

## NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC VÀ NUÔI SINH KHỐI LOÀI VI TẢO LỤC (*NANNOCHLORIS ATOMUS*) PHÂN LẬP TẠI VIỆT NAM CHO TÁCH CHIẾT CÁC CHẤT CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC

Lưu Thị Tâm<sup>1</sup>, Ngô Thị Hoài Thu<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Minh Hằng<sup>4</sup>, Châu Văn Minh<sup>4</sup>, Đặng Diễm Hồng<sup>1, 2, 3, ✉</sup>

<sup>1</sup>Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>2</sup>Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>3</sup>Trường Đại học Thủy Lợi

<sup>4</sup>Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: ddhong60vn@yahoo.com; ddhong@ibt.ac.vn

Ngày nhận bài: 18.9.2020

Ngày nhận đăng: 15.3.2021

### TÓM TẮT

Vi tảo được biết đến là nguồn thức ăn giàu dinh dưỡng cho nhiều đối tượng nuôi trồng thủy, hải sản và là nguyên liệu tiềm năng để khai thác các chất có hoạt tính sinh học cao cho con người. Các kết quả nghiên cứu đặc điểm sinh học và nuôi đủ sinh khối tảo cho tách chiết các hợp chất có giá trị từ vi tảo lục *Nannochloris atomus* là hoàn toàn mới ở Việt Nam. Trong nghiên cứu này, dựa trên đặc điểm hình thái và trình tự gen 18S rRNA, tên khoa học chính xác của chủng *Nannochloris* sp. NT12 đã được định tên và thuộc về loài *N. atomus* có độ tương đồng đạt 99,7% so với loài *N. atomus* CCAP251.7 (AB080303.1) và đã được cấp mã số trên ngân hàng gen là MW007766. Chủng vi tảo biển này sinh trưởng tốt nhất dưới điều kiện với môi trường Walne, mật độ tế bào ban đầu  $3 \times 10^6$  tế bào/mL, nhiệt độ 25 - 30°C, cường độ ánh sáng 60 - 100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ , pH = 7,0, độ mặn 30‰, với giá trị mật độ tế bào đạt cao nhất là  $30 \times 10^6$  tế bào/mL sau 30 ngày nuôi cấy. Sinh khối chủng *N. atomus* NT12 nuôi ở quy mô pilot (trong bình nhựa 10 L và hệ thống nuôi kín bề phản ứng quang sinh 20 - 50 L) cũng đạt năng suất cao (209 mg/L/ngày) và giàu các acid béo không bão hòa đa nối đôi như oleic acid (C18:1n-9), linoleic (C18:2n-6) và  $\alpha$ -linolenic (C18:3n-3), đảm bảo chất lượng cho tách chiết các hợp chất có giá trị sinh học quý.

**Từ khóa:** acid béo không bão hòa đa nối đôi, *Nannochloris atomus*, hoạt tính sinh học, sinh khối, vi tảo

### MỞ ĐẦU

*Nannochloris* là một chi tảo lục thuộc họ Chlorellaceae, bộ Chlorellales, lớp Trebouxiophyceae, ngành Chlorophyta. Chi này được phát hiện lần đầu bởi Naumann (1931), có hình thái tế bào rất giống với các loài thuộc chi *Chlorella*, tế bào của chúng có dạng đơn bào, hình cầu, sinh sản vô tính bằng cách phân chia thành hai tế bào con có kích thước khoảng 3  $\mu\text{m}$ , không có pyrenoid (Butcher, 1952). Loài vi tảo biển *Nannochloris atomus* Butcher (tên đồng

nghĩa là *Picochlorum atomus* (Butcher) Henley) thuộc chi *Nannochloris* là loài được nghiên cứu nhiều nhất. *N. atomus* có tốc độ sinh trưởng cao với tốc độ sinh trưởng đặc trưng  $\mu$  đạt 0,32-1,05/ngày (Roncarati *et al.*, 2004; Sunda *et al.*, 2007; Cho *et al.*, 2007), chịu được dải độ mặn rộng từ 20 - 60 ppt (Saadaoui *et al.*, 2016), chịu nhiệt độ tốt từ 20 - 40°C. Sinh khối tảo này rất giàu dinh dưỡng với hàm lượng protein, carbohydrate đạt lần lượt là 30% và 23% sinh khối khô (Brown, 1991), giàu các acid béo omega 3-6 như linoleic acid (LA, C18:2n-6),  $\alpha$ -

linolenic acid (ALA, C18:3n-3) (Bounnit *et al.*, 2020), phù hợp làm thức ăn sống cho các đối tượng nuôi trồng thủy sản (Chen *et al.*, 2012). Ngoài ra, do hàm lượng lipid cao chiếm 21 - 30% sinh khối khô nên tảo này đã được ứng dụng sản xuất nhiên liệu sinh học (Bounnit *et al.*, 2020). Hơn nữa, nghiên cứu về khai thác các chất có hoạt tính từ *Nannochloris* sp. cho thấy sinh khối tảo này có hoạt tính malate dehydrogenase, peroxidase, catalase và thường sử dụng như các chất phụ gia chống oxy hóa. Dịch chiết *Nannochloris* sp. còn có chứa các hợp chất phenolic... làm giảm đáng kể sự phát triển của tế bào khối u. Ngoài ra, dịch chiết tảo này có chứa các sắc tố neoxanthin, violaxanthin, zeaxanthin, lutein và  $\beta$ -carotene, có thể được sử dụng như nguồn sản phẩm phụ có giá trị để nâng cao giá trị gia tăng của sinh khối cuối cùng (Pereira *et al.*, 2015). Do vậy, các nghiên cứu tìm điều kiện nuôi thích hợp để có thể nuôi tảo đạt năng suất sinh khối cao trong thời gian ngắn nhất nhằm chủ động cung cấp đủ nguyên liệu cho các ứng dụng nêu trên là rất cần thiết. Dogaris và đồng tác giả (2015) đã công bố nuôi thành công vi tảo biển *N. atomus* trong hệ thống bể phản ứng quang sinh học nằm ngang nổi (floating horizontal photobioreactor -HBR) dung tích 65 L. Sinh khối của tảo này đạt cao nhất 4,0 g/L và năng suất đạt 12,9 g/m<sup>2</sup>/ngày dưới điều kiện chiếu sáng nhân tạo có cường độ 435  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ . Khi nuôi tảo này ở hệ thống out door (đặt ngoài trời), sinh khối tối đa đạt 4,3 g/L và năng suất trung bình đạt 18,2 g/m<sup>2</sup>/ngày trong suốt 165 ngày mà không bị nhiễm tạp (vi sinh vật và các loài tảo khác).

Tuy nhiên, năng suất sinh khối tảo cũng như thành phần sinh hóa và hàm lượng các hợp chất có hoạt tính sinh học quý của chúng đều thay đổi dưới các điều kiện nuôi trồng khác nhau như môi trường dinh dưỡng, nhiệt độ, ánh sáng, giới hạn dinh dưỡng..., pha sinh trưởng và đặc điểm của chủng tảo nuôi cấy (Chen *et al.*, 2015; Mitra *et al.*, 2015). Chính vì các ưu điểm vượt trội và tiềm năng ứng dụng của loài *N. atomus* đã phân tích ở trên, trong bài báo này, chúng tôi tập trung nghiên cứu đặc điểm sinh học và lựa chọn các điều kiện nuôi cấy thích hợp cho sinh trưởng của

chủng vi tảo biển *Nannochloris* sp. NT12, được phân lập tại vùng biển Nha Trang, Khánh Hòa, Việt Nam năm 2009, nhằm nuôi sinh khối tảo đạt năng suất cao làm nguyên liệu cho khai thác các hợp chất sinh học quý.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu

Chủng vi tảo biển *Nannochloris* sp. phân lập tại vùng bờ biển Nha Trang, Khánh Hòa, Việt Nam năm 2009 (được ký hiệu là *Nannochloris* sp. NT12). Chủng này sống trong môi trường tự nhiên ở Vịnh Nha Trang có nhiệt độ  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ , cường độ ánh sáng 400 - 500  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ , độ mặn 27 - 30‰, pH =7. Sau khi phân lập thành dòng thuần, sạch, chủng này được lưu giữ trong bộ sưu tập giống của Phòng Công nghệ tảo, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và công nghệ Việt Nam và được nuôi cấy dưới điều kiện: môi trường Walne, nhiệt độ  $25^\circ\text{C}$ , cường độ chiếu sáng 30  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  với quang chu kỳ sáng:tối là 12:12 giờ, nồng độ muối 30‰ và pH =7.

Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu là những hóa chất thông dụng và đảm bảo độ tinh khiết cho từng thí nghiệm.

### Phân lập vi tảo biển *Nannochloris* sp. thu thập được từ vùng biển Nha Trang, Khánh Hòa

Để phân lập được mẫu vi tảo biển *Nannochloris* sp. từ mẫu nước thu tại vùng biển Nha Trang, Khánh Hòa (năm 2009), chúng tôi sử dụng phương pháp hút 1 tế bào bằng micropipette và cấy trải trên môi trường thạch đĩa có bổ sung hỗn hợp kháng sinh (chi tiết quy trình phân lập được trình bày trong công bố của Đặng Diễm Hồng, 2019). Các đặc điểm hình thái tế bào *Nannochloris* spp. trong mẫu nước được xác định bằng cách soi dưới kính hiển vi quang học OLYMPUS (Nhật Bản) ở độ phóng đại 400 lần. Sau khi phân lập thành công chủng *Nannochloris* sp. thành dòng thuần, sạch, chủng này được lưu giữ trong môi trường Walne lỏng ở ống nghiệm dưới điều kiện phòng thí nghiệm.

### Xác định sinh trưởng của tảo

Sinh trưởng của tảo xác định thông qua mật độ quang hấp thụ ở bước sóng 680 nm ( $OD_{680\text{ nm}}$ ) bằng máy quang phổ (Shimazu, Nhật Bản) hoặc đếm mật độ tế bào sử dụng buồng đếm hồng cầu Burkner - Turk (Đức) và tốc độ sinh trưởng đặc trưng  $\mu$  (/ngày) (Đặng Diễm Hồng, 2019).

### Định danh bằng sinh học phân tử

Chủng vi tảo biển *Nannochloris* sp. NT12 được định tên khoa học bằng phương pháp đọc và so sánh trình tự nucleotide của gen 18S rRNA. Dựa vào trình tự gen 18S rRNA của các loài vi tảo biển thuộc chi *Nannochloris* đã được công bố trên ngân hàng gen, chúng tôi đã thiết kế cặp mồi 2L-2R để nhân toàn bộ gen 18S rRNA của các loài thuộc chi *Nannochloris* với kích thước 1,7 kb có trình tự như sau: 2L-GTCATACGCTCGTCTCAAAGA và 2R-CCTTGTTACGACTTCACCTTCC. Trình tự gen 18S rRNA của các loài thuộc chi *Nannochloris* và các loài thuộc chi *Chlorococcum*, *Picochlorum* đăng ký trên ngân hàng gen đã được sử dụng để xây dựng cây phát sinh chủng loại (Liu *et al.*, 2013, Haddad *et al.*, 2014). Các bước của quy trình này và phương pháp phân tích, so sánh và xây dựng cây phát sinh chủng loại được mô tả chi tiết trong công bố của Hoàng Thị Lan Anh và đồng tác giả (2010).

### Phân tích thành phần acid béo

Thành phần và hàm lượng các acid béo bão hòa và không bão hòa đa nối đôi của chủng *Nannochloris* sp. NT12 được phân tích bằng máy sắc ký khí HP-6890, ghép nối phổ với Mass Selective Detector Agilent 5973. Chi tiết các bước tiến hành theo công bố của Đặng Diễm Hồng (2019) và được đo tại Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, VAST. Hàm lượng lipid được xác định theo phương pháp của Bligh & Dyer (1959) có cải tiến phù hợp với điều kiện của Việt Nam như mô tả chi tiết trong công bố của Đặng Diễm Hồng (2019).

### Lựa chọn điều kiện nuôi cấy thích hợp lên sinh trưởng của chủng *Nannochloris* sp. NT12

Ba môi trường dinh dưỡng (Walne, F/2 và

Erdcheiber - Erd) được thử nghiệm nuôi chủng *Nannochloris* sp. NT12 có thành phần dinh dưỡng được trình bày chi tiết theo công bố của Andersen (2005). Các điều kiện nuôi khác như: mật độ tế bào ban đầu ( $1 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $7 \times 10^6$  và  $10 \times 10^6$  tế bào/mL), nhiệt độ (15, 25, 30, 37 và  $45^\circ\text{C}$ ), cường độ ánh sáng (60, 100, 140, 200, 300 và  $400 \mu\text{mol/m}^2\text{s}$ ), pH (3, 5, 7, 8 và 9), nồng độ muối (10, 20, 30, 40, 50 và 60%) được tiến hành trong bình tam giác 250 mL (chứa 150 mL dịch tảo/bình). Thí nghiệm được bố trí theo kiểu thí nghiệm 1 nhân tố ngẫu nhiên hoàn toàn (tức là chỉ thay đổi 1 nhân tố, các nhân tố còn lại được giữ nguyên). Mỗi công thức thí nghiệm được lặp lại 3 lần và thời gian kéo dài từ 15 - 30 ngày. Các bình nuôi được lắc tay 4 lần/ngày (từ 8 giờ sáng đến 6 giờ chiều) trong suốt quá trình thí nghiệm. Tần suất lấy mẫu 3-5 ngày/lần với lượng mẫu 20 mL/lần để xác định các thông số sinh trưởng của chủng *Nannochloris* sp. NT12. Việc khảo sát các thông số này lên sinh trưởng của chủng NT12 là cần thiết bởi vì: (i) Chủng NT12 được phân lập ở vùng biển Nha Trang năm 2009 và lưu giữ ở môi trường lỏng trong ống nghiệm dưới điều kiện phòng thí nghiệm trong một thời gian rất dài (10 năm); với thời gian nhân đôi thế hệ của tảo tương đối ngắn (12 giờ), việc sinh sản dinh dưỡng liên tiếp trong thời gian dài rất dễ gây thoái hóa giống, từ đó làm thay đổi các đặc điểm sinh học vốn có của chủng tảo gốc nên cần khảo sát lại các đặc điểm sinh lý, sinh hóa của chủng tảo trước khi tiến hành nhân nuôi sinh khối; (ii) Để nuôi trồng thành công tảo ở quy mô lớn cần tìm được các điều kiện nuôi tối ưu nhất cho sinh trưởng của chủng tảo ở các cấp độ khác nhau nhằm đạt năng suất cao và chất lượng sinh khối tốt. Bên cạnh đó, việc nghiên cứu các thông số như nhiệt độ, pH, ánh sáng, độ mặn với biên độ dao động rộng như nêu ở trên nhằm đánh giá tính chống chịu của chủng tảo với điều kiện nuôi. Chủng tảo càng thích nghi tốt với sự thay đổi của điều kiện môi trường thì khả năng nuôi sinh khối thành công ở quy mô phòng thí nghiệm và ngoài thực tế trong các bể hở càng lớn. Các thí nghiệm sinh hóa nêu trên được tiến hành tại phòng Công nghệ tảo, Viện Công nghệ sinh học.

### Nuôi sinh khối tảo *Nannochloris* sp. NT12 ở các quy mô nuôi cấy khác nhau

Sử dụng các điều kiện thích hợp lựa chọn được từ việc nuôi trong bình tam giác 250 mL để nuôi cấy sinh khối chủng NT12 trong các hệ thống nuôi hở (HTNH) ở bình nhựa 10 L, hệ thống nuôi kín (HTNK) 20 và 50 L (với thể tích nuôi thực tế lần lượt là 26 và 70 L). Thời gian nuôi tảo kéo dài trong 15 - 20 ngày. Ở các hệ thống nuôi này, dịch tảo được sục khí 24/24 (với tốc độ sục khí là 0,25 L/phút). Mẫu được lấy 3 - 5 ngày/lần để xác định các thông số như mật độ tế bào và tốc độ sinh trưởng đặc trưng của tảo.

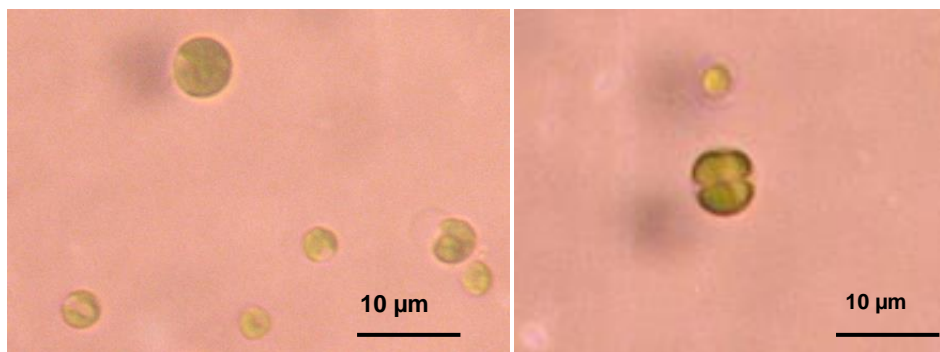
### Xử lý số liệu

Số liệu thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Excel và xử lý thống kê ANOVA một thành phần ở mức ý nghĩa  $p \leq 0,05$ .

### KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### Định tên khoa học chủng vi tảo biển *Nannochloris* sp. NT12

Hình thái tế bào của chủng NT12 nuôi trong bình tam giác 250 mL dưới kính hiển vi quang học với độ phóng đại 40X được chỉ ra ở hình 1.



**Hình 1.** Hình thái tế bào của chủng *Nannochloris* sp. NT12 chụp dưới kính hiển vi quang học. Thanh thước có kích thước 10µm.

Tế bào chủng NT12 có dạng hình cầu, đơn bào, kích thước tế bào 2 - 3 µm, kích thước có thể tăng lên đến 6 µm khi chúng bắt đầu phân chia. Tế bào sinh sản vô tính bằng cách chia đôi tế bào mẹ thành 2 tế bào con, mỗi tế bào con có kích thước 3 µm. Dựa trên khóa phân loại của Butcher (1952) đã được công bố và các đặc điểm hình thái quan sát được của chủng NT12 có đặc điểm giống với loài *Nannochloris atomus* (Butcher) Henley. Như vậy, dựa trên các đặc điểm hình thái tế bào quan sát được dưới kính hiển vi quang học, chúng tôi xác định sơ bộ chủng NT12 thuộc về loài *N. atomus* và chủng này được ký hiệu là *N. atomus* NT12.

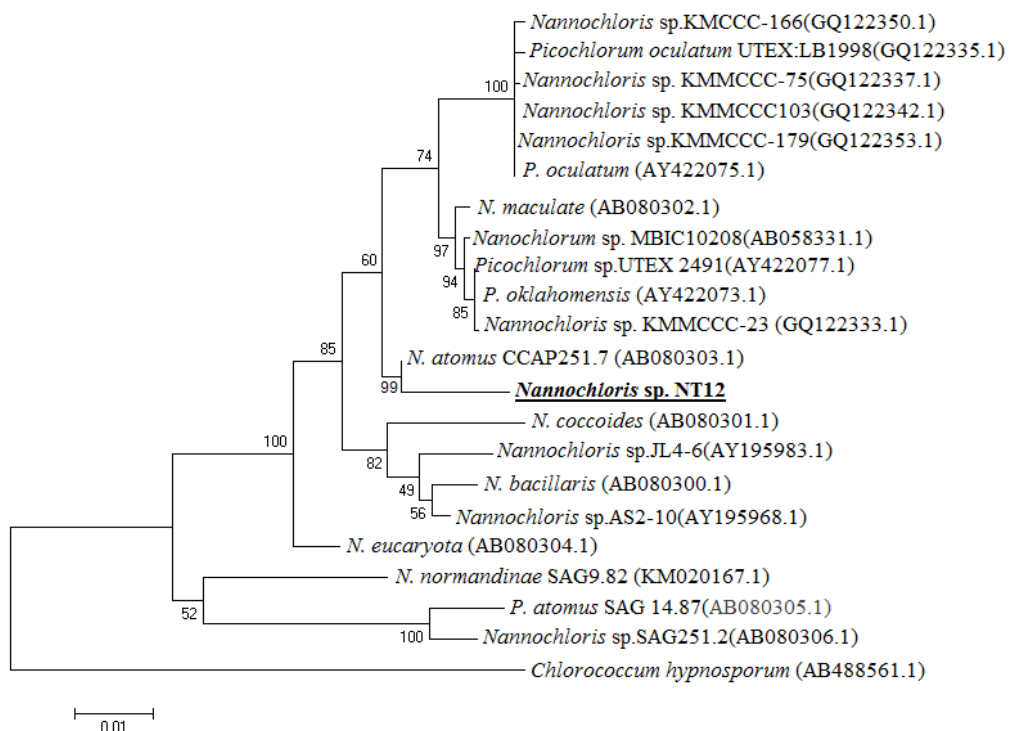
Do tế bào có kích thước nhỏ và hình dạng tế bào phụ thuộc vào điều kiện nuôi nên để định tên

khoa học chính xác, chúng tôi tiến hành phân tích trình tự gen 18S rRNA. Gen 18S rRNA của mẫu *Nannochloris* sp. NT12 được khuếch đại nhờ cặp mồi 2L-2R thu được gen có kích thước 1644 bp. Khi so sánh trình tự này trên ngân hàng gen cho thấy trình tự nêu trên thuộc các loài của chi *Nannochloris*. Theo các nghiên cứu về phân loại gần đây đã cho thấy có mối quan hệ khá gần gũi về mặt di truyền giữa chi *Nannochloris* và *Picochlorum* dựa trên các đặc điểm về hình thái, đặc điểm sinh học... Chính vì vậy, một số loài thuộc chi *Nannochloris* đã được chuyển sang chi *Picochlorum* và ngược lại (Henley *et al.*, 2004), các kết quả nghiên cứu kết hợp giữa đặc điểm hình thái và giải mã trình tự của một số gen bảo thủ như 18S rRNA để góp phần làm sáng tỏ hơn vị trí phân loại giữa các loài thuộc chi

*Nannochloris* và *Picochlorum* cũng đã được tiến hành (Haddad *et al.*, 2014).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng trình tự của loài *Chlorococcum hypnosporum* (AB488561.1) làm nhóm ngoại đối với chi *Nannochloris* (Liu *et al.*, 2013). Kết quả trên cây phát sinh chủng loại của các loài thuộc chi *Nannochloris* được chia thành 2 nhánh, nhánh thứ nhất là loài *Chlorococcum hypnosporum* (AB488561.1) có tỉ lệ phần trăm tương đồng so với các loài thuộc chi *Nannochloris* dao động từ 88,5% đến 90,4%. Nhánh thứ hai là các loài thuộc chi *Nannochloris* và *Picochlorum*, kết quả cho thấy tỷ lệ phần trăm tương đồng của mẫu *Nannochloris* sp. NT12 so với các loài thuộc chi *Nannochloris* đạt 94,4% - 99,7%, còn so với các loài thuộc chi *Picochlorum* chỉ đạt từ 94,0% - 98,5%. Như vậy mẫu *Nannochloris* sp. NT12 có sự khác biệt hoàn toàn đối với hai

chi vi tảo này khi so sánh ở mức độ phân tử. Cụ thể mẫu *Nannochloris* sp. NT12 có độ tương đồng cao nhất với loài *N. atomus* CCAP251.7 (AB080303.1) đạt 99,7%, tiếp theo là loài *N. maculate* (AB080302.1) đạt 99,6% và loài *P. oklahomensis* (AY422073.1) đạt 98,5%; loài *P. oculatum* (AY422075.1) đạt 98,0%; loài *N. bacillaris* (AB080300.1) đạt 97,4%; loài *N. coccooides* (AB080301.1) đạt 97,0% và thấp nhất là *Nannochloris* sp. SAG251.2 (AB080306.1) đạt 94,5% và loài *P. atomus* SAG 14.87(AB080305.1) đạt 94,0%. Do vậy, dựa trên các đặc điểm hình thái, tỷ lệ phần trăm tương đồng và cây phát sinh chủng loại (Hình 2) của các loài thuộc chi *Nannochloris*, có thể kết luận mẫu *Nannochloris* sp. NT12 thuộc về loài *Nannochloris atomus* với độ tương đồng đạt 99,7% và đã được cấp mã số trên ngân hàng gen là MW007766.



**Hình 2.** Cây phát sinh chủng loại của các loài thuộc chi *Nannochloris* dựa trên trình tự gen 18S rRNA đã được công bố trên GenBank.

### Lựa chọn môi trường nuôi cấy thích hợp cho sinh trưởng của chủng vi tảo biển *N. atomus* NT12 trong bình tam giác 250 mL

Kết quả về lựa chọn điều kiện nuôi cấy thích hợp cho sinh trưởng của chủng *N. atomus* NT12 được chỉ ra ở Hình 3.

#### - Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng

Sinh trưởng của chủng *N. atomus* NT12 ở các môi trường dinh dưỡng khác nhau trong bình tam giác 250 mL sau 33 ngày nuôi được chỉ ra ở Hình 3A. Chủng NT12 sinh trưởng tốt trong cả 3 môi trường nuôi. Tuy nhiên, mật độ tế bào đạt cao nhất ở môi trường Erd, tiếp theo là Walne và cuối cùng là F/2, với giá trị tương ứng là  $30,24 \pm 1,95$ ;  $28,45 \pm 1,56$  và  $26,78 \pm 2,05 \times 10^6$  tế bào/mL. Quan sát dưới kính hiển vi quang học không có sự khác biệt về hình thái tế bào tảo giữa các môi trường nuôi cấy khác nhau. Mặc dù thành phần và hàm lượng của các nguyên tố khoáng đa và vi lượng vô cơ trên cùng đơn vị thể tích không có sự khác biệt nhiều giữa 3 môi trường dinh dưỡng Erd, Walne và f/2. Nhưng môi trường Erd vẫn là môi trường giàu dinh dưỡng nhất so với 2 môi trường nuôi còn lại (do có chứa thành phần dịch chiết đất - một nguồn dinh dưỡng vi lượng tốt), đây có thể là nguyên nhân giúp chủng NT12 sinh trưởng, phát triển tốt nhất. Tuy nhiên, khi nuôi tảo trên quy mô lớn, việc pha môi trường Erd rất khó thực hiện và thành phần dinh dưỡng thường không ổn định (do thành phần dịch chiết đất không xác định được). Trong khi đó, sinh trưởng của chủng NT12 trong môi trường Walne cũng không có sự khác biệt nhiều so với môi trường Erd. Hơn nữa, do môi trường Walne có giá thành thấp, dễ pha môi trường cũng như dễ bổ sung vào hệ thống nuôi lớn nên môi trường này đã được chọn cho các thí nghiệm nghiên cứu tiếp theo.

#### - Ảnh hưởng mật độ tế bào gieo ban đầu

Mật độ tế bào gieo ban đầu là một yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến khả năng sống và năng suất sinh khối của vi tảo, đặc biệt khi nuôi ngoài ánh sáng tự nhiên. Mật độ tế bào ban đầu càng cao thì thời gian “pha tiềm” trong đường cong sinh trưởng của tảo càng giảm. Tuy nhiên, nếu mật độ tảo ban đầu quá cao sẽ dẫn đến cạnh tranh

dinh dưỡng, từ đó kìm hãm sinh trưởng của tảo. Kết quả trình bày ở Hình 3B cho thấy sinh trưởng của chủng NT12 phụ thuộc lớn vào mật độ tế bào gieo ban đầu. Ở mật độ tế bào ban đầu là  $3 \times 10^6$  tế bào/mL, tốc độ sinh trưởng đặc trưng của chủng NT12 đạt cao nhất ( $\mu = 0,134/\text{ngày}$ ) sau 6 ngày nuôi. Tiếp theo là mật độ tế bào gieo  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $7 \times 10^6$  và  $10 \times 10^6$  tế bào/mL, với giá trị tốc độ sinh trưởng đặc trưng đạt lần lượt là 0,115/ngày, 0,085/ngày, 0,081/ngày và 0,055/ngày. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa mật độ tế bào ban đầu  $3 \times 10^6$  TB/mL so với công thức  $5 \times 10^6$ ,  $7 \times 10^6$  và  $10 \times 10^6$  tế bào/mL ( $P < 0,05$ ). Không có sự khác biệt về ảnh hưởng của mật độ ban đầu  $5 \times 10^6$  và  $7 \times 10^6$  tế bào/mL lên sinh trưởng của chủng NT12 ( $P > 0,05$ ). Như vậy, giá trị mật độ tế bào gieo ban đầu thích hợp cho sinh trưởng của chủng NT12 là  $3 \times 10^6$  tế bào/mL đã được chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

#### - Ảnh hưởng của nhiệt độ

Kết quả trình bày ở Hình 3C cho thấy chủng NT12 sinh trưởng tốt nhất ở  $30^\circ\text{C}$ , tiếp theo ở  $25^\circ\text{C}$  và  $37^\circ\text{C}$ , thấp nhất ở  $15^\circ\text{C}$  và  $45^\circ\text{C}$  sau 25 ngày nuôi cấy. Có sự sai khác có ý nghĩa thống kê sinh học về sinh trưởng của chủng NT12 ở nhiệt độ  $30^\circ\text{C}$  so với các công thức nhiệt độ  $37^\circ\text{C}$ ,  $45^\circ\text{C}$  và  $15^\circ\text{C}$  ( $P < 0,05$ ). Tuy nhiên, không có sự sai khác có ý nghĩa giữa nhiệt độ  $30^\circ\text{C}$  và  $25^\circ\text{C}$  ( $P > 0,05$ ). Hơn nữa, tại  $30^\circ\text{C}$ , chủng NT12 cũng có tốc độ sinh trưởng đặc trưng cao nhất ( $\mu = 0,124/\text{ngày}$ ) và mật độ tế bào đạt  $28 \times 10^6$  tế bào/mL cao hơn so với các nhiệt độ khác. Do vậy, nhiệt độ  $30^\circ\text{C}$  là nhiệt độ tối ưu đã được chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

#### - Ảnh hưởng của cường độ ánh sáng

Kết quả trình bày ở Hình 3D đã cho thấy sau 20 ngày nuôi cấy, sinh trưởng của chủng NT12 đạt cao nhất với mật độ tế bào đạt  $29,8 \times 10^6$  tế bào/mL ở cường độ ánh sáng  $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ . Sự sai khác về sinh trưởng của chủng NT12 ở  $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  so với các cường độ ánh sáng  $200$ ,  $300$  và  $400 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  sau 30 ngày nuôi có ý nghĩa thống kê ( $P < 0,05$ ). Tuy nhiên, không có sự sai khác giữa cường độ chiếu sáng  $60$ ,  $100$

và  $140 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  ( $P > 0,05$ ). Hơn nữa, tốc độ sinh trưởng đặc trưng của chủng NT12 lại đạt cao nhất tại  $60 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  sau 14 ngày nuôi (với giá trị  $\mu = 0,127/\text{ngày}$ ). Do vậy, chúng tôi chọn cường độ ánh sáng thích hợp là  $60 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  cho sinh trưởng của chủng NT12 cho các thí nghiệm tiếp theo.

#### - Ảnh hưởng của nồng độ muối

Ảnh hưởng của môi trường có nồng độ muối khác nhau (từ 10 đến 60‰) lên sinh trưởng của chủng NT12 được trình bày ở Hình 3E. Chủng NT12 đã thể hiện khả năng thích nghi với nồng độ muối rất rộng. Sau 30 ngày nuôi cấy, chủng NT12 sinh trưởng tốt nhất ở nồng độ muối 30‰, tiếp theo là 40‰, 20‰, 50‰, 60‰ và thấp nhất ở 10‰ với mật độ tế bào ở các nồng độ muối này tuần tự là  $30,1 \times 10^6$ ,  $29,3 \times 10^6$ ,  $24,3 \times 10^6$ ,  $23,8 \times 10^6$ ,  $16,2 \times 10^6$  và  $13,1 \times 10^6$  tế bào/mL. Sự khác nhau về sinh trưởng của chủng NT12 ở nồng độ muối 30‰ và 40‰ là không có ý nghĩa thống kê ( $P > 0,05$ ). Tuy nhiên, ở nồng độ muối  $<20‰$  và  $>50‰$ , sự sai khác có ý nghĩa thống kê sinh học ( $P < 0,05$ ) so với nồng độ muối còn lại. Vì vậy, nồng độ muối 30‰ đã được chọn cho các thí nghiệm tiếp theo. Kết quả này cũng phù hợp với công bố của Saadaoui và đồng tác giả (2016) khi cho thấy chủng *Nannochloris* sp. có khả năng chịu được độ mặn rộng lên tới 60 ‰.

#### - Ảnh hưởng của pH

Kết quả trình bày ở Hình 3F cho thấy không có sự khác biệt về ảnh hưởng của pH từ 7 đến 9 lên sinh trưởng của chủng NT12 ( $P > 0,05$ ) và pH tối ưu cho sinh trưởng của chủng này là pH 7. Ngoài ra, kết quả nghiên cứu cho thấy pH  $> 10$  và pH  $< 5$  đã ảnh hưởng đến sinh trưởng của chủng này. Trong môi trường có độ acid cao (pH 3) hoặc độ kiềm cao (pH 11), chủng NT12 không thích nghi được nên sinh trưởng của chúng đã bị ức chế và dừng lại sau vài ngày nuôi cấy. Như vậy, giá trị pH thích hợp cho sinh trưởng của chủng NT12 là pH trung tính (pH 7) đã được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

Như vậy, trong điều kiện phòng thí nghiệm, chủng NT12 sinh trưởng tốt nhất ở môi trường Erd, nhiệt độ  $30^\circ\text{C}$ , cường độ ánh sáng 100

$\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ , pH 7, nồng độ muối 30‰ và mật độ tế bào gieo ban đầu là  $3 \times 10^6$  tế bào/mL. Chúng tôi nhận thấy rằng các giá trị tối ưu về nhiệt độ, pH và độ mặn không có sự khác biệt so với các thông số lý hóa tại vùng biển Nha Trang nơi phân lập chủng NT12. Điều này có nghĩa rằng các đặc điểm sinh học của chủng tảo gốc vẫn được duy trì ổn định sau một thời gian dài lưu giữ, bảo quản giống. Tuy nhiên, cường độ ánh sáng thích hợp cho sinh trưởng của chủng *N. atomus* NT12 dưới điều kiện phòng thí nghiệm có thấp hơn so với điều kiện tại nơi thu mẫu. Đây có thể là do quá trình thích nghi của chủng tảo trong quá trình lưu giữ mẫu dưới điều kiện ánh sáng yếu trong thời gian dài.

Trên cơ sở kết quả lựa chọn được về điều kiện nuôi cấy thích hợp cho sự phát triển của chủng NT12 trong bình tam giác 250 mL ở trên, việc nuôi cấy chủng này ở quy mô lớn hơn, từ hệ thống nuôi hở trong bình nhựa 10 L đến các hệ thống kín bề phản ứng quang sinh dạng ống kín có dung tích 20 và 50 L cũng đã được tiến hành. Kết quả chi tiết được trình bày trong Hình 4 đã cho thấy mật độ tế bào của chủng NT12 phụ thuộc vào hệ thống nuôi cấy và giá trị mật độ tế bào tảo đạt được trong hệ thống kín cao hơn hệ thống hở ở cùng thời điểm nuôi cấy. Giá trị mật độ tế bào tảo cực đại đạt được lần lượt là  $21,4 \times 10^6$ ;  $25,06 \times 10^6$  và  $30,5 \times 10^6$  tế bào/mL, tương ứng với cấp độ bình nhựa 10 L, hệ thống kín 20 và 50 L sau 20 ngày nuôi cấy. Tốc độ sinh trưởng đặc trưng  $\mu$  của chủng NT12 ở các cấp độ nuôi này đạt lần lượt là 0,097/ngày, 0,106/ngày và 0,113/ngày. Không có sự khác biệt về thời gian tế bào tảo đạt cực đại giữa các cấp độ nuôi khác nhau. Năng suất sinh khối tảo tươi cũng đạt cao nhất ở hệ thống nuôi kín 50 L, tiếp đó là hệ thống nuôi kín 20 L và cuối cùng là bình nhựa 10 L, với giá trị đạt tương ứng là 209, 185 và 145 mg/L/ngày. Kết quả này tương đồng với công bố của Bounnit và đồng tác giả (2020) khi nuôi tảo *N. atomus* trong bề phản ứng quang sinh 1 L ở nhiệt độ  $30^\circ\text{C}$ , năng suất sinh khối tảo đạt 195 mg/L/ngày. Tuy nhiên, mật độ tế bào cực đại đạt được trong nghiên cứu này là thấp hơn nhiều so với các công bố của Robert (1998) khi nuôi cấy chủng *N. atomus* trong bình



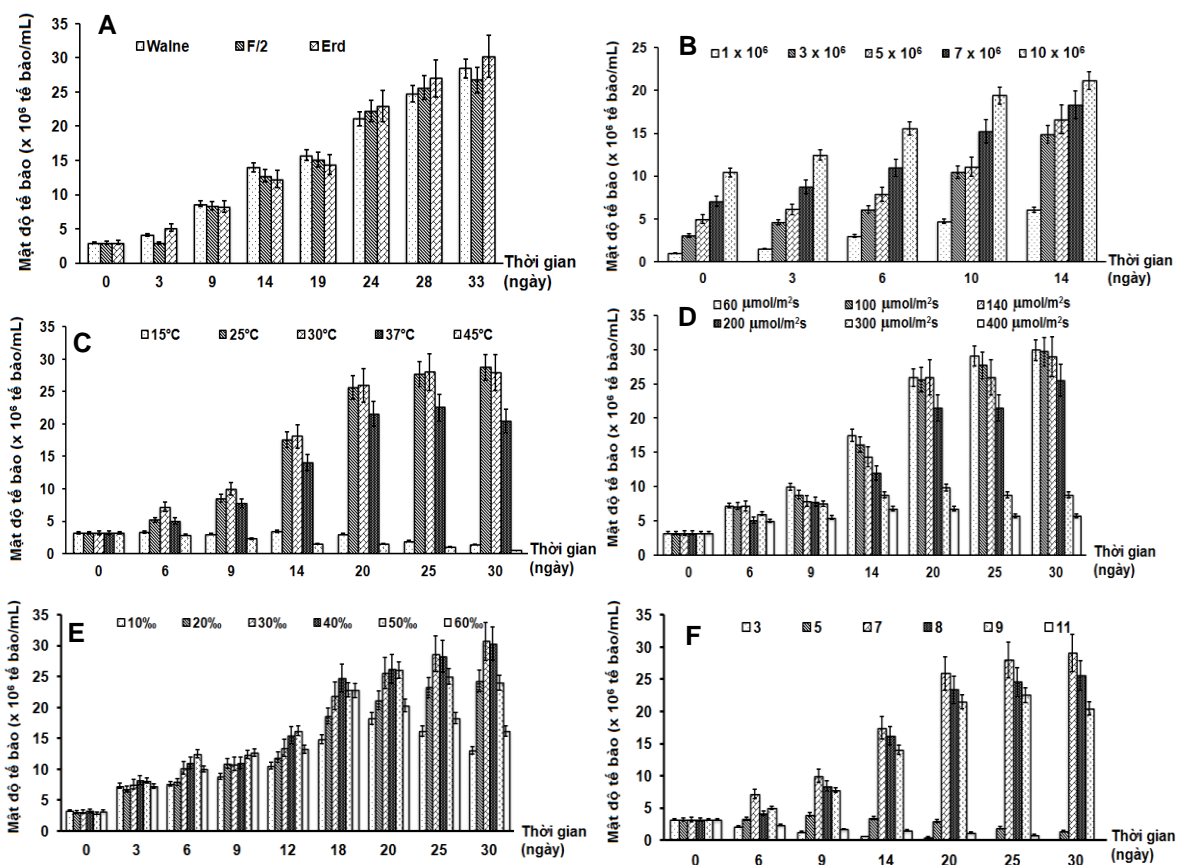
5 L, mật độ tế bào có thể đạt  $24 \times 10^7$  tế bào/mL sau 30 ngày nuôi. Dogaris và đồng tác giả (2015) cũng đã công bố về nuôi chủng *N. atomus* Butcher CCAP 251/4A trong hệ thống bể phản ứng quang sinh học nằm ngang nội (HBR) có dung tích 65 L, mật độ tế bào tối đa đạt được là  $1,05 \times 10^8$  tế bào/mL. Điều này có thể do sự khác biệt về đặc điểm di truyền của chủng tảo được lựa chọn và điều kiện nuôi cấy khác nhau.

Như vậy, mật độ tế bào cực đại của vi tảo *N. atomus* trong hệ thống nuôi kín và hở là tương tự như trong bình tam giác. Tuy nhiên, thời gian tảo đạt cực đại trong các hệ thống nuôi này giảm

30% so với thời gian nuôi trong bình tam giác. Kết quả của nghiên cứu này là cơ sở khoa học cho nhân nuôi sinh khối tảo *N. atomus* NT12 trên quy mô lớn đạt năng suất cao nhằm cung cấp sinh khối cho tách chiết các chất có hoạt tính sinh học ở Việt Nam.

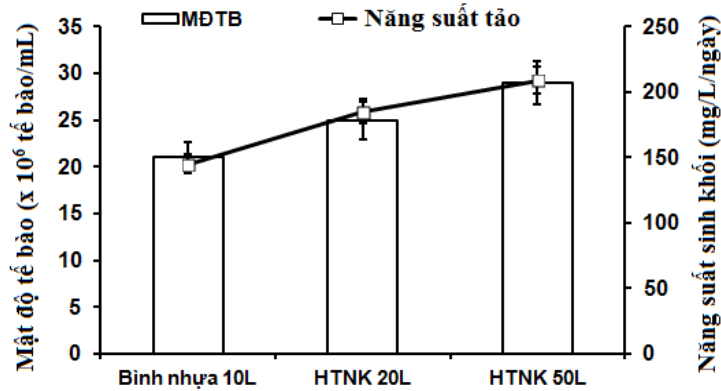
### Thành phần acid béo trong sinh khối của chủng *N. atomus* NT12 trong HTNK 50L

Sau 20 ngày nuôi trong HTNK 50 L, sinh khối chủng NT12 được thu ở pha cân bằng sớm và xác định hàm lượng lipid và phân tích thành phần acid béo (Bảng 1).



**Hình 3.** Sinh trưởng của vi tảo biển *N. atomus* NT12 dưới các điều kiện nuôi khác nhau A: Môi trường dinh dưỡng; B: Mật độ tế bào ban đầu; C: Nhiệt độ; D: Cường độ chiếu sáng; E: Nồng độ muối; F: pH môi trường





Hình 4. Sinh trưởng của chủng *N. atomus* NT12 ở các cấp độ nuôi khác nhau.

Bảng 1. Thành phần và hàm lượng các acid béo của chủng *N. atomus* NT12 nuôi trong HTNK 50 L.

Acid béo	Tên khoa học	Hàm lượng acid béo (%acid béo tổng số - TFA)
C14:0	Myristic acid	1,02 ± 0,08
C14:1 $\omega$ -5		0,05 ± 0,01
<b>C16:0</b>	<b>Palmitic acid</b>	<b>30,65 ± 2,03</b>
C16:1 $\omega$ -7	Palmitoleic acid	2,67 ± 1,11
C18:0	Stearic acid	4,83 ± 0,35
<b>C18:1<math>\omega</math>-9</b>	<b>Oleic acid</b>	<b>30,12 ± 2,01</b>
C18:2	Methyl linolenate acid	9,24 ± 0,04
C18:2 $\omega$ -6	$\alpha$ -Linoleic acid	10,50 ± 0,47
<b>C18:3<math>\omega</math>-3</b>	$\alpha$ -Linolenic -ALA acid	5,65 ± 0,10
C20:0	Methyl arachidate acid	1,93 ± 0,27
C20:1 $\omega$ -7		0,23 ± 0,02
C20:2	Methyl 11, 14 eicosadienoate	0,83 ± 0,03
C20:3		0,08 ± 0,04
C20:4 $\omega$ -6		0,21 ± 0,01
<b>C20:5<math>\omega</math>-3</b>	<b>Eicosapentaenoic acid - EPA</b>	<b>1,08 ± 0,16</b>
C22:0		Vết
C22:6 $\omega$ -3	Docosahexaenoic acid - DHA	0,061 ± 0,003
Khác		0,849
Tổng số acid béo no - SFAs		38,43
Tổng số acid béo không bão hòa có 1 nối đôi -MUFAs		33,07
Tổng số acid béo không bão hòa có nhiều nối đôi -PUFAs		28,50
Lipit tổng số (% sinh khối khô)		24,6 ± 0,21

Ghi chú: - Không phát hiện

Kết quả ở bảng 1 cho thấy hàm lượng lipid tổng số của chủng NT12 là  $24,6 \pm 0,21$  % so với sinh khối khô. Kết quả này cũng tương đồng với công bố của Bounnit và đồng tác giả (2020) khi thông báo về hàm lượng lipid của chủng *N. atomus* QUCCCM31 dao động từ 23 - 28% sinh khối khô khi tảo được nuôi ở nhiệt độ từ 20 - 40°C. Trong sinh khối chủng NT12 chứa chủ yếu các acid béo bão hòa và không bão hòa có 1- 3 nối đôi như palmitic C16:0 ( $30,65 \pm 2,03\%$ ), oleic C18:1n-9 ( $30,12 \pm 2,01\%$ ),  $\alpha$ -linoleic ( $10,50 \pm 0,47\%$ ). Các PUFAs chiếm ưu thế là acid  $\alpha$ -linolenic ALA ( $5,65 \pm 0,10\%$ ), acid eicosapentaenoic EPA ( $1,08 \pm 0,16\%$ ) và một lượng nhỏ acid docosahexaenoic DHA ( $0,061 \pm 0,003\%$ ) so với acid béo tổng số. Dunstan và cộng sự (1992) đã chỉ ra rằng các acid béo chính trong các họ Chlorophyceae là C16:0, C16:1, C16:2, C16:3, C18:2 và C18:3. Kết quả nghiên cứu thu được trong nghiên cứu này cho thấy chủng NT12 cũng chủ yếu giàu các acid béo nêu trên. Hơn nữa, các acid béo  $\omega$ -6 C16:2, C18:2 và  $\omega$ -3 C18:3 cũng có giá trị đối với sức khỏe của con người (Biller, Ross, 2011).

## KẾT LUẬN

Chúng tôi đã định tên khoa học được chủng *Nannochloris* sp. NT12 phân lập tại vùng biển Nha Trang, Khánh Hòa, Việt Nam (năm 2009) thuộc về loài *Nannochloris atomus* NT12 dựa trên cơ sở đặc điểm hình thái tế bào và so sánh trình tự gen 18S rRNA. Chủng này có khả năng sinh trưởng tốt ở cả quy mô phòng thí nghiệm và pilot, với mật độ tế bào đạt cao nhất là  $30 \times 10^6$  tế bào/mL sau 30 ngày nuôi cấy ở bình tam giác 250 mL và 20 ngày nuôi ở hệ thống nuôi kín 50 L. Sinh khối tảo này có hàm lượng lipid đạt 24,6% sinh khối khô và giàu các acid béo C16, C18 và C20, có tiềm năng cho khai thác các chất có hoạt tính sinh học.

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu này được hỗ trợ kinh phí của đề tài trọng điểm cấp VAST “Nghiên cứu các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học từ một số loài vi tảo biển tại vùng biển khu vực Nam Trung Bộ (vùng biển Khánh Hòa - Bình Thuận)

Việt Nam” mã số TĐDLB0.06/20-22, do GS.TS. Đặng Diễm Hồng làm chủ nhiệm đề tài nhánh.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Andersen RA (2005) *Algal culturing techniques*, 1<sup>st</sup> ed. Elsevier Academic Press, Burlington, 596pp.
- Hoàng Thị Lan Anh, Ngô Thị Hoài Thu, Đặng Diễm Hồng (2010) Định tên một số chủng vi tảo biển phân lập từ vùng biển Hải Phòng và Nha Trang dựa trên hình thái tế bào và phân tích 18S rRNA. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 8(3): 387-396.
- Barkia I, Saari N, Manning A (2019) Microalgae for High-Value Products Towards Human Health and Nutrition. *Mar Drugs* 17(5): 304.
- Biller P, Ross AB (2011) Potential yields and properties of oil from the hydrothermal liquefaction of microalgae with different biochemical content. *J Bioresour Technol* 100: 215-225.
- Bounnit T, Saadaui I, Rasheed R, Schipper K, Muraikhi MA, Jabri HA (2020) Sustainable production of *Nannochloris atomus* biomass towards biodiesel production. *Sustainability* 12, 2008: 1-21.
- Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37(8): 911-917.
- Butcher RW (1952) Contributions to knowledge of the smaller marine algae. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 31: 175-191, 2 pls.
- Chen TY, Lin HY, Lin CC, Lu CK, Chen YM (2012) *Picochloromas* an alternative to *Nannochloropsis* for grouper larval rearing. *Aquaculture* 338: 82-88.
- Chen H, Qiu T, Rong J, He C, Wang Q (2015) Microalgal biofuel revisited: an informatics-based analysis of developments to date and future prospects. *Appl Energy* 155: 585-598
- Cho SH, Ji SC, Hur SB, Bae J, Park IS (2007) Optimum temperature and salinity conditions for growth of green algae *Chlorella ellipsoidea* and *Nannochloris oculata*. *Fisheries Science* 73: 1050-1056.
- Dogaris I, Welch M, Meiser A, Walmsley L, Philippidis G (2015) A novel horizontal photobioreactor for high-density cultivation of microalgae. *Bioresour Technol* 198: 316-324.

- Dunstan GA, Volkman JK, Jeffrey SW, Barrett SM (1992) Biochemical composition of microalgae from the green algal classes Chlorophyceae and Prasinophyceae. 2. Lipid classes and fatty acids. *J Exp Mar Biol Ecol* 161: 115-134.
- Haddad R, Alemzadeh E, Ahmadi A-R, Hosseini R, Moezzi M (2014) Identification of Chlorophyceae based on 18S rDNA sequences from Persian Gulf. *Iran J Microbiol* 6 (6): 437-442.
- Henley WJ, Hironaka JL, Guillou L, Buchheim MA, Buchheim JA, Fawley MW, Fawley KP (2004) *Picochlorum oklahomensis* gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Phycologia* 43: 641-652.
- Đặng Diễm Hồng (chủ biên) (2019) Nuôi trồng vi tảo giàu dinh dưỡng làm thực phẩm chức năng cho người và động vật nuôi ở Việt Nam. Bộ sách chuyên khảo Tài nguyên thiên nhiên và môi trường Việt Nam. Nhà xuất bản Khoa học tự nhiên và Công nghệ. 750 trang.
- Liu Z, Zhang F, Chen F (2013) High throughput screening of CO<sub>2</sub>-tolerating microalgae using GasPak bags. *Aquatic Biosystems* 9: 23.
- Mitra M, Patidar SK, George S, Shah F, Mishara S (2015) A euryhaline *Nannochloropsis gaditana* with potential for nutraceutical (EPA) and biodiesel production. *Algal Res* 8: 161-167.
- Nogueira JMF, Alrokayan SA, Mouffouk F, Khalid M, Abu-Salah KM, Ben -Hamadou R, Varela J (2015) Biological activities and chemical composition of methanolic extracts of selected *Autochthonous* microalgae strains from the red sea. *Mar Drugs* 13(6): 3531-3549.
- Naumann E (1931) Notizen zur systematik der Siisswasser algen. *Arkiv Botan* 16: 16-18.
- Pereira H, Custódio L, Rodrigues MJ, de Sousa CB, Oliveira M, Barreira L, da Rosa Neng N, Robert R (1998) Nutritional inadequacy of *Nannochloris atomus* and *Stichococcus bacillaris* for the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) larvae. *Haliotis* 27: 29-34.
- Roncarati A, Meluzzi A, Acciarri S, Tallarico N, Melotti P (2004) Fatty acid composition of different microalgae strains (*Nannochloropsis* sp., *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd, *Nannochloris atomus* Butcher and *Isochrysis* sp.) according to the culture phase and the carbon dioxide concentration. *J World Aquacult Soc* 35(3): 401-411.
- Saadaoui I.; Al Ghazal G, Bounnit T, Al Khulaifi F, Al Jabri H, Potts M (2016) Evidence of thermo and halotolerant *Nannochloris* isolate suitable for biodiesel production in Qatar Culture Collection of Cyanobacteria and Microalgae. *Algal Res* 14: 39-47.

## STUDY ON BIOLOGICAL CHARACTERISTICS AND BIOMASS PRODUCTION OF THE GREEN MICROALGAE (*NANNOCHLORIS ATOMUS*) ISOLATED FROM VIETNAM FOR THE EXTRACTION OF BIOACTIVE COMPOUNDS

Luu Thi Tam<sup>1</sup>, Ngo Thi Hoai Thu<sup>1</sup>, Nguyen Thi Minh Hang<sup>4</sup>, Chau Van Minh<sup>4</sup>, Dang Diem Hong<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

<sup>2</sup>Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology

<sup>3</sup>ThuyLoi University

<sup>4</sup>Institute of Marine Biochemistry, Vietnam Academy of Science and Technology

### SUMMARY

Microalgae are known to be a nutrient-rich feed source for many aquatic animals. It is also an important raw material source to exploit high biological activity substances for humans. This is the first study on biological characteristics and algae biomass production from the green microalgae *Nannochloris atomus* being carried out in Vietnam. In this study, scientific name of the strain *N. atomus* NT12 based on morphological characteristics and 18S rRNA gene sequence (with accession number MW007766 on the GenBank) was identified. At the best conditions for the growth (i.e. Walne medium, 3 x 10<sup>6</sup> cells/mL initial cell density, 25 -30°C growth temperature, 60 - 100 µmol/m<sup>2</sup>s light

intensity, pH 7, 30‰ salinity), highest NT12 strain cell density of  $30 \times 10^6$  cells/mL was obtained after 30 days of culture. The microalgae *N. atomus* NT12 was also successfully cultured on a pilot scale in the plastic bottle 10 L and closed photobioreactors 20 – 50 L resulting in a high biomass productivity of 209 mg/L/day and a biomass rich in polyunsaturated fatty acids such as oleic acid (C18:1n-9), linoleic acid (C18:2n-6) and  $\alpha$ -linolenic acid (C18:3n-3) qualified for the purpose of extraction of value bioactive compounds.

**Keywords:** *polyunsaturated fatty acids, Nannochloris atomus, biological activity, biomass, microalgae*