properties were determined.

#### **Results**

Dry weight of algae was significantly influenced by addition levels of trace elements. The maximum algal biomass and fat content were observed in CuSO<sub>4</sub> with 75% of standard

concentration (1425.1 mg/L and 374 mg/biomass, respectively) and was significantly higher than the control treatment ( $P < 0.05$ ). Majority of the fatty acid methyl esters were between C14-18 and C22:1n9., The highest cetane number (82.7) and the lowest iodine value (123.5) were found in  $\text{CoCl}_2$  with 25% of the standard concentration treatment ( $P < 0.05$ ). Among all treatments, the highest degree of unsaturation was observed in the 25% manganese treatment ( $P < 0.05$ ). The highest and lowest amount of CFPP was observed in cobalt 75% (4.50°C) and cobalt 25% (-2.86°C) treatments, respectively; being significantly higher than the control treatment ( $P < 0.05$ ).

### Conclusions

High-quality biodiesel that was obtained from *D. salina* grown in  $\text{CoCl}_2$  with 25% of the standard concentration (higher cetane number and lower long-chain unsaturated fatty acids) showed the great potential for biodiesel production due to higher lipids content (197.92 mg/total biomass) than the control treatment (193.44 mg/total biomass) from lower mass quantity. The exposure of *D. salina* to trace elements deficiency revealed the ability of this algae to grow the same rate as control (in case of zinc, manganese, cobalt, and molybdate treatments 75%) or even higher growth (75% copper; 1425.1 mg/d.w.). The use of modified Guillard medium (f/2) could be beneficial during the cultivation period of *D. salina* to prevent biomass loss to some degree (e.g. nitrogen and phosphorus shock), resulting in higher lipids production.

**Keywords:** Trace elements, Algae Biomass, Biofuel, Fatty acids.

**Paper Type:** Research Paper.

**Citation:** Yeganeh S, Vahdat S, Biabani Asrami M, Nikoo M (2024) Investigating the production of biodiesel from *Dunaliella salina* grown in Guillard medium (f/2) modified with trace elements. *Agricultural Biotechnology Journal* 16 (3), 1-22.

---

*Agricultural Biotechnology Journal* 16 (3), 1-22.

DOI: 10.22103/jab.2024.22748.1540

Received: June 21, 2024.

Received in revised form: July 27, 2024.

Accepted: July 28, 2024.

Published online: September 30, 2024

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.




© the authors

## بررسی تولید بیودیزل از ریز جلبک *Dunaliella salina* پرورش یافته در محیط کشت گیلارد (f/2) اصلاح شده با عناصر کمیاب

سکینه یگانه 


\*نویسنده مسئول: استاد، گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

رایانامه: skyeganeh@gmail.com

سعید وحدت 


دانشجوی پسادکتر، گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران. رایانامه:

saeidvahdat1989@gmail.com

منیژه بیابانی اسرمی 

دکتر شیلات، گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان،

ایران. رایانامه: m\_biabani@ymail.com

مهدی نیکو 

دانشیار، گروه پاتوبیولوژی و کنترل کیفیت، پژوهشکده آرمیا و آبی پروری، دانشگاه ارومیه، ارومیه ایران. رایانامه:

mehdi.nikoo@ymail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۴/۰۱ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۳/۰۵/۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۰۷

### چکیده

**هدف:** این مطالعه به منظور ارزیابی اثرات عناصر کمیاب بر رشد، محتوای روغن، پروفایل اسیدهای چرب و خواص سوخت بیودیزل جلبک *Dunaliella salina* انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** سلول‌های *D. salina* در محیط کشت گیلارد (f/2) با شوری ۱۱۷ گرم بر لیتر و با ۱۹ تیمار غذای حاوی درصدهای مختلف از عناصر کمیاب (۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد از غلظت اولیه محیط کشت گیلارد برای هر عنصر) و با ۳ تکرار، رشد کردند. در انتهای آزمایش، وزن خشک، میزان چربی، اسیدهای چرب و خواص سوخت بیودیزل اندازه‌گیری شدند.

**نتایج:** وزن خشک جلبک به طور قابل توجهی تحت تأثیر غلظت‌های عناصر کمیاب قرار گرفت. حداکثر زیست توده جلبک و محتوای چربی در غلظت مس ۷۵ درصد به مقدار  $98/23 \pm 1425/08$  میلی‌گرم بر لیتر و  $374 \pm 5/32$  میلی‌گرم بر زیست توده مشاهده شد که نسبت به تیمار شاهد افزایش چند برابری را نشان داد ( $P > 0/05$ ). اکثر متیل استرهای اسید چرب بین C14-18 و C22:1n9 قرار داشتند. در تیمار کبالت ۲۵ درصد بالاترین عدد ستان ( $82/69$ ) و پایین‌ترین عدد ید ( $123/45$ ) مشاهده شد که دارای تفاوت معنی‌دار با تیمار شاهد بود ( $P > 0/05$ ). بالاترین مقدار درجه غیراشباعیت در تیمار منگنز ۲۵ درصد بصورت معنی‌دار مشاهده شد ( $P > 0/05$ ). بیشترین و کمترین میزان CFPP در تیمار کبالت ۷۵ درصد ( $4/50$  درجه سلسیوس) و کبالت ۲۵ درصد ( $2/86$  - درجه سلسیوس) مشاهده شد که نسبت به تیمار شاهد دارای تفاوت معنی‌داری بودند ( $P > 0/05$ ).

**نتیجه‌گیری:** بیودیزل با کیفیت بالای به دست آمده از زیست توده جلبک *D. salina* رشد یافته در تیمار کبالت ۲۵ درصد (عدد ستان بالاتر و اسیدهای چرب بلند زنجیره غیر اشباع پایین‌تر)، امکان کشت انبوه آن را برای تولید بیودیزل دارد چراکه با وجود تولید زیست توده کمتر، میزان چربی ( $197/92$  میلی‌گرم بر زیست توده کل) بیشتر از تیمار شاهد ( $193/44$  میلی‌گرم بر زیست توده کل) تولید می‌کند. حتی زیست توده جلبک *D. salina* که در معرض کمبود برخی از عناصر کمیاب قرار گرفته بود، توانای رشد به اندازه تیمار شاهد (همانند تیمارهای روی، منگنز، کبالت و مولیبدات ۷۵ درصد) و یا بیشتر (تیمار مس ۷۵ درصد با مقدار زیست توده  $1425/08$  میلی‌گرم وزن خشک) را نشان داد. پتانسیل استفاده از محیط کشت گیلارد ( $f/2$ ) تغییر یافته در بخش عناصر کمیاب می‌تواند در طول دوره پرورش بدون اینکه میزان زیادی از زیست توده را از دست بدهد (مانند زمانی که از شوک عناصر پر مصرف مانند نیتروژن و فسفر برای تولید چربی استفاده می‌شود)، مقدار چربی بیشتری را نسبت به تیمار شاهد حاصل کند.

**کلیدواژه‌ها:** عناصر کم نیاز، زیست توده جلبک، سوخت زیستی، اسیدهای چرب.

**نوع مقاله:** پژوهشی.

**استناد:** یگانه سکینه، وحدت سعید، بیابانی اسرمی منیژه، نیکو مهدی (۱۴۰۳) بررسی تولید بیودیزل از ریز جلبک *Dunaliella salina* پرورش یافته در محیط کشت گیلارد ( $f/2$ ) اصلاح شده با عناصر کمیاب. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۶(۳)، ۱-۲۲.



Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

## مقدمه

ریز جلبک *Dunaliella salina* با تقارن شعاعی دو طرفه و مسطح، به شکل خمیده یا کمی نامتقارن مشخص می‌شود. شکل سلولی آن‌ها از بیضی، بیضی-استوانه‌ای، گلابی شکل یا دوکی شکل تا تقریباً کروی متغیر است. در غلظت‌های نامساعد

محیطی مانند شوری، سلول‌ها می‌توانند مورفولوژی خود را تغییر دهند تا کیست‌های غیر جنسی، کروی شکل با دیواره‌های ضخیم و سطوح ناهموار تشکیل دهند که اغلب به آن آپلانوسپور می‌گویند (Yang et al. 2011). عناصر ریز مغذی در جلبک‌ها همانند آهن به دلیل دخالت مستقیم آن در ساخت کلروفیل، تنفس، تثبیت نیتروژن و فتوسنتز برای جلبک‌ها اهمیت ویژه‌ای دارد (Alexova et al. 2011). روی ساختار پروتئین را حفظ می‌کند و به انتقال و تثبیت CO<sub>2</sub> در آنزیم کربنیک انهدراز و آلکالین فسفاتاز، آنزیمی که فسفر را از استرهای فسفات آلی به دست می‌آورد، کمک می‌کند (Baptista & Vasconcelos 2006). مس به عنوان یک ریز مغذی، جزئی از سیتوکروم اکسیداز و پلاستوسیانین در زنجیره انتقال الکترون است که نور را به انرژی شیمیایی تبدیل می‌کند (Burnat et al. 2009). مولیبدات برای جذب نیتروژن معدنی مورد نیاز است و یک کوفاکتور در آنزیم نیتروژناز تثبیت‌کننده N<sub>2</sub> می‌باشد (Glass et al. 2012). کبالت اغلب با ویتامین B<sub>12</sub>، گروه متنوعی از کورینوئیدها که در انتقال گروه‌های متیل و واکنش‌های بازآرای در متابولیسم سلولی نقش دارند، مرتبط است (Helliwell et al. 2016). منگنز یکی از فراوان‌ترین فلزات واسطه بر روی زمین است و به دلیل نقشی که در تیلاکوئیدها دارد، برای فتوسنتز ضروری است، به طوری که چهار اتم منگنز برای هر کمپلکس اکسیدکننده آب در فتوسیستم دو (در طی واکنش‌های نوری فتوسنتز) مورد نیاز است (Lehman et al. 2004; Burnat et al. 2009).

از دهه ۱۹۷۰، بیشتر تحقیقات در مورد تولید سوخت زیستی جلبکی بر شناسای گونه‌های با بیشترین پتانسیل برای تولید سوخت (Pandey et al. 2019) و یا اصلاح ژنتیکی سویه‌ها برای افزایش خواص مطلوب (Sebesta et al. 2022) متمرکز شده است. ریزجلبک‌ها حاوی مقدار مناسبی از چربی‌ها هستند (۲۰ تا ۵۰ درصد وزن خشک سلول و تا ۸۰ درصد از وزن خشک سلول برای *Botryococcus braunii*) که می‌توانند به بیودیزل و سایر سوخت‌های زیستی مانند اتانول و بیوگاز تبدیل شوند (Hirano et al., 2019). کاهش هزینه‌های تولید محصولاتی مانند بیودیزل یکی از چالش‌های مهم می‌باشد. بنابراین، توسعه یک فرآیند کم هزینه، قوی و کارآمد برای کشت جلبک برای دستیابی به تولید تجاری این محصولات بسیار مهم است (Zuorro et al. 2021). بهره‌وری زیست توده و چربی را می‌توان با تنظیم کافی ترکیب محیط کشت افزایش داد. برخی مطالعات نشان می‌دهد که سویه *Scenedesmus obliquus* BR003 می‌تواند در انبوهی از محیط‌های کشت مبتنی بر کودهای کم هزینه رشد کند (Soares et al. 2018). همچنین تنظیم مواد مغذی موجود در محیط کشت می‌تواند سوخت زیستی و ذخیره چربی‌ها را در سلول‌های ریزجلبک تحریک کند. عناصر کمیاب بر تولید و ترکیب چربی‌ها در ریز جلبک *Nannochloropsis oculata* تأثیر می‌گذارند (Reetu et al. 2024). با این حال، توجه کمی به اثرات عناصر کمیاب بر بهره‌وری چربی در ریز جلبک *D. salina* شده است. در این تحقیق، در مورد پاسخ خاص سلول‌های *D. salina* به کاهش مواد کمیاب (کم مصرف) تحت شرایط کنترل شده در طول مدت پرورش مطالعه شده است. اثرات کاهش مواد کمیاب بر ویژگی‌های رشد و بهره‌وری زیست توده، و همچنین اثرات آن بر اسیدهای چرب سوخت زیستی تولید شده، مورد بررسی قرار گرفته است.

## مواد و روش‌ها

**گونه جلبکی:** گونه ریز جلبک (*Dunaliella Salina* (UTEX LB200) از بانک جلبکی دانشگاه آستین تگزاس (آمریکا) تهیه شده بود.

**محیط کشت جلبک:** از محیط کشت گیلارد (f/2) برای این مطالعه استفاده شد (Guillard 1973). مواد پر نیاز شامل:  $10^{-4} \times 8/82$  مولار از نیترات سدیم و  $10^{-5} \times 3/62$  مولار از مونوسدیم فسفات (۲ آبه) بود. مواد کم نیاز (کمیاب) شامل  $10^{-5} \times 1/17$  مولار آهن کلراید (۶ آبه)،  $10^{-5} \times 1/17$  مولار نمک سدیم دار EDTA (۲ آبه)،  $10^{-8} \times 3/93$  مولار مس سولفات (۵ آبه)،  $10^{-8} \times 2/60$  مولار مولیبدات سدیم (۲ آبه)،  $10^{-8} \times 7/65$  مولار سولفات روی (۷ آبه)،  $10^{-8} \times 4/20$  مولار کلرید کبالت (۶ آبه) و  $10^{-7} \times 9/10$  مولار کلرید منگنز (۴ آبه) بود. محلول ویتامین حاوی  $10^{-7} \times 2/96$  مولار تیامین HCl (ویتامین ب ۱)،  $10^{-9} \times 2/05$  مولار بیوتین (ویتامین H) و  $10^{-10} \times 3/69$  مولار سیانوکوبالامین (ویتامین ب ۱۲) بود.

**شرایط پرورش:** پرورش جلبک *D. salina* در ظروف ۱۰ لیتری حاوی ۱ لیتر استوک جلبک و ۸ لیتر آب تازه صورت پذیرفت. تراکم اولیه برابر با  $110 \pm 25$  میلی‌گرم جلبک در لیتر (وزن خشک)، شوری محیط پرورش ۱۱۷ گرم بر لیتر نمک کلرید سدیم (۲ مولار)، دما  $23 \pm 1$  درجه سلسیوس، دوره نوری ۱۲:۱۲ (تاریکی/روشنایی) و شدت نوری ۱۰۰ میکرومول بر متر مربع بر ثانیه با استفاده از ۲ عدد لامپ فلئورسانت ۴۰ واتی بود. محیط کشت گیلارد (f/2) با استفاده از آب دیونیزه ساخته شد. ریز جلبک *D. salina* برای مدت ۱۲ روز در ۱۹ تیمار مختلف از عناصر کمیاب مورد مطالعه قرار گرفت. در طی مدت زمان پرورش، محیط کشت گیلارد به عنوان تیمار کنترل و در سایر تیمارها غلظت‌های کاهشی از مواد کمیاب در سطوح ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد از میزان آن عنصر در محیط کشت گیلارد (f/2) مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۱).

**آنالیز رشد سلولی:** مقدار یک میلی‌لیتر جلبک زنده از محیط پرورش برداشت شده و در طول موج ۷۵۰ نانومتر خوانده شد (Wang et al. 2014) و سپس رابطه رگرسیونی زیر (با استفاده از نرم افزار اکسل، Excel 2016) برای وزن خشک و غلظت، محاسبه شد:

$$\text{Biomass (g. L}^{-1}\text{) } D. \text{ salina} = 0.834 * \text{OD}_{750} + 0.0924 \text{ R}^2 = 0.983(1) \text{ رابطه}$$

**آنالیز چربی:** استخراج چربی بر اساس AOAC (۲۰۰۵) انجام شد. برای این کار ۰/۵ گرم نمونه خشک توزین شده و به مدت ۷ ساعت به سوکسله حاوی دی اتیل اتر ۹۸ درصد منتقل شد تا چربی شسته شود. سپس نمونه‌ها از سوکسله خارج شدند و به مدت ۲ ساعت در خشک کن (دسیکاتور) قرار گرفتند. مقدار چربی هر نمونه بر حسب میلی‌گرم بر گرم ماده خشک بیان شد.

جدول ۱. تیمارهای مختلف *Dunaliella salina* در زمان پرورش ۱۲ روزه (تمامی تیمارها با ۳ تکرار انجام شدند)

Table 1. Different treatments of *Dunaliella salina* during 12 days of cultivation (n=3)

غلظت‌های مختلف از عناصر کمیاب	تیمارها
Guillard medium محیط کشت گیلارد	شاهد Control
منیزیم سولفات با ۵۰ درصد مقدار استاندارد در محیط کشت گیلارد ZnSO <sub>4</sub> with 50% of standard concentration	روی ۵۰ درصد Zn 50%
منیزیم سولفات با ۲۵ درصد مقدار استاندارد در محیط کشت گیلارد ZnSO <sub>4</sub> with 25% of standard concentration	روی ۲۵ درصد Zn 25%
منیزیم سولفات با ۷۵ درصد مقدار استاندارد در محیط کشت گیلارد ZnSO <sub>4</sub> with 75% of standard concentration	روی ۷۵ درصد Zn 75%
مس سولفات با ۵۰ درصد مقدار استاندارد در محیط کشت گیلارد CuSO <sub>4</sub> with 50% of standard concentration	مس ۵۰ درصد Cu 50%
مس سولفات با ۲۵ درصد مقدار استاندارد در محیط کشت گیلارد CuSO <sub>4</sub> with 25% of standard concentration	مس ۲۵ درصد Cu 25%
مس سولفات با ۷۵ درصد مقدار استاندارد در محیط کشت گیلارد CuSO <sub>4</sub> with 75% of standard concentration	مس ۷۵ درصد Cu 75%
کلرید منگنز با ۵۰ درصد مقدار استاندارد در محیط کشت گیلارد MnCl <sub>2</sub> with 50% of standard concentration	منگنز ۵۰ درصد Mn 50%
کلرید منگنز با ۲۵ درصد مقدار استاندارد در محیط کشت گیلارد MnCl <sub>2</sub> with 25% of standard concentration	منگنز ۲۵ درصد Mn 25%
کلرید منگنز با ۷۵ درصد مقدار استاندارد در محیط کشت گیلارد MnCl <sub>2</sub> with 75% of standard concentration	منگنز ۷۵ درصد Mn 75%
کلرید آهن با ۵۰ درصد مقدار استاندارد در محیط کشت گیلارد FeCl <sub>3</sub> with 50% of the standard concentration	آهن ۵۰ درصد Fe 50%
کلرید آهن با ۲۵ درصد مقدار استاندارد در محیط کشت گیلارد FeCl <sub>3</sub> with 25% of the standard concentration	آهن ۲۵ درصد Fe 25%
کلرید آهن با ۷۵ درصد مقدار استاندارد در محیط کشت گیلارد FeCl <sub>3</sub> with 75% of the standard concentration	آهن ۷۵ درصد Fe 75%
کلرید کبالت با ۵۰ درصد مقدار استاندارد در محیط کشت گیلارد CoCl <sub>2</sub> with 50% of the standard concentration	کبالت ۵۰ درصد Co 50%
کلرید کبالت با ۲۵ درصد مقدار استاندارد در محیط کشت گیلارد CoCl <sub>2</sub> with 25% of the standard concentration	کبالت ۲۵ درصد Co 25%
کلرید کبالت با ۷۵ درصد مقدار استاندارد در محیط کشت گیلارد CoCl <sub>2</sub> with 75% of the standard concentration	کبالت ۷۵ درصد Co 75%
مولیبدات سدیم با ۵۰ درصد مقدار استاندارد در محیط کشت گیلارد Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> with 50% of the standard concentration	مولیبدات ۵۰ درصد Mo 50%
مولیبدات سدیم با ۲۵ درصد مقدار استاندارد در محیط کشت گیلارد Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> with 25% of the standard concentration	مولیبدات ۲۵ درصد Mo 25%
مولیبدات سدیم با ۷۵ درصد مقدار استاندارد در محیط کشت گیلارد Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> with 75% of the standard concentration	مولیبدات ۷۵ درصد Mo 75%

**ساخت بیودیزل:** یک میلی‌لیتر از چربی (روغن)، در یک تیوب ۱۰ میلی‌لیتری ریخته شده و در دمای ۶۰ درجه سلسیوس

در آون فن دار به مدت ۳۰ دقیقه گرم شد تا رطوبت آن حذف شود. سپس روغن گرم شده تا دمای ۳۸/۵۰ درجه سلسیوس خنک

شد. یک گرم سود (NaOH) و ۶ میلی‌لیتر متانول به یک گرم روغن اضافه شده و به مدت چند دقیقه تکان داده شد تا کاتالیزور کاملاً حل شود. پس از بستن در، تیوب‌ها به مدت ۳۰ دقیقه روی شیکر با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. سپس تیوب‌ها در محل خنک (دمای اتاق، ۲۴ درجه سلسیوس و محل تاریک) به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. در این حالت گلیسرین تیره رنگ در پایین رسوب کرد در حالی که یک لایه مایع کم رنگ (متیل استر) در بالا مشاهده شد (Wu et al. 1998).

**شستشوی بیودیزل:** بیودیزل به یک قیف جداکننده (دکانتور) ۵۰ میلی‌لیتر منتقل شد و پس از آن مقدار برابر (مقدار وزنی) با بیودیزل آب مقطر اضافه شد. قیف جداکننده (دکانتور) به آرامی چرخانده شد و سپس برای چند دقیقه استراحت داده شد و با باز کردن شیر قیف جداکننده (دکانتور)، آب از ته قیف خارج شد. این روش برای اطمینان از شستشوی کامل دو بار تکرار شد و بیودیزل با حرارت دادن (در دمای ۶۰ درجه و با استفاده از آون فن‌دار) خشک شد و روغن استری شده برداشت شد (Tat & Van 1999).

**پروفاایل اسیدهای چرب:** ترکیب اسیدهای چرب روغن متیل استر (سوخت بیودیزل) جلبک با استفاده از روش Miquel (1992) & Browse مشخص شد.

**مشخصه‌های کیفی بیودیزل:** کیفیت بیودیزل تولید شده از روغن جلبک *D. salina* در تیمارهای مختلف با استفاده از روابط زیر محاسبه شد (Iyer 2016):

$$SV = \Sigma(560 \times F) / M \quad \text{رابطه ۲}$$

$$IV = \Sigma(254 \times F \times D) / M \quad \text{رابطه ۳}$$

$$CN = (46.3 + 5458 / SV) - (0.225 \times IV) \quad \text{رابطه ۴}$$

$$DU = (MUFAwt\%) + (2 \times PUFAwt\%) \quad \text{رابطه ۵}$$

در این روابط F درصد اسیدهای چرب، M وزن مولکولی اسیدهای چرب، D تعداد باندهای دوگانه، MUFA درصد اسیدهای چرب تک غیر اشباع و PUFA درصد اسیدهای چرب غیر اشباع چندگانه می‌باشد. SV عدد صابونی شدن، IV عدد یونی، CN عدد ستان و DU درجه غیر اشباعیت می‌باشد.

**خواص جریان‌ی سرد:** روش‌های آزمایش برای ارزیابی خواص جریان‌ی با استفاده از معادلات زیر از ترکیب اسیدهای چرب بدست آمد (Iyer 2016).

$$LCSF (^{\circ}C) = (0.1 \times C16:0) + (0.5 \times C18:0) + (1 \times C20:0) + (1.5 \times C22:0) + (2 \times C24:0) \quad \text{رابطه ۶}$$

$$CFPP (^{\circ}C) = (3.1417 \times LCSF) - 16.477 \quad \text{رابطه ۷}$$

در این روابط C16:0 درصد اسید چرب پالمیتیک اسید، C18:0 درصد اسید چرب استئاریک اسید، C20:0 درصد اسید چرب آراشیدیک اسید، C22:0 درصد اسید چرب بهنیک اسید و C24:0 درصد اسید چرب لیگنوسریک اسید می‌باشند.



**گرمای احتراق:** ارزش حرارتی ناخالص (H) یا محتوای حرارتی روغن‌های گیاهی که مقدار حرارتی است که با سوختن

مول روغن به CO<sub>2</sub> و H<sub>2</sub>O ایجاد می‌شود و از شاخص‌های ساختاری آن با استفاده از معادله زیر به دست آمد (Ali & Manna, 1994).

$$H \text{ (KJ/kg)} = 47.645 - [4.187(IV) + 38.31(SV)] \quad \text{رابطه ۸}$$

در این رابطه IV عدد یونی و SV عدد صابونی شدن می‌باشد.

**آنالیز آماری:** قبل از آنالیز آماری از تست کولموگروف-اسمیرنوف برای نرمال بودن و همگن بودن داده‌ها استفاده شد. از

تجزیه واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) در نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۲) استفاده شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح معنی‌داری ۵ درصد استفاده شد ( $P < 0.05$ ).

### نتایج

بر اساس داده‌ها بالاترین میزان زیست توده کل تولید شده در تیمار مس ۷۵ درصد بود که نسبت به تیمار شاهد (یک) و

سایر تیمارها دارای تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد بود (جدول ۲). همچنین بالاترین میزان چربی تولید شده در جلبک *D.*

*salina* در تیمار مس ۷۵ درصد با مقدار ۳۷۴/۸۸ میلی‌گرم بر زیست توده کل مشاهده شد که نسبت به تیمار شاهد در حدود ۱/۹

برابر چربی بیشتری تولید نمود ( $P < 0.05$ ). پروفایل اسیدهای چرب اشباع در سوخت زیستی (روغن استری شده) در جدول ۳ نشان

داده شده است. بالاترین مقدار اسیدهای چرب مریستیک اسید (۱۱/۶۰ درصد)، پالمیتیک اسید (۱۸/۲۵ درصد) و مجموع اسیدهای

چرب اشباع (۳۴/۴۵ درصد) در تیمار مس ۵۰ درصد مشاهده شد که نسبت به تیمار شاهد و سایر تیمارها دارای تفاوت معنی‌داری

بود. مقدار اسید چرب آراشیدیک اسید در تیمار مس ۵۰ درصد کمترین مقدار (۰/۴۵ درصد) و در تیمار مولیبدات ۲۵ درصد بالاترین

مقدار (۱/۴۴ درصد) را نشان دادند. در تیمارهای کبالت ۷۵ درصد و مس ۵۰ درصد، اسیدچرب استئاریک اسید در روغن استری شده

سوخت زیستی نسبت به تیمار شاهد مقدار بیشتری داشتند و دارای تفاوت معنی‌داری بودند ( $P < 0.05$ ). اسیدهای چرب تک غیر اشباع

در جدول ۴ نشان داد که در بین تیمارهای این مطالعه در اسید چرب مریستولئیک اسید تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. پالمیتولئیک

اسید در تیمار آهن ۷۵ درصد (۱۹/۰۷ درصد) بالاترین مقدار را به صورت معنی‌دار در بین تیمارهای مختلف از خود نشان داد. اولئیک

اسید در تیمار کبالت ۷۵ درصد (۶/۵۸ درصد) بیشترین مقدار را نسبت به سایر تیمارها نشان داد. واکسینیک اسید در تیمارهای مس

۵۰ درصد، کبالت ۷۵ درصد و مولیبدات ۷۵ درصد بیشترین مقدار را بصورت معنی‌دار نسبت به تیمار شاهد نشان دادند. ایکوزنوئیک

اسید در تیمار شاهد به مقدار ۹/۲۴ درصد بیشترین مقدار را نسبت به سایر تیمارها از خود نشان داد. اروسیک اسید در تیمار منگنز ۲۵

درصد با ۹/۱۵ درصد بیشترین مقدار را بصورت معنی‌دار از خود نشان داد. نروونیک اسید با ۰/۸۳ درصد در تیمار کبالت ۵۰ درصد

بالاترین مقدار بصورت معنی‌دار مشاهده شد. همچنین مجموع اسیدهای چرب تک غیر اشباع در تیمار شاهد و مولیبدات ۲۵ درصد

بیشترین مقدار را بصورت معنی‌دار از خود نشان دادند ( $P < 0.05$ ) (جدول ۴).

جدول ۲. پارامترهای رشدی در جلبک *Dunaliella salina* در تیمارهای مختلف

Table 2. Growth parameters in *Dunaliella salina* at different treatments

تیمارها Treatments	زیست توده کل (میلی گرم بر لیتر) Total Biomass (mg. mL)	بازدهی زیست توده (میلی گرم بر لیتر در روز) Biomass productivity (mg. L. d)	چربی (میلی گرم بر زیست توده کل) Lipid (mg. Total Biomass)
شاهد Control	1177.48±48.59 <sup>f</sup>	96.47±4.09 <sup>f</sup>	193.44±13.09 <sup>def</sup>
روی ۵۰ درصد Zn 50%	557.33±7.77 <sup>d</sup>	44.79±0.64 <sup>d</sup>	131.56±2.20 <sup>abc</sup>
روی ۲۵ درصد Zn 25%	435.56±13.22 <sup>abc</sup>	34.64±1.10 <sup>abc</sup>	130.64±7.71 <sup>abc</sup>
روی ۷۵ درصد Zn 75%	1235.74±44.56 <sup>f</sup>	101.32±3.71 <sup>f</sup>	255.91±4.67 <sup>hi</sup>
مس ۵۰ درصد Cu 50%	547.17±5.93 <sup>d</sup>	43.94±0.49 <sup>d</sup>	113.28±5.72 <sup>ab</sup>
مس ۲۵ درصد Cu 25%	430.82±5.26 <sup>abc</sup>	34.25±0.43 <sup>abc</sup>	123.79±3.34 <sup>abc</sup>
مس ۷۵ درصد Cu 75%	1425.08±98.23 <sup>g</sup>	117.10±8.18 <sup>g</sup>	374.88±5.32 <sup>l</sup>
منگنز ۵۰ درصد Mn 50%	573.14±3.03 <sup>d</sup>	46.11±0.25 <sup>d</sup>	182.02±7.54 <sup>def</sup>
منگنز ۲۵ درصد Mn 25%	450.79±4.11 <sup>abc</sup>	35.91±0.34 <sup>abc</sup>	151.11±2.58 <sup>bcd</sup>
منگنز ۷۵ درصد Mn 75%	1134.43±24.52 <sup>f</sup>	92.88±2.04 <sup>f</sup>	337.18±4.52 <sup>kl</sup>
آهن ۵۰ درصد Fe 50%	435.56±13.22 <sup>abc</sup>	34.64±1.10 <sup>abc</sup>	163.57±5.28 <sup>cde</sup>
آهن ۲۵ درصد Fe 25%	316.57±6.76 <sup>a</sup>	24.73±0.56 <sup>a</sup>	186.06±3.48 <sup>def</sup>
آهن ۷۵ درصد Fe 75%	785.66±48.18 <sup>e</sup>	63.82±4.01 <sup>e</sup>	274.69±18.84 <sup>ij</sup>
کبالت ۵۰ درصد Co 50%	599.76±6.21 <sup>d</sup>	48.33±0.51 <sup>d</sup>	190.16±1.70 <sup>def</sup>
کبالت ۲۵ درصد Co 25%	455.46±4.13 <sup>abc</sup>	36.30±0.34 <sup>abc</sup>	197.92±4.20 <sup>efg</sup>
کبالت ۷۵ درصد Co 75%	1236.12±170.83 <sup>f</sup>	101.36±14.23 <sup>f</sup>	305.72±45.95 <sup>ik</sup>
مولیبدات ۵۰ درصد Mo 50%	605.15±6.23 <sup>d</sup>	48.77±0.51 <sup>d</sup>	224.78±3.89 <sup>fgh</sup>
مولیبدات ۲۵ درصد Mo 25%	408.30±2.56 <sup>ab</sup>	32.37±0.21 <sup>ab</sup>	102.00±3.53 <sup>a</sup>
مولیبدات ۷۵ درصد Mo 75%	1175.53±60.11 <sup>f</sup>	96.31±5.00 <sup>f</sup>	239.61±13.25 <sup>ghi</sup>

در هر ستون اعداد دارای حروف مشابه بر اساس آزمون دانکن بدون اختلاف معنی دار با یکدیگر در سطح ۵ درصد می باشند ( $P < 0.05$ ).

جدول ۵ اسیدهای چرب بلند زنجیره چندگانه غیر اشباع روغن استری شده سوخت زیستی را نشان می دهد. بر اساس نتایج، تیمارهای مولیبدات ۷۵ درصد و مس ۵۰ درصد، لینولئیک اسید را بالاتر از سایر تیمارها نشان دادند. آلفا-لینولنیک (۱۲/۰۸ درصد) و ایکوزادینوئیک اسید (۳/۰۱ درصد) در تیمار منگنز ۲۵ درصد بیشترین مقدار را بصورت معنی دار از خود نشان داد. آراشیدونیک اسید (۱/۰۹ درصد) در تیمار مولیبدات ۲۵ درصد دارای بالاترین مقدار نسبت به تیمار شاهد بود. ایکوزاتریئوئیک اسید و ایکوزاپنتانوئیک اسید در تیمارهای مولیبدات ۲۵ درصد، منگنز ۲۵ درصد و تیمار شاهد بیشترین مقدار را بصورت معنی دار از خود نشان دادند. دوکوزاهگزانوئیک اسید در تیمارهای شاهد و منگنز ۲۵ درصد بالاترین مقدار را نشان دادند. همچنین، مجموع اسیدهای چرب غیر اشباع چندگانه در تیمارهای روی ۲۵ درصد، منگنز ۲۵ درصد و منگنز ۷۵ درصد نسبت به تیمار شاهد مقدار بالاتری را بصورت معنی دار از خود نشان دادند ( $P < 0.05$ ) (جدول ۵).

جدول ۳. پروفایل اسیدهای چرب اشباع بیودیزل (متیل استر شده) در جلبک *Dunaliella salina* پرورش

یافته تحت شرایط مختلف (اعداد بر حسب درصد می باشند)

**Table 3. Profile of saturated fatty acids of biodiesel (methyl esterified) in *Dunaliella salina* grown under different conditions (numbers are in percentage)**

مجموع اسیدهای چرب اشباع Total saturated fatty acids (SFA)	آراشیدیک اسید Arachidic acid (C20)	استئاریک اسید Stearic acid (C18)	پالمیتیک اسید Palmitic acid (C16)	مریستیک اسید Myristic acid (C14)	تیمارها Treatments
24.59±0.56 <sup>bc</sup>	1.26±0.14 <sup>fgh</sup>	4.99±0.14 <sup>b</sup>	11.20±0.14 <sup>c</sup>	7.12±0.14 <sup>bc</sup>	شاهد Control
31.52±0.63 <sup>fgh</sup>	0.66±0.07 <sup>abc</sup>	6.60±0.18 <sup>def</sup>	14.82±0.18 <sup>g</sup>	9.42±0.18 <sup>gh</sup>	روی ۵۰ درصد Zn 50%
22.86±0.52 <sup>ab</sup>	1.17±0.13 <sup>efgh</sup>	4.64±0.13 <sup>ab</sup>	10.42±0.13 <sup>b</sup>	6.62±0.13 <sup>b</sup>	روی ۲۵ درصد Zn 25%
30.35±0.64 <sup>ef</sup>	0.95±0.10 <sup>cdefg</sup>	6.29±0.17 <sup>cde</sup>	14.12±0.17 <sup>f</sup>	8.97±0.17 <sup>fg</sup>	روی ۷۵ درصد Zn 75%
38.45±0.74 <sup>j</sup>	0.45±0.05 <sup>a</sup>	8.13±0.23 <sup>i</sup>	18.25±0.23 <sup>j</sup>	11.60±0.23 <sup>k</sup>	مس ۵۰ درصد Cu 50%
23.39±0.53 <sup>bc</sup>	1.19±0.13 <sup>efgh</sup>	4.75±0.13 <sup>ab</sup>	10.66±0.13 <sup>b</sup>	6.77±0.13 <sup>b</sup>	مس ۲۵ درصد Cu 25%
33.36±0.67 <sup>h</sup>	0.72±0.08 <sup>abcd</sup>	6.99±0.19 <sup>fg</sup>	15.67±0.19 <sup>h</sup>	9.96±0.19 <sup>i</sup>	مس ۷۵ درصد Cu 75%
29.29±0.61 <sup>de</sup>	0.83±0.09 <sup>bcde</sup>	6.09±0.17 <sup>cd</sup>	13.67±0.17 <sup>ef</sup>	8.69±0.17 <sup>ef</sup>	منگنز ۵۰ درصد Mn 50%
25.28±0.58 <sup>c</sup>	1.29±0.14 <sup>gh</sup>	5.13±0.14 <sup>b</sup>	11.52±0.14 <sup>c</sup>	7.32±0.14 <sup>c</sup>	منگنز ۲۵ درصد Mn 25%
32.52±0.67 <sup>gh</sup>	0.92±0.10 <sup>cdef</sup>	6.76±0.19 <sup>ef</sup>	15.18±0.19 <sup>gh</sup>	9.65±0.19 <sup>hi</sup>	منگنز ۷۵ درصد Mn 75%
28.02±0.61 <sup>d</sup>	0.55±0.09 <sup>ab</sup>	5.82±0.17 <sup>c</sup>	13.40±0.17 <sup>e</sup>	8.42±0.17 <sup>de</sup>	آهن ۵۰ درصد Fe 50%
22.81±0.52 <sup>ab</sup>	1.16±0.13 <sup>efgh</sup>	4.63±0.13 <sup>ab</sup>	10.39±0.13 <sup>b</sup>	6.61±0.13 <sup>b</sup>	آهن ۲۵ درصد Fe 25%
36.10±0.75 <sup>i</sup>	1.02±0.11 <sup>defg</sup>	7.51±0.21 <sup>gh</sup>	16.85±0.21 <sup>i</sup>	10.71±0.21 <sup>j</sup>	آهن ۷۵ درصد Fe 75%
29.91±0.61 <sup>def</sup>	0.98±0.09 <sup>cdefg</sup>	6.25±0.17 <sup>cde</sup>	13.82±0.17 <sup>ef</sup>	8.84±0.17 <sup>ef</sup>	کبالت ۵۰ درصد Co 50%
20.98±0.46 <sup>a</sup>	1.24±0.11 <sup>efgh</sup>	4.30±0.11 <sup>a</sup>	9.39±0.11 <sup>a</sup>	6.04±0.11 <sup>a</sup>	کبالت ۲۵ درصد Co 25%
30.51±0.59 <sup>ef</sup>	1.22±0.03 <sup>efgh</sup>	8.33±0.23 <sup>i</sup>	12.80±0.16 <sup>d</sup>	8.14±0.16 <sup>d</sup>	کبالت ۷۵ درصد Co 75%
29.25±0.61 <sup>de</sup>	0.82±0.09 <sup>bcde</sup>	6.08±0.17 <sup>cd</sup>	13.66±0.17 <sup>ef</sup>	8.68±0.14 <sup>ef</sup>	مولیبدات ۵۰ درصد Mo 50%
23.92±0.52 <sup>bc</sup>	1.44±0.13 <sup>h</sup>	4.91±0.13 <sup>b</sup>	10.67±0.13 <sup>b</sup>	6.88±0.13 <sup>bc</sup>	مولیبدات ۲۵ درصد Mo 25%
31.34±0.60 <sup>fg</sup>	1.17±0.03 <sup>efgh</sup>	8.00±0.22 <sup>hi</sup>	13.54±0.17 <sup>e</sup>	8.61±0.17 <sup>def</sup>	مولیبدات ۷۵ درصد Mo 75%

در هر ستون اعداد دارای حروف مشابه بر اساس آزمون دانکن بدون اختلاف معنی دار با یکدیگر در سطح ۵ درصد می باشند ( $P < 0.05$ ).

پارامترهای کیفی سوخت زیستی در جدول ۶ نشان داده شده است که بر اساس آن تیمارهای منگنز ۷۵ درصد و مولیبدات ۷۵ درصد بالاترین مقدار عدد ید (IV) و عدد صابونی شدن (SV) را نسبت به تیمار شاهد از خود نشان دادند. تیمار کبالت ۲۵ درصد بالاترین مقدار عدد ستان را نسبت به تیمار شاهد بصورت معنی دار از خود نشان داد. بالاترین مقدار درجه غیراشباعیت در تیمار منگنز ۲۵ درصد بصورت معنی دار مشاهده شد. تیمار مولیبدات ۷۵ درصد بیشترین مقدار LCSF را بصورت معنی دار نسبت به سایر تیمارها از خود نشان داد. بیشترین و کمترین میزان CFPP در تیمار کبالت ۷۵ درصد (۴/۵۰ درجه سلسیوس) و کبالت ۲۵ درصد (۲/۸۶- درجه سلسیوس) مشاهده شد که نسبت به تیمار شاهد دارای تفاوت معنی داری بودند. انرژی حرارتی ناخالص یا گرمای احتراق (H) در تیمار کبالت ۲۵ درصد (۴۶۸۰۲/۲۳ کیلوژول بر کیلوگرم) مشاهده شد که دارای تفاوت معنی داری با سایر تیمارها بود ( $P < 0.05$ ).

جدول ۴. پروفایل اسیدهای چرب تک غیر اشباع بیودیزل (متیل استر شده) در جلبک *Dunaliella salina* پرورش یافته تحت شرایط مختلف (اعداد بر حسب درصد می‌باشند)

**Table 4. Profile of monounsaturated fatty acids of biodiesel (methyl esterified) in *Dunaliella salina* grown under different conditions (numbers are in percentage)**

تیمارها Treatments	مریستولئیک اسید Myristoleic acid (C14:1n5)	پالمیتولئیک اسید Palmitoleic acid (C16:1n7)	اولئیک اسید Oleic acid (C18:1n9)	واکسینیک اسید Vaccinic acid (C18:1n7)	ایکوزنوئیک اسید Eicosanoic acid (C20:1n9)	اروسیک اسید erucic acid (C22:1n9)	نروونیک اسید Nervonic acid (C24:1n9)	مجموع اسیدهای چرب تک غیر اشباع Total monounsaturated fatty acids (MUFA)
شاهد Control	0.71±0.14 <sup>a</sup>	13.35±0.14 <sup>b</sup>	3.94±0.14 <sup>ab</sup>	3.35±0.14 <sup>ab</sup>	9.24±0.14 <sup>i</sup>	8.90±0.19 <sup>j</sup>	0.19±0.08 <sup>ab</sup>	29.71±0.35 <sup>lm</sup>
روی ۵۰ درصد Zn 50%	0.93±0.18 <sup>a</sup>	17.66±0.18 <sup>ef</sup>	5.22±0.18 <sup>ef</sup>	4.43±0.18 <sup>de</sup>	4.85±0.07 <sup>b</sup>	4.67±0.10 <sup>c</sup>	0.10±0.04 <sup>a</sup>	19.02±0.07 <sup>b</sup>
روی ۲۵ درصد Zn 25%	0.66±0.13 <sup>a</sup>	12.41±0.13 <sup>ab</sup>	3.66±0.13 <sup>ab</sup>	3.11±0.13 <sup>a</sup>	8.59±0.13 <sup>h</sup>	8.27±0.18 <sup>i</sup>	0.18±0.07 <sup>ab</sup>	27.62±0.32 <sup>ijk</sup>
روی ۷۵ درصد Zn 75%	0.89±0.17 <sup>a</sup>	16.82±0.17 <sup>de</sup>	4.97±0.17 <sup>def</sup>	4.22±0.17 <sup>cde</sup>	7.02±0.11 <sup>f</sup>	6.76±0.07 <sup>g</sup>	0.15±0.06 <sup>a</sup>	24.73±0.19 <sup>gh</sup>
مس ۵۰ درصد Cu 50%	1.15±0.23 <sup>a</sup>	20.79±0.72 <sup>h</sup>	6.42±0.23 <sup>hi</sup>	5.46±0.23 <sup>g</sup>	3.32±0.05 <sup>a</sup>	3.20±0.18 <sup>b</sup>	0.06±0.00 <sup>a</sup>	16.14±0.05 <sup>a</sup>
مس ۲۵ درصد Cu 25%	0.67±0.13 <sup>a</sup>	12.70±0.13 <sup>b</sup>	3.75±0.13 <sup>ab</sup>	3.19±0.13 <sup>a</sup>	8.79±0.13 <sup>hi</sup>	8.46±0.11 <sup>ij</sup>	0.18±0.07 <sup>ab</sup>	28.26±0.33 <sup>kl</sup>
مس ۷۵ درصد Cu 75%	0.99±0.19 <sup>a</sup>	18.67±0.19 <sup>fg</sup>	5.52±0.19 <sup>fg</sup>	4.69±0.19 <sup>ef</sup>	5.33±0.08 <sup>bc</sup>	5.14±0.12 <sup>cd</sup>	0.11±0.04 <sup>a</sup>	20.69±0.08 <sup>bcd</sup>
منگنز ۵۰ درصد Mn 50%	0.86±0.17 <sup>a</sup>	16.29±0.17 <sup>cd</sup>	4.81±0.17 <sup>de</sup>	4.09±0.17 <sup>cd</sup>	6.09±0.09 <sup>d</sup>	5.87±0.19 <sup>e</sup>	0.13±0.05 <sup>a</sup>	22.01±0.15 <sup>cde</sup>
منگنز ۲۵ درصد Mn 25%	0.72±0.14 <sup>a</sup>	13.72±0.14 <sup>b</sup>	4.05±0.14 <sup>bc</sup>	3.44±0.14 <sup>ab</sup>	9.49±0.14 <sup>i</sup>	9.15±0.14 <sup>k</sup>	0.20±0.08 <sup>ab</sup>	30.54±0.36 <sup>m</sup>
منگنز ۷۵ درصد Mn 75%	0.96±0.19 <sup>a</sup>	16.58±1.30 <sup>cde</sup>	5.34±0.19 <sup>ef</sup>	4.54±0.19 <sup>def</sup>	6.76±0.10 <sup>ef</sup>	6.52±0.12 <sup>fg</sup>	0.14±0.05 <sup>a</sup>	24.43±0.16 <sup>fgh</sup>
آهن ۵۰ درصد Fe 50%	0.59±0.17 <sup>a</sup>	16.01±0.17 <sup>cd</sup>	4.54±0.17 <sup>cd</sup>	3.81±0.17 <sup>bc</sup>	5.82±0.09 <sup>cd</sup>	5.60±0.18 <sup>de</sup>	0.40±0.05 <sup>c</sup>	20.09±0.15 <sup>bc</sup>
آهن ۲۵ درصد Fe 25%	0.65±0.13 <sup>a</sup>	12.38±0.13 <sup>ab</sup>	3.66±0.13 <sup>ab</sup>	3.11±0.13 <sup>a</sup>	8.57±0.13 <sup>h</sup>	8.25±0.10 <sup>i</sup>	0.18±0.07 <sup>ab</sup>	27.56±0.32 <sup>ijk</sup>
آهن ۷۵ درصد Fe 75%	1.06±0.21 <sup>a</sup>	19.07±0.78 <sup>g</sup>	5.93±0.21 <sup>gh</sup>	5.04±0.21 <sup>fg</sup>	5.14±0.07 <sup>b</sup>	1.95±0.12 <sup>a</sup>	0.11±0.04 <sup>a</sup>	22.62±0.02 <sup>def</sup>
کبالت ۵۰ درصد Co 50%	1.01±0.17 <sup>a</sup>	16.44±0.17 <sup>cde</sup>	4.96±0.17 <sup>def</sup>	4.24±0.17 <sup>cde</sup>	6.25±0.09 <sup>de</sup>	6.02±0.15 <sup>ef</sup>	0.83±0.05 <sup>c</sup>	23.09±0.15 <sup>efg</sup>
کبالت ۲۵ درصد Co 25%	0.78±0.11 <sup>a</sup>	11.15±0.11 <sup>a</sup>	3.44±0.11 <sup>a</sup>	2.95±0.11 <sup>a</sup>	7.77±0.11 <sup>g</sup>	7.50±0.37 <sup>h</sup>	0.37±0.06 <sup>bc</sup>	25.79±0.28 <sup>hi</sup>
کبالت ۷۵ درصد Co 75%	0.81±0.16 <sup>a</sup>	15.25±0.16 <sup>c</sup>	6.58±0.23 <sup>i</sup>	5.59±0.23 <sup>g</sup>	5.21±0.58 <sup>b</sup>	5.00±0.12 <sup>c</sup>	0.10±0.01 <sup>a</sup>	27.96±1.76 <sup>jkl</sup>
مولیبدات ۵۰ درصد Mo 50%	0.85±0.17 <sup>a</sup>	16.28±0.17 <sup>cd</sup>	4.80±0.17 <sup>de</sup>	4.08±0.17 <sup>cd</sup>	6.08±0.09 <sup>d</sup>	5.86±0.18 <sup>e</sup>	0.66±0.05 <sup>d</sup>	21.94±0.15 <sup>cde</sup>
مولیبدات ۲۵ درصد Mo 25%	0.93±0.13 <sup>a</sup>	12.66±0.13 <sup>b</sup>	3.93±0.13 <sup>ab</sup>	3.38±0.13 <sup>ab</sup>	8.84±0.13 <sup>hi</sup>	8.53±0.39 <sup>ij</sup>	0.45±0.07 <sup>c</sup>	29.49±0.32 <sup>klm</sup>
مولیبدات ۷۵ درصد Mo 75%	0.86±0.17 <sup>a</sup>	16.14±0.17 <sup>cd</sup>	6.32±0.22 <sup>hi</sup>	5.37±0.22 <sup>g</sup>	5.96±0.40 <sup>d</sup>	4.76±0.32 <sup>c</sup>	0.09±0.01 <sup>a</sup>	26.84±1.69 <sup>ij</sup>

در هر ستون اعداد دارای حروف مشابه بر اساس آزمون دانکن بدون اختلاف معنی‌دار با یکدیگر در سطح ۵ درصد می‌باشند ( $P < 0.05$ ).

جدول ۵. پروفایل اسیدهای چرب چندگانه غیر اشباع بیودیزل (متیل استر شده) در جلبک *Dunaliella salina* پرورش یافته تحت شرایط مختلف (اعداد بر حسب درصد می باشند)

**Table 5. Profile of polyunsaturated fatty acids of biodiesel (methyl esterified) in *Dunaliella salina* grown under different conditions (numbers are in percentage)**

مجموع اسیدهای چرب چندگانه غیر اشباع Total polyunsaturated fatty acids (PUFA)	دوکوزاهگزانوئیک اسید Docosahexaenoic acid (C22:6n3)	ایکوزاپنتانویک اسید Eicosapentaenoic acid (C20:5n3)	ایکوزاتریئینوئیک اسید Eicosatrienoic acid (C20:3n3)	آراشیدونیک اسید Arachidonic acid (C20:4n6)	ایکوزادینوئیک اسید Eicosadienoic acid (C20:2n-6)	آلفا-لینولنیک اسید Alpha-linolenic acid (C18:3n3)	لینولنیک اسید Linoleic acid (C18:2n6)	تیمارها Treatments
39.70±0.59 <sup>def</sup>	4.69±0.19 <sup>h</sup>	2.51±0.19 <sup>f</sup>	2.63±0.19 <sup>h</sup>	0.88±0.19 <sup>cd</sup>	2.92±0.14 <sup>ef</sup>	11.75±0.14 <sup>ij</sup>	4.29±0.14 <sup>b</sup>	شاهد Control
37.88±0.76 <sup>bc</sup>	2.46±0.10 <sup>b</sup>	1.32±0.10 <sup>ab</sup>	1.38±0.10 <sup>ab</sup>	0.46±0.10 <sup>abc</sup>	1.53±0.07 <sup>b</sup>	6.16±0.07 <sup>b</sup>	5.68±0.18 <sup>def</sup>	روی ۵۰ درصد Zn 50%
36.91±0.55 <sup>b</sup>	4.36±0.18 <sup>gh</sup>	2.34±0.18 <sup>def</sup>	2.45±0.18 <sup>fgh</sup>	0.82±0.18 <sup>abcd</sup>	2.72±0.13 <sup>ef</sup>	10.92±0.13 <sup>i</sup>	3.99±0.13 <sup>3</sup>	روی ۲۵ درصد Zn 25%
40.85±0.73 <sup>f</sup>	3.56±0.14 <sup>ef</sup>	1.91±0.14 <sup>cde</sup>	2.00±0.14 <sup>cdef</sup>	0.67±0.14 <sup>abcd</sup>	2.22±0.11 <sup>d</sup>	8.93±0.10 <sup>g</sup>	5.41±0.17 <sup>7cde</sup>	روی ۷۵ درصد Zn 75%
40.43±0.02 <sup>def</sup>	1.68±0.06 <sup>a</sup>	0.90±0.06 <sup>a</sup>	0.94±0.06 <sup>a</sup>	0.31±0.06 <sup>ab</sup>	1.05±0.05 <sup>a</sup>	4.22±0.05 <sup>a</sup>	6.99±0.23 <sup>hi</sup>	مس ۵۰ درصد Cu 50%
37.76±0.56 <sup>bc</sup>	4.46±0.18 <sup>gh</sup>	2.39±0.18 <sup>ef</sup>	2.50±0.18 <sup>gh</sup>	0.83±0.18 <sup>bcd</sup>	2.78±0.13 <sup>ef</sup>	11.17±0.13 <sup>ij</sup>	4.08±0.13 <sup>3<sup>b</sup></sup>	مس ۲۵ درصد Cu 25%
40.47±0.80 <sup>def</sup>	2.71±0.11 <sup>bc</sup>	1.45±0.11 <sup>bc</sup>	1.52±0.11 <sup>bc</sup>	0.51±0.11 <sup>abc</sup>	1.69±0.08 <sup>bc</sup>	6.78±0.08 <sup>b</sup>	6.01±0.19 <sup>9fg</sup>	مس ۷۵ درصد Cu 75%
38.17±0.70 <sup>bcd</sup>	3.09±0.13 <sup>cd</sup>	1.66±0.12 <sup>bc</sup>	1.74±0.12 <sup>bc</sup>	0.58±0.12 <sup>abcd</sup>	1.93±0.09 <sup>cd</sup>	7.75±0.09 <sup>d</sup>	5.24±0.17 <sup>7cd</sup>	منگنز ۵۰ درصد Mn 50%
40.81±0.61 <sup>f</sup>	4.82±0.19 <sup>h</sup>	2.58±0.19 <sup>f</sup>	2.71±0.19 <sup>h</sup>	0.90±0.19 <sup>cd</sup>	3.01±0.14 <sup>f</sup>	12.08±0.14 <sup>j</sup>	4.41±0.14 <sup>4<sup>b</sup></sup>	منگنز ۲۵ درصد Mn 25%
40.86±0.71 <sup>f</sup>	3.44±0.14 <sup>de</sup>	1.84±0.14 <sup>bcd</sup>	1.93±0.14 <sup>bcd</sup>	0.64±0.14 <sup>abcd</sup>	2.14±0.10 <sup>d</sup>	8.61±0.10 <sup>ef</sup>	5.82±0.19 <sup>9<sup>ef</sup></sup>	منگنز ۷۵ درصد Mn 75%
36.80±0.70 <sup>b</sup>	2.82±0.12 <sup>bc</sup>	1.38±0.12 <sup>abc</sup>	1.46±0.12 <sup>abc</sup>	0.30±0.12 <sup>a</sup>	1.65±0.09 <sup>bc</sup>	7.48±0.09 <sup>c</sup>	4.96±0.17 <sup>7<sup>c</sup></sup>	آهن ۵۰ درصد Fe 50%
36.83±0.55 <sup>b</sup>	4.35±0.18 <sup>gh</sup>	2.33±0.18 <sup>def</sup>	2.44±0.18 <sup>fgh</sup>	0.81±0.18 <sup>abcd</sup>	2.71±0.13 <sup>ef</sup>	10.90±0.13 <sup>i</sup>	3.98±0.13 <sup>3<sup>ab</sup></sup>	آهن ۲۵ درصد Fe 25%
38.32±0.13 <sup>bcd</sup>	1.61±0.11 <sup>a</sup>	1.40±0.10 <sup>abc</sup>	1.46±0.10 <sup>abc</sup>	0.49±0.10 <sup>abc</sup>	1.63±0.07 <sup>bc</sup>	9.55±0.11 <sup>g</sup>	6.46±0.21 <sup>1<sup>gh</sup></sup>	آهن ۷۵ درصد Fe 75%
39.79±0.70 <sup>cde</sup>	3.25±0.13 <sup>cd</sup>	1.81±0.12 <sup>bcd</sup>	1.89±0.12 <sup>bcd</sup>	0.73±0.12 <sup>abcd</sup>	2.08±0.09 <sup>d</sup>	7.91±0.09 <sup>d</sup>	5.39±0.17 <sup>7<sup>cde</sup></sup>	کیالت ۵۰ درصد Co 50%
33.98±0.48 <sup>a</sup>	4.05±0.16 <sup>fg</sup>	2.27±0.15 <sup>def</sup>	2.36±0.15 <sup>efgh</sup>	0.93±0.15 <sup>cd</sup>	2.60±0.11 <sup>e</sup>	9.83±0.11 <sup>h</sup>	3.72±0.13 <sup>1<sup>a</sup></sup>	کیالت ۲۵ درصد Co 25%
38.57±1.76 <sup>bcd</sup>	3.17±0.39 <sup>cd</sup>	1.70±0.27 <sup>bc</sup>	1.78±0.27 <sup>bc</sup>	0.60±0.17 <sup>abcd</sup>	1.96±0.07 <sup>cd</sup>	11.55±0.81 <sup>ij</sup>	7.17±0.23 <sup>3<sup>i</sup></sup>	کیالت ۷۵ درصد Co 75%
38.64±0.70 <sup>bcd</sup>	3.08±0.13 <sup>cd</sup>	1.65±0.12 <sup>bc</sup>	1.72±0.12 <sup>bc</sup>	0.57±0.12 <sup>abcd</sup>	1.92±0.09 <sup>cd</sup>	7.74±0.09 <sup>d</sup>	5.23±0.17 <sup>7<sup>cd</sup></sup>	مولیبدات ۵۰ درصد Mo 50%
38.76±0.55 <sup>bcd</sup>	4.63±0.18 <sup>gh</sup>	2.61±0.18 <sup>f</sup>	2.72±0.18 <sup>h</sup>	1.09±0.18 <sup>e</sup>	2.99±0.13 <sup>ef</sup>	11.17±0.13 <sup>ij</sup>	4.26±0.13 <sup>3<sup>ab</sup></sup>	مولیبدات ۲۵ درصد Mo 25%
39.52±0.80 <sup>cdef</sup>	3.04±0.37 <sup>cd</sup>	1.63±0.26 <sup>bc</sup>	1.71±0.26 <sup>bc</sup>	0.58±0.17 <sup>abcd</sup>	1.88±0.06 <sup>cd</sup>	11.09±0.78 <sup>i</sup>	6.88±0.23 <sup>2<sup>hi</sup></sup>	مولیبدات ۷۵ درصد Mo 75%

در هر ستون اعداد دارای حروف مشابه بر اساس آزمون دانکن بدون اختلاف معنی دار با یکدیگر در سطح ۵ درصد می باشند (P<۰/۰۵).

جدول ۶. پارامترهای کیفی سوخت زیستی تولید شده با جلبک *Dunaliella salina* تحت شرایط پرورشی مختلف

**Table 6. Quality parameters of biofuel produced with *Dunaliella salina* algae under different conditions**

تیمارها Treatments	عدد ید Iodine Value	عدد صابونی شدن Saponification Value	عدد ستان Cetan Number	درجه غیر اشباعیت Degree of unsaturation	LCSF	CFPP (درجه سلسیوس) (کیلوژول بر کیلوگرم)	H (کیلوژول بر کیلوگرم)
شاهد Control	143.69±1.23 <sup>ef</sup>	9.90±0.08 <sup>ef</sup>	69.10±0.75 <sup>bc</sup>	99.13±0.11 <sup>g</sup>	4.88±0.22 <sup>abcd</sup>	-1.14±0.07 <sup>bcd</sup>	46664.04±8.44 <sup>bc</sup>
روی ۵۰ درصد Zn 50%	135.16±2.03 <sup>c</sup>	9.30±0.13 <sup>c</sup>	74.50±1.33 <sup>e</sup>	75.93±0.62 <sup>b</sup>	5.44±0.18 <sup>cde</sup>	0.64±0.05 <sup>cd</sup>	46722.29±13.86 <sup>e</sup>
روی ۲۵ درصد Zn 25%	133.58±1.15 <sup>bc</sup>	9.20±0.07 <sup>bc</sup>	75.55±0.76 <sup>ef</sup>	92.15±0.10 <sup>ef</sup>	4.53±0.21 <sup>a</sup>	-2.22±0.06 <sup>a</sup>	46733.08±7.85 <sup>ef</sup>
روی ۷۵ درصد Zn 75%	146.65±1.80 <sup>fg</sup>	10.10±0.12 <sup>fg</sup>	67.32±1.07 <sup>ab</sup>	90.32±0.34 <sup>e</sup>	5.51±0.22 <sup>de</sup>	0.86±0.06 <sup>de</sup>	46643.83±12.33 <sup>ab</sup>
مس ۵۰ درصد Cu 50%	145.25±1.18 <sup>efg</sup>	10.01±0.08 <sup>efg</sup>	68.15±0.71 <sup>abc</sup>	72.72±0.08 <sup>a</sup>	6.34±0.18 <sup>fg</sup>	3.46±0.05 <sup>f</sup>	46653.42±8.07 <sup>abc</sup>
مس ۲۵ درصد Cu 25%	136.69±1.17 <sup>cd</sup>	9.41±0.08 <sup>cd</sup>	73.50±0.76 <sup>de</sup>	94.29±0.10 <sup>f</sup>	4.64±0.21 <sup>ab</sup>	-1.89±0.06 <sup>ab</sup>	46711.87±8.03 <sup>de</sup>
مس ۷۵ درصد Cu 75%	144.48±2.13 <sup>ef</sup>	9.95±0.14 <sup>ef</sup>	68.62±1.29 <sup>abc</sup>	81.85±0.63 <sup>c</sup>	5.79±0.20 <sup>ef</sup>	1.71±0.06 <sup>e</sup>	46658.64±14.58 <sup>bc</sup>
منگنز ۵۰ درصد Mn 50%	136.78±1.78 <sup>cd</sup>	9.42±0.12 <sup>cd</sup>	73.44±1.15 <sup>de</sup>	82.20±0.40 <sup>c</sup>	5.24±0.19 <sup>bcd</sup>	0.01±0.06 <sup>bc</sup>	46711.25±12.19 <sup>de</sup>
منگنز ۲۵ درصد Mn 25%	147.72±1.27 <sup>fg</sup>	10.17±0.08 <sup>fg</sup>	66.69±0.74 <sup>ab</sup>	101.90±0.11 <sup>h</sup>	5.01±0.23 <sup>abcd</sup>	-0.71±0.07 <sup>cd</sup>	46636.57±8.68 <sup>ab</sup>
منگنز ۷۵ درصد Mn 75%	149.53±0.30 <sup>g</sup>	10.30±0.02 <sup>g</sup>	65.63±0.17 <sup>a</sup>	89.74±1.05 <sup>e</sup>	5.82±0.21 <sup>ef</sup>	1.82±0.06 <sup>e</sup>	46624.19±2.11 <sup>a</sup>
آهن ۵۰ درصد Fe 50%	130.08±1.78 <sup>b</sup>	8.96±0.12 <sup>b</sup>	77.94±1.23 <sup>f</sup>	76.99±0.40 <sup>b</sup>	4.80±0.19 <sup>abc</sup>	-1.36±0.06 <sup>abc</sup>	46757.01±12.19 <sup>f</sup>
آهن ۲۵ درصد Fe 25%	133.30±1.14 <sup>bc</sup>	9.18±0.07 <sup>bc</sup>	75.73±0.76 <sup>ef</sup>	91.95±0.10 <sup>ef</sup>	4.52±0.21 <sup>a</sup>	-2.25±0.06 <sup>a</sup>	46735.01±7.83 <sup>ef</sup>
آهن ۷۵ درصد Fe 75%	148.34±0.91 <sup>fg</sup>	10.22±0.06 <sup>fg</sup>	66.32±0.53 <sup>ab</sup>	83.57±0.18 <sup>cd</sup>	6.46±0.24 <sup>g</sup>	3.83±0.07 <sup>g</sup>	46632.32±6.21 <sup>ab</sup>
کبالت ۵۰ درصد Co 50%	141.83±1.78 <sup>e</sup>	9.77±0.13 <sup>e</sup>	70.24±1.10 <sup>c</sup>	85.97±0.40 <sup>d</sup>	5.49±0.19 <sup>cde</sup>	0.78±0.06 <sup>cd</sup>	46676.74±12.19 <sup>c</sup>
کبالت ۲۵ درصد Co 25%	123.45±1.01 <sup>a</sup>	8.50±0.07 <sup>a</sup>	82.69±0.75 <sup>g</sup>	82.69±0.75 <sup>g</sup>	4.33±0.18 <sup>a</sup>	-2.86±0.05 <sup>a</sup>	46802.23±6.92 <sup>g</sup>
کبالت ۷۵ درصد Co 75%	148.35±0.91 <sup>fg</sup>	10.22±0.06 <sup>fg</sup>	66.32±0.53 <sup>ab</sup>	94.50±1.76 <sup>f</sup>	6.67±0.17 <sup>g</sup>	4.50±0.05 <sup>b</sup>	46632.28±6.21 <sup>ab</sup>
مولیبدات ۵۰ درصد Mo 50%	137.33±1.78 <sup>cd</sup>	9.46±0.12 <sup>cd</sup>	73.09±1.15 <sup>de</sup>	82.53±0.40 <sup>c</sup>	5.23±0.19 <sup>bcd</sup>	-0.04±0.06 <sup>bc</sup>	46707.51±12.19 <sup>de</sup>
مولیبدات ۲۵ درصد Mo 25%	140.90±1.14 <sup>de</sup>	9.70±0.08 <sup>de</sup>	70.82±0.71 <sup>cd</sup>	97.76±0.10 <sup>g</sup>	4.96±0.21 <sup>abcd</sup>	-0.86±0.06 <sup>cd</sup>	46683.13±7.83 <sup>cd</sup>
مولیبدات ۷۵ درصد Mo 75%	149.36±0.43 <sup>g</sup>	10.29±0.03 <sup>g</sup>	65.72±0.25 <sup>a</sup>	93.21±2.58 <sup>f</sup>	6.53±0.16 <sup>g</sup>	4.06±0.05 <sup>g</sup>	46625.34±2.96 <sup>a</sup>

در هر ستون اعداد دارای حروف مشابه بر اساس آزمون دانکن بدون اختلاف معنی دار با یکدیگر در سطح ۵ درصد می باشند ( $P < 0.05$ ).

اثرات عنصر مس بر جلبک‌های مختلف، متفاوت می‌باشد (Lehman et al. 2004). در پژوهشی Zhang et al. (2019) مشاهده کردند که افزودن ۲۰ میکروگرم در لیتر مس اثر تحریکی بر رشد جلبک، از جمله *Microcystis aeruginosa* در دریاچه هایپروتروفیک Taihu داشت. بالاترین رشد در مطالعه‌ی حاضر در تیمار ۷۵ درصد مس مشاهده شده که غلظت مس در این تیمار برابر با ۷/۳۵ میکروگرم در لیتر بود. هنگام کشت ریزجلبک‌ها، مدت زمان مراحل رشد، تابعی از مقدار مواد مغذی موجود در محیط است که در کشت‌های ساکن (پرورش گروهی یا Batch) مانند آزمایش حاضر، کاهش می‌یابد (Bumbak et al. 2011). در مطالعه حاضر بسترهای مغذی مورد استفاده اثرات متفاوتی بر پویای رشد *D. salina* داشتند، محیط کشت گیلارد (f/2) با دوره نوری ۱۲:۱۲ (روشنای/تاریکی) باعث رشد ریزجلبک‌ها شد به طوری‌که تا پایان کشت (روز ۱۲)، در یک فاز نمای باقی ماندند و حداکثر غلظت آن به ۱۴۲۵ میلی‌گرم بر لیتر (با تراکم اولیه ۱۱۰ میلی‌گرم در لیتر) در تیمار مس ۷۵ درصد رسید، درحالی‌که کمترین مقدار زیست توده تولید شده در تیمار آهن ۲۵ درصد (۳۱۶/۵۷ میلی‌گرم در لیتر) بود و مشخص شده است که عنصر آهن بر مقدار فتوسنتز و تولید زیست توده جلبکی بیشترین اثر را دارد (Gastelum-Franco et al. 2021). در پژوهشی Gastelum-Franco et al. (2021) گزارش دادند که پرورش جلبک *D. salina* با محیط کشت استاندارد گیلارد (f/2) برابر با ۲۹۳۰ میلی‌گرم بر لیتر بود (با تراکم اولیه ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر). اختلاف بین نتایج قبلی را می‌توان تا حدی با تفاوت در برخی از عوامل کشت مانند تراکم اولیه و فاز کاشت، مواد و حجم ظروف آزمایشی و شرایط کشت و غیره توضیح داد. محتوای چربی در *D. salina* تحت تأثیر مواد ریز مغذی (عناصر کمیاب) مورد استفاده، قرار گرفت و در غلظت مس با ۷۵ درصد مقدار استاندارد، به ۳۷۴ میلی‌گرم بر گرم از بیوماس رسید. کشت‌های اتوتروفیک سطوح چربی بالاتری را بدست می‌دهند که با مطالعه Smetana et al. (2017) همسو بود. میزان چربی تولید شده با محیط کشت استاندارد گیلارد (f/2) را پس از ۱۳ روز برابر با ۹/۲۹ میلی‌گرم بدست آمد (Gastelum-Franco et al. 2021) که مقدار بدست آمده در حدود ۴۰ برابر کمتر از مطالعه حاضر در تیمار مس ۷۵ درصد بود. همچنین Rugnini (2018) گزارش داد که در زمان پرورش جلبک *Desmodesmus* sp. با محیط کشت استاندارد BG-11 مقدار چربی در روز ۱۲ در حدود ۵۱/۰۴ میلی‌گرم و در زمان پرورش با محیط کشت استاندارد BG-11 حاوی مس و نیکل (۹/۸ و ۷/۴ میلی‌گرم بر لیتر)، مقدار چربی در روز ۱۴ در حدود ۸۹/۰۱ میلی‌گرم گزارش شد، که این نشان می‌دهد کاهش غلظت مس در محیط کشت جلبک *D. salina* سبب افزایش رشد و میزان چربی می‌شود.

اسیدهای چرب اشباع C16 و اسید چرب غیر اشباع C22:1n9 به عنوان ماده اولیه سوخت زیستی می‌باشند (Zhou et al. 2017). درصد بالاتری از C16 تا C18 بهترین شکل چربی برای تولید بیودیزل است، زیرا با افزایش مقادیر C16-18، عدد ستان (Cetan number) بالاتر رفته و گرمای احتراق بیشتری را فراهم می‌کند (Zhou et al. 2017). اسیدهای چرب چند غیر اشباع حاوی چهار یا چند پیوند دوگانه اغلب در روغن ریزجلبکی مشاهده می‌شوند. این پیوندها نسبت به بیودیزل حاوی اسیدهای

چرب غیر اشباع (USFA) حساس هستند، محتوای اکسید نیتروژن بالاتری تولید می‌کنند و بازده حرارتی کمتری را نشان می‌دهند (Chisti 2007). بنابراین روغن‌های ریزجلبکی حاوی اسیدهای چرب غیر اشباع چندگانه (PUFA) برای تولید بیودیزل کمتر قابل قبول هستند (Chisti 2007). در سطح صنعتی، یکی از معایب بیودیزل در روغن‌های که دارای محتوای بالای اسیدهای چرب بلند زنجیره غیر اشباع (PUFA) هستند، این است که با کاهش پایداری اکسیداسیون و کاهش عدد ستان، و همچنین حساس بودن، اثرات منفی در سوخت دارند (Pinzi et al. 2009)، در حالیکه در تیمار کبالت ۲۵ درصد در مطالعه حاضر میزان اسیدهای چرب بلند زنجیره غیر اشباع کمترین مقدار را نشان دادند. چگالی انرژی محاسبه شده، همانطور که در جدول ۶ نشان داده شده است، در محدوده ۴۶/۶۲ تا ۴۶/۷۵ کیلو ژول بر کیلوگرم متفاوت بوده و با محدوده مقادیری که قبلاً برای سایر روغن‌های گیاهی (در محدوده ۴۰ کیلوژول بر کیلوگرم) به دست آمده بود (Demirbas 1982) بالاتر می‌باشد و با مقدار مربوطه برای سوخت‌های فسیلی مانند گازوئیل (در حدود ۴۵ کیلوژول بر کیلوگرم) مقایسه می‌شود. محدودیت‌های مواد مغذی مستقیماً بر خواص سوخت تأثیر نمی‌گذارد. بلکه با افزایش اسیدهای چرب زنجیره بلند و اسیدهای چرب اشباع شده بر پروفایل اسیدهای چرب متیل استری شده (FAME) تأثیر می‌گذارند، در حالی که تأثیر منفی مواد غذایی بر مصرف بر زیست توده خشک دیده می‌شود (Nouri et al. 2019). در تحقیق حاضر *D. salina* رشد کرده در شرایط کنترل دارای عدد ید برابر با ۱۴۳ بود، اما زمانی که منگنز و مولیبدات به میزان ۷۵ درصد از مقدار استاندارد، در محیط کشت استفاده شدند، عدد ید بصورت معنی‌داری افزایش پیدا کرد. سایر تیمارها منجر به کاهش عدد ید شد و یا هیچ تأثیر معنی‌داری نداشت. یکی از پارامترهای که در استانداردهای ASTM، استرالیا و برزیل گنجانده نشده است، اما ممکن است هنگام تعریف استانداردهای عمومی برای اسیدهای چرب متیل استر (FAME) ضروری باشد، عدد ید است که محتوای اسید چرب غیر اشباع را توصیف می‌کند. بر اساس نظر Mittelbach (1996)، این شاخص تنها به منشأ روغن (جرم ید بر حسب گرم که توسط ۱۰۰ گرم از یک ماده شیمیایی مصرف می‌شود) بستگی دارد. استاندارد اروپا (۲۰۰۳) حداکثر مقدار ۱۲۰ گرم ید (I<sub>2</sub>) بر ۱۰۰ گرم روغن را تعریف می‌کند که می‌تواند به عنوان یک عامل ضروری در نظر گرفته شود، چراکه حرارت دادن اسیدهای چرب بلند زنجیره غیر اشباع، منجر به پلیمریزاسیون گلیسریدها شده و منجر به تشکیل رسوبات یا خراب شدن روغن روان می‌شود. این اثر با تعداد پیوندهای دوگانه در زنجیره اسیدهای چرب افزایش می‌یابد. بنابراین، کم بودن محتوای اسیدهای چرب بلند زنجیره غیر اشباع بهتر از تغییر درجه غیراشباع با عدد ید ۳۷ به نظر می‌رسد. در این مطالعه، نمونه‌های بیودیزل تولید شده توسط همه تیمارها دارای مقادیر ید کمتری نسبت به حداکثر پذیرفته شده توسط استانداردهای اروپای (۱۲۰ گرم ید) بدست آمد. اسیدهای چرب غیر اشباع در بیودیزل، مقدار عدد ید مربوط به پایداری اکسیداتیو آن را اندازه‌گیری می‌کند. بیودیزل با عدد ید خیلی بالا، پایداری اکسیداتیو کمتری نسبت به بیودیزل با مقدار عدد ید پایین‌تر دارد (Mittelbach 1996). بیشترین عدد ستان (CN) در نمونه کبالت ۲۵ درصد مشاهده شد. عدد ستان یک ضریب دیفرانسیل بیودیزل بین زمان تأخیر احتراق و کیفیت احتراق است. مقدار عدد ستان بالاتر، برای عملکرد موتور احتراقی، بهتر در نظر گرفته می‌شود و حداقل عدد ستان بر اساس استانداردهای جهانی می‌تواند بین ۴۷ تا ۵۱ باشد (ASTM



2002). مشخص شده است که عدد ستان بیودیزل به مواد اولیه مورد استفاده برای تولید آن بستگی دارد. جدول ۶ مقادیر عدد ستان مورد مطالعه را نشان می‌دهد که در محدوده بالای برای موتورهای دیزل قرار دارند. عدد ستان یکی از شاخص‌های اصلی کیفیت سوخت دیزل است. این مربوط به زمان تأخیر اشتعال انرژی پس از تزریق به محفظه احتراق است. هر چه زمان تأخیر احتراق کمتر باشد، عدد ستان بیشتر است و بالعکس (Ramos et al. 2009). تحقیقات ارتباط بین عدد ستان بالا و انتشار NOx را پایین و کم نشان داده است. عدد ستان بیودیزل به طور کلی بیشتر از دیزل معمولی است. مطالعات قبلی همچنین نشان داده‌اند که مقادیر عدد ستان از مواد اولیه مختلف به طور گسترده با بیودیزل مشتق شده از روغن سویا، متفاوت است (Krisnangkura 1986). همچنین، Rugnini et al. (2018) گزارش دادند که مقدار عدد ستان در جلبک *Desmodesmus sp.* رشد کرده با محیط کشت استاندارد و محیط کشتی که حاوی فلزات نیکل و مس بود به ترتیب برابر با ۳۷/۹۱ و ۵۵/۰۷ بود، درحالی‌که در استانداردهای اتحادیه اروپا (حداقل ۵۱) و ایالات متحده (حداقل ۴۷) می‌باشد. مقادیر عدد ستان برای بیودیزل نخل برابر با ۶۱ (Ramos et al. 2009)، ریز جلبک سبز *Scendesmus sp.* برابر با ۵۹/۵۷ (Talebi et al. 2013) و برخی از سیانوباکتری‌ها مانند *Anabena avestumalis*، *Nostoc sp.* و *Calothrix sp.* به ترتیب برابر با ۷۱/۶۸، ۷۱/۵۶ و ۷۱/۷۸ بود (Gismondi et al. 2016). مقدار عدد ستان در این مطالعه در محدوده ۶۵ تا ۸۲ بود که به طور قابل توجهی بهتر از مطالعات قبلی بود. یکی دیگر از شاخص‌های پایداری اکسیداتیو و ذخیره‌سازی طولانی مدت، درجه‌ای از اشباع نشدن (DU) است. سوخت بیودیزل با درجه اشباعیت پایین‌تر، در ذخیره‌سازی طولانی مدت، پایداری بالاتری دارد. این تحقیق نتایج کمتری را برای مس ۵۰ درصد ثبت کرد.

در مطالعه‌ای Ruangsomboon (2018) خواص بیودیزل میکرو جلبک سبز *Botryococcus braunii* را مورد مطالعه قرار داد. نتایج این مطالعه از نظر عدد ید (۵۹-۹۸) و درجه غیر اشباعیت (۴۹-۷۴) به طور قابل توجهی بهتر از مطالعه حاضر بود. علاوه بر طول زنجیره و اشعاعات زنجیره اسیدهای چرب، درجه اشباع نشدن یکی دیگر از ویژگی‌های ساختاری است که بر خواص فیزیکی و سوختی مولکول استر چرب تأثیر می‌گذارد (Knothe 2007). در جدول ۶ درجه غیر اشباعیت (DU) برای تیمارهای مختلف ریز جلبک *D. salina* نشان داده شده است. مقادیر به دست آمده از ۷۲ درصد تا ۱۰۱ متغیر بود. *D. salina* در تیمار منگنز ۲۵ درصد محصولی با درجه غیر اشباع بالاتر تولید کرد که نشان‌دهنده محتوای بالای PUFA است، چراکه درجه غیر اشباعیت مجموع وزنی از جرم‌های اسیدهای چرب تک غیر اشباع و اسیدهای چرب غیر اشباع چندگانه است. تأثیر ساختار شیمیایی اسیدهای چرب، به ویژه درجه غیر اشباعیت، در پایداری اکسیداتیو بیودیزل بسیار مهم است و بر حساسیت به نگهداری طولانی مدت تأثیر می‌گذارد. وجود هوا، گرما، نور، آثار فلزی، آنتی اکسیدان‌ها، پراکسیدها و ماهیت ظرف ذخیره‌سازی، پایداری سوخت زیستی را تعیین می‌کند. دلیل اتواکسیداسیون (اکسیداسیون خود به خودی یک ماده در دمای محیط در حضور اکسیژن)، وجود پیوندهای دوگانه در زنجیره ترکیبات چربی است. اتوکسیداسیون ترکیبات اسیدهای چرب غیر اشباع با سرعت‌های مختلف بستگی به تعداد و موقعیت پیوندهای دوگانه دارد. کلاسه‌های آلک (پیوندهای که در آن اتم کربن دارای پیوند دوگانه با سایر اتم‌های کربن هستند) در مقایسه با سایر پیوندهای دوگانه، به طور ویژه‌ای در برابر اکسیداسیون حساس‌تر هستند. حتی مکان‌های دو آلکی (Allylic bonds) که

معمولاً در اسیدهای چرب غیر اشباع چندگانه مانند لینولئیک و لینولنیک اسید یافت می‌شوند، بیشتر از موقعیت‌های آلیکی در معرض اکسیداسیون هستند (Frankel 1998). بر اساس گزارش Francisco et al. (2010) جلبک‌های *D. tertiolecta* و *Phormidium sp.* با مقادیر درجه غیر اشباعیت بالا و غلظت‌های بالای لینولئیک + لینولنیک اسید (به ترتیب برابر با ۹۸/۰ درصد و ۰/۶۷ درصد، ۷۶/۳ درصد و ۴/۵۳ درصد و ۷۴/۱ درصد و ۰/۱۱ درصد)، تمایل به تولید سوخت متیل استر با پایداری اکسیداسیون ضعیف‌تر نسبت به سایر گونه‌های گزارش شده دارند. علاوه بر این، انتشار گازهای گلخانه‌ای NOx با افزایش درجه غیر اشباعیت افزایش می‌یابد (Rosli et al. 2020).

مشخص شده است که نقطه اتصال فیلتر سرد (CFPP) با محتوای اسید چرب متیل استر اشباع شده مرتبط است (Ramos et al. 2009)، با استاندارد سوخت با کربن پایین (LCSF) که پیش‌بینی‌کننده و مستقیماً با CFPP مرتبط است. در مقابل، زنجیره‌های کربنی طولانی‌تر (C24:0 و C22:0) در بیودیزل با خواص ضعیف‌تر در دمای پایین مرتبط هستند (Wu et al. 2012). فاکتور CFPP خاصیت جریان سرد بیودیزل را نشان می‌دهد و مقدار کمتری را در زمان حضور اسیدهای چرب غیر اشباع نشان می‌دهد. استاندارد EN 14214 محدودیت دمای پایین را در لیست مشخصات خود ذکر نکرده است، در حالیکه این پارامتر را برای کشورهای مختلف از ۴۵- درجه سلسیوس در آب و هوای سرد قطبی تا ۴/۵ درجه سلسیوس در آب و هوای معتدل تعریف کرده است. مقادیر CFPP گزارش شده در مطالعه‌ی حاضر در محدوده ۲/۲۲- الی ۴/۵۰ درجه سلسیوس بود که در دامنه استاندارد EN 14214 جای می‌گیرد. مقدار CFPP از ۷/۵۰- درجه سلسیوس تا ۵/۲۹- درجه سلسیوس در مطالعه Rugnini (2018) گزارش شد. همچنین، Alvarez-Díaz et al. (2015) گزارش دادند که کشت جلبک *Scenedesmus obliquus* دارای عدد CFPP کمتر از صفر درجه سلسیوس بودند.

**نتیجه‌گیری:** داده‌ها نشان داد که زیست توده جلبک *D. salina* می‌تواند با غلظت‌های کمتر از عناصر کم نیاز معرفی شده در محیط کشت استاندارد گیلارد (f/2) رشد کند. حتی زیست توده در طول رشد که در معرض کمبود برخی از عناصر کمیاب قرار گرفته بود، توانای رشد به اندازه تیمار شاهد (همانند تیمارهای روی، منگنز، کبالت و مولیبدات ۷۵ درصد) و یا بیشتر (تیمار مس ۷۵ درصد با مقدار زیست توده ۱۴۲۵/۰۸ میلی‌گرم وزن خشک) را نشان داد. پتانسیل استفاده از محیط کشت گیلارد (f/2) تغیر یافته در بخش عناصر کمیاب می‌تواند در طول دوره پرورش بدون اینکه میزان زیادی از زیست توده را از دست بدهد (مانند زمانی که از شوک عناصر پر مصرف مانند نیتروژن و فسفر برای تولید چربی استفاده می‌شود)، مقدار چربی بیشتری را نسبت به تیمار شاهد حاصل کند. بیودیزل با کیفیت خوب به دست آمده از زیست توده رشد یافته در تیمار کبالت ۲۵ درصد (دارای عدد ستان بالاتر و اسیدهای چرب بلند زنجیره غیر اشباع پایین‌تر)، امکان استفاده از این تیمار برای کشت انبوه ریزجلبک *D. salina* برای تولید بیودیزل را دارد چراکه با وجود تولید زیست توده کمتر، ولی میزان چربی (۱۹۷/۹۲ میلی‌گرم بر زیست توده کل) کمی بیشتر از تیمار شاهد (۱۹۳/۴۴ میلی‌گرم بر زیست توده کل) را دارد.

سپاسگزاری: این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری تحت قرارداد با شماره ۰۸-

۱۴۰۲-۰۳ انجام شد که به این وسیله سپاسگزاری می‌شود.

## References

- Alexova R, Fujii M, Birch D, et al. (2011) Iron uptake & toxin synthesis in the bloom-forming *Microcystis aeruginosa* under iron limitation. *Environ Microbiol* 13, 1064–1077.
- Álvarez-Díaz PD, Ruiz J, Arbib Z, et al. (2015) Wastewater treatment & biodiesel production by *Scenedesmus obliquus* in a two-stage cultivation process. *Bioresour Technol* 181, 90–96.
- AOAC (2005) AOAC official method In, Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th ed. AOAC International Gaithersburg.
- ASTM 6751 (2002) Standard Specification for Biodiesel Fuel (B100) Blend Stock for Distillate Fuels.
- Baptista MS, Vasconcelos MT (2006) Cyanobacteria metal interactions, Requirements toxicity & ecological implications. *Crit Rev Microbiol* 32, 127–137.
- Bumbak F, Cook S, Zachleder V, et al. (2011) Best practices in heterotrophic high-cell density microalgal processes, achievements potential & possible limitations. *Appl Microbiol Biotechnol* 91, 31-46.
- Burnat M, Diestra E, Esteve I, Solé A (2009) In situ determination of the effects of lead & copper on cyanobacterial populations in microcosms. *PLoS One* 4, e6204.
- Chisti Y (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv* 25,294–306.
- Dai A (2013) Increasing drought under global warming in observations & models. *Nat Clim Change* 3, 52–58.
- Demirbas A (1982) Fuel properties & calculation of higher heating values of vegetable oils. *Fuel* 17(9), 11-122.
- Francisco EC, Neves DB, Jacob-Lopes E, Franco TT (2010) Microalgae as feedstock for biodiesel production, carbon dioxide sequestration lipid production & biofuel quality. *J Chem Technol Biotechnol* 85(3), 395-403.
- Frankel EN (1998) Lipid Oxidation. The Oily Press Dundee UK.
- Gismondi A, Pippo FD, Bruno L, Antonaroli S, Congestri R (2016) Phosphorus removal coupled to bioenergy production by three cyanobacterial isolates in a biofilm dynamic growth system. *Int J Phytoremediation* 18(9), 869-876.
- Glass JB, Axler RP, Chara S, Goldman CR (2012) Molybdenum limitation of microbial nitrogen assimilation in aquatic ecosystems & pure cultures. *Front Microbiol* 3, 1–11.

- Glass JB, Wolfe-Simon F, Elser JJ, Anbar AD (2010) Molybdenum-nitrogen co-limitation in freshwater & coastal heterocystous cyanobacteria. *Limnol Oceanogr* 55, 667–676.
- Guillard RRL (1973) Division rates In, Stein J R ed H & book of Physiological Methods, Culture Methods & Growth Measurements. Cambridge University Press Cambridge 289-312.
- Helliwell KE, Lawrence AD, Holzer A, et al. (2016) Cyanobacteria & Eukaryotic Algae Use Different Chemical Variants of Vitamin B<sub>12</sub>. *Curr Biol* 26, 999–1008.
- Hirano K, Hara T, Ardianor et al. (2019) Detection of the oil-producing microalga *Botryococcus braunii* in natural freshwater environments by targeting the hydrocarbon biosynthesis gene SSL-3. *Sci Rep* 9, 16974.
- Iyer R (2016) The issue of reducing or removing phospholipids from total lipids of a microalgae & an oleaginous fungus for preparing biodiesel. *Biofuels* 7(1), 37-47.
- Knothe GH (2007) Some aspects of biodiesel oxidative stability. *Fuel Process Technol* 88, 669–677.
- Krisnangkura KA (1986) Simple method for estimation of cetane index of vegetable oil methyl esters. *J Chem Soc* 63, 552–553.
- Lehman JT, Bazzi A, Noshier T, Nriagu JO (2004) Copper inhibition of phytoplankton in Saginaw Bay Lake Huron. *Can J Fish Aquat Sci* 61, 1871–1880.
- Miquel M, Browse J (1992) Arabidopsis mutants deficient in polyunsaturated fatty acid synthesis, Biochemical & genetic characterization of a plant oleoyl-phosphatidylcholine desaturase. *J Biol Chem* 267, 1502–1509.
- Mittelbach M (1996) Diesel fuel derived from vegetable oils VI, specifications & quality control of biodiesel. *Bioresour Technol* 56, 7–11.
- Nouri H, Moghimi H, Nikbakht RM, et al. (2019) Enhanced growth & lipid production in oleaginous fungus *Sarocladiumkiliense* ADH17, study on fatty acid profiling & prediction of biodiesel properties. *J Renew Energy* 135, 10–20.
- Pandey A, Srivastava S, Kumar S (2019) Isolation, screening and comprehensive characterization of candidate microalgae for biofuel feedstock production and dairy effluent treatment: A sustainable approach. *Bioresour Technol* 293, 121998.
- Pinzi S, Garcia IL, Lopez-Gimenez FJ, et al. (2009) The ideal vegetable oil-based biodiesel composition, a review of social economical & technical implications. *Energy Fuels* 23, 2325-2341.
- Ramos MJ, Fernández CM, Casas A, et al. (2009) Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresour Technol* 100(1), 261-268.

- Reetu, Yadav K, Vasistha S, et al. (2024) Microalgae as sustainable feedstock for biofuel production and value-added co-products. *Microalgal Biomass for Bioenergy Applications*. Woodhead Series in Bioenergy pp. 253-286.
- Rodolfi L, Zittelli GC, Bassi N, et al. (2009) Microalgae for oil, Strain selection induction of lipid synthesis & outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol Bioeng* 102, 100–112.
- Rosli SS, Wong CY, Yunus NM, et al. (2020) Optimum interaction of light intensity and CO<sub>2</sub> concentration in bioremediating N-rich real wastewater via assimilation into attached microalgal biomass as the feedstock for biodiesel production. *Process Saf Environ Prot* 141, 355-365.
- Ruangsomboon S (2018) Hydrocarbon Production & Biodiesel Properties of a Green Microalga *Botryococcus braunii* KMITL 2 Cultivated Outdoor in Open Pond & Closed Photobioreactor. *Chiang Mai J Sci* 45(2), 668-679.
- Schenk PM, Thomas-Hall SR, Stephens E, et al. (2008) Second generation biofuels, high-efficiency microalgae for biodiesel production. *BioEnergy Res* 1, 20–43.
- Sebesta J, Xiong W, Guarnieri MT, et al. (2022) Biocontainment of Genetically Engineered Algae. *Front Plant Sci* 13, 1-10.
- Smetana S, Sandmann M, Rohn S, et al. (2017) Autotrophic & heterotrophic microalgae & cyanobacteria cultivation for food & feed, life cycle assessment. *Bioresour Technol* 245, 162-170.
- Soares J, Krieger Loterio R, Rosa RM, et al. (2018) *Scenedesmus* sp. cultivation using commercial-grade ammonium sources. *Ann Microbiol* 68, 35–45.
- Talebi AF, Mohtashami SK, Tabatabaei M, et al. (2013) Fatty acids profiling, a selective criterion for screening microalgae strains for biodiesel production. *Algal Res* 2(3), 258-267.
- UNE-EN 14214 (2003) Automotive Fuels Fatty Acid Methyl Esters (FAME) for Diesel Engines Requirements & Test Methods.
- Wang XW, Liang JR, Luo CS, et al. (2014) Biomass total lipid production & fatty acid composition of the marine diatom *Chaetoceros muelleri* in response to different CO<sub>2</sub> levels. *Bioresour Technol* 161, 124–130.
- Wu LF, Chen PC, Huang AP, Lee CM (2012) The feasibility of biodiesel production by microalgae using industrial wastewater. *Bioresour Technol* 113, 14–18.
- Yang C, Jia L, Chen C, et al. (2011) Bio-Oil from Hydro-Liquefaction of *Dunaliella salina* over Ni/REHY Catalyst. *Bioresour Technol* 102, 4580–4584.
- Zhang X, Li B, Xu H, et al. (2019) Effect of micronutrients on algae in different regions of Taihu a large spatially diverse hypereutrophic lake. *Water Res* 151, 500–514.

Zuorro A, García-Martínez JB, Barajas-Solano AF (2021) The Application of Catalytic Processes on the Production of Algae-Based Biofuels: A Review. Catalyst 11(1), 1-25.