

## اثر تیمار فسفر بر سرعت رشد و ترکیبات بیوشیمیایی جلبک دریایی طلایی-قهوه ای *Isochrysis galbana*

محمد جواد زرین مهر<sup>۱</sup>، امیدوار فرهادیان<sup>۱\*</sup>، فاطمه پیکان حیرتی<sup>۱</sup> و جواد کرامت<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup>گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، گروه صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۱۶، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۸/۰۸/۱۱)

### چکیده

فسفر به عنوان یکی از درشت مغذی‌های اصلی بوده و نقش مهمی در انتقال انرژی، سنتز فسفولیپید و اسیدنوکلئیک و ترکیبات بیوشیمیایی در سلول‌های ریزجلبک دارد، همچنین نقش مهمی در تشکیل و انتقال انرژی متابولیتی در ATP و NADPH ایفا می‌کند. در این تحقیق اثر غلظت‌های مختلف فسفر به شکل فسفات (صفر، ۲، ۴، ۸ و ۱۶ میلی‌گرم در لیتر) بر میزان رشد و ترکیب بیوشیمیایی جلبک دریایی *Isochrysis galbana* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد محرومیت فسفر (صفر میلی‌گرم در لیتر) باعث کاهش رشد سلول، محتوای رنگدانه‌ها و پروتئین‌ها می‌شود. در حالی که مقدار کربوهیدرات و چربی *I. galbana* با افزایش غلظت فسفر، افزایش یافته است. بیشترین میزان کربوهیدرات، پروتئین و چربی در جلبک *I. galbana* به ترتیب ۲۳/۵، ۳۴/۶ و ۳۶/۲ درصد وزن خشک در غلظت‌های فسفر صفر، ۸ و صفر میلی‌گرم در لیتر بود. همچنین با افزایش غلظت فسفر، اسیدهای چرب C16:0 از ۳۳/۹۶ درصد و C18:0 از ۲۳/۴۰ درصد در غلظت صفر فسفر (شرایط محرومیت) به ترتیب به میزان ۲۷/۷۵ و ۱۴/۳۷ درصد در جلبک پرورش داده تحت شرایط فسفر ۱۶ میلی‌گرم در لیتر کاهش یافتند. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که غلظت فسفر به طور قابل توجهی بر سرعت رشد و ترکیبات بیوشیمیایی جلبک *I. galbana* تاثیر می‌گذارد.

واژه‌های کلیدی: اسید چرب، ترکیبات بیوشیمیایی، فسفر، *Isochrysis galbana*

### مقدمه

استفاده قرار می‌گیرند (Hemaiswarya et al., 2011). علاوه بر این، ریز جلبک‌ها ریز مغذی‌ها، ویتامین‌ها و ترکیبات زیست فعال مناسبی دارند که به عنوان مکمل‌های غذایی، برای انسان مورد مصرف هستند (Becker, 2004). عوامل اصلی و موثر بر رشد ریزجلبک‌ها شامل عوامل زیست‌محیطی (نور، دما، pH، مواد مغذی و شوری)، شرایط فیزیکی (تلاطم)، عوامل زیستی، گونه‌های جلبک و شکل ظروف کشت می‌باشد. این عوامل بر فعالیت فتوسنتزی، تولید زی‌توده، ترکیب فیزیولوژیکی و

ریزجلبک‌ها (Microalgae) موجودات زنده تک سلولی هستند و ویژگی‌هایی همچون نرخ رشد سریع، توانایی تبدیل انرژی نور به ترکیبات بیوشیمیایی، تثبیت دی‌اکسیدکربن و مصرف مواد آلی، معدنی، مواد درشت مغذی و ریز مواد مغذی را دارا هستند و به همین دلیل کاربردهای فراوانی دارند (Daneshvar et al., 2018a). در حال حاضر، ریزجلبک‌ها به صورت گسترده در آبی‌پروری به عنوان غذای زنده مورد

\*نویسنده مسئول، نشانی پست الکترونیکی: omfarhad@cc.iut.ac.ir

کرده‌اند که محدودیت‌های منابع نیتروژن و فسفر می‌تواند ترکیبات بیوشیمیایی مانند کربوهیدرات، پروتئین، رنگدانه‌ها، میزان چربی، ترکیبات اسیدهای چرب، و نیز فعالیت فتوسنتزی ریزجلبک‌ها را تغییر دهد (Fan et al., 2014; Solovchenko et al., 2013).

*Isochrysis galbana* گونه جلبک دریایی طلایی-قهوه‌ای رنگ متداولی است که به صورت گسترده به عنوان غذای زنده در آبی‌پروری مورد استفاده قرار می‌گیرد (Tzovenis et al., 2003). این جلبک از شاخه Haptophyta، رده Prymnesiophyceae، راسته Isochrysidales، جنس *Isochrysis* می‌باشد. جلبک *I. galbana* تک‌سلولی بیضی‌شکل با دو تاژک است، سلول‌ها به رنگ قهوه‌ای - طلایی هستند و طول ۵-۶ میکرون و عرض ۲/۵-۳ میکرون دارند و بدون دیواره سلولی هستند. این گونه به دلیل اینکه در زیستگاه‌های دریایی با درجه تحمل شوری ۲۲ تا ۳۵ گرم در لیتر یافت می‌شود به طور اصلی در آبی‌پروری دریایی و همچنین به عنوان غذای زنده برای موجودات دریایی مانند نرم‌تنان، سخت‌پوستان و زئوپلانکتون‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد؛ همچنین به دلیل اندازه کوچک برای مصرف و هضم مناسب هستند (Sánchez et al., 2013). در آبی‌پروری *I. galbana* دارای رشد سریع و کشت آسان می‌باشد که تحمل شرایط مختلف محیطی را نیز دارد (Van Bergeijk et al., 2010).

در این پژوهش ریزجلبک دریایی *I. galbana* در غلظت‌های مختلف فسفر به شکل فسفات در محیط کشت والن (Walne's medium) پرورش یافت. پارامترهای رشدی این گونه در غلظت‌های مختلف فسفات مورد بررسی قرار گرفت. تغییرات در ترکیبات بیوشیمیایی مانند رنگدانه‌ها، کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها، چربی‌ها و اسیدهای چرب در غلظت‌های مختلف فسفات نیز بررسی شدند.

#### مواد و روش‌ها

آماده‌سازی گونه‌ی ریزجلبک و محیط کشت: استوک اولیه جلبک طلایی-قهوه‌ای *I. galbana* از پژوهشکده اکولوژی

بیوشیمیایی ریزجلبک‌ها اثر می‌گذارند (Tebani et al., 2014). ترکیبات آلی سازنده سلولی ریزجلبک‌ها، شامل تولیدات غذایی و حیاتی با ارزش از جمله رنگدانه‌ها، پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها، چربی و اسیدهای چرب هستند (Spolaore et al., 2006)، مواد مغذی و فاکتورهای محیطی می‌تواند اثر بسیار مهمی روی بیوسنتز متابولیت‌های جلبک‌ها بگذارد. دستکاری این عوامل مانند تغییر در میزان مواد مغذی می‌تواند باعث افزایش محتوای تولیدات زیستی سلولی شود اما ممکن است باعث کاهش رشد سلولی نیز گردد (Hu, 2004). فسفر به شکل فسفات نقش مهمی در انتقال انرژی در سلول‌های جلبکی، سنتز فسفولیپید و اسیدنوکلئیک دارد، همچنین نقش مهمی در تشکیل و انتقال انرژی متابولیتی در ATP و NADPH ایفا می‌کند (El-Sheek and Rady, 1995). نیاز به فسفر در بین گونه‌های مختلف از ریزجلبک‌ها بررسی شده است و گزارش گردیده که غلظت بهینه فسفات برای حداکثر تولیدی زی‌توده جلبک مقادیری از ۰/۰۰۱ تا ۰/۱۷۹ گرم بر لیتر است (Shelef and Soeder, 1980). فسفر به شکل‌های مختلف مورد استفاده جلبک‌ها قرار می‌گیرد، که از انواع آن می‌توان فسفر آلی، فسفر معدنی و فسفر باند شده با دیگر ترکیبات را نام برد. برخی ترکیبات شناسایی شده در ریزجلبک‌ها می‌توان به ارتوفسفات‌ها، فسفات مونواستر، فسفات دی‌استر، پیرو فسفات، تری و تترا پلی فسفات‌ها و فسفونات‌ها اشاره کرد. بیشترین فرم فسفر قابل دسترس برای ریزجلبک‌ها به شکل فسفات می‌باشد (El-Sheek and Rady, 1995). بر اساس منابع کمبود فسفر، باعث افزایش تجمع چربی در برخی جلبک‌ها می‌گردد. در تحقیقی Kamalanathan و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند در شرایط محدودیت فسفری، مقدار چربی جلبک *Chlamydomonas reinhardtii* افزایش و با در دسترس قرار دادن فسفر در اختیار جلبک، این مقدار کاهش پیدا می‌کند. همچنین نرخ تنفس در شرایط بدون فسفر افزایش پیدا کرد.

یکی از مسایل مهم در کشت ریزجلبک‌ها برداشت حداکثر زی‌توده و بیشترین میزان ترکیبات ذخیره‌ی انرژی به صورت همزمان می‌باشد (Li et al., 2008). بسیاری از مطالعات تایید

**اندازه‌گیری میزان رشد ریزجلبک:** اندازه‌گیری میزان رشد ویژه جلبک‌ها بر اساس تعداد است. بنابراین، برای اندازه‌گیری میزان رشد ویژه، تعداد سلول‌های جلبک (تراکم سلولی جلبک) با نمونه برداری ۳ میلی لیتر نمونه از هر واحد آزمایشی (ارلن آزمایش) و تثبیت در ۰/۱ میلی لیتر محلول لوگول آیودین انجام گردید. شمارش سلولی جلبک به وسیله لام هموسایتومتر به وسیله میکروسکوپ (Olympus optical) (CHK, made in Taiwan) با بزرگ‌نمایی  $\times 40$ ، بر اساس روش Martinez و همکاران (۱۹۷۵) تعیین گردید. هر نمونه در سه تکرار شمارش و از میانگین تراکم سلولی برای هر تکرار استفاده شد.

**اندازه‌گیری رنگدانه‌ها:** اندازه‌گیری کلروفیل  $a$  و  $b$  و کل کاروتنوئید نمونه‌ها با روش شرح داده شده توسط Parsons و همکاران (۱۹۸۴) انجام شد. ابتدا دو میلی لیتر از نمونه مورد نظر به وسیله سانتریفوژ برداشت شد سپس سه نوبت با آب مقطر شستشو داده شد. ۱/۶ میلی لیتر استون ۸۰ درصد به آن اضافه و بلافاصله با دستگاه ورتکس به مدت ۳۰ ثانیه تکان داده شد. بعد از ۱۵ دقیقه محتوای بالای نمونه سانتریفوژ شده را جدا نموده و به درون یک کیبوت یا سل اسپکتروفتومتر منتقل شد. مقدار جذب نمونه‌ها بدون تاخیر با دستگاه اسپکتروفتومتری (مدل Jenway 6400) در طول موج‌های ۶۶۳، ۶۴۶ و ۴۷۰ نانومتر خوانده شد. برای محاسبه مقدار کلروفیل و کل کاروتنوئید از فرمول‌های زیر استفاده گردید.

$$\text{Chl } a = 12.71A_{727} - 2.11A_{747} \quad (1)$$

$$\text{Chl } b = 20.13A_{747} - 5.03A_{727} \quad (2)$$

$$C_t = (1000A_{470} - 3/21C_a - 104C_b) / 191 \quad (3)$$

در اینجا  $\text{Chl } a$  = کلروفیل  $a$ ،  $\text{Chl } b$  = کلروفیل  $b$ ،  $C_t$  = کل کاروتنوئید و  $A$  مقدار جذب در طول موج مورد نظر می باشد. **اندازه‌گیری محتوای پروتئین:** درصد پروتئین نمونه‌های جلبک با استفاده از روش Rausch (۱۹۸۱)، با تغییرات جزئی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. زیست توده‌ی خشک جلبک (۱۰ میلی گرم) در ۱۰ میلی لیتر  $\text{NaOH}$  ۰/۵ مولار قرار گرفت.

خلیج فارس، بندر عباس، استان هرمزگان تهیه گردید. برای پیش‌کشت این جلبک از ارلن مایر دو لیتری حاوی محیط کشت والن (Walne's medium) در شرایط آزمایشگاهی استفاده گردید. برای تهیه محیط کشت والن یک میلی لیتر از محلول پرمصرف و یک میلی لیتر محلول کم مصرف مورد استفاده قرار گرفت. ترکیبات محلول پرمصرف شامل  $\text{NaNO}_3$  (۱۰۰/۰ گرم)، EDTA ( $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$ ) (۴۵/۰ گرم)،  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (۳۳/۶ گرم)،  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (۲۰/۰ گرم)،  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (۱/۳ گرم)،  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (۰/۳۶ گرم) که در حجم یک لیتر آب مقطر ساخته شده است و ترکیبات محلول کم مصرف که شامل عناصر کم مصرف فلزی  $\text{ZnCl}_2$  (۲/۱ گرم)،  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (۲/۱ گرم)،  $(\text{NH}_4)_2 6\text{MO}_7\text{O}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (۰/۹ گرم)، تیامین (۰/۲ گرم) و سیانوکوبالامین (۰/۰۱ گرم) که در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر به صورت محلول مورد استفاده قرار گرفته است (Walne, 1966).

آب مقطر مورد نیاز برای تهیه محیط کشت و محلول‌های شیمیایی مورد نیاز، ابتدا با استفاده از کاغذ صافی نصب شده روی دستگاه صافی پمپ خلأ، فیلتر شد و سپس در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه در فشار ۱/۲ بار اتوکلاو گردید و برای انجام آزمایش‌ها از آب دریا به صورت طبیعی با شوری ۳۵ گرم در لیتر استفاده شد.

**روش انجام آزمایش:** جلبک *I. galbana* در محیط کشت والن با غلظت‌های صفر، ۲، ۴، ۸ و ۱۶ میلی گرم در لیتر فسفر از ماده‌ی مغذی فسفردار با ترکیب  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  کشت داده شد. آزمایش در ارلن مایر پنج لیتری در سه تکرار در یک طرح کاملاً تصادفی به مدت ۱۳ روز انجام گرفت. غلظت اولیه جلبک  $2 \times 10^5$  سلول در هر میلی لیتر برای تلقیح استفاده شد. کشت جلبک در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، شوری ۳۵ گرم در لیتر و دوره‌ی نوری ۱۲ ساعت تاریکی ۱۲ ساعت روشنایی با شدت نور ۸۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه با نورسنج مدل (LI COR-LI-۱۸۹) تنظیم شد. کشت جلبک به طور مداوم هوادهی با غلظت  $\text{CO}_2$  ۰/۰۴ درصد انجام شد (Daneshvar et al., 2018a).

روش با ۲/۵ میلی لیتر کلروفورم و ۱/۲۵ میلی لیتر متانول تکرار شد، سپس حلال‌ها از روش اول و دوم با هم مخلوط شدند، سپس ۴ میلی لیتر NaCl ۱ درصد اضافه شد. مخلوط به مدت ۵ دقیقه بر روی شیکر (۸۰ دور در دقیقه) قرار گرفت، سپس محتوا به مدت ۵ دقیقه در ۷۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. لایه سبز تیره حاوی چربی استخراج شده می‌باشد، که کلروفورم حلال پرانی و درصد چربی از طریق وزن کردن اندازه‌گیری شد.

**اندازه‌گیری محتوای اسیدهای چرب متیل استری (FAME):** برای تجزیه و تحلیل ترکیبات اسید چرب از روش اصلاح شده Levine و همکاران (۲۰۱۱) استفاده شد. استخراج چربی از پودر خشک جلبک (بیوماس اولیه) برای اندازه‌گیری اسیدهای چرب متیل استری (FAME) انجام شد. نمونه‌های استخراج شده به دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC) (مدل Agilent Technologies 7890A) تزریق گردید. دمای ستون به مدت ۰/۵ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد، سپس دما با سرعت ۲۵ درجه سانتی‌گراد بردقیقه به دمای ۱۹۵ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت. پس از آن درجه حرارت با سرعت ۸ درجه سانتی‌گراد بردقیقه به ۲۰۵ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت. دمای آشکارساز و تزریق کننده در دمای ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد نگه داشته شد. از گاز هلیوم با سرعت جریان ۳۰/۳۴ سانتی‌متر بر ثانیه به عنوان گاز حامل استفاده گردید. برای اندازه‌گیری از یک ستون ۱۰ میلی متر (DB-WAX)، با قطر داخلی ۰/۱ میلی متر و ضخامت ۰/۱ میکرومتر) استفاده شد. از هپتادکانوئیک‌اسید، (سیگما) با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر به عنوان استاندارد داخلی (Internal Standard) استفاده گردید.

**آنالیز آماری:** تیمارهای آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در محیط کشت حاوی جلبک مورد استفاده قرار گرفتند. به منظور آنالیز آماری داده‌ها از آزمون واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) استفاده شد و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح معنی داری ۵ درصد انجام گرفت. از نرم افزار آماری SPSS ورژن ۲۲ برای انجام کارهای آماری استفاده شد.

سپس یک دقیقه ورتکس و مخلوط گردیدند و به مدت ۳۰ دقیقه در سونیکیتور قرار داده شد. پس از آن نمونه‌ها به مدت ۱۲۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد درآون نگهداری گردید، سپس برای جدا کردن محتوای بالای، نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه با دور ۶۰۰۰ توسط سانتریفوژ (Heraeus Biofuge made in Germany) شد. محتوای پروتئین استخراج شده در محتوای بالای با استفاده از روش Bradford (۱۹۷۶) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. ۰/۱ میلی لیتر از محلول استخراج شده به ۳ میلی لیتر از محلول برادفورد (۵۰ میلی‌گرم Coomassie Brilliant blue، ۲۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد و ۵۰ میلی لیتر اسید فسفریک ۸۵ درصد) اضافه گردید. مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری و سپس جذب پروتئین با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفت. آلبومین سرم گاوی (Bovine Serum Albumin) به عنوان محلول استاندارد مورد استفاده قرار گرفت.

**اندازه‌گیری محتوای کربوهیدرات:** محتوای کربوهیدرات نمونه‌های جلبک با استفاده از روش فنول و سولفوریک اسید تعیین گردید. به این منظور ۱۰ میلی گرم زیست توده خشک جلبک در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر قرار گرفت، سپس ۰/۵ میلی لیتر از نمونه با ۲/۵ میلی لیتر اسید سولفوریک ۹۶ درصد و ۰/۵ میلی لیتر فنول ۵ درصد مخلوط گردید و به مدت ۵ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۹۰-۱۰۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. سپس مقدار جذب نوری محلول در طول موج ۴۹۰ نانومتر محاسبه گردید. محتوای کربوهیدرات با توجه به استاندارد گلوکز اندازه‌گیری شد (Dubois et al., 1956).

**اندازه‌گیری محتوای چربی:** میزان چربی زیست توده جلبک توسط Daneshvar و همکاران (۲۰۱۸) شرح داده شده است. ۵ میلی لیتر کلروفورم و ۲/۵ میلی لیتر متانول (۲:۱، V / V) به ۰/۱ گرم پودر خشک جلبک اضافه گردید، سپس مخلوط به مدت یک دقیقه ورتکس و پس از آن به مدت ۳۰ دقیقه در سونیکیتور قرار داده شد. فاز مایع (لایه کلروفورم و متانول) از فاز جامد (زیست توده جلبک) جدا گردید. این

## نتایج و بحث

نتایج حاصل از آنالیز واریانس یک طرفه اثر غلظت‌های مختلف فسفر (صفر، ۲، ۴، ۸ و ۱۶ میلی‌گرم بر لیتر) بر فراسنجه‌های زیست توده، کلروفیل، کارتنوئید، کربوهیدرات، پروتئین و چربی در ریزجلبک *I. galbana* در جدول ۱ نشان داده شده است.

### ویژگی‌های رشد سلولی ریز جلبک تحت تیمارهای

فسفر: تعداد سلول‌های اولیه جلبک  $2 \times 10^6$  سلول بر میلی لیتر به صورت معنی‌داری تحت شرایط مختلف فسفر در طی دوره ۱۳ روزه تغییر یافت (شکل ۱). تعداد سلول حداقل  $3/57 \times 10^6$  و حداکثر  $9/25 \times 10^6$  به ترتیب در صفر و ۸ میلی گرم بر لیتر فسفر بدست آمد. رشد ریزجلبک‌ها دارای ۵ مرحله مختلف از جمله: فاز تاخیر، رشد تصاعدی، کاهش، فاز ثابت و مرگ می‌باشد (Blair et al., 2014). در این مطالعه رشد ریز جلبک در عدم حضور فسفر تا روز هفتم به صورت آهسته رشد ادامه داشته و سپس کاهش یافته است. Kamalanathan و همکاران (۲۰۱۵) در گزارشی مشابه، بیان نمودند رشد ریزجلبک *Chlamydomonas reinhardtii* در غیاب فسفات تا روز ۶ پرورش رشد آهسته بوده و سپس کاهش رشد دیده شده است. این میزان رشد سلولی می‌تواند به دلیل وجود ذخیره ی فسفر در سلول‌ها می‌باشد. در غلظت کم فسفر (۲ میلی گرم در لیتر)، سرعت رشد *I. galbana* به میزان قابل توجهی پایتتر از سطوح بالاتر فسفر بود. در تحقیق El-Kassas (۲۰۱۳) بر روی اثر غلظت‌های متفاوت فسفات بر میزان رشد جلبک *Picochlorum sp.* با کاهش ۵۰ و ۱۰۰ درصدی میزان فسفات به ترتیب ۳۵ و ۴۵/۴ درصد کاهش در میزان رشد جلبک مشاهده شد. در این تحقیق رشد ریزجلبک *I. galbana* در تیمارهای با ۴، ۸ و ۱۶ میلی گرم در لیتر فسفر تا حدوداً روز ۹ دوره رشد، روند افزایشی نشان داد. تنوع در ریزجلبک‌ها موجب تغییر در ترکیبات زیست شیمیایی داخل سلولی می‌گردد. از این رو، برخی از گونه‌ها با فسفر و برخی از گونه‌ها با نیتروژن محدود می‌گردند. استوکیومتری موجودات به طور متقابل به شیمی محیط متصل می‌شوند، نیتروژن به فسفر در

نسبت ردفیلد (Redfield, 1934) ۱:۱۶ می‌باشد. کمبود هر یک از مواد مغذی در داخل سلول می‌تواند منجر به ایجاد استرس گردد از اینرو ترکیبات داخل سلولی متفاوتی نیز ایجاد می‌گردد. فسفر نقش کلیدی در انتقال انرژی متابولیکی دارد همچنین به عنوان یک عامل ساختاری ضروری در نوکلئوتیدها و مولکول‌های فسفولیپید در تمام سلول‌های زنده می‌باشد، به طور گسترده‌ای گزارش شده است که رشد سلول‌های ریزجلبک‌ها تحت تأثیر محدودیت یا گرسنگی کامل مواد مغذی ضروری قرار می‌گیرد (Pinto et al., 2003).

### تأثیر غلظت‌های مختلف فسفر بر رنگدانه‌ها: اثر غلظت

های مختلف فسفر بر محتوای رنگدانه‌های اصلی بررسی شده است. میزان کلروفیل *a*، کلروفیل *b* و کاروتنوئیدها در ریزجلبک *I. galbana* بر اساس میلی‌گرم در لیتر ( $p < 0.05$ ) در شکل ۲ نشان داده شده است. محدودیت ترکیبات فسفر منجر به کاهش میزان رنگدانه‌های سلولی می‌گردد. با کاهش غلظت فسفر از ۴ تا صفر میلی‌گرم، غلظت کلروفیل *a* به ترتیب از ۰/۶۶ و ۰/۱۸ میلی‌گرم بر لیتر و کلروفیل *b* به ترتیب از ۰/۵۲ تا ۰/۱۶ میلی‌گرم بر لیتر کاهش یافت. حداقل حداکثر کاروتنوئید کل در صفر و ۸ میلی‌گرم فسفر به ترتیب ۰/۸۴ و ۰/۰۳ میلی‌گرم در لیتر بود. این نتایج در توافق با El-Sheek and Rady (۱۹۹۵) می‌باشد، آنها بیان کردند میزان محتوای کلروفیل ریزجلبک *Picochlorum sp.* در دوره محدودیت فسفر کاهش می‌یابد. همچنین مشاهده کردند این شرایط منجر به کاهش میزان رشد و محتوای پروتئینی و همچنین افزایش میزان کربوهیدرات می‌گردد. کاهش مقدار رنگدانه‌ها در هنگام توقف رشد در پاسخ به عدم توانایی تولید مولکول‌های انرژی (ATP و NADPH) است که باعث می‌گردد سنتز کلروفیل سلول‌ها تحت شرایط کمبود فسفر با مشکل روبرو گردد. رنگدانه کلروفیل دارای نیمه عمر کوتاه مدت است.

### ترکیب بیوشیمیایی *I. galbana* در غلظت‌های مختلف فسفر:

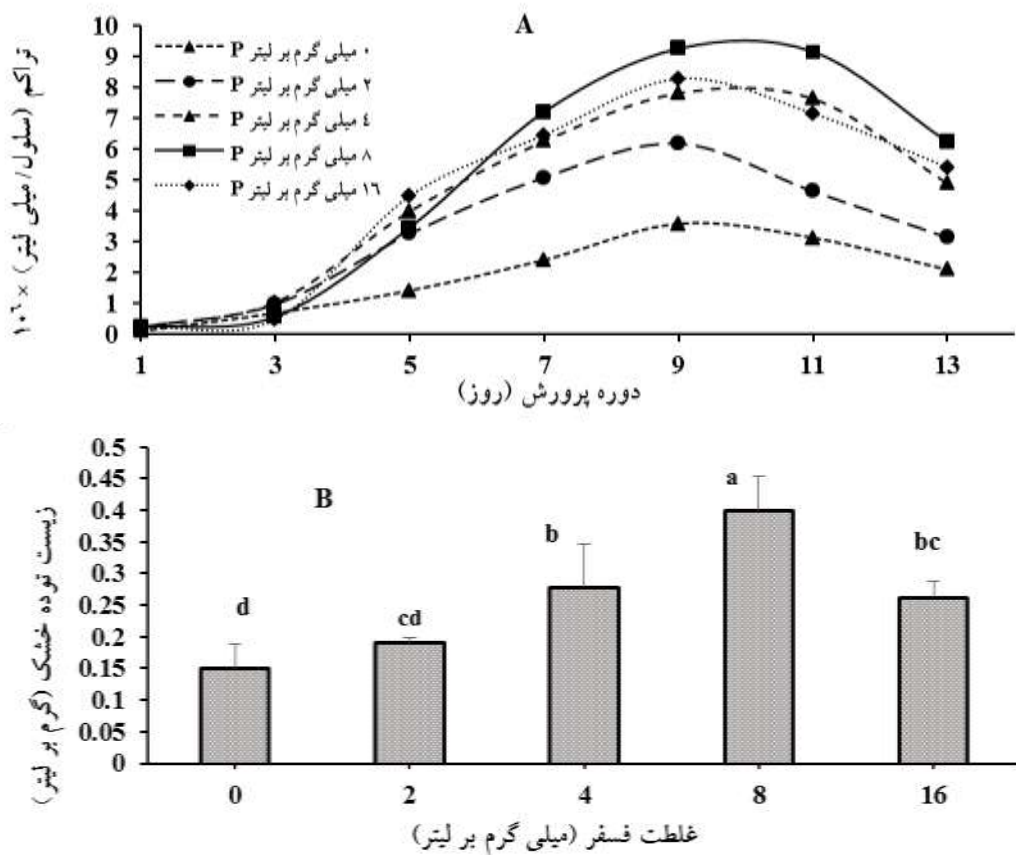
کربوهیدرات‌های ریزجلبک‌ها دارای ویژگی‌های متعددی هستند، سیتوپلاسم ریزجلبک‌ها عمدتاً حاوی نشاسته است.

جدول ۱ - تجزیه واریانس زیست توده، کلروفیل، کارتنوئید، کربوهیدرات، پروتئین و چربی در تیمارهای مختلف آزمایشی

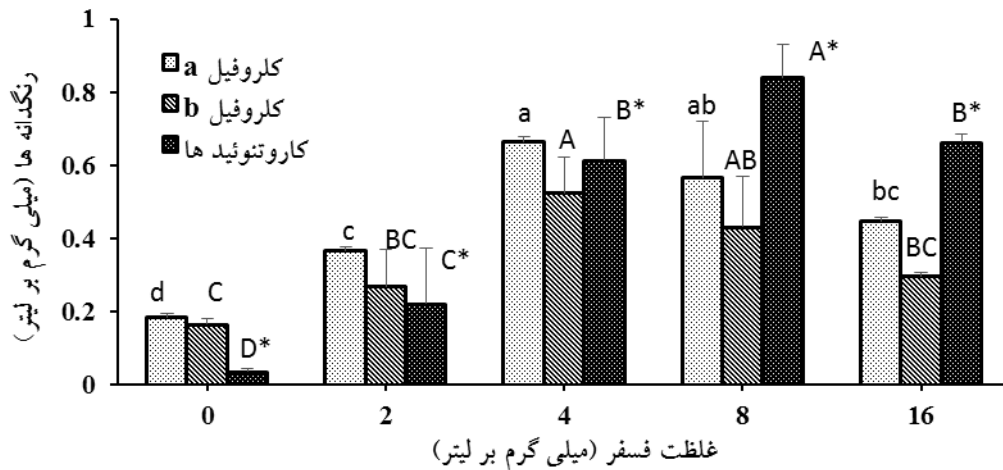
پارامتر	تیمار	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	فاکتور F	سطح معنی داری
زیست توده خشک	درون گروهی	۰/۱۱۱	۴	۰/۰۲۸	۱۴/۷۲۳	۰/۰۰۱
	بین گروهی	۰/۰۱۹	۱۰	۰/۰۲		
	کل	۰/۱۲۹	۱۴			
کلروفیل a	درون گروهی	۰/۴۱۱	۴	۰/۱۰۳	۲۱/۷۲۷	۰/۰۰۲
	بین گروهی	۰/۰۴۷	۱۰	۰/۰۰۵		
	کل	۰/۴۵۹	۱۴			
کلروفیل b	درون گروهی	۰/۲۳۹	۴	۰/۰۶۰	۷/۷۰۶	۰/۰۰۴
	بین گروهی	۰/۰۷۸	۱۰	۰/۰۰۸		
	کل	۰/۳۱۷	۱۴			
کارتنوئید	درون گروهی	۱/۳۳۷	۴	۰/۳۳۴	۳۷/۵۲۸	۰/۰۰۱
	بین گروهی	۰/۰۸۹	۱۰	۰/۰۰۹		
	کل	۱/۴۲۶	۱۴			
کربوهیدرات	درون گروهی	۲۰۵/۰۰۴	۴	۵۱/۲۵۱	۵/۵۵۲	۰/۰۱۳
	بین گروهی	۹۲/۳۰۸	۱۰	۹/۲۳۱		
	کل	۲۹۷/۳۱۲	۱۴			
پروتئین	درون گروهی	۹۹/۴۵۸	۴	۲۴/۸۷۱	۱۶/۰۳۰	۰/۰۰۱
	بین گروهی	۱۹/۵۱۵	۱۰	۱/۵۵۲		
	کل	۱۱۵	۱۴			
چربی	درون گروهی	۵۴۰/۱۲۰	۴	۱۳۵/۰۳۰	۵۸/۲۷۳	۰/۰۰۲
	بین گروهی	۲۳/۱۷۲	۱۰	۲/۳۱۷		
	کل	۵۳۶/۲۹۲	۱۴			

نشان داده شده است. درصد پروتئین انباشته شده در غلظت-های مختلف فسفر از ۲۰/۱۴ تا ۳۴/۵۶ درصد از وزن سلولی متغیر بود. حداکثر محتوای پروتئین (۳۴/۵۶ درصد) در غلظت ۸ میلی گرم در لیتر فسفر به دست آمد، اما به طور معنی داری بیشتر از واحدهای آزمایشی با غلظت ۴ و ۱۶ میلی گرم در لیتر فسفر بود. Kilham و همکاران (۱۹۹۷) در گزارشی به بررسی محدودیت فسفر بر میزان رشد، فتوسنتز و برخی پروسه‌های متابولیسمی جلبک تک سلولی *Ankistrodesmus falcatus* پرداختند. آنها پیشنهاد کردند میزان محتوای کلروفیل و پروتئین در طول مدت پرورش جلبک در شرایط مذکور کاهش و میزان کربوهیدرات در سلول‌های جلبکی افزایش می‌یابد. همچنین بیان نمودند نسبت پروتئین به کربوهیدرات کمتر از ۱/۲ نشان دهنده استرس مواد مغذی در سلول‌های جلبکی است،

این درشت مولکول‌ها گزینه مناسبی برای تولید بیواتانول هستند (Yuan et al., 2018). علاوه بر این، آنها به دلیل عدم وجود لیگنین به راحتی در ساختار سلولی، هیدرولیز می‌شوند (Markou et al., 2012). برای رسیدن به زیست توده ریزجلبکی که حاوی بیشترین محتوای کربوهیدرات، پروتئین و چربی باشد، غلظت مطلوب فسفر در محیط کشت باید تعیین شود. سلول‌های رشد یافته در شرایط فقدان فسفر بالاترین میزان کربوهیدرات را ۲۳/۵۳ درصد را نشان دادند. شکل ۳ (A) روند تغییرات میزان کربوهیدرات در میان تیمارها با افزایش غلظت‌های مختلف فسفر از ۲ تا ۱۶ میلی گرم در لیتر به تدریج روند کاهشی در محتوای کربوهیدرات از ۱۶/۴۸ به ۱۲/۶۵ درصد نشان داد. تأثیر غلظت فسفر بر محتوای پروتئین در شکل 3 (B)



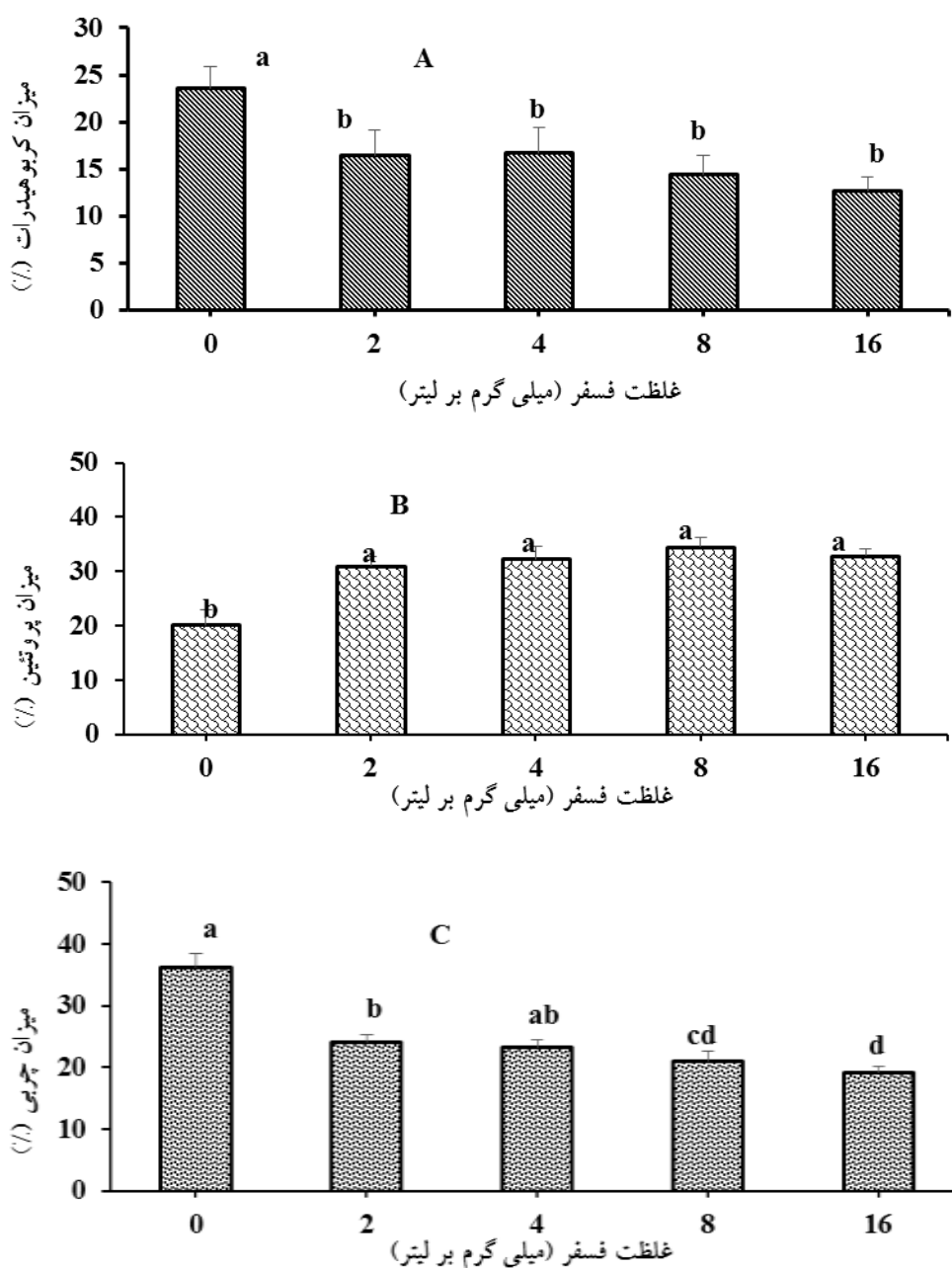
شکل ۱- اثر میانگین (± انحراف معیار) غلظت‌های مختلف فسفر (صفر، ۲، ۴، ۸ و ۱۶ میلی‌گرم بر لیتر) بر روی میزان رشد (تعداد سلول) (A) و زیست توده خشک (B) جلبک *I. galbana* در طی یک دوره رشد ۱۳ روزه.



شکل ۲- اثر غلظت‌های مختلف فسفر بر روی رنگدانه‌های جلبک *I. galbana*. مقادیر به عنوان میانگین ± انحراف معیار می‌باشند. حروف مختلف انگلیسی نشان دهنده تفاوت معنی‌داری بین تیمارها ( $P < 0.05$ ) می‌باشد. ستونها با هر یک از حروف کوچک، حروف بزرگ و حروف بزرگ ستاره دار به صورت مستقل با یکدیگر مقایسه شده‌اند.

همچنین نسبت پروتئین به CHO در شرایط کمبود فسفر و ۳/۷۹ می‌باشد.

بدون محدودیت فسفری در سلول‌های جلبکی به ترتیب ۱/۶۴ مقادیر کل محتوای چربی به ترتیب ۳۶/۲، ۲۴/۰، ۲۳/۲



شکل ۳- اثر غلظت‌های مختلف فسفر بر ترکیبات بیوشیمیایی جلبک *I. galbana* (A) محتوای کربوهیدرات (درصد از وزن خشک)، (B) محتوای پروتئین (درصد از وزن خشک)، (C) محتوای چربی (درصد از وزن خشک). مقادیر به عنوان میانگین  $\pm$  انحراف معیار می‌باشند. حروف مختلف نشان دهنده اختلاف معنی‌داری میان تیمارها ( $P < 0.05$ ) می‌باشد.

گزارش داد که بیشترین میزان چربی بترتیب در اثر گرسنگی فسفات و مکمل سدیم کربنات به دست می‌آید. در تحقیقی Piorreck و همکاران (۱۹۸۴) گزارش کردند، در محدودیت های مواد مغذی، سنتز چربی به سمت ذخیره سازی تری گلیسیرید اشباع می‌رود. آنها اعلام کردند که نیتروژن و

۲۱/۰ و ۱۹/۱ درصد در واحد آزمایشی به ترتیب با غلظت های ۰، ۲، ۴، ۸ و ۱۶ میلی‌گرم بر لیتر فسفر بود. نتایج نشان داد که کاهش غلظت فسفر در محیط کشت سبب افزایش قابل توجهی در میزان چربی‌ها می‌شود شکل ۳ (C). Dahmen و همکاران (۲۰۱۴) در مطالعه خود بر روی *Picochlorum sp*



جدول ۲- پروفایل اسید چرب متیل استری ریزجلبک *I. galbana* در غلظت های متفاوت فسفر (صفر، ۲، ۴، ۸ و ۱۶ میلی گرم در لیتر). مقادیر ارائه شده به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار می باشند. حروف معنی داری در هر ردیف به صورت مجزا با هم مقایسه شدند.

ترکیب اسید چرب (درصد)	صفر (میلی گرم در لیتر)	۲ (میلی گرم در لیتر)	۴ (میلی گرم در لیتر)	۸ (میلی گرم در لیتر)	۱۶ (میلی گرم در لیتر)
C14:0	۱۰/۶۳ $\pm$ ۰/۷۸ <sup>b</sup>	۱۳/۰۵ $\pm$ ۰/۹۶ <sup>a</sup>	۱۴/۱۳ $\pm$ ۰/۰۴ <sup>a</sup>	۱۴/۳۹ $\pm$ ۰/۰۶ <sup>a</sup>	۱۴/۷۹ $\pm$ ۰/۰۹ <sup>a</sup>
C16:0	۳۳/۹۶ $\pm$ ۲/۵۰ <sup>a</sup>	۳۰/۳۶ $\pm$ ۲/۲۳ <sup>ab</sup>	۲۶/۶۳ $\pm$ ۱/۹۶ <sup>bc</sup>	۲۳/۹۰ $\pm$ ۱/۷۶ <sup>c</sup>	۲۷/۷۵ $\pm$ ۲/۰۴ <sup>bc</sup>
C16:1	۵/۰۲ $\pm$ ۰/۳۷ <sup>b</sup>	۴/۱۵ $\pm$ ۰/۳۱ <sup>c</sup>	۶/۷۹ $\pm$ ۰/۵۰ <sup>a</sup>	۷/۱۴ $\pm$ ۰/۵۳ <sup>a</sup>	۷/۱۱ $\pm$ ۰/۵۲ <sup>a</sup>
C18:0	۲۳/۴۰ $\pm$ ۱/۷۲ <sup>a</sup>	۱۷/۵۹ $\pm$ ۱/۲۹ <sup>b</sup>	۱۳/۷۵ $\pm$ ۱/۰۱ <sup>c</sup>	۱۰/۴۴ $\pm$ ۰/۷۷ <sup>d</sup>	۱۴/۳۷ $\pm$ ۰/۰۶ <sup>c</sup>
C18:1n-9	۱۸/۷۰ $\pm$ ۱/۳۸ <sup>c</sup>	۲۵/۷۹ $\pm$ ۱/۹۰ <sup>b</sup>	۲۶/۲۶ $\pm$ ۱/۹۳ <sup>b</sup>	۳۰/۷۵ $\pm$ ۲/۲۶ <sup>a</sup>	۲۴/۳۸ $\pm$ ۱/۷۹ <sup>b</sup>
C18:2n-6	۴/۷۹ $\pm$ ۰/۳۵ <sup>c</sup>	۵/۰۰ $\pm$ ۰/۳۷ <sup>c</sup>	۶/۹۳ $\pm$ ۰/۵۱ <sup>ab</sup>	۷/۷۳ $\pm$ ۰/۵۷ <sup>a</sup>	۶/۱۶ $\pm$ ۰/۴۵ <sup>b</sup>
C18:3n-3	۳/۵۰ $\pm$ ۰/۲۶ <sup>b</sup>	۴/۰۶ $\pm$ ۰/۳۰ <sup>b</sup>	۵/۵۱ $\pm$ ۰/۴۱ <sup>a</sup>	۵/۶۴ $\pm$ ۰/۴۲ <sup>a</sup>	۵/۴۴ $\pm$ ۰/۴۰ <sup>a</sup>
$\Sigma$ SFA <sup>۱</sup>	۶۷/۹۹ $\pm$ ۵/۰۰ <sup>a</sup>	۶۱/۰۰ $\pm$ ۴/۴۹ <sup>ab</sup>	۵۴/۵۱ $\pm$ ۴/۰۱ <sup>bc</sup>	۴۸/۷۳ $\pm$ ۳/۵۹ <sup>c</sup>	۵۶/۹۱ $\pm$ ۴/۱۹ <sup>b</sup>
$\Sigma$ MUFA <sup>۲</sup>	۲۳/۷۲ $\pm$ ۱/۷۵ <sup>c</sup>	۲۹/۹۴ $\pm$ ۴/۴۹ <sup>b</sup>	۳۳/۰۵ $\pm$ ۴/۰۱ <sup>b</sup>	۳۷/۹۰ $\pm$ ۳/۵۹ <sup>a</sup>	۳۱/۴۹ $\pm$ ۴/۱۹ <sup>b</sup>
$\Sigma$ PUFA <sup>۳</sup>	۸/۲۹ $\pm$ ۰/۶۱ <sup>c</sup>	۹/۰۶ $\pm$ ۰/۶۷ <sup>c</sup>	۱۲/۴۴ $\pm$ ۰/۹۲ <sup>ab</sup>	۱۳/۳۷ $\pm$ ۰/۹۸ <sup>a</sup>	۱۱/۵۹ $\pm$ ۰/۸۵ <sup>b</sup>

مقادیر به عنوان میانگین  $\pm$  انحراف معیار می باشند. حروف مختلف نشان دهنده اختلاف معنی داری میان تیمارها ( $P < ۰/۰۵$ ) می باشد.

SFAs<sup>۱</sup>: اسیدهای چرب اشباع، MUFAs<sup>۲</sup>: اسیدهای چرب تک غیراشباع و PUFAs<sup>۳</sup>: اسیدهای چرب چند غیر اشباع

غالب بودند. خواص این اسیدهای چرب ریزجلبکها برای تولید سوخت زیستی به خوبی شناخته شده است (Singhasuwan *et al.*, 2015). با افزایش میزان فسفر از صفر تا ۱۶ میلی گرم در لیتر مقادیر C16: 0 از ۲۳/۴۰٪ به ترتیب به ۲۷/۷۵ و ۱۴/۳۷٪ کاهش یافته اند. در تحقیقی مشابه که بر روی جلبک *Picochlorum sp* صورت گرفت در شرایط محرومیت کامل فسفر میزان اسیدهای چرب اشباع به میزان دو برابر بیشتر از شرایط کنترل بود، همچنین بیان نمودند تغییر در میزان اسیدهای چرب وابسته به محیط کشت و همچنین ذخیره فسفر سلولی در شرایط محدودیت و همچنین شرایط بهینه فسفر می باشد. در مطالعه حاضر، در شرایط محرومیت کامل فسفر مقادیر اسیدهای چرب چند غیر اشباع به صورت معنی داری ( $P < ۰/۰۵$ ) کمتر از شرایط وجود فسفر در محیط کشت می باشد. در گزارشی مشابه تحقیق حاضر Dahmen-Ben Moussa و همکاران (۲۰۱۷) بیان نمودند با افزایش میزان فسفر در محیط کشت ریزجلبک *Tetraselmis marina* میزان اسیدهای چرب اشباع کاهش و میزان اسیدهای چرب غیراشباع به طور همزمان افزایش می یابد.

همچنین فسفر در توسعه فسفولیپیدها شرکت می کند. در مطالعات انجام شده روی موجودات زنده دیگر، از جمله گیاهان بالاتر، برخی محققان جایگزینی فسفولیپیدهای غشایی توسط گلیکولیپیدهای بدون فسفر و چربی های بتائین تحت محدودیت فسفات را تایید کرده اند (Andersson *et al.*, 2003). به طور کلی تحت شرایط محدودیت مواد مغذی در زمانی که منبع انرژی (نور) و کربن (دی اکسید کربن) در دسترس و مکانیزم های سلولی برای فتوسنتز فعال باشند، انباشته شدن چربی در ریزجلبکها صورت می گیرد (Courchesne *et al.*, 2009).

#### اثر غلظت های مختلف فسفر بر محتوای اسید چرب

متیل استری: مشخصات اسیدهای چرب و محتوای نسبی اسیدهای چرب اشباع (Saturated Fatty Acids)، اسیدهای چرب غیراشباع تکی و غیراشباع چندگانه (Monounsaturated Fatty Acids و Polyunsaturated Fatty Acids) در جدول ۲ ارائه شده است. تجزیه و تحلیل کروماتوگرافی گازی (GC) هفت اسید چرب در ریزجلبک *I. galbana* نشان داد که در میان آنها، اسیدهای چرب با طول زنجیره ی از C14 تا C18

پروتئین فسفر کاهش می‌یابد. افزایش غلظت فسفر از صفر تا ۸ میلی‌گرم در لیتر باعث افزایش تعداد سلول می‌گردد، اما در غلظت‌های بالاتر فسفر (۱۶ میلی‌گرم در لیتر) تراکم و تعداد سلولها کاهش می‌یابد. تمام رنگدانه‌های فتوسنتزی به دلیل محرومیت فسفر کاهش یافت. با توجه به تجزیه و تحلیل اسید چرب متیل استری (FAMES) غلظت ۸ میلی‌گرم بر لیتر فسفر، کمترین میزان SFAs را موجب شد. نتایج این مطالعه نشان داد که سرعت رشد و ترکیب بیوشیمیایی *I. galbana* با تغییر غلظت فسفر به میزان قابل توجهی تغییر می‌یابد، که با توجه به هدف پرورش، ریزجلبک‌ها در صنعت آبی پروری، تهیه سوخت زیستی و تصفیه فاضلاب کارخانه‌های صنایع غذایی می‌تواند از آن بهره‌برداری گردد.

همچنین نتایج نشان داد که در غلظت‌های پایین‌تر و بالاتر از ۸ میلی‌گرم بر لیتر فسفر مقادیر MUFA و PUFA نسبت به گروه شاهد بالاتر است. اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه نقش مهمی در سازگاری دمایی، تنظیم سیالیت غشاء و نفوذپذیری و انتقال اکسیژن و الکترون در متابولیسم سلولی و بافتی ایفا می‌کنند (Cardozo *et al.*, 2007).

### نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش پاسخ فیزیولوژیک *I. galbana* تحت غلظت‌های مختلف فسفر مورد مطالعه قرار گرفت. غلظت کم (صفر و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و زیاد (۱۶ میلی‌گرم در لیتر) فسفر باعث ایجاد تنش در *I. galbana* شد. در غلظت‌های بیشتر و کمتر از ۸ میلی‌گرم در لیتر، رشد سلول، محتوای رنگدانه‌ها،

### منابع

- Andersson, M.X., Stridh, M.H., Larsson, K.E., Liljeborg, C. and Sandelius, A.S. (2003) Phosphate-deficient oat replaces a major portion of the plasma membrane phospholipids with the galactolipid digalactosyldiacylglycerol. *FEBS letters* 537: 128-132.
- Dahmen-Ben Moussa I, Chtourou H, Karray F, Sayadi S, Dhoub A (2017) Nitrogen or phosphorus repletion strategies for enhancing lipid or carotenoid production from *Tetraselmis marina*. *Bioresource Technology* 238:325-332.
- Becker, W. (2004) 18 Microalgae in Human and Animal Nutrition, *Handbook of microalgal culture*. Biotechnology and Applied Phycology 312.
- Blair, M.F., Kokabian, B. and Gude, V.G. (2014) Light and growth medium effect on *Chlorella vulgaris* biomass production. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 2: 665-674.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Cardozo, K.H., Guaratini, T., Barros, M.P., Falcão, V.R., Tonon, A.P., Lopes, N.P., Campos, S., Torres, M.A., Souza, A.O. and Colepicolo, P. (2007) Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 146: 60-78.
- Courchesne, N.M.D., Parisien, A., Wang, B. and Lan, C.Q. (2009) Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches. *Journal of Biotechnology* 141: 31-41.
- Dahmen, I., Chtourou, H., Jebali, A., Daassi, D., Karray, F., Hassairi, I., Sayadi, S., Abdelkafi, S. and Dhoub, A. (2014) Optimisation of the critical medium components for better growth of *Picochlorum* sp. and the role of stressful environments for higher lipid production. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94: 1628-1638.
- Daneshvar, E., Antikainen, L., Koutra, E., Kornaros, M. and Bhatnagar, A. (2018a) Investigation on the feasibility of *Chlorella vulgaris* cultivation in a mixture of pulp and aquaculture effluents: Treatment of wastewater and lipid extraction. *Bioresource Technology* 255: 104-110.
- Daneshvar, E., Zarrinmehr, M.J., Hashtjin, A.M., Farhadian, O. and Bhatnagar, A. (2018b) Versatile applications of freshwater and marine water microalgae in dairy wastewater treatment, lipid extraction and tetracycline biosorption. *Bioresource Technology* 268: 523-530.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.T. and Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-356.
- El-Kassas, H.Y. (2013) Growth and fatty acid profile of the marine microalga *Picochlorum* sp. grown under nutrient stress conditions. *The Egyptian Journal of Aquatic Research* 39: 233-239.
- El-Sheek, M. and Rady, A. (1995) Effect of phosphorus starvation on growth, photosynthesis and some metabolic processes in the unicellular green alga *Chlorella kessleri*. *Phyton* 35: 139-151.
- Fan, J., Cui, Y., Wan, M., Wang, W. and Li, Y. (2014) Lipid accumulation and biosynthesis genes response of the oleaginous *Chlorella pyrenoidosa* under three nutrition stressors. *Biotechnology for Biofuels* 7: 17.

- Hemaiswarya, S., Raja, R., Kumar, R.R., Ganesan, V. and Anbazhagan, C. (2011) Microalgae: a sustainable feed source for aquaculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27: 1737-1746.
- Hu, Q. (2004) Environmental effects on cell composition. Blackwell Science Ltd.: Oxford, UK pp. 83–93.
- Kamalanathan, M., Gleadow, R. and Beardall, J. (2015) Impacts of phosphorus availability on lipid production by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Algal Research* 12: 191-196.
- Kilham, S., Kreeger, D., Goulden, C. and Lynn, S. (1997) Effects of nutrient limitation on biochemical constituents of *Ankistrodesmus falcatus*. *Freshwater Biology* 38: 591-596.
- Levine, R.B., Costanza-Robinson, M.S. and Spatafora, G.A. (2011) *Neochloris oleoabundans* grown on anaerobically digested dairy manure for concomitant nutrient removal and biodiesel feedstock production. *Biomass and Bioenergy* 35: 40-49.
- Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N. and Lan, C.Q. (2008) Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81: 629-636.
- Markou, G., Angelidaki, I. and Georgakakis, D. (2012) Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. *Applied Microbiology and Biotechnology* 96: 631-645.
- Martinez, M., Chakroff, R. and Pantastico, J. (1975) Note: direct phytoplankton counting techniques, using the haemocytometer, *Philippine Agriculturist* 59:43 – 50.
- Moussa, I.D., Chtourou, H., Karray, F., Sayadi, S. and Dhoub, A. (2017) Nitrogen or phosphorus repletion strategies for enhancing lipid or carotenoid production from *Tetraselmis marina*. *Bioresource Technology* 238: 325-332.
- Parsons, T., Maita, Y. and Lalli, C. (1984) Determination of chlorophylls and total carotenoids: spectrophotometric method, Parsons, TR, Y.Maita and CM Lalli. A manual of chemical and biological methods for seawater analysis. Pergamon Press, Oxford. 101-112.
- Pinto, E., Sigaud-kutner, T.C., Leitao, M.A., Okamoto, O.K., Morse, D. and Colepicolo, P. (2003) Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *Journal of Phycology* 39: 1008-1018.
- Piorreck, M., Baasch, K. and Pohl, P. (1984) Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. *Phytochemistry* 23: 207-216.
- Rausch, T. (1981) The estimation of micro-algal protein content and its meaning to the evaluation of algal biomass I. Comparison of methods for extracting protein. *Hydrobiologia* 78: 237-251.
- Redfield, A. C. (1934) On the proportions of organic derivatives in sea water and their relation to the composition of plankton. In James Johnstone Memorial Volume, pp. 176–192. Liverpool University Press.
- Sánchez, Á, Maceiras, R., Cancela, Á. and Pérez, A. (2013) Culture aspects of *Isochrysis galbana* for biodiesel production. *Applied Energy* 101: 192-197.
- Shelef, G., Soeder, C.J. (1980). *Algae Biomass: production and use*. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam pp. 315-341.
- Singhasuwan, S., Choorit, W., Sirisansaneeyakul, S., Kokkaew, N. and Chisti, Y. (2015) Carbon-to-nitrogen ratio affects the biomass composition and the fatty acid profile of heterotrophically grown *Chlorella* sp. TISTR 8990 for biodiesel production. *Journal of Biotechnology* 216: 169-177.
- Solovchenko, A., Solovchenko, O., Khozin-Goldberg, I., Didi-Cohen, S., Pal, D., Cohen, Z. and Boussiba, S. (2013) Probing the effects of high-light stress on pigment and lipid metabolism in nitrogen-starving microalgae by measuring chlorophyll fluorescence transients: studies with a  $\Delta 5$  desaturase mutant of *Parietochloris incisa* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Algal Research* 2: 175-182.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. and Isambert, A. (2006) Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101: 87-96.
- Tebbani, S., Filali, R., Lopes, F., Dumur, D. and Pareau, D. (2014) CO<sub>2</sub> Biofixation by Microalgae: Modeling, estimation and control. Wiley ISTE, United Kingdom.
- Tzovenis, I., De Pauw, N. and Sorgeloos, P. (2003) Optimisation of T-ISO biomass production rich in essential fatty acids: II. Effect of different light regimes on the production of fatty acids. *Aquaculture* 216: 223-242.
- Van Bergeijk, S., Salas-Leiton, E. and Cañavate, J. (2010) Low and variable productivity and low efficiency of mass cultures of the haptophyte *Isochrysis aff. galbana* (T-iso) in outdoor tubular photobioreactors. *Aquacultural Engineering* 43: 14-23.
- Walne, P. R. (1966) Experiments on the large-scale culture of the larvae of *Ostrea edulis*. *Journal Fish Invest Min Agric Fish London, Ser. 2*: 25-53.
- Yuan, Y., Liu, H., Li, X., Qi, W., Cheng, D., Tang, T., Zhao, Q., Wei, W. and Sun, Y. (2018) Enhancing Carbohydrate Productivity of *Chlorella* sp. AE10 in Semi-continuous Cultivation and Unraveling the Mechanism by Flow Cytometry. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 185: 419-433.

## Effect of different phosphorus concentrations on the growth rate and biochemical composition of golden-brown alga *Isochrysis galbana*

Mohammad Javad Zarrinmehr<sup>1</sup>, Omidvar Farhadian<sup>1\*</sup>, Fatemeh Paykan Heyrati<sup>1</sup>, Javad Keramat<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan 84156, Iran

<sup>2</sup> Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, 84156, Iran

(Received: 08/12/2018, Accepted: 02/11/2019)

### Abstract

Phosphorus is one of the critical macronutrients that plays an important role in energy transfer, phospholipid and nucleic acids synthesis, and biochemical compounds in microalgal cells. It plays an important role in the formation and transfer of metabolic energy to ATP and NADPH structures. In this study, the effect of different phosphorus ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) concentrations (0, 2, 4, 8 and 16  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) was investigated on growth rate and biochemical composition of *Isochrysis galbana*. The results showed that phosphorus deprivation decreased cell growth, pigments and protein contents, whilst carbohydrate and lipids were increased along with phosphorus concentration increments. The highest carbohydrate, protein and lipid content was observed as, 23.5, 34.6 and 36.2 % in phosphorus concentrations of 0, 8, 0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively. By increasing the concentration of phosphorus from 0 to 16  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , the content of C16: 0 (33.96%) and C18: 0 (23.4%) were decreased to 27.75% and 14.37%, respectively. The results of this study indicated that phosphorus concentration can significantly affect the growth rate and biochemical compositions of *I. galbana*.

**Key words:** Biochemical composition, Fatty acids, *Isochrysis galbana*, Phosphorus.

:

Corresponding author, Email: omfarhad@cc.iut.ac.ir