

Crecimiento y contenido en pigmentos de cuatro especies de microalgas marinas cultivadas con diferentes temperaturas e intensidades de luz

I. LÓPEZ-MUÑOZ, J. ABALDE & C. HERRERO

Departamento de Biología Celular y Molecular. Facultad de Ciencias. Universidad de La Coruña. Campus de La Zapateira s/n. 15071 La Coruña

Resumen

LÓPEZ-MUÑOZ, I., ABALDE, J. & HERRERO, C. (1992). Crecimiento y contenido en pigmentos de cuatro especies de microalgas marinas cultivadas con diferentes temperaturas e intensidades de luz. *Nova Acta Científica Compostelana (Biología)*, 3: 59-65

Se estudian las diferencias en el crecimiento y composición de pigmentos de las microalgas marinas *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch (*Prasynophyceae*), *Dunaliella tertiolecta* Butch. (*Chlorophyceae*), *Isochrysis galbana* Parke (*Haptophyceae*) y *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin (*Bacillariophyceae*) cultivadas con distintas combinaciones de luz y temperatura. En los cultivos de *T. suecica* y *D. tertiolecta* la temperatura constituye un factor de crecimiento más determinante que la luz, obteniéndose los mejores crecimientos a 20°C y, dentro de éstos, a la intensidad de luz mayor de las ensayadas. Por el contrario, en los cultivos de *I. galbana* y *P. tricorutum* la luz constituye un factor de crecimiento más determinante que la temperatura obteniéndose los mejores crecimientos a la mayor de las intensidades de luz ensayadas. A temperatura constante, la velocidad de crecimiento aumenta al aumentar la intensidad luminosa en todos los cultivos estudiados, obteniéndose el mayor número de doblajes por día a 80 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. A intensidad de luz constante, la velocidad de crecimiento aumenta con la temperatura en todos los cultivos ensayados menos en los de *D. tertiolecta*, en los que las variaciones de temperatura no provocan diferencias significativas en la tasa de crecimiento. Los contenidos en clorofila para una misma temperatura disminuyen al aumentar la intensidad luminosa para todas las especies estudiadas, obteniéndose los mayores contenidos celulares de pigmentos para las cuatro especies a la intensidad de luz más baja de las ensayadas.

Palabras clave: Microalgas marinas, luz, temperatura, pigmentos fotosintéticos.

Abstract

LÓPEZ-MUÑOZ, I., ABALDE, J. & HERRERO, C. (1992). Growth and pigment content of four marine microalgae cultured under different temperature and light intensity conditions. *Nova Acta Científica Compostelana (Biología)*, 3: 59-65

Growth and pigment content of the marine microalgae *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch (*Prasynophyceae*), *Dunaliella tertiolecta* Butch. (*Chlorophyceae*), *Isochrysis galbana* Parke (*Haptophyceae*) and *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin (*Bacillariophyceae*) were studied under different temperature-light intensity conditions. In *T. suecica* and *D. tertiolecta* cultures temperature is a growth factor more important than light intensity, and better growths were obtained at 20°C and at the higher light intensity assayed. Conversely, in *I. galbana* and *P. tricorutum* cultures light intensity is a growth factor more important than temperature and better growths were obtained at the higher light intensity assayed. At a constant temperature, growth velocity increases when the light intensity increases in all the cultures studied, and maximum doublings/day were obtained at a light intensity of 80 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. At a constant light intensity, the growth velocity increases when temperature increases in all the cultures studied except for *D. tertiolecta* cultures. At a constant temperature, the cellular contents in chlorophylls decreases when light intensity increases in all the species studied, and maximum values were obtained at the lower light intensity assayed for the four microalgae studied.

Key words: Marine microalgae, light, temperature, photosynthetic pigments.

INTRODUCCION

Las microalgas marinas adquieren gran importancia en la actualidad por su utilización en la acuicultura de moluscos y crustáceos (DE PAUW *et al.*, 1983), así como por sus potenciales utilidades como fuente de proteína (SCP) (FÁBREGAS & HERRERO, 1985), como suplemento en las dietas de peces dado su contenido en minerales (FÁBREGAS & HERRERO, 1986), y también por su empleo en la obtención de diferentes productos como vitaminas, glicerol, β -caroteno y ácidos grasos (KARNI & AVRON, 1988; BEN-AMOTZ *et al.*, 1986). El crecimiento de las poblaciones microalgales depende de múltiples factores entre los que destacan por su importancia la luz y la temperatura.

La luz, además de su papel primario en la fotosíntesis, puede actuar modificando los requerimientos nutritivos de las especies microalgales. Variaciones en la intensidad luminosa están acompañadas de variaciones en la tasa de crecimiento (GINZBURG, 1987; WALSH, 1988), volumen celular (OSBORNE & RAVEN, 1986), actividad enzimática (DIONISIO *et al.*, 1989a,b), y composición bioquímica (BEN-AMOTZ & AVRON, 1983; DUBINSKY *et al.*, 1986).

La temperatura es otro parámetro fundamental que afecta no sólo al crecimiento sino también a la naturaleza del metabolismo (RICHMOND, 1986), y a la composición bioquímica de las microalgas (WITT *et al.*, 1981). Luz y temperatura están estrechamente relacionadas siendo las interacciones entre ellas muy marcadas (COLLINS & BOYLEN, 1982). Así, a mayores temperaturas las microalgas toleran intensidades de luz mucho más altas que a temperaturas más bajas, existiendo para cada temperatura dada una tasa máxima de crecimiento asociada a una intensidad de luz óptima (DAUTA *et al.*, 1990).

De todos los factores que controlan el crecimiento de las microalgas, la luz y la temperatura son los que experimentan mayores variaciones, tanto diarias como estacionales, dependiendo el éxito ecológico de cada especie de su respuesta fisiológica para adaptarse a los cambios en el medio. En este trabajo se estudian las diferencias en el crecimiento y composición de pigmentos de cuatro especies de microalgas marinas culti-

vadas con distintas combinaciones de luz y temperatura.

MATERIAL Y METODOS

Las microalgas marinas *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butch (*Prasynophyceae*), *Dunaliella tertiolecta* Butch. (*Chlorophyceae*), *Isochrysis galbana* Parke (*Haptophyceae*) y *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin (*Bacillariophyceae*) se cultivan en agua de mar filtrada a través de un filtro Millipore (0.45 μm), esterilizada en autoclave y enriquecida con NaNO_3 , 2 μM ; NaH_2PO_4 , 100 μM ; ZnCl_2 , 1 μM ; MnCl_2 , 1 μM ; Na_2MoO_4 , 1 μM ; CoCl_2 , 0.1 μM ; citrato férrico, 20 μM ; tiamina 35 $\mu\text{g l}^{-1}$; biotina, 5 $\mu\text{g l}^{-1}$; B_{12} , 3 $\mu\text{g l}^{-1}$; EDTA, 26.4 μM ; Tris-HCl, 15 μM ; pH 7.6 (FÁBREGAS *et al.*, 1984), siendo la salinidad de 35‰. Los cultivos se agitan mediante aireación con un flujo de 10 l min^{-1} , lo que impide que se depositen las células y favorece una mejor distribución de la luz y los nutrientes (RICHMOND & BECKER, 1986), además de proporcionar un aporte de CO_2 que sirve como fuente de carbono y ayuda a estabilizar el pH. Los cultivos se realizan en una cámara de temperatura controlada, ensayando dos temperaturas: 16° y 20° C, y dos intensidades de luz: 40 y 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La luz es proporcionada por tubos fluorescentes MAZDA FLUOR C7 TF40 (luz día), manteniéndose un régimen de luz-oscuridad 12-12 horas. Los inóculos se toman a partir de cultivos stock en fase exponencial de crecimiento mantenidos en las mismas condiciones que las experiencias a realizar. La densidad inicial de los cultivos es de 0.5×10^6 cel ml^{-1} para *T. suecica*, 0.65×10^6 cel ml^{-1} para *D. tertiolecta*, 2.5×10^6 cel ml^{-1} para *I. galbana* y 1.5×10^6 cel ml^{-1} para *P. tricorutum*. Los cultivos se realizan en botellas de 1000 ml con 600 ml de medio y por duplicado.

El crecimiento de los cultivos se sigue diariamente mediante recuento de células en un contador de partículas Coulter Counter modelo DN hasta alcanzar la fase estacionaria, calculándose la velocidad de crecimiento k o doblajes en la fase logarítmica, mediante la fórmula:

$$k = (\text{Ln } N_t - \text{Ln } N_0) / \text{Ln } 2 \cdot t$$

donde N_0 es el número de células al inicio de esta fase, N_t el número de células al final de la misma, y t la duración en días de la fase logarítmica.

Una vez alcanzada la fase estacionaria el contenido en clorofilas de cada uno de los diferentes cultivos se determina espectrofotométricamente tras su extracción con acetona-metanol mediante las fórmulas propuestas por JEFFREY & HUMPHREY (1975), para los grupos de organismos fotosintéticos utilizados:

1.- Algas verdes conteniendo clorofila a y clorofila b:

$$\begin{aligned} \text{Clorofila a} &= 11.93 A_{664} - 1.93 A_{647} \\ \text{Clorofila b} &= 20.36 A_{647} - 5.50 A_{664} \end{aligned}$$

2.- Diatomeas y algas pardas conteniendo clorofila a y clorofilas c_1 y c_2 .

$$\begin{aligned} \text{Clorofila a} &= 11.47 A_{664} - 0.40 A_{630} \\ \text{Clorofila } c_1+c_2 &= 24.36 A_{630} - 3.73 A_{664} \end{aligned}$$

Los valores de las densidades celulares así como de los contenidos en pigmentos en la fase estacionaria de los distintos cultivos se comparan mediante un análisis de varianza (ANOVA) ($P < 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSION

Las distintas combinaciones de luz y temperatura afectan de forma significativa al crecimiento y la composición de pigmentos de las cuatro especies de microalgas estudiadas, apreciándose diferencias específicas en las respuestas a dichas variaciones.

Tras un período de adaptación de 1-2 días los distintos cultivos entran en fase logarítmica, obteniéndose diferencias en el crecimiento en función de la luz y la temperatura (Fig.1,2).

En los cultivos de *T. suecica* y *D. tertiolecta* la temperatura constituye un factor de crecimiento

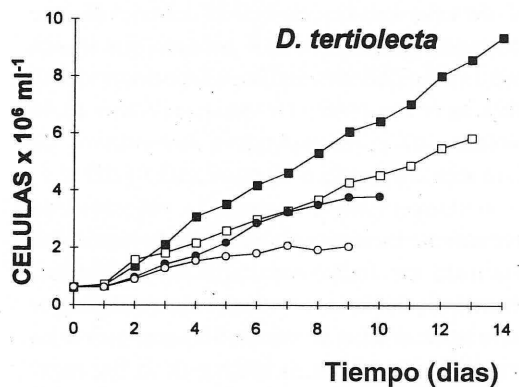
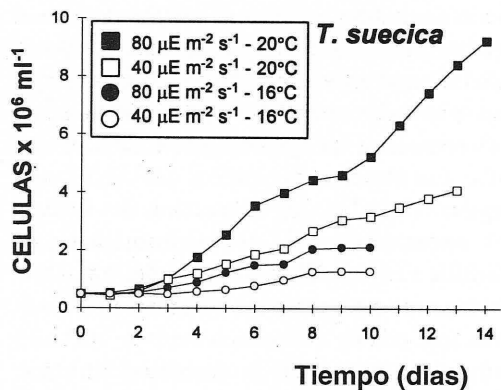


Fig 1. Curvas de crecimiento de *T. suecica* y *D. tertiolecta* con diferentes intensidades de luz y temperaturas.

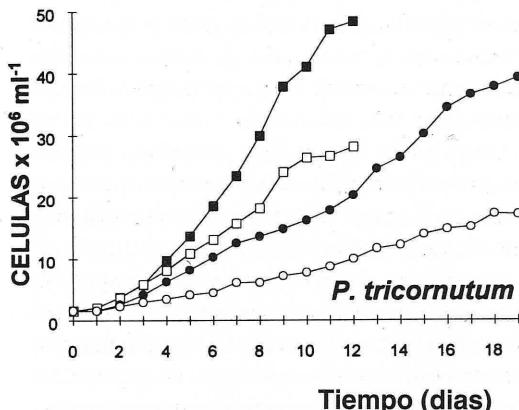
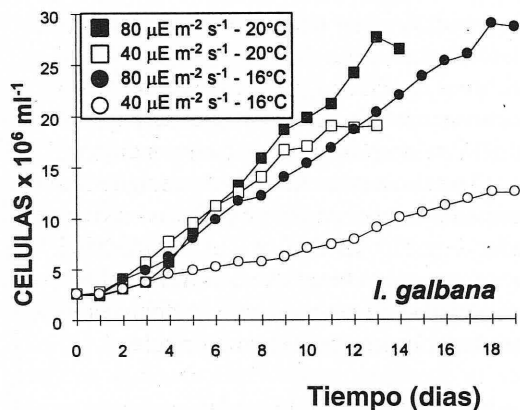


Fig 2. Curvas de crecimiento de *I. galbana* y *P. tricornutum* con diferentes intensidades de luz y temperaturas.

más determinante que la luz, obteniéndose los mejores crecimientos a 20°C y, dentro de éstos, a la intensidad de luz mayor. En los cultivos de estas dos especies, a 16°C se produce un acortamiento de la fase logarítmica de 5 y 7 días, respectivamente, frente a las alcanzadas en los cultivos a la temperatura de 20°C (Fig. 1). Por el contrario, en los cultivos de *I. galbana* y *P. tricorutum* la luz constituye un factor de crecimiento más determinante que la temperatura obteniéndose los mejores crecimientos a la mayor de las intensidades de luz ensayadas (80 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Los cultivos de estas dos especies, que crecen a la temperatura más baja, presentan una fase logarítmica más larga, alcanzándose la fase estacionaria hasta 7 días después que en los cultivos a una temperatura más alta (Fig. 2).

La velocidad de crecimiento (k), en la fase logarítmica, se ve igualmente afectada por las variaciones en la temperatura e intensidad luminosa, variando asimismo en función de la especie microalgal estudiada (Tablas I, II, III, IV). El valor más bajo de k (0.14 doblajes día⁻¹) se obtiene en los cultivos de *I. galbana* que crecen bajo las condiciones de luz-temperatura de 40 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y 16°C. El valor más alto (0.46 doblajes día⁻¹) corresponde a los cultivos de *T. suecica* creciendo a 80 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y 20°C.

A temperatura constante, la velocidad de crecimiento aumenta al aumentar la intensidad luminosa en todos los cultivos estudiados, obteniéndose el mayor número de doblajes por día a la intensidad de luz de 80 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. La existencia de un efecto aditivo de la luz en el crecimiento ha sido señalado con anterioridad (EPPLEY & COASTSWORTH, 1966), estableciéndose que la producción celular diaria es proporcional al producto de intensidad de la luz y tiempo cuando la intensidad es menor o igual que 224 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y la irradiación diaria total no sobrepasa las 70 cal cm⁻²día⁻¹, pudiendo establecerse una relación lineal entre la energía luminosa total y el número de divisiones por día (SHARFSTEIN, 1976).

Asimismo, a intensidad de luz constante la velocidad de crecimiento aumenta al aumentar la temperatura en todos los cultivos ensayados menos en los de *D. tertiolecta*, en los que las variaciones de temperatura no representan dife-

rencias significativas en el número de doblajes por día. Los valores máximos de k se obtienen para todos los cultivos en la combinación de luz-temperatura de 80 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y 20°C.

La densidad celular final está condicionada por la velocidad de crecimiento y la duración de la fase logarítmica en cada uno de los diferentes cultivos ensayados (Tablas I, II, III y IV). Las densidades celulares máximas para *T. suecica* (9.24×10^6 cel ml⁻¹), *D. tertiolecta* (9.36×10^6 cel ml⁻¹) y *P. tricorutum* (48.32×10^6 cel ml⁻¹) se obtienen a 20°C y 80 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. En los cultivos de *I. galbana* se alcanza la densidad celular máxima a 16°C y 80 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (28.70×10^6 cel ml⁻¹), aunque no existen diferencias significativas con la alcanzada a 20°C y 80 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (26.59×10^6 cel ml⁻¹).

Los contenidos en clorofila a y b o c_1+c_2 por unidad celular y volumen de cultivo se muestran en las Tablas I, II, III, IV. Para una misma temperatura el contenido celular de clorofila a y b o c_1+c_2 disminuye al aumentar la intensidad luminosa en las especies estudiadas, obteniéndose los mayores contenidos celulares de pigmentos para las cuatro especies a la intensidad de luz más baja de las ensayadas. En los cultivos de *T. suecica* y *D. tertiolecta* los mayores contenidos en clorofila a se obtienen en aquellos que crecen a 40 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y 20°C, con valores de 1.99 y 3.10 pg cel⁻¹ respectivamente. Los valores máximos de clorofila a en *I. galbana* (1.59 pg cel⁻¹) y *P. tricorutum* (0.64 pg cel⁻¹) se obtienen en los cultivos que crecen a 40 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y 16°C. El aumento en la cantidad de clorofila al disminuir la intensidad de la luz es una respuesta general de las microalgas ante condiciones de baja iluminación (DUBINSKY *et al.*, 1986). Este mecanismo fotoadaptativo es particularmente acusado en los cultivos de *P. tricorutum*. En esta especie los cultivos que crecen a intensidad de luz baja duplican sus contenidos celulares en clorofila a y c_1+c_2 con respecto a los valores obtenidos en los cultivos que crecen a intensidad de luz más alta.

Las producciones de clorofila a y b o c_1+c_2 por unidad de volumen de cultivo dependen tanto del contenido celular en pigmentos como de la densidad celular final obtenida en cada cultivo, variando los valores obtenidos para cada

TABLA I. Velocidad de crecimiento, densidad celular y composición de pigmentos fotosintéticos obtenidos en los cultivos de *T. suecica* cultivada con diferentes temperaturas e intensidades de luz

	16°C		20°C	
	40μE m ⁻² s ⁻¹	80μE m ⁻² s ⁻¹	40μE m ⁻² s ⁻¹	80μE m ⁻² s ⁻¹
vel. crecimiento (k)	0.22	0.32	0.37	0.46
dens.celular (cel 10 ⁶ ml ⁻¹)	1.28±0.11	2.12±0.38	4.09±0.22	9.24±0.25
clorofila a (pg cel ⁻¹)	1.63±0.09	1.60±0.12	1.99±0.27	1.43±0.24
clorofila a (mg ml ⁻¹)	2.09±0.23	3.40±0.34	8.18±1.33	13.24±2.07
clorofila b (pg cel ⁻¹)	1.00±0.05	0.85±0.08	0.82±0.13	0.62±0.10
clorofila b (mg ml ⁻¹)	1.28±0.26	1.78±0.16	3.37±0.60	5.88±0.81

TABLA II. Velocidad de crecimiento, densidad celular y composición de pigmentos fotosintéticos obtenidos en los cultivos de *D. tertiolecta* cultivada con diferentes temperaturas e intensidades de luz

	16°C		20°C	
	40μE m ⁻² s ⁻¹	80μE m ⁻² s ⁻¹	40μE m ⁻² s ⁻¹	80μE m ⁻² s ⁻¹
vel. crecimiento (k)	0.24	0.36	0.27	0.35
dens.celular (cel 10 ⁶ ml ⁻¹)	2.05±0.13	3.79±0.05	5.84±0.17	9.36±0.66
clorofila a (pg cel ⁻¹)	2.36±0.15	2.11±0.09	3.10±0.22	2.17±0.09
clorofila a (μg ml ⁻¹)	4.83±0.07	8.01±0.23	18.11±0.89	20.25±0.72
clorofila b (pg cel ⁻¹)	0.64±0.04	0.49±0.03	0.94±0.06	0.59±0.05
clorofila b (μg ml ⁻¹)	1.30±0.04	1.83±0.08	5.53±0.36	5.51±0.83

TABLA III. Velocidad de crecimiento, densidad celular y composición de pigmentos fotosintéticos obtenidos en los cultivos de *I. galbana* cultivada con diferentes temperaturas e intensidades de luz

	16°C		20°C	
	40μE m ⁻² s ⁻¹	80μE m ⁻² s ⁻¹	40μE m ⁻² s ⁻¹	80μE m ⁻² s ⁻¹
vel. crecimiento (k)	0.14	0.23	0.25	0.31
dens.celular (cel 10 ⁶ ml ⁻¹)	12.48±0.49	28.70±0.84	18.92±0.43	26.59±0.67
clorofila a (pg cel ⁻¹)	1.59±0.04	1.37±0.02	0.96±0.06	0.71±0.03
clorofila a (μg ml ⁻¹)	19.78±0.59	39.25±1.39	18.18±1.46	18.75±0.62
clorofila c ₁ +c ₂ (pg cel ⁻¹)	0.24±0.03	0.18±0.01	0.13±0.01	0.10±0.01
clorofila c ₁ +c ₂ (μg ml ⁻¹)	2.95±0.25	5.08±0.21	2.39±0.22	2.63±0.04

TABLA IV. Velocidad de crecimiento, densidad celular y composición de pigmentos fotosintéticos obtenidos en los cultivos de *P. tricornutum* cultivada con diferentes temperaturas e intensidades de luz

	16°C		20°C	
	40µE m ⁻² s ⁻¹	80µE m ⁻² s ⁻¹	40µE m ⁻² s ⁻¹	80µE m ⁻² s ⁻¹
vel. crecimiento (k)	0.23	0.34	0.36	0.44
dens.celular (cel 10 ⁶ ml ⁻¹)	17.05±0.08	39.35±0.40	28.14±0.32	48.32±1.04
clorofila a (pg cel ⁻¹)	0.64±0.05	0.26±0.02	0.58±0.03	0.27±0.03
clorofila a (µg ml ⁻¹)	10.87±0.84	10.01±0.75	16.45±0.69	13.18±1.46
clorofila c ₁ +c ₂ (pg cel ⁻¹)	0.23±0.01	0.11±0.01	0.09±0.01	0.05±0.005
clorofila c ₁ +c ₂ (µg ml ⁻¹)	3.94±0.24	4.46±0.15	2.60±0.14	2.23±0.23

especie en función de estos dos parámetros. Las mayores producciones de clorofila a por volumen de cultivo para *T.suecica* (13.24 mg ml⁻¹) y *D. tertiolecta* (20.25 mg ml⁻¹) se obtienen a 80 µmol m⁻²s⁻¹ y 20°C. Para *I. galbana* la mayor producción de clorofila a (39.25 mg ml⁻¹) se obtiene en los cultivos a 80 µmol m⁻²s⁻¹ y 16°C, mientras que en los cultivos de *P.tricornutum* los mayores rendimientos de clorofila a (16.45 mg ml⁻¹) se obtienen a 40 µmol m⁻²s⁻¹ y 20°C.

Los resultados obtenidos muestran que tanto la luz como la temperatura afectan al crecimiento de las microalgas marinas y a su composición en pigmentos fotosintéticos. Esta respuesta a los factores ambientales depende no sólo de la magnitud de la modificación sino que existen respuestas específicas en función de la especie microalgal que sea sometida a dichas variaciones.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado parcialmente por la Consellería de Educación y Ordenación Universitaria a través del proyecto XUGA7110389. I. López-Muñoz es becaria predoctoral de la Consellería de Educación y Ordenación Universitaria de la Xunta de Galicia.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- BEN-AMOTZ, A. & AVRON, M. (1983). On the factors which determine massive β-carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol.*, **72**:593-597.
- BEN-AMOTZ, A., EDELSTEIN, S. & AVRON, M. (1986). Use of the β-carotene rich alga *Dunaliella bardawil* as a source of retinol. *Br. Poultry Sci.*, **27**:613-619.
- COLLINS, C. D. & BOYLEN, C. W. (1982). Physiological response of *Anabaena variabilis* (Cyanophyceae) to instantaneous exposure to various combinations of high light intensity and temperature. *J. Phycol.*, **18**: 206-211.
- DAUTA, A., DEVAUX, J., PIQUEMAL, F. & BOUMNICH, L. (1990). Growth rate of four freshwater algae in relation to light and temperature. *Hydrobiologia.*, **207**: 221-226.
- DE PAUW, N., VERBOVEN, J. & CLAUS, C. (1983). Large-scale microalgae production for nursery rearing of marine bivalves. *Aquacultural Eng.*, **2**:27-47.
- DIONISIO, M.L., TSUZUKI, M. & MIYACHI, S. (1989a). Light requirement for carbonic anhydrase induction in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol.*, **30**(2):207-213.
- DIONISIO, M.L., TSUZUKI, M. & MIYACHI, S. (1989b). Blue light induction of carbonic anhydrase activity in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol.*, **30**(2):215-219.
- DUBINSKY, Z., FALKOWSKY, P.G. & WYMAN, K. (1986). Light harvesting and utilization by phytoplankton. *Plant Cell Physiol.*, **27** (7): 1335-1349.

- EPPLEY, R. W. & COASTSWORTH, J.L. (1966). Culture of the marine phytoplankter, *Dunaliella tertiolecta*, with light-dark cycles. *Archiv. Mikrobiol.*, **55**: 66-80.
- FÁBREGAS, J. & HERRERO, C. (1985). Marine microalgae as a potencial source of single cell protein (SCP). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**: 110-113.
- FÁBREGAS, J. & HERRERO, C. (1985). Marine microalgae as a potencial source of single cell protein (SCP). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**: 110-113.
- FÁBREGAS, J., ABALDE, J., HERRERO, C., CABEZAS, B. & VEIGA, M. (1984). Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. *Aquaculture*, **42**: 207-215.
- FÁBREGAS, J., HERRERO, C., CABEZAS, B. & ABALDE, J. (1985). Mass culture and biochemical variability of the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch with high nutrient concentrations. *Aquaculture*, **49**: 231-241.
- GINZBURG, M. (1987). *Dunaliella*: a green alga adapted to salt. *Adv. Bot. Res.*, **14**:93-183.
- JEFFREY, S.W. & HUMPHREY, G.F. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a,b,c₁ and c₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen.*, **167**:191-194.
- KARNI, L. & AVRON, M. (1988). Ion content of the halotolerant alga *Dunaliella salina*. *Plant Cell Physiol.*, **29**:1311-1314.
- OSBORNE, B.A. & RAVEN, J.A. (1986). Growth light level photon absorption by cells of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae, Volvocales), *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae, Chlorococcales), and *Euglena viridis* (Euglenophyceae, Euglenales). *Br. Phycol. J.*, **21**:303-313.
- RICHMOND, A. (1986). Cell response to enviromental factors. In: Richmond, A. (Ed.), *Handbook of Microalgal Mass Culture* : 69-99. CRC Press. Florida.
- RICHMOND, A. & BECKER, E.W. (1986). Technological aspects of mass cultivation. A general outline. In: Richmond, A.(Ed.), *Handbook of Microalgal Mass Culture* : 245-263. CRC Press. Florida.
- SHARFSTEIN, B.A. (1976). Ph.D. thesis submitted to City University of New York.
- WALSH, G.E.(1988). Principles of toxicity testing with marine unicellular algae. *Environ.Toxicol. Chem.*, **7**:979-987.
- WITT, U., KOSKE, P. H., KUHLMANN, D., LENZ, J. & NELLEN, W. (1981). Production of *Nannochloris sp.* (Chlorophyceae) in large-scale outdoors tanks and its use as a food organism in marine aquaculture. *Aquaculture*, **23**:171-181.