

## بررسی تأثیر تنش کوتاه مدت کادمیوم بر شاخص‌های رشد و فعالیت آنزیم‌های

آنتی‌اکسیدانی در ریز جلبک *Anabaena sp.*

جنت سرمد\*، مریم زمانی و سیده فاطمه فلاح

رشت، دانشگاه گیلان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۹۵/۲/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۴

## چکیده

این مطالعه با بررسی اثر تنش کوتاه‌مدت غلظت‌های مختلف کادمیوم بر برخی خصوصیات رشدی و بیوشیمیایی در ریز جلبک *Anabaena sp.* انجام شده است. پس از اعمال غلظت‌های مختلف کادمیوم (۰، ۵، ۱۰ و ۲۰ میکرومولار)، ریز جلبک‌ها به محیط کشت منتقل و در شرایط پایه با دمای  $28 \pm 1^\circ \text{C}$ ، شدت نوری  $2500$  لوکس، تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در شرایط هوادهی بمدت ۲۴ ساعت انتقال داده شدند. نتایج نشان داد با افزایش غلظت کادمیوم تا ۲۰ میکرومولار در ریز جلبک *Anabaena sp.* محتوای رنگیزه‌های کلروفیل *a*، بتاکاروتن، فیکوبیلی پروتئین‌ها و همچنین پروتئین کل نسبت به کنترل کاهش معنی‌داری یافت. همچنین محتوای مالون‌دی‌آلدهید (MDA) به‌عنوان محصول تنش اکسیداتیو و فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز (POD)، آسکوبات پراکسیداز (APX) و سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. با توجه به نتایج حاصل، ریز جلبک *Anabaena sp.* در تنش کوتاه‌مدت به غلظت کم فلز سنگین کادمیوم مورد استفاده در این پژوهش حساس هستند.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، *Anabaena sp.*، پروتئین، رنگیزه‌های فتوسنتزی، کادمیوم

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۱۳۳۵۰۱۶۸، پست الکترونیکی، sarmad1392@gmail.com

## مقدمه

هیدروکسیل (-OH)، فسفریل ( $-\text{PO}_3^{2-}$ )، آمینه ( $-\text{NH}_2$ )، کربوکسیل (-COOH) و سولفیدریل (-SH) می‌باشند که سبب ایجاد بار منفی بر روی سطح سلول می‌شوند. یون‌های فلزات سنگین مانند  $\text{Hg}^{2+}$  و  $\text{Pb}^{2+}$  پیوندهای قوی ای با گروه‌های عاملی -CN، -R-S، -SH، -NH<sub>2</sub> و ایمیدازول ( $(\text{CH})_2\text{N}(\text{NH})\text{C}^-$ ) ایجاد می‌کنند که همه آنها شامل اتم‌های نیتروژن و گوگرد هستند. دیواره‌های سلولی جلبک حاوی پلی‌ساکاریدها و یون‌های فلزی دو ظرفیتی است که با یون‌هایی از پلی‌ساکاریدها تبادل می‌شوند، در نتیجه جذب فلزات سنگین رخ می‌دهد. حذف فلز از محلول نیز ممکن است با شکل‌گیری کمپلکس در سطح سلول پس از تعامل بین فلز و گروه‌های فعال رخ دهد (۲۸). استفاده

جلبک‌ها موجودات آبی هستند که قادر به حذف فلزات سنگین می‌باشند و نقش مهمی در کنترل غلظت فلزات سنگین در دریاچه‌ها و اقیانوس‌ها دارند. نقش ضد آلودگی جلبک‌ها وسیع‌تر از گیاهان عالی آبی است و در مقیاس‌های گسترده‌تر از آنها برای این منظور بهره‌مندی می‌گیرند. علاقه زیادی برای کاربرد جلبک‌ها برای یوتروفیکاسیون آلاینده‌های آلی و معدنی وجود دارد (۵). جذب فلزات سنگین در محیط‌های آبی معمولاً در سطح سلول (دیواره، غشاء یا پلی‌ساکارید خارجی) و با اتصال به لیگاندهای سیتوپلاسمی، فیتوکلاتین‌ها، متالوتینین‌ها و دیگر مولکول‌های داخل سلولی اتفاق می‌افتد. دیواره سلولی جلبک‌ها دارای بسیاری از گروه‌های عاملی مانند

مالون دی آلدهید، محتوای پروتئین کل و میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بررسی شد.

### مواد و روشها

**تهیه و آماده‌سازی نمونه‌های جلبکی:** نمونه‌های محیطی متعددی برای جداسازی سیانوباکتری *Anabaena sp.* از تالاب‌های استان گیلان برداشت شدند. عمل خالص سازی با روش پلیت آگار (۴۰) و با استفاده از محیط جامد BG-11 انجام شد. رشته‌های سیانوباکتری رشد یافته بر سطح پلیت با چندین بار کشت دوباره خالص شدند. شناسایی با استفاده از میکروسکپ نوری و کلید شناسایی معتبر انجام شد (۳۸). روش تهیه محیط کشت جامد مطابق روش Wegmann (۱۹۷۱) است (۴۱). محیط حاوی آگار به اتاقک کشت برای رشد انتقال داده شد. پس از حصول اطمینان از خالص بودن کلنی‌ها، سویه‌ها به درون محیط کشت مایع BG-11 انتقال داده شدند. قبل از انتقال آنها، محیط کشت‌های استریل سرد شده، داخل ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری استریل ریخته و تلقیح ریزجلبک‌ها از محیط جامد به محیط مایع انجام شد. در نهایت ارلن‌ها به اتاقک کشت منتقل و فرصت رشد یک تا سه هفته‌ای برای رشد کامل و قرارگیری در فاز لگاریتمی به آنها داده شد. مشخصات اتاقک کشت از این قرار بود که دمای آن توسط ترموستات  $28 \pm 1$  درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. نور سفید فلورسانت در حدود ۲۵۰۰ لوکس با دوره رشد ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی اعمال شد. هوادهی توسط پمپ‌های هوا Air8000 انجام شد. ریزجلبک *Anabaena sp.* در غلظت‌های مختلف کادمیوم کلرید (۰، ۵، ۱۰ و ۲۰ میکرومولار) و در سه تکرار تحت تنش قرار گرفتند. پس از پایان اعمال تنش کوتاه مدت طی ۲۴ ساعت برای مطالعات بعدی ریزجلبک *Anabaena sp.* برداشت شد. بیومس حاصل پس از شوک فریز در نیتروژن مایع برای سنجش پروتئین کل و فعالیت آنزیم‌ها و اندازه‌گیری محتوی MDA در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری

از سیانوباکتری‌ها در تصفیه فاضلاب، فرایند سازگار با محیط‌زیست بدون آلودگی ثانویه است. سیانوباکتری‌ها گروه وسیعی از موجودات پروکاریوت فتوسنتزی را تشکیل می‌دهند که برخی از آنها توانایی منحصر به فردی در تثبیت نیتروژن دارند. آنها تقریباً در هر نوع زیستگاه (آبی، زمینی، آب شیرین، دریایی، خاک مرطوب، خاک برهنه و صحرا) یافت می‌شوند. تسلط و تنوع جنس سیانوباکتری‌ها در محیط آبی نشان می‌دهد که این گروه به طیف گسترده‌ای از آلاینده‌ها تحمل نشان می‌دهد که از جمله نقش‌هایی که سیانوباکتری‌ها می‌توانند داشته باشند شامل ۱- بهبود کیفیت آب توسط سیانوباکتری‌ها، ۲- حذف مقادیر بالایی از نیتروژن و فسفر از آب و ۳- حذف عناصر سنگین می‌باشند (۸). Dwivedi و همکاران (۲۰۱۰) به بررسی پتانسیل جلبک سبز و ریزجلبک جلبک سبز-آبی برای تجمع فلزات (کرم، مس، آهن، منگنز، نیکل و روی) و شبه فلز (آرسنیک) پرداختند. آنان پی بردند که حداکثر انباشت کرم توسط *Phormidium bohneri* رخ داده است و بعد توسط *Oscillatoria tenuis*، *Chlamydomonas angulosa*، *Ulothrix tenuissima* و *Oscillatoria nigra* نشان داده شد، در نتیجه جلبک سبز-آبی *Phormidium bohneri* توانایی بالایی در تجمع کرم دارد (۹). بر اساس مطالعات Sahu, Worku و همکاران (۲۰۱۴)، ریزجلبک *Synechocystis salina* می‌تواند ۶۰ درصد کرم، ۶۶ درصد آهن، ۷۰ درصد نیکل، ۷۷ درصد جیوه، ۶۵ درصد کلسیم، ۶۳ درصد منیزیم و ۷۸ درصد از سختی کل را از آب فاضلاب کاهش دهد (۴۳).

از آنجا که ریزجلبک‌ها، تولیدکننده‌های اولیه در قاعده زنجیره غذایی هستند و پیش از سایرین توسط آلودگی فلزات سنگین تحت تأثیر قرار می‌گیرد، از این‌رو در این پژوهش چگونگی اثر فلزات سنگین بر روی ریزجلبک‌ها می‌تواند اطلاعات مفیدی در اختیار محققان قرار دهد و در این پژوهش، اثر غلظت‌های مختلف تنش کوتاه مدت کادمیوم بر میزان رشد، رنگیزه‌های فتوسنتزی، محتوای

رویی در طول موج های ۶۴۷ و ۶۶۳ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین شد (۱۰).

**سنجش رنگیزه‌های فیکوبیلی پروتئینی در ریز جلبک *Anabaena sp.*** برای اندازه‌گیری محتوای فیکوبیلی-پروتئین‌ها از روش Wayman و Fay (۱۹۸۶) استفاده شد (۴۲). بدین منظور یک میلی لیتر از سوسپانسیون جلبکی بمدت دو ساعت در تاریکی و یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) با کمک گلیسرول تحت فشار اسمزی شدید قرار گرفتند. پس از گذشت این زمان، سلول‌ها با کمک استات سدیم ۰/۳ نرمال و آب مقطر شکسته شدند، بنحوی که غلظت نهایی استات سدیم در محلول ۲۰۰ میلی‌مولار بود. در نهایت جذب نمونه‌ها در مقابل بلانک تهیه شده از مواد مورد استفاده در استخراج فیکوبیلی پروتئین (بدون وجود نمونه جلبک) در طول موج‌های ۶۵۲، ۶۱۵ و ۵۶۲ نانومتر خوانده شد.

**سنجش مقدار پروتئین کل:** اندازه‌گیری مقدار پروتئین کل توسط روش Bradford (۱۹۷۶) انجام شد (۶). به‌منظور آماده‌سازی نمونه‌ها برای سنجش پروتئین کل، ابتدا استخراج عصاره سلولی جلبک به کمک بافر استخراج (شامل بافر فسفات ۵۰ میکرومولار، EDTA سدیم دار ۰/۵ مولار و گاهی ۲ pvpv درصد) انجام شد. برای پاره کردن کامل غشای سلولی، نمونه‌ها بمدت ۳۰ ثانیه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سونیک و بعد بمدت ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد در دور ۱۲۵۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. با استفاده از رسم منحنی استاندارد پروتئین گاما گلوبین پلاسمای گاوی (BSA) میزان آن سنجش شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد.

**سنجش میزان مالون دی‌آلدهید:** برای سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء، غلظت مالون دی‌آلدهید (MDA) توسط روش Heath و Packer (۱۹۸۶) اندازه‌گیری شد (۱۶). در این روش ۰/۱ گرم توده جلبکی به کمک ۲ میلی لیتر محلول تری کلرو استیک اسید (TCA) ۵

شدند. از ریز جلبک‌های مورد آزمایش برای سنجش تغییرات رشد بر حسب وزن خشک، مقدار کلروفیل *a*، سنجش بتا کاروتن، محتوای فیکوبیلی پروتئین‌ها، محتوای پروتئین کل، مالون دی‌آلدهید و برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی استفاده شدند.

**سنجش رشد بر حسب وزن خشک:** به‌منظور بررسی روند رشد ریز جلبک‌ها بر حسب وزن خشک در کلیه نمونه‌های تحت تیمار با فلز سنگین کادمیوم و گروه شاهد مقدار جذب نوری نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۵۰ nm اندازه‌گیری شد. به‌منظور محاسبه وزن خشک، ابتدا چهار رقت سریالی (۲۵ mL) از سوسپانسیون ریزجلبک که در فاز ثابت رشد قرار داشت، تهیه شد. جذب چهار رقت در طول موج ۷۵۰ nm قرائت شد. سپس زیست‌توده هر چهار رقت بمدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰-۴۰ درجه سانتی‌گراد در آون، خشک شد. نمودار خطی برحسب وزن خشک (DW) و جذب نوری (OD) رسم شد و بر اساس معادله بدست آمده از منحنی استاندارد رشد، وزن خشک ریزجلبک تحت تنش و شاهد محاسبه شد (۳۳).

**سنجش محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی:** برای تعیین غلظت رنگیزه‌های کلروفیلی در ریز جلبک *Anabaena sp.* ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش یک میلی لیتر از سوسپانسیون جلبکی (کلنی جلبک‌آبنا بسیار سلول‌های کوچکی دارد که با هم زدن ارلن تا ده دقیقه سوسپانسیون یکنواخت تشکیل می‌شود و بعد کم‌کم ته‌نشین می‌شود) هر ارلن بطور جداگانه، به میکروتیوب‌های میکروسانتریفیوژ منتقل و بمدت ۵ دقیقه با ۷۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول رویی با دقت به کمک سمپلر خارج و به رسوب باقیمانده، یک میلی لیتر استون ۸۵٪ اضافه شد. سپس محتویات داخل میکروتیوب‌ها با دستگاه ورتکس مخلوط و پس از آن نمونه‌ها دوباره با دور ۷۰۰۰، بمدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ شدند. جذب محلول

احتمال  $P < 0/05$  با نرم افزار SPSS v.16 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و رسم نمودارها با نرم افزار Excel انجام شد.

### نتایج

**تغییرات رشد بر اساس وزن خشک:** میزان وزن خشک ریز جلبک *Anabaena sp.* در نمونه های شاهد و تحت تنش کوتاه مدت فلز سنگین کادمیوم در غلظت های ۵، ۱۰ و ۲۰ میکرومولار بر اساس جذب نوری اندازه گیری شد. همان طور که در شکل ۱ مشاهده می شود، با افزایش غلظت فلز سنگین در محیط کشت، میزان وزن خشک نمونه های ریز جلبک *Anabaena sp.* ۲۴ ساعت بعد از در معرض قرار گیری با فلز سنگین بطور قابل توجهی کاهش یافت و با افزایش غلظت فلز سنگین تا ۲۰ میکرومولار مهار شدیدتری در وزن خشک نشان داد. ریز جلبک *Anabaena sp.* در اثر تنش کوتاه مدت کادمیوم در غلظت های ۵، ۱۰، ۲۰ میکرومولار نسبت به شاهد به ترتیب ۱۷/۰۳، ۳۳/۶۲ و ۴۸/۱۴ درصد کاهش وزن خشک نشان دادند.

**محتوای رنگیزه های فتوسنتزی:** با توجه به شکل ۲، نتایج نشان داد که با افزایش غلظت فلز سنگین کادمیوم تا ۲۰ میکرومولار محتوای کلروفیل *a* در ریز جلبک *Anabaena sp.* بطور معنی داری در مقایسه با شاهد کاهش یافت. به طوری که بالاترین میزان کلروفیل *a* مربوط به نمونه شاهد با مقدار ۲/۱۱ میکروگرم بر میلی لیتر و کمترین مقدار کلروفیل *a* مربوط به نمونه های تیمار ۲۰ میکرومولار با مقدار ۰/۸۳ میکروگرم بر میلی لیتر بود.

محتوای رنگیزه بتاکاروتن در ریز جلبک *Anabaena sp.* در کلیه نمونه های تحت تیمار و شاهد پس از گذشت ۲۴ ساعت در معرض قرار گیری با غلظت های مختلف فلز سنگین کادمیوم در شکل ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت فلز سنگین تا ۲۰

درصد توسط دستگاه سونیکاتور بمدت ۳۰ ثانیه در دمای ۴ درجه سانتی گراد، سونیک و عصاره های بدست آمده استخراج شدند. عصاره حاصل در دمای اتاق و با سرعت ۱۲۰۰۰ rpm بمدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. جذب سوپرناتانت در ۵۳۲ نانومتر اندازه گیری شد. جذب بقیه رنگیزه های غیر اختصاصی در ۶۰۰ نانومتر تعیین و از میزان جذب در ۵۳۲ نانومتر کسر شدند.

**سنجش آنزیم گایاکول پراکسیداز:** سنجش فعالیت کیتیکی آنزیم پراکسیداز مطابق روش Kalir و همکاران (۱۹۸۴) انجام شد (۱۸). بدین ترتیب که ۱ میلی لیتر محلول واکنش شامل ۴۷۵ میکرولیتر گایاکول ۴۵ میلی مولار، ۴۷۵ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۱۰۰ میلی مولار و ۵۰ میکرولیتر سوپرناتانت آنزیمی استخراج شده بود. تغییرات جذب برای ۲ دقیقه در طول موج ۴۷۰ نانومتر در نتیجه اکسیداسیون گایاکول خوانده شد.

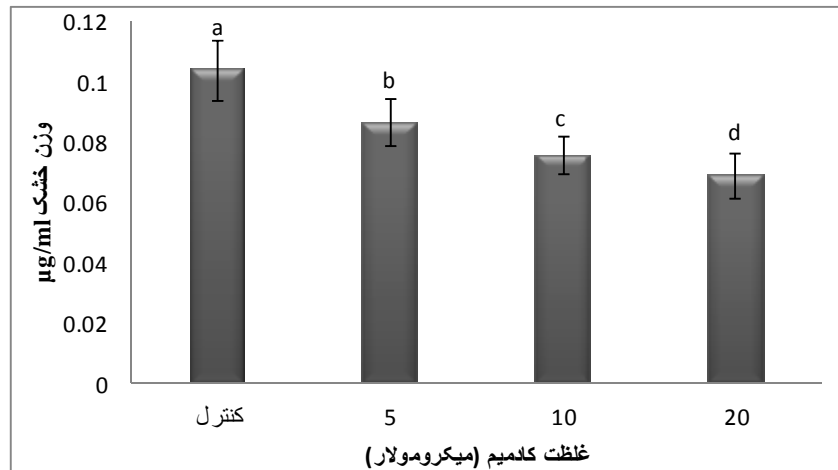
**سنجش آنزیم سوپراکسید دیسموتاز:** فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) توسط روش Giannoplitis و Ries (۱۹۷۷) انجام شد (۱۳). ۱ میلی لیتر محلول واکنش شامل EDTA ۰/۱ میلی مولار، بافر فسفات ۵۰ میلی مولار، متیونین ۱۳ میلی مولار، NBT ۷۵ ماکرومولار، ریبوفلاوین ۰/۲۱ میلی مولار و سوپرناتانت آنزیمی استخراج گردید. سپس جذب نمونه ها در طول موج ۵۶۰ نانومتر خوانده شد.

**سنجش آسکوربات پراکسیداز (APX):** فعالیت این آنزیم با استفاده از روش Nakano و Asada (۱۹۸۱) مورد سنجش قرار گرفت (۲۴). سنجش فعالیت آنزیم از طریق اندازه گیری اکسید شدن آسکوربات توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۹۰ نانومتر بمدت یک دقیقه انجام شد.

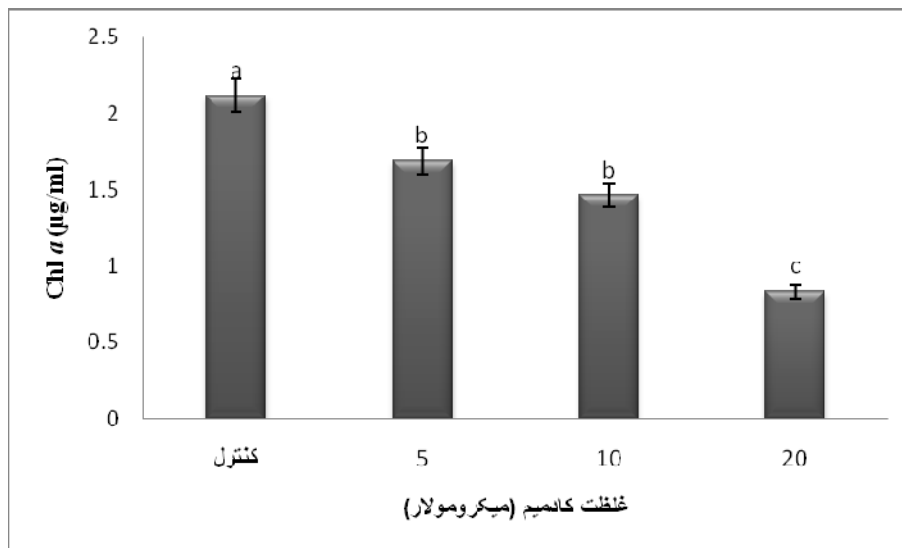
**تجزیه و تحلیل آماری:** انجام کلیه تیمار های مورد آزمایش در ۳ تکرار انجام شد. تجزیه واریانس داده ها و آزمون مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح

میکروگرم بر میلی لیتر و کمترین مقدار آن مربوط به نمونه های تیمار ۲۰ میکرومولار با مقدار ۰/۱۳ میکروگرم بر میلی لیتر بود.

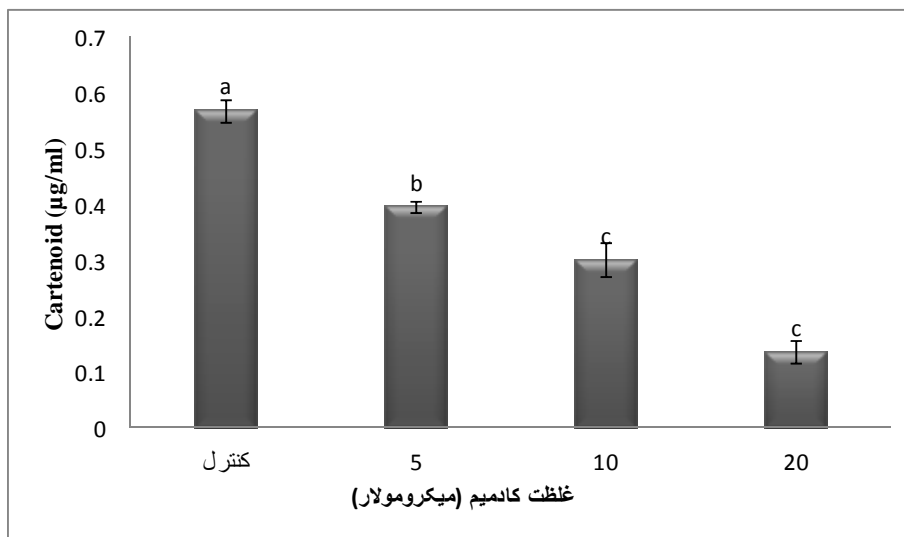
میکرومولار، محتوای بتاکاروتن در ریز جلبک، بطور معنی داری در مقایسه با شاهد کاهش یافت. به طوری که بالاترین میزان بتاکاروتن مربوط به نمونه شاهد با مقدار ۰/۴۵



شکل ۱- مقایسه تغییرات میزان وزن خشک ریز جلبک *Anabaena sp.* پس از اعمال تنش کوتاه مدت در تیمارهای مختلف فلز سنگین کادمیم در شرایط استاندارد آزمایش در سطح معنی دار ۵٪. داده ها نشان دهنده میانگین ± انحراف معیار (SE) است. حروف متفاوت حاصل از آزمون چند دامنه ای دانکن بالای نمودار بیانگر اختلاف معنی دار می باشد.



شکل ۲- تغییرات محتوای رنگیزه کلروفیل *a* ریز جلبک *Anabaena sp.* پس از اعمال تنش کوتاه مدت در تیمارهای مختلف فلز سنگین کادمیم در شرایط استاندارد آزمایش در سطح معنی دار ۵٪. داده ها نشان دهنده میانگین ± انحراف معیار (SE) است. حروف متفاوت حاصل از آزمون چند دامنه ای دانکن بالای نمودار بیانگر اختلاف معنی دار می باشد.



شکل ۳- تغییرات محتوای رنگیزه بتا کاروتن ریز جلبک *Anabaena sp.* پس از اعمال تنش کوتاه مدت در تیمارهای مختلف فلز سنگین کادمیم در شرایط استاندارد آزمایش در سطح معنی دار ۵٪. داده‌ها نشان‌دهنده میانگین  $\pm$  انحراف معیار (SE) است. حروف متفاوت حاصل آزمون چند دامنه‌ای دانکن بالای نمودار بیانگر اختلاف معنی دار می‌باشد.

تغییرات محتوای پروتئین: با توجه به شکل ۴، نتایج داده‌ها نشان داد که محتوای پروتئین کل پس از اعمال تنش کوتاه مدت با غلظت‌های مختلف فلز سنگین کادمیم در محدوده ۵ تا ۲۰ میکرومولار در *Anabaena sp.* بطور معنی‌داری نسبت به کنترل کاهش پیدا کرد. متناسب با افزایش غلظت فلز سنگین کادمیم میزان تخریب پروتئین نیز افزایش یافت، به طوری که در ریز جلبک مورد مطالعه بیشترین مقدار پروتئین کل در گروه کنترل (شاهد) بود. کمترین میزان پروتئین کل در ریز جلبک *Anabaena sp.* در غلظت ۲۰ میکرومولار مشاهده شد.

تغییرات محتوای مالون دی‌آلدهید: تغییرات محتوای مالون دی‌آلدهید (MDA) ریز جلبک *Anabaena sp.* تحت اثر تنش کوتاه مدت فلز سنگین کادمیم، ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش بررسی و نتایج در شکل ۵ نشان داده شده است. نتایج داده‌ها نشان داد که محتوای مالون دی‌آلدهید (MDA) در ریز جلبک *Anabaena sp.* در کلیه تیمارها در مقایسه با گروه کنترل (شاهد) افزایش پیدا کرد و متناسب با افزایش غلظت فلز سنگین کادمیم، میزان

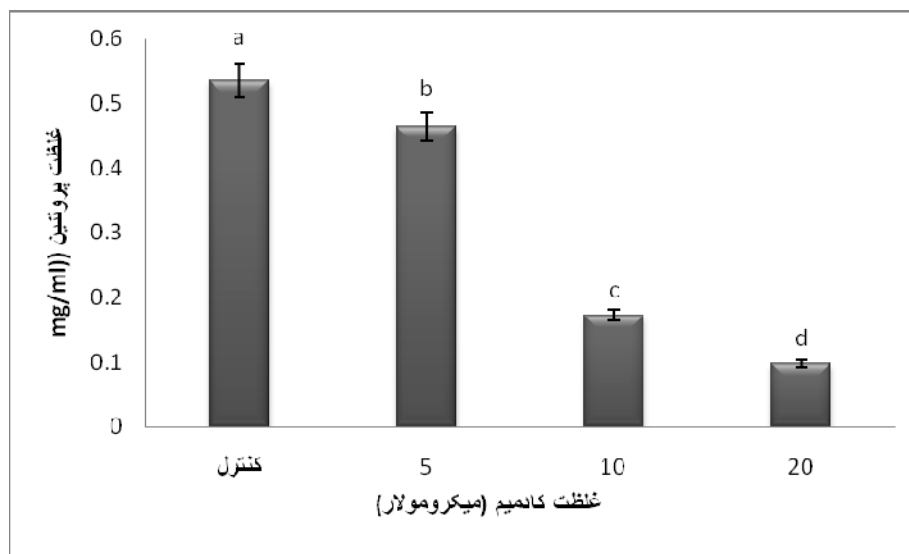
محتوای رنگیزه‌های فیکوبیلی پروتئینی در ریز جلبک *Anabaena sp.* با توجه به جدول ۱، نتایج آزمایش نشان داد که محتوای فیکوبیلی پروتئین‌ها در نمونه کنترل (شاهد) بطور معنی‌داری بیشتر از سایر نمونه‌های تحت تنش کوتاه مدت با غلظت‌های مختلف کادمیم بود، به طوری که مقدار فیکوبیلی پروتئین کل در گروه کنترل (شاهد) ۲۲/۰۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر و با افزایش غلظت فلز سنگین کادمیم محتوای فیکوبیلی پروتئین بطور معنی‌داری کاهش یافت و کمترین مقدار آن مربوط به تیمار ۲۰ میکرومولار با مقدار ۶/۰۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. در ریز جلبک *Anabaena sp.* فیکوسیانین ساختار اصلی فیکوبیلی زوم‌ها است. همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، تغییرات محتوای فیکوسیانین و آلفوفیکوسیانین و فیکواریترین نیز از همین روند پیروی می‌کنند و با افزایش غلظت فلز سنگین کادمیم مقادیر آنها بطور معنی‌داری کاهش می‌یابد، به طوری که کمترین مقدار این رنگیزه‌ها مربوط به تیمار ۲۰ میکرومولار می‌باشد.

کادمیوم فعالیت آنزیم پراکسیداز بطور قابل توجهی در همه تیمارها افزایش یافت، به طوری که بیشترین میزان فعالیت آنزیم در غلظت ۲۰ میکرومولار کادمیوم مشاهده شد.

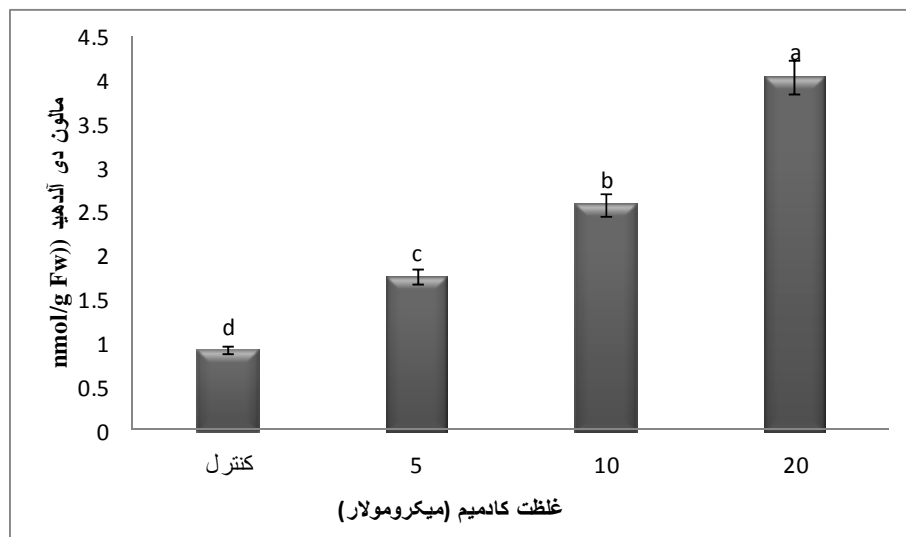
**فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز:** با توجه به شکل ۷، فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در تنش کوتاه مدت فلز سنگین کادمیوم نشان داد که در ریز جلبک *Anabaena sp.* تحت اثر تنش کوتاه مدت فلز سنگین کادمیوم فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بطور معنی داری در همه تیمارها افزایش یافت، به طوری که بیشترین میزان فعالیت آنزیم در غلظت ۲۰ میکرومولار مشاهده شد.

جدول ۱- تغییرات محتوای رنگیزه‌های فیکوبیلی پروتئین‌ها پس از تنش کوتاه مدت در غلظت‌های مختلف فلز سنگین کادمیم در سطح معنی دار ۵ درصد در ریز جلبک *Anabaena sp.* داده‌ها نشان دهنده میانگین  $\pm$  انحراف معیار (SE) است. حروف متفاوت حاصل از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در جدول بیانگر اختلاف معنی دار می‌باشد.

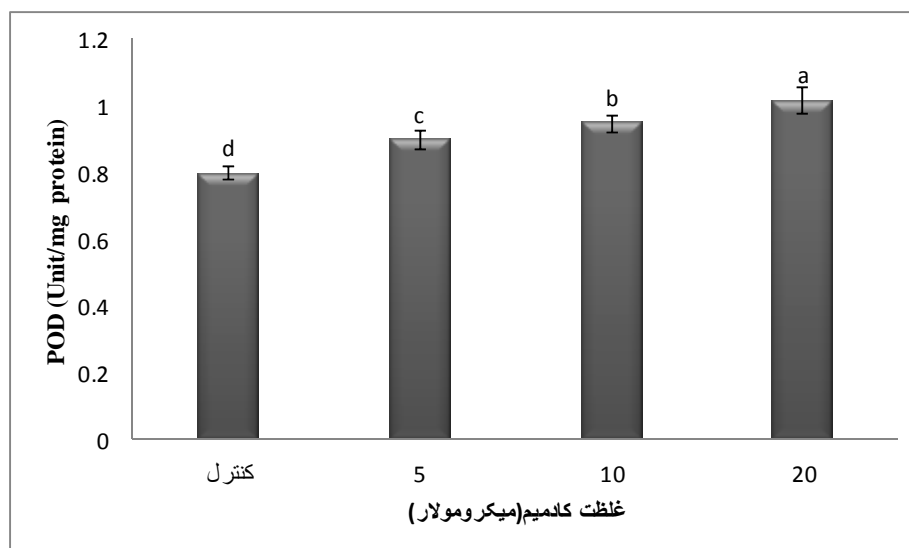
تیمارها ( $\mu\text{M}$ )	فیکوبیلی پروتئین‌ها ( $\mu\text{g/ml}$ )	فیکواریترین (PE) ( $\mu\text{g/ml}$ )	آلوفیکوسیانین (APC) ( $\mu\text{g/ml}$ )	فیکوسیانین (PC) ( $\mu\text{g/ml}$ )
کنترل	$22.09 \pm 3.9^a$	$1.68 \pm 0.15^a$	$7.06 \pm 0.9^a$	$13.32 \pm 1.2^a$
غلظت ۵	$18.41 \pm 3.2^b$	$1.49 \pm 0.1^b$	$6.58 \pm 0.6^b$	$10.34 \pm 2.19^b$
غلظت ۱۰	$13.18 \pm 2.8^c$	$1.42 \pm 0.1^c$	$4.81 \pm 0.34^c$	$6.94 \pm 1.2^c$
غلظت ۲۰	$6.05 \pm 3.13^d$	$1.14 \pm 0.12^d$	$2.87 \pm 0.46^d$	$2.03 \pm 1.5^d$



شکل ۴- تغییرات محتوای پروتئین کل ریز جلبک *Anabaena sp.* پس از اعمال تنش کوتاه مدت در تیمارهای مختلف فلز سنگین کادمیم در شرایط استاندارد آزمایش در سطح معنی دار ۵٪. داده‌ها نشان دهنده میانگین  $\pm$  انحراف معیار (SE) است. حروف متفاوت حاصل از آزمون چند دامنه‌ای دانکن بالای نمودار بیانگر اختلاف معنی دار می‌باشد.



شکل ۵- محتوای مالتون دی آلدئید (MDA) ریز جلبک *Anabaena sp.* پس از اعمال تنش کوتاه مدت در تیمارهای مختلف فلز سنگین کادمیم در شرایط استاندارد آزمایش در سطح معنی دار ۵٪. داده‌ها نشان‌دهنده میانگین  $\pm$  انحراف معیار (SE) است. حروف متفاوت حاصل از آزمون چند دامنه‌ای دانکن بالای نمودار بیانگر اختلاف معنی دار می‌باشد.



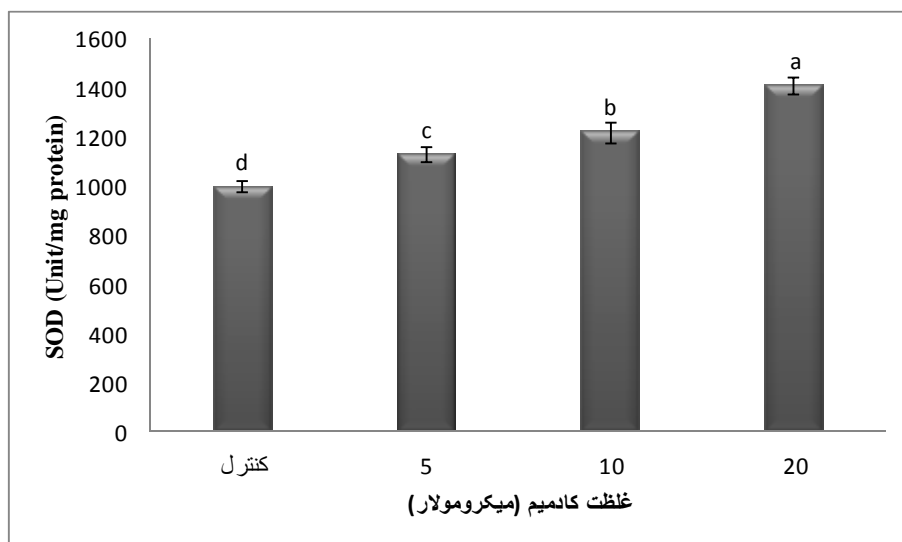
شکل ۶- تغییرات فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (POD) ریز جلبک *Anabaena sp.* پس از اعمال تنش کوتاه مدت در تیمارهای مختلف فلز سنگین کادمیم در شرایط استاندارد آزمایش در سطح معنی دار ۵٪. داده‌ها نشان‌دهنده میانگین  $\pm$  انحراف معیار (SE) است. حروف متفاوت حاصل از آزمون چند دامنه‌ای دانکن بالای نمودار بیانگر اختلاف معنی دار می‌باشد.

مطالعه در شکل ۸ نشان داده شده است. با توجه به نتایج موجود فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در ریز جلبک *Anabaena sp.* بطور قابل توجهی در همه تیمارها نسبت

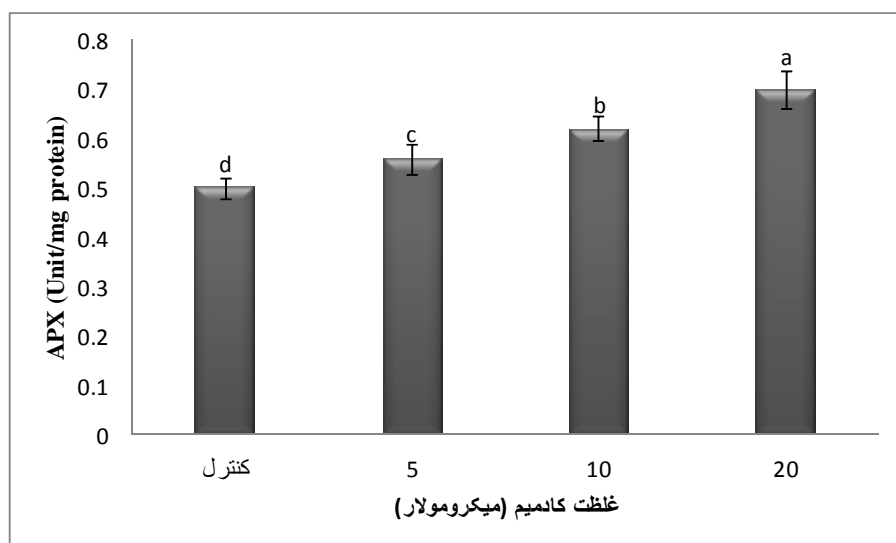
فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز: نتایج داده‌های اثر تنش کوتاه مدت غلظت‌های مختلف فلز سنگین کادمیم بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در ریز جلبک مورد



به کنترل افزایش یافت و بیشترین میزان فعالیت آنزیم در غلظت ۲۰ میکرومولار مشاهده شد.



شکل ۷- تغییرات فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) ریز جلبک *Anabaena sp.* پس از اعمال تنش کوتاه مدت در تیمارهای مختلف فلز سنگین کادمیم در شرایط استاندارد آزمایش در سطح معنی دار ۵٪. داده‌ها نشان‌دهنده میانگین  $\pm$  انحراف معیار (SE) است. حروف متفاوت حاصل آزمون چند دامنه‌ای دانکن بالای نمودار بیانگر اختلاف معنی دار می‌باشد.



شکل ۸- تغییرات فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) ریز جلبک *Anabaena sp.* پس از اعمال تنش کوتاه مدت در تیمارهای مختلف فلز سنگین کادمیم در شرایط استاندارد آزمایش در سطح معنی دار ۵٪. داده‌ها نشان‌دهنده میانگین  $\pm$  انحراف معیار (SE) است. حروف متفاوت حاصل آزمون چند دامنه‌ای دانکن بالای نمودار بیانگر اختلاف معنی دار می‌باشد.

ساعت نشان داد که میزان وزن خشک نمونه‌های ریز جلبک *Anabaena sp.* بطور قابل توجهی کاهش می‌یابند، به طوری که در غلظت ۲۰ میکرومولار کاهش بیشتری در

بحث

نتایج حاصل از این پژوهش از اثر تنش کادمیم بعد از ۲۴

بدلیل یک کاهش چشمگیر در محتوای کلروفیل کل ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت بعد از در معرض قرار گیری به تنش کادمیوم، مس و سرب مشاهده شد (۴). علاوه بر این کاروتنوئیدها حساسیت کمتری به کلروفیل‌ها نسبت به فلزات سنگین دارند که احتمالاً بعلت حفاظت از دستگاه فتوسنتزی در برابر تنش فلزات سنگین می‌باشد و کاروتنوئیدها از کلروفیل در برابر تخریب اکسیداتیو نوری محافظت می‌کنند، در نتیجه کاهش کاروتنوئیدها می‌تواند پیامدی جدی بر روی رنگیزه کلروفیل باشد (۲۵). Prasad و Zeeshan در سال ۲۰۰۵ مشاهده کردند که تیمار با کادمیوم (۲ و ۴ میکرومولار) در ریز جلبک *Plectonema boryanum* باعث کاهش مقدار کلروفیل *a* و مقدار رنگیزه کاروتنوئیدی شد (۲۶). Murugesan و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که کادمیوم در غلظت‌های بین ۱ تا ۲ mg/L مقدار کلروفیل *a* ریز جلبک *Spiroliina platensis* با افزایش غلظت کادمیوم کاهش چشمگیر می‌یابد (۲۲). همچنین بهشتی فر و شریعتی (۱۳۹۴) گزارش کردند که تیتانیوم سبب کاهش میزان رنگیزه‌های کلروفیل و بتاکاروتن در جلبک تک سلولی *Dunaliella salina* می‌شود (۱).

نتایج حاصل از این پژوهش از اثر تنش کادمیوم طی ۲۴ ساعت نشان داد که محتوای فیکوسیانیین، آلفوکوسیانیین و فیکواریترین با افزایش غلظت فلز سنگین کادمیوم بطور معنی‌داری کاهش می‌یابد (جدول ۱). در سیانوباکتری‌ها فیکوبیلی زوم‌هایی که در سطح استرومایی غشا تیلاکوئیدی قرار دارند و حاوی فیکوبیلی پروتئین‌ها هستند، به‌عنوان آنتن‌های اولیه گیرنده نوری برای PSII عمل می‌کنند. انتقال انرژی بوسیله این پیگمان‌های اضافی از فیکواریترین (در صورت وجود) به فیکوسیانیین و بعد الیفوکوسیانیین و در نهایت به گیرنده‌های نور با طول موج بالا انجام می‌شود (۳۴). ساختار و عملکرد فیکوبیلی زوم سیانوباکتری‌ها با افزایش غلظت فلز سنگین کادمیوم کاهش بیشتری نسبت به کنترل پیدا می‌کند، احتمالاً علت

وزن خشک نشان داد (شکل ۱). شوری، خشکی و عناصر سنگین تأثیر منفی در رشد و نمو می‌گذارد (۲۳). تعادل بین تولید و تخریب ROS به‌عنوان یک مکانیسم محافظتی در شرایط تنش لازم است و از خسارت اکسیداتیو جلوگیری می‌کند (۱۷). Carfagna و همکاران (۲۰۱۳) دریافتند که غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار سرب و کادمیوم هیچ تغییر چشمگیری بر روی رشد و پاسخ‌های فیزیولوژیکی جلبک سبز *Chlorella sp.* نداشت. آنها بعد از ۲ و ۲۴ ساعت پس از در معرض قرار دادن *Chlorella sp.* با غلظت ۲۵۰ میکرومولار از فلز سنگین کادمیوم و سرب اثرات چشمگیری در رشد این ریز جلبک مشاهده کردند (۸). EL-Naggar و EL-Sheekh دریافتند که در معرض قرار گیری *Chlorella vulgaris* با غلظت ۲۵ میکرومولار کادمیوم، وزن خشک را بطور چشمگیری کاهش می‌دهد (۱۱). همچنین نتایج این آزمایش با مشاهدات Shanab و همکاران (۲۰۱۲) مطابقت می‌کند. آنان گزارش کردند که *Phormidium ambiguum* نسبت به فلزات سنگین (جیوه، کادمیوم و سرب) حساس می‌باشد (۲۹).

در این پژوهش، محتوای کلروفیل *a* و بتاکاروتن با افزایش غلظت کادمیوم طی ۲۴ ساعت بطور معنی‌داری کاهش می‌یابد (شکل ۲ و ۳). تنش عنصر سنگین نیز به ساختار تیلاکوئید و گرانی کلروپلاست آسیب وارد می‌کند و باعث بی‌ثباتی مجموعه پروتئین رنگیزه و تخریب کلروپلاست می‌شود (۳۲). مهار تجمع رنگیزه فتوسنتزی در پاسخ به تنش فلزات سنگین و همچنین پر اکسیداسیون غشاء کلروپلاست ناشی از افزایش مقدار تولید  $H_2O_2$  و پراکسیداسیون لیپید در غشاء کلروپلاست می‌باشد (۲۵). داده‌های این آزمایش با مطالعات Bajguz (۲۰۱۱) مطابقت دارد. او گزارش کرد که ریز جلبک *Chlorella vulgaris* تیمار شده با فلزات سنگین کادمیوم، سرب و مس در غلظت‌های  $10^4$  و  $10^6$  مولار، کلروز (کم شدن یا از بین رفتن رنگدانه زرد طبیعی) را از خود نشان دادند و این امر

آلدهید در غلظت ۲۰ میکرومولار کادمیوم مشاهده شد (شکل ۵). تخریب اکسیداتیو چربی غشای سلولی بطور گسترده به‌عنوان یک نشانگر اکسیداتیو در تنش استفاده می‌شود و توسط اندازه‌گیری محتوای مالون دی‌آلدهید تخمین زده می‌شود. همچنین القای پراکسیداسیون لیپیدها توسط کادمیوم نتیجه غیر مستقیم انباشت پراکسیدهای هیدروژن می‌باشد، زیرا این پراکسیدهای هیدروژن در اثر مهار مسیرهای متابولیکی مختلف ایجاد می‌شوند (۱۵). نتایج این آزمایش با مطالعات Prasad و Zeeshan (۲۰۰۵) در بررسی اثر کادمیوم در ریز جلبک *Plectonema boryanum* مطابقت دارد که میزان پراکسیداسیون لیپیدی تحت تأثیر تنش افزایش می‌یابد (۲۶). همچنین نتایج این آزمایش با مطالعات Soto و همکاران (۲۰۱۱) در بررسی اثر فلزات سنگین روی و مس بر ریز جلبک *Pseudokirchneriella subcapitata* بر روی میزان فعالیت مالون دی‌آلدهید مطابقت دارد (۳۵).

افزایش در پراکسیداسیون لیپیدها در شرایط تنش ناشی از افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن در شرایط تنش اکسیداتیو می‌باشد که حذف و یا خاموش نمودن آنها خارج از توان گیاه بوده و نشان می‌دهد که سازوکارهای دفاعی ایجاد شده در گیاه در برابر تنش اکسیداتیو کافی نبوده است. کاهش رشد می‌تواند نتیجه تأثیر تنش کوتاه مدت کادمیوم در فرایندهای دخیل در تولید انرژی مانند فتوسنتز باشد.

در شرایط غیرتنش بین میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن و ظرفیت جاروب کردن آنها توسط سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی (آنزیمی و غیر آنزیمی) تعادل وجود دارد. اما در شرایط تنش میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن از ظرفیت جاروب کردن آنها توسط سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی بیشتر شده، در نتیجه تنش اکسیداتیو رخ می‌دهد. بنابراین برای مقابله با تنش اکسیداتیو تغییر ظرفیت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی ضروری می‌باشد. آنزیم‌هایی مانند سوپر

این امر این است که فلزات سنگین باعث تخریب رنگیزه‌های فیکوبیلی پروتئینی می‌شود. فیکوسیانین‌ها منبع نیتروژن در سیانوباکتری‌ها هستند (۳۰)، از این رو افت شدید فیکوسیانین در *Anabaena sp.* مهار شدید رشد را حتی در غلظت‌های پایین فلز سنگین کادمیوم نشان می‌دهد و این امر با داده‌های وزن خشک نیز تأیید می‌شود. نتایج این آزمایش با مطالعات Singh و همکاران (۲۰۱۲) مطابقت دارد. آنان گزارش کردند که مقدار فیکوسیانین در *Anabaena sp. PCC7120* تحت تأثیر ۲۰ میکرومولار کادمیوم نسبت به کنترل ۳۲٪ درصد کاهش یافت (۳۳). همچنین Prasad و Zeeshan (۲۰۰۵) مشاهده کردند که تنش کادمیوم در ریز جلبک *Plectonema boryanum* باعث کاهش مقدار فیکوسیانین می‌شود (۲۶).

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که محتوای پروتئین تحت تنش کوتاه مدت کادمیوم کاهش می‌یابد (شکل ۴). Khudsar و همکاران (۲۰۰۱) گزارش کردند که کاهش در محتوای پروتئینی در غلظت‌های بالای یون می‌تواند باعث کاهش در سنتز بعضی پروتئین‌ها یا احتمالاً افزایش فعالیت آنزیم‌های پروتئولیتیک باشد (۱۹). همچنین کاهش در محتوای پروتئین می‌تواند به اثر متفاوت گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) مربوط باشد، به گونه‌ای که ROS با صدمه زدن به پروتئوم سبب نابودی شماری زیادی از پروتئین‌ها شود (۲، ۳۹). نتایج این آزمایش با مطالعات Sibi و همکاران (۲۰۱۴) در بررسی اثر تنش مس بر روی گونه‌های *Chlorella vulgaris*، *C. protothecoides* و *C. pyrenoidosa* مطابقت دارد (۳۱). همچنین نتایج این آزمایش با مطالعات Rafiqul و همکاران (۲۰۰۳) مطابقت دارد که تنش شوری سبب کاهش محتوای پروتئین در ریز جلبک سبز-آبی *Spirulina fusiformis* شده است (۲۷).

در این مطالعه محتوای مالون دی‌آلدهید (MDA) در ریز جلبک *Anabaena sp.* در کلیه تیمارها در مقایسه با گروه کنترل افزایش پیدا کرد و بیشترین محتوای مالون دی

سلولی *Gonyaulax polyedra*، فلزهای کادمیوم و مس موجب افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از جمله SOD، در پاسخ به یک تنش بلند مدت می‌شود (۳۶). همچنین در ریز جلبک *Scenedesmus sp.* فعالیت آنزیم SOD با افزایش غلظت  $\text{Cu}^{+2}$  و  $\text{Zn}^{+2}$  افزایش می‌یابد (۳۷). Hazani و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که قرار گرفتن ریز جلبک *Chlorella vulgaris* در معرض مقادیر مختلفی از نقره در محیط آبی سبب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی SOD و POX می‌شود (۱۵).

### نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج حاصل، قرار گرفتن ریز جلبک‌ها در معرض غلظت‌های مختلف فلز سنگین کادمیوم بمدت ۲۴ ساعت، کاهش در میزان وزن خشک، رنگدانه‌های فتوسنتزی و میزان پروتئین کل و افزایش در محتوای مالون دی‌آلدهید و فعالیت آنزیم‌های SOD، POD و APX در ریز جلبک *Anabaena sp.* مشاهده شد که این اثرات در تیمار ۲۰ میکرومولار چشمگیر بود. بنابراین با در نظر گرفتن اینکه جلبک‌ها نقش مهمی را در پالایش آلودگی فلزات سنگین در محیط زیست بازی می‌کنند و اطلاعات مفیدی را در اختیار محققان قرار می‌دهند؛ از این‌رو پیشنهاد می‌شود که اندازه‌گیری میزان جذب زیستی فلز سنگین کادمیوم توسط ریز جلبک مورد مطالعه قرار گیرد. این پژوهش به‌منظور بررسی اثرات غلظت‌های مختلف فلزات سنگین کادمیوم بمدت ۲۴ ساعت بر برخی پارامترهای فیزیولوژی انجام شد.

### سپاسگزاری

بدین‌وسیله از معاون محترم پژوهشی دانشگاه گیلان بدلیل فراهم آوردن امکانات آزمایشگاهی و سرکار خانم معصومه داخم به سبب کمک‌هایشان تشکر می‌گردد.

اکسیددیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز از آنزیم‌های مهم سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی در گیاهان می‌باشند (۳). در این مطالعه فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز (POD)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) بطور معنی‌داری افزایش پیدا کرده است (شکل ۶، ۷ و ۸). این آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی یک مکانیسم دفاعی در گیاه می‌باشند. وقتی به گیاه خسارت وارد می‌شود، فرایند آنتی‌اکسیدانی و مکانیسم سمیت‌زدایی در برابر تولید ROS رخ می‌دهد و گیاهان مکانیسم دفاعی خودشان را در برابر تولید ROS که شامل چندین آنزیم و آنتی‌اکسیدان‌ها است، افزایش می‌دهند (۲۱). سوپراکسید دیسموتاز اولین آنزیمی است که در فرایند سمیت‌زدایی و تبدیل به رادیکال  $\text{O}_2$  و  $\text{H}_2\text{O}_2$  در سیتوزل، کلروپلاست و میتوکندری شرکت می‌کند. این آنزیم نقش مهمی در مکانیسم دفاعی گیاه در برابر اشکال رادیکال OH بازی می‌کند و از تجمع رادیکال‌های آزاد اکسیژن جلوگیری می‌کند (۲۰). گایاکول پراکسیداز گرایش مثبتی را نسبت به آنزیم کاتالاز نشان می‌دهد و نقش مهمی را در سمیت‌زدایی  $\text{H}_2\text{O}_2$  نسبت به آنزیم کاتالاز دارد و از سمیت در گیاه جلوگیری می‌کند (۱۲). APX در مهار ROS و محافظت از سلول‌های گیاهان، جلبک‌ها و دیگر موجودات زنده نقش مهمی را بازی می‌کند. APX در مهار  $\text{H}_2\text{O}_2$  در چرخه ASH-GSH از طریق استفاده از ASH به‌عنوان دهنده الکترون درگیر می‌باشد. APX میل ترکیبی بالاتری به  $\text{H}_2\text{O}_2$  نسبت به آنزیم‌های CAT و POD دارد و ممکن است نقش بسیار مهمی در مدیریت ROS در شرایط تنش داشته باشد. افزایش در فعالیت APX در *A. doliolum* تحت تنش شوری مشاهده شده است. همچنین افزایش در فعالیت APX در *Proteus vulgaris* و *Picea asperata* تحت تنش آب مشاهده شده است (۱۴). Souza و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کرده‌اند که در ریز جلبک تک

## منابع

- اندام هوایی گیاه آفتابگردان (*Helianthus annuus*)، مجله زیست‌شناسی گیاهی، ۱۳(۴): ۹۷-۱۱۴.
- ۳- دانشمند ف. ۱۳۹۳. تأثیر آسکوربیک اسید در کاهش تنش اکسیداتیو حاصل از تنش شوری در سیب زمینی، مجله پژوهش‌های گیاهی (زیست‌شناسی ایران)، ۲۷(۳): ۴۱۷-۴۲۶.
- 4- Bajguz, A. 2011. Suppression of *Chlorella vulgaris* Growth by Cadmium, Lead and Copper Stress and Its Restoration by Endogenous Brassinolide. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 60: 406-416.
- 5- Ben Chekroun, K. and Baghour, M. 2013. The role of algae in phytoremediation of heavy metals: A review. Journal of Materials and Environmental Science, 4 (6): 873-880.
- 6- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the Quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry, 72: 248-254.
- 7- Bryant, D. A. 1994. The Molecular Biology of Cyanobacteria, Book. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, ISBN: 978-0-7923-3273-2.
- 8- Carfagna, S., Lanza, N., Salbitani, G., Basile, A., Sorbo, S., and Vona V. 2013. Physiological and morphological responses of Lead or Cadmium exposed *Chlorella sorokiniana* 211-8K (*Chlorophyceae*). Springerplus, 2:147.
- 9- Dwivedi, S., Srivastava, S. and Mishra, S. 2010. Characterization of native microalgal strains for their chromium bioaccumulation potential: phytoplankton response in polluted habitats. Journal of Hazardous Materials, 173:95-101.
- 10- Eijkelhoff, C. and Dekker, J. P. 1997. A routine method to determine the chlorophyll a, pheophytin a, and  $\beta$ -carotene contents of isolated photosystem II reaction center complexes. Photosynthesis Research, 52: 69-73.
- 11- El-Naggar, A. H., El-Sheekh, M. M. 1998. Abolishing cadmium toxicity in *Chlorella vulgaris* by ascorbic acid, calcium, glucose and reduced glutathione. Environmental Pollution Journal, 101(2): 169-74.
- 12- Erdal, S., Aydın, M., Genisel, M., Taspınar, M. S., Dumlupınar, R., Kaya, O. and Gorcek Z. 2011. Effects of salicylic acid on wheat salt sensitivity. African Journal of Biotechnology, 10(30): 5713- 5718.
- ۱- بهشتی فر.س. و شریعتی م. ۱۳۹۴. اثر تیتانیوم بر رشد و تولید رنگیزه‌های فتوسنتزی در جلبک تک سلولی *Dunaliella salina*، مجله پژوهش‌های گیاهی (زیست‌شناسی ایران)، ۲۸(۱): ۴۲-۵۲.
- ۲- پیروز پ.س. و منوچهری کلانتری خ. ۱۳۹۰. تأثیر فلز سنگین کروم بر میزان تجمع، عوامل رشد و القا تنش اکسیداتیو در
- 13- Giannopolitis, C. N. and Reis S. K. 1997. Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants. Plant Physiology, 59:309-314.
- 14- Gill, S. S. and Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry, 48: 909-930.
- 15- Hazani A. A., Ibrahim M. M., Shehata A. I., EL-Gaaly G. A., Daoud M., Fouad D., Rizwana H. and Moubayed N. 2013. Ecotoxicity of agnanoparticles on two microalgae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*, Archives of Biological Science, Belgrade, 65 (4), 1447-1457.
- 16- Heath, R. L. and Packer, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives in Biochemistry and Biophysics, 125: 189-198.
- 17- Howladar, S. M. 2014. A novel Moringaoleifera leaf extract can mitigate the stress effects of salinity and cadmium in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants. Ecotoxicology and Environmental Safety, 100: 69-75.
- 18- Kalir, A., Omri, G. and Poljak-Off Mayber, A. 1984. Peroxidase and catalase activity in leaves of *Halimione portulacoides* (L.) exposed to salinity. Physiologia Plantarum, 62: 238-244.
- 19- Khudsar, T., Zafar, M. and Iqbal, M. 2001. Cadmium-induced changes in leaf epidermis, photosynthetic rate and pigment concentrations in *Cajanus Cajun*. Biologia Plantarum, 44(1): 59-64.
- 20- Liu, Z. G., Zhang, X. L., Bai, G. J., Suo, B. X., Xu, P. L. and Wang L. 2009. Exogenous paraquat changes antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in drought-stressed cucumber leaves, Scientia Horticulturae, 121: 138- 143.
- 21- Michalak, A. 2006. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing

- under heavy metal stress. Polish Journal of Environment, 15(4): 523- 530.
- 22- Murugesan, A. G Maheswari, S. and Bagirath, G. 2008. Biosorption of Cadmium by Live and Immobilized Cells of *Spirulina Platensis*. International Journal of Environmental Research, 2(3): 307-312.
- 23- Nadeem, S. M., Ahmad, M., Zahir, Z. A., Javaid, A. and Ashraf, M. 2013. The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stress ful environments. Biotechnology Advances, JBA, 67- 75: 20.
- 24- Nakano, Y. and Asada, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiology, 22, 867-880.
- 25- Piotrowska-Niczyporuk, A., Bajguz, A., Zambrzycka, E. B. and Godlewska-Zykiewicz, B. 2012. Phytohormones as regulators of heavy metal biosorption and toxicity in green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae). Plant Physiology and Biochemistry, 52: 52- 65.
- 26- Prasad, S. M. and Zeeshan, M. 2005. UV-B radiation and Cd induced changes in growth, photosynthesis, and antioxidant enzymes of cyanobacterium *Plectonema boryanum*. Biologia Plantarum, 49: 229-236.
- 27- Rafiqul, I. M., Hassan, A., Sulebele, G., Orosco, C. A., Roustaian, P., Jalal, K. C. A. 2003. Salt stress culture of Blue-green algae *Spirulina fusiformis*. Pakistan Journal of Biological Science, 6(7): 648-650.
- 28- Sekabira, K., Oryem Origa, H., Basamba, T. A., Mutumba, G. and Kakudidi, E. 2011. Application of algae in biomonitoring and phytoextraction of heavy metals contamination in urban stream water. International Journal of Environmental Science and Technology, 8:115-128.
- 29- Shanab, S., Essa A. and shalaby E. 2012. Bioremoval capacity of three heavy metals by some microalgae species (*Egyptian isolates*). Plant Signaling and Behavior, 7: 1-8.
- 30- Sheeba, P. S. V. Kumar, S. P. and Moha, P. S. 2011. Differential physiological and biochemical responses of two cyanobacteria *Nostoc muscorum* and *Phormidium foveolarum* against oxyfluorfen and UV-B radiation. Ecotoxicology and Environmental Safety, 74(7): 1981-1993.
- 31- Sibi, G., Anuraag, T.S. and Bafila, G. 2014. Copper stress on cellular contents and fatty acid profiles in *chlorella* species. Online Journal of Biological Sciences, 14 (3): 209-217.
- 32- Siddiqui, H. M., Al-Wahaibi, H. M. and Basalah, O.M. 2010. Interactive effect of calcium and gibberellin on nickel tolerance in relation to antioxidant systems in *Triticumaestivum* L.. Protoplasma, DOI 10.1007/s00709-010-0197-6.
- 33- Singh, V. P., Srivastava, P. K. and Prasad, S. M. 2012. Differential effect of UV-B radiation on growth, oxidative stress and ascorbate-glutathione cycle in two cyanobacteria under copper toxicity. Plant Physiology Biochemistry Journal, 61:61-70.
- 34- Soltani, N., Khavari-Nejad, R. A., Tabatabaei, M., Shokravi, S. and Fernandez-Valiente S. 2006. Variation of nitrogenase activity, photosynthesis and pigmentation of cyanobacterium *Fischerella ambigua* strain *FSJ8* under different irradiance and PH values. Journal of Applied Biotechnology, 22: 571-576.
- 35- Soto, P., Gaete H. and Hidalgo M. E. 2011. Assessment of catalase activity, lipid peroxidation, chlorophyll-a, and growth rate in the freshwater green algae *Pseudokirchneriella subcapitata* exposed to copper and zinc. Lat. Am. Egyptian Journal of Aquatic Research, 39(2): 280-285.
- 36- Souza, P. O., Ferreira, L. R., Pires, N. R. X., Filho, P. J. S., Duarte, F. A., Pereira C. M. P. and Mesko M. F. 2012. Algae of economic importance that accumulate cadmium and lead: a review, Revista Brasileira de Farmacognosia, 22(4): 825-837.
- 37- Tripathi, B. N., Mehta, S. K., Amar, A. and Gaur, J. P. 2006. Oxidative stress in *Scenedesmus* sp. during short- and long-term exposure to  $Cu^{2+}$  and  $Zn^{2+}$ . Chemosphere, 62(4): 538-544.
- 38- Tiwari P., Kumar, B., Kaur M., Kaur, G. and Kaur H. 2011. Phytochemical screening and Extraction: A review. Internationale Pharmaceutica Scientia, 1(1): 98-106.
- 39- Turkina, M. 2008. Functional proteomics of protein phosphorylation in algal photosynthetic membranes, Linköping, Sweden, PP: 1-58.
- 40- Victory K. J. 2009. Isolation and characterization of antimicrobial compounds synthesised by *Microcystis* sp. Ph.D. Thesis, University of Adelaide, Australia, P 255.
- 41- Wegmann, T. G. 1971. In progress in Immunology (B.Amos, ed.) Academic Press, New York, PP: 1468.

- 42- Wyman, M. and Fay, P. 1986. Underwater light climate and the growth and pigmentation of planktonic blue- green algae (*Cyanobacteria*). I. The influence of light quality. Proceedings of the Royal Society, 227: 367-380.
- 43- Worku A. and Sahu O. 2014. Reduction of heavy metal and hardness from ground water by algae. Journal of Applied & Environmental Microbiology, 2(2): 86-89.

## The effect of cadmium on growth characteristics and antioxidant enzymes in microalga *Anabaena sp.*

Sarmad J., Zamani M. and Fallah S.F.

Biology Dept., Faculty of Sciences, Guilan University, Guilan, Rasht, I.R. of Iran

### Abstract

In this study the effect different concentration of heavy metal cadmium (0, 5, 10 and 20  $\mu\text{M}$ ) on two microalga, *Anabaena sp.* were examined. After cadmium treatment, all samples with three replication were transferred to culture room with temperature of  $28 \pm 1$  °C, light intensity of 2500 lux and duration of 16 hours light and 8 hours darkness with aeration condition. The results showed that with increasing cadmium concentration up to 20  $\mu\text{M}$  in microalga *Anabaena sp.* The content of pigments (chlorophyll *a*,  $\beta$ -carotene, phycobiliproteins) and total protein were significantly reduced compare to control. Malondialdehyde (MDA) content as a product of oxidative stress and Enzyme activity of peroxidase (POD), ascorbate peroxidase (APX) and superoxid desmutase (SOD) significantly increased. According to the results, microalgae *Anabaena sp.* in short-term stress of metal cadmium low concentrations used in this study are sensitive.

**Key words:** *Anabaena sp.*, antioxidant enzymes, cadmium, photosynthetic pigments, protein