

پاسخ سیانوباکتر *Nostoc calcicola* به غلظت‌های مختلف فسفر محیط در روزهای مختلف کشت

فاطمه خواجه‌پور^{*}، سید عباس حسینی^۱، رسول قربانی نصرآبادی^۱، بهاره شعبانپور^۱

^۱- گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران، صندوق پستی: ۴۹۱۶۵-۳۸۶

تاریخ پذیرش: ۱۸ بهمن ۱۳۹۴

تاریخ دریافت: ۱۰ مهر ۱۳۹۴

چکیده

در این تحقیق اثر فسفر بر میزان زی توده، کلروفیل آ، کاروتین و کربوهیدراتات سیانوباکتر *Nostoc calcicola* در روزهای مختلف کشت در آزمایشگاه کشت جلبک دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان مورد بررسی قرار گرفت. سیانوباکتر نوستوک تحت سه سطح فسفر ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ (میکرو گرم در لیتر) در سه تکرار برای ۱۲ روز در آزمایشگاه کشت جلبک مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج نشان داد که میزان فسفر محیط بر روی میزان زی توده، کلروفیل آ و کاروتین کشت *Nostoc calcicola* در برخی از روزهای کشت اثر معنی داری داشته است. در بررسی میزان تغییرات پروتئین کل و کربوهیدراتات، نتایج نشان داد که میزان پروتئین برای هر گرم وزن خشک این جلبک از آغاز کشت تا روز ۱۲ برای هر سه تیمار با افزایش همراه بوده است. با افزایش فسفر محیط، محتوی پروتئین زی توده افزایش یافته به طوریکه در روزهای ۶، ۸ و ۱۰ کشت اختلاف بین تیمار ۴۰۰ میکرو گرم فسفر در لیتر با دو سطوح دیگر معنی دار ($P < 0.05$) بوده است. در بررسی روند تغییرات پروتئین در طول روزهای کشت مشاهده شد که میزان پروتئین در تیمار با ۱۰۰ میکرو گرم فسفر در لیتر در روز ۶ کشت به حد اکثر مقدار خود ($372 \pm 20/10$ میلی گرم در گرم ماده خشک) رسیده و برای تیمار ۲۰۰ میکرو گرم فسفر در لیتر در روز ۱۲ کشت روند نزولی نشان داده است، در تیمار ۴۰۰ میکرو گرم در گرم ماده خشک) در روز ۸ کشت به دست آمده است و سپس تا روز ۱۲ کشت روند نزولی نشان داده است، در تیمار ۴۰۰ میکرو گرم فسفر در لیتر حد اکثر میزان پروتئین ($434 \pm 47 \pm 39$ میلی گرم در گرم ماده خشک) بوده و این مقدار مربوط به روز ۶ کشت بود و میزان پروتئین تا روز ۱۰ کشت با دو تیمار دیگر به طور معنی داری بیشتر بوده است. میزان کربوهیدراتات در هر سه سطح فسفر تا روز ۱۲ افزایش معنی داری ($P < 0.05$) را نشان داده است، اما در بین سطوح فسفر در روزهای کشت اختلاف معنی داری را نشان نداده است. نتایج مشاهده حاضر نشان داد که می‌توان با تغییر میزان فسفر محیط رشد و محتوی برخی از ترکیبات بیوشیمیایی سیانوباکتر *N. calcicola* را کنترل نمود.

کلمات کلیدی: *Nostoc calcicola*، کاروتین کل، پروتئین، کربوهیدراتات، فسفر.

* عهدهدار مکاتبات (✉) fatemekhajepour@yahoo.com.

مقدمه

پراکنش دارد. نوستوک به عنوان غذای سالم با پروتئین بالا، غنی از رنگدانه‌های و اسیدهای چرب غیراشبع است. گونه‌های این جنس دارای انواع آمینواسیدهای ضروری، کاروتونوئیدها و کلروفیل است. علاوه بر این ترکیبات پایه، ویتامین‌های C، B و انواع مواد معدنی را در خود دارد (Hashtroudi *et al.*, 2013).

نوستوک از جمله سیانوباکترهای است که در شکوفای جلبکی در اکوسیستم‌های آبی نقش دارد. بنابراین مطالعه بر روی نیاز اکولوژیکی این گونه‌ها می‌توانند در کنترل و محدود کرده رشد این گونه در شرایط خاص کمک کنند. از طرفی، علم زیست فناوری به دنبال یافتن محرك‌هایی مؤثر جهت افزایش نرخ رشد و محتوای ترکیبات مختلف بیوشیمیایی در جلبک‌ها است (Balat, 2010). مطالعه بر روی تأثیر عوامل فیزیکوشیمیایی بر رشد و ترکیبات شیمیایی موجود در جلبک می‌تواند با هدف تعیین بهترین شرایط کشت برای به دست آوردن بیشترین میزان ترکیبات شیمیایی در ریزجلبک‌ها به عنوان غذای زنده در آبزی پروری و یا سایر اهداف انجام شود. فاکتورهای محیطی بویژه نور، دما و وضعیت غذایی نظری میزان فسفر و نیتروژن، بر فتوستتر، زی توده و ترکیبات شیمیایی ریزجلبک‌ها تاثیرگذارند. در واقع این اثرات بر روی الگو و مسیر فعالیت متابولیسم سلولی تأثیرگذار می‌باشد. در بین این ترکیب‌ها اغلب، تغییر کربوهیدرات‌ها، لیپیدها، آمینواسیدها، نوکلئیک اسیدها، رنگدانه‌ها و پروتئین‌ها با تغییر شرایط محیطی ریزجلبک گزارش شده است. جلبک‌ها در پاسخ به انواع استرس‌های محیطی موادی (نظری پلی ساکاریدها، کاروتونوئیدها، اسیدهای چرب اشباع، ویتامین‌ها، گلیسرول و تعدادی از آنتی اکسیدانت‌ها) تولید می‌کنند

ریزجلبک‌ها موجودات تک‌سلولی فتوستتر کنده‌ای هستند که در حضور نور خورشید، دی‌اکسید کربن را به مواد آلی تبدیل می‌کنند. آن‌ها منبع انرژی، ویتامین‌های ضروری، اسیدهای چرب غیر اشباع، منبع غنی از آمینواسیدهای ضروری و رنگدانه‌های مختلف می‌باشند که به طور گسترده در آبزی پروری بکار می‌روند (Demirbas, 2009). ریزجلبک‌ها با داشتن میزان زیاد پروتئین که در برخی گونه‌ها تا بیش از ۵۰ درصد وزن تر را تشکیل می‌دهد و بدلیل فراوانی و ترکیب آمینواسیدهای آن‌ها، به عنوان Schwenzfeier *et al.*, 2011 مبنی پروتئینی مد نظر قرار گرفته‌اند (Reis *et al.*, 1998). همچنین ریزجلبک‌ها علاوه بر کلروفیل که رنگدانه اصلی شرکت کننده در فرآیند فتوستتر آن‌ها است دارای انواع دیگر از رنگدانه‌ها هستند که توانایی جذب طیف وسیعی از نور را دارا می‌باشند. این رنگدانه‌ها در سیانوباکترها شامل کاروتونوئیدها و فایکوبیلی‌پروتئین‌ها هستند (Del Campo *et al.*, 2007). کاروتونوئیدها رنگدانه‌هایی هستند که به عنوان رنگ مجاز در غذاها، پیش‌ساز ویتامین A در غذای انسان، دام، آبزی، تهیه فرآورده‌های مولتی ویتامین و همچنین فرآورده‌های آرایشی و بهداشتی در مقادیر بسیار زیاد مصرف می‌شود (N. calcicola). اخیراً گونه از سیانوباکترها در شمال ایران گزارش شده است که منبع غنی از کاروتونوئیدها است. مقدار این رنگدانه‌ها در این گونه از جلبک از منابع غنی آن‌ها که تاکنون اعلام شده بود، بیشتر است. جنس نوستوک از نظر پراکنش در اکوسیستم‌های آب شیرین و شور وجود دارد و تحمل بالایی در برابر تغییرات محیطی دارد و در مناطق وسیع با شرایط مختلف

می‌شوند. ارلن مایرهای حاوی محیط کشت مایع در دستگاه اتوکلاو کاملاً استریل می‌شوند.

شرایط کشت

کشت ریزجلبک‌ها در شدت نوری $3000 \pm 10\%$ و لوكس، دوره نوری (تاریکی : روشنایی) ۱۲:۱۲ و دمای ثابت 25 ± 2 در محیط کشت Z Zehnder با غلظت‌های مختلف فسفر (100 , 200 و 400 میکروگرم بر لیتر) انجام می‌شود. در طول دوره کشت (روزهای ۲, ۴, ۶, ۸, ۱۰ و ۱۲) تغییرات رشد، کلروفیل آ، کاروتینید کل، پروتئین کل و کربوهیدرات بررسی می‌شود. برای تنظیم فسفر از افزودن فسفات هیدروژن دی‌پتاسیم (K_2HPO_4) استفاده می‌شود.

تعیین میزان رشد

ابتدا سلول‌ها به کمک صافی (معمولأً 50 میلی‌لیتر از حجم محیط کشت) از محیط کشت (کاغذ واتمن شماره ۱) جدا می‌شود. سپس سلول‌ها با آب مقطر شستشو داده می‌شوند. وزن خشک توده زیستی با حذف آب توده زیستی حاصل از مرحله قبل با استفاده از حرارت در دمای 60 تا 70 درجه سانتی‌گراد به دست می‌آید (Lee and Shen, 2006).

اندازه‌گیری کلروفیل و کاروتینید کل

برای تعیین کلروفیل آ و کاروتینید کل، 50 میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی را از کاغذ صافی $45/45$ میکرون (سی/جی اف) عبور داده و به روش Aminot و Rey (۱۹۹۹) اندازه‌گیری شد.

که به عنوان مکانیسم دفاعی برای جلوگیری از تخریب سلولی عمل می‌کند. نتایج چنین مطالعات می‌تواند مسیرهای سنتز ماکرومولکول‌ها را در سلول را نشان دهد. فسفر از عناصر ضروری برای ریزجلبک‌ها می‌باشد که نقش مهمی در سنتز پروتئین و چربی‌ها داردند (Zhao et al., 2009).

مطالعه تأثیر سطوح فسفر بر روی سیانوباکترها و گونه‌های با ارزش آن‌ها بسیار محدود است. Markou در سال ۲۰۱۲ تغییر ترکیبات شیمیایی بیومس *Spirulina platensis* در مقادیر مختلف فسفر را نشان داد. Marco و Uros (۱۹۸۸) تغییرات رشد آنابنا و اسیلاتوریا در شرایط کمبود فسفر در کشت بسته نشان دادند. با توجه به مطالعه فوق، هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر فسفر بر روی زی توده تولید شده، کلروفیل آ، کاروتینیدها کل، پروتئین کل و کربوهیدرات در سیانوباکتر *N. calcicola* در روزهای مختلف کشت می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه استوک و آماده‌سازی اتاق کشت

به منظور انجام تحقیق، استوک ریزجلبک *Nostoc calcicola* از گروه فیتوشیمی دانشگاه شهید بهشتی تهیه و در محیط کشت Z_8 کشت داده می‌شود. ترکیب اصلی و مقدار مواد برای تهیه این محیط کشت در جدول ۱ نشان داده شده است (Miller et al., 1978). قبل از شروع کشت، اتاق کشت با استفاده از لامپ‌های فرابنفش به مدت نیم ساعت استریل شده است. تمامی وسایل شیشه‌ای در آون 180 درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت خشک و استریل

جدول ۱: ترکیبات و مقدار محیط کشت Z₈

اسامی	مقدار بر حسب گرم	محلول ۱: در ۳۰۰ میلی لیتر آب مقطر
NaNO ₃	۷/۴۶	
Ca(NO ₃) ₂ +H ₂ O	۹/۵	
MgSO ₄ +7H ₂ O	۵/۲	
K ₂ HPO ₄	۳/۹	محلول ۲: در ۳۰۰ میلی لیتر آب مقطر
Na ₂ CO ₃	۳/۶	
FeCl ₃ +6H ₂ O	۳۵۱۵/۱	محلول ۳: ۵ میلی لیتر محلول ۴۹۰+ EDTA + ۵ میلی لیتر محلول FeCl ₃
HCl	۱/۵	
EDTA	۲/۱۵۱۹	
Na ₂ SiO ₃ +9H ₂ O	۰/۰۲۵	محلول ۴: در ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر
H ₃ BO ₃	۱/۵۵	
MnCl ₂ +4H ₂ O	۰/۱۱۵	
(NH ₄)Mo ₇ O ₂₇ +4H ₂ O	۰/۰۴۴	
KBr	۰/۰۶	
KI	۰/۰۴۲	
ZnSO ₄ +7H ₂ O	۰/۱۴۳	
Co(NO ₃) ₂ +6H ₂ O	۰/۰۷۲	
CuSO ₄ +5H ₂ O	۰/۰۵۳	
Al ₂ (SO ₄) ₃ +18H ₂ O	۰/۲۴	
LiCl+H ₂ O	۰/۰۲۵	

گردیده و حداقل یک ساعت عمل همزنی به منظور حل شدن کامل انجام می‌شود. سپس ۱۰ میلی لیتر اسیدفسفریک ۸۵ درصد قطره قطره به محلول اضافه گردیده و محلول از کاغذ صافی واتمن عبور داده خواهد شد. در پایان حجم کل به وسیله آب مقطر به یک لیتر رسانده می‌شود.

۲. استخراج پروتئین

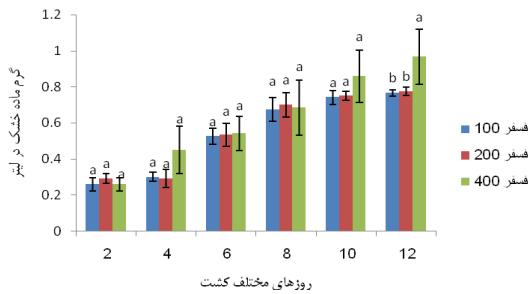
تعیین میزان پروتئین کل

برای سنجش غلظت پروتئین کل نمونه از روش برادفورد (Kochert, 1978) استفاده می‌شود. در ابتدا پروتئین نمونه‌ها استخراج و آماده‌سازی می‌شود.

۱. آماده‌سازی معرف برادفورد

برای تهیه محلول برادفورد، مقدار ۱۰ میلی گرم بریلانت بلو G₂₅₀ در ۵۰ میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد حل

کشت با هم اختلاف معنی داری ندارد اما در روز ۱۲ میزان ماده خشک تولید شده در تیمار ۴۰۰ میکروگرم فسفر در لیتر به طور معنی داری از دو تیمار دیگر بیشتر بوده است (شکل ۱).



شکل ۱: اثر سطوح فسفر (۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم فسفر در لیتر) بر زی توده تولید شده *N. calcicola* در روزهای مختلف کشت

همچنین نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تغییرات کلروفیل آز آغاز کشت تا روز ۱۲ روند افزایش را نشان داده است این افزایش در هر سه تیمار فسفر مشاهده شده است. به طوریکه میزان آن از ۲/۰۲ میلی گرم در ماده خشک در روز ۲ کشت به ۳/۹۴ میلی گرم در ماده خشک در روز ۱۲ به طور متوسط برای هر سه سطح فسفر افزایش یافت. اثر فسفر بر میزان کلروفیل فراینده بوده به طوریکه تیمار ۴۰۰ میکروگرم فسفر در لیتر میزان کلروفیل آبیشتری را در روزهای ۶ و ۸ کشت نشان داده که با سطوح دیگر فسفر دارای اختلاف معنی داری ($P < 0.05$) بوده است (جدول ۲). نتایج حاصل در مورد پاسخ کاروتونوئید کل مشابه با کلروفیل آبوده با این تفاوت که فقط در روز ۶ کشت اثر سطح ۴۰۰ میکروگرم فسفر با دو سطح دیگر بر روی این رنگدانه معنی دار بوده و باعث افزایش میزان کاروتونوئید کل گردیده است (جدول ۲).

به منظور استخراج پروتئین، میزان جلبک استخراج شده از ۵۰ میلی لیتر محیط کشت در ۲۰ درجه سانتی گراد انجام داده شود، سپس استخراج پروتئین به روش Meijer و Wijffels (۱۹۹۸) انجام می شود.

اندازه گیری کربوهیدرات

استخراج کربوهیدرات به روش Schneegurt همکاران (۱۹۹۴) و اندازه گیری آن به روش انترون (Gerhardt, 1994) انجام می شود. در این روش برای تهیه منحنی استاندارد از غلظت‌های مختلف گلوکز استفاده می شود و میزان جذب نوری محلول‌ها در طول موج ۵۷۸ نانومتر در دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت می شود.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

در این تحقیق از طرح کاملاً تصادفی در قالب اسپلیت پلات در زمان (جمع آوری شده در روزهای ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۱۲ کشت) با ۱ عامل فسفر در محیط کشت ۳ سطح (۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم فسفر در لیتر) در ۳ تکرار انجام شد. برای مقایسه میانگین پارامترها برای تعیین اثر فسفر در هر روز به طور مستقل و روزهای مختلف کشت به طور همزمان برای هر سطح فسفر از آزمون های واریانس یکطرفه و چند دامنه ای دانکن در سطح معنی دار ۵ درصد صورت گرفت.

نتایج

بررسی میزان ماده خشک تولیده شده *Nostoc calcicola* در روزهای مختلف کشت نشان داد که با میزان زی توده تولید شده در سه تیمار فسفر تا روز ۱۰

میلی گرم در گرم ماده خشک) در روز ۸ کشت به دست آمده است و سپس تا روز ۱۲ کشت روند نزولی نشان دادند، در حالی که در تیمار ۴۰۰ میکرو گرم فسفر در لیتر حداکثر میزان پروتئین $434/47 \pm 39$ میلی گرم در گرم ماده خشک بوده و این مقدار مربوط به روز ۶ کشت بود و میزان پروتئین تا روز ۱۰ کشت با دو تیمار دیگر به طور معنی داری بیشتر بوده است.

در بررسی تغییرات کربوهیدرات در هر سه سطح فسفر، کربوهیدرات از آغاز کشت تا روز ۱۲ افزایش معنی ($P < 0.05$) را نشان داده است. مقایسه میزان کربوهیدرات در تیمارهای فسفر در روزهای مختلف کشت اختلاف معنی داری را نشان نداد اما همواره تیمار ۴۰۰ میکرو گرم فسفر در لیتر دارای میزان کربوهیدرات کمتری نسبت به دو تیمار دیگر بوده است (جدول ۲).

در بررسی میزان تغییرات پروتئین کل و کربوهیدرات، نتایج تحقیق نشان داد که میزان پروتئین بر هر گرم وزن خشک این جلبک از آغاز کشت تا روز ۱۲ برای هر سه تیمار فسفر روند افزایش را نشان داده است. در بررسی اثر فسفر، مشاهده شده است که افزایش سطح فسفر با افزایش سطح پروتئین همراه بود و در روزهای ۶، ۸ و ۱۰ کشت، اختلاف بین تیمار ۴۰۰ میکرو گرم فسفر در لیتر با تیمار ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرو گرم فسفر در لیتر معنی دار ($P < 0.05$) بوده است اما بین تیمار ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرو گرم فسفر در لیتر اختلاف معنی دار نبوده است (جدول ۲). میزان پروتئین برای تیمار ۱۰۰، حداکثر مقدار ($372/4 \pm 20/10$ میلی گرم در گرم ماده خشک) مربوط به روز ۶ کشت و برای تیمار ۳۸۶/۳۳ $\pm 34/0.5$ میکرو گرم فسفر در لیتر (۲۰۰

جدول ۲: ترکیبات شیمیایی سیانوباکتر *N. cacticola* رشد یافته در سه غلظت فسفر در روزهای مختلف کشت

پارامترها	فسفر
(میلی گرم در گرم (میکرو گرم ماده خشک) در لیتر)	
روز ۱۲	
۳/۷۳ $\pm 0/13^a$	۳/۸۸ $\pm 0/16^a$
۳/۸۹ $\pm 0/48^a$	۳/۹۸ $\pm 0/39^a$
۴/۱۹ $\pm 0/1^a$	۴/۳۹ $\pm 0/14^a$
۶/۶۳ $\pm 0/11^b$	۶/۶۵ $\pm 0/12^{ab}$
۶/۴۹ $\pm 0/12^b$	۶/۸۵ $\pm 0/35^{ab}$
۶/۶۶ $\pm 0/2^c$	۶/۹۶ $\pm 0/08^b$
۳۲۰/۴۷ $\pm 5/8^{bc}$	۳۲۵/۵۳ $\pm 2/19^{bc}$
۳۲۵/۵۳ $\pm 18/74^{bc}$	۳۱۵/۴ $\pm 13/7^{bc}$
۳۴۵/۸ $\pm 10/0.5^{bc}$	۳۵۴/۶۷ $\pm 12/21^b$
۶۷۳/۲ $\pm 15/5^a$	۶۶۸/۷ $\pm 24/34^a$
۶۸۳/۱ $\pm 39/95^a$	۶۷۴/۱ $\pm 21/82^a$
۶۴۰/۸ $\pm 48/0.2^a$	۶۰۲/۱ $\pm 56/18^{ab}$
روز ۱۰	
۳/۶ $\pm 0/22^a$	۲/۸۴ $\pm 0/18^b$
۳/۹۲ $\pm 0/22^{ac}$	۳/۰۳ $\pm 0/0.3^b$
۴/۴۶ $\pm 0/11^a$	۳/۵ $\pm 0/27^b$
۶/۹۳ $\pm 0/26^a$	۵/۸۴ $\pm 0/16^c$
۷/۲۱ $\pm 0/29^a$	۵/۸۷ $\pm 0/13^c$
۷/۲۸ $\pm 0/1^a$	۶/۲۱ $\pm 0/18^d$
۳۵۷/۲ $\pm 7/6^{ab}$	۳۷۲/۴ $\pm 20/1^a$
۳۸۶/۳۳ $\pm 34/0.5^a$	۳۵۳/۴ $\pm 21/15^{ab}$
۴۳۱/۹۳ $\pm 7/91^a$	۴۳۴/۴۷ $\pm 39^a$
۶۲۸/۲ $\pm 32/21^{ab}$	۶۰۷/۵ $\pm 7/14^{bc}$
۵۹۹/۴ $\pm 14/28^{bc}$	۵۷۹/۶ $\pm 8/67^c$
۵۹۴/۹ $\pm 6/79^{ab}$	۶۲۵/۵ $\pm 40/52^{ab}$
روز ۸	
۲/۱۲ $\pm 0/0.2^c$	۲/۱۸ $\pm 0/24^c$
۲/۱۵ $\pm 0/15^c$	۱/۹۹ $\pm 0/18^c$
۲/۳۳ $\pm 0/32^c$	۱/۸۸ $\pm 0/11^d$
۵/۱۹ $\pm 0/0.1^d$	۵/۱۱ $\pm 0/14^d$
۵/۲۸ $\pm 0/0.9^d$	۵/۰۸ $\pm 0/16^d$
۵/۲۱ $\pm 0/0.3^e$	۴/۹۸ $\pm 0/0.9^e$
روز ۶	
۲/۱۸ $\pm 0/24^c$	۱۰۰
۱/۹۹ $\pm 0/18^c$	۲۰۰
۱/۸۸ $\pm 0/11^d$	۴۰۰
۵/۱۱ $\pm 0/14^d$	۱۰۰
۵/۰۸ $\pm 0/16^d$	۲۰۰
۴/۹۸ $\pm 0/0.9^e$	۴۰۰
روز ۴	
۲/۱۸ $\pm 0/24^c$	۱۰۰
۱/۹۹ $\pm 0/18^c$	۲۰۰
۱/۸۸ $\pm 0/11^d$	۴۰۰
۵/۱۱ $\pm 0/14^d$	۱۰۰
۵/۰۸ $\pm 0/16^d$	۲۰۰
۴/۹۸ $\pm 0/0.9^e$	۴۰۰
روز ۲	
۲/۱۸ $\pm 0/24^c$	۱۰۰
۱/۹۹ $\pm 0/18^c$	۲۰۰
۱/۸۸ $\pm 0/11^d$	۴۰۰
۵/۱۱ $\pm 0/14^d$	۱۰۰
۵/۰۸ $\pm 0/16^d$	۲۰۰
۴/۹۸ $\pm 0/0.9^e$	۴۰۰

داده ها مربوط به میانگین سه تکرار از آزمایش \pm انحراف معیار می باشد.

حروف کوچک معنی داری در سطح 0.05 را در هر ردیف نشان می دهد.

Buapet و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که افزایش فسفر تأثیر معنی داری بر میزان کلروفیل آ در علف دریایی *Ulva reticulate* ندارد. همچنین Dean و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند سطوح فسفر اثر معنی داری بر روی کربوهیدراتات دارند. در این مطالعه اختلاف غلظت فسفر تیمارهای، شاید به اندازه ای زیاد نبوده که اثر معنی داری را بر روی کربوهیدراتات نشان دهد. هر چند ما در این مطالعه میزان فسفر مصرف شده توسط ریز جلبک را در روزهای مختلف کشت مورد بررسی قرار نداده ایم اما اختلاف در میزان برخی از ترکیبات در سطوح مختلف فسفر اهمیت میزان این عنصر را نشان می دهد.

Marco و Orus (۱۹۸۸) بیان کردند سطوح پایین فسفر به طور زیادی میزان اسید نوکلئیک را کاهش می دهد. Reddy و Sarada (۱۹۸۲) رابطه بین کاهش فسفر و کاهش سطح ATP سلول را بیان کرد. و در نتیجه کاهش تقسیم سلولی و در نهایت رشد و در نهایت کاهش رنگدانه ها و پروتئین را به همراه دارد. و این خود می تواند مهم ترین دلیل برای کاهش رشد، پروتئین و رنگدانه های در سیانوباکتر مطالعه در غلظت پایین تر فسفر باشد.

با توجه به بومی بودن سیانوباکتر *N. calcicola* تاکنون مطالعات زیادی بر روی این گونه صورت نگرفته است. در حالی که این گونه می تواند کاندید مناسبی برای تولید انبوه رنگدانه باشد. از طرفی، علم زیست فناوری بدنبال بهینه سازی شرایط کشت برای حداقل تولیدات با ارزش می باشد. بنابراین با توجه به نتایج مطالعه حاضر می توان بیان کرد که با افزایش میزان فسفر محیط می تواند به عنوان یک فاکتور مؤثر بر افزایش میزان تولید کاروتونوئید باشد و جمع آوری زی

بحث

به خوبی مشخص شده است که سطوح مواد غذایی باعث تغییر ترکیب شیمیایی زی توده می شود. موجودات که تحت غلظت های مختلف قرار می گیرند استراتژی سوخت و سازشان تغییر می کنند و برخی ترکیبات را می سازند و یا ذخیره می کنند که بتوانند با شرایط جدید سازگار شوند (Dean et al., 2008). میکروارگانیسم ها تأثیر پذیری بالایی نسبت به تغییرات جزئی شرایط محیط دارند. بنابراین در این مطالعه سعی شده عوامل محیطی نظیر رژیم نوری، دما و هوادهای ثابت باشد تا بتوان به بهترین نتایج دست یافت.

نتیجه حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که میزان زی توده تولید شده، کلروفیل آ، کاروتونوئید کل و کربوهیدرات سیانوباکتر *Nostoc calcicola* به ازای هر گرم ماده خشک در روزهای مختلف کشت با روند افزایشی همراه بوده است. میزان پروتئین تا چند روز بعد از آغاز کشت افزایش و سپس روند نزولی نشان می دهد. که در تیمار با ۴۰۰ میکرو گرم فسفر در لیتر حداقل مقدار پروتئین و در مدت زمان کوتاه تری حاصل می شود. روند کربوهیدراتات در طول دوره کشت صعودی بوده و فسفر تاثیری واضحی بر میزان کربوهیدراتات نشان نداد. نتایج این تحقیق با مطالعه Traichaiyaporn و Khuantrairong (۲۰۰۹) که بر روی جلبک سبز *Cladophora sp* انجام گرفت مطابقت دارد. همچنین Celekli (۲۰۰۹) گزارش کردند که افزودن فسفر با افزایش میزان *Spirulina platensis* کاروتونوئید در جلبک سبز آبی *Tetraselmis sp* می گردد. JI و همکاران (۲۰۱۱) نشان داد که در کشت تأثیر گذار نبوده است. برخلاف یافته های این تحقیق،

- Recovery Utilization and Environmental Effects, 31, 163–8.
8. Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A., Krieg, N.R., 1994. Methods for General and Molecular Bacteriology, ASM, Washington, DC.
 9. Hashtroudi, M.S., Shariatmadari, Z., Riahi, H., and GhassemPour, A.R., 2013. Analysis of *Anabaena vaginicola* and *Nostoc calcicola* from Northern Iran, as rich sources of major carotenoids. *Food Chemistry*, 136, 1148–1153.
 10. Ji, C.F., Yu, X.J., Chen, Z.A., Xue, S., Legrand, J., Zhang, W., 2011. Effects of nutrient deprivation on biochemical compositions and photohydrogen production of *Tetraselmis subcordiformis*. *Int J Hydron Energ*, 36, 5817–5821.
 11. Khuantrairong, T., Traichaiyaporn, S., 2009. Production of biomass, carotenoid and nutritional values of *Cladophora* sp. (Kai) by cultivation in mass culture. *Phycologia*, 48, 60.
 12. Kochert, G., 1978. Protein determination by dye binding. In: Hellebust, J.A., Craigie, J.S. (Eds.), *Handbook of Physiological Methods: Physiological and Biochemical Methods*. Cambridge University Press, London, 90–93.
 13. Lee, Y.K., Shen, H., 2006. Basic culturing techniques. In: Richmond A (Ed.) *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. 3rd edn., Blackwell Publishing Company, Oxford.
 14. Marco, E., Orus, M.I., 1988. Variation in Growth and Metabolism with Phosphorus Nutrition in two Cyanobacteria. *J. Plant Physiol.* 132, 339–344.
 15. Markou, G., 2012. Alteration of the biomass composition of *Arthrospira (Spirulina) platensis* under various amounts of limited phosphorus. *Bioresource Technol*, 116, 533–535.
 16. Meijer, E.A., Wijffels, R.H., 1998. Development of a fast, reproducible and effective method for the extraction and quantification of proteins of micro-algae. *Biotechnol Tech*, 12, 353–358.
 17. Miller, D.E., Green, J.C. and Shiroyama, T., 1978. The *Selenastrum capricornatum* Printz algal assay bottle test. Experimental Design, application and Data Interpretation Protocol. Environmental Protection Agency, U.S. 126p.
 18. Reddy, T.R.K., Sarada, K., 1982. UV irradiation protection by Cysteine and ATP in *Anabaena dolium*. *Phykos*, 21, 108–114.
 19. Reis, A., Mendes, A., Lobo-Fernandes, H., Empis, J.A., and Maggiolly Novais, j., 1998. Production, extraction and purification of

توده در روزهای ۸، ۱۰ و ۱۲ کشت با بیشترین مقدار رنگدانه ها همراه است از طرفی، با کاهش محتوی فسفر محیط کشت می توان به زی توده با بالاترین مقدار کربوهیدرات دست یافت که این ترکیب به عنوان ماده اولیه برای تولید بیوتانول بسیار مورد توجه است.

سپاسگزاری

بدین وسیله نویسندهان مقاله از سرکار خانم دکتر زینب شریعتمداری گروه فیتوشیمی دانشگاه شهید بهشتی تهران بخاطر راهنمایی در طول مطالعه تقدیر به عمل می آورند.

منابع

1. Aminot, A., Rey, F., 1999. Determination of chlorophyll a by spectroscopic methods. ICES Techniques in Marine Environmental Sciences, 1–15.
2. Balat, H., 2010. Prospects of biofuels for a sustainable energy future: a critical assessment. *Energy Education Science and Technology Part A*, 24(2), 85–111.
3. Buapet, P., Hiranpan, R., Ritchie R.J., Prathee, A., 2008. Effect of nutrient inputs on growth, chlorophyll, and tissue nutrient concentration of *Ulva reticulata* from a tropical habitat, *Science Asia*, 34, 245–252.
4. Celekli, A., Yavuzatmaca M., Bozkurt, H., 2009. Modeling of biomass production by *Spirulina platensis* as function of phosphate concentrations and pH regimes. *Bioresour. Technol*, 100, 3625–3629.
5. Dean, A.P., Estrada, B., Nicholson, J.M., Sigee, D.C., 2008. Molecular response of *Anabaena flos-aquae* to different concentrations of phosphorus: a combined Fourier transform infrared and X-ray microanalytical study. *Phycol. Res*, 56(3), 193–201.
6. Del Campo, J.A., García-González, M., Guerrero, M.G., 2007. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74, 1163–1174.
7. Demirbas, A., 2009. Production of biodiesel from algae oils. *Energy Sources Part A*

22. Zhao, Y.F., Yu, Z.M., Song, X.X., Cao, X.H., 2009. Biochemical compositions of two dominant bloom-forming species isolated from the Yangtze River Estuary in response to different nutrient conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 368, 30–36.
20. Schneegurt, M.A., Sherman, D.M., Nayar, S., Sherman, L.A., 1994. *J. Bacteriol.* 176, 1586.
21. Schwenzfeier, A., Wierenga, P.A., Gruppen, H., 2011. Isolation and characterization of soluble protein from the green microalgae. *Tetraselmis* sp. *Bioresource Technol.* 102, 9121-9127.