

## بررسی اثر مس ( $\text{Cu}^{2+}$ ) بر میزان کلروفیل a و تراکم جلبک *Scenedesmus obliquus*

حمیده کیهانیان<sup>۱\*</sup>، فرناز رفیعی<sup>۲</sup>، کریم مهدی نژاد<sup>۳</sup> و افتخار شیروانی مهدوی<sup>۴</sup>

۱، ۲ و ۴- دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال

۳- پژوهشکده آبی پروری آب‌های داخلی ایران، اهواز

تاریخ پذیرش: ۸۹/۴/۲۵

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۰/۸

### چکیده

محیط‌های آبی اغلب در معرض آلاینده‌های مختلف از جمله فلزات سنگین هستند که انتشار آنها به داخل آب‌ها می‌تواند مشکلات مختلفی برای گیاهان بوجود آورد. در این بررسی اثر فلز سنگین مس ( $\text{Cu}^{2+}$ ) بر تراکم و میزان کلروفیل a در جلبک *Scenedesmus obliquus* مورد مطالعه قرار گرفت. پرورش در غلظت‌های مختلف (۲، ۴، ۶، ۸) میلی گرم در لیتر مس و یک شاهد با استفاده از محیط کشت زاندر (z8) در دمای  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  و شدت نور ۳۰۰۰ لوکس به مدت ۵ روز انجام شد. سپس فراوانی جلبک‌ها در زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت با استفاده از لام هموسیتومتر توسط میکروسکوپ نوری شمارش شده و میزان کلروفیل a آنها اندازه‌گیری گردید. در غلظت کلروفیل a جلبک *S. obliquus* بین زمان‌های مختلف و تیمارهای آزمایشی و در میزان تراکم سلولی بین تیمار شاهد و غلظت‌های متفاوت مس، بین غلظت‌های ۲/۴ با  $16/8 \text{ mg l}^{-1}$  اختلاف معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ). در تیمار شاهد با گذشت زمان میزان تراکم سلولی و غلظت کلروفیل a افزایش نشان داد. در تیمارهای فلز مس با افزایش زمان در میزان کلروفیل a و تراکم جلبک سندسموس کاهش دیده شد، بطوریکه با افزایش غلظت مس از ۲ تا  $8 \text{ mg l}^{-1}$  میزان کاهش تراکم سلولی از  $72/09\%$  (در  $2 \text{ mg l}^{-1}$  در ساعت ۹۶) به  $92/33\%$  (در  $8 \text{ mg l}^{-1}$  در ساعت ۹۶) نسبت به ساعت صفر رسید. در این غلظت‌ها از ساعت ۲۴ مرگ سلولی روی داد. در تیمار شاهد سلول‌ها در ساعت ۹۶ هنوز در فاز رشد قرار داشتند و افزایش  $28/4\%$  نسبت به ساعت ۷۲ دیده شد.

**Effect of  $\text{Cu}^{2+}$  on cell number and chlorophyll a content of green alga *Scenedesmus obliquus***

**Keyhanian, H.<sup>۱\*</sup>, Rafiee, F.<sup>۲</sup>, Mehdinejad, K.<sup>۳</sup> & Shirvani, E.<sup>۴</sup>**

1, 2, 4 - Faculty of Marine Science and Technology, Islamic Azad University, North Tehran Branch  
3- Inland Waters Aquaculture Research Institute, Ahvaz

#### Abstract

Aquatic environments are often exposed to heavy metals, this can affect aquatic organisms. The effect of  $\text{Cu}^{2+}$  on cell density and chl a content of *S. obliquus* was studied. The algae were grown for 5 days at temperature of  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  and light intensity of 300 lux on z8 medium. Copper treatment was carried out at a concentration of 0 (control), 2, 4, 6 and  $8 \text{ mg l}^{-1}$ . Cell counting was performed at 0, 24, 48, 72 and 96 hours using hemocytometer and amount of chl a was determined at the same hours. There was a significant difference between time and treatments ( $p < 0.05$ ). The difference of cell density was significant between control and metal concentrations,  $2, 4 \text{ mg l}^{-1}$  with  $6, 8 \text{ mg l}^{-1}$ . In control groups, the cell density and chl a content were increased with time. On the other hand, the content of chl a and cell number reduced with  $\text{Cu}^{2+}$ . The concentration of  $\text{Cu}^{2+}$  from 2 to  $8 \text{ mg l}^{-1}$  inhibited cell density from 72.09% (  $2 \text{ mg l}^{-1}$ , 96 h) to 92.33% (  $8 \text{ mg l}^{-1}$ , 96 h), respectively. In the  $\text{Cu}^{2+}$  treatments the death of algal biomass was observed in 24 h, but there was an increase in cell numbers of *S. obliquus* in control and the algae were still on exponential phase at 96 h.

**Keyword:** Copper, *Scenedesmus obliquus*, Chlorophyll a, cell number

### واژگان کلیدی

*Scenedesmus obliquus*، مس، تراکم سلولی، کلروفیل a

## مقدمه

هر عاملی که سبب بهم خوردن اجزاء طبیعی یک اکوسیستم گردد و تغییرات نامطلوب زیست محیطی را بوجود آورد و موجب اختلال در سلامتی، رشد، فرایندهای سوخت و ساز و فیزیولوژیکی گردد آلودگی نام دارد. از مهم‌ترین آلاینده‌های سمی که برای محیط زیست بویژه محیط‌های آبی تهدید بزرگی به شمار می‌رود می‌توان به فلزات سنگین و ترکیبات آلی فلزی اشاره نمود (کردوانی، ۱۳۷۴). با توجه به گسترش صنعتی شدن و انواع فعالیت‌های انسانی، فاضلاب‌های خانگی، شهری، کشاورزی، استخراج معادن، ضایعات مواد رادیواکتیو و... استفاده از فلزات و یا موادی که دارای فلزات آلاینده می‌باشند وارد اکوسیستم آبی شده و بدین طریق ضمن ایجاد خطر برای آبزیان می‌توانند بطور مستقیم یا غیر مستقیم از طریق زنجیره غذایی برای انسان مخاطره آمیز باشند (رستمی، ۱۳۷۸). حدود ۵/۷ میلیون تن در سال مس، برای استفاده در وسایل الکتریکی، در آلیاژها، به عنوان یک کاتالیزور شیمیایی، در ضد لکه کردن رنگ برای بدنه کشتی‌ها به عنوان یک جلبک کش و محافظ چوب تولید می‌گردد. بناچار در تعدادی از این کاربردها، مس به محیط زیست منتقل می‌شود. فاضلاب‌های شهری حاوی مقدار قابل توجهی مس بوده و این نشان دهنده افزایش غلظت مس در رسوبات مناطق دفن فاضلاب است. مس یک عنصر ضروری برای موجودات زنده دریایی به حساب می‌آید. حد مجاز آن در آب آشامیدنی طبق استاندارد جهانی ۵ ppm است. به رغم حضور تعدادی از سیستم‌های دفع مسمومیت و ذخیره سازی برای مس، پس از جیوه و نقره، به دلیل کاربرد فراوان آن در رنگ‌های ضد لکه برای طیف وسیعی از موجودات دریایی سمی‌ترین فلز محسوب می‌شود اما اثر مخرب غلظت بیش از حد آن بر موجودات شناخته شده است و در خصوص جلبک‌ها، می‌توان تاثیر آن روی تراکم، پیگمان‌ها و... اشاره کرد. مس می‌تواند بر سنتز پیگمان‌ها ی فتوسنتزی تاثیر گذارد و یا باعث تجزیه آنها صورت گردد. پنج نوع کلروفیل در گیاهان شناخته شده است و تنها کلروفیل a در تمام موجودات فتوسنتز کننده وجود دارد. میزان این ماده تخمینی از تولید اولیه، وضعیت چرخه غذایی و پراکنش فیتوپلانکتونی را نشان می‌دهد (کلارک، ۱۹۲۳). گونه *Scenedesmus obliquus* دارای سلول‌های میانی دوکی سلول‌های کناری به شکل هلالی و فشرده و غشاء فاقد هر گونه زائده است. اندازه آن حدود ۱۰ میکرومتر بوده و در آبهای بتا و مزوساپروپ بصورت انبوه وجود دارند (محمد جانی و فلاحی، ۱۳۷۶). به دلیل اینکه جلبک‌ها در پایه زنجیره غذایی قرار دارند، هرگونه تغییری در تراکم، بیوماس، جمعیت آنها روی زنجیره غذایی تاثیر می‌گذارد. مطالعه پاسخ این موجودات به فلزات سنگین از اهمیت ویژه ای برخوردار است. با مطالعات اثر فلز مس بر فیزیولوژی و رشد موجودات از جمله جلبک‌ها می‌توان در یک محیط آبی آلوده به اثرات مخرب آن پی برد. هدف از انجام این تحقیق بررسی اثر فلز مس در غلظت‌های مختلف بر تراکم و میزان کلروفیل a در جلبک *S. obliquus* می‌باشد.

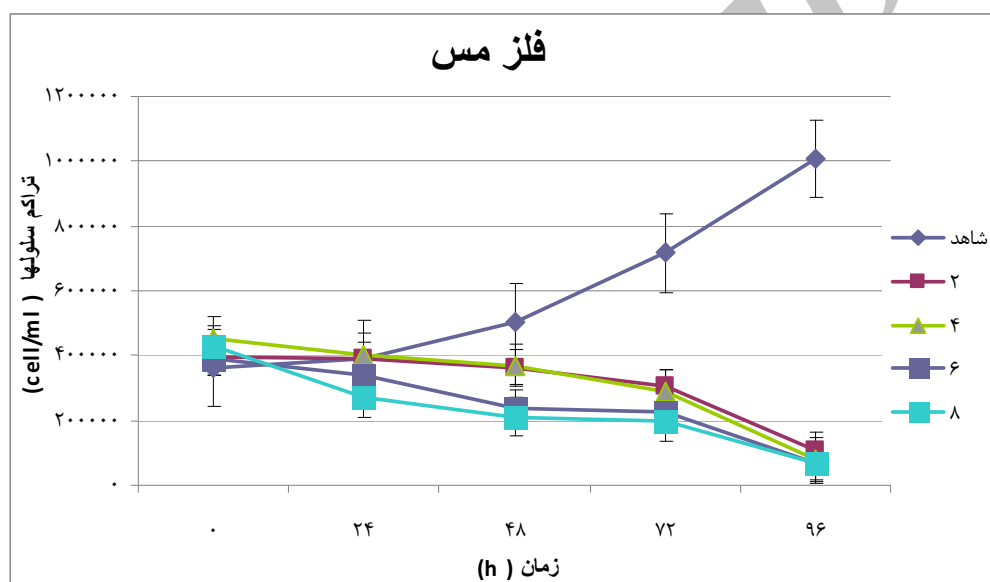
## مواد و روش کار

استوک خالص جلبک *Scenedesmus obliquus* از پژوهشکده آبی پروری انزلی تهیه گردید. جلبک‌ها در محیط کشت Z8 ((Surosz & Palinska, 2004) در حجم ۵۰۰ میلی لیتر تحت شرایط دمایی  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  و شدت نور ۳۰۰۰ لوکس و دوره روشنایی و تاریکی ۱۲:۱۲ و هوادهی منظم با سه تکرار پرورش داده شدند. پس از حدود ۳ تا ۴ روز تراکم سلول‌ها به حدود  $4 \times 10^5$  سلول در میلی لیتر رسید. به منظور ساختن محلول استاندارد مس از نمک سولفات مس ( $\text{Cu So}_4, 5\text{H}_2\text{O}$ ) استفاده گردید. ۳/۹۳ گرم از سولفات مس را با آب مقطر به حجم ۱۰۰۰ سی سی رسانده و طبق فرمول  $n_1 v_1 = n_2 v_2$  با توجه به حجم محیط کشت جلبک، به ظرف حاوی جلبک در حال رشد تزریق گردید. تا غلظت‌های ۴، ۶، ۸ و ۲ میلی گرم در لیتر (ppm) حاصل شود. نمونه‌برداری در ساعت‌های ۷۲، ۴۸، ۲۴، و ۹۶ پس از تزریق فلز مس صورت گرفت و تعداد سلول‌های جلبکی با استفاده از لام هموسیتومتر شمارش (Tripathi & Gaur, 2006) شد. برای تعیین میزان کلروفیل a ۳۰ میلی لیتر از محلول جلبک با استفاده از کاغذ صافی واتمن ۴۵/۰ میکرومتر (GF/C) فیلتر گردیده و ۱۰ استن ۹۹ درصد به آن اضافه شد. لوله‌ها در بن ماری ۷۵ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت قرار داده شدند. سپس جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در ۶۶۵ و ۷۵۰ نانومتر خوانده و توسط معادله مربوطه میزان کلروفیل a برحسب میکروگرم در لیتر محاسبه شد (Mohamed, 2008). آنالیز واریانس یکطرفه و تست دانکن، با استفاده از نرم افزار SPSS برای مقایسه آماری انجام شد.

## نتایج

## اثرات فلز مس بر جلبک سبز سندسموس

نتایج بدست آمده از تیمار شاهد نشان داد که در زمان شروع کشت تعداد جلبک‌ها  $10^5 \times 36$  عدد در میلی لیتر بود که با افزایش زمان در طی ۹۶ ساعت به میزان  $10^6 \times 1$  عدد در میلی لیتر ( $28/4$  درصد نسبت به ساعت ۷۲) رسید. در این آزمایش در ساعت ۹۶ جلبک‌ها هنوز در مرحله رشد سریع بسر می بردند. در تیمارهای فلز مس نیز از ساعت ۲۴ کاهش جمعیت آغاز شد، به طوریکه در تیمار  $2 \text{ mg l}^{-1}$  در شروع آزمایش تعداد سلول‌ها  $10^5 \times 3/94$  بود و در ساعت ۲۴ به  $10^5 \times 3/75$  رسید و ۱۰ درصد کاهش نشان داد و در ساعت ۹۶ این کاهش  $72/09$  درصد بود. تراکم در تیمار ۴ میلی گرم در لیتر در ساعت صفر و ۹۶ به ترتیب  $10^5 \times 4/54$  و  $10^4 \times 40$  سلول در میلی لیتر بدست آمد. در تیمار  $6 \text{ mg l}^{-1}$  نیز کاهش میزان جمعیت از ساعت ۲۴ دیده شد، و بطوریکه در ساعت ۹۶ به  $88,12$  درصد خود در زمان صفر رسید. (شکل ۱).

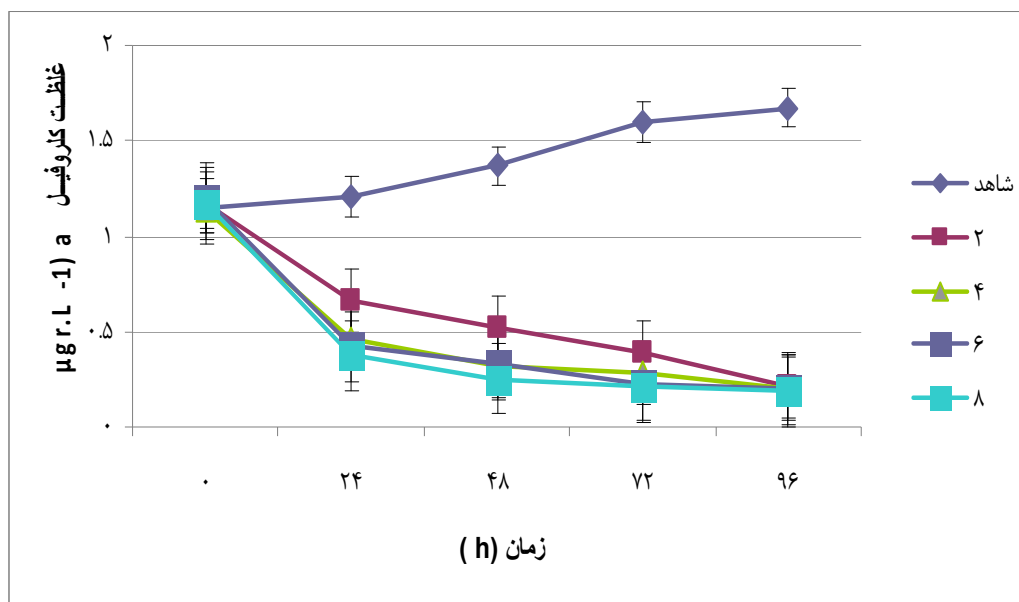


شکل ۱- تغییرات تراکم سلولی (سلول در میلی لیتر) جلبک سندسموس طی ۹۶ ساعت در گروه شاهد و تیمارهای با (۲، ۴، ۶، ۸) میلی گرم در لیتر یون مس

به این ترتیب در تیمارهای دارای فلز مس از ساعت ۲۴ به بعد تنها افزایشی در جمعیت نشان نداده، بلکه سیر نزولی نیز داشته و وارد فاز مرگ شده‌اند و در ساعت ۹۶ به حداقل خود رسیدند. بیشترین کاهش تراکم سلولی در ۲۴ ساعت اول در تیمار  $8 \text{ mg l}^{-1}$  فلز مس مشاهده شد که از  $4/30 \times 10^5$  سلول در میلی لیتر در زمان صفر به  $2/69 \times 10^5$  سلول در میلی لیتر در ساعت ۲۴ رسید که  $37/45$  درصد کاهش نشان داد و این کاهش در ساعت ۹۶ به  $92/33$  درصد ( $10^4 \times 3/33$  سلول در میلی لیتر) رسید. بین تراکم سلول‌ها در ساعات مختلف در تیمار شاهد و تیمارهای فلز مس اختلاف معنی‌دار وجود داشت ( $p=0/01$ ). اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای  $2 \text{ mg/l}$  با  $6/8 \text{ mg/l}$  (به ترتیب  $p=0/38$  و  $p=0/34$ )،  $p=0/11$  و  $p=0/12$  (به ترتیب) مشاهده شد. اما اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای  $2/4 \text{ mg/l}$  و تیمارهای  $6/8 \text{ mg/l}$  ( $p=1/0$ ) دیده نشد. همچنین در شکل (۱) تاثیر غلظت‌های مختلف یون مس بر میزان کلروفیل مشاهده شد. در تیمار شاهد غلظت کلروفیل a از  $1/14$  میکروگرم در لیتر در ساعت صفر به  $1/67$  میکروگرم در لیتر پس از گذشت ۹۶ ساعت رسید.

در تیمارهای ۲، ۴، ۶ و ۸ میلی گرم در لیتر فلز مس میزان کلروفیل a از ساعت ۲۴ کاهش معنی‌داری داشت. بیشترین کاهش کلروفیل a در غلظت ۸ میلی گرم در لیتر مشاهده شده از زمان صفر با  $1/20$  میکروگرم در لیتر به  $0/01$

میکروگرم در لیتر در ساعت ۹۶ رسید بطوریکه ۷۵/۹۸ درصد کاهش نشان داد. بین میزان کلروفیل a در زمان‌های مختلف (۷۲، ۴۸، ۲۴ و ۹۶) و ساعت صفر اختلاف معنی‌دار مشاهده شد ( $p < 0.05$ ) (شکل ۲).



شکل ۲- تغییرات غلظت کلروفیل a جلبک سبز سندسموس طی ۹۶ ساعت در گروه شاهد و تیمارهای با (۲، ۴، ۶ و ۸) میلی گرم در لیتر مس

این اختلاف بین تیمارهای مختلف نیز معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ) و با افزایش غلظت فلز مس از ۲ تا ۸ میلی گرم در لیتر کاهش در میزان کلروفیل a مشاهده شد. در بررسی اثر غلظت‌های مختلف فلز مس تغییرات رنگ و شکل در این جلبک، شامل بیرنگ شدن و از دست دادن خارها، در غلظت ۸ میلی گرم در لیتر در ساعت ۹۶ مشاهده گردید.

## بحث و نتیجه‌گیری

هدف در این تحقیق مطالعه و بررسی پاسخ‌های جلبک *S. obliquus* در برابر غلظت‌های مختلف فلز سنگین مس در ساعت‌های مختلف در غلظت‌های (۲، ۴، ۶ و ۸) میلی گرم در لیتر یون مس و ساعت‌های (۷۲، ۴۸، ۲۴ و ۹۶) بود. در غلظت ۲ میلی گرم در لیتر فلز مس، در ۲۴ ساعت اول مورفولوژی جلبک سندسموس دارای رنگ سبز طبیعی مشابه با گروه شاهد بود، اما با افزایش زمان و غلظت مس تغییراتی مشاهده شد که بیشترین این تغییرات بعد از گذشت ۹۶ ساعت در ۸ میلی گرم در لیتر روی داد که رنگ طبیعی سلولها تغییر کرده بتدریج بیرنگ شده و خارها از بین رفتند. در غلظت  $2 \text{ mg l}^{-1}$  فلز مس کاهش تراکم جلبک از ساعت ۲۴ آغاز گردید، بطوریکه در ساعت ۹۶ تراکم سلولها  $72/09$  درصد کاهش داشت و از  $3/94 \times 10^5 \text{ cell.ml}^{-1}$  در زمان صفر به  $1/10 \times 10^5 \text{ cell.ml}^{-1}$  رسید و این تغییرات در همه تیمارهای مورد آزمایش مشاهده شد. در حالیکه در گروه شاهد سلولها روند طبیعی خود را از نظر افزایش تراکم سلولی و میزان کلروفیل a حفظ کرده بودند. بطور کل تراکم جلبک *S. obliquus* در تیمارهای متفاوت مس کاهش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد داشت ( $p < 0.05$ ) (شکل ۱). از آنجائیکه مس از آنجائیکه مس از طریق سیتوکروم در دیواره‌های سلولی جذب می‌شود، زمانیکه غلظت‌های مختلف فلز مس به محیط کشت جلبک اضافه می‌شود، احتمالاً به دلیل ایجاد فعالیت‌های متابولیکی خاص در داخل سلول‌های جلبک کاهش تراکم سلولی مشاهده می‌گردد. بررسی نتایج کار پژوهشگران نشانگر آن است که تیمارهای متفاوت فلز مس بر رشد گونه‌های مختلف جلبکی تأثیرگذار بوده و میزان این تأثیر بر اساس غلظت آنها و همچنین نوع جلبک متغیر است. سلول‌های سیانوباکتر *Anabaena flos-aquae* در غلظت  $0/35 \text{ mg l}^{-1}$  فلز مس ۵ درصد کاهش رشد داشته و فرا ساختمان

سلول‌های گیاهی در نتیجه تاثیر فلز مس تغییر می نماید. این فلز در غلظت  $3\text{mg l}^{-1}$  سلول‌ها را از حالت طبیعی خود خارج ساخته و باعث بزرگ شدن فضای داخلی تیلاکوئیدها می‌شود. بیشترین تغییرات ساختمانی در غلظت  $9\text{mg/l}$  مس روی داده، و در این هنگام فیلامنت‌ها بطور کامل قطعه قطعه شده و سلول‌های گیاهی باقی مانده موجی شکل و لیز شدند (Surosz & Palinska, 2004). چنین کاهشی در سلول‌های *S. quadricauda* در غلظت  $30\text{mg l}^{-1}$  ترکیبات مس در ساعت ۷۲ نیز مشاهده شده است (Muwafg & Market, 2006). در این پژوهش مقدار کلروفیل a، در غلظت ۲ میلی گرم در لیتر مس در ساعت ۲۴ به میزان ۶۰ درصد کاهش یافت، اما در ساعت ۹۶ میزان کاهش به ۸۰ درصد رسید. در مقایسه بین گروه شاهد و غلظت‌های مورد آزمایش اختلاف معنی‌دار بوده ( $p < 0.05$ ) و باعث تخریب کلروفیل a در سلول شد که نشانگر تأثیر غلظت‌های (۲، ۴، ۶ و ۸) میلی گرم در لیتر مس بر میزان کلروفیل a جلبک سندسموس می‌باشد (شکل ۲). تأثیر ترکیبات مس بر میزان کلروفیل a در سایر گونه‌های جلبک نیز به اثبات رسیده است که باعث کاهش کلروفیل a، در جلبک سبز *quadricauda Scenedesmu* (Tripathi & Gaur, 2004, Fargašová et al., 2005)، فعالیت فتوسنتزی و میزان کلروفیل a در غلظت‌های ۰/۵، ۰/۱ و ۰/۵ ppm در دیاتومه *Chaetoceros radican* (Wagly et al., 1995)، کاهش کلروفیل‌های a، b در غلظت‌های ۲ میلی گرم در لیتر در گیاه پربگ *Pychanthus striat* شده است (Shakya et al., 2007).

رشد و میزان کلروفیل a در جلبک سبز *S. quadricauda* تحت تاثیر ترکیب نیتрат مس، کاهش معنی‌داری یافته‌اند. مس از اجزاء تشکیل دهنده پروتئین‌های تنفسی و اکسیداز است که در غلظت بالا موجب سمیت می‌شود، بر اساس مطالعات انجام شده مس دو ظرفیتی آزاد در محیط کشت‌های آبی (نانو تا پیکو) سبب کاهش تقسیم سلولی در بعضی از کشت‌های فیتوپلانکتونی بخصوص در جلبک‌های سبز می‌شود. علاوه بر آن  $Cu\ II$  آزاد با سطح مقاومت بالاتر ممکن است سرعت فتوسنتز را کاهش دهد و سبب دخالت در جهت جذب دیگر فلزات گردد و در نهایت فعالیت آنزیم‌ها را بوسیله ایجاد رادیکال‌های هیدروکسیل مختل کند. (Pedro et al., 2006, Rehman et al., 2006). یون‌های فلزی از جمله مس باعث تشکیل رادیکال‌های اکسیژن می‌شوند که این تغییر در غشاء، پراکسیداسیون لیپید را افزایش می‌دهد و باعث تجزیه شدن غشاء و تضعیف تنظیم اسمزی در سلول گردد. در نتیجه سلول‌ها شکسته می‌شوند. در جلبک *Cylinroathica fusiformis* با تولید کربوهیدرات‌ها در فاز سکون، در برابر سمیت مس مکانیسم دفاعی ایجاد می‌کند. اثر سمی فلز مس با غلظت بالا ناشی از پتانسیل اکسیداتیو مس II است که باعث کاهش کلروفیل می‌شود و تغییر میزان اکسیژن و ATP را بوسیله آنزیم‌های ردکتاز و آلکالین فسفاتاز کم می‌کند، (Muwafg & Bernd, 2006) احتمالاً کاهش رشد و مقدار کلروفیل a توسط ترکیب فلز مس II می‌تواند با تغییراتی در بیوسنتز کلروفیل ارتباط داشته باشد، بطوریکه یون مس جایگزین یون منگنز در ساختمان شیمیایی کلروفیل a شده و پیوندهای هیدروژنی را شکسته، در نتیجه با تغییر آنزیم‌های دخیل در بیوسنتز کلروفیل a، میزان رشد و کلروفیل a را کاهش می‌دهد، که با نتایج دیگر مطالعات مطابقت داشته است.

به طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که اختلال در تقسیم سلول‌های جلبکی سندسموس و کاهش میزان کلروفیل a فلز سنگین مس از غلظت ۲ میلی گرم در لیتر آشکار می‌شود. *Scenedesmus* به صورت پلانکتونی در حد وسیعی در آب‌های شیرین انتشار دارد و می‌تواند یک موجود مناسب برای آزمایشات بازدارندگی رشد باشد و در مطالعات اثر مخرب آلاینده‌های آبی از جمله فلزاتی مانند مس، به کار گرفته شود.

## تشکر و قدرانی

از محبت‌های بی دریغ خانم دکتر نجات خواه، خانم وکیلی مسئول آزمایشگاه پژوهشی دانشکده علوم فنون دریایی، آقای بابایی مسئول آزمایشگاه شیمی پژوهشکده آبی پروری انزلی و خانم دکتر فلاحی رئیس ایستگاه تحقیقات تکثیر و پرورش آبزیان دریایی سپاسگزاری می‌گردد.

## منابع

- محمد جانی، م. و فلاحی کپور چالی، م. ۱۳۷۶. شناسایی پلانکتون‌های گیاهی مرداب انزلی. مرکز تحقیقات شیلات گیلان، ایران.
- رستمی، ش. ۱۳۷۸. اندازه‌گیری آلاینده‌های آلی و قدرت خود پالایی در رودخانه لنگرود، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، ایران.
- کردوانی، پ. ۱۳۷۴. اکوسیستم‌های آبی ایران. انتشارات قومس، تهران.
- کلارک، ر.ب. ۱۹۹۲. آلودگی دریا، ۱۳۷۹، مترجمین؛ محمدعلی زاهد، زینب محمدی دشتکی. تهران. انتشارات نقش مهر، تهران.
- Fargašová, F., Ondrejkočičová, I. & Mašlejová, A. 2005. Effect of various copper forms on the freshwater alga, *Scenedesmus quadricauda* (TURP.) BREB. Strain Greifswald 15. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 75: 1200-1207.
- Fargašová, A. 2001. Interactive effect of Manganese, Molybdenum, Nickel, Copper I and II, and Vanadium on the freshwater alga *Scenedesmus quadricauda*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 67: 688-695.
- Küpper, A., Küpper, F., & Spiller, M. 1998. In situ detection of heavy metal substituted chlorophylls in water plant. Photosynthesis Research. Marl., 58: 123-133.
- Muwafq, H.M. & Markert, B. 2006. Toxicity of heavy metals on *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) de brebisson in Batch Culture. ESPR. Environ. Sci. & Pollut. Research, 2: 98-104.
- Pedro, N., Leao, T.M., Vasconcelos, S.D. & Vasconcelos, V.M. 2007. Role of marine cyanobacteria in trace metal bioavailability in seawater. Microb. Ecol. 53: 194-109.
- Rehman, A., Shakoori, F.R. & Shakoori, A. R. 2007. Heavy metal resistant *Distigma proteus* (Euglenophyta) isolated from industrial effluents and its possible role in bioremediation of contaminated wastewaters. World J. Microbiol. Biotechnol., 123: 753-758.
- Shakya, K., Chettri, M.K. & Sawidis, T. 2008. Impact of heavy metals (Cu, Zn, Pb) on the chlorophyll content of some mosses. Arch. Environ. Contam. Toxicol. Kathmandu., 54: 412-421.
- Surosz, W., Palinska, K.A. 2004. Effect of heavy metal stress on cyanobacterium *Anabaena flos-aquae*. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 48: 40-48.
- Tripathi, B N. & Gaur, P. J. 2006. Physiological behavior of *Scenedesmus sp.* during exposure to elevated levels Cu and Zn and after withdrawal of metal stress. Protoplasma., 229: 1-9.
- Tripathi, B N. & Gaur, P. J. 2004. Relationship between and Zinc-induced oxidative stress and proline accumulation in *Scenedesmus sp.* Planta., 219: 397-404.
- Wagdy, M. & El-Sarraf, Dae. T. 1995. Effect of copper photosynthetic activity and chlorophyll a content *Chaetoceros radican* Schütt. Bulletin of High Institute of Public Health, 25 (2): 439-446.
- Mohamed, Z. A. 2008. Polysaccharide as protective response against microcystin induced oxidative stress in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda* and their possible significant in the aquatic ecosystem. Ecotoxicology., 17: 504-516.