بررسی توانایی جلبک *Dunaliella salina* سویه Utex-200 در زدایش آلومینیوم از محیط

منصور شریعتی* و ندا اکبرزاده

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۴/۲۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۷/۳۰)

چکیده :

در این مطالعه به بررسی توانایی جلبک *Dunaliella salina* سویه Utex-200 در زدایش آلومینیوم محیط پرداخته شد. جلبک در محیط کشت رشد داده شد و اثر غلظت‌های صفر(شاهد)، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میکرومولار آلومینیوم بر روند رشد و میزان کلروفیل کل جلبک طی ۲۷ روز بررسی گردید. نتایج حاکی از آن بود که افزایش غلظت آلومینیوم در محیط باعث کاهش نرخ رشد و کاهش محتوای کلروفیل می‌گردد. به نظر می‌رسد احتمالاً این اثر به ترتیب می‌تواند ناشی از تخریب غشا و کاهش محتوای کلروفیل به واسطه عدم جذب عناصری نظیر کلسیم و منیزیم و متعاقب آن افزایش غلظت آلومینیوم باشد. تیمار سوسپانسیون جلبکی در غلظت‌های مورد بررسی آلومینیوم موجب برقراری پیوند بین سلول‌های جلبکی و یون‌های آلومینیوم شده که در نتیجه آگلوتیناسیون و رسوب یافتن سلول‌ها، کاهش تعداد سلول جلبکی در بخش رویی محیط و متعاقباً حذف آلومینیوم را در پی داشت. افزودن EDTA به محیط جلبکی ضمن پیوند با یون‌های آلومینیوم و جلوگیری نمودن از رسوب سلول‌ها، برقراری پیوند بین سلول‌های جلبکی و یون‌های آلومینیوم را تأئید نمود. همچنین مشاهده گردید که نه تنها هر سلول سوسپانسیون جلبکی ظرفیت مشخصی برای رسوب دادن آلومینیوم دارد بلکه تنها سلول‌های سالم و دست‌نخورده قادر به برقراری پیوند با یون‌های آلومینیوم و رسوب دادن آن می‌باشند. در مجموع، نتایج حاصل از این تحقیق برقراری پیوند مستحکم و مؤثر بین سلول‌های جلبکی و یون‌های آلومینیوم را نشان می‌دهد که این امر باعث توقف رشد و تقسیم سلولی، آگلوتینه شدن و رسوب سلول‌های جلبکی و به طور هم‌زمان زدایش آلومینیوم محیط می‌گردد.

کلمات کلیدی: آگلوتیناسیون سلولی، آلومینیوم، پاک‌سازی زیستی، جلبک *Dunaliella*

مقدمه:

فلزات سنگین گروه مهمی از آلاینده‌ها هستند که به طور طبیعی در محیط وجود داشته و یا به واسطه فعالیت انسان به محیط زیست وارد می‌شوند. از جمله این فلزات، می‌توان به آلومینیوم اشاره نمود که حدود ۷ درصد از توده قشر زمین را تشکیل داده (Delhaize and Ryan, 1995) و فرم شیمیایی و حلالیت آن توسط فاکتورهای محیطی مختلفی نظیر pH تحت تأثیر قرار می‌گیرد. ورود آلومینیوم به آب‌های اسیدی، افزایش حلالیت این عنصر، بروز سمیت و افزایش مقدار کل این فلز را به همراه دارد (Rengel, 1996). ممانعت از رشد ریشه نشانه‌ای بارز از سمیت آلومینیوم است و به نظر می‌رسد غشای پلاسمایی

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: mansour_shariati@yahoo.com

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1393.3.7.7.0]

سلول‌های ریشه بیش از سایر قسمت‌ها توسط سمیت آلومینیوم متأثر می‌گردد (Zhang and Rengel, 1999). فلزات سنگین بر موجودات دریایی از جمله فیتوپلانکتون‌ها و جلبک‌ها نیز تأثیر گذاشته و تغییراتی نظیر شکسته شدن غشاهای تیلاکوئیدی، اجسام پلی فسفات و واکوئل‌های تجمع یافته در بعضی از سلول‌های جلبکی تحت تیمار آلومینیوم یا سرب مشاهده گردیده است (Rengel, 1996). همچنین آلومینیوم سه ظرفیتی به طور مستحکم‌تری جایگزین کلسیم دو ظرفیتی پیوند شده به بارهای منفی سطح غشا شده و بر ساختار و پروتئین‌های غشای سلولی اثر می‌گذارد (Clarkson, 1989). ریزموجودات واکنش پذیری و سیالیت فلزات را تحت تأثیر قرار داده و می توانند جهت سمیت‌زدایی فلزات سنگین استفاده شوند (Vilensky *et al*., 2002; Al-Homaidan, 2006). وجود ویژگی‌هایی نظیر تحمل بالا به فلزات سنگین، توانایی رشد به صورت اتوتروفی و هتروتروفی، نسبت زیاد سطح به حجم، نورگرایی، توانایی بیان فیتوکلاتین‌ها و قابلیت دست‌کاری ژنتیکی در جلبک‌ها، آنها را به عنوان گزینه‌های ایده‌آلی برای پاک‌سازی و تغلیظ انتخابی فلزات سنگین از محیط مطرح می‌نماید (Suresh and Ravishankar, 2004). مشاهده شده است که برخی از گونه‌های جلبک سبز تک سلولی *Dunaliella* به عنوان سیستم مدل در مطالعات فیزیولوژی گیاهی و تنش‌ها مورد استفاده قرار گرفته (Avron and Ben-Amosts, 1992) و توانایی بالایی برای زیست در شرایط نامساعد محیطی دارد (Ben-Amotz and Avron, 1990). این جلبک غلظت‌های بالای فلزات سنگین را تحمل نموده و توانایی قابل توجهی برای جذب و پاک‌سازی فلزات از محیط‌های آبی دارد (Vilensky *et al*., 2002; Cabuk *et al*., 2005). در برخی از مشاهدات شخصی اولیه، سلول‌های جلبک *Dunaliella* در حضور آلومینیوم آگلوتینه شده و رسوب یافتند. این مشاهدات ما را بر آن داشت که به مطالعه توانایی جلبک *Dunaliella* در رسوب دادن و پاک‌سازی فلز سنگین آلومینیوم که از آلودگی‌های زیست محیطی محسوب شده و حذف آن کمک شایانی به محیط زیست می‌نماید، بپردازیم.

مواد و روش‌ها:

کشت جلبک: جلبک *Dunaliella* گونه *D. salina* سویه Utex-200 از کلکسیون دانشگاه تگزاس آمریکا تهیه و در محیط کشت Johnson و همکاران (۱۹۶۸) حاوی ۱ مولار KNO_3، ۱ مولار $MgSO_4$، ۴۰ میلی‌مولار $CaCl_2$، ۴۰ میلی-مولار KH_2PO_4، ۱+۴ میلی‌مولار $FeCl_3$+Na_2-EDTA، ۷ میلی‌مولار $MnCl_2$، ۱ میلی‌مولار $CuCl_2$، ۱ میلی‌مولار $ZnCl_2$، ۱ میلی‌مولار $CoCl_2$، ۱ میلی‌مولار $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$+$4H_2O$، ۲۳ میلی‌مولار $NaHCO_3$ در pH برابر ۷/۵ و غلظت ۲ مولار NaCl، در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و در رژیم شبانه‌روزی ۱۴ ساعت نور و ۱۰ ساعت تاریکی با شدت نور ۱۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه کشت گردید.

اثر آلومینیوم بر رشد (تقسیم سلولی) و میزان کلروفیل: جهت بررسی اثر آلومینیوم بر روند رشد و تغییرات میزان رنگیزه کلروفیل، کشت جلبکی با میزان تقریبی ۱۳×۱۰^{۴} سلول در میلی‌لیتر به گونه‌ای توسط نمک $AlCl_3$ مورد تلقیح قرار گرفت که غلظت‌های انتخابی صفر(شاهد)، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میکرو مولار آلومینیوم حاصل گردید. پس از تلقیح، نمونه‌ها در اتاق کشت و روی شیکر(INFOR AG CH-4103 BOTTNINGEN) با ۱۰۵ دور در دقیقه قرار داده شدند و طی یک دوره آزمایشی ۲۷ روزه در زمان‌های صفر، روز سوم و سپس هر شش روز یک بار نمونه‌برداری انجام و شمارش سلولی توسط لام هموسایتومتر (Schoen, 1988) و در سه تکرار انجام گرفت. به منظور بررسی تغییرات میزان رنگیزه کلروفیل، یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی در زمان‌های مذکور برداشته شد و به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰g سانتریفیوژ (Eppendorf AG 22331 Hamburg) گردید. سپس محلول رویی به طور

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1393.3.7.7.0]

کامل خارج شده و به رسوب حاصله ۱ میلی‌لیتر استون ۸۵ درصد اضافه و توسط ورتکس (Heidolph REAXtop) به خوبی مخلوط گردید. مجدداً عمل سانتریفیوژ تکرار، محلول رویی استخراج و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر(SECOMAM RS232) میزان جذب آن در طول موج‌های ۴۱۲، ۴۳۱، ۴۶۰ و ۴۸۰ نانومتر قرائت و مقدار کلروفیل کل بر حسب میکروگرم در میلی‌لیتر و در سه تکرار محاسبه گردید (Eijckelhoff and Dekker, 1997).

بررسی توانایی جلبک در رسوب دادن آلومینیوم: این بخش مطابق روش (Akbarzadeh and Shariati, 2014) انجام گرفت. در اواسط فاز رشد و پس از انجام دادن شمارش سلولی، سوسپانسیون جلبکی در سه تکرار برای رسیدن به غلظت‌های نهایی صفر (شاهد)، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰ و ۴۰۰۰ میکرومولار آلومینیوم با نمک $AlCl_3$ تیمار گردید. پس از افزودن آلومینیوم و مخلوط نمودن آن با محیط جلبکی، نمونه‌ها در شرایط سکون کامل قرار داده شدند و در زمان‌های صفر، ۱۰، ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه از بخش رویی محیط نمونه‌برداری شد و شمارش سلولی مجدداً انجام گرفت. با توجه به نتایج حاصل از شمارش سلولی، روند کاهش تعداد سلول در بخش رویی محیط و به کمک تصویربرداری از نمونه‌ها طی زمان‌های فوق، افزایش رسوب جلبکی ایجاد شده مورد بررسی قرار گرفت.

تأیید برهم‌کنش جلبک و آلومینیوم: در راستای تأئید کاهش تعداد سلول در محلول رویی محیط جلبکی و ایجاد رسوب حاصله در اثر برهم‌کنش جلبک و آلومینیوم موجود در سوسپانسیون جلبکی از ترکیب اتیلن دی آمید ترا استیک اسید (EDTA) به عنوان ماده کلات شونده با آلومینیوم جهت ممانعت از اتصال آلومینیوم با جلبک طبق ۶ تیمار استفاده گردید:

تیمار ۱(شاهد) (سوسپانسیون جلبکی بدون آلومینیوم و EDTA)، تیمار ۲ (سوسپانسیون جلبکی فاقد آلومینیوم و حاوی ۴۰۰۰ میکرومولار EDTA)، تیمار ۳ (سوسپانسیون جلبکی حاوی۲۰۰۰ میکرومولار آلومینیوم و فاقد EDTA)، تیمار ۴ (افزودن مخلوط ۲۰۰۰ میکرومولار آلومینیوم و ۴۰۰۰ میکرومولار EDTA به سوسپانسیون جلبکی)، تیمار ۵ (افزودن ۴۰۰۰ میکرومولار EDTA به سوسپانسیون جلبکی، مخلوط نمودن و سپس افزودن ۲۰۰۰ میکرومولار آلومینیوم) و تیمار ۶ (افزودن ۲۰۰۰ میکرومولار آلومینیوم به سوسپانسیون جلبکی، مخلوط نمودن و سپس افزودن ۴۰۰۰ میکرومولار EDTA). سپس تمامی نمونه‌ها در حالت سکون کامل قرار داده شدند. شمارش سلولی و نیز بررسی میزان رسوب جلبکی مطابق حالت قبل در زمان‌های صفر و ۹۰ دقیقه پس از تیمار و در سه تکرار انجام گرفت.

بررسی توانایی سلول کامل در اتصال و رسوب دادن آلومینیوم: جهت تحقیق پیرامون این که آیا غشاهای پاره شده سلول‌های جلبکی و یا مواد مترشحه و درون‌سلولی نیز مشابه با یک سلول سالم و زنده، اقدام به برقراری پیوند با آلومینیوم و رسوب دادن آن می نمایند، ۲۰ میلی‌لیتر محلول ۴۰۰۰ میکرومولار آلومینیوم به صورت جداگانه تحت تیمارهای زیر قرار گرفته و به مدت ۱۲۰ دقیقه در حالت سکون قرار داده شدند:

تیمار ۱ (۲ میلی‌لیتر محیط جلبکی حاوی سلول‌های جلبک سالم و دست‌نخورده)، تیمار ۲ (۰/۰۵ گرم رسوب تر حاصل از سانتریفیوژ سلول‌های پاره شده)، تیمار ۳ (۲ میلی‌لیتر محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ سلول‌های پاره شده)، تیمار ۴ (۰/۰۰۵ گرم رسوب خشک و پودر شده حاصل از سانتریفیوژ سلول‌های پاره شده) و تیمار ۵ (۰/۰۵ گرم محلول رویی خشک و پودر شده حاصل از سانتریفیوژ سلول‌های پاره شده).

سپس ۱۰ میلی‌لیتر از محلول رویی نمونه‌ها به آرامی برداشته شد و میزان آلومینیوم موجود در آن توسط دستگاه جذب اتمی (Atomic Absorption Spectrophotometer PU 9100 PHILIPS) اندازه‌گیری و بر اساس نتایج حاصله، میزان آلومینیوم رسوب‌یافته توسط سلول سالم و سایر تیمارها محاسبه گردید. در موارد اشاره شده جهت

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1393.3.7.7.0]

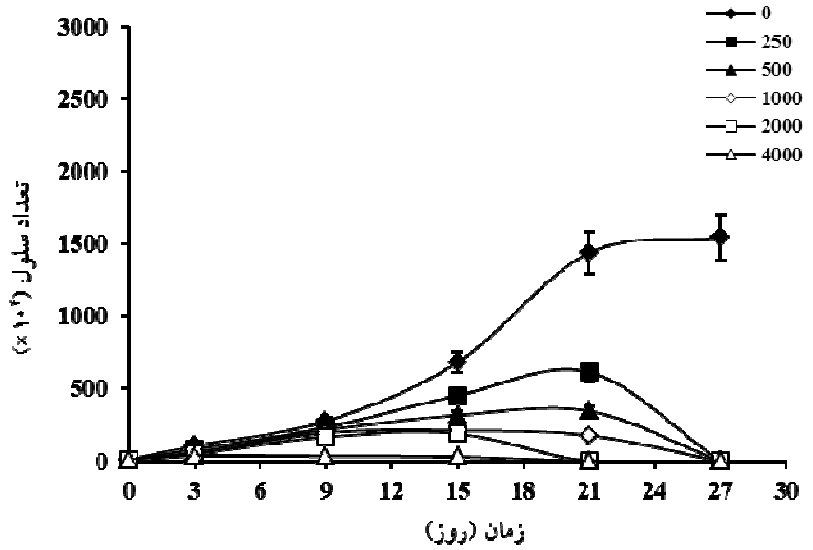
پاره و متلاشی نمودن سلول‌ها از سونیکیشن (TRANSSONIC 66O/H) و برای حصول اطمینان از پاره شدن سلول‌ها از میکروسکوپ نوری (OLYMPUS OPTICAL CO., LTD, MODEL CH3ORF200) استفاده گردید. همه آزمایش‌ها در سه تکرار مستقل برای هر تیمار انجام شد. میانگین و انحراف معیار (Standard deviation ±SD) برای هر تیمار اندازه گیری و در موارد مورد نیاز اختلاف آماری معنی‌دار بین نمونه‌ها با استفاده از آزمون دانکن ($P < 0.05$) تعیین گردید.

نتایج و بحث:

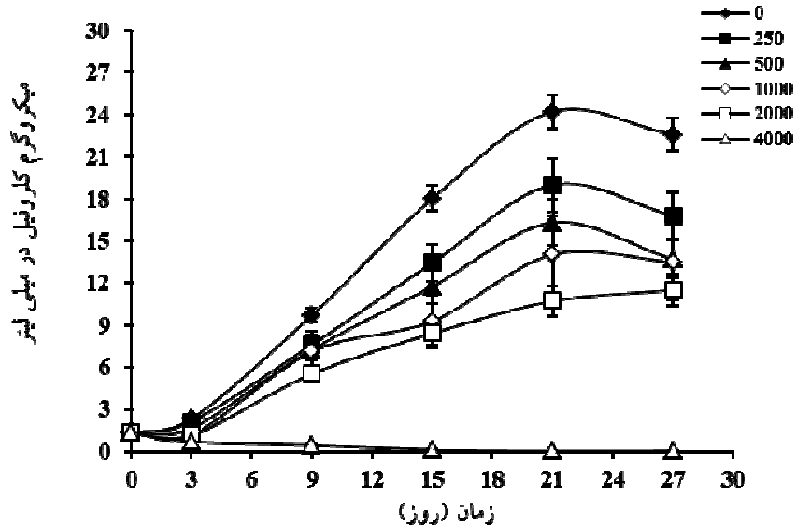
اثر فلز آلومینیوم بر روند رشد و تقسیم سلولی جلبک *Dunaliella*، گونه *D. salina* سویه Utex-200 تحت تیمار غلظت‌های نهایی صفر(شاهد)، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میکرومولار آلومینیوم طی ۲۷ روز بررسی گردید. همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود تعداد سلول در نمونه شاهد تا روز ۲۱ افزایش داشته و سپس در فاز ایستایی رشد با نرخ نسبتاً ثابتی تا پایان زمان آزمایش ادامه می‌یابد. از سوی دیگر، با افزایش غلظت آلومینیوم تا ۲۰۰۰ میکرومولار رشد به میزان چشم‌گیری کاهش یافته و در غلظت ۴۰۰۰ میکرومولار متوقف می‌گردد. نتایج حاصل از اعمال آلومینیوم بر روند رشد حاکی از آن است که همراه با افزایش غلظت آلومینیوم، کاهش و توقف تقسیم و رشد سلولی در زمان کوتاه‌تر و با سرعت بیشتری اتفاق می‌افتد. بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهند که برخی از فلزات سنگین نظیر مس و روی، اگرچه برای متابولیسم ضروری‌اند، در صورت تجمع یافتن سمیت بالایی ایجاد نموده و موجب توقف رشد و مرگ سلولی می‌گردند (Steffens, 1990; Gazso, 2001). گزارش‌ها نشان داده که فلزات سنگینی نظیر سرب و آلومینیوم می‌توانند باعث تغییرات ساختاری در غشای جلبک‌های تک‌سلولی گردند(Sagan *et al.*, 2007). همچنین گزارش شده است که فلز سنگین سرب باعث کاهش معنی‌دار تعداد سلول‌های جلبک *Dunaliella* می‌گردد (Shariati and Yahyaabadi, 2006). تحقیقات متعددی نیز به سمیت آلومینیوم و اتصال آن به محل‌هایی نظیر غشای پلاسمایی (Rengel, 1996; Silva *et al.*, 2000) به عنوان مهم‌ترین محل جهت اتصال یون‌های آلومینیوم (Taylor *et al.*, 2000) اشاره می‌نمایند. به نظر می‌رسد اثر بازدارنده آلومینیوم در سطح سلولی را می‌توان ناشی از برهم‌کنش قوی یون‌های Al^{3+} با ترکیباتی نظیر پروتئین‌ها، نوکلئیک‌اسیدها و پلی‌ساکاریدها دانست که با ممانعت از تقسیم و توسعه سلولی (Mossor-Pietraszewska, 2001) و دستخوش نمودن ترکیب غشای پلاسمایی (Zhang *et al.*, 1997) رشد را متوقف و موجب مرگ سلولی می‌گردند.

محتوای کلروفیل کل نیز به عنوان یکی از شاخص‌های مهم رشد در شرایطی مشابه با حالت قبل بررسی گردید. همان گونه که شکل ۲ نشان می‌دهد، در نمونه شاهد میزان کلروفیل کل هم‌سو با سیر صعودی رشد (شکل۱) تا روز ۲۱ با شیب تندی افزایش یافته و پس از این زمان، با تعدیل و کاهش سرعت تقسیم سلولی رو به کاهش می‌گذارد. روند هماهنگی از افزایش میزان کلروفیل در غلظت‌های ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار و با شیب ملایم‌تری در غلظت ۲۰۰۰ میلی‌مولار آلومینیومدیده می‌شود که تا روز ۲۱ ادامه و سپس کاهش می‌یابد. از سوی دیگر، همراه با توقف رشد سلول‌ها در غلظت ۴۰۰۰ میکرومولار آلومینیوم، متابولیسم سلولی به گونه‌ای دستخوش تغییر می‌گردد که تولید کلروفیل متوقف و میزان کلروفیل کل اولیه نیز کاهش یافته و به صفر می‌رسد. با توجه به نتایج به نظر می‌رسد کاهش میزان کلروفیل کل حاصل از تیمار آلومینیوم، احتمالاً ناشی از اختلال در ساختار و عملکرد غشای پلاسمایی و متعاقباً متابولیسم و فرآیندهای سلولی جلبک بوده که منجر به اختلال در جذب عناصر ضروری جهت تولید کلروفیل و نهایتاً کاهش میزان کلروفیل کل نسبت به شاهد می‌گردد. بررسی‌های دیگر نیز به کاهش زی‌توده و

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1393.3.7.7.0]



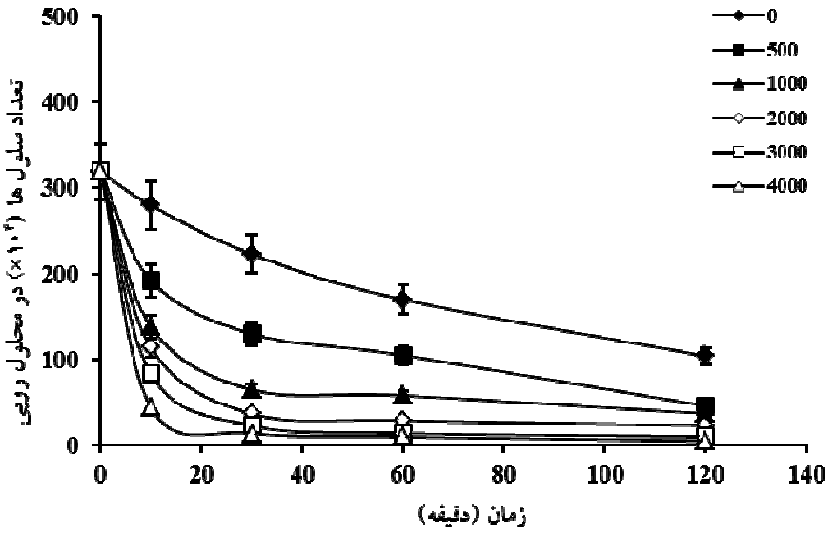
شکل۱- اثر تیمار غلظت‌های صفر، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میکرومولار آلومینیوم بر روند رشد جلبک *D. salina* سویه Utex-200 طی مدت ۲۷ روز. مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار می‌باشد.



شکل۲- تأثیر آلومینیوم بر محتوای کلروفیل کل جلبک *D. salina* سویه Utex-200 بر حسب میکروگرم بر واحد حجم طی مدت ۲۷ روز. مقادیر میانگین سه تکرار± انحراف معیار می‌باشد.

محتوای کلروفیل برگ‌ها و ساقه‌های گیاهان (Burzynski and Buczek, 1989; Ouzounidou *et al*., 1992; Sharma and Gaur, 1995) و ممانعت از عمل برخی از آنزیم‌های مسیر بیوسنتز کلروفیل نظیر δ-آمینولولینیک‌اسید دهیدروژناز و پروتوکلروفیلیدردوکتاز متعاقب تجمع فلزات سنگین (Prasad, 1998) اشاره نموده‌اند. همچنین کاهش میزان کلروفیل کل در جلبک *Dunaliella* تحت تیمار سرب مشاهده شده (Shariati and Yahyaabadi, 2006) و نشان داده شده است که برهم‌کنش یون‌های فلزات با پروتئین‌های غشای سلولی، نفوذپذیری غشا را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد (Khristo Forova *et al*., 1996). یون آلومینیوم نیز با

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1393.3.7.7.0]



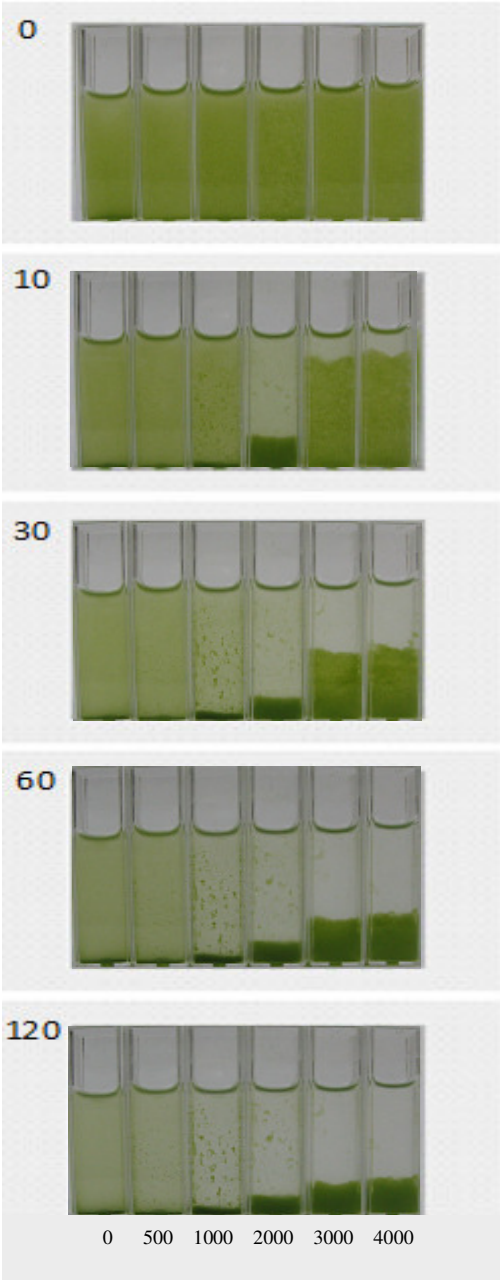
شکل۳- اثر تیمار غلظت‌های صفر، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰ و ۴۰۰۰ میکرومولار آلومینیوم بر تعداد سلول در محلول رویی محیط جلبکی *D. salina* سویه Utex-200 به عنوان شاخص میزان آلومینیوم رسوب یافته توسط جلبک طی مدت ۱۲۰ دقیقه. مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار می‌باشد.

ایجاد تغییر در ساختار لیپید غشای سلولی و مختل نمودن جذب و تجمع عناصری نظیر کلسیم و منیزیم، تولید کلروفیل را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Rengel and Robinson, 1989).

شکل ۳ روند کاهش تعداد سلول در محلول رویی محیط جلبکی تیمار شده با آلومینیوم را به عنوان شاخصی از آلومینیوم رسوب‌یافته و تصاویر شکل ۴ روند افزایش حجم رسوب جلبکی طی مدت ۱۲۰ دقیقه را نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود تعداد سلول موجود در محلول رویی نمونه شاهد با شیب نسبتاً آرامی کاهش می‌یابد که این امر می‌تواند به‌واسطه وزن سلول‌های جلبکی باشد. افزایش غلظت آلومینیوم موجب روند شدیدتر کاهش تعداد سلول در محلول رویی و از سوی دیگر افزایش حجم رسوب جلبکی (شکل ۴) طی مدت ۱۰ دقیقه می‌شود، به گونه‌ای که در شروع آزمایش، بیشترین سرعت کاهش تعداد سلول در محلول رویی مربوط به غلظت ۴۰۰۰ میکرومولار آلومینیوم بوده که منجر به ایجاد بیشترین حجم رسوب جلبکی و به تبع آن بیشترین شفافیت محلول رویی می‌گردد. برخی مطالعات به توانایی شماری از میکروارگانیسم‌ها نظیر باکتری، قارچ، مخمر، سیانوباکتری و جلبک برای اتصال یافتن به تعداد زیادی از فلزات سنگین اشاره نموده (Gupta *et* al., 2000) و غشای پلاسمایی سلول را به عنوان اولین محلی که تحت تأثیر سمیت این گروه از فلزات قرار می‌گیرد، معرفی می‌نمایند (McBrien and Hassall, 1965; Barber, 1968). لذا به نظر می‌رسد گرایش بالای آلومینیوم برای اتصال محکم به گروه‌های فسفات غشای سلولی، سبب تشدید این امر و برهم‌کنش مؤثر جلبک و آلومینیوم گشته (Gunse *et al.*, 1997) و آگلوتیناسیون شدید سلول‌های جلبکی را در پی دارد.

به منظور تأئید رابطه مستقیم جلبک و آلومینیوم در آگلوتیناسیون سلولی، رسوب یافتن جلبک و به تبع آن زدایش آلومینیوم از بخش رویی محیط جلبکی، از ترکیب

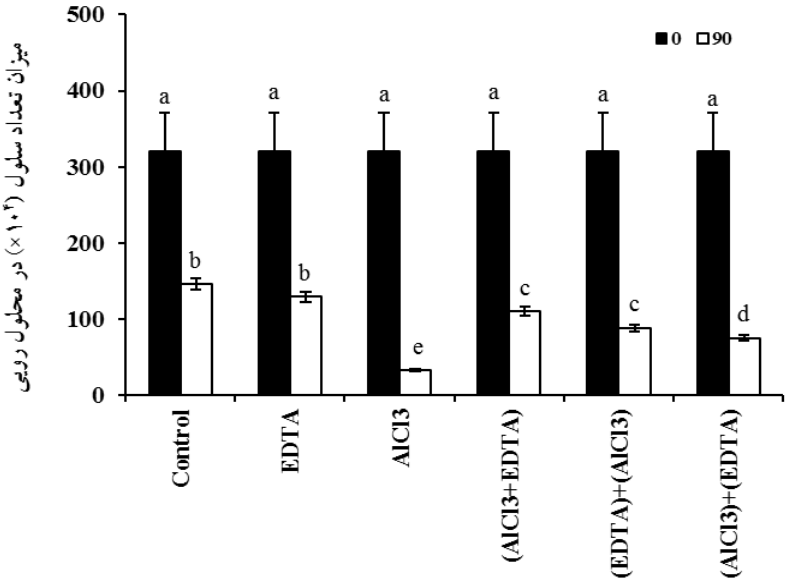
[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1393.3.7.7.0]



شکل۴- روند تشکیل رسوب جلبکی به واسطه پیوند آلومینیوم با سلول‌های جلبک *D. salina* سویه Utex-200 تحت تیمار غلظت‌های صفر، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰ و ۴۰۰۰ میکرومولار آلومینیوم طی مدت۱۲۰ دقیقه.

EDTA به عنوان کلات جهت باند نمودن آلومینیوم و جلوگیری از پیوند شدن آن با سلول‌های جلبکی استفاده گردید. شکل ۵ روند کاهش تعداد سلول در محلول رویی و تصاویر شکل ۶ اختلاف حجم رسوب جلبکی ایجاد شده در نمونه شاهد و نمونه‌های تیمار شده با EDTA، آلومینیوم و یا هر دو را نشان می‌دهد. همان طور که ملاحظه می‌گردد افزودن EDTA به تنهایی به محیط جلبکی موجب کاهش تعداد سلول در محلول رویی و نیز ایجاد رسوب جلبکی قابل توجهی در مقایسه با نمونه شاهد نمی‌گردد. این در حالی است که افزودن آلومینیوم به

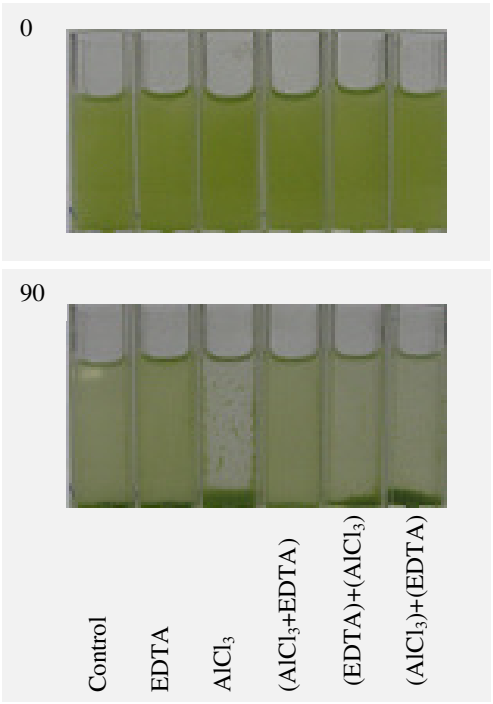
[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1393.3.7.7.0]



شکل۵- اثر تیمار ۴۰۰۰ میکرومولار کلات (EDTA)، ۲۰۰۰ میکرومولار کلرورآلومینیوم ($AlCl_3$)، مخلوط ۲۰۰۰ میکرومولار کلرورآلومینیوم و ۴۰۰۰ میکرومولار کلات ($AlCl_3$+EDTA)، افزودن کلرورآلومینیوم بعد از تیمار با کلات ($AlCl_3$)+(EDTA) و قبل از تیمار با کلات ($AlCl_3$)+(EDTA) در قیاس با شاهد بر تعداد سلول در محلول رویی محیط جلبکی *D. salina* سویه Utex-200 در زمان‌های صفر و ۹۰ دقیقه. مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار می‌باشد. مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن انجام گرفته و حروف غیرمشابه بیان‌گر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ ($P < 0.05$) می‌باشد

محیط جلبکی، تعداد سلول در محلول رویی را به طور قابل توجهی کاهش داده (شکل ۵) و بیشترین میزان رسوب جلبکی نیز مشاهده می‌گردد (شکل ۶). کاهش تعداد سلول در محلول رویی و نیز حجم رسوب جلبکی ایجاد شده متعاقب افزودن محلولی از آلومینیوم و EDTA و نیز در حالتی که آلومینیوم پس از تیمار محیط جلبکی با کلات، افزوده شود قابل توجه نمی‌باشد. این در حالی است که افزودن آلومینیوم قبل از افزودن کلات به محیط جلبکی سبب کاهش قابل توجه تعداد سلول و تشکیل شدن رسوب جلبکی می‌گردد. نتایج حاکی از آن است که افزودن آلومینیوم به محیط جلبکی موجب اتصال یون‌های آلومینیوم به غشای سلولی جلبک، آگلوتینه شدن و رسوب یافتن سلول‌ها که زدایش آلومینیوم از محلول رویی را نیز به همراه دارد شده و لذا به‌طور معنی‌داری بیشترین میزان رسوب جلبکی در مقایسه با سایر نمونه‌ها نیز ایجاد می‌گردد. زمانی که مخلوط آلومینیوم و کلات که در آن یون‌های آلومینیوم با EDTA کلات شده‌اند به محیط جلبکی افزوده شود، یون‌های آلومینیوم به واسطه اتصال با کلات، توانایی اتصال به سلول‌های جلبکی را نداشته و قادر به کاهش تعداد سلول و ایجاد رسوب جلبکی نمی‌باشند. اما زمانی که ابتدا کلات به محیط اضافه شده و سپس آلومینیوم افزوده می‌گردد کلات موجود در محیط با یون‌های آلومینیوم اضافه شده قبل از این که آلومنیوم به غشای سلول متصل گردد باند شده و از کاهش شدید تعداد سلول و تشکیل رسوب جلبکی ممانعت می‌نماید و علی‌رغم اینکه میزان رسوب نسبت به شاهد اندکی بیشتر می‌باشد به طور معنی‌داری نسبت به وجود آلومنیوم بدون کلات، کمتر می‌باشد. از سوی دیگر افزودن آلومینیوم قبل از اضافه نمودن کلات به محیط جلبکی، این فرصت را ایجاد می‌نماید که بین گروه‌های آمین، فسفریل، سولفیدریل و کربوکسیل موجود در سطح سلول‌های جلبکی با آلومینیوم (Gonzales-Davila *et al.*, 1995)

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1393.3.7.7.0]

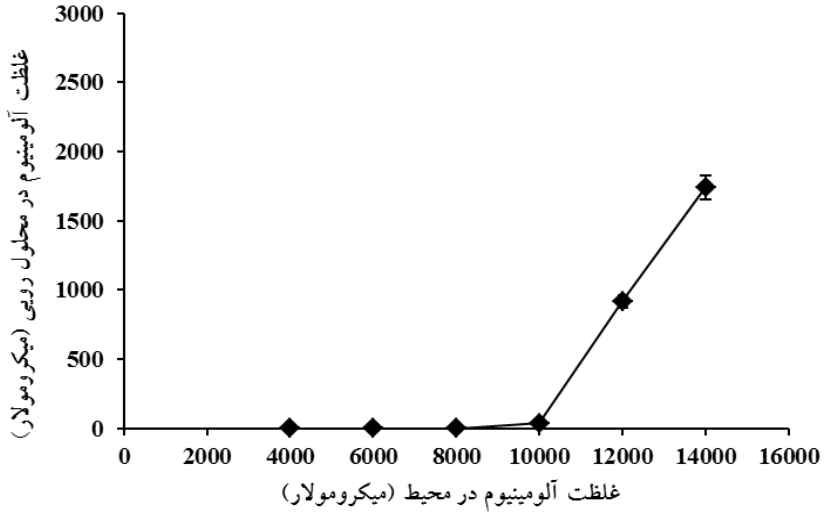


شکل ۶- اثر تیمار ۴۰۰۰ میکرومولار کلات (EDTA)، ۲۰۰۰ میکرومولار کلرور آلومینیوم ($AlCl_3$)، مخلوط ۲۰۰۰ میکرومولار کلرورآلومینیوم و ۴۰۰۰ میکرومولار کلات ($AlCl_3$+EDTA)، افزودن کلرورآلومینیوم بعد از تیمار با کلات ($AlCl_3$)+(EDTA) و قبل از تیمار با کلات ($AlCl_3$)+(EDTA) در قیاس با شاهد بر میزان رسوب جلبکی *D. salina* سویه Utex-200 در زمان‌های صفر و ۹۰ دقیقه.

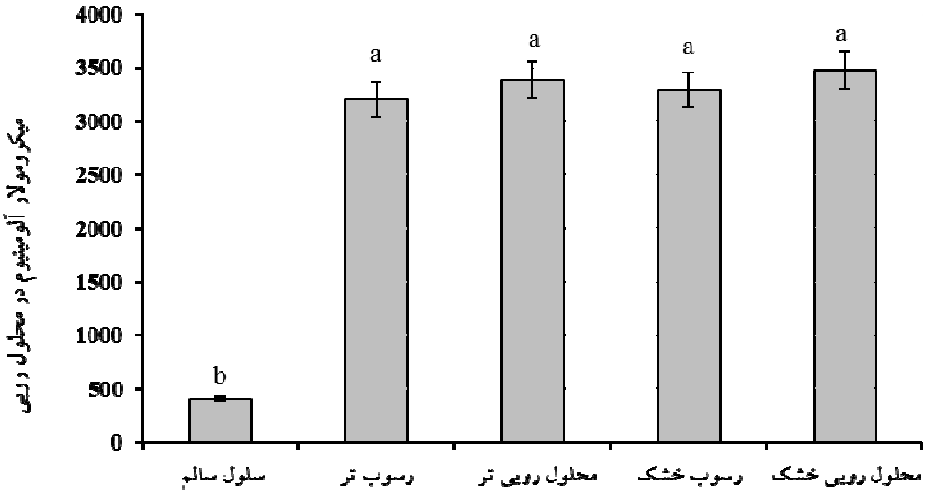
اتصال محکمی برقرار شود و لذا کاهش تعداد سلول و حجم رسوب جلبکی قابل توجه می‌باشد. با این وجود کلات افزوده شده، یون‌های آلومینیوم آزاد را باند نموده و از عمل آنها جلوگیری می‌نماید، از این رو میزان رسوب در مقایسه با نمونه‌هایی که تنها با آلومینیوم تیمار شده‌اند، به طور معنی‌داری کمتر است. به نظر می‌رسد عدم توانایی کلات در جلوگیری نمودن از رسوب جلبکی حاکی از اتصال محکم بین جلبک و آلومینیوم بوده و به راحتی قابل گسستن نمی‌باشد.

شکل ۷ رابطه بین تعداد سلول جلبکی و میزان رسوب آلومینیوم از محلول رویی سوسپانسیون جلبکی تیمار شده با غلظت‌های نهایی۴۰۰۰، ۶۰۰۰، ۸۰۰۰، ۱۰۰۰۰، ۱۲۰۰۰ و ۱۴۰۰۰ میکرومولار آلومینیوم طی مدت ۱۲۰ دقیقه را نشان می‌دهد. همان طور که مشاهده می‌شود برقراری پیوند بین یون‌های آلومینیوم و سلول‌های جلبکی سوسپانسیونی با تعداد $۶۲۵/۸\times۱۰^{۴}$ سلول در میلی‌لیتر، سبب رسوب یافتن کل محتوای آلومینیوم موجود در بخش رویی محیط‌های تیمار شده با غلظت‌های ۴۰۰۰، ۶۰۰۰ و ۸۰۰۰ میکرومولار آلومینیوم می‌گردد، به گونه‌ای که پس از ۱۲۰ دقیقه هیچ گونه آلومینیومی در محلول رویی نمونه‌های مذکور دیده نمی‌شود. با افزایش محتوای آلومینیوم محیط تا غلظت ۱۰۰۰۰ میکرومولار و بیشتر، میزان آلومینیوم موجود در محلول رویی محیط‌های جلبکی به‌طور چشم‌گیری رو به افزایش می‌گذارد. نتایج نشان می‌دهد که نه تنها سلول‌های جلبک *Dunaliella* قادرند به طور مؤثری با آلومینیوم باند شده و آن را رسوب دهند بلکه هر سلول جلبکی و در نتیجه یک سوسپانسیون سلولی با تعداد سلول مشخص دارای ظرفیت خاصی برای اتصال به آلومینیوم و رسوب دادن آن می‌باشد و افزایش غلظت آلومینیوم در محیط از حد

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1393.3.7.7.0]



شکل۷- رابطه بین تعداد مشخص سلول جلبکی (۶۲۵/۸×۱۰^۴) و میزان رسوب آلومینیوم از بخش رویی محیط جلبکی گونه *D. salina* سویه Utex-200 تحت تیمار غلظت‌های ۴۰۰۰، ۶۰۰۰، ۸۰۰۰، ۱۰۰۰۰، ۱۲۰۰۰ و ۱۴۰۰۰ میکرومولار آلومینیوم طی مدت ۱۲۰ دقیقه. مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار می‌باشد.



شکل ۸- بررسی توانایی سلول سالم، ۰/۰۵ گرم رسوب تر و ۲ میلی‌لیتر محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ سلول‌های پاره شده، ۰/۰۰۵ گرم رسوب خشک پودر شده و ۰/۰۵ گرم محلول رویی خشک شده حاصل از سانتریفیوژ سلول‌های پاره شده جلبک *D. salina* سویه Utex-200 در کاهش میزان آلومینیوم از بخش رویی محلول ۴۰۰۰ میکرومولار آلومینیوم طی مدت ۱۲۰ دقیقه. مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار می‌باشد. مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن انجام گرفته و حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ ($P < 0.05$) می‌باشد.

مشخصی که با غلظت نمونه جلبکی کاملاً در ارتباط است، جلبک‌های اشباع شده با آلومینیوم قادر به رسوب آلومینیوم مازاد در محیط نمی‌باشند.

در تکمیل آزمایش‌ها، توانایی قطعات غشایی، مواد مترشحه و درون‌سلولی در رسوب دادن آلومینیوم در قیاس با سلول‌های جلبکی سالم بررسی گردید. به این منظور،

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1393.3.7.7.0]

محلول ۴۰۰۰ میکرومولار آلومینیوم به مدت ۱۲۰ دقیقه در معرض سلول‌های جلبکی سالم، رسوب و محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ سلول‌های جلبکی پاره شده، رسوب خشک و محلول رویی خشک شده حاصل از سانتریفیوژ سلول‌های پاره شده جلبکی قرار گرفت. شکل ۸ نشان می‌دهد که علی‌رغم توانایی سلول‌های سالم در اتصال به آلومینیوم و کاهش دادن شدید میزان آلومینیوم محلول رویی، اختلاف چندانی در میزان آلومینیوم کاهش یافته از بخش رویی محلول آلومینیوم قرار گرفته در معرض سایر تیمارها دیده نمی‌شود. لذا به نظر می‌رسد که تنها سلول جلبکی سالم و زنده قادر به برقراری اتصال با آلومینیوم و رسوب دادن آن می‌باشد و هر گونه آسیب به غشا و ساختار سلولی، پیوند مؤثر سلول‌های جلبکی و یون‌های آلومینیوم را ممانعت نموده و لذا کاهش قابل توجهی در میزان آلومینیوم موجود در بخش رویی دیده نمی‌شود.

نتیجه‌گیری کلی:

از نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان به توانایی سلول‌های جلبک *Dunaliella* به آگلوتینه شدن و رسوب یافتن در حضور آلومینیوم اشاره نمود که سبب زدایش آلومینیوم از محیط می‌گردد. به نظر می‌رسد این امر ناشی از اتصال یون‌های آلومینیوم به غشای سلول‌های جلبک بوده و افزودن EDTA به محیط جلبکی و عدم رسوب ناشی از آن، برقراری این پیوند را تأئید می‌نماید. همچنین رابطه مستقیم مشاهده شده بین تعداد سلول جلبکی و میزان آلومینیوم رسوب یافته حاکی از ظرفیت مشخص هر سلول برای اتصال و رسوب دادن آلومینیوم است و تنها سلول‌های سالم و دست نخورده قادر به برقراری پیوند با آلومینیوم و کاهش محتوای آلومینیوم محیط می‌باشند. از این رو می‌توان از اتصال جلبک *Dunaliella* و آلومینیوم به عنوان راه‌کاری جهت پاک‌سازی آب‌های آلوده به آلومینیوم استفاده نمود.

تشکر و قدردانی:

بدین وسیله از تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان به خاطر حمایت مالی در انجام این تحقیق قدردانی می‌گردد.

منابع:

Akbarzadeh, N. and Shariati, M. (2014) Aluminum remediation from medium by *Dunaliella*. Ecological Engineering 67: 76-79

Al-Homaidan, A. A. (2006) Heavy metal levels in Saudi Arabian Spirulina. Pakistan Journal of Biological Sciences 9: 2693-2695.

Avron, M. and Ben-Amosts, A. (1992) Glycerol and β-carotene metabolism in the halotolerant algae *Dunaliella* a model system for biosolar energy conversion. Trends in Biochemical Sciences 6: 297-299.

Barber, J. (1968) The efflux of potassium from *Chlorella pyrenoidosa*. Biochimica et Biophysica ACTA 163: 531-538.

Ben-Amotz, A. and Avron, M. (1990) The biotechnology of cultivating the halotolerant algae *Dunaliella*. Trends in Biotechnology 8: 124-129.

Burzynski, M. and Buczek, J. (1989) Interaction between cadmiumand molybdenum affecting the chlorophyll content and accumulation of some heavy metals in the second leaf of *Cucumis sativus* L. Acta Physiologiae Plantarum 11: 137-145.

Cabuk, A. (2005) Pb_2 biosorption by pretreated fungal biomass. Turkish Journal of Biology 29: 23-28.

Clarkson, D. T. (1989) Ionic relations. In: Advanced Plant Physiology (ed. Wilkins, M. B.) Pp. 319-353. Longman Scientific and Technical, New York.

Delhaize, E. and Ryan, P. R. (1995) Aluminium toxicity and tolerance in plants. Plant Physiology 107: 315-321.

Eijckelhoff, 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: 69-73

Gazso, L. (2001) The key microbial processes in the removal of toxic metals and radionuclides from the environment. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 7: 178-185.

Gonzales-Davila, M., Macdalena-Casiano, M. and Perez-Pena, J. (1995) Binding of Cu (II) to the

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1393.3.7.7.0]

C. S., Chapmans, D. J. and Kremer, B. P.) Pp. 16-22. Cambridge University Press, Cambridge.

Shariati, M. and Yahyaabadi, S. (2006) The effects of different concentrations of cadmium on the growth rate and beta-carotene synthesis in unicellular green alga *Dunaliella salina*. Iranian Journal of Science and Technology Transection A 30: 57-63.

Sharma, S. S. and Gaur, J. P. (1995) Potential of *Lemna polyrrhiza* for removal of heavy metals. Ecological Engineering 4: 37-43.

Silva, J. R., Smyth, T. J., Moxley, D. F., Carter, T. E., Allen, N. S. and Rufty, T. W. (2000) Aluminium accumulation at nuclei of cells in the root tip. Fluorescence detection using lumogallion and confocal laser scanning microscopy. Plant Physiology 123: 543-552.

Suresh, B. and Ravishankar, G. A. (2004) Phytoremediation-A Novel and promising approach for environment clean-up. Critical Reviews in Biotechnology 24: 97-124.

Steffens, J. (1990) The Heavy metal-binding peptides of plants. Annual Review of Plant Physiology 41: 553-575.

Taylor, G. J., McDonald-Stephens, J. L., Hunter, D. B., Bertsch, P. M., Elmore, D., Rengel, Z. and Reid, R. J. (2000) Direct measurement of aluminium uptake and distribution in single cells of *Chara corallina*. Plant Physiology 123: 987-996.

Vilensky, M. Y., Berkowitz, B., Warshawsky, A. (2002) In situ remediation of groundwater contaminated by heavy-and transition-metal ions by selective ion-exchange methods. Environmental Science and Technology 3: 1851-1855.

Zhang, G., Slaski, J. J., Archambault, D. J. and Taylor, G. J. (1997) Alteration of plasma membrane lipids in aluminium-resistant and aluminium-sensitive wheat genotypes in response to aluminium stress. Plant Physiology 99: 302-308.

Zhang, W. H. and Rengel, Z. (1999) Aluminium induces an increase in cytoplasmic calcium in intact wheat root apical cells. Australian Journal of Plant Physiology 26: 401-409.

surface and exudates of the alga *Dunaliella tertiolecta* in seawater. Environmental Science and Thechnology 29: 289-301.

Gunse, B., Poschenrieder, Ch. and Barcelo, J. (1997) Water transport properties of roots and root cortical cells in proton- and Al-stressed maize varieties. Plant Physiology 113: 595-602.

Gupta, R., Ahuja, P., Khan, S., Saxena, R. K. and Mohapatra, H. (2000) Microbial biosorbents: Meeting challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions. Current Science 78: 967-973.

Johnson, M. K., Johnson, E. G., McElroy, R. D., Speer, H. L. and Bruff, B. S. (1968) Effects of salt on the halophilic algae *Dunaliella viridis*. Journal of Experiment Botany 36: 701-712.

Khristo Forova, N. K., Aizdaicher, N. A. and Berezovskaya, O. (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.

McBrien, D. C. H. and Hassall, K. A. (1965) Loss of cell potassium by *Chlorella vulgaris* after contact with toxic amounts of copper sulphate. Plant Physiology 18: 1059-1065.

Mossor-Pietraszewska, T. (2001) Effect of aluminium on plant growth and metabolism. Acta Biochimica Polonica 48: 673-686.

Ouzounidou, G., Eleftheriou, E. P. and Karataglis, S. (1992) Ecophysical and ultrastructural effects of copper in *Thlaspi ochroleucum* (Cruciferae). Canadian Journal of Botany 70: 947-957.

Prasad, M. N. V. (1998) Metal-biomolecule complexes in plants: Occurrence, functions and applications. Analusis Magazine 26: 25-28.

Rengel, Z. and Robinson, D. L. (1989) Aluminium effects on growth and macronutrient uptake by annual ryegrass. Agronomy Journal 81: 208-215.

Rengel, Z. (1996) Uptake of aluminum by plant cells. New Phytologist 134: 389-406.

Sagan, M. T., Oztay, F. and Bolkent, S. (2007) Exposure of *Dunaliella tertiolecta* to lead and aluminium: Toxicity and effects on ultrastructure. Biological Trace Element Research 120: 264-277.

Schoen, S. (1988) Cell counting. In: Experimental phycology: A laboratory manual (eds: Lobban,

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1393.3.7.7.0]