

# ẢNH HƯỞNG CỦA MÔI TRƯỜNG NUÔI ĐẾN SINH TRƯỞNG VÀ TÍCH LŨY CAROTENOID TRONG PHA SINH TRƯỞNG Ở VI TẢO *TETRADESMUS OBLIQUUS*

## EFFECTS OF NUTRIENTS CONCENTRATION AND SALINITY ON THE GROWTH AND TOTAL CAROTENOIDS ACCUMULATION IN THE MICROALGAE *TETRADESMUS OBLIQUUS*

Phan Thị Diễm My, Phan Nhật Trường, Võ Văn Minh, Trịnh Đăng Mậu, Trần Nguyễn Quỳnh Anh\*

Trường Đại học Sư phạm - Đại học Đà Nẵng; [tnqanh@ued.udn.vn](mailto:tnqanh@ued.udn.vn)

**Tóm tắt** - Nghiên cứu này khảo sát ảnh hưởng của nồng độ các chất dinh dưỡng nitơ (N), photpho (P) và muối NaCl đến khả năng sinh trưởng và tích lũy carotenoid của vi tảo *Tetradescmus obliquus* được phân lập từ các thủy vực nước ngọt tại Đà Nẵng. Kết quả cho thấy *T. obliquus* sinh trưởng tốt nhất trong môi trường BG11 với nồng độ N 120 mgN.L<sup>-1</sup>, nồng độ P 5,43 mgP.L<sup>-1</sup> và môi trường BG11 có nồng độ N 260 mgN.L<sup>-1</sup>, P 12,21 mgP.L<sup>-1</sup> với tốc độ sinh trưởng tương ứng đạt 0,298 ± 0,01 ngày<sup>-1</sup> và 0,252 ± 0,20 ngày<sup>-1</sup>. Đồng thời, ở các điều kiện này, sự tích lũy carotenoid tổng cũng đạt tốt nhất với năng suất trung bình tương ứng đạt 0,80 ± 0,13 % và 0,49 ± 0,18 % sinh khối khô. Bên cạnh đó, muối NaCl ở nồng độ rất nhỏ (0,01 - 0,2 M) được xác định gây ra tác động tiêu cực đến *T. obliquus* trong giai đoạn sinh trưởng, và nồng độ NaCl 0,6 M ức chế hoàn toàn sự sinh trưởng của vi tảo.

**Từ khóa** - Vi tảo; *Tetradescmus obliquus*; carotenoid; nitơ; photpho

### 1. Đặt vấn đề

Trong những năm gần đây, vi tảo ngày càng thu hút nhiều sự chú ý không chỉ nhờ những ứng dụng của sinh khối vi tảo trong việc sản xuất nhiên liệu sinh học mà còn nhờ tiềm năng trở thành nguồn nguyên liệu cung cấp các hợp chất hóa học có giá trị cao như axit béo, polysaccharide, vitamin và các sắc tố chống oxy hóa như beta-carotene, phycocyanin, astaxanthin [1], [2]. Carotenoid là các sắc tố liên kết với cấu trúc isoprenoid, trong các sinh vật quang hợp, carotenoid hoạt động như các sắc tố phụ trong quá trình quang hóa. Các carotenoid thứ cấp có khả năng bảo vệ hệ thống quang hợp bằng cách loại bỏ các phân tử oxy phản ứng dư thừa, chống lại các tổn thương do phản ứng oxy hóa gây ra [3], [4].

Nuôi vi tảo làm nguồn cung cấp các carotenoid là một hướng nghiên cứu và ứng dụng giàu tiềm năng trong bối cảnh công nghệ sinh học tảo đang ngày càng phát triển bởi vì vi tảo có tốc độ sinh trưởng và sinh sản nhanh, khả năng tích lũy cao hàm lượng các sắc tố. Sự tích lũy này thường được kích thích bằng cách tạo ra các điều kiện bất lợi như thiếu hụt nitơ, độ mặn cao hoặc cường độ ánh sáng cao do vi tảo có xu hướng tích lũy các carotenoid thứ cấp để thích nghi với các căng thẳng từ môi trường [5], [6]. Hai loài vi tảo được nuôi phổ biến nhất để sản xuất carotenoid hiện nay là *Dunaliella salina* và *Haematococcus pluvialis*. Hàm lượng astaxanthin của *Haematococcus pluvialis* nuôi cấy trong điều kiện thiếu nitơ và photphat được ghi nhận đạt đến 40 mg.g<sup>-1</sup> sinh khối khô [7], cao hơn rất nhiều so với trong điều kiện bình thường. Tuy nhiên, nhược điểm của việc nuôi cấy *H. pluvialis* là loài vi tảo này có tốc độ tăng trưởng tương đối chậm và cho sinh khối thấp [8]. *Tetradescmus obliquus* (tên đồng vật là *Scenedesmus obliquus*) được coi là một ứng viên thay thế tiềm năng do chúng có khả năng tích lũy carotenoid thứ cấp cao và khả

**Abstract** - In this study, effects of nutrients concentration, including nitrogen (N) and phosphorus (P), and salinity (NaCl) on the growth and total carotenoids accumulation of the microalgae *Tetradescmus obliquus* isolated from freshwater bodies in Danang were investigated. The results showed that in BG11 medium with 120 mgN.L<sup>-1</sup>, 5.43 mgP.L<sup>-1</sup> and BG11 medium with 260 mgN.L<sup>-1</sup>, 12.21 mgP.L<sup>-1</sup>, *T. obliquus* have demonstrated the greatest growth rates of 0.298 ± 0.01 day<sup>-1</sup> and 0.252 ± 0.20 day<sup>-1</sup>, respectively. Moreover, under these culture conditions, the highest total carotenoids accumulation was also obtained with an average efficiency of 0.80 ± 0.13% and 0.49 ± 0.18% of dry biomass, respectively. In addition, NaCl was identified to inhibit microalgae growth only at small concentrations from 0.01 to 0.6 M.

**Key words** - Microalgae; *Tetradescmus obliquus*; carotenoids; nitrogen, phosphorus

năng phục hồi sinh trưởng nhanh chóng sau các căng thẳng của môi trường [9]. Tuy vậy, đến nay số lượng nghiên cứu về khả năng sinh trưởng và tích lũy sắc tố của loài vi tảo này ứng dụng trong việc sản xuất các hợp chất có giá trị là không nhiều và khá khan hiếm ở Việt Nam. Nghiên cứu này khảo sát ảnh hưởng của môi trường nuôi, cụ thể là ảnh hưởng của nồng độ nitơ (N), photpho (P) và muối NaCl tới khả năng sinh trưởng và tích lũy carotenoid tổng của vi tảo *Tetradescmus obliquus*, nhằm tìm ra môi trường tối ưu cho sự phát triển cũng như sự tích lũy carotenoid của giống tảo bản địa này.

### 2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

#### 2.1. Vật liệu

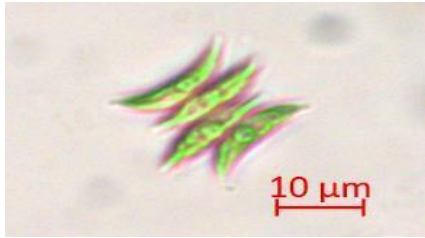
Giống *Tetradescmus obliquus* được phân lập từ các thủy vực nước ngọt trên địa bàn thành phố Đà Nẵng bởi tác giả và lưu giữ tại phòng thí nghiệm Công nghệ tảo, khoa Sinh - Môi trường, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Đà Nẵng.

#### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

##### 2.2.1. Nuôi cấy và quan sát hình thái

*T. obliquus* được nuôi cấy trong môi trường BG11 (Citric acid: 3,12x10<sup>-5</sup>; Ferric ammonium citrate: 3x10<sup>-5</sup>; MgSO4.7H2O: 3,04x10<sup>-4</sup>; CaCl2.2H2O: 2,45x10<sup>-4</sup>; NaNO3: 1,76x10<sup>-2</sup>; K2HPO4.3H2O: 1,75x10<sup>-4</sup>; Na2EDTA.H2O: 1,89x10<sup>-4</sup>; Na2CO3: 1,89x10<sup>-4</sup> mM) có sục khí, cường độ ánh sáng 100 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> với chu kỳ sáng:tối là 16:8, nhiệt độ duy trì ở 25 ± 1°C.

Quan sát hình thái cho thấy *T. obliquus* có cấu tạo cộng đơn bào gồm 2-4-8 tế bào sắp xếp trên 1 hàng và gắn với nhau ở phần giữa tế bào (Hình 1). Tế bào có hình thoi, đôi khi hơi uốn cong vào phía trong, đầu tế bào thắt nhọn, có chiều dài từ 4 - 30 μm và chiều rộng từ 2 - 9,5 μm. Thành tế bào nhẵn, thể màu nằm ở ngoại vi, có 1 hạt tạo bột.



**Hình 1.** Vi tảo *Tetradesmus obliquus* phân lập từ các thủy vực nước ngọt trên địa bàn thành phố Đà Nẵng

### 2.2.2. Bố trí thí nghiệm

Sự sinh trưởng và tích lũy carotenoid tổng của vi tảo *T. obliquus* được khảo sát trong môi trường nuôi cấy BG11 có điều chỉnh chứa các nồng độ nitơ (N), photpho (P). Tất cả các thí nghiệm đều được tiến hành trong phòng thí nghiệm trong thời gian 12 ngày với điều kiện môi trường như đã được nêu ở mục 2.2.1. Đối với thí nghiệm ảnh hưởng của các nồng độ nitơ, sáu nghiệm thức được bố trí với các nồng độ nitơ tương ứng: N0: 0 mg.L<sup>-1</sup>; N1: 10 mg.L<sup>-1</sup>; N2: 120 mg.L<sup>-1</sup>; N3: 260 mg.L<sup>-1</sup>; N4: 450 mg.L<sup>-1</sup>; N5: 780 mg.L<sup>-1</sup> (nồng độ P 5.43 mg.L<sup>-1</sup> ở tất cả các nghiệm thức). Với thí nghiệm ảnh hưởng của các nồng độ P, sáu nghiệm thức được tiến hành với nồng độ P tương ứng: P0: 0 mg.L<sup>-1</sup>; P1: 1,07 mg.L<sup>-1</sup>; P2: 2,41 mg.L<sup>-1</sup>; P3: 5,43 mg.L<sup>-1</sup>; P4: 12,21 mg.L<sup>-1</sup>; P5: 27,46 mg.L<sup>-1</sup> (nồng độ N 260 mg.L<sup>-1</sup> ở tất cả các nghiệm thức). Tương tự, thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của NaCl được tiến hành với 6 nghiệm thức: M0: 0 M; M1: 0,01 M; M2: 0,1 M; M3: 0,15 M; M4: 0,2 M; M5: 0,6 M (nồng độ P: 5,43 mg.L<sup>-1</sup> và N: 260 mg.L<sup>-1</sup> ở tất cả các nghiệm thức). Mật độ tế bào được theo dõi hàng ngày thông qua phương pháp đo mật độ quang ở bước sóng 680 nm và phương pháp đếm tế bào bằng buồng đếm Neubauer. Hàm lượng sắc tố được xác định ở ngày đầu tiên và ngày cuối cùng của thí nghiệm.

### 2.2.3. Xác định tốc độ sinh trưởng và hàm lượng sắc tố tích lũy

Tốc độ sinh trưởng  $\mu$  (ngày<sup>-1</sup>) của vi tảo được tính theo công thức:

$$\mu = (\ln(n_t) - \ln(n_0)) / (t - t_0)$$

Trong đó:  $t_0$  và  $t$  là thời điểm bắt đầu và kết thúc của giai đoạn tăng trưởng (ngày),

$n_0$  và  $n_t$  là mật độ tế bào ở thời điểm bắt đầu và kết thúc của giai đoạn tăng trưởng (tế bào.mL<sup>-1</sup>).

Để xác định trọng lượng khô, sinh khối tảo được lọc qua giấy lọc Whatman GF/B và sấy ở 40°C đến khối lượng không đổi. Lượng sinh khối khô  $\alpha$  ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) được tính dựa trên sự thay đổi trọng lượng theo công thức:

$$\alpha = (W_2 - W_1) / V$$

Trong đó:  $W_1$  là trọng lượng giấy lọc sau khi sấy đến khối lượng không đổi ( $\mu\text{g}$ );  $W_2$  là trọng lượng sinh khối tảo và giấy lọc sau khi sấy đến khối lượng không đổi ( $\mu\text{g}$ );  $V$  là thể tích của mẫu tảo đem lọc (mL).

Hàm lượng carotenoid tổng, chlorophyll-a, chlorophyll-b ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) được xác định theo phương pháp của Dharma [10] và Sartory và Grobbelaar [11]. Cụ thể, 2 mL sinh khối tảo được ly tâm với tốc độ 12.500 vòng.phút<sup>-1</sup> trong 5 phút, sau đó thêm 2 mL methanol 90% và ủ ở 64,7 °C trong 5 phút. Mẫu sau khi được ủ 20 giờ trong bóng tối được đem ly tâm với tốc độ 12.500 vòng.phút<sup>-1</sup> trong

5 phút. Phần dịch trong phía trên được thu và đo OD ở các bước sóng 470 nm; 652,4 nm và 665,2 nm. Hàm lượng carotenoid tổng được tính theo Lichtenthaler [12]:

$$\text{Carotenoid tổng} = (1000(A_{470}) - 1.63\text{Ch-a} - 104.96\text{Ch-b}) / 221$$

với hàm lượng Chlorophyll-a và b được tính theo công thức:

$$\text{Chlorophyll-a (Ch-a)} = 16.72(A_{665,2}) - 9.16(A_{652,4})$$

$$\text{Chlorophyll-b (Ch-b)} = 34.09(A_{652,4}) - 15.28(A_{665,2})$$

Năng suất tổng hợp Carotenoid (hàm lượng carotenoid tổng so với lượng sinh khối khô của tảo) (% $\delta$ ) được tính theo công thức:

$$\% \delta = C / \alpha * 100\%$$

Trong đó:

$A_{470}$ ;  $A_{652,4}$ ;  $A_{665,2}$  lần lượt là độ hấp thụ quang ở các bước sóng 470 nm; 652,4 nm và 665,2 nm;

$C$  là hàm lượng carotenoid tổng ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ );

$\alpha$  là lượng sinh khối khô của vi tảo ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

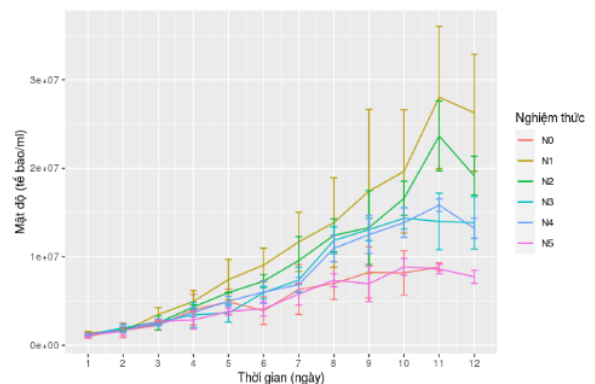
### 2.2.4. Thống kê và xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm R [13]. Phân tích phương sai 1 yếu tố (ANOVA) được áp dụng để đánh giá sự sai khác có ý nghĩa giữa các nghiệm thức, giá trị  $p < 0,05$  được xác định là có ý nghĩa thống kê.

## 3. Kết quả nghiên cứu

### 3.1. Ảnh hưởng của nồng độ N đến sinh trưởng và tích lũy carotenoid của vi tảo *T. obliquus*

#### 3.1.1. Ảnh hưởng của nồng độ N đến sinh trưởng của vi tảo *T. obliquus*

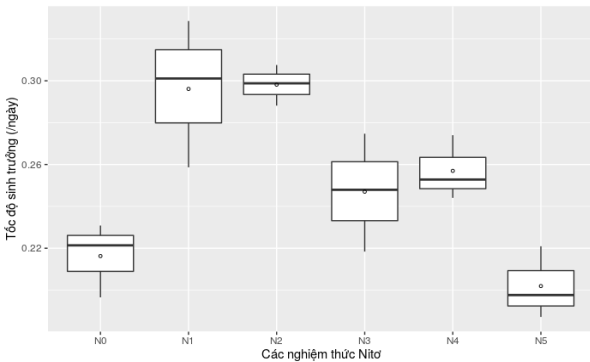


**Hình 2.** Đường cong sinh trưởng của vi tảo *T. obliquus* ở các nồng độ N khác nhau

Kết quả nghiên cứu cho thấy nồng độ nitơ trong môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng rõ rệt đến quá trình sinh trưởng của tảo *T. obliquus*. Mặc dù tốc độ sinh trưởng của vi tảo khác nhau ở các nồng độ N khác nhau nhưng đường cong sinh trưởng của chúng lại có xu hướng khá tương đồng (Hình 2). Mật độ vi tảo tăng chậm trong 4 ngày đầu nuôi cấy do đây là giai đoạn để tảo thích nghi với điều kiện môi trường dinh dưỡng mới. Từ ngày thứ 5 trở đi, tảo có sự sinh trưởng mạnh mẽ và tốc độ sinh trưởng cao nhất được ghi nhận ở ngày thứ 10 hoặc 11. Sau đó, tốc độ sinh trưởng của vi tảo có dấu hiệu chững lại hoặc suy giảm. Tốc độ sinh trưởng của *T. obliquus* cao nhất được ghi nhận ở ngày thứ 11 trong môi trường có nồng độ N là 10 mg.N.L<sup>-1</sup> (nghiệm thức N1), với mật độ tế bào đạt  $28 \pm 8,03 \times 10^6$  tế

bào.mL<sup>-1</sup>, cao hơn gần 20 lần so với mật độ tế bào ban đầu. Ngược lại, trong môi trường không có nitơ (thí nghiệm N0) hoặc nồng độ nitơ quá cao (thí nghiệm N5 với 780 mgN.L<sup>-1</sup>), vi tảo sinh trưởng rất chậm, với mật độ chưa đến 10<sup>7</sup> tế bào.mL<sup>-1</sup> sau 10 ngày nuôi cấy.

Tốc độ sinh trưởng của *T. obliquus* ở các môi trường có nồng độ N khác nhau có sự khác biệt rõ rệt ( $p < 0,05$ ) (Hình 3). Vi tảo phát triển nhanh trong môi trường được bổ sung 120 mgN.L<sup>-1</sup> (thí nghiệm N2) và 10 mgN.L<sup>-1</sup> (thí nghiệm N1) với tốc độ sinh trưởng trung bình tương ứng là  $0,298 \pm 0,01$  ngày<sup>-1</sup> và  $0,296 \pm 0,035$  ngày<sup>-1</sup>, cao hơn đáng kể so với tốc độ sinh trưởng ở các thí nghiệm còn lại. Sự sinh trưởng của tảo trong 2 thí nghiệm N3 (260 mgN.L<sup>-1</sup>) và N4 (450 mgN.L<sup>-1</sup>) là khá tương đương nhau với giá trị trung bình khoảng 0,25 ngày<sup>-1</sup>. Trong khi đó, tốc độ sinh trưởng thấp nhất được ghi nhận trong môi trường không có N (thí nghiệm N0) và môi trường có nồng độ N cao nhất của thí nghiệm (780 mgN.L<sup>-1</sup>, thí nghiệm N5) với các giá trị ghi nhận được lần lượt là 0,22 và 0,20 ngày<sup>-1</sup>.



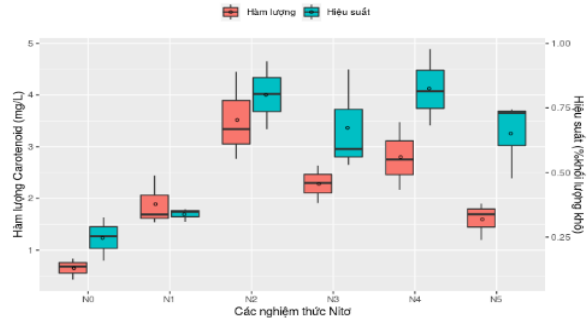
**Hình 3.** Tốc độ sinh trưởng của vi tảo *T. obliquus* ở các nồng độ N khác nhau

**3.1.2. Ảnh hưởng của nồng độ N đến sự tích lũy carotenoid tổng của vi tảo *T. obliquus***

Cuối pha sinh trưởng, hàm lượng tích lũy và năng suất tổng hợp carotenoid của vi tảo *T. obliquus* trong các môi trường có nồng độ N khác nhau có sự khác biệt rõ rệt (Hình 4). Tương tự với xu hướng quan sát được ở tốc độ sinh trưởng, hiệu quả tích lũy carotenoid (hàm lượng và năng suất) chỉ tăng tỉ lệ thuận với sự gia tăng của nồng độ N trong khoảng từ 0 - 120 mgN.L<sup>-1</sup>, vượt qua ngưỡng này, hiệu quả tích lũy có dấu hiệu suy giảm ở các giá trị cao hơn của nồng độ N (từ 260 - 780 mgN.L<sup>-1</sup>).

Hàm lượng carotenoid tổng tích lũy lớn nhất ghi nhận được trong môi trường BG11+120 mgN.L<sup>-1</sup> (thí nghiệm N2) với giá trị đạt  $3,52 \pm 0,85$  mg.L<sup>-1</sup>, chiếm  $0,8 \pm 0,13$  % sinh khối khô của vi tảo. Trong khi đó, hàm lượng carotenoid tích lũy thấp nhất ( $0,65 \pm 0,21$  mg.L<sup>-1</sup>, năng suất  $0,25 \pm 0,08$  %) tại môi trường BG11 không có N. Với nồng độ N trong môi trường nuôi 10 mgN.L<sup>-1</sup> (N1) và 120 mgN.L<sup>-1</sup> (N2), mặc dù *T. obliquus* có tốc độ sinh trưởng xấp xỉ nhau (Hình 3), nhưng lượng carotenoid thu được cũng như năng suất tích lũy ở nồng độ N 10 mgN.L<sup>-1</sup> lại thấp hơn đáng kể so với ở nồng độ 120 mgN.L<sup>-1</sup> ( $p = 0,03 < 0,05$ ). Năng suất tích lũy quan sát được cao nhất trong môi trường chứa 450 mgN.L<sup>-1</sup> (N4), tuy nhiên sự khác biệt này so với năng suất tích lũy trong môi trường chứa 120 mgN.L<sup>-1</sup> (N2) là không có ý nghĩa thống kê

( $p = 0,99 > 0,05$ ), đồng thời hàm lượng carotenoid trung bình ở N4 cũng thấp hơn giá trị ghi nhận được ở N2.

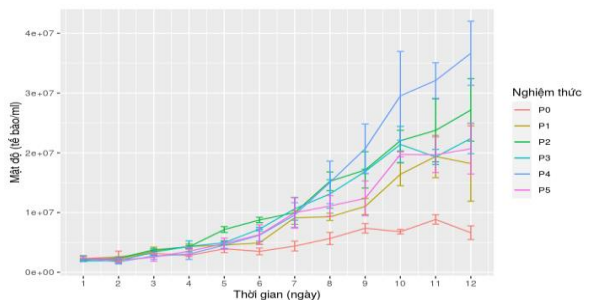


**Hình 4.** Hàm lượng và năng suất tổng hợp carotenoid của vi tảo *T. obliquus* ở các nồng độ N khác nhau

**3.2. Ảnh hưởng của nồng độ P đến sinh trưởng và tích lũy carotenoid của vi tảo *T. obliquus***

**3.2.1. Ảnh hưởng của nồng độ P đến sinh trưởng của vi tảo *T. obliquus***

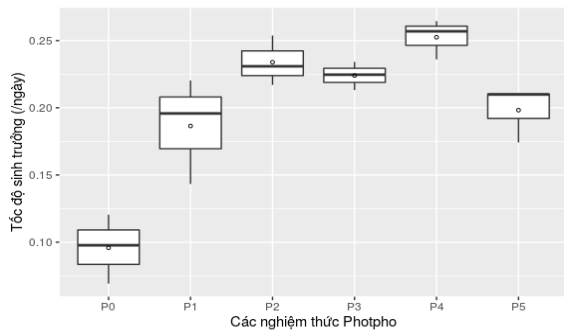
Đường cong sinh trưởng của vi tảo *T. obliquus* ở các nồng độ P khác nhau được thể hiện ở Hình 5. Sự khác biệt trong quá trình sinh trưởng bắt đầu được quan sát rõ vào ngày thứ 4, khi vi tảo bước vào pha tăng sinh cho đến ngày thứ 12. Đối với môi trường không chứa P (thí nghiệm P0) và môi trường có nồng độ P thấp (1,07 mgP.L<sup>-1</sup>, thí nghiệm P1), mật độ vi tảo đạt giá trị tối đa vào ngày 11 và sau đó bắt đầu suy giảm vào ngày 12. Trong khi đó, ở các môi trường có nồng độ P cao hơn (P2 - P5, với P từ 2,41 - 27,46 mgP.L<sup>-1</sup>), sự sinh trưởng của tảo vẫn có xu hướng tiếp tục tăng sau ngày 11 và chưa có dấu hiệu chuyển qua pha cân bằng. Mật độ tảo cao nhất vào thời điểm kết thúc thí nghiệm (ngày 12) ghi nhận được ở nồng độ P 12,21 mgP.L<sup>-1</sup> (P4) với giá trị trung bình lên đến  $3,667 \times 10^7$  tế bào.mL<sup>-1</sup>, và thấp nhất ở môi trường hoàn toàn không có P (P0) với giá trị  $6,617 \times 10^6$  tế bào.mL<sup>-1</sup>.



**Hình 5.** Đường cong sinh trưởng của vi tảo *T. obliquus* ở các nồng độ P khác nhau

*T. obliquus* sinh trưởng với tốc độ lớn nhất ( $0,252 \pm 0,20$  ngày<sup>-1</sup>) trong môi trường được bổ sung 12,21 mgP.L<sup>-1</sup> (P4) và chậm nhất ( $0,096 \pm 0,016$  ngày<sup>-1</sup>) trong môi trường không có P (P0) ở ngày nuôi thứ 12 (Hình 6). Kết quả kiểm định cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tốc độ sinh trưởng của vi tảo giữa môi trường có nồng độ P 12,21 mgP.L<sup>-1</sup> (P4) với các môi trường có nồng độ P 0 mgP.L<sup>-1</sup> (P0); 1,07 mgP.L<sup>-1</sup> (P1) và 27,46 mgP.L<sup>-1</sup> (P5) với độ tin cậy 90%. Trong khi đó, sự chênh lệch giữa tốc độ sinh trưởng của vi tảo giữa các nồng độ 2,41 mgP.L<sup>-1</sup> (P2); 5,43 mgP.L<sup>-1</sup> (P3) và 12,21 mgP.L<sup>-1</sup> (P4) là không đáng kể ( $p > 0,05$ ). Có thể thấy rằng trong thí nghiệm này,

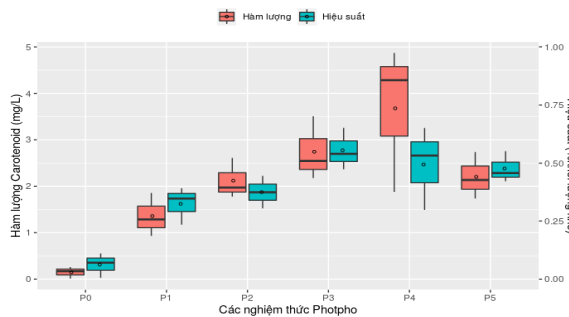
nồng độ P trong khoảng 2,41 - 12,21 mgP.L<sup>-1</sup> là thích hợp cho sự phát triển của vi tảo *T. obliquus*. Các nồng độ P quá cao hoặc quá thấp (trong nghiên cứu này lần lượt là 27,46 mgP.L<sup>-1</sup> và từ 0 - 1,07 mgP.L<sup>-1</sup>) đều không phải là điều kiện tối ưu cho sự phát triển của quần thể vi tảo này.



**Hình 6.** Tốc độ sinh trưởng của vi tảo *T. obliquus* ở các nồng độ P khác nhau

### 3.2.2. Ảnh hưởng của nồng độ P đến sự tích lũy carotenoid của vi tảo *T. obliquus*

Ảnh hưởng của nồng độ photpho đến hàm lượng và năng suất tích lũy sắc tố của *T. obliquus* được thể hiện trong Hình 7.



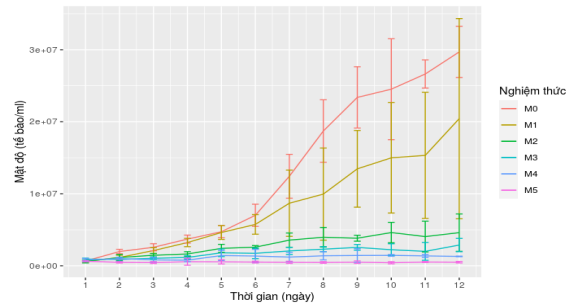
**Hình 7.** Hàm lượng và năng suất tổng hợp carotenoid của vi tảo *T. obliquus* ở các nồng độ P khác nhau

Nhìn chung, khả năng tổng hợp carotenoid của *T. obliquus* có xu hướng tăng tỉ lệ thuận với sự gia tăng nồng độ P trong môi trường (0 - 12,21 mgP.L<sup>-1</sup>), tuy nhiên lại có dấu hiệu giảm khi môi trường nuôi cấy được bổ sung quá nhiều chất dinh dưỡng này (27,46 mgP.L<sup>-1</sup>). Hàm lượng carotenoid đạt giá trị tối đa ( $3,68 \pm 1,5$  mg.L<sup>-1</sup>) ở nồng độ 12,21 mgP.L<sup>-1</sup> (P4), với năng suất tổng hợp đạt  $0,49 \pm 0,18$  %. Trong khi đó, khả năng tổng hợp sắc tố của vi tảo trong môi trường không chứa P (N0) là rất hạn chế, với hàm lượng chỉ đạt  $0,15 \pm 0,13$  mg.L<sup>-1</sup> và năng suất 0,06%.

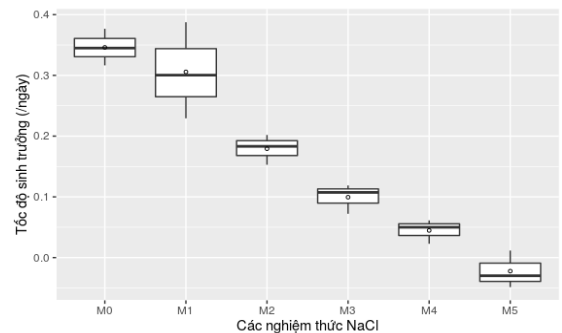
### 3.3. Ảnh hưởng của nồng độ NaCl đến sinh trưởng của vi tảo *T. obliquus*

Nhìn chung, muối NaCl gây ra ảnh hưởng tiêu cực đến sự sinh trưởng của *T. obliquus* và mức độ ảnh hưởng càng lớn khi nồng độ muối trong môi trường nuôi cấy càng cao (Hình 8, 9). Trong môi trường BG11 không chứa NaCl (thí nghiệm M0) hoặc chứa NaCl với nồng độ thấp (M1 - 0,01 M), tảo sinh trưởng với tốc độ khá cao (lần lượt là  $0,35 \pm 0,03$  và  $0,30 \pm 0,08$  ngày<sup>-1</sup>), đạt mật độ trung bình tương ứng  $2,97 \times 10^7$  tế bào.mL<sup>-1</sup> và  $2,04 \times 10^7$  tế bào.mL<sup>-1</sup> vào ngày thứ 12 và chưa có dấu hiệu ngừng tăng. Tuy nhiên, ở các nồng độ NaCl từ 0,1 - 0,6 M (M2 - M5), tốc độ sinh trưởng của *T. obliquus* rất thấp và có xu hướng giảm dần cùng với sự gia tăng nồng độ muối trong môi trường.

Đặc biệt, sự ức chế sinh trưởng đã được ghi nhận ở nồng độ NaCl 0,6 M với mật độ tảo lúc kết thúc thí nghiệm thấp hơn so với mật độ giống ban đầu, tốc độ sinh trưởng trung bình đạt giá trị  $-0,02 \pm 0,03$  ngày<sup>-1</sup>. Ngoài ra, ở nồng độ này (0,6 M), quần thể tảo *T. obliquus* được quan sát thấy đã bị mất diệp lục và chuyển sang màu trắng.



**Hình 8.** Sinh trưởng của vi tảo *T. obliquus* ở các nồng độ NaCl khác nhau



**Hình 9.** Tốc độ sinh trưởng của vi tảo *T. obliquus* ở các nồng độ NaCl khác nhau

Do hầu hết các thí nghiệm đều cho thấy NaCl tác động tiêu cực lên sự phát triển của *T. obliquus* trong giai đoạn sinh trưởng, hiệu quả tích lũy sắc tố không được đánh giá đối với chất này.

## 4. Thảo luận

Nitơ (N) là một trong những chất dinh dưỡng quan trọng nhất đối với vi tảo, là thành phần chính cấu tạo nên protein, chlorophyll, DNA,... Sự thiếu hụt N có thể dẫn đến sự suy giảm trong các quá trình tăng sinh, tổng hợp protein, quang hợp nhưng ngược lại làm tăng hàm lượng lipid, carbohydrate ở vi tảo nói chung [14]–[16]. Tuy nhiên, sự có mặt của N với nồng độ quá cao có thể gây ức chế sinh trưởng của vi tảo [17]. Do vậy, N trong môi trường nuôi phải được cung cấp ở một ngưỡng nồng độ thích hợp mới có thể thúc đẩy sự sinh trưởng của vi tảo đạt cao nhất, các giá trị N thấp hơn hay cao hơn ngưỡng này đều có thể gây ra sự suy giảm về mật độ và sinh khối. Xu hướng này đã được quan sát thấy ở nhiều nghiên cứu khảo sát ảnh hưởng của dinh dưỡng đến các loài tảo như *Neochloris oleoabundans* [18], *Prorocentrum donghaiense* [19], *Alexandrium minutum* [20]. Nghiên cứu của nhóm tác giả chỉ ra rằng, *T. obliquus* bản địa sinh trưởng tốt nhất trong môi trường BG11 + 120 mgN.L<sup>-1</sup>. Nồng độ N tối ưu này cao hơn so với kết quả nghiên cứu của Panca và cs. [21] ở loài *Scenedesmus* sp. CCNM 1077 (27,89 mgN.L<sup>-1</sup>) hay nghiên cứu của Xin và cs. [22] ở loài *Scenedesmus* sp. LX1 (25 mgN.L<sup>-1</sup>) nhưng lại thấp hơn so với nồng độ chuẩn trong môi trường BG11. Những sự khác biệt này có thể là do các giống vi tảo được sử dụng trong mỗi nghiên cứu là khác nhau.

Bên cạnh nitơ, photpho (P) cũng là một yếu tố dinh dưỡng cần thiết đối với vi tảo vì nó góp phần hình thành axit nucleic nội bào, protein và phospholipid, đồng thời tham gia vào các quá trình chuyển hóa khác nhau trong suốt quá trình phát triển của vi tảo, đặc biệt trong giai đoạn tăng trưởng [23], [24]. Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy nồng độ P trong môi trường thích hợp cho sự sinh trưởng của vi tảo *T. obliquus* là  $12,21 \text{ mgP.L}^{-1}$ , cao hơn so với nồng độ P tối ưu ( $2 \text{ mgP.L}^{-1}$ ) được xác định trong nghiên cứu Xin và cs. [22] cho sự phát triển của vi tảo *Scenedesmus* sp. LX1, tuy nhiên mật độ tế bào tích lũy trong nghiên cứu của chúng tôi lại cao hơn đáng kể ( $3,667 \times 10^7$  tế bào. $\text{mL}^{-1}$  sau 11 ngày nuôi cấy so với  $0,7 \times 10^7$  tế bào. $\text{mL}^{-1}$  sau 14 ngày nuôi cấy). Bên cạnh đó, nồng độ P thích hợp cho *Scenedesmus obliquus* được xác định bởi Hamouda và Abou-El-Souod là  $1,3 \text{ mgP.L}^{-1}$ , thấp hơn so với kết quả nghiên cứu của nhóm tác giả [25]. Ngoài ra, cần lưu ý rằng tỉ lệ N:P có thể chi phối sự sinh trưởng của vi tảo dù ảnh hưởng cụ thể của nó có sự khác biệt khá lớn giữa các nghiên cứu. Chẳng hạn, nghiên cứu của Ho và cs. [26] cho thấy *S. obliquus* được nuôi cấy trong môi trường hạn chế N (môi trường Detmer có điều chỉnh, N:P = 1,25) có năng suất đạt  $440,68 \pm 15,79 \text{ mg.L}^{-1}.\text{ngày}^{-1}$ , cao gấp khoảng 1,5 - 2,5 lần kết quả nghiên cứu của Tang và cs. [27] trên *S. obliquus* cũng như của Rodolfi và cs. [28] trên *Scenedesmus* sp. và *S. quadricauda* trong môi trường giới hạn P (môi trường BG11, N:P = 100). Sự chênh lệch lớn giữa các nghiên cứu có thể được quy cho sự khác biệt trong điều kiện và cách bố trí thí nghiệm như cường độ ánh sáng, chu kỳ quang, thành phần môi trường nuôi, nhiệt độ môi trường, mật độ tảo ban đầu, thời điểm kết thúc thí nghiệm,... cũng như sự khác biệt về chủng vi tảo được nghiên cứu [29].

Đối với ảnh hưởng của muối NaCl, El-Katony và El-Adl đã chứng minh rằng nồng độ NaCl trong khoảng 0,03 - 0,2 M gây tác động bất lợi đến *S. obliquus*, cụ thể là làm ức chế sự sinh trưởng và kéo dài thời gian của các pha trong quá trình sinh trưởng [30]. Tương tự, mật độ tế bào, tốc độ sinh trưởng và năng suất sinh khối của *Scenedesmus obliquus* XJ002 cũng được quan sát giảm đáng kể khi tăng nồng độ NaCl trong môi trường nuôi cấy từ 0 M đến 0,2 M [31]. Nguyên nhân là do các ion muối dư thừa phá hủy trạng thái cân bằng giữa quá trình sản sinh và tiêu thụ các gốc tự do có oxy [32], gây ra stress oxy hóa làm hư tổn nhiều thành phần như protein, axit nucleic, ảnh hưởng đến sự trao đổi chất của tế bào, ức chế sự phát triển của tế bào và thậm chí gây chết tế bào [33]. Những quan sát trong nghiên cứu của chúng tôi cũng tương đồng với những kết quả trên với tốc độ sinh trưởng của *T. obliquus* được ghi nhận tốt nhất trong môi trường không chứa NaCl, giảm dần khi tăng nồng độ NaCl từ 0,01 đến 0,2 M và mang giá trị âm khi nồng độ NaCl ở mức 0,6 M.

Khi khảo sát ảnh hưởng của các chất dinh dưỡng N và P đến sự tích lũy carotenoid ở *T. obliquus*, nghiệm thức N2 (BG11 +  $120 \text{ mgN.L}^{-1}$ ) được đánh giá là điều kiện tối ưu nhất trong khoảng khảo sát với hàm lượng và năng suất tích lũy carotenoid của vi tảo cao nhất, đạt  $3,52 \text{ mg.L}^{-1}$ , chiếm 0,8% sinh khối khô. Đối với P, nồng độ tối ưu được xác định là  $12,21 \text{ mgP.L}^{-1}$  (nghiệm thức P4) với hàm lượng carotenoid là  $3,68 \text{ mg.L}^{-1}$ , chiếm 0,49% sinh khối khô. Các giá trị này cao hơn so với các giá trị tương ứng thu được khi nuôi cấy vi tảo trong môi trường BG11 chuẩn (nghiệm

thức N3 và P3). Hàm lượng carotenoid tổng trong tế bào rất khác biệt giữa các chủng vi tảo khác nhau và điều kiện nuôi trồng chúng. Vi tảo *Dunaliella salina* nuôi cấy trong bình kín ngoài trời tích lũy được lượng carotenoid từ 2,8 - 5,4  $\text{mg.L}^{-1}.\text{ngày}^{-1}$  [34]. Loài *Muriellopsis* sp. trong ao nuôi ngoài trời tích lũy gần 2  $\text{mg.L}^{-1}.\text{ngày}^{-1}$ , chiếm 1% sinh khối khô [35]. Đối với các loài *Scenedesmus*, *Scenedesmus acutus* PVUW12 trong điều kiện bị stress về N và điều kiện nuôi bình thường có hàm lượng carotenoid tổng lần lượt chiếm 0,43% và 0,65% sinh khối khô [36]. Sự tích lũy carotenoid ở loài *Scenedesmus* sp. COBIEM 34 có thể lên đến 2% sinh khối tảo [37].

Thông thường, giai đoạn kích thích tích lũy sắc tố được tiến hành sau pha sinh trưởng bằng cách thay đổi điều kiện môi trường để gây stress cho vi tảo, như tăng cường độ ánh sáng, giảm nồng độ dinh dưỡng, tăng độ muối, thay đổi pH môi trường,... [21], [37]–[39]. Tuy nhiên, những điều kiện bất lợi của môi trường lại thường làm giảm tốc độ sinh trưởng và sinh khối của quần thể vi tảo. Trên phương diện ứng dụng sản xuất, hàm lượng carotenoid trong tế bào không phải là yếu tố duy nhất cần chú trọng mà tốc độ sinh trưởng, mật độ sinh khối tảo và khả năng chống chịu của vi tảo với các điều kiện khắc nghiệt của môi trường cũng là các yếu tố quan trọng cần được cân nhắc để tối ưu hóa năng suất và lợi nhuận [37]. Tốc độ sinh trưởng tối đa của các loài *Scenedesmus* được tuyển chọn để sản xuất carotenoid trong các nghiên cứu trên thế giới cũng có sự biến động khá lớn, từ khoảng  $0,3 \text{ ngày}^{-1}$  đối với loài *S. komarekii* [40] đến  $0,57 \text{ ngày}^{-1}$  đối với *Scenedesmus* sp. [39] hay lên đến  $1,8 \text{ ngày}^{-1}$  đối với *S. almeriensis* [41]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, tốc độ sinh trưởng của *T. obliquus* cao nhất ghi nhận được là  $0,35 \text{ ngày}^{-1}$  ở nghiệm thức M0; kế đến là  $0,298 \text{ ngày}^{-1}$  ở nghiệm thức N2 và  $0,252 \text{ ngày}^{-1}$  ở nghiệm thức P4; đây cũng chính là các điều kiện môi trường nuôi mà tảo tích lũy được hàm lượng carotenoid cao nhất. Điều này cho thấy, đây có thể là các điều kiện môi trường thích hợp cho việc kích thích tích lũy carotenoid. Tuy nhiên, để có thể xác định được một điều kiện nuôi trồng tối ưu nhất cho loài vi tảo này thì vẫn còn cần tiến hành thêm các thí nghiệm tiếp theo.

## 5. Kết luận

Hàm lượng dinh dưỡng (nitơ, photpho) và nồng độ muối (NaCl) trong môi trường nuôi cấy có những ảnh hưởng rõ rệt đến sự sinh trưởng và khả năng tích lũy sắc tố carotenoid của vi tảo *Tetradesmus obliquus*. Cụ thể, tốc độ tăng trưởng tối đa của vi tảo đạt  $0,298 \pm 0,01 \text{ ngày}^{-1}$  trong môi trường BG11 chứa  $120 \text{ mgN.L}^{-1}$ ;  $0,252 \pm 0,20 \text{ ngày}^{-1}$  trong môi trường BG11 chứa  $12,21 \text{ mgP.L}^{-1}$  và  $0,35 \pm 0,03 \text{ ngày}^{-1}$  trong môi trường BG11 chuẩn không bổ sung NaCl. Đối với hàm lượng và năng suất tích lũy carotenoid, các giá trị cực đại được ghi nhận ở các nghiệm thức N2 (BG11 +  $120 \text{ mgN.L}^{-1}$ ) và P4 (BG11 +  $12,21 \text{ mgP.L}^{-1}$ ). Bên cạnh đó, muối NaCl trong khoảng nồng độ 0,01 - 0,6 M được chứng minh là gây hạn chế và thậm chí ức chế sự sinh trưởng của vi tảo. Các kết quả từ những thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của từng yếu tố riêng lẻ này sẽ là cơ sở để xây dựng các thí nghiệm tối ưu hóa nhằm tìm ra một môi trường nuôi phù hợp nhất cho việc tăng sinh khối và kích thích tích lũy các hợp chất thứ cấp có giá trị ở vi tảo *T. obliquus* tại Việt Nam.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Otto Pulz and Wolfgang Gross, "Valuable products from biotechnology of microalgae", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 65, no. 6, 2004, 635–648.
- [2] P. Přibyl, P. Jan, C. Vladislav, and K. Petr, "The role of light and nitrogen in growth and carotenoid accumulation in *Scenedesmus* sp.", *Algal Res.*, vol. 16, 2016, 69–75.
- [3] K. Skjånes, C. Rebours, and P. Lindblad, "Critical Reviews in Biotechnology Potential for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process", *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 33, no. 2, 2013, 172–215.
- [4] L. H. Skibsted, "Carotenoids in antioxidant networks. Colorants or radical scavengers", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 60, no. 10, 2012, 2409–2417.
- [5] P. Bhosale, "Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms", *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 63, no. 4, 2004, 351–361.
- [6] Y. Lemoine and B. Schoefs, "Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: A multifunctional response to stress", *Photosynthesis Research*, vol. 106, no. 1–2, Kluwer Academic Publishers, 2010, 155–177.
- [7] S. Boussiba, W. Bing, J. P. Yuan, A. Zarka, and F. Chen, "Changes in pigments profile in the green alga *Haematococcus pluvialis* exposed to environmental stresses", *Biotechnol. Lett.*, vol. 21, no. 7, 1999, 601–604.
- [8] C. Hagen, K. Grünewald, M. Xyländer, and E. Rothe, "Effect of cultivation parameters on growth and pigment biosynthesis in flagellated cells of *Haematococcus pluvialis*", *J. Appl. Phycol.*, vol. 13, no. 1, 2001, 79–87.
- [9] S. Qin, G.-X. Liu, and Z.-Y. Hu, "The accumulation and metabolism of astaxanthin in *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae)", *Process Biochem.*, vol. 43, no. 8, 2008, 795–802.
- [10] A. Dharma, W. Sekatresna, R. Zein, Z. Chaidir, and N. Nasir, "Chlorophyll and Total Carotenoid Contents in Microalgae Isolated from Local Industry Effluent in West Sumatera, Indonesia," *Der Pharma Chem.*, vol. 9, no. 18, 2017, 9–11.
- [11] D. P. Sartory, D. P. Sartory, and J. U. Grobbelaas, "Extraction of Chlorophyll a From Freshwater Phytoplankton for Spectrophotometric Analysis," *Hydrobiologia*, vol. 114, no. 3, 2015, 177–187.
- [12] H. Lichthentaler, "Chlorophyll and carotenoids-pigments of photosynthetic biomembranes,-In: Colowick, SP., Kaplan, NO (ed): , Vol, 148", in *Methods in Enzymology*, vol. 148, S. Colowick and N. Kaplan, Eds. 1987, 350–382.
- [13] R Core Team, "R: A language and environment for statistical computing." R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2014, [Online]. Available: <http://www.r-project.org/>.
- [14] D. Simionato *et al.*, "The Response of *Nannochloropsis gaditana* to Nitrogen Starvation Includes De Novo Biosynthesis of Triacylglycerols, a Decrease of Chloroplast Galactolipids, and Reorganization of the Photosynthetic Apparatus", *Eukaryot. Cell*, vol. 5, 2013, 665–676.
- [15] J. Liu, C. Yuan, G. Hu, and F. Li, "Effects of Light Intensity on the Growth and Lipid Accumulation of Microalga *Scenedesmus* sp. 11-1 Under Nitrogen Limitation", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 166, no. 8, 2012, 2127–2137.
- [16] S. Nigam and M. Prakash, "Effect of Nitrogen on Growth and Lipid Content of *Chlorella pyrenoidosa* Polymer degradation by microbial consortium isolated from landfill site of New Delhi View project Microalgae biomass production for biodiesel and other value added compounds View project", *Artic. Am. J. Biochem. Biotechnol.*, 2011.
- [17] A. Richmond, Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. John Wiley & Sons, 2008.
- [18] Y. Li, M. Horsman, B. Wang, N. Wu, and C. Q. Lan, "Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 81, no. 4, 2008, 629–636.
- [19] J. Lai, Zhiming Yu, Xiuxian Song, Xihua Cao, and Xiaotian Han, "Responses of the growth and biochemical composition of *Proocentrum donghaiense* to different nitrogen and phosphorus concentrations", *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.*, vol. 405, no. 1, 2011, 6–17.
- [20] N. Touzet, J. Franco, and R. Raine, "Influence of inorganic nutrition on growth and PSP toxin production of *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) from Cork Harbour, Ireland", *Toxicon*, vol. 50, no. 1, 2007, 106–119.
- [21] I. Panha *et al.*, "Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077", *Bioresour. Technol.*, vol. 156, 2014, 146–154.
- [22] L. Xin, H. Hong-Ying, G. Ke, and S. Ying-Xue, "Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp.", *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 14, 2010, 5494–5500.
- [23] KG Raghobhama, "Phosphate transport and signaling", *Curr. Opin. Plant Biol.*, vol. 3, no. 3, 2000, 182–187.
- [24] Y. Duan, X. Guo, J. Yang, M. Zhang, and Y. Li, "Nutrients recycle and the growth of *Scenedesmus obliquus* in synthetic wastewater under different sodium carbonate concentrations", *R. Soc. Open Sci.*, vol. 7, no. 1, 2020, 191–214.
- [25] Hamouda Ragaa Abd Elfatah and Ghada Wagih Abou-El-Souod, "Influence of Various Concentrations of Phosphorus on the Antibacterial, Antioxidant and Bioactive Components of Green Microalgae *Scenedesmus obliquus*", *Int. J. Pharmacol.*, vol. 14, no. 1, 2018, 99–107.
- [26] S. Ho, C. Chen, J. C.-B., "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*, vol. 113, 2012, 244–252.
- [27] D. Tang, W. Han, P. Li, X. Miao, and J. Zhong, "CO<sub>2</sub> biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO<sub>2</sub> levels", *Bioresour. Technol.*, vol. 102, no. 3, 2011, 3071–3076.
- [28] L. Rodolfi *et al.*, "Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor", *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 102, no. 1, 2009, 100–112.
- [29] Z. Arbib, J. Ruiz, P. Álvarez-Díaz, C. Garrido-Pérez, J. Barragan, and J. A. Perales, "Photobiotreatment: influence of nitrogen and phosphorus ratio in wastewater on growth kinetics of *Scenedesmus obliquus*", *Int. J. Phytoremediation*, vol. 15, no. 8, 2013, 774–788.
- [30] T. Mohamed El-Katony and M. Faiz El-Adl, "Salt response of the freshwater microalga *Scenedesmus obliquus* (Turp.) Kutz is modulated by the algal growth phase", *J. Oceanol. Limnol.*, vol. 38, no. 3, 2020, 802–815.
- [31] J. Cheng *et al.*, "The effect of NaCl stress on photosynthetic efficiency and lipid production in freshwater microalga—*Scenedesmus obliquus* XJ002", *Sci. Total Environ.*, vol. 633, 2018, 593–599.
- [32] M. Guilian, X. Xu, and Z. Xu, "Advances in physiological and biochemical research of salt tolerance in plant", *Chinese J. Eco-Agriculture*, vol. 12, no. 1, 2004, 43–46.
- [33] K. Asada, "The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons", *Annu. Rev. Plant Biol.*, vol. 50, 1999, 601–639.
- [34] M. García-González *et al.*, "Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-cis-?-carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-cis-carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor", *Artic. J. Biotechnol.*, vol. 115, 2005, 81–90.
- [35] A. M. Blanco, J. Moreno, J. A. Del Campo, J. Rivas, and M. G. Guerrero, "Outdoor cultivation of lutein-rich cells of *Muriellopsis* sp. in open ponds", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2007.
- [36] M. C. Damiani *et al.*, "Triacylglycerol content, productivity and fatty acid profile in *Scenedesmus acutus* PVUW12", *J. Appl. Phycol.*, vol. 26, no. 3, 2014, 1423–1430.
- [37] P. Přibyl, V. Cepák, P. Kaštánek, and V. Zachleder, "Elevated production of carotenoids by a new isolate of *Scenedesmus* sp.", *Algal Res.*, vol. 11, 2015, 22–27.
- [38] J. Sánchez, J. Fernández, F. Ación, A. Rueda, J. Pérez-Parra, and E. Molina, "Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new strain *Scenedesmus almeriensis*", *Process Biochem.*, vol. 43, no. 4, 2008, 398–405.
- [39] F. Perreault *et al.*, "Carotenoid production and change of photosynthetic functions in *Scenedesmus* sp. exposed to nitrogen limitation and acetate treatment", *Artic. J. Appl. Phycol.*, vol. 24, no. 1, 2011, 117–124.
- [40] N. Hanagata and Z. Dubinsky, "Secondary carotenoid accumulation in *Scenedesmus komarekii* (Chlorophyceae, Chlorophyta)", *J. Phycol.*, vol. 35, no. 5, 1999, 960–966.
- [41] J. F. Sánchez, J. M. Fernández-Sevilla, F. G. Ación, M. C. Cerón, J. Pérez-Parra, and E. Molina-Grima, "Biomass and lutein productivity of *Scenedesmus almeriensis*: Influence of irradiance, dilution rate and temperature", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 79, no. 5, 2008, 719–729.