Archive of SID

بررسی اثر غلظت های مختلف نیترات بر میزان پروتئین، کلروفیل a و وزن خشک جلبک *Tetraselmis suecica*

فرناز رفیعی[1]؛آریا اشجع اردلان[1]؛ نکیسا اصغربیگی[1]*؛ عبدالله اسماعیل زاده[2]

nakisa_a63@ yahoo.com

۱- گروه بیولوژی دریا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران

۲- ایستگاه تحقیقات شیلاتی نرمتنان بندر لنگه، هرمزگان، ایران.

تاریخ دریافت : فروردین ۱۳۹۰ تاریخ پذیرش : مرداد ۱۳۹۰

چکیده

رشد ریزجلبک ها می‌تواند بدلیل سطوح پائین مواد غذایی در محیط، محدود شده و همچنین در ترکیبات بیوشیمیایی آنها تغییراتی حاصل شود. برخی از ریزجلبک ها برای تغذیه موجودات پرورشی استفاده می‌شوند. در مطالعه ای که در بهار سال ۱۳۹۰ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال انجام گرفت، ریزجلبک *Tetraselmis suecica* در محیط کشت F/2 گیلارد، حاوی مقادیر متفاوتی از نیترات($12mgL^{-1}$ / ۶ (کم) ، ۱۲/۲۵(استاندارد،محیط کشت f2) ، ۲۴/۷۱ (زیاد)) کشت داده شد و اثر غلظت های مختلف نیترات بر میزان پروتئین، کلروفیلa و وزن خشک جلبک *Tetraselmis suecica* بررسی شد. نتایج بررسی ها نشان داد که با افزایش غلظت نیترات محتوای پروتئین جلبک به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد($P<۰/۰۵$). میزان پروتئین در روز پنجم کشت در غلظت بالای نیترات ۵/۸ ٪ بود و در روز نهم به ۱۰/۷٪ رسید. این در حالی بود که میزان پروتئین در روز نهم کشت در غلظت استاندارد و پائین نیترات به ترتیب از ۵/۸ ٪ و ۵/۱ ٪ تجاوز نکرد. با کاسته شدن از میزان نیترات در دسترس سلول های جلبکی، میزان کلروفیل a نیز در حد معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) کاهش یافت، این در حالیست که وزن خشک سلول های جلبکی افزایش یافت. در روز نهم میزان وزن خشک در سلول های کشت داده شده در غلظت پائین نیترات $۰/۱۸ mgL^{-1}$ و در غلظت بالای نیترات $۰/۱۵۶ mgL^{-1}$ اندازه گیری شد.

کلمات کلیدی : *Tetraselmis suecica*، نیترات، پروتئین، کلروفیل a

*نویسنده مسئول

www.SID.ir

Archive of SID

۱.مقدمه

درک مکانیسم هایی که تولیدات را در اقیانوس ها کنترل می کنند به فهم گسترده تر ما از محیط زیست دریایی می انجامد. مواد مغذی، به ویژه نیتروژن، به عنوان عامل محدود کننده تولیدات فیتوپلانکتون ها مطرح شده اند. در طبیعت محدودیت نیتروژن هنگامی رخ می دهد که میزان تقاضا از فرایند تولید پیشی بگیرد. نتایج حاصل از بررسی استرس های ناشی از نیتروژن در ریزجلبک ها، می تواند در تشریح محیط زیست دریا و چگونگی بهره برداری از آن مفید باشد(۱۰).

جلبک سبز تتراسلمیس یک فیتوپلانکتون دریایی و متحرک است که حرکت آن توسط ۴ تاژک انجام می‌شود که از بخش قدامی آن خارج شده است(۴). سلول ها معمولاً تا ۱۰ میکرومتر طول و ۱۴ میکرومتر پهنا، رشد می‌کنند. در این جلبک سلول ها تقریبا به صورت فشرده، قطبی شکل، بیضی یا تقریباً کروی دیده می‌شوند. دارای لکه چشمی بوده و تولیدمثل آن به صورت غیرجنسی می باشد. تتراسلمیس دارای بیش از ۵۰ گونه می‌باشد که اکثراً مربوط به آب های دریایی بوده و تعدادی نیز در آب های شیرین شناسایی شدند (۳) . *T. suecica* همچنین بدلیل توانایش در تحمل طیف گسترده‌ای از غلظت نمک بسیار مورد توجه است(۹). از آنجا که تحرک پذیری، میزان بازماندگی و رشد اکثر آبزیان در دوران لاروی نیازمند به تامین غذاهای زنده می باشد، لذا شناخت و تهیه این نوع غذاها از طریق تکثیر و پرورش آنها در کارگاه های تکثیر و پرورش واجد اهمیت است(۲) و ریزجلبک تتراسلمیس از جمله گونه هایی است که بدلیل داشتن مقادیر بالایی از پروتئین و چربی به طور گسترده در صنعت آبزی پروری به عنوان غذای زنده برای دوکفه‌ای‌ها ، زئوپلانکتون‌ها ، لارو سخت‌پوستان و ماهی ها، مورد استفاده قرار می گیرد(۹).

از جمله مطالعاتی که در این زمینه صورت گرفته است می توان به ارزیابی تأثیر محدودیت نیتروژن بر روی جلبک *Chlorella sorokiniana* و *Oocystis polymorpha* اشاره کرد(۱۴). آنها دریافتند که افزایش نیتروژن در محیط سبب افزایش میزان پروتئین و کلروفیل در ریزجلبک ها می‌شود(۱۴). در مطالعه دیگری محققین، *Tetraselmis suecica* را در دو غلظت بالا و پائین نیتروژن کشت داده و تأثیر آن را بر ترکیبات بیوشیمیایی جلبک بررسی کردند(۸). آنها دریافتند که محدودیت نیترات سبب بوجود آمدن اختلاف معنی داری در میزان پروتئین جلبک می گردد به طوری که جلبک کشت داده شده در نیترات بالا حاوی ۵ برابر پروتئین بیشتر نسبت به جلبک کشت داده شده در نیترات پائین بود. همچنین میزان وزن خشک در سلول های کشت داده شده در غلظت پائین نیترات به طور معنی‌داری بالاتر گزارش شد(۸). مطالعاتی نیز بر روی تاثیر غلظت های مختلف نیترات بر میزان پروتئین جلبک *Spirulina platensis* انجام گرفته است(۲۰). در مطالعه آنها *S. platensis* در دو غلظت ($۲/۵\ gL^{-1}$) ۵۰٪ و ($۰\ gL^{-1}$) ۱۰۰٪ نیتروژن کشت داده شد. نتایج بدست آمده نشان داد که میزان پروتئین در غلظت ۵۰٪ نیتروزن ۵۳٪ و در غلظت N ۱۰۰٪ ، این میزان به ۵/۶ ٪ کاهش یافت. بالاترین میزان وزن خشک ($۱\ gL^{-1}$) نیز از سلول های جلبکی کشت داده شده در غلظت N ۱۰۰٪ بدست آمد(۲۰). پیشنهاد شده که می‌توان با کنترل میزان نیتروژن در محیط کشت، ارزش غذایی جلبک ها را بهبود بخشید(۹). با توجه به هزینه بالای تولید محیط کشت، می توان تغییراتی را در نوع محیط کشت مورد استفاده ریزجلبک ها ایجاد کرد تا بدین ترتیب، ارزش غذایی ریز جلبک ها و راندمان تولید را افزایش داد(۱). هدف مطالعه حاضر تعیین اثر غلظت های متفاوت نیترات بر روی میزان پروتئین،کلروفیل a و وزن خشک جلبک *Tetraselmis suecica* می باشد. برای این منظور جلبک *Tetraselmis suecica* در سه غلظت متفاوت از نیترات ($۶/۱۲\ mg\ L^{-1}$ (کم)، ۱۲/ ۲۵ (استاندارد) و ۲۴/ ۷۱ (زیاد) کشت داده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

۲.مواد و روش ها

جلبک *Tetraselmis suecica* از ایستگاه تحقیقات شیلاتی نرمتنان بندرلنگه ، جهت بررسی اثر غلظت های متفاوت نیترات بر میزان پروتئین، وزن خشک و کلروفیل a، تهیه شد. برای کشت جلبک از محیط کشت f2 گیلارد(۱۱) با شوری ppm ۳۵ استفاده شد. تیمارهای نیترات در سه غلظت mg^{-1} ۱۲/ ۶ (کم)، mgL^{-1} ۲۵/ ۱۲ (استاندارد) و mgL^{-1} ۷۱/ ۲۴ (زیاد) و در سه تکرار در نظر گرفته شد(۶). تلقیح نمونه ها د ر محیط کاملاً استریل و به نسبت ٪ ۱۰ استوک جلبکی در ٪ ۹۰ محیط کشت انجام گردید. برای کلیه تیمارها از دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی با شدت نور $photon\ m^{-2}$ $\mu mol\ s^{-1}$ ۴۰ استفاده شد. دمای محیط ۲۵- ۲۳ درجه سانتیگراد، pH محیط حدود ۸– ۷/۸ و هوادهی به طور مداوم انجام شد. سلول های جلبکی روزانه توسط لام هموسیتومتر نئوبار شمارش شدند. برای این منظور روزانه ۵ میلی لیتر از محلول جلبکی را داخل لوله آزمایش ریخته و برای تثبیت سلول های جلبکی ۲ الی ۳ قطره محلول لوگل ٪ ۱ به آن افزوده شد. سپس یک قطره از محلول را بر روی لام هموسیتومتر ریخته و پس از شمارش سلول های جلبکی، تراکم سلول ها از طریق فرمول زیر محاسبه شد(۱).

$$\text{تراکم سلولی (Cell / ml)} = \frac{N}{\text{تعداد بلوک ها}} \times ۱۰^{۴}$$

جلبک ها به مدت ۱۰ روز کشت داده شدند و در روز پنجم، هفتم و نهم پس از آغاز کشت، ۵۰۰ سی سی از محلول جلبکی به همراه فرمیات آمونیوم ۰/۵ مولار به منظور زدودن نمک، با دور ۳۵۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ کرده و نمونه بدست آمده در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد در مدت ۲۴ ساعت خشک و برای انجام سنجش پروتئین نگهداری شد(۱۵). سنجش پروتئین با استفاده از روش Lowry که بیشترین کاربرد را در زمینه تعیین میزان پروتئین نمونه های زیستی دارد، انجام شد. در این روش ابتدا پروتئین به همراه یون مس در محلول قلیایی عمل آوری شده، سپس اسید آمینه‌های آروماتیک در نمونه عمل آوری شده باعث کاهش اسید phosphomolybdate-phosphotungstic ظاهر شده در معرف فولین می شود که محصول نهایی این واکنش محلولی آبی رنگ خواهد بود. میزان پروتئین را می توان از طریق خواندن میزان جذب نوری نمونه در برابر منحنی استاندارد سرم آلبومین بدست آورد(۱۳).

به منظور تعیین میزان وزن خشک جلبک، حجم مشخصی از محلول جلبکی(۱۰۰ میلی لیتر) را توسط کاغذ صافی واتمن (Whatman GF/C, 4.7 cm) فیلتر کرده، سپس توسط فرمیات آمونیوم ۰/۵ مولار به منظور زدودن نمک شستشو داده شده و در نهایت فیلترها در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد در مدت ۲۴ ساعت خشک و سپس وزن شدند(۱۸).

$$\text{وزن خشک (mg/L)} = \frac{(A-B)\times 1000}{\text{حجم نمونه}(ml)}$$

A = وزن فیلتر + جلبک خشک شده(mg)

B = وزن فیلتر(mg)

برای اندازگیری میزان کلروفیل a از روش Lorenzen استفاده شد. برای این منظور مقدار ۵۰ میلی‌لیتر از جلبک توسط کاغذ صافی(Sartorius (Sartorius -type 82121-005-04، فیلتر شد. نمونه بدست آمده به همراه استون ۹۰٪ به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شد. سپس نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شده و جذب نوری آنها در طول موج های ۶۳۰ ، ۶۴۷ و ۶۶۵ نانومترخوانده و تراکم کلروفیل a طبق فرمول زیر محاسبه شد(۱۲).

$$Ca = 11.85\ E_{665} - 1.54\ E_{647} - 0.08\ E_{630}$$

$$\text{کلروفیل a } (mg/m^3) = \frac{(Ca)\times(V_E)}{(V_F)\times(n)}$$

V_E = حجم استون ۹۰ ٪ (ml)

V_F = حجم جلبک فیلتر شده (L)

n = ۱

www.SID.ir

Archive Of SID

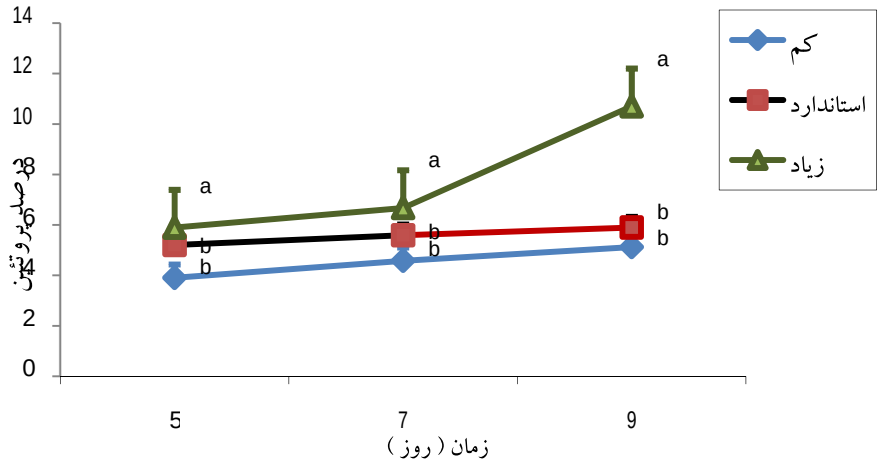
بر روی کلیه اطلاعات حاصل از اندازه گیری های مختلف محاسبات آماری لازم با استفاده از برنامه های نرم افزاری SPSS و EXCEL انجام شد. جهت مشخص نمودن تفاوت معنی دار بودن بین گروه های مختلف از آزمون تجزیه واریانس یک طرفه و از آزمون توکی(Tukey) جهت مشخص نمودن حد معنی دار بودن تیمارهای مختلف با ۹۵ درصد اطمینان استفاده شد.

۳.نتایج

بررسی اثر غلظت های مختلف نیترات بر میزان پروتئین جلبک تتراسلمیس اختلاف معنی داری را نشان داد($p<۰/۰۵$). در غلظت پائین نیترات ($۶/۱۲ mg L^{-1}$) میزان پروتئین از ۳/۹ ٪ در روز پنجم به ۵/۱ ٪ در روز نهم رسید، در غلظت استاندارد ($۱۲/۲۵ mgL^{-1}$) در روز پنجم ۵/۲٪ و در روز نهم ۵/۸٪ اندازگیری شد. در غلظت بالای نیترات($۲۴/۷۱ mg L^{-1}$) میزان پروتئین از ۵/۸ ٪ در روز پنجم به ۱۰/۷ ٪ در رو نهم رسید(شکل ۱).

بررسی تأثیر غلظت های متفاوت نیترات بر روی وزن خشک سلول های جلبک تتراسلمیس اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ($p>۰/۰۵$) . با این حال میانگین وزن خشک ۱۰۰ میلی لیتر از محلول جلبکی، در سلول هایی که در غلظت پائین نیترات رشد کردند بالاتر بود. در غلظت ۶/۱۲ میلی‌گرم در لیتر ، وزن خشک جلبک از $۰/۱۶ mgL^{-1}$ در روز پنجم به $۰/۱۸ mgL^{-1}$ در روز نهم رسید. در حالی که در غلظت ۲۴/۷۱ میلی‌گرم در لیتر، وزن خشک از $۰/۱۴ mgL^{-1}$ در روز پنجم به $۰/۱۵ mgL^{-1}$ در روز نهم رسید(شکل ۲).

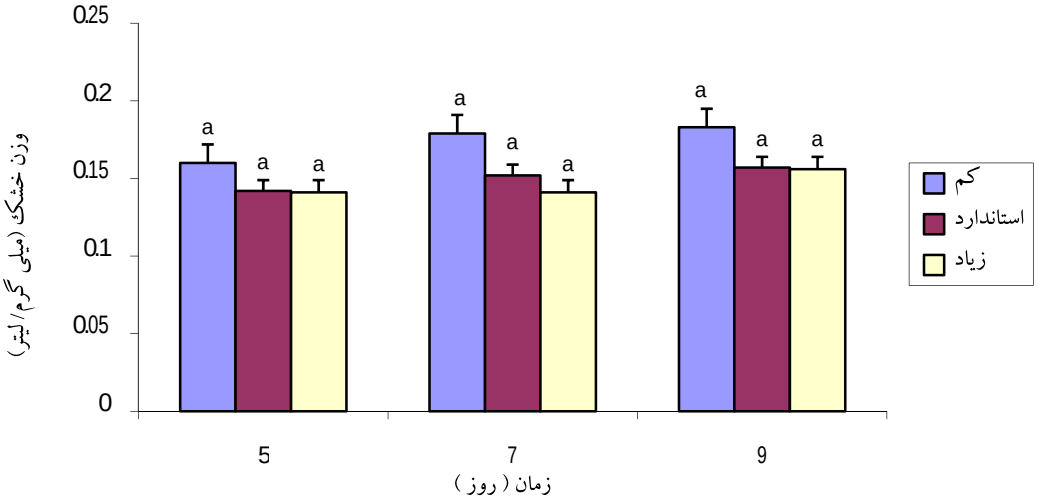
نتایج بررسی‌های انجام شده در اثر غلظت های نیترات بر میزان کلروفیل a جلبک تتراسلمیس نشان داد که با کاسته شدن از میزان نیترات در دسترس سلول های جلبکی، میزان کلروفیل a نیز در حد معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) کاهش یافت. به طوری که در غلظت بالای نیترات میزان کلروفیل mg/ m^3 ۵/۳، در غلظت استاندارد نیترات حدود mg/ m^3 ۲/۲ و در غلظت پائین نیترات mg/m^3 ۱/۳ اندازه گیری شد(شکل ۳). بر اساس نتایج بدست آمده در غلظت بالای نیترات سلول های جلبکی به رنگ سبز لجنی تیره، در غلظت استاندارد نیترات به رنگ سبز لجنی و در غلظت پائین نیترات به رنگ سبز متمایل به زرد دیده شدند. اگرچه در روزهای ابتدایی آغاز کشت تفاوتی در رنگ آنها مشاهده نشد اما پس از گذشت ۵ روز این تفاوت ها به مرور آشکار شدند.



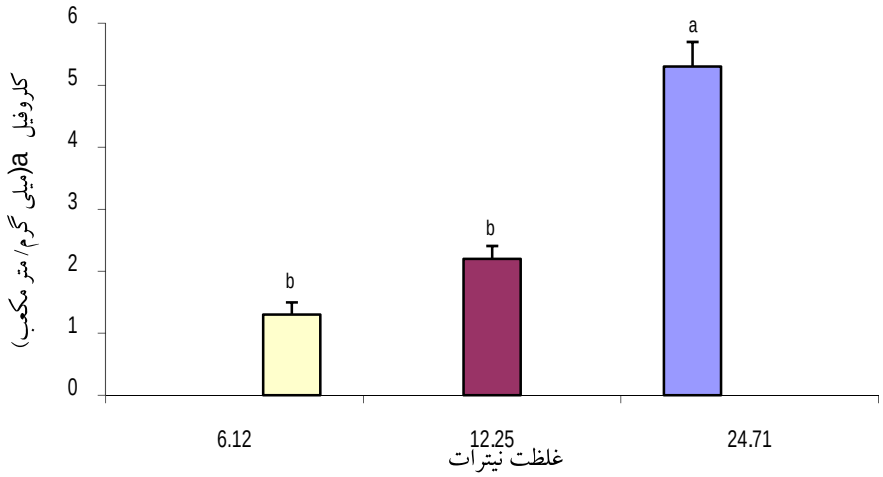
شکل ۱ : تغییرات میزان پروتئین (درصد در وزن خشک جلبک) جلبک تتراسلمیس کشت داده شده در تیمارهای مختلف نیترات(mean ± SD , N = 3).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲: اثر غلظت های مختلف نیترات بر وزن خشک سلول های جلبک *Tetraselmis suecica*(mean ± SD , N = 3).



شکل ۳: میزان کلروفیل a جلبک تتراسلمیس کشت داده شده در تیمارهای مختلف نیترات(mean ± SD , N = 3).

٤. بحث

ترکیب بیوشیمیایی میکروجلبک ها در بین گونه‌های مختلف متفاوت است(۴) و به طور گسترده‌ای به میزان مواد غذایی و روش کشت آنها بستگی دارد(۶). در این تحقیق با افزایش میزان نیترات، میزان کلروفیل a نیز افزایش پیدا کرد که به دلیل اهمیت نیترات(نیتروژن) در ساختمان کلروفیل a بود.تحت تأثیر نیترات، میزان کلروفیل در جلبک *Chlorella sorokiniana* نیز باعث کاهش ۳ درصدی کلروفیل a در غلظت ۵ mmol/ L نیترات نسبت به غلظت ۱۰mmol/ L نیترات شده است (۱۴).

محققین دریافتند که در محدودیت نیترات ، کمپلکس پروتئین _ کلروفیل نیز کاهش میابد(۷). همچنین رابطه مستقیمی بین میزان پروتئین و کلروفیل a مشاهده شده(۱۷) که بیان میکند کلروفیل a یکی از منابع مهم ذخیره نیتروژن در جلبک ها بوده و پیگمنت ها می توانند تأثیر محدودیت نیتروژن را کاهش دهند. در تمام جلبک ها افزایش حجم نیتروژن در محیط سبب افزایش محتوای پروتئین و کلروفیل می گردد(۲۰).

این تحقیق نشان داد که ارتباط مستقیم بین غلظت نیترات و

www.SID.ir

Archive Of SID

محتوای پروتئینی سلول های جلبکی وجود دارد. هنگامی که سلول های جلبکی در محدودیت نیتروژن رشد می کنند محتوای پروتئینی آنها کاهش میابد(۸). محتوای پروتئینی جلبک ها بستگی زیادی به میزان نیتروژن در دسترسشان دارد(۶). فیتوپلانکتون ها نیتروژن درون سلولی را به اشکال گوناگونی مانند نیترات، آمونیوم، آمینواسیدها، پروتئین و RNA انباشته می کنند. این ترکیبات منبع طولانی مدت ذخیره نیتروژن هستند. (۲۱) . در این تحقیق، سلول های جلبکی کشت داده شده در غلظت بالای نیترات حاوی حدوداً ۲٪ پروتئین بیشتر نسبت به دو غلظت دیگر بودند. همچنین می توان جلبک *Chlorella vulgaris* را در دو غلظت بالا و پائین نیترات کشت داد(۵). پائین ترین میزان پروتئین اندازه گیری شده ۱۳/۰۱ درصد بود که از غلظت پائین نیترات بدست آمد.

از طرفی *Phaeodactylum tricomutum* را در محیط کشت حاوی میزان کافی از نیترات و محیط کشت حاوی نیترات پائین کشت دادند(۱۹). میزان پروتئین بدست آمده از *P. tricomutum* کشت داده شده در میزان کافی نیترات ۵۵٪ بود در حالی که در گروه دوم این میزان به ۲۵٪ کاهش یافت.

با کاهش حجم نیترات در محیط کشت در دسترس سلول های جلبکی، وزن خشک در این سلول ها افزایش یافت. اگرچه این اختلاف در حد معنی داری نبود اما این میزان در روز نهم کشت در غلظت بالای نیترات $0/15\ mgL^{-1}$ ، در غلظت استاندارد $0/157\ mgL^{-1}$ و در غلظت پائین نیترات $0/18\ mgL^{-1}$ اندازه گیری شد. بالا بودن میزان وزن خشک در سلول های کشت داده شده در غلظت پائین نیترات احتمالاً بدلیل بالا بودن حجم کربوهیدرات در این سلول ها می‌باشد. اگرچه میزان کربوهیدرات در این تحقیق مورد سنجش قرار نگرفت، اما شواهد زیادی وجود دارد که با کاهش نیترات در محیط میزان کلروفیل و پروتئین کاهش ، و به دنبال آن میزان کربوهیدرات در سلول های جلبکی افزایش می‌یابد(۱۴). هنگامی که نیتروژن محدود می‌شود، انرژی مشتق شده از فتوسنتز که به طور طبیعی باعث ساخت تعداد بیشتر سلول ها و بنابراین میزان بیشتر پروتئین می‌شود، صرف تولید منابع ذخیره‌ای همچون کربوهیدرات و چربی می‌شود که اکثراً فاقد نیتروژن می‌باشند(۱۶). در تحقیقات دیگر، وزن خشک سلول های جلبک *Tetraselmis suecica* کشت داده شده در غلظت پائین نیترات (۱۷۶ μM) به طور معنی‌داری بالاتر از سلول های کشت داده شده در غلظت بالای نیترات (۱۷۶۰ μM) اندازگیری کردند(۸).

این تحقیق به وضوح نشان داد که کمبود میزان نیترات در رژیم غذایی *Tetraselmis suecica* ، سبب کاهش حجم پروتئین و کلروفیل و افزایش وزن خشک سلول های جلبکی می گردد. سلول های جلبکی کشت داده شده در غلظت پائین نیترات حاوی ۲/۱٪ پروتئین کمتر نسبت به سلول های کشت داده شده در غلظت بالای نیترات بودند، به طوری که حجم پروتئین در روز نهم کشت در غلظت پائین نیترات ۵/۱٪، در غلظت استاندارد ۵/۸٪ و در غلظت بالای نیترات ۱۰/۷٪ اندازگیری شد. کاهش میزان نیترات در محیط کشت جلبک، اختلاف معنی داری را در میزان کلروفیل سلول های جلبکی بوجود آورد. در غلظت بالای نیترات میزان کلروفیل a حدود ۴ برابر افزایش یافته و به میزان $5/3\ mg/m^3$ رسیده، در حالیکه این میزان در غلظت متوسط و پائین نیترات به ترتیب $2/2\ mg/m^3$ و ۱/۳ اندازه گیری شد.

انتخاب گونه میکروجلبک یکی از نکات مهم در بهبود میزان رشد و ترکیب بیوشیمیایی آبزیان پرورشی محسوب می‌شود. شرایط کشت حاوی نیترات پائین در محیط طبیعی معمول می‌باشد که سبب کاهش ارزش غذایی ریز جلبک ها می گردد (۸). بنابراین هچری‌ها در هنگام استفاده از این ریزجلبک در رژیم غذایی آبزیان باید اطمینان حاصل کنند که سلول های جلبکی در محیط کشت حاوی نیترات کافی رشد کرده باشند.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از تمامی کسانی که آنها را در انجام تحقیق یاری نمودند، مخصوصا سرکار خانم مهندس وکیلی صمیمانه تشکر و سپاسگزاری می نمایند.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

۱.کیهانیان، ح. ۱۳۸۷ . بررسی فلزات سنگین (cu, zn, pb) بر تراکم و میزان کلروفیل a در جلبک سبز *Scendesmus obliqus* . پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال ، گروه بیولو ژی دریا. ص ۸۰- ۶۰ .

۲. معصومی، ز. یاوری ، و. کوچنین، پ. سواری، ا. ۱۳۸۶. بررسی تأثیر رژیم نوری بر رشد میکروجلبک *Tetraselmis suecica* در محیط کشت های ویتامینه و فاقد ویتامین. مجله پژوهش و سازندگی در امور دام و آبزیان. ۷۴: ص ۱۳۹- ۱۳۱ .

3. Borghini,F. ,Colacevich,A., Bergamino ,N. , Micarelli,P. , Dattilo,A.M. ,Focardi,S., Loiselle,S.A., 2009 . The microalgae *Tetraselmis suecica* in mesocosms under different light regims . Chemistry And Ecology 5:345-357

4 Brown, M.R., 1991. The amino-acid composition of 16 species of microalgae used in mariculture . Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 145: 79–99.

5. Bulut Y .2009. The investigations on the possibility of increase lipid content of *Chlorella*. Cukurova Univ.,Institute of Science and Technology, Biotechnology Department.Turkey. 62 p.

6. Daume ,S., Krsinich,A., Farrell,S., Gervis, M., 2000. Settlement,early growth and survival of *Haliotis Rubra* in response to differentalgal species. Journal of Applied Phycology. 12: 479–488.

7. Dortch, Q., Clayton, J.R., Thoresen, S.S., Ahmed, S.I. 1984. Species differences in of accumulation nitrogen pools in phytoplankton. Marine Biology. 81:237-250.

8. D'Souza, F.M.L., Kelly, G.J. 2000. Effects of a diet of a nitogen-limited alga (*Tetraselmis suecica)* on growth, survival and biochemical composition of tiger prawn *(Penaeus semisulcatus)* larvae. Aquaculture 191: 311–329.

9. Fabregas,J., Herrero,C., Cabeza,B., Abalde, J. 2003. Mass culture and biochemical variability of the marine microalgae *Tetraselmis suecica* Kylin (Butch) with high nutrient concentration . Aquaculture.49:231-244.

10. Flynn, K.J. 1990. The determination of nitrogen status in microalgae. Marine Ecology progress series. 61:297–307.

11. Guillard, R. R. L. 1972. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates . In: Smith, W. L., Chanley, M. H. (ed.) Culture of marine invertebrate animals. Plenum Press, New York. 29 - 60.

12.Lorenzen,C.J.1967.Determination of chlorophylls and phaeopigments:spectrophotometric equations. Limnology and Oceanography. 12: 343 – 346.

13. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenolreagent. Journal of Biological Chemistry. 193: 265–275.

14. Richardson,B., Orcutt, D.M., Schwertner,H.A., Martinez ,L., Wickline H.E . 1969 . Effect on nitrogen limitation on the growth and composition of unicellular algae in continuos culture. USAF School of Aerospace Medicine.Texas. 247-249.

15. Seixas, P., Rey-Méndez, M., Valente, L.M.P., Otero, A. 2008. Producing juvenile *Artemia* asprey for *Octopus vulgaris* paralarvae with different microalgal species of controlled biochemical composition. Aquaculture. 283: 83–91.

16. Shifrin, N.S., Chisholm, S.W. 1981. Phytoplankton lipids: interspecific differences and effects of nitrate,silicate and light–dark cycles. Journal of Phycology. 17: 374–384.

17. Smit, A.J., Robertson, B.L., Du preez, D.R. 1997. Influence of ammonium-N pulse concentrations and frequency, tank condition and nitrogen starvation on growth rate and bioquemical composition of *Gracilaria gracilis*. Journal of Applied Phycology. 8:473-481.

18. Steinman, A.D., Lamberti, G. A. 1996. Biomass and pigments of benthic algae.In

www.SID.ir

Archive Of SID

"Methods in Stream Ecology". Hauer, F.R. and G.A. Lamberti (eds). Academic Press ,San Diego, CA. 297.

19.Thomas,W.H., Seibert, D.L.R., Alden, M., Neori, A., Eldridge, P. 1984. Yields, photosynthetic efficiencies and proximate composition of dense marine microalgal cultures. I. Introduction and *Phaeodactylum tricornutum* experiments. 5: 181-209.

20. Uslu.L., Oya, I., Koc,K., Goksan, T. 2010. The effect of nitrogen deficiencies on the lipid and protein contents of *Spirulina platensis*. African Journal of Biotechnology.10: 387-389.

21. Von Rückert, G., Giani, A. 2004. Effect of nitrate and ammonium on the growth and protein concentration of *Microcystis viridis* Lemmermann (*Cyanobacteria*). Revista Brasileira de Botânica. 27: 325–331.

www.SID.ir