در محیط آزمایشگاهی *Gracilaria corticata* بررسی اثر شوری ، آمونیوم وسیتوکینین بر رشد

فرناز رفیعی و نسرین سلمان زاده*

گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی ،دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۲/۱۰ تاریخ پذیرش:۱۳۹۰/۰۲/۱۰

چکیده

اثرعوامل شوری ، آمونیوم و سیتوکینین بررشد جلبک *Gracilaria corticata*(J.Agardh) در یک دوره ۶ هفته ، تحت شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. جلبک گراسیلاریا ازسواحل بندربستانه واقع در استان هرمزگان درتیرماه ۱۳۸۸ نمونه برداری شده و در آکواریوم های ۴۰×۳۰×۶۰ سانتی متر (۲۰لیتر) باروش معلق درسه تکرار پرورش داده شد . نور مورد نیاز برای پرورش ۳۳۰۰ لوکس و دما ۳۵ درجه سانتی گراد بود.تیمار های مورد بررسی شوری۲۵جزء در هزار(شوری مصب)، ۳۵جزءدرهزار(شوری آب دریا) و ۴۵جزءدرهزار(شوزی خور)،آمونیوم(۰،۰،۰۰۱ و ۰،۰۰۲مولار)و سیتوکینین(۰،۰۱ ،۰،۰۰۱ و ۰،۰۰۰۱گرم بر لیتر)بودند.جلبک ها درروزهای ۴۲و۳۵،۲۸،۲۱،۱۴،۷ برداشته شدند. طول ،عرض و وزن آن ها اندازه گیری و رشد نسبی محاسبه شد. نتایج نشان داد که عوامل شوری ،آمونیوم وسیتوکنین اثرمعنی داری($P<0/05$) برروی رشد جلبک گراسیلاریا داشتند . رشدنسبی جلبک گراسیلاریا باتیمارهای مختلف سیتوکینین ، شوری وآمونیوم درروزهای مختلف آزمایش اختلاف معنی داری داشت ($P<0/05$) و حداکثر میزان آن درتیمار۰/۰۰۲ مولار آمونیوم با۸/۲۶ درصدمشاهده شد.

واژگان کلیدی:گراسیلاریا کورتیکاتا،سیتوکینین، بندر بستانه،آمونیوم.

* **مسئول مکاتبه:**salmanzadeh_nasrin@yahoo.com

مقدمه

یکی ازمنابع تقریبا اتمام ناپذیر برای تهیه گیاهان دارویی، جلبک ها ی بدست آمده از آبهای دریایی می باشـد .بـیش از دوهزار سال است که ازجلبک های دریایی، هم به عنوان غذای جانبی بشروهم در علم پزشکی استفاده مـی شـود . گیاهان دریایی به عنوان اولین تولیدکنندگان موادآلی به حساب مـی آینـد(Kaczyna & Megnet, 1993). درایـن میان نقش جلبک ها را درتولیدمواد مختلف مانند کاراگینان وآگار واسیدآلژنیک که دارای مصـارف مختلـف صـنعتی، دارویی وغذایی می باشند را باید درنظرگرفت(Dawes ,1997). گراسیلاریایکی ازجنس های جلبک های قرمـز بـه حساب می آید که بیش از ۵۳ درصد آگار جهانی از گونه های آن بدسـت مـی آیـد. تـاکنون چنـد گونـه از جلبـک گراسیلاریا از سواحل ایران گزارش شده که یکی از آنها جلبک *G. corticata* است که در مناطقی مانند بندر لنگه، چابهار، بوشهر و سواحل جزایر خلیج فارس وجود دارد و توده زنده آن نسبت به گونه‌هـای دیگـر بیشـتر اسـت. ایـن جلبک در استخرهای کشندی بخش میانی و پائینی منطقه بین جزر و مدی به صورت چسـبیده بـه صـخره‌هـا رشـد می‌کند. مواد استخراجی استن و اتانول حاصل از این جلبک از رشد برخی از باکتری ها و قارچها جلوگیری می‌کنـد و دارای کولین استراز آنزیم تجزیه کننده استیل کولین با فعالیت زیاد است (رفیعـی و همکـاران، ۱۳۸۷). رشـدگیاهان دریایی به عواملی مانند نور و مواد مغذی دردسترس مانند فسفات و نیترات بستگی دارد. ازپاسـخ هـای فیزیولوژیـک این جلبک به عوامل غیر زیستی مانند نور،دما وشوری اطلاعات کمی دردسترس است(Oliviera *et al.*,2000).

Gujarat در سال ۲۰۰۱درهندنشان دادکه بالا بردن غلظت آمونیوم ونیتروژن درمحیط بر ۶ گونه گراسیلاریا *r*باعث افزایش بیو ماس شده است. Haglundو Pedersen در سال ۱۹۹۳عنوان کردند که رشـددرجلبک *Gracilaria tenuistipitata* باتغییرات میزان شوری همبستگی معنی داری دارد.

در چین نشان دادندکه هورمون سیتوکینین باعث بازسازی گونه جلبک *Gracilaria popenfussi*می شود(Yokoya ,2000).

باوجود ۱۸۰۰ کیلومتر مرز آبی درجنوب کشوروافزایش روزافزون نیاز برای استفاده از ذخایر آن مانندجلبک ها به عنوان منابع ارزشمند درجهت تامین نیازهای صنعتی ، دارویی وغذایی درضمن اینکه سالیانه مبالغ هنگفتی صرف واردات مواد ترکیبات خام موجود درپیکره جلبک های پرسلولی می گردد لزوم انجام تحقیقات اولیه وپی بردن به پتانسیل کشت وپرورش جلبک ها واستخراج این مواد احساس می شد .

در این تحقیق میزان طول ، عرض ، وزن و رشد نسبی این جلبک در یک دوره ۶ هفته در تیمار های مورد بررسی اندازه گیری شد تا بر پایه نتایج پژوهش حاضر وتحقیقات دیگر گامی درجهت رفع نیازها و خودکفایی کشور برداشته شود.

مواد و روش ها

به منظور انجام پروژه و براساس اطلاعات قبلی سواحل منطقه مورد بررسی قرارگرفتند وساحل بندر بستانه برای مطالعه برروی جلبک گراسیلاریا انتخاب گردید.این بندر ازتوابع شهرستان بندرلنگه دراستان هرمزگان ودرفاصله ۳۰ کیلومتری غرب این شهرستان واقع شده است. این بندر ازجنوب ومغرب به خلیج فارس وازشمال به ارتفاعات تنگ کوه منتهی می شود و بین مختصات جغرافیایی°۵۴درجه و ۳۶ دقیقه طول شرقی ازنصف النهار گرینویچ و ۲۶ درجه و ۲۱ دقیقه عرض شمالی قراردارد. ارتفاع آن ازسطح دریا بین ۵تا۱۲ متراست ودارای آب وهوای بسیارگرم ومرطوب می باشد. تغییرات درجه حرارت از۴۱الی۴۴ درجه بالای صفر درتابستان و۴الی ۵ درجه بالای صفر در زمستان متغیر می باشد .میزان رطوبت بالایی دارد به طوری که درتابستان ۱۰۰درصد و در زمستان بین ۵۰تا۶۰ درصد متغییر می باشد (شکل ۱).

شکل۱- موقعیت جغرافیایی بندر لنگه و بستانه در خلیج فارس

نمونه برداری درتیرماه ۱۳۸۸بر اساس جدول جز و مدی سازمان کشتیرانی بندرعباس در هنگام جزر کامل حدود ساعت ۶بامدادانجام گرفت.جلبک ها ازناحیه اتصال به رسوبات با دست به صورت تصادفی از بستر منطقه جدا شده و داخل کیسه های نایلونی حاوی آب دریا به آزمایشگاه شیلات بندرلنگه منتقل شدند. در ابتدا برای جدا کردن مواد

زاید از نمونه ها ، جلبک ها توسط آب شور شسته شده و در کیسه های نایلونی حاوی آب دریا به تهران منتقل شدند. به منظورپرورش جلبک ها از ۲۷ اکوریوم با ابعاد ۳۰*۴۰*۶۰ لیتر (۲۰ لیتر) استفاده شد و شوری مناسب توسطنمک سنتتیک تهیه گردید.

کلیه جلبک ها توسط ترازوی دیجیتال بادقت ۰/۰۱ گرم وزن شد و طول آنها از ناحیه پایه تا بلندترین انشعاب آن وعرض آن ها به طور دقیق اندازه گیری و ثبت گردید. نمونه ها به صورت معلق در آب توسط نخ به طناب های نایلونی که به فاصله ۵ سانتی متر از یکدیگر که در عرض آکواریوم ها کشیده شده بودند و به تعداد ۶ عدد در هر اکوریوم نصب شدند.

با استفاده از لوکس متر و به منظور ایجاد نورکافی(۳۳۰۰ لوکس) لامپ مهتابی بالای هرکدام از آکوریوم ها نصب گردید. سپس آکوریوم ها توسط ورقه های ضخیم آلومینیوم فویل پوشیده شدند. دوره تاریکی آکواریوم ها ازساعت ۹ شب تا ۷صبح (۱۰ساعت) و دوره روشنایی از۷ صبح تا ۹ شب (۱۴ساعت) بود. آب آکوریوم ها هرهفته تعویض شد .

در روزهای ۷ ،۱۴ ،۲۱ ،۲۸ و ۳۵ ریسه ها از آب خارج شده و پس از اندازه گیری طول و عرض توسط خط کش و هم چنین وزن کردن آنها توسط ترازو مجددا در آکوریوم ها قرار داده شدند. در روز۴۲ جلبک ها برای آخرین بار اندازه گیری و وزن شده و درصد رشد نسبی از فرمول زیر محاسبه شد.

$$GRG = \frac{L_n w_2 - L_n w_1}{t_2 - t_1}$$

w_2 t_2 وزن در زمان

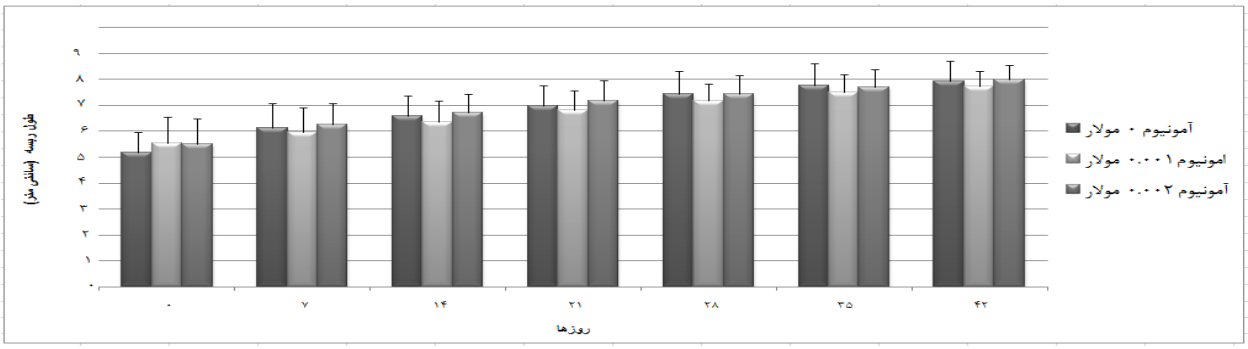
w_1 t_1 وزن درزمان

$t_2 - t_1$ فاصله زمانی

به منظور انجام آزمایش ، اثرغلظت های۰، ۰/۰۱ و ۰/۰۲ مولارکلرید آمونیوم و سه تیمار شوری۲۵، ۳۵و ۴۵ قسمت در هزار (Yokoya *et al.*,1999) و تیمارهای سیتوکینین(بنزیل آمینو پورین)(۰/۰۱ ، ۰/۰۰۱ و۰/۰۰۰۱ گرم در لیتر(Israel *et al.*,1999) صورت گرفت .برای هر تیمارسه تکرار درنظر گرفته شد. نتایج حاصل از اندازه گیری عوامل محیطی بر رشد جلبک توسط آنالیز واریانس یک طرفه (ANOWA) بادامنه اطمینان ۹۵ درصد تجزیه وتحلیل شد (Haglund & Pedersen,1993, Gujarat ,2001, Hagen,1995)

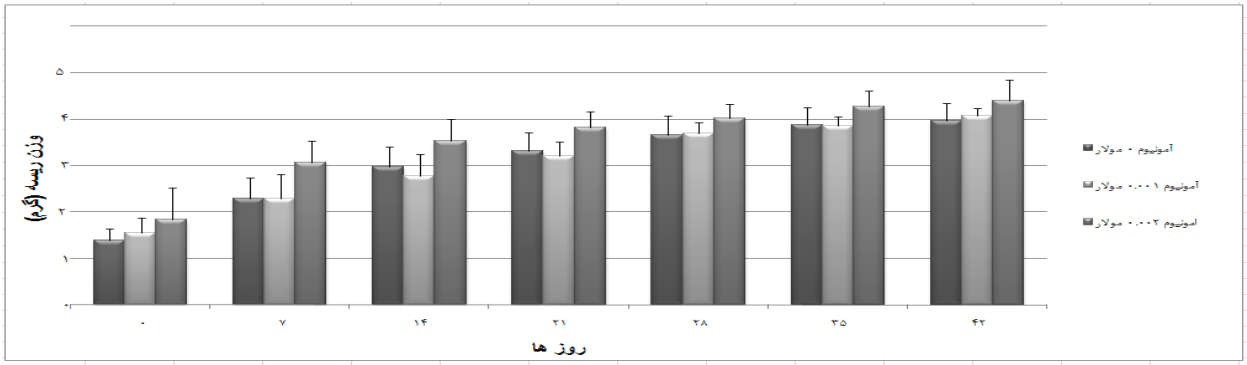
نتایج

نتایج حاصل از تیمار های مختلف آمونیوم ۰ و ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۲ مولار بر تغییرات طول ریسه در مدت ۴۲ روز بررسی شد. میانگین طول ریسه ها در تیمار ۰ مولار از ۵/۱۶ به ۷/۹۴ سانتی متر و در غلظت ۰/۰۰۱ مولار از ۵/۵۵ به ۷/۷۲سانتی متر و در غلظت ۰،۰۰۲ مولار از ۵/۵۰ به ۸/۰۰سانتی متر از روز اول تا روز ۴۲ افزایش یافت. آنالیز های آماری نشان دادند که بین میزان تغییرات طول در تیمارهای مختلف اختلاف معنی داری وجود داشت($p<0/05$)(شکل ۲).



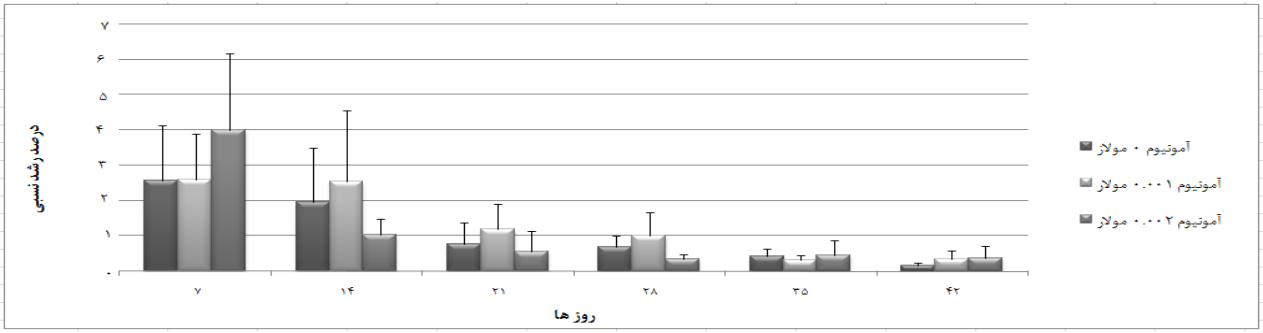
شکل ۲- تغییرات طول ریسه های جلبک گراسیلاریا در تیمارهای مختلف آمونیوم . آنتنک ها انحراف معیار را نشان می دهند.

نتایج حاصل از تیمار های مختلف آمونیوم ۰ و ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۲ مولار بر تغییرات وزن ریسه در مدت ۴۲ روز بررسی گردید. میانگین وزن ریسه ها در غلظت ۰ مولار از ۱/۵۹ به۳/۹۷ گرم و در تیمار ۰/۰۰۱ مولار از میانگین۱/۵۵ به۴/۰۷ گرم و در غلظت ۰/۰۰۲ مولار از۱/۸۳به ۴/۳۹ گرم از روز اول تا روز ۴۲ افزایش داشت. (شکل ۳).



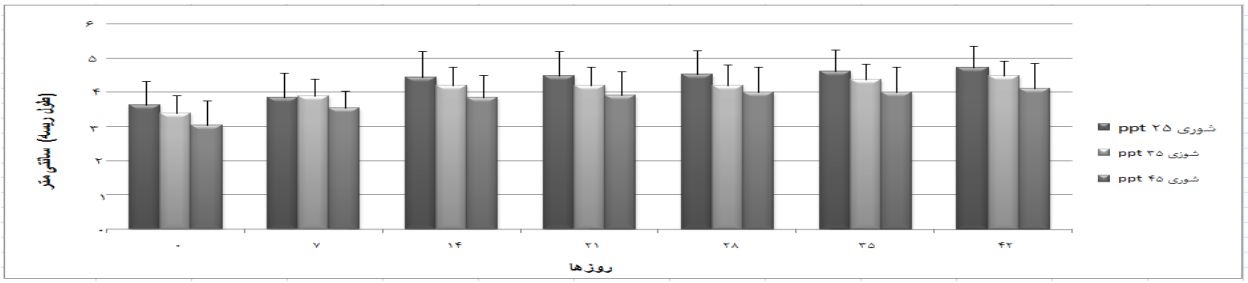
شکل ۳ - تغییرات وزن ریسه های جلبک گراسیلاریا در تیمار های مختلف آمونیوم . آنتنک ها انحراف معیار را نشان می دهند.

نتایج حاصل از تیمار های مختلف آمونیوم ۰ ، ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۲ مولار بر درصد رشد نسبی ریسه ها بررسی شد (شکل ۴)



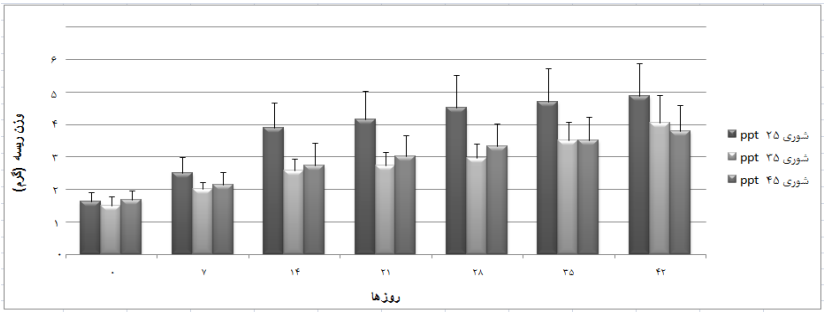
شکل ۴- تغییرات درصد رشد نسبی جلبک گراسیلاریا در تیمار های مختلف آمونیوم . آنتنک ها انحراف معیار را نشان می دهند.

نتایج حاصل از تیمار های مختلف شوری ۲۵ و۳۵ و۴۵ قسمت در هزار بر تغییرات طول ریسه بررسی شد.میانگین طول ریسه ها در غلظت ۲۵ قسمت در هزار از ۷/۲۵ به ۹/۴۷ سانتی متر و در تیمار ۳۵ قسمت در هزار از ۶/۷۷ به ۸/۹۷ سانتی متر و در غلظت ۴۵ قسمت در هزار از ۶/۰۸ به ۸/۲۲ سانتی متر از روز اول تا روز ۴۲ افزایش یافت($p<0,05$)(شکل ۵).



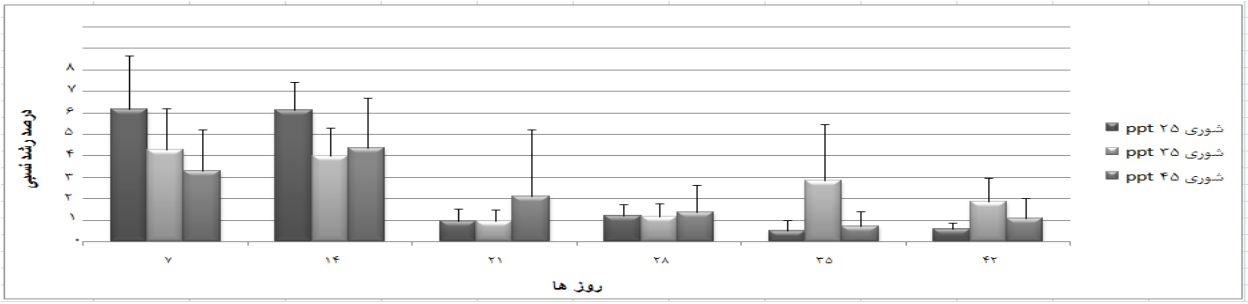
شکل ۵- تغییرات طول ریسه های جلبک گراسیلاریا در تیمار های مختلف شوری . آنتنک ها انحراف معیار را نشان می دهند.

نتایج حاصل از تیمار های مختلف شوری ۲۵ و۳۵ و۴۵ جزء در هزار بر تغییرات وزن ریسه در مدت ۴۲ روز بررسی گردید.میانگین وزن ریسه ها در شوری ۲۵ جزء در هزار از ۱/۶۲ به ۴/۸۵ و در تیمار۳۵ جزء در هزار از میانگین ۱/۴۹ به ۴/۰۳ گرم و در شوری ۴۵ جزء در هزار از۱/۶۸میانگین به ۳/۷۸ گرم در روز ۴۲ رسید .آنالیز های آماری نشان دادند که بین تغییرات وزن ریسه ها در تیمارهای مختلف شوری اختلاف معنی داری وجود داشت($p<0/05$)(شکل ۶).



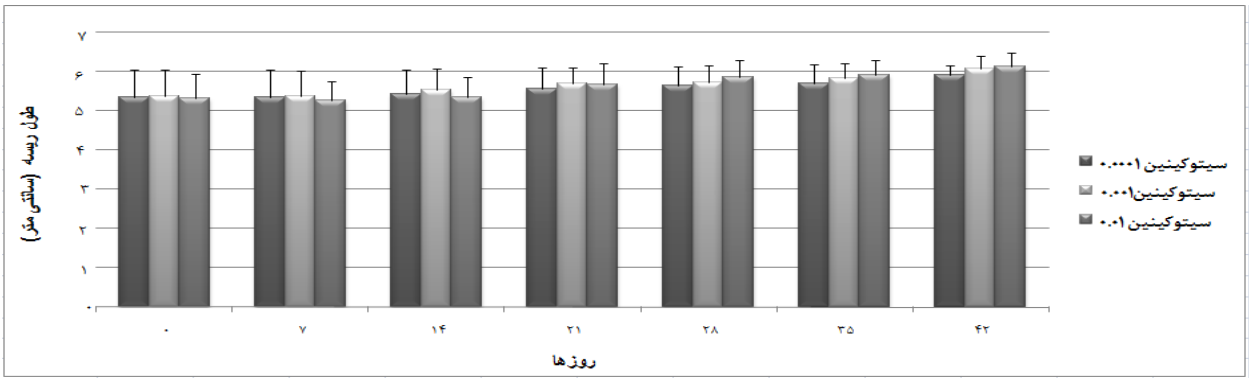
شکل ۶- تغییرات وزن ریسه های جلبک گراسیلاریا در تیمار های مختلف شوری . آنتنک ها انحراف معیار را نشان می دهند.

نتایج حاصل از تیمار های مختلف شوری ۲۵ و۳۵ و۴۵ جزء در هزار بر درصد رشد نسبی ریسه ها در مدت ۴۲ روز بررسی شد . آنالیز های آماری نشان دادند که بین میزان درصد رشد نسبی در تیمارهای مختلف شوری اختلاف معنی داری وجود داشت($p<0/05$)(شکل ۷).



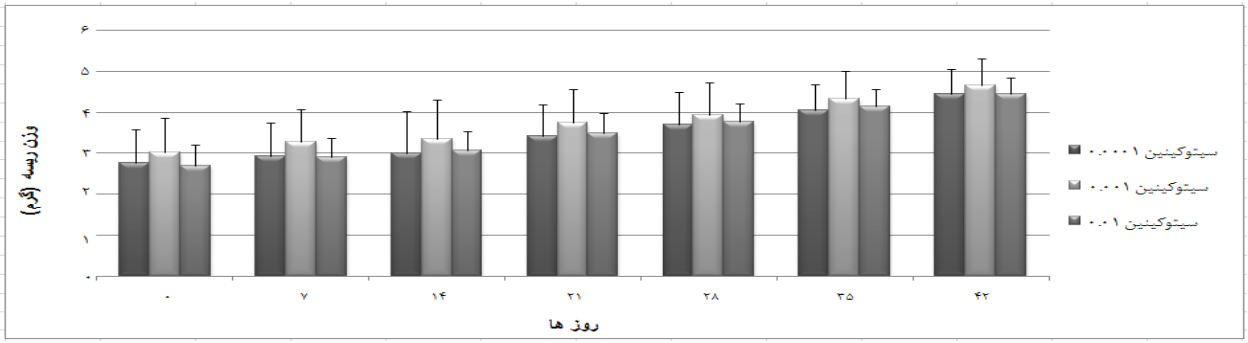
شکل ۷ - تغییرات درصد رشد نسبی جلبک گراسیلاریا در تیمار های مختلف شوری . آنتنک ها انحراف معیار را نشان می دهند.

نتایج حاصل از تیمار های مختلف سیتوکینین ۰/۰۱ ، ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۰۱ گرم درلیتر بر تغییرات طول ریسه در مدت ۴۲ روز بررسی شد.میانگین طول ریسه ها در غلظت ۰/۰۱ گرم درلیتر از ۵/۳۶ به ۵/۹۱ سانتی متر و در تیمار ۰/۰۰۱ گرم در لیتر ازمیانگین ۵/۳۸ به ۶/۰۸ سانتی متر و در غلظت ۰/۰۰۰۱ گرم در لیتر از ۵/۳۳ به ۶/۱۳ سانتی متر از روز اول تا روز ۴۲ افزایش یافت. آنالیز های آماری نشان دادند که بین میزان طول ریسه ها در تیمارهای مختلف سیتو کینین اختلاف معنی داری وجود نداشت($p>0/05$)(شکل ۸).



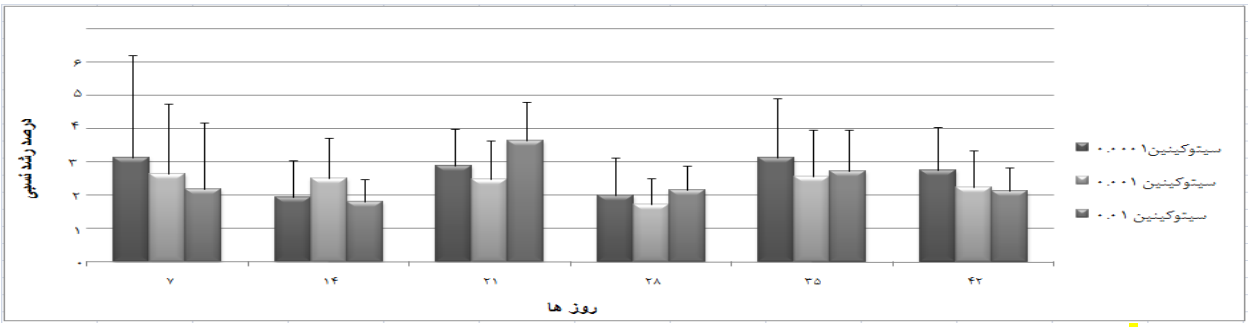
شکل۸- تغییرات طول ریسه های جلبک گراسیلاریا در تیمار های مختلف سیتوکینین . آنتنک ها انحراف معیار را نشان می دهند.

نتایج حاصل از تیمار های مختلف مختلف سیتوکینین ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۰۱ گرم در لیتر بر تغییرات وزن ریسه در مدت ۴۲ روز بررسی گردید.میانگین وزن ریسه ها در غلظت ۰/۰۱ گرم در لیتر از ۱/۶۲ به ۴/۸۵ گرم و در تیمار ۰/۰۰۱ گرم در لیتر از میانگین ۱/۴۹ به ۴/۰۳ گرم و در غلظت ۰/۰۰۰۱ گرم در لیتر از ۱/۶۸به ۳/۷۸ گرم در روز ۴۲ مشاهده گردید. آنالیز های آماری نشان دادند که بین میزان وزن ریسه ها در تیمارهای مختلف اختلاف معنی دار وجود داشت($p<0/05$)(شکل۹).



شکل ۹- تغییرات وزن ریسه های جلبک گراسیلاریا در تیمار های مختلف سیتوکینین. آنتنک ها انحراف معیار را نشان می دهند.

نتایج حاصل از تیمار های مختلف سیتوکینین ۰/۰۱، ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۰۱ گرم در لیتر بر درصد رشد نسبی ریسه ها در مدت ۴۲ روز بررسی شد. آنالیز های آماری نشان دادند که بین میزان درصد رشد نسبی در تیمارهای مختلف سیتوکینین اختلاف معنی دار وجود نداشت($p>0/05$)(شکل ۱۰).



شکل ۱۰- تغییرات درصد رشد نسبی جلبک گراسیلاریا در تیمار های مختلف سیتوکینین. آنتنک ها انحراف معیار را نشان می دهند

بحث و نتیجه گیری

بررسی اثرعوامل محیطی بررشد ومیزان تولیدآگار از جلبک *Gracilaria corticata* در محیط آزمایشگاه به مدت ۶هفته صورت گرفت.تحقیقات انجام شده بر روی جلبک گراسیلاریا در هاوایی نشان داد که با افزایش میزان آمونیوم در محیط رشد بیشتر می شود،ریسه های جلبک گراسیلاریا در بیشتر موارد به یون آمونیوم بیش ازمواد مغذی دیگر وا بستگی دارد(Smit,2002). در این تحقیق نیز جلبکها در آمونیوم ۰/۰۰۲ مولار بیشترین رشد را نشان دادند. هم چنین تحقیقات برروی جلبک *G. gracilis* نشان دادکه توده زنده با افزایش آمونیوم،افزایش یافته واین دو دارای همبستگی معنی دار بودند اما تفاوت در روند جذب دراین جلبک نسبت به دیگر جلبک ها دیده شده است (Pedersen,1994). میزان رشد نسبی درتیمارهای مختلف آمونیوم دراین تحقیق نیز معنی داربوده است.اما بالا بردن غلظت آمونیوم درشرایط کمبود نیتروژن درجلبک *G. foliifolia* در هند باعث عدم رشد دراین جلبک شده بود(D'Elin & Deboer,1978).همچنین تحقیقات درهندنشان دادکه بالا بردن غلظت آمونیوم و نیتروژن در محیط بر ۶ گونه , *G.verucosa* , *G.edulis* , *G. erassa* , *G. acerosa.* ,*G.corticata*, *G.Folutera*باعث افزایش بیو ماس شد (Gujarat ,2001)،در این تحقیق نیز با بالا بردن غلظت آمونیوم در محیط افزایش رشد دیده شد.نتایج حاصل ازاین آزمایش نشان دادکه میزان رشد نسبی جلبک *G. corticata* با تغییرات شوری محیط اختلاف معنی داری داشت . میزان رشد نسبی درشوری ۴۵ جزء درهزارکمترین و برابر با ۲/۱۶ درصدبود . درشوری ۲۵ جزء درهزار رشد نسبی به بیشترین و برابر ۲/۵۸ درصدافزایش یافت. همچنین جلبک *G. sjeostedii* درهاوایی رشد قابل توجهی درشوری متوسط ۲۱جزء درهزار داشت(Jim *et al.*, 2004). درچین

بر روی جلبک *G. foliifera* تحقیقاتی انجام شد و نتایج آن نشان داد که درشوری ۲۱جزء در هزار جلبک رشد بهتر و سریعتری نسبت به شوری ۳۳ جزء در هزار داشت. میزان رشد درشوری ۲۱ جزء درهزار برابر با ۳۷/۶ درصدبود(Dawes ,1999). در این تحقیق بیشترین تغییرات طول ، وزن و درصد رشد نسبی ریسه های جلبک گراسیلاریا درطی دوهفته اول آزمایش درشوری متوسط ۲۵جزء درهزار دیده شد. آزمایشات ومطالعات دیگر نشان می دهند که رشددرجلبک *G.tenuistipitata* متحمل به طیف گسترده ای از شوری می باشد و رشد با تغییرات میزان شوری همبستگی معنی داری دارد. در این تحقیق بیشترین رشد درشوری کم ۲۶ جزء درهزار دیده شد (Haglund & Pedersen,1993). میزان رشد جلبک توسط هورمون کنترل می شود و تغییرات بر میزان این هورمون ها تاثیر مستقیمی بر رشد گیاه خواهد گذاشت(Lahaye & Rochas, 1991). نتایج حاصل از تیمار های مختلف سیتوکینین ۰/۰۱، ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۰۱ گرم در لیتر بر درصد رشد نسبی ریسه ها نشان داد که بین میزان درصد رشد نسبی در تیمارهای مختلف سیتوکینین اختلاف معنی دار وجود نداشت($p>0/05$). تحقیقات انجام شده درچین نشان می دهدکه اثرهورمون سیتوکینین برروی گونه های مختلف گراسیلاریا تحت تاثیر مورفولوژیک جلبک ها قرار می گیرد(Huang &fujita ,1996). جلبک *G. popenfussii* در چین نشان داد که هورمون سیتوکینین باعث بازسازی این گونه می شود(Yokoya ,2000,Polne & Bor,1987). سیتوکینین باعث مهار رشد در جلبک *G. perplexa* و رشد در *G.tenuistipitata* می گردد.(Hagen,1995) .

نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان داد که در تیمار های شوری ، آمونیوم و سیتوکینین ،میزان طول ، عرض ، وزن و توده زنده *G.corticata* در یک دوره ۶ هفته آزمایش، اختلاف معنی دار وجود داشت و بیشترین میزان توده زنده در تیمار ۰/۰۰۲ آمونیوم بدست آمد.

Reference

رفیعی، ف.، فاطمی، م.، فیلی زاده، ی.، وثوقی، غ. و اسماعیلی ساری، ع. ۱۳۸۷. بررسي تغییرات ماهانه جلبك قرمز Gracilaria corticata در منطقه جزر و مدی بندر بستانه در استان هرمزگان. مجله پژوهش های علوم و فنون دریایی، ۳(۱): ۱۰- ۱.

Buschmann, A.H., Correa, J.A. 2001. Red algal farming: a review. Aquaculture, 194**:** 203–220.

Dawes, C.J., Orduna-Rojas. J., Robledo. D. 1999. Response of the tropical red seaweed *Gracilaria cornea* to temperature, salinity and irradiance. J. appl. Phycol., 10: 419–425.

D'Elia, C.F., DeBoer, J.A. 1978. Nutritional studies of two red algae: II. Kinetics of ammonium and nitrate uptake. J. Phycol., 14: 266–272.

Gujarat, I. 2001. Controlled by plant growth regulators on axenic culture of the red alga *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta) *Phycol. Res.*, 48: 133–42.

Haglund .K. & Pedersen. M. 1993. Outdoor pond cultivation of the marine red alga *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* Zhang et Xia (Gracilariales Rhodophyta) in brackish water in Sweden. Growth, nutrient uptake, cocultivation with rainbow trout and epiphyte control. J. appl. Phycol., 5: 271–284.

Huang, W. & Fujita, Y. 1996. Callus induction and thallus regeneration in some species of red algae. *Phycol., Res.* 45: 105–11.

Israel, A., Martinez-Gross,M. and Friedlander,M. 1999. Effect of salinity and pH on growth and agar yield of Gracilaria tenuistipitata var.liui in laboratory and outdoor cultivation.J.appl.Phycol.11:543-549

Jime´nez-Pe´rez M.V., Sa´ nchez-Castillo. P., Romera. O., Ferna´ ndez- Moreno. D.& Pe´rez-Martı´nez. C. 2004. Growth and nutrient removal in free and immobilized planktonic green algae isolated from pig manure. Enzyme Microb Technol, 34:392–398.

Kaczyna,F.& Megnet,R. 1993.The effects of glycerol and plant growth regulators on *Gracilaria verrucosa* (Gigartinales, Rhodophyceae). Hydrobiologia, 268: 57–64.

Lahaye, M. & Rochas, C. 1991. Chemical structure and physic properties of agar. Hydrobiologia, 221: 137–148.

Oliviera, E.C., Alveal,K.& Anderson,R.J.2000. Mariculture of the agar-producing gracilarioid red algae. Rev. Fish. Sci., 8**:** 345–377.

Pedersen, M.F. 1994. Transient ammonium uptake in the macroalga *Ul*Õ*a lactuca* ŽChlorophyta.: nature, regulation, and the consequences for choice of measuring technique. J. Phycol., 30: 980–98.

Smit, A.J. 2002. Nitrogen uptake by *Gracilaria gracilis* Rhodophyta): Adaptations to a temporally variable nitrogen environment. Bot. Mar., 45: 196–209.

Trono, G. C. & Azanza-Corrales, R. 1981. The seasonal variation in the biomass and reproductive states of *Gracilaria* in Manila Bay. Proc. int. Seaweed Symp.,10: 743–748.

Yokoya, N. S. 2000. Apical callus formation and plant regeneration controlled by plant growth regulators on axenic culture of the red alga *Gracilariopsia tenuifrons*(Gracilariales,arhodophyta).Phycological research, 48(3):133-142.

Yokoya, N.S., Kakita, H., Obika, H. and Kitamura,T. 1999. Effect of environmental factors and plant growth regulators on growth of the red alga Gracilaria vermiculophylla from Shikoku Island,Japan. Hydrobiologia.398/399:339-347.