Journal of Plant Environmental Physiology
ISSN: 7671-2423 (Print), 2783-4689 (Online) http://ecophysiologi.gorganiau.ac.ir

Doi: 10.30495/iper.2021.679548;
Dor: 20.1001.1.24237671.1401.17.65.5.8

Islamic Azad University
Gorgan Branch

# Effect of Pretilachlor on some physiological properties of *Chlorella vulgaris*

**Hamid Salehian[1*], Mahdie Shakery[1], Maryam Salehian[2]**

[1]Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture and Natural Resources, Islamic Azad University, Qaemshahr Branch, Qaemshahr, Iran, Email: hamisalehian@gmail.com
[2]Department of Operating Room, Nursing and Midwifery Care Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

Serial 65, 17th year, Number 1, Spring 2022 (141-153)

**Article type:**
Research Full Paper

**Article history**
Received: 2020/09/28
Revised: 2020/11/07
Accepted: 2021/01/12

**Keywords**
Chlorella
Chlorophyll
Enzymatic activity
Pretilachlor

## Abstract

Micro algae have a major role in food chains and aquatic ecosystems. Among the monocellular algae in the paddy fields found in Mazandaran, *Chlorella vulgaris* is an important species in Chlorophyta phylum. Influence of herbicides as the most serious pesticides on the algae is very considerable. Therefore, this study was performed in order to determine the effects of Pertilachlor on some properties of *Chlorella vulgaris.* Nine treatments (0, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, and 300 mg herbicide per 1 liter) were prepared in one-liter bottles to which 100 cc algae solution and stock culture was added before the system was aerated. Treatments were investigated with three replications during 24, 48, 72, and 96 hours. After treating, the effects of Pretilachlor on the growth, chlorophyll a concentration, and the activity of catalase, peroxidase, ascorbate peroxidase, and polyphenol oxidase enzymes and also lipid peroxidation were examined. Increasing the concentration of herbicide at all application times resulted in significant reductions in cellular density ($p<0.0001$). Maximum and minimum cellular densities were measured in the control (without herbicide) and 300 mg Pretilachlor treatment, respectively. The lowest Chl a concentration was observed in the highest dose of the herbicide. Long term analysis of the activity rate of the four enzymes (9 days) indicated a significant loss with increasing herbicide dose. Also lipid peroxidation was more in all treatments as compared to the control. The study showed that enzymes activity under high concentrations of Pretilachlor was not enough to prevent the activity of reactive oxygen species and the very material enzymes were affected by the herbicide.

Please cite this article as Hamid Salehian, Mahdie Shakery, Maryam Salehian. 2022. Effect of Pretilachlor on some physiological properties of Chlorella vulgaris. *Journal of Plant Environmental Physiology*. 65(1): 141-153.

© 2022. All Rights Reserved

نشریه فیزیولوژی محیطی گیاهی

http://ecophysiologi.gorganiau.ac.ir شاپا: (چاپی) ۲۴۲۳-۷۶۷۱ (آنلاین) ۴۶۸۹-۲۷۸۳،

Doi: 10.30495/iper.2021.679548;
Dor: 20.1001.1.24237671.1401.17.65.5.8

دانشگاه آزاد اسلامی
واحد گرگان

# تاثیر علف‌کش پرتیلاکلر بر برخی از خصوصیات فیزیولوژیک جلبک سبز کلرلا (*Chlorella vulgaris*)

**حمید صالحیان[1*]، مهدیه شاکری[1]، مریم صالحیان[2]**

[1]گروه زراعت، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد قائمشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائمشهر، ایران، رایانامه:hamisalehian@gmail.com

[2]گروه اتاق عمل، مرکز تحقیقات مراقبت پرستاری و مامایی، دانشگاه علوم پزشکی، مشهد، ایران

**سال هفدهم، شماره ٦٥، بهار ١٤٠١ / صفحات: ١٥٣-١٤١**

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی-پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۷/۰۷
تاریخ ویرایش:۱۳۹۹/۰۸/۱۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۲۳

***واژه‌های کلیدی:***
پرتیلاکلر
فعالیت آنزیمی
کلرلا
کلروفیل

## چکیده

ریزجلبک‌ها نقش اساسی در زنجیره‌های غذایی اکوسیستم‌های آبی به عهده دارند. از میان انواع جلبک‌های تک سلولی گزارش شده در آب‌های شالیزارهای استان مازندران، جلبک *Chlorella vulgaris* از گونه‌های مهم شاخه جلبک سبز به حساب می‌آید. تاثیر علف‌کش‌ها به‌عنوان مهمترین بخش آفت‌کش‌ها بر روی جلبک‌ها بسیار برجسته و قابل تأمل است. از این روی این تحقیق به منظور بررسی تاثیر علف‌کش پرتیلاکلر بر برخی از خصوصیات فیزیولوژیک جلبک کلرلا انجام شد. جهت بررسی اثرات علف‌کش پرتیلاکلر بر جلبک کلرلا ۹ تیمار آزمایشی (مقادیر ۰، ۲۰، ۳۰، ٤٠، ٥٠، ٧٥، ١٠٠، ١٥٠ و ٣٠٠ میلی‌گرم علف‌کش در لیتر) در بطری‌های یک لیتری تهیه و با افزایش ۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول جلبک پس از فراهم سازی و کشت استوک، هوادهی شدند. تیمارها با سه تکرار در طی ٢٤، ٤٨، ٧٢ و ٩٦ ساعت مورد بررسی قرار گرفتند. بعد از تیماردهی اثر علف‌کش بر رشد، غلظت کلروفیل a ، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز، پلی‌فنول‌اکسیداز و میزان پراکسیداسیون لیپیدی بررسی گردید. افزایش غلظت علف‌کش در همه زمان‌ها موجب کاهش معنی‌دار در تراکم سلولی جلبک گشت. بیشترین تراکم سلولی در شاهد (بدون علف‌کش) و کمترین میزان تراکم سلولی در غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم پرتیلاکلر در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر محلول به دست آمد. کمترین میزان کلروفیل a نیز در بیشترین مقادیر غلظت علف‌کش اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان چهارگانه در بلند مدت (بعد از ۹ روز) حاکی از افت معنی‌دار آنها توام با افزایش غلظت علف‌کش بود. همچنین میزان پراکسیدان لیپیدی در تیمارها نسبت به شاهد بیشتر بود. آزمایش حاضر نشان داد که فعالیت آنزیم‌های مورد نظر در مقادیر زیاد پرتیلاکلر به اندازه‌ای نبوده که مانع فعالیت گونه‌های فعال اکسیژن گشته و خود آنها به علت غلظت زیاد علف‌کش مورد هدف قرار گرفته‌اند.

**استناد:** حمید صالحیان، مهدیه شاکری، مریم صالحیان. (١٤٠١). تاثیر علف‌کش پرتیلا کلر بر برخی از خصوصیات فیزیولوژیک جلبک سبز کلرلا (*Chlorella vulgaris*). *نشریه فیزیولوژی محیطی گیاهی*، ٦٥ (١)، ١٥٣-١٤١.

**مقدمه**

ارزیابی‌ها نشان می‌دهد که حداکثر یک درصد آفت‌کش‌های مصرفی، صرف از بین بردن آفات شده و در نتیجه مقادیر قابل توجهی از آن‌ها وارد محیط زیست شده و منابع آبی و خاکی را آلوده می‌سازند (Clay, 1995). اگر چه تمامی بوم سامانه‌ها در برابر اثرات سمیت آفت‌کشها حساس‌اند، اما این حساسیت در بوم سامانه‌های آبی به مراتب بیشتر است. هنگامی که محیط‌های آبی به طرق مختلف آلوده می‌شوند، اثرات زیان‌بار این آلودگی‌ها پایه‌های اصلی در زنجیره غذایی یعنی فیتوپلانکتون‌ها و زئوپلانکتون‌ها را مورد تهدید جدی قرار می‌دهند (Pashaie et al., 2012). از حساس‌ترین موجودات غیر هدف به علف‌کش‌ها می‌توان به گیاهان و جلبک‌های آبزی اشاره کرد. موجودات اخیر نقش مهمی در اکوسیستم‌های آبی ایفا می‌کنند. گیاهان آبزی ضمن کمک به پایداری رسوبات در دریاچه‌ها و آب‌های جاری، بر جذب عناصر و چرخه آنها (Bonanno, 2012) و همچنین زندگی میکروارگانیسم‌ها موثر هستند (Matamoros et al.,2012).

علف‌کش‌ها باعث اختلال در تقسیم سلولی، تمایز بافت‌ها، و مرگ سلول و بافت می‌شوند (Mahdinezhad, 2005). از آنجایی که بیشتر جلبک‌های پلانکتونی از طریق تقسیم سلولی تکثیر می‌شوند (Rahimi, 2000)، بنابراین تاثیر این سموم بر روی جلبکها برجسته و قابل تأمل است. گزارشات حاکی از سمی بودن علف‌کش‌های ماچتی[1]، ساترن[2] و تاپ‌استار[3] بر جلبک سبز آب‌های شیرین *Scenedesmus*. spp (Ershad Langroody, 1999; Mahdinezhad et al., 2011) می‌باشد. از میان انواع جلبک‌های تک سلولی گزارش شده در آب‌های منطقه شالیزارهای استان مازندران، جلبک *Chlorella vulgaris* از گونه‌های مهم شاخه جلبک سبز (Chlorophyta) شناخته می‌شود (Fallahi et al., 2001). از جلبک کلرلا به‌عنوان ماده مناسبی در تحقیقات مرتبط با فتوسنتز، تنفس و سنتز کلروفیل استفاده می‌گردد (Czaplicka-Kotas and Lodowska, 2014).

پرتیلاکلر علف‌کشی سیستمیک متعلق به کلرواستامیدها است (Jiang et al., 2016). از آنجائی‌که این علف‌کش‌ها باعث اختلالات سلولی از طریق جلوگیری از سنتز اسیدهای چرب در جلبک‌ها شده مستقیما موجب صدمه به زنجیره غذایی در اکوسیستم‌های خاکی و آبی گشته و برای موجودات غیر هدفی چون جانوران و ریز جلبک‌ها سمی به حساب می‌آیند (Pandey et al., Livingston, 2005; 2005). اکسادیارژیل از علف‌کش‌های رایج در شالیکاری است که علاوه بر کاهش کلروفیل، غشا سلولی گیاه را متلاشی می‌سازد (Mahdinezhad et al., 2011). علف‌کش 2,4-D نیز در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر رشد جلبک *Scenedesmus quadricauda* را کاملاً متوقف کرده است (Wong 2000).

وجود فعالیت‌های کشاورزی در استان مازندران نقش مهمی در آلودگی منابع آب سطحی داشته و عامل اصلی آلودگی زه‌آب‌ها، رواناب اراضی زراعی و به خصوص شالیزارهای حاشیه رودخانه می‌باشد (Shayeghi et al., 2001). از آنجایی که جلبک کلرلا از نظر اقتصادی در تولید مواد پروتئینی اهمیت زیادی داشته (Fallahi and Makhdomi et al., 2001; Salavatian, 2006) و موجب افزایش اکسیژن و تصفیه آب‌های آلوده و فاضلاب‌ها می‌شود

1. Machete
2. Saturn
3. Topstar

(Rafie et al., 2012; Malakootian et al., 2017)، این تحقیق به منظور بررسی تاثیر علف‌کش پرتیلاکلر بر برخی از خصوصیات فیزیولوژیک جلبک کلرلا انجام شد.

## مواد و روش‌ها

بررسی حاضر در سال ۱۳۹۶ با تهیه جلبک سبز *Chlorella vulgaris* از مرکز تحقیقات اکولوژی دریای خزر انجام گردید. در این آزمایش تعداد ۲۷ عدد ارلن مایر ۱/۵ لیتری تهیه و پس از ضد عفونی به آن‌ها یک لیتر آب شیر که از فیلتر مخصوص (۰/٤ میکرونی) عبور داده شده بود اضافه شد. سپس علف‌کش پرتیلاکلر (Pretilachlor) (با نام تجاری ریفیت ۵۰ درصد امولسیون) را که به مقدار ۱/۵ لیتر در هکتار در مزارع شالیکاری استفاده می‌شود، در مقادیر ۰، ۲۰، ۳۰، ٤۰، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر بر اساس روش (Ma, 2002) در زیر دستگاه هود با استفاده از سمپلر به ترتیب در داخل بطری‌ها تزریق شد. این آزمایش دارای ۹ تیمار (همراه با شاهد) و هر کدام شامل سه تکرار بود.

به منظور انجام کشت انبوه ابتدا استوک خالص جلبک که حاوی ۵۰ میلی‌لیتر جلبک کلرلا بود، در ۵۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت[1] استریل شده قرار داده شد. انتقال جلبک‌ها در فاز رشد سریع انجام گردید. بعد از گذشت ۵ روز از آغاز کشت، این حجم به حدود دو برابر یعنی ۱۰۰۰ میلی‌لیتر افزایش داده شد. هرکدام از بطری‌ها حاوی یک لیتر محیط کشت، حجم مورد نظر از علف‌کش و ۱۰۰ میلی‌لیتر جلبک خالص کلرلا بود. عمل انتقال جلبک به بطری‌های حاوی محیط کشت استریل شده تماما در کنار شعله انجام گردید. سپس پیپت استریل شده داخل بطری‌ها قرار گرفته و لوله هوا به آنها متصل شد. اتاق کشت کاملا استریل و با شدت نوری ۳۵۰۰±۳۵۰ میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه، دوره روشنایی (L) و تاریکی (D) توسط پریز اتوماتیک (تایمردار) به‌صورت تناوب (۱۲/۱۲) (L/D) ساعت تنظیم گردید. هوادهی محیط کشت با استفاده از دستگاه پمپ آکواریوم مرکزی به وسیله چند رابط به هم متصل انجام شد، به‌طوری‌که با ایجاد تلاطم مواد مغذی مورد نیاز در اختیار استوک قرار گیرد و از رسوب جلوگیری شود. بعد از بستن درب بطری‌ها، برای جلوگیری از آلودگی، کاملا با پارافیلم پوشانده شدند (Ferreira et al., 2009).

نمونه‌هایی نیز پس از ۹٦ ساعت، از تیمارها برداشته شده و رشد آن‌ها به روش کدورت سنجی از طریق دستگاه اسپکتروفوتومتر[2] انجام گرفت. به‌طور کلی تعداد سلول‌ها با میزان جذب در طی ۹٦ ساعت همبستگی دارد (Kasae et al., 2012). مناسب‌ترین طول موج برای ارزیابی میزان رشد ٦۸۰ نانومتر است. بنابراین رشد سلول‌های جلبک به‌طور غیرمستقیم از طریق طیف سنجی صورت می‌گیرد.

**نحوه سنجش کلروفیل:** بدین‌منظور ۰/۰۵ گرم جلبک در ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد ساییده و محلول حاصل با کاغذ واتمن شماره یک صاف می‌گردد و حجم نهایی را به ۲۰ میلی‌لیتر رسانده و جذب محلول را در طول موج‌های ٦٤٦ و ٦٦۳ نانومتر با اسپکتروفتومتر اندازه گرفته و با استفاده از فرمول مشروحه ذیل غلظت کلروفیل a محاسبه می‌گردد (Lichtenthaler and Wellburn, 1985):

$$\text{Chl a } (mg.ml^{-1}) = 12.25A_{663} - 2.79A_{646}$$

**تهیه عصاره آنزیمی:** به ۰/۵ گرم بافت جلبک در درون لوله اپندورف نیتروژن مایع اضافه و سائیده شد. سپس ۵۰۰ میکرو لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار و pH=۷ به آن اضافه و به مدت نیم ساعت

۱- محیط کشت TMRL

۲- مدل Cambridge-WPA

در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد با تکان‌های ملایم استخراج شد. ترکیب حاصل در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و از محلول شفاف رویی برای انجام آزمایش‌های بیوشیمیائی استفاده گردید (Lowry et al., 1951).

**فعالیت کاتالاز:** مقدار ۲۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی به همراه ٤۰۰ میکرولیتر از محلول بافر فسفات پتاسیم ۲۵ میلی‌مولار و ۳۰۰ میکرولیتر $H_2O_2$ مخلوط و در طول موج ۲٤۰ نانومتر سرعت حذف $H_2O_2$ به‌مدت ۲ دقیقه اندازه‌گیری شد (لازم به ذکر است قبلا میزان جذب $H_2O_2$ در بافر فسفات ۰/٤ تنظیم گردید که نقطه شروع برای اندازه‌گیری کینتیک سرعت بود). در این آزمایش ۲ میلی‌لیتر از بافرحاوی $H_2O_2$ فاقد عصاره آنزیمی به‌عنوان نمونه شاهد به منظور صفر کردن دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد. میزان فعالیت آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی $٤/۳۹\ m\ M^{-1}\ cm^{-1}$ با استفاده از روش زیر بر اساس سرعت مصرف هیدروژن پراکسید در دقیقه محاسبه گردید. فعالیت آنزیم کاتالاز مساوی است با اختلاف جذب تقسیم بر عدد ۳۹/۵ ضربدر عدد صد (Pereira et al., 2002).

**فعالیت پراکسیداز:** برای سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز از ۲ میلی لیتر بافر تریس ۱۰۰ میلی‌مولار و ۲۰۰ میکرولیتر پیروگالل ۱۰ میلی‌مولار که در حمام یخ با هم مخلوط شدند، استفاده گردید. سپس به آنها ۵۰ میکرو لیتر عصاره آنزیمی اضافه و منحنی تغییرات جذب در طول موج ٤۲۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد. فعالیت آنزیمی بر حسب تغییرات در دقیقه به ازای هر گرم وزن تر جلبک محاسبه گردید (Kar and Mishra, 1976).

**فعالیت پلی‌فنل اکسیداز:** برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز از روش Nicoli و همکاران (1991) استفاده شد. در این روش پیروگالل پیش ماده آنزیم بود. در این واکنش مخلوط شامل ۲/۵ میلی‌لیتر بافر پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷)، ۲۰۰ میکرولیتر پیروگالل ۰/۲ مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. جذب نمونه‌ها در طول موج ٤۲۰ نانومتر و پس از سه دقیقه خوانده شد.

**فعالیت آسکوربات پراکسیداز:** فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز با بررسی میزان پراکسیداسیون آسکوربات با افزایش جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر انجام شد. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷) اسید آسکوربیک ۰/۵ میلی‌مولار، پراکسید هیدروژن ۱/۲ میلی‌مولار و EDTA ، ۰/۱ میلی‌مولار بود. واکنش با افزودن ۲۰۰ میکرو مولار عصاره آنزیمی در حجم نهایی سه میلی‌لیتر آغاز گردید. با اضافه کردن پراکسید هیدروژن فعالیت آنزیمی شروع شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۲٤۰ نانومتر و پس از یک دقیقه خوانده شد (Nakano and Asada, 1981).

**میزان پراکسیداسیون لیپیدی:** میزان پراکسیداسیون لیپید از روش اصلاح شده Heath و Packer (1968) انجام شد. در این روش سنجش مالون‌دی‌آلدئید به‌عنوان شاخص پراکسیداسیون در نظر گرفته شده است. مراحل اندازه‌گیری میزان مالون‌دی‌آلدئید به ترتیب زیر انجام شد. نیم گرم از بافت جلبک با یک میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۰/۱ درصد در هاون چینی سائیده شد و عصاره به دست آمده به مدت ۳۰ دقیقه در سانتریفوژ با سرعت ٤۰۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت. به یک میلی‌لیتر از محلول شفاف رویی، یک میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک‌اسید ۲۰ درصد حاوی تیوباربیتوریک اسید ۰/۵ در صد افزوده شد. مخلوط به دست آمده به‌مدت ۳۰ دقیقه در حرارت ۱۰۰ درجه سانتی گراد در حمام آب گرم قرار داده شد و بلافاصله لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در یخ خرد شده قرار گرفت

و بعد سانتریفوژ شد. سپس جذب محلول در طول موج ۵۳۲ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. از آنجایی که بعضی از ترکیبات، به عنوان ترکیبات مزاحم در طول موج ۵۳۲ نانومتر جذب دارند، جذب محلول در طول موج ۶۰۰ نانومتر نیز خوانده و از جذب خوانده شده در طول موج ۵۳۲ نانومتر کم شد. از محلول تری کلرواستیک اسید ۲۰ درصد حاوی تیوباربیتوریک اسید ۰/۵ درصد برای صفر کردن دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۲ نانومتر استفاده شد. غلظت کمپلکس تیوباربیتوریک-مالون‌دی‌آلدئید با استفاده از ضریب خاموشی $\varepsilon = 155\ cm^{-1}\ m\ mo$ و فرمول زیر محاسبه شد:

$$A = \varepsilon\ b\ c$$

در این فرمول A جذب خوانده شده، ε ضریب خاموشی، b عرض کووت (یک سانتی‌متر)، c غلظت کمپلکس مالون دی‌آلدئید می‌باشد.

تجزیه داده‌ها از طریق آزمون واریانس یکطرفه و ارزیابی احتمال معنی‌دار بودن میانگین آنها با آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($p<۰/۰۵$) تعیین گردید. کلیهٔ آنالیزها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (version 9.1) و رسم نمودارها با استفاده از برنامهٔ Excel انجام شد.

## نتایج

تجزیه واریانس تاثیر غلظت‌های مختلف علف‌کش پرتیلاکلر بر تراکم جلبک کلرلا نشان داد که اثر غلظت علف‌کش در ۹۶ ساعت پس از شروع آزمایش بسیار معنی‌دار است (جدول ۱). نتایج غلظت‌های مختلف علف‌کش (۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت) بر تراکم جلبک کلرلا نیز بعد از چهار روز در (شکل ۱) آورده شده است. بیشترین تراکم سلولی در شاهد (بدون علف‌کش) و کمترین میزان تراکم سلولی در غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم پرتیلاکلر در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر محلول به دست آمد.

**جدول ۱:** تجزیه واریانس تراکم جلبک کلرلا در غلظت‌های متفاوت علف کش پرتیلاکلر در ۹۶ ساعت پس از نمونه‌برداری.

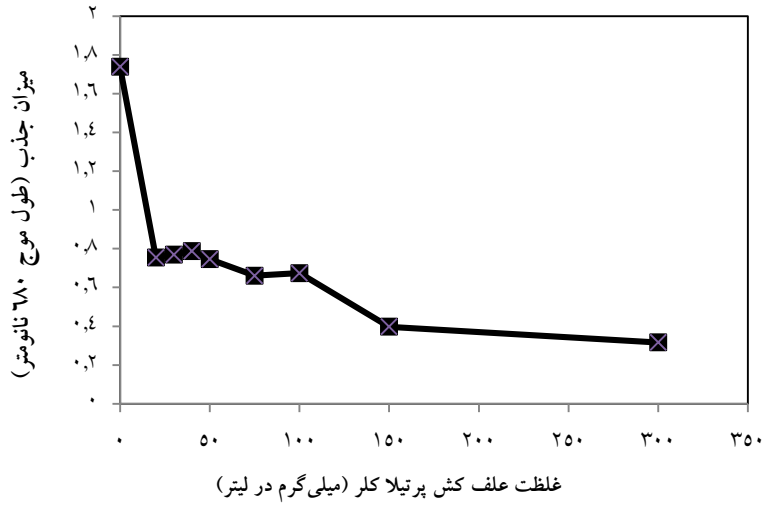
| منبع تغییر | درجه آزادی | میانگین مربعات |
|---|---|---|
| غلظت علف‌کش | ۸ | ۰/۴۹۰۲*** |
| اشتباه | ۱۸ | ۰/۰۰۳۷ |
| ضریب تغییرات (درصد) | | ۸/۰۱ |

***معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۱ درصد

**جدول ۲:** تجزیه واریانس مقدار کلروفیل a در غلظت‌های مختلف علف‌کش پرتیلاکلر در نه روز پس از نمونه‌برداری.

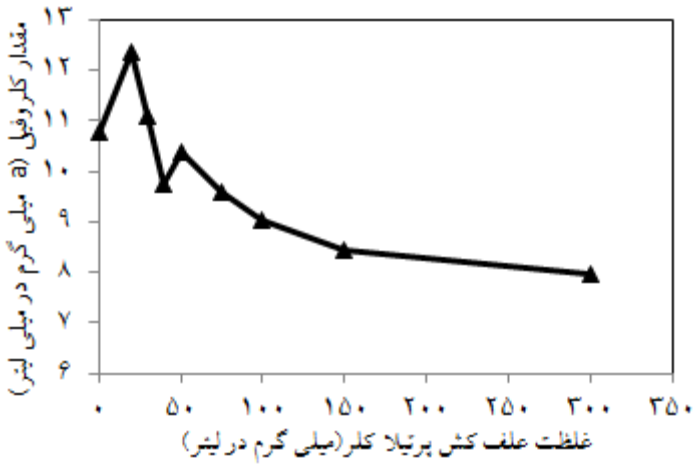
| منبع تغییر | درجه آزادی | میانگین مربعات |
|---|---|---|
| غلظت علف‌کش | ۸ | ۵/۶۵۲۴*** |
| اشتباه | ۱۸ | ۰/۶۳۰۳ |
| ضریب تغییرات(درصد) | | ۷/۹۹ |

*** معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۱ درصد




**شکل ۱:** اثر غلظت‌های مختلف پرتیلاکلر (میلی‌گرم در هزار میلی‌گرم محیط کشت) بر رشد نمونه‌های *Chlorella vulgaris* بعد از چهار روز.

آنالیز واریانس مقدار کلروفیل a در نه روز پس از نمونه برداری نشان داد که تاثیر غلظت علف‌کش معنی‌دار است (جدول ۲). منحنی نمایش تاثیر غلظت‌های مختلف علف‌کش بر میزان کلروفیل a پس از نه روز در شکل ۲ آمده است. کمترین میزان کلروفیل a در بیشترین مقادیر غلظت علف‌کش بدست آمد.




**شکل ۲:** اثر غلظت‌های مختلف پرتیلاکلر (میلی‌گرم در هزار میلی‌لیتر محیط کشت) بر میزان کلروفیل a در روز نهم.

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در بلند مدت (بعد از ۹ روز) مورد سنجش قرار گرفت. برای مشخص شدن فعالیت آنتی اکسیدانی، چهار آنزیم مختلف مورد بررسی عبارت بودند از کاتالاز، پراکسیداز، پلی‌فنل‌اکسیداز و آسکوربات پراکسیداز. تجزیه واریانس مقدار آنزیم‌های چهارگانه در غلظت‌های مختلف علف‌کش پرتیلاکلر در جلبک کلرلا حاکی از تفاوت بسیار معنی‌دار مقدار آنزیم‌ها

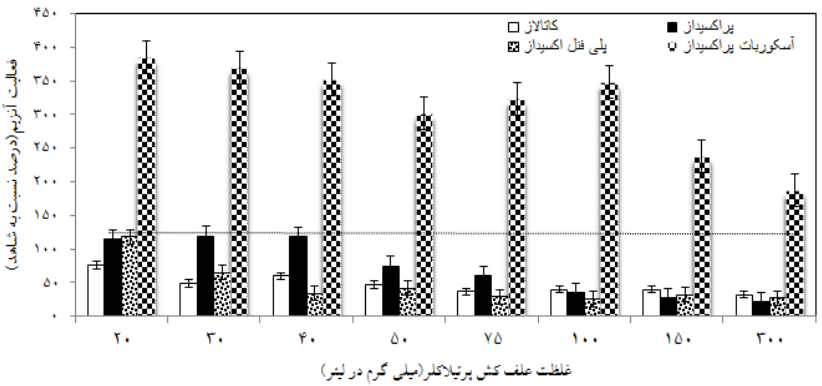
بود (جدول ۳). بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار شاهد و کمترین مقدار علف‌کش (۲۰ میلی‌گرم پرتیلاکلر در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت) بدست آمد. بطورکلی با افزایش مقدار علف‌کش از فعالیت این آنزیم کاسته شد. بطوری‌که مقدار نهایی علف‌کش (۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر) از کمترین مقدار فعالیت آنزیم کاتالاز برخوردار بود (شکل ۳).

حداکثر مقدار آنزیم پراکسیداز در سه سطح اول میزان علف‌کش (۳۰، ٤٠ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر) بدست آمد و این مقادیر با اندازه آنزیم در تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ۳). با افزایش فراهمی علف‌کش کمترین مقدار فعالیت آنزیم در بیشترین تیمار پرتیلاکلر (۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر) دیده شد.

**جدول ۳:** تجزیه واریانس مقدار آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز، پلی فنول اکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداسیون در غلظت‌های مختلف پرتیلاکلر بعد از نه روز در نمونه‌های جلبک کلرلا.

| منبع تغییرات | درجه آزادی | میانگین مربعات | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | کاتالاز | پراکسیداز | پلی فنل اکسیداز | آسکوربات‌پراکسیداز | پراکسیداسیون |
| غلظت علف‌کش | ۸ | ۰/۰٥٤٥*** | ۰/۰٥۹۰*** | ۰/۰۲۱۳*** | ۰/۲۸۸٦*** | ۰/۰۰۰۰٦*** |
| اشتباه | ۱۸ | ۰/۰۰۲٦ | ۰/۰۰٤٦ | ۰/۰۰۰۳ | ۰/۰۲۷٦ | ۰/۰۰۰۰۱ |
| ضریب تغییرات (درصد) | | ۱٥/٦٤ | ۲٥/۷۰ | ۱٤/۲ | ۱۷/۷٤ | ۱۰/۹۷ |

***معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۱ درصد

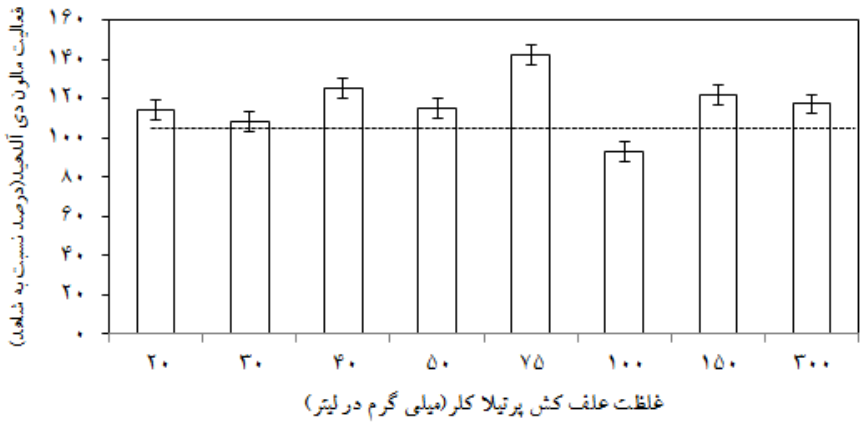



**شکل ۳:** فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز، پلی‌فنول‌اکسیداز و آسکوربات پراکسیداز نسبت به شاهد در روز نهم.
خط نقطه چین بیانگر مقدار شاهد بر مبنای صد می‌باشد. داده‌ها میانگین بوده و انحراف استاندارد آنها نمایش داده شده است.

فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز مشخص کرد که بیشترین میزان غلظت علف‌کش موجب کمترین میزان فعالیت آنزیم یاد شده گشته و بیشترین میزان فعالیت آنزیم در غلظت ۲۰ میلی‌گرم پرتیلاکلر در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت تعیین گردید (شکل ۳). بیشترین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در تیمار ۲۰ میلی‌گرم علف‌کش در لیتر بوده و در تیمارهای ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم علف‌کش میزان فعالیت بسیار کاهش یافت (شکل ۳).

اثر تیمارهای مختلف علف‌کش بر میزان پراکسیداسیون لیپیدی غشاء معنی‌دار بدست آمد (جدول ۳). بر این اساس کمترین میزان پراکسیداسیون لیپیدی غشاء در شاهد و بیشترین آن در غلظت ۷۵ میلی‌گرم پرتیلاکلر دیده شد (شکل ٤). اختلاف

پراکسیداسیون لیپیدی غشاء در غلظت‌های ۷۵، ٤٠ و ۱۵۰ میلی‌گرم علف‌کش معنی‌دار نبود.




**شکل٤:** فعالیت پراکسیداسیون لیپیدی غشاء براساس غلظت مالون دی آلدهید نسبت به شاهد در روز نهم.

خط نقطه چین بیانگر مقدار شاهد بر مبنای صد می‌باشد. داده‌ها میانگین بوده و انحراف استاندارد آنها نمایش داده شده است.

**بحث**

وجود پرتیلاکلر به‌عنوان عامل سمی موجب کاهش تعداد جلبک کلرلا شد. در تیمار شاهد مقدار جذب یا تعداد سلول‌های جلبک در تمام دوره‌های نمونه برداری بیشتر بود. با افزایش غلظت سم روند کاهش تعداد برای تمام دوره‌ها مشاهده گردید. درصد کاهش تعداد جلبک در ٢٤ و ٩٦ ساعت پس از کاربرد علف‌کش به‌ترتیب ۱۹ و ۸۲ درصد بدست آمد. به عبارت دیگر مدت ماندگاری بیشتر جلبک در معرض علف‌کش موجب صدمه بیشتری به آن گردیده است. در تحقیقات دیگر، علف‌کش متالاکلر از همین خانواده (کلرواستامیدها) در غلظت‌های ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر (Coquille et al., 2015) و ۰/۰۳ میلی‌گرم در لیتر (Debenest et al., 2009) بر روی دیاتومه *Gomphonema gracile* باعث کاهش رشد آن شده است. این مشاهدات با استفاده از نقطه عمل پرتیلاکلر قابل توجیه است. مطالعات نشان داده است بعد از گذشت ۱۰ روز از مصرف این گروه از علف‌کش‌ها، غشای سلولی آسیب دیده و بافت‌ها متلاشی می‌شوند (Maronic et al., 2018). Junghans و همکاران (۲۰۰۳) هنگام مطالعه تاثیر غلظت‌های مختلف علف‌کش‌های کلرواستامید در جلبک سبز *Scenedesmus vacuolatus* با تخریب دیواره سلولی مواجه شدند. آنها سمیت علف‌کش متالاکلر بر جلبک یاد شده را ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر برآورد نمودند. Deng و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند با افزایش غلظت متالاکلر رشد جلبک *Botryococcus braunii* شدیدا بعد از ٤٠ روز کم شد. ریز جلبک *Nannochloris oculata* نیز کاهش چشمگیر ۷۵ درصدی نسبت به شاهد در رشدش را در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر از متالاکلر نشان داد (Deng et al., 2015). غلظت‌های یاد شده در مطالعات بالا که منجر به مرگ ریز جلبک‌ها گردید در حد غلظت‌های پایین آزمایش ما بوده است. این موضوع می‌تواند توجیه‌گر آن باشد که نه تنها مقدار اکسیژن‌های واکنش‌گر در این آزمایش بالا بوده بلکه افزایش محتوای آنزیمی نتوانسته جلوی تخریب آنها را گرفته و خود آنزیم‌ها نیز دچار آسیب شده‌اند.

در آزمایش حاضر علف‌کش پرتیلاکلر بر مقدارکلروفیل a تاثیر کاهنده داشت. Mahdinezhad و

همکاران (۲۰۱۱) نیز هنگام بررسی اثرات سمی علف‌کش اکسادیارژیل بر جلبک سبز *Scenedesmus* sp. به نتیجه مشابهی رسیدند. کلروفیل a به علت نقش آن در جذب نور در مرکز واکنش PSII و زنجیره انتقال الکترون، حساسیت بیشتری نسبت به سایر پیگمان‌ها در مقابل تخریب‌های ناشی از تنش دارد (Rontani, 2001). Carder و Hoagland (1998) اشاره داشته‌اند که کلرواستامیدها باعث تخریب اسیدهای چرب شده و در نهایت از تقسیم سلولی ممانعت به عمل می‌آورند. جلوگیری از تقسیم سلولی جلبک کلرلا می‌تواند منجر به کاهش محتوای کلروفیل آنها گردد (Debenset et al., 2009). در جلبک‌ها مقدار کلروفیل شاخصی از فیزیولوژی سلول می‌باشد. جهت برآورد تاثیر آلاینده‌ها محققین زیادی از محتوای کلروفیل به عنوان شاخص زیستی استفاده کرده‌اند (Geoffroy et al., 2002; Teisseire and Vernet, 2001). Coquille و همکاران (۲۰۱۵) نیز در تاثیر متولاکلر بر دیاتومه‌ها نشان دادند مقدار کلروفیل a کاهش می‌یابد. گزارشات حاکی از آن است که پرتیلاکلر (۵-۴۰ ppm) باعث کاهش ۴۵-۱۰ درصدی کلروفیل a در *Anabaena fertilissima* شده است (Inderjit, 2010). همچنین Qian و همکاران (۲۰۰۹) هنگام بررسی اثرات پاراکوات بر جلبک *Chorella vulgaris* نتیجه گرفتند که در غلظت‌های ۰/۵ و ۰/۷۵ میکرو مول از این علف‌کش به ترتیب محتوای کلروفیل a، ۵۲ و ۷۷ درصد کاهش می‌یابد.

شرایط تنش مانند حضور علف‌کش‌ها موجب تولید انواع اکسیژن فعال می‌شود. ترکیبات اخیر مانند سیگنالی برای فعال سازی پاسخ‌ها به تنش و مسیرهای دفاعی عمل می‌کنند. در غلظت‌های کم مواد سمی، مقدار آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی برای نابودی آنها کفایت می‌کند ولی با افزایش غلظت مواد خارجی به دلیل تجمع اکسیژن‌های واکنش‌گر، سلول‌ها از بین می‌روند (Singh et al., 2016). آزمایش ما نشان داد که فعالیت آنزیم کاتالاز در مقادیر زیاد پرتیلاکلر به اندازه‌ای نبود که مانع فعالیت گونه‌های فعال اکسیژن گردد. این موضوع منجر به کاهش مقادیر آنزیم‌ها و نهایتا مرگ سلول‌ها گشت. چنین نتیجه‌ای با یافته‌های (Sood et al., 2011; Wannigama et al., 2012) که به ترتیب فعالیت کم کاتالاز را در جلبک‌های *Anabaena* sp. و *Azolla microphylla* بر اثر مقادیر زیاد بوتاکلر و پاراکوات مشاهده کردند، مطابقت داشت. سایر آنزیم‌ها نیز مانند کاتالاز با افزایش غلظت پرتیلاکلر از فعالیت شان کاسته شد. این موضوع نشان از تنش اکسیداتیو قوی در سلول‌های جلبک می‌باشد (Lichtenthaler, 1996). بازدارندگی فعالیت آنزیم کاتالاز قبلا توسط علف‌کش متالاکلر با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر در جلبک *Chlorella pyrenidosa* دیده شده است (Liu and Xiong, 2009). گزارشات دیگری نیز مبنی بر کاهش فعالیت کاتالاز (۹۵-۲۵ درصد) و پراکسیداز (۸۸-۷۰ درصد) در جلبک *Nostoc muscorum* هنگام استفاده از علف‌کش مولی‌نیت[1] (۲-۰/۷۵ میلی‌مول) وجود دارد (Galhano et al., 2011).

در بررسی میزان فعالیت پراکسیدان لیپیدی از روش مالون دی‌آلدهید، میزان پراکسیدان لیپیدی در تیمارها نسبت به شاهد بیشتر بود (شکل ٤). به عبارت دیگر اثرات آنتی‌اکسیدانی در غلظت‌های مختلف کافی نبوده و اثرات تخریبی غشاء قابل مشاهده است. افزایش فعالیت پراکسیداسیونی لیپیدی در مقادیر زیادتری از علف‌کش حاکی از تولید مقادیر بیشتر $H_2O_2$ در سلول‌های جلبک ، سمیت و نهایتا مرگ آن‌ها می‌باشد (Farombi et al., 2008). با قطع بیشتر سنتز اسیدهای چرب، کلرواستامیدها باعث

1. Ordram

آسیب رساندن به دیواره سلولی، رشد نامنظم و اختلال در تقسیم سلولی می‌شوند (Weisshaar and Boger, 1987). افزایش میزان پراکسیداسیون لیپیدی با افزایش غلظت تیمار کبالت بر روی جلبک *Pavlova viridis* نیز مشاهده شده است (Mei et al., 2007).

**نتیجه‌گیری نهایی**

با توجه به استفاده زیاد از علف‌کش پرتیلاکلر در منطقه، احتمال آسیب رسیدن به رشد و نقش مفید بوم زراعی جلبک کلرلا وجود دارد. این علف‌کش از طریق جلوگیری از تکثیر جلبک و تخریب کلروفیل، خاصیت سمی خود را نشان می‌دهد. اندازه‌گیری مقادیر و فعالیت آنزیم‌هایی چون کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز، پلی‌فنول اکسیداز و میزان پراکسیداسیون لیپیدی از شاخص‌های تاثیر پرتیلاکلر بر جلبک کلرلا می‌باشند. برای ارزیابی دقیق‌تر واکنش‌های آنزیمی بهتر است از درهایی کمتر از ۲۰ میلی‌گرم علف‌کش در لیتر عصاره جلبکی استفاده نمود.

**References**


**Bonanno, G. (2012).** *Arundo donax* as a potential biomonitor of trace element contamination in water and sediment. Ecotoxicology and Environmental Safety. 80:20-27.

**Carder, J.P. and Hoagland, K.D. (1998).** Combined effects of alachlor and atrazine on benthic algal communities in artificial streams. Environmental Toxicology and Chemistry.17:1415-1420.

**Clay, D.V. (1995).** Herbicide residue in soils and plants and their bioassay.In.Herbicide Bioassay, pp.153-171.ed.

**Coquille, N., Jan, G., Moreira, A. and Morin, S. (2015).** Use of diatom motility features as endpoints of metolachlor toxicity. Aquatic Toxicology.158: 202-210.

**Czaplicka-Kotas, A. and Lodowska, J. (2014).** Biomonitoring of surface water by synchronous culture of *Chlorella vulgaris* algae. Environment Protection Engineering. 4: 30-40.

**Debenest, T., Pinelli, E., Coste, M., Silvestre, J., Mazzella, N., Madigou, C. and Delmas, F. (2009).** Sensitivity of freshwater periphytic diatoms to Agricultural herbicides. Aquatic Toxicology. 93:11-17.

**Deng, L., Senseman, S.A., Gentry, T.J., Zuberer, D.A., Camargo, E.R., Weiss, T.L. and Devarenne, T.P. (2015).** Effect of selected herbicides on growth and lipid content of *Nannochloris oculata*. Journal Aquatic Plant Management.53:28-35.

**Deng, X., Gao, K. and Sun, J. (2012).** Physiological and biochemical responses of Synechococcus sp. PCC 7942 to irgarol 1051 and diuron. Aquatic Toxicology. 122-123:113-119.

**Ershad Langroody, H. (1999).** Deterrmination toxicity Hinosan and Tilt on the *Selenatrom carpricornutum* and nutrition behavior and death *Dophnia magna.* M.Sc Thesis. Islamic Azad University, Lahijan Branch. 96 p.

**Fallahi, M., Ghenatparast, A., Salavatian, M., Danesh, A., Piri, H. and Sheikh, G.H. (2001).** Report determination role *Brachianus pilicatilis* on the survival *Rutilus kutum* larva and comparison it's with concentrate food. Iranian Journal of Fisheries Science.1: 7-8 p.

**Fallahi, M. and Salavatian, S.M. (2006).** Study on effect of different concentrations of magnesium on growth and biomass of *Chlorella vulgaris.* Pajouhesh and Sazandegi. 72: 9-13.

**Farombi, E.O., Ajimoko, Y.R. and Adelowo, O.A. (2008).** Effect of butachlor on antioxidant enzyme status and lipid peroxidation in fresh water African Catfish (*Clarias gariepinus*). International Environmental Research. Publication Health.5:423-427.

**Ferreira, M., Coutinho, P., Seixas, P., Fabregas, J. and Otero, A. (2009).** Enriching rotifers with peremium microalgae, *Nannochloropsis gaditana*. Mar Biotechnology. 11:585-595.

**Galhano, V., Gomes-Laranjo, J. and Peixoto, F. (2011).** Exposure of the

cyanobacterium *Nostoc muscorum* from Portuguese rice fields to molinate (Ordram): Effects on antioxidant system and fatty acid profile. Aquatic Toxicology. 101:367-376.

**Geoffroy, L., Teisseire, H., Couderchet, M. and Vernet, G. (2002).** Effect of oxyfluorfen and diuron alone and in mixture on antioxidative enzymes of *Scenedesmus obliquus* . Pesticide Biochemistry and Physiology.72:178-185.

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

**Inderjit, K.S. (2010).** Effect of herbicides with different modes of action on physiological and cellular traits of *Anabaena fertilissima*. Paddy Water Environment.8:277-282.

**Jiang, J., Chen,Y., Yu,R., Zhao, X., Wang, Q. and CaI, L. (2016).** Pretilachlor has the potential to induce endocrine disruption, oxidative stress, apoptosis and immunotoxicity during zebrafish embryo development. Environmental Toxicology and Pharmacology.42:125-134.

**Junghans, M., Backhaus, T., Faust, M., Scholze, M. and Grimme, L.H. (2003).** Predictability of combined effects of eight chloroacetanilide herbicides on algal reproduction. Pest Management Science. 8:1101-1110.

**Kar, M. and Mishra, D. (1976).** Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. Plant Physiology. 57: 315-319.

**Kasae, M., Soroushnasab, L. and Sate, A. (2012).** Effect of Al on the growth, pH, activity antioxidant enzymes and osmolites in *Chlorella vulgaris*. Iranian Journal of Biology. 26(2):59-97.

**Lichtenthaler, H.K. (1996).** Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. Journal Plant Physiology.148:4-14.

**Lichtenthaler, H.K. and Wellburn, A.R. (1985).** Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf in different solvents. Biology Society Transmission.11: 591-592.

**Liu, H. and Xiong, M. (2009).** Comparative toxicity of racemic metolachlor and S-metalachlor to *Chlorella pyrenoidosa*. Aquatic Toxicology.93:100-106.

**Livingston, J. (2005).** Agriculture and soil pollution: Physiological side effects of pesticides on non-target plants, pp. 53-84. Ed. G. Saladin and C. Clement Nova Science publishers.

**Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall R.J. (1951).** Protein measurement with the phenol Reagent. Journal Biology chemisty.193: 265-275.

**Ma, J. (2002).** Differential sensitivity 2030 herbicides among populations of two green alga *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa*. Environmental Contamination and Toxicology. 68: 275-281.

**Mahdinezhad, M. (2005).** Familiarity with some water pollutants (Investigating the effect of detergents on Chlorella green algae). Internship Report.Environment Technology. Lahijan Branch, Islamic Azad University, 40 p.

**Mahdinezhad, K., Mahdinezhad, M. and Shariati, F. (2011).** Investigation of toxic effects of different concentrations of oxadiargil herbicide (Top Star) rice fields on green Scenedesmus algae in the water source. Journal of Biology Science. 5(2): 95-105.

**Makhdomi, N., Hosseini, A. and Sharifpor, I. (2001).** In vitro studies on growth and reproduction of Artemia in Incheh lake. Iranian Scientific Fisheries Journal. 11 (2): 69-78.

**Malakootian, M., Yousefi, Z. and Khodashenas Limoni, Z. (2017)**. Evaluation of copper removal from industrial sewages by the green microalgae *Chlorella vulgaris*. Journal of Gorgan University of Medical Sciences. 18(4):74-80.

**Matamoros, V., Nguyen, L. X., Arias, C.A., Salvadó, V. and Brix, H. (2012).** Evaluation of aquatic plants for removing polar microcontaminants: A microcosm experiment. Chemosphere. 88:1257-1264.

**Maronic, D.S., Camagajevac, I.S., Horvatic, J., Pfeiffer, T. Z., Stevic, F., Zarkovic, N., Waeg, G. and Jaganjac, M. (2018).** S-metolachlor promotes oxidative stress in

green microalga *Parachlorella kessleri*- A potential environmental and health risk for higher organisms. Science of the Total Environment. 637-638: 41-49.

**Mei, L., Qin, Z., Chang-Wei, H., Li, C., Zhi-Li, L. and Zhi-Ming, K. (2007).** Cobalt and Manganese stress in the microalga *Pavlova viridis* (Prymnesiophyceae): Effects on lipid peroxidation and antioxidant enzymes. Journal of Environmental Sciences. 19: 1330-1335.

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

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

**Pandey, S., Kumar, R., Sharma, S. and Verma, M. (2005).** Acute toxicity bioassays of mercuric chloride and Pretilachlor on air-beathing fish *Lujanus argentimaculatus*. Ecotoxicology an Enviranmental Safety. 61: 114-120.

**Pashaie, H., Farokhrooz, M., Zamini, A. and Ebrahimian, Y. (2012).** Determination the Lethal Concentration ($LC_{50}$) of Diazinon and Machety on (*Vimba vimba persa*). Journal of Oceanography. 3(9):63-683.

**Pereira, G.J.G.F., Molina, S.M.G., Lea, P.J. and Azevedo, R.F.A. (2002).** Activity of antioxidant enzymes in response to cadmium in *Crotalaria juncea*. Plant and Soil. 239:123-132.

**Qian, H., Chen, W., Sun, L., Jin, Y., Liu, W. and Fu, Z. (2009).** Inhibitory effects of paraquat on photosynthesis and response to oxidative stress in *Chlorella vulgaris*. Ecotoxicology.18: 537-543.

**Rafie, F., Ashjae Ardalan, A., Mesgarha, M. and Esmaeilzadeh, A. (2012).** Effect of nitrate concentration on chlorophyll-a and lipid content of green algae, *Chlorella vulgaris*. Journal of Merine Biology. 4(1):33-40.

**Rahimi Bashar, M. (2000).** Phytoplanktones. (Translated). Shahr Sabz Publication.203 p.

**Rontani, J.F. (2001).** Visible light-dependent degradation of lipidic phytoplanktonic components during senescence: a review. Phytochemistry. 58:187-202.

**Shayeghi, M., Shahtaheri, S. and Selsele, M. (2001).** Phosphorous insecticides residues in Mazandaran river waters, Iran. Iranian Journal Publication Health. 30: 115-118.

**Singh, D.P., Khattar, J.I.S., Kaur, G. and Singh, Y. (2016).** Toxicological impact of herbicides on Cyanobacteria. Annual Research and Review in Biology. 9: 1-39.

**Sood, A., Pabbi, S. and Uniyala, P.L. (2011).** Effects of paraquat on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in aquatic fern *Azolla microphylla*. Russian Journal of Plant Physilogy. 58: 667-673.

**Teisseire, H. and Vernet, G. (2001).** Effects of the fungicide folpet on the activities of antioxidative enzymes in duckweed (*Lemna minor*). Pesticide Biochemistry and Physiology. 69: 122-117.

**Wannigama, D.L, Agrawal, C. and Rai, L.C. (2012).** A comparative study on proteomic and biochemical alterations in the cyanobaterium Anabaena sp. PCC 7120 under short term exposure of abiotic stresses: Pesticide, Salinity, Heavy metal and UV-B. Journal Biotechnology Biomaterial. 2: 6.

**Weisshaar, H. and Boger, P. (1987).** Primary effects of chloroacetamides. Pesticides Biochemistry Physiology. 28: 286-293.

**Wong, P.K. (2000).** Effects of 2,4-D, glyphosate and paraquat on growth, photosynthesis and chlorophyll a synthesis of *Scenedesmus quadricauda* Berb. Chemosphere. 41: 177-182