

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

فاطمه خواجه‌پور*^۱، 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 دریافت: ۱۰ مهر ۱۳۹۴

تاریخ پذیرش: ۱۸ بهمن ۱۳۹۴

چکیده

در این تحقیق اثر فسفر بر میزان زی توده، کلروفیل آ، کاروتنوئید کل، پروتئین کل و کربوهیدرات 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 (میکروگرم 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 کاروتنوئید کل *Nostoc calcicola* در برخی از روزهای کشت اثر معنی‌داری داشته است. در بررسی میزان تغییرات پروتئین کل و کربوهیدرات، 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 به‌طوری‌که در روزهای ۶، ۸ و ۱۰ کشت اختلاف بین تیمار ۴۰۰ میکروگرم فسفر در لیتر با دو سطوح دیگر معنی‌دار ($P < 0.05$) بوده است. در بررسی روند تغییرات پروتئین در طول روزهای کشت مشاهده شد که میزان پروتئین در تیمار با ۱۰۰ میکروگرم فسفر در لیتر در روز ۶ کشت به حداکثر مقدار خود ($372/4 \pm 20/10$ میلی گرم در گرم ماده خشک) رسیده و برای تیمار ۲۰۰ میکروگرم فسفر در لیتر ($386/33 \pm 34/05$ میلی گرم در گرم ماده خشک) در روز ۸ کشت به‌دست آمده است و سپس تا روز ۱۲ کشت روند نزولی نشان داده است، در تیمار ۴۰۰ میکروگرم 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 به‌طور معنی‌داری بیشتر بوده است. میزان کربوهیدرات در هر سه سطح فسفر تا روز ۱۲ افزایش معنی‌داری ($P < 0.05$) را نشان داده است، اما در بین سطوح فسفر در روزهای کشت اختلاف معنی‌داری 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*، کاروتنوئید کل، پروتئین، کربوهیدرات، فسفر.

مقدمه

ریز جلبک‌ها موجودات تک‌سلولی فتوسنتز کننده‌ای 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 به‌طور گسترده در آبرزی پروری بکار می‌روند (Demirbas, 2009). ریز جلبک‌ها 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 منبع پروتئینی مد نظر قرار گرفته‌اند (Schwenzfeier et al., 2011). همچنین ریز جلبک‌ها علاوه بر کلروفیل که رنگدانه اصلی شرکت کننده در فرآیند فتوسنتز آن‌ها است دارای انواع دیگر از رنگدانه‌ها هستند که توانایی جذب طیف وسیعی از نور را دارا می‌باشند. این رنگدانه‌ها در سیانوباکترها شامل کاروتنوئیدها و فایکوبیلی پروتئین‌ها هستند (Reis et al., 1998). کاروتنوئیدها رنگدانه‌هایی هستند که به عنوان رنگ مجاز در غذاها، پیش ساز ویتامین A در غذای انسان، دام، آبرزی، تهیه فرآورده‌های مولتی ویتامین و همچنین فرآورده‌های آرایشی و بهداشتی در مقادیر بسیار زیاد مصرف می‌شود (Del Campo et al., 2007). اخیراً گونه *N. calcicola* از سیانوباکترها در شمال ایران گزارش شده است که منبع غنی از کاروتنوئیدها 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

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

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

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

شرایط کشت

کشت ریز جلبک‌ها در شدت نوری 3000 ± 10 لوکس، دوره نوری (تاریکی: روشنایی) ۱۲:۱۲ و دمای ثابت 25 ± 2 در محیط کشت ۸ Zehnder با غلظت‌های مختلف فسفر (۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر لیتر) انجام می‌شود. در طول دوره کشت (روزهای ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۱۲) تغییرات رشد، کلروفیل آ، کاروتنوئید کل، پروتئین کل و کربوهیدرات بررسی می‌شود. برای تنظیم فسفر از افزودن فسفات هیدروژن دی پتاسیم (K_2HPO_4) استفاده می‌شود.

تعیین میزان رشد

ابتدا سلول‌ها به کمک صافی (معمولاً ۵۰ 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 ۶۰ تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد به‌دست می‌آید (Lee and Shen, 2006).

اندازه‌گیری کلروفیل و کاروتنوئید کل

برای تعیین کلروفیل آ و کاروتنوئید کل، ۵۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی را از کاغذ صافی ۰/۴۵ 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 دارند (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 اسپلاتوریا در شرایط کمبود فسفر در کشت بسته نشان دادند. با توجه به مطالب فوق، هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر فسفر بر روی زی توده تولید شده، کلروفیل آ، کاروتنوئیدها 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 Z₈ 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 ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت خشک و استریل

جدول ۱: ترکیبات و مقدار محیط کشت Z_8

اسامی	مقدار بر حسب گرم
محلول ۱: در ۳۰۰ میلی لیتر آب مقطر	
NaNO_3	۷/۴۶
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 + \text{H}_2\text{O}$	۹/۵
$\text{MgSO}_4 + 7\text{H}_2\text{O}$	۵/۲
محلول ۲: در ۳۰۰ میلی لیتر آب مقطر	
K_2HPO_4	۳/۹
Na_2CO_3	۳/۶
محلول ۳: ۵ میلی لیتر محلول $\text{FeCl}_3 + ۵$ میلی لیتر محلول $\text{EDTA} + ۴۹۰$ میلی لیتر آب مقطر	
$\text{FeCl}_3 + 6\text{H}_2\text{O}$	۳۵۱۵/۱
HCl	۱/۵ میلی لیتر
EDTA	۲/۱۵۱۹
محلول ۴: در ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر	
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 + 9\text{H}_2\text{O}$	۰/۰۲۵
H_3BO_3	۱/۵۵
$\text{MnCl}_2 + 4\text{H}_2\text{O}$	۰/۱۱۵
$(\text{NH}_4)\text{Mo}_7\text{O}_{27} + 4\text{H}_2\text{O}$	۰/۰۴۴
KBr	۰/۰۶
KI	۰/۰۴۲
$\text{ZnSO}_4 + 7\text{H}_2\text{O}$	۰/۱۴۳
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 + 6\text{H}_2\text{O}$	۰/۰۷۲
$\text{CuSO}_4 + 5\text{H}_2\text{O}$	۰/۰۵۳
$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 + 18\text{H}_2\text{O}$	۰/۲۴
$\text{LiCl} + \text{H}_2\text{O}$	۰/۰۲۵

تعیین میزان پروتئین کل

برای سنجش غلظت پروتئین کل نمونه از روش برادفورد (Kochert, 1978) استفاده می شود. در ابتدا پروتئین نمونه ها استخراج و آماده سازی می شود.

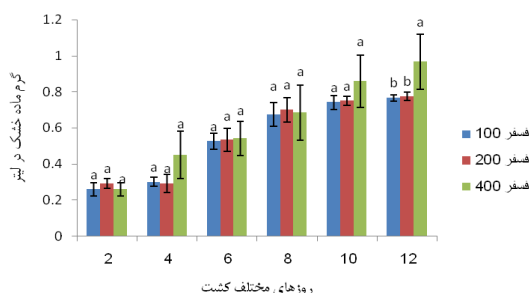
۱. آماده سازی معرف برادفورد

برای تهیه محلول برادفورد، مقدار ۱۰ میلی گرم برلیانت بلو G_{250} در ۵۰ میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد حل

گردیده و حداقل یک ساعت عمل همزنی به منظور حل شدن کامل انجام می شود. 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 می شود.

۲. استخراج پروتئین

کشت با هم اختلاف معنی‌داری ندارد اما در روز ۱۲ میزان ماده خشک تولید شده در تیمار ۴۰۰ میکروگرم فسفر در لیتر به‌طور معنی‌داری 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 آ از آغاز کشت تا روز ۱۲ روند افزایش را نشان داده است این افزایش در هر سه تیمار فسفر مشاهده شده است. به‌طوری‌که 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 به‌طور متوسط برای هر سه سطح فسفر افزایش یافت. اثر فسفر بر میزان کلروفیل فزاینده بوده به‌طوری‌که تیمار ۴۰۰ میکروگرم فسفر در لیتر میزان کلروفیل بیشتری را در روزهای ۶ و ۸ کشت نشان داده که با سطوح دیگر فسفر دارای اختلاف معنی‌داری ($P < 0.05$) بوده است (جدول ۲).

نتایج حاصل در مورد پاسخ کاروتنوئید کل مشابه با کلروفیل آ بوده با این تفاوت که فقط در روز ۶ کشت اثر سطح ۴۰۰ میکروگرم فسفر با دو سطح دیگر بر روی این رنگدانه معنی‌دار بوده و باعث افزایش میزان کاروتنوئید کل گردیده است (جدول ۲).

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

اندازه‌گیری کربوهیدرات

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

تجزیه و تحلیل داده‌ها

در این تحقیق از طرح کاملاً تصادفی در قالب اسپلیت پلات در زمان (جمع‌آوری 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 به‌طور مستقل و روزهای مختلف کشت به‌طور همزمان برای هر سطح فسفر از آزمون‌های واریانس یکطرفه و چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌دار ۵ درصد صورت گرفت.

نتایج

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

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 میکروگرم فسفر در لیتر با تیمار ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم فسفر در لیتر معنی‌دار ($P < 0.05$) بوده است اما بین تیمار ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم فسفر در لیتر اختلاف معنی‌دار 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 ۲۰۰ میکروگرم فسفر در لیتر ($386/33 \pm 34/05$)

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 میکروگرم 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 معنی‌داری 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 معنی‌داری را نشان نداد اما همواره تیمار ۴۰۰ میکروگرم فسفر در لیتر دارای میزان کربوهیدرات کمتری نسبت به دو تیمار دیگر بوده است (جدول ۲).

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

پارامترها (میلی گرم در گرم ماده خشک)	فسفر (میکروگرم در لیتر)	روز ۲	روز ۴	روز ۶	روز ۸	روز ۱۰	روز ۱۲
کلروفیل آ	۱۰۰	$2/18 \pm 0/24^c$	$2/12 \pm 0/02^c$	$2/84 \pm 0/18^b$	$3/6 \pm 0/22^a$	$3/88 \pm 0/16^a$	$3/73 \pm 0/13^a$
	۲۰۰	$1/99 \pm 0/18^c$	$2/15 \pm 0/15^c$	$3/03 \pm 0/03^b$	$3/92 \pm 0/22^{ac}$	$3/98 \pm 0/39^a$	$3/89 \pm 0/48^a$
	۴۰۰	$1/88 \pm 0/11^d$	$2/33 \pm 0/32^c$	$3/5 \pm 0/27^b$	$4/46 \pm 0/11^a$	$4/39 \pm 0/14^a$	$4/19 \pm 0/1^a$
کاروتنوئید کل	۱۰۰	$5/11 \pm 0/14^d$	$5/19 \pm 0/01^d$	$5/84 \pm 0/16^c$	$6/93 \pm 0/26^a$	$6/65 \pm 0/12^{ab}$	$6/63 \pm 0/11^b$
	۲۰۰	$5/08 \pm 0/16^d$	$5/28 \pm 0/09^d$	$5/87 \pm 0/13^c$	$7/21 \pm 0/29^a$	$6/85 \pm 0/35^{ab}$	$6/49 \pm 0/12^b$
	۴۰۰	$4/98 \pm 0/09^e$	$5/21 \pm 0/03^c$	$6/21 \pm 0/18^d$	$7/28 \pm 0/1^a$	$6/96 \pm 0/08^b$	$6/66 \pm 0/2^c$
پروتئین کل	۱۰۰	$229/27 \pm 30/47^d$	$295/13 \pm 30/71^c$	$372/4 \pm 20/1^a$	$357/2 \pm 7/6^{ab}$	$325/53 \pm 2/19^{bc}$	$320/47 \pm 5/8^{bc}$
	۲۰۰	$233/07 \pm 36/51^d$	$288/8 \pm 23/7^c$	$353/4 \pm 21/15^{ab}$	$386/33 \pm 34/05^a$	$315/4 \pm 13/7^{bc}$	$325/53 \pm 18/74^{bc}$
	۴۰۰	$244/47 \pm 19/5^d$	$311/6 \pm 10/05^c$	$434/47 \pm 39^a$	$431/93 \pm 7/91^a$	$354/67 \pm 12/21^b$	$345/8 \pm 10/05^{bc}$
کربوهیدرات	۱۰۰	$454/5 \pm 34/4^d$	$579/6 \pm 8/67^c$	$607/5 \pm 7/14^{bc}$	$628/2 \pm 32/21^{ab}$	$668/7 \pm 39/34^a$	$673/2 \pm 15/5^a$
	۲۰۰	$466/2 \pm 29/74^d$	$549/9 \pm 53^c$	$626/4 \pm 30/42^{ab}$	$599/4 \pm 14/28^{bc}$	$674/1 \pm 21/82^a$	$683/1 \pm 39/95^a$
	۴۰۰	$450/9 \pm 39/77^c$	$550/8 \pm 50^b$	$625/5 \pm 40/52^{ab}$	$594/9 \pm 6/79^{ab}$	$602/1 \pm 56/18^{ab}$	$640/8 \pm 48/02^a$

داده‌ها مربوط به میانگین سه تکرار از آزمایش $\pm$ انحراف معیار می‌باشد.

حروف کوچک معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ را در هر ردیف نشان می‌دهد.

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 هوادهی ثابت باشد تا بتوان به بهترین نتایج دست یافت.

نتیجه حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که میزان زی توده تولید شده، کلروفیل آ، کاروتنوئید 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 میکروگرم فسفر در لیتر حداکثر مقدار پروتئین و در مدت زمان کوتاه تری حاصل می شود. روند کربوهیدرات در طول دوره کشت صعودی بوده و فسفر تأثیری واضحی بر میزان کربوهیدرات نشان نداد. نتایج این تحقیق با مطالعه Traichaiyaporn و Khuantrairong (۲۰۰۹) که بر روی جلبک سبز *Cladophora* sp انجام گرفت مطابقت دارد. همچنین Celekli و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند که افزودن فسفر با افزایش میزان کاروتنوئید در جلبک سبز-آبی *Spirulina platensis* می گردد. Ji و همکاران (۲۰۱۱) نشان داد که در کشت *Tetraselmis* sp سطوح فسفر بر میزان کربوهیدرات تأثیر گذار نبوده است. بر خلاف یافته های این تحقیق،

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 کربوهیدرات دارند. در این مطالعه اختلاف غلظت فسفر تیمارهای، شاید به اندازه ای زیاد نبوده که اثر معنی داری را بر روی کربوهیدرات 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 پایش 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 مورد 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 بدنال بهینه سازی شرایط کشت برای حداکثر 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 کاروتنوئید باشد و جمع آوری زی

- 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 Hydrog Energy, 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 doliolum*. Phytos., 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 رنگدانه‌ها همراه است از طرفی، با کاهش محتوی فسفر محیط کشت می‌توان به زی‌توده با بالاترین مقدار کربوهیدرات دست یافت که این ترکیب به عنوان ماده اولیه برای تولید بیواتانول بسیار مورد توجه است.

سپاسگزاری

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

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., Prathep, 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 differing 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.