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 بیوشیمایی 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 ۱±۲۸ °C، شدت نوری ۲۵۰۰ 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 آنتی اکسیدانی، *Anabaena sp.*، پروتئین، رنگیزه‌های فتوسنتزی، کادمیوم

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

مقدمه

جلبک ها موجودات آبزی هستند که قادر به حذف فلزات سنگین می باشند و نقش مهمی در کنترل غلظت فلزات سنگین در دریاچه ها و اقیانوس ها دارند. نقش ضد آلودگی جلبک ها وسیع تر از گیاهان عالی آبزی است و در مقیاس های گسترده تر از آنها برای این منظور بهره می گیرند. علاقه زیادی برای کاربرد جلبک ها برای یوتروفیکاسیون آلاینده های آلی و معدنی وجود دارد (۵). جذب فلزات سنگین در محیط های آبی معمولاً در سطح سلول (دیوار، غشاء یا پلی ساکارید خارجی) و با اتصال به لیگاندهای سیتوپلاسمی، فیتوکلاتین ها، متالوتیونین ها و دیگر مولکول های داخل سلولی اتفاق می‌افتد. دیواره سلولی جلبک ها دارای بسیاری از گروه های عاملی مانند هیدروکسیل (-OH)، فسفریل ($-PO_3^{2-}$)، آمینه ($-NH_2$)، کربوکسیل (-COOH) و سولفیدریل (-SH) می باشند که سبب ایجاد بار منفی بر روی سطح سلول می شوند. یون های فلزات سنگین مانند Hg^{2+} و Pb^{2+} پیوندهای قوی ای با گروه های عاملی -CN، R-S-، -SH-، $-NH_2$ و ایمیدازول ($(CH)_2N(NH)C^-$) ایجاد می کنند که همه آنها شامل اتم های نیتروژن و گوگرد هستند. دیواره های سلولی جلبک حاوی پلی ساکاریدها و یون های فلزی دو ظرفیتی است که با یون هایی از پلی ساکاریدها تبادل می شوند، در نتیجه جذب فلزات سنگین رخ می‌دهد. حذف فلز از محلول نیز ممکن است با شکل گیری کمپلکس در سطح سلول پس از تعامل بین فلز و گروه های فعال رخ دهد (۲۸). استفاده

از سیانوباکتری ها در تصفیه فاضلاب، فرایند سازگار با محیطزیست بدون آلودگی ثانویه است. سیانوباکتری ها گروه وسیعی از موجودات پروکاریوت فتوسنتزی را تشکیل می دهند 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 می شوند. تسلط و تنوع جنس سیانوباکتری ها در محیط آبی نشان می دهد که این گروه به طیف گسترده ای از آلاینده ها تحمل نشان می دهد که ازجمله نقش هایی که سیانوباکتری‌ها می توانند داشته باشند شامل ۱- بهبود کیفیت آب توسط سیانوباکتری ها، ۲- حذف مقادیر بالایی از نیتروژن و فسفر از آب و ۳- حذف عناصر سنگین می باشند (۸). Dwivedi و همکاران (۲۰۱۰) به بررسی پتانسیل جلبک سبز و ریز جلبک 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 Worku، Sahu و همکاران (۲۰۱۴)، ریز جلبک *Synechocystis salina* می تواند 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 ریز جلبک ها، تولید کننده های اولیه در قاعده زنجیره غذایی هستند و پیش از سایرین توسط آلودگی فلزات سنگین تحت تأثیر قرار می گیرد، از این‌رو در این پژوهش چگونگی اثر فلزات سنگین بر روی ریز جلبک می تواند اطلاعات مفیدی در اختیار محققان قرار دهد و در این پژوهش، اثر غلظت های مختلف تنش کوتاه مدت کادمیوم بر میزان رشد، رنگیزه های فتوسنتزی، محتوای مالون دی آلدهید، محتوای پروتئین کل و میزان فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی بررسی شد.

مواد و روشها

تهیه و آماده سازی نمونه‌های جلبکی: نمونه های محیطی متعددی برای جداسازی سیانوباکتری *Anabaena sp.* از تالاب های استان گیلان برداشت شدند. عمل خالص سازی با روش پلیت آگار (۴۰) و با استفاده از محیط جامد BG-11 انجام شد. رشته های 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 کشت های استریل سرد شده، داخل ارلن‌های ۱۰۰ میلی لیتری استریل ریخته و تلقیح ریزجلبک ها از محیط جامد به محیط مایع انجام شد. در نهایت ارلن‌ها به اتاق کشت منتقل و فرصت رشد یک تا سه هفته‌ای برای رشد کامل و قرارگیری در فاز لگاریتمی به آنها داده شد. مشخصات اتاق کشت از این قرار بود که دمای آن توسط ترموستات ۱ ±۲۸ درجه سانتی گراد 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. ریز جلبک *Anabaena sp.* در غلظت های 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 ریز جلبک *Anabaena sp.* برداشت شد. بیومس حاصل پس از شوک فریز در نیتروژن مایع برای سنجش پروتئین کل و فعالیت آنزیم ها و اندازه گیری محتوی MDA در فریزر ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری

شدند. از ریز جلبک های مورد آزمایش برای سنجش تغییرات رشد بر حسب وزن خشک، مقدار کلروفیل *a*، سنجش بتا کاروتن، محتوای فیکوبیلی پروتئین ها، محتوای پروتئین کل، مالون دی آلدهید و برخی آنزیم های آنتی اکسیدانی استفاده شدند.

سنجش رشد بر حسب وزن خشک: به‌منظور بررسی روند رشد ریز جلبک ها بر حسب وزن خشک در کلیه نمونه های تحت تیمار با فلز سنگین کادمیوم و گروه شاهد مقدار جذب نوری نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۷۵۰ nm اندازه گیری 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 زیست توده هر چهار رقت بمدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰-۴۰ درجه سانتی گراد 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 رنگیزه های فتوسنتزی: برای تعیین غلظت رنگیزه های کلروفیلی در ریز جلبک *Anabaena sp.*، ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش یک میلی لیتر از سوسپانسیون جلبکی (کلنی جلبک آنابنا بسیار سلول های کوچکی دارد که با هم زدن ارلن تا ده دقیقه سوسپانسیون یکنواخت تشکیل می شود و بعد کم کم ته نشین می شود) هر ارلن بطور جداگانه، به میکروتیوب‌های میکروسانتریفیوژ منتقل و بمدت ۵ دقیقه با ۷۰۰۰ دور دردقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول رویی با دقت به کمک سمپلر خارج و به رسوب باقیمانده، یک میلی لیتر استون ۸۵٪ اضافه شد. سپس محتویات داخل میکروتیوب ها با دستگاه ورتکس مخلوط و پس از آن نمونه ها دوباره با دور ۷۰۰۰، بمدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ شدند. جذب محلول 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 اندازه گیری 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 سانتی گراد) 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: اندازه گیری مقدار پروتئین کل توسط روش Bradford (۱۹۷۶) انجام شد (۶). به‌منظور آماده سازی نمونه ها 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 pvpp ۲ درصد) انجام شد. برای پاره کردن کامل غشای سلولی، نمونه ها بمدت ۳۰ ثانیه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سونیک و بعد بمدت ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد در دور ۱۲۵۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. با استفاده از رسم منحنی استاندارد پروتئین گاما گلوبین پلاسمای گاوی (BSA) میزان آن سنجش شد. جذب نمونه ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد.

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

درصد توسط دستگاه سونیکاتور بمدت ۳۰ ثانیه در دمای ۴ درجه سانتی گراد، سونیک و عصاره‌های 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 کینتیکی 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 آسکوربات‌پراکسیداز (APX): فعالیت این آنزیم با استفاده از روش Nakano و Asada (۱۹۸۱) مورد سنجش قرار گرفت (۲۴). سنجش فعالیت آنزیم از طریق اندازه‌گیری اکسید شدن آسکوربات توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۹۰ نانومتر بمدت یک دقیقه انجام شد.

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

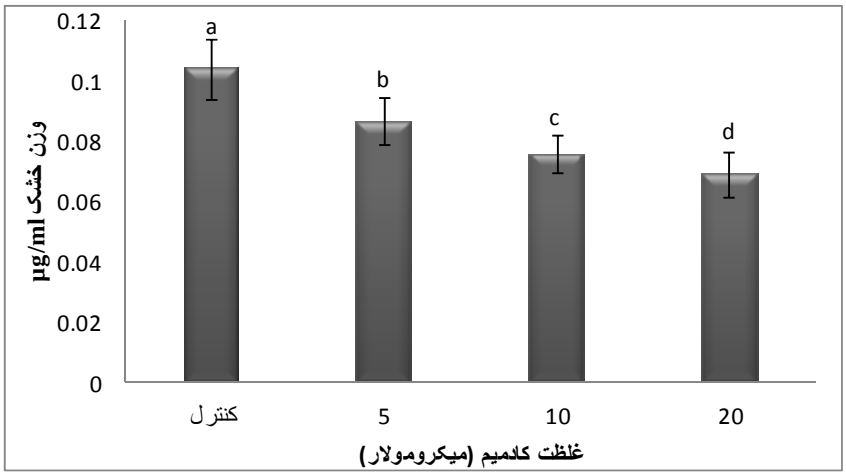
نتایج

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 به‌ترتیب ۱۷/۰۳، ۳۳/۶۲ و ۴۸/۱۴ درصد کاهش وزن خشک نشان دادند.

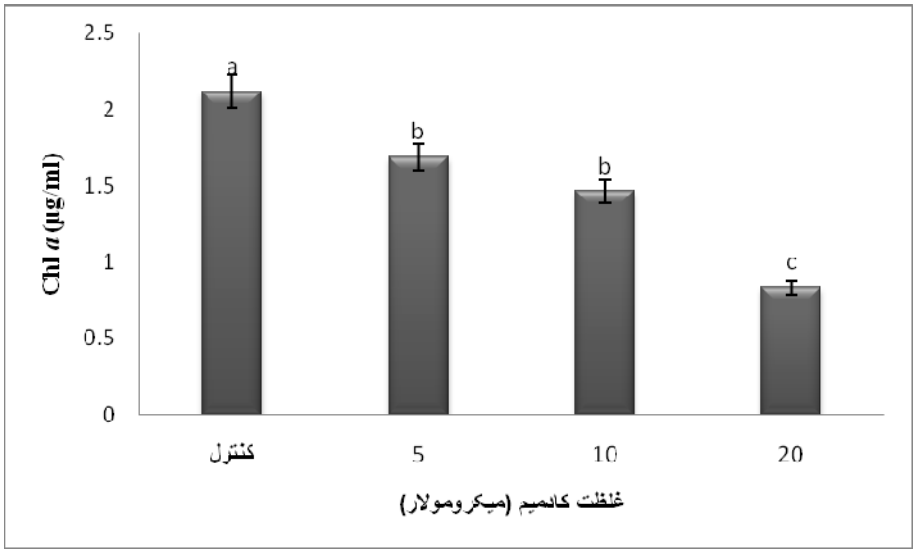
محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی: با توجه به شکل ۲، نتایج نشان داد که با افزایش غلظت فلز سنگین کادمیوم تا ۲۰ میکرومولار محتوای کلروفیل *a* در ریز جلبک *Anabaena sp.*، بطور معنی داری در مقایسه با شاهد کاهش یافت. به‌طوری‌که بالاترین میزان کلروفیل *a* مربوط به نمونه شاهد با مقدار ۲/۱۱ میکروگرم بر میلی لیتر و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

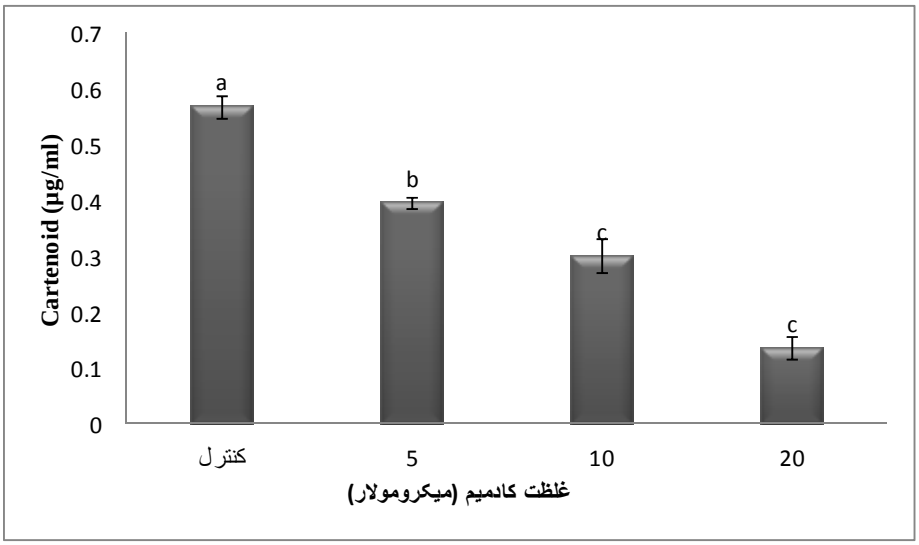
میکرومولار، محتوای بتاکاروتن در ریز جلبک، بطور معنی داری در مقایسه با شاهد کاهش یافت. به‌طوری‌که بالاترین میزان بتاکاروتن مربوط به نمونه شاهد با مقدار ۰/۴۵ میکروگرم بر میلی لیتر و کمترین مقدار آن مربوط به نمونه های تیمار ۲۰ میکرومولار با مقدار ۰/۱۳ میکروگرم بر میلی لیتر بود.



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 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 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٪. داده ها نشان دهنده میانگین±انحراف معیار (SE) است. حروف متفاوت حاصل آزمون چند دامنه ای دانکن بالای نمودار بیانگر اختلاف معنی دار می باشد.

محتوای رنگیزه‌های فیکوبیلی پروتئینی در ریز جلبک *Anabaena sp.*: با توجه به جدول ۱، نتایج آزمایش نشان داد که محتوای فیکوبیلی پروتئین ها در نمونه کنترل (شاهد) بطور معنی داری بیشتر از سایر نمونه های تحت تنش کوتاه مدت با غلظت های مختلف کادمیوم بود، به‌طوری‌که مقدار فیکوبیلی پروتئین کل در گروه کنترل (شاهد) ۲۲/۰۹ میکروگرم بر میلی لیتر و با افزایش غلظت فلز سنگین کادمیوم محتوای فیکوبیلی پروتئین بطور معنی داری کاهش یافت و کمترین مقدار آن مربوط به تیمار ۲۰ میکرومولار با مقدار ۶/۰۵ میکروگرم بر میلی لیتر می باشد. در ریز جلبک *Anabaena sp.* فیکوسیانین ساختار اصلی فیکوبیلی زوم‌ها است. همان طور که در جدول ۱ مشاهده می شود، تغییرات محتوای فیکوسیانین و آلوفیکوسیانین و فیکواریترین نیز از همین روند پیروی می کنند و با افزایش غلظت فلز سنگین کادمیوم مقادیر آنها بطور معنی داری کاهش می یابد، به‌طوری‌که کمترین مقدار این رنگیزه ها مربوط به تیمار ۲۰ میکرومولار می باشد.

تغییرات محتوای پروتئین: با توجه به شکل ۴، نتایج داده ها نشان داد که محتوای پروتئین کل پس از اعمال تنش کوتاه مدت با غلظت های مختلف فلز سنگین کادمیوم در محدوده ۵ تا ۲۰ میکرومولار در *Anabaena sp.* بطور معنی داری نسبت به کنترل کاهش پیدا کرد. متناسب با افزایش غلظت فلز سنگین کادمیوم میزان تخریب پروتئین نیز افزایش یافت، به‌طوری‌که 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 دی آلدهید: تغییرات محتوای مالون دی آلدهید (MDA) ریز جلبک *Anabaena sp.* تحت اثر تنش کوتاه مدت فلز سنگین کادمیوم، ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش بررسی و نتایج در شکل ۵ نشان داده شده است. نتایج داده ها نشان داد که محتوای مالون دی آلدهید (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 کادمیوم، میزان

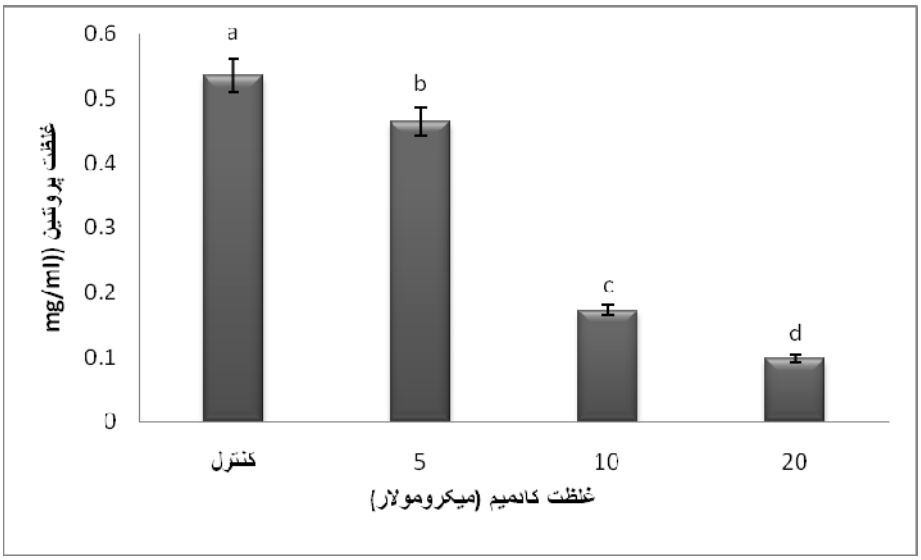
افزایش محتوای مالون دی آلدهید نیز مشاهده شد. کمترین محتوای مالون دی آلدهید در ریز جلبک *Anabaena sp.* در گروه کنترل (شاهد) بود و بیشترین محتوای مالون دی آلدهید در ریز جلبک *Anabaena sp.* در غلظت ۲۰ میکرومولار کادمیوم مشاهده شد.

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز: اثر تنش کوتاه مدت در غلظت های مختلف فلز سنگین کادمیوم بر فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در ریز جلبک *Anabaena sp.* در شکل ۶ نشان داده شده است. نتایج بیان کرد که در ریز جلبک *Anabaena sp.* تحت اثر تنش کوتاه مدت فلز سنگین کادمیوم فعالیت آنزیم پراکسیداز بطور قابل توجهی در همه تیمارها افزایش یافت، به‌طوری‌که بیشترین میزان فعالیت آنزیم در غلظت ۲۰ میکرومولار کادمیوم مشاهده شد.

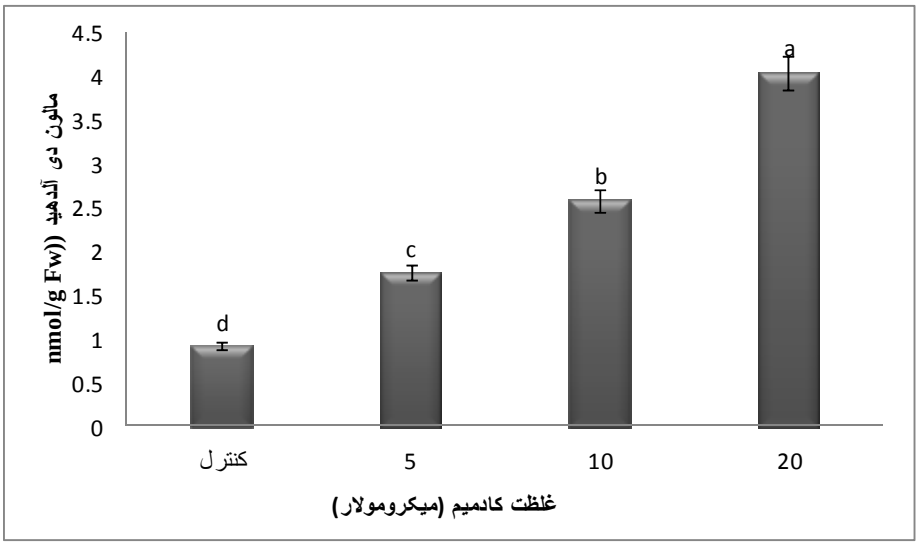
فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز: با توجه به شکل ۷، فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در تنش کوتاه مدت فلز سنگین کادمیوم نشان داد که در ریز جلبک *Anabaena sp.* تحت اثر تنش کوتاه مدت فلز سنگین کادمیوم فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بطور معنی داری در همه تیمارها افزایش یافت، به‌طوری‌که بیشترین میزان فعالیت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

جدول۱- تغییرات محتوای رنگیزه های فیکوبیلی پروتئین ها پس از تنش کوتاه مدت در غلظت های مختلف فلز سنگین کادمیم در سطح معنی دار ۵ درصد در ریز جلبک *Anabaena sp.* داده ها نشان دهنده میانگین± انحراف معیار (SE) است. حروف متفاوت حاصل آز ازمون چند دامنه ای دانکن در جدول بیانگر اختلاف معنی دار می باشد.

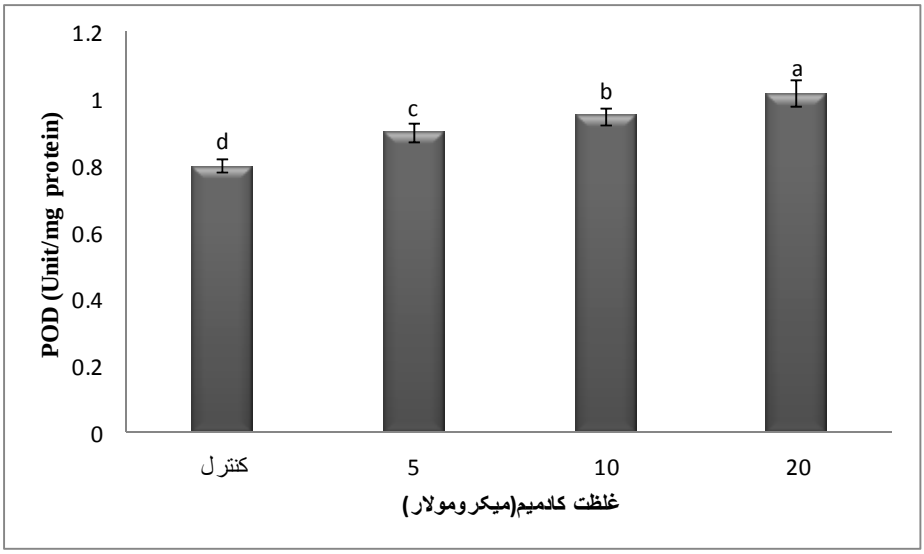
تیمارها (μM)	فیکوبیلی پروتئین ها (μg/ml)	فیکواریترین (PE) (μg/ml)	آلوفیکوسیانین (APC) (μg/ml)	فیکوسیانین (PC) (μg/ml)
کنترل	۲۲/۰۹ ±۳/۹^{a}	۱/۶۸±۰/۱۵^{a}	۷/۰۶±۰/۹^{a}	۱۳/۳۴±۱/۲^{a}
غلظت ۵	۱۸/۴۱±۳/۲^{b}	۱/۴۹±۰/۱^{b}	۶/۵۸±۰/۶^{b}	۱۰/۳۴±۲/۱۹^{b}
غلظت ۱۰	۱۳/۱۸±۲/۸^{c}	۱/۴۲±۰/۱^{c}	۴/۸۱±۰/۳۴^{c}	۶/۹۴±۱/۲^{c}
غلظت ۲۰	۶/۰۵±۳/۱۳^{d}	۱/۱۴±۰/۱۲^{d}	۲/۸۷±۰/۴۶^{d}	۲/۰۳±۱/۵^{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٪. داده ها نشان دهنده میانگین± انحراف معیار (SE) است. حروف متفاوت حاصل آزمون چند دامنه ای دانکن بالای نمودار بیانگر اختلاف معنی دار می باشد.



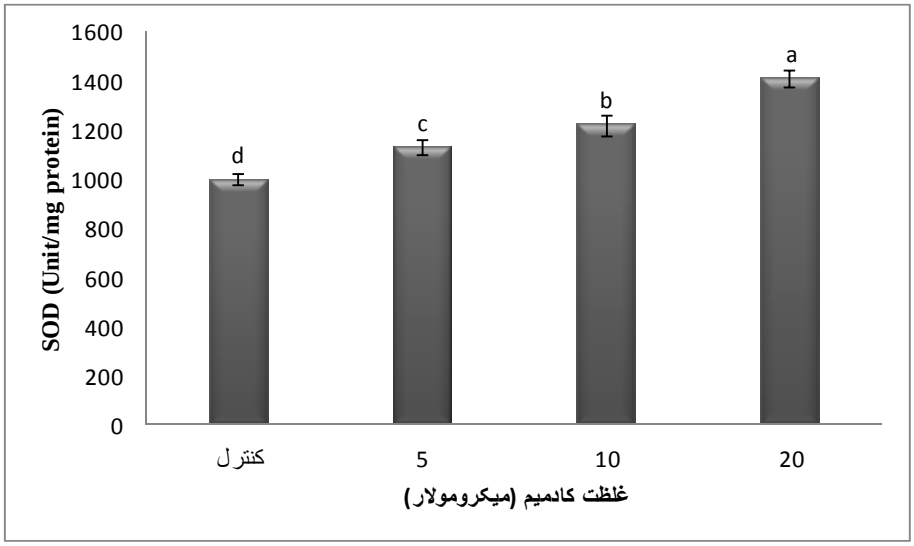
شکل ۵- محتوای مالون دی آلدهید (MDA) ریز جلبک *Anabaena sp.* پس از اعمال تنش کوتاه مدت در تیمارهای مختلف فلز سنگین کادمیم در شرایط استاندارد آزمایش در سطح معنی دار ۵٪. داده ها نشان دهنده میانگین± انحراف معیار (SE) است. حروف متفاوت حاصل آزمون چند دامنه ای دانکن بالای نمودار بیانگر اختلاف معنی دار می باشد.



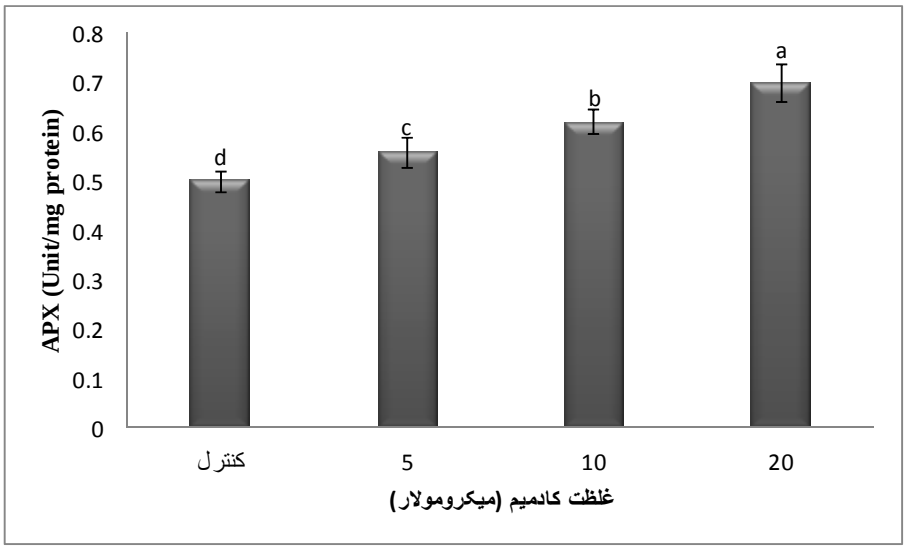
شکل ۶- تغییرات فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (POD) ریز جلبک *Anabaena sp.* پس از اعمال تنش کوتاه مدت در تیمارهای مختلف فلز سنگین کادمیم در شرایط استاندارد آزمایش در سطح معنی دار ۵٪. داده ها نشان دهنده میانگین± انحراف معیار (SE) است. حروف متفاوت حاصل آزمون چند دامنه ای دانکن بالای نمودار بیانگر اختلاف معنی دار می باشد.

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز: نتایج داده های اثر تنش کوتاه مدت غلظت های مختلف فلز سنگین کادمیوم بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در ریز جلبک مورد 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

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٪. داده ها نشان دهنده میانگین± انحراف معیار (SE) است. حروف متفاوت حاصل آزمون چند دامنه ای دانکن بالای نمودار بیانگر اختلاف معنی دار می باشد.



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٪. داده ها نشان دهنده میانگین± انحراف معیار (SE) است. حروف متفاوت حاصل آزمون چند دامنه ای دانکن بالای نمودار بیانگر اختلاف معنی دار می باشد.

بحث

نتایج حاصل از این پژوهش از اثر تنش کادمیوم بعد از ۲۴ ساعت نشان داد که میزان وزن خشک نمونه های ریز جلبک *Anabaena sp.*، بطور قابل توجهی کاهش می یابند، به‌طوری‌که در غلظت ۲۰ میکرومولار کاهش بیشتری در

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 غلظت های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار سرب و کادمیوم هیچ تغییر چشمگیری بر روی رشد و پاسخ های 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 می دهد (۱۱). همچنین نتایج این آزمایش با مشاهدات Shanab و همکاران (۲۰۱۲) مطابقت می کند. آنان گزارش کردند که *Phormidium ambiguum* نسبت به فلزات سنگین (جیوه، کادمیوم و سرب) حساس می باشد (۲۹).

در این پژوهش، محتوای کلروفیل *a* و بتاکاروتن با افزایش غلظت کادمیوم طی ۲۴ ساعت بطور معنی داری کاهش می یابد (شکل ۲ و ۳). تنش عنصر سنگین نیز به ساختار تیلاکوئید و گرانای 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). داده های 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 غلظت های 10^{-6} و 10^{-4} مولار، کلروز (کم شدن یا از بین رفتن رنگدانه زرد طبیعی) را از خود نشان دادند و این امر 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 غلظت های بین ۱ تا ۲ mg/L، مقدار کلروفیل *a* ریز جلبک *Spirolina platensis* با افزایش غلظت کادمیوم کاهش چشمگیر می یابد (۲۲). همچنین بهشتی فر و شریعتی (۱۳۹۴) گزارش کردند که تیتانیوم سبب کاهش میزان رنگیزه های کلروفیل و بتاکاروتن در جلبک تک سلولی *Dunaliella salina* می شود (۱).

نتایج حاصل از این پژوهش از اثر تنش کادمیوم طی ۲۴ ساعت نشان داد که محتوای فیکوسیانین، آلوفیکوسیانین و فیکواریترین با افزایش غلظت فلز سنگین کادمیوم بطور معنی داری کاهش می یابد (جدول ۱). در سیانوباکتری ها فیکوبیلی زوم هایی که در سطح استرومایی غشا تیلاکوئیدی قرار دارند و حاوی فیکوبیلی پروتئین ها هستند، به‌عنوان آنتن های اولیه گیرنده نوری برای PSII عمل می کنند. انتقال انرژی بوسیله این پیگمان های اضافی از فیکواریترین (در صورت وجود) به فیکوسیانین و بعد الوفیکوسیانین و در نهایت به گیرنده های نور با طول موج بالا انجام می‌شود (۳۴). ساختار و عملکرد فیکوبیلی زوم سیانوباکتری ها با افزایش غلظت فلز سنگین کادمیوم کاهش بیشتری نسبت به کنترل پیدا می کند، احتمالاً علت

این امر این است که فلزات سنگین باعث تخریب رنگیزه های فیکوبیلی پروتئینی می شود. فیکوسیانین ها منبع نیتروژن در سیانوباکتری ها هستند (۳۰)، از این رو افت شدید فیکوسیانین در *Anabaena sp.* مهار شدید رشد را حتی در غلظت های پایین فلز سنگین کادمیوم نشان می دهد و این امر با داده های وزن خشک نیز تأیید می شود. 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 ۳۲/۷ درصد کاهش یافت (۳۳). همچنین Prasad و Zeeshan (۲۰۰۵) مشاهده کردند که تنش کادمیوم در ریز جلبک *Plectonema boryanum* باعث کاهش مقدار فیکوسیانین می شود (۲۶).

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که محتوای پروتئین تحت تنش کوتاه مدت کادمیوم کاهش می یابد (شکل ۴). Khudsar و همکاران (۲۰۰۱) گزارش کردند که کاهش در محتوای پروتئینی در غلظت های بالای یون می تواند بعلت کاهش در سنتز بعضی پروتئین ها یا احتمالاً افزایش فعالیت آنزیم های پروتئولیتیک باشد (۱۹). همچنین کاهش در محتوای پروتئین می تواند به اثر متفاوت گونه های فعال اکسیژن (ROS) مربوط باشد، به گونه ای که ROS با صدمه زدن به پروتئوم سبب نابودی شماری زیادی از پروتئین شود (۲، ۳۹). نتایج این آزمایش با مطالعات Sibi و همکاران (۲۰۱۴) در بررسی اثر تنش مس بر روی گونه های *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 دی آلدهید (MDA) در ریز جلبک *Anabaena sp.* در کلیه تیمارها در مقایسه با گروه کنترل افزایش پیدا کرد و بیشترین محتوای مالون دی آلدهید در غلظت ۲۰ میکرومولار کادمیوم مشاهده شد (شکل ۵). تخریب اکسیداتیو چربی غشای سلولی بطور گسترده به‌عنوان یک نشانگر اکسیداتیو در تنش استفاده می شود و توسط اندازه گیری محتوای مالون دی آلدهید تخمین زده می شود. همچنین القای پراکسیداسیون لیپیدها توسط کادمیوم نتیجه غیر مستقیم انباشت پراکسیدهای هیدروژن می باشد، زیرا این پراکسیدهای هیدروژن در اثر مهار مسیرهای متابولیکی مختلف ایجاد می شوند (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 می یابد (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 دی آلدهید مطابقت دارد (۳۵).

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

در شرایط غیرتنش بین میزان تولید گونه های فعال اکسیژن و ظرفیت جاروب کردن آنها توسط سیستم دفاع آنتی اکسیدانی (آنزیمی و غیر آنزیمی) تعادل وجود دارد. امّا در شرایط تنش میزان تولید گونه های فعال اکسیژن از ظرفیت جاروب کردن آنها توسط سیستم دفاع آنتی اکسیدانی بیشتر شده، در نتیجه تنش اکسیداتیو رخ می دهد. بنابراین برای مقابله با تنش اکسیداتیو تغییر ظرفیت سیستم دفاع آنتی اکسیدانی ضروری می باشد. آنزیم هایی مانند سوپر

اکسیددیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز از آنزیم های مهم سیستم دفاع آنتی اکسیدانی در گیاهان می باشند (۳). در این مطالعه فعالیت آنزیم های پر اکسیداز (POD)، آسکوبات پراکسیداز (APX) و سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) بطور معنی داری افزایش پیدا کرده است (شکل ۶، ۷ و ۸). این آنزیم‌های آنتی اکسیدانی یک مکانیسم دفاعی در گیاه می‌باشند. وقتی به گیاه خسارت وارد می‌شود، فرایند آنتی اکسیدانی و مکانیسم سمیت‌زدایی در برابر تولید ROS رخ می‌دهد و گیاهان مکانیسم دفاعی خودشان را در برابر تولید ROS که شامل چندین آنزیم و آنتی اکسیدان‌ها است، افزایش می-دهند (۲۱). سوپراکسید دیسموتاز اولین آنزیمی است که در فرایند سمیت‌زدایی و تبدیل به رادیکال O_2 و H_2O_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 H_2O_2 نسبت به آنزیم کاتالاز دارد و از سمیت در گیاه جلوگیری می‌کند (۱۲). APX در مهار ROS و محافظت از سلول های گیاهان، جلبک ها و دیگر موجودات زنده نقش مهمی را بازی می کند. APX در مهار H_2O_2 در چرخه ASH-GSH از طریق استفاده از ASH به‌عنوان دهنده الکترون درگیر می باشد. APX میل ترکیبی بالاتری به H_2O_2 نسبت به آنزیم های 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 کرده اند که در ریز جلبک تک سلولی *Gonyaulax polyedra*، فلزهای کادمیوم و مس موجب افزایش آنزیم های آنتی اکسیدان از جمله SOD، در پاسخ به یک تنش بلند مدت می شود (۳۶). همچنین در ریز جلبک *Scenedesmus sp.*، فعالیت آنزیم SOD با افزایش غلظت Cu^{+2} و Zn^{+2} افزایش می یابد (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 آنتی اکسیدانی SOD و POX می شود (۱۵).

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج حاصل، قرار گرفتن ریز جلبک ها در معرض غلظت های مختلف فلز سنگین کادمیوم بمدت ۲۴ ساعت، کاهش در میزان وزن خشک، رنگدانه های فتوسنتزی و میزان پروتئین کل و افزایش در محتوای مالون دی آلدهید و فعالیت آنزیم های 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 جلبک ها نقش مهمی را در پالایش آلودگی فلزات سنگین در محیط زیست بازی می کنند و اطلاعات مفیدی را در اختیار محققان قرار می دهند؛ از این‌رو پیشنهاد می شود که اندازه گیری میزان جذب زیستی فلز سنگین کادمیوم توسط ریز جلبک مورد مطالعه قرار گیرد. این پژوهش به‌منظور بررسی اثرات غلظت های مختلف فلزات سنگین کادمیوم بمدت ۲۴ ساعت بر برخی پارامترهای فیزیولوژی انجام شد.

سپاسگزاری

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

منابع

۱- بهشتی فر س. و شریعتی م. ۱۳۹۴. اثر تیتانیوم بر رشد و تولید رنگیزه های فتوسنتزی در جلبک تک سلولی *Dunaliella salina*، مجله پژوهش های گیاهی (زیست شناسی 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 اندام هوایی گیاه آفتابگردان (*Helianthus annuus*)، مجله زیست شناسی گیاهی، ۱۳(۴): ۹۷-۱۱۴.

۳- دانشمند ف. ۱۳۹۳. تأثیر آسکوربیک اسید در کاهش تنش اکسیداتیو حاصل از تنش شوری در سیب زمینی، مجله پژوهش های گیاهی (زیست شناسی 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- Eijckelhoff , C. and Dekker, J. P. 1997. A routine method to determine the chlorophyll a, pheophytin a, and β-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., Dumlupinar, R., Kaya, O. and Gorcek Z. 2011. Effects of salicylic acid on wheat salt sensitivity. African Journal of Biotechnology, 10(30): 5713- 5718.

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 ag-nanoparticles 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 portulaccoides* (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 Environent,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 mycorrhizaeand plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stress fulenvironments. 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 Spirulinafusiformis. 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-Whaibi, 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 FS18* 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 Sciencia, 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 microalgea *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 µM) on two microalgea, *Anabaena sp.* were examined. After cadmium treatment, all samples with three replication were transferred to culture room with temperature of 28±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 20µM in microalgea *Anabaena sp.* The content of pigments (chorophyll *a*, β-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