مطالعه اثر شدت و زمان تابش نور بر رشد و برخی پارامترهای بیوشیمیایی در جلبک سبز *Scenedesmus obliquus*

حکیمه منصوری[1*]، فاطمه حاجی‌زاده[2]

۱- دانشیار زیست شناسی، دانشگاه شهید باهنر، کرمان، ایران، پست الکترونیکی: h_mansuori@yahoo.com
۲- دانشجوی ارشد زیست شناسی، دانشگاه شهید باهنر، کرمان، ایران، پست الکترونیکی: f.hajizadeh@sci.uk.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۷/۶/۱۹ * نویسنده مسوول تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۱/۲۸

چکیده

در این تحقیق اثر شدت نور در زمان‌های مختلف بر رشد، بعضی رنگدانه‌ها، پروتئین و کربوهیدرات در جلبک *Scenedesmus obliquus* مورد مطالعه قرار گرفت. به این منظور جلبک‌ها یک هفته بعد از واکشت به مدت ۰، ۲، ٤ و ٦ روز در معرض شدت نور ٦۰۰۰ لوکس قرار گرفتند. نور شدید وزن تر جلبک سندسموس را کاهش داد. نور شدید سبب کاهش محتوی رنگیزه‌های کلروفیل و کاروتنوئید شد. مقدار β کاروتن و لوتئین نیز تحت تنش نور شدید کاهش یافت، ولی مقدار آستاگزانتین افزایش یافت. محتوی قند و پروتئین هم در این تیمار کاهش یافت در تیمار ٦ روز نور شدید کمترین مقدار این ترکیبات و در نمونه‌های شاهد بیشترین مقدار مشاهده شد. کاهش وزن و سایر پارامترها نشان دهنده مقاومت پایین وعدم سازگاری این گونه جلبکی به شدت نور بالا بود. سنتز آستاگزانتین به عنوان یکی راه‌های مقابله با شرایط تنش در این جلبک استفاده می‌شود.

کلمات کلیدی: *آستاگزانتین، پروتئین، تنش نور شدید، سندسموس.*

۱. مقدمه

همانگونه که گیاهان سبز اساس و پایه حیات را روی خشکی تشکیل می‌دهند جلبک‌ها نیز پایه حیات در آب‌های شیرین و شور می‌باشند. عوامل اصلی رشد و نمو این موجودات نور، گازکربنیک و مواد معدنی موجود در آب می‌باشند. سندسموس از جلبک‌های سبز، راسته کلروکوکال (Chlorococales) و خانواده سندسماسه (Scenedesmaceae) است. این جلبک از نظر محل زندگی معمولا در رودخانه‌های آب شیرین، دریاچه‌ها، استخرها و گاهی اوقات در زیستگاه‌های شور وجود دارد. به شکل کلنی ۲تا ٤ سلولی بوده اما ممکن است گاهی به علت عوامل محیطی مختلف به شکل ۸، ۱٦ و۳۲ سلولی و یا تک سلولی هم دیده می‌شوند (Trainor et al., 1976). جلبک سندسموس آستاگزانتین و اسید چرب امگا۳ تجمع می‌کنند. این جلبک همچنین به عنوان منبعی برای تولید لیپید قرار گرفته است (Qin et al., 2008).

آستاگزانتین یک کتوکاروتنوئید ثانویه است که به وسیله تعداد کمی از ریز جلبک‌ها، گیاهان، باکتری‌ها و قارچ‌ها ساخته می‌شود. در ریز جلبک‌ها در شرایطی مثل نور شدید، شوری و کمبود مواد غذایی تجمع می‌یابد، دارای قوی‌ترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی شناخته شده است (Qin et al, 2008; Dufossé et al., 2005; Breithaupt 2007). آستاگزانتین در پرورش ماهی به عنوان غذای آبزیانی از قبیل ماهیان سالمون، قزل‌آلا و خرچنگ‌ها استفاده می‌شود و رنگ بدن آن‌ها را قرمز و صورتی می‌کند (Guerin et al., 2003).آن دسته از کاروتنوئیدهایی که هم در فتوسنتز و انتقال انرژی و هم نقش آنتی اکسیدانی دارند کاروتنوئید اولیه می نامند که از جمله کاروتنوئیدهای اولیه می‌توان β کاروتن و لیکوپن نام

برد که در تیلاکوئید نام وجود دارند (Goodwin and Britton, 1988) بر خلاف این نوع کاروتنوئیدها نوع دیگر آن‌ها که فقط نقش آنتی اکسیدانی دارند و در فتوسنتز نقش ندارند کاروتنوئید ثانویه نام دارند که از مهمترین آن‌ها آستاگزانتین است (Solovchenko, 2013).

نور به عنوان منبع انرژی یک فاکتور مهم برای زندگی گیاهان و جلبک‌ها محسوب می‌شود که نقش مهمی را در فتوسنتز وتجمع محصولات فتوسنتزی ایفا می‌کند. همچنین می‌تواند اثرات زیادی از جمله بازدارندگی نوری روی گیاهان بگذارد (Sysoeva et al., 2010). در تحقیقی اثرات نور کم و زیاد همراه با فیتوهورمونهای سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات بر سیستم آنتی اکسیدانی *Haematococcus pluvialis* بررسی شد و نتایج نشان داد که در شدت نور زیاد مقدار تجمع آستاگزانتین در این جلبک افزایش یافت (Raman and Ravi 2011). همچنین اثرات شدت نور بر روی خصوصیات بیوشیمیایی دونالیلا مورد مطالعه قرار گرفته است (Zarandi-Miandoab et al., 2015). در آزمایشی اثر فاکتورهای مختلفی مانند نیتروژن، آهن، فسفر، نمک و شدت نور در افزایش آستاگزانتین و رشد *H. pluvialis* بررسی شد و نتایج نشان داد که کمبود نیتروژن و فسفات و اضافه کردن نمک به محیط کشت می‌توانند فاکتورهای موثری در افزایش مقدار آستاگزانتین باشند بخصوص اگر همزمان با افزایش شدت نور باشد (Harker et al., 1996).

هدف از این پژوهش بررسی میزان مقاومت و پاسخ جلبک سندسموس به نور شدید بود.

۲. مواد و روش‌ها

جلبک مورد مطالعه در این تحقیق *Scenedesmus obliquus* می‌باشد که متعلق به خانواده Scenedesmaceae و از جلبک‌های سبز است. این جلبک از استخرهای پرورش ماهی در روستای لاله زار از توابع شهرستان بردسیر استان کرمان جمع‌آوری و در آزمایشگاه با توجه به خصوصیات مورفولوژیکی شناسایی شد (Bellinger and Sigee 2010).

به منظور خالص‌سازی جلبک مورد مطالعه نمونه‌های جمع‌آوری شده ابتدا به محیط کشت حاوی نیترات BG-11 منتقل شدند. بعد از اینکه نمونه‌ها در این محیط به اندازه کافی رشد کردند (تقریبا به مدت یک ماه)، خالص‌سازی با روش‌های متفاوت از جمله غلظت مناسب سدیم کلرید و همچنین سانتریفیوژ با دور ملایم صورت گرفت (فرامرزی و همکاران، ۱۳۸۹; Lavens and Sorgeloos, 1996).

محیط کشت مورد استفاده در این پژوهش محیط BG-11 حاوی نیترات بود (Guiilard, 1975). محیط کشت تهیه شده به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۰°C و فشار ۲ اتمسفر اتوکلاو شد. بعد از سرد شدن محیط کشت مقدار ۰/۱میلی‌لیتر از محلول ویتامین B12 با غلظت نهایی ۱میلی گرم در میلی‌لیتر به محیط کشت اضافه شد و در نهایت pH آن روی ٦/٨ تنظیم شد. برای کشت جلبک‌ها از ارلن‌های ۲۵۰ mL و از ۲۰ میلی لیتر محیط کشت پایه برای واکشت استفاده شد. جلبک‌ها در شرایط نوری ۳۰۰۰ لوکس، دوره نوری ١٦ ساعت روشنایی و ٨ ساعت تاریکی (در این دوره نوری رشد جلبک‌های سبز نسبت به بقیه دوره ها بیشتر است) (پور افراسیابی و همکاران ,۱۳۹۲) و دمای ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد کشت شدند. جهت اعمال تنش نور شدید محیط کشت‌های یک هفته‌ای به مدت ۲، ٤ و ٦ روز در شدت نور٦۰۰۰ لوکس قرار گرفتند (در دوره نور شدید منبع نور بیشتر شده و همچنین فاصله منبع نور با جلبک‌ها کمتر شد). نمونه‌های شاهد همزمان در شدت نور ۳۰۰۰ لوکس با دوره نوری و تاریکی یکسان قرار گرفتند. نمونه‌ها با استفاده از سانتریفیوژ جمع‌آوری و آنالیزهای مورد نظر روی آن‌ها انجام شد.

۲-۱ *اندازه‌گیری وزن تر*

به منظور اندازه‌گیری وزن تر حجم مشخصی از محیط کشت از طریق یک کاغذ صافی واتمن GF/C از قبل وزن شده و با محیط کشت مرطوب شده بود فیلتر شد. بعد از فیلتر کردن همه محتویات محیط کشت بوسیله پمپ خلاء کاغذ صافی مرطوب شده به همراه وزن تر جلبک مجددا وزن شد. تفاوت وزن نشان دهنده وزن تر جلبک بود (Toledo-Cervantes et al., 2013).

۲-۲ *سنجش محتوی رنگیزه‌های فتوسنتزی*

سنجش مقدار کلروفیل a، b وکاروتنوئیدها از روش دری انجام شد (Dere, (1998. ۰/۰۵ گرم از وزن تر نمونه جلبکی در هاون چینی حاوی۲ mL اتانول ۹٦درصد سایئده شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و جذب آن‌ها با

استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۶۶۶، ۶۵۳ و ۴۷۰ خوانده شد. غلظت رنگیزه‌ها با استفاده از معادله‌های زیر و برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه وارائه گردید(کلروفیلa=C_a، کلروفیل b=C_b، کاروتنوئید کل =C_{x+C})

$C_a=15.65A_{666}-7.340A_{653}$

$C_b=27.05A_{653}-11.21A_{666}$

$C_{x+c}=1000A_{470}-2.860C_a-85.9C_{b/245}$

عصاره‌گیری جهت سنجش مقدار لوتئین وβ کاروتن هم با روش دری انجام شد. ۰/۰۵ گرم از وزن تر نمونه جلبکی در هاون چینی حاوی۲ mL اتانول ۹۶ درصد سایئده شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و جذب نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر برایβ کاروتن در طول موج ۴۵۳ و برای لوتئین در طول موج ۴۴۶ خوانده شد (Pocock et al., 2005). غلظت این رنگیزه‌ها با استفاده از ضریب خاموشی $mLg^{-1}cm^{-1}$ ۲۶۲۰ برای β-کاروتن و $mLg^{-1}cm^{-1}$ ۲۵۴۰ برای لوتئین محاسبه و بر حسب میکروگرم برگرم وزن تر ارائه شد.

۲-۳ سنجش محتوی آستاگزانتین

سنجش مقدار آستاگزانتین با روش اسپکتروفتومتری انجام شد (Li et al, 2012). برای این کار ابتدا ۰/۱ گرم جلبک در هاون چینی حاوی mL ۲ دی متیل سولفوکسید (DMSO) سایئده شد. عصاره حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری C ۷۰° قرار گرفته و سپس به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول رویی درون لوله‌های جداگانه جمع‌آوری شده و دوباره عصاره‌گیری با mL ۲ DMSO تکرار شد. جذب محلول رویی در طول موج ۴۹۲ نانومتر خوانده شد و با معادله زیر محاسبه و برحسب میکروگرم بر گرم وزن تر ارائه گردید. (جذب نمونه= A، غلظت آستاگزانتین=C).

A=0.222C+0.0104

۲-۴ سنجش محتوی پروتئین کل

پروتئین کل با استفاده از روش Bradford (1976) سنجش شد. ۵۰۰ میلی‌گرم از بافت جلبک در ۵ میلی لیتر بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH= ۷.۲) سائیده شد. تمام مراحل استخراج در یخ انجام گرفت. سپس عصاره‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در g ×۲۰۰۰ و در دمای C° ۴ سانتریفیوژ شدند. از محلول شفاف رویی برای سنجش غلظت پروتئین استفاده شد. به این منظور، به لوله‌های آزمایش حاوی عصاره پروتئینی، ۵ میلی لیتر معرف بیوره افزوده شد و سریعا ورتکس گردیدند. پس از ۲۵ دقیقه جذب آن با دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. غلظت پروتئین با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد و نتایج بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر ارائه گردید.

۲-۵ سنجش محتوی قند کل

برای سنجش قند کل از روش رنگ سنجی فنل سولفوریک اسید استفاده شد(Dubois et al., 1956). برای این منظور ابتدا مقدار ۰/۱گرم از بافت جلبک با mL ۵ HCL ۲/۵ نرمال مدت ۳ ساعت در بن ماری ۹۰°C هیدرولیز شد. پس از سرد شدن حجم لوله ها با آب مقطر به mL ۱۰ رسانده وسانتریفیوژ شدند. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی برداشته و با آب مقطر به حجم ۱mL رسانده شد. سپس mL ۱ محلول فنول ۵ درصد و mL ۵ اسید سولفوریک ۹۶ در صد به آن افزوده شد. پس از مخلوط شدن نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری C° ۳۰ قرا گرفتند. جذب نمونه‌ها در ۴۹۰ نانومتر خوانده شد. برای محاسبه مقدار قند از منحنی استاندارد گلوکز استفاده شد و نتایج برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر ارائه گردید.

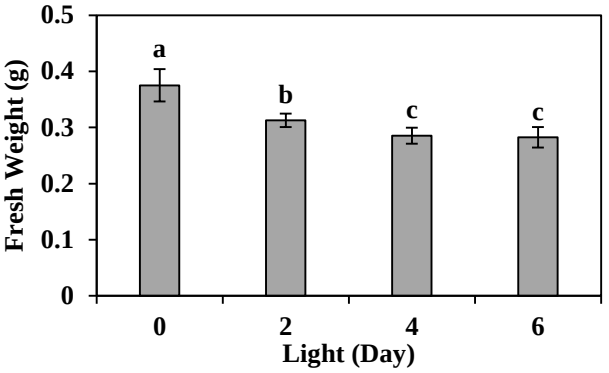
۲-۶ عملیات آماری

در این تحقیق برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد. داده‌های حاصل از اندازه‌گیری پارامترها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (۱۸:۰) آنالیز شد. میانگین‌ها با آزمون دانکن مقایسه شدند. سطح معنی‌داری P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel (۲۰۱۳) استفاده شد.

۳. نتایج و بحث

نمودار ۱ نتایج حاصل از اندازه‌گیری وزن تر را در تنش نور شدید نشان می‌دهد. تنش نور شدید باعث کاهش وزن تر شد. با افزایش مدت زمان نور شدید وزن تر کاهش یافت. بین تیمار ۴ و

٦ روزه تفاوت معنی‌داری در کاهش وزن تر مشاهده نشد. مطابق نتایج این تحقیق گزارش شده است که تعدادسلول‌ها تحت شدت نور شدید در جلبک *Haematococcus pluvialis* کاهش یافته است (Harker et al, 1996). تنش نور شدید باعث کاهش تعداد سلول‌ها در جلبک سبز آبی *Anabeana variabilis* شده است (Sanda et al., 2012).



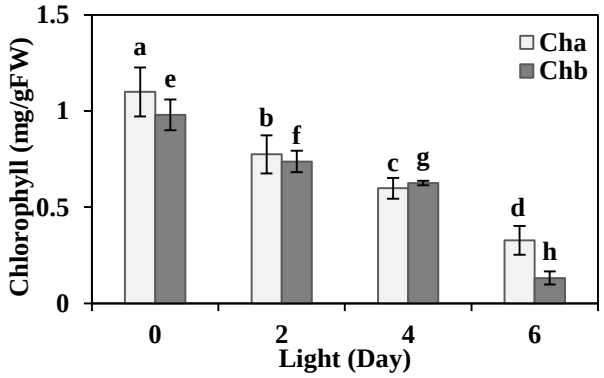
نمودار ۱: اثر تنش نور شدید بر وزن تر جلبک *S.obliquus*. حروف غیر یکسان تفاوت معنی‌دار بین غلظت هارا نشان می‌دهد. (در تیمار دهی شدت نور ٦٠٠٠ لوکس استفاده شد و در بقیه موارد شدت نور ٣٠٠٠ لوکس).

٣-١ تغییرات محتوی کلروفیل a و b در تنش نور شدید

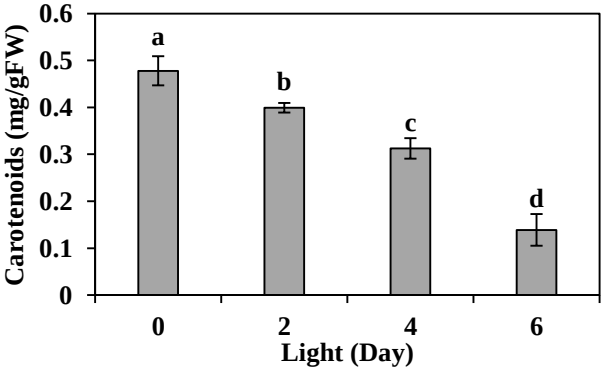
نتایج حاصل از اندازه‌گیری کلروفیل a وb در نمودار ٢ مشاهده می‌شود. مقادیر کلروفیل a و b تحت تنش نور شدید کاهش معنی‌داری نشان دادند. بیشترین کاهش در تیمار ٦ روز مشاهده شد. نتایج حاصل از اندازه‌گیری کلروفیل و سایر رنگیزه‌ها در این تحقیق هم نشان می‌دهد که تنش نور شدید باعث کاهش معنی‌دار مقدار کلروفیل وکاروتنوئیدها شده است. مطابق نتایج این تحقیق تنش نور شدید باعث کاهش کلروفیل a، b و افزایش کاروتنوئید در جلبک سبز *Dunaliella salina* شده است (Zarandi-Miandoab et al., 2015). بر خلاف نتایج این تحقیق مقدار β کاروتن و لوتئین در جلبک *Chlamydomonas acidophila* تحت تنش‌هایی مثل نور شدید و اشعه UV افزایش یافته است (Garbayo, 2000).

٣-٢ تغییرات محتوی کاروتنوئید کل در تنش نور شدید

نتایج حاصل از اندازه‌گیری کاروتنوئید کل در نمودار ٣ نشان داده شده است. با افزایش مدت زمان تیمار نور شدید مقدار کاروتنوئید کل کاهش یافت. تیمار ٦ روزه نور شدید باعث کاهش بیشتر کاروتنوئید کل شد وتفاوت معنی‌داری در سطح $p<0.05$ نسبت به نمونه شاهد نشان داد. تغییرات محتوی کاروتنوئید کل مشابه تغییرات مشاهده شده در کلروفیل بود.



نمودار ٢: اثر تنش نور شدید بر محتوی کلروفیل a و b در جلبک *S.obliquus* (برای هر پارامتر بصورت جداگانه مقایسه میانگین انجام شده است). حروف غیر یکسان تفاوت معنی‌دار بین غلظت ها را نشان می‌دهند.



نمودار ٣: اثر تنش نور شدید بر محتوی کاروتنوئید کل در جلبک *S.obliquus*. حروف غیر یکسان تفاوت معنی‌دار بین غلظت هارا نشان می‌دهد.

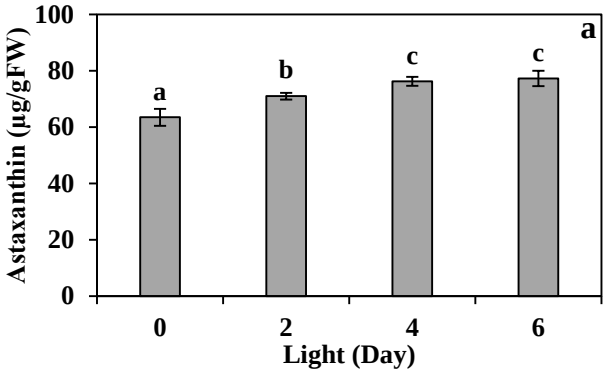
٣-٣ تغییرات محتوی آستاگزانتین، β کاروتن و لوتئین در تنش نور شدید

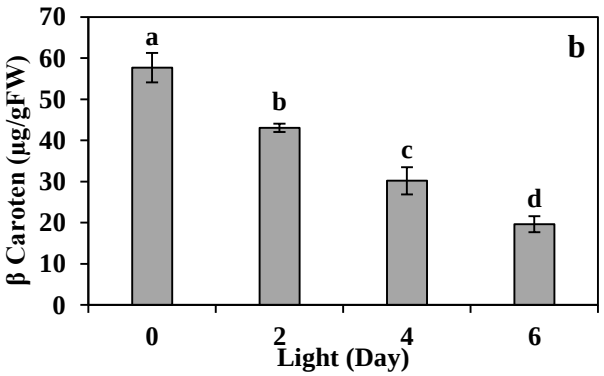
طبق نمودار ٤a نور شدید مقدار آستاگزانتین را افزایش داد. بین تیمار ٤ و٦ روزه تفاوت معنی‌داری در افزایش آستاگزانتین مشاهده نشد. این نتیجه منطبق بر کاهش وزن ایجاد شده تحت این شرایط بود که نشان می‌دهد افزایش مقدار آستاگزانتین با کاهش وزن تر رابطه عکس دارد. حتی در تیمارهای ٤ و ٦ روزه که وزن تر برابر بوده مقدار آستاگزانتین هم یکسان بوده است.

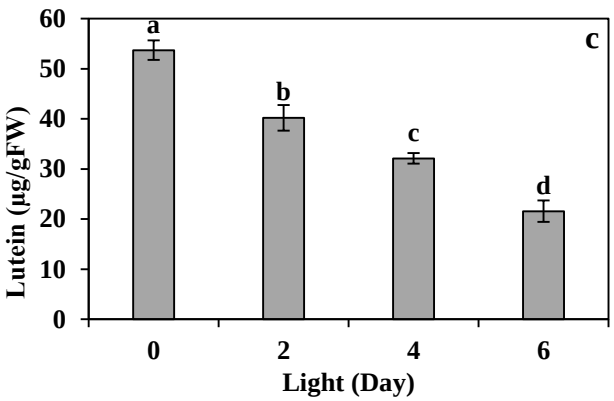
β کاروتن و لوتئین جزو کاروتنوئیدهای اولیه هستند که از نظر دارویی ارزش قابل توجهی دارند و بنابراین تغییرات مقدار این کاروتنوئیدها در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت. نمودار ٤b نشان می‌دهد که محتوی β کاروتن در تنش نور شدید کاهش یافته است. مقدار β کاروتن با افزایش مدت زمان نور شدید کاهش بیشتری نشان داد. کمترین مقدار β کاروتن در جلبک‌های تیمار شده ٦ روزه مشاهده شد.

در نمودار ٤c نتایج حاصل از اندازه‌گیری محتوی لوتئین در تنش نور شدید آورده شده است. این نمودار نشان می‌دهد که مقدار لوتئین هم تحت نور شدید کاهش یافته است. همانند β کاروتن و کلروفیل‌ها بیشترین مقدار لوتئین در نمونه شاهد وکمترین آن در تیمار ٦ روزه مشاهده شد.

کاروتنوئیدها یک نمونه از سیستم آنتی اکسیدانی غیر آنزیمی هستند که در گیاهان و برخی از جلبک‌ها برای مقابله با شرایط استرس وجود دارند. در این تحقیق بر خلاف انتظار تنش نور شدید به طور معنی داری باعث کاهش مقدار کاروتنوئید کل، β کاروتن و لوتئین شد. بر خلاف کاروتنوئیدهای اولیه (β کاروتن و لوتئین) مقدار کاروتنوئید ثانویه آستاگزانتین افزایش یافت. احتمالا چون آستاگزانتین بعنوان یک آنتی اکسیدان قوی در این جلبک وجود دارد می‌تواند به تنهایی این نقش را ایفا کند. شبیه نتایج بدست آمده در این تحقیق گزارش شده است که نور شدید باعث افزایش مقدار آستاگزانتین در جلبک *Haematococcus Pluvialis* شد (Harker et al., 1996).



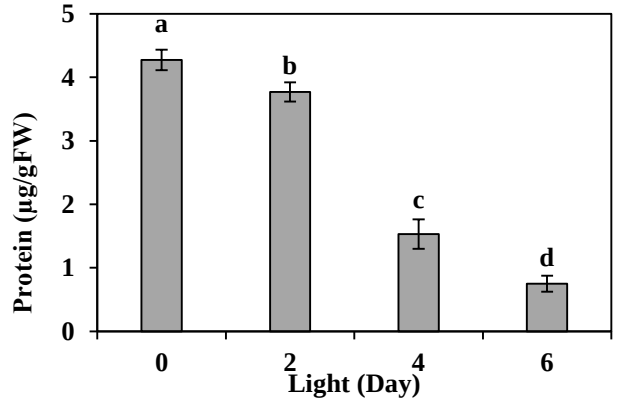




نمودار ٤: اثر تنش نور شدید بر محتوی آستاگزانتین، β کاروتن و لوتئین در جلبک *S.obliquus*. حروف غیر یکسان تفاوت معنی‌دار بین غلظت هارا نشان می‌دهد.

۳-۴ *تغییرات محتوی پروتئین کل در تیمار نور شدید*

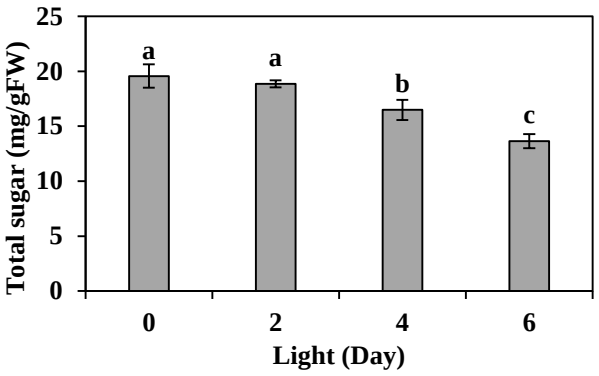
نتایج حاصل از سنجش مقدار پروتئین کل در نمودار ٥ نشان داده شده است. تنش نور شدید محتوی پروتئین کل را کاهش داد. با افزایش مدت زمان نور شدید پروتئین کل هم کاهش بیشتری نشان داد. تیمار ۲ روز در مقایسه با ٤ و ٦ روز اثر کمتری بر کاهش پروتئین کل داشت.



نمودار ٥: اثر تنش نور شدید بر محتوی پروتئین کل در جلبک *S.obliquus*. حروف غیر یکسان تفاوت معنی‌دار بین غلظت هارا نشان می‌دهد.

۳-۵ تغییرات محتوی قند کل در تیمار نور شدید

نمودار ٦ نتایج حاصل از سنجش محتوی قند کل را در تیمار نور شدید نشان می‌دهد. تنش نور شدید سبب کاهش محتوی قند کل شده است. بین جلبک‌هایی که ۲ روز با نور شدید تیمار شدند و نمونه شاهد تفاوت معنی داری مشاهده نشد و هر دو بیشترین مقدار را داشتند. با افزایش شدت تنش محتوی قند کاهش بیشتری نشان داد.



نمودار ٦: اثر تنش نور شدید بر محتوی قند کل در جلبک *S.obliquus*. حروف غیریکسان تفاوت معنی‌دار بین غلظت هارا نشان می‌دهد.

در این تحقیق در شرایط تنش نور شدید محتوی ترکیبات آلی از جمله پروتئین و قند کل کاهش یافت. بر خلاف نتایج این تحقیق گزارش شده است مقدار پروتئین و همچنین کربوهیدرات کل در جلبک *Dunaliella salina* تحت تنش نور شدید افزایش یافته است که این افزایش نشان دهنده پاسخ‌های مختلف گونه‌های جلبکی در برابر شرایط تنش بوده است (Zarandi-Miandoab et al., 2015). همچنین شدت نور استفاده و نحوه اعمال تیمار می‌تواند در پاسخ داده شده به شدت نور تاثیر بگذارد.

۴. نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از اندازه‌گیری پارامترها از جمله کاروتنوئیدها در این تحقیق نشان می‌دهد که جلبک مورد پژوهش در شرایط تنش محیطی و برای مقابله با آن کاروتنوئید ثانویه و آنتی اکسیدان قوی آستاگزانتین را افزایش ولی مقدار سایر کاروتنوئیدها را کاهش داده است.

۵. سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور و دانشگاه شهید باهنر کرمان برای حمایت مالی از این طرح بی نهایت تشکر می کنند.

منابع

پورافراسیابی، م.، ایمان‌پور نمین، ج.، رمضانپور، ز.؛ صادقی‌راد، م.، ۱۳۹۲. تأثیر شدت و دوره نوری بر نرخ رشد و سنتز چربی در جلبک سبز *Dunaliela salina*. مجله بهره برداری و پرورش آبزیان ، جلد دوم شماره سوم صفحات ٦٣-٧٥

فرامرزی، م.، فروتن‌فر، ح.، شکیبایی، م.، ۱۳۸۹. بیوتکنولوژی ریز جلبک‌ها، انتشارات دانشگاه تهران

Bellinger, E.G., Sigee, D.C., 2010. Freshwater algae: Identification and use as bioindicator. ISBN 978-0-470-05814-5 ©2010 by John Wiley & Sons, Ltd.

Borowitzka, M., Huisman, J., Osborn, A., 1991. Culture of the astaxanthin-producing green alga *Haematococcus Pluvialis*, Journal of Applied Phycology 3: 295-304. https://doi.org/10.1007/BF02392882

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantitites of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Analytical Biochemistry, 72: 248-254. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3

Breithaupt, D.E., 2007. Modern application of xanthophylls in animal feeding - a review. Trends in Food Science and Technology, 18: 501-506. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.04.009

Dere, S., Gunes, T., Sivaci, R., 1998. Spectrophotometric determination of chlorophyll a, b and total carotenoid contents of some algal species using different solvents, Journal of Botany. 22:13.

Dubois, M., Gilles, K.A, Hamilton, J.K, Rebers, P.A, Smith, F., 1956. Phenol suplhuric acid method for total carbohydrate , Annals of Chemistry, 26:350.

Lavens,P., Sorgeloos, P., 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fisheries Technical., 295pp.

Li, Y., Miao, F., Geng, Y., Lu, D., Zhang, C., Zeng, M., 2012. Accurate quantification of astaxanthin from Haematococcus crude extract spectrophotometrically, Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 30(4): 627-637.

https://doi.org/10.1007/s00343-012-1217-5

Miki, W., 1991. Biological functions and activities of animal carotenoids, Pure and Applied Chemistry, 63:141-146.

https://doi.org/10.1351/pac199163010141

Pocock, T., Krol, M., Huner, N., 2005. The determination and quantification of photosynthetic pigments by reverse phase high-performance liquid chromatography, thin-layer chromatography, and spectrophotometry, Methods in Molecular Biology, 274: 137-148.

https://doi.org/10.1385/1-59259-799-8:137

Qin, S., Liu, G., Hu, Z., 2008. The accumulation and metabolism of astaxanthin in scenedesmus obliquus (chlorophyceae) , Process Biochemistry, 43: 795-802.

https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.03.010

Raman, V., Ravi, S., (2011) Effect of salicylic acid and methyl jasmonate on antioxidant.

Systems of Haematococcus pluvialis. Acta Physiologia Plantarum, 33: 1043-1049.

Sanda, O., Cosmin, S., Teodor, R., 2012. Influence of high light intensity on the cells of cyanobacteria *Anabaena variabilis* sp. atcc 29413, Journal of Plant Development, 19: 23-28.

Sarada, R., Tripathi, U., Ravishankar, G.A., 2002. Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions, Process Biochemistry 37:623-627.

https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00246-1

https://doi.org/10.1021/ac60111a017

Dufossé, L., Galaupa, P., Yaronb, A., Arad, S.M., Blanc, P., Chidambara Murthy, K.N., Ravishankard, G.A., 2005. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? Trends in Food Science and Technology 16: 389–406.

https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.02.006

Garbayo, I., Cuaresma, M., Vílchez, C., Vega, M., 2000. Effect of abiotic stress on the production of lutein and β-carotene by *Chlamydomonas acidophila*, Process Biochemistry 2:111-119

Goodwin T, Britton G, (1988) Distribution and analysis of carotenoids. In Goodwin TW (ed.) Plant Pigments, Academic Press, Padstow, Cornwall, 61–132

Guerin, M., Huntley, M.E, Olaizola, M., 2003. *Haematococcus astaxanthin*: applications for human health and nutrition, Trend in Biotechnology, 21:210-216. https://doi.org/10.1016/S0167-7799(03)00078-7

Guillard, R.R.L., 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates in "Culture of Marine Invertebrate Animals." (eds: Smith W.L. and Chanley M.H.) Plenum Press, New York, USA. pp 26-60.

https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9_3

Harker, M., Tsavalos, A., Young, A., 1996. Factors responsible for astaxanthin formation in the chlorophyte Haematococcus pluvialis, Bioresource Technology, 55: 207-214.

https://doi.org/10.1016/0960-8524(95)00002-X

Johnston, J., Racusen, D., Bonner, J., 1954. The metabolism of isoprenoid precursors in a plant system, National Academy of Sciences, 40(11): 1031-1037.

https://doi.org/10.1073/pnas.40.11.1031

Johnson, E.A, Schroeder, W.A., 1996. Microbial carotenoids, advanced biochemistry engineering biotechnology.

https://doi.org/10.1007/BFb0102327

80 years later, Botanical Review, 42(1): 5-25. https://doi.org/10.1007/BF02860860

Van Breusegem, F., Vranova, E., Dat, J.F., Inze, D., 2001. The role of active oxygen species in plant signal transduction, Plant Sciences 161: 405–414. https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00452-6

Zarandi-Miandoab, L., Hejazi, M., Bagherieh-Najjar, M., Chaparzadeh, N., 2015. Light intensity effects on some molecular and biochemical characteristics of *Dunaliella salina*, Iranian Journal of Plant Physiology 5 (2), 1311-1321.

Solovchenko, A.E., 2013. Physiology and adaptive significance of secondary carotenogenesis, Russian Journal of Plant Physiology, 60(1): 1-13. https://doi.org/10.1134/S1021443713010081

Toledo-Cervantes, A., Morales, M., Novelo, E., Revah, S., 2013. Carbon dioxide fixation and lipid storage by *Scenedesmus obtusiusculus*. Bioresource Technology, 130: 652–658. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.081

Trainor, R.F, Cain, R.J., Shubert, L.E., 1976. Morphology and nutrition of the colonial green alga *scenedesmus*: