بررسی روند رشد میکروجلبک دونالیلا سالینا و میزان تولید بتاکاروتن در غلظت‌های مختلف نمک

سید علی هاشمی[a]، فرشید پژوم شریعتی[*b]، حسین دلاوری امرئی[c]، امیر حیدری نسب[d]

[a] دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه مهندسی شیمی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[b] استادیار گروه مهندسی شیمی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[c] استادیار گروه مهندسی شیمی، دانشگاه بجنورد، بجنورد، ایران
[d] دانشیار گروه مهندسی شیمی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۲/۳۱ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۱۲/۲۳

چکیده

مقدمه: میکروجلبک دونالیلا سالینا یک گونه تک سلولی یوکاریوت و بدون دیواره سلولی تمایز یافته می‌باشد. در شرایط معمول رشد به رنگ سبز، اما در شرایط تحت انواع استرس به رنگ زرد متمایل به نارنجی تغییر حالت می‌دهد. در شرایط تحت استرس از قبیل: شوری بالا، فقر مواد مغذی و شدت نور بالا برای حفظ علائم حیاتی خود اقدام به تولید انواع متابولیت‌های ثانویه مانند بتاکاروتن و گلیسرول می‌نماید که هریک از این متابولیت های ثانویه دارای ارزش های اقتصادی فراوانی می باشد. امروزه با افزایش روز افزون جمعیت جهانی تامین منابع جایگزین مناسب برای نیازهای غذایی و انرژی بشر بسیار ضروری به نظر می‌رسد و میکروجلبک‌ها با ویژگی‌های منحصر به فردشان میتوانند انتخاب مناسبی در این زمینه به حساب آیند.

مواد و روش‌ها: در کار تحقیقاتی حاضر به بررسی مقدار غلظت بهینه نمک برای رشد میکروجلبک دونالیلا سالینا تخلیص شده از دریاچه ارومیه پرداخته شد. برای این منظور نمونه میکروجلبک دونالیلاسالینا تحت شدت نور سفید ۱۰۰۰۰ لوکس و در محیط‌کشت جانسون کشت داده شد. همچنین در قسمت دوم به بررسی مقدار بتاکاروتن تولیدی در اثر ۱۱ مرحله شوک نمکی ۰/۵ مولار درون سلول‌های دونالیلاسالینا پرداخته شد.

یافته‌ها: مقدار بهینه غلظت نمکی برای رشد گونه جلبک دونالیلا سالینای مورد نظر شوری ۱ مولار در راستای رشد مناسب‌تر و بالاترین میزان زیست توده تولیدی گزارش گردید. همچنین بالاترین مقدار بتاکاروتن تولیدی در سلول‌های دونالیلاسالینا در غلظت نمکی ۳/۵ مولار برابر با ۳۶/۶۴ میکروگرم بتاکاروتن به میلی‌لیتر محیط‌کشت سلولی به دست آمد. همچنین با وجود روند نزولی تجمع بتاکاروتن در غلظت‌های نمکی بالاتر از ۳/۵ مولار، در غلظت‌های بالاتر (تا ۶/۵ مولار) نیز مقدار قابل توجهی بتاکاروتن با تزریق شوک‌های نمکی درون سلول‌ها تجمع می یابد.

نتیجه‌گیری: با اعمال شوک‌های نمکی کوچک می‌توان شرایط سلول‌های میکروجلبک را به تالاب‌های طبیعی نزدیک‌تر نمود و در این حالت مقدار قابل ملاحظه‌ای بتاکاروتن درون سلول‌ها تجمع میابد.

واژه‌های کلیدی *: بتاکاروتن، دونالیلا سالینا، غلظت نمک، میکروجلبک*

[*] نویسنده مسئول مکاتبات email: pajoum@srbiau.ac.ir

مقدمه

میکروجلبک‌ها سلول‌های یوکاریوت با قابلیت فتوسنتز هستند و می‌توانند ترکیبات با ارزش بالا را سنتز کنند و می‌توان آنها را در محیط‌های گوناگونی از محیط‌های آبی گرفته تا خشکی‌ها و مکان‌هایی که سایر گیاهان توانایی رشد ندارند مانند بیابان‌ها و سواحل یافت. علاوه براین به علت ساختار ساده تک‌سلولی و یا پرسلولی آن‌ها میکروجلبک‌ها می‌توانند به سرعت در محیط‌های با شرایط سخت مانند دمای بسیار بالا یا پایین، اکسیداسیون نوری، شوری بالا، فشاراسمزی و یا در معرض اشعه یو وی رشد کنند (Pour Hosseini *et al*., 2017).

جلبک‌ها بسته به ماهیت ذاتیشان در تحمل شوری به دو دسته هالوفیل (نیازمند به نمک برای رشد بهینه) و هالوتالرنت (دارای مکانیزم‌هایی جهت ارائه پاسخ‌های محیطی و حفظ حیات در محیط‌های بسیار شور) تقسیم‌بندی می‌شود. به عبارت دیگر جلبک‌های هالوتالرنت با تولید متابولیت‌های خاصی از آسیب‌های ناشی از شوک نمک محافظت می‌شوند (Richmond, 1986).

ایده استفاده از میکروجلبک‌ها در مقیاس بالا برای بار اول توسط دانشمندان آلمانی به‌منظور دستیابی به منابع پروتئینی ارزان قیمت و جایگزینی آن‌ها با منابع پروتئین حیوانی که در طول جنگ جهانی دوم دستیابی به آن با مشکل مواجه گردید به کار برده شد (Soeder, 1986). زمانی که شرایط محیطی سخت است و میکروجبک‌ها تحت استرس به سر میبرند متابولیت‌های ثانویه مختلفی را سنتز می‌کنند. این مواد سنتز شده عموما برای ثابت نگه داشتن نرخ ویژه رشد و زنده نگه داشتن جلبک ها درآن شرایط نامطلوب تولید می‌شوند متابولیت‌های ثانویه به آن دسته از ترکیباتی اطلاق می‌شود که برای متابولیسم اولیه میکرو جلبک‌ها مانند تقسیمات سلولی و متابولیسم عمومی جلبک‌ها بکار نمی‌رود. این متابولیت‌های ثانویه به طور کلی وظایفی از قبیل فعالیت‌های آنتی اکسیدانی، هورمونی، آنتی‌بیوتیکی و مواد سمی را در سلول‌ها برعهده می‌گیرند (Carmichael, 1992; Skjanes *et al*., 2012). میکروجلبک تک سلولی دونالیلا در حالت معمول سبز رنگ است و در شرایط مختلف به اشکال: تخم مرغی، کروی و یا بیضوی وجود دارد (Ben-Amotz, 1980). تعداد اندکی از موجودات زنده همانند این گونه، تحمل شوری بسیار بالا را خواهند داشت. در شرایط تحت استرس، سلول‌ها باید میزان بالایی از بتاکاروتن برای حفاظت در برابر نور بالا و گلیسرول برای مقابله با فشار اسمزی بیش از حد را تولید نمایند گونه دونالیلا به ۲۲ شاخه متنوع از گونه‌های دریایی و نمک دوست تقسیم می‌شود که معروف‌ترین آنها دونالیلا سالینا می‌باشد (Borowitzka and Siva, 2007).

بتاکاروتن یک رنگدانه تروپن‌دار است که دارای یک بازار هدف رو به گسترش شامل: رنگ‌های خوراکی مواد غذایی، در ساختار ویتامین آ، افزودنی به مواد آرایشی، در ساختار مالتی ویتامین‌ها و در تولید مواد غذایی سالم بکار می‌رود (Johnson and Schroeder, 1996; Edge *et al*., 1997). مولکول‌های بتاکاروتن در سلول‌های گیاهی نظیر هویج، زرد آلو و بسیاری سلول‌های گیاهی دیگر وجود دارد اما به دلیل پیچیده بودن ساختار سلول‌های گیاهی، محققان به سمت استفاده از گونه‌هایی مانند جلبک سبز تک سلولی با قدرت تکثیر بالا همانند جلبک دونالیلا سالینا گرایش پیدا کرده‌اند (Glenn *et al*., 1999; Madadkar, 2011). در سالیان اخیر با توجه به بررسی‌های صورت گرفته توسط محققین در سراسر جهان مقوله کشت میکروجلبک‌ها و تولید زیست‌توده آن‌ها و همچنین انواع متابولیت‌های ثانویه از آن‌ها ارزش و اعتباری روز افزون پیدا نموده است. در چارچوب گونه مورد نظر این مقاله نیز تحقیقات پرشماری برای بررسی روند رشد و تولید مواد مختلف درون سلولی توسط انواع روش‌ها انجام گرفته است. اغلب گونه های دونالیلا در محیط‌های کشت با درجه شوری ۱تا ۲ مولار به خوبی رشد می‌کنند. البته این میزان تحمل شوری رابطه مستقیمی با دمای کشت دارد. هرچه دما افزایش بیابد قدرت تحمل شوری در میکروجلبک افزایش میابد (Ben-Amotz, 2004). Hadi و همکاران (۲۰۰۸) در بررسی میکرو جلبک دونالیلا سالینای برگرفته از باتلاق گاوخونی تحت چند غلظت نمک متفاوت ۰,۱۷، ۱، ۲، ۳، ۴ مولار نشان دادند که شوری بالا سبب کاهش رشد میکروجلبک‌ها و افزایش تجمع بتاکاروتن در سلول‌ها می‌گردد. در کار تحقیقاتی دیگری Garcia و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که افزایش غلظت نمک از ۱۰به ۳۵ درصد باعث تجمع بتاکاروتن بالاتر در دونالیلا شده است.

در این کار تحقیقاتی اثر غلظت‌های نمکی مختلف بر روند رشد میکروجلبک دونالیلا سالینا تخلیص شده از دریاچه ارومیه و میزان تولید بتاکاروتن بررسی گردیده است.

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی روند رشد میکروجلبک دونالیلا سالینا در غلظت‌های نمکی مختلف، شش نمونه میکروجلبک دونالیلا سالینا به حجم یک لیتر و در محیط‌کشت جانسون، تحت شدت نور ۱۰۰۰۰ لوکس و دمای ۲±۲۵ درجه سلسیوس و در غلظت‌های نمکی ۰/۵ تا ۳ مولار مورد کشت قرار گرفت. در طول دوره کشت (۲۴ روز) مقدار جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و به این ترتیب معیاری برای سنجش میزان زیست توده تولیدی در طول دوره کشت حاصل گردید. اجزای محیط کشت جانسون به شرح گفته شده در جدول ۱ می‌باشد.

جدول ۱- محیط کشت جانسون (Borowitzka, 1988)

ترکیبات	مقدار
NaCl	As needed to the desired salinity
$MgCl_2.6H_2O$	1.5g
$MgSO_4.7H_2O$	0.5g
KCl	0.2g
$CaCl_2.2H_2O$	0.2g
KNo_3	1.0g
$NaHCo_3$	0.043g
KH_2PO_4	0.035g
Fe solution	10ml
Trace element solution	10ml
Fe solution	
Na_2EDTA	189mg
$FeCl_3.6H_2O$	244mg
dH_2O	to 1000 ml
Trace element solution	
H_3BO_3	61.0mg
$(NH_4)6MO_7(O_2).4H_2O$	38.0mg
$CuSO_4.5H_2O$	6.0mg
$CoCl_2.6H_2O$	5.1mg
$ZnCl_2$	4.1mg
$MnCl_2.4H_2O$	4.1mg
dH_2O	to 1000 ml

همچنین برای بررسی اثر شوک‌های نمکی بر روی تولید بتاکاروتن تجمع یافته درون سلول‌های میکروجلبک یک نمونه ۱ لیتری دیگر را عینا تحت شرایط گفته شده در بالا با غلظت نمکی ۱ مولار (بهترین روند رشد در این غلظت به دست آمد) مورد کشت قرار داده شد و در طول دوره کشت (۴۴ روز) (Cifuentes *et al*., 1996) اقدام به تزریق شوک های نمکی ۰/۵ مولار هر سه روز یکبار به نمونه تحت کشت گردید (Borowitzka *et al*., 1990). در طول دوره کشت به منظور بررسی مقدار بتاکاروتن تولیدی در چهار غلظت نمکی متفاوت در فاز ایستایی اقدام به استخراج بتاکاروتن گردید. برای انجام عملیات استخراج بتاکاروتن از فرایند استخراج با حلال‌های هگزان و اتانول استفاده شد (Morowvat *et al*., 2016). در طول دوره کشت و تزریق ۱۱ مرحله شوک های نمکی روند تغییرات pH مورد بررسی قرار گرفت و دامنه تغییراتی در حدود ۱/۳ واحد را از خود به ثبت رساند.

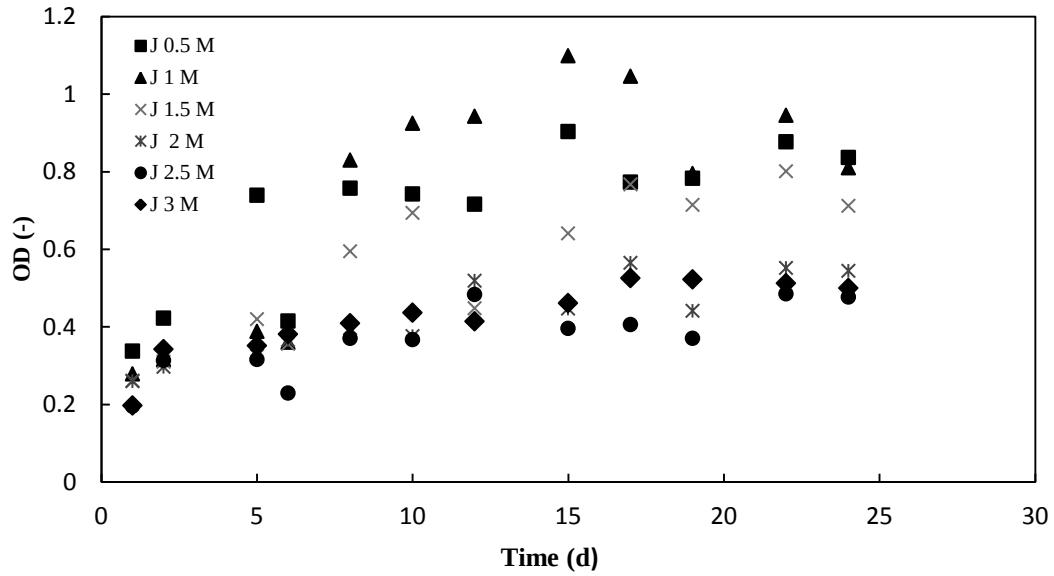
یافته‌ها

پس از بررسی‌های به عمل آمده از روند رشد میکروجلبک دونالیلا سالینا در غلظت‌های نمکی مختلف، مقدار بهینه غلظت نمکی که بهترین روند رشد و بالاترین مقدار زیست توده تولیدی را نشان می‌دهد برابر با ۱ مولار ثبت گردید که این مسئله در شکل ۱ که مقادیر جذب در طول دوره کشت در غلظت‌های مختلف نمک را نشان می‌دهد کاملا مشهود می‌باشد و این مقدار با غلظت‌های نمکی عنوان شده در بسیاری از مقالات هم خوانی دارد. غلظت نمکی تحقیق حاضر بین ۱ تا ۲ مولار برای رشد بهینه بسیاری از شاخه‌های دونالیلا مناسب می‌باشد (Ben-Amotz, 2004).

همانطور که در شکل ۱ دیده می‌شود در غلظت‌های نمکی ۲ مولار و بالاتر روند رشد سلولی به نسبت غلظت‌های نمک پایین‌تر با مشکل مواجه می‌شود و دلیل آن احتمالا به علت عدم توانایی برقراری تطابق در محیط کشت سلولی با مقدار زیاد نمک در روزهای ابتدایی کشت و عدم توانایی سلول‌ها در تقسیم مناسب سلولی به‌علت شرایط پرتنش محیطی می‌باشد. (همان‌طور که قبلا اشاره گردید غلظت بالای نمک به‌عنوان یک شوک در محیط کشت سلول‌ها در نظر گرفته می‌شود). در قسمت بعدی

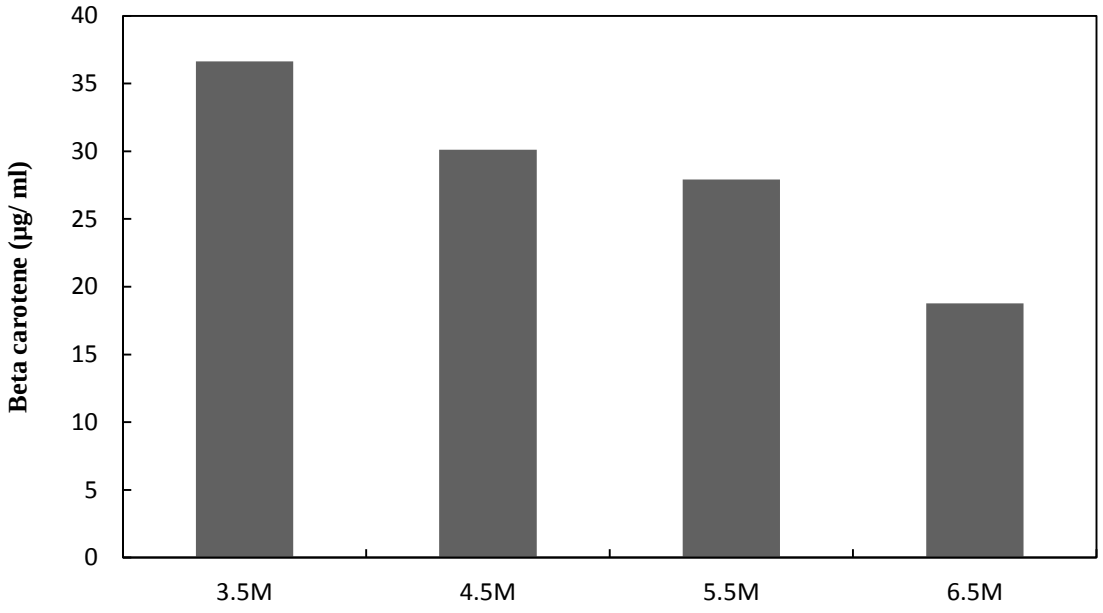
آزمایش، مقدار عددی بتاکاروتن استخراج شده از میکروجلبک دونالیلا سالینا در شکل ۲ آورده شده است.

همانطور که در این شکل مشاهده میشود بالاترین مقدار بتاکاروتن تولیدی در غلظت نمکی ۳/۵ مولار با مقدار عددی ۳۶/۶۴ میکروگرم بتاکاروتن به میلی‌لیتر محیط کشت سلولی به دست آمد. از طرفی دیگر باتوجه به شکل مشاهده می‌شود که غلظت نمکی بتاکاروتن پس از ۱۱ مرحله شوک نمکی ۰/۵ مولار به مقدار قابل توجه ۶/۵ مولار رسیده است که در این غلظت هم، سلول‌ها علاوه بر حفظ شرایط زیستی خود در این شرایط دشوار مقدار قابل ملاحظه ای نیز بتاکاروتن تولید نموده‌اند. در شکل ۳ روند تغییرات pH در طول فرآیند نشان داده شده است.

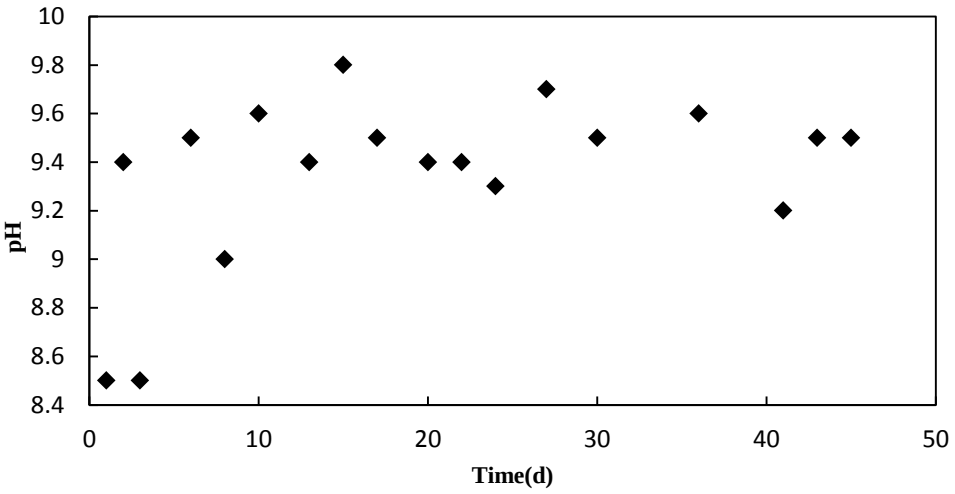


شکل ۱ – مقادیر جذب در طول موج ۵۶۰ نانومتر در روزهای مختلف کشت برای غلظت های مختلف نمک (۰/۵ تا ۳ مولار).

غلظت های نمکی ۰/۵ تا ۳ مولار برای میکروجلبک دونالیلا سالینا در محیط کشت جانسون در یک دوره کشت مورد بررسی قرار گرفت و اعداد جذب توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۶۰ نانومتر ثبت گردید.



شکل ۲ – مقدار بتاکاروتن تجمع یافته درون سلول در غلظت‌های نمکی مختلف با تزریق شوک‌های نمکی ۰/۵ مولار



شکل ۳ – روند تغییرات pH در طول دوره کشت دونالیلا سالینا همراه با ۱۱ مرحله شوک نمکی ۰/۵ مولار

بحث

با توجه به اطلاعات به دست آمده در کار تحقیقاتی حاضر، غلظت بهینه نمک برای رشد مناسب میکروجلبک دونالیلا سالینا تخلیص شده از دریاچه ارومیه برابر ۱ مولار گزارش گردید. البته در غلظت‌های بالاتر نمک تا مرز ۲ مولار هم میکروجلبک روند رشد مناسبی را از خود نشان داده است اما در غلظت‌های نمکی ۲ مولار و بالاتر روند رشد سلولی با مشکل مواجه می‌شود. در غلظت‌های بالای نمک سلول‌ها با پدیده غالب فشار اسمزی در محیط مواجه میگردند و با تولید انواع متابولیت‌های ثانویه و نشان دادن مکانیزم‌های دفاعی خاصی روند رشد سلولی را کند نموده و فعالیت‌های سلولی را به‌حداقل می‌رسانند تا با این راه از شرایط سخت محیطی به‌وجود آمده گذر نمایند (Tammam *et al* ., 2011). در قسمت دوم نیز بالاترین مقدار بتاکاروتن تولیدی برای غلظت نمکی ۳/۵ مولار ثبت گردید. همانطور که قبلا اشاره شد بتاکاروتن یک متابولیت ثانویه می‌باشد که در شرایط تحت استرس برای حفظ علائم حیاتی سلول، درون غشای تیلاکوییدی کلروپلاست سلولی تجمع می‌یابد. در تصدیق این مطلب می‌توان عنوان نمود که در شوری‌های بالاتر نیز همچنان مقدار بتاکاروتن تجمع یافته در مقادیری نزدیک به‌هم مقدار قابل‌ملاحظه‌ای دارد. در این شرایط (مقدار شوری بالا) روند رشد سلولی کاهش یافته و در نقطه مقابل آن تولید بتاکاروتن و لیپیدها (برای غلبه بر پدیده فشار اسمزی وارد شده بر سلول‌ها) افزایش پیدا می‌کند. همچنین در شدت تابش‌های نوری بالا (استرس نوری) نیز بتاکاروتن به عنوان یک فیلتر نوری عمل می‌کند و به میزان قابل توجهی در سلول‌ها تجمع میابد. Tammam و همکاران (۲۰۱۱) غلظت نمک محیط کشت را تا ۴ مولار بالا بردند و رشد ۴۱ درصدی را در تجمع بتاکاروتن سلولی گزارش نمودند (۳/۹۸ میلی‌گرم بر لیتر). همچنین در تحقیق دیگری Hadi و همکاران (۲۰۰۸) تولید و تجمع کاروتنوییدها را در پنج غلظت نمکی مختلف در گونه دونالیلا سالاینا مورد بررسی قرار دادند و بالاترین مقدار تولید کاروتنوییدها را در غلظت نمکی ۲ مولار (۴/۵۷ میکروگرم بر میلی‌گرم) عنوان نمودند. پس از بررسی روند تغییرات pH ملاحظه می‌شود که دامنه تغییرات آن از ۸/۵ تا ۹/۸ در تغییر می‌باشد و در روزهای نیمه دوم کشت روند نوسانی کمتری از خود نشان می‌دهد. در مقادیر بالای pH می‌توان با تزریق گاز دی اکسید کربن به درون محیط‌کشت از میزان قلیاییت محیط‌کشت کاست.

نتیجه‌گیری

میکروجلبک دونالیلا سالینا مورد استفاده در این کار تحقیقاتی خالص سازی شده از دریاچه ارومیه بوده است و گونه‌ای بسیار نمک دوست و مقاوم در برابر غلظت های بالای نمک محیط‌کشت می‌باشد. در کار آزمایشگاهی حاضر ملاحظه گردید که با وجود ثبت شوری ۱ مولار به عنوان غلظت نمکی بهینه برای رشد این گونه، با وجود افزایش شوری محیط کشت تا ۶/۵ مولار به صورت کامل علائم حیاتی در سلول‌ها یافت شد که در بسیاری از مقالات

غلطت نمکی ۱ تا ۲ مولار به‌عنوان غلظت بهینه رشد دونالیلا سالیتا اعلام گردیده است. به همین منظور بررسی دقیق روند رشد دونالیلا سالینا و تولید و تجمع بتاکاروتن، اجازه تکمیل طول دوره کشت و پیمودن تمام فازهای رشد (تاخیر، رشد لگاریتمی، ایستایی و مرگ) به میکروجلبک دونالیلا سالینا داده شد و به‌صورت متوالی اندازه‌گیری مقدار بتاکاروتن درون سلولی انجام گردید. نتایج نشان داد که در غلظت‌های بالاتر نمک با کاهش یافتن مقدار نرخ ویژه رشد و بازدهی تولید زیست توده، تولید بتاکاروتن به عنوان یک متابولیت‌های ثانویه درون سلول‌ها (فضای کلرو پلاست سلولی) افزایش پیدا کرد. در واقع، در شرایط تحت استرس مقدار قابل‌ملاحظه‌ای بتاکاروتن درون سلول‌ها (به منظور حفظ سلول‌ها در برابر شرایط نامساعد محیطی) تجمع پیدا نمود به طوری که بالاترین میزان بتاکاروتن به دست آمده در غلظت نمکی ۳/۵ مولار با مقدار ۳۶/۶۴ میکروگرم بتاکاروتن به میلی لیتر محیط کشت سلولی به دست آمد.

منابع

Ben-Amotz, A. (2004). Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products, major industrial species, Dunaliella. In: Richmond A, editor. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Oxford: Blackwell Publishing Ltd.

Ben-Amotz, A. (1980). Glycerol production in the alga dunaliella, in: A.S. Pietro (Ed.), Biochemical and Photosynthetic Aspects of Energy Production, AcademicPress. pp. 191–208.

Borowitzka, M. & Siva, C. (2007). The taxonomy of the genus Dunaliella (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species. J. Applied Phycology, 19, 567-590.

Borowitzka, M. A., Borowitzka, L. J. & Kessly, D. (1990). Effects of Salinity Increase on Carotenoid Accumulation in the Green Alga Dunaliella Salina. Journal of Applied Phycology, 2, 111-119.

Carmichael, W. W. (1992). Cyanobacteria secondary metabolites the cyanotoxins. Journal of Applied Microbiology, 72, 445–459.

Cifuentes, A. S., Gonzalez, M. A. & Parra, O. O. (1996). The Effect of Salinity on the Growth and Carotenogenesis in Two Chilean Strains of Dunaliella Salina Teodoresco. Biological Research, 29, 227-236.

Edge, R., McGarvey, D. J. & Truscott, T. G. (1997). The carotenoids as antioxidants, a review. J. Photochem. Photobiology, 41, 189–200.

Garcı´a, F., Freile-Pelegrı´n, Y. & Robledo, D. (2007). Physiological characterization of Dunaliella sp. (Chlorophyta, Volvocales) from Yucatan, Mexico. Journail of Bioresource Technology, 98, 1359–1365.

Glenn, E. P., Brown, J. J. & Blumwald, E. (1999). Salt Tolerance and Crop Potential of Halophytes. Critical Reviews in Plant Sciences, 18, 227–255.

Hadi, M. R., Shariati, M. & Afsharzadeh, S. (2008). Microalgal Biotechnology: Carotenoid and Glycerol Production by the Green algae *Dunaliella* isolated From the Gave-Khooni Salt Marsh, Iran. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 13, 540-544.

Johnson, E. A. & Schroeder, W. A. (1996). Microbial Carotenoids. Advances in Biochemical Engineering Biotechnology, 53, 119–178.

Madadkar Haghjou, M. (2011). Induction of Paraquat Tolerance in *Dunaliella* by Using Some Pretreatments. Journal of Plant Biology, 10, 71-78.

Morowvat, M. H. & Ghasemi, Y. (2016). Culture medium optimization for enhanced β-carotene and biomass production by Dunaliella salina in mixotrophic culture. Journal of Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 7, 217-223.

Pour Hosseini, R., Tavakoli, O. & Sarrafzade, M. (2017). Experimental optimization of SC CO_2 extraction of carotenoids from Dunaliella. Journal of Supercritical Fluids, 121, 85-95.

Richmond, A. (1986). Cell response to environmental factors. In: Richmond, A. (Ed.), CRC Handbook of Microalgal Mass culture. CRC Press Inc., Florida. pp. 89-95.

Skjånes, K., Rebours, C. & Lindblad, P. (2012). Potential for green microalgae to produce hydrogen,pharmaceuticals and other high value products in a combined process. Critical Reviews in Biotechnology, 144.

Soeder, C. J. (1986). A historical outline of applied algology. In Handbook of Microalgal Mass Culture; Richmond, A., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL. pp. 25-41.

Tammam, A. A., Fakhry, E. M. & El-Sheekh, M. (2011). Effect of salt stress on antioxidant system and the metabolism of the reactive oxygen species in Dunaliella salina and Dunaliella tertiolecta. African Journal of Biotechnology, 10, 3795-3808.