

اثر غلظت‌های مختلف کبالت بر رشد، برخی ترکیبات بیوشیمیایی و پروفایل اسیدهای چرب ریزجلبک *Isochrysis galbana*

حسین اسکندرنیا^۱، مهدی شمسایی مهرجان^{۲*}، هومن رجبی اسلامی^۲، مهدی سلطانی^۲، ابوالقاسم کمالی^۴

تاریخ دریافت: آذر ۹۸

تاریخ پذیرش: فروردین ۹۹

چکیده

تغییر در غلظت مواد مغذی یکی از راهکارهای موثر در بهبود زیست‌توده و ارزش غذایی ریزجلبک‌ها محسوب می‌شود. در مطالعه حاضر اثر غلظت‌های مختلف کبالت (۰/۰۱، ۰/۰۰۱، ۰/۱، ۱ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر) بر تراکم سلولی، کلروفیل‌های a و b، چربی، پروفایل اسیدهای چرب، عددهای یدی و صابونی ریزجلبک *Isochrysis galbana* به مدت دو هفته مورد بررسی قرار گرفت. افزودن ۰/۰۰۱ میلی‌گرم در لیتر کبالت موجب بهبود معنی‌دار در کلروفیل‌های a (۳/۲۱۱۸ میلی‌گرم در لیتر) و b (۲/۰۰۱ میلی‌گرم در لیتر)، محتوای چربی (۲۴/۰۹ درصد) و پروتئین (۵۳/۹۱ درصد) در مقایسه با تیمارهای دیگر شد ($P < 0/05$). بیشترین میزان اسید چرب اشباع (۴۷/۸۳ درصد) در تیمار ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کبالت مشاهده شد، در حالی که کاهش کبالت تا مقدار ۰/۰۰۱ میلی‌گرم در لیتر سبب افزایش اسیدهای چرب تک غیراشباع (MUFA) و چند غیراشباع (PUFA) شد. همچنین، بیشترین و کمترین میزان عدد یدی و عدد صابونی نیز به ترتیب در غلظت‌های ۰/۰۰۱ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کبالت مشاهده شد. به طور کلی، غلظت ۰/۰۰۱ میلی‌گرم در لیتر کبالت میزان کلروفیل، محتوای چربی، پروتئین و PUFA ریزجلبک *I. galbana* را ارتقا بخشید، با این وجود تغییر غلظت بهینه کبالت تاثیر منفی بر رشد داشت.

واژگان کلیدی: کبالت، *Isochrysis galbana*، چربی، اسید چرب، ترکیبات بیوشیمیایی.

- ۱- دانشجوی دکتری شیلات، گروه شیلات، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
- ۲- دانشیار گروه شیلات، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
- ۳- استاد گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
- ۴- استاد گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

* نویسنده مسئول: m.shamsaie@srbiau.ac.ir

مقدمه

اسیدهای چرب غیراشباع، مکمل‌های غذایی و رنگدانه‌ها را دارند که برخی از این ترکیبات، قابلیت استفاده در منابع غذایی انسان را نیز دارند (Valderrama et al., 2003; Craigie, 2011). با این وجود استفاده روز افزون از فلزات سنگین یکی از مهم‌ترین معضلات زیست‌محیطی جهان به ویژه در اکوسیستم‌های آبی است که بر رشد، فتوسنتز و تنفس جلبک‌ها اثر گذاشته و باعث تغییر در رشد و وضعیت بیوشیمیایی این ریزجلبک‌ها شده است. هر چند، برخی از این فلزات سنگین در غلظت‌های پایین نقش مهمی در فرآیندهای فیزیولوژیکی ریزجلبک‌ها ایفا می‌کنند.

کبالت از جمله ریز مغذی‌های مهم در کشت ریز جلبک‌ها محسوب می‌شود. این عنصر چهار درصد از وزن ویتامین B₁₂ را در کشت ریزجلبک‌ها تشکیل می‌دهد و به عنوان یک کوفاکتور نقش مهمی را در انجام واکنش‌های مختلف درون سلولی ایفا می‌کند (Cheng et al., 2015). بنابراین با هر گونه تغییر در غلظت‌های بهینه این ریز مغذی ضروری در شرایط طبیعی و آزمایشگاهی انتظار می‌رود تغییراتی در ترکیبات ساختاری و ارزش غذایی ریزجلبک‌ها ایجاد شود. برای نمونه، Chia و

جلبک‌های تک سلولی، میکروارگانیزم‌های پروکاریوت و یا یوکاریوتی هستند که با توجه به ساختار تک سلولی و یا چند سلولی ساده، توانایی رشد سریع و زندگی در شرایط سخت را دارند (Mata et al., 2010). علاوه بر این، جلبک‌ها نقش به‌سزایی در حل مشکلات مربوط به کمبود مواد غذایی و تولید انرژی‌های تجدید شونده دارند (Chaumont, 1993; Nigam and Singh, 2011). جلبک‌ها، همانند گیاهان، از طریق فرآیند فتوسنتز و تبدیل انرژی خورشید به مواد شیمیایی، قادر به تولید و ذخیره ترکیبات پرانرژی از جمله کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها و چربی‌ها هستند (Ozkurt, 2009). امروزه پژوهش درباره کاربردهای چندگانه جلبک‌ها رو به رشد است که علت آن نیز قابلیت رشد سریع و سازگار شدن جلبک‌ها با شرایط گوناگون محیط‌های پرورشی است. همچنین امکان تولید متراکم جلبک‌ها در محیط کشت، یکی از امتیازات برجسته آن‌ها است که امکان تولید تجاری محصولات مختلف را از جلبک‌ها در سیستم‌های باز یا بسته فراهم می‌کند (Ugwu et al., 2008; Posten and Schaub, 2009). علاوه بر این، جلبک‌ها توانایی تولید ترکیبات با ارزشی همچون

می‌تواند در تولید سوخت زیستی نیز استفاد شود (Jalal et al., 2013). بنابراین با توجه به نقش ریزمغذی کبالت در فرآیندهای فیزیولوژیکی ریزجلبک‌ها، سطوح مختلف این عنصر به مدت دو هفته بر رشد، محتوای کلروفیل و ترکیبات ساختاری ریزجلبک *I. galbana* مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

شرایط کشت جلبک

برای انجام آزمایش، ذخیره اولیه ریزجلبک *Isochrysis galbana* از موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور واقع در بندر ماهشهر تهیه شدند. در این آزمایش از محیط کشت F2 استفاده شد (Guillard and Ryther, 1962) که حاوی NaNO_3 (۷۵ میلی‌گرم در لیتر)، $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (۶ میلی‌گرم در لیتر)، ویتامین B_{12} (۰/۰۰۰۵ میلی‌گرم در لیتر)، ویتامین H (۰/۰۰۰۵ میلی‌گرم در لیتر)، ویتامین B_1 (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر)، Na_2EDTA (۴/۱۶ میلی‌گرم در لیتر)، $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (۳/۱۵ میلی‌گرم در لیتر)، $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر)، $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (۰/۰۲۲ میلی‌گرم در لیتر)، $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (۰/۱۸ میلی‌گرم در لیتر)،

همکاران (۲۰۱۳) گزارش دادند که کاهش این عنصر به میزان ۵۰ درصد در محیط کشت موجب کاهش رشد و افزایش میزان لیپید در ریزجلبک *Chlorella vulgaris* می‌شود. همچنین El-Sheekh و همکاران (۲۰۰۳) مشاهده کردند که استفاده از کبالت به میزان ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر منجر به بهبود معنی‌دار در میزان کلرفیل‌های a و b و میزان کاروتنوئید در ریزجلبک *Monoraphidium minutum* نسبت به گروه شاهد شد. تجمع لیپید در غلظت‌های خارج از حد بهینه کبالت در ریزجلبک‌های مختلف ممکن است به دلیل نقش این عنصر در فرآیندهای فیزیولوژیکی سلول، اختلال در فرآیند فتوسنتز و افزایش تجمع چربی (از طریق تغییر در فعالیت آنزیم پروفیرین کبالت) به عنوان یک منبع انرژی قابل دسترس به منظور سازگاری با شرایط استرس باشد (Cheng et al., 2015).

ریز جلبک *Isochrysis galbana* یک ریزجلبک تجاری متعلق به خانواده Isochrysidaceae است که به خاطر دارا بودن سطوح بالایی از اسیدهای چرب غیراشباع، آنتی‌اکسیدان فوکوگزانتین و پروتئین کاربرد بالایی در تغذیه آبزیان، صنایع غذایی و دارویی دارد و در صورت بهبود رشد و میزان چربی،

ظروف پرورشی معرفی شد. دما و شدت نور به ترتیب در 25 ± 1 درجه سانتی گراد و ۱۵۰ میکرومول فوتون بر متر مربع در ثانیه (۱۰:۱۴ تاریکی: روشنایی)، تنظیم شدند.

اندازه‌گیری رشد جلبک

میزان رشد از طریق شمارش زیر لوپ (SMZ745, Nikon, ژاپن) و با استفاده از لام هموسیستمتر انجام شد. به منظور شمارش، پس از همگن کردن محیط کشت ریزجلبک، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون ریزجلبکی به میکروتیوب منتقل شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از نمونه توسط سمپلر به روی لام منتقل و با عدسی شیئی $\times 40$ میکروسکوپ نوری (E200, Nikon, ژاپن) شمارش شد و تعداد سلول‌ها (N) در هر میلی‌لیتر با استفاده از رابطه ۱ محاسبه شد (Salama et al., 2014).

رابطه ۱:

$$N (\text{mL}^{-1}) = N_c \times C \times 10^4$$

N_c : میانگین تعداد سلول در ۵ مربع متوسط لام هموستومتر؛ C: ضریب رقت.

برداشت جلبک از محیط کشت

پس از پایان مرحله پرورش، فاکون‌های حاوی جلبک در دستگاه سانتریفیوژ (Micro Hettich, 220R, آلمان) با سرعت ۸۰۰۰ دور

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر) و $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (۰/۰۰۷ میلی‌گرم در لیتر) بود.

کشت جلبک در ظروف پلاستیکی ۳ لیتری شفاف در شوری ۲۵ گرم در لیتر و pH ۷ انجام گرفت. تمامی ظروف، وسایل هوادهی و محل استقرار جلبک‌های آزمایشی، پیش از آغاز عملیات تولید، با استفاده از محلول ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر کلر ضد عفونی شدند. آب مقطر مورد استفاده در آزمایش نیز ابتدا به مدت ۲۰ دقیقه با جوشاندن در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس ضد عفونی شد و پس از سرد شدن مورد استفاده قرار گرفت. هوادهی مداوم نیز از خلال فیلترهای هوا صورت می‌گرفت تا هیچ گونه آلودگی از طریق هوا وارد محیط‌های پرورش جلبک‌ها نشود. تیمار شاهد را محیط کشت F2 تشکیل می‌داد که میزان کلرید کبالت آن ۰/۰۱ میلی‌گرم بود. تیمارهای بعدی را به ترتیب مقادیر ۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۱ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کلرید کبالت در محیط کشت تشکیل می‌دادند (هر تیمار با سه تکرار). که همگی در آزمایشگاه شیلات مجتمع آزمایشگاهی واحد علوم و تحقیقات تهران دانشگاه آزاد اسلامی تهیه شدند. سپس ذخیره آغارین جلبک‌های *I. galbana* در مجاورت شعله به هر یک از

W_0 : وزن میکروفیلتر بدون ریزجلبک (گرم)؛ W_1 : وزن میکروفیلتر با ریزجلبک (گرم).

اندازه‌گیری مقدار کلروفیل‌های a و b

اندازه‌گیری کلروفیل‌های a و b به روش Lorenzen (۱۹۶۷) انجام شد. در این روش، ۵۰ میلی‌لیتر از جلبک از طریق صافی واتمن به شماره ۳ فیلتر شد. به نمونه جلبک‌های فیلتر شده استون ۹۰ درصد اضافه شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ صورت گرفت. جذب نوری محلول به دست آمده در طول موج‌های ۶۴۶/۶ و ۶۶۳/۶ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر (T80, PG Instruments, انگلستان) خوانده شد و مقدار کلروفیل‌های a و b از رابطه‌های ۳ و ۴ محاسبه شد (Rastar et al., 2018).

رابطه ۳:

$$\text{Chlorophyll a (mg/L)} = 12.25A_{663.6} - 2.25A_{646.6}$$

$A_{663.6}$: جذب در طول موج ۶۶۳/۶ نانومتر؛ $A_{646.6}$: جذب در طول موج ۶۴۶/۶ نانومتر.

رابطه ۴:

$$\text{Chlorophyll b (mg/L)} = 20.31A_{646.6} - 2.25A_{663.6}$$

$A_{646.6}$: جذب در طول موج ۶۴۶/۶ نانومتر؛ $A_{663.6}$: جذب در طول موج ۶۶۳/۶ نانومتر.

در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد (Hsieh and Wu, 2009). سپس توده جلبک به دست آمده توسط آون در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک شد.

سنجش وزن خشک ریزجلبک

تعیین وزن خشک ریزجلبک در این مطالعه جز شاخص‌های کلیدی است که به صورت زیر اندازه‌گیری شد:

۱۰ میلی‌لیتر از هر نمونه برداشت شد و به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس سلول‌ها دو مرتبه با آب مقطر شستشو داده شدند. میکروفیلترهای شیشه‌ای فاقد نمونه در آون در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک و سپس وزن شدند. وزن خشک فیلترهای شیشه‌ای به عنوان W_0 در نظر گرفته شدند. میکروفیلترهای حاوی جلبک نیز به مدت ۲۴ ساعت در آون ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد خشک شدند و به عنوان W_1 در نظر گرفته شدند و وزن خشک (W_D) بر اساس رابطه ۲ محاسبه شد (Ding et al., 2019).

رابطه ۲:

$$W_D \text{ (g/L)} = [(W_1 - W_0) / 10] \times 1000$$

استخراج چربی و بررسی ترکیب اسیدهای چرب

تعیین میزان کل اسیدهای چرب و استخراج چربی با استفاده از روش Bligh و Dyer (۱۹۵۹) انجام گرفت. به این منظور ۱۰۰ میلی‌گرم نمونه خشک شده جلبک به ۳ میلی‌لیتر محلول متانول/کلروفرم با نسبت ۱:۲ اضافه شد و مخلوط به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سوسپانسیون به دست آمده به مدت ۳ دقیقه با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. نمونه حاوی کلروفرم و چربی به درون لوله آزمایش توزین شده انتقال داده شد. در مرحله آخر لوله‌های آزمایش به مدت ۲ ساعت درون آن با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا کلروفرم تبخیر شود لوله‌های آزمایش مجدداً توزین شدند و سپس درصد چربی زیست‌توده محاسبه شد.

به منظور بررسی پروفایل اسید چرب ۰/۰۲ گرم از ماده خشک ریزجلبک داخل ویال ۲ میلی‌لیتری ریخته و به آن ۵۰۰ میکرولیتر متانول اضافه شد. سپس درب ویال‌ها با پارافیلیم به دقت پوشانده شد تا از تبخیر متانول جلوگیری شود. ویال‌ها طی ۲۰ ثانیه ورتکس

(IKA, MS3, آلمان) شده، به مدت ۲ ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق سرد شدند. در مرحله بعد ۳۰۰ میکرولیتر از محلول سدیم کلراید ۰/۹ درصد و ۱۵۰ میکرولیتر هگزان به آن‌ها اضافه و طی ۲۰ ثانیه ورتکس شدند. سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و بعد با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. در این مرحله دو فاز تشکیل شد. از فاز بالایی یک میکرولیتر به دستگاه گاز کروماتوگرافی (Shimadzu, QP2010, ژاپن) حاوی نیتروژن، فشار ۰/۷۶ بار همراه با شدت جریان ۲/۱ میلی‌لیتر در دقیقه، ستون کاپیلار EC-۱۰۰۰ با ماهیت قطبی از جنس شیشه به طول سی متر و قطر ۰/۳۲ میلی‌متر تزریق شد. پس از تزریق نمونه به دستگاه کروماتوگرافی گازی، منحنی رسم شد و زمان بازداری مربوط به هر اسید چرب با منحنی مربوط با نمونه استاندارد (Sigma-Aldrich, آلمان) و زمان بازداری آن مقایسه شد. به این ترتیب نوع و میزان اسیدهای چرب موجود در نمونه مورد آزمایش بر حسب درصد مشخص شد (Guan et al., 2011).

استخراج پروتئین

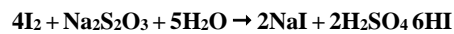
برای بررسی میزان پروتئین ذخیره شده در تیمارهای مختلف ابتدا نیتروژن کل با استفاده روش کج‌لدال استخراج شد (AOAC, 2005). سپس برای تعیین مقدار پروتئین کل از ضریب تبدیل نیتروژن به پروتئین در ریزجلبک‌ها (AOAC, 2005) استفاده شد ($N \times 4/78$).

معنی‌دار بین تیمارها پس از تأیید نرمال بودن توزیع داده‌ها، از طریق آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) داده‌ها در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P < 0/05$) بررسی شد. مقایسه میانگین شاخص‌های مورد بررسی در تیمارهای مختلف نیز توسط پس‌آزمون Tukey's HSD صورت گرفت. نمودارها نیز به کمک نرم‌افزار Microsoft Excel 2013 رسم شدند.

اندازه‌گیری عدد یدی و صابونی

محاسبه عدد یدی نمونه چربی با استفاده از تیتراسیون تیوسولفات با توجه به واکنش ۱ انجام شد (Bondioli et al., 2012). سپس با استفاده از رابطه ۵ میزان عدد صابونی (SV) محاسبه شد (Bondioli et al., 2012).

واکنش ۱:



رابطه ۵:

$$SV \text{ (mg KOH/g Oil)} = (V_{St} \times V_S \times M) / W$$

V_{St} : حجم KOH مصرف شده در تیتراسیون محلول استاندارد؛ V_S : حجم KOH مصرف شده در تیتراسیون نمونه؛ M : جرم مولکولی KOH (۵۶/۱) گرم در مول؛ W : وزن نمونه روغن.

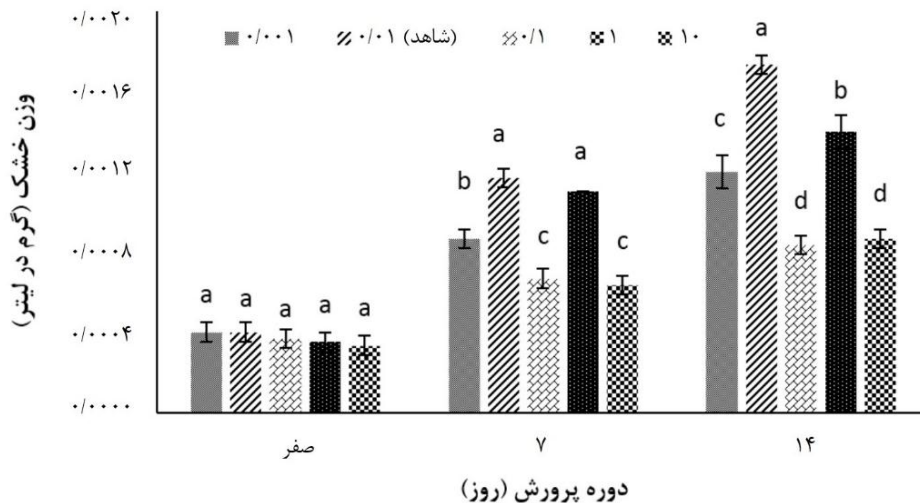
تجزیه و تحلیل داده‌ها

تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS-16 صورت گرفت. وجود یا عدم وجود اختلافات

نتایج

وزن خشک جلبک

تأثیر سطوح مختلف کبالت بر وزن خشک ریزجلبک *Isochrysis galbana* در روزهای مختلف در شکل ۱ نشان داده شده است. بر اساس نتایج به دست آمده میزان وزن خشک در تیمارهای ۱۰، ۰/۱ و ۰/۰۰۱ در روز هفتم و همه تیمارهای آزمایشی در روز چهاردهم کاهش معنی‌داری را نسبت گروه شاهد (۰/۰۱) نشان داد. علاوه بر این، بیشترین میزان وزن خشک ریزجلبک در انتهای دوره پرورش (۰/۰۰۱۷ گرم در لیتر) در گروه شاهد و کمترین میزان در تیمار ۱۰ (۰/۰۰۰۸۴ گرم در لیتر) و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر کلرید کبالت (۰/۰۰۰۸۲ گرم در لیتر) مشاهده شد.



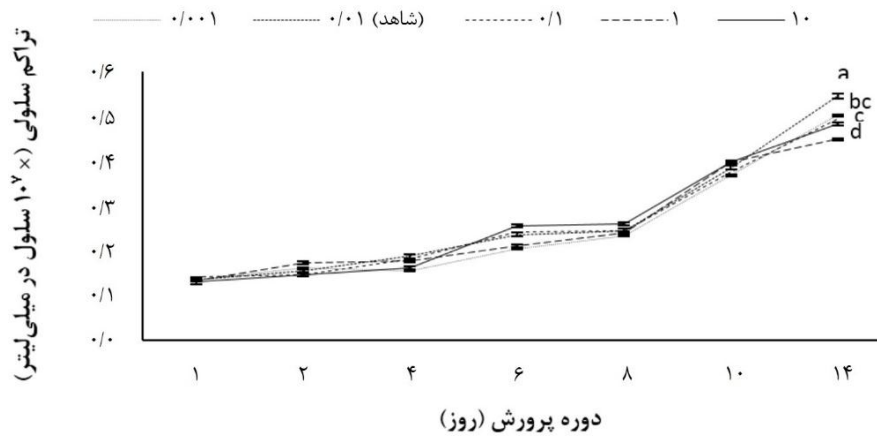
شکل ۱: نمودار تغییرات وزن خشک جلبک *Isochrysis galbana* در غلظت‌های مختلف کبالت (میلی‌گرم در لیتر) (میانگین \pm انحراف معیار). در هر دوره نمونه برداری، وجود حروف متفاوت روی ستون‌ها نشان دهنده اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.05$).

تراکم سلولی جلبک

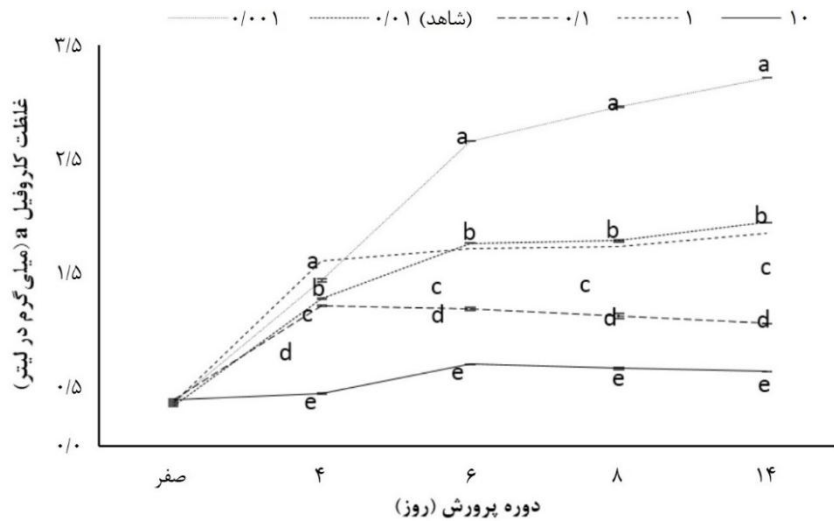
شکل ۲ تغییرات تراکم سلولی جلبک *I. galbana* را در روزهای ۱، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۱۴ نشان می‌دهد. در انتهای دوره پرورش بیشترین تراکم سلولی (۰/۵۵ سلول در میلی‌لیتر) در تیمار شاهد (حاوی ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر کبالت) مشاهده شد که با تیمارهای دیگر تفاوت معنی‌داری را نشان داد. همچنین کمترین تراکم سلولی (۰/۴۵ سلول در میلی‌لیتر) نیز در تیمار حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر کلرید کبالت مشاهده شد.

کلروفیل a

بر اساس شکل ۳ میزان کلروفیل a ریزجلبک در روزهای مختلف دوره پرورش در غلظت‌های مختلف کبالت، تحت تاثیر قرار گرفت. بیشترین میزان تجمع کلروفیل a در روزهای مختلف در غلظت ۰/۰۰۱ میلی‌گرم در لیتر کبالت مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری را با گروه‌های آزمایشی دیگر نشان داد. همچنین کمترین میزان ذخیره کلروفیل a در تمامی روزهای پرورش در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کبالت مشاهده شد.



شکل ۲: نمودار تغییرات تراکم سلولی جلبک *Isochrysis galbana* در غلظت‌های مختلف کبالت (میلی گرم در لیتر) (میانگین \pm انحراف معیار). وجود حروف متفاوت (در روز آخر) نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارها است ($P < 0.05$).



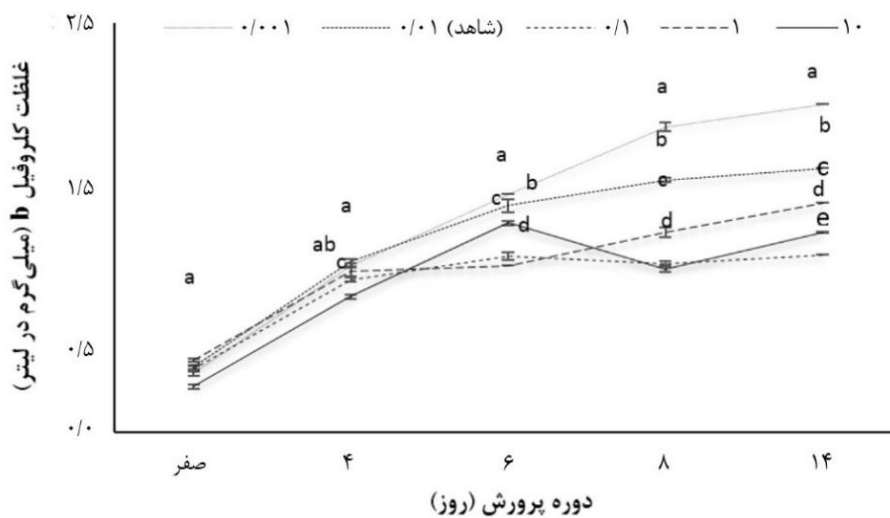
شکل ۳: نمودار تغییرات کلروفیل a در جلبک *Isochrysis galbana* در غلظت‌های مختلف کبالت (میلی گرم در لیتر) (میانگین \pm انحراف معیار). در هر دوره نمونه برداری، وجود حروف متفاوت روی نمودار نشان دهنده اختلاف معنی دار است ($P < 0.05$).

کلروفیل b

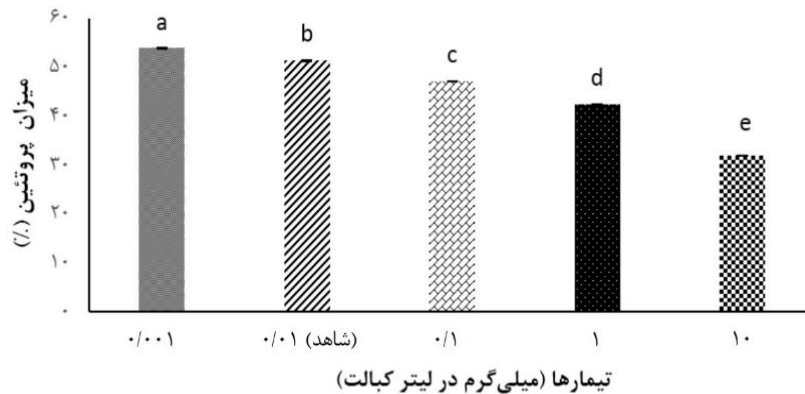
غلظت‌های مختلف کبالت اختلافات معنی‌داری را بر میزان تجمع کلروفیل b در جلبک *I. galbana* در دوره پرورش نشان داد (شکل ۴). در انتهای دوره پرورش بیشترین تجمع کلروفیل b در غلظت ۰/۰۰۱ میلی‌گرم در لیتر کبالت (۲/۰۰۱ میلی‌گرم در لیتر) و کمترین میزان ذخیره کلروفیل b به ترتیب در غلظت‌های ۰/۱ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کبالت (۱/۰۸ و ۱/۲۲ میلی‌گرم در لیتر) به دست آمد. (شکل ۴).

پروتئین

تاثیر غلظت‌های مختلف کبالت بر میزان پروتئین در انتهای دوره پرورش در شکل ۵ نشان داده شده است. بر این اساس کاهش غلظت کبالت در محیط، اثر معنی‌داری بر افزایش پروتئین در سلول جلبک‌ها داشت (شکل ۵). بیشترین میزان پروتئین (۵۳/۹۱ درصد) در محیط کشت ۰/۰۰۱ میلی‌گرم در لیتر کبالت ثبت شد. افزایش یون کبالت در محیط باعث کاهش تولید پروتئین در سلول‌ها شد به نحوی که کمترین میزان پروتئین (۳۱/۸۷ درصد) در تیمار ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کبالت ثبت شد.



شکل ۴: نمودار تغییرات کلروفیل b در جلبک *Isochrysis galbana* در غلظت‌های مختلف کبالت (میلی‌گرم در لیتر) در (میانگین \pm انحراف معیار). در هر دوره نمونه‌برداری، وجود حروف متفاوت روی نمودار نشان دهنده اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.05$).



شکل ۵: نمودار تغییرات پروتئین (درصد در وزن خشک) جلبک *Isochrysis galbana* در غلظت‌های مختلف کبالت (میانگین \pm انحراف معیار). وجود حروف متفاوت روی ستون‌ها نشان دهنده اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.05$).

هنیکوزانویک (C21:0)، وکسنیک (C18:1t)، پولینیک (C18:1c)، لینولئیک (C18:2c)، آلفا لینولینیک (C18:3n3) و گاما لینولینیک (C18:3n6) جزء اسیدهای چرب غالب موجود در جلبک *I. galbana* بودند (جدول ۱). شکل ۷ نشان می‌دهد اضافه کردن ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کبالت به محیط کشت، باعث افزایش چشمگیر تمامی اسیدهای چرب اشباع شد (۴۷/۸۳ درصد). پالمیتیک اسید (C16:0) با اضافه کردن ۱۰ میلی‌گرم در لیتر یون کبالت به محیط کشت به بالاترین میزان خود (۴۲/۱۸ درصد) در مقایسه با تیمار شاهد (۲۸/۸۳ درصد) رسید. همچنین مقدار تمامی اسیدهای چرب غیراشباع با یک پیوند دوگانه

چربی کل

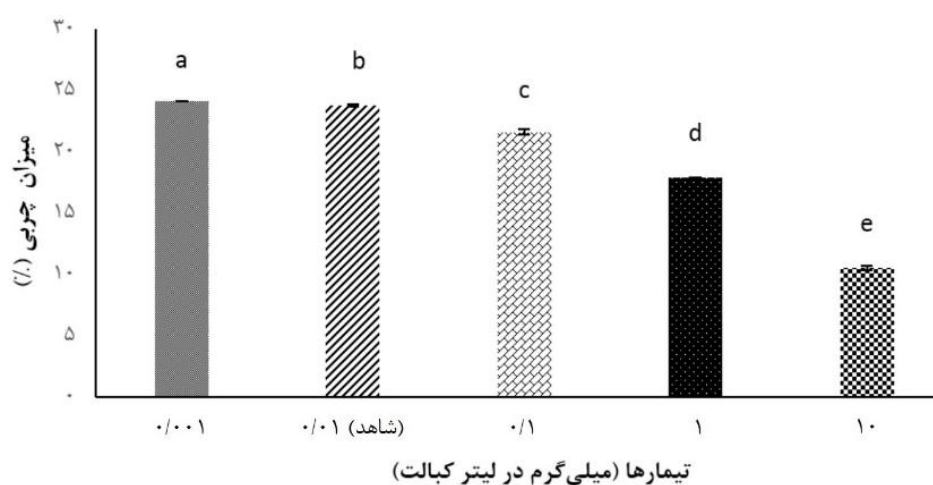
بر اساس شکل ۶ محتوای چربی جلبک *I. galbana* تحت سطوح مختلف کبالت تغییرات معنی‌داری را نشان داد. در مورد چربی همانند پروتئین با افزایش غلظت کبالت میزان تجمع چربی در سلول کاهش یافت بر این اساس بیشترین میزان چربی در تیمار حاوی ۰/۰۰۱ میلی‌گرم در لیتر کبالت (۲۴/۰۹ درصد) مشاهده شد. کمترین میزان ذخیره چربی (۱۰/۴۹ درصد) در تیمار حاوی ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کبالت ثبت شد.

اسیدهای چرب

نتایج بررسی پروفایل اسیدهای چرب نشان داد که اسیدهای چرب پالمیتیک (C16:0)،

نتایج مشابه در مورد اسیدهای چرب چند غیراشباع (Polyunsaturated Fatty Acids:) (PUFA) نشان داد که افزایش کبالت در محیط کشت اثر منفی بر ذخیره اسیدهای چرب غیراشباع (MUFA و PUFA) داشت. با توجه به شکل ۷، بالاترین میزان PUFA (۳۲/۷۵ درصد) در تیمار دارای ۰/۰۰۱ میلی گرم در لیتر کبالت دیده شد که اختلاف معنی داری را با گروه شاهد و تیمار ۱۰ میلی گرم در لیتر نشان داد.

(Monounsaturated Fatty Acids:) MUFA) با افزایش یون کبالت در محیط کشت، روندی کاهشی نشان دادند به نحوی که کمترین مقدار آن‌ها (۲۴/۳۱۵ درصد) در تیمار حاوی ۱ میلی گرم در لیتر کبالت مشاهده شد. علاوه بر این، بیشترین میزان MUFA (۳۱/۸۹ درصد) در تیماری مشاهده شد که دارای کمترین غلظت کبالت (۰/۰۰۱ میلی گرم در لیتر) در محیط کشت بود.



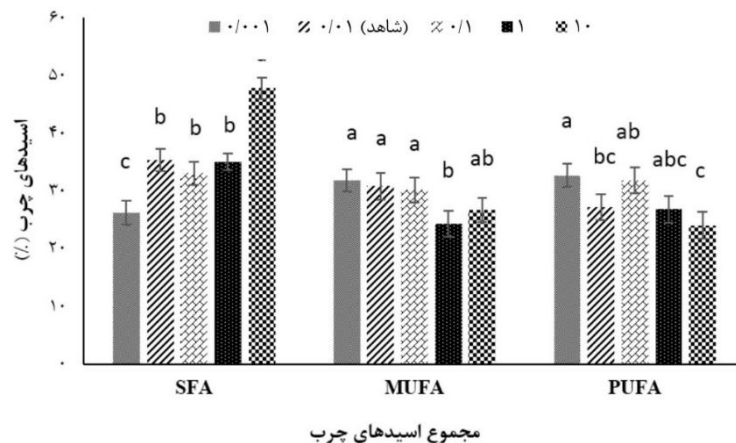
شکل ۶: نمودار تغییرات چربی کل (درصد در وزن خشک) جلبک *Isochrysis galbana* در غلظت‌های مختلف کبالت (میانگین \pm انحراف معیار). وجود حروف متفاوت روی ستون‌ها نشان دهنده اختلاف معنی دار است ($P < 0/05$).

جدول ۱: پروفایل اسیدهای چرب *Isochrysis galbana* تحت تاثیر سطوح مختلف کبالت

غلظت‌های مختلف کبالت (میلی گرم در لیتر)					نوع اسید چرب (درصد)
۰/۰۰۱	۰/۰۱	۰/۱	۱	۱۰	
۳/۱۸۰	۳/۰۶۵	۱/۶۰۵	۱/۵۹۵	۲/۷۸۰	اسید چرب میریستیک (C14:0)
۰/۴۴۵	۱/۰۹۰	۰/۷۷۰	۱/۳۶۰	۰/۵۴۰	اسید چرب پنتادکانوئیک (C15:0)
۲۰/۳۱۰	۲۸/۸۳۰	۲۷/۷۴	۲۷/۱۲۵	۴۲/۱۸۵	اسید چرب پالمیتیک (C16:0)
۰/۱۷۰	۰/۳۰۰	۰/۳۰۵	۰/۳۲۵	۰/۲۱۵	اسید چرب مارگاریک (C17:0)
۱/۳۷۵	۱/۳۸۵	۱/۹۱۵	۳/۷۵۶	۱/۲۹۵	اسید چرب استیریک (C18:0)
۰/۲۱۵	۰/۴۲۵	۰/۳۹۵	۰/۵۶۵	۰/۶۳۵	اسید چرب هنیکوزانوئیک (C21:0)
۰/۳۰۰	۰/۱۸۵	۰/۲۱۵	۰/۱۳۰	۰/۰۵۵	اسید چرب بهنیک (C22:0)
۰/۲۶۰	۰/۱۴۰	۰/۱۳۰	۰/۲۲۵	۰/۱۲۵	اسید چرب ایگنوسریک (C24:0)
۲۶/۲۵۵	۳۵/۴۲۰	۳۳/۰۷	۳۵/۰۹۰	۴۷/۸۳۰	اسید چرب اشباع (SFA)
۰/۷۴۰	۱/۴۴۵	۱/۰۷۰	۱/۴۵۵	۰/۴۰۰	اسید چرب میریستولنیک (C14:1)
۱۲/۸۲۰	۱۳/۱۶۵	۸/۶۳۵	۳/۱۶۵	۳/۵۱۵	اسید چرب پنتایکانوئیک (C15:1)
۳/۵۳۵	۳/۲۰۵	۴/۵۶۵	۳/۸۹۵	۴/۹۳۵	اسید چرب پالمیتولنیک (C16:1)
۰/۳۶۵	۰/۴۴۰	۰/۴۸۰	۰/۴۸۵	۰/۷۲۵	اسید چرب هپتادکانوئیک (C17:1)
۵/۶۶۵	۳/۰۹۰	۵/۳۵۰	۴/۰۸۰	۱/۳۵۵	اسید چرب وکسنیک (C18:1t)
۸/۳۹۰	۹/۱۰۰	۹/۷۶۵	۱۰/۷۴۵	۱۵/۵۲۵	اسید چرب پولینیک (C18:1c)
۰/۰۱۵	۰/۱۲۰	۰/۱۷۵	۰/۳۰۰	۰/۱۹۵	اسید چرب ایکوزنوئیک (C20:1)
۰/۲۶۰	۰/۲۷۵	۰/۱۷۰	۰/۱۳۰	۰/۰۵۵	اسید چرب اوروسیک (C22:1)
۰/۱۰۰	۰/۰۲۰	۰/۰۵۰	۰/۰۶۰	۰/۰۵۵	اسید چرب نروونیک (C24:1)
۳۱/۸۹۰	۳۰/۸۶۰	۳۰/۲۶۰	۲۴/۳۱۵	۲۶/۷۶۰	اسید چرب تک زنجیره (MUFA)
۰/۲۴۰	۰/۳۲۵	۰/۳۸۰	۰/۴۱۰	۰/۵۴۰	اسید چرب لینوللیدیک (C18:2t)
۱۵/۹۴۰	۱۴/۱۰۰	۱۴/۹۵	۱۳/۸۹۵	۱۱/۲۱۰	اسید چرب لینولنیک (C18:2c)
۰/۲۹۰	۰/۵۶۰	۰/۷۶۵	۰/۸۱۵	۰/۶۵۵	اسید چرب آلفا لینولنیک (C18:3t)
۱۱/۷۹۵	۵/۹۴۰	۹/۵۹۰	۵/۴۴۵	۱/۵۸۵	اسید چرب آلفا لینولنیک (C18:3n3)
۴/۳۷۰	۶/۰۷۰	۵/۹۵۵	۵/۹۵۵	۹/۸۴۵	اسید چرب گاما لینولنیک (C18:3n6)
۰/۰۸۰	۰/۱۳۵	۰/۱۵۵	۰/۲۸۵	۰/۱۷۵	اسید چرب ایکوزادینوئیک (C20:2)
۰/۰۳۵	۰/۰۵۰	۰/۰۳۵	۰/۰۵۰	۰/۰۶۵	اسید چرب دکوزادینوئیک (C22:2)
۳۲/۷۵۰	۲۷/۱۸۰	۳۱/۸۳	۲۶/۸۵۵	۲۴/۰۷۵	اسید چرب بلند زنجیره (PUFA)

Polyunsaturated Fatty Acids :PUFA ;MUFA :Saturated Fatty Acid ;SFA

Fatty Acids



شکل ۷: نمودار تغییرات اسیدهای چرب (درصد از کل چربی) جلبک *Isochrysis galbana* در غلظت‌های مختلف کبالت (میلی‌گرم در لیتر) (میانگین \pm انحراف معیار). در هر دوره نمونه‌برداری، وجود حروف متفاوت روی ستون‌ها نشان دهنده اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.05$).

عدد یدی

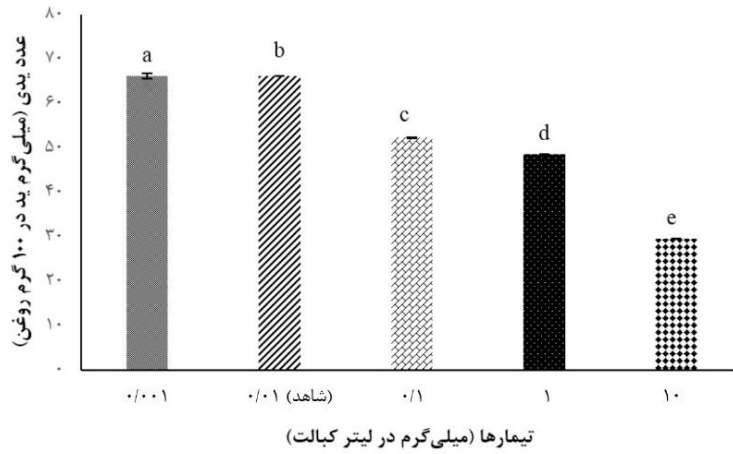
عدد یدی (۲۹/۵۲ گرم ید در ۱۰۰ گرم روغن) در تیمار حاوی ۱۰ میلی‌گرم در لیتر یون کبالت مشاهده شد.

شکل ۸ تغییرات عدد یدی جلبک *I. galbana* را در حضور غلظت‌های مختلف یون کبالت در محیط کشت، نشان می‌دهد. تیمارهای مختلف در مورد این شاخص، اختلافات معنی‌داری را نشان دادند. به نحوی که بالاترین عدد یدی به دست آمده در این مطالعه در ۰/۰۰۱ میلی‌گرم در لیتر (۶۶/۱۵ گرم ید در ۱۰۰ گرم روغن) یون کبالت مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری را با تیمارهای دیگر نشان داد. همچنین بررسی نتایج حاکی از آن بود که افزایش غلظت کبالت در محیط کشت، اثر منفی بر عدد یدی داشت به گونه‌ای که کمترین میزان

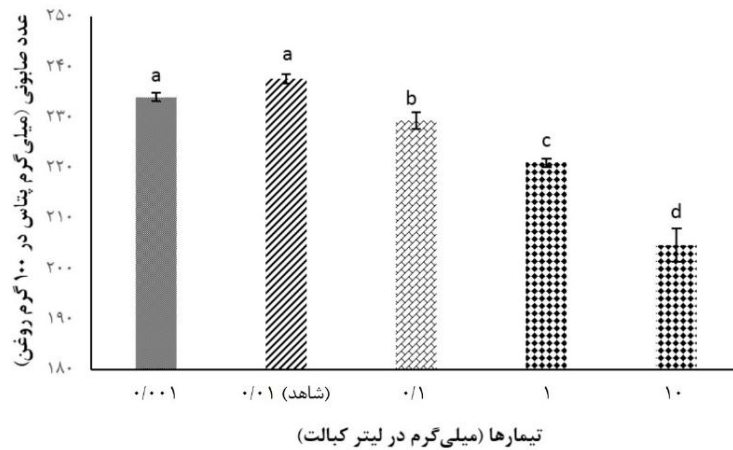
عدد صابونی

سطوح مختلف کبالت در محیط کشت *I. galbana* موجب تغییرات معنی‌داری در عدد صابونی شد بیشترین میزان عدد صابونی در گروه شاهد (۲۳۷/۶۷ میلی‌گرم پتاس در ۱۰۰ گرم روغن) و تیمار ۰/۰۰۱ میلی‌گرم بر لیتر کبالت (۲۳۴/۰۰ میلی‌گرم پتاس بر ۱۰۰ گرم روغن) مشاهده شد و افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه‌های دیگر نشان داد. علاوه بر این، نتایج نشان داد که با افزایش غلظت یون کبالت

در محیط کشت جلبک، میزان عدد صابونی کاهش یافت، به نحوی که کمترین میزان عدد صابونی در تیمار حاوی ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کبات (۲۰۴/۶۷ میلی‌گرم پتاس در ۱۰۰ گرم روغن) مشاهده شد (شکل ۹).



شکل ۸: نمودار تغییرات عدد پدی جلبک *Isochrysis galbana* در غلظت‌های مختلف کبات (میانگین \pm انحراف معیار). وجود حروف متفاوت روی ستون‌ها نشان دهنده اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.05$).



شکل ۹: نمودار تغییرات عدد صابونی در ریزجلبک *Isochrysis galbana* در غلظت‌های مختلف کبات (میانگین \pm انحراف معیار). وجود حروف متفاوت روی ستون‌ها نشان دهنده اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.05$).

بحث

نیاز است. آلژینات‌ها در دیواره سلولی نقش مهمی در اتصال کبالت در ساختار دیواره سلولی جلبک‌ها دارند (Ryrdina and Polikarpov, 1983).

در این پژوهش، بالاترین میزان تراکم سلولی جلبک *Isochrysis galbana* در روز چهاردهم و در تیمار شاهد با ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر یون کبالت به دست آمد. افزایش و کاهش یون کبالت در محیط کشت منجر به کاهش تراکم سلولی در جلبک شد. Chen و همکاران (۲۰۱۱) اثر مواد مغذی بر رشد و چربی جلبک *Dunaliella tertiolecta* را بررسی و بیان کردند که حذف کبالت، منیزیم و مولیبدن از محیط کشت موجب کاهش رشد جلبک می‌شود. گزارش‌های پیشین در مورد اثر کبالت بر رشد جلبک‌ها حاکی از آن است که کاهش غلظت کبالت منجر به افزایش وزن خشک جلبک، رنگدانه‌ها، پروتئین، تثبیت نیتروژن و فرآیند تنفس در جلبک‌های *Calothrix fusca* و *Nostoc muscorum* می‌شود، از سوی دیگر افزایش غلظت کبالت، کاهش قابلیت نفوذپذیری غشا، اختلال در متابولیسم سلولی، اثر بازدارندگی بر رشد، تولید کلروفیل و تغییر در فعالیت فتوسنتزی این جلبک‌ها را به همراه داشته است (Rachlin and Grosso, 1993;).

جلبک‌ها برای رشد مناسب علاوه بر درشت مغذی‌ها به ریزمغذی‌هایی همچون آهن، منگنز، روی، نیکل، کبالت، مولیبدن، مس و سلنیوم نیز نیازمند هستند. ریزمغذی‌ها مانند آهن و منگنز در مقادیر کم (۳۰-۲/۵ میلی‌گرم در لیتر) برای رشد جلبک‌ها مورد نیاز هستند. علاوه بر این، وجود عناصر کمیاب از جمله کبالت، روی و مولیبدن در غلظت‌های بسیار پایین (۴/۵-۲/۵ میلی‌گرم در لیتر) برای رشد مناسب جلبک‌ها بسیار ضروری هستند (Juneja et al., 2013). اغلب جلبک‌های میکروسکوپی برای تولید ویتامین B اگزوتروف هستند. در عین حال، جلبک‌ها برای رشد به موادی مثل ویتامین B₁₂، ویتامین B₁ و ویتامین B₇ نیاز دارند (Croft et al., 2006). کبالت برای بسیاری از میکروارگانیسم‌ها از جمله جلبک‌های میکروسکوپی یک عنصر ضروری است. یون کبالت (Co⁺²) در ساختار ویتامین B₁₂ که از اجزای بسیاری از آنزیم‌ها در زمان تثبیت نیتروژن در میکروارگانیسم‌ها است، مشارکت دارد (Kuyacak and Volesky 1989). کبالت همچنین به طور گسترده‌ای در جلبک‌هایی مانند *Cystoseira*، *Spirulina*، *Chlorella* و *barbata* *Ascophyllum nodosum* مورد

مشاهده شد. از سوی دیگر ریزجلبک‌ها در زمان محرومیت از ریزمغذی‌ها از طریق تغییر ساختار پروتئین‌ها، فعال کردن آنزیم‌های مرتبط در بیوسنتز کلروفیل‌ها، و فعال‌سازی انواع آنزیم‌های فتوسنتزی همانند روبیسکو می‌توانند میزان تولید کلروفیل و کاروتنوئیدها را در سلول افزایش دهند (Cheng et al., 2015). El-Sheekh و همکاران (۲۰۰۳) اثر غلظت‌های مختلف کبالت را بر روی رشد، رنگدانه و انتقال فتوسنتتیک الکترون بر روی دو جلبک *Nitzschia* و *Monoraphidium minutum* بررسی کردند. نتایج به دست آمده از مطالعه آن‌ها نشان داد که کاهش کبالت (۵/۰ و ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر) در محیط کشت، باعث افزایش معنی‌دار میزان رنگدانه‌ها (کلروفیل‌ها) در این جلبک‌ها شد (El-Sheekh et al., 2003). Gholamiourimi و Soltani (۲۰۱۴) اثر کبالت را بر فعالیت‌های زیستی جلبک سبز *Chara* sp. بررسی کردند. در این مطالعه از نمک نیترات کبالت به عنوان منبع کبالت استفاده شد. نتایج این آزمایش نشان داد که بیشترین غلظت کبالت (10^{-3} میکرومولار) منجر به کمترین تجمع کلروفیل a و b شد. Price و Morel (۱۹۹۰) عنوان کردند که بهبود رشد جلبک در زمان کاهش کبالت (Tiwari and Mohanty, 1996). Manusadzian و همکاران (۲۰۰۲) بیان کردند که سمیت کبالت برای جلبک‌های آب شیرین از فلزاتی همچون نقره، مس و کادمیوم کمتر است. با وجود اثرات منفی فلزات سنگین بر رشد جلبک‌ها گزارش‌هایی مبنی بر نقش مثبت برخی از آن‌ها در رشد جلبک‌ها نیز وجود دارند. به عنوان مثال، سرب، آلومینیوم و کبالت در غلظت‌های پایین به عنوان محرک رشد در جلبک‌های *Dunaliella tertiolecta* و *Monoraphidium minutum* عمل می‌کنند (El-Sheekh et al., 2003; Sacan et al., 2007). طبق این نتایج، میزان تجمع کلروفیل‌های a و b در محیط کشت تحت تاثیر غلظت‌های مختلف رفتار متفاوتی را نشان می‌دهد و از روند ثابتی تبعیت نمی‌کند. در پژوهش حاضر، بیشترین میزان کلروفیل‌های a و b در جلبک *I. galbana* به ترتیب در تیمار شاهد و تیمار ۰/۰۰۱ میلی‌گرم در لیتر و کمترین مقدار کلروفیل‌های a و b نیز در تیمار ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کبالت به دست آمد. در این مطالعه به دلیل اثرات بازدارنده غلظت‌های بالای کبالت بر عملکرد فتوسنتز، کاهش تقسیم سلولی، تراکم و نهایتاً کاهش میزان کلروفیل

به این دلیل باشد که در شرایط استرس ریزجلبک‌ها مسیرهای بیوسنتتیک را به سمت ذخیره‌سازی چربی تغییر می‌دهند که نسبت به ترکیبات ساختاری دیگر به عنوان یک منبع انرژی کاربرد دارد.

در مطالعه حاضر بالاترین میزان پروتئین کل در جلبک *I. galbana* (۵۳/۹۱ درصد) در تیمار دارای ۰/۰۰۱ میلی‌گرم در لیتر یون کبالت مشاهده شد. Osman و همکاران (۲۰۰۴) اثر کبالت و نیکل را روی متابولیسم پروتئین در دو جلبک *Scenedesmus obliquus* و *Nitzschia perminuta* بررسی و عنوان کردند که کاهش غلظت کبالت در محیط کشت جلبک، منجر به بهبود وزن خشک و پروتئین شد در حالی که افزایش کبالت در محیط کشت، اثر مهارکنندگی بر رشد و فعالیت آنزیم‌های تولید کننده پروتئین در جلبک‌های یاد شده داشت که این موضوع با نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر مطابقت دارد. Elsalhin و همکاران (۲۰۱۶) نیز اثر غلظت‌های مختلف یون کبالت را بر پروتئین کل و کربوهیدرات‌های جلبک *Spirulina platensis* بررسی کردند و نشان دادند که کاهش کبالت (۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) نسبت به گروه شاهد (۴ میلی‌گرم در لیتر) باعث افزایش معنی‌دار پروتئین تا روز چهارم

می‌تواند به دلیل جایگزینی کبالت با روی در برخی متالوآنزیم‌ها (آنزیم‌های حاوی یون فلزی) باشد. از طرف دیگر، سمیت کبالت در غلظت‌های بالا منجر به کاهش سرعت فعالیت پلاسمایی غشا می‌شود. این کار از طریق تعامل کبالت با گروه‌های سولفیدریل (Sulfhydryl) یا پروتئین‌های غشا برای ایجاد اتصالات گوگرد-فلز صورت می‌گیرد که می‌تواند نفوذپذیری غشا را تغییر دهد (Rachlin and Grosso 1993; Afkar et al., 2010). جلبک‌ها حاوی آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند گلوکاتیون هستند که از سلول در برابر فلزات سنگین و ترکیبات دیگر که باعث ایجاد اکسیداسیون می‌شوند محافظت می‌کند (Pinto et al., 2003). افزایش آلاینده‌ها در داخل سلول می‌تواند از طریق غلبه بر آنتی‌اکسیدان‌ها موجب آسیب به مولکول‌های سلولی از جمله کلروپلاست‌ها شود. با توجه به آن که کلروپلاست نقش مهمی در فتوسنتز دارد بالا رفتن غلظت فلزات در سلول بر رشد جلبک تاثیر منفی می‌گذارد. همچنین برخی گزارش‌ها نشان داده‌اند که کادمیوم در غلظت ۰/۶ میکرومول باعث مهار رشد جلبک می‌شود و تجمع چربی را افزایش می‌دهد (Yang et al., 2015). در واقع افزایش میزان چربی ممکن است بر اساس ادعای Hu و همکاران (۲۰۰۸)

معنی‌داری بر تجمع چربی در سلول نداشت. Cakmak و Cakmak (۲۰۱۶) اثر کاهش کبالت محیط کشت را بر بتاکاروتن و چربی جلبک *Dunaliella tertiolecta* بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد کاهش کبالت، اثر معنی‌داری بر رشد جلبک نداشت، اما باعث افزایش چربی‌های خنثی، بتاکاروتن و کربوهیدرات‌ها در سلول جلبک شد (Cakmak et al., 2016).

نتایج به دست آمده از مطالعه بر روی دو جلبک *Dunaliella salina* و *Nannochloropsis salina* نشان داد که افزودن نیکل (Ni^{+2}) به محیط کشت منجر به تغییر پروفایل اسیدهای چرب به سمت تولید بیشتر اسیدهای چرب اشباع (C14:0, C16:0, C20:0) شد (Mohammady and Fathy, 2007). همچنین Lin و Lin (۲۰۱۲) اثر آهن را بر روی جلبک *Scenedesmus rubescens* بررسی کردند و نشان دادند که افزودن آهن به محیط کشت باعث بهبود تجمع اسیدهای چرب اشباع (C16:0 و C18:0) در سلول جلبک شد. نتایج این مطالعه با اطلاعات به دست آمده در مطالعه حاضر درباره اثر افزایش کبالت بر روی اسیدهای چرب اشباع (SFA) مطابقت داشت.

کشت جلبک شد. همچنین بیان شد که افزایش بیشتر کبالت با کاهش مقدار پروتئین همراه بود (Elsalhin et al., 2016). قرار گرفتن سلول در معرض استرس‌های غذایی منجر به شکل‌گیری بیشتر چربی‌ها می‌شود و در این میان تری‌اسیل گلیسرول‌ها به عنوان جزء غالب در بین انواع چربی‌های دیگر تولید می‌شوند (Sibi et al., 2014). این موضوع در سال‌های اخیر برای افزایش تولید چربی و محصولات با ارزش دیگر در سلول جلبک‌ها مورد توجه قرار گرفته است (Chen et al., 2017). کاهش دسترسی به مواد مغذی یکی از موثرین عوامل القایی در تولید و بهبود تجمع چربی در جلبک‌ها است (Ramya et al., 2017; Taleb et al., 2017). مطالعه حاضر نیز با ایجاد تغییر در غلظت کبالت به عنوان یکی از عناصر ریزمغذی در محیط کشت، بیشترین میزان چربی کل (۲۴/۰۹ درصد) در جلبک *I. galbana* در تیمار دارای ۰/۰۰۱ میلی‌گرم در لیتر کبالت مشاهده شد. Chen و همکاران (۲۰۱۱) نیز در بررسی اثر مواد مغذی بر رشد و چربی جلبک *Dunaliella tertiolecta* عنوان کردند که کاهش دسترسی به نیتروژن، آهن و کبالت منجر به افزایش تجمع چربی سلول تا روز سوم شد، در حالی که حذف منگنز، مولیبدن و روی اثر

متفاوت است و روابط حاکم بر تولید و سوخت و ساز اسیدهای چرب در درون سلول‌های یک موجود زنده بسیار پیچیده بوده، مستلزم مطالعات بسیار است.

پژوهش‌های صورت گرفته بر روی جلبک‌ها نشان داده است که جلبک *I. galbana* با توجه به میزان تولید چربی گزینه مناسبی برای زمینه‌های دیگر مانند دارویی، غذایی و تولید سوخت زیستی است (Montero et al., 2011; Bondioli et al., 2012; Sanchez et al., 2013).

بالاترین عدد صابونی مشاهده شده در مطالعه حاضر به ترتیب در تیمار حاوی ۰/۰۰۱ میلی‌گرم در لیتر کبالت (۲۳۷/۳۳ میلی‌گرم پتاس در ۱۰۰ گرم روغن) و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر کبالت (۲۳۳/۳۳ میلی‌گرم پتاس در ۱۰۰ گرم روغن) مشاهده شد. علاوه بر این، نتایج نشان داد افزایش غلظت یون کبالت در محیط کشت جلبک اثر منفی بر میزان عدد صابونی داشت. بر اساس نتایج به دست آمده توسط Yodsuwan و همکاران (۲۰۱۷) با اضافه کردن NaNO_3 به میزان ۱۶/۴۵، ۳۲/۰۹ و ۶۴/۲۹ میلی‌گرم در لیتر عدد صابونی در جلبک *Phaeodactylum tricornutum* افزایش یافت، در حالی که در تیمارهای بدون NaNO_3

Battah و همکاران (۲۰۱۵) اثر غلظت‌های مختلف نیترات کبالت (۱/۷) (شاهد)، ۱، ۲ و ۲/۵ میکرومول کبالت)، منگنز و پراکسید هیدروژن را بر روی جلبک *Chlorella vulgaris* بررسی کردند. نتایج به دست آمده از آنالیز داده‌ها در این مطالعه نشان داد که افزودن کبالت به میزان ۲/۵ میکرومول به محیط کشت جلبک *C. vulgaris* منجر به کاهش شدید اسیدهای چرب SFA در مقایسه با تیمار شاهد شد. همچنین PUFA در این محیط به طور معنی‌داری افزایش نشان داد (Battah et al., 2015).

در مطالعه حاضر نتایج به دست آمده از بررسی پروفایل اسیدهای چرب جلبک در *I. galbana* نشان داد با افزودن ۱۰ میلی‌گرم در لیتر به محیط کشت، غلظت SFA در مقایسه با تیمار شاهد و تیمارهای دیگر به شکل معنی‌داری افزایش یافت (۴۷/۸۳۰ درصد). بیشترین میزان اسیدهای MUFA (۳۱/۸۹۰ درصد) و PUFA (۳۲/۷۵۰ درصد) نیز در تیمار دارای ۰/۰۰۱ میلی‌گرم در لیتر کبالت مشاهده شد. تغییر در عوامل محیطی و مواد مغذی قادر است پروفایل اسیدهای چرب را تغییر دهد. واکنش اسیدهای چرب نسبت به غلظت‌های مختلف مواد مغذی در گونه‌های مختلف،

این افزایش در مقدار عدد صابونی دیده نشد. همچنین مطالعه حاضر بالاترین میزان عدد یدی در جلبک *I. galbana* به ترتیب در تیمار ۰/۰۱ (شاهد) و ۰/۰۰۱ میلی‌گرم در لیتر کبالت به دست آمد. به طور کلی اسیدهای چرب فاقد پیوند دوگانه یا SFA و اسیدهای چرب با یک پیوند دوگانه یا MUFA به دلیل داشتن پایداری اکسیداتیو و عدد صابونی و یدی بالا برای تولید سوخت زیستی گزینه مناسب‌تری هستند. در مقابل لیپیدهای غنی از اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه یا PUFA نسبت به اکسیداسیون حساس‌تر هستند (Thi et al., 2011). در مطالعه حاضر اثر غلظت‌های مختلف کبالت بر جلبک *I. galbana* منجر به تغییرات زیادی در ترکیب اسیدهای چرب شد.

در مجموع، بر اساس نتایج به دست آمده در بین تیمارهای مختلف کبالت غلظت ۰/۰۰۱ میلی‌گرم در لیتر قادر است شرایط بهینه ارزش غذایی این ریزجلبک را از نظر میزان کلروفیل‌های a و b، پروتئین، چربی و PUFA تامین کند. با این وجود بیشترین میزان رشد در این تیمار مشاهده نشد و به نظر می‌رسد بین ارزش غذایی ریزجلبک و میزان رشد ارتباطی وجود نداشته باشد. علاوه بر این، بالاترین مقدار عدد یونی و صابونی در این تیمار مشاهده شد و از سوی دیگر با افزایش غلظت کبالت میزان SFA افزایش یافت و در تیمار ۱۰ میلی‌گرم در لیتر به بیشترین مقدار رسید. به طور کلی می‌توان بیان کرد که کاهش غلظت کبالت می‌تواند ترکیبات ساختاری یا ساختمانی این ریزجلبک را تحت تاثیر قرار دهد.

منابع

- Afkar E., Ababna H. and Fathi A. 2010.** Toxicological response of the green alga *Chlorella vulgaris*, to some heavy metals. American Journal of Environmental Sciences, 6(3): 230–237.
- AOAC. 2005.** Official Method of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, USA. 2000P.
- Battah M., El-Ayoty Y., Abomohra A.E.F., Abd El-Ghany S. and Esmael A. 2015.** Effect of Mn^{2+} , Co^{2+} and H_2O_2 on biomass and lipids of the green microalga *Chlorella vulgaris* as a potential candidate for biodiesel production. Annals of Microbiology, 65(1): 155–162.
- Bligh E. and Dyer W. 1959.** A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 37: 911–917.
- Bondioli P., Bella A., Rivolta G., Zittelli G., Bassi N., Rodolfi N., Casini D., Prussi M., Chiaramonti D. and Tredici M. 2012.** Oil production by the marine microalgae *Nannochloropsis* sp. F & M-M24 and *Tetraselmis suecica* F&M-M33. Bioresource Technology, 114: 567–572.
- Cakmak Z.E. and Cakmak T. 2016.** Evaluation of an indigenous *Dunaliella* strain for β -caroten and neutral lipid production as a response to cobalt deprivation. Advances in Renewable Energy, 3: 1–6.
- Chaumont D. 1993.** Biotechnology of algal biomass production: A review of systems for outdoor mass culture. Journal of Applied Phycology, 5: 593–604.
- Chen B., Wan C., Mehmood M.A., Chang J.S., Bai F. and Zhao X. 2017.** Manipulating environmental stresses and stress tolerance of microalgae for enhanced production of lipids and value-added products- A review. Bioresource Technology, 244: 1198–206.
- Chen M., Tang H., Ma H., Holland T.C., Ng K.Y. and Salley S.O. 2011.** Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. Bioresource Technology, 102(2): 1649–1655.
- Cheng P., Wang J. and Liu T. 2015.** Effect of cobalt enrichment on growth and hydrocarbon accumulation of *Botryococcus braunii* with immobilized biofilm attached cultivation. Bioresource Technology, 177: 204–208.
- Chia M., Lombardi A., Melao M. and Parrish C. 2013.** Effects of cadmium and nitrogen on lipid composition of *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta).

- European Journal of Phycology, 48(1): 1–11.
- Craigie J.S. 2011.** Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. *Journal of Applied Phycology*, 23(3): 371–393.
- Croft M.T., Warren M.J. and Smith A.G. 2006.** Algae need their vitamins. *Eukaryote Cell*, 5: 1175–1183.
- Ding W., Peng J., Zhao Y., Zhao P., Xu J.W., Li T. and Yu X. 2019.** A strategy for boosting astaxanthin accumulation in green microalga *H. pluvialis* by using combined diethyl aminoethyl hexanoate and high light. *Journal of Applied Phycology*, 31(1): 171–181.
- Elsalhin H.E.L., Abobaker H.M. and Ali M.S. 2016.** Toxicity effect of cobalt on total protein and carbohydrate of cyanobacteria *Spirulina platensis*. *Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, 10(9): 114–120.
- El-Sheekh M.M., El-Naggar A.H., Osman M.E.H. and El-Mazaly E. 2003.** Effect of cobalt on growth, pigments and the photosynthetic electron transport in *Monoraphidium minutum* and *Nitzschia perminuta*. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 15: 159–166.
- Gholamiourimi A. and Soltani S. 2014.** Effect of cobalt on biological activities of green algae *Chara* sp. *Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, 4(8): 4730–4733.
- Guan W., Zhao H., Lu X., Wang C., Yang M. and Bai F. 2011.** Quantitative analysis of fatty-acid-based biofuels produced by wild-type and genetically engineered cyanobacteria by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 1218: 8289–8293.
- Guillard R.R.L. and Ryther J.H. 1962.** Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Husted and *Detonula confervacea* Cleve. *Canadian Journal of Microbiology*, 8: 229–239.
- Hsieh C.H. and Wu W.T. 2009.** Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation. *Bioresource Technology*, 100(17): 3921–3926.
- Hu Q., Sommerfeld M., Jarvis E., Ghirardi M., Posewitz M., Seibert M. and Darzins A. 2008.** Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuels production: Perspectives and advances. *Plant Journal*, 54(4): 621–639.
- Jalal K.C.A., Shamsuddin A.A., Rahman M.F., Nurzatul N.Z. and Rozihan M. 2013.** Growth and total carotenoid, chlorophyll a and chlorophyll b of tropical microalgae (*Isochrysis* sp.) in

- laboratory cultured conditions. *Biology Science*, 13(14): 10–17.
- Juneja A., Ceballos R.M. and Murthy G.S. 2013.** Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: A review. *Energies*, 6(9): 4607–4638.
- Kuyacak N. and Volesky B. 1989.** The mechanism of cobalt biosorption. *Biotechnology and Bioengineering*, 33: 823–831.
- Lin Q., Gu N. and Lin J. 2012.** Effect of ferric ion on nitrogen consumption, biomass and oil accumulation of a *Scenedesmus rubescens*-like microalga. *Bioresource Technology*, 112: 242–247.
- Lorenzen C.J. 1967.** Determination of chlorophyll and pheo-pigments: Spectrophotometric equations 1. *Limnology and Oceanography*, 12(2): 343–346.
- Manusadzianas L., Maksimov G., Darginaviciene J., Jurkoniene S., Sadauskas K. and Vitkus R. 2002.** Response of the charophyte *Nitellopsis obtusa* to heavy metals at the cellular, cell membrane, and enzyme levels. *Environmental Toxicology*, 17(3): 275–289.
- Mata T.M., Martins A.A. and Caetano N.S. 2010.** Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1): 217–232.
- Mohammady N.G.E. and Fathy A.A. 2007.** Humic acid mitigates viability reduction, lipids and fatty acids of *Dunaliella salina* and *Nannochloropsis salina* grown under nickel stress. *International Journal of Botany*, 3(1): 64–70.
- Montero M.F., Aristizabal M. and Reina G.G. 2011.** Isolation of high-lipid content strains of the marine microalga *Tetraselmis suecica* for biodiesel production by flow cytometry and single-cell sorting. *Journal of Applied Phycology*, 23(6): 1053–1057.
- Nigam P.S. and Singh A. 2011.** Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*, 37(1): 52–68.
- Osman M.E., El-Naggar A., El-Sheekh M. and El-Mazally E. 2004.** Differential effects of Co^{2+} and Ni^{2+} on protein metabolism in *Scenedesmus obliquus* and *Nitzschia perminuta*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 16(3): 169–178.
- Ozkurt I. 2009.** Qualifying of safflower and algae for energy. *Energy Education Science and Technology*, 23(1): 145–151.
- Pinto E., Sigaud-Kutner T.C.S., Leitao M.A.S., Okamoto O.K., Morse D. and Colepicolo P. 2003.** Heavy metal-induced oxidative

- stress in algae. *Journal of Phycology*, 39: 1008–1018.
- Posten C. and Schaub G. 2009.** Microalgae and terrestrial biomass as source for fuels- A process view. *Journal of Biotechnology*, 142(1): 64–69.
- Price N.M. and Morel F.M. 1990.** Cadmium and cobalt substitution for zinc in marine diatom. *Nature*, 344: 658–660.
- Rachlin J.W. and Grosso A. 1993.** The growth response of the green alga *Chlorella vulgaris* to combined divalent cation exposure. *Environmental Contamination and Toxicology*, 24(1): 16–29.
- Ramya A.N., Ambily P.S., Sujitha B.S., Muthu A. and Kaustabh K.M. 2017.** Single cell lipid profiling of *Scenedesmus quadricauda* CASA-CC202 under nitrogen starved condition by surface enhanced Raman scattering (SERS) fingerprinting. *Algal Research*, 25: 200–206.
- Rastar M., Hosseini Shekarabi S.P., Shamsaie Mehragan M. and Sabz S. 2018.** Effects of iron and zinc concentrations on growth performance and biochemical composition of *Haematococcus pluvialis*: A comparison between nanoparticles and their corresponding metals bulks. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 9(2): 59–67.
- Ryrdina D.D. and Polikarpov G.G. 1983.** Distribution of certain chemical elements in biochemical fractions of the black sea alga *Cystoseira barbata*. *Gidrobiologicheskii Zhurnal*, 19: 79–84.
- Sacan M.T., Oztay F. and Bolkent S. 2007.** Exposure of *Dunaliella tertiolecta* to lead and aluminum: Toxicity and effects on ultrastructure. *Biological Trace Element Research*, 120: 264–272.
- Salama E.S., Kabra A.N., Ji M.K., Kim J.R., Min B. and Jeon B.H. 2014.** Enhancement of microalgae growth and fatty acid content under the influence of phytohormones. *Bioresource Technology*, 172: 97–103.
- Sanchez A., Maceiras R., Cancela A. and Perez A. 2013.** Culture aspects of *Isochrysis galbana* for biodiesel production. *Applied Energy*, 101: 192–197.
- Sibi G., Anuraag T.S. and Bafila G. 2014.** Copper stress on cellular contents and fatty acid profiles in *Chlorella* species. *Journal of Biological Sciences*, 14(3): 209–217.
- Taleb A., Legrand J. and Takache H. 2017.** Investigation of lipid production by nitrogen-starved *Parachlorella kessleri* under continuous illumination and day/night cycles for biodiesel

- application. *Journal of Applied Phycology*, 30(2): 761–772.
- Thi T.Y.D.A., Balasubramanian S.B. and Jeffrey P.O.B. 2011.** Screening of marine microalgae for biodiesel feedstock. *Biomass and Bioenergy*, 35: 2534–2544.
- Tiwari S. and Mohanty P. 1996.** Cobalt induced changes in photosystem activity in *Synechocystis* PCC 6803: Alteration in energy distribution and stoichiometry. *Photosynthesis Research*, 50(3): 243–256.
- Ugwu C.U., Aoyagi H. and Uchiyama H. 2008.** Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology*, 99 (10): 421–428.
- Valderrama J.O., Perrut M., Majewski W. and Serena L. 2003.** Extraction of *Astaxantine* and *Phycocyanine* from microalgae with supercritical carbon dioxide. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 48(4): 827–830.
- Yang J., Cao J., Xing G. and Yuan H. 2015.** Lipid production combined with biosorption and bioaccumulation of cadmium, copper, manganese and zinc by oleaginous microalgae *Chlorella minutissima* UTEX2341. *Bioresource Technology*, 175: 537–544.
- Yodsuwan N., Sawayama S. and Sirisansaneeyakul S. 2017.** Effect of nitrogen concentration on growth, lipid production and fatty acid profiles of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Agriculture and Natural Resources*, 51(3): 190–197.



Research Paper

Effect of different cobalt concentrations on growth, biochemical composition and fatty acids profile of microalgae *Isochrysis galbana*

Hossein Skandarnia¹, Mehdi Shamsaie Mehrjan^{2*}, Houman Rajabi Islami², Mehdi Soltani³, Abolghasem Kamali⁴

Received: December 2019

Accepted: April 2020

Abstract

Manipulation in the concentration of the nutrients of microalgae is one of the effective strategies to improve biomass and nutritional value. In this study, the effect of different concentrations of cobalt (0.001, 0.01 (control), 0.1, 1 and 10mg/L) on cell density, chlorophyll a and b, lipid, fatty acid profile, iodine and soap numbers of *Isochrysis galbana* were studied for two weeks. Adding 0.001 mg/L cobalt significantly improved chlorophyll a (3.2118mg/L) and b (2.001mg/L) and lipid (24.09%) and protein (53.91%) content of *I. galbana* compared to other treatments (P<0.05). The highest level of saturated fatty acid (47.83%) was observed in 10mg/L cobalt treatment, while the reduction of cobalt to 0.001mg/L caused an increase in monounsaturated fatty acid (MUFA) and polyunsaturated fatty acids (PUFA). Also, the maximum and minimum iodine and soap numbers were observed at concentrations of 0.001 and 10mg/L cobalt, respectively. Overall, a concentration of 0.001 mg/L cobalt provided the nutritional value of this microalgae in terms of chlorophyll a and b, protein, lipid and PUFA, although an alteration in the optimal concentration had a negative effect on biomass.

Key words: *Cobalt, Isochrysis galbana, Lipid, Fatty Acid, Biochemical Composition.*

1- Ph.D. Student in Fisheries, Department of Fisheries Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2- Associate Professor in Department of Fisheries Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

3- Professor in Department of Aquatic Health and Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.

4- Professor in Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

*Corresponding Author: m.shamsaie@srbiau.ac.ir

