بررسی ترکیب اسید چرب و پتانسیل تولید بیودیزل برخی ریزجلبک‌ها در زیستگاه‌های مختلف

مجتبی یزدانی[1*]، معصومه خسروی رینه[2]، اکرم احمدی[3]

تاریخ دریافت : ۱۳۹۵/۷/۲۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۹/۲۶

چکیده

بسیاری از جلبک‌ها از جمله ریز جلبک های: *Chlorella vulgaris*، *Scenedesmus obliqus* و *Spirulina platensis* مقادیر زیادی ذخایر روغنی تولید می‌کنند که می‌تواند در تولید بیودیزل بکار روند. جهت بررسی میزان تولید لیپید در این ریزجلبک‌ها، نمونه برداری از مناطق مختلف انجام شده و در شرایط مناسب کشت داده شدند. بر اساس نتایج، کمترین میزان اسید چرب اشباع در گونه *Chlorella vulgaris* (۲۱/۷۹٪) مشاهده گردید. اسیدهای چرب اشباع اسید لوریک (C12:0)، اسید مریستیک (C14:0)، اسید پنتا دسیکلیک (C15:0)، اسید پالمتیک (C16:0) و اسید استئاریک (C18:0) در تمامی گونه‌ها به میزان متفاوت مشاهده شدند. بیشترین میزان اسید چرب غیر اشباع در گونه *Chlorella vulgaris* مشاهده گردید. تنوع اسیدهای چرب نیز در گونه‌ها متفاوت است. بیشترین تنوع تعداد اسیدهای چرب در گونه *Scenedesmus obliques* با تعداد ۲۲ نوع مشاهده شد و این تعداد در دو گونه *Chlorella vulgaris* و *Spirulina platensis* به ترتیب به ۱۲ و ۱۰ نوع اسید چرب رسید. بیشترین میزان اسید چرب اشباع چند گانه EPA و DHA در گونه *Scenedesmus obliques* گزارش گردید. بیشترین میزان اسید چرب غیر اشباع متعلق به اسید لینولنیک (C18:3) بود. بیشترین میزان اسید چرب دارای دو باند غیر اشباع در گونه *Spirulina platensis* برابر با ۱۸/۶٪ مشاهده شد. بیشترین میزان اسید چرب دارای سه باند غیر اشباع در گونه *Chlorella vulgaris* برابر با ۴۸/۵۳ ٪ اندازه گیری گردید. اسیدهای چرب غیر اشباع دارای باندهای چند گانه تنها در گونه *Scenedesmus obliques* مشاهده شد. بیشترین ترکیب اسید چرب موجود در جلبک‌های مورد مطالعه مربوط به انواع اسیدهای چرب غیر اشباع بود.

واژه‌های کلیدی: اسپیرولینا، اسیدچرب، بیودیزل، سندسموس، کلرلا.

مقدمه

استفاده از سوخت‌های زیستی (Biofuel) بعنوان یکی از منابع انرژی جایگزین محسوب می‌شود و بیودیزل (Biodiesel) یکی از اشکال مهم سوخت‌های زیستی است. سوخت‌های زیستی انواع مختلفی دارند از جمله بیواتانول، بیوگاز و بیودیزل (Huang et al., 2010). میکروجلبک‌ها موجوداتی با رشد سریع هستند و ۵- ۶ درصد انرژی دریافتی را به بیوماس تبدیل می‌کنند. بسیاری از جلبک‌ها مقادیر زیادی ذخایر روغنی یا شبه روغنی تولید می‌کنند که براحتی می‌تواند به بیودیزل تبدیل شوند. پتانسیل

۱. مربی گروه زیست شناسی، واحد آشتیان، دانشگاه آزاد اسلامی، آشتیان، ایران (نویسنده مسئول: yazdani-m@aiau.ac.ir)
۲. استادیار گروه زیست شناسی، واحد آشتیان، دانشگاه آزاد اسلامی، آشتیان، ایران
۳. دکتری تخصصی فیزیولوژی گیاهی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران

تولید ترکیبات روغنی در جلبک‌ها به میزان ۴۰ تا ۶۰ تن در هکتار در طی یکسال در آب و هوای گرمسیری یا نیمه گرمسیری می‌باشد. جلبک‌ها از ساده ترین موجودات واجد کلروفیل هستند که با عمل فتوسنتز مواد آلی را می‌سازند. میکروجلبک‌ها عموماً دارای سرعت رشد بالایی بوده و قابلیت تولید حجم زیاد روغن را دارند. بیوماس حاصل از جلبک دارای یک فرمول کلی $CO_{0.48}H_{1.83}N_{0.11}P_{0.01}$ بوده و برای پرورش آن نیاز غذایی کمی مورد نیاز است. این نیازها شامل: نور، آب، دی اکسیدکربن، نمک و مواد مغذی مانند آهن، فسفر، نیترات می‌باشند. آب دریا به همراه املاحی چون فسفات و نیترات و مقدار کمی مواد مغذی میتواند محیطی مناسب برای پرورش میکروجلبک باشد. نکته قابل توجه در مورد میکروجلبکها استفاده از فاضلاب برای پرورش آنهاست. به این ترتیب میتوان هم مسئله آلودگی فاضلاب را با پرورش میکروجلبکها برطرف نمود و هم یک منبع ارزان قیمت و رایگان برای تولید بیوماس میکروجلبک و در پی آن انرژی پیدا کرد (Xiaodong et al., 2009).

تحقیق و مطالعه کشت ریزجلبک‌ها در تولید انرژی تجدیدپذیر در دهه ۱۹۷۰ افزایش یافت، در طی این دهه ایالات متحده برنامه‌ای را جهت تحقیق و توسعه سوخت‌های تجدیدپذیر شامل تولید بیودیزل از ریزجلبک‌ها تدوین نمود و نتیجه این بود که تولید کم هزینه بیودیزل از ریزجلبک‌ها به لحاظ فنی مردود بوده و لازم است تحقیقات گسترده تر جهت انتخاب سویه‌هایی با دست ورزی ژنتیکی که قادر به تولید لیپید بیشتری باشند صورت گیرد (Sheehan et al., 1998). Chisti در سال ۲۰۰۷ مشخص نمود که تولید بیودیزل بسیار به صرفه تر از بیواتانول می‌باشد چرا که مقدار انرژی حاصل از بیودیزل ۱/۶ برابر بیشتر از بیواتانول است. تولید زیست توده یک پارامتر کلیدی در ارزیابی اقتصادی تولید بیودیزل از جلبک می‌باشد. اگرچه توسعه مهندسی ژنتیک به علاوه تجهیز بیوراکتورها نیز تأثیر بسزایی در افزایش راندمان خواهند داشت.

Rosenberg و همکاران در سال ۲۰۰۸ تقریباً ۲۲۰۰۰ تا ۲۶۰۰۰ گونه جلبک دارای کاربرد اقتصادی را معرفی کردند که از این میان وزارت انرژی ایالات متحده تنها ۳۰۰۰ سویه از ریزجلبک‌ها را به عنوان منبع تولید بیودیزل معرفی نموده است. میزان تولید لیپید به ازای وزن خشک کشت ریز جلبک‌ها تا ۴۴/۳٪ می‌رسد.

Liu و همکاران در سال ۲۰۰۸، تأثیر مقادیر آهن را بر رشد و تجمع لیپید در جلبک *Chlorella vulgaris* بررسی نمودند و دریافتند که افزایش میزان کلات Fe^{3+} سبب تحریک تولید روغن در ریز جلبک گردید و محتوای روغن به ۵۶/۶٪ وزن خشک رسید.

هدف از انجام این پروژه تعیین ترکیب و میزان اسیدهای چرب در تعدادی از میکروجلبک‌های آب شیرین به منظور مقایسه و تعیین سطح لیپیدی آنها بوده است.

مواد و روش ها

نمونه برداری

با توجه به مطالعات و بررسی منابع، از میان ریزجلبک‌ها گونه‌های *Chlorella vulgaris*، *Scenedesmus obliqus* و *Spirulina platensis* به علت دارا بودن مقادیر قابل توجه لیپید جهت مطالعه تولید بیودیزل انتخاب شدند. نمونه برداری با استفاده از ظروف شیشه‌ای اتوکلاو شده در شرایط کاملاً استریل در فاصله ماه‌های خرداد تا شهریور در ایستگاه‌های مختلف همچون عباس آباد شازند، خنداب، پارک‌های ملایر، نهاوند و میدان شریعتی اراک در تاریخ‌های مختلف و با فواصل زمانی منظم در مقطع زمانی بهار انجام شد. پس از ثبت مشخصات جهت انجام خالص سازی با استفاده از واکشت‌های مختلف، نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل گردیده و در فریزر نگهداری شدند که در این شرایط نمونه‌ها پایدارند. کشت نمونه‌ها در محیط کشت و شرایط نوری مناسب با شدت نور ۳۵۰۰ لوکس، درجه حرارت ۲۵ درجه سانتیگراد و دوره متناوب نوردهی شامل ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی انجام شد. جدا سازی و خالص سازی سویه‌ها به روش واکشت‌های متوالی و رقیق کردن سریالی برخی نمونه‌ها تا رسیدن به نمونه مورد نظر انجام گرفت. شناسایی گونه‌های حاصل بر طبق کلید شناسایی معتبر پرسکات (Prescott, 1962) انجام شد. اطلاعات مربوط به هریک از جلبک‌ها در جدول ذکر گردیده است.

تهیه محیط‌های کشت

هر یک از نمونه‌ها پس از ثبت مشخصات در محیط کشت‌های مناسب کشت شدند. محیط کشت Zinder (Komarek, 1973) جهت کشت جلبک *Chlorella vulgaris*، محیط کشت Zarrouk (Zarrouk, 1966) جهت کشت جلبک *Spirulina platensis* و محیط کشت Bold Basal Medium (BBM) (Nicholas, 1973) جهت کشت جلبک *Scenedesmus obliques* بکار رفت.

نحوه خشک کردن نمونه ها

نمونه‌های همراه محیط کشت بصورت یکنواخت به درون لوله‌های آزمایش منتقل شدند و سپس به مدت ۲۰ دقیقه و با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. پس از آن لوله‌ها از دستگاه خارج شده و محیط کشت‌ها دور ریخته شدند و بر روی جلبک‌های درون لوله‌های آزمایش آب مقطر اضافه گردید و مجدداً با دور ۱۵۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ انجام شد. در ادامه پس از دور ریختن آب مقطر رویی، جلبک‌ها از لوله خارج شده و در درون یک ویال استریل قرار گرفتند و به دستگاه انکوباتور منتقل شدند. دمای انکوباتور ۳۷-۳۵ درجه سانتیگراد تنظیم گردید و به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت درب ویال را باز گذاشته تا نمونه‌های موردنظر خشک شدند. جهت پودر کردن ریزجلبک‌ها از دستگاه پمپ وکیوم خلا (Vaccum Pump) و

شستشو با آب مقطر استفاده گردید و در مرحله ی پایانی از خشک کن اسپری درایر(Spray Dryer) و فیلترهای مخصوص استفاده شد و در نهایت پودر کنسانتره یکنواخت بدست آمد.

تهیه عصاره متانولی گیاهان

مقدار ۲۵ گرم از پودر آسیاب شده توسط دستگاه Soxhlet با استفاده از ۲۵۰ ml متانول به مدت ۲۴ ساعت عصاره گیری شد. عصاره توسط دستگاه روتاری Heidoloh مدل Laborota ۴۰۰۳ تحت فشار خلأ تا حجم۱۰ سی سی غلیظ شد.سپس عصاره تغلیظ شده به وسیله جریان هوا در زیر هود کاملاً تغلیظ شده و به صورت یک ماده گریسی درآمد. این عصاره در ظروف دربسته در فریزر نگهداری شد.

روش اندازه گیری لیپید

در این تحقیق انواع متیل استر اسیدهای چرب با کروماتوگرافی گازی با شناساگر طیف سنجی جرمی تعیین گردید. بدین منظور مقدار ۲g از عصاره داخل لوله آزمایش به ابعاد ۲۲×۲۷۵ mm ریخته شد و به آن ۲ml اتانول اضافه گردید و پس از خوب تکان دادن، مقدار ۱۰ml محلول ۸ مولار اسیدکلریدریک به لوله آزمایش اضافه شد. پس از بستن درب لوله مجدداً خوب تکان داده شد و سپس در حمام ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ دقیقه قرار گرفت. در ادامه لوله از حمام خارج شده و سریع به آن ۱۰ml اتانول اضافه گردید و خوب بهم زده شد و در حمام دیگر تا رسیدن به دمای محیط، سرد شد. سپس محتویات لوله ۲ بار و هر بار با ۱۵ml دی اتیل اتر استخراج گردید و داخل بالن ۱۰۰ml میلی لیتر ریخته شد. محتویات لوله بار دیگر با ۱۵ml پترولیوم اتر استخراج شده و به بالن منتقل گردید. سپس حلال درون بالن با استفاده از روتاری (rotary evaporator) تبخیر شده و از روی اختلاف وزن حاصل، مقدار چربی محاسبه گردید (Dieffnbacher et al., 1992).

نتایج

محتوا و ترکیب اسید چرب متفاوتی در گونه‌های مختلف در مقالات با توجه به شرایط محیطی گزارش شده است. همانگونه که در جدول۱ و نیز نمودار۱ مشاهده می‌شود، میزان اسید چرب اشباع در گونه‌های مورد مطالعه مقادیر متفاوتی را نشان می‌دهد.

کمترین میزان اسید چرب اشباع در گونه *Chlorella vulgaris* (۲۱/۷۹٪) مشاهده می‌گردد و اسیدهای چرب اشباع اسید لوریک (C12:0)، اسید مریستیک (C14:0)، اسید پنتا دیسیکلیک (C15:0)، اسید پالمتیک (C16:0) و اسید استئاریک (C18:0) در تمامی گونه‌ها بطور مشترک اما با مقدار متفاوت مشاهده می‌گردد (جدول۱).

بیشترین میزان اسید چرب غیر اشباع در گونه *Chlorella vulgaris* مشاهده شد (نمودار۱). در گونه‌های مورد مطالعه اسید لینولنیک (C18:3) دارای بیشترین مقدار بوده و تنوع اسیدهای چرب نیز در گونه‌های مختلف متفاوت است (جدول۱).

بیشترین تنوع در تعداد اسیدهای چرب در گونه *Scenedesmus obliques* مشاهده می‌شود که در حدود ۲۲ نوع متفاوت بوده و این تعداد در گونه *Chlorella vulgaris* به ۱۲ نوع اسید چرب و گونه *Spirulina platensis* به ۱۰ نوع اسید چرب می‌رسد. بیشترین میزان اسید چرب غیر اشباع نیز متعلق به اسید لینولنیک (C18:3) است (جدول۱).

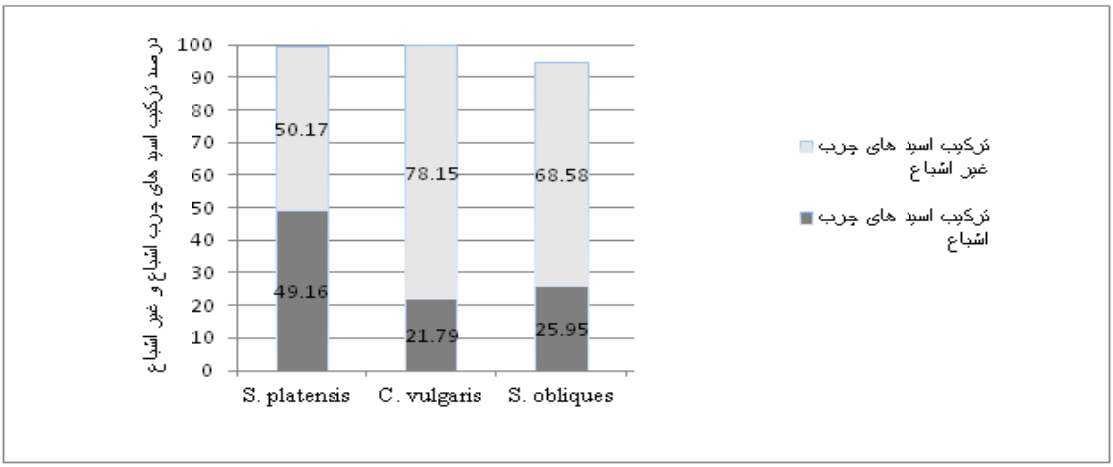
بر اساس داده‌های مندرج در جدول۱، بیشترین میزان اسید چرب دارای دو باند غیر اشباع در گونه *Spirulina platensis* برابر با ۱۸/۶٪ و بیشترین میزان اسید چرب دارای سه باند غیر اشباع در گونه *Chlorella vulgaris* برابر با ۴۷/۹ ٪ اندازه گیری می‌باشد. اسیدهای چرب غیر اشباع دارای باندهای چند گانه (EPA) تنها در گونه *Scenedesmus obliques* مشاهده شد. در جلبک‌های مورد مطالعه بیشترین ترکیب اسید چرب مربوط به انواع اسیدهای چرب غیر اشباع است.

اسید مریستئولیک (C14:1) و اسید پنتادسیکلینیک (C15:1) تنها در گونه *Scenedesmus obliques* مشاهده گردید. اسید پالمیتولئیک (C16:1) و اسید اولئیک (C18:1) جزء اسید چرب‌های غالب هستند که در تمامی گونه‌ها شناسایی شدند. اسیدهای چرب EPA (C20:5) و DHA (C22:6) تنها در گونه *Scenedesmus obliques* مشاهده گردید.

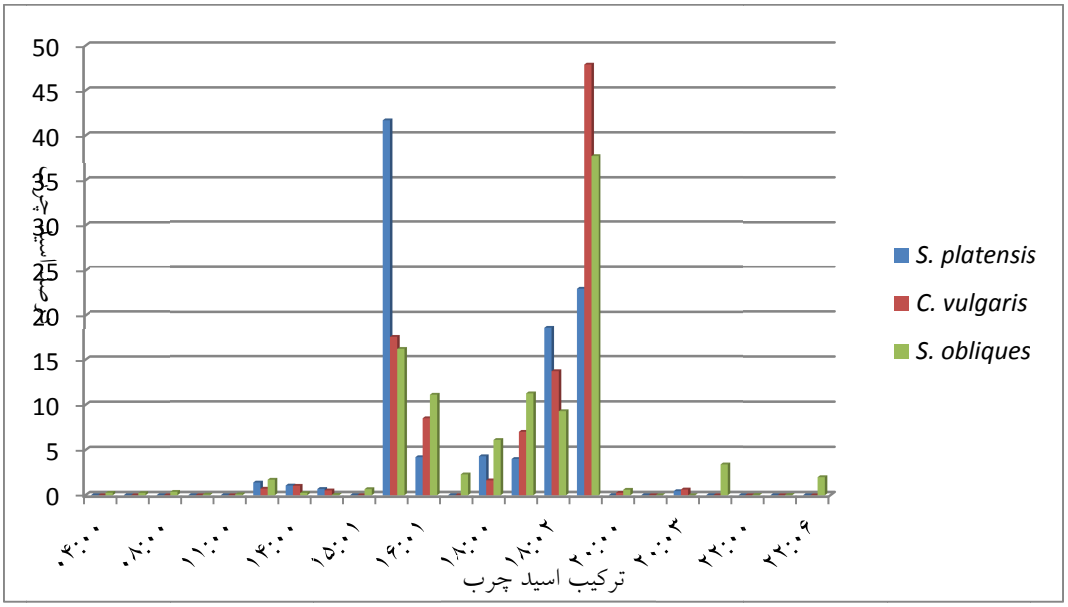
جدول۱: میزان و نوع اسیدهای چرب در گونه‌های مورد مطالعه

اسید چرب	*Spirulina platensis* (% ww^{-1})	*Chlorella vulgaris* (% ww^{-1})	*Scenedesmus obliques* (% ww^{-1})
4:0	-	-	۰/۲۷
6:0	-	-	۰/۲۴
8:0	-	-	۰/۳۷
10:0	-	-	۰/۰۷
11:0	-	-	۰/۱
12:0	۱/۴	۰/۷۲	۱/۷۱
14:0	۱/۰۷	۱/۰۴	۰/۲۵
14:1	-	-	۰/۱۰۸
15:0	۰/۶۹	۰/۵۳	۰/۰۵۱
15:1	-	-	۰/۶۷
16:0	۴۱/۷	۱۷/۶	۱۶/۱۶
16:1	۴/۲	۸/۵	۱۱/۱
17:0	-	-	۲/۳
18:0	۴/۳	۱/۶۴	۶/۱
18:1	۴	۷	۱۱/۲۵
18:2	۱۸/۶	۱۳/۷	۹/۲۸
18:3	۲۲/۹۲	۴۷/۹	۳۷/۷۲
20:0	-	۰/۲۶	۰/۶
20:1	-	-	-

اسید چرب	*Spirulina platensis* (% ww^{-1})	*Chlorella vulgaris* (% ww^{-1})	*Scenedesmus obliques* (% ww^{-1})
20:3	۰/۴۵	۰/۶۳	-
20:5 (EPA)	-	-	۳/۴
22:0	-	-	۰/۰۳
22:1	-	۰/۴۲	۰/۰۳
22:6 (DHA)	-	-	۲
درصد اسید چرب اشباع	۴۹/۱۶	۲۱/۷۹	۲۵/۹۵
درصد اسید چرب غیر اشباع	۵۰/۱۷	۷۸/۱۵	۶۸/۵۸
نسبت اسید چرب اشباع به غیر اشباع	۰/۹۷	۰/۲۷	۰/۳۷
تعداد اسیدهای چرب	۱۰	۱۲	۲۲



نمودار۱: نمودار میله‌ای ترکیب اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع در ریز جلبک ها



نمودار۲: مقایسه درصد ترکیب اسیدهای چرب در ریز جلبک ها

بحث

ریزجلبک‌ها حاوی مقادیر لیپید، پروتئین، کاروتنوئید، رنگدانه، ویتامین، استرول و پلی ساکاریدهایی هستند که در تهیه سوخت، ترکیبات داروئی، صنایع غذایی و آرایشی کاربرد دارند (E. W. Becker, 1994). ترکیب و محتوای اسید چرب بستگی به گونه جلبک، فاکتورهای تغذیه‌ای و فاکتورهای محیطی دارد (Spolaore et. al., 2006).

تنها گونه‌های اندکی از ریزجلبک‌ها از نظر تولید سوخت زیستی حائز اهمیت هستند. به همین دلیل جدا کردن گونه‌های جدید و اصلاح آنها جهت تولید بهینهٔ ترکیبات لیپیدی برای بیودیزل‌های زیستی اهمیت دارند. در گونه‌های مورد مطالعه اسیدهای چرب غیر اشباع تنوع و میزان بیشتری را به خود اختصاص داده اند. بر اساس کاربرد نوع اسید چرب، می‌توان گونه خاصی را جهت تولید اسید چرب مورد نیاز کشت داد. به عنوان مثال در کاربردهای غذایی می‌توان از گونه‌هایی که درصد اسید چرب غیر اشباع بالاتری دارند جهت کشت و استخراج استفاده نمود.

Kenyon و همکاران در سال ۱۹۷۲ در حدود ۱۱ نوع اسید چرب در گونه *Scenedesmus obliques* گزارش کردند که از میان آنها ۷ اسید چرب غیر اشباع بودند و بیشترین میزان مربوط به اسید چرب غیر اشباع (C18:3) بود که نتایج حاصل از این تحقیق نیز همین مطلب را نشان داد. همچنین Spoehr و Milner در سال ۱۹۴۹ در گونه *C. vulgaris* ۱۲ گونه متفاوت اسید چرب از (C12-C20:3) را گزارش نمودند که بیشترین مقدار متعلق به اسید چرب غیر اشباع (C20:3) بود ولی بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش، بیشترین مقدار متعلق به اسید چرب غیر اشباع (C18:3) می‌باشد.

Hudson و Karis در سال ۱۹۷۴ در گونه *Spirulina platensis* در حدود ۱۳ نوع اسید چرب را گزارش کردند که بیشترین میزان مربوط به اسید پالمتیک (C16:0) بوده است.

در نمونه‌های مورد مطالعه میزان متفاوتی از اسیدهای چرب اشباع و غیر اشباع دیده شد. بیشترین درصد اسید چرب غیر اشباع در گونه *C. vulgaris* و بیشترین تنوع اسید چرب در گونه *S. obliques* دیده شد و این در حالیست که Gouveia **و** Oliveira در سال ۲۰۰۹ در گونه *Spirulina platensis* در حدود ۱۱ نوع اسید چرب، در گونه *C. vulgaris* در حدود ۱۴ نوع متفاوت و در گونه *Scenedesmus obliquus* ۱۱ نوع اسید چرب را گزارش نمودند.

در انتخاب نوع ریزجلبک مناسب جهت کشت و تولید بیودیزل چند نکته را باید مد نظر داشت: اول اینکه هر گونه جلبک پروفایل اسید چرب مربوط به خود را دارا می‌باشد و رابطه مستقیمی بین درصد اسیدهای چرب اشباع و غیر اشباع با کیفیت روغن تولید شده وجود دارد. هر اندازه که میزان اسیدهای چرب غیر اشباع بیشتر باشد بیودیزل نهایی حساسیت بیشتری نسبت به اکسیداسیون خواهد داشت ولی در سرما ویسکوزیته خود را حفظ می‌نماید اما عدد ستان آن به همان نسبت کمتر خواهد بود (عدد ستان در سوخت‌های دیزلی معادل عدد اکتان بنزین است). در مقابل هر چه میزان اسیدهای چرب اشباع در

روغن استخراج شده بیشتر باشد حساسیت در مقابل اکسیداسیون کمتر خواهد بود اما در هوای سرد سریعاً ویسکوزیته خـود را از دست می‌دهد و احتمال یخ زدگی وجود خواهد داشت در مقابل عدد ستان بالاتری نیز دارند. با توجه به شرایط آب و هـوایی می‌توان روغن‌های حاصله را با نسبت مشخصی با هم مخلوط نمود تا سوخت حاصله از کارآیی لازم برخوردار باشد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل از انجام طرح پژوهشی مصوب شورای پژوهشی دانشگاه آزاد اسـلامی واحـد آشـتیان بـوده کـه بدینوسـیله از معاونت محترم پژوهش و فناوری واحد آشتیان جهت تامین منابع مالی مورد نیاز تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

Becker, E. W. (1994) Microalgae: Biotechnology and microbiology. Cambridge University press, 293 pp., Cambridge, Great Britain.

Chisti, Y. (2007) Biodiesel from microalgae. Biotechnology Advances 25: 294–306.

Dieffnbacher, A. and Pocklington, W. (1992) Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives 1St Supplement. 7th Revised and Enlarged Edition. Blackwell Scientific Oxford. 1: 171.

Gouveia, L. and Oliveira, A. C. (2009) Microalgae as a raw material for biofuels production. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 36(2): 269-74.

Huang, G. H., Chen, F., Dong, W., Zhang XW. and Chen, G. (2010) Biodiesel production by microalgal biotechnology Applied Energy 87: 38–46.

Hudson, B.J.F. and Karis, I.G. (1974) The Lipids of the Algae *Spirulina*. Journal Sciences of Food Agriculture 25: 759-763.

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

Komarek, J. (1973) Culture collections. Pages: 519-524. In: Carr N.G. and Whitton B.A. The biology of blue-green algae. Blackwell Scientific publication.

Nichols, H.W. (1973) Growth media – freshwater. Pages: 7-24. In: Stein, J.R. (Ed.), Handbook of Phycological Methods–Culture Methods and Growth Measurements. Cambridge University Press, Cambridge.

Prescott, G.W. (1962) Algae of the Western Great Lakes Area. Wm. C. Brown Co., Dubuque, Iowa, USA. 977 pp.

Rosenberg, J.N., Oyler, G.A., Wilkinson, L. and Betenbaugh, M.J. (2008) A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. Current Opinion in Biotechnology 19: 430-436.

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. and Isambert, A. (2006) Commercial applications of microalgae. Journal of Bioscience and Bioengineering.101: 87-96.

Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J. and Roessler, P.G. (1998) US Department of Energy's Office of Fuels

Development, July 1998. A Look Back at the US Department of Energy's Aquatic Species Program–Biodiesel from Algae, Close Out Report TP-580-24190. Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory.

Xiaodong, D., Yajun, L. and Xiaowen, F. (2009) Microalgae: A promising feedstock for biodiesel. African Journal of Microbiology Research Vol. 3(13) pp. 1008-1014.

Zarrouk, C. (1966) Contribution à l'étuded'unecyanophycée. Influence de divers' facteurs physiques et chimiquessur la croissance et la photosynthèse de Spirulina maxima. Ph.D. Thesis, Université de Paris, Paris.