در
امور دام و آبزیان شماره ۷۴، بهار ۱۳۸۶
پژوهش و سازندگی

اثر کادمیوم در حضور غلظت‌های مختلف نمک NaCl برروی شاخص‌های رشد در جلبک سبز تک سلولی *Dunaliella salina*

• **سیما یحیی آبادی،**
عضو هیأت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان
• **منصور شریعتی،**
عضو هیأت علمی دانشگاه اصفهان
تاریخ دریافت: خرداد ماه ۱۳۸۴ تاریخ پذیرش: آذرماه ۱۳۸۴
Email: Sima-yah@yahoo.com

چکیده

Dunaliella یک جلبک سبز تک سلولی می‌باشد. اثر کادمیوم در حضور غلظت‌های مختلف نمک کلریدسدیم شاهد (غلظت ۱ مولار) و ۱/۵ و۲ مولار برشاخص‌های رشد (تعداد سلول ومیزان کلروفیل کل) در سویهٔ ایرانی جلبک سبز *D. salina* به مدت ۳۶ روز مورد بررسی قرار گرفت . نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که افزایش در غلظت نمک موجب کاهش اثرات تخریبی کادمیوم بر تعداد سلول و میزان کلروفیل کل سلول‌های *D. salina* می‌گردد. به نظر می‌رسد که کاهش تأثیر کادمیوم در نرخ رشد و میزان کلروفیل کل با افزایش غلظت نمک به علت تشکیل $CdCl_2$ وجذب کمتر کادمیوم توسط سلول می‌باشد.

کلمات کلیدی: *D. salina*، کادمیوم، کلروفیل، کلریدسدیم

Pajouhesh & Sazandegi No 74 pp: 118-122

Effect of cadmium (Cd) at different concentrations of NaCl on growth rates in unicellular green alga *Dunalilla salina*

By: S. Yahyaabadi. Islamic Azad University of Falavarjan and M. Shariati, Dept. of Biology, University of Isfahan

D. salina is a unicellular green alga. The individual effects of Cd^{2+} ($0.5\ mg.L^{-1}$) at different concentrations of NaCl (1, 1.5 and 2M) on the growth (cell number and total chlorophyll content) of Iranian strain of *Dunaliella salina* were examined during 36 days of treatment. The results show that increase in salt concentration caused significant increase in cell number and chlorophyll content of *D. salina*. It seems such increase in growth rates is due to formation of $CdCl_2$ and decrease of uptake of Cd^{2+} by cells.

Keywords: *D. Salina*, Cadmium, Chlorophyll, Nacl.

www.SID.ir

مقدمه

Dunaliella یک جلبک سبز تک سلولی از شاخهٔ Chlorophyta ، راستهٔ Volvocales وتیرهٔ Chlorophyceae می‌باشد. مشخصهٔ خاص گونه‌های این جنس ، رشد درمحیط‌های نمکی با غلظت زیاد می‌باشد (۷و۵و۱). میـزان کلروفیـل تحت تنش‌های مختلف در سـلول‌های گیاهی تغییرمی کند، برای مثال گزارش شـده اسـت که تحت تأثیر افزایش مس ، کادمیوم وسرب میزان کلروفیل درواحدهای فتوسنتزی کاهش یافته اسـت (۱۷) . کادمیوم یکی از فلزات سـنگین می‌باشد کـه در غلظت‌های درحـد میلی مولار ودر زمان‌های طولانـی، اثرات سـمی متنوعی از خودنشـان میدهد از جمله ممانعت از سنتزDNA RNA ، وپروتیئـن، ممانعت از فعالیت آنزیم‌ها (۲، ۱۴، ۱۵). علیرغم اینکـه کادمیوم از عناصر ضروری جهت رشـد جلبـک *D. salina* محسـوب نمی شـود ولی جذب این عنصر توسط سلول بیانگر وجود راه‌های جذب این عنصر از طریق کانال‌ها و مئافذ جذب عناصر دیگر می‌باشـد . برای مثال کادمیوم به راحتی می‌تواند از طریق کانال‌های کلسیم عبور کند زیرا اندازه شعاع یونی کلسیم ($0/99A^{\circ}$) و کادمیوم ($0/97A^{\circ}$) و بار الکتریکی آنها مشـابه اسـت (۲). به نظر می‌رسد که وجود کادمیوم در محیط *D. salina* برتقسیم سلولی وسنتزکلروفیل اثـر می‌گذارد که بـا افزایش غلظت نمک این اثـرات کاهش می‌یابد. نتایـج حاصـل از اثر کادمیوم در حضـور غلظت‌های مختلـف نمک برشاخص‌های رشد در جلبک *D. salina* می‌تواند به عنوان یک مدل مناسب در مطالعات فیزیولوژی گیاهی مورد استفاده قرارگیرد.

مواد و روش‌ها

سـویهٔ ایرانی جلبک سبز تک سـلولی *D. salina* جدا سـازی شده از باتلاق گاوخونی اصفهان از کلکسیون گروه زیست شناسی دانشگاه اصفهان تهیه گردید. ابتدا جلبک‌ها در محیط کشت Johnson و همکاران (۸) شامل ۵ میلـی مولار KNo_3، و ۵ میلی مـولار $Mgso_4$، و ۰/۲ میلی مولار $Cacl_2$، و ۰/۲ میلـی مـولار Kh_2po_4 + ۱۰ + ۴ میکرومولار $FeCl_3$+Na_2-EDTA، و ۷ میکرومـولار ۱ ،$Mncl_2$ میکرومولار $2H_2O$ و $CuCl2$، میکرومولار $Zncl_2$، و ۱ میکرومـولار $Cocl_2$,$6H_2O$، و ۱ میکرومولار (NH_4)$_6$ Mo_7O_{24}, $4H_2O$ و ۱۰ میکرومولار $NaHCO_3$

در pH برابـر ۷/۵ و در غلظت یـک مولار نمک NaCl دررژیم شـبانه روزی ۱۴ سـاعت نور و۱۰ ساعت تاریکی باشدت نور ۱۰۰ میکرومول فوتون برمتر مربع برثانیه و در دمای ۲ ± ۲۷ درجه سـانتی‌گراد کشت گردیدند (۱، ۱۳). جهت تنظیم شـدت نور از دسـتگاه Quantum Sensor Qspar, U.K Hansatech، اسـتفاده گردیـد. در مرحلهٔ بعـد جهت اجراء آزمایـش تلقیح سوسپانسـیون‌های جلبکی دراواسـط فاز رشد لگاریتمی در شـرایط کاملاً استریل به ارلن‌های محیط کشت به گونه‌ای انجام شد که غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر کادمیوم با استفاده از $CdCl_2$ برای شاهد و غلظت‌های ۱، ۱/۵ و۲ مولار NaCl وتعداد جلبک به میزان تقریبی ۲۴×۱۰^4 در هر میلی لیتر تأمیـن گردد (۳). تأثیرکادمیوم در حضـور غلظت‌های مختلف نمک NaCl بر روی تعداد سـلول هر دو روزیکبار با شمارش سلول توسط هموسایتومتر (۶) مورد بررسـی قرارگرفت. جهـت تعیین میزان کلروفیـل ۵ میلی لیتر از سوسپانسـیون جلبکـی به یک لولـهٔ آزمایش منتقل و با اسـتفاده از دسـتگاه سـانتریفوژ E-1-west Germany SIGMA3 در ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سـانتریفوژ گردید. سـپس محلول رویی خارج و بـه رسـوب حاصله، ۵ میلی لیتر اسـتون ۸۰ درصد اضافـه و مخلوط گردید. مجدداً عمل سـانتریفوژ تکرار و محلول رویی اسـتخراج گردید و با استفاده از اسـپکتروفتومتر Pharmacia ، LKB ، VASPEC ، U.K. میـزان جذب در طـول موج‌هـای ۴۱۲، ۴۸۰،۴۶۰، ۴۳۱ نانومتر قرائت و میـزان کلروفیل برحسـب میکروگرم برمیلی لیتر وپیکوگرم برسـلول مورد محاسـبه قرار گرفت (۴). نتایج بدسـت آمده در این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار و با اسـتفاده از نرم افزارآماری Minitab و تحلیل واریانس چند متغیره (MANOVA) و با اسـتفاده از آزمون λ Wilk's مورد تجزیه وتحلیل آماری قرار گرفت.

نتایج و بحث

مقدار کلروفیل و تعداد سلول از شاخص‌های فیزیولوژیک جهت بررسی اسـترس‌ها می‌باشـد (۹، ۱۰). با عنایت به گسـترش فزایندهٔ کاربرد فلزات سـنگین و از جمله کادمیوم، بررسـی تأثیراین عناصر برروی متابولیسـم و شـاخص‌های فیزیولوژیک سـلول‌های زنده از اهمیت خاصی برخورداراست (۱۱، ۱۲) . دراین تحقیق غلظت کادمیوم به نحوی انتخاب گردید که اثرات کشـندگی شدید نداشته باشد. بدین منظور سوسپانسـیون‌های جلبکی با غلظت‌هـای صفر، ۰/۱، ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷ و ۰/۹ میلی گرم در لیتر کادمیوم با غلظت ۱ مولار نمک کلرید سدیم تیمار گردیدند و پس از شمارش سلولی و رسم منحنی رشد غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر کادمیوم که در آن غلظت،۵۰ درصد سـلول‌ها بقای خود را حفظ می‌نمایند انتخاب گردید (جدول ۱) و اثر غلظت‌های مختلف نمک در حضور کادمیوم برروی شـاخص‌های رشـد (تقسـیم سـلولی و کلروفیل کل) در جلبک سبز تک سـلولی *Dunaliella salina* بررسـی گردید. گزارشات نشان میدهد که درغلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر کادمیوم ۵۰ درصد سـلولهای جلبـک *Dunaliella salina* قادربه ادامه رشـد می‌باشـند (۱۶). جدول ۲، میانگین تعداد سلول سـویهٔ ایرانی جلبک سـبزتک سـلولی *Dunaliella salina* را در شاهد (غلظت ۱ مولار) وغلظت‌هـای ۱/۵ و۲ مولار نمک در حضور غلظـت ۰/۵ میلی گرم در لیتر کادمیوم در طی ۳۶ روز آزمایش نشان می‌دهد. طبق نتایج حاصله مشاهده می‌گردد که با افزایش غلظت نمک، یون‌های کادمیوم اثر کشندگی کمتری بر روی سـلول دارد وتعداد سلول نسبت به شاهد بطور معنی‌داری (با توجه به جدول آماری ۳) کاهش کمتری نشـان می‌دهـد که این اختلاف در روز ۱۲ خصوصا در غلظت ۲ مولار نمک مشهودتر است. به نظر می‌رسد کاهش در میزان مرگ و میرسـلول‌ها با افزایش غلظـت نمک درحضورغلظت ۰/۵ میلی‌گـرم درلیتر کادمیوم، احتمالاً به علت کاهش فـرم آزاد یون کادمیوم ناشی از وجود NaCl و افزایش کادمیوم به صورت $CdCl_2$ و در نتیجه کمتر جذب شـدن آن توسط سـلول‌ها باشـد (۱۳). جدول ۴ میانگین کلروفیل کل را برحسـب میکروگرم در واحد حجم (میلی لیتر) و برحسـب پیکوگرم برسـلول نشـان می‌دهد. همانگونه که مشـاهده می‌گردد با افزایش غلظت

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱: میانگین تعداد سلول در حضور غلظت های، ۰/۱۰، ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷ و ۰/۹ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم و غلظت ۱ مولار نمک NaCl مربوط به ۴ تکرار ± انحراف معیاردرطی ۳۶ روزدرسویهٔ ایرانی *D. salina*

روز	10^6* (میانگین تعداد سلول برمیلی لیتر)					
	۰	۰/۱	۰/۳	۰/۵	۰/۷	۰/۹
۰	۰/۲۵ ± ۰/۱	۰/۲۵ ± ۰/۱	۰/۲۵ ± ۰/۱	۰/۲۵ ± ۰/۱	۰/۲۵ ± ۰/۱	۰/۲۵ ± ۰/۱
۶	۲/۲ ± ۰/۲	۲ ± ۰/۳	۱/۷ ± ۰/۰۱	۱/۱ ± ۰/۰۲	۰/۹ ± ۰/۰۱	۰/۷ ± ۰/۰۲
۱۲	۶ ± ۰/۱	۴/۳ ± ۰/۱	۳/۹ ± ۰/۰۱	۳ ± ۰/۱	۲/۵ ± ۰/۰۱	۲/۲ ± ۰/۰۲
۱۸	۱۰/۱ ± ۰/۰۸	۷/۲ ± ۰/۰۱	۶ ± ۰/۰۲	۵ ± ۰/۱	۴/۱ ± ۰/۰۱	۳/۲ ± ۰/۰۱
۲۴	۷/۵ ± ۰/۱۵	۶ ± ۰/۰۴	۴/۵ ± ۰/۲	۳/۸ ± ۰/۰۱	۲/۸ ± ۰/۰۲	۲/۲ ± ۰/۰۳
۳۰	۵/۵ ± ۰/۱	۴/۵ ± ۰/۰۳	۳/۲ ± ۰/۰۱	۲/۸ ± ۰/۰۲	۲/۱ ± ۰/۰۱	۱/۹ ± ۰/۰۲
۳۶	۴/۴ ± ۰/۴	۳/۲ ± ۰/۰۱	۲/۹ ± ۰/۰۳	۲/۲ ± ۰/۰۳	۱/۸ ± ۰/۰۳	۱/۱ ± ۰/۰۱

جدول ۲: میانگین تعداد سلول در حضور غلظت‌های ۲،۱/۵،۱ مولار نمک NaCl وتیمارشده باغلظت ۰/۵ میلی گرم درلیتر کادمیوم مربوط به ۴ تکرار ± انحراف معیار درطی ۳۶ روز درسویهٔ ایرانی *D. salina*.

روز	10^6* (میانگین تعداد سلول برمیلی لیتر)		
	شاهد (۱مولار)	غلظت ۱/۵ مولار نمک	غلظت ۲ مولار نمک
۰	۰/۲۵ ± ۰/۱	۰/۲۵ ± ۰/۱	۰/۲۵ ± ۰/۱
۶	۲/۲ ± ۰/۲	۳/۱ ± ۰/۱	۵/۴ ± ۰/۲
۱۲	۶ ± ۰/۱	۸/۵ ± ۰/۲	۱۱/۳ ± ۰/۶
۱۸	۱۰/۱ ± ۰/۰۸	۱۱ ± ۰/۱	۱۲/۴ ± ۰/۴
۲۴	۷/۵ ± ۰/۱۵	۹/۵ ± ۰/۲	۱۰/۳ ± ۰/۲
۳۰	۵/۵ ± ۰/۱	۶/۲ ± ۰/۴	۷/۳ ± ۰/۵
۳۶	۴/۴ ± ۰/۴	۵/۵ ± ۰/۴	۶ ± ۰/۲

جدول ۳: تحلیل واریانس چندمتغیره (MANOVA) باآزمون wilk's λ جهت بررسی اثرغلظت نمک NaCl و (۱، ۱/۵ و۲ مولار) برروی شاخص‌های اندازه گیری شده درحضورغلظت ۰/۵ میلی گرم درلیتر کادمیوم درسویهٔ ایرانی *D. salina*

تیمارها	تعدادسلول		کلروفیل کل برمیلی لیتر		کلروفیل کل برسلول	
	F	wilk's λ	F	wilk's λ	F	wilk's λ
اثرغلظت اصلی	۱۲۲/۲۰۲	۰/۰۰۰۰۲**	۵۱۲/۶۵۴	۰/۰۰۰۰۱**	۹۰/۵۰۰	۰/۰۰۰۰۴**
غلظت شاهد با ۱/۵	۲۲۰۰/۵۰۱	۰/۰۰۰۵۲	۳۶۸۸۰	۰/۰۰۰۰۱**	۷۹۰۰/۰۳۱	۰/۰۰۰۰۵**
غلظت شاهد با ۲	۳۰۴۲/۴۰۵	۰/۰۰۰۲۶**	۵۴۳۹۰	۰/۰۰۰۰۴**	۵۸۲۹/۱۳۸	۰/۰۰۰۱۴**
غلظت ۱/۵ با ۲	۴۹/۷۳۲	۰/۰۳۰۰۰*	۳۶۵۵۴	۰/۰۰۰۱۴**	۲۴/۸۲۱	۰/۰۱۹۲۴**

نتایج باسطوح احتمال ۱٪ (**) و۵٪ (*) ارزیابی شده اند.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۴: میانگین کلروفیل کل درحضورغلظت‌های ۱، ۱/۵، و۲ مولار نمک NaCl وتیمارشده باغلظت ۰/۵ میلی گرم درلیتر کادمیوم مربوط به ۴ تکرار ± انحراف معیاردرطی ۳۶ روزدرسویهٔ ایرانی *D. salina*

روز	میانگین کلروفیل کل					
	میکروگرم برمیلی لیتر			پیکوگرم برسلول		
	شاهد (۱مولار)	۱/۵مولار	۲مولار	شاهد (۱مولار)	۱/۵ مولار	۲ مولار
۰	۰/۷ ± ۰/۰۲	۰/۷ ± ۰/۰۲	۰/۷ ± ۰/۰۳	۱/۹ ± ۰/۰۲	۱/۹ ± ۰/۰۲	۱/۹ ± ۰/۰۱
۶	۴/۹ ± ۰/۱	۵/۲ ± ۰/۰۱	۵/۶ ± ۰/۰۲	۲/۹ ± ۰/۲	۳/۲ ± ۰/۰۴	۳/۵ ± ۰/۰۲
۱۲	۶ ± ۰/۴	۷/۱ ± ۰/۰۲	۷/۶ ± ۰/۰۴	۳/۲ ± ۰/۱	۳/۶ ± ۰/۰۳	۳/۹ ± ۰/۰۴
۱۸	۲۰ ± ۰/۲	۲۲ ± ۰/۰۱	۲۳/۲ ± ۰/۰۱	۲/۱ ± ۰/۰۳	۲/۴ ± ۰/۰۸	۲/۹ ± ۰/۰۲
۲۴	۱۵/۱ ± ۰/۱	۱۶/۵ ± ۰/۰۴	۱۷/۴ ± ۰/۱	۱/۵ ± ۰/۰۱	۱/۹ ± ۰/۰۱	۲/۲ ± ۰/۰۱
۳۰	۵/۲ ± ۰/۰۱	۷/۴ ± ۰/۰۸	۷/۹ ± ۰/۰۴	۱/۰۱ ± ۰/۰۲	۱/۳ ± ۰/۰۲	۱/۴ ± ۰/۰۲
۳۶	۰/۶ ± ۰/۰۳	۱/۴ ± ۰/۰۱	۲/۲ ± ۰/۰۲۱	۰/۴۶ ± ۰/۰۱	۱ ± ۰/۰۱	۱/۲ ± ۰/۰۱

نمک، مقدار کلروفیل کل نیز برحسب میکروگرم برمیلی لیتر و پیکوگرم بر سلول نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری (جدول آماری ۳) می‌یابد و این امر به این معناست که اثرات سمی کادمیوم در غلظت‌های بالاتر نمک کاهش یافته است و همانگونه که در مورد تقسیم سلولی در جدول ۱ اشاره شد به نظر می‌رسد این حالت نیز به علت افزایش کادمیوم به صورت $CdCl_2$ و در نتیجه کمتر جذب شدن آن توسط سلول‌ها باشد (۱۳).

به طور کلی نتایج حاصل از این تحقیق مبین آن است که تنش حاصل از وجود کادمیوم در محیط موجب اختلال در شاخص‌های رشد ازجمله تعداد سلول ومیزان کلروفیل در جلبک *D. salina* می‌گردد که با افزایش شوری محیط این اثرات کاهش می‌یابد لذا مطالعات گسترده برروی تأثیرفلزات سنگین برروی موجودات زنده وشناسایی عواملی که اثرات سمی این فلزات را کاهش می‌دهد ازاهمیت خاصی برخورداراست .

منابع مورد استفاده

1-Ben-Amotz , A.and Avron. M. 1990; The biotechnology of cultivating the halo tolerant alga dunaliella. TIBTECH . 8,124-129

2- Bhattacharya , M. H. Wilson .A. K. , Brjan ,S.S. and Jonah, M.2000; Biochemical pathways in cadmium toxicity. In : Molecular biology and toxicology of metals (eds. Zalups , R. K. and Koropatnick,J.). Taylor and Francis. London and new York , 34-74.

3- Chen , B.L. , Huang , Q., Shi , Q . and Wu, S. 1998; Accumulation of Ag , Cd,Co,Cu,Hg,Ni and Pb in *Pavlova viridis* Tseng (Haptophyceae). Journal of Applied phycology. 10,371-376 .

4- Eijckelhoff , C . and Dekker , J.P. 1997; A routine method to determine the chlorphyll a, pheophytin a and β - carotene contents of isolated photosystem II reaction center complexes. Photosynthesis Research .52,63-67.

5- Fabregas, J., Herrero ,C., Cabezas, B., Liano, R.and Abalde,J.1986; Response of the marine microalga *Dunaliello tertiolecta* to nuteirnt concentration and salinity variations in batch cultures . Journal of plant physiology . 125,475-484.

6- Fujii, S. 1991; The growth and intracellular ionic composition of *Dunaliella tertiolecta* in magnesium - rich media. Plant cell physiology . 32,549-554.

7- Jimenez, C. and Xavier Niell , F. 1991; Growth of *Dunaliella viridis* Teodoresco: Effect of salinity , temperature and nitrogen Concentration. Journal of Applied phycology. 3 , 319-327.

Archive of SID

www.SID.ir

8- Johnson, M.K., Johnson,E.J., McElrory, R.D. Speer, H.L. and Bruff, B.S. 1968; Effects of salt on the halophilic alga *Dunaliella viridis*. Journal of Bacteriology. 95,1461-1468.

9- Kastori , R. Plesincar. M, Sakac Z., Pankovic, D. and Arsenijevic – Maksimovic , I. 1998; Effect of excess lead on sunflower growth and photosynthesis. Journal of plant Nutrition. 21,75-85.

10- Khristoforova, N.K., Aizdaicher, N.A and Berezovskaya, O.U. 1996; The effect of copper ions and a detergent of green microalgae *Dunaliella tertiolecta* and Platymonas sp. Russian Journal of Marine Biology . 22 , 109-114 .

11- Lam , P.K.S, Wut , P.F. Chan , A.C.W . and Wu, R.S.S. 1999; Individual and combined effects of cadmium and copper on the growth response of *Chlorella vulgaris*. Environmental Toxicology . 14 , 347-353.

12- Nygard, C. and Ekelund, N.G.A. 1999; Effects of lead (PbCl2) on photosynthesis and respiration of the bladder Wrack , Fucus vesiculosus in relation to different salinities. Water, Air and Soil pollution. 116 , 549 –565.

13- Pick, U.1992; ATPase and ion transport in Dunaliella. In: Dunaliella : Physiology, biochemistry and biotechnology. (eds. Avron, M. and Ben – Amotz, A.) Boca Raton, Ann Arbor , London, Tokyo. CRC press, 63-98.

14- Pistocchi , R., Mormile, A.M., Guerrini , F., Isani, G. and Boni , L.2000; Increased production of extra – and intracellular metal – ligands in phytoplankton exposed to copper and cadmium . Journal of Applied Phycology. 12,469-477.

15- Romero – Puetas,M.C., Palam, J.M,. Gomez,M., Del Rio,L.A.and Sandalio, L.M.2002; Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants Plant, Cell and Environment . 25 , 677 – 686.

16-Visviki,I. and Rachlin,J.W. 1994; Acute and chronic exposure of *Dunaliella salina* and chlamydomonas bullosa to copper and cadmium:Effects on growth.Archive Environmental contamination and Toxicology.26:154-162.

17- Woolhouse, H.W. 1983; Toxicity and tolerance in the responses of plants to metals. In: Physiological plant ecology III, (eds, Lange, O. L.Nobel,P.S. Osmond, C.B. and Ziegler. H.). Springer – Verlag, Berlin, Heidelberg,New York, 245-300.

Archive of SID

www.SID.ir