**علوم و تکنولوژی محیط زیست ، دوره شانزدهم، شماره دو ، تابستان ۹۳**

# تاثیر نیکل و اسیدیته بر فعالیت آنتی اکسیدانی، محتوای تام فنولی و فلاونوئیدی جلبک کلادوفورا گلومراتا

**زهره صنوبری** [۱]
**ناصر جعفری** [۲*]
*n.jafari@umz.ac.ir*
**محمد علی ابراهیم زاده** [۳]

**تاریخ دریافت:۹۲/۲/۶** **تاریخ پذیرش:۹۲/۱۰/۱۸**

**چکیده**

غلظت های بالای نیکل به عنوان عاملی تنش زا برای جلبک ها محسوب می شود که می تواند به عنوان یک عامل محدود کننده رشد جلبک ها را تحت تأثیر قرار دهد. سمیت در اثر این فلز همچنین می تواند از طریق تولید رادیکال های آزاد، سبب القا تنش اکسیداتیو در جلبک ها و گیاهان شود. این تحقیق به منظور بررسی اثر غلظت های متفاوت نیکل و pH بر فعالیت آنتی اکسیدانی، محتوای تام فنولی و فلاونوئیدی انجام گرفته است. مقدار محتوای تام فنولی و فلاونوئید عصاره ها به روش فولین سیوکالتو سنجش و بر اساس میلی گرم گالبک اسید بر گرم عصاره بیان گردید. سپس فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره اتانولی با استفاده از تکنیک های ۲و۲ دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل تعیین گردید. در این مطالعه بیشترین مقدار فنول (۱۸۷۳ میلی گرم گالیک اسید بر گرم عصاره) و بیشترین مقدار فلاونوئید (۱۱۰۶ میلی گرم کوئرستین بر گرم عصاره) در pH=۵ به دست آمد. در آزمون فعالیت آنتی اکسیدانی نیز بیشترین درصد $IC_{50}$ نیز مربوط به pH=۹ گزارش گردید. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره اتانولی کلادوفورا گلومراتا دارای قدرت آنتی اکسیدانی خوبی در مقابل انواع سیستم های اکسیداتیو بوده و به عنوان یک آنتی اکسیدان طبیعی در دسترس می تواند در صنایع غذایی و دارویی مورد استفاده قرار گیرد.

**واژه های کلیدی:** کلادوفورا گلومراتا، تام فنولی، فلاونوئید، فعالیت آنتی اکسیدانی

۱- دانش آموخته گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه مازندران، بابلسر
۲- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر *(مسئول مکاتبات)
۳- دانشیار، گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

**مقدمه**

هنگامی که جلبک ها تحت شرایط استرس زا از قبیل تابش، تنش فلز سنگین، درجه حرارت انجماد و غیره قرار می گیرند استراتژی های مختلفی را برای مقابله با این شرایط زیست محیطی اتخاذ می نمایند (۱). فلزاتی که درگروه فلزات غیر ضروری قرار می‌گیرند دارای سمیت بالایی برای گیاهان می‌باشند. فلزاتی مانند Cd, Co, Cr, Hg, Mn, Ni, Pb و Zn در غلظت‌های اضافی سمی هستند و منجر به مهار رشد، کاهش بیومس و مرگ گیاه می‌شود. فلزات سنگین باعث مهار فرآیندهای بیولوژیکی مانند تنفس، فتوسنتز، طویل شدن سلولی، متابولیسم نیتروژن و مواد معدنی می شوند (۲). از منابع تولید فلزات سنگین می‌توان به پدیده‌های طبیعی و همچنین فعالیت‌های انسانی اشاره نمود (۳). که از جمله این فلزات سنگین می توان به فلز نیکل اشاره نمود که فلزی سمی و سرطان زا می باشد، انتشار مداوم آن در نتیجه فعالیت های صنعتی و توسعه فن آوری به عنوان تهدیدی جدی برای محیط زیست و سلامت عمومی به شمار می رود (۴). یکی از اثرات مضر نیکل در موجود زنده تولید رادیکال‌های آزاد و باعث افزایش پراکسیداسیون چربی‌ها می‌شود، که موجود برای خنثی کردن این رادیکال‌ها از برخی از آنتی اکسیدان‌ها استفاده می-نماید (۵). دانشمندان بسیاری برای حذف آلودگی‌ها خصوصاً فلزات سنگین از اکوسیستم های آبی بررسی‌های مختلفی را انجام داده‌اند، که یکی از بهترین روش‌ها در مبارزه با آلاینده های زیست محیطی استفاده از موجودات زنده از جمله گیاهان و جلبک‌ها می‌باشد. به طوری که این موجودات با جذب فلزات سنگین و افزایش آنتی‌اکسیدان‌ها برای مقابله با این تنش‌ها به پاک سازی محیط کمک شایان توجهی می‌کنند، به طوری که رابطه مشهودی بین آلودگی موجود در محیط و میزان آنتی-اکسیدان‌های این موجودات مشاهده می‌شود. از این میان می-توان به چو و همکارانش اشاره نمود که نشان دادند جلبک سبز رشته‌ای کلادوفورا در برابر استرس‌های محیطی راه کارهای مختلفی از خود بروز می‌دهد (۶). متابولیت های ثانویه مشتق از گیاهان مانند فنول و فلاونوئید تام دارای پتانسیل قوی بری پاک سازی رادیکال های آزاد می باشند (۷). ترکیبات گیاهی با خصوصیات آنتی اکسیدانی و شلاتوری باعث بهبود آسیب های بافتی ناشی از فلزات سمی و سنگین در بدن می‌گردند. آنتی-اکسیدان‌ها، ترکیباتی هستند که از طریق مهار واکنش ها و انتشار زنجیره اکسیداتیو باعث به تاخیر افتادن یا مهار اکسیداسیون لیپیدها و مولکول های دیگرمی‌شوند. فنول ها و ترکیبات فنولیک از قبیل فلاونوئیدها بطور وسیعی در منابع گیاهی یافت شده که دارای عملکرد مهم آنتی‌اکسیدانی هستند (۸). ساختار شیمیایی ترکیبات فنولی شامل گروه های آروماتیک و هیدروکسیل فراوان است و از طریق الکترون های جفت نشده موجود در اطراف حلقه آروماتیک، در به دام اندازی رادیکال های آزاد نقش دارند (۹). بزرگترین دسته از ترکیبات پلی فنول، فلاونوئیدها هستند که توانایی مهار پراکسیداسیون چربی با روش جمع کنندگی رادیکال‌هایی مانند سوپراکسید، آنیون ها، رادیکال های پراکسید چربی و رادیکال های هیدروکسیل را دارند. گروه های هیدروکسیل و متوکسیل نزدیک به هم در فلاونوئیدها باعث پایدار شدن رادیکال ها می شود و خاصیت خنثی کردن رادیکال های آزاد را تقویت می کنند (۱۰).

کلادوفورا یکی از فراوانترین جنس های خانواده جلبک های سبز است که در سواحل دریای خزر پراکنده شده‌اند (۱۱). ترکیبات بیولوژیکی فعال موجود در جلبک ها دارای عملکردهای وسیعی از جمله به عنوان ضد تومور، ضد باکتری، ضد قارچ و فعالیت انتی اکسیدانی می باشد (۱۲). یکی از اهداف این تحقیق ضمن اندازه گیری محتوای تام فنول و تام فلاونوئید، خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره اتانولی جلبک را با روشهای in vitro مورد برررسی و به این وسیله شرایط بهتر و توان بالاتر این جلبک را در حذف عامل استرس زا در محیط زیست شناسایی و معرفی نمایم.

## مواد و روش ها

### مواد شیمیایی

دی فنیل پیکریل هیدرازیل از کارخانه سیگما آلمان و کوئرستین از شرکت سیگما آلدریچ امریکا تهیه شد. بوتیل هیدروکسیل آنیزول، اسکوربیک اسید و کربنات سدیم، استات پتاسیم، اتانول و سولفات نیکل شش آبه از شرکت مرک آلمان خریداری شد. گالیک اسید از شرکت اسکارلو آلمان تهیه گردید. کلرید آلومینیوم از شرکت پانرک اسپانیا فراهم گردید همچنین کلریدریک اسید از شرکت لب اسکن ایرلند خریداری شد.

### جمع آوری جلبک و عصاره گیری

در این بررسی از جلبک کلادوفورا گلومراتا (*Cladophora glomerata*) از سواحل دریای خزر برای جذب یون‌های فلزی استفاده شد. نمونه برداری در تیر ماه ۹۱ به صورت تصادفی و با ۳ تکرار از سواحل دریای خزر، شهرستان بابلسر با مختصات طول جغرافیایی ´۶۷ °۵۲ و عرض جغرافیایی ´۷۱ °۳۶ انجام شد. جلبک کلادوفورا گلومراتا در دریای خزر به صورت توده‌ای و چسبیده به صخره‌های سواحل یافت می‌شود که از اواسط بهار تا اواسط پاییز در سواحل یافت می‌شود. پس از نمونه برداری و شستشو با آب شهری برای پاک سازی ذرات شن و موجودات آبزی، با آب مقطر نیز شستشو داده و سپس نمونه ها را در ۲۲/۳۲ میلی گرم نیکل دو ظرفیتی و در ۶ بازه pH (۴، ۵، ۶، ۷، ۸ و ۹) به مدت ۲۴ ساعت در شرایط نور و سایه طبیعی قرار گرفت. بعد از این مدت زمان، نمونه‌ها را صاف نموده و در آون با درجه حرارت ۵۰ درجه سانتیگراد قرار داده تا نمونه‌ها کاملاً خشک شدند. در مرحله بعد نمونه های جلبک کلادوفورا گلومراتا را در اتانول ۷۵ درصد خیس کرده و بعد از ۲۴ ساعت محلول رویی آن را صاف می‌کنیم. این عمل ۳ بار تکرار گردید و محلول عصاره‌ها به آون با درجه حرارت ۵۰ درجه سانتیگراد انتقال تا حلال تبخیر شود.

### تعیین محتوی تام فنولی

تعیین ترکیبات فنولیک توتال در استخراج هیدروالکلی این گیاه با استفاده از معرف فولین سیوکالتیو[1] (FCR) انجام گرفت (۱۳). در این روش ۲۵۰ µl از استخراج جلبک با غلظت ۱۰ mg/ml که از فیلتر میلی‌پور عبور داده و با ۱/۲۵ ml از معرف فولین سیوکالتیو ۰/۲ M مخلوط گردید و پس از ۵ دقیقه انکوباسین در دمای محیط به آنها حدود ۱ ml از محلول $NaCo_3$ (۷/۵ $g\ dl^{-1}$) اضافه شد. پس از ۲ ساعت گرماگذاری در دمای محیط جذب مخلوط فوق در مقابل شاهد به کمک اسپکتروفوتومتر در طول موج ۷۶۰ nm قرائت شد. جهت تهیه محلول شاهد طبق روش فوق عمل شده اما به جای استخراج گیاهی از اتانول ۷۵ درصد استفاده شده است. در این روش از غلظت‌های استاندارد گالیک اسید در دامنه غلظتی (۰، ۱۰، ۲۰، ... ۱۰۰ mg/l) جهت رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد. محتوی فنولیک توتال در استخراج این گیاه برمبنای میلی گرم اسید گالیک بر گرم استخراج عصاره ( $mg\ gallic\ acid\ g^{-1}$ of extracted) و با میانگین سه بار تکرار آزمایش گزارش گردیده است.

### تعیین محتوای تام فلاونوئید

محتوی توتال میزان فلاونوئید در استخراج هیدروالکلی جلبک سبز کلادوفورا به کمک معرف آلومینیوم کلراید ($AlCl_3$) و با استفاده از روش کالیریمتریک تعیین گردیده است (۱۴). دراین روش حدود ۲۵۰ µl از استخراج جلبک با غلظت ۱۰ mg/ml که از فیلتر میلی‌پور ۰/۲۲ mµ عبور داده شد، با ۷۵۰ µl ازمتانول، ۵۰ µl از محلول $AlCl_3$ (۱۰٪) در اتانول، ۵۰ µl از استات پتاسیم ۱ M به همراه ۱/۴ ml از آب مقطر با هم مخلوط شد و بعد از۳۰ دقیقه گرماگذاری در دمای محیط جذب مخلوط واکنش در مقابل شاهد در طول موج ۴۱۵ nm به کمک روش اسپکتروفتومتری قرائت گردید. در این آزمایش از غلظت‌های استاندارد کوئرستین در محدوده غلظتی (۰، ۱۰، ۲۰، ... ۱۶۰ mg/l) جهت رسم منحنی کالیبراسیون

1 -Folin-Ciocalteu reagent(FCR)

استفاده شد. محتوای فلاونوئید توتال در استخراج این جلبک بر مبنای میلی گرم کوئرستین بر گرم استخراج و با میانگین سه بار آزمایش گزارش شده است.

**ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی**

جهت بررسی اثرات آنتی اکسیدانتی استخراج جلبک تحت تنش در جهت به دام اندازی رادیکال آزاد، از نقش عصاره جلبک کلادوفورا، از روش جاروب کنندگی رادیکال آزاد پایدار ۲،۲- دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل[1] (DPPH) در حالت برون تن استفاده شد (۱۵). در این روش، حدود ۱ ml از غلظت‌های مختلف عصاره این جلبک با حجم خود (۱ ml) از محلول متانولی دی فنیل پیکریل هیدرازیل مخلوط شد و پس از هم زدن، به مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی و دمای آزمایشگاه گرماگذاری شد. سپس جذب مخلوط در طول موج ۵۱۷ nm در مقابل شاهد قرائت شد. آزمایشات سه بار تکرار و میانگین آن‌ها گزارش گردید. براساس اطلاعات حاصل، غلظت مهار عصاره از نمودار درصد مهار در مقابل غلظت عصاره به دست می‌آید. آسکوربیک اسید، و بوتیل هیدروکسی انیزول[2] (BHA) و کوئرسیتین به عنوان شاهد مثبت جهت مقایسه بکار گرفته شد. سپس مقادیر $IC_{50}$ [3] (مقدار غلظتی از عصاره که مورد نیاز است تا حدود ۵۰ درصد از رادیکال آزاد DPPH مهار گردد) مورد محاسبه قرار گرفت. جهت تهیه محلول شاهد از اتانول ۷۵ درصد (حلال عصاره) و متانول استفاده گردید. برای کنترل منفی از اتانول ۷۵ درصد (حلال عصاره) و محلول متانولی DPPH به همان نسبت فوق استفاده شده است و برای کنترل مثبت (استاندارد) از آسکوربیک اسید، BHA و کوئرسیتین به همان نسبت فوق به عنوان استاندارد استفاده شده است. لذا محاسبه مهار رادیکال آزاد توسط استخراج گیاهی در مقایسه با استانداردها از روی نمودار و طبق رابطه زیر انجام می‌شود:

$$\%\ \text{Inhibitory activity}\ (IC_{50}) = A_b - A_t / A_b \times 100$$

$A_b$= جذب کنترل منفی

$A_t$= جذب تست (استخراج)

**آنالیز آماری**

تجزیه واریانس نتایج حاصل بر اساس طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد و سپس مقایسه میانگین تیمارها با آزمون LSD و با استفاده از نرم افزار SAS و SPSS انجام پذیرفت. مقادیر $IC_{50}$ از روی رگرسیون خطی بین درصد مهار و غلظت های مربوطه به دست آمد. کلیه اطلاعات به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش گردید.

**نتایج**

**محتوای فنول و فلاونوئید**

خلاصه کلی نتایج حاصل از اندازه گیری میزان فنول و فلاونوئید و نیز بررسی قدرت احیاکنندگی در جدول ۱ آمده است. محتوای تام فنولی با روش فولین سیتوکالتیو به صورت معادل اکی والان گالیک اسید در گرم عصاره بر اساس معادله خط منحنی استاندارد محاسبه شد. در شکل ۱ مقایسه میانگین‌های سطوح مختلف تنش pH برای فنول مشاهده می-شود. نتایج نشان می‌دهد که محتوای تام فنول برای تمامی نمونه‌های تحت تنش با نمونه شاهد اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد را نشان می دهد. محتوای تام فنولی بیشترین میزان را در pH=۵ و کمترین میزان را در pH=۹ نشان داد (جدول ۱). همچنین نمونه شاهد که pH آن به طور طبیعی ۷ می باشد با نمونه تحت تنش pH=۷ و فلز سنگین تفاوت معنی داری را نشان می دهد (شکل ۱). محتوای تام فلاونوئید نیز به صورت معادل اکی والان میلی گرم کوئرستین در گرم عصاره ها گزارش شد. دامنه تغییر در میزان فلاونوئیدها بین ۲۴۴/۶۵ برای نمونه شاهد و ۱۱۰۶/۵۴ برای نمونه تنش (pH=۵) گزارش شده است. همانگونه که در شکل ۲ مشاهده می شود اختلاف کاملا معنی داری بین نمونه شاهد و نمونه ۷ مشاهده می شود که با وجود pH یکسان بیانگر اثر قوی فلز سنگین نیکل بر القای تولید فلاونوئید می باشد.

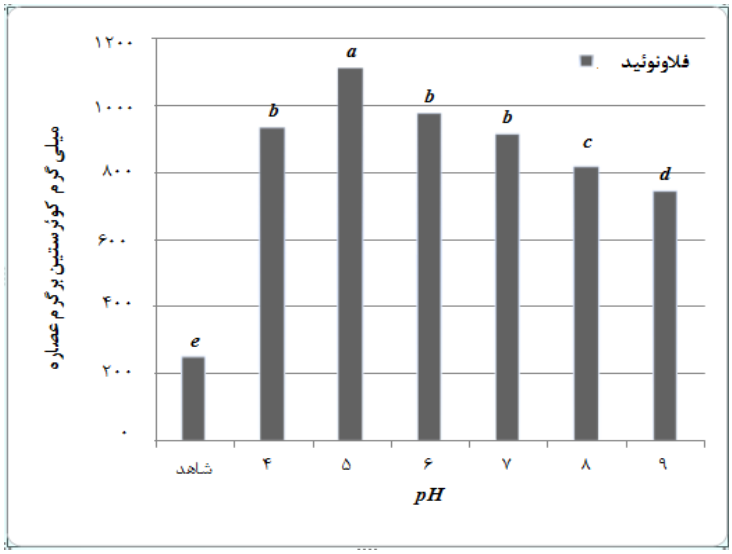
1- 2, 2-Diphnyl-1-picrylhyrazyl

2 -Butylated hydroxyanisole (BHA)

3 -$IC_{50}$: The concentration of substance that provides 50% inhibition to certain reaction

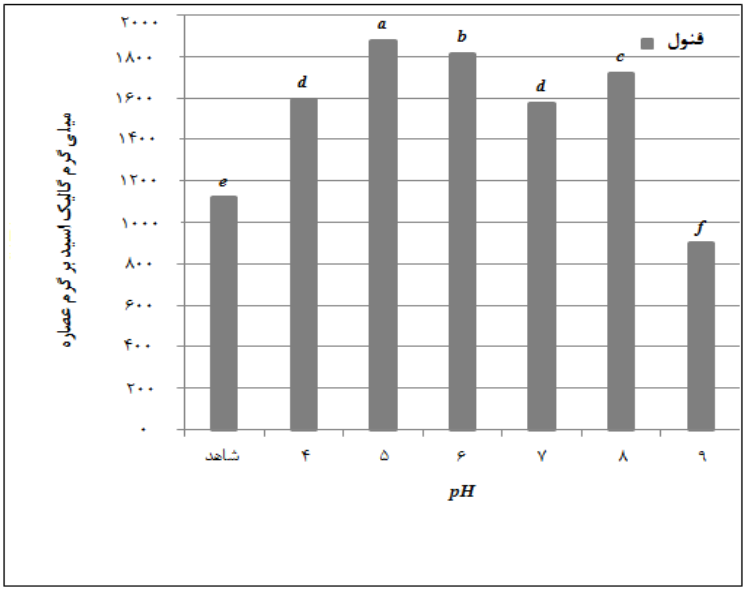
**فعالیت به دام اندازی رادیکال DPPH**

این آزمایش بر اساس واکنش مستقیم رادیکال آزاد $DPPH^{\bullet}$ با آنتی اکسیدان ها می‌باشد، زمانی که این رادیکال توسط آنتی اکسیدان ها به دام انداخته میشود، $DPPH^{\bullet}$ احیا شده و مولکول پایدار DPPH-H تشکیل میشود. این روش بطور گسترده ای برای ارزیابی توانایی به دام اندازی رادیکال آزاد در نمونه های مختلف مورد استفاده قرار می گیرد (۱۶). جدول ۲ مقایسه میانگین های $IC_{50}$ جلبک را تحت سطوح مختلف تنش pH نشان می‌دهد که افزایش در فعالیت به دام اندازی رادیکال آزاد در تمامی نمونه‌های تحت تنش مشاهده می شود. نتایج بیانگر اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد بین pH های مختلف و نمونه شاهد به جز نمونه pH=۷ می باشد. غلظت مهار ۵۰ درصد عصاره‌ها و نیز بوتیل هیدروکسیل آنیزول، آسکوربیک اسید و کوئرستین به عنوان آنتی اکسیدان استاندارد در جدول ۲ مشاهده می گردد..




**شکل ۱- مقایسه میزان فلاونوئید تام عصاره هیدروالکلی جلبک کلادوفورا تحت تنش pH**

(در هر ستون میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند بر اساس ازمون حداقل تفاوت معنی دار در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.)




**شکل ۲- مقایسه میزان فنول تام عصاره هیدروالکلی جلبک کلادوفورا تحت تنش pH**

(در هر ستون میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند بر اساس آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

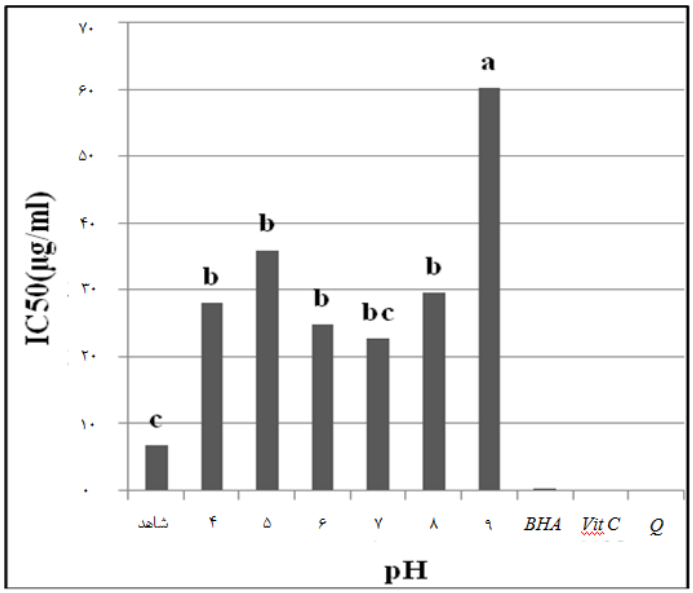
**جدول ۱- مقایسه میانگین‌های فنول و فلاونوئید جلبک کلادوفورا گلومراتا تحت سطوح مختلف تنشpH**

| عامل آزمایشی | فنول mg GAE/g extrac | فلاونوئید mg QE /g extrac |
|---|---|---|
| شاهد | ۱۱۱۸/۶۷± ۲۵/۳۲ | ۲۴۴/۶۵± ۱۸/۰۸ |
| pH=۴ | ۱۵۹۳/۵۲± ۲۷/۴۰ | ۹۲۸/۹۴± ۵۵/۱۱ |
| pH=۵ | ۱۸۷۳/۶۲±۲۱/۳۷ | ۱۱۰۶/۵۴±۲۵/۹۷ |
| pH=۶ | ۱۸۱۲/۴۵± ۲۹/۹۵ | ۹۷۰/۹۶± ۴۴/۸۷ |
| pH=۷ | ۱۵۷۲/۷۲±۲۶/۹۹ | ۹۱۰/۰۹±۳۱/۲۶ |
| pH=۸ | ۱۷۱۶/۰۷±۲۹/۱۳ | ۸۱۳/ ۶۳±۹۱/۰۳ |
| pH=۹ | ۸۹۸/۳۹ ± ۲۲/۳۷ | ۷۳۹/۵۰±۵۳/۹۳ |
| LSD(٪۵) | ۳۵/۰۰۳±۳۴۸/۰۲ | ۷۳/۳۳±۲۶۶/۷۸ |

**جدول ۲- مقایسه میانگین¬های IC50 جلبک کلادوفورا گلومراتا تحت سطوح مختلف تنش pH**

| نمونه | $IC_{50}$(میکروگرم بر میکرولیتر) |
|---|---|
| شاهد | ۶/۸۵±۰/۰۰۵ |
| pH=۴ | ۲۸/۰۷±۰/۰۱۰ |
| pH=۵ | ۳۵/۹۷±۰/۰۱۰ |
| pH=۶ | ۲۴/۹±۰/۰۰۱ |
| pH=۷ | ۲۲/۷۸±۰/۰۰۳ |

| | |
|---|---|
| pH=۸ | ۲۹/۶۲±۰/۰۰۷ |
| pH=۹ | ۶۰/۲۷±۰/۰۲۰ |
| بوتیل هیدروکسی انیزول | ۰/۳۳۶۹±۰/۰۰۰۴ |
| آسکوربیک اسید | ۰/۰۰۲۳±۰/۰۰۰۲ |
| کوئرستین | ۰/۰۰۳۹±۰/۰۰۱۴ |

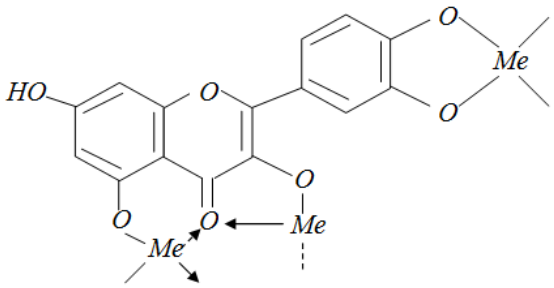



**شکل ۳- مقایسه میزان فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره هیدروالکلی کلادوفورا تحت تنش درآزمایش تخریب رادیکال های DPPH**

(در هر ستون میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند بر اساس آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.)

## بحث و نتیجه گیری

در گیاهان میزان فنول و فلاونوئید تام و خواص آنتی اکسیدانی بستگی به پارامترهای زیادی از جمله به آب، هوا، شرایط خاک، ارتفاع و غیره دارد (۱۷). به طور مثال سمیت با فلز سنگین نیکل در گندم منجر به القا ترکیبات فنولی در آن شد (۱۸). در گیاهان آبزی از جمله جلبک ها نیز شرایط محیط زیست از قبیل دما، pH، شوری و غیره بر فرایند متابولیکی آنها تاثیر می گذارد. در بررسی که بر روی دو جلبک در دریای بالتیک انجام گرفت نشان داد که جلبک ها با روش های مختلف در برابر استرس های محیطی از خود محافظت می کنند. پایین بودن پراکسیداسیون لیپیدی در جلبک تحت استرس اکسیداتیو به علت اثرات حفاظتی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی غیر آنزیمی (ترکیبات با وزن مولکولی کم) می‌باشد که از جمله انها می توان به افزایش متابولیت های ثانویه مانند ترکیبات فنولی اشاره نمود (۱۹). یکی از اعمال ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی تشکیل کمپلکس با فلزات است (۲۰)، که این موضوع در این بررسی به خوبی مشاهده شد.




**شکل۴- نحوه اتصال فلزات به فلاونوئید**

در این بررسی ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در نمونه ۷ pH=۷ وجود فلز سنگین) نیز تفاوت معنی داری را با نمونه شاهد (pH=۷) نشان داد که این باز در تایید مطالعات قبلی مبنی بر افزایش میزان فنول و فلاونوئید برای تشکیل کمپلکس با فلزات سنگین می‌باشد. مطالعات بلینکز بر روی بسیاری از جلبک های قرمز، قهوه‌ای و سبز بیان می‌کند که در pH های بالا نفوذ یون $HCO_3^-$ به آسانی به سلول‌ها مقدور نمی‌باشد و از این رو کاهش فتوسنتز رخ می‌دهد (۲۱). کمبود کربن در اثر pH بالا و در نتیجه کاهش ورود $HCO_3^-$، افزایش انواع ROS را به دنبال دارد. به این ترتیب که هنگامی که $CO_2$ موجود در داخل یک سلول فتوسنتزی محدود شود فعالیت های چرخه کلوین کاهش می یابد اما فتوسیستم ۲ فعال باقی می ماند. که این منجر به یک انرژی تحریکی بیشتر در فتوسیستم شده و الکترون های انباشته شده در زنجیره انتقال الکترون به اکسیژن رسیده و این منجر به تولید رادیکال های آزاد می شود. غیر فعال شدن رادیکال های آزاد در مرکز زنجیره فتوشیمیایی سر اغاز واکنش های فتوشیمیایی در فتوسیستم ۲ می شود که این به صورت استرس اکسیداتیو بروز می کند و موجب افزایش در مقادیر فنول و فلاونوئید می شود که نتایج حاصل از این مطالعه این امر را تایید می کند. در مورد pH پایین جلبک با افزایش ورود $CO_2$ نسبت فتوسنتز به تنفس در گیاه به هم می ریزد و این خود دوباره باعث استرس اکسیداتیو گیاه می شود (۲۲ و ۲۳). نتایج این بررسی به خوبی این مساله را نشان داده است.

در بررسی دیگری بر روی جلبک‌های قرمز مشخص شد که با افزایش pH محیط، مقدار $H_2O_2$ در جلبک افزایش می-یابد و به دنبال این آسیب اکسیداتیو، آنتی‌اکسیدان‌ها افزایش می یابد (۲۴). در شکل ۳ نمونه pH=۹ به دلیل کاهش قابل توجه کربن در اثر قلیایی شدن مقدار به دام اندازی رادیکال آزاد حتی با سایر نمونه‌ها نیز تفاوت معنی‌داری را به نمایش می-گذارد. ولی بین نمونه شاهد و نمونه pH=۷ تفاوت معنی داری مشاهده نمی‌گردد. در توجیه این امر می‌توان این گونه بیان نمود که احتمالا مقدار فلز سنگین هنوز به مقدار تنش زا برای جلبک نرسیده است. از نکات مورد توجه در این مطالعه می توان به بالا بودن مقادیر فنول و فلاونوئید دراین جلبک به طور طبیعی (نمونه شاهد) اشاره نمود که این موضوع می تواند در صنایع غذایی و دارویی مورد توجه قرار گیرد. از سوی دیگر با افزودن فلز سنگین به محیط، مقادیر فنول و فلاونوئید (مقایسه نمونه شاهد و نمونه ۷) بالا رفت. این احتمال وجود دارد که جلبک با افزایش مقادیر فنول و فلاونوئید با سمیت فلز سنگین مقابله می کند و احتمال یک جاذب مناسب را مطرح می‌کند. در پساب های آلوده به فلز نیکل کارخانه ها این مطلب اهمیت پیدا می کند و این موضوع نیازمند مطالعات کاملتری می‌باشد. همچنین با افزایش pH مقادیر فنول و فلاونوئید نمونه ها نسبت به نمونه شاهد افزایش می‌یابد که این موضوع برای مقاصد صنعتی حایز اهمیت می‌باشد.

## منابع

1. Kupper, F.C., Kolareg, B., Guern, J. and Potin, P. (2001). Oligoguluronates elicit an oxidative burst in the brown algal

9. Bovicelli, P. (2007). Radical-scavenging polyphenols: new strategies for their synthesis. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 59: 1703-1710.
10. Pokorny, J. and Schmidt, S. (2001). Antioxidant in food, Practical application, America, Woodhead publishing Ltd and CRC Press LLC.
11. Soltani, S., Saadatmand, S., Khavarinejad, R. and Najadsattari, T. (2011). Antioxidant and antibacterial activities of *Cladophora glomerata* (L.) Kütz. in Caspian Sea Coast, Iran. *African Journal of Biotechnology*, 10(39): 7684-7689.
12. Volka, R. B. and Furkert, F. H. (2006). Antialgal, antibacterial and antifungal activity of two metabolites produced and excreted by cyanobacteria during growth. *Microbiological Research*, 161: 180-186.
13. Fukumoto, L. and Mazza, G. (2000). Asessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 3597-3604.
14. Jia, Z., Tang, M. and Wu, J. (1999). The determination of flavonoids content in mulberry and their scavenging effect on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64: 555-599.
15. Yamaguchi, T., Takamura, H., Matoba, T. and Terao, Y. (1998). HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of food by using 1, 1-diphenil,-2-picrylhydrazil. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 62: 1201-1204.
16. Junior, M. R. M., Rochae Silva, T. A., Franchi, C. G., Noeill, A., Pastorea, G. M. and Hyslopc, S. (2009). Antioxidant potential of aroma compounds obtained by limonene biotransformation of kelp *Laminaria digitata*. *Plant Physiology*, 125: 278– 291.
2. Michalak, A. (2006). Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15: 523-530.
3. Sarkar, S., Satheshkumar, A., Jayanthi, R. and Premkumar, R. (2010). Biosorption of nickel by live biomass of *Trichoderma harzianum. Research Journal of Agricultural Sciences*, 1(2): 69-74.
4. Ibrahim, M. B. and Jimoh, W. L. O. (2011). Bioremediation of Ni (II) and from aqueous solution. *Indian Journal of Science and Technology*, 4: 487-491.
5. Samir, D., Keechrid, Z. and Djabar, M. R. (2012). Combined protective effect of zinc and vitamin C on nickel-induced oxidative liver injury in rats. *Annals of Biological Research*, 3(7): 3410-3418.
6. Choo, K. S., Snoeijs, P. and Pedersn, M. (2004). Oxidative stress tolerance in the filamentous green algae *Cladophora glomerata* and *Enteromorpha ahlneriana*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 298: 111-123.
7. Mathew, S. and Abraham, T. E. (2006). In vitro antioxidant activity and scavenging effects of *Cinnamomum verum* leaf extract assayed by different methodologies. *Food and Chemical Toxicology*, 44: 198-206.
8. Alam, M. S., Kaur Jabbar, Z., Javed, K. and Athar, M. (2007). *Eruca sativa* seeds possess antioxidant activity and exert a protective effect on mercuric chloride induced renal toxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 45(6): 910-920.

orange essential oil. *Food Chemistry*, 116: 8-12.

17. David, R. and Zbigniew, A. (2010). Aqueous extract of *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) inflorescences suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW 264.7 murine macrophages. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(3): 225-234.
18. Diaz, j., Bernal, A., Pomar, F. and Merino, F. (2001). Induction of shikimate dehydrogenase and peroxidase in pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings in response to copper stress and its relation to lignifications. *Plant Science*, 161: 179-188.
19. Stanisavljevic, N., Savic, J., Jovanovic, Z., Miljus-Djukic, J., Radovic, S., Vinterhalter, D. and Vinterhalter, B. (2012). Antioxidative-related enzyme activity in *Alyssum markgrafii* shoot cultures as affected by nickel level. *Acta Physiol Plant*, 34(5):1997–2006.
20. Jung, Ch., Maeder, V., Funk, F., Frey, B., Sticher, H. and Frosserd, E. (2003). Release of phenols from *Lupinus albus* L. roots exposed to Cu and their possible role in Cu detoxification. *Plant Soil*, 252: 301-312.
21. Blinks, L. R. (1963). The effect of pH upon the photosynthesis of littoral marine algae. *Journal Protoplasma*, 57: 126-136.
22. Moss, B. (1973). The influence of environmental factors on the distribution of freshwater algae: an experimental study: II. The role of pH and the carbon dioxide-bicarbonate system. *The Journal of Ecology*, 61: 157-177.
23. Han, J. W., Yoon, M., Kupper, F. D., Klochkova, T. A., Oh, J. S., Rho, J. R. and Kim, G. H. (2012). Accumulation of galloyl derivatives in a green alga, *Spyrogyra varinas*, in response to cold stress. *Journal of Applied Phycology*, 24: 1279-1286.
24. Mtolera, M. S. P., Collen, J., Pedersen, M. and Semesi, A. K. (2012). Destructive hydrogen peroxide production in *Eucheuma denticulatum* (Rhodophyta) during stress caused by elevated pH, high light intensities and competition with other species. *European Journal of Phycology*, 30(4): 289-297.