

بررسی رشد ریز جلبک *Chlorella sp* در سه ترکیب ویتامینه در آب دریا

شبنم باقری^۱، سیده زهرا معصومی زاده^{۲*}

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز، اهواز، ایران

۲- گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز، اهواز، ایران

*zmasoomi@yahoo.com

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۴

تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۴

چکیده

ریز جلبک کلرلا از جلبک‌های سبز فتوسنتزکننده می‌باشد که در آبی پروری، تحقیقات و بسیاری علوم دیگر به طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد. از آنجایی که ویتامین‌ها باعث افزایش رشد برخی فیتوپلانکتون‌ها می‌شود؛ لذا اثرات ویتامین‌ها (ویتامین محیط کشت کانوی شامل: B₁ و B₁₂، ویتامین محیط کشت گیلارد شامل: B₁ و B₁₂ و H و ویتامین‌های Bcomplex و B₁₂ بر رشد میکرو جلبک کلرلا مورد آزمایش قرار گرفت. رشد این ریز جلبک در ۴ تیمار هر یک با سه تکرار برای هر تیمار مورد آزمایش قرار گرفت. میکرو جلبک‌ها با شمارش روزانه و در شرایط آزمایشگاهی یکسان (دمای ۲۵°C، شوری ۵ ppt، شدت نوری ۲۵۰۰ لوکس و دوره نوری ۱۶:۸) محاسبه شد. نتایج آماری نشان داد که بین تیمارهای دارای ترکیبات ویتامینه اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. اگرچه بیشترین تراکم مربوط به تیمار دارای ویتامین کانوی بود ولی بین دو محیط کشت ویتامینه گیلارد و کانوی اختلاف آماری معنی‌داری وجود نداشت. همچنین کمترین تراکم مربوط به تیمار فاقد ویتامین بود و بین تیمار فاقد ویتامین و تیمارهای دارای ویتامین‌های کانوی و گیلارد اختلاف معنی‌داری وجود داشت، لذا می‌توان جهت افزایش رشد کلرلا از ویتامین‌های کانوی و گیلارد استفاده نمود.

کلمات کلیدی: کلرلا، آبی پروری، ویتامین، ریز جلبک، آب دریا.

۱- مقدمه

کلرلا از گونه‌های مهم شاخه جلبک‌های سبز کلروفیتا بوده و ساکن آب‌های شیرین و شور می‌باشد. در استخراج‌های پرورشی ماهی و اکوسیستم‌های آبی به طور وسیعی مورد تغذیه روتیفر، انواع لارو ماهیان و سایر آبزیان قرار می‌گیرد. علاوه بر آن نقش، در آبی‌پروری از نظر دارویی، استخراج مواد و... نیز مورد توجه می‌باشد (فلاحی و صلواتیان، ۱۳۸۴). کلرلا مشابه گیاهان از فعال‌ترین میکروجلبک‌های فتوسنتزکننده و دارای کلروفیل با تراکم بالا است. این میکروجلبک سلامتی و قدرت دفاعی پوست بدن را بهبود می‌بخشد. از عصاره کلرلا در تهیه لوازم آرایشی بهداشتی با توجه به پلی‌ساکاریدهای موجود در آن داروسازی استفاده می‌گردد. بخشی از خواص درمانی کلرلا مربوط به مقدار زیاد کلروفیل و ساختمان دیواره سلولی خصوصاً مواد متشکله این دیواره سلولی است (صفری، ۱۳۹۰). تحقیقات نشان داده که کلرلا باعث تقویت سیستم ایمنی بدن شده و با استفاده از نتایج امیدارکننده آن، در درمان سرطان انسانی مورد بررسی قرار گرفته است. کلرلا به طور خاص از عمل سرکوب سیستم ایمنی ناشی از استرس و تشکیل زخم معده جلوگیری و محافظت می‌کند (Janczyk et al., 2007). همچنین اغلب اسیدهای آمینه ضروری به غیر از متیونین را دارا می‌باشد. ۶۰٪ وزن خشک آن را پروتئین تشکیل داده و دارای انواع ویتامین‌ها و مواد معدنی است. عصاره آن در کلسترول خون نقش دارد (معظمی، ۱۳۸۲).

ویتامین‌ها در میان فاکتورهای آلی برای رشد گونه‌های فیتوپلانکتونی مورد نیاز می‌باشد. با توجه به نیاز میکروجلبک‌ها به ویتامین‌ها جهت افزایش رشد آن‌ها ویتامین‌هایی مانند سیانوکوبالامین، تیامین، بیوتین به محیط کشت آن‌ها اضافه می‌شود (معصومی زاده، ۱۳۸۳). بدون مصرف کافی از محلول ویتامین‌ها بسیاری از گونه‌های فیتوپلانکتونی رشد نخواهند کرد. بعضی از فیتوپلانکتون‌ها کاملاً به منابع خارجی ویتامین‌ها وابسته می‌باشند در حالی که بقیه قادر به ساختن ویتامین‌ها هستند. این ویتامین‌ها به مقدار بسیار کم به عنوان کوفاکتوری برای استفاده از ارگانسیم‌هایی که صرفاً رشد اتوتروفیک دارند مورد استفاده قرار می‌گیرد (رحیمی بشر، ۱۳۷۹).

تهیه محلول خالص ویتامین‌ها هزینه زیادی از نظر اقتصادی دارد ولی استفاده از محلول ویتامینه گروه B که در داروخانه‌ها با قیمت ارزان‌تری وجود دارند، مقرون به صرفه است. با توجه به هزینه زیاد تولید محیط کشت، می‌توان تغییراتی را در نوع محیط کشت مورد استفاده میکروجلبک‌ها انجام داد که علاوه بر کم کردن هزینه‌ها راندمان تولید نیز افزایش یابد، لذا بررسی شرایط بهینه جهت افزایش تولید ضروری به نظر می‌رسد. در این تحقیق سعی شده است تا با جایگزین نمودن محیط کشت‌های مغذی و در عین

۲- مواد و روش‌ها

این تحقیق در فروردین ۱۳۹۴ در آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز انجام شد. ابتدا محیط کشت TMRL تهیه شد. سه ترکیب ویتامینه شامل: ویتامین‌های محیط کشت کانوی شامل: B₁ و B₁₂، ویتامین‌های محیط کشت گیلارد شامل: B₁، B₁₂ و H و ویتامین‌های گروه B شامل: Bcomplex و B₁₂. به میزان ۵۰ cc ریزجلبک و ۴۵۰ cc محیط کشت در ظروف ۵۰۰ cc تحت شرایط زیستی یکسان (نوع آب دریا، دمای ۲۵°C، شوری ppt ۵، شدت نوری ۲۵۰۰ لوکس و دوره نوری ۱۶:۸) قرار داده شدند. همچنین هوادهی با استفاده از پمپ‌های هواده به صورت شبانه‌روزی صورت گرفت.

۱-۲- مقدار و نوع استفاده از محلول‌های ویتامینه

جهت تعیین تأثیر ویتامین‌ها بر رشد ریزجلبک کلرلا از محیط کشت TMRL استفاده شد به این محیط کشت ۳ محلول ویتامینه اضافه شد. مقدار ویتامین‌های مورد استفاده در استوک محلول اولیه ویتامین‌های گیلارد، کانوی و گروه B مطابق جدول ۱ ارائه شده است. برای تهیه ویتامین‌های گیلارد هر کدام از این مقادیر در یک لیتر آب مقطر حل گردیده است. سپس از استوک اولیه محلول ویتامین‌های گیلارد ساخته شده ۵ میلی‌لیتر به یک لیتر آب مقطر اضافه می‌شود (استوک ثانویه) و به ۱ لیتر محیط کشت مورد نظر ۱ میلی‌لیتر از استوک ثانویه گیلارد اضافه می‌شود. در مورد محلول ویتامینه کانوی به مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر به ۱ لیتر محیط کشت مورد نظر اضافه می‌شود (Lavens & Sorgeloose., 1996). محلول ویتامینه B که شامل ۱ آمپول ویتامین B₁₂ (۲ میلی‌لیتر) و ۱ آمپول B complex (۱ میلی‌لیتر) به ۱ لیتر آب مقطر اضافه شده، سپس ۱ میلی‌لیتر از این استوک ویتامینه به ۱ لیتر محیط کشت مورد نظر اضافه می‌گردد (معصومی زاده، ۱۳۸۳). در مجموع ۴ تیمار هر یک با سه تکرار شامل محیط کشت TMRL، محیط کشت TMRL و ویتامین‌های محیط کشت گیلارد، محیط کشت TMRL و ویتامین‌های محیط کشت کانوی و محیط کشت TMRL و ویتامین‌های گروه B تهیه و مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۱).

جدول ۱: مقادیر ویتامین محیط کشت گیلارد، ویتامین محیط کشت کانوی و ویتامین گروه B

ویتامین‌های محیط کشت کانوی		ویتامین‌های محیط کشت گیلارد		ویتامین‌های گروه B	
مقدار (mg)	نوع	مقدار (g)	نوع	مقدار (mg)	نوع
۲۰۰	B ₁	۲۰	B ₁	۲	B complex
۲۰۰	B ₁₂	۰/۱	H	۱	B ₁₂
		۰/۱	B ₁₂		

درصد تعیین گردید همچنین در رسم نمودارها و جداول از نرم افزار Excel استفاده گردید.

۲-۲- شمارش نرخ رشد و تجزیه تحلیل آماری

به طور روزانه از تمام تیمارها نمونه برداری شد و در زیر میکروسکوپ با استفاده از لام نثوبار روزانه با ۳ تکرار شمارش گردید و تراکم مشخص شد. میزان رشد با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

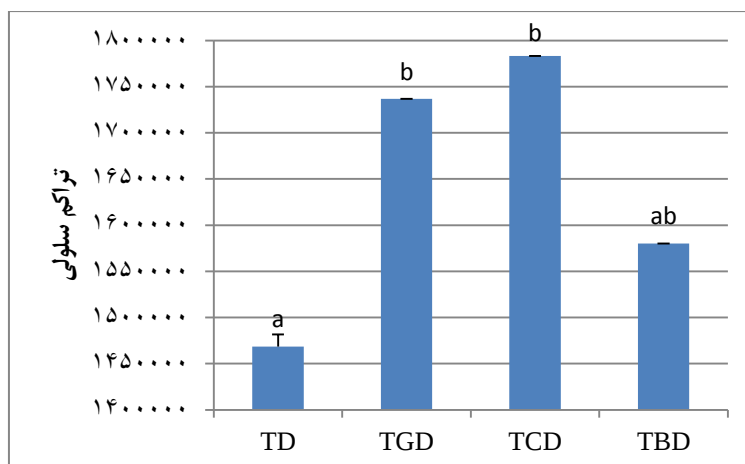
(Banerjee et al, 2011)

$$\frac{\text{تعداد کل سلول شمارش‌های شده}}{\text{تعداد بلوک‌ها}} \times 10^4 = \frac{\text{سلول}}{\text{میلی لیتر}}$$

در این بررسی تجزیه و تحلیل داده‌ها به کمک نرم افزار Spss 19 انجام شد و میانگین تیمارها به کمک آنالیز واریانس یک طرفه (آزمون دنباله‌ای LSD در One Way ANOVA) با یکدیگر مقایسه شدند که وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵

۳- نتایج

مقایسه نتایج آزمون LSD نشان داد ویتامین بر رشد میکروجلبک کلرلا مؤثر بوده و باعث افزایش رشد می‌شود. نتایج این آزمون در نمودار ۱ نشان می‌دهد بین تیمار فاقد ویتامین و تیمارهای دارای ترکیبات ویتامین گیلارد و کانوی اختلاف آماری معنی‌داری وجود دارد، در حالی که بین تیمارهای دارای ترکیبات ویتامینه اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد؛ اگرچه نمودار یاد شده نشان می‌دهد رشد کلرلا در محیط کشت دارای ویتامین‌های کانوی بیشتر از ۳ تیمار دیگر بوده است ولی در تیمار دارای ویتامین گیلارد از نظر آماری با محیط کشت دارای ویتامین کانوی اختلاف معنی‌داری نداشته است.



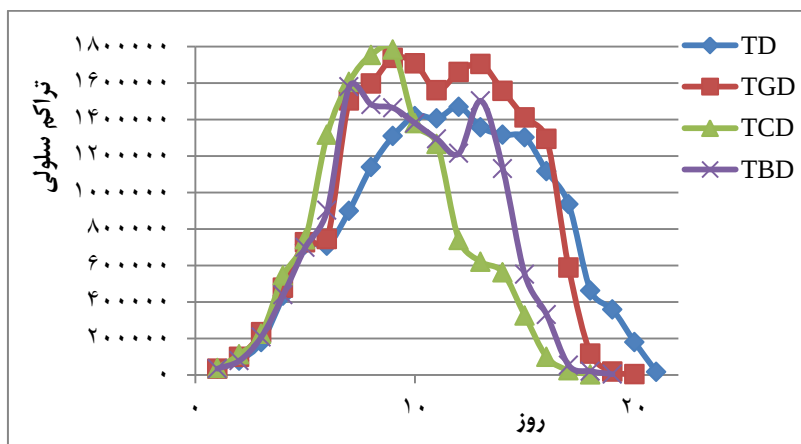
نمودار ۱: مقایسه حداکثر رشد ریزجلبک *Chlorella sp.* در محیط کشت TMRL فاقد ویتامین و دارای ترکیبات ویتامین‌های مختلف، TD: محیط کشت فاقد ویتامین، TGD: محیط کشت دارای ویتامین‌های گیلارد، TCD: محیط کشت دارای ویتامین‌های کانوی، TBD: محیط کشت دارای ویتامین‌های گروه B

بیشتر بود (نمودار ۲). همچنین ماندگاری در محیط کشت دارای ویتامین گروه B نیز بیشتر از ویتامین کانوی می‌باشد و تیمار فاقد ویتامین نسبت به دیگر تیمارهای دارای ترکیبات ویتامین حداکثر

نمودار نتایج نشان دادند رشد میکروجلبک کلرلا در محیط دارای ویتامین گیلارد و کانوی تقریباً یکسان بود اما در محیط دارای ویتامین گیلارد دیرتر وارد فاز مرگ شد و ماندگاری در این محیط

دیگر بوده است. کمترین رشد نیز در محیط کشت TMRL مشاهده شد.

رشد کمتری داشته است. اگرچه ویتامین‌های محیط کشت کانوی باعث افزایش رشد به میزان قابل توجهی شده‌اند ولی زمان ماندگاری در فاز سکون در محیط کشت گیلارد بیشتر از محیط‌های



نمودار ۲: مقایسه منحنی رشد ریز جلبک *Chlorella sp.* در محیط کشت TMRL فاقد ویتامین و دارای ترکیبات ویتامینی مختلف

ویتامین‌های گیلارد، گروه B و محیط کشت TMRL در رتبه‌های بعدی قرار داشته‌اند.

جدول ۲ میزان حداکثر تراکم در ترکیبات ویتامینه مختلف را نشان می‌دهد. نتایج بیانگر این نکته بود که بیشترین تراکم در محیط کشت TMRL و ویتامین‌های کانوی بوده و پس از آن به ترتیب

جدول ۲: مقایسه حداکثر تراکم در تیمارهای مختلف

تیمار	محیط کشت	نامگذاری	تراکم Cell/ml
۱	TMRL	TD	$3671/667 \times 10^4$
۲	محیط کشت TMRL و ویتامین‌های گیلارد	TGD	4342×10^4
۳	محیط کشت TMRL و ویتامین‌های کانوی	TCD	$4458/333 \times 10^4$
۴	محیط کشت TMRL و ویتامین‌های گروه B	TBD	$3950/333 \times 10^4$

ترکیب ویتامینه گیلارد شامل ویتامین‌های بیوتین، تیامین و B_{12} است. این سه ویتامین برای بسیاری از جلبک‌های فتوسنتزی که تصور می‌شود به طور کامل اتوتروف هستند ضروری است (Murakami, 2004). این ویتامین‌ها به میزان بسیار کم (10^{-10} - 10^{-13} mol/L) به عنوان کوفاکتور برای استفاده ارگانیسم‌هایی که صرفاً رشد اتوتروفیک دارند، مورد استفاده قرار می‌گیرد (Sournia, 1978). بیوتین و تیامین در مسیرهای متابولیسمی که در تمام ارگانیسم‌ها وجود دارند مورد استفاده قرار می‌گیرند. در گیاهان عالی‌تر این دو ویتامین توسط سلول‌ها سنتز می‌شوند. در جانوران نهایتاً از منابع غذایی و یا توسط فلور میکروبی به دست می‌آیند. در اکوسیستم‌های آبی ذخیره ابتدایی ویتامین که از زنجیره غذایی عبور می‌کند فراهم می‌شود و شاید بوسیله هضم مستقیم باکتری‌ها و یا ترشح فلور باکتریایی تقویت شود (Sournia,

۴- بحث و نتیجه‌گیری

محققین از سال‌ها قبل مشخص کرده‌اند که ویتامین‌های تیامین، بیوتین و کوبالامین جز اصلی ویتامین‌های مورد نیاز جلبک‌ها هستند در حالی که تا امروز اطلاعات کمی درباره چگونگی بیوسنتز ویتامین‌ها در جلبک‌ها وجود دارد و تنها اطلاعاتی در مورد نقش کوفاکتوری ویتامین‌ها در متابولیسم جلبک‌ها وجود دارد که بر اساس توالی ژنومی جلبک‌ها به دست آمده است (Croft et al., 2005). نیاز به این سه ویتامین در بسیاری از جلبک‌ها متفاوت است. ویتامین‌هایی که در آب وجود دارند توانایی جذب شدن توسط سلول‌هایی جلبکی را دارند و همه محلول در آب و نسبتاً پایدار هستند و به عنوان کوفاکتور در تعداد محدودی از آنزیم‌ها هستند و در نتیجه به مقدار کم مورد نیاز بوده و باعث کاهش فشار بر جریان بیوسنتز می‌شوند (Settembre et al., 2003)

ویتامین بسیار بیشتر از محیط کشت فاقد ویتامین بوده است. دلیل این امر را می‌توان به وجود ویتامین‌های بیوتین (B_6)، تیامین (B_1) و (B_{12}) در مسیرهای متابولیکی که در تمام ارگانیسم‌ها وجود دارند و به عنوان کوفاکتور مورد استفاده قرار می‌گیرند، دانست. در گیاهان عالی‌تر این دو ویتامین توسط سلول‌ها سنتز می‌شوند. نتایج تحقیق حاضر نشان داده که رشد محیط کشتهای حاوی ویتامینه بسیار بالاتر از رشد در محیط کشت فاقد ویتامینه است که با تحقیقات (Sournia, 1987) همخوانی دارد.

به طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد اضافه نمودن ویتامین به محیط کشت سبب افزایش رشد شده و کلرلا در محیط کشت دارای ویتامین‌های کانوی بیشتری رشد را داشته و در محیط کشت دارای ویتامین‌های گیلارد بیشترین ماندگاری را داشته است و بین محیط کشت‌های دارای ترکیبات ویتامینه اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه می‌توان گفت که ویتامین‌ها تأثیر قابل توجهی بر میزان رشد ریزجلبک *Chlorella* sp. داشته‌اند و اضافه نمودن ویتامین‌های گروه B از نظر اقتصادی به صرفه‌تر است. این موضوع در موارد کشت انبوه این ریزجلبک بخصوص در مراکز تکثیر و پرورش ماهیان دریایی دارای اهمیت است.

۵- منابع

- رحیمی‌بشر، م. ر.، ۱۳۷۹. فیتوپلانکتون. انتشارات شهرسبز، ۲۱۸ ص.
- رنجبر، آ.، پقه، آ.، کاهکش، ش.، زبایح نجف آبادی، م.، ۱۳۹۳. بررسی تأثیر وجود ویتامین‌های تیامین، کوبالامین و بیوتین در محیط کشت‌های کانوی بر رشد جلبک *Nannochloropsis oculata* اولین همایش ملی آبزیان و توسعه آبی‌زی پروری دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز، صص ۱۹-۲۱.
- صفری، ر.، ابطحی، ب.، طیبی، پ.، ۱۳۹۰. بررسی اثرات بازدارندگی عصاره جلبک *Chlorella vulgaris* روی باکتری *Bacillus subtilis* در محیط کشت آزمایشگاهی، مجله علمی پژوهشی علوم و فناوری غذایی، سال سوم، شماره ۲ (تابستان ۹۰): صص ۲۷-۳۳.
- فلاحی، م.، صلواتیان، س. م.، ۱۳۸۴. بررسی اثر غلظت‌های مختلف عنصر منیزیم بر میزان رشد و بیوماس جلبک سبز *Chlorella vulgaris*. پژوهش و سازندگی در امور دام و آبزیان، شماره ۷۲، صص ۹-۱۳.
- معصومی‌زاده، س. ز.، ۱۳۸۳. بررسی روند رشد برخی فیتوپلانکتون‌های بومی استان خوزستان در شرایط آزمایشگاهی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه شهید چمران اهواز، ۲۵۰ ص.

(1978). به نظر می‌رسد که ویتامین B_{12} ، بیشتر مورد نیاز جلبک‌های فتوسنتز کننده‌ای است که قادر نیستند ذرات مواد آلی را در خود بسازند (رحیمی بشر، ۱۳۷۹).

بررسی رشد ریزجلبک *Chlorella Sp.* در محیط کشتهای مختلف نشان داد بین محیط کشت فاقد ویتامین و محیط کشت دارای ترکیبات ویتامینه کانوی و همچنین گیلارد اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P < 0/05$) (نمودار ۱)، این نشان می‌دهد که ویتامین‌ها بر رشد تأثیر داشته و افزایش تراکم نشان دهنده افزایش رشد در تیمارهای ویتامینه خواهد بود. معصومی‌زاده و همکاران در سال (۱۳۸۳) نشان دادند که وجود ویتامین تأثیر بسیاری در رشد ریزجلبک تتراسلمیس دارد و در محیط فاقد ویتامینه رشد تتراسلمیس بسیار کم بوده و بین این دو تیمار اختلاف معنی‌داری وجود داشت که نتایج مذکور با تحقیق حاضر مطابقت دارد.

در این مطالعه بین هر سه محیط کشت دارای ویتامین گیلارد و ویتامین کانوی و ویتامین گروه B و همچنین بین محیط کشت دارای ویتامین گروه B و تیمار فاقد ویتامین اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($P > 0/05$). به عبارت دیگر، اگرچه تراکم در محیط کشت کانوی بالاتر بود ولی از نظر آماری تفاوتی بین رشد در سه محلول ویتامینه وجود نداشت، زیرا مقدار و تعداد ویتامین‌های این تیمار بیشتر از ویتامین‌های تیمارهای دیگر بوده و تیمار دارای ویتامین‌های گیلارد دارای هر سه ویتامین بیوتین، تیامین و کوبالامین است. به همین دلیل دارای رشد و ماندگاری بیشتری نسبت به تیمارهای دارای ویتامین‌های B_1 و B_{12} دارد. لذا می‌توان به جای استفاده از محلول‌های ویتامینه گران قیمت (گیلارد و کانوی)، از محلول‌های ویتامینه با هزینه کمتر (گروه B) استفاده نمود و نتیجه مشابهی را در افزایش رشد شاهد بود. تحقیقات نام برده نیز نشان می‌دهد اضافه نمودن ویتامین‌ها (بیوتین، تیامین و کوبالامین) افزایش رشد را شاهد خواهیم بود که این امر در نتایج این تحقیق بود و با تحقیق حاضر مطابقت داشت. با توجه به اثر افزایش نرخ رشد جلبک کلرلا با وجود ویتامین‌های گروه B، مشخص می‌شود که وجود ویتامین‌های گروه B سبب افزایش رشد می‌شود همچنان که بعضی از گونه‌های کلامیدوموناس به یک نوع یا بیشتر ویتامین B نیاز دارند. همچنین کلونی‌های رده ولوکس نیز حداقل به یک نوع ویتامین B نیاز دارند که با نتایج (Graham and Wilcox, 2000) مطابقت داشت.

Li-Xin و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که اضافه کردن مقدار بیشتری از ویتامین‌های تیامین و کوبالامین باعث افزایش رشد جلبک *Haematococcus pluvialis* می‌شود که این امر با یافته‌های تحقیق حاضر مطابقت دارد. همچنین رنجبر و همکاران (۱۳۹۳) اثر ویتامین‌های محیط کشت کانوی (ویتامین B_1 ، B_{12} و ویتامین H) را بر رشد میکروجلبک *Nannochloropsis oculata* بررسی کردند. در این مطالعه رشد این گونه در محیط کشت دارای

- center university of Ghent Belgium published by F.A.O. 438P.
- Li-Xin, Li., Song, Z.W., Duan, S.S., Luo, K.J., Li, T., Tang E.K., Wang, Q.X., 2015.** Effect of vitamin B₁ and vitamin B₁₂ on the Growth and Carotenoid Content of *Haematococcus pluvialis* CH-1. Advance Journal of Food Science and Technology 7(9): 709-711.
- Martin, T.C., Mattin T.W., Alison, G.S., 2000.** Algae need their Vitamins University of Cambridge, Cambridge CB2 3EA, United Kingdom Vol. 5(8), pp.1175-1183.
- Murakami, A., Miyashita, H., Iseki, M., Adachi, K., Mimuro, M., 2004.** Chlorophyll *d* in an epiphytic cyan bacterium of red algae. Science 303: 1633.
- Settembre, E., Begley, T.P., Ealick, S.E., 2003.** Structural biology of enzymes of the thiamin biosynthesis pathway. Current Opinion in Structural Biology, 13: 739-747.
- Sournia, A., 1978.** Phytoplankton manual. Publ: Paris-Unisco.337 P.
- معظمی، ن.، ۱۳۸۲. گزارش مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی قشم. ۳۴ص.
- Banerjee, S., Hew W.E., Khatoon, H., Shariffi, M., 2011.** Growth and proximate composition of tropical marine *Chaetoceros calcitrans* and *Nannochloropsis oculata* cultured outdoors and under laboratory condition. African Journal of Biotechnology Vol. 10(8), pp. 1375-1383.
- Croft, M.T., Lawrence, A.D., Raux-Deery, E., Warren, M., Smith, A.G., 2005.** Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria. Nature. (483): 90-93.
- Graham, Linda E. and Wilcox. Lee, W. 2000.** Alga. Publ: Prentice hall. 64P.
- Janczyk, P., Franke, H., Souffrant, W.B., 2007.** Nutritional value of *Chlorella vulgaris*: Effects of ultra-sonication and electroporation on digestibility in rats. Animal Feed Science and Technology, 132 pp. 163–169.
- Lavens, P., Sorgeloose P., 1996.** Manual on production and use of life food for aqua culture. Lab of Aqua culture and Artemia Research