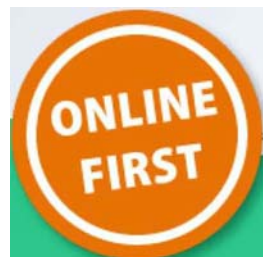


## اثرات غلظت‌های مختلف سرب بر رشد و محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی و

مالون‌دی‌آلدهید جلبک سبز تک یاخته‌ای *Chlorella Vulgaris*اکرم سادات نعیمی<sup>۱\*</sup>، جنت سرمد<sup>۱</sup>، نسترن محسنی<sup>۱</sup> و فاطمه کهتری<sup>۲</sup><sup>۱</sup> گیلان، دانشگاه گیلان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی<sup>۲</sup> دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، گروه زیست‌شناسی سلولی-تکوبنی گیاهی

تاریخ پذیرش: ۹۶/۹/۱۳

تاریخ دریافت: ۹۵/۴/۱۰



## چکیده

فلز سنگین سرب به عنوان آلاینده در محیط زیست سبب بروز اثرات سمی در سلول‌ها می‌شود. جلبک سبز تک یاخته‌ای *Chlorella Vulgaris* متعلق به خانواده *Chlorellaceae* به علت ساده بودن ساختار سلولی و ویژگی‌های منحصر به فرد خود، به عنوان مدل در مطالعات فیزیولوژیکی گیاهی استفاده می‌شود. به منظور بررسی وضعیت رشد و سازگاری *C. Vulgaris* به غلظت‌های مختلف سرب (صفر، ۱۰، ۵۰، ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر)، آزمایشی در محیط کشت زاندر مثبت با سه تکرار در اتاقک کشت با دمای  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ، شدت نوری ۲۵۰۰ لوکس، تناوب نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در شرایط هوادهی به مدت ۱۸ روز انجام شد. منحنی رشد نمونه‌ها در هر تیمار بر اساس جذب نوری در طول موج ۷۵۰ nm، نرخ رشد، میزان کلروفیل‌ها و مالون‌دی‌آلدهید و مقدار سرب جذب شده از محیط توسط جلبک کلرلا اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد با افزایش غلظت سرب در محیط کشت تا تیمار ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر سرب، تولید ماده زیستی، رنگیزه‌های فتوسنتزی و متعاقب آن نرخ رشد کاهش یافت و نمونه‌ها در مدت زمان کمتری وارد مرحله ایستایی رشد شدند و میزان مالون‌دی‌آلدهید در تیمارهای ۵۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نسبت به کنترل افزایش معنی‌داری داشتند. به طور کلی غلظت‌های بالای فلز سمی سرب، اکثر پارامترهای فیزیولوژیکی و حیاتی جلبک *C. Vulgaris* را تحت تاثیر قرار داد اما به عنوان یک میکروآلگ مقاوم، علی‌رغم کاهش تقسیم سلولی همچنان توانایی رشد خود را حفظ نمود.

واژه‌های کلیدی: فلز سنگین، کلرلا، رشد، کلروفیل، مالون‌دی‌آلدهید

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۱۳۳۳۳۱۰۱۷۳، پست الکترونیکی: akramnaeemi@yahoo.com

## مقدمه

سلولی و عدم توانایی سلول در مقابله با آنها رخ می‌دهد، در غلظت‌های پایین فلزات سنگین توسط گیاهان و جلبکها جذب شده و به دیگر موجودات زنجیره غذایی انتقال می‌یابد (۱۸) مقدار استاندارد سرب در آب‌های آشامیدنی براساس داده‌های آژانس حفاظت محیط زیست (EPA) و سازمان بهداشت جهانی (WHO) به ترتیب  $5 \mu\text{g/l}^{-1}$  و  $10 \mu\text{g/l}^{-1}$  و حداکثر غلظت مجاز سرب در آب‌های طبیعی برای حفظ سلامتی انسان  $50 \mu\text{g/l}^{-1}$  گزارش شده‌است

توسعه‌ی فعالیت‌های انسانی و صنعتی منجر به افزایش آلودگی فلزات در محیط زیست می‌شود (۷). سرب یکی از خطرناک‌ترین، مهمترین و سمی‌ترین فلزات سنگین در اکوسیستم‌های آبی است (۱۵). فلزات سنگین بسته به موقعیت اکسیداسیونی که دارند به میزان زیادی فعال بوده و برای اغلب موجودات سمی هستند. در غلظت‌های بالای فلزات سنگین، آسیب به سلولها به علت بالا رفتن سطوح گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species)

۲۵±۴c، شدت نوری ۲۵۰۰ لوکس، تناوب نوری ۱۲ ساعت و روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی با شدت جریان هوای مناسب) به اتافک کشت انتقال یافتند. نمونه برداری در زمان صفر ( لحظه شروع آزمایش) تا انتهای دوره آزمایش در زمان‌های مشخصی به منظور رسم منحنی رشد و سنجش رنگیزه‌ها انجام شد. رشد جلبک از طریق اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج ۷۵۰nm اندازه‌گیری و سپس منحنی رشد رسم شد. میزان نرخ رشد ریز جلبک‌های مورد بررسی جداسازی شده بر طبق فرمول جدول شماره یک محاسبه گردید (۱۲).

جدول ۱- معادله نرخ رشد

$$\mu = \frac{(\ln(dw_{9th}) - \ln(dw_{7th}))}{t_2 - t_1}$$

در این رابطه  $\mu$  نرخ رشد روزانه است.  $dw_{9th}$  وزن خشک روز نهم و  $dw_{7th}$  وزن خشک روز هفتم می‌باشد.  $t_2 - t_1$  بترتیب روزهای هفتم و نهم آزمایش می‌باشند.

جهت تعیین غلظت رنگیزه‌ها، یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی هر ارلن به طور جداگانه، به میکروتیوب‌های مخصوص میکروسانتریفیوژ منتقل و به مدت ۵ دقیقه با ۷۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. محلول رویی به کمک سمپلر خارج و به رسوب باقیمانده، یک میلی‌لیتر استون ۸۵٪ اضافه شد. سپس محتویات داخل میکروتیوب-ها با دستگاه ورتکس مخلوط و پس از آن نمونه‌ها مجدداً با دور ۷۰۰۰، به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ شدند. جذب محلول رویی در طول موج‌های ۶۴۷ و ۶۶۳ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر تعیین گردید. (جهت جلوگیری از تخریب رنگیزه‌ها، نمونه‌ها همواره در سرما و تاریکی نگه داشته شدند) با استفاده از فرمول‌های جدول شماره دو، میزان کلروفیل a، کلروفیل کل بر حسب میکروگرم در میلی‌لیتر در هر سلول محاسبه گردید (۸).

(۲۵). جلبک‌ها، تولید کنندگان اولیه‌ی زنجیره غذایی آبی هستند و به این دلیل اهمیت اکولوژیکی بالایی دارند. جلبک سبز تک یاخته‌ای کلرلا به علت ساده بودن ساختار سلولی و شرایط کشت آسان دوره رشد کوتاه و شباهت زیاد به ساختار سلولی گیاهان عالی (۲۱)، معمولاً به عنوان مدل آزمایشی استفاده می‌شود. علاوه بر این، نتایج حاصل از آزمون سمیت جلبکی نسبتاً قابل اعتماد و برای سایر گونه‌های گیاهی تکرار پذیر است (۱۱). تحقیقات گذشته نشان داده اند که فلزات سنگین اثرات قابل توجهی بر تقسیم سلولی، رشد و محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی و میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشای ریزجلبک کلرلا داشته است (۷، ۹، ۱۱، ۱۳، ۱۹، ۲۵). با توجه به اهمیت فلز سنگین سرب به عنوان آلاینده اکوسیستم، در مطالعه حاضر آزمایشی به طرح سمیت بلند مدت فلز سرب و بررسی غلظت‌های مختلف آن بر شاخص‌های حیاتی *Chlorella Vulgaris* اختصاص دارد.

## مواد و روشها

جلبک *Chlorella Vulgaris* از موسسه تحقیقات ماهیان خاویاری واقع در شهر رشت تهیه و در محیط کشت زاندر مثبت و pH ۷ کشت اولیه داده شد. کلیه مواد شیمیایی مورد مطالعه از درجه خلوص آنالیتیکی برخوردار بودند. در ابتدا حجم مشخصی از سوسپانسیون جلبکی در شرایط استریل، به ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری در سه تیمار از غلظت‌های ۱۰، ۵۰، ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر سرب (با استفاده از نمک نترات سرب) و یک گروه شاهد با سه تکرار تلقیح شدند. تعداد سلول‌ها در ابتدای آزمایش تقریباً  $\times 10^6$  ۰/۲۵ سلول در هر میلی‌لیتر در نظر گرفته شد. این عمل به منظور مشابهت نقطه ابتدایی منحنی رشد صورت گرفت. سپس تمامی ارلن‌ها تحت شرایط پایه آزمایش (دمای

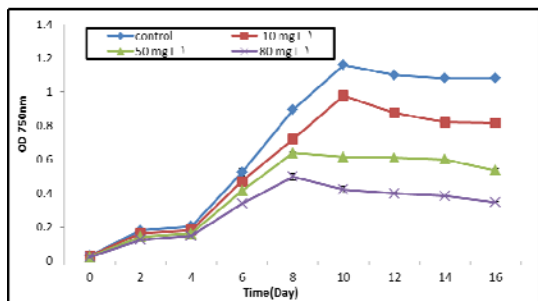
جدول ۲- معادلات مورد استفاده در محاسبه رنگیزه‌های کلروفیلی در جلبک سبز تک یاخته‌ای *C. vulgaris*

Chla	$=((12.25 \times \text{od } 663 \text{ nm}) - (2.79 \times \text{od } 647 \text{ nm})) \times \text{Dilution factor}$
Chlb	$=((21.5 \times \text{od } 647 \text{ nm}) - (5.1 \times \text{od } 663 \text{ nm})) \times \text{Dilution factor}$
T-chl	$=\text{Chla} + \text{chlb}$

جذب شده توسط جلبک بر حسب میلی گرم بر گرم وزن خشک جلبک اندازه گیری شد.

## نتایج

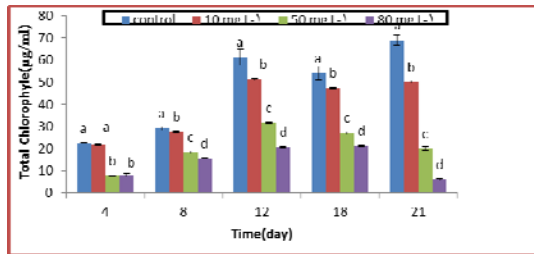
روند روزانه رشد در منحنی های شکل شماره ۱، در نمونه‌های تحت تیمار سرب و کنترل، تقریباً از الگوی مشابهی تبعیت می‌کند.



شکل ۱ - نمودار مقایسه منحنی رشد جلبک سبز *Chlorella Vulgaris* در روزهای مختلف تحت تیمار غلظت‌های مختلف سرب، در شرایط پایه آزمایش. داده‌ها میانگین سه تکرار  $\pm$  خطای معیار (SE) می‌باشد

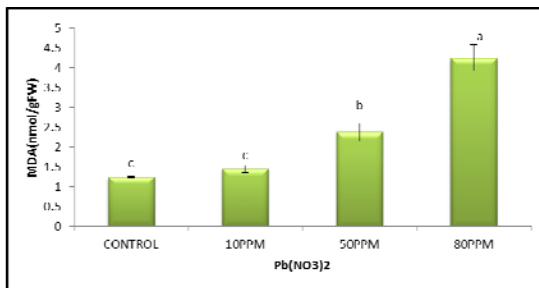
به طوری که پس از گذراندن فاز کندی یا تاخیری رشد (lag phase) که در حدود ۴ روز پس از اعمال تنش ادامه داشت، وارد مرحله لگاریتمی رشد (logarytmic phase) می‌شوند با این تفاوت که با افزایش غلظت سرب تا تیمار ۸۰ میلی گرم در لیتر نمونه‌ها به ترتیب با شیب ملایم تر و در مدت زمان کوتاه‌تری وارد مرحله ایستایی رشد (stationary phase) شدند. در شکل ۲ نمودار نرخ رشد جلبک سبز تک‌یاخته‌ای *Chlorella vulgaris* در گروه کنترل و نمونه‌های تحت تیمار، نشان داده شده است. نرخ رشد در نمونه کنترل ۰/۲۲۱ است و در نمونه‌های تحت تیمار ۱۰ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر سرب به ۰/۱۵۳ و ۰/۰۳ کاهش می‌یابد و در تیمار ۸۰ میلی‌گرم در لیتر سرب این مقدار منفی می‌شود و به ۰/۰۶- میرسد. در مقایسه نرخ رشد بین تیمار ۵۰ و ۸۰ با کنترل اختلاف معناداری مشاهده شد.

برای سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشا و غلظت مالون‌دی‌آلدئید (MDA) ۰/۱ گرم رسوب جلبکی از هر تیمار به کمک ۱ ml محلول تری‌کلرواستیک اسید (TCA) ۵ درصد، در دمای ۴ درجه و به مدت ۳۰ ثانیه سونیک شد و عصاره به دست آمده با سرعت ۱۲۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول روئی برداشته شد. هم حجم محلول روئی، محلول تیوباربیتوریک اسید ۰/۵ درصد در تری‌کلرواستیک اسید ۲۰٪ به آن اضافه شد و مخلوط برای ۲۵ دقیقه در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده شده و سپس برای مدت ۵ دقیقه در ۷۵۰۰ rpm سانتریفیوژ شد تا محلول شفاف به دست آید. جذب محلول حاصله در ۵۳۲nm اندازه‌گیری شد. ماده مورد نظر برای جذب در این طول موج کمپلکس (MDA-TBA) است. جذب بقیه رنگیزه‌های غیراختصاصی در ۶۰۰ نانومتر تعیین شد و از میزان جذب در ۵۳۲ نانومتر کسر شد. برای محاسبه غلظت MDA از ضریب خاموشی معادل 155 mM-1cm-1 استفاده شد و در نهایت مقدار مالون‌دی‌آلدئید که محصول پراکسیداسیون لیپیدی است برحسب نانومول در گرم وزن تر محاسبه گردید (۱۰). برای اندازه‌گیری میزان سرب جذب شده از محیط توسط جلبک کلرلا، پس از سانتریفیوژ، رسوب جلبک جدا سپس با آب دیونیزه چند بار شستشو گردید. سپس جلبک در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد آون به مدت ۴۸ ساعت خشک گردید. به ازای هر ۰/۲ گرم پودر جلبک، ۵ سی سی اسید نیتریک ۶۵٪ (مرک) اضافه گردید و به مدت یک ساعت در دمای اتاق باقی ماند. سپس دیواره جلبک توسط اسید نیتریک به مدت ۴۰ دقیقه در دمای بالا هضم گردید تا یون های سرب جذب شده توسط جلبک آزاد شود. پس از آن با صافی 40 whatman صاف شد. محلول صاف شده حاصله با آب دیونیزه به حجم ۵۰ سی سی رسانده و رقیق شد. سپس مقدار فلز سرب توسط دستگاه جذب اتمی مدل Younglin AAS 8020 آنالیز گردید. در نهایت مقدار سرب



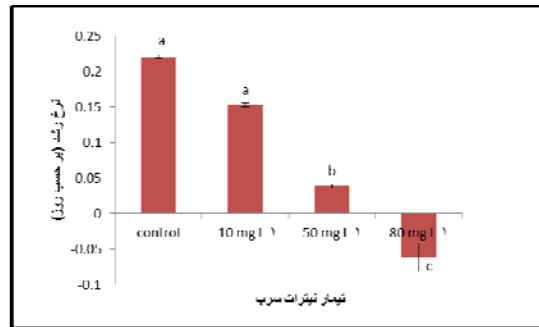
شکل ۴- روند تغییرات روزانه میزان کلروفیل کل بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر در جلبک *Chlorella.sp* در غلظت‌های مختلف سرب. داده‌ها میانگین سه تکرار  $\pm$  خطای معیار (SE) می‌باشد و حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین نمونه‌ها بر اساس مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن و حروف مشترک بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال  $p \leq 0.05$  می‌باشند.

محتوای مالون‌دی‌آلدهید (MDA) ریز جلبک کلرلا تحت غلظت‌های مختلف سرب، ۱۶ روز پس از اعمال تنش بررسی و نتایج در شکل (۵) نشان داده شده است.



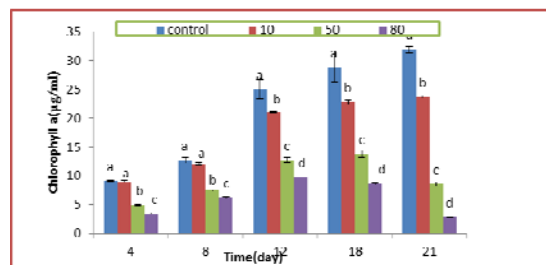
شکل ۵- تغییرات غلظت MDA در جلبک سبز تک یاخته‌ای *Chlorella vulgaris* در پاسخ به غلظت‌های مختلف نیترات سرب. پس از ۱۶ روز تنش. داده‌ها میانگین سه تکرار  $\pm$  خطای معیار (SE) می‌باشد و حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین نمونه‌ها بر اساس مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن و حروف مشترک بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال  $p \leq 0.05$  می‌باشند.

نتایج نشان داد که، محتوای مالون‌دی‌آلدهید (MDA) در تیمار ۱۰ میلی گرم در لیتر تفاوت معنی‌داری با شاهد نشان نداد، ولی در بقیه تیمارها در مقایسه با کنترل تفاوت معنی‌دار بود و محتوای MDA افزایش یافت. بیشترین میزان مالون‌دی‌آلدهید در غلظت ۸۰ میلی گرم در لیتر و کمترین مقدار در کنترل مشاهده شد. مقدار سرب جذب شده از محیط توسط جلبک کلرلا بعد از ۱۶ روز قرار



شکل ۲- نرخ رشد جلبک سبز تک یاخته‌ای *Chlorella vulgaris* تحت تیمار غلظت‌های مختلف سرب. داده‌ها میانگین سه تکرار  $\pm$  خطای معیار (SE) می‌باشد. و حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین نمونه‌ها بر اساس مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن و حروف مشترک بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال  $p \leq 0.05$  می‌باشند.

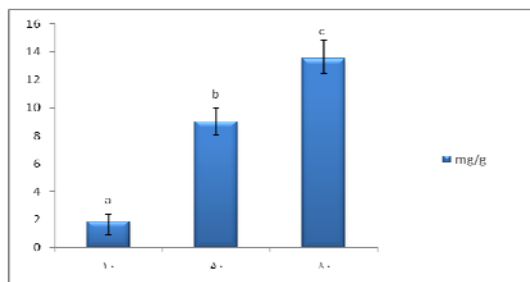
در بررسی میزان کلروفیل a و کلروفیل کل، *Chlorella vulgaris* (شکل‌های ۳ و ۴) تحت تیمارهای مختلف سرب، غلظت ۱۰ mg/l الگوی تقریباً مشابهی را نسبت به کنترل تا روز دوازدهم نشان می‌دهد و اختلاف معنی‌دار بین این تیمار با کنترل از روز دوازدهم به بعد مشاهده شد. در غلظت ۵۰ و ۸۰ mg/l تفاوت معنی‌داری نسبت به کنترل از روز چهارم به بعد در محتوای کلروفیل a و کلروفیل کل مشاهده شد و با نزدیک شدن به روزهای انتهایی بیشترین میزان کاهش کلروفیل در تیمار ۸۰ mg/l مشاهده شد.



شکل ۳- روند تغییرات روزانه میزان کلروفیل a بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر در جلبک *Chlorella.sp* در غلظت‌های مختلف سرب. داده‌ها میانگین سه تکرار  $\pm$  خطای معیار (SE) می‌باشد و حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین نمونه‌ها بر اساس مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن و حروف مشترک بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال  $p \leq 0.05$  می‌باشند.

کاهش یافت. لذا در مجموع می‌توان گفت که تنش حاصل از غلظت‌های مختلف سرب تا ۸۰ میلی‌گرم در لیتر در این تحقیق سبب کاهش رشد و تولید ماده خشک (بیومس) در ریز جلبک کلرلا گردید. نتایج آزمایش حاضر با مطالعات Zhang و همکاران در مورد اثرات بلند مدت و کوتاه مدت تنش فلز سنگین سرب بر روی دو گونه‌ی جلبک کلرلا *C. vulgaris* و *C. protothecoides* مطابقت نشان داد. آن‌ها با اندازه‌گیری نرخ رشد بر اساس جذب نوری در طول موج ۶۸۰ نانومتر گزارش نمودند که نمونه‌های تحت تیمار در غلظت‌های پایین و متوسط سرب رفتاری مشابه با کنترل نشان می‌دهند. در حالی که غلظت‌های بالا (۵۰ و ۸۰) میلی‌گرم بر لیتر اثر بازدارندگی قابل توجهی بر رشد هر دو گونه ریز جلبک کلرلا نشان داده است (۲۵). به نظر می‌رسد که کاهش رشد القا شده به وسیله‌ی فلزات سنگین می‌تواند نتیجه‌ی دخالت فلز با فرایندهای متابولیکی مرتبط شده با نمو طبیعی، مخصوصاً سنتز پروتئین باشد، زیرا فعالیت برخی از آنزیم‌های مهم به وسیله‌ی اتصال فلز با گروه‌های آمینو آزاد، کربوکسیل و گروه‌های جانبی مهار می‌شود (۱۳). تحقیقات نشان داده است که یون سرب می‌تواند مقلد خوبی برای نقش کلسیم-کالمودولین باشد و به نظر می‌رسد یکی دیگر از دلایل کاهش رشد، اختلال در جذب عناصر ضروری نظیر کلسیم و منیزیم به دلیل وجود یون سرب در محیط باشد که به نوبه خود متابولیسم سلول‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۲۴). سرب همچنین می‌تواند به اسیدهای نوکلئیک متصل شده و بدین ترتیب سبب تجمع و تراکم کروماتین و تثبیت مارپیچ مضاعف DNA و به دنبال آن مانع از فرایند رونویسی و ترجمه گردد (۲۲). با این همه به نظر می‌رسد ریز جلبک کلرلا قادر به تحمل سرب در غلظت‌های مورد استفاده در این تحقیق باشد. زیرا به رشد و تکمیل چرخه زندگی خود (شکل ۱) هر چند با کاهش نرخ رشد (شکل ۲) در مقایسه با شاهد ادامه داده است.

گرفتن در معرض ۳ غلظت مختلف سرب (۱۰، ۵۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر) در شکل ۶ آورده شده است. نتایج نشان می‌دهد که با افزایش غلظت فلز سرب در محیط کشت میزان جذب این فلز توسط جلبک کلرلا افزایش یافته است.



شکل ۶- مقدار فلز سرب جذب شده بر حسب میلی‌گرم در گرم وزن خشک جلبک سبز تک یاخته‌ای *Chlorella vulgaris* در پاسخ به غلظت‌های مختلف نیترات سرب در محیط (۱۰، ۵۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر) پس از ۱۶ روز تنش. داده‌ها میانگین سه تکرار  $\pm$  خطای معیار (SE) می‌باشد و حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین نمونه‌ها بر اساس مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن و حروف مشترک بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال  $p \leq 0.05$  می‌باشند.

## بحث

موجودات فتوسنتزکننده به ترکیبات فلزی بسیار حساس هستند. اثرات یونهای فلزی بر گیاهان شامل اختلال در بسیاری از کارکردهای فیزیولوژیکی مانند جذب آب، تنفس، جذب مواد معدنی، فتوسنتز (۱۹) کاهش سنتز DNA، تغییر در قابلیت نفوذپذیری غشا و مهار یا فعال سازی فعالیت‌های آنزیمی می‌باشد (۳). در مطالعه حاضر، با توجه به نمودار رشد (شکل ۱) با آن که کلیه نمونه‌های تحت تیمار سرب روند رشد لگاریتمی را در منحنی‌های رشد خود نشان دادند، اما شدت و مدت زمان آن در مقایسه با شاهد کاهش یافت. همچنین بررسی نتایج حاصل از شکل (۲) نشان داد که با افزایش تنش سرب تا تیمار ۸۰ نرخ رشد به معنای تولید ماده خشک در نمونه‌های تحت تیمار در مقایسه با نمونه‌های شاهد به طور معناداری

آنتی‌اکسیدانی نتوانسته‌اند به طور کامل از پیشرفت و افزایش فرایند پراکسیداسیون لیپیدی غشاها، در سلول‌های تحت تنش جلوگیری کنند (۱۷). شکل (۵) نشان داد که غلظت MDA در تیمار ۱۰ میلی‌گرم در لیتر تفاوت معناداری با کنترل نداشت، ولی با افزایش غلظت سرب تا تیمار ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر، محتوای MDA در نمونه‌های تحت تیمار به طور معنا داری افزایش یافت که این نتیجه افزایش MDA در غلظت‌های ۵۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر سرب، می‌تواند نشان دهنده اعمال تنش سلولی بر جلبک کلرلا باشد. داخ‌م در سال ۱۳۹۰ مشاهده نمود که با افزایش غلظت سرب در محیط کشت تا غلظت ۸۰ میکرو مولار به مدت ۲۰ روز، محتوای مالون دی‌آلدئید (MDA) جلبک دونالیا در مقایسه با شاهد به طور معنا دار ی افزایش یافت. بنابراین افزایش مالون دی‌آلدئید بیانگر افزایش میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشا در شرایط تنش فلزات سنگین از جمله سرب است. افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشا نیز می‌تواند به علت تجمع انواع فعال اکسیژن از جمله پراکسید هیدروژن تحت تنش سرب باشد (۳).

میزان فلز جذب شده توسط جلبک در غلظت‌های مختلف سرب، می‌تواند کاهش رشد و محتوای کلروفیل و افزایش MDA را توجیه کند. به نظر می‌رسد افزایش میزان سرب در محیط کشت تا در غلظت ۵۰ و ۸۰ باعث افزایش این فلز درون جلبک شده و ایجاد تنش می‌کند.

نتایج این آزمایش به طور کلی نشان می‌دهد که که قرار گرفتن کلرلا در غلظت‌های ۵۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر سرب در سلول‌های جلبک کلرلا تنش ایجاد می‌کند و باعث کاهش رشد و محتوای کلروفیلی آن می‌گردد، اما جلبک با وجود این غلظت بالا همچنان توانایی رشد خود را (اگرچه ضعیف تر از گروه کنترل) حفظ می‌کند و می‌تواند چرخه زندگی خورد را کامل کند. با توجه به این مقاومت بالا و پتانسیل خوب جلبک کلرلا در جذب فلز سنگین سرب و

کلروفیل‌ها به عنوان رنگیزه اصلی در فتوسنتز، مسئول دریافت انرژی نورانی و تبدیل آن به انرژی شیمیایی در زنجیره انتقال الکترون می‌باشد. از آنجا که میزان و شدت فتوسنتز تحت تاثیر تنش‌های محیطی تغییر می‌کند، انتظار می‌رود که تغییراتی در میزان کلروفیل a و پروتئین‌هایی که در ساختار کلروپلاست و در ارتباط با کلروفیل a می‌باشند، ایجاد شود (۲). شکل (۳ و ۴) ارتباط مابین غلظت سرب و محتوای کلروفیل a و کلروفیل کل را در روزهای (۴، ۸، ۱۲، ۱۸، ۲۱) نشان می‌دهد همان‌طور که مشاهده می‌شود سنتز کلروفیل در جلبک *Chlorella vulgaris* با افزایش غلظت سرب بتدریج کاهش پیدا می‌کند و با افزایش زمان این اختلاف بیشتر می‌شود. در مقایسه با گروه کنترل، سطح پایین‌تر سرب به سختی منجر به اختلال در سنتز کلروفیل می‌شود، این در حالی است که در غلظت‌های ۵۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر تفاوت بسیار معناداری با گروه کنترل دیده می‌شود. یافته‌های این پژوهش با نتایج قیصری و همکاران در سال ۱۳۹۴ بر روی گیاه (*Ocimum basilicum L.*) همسو می‌باشد. آنها مشاهده کردند که غلظت‌های سرب باعث کاهش چشمگیر رنگیزه‌های فتوسنتزی در این گیاه می‌شود. این کاهش می‌تواند به دلیل بازدارندگی مراحل مختلف بیوسنتز رنگیزه‌ها توسط سرب باشد (۴). به نظر می‌رسد سرب بر سنتز هم در ساختمان سیتوکروم‌های زنجیره انتقال الکترون میتوکندری و یا در حلقه پورفیرینی کلروفیل‌ها از طریق رقابت با  $Fe^{+2}$  و  $Mg^{+2}$  اثر دارد (۶). همچنین کاهش محتوای کلروفیل ممکن است به علت افزایش فعالیت کلروفیل‌لاز به وسیله‌ی اختلال در غشاء کلروپلاست و غیر فعال شدن نقل و انتقال الکترون به فتوسیستم I ایجاد شود (۲۰).

غشای سلولی یکی از اولین مکان‌هایی است که سمیت با فلزات سنگین روی آن اثر می‌گذارد. آسیب غشای سلولی از طریق تولید مالون‌دی‌آلدئید (MDA) که یک محصول و شاخص تنش و تولید رادیکال‌های آزاد در سلول‌ها است، مشخص می‌گردد (۱۷) و نشان می‌دهد که مکانیسم‌های

سمیت این پساب‌ها کاست و از انتشار آلاینده‌ها به محیط زیست جلوگیری کرد.

دیگر فلزات سنگین (۵، ۹، ۱۳، ۱۴، ۲۳) و با رشد و تکثیر مصنوعی جلبک کلرلا در پساب‌های صنعتی، می‌توان از

## منابع

- ۱- داخم، م. (۱۳۹۰) بررسی فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی جلبک تک سلولی *Dunaliella sp.* تحت تنش فلز سنگین سرب. پایان نامه کارشناسی ارشد.
- ۲- زمانی ن. (۱۳۸۵) اثر جیوه بر رشد، تکثیر و سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی در جلبک *Dunaliella Tertiolecta* پایان نامه کارشناسی ارشد.
- ۳- قلیچ س.، زرین کمر ف.، نیکنام و. (۱۳۹۴) بررسی میزان انباشتگی سرب و تاثیر آن بر فعالیت آنزیم پراکسیداز، محتوای of *Chlorella vulgaris*. Environmental Toxicology. 14: 347- 353.
- 12- Leganes, F., Sanchez, E. & Fernandez-Vaiante, E. (1987), Effect of indoleacetic acid on growth and dinitrogen fixation in cyanobacteria. Plant Cell Physiol. 28:529-533.
- 13- Maznah W. O. W., Al-Fawwaz A.T., Surif M. (2012) Biosorption of copper and zinc by immobilised and free algal biomass, and the effects of metal biosorption on the growth and cellular structure of *Chlorella sp.* and *Chlamydomonas sp.* isolated from rivers in Penang, Malaysia. Journal of Environmental Sciences. 24(8): 1386–1393
- 14- Mehta S. K., Singh A., Gaur J. P. (2002) Kinetics of adsorption and uptake of  $Cu^{2+}$  by *Chlorella vulgaris*: influence of pH, temperature, culture age, and cations. Journal of Environmental Science and Health Part A. 37(3): 399–414.
- 15- Muhaemin M. (2004) toxicity and bioaccumulation of lead in *Chlorella* and *Dunaliella*. Journal of Coastal Development. 8: 27-33.
- 16- Nicholas S. F. and Gary j. j. (1981) Effect of copper and zinc on growth, morphology, and metabolism of *asteronella japonica* (Cleve). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 51: 37-56.
- 17- Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. (1979) Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95: 351-358.
- 18- Pinto E., Sigaud-kutner C.S., Lehao A., Okamoto S., Morse D., Colepicolo P. (2003) Heavy metal
- ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در مرحله جوانه زنی در گیاه یونجه (*Medicago sativa L.*). پژوهش‌های گیاهی. ۲۸(۱): ۱۶۴-۱۷۴.
- ۴- قیصری س.، سعید نعمت پور ف.، صفی پور افشار ا. (۱۳۹۴) اثر سالیسیلیک اسید و آسکوربیک اسید بر محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی و فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاه ریحان (*Ocimum basilicum L.*) تحت تنش سرب. پژوهش‌های گیاهی. ۲۸(۴): ۸۱۴-۸۲۵.
- 5-Akhtar N., Saeed A., Iqb M., (2003) *Chlorella sorokiniana* immobilized on the biomatrix of vegetable sponge of *Luffa cylindrica*: a new system to remove cadmium from contaminated aqueous medium. Bioresource Technology. 88(2):163–165.
- 6- Borowitzka M.A. (1998) Limits to growth. In: Wong Y.S. & Tam N.F.Y. (eds.), Wastewater treatment with algae. Springer-Verlag, Berlin. 203-226.
- 7- Carfagna S., Lanza N. G., Salbitani A. B., Sorbo S., Vincenza V. (2013) Physiological and morphological responses of Lead or Cadmium exposed *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyceae). Springer plus. 2: 147.
- 8- Eijckelhoff C., 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. Photosynth Res. 52: 69–73.
- 9- El-Naas M.H., Al-Rub F. Ashour A., Al Marzouqi M. (2007) Effect of competitive interference on the biosorption of lead (II) by *Chlorella vulgaris*. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification. 46:1391-1399.
- 10-Heath R.L., Packer L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives in Biochemistry and Biophysics. 125:189–198.
- 11- Lam P. K., Wut S. P. F., Chan A. C. W., Wu, R. S. S. (1999) Individual and Combined Effects of Cadmium and Copper on the Growth Response

- induced oxidative stress in algae. *J. phycol.* 39: 1008-1018.
- 19- Qian H., Li J., Li S., Chen W., Sheng G., Sheng D., Liu W., Zhengwei F. (2009) Combined effect of copper and cadmium on *Chlorella vulgaris* growth and photosynthesis-related gene transcription. *Aquatic Toxicology*. 94: 56–61.
- 20- Sen A.K. and Mondal N.G. (1987) *Salvinia natan*-as the scavenger of Hg (II). *Water Air Soil Pollut.* 34: 439-46.
- 21- Shakya P. R. (2007) Nickel Adsorption by Wild type and Nickel Resistant Isolate of *Chlorella* sp. *Pak. J. Anal. Environ.* 8: 86 – 90.
- 22- Valley L. B., Ulmer, D. D. (1972). Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. *Ann Rev. Biochem.* 41:91-128.
- 23- Tam Y., Wong S., Simpson G. (1998) Removal of copper by free and immobilized microalga, *Chlorella vulgaris*. In: *Wastewater Treatment with Algae* (Wong S, Tam Y, eds.). Springer-Verlag and Landes Bioscience, Berlin. 17–35.
- 24- Visiki L., and Rachi, J.W. (1992) Ultrastructural changes in *Dunaliella minuta* following acute and chronic exposure to copper and cadmium. *Archive of Environmental Toxicology*. 23: 420-425.
- 25- Zhang W., Xiong B., Lin C., Kuangfei L., Xinhong C., Huasong Bi., Meijin G., Weiliang W. (2013). Toxicity assessment of *Chlorella vulgaris* and following exposure to Pb (II). *Journal of Environmental Toxicology and Pharmacology*. 36: 51-57

## The effects of different concentrations of lead on the growth, photosynthetic pigments and malondialdehyde content of the unicellular green algae *Chlorella Vulgaris*

Naeemi A.S.<sup>1</sup>, Sarmad J.<sup>1</sup>, Mohseni N.<sup>1</sup> and Kehtari F.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Biology Dept., Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, I.R. of Iran

<sup>2</sup> Plant Biology Dept., Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, I.R. of Iran

### Abstract

Lead as a contaminant of the environment cause cell poisoning. The unicellular green algae *Chlorella Vulgaris* belongs to the family Chlorellaceae. Since *C. Vulgaris* has a simple cell structure and unique feature, it is used as a model in plant physiological studies. In order to investigate the growth and adaption of *Chlorella sp.* to different concentrations of lead (0, 10, 50, 80 mgL<sup>-1</sup>), an experiment was done in the medium Zn<sup>+</sup> With 3 replication in the growth chamber with 12 h light photoperiod, temperature of 25 ± 2 °C, light intensity of 2500 lux and with proper aeration, during 18 days. Growth curve of total samples were determined by measuring the absorbance of 750 nm. Growth rate, chlorophylls and malondialdehyde content and sorption of lead by the algae were measured. Results showed that by increasing concentrations of Lead in the medium up to 80 mgL<sup>-1</sup>, biomass production, photosynthetic pigments and subsequent growth rate were decreased and samples in less time were able to enter stationary phase and the amount of malondialdehyde (MAD) in treatment of 50 and 80 mgL<sup>-1</sup> were significantly increased compared to control. Generally, high concentrations of toxic metal lead influenced the majority of physiological and vital parameters of *C. Vulgaris* but as a resistant microalgae, despite of the reduction in cell division still retained its growth potential.

**Key words:** Heavy metal, *Chlorella sp.*, growth rate, chlorophyll, malondialdehyde