

FARKLI TUZLULUK VE IŞIK ŞİDDETİNİN *PORPHYRIDIDIUM CRUENTUM*'UN BÜYÜMESİNE ETKİSİ

EFFECT OF DIFFERENT SALINITY AND LIGHT INTENSITY ON THE GROWTH OF *PORPHYRIDIDIUM CRUENTUM*

Doç. Dr. Leyla USLU 

Çukurova Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Temel Bilimler Bölümü, Deniz Biyolojisi Anabilim Dalı,
Balcalı Kampüsü, Adana, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 27.09.2021
Kabul Tarihi / Accepted: 19.11.2021

Araştırma Makalesi/Research Article
DOI: 10.38065/euroasiaorg.760

ÖZET

Çalışmada *Porphyrididium cruentum* kırmızı alg türü laboratuvar koşullarında $20\pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklıkta, 16:8 fotoperiyot ve sürekli havalandırma yapılarak farklı tuzluluk (%20, 30, 40) ve iki farklı ışık şiddetinde (37 ve $110 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) kültüre alınmış ve büyümesi belirlenmiştir. Büyümeyi belirlemek için kuru madde, optik yoğunluk ve klorofil *a* parametreleri kullanılmıştır. Büyüme en iyi $110 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ photon ışık şiddetinde, %30 tuzluluğa sahip kültürde belirlenmiştir. Bu grupta son gün optik yoğunluk (OD) 1.504 ± 0.003 ve kuru madde miktarı 1.327 gl^{-1} olarak belirlenmiştir. $37 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ photon ışık şiddetinde ise %30 ve %50 tuzluluğa sahip gruplarda optik yoğunluk değerleri benzer bulunmuş ve sırasıyla 1.234 ± 0.004 ve 1.215 ± 0.002 olarak tespit edilmiştir. Kuru madde miktarları da benzerlik göstermiş olup; sırasıyla 1.168 gl^{-1} ve 1.159 gl^{-1} olarak belirlenmiştir. Klorofil *a* miktarı ise en iyi $37 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ photon ışık şiddetinde kültüre alınan gruplarda belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Porphyrididium cruentum*, tuzluluk, ışık yoğunluğu, büyüme

ABSTRACT

In the study, *Porphyrididium cruentum* was cultured under laboratory conditions at $20\pm 2^\circ\text{C}$, 16:8 (light:dark) photoperiod and continuous aeration to different salinity (20‰, 30‰, 40‰) and two different light intensities ($37 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ photon and $110 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ photon) and growth was determined. Dry matter, optical density and chlorophyll *a* parameter were used to determine growth. The best growth was determined in culture with a salinity of 30‰ at $110 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ photon light intensity. In this group, the optical density (OD) was 1.504 ± 0.003 and the dry matter amount was 1.327 gl^{-1} . In the case of $37 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ photon light intensity, the optical density values were found to be similar in groups with 30‰ and 50‰ salinity and were found to be 1.234 ± 0.004 and 1.215 ± 0.002 , respectively. The amounts of dry matter were also similar; 1.168 gl^{-1} and 1.159 gl^{-1} , respectively. While the lowest growth was in the culture at $37 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ photon light intensity and 20‰ salinity. The optical density obtained on the last day of this group was 1.165 ± 0.004 and the dry matter amount was determined as 0.986 gl^{-1} . The amount of chlorophyll *a* was determined in the cultured groups at the best $37 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ photon light intensity.

Keywords: *Porphyrididium cruentum*, salinity, light intensity, growth

1.GİRİŞ

Son yıllarda mikroalg biyoteknolojiye olan ilginin artması, mikroalglerin hücre içerisinde biriktirdiği bazı değerli metabolitlerinden kaynaklanmaktadır. Algler, uzun yıllar boyunca birçok farklı alanda kullanılmıştır. Algler, hücre proteinleri, vitaminler, yağ asitleri, karbonhidratlar, mineraller ve pigmentler, hidrokarbonlar, polisakkaritler, antibiyotikler ve daha birçok metaboliti hücre içinde biriktirirler. Bu metabolitler çeşitli amaçlar için, başlıca gıda takviyesi olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle II. Dünya Savaşından sonra Amerika, Japonya, İngiltere, Almanya ve Norveç gibi gelişmiş ülkelerde mikroalglerin besinsel zenginliğinden yararlanmaya başlanmıştır

(Becker, 1994). Algler, güneş enerjisini en etkili şekilde kullanan canlı sistemlerdir. Bu nedenle, mikroalg üretim teknolojisi, farklı mikroalg türlerin beslenme bileşenlerini incelemeye giderek daha fazla ilgi göstermektedir. Alg kültürü çalışmalarında temel amaç, biyokütleyi en verimli şekilde üretmektir. Alg biyoteknolojisindeki gelişmelere rağmen, mikroalgleri üretiminde bazı zorluklar ile karşılaşmaktadır. Mikroalgenin biyokimyasal bileşimi, çevresel faktörler, besin ortamı, sıcaklık, tuzluluk, pH, ışık gibi büyüme faktörlerine bağlıdır (Sukenic, 1991). Mikroalglerden elde edilen hücre metabolitleri çoğunlukla durağan fazda üretilir (Eitinger ve Schlegel, 1985). *Porphyridium cruentum* kuru ağırlığının %28-39'u protein, %40-57'si karbonhidrat ve %9-14'ü lipittir. Aynı zamanda büyük miktarlarda tokoferol, K vitamini ve karotenoid içerir (Becker, 1994). Hücrelerin karakteristik kırmızı rengi, içerdikleri fikoeritrin kaynaklıdır (Gantt, 1981). Sınırlayıcı koşullar altında, kültür viskoz bir yapıyı alır ve polisakkaritleri üretmeye başlar (Ramus ve ark., 1989). *P. cruentum* (Rhodophyta) tek hücreli ve musilaj bir yapıdır (Vonshak, 1988). *P. cruentum* hücreleri yüksek seviyelerde şeker içerir (Singh ve ark., 2000; Vonshak, 1988). Bu şekerler, özellikle durağan fazda ve azot sınırlandırıldığında daha yüksek miktarlarda üretilir (Ramus ve Groves, 1972). Son yıllarda, *P. cruentum* dış ortam koşullarında tüp şeklinde fotobiyoreaktörler, havuzlar ve düz panellerde üretimi denenmiştir. Çalışmada *P. cruentum* laboratuvar koşullarında 20±2°C, 16:8 (aydınlık: karanlık) fotoperiyotta ve farklı tuzluluk (20‰, 30‰, 40‰) ve iki farklı ışık şiddeti (37 µmol m⁻²s⁻¹ photon ve 110 µmol m⁻²s⁻¹ photon) sürekli havalandırma yapılarak kültüre alındı ve büyüme belirlendi.

2.MATERYAL ve METOD

Rhodellophyceae sınıfına ait, *Porphyridium cruentum* denizlerde bulunan tek hücreli kırmızı alglerdendir. 4-9 µm çapında küresel hücrelere sahip olan *P. cruentum*'da hücre duvarı yoktur. Hücreler tek başına ya da yığın bir şekilde düzensiz koloniler oluşturarak musilaj bir kılıfın içinde bulunurlar (Vonshak, 1988). Mikroalg hücre metabolitleri daha çok dinlenme fazında üretilir (Eitinger ve Schlegel, 1985). Bu metabolitler organik asitler, karbohidrat, aminoasit, pestisit, vitamin, organik madde, antibiyotik, enzim ve toksik bileşenlerdir. *P. cruentum*'un kuru ağırlığının yaklaşık %28-39'unu protein, %40-57'sini karbohidrat ve %9-14'ünü de toplam toplam yağ oluşturur. Ayrıca tocopherol, K vitamini ve büyük miktarda da karotenoid içermektedir (Becker, 1994). Hücrelerin karakteristik kırmızı rengi içermiş olduğu fikoeritrinden kaynaklanmaktadır (Gantt, 1981). Sınırlayıcı koşullar altında kültür viskoz bir yapı alır ve polisakkarit üretmeye başlar (Ramus ve ark., 1989). Denemede, *P. cruentum* için F/2 (Guillard, 1973) kültür ortamı kullanılmıştır. Kültür ortamının içeriği (Tablo 2.1 ve Tablo 2.2) verilmiştir. Denemede kullanılan deniz suyunun tuzluluğu (Orion 3 Star) ‰20, ‰30 ve ‰50 olacak şekilde ayarlanmıştır. F/2 kültür ortamını hazırlamak için kullanılan deniz suyu, 0.45 µm göz açıklığına sahip GF/C (Whatman 0.45 µm) filtre kağıdından süzüldü. Kültür ortamının pH değeri 8'e ayarlanmıştır. Deneme kurulmadan önce kültür ortamı otoklavda (Hirayama-HV-50L) 30 dakika 121°C'de sterilize edilmiştir. Denemeler 2L erlenlerde ve 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Tablo 2.1. F/2 Kültür Ortamı (Guillard, (1973)'ten)

Miktar	Eklene Madde	Stok Solüsyon	Molar Konsantrasyon
1ml ⁻¹	NaNO ₃	75gl ⁻¹	882µmolL ⁻¹
1ml ⁻¹	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	5gl ⁻¹	363µmolL ⁻¹
1ml ⁻¹	f/2 metal solüsyonu	Tablo. 2	

Tablo 2.2. F/2 Metal Solüsyonu

FeCl ₃ ·6H ₂ O	3.15g
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	4.36g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0098g
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.0063g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.022g
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.01g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.18g

Optik yoğunluk için 5 mL ve klorofil a analizi için 5 mL örnek alınmıştır. Optik yoğunluk *P. cruentum* için 680 nm (Kusmiyati, 2007) dalga boyunda visible spektrofotometre (Shimadzu, UV mini 1240) ile değerlendirilmiştir. Klorofil analizi için alınan 5mL'lik örnek su trombu yardımı ile GFC filtre kağıdından süzölmüş ve 15 mL'lik deney tüplerine konmuştur. Üzerine 10 mL %90'lık aseton ilavesi yapılmıştır. Asiditenin artması ve pigmentin zarar görmesini önlemek amacıyla filtre sırasında 2 damla %1'lik MgCO₃ eklenmiştir. Ağzuları mantar tıpa ile kapatılan deney tüpleri çalkalandıktan sonra buzdolabında (+4 °C) 24 saat karanlıkta bırakılmış ve ekstraksiyon süresi sonunda üstteki berrak kısım alınarak visible spektrofotometrede 630, 645, 665 ve 750 nm'de absorpsiyon değerleri ölçölmüştür. 750 nm'de okunan değerler bulanıklık düzeltme faktörü olarak kullanılmıştır. Bu amaçla 750 nm'de okunan absorbans değerleri diğer dalga boylarında okunan değerlerden çıkartılmış ve klorofil a konsantrasyonları aşağıdaki eşitlikler kullanılarak hesaplanmıştır (Parsons ve Strickland, 1963).

$$\text{Klorofil } a = 11.6 \times D_{665} - 1.31 \times D_{645} - 0.14 \times D_{630}$$

$$\mu\text{gl}^{-1} = C \times \frac{v}{1} \times V$$

C= Birinci eşitlikte hesaplanan klorofil miktarı

V= filtre edilen su örneği (l)

v= kullanılan asetonun hacmi (ml)

l= küvetten geçen ışık yolu (cm)

Denemenin başladığı günden itibaren her gün kuru madde (kuru biyomas) analizi için 20 mL örnek alınmıştır. Biyomas miktarlarının saptanması için, 0.45 µ göz açıklığındaki “glass fibre” filtre kağıtları (GFC), süzme düzeneği ve bir su trombu kullanılarak oluşturulan vakum yardımıyla hücreler ortamdan ayrılarak yoğunlaştırılmıştır. Filtre kağıtları etüvde (Medcenter, Venticell 111) 105° C'de 1 saat tutulduktan ve desikatörde soğutulduktan sonra, 0.001 g duyarlı terazide (Denver, TP214) ağırlıkları alınmıştır. Yoğunlaştırılmış biyomas etüvde 105o C'de 2 saat tutulmuştur. Bu süre filtre kağıtları desikatöre konularak, oda sıcaklığına kadar soğumaları sağlanmış ve daha sonra 0.001 g duyarlı terazide tartımları yapılarak kuru madde miktarı hesaplanmıştır (Boussiba ve ark., 1992). Denemenin sona ermesi sırasında kuru madde analizi, optik yoğunluk ve klorofil a analizi için örnekler alınmıştır. Deneme sonunda geriye kalan kültürlerin tamamı 7500 rpm dönme hızındaki soğutmalı santrifüj (Heraeus, Suprafuge 22) yardımıyla 10 dakika boyunca hasat edilmiştir. Elde edilen biyomas 55°C de kurutularak protein ve toplam yağ analizi için - 21°C'de

saklanmıştır. Protein analizi Kjeldahl yöntemine göre yapılmıştır (AOAC, 1995). Toplam yağ değerleri % kuru biyomas oranına göre hesaplanmıştır. Toplam yağ analizi Bligh ve Dyer (1959)'in uyguladığı yöntemine göre yapılmıştır. 0.2 g homojenize edilmiş örnek, üzerine 120 ml metanol/kloroform (1/2) eklendikten sonra Waring blender ile karıştırılmıştır. Daha sonra bu örnekler üzerine 20 ml %0.4'lük CaCl₂ solüsyonundan eklenerek süzme kâğıdından (Scheicher&Schuell, 5951/2 185 mm) süzülen örnekler, 105 °C'de 2 saat etüvde bekletilip darası alınmış olan balon jöjelere süzdürülmüştür. Bu balonlar ağızları hava almayacak şekilde kapatılıp, 1 gece karanlık bir ortamda bekletilmiş ve ertesi gün metanolsudan oluşan üst tabaka bir ayırma hunisi yardımıyla alınmıştır. Balonların içinde kalan kloroform-toplam yağ kısmından kloroform +60°C'de su banyosunda rotary evaporatör kullanılarak uçurulmuştur. Daha sonra balonlar etüvde 1 saat süreyle 60°C'de bekletilerek içerisindeki kloroformun tamamının uçması sağlanmış ve bir desikatör içerisinde oda sıcaklığına kadar soğutulup 0.001 g duyarlı hassas terazide tartılmıştır. Toplam yağ oranının hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\text{Toplam yağ \%} = \frac{(\text{balon darası} + \text{toplam yağ}) - (\text{balon darası})}{\text{örnek miktarı}} \times 100$$

İstatistiksel analiz Kültürün tuzluluk ve ışık yoğunluklarının lipit, protein, optik yoğunluk, klorofil ve kuru ağırlık üzerine etkilerini test etmek için iki yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. İki yönlü ANOVA'da farklılıklar bulunduğu, tek yönlü ANOVA'nın Duncan çoklu karşılaştırma testi (HSD), (SPSS) (Sürüm 12.0, SPSS, Chicago, IL) kullanıldı.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

Çalışmada 20±2°C, 16: 8 (aydınlık: karanlık) fotoperiyotta ve farklı tuzluluk (20 ‰, 30 ‰, 40 ‰) ve iki farklı ışık şiddetinde (37 µmolm⁻² s⁻¹ photon ve 110 µmolm⁻² s⁻¹ photon), sürekli havalandırma yapılarak *P. cruentum* laboratuvar koşullarında kültüre alındı ve büyüme belirlendi. 37 µmolm⁻² s⁻¹ photon ışık şiddetinde ve farklı tuzluluklarda *P. cruentum*'un biyokütle, optik yoğunluk, klorofil a, protein ve lipid içerikleri Tablo 3.3.'de özetlenmiştir.

Tablo 3.3. 37 µmolm⁻²s⁻¹photon ışık şiddetinde ve farklı tuzluluklarda *P. cruentum*'un biyokütle, optik yoğunluk, klorofil a, protein ve lipid içerikleri

	Biomass (gl-1)	Optical density	Chl-a (µgL-1)	Lipid (%)	Protein (%)
20‰ salinity	0.986±0.1 ^b	1.165±0.2 ^b	322.5±2 ^a	6.35±0.2 ^c	31.6±0.4 ^a
30‰ salinity	1.168±0.2 ^a	1.234±0.3 ^a	253.5±2 ^b	8.02±0.4 ^b	30.1±0.3 ^b
50‰ salinity	1.159±0.2 ^a	1.215±0.2 ^a	210.5±3 ^b	10.07±0.2 ^a	28.65±0.2 ^c

^{a, b, c} harfleriyle sembolize edilen satırlar ortalamaları arasında istatistiksel olarak fark vardır (p<0.05).

Tablo 4.4'de, 110 µmolm⁻²s⁻¹photon ışık şiddetinde ve farklı tuzluluklarda *P. cruentum*'un biyokütle, optik yoğunluk, klorofil a, protein ve lipid içerikleri özetlenmiştir.

Tablo 4.4. 110 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ photon ışık şiddetinde *P. cruentum*'un biyokütle, optik yoğunluk, klorofil a, protein ve lipid içerikleri ve farklı tuzluluk.

	Biomass (g^{-1})	Optik yoğunluk	Chl-a (μg^{-1})	Lipid (%)	Protein (%)
20% salinity	1.201±0.4 ^b	1.431±0.3 ^b	102.6±2 ^b	6.02±0.4 ^b	30.15±0.1 ^a
30% salinity	1.327±0.2 ^a	1.504±0.4 ^a	119.5±5 ^a	10.28±0.3 ^a	28.13±0.3 ^b
50% salinity	1.112±0.1 ^c	1.403±0.2 ^c	108.2±02 ^b	11.16±0.5 ^a	27.83±0.3 ^b

^{a, b, c} harfleriyle sembolize edilen satırlar ortalamaları arasında istatistiksel olarak fark vardır ($p < 0.05$).

En iyi büyüme, 110 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ photon ışık yoğunluğunda %30 tuzluluk olan kültürde belirlenmiştir. Bu grupta optik yoğunluk (OD) 1.504 ± 0.4 ve kuru madde miktarı 1.327 gL^{-1} olarak belirlendi. 37 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ photon ışık yoğunluğundaki kültürlerde optik yoğunluk değerleri 30 % ve 50 % tuzluluğa sahip gruplarda benzer bulunmuştur ve sırasıyla 1.234 ± 0.3 ve 1.215 ± 0.2 olarak bulunmuştur. Bu grupların biyokütle miktarları da benzer bulunmuş olup; sırasıyla 1.168 gL^{-1} ve 1.159 gL^{-1} olarak belirlenmiştir.

En düşük büyüme 37 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ photon ışık yoğunluğunda ve %20 tuzluluğunda kültürde elde edilirken, bu grubun son gününde elde edilen optik yoğunluk 1.165 ± 0.2 ve biyokütle miktarı 0.986 gL^{-1} olarak belirlendi. Klorofil a miktarı deneme gruplarında en iyi 37 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ photon ışık yoğunluğunda ve 20 % tuzlulukta $322.5 \mu\text{g}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. En yüksek lipid kültürde $110 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ photon ışık yoğunluğunda ve 50 % tuzlulukta % 11.16 olarak bulunmuştur. En yüksek lipid elde edilen bu gruptaki en düşük protein miktarı % 27.83 ile elde edilmiştir. En yüksek protein %31.6 oranı ile 37 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ photon ışık yoğunluğunda ve %20 tuzluluğa sahip kültür grubunda bulunmuştur.

Algal biyoteknolojideki gelişmelere rağmen mikroalg türlerinin kültürlerinde çeşitli güçlüklerle karşılaşmaktadır. Fototrofik organizmaların üretimindeki temel amaç genelde optimal hücre yoğunluğunda sürekli bir kültür sağlamaktır. Bir alg türünün dış ortamda sürdürülen kültürü sırasında, çeşitli çevresel faktörler hem günlük hem de mevsimsel olarak büyük değişimler gösterdiği için, kültürdeki hücrelerin bu koşullara sürekli tepki göstermesi gerektirir. Biyomasın biyokimyasal kompozisyonuna, çevresel faktörler, besin ortamı, sıcaklık, tuzluluk, pH, ışık gibi büyüme koşullarına bağlıdır (Sukenic, 1991). Besi ortamında aşırı tuzluluk stresi fotosentezi inhibe eder bu da biyokütleyi azaltır (Martinez-Roldan ve ark., 2014). Ancak bazı mikroalg türlerinde lipid ve biyokütlenin üretimini artırabilir (Minhas ve ark., 2016). Ben-Amotz ve ark., (1987) bildirdiğine göre bazı alg türlerinde yüksek tuzlulukta kül ve lipid içeriğinde artışlar gözlemlendiğini ve Fabregas ve ark., (1985), bazı alg türlerinde tuzluluğun artmasıyla protein içeriğinde azalma gözlemlenmiştir. Gu ve ark., (2012) yaptıkları çalışmada farklı tuzluluklarda kültüre alınan *Nannochloropsis*'de tuzluluğun %35 olduğu kültürde lipid miktarının en yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada da tuzluluk arttıkça lipid miktarı artmış ve biyokütle miktarında kontrol grubuna göre azalma olmuştur. Aynı zamanda tuzluluk artışı ile protein miktarında düşüşler gözlenmiştir. Lu ve ark. (2020) yaptıkları tuzluluk çalışmasında, *P. purpureum*'da yüksek ve düşük tuzluluğun büyüme yavaşlattığı, en iyi büyümenin %34 tuzlulukta olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da en iyi büyüme %30 tuzlukta olmuştur ve sonuçlar benzer bulunmuştur. Yüksek ışık şiddetinde bazı alglerde büyüme yavaşlayabilir. Aynı zamanda klorofil miktarında azalmalara sebep olabilir. Levy ve Gantt (1988) yaptığı çalışmada da

Porphyridium yüksek ışık yoğunluğunda klorofil miktarını azaltmıştır. Bizim çalışmamızda da yüksek ışığın klorofil miktarında azalmaya neden olduğu bulunmuştur.

Porphyridium cruentum'un kuru ağırlığının yaklaşık %28-39'unu protein, %40-57'sini karbohidrat ve %9-14'ünü de lipid oluşturur. (Becker, 1994). Protein ve lipid üretimi açısından baktığımızda ise iyi bir protein kaynağı iken, lipid miktarı oldukça düşük bir türdür.

Algal biyoteknoloji alanında ilk çalışmalar genelde protein içeriği yüksek ve kolay kültüre edilebilen türler ile gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte protein dışında değerli diğer metabolitleri üreten alglerin keşfedilmesine de devam edilmiştir. Hücre içinde biriktirmiş metabolitleri nedeniyle *Porphyridium cruentum* mikroalgal biyoteknoloji alanında önemli türlerden biridir. Çalışma alanı çok geniş olan bu sektörde, ekonomik anlamda değerli türlerin ticari boyutlarda çalışılması, yeni türlerin keşfedilmesi ve bunların uygulanabilirliğinin belirlenmesi algal biyoteknoloji konusunun ülkemizde gelişmesine yardımcı olacaktır.

KAYNAKÇA

- AOAC (1995). Official methods of analysis (16th ed.). Washington, DC, USA; Association of Official Analytical Chemists.
- Becker, E. W. (1994). *Microalgae: biotechnology and microbiology* (Vol. 10). Cambridge University Press.
- Ben-Amotz, A., Fishler, R., & Schneller, A. (1987). Chemical composition of dietary species of marine unicellular algae and rotifers with emphasis on fatty acids. *Marine biology*, 95(1), 31-36.
- Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959). A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can.J.Biochem.Physiol.*, 37:911-917.
- Boussiba, S., Fan, L., & Vonshak, A. (1992). [36] Enhancement and determination of astaxanthin accumulation in green alga *Haematococcus pluvialis*. *Methods in enzymology*, 213, 386-391.
- Eitinger, T., & Schlegel, H. G. (2007). *Allgemeine mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag.
- Fabregas, J., Herrero, C., Abalde, J., & Cabezas, B. (1985). Growth, chlorophyll a and protein of the marine microalga *Isochrysis galbana* in batch cultures with different salinities and high nutrient concentrations. *Aquaculture*, 50(1-2), 1-11.
- Gantt, E. (1981). Phycobilisomes. *Annual Review of Plant Physiology*, 32(1), 327-347.
- Gu, N., Lin, Q., Li, G., Tan, Y., Huang, L., & Lin, J. (2012). Effect of salinity on growth, biochemical composition, and lipid productivity of *Nannochloropsis oculata* CS 179. *Engineering in life sciences*, 12(6), 631-637.
- Guillard, R. R. (1973). Division rates. *Handbook of phycological methods: culture methods and growth measurements*.
- Kusmıyati, K., & Agustini, N. W. S. (2007). Antibacterial activity assay from *Porphyridium cruentum* microalgae. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 8(1).
- Levy, I., & Gantt, E. (1988). LIGHT ACCLIMATION IN PORPHYRIDIDIUM PURPUREUM (RHODOPHYTA): GROWTH, PHOTOSYNTHESIS, AND PHYCOBILISOMES 1. *Journal of phycology*, 24(4), 452-458.
- Martínez-Roldán, A. J., Perales-Vela, H. V., Cañizares-Villanueva, R. O., & Torzillo, G. (2014). Physiological response of *Nannochloropsis* sp. to saline stress in laboratory batch cultures. *Journal of applied phycology*, 26(1), 115-121.

- Minhas, A. K., Hodgson, P., Barrow, C. J., & Adholeya, A. (2016). A review on the assessment of stress conditions for simultaneous production of microalgal lipids and carotenoids. *Frontiers in microbiology*, 7, 546.
- Parsons, T. R., & Strickland, J. D. H. (1963). Discussion of spectrophotometric determination of Marine-plant Pigments, with Revised Equations for Ascertaining Chlorophylls and Carotenoids. *J. mar. Res.*, 21, 155-163.
- Ramus, J., Kenney, B. E., & Shaughnessy, E. J. (1989). Drag reducing properties of microalgal exopolymers. *Biotechnology and bioengineering*, 33(5), 550-557.
- Singh, S., Arad, S. M., & Richmond, A. (2000). Extracellular polysaccharide production in outdoor mass cultures of *Porphyridium* sp. in flat plate glass reactors. *Journal of applied phycology*, 12(3), 269-275.
- Sukenik, A. (1991). Ecophysiological considerations in the optimization of eicosapentaenoic acid production by *Nannochloropsis* sp.(Eustigmatophyceae). *Bioresource Technology*, 35(3), 263-269.
- Vonshak, A. (1988). *Porphyridium*. In: Borowitzka MA, Borowitzka LJ (eds) *Microalgal biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 122–134.