فصلنامه علمی ـ پژوهشی دورهٔ ٦، شمارهٔ ٣، پاییز ١٣٩٦، صفحه ٦١- ٧٣

اثر ترکیبی دما و دوره نوری میزان آسکوربیک اسید در جلبک سبز *Scenedesmus quadricauda*

زهرا شاهینی شمس آبادی [١]، امیدوار فرهادیان [٢*] و مهدی کدیور [٣]

١- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران
٢- دانشیار، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران
٣- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

دریافت: ٩٤/٠٨/١٧ پذیرش: ٩٦/٠٨/٠٨

*نویسنده مسئول مقاله: omfarhad@cc.iut.ac.ir ، farhadyo@yahoo.com

چکیده:

تأثیر ترکیبی دما و دوره نوری بر میزان آسکوربیک اسید ریزجلبک آب شیرین *Scenedesmus quadricauda* بررسی شد. آزمایش با سه دوره نوری ٨L:١٦D (ساعت‌های روشنایی: ساعت‌های تاریکی)، ١٢L:١٢D و ١٦L:٨D در دماهای ٢٠، ٢٥ و ٣٠ درجه سانتی‌گراد در مدت ٢٠ روز به‌صورت یک طرح کاملاً تصادفی در ارلن مایرهای ٥ لیتری انجام شد. براساس نتایج، میزان آسکوربیک اسید در بین تیمارها تفاوت معناداری داشت ($p< ٠/٠٥$). در روز ٨ کشت، بالاترین میزان آسکوربیک اسید به میزان ٠/٠٦±٠/٣٨ درصد وزن خشک و ١٠/١±٦٠/٦ فمتوگرم در سلول در تیمار ١٦L:٨D و دمای ٣٠ درجه سانتی‌گراد به‌دست آمد. علاوه بر این، کمترین میزان آسکوربیک اسید در تیمار ٨L:١٦D در دمای ٣٠ درجه سانتی‌گراد در روز ٨ کشت به میزان ٠/٠٣±٠/١١ درصد وزن خشک حاصل شد. مرحله رشد جلبک بر میزان اسکوربیک اسید تأثیر داشت، به‌طوری‌که در شرایط نوری ١٦L:٨D و دمای ٣٠ درجه سانتی‌گراد میزان آسکوربیک اسید در روز ٨ (مرحله لگاریتمی رشد) بسیار بیشتر از روز ٢٠ (مرحله ایستایی رشد) بود. این مطالعه نشان داد که افزایش ساعت‌های روشنایی سبب بهبود میزان آسکوربیک اسید در ریزجلبک *S. quadricauda* می‌شود، درحالی‌که افزایش دما تأثیر چشمگیری بر میزان آسکوربیک اسید نداشت.

کلید واژگان: دما، دوره نوری، آسکوربیک اسید، کشت، *Scenedesmus quadricauda*

مقدمه

ریزجلبک‌ها منبع غذایی ضروری برای تمام مراحل رشد آبزیان از قبیل دوکفه‌ای‌ها و لارو برخی گونه‌های سخت‌پوستان و ماهیان در آبزی‌پروری محسوب می‌شوند (Vismara et al., 2003). ارزش غذایی آنها متأثر از عواملی از جمله اندازه، شکل، قابلیت هضم و ترکیب

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-12-01]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1396.6.3.1.7]

شیمیایی ریزجلبک است (Brown et al., 1999). وجود اسیدهای چرب، اسیدهای آمینه، ویتامین‌ها، کاروتنوئیدها و مواد مغذی مورد نیاز لاروها در جلبک‌ها بر اهمیت استفاده از آنها می‌افزاید (Barsanti et al., 2006).

استخراج ویتامین‌ها از منابع طبیعی به‌دلیل فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی این دسته از ترکیبات همواره مورد توجه بسیاری از محققان بوده است. همچنین مطالعات اخیر نشان داده است که برخی ویتامین‌های سنتتیک نسبت به ویتامین‌های طبیعی اثر کمتری دارند (Kelman et al., 2012).

محتوای ویتامین‌ها در جلبک‌های میکروسکوپی با توجه به شرایط پرورش متفاوت است. برای مثال، Brown وهمکاران (١٩٩٩)، محتوای ویتامینی ٤ گونه جلبک میکروسکوپی شامل *Nannochloropsis* sp.، *pinguis Pavlova*، *Stichococcus* sp. و *Tetraselmis* sp. را تحت دوره نوری ١٢ساعت روشنایی: ١٢ ساعت تاریکی مطالعه و گزارش کردند که ویتامین E (آلفاتوکوفرول) ٠/٢٩–٠/٠٧، تیامین ١٠٩–٢٩، ریبوفلاوین ٥٠–٢٥ و بیوتین ١/٩–١/١ میلی‌گرم در گرم وزن خشک است.

آسکوربیک اسید، یکی از ویتامین‌های محلول در آب است که در واکنش‌های بیوشیمیایی از جمله، سنتز کلاژن و کارنیتین، متابولیسم تیروزین، فعالیت لیزوزیم، فعالیت فاگوسیتوزی و مقاومت در برابر استرس و بیماری، در سلول‌ها و بافت‌های گیاهان و حیوانات نقش‌های مهمی دارد (Qinghui et al., 2004; Ferin et al., 2013). معمولاً آسکوربیک اسید به‌عنوان دهنده الکترون بوده و در برقراری واکنش با رادیکال‌های آزاد و سایر اکسیدان‌ها از جمله رادیکال هیدروکسید و هیپوکلروس اسید نقش دارد. از سوی دیگر، آسکوربیک اسید قابلیت بازسازی ویتامین E از رادیکال آلفا توکوفروکسیل در غشاها را دارد (Ferin et al., 2013).

ویتامین‌ها از جمله ترکیبات شیمیایی هستند که وجودشان در جیره غذایی آبزیان حتی به میزان کم ضروری است (Kelman et al., 2012). در آبزیان آسکوربیک اسید سبب تحریک تولید مثل ماهی و پوست‌اندازی سخت‌پوستان می‌شود. نیاز ماهی به آسکوربیک اسید بسته به عواملی از جمله گونه و اندازه ماهی از ٢٠ تا ٥٠ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم غذا متفاوت است (Qinghui et al., 2004).

بیشتر ماهیان استخوانی به‌دلیل نبود آنزیم گالانو ١–٤ لاکتون دهیدروژناز (آنزیم مؤثر در ساخت آسکوربیک اسید) قادر به ساخت این ویتامین نیستند (Forshey et al., 1954). معمولاً کمبود این ویتامین می‌تواند باعث بروز مشکلاتی از قبیل تغییر شکل در ستون فقرات، اختلال در تشکیل کلاژن و اختلال در رشد آبزیان شود (Qinghui et al., 2004).

از آنجایی‌که ریزجلبک‌ها در زنجیره غذایی آبزیان بسیار با اهمیت تلقی می‌شوند، می‌توانند در تأمین بسیاری از ویتامین‌ها از جمله آسکوربیک اسید کاربرد داشته باشند. برای مثال، Brown و همکاران (١٩٩٢) گزارش دادند که میزان آسکوربیک اسید در جلبک‌های میکروسکوپی دامنه‌ای بین ١ تا ١٦ میلی‌گرم در گرم وزن خشک دارد. از آنجایی‌که محتوای آسکوربیک اسید نظیر سایر مواد آلی در جلبک‌ها می‌تواند متأثر از شرایط محیطی باشد، بنابراین در راستای بهینه کردن شرایط پرورش به‌منظور تولید حداکثری آسکوربیک اسید دستکاری شرایط محیطی امری ساده و انجام‌شدنی خواهد بود. به عبارتی، آسکوربیک اسید دارای عملکردهای فراوانی در گیاهان است و این فرضیه وجود دارد که شاخص‌های محیطی و فیزیولوژیکی می‌توانند بر بیوسنتز و متابولیسم آسکوربیک اسید تأثیرگذار باشند (Brown et

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-12-01]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1396.6.3.1.7]

al., 1992; Smirnoff, 1996). اگرچه در ریزجلبک‌ها، مطالعات اندکی دربارهٔ تأثیرات شرایط پرورش بر میزان ویتامین‌ها و به‌ویژه آسکوربیک اسید انجام شده است (Shigeoka et al., 1979; Brown et al., 1992; Brown et al., 2002)، اما به بررسی آثار ترکیبی عوامل محیطی به‌ندرت توجه شده است. با توجه به این‌که بسیاری از جلبک‌های آب شیرین به‌طور طبیعی در محدوده دمایی ۲۰ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد زندگی می‌کنند و حداکثر ۱٦ ساعت و حداقل ۸ ساعت در معرض تابش نور هستند، از این‌رو این مطالعه با هدف بررسی اثر ترکیبی دما (۲۰، ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد) و دوره‌های نوری مختلف (ساعت‌های روشنایی: ساعت‌های تاریکی)، ۸L:۱٦D، ۱۲L:۱۲D و ۱٦L:۸D بر میزان آسکوربیک اسید در ریزجلبک سبز *Scenedesmus quadricauda*، در شرایط کنترل شده آزمایشگاهی انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و کشت جلبک

جلبک *S. quadricauda* از استخرهای پرورش ماهی و کانال‌های آبی جمع‌آوری و پس از مشاهده با میکروسکوپ اینورت (مدل CETI، ساخت بلژیک) شناسایی شد. در شناسایی این گونه از کلید شناسایی آب شیرین براساس Bellinger و Sigee در سال ۲۰۱۰ براساس معیارهایی از قبیل مرفولوژی و داشتن زوائد، اندازه سلول و شکل هسته عمل گردید. جلبک موردنظر با روش Lavens و Sorgeloos در سال ۱۹۹٦ با کشت روی آگار خالص‌سازی شد (Lavens et al., 1996). برای اطمینان از خالص بودن جلبک، کشت‌های متوالی از جلبک در ارلن مایرهای دو لیتری با محیط کشت مناسب BBM انجام گردید (Nichols, 1973). به‌منظور کشت جلبک، دو لیتر آب مقطر در ارلن مایرهای شیشه‌ای ریخته شد و به آن مقدار ۲٦ میلی‌لیتر محیط کشت BBM اضافه شد. در مرحله بعد ظروف حاوی محیط کشت جلبک پس از تنظیم pH برابر ٦/۸ در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه اتوکلاو (مدل 121A، ساخت ایران) ضدعفونی و استریل گردید. پس از اتمام از اتوکلاو و هم دما شدن با دمای آزمایشگاه، محلول ویتامین B طبق دستورالعمل اختصاصی کشت (۳ میلی‌لیتر در لیتر) به ظرف کشت اضافه شد. پس از افزودن ذخیره جلبک *S. quadricauda* کشت‌ها در دمای ۱±۲۲ درجه سانتی‌گراد و شدت نور ٦۰ میکرو مول فوتون بر متر مربع بر ثانیه، و در دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی قرار داده شد (Richmond, 2004).

نحوه انجام آزمایش

این آزمایش با سه سطح دمایی (۲۰، ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد) و سه سطح نوری (۸L:۱٦D، ۱۲L:۱۲D و ۱٦L:۸D روشنایی: تاریکی) به‌طور ترکیبی در مجموع ۹ تیمار شامل ۲۰˚C/ ۸L:۱٦D، ۲۵˚C/ ۸L:۱٦D، ۳۰˚C/ ۸L:۱٦D، ۲۰˚C/ ۱۲L:۱۲D، ۲۵˚C/ ۱۲L:۱۲D، ۳۰˚C/ ۱۲L:۱۲D، ۲۰˚C/ ۱٦L:۸D، ۲۵˚C/ ۱٦L:۸D، ۳۰˚C/ ۱٦L:۸D در یک دوره ۲۰ روزه در ارلن مایرهای ۵ لیتری با ۳ تکرار به‌صورت کاملاً تصادفی انجام شد. به‌منظور تهیه شرایط محیطی متفاوت تیمارها، از اتاقک رشد پوشیده شده با پلاستیک مشکی استفاده شد. در تمام دوره آزمایش، برای تأمین نور و اجرای پروتکل نوری در هریک از تیمارها (برای مثال ۸ ساعت نور: ۱٦ ساعت تاریکی در تیمار ۸L:۱٦D) از سه عدد ساعت فرمان (Fur Aussen-geeignet مدل IP44، ساخت آلمان) متصل شده به لامپ‌های فلوئورسنت (نور مهتابی) استفاده گردید. دما با استفاده از بخاری (Atman مدل AT180، ساخت ایران)

[DOR: 20.1001.1.23225513.1396.6.3.1.7]
[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-12-01]

تنظیم شد. شمارش جلبک‌ها با استفاده از لام هماسیتومتری با روش Martinez و همکاران (٢٠٠٠) انجام شد. سرعت رشد ویژه Special Growth Rate (SGR) با استفاده از رابطه $SGR= (ln\ N2-ln\ N1)/\ \Delta t$ که در آن $N2$ تعداد سلول‌های جلبک در پایان آزمایش، $N1$ تعداد سلول‌های جلبک در ابتدای آزمایش و Δt مدت زمان انجام آزمایش است، اندازه‌گیری شد و زمان دوبرابر شدن (D_t) جمعیت جلبک‌ها با استفاده از رابطه $D_t=log2e/SGR$ محاسبه گردید (Berg-Nilsen, 2006). زیست توده خشک نیز با روش پیشنهاد شده از سوی Lavens و همکاران (١٩٩٦) اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری حجم مشخص ١٠٠ میلی‌لیتر از محلول جلبکی در شرایط کاملاً استریل شده در زیر هود میکروبیولوژیکی از هر کشت در هر مرحله از اندازه‌گیری برداشت شد و پس از شمارش جلبک‌ها، با استفاده از کاغذ صافی ٠/٢ میکرونی فیلتر گردید و در دمای ٦٠ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٣ ساعت خشک شد. تفاوت وزنی حاصل شده را بر حسب لیتر محاسبه و به‌عنوان زیست توده خشک در نظر گرفته شد.

اندازه‌گیری آسکوربیک اسید

برای بررسی تأثیر تیمارهای مختلف بر میزان آسکوربیک اسید در روز ١٦ و مرحله لگاریتمی رشد، از روش تیتراسیون با محلول ٢ و ٦- دی کلروفنل اندوفنل، براساس روش‌های استاندارد AOAC استفاده شد (AOAC, 1995). در ابتدا ٢ میلی‌لیتر محلول آسکوربیک اسید استاندارد با غلظت ١ میلی‌گرم آسکوربیک اسید در ١ میلی‌لیتر محلول متافسفریک اسید- استیک اسید ٣ درصد با محلول ٢ و ٦- دی کلروفنل اندوفنل ٠/٠٢٥ درصد تا ظهور رنگ صورتی گلی که بیشتر از ٥ ثانیه پایدار است، تیتر شد. هم‌زمان حجم معینی از نمونه جلبکی همگن شده به درون یک ارلن مایر ٥٠ میلی‌لیتری حاوی ٣٠ میلی‌لیتر محلول متافسفریک اسید- استیک اسید ٣ درصد اضافه گردید. محلول آسکوربیک اسید استاندارد با محلول ٢ و ٦- دی کلروفنل اندوفنل ٠/٠٢٥ درصد تا ظهور رنگ صورتی گلی تیتر شد. با استفاده از حجم مصرفی دی کلروفنل اندوفنل میزان آسکوربیک اسید محاسبه گردید. میزان آسکوربیک اسید در روزهای ٨، ١٦ و ٢٠ کشت اندازه‌گیری شد. میزان اسکوربیک اسید براساس وزن خشک و همچنین به‌ازای سلول‌های جلبک محاسبه شد. محاسبه اسید اسکوربیک به‌ازای سلول‌های جلبکی با توجه به تعداد سلول‌ها در هر میلی‌لیتر از نمونه مورد استفاده انجام شد و بر حسب فمتوگرم به‌ازای هر سلول گزارش گردید.

آنالیز آماری

برای آنالیز آماری داده‌ها از تجزیه واریانس دو طرفه (Two-way ANOVA) و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح معنادار ٥ درصد استفاده شد. کارهای آماری لازم با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ٢٢ (SPSS, 2002) انجام گردید.

نتایج

نتایج حاصل از تأثیر دما و دوره‌های نوری مختلف بر رشد، زمان دو برابر شدن و زیست توده در روزهای ٨، ١٦ و ٢٠ پرورش به‌ترتیب در جداول ١ تا ٣ ارائه شده است. براساس نتایج در روز ٨ کشت، ریز جلبک *S. quadricauda*، بالاترین میزان رشد (٠/٠٠١±٠/٣٧ در روز)، کوتاه‌ترین زمان دو برابر شدن (٠/٠٠٦±١/٩ روز) و بیشترین میزان زیست توده (٠/٠٠٦±٠/١٢ میلی‌گرم در لیتر) در دوره نوری ١٦L:٨D در دمای ٣٠ درجه سانتی‌گراد را داشت. در روز ١٦ پرورش نیز بالاترین

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-12-01]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1396.6.3.1.7]

میزان رشد (۰/۰۰۳±۰/۲٤ در روز)، کوتاه‌ترین زمان دو برابر شدن (۰/۰۰٤±۲/۹ روز) و بیشترین میزان زیست توده (۰/۰۰۵±۰/۳ میلی‌گرم در لیتر) در دوره نوری ۱٦L:۸D در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد بود. در روز ۲۰ کشت بالاترین میزان رشد و کوتاه‌ترین زمان دو برابر شدن در دوره نوری ۱٦L:۸D بود و در این دوره نوری بین دماهای مختلف تفاوت معناداری از نظر میزان رشد وجود نداشت (p>۰/۰۵).

جدول ۱ میانگین (± خطای استاندارد) تأثیر دما و دوره‌های نوری مختلف بر میزان رشد (در روز) در روزهای مختلف کشت

تیمار	روز۸	روز ۱٦	روز ۲۰
۸L:۱٦D /۲۰°C	۰/۱٦±۰/۰۰٦^{f}	۰/۱۸±۰/۰۰۱^{e}	۰/۱۵±۰/۰۰٤^{d}
۸L:۱٦D /۲۵°C	۰/۱۹±۰/۰۰۲^{e}	۰/۲۰±۰/۰۰۳^{d}	۰/۱٦±۰/۰۰۳^{c}
۸L:۱٦D /۳۰°C	۰/۱۹±۰/۰۰۳^{e}	۰/۲۰±۰/۰۰۱^{d}	۰/۱۷±۰/۰۰٤^{bc}
۱۲L:۱۲D /۲۰°C	۰/۲۵±۰/۰۰۳^{d}	۰/۲۱±۰/۰۰۲^{cd}	۰/۱۷±۰/۰۰۱^{bc}
۱۲L:۱۲D /۲۵°C	۰/۳۰±۰/۰۰۹^{c}	۰/۲۱±۰/۰۰۵^{c}	۰/۱۷±۰/۰۰۱^{b}
۱۲L:۱۲D /۳۰°C	۰/۳۰±۰/۰۰۵^{c}	۰/۲۳±۰/۰۰۲^{b}	۰/۱۷±۰/۰۰۵^{bc}
۱٦L:۸D /۲۰°C	۰/۳۱±۰/۰۰۳^{c}	۰/۲٤±۰/۰۰۱^{b}	۰/۱۹±۰/۰۰۱^{a}
۱٦L:۸D /۲۵°C	۰/۳٤±۰/۰۰۹^{b}	۰/۲۳±۰/۰۰۳^{b}	۰/۱۹±۰/۰۰۱^{a}
۱٦L:۸D /۳۰°C	۰/۳۷±۰/۰۰۱^{a}	۰/۲٤±۰/۰۰۳^{a}	۰/۱۹±۰/۰۰۳^{a}

*در هر ستون میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشابه از نظر آماری اختلاف معناداری ندارند (p>۰/۰۵).

جدول ۲ میانگین (± خطای استاندارد) تأثیر دما و دوره‌های نوری مختلف بر زمان دو برابر شدن (روز) در روزهای مختلف کشت

تیمار	**روز ۸**	**روز ۱٦**	**روز ۲۰**
۸L:۱٦D /۲۰°C	٤/۵±۰/۱۸٤^{a}	۳/۹±۰/۰۱۵^{a}	٤/٦±۰/۰۱۳^{a}
۸L:۱٦D /۲۵°C	۳/۷±۰/۰٤۸^{b}	۳/٤±۰/۰٤۳^{b}	٤/۳±۰/۰۷۸^{b}
۸L:۱٦D /۳۰°C	۳/٦±۰/۰٦٤^{b}	۳/٤±۰/۰۰۹^{bc}	٤/۲±۰/۰۹٦^{bc}
۱۲L:۱۲D /۲۰°C	۲/۸±۰/۰۳۱^{c}	۳/۳±۰/۰۳^{cd}	٤/۲±۰/۰۳۱^{bc}
۱۲L:۱۲D /۲۵°C	۲/۳±۰/۰۷۲^{d}	۳/۲±۰/۰۷٤^{d}	٤±۰/۰۳۱^{c}
۱۲L:۱۲D /۳۰°C	۲/۳±۰/۰٤۳^{d}	۳±۰/۰۲۲^{e}	٤/۲±۰/۱۲۱^{bc}
۱٦L:۸D /۲۰°C	۲/۳±۰/۰۱۸^{d}	۳±۰/۰۱۲^{ef}	۳/۷±۰/۰۱۸^{d}
۱٦L:۸D /۲۵°C	۲±۰/۰۵۳^{e}	۳±۰/۰٤۵^{ef}	۳/۷±۰/۰۱۳^{d}
۱٦L:۸D /۳۰°C	۱/۹±۰/۰۰٦^{e}	۲/۹±۰/۰۰٤^{f}	۳/۷±۰/۰۵٦^{d}

* در هر ستون میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشابه از نظر آماری اختلاف معناداری ندارند (p>۰/۰۵).

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-12-01]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1396.6.3.1.7]

جدول ٣ میانگین (± خطای استاندارد) تأثیر دما و دوره‌های نوری مختلف بر میزان زیست توده خشک (میلی‌گرم در لیتر) در روزهای مختلف کشت

تیمار	روز ٨	روز ١٦	روز ٢٠
٨L:١٦D /٢٠°C	٠/٠٣±٠/٠٠١^{g}	٠/٠٩±٠/٠٠٤^{f}	٠/١٦±٠/٠٠٤^{f}
٨L:١٦D /٢٥°C	٠/٠٣±٠/٠٠٢^{fg}	٠/١٥±٠/٠٠٢^{e}	٠/١٨±٠/٠٠٣^{ef}
٨L:١٦D /٣٠°C	٠/٠٤±٠/٠٠٢^{f}	٠/١٥±٠/٠٠٦^{e}	٠/١٩±٠/٠٠٤^{ef}
١٢L:١٢D /٢٠°C	٠/٠٦±٠/٠٠٣^{e}	٠/١٦±٠/٠٠١^{e}	٠/٢٠±٠/٠٠٧^{e}
١٢L:١٢D /٢٥°C	٠/٠٩±٠/٠٠٨^{d}	٠/١٧±٠/٠١٨^{de}	٠/٣٣±٠/٠١٣^{d}
١٢L:١٢D /٣٠°C	٠/٠٩±٠/٠٠٣^{cd}	٠/٢±٠/٠٠٥^{cd}	٠/٣٠±٠/٠٠٧^{c}
١٦L:٨D /٢٠°C	٠/١٠±٠/٠٠٣^{bc}	٠/٢١±٠/٠١١^{c}	٠/٣٧±٠/٠١٢^{b}
١٦L:٨D /٢٥°C	٠/١١±٠/٠٠٩^{b}	٠/٢٥٧±٠/٠٢٣^{b}	٠/٥٠±٠/٠٢٨^{a}
١٦L:٨D /٣٠°C	٠/١٢±٠/٠٠٦^{a}	٠/٣٠±٠/٠٠٥^{a}	٠/٤٦±٠/٠٢٤^{a}

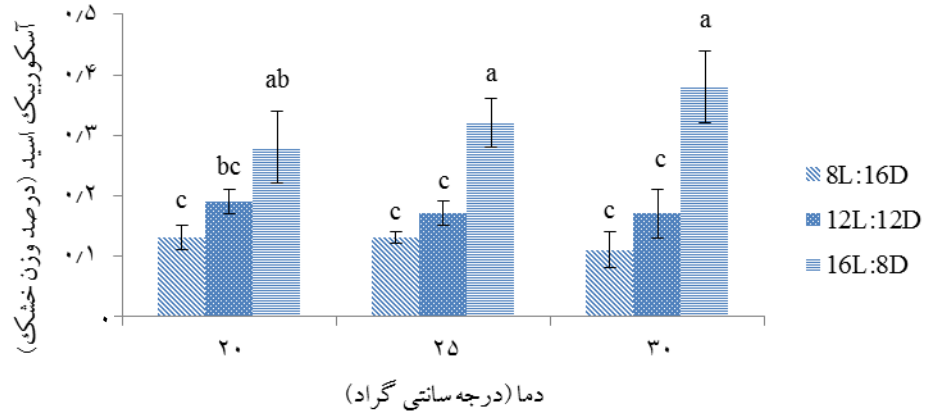
*در هر ستون میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشابه از نظر آماری اختلاف معناداری ندارند ($p>0/05$).

مقدار آسکوربیک اسید *S. quadricauda* در روزهای ٨، ١٦ و ٢٠ پرورش به تفکیک در شکل‌های ١ و ٢ ارائه شده است. در روز ٨ کشت در دوره نوری ١٦L:٨D و دمای ٣٠ درجه سانتی‌گراد بالاترین میزان (٠/٠٦±٠/٣٨ درصد وزن خشک) و در دوره نوری ٨L:١٦D و دمای ٣٠ درجه سانتی‌گراد کمترین میزان (٠/٠٣±٠/١١ درصد وزن خشک) به‌دست آمد. در روز ١٦ و ٢٠ نیز بالاترین آسکوربیک اسید به‌ترتیب ٠/٠٣±٠/٢٥ درصد وزن خشک در دوره نوری ١٦L:٨D و دمای ٢٠ درجه سانتی‌گراد و ٠/٢±٠/٠٢ درصد وزن خشک در دوره نوری ١٦L:٨D و دمای ٢٥ درجه سانتی‌گراد بود. همچنین میزان آسکوربیک اسید در دوره نوری ١٦L:٨D در دمای ٣٠ درجه سانتی‌گراد در روز ٨ (مرحله لگاریتمی رشد) ٠/٠٦±٠/٣٨ درصد وزن خشک و در روز ٢٠ (مرحله ایستایی رشد) ٠/١٢±٠/٠٢ درصد وزن خشک به‌دست آمد (شکل ١). بالاترین آسکوربیک اسید *S. quadricauda*، در روز ٨، ١٦ و ٢٠ کشت به‌ترتیب ١٠/١±٦٠/٦، ٣/٣±٢١/٨ و ٠/٠٦±٤٥/٥ فمتوگرم در سلول در دوره نوری ١٦L:٨D و دمای ٣٠ درجه سانتی‌گراد و کمترین میزان آسکوربیک اسید به‌ترتیب ٣/٣±٢١/٨، ١/٤±١٣/٨ و ٢/٨±٢٠ فمتوگرم در سلول در دوره نوری ٨L:١٦D و دمای ٢٠ درجه سانتی‌گراد به‌دست آمد (شکل ٢).

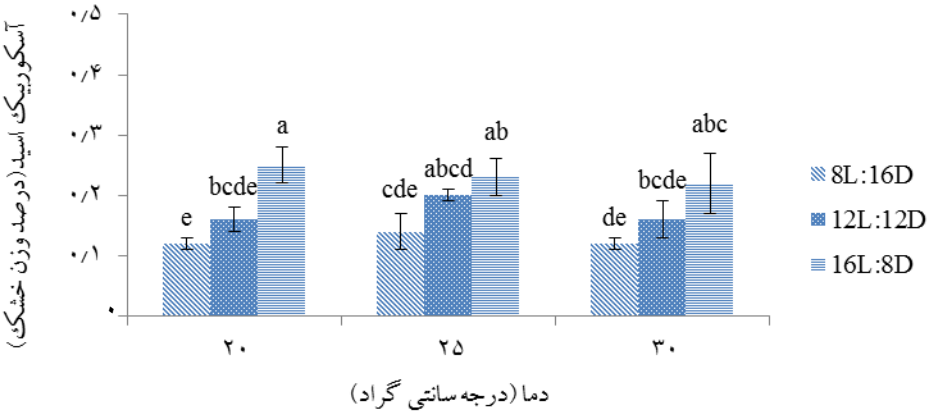
[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-12-01]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1396.6.3.1.7]

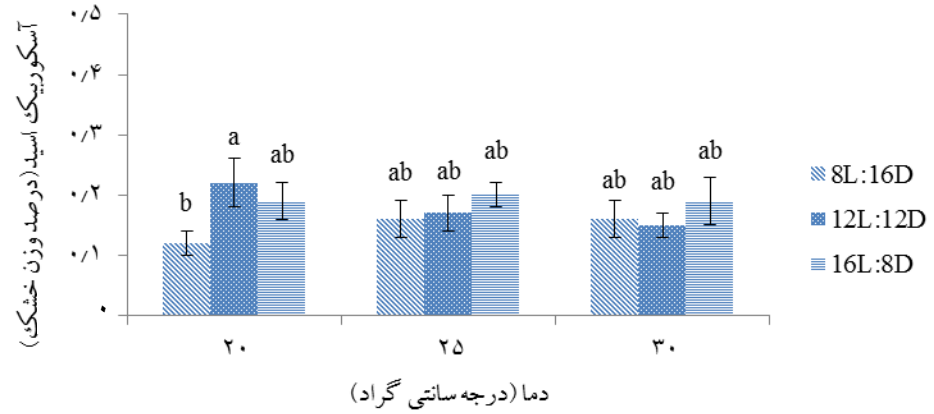
الف



ب



ج

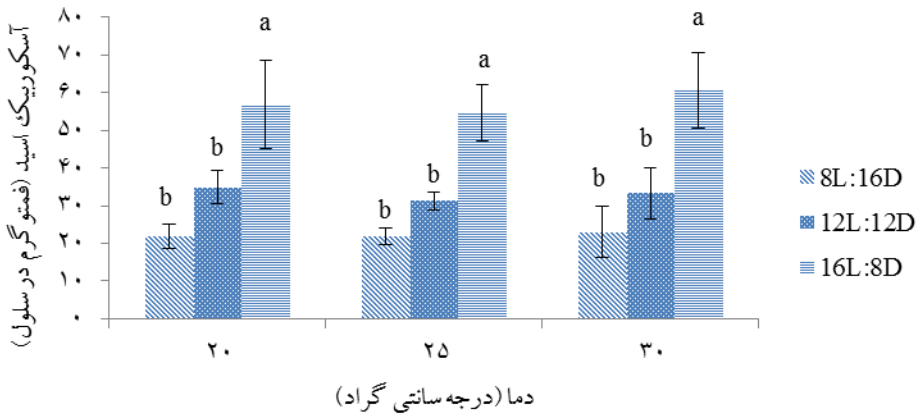


شکل ۱ میانگین (± خطای استاندارد) میزان آسکوربیک اسید *S. quadricauda* رشد یافته تحت دوره‌های نوری و درجه حرارت‌های متفاوت در روزهای مختلف آزمایش. (الف) میزان آسکوربیک اسید در روز ۸، (ب) میزان آسکوربیک اسید در روز ۱۶، (ج) میزان آسکوربیک اسید در روز ۲۰. میانگین‌ها در هر ستون که دارای حداقل یک حرف مشابه هستند از نظر آماری با هم اختلاف معناداری ندارند ($p>0/05$).

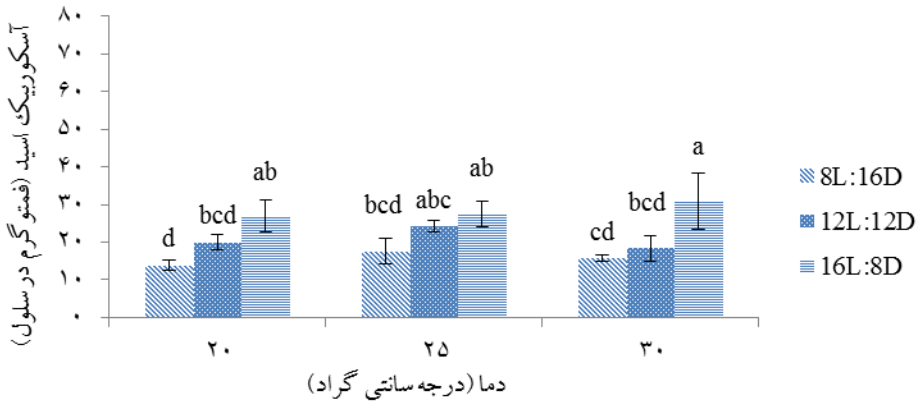
[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-12-01]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1396.6.3.1.7]

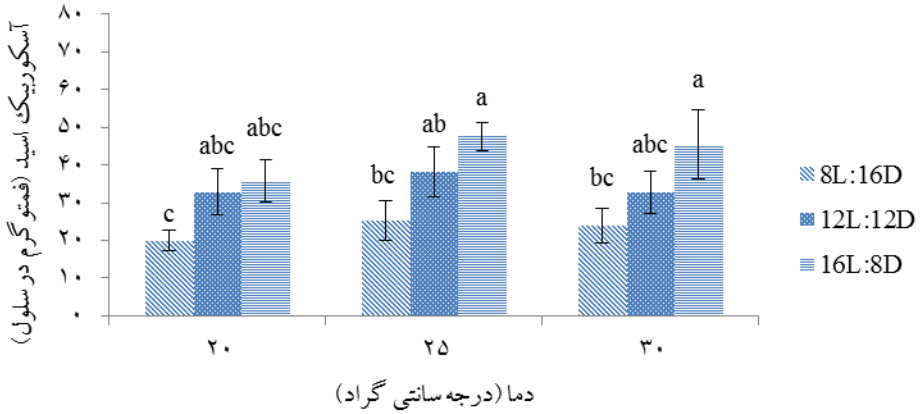
الف



ب



ج



شکل ۲ میانگین (± خطای استاندارد) میزان آسکوربیک اسید *S. quadricauda* رشد یافته تحت دوره‌های نوری و درجه حرارت‌های متفاوت در روزهای مختلف آزمایش. (الف) میزان آسکوربیک اسید در روز ۸، (ب) میزان آسکوربیک اسید در روز ١٦، (ج) میزان آسکوربیک اسید در روز ۲۰. میانگین‌ها در هر ستون که دارای حداقل یک حرف مشابه هستند از نظر آماری با هم اختلاف معناداری ندارند ($p>0/05$).

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-12-01]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1396.6.3.1.7]

بحث

در مطالعه حاضر بیشترین میزان آسکوربیک اسید جلبک *S. quadricauda*، در دوره نوری ١٦L:٨D در دمای ٣٠ درجه سانتی‌گراد و کمترین میزان در دوره نوری ٨L:١٦D در دمای ٣٠ درجه سانتی‌گراد به‌دست آمد که بیانگر تأثیر دوره نوری و دما بر میزان اسکوربیک اسید است. با وجود مطالعاتی که دربارهٔ تأثیر شاخص‌های محیطی بر ویتامین‌ها در ریزجلبک‌ها انجام شده است، اما تأثیر این عوامل به‌طور ترکیبی بر مقدار آسکوربیک اسید به‌ندرت مطالعه شده است. شاخص‌های محیطی از قبیل شدت نور، دوره نوری، دما، شوری و دسترسی به مواد مغذی تا حد زیادی ترکیبات بیوشیمیایی از جمله ویتامین‌ها را در گیاهان و جلبک‌ها تحت تأثیر قرار می‌دهد. در واقع این شاخص‌ها با تأثیر بر فتوسنتز، سبب تغییر در تثبیت کربن و اختصاص آن به انواع مختلف درشت مولکول‌ها می‌شوند (Juneja et al., 2013). Brown و همکاران (١٩٩٢) بیان کردند افزایش دوره نوری و شدت نور در جلبک *Thalassiosira pseudonana* منجر به افزایش آسکوربیک اسید می‌شود. افزایش بازده فتوسنتزی در ساعت‌های روشنایی بیشتر و دماهای بالاتر را می‌توان دلیلی برای افزایش آسکوربیک اسید دانست، زیرا استنباط ما این است که در این شرایط انرژی لازم برای انجام واکنش‌های فتوسنتزی و تولید ترکیبات آلی بهتر در اختیار سلول‌ها قرار می‌گیرد. Ventet (١٩٧٧) بیان کرد کاهش نور و ایجاد سایه با تأثیر بر دما سبب کاهش در میزان آسکوربیک اسید در گوجه‌فرنگی می‌شود. بر طبق تحقیقات Liptay و همکاران (١٩٨٦)، در شدت نور و دوره نوری مشابه، با افزایش دما میزان آسکوربیک اسید در گوجه‌فرنگی افزایش می‌یابد و در یک دمای ثابت نیز، افزایش ساعت‌های روشنایی سبب افزایش میزان آسکوربیک اسید می‌شود.

علاوه بر این، شاید بتوان تفاوت در میزان آسکوربیک اسید را به‌دلیل تفاوت در تولید میزان قندها (Forshey et al., 1954) و یا تغییر در فعالیت آنزیم‌های دخیل در بیوسنتز آسکوربیک اسید (Shigeoka et al., 1979) دانست. Forshey و همکاران (١٩٥٤) نشان دادند که میزان برخی ترکیبات از جمله قندها و اسیدها به‌ویژه آسکوربیک اسید در گوجه‌فرنگی‌های رشد یافته در گلخانه در فصل پاییز کاهش می‌یابد که می‌تواند ناشی از کاهش دما به‌تنهایی و یا در تقابل با کاهش طبیعی نور در گلخانه‌ها باشد. این شرایط ممکن است دارای اثرهای متابولیکی گسترده بر بسیاری از تولیدات و ترکیبات بیوشیمیایی از جمله آسکوربیک اسید در گیاهان باشد زیرا جزء مهم بیوسنتز آسکوربیک اسید ترکیبات قندی است. همچنین، Shigeoka و همکاران (١٩٧٩) در بررسی نقش نور در میزان ال-آسکوربیک اسید در جلبک *Euglena gracilis* نشان دادند که با افزایش مدت تابش نور فعالیت آنزیم ال-گالاکتونو ١-٤ دهیدروژناز، کاتالیزور مرحله پایانی بیوسنتز آسکوربیک اسید، نیز افزایش می‌یابد و باعث افزایش میزان آسکوربیک اسید می‌شود و در مقابل بازگشت به تاریکی سبب کاهش فعالیت آنزیم و کاهش ال-آسکوربیک اسید می‌شود. در آستانه اشباعیت از شدت نور، افزایش دوره نوری میزان اسید آسکوربیک در ریز جلبک *Nannochloropsis* sp. را افزایش می‌دهد (Brown et al., 1999). در مطالعه دیگری، Brown و Hohmannm در سال ٢٠٠٢ نتیجه‌گیری کردند که افزایش شدت نور تا نقطه اشباعیت نور همراه با نوردهی مداوم سبب افزایش میزان اسید آسکوربیک در ریزجلبک *Isochrysis* sp. می‌شود، درحالی‌که در شدت نور بالاتر از حد اشباع میزان اسید آسکوربیک کاهش می‌یابد (Brown and Hohmannm, 2002). مسیر بیوسنتز اسید آسکوربیک در جلبک‌ها یک

[DOR: 20.1001.1.23225513.1396.6.3.1.7]
[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-12-01]

مسیر وابسته به انرژی است (Smirnoff and Wheeler, 2000). این مسیر شامل تبدیل GDP- دی مانوز به ال گالاکتوز ١ و ٤ لاکتون و سپس به ال-آسکوربیک اسید به‌وسیله آنزیم ال-گالاکتونو ١و٤ لاکتون دهیدروژناز موجود در غشای داخلی میتوکندری می‌باشد (Smirnoff and Wheeler, 2000).

در این مطالعه افزایش در میزان آسکوربیک اسید در دوره نوری ١٦L:٨D در دمای ٣٠ درجه سانتی‌گراد را می‌توان به افزایش تولید قندها در طی فتوسنتز و یا افزایش فعالیت آنزیم سازنده آسکوربیک اسید در شرایط نوری و دمایی بالا نسبت داد. به‌طور مشابهی، در مطالعه دیگری، Hamner و همکاران (١٩٤٤) بیان کردند که افزایش مدت روشنایی و افزایش دما سبب افزایش میزان آسکوربیک اسید در گوجه‌فرنگی می‌شود. بنابراین می‌توان بیان کرد که دوره نوری و دما، عواملی هستند که در چرخه‌های شبانه‌روزی فتوسنتز، تنفس سلولی، نرخ رشد و تقسیم سلولی معمولاً تأثیرگذار هستند و با تأثیر بر فعالیت‌های آنزیمی و سنتز درشت مولکول‌ها به رشد سلول کمک می‌کنند (Fabregas et al., 2002; Bouterfas et al., 2006).

براساس نتایج تحقیق حاضر، ریزجلبک *S. quadricauda* در روز ٨ پرورش نسبت به روزهای ١٦ و ٢٠ پرورش از میزان آسکوربیک اسید بالاتری برخوردار بود، به‌طوری‌که میزان آسکوربیک اسید در دوره نوری ١٦L:٨D در دمای ٣٠ درجه سانتی‌گراد در روز ٨ (مرحله لگاریتمی رشد) ٠/٣٨±٠/٠٦ درصد وزن خشک و در روز ٢٠ (مرحله ایستایی رشد) ٠/١٢±٠/٠٢ درصد وزن خشک به‌دست آمد. به این ترتیب مرحله رشد نیز بر مقدار آسکوربیک اسید در ریزجلبک‌ها تأثیرگذار است. برای مثال Brown و همکاران (١٩٩٢) میزان آسکوربیک اسید در ریزجلبک *Chaetoceros gracilis* را در مرحله لگاریتمی رشد و سکون اندازه‌گیری و گزارش کردند که میزان آسکوربیک اسید در مرحله لگاریتمی رشد ١/٦ درصد وزن خشک و در مرحله سکون ٠/٣٢ درصد وزن خشک است. این تغییر در میزان آسکوربیک اسید از مرحله لگاریتمی به مرحله سکون می‌تواند منعکس‌کننده پاسخ‌های فیزیولوژیکی سلول به محدودیت ماکرونوترینت‌های معدنی از قبیل نیترات و سیلیکات باشد (Brown et al., 2002). نتایج حاصل از تحقیق حاضر نیز با نتایج سایر تحقیقات دربارهٔ تأثیر دوره‌های نوری و دما بر میزان آسکوربیک اسید مطابقت داشت و کاهش میزان آسکوربیک اسید در روز ٢٠ (مرحله ایستایی رشد) را می‌توان به‌دلیل کاهش مواد مغذی در محیط کشت دانست.

در تحقیق حاضر دوره‌های نوری و درجه حرارت‌های متفاوت تأثیر معناداری بر آسکوربیک اسید در ریزجلبک *S. quadricauda* داشت و نتایج نشان داد افزایش دما تأثیر معناداری بر آسکوربیک اسید ندارد، ولی با افزایش ساعت‌های روشنایی آسکوربیک اسید به‌طور معناداری افزایش می‌یابد. به‌طورکلی می‌توان نتیجه‌گیری کرد که ساعت‌های روشنایی بیشتر با تأثیر بر درجه حرارت به‌عنوان عامل محیطی کلیدی بر سیستم فتوسنتز تأثیر گذاشته و به‌دنبال آن سبب تولید کربوهیدرات‌ها در سلول‌های جلبکی می‌گردد که احتمالاً می‌توان استدلال کرد که با افزایش تولید قندها به‌عنوان پیش ماده سازنده آسکوربیک اسید، میزان این ویتامین نیز در سلول افزایش می‌یابد (Iqbal et al., 1993).

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی دانشکده منابع طبیعی و معاونت پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشگاه صنعتی

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-12-01]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1396.6.3.1.7]

اصفهان کـه زمینـه انجـام ایـن تحقیـق را فـراهم کردنـد، سپاسگزاری می‌شود.

منابع

AOAC, 1995. Association of Official Analytical Chemistry. Official Methods of analysis, 16th edition.; AOAC: Arlington, VA, USA.771 p.

Barsanti, L. and Gualtieri, P. 2006. Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology. CRC Press, Taylor and Francis Group, 320 p.

Bellinger, E. G. and Sigee, D.C. 2010. Freshwater Algae: Identification, Enumeration and Use as Bioindicators, 2nd Edition., 296 p.

Berg-Nilsen, J. 2006. Production of Micro algae based products. Algetech Produkter AS, 28 p.

Bouterfas, R., Belkoura, M. and Dauta, A. 2006. The effects of irradiance and photoperiod on the growth rate of three freshwater green algae isolated from a eutrophic lake. *Limnetica*, 25: 647-656.

Brown, M. R. and Miller, K. A. 1992. The ascorbic acid content of eleven species of microalgae used in mariculture. *Journal of Applied Phycoogyl*, 4: 205-215.

Brown, M. R., Mular, M., Miller, I., Farmer, C. and Trenerry, C. 1999. The vitamin content of microalgae used in aquaculture. *Journal of Applied Phycology*, 11: 247-255.

Brown, M. R. and Hohmann, S. 2002. Effects of irradiance and growth phase on the ascorbic acid content of *Isochrysis* sp. T.ISO (Prymnesiophyta). *Journal of Applied Phycology*, 14: 211-214.

Fabregas, J., Maseda, A., Domanguez, A., Ferreira, M. and Otero, A. 2002. Changes in the cell composition of the marine microalga, *Nannochloropsis gaditana*, during a light:dark cycle. *Biotechnology Letters*, 24: 2491-2500.

Ferin, R., Leonor Pavão , M. and Baptista, J. 2013. Rapid, sensitive and simultaneous determination of ascorbic and uric acids in human plasma by ion-exclusion HPLC-UV. *Clinical Biochemistry*, 46: 665-669.

Forshey, C. G. and Alban, E. K. 1954. Seasonal changes in greenhouse tomatoes. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, 64: 372-378.

Hamner, K. C., Bernstein, L. and Maynard, L. A. 1944. Effects of light intensity, day length, temperature, and other environmental factors on the ascorbic acid. *Journal of Nutritional*, 29: 85-97.

Iqbal, M. and Zafar, S. 1993. Effects of photon flux density, CO2, aeration rate, and inoculum density on growth and extracellular polysaccharide production by *Porphyridium cruentum*. *Folia Microbiologica*, 38: 509-514.

Juneja, A., Ceballos, R. S. and Murthy, G. 2013. Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: A Review, Energies, 6: 4607-4638.

Kelman, D., Posner, E. K., McDermid, K. J., Tabandera, N. K., Wright, P. R. and Wright, A. D. 2012. Antioxidant activity of Hawaiian marine algae. *Marine Drugs*, 10: 403-416.

Lavens, P. and Sorgeloos, P. 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. *Fisheries Technical Paper*; 295p.

Liptay, A., Papadopoulos, A. P., Bryan, H. H. and Gull, D. 1986. Ascorbic acid levels in tomato (*Lycopersicon esculentum Mill*.) at low temperatures. *Agriculture and Biological Chemistry*, 50: 3185-3187.

Martinez, M. E., Sanches, S., Jimenes, J. M., Yousfi, F. E. and Munoz, L. 2000. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalgae *Scenedesmus obliqus*. *Bioresource Technology*, 73: 263-272.

Nichols, H. W. 1973. Growth media – freshwater. In: Stein, J. R. [Editor], handbook of phycological methods – culture methods and growth measurements. Cambridge University Press, pp. 7-24.

Qinghui, A., Kangsen, M., Chunxiao, Z., Wei, X., Qingyuan, D., Beiping, T. and Zhiguo, L. 2004. Effects of dietary vitamin C on growth and immune response of Japanese seabass, *Lateolabrax japonicas*. *Aquaculture*, 242: 489-500.

Richmond, A. (Ed). 2004. Handbook of Microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-12-01]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1396.6.3.1.7]

SPSS, 2002. Statistical Package for Social Science, version 11.5, SPSS Inc., Michigan Avenue, Chicago, Illinois, USA.

Venter, F. 1977. Solar radiation and vitamin C content of tomato fruit. *Acta Horticulturae*, 58: 121-127.

Vismara, R., Vestri, S., Kusmic, C., Brarsanti, L. and Gualtieri, P., 2003. Natural vitamin E enrichment of *Artema salina* fed freshwater and marine microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 15: 75–80.

Blackwell Publishing Company, Cornwall, UK. 566 p.

Shigeoka, S., Yokotay, A., Nakano, Y. and Kitaoka, S. 1979. The effect of illumination on the L-Ascorbic acid content in *Euglena gracilis*. *Agriculture and Biological Chemistry*, 43: 2053-2058.

Smirnoff, N. and Wheeler, G.L. 2000. Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 35: 291-314.

Smirnoff, N. 1996. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals of Botany*, 78: 661–669.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-12-01]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1396.6.3.1.7]

Fisheries Science & Technology
TMU
Scientific - Research Journal Vol. 6, No. 3, Autumn 2017

Combine effects of temperature and photoperiod on the ascorbic acid of green algae *Scenedesmus quadricauda*

Zahra Shahini Shams Abadi[1], Omidvar Farhadian*[2] , Mahdi Kadivar[3]

1- M. Sc. of Fisheries Science, Department of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran
2- Associate Prof., Department of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran
3- Professor, Department of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

Received: 08.11.2015 Accepted: 30.10.2017

* Corresponding author: omfarhad@cc.iut.ac.ir ; farhadyo@yahoo.com

Abstract:

The combined effects of temperature and photoperiod on ascorbic acid of content of freshwater microalgae *Scenedesmus quadricauda* were investigated. The experiment was carried out at three photoperiods (8L:16D, 12L:12D and 16L:8D) and three temperatures (20, 25 and 30˚C) for 20 days as a completely randomized design in 5-L Erlenmeyer flasks. Based on results, the ascorbic acid (AA) level was significantly different among treatments ($p<0.05$). At 8th day of culture, the highest AA amount (0.38±0.06% dry weight and 60.6±10.1 fg/cell) was obtained at 16L:8D photoperiod and 30˚C. In addition, the lowest AA (11±0.03% dry weight) at 8L:16D photoperiod and 30˚C in 8th day of culture. The growth phases affected the AA level. The AA level at 16L:8D photoperiod and 30˚C in day-8 of culture (logarithmic phase) as higher than that day-20 of culture (stationary phase). This study illustrated that increasing light hours improved and increasing temperature had no considerable effect on AA content among different treatments.

Key words: temperature, photoperiod, acid ascorbic, culture, *Scenedesmus quadricauda*

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-12-01]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1396.6.3.1.7]