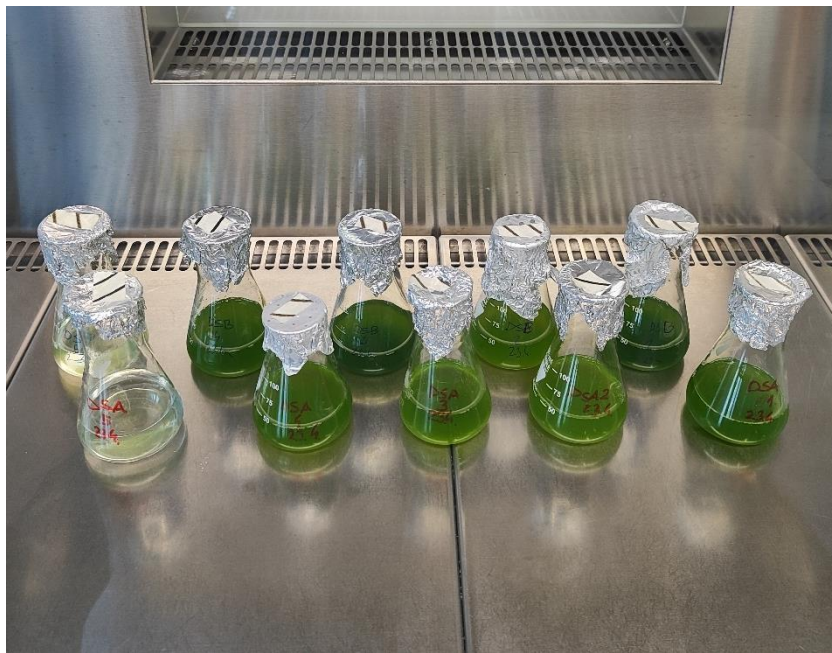


Tržaška 72, Ljubljana

Biologija

Primerjava rasti dveh alg iz rodu  
*Dunaliella* v laboratorijskih razmerah



Avtor: Maks Leon Rogelj, 4.b

Mentorici: dr. Petra Tavčar Verdev, Helena Potočnik Vičar

V Ljubljani, februar 2025

# Primerjava rasti dveh alg iz rodu *Dunaliella* v laboratorijskih razmerah

## Kazalo

Kazalo .....	1
Izvleček .....	2
Ključne besede .....	2
Uvod .....	3
1. Namen in hipoteze .....	4
Hipoteze .....	4
2. Materiali in metode .....	5
Priprava gojišča za alge .....	5
Algne kulture in eksperimentalne razmere .....	6
UV/Vis spektrofotometrija .....	7
Štetje celic pod mikroskopom .....	7
Podatkovna obravnava .....	7
3. Rezultati .....	8
Rastne krivulje .....	8
Razmerja med celično gostoto in absobanco .....	12
Napake .....	14
Fotografije .....	14
4. Razprava .....	16
I. hipoteza .....	16
II. hipoteza .....	16
III. hipoteza .....	17
IV. hipoteza .....	18
Izboljšave .....	19
5. Zaključek .....	20
6. Viri .....	21

# Primerjava rasti dveh alg iz rodu *Dunaliella* v laboratorijskih razmerah

## Izveček

Alge rodu *Dunaliella* so enocelične zelene alge, med katerimi najdemo številne slanoljubne predstavnike, ki naseljujejo bazene v solinah in jim poleti dajejo rdeče-oranžno barvo. Njihovo raziskovanje je pomembno, ker se nekatere vrste *Dunalielle* uporabljajo v kozmetični in prehrabeni industriji zaradi velike količine beta-karotenoidov in drugih bioaktivnih snovi, ki jih proizvajajo. Alge iz rodu *Dunaliella* so prisotne tudi v Sečoveljskih solinah, vendar trenutno o njih vemo malo.

V raziskovalnem delu smo se osredotočili na dve kulturi rodu *Dunaliella*. Prva je *D. salina*, ki je najbolj raziskana predstavnica svojega rodu, druga pa je neznan vrsta tega rodu, izolirana iz Sečoveljskih solin. Raziskovali smo njuno rast v različnih razmerah: pri standardnih solinskih pogojih (kontrola), pri visoki in nizki koncentraciji NaCl, ter pri visoki in nizki svetlosti. Rast alg smo spremljali spektrofotometrično z merjenjem absorbance pri 600 nm (sorazmerna gostoti celic) in absorbance pri 740 nm (sorazmerna koncentraciji klorofila). Pri kontrolnih poskusih smo rast dodatno spremljali s tedenskim štejetjem celic pod svetlobnim mikroskopom.

Cilj naloge je bil poiskati najboljše pogoje za rast obeh kultur (še posebej alg iz Sečoveljskih solin), kar bo pripomoglo k hitremu razmnoževanju teh alg v laboratorijskih pogojih. Z opazovanjem morfoloških značilnosti pod mikroskopom smo želeli ugotoviti, ali sta obe preučevani algi iste vrste. Naši rezultati so pokazali, da *Dunaliella salina* najbolje uspeva v kontrolnih razmerah (srednja slanost gojišča) in pri visoki svetlosti. *Dunaliella* iz Sečoveljskih solin pa je najbolje uspevala v zelo slanem gojišču. Ugotovili smo, da se testirani kulturi alg razlikujeta glede na rastni optimum, poleg tega pa imata tudi različne morfološke značilnosti. Sklepamo, da *Dunalielle* iz Sečoveljskih solin najverjetneje niso vrste *D. salina*, kar pa bi morali v nadaljevanju raziskave preveriti z analizo genomske DNA, ki omogoča zanesljivo razlikovanje vrst alg.

## Ključne besede

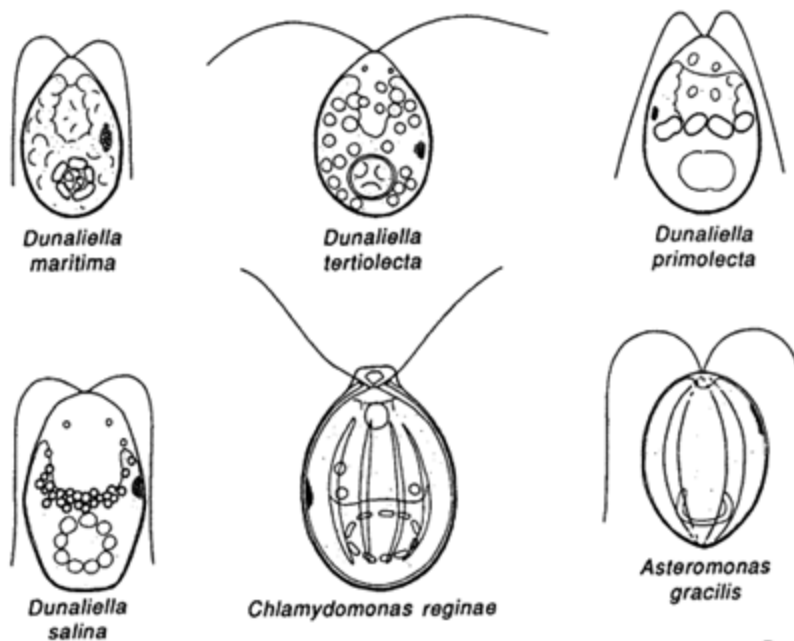
*Dunaliella*, zelene mikroalge, Sečoveljske soline, spektrofotometrija, svetlobni mikroskop

# Primerjava rasti dveh alg iz rodu *Dunaliella* v laboratorijskih razmerah

## Uvod

Alge rodu *Dunaliella* so halofilne ali halotolerantne enocelične zelene alge, za katere je značilna sposobnost preživetja v zelo slanem okolju. Najpogosteje jih najdemo v morskih in obmorskih habitatih v Evropi in Sredozemlju, predvsem v slanih močvirjih in v solinah. Za nekatere vrste je značilno, da se ob ekstremnih pogojih obarvajo v rdečkaste odtenke [1].

Posamezne celice so velike od 5  $\mu\text{m}$  do 15  $\mu\text{m}$ , nimajo celične stene in imajo dva bička. Običajno so zelene barve, a lahko se obarvajo tudi rumeno-zeleno, rdeče in oranžno. Lahko so okrogle, ovoidne/jajčaste ali elipsoidne oblike (slika 1). Razmnožujejo se spolno ali nespolno, odvisno od okoljskih razmer. Pripadnike rodu *Dunaliella* stežka ločujemo glede na morfološke in fiziološke značilnosti, saj se lahko razlike pojavijo že znotraj vrste. Vrste zato običajno ločujemo z molekularno filogenijo, vedo, ki se ukvarja z razlikovanjem in odkrivanjem sorodnosti med organizmi z odkrivanjem razlik v dednem zapisu in beljakovinah [1][2].



Slika 1: Prikaz nekaj vrst alg iz rodu *Dunaliella* in sorodnikov [3].

Najbolje raziskana predstavnica rodu *Dunaliella* je vrsta *D. salina*. Je ekstremni halofil, saj se najpogosteje nahaja v slanih jezerih, slanih močvirjih, slanih ravninah ali evaporacijskih bazenih v solinah. Te alge lahko živijo pri koncentracijah NaCl od 0,2 % do 35 %. Najbolje uspevajo pri koncentracijah od 3 % do 7 % NaCl [4]. So okrogle ali podolgovate jajčaste oblike in v dolžino običajno merijo 8-24  $\mu\text{m}$ . Običajno so zelene barve. Pod mikroskopom se vidi zelene kloroplaste, a tudi veliko rdečih zrn, ki so sestavljena iz karotenoidov in glicerola [5].

Za to vrsto in mnoge druge pripadnike tega rodu je značilno obarvanje v rdečo ali oranžno v ekstremnih pogojih, kot so visoka temperatura, visoka koncentracija soli, visoka intenziteta svetlobe in pomanjkanje kisika ter dušika. V tem primeru začnejo omenjene alge proizvajati veliko  $\beta$ -karotenoidov, ki delujejo kot antioksidanti in celico ščitijo pred UV-sevanjem, ter glicerol, ki uravnava osmotski tlak v celici, tako da omogoči normalno delovanje celičnih mehanizmov tudi v zelo slanem okolju [5][6].

# Primerjava rasti dveh alg iz rodu *Dunaliella* v laboratorijskih razmerah

## 1. Namen in hipoteze

V tej nalogi smo želeli raziskati rast alg iz rodu *Dunaliella* v različnih razmerah:

- **normalni pogoji** - kontrolni poskus (gojišče MJM z 1,5 M NaCl, sobna temperatura, standardna intenziteta svetlobe),
- **visoka slanost**, 3 M NaCl (nadzorovane spremenljivke: slanost gojišča MJM, sobna temperatura, standardna intenziteta svetlobe),
- **nizka slanost**, 0,5 M NaCl (n.s.: slanost gojišča MJM, sobna temperatura, standardna intenziteta svetlobe),
- **visoka svetlost** (n.s.: gojišče MJM z 1,5 M NaCl, sobna temperatura, intenziteta osvetlitve),
- **nizka svetlost** (n.s.: gojišče MJM z 1,5 M NaCl, sobna temperatura, intenziteta osvetlitve).

Odvisna spremenljivka je gostota celic, ki smo jih spremljali v odvisnosti od časa na več načinov: z merjenjem absorbanca svetlobe pri valovni dolžini 600 nm, zmerjenjem absorbanca pri valovni dolžini 740 nm (ustreza količini klorofila), in s štetjem celic z uporabo svetlobnega mikroskopa. Slednje smo naredili zgolj pri kontrolnih kulturah.

Na podlagi meritev smo določili rastni krivulji alg *Dunaliella* (absorbanca pri izbrani valovni dolžini v odvisnosti od časa). S primerjavo spektrofotometričnih meritev in dejanskega števila celic, ki smo ga določili z mikroskopom, smo nato ovrednotili ustreznost spektrofotometričnih meritev za oceno števila alg v tekoči kulturi.

Pri vseh pogojih smo raziskovali dve kulturi alg. Prva kultura so bile alge vrste *Dunaliella salina* in druga kultura so bile alge rodu *Dunaliella* neznane vrste. Slednje so bile izolirane iz Sečoveljskih solin. S primerjavo rastnih krivulj in morfoloških značilnosti smo poskušali ugotoviti, ali so alge v drugi kulturi vrste *Dunaliella salina* ali druga vrsta rodu *Dunaliella*. Poznavanje vrste alg, izoliranih iz Sečoveljskih solin, bi olajšalo nadaljnje raziskave za biotehnološke in ekološke namene. Alge *Dunaliella* med drugim proizvajajo veliko karotenoidov, ki se v človeškem telesu pretvorijo v vitamin A. Ker so te alge proizvajalci biotehnološko zanimivih snovi v obmorskih slaniščih in solinskih ekosistemih, ki so zelo redki in občutljivi, jih je pomembno raziskovati in ohraniti [4]. Največje slanišče v Sloveniji je ravno v Sečoveljskih solinah, od koder izvira druga kultura testiranih alg.

## Hipoteze

1. Alge rodu *Dunaliella* se najhitreje razmnožujejo pri visoki svetlosti.
2. Spremembe slanosti gojišča vplivajo na razmnoževanje alg rodu *Dunaliella*.
3. Spektrofotometrične meritve za določanje gostote celic so primerne za oceno števila alg rodu *Dunaliella* v tekoči kulturi.
4. Neznana vrsta alg iz Sečoveljskih solin ni vrste *Dunaliella salina*.

# Primerjava rasti dveh alg iz rodu *Dunaliella* v laboratorijskih razmerah

## 2. Materiali in metode

### Priprava gojišča za alge

Celice rodu *Dunaliella* so prilagojene rasti v slanem okolju, zato je bilo najprej potrebno pripraviti gojišče MJM (angl. Modified Johnson's Medium) (tabela 1, tabela 2, tabela 3), ki simulira zelo slano okolje (standardni MJM se pripravi z 1,5 M NaCl, kar je približno trikrat več kot povprečna slanost morja) ter zagotavlja preskrbo alg s hranili in mikroelementi.

**Tabela 1: Sestavine prilagojenega\* gojišča MJM** \*(standard: 1 g/l KNO<sub>3</sub>, mi smo uporabili 0,84 g/l NaNO<sub>3</sub>).

Gojišče MJM	Količina za 1 l raztopine	Količina za 2 l raztopine
H <sub>2</sub> O destilirana	980 ml	1960 ml
NaCl	po potrebi	po potrebi
MgCl <sub>2</sub> ×6H <sub>2</sub> O	1,5 g	3,0 g
MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,5 g	1,0 g
KCl	0,2 g	0,4 g
CaCl <sub>2</sub> ×2H <sub>2</sub> O	0,2 g	0,4 g
NaNO <sub>3</sub>	0,84 g	1,7 g
NaHCO <sub>3</sub>	0,043 g	0,086 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,035 g	0,070 g
Fe-razt.	10 ml	20 ml
razt. mikroel.	10 ml	20 ml

**Tabela 2: Sestavine železove raztopine (Fe-razt.).**

Fe-raztopina	Količina za 1 l raztopine	Količina za 200 ml raztopine
Na <sub>2</sub> EDTA	189,0 mg	37,8 mg
FeCl <sub>3</sub> ×6H <sub>2</sub> O	244,0 mg	48,8 mg

## Primerjava rasti dveh alg iz rodu *Dunaliella* v laboratorijskih razmerah

**Tabela 3: Sestavine prilagojene\* raztopine mikroelementov (razt. mikroel.)** \*(standard: 38,0 mg/l  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\times 4\text{H}_2\text{O}$ , mi smo uporabili 52,1 mg/l  $\text{Na}_2\text{MoO}_4\times 2\text{H}_2\text{O}$ ).

Raztopina mikroelementov	Količina za 1 l raztopine	Količina za 200 ml raztopine
$\text{H}_3\text{BO}_3$	61,0 mg	12,2 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4\times 2\text{H}_2\text{O}$	52,1 mg	10,4 mg
$\text{CuSO}_4\times 5\text{H}_2\text{O}$	6,0 mg	1,2 mg
$\text{CoCl}_2\times 6\text{H}_2\text{O}$	5,1 mg	1,0 mg
$\text{ZnCl}_2$	4,1 mg	0,8 mg
$\text{MnCl}_2\times 4\text{H}_2\text{O}$	4,1 mg	0,8 mg

Ker nas je zanimala rast alg pri različnih slanostih oz. koncentracijah NaCl 0,5 M, 1,5 M in 3 M, smo najprej naredili gojišče MJM brez NaCl in nato dodali ustrezno količino NaCl v 400 mL takšnega gojišča.

**Tabela 4: Masa NaCl za željeno molarno koncentracijo.** Standardni MJM smo pripravili z 1,5 M NaCl, kar je približno trikrat več kot povprečna slanost morja.

NaCl	M = 58,44 g/mol	
c [M]	Količina za 1 l	Količina za 400 ml
0,5	29,2 g	11,7 g
1,5	87,7 g	35,1 g
3	175,3 g	70,1 g

### Algne kulture in eksperimentalne razmere

S kulturami alg smo ravnali previdno in jih obravnavali pod sterilnimi pogoji v biološki varovalni komori (laminariju). V sterilne erlenmajerice smo nalili 50 ml gojišča MJM z ustrezno koncentracijo NaCl in v prvih pet dodali alge, za katere smo vedeli, da so vrste *Dunaliella salina*, in v drugih pet pa smo dodali alge neznane vrste rodu *Dunaliella* iz Sečoveljskih solin. Alge smo odvzeli iz že obstoječih tekočih algnih kultur, in sicer smo dodali po 1 ml goste algne kulture v vsako erlenmajerico s 50 ml gojišča MJM. Celoten poskus je potekal v desetih erlenmajericah.

Kontrolni poskus ter poskusa z nizko in visoko koncentracijo NaCl so potekali na osvetljeni polici v laboratoriju, pri konstantni osvetlitvi intenzitete 800 – 1000 lumnov ( $T = 22\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ ), poskus pri nižji svetlosti je potekal za omaro v laboratoriju pri intenziteti svetlobe 50 lumnov ( $T = 22\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ ), poskus pri višji svetlosti pa v rastni komori z intenziteto svetlobe 1300 lumnov in temperaturo 22 °C. Spremembe v svetlosti čez dan so zanemarljivo majhne, saj so bili

## Primerjava rasti dveh alg iz rodu *Dunaliella* v laboratorijskih razmerah

poskusi, razen tisti pri nizki svetlosti, izvedeni pod lučjo, ki zagotavlja konstantno osvetlitev. Zaradi položaja svetil pri kontrolnem poskusu in prenatrpanosti police, je možno da so bile nekatere kulture izpostavljene višji svetlosti kot druge, a poskušali smo jih postaviti tako da so bile enako osvetljene.

Algne kulture, ki smo jih gojili v različnih razmerah, smo spremljali 43 dni in redno izvajali meritve, kot je opisano v nadaljevanju. V tem obdobju algam nismo dovajali svežega gojišča, saj nas je zanimala njihova rast v omenjenem časovnem obdobju.

### UV/Vis spektrofotometrija

Absorbanco svetlobe pri valovnih dolžinah 600 nm in 740 nm smo merili z bralcem mikrotiterskih plošč proizvajalca Agilent. To je naprava, ki meri pronicanje svetlobe skozi raztopino vzorca, tako da vanjo vložimo ploščo s 96 vdolbinami, v katere smo predhodno dali po 200 µl vzorca, ki je bil v našem primeru kultura alg. Absorbanca je definirana kot desetiški logaritem razmerja med intenziteto svetlobe, ki potuje v vzorec, in intenziteto prepuščene svetlobe. Absorbanca pri valovni dolžini 600 nm je merilo za gostoto celic, absorbanca pri valovni dolžini 740 nm pa je merilo za količino klorofila v vzorcu. Gostejši kot je material, ki absorbira svetlobo, večja je vrednost absorbance. Poleg kontrolne meritve, kjer smo merili absorbanco gojišča (brez dodanih alg), smo za vsako meritev testirano aljno kulturo odpipetirali v dve vdolbini na mikrotiterski plošči, kar je izboljšalo natančnost in zanesljivost meritev. Ker se lahko alge v vdolbinicah posedejo na dno, smo v program bralca plošč dodali korak stresanja, ki se je izvedlo tik pred meritvijo.

### Štetje celic pod mikroskopom

Celice smo šteli z uporabo optičnega mikroskopa v Petroff-Hausserjevi števni komori. Vzorec alg smo po potrebi redčili z dodatkom gojišča. Nato smo določili število celic v štirih kvadratih za meritev in izračunali povprečno vrednost. Število celic na militer (kar ustreza gostoti celic) smo izračunali tako:

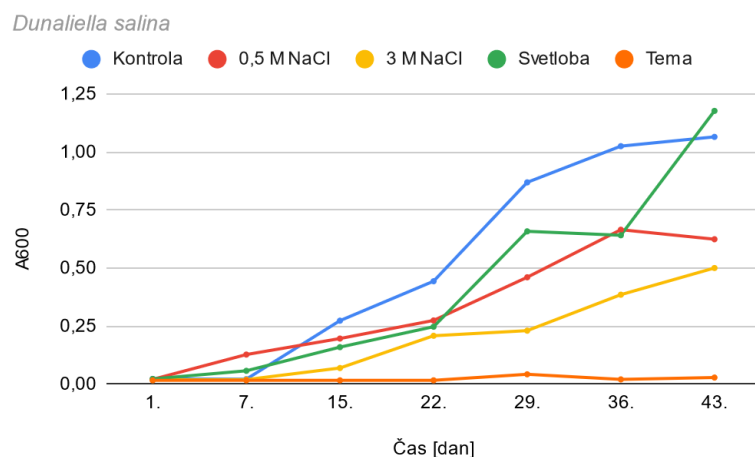
$$\text{Število celic/ml} = \text{povprečno št. prešteti celic} * \text{faktor redčitve} * 50.000$$

### Podatkovna obravnava

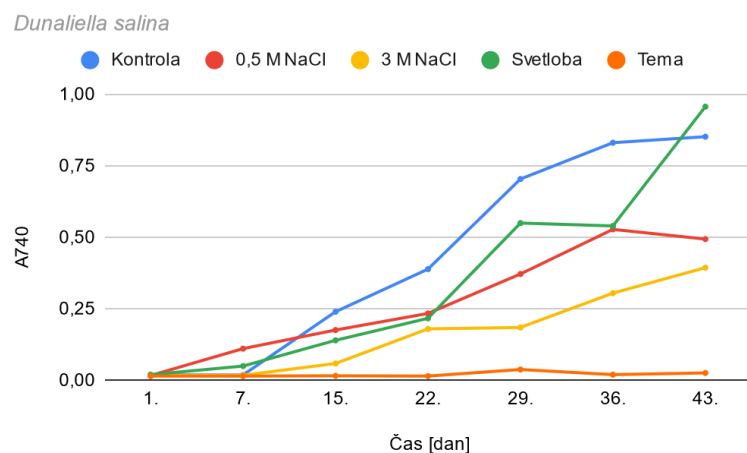
Podatke smo uredili in analizirali v Alfabetovem programu Google Sheets. Od izmerjenih absorbanc v spektrofotometru smo odšteli absorbanco gojišča, ki meri 0,04 in izračunali aritmetično sredino vrednosti obeh vzorcev kulture. Ta je zaokrožena na tri decimalna mesta. Razmerje med gostoto alg in absorbanco pri 600 nm ali 740 nm smo izračunali pri vsaki meritvi in zaokrožili na  $10^5$ . Aritmetično sredino teh vrednosti smo zopet zaokrožili na  $10^5$ , za boljše preglednost in s tem dobili uporaben količnik za pretvorbe iz absorbance v gostoto celic. Relativno napako smo definirali kot količnik največjega odstopanja od izračunanega povprečja in izračunanega povprečja.

### 3. Rezultati

#### Rastne krivulje



**Slika 2: Časovna odvisnost absorbance pri valovni dolžini 600 nm (A600) za kulturo alg *Dunaliella salina*.** Meritve smo izvedli približno na 7 dni. Vsi poskusi so potekali v gojišču MJM (z ustrezno prilagojeno slanostjo) pri sobni temperaturi. Kontrolni poskus (modro, Kontrola) je potekal pri 1,5 M NaCl in 800 – 1000 lumnih. Poskus 2 (rdeče, 0,5 M NaCl) je potekal pri nižji slanosti in kontrolni intenziteti osvetlitve (800 – 1000 lumnov). Poskus 3 (rumeno, 3 M NaCl) je potekal pri višji slanosti in kontrolni intenziteti osvetlitve (800 – 1000 lumnov). Poskus 4 (zeleno, Svetloba) je potekal pri kontrolni slanosti (1,5 M NaCl) in povišani intenziteti osvetlitve (1300 lumnov). Poskus 5 (oranžno, Tema) je potekal pri kontrolni slanosti (1,5 M NaCl) in zmanjšani intenziteti osvetlitve (50 lumnov).



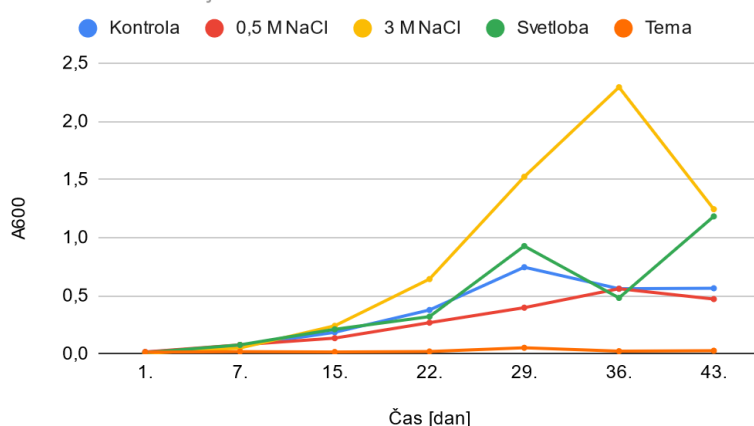
**Slika 3: Časovna odvisnost absorbance pri valovni dolžini 740nm (A740) za kulturo alg *Dunaliella salina*.** Meritve smo izvedli približno na 7 dni. Vsi poskusi so potekali v gojišču MJM (z ustrezno prilagojeno slanostjo) pri sobni temperaturi. Kontrolni poskus (modro, Kontrola) je potekal pri 1,5 M NaCl in 800 – 1000 lumnih. Poskus 2 (rdeče, 0,5 M NaCl) je potekal pri nižji slanosti in kontrolni intenziteti osvetlitve (800 – 1000 lumnov). Poskus 3 (rumeno, 3 M NaCl) je potekal pri višji slanosti in kontrolni intenziteti osvetlitve

## Primerjava rasti dveh alg iz rodu *Dunaliella* v laboratorijskih razmerah

(800 – 1000 lumnov). Poskus 4 (zeleno, Svetloba) je potekal pri kontrolni slanosti (1,5 M NaCl) in povišani intenziteti osvetlitve (1300 lumnov). Poskus 5 (oranžno, Tema) je potekal pri kontrolni slanosti (1,5 M NaCl) in zmanjšani intenziteti osvetlitve (50 lumnov).

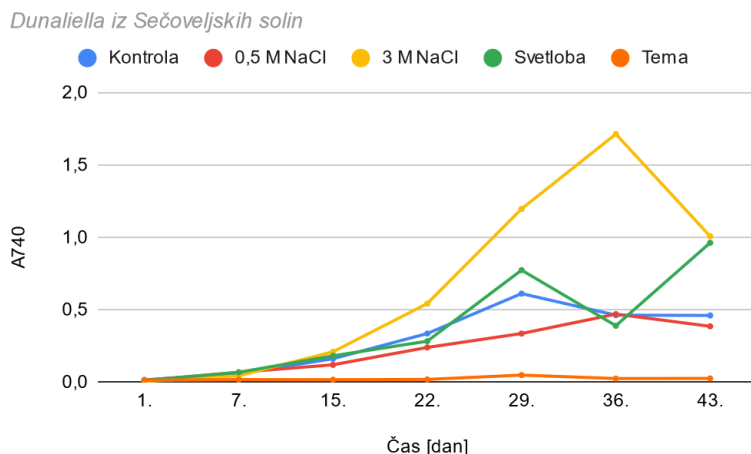
Vrednosti absorbanc so se pri štirih od petih poskusov za kulturo *D. salina* rasle premo enakomerno (slika 2, slika 3). Vrednosti se pri poskusu v temi (oranžna) niso spreminjale. Najvišjo vrednost je dosegla kultura v poskusu pri višji svetlosti (zeleno). Pri ostalih meritvah je imel kontrolni poskus najvišje vrednosti. V povprečju so namerjene vrednosti absorbance kulture v poskusu pri nižji slanosti (rdeča) bile nekaj manjše od tistih pri višji svetlosti (zeleno), le na koncu je imela slednja enkrat večjo vrednost. Absorbanca kulture pri višji slanosti (rumena) je imela v povprečju približno polovično tolikšnjo vrednost kot tista pri nižji slanosti (rdeča).

*Dunaliella* iz Sečoveljskih solin



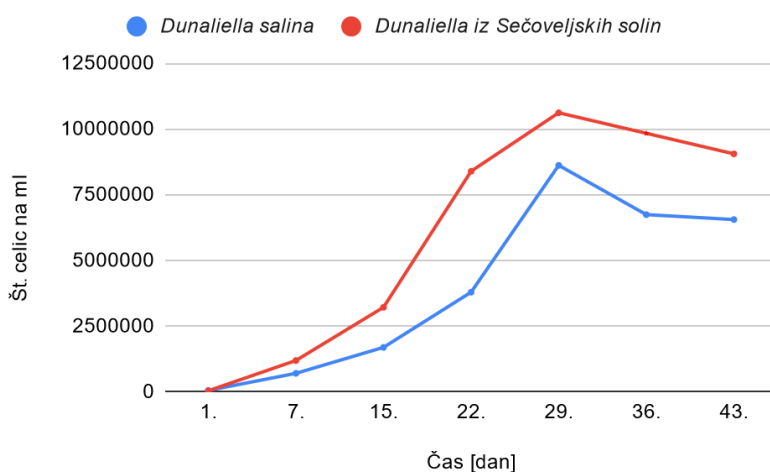
**Slika 4: Časovna odvisnost absorbance pri valovni dolžini 600 nm (A600) za kulturo alg *Dunaliella* iz Sečoveljskih solin.** Meritve smo izvedli približno na 7 dni. Vsi poskusi so potekali v gojišču MJM (z ustrežno prilagojeno slanostjo) pri sobni temperaturi. Kontrolni poskus (modro, Kontrola) je potekal pri 1,5 M NaCl in 800 – 1000 lumnih. Poskus 2 (rdeče, 0,5 M NaCl) je potekal pri nižji slanosti in kontrolni intenziteti osvetlitve (800 – 1000 lumnov). Poskus 3 (rumeno, 3 M NaCl) je potekal pri višji slanosti in kontrolni intenziteti osvetlitve (800 – 1000 lumnov). Poskus 4 (zeleno, Svetloba) je potekal pri kontrolni slanosti (1,5 M NaCl) in povišani intenziteti osvetlitve (1300 lumnov). Poskus 5 (oranžno, tema) je potekal pri kontrolni slanosti (1,5 M NaCl) in zmanjšani intenziteti osvetlitve (50 lumnov).

## Primerjava rasti dveh alg iz rodu *Dunaliella* v laboratorijskih razmerah



**Slika 5: Časovna odvisnost absorbance pri valovni dolžini 740nm (A740) za kulturo alg *Dunaliella* iz Sečoveljskih solin.** Meritve smo izvedli približno na 7 dni. Vsi poskusi so potekali v gojišču MJM (z ustrezno prilagojeno slanostjo) pri sobni temperaturi. Kontrolni poskus (modro, Kontrola) je potekal pri 1,5 M NaCl in 800 – 1000 lumnih. Poskus 2 (rdeče, 0,5 M NaCl) je potekal pri nižji slanosti in kontrolni intenziteti osvetlitve (800 – 1000 lumnov). Poskus 3 (rumeno, 3 M NaCl) je potekal pri višji slanosti in kontrolni intenziteti osvetlitve (800 – 1000 lumnov). Poskus 4 (zeleno, Svetloba) je potekal pri kontrolni slanosti (1,5 M NaCl) in povišani intenziteti osvetlitve (1300 lumnov). Poskus 5 (oranžno, Tema) je potekal pri kontrolni slanosti (1,5 M NaCl) in zmanjšani intenziteti osvetlitve (50 lumnov).

Najvišjo absorbanco je pri vseh meritvah kulture alg iz Sečoveljskih solin (slika 5, slika 6) imel poskus pri višji slanosti (rumena). Njegova absorbanca je bila pri predzadnji meritvi trikrat tolikšna, kot pri kontrolnem poskusu (modra), pri zadnji meritvi je pa bila dosti nižja. Krivulje napram tistim pri kulturi *D. salina* niso premo enakomerne, temveč imajo S obliko: na začetku eksponentno naraščajo, nato pa okoli 29. dne začnejo stagnirati. Vrednosti se pri poskusu v temi (oranžna) niso spreminjale. Krivulji spremembe absorbance pri kontrolnem poskusu (modra) in poskusu pri nižji slanosti (rdeča) skoraj sovpadata.



**Slika 6: Spremljanje rasti obeh kultur alg (*Dunaliella salina* in *Dunaliella* iz Sečoveljskih solin) z določanjem števila celic.** Število celic smo določali le pri algnih kulturah, ki so rastle v kontrolnih pogojih (gojišče MJM s koncentracijo NaCl 1,5 M, osvetlitev 800-1000 lumnov). Celice smo prešteli s pomočjo svetlobnega mikroskopa.

## Primerjava rasti dveh alg iz rodu *Dunaliella* v laboratorijskih razmerah

Na grafikonu je vidna razlika med rastno krivuljo kulture *D. salina* in neznanu algo iz Sečoveljskih solin. Krivulji eksponentno naraščata do okoli 29. dne, ko dosežeta plato, nato pa začnejo vrednosti malo padati. Gostota celic *Dunalielle* iz sečoveljskih solin doseže vrednost več kot  $10^7$  celic na mililiter, *D. salina* pa čez  $8,5 \times 10^6$ .

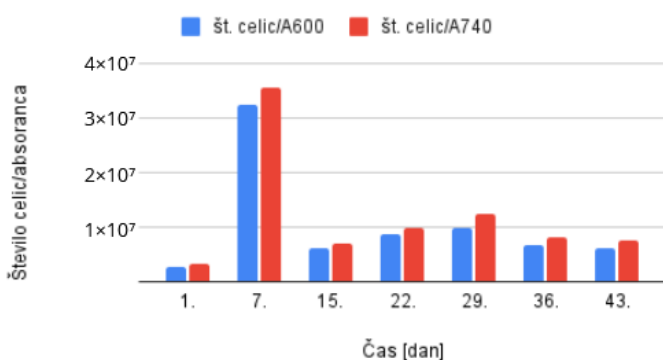
## Primerjava rasti dveh alg iz rodu *Dunaliella* v laboratorijskih razmerah

### Razmerja med celično gostoto in absobanco

**Tabela 5: Razmerje med številom celic na ml in absorbanco pri valovni dolžini 600 nm oz. 740 nm, zaokroženo na 100 000, pri kulturi *Dunaliella salina*.** Prvega dne je bilo število pod mikroskopom prešteti celic (rdeče) zelo majhno, kar povzroča velika statistična odstopanja; 7. dne je bila izmerjena absorbanca (rdeče) nepričakovano nizka, zaradi postopkovnih napak. Zato smo točki odstranili iz nabora podatkov za računanje povprečja.

Čas [dan]	št. celic/ml	A600	A740	št. celic/A600 [ $\times 10^6$ ]	št. celic/A740 [ $\times 10^6$ ]
1.	<b>62500</b>	0,023	0,02	<b>2,7</b>	<b>3,1</b>
7.	712500	<b>0,022</b>	<b>0,02</b>	<b>32,3</b>	<b>35,6</b>
15.	1700000	0,274	0,241	6,2	7,0
22.	3800000	0,444	0,39	8,5	9,7
29.	8625000	0,87	0,705	9,9	12,2
36.	6750000	1,026	0,832	6,5	8,1
43.	6562500	1,066	0,853	6,1	7,6

*Dunaliella salina*



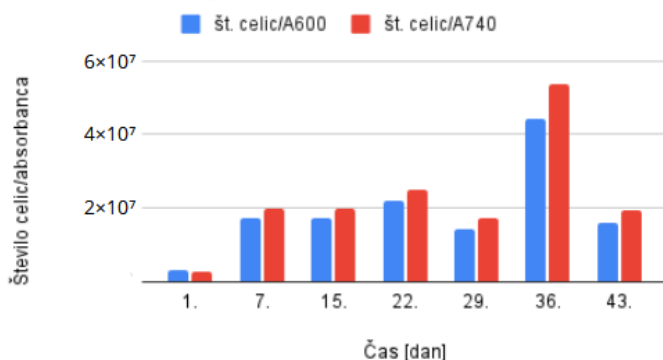
**Slika 7: Grafični prikaz razmerij med številom celic in absorbanco pri valovni dolžini 600 nm (modra) oz. 740 nm (rdeča) za kulturo *Dunaliella salina*.** Prikazani so podatki iz tabele 5.

## Primerjava rasti dveh alg iz rodu *Dunaliella* v laboratorijskih razmerah

**Tabela 6: Razmerja med številom celic na ml in absorbanco svetlobe pri valovni dolžini 600 nm in 740 nm, zaokroženo na 100 000, pri kulturi *Dunaliella* iz Sečoveljskih solin.** Prvega dne je bilo število pod mikroskopom preštetih celic (rdeče) zelo majhno, kar povzroča velika statistična odstopanja; 36. dne je bilo izmerjeno število celic na ml nepričakovano visoko zaradi postopkovnih napak. Zato smo točki odstranili iz zbora podatkov za računanje povprečja.

Čas[Dan]	Št. celic/ml	A600	A740	št. celic/A600 [ $\times 10^7$ ]	št. celic/A740 [ $\times 10^7$ ]
1.	<b>50000</b>	0,017	0,018	<b>0,29</b>	<b>0,27</b>
7.	1200000	0,069	0,061	1,73	1,96
15.	3225000	0,187	0,164	1,72	1,96
22.	8400000	0,379	0,338	2,21	2,48
29.	10625000	0,747	0,614	1,42	1,73
36.	<b>25000000</b>	0,562	0,465	<b>4,44</b>	<b>5,37</b>
43.	9062500	0,566	0,463	1,60	1,95

*Dunaliella* iz Sečoveljskih solin



**Slika 8: Grafični prikaz razmerij med številom celic in absorbanco pri valovni dolžini 600 nm in 740 nm pri kulturi *Dunaliella* iz Sečoveljskih solin.** Prikazani so podatki iz tabele 6.

Za alge *D. salina* (tabela 5, slika 7) smo določili:

- Razmerje števila alg/ml in A600:  $7,4 \times 10^6 \pm 34\%$
- Razmerje števila alg/ml in A740:  $8,9 \times 10^6 \pm 37\%$

Pri neznanih algah rodu *Dunaliella* iz Sečoveljskih solin (tabela 6, slika 8) pa smo namerili:

- Razmerje števila alg/ml in A600:  $1,73 \times 10^7 \pm 28\%$
- Razmerje števila alg/ml in A740:  $2,01 \times 10^7 \pm 23\%$

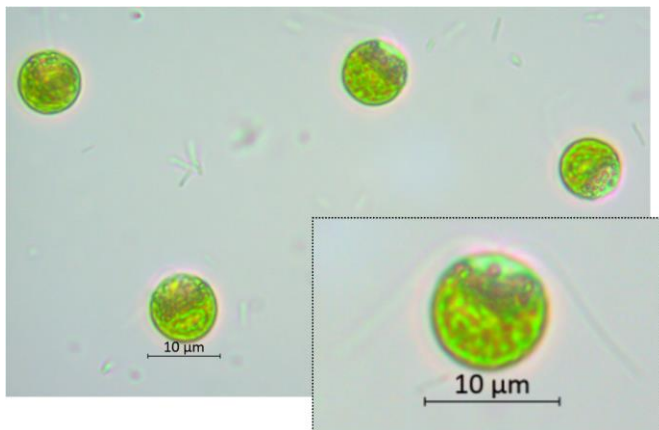
# Primerjava rasti dveh alg iz rodu *Dunaliella* v laboratorijskih razmerah

## Napake

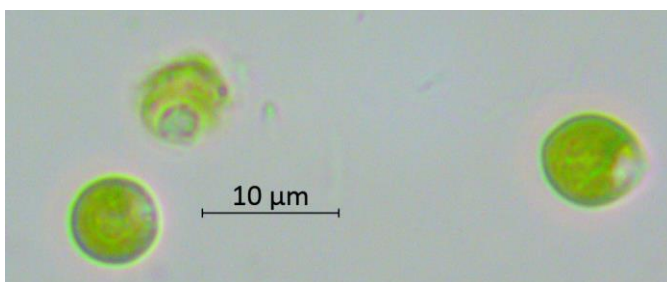
Najpogostejša napaka pri delu, do katere je prišlo je premajhno mešanje vzorca pred pipetiranjem. Sklepamo, da se je to zgodilo 7. dan pri kulturi *D. salina* ker je meritev absorbanc nižja kot pričakovano (slika 3, slika 4, tabela 4), kar je vodilo v trikrat večje izračunano razmerje med številom celic in absorbanco kot pri ostalih meritvah (tabela 4). Pri meritvi 36. dne pri kulturi z Sečoveljskih solin (slika 4, slika 5) tudi sumimo na enako napako, saj vrednost absorbance pri kulturi z višjo koncentracijo soli poskoči na trikrat višjo vrednost v primerjavi z vsemi ostalimi meritvami. Na 36. dan smo pri kulturi z Sečoveljskih solin (slika 6, tabela 6) namerili abnormalno veliko število celic in zopet sumimo nepravilno premešan vzorec. Vse te vzorce smo odstranili iz izračuna povprečnih vrednosti.

Štetje je bilo najbolj problematično prvič, ko je bila koncentracija celic tako nizka da smo prešteli nič ali eno celico na kvadrant (tabela 5, 6), kar lahko vodi v veliko napako pri določanju koncentracije celic. Tu izračunano razmerje je bilo tudi nesorazmerno z ostalimi, tako da smo ga odstranili iz nabora podatkov za računanje povprečja.

## Fotografije



**Slika 9: Mikroskopska slika štirih alg vrste *Dunaliella salina* in povečana mikroskopska slika alge vrste *Dunaliella salina*. Vidi se značilno pomanjkanje celične stene, dva bička in plastidi v celici.**



**Slika 10: Dva živa in en mrtev predstavnik neznane vrste rodu *Dunaliella* iz Sečoveljskih solin. V primerjavi z *D. salina* so manjši in imajo nepravilne oblike.**

## Primerjava rasti dveh alg iz rodu *Dunaliella* v laboratorijskih razmerah



**Slika 11: Erlenmajerice s kulturami alg.** V prednji vrsti so alge *Dunaliella salina*, v zadnji pa neznane alge iz Sečovljskih solin. Od leve proti desni so: poskusa z manjšo intenziteto svetlobe, poskusa z višjo intenziteto svetlobe, poskusa pri višji slanosti, poskusa pri nižji slanosti in kontrolna poskusa. Barvni gradient se sklada z rezultati na sliki 2, sliki 3, sliki 4 in sliki 5.

## 4. Razprava

V prvem delu raziskovalne naloge smo želeli določiti rast alg in rodu *Dunaliella* (*D. salina* in neznana vrsta iz Sečoveljskih solin) v različnih laboratorijskih pogojih. To smo naredili na več načinov, in sicer smo merili absorbanco pri 600 nm, ki podaja optično gostoto kulture, ter absorbanco pri 740 nm, ki je premo-sorazmerna koncentraciji klorofila [7], fotosintetskega pigmenta, ki je značilno prisoten v celicah rastlin in alg [8]. Z določanjem absorbance lahko torej spremljamo rast alg v testiranih pogojih.

### I. hipoteza

“Alge rodu *Dunaliella* se najhitreje razmnožujejo pri visoki svetlosti.”

Iz slike 2 in slike 3 je razvidno, da sta najboljše od kultur *D. salina* uspevali kulturi v kontrolnem poskusu in pri višji svetlosti. Alge, ki so rasle pri visoki intenziteti svetlobe, so imele šele pri zadnji meritvi večjo izmerjeno absorbanco (A600 in A740) kot alge iz kontrolnega poskusa. Domnevamo, da so bile alge pri kontrolnem poskusu izpostavljene višji svetlosti kot smo namerili, saj smo v literaturi naleteli na bistveno višje optimume za rast *D. salina* [9]. Iz rastnih krivulj je pa tudi jasno razvidno, da je kultura pri kontrolnem poskusu dosegla fazo stacionarne rasti, med tem ko pa ta pri višji svetlosti še ni. Če bi nadaljevali poskus pričakujemo, da bi slednja prvo prerasla, saj pri višji svetlosti bolj učinkvito vrši fotosintezo [8]. Kultura v temi je rasla zanemarljivo malo, saj alge, in rastline na splošno potrebujejo svetlobo, da poteka proces fotosinteze. Ta je nujno potreben, saj tako pridobivajo glukozo, katero potrebujejo za opravljanje celičnega dihanja ter pridobivanja energije, za metabolne procese in razmnoževanje. Alge v temi ne morajo opravljati fotosinteze, hitro porabijo zalogo glukoze in odmrejo [8].

Vse algne kulture iz Sečoveljskih solin, razen tiste pri višji intenziteti svetlobe, so do 36. dne gojenja dosegle stacionarno fazo rasti (slika 4, slika 5). Slednje zaradi višje intenzitete proizvedejo več sladkorja in posledično energije za rast [9]. Podobno kot pri algah *Dunaliella salina*, tudi te alge pri nizki intenziteti svetlobe niso rasle zaradi nezmožnosti vršenja fotosinteze. Rast alg pri višji svetlosti je bila približno enako uspešna kot rast pri kontrolnih pogojih, le da je nekoliko kasneje dosegla stacionarno fazo rasti.

Prvo hipotezo smo potrdili. Pri algah vrste *D. salina*, ki so rasle pri višji intenziteti svetlobe, smo po mesecu in pol gojenja izmerili višji absorbanci pri 600 nm in 740 nm kot pri algah, gojenih v kontrolnih pogojih. Čeprav so se v začetnih tednih kontrolne alge razmnoževale hitreje kot tiste, gojene pri visoki slanosti, predvidevamo, če bi nadaljevali poskus, bi pri teh potekala fotosinteza bolj učinkovito kar bi pomenilo več energije za rast kulture. Neznana vrsta *Dunaliella* iz Sečoveljskih solin je večji del poskusa boljše rastla pri višji svetlosti kot pri kontroli, čeprav razlika ni bila zelo izrazita. Pri obeh kulturah zgolj kultura pri višji intenziteti svetlobe ni dosegla faze stacionarne rasti. Če bi rast alg spremljali dlje časa in jim dodajali hranilno gojišče, bi bila razlika v rasti pri omenjenih pogojih najverjetneje bolj opazna.

### II. hipoteza

“Spremembe slanosti gojišča vplivajo na razmnoževanje alg rodu *Dunaliella*.”

Drugo hipotezo smo potrdili pri obeh testiranih kulturah. Izkazalo se je, da tako nizka slanost (0,5 M NaCl) kot tudi visoka slanost (3 M NaCl) inhibira rast alg *D. salina*, ki so najboljše rastle

## Primerjava rasti dveh alg iz rodu *Dunaliella* v laboratorijskih razmerah

pri srednji slanosti gojišča (1,5 M NaCl). Nekoliko hitreje je rasla kultura pri nižji slanosti. Sklepamo, da se pri slanosti 0,5 M NaCl in 3 M NaCl alge množijo počasneje, ker so to pogoji, ki so sicer možni v naravi in se nanje alge lahko prilagodijo, a niso optimalni za njihovo rast. To se ujema z modelom strpnostne krivulje, ki kaže, da bolj kot se bližamo ekstremu prisotnosti ali pomanjkanju nečesa, počasnejša je rast organizma [10]. Ti pogoji se pojavijo, ko na primer morje poplavi soline, v sušnih obdobjih, ali ko se alge nahajajo v solinskih bazenčkih, ki so tik pred žetjem kristalizirane soli. Glede na podatke iz literature so sicer alge *Dunaliella salina* zelo halofilni organizmi [11] in bi tako pričakovali, da bodo najboljše rastle pri povišani slanosti gojišča. Znano pa je tudi, da pri izredno visokih slanostih alge pridejo v stanje aplanospor, ki omogočajo preživetje v neugodnih razmerah, vendar niso več metabolno aktivne in se ne razmnožujejo [12][13].

Alge rodu *Dunaliella*, izolirane iz Sečoveljskih solinah, so po drugi strani odlično uspevale v zelo slanem gojišču s 3 M NaCl, kar je kar približno šestkrat večja slanost kot v morju, saj smo v teh pogojih izmerili smo najvišje meritve absorbanc pri 600 nm in 740 nm. Glede na te rezultate sklepamo, da je neznana vrsta *Dunaliella* zelo dobro prilagojena na ekstremne razmere, ki so naravno prisotne v Sečoveljskih solinah. Poleti, ko se zaradi pripekajočega sonca pospeši izhlapevanje in se gladina vode v kristalizacijskih bazenih zniža, se posledično močno poveča slanost vode, v kateri živijo. Slanoljubne alge morajo biti sposobne zaradi naglih sprememb slanosti hitro uravnati osmotski tlak, kar alge iz rodu *Dunaliella* naredijo s kopičenjem znotrajceličnega glicerola, ki deluje kot osmoprotektant [14].

Alge iz Sečoveljskih solinah so pri 1,5 M NaCl in pri 0,5 M NaCl vzpevale približno ekvivalentno. Ker so prilagojene na rast pri visoki slanosti so te vrednosti izven njihovega optimuma, zato se množijo počasneje [11], saj izvirajo iz okolja, kjer slanost okolja večino časa dosega izredno visoke vrednosti.

### III. hipoteza

“Spektrofotometrične meritve za določanje gostote celic so primerne za oceno števila alg rodu *Dunaliella* v tekoči kulturi.”

V drugem delu naloge smo želeli preveriti, ali lahko na podlagi spektrofotometričnih meritev (A600 in A740) določimo dejansko število celic v tekoči kulturi alg iz rodu *Dunaliella*. Pri delu z algami se namreč pogosto meri kar optična gostota, bodisi pri A600 ali A740 (slika 2, slika 3, slika 4, slika 5), saj je to hitra in enostavna metoda za oceno celične gostote [7]. V kontrolnih vzorcih obeh kultur alg smo z uporabo mikroskopa prešteli celice in določili celično gostoto (št. celic na ml). Nato smo za algne kulture v različnih časovnih točkah, čez celotno trajanje poskusa, določili razmerje med št. celic na ml in izmerjeno absorbanco.

Izkazalo se je, da je bilo razmerje med preštetimi celicami in izmerjeno absorbanco pri obeh kulturah približno konstantno in se ni spreminjalo s časom (tabela 5, tabela 6, slika 7, slika 8). Večja odstopanja, ki smo jih opazili v nekaterih časovnih točkah, so najverjetneje nastala zaradi napak pri delu. Pred pipetiranjem vzorca alg iz erlenmajerice v ploščo za spektrofotometrične meritve je bilo treba aljno kulturo temeljito premešati in hitro odpipetirati, ker se alge pri višjih celičnih gostotah hitro posedajo na dno erlenmajerice (slika 11). To je včasih težavno, saj moramo z vzorci hkrati ravnati previdno in aseptično, da jih ne kontaminiramo. Problematične meritve smo izločili iz nabora podatkov za določitev povprečja,

## Primerjava rasti dveh alg iz rodu *Dunaliella* v laboratorijskih razmerah

v nadaljevanju raziskave pa bi bilo smiselno ta poskus še enkrat ponoviti, da bi povečali zanesljivost meritev.

Za alge *D. salina* (tabela 5, slika 7) smo določili:

- Razmerje števila alg/ml in A600:  $7,4 \times 10^6 \pm 34\%$
- Razmerje števila alg/ml in A740:  $8,9 \times 10^6 \pm 37\%$

Pri neznanih algah rodu *Dunaliella* iz Sečoveljskih solin (tabela 6, slika 8) pa smo namerili:

- Razmerje števila alg/ml in A600:  $1,73 \times 10^7 \pm 28\%$
- Razmerje števila alg/ml in A740:  $2,01 \times 10^7 \pm 23\%$

Hipotezo smo potrdili. Kot lahko vidimo, so izračunana razmerja na podlagi A600 in A740 za posamezno alno kulturo v istem velikostnem razmerju, kar kaže, da lahko za oceno števila celic merimo absorbanco pri kateri koli od teh valovnih dolžin. S temi ugotovitvami smo potrdili tudi tretjo hipotezo. Zanimivo je opažanje, da so izračunana razmerja alge *D. salina* in alge neznane vrste rodu *Dunaliella* različna približno za faktor 10. Raziskovalci bodo lahko izračunana razmerja v prihodnje uporabili za oceno dejanskega števila celic na podlagi izmerjene absorbance pri valovni dolžini 600 nm oz. 740 nm.

Opozorili pa bi, da je ocena manj zanesljiva v primeru, da delamo z zelo redkimi kulturami ter tudi, ko so alne kulture že zelo goste in se celice posedajo na dno gojitvenih posod. Ocena števila pa bi morala biti ustrezna za večino stacionarne faze rasti testiranih alg rodu *Dunaliella*. Pomembno je tudi, da se razmerje, ki služi za pretvorbo absorbance v število celic določi za vsako kulturo posebej, saj se izkaže, da ti faktorji pretvorbe niso nujno enaki za različne vrste oz. seve alg *Dunaliella*.

### IV. hipoteza

“Neznana vrsta alg iz Sečoveljskih solin ni vrste *Dunaliella salina*.”

Četrte hipoteze nismo niti potrdili niti ovrgli. Kulturi sta se drastično razlikovali po uspešnosti razmnoževanja pod določenimi pogoji. Alge rodu *Dunaliella* iz Sečoveljskih solin so bile najboljše uspevale pri slanosti 3 M NaCl, za tem pa pri poskusu z višjo intenziteto svetlobe (slika 4, slika 5). Razmnoževanje celic *Dunaliella salina* pa je bila najbolj uspešno pri poskusu z večjo intenziteto svetlobe in pri kontrolnem poskusu (slika 2, slika 3), v obeh primerih pri slanosti 1,5 M NaCl. Kulturi sta izkazovali podobno dinamiko rasti. Začetni kratki prilagoditveni fazi je sledila linearna rast, ki je proti koncu opazovanega časovnega obdobja (približno 6 tednov) dosegla stacionarno fazo rasti. Izkazalo se je, da se alge iz Sečoveljskih solin v danih laboratorijskih pogojih hitreje razmnožujejo.

Kulturi se razlikujeta tudi po morfoloških lastnostih: predstavniki vrste *Dunaliella salina* (slika 9) so pravilne kroglaste oblike in veliki okoli 10  $\mu\text{m}$ , medtem ko so predstavniki neznane vrste iz Sečoveljskih solin (slika 10) manjši, veliki 6 - 8  $\mu\text{m}$ , in so večinoma nepravilnih oblik. A ločevanje vrst po morfoloških značilnostih je pri algah rodu *Dunaliella* zavajajoče. Ker nimajo celične stene, se njihove oblike in velikosti spreminjajo skozi življenjski cikel in glede na razmere v okolju [2]. Dandanes je najpogostejši in najbolj natančen način ločevanja vrst z molekularno filogenijo [1], ki preučuje razlike v samem genetskem zapisu in na osnovi tega razlikuje predstavnike različnih vrst. V našem poskusu smo opazovali le osnovne značilnosti alg (morfologijo in dinamiko rast), kar pogosto zadostuje. Ker pa so si predstavniki znotraj rodu

## Primerjava rasti dveh alg iz rodu *Dunaliella* v laboratorijskih razmerah

alg *Dunaliella* po osnovnih značilnostih pogosto zelo podobni [1], menimo, da je potrebno neznano vrsto iz Sečoveljskih solin raziskati z bolj natančnimi molekularnobiološkimi pristopi.

### Izboljšave

Glede na to da je naloga sestavljena iz več delov, bi se dalo vsakega nekaj dopolniti in izpopolniti. Že pri samem začetku bi bilo bolje če bi v vsako gojišče dali dvakrat več alg, da bi imeli pri prvi spektrofotometrični meritvi bolj zanesljive vrednosti. V prihodnje bi meritve opravljali pogosteje, da dobimo boljši skupek podatkov in lažje oblikujemo rastne krivulje, in se znebimo hujših statističnih odklonov. Z enakim razlogom bi tudi večkrat prešteli alge. Bolje bi bilo tudi, če bi posebej merili spremembe pri osvetljenosti in slanosti medija, saj bi bila v tem primeru naša pozornost namenjena eni od dveh spremenljivk. Tako bi lahko bolj podrobno raziskovali razlike v rasti kultur pri različnih svetlostih, pri osvetlitvah v blokih ali sinusoidnih osvetlitvah. Glede na slanoljubnost neznane vrste iz Sečoveljskih solin predlagamo, da se jo nadaljno raziskuje pri še večjih koncentracijah NaCl. Kljub temu, da smo odkrili morfološke razlike med kulturama algama, to ne zadostuje za določitev vrste, zato prelagamo to nalogo na bolj izkušene kolege, ki bi podobnosti in razlike med kulturama ugotavljali z biokemijskimi procesi.

## 5. Zaključek

V tej nalogi smo dokazali, da alge rodu *Dunaliella* najbolje uspevajo pri višji intenziteti svetlobe, da slanost gojišča vpliva na rast alg rodu *Dunaliella*, in primernost spektrofotometrije kot orodja za merjenje rasti teh alg, ter določili pretvorbene koeficiente med namerjenimi absorbančami in številom celic. Želeli smo tudi ugotoviti, ali je alga iz Sečoveljskih solin vrste *Dunaliella salina*, a zaradi zapletenosti in prepletenosti med sevi in vrstami v rodu *Dunaliella*, naša analiza rastnih krivulj in morfoloških lastnosti ne zadošča.

Odkrivanje in analiziranje domačega, slovenskega, okolja je pomembno, saj ga tako lažje obvarujemo, ali pa mogoče tudi izkoristimo v prid družbe. Že najmanjša alga ima lahko velik vpliv na okolje v katerem biva, sploh če je primarni proizvajalec v ekstremnem okolju, kar naša alga iz Sečoveljskih solin je. Z nadaljnjimi raziskavami bi se dalo odkriti marsikaj zanimivega o tej algi in njeni vlogi v ekstremnem ekosistemu, katerega naseljuje, njenem pomenu v solinarstvu v Sečovljah in potencialni uporabnosti v prehrambeni industriji, kot vir vitamina A.

## 6. Viri

- [1] U. Lortou *et al.*, "Beneath the Aegean Sun: Investigating *Dunaliella* Strains' Diversity from Greek Saltworks," *Water (Basel)*, vol. 15, no. 6, 2023, doi: 10.3390/w15061037.
- [2] M. A. Borowitzka and C. J. Siva, "The taxonomy of the genus *Dunaliella* (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species," *J Appl Phycol*, vol. 19, no. 5, pp. 567–590, 2007, doi: 10.1007/s10811-007-9171-x.
- [3] J. Throndsen, "Chapter 5 - The Planktonic Marine Flagellates," in *Identifying Marine Phytoplankton*, C. R. Tomas, Ed., San Diego: Academic Press, 1997, pp. 591–729. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-012693018-4/50007-0>.
- [4] N. Farhat, M. Rabhi, H. Falleh, J. Jouini, C. Abdelly, and A. Smaoui, "OPTIMIZATION OF SALT CONCENTRATIONS FOR A HIGHER CAROTENOID PRODUCTION IN *DUNALIELLA SALINA* (CHLOROPHYCEAE)," *J Phycol*, vol. 47, no. 5, pp. 1072–1077, 2011, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2011.01036.x>.
- [5] S. Pourkarimi, A. Hallajisani, O. Alizadeh, and A. Golzary, "Factors affecting production of beta-carotene from *Dunaliella salina* microalgae," *Biocatal Agric Biotechnol*, vol. 29, p. 101771, Nov. 2020, doi: 10.1016/j.bcab.2020.101771.
- [6] C.-C. Hu, J.-T. Lin, F.-J. Lu, F.-P. Chou, and D.-J. Yang, "Determination of carotenoids in *Dunaliella salina* cultivated in Taiwan and antioxidant capacity of the algal carotenoid extract," *Food Chem*, vol. 109, no. 2, pp. 439–446, 2008, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.043>.
- [7] H.-E. Lazcano-Hernández, G. Aguilar, G. A. Dzul-Cetz, R. Patiño, and J. Arellano-Verdejo, "Off-line and on-line optical monitoring of microalgal growth," *PeerJ*, vol. 7, p. e7956, Nov. 2019, doi: 10.7717/peerj.7956.
- [8] M. P. Johnson, "Photosynthesis," *Essays Biochem*, vol. 60, no. 3, pp. 255–273, Oct. 2016, doi: 10.1042/EBC20160016.
- [9] Y. Maltsev, K. Maltseva, M. Kulikovskiy, and S. Maltseva, "Influence of Light Conditions on Microalgae Growth and Content of Lipids, Carotenoids, and Fatty Acid Composition," *Biology (Basel)*, vol. 10, no. 10, 2021, doi: 10.3390/biology10101060.
- [10] O. Nougué, N. Svendsen, R. Jabbour-Zahab, T. Lenormand, and L.-M. Chevin, "The ontogeny of tolerance curves: habitat quality vs. acclimation in a stressful environment," *Journal of Animal Ecology*, vol. 85, no. 6, pp. 1625–1635, 2016, doi: <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12572>.
- [11] J. R. Tanoeiro, G. W. Fehrenbach, P. Murray, R. Pedrosa, and Y. Chen, "Evaluation of *Dunaliella salina* Growth in Different Salinities for Potential Application in Saline Water Treatment and Biomass Production," *Aquaculture Journal*, vol. 4, no. 3, pp. 92–103, 2024, doi: 10.3390/aquacj4030007.
- [12] L. Panawala, "Difference Between Zoospores and Aplanospores," Nov. 2017.
- [13] M. A. Borowitzka and J. M. Huisman, "The ecology of *Dunaliella salina* (Chlorophyceae, Volvocales): Effect of environmental conditions on aplanospore formation," *Botanica Marina*, vol. 36, no. 3, pp. 233–244, 1993, doi: 10.1515/botm.1993.36.3.233.
- [14] H. Chen and J.-G. Jiang, "Osmotic responses of *Dunaliella* to the changes of salinity," *J Cell Physiol*, vol. 219, no. 2, pp. 251–258, 2009, doi: <https://doi.org/10.1002/jcp.21715>.