

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

فرناز رفیعی<sup>(۱)</sup>؛ آریا اشجج اردلان<sup>(۱)</sup>؛ نکیسا اصغریگی<sup>(۱)\*</sup>؛ عبدالله اسماعیل زاده<sup>(۲)</sup>

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 پذیرش: مرداد ۱۳۹۰

تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹۰

### چکیده

رشد ریزجلبک ها می تواند 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 می شوند. 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 نیترا ت ( $1/12 \text{mgL}^{-1}$  / ۶ (کم) ،  $12/25$  (استاندارد، محیط کشت f2) ،  $24/71$  (زیاد) ) کشت داده شد و اثر غلظت های مختلف نیترا ت بر میزان پروتئین، کلروفیل a و وزن خشک جلبک *Tetraselmis suecica* بررسی شد. نتایج بررسی ها نشان داد که با افزایش غلظت نیترا ت محتوای پروتئین جلبک به طور معنی داری افزایش پیدا کرد ( $P < 0/05$ ). میزان پروتئین در روز پنجم کشت در غلظت بالای نیترا ت  $5/8\%$  بود و در روز نهم به  $10/7\%$  رسید. این در حالی بود که میزان پروتئین در روز نهم کشت در غلظت استاندارد و پائین نیترا ت به ترتیب از  $5/8\%$  و  $5/1\%$  تجاوز نکرد. با کاسته شدن از میزان نیترا ت در دسترس سلول های جلبکی، میزان کلروفیل a نیز در حد معنی داری ( $p < 0/05$ ) 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 نیترا ت  $0/18 \text{mgL}^{-1}$  و در غلظت بالای نیترا ت  $0/156 \text{mgL}^{-1}$  اندازه گیری شد.

کلمات کلیدی: *Tetraselmis suecica*، نیترا ت، پروتئین، کلروفیل a

## 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 می شود که از بخش قدامی آن خارج شده است (۴). سلول ها معمولاً تا ۱۰ میکرومتر طول و ۱۴ میکرومتر پهنا، رشد می کنند. در این جلبک سلول ها تقریباً به صورت فشرده، قطبی شکل، بیضی یا تقریباً کروی دیده می شوند. دارای لکه چشمی بوده و تولیدمثل آن به صورت غیرجنسی می باشد. تتراسلمیس دارای بیش از ۵۰ گونه می باشد 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 گسترده ای 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 بالای از پروتئین و چربی به طور گسترده در صنعت آبرزی پروری به عنوان غذای زنده برای دوکفه ای ها، زئوپلانکتون ها، لارو سخت پوستان 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 می شود (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 معنی داری بالاتر گزارش شد (۸). مطالعاتی نیز بر روی تأثیر غلظت های مختلف نیترات بر میزان پروتئین جلبک *Spirulina platensis* انجام گرفته است (۲۰). در مطالعه آنها *S. platensis* در دو غلظت ( $2/5 \text{ gL}^{-1}$ ) و ( $0/100 \text{ gL}^{-1}$ ) نیتروژن کشت داده شد. نتایج بدست آمده نشان داد که میزان پروتئین در غلظت  $2/5$  نیتروژن  $53\%$  و در غلظت  $100 \text{ N}$ ، این میزان به  $5/6\%$  کاهش یافت. بالاترین میزان وزن خشک ( $1 \text{ gL}^{-1}$ ) نیز از سلول های جلبکی کشت داده شده در غلظت  $100 \text{ N}$  بدست آمد (۲۰). پیشنهاد شده که می توان 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 ( $6/12 \text{ mg L}^{-1}$ ) (کم)،  $12/25$  (استاندارد) و  $24/71$  (زیاد) کشت داده شد.

## ۲. مواد و روش ها

جلبک *Tetraselmis suecica* از ایستگاه تحقیقات شیلاتی نرمتان بندرلنگه، جهت بررسی اثر غلظت های متفاوت نیترا ت بر میزان پروتئین، وزن خشک و کلروفیل a، تهیه شد. برای کشت جلبک از محیط کشت f2 گیلارد (۱۱) با شوری ۳۵ ppm استفاده شد. تیمارهای نیترا ت 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 در 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  $photon m^{-2}$   $40 \mu mol s^{-1}$  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 هموسیتمتر نوبار 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 هموسیتمتر ریخته و پس از شمارش سلول های جلبکی، تراکم سلول ها از طریق فرمول زیر محاسبه شد (۱).

N

$$10^4 \times \frac{N}{\text{تراکم سلولی (Cell/ml)}}$$

تعداد بلوک ها

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 آمینه های 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).

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

$$A = \text{وزن فیلتر + جلبک خشک شده (mg)}$$

$$B = \text{وزن فیلتر (mg)}$$

برای اندازه گیری میزان کلروفیل a از روش Lorenzen استفاده شد. برای این منظور مقدار ۵۰ میلی لیتر 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 نانومتر خوانده و تراکم کلروفیل a طبق فرمول زیر محاسبه شد (۱۲).

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

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

$$V_E = \text{حجم استون ۹۰\% (ml)}$$

$$V_F = \text{حجم جلبک فیلتر شده (L)}$$

$$1 = n$$

محلول جلبکی، در سلول هایی که در غلظت پائین نیترات رشد کردند بالاتر بود. در غلظت ۶/۱۲ میلی گرم در لیتر، وزن خشک جلبک از  $0.16 \text{ mgL}^{-1}$  در روز پنجم به  $0.18 \text{ mgL}^{-1}$  در روز نهم رسید. در حالی که در غلظت ۲۴/۷۱ میلی گرم در لیتر، وزن خشک از  $0.14 \text{ mgL}^{-1}$  در روز پنجم به  $0.15 \text{ mgL}^{-1}$  در روز نهم رسید (شکل ۲).

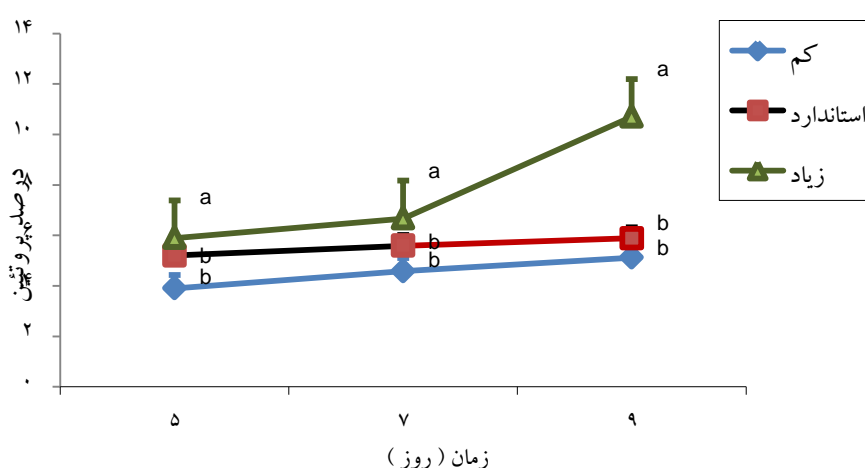
نتایج بررسی های انجام شده در اثر غلظت های نیترات بر میزان کلروفیل a جلبک تتراسلمیس نشان داد که با کاسته شدن از میزان نیترات در دسترس سلول های جلبکی، میزان کلروفیل a نیز در حد معنی داری ( $p < 0.05$ ) کاهش یافت. به طوری که در غلظت بالای نیترات میزان کلروفیل  $5.3 \text{ mg/m}^3$ ، در غلظت استاندارد نیترات حدود  $2.2 \text{ mg/m}^3$  و در غلظت پائین نیترات  $1.3 \text{ mg/m}^3$  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.

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.

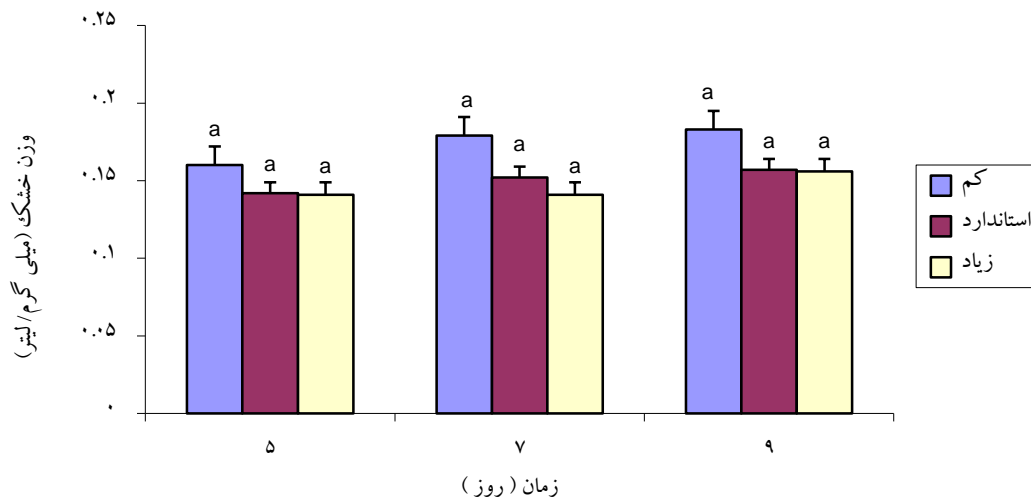
### ۳. نتایج

بررسی اثر غلظت های مختلف نیترات بر میزان پروتئین جلبک تتراسلمیس اختلاف معنی داری را نشان داد ( $p < 0.05$ ). در غلظت پائین نیترات ( $6.12 \text{ mg L}^{-1}$ ) میزان پروتئین از ۳/۹٪ در روز پنجم به ۵/۱٪ در روز نهم رسید، در غلظت استاندارد ( $12.25 \text{ mgL}^{-1}$ ) در روز پنجم ۵/۲٪ و در روز نهم ۵/۸٪ اندازه گیری شد. در غلظت بالای نیترات ( $24.71 \text{ mg L}^{-1}$ ) میزان پروتئین از ۵/۸٪ در روز پنجم به ۱۰/۷٪ در روز نهم رسید (شکل ۱).

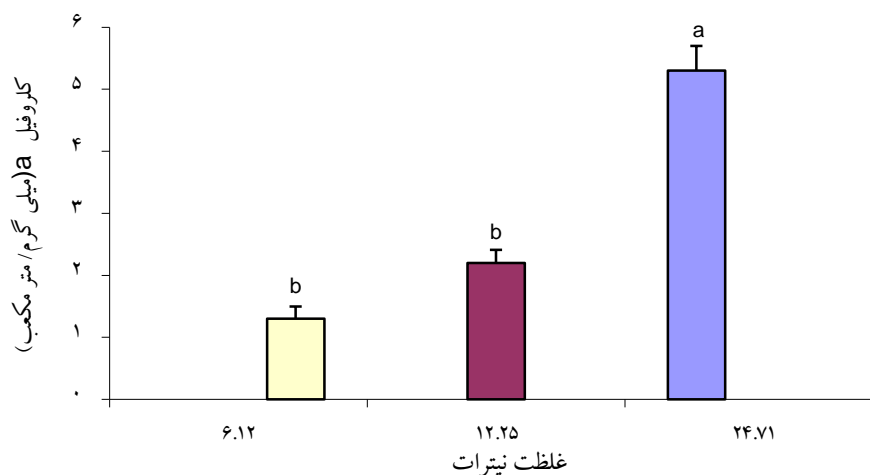
بررسی تأثیر غلظت های متفاوت نیترات بر روی وزن خشک سلول های جلبک تتراسلمیس اختلاف معنی داری را نشان نداد ( $p > 0.05$ ). با این حال میانگین وزن خشک ۱۰۰ میلی لیتر از



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



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



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

#### ۴. بحث

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

ترکیب بیوشیمیایی میکرو جلبک ها در بین گونه های مختلف متفاوت است (۴) و به طور گسترده ای 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 ۱۰ mmol/L نیترات شده است (۱۴).

باعث ساخت تعداد بیشتر سلول ها و بنابراین میزان بیشتر پروتئین می شود، صرف تولید منابع ذخیره ای همچون کربوهیدرات و چربی می شود که اکثراً فاقد نیتروژن می باشند (۱۶). در تحقیقات دیگر، وزن خشک سلول های جلبک *Tetraselmis suecica* کشت داده شده در غلظت پائین نیترا ت ( $176 \mu\text{M}$ ) به طور معنی داری بالاتر از سلول های کشت داده شده در غلظت بالای نیترا ت ( $1760 \mu\text{M}$ ) اندازه گیری کردند (۸).

این تحقیق به وضوح نشان داد که کمبود میزان نیترا ت 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 نیترا ت حاوی  $2/1$ ٪ پروتئین کمتر نسبت به سلول های کشت داده شده در غلظت بالای نیترا ت بودند، به طوری که حجم پروتئین در روز نهم کشت در غلظت پائین نیترا ت  $5/1$ ٪، در غلظت استاندارد  $5/8$ ٪ و در غلظت بالای نیترا ت  $10/7$ ٪ اندازه گیری شد. کاهش میزان نیترا ت در محیط کشت جلبک، اختلاف معنی داری را در میزان کلروفیل سلول های جلبکی بوجود آورد. در غلظت بالای نیترا ت میزان کلروفیل  $a$  حدود ۴ برابر افزایش یافته و به میزان  $5/3 \text{ mg/m}^3$  رسیده، در حالیکه این میزان در غلظت متوسط و پائین نیترا ت به ترتیب  $2/2 \text{ mg/m}^3$  و  $1/3$  اندازه گیری شد.

انتخاب گونه میکرو جلبک یکی از نکات مهم در بهبود میزان رشد و ترکیب بیوشیمیایی آبزبان پرورشی محسوب می شود. شرایط کشت حاوی نیترا ت پائین در محیط طبیعی معمول می باشد که سبب کاهش ارزش غذایی ریز جلبک ها می گردد (۸). بنابراین هچری ها در هنگام استفاده از این ریز جلبک در رژیم غذایی آبزبان باید اطمینان حاصل کنند که سلول های جلبکی در محیط کشت حاوی نیترا ت کافی رشد کرده باشند.

### سپاسگزاری

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

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 نیترا ت، 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 نیترا ت حاوی حدوداً  $2$ ٪ پروتئین بیشتر نسبت به دو غلظت دیگر بودند. همچنین می توان جلبک *vulgaris* *Chlorella* را در دو غلظت بالا و پائین نیترا ت کشت داد (۵). پائین ترین میزان پروتئین اندازه گیری شده  $13/01$  درصد بود که از غلظت پائین نیترا ت بدست آمد.

از طرفی *Phaeodactylum tricomutum* را در محیط کشت حاوی میزان کافی از نیترا ت و محیط کشت حاوی نیترا ت پائین کشت دادند (۱۹). میزان پروتئین بدست آمده از *P. tricomutum* کشت داده شده در میزان کافی نیترا ت  $55$ ٪ بود در حالی که در گروه دوم این میزان به  $25$ ٪ کاهش یافت. با کاهش حجم نیترا ت 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 نیترا ت  $15 \text{ mgL}^{-1}$ ، در غلظت استاندارد  $157 \text{ mgL}^{-1}$  و در غلظت پائین نیترا ت  $18 \text{ mgL}^{-1}$  اندازه گیری شد. بالا بودن میزان وزن خشک در سلول های کشت داده شده در غلظت پائین نیترا ت احتمالاً بدلیل بالا بودن حجم کربوهیدرات در این سلول ها می باشد. اگرچه میزان کربوهیدرات در این تحقیق مورد سنجش قرار نگرفت، اما شواهد زیادی وجود دارد که با کاهش نیترا ت در محیط میزان کلروفیل و پروتئین کاهش، و به دنبال آن میزان کربوهیدرات در سلول های جلبکی افزایش می یابد (۱۴). هنگامی که نیتروژن محدود می شود، انرژی مشتق شده از فتوسنتز که به طور طبیعی

## منابع

- 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 phenol reagent. *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 continuous 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 biochemical 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
۱. کیهانیان، ح. ۱۳۸۷. بررسی فلزات سنگین (cu, zn, pb) تراکم و میزان کلروفیل a در جلبک سبز *Scenedesmus obliquus*. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، گروه بیولوژی دریا. ص ۸۰-۶۰.
۲. معصومی، ز. یاوری، و. کوچینین، 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: ۱۳۹-۱۳۱.
3. Borghini, F., Colacevich, A., Bergamino, N., Micarelli, P., Dattilo, A.M., Focardi, S., Loiseau, 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 different algal 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 nitrogen-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

“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.



## The effect of different concentration of nitrate on protein, chlorophyll and dry weight of *Tetraselmis suecica*

Rafiei F.<sup>(1)</sup>; Ashjae Ardalan A.<sup>(1)</sup>; Asghar Baigi<sup>(1)\*</sup>; Eamail Zadeh A.<sup>(2)</sup>

nakisa\_a63@ yahoo.com

1-Department of Marine Biology, Islamic Azad University North Tehran Branch, Tehran, Iran.

2- Fisheries Research Station Lengeh mollusks, Hormozgan, Iran.

Received: April 2011

Accepted: July 2011

### Abstract

Microalgal growth can be restricted due to low levels of nutrients in the environment. Moreover, there can be changes in their biochemical content. Some microalgae are used for feeding various animal breeds. In spring of the 1390 a study was conducted at the Islamic Azad University of North Tehran Branch, *Tetraselmis suecica* was grown in f2 Guillard culture in various concentrations of nitrate (6.12 (low), 12.25 (standard), and 24.71 (high) mgL<sup>-1</sup>) and the effect of different concentrations of nitrate on the amount of protein, chlorophyll, and dried weight of algae *Tetraselmis suecica* was evaluated. Results showed that increasing the amount of nitrate significantly increased the protein content of algae ( $p < 0.05$ ). The amount of protein by the 5th day of culture in high concentration of nitrate was at 5.8%, which increased to 10.7% by the 9th day. However, the amount of protein in the 9th day of culture for standard and low nitrate concentrations did not exceed 5.8% and 5.1% respectively. Chlorophyll *a* decreased significantly ( $p < 0.05$ ) as a result of decreasing the available nitrate levels for algal cells. By the 9th day, the dried weight of cells grown in low nitrate concentration was measured at 0.18 mgL<sup>-1</sup>, and in high concentration of nitrate at 0.156 mgL<sup>-1</sup>.

**Keywords:** *Tetraselmis suecica*, Nitrate, protein, Chlorophyll *a*

---

\*Corresponding author