

اثر کادمیوم در حضور غلظت‌های مختلف نمک NaCl بر روی شاخص‌های رشد در جلبک سبز تک سلولی *Dunaliella salina*

• سیمایحیی آبادی،

عضو هیأت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان

• منصور شریعتی،

عضو هیأت علمی دانشگاه اصفهان

تاریخ دریافت: خرداد ماه ۱۳۸۴ تاریخ پذیرش: آذرماه ۱۳۸۴

Email: Sima-yah@yahoo.com

چکیده

Dunaliella یک جلبک سبز تک سلولی می‌باشد. اثر کادمیوم در حضور غلظت‌های مختلف نمک کلرید سدیم شاهد (غلظت ۱ مولار) و ۱/۵ و ۲ مولار بر شاخص‌های رشد (تعداد سلول و میزان کلروفیل کل) در سویه ایرانی جلبک سبز *D. salina* به مدت ۳۶ روز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که افزایش در غلظت نمک موجب کاهش اثرات تخریبی کادمیوم بر تعداد سلول و میزان کلروفیل کل سلول‌های *D. salina* می‌گردد. به نظر می‌رسد که کاهش تأثیر کادمیوم در نرخ رشد و میزان کلروفیل کل با افزایش غلظت نمک به علت تشکیل $CdCl_2$ و جذب کمتر کادمیوم توسط سلول می‌باشد.

کلمات کلیدی: *D. salina*، کادمیوم، کلروفیل، کلرید سدیم

Pajouhesh & Sazandegi No 74 pp: 118-122

Effect of cadmium (Cd) at different concentrations of NaCl on growth rates in unicellular green alga *Dunaliella salina*

By: S. Yahyaabadi. Islamic Azad University of Falavarjan and M. Shariati, Dept. of Biology, University of Isfahan

D. salina is a unicellular green alga. The individual effects of Cd^{2+} (0.5 mg.L^{-1}) at different concentrations of NaCl (1, 1.5 and 2M) on the growth (cell number and total chlorophyll content) of Iranian strain of *Dunaliella salina* were examined during 36 days of treatment. The results show that increase in salt concentration caused significant increase in cell number and chlorophyll content of *D. salina*. It seems such increase in growth rates is due to formation of $CdCl_2$ and decrease of uptake of Cd^{2+} by cells.

Keywords: *D. Salina*, Cadmium, Chlorophyll, NaCl.

تأمین گردد (۳). تأثیر کادمیوم در حضور غلظت‌های مختلف نمک NaCl بر روی تعداد سلول هر دو روزیکبار با شمارش سلول توسط هموسایتومتر (۶) مورد بررسی قرار گرفت. جهت تعیین میزان کلروفیل ۵ میلی لیتر از سوسپانسیون جلبکی به یک لوله آزمایش منتقل و با استفاده از دستگاه سانتریفوژ E-1-west Germany SIGMA3 در ۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس محلول رویی خارج و به رسوب حاصله، ۵ میلی لیتر استون ۸۰ درصد اضافه و مخلوط گردید. مجدداً عمل سانتریفوژ تکرار و محلول رویی استخراج گردید و با استفاده از اسپکتروفتومتر Pharmacia، LKB، VASPEC، U.K. میزان جذب در طول موج‌های ۴۱۲، ۴۸۰، ۴۳۱، ۴۶۰ نانومتر قرائت و میزان کلروفیل برحسب میکروگرم بر میلی لیتر و پیکوگرم بر سلول مورد محاسبه قرار گرفت (۴). نتایج بدست آمده در این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار و با استفاده از نرم افزار آماری Minitab و تحلیل واریانس چند متغیره (MANOVA) و با استفاده از آزمون Wilk's λ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

نتایج و بحث

مقدار کلروفیل و تعداد سلول از شاخص‌های فیزیولوژیک جهت بررسی استرس‌ها می‌باشد (۹، ۱۰). با عنایت به گسترش فزاینده کاربرد فلزات سنگین و از جمله کادمیوم، بررسی تأثیر این عناصر بر روی متابولیسم و شاخص‌های فیزیولوژیک سلول‌های زنده از اهمیت خاصی برخوردار است (۱۱، ۱۲). در این تحقیق غلظت کادمیوم به نحوی انتخاب گردید که اثرات کشندگی شدید نداشته باشد. بدین منظور سوسپانسیون‌های جلبکی با غلظت‌های صفر، ۰/۱، ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷، ۰/۹ میلی گرم در لیتر کادمیوم با غلظت ۱ مولار نمک کلرید سدیم تیمار گردیدند و پس از شمارش سلولی و رسم منحنی رشد غلظت ۵ میلی گرم در لیتر کادمیوم که در آن غلظت ۵۰ درصد سلول‌ها بقای خود را حفظ می‌نمایند انتخاب گردید (جدول ۱) و اثر غلظت‌های مختلف نمک در حضور کادمیوم بر روی شاخص‌های رشد (تقسیم سلولی و کلروفیل کل) در جلبک سبز تک سلولی *Dunaliella salina* بررسی گردید. گزارشات نشان می‌دهد که در غلظت ۵ میلی گرم در لیتر کادمیوم ۵۰ درصد سلول‌های جلبک *Dunaliella salina* قادر به ادامه رشد می‌باشند (۱۶). جدول ۲، میانگین تعداد سلول سویه ایرانی جلبک سبزتک سلولی *Dunaliella salina* را در شاهد (غلظت ۱ مولار) و غلظت‌های ۱/۵ و ۲ مولار نمک در حضور غلظت ۵ میلی گرم در لیتر کادمیوم در طی ۳۶ روز آزمایش نشان می‌دهد. طبق نتایج حاصله مشاهده می‌گردد که با افزایش غلظت نمک، یون‌های کادمیوم اثر کشندگی کمتری بر روی سلول دارد و تعداد سلول نسبت به شاهد بطور معنی‌داری (با توجه به جدول آماری ۳) کاهش کمتری نشان می‌دهد که این اختلاف در روز ۱۲ خصوصاً در غلظت ۲ مولار نمک مشهودتر است. به نظر می‌رسد کاهش در میزان مرگ و میر سلول‌ها با افزایش غلظت نمک در حضور غلظت ۵/۰ میلی گرم در لیتر کادمیوم، احتمالاً به علت کاهش فرم آزاد یون کادمیوم ناشی از وجود NaCl و افزایش کادمیوم به صورت $CdCl_4$ و در نتیجه کمتر جذب شدن آن توسط سلول‌ها باشد (۱۳). جدول ۴ میانگین کلروفیل کل را برحسب میکروگرم در واحد حجم (میلی لیتر) و برحسب پیکوگرم بر سلول نشان می‌دهد. همانگونه که مشاهده می‌گردد با افزایش غلظت

مقدمه

Dunaliella یک جلبک سبز تک سلولی از شاخه Chlorophyta، راسته Volvocales و تیره Chlorophyceae می‌باشد. مشخصه خاص گونه‌های این جنس، رشد در محیط‌های نمکی با غلظت زیاد می‌باشد (۷ و ۱۵). میزان کلروفیل تحت تنش‌های مختلف در سلول‌های گیاهی تغییر می‌کند، برای مثال گزارش شده است که تحت تأثیر افزایش مس، کادمیوم و سرب میزان کلروفیل در واحدهای فتوسنتزی کاهش یافته است (۱۷). کادمیوم یکی از فلزات سنگین می‌باشد که در غلظت‌های در حد میلی مولار و در زمان‌های طولانی، اثرات سمی متنوعی از خود نشان می‌دهد از جمله ممانعت از سنتز DNA، RNA، و پروتئین، ممانعت از فعالیت آنزیم‌ها (۲، ۱۴، ۱۵). علیرغم اینکه کادمیوم از عناصر ضروری جهت رشد جلبک *D. salina* محسوب نمی‌شود ولی جذب این عنصر توسط سلول بیانگر وجود راه‌های جذب این عنصر از طریق کانال‌ها و منافذ جذب عناصر دیگر می‌باشد. برای مثال کادمیوم به راحتی می‌تواند از طریق کانال‌های کلسیم عبور کند زیرا اندازه شعاع یونی کلسیم (0.998°) و کادمیوم (0.978°) و بار الکتریکی آنها مشابه است (۲). به نظر می‌رسد که وجود کادمیوم در محیط *D. salina* بر تقسیم سلولی و سنتز کلروفیل اثر می‌گذارد که با افزایش غلظت نمک این اثرات کاهش می‌یابد. نتایج حاصل از اثر کادمیوم در حضور غلظت‌های مختلف نمک بر شاخص‌های رشد در جلبک *D. salina* می‌تواند به عنوان یک مدل مناسب در مطالعات فیزیولوژی گیاهی مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

سویه ایرانی جلبک سبز تک سلولی *D. salina* جدا سازی شده از باتلاق گاوخونی اصفهان از کلکسیون گروه زیست شناسی دانشگاه اصفهان تهیه گردید. ابتدا جلبک‌ها در محیط کشت Johnson و همکاران (۸) شامل ۵ میلی مولار KNO_3 ، ۵ میلی مولار $MgSO_4$ ، ۰/۲ میلی مولار $CaCl_2$ ، و ۰/۲ میلی مولار $10K_2HPO_4 + EDTA-Na_4-FeCl_3$ ، و ۷ میلی مولار $MnCl_2$ ، ۱ میلی مولار $ZnCl_2$ ، و ۱ میلی مولار $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ، و ۱ میلی مولار $Mo_4O_{10} \cdot 4H_2O$ (NH₄)₂ و ۱۰ میلی مولار $NaHCO_3$ در pH برابر ۷/۵ و در غلظت یک مولار نمک NaCl در رژیم شبانه روزی ۱۴ ساعت نور و ۱۰ ساعت تاریکی باشد نور ۱۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه و در دمای 27 ± 2 درجه سانتی‌گراد کشت گردیدند (۱). جهت تنظیم شدت نور از دستگاه Quantum Sensor Qspar، U.K. استفاده گردید. در مرحله بعد جهت اجراء آزمایش تلقیح *Hansatech*، سوسپانسیون‌های جلبکی در اواسط فاز رشد لگاریتمی در شرایط کاملاً استریل به ارلن‌های محیط کشت به گونه‌ای انجام شد که غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر کادمیوم با استفاده از $CdCl_2$ برای شاهد و غلظت‌های ۱، ۱/۵ و ۲ مولار NaCl و تعداد جلبک به میزان تقریبی $10^4 \times 24$ در هر میلی لیتر

جدول ۱: میانگین تعداد سلول در حضور غلظت‌های ۰، ۰/۱، ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷، ۰/۹ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم و غلظت ۱ مولار نمک NaCl مربوط به ۴ تکرار ± انحراف معیار در طی ۳۶ روز در سوبیه ایرانی *D. salina*.

*۱۰ ^۶ (میانگین تعداد سلول بر میلی لیتر)						روز
۰/۹	۰/۷	۰/۵	۰/۳	۰/۱	۰	
۰/۲۵ ± ۰/۱	۰/۲۵ ± ۰/۱	۰/۲۵ ± ۰/۱	۰/۲۵ ± ۰/۱	۰/۲۵ ± ۰/۱	۰/۲۵ ± ۰/۱	۰
۰/۷ ± ۰/۰۲	۰/۹ ± ۰/۰۱	۱/۱ ± ۰/۰۲	۱/۷ ± ۰/۰۱	۲ ± ۰/۳	۲/۲ ± ۰/۲	۶
۲/۲ ± ۰/۰۲	۲/۵ ± ۰/۰۱	۳ ± ۰/۱	۳/۹ ± ۰/۰۱	۴/۳ ± ۰/۱	۶ ± ۰/۱	۱۲
۳/۲ ± ۰/۰۱	۴/۱ ± ۰/۰۱	۵ ± ۰/۱	۶ ± ۰/۰۲	۷/۲ ± ۰/۰۱	۱۰/۱ ± ۰/۰۸	۱۸
۲/۲ ± ۰/۰۳	۲/۸ ± ۰/۰۲	۳/۸ ± ۰/۰۱	۴/۵ ± ۰/۲	۶ ± ۰/۰۴	۷/۵ ± ۰/۱۵	۲۴
۱/۹ ± ۰/۰۲	۲/۱ ± ۰/۰۱	۲/۸ ± ۰/۰۲	۳/۲ ± ۰/۰۱	۴/۵ ± ۰/۰۳	۵/۵ ± ۰/۱	۳۰
۱/۱ ± ۰/۰۱	۱/۸ ± ۰/۰۳	۲/۲ ± ۰/۰۳	۲/۹ ± ۰/۰۳	۳/۲ ± ۰/۰۱	۴/۴ ± ۰/۴	۳۶

جدول ۲: میانگین تعداد سلول در حضور غلظت‌های ۰، ۱/۵، ۲، ۱/۵ مولار نمک NaCl و تیمار شده با غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر کادمیوم مربوط به ۴ تکرار ± انحراف معیار در طی ۳۶ روز در سوبیه ایرانی *D. salina*.

*۱۰ ^۶ (میانگین تعداد سلول بر میلی لیتر)			روز
غلظت ۲ مولار نمک	غلظت ۱/۵ مولار نمک	شاهد (۱ مولار)	
۰/۲۵ ± ۰/۱	۰/۲۵ ± ۰/۱	۰/۲۵ ± ۰/۱	۰
۵/۴ ± ۰/۲	۳/۱ ± ۰/۱	۲/۲ ± ۰/۲	۶
۱۱/۳ ± ۰/۶	۸/۵ ± ۰/۲	۶ ± ۰/۱	۱۲
۱۲/۴ ± ۰/۴	۱۱ ± ۰/۱	۱۰/۱ ± ۰/۰۸	۱۸
۱۰/۳ ± ۰/۲	۹/۵ ± ۰/۲	۷/۵ ± ۰/۱۵	۲۴
۷/۳ ± ۰/۵	۶/۲ ± ۰/۴	۵/۵ ± ۰/۱	۳۰
۶ ± ۰/۲	۵/۵ ± ۰/۴	۴/۴ ± ۰/۴	۳۶

جدول ۳: تحلیل واریانس چندمتغیره (MANOVA) با آزمون $wilk's \lambda$ جهت بررسی اثر غلظت نمک NaCl و (۱/۵، ۲ مولار) بروی شاخص‌های اندازه گیری شده در حضور غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر کادمیوم در سوبیه ایرانی *D. salina*.

کلروفیل کل بر سلول		کلروفیل کل بر میلی لیتر		تعداد سلول		تیمارها
wilk's λ	F	wilk's λ	F	wilk's λ	F	
۰/۰۰۰۰۴**	۹۰/۵۰۰	۰/۰۰۰۰۱**	۵۱۲/۶۵۴	۰/۰۰۰۰۲**	۱۲۲/۲۰۲	اثر غلظت اصلی
۰/۰۰۰۰۵**	۷۹۰۰/۰۳۱	۰/۰۰۰۰۱**	۳۶۸۸۰	۰/۰۰۰۰۵۲	۲۲۰۰/۵۰۱	غلظت شاهد با ۱/۵
۰/۰۰۰۰۴**	۵۸۲۹/۱۳۸	۰/۰۰۰۰۴**	۵۴۳۹۰	۰/۰۰۰۰۲۶**	۳۰۴۲/۴۰۵	غلظت شاهد با ۲
۰/۰۰۰۰۴**	۲۴/۸۲۱	۰/۰۰۰۰۱۴**	۳۶۵۵۴	۰/۰۰۰۰۰*	۴۹/۷۳۲	غلظت ۱/۵ با ۲

نتایج با سطوح احتمال ۱٪ (***) و ۵٪ (*) ارزیابی شده اند.

جدول ۴: میانگین کلروفیل کل در حضور غلظت‌های ۰.۱، ۰.۵ و ۲ مولار نمک NaCl و تیمار شده با غلظت ۰.۵ میلی گرم در لیتر کادمیوم مربوط به ۴ تکرار \pm انحراف معیار در طی ۳۶ روز در سویه ایرانی *D. salina*

میانگین کلروفیل کل						روز
پیکوگرم بر سلول			میکروگرم بر میلی لیتر			
۲ مولار	۱/۵ مولار	شاهد (۱ مولار)	۲ مولار	۱/۵ مولار	شاهد (۱ مولار)	
$1/9 \pm 0/01$	$1/9 \pm 0/02$	$1/9 \pm 0/02$	$0/7 \pm 0/03$	$0/7 \pm 0/02$	$0/7 \pm 0/02$	۰
$3/5 \pm 0/02$	$3/2 \pm 0/04$	$2/9 \pm 0/2$	$5/6 \pm 0/02$	$5/2 \pm 0/01$	$4/9 \pm 0/1$	۶
$3/9 \pm 0/04$	$3/6 \pm 0/03$	$3/2 \pm 0/1$	$7/6 \pm 0/04$	$7/1 \pm 0/02$	$6 \pm 0/4$	۱۲
$2/9 \pm 0/02$	$2/4 \pm 0/08$	$2/1 \pm 0/03$	$23/2 \pm 0/01$	$22 \pm 0/01$	$20 \pm 0/2$	۱۸
$2/2 \pm 0/01$	$1/9 \pm 0/01$	$1/5 \pm 0/01$	$17/4 \pm 0/1$	$16/5 \pm 0/04$	$15/1 \pm 0/1$	۲۴
$1/4 \pm 0/02$	$1/3 \pm 0/02$	$1/01 \pm 0/02$	$7/9 \pm 0/04$	$7/4 \pm 0/08$	$5/2 \pm 0/01$	۳۰
$1/2 \pm 0/01$	$1 \pm 0/01$	$0/46 \pm 0/01$	$2/2 \pm 0/021$	$1/4 \pm 0/01$	$0/6 \pm 0/03$	۳۶

and Koropatnick, J.). Taylor and Francis. London and new York , 34-74.

3- Chen , B.L. , Huang , Q., Shi , Q . and Wu, S. 1998; Accumulation of Ag , Cd, Co, Cu, Hg, Ni and Pb in *Pavlova viridis* Tseng (Haptophyceae). Journal of Applied phycology. 10, 371-376 .

4- Eijkelhoff , C . and Dekker , J.P. 1997; A routine method to determine the chlorophyll a, pheophytin a and β - carotene contents of isolated photosystem II reaction center complexes. Photosynthesis Research. 52, 63-67.

5- Fabregas, J., Herrero , C., Cabezas, B., Liano, R. and Abalde, J. 1986; Response of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* to nutrient concentration and salinity variations in batch cultures . Journal of plant physiology . 125, 475-484.

6- Fujii, S. 1991; The growth and intracellular ionic composition of *Dunaliella tertiolecta* in magnesium - rich media. Plant cell physiology . 32, 549-554.

7- Jimenez, C. and Xavier Niell , F. 1991; Growth of *Dunaliella viridis* Teodoresco: Effect of salinity , temperature and nitrogen Concentration. Journal of Applied phycology. 3 , 319-327.

نمک، مقدار کلروفیل کل نیز بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر و پیکوگرم بر سلول نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری (جدول آماری ۳) می‌یابد و این امر به این معناست که اثرات سمی کادمیوم در غلظت‌های بالاتر نمک کاهش یافته است و همانگونه که در مورد تقسیم سلولی در جدول ۱ اشاره شد به نظر می‌رسد این حالت نیز به علت افزایش کادمیوم به صورت CdCl_۲ و در نتیجه کمتر جذب شدن آن توسط سلول‌ها باشد (۱۳).

به طور کلی نتایج حاصل از این تحقیق مبین آن است که تنش حاصل از وجود کادمیوم در محیط موجب اختلال در شاخص‌های رشد از جمله تعداد سلول و میزان کلروفیل در جلبک *D. salina* می‌گردد که با افزایش شوری محیط این اثرات کاهش می‌یابد لذا مطالعات گسترده بر روی تأثیر فلزات سنگین بر روی موجودات زنده و شناسایی عواملی که اثرات سمی این فلزات را کاهش می‌دهد از اهمیت خاصی برخوردار است .

منابع مورد استفاده

- 1- Ben-Amotz , A. and Avron. M. 1990; The biotechnology of cultivating the halo tolerant alga *dunaliella*. TIBTECH . 8, 124-129
- 2- Bhattacharya , M. H. Wilson .A. K. , Brjan , S.S. and Jonah, M. 2000; Biochemical pathways in cadmium toxicity. In : Molecular biology and toxicology of metals (eds. Zalups , R. K.

- 8- Johnson, M.K., Johnson, E.J., McElrory, R.D. Speer, H.L. and Bruff, B.S. 1968; Effects of salt on the halophilic alga *Dunaliella viridis*. Journal of Bacteriology. 95, 1461-1468.
- 9- Kastori, R. Plesincar, M. Sakac Z., Pankovic, D. and Arsenijevic – Maksimovic, I. 1998; Effect of excess lead on sunflower growth and photosynthesis. Journal of plant Nutrition. 21, 75-85.
- 10- Khristoforova, N.K., Aizdaicher, N.A and Berezovskaya, O.U. 1996; The effect of copper ions and a detergent of green microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Platymonas* sp. Russian Journal of Marine Biology. 22, 109-114.
- 11- Lam, P.K.S, Wut, P.F. Chan, A.C.W. and Wu, R.S.S. 1999; Individual and combined effects of cadmium and copper on the growth response of *Chlorella vulgaris*. Environmental Toxicology. 14, 347-353.
- 12- Nygard, C. and Ekelund, N.G.A. 1999; Effects of lead (PbCl₂) on photosynthesis and respiration of the bladder Wrack, *Fucus vesiculosus* in relation to different salinities. Water, Air and Soil pollution. 116, 549-565.
- 13- Pick, U. 1992; ATPase and ion transport in *Dunaliella*. In: *Dunaliella: Physiology, biochemistry and biotechnology*. (eds. Avron, M. and Ben – Amotz, A.) Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo. CRC press, 63-98.
- 14- Pistocchi, R., Mormile, A.M., Guerrini, F., Isani, G. and Boni, L. 2000; Increased production of extra- and intracellular metal-ligands in phytoplankton exposed to copper and cadmium. Journal of Applied Phycology. 12, 469-477.
- 15- Romero – Puetas, M.C., Palam, J.M., Gomez, M., Del Rio, L.A. and Sandalio, L.M. 2002; Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. Plant, Cell and Environment. 25, 677-686.
- 16- Visviki, I. and Rachlin, J.W. 1994; Acute and chronic exposure of *Dunaliella salina* and *Chlamydomonas bullosa* to copper and cadmium: Effects on growth. Archive Environmental Contamination and Toxicology. 26: 154-162.
- 17- Woolhouse, H.W. 1983; Toxicity and tolerance in the responses of plants to metals. In: *Physiological plant ecology III*, (eds. Lange, O. L. Nobel, P.S. Osmond, C.B. and Ziegler, H.). Springer – Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 245-300.



Archive of SID