شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۷۴، شماره ۱، بهار ۱۴۰۰
صفحات ۱۱۸-۱۰۷

اثر تنش فلزات سنگین در تولید ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در ریزجلبک‌های *Monoraphidium* و *Scenedesmus*

پریچهر حناچی[۱]*، آسیه آقا بابایی[۲]، مصطفی نوروزی[۳]، روشنک زرین قلمی[۲]

۱. دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران
۲. دانشجوی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران
۳. استادیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران

تاریخ ارسال: ۱۳۹۹/۱۱/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۰۷

چکیده

ریز جلبک‌ها یکی از منابع غنی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی با خواص درمانی هستند. سنتز یا ساخت چنین ترکیباتی در سلول‌های ریز جلبکی را می‌توان تحت شرایط تنش افزایش داد. هدف از این مطالعه بررسی تنش با فلز سنگین جهت دستیابی به مقادیر بالایی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی بود. برای این منظور ابتدا هر دو سویه *Monoraphidium* و *Scenedesmus* در محیط BBM (*Bold's Basal* Medium) کشت داده شد و پس از رسیدن به رشد مناسب، تحت شرایط تنش با کلرید جیوه تیمار داده شد. پس از عصاره گیری از ریز جلبک‌ها سنجش‌های فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل به روش FRAP وDPPH، رنگیزه‌های فتوسنتزی و میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز مورد بررسی قرار گرفتند. میزان رشد و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی هر دو ریز جلبک *Monoraphidium* و *Scenedesmus* تحت تنش با غلظت‌های مختلف کلرید جیوه، کاهش یافت؛ که این کاهش احتمالاً به دلیل افزایش استرس ناشی از سمیت کلرید جیوه بود. اما میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز با افزایش غلظت کلرید جیوه افزایش یافت. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که می‌توان با حذف فلزات سنگین از محیط پرورش، محیطی مناسب جهت بالا بردن پتانسیل این ریز جلبک‌ها در تولید ترکیبات خاص و به کارگیری آنها در صنایع دارویی، پزشکی و مکمل‌های غذایی فراهم نمود.

کلمات کلیدی: *Scenedesmus*، *Monoraphidium*، کلرید جیوه، ترکیبات آنتی‌اکسیدانی

* نویسنده مسئول: پریچهر حناچی
Email: p.hanachi@alzahra.ac.ir

Journal of Fisheries
Vol. 74, No. 1, Spring 2021
pp. 107-118

Effect of heavy metals on production of antioxidant compounds in *Monoraphidium* and *Scenedesmus* microalgae

Parichehr Hanachi[1*], Asiyeh Aghbabaei[2], Mostafa Noroozi[3], Roshanak Zarringhalami[2]

1. Associate Professor, Biotechnology Department, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran
2. M.Sc. Graduated student, Biotechnology Department., Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran
3. Assistant Professor, Biotechnology Department, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran

Received: 24-Feb-2021 **Accepted: 28-Jan-2021**

Abstract

Microalgae are one of the rich sources of antioxidant compounds with health benefits. The synthesis of such compounds in microalgae cells can be increased under stress conditions. The aim of this study was to investigate the effect of heavy metals on antioxidant compounds production. For this purpose, both *Monoraphidium* and *Scenedesmus* strains were first cultured in BBM medium and after reaching the appropriate growth, they were treated with mercury chloride under stress conditions. Total antioxidant activity was measured by FRAP and DPPH methods, also photosynthetic pigments and superoxide dismutase activity were examined. The growth rates and the amount of antioxidant compounds decreased in both *Monoraphidium* and *Scenedesmus* microalgae under different concentrations of mercury chloride stress. However, the activity of superoxide dismutase increased while mercury chloride concentration increased. The results of this study showed that by removing heavy metals from algae medium, a suitable environment is provided to increase the specific compounds and these microalgae compounds cab be used in the pharmaceutical, medical and food supplements industries.

Keywords: *Scenedesmus*, *Monoraphidium*, $HgCl_2$, Antioxidant compounds

Corresponding author: Parichehr Hanachi Email: p.hanachi@alzahra.ac.ir

۱. مقدمه

در دودهه گذشته به دلیل تخریب ذخایر سوخت فسیلی، افزایش قیمت نفت وگرم شدن کره زمین ریزجلبک ها وارد دوره جدیدی از کاربرد ها شده‌اند. استراتژی‌های جهانی برای کاهش دی اکسید کربن به دنبال جایگزینی منابع تجدیدپذیر وتشدید تحقیقات در مورد نسل سوم سوخت‌های زیستی اند. علاوه بر این ریزجلبک‌ها به دلیل جذب نور خور شید و انجام فتو سنتز قادر به تولید نیمی از اکسیژن اتمسفر در زمین هستند و به دلیل جذب مقدار زیادی از دی اکسید کربن، کشت آنها در کنار نیروگاه‌های حرارتی امری ضروری محسوب می‌شود. همچنین ریزجلبک‌ها منبعی برای تولید محصولاتی مانند پروتئین، کربوهیدرات ها، رنگدانه ها، ویتامین‌ها و مواد معدنی‌اند (Safi *et al*., 2014). یکی از دلایل اصلی استفاده از ریزجلبک‌ها به عنوان غذای دام، وجود مقادیر بالای پروتئین در توده زیستی جلبک‌هاست. حدود۳۰در صد ازکل جلبک تولیدی در جهان برای تغذیه حیوانات بکار می‌رود؛ همچنین ریزجلبک ها در فرایند تثبیت نیتروژن خاک نیز نقش دارند. افق آینده استفاده از ریزجلبک ها کاربرد آن ها در مقابله با بیماری های باکتریایی و ویروسی گیاهان است (Borowitzka, 1997; Borowitzka, 1999). همچنین گزارش‌هایی مبنی بر بهبود بیماری‌های مرتبط با اکسیداسیون (بیماری‌های التهابی) به دنبال مصرف نوشیدنی‌های حاوی فراورده‌های جلبکی وجود دارد که می‌توان این تاثیر را ناشی از مکانیسم جمع آوری کننده رادیکال‌های آزاد آنتی‌اکسیدان های موجود در این فراورده ها دانست (Ghasemi *et al*,. 2007). محیط کشت مناسب، محیطی است که بتواند تمام عناصر مورد نیاز را در مقادیر مناسب دراختیار ریزجلبک قرار دهد. عوامل شیمیایی موثر یا مواد لازم جهت ساخت محیط‌های کشت ریزجلبک‌ها به دو دسته عوامل با مقدار بالا یا ماکرو (Na, Ca, Mg, K, S, P,N, O, H, C, Cl) و عوامل با مقدار پایین یا میکرو (Fe, Mn, Cu, Zn, B, Si, Mo, Co, V) که برای اعمال حیاتی سلول به مقدار جزئی مورد نیاز بوده تقسیم می‌شوند (Grobbelaar, 2006). برخی از این فلزات نظیر آهن و روی جزو عناصر غذایی ضروری در جیره غذایی انسان است. اما مقادیر بالای این عناصر بسیار سمی هستند. از منابع تولید فلزات سنگین می‌توان به فعالیت‌های انسانی اشاره کرد که شامل فعالیت‌های معدن کاری فلزات، احتراق سوخت‌های فسیلی، تخلیه پسماندها، کشاورزی و فعالیت‌های صنعتی است. بهترین روش برای حذف فلزات سنگین استفاده از روش جذب زیستی است. در حال حاضر ریزجلبک‌ها به دلیل کاربردشان در صنعت و پزشکی مورد توجه بسیاری از محققین اند و بدلیل حضور فلزات سنگین در محیط رشد جلبک‌ها و همچنین اثرات سمی و کشندگی بر انسان، حیوانات وگیاهان، پژوهش حاضر اثر تنش فلز سنگین روی دو ریزجلبک *Scenedesmus* و *Monoraphidium* را از ابعاد اثر فلز سنگین جیوه بر محتوای آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی و رنگدانه‌های آن مورد بررسی قرار می‌دهد. دو *Scenedesmus* و *Monoraphidium* از ریزجلبکهای ساکن دریاچه‌های آب شیرین هستند که از مزیت‌های آنها می‌توان به رشد سریع، مقاومت بالا در برابر آلودگی و مدیریت آسان آنها در کشت داخل آزمایشگاه اشاره کرد (Hanachi *et al*., 2019).

۲. مواد و روش‌ها

۲.۱. تهیه و کشت نمونه

ریزجلبک *Monoraphidium* و *Scenedesmus* از بخش آزمایشگاه بیوتکنولوژی میکروبی، واحد کشت جلبک، دانشگاه الزهرا تهیه گردید. جهت کشت ریزجلبک ازمحیط اختصاصی BBM استفاده شد. جهت اطمینان از خالص بودن ریزجلبک‌ها، ابتدا آن‌ها در محیط کشت جامد به روش پلیت آگار کشت داده شدند و سپس به محیط کشت مایع انتقال داده شدند. پس از رسیدن ریزجلبک‌ها به مرحله لگاریتمی، آن‌ها به صورت پلکانی به حجم‌های

بالاتر ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰میلی‌لیتر منتقل شدند، و در هر بار انتقال ۱۰درصد ازحجم کل محیط به ریزجلبک‌ها اختصاص داده شد. در تمامی این مراحل شرایط مناسب کشت، یعنی دمای ۲ ± ۲۵ درجه سانتیگراد، دوره نوری ۱۲ساعت روشنایی، ۱۲ساعت تاریکی و نوردهی ۲۵۰۰ لوکس فراهم گردید. در نهایت برای کسب بیومس یا زیست توده لازم جهت اعمال تیمارها، ریزجلبک ها به محیط ۲۰۰۰ میلی لیتر منتقل، و در این مرحله عمل هوادهی از طریق پمپ مرکزی انجام، و جهت جلوگیری از ورود هر گونه آلودگی از طریق هوا از فیلترهای ۰/۲ µm میکرون در مسیر ورود هوا به داخل محیط ریزجلبک‌ها استفاده گردید (Bischoff and Bold, 1963).

۲.۲. تنش با کلرید جیوه

به منظور اعمال شرایط استرس‌زای کلرید جیوه بدین ترتیب عمل شد که ریزجلبک‌ها در ۴ ارلن مختلف حاوی ۱۷۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت BBM (۱۵۳۰میلی لیتر محیط کشت به همراه ۱۷۰میلی لیتر بیومس ریزجلبک) کشت داده شدند، بعد از گذشت هفت روز از زمان تلقیح و پس از گذر از مراحل رشد اولیه و رسیدن ریزجلبک‌ها به فاز لگاریتمی، ریزجلبک ها با غلظت های مختلف از کلرید جیوه شامل ۲، ۵ و ۸ میکرومولار تیمار شدند (De-Bashan et al., 2002). به این صورت که با داشتن جرم مولی کلرید جیوه مقدار مورد نیاز برای هر غلظت در یک محیط ۱۷۰۰میلی لیتر را محاسبه کرده و مقدار مورد نیاز از کلرید جیوه را پس از توزین، در دو میلی لیتر آب مقطر حل کرده و برای استریل کردن غلظت‌های مختلف کلرید جیوه از فیلتر سر سرنگی ۰/۲۲ میکرونی عبور داده سپس به محیط کشت ریزجلبک انتقال داده شد، برای انجام سنجش‌ها نیز، دو برداشت مختلف: برداشت اول۹۶ساعت بعد از اعمال تیمار و برداشت دوم نیز در پایان روز شانزدهم از زمان تلقیح صورت گرفت، و برای اینکه اثر کلرید جیوه بر تعداد سلول‌ها مشخص گردد، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بعد از اعمال تیمار از سلول‌ها نمونه‌برداری شد (De-Bashan *et al*., 2002).

۲.۳. استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدان

ابتدا به ۱۰ میلی گرم از نمونه خشک شده توسط فریز درایر، دو میلی لیتر متانول ۹۹ درصد اضافه شد، سپس برای شکستن دیواره سلولی از دستگاه هموژنایزر (Q2000, USA)، ۱۴۰۰ دور، به مدت ۳۰ ثانیه استفاده گردید، در مرحله بعد نمونه داخل ویال تیره رنگ ریخته، و ۳۰ دقیقه روی استیرر قرار داده شد، در نهایت نمونه داخل میکروتیوپ ریخته، و با سرعت ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۰دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد سانترفیوژکرده و سوپرناتانت حاصل در یک ویال تیره رنگ به صورت جداگانه ریخته و مجددا"عمل استخراج با متانول را برروی بیومس حاصل از سانترفیوژ تکرار کرده و سپس عصاره‌های متانولی را روی هم ریخته و برای تغلیظ عصاره از دستگاه روتاری (FD-5005-BT) استفاده شد، تا با تبخیر حلال، نمونه تغلیظ شود. در پایان، تمامی نمونه‌ها در یخچال ۴درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Hajimahmoodi *et al*., 2010).

۲.۴. سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی

در روش FRAP (ferric-reducing antioxidant power) برای تهیه معرف FRAP، ۵ میلی‌لیتر از محلول TPTZ (۱۰ mmol L-1) در هیدروکلریک اسید (۴۰ mmol L-1)، و ۵ میلی‌لیتر از محلول کلروآهن (۲۰ mmol L-1) به همراه ۵۰ میلی‌لیتر از محلول بافر استات (۳/۶=mol L- pH 1, ۰/۳) به ترتیب اضافه شد، تا محلولی به رنگ زرد-قهوه‌ای حاصل شود. این محلول باید تازه تهیه شود زیرا پس از ۳۰ دقیقه ناپایدار و غیر قابل استفاده است. سپس مقدار ۱/۵ میلی‌لیتر از معرف آماده فرپ به لوله‌ها اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید، سپس نمونه لیوفیلیزه با ۲ میلی‌لیتر متانول رقیق شد، در نهایت از روی نمونه ۵۰ میکرولیتر برداشت و به لوله‌های مربوطه اضافه گردید و مجدداً به مدت ۱۰دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در بن‌ماری نگهداری و در نهایت شدت رنگ حاصل، با اسپکتروفتومتر (UV-2100) در طول موج ۵۹۳ نانومتر اندازه‌گیری شد (Al-Farsi *et al*, 2005).

۲.۵. تعیین محتوای کل فنل

تعیین ترکیبات فنلی کل با اســـتفاده از معرف فولین ســـیوکالتو انجام گرفت. در این روش ۲۰۰ میکرولیتر از نمونـه مورد آزمـایش بـا ۱/۵میلی لیتر معرف فولین سیوکالتو رقیق شد و سپس با آب به نسبت ۱ به ۱۰ با هم مخلوط گردید و پس از ۵ دقیقه انکوبا سیون در دمای محیط، به میزان ۱/۵ میلی لیتر از محلول ســدیم اضــافه شــد. بعد از ۹۰ دقیقه انکوباســیون در دمای اتاق، جذب مخلوط فوق به کمک اســپکتروفتومتر در طول موج ۷۲۵ نانومتر قرائت شد (Hanachi *et al*., 2018).

۲.۶.تعیین محتوای کل فلاونوئید

محتوای کل فلاونوئید با اســـتفاده از معرف آلومینیوم کلرید (AlCl3) تعیین گردید. در این روش ۲۵۰میکرولیتر از نمونه متانولی با۷۵۰ میکرولیتر از متانول، ۵۰ میکرولیتر از محلول آلومینیوم کلرا ید (w/v ۱۰٪) در آب مقطر، ۵۰ میکرولیتر از ا ستات پتا سیم ۱مولار به همراه ۱/۴میلی‌لیتر از آب مقطر مخلوط شد، و بعد از ۳۰ دقیقه انکوبا سیون در د مای محیط، جذب مخلوط واکنش در طول موج ۴۱۵ نانومتر قرائت گردید (Hanachi *et al*., 2018).

۲.۷. استخراج رنگدانه‌ها

ابتدا ۴ میلی‌گرم از نمونه لیوفیلیزه را وزن کرده و ۴ میلی‌لیتر متانول ۹۹ درصد به آن اضافه شد و سپس برای شــکســتن دیواره ســلولی ریزجلبک‌ها و همچنین همگن شدن محیط، از دستگاه هموژنایزر با سرعت ۸۰۰rpm، به مدت ۴ دقیقه استفاده گردید. سپس به مدت ۲۴ ساعت به بن ماری ۴۵ c° منتقل گردید. بعد از این مدت محتویات فالکون با دور ۸۰۰۰rpm ســـانترفیوژ گردید. از محلول رویی جهت سنجش میزان رنگدانه‌ها استفاده شد. بعد از ا ستخراج کل رنگدانه‌ها با متانول، محتوای کلروفیل وکاروتنوئید با معادله شرح داده شده تو سط Wellburn (۱۹۹۴) محاسبه گردید (Wellburn, 1994).

۳. نتایج

۳.۱. اثر کلرید جیوه در طی فاز لگاریتمی بر شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی جلبک *Monaraphidium* بعد از ۹۶ ساعت

جدول ۱ بیانگر اثر کلرید جیوه در طی فاز لگاریتمی روی شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی *Monaraphidium* درطی ۹۶ســـاعت تیمار می‌باشـــد. اعداد گزارش شـــده میانگین بررســـی شـــش بار خاصـــیت آنتی‌اکســـیدانی (۹ بار تکرار) می‌باشـد که برحسـب میانگین± انحراف معیار ذکر شـده ا ست. نتایج حا صل از ظرفیت آنتی‌اک سیدانی کل به روش FRAP نشـــان می‌دهد که با افزایش غلظت کلرید جیوه در محیط، قدرت آنتی‌اکســـیدانی نمونه‌ها کاهش پیدا می‌کند. نتایج حاصـل گویای آن اسـت که بیشـترین میزان قدرت آنتی‌اکســـیدانی مربوط به گروه کنترل وکمترین میزان با کاهش معنی‌دار ($P <$۰/۰۵)، متعلق به تیمار ۵ میکرو مولار ا ست. نتایج مربوط به محتوی فنولی تام نشان می‌دهد که بیش‌ترین محتوی فنولی مربوط به گروه کنترل و کم‌ترین آن متعلق به غلظت ۵ میکرومولار است ($P <$۰/۰۵) که این نتایج مربوط به میانگین می‌باشـد اما از نظر آماری تغییری در میزان فنول نســـبت به گروه کنترل مشـــاهده نشـــد.

جدول ۱- میانگین (Mean±SD) نتایج حاصل از اثر کلرید جیوه در طی فاز لگاریتمی بر شاخص‌های آنتی‌اکسیدان *Monoraphidium* بعد از ۹۶ ساعت

اثر کلرید جیوه(برداشت اول)	FRAP µmol Fe (II) /g	TOTAL Phenol Mg GAE/g	Flavonoid Mg/g
صفر	۸۸/۱۵ ± ۰/۱۸ (a)	۵/۱۲ ± ۰/۰۴ (a)	۲۹/۸۹± ۰/ ۵۱ (a)
۲µM	۶۰/۶۵ ± ۰/۲۴ (a)	۳/۵۳ ± ۰/۰۵ (a)	۲۰/۸۹±۰/۳۳ (a)
۵µM	۵۰/۶۵ ± ۰/۰۴ (b)	۸۲/۲ ± ۰/۰۳۶ (a)	۱۵/۶۰±۰/۱۷ (a)
۸µM	۵۳/۶۵ ± ۰/۰۶ (b)	۳/۴۷ ± ۰/۰۰۴ (a)	۱۳/۰۵±۰/۰۸ (b)

حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنا دار در سطح ۰/۰۵ است.

نتایج حاصـــل از تاثیر غلظت‌های مختلف کلرید جیوه بر روی محتوی فلاونوئید نشـــان از کاهش میزان فلاونوئید با افزایش غلظت می‌باشد. کم‌ترین میزان فلاونوئید با کاهش معنی‌دار (P <۰/۰۵) مربوط به غلظت ۸ میکرومولار از کلرید جیوه است.

جدول ۲ بیانگر اثر کلرید جیوه درطی فاز لگاریتمی روی شـــاخص‌های آنتی‌اکســـیدانی *Monaraphidium* در پایان روز شـــانزدهم از زمان تلقیح می‌باشـــد. اعداد گزارش شده میانگین بررسی شش بار خاصیت آنتی‌اکسیدانی (سه بار استخراج متفاوت واز هر استخراج سه بار بررسی خاصـــیت آنتی‌اکســـیدانی) اســـت که برحســـب میانگین± انحراف معیار ذکر شـــده اســـت. نتایج حاصـــل از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل به روش FRAP نشان می‌دهد که، با افزایش زمان مواجه ریز جلبک‌ها با غلظت‌های مختلف کلرید جیوه، میزان آنتی‌اکســـیدان کل در غلظت ۸ میکرو مولار بیش‌تر از سایر تیمارها ست؛ اما این افزایش از نظر آماری معنی‌دار گزارش نشـــد (P>۰/۰۵). کم‌ترین میزان آنتی‌اکســـیدان کل مربوط به غلظت ۵ میکرو مولار بود که نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت. بررسی تاثیر تیمارهای مختلف کلرید جیوه بر محتوی فنولی ریز جلبک مورد مطالعه نشـــان از کاهش میزان فنول تام در غلظت‌های ۲ و۵ میکرومولار دارد. تنها با اندکی اختلاف میزان فنول تام در غلظت ۸ میکرومولار با نمونه کنترل برابری می‌کند. نتایج حاصل، از نظر میانگین گزارش شده ولی از نظر آماری کاهش معنی‌داری گزارش نشـده اسـت. نتایج نشان داد که تاثیر تیمارهای مختلف کلرید جیوه بر محتوی فلاونوئیدی ریز جلبک‌ها باعث کاهش میزان فلاونوئید نســـبت به گروه کنترل می‌شـــود و بیش‌ترین کاهش متعلق به غلظت ۵ میکرو مولار بود، ولی از نظر آماری کاهش معنی‌داری (P <۰/۰۵) نداشت.

جدول ۲- میانگین(Mean±SD) نتایج حاصل از اثر کلرید جیوه در طی فاز لگاریتمی بر شاخص‌های آنتی‌اکسیدان *Monoraphidium* در پایان روز شانزدهم از زمان تلقیح

اثر کلرید جیوه(برداشت دوم)	FRAP µmol Fe(II) /g	TOTAL Phenol Mg GAE/g	Flavonoid Mg/g
صفر	۱۱۲/۴ ± ۰/۰۶ (b)	۵/۵۶ ± ۰/۰۵ (a)	۳۲/۷۶ ± ۰/۳۰(a)
۲µM	۷۹/۹ ± ۰/۱۳ (c)	۴/۱۷ ± ۰/۰۲ (a)	۲۸/۱۸ ± ۰/۲۵ (a)
۵µM	۷۱/۹ ± ۰/۱۱ (c)	۳/۷۰ ± ۰/۰۷(a)	۲۲/۲ ± ۰/۴۶ (a)
۸µM	۱۳۰/۶۵ ± ۰/۰۷(a)	۵/۴۷ ± ۰/۰۹ (a)	۳۱/۷۳ ± ۰/۵۴ (a)

حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار است.

۳.۳. اثر کلرید جیوه در طی فاز لگاریتمی در جلبک *Scenedesmus* بعد از ۹۶ساعت

جدول ۳ بیانگر اثر کلرید جیوه درطی فاز لگاریتمی بر روی شـــاخص‌های آنتی‌اکســـیدانی درطی ۹۶ســـاعت تیمار می‌باشـــد. . اعداد گزارش شـــده میانگین بررســـی شـــش بار خاصیت آنتی‌اکسیدانی (سه بار استخراج متفاوت واز هر استخراج سه بار بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی) می‌باشد که برحسب میانگین± انحراف معیار ذکر شده است. نتایج حاصل از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل به روش FRAP نشان می‌دهـد کـه، بـا افزایش غلظـت کلریـد جیوه قـدرت آنتی‌اکســـیدانی ریزجلبک نســـبت به گروه کنترل کاهش معنادار (P <۰/۰۵) را نشـــان می‌دهد. بیش‌ترین کاهش میزان آنتی‌اکســـیدان مربوط به غلظت ۸ میکرومولار از کلرید جیوه بود. بررســـی تاثیر هر یک از تیمارها برمحتوی فنولی تام نشـــان از کاهش میزان فنول نســـبت به گروه کنترل می‌باشد؛ که به صورت مشترک با اندکی اختلاف با یکدیگر تیمار ۸ و ۵ میکرو مولار بیش‌ترین کاهش محتوی فنولی را نشان می‌دهد؛ که این کاهش تنها از نظر میانگین گزارش شـــده اما از نظر آماری کاهش معنی‌داری گزارش

نشده است. نتایج حاصل از اثر غلظت‌های مختلف تیمار با کلرید جیوه نشان از کاهش میزان فلاونوئید نسبت به گروه کنترل می‌باشد و بیش‌ترین کاهش در محتوی فلاونوئیدی مربوط به تیمار با ۵ میکرو مولار می‌باشد.

جدول ۳- میانگین (Mean±SD) نتایج حاصل از اثر کلرید جیوه در طی فاز لگاریتمی بر شاخص‌های آنتی‌اکسیدان *Scenedesmus* بعد از ۹۶ ساعت

اثر کلرید جیوه(برداشت اول)	FRAP µmol Fe(II) /g	TOTAL Phenol Mg GAE/g	Flavonoid Mg/g
صفر	۶۲/۶۵ ± ۰/۱۹ (a)	۴/۱۲ ± ۰/۰۴ (a)	۲۰/۹۲ ± ۰/۴۲ (a)
۲µM	۵۳/۶۵ ± ۰/۱۰ (a)	۳/۹۴ ± ۰/۰۲ (a)	۱۸/۹۶ ± ۰/۳۴ (a)
۵µM	۳۰/۱۵ ± ۰/۰۵ (b)	۲/۹۴ ± ۰/۰۱۵ (a)	۹/۵۷ ± ۰/۱۹ (a)
۸µM	۲۶/۶۵ ± ۰/۰۳ (b)	۲/۶۷ ± ۰/۰۱۵ (a)	۱۰/۶۷± ۰/۱۸ (a)

حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار است.

۳.۴. اثر کلرید جیوه در طی فاز لگاریتمی بر شاخص‌های آنتی‌اکسیدان *Scenedesmus* درپایان روز شانزدهم

جدول ۴ بیانگر اثر کلرید جیوه درطی فاز لگاریتمی روی شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی *Scenedesmus* در پایان روز شانزدهم است. اعداد گزارش شده میانگین بررسی شش بار خاصیت آنتی‌اکسیدانی (سه بار استخراج متفاوت و از هر استخراج سه بار بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی) می‌باشد که برحسب میانگین± انحراف معیار ذکر شده است.

جدول۴- میانگین (Mean±SD) نتایج حاصل از اثر کلرید جیوه در طی فاز لگاریتمی بر شاخص‌های آنتی‌اکسیدان *Scenedesmus* درپایان روز شانزدهم

اثر کلرید جیوه(برداشت دوم)	FRAP µmol Fe(II) /g	TOTAL Phenol Mg GAE/g	Flavonoid Mg/g
صفر	۷۸/۶۵ ± ۰/۳۱ (a)	۴/۴۱ ± ۰/۰۵ (a)	۱۸/۴۱ ± ۰/۱۸(a)
۲µM	۳۳/۴ ± ۰/۱۲ (b)	۳/۳۵ ± ۰/۰۲ (a)	۱۱/۶۷ ± ۰/۱۲ (a)
۵µM	۳۴/۹ ± ۰/۱۴ (b)	۲/۴۴ ± ۰/۰۶ (a)	۹/۶۳ ± ۰/۱۲ (a)
۸µM	۴۰/۴ ± ۰/۰۶۷ (b)	۴/۰۶ ± ۰/۰۴۹ (a)	۱۶/۸ ± ۰/۱۸ (a)

حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار است.

نتایج حاصل از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل به روش FRAP نشان می‌دهد که، افزایش زمان مواجه ریزجلبک با غلظت های مختلف کلرید جیوه همچنان باعث کاهش معنی‌دار میزان آنتی‌اکسیدان شده است و بیشترین میزان کاهش نسبت به نمونه کنترل ابتدا مربوط به تیمار با غلظت ۲میکرومولار و سپس تیمار با غلظت ۵ میکرومولار از کلرید جیوه می‌باشد. براساس نتایج ارائه شده در جدول ۴ کمترین میزان محتوای فنلی تام مربوط به تیمار با غلظت ۵ میکرومولار بود و بیشترین میزان فنل تام مربوط به گروه کنترل و تیمار با غلظت ۸ میکرومولار ثبت شد وکاهش معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵). طبق جدول محتوای فلاونوئید نمونه‌ها با افزایش غلظت کلرید جیوه کاهش می یابد و میزان این کاهش در تیمار با غلظت ۵ میکرومولار بیشتر از ۸ میکرومولار است.

۳.۵. اثر کلرید جیوه در طی فاز لگاریتمی بر میزان رنگیزه‌ها در جلبک *Monoraphidium* بعد از ۹۶ ساعت

مطابق جدول ۵ میزان رنگدانه ها با افزایش غلظت

کلرید جیوه کاهش می‌یابد. بیشترین میزان رنگدانه نیز در گروه کنترل دیده شد (P <۰/۰۵).

جدول۵- میانگین (Mean±SD) نتایج حاصل از اثر کلرید جیوه در طی فاز لگاریتمی بر میزان رنگیزه‌ها در *Monoraphidium* در طی ۹۶ ساعت

اثر کلرید جیوه (برداشت اول)	Chlorophyll a mg/g	Chlorophyll b mg/g	Carotenoid mg/g
صفر	۱۸/۰۸ ± ۱/۱۸ (a)	۲۲/۵۶ ± ۱/۰۴ (a)	۵/۴۱±۰/۵۱ (a)
۲µM	۱۳/۹۵ ± ۰/۲۴ (a)	۱۷/۶۳ ± ۰/۰۵ (a)	۳/۰۳±۰/۳۳ (a)
۵µM	۱۳/۴۳± ۲/۰۴ (a)	۱۷/۰۵ ± ۰/۰۳۶ (a)	۲/۹۲±۰/۱۷ (a)
۸µM	۱۲ ± ۰/۰۶ (a)	۱۵/۸۲ ± ۰/۰۰۴ (a)	۲/۱۷±۱/۰۸ (a)

حروف مشابه هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار است.

۳.۶. اثر کلرید جیوه در طی فازلگاریتمی بر میزان رنگیزه‌ها در جلبک *Monoraphidium* در پایان روز شانزدهم

همانطور که در جدول ۶ آمده است، میزان تولید کلروفیل a در غلظت ۸ میکرومولار افزایش یافت و میزان کلروفیلb و کاروتنوئید در غلظت ۵ میکرومولار بیشتر بود (P <۰/۰۵).

جدول ۶- میانگین (Mean±SD) نتایج حاصل از اثر کلرید جیوه در طی فازلگاریتمی بر میزان رنگیزه‌ها در جلبک *Monoraphidium* در پایان روز شانزدهم

اثر کلرید جیوه (برداشت دوم)	Chlorophyll a mg/g	Chlorophyll b mg/g	Carotenoid mg/g
صفر	۴/۷۳± ۱/۱۸ (a)	۷/۹۸± ۱/۰۴ (a)	۱/۷۳±۰/۵۱ (a)
۲µM	۱۱/۷۵± ۰/۲۴ (a)	۱۲/۶۳ ± ۰/۰۵ (a)	۱/۶۴±۰/۵۳ (a)
۵µM	۸/۴۳± ۲/۰۴ (a)	۱۶/۷۵ ± ۱/۰۳۶ (a)	۴/۲۶ ±۰/۱۷ (a)
۸µM	۱۳/۱۱ ± ۱/۰۶ (a)	۱۴/۶۲ ± ۲/۰۰۴ (a)	۲/۳۵ ± ۱/۰۸ (a)

حروف مشابه هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار است.

۳.۷. نتایج حاصل از اثر کلرید جیوه در طی فاز لگاریتمی بر میزان رنگیزه‌ها در *Scenedesmus* درطی ۹۶ ساعت تیمار

بر طبق جدول ۷ میزان تولید رنگدانه با افزایش غلظت کلرید جیوه کاهش نشان می‌دهد (P <۰/۰۵). این نتایج تنها بر حسب میانگین می‌باشد اما از نظر آماری اختلاف معنی‌داری گزارش نشده است.

۳.۸. نتایج حاصل از اثر کلرید جیوه در طی فاز لگاریتمی بر میزان رنگیزه ها در *Scenedesmus* در پایان روز شانزدهم از زمان تلقیح

طبق نتایج بدست آمده، همچنان با افزایش غلظت میزان تولید رنگدانه‌ها کاهش می‌یابد (P <۰/۰۵).

جدول۷- میانگین نتایج (Mean±SD) حاصل از اثر کلرید جیوه در طی فاز لگاریتمی بر میزان رنگیزه‌ها در *Scenedesmus* درطی ۹۶ ساعت

اثر کلرید جیوه(برداشت اول)	Chlorophyll a mg/g	Chlorophyll b mg/g	Carotenoid mg/g
صفر	۱۴/۳۳± ۱/۱۸ (a)	۳۳/۶± ۲/۰۴ (a)	۸/۸۵± ۰/۵۱ (a)
۲µM	۱۸/۳۳ ± ۰/۲۴ (a)	۲۰/۶۹± ۰/۰۵ (a)	۴/۲۳ ± ۰/۳۳ (a)
۵µM	۱۱/۰۸ ± ۱/۰۴ (a)	۱۵/۵۱± ۰/۰۳۶ (a)	۲/۸۷±۱/۱۷ (a)
۸µM	۳/۸ ± ۰/۰۶ (a)	۱۵/۱۱ ± ۱/۰۰۴ (a)	۲/۶۴±۱/۰۸ (a)

حروف مشابه هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار است.

جدول۸- میانگین (Mean±SD) نتایج حاصل از اثر کلرید جیوه در طی فاز لگاریتمی بر میزان رنگیزه‌ها در *Scenedesmus* در پایان روز شانزدهم از زمان تلقیح

اثر کلرید جیوه(برداشت اول)	Chlorophyll a mg/g	Chlorophyll b mg/g	Carotenoid mg/g
صفر	۱۱/۸۳ ± ۱/۱۸ (a)	۱۷/۱۸ ± ۱/۰۴ (a)	۳/۰۶±۱/۵۱ (a)
۲µM	۹/۵۲ ± ۱/۲۴ (a)	۱۲/۴۸ ±۱/۰۵ (a)	۲/۰۸ ± ۱/۳۰ (a)
۵µM	۱۰/۷۱± ۲/۰۴ (a)	۱۲/۹۵± ۰/ ۳۶ (a)	۰/۶۱±۰/۱۷ (a)
۸µM	۹/۰۵ ± ۱/۰۶ (a)	۱۲/۸۲ ± ۱/۰۰۴ (a)	۲/۱۳±۱/۰۸ (a)

حروف مشابه هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار است.

۴. بحث و نتیجه گیری نهایی

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که از میزان رنگیزه‌های ریزجلبک *Monoraphidium* در مواجه کوتاه مدت با غلظت‌های مختلف کلرید جیوه کاسته می‌شود، اما در مواجه طولانی مدت میزان تولید رنگیزه در غلظت ۸ و ۵ میکرومولار نسبت به گروه کنترل افزایش نشان داد. ولی درجلبک *Scenedesmus* با افزایش غلظت کلرید جیوه و افزایش زمان، میزان تولید رنگدانه کاهش نشان داد. این افزایش و کاهش تنها از نظر میانگین بررسی شد، اما از نظر آماری هیچ اختلاف معناداری ($P < ۰/۰۵$) مشاهده نشد. مقدار کلروفیل و تعداد سلول از جمله شاخص‌های فیزیولوژیکی جهت بررسی استرس‌ها در اکوسیستم‌های آبی محسوب می شوند (Bindhu, 2013). Sengar و همکاران در سال ۱۹۹۶ بیان کردند که کاهش محتوای کلروفیل در اثر استرس ناشی از فلزات سنگین نتیجه‌ی آنزیم‌های دخیل در بیوسنتز کلروفیل است. سایر محققین نیز گزارش کردند که مکانیسم اصلی ایجاد سمیت ناشی از جایگزینی فلزات سنگینی چون جیوه، سرب و کادمیوم با فلز منیزیوم در کلروفیل است که با تولید رادیکال‌های آزاد سبب تخریب مولکول‌های کلروفیل وکاهش فتوسنتز می‌گردند (Sengar and Panday, 1996).

در تحقیق Choudhary و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان داده شد که قرار گرفتن جلبک اسپیرولینا *Spirulina* spp. در معرض فلزهای مس، سرب و روی باعث کاهش در نرخ رشد سلولی جلبک خواهد شد. این امر شاید به علت اثرگذاری استرس اکسیداتیو بر فعالیت خط دفاعی ریزجلبک باشد (Choudhary *et al*., 2007). مکانیسم اثرات سمی فلزات سنگین از طریق مسدود کردن گروه‌های عملکردی مهم مانند آنزیم‌ها، پلی‌نوکلئوتیدها، دناتوراسیون و غیر فعال شدن آنزیم‌ها، باعث اختلال فیزیولوژیکی در سلول می‌شوند. همچنین رادیکال‌های آزاد باعث اکسیداسیون مولکول‌های زیستی

مانند ا سیدهای نوکلئیک و پروتئین می شوند و در نهایت در ثبات سلولی و در نفوذ پذیری غشا اخلال ایجاد می‌کنند (Cobbbet and Goldsbrough, 2002; Cobbbet, 2000; Rauser, 1995). در تحقیق Carfagna و همکاران در سال ۲۰۱۳، از فلز سرب و کادمیوم ا ستفاده شد که هر دو فلز رشد جلبک کلرلا را مهار کردند که اثراتشان وابسته به غلظت، نوع فلز و مدت زمان مواجه بود و در این میان تاثیر سمیت فلز کادمیوم بیشتر از سرب بود (Carfagna *et al*., 2013).

طبق تحقیقات Hamed و همکاران در سال ۲۰۱۷ میزان کلروفیل در هر دو ریزجلبک کلرلا *Chlorella* و *Scenedesmus* در مواجه با فلز مس نسبت به گروه کنترل کاهش می‌یابد (Hamed *et al*., 2017). کیانی و همکاران در سال ۱۳۹۳ با تحقیقی که روی ریزجلبک *Scenedesmus* انجام دادند نشان دادند که تاثیر غلظت‌های مختلف سرب، مس، نیکل وکادمیوم روی ریز جلبک باعث کاهش معنادار کلروفیل و وزن خشک جلبک می‌گردد (Kiani *et al*., 2014).

مطالعه حاضر نشان داد که میزان آنتی‌اکسیدان کل به روش FRAP در ریزجلبک *Scenedesmus* با افزایش غلظت کلرید جیوه و افزایش زمان مواجه کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد. نتایج این مطالعه کاهش معنی‌دار در میزان آنتی‌اکسیدان‌ها را هم در مواجه کوتاه مدت و هم در مواجه بلند مدت درجلبک *Monoraphidium* *تنها در غلظت ۵ میکرومولار* نشان داد. همچنین میزان فنول و فلاونوئید در مواجه طولانی نیز به صورت کاهش معنی‌دار کاهش یافت. یکی از راه های دفاعی در گیاهان جهت کاهش مضرات رادیکال‌های آزاد، استفاده از سیستم آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی از قبیل SOD، CAT و گلوتاتیون پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز و یا آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی مانند آسکوربات، گلوتاتیون، کاروتنوئیدها، ترکیبات فنولی مانند فلاونوئیدها، محتوای فنلی تام، تانن‌ها ولیگنین‌ها ست که به عنوان حذف‌کنندگان رادیکال های آزاد محسوب می‌شوند (Qin *et al*., 2006). در این مطالعه برخلاف انتظار، با افزایش رادیکال‌های آزاد میزان آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی کاهش یافت. Sabatini و همکاران درسال ۲۰۰۹ بیان داشتند که ریزجلبک‌ها برای محافظت از خود در مواجه با فلزات سنگین دارای مکانیسم‌های مختلفی هستند. به عنوان مثال یکی از راهکارهای ریزجلبک *Scenedesmus* وجود کمپلکس پلی ساکاریدی در دیواره سلولی ریزجلبک است که باعث مقاومت ریزجلبک از ورود فلزات به داخل سیتوپلاسم می‌شود که این امر در راستای پاسخ آنتی‌اکسیدانی ریزجلبک است و همچنین دومین راهکار *Scenedesmus* در مواجه با فلزات تغییر در نسبت کلروفیل a به b و فعالیت آنزیم کاتالاز است که این امر در مورد ریزجلبک‌های دیگر نیز صادق است. آنها مشاهده کردند که مواجه *Scenedesmus* و *Chlorella* با فلز مس به مدت ۷روز باعث افزایش میزان آنزیم سوپراکسید دیسموتاز می‌شود. و این افزایش با بالا رفتن غلظت فلز مس افزایش می‌یابد (Sabatini *et al*., 2009).

۵. نتیجه گیری

نتایج بدست آمده از بررسی اثرات کلرید جیوه بر دو ریزجلبک *Scenedesmus* و Monoraphidium نشان داد که هر دو ریزجلبک از نظر خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بسزایی هستند و به علت اثرات سمی کلرید جیوه میزان رشد و تکثیر ریزجلبک‌ها کاهش می یابد و غلظت و زمان مواجه با کلرید جیوه نیز بر محتوای رنگیزه‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها اثر کاهشی دارد. پیشنهاد می شود بعداز مواجهه جلبک با فلزات سنگین، و با حذف فلزات سنگین از محیط پرورش آنها، شرایط مناسبی را جهت بالا بردن پتانسیل این ریز جلبک‌ها، در تولید ترکیبات خاص و به کار گیری آنها در صنایع دارویی، پزشکی، مکمل‌های غذایی، فراهم نمود.

References ۶. منابع

Al-Farsi, M., Alasalvar, C., Morris, A., Baron, M., Shahidi, F., 2005. Comparison of antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids, and phenolics of three native fresh and sun-dried date (*Phoenix dactylifera* L.) varieties grown in Oman. *Journal of agricultural and food chemistry 53*(19), pp.7592-7599.

Bindhu, K.B., 2013. Optimum nutritional requirement for the growth of *Chaetoceros Calcitrans*. *Research Journal of Marine Sciences ISSN, 2321*, p.1296.

Bischoff, H.C., 1963. Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species. *Phycological Studies IV. University of Texas Publ. No. 6318, 6318*, pp.1-95.

Borowitzka, M.A., 1997. Microalgae for aquaculture: opportunities and constraints. *Journal of applied phycology 9*(5), pp.393-401.

Borowitzka, M.A., 1999. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, and fermenters. In *Progress in industrial microbiology* (Vol. 35, pp. 313-321). Elsevier.

Carfagna, S., Lanza, N., Salbitani, G., Basile, A., Sorbo, S., Vona, V., 2013. Physiological and morphological responses of Lead or Cadmium exposed *Chlorella sorokiniana* 211-8K (Chlorophyceae). *Springer Plus 2*(1), pp.1-7.

Choudhary, M., Jetley, U.K., Khan, M.A., Zutshi, S. and Fatma, T., 2007. Effect of heavy metal stress on proline, malondialdehyde, and superoxide dismutase activity in the cyanobacterium Spirulina platensis-S5. *Ecotoxicology and environmental safety 66*(2), 204-209.

Cobbett, C., Goldsbrough, P., 2002. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual review of plant biology 53*(1),159-182.

Cobbett, C.S., 2000. Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant physiology 123*(3),.825-832.

De-Bashan, L.E., Bashan, Y., Moreno, M., Lebsky, V.K. and Bustillos, J.J., 2002. Increased pigment and lipid content, lipid variety, and cell and population size of the microalgae Chlorella spp. when co-immobilized in alginate beads with the microalgae-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Canadian journal of microbiology*, *48*(6), pp.514-521.

Ghasemi, Y., Moradian, A., Mohagheghzadeh, A.A., Shokravi, S., Morowat, A., 2007. Antifungal and antibacterial activity of microalgae collected from paddy –fields of iran: characterization of antimicrobial activity of *Chroococcus disperses*. *Journal of Biological Science* **7**, 904-910.

Grobbelaar, J.U., 2006. Algal nutrition. In: Richmond A (Ed). *Handbook of micro algal culture: biotechnology and applied phycology*.3rd end, Blackwell publishing company, Oxford.

Hajimahmoodi, M., Faramarzi, M.A., Mohammadi, N., Soltani, N., Oveisi, M.R., Nafissi-Varcheh, N., 2010. Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. *Journal of Applied Phycology 22*(1), 43-50.

Hamed, S.M., Selim, S., Klöck, G., AbdElgawad, H., 2017. Sensitivity of two green microalgae to copper stress: growth, oxidative and antioxidants analyses. *Ecotoxicology and environmental safety 144*,19-25.

Hanachi, P., Aghababaei, A., Norozi, M., 2019. The effect of pH and temperature on growth, the antioxidants, phenols and flavonoids in *Scenedesmus* sp. microalgae. *Journal of Fisheries 72*(1), 13-27.

Hanachi, P., Zarringhalami, R., Tamijani, R.R., 2019. Investigation of Antioxidant Properties of *Polygonatum orientale* Desf and *Tilia dasystyla* Extracts by Different Methods and Solvents. *Hormozgan Medical Journal 22*(4), 86504-e86504.

Kiani, S., Farhadian, O., Soofiani, N.M., 2014. Effect of Heavy Metals (Cadmium, Copper, Lead and Nickel) on Chlorophyll *a* and Biomass of Green Algae *Scenedesmus quadricauda*. *Journal of Fisheries Science & Technology 3*(3).

Qin, G.Q., Yan, C.L., Wel, L.L., 2006. Effect of cadmium stress on the contents of tannin, soluble sugar and proline in Kandelia candel (L.) Druce seedlings [J]. *Acta Ecologica Sinica*, *10*.

Rauser, W.E., 1995. Phytochelatins and related peptides. Structure, biosynthesis, and function. *Plant physiology 109*(4), 1141.

Sabatini, S.E., Juárez, Á.B., Eppis, M.R., Bianchi, L., Luquet, C.M., de Molina, M.D.C.R., 2009. Oxidative stress and antioxidant defenses in two green microalgae exposed to copper. *Ecotoxicology and environmental safety 72*(4), 1200-1206.

Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.Y., Vaca-Garcia, C., 2014. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews 35*, 265-278.

Sengar, R.S., Pandey, M., 1996. Inhibition of chlorophyll biosynthesis by lead in greening *Pisum sativum* leaf segments. *Biologia plantarum 38*(3), 459-462.

Wellburn, A.R., 1994. The spectral determination of chlorophylls *a* and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of plant physiology 144*(3), 307-313.