مجله علوم دانشگاه تهران
جلد بیست و هشتم (۱۳۸۱) شماره۲ (۲۲۴-۲۱۵)

تأثیر شکل ازت بر رشد و میزان آستاگزانتین محتوای جلبک سبز تک‌سلولی هماتوکوکوس پلوویالیس

صادق فرهی‌آشتیانی و مجید مهدیه
دانشگاه تربیت مدرس - بخش علوم زیستی، صندوق پستی ۴۸۳۸-۱۴۱۵۵، تهران
(دریافت: ۸۰/٤/۳۰ ؛ پذیرش: ۸۱/۲/۱)

چکیده

کیست قرمز رنگ جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس(*Haematococcus pluvialis*) در محلول غذائی و شرایط تحت کنترل اتاقک رشد(۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت) و یا فضای باز گلخانه (۸ لیتر محیط کشت) کشت داده شده تا به وسیله آن تأثیر فرم ازت بر رشد و تولید کتوکارتنوئید آستاگزانتین، مورد بررسی قرار گیرد. آزمایش کوتاه مدت در اتاقک رشد، نشان داد که جلبک‌های پرورش یافته در شرایط مصرف ازت نیتراتی، در مقایسه با آنهائی که تحت شرایط تغذیه ازت آمونیومی بودند، آستاگزانتین بیشتری تولید کردند. در ظرف دو هفته اول کشت، در شرایط مصرف ازت آمونیومی، جلبکها فقط به صورت رویشی افزایش یافته و آستاگزانتین تولید نکردند؛ ولی در روزهای باقیمانده دوران کشت، کلیه انها به کیست رفته و کارتنوئید تولید کردند. در ظرف ۳۲ روز جلبکهایی که در شرایط تغذیه ازت آمونیومی کشت داده شده بودند، تعداد سلول و آستاگزانتین بیشتری تولید نمودند، و با مصرف نمک فسفات آمونیوم، بیشترین تعداد سلولها به دست آمد. به علاوه بیشترین رشد رویشی در تبعیت از مصرف نمکهای مختلف آمونیوم، به شدت تحت تأثیر زمان انکوباسیون بوده، که علت آن شاید به متغیر بودن زمان لازم برای تغییر تیپ‌های مختلف سلولی و فعالیت آنها مربوط باشد که آن هم ممکن است به تغذیه ازت و فسفر ارتباط داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: *آستاگزانتین، ریز جلبک، هماتوکوکوس پلوویالیس، شکل ازت*

مقدمه

جلبک سبز تک سلولی هماتوکوکوس پلوویالیس(*Haematococcus pluvialis*) قادر است مقدار زیادی کتوکاروتنوئید قرمز رنگ آستاگزانتین در سلول خود انباشته کند. بدین جهت در پزشکی و صنایع داروئی به عنوان یک ماده ضد اکسید کننده (MiKi, 1991) و درصنایع شیلات و مرغداری به عنوان مکمل غذایی و رنگدانه برای تولید ماهی آزاد، ماهی قزل‌آلا، میگو و تخم‌مرغ مصرف می‌شود، (Johnson *et al.,* 1980) در سالهای اخیر بیشتر کارهای انجام شده بر روی این جلبک، در رابطه با مکانیسم تجمع آستاگزانتین و نقش این رنگدانه بوده است (Kobayashi *et al.,* 1991; Boussiba & Vonshak , 1991) . تاکنون مطالعات کمی بر روی نیاز غذایی و شرایط محیط کشت این جلبک، جهت بهینه‌سازی رشد رویشی و تولید آستاگزانتین محتوی آن صورت گرفته است.

مشاهدات ما نشان داده است که یکی از عوامل مهم تعیین کننده رشد رویشی جلبک، عنصر ازت است. در زمینه بهترین شکل ازت برای تشکیل کاروتنوئید و بازده سلولی، میان پژوهشگران اختلاف نظر وجود دارد. مطالعات اندکی که در خصوص ارتباط بین شکل ازت و تولید آستاگزانتین در جلبک هماتوکوکوس انجام شده است نشان می‌دهد که مصرف ازت نیتراتی بر ازت آمونیومی برتری دارد (Proctor, 1957). با این حال، اشتروس گزارش کرده است که سلولهای درحال رشد نمایی، در شرایط pH اسیدی، ازت آمونیومی را ترجیح می‌دهند (Stross, 1963). همچنین گزارش دیگری وجود دارد که نشان می‌دهد جلبک هماتوکوکوس در محیط کشت رقیق، ازت نیتراتی را بر ازت آمونیومی ترجیح می‌دهد (Syrett, 1962). این تفاوت در مصرف شکل ازت شاید به اختلاف نژاد مربوط باشد. از این رو، هدف ما در این گزارش، معرفی مناسب‌ترین شکل ازت برای بهبود رشد رویشی نژاد ایرانی این جلبک - در شرایط کنترل شده (اتاقک رشد) و غیر کنترل شده (فضای آزاد) - با تأکید بر شناخت مسایل مربوط به کشت جلبک هماتوکوکوس، و نیز با در نظر گرفتن شرایط کشت آن در فضای باز، جهت تولید آستاگزانتین می‌باشد.

موارد و روش کار:

به منظور بررسی تأثیر شکل ازت بر رشد و میزان آستاگزانتین محتوی جلبک تک‌سلولی هماتوکوکوس، روشهای زیر به کار برده شد.

۱- *کشت هماتوکوکوس پلوویالیس در شرایط سترون و اتاقک رشد*: کیست‌های قرمز جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس در فصل پاییز از آب یک حوضچه سیمانی در دانشگاه اصفهان

تأثیر شکل ازت بر رشد و میزان آستاگزانتین محتوای جلبک سبز ... ـــــــ

کلرورآمونیوم، استاتآمونیوم، نیترات آمونیوم، کربنات آمونیوم، فسفات آمونیوم و سولفاتآمونیوم، به محیط کشت اضافه شد. سرانجام تمامی ارلن‌ها، به‌طور تصادفی در اتاقک رشد، تحت شرایط دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد، شدت نور ۱۵۰۰ لوکس و دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، قرار داده شدند. همچنین دراین آزمایش، تعداد سلولهای هر ارلن در فواصل زمانی معین، به‌مدت ۳۲ روز شمارش شدند که نتایج آزمایش به شرح جدول ۳ می‌باشد.

اندازه‌گیریها

درهر یک از آزمایشهای فوق، نخست شمارش سلولهای جلبک، توسط لام هماسیتومتر، اوکولر ۲۰×۱۰ و ابژکتیو ۲۰ میکروسکوپ نوری، مدل Olympus انجام گرفت و تعداد سلول درهر میلی‌لیتر محیط کشت محاسبه شد. سپس وزن خشک جلبک، پس‌از فیلتر کردن ۱۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون حاوی جلبک (توسط فیلترهای میلی پور ۰/۴۵ میکرون و خشک کردن در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۲ساعت)، برحسب گرم‌درلیتر تعیین گردید (Fan *et al.,* 1994).

کلروفیل محتوی سلول جلبک، پس از استخراج با دی متیل سولفوکسید (DMSO) دردمای ۷۰ درجه سانتیگراد و در طول موج ۶۷۲ نانومتر و با استفاده از ضریب جذب $A_{1Cm}^{1\ Percent}$ = ۸۷۰ (برحسب میلی‌گرم در لیتر محیط کشت)، محاسبه‌شد(Fan *et al.,*1994).

با استفاده از استون ٪۹۰ (حجم در حجم) در دمای ۴ درجه سانتیگراد و همچنین سائیدن سلول‌های جلبک در داخل هاون- همراه با افزودن کمی ذرات شیشه به آن- کاروتنوئید کل محتوی جلبک‌ها استخراج شدند. بطوریکه مقدار کاروتنوئید کل، در طول موج ۴۸۰ نانومتر و با استفاده از ظریب جذب $A_{1Cm}^{1\ Percent}$ =۲۵۰۰ (بر حسب میلی‌گرم در لیتر محیط کشت) تعیین شد(Kobayashi *et al.,* 1997) .

نتیجه و بحث

با توجه با اعداد مندرج در جدول ۱، استنباط می‌شود که در مدت دو هفته بعد از شروع آزمایش، تحت شرایط مصرف نمک نیترات سدیم، در جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس، بیشترین تولید آستاگزانتین به دست می‌آید. به نظر می‌رسد ازت نیتراتی مناسب‌ترین منبع ازت برای تولید آستاگزانتین باشد؛ درحالی‌که مصرف ازت به شکل سولفات آمونیوم فقط در افزایش رشد

رویشی مؤثر بوده و در تولید کاروتن در ظرف دو هفته اول کشت نقش چندانی نـدارد. مصـرف نیترات کلسیم گرچه برای کاروتن‌زایی مؤثر است، ولی مصرف آن در مقایسه با سولفات آمونیوم و اوره، در پایان آزمایش موجب کاهش تعداد سلولهای کل شد. همچنین به نظر مـی‌رسـد کـه مصرف نیترات کلسـیم بـرای رشـد رویشـی ایـن جلبـک، منبـع ازت مناسـبی نباشـد. جلبـک هماتوکوکوس در شرایط مصرف ازت به شکل اوره نیـز بـه خـوبی رشـد مـی‌کنـد؛ ولـی میـزان کاروتنوئید محتوای آن در مقایسه با مصرف ازت از نمکهـای نیتـرات کلسـیم و نیتـرات سـدیم کاهش می‌یابد. نتایج به دست آمده در این آزمایش، با نتایج به دست آمده به وسیله برووِیتسکا و همکاران به خوبی مطابقت دارد(Borowitzka *et al*., 1991). مطالعـات قبلـی بـرروی جلبـک همـاتوکوکوس نیـز نشـان داده اسـت کـه مصـرف ازت نیتراتـی بـر ازت آمونیـومی درتولیـد آستاگزانتین برتری دارد(Syrett, 1962)؛ هر چند اشتروس گـزارش کـرده اسـت کـه سـلولهای درحال رشدنمایی(در pH اسیدی)، ازت به شکل آمونیومی را به ازت نیتراتی ترجیح می‌دهنـد (Stross, 1963)؛ ولی شاید این اختلاف در اسـتفاده از شـکلهای مختلـف ازت بـه نـژاد جلبـک مربوط باشد.

رشد رویشی ضعیف جلبک هماتوکوکوس در محیط کشت حاوی نیترات کلسیم (جـدول۱)، به احتمال زیاد به خاطر بالا بودن غلظت کلسیم و افزایش pH محیط کشت می‌باشد. در ضمن مطالعات نشان مـی‌دهـد کلریـد کلسـیم در غلظـت بـالا منجـر بـه تشـکیل کیسـت و تجمـع آستاگزانتین در جلبک هماتوکوکوس می‌شود (Kobyashi et al., 1997). چنین به نظر می‌رسد که رشد جلبک در محیط حاوی نیترات کلسیم، بلافاصله متوقف می‌گردد و پایین بـودن تعـداد سلول کل نیز به همین علت است (جدول۱).

درجلبک هماتوکوکوس، محیط کشت حاوی ازت آمونیومی، مـانع از تشـکیل کاروتنوئیـد در سلولهای رشد یافته می‌شود؛ زیرا برای تشکیل آستاگزانتین، تغیر شکل جلبک از فاز رویشی بـه فاز تولید کیست ضرورت دارد. در ضـمن میـزان کلروفیـل محتـوای جلبـک، بـه علـت کـاهش سلولهای رویشی و افزایش تعداد سلولهای غیر متحرک سبز رنگ و همچنـین تخریـب کلرفیـل محتوای کیستهای قرمز رنگ، به پایین‌ترین میزان خود در مقایسه بـا سـایر تیمارهـای مصـرف شکل ازت می‌رسد. دلیل بالاتر بـودن میـزان کلروفیـل در تیمـار سـولفات آمونیـوم نسـبت بـه تیمارهای با نیترات سدیم و اوره، شاید به علت عدم تشکیل کیست قرمز باشد.

دو هفته بعد از شروع آزمایش، میزان درصد آستاگزانتین حاوی جلبک هماتوکوکوس، تحـت تیمارهای مختلف ازت، نظیر نیترات کلسیم، نیترات سدیم، اوره و سولفات آمونیـوم بـه ترتیـب ۰/۵۷٪ ، ۰/۳۴٪ ، ۰/۱۴٪ و ۰/۰۰٪ می‌باشد که این اختلاف، بـه تـأثیر مصـرف شـکل ازت در

تغییر شکل جلبک از فاز رویشی به فاز تولید کیست، مربوط می‌شود. به طوری که مصرف ازت به شکل نیترات کلسیم، باعث قطع رشد رویشی و مصرف ازت به شکل سولفات آمونیوم، باعث ادامه رشد رویشی در ظرف دو هفته اول انکوباسیون می‌شود.

جدول ۱ – تأثیر شکل نیتروژن بر میزان رشد، تیپ سلولی، میزان کلروفیل و آستاگزانتین محتوی جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس، دو هفته بعد از شروع آزمایش. (میانگین سه تکرار ± انحراف معیار)*

شکل نیتروژن	(تعدادسلول در هر میلی‌لیتر(10^5 ×)**				وزن‌خشک (گرم در لیتر)	میزان کلروفیل محتوی جلبک (میلی‌گرم در لیتر)	میزان آستاگزانتین محتوی جلبک (میلی‌گرم در لیتر)
	سلول رویشی	سلول‌سبز غیرمتحرک	کیست قرمز	کل			
ازت محیط کشت به شکل نیترات سدیم (شاهد)	۰/۳۳ ± ۰/۱۱ ^{ab} (۱۱٪)	۲/۰ ± ۰/۲۰ ^{b} (۶۹٪)	۰/۰۶ ± ۰/۲۰ ^{c} (۲۰٪)	۲/۹۳ ^{b}	۰/۷۵ ± ۰/۰۳ ^{bc}	۶/۶۴ ± ۰/۱۷ ^{b}	۲/۵۷ ± ۰/۷۱ ^{c}
ازت محیط کشت به شکل نیترات کلسیم	۰ ± ۰/۰ ^{a} (۰٪)	۰/۱۶ ± ۰/۰۵ ^{a} (۳۲٪)	۰/۳۲ ± ۰/۰۳ ^{b} (۶۸٪)	۰/۴۸ ^{a}	۰/۴۴ ± ۰/۰۴ ^{a}	۰/۱۲ ± ۰/۰۳ ^{a}	۲/۴۹ ± ۰/۳۱ ^{c}
ازت محیط کشت به شکل سولفات آمونیوم	۱/۱۳ ± ۰/۶۱ ^{c} (۳۴٪)	۲/۳۰ ± ۰/۸۲ ^{b} (۶۶٪)	۰ ± ۰/۰ ^{a} (۰٪)	۳/۴۳ ^{b}	۰/۷۹ ± ۰/۰۶ ^{c}	۷/۱۵ ± ۰/۱۰ ^{c}	۰/۰ ± ۰/۰ ^{a}
ازت محیط کشت به شکل اوره	۰/۴۷ ± ۰/۱۶ ^{b} (۱۵٪)	۲/۳۳ ± ۰/۴۱ ^{b} (۷۸٪)	۰/۲۰ ± ۰/۱۰ ^{ab} (۷٪)	۳/۰ ^{b}	۰/۶۹ ± ۰/۰۸ ^{b}	۵/۰۴ ± ۰/۴۵ ^{b}	۰/۹۵ ± ۰/۵۵ ^{b}

*** مقایسهٔ میانگین‌ها در سطح ۵٪ انجام شده است و در هر ستون، تیمارهایی که دارای حروف مشترک نیستند از نظر آماری معنی‌دار هستند (آزمون دانکن) .**

**** زمان اندازه‌گیری دو هفته بعد از شروع آزمایش (وزن خشک جلبک در شروع آزمایش مساوی ۰/۰۳ گرم در لیتر بوده است و تمامی سلولها در شروع آزمایش در فاز رویشی بوده‌اند. همچنین میزان کلروفیل اولیه ۰/۳۱ میلی‌گرم در لیتر و میزان آستاگزانتین اولیه برابر صفر میلی گرم در لیتر بوده است)، اعداد داخل پرانتز مربوط به درصد تیپ سلولی است.**

باتوجه به ارقام مندرج در جدول۲ معلوم می‌شود که در کلیه تیمارها، بعد از یک ماه انکوبه کردن جلبکها، وزن خشک انها در شرایط کشت فضای باز افزایش می‌یابد، که این افزایش در تیمار نیترات کلسیم در مقایسه با تیمار سولفات آمونیوم، اوره و نیترات سدیم، حدود ٪۶۲ بیشتر است. بالاتر بودن وزن خشک جلبک در تیمار نیترات کلسیم نسبت به سه تیمار سولفات آمونیوم، اوره و نیترات سدیم، شاید به دلیل ضخیم‌تر شدن دیواره سلولهای کیست در این تیمار باشد؛ زیرا مطالعات آزمایشگاهی نشان داده است که جلبک هماتوکوکوس تحت تیمار نیترات کلسیم زودتر به فاز تولید کیست می‌رود.

همان‌طور که نتایج جدول ۲ نشان می‌دهد، در ظرف یک ماه در فضای باز، با مصرف ازت به شکل سولفات آمونیوم، بالاترین میزان آستاگزانتین تولید می‌شود و کمترین آن، در شرایط مصرف نیترات کلسیم حاصل می‌گردد. این اختلاف احتمالاً ناشی از جمعیت بیشتر سلولها در شرایط سولفات آمونیوم در ظرف یک ماه می‌باشد. در ضمن بین تیمارهای اوره و نیترات سدیم از لحاظ تولید آستاگزانتین و وزن خشک اختلاف معنی‌داری وجود ندارد.به طور کلی نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که مناسب‌ترین شکل ازت برای دستیابی به بیشترین تعداد سلولهای رویشی (هم در شرایط آزمایشگاهی اتاقک رشد و هم در آزمایش انجام شده در فضای باز)، ازت آمونیومی می‌باشد.

جدول۲- تأثیر شکل ازت بر میزان رشد، کلروفیل کل و آستاگزانتین محتوی جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس درمدت یک‌ماه درظروف پلاستیکی حاوی ۸ لیتر محلول غذائی.

(میانگین سه تکرار ± انحراف معیار)*

تیمار (شکل ازت)	وزن خشک ** (گرم در لیتر)	کلروفیل کل (میلی‌گرم بر گرم وزن خشک)	آستاگزانتین (میلی‌گرم بر گرم وزن خشک)	آستاگزانتین (میلی‌گرم در لیتر)
سولفات آمونیوم	۰/۱۵ ± ۰/۰۳ [a]	۰/۶۰ ± ۰/۰۹ [c]	۴/۱۷ ± ۰/۵۵ [c]	۰/۶۲ ± ۰/۱۲ [c]
اوره	۰/۱۷ ± ۰/۰۶ [a]	۰/۳۶ ± ۰/۰۶ [b]	۲/۶۰ ± ۰/۲۶ [b]	۰/۴۲ ± ۰/۱۲ [b]
نیترات سدیم	۰/۱۶ ± ۰/۰۲ [a]	۰/۴۳ ± ۰/۰۷ [b]	۲/۹۶ ± ۰/۲۹ [b]	۰/۴۸ ± ۰/۰۹ [bc]
نیترات کلسیم	۰/۲۶ ± ۰/۰۲ [b]	۰/۱۱ ± ۰/۰۳ [a]	۰/۸۷ ± ۰/۱۵ [a]	۰/۲۳ ± ۰/۰۳ [a]

*** مقایسه میانگین‌ها در سطح ۵٪ انجام شده و در هر ستون تیمارهایی که دارای حروف مشترک نیستند از نظر آماری معنی‌دار هستند (آزمون دانکن).**

**** زمان اندازه‌گیری یک ماه بعد از شروع آزمایش (وزن خشک جلبک در شروع آزمایش ۰/۰۲۶ گرم در لیتر، میزان کلروفیل اولیه ۱۲/۵ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک و میزان آستاگزانتین اولیه برابر صفر میلی‌گرم) بوده است.**

ازاعداد مندرج در جدول۳ و شکل۱ که در شرایط اتاقک رشد انجام شده است، چنین برداشت می‌شود که تأثیر ازت آمونیومی مصرف شده از نمکهای مختلف آمونیوم، متفاوت است به طوری که بیشترین تعداد سلولهای رویشی به دست آمده، در شرایط مصرف نمکهای مختلف آمونیوم، به ترتیب زیر می‌باشد:

کربنات آمونیوم < سولفات آمونیوم < نیترات آمونیوم < کلرور آمونیوم < استات آمونیوم < فسفات آمونیوم

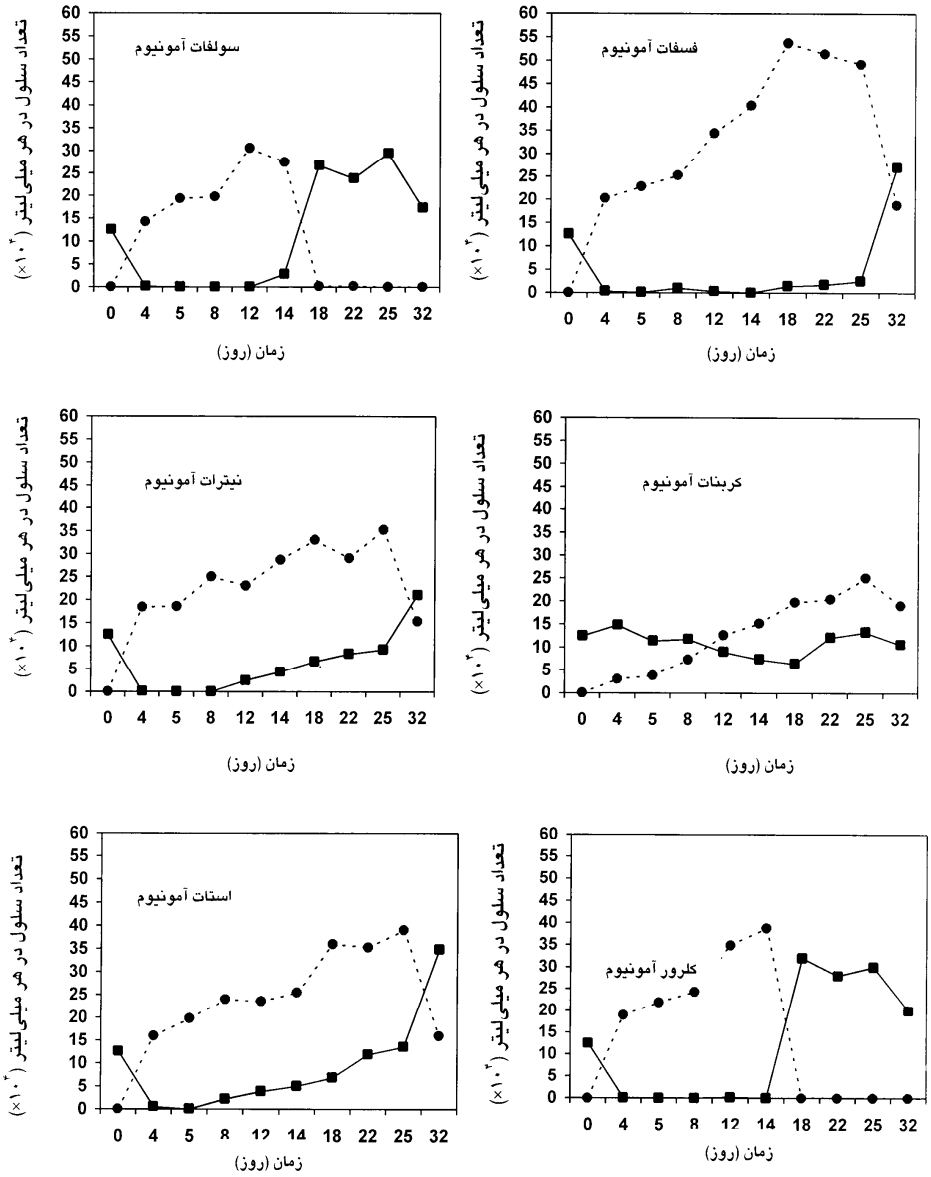
تحت شرایط انجام این آزمایش؛ زمان انکوباسیون برای دستیابی به بیشترین سلول رویشی در شرایط مصرف سولفات و کلرور آمونیوم، ۱۵ روز است. این زمان در مورد فسفات آمونیوم، ۱۹ روز و در شرایط استات و نیترات و کربنات آمونیوم ۲۶ روز است (جدول ۳). به نظر می‌رسد دسترسی به بیشترین رشد رویشی – در پیروی از مصرف نمکهای مختلف آمونیوم – به شدت تحت تأثیر زمان انکوباسیون است، علت آن شاید مربوط به متغیر بودن زمان لازم برای ظهور تیپ‌های مختلف سلولی این جلبک باشد که خود تابع عوامل محیطی، تغذیه‌ای و تنش‌زا است.

در ضمن زمان لازم برای دستیابی به بیشترین سلول های سبز غیر متحرک در شرایط مصرف نمک‌های سولفات آمونیوم، کلرورآمونیوم و کربنات آمونیوم به ترتیب ۲۶، ۱۹ و ۲۶ روز است و در مورد نمک‌های فسفات آمونیوم، استات‌آمونیوم و نیترات آمونیوم، احتمالاً این زمان بیش‌از ۳۲ روز می‌باشد(جدول۳)، زیرا جلبک‌ها درست۳۲ روز بعد از کشت برداشت شده‌اند. از آنجا که مطالعات انجام شده بر روی جلبک هماتوکوکوس، روابط پیچیده‌ای را میان عوامل محیطی و تغذیه‌ای نمایان می‌سازد (Borowitzka et al., 1991) ، از این رو به نظر می‌رسد که اثر برهم کنش این عوامل بر رشد رویشی و تولید آستاگزانتین در جلبک سبز هماتوکوکوس، نیاز به بررسی بیشتردارد.

جدول ۳ – دستیابی به بیشترین سلولهای رویشی و سلولهای سبز غیر متحرک – در هر میلی‌لیتر محیط کشت و در پیروی از مصرف نمکهای مختلف آمونیوم – در مدت ۳۲ روز (میانگین چهار تکرار ± انحراف معیار).

نمک آمونیوم	بیشترین سلولهای رویشی		بیشترین سلول‌های سبز غیرمتحرک	
	زمان‌لازم(روز) *	تعداد ($\times 10^4$)	زمان لازم (روز) *	تعداد ($\times 10^4$)
سولفات آمونیوم	۱۵	۲۷/٤ ± ۳/۸	۲٦	۲۹/٤ ± ۲/۰
کلرور آمونیوم	۱۵	۳۸/۸ ± ۱/۰	۱۹	۳۲/۰ ± ۲/۷
فسفات آمونیوم	۱۹	۵۳/۷ ± ۳/۹	۳۲	۲۷/۰ ± ٤/۰
استات آمونیوم	۲٦	۳۹/۰ ± ۵/۳	۳۲	۳٤/۸ ± ۲/۰
نیترات آمونیوم	۲٦	۳۵/۲ ± ۵/٤	۳۲	۲۱/۱ ± ۲/۳
کربنات آمونیوم	۲٦	۲۵/۰ ± ۲/۷	۲٦	۱۳/۳ ± ۳/۰

* زمان لازم برای دستیابی به بیشترین سلول‌های رویشی و سلول‌های سبز غیرمتحرک درشرایط مصرف نمک‌های مختلف آمونیوم.



شکل۱ – تأثیر مصرف شکل‌های مختلف ازت آمونیومی برمیزان‌رشد جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس.
(●) تعداد سلول‌های رویشی، (■) تعداد سلول‌های سبز غیر متحرک(میانگین چهار تکرار).

Refrences

Borowitzka, M.A., Huisman, J.M., and Osbron, A.., (1991) *Culture of the astaxanthin producing alga Haematococcus pluvialis. I : Effect of nutrients and cell type.* J.Appl. Phycol, **3,** 295 – 304 .

Boussiba, S., and Vonshak, A., (1991) *Astaxanthin accumulation in the green alga Haematococcus pluvialis*; Plant Cell Physiol., **32,**1077-82.

Fan, L., Vonshak, A., and Boussiba, S., (1994) *Effect of temperature and irradiance on growth of Haematococcus pluvialis.* J. Phycol., **30,**829-833 .

Fritsch. F.E, (1968) *A treatise on the british fresh water algae*. Cabridge University Press, 78-79.

Johnson, E.A., Villa, T.G., and Lewis, M.J., (1980). *Phaffia rhodozyma as an astaxanthin source in salmonid diets*. Aquaculture, **20,**123-134.

Kobayashi, M., Kakizono, T., and Nagai, S., (1991) *Astaxanthin production by a green alga, Haematococcus pluvialis accompanied with morphological changes in acetate media*. J. Ferment . Bioengin., **71,**335-339 .

Kobayashi, M., Kurimura, Y., and Tsuji, Y., (1997) *Light – independent astaxanthin production by the green microalga Haematococcus pluvialis under salt stress.* Biotechnol. Lett., **19,**507-509 .

Miki, W., (1991) *Biological functions and activities of animal caroteniods.* Pure Appl. Chem., **63,**141-146 .

Proctor, V.W., (1957) *Preferential assimilation of nitrate by Haematococcus pluvialis.* Am. J. Bot., **44,**141-143.

Stross, R.G., (1963) *Nitrate preference in Haematococcus pluvialis is controlled by strain, age of inoculum and pH of the medium.* Can J.Microbiol., **9,** 33-40 .

Syrett. P.J., (1962) *Nitrogen assimilation. In lewin R.A.(ed), Physiology and Biochemistry of Algae*. Academic Press, London, 171-188.

مهدیه، م.، (۱۳۷۸) *تأثیر شوری و برخی‌از عوامل تغذیه‌ای برمیزان رشد و تولید کارتنوئید دربرخی از جلبکهای سبز*، پایان‌نامهٔ کارشناسی‌ارشد دانشکدهٔ علوم‌پایه، دانشگاه تربیت مدرس.