



تأثیر غلظت‌های مختلف فسفر در محیط کشت بر رشد، زیست توده، محتوای فنول کل و ارزیابی خواص آنتی‌اکسیدانی در سیانوباکتری‌های آب شیرین،

Anabeana variabilis و *Microcystis aeruginosa*

فاطمه رستمی^۱، امیدوار فرهادیان^{۲*}، نصراله محبوبی صوفیانی^۳، محمود اعتباری^۴

۱. دانشجوی دکتری گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

۲. دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

۳. استاد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

۴. دانشیار گروه فارماکولوژی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۱۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۲۷

چکیده

فسفر نقش مهمی در رشد جلبک‌ها، تولید اسیدهای چرب و فرآیندهای متابولیکی مانند انتقال انرژی و فتوسنتز دارد. در پژوهش حاضر اثر غلظت‌های مختلف فسفر بر رشد، زیست توده، محتوای فنول کل و خواص آنتی‌اکسیدانی در سیانوباکتری‌های آب شیرین، *Microcystis aeruginosa* و *Anabeana variabilis* مورد بررسی قرار گرفتند. آزمایش با ۴ غلظت مختلف فسفر شامل صفر، ۰/۵، ۶۴ و ۲۵۶ میکروگرم بر لیتر فسفر هر کدام در ۳ تکرار با استفاده از محیط کشت BG11 به مدت ۱۰ روز در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. میانگین تعداد سلول‌ها در تیمارهای صفر (شاهد)، ۰/۵، ۶۴ و ۲۵۶ میکروگرم بر لیتر فسفر برای *M. aeruginosa* به ترتیب برابر $۵/۲ \times 10^5$ ، $۶/۴ \times 10^5$ ، $۱۰/۶ \times 10^5$ و $۱۱/۳ \times 10^5$ سلول در میلی لیتر و برای *A. variabilis* به ترتیب $۲/۸ \times 10^5$ ، $۴/۳ \times 10^5$ و $۷/۷ \times 10^5$ و $۴/۱ \times 10^5$ بود. میزان فنول کل برای *M. aeruginosa* برابر با ۰/۵، ۰/۵، ۵/۱۲ و ۷/۷۵ میلی گرم گالیک اسید بر وزن خشک جلبک و برای *A. variabilis* نیز ۴/۱۲، ۴/۹، ۹ و ۶/۶ میلی گرم گالیک اسید بر وزن خشک جلبک به دست آمد. درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH برای *M. aeruginosa* برابر با ۲۰/۵۱، ۲۲، ۲۳ و ۳۹/۲۳ درصد و برای *A. variabilis* ۲۵/۹، ۳۲/۵۶، ۴۵/۱۲ و ۳۴/۱ درصد محاسبه شد. نتایج نشان داد که بیشترین رشد، رنگدانه‌های فتوسنتزی و فنول کل و همچنین محتوای آنتی‌اکسیدانی برای *M. aeruginosa* در غلظت ۲۵۶ میکروگرم بر لیتر فسفر و برای *A. variabilis* در غلظت ۶۴ میکروگرم بر لیتر فسفر به دست آمد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که نیاز فسفر در جلبک‌ها با توجه به گونه متفاوت است، به طوری که هر گونه در غلظت خاصی از فسفر بیشترین میزان رشد و سایر فعالیت‌های زیستی را از خود نشان می‌دهد. همچنین درک رشد سیانوباکتری‌ها در رابطه با غلظت مواد مغذی که منجر به شکوفایی آن‌ها می‌شود برای مدیریت آن‌ها در منابع آبی به‌ویژه آب شیرین و قابل شرب اهمیت حیاتی دارد.

واژگان کلیدی: آنتی‌اکسیدان، رشد، سیانوباکتری‌ها، فسفر، فنول کل



Effects of different phosphorus concentrations in medium on growth, biomass, total phenol contents, and evaluation of antioxidant properties in freshwater cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* and *Anabeana variabilis*

Fatemeh Rostami¹, Omidvar Farhadian^{2*}, Nasrollah Mahboobi Soofiani³, Mahmood Etebari⁴

1. Ph. D. student, Department of Natural Resources, University of Isfahan Technology, Isfahan, Iran

2. Associate Professor, Department of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

3. Professor, Department of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

4. Associate Professor, Department of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University, Isfahan, Iran

Received: 18-Mar-2023

Accepted: 31-May-2023

Abstract

Phosphorus plays an important role in the growth of algae, production of fatty acids and metabolic processes such as energy transfer and photosynthesis. This study aimed to determine the effect of different phosphorus (P) concentrations on the growth, biomass, phenolic content and antioxidant properties of *Microcystis aeruginosa* and *Anabeana variabilis*. After identifying and isolation the desired cyanobacteria, in a completely randomized experimental design was conducted with four different concentrations of Phosphorus in the media, including zero, 0.5, 64 and 256 $\mu\text{gP/L}$, each in triplicates, using BG11 medium for a 10- day period culture. The average cell density in the treatments of 0 (control), 0.5, 64 and 256 $\mu\text{g/L}$ of P for *M. aeruginosa* were recorded at 5.2×10^5 , 6.4×10^5 , 10.6×10^5 and 11.3×10^5 cells/mL, respectively, for *A. variabilis* were 2.8×10^5 , 3.4×10^5 , 7.7×10^5 and 1.4×10^5 cells/mL, respectively. The amount of total phenolic for *M. aeruginosa* were 0.5, 1.5, 5.12 and 7.75 mg gallic acid/ DW and for *A. variabilis* were 4.12, 4.9, 9 and 66.0 mg gallic acid/DW. The DPPH free radical inhibition percentage for *M. aeruginosa* were equal to 20.51, 22, 23 and 39.23% and for *A. variabilis*, 25.9, 32.56, 45.12 and 34.1% were calculated. The results showed that the highest growth, photosynthetic pigments and total phenolic as well as antioxidant content were obtained for *M. aeruginosa* at a concentration of 256 $\mu\text{g/L}$ of P and for *A. variabilis* at concentration of 64 $\mu\text{g/L}$ of P. Therefore, it can be concluded that the requirement of P in algae is different according to the species, so that each species shows the highest growth rate and other biological activities at a certain concentration of P. Also, understanding the growth of cyanobacteria in relation to the concentration of nutrients in which lead to their bloom is importance for their management of natural water resources, especially fresh and drink waters.

Keywords: Antioxidant, Growth, Cyanobacteria, Phosphorus, Total phenolic

۱. مقدمه

سیانوباکتری‌ها پروکاریوت‌های فتوسنتزکننده هستند که به‌عنوان یک غذای سالم، رنگدانه طبیعی برای غذا و نوشیدنی، کود زیستی، منبع آگروپلی‌ساکاریدها و همچنین منبع انرژی‌های تجدیدپذیر پتانسیل زیادی دارند (Xiong et al., 2017). گونه *Anabaena variabilis* سیانوباکتری رشته‌ای دارای هتروسیست است که از قابلیت تثبیت نیتروژن برخوردار است. *A. variabilis* بیش از ۴۰ سال است که به‌طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته و سوپه‌انتخابی برای بسیاری از آزمایشگاه‌ها است (Borodin et al., 2000). *Microcystis aeruginosa* نیز از سیانوباکتری‌های آب شیرین، و از شایع‌ترین عوامل شکوفایی سمی سیانوباکتریایی در آب‌های شیرین یوتروفیک (پرتولید) است. گونه *M. aeruginosa* دارای ویژگی‌های تشخیصی نظیر حضور ویزکول‌های گازی (Chu et al., 2007)، ذخیره‌سازی فسفر به‌صورت گرانول پلی‌فسفات (Jacobson and Halmann, 1982)، تحمل در برابر تابش زیاد نور (Rabouille and Salencon, 2005) و قابلیت ایجاد کلنی‌های بزرگ دارای موسیلاژ (Tsukada et al., 2006) است.

نیتروژن همراه با فسفر، کربن، اکسیژن، هیدروژن و گوگرد از عناصر اصلی تشکیل دهنده مولکول‌های آلی هستند. بنابراین از لحاظ کمی عناصر اصلی و پرمصرف در تولید و تشکیل زیست‌توده جلبکی هستند. احتیاجات نیتروژنی در جانوران به‌طور عمده مرتبط با پروتئین است در حالی که گیاهان از ترکیبات نیتروژن‌دار معدنی استفاده می‌کنند. فرآیند جذب نیتروژن همزمان با جذب سایر مواد مغذی مطابق با یک نسبت معین بین مواد مغذی اتفاق می‌افتد. نسبت کربن، نیتروژن و فسفر مطابق با نیاز هر جلبک در کشت آن‌ها تنظیم می‌شود. نسبت‌های C:N:P ۱۰۶:۱۶:۱ و ۱۰۰:۱۲:۱ در بسیاری از موارد ذکر شده‌اند. این نسبت‌ها ثابت نیستند، زیرا سطوح نیتروژن و فسفر در سلول‌های جلبکی به‌واسطه جذب و سایر فعالیت‌های متابولیسی دائماً تغییر می‌کنند

(Bellinger and Sigeo, 2015). در میان مواد مغذی مختلف مورد نیاز برای رشد جلبک‌های میکروسکوپی یوکاریوت و پروکاریوت، نیترات و فسفات نقش غیرقابل جایگزین در فیزیولوژی و رشد سلولی دارند. داشتن اطلاعات درخصوص غلظت بهینه نیترات و فسفات برای افزایش سرعت رشد و پرورش جلبک‌ها اهمیت دارد (Tsukada et al., 2006; Widjaja et al., 2009;). زمانی که فسفر کافی باشد، فسفات معدنی به‌صورت پلی‌فسفات در سلول‌های این گروه از جلبک‌ها تجمع می‌یابد و در صورت مواجهه با کمبود فسفر مجدداً در دسترس قرار می‌گیرد (Beardall et al., 2001). کاهش شدید وزن خشک ریزجلبک به‌دلیل کمبود فسفر در نتیجه اهمیت فسفر برای ریزجلبک‌ها، قارچ‌ها و گیاهان عالی به‌عنوان درشت مغذی ضروری است (Schachtman et al., 1998). بررسی‌ها و آزمایش‌های میدانی همبستگی بین فراوانی سیانوباکتری‌ها و غلظت فسفر در دریاچه‌ها را نشان می‌دهد (Chaffin et al., 2001; Chaffin et al., 2011). فسفر نقش مهمی در رشد جلبک، تولید چربی، تولید اسیدهای چرب و فرآیندهای متابولیسی مانند انتقال انرژی، انتقال پیام‌ها و فتوسنتز دارد (Ota et al., 2016; Yang et al., 2018). به‌طور کلی فسفر یک ماده مغذی ضروری است که کمی کمتر از ۱ درصد از کل زیست‌توده جلبکی را تشکیل می‌دهد و تقریباً غلظتی بین ۰/۶ - ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر در محیط پرورش، برای حفظ رشد جلبک مورد نیاز است (Procházková et al., 2013; Ota et al., 2016). فسفر برای سلول‌های ریزجلبکی جهت تولید اجزای سلولی مانند فسفولیپیدها، DNA، RNA و ATP برای مسیرهای متابولیسی که شامل انتقال انرژی و سنتز اسیدهای نوکلئیک است، ضروری است (Sarkheil et al., 2021; Atiku et al., 2016). بنابراین، در دسترس بودن مواد مغذی کلیدی می‌تواند تا حد زیادی بر ترکیب جامعه جلبک‌ها در آب‌های سطحی تأثیرگذار باشد (Dignum et al., 2005). سطوح پایین درشت‌مغذی‌های فسفر و نیتروژن اغلب عامل محدودکننده رشد

نبود اطلاعات دقیق آزمایشگاهی در خصوص نیازهای دو گونه سیانوباکتری *M. aeruginosa* و *A. variabilis* نسبت به غلظت مورد نیازشان به فسفر، در این پژوهش سعی رشد و زیست توده، محتوای فنول کل و خواص آنتی اکسیدانی دو گونه سیانوباکتری *M. aeruginosa* و *A. variabilis* با توجه به غلظت‌های مختلف فسفر مورد بررسی قرار گیرد. داشتن اطلاعات و دانش در خصوص نیاز فسفوری سیانوباکتری‌ها می‌تواند در مدیریت منابع آب های شیرین و کنترل پدیده‌های ناخواسته همانند شکوفایی‌های جلبکی نیز مفید باشد. این مطالعه همچنین می‌تواند به دانش علمی در مورد نقش بالقوه ترکیبات زیست فعال سیانوباکتریایی و تأثیر مفید احتمالی ترکیبات اهمیت داشته باشد.

۲. مواد و روش کار

۲.۱. نمونه برداری از سیانوباکتری‌ها

نمونه‌های آب حاوی سیانوباکترها با استفاده از بطری‌های ۱۰۰ میلی لیتری شیشه‌ای از سطح آب منابع آبی حوضه زاینده رود اصفهان (ایستگاه پل مارنان با مختصات جغرافیایی "۳۲°۳۸'۵۸" شمالی و "۵۱°۳۸'۳۶" شرقی و ایستگاه سی و سه پل با مختصات "۳۲°۱۵'۴۵" شمالی و "۵۲°۵۴'۳۰" شرقی) جمع‌آوری و سپس به آزمایشگاه گروه شیلات در دانشگاه صنعتی اصفهان انتقال داده شدند. شناسایی اولیه نمونه‌ها به منظور تأیید حضور سیانوباکترها با استفاده از میکروسکوپ با بزرگنمایی گوناگون انجام و سپس نمونه‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قبل از مراحل جداسازی و کشت، نگهداری شدند (Rippka, 1988).

۲.۲. محیط کشت مورد استفاده

از آنجا که در این پژوهش هدف مقایسه دو گونه سیانوباکتری *M. aeruginosa* و *A. variabilis* مورد نظر بود، برای هر دو گونه محیط کشت یکسان لحاظ گردید بنابراین، دو نوع محیط کشت مایع (BG-11 و جامد (آگار)

سیانوباکتری در اکوسیستم‌های آب شیرین هستند (Xu et al., 2010; Pearl et al., 2011; Mueller and Mitrovic, 2014). علاوه بر گیاهان خشکی، در سال‌های اخیر، بسیاری از منابع دریایی به‌عنوان گزینه‌ای عالی برای تولید ترکیبات زیست فعال مورد توجه قرار گرفته‌اند (Kuda et al., 2005). سیانوباکتری‌ها منبع بسیاری از مواد فعال زیستی با کاربردهای زیست فناوری بالقوه هستند و ترکیبات آنتی اکسیدانی آن‌ها، به‌ویژه برای صنایع آرایشی و بهداشتی (Morone et al., 2019) و صنایع غذایی (Singh et al., 2017)، به‌عنوان مولکول‌های امید بخش در نظر گرفته شده‌اند. در واقع، جستجو برای ترکیبات آنتی اکسیدانی طبیعی با توجه به ترکیبات آنتی اکسیدانی مصنوعی فعلی که حاوی مواد نگهدارنده و احتمالاً سمی هستند، توجه بسیاری از محققان را به خود معطوف نموده است (Andrade et al., 2019). در میان آنتی اکسیدان‌های طبیعی، ترکیبات فنولی از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند، زیرا نقش مهمی در حفاظت از موجودات زنده علیه انواع رادیکال‌های آزاد ایفا می‌کنند (Stratil et al., 2006). ترکیبات فنولی مانند فنول‌های ساده، اسید فنولیک، کومارین‌ها و فلاونوئیدها به‌عنوان ترکیبات با خواص آنتی اکسیدانی مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند (Rico 2013). این ترکیبات به‌عنوان گروهی از متابولیت‌های ثانویه، میزان و تنوع آن‌ها در حین رشد گیاهان و جلبک‌ها تحت تأثیر ژنتیک، شرایط رشد، پرورش و شرایط آب و هوایی‌اند.

نشان داده شده است که در آب‌های طبیعی با افزایش میزان فسفر، میزان زیست توده نیز افزایش دارد و در کمتر از ۱۰۰ میکروگرم فسفر در لیتر ارتباط فسفر و زیست توده خطی است در حالی که در سطوح بیشتر از این سطح عوامل دیگری می‌تواند به‌طور افزایشی زیست توده را تحت تأثیر قرار دهد (Prairie et al., 1989). از سوی دیگر نیاز سیانوباکتری‌ها در مقایسه با سایر جلبک‌های یوکاریوت به لحاظ نیاز به فسفر و نیتروژن متفاوت است. این نسبت فسفر به نیتروژن در سیانوباکتری‌ها بین ۱:۱۲۵ تا ۱:۴۲ متغیر است (Barsanti and Gualtieri 2006). با توجه به

تغییرات سطح فسفر مطرح بود، بنابراین میزان فسفر با استفاده از K_2HPO_4 با (حلالیت ۱۵۰ گرم در هر ۱۰۰ میلی لیتر آب، مرک آلمان) تهیه و در سطح‌های موجود در تیمارهای آزمایشی به محیط کشت BG-11 فاقد فسفر اضافه گردید. برای تهیه محیط کشت جامد، ۷/۵ گرم آگار به نیم لیتر محیط کشت مایع BG-11 اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شد (Stanier et al., 1971).

برای جداسازی و پایش کشت این سیانوباکتری‌ها مورد استفاده قرار گرفت (Stanier et al., 1971). غلظت ترکیبات محیط کشت مایع BG-11 در هر لیتر در محلول نهایی در جدول ۱ ارائه شده است. پس از آماده‌سازی محیط کشت، ۱۰ میلی لیتر از عناصر پرمصرف و ۱ میلی لیتر از عناصر کم‌مصرف اضافه شد و pH با استفاده از HCl با غلظت ۰/۱ نرمال تا ۷/۱ تنظیم گردید (Stanier et al., 1971). در این تحقیق از آنجا که موضوع

جدول ۱- ترکیبات محیط کشت BG-11 در هر لیتر (Stanier et al., 1971).

مقدار (گرم)	عناصر کم مصرف (در هر ۱۰۰۰ میلی لیتر)	مقدار (گرم)	ترکیبات اصلی (در هر ۱۰۰۰ میلی لیتر)
۲/۸۶	H_3BO_3	۱۵۰/۰۰	$NaNO_3$
۱/۸۱	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	۴/۰۰	K_2HPO_4
۰/۳۲	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	۷/۵۰	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$
۰/۳۹	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	۳/۶۰	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$
۰/۰۸	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	۰/۶۰	سیتریک اسید
۰/۰۵	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	۰/۶۰	آمونیم فریک سترات
		۰/۱۰	EDTANa ₂
		۲/۰۰	Na_2CO_3

داده شدند. این کار برای به دست آوردن کلونی‌های خالص سیانوباکتری‌ها چندین بار تکرار شد (Gorji et al., 2016). بعد از اطمینان از خالص بودن کلونی‌های موجود در کشت جامد، به منظور افزایش زیست‌توده سیانوباکتری‌های مورد نظر و به دست آوردن مقدار کافی از آن برای انجام مراحل آزمایش، کلونی‌ها به محیط کشت مایع BG-11 منتقل و در اتاقک رشد تحت هوادهی و تابش نور مداوم و همچنین دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Safari et al., 2015).

۲.۴. شناسایی سیانوباکتری‌ها

شناسایی تاکسونومیکی سیانوباکتری‌ها طبق کلیدهای شناسایی Jains van Vuuren و همکاران (۲۰۰۶) و Bellinger و Sige (۲۰۱۰) و نیز مقالات مربوط به شناسایی ظاهری مرتبط به این شاخه از جلبک‌ها انجام

۲.۳. جداسازی و خالص‌سازی سیانوباکتری‌ها

به منظور جدا کردن جلبک‌ها از یکدیگر از روش پلیت آگار استفاده شد (Heidary et al., 2008). بدین صورت که ۷۵ میکرولیتر از نمونه آب به کمک نوعی دستگاه اسپری کننده به صورت قطرات بسیار ریز روی سطح پلیت دارای محیط کشت BG-11 اسپری و سپس پلیت‌های حاوی نمونه آب به مدت دو هفته در شرایط نوری (روشنایی کامل) و دمایی مناسب (نور سفید ۳۵ میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند (Yoon et al., 2008). برای تهیه کشت خالص، پلیت‌های کشت داده شده پس از ۱۰ روز نگهداری در شرایط مناسب، در زیر هود لامینار بررسی و کلونی‌های پدیدار شده به وسیله لوپ استریل برداشته و در پلیت دیگری به روش کشت خطی کشت

آن که ۱/۱۷۴ گرم است، ابتدا سهم فسفر خالص در مولکول محاسبه شد که این میزان حدود ۱۷/۸ درصد بود و سپس مقادیر فسفر خالص در تیمارهای ۰/۵، ۰/۶۴ و ۰/۲۵۶ میکروگرم بر لیتر فسفر که معادل با ۰/۰۰۲، ۰/۰۳۶۰ و ۱/۴۴ میلی گرم در هر لیتر از نمک دی پتاسیم فسفات بود، در نظر گرفته شد. این دامنه از غلظت فسفر بر مبنای معادلات جذب و ذخیره فسفر در جلبک‌های سبز-آبی و براساس میزان فسفر بیان شده است (Ghaffar et al., 2017). در انتخاب سطوح مختلف فسفر با توجه به میزان آهن به صورت آمونیوم فریک سیترات در محیط کشت BG11، سطح فسفر لحاظ شده نسبت به میزان آهن و همچنین میزان گوگرد (Fernandez-Juarez et al., 2020).

۲.۶. شرح آزمایش

پس از تأیید خالص بودن کشت، ۵۰ میلی لیتر از استوک مذکور در هر یک از ظروف کشت مورد آزمایش (ارلن مایرهای ۵۰۰ میلی لیتری حاوی ۳۰۰ میلی لیتر محیط کشت و غلظت‌های تعیین شده فسفر) تزریق و لوله‌های هوادهی نصب و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در زیر نور مداوم با نور فلورسنت سفید (۳۵ میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه) نگهداری شدند (Gorji et al., 2016). شمارش تعداد سلول‌های جلبک‌ها هر روز و با استفاده از لام هموسیتمتر و با روش پیشنهاد شده توسط Martinez و همکاران (۲۰۰۰) انجام شد. میزان رشد ویژه (SGR) و زمان دو برابر شدن سلول‌های جلبک نیز با استفاده از روابط زیر محاسبه شد (Omori and Ikeda 1984).

$$SGR = (\ln N_2 - \ln N_1) / t$$

N_2 : تعداد سلول‌های جلبک در انتهای آزمایش

N_1 : تعداد سلول‌های جلبک در ابتدای آزمایش

t: مدت زمان انجام آزمایش

$$DT = \ln 2 / SGR$$

۲.۷. تعیین مقدار کلروفیل و کاروتنوئید

سنجش میزان کلروفیل و کاروتنوئید کل در انتهای

شد (Galhano and Figueiredo, 2011). برای تجزیه و تحلیل ظاهری جلبک‌ها، ابتدا صفات کلیدی و تعیین‌کننده مربوط به هر جنس مشخص و در مرحله بعد شناسایی بر مبنای این صفات انجام گرفت. از جمله صفات مهم در شناسایی، می‌توان به ابعاد سلول (طول و عرض سلول‌های رویشی، هتروسیست‌ها و آکینت‌ها)، رشته‌های مختلف هر سویه و همچنین شکل و رنگ کلنی‌ها، اندازه تالس، طول و عرض تریکم‌ها، شکل سلول‌های رأسی و وجود یا عدم وجود غلاف موسیلاژی از کشت‌های تازه اشاره کرد (Bellinger and Sigeo, 2015; Janes et al., 2006). سیانوباکتری‌ها براساس ویژگی‌های طبقه‌بندی شامل اندازه، رنگ، ماهیت رشته، دیواره‌های متقاطع، غلاف و ویژگی‌های رشد شناسایی شدند. *A. variabilis* رشته‌ای با قطر ۲ تا ۱۰ میکرومتر و دارای تریکوم‌های یکپارچه خمیده است که کمی در دیواره سلولی منقبض شده‌اند. سلول‌ها سبز-آبی و استوانه‌ای خمیده که به شکل رشته‌ای از مهره‌ها هستند. هتروسیست منفرد برای تثبیت نیتروژن به‌طور منظم در انتهای رشته‌ها قرار دارد. آکینت‌ها نیز بینابینی و منفرد به شکل بیضی و گاهی کروی هستند که گاهاً در مجاورت هتروسیست‌ها نیز یافت می‌شوند (Galhano and Figueiredo 2013). سلول‌های *M. aeruginosa* اغلب کروی با قطر ۲ تا ۷ میکرومتر با کلنی‌های از ۴۰ میکرومتر تا ۳ میلی‌متر هستند. هنگام بررسی به صورت میکروسکوپی، کروی، دیسکی یا نامنظم و به صورت ماکروسکوپی بی‌شکل و گاهی اوقات شبکه مانند هستند. رنگ سلول‌ها آبی مایل به سبز یا تیره و سلول‌ها با شکاف دوتایی در سه صفحه عمود تقسیم می‌شوند (Radkova et al., 2020).

۲.۵. طرح آزمایش

آزمایش در چهار تیمار شامل صفر، ۰/۵، ۰/۶۴ و ۰/۲۵۶ میکروگرم بر لیتر فسفر در سه تکرار برای هر کدام از دو گونه سیانوباکتری انجام شد. تهیه و تنظیم سطح فسفر در هر تیمار با استفاده از نمک دی پتاسیم فسفات (K_2HPO_4) انجام شد. بدین‌منظور با توجه به وزن مولکولی

جهت اندازه‌گیری ترکیبات فنولی تهیه شد. برای تهیه حجم گالیک اسید ۲۵ میلی‌گرم گالیک اسید در ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل گردید و سپس غلظت‌های مختلف گالیک اسید از طریق فرمول $N_1V_1=N_2V_2$ محاسبه شد. جهت تهیه محلول استاندارد نیز به ۱ میلی‌لیتر از محلول‌های تهیه شده گالیک اسید، ۵ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتو^۱ ۱۰ درصد و ۴ میلی‌لیتر کربنات سدیم اضافه و جذب محلول‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید و منحنی کالیبراسیون ترسیم شد (Blaise et al., 2009). جهت اندازه‌گیری فنول کل، ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره متانولی با ۵ میلی‌لیتر فولین سیوکالتو مخلوط و سپس ۴ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم ۱ مولار اضافه گردید. برای شاهد نیز به جای عصاره از آب مقطر به‌همراه فولین و کربنات سدیم استفاده و در نهایت جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانش گردید.

۲.۱۰. ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها به

روش DPPH

اساس این روش بر مبنای احیاء رادیکال آزاد DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) به‌وسیله آنتی‌اکسیدان‌ها در غیاب سایر رادیکال‌های آزاد در محیط است که نتیجه این عمل باعث ایجاد رنگ در محیط می‌شود که شدت آن با دستگاه طیف‌سنج قابل اندازه‌گیری است. بدین‌منظور، در ابتدا ۴ میلی‌گرم DPPH در ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول (۰/۱ میلی‌مولار) حل و سپس ۲ میلی‌لیتر عصاره به ۲ میلی‌لیتر از آن اضافه شد. علاوه بر لوله‌های محتوای عصاره‌ها یک لوله نیز به‌عنوان شاهد (۲ میلی‌لیتر متانول + ۲ میلی‌لیتر DPPH) در نظر گرفته شد (Olasehinde et al., 2019). لوله‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه در محیط تاریک قرار گرفت و سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر در مقابل محلول متانول (بلانک) توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید. در

دوره رشد انجام گرفت. جهت اندازه‌گیری کلروفیل ۱۰ میلی‌لیتر از هر نمونه برداشت و به‌مدت ۱۵ دقیقه با دور ۴۵۰۰ در دقیقه سلنتریفیوژ گردید. ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۹۰ درصد به سلول‌های رسوب یافته اضافه شد و مجموعه حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در آون ۶۰ درجه سلنتری‌گراد قرار گرفت. درنهایت پس از مراحل عصاره‌گیری، با استفاده از سانتریفیوژ کردن مجدد مایع رویی برداشته شد و توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (UV-spectrophotometer 2401PC) عدد جذب در طول موج ۶۶۵ نانومتر قرائت گردید (Marker, 1972). به‌منظور اندازه‌گیری میزان کاروتنوئید (Jensen, 1978) نیز ابتدا جذب در دو طول موج ۴۶۱ و ۶۶۵ خوانش و سپس به‌منظور برآورد کمی میزان کلروفیل و کاروتنوئید از معادلات زیر استفاده گردید؛

$$\text{Chlorophyll (mg/L)} = 3.14 \times \text{OD}_{665}$$

$$\text{Carotenoids (mg/L)} = (\text{OD}_{461} - (0.046 \times \text{OD}_{665})) \times 4.1$$

۲.۸. عصاره‌گیری

جهت انجام فرآیند عصاره‌گیری، ابتدا ۵۰ میلی‌گرم از زیست‌توده خشک شده به روش انجمادی از هر کدام از جلبک‌های *M. aeruginosa* و *A. variabilis* به ۵ میلی‌لیتر حلال متانول در لوله‌های فالكون اضافه گردید. نمونه‌ها به‌مدت دو ساعت روی مخلوط‌کن الکتریکی قرار گرفت و سپس محلول‌ها در ۴۵۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی آن‌ها برداشت شد. این عمل برای ۳ بار تکرار و در نهایت تمامی محلول‌های رویی به‌دست آمده برای هر تیمار جمع‌آوری شد (Manivannan et al., 2012).

۲.۹. روش سنجش فنول کل

ابتدا محلول ۱ مولار کربنات سدیم (Na_2CO_3) با اضافه کردن ۱۰/۶ گرم کربنات سدیم به آب مقطر و رساندن آن به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر تهیه شد. در مرحله بعد حجم گالیک اسید برای تهیه منحنی کالیبراسیون

¹Folin-Ciocalteu

به ترتیب برابر $۵/۲ \times ۱۰^۵$ ، $۶/۴ \times ۱۰^۵$ ، $۱/۰۶ \times ۱۰^۶$ و $۱/۱۳ \times ۱۰^۶$ سلول در میلی‌لیتر و برای *A. variabilis* به ترتیب $۲/۸ \times ۱۰^۵$ ، $۴/۳ \times ۱۰^۵$ ، $۷/۷ \times ۱۰^۵$ و $۴/۱ \times ۱۰^۵$ بود. میزان رشد ویژه نیز برای *M. aeruginosa* به ترتیب، $۱/۳$ ، $۱/۳۲$ ، $۱/۳۷$ و $۱/۳۸$ در روز و برای *A. variabilis* $۱/۲۳$ ، $۱/۲۸$ ، $۱/۳۴$ و $۱/۲۸$ در روز محاسبه شد. به همین ترتیب میانگین میزان زیست‌توده برای گونه *M. aeruginosa* برابر با $۰/۴۳$ ، $۰/۷$ ، $۱/۷۴$ و $۲/۵$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای گونه *A. variabilis* $۰/۴۰$ ، $۰/۷۰$ ، $۲/۲۱$ و $۰/۵۰$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. نتایج نشان داد که بیشترین میزان رشد و زیست‌توده برای *M. aeruginosa* در غلظت ۲۵۶ میکروگرم بر لیتر و برای *A. variabilis* در غلظت ۶۴ میکروگرم بر لیتر فسفر به دست می‌آید. تراکم سلولی در جلبک *M. aeruginosa* به جز در تیمار شاهد برای سایر تیمارها تا انتهای دوره یک روند صعودی را نشان داد، اما در تیمار صفر (شاهد) از روز ۹ به بعد تراکم سلولی وارد یک فاز ثابت شد. تراکم سلولی برای جلبک *A. variabilis* از روز ۷ به بعد یک روند کاهشی (در تیمارهای شاهد و غلظت ۲۵۶ میکروگرم بر لیتر فسفر) و یا ثابت (غلظت‌های $۰/۵$ و ۶۴ میکروگرم بر لیتر فسفر) را نشان داد.

۳.۲. رنگدانه‌های کلروفیل و کاروتنوئیدها

نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین تیمارها از نظر رنگدانه‌های فتوسنتزی وجود دارد (شکل ۳). مقدار کلروفیل *a* در تیمارهای صفر، $۰/۵$ ، ۶۴ و ۲۵۶ میکروگرم بر لیتر فسفر در جلبک *M. aeruginosa* به ترتیب، $۱/۱$ ، $۱/۳$ و $۱/۴$ میلی‌گرم بر لیتر و در جلبک *A. variabilis* به ترتیب $۰/۵۱$ ، $۰/۶۸$ ، $۱/۷$ و $۰/۵$ میلی‌گرم بر لیتر به دست آمد. به همین ترتیب میزان کاروتنوئید کل در جلبک *M. aeruginosa* به ترتیب برابر با $۰/۳۹$ ، $۰/۳۹$ ، $۰/۵$ و $۰/۵$ برای جلبک *A. variabilis* $۰/۵۱$ ، $۰/۵۱$ ، ۱ و $۰/۷$ میلی‌گرم بر لیتر محاسبه شد.

نهایت درصد مهار رادیکال آزاد از طریق سنجش میزان تغییر رنگ DPPH از بنفش به زرد و با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد (Olasehinde et al. 2019).

$$\text{DPPH scavenging activity (\%)} = (A_0 - A_1 / A_0) \times 100$$

در این رابطه: میزان جذب کنترل (DPPH و اتانول) و A_1 : میزان جذب نمونه است.

جهت تهیه استاندارد آسکوربیک اسید استفاده شده در این کار، در ابتدا ۲۰ میلی‌گرم آسکوربیک اسید را در ۵ میلی‌لیتر متانول حل شد تا غلظت ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر حاصل شود (محلول استوک)، سپس چهار غلظت متفاوت $۰/۰۸$ ، $۰/۰۴$ ، $۰/۰۲$ و $۰/۰۱$ میلی‌گرم بر لیتر از آسکوربیک اسید آماده و جذب آن‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد و منحنی استاندارد رسم گردید.

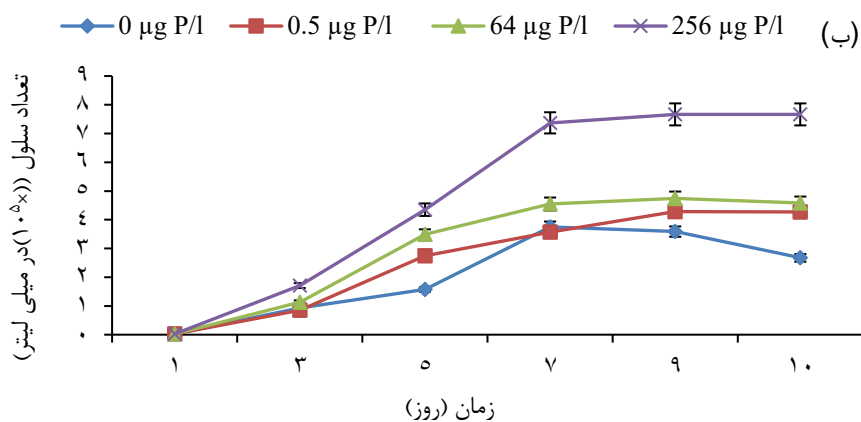
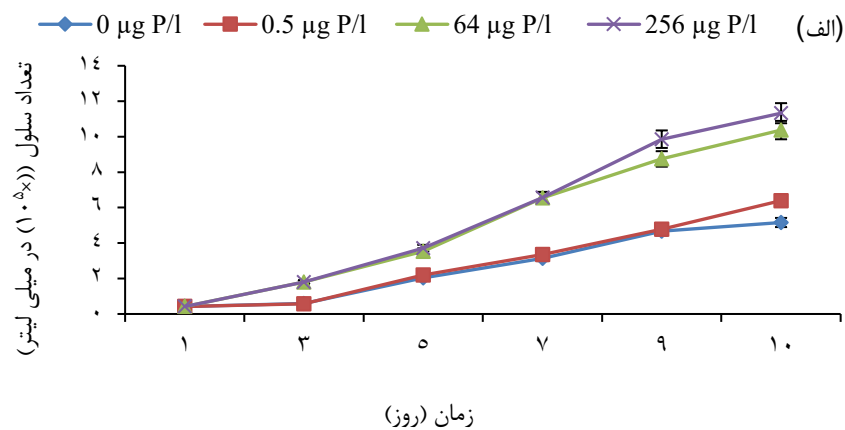
۲.۱۱. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار و ۳ تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از آنالیز تجزیه واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA) با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۲ انجام شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح معنی‌داری ۵ درصد استفاده شد.

۳. نتایج

۳.۱. میزان رشد و زیست‌توده

غلظت فسفر در تیمارهای مختلف آزمایشی بر مشخصه‌های اندازه‌گیری شده تأثیر معنی‌داری داشتند ($P < ۰/۰۵$). میانگین تعداد سلول، زیست‌توده، میزان رشد ویژه و زمان دوبرابر شدن کشت‌های دو سیانوباکتری *M. aeruginosa* و *A. variabilis* در تیمارهای مختلف فسفر در نمودارهای شکل‌های ۱، ۲ و ۳ ارائه شده است. میانگین تعداد سلول‌ها در تیمارهای صفر، $۰/۵$ ، ۶۴ و ۲۵۶ میکروگرم بر لیتر فسفر برای *M. aeruginosa*



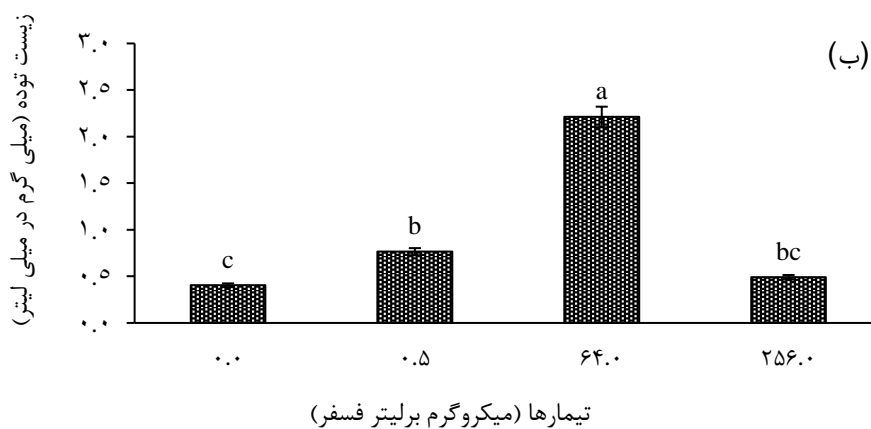
شکل ۱- نمودارهای میانگین اثر غلظت‌های مختلف فسفر بر میانگین تراکم سلولی در سیانوباکترهای *M. aeruginosa* (الف) و *A. variabilis* (ب) در روزهای مختلف رشد.

۳.۳. محتوای فنول کل

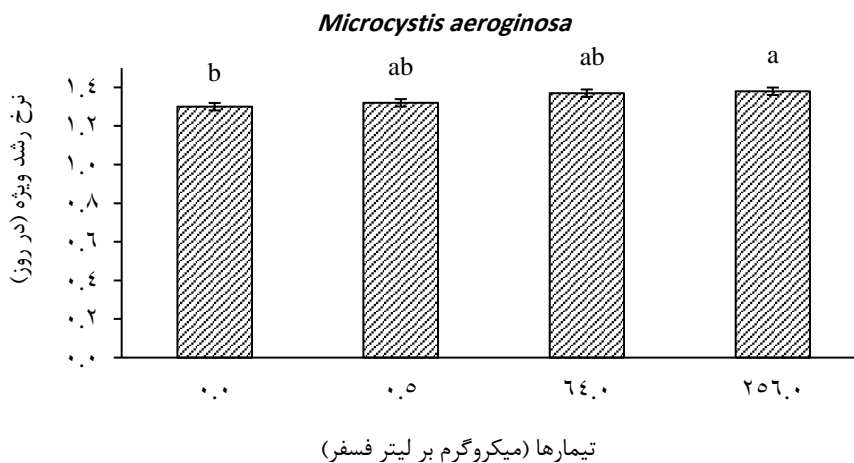
میانگین میزان فنول کل در تیمارهای مختلف آزمایشی در شکل ۵ نشان داده شده است. مقدار فنول کل در تیمارهای صفر، ۰/۵، ۶۴ و ۲۵۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر در جلبک *M. aeruginosa* به ترتیب، ۰/۵، ۱/۵، ۵/۱۲ و ۷/۷۵ میلی‌گرم گالیک اسید بر وزن خشک و برای *A. variabilis*، ۴/۱۲، ۴/۹، ۹ و ۶/۶ میلی‌گرم گالیک اسید بر وزن خشک به دست آمد. نتایج نشان داد بیشترین میزان فنول کل برای جلبک *M. aeruginosa* در غلظت ۲۵۶ میکروگرم بر لیتر فسفر و برای *A. variabilis* در غلظت ۶۴ میکروگرم بر لیتر فسفر مشاهده شد که متناسب با میزان رشد برای هر دو گونه بود.

۳.۴. عملکرد آنتی‌اکسیدانی

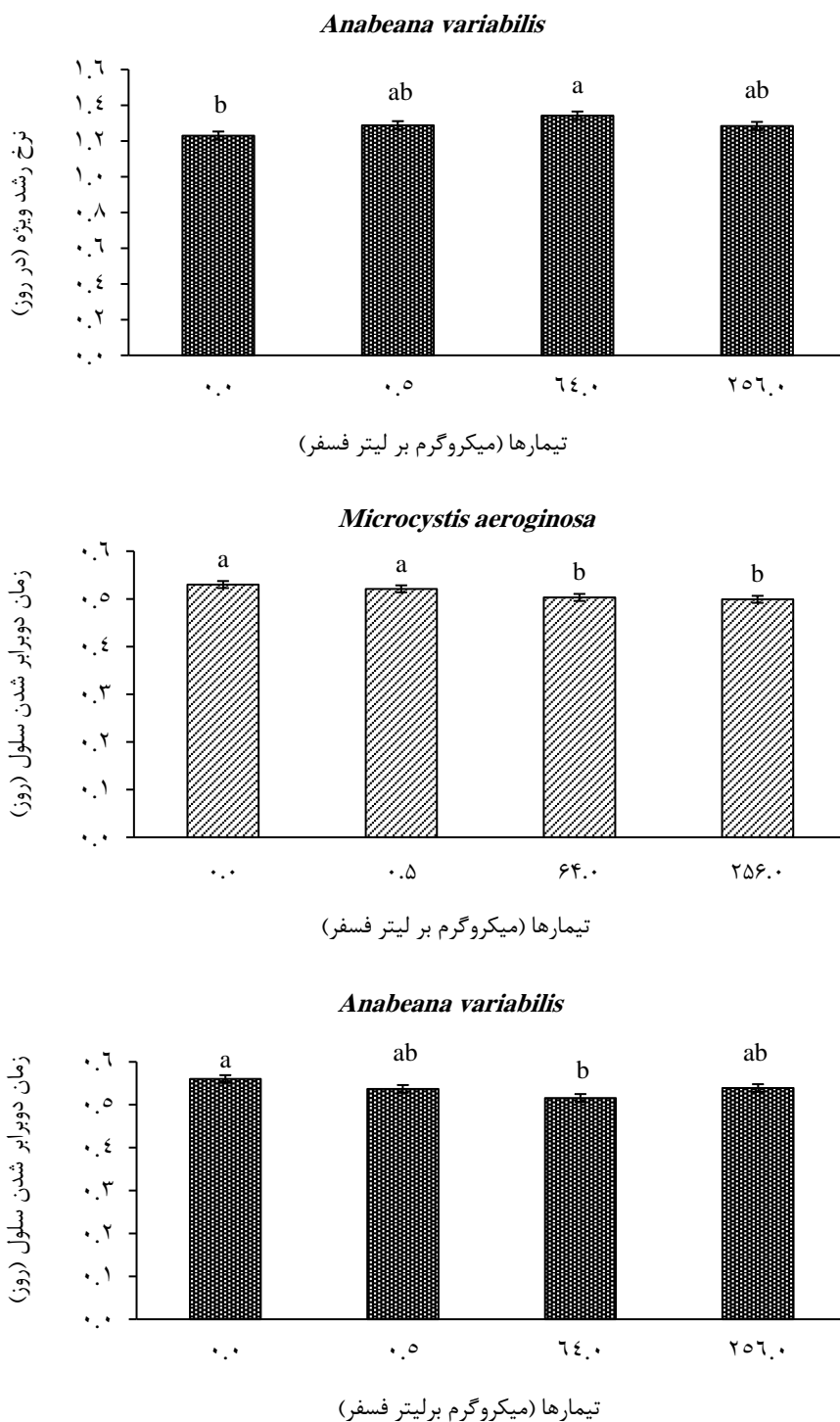
در شکل ۶ ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره زیست‌توده دو جلبک *M. aeruginosa* و *A. variabilis* در سنجش DPPH نشان داده شده است. نتایج آنالیز تجزیه واریانس یک طرفه اختلاف معنی‌داری ($P < 0.05$) را بین تیمارها از نظر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها نشان داد. درصد مهار رادیکال آزاد DPPH برای غلظت‌های صفر، ۰/۵، ۶۴ و ۲۵۶ میکروگرم بر لیتر فسفر در سیانوباکتری *M. aeruginosa* به ترتیب، ۲۰/۵۱، ۲۲/۰۵، ۲۳/۰۷ و ۳۹/۲۳ درصد و برای *A. variabilis*، ۲۵/۹، ۳۲/۵۶، ۴۵/۱۲ و ۳۴/۱ درصد اندازه‌گیری شد.



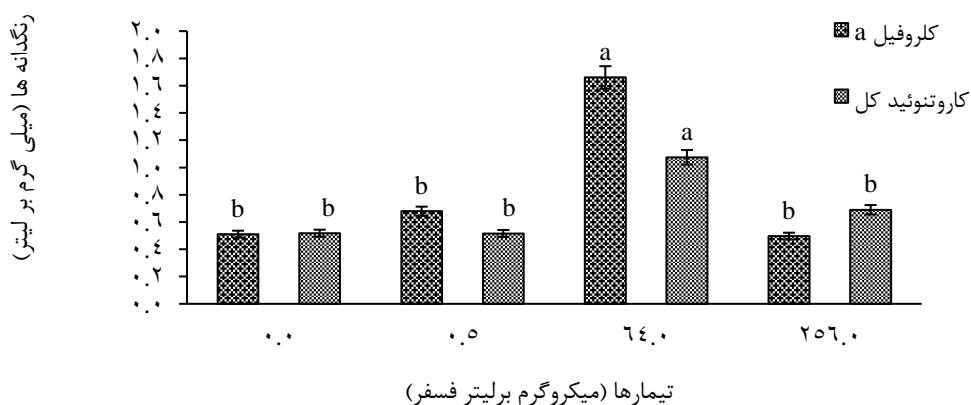
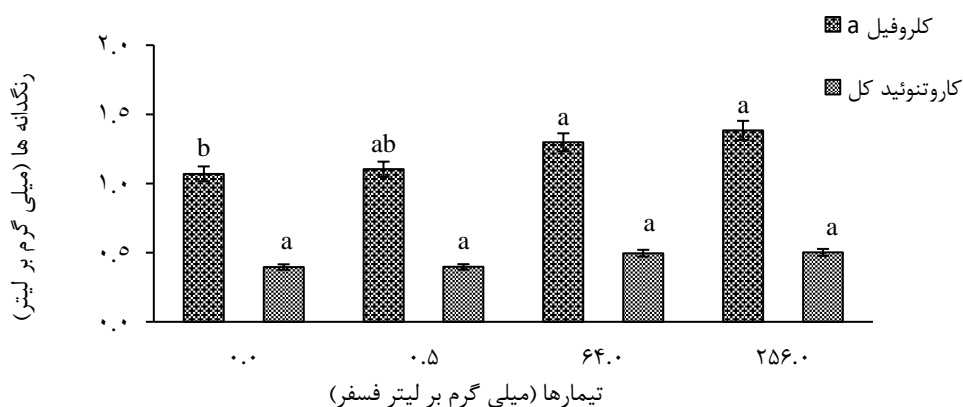
شکل ۲- نمودارهای میانگین اثر غلظت‌های مختلف فسفر بر زیست‌توده جلبک‌های *M. aeruginosa* (الف) و *A. variabilis* (ب) در انتهای دوره ۱۰ روزه رشد (حروف انگلیسی متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است).



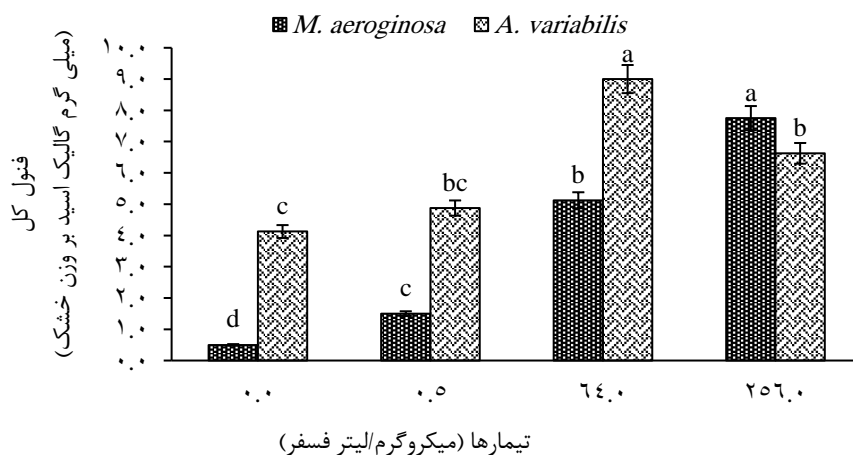
شکل ۳- نمودارهای میانگین اثر غلظت‌های مختلف فسفر بر شاخص‌های رشد (میزان رشد ویژه و زمان دو برابر شدن سلول) در انتهای دوره ۱۰ روزه رشد. (حروف انگلیسی متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است).



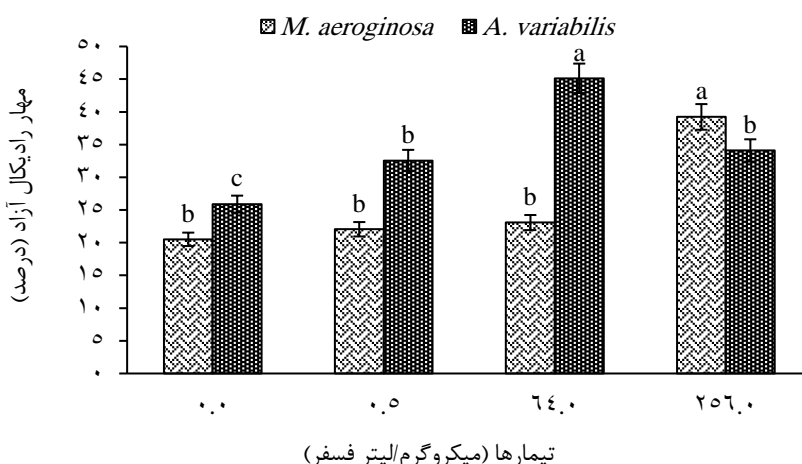
ادامه شکل ۳



شکل ۴- نمودارهای میانگین اثر غلظت‌های مختلف فسفر برمقادیر رنگدانه‌های فتوسنتزی سیانوباکتری‌های *M. aeruginosa* (بالا) و *A. variabilis* (پایین) در انتهای دوره رشد. (حروف انگلیسی متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است).



شکل ۵- نمودار اثر غلظت‌های مختلف فسفر ارزیابی فنول کل عصاره‌های متانولی دو سیانوباکتری *M. aeruginosa* و *A. variabilis* به روش DPPH (حروف انگلیسی متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است).



شکل ۶- نمودار اثر غلظت‌های مختلف فسفر عملکرد آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های متانولی به روش DPPH (حروف انگلیسی متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است).

۴. بحث و نتیجه‌گیری نهایی

فسفر یک ماده مغذی اساسی برای رشد جلبک‌هاست، زیرا در انتقال انرژی درون سلولی، سنتز اسید نوکلئیک و واکنش‌های ویژه مربوط به تقسیم سلولی سهیم است (Beardall *et al.*, 2001). فسفر همچنین یک ماده مغذی پویا برای تبدیل نور خورشید به انرژی شیمیایی و یک عنصر اساسی برای رشد و تولید مثل سلولی است (Li *et al.*, 2016). اثرات فسفر یا اثر مشترک آن با نیتروژن بر جوامع جلبکی در دریاچه‌ها به خوبی بررسی شده است و به طور کلی، زیست‌توده جلبکی و بهره‌وری و تغییر در ساختار جمعیتی گونه‌ها را ارتقاء می‌دهد (Smith, 1984; Farhadian *et al.*, 2015). استفاده از نیتروژن و فسفر توسط جلبک‌ها به عوامل مختلفی مانند ترکیبات محیط کشت، غلظت اولیه مواد مغذی محیط، شدت نور، اختلاط و نسبت نیتروژن/فسفر و چرخه نور/تاریکی بستگی دارد (Aslan and Kapdan, 2006).

یافته‌های این مطالعه نشان داد که بیشترین میزان تراکم سلولی، زیست‌توده جلبکی، میزان رشد ویژه و کمترین زمان دو برابر شدن جمعیت برای جلبک *M. aeruginosa* در غلظت ۲۵۶ میکروگرم بر لیتر فسفر مشاهده شد. به طوری که تراکم سلولی جلبک

M. aeruginosa در روز دهم از $5/16 \times 10^5$ در غلظت صفر فسفر (شاهد) به $11/32 \times 10^5$ در غلظت ۲۵۶ میکروگرم بر لیتر فسفر رسید. نتایج مطالعه Ghaffar و همکاران (۲۰۱۷) نیز در رابطه با اثر استرس فسفر بر رشد و همچنین جذب فسفر توسط جلبک *M. aeruginosa* نشان داد که میزان تراکم سلولی با افزایش غلظت فسفر، از ۳۵ هزار سلول در میلی‌لیتر در روز ۶، به ۷۰ هزار سلول در میلی‌لیتر افزایش یافت. بنابراین می‌توان گفت زمانی که مواد مغذی کلیدی مانند نیتروژن و فسفر به طور مؤثر از محیط رشد استفاده شوند، عملکرد جلبک‌ها افزایش پیدا خواهد کرد. نتایج ما همچنین با یافته‌های Khajehpour و همکاران (۲۰۱۷) همخوانی دارد. آن‌ها سه غلظت ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر لیتر فسفر را روی فاکتورهای رشد و ترکیبات بیوشیمیایی جلبک *Nostoc calcicola* مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که با افزایش غلظت فسفر از ۱۰۰ به ۴۰۰ میکروگرم بر لیتر میزان رشد جلبک *N. calcicola* به طور معنی‌داری افزایش خواهد یافت. در مطالعه حاضر همچنین میزان زیست‌توده برای جلبک *M. aeruginosa* در غلظت‌های پایین فسفر (غلظت صفر و ۰/۵ میکروگرم بر لیتر، به ترتیب ۰/۴۲ و ۰/۴۰ میلی‌گرم بر لیتر) حدود

۶۵ میلی‌گرم در لیتر فسفر مهار شد. مقایسه‌ه میزان رشد دو گونه مورد بررسی نشان داد که رشد سیانوباکتر *M. aeruginosa* تا انتهای دوره ۱۰ روزه روندی صعودی دارد و به‌طور کلی مقادیری بیشتر از *A. variabilis* را نشان می‌دهد، در حالی که در *A. variabilis* از روز هفتم به بعد رشد تا انتهای دوره تقریباً ثابت است. مطالعات Nalewajko و همکاران (۲۰۰۱) در رابطه با مقایسه رشد *Microcystis sp.* و *Anabeana sp.* نیز نشان داد که نسبت نیتروژن و فسفر تعیین‌کننده میزان رشد در این دو گونه است، به‌طوری که در شرایط یکسان در *Anabeana spp.* در شرایط کاهش نیتروژن و فسفر محیط با افزایش طول دوره رشد، تا یک محدوده خاص میزان رشد ثابت و پس از آن کاهش می‌یابد. بنابراین، می‌توان اظهار داشت در مطالعه حاضر میزان رشد *M. aeruginosa* با افزایش طول دوره و قرار گرفتن در شرایط بهینه نسبت نیتروژن به فسفر، رشد بیشتری را نسبت به *A. variabilis* داشته است. علاوه بر میزان نیتروژن و فسفر و نسبت‌های آن‌ها، نسبت فسفر به سایر عناصر محیط کشت از قبیل آهن به‌صورت ترکیب آمونیوم فریک سیترات در محیط کشت BG-11 از عواملی است که می‌تواند تفاوت را در بخشی از بررسی انجام شده با مطالعه قبلی نشان دهد. برای مثال Fernandez-Juarez و همکاران (۲۰۲۰) بیان کردند که افزایش فسفر با افزایش آهن در سیانوباکتری‌های جنس‌های *Halothece* و *Fischerella* مانع رشد خواهد شد. در این مطالعه با توجه به میزان آهن به‌صورت آمونیوم فریک سیترات در محیط کشت BG11، سطح فسفر لحاظ شده نسبت به میزان آهن و همچنین میزان گوگرد تا حدودی متناسب انتخاب شد و انتظار می‌رود که تفاوت‌های مشاهده شده در لحاظ کردن غلظت فسفر به نسبت‌های سایر عناصر از جمله آهن و گوگرد مرتبط باشد، به‌عبارتی دیگر، وجود میزان آهن و گوگرد در محیط کشت سیانوباکتری‌ها می‌تواند باعث رسوب و حتی ممانعت از اثرگذاری میزان فسفر مازاد شود و بهتر است میزان آهن و گوگرد زیاد را در کنار میزان فسفر با سطوح پایین‌تر مورد بررسی قرار گیرد

۵۰ درصد کمتر از میزان آن در غلظت ۲۵۶ میکروگرم بر لیتر فسفر (۰/۹۰ میلی‌گرم بر لیتر) در انتهای دوره محاسبه شد. Xin و همکاران (۲۰۱۰) نیز بیان کردند که زیست‌توده جلبکی که اغلب به‌عنوان رشد در نظر گرفته می‌شود در کشت‌های با میزان فسفر محدود حدود ۳۰ تا ۴۰ درصد کمتر از زمانی است که فسفر به میزان کافی در دسترس باشد.

در نتایج مطالعه حاضر همچنین بیشترین میزان تراکم سلولی، زیست‌توده جلبکی، میزان رشد ویژه و کمترین زمان دوبرابر شدن سلول برای *A. variabilis* مربوط به غلظت ۶۴ میکروگرم بر لیتر بود. تراکم سلولی جلبک *A. variabilis* در روز دهم در غلظت ۶۴ میکروگرم بر لیتر $7/66 \times 10^5$ سلول بر میلی‌لیتر به‌دست آمد که با غلظت صفر ($2/70 \times 10^5$) و غلظت ۲۵۶ میکروگرم بر لیتر فسفر ($4/1 \times 10^5$) تفاوت معنی‌داری داشت. نتایج مطالعات Heidary و همکاران (۲۰۰۹) هم در رابطه با اثر غلظت‌های مختلف فسفر بر رشد سیانوباکتر *Jaaginema sp.* نشان داد که افزایش غلظت فسفات به میزان ۶/۲ گرم بر لیتر بسیار مؤثرتر از ۹/۳ گرم بر لیتر رشد این سیانوباکتر است. این محققان در نتایج خود بیان کردند که میزان فسفر درمقادیر بالاتر از ۶/۲ گرم بر لیتر فسفات برای جلبک *Jaaginema sp.* می‌تولند بازدارنده رشد باشد که این باز دارندگی از نیاز متفاوت فسفر در گونه‌های مختلف جلبک و همچنین میزان سمیت مستقیم فسفر یا فرم فسفات بر گونه مورد نظر به‌ویژه زمانی که منابع دیگر مانند نیتروژن یا نور محدود هستند، پشتیبانی می‌کند (Heidary et al., 2009). در مطالعه‌ای دیگر Yoon و همکاران (۲۰۰۸) عوامل تأثیرگذار بر رشد جلبک *A. variabilis* را در یک راکتور حبابی مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان داد غلظت ۵۵ میلی‌گرم بر لیتر فسفر در محدوده ۲۱-۶۵ میلی‌گرم بر لیتر، غلظت بهینه فسفات برای رشد سیانوباکتر *A. variabilis* است. آن‌ها همچنین بیان کردند که نرخ رشد ویژه در فاز رشد نمایی با غلظت اولیه فسفات در محدوده ۲۱-۵۵ میلی‌گرم در لیتر فسفات افزایش یافت در حالی که رشد سلولی در

به‌میزان قابل توجهی در فعالیت آنتی‌اکسیدانی در ریزجلبک‌ها نقش دارند (Hajimahmoodi et al., 2010; Goiris et al., 2012). ترکیبات زیست‌فعال ریزجلبک‌ها اغلب به‌شدت به استرس مواد مغذی پاسخ می‌دهند. استرس مواد مغذی همچنین منجر به تولید گونه‌های رادیکال آزاد در سلول می‌شود و ممکن است منجر به تغییر در محتوای آنتی‌اکسیدان‌ها گردد (Goiris et al., 2015). در مطالعه حاضر بیشترین میزان فنول کل و آنتی‌اکسیدان در جلبک *M. aeruginosa* در غلظت ۲۵۶ میکروگرم بر لیتر فسفر (به‌ترتیب ۷/۷۵ میلی‌گرم اسید گالیک بر وزن خشک، ۳۹/۲۳ درصد) و کمترین میزان این دو فاکتور نیز برای در غلظت صفر فسفر (شاهد) مشاهده شد. نتایج به‌دست آمده از این مطالعه با نتایج مطالعه Goiris و همکاران (۲۰۱۵) در رابطه با اثر استرس مواد مغذی بر سه گونه از ریزجلبک‌ها (*Phaeodactylum tricornutum*، *Tetraselmis suecica* و *Chlorella vulgaris*) مطابقت داشت. نتایج آن‌ها نشان داد که محتویات فنلی و کارتنوئیدی عصاره‌های ریزجلبکی به‌طور قابل توجهی در کشت‌های با مواد مغذی محدود کاهش می‌یابد. آن‌ها همچنین بیان کردند که استرس مواد مغذی یک راهبرد مؤثر برای افزایش محتوای آنتی‌اکسیدان کل در ریزجلبک‌ها نیست، اگرچه ممکن است برای افزایش آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند توکوفرول یا اسیدآسکوربیک مفید باشد (Goiris et al., 2015). بیشترین میزان محتوای فنول کل و آنتی‌اکسیدان برای جلبک *A. variabilis* در غلظت ۶۴ میکروگرم بر لیتر فسفر (به‌ترتیب ۹ میلی‌گرم اسید گالیک بر وزن خشک، ۴۵/۱۲ درصد) مشاهده شد که همانند جلبک *M. aeruginosa* تابع میزان رشد بود. در مطالعه Hamouda و Abou-El-Souod (۲۰۱۸) اثر غلظت‌های ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۲، ۰/۰۰۵، ۰/۰۰۷ و ۰/۰۱ گرم بر لیتر فسفر را روی خواص آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌باکتریال و ترکیبات زیست‌فعال ریزجلبک *Scenedesmus obliquus* مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن‌ها نیز نشان داد که غلظت ۰/۰۰۷ گرم بر لیتر فسفر بیشترین میزان آنتی‌اکسیدان،

(Fernandez-Juarez et al., 2020). مطالعات بیشتر در خصوص نقش آهن و گوگرد و ارتباط آن با میزان فسفر و حتی نیتروژن بر رشد سیانوباکتری‌ها توصیه می‌شود. در این مطالعه، بیشترین میزان کلروفیل و کارتنوئید کل برای جلبک *M. aeruginosa* در غلظت ۲۵۶ میکروگرم بر لیتر فسفر مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد داشت. میزان کلروفیل *a* در روز دهم در غلظت صفر فسفر (شاهد) حدود ۳۰ درصد کمتر از میزان آن در غلظت ۲۵۶ میکروگرم بر لیتر فسفر بود. در واقع میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی تابع میزان رشد بوده و در غلظت‌های بالاتر فسفر مقادیر بیشتری از آن‌ها در جلبک *M. aeruginosa* اندازه‌گیری شد. یافته‌های این تحقیق با مطالعه Zarinmehr و همکاران (۲۰۲۱) در رابطه با اثر تیمار فسفر بر سرعت رشد و ترکیبات بیوشیمیایی جلبک *Isocrysis galbana* منطبق بود. آن‌ها ضمن مطالعات خود بیان کردند که محدودیت میزان فسفر، رنگدانه‌های سلولی را کاهش می‌دهد. نتایج آن‌ها نشان داد که با کاهش غلظت فسفر از صفر تا ۴ میلی‌گرم، غلظت کلروفیل *a* به‌ترتیب از ۰/۶۶ تا ۰/۱۸ میلی‌گرم بر لیتر و کلروفیل *b* به‌ترتیب از ۰/۵۲ تا ۰/۱۶ میلی‌گرم بر لیتر کاهش یافت. El-Sheek and Rady (۱۹۹۵) نیز طی مطالعات خود نشان دادند که میزان محتوای کلروفیل ریزجلبک *Picochlorum* sp. در زمان محدودیت فسفر کاهش می‌یابد. بررسی‌های آن‌ها همچنین نشان داد که شرایط محدودیت و کاهش فسفر منجر به کاهش رشد و محتوای پروتئینی می‌گردد. در واقع می‌توان گفت که کاهش میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی در زمان کاهش رشد به‌دلیل عدم توانایی در تولید مولکول‌های محتوای انرژی است که باعث ایجاد مشکل در سنتز کلروفیل سلول‌ها در شرایط کمبود فسفر می‌گردد (Zarinmehr et al., 2021). بیشترین میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی برای *A. variabilis* نیز در تیمار با غلظت ۶۴ میکروگرم بر لیتر فسفر مشاهده شد که تابع میزان رشد و زیست‌توده در این جلبک بود. مطالعات اخیر نشان داده است که ترکیبات فنلی

کشت به‌دست آمد. همچنین در این دو گونه سیانوباکتری مورد بررسی، مشخص شد که مهار رادیکال‌های آزاد در غلظت‌های بیشتر از فسفر، به‌مراتب مناسب‌تر از غلظت‌های کم فسفر اتفاق می‌افتد. علاوه بر این، مقایسه دو گونه مورد بررسی نشان داد که نسبت میزان نیتروژن به فسفر محیط که با افزایش طول دوره رشد در حال تغییر است می‌تواند بر میزان رشد سلول‌های جلبکی تأثیرگذار باشد. به‌طور کلی می‌توان گفت که فسفر یک ماده مغذی ضروری است که بر رشد، زیست‌توده، محتوای فنول کل و خواص آنتی‌اکسیدانی سیانوباکتری‌ها تأثیر گذار بوده و نیاز آن در گونه‌های مختلف سیانوباکتری‌ها متفاوت است. کمبود یا افزایش فسفر در داخل سلول می‌تواند منجر به ایجاد استرس گردد که در نتیجه روی رشد، زیست‌توده و خواص آنتی‌اکسیدانی و محتویات فنلی و همچنین خاصیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد تأثیرگذار خواهد بود.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از معاونت پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشگاه صنعتی اصفهان و کارشناسان گروه شیلات دانشکده منابع طبیعی برای فراهم نمودن شرایط و امکانات لازم برای این تحقیق تشکر می‌شود.

فلاونوئیدها و محتوای فنلی را در بر دارد، زیرا بیشترین میزان رشد *S. abliquus* نیز در این غلظت از فسفر به‌دست آمد.

به‌طور کلی با توجه به یافته‌های این تحقیق و سایر محققان می‌توان بیان کرد که چنانچه اثر افزایشی فسفر در محیط کشت‌های سیانوباکتری‌ها در کنار سایر مواد غذایی و عناصر رشد مانند نیتروژن، آهن و گوگرد و حتی سایر عناصر کم مصرف باعث افزایش رشد و تکثیر سلول‌های جلبکی در سیانوباکتری‌ها گردد، می‌توان انتظار داشت که میزان فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، میزان فلاونوئیدها و محتوای فنلی را افزایش دهد. در هر صورت مطالعه همزمان سایر عناصر مؤثر در عملکرد فسفر مانند آهن و گوگرد در تولید متابولیت‌های ثانویه توصیه می‌شود.

نتیجه‌گیری نهایی

نتایج به‌دست آمده در مطالعه حاضر نشان داد که یک بهبود و افزایش قابل ملاحظه‌ای در رشد، زیست‌توده، ترکیبات زیست‌فعال از قبیل کلروفیل و کاروتنوئیدها در سیانوباکتری‌های *M. aeruginosa* و *A. variabilis* و همچنین خواص آنتی‌اکسیدانی و فنل کل زیست‌توده حاصل از آن‌ها با افزایش میزان فسفر اولیه در محیط

References

۵. منابع

- Andrade, M.A., Lima, V., Sanches-Silva, A., Vilarinho, F., Castilho, M.C., Khwaldia, K., Ramos, F., 2019. Pomegranate and grape by-products and their active compounds: Are they a valuable source for food applications. *Trends in Food Science and Technology* 86(1), 68-84, DOI: org/10.1016/j.tifs.2019.02.010
- Aslan, S., Kapdan, I.K., 2006. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Journal of Ecological Engineering* 28(1), 64-70, DOI: 10.1016/j.ecoleng.2006.04.003
- Atiku, A., Mohamed, R.M.S.R., Al-Gheethi, A.A., Wurochekke, A.A., Kassim, A.H., 2016. Harvesting microalgae biomass from the phyco remediation process of grey water. *Journal of Environmental Science and Pollution Research* 23(2), 24624-24641, DOI: 10.1007/s11356-016-7456-9
- Barsanti, L., Gualtieri, P. 2006. *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*, CRC Press, Taylor and Francis Group. 320 pp, DOI: 10.1201/b16544

- Blaise, W.L., Owen, K.D., Stephen, B., Anthony, D., Thomas, D., 2009. Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen. *Journal of Food Chemistry* 115, 1299 – 1305, DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.01.055
- Beardall, J., Berman, T., Heraud, P., Kadiri, M.O., Light, B.R et al., 2001. A comparison of methods for detection of phosphate limitation in microalgae. *Journal of Aquatic Sciences* 63, 107-121, DOI: 10.1007/PL00001342
- Bellinger, G.E. & Sigeo, D.C., 2015. Freshwater Algae: Identification, Enumeration and Use as Bioindicators. (2ndEds). Freshwater Ecology p. 290, DOI:10.1002/9781118917152
- Borodin, V.B., Tsygankov, A.A., Rao, K.K., Hall, D.O., 2000. Hydrogen production by *Anabaena variabilis* PK84 under simulated outdoor conditions. *Journal of Biotechnology and Bioengineering* 69(5), 478-485, DOI:10.1002/1097-0290(20000905)69:5%3C478::AID-BIT2%3E3.0.CO;2-L
- Chaffin, J.D., Bridgeman, T.B., Heckathorn, S.A., Mishra, S., 2011. Assessment of *Microcystis* growth rate potential and nutrient status across a trophic gradient in western Lake Erie. *Journal of Great Lakes Research* 37(1), 92–100, DOI:10.1016/j.jglr.2010.11.016
- Chu, Z., Jin, X., Yang, B., Zeng, Q., 2007. Buoyancy regulation of *Microcystis flosaquae* during phosphorus-limited and nitrogen-limited growth. *Journal of Plankton Research* 29(9), 739-745, DOI: 10.1093/plankt/fbm054
- Custódio, L., Justo, T., Silvestre, L., Barradas, A., Duarte, C.V., Pereira, H., Varela, J., 2011. Microalgae of different phyla display antioxidant, metal chelating and acetylcholinesterase inhibitory activities. *Journal of Food Chemistry* 131, 134–140, DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.08.047
- Dignum, M., Matthijs, H.C.P., Pel, R., Laanbroek, H.J. Mur, L.R., 2005. Nutrient Limitation of Freshwater Cyanobacteria. In Harmful Cyanobacteria; Huisman J. Matthijs HCP. (Eds). Springer: Dordrecht, the Netherlands. Pp. 65–86, DOI: 10.1007/1-4020-3022-3_4
- Chaffin, J.A., Watson, S.B., McCauley, E., 2001. Predicting cyanobacteria dominance in lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 58(10), 1905–1908, DOI: 10.1139/cjfas-58-10-1905
- El-Sheek, M., 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.
- Farhadian, O., Fallahi, M., Mahboubi Soofiani, N., 2013. Effects of different phosphorus concentrations on biomass and growth in green microalgae *Chlorococcum* sp. *Journal of Plant Research* 27(3), 478-489. (in Prsian), DOR: 20.1001.1.23832592.1393.27.3.14.6
- Fernández-Juárez, V., Bennasar-Figueras, A., Sureda-Gomila, A., Ramis-Munar, G., Agawin, S.R.N., 2020. Differential effects of varying concentrations of phosphorus, iron, and nitrogen in N₂-fixing Cyanobacteria. *Frontiers in Microbiology* 11, 541558. DOI: 10.3389/fmicb.2020.541558
- Galhano, V., Figueiredo, D.R., 2011. Morphological, biochemical and molecular characterization of *Anabaena*, *Aphanizomenon* and *Nostoc* strains (Cyanobacteria, Nostocales) isolated from Portuguese freshwater habitats. *Journal of Hydrobiologia* 663, 187-203, DOI: 10.1007/s10750-010-0572-5
- Ghaffar, S., Stevenson, R.J., Khan, Z., 2017. Effect of phosphorus stress on *Microcystis aeruginosa* growth and phosphorus uptake. *PLoS ONE* 12(3), e0174349, DOI: 10.1371/journal.pone.0174349
- Goiris, K., Muylaert, K., Fraeye, I., Foubert, I., De Brabanter, J., De Cooman, L., 2012. Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *Journal of Applied Phycology* 24, 1477–1486, DOI: 10.1007/s10811-012-9804-6
- Goiris, K., Van Colen, W., Wilches, I., Tamariz, F.L., De Cooman, L., Muylaert, K., 2015. Impact of nutrient stress on antioxidant production in three species of microalgae. *Algal Research* (7), 51-57, DOI: 10.1016/j.algal.2014.12.002
- Gorji, M.N., Modarresi, M., Keysami, M., Jamali, F., 2016. Optimization of BG-11 culture medium for increasing antifungal activity of *Cyanobacterium* sp. PGU1 against some plant pathogenic fungi. *Biological Control of Pests and Plant Diseases* 5(1), 49–58, DOI: 10.22059/jbioc.2016.58604

- Hajimahmoodi, M., Faramarzi, M.A., Mohammadi, N., Soltani, N., Oveisi, M.R., Nafissi-Varcheh, N., 2010. Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. *Journal of Applied Phycology* 22, 43-50, DOI:10.1007/s10811-009-9424-y
- Hamouda, R.A.E., Abou-El-Souod, G.W., 2018. Influence of various concentrations of phosphorus on the antibacterial, antioxidant and bioactive components of green microalgae *Scenedesmus obliquus*. *International Journal of Pharmacology* 14(1), 99-107, DOI: 10.3923/ijp.2018.99.107
- Heydary, N., Nejatkhah, P., Ramezanzpour, Z., Sabahi, M., 2009. Effects of different concentrations of phosphorous on the growth of the Cyanobacteria *Jaaginema* sp. and its toxic effects on aquatic organisms. *Journal of Islamic Azad University of Veterinary* 4(2), 15-20. (in Persian).
- Jacobson, L., Halmann, M., 1982. Polyphosphate metabolism in the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Plankton Research* 4(3), 481-488. DOI: 10.1093/plankt/4.3.481.
- Janes van Vuuren, S., Taylor, J., Gerber, A., Van Ginkel, C., 2006. Easy identification of the most common freshwater algae. A guide for the identification of microscopic algae in South Africean freshwater. ISBN 0-621-35471-6.
- Jensen, A., 1978. Chlorophylls and carotenoids. In: Hellebust JA, Craige IS. (ed). Hand book of Phycological Methods. Physiological and Biochemical Methods. Cambridge: Cambridge University Press. p. 59-70.
- Khajehpour, F., Hosseini, A., Ghorbami, R., Shabanpour, B., 2016. Response of *Nostoc calcicola* to phosphorus of medium at different day of culture. *Journal of Aquaculture Development* 10(1), 43-51 (In Prsian), <http://dorl.net/dor/20.1001.1.23223545.1395.10.1.7.7>.
- Kuda, T., Tsunekawa, M., Goto, H., Araki, Y., 2005. Antioxidant properties of four edible algae harvested in the Noto Peninsula, Japan. *Journal of Food Composition and Analysis* 18(7), 625-633, DOI: 10.1016/j.jfca.2004.06.015.
- Li, M., Shi, X., Guo, C., Lin, S., 2016. Phosphorus deficiency inhibits cell division but not growth in the dinoflagellate *Amphidinium carterae*. *Frontiers in Microbiology* 7, 826, DOI: 10.3389/fmicb.2016.00826.
- Manivannan, K., Anantharaman, P., Balasubramanian, T., 2012. Evaluation of antioxidant properties of marine microalga *Chlorella marina* (Butcher, 1952). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2, S342-S346, DOI: 10.1016/S2221-1691(12)60185-3.
- Marker, A.F.H., 1972. The use of acetone and methanol in the estimation of chlorophyll in the presence of phaeophytin. *Freshwater Biology* 2, 361-385, DOI: 10.1111/j.1365-2427.1972.tb00377.x.
- Martinez, M.E., Yang, J., Correa, G., 2000. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalgae *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology* 73, 263-272, DOI: 10.1016/S0960-8524(99)00121-2.
- Morone, J., Alfeus, A., Vasconcelos, V., Martins, R., 2019. Revealing the potential of cyanobacteria in cosmetics and cosmeceuticals-A new bioactive approach. *Algal Research* 41, 101541, DOI: 10.1016/j.algal.2019.101541.
- Mueller, S., Mitrovic, S.M., 2014. Phytoplankton co-limitation by nitrogen and phosphorus in a shallow reservoir: Progressing from the phosphorus limitation paradigm. *Hydrobiologia* 744, 255-269, DOI: 10.1007/s10750-014-2082-3.
- Nalewajko, C.P., Murphy, T., 2001. Effects of temperature, and availability of nitrogen and phosphorus on the abundance of *Anabaena* and *Microcystis* in Lake Biwa, Japan: an experimental approach. *Journal of Limnology* 2, 45-48, DOI: 10.1007/s102010170015.
- Olasehinde, T.A., Odjadjare, E.C., Mabinya, L.V., Olaniran, A.O., Okoh, A.I., 2019. *Chlorella sorokiniana* and *Chlorella minutissima* exhibit antioxidant potentials, inhibit. *Electron. Journal of Biotechnology* 40, 1-9, DOI: 10.1016/j.ejbt.2019.03.008.

- Omori, M., Ikeda, T., 1984. *Methods in Marine Zooplankton Ecology*. (1st Eds). Wiley, J. & Inc, S. New York, USA. 332 p.
- Ota, S., Yoshihara, M., Yamazaki, T., Takeshita, T., Hirata, A., Konomi, M., Oshima, K., Hattori, M., Bisova, K., Zachleder, V. *et al.*, 2016. Deciphering the relationship among phosphate dynamics, electron-dense body and lipid accumulation in the green alga *Parachlorella kessleri*. *Scientific Reports* 6, 25731.
- Paerl, H.W., Xu, H., McCarthy, M.J., Zhu, G., Qin, B., Li, Y., Gardner, W.S., 2011. Controlling harmful cyanobacterial blooms in a hyper-eutrophic lake (Lake Taihu, China): The need for a dual nutrient (N & P) management strategy. *Water Research* 45, 1973–1983, DOI: 10.1016/j.watres.2010.09.018
- Prairie, Y.T., Duarte, C. M., Kalff, J. 1989. Unifying nutrient chlorophyll relationship in lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 46, 1176-1182, DOI: 10.1139/f89-153
- Procházková, G., Brányiková, I., Zachleder, V., Brányik, T., 2013. Effect of nutrient supply status on biomass composition of eukaryotic green microalgae. *Journal of Applied Phycology* 26, 1359–1377, DOI: 10.1007/s10811-013-0154-9
- Rabouille, S., Salencon, M.J., 2005. Functional analysis of *Microcystis* vertical migration: a dynamic model as a prospecting tool. II. Influence of mixing, thermal stratification and colony diameter on biomass production. *Aquatic Microbial Ecology* 39(3), 281–292, DOI: 10.3354/ame039281
- Radkova, R., Stefanova, K., Uzunov, B., Gärtner, G., Stoyneva-Gärtner, M., 2020. Morphological and molecular identification of microcystin-producing Cyanobacteria in nine shallow Bulgarian water bodies. *Journal of Toxins* 12(39), 1-24, DOI: 10.3390/toxins12010039
- Rico, M., 2013. Ló pez A, Santana-Casiano JM, Gonzá lez JM, Gonzá lez-Dá vila M. Variability of the phenolic profile in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* growing under copper and iron stress. *Limnology and Oceanography* 58, 144–152, DOI: 10.4319/lo.2013.58.1.0144
- Rippka, R., 1988. Isolation and purification of Cyanobacteria. *Methods in Enzymology* 167, 3-27, DOI: 10.1016/0076-6879(88)67004-2
- Safari, M., Ahmadi-Asbechin, S., Soltani, N., 2015. In vitro assessment of antimicrobial activity from aqueous and methanolic extracts of some species of cyanobacteria. *Biological Journal of Microorganism* 14, 111-130, DOI: 10.5281/zenodo.3463632.
- Sarkheil, M., Ameri, M., Safari, O., 2021. Application of alginate-immobilized microalgae beads as biosorbent for removal of total ammonia and phosphorus from water of African cichlid (*Labidochromis lividus*) recirculating aquaculture system. *Environmental Science and Pollution Research* 29(8), 11432-11444, DOI: 10.1007/s11356-021-16564-w.
- Schachtman, P., Reid, R., Ayling, S., 1998. Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Journal of Plant Physiology* 116, 447-453, DOI: 10.1104/pp.116.2.447
- Singh, R., Parihar, P., Singh, M., Bajguz, A., Kumar, J., Singh, S., Singh, V.P., Prasad, S.M., 2017. Uncovering potential applications of Cyanobacteria and algal metabolites in biology, agriculture and medicine: Current status and future prospects. *Front Microbiology* 8, 515, DOI: 10.3389/fmicb.2017.00515
- Smith, S.V., 1984. Phosphorus versus nitrogen limitation in the marine environment. *Limnology and Oceanography* 29, 1149-1160, DOI: 10.4319/lo.1984.29.6.1149
- Stanier, R.Y., Kunisawa, R., Mandel, M., Cohen-Bazire, G., 1971. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriological Reviews* 35, 171-205, DOI: 10.1128/br.35.2.171-205.1971
- Stratil, P., Klejdus, B., Kubáň, V., 2006. Determination of Total Content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables evaluation of spectrophotometric methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(3), 607-616, DOI: 10.1021/jf052334j

- Tsukada, H., Tsujimura, S., Nakahara, H., 2006. Effect of nutrient availability on the C, N, and P elemental ratios in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Limnology* 7(3), 185-192, DOI: 10.1007/s10201-006-0188-7
- Verspagen, J.M., Snelder, E.O., Visser, P.M., Huisman, J., Mur, L.R. Ibelings, B.W., 2004. Recruitment of benthic *Microcystis* (Cyanophyceae) to the water column: internal buoyancy changes or resuspension. *Journal of Phycology* 40(2), 260-270, DOI: 10.1111/j.1529-8817.2004.03174.x
- Widjaja, A., Chien, C.C., Ju, Y.H., 2009. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 40, 13-20, DOI: 10.1016/j.jtice.2008.07.007
- Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G., Ying-xue, S., 2010. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology* 101, 5494-5500, DOI: 10.1016/j.biortech.2010.02.016
- Xiong, J., Kurade, M.B., Kim, J.R., Roh, H., Jeon, B., 2017. Ciprofloxacin toxicity and its co-metabolic removal by a freshwater microalga *Chlamydomonas mexicana*. *Journal of Hazardous Materials* 323, 212-219, DOI: 10.1016/j.jhazmat.2016.04.073
- Xu, H., Paerl, H.W., Qin, B., Zhu, G., Gao, G., 2010. Nitrogen and phosphorus inputs control phytoplankton growth in eutrophic Lake Taihu, China. *Limnology and Oceanography* 55, 420-432, DOI: 10.4319/lo.2010.55.1.0420
- Yang, F.F., Xiang, W., Li, T., Long, L., 2018. Transcriptome analysis for phosphorus starvation-induced lipid accumulation in *Scenedesmus* sp. *Scientific Reports* 8, 1-11, DOI: 10.1038/s41598-018-34650-x
- Yoon, J.H., Shin, J.H., Ahn, E.K., Park, T.H., 2008. High cell density culture of *Anabaena variabilis* with controlled light intensity and nutrient supply. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 18(5), 918-925, DOI: 10.1038/s41598-018-34650-x
- Zarinmehr, M.J., Farhadian, O., Peykan Heiraty, F., Keramat, J., 2021. Effect of different phosphorus concentrations on the growth rate and biochemical composition of golden-brown alga *Isochrysis galbana*. *Journal of Plant process and function* 9(36), 413-424. (in Persian). DOI: 10.3856/vol47-issue2-fulltext-17.
- Zhang, W., Feng, Y., 2008. Characterization of nitrogen-fixing moderate halophilic cyanobacteria isolated from saline soils of Songnen Plain in China. *Progress in Natural Science* 18, 769-773, DOI: 10.1016/j.pnsc.2008.01.022