اثر آلومینیوم بر رشد، مقدار پروتئین، کلروفیل‌ها، کاروتنوئیدها و میزان تجمع آلومینیوم در جلبک *Dunaliella salina* Teodoresco.

فاطمه یدالهی، *آرین ساطعی، مه لقا قربانلی

گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۱۱/۳ **تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۰۳/۰۸**

چکیده

اثر آلومینیوم با غلظت‌های ۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ٤۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار در طی ده روز بر جلبک *Dunaliella salina* Teodoresco مورد بررسی قرار گرفت. مقدار پروتئین، رنگیزه‌های فتوسنتزی، تعداد سلول و میزان تجمع آلومینیوم اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که مقادیر کلروفیل b، تعداد سلول و میزان پروتئین تغییرات معنی‌داری نداشته، اما میزان بتاکاروتن، کلروفیل a، کلروفیل کل و تجمع آلومینیوم افزایش معنی‌داری داشته است. آلومینیوم باعث افزایش رشد جلبک تا غلظت ۳۰۰ میکرو مولار شده، ولی در غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار باعث کاهش رشد شده است. pH به غیر از روزهای اول در بقیه روزها نسبت به شاهد با افزایش غلظت آلومینیوم افزایش معنی‌داری داشته، به این صورت که تا غلظت ۳۰۰ میکرو مولار افزایش و از ۳۰۰ میکرو مولار به بعد کاهش pH را نشان داد. با توجه به مقدار انباشتگی آلومینیوم و تعداد سلول می‌توان نتیجه گرفت که جلبک سبز *Dunaliella salina* از طریق افزایش تقسیم سلولی در غلظت‌های پایین قادر به تحمل تنش فلز سنگین آلومینیوم می‌باشد.

کلمات کلیدی: *Dunaliella salina* Teodoresco، آلومینیوم، کلروفیل، pH، رشد

مقدمه

آلومینیوم یک عنصر فراوان (۱۸درصد) در پوسته زمین است، اما این عنصر در حالت آزاد خود بسیار نادر است. آلومینیوم یک عنصر شیمیایی با علامت Al و عدد اتمی ۱۳ است. عنصری است نقره‌ای رنگ و انعطاف‌پذیر که عمدتاً به صورت سنگ معدن بوکسیت یافت می‌شود. این عنصر به صورت کاتیون سه ظرفیتی محلول است که در غلظت‌های میلی‌مولار در گیاهان باعث سمیت می‌شود. در میان میکروارگانیسم‌ها بیشترین مقاومت اسیدی به آلومینیوم مربوط به مخمرها و قارچ‌هاست. به طور کلی اثر آلومینیوم در ارتباط یا کاهش pH می‌باشد. آلومینیوم در pHهای ۵ و پائین‌تر از آن محلول بوده و در pHهای بالاتر از ۵ رسوب می‌کند. پاسخ اصلی به سمیت آلومینیوم بازدانگی سریع طویل شدن ریشه می‌باشد که در نتیجه آن کاهش رشد محصولات را سبب می‌شود (Adams & Alam, 1979).

* *Email:saateyi@gmail.com*

Archive of SID

www.SID.ir

آلومینیوم بر جوانه‌زنی اثری ندارد، اما می‌تواند بر ریشه جدید و توسعه دانه رست اثر کند. بازدارندگی رشد ریشه در طی ۲ تا ٤ روز بعد از آغاز جوانه‌زنی نشان داده شده‌است. سمیت آلومینیوم به خصوص در نوک ریشه و ریشه‌های جانبی دیده می‌شود (Bennet & Breen, 1991). اتصال آلومینیوم به DNA سبب بازدارندگی تقسیم سلولی می‌شود (Bennet & Laurie, 1985). همچنین آلومینیوم بر حرکت کروموزوم‌ها که بوسیله دوک میتوز انجام می‌گیرد، تاثیرگذار است (Rout et al., 2001). اطلاعات بیولوژیکی اثرات آلومینیوم بر جلبک‌ها حاکی از اثرات بازدارنده آن است که معمولاً با تغییر pH انجام می‌گیرد. این فلز در غلظت‌های پائین‌تر اثر تحریکی داشته و در غلظت‌های بالا اثر بازدارنده دارند. آلومینیوم روی فراساختار سلول اثر خواهد داشت. در بررسی با میکروسکوپ الکترونی دیده شده که غشاهای تیلاکوئیدی شکسته شده و پلی فسفاتها انباشته و متراکم شده‌اند و همچنین واکوئل‌ها نیز به صورت رسوبات شیمیایی روی سطح سلول قرار گرفته‌اند. بنابراین تاثیرات مهم آلومینیوم بر سلول‌های جلبک شامل لیز شدن و زوال تدریجی غشای سلول‌هاست. به نظر می‌رسد که آلومینیوم به صورت سینرژیکی روی غشاء سلول‌ها اثر گذاشته و آن‌ها را به سمت زوال و نابودی می‌کشاند (Sacan et al., 2007). علاوه بر آلومینیوم فلزات مس و کادمیوم نیز میتوانند باعث ایجاد تنش در جلبک *Dunaliella salina* شوند. استرس این فلزات پارامترهای سلولی مختلفی را تحت تاثیر قرار می‌دهد، از جمله: حجم کلی سلول، پیرنوئید هسته، گرانول‌های نشاسته، پلی فسفات‌ها، لیپیدها، واکوئل‌ها، دیواره سلول و فضای پری پلاسمی (Visviki & Rachlin, 1993). باتوجه به اینکه تغییر در میان رنگیزه‌های گیاهی به ویژه کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها یکی از تغییرات فیزیولوژیکی مهم در نمو محسوب می‌شود و با توجه به اینکه بررسی‌های اندکی در زمینه اثر آلومینیوم بر رشد جلبک *Dunaliella salina* Teodoresco و میزان پروتئین آن صورت گرفته است. لذا بررسی این اثر در این پژوهش مورد توجه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

جلبک دونالیلا سالینا در محیط کشت جانسون دارای $AlCl_3$ با غلظت‌های مختلف ۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ٤۰۰، ٥۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار، pH 7.5، با دمای۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۱٥۰۰ لوکس با تناوب ۲۰ ساعت روشنایی و ٤ ساعت تاریکی در طی ده روز رشد داده شد. همچنین هوادهی به کمک پمپ هوادهی در هر روز انجام شد. نتایج حاصل از سنجش مقادیر مختلف با در نظر گرفتن ۳ تکرار برای هر مورد محاسبه و به صورت میانگین و انحراف معیار معرفی شده‌اند. آزمون آنالیز واریانس (Anova) با استفاده از نرم‌افزار SPSS در سطح ۰/۰٥ انجام شدند و برای رسم نمودارها از نرم‌افزارها Excel استفاده شد .

اندازه‌گیری رنگیزه‌های فتوسنتزی

سنجش کلروفیل a، b و بتاکاروتن

سوسپانسیون جلبک دونالیلا و استن ۸۰درصد برای استخراج رنگیزه‌ها استفاده گردید. ابتدا به هر لوله سانتریفوژ ۳ میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبک انتقال داده شد و سپس توسط دستگاه سانتریفوژ به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۲٥۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. محلول فوقانی را به آرامی جدا کرده و به رسوب جلبکی حامل ۳ میلی‌لیتر استن ۸۰ درصد اضافه گردید. پس از همزدن کامل توسط دستگاه همزن، مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه عمل سانتریفوژ تکرار شد. محلول فوقانی را جدا کرده و جذب نور را در طول موج‌های ٤۳۱، ٤۱۲، ٤۸۰، ٤٦۰، ٦٦۳، ٦٦٥ و ٦٤٥ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکترو فتومتر مدل Labomed, Inc (U.S.A) خوانده شد و میزان کلروفیل a, b و بتاکاروتن بر حسب میلی‌گرم در گرم ماده تر نمونه محاسبه شد (Jensen, 1987).

میزان پروتئین نیز با استفاده از منحنی استاندارد پروتئین، بر اساس گرم بر کیلوگرم وزن خشک ارزیابی شد و جذب آن توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷٥۰ نانومتر خوانده شد (Lowry et al., 1995).

Archive of SID

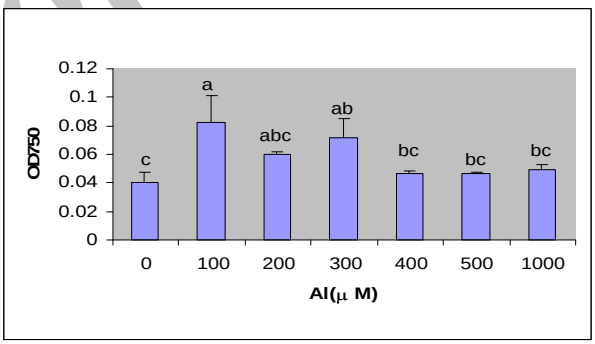
www.SID.ir

میزان رشد جلبک نیز در هر روز به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۵۰ نانومتر پس از هوادهی خوانده شده است و در هر روز pH نیز به وسیله pH متر خوانده شد.

تعداد سلول‌ها به وسیله میکروسکوپ شمارش شد. میزان تجمع آلومینیوم در سلول به وسیله دستگاه فلیم فتومتر مورد سنجش قرار گرفت .

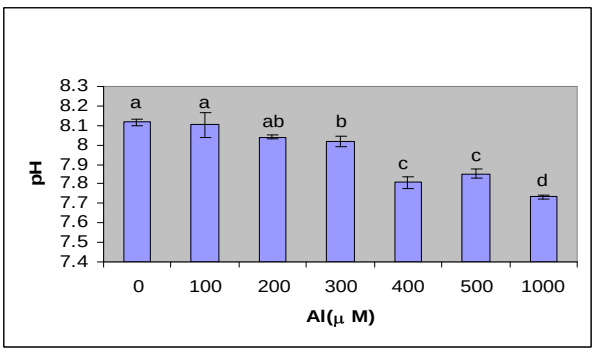
نتایج

اثر کلی آلومینیوم همانطوری که در شکل ۱ نشان داده شده است بر رشد معنی‌دار بوده است. رشد در تیمارهای ۱۰۰ و ۳۰۰ میکرومولار نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری داشته است. به طور کلی در این تحقیق افزایش رشد جلبک تا غلظت ۳۰۰ میکرو مولار و کاهش رشد در غلظت‌های ٤۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار آلومینیوم مشاهده شد.



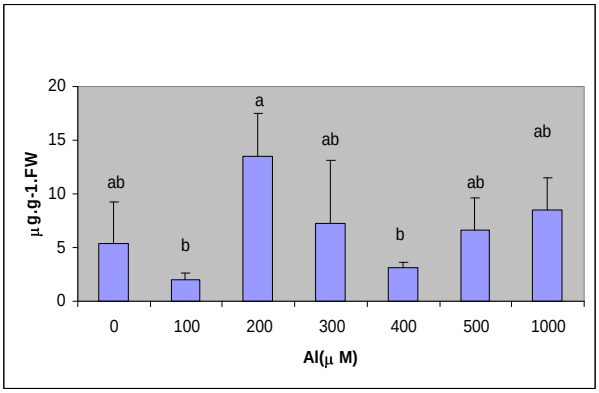
شکل ۱: OD دونالیلا در غلظت‌های مختلف آلومینیوم

همچنین pH نیز طبق شکل ۲ تا غلظت ۳۰۰ میکرومولار افزایش و از ۳۰۰ میکرومولار به بعد کاهش یافته است.



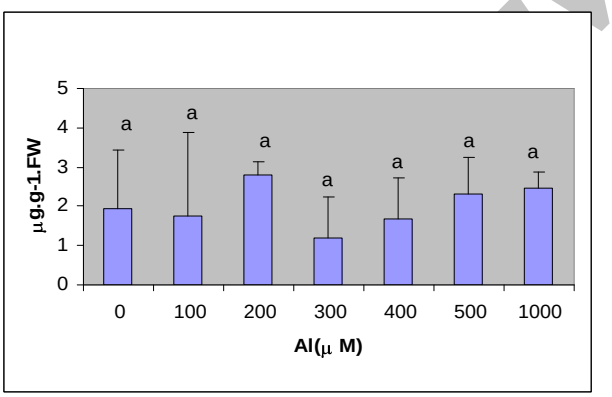
شکل ۲: تغییرات pH دونالیلا در غلظت‌های مختلف آلومینیوم

اثر آلومینیوم بر محتوای کلروفیل a معنی‌دار می‌باشد. محتوای کلروفیل a در تیمار ۲۰۰ میکرومولار نسبت به شاهد و سایر تیمارها با توجه به شکل ۳ افزایش معنی‌داری نشان داده است.



شکل ۳: محتوای کلروفیل a در غلظت‌های مختلف آلومینیوم

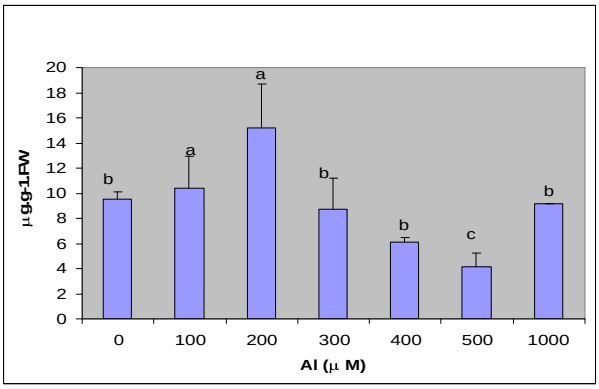
همچنین اثر آلومینیوم بر محتوای کلروفیل b نیز طبق شکل ٤ معنی‌دار نمی‌باشد. محتوای کلروفیل b در تمامی تیمارها نسبت به تیمار شاهد و نسبت به یکدیگر اختلاف معنی‌داری نشان نداده است.



شکل ٤: محتوای کلروفیلb در غلظت‌های مختلف آلومینیوم

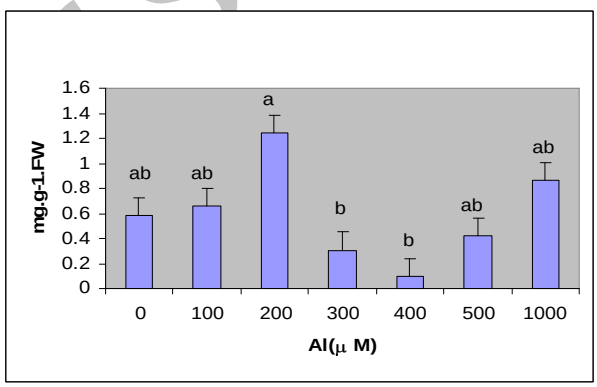
اثر آلومینیوم بر کلروفیل کل افزایش معنی‌داری داشته است. طبق شکل ۵ افزایش معنی‌داری در غلظت ۲۰۰ میکرومولار دیده شده است.

www.SID.ir



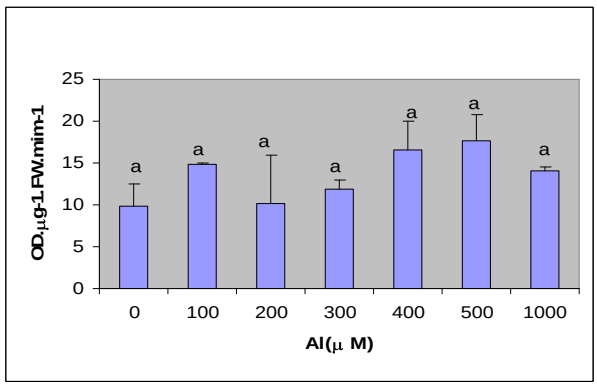
شکل ۵: محتوای کلروفیل کل در غلظت‌های مختلف آلومینیوم

اثر آلومینیوم بر میزان بتا کاروتن با توجه به شکل ٦ معنی‌دار بوده است. میزان بتا کاروتن در تیمار ۲۰۰ میکرومولار نسبت به شاهد و سایر تیمارها افزایش معنی‌داری نشان داده است.



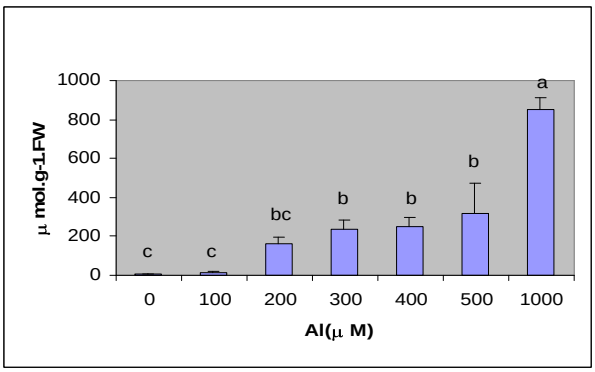
شکل ٦: میزان بتا کاروتن در غلظت‌های مختلف آلومینیوم

اثر آلومینیوم بر میزان پروتئین کل با توجه به شکل ۷ معنی‌دار نبوده است. میزان پروتئین در تمامی تیمارها نسبت به تیمار شاهد و نسبت به یکدیگر اختلاف معنی‌داری نشان نداده است.



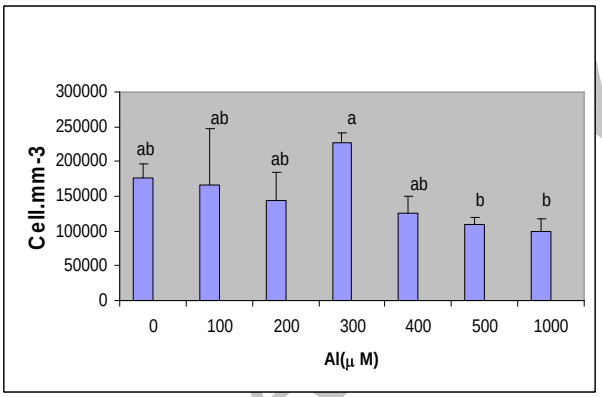
شکل ۷: میزان پروتئین کل در غلظت‌های مختلف آلومینیوم

میزان تجمع آلومینیوم: افزایش تجمع آلومینیوم با افزایش غلظت آلومینیوم معنی‌دار می‌باشد. میزان انباشتگی در تمامی تیمارها نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌دار داشته است (شکل ۸).



شکل ۸: میزان تجمع آلومینیوم در غلظت‌های مختلف

تعداد سلول: اثر کلی آلومینیوم بر تعداد سلول معنی‌دار نمی‌باشد، اما در غلظت ۳۰۰ میکرو مولار افزایش معنی‌داری نسبت به غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار دیده شده است (شکل ۹).



شکل ۹: تعداد سلول در غلظت‌های مختلف آلومینیوم در فاز ثابت

بحث

در این تحقیق دیده شده است که رشد تا غلظت ۳۰۰ میکرو مولار آلومینیوم افزایش پیدا می‌کند و در غلظت‌های بالاتر یعنی ٤۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار به تدریج کاهش داشته است. افزایش رشد تا غلظت ۳۰۰ میکرو مولار ممکن است به دلیل افزایش pH محیط کشت و کاهش احتمال انحلال، ورود و سمیت آلومینیوم باشد.

www.SID.ir

علاوه بر این افزایش رشد ممکن است در نتیجه کم شدن سمیت پروتون به وسیله آلومینیوم باشد. این نتیجه (افزایش رشد در غلظت‌های پایین آلومینیوم) قبلاً در گیاه کدو نیز مشاهده شده است (Lazaranos et al., 2004) کاهش رشد در غلظت‌های بالاتر یعنی در غلظت ٤٠٠ میکرو مولار تا حدی و در غلظت‌های ٥٠٠ و ١٠٠٠ میکرو مولار آلومینیوم به میزان زیادی دیده شده است. در این غلظت‌ها جلبک به دلیل عدم توانایی در قلیایی کردن محیط کشت قادر به رشد زیاد نمی‌باشد و در نتیجه کاهش رشد در این غلظت‌ها مشاهده می‌گردد. همچنین فلزات دیگر نظیر سیلیکون در حضور آلومینیوم رشد را در جلبک *Dunaliella salina* تحریک می‌کند. این در حالی است که در جلبت کلرلا ولگاریس این مسئله در عدم حضور سیلیکون اتفاق می‌افتد (Exley et al., 1993)

pH محیط کشت نیز تا غلظت ٣٠٠ میکرو مولار افزایش داشته و از آن به بعد کاهش داشته است. افزایش pH اثر سمیت را کاهش می‌دهد. در واقع در محیط‌های اسیدی اثر سمیت آلومینیوم به دلیل افزایش انحلال آن تشدید می‌شود. مطابق نتایج Rout و همکاران (٢٠٠١) سمیت آلومینیوم از وقایع پیچیده‌ای است که ممکن است کاهش جذب کاتیون‌های دو ظرفیتی مثل کلسیم و منیزیم و شسته شدن آنها را در برداشته باشد (Hortone & Kirka, 1976) و در نتیجه سبب کاهش pH محیط خاک شود. در این پژوهش نیز ممکن است کاهش جذب این کاتیون‌ها و حضور آنها در محیط کشت مایع و عدم امکان شسته شدن آنها از دلایل قلیایی شدن محیط کشت باشد.

کاروتنوئیدها به عنوان آنتی اکسیدان و سیستم محافظ در برابر تنش اکسیداتیو، خود قربانی تنش اکسیداتیو القا شده می‌شوند (Dicango et al., 2001؛Larson et al., 1998) تولید گونه‌های فعال اکسیژن در گیاهان و جلبک‌ها در حضور فلزات سنگین افزایش می‌یابد.از طرف دیگر بتا کاروتن به عنوان یک آنتی اکسیدان غیرآنزیمی در داخل سلول به ویژه کلروپلاست مطرح می‌گردد. تجمع بتاکاروتن در غلظت‌های بالای فلزات سنگین در جلبک *Dunaliella salina* می‌تواند به دلیل نقش پاک کنندگی بتاکاروتن در حضور اکسید کننده‌ها باشد. در این پژوهش اثر آلومینیوم بر افزایش بتاکاروتن معنی‌دار بوده است (شکل ٦).

در این پژوهش افزایش غلظت آلومینیوم بر محتوای کلروفیل b تاثیر نداشته است. در سمیت کدو با آلومینیوم (Lazaranos et al., 2004) نشان دادند که با افزایش انتقال منیزیم از ریشه به ساقه و افزایش سطح منیزیم ساقه، شکل‌گیری کلروفیل a افزایش می‌یابد، به نظر نمی‌رسد که در جلبک تک سلولی *Dunaliella salina* نیز به این صورت باشد. در تنش سولفات دیده شده که محدودیت سولفات منجر به کاهش روند تقسیم سلولی، کاهش میزان کلروفیل و افزایش میزان بتاکاروتن سلولی می‌گردد. همچنین بررسی فتوسنتز جلبک *Dunaliella salina* تحت شرایط محدودیت سولفور نشان داد که کاهش غلظت سولفور میزان فتوسنتز را به شدت کاهش می‌دهد که این امر به دلیل اختلالاتی است که در عملکرد آنزیم‌های دخیل در سنتز کلروفیل و آنزیم‌های تنظیمی مسیرهای متابولیکی درگیر در سنتز مولکول‌های کلروفیل روی می‌دهد (Ben–Amotz and Avron, 1983). میزان پروتئین نیز با افزایش غلظت آلومینیوم افزایش معنی‌داری نداشته است.

نتیجه‌گیری نهایی

نتایج این تحقیق نشان داد که رشد و pH در غلظت‌های پایین آلومینیوم افزایش داشته، اما در غلظت‌های بالا کاهش یافته است. همچنین مقادیر کلروفیل b و میزان پروتئین با افزایش غلظت آلومینیوم افزایش معنی‌داری نداشته است، اما میزان بتاکاروتن، کلروفیل a وکلروفیل کل افزایش معنی‌داری داشته است.

Archive of SID

www.SID.ir

Refrences

Alam S.M., Adams, W.A. (1979). Effects of Aluminium on nutrient composition and yield of roots, J. plant Nutr. l: 365-375

Ben–Amotz, A. and Avron, M. (1983). On the factors which determine massive β carotene accumulation in the halotolerant alga Dunaliella bardawil. Plant Physiol. 72: 593-597.

Bennet, M.D., Laurie D.A. (1985). Nuclear DNA content in the genera zea and sorghum. Intergeneric, interspecific and intraspecific variation. Heredity. 55: 307-313

Bennet, R.J., Breen, C.M. (1991). Aluminium toxicity in roots.An Investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap.J. EXP. 44: 437-446

Dicango, R., Guid, R.L, De Gara, L., Soldatini. G.F. (2001) Combined cadmium an azone treatment effect photosynthesis and ascorbate-dependennt defences in sunflower. Newphytol. 151: 622-636

Exley, C., Tollervey, A., Gillian, G., Sophie, R., Birchall, J.D. (1993). Silicon; Aluminium and the Biological Arailability of Phosphorus in Algae. Biological Sciences , 253: 93-99

Horton, B.D., Kirkapatick, H.C. (1976). Aluminium toxicity symptoms in peach trees, J. Am. soc. Hort. sci. 101: 139-142

Jensen, A. (1987) Chlorophyll and carotenoid, Hand book of physiological and biochemical method. Combridge.

Larson, H.E., Bornman, J.F., Asp, H. (1988). Influence of Uv-B radiation and cd+2 on chlorophyll fluorescence, Growth and nutrient content in Brassica napus. Exp. Bot. 49: 1031-1039

Lazaranos, S., Mohamad, M., Abou, A., Traianos, Y. (2004). Aluminium toxicity effect on Cucumis melo and response of diphosphonucleotide kinase. Biology, Bratlslava, 59/1: 133-131.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Randall, R.J. (1995). Protein measurement with the folin phenolreagent. J. Biol. Chen. 193: 256- 275.

Rout, G.R., Samantaray, S. Das, P. (2001). Aluminium toxicity in plants; A REVIEW Agronomie 21, P.3. View Record in scopus. 32: 305-311.

Sacan, M., Fusun, O., Sehnaz, B. (2007). Exposure of Dunaliella Tertiolecta to lead and Aluminium toxicity and effect on ultrastracture Biological Trace. Element Research. 120: 64-72

Visviki, I., Rachlin, J.W. (1993) Department of Biological sciences ,Lehman college of CUNY, 250 Bedford park Boulevard west, 10468 Bronx , New York, USA. 108: 146-153.

Archive of SID

www.SID.ir

Effect of aluminium on growth, protein content, chlorophylls, carotenoids and Al accumulation in *Dunaliella salina* Teodoresco.

Yadollahi, F., *Sateei, A., Ghorbanli, M.
Department of Biology, Islamic Azad University, Gorgan Branch, Gorgan - Iran

Abstract

Aluminum effect with 0, 100, 200, 300, 400, 500 and 1000 µmolar concentrations was considered during ten days on *Dunaliella salina* Teodoresco alga. Protein content, photosynthetic pigments, cell number and Al accumulation were measured. The results showed that chlorophyll β-content, cell number and protein content haven't any significant differences but β carotene, chlorophyll a, total chlorophyll and Al accumulation increased significantly. Al increased algal growth to 300 µmolar concentration and also decreased growth in 500 and 1000 µmolar concentrations. pH except first day in the rest of days with increase of Al increased significantly in compare to control, it means that pH from 0 till 300µmolar increased and from 300 to 1000 µmolar decreased. From Al accumulation and number of cell concluded that *Dunaliella salina* Teodoresco green alga can tolerated Al heavy metal stress in low concentrations.

Keyword: *Dunaliella salina* Teodoresco, Al, Chlorophyll, pH

Archive of SID

* *Email:saateyi@gmail.com*

www.SID.ir