14(3) 367-376, Autumn 2022

Journal of Animal Environment

(AEJ)

Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

Effect of heavy metals (cadmium and lead) on growth, photosynthetic pigment content and Protein microalgae *Isochrysis galbana*

Zohreh Barkhordari Ahmadi, Mohammadreza Taherzadeh*, Morteza Yousefzadi

Department of marine biology, Faculty of marine science and technology, Universtity of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran

Key Words

Microalgae *Isochrysis galbana*
Cadmium and lead metal
Growth
Chlorophyll a
Protein

Abstract

Introduction: Heavy metals are especially important because of the toxic effects of the environment, the accumulation of biodiversity in various aquatic species and the creation of biological magnification in food chains.

Materials & Methods: The present study was conducted to compare the toxicity of heavy metals of cadmium and lead in different concentrations (500, 250, 100, 50, 5 µg/L) on microorganism growth of *Isochrysis galbana* during 15 days in F2 culture media.

Results: The results showed that the effect of two metals on growth of *I. galbana* was dependent on two factors of time and concentration. Observations showed that concentrations of 500 micrograms per liter of cadmium on day 4 significantly inhibited the growth of *I. galbana*. The highest growth rate was obtained at a concentration of 5 µg/L for both tested metals.

Conclusion: In this experiment, the highest content of chlorophyll a for cadmium and lead was 5 g/L and the lowest content of chlorophyll was in two concentrations of 250 and 500 µg/L. Also, by studying the effect of cadmium and lead on the amount of alfalfa protein, low concentrations increased protein levels and high concentrations reduced the amount of microalgae protein.

* Corresponding Author's email: taheri.1965@gmail.com

Received: 24 April 2021; Reviewed: 2 June 2021; Revised: 5 August 2021; Accepted: 28 August 2021

(DOI): 10.22034/AEJ.2021.295825.2588

مقاله پژوهشی

تاثیرفلزات سنگین (کادمیوم و سرب) بر رشد، محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی و پروتئین ریزجلبک *Isochrysis galbana*

زهره برخورداری‌احمدی، محمدرضا طاهری‌زاده*، مرتضی یوسف‌زادی

گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم وفنون دریا، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

کلمات کلیدی

ریزجلبک *Isochrysis galbana*
فلز کادمیوم و سرب
رشد
کلروفیل a
پروتئین

چکیده

مقدمه: فلزات سنگین به‌علت اثرات سمی در محیط، تجمع زیستی در گونه‌های مختلف آبزیان و ایجاد بزرگ‌نمایی زیستی در زنجیره‌های غذایی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند.

مواد و روش‌ها: مطالعه حاضر با هدف مقایسه سمیت فلزات سنگین کادمیوم و سرب در غلظت‌های مختلف (۵۰۰، ۲۵۰، ۱۰۰، ۵۰، ۵ میکروگرم‌برلیتر) بر رشد ریزجلبک *Isochrysis galbana* در طول ۱۵ روز در محیط کشت F_2 مورد مطالعه قرار گرفت.

نتایج: نتایج نشان داد که اثر دو فلزات مورد مطالعه بر رشد *I. galbana* وابسته به دو فاکتو زمان و غلظت بود. مشاهدات حاکی از این بود که غلظت‌های ۵۰۰ میکروگرم بر لیتر از کادمیوم در روز چهارم به‌طور قابل توجهی باعث مهار رشد *I. galbana* گردید. بیش‌ترین میزان رشد در غلظت ۵ میکروگرم بر لیتر به برای هر دو فلز مورد آزمایش به‌دست آمد.

بحث و نتیجه‌گیری: در این آزمایش بیش‌ترین محتوای کلروفیل *a* برای‌فلزات کادمیوم و سرب مربوط به غلظت ۵ میکروگرم بر لیتر و کم‌ترین محتوای کلروفیل مربوط به دو غلظت ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر لیتر بود. هم‌چنین با مطالعه اثر فلز کادمیوم و سرب بر میزان پروتئین ریزجلبک مشخص گردید که غلظت‌های کم باعث افزایش میزان پروتئین و غلظت‌های بالا باعث کاهش میزان پروتئین ریزجلبک شد.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: taheri.1965@gmail.com

تاریخ دریافت: ٤ اردیبهشت ۱٤۰۰؛ تاریخ داوری: ۱۲ خرداد ۱٤۰۰؛ تاریخ اصلاح: ۱٤ مرداد ۱٤۰۰؛ تاریخ پذیرش: ٦ شهریور ۱٤۰۰
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.295825.2588

مقدمه

در میان هزاران ماده آلی و غیرآلی که وارد اکوسیستم‌های آبی می‌شوند، فلزات سنگین با توجه به مقدار سمیت، پایداری، تجزیه ناپذیر بودن و توانایی تجمع زیستی‌شان در بسیاری از گونه‌های دریایی از اهمیت بالایی برخوردارند. فلزات توسط فرآیند خودپالایی از آب‌ها گرفته نمی‌شوند، اما در ذرات معلق شده در آب و رسوبات و جانوران آبزی تجمع پیدا می‌کنند و در نهایت از طریق زنجیره‌های غذایی به انسان انتقال می‌یابند (۱، ۲). با وجود این‌که فلزات سنگین از اجزاء تشکیل‌دهنده پوسته زمین هستند و به‌طور طبیعی در همه اکوسیستم‌ها حضور دارند، غلظت‌شان به‌طور قابل ملاحظه‌ای توسط فعالیت‌های انسانی افزایش می‌یابد (۳). فلزات سنگین شامل عناصر ضروری و غیر ضروری بوده که عناصر ضروری نیز در غلظت‌های بالا سمی می‌باشند. اما برخی از فلزات مانند کادمیوم، سرب و جیوه حتی در سطوح پایین نیز سمی می‌باشند و ثاثیر مستقیم و نامطلوب بر فرآیندهای مختلف بیولوژیکی دارند (۴). کادمیوم ازجمله عناصر سنگین غیرضروری که از طریق پروسه‌های صنعتی و محصولات فرعی معادن به محیط طبیعی وارد می‌شود. موجودات دریایی به‌طور فعال کادمیوم را در خود ذخیره می‌کنند (۵). سرب عمدتاً درنتیجه بهره‌برداری از معادن (به‌صورت سولفید، کربنات، سولفات سرب)، صنایع باتری‌سازی (سولفات و اکسید سرب و سرب)، سوخت‌های فسیلی (تترا اتیل و تترا متیل‌سرب)، رنگ‌سازی (کربنات و کرومات سرب) و صنایع شیشه و لعاب (سیلیکات سرب)، وارد محیط زیست و اکوسیستم‌های آبی می‌شود (۶). ریزجلبک‌ها گروهی از جلبک‌های فتوسنتزکننده شناور هستند که نقش مهمی در تامین مواد غذایی و اکسیژن برای سایر جانداران، تثبیت مواد زائد نیتروژندار و تثبیت دی‌اکسیدکربن دارند. این موجودات تولیدکنندگان اولیه در اکوسیستم آبی محسوب شده و در تعیین میزان آلودگی آب مورد استفاده قرار می‌گیرند. این جلبک‌ها پایه اولیه تمام شبکه‌های غذایی در اکوسیستم آبی و جزء عناصر مهم چرخه بیوژئوشیمیایی محسوب می‌شوند (۷). در اکوسیستم‌های آبی جلبک‌ها به‌طور وسیعی برای ارزیابی خطرهای اکولوژیک، ارزیابی اثرهای فلزات سنگین، علف‌کش‌ها، و دیگر مواد آلاینده در سیستم‌های آبی استفاده می‌شوند زیرا آن‌ها به آلاینده‌های فلزی حساس هستند (۸، ۹). یکی از ویژگی‌های مشخصه سمیت فلزات سنگین، مسمومیت و غیرفعال کردن سیستم آنزیمی است. بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی، یعنی فتوسنتز، تنفس، سنتز پروتئین، سنتز کلروفیل، تغییرات در پروتئین‌ها، DNA و چربی‌های سلولی به‌شدت در غلظت‌های بالای فلزات تحت تاثیر قرار می‌گیرند (۱۰، ۱۱). اثرات و نوع فلزهای سنگین در غلظت‌های مختلف بر خصوصیات بیولوژیکی و بیوشیمیایی جلبک‌های میکروسکوپی متنوع است. این تاثیرها نه تنها به نوع و غلظت فلزهای سنگین بلکه به‌طور اختصاصی به گونه جلبک، خصوصیات ساختاری و عملکردی آن‌ها نیز بستگی دارد. فلزات سنگین بسته به موقعیت اکسیداسیونی که دارند به‌میزان زیادی فعال بوده و برای اغلب موجودات سمی هستند. در غلظت‌های بالای فلزات سنگین، آسیب به سلول‌ها به‌علت بالا رفتن سطوح گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species) سلولی و عدم توانایی سلول در مقابله با آن‌ها رخ می‌دهد، در غلظت‌های پایین فلزات سنگین توسط گیاهان و جلبک‌ها جذب شده و به دیگر موجودات زنجیره غذایی انتقال می‌یابد (۱۲). ریز جلبک‌ها از گروه گیاهان آبزی می‌باشند و امروزه کاربرد وسیعی در علم زیست فناوری دارند. این فتوسنتزکنندگان میکروسکوپی، تقریباً در تمام آب‌های کره زمین یافت می‌شوند. اهمیت این گروه از موجودات زنده در ارزش بالای تغذیه‌ای، پتانسیل تولید ترکیبات زیست‌فعال با کاربردهای متنوع در صنایع غذایی و داروسازی، کاربرد به‌عنوان ماده خام جهت استخراج سوخت‌های زیستی سازگار با محیط زیست، کاربرد در پایش آلاینده‌های زیست محیطی و ... می‌باشند (۱۳). ریزجلبک‌ها به‌عنوان پایه و اساس زنجیره‌های غذای در محیط‌های دریایی شناخته می‌شوند و بنابراین به‌عنوان یک منبع غذایی غیرقابل اجتناب در پرورش تجاری گونه‌های مختلف آبزیان مطرح می‌باشند به‌علاوه در تولید انبوه زئوپلانکتون‌ها نقش دارند که زئوپلانکتون‌ها نیز به‌عنوان منبع غذایی در رشد مراحل لاروی و جوانی سخت‌پوستان و ماهیان دارای اهمیت و کاربرد می‌باشند (۱۴). کاهش تولید جلبک‌ها می‌تواند ناشی از عوامل متعددی ازجمله کاهش کیفیت آب محیط اطراف باشد. به‌عنوان مثال، سطح بالای فلزات در آب دریا ممکن است بر رشد جلبک دریایی تاثیر بگذارد (۱۵). مواد مغذی مورد نیاز جلبک‌ها به سه دسته عناصر درشت مغذی (نیتروژن، فسفر و کربن)، عناصر ریزمغذی (آهن، روی، مس، منگنز، مولبیدین و غیره) و ویتامین (ویتامین B12، تیامین و بیوتین) تقسیم می‌شوند. نیتروژن و فسفر، رشد و تولید جلبک را در بیش‌ترین محیط‌های طبیعی محدود می‌کنند (۱۳). جلبک *I. balbana* به‌عنوان غذا برای پرورش آرتمیا، لارو میگوی آب‌شیرین، لارو نرم‌تنان دوکفه‌ای، لارو میگوهای خانواده پنائیده استفاده می‌شود (۱۶). ارزش تغذیه *I. galbana* مربوط به ترکیبات بیوشیمیایی آن‌ها به‌ویژه لپید و اسیدهای چرب است (۱۷، ۱۸، ۱۹). در اکوسیستم‌های آبی، ریزجلبک‌ها را می‌توان به‌عنوان تولیدکنندگان اصلی در نظر گرفت و از طریق برآورد تأثیر فلزات سنگین بر رشد آن‌ها و نقش مهم ریزجلبک‌ها را در ارزیابی خطر اکولوژیکی تولید شده توسط فلزات سنگین بیان نمود (۲۰). با توجه به اهمیت جلبک‌ها و نقش آن‌ها در اکوسیستم‌های آبی افزودن سرب و کادمیوم به محیط آبی با ایجاد خطراتی ازجمله از بین رفتن ریزجلبک‌ها همراه

است لذا هدف از مطالعه بررسی اثرات مختلف سرب و کادمیوم بر تراکم سلولی، محتوایی کلروفیل و پروتئین ریز جلبک *I. galbana* می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش استوک مورد نیاز جهت شروع کشت ریزجلبک از مرکز تحقیقات شیلات بندرلنگه تهیه گردید. برای کشت جلبک از محیط کشت f_2 استفاده شد. پس از انجام این مراحل با اضافه کردن استوک‌اولیه درحجم ۲۵۰ و ۵۰۰ سی‌سی‌استوک خالص *I. galbana* کشت داده شد (۲۱). کشت اولیه جلبک ممکن است ۱تا ۲ هفته به تراکم موردنظر برسد که باتوجه به شرایط محیطی که درآن نگه‌داری می‌شوند متفاوت خواهد بود. جلبک *I. galbana* پس از رسیدن به حجم مطلوب، جهت بررسی اثر غلظت‌های متفاوت کادمیوم و سرب طی دوره ۱۵ روزه بر میزان رشد، کلروفیل و پروتئین مورد آزمایش قرارگرفت. تیمار فلزات در شش غلظت (شاهد، ۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم برلیتر) و در ۳ تکرار درنظر گرفته شد. تمامی تیمارها و تکرارها تحت شرایط یکسان دمایی (۲۲-۲۵ درجه سانتی‌گراد) و میزان نور ۵۰۰۰-۲۵۰۰ لوکس توسط لامپ فلوروسنت سفید با فاصله (۱۵-۱۰ سانتی‌متری) و به‌صورت ۱۲ ساعت روشنایی ۱۲ ساعت تاریکی و pH حدود ۸-۷/۸ و شوری ۲۵ کشت داده شد (۲۲). جهت جلوگیری از رسوب‌گذاری و شناوری فیتوپلانکتون‌ها و هم‌چنین ایجاد سطح تماس بیش‌تر فیتوپلانکتون‌ها با فلز، هوادهی در تمام دوره برای همه تیمارها به‌طور یکسان و مداوم برقرار بوده است. پس از تهیه استوک جلبکی به نسبت ۱۰ در ۹۰ درصد به مقدار یکسان در درون ارلن‌ها ریخته و شش غلظت (۰، ۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرو گرم بر لیتر) از فلز کادمیوم (کلرید کادمیوم) و سرب (کلرید سرب) را تهیه کرده و با استفاده ازسمپلر به‌خوبی با نمونه جلبکی مخلوط شده و به‌مدت ۱۵ روز هوادهی شد. برای اندازه‌گیری میزان رشد به‌صورت یک روز در میان از تمامی تیمارها به‌میزان یکسان نمونه‌برداری شد. در ادامه برای شمارش سلول‌های ریزجلبک در هر میلی‌لیتر به‌صورت جداگانه بعد از همگن نمودن محیط کشت ریزجلبک و تثبیت یک میلی‌لیتر از نمونه ریزجلبک با استفاده فرمالین ۱۰ درصد توسط لام هموسیتومتر و با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ در روزهای اول، سوم، پنجم، هفتم، نهم، یازدهم، سیزدهم و پانزدهم صورت پذیرفت و در طول موج ۶۸۰ نانومتر با دستگاه اسپکتوفتومتر خوانده شد و بر این اساس میزان رشد آن‌ها به‌دست آمد.

اندازه‌گیری-میزان کلروفیل: به‌منظور بررسی تغییرات میزان کلروفیل، درفواصل‌زمانی سه‌روزه به‌مقدار ۱۰ میلی‌لیتراز سوپانسیون جلبکی هر ارلن به‌طور جداگانه، به میکروتیوپ‌های مخصوص میکرو سانتریفیوژ منتقل و به‌مدت ۵ دقیقه با۶۰۰۰ مدل (ALph-1506) دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس محلول رویی به‌طور کامل خارج شده و به باقی‌مانده حاصله یک میلی‌لیتر استون ۸۵ درصد اضافه و توسط ورتکس به‌خوبی مخلوط می‌شود و سپس توسط فویل آن پوشانده و به‌مدت ۲۴ ساعت در مکانی تاریک و سرد قرار می‌دهیم و بعد از گذشت ۲۴ عمل سانتریفیوژ با دور ۷۰۰۰ و در سه دقیقه تکرار کرده، محلول رویی استخراج و با استفاده از دستگاه اسپکترفتومتر میزان جذب آن در طول موج‌های ۶۳۰ و ۶۶۴ نانومتر خوانده و مقدار کلروفیل کل برحسب میکروگرم‌در لیتر و در سه‌تکرار به‌وسیله فرمول زیر محاسبه شد (۲۳):

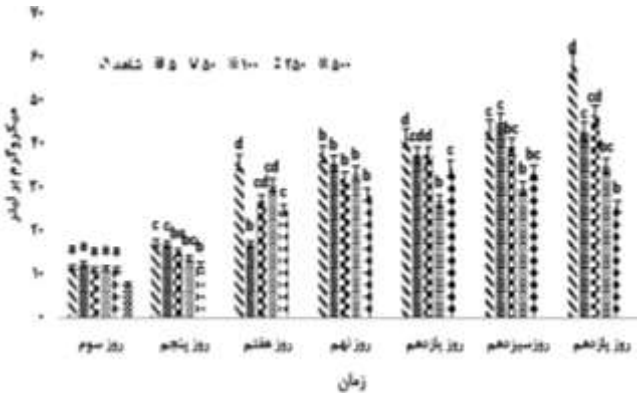
$$Ca=11.64\ E664-0.40E630$$

اندازه‌گیری میزان پروتئین: میزان تغییرات پروتئین از روش Bradford استفاده گردید (۲۴). برای استخراج عصاره پروتئین ۰/۵ گرم از وزن خشک نمونه در ۱/۵ میلی‌گرم محلول بافر فسفات حل نموده‌و در دور ۵۰۰۰ سانتریفیوژ شدو سپس فاز بالایی جدا گردیده که حاوی پروتئین کل است. برای اندازه‌گیری پروتئین به‌روش Bradford به ۰/۱ سی‌سی عصاره پروتئینی از هر نمونه ۵ سی‌سی محلول Bradford اضافه شد و سپس به‌مدت ۲۰ دقیقه ورتکس گردیده و جذب در طول‌موج ۵۹۵ نانومتر توسط دستگاه‌اسپکتروفوتومتر یادداشت گردید (۲۴). داده‌های به‌دست آمده، در نرم‌افزار Excel ثبت و در مراحل بعدی مورد آزمون قرار گرفت. ابتدا، نسبت به نرمال بودن داده‌ها به کمک نرم‌افزار SPSS و آنالیز Kolmogorov-Smirinov Z اطمینان حاصل شد و سپس، تفاوت میانگین بین گروه‌های تیماری از طریق آزمون ANOVA و در سطح اطمینان ($p<0/05$) مورد بررسی قرار گرفت و به‌کمک نرم‌افزارهای Excel و SPSS نتایج حاصله به‌صورت نمودار ارائه گردید.

نتایج

اثرات فلزات‌سنگین (کادمیوم و سرب) بر روی رشد ریزجلبک: شکل ۱، تراکم ریزجلبک *I. gabana* در مواجهه با غلظت‌های مختلف کادمیوم و زمان‌های مختلف نشان می‌دهد. در رابطه با تراکم ریز جلبک *I. gabana* در غلظت‌های مختلف کادمیوم کم‌ترین میزان رشد ریزجلبک در غلظت‌های ۲۵۰ و ۵۰۰ پس‌از مواجهه با فلز کادمیوم حاصل گردید به گونه‌ای که نسبت به‌رشد به‌دست آمده از غلظت‌های ۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر غلظت‌های ۲۵۰ و ۵۰۰ رشد کم‌تری را نشان دادند و در روز پنجم غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر لیتر باعث مهار رشد ریزجلبک شد. اما بیش‌ترین تراکم ریزجلبک را در غلظت ۵ میکروگرم برلیتر در مقایسه با شاهد را مشاهده شد. با توجه به

آن‌چه از نتایج آنالیز واریانس به‌دست آمد در میان تیمارهای مختلف (غلظت‌ها) و روزهای فرد از نظر میزان رشد ریزجلبک *I. galbana* اختلاف معنی‌دار وجود داشته است ($p<0/05$). نتایج آزمون توکی نشان داد میزان رشد، درمیان روزهای سوم و نهم اختلاف معنی‌داری وجود ندارد ($p>0/05$). از طرف دیگر براساس نتایج حاصله می‌توان دریافت که در میان روزهای پنجم، هفتم، یازدهم، سیزدهم و پانزدهم اختلاف معنی داری وجود دارد ($p<0/05$).

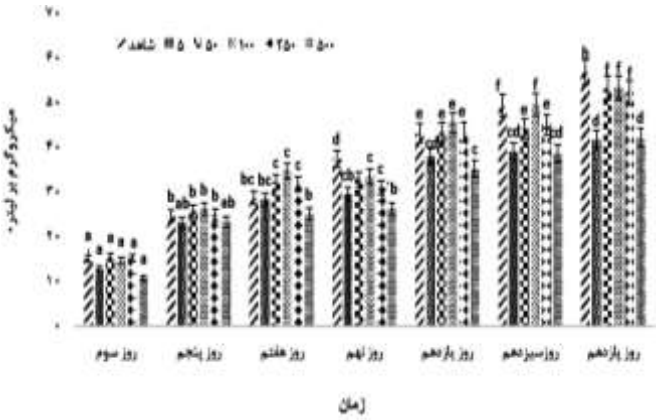


شکل ۱: نمودار میزان رشد جلبک *I. galbana* تحت تیمار غلظت‌های مختلف کادمیوم

داده‌ها میانگین سه تکرار±خطای معیار (SE) می‌باشد و حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین نمونه‌ها براساس مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی و حروف مشترک بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال $p<0/05$ می‌باشند.

شکل ۲، تراکم ریزجلبک *I. gabana* در مواجهه با غلظت‌های مختلف سرب و زمان‌های مختلف نشان می‌دهد. در رابطه با تراکم ریزجلبک *I. gabana* در غلظت‌های مختلف سرب نتایج نشان داد که تأثیرگذاری سرب نسبت فلز کادمیوم کم‌تر بوده و در هیچ‌یک از غلظت‌های مختلف اثر مهاری مشاهده نشد درحالی‌که رشد ریزجلبک در غلظت‌های مختلف نسبت به شاهد کم‌تر بوده است. با توجه به آن‌چه نتایج آنالیز واریانس نشان می‌دهد درمیان تیمارهای مختلف (غلظت‌ها) و روزهای فرد از نظر میزان رشد ریزجلبک *I. gabana* اختلاف معنی‌دار وجود داشته است ($p<0/05$). نتایج آزمون توکی نشان داد که میزان رشد در میان روزهای سوم وپنجم اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($p>0/05$). از طرفی براساس نتایج حاصله می‌توان در یافت که در بین روزهای هفتم، نهم، یازدهم، سیزدهم و پانزدهم اختلاف معنی‌داری وجود داشته است ($p<0/05$).

اثر فلزات کادمیوم و سرب بر محتوای کلروفیل *a* ریزجلبک *Isochrysis galbana*: شکل ۳، تأثیر غلظت‌های مختلف کادمیوم بر میزان کلروفیل *a* ریزجلبک *Isochrysis galbana* را نشان می‌دهد. در بین غلظت‌های مختلف کادمیوم بیش‌ترین میزان جذب بعداز شاهد در غلظت ۵ و ۵۰ میکروگرم بر لیتر کم‌ترین میزان جذب کلروفیل در غلظت‌های ۵۰۰ میکروگرم بر لیتر در روز اول و در غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر لیتر در روزهای بعدی مشاهده شد. با توجه به بررسی غلظت‌های مختلف تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ($p<0/05$) بین میزان کلروفیل در غلظت‌های مختلف کادمیوم ریز جلبک *I. galbana* وجود داشت. شکل ۴، نشان می‌دهد که تأثیر غلظت‌های مختلف سرب بر میزان کلروفیلa ریزجلبک *Isochrysis galbana* را نشان می‌دهد. در بین غلظت‌های مختلف سرب بیش‌ترین میزان جذب بعد از شاهد در بین غلظت‌های ۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم برلیتر کم‌ترین میزان جذب کلروفیل در غلظت‌های ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر لیتر مشاهده شد. با توجه به بررسی غلظت‌های مختلف، تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ($p<0/05$) بین میزان کلروفیل غلظت‌های مختلف کلریدسرب در ریز جلبک *I. galbana* مشخص شد.



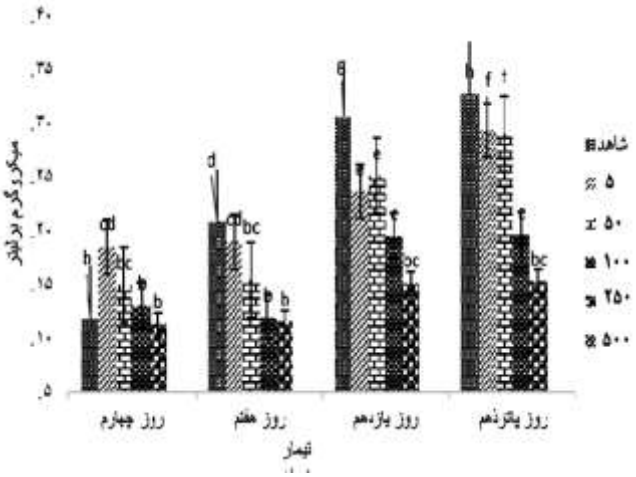
شکل ۲: نمودار میزان رشد جلبک *I. galbana* تحت تیمار غلظت‌های مختلف سرب

داده‌ها میانگین سه تکرار±خطای معیار (SE) می‌باشد و حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین نمونه‌ها براساس مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی و حروف مشترک بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال $p<0/05$ می‌باشند.

اثر فلزات کادمیوم و سرب بر محتوای پروتئین ریزجلبک:

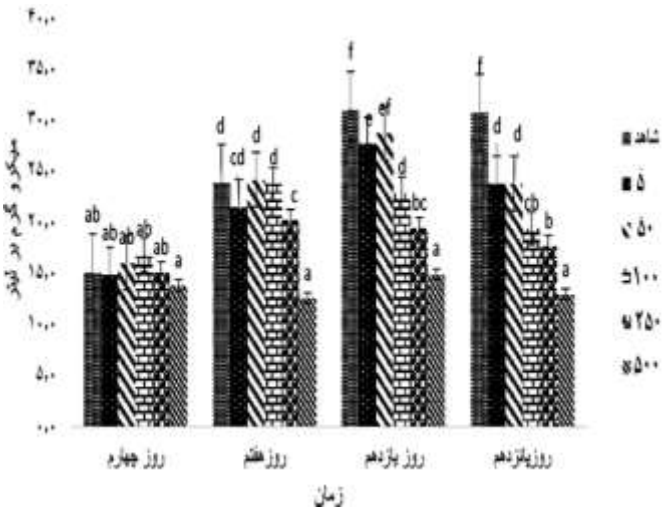
در شکل ۵، تغییرات میزان پروتئین ریزجلبک *I. galbana* که در معرض با غلظت‌های مختلف کادمیوم درروز پانزدهم مورد بررسی قرار گرفت، مشاهده می‌شود. یافته‌ها نشان می‌دهند که، در بین غلظت‌های مختلف کادمیوم روند کاهشی دیده‌شد و نشان می‌دهد که بیش‌ترین میزان پروتئین بعد از شاهد مربوط به غلظت ۵ و غلظت ۲۵۰ میکرو گرم برلیتر دارای کم‌ترین میزان پروتئین بوده است. باتوجه به بررسی غلظت‌های مختلف تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ($p<0/05$) بین میزان پروتئین در غلظت‌های مختلف کادمیوم در ریزجلبک *Isochrysis galbana* وجود داشت. نتایج حاصله از آزمون توکی جهت مطالعه همگنی بین غلظت‌های مختلف نشان داد در میان شاهد و غلظت‌های

۵ و ۱۰۰ میکروگرم برلیتر اختلاف معنی‌داری از نظر میزان پروتئین وجود ندارد ($p>0/05$) در حالی که بین غلظت‌های ۵۰ و ۲۵۰ میکروگرم برلیتر اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($p<0/05$).



شکل ۳: نمودار روند تغییرات میزان کلروفیل a در ریزجلبک *I. galbana* در غلظت‌های مختلف کادمیوم

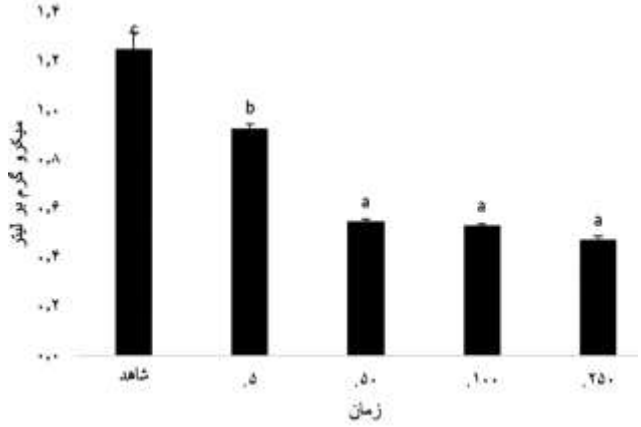
داده‌ها میانگین سه تکرار±خطای معیار (SE) می‌باشد و حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین نمونه‌ها براساس مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی و حروف مشترک بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال $p<0/05$ می‌باشند.



شکل ۴: نمودار روند تغییرات میزان کلروفیل a در ریزجلبک *I. galbana* در غلظت‌های مختلف سرب

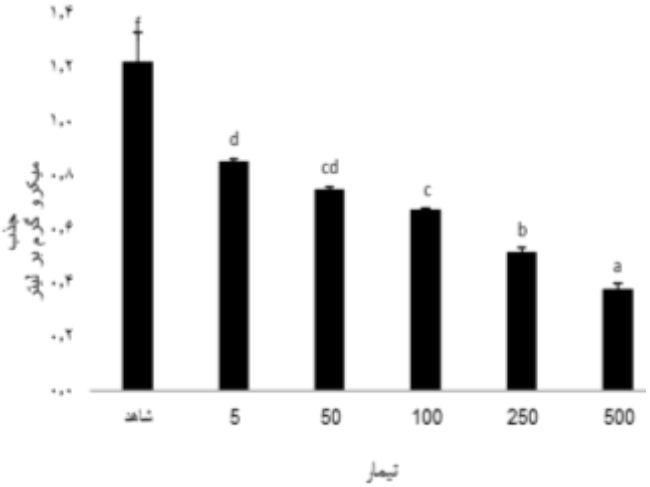
داده‌ها میانگین سه تکرار±خطای معیار (SE) می‌باشد و حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین نمونه‌ها براساس مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی و حروف مشترک بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال $p<0/05$ می‌باشند.

تغییرات میزان پروتئین ریزجلبک *I. galbana* که در معرض با غلظت‌های مختلف سرب در روز پانزدهم مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۶). یافته‌ها نشان می‌دهند که در بین غلظت‌های مختلف بیش‌ترین میزان پروتئین بعد از شاهد مربوط به غلظت ۵ میکروگرم و غلظت ۵۰۰ میکروگرم دارای کم‌ترین میزان پروتئین بوده است. با توجه به بررسی غلظت‌های مختلف تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ($p<0/05$) بین میزان پروتئین در غلظت‌های مختلف سرب در ریزجلبک *I. galbana* وجود داشت. نتایج حاصله از آزمون توکی جهت مطالعه همگنی بین غلظت‌های مختلف نشان داد در میان شاهد و غلظت‌های ۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم برلیتر اختلاف معنی‌داری از نظر میزان پروتئین وجود ندارد ($p>0/05$).



شکل ۵: نمودار تغییرات میزان پروتئین در ریزجلبک *I. galbana* در غلظت‌های مختلف کادمیوم

داده‌ها میانگین سه تکرار±خطای معیار (SE) می‌باشد و حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین نمونه‌ها براساس مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی و حروف مشترک بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال $p<0/05$ می‌باشند.



شکل ۶: تاثیر غلظت‌ها مختلف فلز سرب برمیزان محتوای پروتئین *I. galbana*

داده‌ها میانگین سه تکرار±خطای معیار (SE) می‌باشد و حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین نمونه‌ها براساس مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی و حروف مشترک بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال $p<0/05$ می‌باشند.

بحث

تاکنون مطالعات مختلفی درباره اثر غلظت‌های مختلف فلزهای سنگین در انسان و جانداران آبزی و هم‌چنین بر رشد و تولیدمثل جوامع فیتوپلانکتونی در جهان انجام گرفته است. همه مطالعات بر تاثیر منفی فلزهای سنگین بر رشد و تولیدمثل دلالت دارند (۲۵، ۲۶، ۲۷، ۲۸). تغییرات در شرایط زیست‌محیطی اغلب به‌طور مشخصی و به‌سرعت از سوی موجودات تک‌سلولی نظیر جلبک‌های میکروسکوپی قابل ارزیابی است و عکس‌العمل سریع‌تری نسبت به موجودات با ساختار پیچیده‌تر دارد (۲۹، ۳۰). موجودات فتوسنتزکننده به ترکیبات فلزی بسیار حساس هستند. اثرات یون‌های فلزی بر گیاهان شامل اختلال در بسیاری از کارکردهای فیزیولوژیکی مانند جذب آب، تنفس، جذب مواد معدنی، فتوسنتز می‌باشد (۹). کاهش در رشد سلول‌های ریزجلبک، زمانی‌که ریزجلبک در معرض با غلظت‌های بیش‌تر کادمیوم قرار می‌گیرد به‌طور محسوسی دخالت در فرآیندهای فیزیولوژیکی اولیه (به‌عنوان مثال تقسیم سلولی، مونتاژ غشاء، فتوسنتز و تنفس) مشاهده می‌شود که ناشی از ارتباط با غلظت‌های بالاتر فلزات است و منجر به وقوع اثرات شدید سمی در غلظت‌های بالا و متعاقب آن باعث بزرگ شدن سلول‌ها و آسیب‌های ساختاری می‌شوند (مانند تخریب تیلاکوئید در کلرپلاست) که درنهایت مرگ سلول را به همراه دارد (۳۱). با توجه به این‌که فلز کادمیوم در اکوسیستم‌های آبی، حلالیت بالایی در آب و هم‌چنین ظرفیت بالایی در بسیاری از گونه‌های آبزی دارد، لذا افزودن کادمیوم به محیط‌های آبی با ایجاد خطراتی از جمله از بین رفتن ریزجلبک‌ها همراه است کادمیوم یکی از فلزات سنگین می‌باشد که در غلظت‌های در حد میلی‌مولار و در زمان‌های طولانی، اثرات سمی متنوعی از جمله ممانعت از پروتئین و فعالیت آنزیم‌ها، از خود نشان می‌دهد. کادمیوم از عناصر ضروری جهت رشد جلبک محسوب نمی‌شود ولی جذب این عنصر توسط سلول بیانگر وجود راه‌های جذب این عنصر ازطریق کانال‌ها و منافذ جذب عناصر دیگر می‌باشد. کادمیوم به‌راحتی می‌تواند از طریق کانال‌های کلسیم عبور کند، زیرا اندازه شعاع یونی و بارالکتریکی آن‌ها مشابه است (۳۲، ۳۳). فلزات سنگین، اثرهای سمی بر مسیرهای متابولکی گیاهان دارند مکانیسم‌های مسمومیت از طریق مسدود کردن گروه‌های عملکردی (Functional groups) در مولکول‌های مهم از قبیل آنزیم‌ها، پلی نوکلئوتیدها، سیستم‌های انتقال مواد مغذی ضروری و یون‌ها، جابه‌جایی و یا جایگرینی با یون‌های ضروری از مکان‌های سلولی، دناتوراسیون و غیرفعال شدن آنزیم‌ها، اختلال فیزیولوژیکی در سلول و غشاهای سلولی می‌شود. علاوه براین، تاثیرهای فلزهای سنگین از طریق تشکیل رادیکال‌های آزاد امکان‌پذیر است. رادیکال‌ها باعث اکسیداسیون مولکول‌های زیستی مانند اسیدهای نوکلئیک؛ پروتئین، و چربی می‌شوند و در نتیجه در ثبات سلولی و نفوذپذیری غشا اختلال ایجاد می‌کنند (۳۴، ۳۵، ۳۶). در این مطالعه با افزایش فلزات سنگین (کادمیوم و سرب) در ریزجلبک *I. galbana* یافته‌های ما نشان داد که میزان سمیت فلزات سنگین متفاوت است. نتایج حاصله از آزمایش نشان داد که میزان سمیت فلز کادمیوم بر رشد و تراکم ریزجلبک نسبت به فلز سرب بیش‌تر بوده به‌طوری‌که بیش‌ترین میزان رشد ریزجلبک در غلظت ۵ میکروکرم بر لیتر در برای هر دو فلز به‌دست آمد. اما در غلظت‌های بالاتر تاثیر و شدت فلز کادمیوم بیش‌تر از فلز سرب بوده به‌طوری‌که در غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر لیتر از فلز کادمیوم رشد جلبک را در روز پنجم آزمایش مهار کرد در صورتی‌که در هیچ‌کدام از غلظت‌های مختلف سرب اثر مهارکنندگی مشاهده نشد. سرب می‌تواند به اسیدهای نوکلئیک متصل شده و به این ترتیب سبب تجمع و تراکم کروماتین و تثبیت مارپیچ مضاعف DNA و به دنبال آن مانع از فرایند رونویسی و ترجمه گردد (۳۷). سلولز موجود در دیواره سلولی ریزجلبک دارای گروه‌های عملکردی مانند هیدوکسیل است که در جذب فلزات سنگین ضروری می‌باشد، گروه‌های عملکردی فلزات را براساس بار تعامل بین بارهای مثبت و منفی روی دیواره سلولی و فلزات متصل می‌کند، گروه‌های عملکردی موجود در سطح دیواره سلولی دارای بار طبیعی هستند که بار مثبت را به یون‌های فلزی متصل می‌کند. جذب فلزات سنگین نیز با جایگزینی فلزات موجود در دیواره سلولی ریزجلبک انجام می‌شود. گروه‌های عملکردی موجود در ترکیبات آلی در سلول‌های ریزجلبکی در جذب یون‌های فلزی از محیط ضروری هستند. بار موجود در یون‌های فلزی و گروه‌های عملکردی یکدیگر را جذب کرده و پیوند ایجاد می‌کند. یکی از نمونه‌های اتصال یک گروه کاربردی به یون فلزی، گروه عملکردی سولفات است که به یون فلزی سرب متصل می‌شود (۳۸). یون‌های فلزی جایگزین یون‌های تک ظرفیتی و دو ظرفیتی موجود در سطح دیواره‌های سلولی میکروجلبک می‌شوند. این اتصال غلظت یون‌های فلزی را در محیط کاهش می‌دهد. با این‌حال، همه یون‌های فلزی به دیواره‌های سلولی متصل نمی‌شوند. برخی از یون‌های فلزی هم‌چنین با یون‌های فلزی دیگر که نمک را تشکیل می‌دهند متصل می‌شوند و رسوب می‌کنند، پس از جذب و متصل شدن یون‌های فلزات سنگین به سطح سلول‌های ریزجلبکی، فرآیند بعدی مرحله جذب فعال است. این فرایند با انتقال فلزات سنگین به اندامک‌های سلولی ریزجلبکی اتفاق می‌افتد که منجر به تجمع زیستی درون اندامک‌های سلولی ریزجلبکی می‌شود. یون‌ها می‌توانند در واکنش‌های متابولیک سلول‌ها دخیل باشند تجمع فلزات سنگین با میزان روشنایی

مطابقت دارد هرچه زمان فرار گرفتن فلزات در معرض نور بیش‌تر باشد تجمع فلزات بیش‌تر است (۳۹). تحقیقات نشان داده است که یون سرب می‌تواند مقلد خوبی برای نقش کلسیم- کالمودولین باشد و به‌نظر می‌رسد یکی دیگر از دلایل کاهش رشد، اختلال در جذب عناصر ضروری نظیر کلسیم و منیزیم به‌دلیل وجود یون سرب در محیط باشد که به نوبه خود متابولیسم سلول را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۴۰). فلز سرب از طریق بلوکه کردن کانال‌های آبی به‌واسطه برهم‌کنش با گروه‌های سولفیدریل کانال‌های آبی سبب بسته شدن آن‌ها و عدم نفوذ آب به درون سلول‌های ریزجلبکی می‌شوند، این عناصر با اثر سریع بر ارتباطات آبی سلول‌های ریزجلبک به‌علت کاهش سریع قابلیت هدایت آبی سلول‌ها سمیت خود را آشکار می‌نمایند و تاثیر بر کاهش قابلیت انتقال آبی غالباً سریع‌تر و بیش‌تر از تاثیر سمیت عناصر سنگین بر غشایی پلاسمی در ریزجلبک آشکار می‌گردد (۴۱). زمانی‌که محیط‌های آبی به فلز سرب آلوده شوند، سطح آنتی‌اکسیدان‌ها و موادی که عملکرد آنتی‌اکسیدانی داشته بالا رفته تا جلبک مورد نظر قادر به تحمل و رشد در شرایط تنش ایجاد شده باشد. در واقع ریزجلبک‌ها در هنگام آلودگی فلز سنگین، میزان ترکیبات فنولی را افزایش داده تا از اکسیداسیون لیپیدها جلوگیری کنند. مطابق با مطالعات انجام شده توسط Arunakumara و Song (۴۲) به‌نظر می‌رسد ریزجلبک *I. galbana* قادر به تحمل سرب در غلظت‌های مورد استفاده در این تحقیق باشد. اما در پژوهشی که Bernd و Muwafq گزارش دادند که فلزات سنگین (کادمیوم، سرب و مس) باعث کاهش رشد ریزجلبک *Scenedesmus quadricauda* می‌شود که شدت تاثیرها به نوع وغلظت فلزات مختلف و هم‌چنین زمان و دوره تماس بستگی دارد (۴۳). کلروفیل‌ها به‌عنوان رنگیزه اصلی در فتوسنتز، مسئول دریافت انرژی نورانی و تبدیل آن به انرژی شیمیایی در زنجیره انتقال الکترون می‌باشند. از آن‌جاکه میزان و شدت فتوسنتز تحت تاثیر تنش‌های محیطی تغییر می‌کند، انتظار می‌رود که تغییراتی در میزان کلروفیل *a* می‌باشند، ایجاد می‌شود. شکل‌های ۳ و ۴ ارتباط مابین غلظت‌های فلزات (سرب و کادمیوم) و کلروفیل *a* را در روزهای مختلف نشان می‌دهد همان‌طورکه مشاهده می‌شود سنتز کلروفیل در ریزجلبک *I. galbana* با افزایش غلظت فلزات به‌تدریج کاهش می‌یابد و با افزایش زمان این اختلاف بیش‌تر می‌شود این در حالی است که در غلظت‌های پایین نسبت به شاهد افزایش کمی از میزان کلروفیل در هر دو فلز سرب و کادمیوم بوده اما در غلظت‌های بالا روند کاهشی نسبت به شاهد دیده می‌شود. Qian و همکاران، نشان دادند که محتوای کلروفیل در غلظت‌های بالای Cd در کشت *Chlorella vulgaris* کاهش می‌یابد (۹) که مطابق با نتایج حاضر است. سیستم جمع‌آوری نور شامل یک ساختار پیچیده از قبیل مولکول‌های کلروفیل و پروتئین‌ها است که هر دو می‌توانند تحت تأثیر فلزات قرار بگیرند و در نتیجه بر در دسترس بودن نور تأثیر می‌گذارند فلزات سنگین می‌توانند سنتز کلروفیل را مهار کنند و مانع جذب عناصر ضروری برای رنگدانه‌های فتوسنتزی نظیر Mg، K، Ca و Fe توسط گیاهان شوند (۴۴). مهار تجمع رنگیزه فتوسنتزی در پاسخ به تنش فلزات سنگین و هم‌چنین پراکسیداسیون غشاء کلروپلاست ناشی از افزایش مقدار تولید H2O2 و پراکسیداسیون لیپید در غشاء کلروپلاست می‌باشد (۴۵). Sheoran و همکاران، نشان دادند که کادمیوم تاثیر بازدارنده بر آنزیم۳-فسفوگلسیریک اسیدکیناز دارد که یکی از آنزیم‌های احیایی فتوسنتزی است (۴۶). هم‌چنین کاهش محتوایی کلروفیلی ممکن است به‌علت افزایش فعالیت کلروفیلاز به‌وسیله اختلال در غشا کلروپلاست و غیرفعال شدن نقل و انتقال الکترون به فتوسیستم*I* ایجاد شود. بررسی‌های انجام شده در این تحقیق نشان داد که میزان پروتئین ریزجلبک با افزایش غلظت فلزات (سرب و کادمیوم) کاهش می‌یابد. Bajguz و همکاران، دربررسی که بر روی جلبک *Chlorella vulgaris* انجام دادند گزارش نمودند که افزایش میزان فلزات، مقدار محتوای پروتئین را در غلظت‌های بالا کاهش می‌دهد (۴۷). محتوای پروتئین، شاخص مهم تغییرات برگشت پذیر و غیرقابل برگشت در متابولیسم شناخته شده است که پاسخ به طیف گسترده‌ای از عوامل استرس‌زا است (۴۸). تحمل جلبک‌ها در شرایط تنش ممکن است با شکل‌گیری و تجمع پرونئین‌ها جدید و تغییرات پی در پی در نوارهای پروتئین و کاهش میزان پروتئین‌ها مشاهده می‌شود. حذف پلی‌پپتیدها در جلبک‌های مورد آزمایش با فلزات سنگین، نتیجه عملکرد سمی فلزات بر روی پروتئین‌های مورد آزمایش و آنزیم‌ها است که در بیوسنتز پروتئین‌ها نقش دارند (۴۹). بیان پروتئین یک ویژگی فنوتیپی است که توسط ژنوتیپ و عوامل محیطی تنظیم می‌شود و هم‌چنین تفاوت در مشخصات پروتئین را بیان می‌کند (۵۰). Bajguz، در بررسی که بر روی جلبک *Chlorella vulgaris* انجام داد گزارش نمود که افزایش میزان فلزات، مقدار محتوای پروتئین را در غلظت‌های بالا کاهش می‌دهد (۴۷). محتوای پروتئین، شاخص مهم تغییرات برگشت‌پذیر و غیرقابل برگشت در متابولیسم شناخته شده است که پاسخ به طیف گسترده‌ای از عوامل استرس‌زا است (۴۸). براساس تحقیقات انجام شده، تفاوت‌های قابل توجهی بین تست‌های سمیت فلزات سنگین وجود دارد حتی اگر بر روی موجود زنده مشابه انجام شود. برمبنای نتایج حاصل از تاثیر فلز (کادمیوم و سرب) برروی ریزجلبک *Isochrysis galbana* باعث کاهش رشد ریزجلبک شدند که شدت تاثیرات به نوع و غلظت فلزات مختلف و هم‌چنین زمان یا دوره تماس بستگی دارد به‌طوری‌که براساس نتایج حاصله تاثیر فلزات مورد آزمایش در غلظت‌های پایین بر روی رشد ریزجلبک افزایش رشد کمی را نشان

دادند. اما در غلظت‌های بالا و با گذشت زمان مهار رشد ریزجلبک مشاهده شد. علاوه بر این در بین دو فلز مورد مطالعه، فلز کادمیوم نسبت به فلز سرب اثرات بیش‌تری را بر روی رشد ریزجلبک داشت. در بررسی انجام شده میزان پروتئین با افزایش فلزات به‌طور قابل توجهی کاهش یافت. ارزیابی تأثیرات سمیت‌ناشی از فلزات با استفاده از ریزجلبک‌ها سریع و کم هزینه است و می‌تواند به‌طور مؤثر در ارزیابی عناصر و ترکیبات سمی حتی در غلظت‌های بسیار کم سموم مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

1. **Ghrefat, H. and Yusuf, N., 2006.** Assessing Mn, Fe, Cu, Zn, and Cd pollution in bottom sediments of Wadi Al-Arab Dam, Jordan. Chemosphere. 65(11): 2114-2121.
2. **Khaled, A., El Nemr, A. and El Sikaily, A., 2006.** An assessment of heavy-metal contamination in surface sediments of the Suez Gulf using geoaccumulation indexes and statistical analysis. Chemistry and Ecology. 22(3): 239-252.
3. **Szefer, P., Glasby, G.P., Stüben, D., Kusak, A., Geldon, J., Berner, Z. and Warzocha, J., 1999.** Distribution of selected heavy metals and rare earth elements in surficial sediments from the Polish sector of the Vistula Lagoon. Chemosphere. 39(15): 2785-2798.
4. **Junior, M.M., Silva, L.O., Leão, D.J. and Ferreira, S.L., 2014.** Analytical strategies for determination of cadmium in Brazilian vinegar samples using ET AAS. Food chemistry. 160: 209-213.
5. **Sunda, W.G., Engel, D.W. and Thuotte, R.M., 1978.** Effect of chemical speciation on toxicity of cadmium to grass shrimp, Palaemonetes pugio: importance of free cadmium ion. Environmental Science & Technology. 12(4): 409-413.
6. **Luo, Y. and Hong, A., 1997.** Oxidation and dissolution of lead in chlorinated drinking water. Advances in Environmental Research. 1: 84-97.
7. **Salavatian. M., Pourgholami mogaddam, A., Makarami, M. and Khatib Hagigi, S., 2018.** Identify and study the density and distribution of Phytoplankton in the Kardeh reservoir in Khorasan Razavi. Journal of Animal Environment. 10(2): 269-276. (In Persian)
8. **Levy, J.L., Stauber, J.L. and Jolley, D.F., 2007.** Sensitivity of marine microalgae to copper: the effect of biotic factors on copper adsorption and toxicity. Science of the Total Environment. 387(1-3): 141-154.
9. **Qian, H., Li, J., Sun, L., Chen, W., Sheng, G.D., Liu, W. and Fu, Z., 2009.** Combined effect of copper and cadmium on Chlorella vulgaris growth and photosynthesis-related gene transcription. Aquatic toxicology. 94(1): 56-61.
10. **Rai, L.C., Gaur, J.P. and Kumar, H.D., 1981.** Phycology and heavy-metal pollution. Biological Reviews. 56(2): 99-151.
11. **Valko, M.M.H.C.M., Morris, H. and Cronin, M.T.D., 2005.** Metals, toxicity and oxidative stress. Current medicinal chemistry. 12(10): 1161-1208.
12. **Pinto, E., Sigaud-kutner, T.C., Leitao, M.A., Okamoto, O.K., Morse, D. and Colepicolo, P., 2003.** Heavy metal induced oxidative stress in algae 1. Journal of phycology. 39(6): 1008-1018.
13. **Azarm, L., Javadzadeh, N. and Jalilzadeh, R., 2020.** Investigation of Chlorella vulgaris capacity in absorption of Nitrate and Phosphate from wastewater of fish farming pool in Khuzestan Province. Journal of Animal Environment. 12(2): 291-298. (In Persian)
14. **Suthers, I.M. and Rissik, D., 2009.** Plankton: A guide to their ecology and monitoring for water quality. CSIRO publishing.
15. **Canterford, G.S. and Canterford, D.R., 1980.** Toxicity of heavy metals to the marine diatom *Ditylum brightwellii* (West) Grunow: correlation between toxicity and metal speciation. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom. 60(1): 227-242.
16. **Ghorbani Vagheaii, R. and Davoudi, R., 2013.** Nutrition in aquaculture. Translated by Shams International Publications. 191 p.
17. **Yang, F., Chen, S., Miao, Z., Sheng, Z., Xu, J., Wan, J. and. Yan, X., 2016.** The effect of several microalgae isolated from East China Sea on growth and survival rate of postset juveniles of razor clam, *Sinonovacula constricta* (Lamarck, 1818). Aquaculture Nutrition. 22(4): 846-856.
18. **Liu, W., Pearce, C.M., Alabi, A.O. and Gurney-Smith, H., 2009.** Effects of microalgal diets on the growth and survival of larvae and post-larvae of the basket cockle, *Clinocardium nuttallii*. Aquaculture. 293(3): 248-254.
19. **Pernet, F. and Tremblay, R., 2004.** Effect of varying levels of dietary essential fatty acid during early ontogeny of the sea scallop *Placopecten magellanicus*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 310(1): 73-86.
20. **Duque, D., Montoya, C. and Botero, L.R., 2019.** Cadmium (Cd) tolerance evaluation of three strains of microalgae of the genus *Ankistrodesmus*, *Chlorella* and *Scenedesmus*. Revista Facultad de Ingeniería, Universidad de Antioquia. 92:60-69. https://doi.org/10.17533/udea.redin.2019052.

21. **Yap, C.K., Ismail, A., Omar, H. and Tan, S.G., 2004.** Toxicities and tolerances of Cd, Cu, Pb and Zn in a primary producer (*Isochrysis galbana*) and in a primary consumer (*Perna viridis*). Environment International. 29(8): 1097-1104.

22. **Koening, L.M. and Demacedo, J.S., 2004.** Urban secondary sewage: an alternative medium for the culture of *Tetraselmis chuii* (Prasinophyceae) and *Dunaliella viridis* (Chlorophyceae). Brazilian archives of Biology and Technology, an International journal. 47(3): 451-459.

23. **Jeffrey, S.T. and Humphrey, G.F., 1975.** New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. Biochemie und Physiologie der Pflanzen. 167(2): 191-194.

24. **Bradford, M.M., 1976.** 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding', Analytical biochemistry. 72: 248-254.

25. **Klaassen, C.D. and Rozman, K.K., 1996.** Absorption, distribution, and excretion of toxicants. Toxicology: The Basic Science of Poisons (Klaassen, C.D., Amdur, M.O. and Doull, J., eds). 5th ed. New York: McGraw-Hill. 91-109.

26. **Bencko, V., 1983.** Nickel: a review of its occupational and environmental toxicology. Journal of hygiene, epidemiology, microbiology, and immunology. 27(2): 237-247.

27. **Björn, A., Godhea, A., Filipssonc, H.L., Rengeforsb, K. and Berglund, O., 2020.** Differences in metal tolerance among strains, populations, and species of marine diatoms, Importance of exponential growth for quantification. Aquatic Toxicology. 226: 1-16.

28. **Ouyang, Y., Higman, J., Thompson, J., O'Toole, T. and Campbell, D., 2002.** Characterization and spatial distribution of heavy metals in sediment from Cedar and Ortega rivers subbasin. Journal of Contaminant Hydrology. 54(1-2): 19-35.

29. **Jochem, F.J., 2000.** Probing the physiological state of phytoplankton at the single-cell level. Scientia Marina. 64(2): 183-195.

30. **Duan, W., Meng, F., Lin, Y. and Wang, G., 2017.** Toxicological effects of phenol on four marine microalgae. Environ. Toxicol. Pharmacol. 52: 170-176.

31. **Nalimova, A.A., Popova, V.V., Tsoglin, L.N. and Pronina, N.A., 2005.** The effects of copper and zinc on Spirulina platensis growth and heavy metal accumulation in its cells. Russian Journal of Plant Physiology. 52(2): 229-234.

32. **Bhattacharyya, M.H., Wilson, A.K., Rajan, S.S. and Jonah, M., 2000.** Biochemical pathways in cadmium toxicity. Molecular biology and toxicology of metals. 34-74.

33. **William, G.S., 2013.** Trace Metal Interactions with Marine Phytoplankton.

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

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

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

37. **Vallee, B.L. and Ulmer, D.D., 1972.** Biochemical effects of mercury, cadmium, and lead. Annual review of biochemistry. 41(1): 91-128.

38. **Asiandu, A.P. and Wahyudi, A., 2021.** Phycoremediation: Heavy Metals Green-Removal by Microalgae and Its Application in Biofuel Production. Journal of Environmental Treatment Techniques. 9(3): 647-656.

39. **Purwaningrum, P., 2016.** Upaya mengurangi timbulan sampah plastik di lingkungan. Indonesian Journal of Urban and Environmental Technology. 8(2): 141-147.

40. **Visviki, I. and Rachlin, J.W., 1992.** Ultrastructural changes in Dunaliella minuta following acute and chronic exposure to copper & cadmium. Archives of environmental contamination and toxicology. 23(4): 420-425.

41. **Arab Bala Gelini, Z., Hosseiny, S.A., Ghorbani, R. and Atashi, S., 2019.** The effects Pollution of Lead Heavy Metals contamination on the Antioxidant Activity of microalgae *Spirulina platensis.* Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics. 7(4): 1-8. (In Persian)

42. **Arunakumara, K.K.I.U., Zhang, X. and Song, X., 2008.** Bioaccumulation of Pb 2+ and its effects on growth, morphology and pigment contents of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis.* Journal of Ocean University of China. 7(4): 397-403.

43. **Muwafq, M. and Bernd, M., 2006.** Toxicity of heavy metals on *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) de Brébisson in batch cultures (7 p). Environmental Science and Pollution Research. 13: 98-104.

44. **Burzynski, M., 1987.** Influence of lead and cadmium on the absorption and distribution of potassium, calcium, magnesium and iron in cucumber seedlings. Acta Physiologiae Plantarum.

45. **Piotrowska-Niczyporuk, A., Bajguz, A., Zambrzycka, E.B. and Godlewska-Zykiewicz, B., 2012.** Phytohormones as regulators of heavy metal biosorption and toxicity in

green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae). Plant Physiology and Biochemistry. 52: 52-65.

46. **Sheoran, I.S., Singal, H.R. and Singh, R., 1990.** Effect of cadmium and nickel on photosynthesis and the enzymes of the photosynthetic carbon reduction cycle in pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). Photosynthesis Research. 23(3): 345-351.

47. **Bajguz, A., 2011.** Suppression of Chlorella vulgaris growth by cadmium, lead, and copper stress and its restoration by endogenous brassinolide. Archives of environmental contamination and toxicology. 60(3): 406-416.

48. **Singh, P.K. and Tewari, R.K., 2003.** Cadmium toxicity induced changes in plant water relations and oxidative metabolism of *Brassica juncea* L. plants. Journal of Environmental Biology. 24(1): 107-112.

49. **El-Din, S.M.M. and Abd el-Kareem, M.S., 2020.** Effects of copper and cadmium on the protein profile and DNA pattern of marine microalgae Chlorella salina and Nannochloropsis salina. Environmental Processes. 7(1): 189-205.

50. **Jong, L.W., Thien, V.Y., Yong, Y.S., Rodrigues, K.F. and Yong, W.T.L., 2015.** Micropropagation and protein profile analysis by SDS-PAGE of *Gracilaria changii* (Rhodophyta, Solieriaceae). Aquaculture Reports. 1: 10-14.