

## اثر مثبت آلومینیوم در کاهش سمیت مس بر فعالیت نیترات ردوکتاز و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کلرلا ولگاریس (*Chlorella vulgaris* Beijernick)

آرین ساطعی، شادمان شکروی، \*نرگس ناطقی  
گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان

### چکیده

کلرلا ولگاریس در محیط کشت BG-11 با ۵ غلظت مس (۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ میکرومولار) بدون آلومینیوم و با آلومینیوم (۳۰۰ میکرومولار) و pH ۷/۱ به مدت ۱۰ روز در ۲۰ ساعت روشنایی و ۴ ساعت تاریکی رشد داده شد. در این تحقیق اثر تیمارهای مختلف روی فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز، نیترات ردوکتاز مورد ارزیابی قرار گرفت. افزایش غلظت مس باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گردید. در حضور آلومینیوم فعالیت کاتالاز در تمامی تیمارهای مس نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد، اما فعالیت پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در تیمار ۲۰ میکرومولار کاهش معنی‌داری نسبت به شاهد نشان داد. همچنین کاهش معنی‌داری در فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در ۲۰ میکرومولار مس با آلومینیوم نسبت به تیمار ۲۰ میکرومولار مس بدون آلومینیوم مشاهده گردید. نتایج نشان داد اثر غلظت‌های مختلف مس بدون آلومینیوم بر فعالیت نیترات ردوکتاز معنی‌دار نمی‌باشد. در تیمارهای مس و آلومینیوم بیشترین فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در غلظت ۴۰ میکرومولار مشاهده گردید که این افزایش نسبت به تیمار ۲۰ میکرومولار معنی‌دار و نسبت به سایر تیمارها و شاهد معنی‌دار نمی‌باشد. افزایش بعضی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در حضور آلومینیوم منجر به کاهش سمیت مس و افزایش رشد جلبک گردید.

کلمات کلیدی: آلومینیوم، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، کلرلا ولگاریس، سمیت مس، نیترات ردوکتاز

### مقدمه

آلاینده‌های اصلی ناشی از صنعتی شدن و شهرنشینی می‌باشند و دریاچه‌های زیادی با فلزات سنگین از جمله مس آلوده شده‌اند. گزارشات زیادی حاکی از اثرات غلظت‌های سمی مس روی ریز جلبک‌ها است و مشخص گردیده، کاتیون آزاد  $Cu^{2+}$  اثرات سمی را ایفا می‌کند (Rai et al., 1981; Lobban and Harrison, 1994; Gledhill et al., 1997; Pinto, 2003). ریزجلبک‌هایی از جنس *Chlorella* ساکنان عمومی آب

مهمترین فلزات سنگین از نظر آلودگی آب، روی، مس، سرب، کادمیوم، جیوه، نیکل، کبالت و کروم هستند (Vymazal, 1995). مس یک عنصر کم مصرف ضروری برای نمو گونه‌های فتوسنتزی است، هر چند در غلظت‌های بالا این فلز برای رشد ریز جلبک سمی است (Baos et al., 2002; Yan and Pan., 2002). در سال‌های اخیر فلزات سنگین

نیترات، افزایش می‌یابد و بوسیله افزایش آمونیم در کشت‌های کلرلا کاهش می‌یابد (Morris and Syrett, 1963).

هدف این تحقیق کاهش سمیت مس و افزایش رشد جلبک *Chlorella vulgaris* Beijernick می‌باشد و بدین منظور جلبک در تیمارهای مختلف مس بدون آلومینیوم و با آلومینیوم (۳۰۰ میکرومولار) رشد داده شد و میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و نیترات ردوکتازی تعیین گردید.

#### مواد و روش‌ها

جلبک *Chlorella vulgaris* Beijernick به طور خالص از کلکسیون ریز جلبک پژوهشکده علوم کاربردی دانشگاه شهید بهشتی تهیه و سپس در محیط کشت BG-11 با ۵ غلظت مس (۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میکرومولار) بدون آلومینیوم و در همان محیط کشت با ۴ غلظت مس (۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰) با آلومینیوم (غلظت ۳۰۰ میکرومولار) در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری (با سه تکرار) تلقیح و کشت گردید. نمونه‌ها به مدت ۱۰ روز در اتاقک کشت جلبک (دانشگاه آزاد اسلامی گرگان) با روشنایی ۱۵۰۰ لوکس و دمای ۲۲°C-۲۵ و تناوب نوری ۲۰ ساعت روشنایی و ۴ ساعت تاریکی رشد نمودند (بدون هوادهی و شیکر).

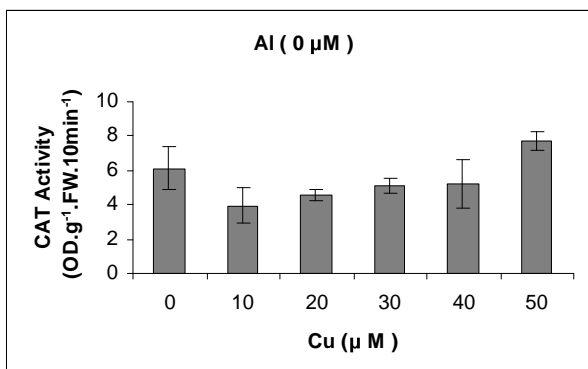
#### سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

ابتدا ۱۰ میلی‌لیتر از هر سوسپانسیون جلبکی برداشته، بعد از سانتریفوژ نمونه، محلول رویی دور ریخته شد و رسوب جلبکی توزین گردید (لوله‌ها قبل از اضافه شدن نمونه و همراه با رسوب جلبکی وزن گردیدند و وزن رسوب جلبکی محاسبه شد). ۴ میلی‌لیتر محلول عصاره‌گیری شامل ۱/۲ گرم تریس، ۲ گرم اسید آسکوربیک، ۳/۸ گرم بوراکس، ۲ گرم EDTANa<sub>2</sub> و ۵۰ گرم پلی‌اتیلن‌گلیکول ۲۰۰۰ به رسوب جلبکی اضافه شد و در حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر همگن گردید. سپس محلول‌های تهیه شده به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شدند. بعد از ۲۴ ساعت هرکدام از محلول‌ها در دور ۴۰۰g به مدت نیم ساعت سانتریفوژ گردیدند. محلول بالایی که بسیار شفاف بود برای سنجش فعالیت آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت. سپس میزان جذب توسط دستگاه

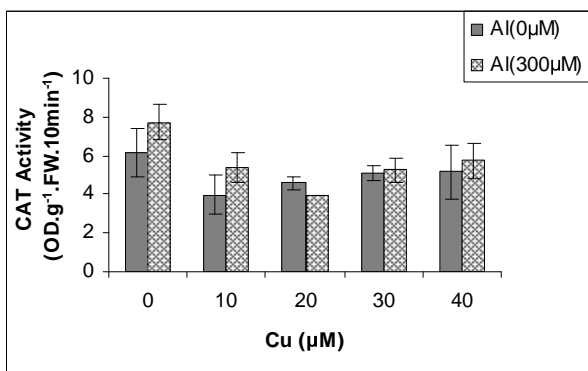
شیرین و اکوسیستم‌های نزدیک دریا هستند و مس که یک کوفاکتور برای آنزیم‌های گوناگون محسوب می‌شود، بسته به غلظت می‌تواند سبب اثرات نامطلوبی در تقسیم سلولی، رشد و مراحل فتوسنتز در گونه‌های *Chlorella* شود (Hassal, 1963; McBrien and Hassal, 1967; Gadd and Griffiths, 1978; Stauber and Florence, 1987).

مکانیزم سمیت مس شامل تولید گونه‌های اکسیژنی واکنش‌گر (ROS) توسط مداخله مس در واکنش فتون می‌باشد (Okamoto et al., 2001; Rijstenbil and Gerringa, 2002). افزایش یافتن سطح ROS سبب آسیب اکسیداتیو در ماکرومولکول‌هایی مانند پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک و لیپیدها شده و سرانجام منجر به آسیب به اندامک‌های مختلف سلولی می‌گردد. کلروپلاست‌های جلبک با یک سیستم پیچیده غشایی غنی از اسیدهای چرب اشباع نشده، هدف بالقوه پراکسیداسیون محسوب می‌شود (Halliwell and Gutteridge, 1999). پاسخ‌های سازگارکننده‌ای به منظور کاهش آسیب ماکرومولکولی ایجاد شده بوسیله استرس اکسیداتیو در جلبک‌ها توسعه یافته که از جمله این پاسخ‌ها رفع سمیت فلز و مکانیسم‌های دفاعی برای رفع ROS، قبل از اینکه بتوانند یک آسیب برگشت‌ناپذیر ایجاد کنند (Pinto et al., 2003). سمیت یونی مس در محیط رشد *Nitzschia closterium* توسط یون‌های فلزی سه ظرفیتی (Cr, Co, Al, Fe, Mn) بهبود می‌یابد، ایجاد یک لایه هیدروکسید فلزی III در اطراف سلول جلبک، مس را جذب نموده و از نفوذ آن به داخل سلول می‌کاهد (Stauber and Florence, 1987). فلزات سنگین و نیترات هر دو آلاینده‌های مضر می‌باشند و اغلب با هم ایجاد می‌شوند. نیترات ردوکتاز ثابت شده که در جلبک برای درمان آلودگی غذایی استفاده می‌شود، شناخت اثر فلزات سنگین روی فعالیت آنزیم بسیار ضروری است. Awasthi در سال ۲۰۰۵ بیان داشت افزایش غلظت نیکل و کادمیوم و روی در کلرلا ولگاریس و جلبک سبز - آبی *Anacystis nidulans* باعث کاهش فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز می‌گردد. بررسی‌ها نشان داده که سطح فعالیت نیترات ردوکتاز بوسیله افزایش

مس بدون آلومینیوم کاهش معنی داری ( $P < 0.05$ ) نشان داد (شکل ۲).



شکل ۱: اثر غلظت‌های مختلف مس بدون آلومینیوم بر فعالیت آنزیم کاتالاز در *Chlorella vulgaris* beijernick



شکل ۲: مقایسه اثر غلظت‌های مختلف مس بدون آلومینیوم و با آلومینیوم بر فعالیت آنزیم کاتالاز در *Chlorella vulgaris* beijernick

پراکسیداز: اثر مس بدون آلومینیوم بر فعالیت آنزیم پراکسیداز معنی‌دار است ( $P < 0.05$ ). افزایش فعالیت پراکسیدازی در غلظت ۵۰ میکرومولار مس بدون آلومینیوم نسبت به سایر تیمارها معنی‌دار و نسبت به شاهد معنی‌دار نمی‌باشد (شکل ۳). در تیمارهای مختلف مس با آلومینیوم (۳۰۰ میکرومولار) فعالیت آنزیم پراکسیداز در تیمار ۲۰ میکرومولار نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد. بین سایر تیمارها با شاهد و تیمار ۲۰ میکرومولار اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید (شکل ۴). فعالیت پراکسیداز در تیمار ۲۰ میکرومولار مس با آلومینیوم نسبت به تیمار ۲۰ میکرومولار مس بدون آلومینیوم کاهش معنی‌داری نشان داد (شکل ۴). با حضور آلومینیوم از شاهد تا غلظت ۲۰

اسپکتروفوتومتر (LABOMED, INC U.S.A) جهت سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی خوانده شد. فعالیت پراکسیداز به روش (Koroi, 1989)، فعالیت آسکوربات پراکسیداز به روش (Arrigoni, 1992). فعالیت کاتالاز به روش (Chance and Maehly, 1995) و برحسب واحد  $OD.g^{-1}.FW.10min^{-1}$  و فعالیت سوپراکسید دیسموتاز به روش (Giannolitis and Rice, 1977) برحسب واحد  $OD.g^{-1}.FW.20min^{-1}$  مورد سنجش قرار گرفت.

سنجش فعالیت نیترات ردوکتاز (Sym, 1984): رسوب جلبکی بدست آمده (مشابه روش بالا) با کمک محلول انکوباسیون (نیترات پتاسیم، پروپانول، تامپون فسفات) ساییده و بعد از سانتریفیوژ، ۲ میلی لیتر از عصاره بدست آمده را با ۱ میلی لیتر گریس I، ۱ میلی لیتر گریس II مخلوط و جذب آن را در طول موج ۵۲۰ nm خوانده شد. آنالیزهای آماری با استفاده از واریانس ANOVA و نرم افزار SPSS و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون Duncan و Tukey ( $P < 0.05$ ) و رسم نمودارها توسط نرم افزار Excel انجام پذیرفت.

## نتایج

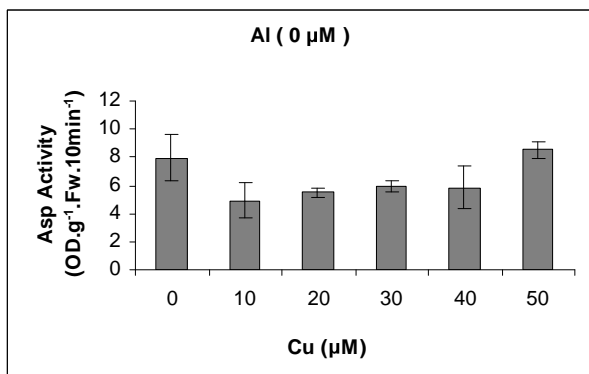
### اثر تیمارهای مختلف مس بدون آلومینیوم و با آلومینیوم

#### بر فعالیت آنزیمهای آنتی‌اکسیدانی

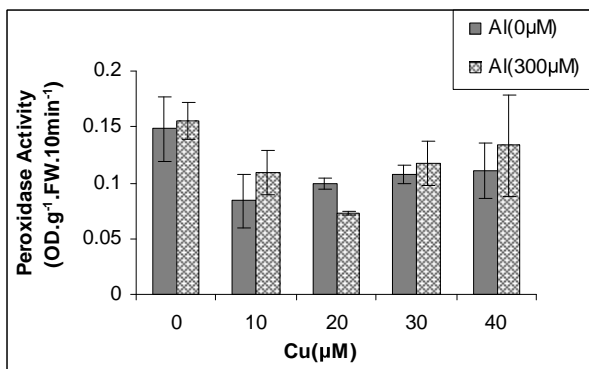
کاتالاز: اثر کلی مس بر فعالیت آنزیم کاتالاز معنی‌دار است ( $P < 0.05$ ) بیشترین فعالیت کاتالازی در ۵۰ میکرومولار مس مشاهده گردید که اختلاف آن با سایر تیمارها معنی‌دار و نسبت به شاهد و تیمار ۴۰ میکرومولار معنی‌دار نمی‌باشد (شکل ۱).

فعالیت کاتالاز در تیمارهای مختلف مس با آلومینیوم (۳۰۰ میکرومولار) کاهش معنی‌داری نسبت به شاهد نشان داد، اما بین تیمارها اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید (شکل ۲). فعالیت کاتالاز در شاهد و غلظت ۱۰ میکرومولار مس با آلومینیوم نسبت به تیمار ۱۰ میکرومولار مس و شاهد بدون آلومینیوم افزایش نشان داد (معنی‌دار نبود). فعالیت کاتالاز در تیمار ۲۰ میکرومولار مس با آلومینیوم نسبت به ۲۰ میکرومولار

افزایش نشان داده است. کاهش فعالیت آنزیم در تیمار ۲۰ میکرومولار مس با آلومینیوم نسبت به ۲۰ میکرومولار مس بدون آلومینیوم معنی دار می باشد (شکل ۶).



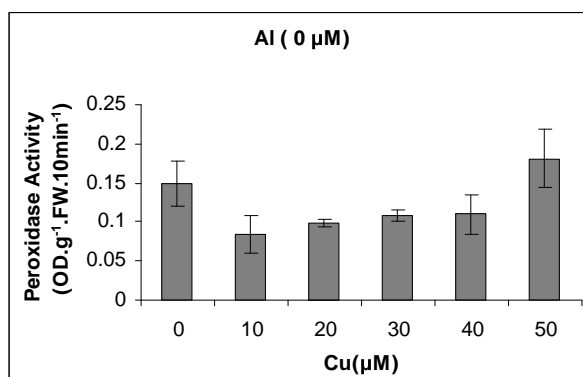
شکل ۵: اثر غلظت‌های مختلف مس بدون آلومینیوم بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در *Chlorella vulgaris* beijernick



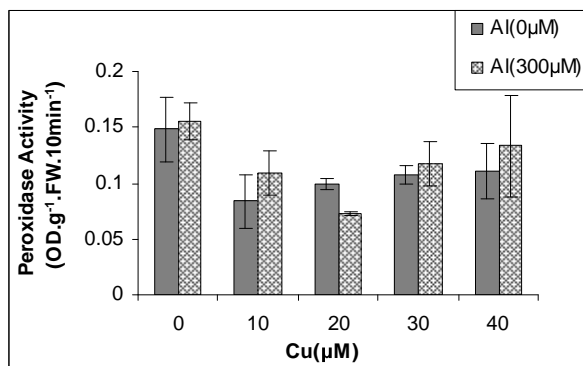
شکل ۶: مقایسه اثر غلظت‌های مختلف مس با و بدون آلومینیوم بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در *Chlorella vulgaris* beijernick

سوپراکسید دیسموتاز: اثر مس بدون آلومینیوم بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز معنی دار است ( $P < 0.05$ ). فعالیت آنزیم در غلظت ۵۰ میکرومولار مس نسبت به سایر تیمارهای مس افزایش معنی داری نشان داد. البته این افزایش فعالیت آنزیم نسبت به شاهد معنی دار نمی باشد (شکل ۷). در حضور آلومینیوم (۳۰۰ میکرومولار) فعالیت سوپراکسید دیسموتازی در تیمار ۲۰ میکرومولار کاهش نشان داد، این کاهش نسبت به شاهد و سایر تیمارها معنی دار نمی باشد (شکل ۸). فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در تمام تیمارهای مس با آلومینیوم نسبت به تیمارهای مس بدون آلومینیوم افزایش نشان داد (شکل ۸).

میکرومولار مس کاهش فعالیت پراکسیدازی و با افزایش غلظت مس افزایش فعالیت پراکسیدازی مشاهده گردید.



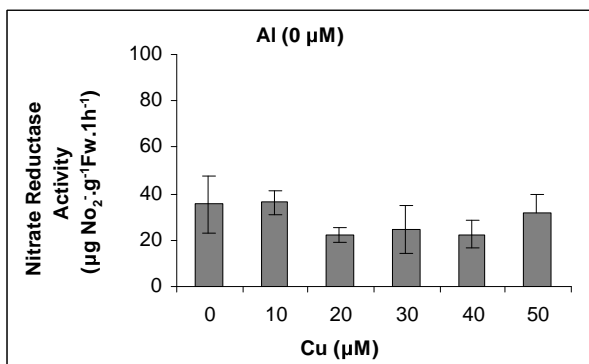
شکل ۳: اثر غلظت‌های مختلف مس بدون آلومینیوم بر فعالیت آنزیم پراکسیداز در *Chlorella vulgaris* beijernick



شکل ۴: مقایسه اثر غلظت‌های مختلف مس با و بدون آلومینیوم بر فعالیت آنزیم پراکسیداز در *Chlorella vulgaris* beijernick

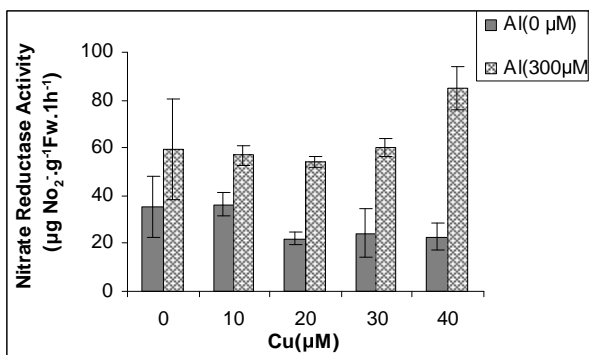
آسکوربات پراکسیداز: اثر مس بدون آلومینیوم بر فعالیت آسکوربات پراکسیداز معنی دار است ( $P < 0.05$ ). کاهش فعالیت آنزیم در تیمارهای ۱۰ و ۲۰ میکرومولار مس بدون آلومینیوم نسبت به تیمار ۵۰ میکرومولار معنی دار می باشد و این کاهش نسبت به شاهد و تیمارهای ۳۰ و ۴۰ میکرومولار معنی دار نمی باشد (شکل ۵). در تیمارهای مختلف مس با آلومینیوم کمترین فعالیت آنزیم در تیمار ۲۰ میکرومولار مس با آلومینیوم و بیشترین فعالیت در شاهد مشاهده گردید. افزایش فعالیت آنزیم در تیمار ۴۰ میکرومولار و شاهد نسبت به تیمار ۲۰ میکرومولار معنی دار است ( $P < 0.05$ ). با توجه به شکل ۶ مشاهده گردید در حضور آلومینیوم فعالیت آنزیم از شاهد تا غلظت ۲۰ میکرومولار مس کاهش و در غلظت‌های بالاتر آن

آلومینیوم افزایش معنی داری نسبت به تیمارهای مس بدون آلومینیوم نشان داد ( $P < 0.05$ ).



شکل ۹: اثر غلظت‌های مختلف مس بدون آلومینیوم بر فعالیت آنزیم

نیترات ردوکتاز در *Chlorella vulgaris* beijernick

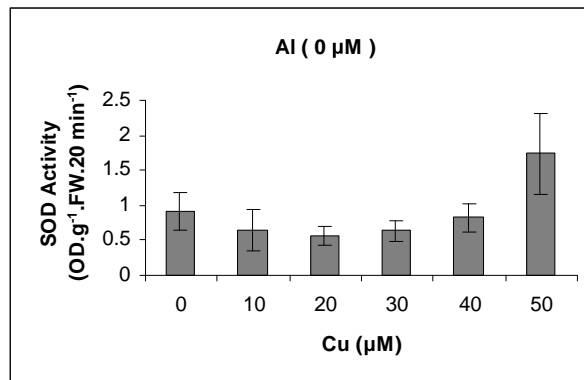


شکل ۱۰: مقایسه اثر غلظت‌های مختلف مس با و بدون آلومینیوم بر

فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در *Chlorella vulgaris* beijernick

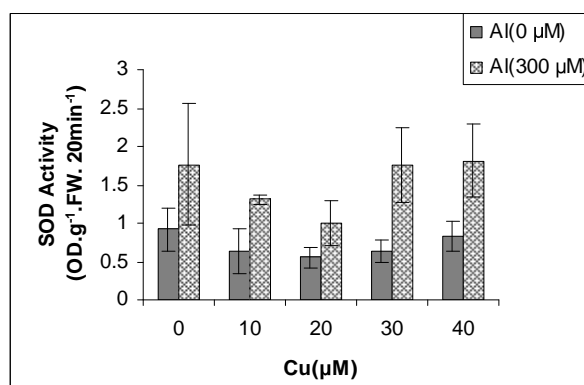
### بحث

نتایج نشان داد، بیشترین فعالیت کاتالازی، پراکسیدازی، اسکوربات پراکسیدازی و سوپراکسیددیسموتازی در غلظت ۵۰ میکرومولار مس است که این افزایش فعالیت آنزیمی در این تیمار نسبت به شاهد معنی دار نمی‌باشد. De Vos و همکاران وی (۱۹۹۱) بیان داشتند ظرفیت کاتالاز با غلظت‌های سمی مس در ریشه‌های *Silene cucubalus* افزایش می‌یابد که با نتایج ما همخوانی دارد. افزایش مس در محیط *Scenedesmus vacuolatus* باعث استرس اکسیداتیو می‌شود و دفاع آنتی اکسیدانی افزایش می‌یابد. یک افزایش معنی داری در فعالیت کاتالاز در ۲۱۰ و ۴۱۴ میکرومولار مس و یک افزایش معنی داری در فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و



شکل ۷: اثر غلظت‌های مختلف مس بدون آلومینیوم بر فعالیت آنزیم

سوپراکسید دیسموتاز در *Chlorella vulgaris* beijernick



شکل ۸: مقایسه اثر غلظت‌های مختلف مس با و بدون آلومینیوم بر

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در *Chlorella vulgaris* beijernick

اثر غلظت‌های مختلف مس بدون آلومینیوم و با آلومینیوم

(۳۰۰ میکرومولار) بر فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز

اثر غلظت‌های مختلف مس بدون آلومینیوم بر فعالیت آنزیم

نیترات ردوکتاز معنی دار نمی‌باشد ( $P < 0.05$ ). فعالیت آنزیم در

تیمار ۲۰ میکرومولار مس کاهش نشان داد که این کاهش

نسبت به شاهد و سایر تیمارها معنی دار نیست (شکل ۹).

اثر غلظت‌های مختلف مس با آلومینیوم (۳۰۰ میکرومولار)

بر فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز معنی دار است. کمترین فعالیت

آنزیم در تیمار ۲۰ میکرومولار مشاهده گردید که این کاهش

فعالیت آنزیم نسبت به تیمار ۴۰ میکرومولار معنی دار و نسبت

به شاهد و تیمارهای ۱۰ و ۳۰ میکرومولار معنی دار نمی‌باشد

(شکل ۱۰). فعالیت نیترات ردوکتازی در تیمارهای مس با

با نتایج ما مطابقت دارند. Okamoto و Colepicolo (۱۹۹۸) نیز بیان داشتند که کارگیری مخلوطی از فلزات (Hg, Cd, Pb, Cu) فعالیت SOD را در *Gonyaulax polyedra* تحریک می‌کند که با نتایج این تحقیق همخوانی دارد.

نتایج نشان داد اثر غلظت‌های مختلف مس بدون آلومینیوم بر فعالیت نیترات ردوکتاز بی‌معنی است. Awasthi در سال ۲۰۰۵ بیان داشت افزایش غلظت فلزات نیکل، روی و کادمیوم بر جلبک سبز - آبی *Anacystis nidulans* و جلبک سبز *Chlorella vulgaris* منجر به کاهش فعالیت نیترات ردوکتاز می‌گردد که با نتایج ما مطابقت ندارد. در تیمارهای مس با آلومینیوم بیشترین فعالیت نیترات ردوکتازی در غلظت ۴۰ میکرومولار مشاهده گردید که نسبت به تیمار ۲۰ میکرومولار معنی‌دار و نسبت به شاهد و سایر تیمارها معنی‌دار نمی‌باشد. همچنین مشاهده گردید در تمامی تیمارهای مس با آلومینیوم افزایش میزان فعالیت نیترات ردوکتاز نسبت به تیمارهای مس بدون آلومینیوم معنی‌دار است. ساطعی و سروش نسب (۱۳۸۷) بیان داشتند، فعالیت نیترات ردوکتاز در جلبک *Chlorella vulgaris* در غلظت‌های ۳۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار آلومینیوم افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار نشان می‌دهد که می‌تواند به دلیل افزایش جذب نیترات همراه با افزایش کاتیون آلومینیوم باشد که تا حدودی با نتایج ما همخوانی دارد. تحقیقات Stauber و Florence (۱۹۸۷) نشان داد سمیت یونی مس در محیط رشد *Nitzschia closterium* توسط یونهای فلزی سه ظرفیتی (Cr, Co, Al, Fe, Mn) بهبود می‌یابد، ایجاد یک لایه هیدروکسید فلزی III در اطراف سلول جلبک، مس را جذب نموده و از نفوذ آن به داخل سلول می‌کاهد و باعث کاهش سمیت مس می‌گردد که با نتایج بدست آمده در این تحقیق همخوانی دارد.

#### نتیجه‌گیری نهایی

در غلظت‌های بالای مس فعالیت آنزیمهای آنتی‌اکسیدانی افزایش نشان می‌دهند، حضور آلومینیوم باعث افزایش بیشتری در بعضی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گردیده که تا حدودی از

محتوای GSH تنها در ۴۱ میکرومولار مشاهده گردید به عکس در *Chlorella kessleri* اختلاف معنی‌داری در این پارامترها بین ۶/۲ و ۱۰۸ میکرومولار مشاهده نشد (Sabatini et al., 2009). پدیده عملکرد مس، تولید ROS است که استرس اکسیداتیو بیان می‌شود (Luna et al., 1994). به نظر می‌رسد افزایش غلظت مس منجر به افزایش سطح ROS و نهایتاً افزایش فعالیت آنزیمهای آنتی‌اکسیدانی می‌گردد. Malick در سال ۲۰۰۴ طی بررسی پاسخهای آنتی‌اکسیدانی جلبک کلرلا ولگاریس تحت استرس مس، بیان نمود با افزایش غلظت مس سوپراکسید دیسموتازی افزایش نشان داده و فعالیت کاتالازی و آسکوربات پراکسیدازی کاهش می‌یابد که از بعضی جنبه‌ها با نتایج ما همخوانی و از جنبه‌هایی دیگر مغایرت دارد.

در تیمارهای مس با آلومینیوم، کاهش فعالیت کاتالاز و پراکسیداز در تیمار ۲۰ میکرومولار نسبت به شاهد معنی‌دار است و نسبت به سایر تیمارها معنی‌دار نمی‌باشد. کاهش فعالیت آسکوربات پراکسیداز در تیمار ۲۰ میکرومولار نسبت به شاهد و تیمار ۴۰ میکرومولار معنی‌دار و نسبت به سایر تیمارها معنی‌دار نمی‌باشد و بین فعالیت سوپر اکسید دیسموتازی تیمارهای مختلف مس با آلومینیوم و شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید. در تیمار ۲۰ میکرومولار مس با آلومینیوم فعالیت کاتالازی، پراکسیدازی و آسکوربات پراکسیدازی نسبت به تیمار ۲۰ میکرومولار مس بدون آلومینیوم کاهش نشان داد. میزان فعالیت سوپر اکسید دیسموتازی در تمام تیمارهای مس با آلومینیوم نسبت به تیمارهای مس بدون آلومینیوم افزایش نشان داد. Jusu و همکاران (۲۰۰۴) بیان داشتند افزایش غلظت آلومینیوم در محیط اسیدی باعث افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتازی و پراکسیدازی در *Scenedesmus obliquus* می‌گردد. تحقیقات ساطعی و سروش نسب (۱۳۸۷) نشان داد آلومینیوم در غلظت ۳۰۰ میکرومولار باعث افزایش معنی‌داری در فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز نسبت به شاهد، تیمارهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار در جلبک کلرلا ولگاریس می‌گردد که تا حدودی

cell plasmalemma in copper tolerant *Silene cucubalus*. *Physiol. Plant.* 82: 523-528

**Gadd, G.M., Griffiths, A.J. (1978).** Microorganisms and heavy metal toxicity. *Microb Ecol* 4:303-317

**Ginnopolitis, N.C. and Ries, S.K. (1977).** Superoxide dismutase occurrence in higher plants. *Plant Phys.*,59: 309-314.

**Gledhill, M., Nimmo, M., Hill, S.J., Brown, M.T. (1997).** The toxicity of copper (II) species to marine algae, with particular reference to macroalgae. *J. Phycol.* 33 (1), 2-11.

**Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C.(1999).** Free Radicals in Biology and Medicine, third ed. Oxford University Press, New York

**Hassal, K. (1963).** Uptake of copper and its physiological effects on *Chlorella vulgaris*. *Physiol Plant* 16:323-332

**Jusu,S.A, Kong,F.X, Qing,B.G, Tan,J.K, Han., X.B, (2004).** The course biochemical response of green algae *Scenedesmus obliquus* PH. *Environ Contam. Toxicol.*73:1001-1008

**Koroi, A. (1989).** Gel electrophoresis and spectrophotometric effects of copper on the growth and activity of amylase and peroxidase isoenzymes. *Physiol Veg.*20:15-23

**Lobban, C.S., Harrison, P.J. (1994).** Seaweed Ecology and Physiology. Cambridge University Press, New York.

**Luna, C.M., Gonzalez, C.A. and Trippi, V.S. (1994).** Oxidative damage caused by an excess of copper in oat leaves. *Plant Cell Physiol.* 35: 11-15.

**Mallick,N.(2004).**Copper-induced oxidative stress in the chlorophyte microalga *Chlorella vulgaris*: response of the antioxidant system. *J. Plant Physiol.*161, 591-597.

**McBrien, D.C., Hassal, K. (1967).** The effect of toxic doses of copper upon respiration, photosynthesis, and growth of *Chlorella vulgaris*. *Physiol Plant* 20:113-117

**Morris, I. and Syrett, P.J. (1963).** The development of nitrate reductase in *Chlorella* and its repression by ammonium. *Arch. Mikrobiol.* 47: 32-41.

**Okamoto, O.K., Colepicolo, P. (1998).** Response of superoxide dismutase to pollutant metal stress in the marine dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*.

سمیت مس می‌کاهد. کاهش فعالیت اکثر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در تیمار ۲۰ میکرومولار مس مشاهده گردید که به نظر می‌رسد در آن غلظت، آلومینیوم نمی‌تواند سمیت مس را کاهش دهد همچنین می‌توان بیان داشت علاوه بر مقدار مطلق مس و آلومینیوم، مقدار نسبی آنها در پاسخ جلبک مؤثر است و به این دلیل جلبک رفتارهای دوگانه‌ای را از خود نشان داده است. افزایش فعالیت نیترات ردوکتازی در حضور آلومینیوم می‌تواند دلیلی بر افزایش جذب نیترات و افزایش رشد جلبک باشد.

### سپاسگزاری

بدین وسیله از کلیه افرادی که در طول انجام این تحقیق، راهنمای اینجانب بوده‌اند و سرکار خانم کیایی (مسئول محترم آزمایشگاه تحقیقات)، سرکار خانم رسایی (مسئول محترم آزمایشگاه شیمی) نهایت قدردانی و تشکر را می‌نمایم.

### منابع

ساطعی، آ. و سروش نسب، ل. (۱۳۸۷). بررسی برخی از پاسخ‌های فیزیولوژی جلبک کلرلاولگاریس به اضافه کردن آلومینیوم در محیط کشت. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان.

**Arrigoni, O. (1992).** Ascorbate system in plant development. *J. Biomember*, 26: 407-419.

**Awasthi, M. (2005).** Nitrate reductase activity: A solution to nitrate problems tested in free and immobilized algal cells in presence of heavy metals. *J. Environ*, Vol. 2, No. 3, pp. 201-206

**Baos, R., García-Villada, L., Agrelo, M., Lopez Rodas, V., Hiraldo, F, Costas, E. (2002).** Short-term adaptation of microalgae in highly stressful environments: an experimental model analyzing the resistance of *Scenedesmus intermedius* (Chlorophyceae) to the heavy metal mixture from the Aznalcollar mine spill. *Eur.J.Phycol.* 37, 593-600.

**Chance, B. and Maehly, C. (1995).** Assay catalase and peroxidase methods *enzymol.* 11: 764-775

**De Vos, C.H.R, H. Schat, M.A.M. De Waal, R. Vooijs, and W.H.O. Ernst. (1991).** Increased resistance to copper-induced damage of the root

- Sabatini, S.E., Juarez, A.B., Eppis, M.R., Bianchi, L., Luquet, C.M., Molina, M.C.R., (2009).** Oxidative stress and antioxidant defenses in two green microalgae exposed to Copper. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. doi: 10.1016.
- Stauber, J.L. and Florence, T.M. (1987).** Mechanism of toxicity of ionic copper and copper complexes to algae. *Marine Biology*. 94: 511- 519
- Sym, G.L. (1984).** Optimisation of the in vivo assay conditions for nitrate reductase in barley. *J. Sci. Food. Agri*, 35: 725-730.
- Vymazal, J. (1995).** Algae and element cycling in wetlands. Lewis Publ., Boca Raton
- Yan, H., Pan, G. (2002).** Toxicity and bioaccumulation of copper in three green microalgal species. *Chemosphere* 49, 471-476.
- Comp Biochem pPhysiol C pPharmacol Toxicol endocrinol. 119:67-73.
- Okamoto, O.K., Pinto, E., Latorre, L.R., Bechara, E.J.H., Colepicolo, P. (2001).** Antioxidant modulation in response to metal-induced oxidative stress in algal chloroplasts. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 40, 18-24
- Pinto, E., Sigaud-Kutner, T.C.S., Leitao, M.A.S., Okamoto, O.K., Morse, D., Colepicolo, P. (2003).** Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *J. Phycol.* 39, 1008-1018
- Rai, L., Gaur, J.P., Kumar, H.D. (1981).** Phycology and heavy metal pollution. *Biol. Rev.* 56, 99-151
- Rijstenbil, J.W., Gerringa, L.J.A. (2002).** Interactions of algal ligands, metal complexation and availability, and cell responses of the diatom *Ditylum brightwellii* with a gradual increase in copper. *Aquat. Toxicol.* 56, 115-131



## Aluminum positive influences in reduction of copper toxic effects on nitrate reductase and antioxidant enzymes activities of *Chlorella vulgaris* Beijernick

Sateei, A., Shokravi, S., \*Nateghi, N.

Department of biology, Islamic Azad University - Gorgan Branch

### Abstract

*Chlorella vulgaris* beijernick was grown in medium BG-11 with 5 concentrations of copper (10, 20, 30, 40, 50 $\mu$ M) without aluminum or with aluminum (300 $\mu$ M) and pH 7.1 for 10 days in 20 hours light and 4 hours darkness. In this study, the effect of different treatments on the activity of peroxidase, catalase, Ascorbat peroxidase and superoxid dismotase and nitrate reductase, in vivo, was evaluated. Increase of copper concentration caused increase in activity of antioxidant enzymes. Catalase activity in the presence of aluminum in all copper treatments showed a significant reduction, but peroxidase and Ascorbat peroxidase activities in 20 $\mu$ M treatments decreased significantly when compared with control. The significant decrease in the activity of catalase, peroxidase and Ascorbat peroxidase activity, in 20 $\mu$ M copper with aluminum comparing with 20  $\mu$ M copper without aluminum was also observed. Results also showed that the effect of different concentrations of copper without aluminum on nitrate reductase activity was not significant and most nitrate reductase activity in treatments with copper and aluminum was observed in 40 $\mu$ M that was significant when compared with 20 $\mu$ M treatment and was not significant when compared with other treatments or control. It is concluded that the presence of aluminum, by increasing some of antioxidant enzymes activities, lead to reduce of copper toxicity and algae growth increases.

**Key Words:** Aluminum, Antioxidant enzymes, *Chlorella vulgaris*, Copper toxicity, Nitrate reductase