

## Comparison of growth factors, chemical composition, fatty acid profiles, chlorophyll content and total carotene of *Scenedesmus obliquus* and *Hematococcus pluvialis*

Behrooz Atashbar \*

Assistant Professor of Aquatic Ecology, Department of Ecology and Resource assessment, Urmia Lake Research Institute, Urmia University, Iran, b.atashbar@urmia.ac.ir

Saeid Vahdat

Ph.D. student of Aquaculture, Department of Biology and Aquaculture, Artemia and Aquaculture Research Institute, Urmia University, Iran, saeid\_vahdat\_mail@yahoo.com

### Abstract

**Introduction:** The algae are rich in minerals, vitamins, and in other nutrients and they are cultivated in order to produce valuable raw materials.

**Materials and methods:** In this regard, the effect of 10% carbon dioxide concentration on growth factors, chemical composition, fatty acids profile, chlorophyll and carotene of two species *Scenedesmus oblique* and *Haematococcus pluvialis* were studied.

**Results:** Based on the results, the protein content was significantly higher in the *S. oblique* compared to the *H. pluvialis* (16.79% and 9.16%, respectively) ( $P < 0.05$ ). In contrast, the total lipid production was significantly higher in the *H. pluvialis* compared to the *S. oblique* ( $P < 0.05$ ). The saturated fatty acids percentage was significantly higher in the *H. pluvialis* in comparison to *S. oblique* (30.93% and 23.51%, respectively) ( $P < 0.05$ ). Also, the amount of chlorophyll *a* and total carotene was measured in the *H. pluvialis* significantly higher than the *S. oblique* ( $P < 0.05$ ). At the end of 20 days of the cultivation, the amount of biomass in the *H. pluvialis* was significantly higher than that produced at *S. oblique* ( $P < 0.05$ ).

**Discussion and conclusion:** Although the presence of CO<sub>2</sub> caused *S.obliquus* use the conditions for more production of biomass (0.18 g.L<sup>-1</sup> DW), significant difference in biomass with *H.pluvialis* (0.17 g.L<sup>-1</sup> DW) was not observed.

**Key words:** Carbon dioxide, *Haematococcus pluvialis*, *Scenedesmus oblique* Fatty acid profile and Chlorophyll

---

\* Corresponding author

**Received:** June 9, 2017 / **Accepted:** November 18, 2017

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها  
سال هفتم، شماره ۲۶، تابستان ۱۳۹۷، صفحه ۱۱۳-۱۰۱  
تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۳/۱۹ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۸/۲۷

## مقایسه عوامل رشد، ترکیب شیمیایی، پروفایل اسیدهای چرب، مقدار کلروفیل و کاروتن کل دو گونه جلبکی سندسموس آبلیکوس و هماتوکوکوس پلوویالیس

**پهروز آتسبار\*:** استادیار اکولوژی آبریان، پژوهشکده مطالعه‌های دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه، ایران، b.atashbar@urmia.ac.ir  
**سعید وحدت:** دانشجوی دکتری تکثیر و پرورش آبریان، پژوهشکده آرتیمیا و آبی‌پروری، دانشگاه ارومیه، ایران، saeid\_vahdat\_mail@yahoo.com

### چکیده

**مقدمه:** جلبک‌ها سرشار از مواد معدنی، ویتامین و دیگر مواد مغذی هستند و برای تولید انواع مختلف مواد خام مفید استفاده می‌شوند. از این رو، روش‌های مختلفی برای افزایش تولید به کار برده می‌شوند.

**مواد و روش‌ها:** تأثیر دی‌اکسید کربن با غلظت ۱۰ درصد بر عوامل رشد، ترکیب شیمیایی، پروفایل اسیدهای چرب، مقدار کلروفیل و کاروتن کل دو گونه جلبکی سندسموس آبلیکوس (*Scenedesmus obliquus*) و هماتوکوکوس پلوویالیس (*Haematococcus pluvialis*) بررسی و مقایسه شد.

**نتایج:** بر اساس نتایج، مقدار پروتئین تولیدشده در جلبک سندسموس به مراتب بیشتر از هماتوکوکوس پلوویالیس و به ترتیب برابر ۱۶/۷۹ و ۹/۱۶ درصد بود ( $P < 0/05$ ). بر عکس، میزان چربی کل تولیدشده در هماتوکوکوس پلوویالیس نسبت به سندسموس آبلیکوس بیشتر بود ( $P < 0/05$ ). همچنین مقادیر اسیدهای چرب اشباع تولیدشده در هماتوکوکوس پلوویالیس به‌طور معناداری بیشتر از سندسموس آبلیکوس بودند و به ترتیب ۳۰/۹۳ و ۲۳/۵۱ درصد اندازه‌گیری شدند ( $P < 0/05$ ). مقدار کلروفیل a و کاروتن کل در جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس به‌طور معناداری بیشتر از سندسموس آبلیکوس اندازه‌گیری شد ( $P < 0/05$ ). در انتهای روز ۲۰ پرورش، مقدار توده زیستی بیشتری در جلبک سندسموس آبلیکوس نسبت به هماتوکوکوس پلوویالیس تولید شده بود ( $P < 0/05$ ).

**بحث و نتیجه‌گیری:** وجود گاز دی‌اکسید کربن در محیط سبب شد سندسموس آبلیکوس از این شرایط برای تولید توده زیستی کل بیشتر (۰/۱۸ گرم بر لیتر وزن خشک) استفاده کند، هرچند تفاوت معناداری در مقدار توده زیستی کل با جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس (۰/۱۷ گرم بر لیتر وزن خشک) مشاهده نشد.

**واژه‌های کلیدی:** گاز دی‌اکسید کربن، سندسموس آبلیکوس، هماتوکوکوس پلوویالیس، پروفایل اسید چرب، کلروفیل

\* نویسنده مسئول مکاتبات

## مقدمه

ریز جلبک‌ها بیشترین سرعت رشد را در بین گیاهان کره زمین دارند و رشد آنها حدود ۱۰ تا ۱۵ بار سریع‌تر از گیاهان خشکی‌زی است و مقادیر دی‌اکسیدکربن بیشتری را تثبیت می‌کنند (۱). همچنین جلبک‌ها در پساب‌ها رشد می‌کنند و مشکلات آلودگی آب‌ها را کاهش می‌دهند (۲). توده زیستی که ریزجلبک‌ها تولید می‌کنند به محصولات باارزش بسیاری مانند سوخت‌های زیستی، مواد افزودنی غذایی، محصولات بهداشتی، مواد آرایشی و ... تبدیل می‌شوند و این، توانایی زیاد ریزجلبک‌ها در کاهش دی‌اکسیدکربن را نشان می‌دهد (۳).

نور، دما، دی‌اکسیدکربن، اسیدیته، اکسیژن، شوری، مواد غذایی و مواد سمی موجود در محیط از عوامل محیطی غیرزنده و باکتری‌ها، قارچ‌ها، ویروس‌ها و رقابت با دیگر جلبک‌ها از عوامل محیطی زنده مؤثر بر رشد ریزجلبک‌ها هستند (۴). رشد، بازدهی و تولید توده زیستی در ریزجلبک‌ها تابعی از شدت نور و طول دوره روشنایی/تاریکی محیط است (۵). اگرچه شدت نور در محیط‌های طبیعی به‌طور متناوب تغییر می‌کند و ویژگی‌های آن در طول روز ثابت نیستند و بر ترکیب شیمیایی جلبک‌ها تأثیر می‌گذارند، عامل محدودکننده‌ای در محیط‌های باز مانند استخرها محسوب نمی‌شود (۵). جذب مؤثر گاز دی‌اکسیدکربن توسط ریزجلبک‌ها و همچنین تولید چربی، محتوای چربی (از نظر اسیدهای چرب) و مقاومت به سطوح مختلف دی‌اکسیدکربن (۶ و ۷) به ارزیابی‌های وسیعی نیاز دارند.

هماتوکوکوس پلوویالیس، جلبکی تک‌سلولی، دوتاژکی و سبزرنگ است که در شرایط شدت نور کم

(۸ و ۹) و محیط اشباع از مواد مغذی (۱۰) به شکل بهینه رشد می‌کند. مطالعه‌های بسیاری درباره ساخت و فعالیت‌های زیستی اسیدهای چرب و آستاگزانتین در جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس انجام شده است (۱۰-۱۳). همچنین، در بررسی‌های گوکسان و کیک (۲۰۱۱)<sup>۱</sup> (۱۴) درباره عوامل رشد، مقدار کلروفیل و کاروتنوئید، این عوامل متأثر از شدت و دوره نوری، محیط کشت و مدت زمان هوادهی بودند.

جلبک سندسموس انواع مختلف سوخت‌های زیستی مانند بیوهیدروژن، بیودیزل، بیواتانول و ذره‌های سوختی را تولید می‌کند، هرچند بیشتر پژوهش‌ها درباره استفاده از سندسموس برای تولید بیودیزل بوده است (۱۵). همچنین، این جلبک آمونیاک و فسفر را از محیط حذف می‌کند (۱۶) و در آبی‌پروری، برای تغذیه موجودات غذایی زنده‌ای استفاده می‌شود که ماهیان مصرف می‌کنند. این جلبک با کوددهی استخرهای خاکی ماهیان گرمابی رشد می‌کند و لارو ماهیان ماهیان فیتوپلانکتون‌خوار آن را استفاده می‌کنند (۱۷) اسیدهای چرب با زنجیره C16-C18 رایج‌ترین ترکیبات اسید چرب لازم برای استفاده در صنعت بیودیزل هستند (۱۸). بررسی‌ها نشان داده‌اند سرعت رشد، ترکیب شیمیایی، پروفایل اسیدچرب و تولید کارتنوئید در این جلبک متأثر از عوامل محیطی هستند (۱۹ و ۲۰).

سالانه افزایش ۶/۵ درصدی گاز دی‌اکسیدکربن در اتمسفر به افزایش آلودگی و گرمایش جهانی منجر می‌شود (۲۱) و از این رو، پژوهش‌های بسیاری با هدف بررسی توانایی حذف زیستی دی‌اکسیدکربن از اتمسفر انجام شده‌اند (۲۲ و ۲۳). همچنین آثار افزایشی غلظت این گاز روی ترکیب شیمیایی، رشد، پروفایل اسیدهای چرب جلبک‌ها بررسی شده است (۶). در پژوهش

بازدهی توده زیستی (گرم بر لیتر در روز) از اختلاف غلظت توده زیستی (گرم بر لیتر) تقسیم بر محدوده زمانی مشخص (روز) براساس رابطه ۲ محاسبه شد (۲۵):

$$\text{رابطه ۲: } Ps (\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}) = (X_1 - X_0) / (T_1 - T_0)$$

نرخ رشد ویژه ( $d^{-1}$ ) از رابطه ۳ محاسبه شد:

$$\text{رابطه ۳: } \mu = (\ln X_1 - \ln X_0) / (T_1 - T_0)$$

همچنین مقدار تقسیم بر روز و مدت زمان دو برابر شدن از رابطه‌های ۴ و ۵ محاسبه شدند:

$$\text{رابطه ۴: } \text{Divisions per day (day}^{-1}\text{)} = \mu / 0.6931$$

$$\text{رابطه ۵: } \text{Generation time (h}^{-1}\text{)} = 0.6931 / \mu$$

$X_0$  و  $X_1$  به ترتیب غلظت توده زیستی (گرم بر لیتر) در روزهای  $T_0$  و  $T_1$  هستند (۲۶).

بازدهی میزان تثبیت دی‌اکسید کربن از اندازه‌گیری مقدار دی‌اکسید کربنی که ریزجلبک مصرف می‌کند و رابطه ۶ محاسبه شد:

$$\text{رابطه ۶: } P \text{ CO}_2 (\text{g l}^{-1}\text{d}^{-1}) = 1.88 \times Ps$$

$Ps$  بازدهی توده زیستی بر حسب گرم بر لیتر است (۲۷).

**اندازه‌گیری چربی کل و خاکستر:** برای اندازه‌گیری مقدار چربی کل و مقدار خاکستر به ترتیب از روش سوکسله و روش سوزاندن نمونه‌های وزن‌شده در کوره الکتریکی با دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۶ ساعت استفاده شد (۲۸).

**آنالیز اسید چرب:** برای اندازه‌گیری اسید چرب، مقدار ۱۰۰ تا ۲۰۰ میلی‌گرم از هر نمونه جلبکی درون ظرف شیشه‌ای دردار ریخته شد. ۱ میلی‌لیتر از محلولی شامل  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ۲/۵ درصد و متانول ۹۸ درصد به هر ظرف نمونه اضافه (۱/۴۰ v/v) و مدت ۱ ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از سرد شدن در دمای اتاق، ۵۰۰ میکرولیتر هگزان با ۱/۵

حاضر، تأثیر گاز دی‌اکسید کربن بر شاخص‌های رشد، اسیدهای چرب و ترکیب شیمیایی دو گونه مختلف جلبک *Scenedesmus obliquus* و *Haematococcus pluvialis* مطالعه شده است.

## مواد و روش‌ها

**کشت جلبک:** استوک خالص جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس و سندسموس آلبیکوس از پژوهشکده مطالعه‌های دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه، ایران تهیه و پرورش جلبک در ظرف‌های ۲۰۰ لیتری و با استفاده از محیط کشت 3NBBM انجام شد (۲۴). ذخیره‌سازی ابتدایی جلبک در ظرف‌ها با تراکم  $5 \times 10^4$  سلول در میلی‌لیتر (مقدار توده زیستی جلبک‌های هماتوکوکوس و سندسموس به ترتیب برابر ۰/۰۰۴۱ و ۰/۰۰۴۲ میلی‌گرم بر لیتر بود) انجام شد. شرایط اولیه پرورش برای هر دو گونه جلبک به ترتیب عبارتند از: اسیدیته ۸/۵، دما  $21 \pm 1$  درجه سانتی‌گراد، نور سرد با شدت نوری ۳۵۰۰ لوکس، دوره نوری ۲۴ ساعت روشنایی. تمام تیمارها، روزانه ۱۲ ساعت در معرض گاز دی‌اکسید کربن ۱۰ درصد قرار داده شدند. هر یک از ظرف‌ها با پیت فیلتردار، شدید و مستمر هوادهی شد (مقدار هوادهی برابر ۷۵۸ میلی‌لیتر در دقیقه بود). هر روز دما، اسیدیته، تراکم سلولی و غلظت جلبکی در محیط‌های پرورشی اندازه‌گیری شدند. برای هر گونه جلبکی، سه تکرار انجام شد.

**اندازه‌گیری رشد سلولی:** تراکم سلول جلبکی با اندازه‌گیری تراکم بهینه ( $\text{OD}_{570}$ ) انجام شد. نمونه‌های غلیظ (بیشتر از یک) رقیق‌سازی شدند تا در محدوده ۰/۱ تا ۱/۰ قرار گیرند. رابطه بین  $\text{OD}_{570}$  و توده زیستی از رابطه‌های زیر محاسبه شد:

$$\text{Biomass (g.L}^{-1}\text{) } \textit{Scenedesmus} = 0.34$$

$$* \text{OD}_{570\text{nm}} - 0.0146 \text{ R}^2 = 0.990$$

$$\text{Biomass (g.L}^{-1}\text{) } \textit{Haematococcus} =$$

$$0.156 * \text{OD}_{570\text{nm}} + 0.0061 \text{ R}^2 = 994$$

رابطه ۱:

ازای هر گرم ماده اضافه شد. سپس نمونه به مدت ۱ دقیقه با ۱۰۰۰ دور بر دقیقه همگن و محلول حاصل از فیلتر واتمن آبی عبور داده شد و سپس ۱۰ دقیقه با ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریوفیوژ (Sigma 8K) شد. میزان جذب نوری محلول رویی حاصل از هر نمونه با دستگاه اسپکتوفتومتر (Camspec M330) و در طول موج‌های ۶۶۲، ۶۴۵ و ۴۷۰ خوانده شد. از رابطه‌های زیر برای محاسبه کاروتن کل هر نمونه استفاده شد.

$$C_a = 11.75A_{662} - 2.350A_{645}$$

$$C_b = 18.61A_{645} - 3.960A_{662}$$

$$C_c = 1000A_{470} - 2.270C_a - 81.4C_b / 227$$

$C_a$  مقدار کلروفیل  $a$ ،  $C_b$  مقدار کلروفیل  $b$  و  $C_c$  مقدار کاروتن کل بر حسب میکروگرم بر گرم وزن تر هستند (۳۱).

**تجزیه و تحلیل آماری:** نرمال بودن پراکنش تمام داده‌ها با آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شد. داده‌ها به شکل تحلیل واریانس یک طرفه بررسی شدند و از آزمون توکی (Tukey) در سطح ۵ درصد برای معنادار بودن عوامل استفاده شد. محاسبه داده‌ها و ترسیم نمودارها با بسته نرم‌افزاری SPSS (نسخه ۲۲) و Excel (نسخه ۲۰۱۳) انجام شد.

## نتایج

بر اساس عوامل رشدی که در جدول ۱ دیده می‌شوند، نرخ رشد ویژه، تقسیم سلولی روزانه، زمان تولیدمثل، بازدهی میزان تثبیت دی‌اکسید کربن، مقدار کل توده زیستی و بازدهی توده زیستی در دوره پرورش سندسموس آبلیکوس و همتوکوکوس پلوویالیس در غلظت ۱۰ درصد گاز دی‌اکسید کربن از نظر آماری تفاوت معناداری با یکدیگر ندارند ( $P > 0.05$ ) (جدول ۱).

میلی لیتر NaCl ۰/۹ درصد (w/v) مخلوط و به نمونه اضافه شد تا اسید چرب متیل استر استخراج شود (FAME). سپس، نمونه ۱۰ دقیقه با ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریوفیوژ (Sigma 8k) و بخش رویی محلول (شامل همگن-FAME) جداسازی و برای تعیین پروفایل اسید چرب به دستگاه گاز کروماتوگرافی (Agilent 7890A) تزریق شد (۲۹).

**تعیین مقدار محتوای پروتئینی:** برای اندازه‌گیری محتوای پروتئینی از روش اسلوکمی<sup>۲</sup> و همکاران استفاده شد. مقدار ۵ میلی گرم جلبک فریزدرای شده در ۰/۲ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید (TSA) ۲۴ درصد (w/v) مخلوط و هم زده شد. مخلوط حاصل ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد انکوباسیون و سپس در دمای اتاق خنک شد. سپس، ۶۰۰ میکرولیتر آب کاملاً خالص به مخلوط اضافه و محلول همگن حاصل ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد با دور ۱۵۰۰۰ سانتریوفیوژ و محلول رویی آن دور ریخته شد. مواد ته‌نشین شده هر ظرف در ۰/۵ میلی لیتر واکنش گر لوری به حالت سوسپانسیون در آمدند و ۳ ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد داخل انکوباتور قرار داده شدند. نمونه‌ها پس از خنک شدن در دمای اتاق، برای مدت زمان ۲۰ دقیقه (در دمای اتاق) با دور ۱۵۰۰۰ سانتریوفیوژ و محلول رویی آنها نگه داشته شد. سپس محلول رویی ۳۰ دقیقه در محلول لوری ریخته و میزان جذب هر نمونه در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد (۳۰).

**اندازه‌گیری مقدار کلروفیل  $a$ ، کلروفیل  $b$  و کاروتن کل:** مقدار ۵۰ میلی لیتر محیط پرورش با فیلتر واتمن (DP 150) آبی‌رنگ فیلتر و سپس نمونه وزن شد. برای استخراج رنگدانه، ۵۰ میلی لیتر استون ۱۰۰ درصد به

جدول ۱- مقادیر عوامل رشدی (تکرار  $\pm$ StD) در جلبک های سندسموس آبلیکوس و هماتوکوکوس پلوویالیس. حروف یکسان، نبود اختلاف معنادار در سطح  $P < 0.05$  را نشان می دهند.

عوامل رشد	هماتوکوکوس پلوویالیس	سندسموس آبلیکوس
نرخ رشد ویژه (روز)	$0.17 \pm 0.00^a$	$0.18 \pm 0.00^a$
تقسیم شدن در روز (روز)	$0.25 \pm 0.00^a$	$0.26 \pm 0.00^a$
زمان تولید مثل (ساعت)	$3.98 \pm 0.06^a$	$3.91 \pm 0.06^a$
بازدهی میزان تثبیت کربن دی اکسید (میلی گرم بر لیتر در روز)	$15.43 \pm 1.08^a$	$16.46 \pm 1.33^a$
مقدار کل توده زیستی خشک (گرم بر لیتر)	$0.17 \pm 0.01^a$	$0.18 \pm 0.01^a$
بازدهی توده زیستی (گرم بر لیتر در روز)	$0.008 \pm 0.00^a$	$0.009 \pm 0.00^a$

به ترتیب برابر با  $30/93$  و  $23/51$  درصد بود و تفاوت معناداری نسبت به یکدیگر داشتند ( $P < 0.05$ ) (جدول ۳).

جدول ۳- پروفایل اسیدهای چرب بر حسب درصد (تکرار  $\pm$ StD) جلبک های سندسموس آبلیکوس و هماتوکوکوس پلوویالیس. حروف یکسان، نبود اختلاف معنادار در سطح  $P < 0.05$  را نشان می دهند.

اسید چرب	سندسموس آبلیکوس	هماتوکوکوس پلوویالیس
C14:0	$0.98 \pm 0.18$	$0.58 \pm 0.01$
C14:1n5	$1.50 \pm 0.26$	$0.92 \pm 0.46$
C16:0	$2.06 \pm 0.48$	$2.89 \pm 0.12$
C16:1n7	$0.92 \pm 0.07$	$1.38 \pm 0.02$
C18:0	$17.42 \pm 4.18$	$23.42 \pm 2.49$
C18:1n9	$1.94 \pm 0.08$	$1.15 \pm 0.14$
C18:3n6	$6.48 \pm 2.07$	$5.48 \pm 0.07$
C18:3n3	$6.69 \pm 1.63$	$7.33 \pm 1.24$
C20:0	$0.46 \pm 0.00$	$0.83 \pm 0.00$
C20:4n6	$0.31 \pm 0.02$	$0.48 \pm 0.04$
C20:5n3	$0.75 \pm 0.03$	$0.34 \pm 0.04$
C22:0	$1.94 \pm 0.22$	$1.37 \pm 0.00$
C24:0	$0.65 \pm 0.03$	$1.84 \pm 0.04$
C24:1n9	$1.48 \pm 0.00$	$1.61 \pm 0.01$
SFA	$23.51 \pm 5.09^b$	$30.93 \pm 2.66^a$
MUFA	$5.84 \pm 0.41^a$	$5.06 \pm 0.63^a$
PUFA	$14.23 \pm 3.75^a$	$13.63 \pm 1.39^a$
سایر اسیدهای چرب	$56.42 \pm 0.25$	$50.38 \pm 5.32$

تحلیل محتوای پروتئینی نشان داد مقدار پروتئین موجود در سندسموس آبلیکوس به مراتب بیشتر از هماتوکوکوس پلوویالیس ( $P < 0.05$ ) و به ترتیب برابر  $16/79$  و  $9/16$  درصد است. میزان چربی تولیدشده در هماتوکوکوس پلوویالیس نیز مقدار بیشتری را نسبت به سندسموس آبلیکوس نشان داد ( $P < 0.05$ ). مقدار خاکستر دو گونه جلبکی تفاوت معناداری نسبت به یکدیگر نشان ندادند ( $P > 0.05$ ) (جدول ۲).

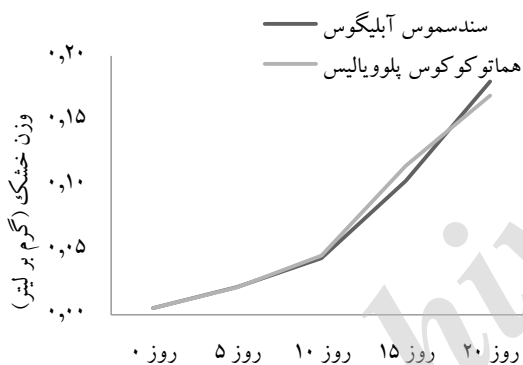
جدول ۲- مقادیر ترکیبات شیمیایی (تکرار  $\pm$ StD) جلبک های سندسموس آبلیکوس و هماتوکوکوس پلوویالیس. حروف یکسان، نبود اختلاف معنادار در سطح  $P < 0.05$  را نشان می دهند.

ترکیب شیمیایی	سندسموس آبلیکوس	هماتوکوکوس پلوویالیس
پروتئین (درصد)	$16.79 \pm 0.61^a$	$9.16 \pm 0.52^b$
چربی (درصد)	$11.68 \pm 0.35^b$	$16.01 \pm 0.52^a$
خاکستر (درصد)	$6.14 \pm 0.44^a$	$6.95 \pm 0.40^a$

اسید چرب استتاریک (C18:0) بیشترین مقدار را در دو گونه جلبک کشت یافته نشان داد و برای جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس بیشتر از سندسموس آبلیکوس بود. اسیدهای چرب اشباع، بیشترین مقدار را در بین سایر اسیدهای چرب نشان دادند و این مقدار در جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس و جلبک سندسموس آبلیکوس

از روز دهم به بعد، مقدار توده زیستی هر دو گونه جلبک افزایش یافت و در انتهای روز بیستم، مقدار توده زیستی تولیدی در جلبک سندسموس آبلیکوس تقریباً برابر جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس بود ( $P > 0.05$ ) (شکل ۲).

هر دو گونه از روز دهم به بعد با کاهش سرعت تقسیم سلولی روبه‌رو شدند که علت آن، افزایش تعداد سلول‌ها در محیط پرورشی بود؛ با وجود این، تعداد سلول‌های جلبک سندسموس آبلیکوس به طور معناداری بیشتر از هماتوکوکوس پلوویالیس بود ( $P < 0.05$ ) (شکل ۳).



شکل ۲- میانگین روند تغییرات غلظت توده زیستی طی مدت ۲۰ روز از زمان پرورش



شکل ۳- میانگین روند تغییرات تعداد سلول طی مدت ۲۰ روز از زمان پرورش

مقدار کلروفیل a در جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس به‌طور معناداری بیشتر از سندسموس آبلیکوس بود ( $P < 0.05$ ) ولی مقدار کلروفیل b در جلبک سندسموس آبلیکوس مقدار بیشتری را نسبت به هماتوکوکوس پلوویالیس نشان داد ( $P < 0.05$ ). براساس نتایج، مقدار کاروتن کل در جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس به‌طور معناداری بیشتر از جلبک سندسموس آبلیکوس بود ( $P < 0.05$ ) (جدول ۴).

با توجه به نتایج، میزان اسیدیته محیط‌های پرورش هر دو جلبک با گذشت زمان کاهش می‌یابد، هرچند این روند کاهش اسیدیته از روز دهم به بعد با افزایش مقدار توده زیستی با شیب کمتری ادامه می‌یابد (شکل ۱).

جدول ۴- مقادیر کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتن کل (تکرار  $\pm$  StD) های سندسموس آبلیکوس و هماتوکوکوس پلوویالیس. حروف یکسان، نبود اختلاف معنادار در سطح  $P < 0.05$  را نشان می‌دهند.

نوع رنگدانه‌ها	هماتوکوکوس پلوویالیس	سندسموس آبلیکوس
کلروفیل a (میکروگرم در گرم وزن تر)	۶۵/۶۵±۱/۶۲ <sup>b</sup>	۶۱/۰۵±۰/۲۸ <sup>a</sup>
کلروفیل b (میکروگرم در گرم وزن تر)	۲۴/۹۹±۱/۲۵ <sup>a</sup>	۳۸/۰۰±۱/۴۶ <sup>b</sup>
کاروتن کل (میکروگرم در گرم وزن تر)	۷۴۸/۳۴±۱/۷۰ <sup>b</sup>	۲۳۸/۶۳±۶/۱۷ <sup>a</sup>



شکل ۱- میانگین روند تغییرات اسیدیته (pH) طی مدت ۲۰ روز از پرورش

## بحث و نتیجه گیری

رشد ریز جلبک‌ها به تأمین دی‌اکسید کربن (منبع کربن) وابسته است و فراهم کردن گاز دی‌اکسید کربن به تنظیم اسیدیته محیط پرورشی کمک می‌کند (۳۲). همچنین، وجود منبع کربن (دی‌اکسید کربن) در محیط، رشد را افزایش می‌دهد و غلظت آن برای هر گونه متفاوت است. پژوهش‌های پیشین نشان داده‌اند استفاده از منابع کربن دار در پرورش جلبک به‌طور معناداری بر رشد ریز جلبک‌ها تأثیر می‌گذارد (۳۳ و ۳۴). برای رسیدن به عملکرد رشد بهتر ریز جلبک‌ها، غلظت گاز دی‌اکسید کربن باید در محدوده مناسبی قرار گیرد (۳۵). در مدت زمان ۲۴ روز پرورش *Scenedesmus dimorphus* نرخ رشد ویژه، مقدار چربی و بازدهی توده زیستی با افزایش دی‌اکسید کربن تا سطح ۱۵ درصد افزایش یافت (۳۶). در مطالعه حاضر نیز غلظت ۱۰ درصد گاز دی‌اکسید کربن برای دو گونه جلبک سندسموس آبلیکوس و هماتوکوکوس پلوویالیس نشان داد عوامل نرخ رشد ویژه، تقسیم سلولی در روز، زمان تولید مثل و بازدهی میزان تثبیت دی‌اکسید کربن یکسان عمل کرده‌اند. در برخی پژوهش‌های پیشین بیان شده مقدار گاز دی‌اکسید کربن بیش از ۵ درصد برای سلول جلبکی مضر و بازدارنده است و در جلبک *Nannochloropsis oculata* باعث جلوگیری از رشد سلول می‌شود (۳۷). برخی جلبک‌ها مانند *S. obliquus* در مقادیر بیش از ۶ درصد رشد می‌کنند و حتی در مقدار ۱۸ درصد گاز دی‌اکسید کربن به بیشترین توده زیستی می‌رسند (۳۸). مقدار گاز دی‌اکسید کربنی که وارد محیط پرورش می‌شود، باعث اختلاط محیط، پراکندگی جلبک‌ها، در دسترس قرار دادن مواد مغذی برای سلول‌ها و همچنین

جذب دی‌اکسید کربن می‌شود که سایه‌اندازی ریز جلبک‌ها روی خودشان را کاهش می‌دهد (۳۹). پرورش *S. dimorphus* برای مدت ۲۵ روز در غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ درصد نشان داد غلظت ۱۵ درصد دی‌اکسید کربن، مقدار توده زیستی را تا ۱/۶ گرم بر لیتر افزایش می‌دهد (۳۶). مقدار توده زیستی تولیدی با غلظت ۱۵ درصد دی‌اکسید کربن پس از ۱۴ روز پرورش، حدود ۱۴۹۰ میلی‌گرم بر لیتر برای *Scenedesmus sp.* (۴۰) و ۱۵۷۰ میلی‌گرم بر لیتر برای *S. dimorphus* (۴۱) گزارش شده است. مطالعه حاضر نشان داد پس از ۲۰ روز از زمان پرورش با ۱۰ درصد دی‌اکسید کربن، مقدار کل توده زیستی خشک برای جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس و برای سندسموس آبلیکوس به ترتیب برابر ۰/۱۷ و ۰/۱۸ گرم بر لیتر بوده است. یکی از تفاوت‌ها در مقدار توده زیستی تولیدی در مطالعه حاضر با مطالعه‌های پیشین، مدت زمان قرار گرفتن جلبک‌ها در معرض گاز دی‌اکسید کربن است که این زمان در مطالعه حاضر ۱۲ ساعت در روز بود. همچنین روند تغییرات توده زیستی نشان دادند تولید توده زیستی از روز دهم به بعد با شیب بیشتری انجام شده است (شکل ۲)؛ این امر با کاهش هم‌زمان شیب اسیدیته به سمت عدد ۶ از روز دهم همراه بود و رابطه تولید توده زیستی با اسیدیته را نشان می‌دهد؛ در اسیدیته‌های کم (اسیدی)، مقدار گاز دی‌اکسید کربن بیشتری در محیط برای استفاده جلبک‌ها وجود دارد. همچنین با توجه به تعداد زیاد سلول‌های جلبک‌های سندسموس آبلیکوس و هماتوکوکوس پلوویالیس در انتهای دوره آزمایش (شکل ۳)، شاید اندازه سلول‌ها کاهش یافته است و از این رو جلبک‌ها توده زیستی کمتری تولید کرده‌اند.



پروتئین، چربی و کربوهیدرات مواد اصلی سلولی شناخته شده‌اند و فتوستت در ریز جلبک‌ها این مواد را برای سلول فراهم و انرژی را برای ساخت این سه نوع ماکرومولکول مصرف می‌کند (۴۲). وانگ<sup>۳</sup> و همکاران گزارش کردند با افزایش غلظت دی‌اکسید کربن تا سطح ۳۰ درصد، محتوای پروتئینی جلبک افزایش می‌یابد ولی بیشترین محتوای پروتئینی در غلظت ۱۰ درصد مشاهده می‌شود. همان‌طور که مطالعه‌های پیشین وانگ<sup>۳</sup> و همکاران، تولد و سروانتس<sup>۴</sup> و همکاران، پاراکاش رای<sup>۵</sup> (۴۳) و همکاران، سانکار<sup>۶</sup> (۴۴) و همکاران و مطالعه حاضر نشان می‌دهند، پرورش گونه‌های جلبکی مختلف در شرایط محیطی یکسان (دوره نوری، شدت نوری، محیط کشت، وجود دی‌اکسید کربن)، غلظت‌های متفاوت توده زیستی، پروتئین، چربی، کربوهیدرات و ... را تولید می‌کند. جلبک سندسموس آبلیکوس در غلظت ۱۰ درصد دی‌اکسید کربن، پروتئین بیشتر و چربی کمتری را نسبت به جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس تولید کرد. مطالعه‌های پیشین نشان داده‌اند ریز جلبک‌ها در اثر تنش‌های محیطی مانند کمبود نیتروژن به تولید ترکیبات غنی از انرژی مانند چربی و کربوهیدرات تمایل دارند (۴۵ و ۴۶). شدت نور زیاد در جلبک‌هایی که اتوتروفی فتوستت می‌کنند، سرعت رشد و تثبیت مقدار دی‌اکسید کربن را متأثر و در ترکیب بیوشیمیایی ریز جلبک‌ها (مانند چربی و کربوهیدرات) تغییر ایجاد می‌کند (۴۷). ریز جلبک‌ها، چربی‌ها را بسیار بیشتر از کربوهیدرات‌ها می‌سازند (۴۸) و مقدار چربی در جلبک‌های مختلف، متفاوت و شرایط محیطی مختلف بر محتوای چربی جلبک اثر گذار است. سارات چاندار<sup>۷</sup> و همکاران دریافتند با افزایش غلظت گاز دی‌اکسید کربن تا سطح ۱۰ درصد، مقدار چربی افزایش می‌یابد و افزایش

غلظت دی‌اکسید کربن بیش از ۱۰ درصد بر مقدار چربی *S. obtusus* اثر افزایشی معناداری ندارد. همچنین مودیما<sup>۸</sup> و همکاران (۴۹) گزارش کردند مقدار چربی با افزایش غلظت دی‌اکسید کربن تا سطح ۵ درصد افزایش می‌یابد و افزایش غلظت دی‌اکسید کربن تا ۱۵ درصد، کاهش مقدار چربی را نشان می‌دهد. تأمین گاز دی‌اکسید کربن در محیط پرورش *S. obtusus* و *C. vulgaris* تغییری در ترکیب اسید چرب نشان نداده است (۵۰ و ۵۱). مقدار ۵ درصد گاز دی‌اکسید کربن در *S. obtusiusculus* باعث انباشتگی چربی تا ۵۵/۷ درصد وزن خشک می‌شود (۲۲) که این مقدار بیش از مقدار ۲/۵ درصد دی‌اکسید کربن استفاده‌شده برای *S. obliquus* (۲۲/۴ درصد چربی) در شرایط نبود نیتروژن است (۴۶). واهیدین<sup>۹</sup> و همکاران (۵۲) گزارش کردند بیشترین مقدار چربی (۳۱/۳ درصد) در جلبک *Nannochloropsis*، در دوره نوری ۱۶:۸ (تاریکی: روشنایی) ایجاد می‌شود و این مقدار به‌طور معناداری از انباشتگی چربی در دوره‌های نوری ۲۴:۰ و ۱۲:۱۲ کمتر است. با توجه به نتایج این آزمایش، عوامل مختلف محیطی بر مقدار اسیدهای چرب اشباع (SFA)، اسیدهای چرب غیر اشباع تک (MUFA) و اسیدهای چرب غیر اشباع چندگانه (PUFA) در گونه‌های جلبکی مختلف تأثیر می‌گذارند. ماندوترا<sup>۱۰</sup> و همکاران (۵۳) گزارش کردند افزایش شدت نور تا ۶۰۰۰ لوکس باعث افزایش مقدار اسیدهای چرب اشباع (SFA) در *S. abundans* می‌شود، در حالی که افزایش مقدار فسفر تا ۶۰ میلی‌گرم در لیتر موجب تولید بیشترین مقدار MUFA شد و بیشترین مقدار PUFA در اسیدیته ۹ مشاهده شد. در زمان استفاده از غلظت ۱۰ درصد گاز دی‌اکسید کربن، مقدار اسیدهای چرب اشباع (SFA) در جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس به‌طور معناداری بیشتر از

مقاومت و رشد بیشتر *S. dimorphus* در شرایط گاز دی‌اکسید کربن زیاد (۱۵٪ v/v) سبب شد این گونه، نمونه مناسبی برای حذف زیستی دی‌اکسید کربن در نظر گرفته شود که سوخت‌های فسیلی تولید می‌کنند (۵۵). در مطالعه حاضر نیز رشد و تکثیر زیاد جلبک‌های سندسموس آبلیکوس و هماتوکوکوس پلوویالیس در غلظت ۱۰ درصد گاز دی‌اکسید کربن، این دو گونه جلبکی را برای حذف زیستی گاز دی‌اکسید کربن حاصل از سوخت‌های فسیلی مناسب نشان می‌دهد.

تعیین مقدار سطوح رنگدانه در جلبک‌ها از عوامل محدودکننده مانند نور شدید، کمبود نیتروژن و محدودیت مواد مغذی متأثر است (۵۶ و ۵۷). در مطالعه‌های پیشین گزارش شده مقدار کلروفیل a به مقدار رنگدانه‌های موجود وابسته و تقریباً در تمام گروه‌های جلبکی یکسان است، اما کلروفیل b و c تغییرپذیر هستند. مقدار کاروتن به گونه جلبکی و شرایط زیستی محیط بستگی دارد و افزایش در مقدار کاروتن به هنگام تنش‌های محیطی دیده می‌شود (۵۸-۶۰). با توجه به نتایج مربوط به رنگدانه، جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس مقدار کلروفیل a بیشتری (در حدود ۴ میکروگرم بر گرم وزن تر) را نسبت به سندسموس آبلیکوس داشت و این مقدار برای کلروفیل b برعکس بود؛ این موضوع نشان می‌دهد وجود گاز دی‌اکسید کربن در محیط سبب استفاده سندسموس آبلیکوس از شرایط موجود برای تولید کلروفیل b بیشتر (۳۸ میکروگرم بر گرم وزن تر) و همچنین توده زیستی کل (۰/۱۸ گرم بر لیتر وزن خشک) شده است ولی تفاوت معناداری در مقدار توده زیستی کل با جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس (۰/۱۷ گرم بر لیتر وزن خشک) دیده نشد. مقدار کاروتن کل به‌طور معناداری

سندسموس آبلیکوس بود و پاسخ جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس را به این شرایط نشان می‌دهد. همچنین اسیدهای چرب غیراشباع تک (MUFA) و چندگانه (PUFA) مقادیر تقریباً یکسانی را در دو گونه جلبکی نشان دادند. بر اساس پژوهش‌های انجام‌شده، عوامل متنوع محیطی (مانند نور، مواد مغذی و دما) بر پروفایل چربی‌های ریزجلبک‌ها اثر می‌گذارند (۵۴). به نظر می‌رسد سطوح زیاد گاز دی‌اکسید کربن (۵ تا ۲۰ درصد) شرایط مناسبی را برای انباشتن مقادیر زیاد اسیدهای چرب اشباع مانند C16:0 و C14:0 به‌ویژه در جلبک سندسموس فراهم می‌کند (۲۵). در مطالعه حاضر، مقدار اسیدچرب C14:0 در هر دو گونه جلبکی به‌عنوان یکی از کمترین اسیدهای چرب موجود شناسایی شد و اسید چرب C16:0 نیز مقادیر بیشتری را در هر دو گونه نشان داد؛ این با مطالعه تانگ<sup>۱۱</sup> و همکاران هم‌خوانی ندارد. مقدار ۱۰ درصد گاز دی‌اکسید کربن برای پرورش *S. obliquus* پروفایل اسید چرب به‌نسبت ساده‌ای دارد که C16:0 و C18:1 از گروه‌های اصلی اسیدهای چرب هستند (۲۷). اسیدهای چرب با زنجیره C16-C18 رایج‌ترین ترکیب‌های اسید چرب برای استفاده در صنعت بیودیزل هستند (۱۸). پروفایل اسید چرب تحلیل‌شده نشان داد مجموع مقادیر اسیدهای چرب C16-C18 در هر دو گونه جلبکی سندسموس آبلیکوس و هماتوکوکوس پلوویالیس از گروه‌های اصلی اسیدهای چرب بودند و به‌ترتیب ۳۵/۵۱ و ۴۱/۶۵ درصد کل اسیدهای چرب را شامل شدند. تحلیل اسید چرب *S. obtusus* در محیط کشت Fogg's نشان داده است اسیدهای چرب C16-C18 تا ۸۸/۸۵ درصد ترکیبات کل اسید چرب را شامل می‌شوند (۴۳) و با نتایج مطالعه حاضر مطابقت ندارد.

- (8) Harker M., Tsavalos AJ., Young, AJ. Use of response surface methodology to optimize carotenogenesis in the microalga, *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Applied Phycology* 1995; 7(4): 399-406.
- (9) Fan L., Vonshak A., Boussiba S. Effect of temperature and irradiance on growth of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology* 1994; 30(5): 829-833.
- (10) Cifuentes AS., Gonzalez MA., Vargas S., Hoeneisen M., Gonzalez N. Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions. *Biological Resource* 2003; 36(3): 343-357.
- (11) Zhekisheva M., Boussiba S., Khozin-Goldberg I., Zarka, A., Cohen, Z. Accumulation of oleic acid in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) under nitrogen starvation or high light is correlated with that of astaxanthin esters. *Journal of Phycology* 2002; 38(2): 325-331.
- (12) Zhekisheva M., Zarka A., Khozin-Goldberg I., Cohen Z., Boussiba S. Inhibition of astaxanthin synthesis under high irradiance does not abolish triacylglycerol accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology* 2005; 41(4):819-826.
- (13) García-Malea López MC., Brindley C., Del Rio E., Acien FG., Fernandez JM., Molina E. Modelling of growth and accumulation of carotenoids in *Haematococcus pluvialis* as a function of irradiance and nutrients supply. *Biochemistry Energy Journal* 2005; 26(2): 107-114.
- (14) Göksan TAKI., Kihc C. Growth Characteristics of the Alga *Haematococcus pluvialis* Flotow as Affected by Nitrogen Source, Vitamin, Light and Aeration. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 2011; 11(1): 377-383.

در جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس بیشتر از سندسموس آبلیکوس بود و توانایی این ریزجلبک برای تولید آستاگزانتین (تا ۴ درصد وزن خشک سلول) در شرایط تنش را نشان می‌دهد (۶۱-۶۳) و شاید وجود گاز دی‌اکسید کربن سبب تحریک این جلبک برای تولید رنگدانه در سلول‌ها شده است.

## References

- (1) Chen CY., Yeh KL., Aisyah R., Lee DJ., Chang JS. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. *Bioresource Technology* 2011; 102(1): 71-81.
- (2) Kim GY., Yun YM., Shin HS., Kim HS., Han, Ji. *Scenedesmus*-based treatment of nitrogen and phosphorus from effluent of anaerobic digester and bio-oil production. *Bioresource Technology* 2015; 196(1): 235-240.
- (3) Ho SH., Chen CY., Chang JS. Perspectives on microalgal CO<sub>2</sub>-emission mitigation systems— A review. *Biotechnology Advance* 2011; 29(2):189-198.
- (4) Moheimani NR. The culture of Coccolithophorid algae for carbon dioxide bioremediation, PhD Thesis. Perth: Murdoch Uni; 2005.
- (5) Richmond A., Globbelaar JU. Factors affecting the output rate of *Spirulina platensis* with reference to mass cultivation. *Biomass* 1986; 10(4): 253-261.
- (6) Yoo C., Jun SY., Lee JY., Ahn CY., Oh HM. Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. *Bioresource Technology* 2010; 101(1): S71-S74.
- (7) Matsumoto H., Hamasaki A., Sioji N., Ikuta Y. Influence of CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> and NO in flue gas on microalgae productivity. *Journal of Chemistry Energy Japan* 1997; 30(4): 620-624.

- (15) Logan C., Sims R. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnology advances* 2011; 29(6): 686-702.
- (16) Gonzalez LE., Canizares RO., Baena S. Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a Colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. *Bioresource Technology* 1997; 60(3): 259-262.
- (17) Faridpak F. Operating instructions reproduction and culture warm water fish. *Aquatic scientific publications* 2012; 6: 308 (in Persian).
- (18) Knothe G. Improving biodiesel fuel properties by modifying fatty ester composition. *Energy Environmental Science* 2009; 2(3): 759-66.
- (19) Pirastru L., Darwish M., Chu FL., Perreault F., Sirois L., Sleno L., Popovic, R. Carotenoid production and change of photosynthetic functions in *Scenedesmus* sp. exposed to nitrogen limitation and acetate treatment. *Journal of Applied Phycology* 2012; 24(1): 117-124.
- (20) Orosa M., Torres E., Fidalgo P., Abalde J. Production and analysis of secondary carotenoids in green algae. *Journal of Applied Phycology* 2000; 12(3): 553-556.
- (21) CDIAC Carbon Dioxide Information Analysis Center. Oak Ridge National Laboratory, U.S. Department of Energy, Oak Ridge, Tenn., U.S.A 2011; doi: 10.3334/CDIAC/00001\_V2011. [http://cdiac.ornl.gov/trends/emis/prelim\\_2009\\_2010\\_estimates.html](http://cdiac.ornl.gov/trends/emis/prelim_2009_2010_estimates.html).
- (22) Toledo-Cervantes A., Morales M., Novelo E., Revah S. Carbon dioxide fixation and lipid storage by *Scenedesmus obtusiusculus*. *Bioresource Technology* 2013; 130(4): 652-658.
- (23) Jacob-Lopes E., Revah S., Hernandez S., Shirai K., Franco TT. Development of operational strategies to remove carbon dioxide in photobioreactors. *Chemistry Energy Journal* 2009; 153(1): 120-126.
- (24) Bischoff HW., Bold HC. Phycological studies. IV. Some soil algae from enchanted rock and related algal species. *University Texas Publication* 1963; 63(18): 1-95.
- (25) Tang D., Han W., Li P., Miao X., Zhong, J. CO<sub>2</sub> biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO<sub>2</sub> levels. *Bioresource Technology* 2011; 102(3): 3071-3076.
- (26) Guillard RRL. *Division rates* In: Stein JR., editor. *Handbook of Physiological Methods: Culture Methods and Growth Measurements*. Cambridge, Cambridge University Press; 1973: 289-312.
- (27) Ho S., Chen W., Chang, J. *Scenedesmus obliquus* CNW-N as a potential candidate for CO<sub>2</sub> mitigation and biodiesel production. *Bioresource Technology* 2010; 101(22): 8725-8730.
- (28) A.O.A.C. International Official methods of analysis of AOAC International. *AOAC International* 2005.
- (29) Miquel M., Browse J. Arabidopsis mutants deficient in polyunsaturated fatty acid synthesis: Biochemical and genetic characterization of a plant oleoyl-phosphatidylcholine desaturase. *Journal Biology Chemistry* 1992; 267(25): 1502-1509.
- (30) Slocombe SP., Ross M., Thomas N., McNeill S., Stanley MS. A rapid and general method for measurement of protein in microalgal biomass. *Bioresource Technology* 2013; 129(3): 51-57.
- (31) Dere S., Gunes T., Sivaci R. Spectrophotometric Determination of Chlorophyll - A, B and Total Carotenoid Contents of Some Algae Species Using Different Solvents. *Turkish Journal of Botany* 1998; 22(1): 13-17.
- (32) Brown LM. Uptake of carbon dioxide from flue Gas by microalgae. *Energy Convers Management* 1996; 37(6): 1363-1367.

- (33) Kong WB., Yang H., Cao YT., Song H., Hua SF., Xia CG. Effect of glycerol and glucose on the enhancement of biomass, lipid and soluble carbohydrate production by *Chlorella vulgaris* in mixotrophic culture. *Food Technology Biotechnology* 2012; 51(4): 62-69.
- (34) Wang H., Fu R., Pei GA. study on lipid production of the mixotrophic microalgae *Phaeodactylum tricornutum* various carbon sources. *African Journal of Microbiology Resource* 2012; 6(1): 1041-1047.
- (35) Rados S., Vaclav B., Frantisek D. CO<sub>2</sub> balance in industrial cultivation of algae. *Arch Hydrobiology* 1975; 46(12): 297-310.
- (36) Vidyashankar S., Deviprasad K., Chauhan VS., Ravishankar GA., Sarada R. Selection and evaluation of CO<sub>2</sub> tolerant indigenous microalga *Scenedesmus dimorphus* for unsaturated fatty acid rich lipid production under different culture conditions. *Bioresource Technology* 2013; 144(2): 28-37.
- (37) Chiu S., Kao C., Tsai M., Ong S., Chen C., Lin C. Lipid accumulation and CO<sub>2</sub> utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO<sub>2</sub> aeration. *Bioresource Technology* 2009; 100(2): 833-838.
- (38) Morais MG., Costa JAV. Biofixation of carbon dioxide fixation by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in three-stage serial tubular photobioreactor. *Journal of Biotechnology* 2007a; 129(3): 439-445.
- (39) Ugwu CU., Aoyagi H., Uchiyama H. Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology*. 2008; 99(10): 4021-4028.
- (40) Tripathi R., Singh J., Thakur, IS. Characterization of microalga *Scenedesmus* sp. ISTGA1 for potential CO<sub>2</sub> sequestration and biodiesel production. *Renewable Energy* 2015; 74(8): 774-781.
- (41) Basu S., Roy AS., Mohanty K., Ghoshal AK. Enhanced CO<sub>2</sub> sequestration by a novel microalga: *Scenedesmus obliquus* SA1 isolated from bio-diversity hot-spot region of Assam. India. *Bioresource Technology* 2013; 143(32): 369-377.
- (42) Liu W., Huang Z., Li P., Xia J., Chen B. Formation of triacylglycerol in *Nitzschia closterium* f. *minutissima* under nitrogen limitation and possible physiological and biochemical mechanisms. *Journal. Experience. Marin Biology Ecology* 2012; 418(4): 24-29.
- (43) Prakash Rai M. and Shivani Gupta. Effect of media composition and light supply on biomass, lipid content and FAME profile for quality biofuel production from *Scenedesmus abundans*. *Journal of Energy Conversion and Management* 2016 (In press).
- (44) Sankar V., Daniel DK., Krastanov A. Carbon dioxide fixation by *Chlorella minutissima* batch cultures in a Stirred tank bioreactor. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 2011; 25(3): 2468-2476.
- (45) Siaux M., Cuine S., Cagnon C., Fessler B., Nguyen M., Carrier P., et al. Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. *BMC Biotechnology* 2011; 11(1): 1-7.
- (46) Ho SH., Chen CY., Chang, JS. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO<sub>2</sub> fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresource Technology* 2012a; 113(2): 244-252.
- (47) Chrismadha T., Borowitzka MA. Effects of cell density and irradiance on growth, proximate composition and eicosapentaenoic acid production of *Phaeodactylum tricornutum* growth in a tubular photobioreactor. *Journal of Applied Phycology* 1994; 6(3): 67-74.
- (48) Bellou S., Aggelis G. Biochemical activities in *Chlorella* sp. and

- Nannochloropsis salina* during lipid and sugar synthesis in a lab-scale open pond simulating reactor. *Journal Biotechnology* 2012; 164 (2): 318-329.
- (49) Sarat Chandra T., Deepak RS., Maneesh Kumar M., Mukherji S., Chauhan VS., Sarada R., et al. Evaluation of indigenous fresh water microalga *Scenedesmus obtusus* for feed and fuel applications: Effect of carbon dioxide, light and nutrient sources on growth and biochemical characteristics. *Bioresource Technology* 2016; 207(7): 430-439.
- (50) Mudimu O., Rybalka N., Bauersachs T., Friedl T., Schulz R. Influence of different CO<sub>2</sub> concentrations on microalgae growth, a-tocopherol content and fatty acid composition. *Geomicrobiology Journal* 2015; 32(3): 291-303.
- (51) Anjos M., Fernandes BD., Vicente AA., Teixeira JA., Dragone, G. Optimization of CO<sub>2</sub> bio-mitigation by *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology* 2013; 139(7): 149-154.
- (52) Wahidin S., Irdis A., Shaleh SRM. The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp. *Bioresource Technology* 2013; 129(5): 7-11.
- (53) Mandotra SK., Kumar P., Suseela MR., Nayaka S., Ramteke PW. Evaluation of fatty acid profile and biodiesel properties of microalga *Scenedesmus abundans* under the influence of phosphorus, pH and light intensities. *Bioresource Technology* 2016; 201(1): 222-229.
- (54) Thompson GA. Lipids and membrane function in green algae. *Lipids and Lipid Metabolism* 1996; 130(4):17-45.
- (55) Sakai N., Sakamoto Y., Kishimoto N., Chihara M., Karube, I. *Chlorella* strains from hot springs tolerant to high temperature and high CO<sub>2</sub>. *Energy Convers Management* 1995; 36(6): 693-696.
- (56) Collier JL., Grossman AR. Chlorosis induced by nutrient deprivation in *Synechococcus* sp. *Journal of Bacteriology* 1992; 174(7): 4718-4726.
- (57) Greene RM., Gerder RJ., Falkowski PG. Effect of iron limitation on photosynthesis in a Marine Diatom. *Limnology Oceanography* 1991; 36(9): 1772-1782.
- (58) Martin JH., Gordon RM., Fitzwater SE. The case for iron. *Limnology and Oceanography* 1991; 36(8): 1793-1803.
- (59) Grung MF., D'souza, ML., Borowitzka M. Algal Carotenoids 1. Secondary Carotenoids. *Journal of Applied Phycology* 1992; 4(2): 165-171.
- (60) Donkin P. Ketocarotenoid biosynthesis by *Haematococcus* La-custris. *Phytochemistry* 1976; 15(2): 711-715.
- (61) Lemoine Y., Schoefs B. Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: a multifunctional response to stress. *Photosynthetic Resource* 2010; 106(1-2): 155-177.
- (62) Boussiba S. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: cellular physiology and stress response. *Physiology Plantarum* 2000; 108(2): 111-117.
- (63) Li Y., Sommerfeld M., Chen F., Hu Q. Consumption of oxygen by astaxanthin biosynthesis: a protective mechanism against oxidative stress in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Journal of Plant Physiology* 2008; 165(17): 1783-1797.

---

<sup>1</sup>- Göksan and Kihc

<sup>2</sup>- Slocombe

<sup>3</sup>- Wang

<sup>4</sup>- Toledo-Cervantes

<sup>5</sup>- Prakash Rai

<sup>6</sup>- Sankar

<sup>7</sup>- Sarat Chandra

<sup>8</sup>- Mudimu

<sup>9</sup>- Wahidin

<sup>10</sup>- Mandotra

<sup>11</sup>- Tang