Journal of
Plant Environmental Physiology
Print ISSN: 2423-7671
Online ISSN: 2783-4689
Islamic Azad University
Gorgan Branch
PSI
انجمن جلبک شناسی ایران
Phycological Society of Iran

Investigation of heavy metal (Pb^{+}) effect in presence of ($Ca2^{+}$) on photosynthetic pigmentsand antioxidant enzymes activityof *Entromorpha* sp.

Belgheys Biyok[1], Saeid Soltani[2*],Amenehsadat Hashemi[3]

[1]Department of Biology, Faculty of Science, Qaemshahr Branch, Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran. Email:
[2]Department of Biology, Faculty of Science, Qaemshahr Branch, Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran.
Email: Sa.Soltani@iau.ac.ir
[3]Departmentof Agriculture, University of Applied Science and Technology, Sari, Mazandaran, Iran. Email: ahashemi@uast.ac.ir

Article type:
Research Article

Article history
Received: 19.02.2021
Revised: 10.07.2021
Accepted: 19.07.2021
Published:22.02.2023

Keywords
Antioxidant enzymes
Enteromorpha green algae
Heavy metal
Lipid peroxidation
Photosynthetic pigments

Abstract

Lead as one of the most expanded metals in environment, effects on human health. Besides, the biological absorption by algae leads to the reduction of heavy metal pollutions in aqueoussolutions. In this study, accumulation and bioabsorption of Pb^{+} on biochemical characteristics of green alga *Entromorpha* was investigated. For this purpose, effects of different concentrations of Pb^{2+} (0, 50, 100 and 150 µM $Pb(SO_4)_2$) in presence of two concentrations of Ca^{2+} (0 and 0.5 mM $CaCl_{2)}$ was studied in *Entromorpha* collected on Caspian Sea in two times of 3 and 8 days in random complete design with 4 replications for photosynthetic pigments content, membrane lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity. The results indicated a decreasing rate of chlorophyll*a* and *b*, total chlorophyll and carotenoid and also activity of polyphenoloxidase enzymewith increase of Pb^{2+} concentration and stress during. In membrane lipid peroxidation assay, malondialdehyde increased significantly by increase of Pb^{2+}concentration. For these traits including chlorophyll, and carotenoid content and also membrane lipid peroxidation assay, effects of Pb^{2+} stress decreased by using $CaCl_2$ treatment. The results of antioxidant assay showed that catalase, ascorbate peroxidase and peroxidase activities in both 3 and 8 days stress was high without $CaCl_2$ treatment than using it. In general, the results of this study showed that Pb^{2+}causes oxidative stress and biochemical changes in *Enteromorpha* green algae. Also, the presence of $CaCl_2$ treatment reduces the effects of stress.

Cite this article as: Biyok, B., Soltani, S., Hashemi, A.S. (2022). Investigation of heavy metal (Pb+) effect in presence of (Ca2+) on photosynthetic pigmentsand antioxidant enzymes activityof *Entromorpha* sp.. *Journal of Plant Environmental Physiology*, 68(4): 55-68.

©The author(s)
Doi: 10.30495/iper.2022.688799
Publisher: Islamic Azad University, Gorgan branch
Dor: 20.1001.1.24237671.1401.17.68.2.1

فیزیولوژی محیطی گیاهی
شاپا چاپی: ۲۴۲۳-۷۶۷۱
شاپا الکترونیکی: ۲۷۸۳-۴۶۸۹
دانشگاه آزاد اسلامی
واحد گرگان
PSI
انجمن جلبک شناسی ایران
Phycological Society of Iran

بررسی اثر فلز سنگین سرب در حضور بهبود دهنده کلسیم بر رنگیزه‌های فتوسنتزی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در جلبک سبز انترومورفا (*Enteromorpha* sp.)

بلقیس بیوک[۱]، سعید سلطانی[۲*]، آمنه سادات‌هاشمی[۳]

۱گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد قائمشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائمشهر، ایران، رایانامه: biukafsaneh1373@yahoo.com
۲ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد قائمشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائمشهر، ایران، رایانامه: Sa.Soltani@iau.ac.ir
۳ گروه کشاورزی، دانشگاه جامع علمی کاربردی، ساری، ایران، رایانامه: ahashemi@uast.ac.ir

نوع مقاله:
مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۰۱
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۴/۱۹
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۲۸
تاریخ چاپ: ۱۴۰۱/۱۲/۰۳

واژه‌های کلیدی:
آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان
پراکسیداسیون لیپیدی
جلبک
رنگیزه‌های فتوسنتزی
فلزات سنگین

چکیده

سرب به عنوان یکی از گسترده ترین عناصر سنگین و سمی در محیط زیست، اختلال جدی در سلامت انسان ایجاد می‌کند. در این میان جلبک‌ها در محیط‌های آبی با جذب زیستی فلزات سنگین در رسوبات، می‌توانند نقش کلیدی در زمینه کاهش آلودگی آب‌ها ایجاد کنند. در این پژوهش اثرات جذب و انباشت زیستی فلز سرب توسط جلبک سبز *انترومورفا* *Enteromorpha* sp. برعملکردو فیزیولوژی جلبک، مورد بررسی قرار گرفت. جهت انجام این پژوهش، اثر غلظت‌های متفاوت یون سرب (در سه تیمار ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ میکرومولار به شکل نیترات سرب) و همچنین ۰/۵ میلی مولار بهبود دهنده کلرید کلسیمبه همراه شاهد (بدون بهبود دهنده)در دو دوره ۳ و ۸ روزهبا چهار تکرار در قالب طرح کاملا تصادفی برای صفات میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی، پراکسیداسیون لیپیدی غشا و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان درجلبک سبز *انترومورفا* جمع آوری شده از سواحل دریای خزر مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد با افزایش غلظت فلز سرب میزان کلروفیل *a* و *b*، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها و همچنین فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز کاهش یافت و با گذشت زمان اثرات تنش، بیشتر شد. در سنجش پراکسیداسیون لیپیدی با افزایش غلظت سرب و همچنین افزایش طول دوره تیماردهی، مقدار مالون‌دآلدئید بطور معنی داری افزایش یافت. در موارد ذکر شده استفاده ازکلرید کلسیم باعث شد تاثیر تنش کمتر شده و میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی کمتر کاهش یابد و همچنین از پراکسیداسیون لیپیدی غشا کاسته شود. مطالعه بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان نشان داد که فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات‌پراکسیداز و پراکسیداز در دوره‌های ۳ و ۸ روزه فاقد بهبود دهنده، بیشتر از فعالیت این آنزیم در همین دوره‌ها و همراه بهبود دهنده بود. بطور کلی این مطالعه نشان داد که یون‌های سرب در شرایط محیط آبی باعث تنش اکسیداتیو و تغییرات بیوشیمیایی در جلبک سبز اینترومورفا می شود. همچنین حضور بهبود دهنده کلرید کلسیم اثرات تنش را کاهش داد.

استناد: بیوک، بلقیس؛ سلطانی، سعید؛ سادات‌هاشمی، آمنه. (۱۴۰۱). بررسی اثر فلز سنگین سرب در حضور بهبود دهنده کلسیم بر رنگیزه‌های فتوسنتزی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در جلبک سبز انترومورفا (*Enteromorpha* sp). *فیزیولوژی محیطی گیاهی*، ۶۸ (۴)، ۶۸-۵۵.

Doi: 10.30495/iper.2022.688799
Dor: 20.1001.1.24237671.1401.17.68.2.1

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان
© نویسندگان.

مقدمه

فلزات جزء اولین و مفید ترین عناصری هستند که توسط انسان شناخته شده است امـاافزایش جمعیـت، تاسیس صنایع در فضاهای شهری و توسعه روزافزون فناوری سبب انباشتن فلزات سنگین در محیط، در اثر انتشار فاضلاب‌ها و آلاینده‌هـای زیسـتی بـه درون آب شده است. تکثیر جلبک‌ها در چنین آب‌هـاییمی‌توانـد باعث آلودگی زنجیره‌های غـذایی بـا فلـزات سـنگین شده و سرانجام تهدید سلامت انسان وحیوانات شـود (Morcillo et al., 2016 و Jaishankar et al., 2014). در سال‌های اخیر جلبـک‌هـا بـه طـور وسـیعی بـرای ارزیابی خطرات اکولـوژیکی، ارزیـابی اثـرات فلـزات سنگین، علف‌کش‌ها، و دیگر مواد آلاینده در سیسـتم-های آبی استفاده می‌شوند (Mehta and Gaur, 2005) و نتایج نشان می‌دهد که جلبک زنده برای بازگرداندن و پاکسازی یونهای فلزات سنگین از محلولهـای آبـی مناسـب مـی‌باشـد (Ji et al., 2012). گونـه‌هـایی از جلبک‌های سـبز از جملـه انتـرومورفـا و کلـادوفورا و اسپیروجیرا برای اندازه‌گیری سطوح فلزات سنگین در بسیاری از نقاط جهان مورد اسـتفاده قـرار گرفتـه‌انـد (Ratkevicius et al., 2003; Maraga et al., 2016; Vetrivel et al., 2017). اثرات سمی فلـزات سـنگین به‌دلیل انواع اکسـیژن فعـال (ROS) و در نتیجـه عـدم تعادل وضعیت اکسایش-کاهش سلولی بروز می‌کند و جلبک‌ها با القا آنتی اکسیدان‌هایی مانند سـوپر اکسـید دسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسـیداز، کاروتنوئیـدها و آسکوربات پراکسیداز به این آلودگی پاسخ می‌دهند (Pinto et al., 2003). القـــای ایـــن آنتـــی اکسیدان‌هامی‌تواند باعث بقای جلبک‌ها تحت شـرایط آلودگی‌های فلزات سـنگین شـود (Okamoto et al., 2001).

یـون سـرب بـه دلیـل اکسیداسـیون پروتئینـی و پراکسیداسیون لیپیـدی یکـی از سـمی تـرین فلـزات سنگین می‌باشد (Okamoto et al., 2001) و خاک‌های آلوده به آن سبب کاهش شدید محصولات کشـاورزی و در نتیجه بروز مشکلات جدی در این امر مـی‌شـود. مطالعـاتی کـه در خصـوص جـذب یون‌هـای سـرب ازطریـق انـواعی از جلبک‌هـا صـورت گرفتـه اسـت (Tabaraki et al., 2014; Yalçın, 2014; Cao et al., 2015) نشان می‌دهنـد کـه جلبک‌هـا قابلیـت حـذف یون‌های سرب محلول در آب را دارند. یون سربا اثـر منفـی بـر روی فعالیـت فتوسیسـتم II و فتوسـنتز و همچنـین تولیـد گونـه‌های اکسـیژن واکنشـی، رشـد جلبک‌ها را کاهش می‌دهند (Xiong et al., 2014; Dao and Beardall, 2016a; Dao and Beardall, 2016 b) و میـزان تـاثیر گـذاری آن‌هانیز به عواملی همچون دما، pH، زمان و غلظتیکـه جلبک‌ها در معرض این یون قرار دارند (Ouyang et al., 2012; Piotrowska-Niczyporuk et al., 2015)، بستگی دارد.جابجایی فلزات سـنگین جـذب شـده از طریق واکنش‌های تبادلی می‌تواند با القـا کاتیون‌هـایی مانند Ca^{2+} و آنیون‌هایی همچـون Cl^- در محلول‌هـای اسیدی افزایش یافته و در نتیجه باعث حـذف اثـرات سمی فلزات سنگین شود، بطوریکه Kuo و همکـاران (۲۰۰۶) با اضافه کردن $CaCl_2$ در محلول‌های اسیدی، کارایی حذف برخی فلزات سنگین در خاک را بهبـود بخشیدند.این تحقیق به منظور بررسـی اثـرات مقـادیر مختلفیون سرب به شکل نیترات سرب (Pb(No3)2) روی صفات فیزیولوژیکی مانند رنگیزه‌های فتوسنتزی، پراکسیداسـیون لیپیـدی و آنزیم‌هـای آنتـی اکسـیدانی جلبک سبز انترومورفا انجام شد.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه و اعمال تنش: در این مطالعه نمونـه‌هـا در اسـفند مـاه سـال ۱۳۹۳ از دریـای خـزر در اسـتان مازندران باعرض جغرافیایی ۳۶/۴۸ و طول جغرافیایی

۵۳/۶۰ جمع‌آوری شدهو با استفاده از کتاب‌های کلید مورد شناسایی قرار گرفت.پس از پاکسازی جلبک‌ها ازگل و لای و بقایای سایر جانداران، در محیط آب دریا، غنی شده با NaH_2PO_4 و $NaNO_3$ به‌مدت ۳ روز در اتاق کشت که روی سقف آن لامپ‌های کم مصرف ۵۰ واتی سفید و زرد به صورت یک در میان شبکه بندی شده بود، قرار داده شدند. برای آماده سازی محیط کشت غنی شده، آب دریا توسط فیلتر ۰/٤ میکرون صاف گردید تا میکرواورگانیسم‌های موجود در آن حذف گردد، سپس به میزان ٦/٤ میکرومول $NaNO_3$ و ۰/٤ میکرومول NaH_2PO_4 به آب اضافه شد. سپس سرب به عنوان فلز سنگین عامل تنش، برای دوره‌های ۳ روزه و ۸ روزه به شکل نیترات سرب ($Pb(No_3)_2$) و در سه غلظت۵۰، ۱۰۰ و۱۵۰میکرومولار مورد استفاده قرار گرفت. جهت تهیه محلول ۱۵۰ میکرومولار نیترات سرب، ۰/۰٤۹٦ گرم از پودر نیترات سرب، در ۱ لیتر آب دریای غنی شده حل شد. برای تهیه محلول ۱۰۰ میکرومولار نیترات سرب، ٦۰۰ میلی‌لیتر از محلول ۱۵۰ مولار نیترات سرب تهیه شده را در یک ارلن ۱ لیتری ریخته و ۳۰۰ میلی‌لیتر آب دریای غنی شده به آن اضافه گردید. جهت تهیه محلول ۵۰ میکرومولار نیترات سرب، ۳۰۰ میلی‌لیتر از محلول ۱۰۰ میکرومولار نیترات سرب را در یک ارلن ۱ لیتری ریخته و ۳۰۰ میلی‌لیتر آب دریای غنی شده به آن اضافه گردید. سپس ۲۰ میلی‌لیتر از هر محلول را در یک شیشه ریخته و حجم آن، با آب دریای غنی شده به ۲۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد، این‌کار برای هر غلظت، ٤ بار تکرار گردید. ٤ شیشه نیز با ۲۰۰ میلی‌لیتر آب دریای غنی شده بدون نیترات سرب آماده شد و جلبک‌ها در آن قرار گرفت. پس از زمان مورد نظر برای تنش،جلبک‌های موجود در محیط کشت برای هر تیمار برداشت و نمونه‌های لازم برای پارامترهای مورد نظر شامل سنجش فعالیت آنزیم، انجام پراکسیداسیون لیپیدی و میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی جمع‌آوری شد.

سنجش کلروفیل‌ها و کاروتنوئید: برای سنجش رنگیزه‌های فتوسنتزی نمونه‌های منجمد به مقدار ۰/۰۵ گرم جلبکدر ۱۰ سی‌سی استون ۸۰ درصد ساییده و محلول حاصل با کاغذ واتمن شماره ۱ صاف و به حجم نهایی ۲۰ سی‌سی رسانده شد. سپس جذب محلول در طول موج‌های ٦٦۳، ٦٤٦، ٤۷۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری و با استفاده از فرمول‌های زیربر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر خوانده شد:

$$Chla\ (mg/ml) = 12.25A_{663} - 2.79A_{646} \quad (۱)$$

$$Chlb\ (mg/ml) = 21.50A_{646} - 5.10A_{663} \quad (۲)$$

$$Tchl\ (mg/ml) = Chla + Chlb \quad (۳)$$

$$C_{X+C} = (1000A_{470} - 1.8\ C_a - 85.02\ C_b)/198 \quad (٤)$$

در این فرمول‌ها Chla، Chlb، Tchlو CX+C به‌ترتیب کلروفیل *a*، کلروفیل *b*، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها (کاروتن و گزانتوفیل) می‌باشد (Lichtenthaler and Wellburn, 1983).

سنجش پراکسیداسیون لیپیدهای غشا: جهت سنجش پراکسیداسیون لیپیدهای غشا، غلظت مالون‌دآلدئید (MDA)اندازه گیری شد. به این منظور نمونه‌های منجمد به مقدار۰/۲ گرم جلبک درهاون چینی حاوی ۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید (TCA) ۱ درصد ساییده و عصاره بدست آمده ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید.سپسبه یک میلی‌لیتر از مایع رویی محلول سانتریفیوژ شده ٤ میلی‌لیترمحلول ۲۰ درصد TCAکه حاوی۵ درصد تیوباربیتوریک اسید بود، اضافه شد. محلول حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد قرار گرفت و بلافاصله در یخ سرد شد. سپس مجدداً با

دور با سرعت ۱۰۰۰۰دور در دقیقهو به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید.شدت جذب محلول حاصل با استفاده از اسپکتروفتومتر و در طول موج‌های ۶۰۰ و ۵۳۲ نانومتر خوانده شد وبرای حذف اثر ترکیبات مزاحم جذب نمونه‌ها در طول ۶۰۰ نانومتر از جذب نمونه در طول موج ۵۳۲ نانومتر کسر شد.نتایج بر حسب نانومول بر میلی‌لیتر ($nmol.ml^{-1}$) طبق فرمول زیر محاسبه شد(Heath and Packer, 1968):

(۵)

$$MDA\ (nmol.ml^{-1})=[(A_{532}-A_{600})/155000]10^{6}$$

تهیه عصاره و سنجش فعالیت آنزیم‌ها: برای تهیه عصاره به منظور سنجش فعالیت آنزیم‌ها،یک گرم بافت تازه جلبک در یک‌هاون چینی حاوی ۵ میلی‌لیتر بافر تریس HCl با غلظت ۰/۰۵ مولار و pH=۷/۵ به‌طور کامل ساییده و سپس در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۵ دقیقه و با سرعت ۱۰۰۰۰دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول همگنی به‌دست آمد. برای سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز ۲/۵ میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات (۵۰ میلی‌مولار، pH=۷/۵) و ۳۰۰ میکرولیترآب اکسیژنه ۳ درصد دریک لوله آزمایش در حمام یخ مخلوط شده و بلافاصله ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به آن افزوده شد. منحنی تغییرات جذب در طول موج ۲٤۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. فعالیت آنزیمی بر حسب تغییرات واحد جذب در دقیقه به ازای هر گرم وزن تر جلبک ($OD.g^{-1}.FW.Min^{-1}$) محاسبه گردید(Posmyk et al., 2009).

برای سنجش فعالیت آنزیمپراکسیداز، ۲ میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات (۵۰ میلی‌مولار، pH= ۷)، ۳۰۰ میکرولیتر آب اکسیژنه ۵ میلی‌مولار و ۲۰۰ میکرولیتر پیروگالل ۱۰میلی‌مولار دریک لوله آزمایش در حمام یخ مخلوط شده و به آن ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی افزوده شد. سپس منحنی تغییرات جذب در طول موج ٤۲۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. فعالیت آنزیمی بر حسب تغییرات واحد جذب در دقیقه به ازای هر گرم وزن تر جلبک ($OD.g^{-1}.FW.Min^{-1}$) محاسبه گردید (Wang and Chen, 2006).

برای سنجش فعالیت آنزیم پلی‌فنول اکسیداز، ۲ میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات (۲۰ میلی‌مولار، ٦/۸ =pH) و ۲۰۰ میکرولیتر پیروگالل ۲۰ میلی‌مولار را به ۱۰۰میکرولیتر عصاره آنزیمی اضافه و محلول به‌مدت ۵ دقیقه در شرایط بن‌ماری با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس منحنی تغییرات جذب آن در طول موج ٤۲۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. فعالیت آنزیمیبر حسب تغییرات واحد جذب در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم وزن تر جلبک ($OD.g^{-1}.FW.Min^{-1}$) محاسبهگردید (Nicoli et al., 1991)

برای سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیدار،۲ میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات (۵۰ میلی‌مولار، pH= ۷ =)و ۲۰ میکرولیتر آب اکسیژنه ۵ میلی‌مولار در حمام یخ مخلوط و بلافاصله ۱۰۰میکرو‌لیترعصاره آنزیمی به آن افزوده شد. در نهایت با افزودن ۱۰ میکرولیتر آسکوربات ۵۰ میکرومولار منحنی تغییرات جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر خوانده شد. فعالیت آنزیمی بر حسب تغییراتواحد جذب در دقیقه به ازای هر میلی‌گرموزن تر جلبک ($OD.g^{-1}.FW.Min^{-1}$) محاسبه گردید (Nakanoand Asada, 1981).

کلیه تیمارها مجددا با استفاده از بهبود دهنده کلرید کلسیم نیز انجام شد. این بار از آب دریای غنی شده با غلظت ۰/۵ میلی مولار کلرید کلسیم استفاده گردید.نتایج با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS و تجزیه‌ی واریانس با آزمون دانکن برای اندازه‌گیری

تفاوت‌های آماری بین تیمارها و نمونه شاهد تجزیه و تحلیل شد.

نتایج

اثرات تیمارهای مختلف ۳ و ۸ روزه نیترات سرب و همچنین بهبوددهنده کلرید کلسیم بر میزان کلروفیل a و b، میزان کل کلروفیل، میزان کاروتنوئید، میزان پراکسیداسیون لیپیدی، فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان شامل آنزیم کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز وپلی‌فنل‌اکسیدازجلبک سبز انترومورفا با آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد مقایسه شدند.

میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی: نتایج آنالیز حاصل ازتیمارهای ۳ روزه نیترات سرب بر میزان کلروفیل a و b و همچنین کلروفیل کل (جدول ۱) نشان داد بین شاهد و تیمارهای مورد آزمایش و همچنین بین هریک از تیمارهای ۵۰ ، ۱۰۰ و۱۵۰ میکرومولار در حضور و عدم حضور بهبود دهنده کلرید سدیم اختلاف معنی‌دار وجود دارد. همچنین میانگین میزان کلروفیل در تیمارها همراه با بهبود دهنده بیشتر از میانگین میزان کلروفیل در تیمارها بدون بهبود دهنده بود. این روند اختلاف در تیمارهای ۸ روزه نیز مشاهده گردید اما نتایج دو دوره مشخص کرد میزان رنگیزه‌ها در دوره ۸ روزه نسبت به دوره ۳ روزه کاهش یافته است (جدول ۱).

میزان کاروتنوئید جلبک سبز *انترومورفا*طبق جدول ۱ نشان می دهددر تیمار ۳ روزه بین شاهد و تیمارهای مختلف در گروه فاقد بهبود دهنده کلرید کلسیم، اختلاف معنی‌دار وجود دارد. اما در گروه دوم که از بهبود دهنده کلرید کلسیم استفاده شده بود بین شاهد و تیمار۵۰ و۱۰۰ میکرومولار نیترات سرب اختلاف معنی‌داری وجود ندارد، درحالیکه هرسه آن‌ها با تیمار ۱۵۰ میکرومولار اختلاف معنی‌دار نشان می‌دهند. میانگین میزان کاروتنوئید در تیمارهای گروه دوم که از بهبود دهنده کلرید کلسیم استفاده شده بود بیشتر از گروه اول (فاقد بهبود دهند کلرید کلسیم) است.میانگین میزان کاروتنوئید در دوره ۸ روزه تیمارهای گروه دوم که از بهبود دهنده کلرید کلسیم استفاده شده بود بیشتر از گروه اول (فاقد بهبود دهند کلرید کلسیم) بود.این نشان می‌دهد که یون‌های کلسیم مانع تخریب کاروتنوئیدها در شرایط تنش مورد مطالعه می‌شوند. همچنین میانگین میزان کاروتنوئید در دوره ۳ روزه بیشتر از میانگین کاروتنوئید در دوره ۸ روزه است.

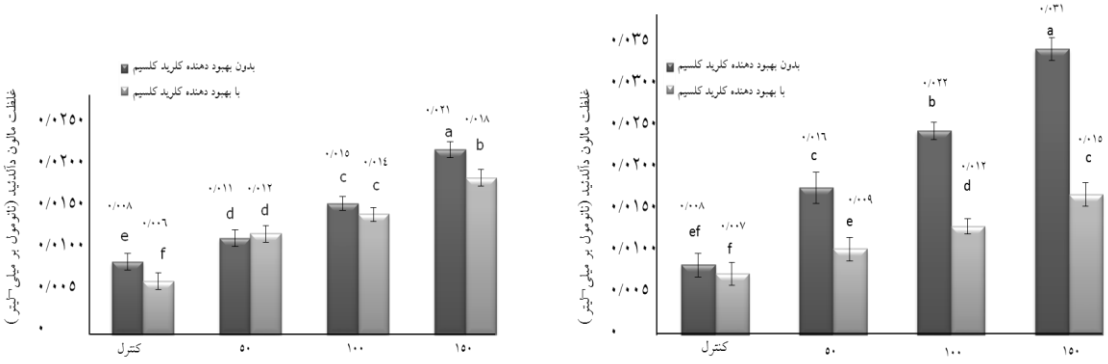
میزان پراکسیداسیون لیپیدی: شکل ۱ اثر تیمارهای مختلف را بر میزان پراکسیداسیون لیپیدی نشان می‌دهد. مطابق با این نتایج در دوره ۳ و ۸ روزه بدون استفاده از بهبود دهنده کلرید کلسیم، شاهد نسبت به سه تیمار دیگر تفاوت معنی‌دار داشت. تیمارهای ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار نیترات سرب نیز با افزایش غلظت، افزایش معنی‌داری را نشان دادند. همچنین در دوره ۳ و ۸ روزه با بهبود دهنده کلرید کلسیم نیزنتایج مشابه بدست آمد. بطور کلی میانگین میزان پراکسیداسیون لیپیدی دوره ۳ و ۸ روزه در گروه فاقد بهبود دهنده بیشتر از گروه دارای بهبود دهنده بود.

میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان: اثر تیمارهای نیترات سرب بر فعالیت چهار آنزیم آنتی اکسیدان شامل آنزیم کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز وپلی‌فنل‌اکسیداز جلبک انترومورفا در طول دوره‌های ۳ و ۸ روزه و در دو گروه فاقد بهبود دهنده و دارای بهبود دهنده در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۱: میانگین میزان کلروفیل *a* و *b*، میزان کلروفیل کل و میزان کاروتنوئید± انحراف استاندارد تحت تیمارهای مختلف ۳ و ۸ روزه نیترات سرب در جلبک سبز *انترومورفا*

شاخص	کلروفیلa میلی‌گرم بر میلی‌لیتر		کلروفیلb میلی‌گرم بر میلی‌لیتر		کلروفیل کل میلی‌گرم بر میلی‌لیتر		کاروتنوئید میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	
	بدون بهبود دهنده کلرید کلسیم	با بهبود دهنده کلرید کلسیم	بدون بهبود دهنده کلرید کلسیم	با بهبود دهنده کلرید کلسیم	بدون بهبود دهنده کلرید کلسیم	با بهبود دهنده کلرید کلسیم	بدون بهبود دهنده کلرید کلسیم	با بهبود دهنده کلرید کلسیم
غلظت نیترات سرب	تیمار ۳ روزه							
شاهد	۱/۹۴۹± ۰/۰۰^{a}	۱/۸۳۰± ۰/۰۲^{b}	۱/۷۶۰± ۰/۱۰^{b}	۱/۹۰۲± ۰/۰۵^{a}	۳/۷۱۰± ۰/۱۰^{a}	۳/۷۳۲± ۰/۰۴^{a}	۰/۵۹۸± ۰/۰۴^{b}	۰/۷۲۲± ۰/۰۲^{a}
۵۰ میکرومولار	۰/۹۲۴± ۰/۰۲^{e}	۱/۴۶۳± ۰/۰۳^{c}	۰/۸۸۵± ۰/۰۴^{d}	۰/۹۷۷± ۰/۰۳^{c}	۱/۸۱۰± ۰/۰۶^{b}	۲/۴۴۱± ۰/۰۴^{c}	۰/۵۳۷ ± ۰/۰۲^{c}	۰/۶۹۹± ۰/۰۱^{a}
۱۰۰میکرومولار	۰/۶۴۱± ۰/۰۳^{g}	۱/۰۶۰±۰/۰۲^{d}	۰/۶۱۲± ۰/۰۸^{f}	۰/۷۳۸± ۰/۰۳^{e}	۱/۲۰۴± ۰/۰۵^{c}	۱/۷۹۸± ۰/۰۵^{e}	۰/۴۶۳± ۰/۰۲^{d}	۰/۶۸۸± ۰/۰۲^{a}
۱۵۰میکرومولار	۰/۴۶۷± ۰/۰۲^{h}	۰/۸۷۳± ۰/۰۱^{f}	۰/۴۱۴± ۰/۰۱^{g}	۰/۶۱۲± ۰/۰۳^{f}	۰/۸۶۶± ۰/۰۳^{d}	۱/۴۸۶± ۰/۰۴^{f}	۰/۳۷۳± ۰/۰۱^{e}	۰/۵۷۸± ۰/۰۲^{b}
	تیمار ۸ روزه							
شاهد	۱/۶۸۳± ۰/۰۳^{a}	۱/۷۰۶± ۰/۰۲^{a}	۱/۵۴۱±۰/۰۱^{b}	۱/۶۷۴± ۰/۰۱^{a}	۳/۲۲۴± ۰/۰۱^{b}	۳/۳۸۰± ۰/۰۴^{a}	۰/۴۲۲± ۰/۰۲^{c}	۰/۵۰۳± ۰/۰۲^{a}
۵۰ میکرومولار	۰/۷۶۲± ۰/۰۳^{d}	۱/۲۶۵± ۰/۰۲^{b}	۰/۶۲۸± ۰/۰۴^{d}	۰/۸۹۱± ۰/۰۴^{c}	۱/۳۹۰± ۰/۰۵^{e}	۲/۱۵۷± ۰/۰۶^{c}	۰/۴۱۰± ۰/۰۲^{c}	۰/۴۶۷± ۰/۰۱^{b}
۱۰۰میکرومولار	۰/۶۵۸± ۰/۰۱^{f}	۱/۰۰۵± ۰/۰۲^{c}	۰/۳۲۵± ۰/۰۲^{f}	۰/۵۹۷± ۰/۰۲^{d}	۰/۹۸۴± ۰/۰۳^{g}	۱/۶۰۳± ۰/۰۴^{d}	۰/۴۰۴± ۰/۰۲^{c}	۰/۳۹۶± ۰/۰۱^{c}
۱۵۰میکرومولار	۰/۴۶۸ ± ۰/۰۱^{g}	۰/۷۱۷± ۰/۰۴^{e}	۰/۲۰۶± ۰/۰۱^{g}	۰/۴۴۸± ۰/۰۵^{e}	۰/۶۷۵± ۰/۰۲^{h}	۱/۱۶۵± ۰/۰۹^{f}	۰/۳۱۸± ۰/۰۱^{d}	۰/۳۳۱± ۰/۰۱^{d}

حروف غیر مشترک بیانگر معنی‌دار بودن در سطح$p\leq$۰/۰۵



شکل ۱: میزان پراکسیداسیون لیپیدی تحت تیمارهای مختلف A) ۳ و B) ۸ روزه نیترات سرب در جلبک سبز *انترومورفا*

میانگین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمارهای مختلف (جدول ۲) نشان داد که در در دوره ۳ و ۸ روزه فاقد بهبود دهنده، شاهد با سه تیمار، تفاوت معنی‌دار دارد و هر یک از سه تیمار با افزایش غلظت، روند کاهشی را در فعالیت آنزیم نشان دادند. اما میزان کاهش درتیمارهای فاقد بهبود دهنده، بیشتر از تیمارهای دارای بهبود دهنده بود. به طور کلی فعالیت آنزیم کاتالاز در دوره ۳ روزه، بیشتر از فعالیت آنزیم کاتالاز در دوره ۸ روزه بود اما در هر دو دوره ۳ و ۸ روزه بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز در غلظت ۵۰ میکرومولار بدون بهبود دهنده و کمترین فعالیت در غلظت ۱۰۰ میکرومولار دارای بهبود دهنده مشاهده شد. استفاده از بهبود دهنده کلرید کلسیم به طور کلی باعث افزایش تحمل جلبک سبز در برابر فلز سنگین شده و فعالیت آنزیم کاتالاز را افزایش داده است.

میانگین فعالیت آنزیم پراکسیداز در شاهد و تیمارهای نیترات سرب با غلظت‌های مختلف در دوره‌های ۳ و ۸ روزه فاقد بهبود دهنده (جدول ۲) نشان داد که شاهد با سه تیمار، ضمن روند کاهشی، تفاوت معنی‌داری را نشان دادند. اما این تیمارها در شرایط استفاده از بهبود دهنده کلرید کلسیم، افزایش فعالیت این آنزیم را در غلظت ۵۰ و ۱۵۰میکرومولار نیتراب سرب نشان دادند. فعالیت آنزیم پراکسیداز در دوره ۳ و ۸ روزه فاقد بهبود دهنده، بیشتر از فعالیت آنزیم پراکسیداز در تیمارهای دارای بهبود دهنده بود و فعالیت این آنزیم در دوره ۳ روزه، بیشتر از فعالیت آن در دوره ۸ روزه بود اما در هر دوره با افزودن کلرید کلسیم به محیط کشت، جلبک در برابر تنش اکسیداتیو مقاومت نشان داده و میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز کاهش یافته است کهمی‌تواند نشان دهنده کاهش میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن باشد.

میانگین فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز (جدول ۲) نشان می‌دهد که اگرچه فعالیت این آنزیم در هر دو دوره ۳ و ۸ روزه و در شرایط استفاده و عدم از استفاده از بهبود دهنده در غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار کاهش نشان داد، اما با افزایش غلظت(۱۵۰میکرومولار)، روند فعالیت آنزیم افزایشی شد.فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیدار در دوره ۳ و ۸ روزه فاقد بهبود دهنده، کمتر از فعالیت این آنزیم نسبت به شرایط استفاده شده از بهبود دهنده بود و فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در دوره ۸ روزه، بیشتر از فعالیت این آنزیم در دوره ۳ روزه بود.

جدول ۲: میانگین میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز و آسکوربات پراکسیداز ± انحراف استاندارد تحت تیمارهای مختلف ۳ و ۸ روزه نیترات سرب در جلبک سبز *اتروموروفا*

غلظت نیترات سرب	کاتالاز (جذب در دقیقه به ازای هر گرم وزن تر)		پراکسیداز (جذب در دقیقه به ازای هر گرم وزن تر)		پلی فنل اکسیداز (جذب در دقیقه به ازای هر گرم وزن تر)		آسکوربات پراکسیداز (جذب در دقیقه به ازای هر گرم وزن تر)	
	بدون بهبود دهنده کلرید کلسیم	با بهبود دهنده کلرید کلسیم	بدون بهبود دهنده کلرید کلسیم	با بهبود دهنده کلرید کلسیم	بدون بهبود دهنده کلرید کلسیم	با بهبود دهنده کلرید کلسیم	بدون بهبود دهنده کلرید کلسیم	با بهبود دهنده کلرید کلسیم
تیمار ۳ روزه								
شاهد	۰/۴۱۷±۰/۰۰۷^{b}	۰/۴۰۱± ۰/۰۰^{c}	۰/۳۳۸±۰/۰۰۳^{e}	۰/۱۶۲±۰/۰۰۲^{d}	۰/۱۳۰±۰/۰۰۱^{b}	۰/۱۷۸±۰/۰۰۷^{a}	۰/۲۶۲±۰/۰۰۳^{b}	۰/۱۰۰±۰/۰۰۸^{g}
۵۰ میکرومولار	۰/۴۴۲±۰/۰۰۲^{a}	/۱۳۶±۰/۰۰۵^{e}	۰/۲۸۹±۰/۰۰۳^{b}	۰/۱۸۹±۰/۳۰۰^{c}	۰/۰۸۳±۰/۰۰۴^{c}	۰/۰۱۷±۰/۰۰۲^{g}	۰/۳۲۹±۰/۰۰۲^{a}	۰/۲۶۷±۰/۰۰۵^{b}
۱۰۰میکرومولار	۰/۱۵۴±۰/۰۰۳^{d}	۰/۰۲۶±۰/۰۰۲^{g}	۰/۱۳۳±۰/۰۰۴^{e}	۰/۰۴۲±۰/۰۰۰^{h}	۰/۰۲۸±۰/۰۰۵^{f}	۰/۰۷۰±۰/۰۰۲^{d}	۰/۲۳۳±۰/۰۰۳^{c}	۰/۱۸۶±۰/۰۰۶^{d}
۱۵۰میکرومولار	۰/۱۳۸±۰/۰۰۲^{e}	۰/۰۵۲±۰/۰۰۳^{f}	۰/۰۵۷±۰/۰۰۲^{f}	۰/۱۰۹±۰/۰۰۲^{f}	۰/۰۵۳±۰/۰۰۴^{e}	۰/۰۸۴±۰/۰۰۳^{c}	۰/۱۰۹±۰/۰۰۵^{f}	۰/۱۳۸±۰/۰۰۷^{e}
تیمار ۸ روزه								
شاهد	۰/۳۹۷±۰/۰۰۷^{b}	۰/۳۹۵±۰/۰۰۴^{b}	۰/۳۲۶±۰/۰۱۰^{a}	۰/۱۴۳±۰/۰۰۴^{c}	۰/۱۲۶±۰/۰۰۱^{b}	۰/۱۷۹±۰/۰۰۴^{a}	۰/۲۴۶±۰/۰۰۵^{b}	۰/۱۰۰±۰/۰۰۶^{e}
۵۰ میکرومولار	۰/۴۱۷±۰/۰۰۶^{a}	۰/۱۲۹±۰/۰۰۵^{c}	۰/۲۷۳±۰/۰۰۹^{b}	۰/۱۵۴±۰/۰۰۵^{c}	۰/۰۷۲±۰/۰۰۳^{e}	۰/۱۰۷±۰/۰۰۶^{c}	۰/۳۰۹±۰/۰۰۸^{a}	۰/۲۹۹±۰/۰۰۷^{a}
۱۰۰میکرومولار	۰/۱۲۵±۰/۰۰۸^{c}	۰/۰۲۴±۰/۰۰۳^{f}	۰/۱۱۹±۰/۰۱۲^{d}	۰/۰۶۷±۰/۰۰۶^{f}	۰/۰۲۴±۰/۰۰۲^{g}	۰/۰۷۰±۰/۰۰۵^{e}	۰/۱۶۰±۰/۰۰۵^{c}	۰/۱۲۵±۰/۰۰۵^{d}
۱۵۰میکرومولار	۰/۱۱۷±۰/۰۰۸^{d}	۰/۰۳۹±۰/۰۰۶^{e}	۰/۰۵۲±۰/۰۰۹^{e}	۰/۰۸۲±۰/۰۰۶^{e}	۰/۰۳۹±۰/۰۰۲^{f}	۰/۰۸۹±۰/۰۰۵^{d}	۰/۰۸۹±۰/۰۰۷^{f}	۰/۱۵۵±۰/۰۰۶^{c}

حروف غیر مشترک بیانگر معنی‌دار بودن در سطح $p\leq$۰/۰۵

با توجه به نتایج حاصل، مشاهده شد با افزایش غلظت فلز سرب فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز ابتدا کاهش یافته و در غلظت‌های بالاتر فعالیت افزایش می‌یابد. کاربرد کلرید کلسیم، تحمل شرایط تنش فلز سنگین را برای جلبک آسانتر نمود و میزان فعالیت آنزیم در تیمارهای دارای بهبود دهنده کلرید کلسیم کاهش یافت.

میانگین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در شاهد و تیمارهای نیترات سرب با غلظت‌های مختلف (جدول ۲) افزایش در هر یک از سه غلظت نیترات سرب روند کاهشی را در فعالیت آنزیم نشان داد. اما میزان کاهش درتیمارهای فاقد بهبود دهنده، بجز در غلظت ۱۵۰ میکرومولار، بیشتر از تیمارهای دارای بهبود دهنده بود. میانگین‌ها نشان داد که فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در دوره‌های ۳ و ۸ روزه فاقد بهبود دهنده، بیشتر از فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در شرایط استفاده از بهبود دهنده است. به‌طورکلی فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در دوره ۳ روزه، بیشتر از فعالیت این آنزیم در دوره ۸ روزه بود. نتایج نشان داد که استفاده از کلرید کلسیم باعث کاهش فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز شد.

بحث

با توجه به نتایج بدست آمده، مشخص است که بیشترین میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی (کلروفیل‌های a و b و میزان کل کلروفیل) مربوط به نمونه شاهد ۳روزه دارای بهبود دهنده کلرید کلسیم است. تغییر در تیمارها نشان می‌دهد با افزایش غلظت سرب از ۵۰ میکرومول به ۱۵۰ میکرومول میزان کلروفیل کاهش یافته است.به طور کلی مقدار کلروفیل، فتوسنتز و رشد در جلبکی که در معرض فلز سنگین قرار گرفته است، تغییر می‌کند (Dao Dao and Beardall, 2016a; Cao et al., 2015; Teoh and Wong, 2018; Beardall, 2016 b). کاهش غلظت کلروفیل تحت تنش فلز سنگین می‌تواند به‌دلیل جایگزینی یون فلز سنگین به جای منیزیوم که اتم مرکزی کلروفیل باشد (Küpper et al., 1996)، تغییر مسیر متابولیسمی سنتز کلروفیل با اختصاص دادن گلوتامات به عنوان پیش‌ساز سنتز کلروفیل و پرولین، به سمت ساخت پرولین، تخریب کلروفیل به دلیل سنتز انواع اکسیژن فعال (Lamaia et al., 2005; Shaw et al.,2004)، تخریب کلروفیل به دلیل افزایش سنتز کلروفیلاز (Drazkiewicz, 1994) و افزایش پراکسیداسیون لیپیدی در غشای کلروپلاست (Piotrowska-Niczyporuk et al., 2015) باشد.

با بررسی نتایج بدست آمده از رنگیزه فتوسنتزی کاروتنوئید مشخص شد که اثرات تخریبی نیترات سرب بر میزان کاروتنوئید جلبک انترومورفا با افزایش غلظت نیترات سرب، افزایش می‌یابد. بیشترین میزان کاروتنوئید در دوره ۳ روزه دارای بهبود دهنده و کمترین آن در دوره ۸ روزه فاقد بهبود دهنده مشاهده شد. همچنین نتایج نشان می‌دهد که کاروتنوئید نسبت به کلروفیل بخصوص در تیمار ۸ روزه، کمتر حساس هستند و در ترکیب با فلز سنگین سرب کمتر تحت تاثیر سمیت رادیکال‌های آزاد تولید شده قرار می‌گیرند. بررسی مطالعات پیشین نیز مطابق با نتایج بدست آمده در این تحقیق است (Fodorpatakiand Bartha 2008 و Arunakumara and Zhang, 2009).

با توجه به نتایج بدست آمده از مقایسه میانگین‌های میزان پراکسیداسیون لیپیدی مشاهده شد که با افزایش غلظت فلز سنگین در محیط، این مقدار نیز افزایش یافته است اما افزودن بهبود دهنده کلرید کلسیم به محیط کشت، مقدار پراکسیداسیون لیپیدی را بخصوص در تیمار ۸ روزه کاهش داد. این نتیجه با

نتایج مطالعات دیگر در جلبک تحت تنش یون‌های سرب نیز همخوانی داشت (Cao et al., 2015; Piotrowska-Niczyporuk et al., 2015; Piotrowska-Niczyporuk et al., 2018).

پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی کلروپلاست‌ها به عنوان اولین نشانه‌های سمیت فلز سنگین از جمله واکنش‌هایی است که در حضور رادیکال‌های اکسیژن فعال حاصل از فلزات سنگین، سرعت بیشتری پیدا می‌کند و افزایش آن می‌تواند اثر بازدارندگی در تجمع رنگدانه‌های فتوسنتزی ایجاد کند (Piotrowska-Niczyporuk et al., 2015). مطالعه Okamoto و همکاران (۲۰۰۱) نشان داد که یون سرب به دلیل پراکسیداسیون لیپیدی بالاتر، نسبت به دیگر فلزات سنگین مورد مطالعه، سمی‌ترین فلز خسارت زا به جلبک تک سلولی است.

میانگین فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیداتیو در شاهد و تیمارهای نیترات سرب با غلظت‌های مختلف بطور کلی نشان داد که افزایش در هر یک از سه غلظت نیترات سرب باعث روند کاهشی در فعالیت آنزیم‌ها می شود، اما میزان کاهش درتیمارهای فاقد بهبود دهنده، بیشتر از تیمارهای دارای بهبود دهنده بود که با مطالعات دیگر نیز مطابقت دارد. Piotrowska-Niczyporuk و همکاران (۲۰۱۸) نیز نشان دادند که اگرچه یون‌های سرب باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های اکسیداتیو می شود، اما استفاده از بهبود دهنده‌هایی همچون اکسین‌ها و سیتوکنین‌ها، باعث افزایش فعالیت این آنزیم‌ها در شرایط تنش می شوند.از آنجایی که انواع فعال اکسیژن هم در سیگنال‌دهی سلول دخالت دارند و هم برای سلول سمی هستند، سلول‌ها مکانیسم‌هایی را برای جمع‌آوری انواع فعال اکسیژن دارند که منجر به افزایش فعالیت‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌شود. با توجه به این که بین میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددسموتاز و تولید مولکول H_2O_2 به عنوان یک مولکول از انواع اکسیژن فعال با سمیت بالا، در سلول‌های جلبک ارتباط مستقیم وجود دارد (Piotrowska-Niczyporuk et al., 2015)، ممکن است افزایش فعالیت سوپراکسیددسموتاز منجر به افزایش تولید مولکول H_2O_2 و در نتیجه باعث افزایش در فعالیت آنزیم‌های آسکوربات‌پراکسیداز و کاتالاز در سلول‌های جلبک سبز *انترومورفا* شده باشد. آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز به کمک آسکوربیک اسید می‌توانند بخش عمده‌ای از سیستم دفاعی گیاه را در برابر تنش اکسیداتیو، تشکیل دهند و به عنوان ماده اولیه در چرخه آسکوربات- گلوتاتیون اثر سمزدایی برای H_2O_2 داشته باشد و رادیکال‌های آزاد اکسیژن را حذف کند (Foyer and Noctor, 2000).کاتالاز نیز بدون نیاز به یک کاهنده می‌تواند H_2O_2را به آب و اکسیژن کاتالیز کند (Sofo et al., 2015). بنابراین کاتالاز به عنوان مهمترین آنزیم در مقابله با تنش اکسیداتیو است (Soto et al., 2011)، به نظر می‌رسد که مکانیسم اصلی گیاه برای پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد باشد.افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در مطالعات دیگر (Okamoto et al., 2001; Bajguz, 2010) نیز کاهش تنش اکسیداتیو در جلبک‌ها را نشان داد. در واقع جلبک‌ها با میزان افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در غلظت‌های مختلف، میزان تحمل خود به تنش‌های اکسیداتیو را نشان می‌دهند.

نتیجه‌گیری نهایی

به‌طور خلاصه مطالعه حاضر نشان داد که حضور یون سرب در محیط آبی ایجاد شده در شرایط آزمایش، منجر به کاهش مقدار رنگدانه‌های فتوسنتزی و افزایش آنزیم‌های آنتی اکسیدان در غلظت ۵۰ میکرومولار شد. این می تواند نشان دهنده این باشد

که یون سرب در محیط آبی در مراحل اولیه به سرعت توسط گیاه جذب شده و منجر به فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها برای بقا گیاه می‌شود. حضور بهبود دهنده کلرید کلسیم به‌طور معنی‌داری در افزایش رنگدانه‌های فتوسنتزی و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی و پراکسیداسیون غشا در هر دو دوره ۳ و ۸ روزه موثر بود. این نتیجه احتمال دارد به‌دلیل القاء مکانیزم‌های تحمل گیاه با حضور بهبود دهنده کلرید کلسیم در شرایط محیط آبی و کاهش خسارت ناشی از فعالیت‌های اکسیداتیو باشد که نیاز به مطالعات بعدی دارد.

References

Arunakumara, K. and Zhang, X. (2009). Effects of heavy metals (Pb2+ and Cd2+) on the ultrastructure, growth and pigment contents of the unicellular *cyanobacterium Synechocystis* sp. PCC 6803. Chinese Journal of Oceanology and Limnology.27: 383-388.

Bajguz, A. (2010). An enhancing effect of exogenous brassinolide on the growth and antioxidant activity in *Chlorella vulgaris* cultures under heavy metals stress. Environmental and Experimental Botany.68: 175-179.

Cao, D.-j., Shi, X.-d., Li, H., Xie, P.-p., Zhang, H.-m., Deng, J.-w. and Liang, Y.-g. (2015). Effects of lead on tolerance, bioaccumulation, and antioxidative defense system of green algae, *Cladophora*. Ecotoxicology and Environmental Safety.112: 231-237.

Dao, L.H. and Beardall, J. (2016a). Effects of lead on growth, photosynthetic characteristics and production of reactive oxygen species of two freshwater green algae. Chemosphere.147: 420-429.

Dao, L.H. and Beardall, J. (2016b). Effects of lead on two green microalgae *Chlorella* and *Scenedesmus*: photosystem II activity and heterogeneity. Algal Research.16: 150-159.

Drazkiewicz, M. (1994). Chlorophyllase: occurrence, functions, mechanism of action, effects of external and internal factors. Photosynthetica. (Czech Republic).

Fodorpataki, L., and Bartha, L. (2008). Differential sensitivity of the photosynthetic apparatus of a freshwater green alga and of duckweed exposed to salinity and heavy metal stress. In Photosynthesis. Energy from the Sun. pp. 1451-1454.Springer.

Foyer, C.H., and Noctor, G. (2000). Tansley Review No. 112 Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. The New Phytologist.146: 359-388.

Heath, R.L., and Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics. 125: 189-198.

Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B.B., and Beeregowda, K.N. (2014). Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. Interdisciplinary Toxicology.7: 60-72.

Ji, L., Xie, S., Feng, J., Li, Y., and Chen, L. (2012). Heavy metal uptake capacities by the common freshwater green alga *Cladophora fracta*. Journal of Applied Phycology.24: 979-983.

Kuo, S., Lai, M.S., and Lin, C.W. (2006). Influence of solution acidity and CaCl2 concentration on the removal of heavy metals from metal-contaminated rice soils. Environmental Pollution.144: 918-925.

Küpper, H., Küpper, F., and Spiller, M. (1996). Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants. Journal of Experimental Botany.47: 259-266.

Lamaia, C., Kruatrachuea, M., Pokethitiyooka, P., Upathamb, E.S., and Soonthornsarathoola, V. (2005). Toxicity and accumulation of lead and cadmium in the filamentous green alga *Cladophorafracta* (OF Muller ex Vahl) Kutzing: A laboratory study. Science Asia.31: 121-127.

Lichtenthaler, H.K., and Wellburn, A.R. (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. Portland Press Limited.

Maraga, J.O., Kimaiyo, P.K., Kituyi, L., and Lutta, S. (2016). Biosorption of Cu^{+2} and Zn^{+2} Heavy Metal Ions from Test Solutions Using Green Algae Biosorbent. Scientific Research Journal. 4:13-19.

Mehta, S., and Gaur, J. (2005). Use of algae for removing heavy metal ions from wastewater: progress and prospects. Critical Reviews in Biotechnology.25: 113-152.

Morcillo, P., Esteban, M.Á., and Cuesta, A. (2016). Heavy metals produce toxicity, oxidative stress and apoptosis in the marine teleost fish *SAF-1* cell line. Chemosphere.144: 225-233.

Nakano, Y., and Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant and Cell Physiology.22: 867-880.

Nicoli, M.C., Elizalde, B.E., Pitotti, A., and Lerici, C.R. (1991). Effect of sugars and maillard reaction products on polyphenol oxidase and peroxidase activity in food. Journal of Food Biochemistry.15: 169-184.

Okamoto, O., Pinto, E., Latorre, L., Bechara, E., and Colepicolo, P. (2001). Antioxidant modulation in response to metal-induced oxidative stress in algal chloroplasts. Archives of Environmental Contamination and Toxicology.40: 18-24.

Ouyang, H., Kong, X., He, W., Qin, N., He, Q., Wang, Y., Wang, R., and Xu, F. (2012). Effects of five heavy metals at sub-lethal concentrations on the growth and photosynthesis of *Chlorella vulgaris*. Chinese Science Bulletin.57: 3363-3370.

Pinto, E., Sigaud-kutner, T., Leitao, M.A., Okamoto, O.K., Morse, D., and Colepicolo, P. (2003). Heavy metal–induced oxidative stress in algae. Journal of Phycology.39: 1008-1018.

Piotrowska-Niczyporuk, A., Bajguz, A., Talarek, M., Bralska, M., and Zambrzycka, E. (2015). The effect of lead on the growth, content of primary metabolites, and antioxidant response of green alga *Acutodesmus obliquus* (Chlorophyceae). Environmental Science and Pollution Research.22: 19112-19123.

Piotrowska-Niczyporuk, A., Bajguz, A., Zambrzycka-Szelewa, E., and Bralska, M. (2018). Exogenously applied auxins and cytokinins ameliorate lead toxicity by inducing antioxidant defence system in green alga *Acutodesmus obliquus*. Plant Physiology and Biochemistry.132: 535-546.

Posmyk, M., Kontek, R., and Janas, K. (2009). Antioxidant enzymes activity and phenolic compounds content in red cabbage seedlings exposed to copper stress. Ecotoxicology and Environmental Safety.72: 596-602.

Ratkevicius, N., Correa, J., and Moenne, A. (2003). Copper accumulation, synthesis of ascorbate and activation of ascorbate peroxidase in *Enteromorpha compressa* (L.) Grev.(Chlorophyta) from heavy metal-enriched environments in northern Chile. Plant, Cell & Environment.26: 1599-1608.

Shaw, B., Sahu, S., and Mishra, R. (2004). Heavy metal induced oxidative damage in terrestrial plants. In: Heavy metal stress in plants. pp. 84-126.Springer.

Sofo, A., Scopa, A., Nuzzaci, M., and Vitti, A. (2015). Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses. International Journal of Molecular Sciences.16: 13561-13578.

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. Latin American Journal of Aquatic Research.39: 280-285.

Tabaraki, R., Nateghi, A., and Ahmady-Asbchin, S. (2014). Biosorption of lead (II) ions on *Sargassum ilicifolium*: Application of response surface methodology. International Biodeterioration & Biodegradation.93: 145-152.

Teoh, M.L., and Wong, S.W. (2018). Influence of lead on growth and physiological characteristics of a freshwater green alga *Chlorella* sp. Malaysian Journal of Science.37: 82-93.

Vetrivel, S.A., Diptanghu, M., Ebhin, M.R., Sydavalli, S., Gaurav, N., and Tiger, K.P. (2017). Green algae of the genus Spirogyra: A potential absorbent for heavy metal from coal mine water. Remediation Journal.27: 81-90.

Xiong, B., Zhang, W., Chen, L., Lin, K.F., Guo, M.J., Wang, W.L., Cui, X.H., Bi, H.S., and Wang, B. (2014). Effects of Pb (II) exposure on C*hlorella protothecoides* and *Chlorella vulgaris* growth, malondialdehyde, and photosynthesis-related gene transcription. Environmental Toxicology.29: 1346-1354.

Yalçın, S. (2014). The mechanism of heavy metal biosorption on green marine macroalga *Enteromorpha linza*. Clean–Soil, Air, Water.42: 251-259.