

بررسی میزان زیست توده و محتوای لیپید ریز جلبک‌های بومی در فاضلاب

معصومه محمدی سروسنانی^{۱*}، رضا قشلاقی^۲، محمود اخوان مهدوی^۲

۱- مربی صنایع شیمیایی، دانشکده فنی دختران شیراز

۲- استادیار مهندسی شیمی، دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۱/۰۷ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۶/۲۷

پیام‌نگار: m_m1394@yahoo.com

چکیده

این مطالعه به بررسی میزان زیست توده و محتوای لیپید ریز جلبک‌های بومی در محیط کشت فاضلاب پرداخته است. میزان زیست توده، محتوای لیپید، بهره‌وری زیست توده و بهره‌وری لیپید در فازهای مختلف رشد ریز جلبک‌های بومی در محیط کشت فاضلاب اندازه‌گیری شد. بیشینه مقدار زیست توده، درصد محتوای لیپید، بهره‌وری زیست توده و بهره‌وری لیپید ریز جلبک‌های بومی در فاضلاب خام، به ترتیب، برابر با 980 mg lit^{-1} ، 25% ، $271/4 \text{ mg lit}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ، $53 \text{ mg lit}^{-1} \text{ d}^{-1}$ اندازه‌گیری شد. با توجه به نتایج به‌کارگیری فاضلاب و ریز جلبک‌های بومی به منظور تولید زیست سوخت با هدف کاهش هزینه تولید، گزینه مناسبی است.

کلیدواژه‌ها: زیست توده، فاضلاب، محتوای لیپید، ریز جلبک بومی.

۱. مقدمه

آب و هوا و صعود جهانی قیمت نفت، از جمله عواملی‌اند که پژوهشگران و دانشمندان را بر آن داشته تا جایگزین‌های مناسبی برای سوخت‌های فسیلی بیابند [۳ و ۴]. در این میان، زیست سوخت به دلیل تجدیدپذیری، فقدان ترکیبات سولفور و آروماتیک، و غیرسمی بودن گزینه مناسبی به‌شمار می‌آید [۵ و ۶]. زیست سوخت را در سال ۱۹۰۰ رادولف دیزل مخترع موتور دیزل مطرح کرد، اما به دلیل فراوانی منابع فسیلی مصرف آن تا سال‌های اخیر راکد ماند [۷]. زیست سوخت آمیزه‌ای از مونو آلکیل استرها حاصل از ترانس استریفیکاسیون روغن‌های گیاهی چون روغن دانه سویا، نخل، آفتابگردان، ذرت، بادام زمینی، کانولا و پنبه دانه است. علاوه بر روغن‌های گیاهی، سایر منابع، چون چربی حیوانی (پیه گاو و چربی خوک)، روغن ضایعاتی پخت و پز، گریس‌ها، چوب و جلبک،

۸۸ درصد انرژی مورد نیاز آدمی چه در بخش صنعت و حمل و نقل و چه در بخش خانگی و کشاورزی، از منابع تجدیدناپذیر هیدروکربنی تأمین می‌شود [۱]. با این روال، منابع تأمین‌کننده سوخت‌های فسیلی رو به کاهش‌اند و بنابر پیش‌بینی‌ها تا صد سال آینده این منابع پایان خواهند یافت. این مشکل تنها مربوط به کشورهای واردکننده نفت نیست، بلکه تولیدکنندگان بزرگ نفت، از جمله کشور ما، در زمینه تهیه سوخت با مشکلات متعددی روبه رو هستند [۲]. اما موضوع به همین جا ختم نمی‌شود، زیرا آلودگی ناشی از سوخت‌های فسیلی، روند رو به رشد جمعیت و شهرنشین شدن روستاییان، روند گرمایش کره زمین، تغییرات

* شیراز، دانشگاه شیراز، دانشکده مهندسی شیمی

سندسموس ابلیکوس^۵، دونالیلا ترتیولکتا^۴ با هدف تولید سوخت بررسی شده‌اند [۱۸].

تولید زیست‌سوخت از ریز جلبک‌ها، شامل چهار مرحله رشد و تکثیر ریز جلبک، برداشت یا جداسازی، روغن‌کشی، و در نهایت تبدیل روغن به زیست‌سوخت می‌شود. مراحل روغن‌کشی و تبدیل روغن به زیست‌سوخت برای ریز جلبک‌ها و منابع گیاهی یکسان است؛ در نتیجه، انرژی لازم برای انجام این مراحل فرایند مشابه است. مهم‌ترین تفاوت میان فرایند تولید زیست‌سوخت حاصل از ریز جلبک با سوخت‌های به‌دست آمده از دانه‌های روغنی در مراحل رشد و برداشت است؛ تولید و برداشت زیست‌توده جلبک پرهزینه‌تر از پرورش گیاهان است [۱۹].

پرورش جلبک به نور، کربن دی‌اکسید، آب و نمک‌های معدنی شامل نیتروژن، فسفر، آهن و گاهی سیلیکون نیاز دارد. میزان و شدت این عوامل نیز بر میزان رشد و محتوای لیپید جلبک تأثیر می‌گذارد. هر چه هزینه تهیه این منابع برای تولید جلبک کمتر باشد و به نحوی بهینه مصرف شوند، هزینه نهایی تولید زیست‌سوخت کاهش خواهد یافت. بنابراین، منبع مناسب برای تأمین نیازهای اولیه رشد جلبک و نیز محیط بهینه که بتواند شرایط مناسب را برای رشد فراهم آورد و از نظر اقتصادی مقرون به صرفه باشد، به شدت بر هزینه تمام شده زیست‌سوخت تأثیر خواهد نهاد [۱۳].

یکی از راهکارهای مناسب برای کاستن هزینه تولید زیست‌سوخت استفاده از فاضلاب است؛ فاضلاب صنایع لبنی در میان فاضلاب‌های مختلف، یکی از منابع غنی از مواد آلی از ته و کربنه شناخته شده است. به همین دلیل، این گونه فاضلاب‌ها محیط مناسبی برای رشد ریزاندامگان‌ها به ویژه ریز جلبک‌ها فراهم می‌آورند. در این تحقیق، به منظور کاهش انرژی و هزینه لازم برای پرورش ریز جلبک‌ها برای اولین بار از ریز جلبک‌های بومی موجود در حوضچه نهایی تصفیه فاضلاب کارخانه شیر پگاه خراسان، به عنوان مایه تلقیح، بهره گرفته شد؛ علاوه بر این، فاضلاب در حکم محیط کشت به کار گرفته شد. به این ترتیب، هزینه مربوط به تهیه مایه تلقیح و محیط کشت سنتزی کاهش یافت و میزان چگالی نوری، محتوای لیپید و زیست‌توده خشک ریز جلبک‌های بومی در محیط کشت فاضلاب بررسی شد.

نیز می‌توانند در تولید زیست‌سوخت به کار گرفته شوند [۸]. یکی از مهم‌ترین عوامل انتخاب ماده خام به منظور تولید زیست‌سوخت، بها و دسترس بودن آن است؛ حدود ۸۰٪ هزینه تولید زیست‌سوخت را مواد خام تشکیل می‌دهند [۹].

یکی از مشکلات موجود در بهره‌گیری از گیاهان روغنی با هدف تولید انرژی، تغذیه انسانی از این منابع گیاهی است [۱۰]. دومین دشواری، عدم کارایی مناسب در تولید گیاهان روغنی (به خصوص با بهره‌گیری از سامانه کشت سنتی فعلی یا حتی با بهره‌گیری از روش‌های جدید و خودکاری) و وسعت بسیار زیاد زمین‌های زیر کشت برای تولید سوخت مورد نیاز در مقیاس جهانی است. افزون بر اینها، بحران آب از دیگر مشکلاتی است که بهره‌گیری از گیاهان روغنی را برای تولید انرژی محدود خواهد کرد.

تولید زیست‌سوخت از چوب و تراشه‌های درختان، علاوه بر بالا بودن هزینه تولید، سبب نابودی جنگل‌ها می‌شود که این مسئله، منشأ تولید ۲۰٪ گاز کربن دی‌اکسید در سال است [۱۱].

تهیه زیست‌سوخت از جلبک یکی از گزینه‌های نویدبخش به‌شمار می‌آید، زیرا لیپید حاصل از جلبک در تقابل با منابع غذایی انسان نیست [۱۲ و ۱۱]. بنا به دلایلی، به کارگیری ریز جلبک‌ها در تولید زیست‌سوخت نسبت به روغن‌های گیاهی مناسب‌تر است؛ این دلایل از این قرارند:

۱. پتانسیل تولید روغن در حدود ۱۵ تا ۳۰۰ برابر امکان بالقوه دانه‌های روغنی رایج برای تولید زیست‌سوخت [۱۳].
۲. توانایی رشد در آب‌های شور، فاضلاب و شرایط محیطی دشوار [۱۴].
۳. مصرف کربن دی‌اکسید در خلال رشد [۱۵].
۴. چرخه حیات کوتاه مدت در حدود ۱ تا ۱۰ روز و توانایی رشد شتابان در شرایط کنترل شده زیست‌راکتورها.
۵. بازده فوتوسنتزی گسترده [۱۶].

جلبک‌ها با بهره‌گیری از کربن دی‌اکسید و نور خورشید، گلوکز و پروتئین تولید و در هنگام محدودیت مواد غذایی به کمک نیتروژن، مقدار زیادی لیپید تولید می‌کنند [۱۷]. تاکنون گونه‌های مختلفی از جلبک‌های میکروسکوپی، از جمله کلرلا ولگاریس^۱، اسپیرولینا ماکسیما^۲، نانوکلوپسیس^۳، نئوکلریس اولاباندنس^۴،

4. Neochloris Oleabundans
5. Scenedesmus Obliquus
6. Dunaliella Tertiolecta

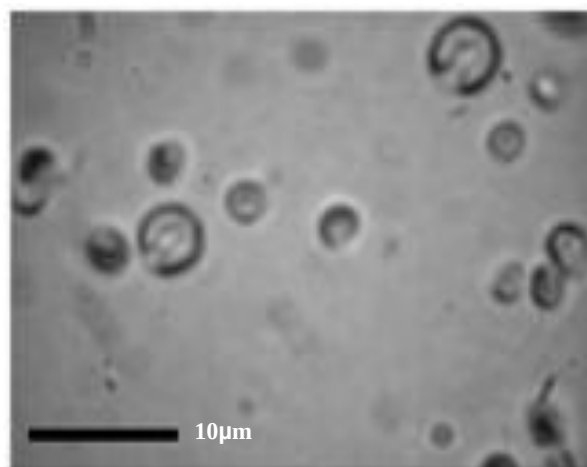
1. Chlorella Vulgaris
2. Spirulina Maxima
3. Nannochloropsis sp

۲. مواد و روش‌ها

۱-۲ تهیه مایه تلقیح^۱

۱-۱-۲ گونه ریز جلبک

ریز جلبک به کار رفته در این تحقیق، از فاضلاب کارخانه شیر پگاه خراسان در مرحله حوضچه ته‌نشینی نهایی تهیه شد. تصویر میکروسکوپی ریز جلبک‌های بومی موجود در فاضلاب کارخانه شیر پگاه خراسان در محیط سنتزی BG11 به کمک ۱ میلی لیتر نمونه مورد نظر در مرحله رشد نمایی، با بزرگ نمایی ۴۰۰ را در شکل (۱) مشاهده می‌کنید. ریز جلبک‌های بومی دارای کلنی‌های کروی متمایل به بیضی در اندازه ۰/۵ تا ۲ سانتی مترند. ضخامت آنها ۰/۵ تا ۱ میلی متر است. اغلب کلنی‌ها سبز رنگ‌اند، اما گاهی لعاب آنها به رنگ قهوه‌ای درمی‌آید. با توجه به توصیف‌های یادشده و شکل (۱)، می‌توان نتیجه گرفت که از لحاظ ریخت‌شناسی ریز جلبک‌های بومی شبیه به گونه تترااسپورا^۲ هستند.



شکل ۱. تصویر میکروسکوپی ریز جلبک‌های بومی موجود در محیط‌های کشت‌های BG11.

۲-۱-۲ کشت ریز جلبک

در این تحقیق، برای کشت ریز جلبک‌های بومی موجود در فاضلاب کارخانه شیر پگاه خراسان، در مرحله حوضچه ته‌نشینی نهایی از کشت مایع به‌صورت ناپیوسته در محیط کشت BG11 استفاده شد. این محیط کشت شامل آب مقطر و ترکیبات شیمیایی مندرج در جدول (۱) بود [۲۰]:

جدول ۱. ترکیب شیمیایی محیط کشت BG11 (mg lit⁻¹) [۲۰].

غلظت (mg/l)	ترکیبات شیمیایی
۳۰/۵۳	K ₂ HPO ₄
۱	FeEDTA
۷۵	MgSO ₄ · ۷H ₂ O
۳۶	CaCl ₂ · ۲H ₂ O
۱۵۰۰	NaNO ₃
۲۰	Na ₂ CO ₃
۶	citric acid
۶	ferric ammonium citrate

به ازای هر لیتر از محیط کشت، ۱ میلی لیتر محلول فلزات معدنی^۳ اضافه شد. محلول فلزات معدنی از ترکیبات شیمیایی مندرج در جدول (۲) تشکیل شده است [۲۱]:

جدول ۲. محلول فلزات معدنی محیط کشت BG11 (g lit⁻¹) [۲۱].

غلظت (g/l)	ترکیبات شیمیایی
۰/۲۲۲	ZnSO ₄ · ۷H ₂ O
۰/۳۹	Na ₂ MoO ₄ · ۲H ₂ O
۰/۰۷۹	CuSO ₄ · ۵H ₂ O
۲/۴۸	MnCl ₂ · ۴H ₂ O
۲/۸۶	H ₃ BO ₃
۰/۰۴۹	CO(NO ₃) ₂ · ۶H ₂ O

۲-۳ شرایط کشت

برای انجام کشت مایع ناپیوسته، از یک ارلن‌مایر با حجم ۵۰۰ میلی لیتر بهره گرفته و ۴۵۰ میلی لیتر از محیط کشت BG11 به فلاسک اضافه شد. سپس، فلاسک را با پنبه و باند استریل مسدود کردیم و در داخل اتوکلاو در فشار ۱/۵ اتمسفر و دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه استریل کردیم. pH محیط کشت با استفاده از HCl با غلظت ۰/۱ نرمال بر روی عدد ۷ تنظیم شد. سپس، به اندازه ۱۰ درصد از حجم محیط کشت، ریز جلبک‌های بومی موجود در فاضلاب کارخانه شیر پگاه خراسان به‌عنوان مایه تلقیح اضافه شد. فلاسک در داخل محفظه کشت (شکل (۲))، با دمای تنظیم شده

3. Traceelement

1. Inoculation
2. Tetraspora

روزانه به منظور آنالیز و اندازه‌گیری محتوای لیپید، زیست‌توده، شمارش سلول و بررسی میزان رشد، برداشت شد و این اندازه‌گیری‌ها تا فاز مرگ ادامه یافت.

۳-۲ روش‌های آنالیز

۳-۲-۱ بررسی رشد ریز جلبک

میزان رشد ریز جلبک با دو روش اندازه‌گیری چگالی نوری و شمارش سلول ارزیابی شد. علاوه بر این، pH نمونه‌ها نیز توسط pH سنج (827 pH lab, Swiss) تعیین شد.

۳-۲-۲ تعیین رشد سلولی با روش اندازه‌گیری چگالی نوری

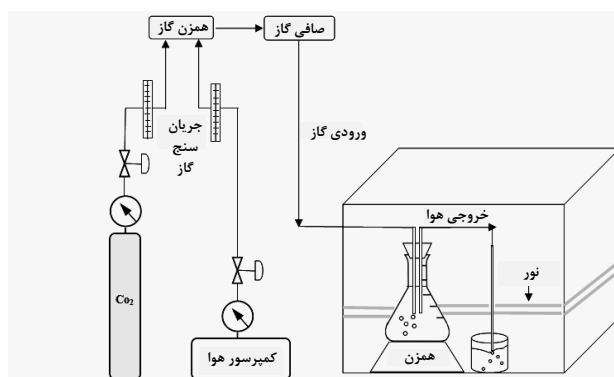
رشد ریز جلبک در محیط کشت به صورت روزانه و با سه تکرار از طریق اندازه‌گیری چگالی نوری ۱ میلی‌لیتر از نمونه مورد نظر در طول موج ۶۸۰ نانومتر توسط دستگاه طیف‌سنج نوری (UNICO 2100, UV-VIS, 2100, USA) تعیین شد. در این اندازه‌گیری‌ها، محیط کشت بدون مایه تلقیح به عنوان مرجع کنترل در نظر گرفته شد؛ طول موج ۶۸۰ نانومتر از پویش نمونه مورد نظر با نمونه شاهد حاصل شد.

۳-۳-۲ تعیین رشد سلولی از طریق روش شمارش سلول

شمارش سلول‌های ریز جلبک به وسیله لام هموسایتومتر به صورت روزانه، با سه بار تکرار، انجام شد. با استفاده از رابطه (۱)، می‌توان تعداد سلول‌ها را در یک میلی‌لیتر از محیط کشت محاسبه کرد [۲۲]:

$$10^4 \times \text{ضریب رقت} \times \text{تعداد سلول‌های شمرده شده بر روی لام نتوبار}$$

(۱)



شکل ۲. تصویر محفظه کشت.

۲۵ درجه سلسیوس بر روی همزن^۱ قرارگرفت و با لامپ فلوئورسان (متهایی) با شدت نور ۲۲۵۰ لوکس به آن نور تابانده شد و چرخه روشنایی (۱۶ ساعت) - تاریکی (۸ ساعت) اجرا شد. اندازه‌گیری نور به کمک دستگاه لوکس‌سنج (Lutron1108, Taiwan) صورت پذیرفت.

هوای فشرده حاوی ۶ درصد حجمی CO₂ در فشار نسبی ۰/۵ اتمسفر به میزان ۱ v/v/min، پس از عبور از صافی با ابعاد حفره‌های ۰/۲ میکرومتری به محیط کشت وارد شد. دبی هوا با استفاده از روتاسنج اندازه‌گیری شد.

۲-۲ کشت مایه تلقیح در محیط کشت فاضلاب

۲-۲-۱ شرایط کشت ریز جلبک‌های بومی

در این مطالعه، به منظور تولید صرفه‌جویانه زیست‌سوخت، از فاضلاب کارخانه شیر پگاه خراسان به عنوان محیط کشت بهره گرفته شد. مشخصات محیط کشت مورد بررسی به همراه pH اولیه محیط کشت در جدول (۳) درج شده است.

جدول ۳. مشخصات محیط کشت.

pH	اجزای تشکیل دهنده	محیط کشت
۷/۸۰	فاضلاب	محیط کشت

کشت مایع به صورت ناپیوسته در دو فلاسک با حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر به ازای محیط کشت مندرج در جدول (۱) صورت گرفت. شرایط کشت در محیط کشت شامل میزان نور ۴۴۱۰ لوکس، میزان کربن دی‌اکسید ۶ درصد حجمی هوا، میزان مایه تلقیح ۵ درصد حجمی محیط کشت، دبی هوا ۱ L.min⁻¹ و چرخه روشنایی (۱۶ ساعت) - تاریکی (۸ ساعت) بود. نمونه به صورت

۲-۳-۴ اندازه‌گیری محتوای لیپید

بعد از رشد ریز جلبک، در انتهای فاز لگاریتمی محیط کشت تلقیح شده به منظور اندازه‌گیری میزان زیست‌توده و محتوای لیپید برداشته شد. محتویات فلاسک‌ها به دو قسمت با حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر تقسیم شدند. یک بخش برای اندازه‌گیری لیپید و بخش دیگر به منظور تعیین زیست‌توده مورد استفاده قرار گرفت.

استخراج لیپید به صورت وزنی براساس روش Bligh and Dyer اجرا شد [۲۳]. به این ترتیب که ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت تلقیح شده به فالكون‌های ۱۵ میلی‌لیتری اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۴۳۰۰ rpm در دستگاه سانتریفیوژ قرار داده شدند. مایع شفاف روی زیست‌توده را با استفاده از پی‌پت برداشته و به فالكون‌های جدید اضافه و زیست‌توده در هریک از فالكون‌ها بعد از مخلوط شدن به داخل یک فالكون منتقل شدند و دوباره به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۴۳۰۰ rpm در داخل سانتریفیوژ قرار داده و همانند مرحله قبل مایع شفاف و زیست‌توده از هم جدا شدند. این کار تا جداسازی کامل زیست‌توده صورت گرفت. تمام زیست‌توده‌ها در داخل یک فالكون جمع‌آوری شدند. سپس، حدود ۴ میلی‌لیتر آب مقطر به منظور حذف املاح به آن اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۴۳۰۰ rpm در داخل سانتریفیوژ قرار گرفت. آب مقطر موجود بر سطح زیست‌توده دور ریخته شد و با ۴ میلی‌لیتر آب مقطر، زیست‌توده را به داخل فالكون ۵۰ میلی‌لیتر منتقل و به آن ۱۰ میلی‌لیتر متانول و ۵ میلی‌لیتر کلروفرم افزوده و بعد از مخلوط شدن، به مدت ۱۵ ساعت در داخل شیکر با دور ۱۴۰ rpm قرار داده شد. سپس، ۵ میلی‌لیتر کلروفرم و ۵ میلی‌لیتر آب مقطر به محتویات فالكون افزوده و بعد از مخلوط شدن به فالكون ۱۵ میلی‌لیتر منتقل کرده و به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۴۳۰۰ rpm در داخل سانتریفیوژ قرار داده شد؛ سه فاز ایجاد شد: فاز اول آب و متانول، فاز دوم سلول‌های شکسته شده، و سرانجام لیپید و کلروفرم. بعد از جداسازی فاز سوم، محتویات فالكون‌ها به همراه ۱۰ میلی‌لیتر کلروفرم به منظور استخراج لیپید باقی مانده به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۴۳۰۰ rpm در سانتریفیوژ قرار داده شد؛ دوباره لیپید و کلروفرم را جدا کردند. یک ظرف شیشه‌ای دردار را به مدت ۱ ساعت در دمای ۱۰۵ درجه سلسیوس در داخل آون خشک و بعد از وزن کردن، لیپید و کلروفرم به آن اضافه کردند و در داخل حمام آب‌گرم با دمای ۴۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه در معرض

گاز نیتروژن قرار دادند تا کلروفرم جدا شود. سپس، به مدت ۱ ساعت در آون با دمای ۱۰۵ درجه سلسیوس قرار دادند تا کلروفرم باقی مانده تبخیر و خشک شود. ظرف شیشه‌ای حاوی لیپید وزن شده و از اختلاف وزن ظرف شیشه‌ای میزان لیپید محاسبه شد. محتوای لیپید مطابق رابطه (۲) به‌دست آید:

$$(2) \quad 100 \times \frac{\text{وزن لیپید استخراج شده}}{\text{وزن زی توده خشک شده}} = \text{محتوای لیپید} \%$$

۲-۳-۵ تعیین میزان بهره‌وری لیپید

میزان بهره‌وری لیپید با توجه به محتوای لیپید و وزن خشک به کمک رابطه (۳) محاسبه می‌شود [۲۴]:

$$(3) \quad P_{\text{Lipid}} (\text{g/L/d}) = \frac{C_{\text{Lipid}} (\text{g/g}) \times \text{DCW} (\text{g/L})}{\text{Time} (\text{day})}$$

که در این رابطه C_{Lipid} محتوای لیپید سلول‌ها و DCW ، وزن خشک سلول است.

۲-۳-۶ وزن زیست‌توده خشک

۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت تلقیح شده به فالكون‌های ۱۵ میلی‌لیتری اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفیوژ دور ۴۳۰۰ rpm قرار داده شد. مایع شفاف و زیست‌توده مثل روش استخراج لیپید از هم جدا شدند. در دو مرحله، زیست‌توده با آب مقطر شستشو داده شد تا املاح موجود در آن جدا شود؛ سپس با مقدار کمی آب مقطر، زیست‌توده به داخل ظرف آلومینیمی خشک‌شده در داخل آون به مدت ۱ ساعت در دمای ۴۵ درجه سلسیوس منتقل شد و به مدت ۴ ساعت در این دما در داخل آون قرار گرفت و مجدداً توزین شد؛ در مرحله بعد، عمل خشک کردن در داخل آون به مدت ۲ ساعت تکرار و در صورتی که اختلاف وزن آنها کمتر از ۲ درصد بود، عمل خشک کردن کامل در نظر گرفته شد. از اختلاف وزن ظرف آلومینیمی میزان وزن زیست‌توده خشک به دست آمد.

۲-۳-۷ تعیین میزان بهره‌وری زیست‌توده

میزان بهره‌وری زیست‌توده با توجه به وزن خشک سلول از رابطه (۴) به‌دست می‌آید:

$$(4) \quad P_{\text{Biomass}} (\text{g/L/d}) = \frac{\text{DCW} (\text{g/L})}{\text{Time} (\text{day})}$$

1. Dry cell Weight

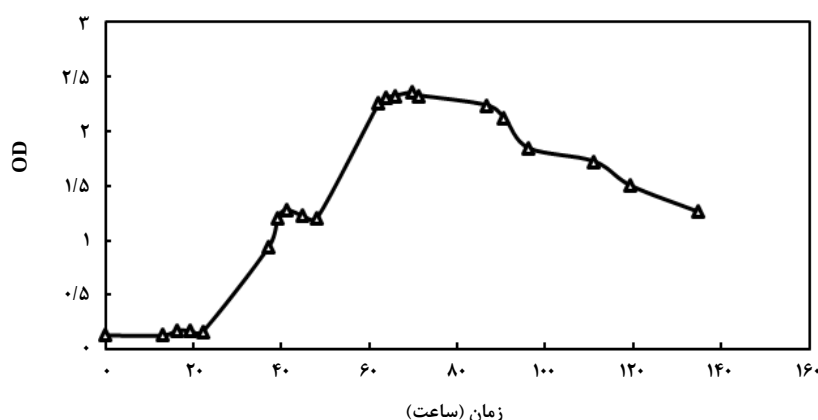
۳. نتایج و بحث

در این بخش، تحلیل و ارزیابی عملکرد فاضلاب کارخانه شیر پگاه خراسان به عنوان محیط کشت، به منظور کشت بانک مایه تلقیح اجرا شد. منحنی رشد ریز جلبک‌های بومی در محیط کشت فاضلاب با منبع نور مهتابی تا فاز مرگ بر حسب چگالی نوری را در شکل (۳) مشاهده می‌کنید.

مطابق شکل (۳)، طول دوره رشد ریز جلبک‌های بومی در این محیط کشت ۱۳۴ ساعت بوده و به چهار دوره‌ی فاز تأخیر، فاز لگاریتمی، فاز سکون و فاز مرگ تقسیم شده است. رشد سلول‌های تلقیح شده بعد از ۲۲ ساعت با عبور از فاز تأخیر شروع شد، به طوری که بیشینه چگالی سلولی در انتهای فاز لگاریتمی ۲/۳۵ اندازه‌گیری شد. علاوه بر این، تعداد سلول‌ها در طول دوره رشد افزایش یافته است (جدول (۴)).

نتایج مربوط به وزن خشک زیست‌توده، لیپید و شمارش

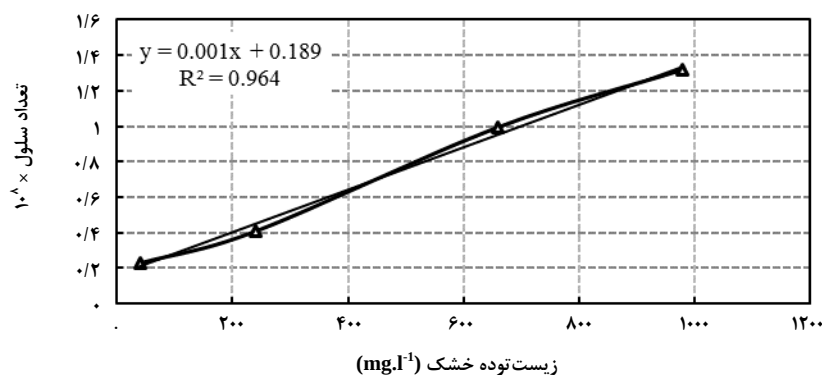
سلول حاصل از محیط کشت فاضلاب در طول دوره رشد ریز جلبک‌های بومی تا فاز مرگ به صورت روزانه در جدول (۴) درج شده است. میزان زیست‌توده خشک و بهره‌وری زیست‌توده با تعداد سلول‌ها مطابقت دارد؛ به بیان دیگر، با ورود سلول‌ها به فاز لگاریتمی و افزایش چگالی سلولی، تعداد سلول‌ها زیاد شده و متناسب با آن زیست‌توده خشک و بهره‌وری زیست‌توده افزایش یافته است، به طوری که در ساعت ۸۶/۶۶ دوره رشد ریز جلبک‌های بومی، بیشینه میزان سلول و تعداد آن 1.0×10^8 / ۱/۳۱۹ اندازه‌گیری شد و در این زمان نیز بالاترین میزان زیست‌توده خشک و بهره‌وری زیست‌توده مشاهده، و میزان آن، به ترتیب، معادل 980 mg.L^{-1} و $271 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ اندازه‌گیری شد. مطابق شکل (۴)، رابطه خطی ($R^2=0.96$) بین زیست‌توده خشک و تعداد سلول‌ها برقرار است.



شکل ۳. منحنی رشد ریز جلبک‌های بومی در محیط کشت فاضلاب.

جدول ۴. نتایج مربوط به وزن خشک زیست‌توده، لیپید و شمارش سلول حاصل از محیط کشت فاضلاب.

تعداد سل $\times 10^4$ (cell ml ⁻¹)	میزان بهره‌وری زی توده خشک (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)	میزان بهره‌وری لیپید (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)	درصد محتوای لیپید بر اساس وزن خشک	وزن خشک (mg.L ⁻¹)	وزن لیپید (mg.L ⁻¹)	زمان (ساعت)
۰/۲۳۲	۷۲/۹	۰	۰	۴۰	۰	۱۳/۱۶
۰/۴۱۲	۱۵۵/۰	۳۹	۲۵/۰	۲۴۰	۶۰	۳۷/۱۶
۰/۹۹۶	۲۴۸/۸	۵۳	۲۱/۲	۶۶۰	۱۴۰	۶۳/۶۶
۱/۳۱۹	۲۷۱/۴	۴۴	۱۶/۳	۹۸۰	۱۶۰	۸۶/۶۶
۱/۱۰۰	۲۰۷/۶	۲۲	۱۰/۴	۹۶۰	۱۰۰	۱۱۰/۹۹



شکل ۴. نمودار تغییرات زیست توده خشک بر حسب تعداد سلول‌های ریز جلبک.

به این نکته باید توجه کرد که در این آزمایش ریز جلبک‌های بومی بیشینه محتوای لیپید ۲۵ درصد و بیشینه بهره‌وری لیپید $53 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ را در محیط فاضلاب بدون بهینه‌سازی محیط و شرایط عملیاتی به دست آورده‌اند و این نتایج با بهینه‌سازی فاضلاب و شرایط عملیاتی افزایش خواهد یافت.

از مقایسه منحنی رشد سلولی با منحنی تغییرات میزان محتوای لیپید در شکل (۵)، پی می‌بریم که ریز جلبک‌های بومی در محیط کشت فاضلاب از بالاترین میزان محتوای لیپید در اواسط فاز لگاریتمی برخوردار بودند. علاوه بر این، لیپید در ریز جلبک‌های بومی یک متابولیت اولیه است و همزمان با رشد تولید شده است.

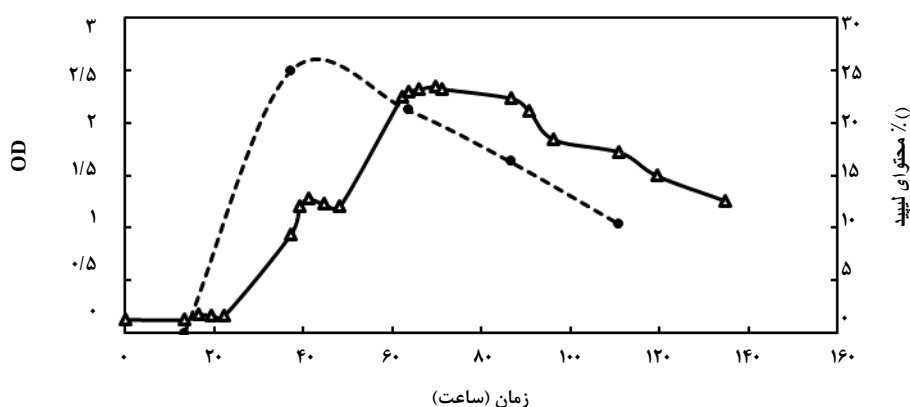
رسلا^۱ در سال ۱۹۹۰ دلیل افزایش محتوای لیپید را در مرحله لگاریتمی رشد ریز جلبک بررسی کرد و از این قرار استدلال کرد که در غلظت‌های پایین زیست توده، میزان دریافت انرژی نوری به ازای واحد سطح افزایش می‌یابد. بنابراین، مازاد انرژی نوری دریافت شده توسط سلول‌های ریز جلبک در جهت ذخیره انرژی به شکل لیپید مصرف می‌شود و محتوای لیپید افزایش می‌یابد [۲۶]. مطابق شکل (۶)، تقریباً در ساعت ۳۷/۱۶ محتوای لیپید بیشینه بوده که در این نقطه میزان زیست توده کم است، در نتیجه، مازاد انرژی نوری دریافتی در جهت افزایش محتوای لیپید به کار رفته و نتایج به دست آمده از این آزمایش با نتایج حاصل از پژوهش‌های رسلا^۱ مطابقت دارد.

بنابر مندرجات جدول (۴)، مشاهده می‌کنید، تغییرات محتوای لیپید در طول دوره رشد از روز اول تا پنجم در محدوده صفر تا ۲۵ درصد، و محدوده تغییرات بهره‌وری لیپید $0 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ تا $53 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ بوده است. بیشینه میزان محتوای لیپید و بهره‌وری لیپید به دست آمده توسط ریز جلبک‌های بومی در این آزمایش، در مقایسه با نتایج حاصل از مطالعات گذشته مطلوب است. مطابق مندرجات جدول (۵)، نتایج مربوط به میزان محتوای لیپید در مطالعات انجام شده بر روی کشت چند گونه خالص ریز جلبک، میزان محتوای لیپید آنها در مقایسه با بیشینه محتوای لیپید ریز جلبک‌های بومی رشد یافته در فاضلاب کمتر، و تأییدی بر عملکرد مناسب ریز جلبک‌های بومی در فاضلاب است.

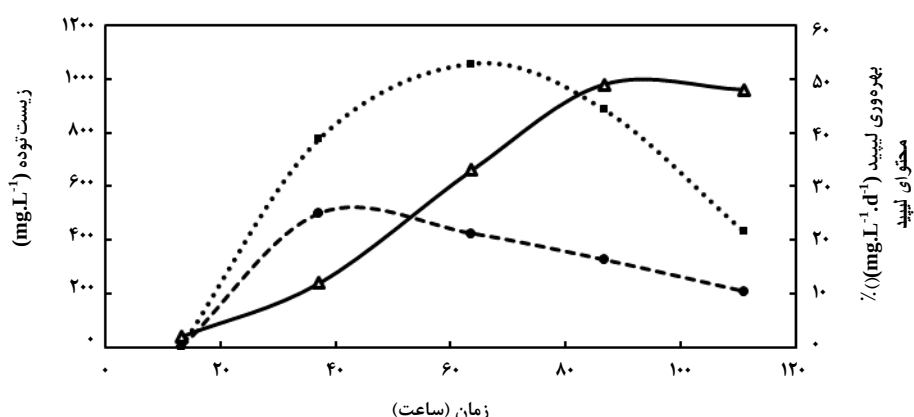
جدول ۵. میزان محتوای لیپید در مطالعات گذشته [۱۳ و ۲۵].

محتوای لیپید (%)	گونه ریز جلبکی
۴/۱	اسپیرولینا ماکسیما
۵/۱	کلورلا ووگاریس
۱۷/۷	سندسموس آبلپکوس
۱۶/۷	دونالیا ترتیولکتا
۲۰	کریپتوکودینیوم گنی
۲۳	دونالیا پریمولکتا
۲۴	فائوداکتیلوم تریکورتاتام
۱۹	تتراسلمیس سویکا sp
۲۵	جلبک در این مطالعه

1. Roessler



شکل ۵. روند تغییرات محتوای لیپید (●) و رشد سلولی (Δ) برحسب زمان.



شکل ۶. روند تغییرات محتوای لیپید (●)، بهره‌وری لیپید (■) و میزان زیست‌توده (Δ) برحسب زمان.

زیست‌توده را کاهش داد. یکی از راهکارهای مناسب به منظور کاهش هزینه تولید زیست‌سوخت از ریزجلبک‌ها، به‌کارگیری فاضلاب به عنوان محیط کشت است. محیط کشت لازم به منظور رشد ریزجلبک از چندین ترکیب ماکرونوترینت^۱ از قبیل کربن، نیتروژن، فسفر، پتاسیم و ترکیبات معدنی^۲ چون کالت، مولیبدن و منگنز تشکیل شده است؛ در نتیجه فاضلاب منبعی غنی برای رشد ریزجلبک خواهد بود. در این مطالعه، با توجه به بیشینه درصد محتوای لیپید بهره‌وری لیپید میکروجلبک‌های بومی در فاضلاب این نکته قابل استنباط است که به‌کارگیری ریزجلبک‌های بومی در فاضلاب عملکرد مناسبی خواهد داشت و سبب کاهش هزینه تولید زیست‌توده می‌شود.

در این محیط کشت، تغییرات pH تقریباً ثابت بود. علت این مشاهده می‌تواند از این قرار تفسیر شود که CO₂ در حدود ۶ درصد حجمی هوا به عنوان منبع کربن به فاضلاب اضافه و انحلال آن در آب سبب تولید سیستم بافری اسید/ باز ضعیف بی‌کربنات/ کربنات شده است. به همین دلیل، تغییرات شدید pH وجود نداشت. علاوه بر این، ماهیت محیط کشت می‌تواند دلیلی بر ثابت بودن pH باشد.

۴. نتیجه‌گیری کلی

یکی از مهم‌ترین موانع اصلی در تولید صنعتی زیست‌سوخت، هزینه گزاف تولید در نتیجه قیمت زیاد آن است. هزینه بالای تولید زیست‌توده تحت اشباع دو عامل مهم و اساسی قرار دارد. این دو عامل عبارتند از: ۱- هزینه مواد اولیه، ۲- هزینه انجام عملیات. بنابراین با ارائه رویکردهای مناسب باید تا حد امکان هزینه تولید

1. Macronutrient
2. Traceelement

۵. تشکر و قدردانی

مؤلفان این مقاله از شورای پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به خاطر حمایت از این پروژه از طریق طرح شماره ۱۲۷۷۱ در تاریخ ۱۳۹۰/۱۱/۱۸ سپاسگزاری می‌کنند.

مراجع

- [13] Chisti, Y., "Biodiesel from microalgae," *Biotechnology Advances*, Vol. 25, pp. 294-306, (2007).
- [14] Schenk, P., Hall, T., Skye, S., Evan, M., Ute, M., Jan, P., Clemens, K. O., Hankamer, B., "Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production," *BioEnergy Research*, Vol. 1, pp. 20-43, (2008).
- [15] Griffiths, M., Harrison, S., "Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production," *Journal of Applied Phycology*, Vol. 21, pp. 493-507, (2009).
- [16] Verma, N. M., Shakti, M., Amitesh, S., Mishra, B. N., "Prospective of biodiesel production utilizing microalgae as the cell factories: a comprehensive discussion," *African Journal of Biotechnology*, Vol. 9, pp. 1402-1411, (2010).
- [17] Mandal, S., Mallick, N., "Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production," *Applied microbiology and biotechnology*, Vol. 84, pp. 281-291, (2009).
- [18] Gouveia, L., Oliveira, A., "Microalgae as a raw material for biofuels production," *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, Vol. 36, pp. 269-274, (2009).
- [19] Omidvar, A., Amini, E., "Predicting of Physical Properties and Atomization Characteristics of the Biofuel Derived from *Chlamydomonas* Microalga " *Fuel and Combustion*, Vol. 2, pp. 46-58, (2011).
- [20] Feng, Y., Li, C., Zhang, D., "Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium," *Bioresource Technology*, Vol. 102, pp. 101-105, (2011).
- [21] Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M., Stanier, R. Y., "Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria," *Journal of General Microbiology*, Vol. 111, pp. 1-61, (1979).
- [22] Berkson, J., Magath, T. B., Horn, M., "The Error of Estimate of the Blood Cell Count as made with the Hemocytometer," *American Journal of Physiology*, Vol. 128, pp. 309-323, (1940).
- [23] Bligh, E. G., Dyer, W. J., "A rapid method of total lipid extraction and purification," *Canadian Journal of biochemistry and physiology*, Vol. 37, pp. 911-917, (1959).
- [24] Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N., Lan, C. Q., "Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*," *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 81, pp. 629-636, (2008).
- [25] Gouveia, L., Oliveira, A. C., "Microalgae as a raw material for biofuels production," *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, Vol. 36, pp. 269-274, (2009).
- [26] Roessler, P. G., "Environmental Control of Glycerolipid Metabolism in Microalgae: Commercial Implications and Future Research Directions," *Journal of Phycology*, Vol. 26, pp. 393-399, (1990).
- [1] Brennan, L., Owende, P., "Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products," *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol. 14, pp. 557-577, (2010).
- [2] Mårtensson, K., Westerberg, K., "How to transform local energy systems towards bioenergy? Three strategy models for transformation," *Energy Policy*, Vol. 35, pp. 6095-6105, (2007).
- [3] Pittman, J. K., Dean, A. P., Osundeko, O., "The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources," *Bioresource Technology*, Vol. 102, pp. 17-25, (2011).
- [4] Salamatnia, B., Hashemizadeh, I., Ahmad Zuhairi, A., "Alkaline Earth Metal Oxide Catalysts for Biodiesel Production from Palm Oil: Elucidation of Process Behaviors and Modeling Using Response Surface Methodology," *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering (IJCCE)*, Vol. 32, pp. 113-126, (2013).
- [5] Ma, F., Hanna, M. A., "Biodiesel production: a review," *Bioresource technology*, Vol. 70, pp. 1-15, (1999).
- [6] Xu, H., Miao, X., Wu, Q., "High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters," *Journal of Biotechnology*, Vol. 126, pp. 499-507, (2006).
- [7] Shay, E. G., "Diesel fuel from vegetable oils: Status and opportunities," *Biomass and Bioenergy*, Vol. 4, pp. 227-242, (1993).
- [8] Ranganathan, S. V., Narasimhan, S. L., Muthukumar, K., "An overview of enzymatic production of biodiesel," *Bioresource technology*, Vol. 99, pp. 3975-3981, (2008).
- [9] Umdu, E. S., Tuncer, M., Seker, E., "Transesterification of *Nannochloropsis oculata* microalga's lipid to biodiesel on Al₂O₃ supported CaO and MgO catalysts," *Bioresource technology*, Vol. 100, pp. 2828-2831, (2009).
- [10] Singh, A., Nigam, P. S., Murphy, J. D., "Renewable fuels from algae: An answer to debatable land based fuels," *Bioresource technology*, Vol. 102, pp. 10-16, (2011).
- [11] Mandalam, R. K., Palsson, B., "Elemental balancing of biomass and medium composition enhances growth capacity in high-density *Chlorella vulgaris* cultures," *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 59, pp. 605-611, (1998).
- [12] Najafi, B., Torkian, M., Hejazi, M. A., Zamzamani, A. A., "Effect of Microalgae Biodiesel on Performance Parameters and Exhaust Emissions From IDI diesel Engine" *Fuel and Combustion*, Vol. 4, pp. 29- 42, (2012).