



بررسی اثر فنانترن و آنتراسن بر میزان ترکیبات بیوشیمیایی و رشد در جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس (*Arthospira-sp* (J. Leonard, 1960))

ولید هوتی* و رامین مناف فر

گروه شیلات و آبریان، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

چکیده

هیدروکربن‌های پلی‌آروماتیک چندحلقه‌ای (poly aromatic hydrocarbon: PAH) با حلقه بنزنی از ترکیبات نفتی بوده و مهمترین عامل آلودگی محیط زیست هستند. فنانترن و آنتراسن PAH هایی هستند که در محیط آبی یافت می‌شوند. در مطالعه حاضر تاثیر این دو ماده بر یک جلبک آب شیرین *Spirulina platensis* در سطوح بیوشیمیایی بررسی شد. کشت انبوه جلبک در شرایط آزمایشگاهی در قالب ۹ تیمار و ۲۷ تکرار انجام گرفت. جلبک‌ها در معرض چهار غلظت آنتراسن (۵، ۲۵، ۵۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) و چهار غلظت فنانترن (۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به مدت ۷۲ ساعت قرار گرفتند و یک تیمار هم به عنوان شاهد بدون فنانترن و آنتراسن در نظر گرفته شد. میزان مالون دی‌آلدئید (MDA) در تیمار فنانترن و آنتراسن نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت که در سطح ۵٪ معنی دار بود، اما میزان MDA در تیمار فنانترن در غلظت ۱۰ mg/L تفاوت معنی داری را نشان نداد ($P > 0/05$). محتوای قند به جز در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر فنانترن تفاوت معنی داری را نشان داد ($P < 0/05$). محتوای پروتئین در پاسخ به هردو هیدروکربن افزایش معنی دار داشت ($P < 0/05$). در تیمارهای آنتراسن و فنانترن در مقایسه با تیمار شاهد افزایش معنی دار پروتئین در سطح احتمال ۵٪ معنی دار مشاهده شد. فعالیت کاتالاز تغییرات معنی داری در بین تیمارها نسبت به تیمار شاهد نشان داد ($P < 0/05$). میزان پروتئین کل روند افزایشی در تنش با فنانترن و روند کاهشی در تنش با فنانترن نشان داد و در همه غلظت‌ها نسبت به تیمار شاهد تفاوت معنی داری را نشان داد ($P < 0/05$). نتایج نشان داد که هر دو ماده هیدروکربنی در غلظت‌های مختلف تاثیر معنی داری بر ویژگی‌های بیوشیمیایی جلبک اسپیرولینا داشتند.

نوع مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۱۲

تاریخ چاپ الکترونیک: ۱۴۰۲/۰۶/۳۱

*نویسنده مسئول:

hooti.valid@gmail.com

کلید واژه‌ها: رشد، جلبک اسپیرولینا، آلودگی، ترکیبات نفتی، مواد هیدروکربنی

مقدمه

ایمنی مواد غذایی یک مسئله جهانی است و تأثیر قابل توجهی بر سلامت انسان دارد. سالانه بیش از دو میلیارد نفر تحت تأثیر بیماری‌های مربوط به غذا قرار دارند که شیوع بیماری‌های ناشی از غذا را در سطح جهانی افزایش می‌دهد (Alshuniaber et al., 2020). *Spirulina al.* به خاطر دارا بودن ترکیبات مهم و موثر در سلامتی موجودات زنده و مزایای پزشکی مرتبط با تغذیه اسپیرولینا (یا ترکیبات مشتق شده از آن)، دارای توانایی تبدیل شدن به یک غذای مهم در توسعه جوامع بشری می‌باشد (Lafarga et al., 2020). همچنین این جلبک دارای پروتئین با کیفیت بالا برای تغذیه انسان و دارای اسید آمینه ضروری توصیه شده توسط سازمان غذا و کشاورزی سازمان ملل متحد (FAO)، علاوه بر آن، این سیانوباکتری غنی از ویتامین‌ها و مواد

معدنی می‌باشد. مصرف اسپیرولینا به عنوان یک ماده غذایی کاربردی اخیراً در کشورهای غربی افزایش یافته است. همچنین اسپیرولینا جلبک سبز آبی با قدرت فتوسنتزی می‌باشد که در بسیاری از نواحی کره زمین خصوصاً در آب و هوای گرمسیری و نیمه گرمسیری به صورت طبیعی وجود داشته و یا به صورت مصنوعی به عنوان غذای انسان کشت داده می‌شوند (Beyrer *et al.*, 2020). این محصول تجاری به دلیل مواد مغذی با ارزش، به‌عنوان منبعی غنی از پروتئین و ویتامین‌هاست که در صنعت داروسازی، مواد غذایی و شیمیایی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Molino *et al.*, 2019).

امروزه آلودگی منابع آبی با ترکیبات آلی، یکی از مشکلات مهم در تامین آب سالم برای مصارف آشامیدنی و بهداشتی است. گروهی از این ترکیبات سمی، هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای (PAHs) هستند که ۱۶ نوع مختلف از این ترکیبات از جمله اصلی‌ترین آلاینده‌های محیط‌های آبی محسوب می‌شوند (Manaffar *et al.*, 2014). بر اساس تحقیقات به عمل آمده هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای (PAHs) دارای قدرت سرطان‌زایی قوی، خواص تراژونیک، جهش‌زایی و سایر اثرات نامطلوب بر روی انسان هستند. آن‌ها یکی از خطرناک‌ترین آلاینده‌ها هستند که در دهه‌های گذشته توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند (Guo *et al.*, 2023). این مواد در اثر نشست مواد نفتی به آب، تخلیه فاضلاب‌های شهری و یا احتراق ناقص سوخت‌های فسیلی ایجاد می‌شوند. همچنین هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای (PAHs) از جمله شایع‌ترین آلاینده‌های زیست محیطی در محیط‌های آبی هستند. این آلاینده‌ها می‌توانند از منابع مختلفی همچون نشت نفت، فاضلاب‌های صنعتی کارخانه‌ها و یا زباله‌های صنعتی ایجاد شده یا به طور طبیعی از طریق سوختن ناقص زغال سنگ، روغن گاز و چوب تولید شوند. بیشتر این ترکیبات جزو مواد سرطان‌زا و جهش‌زای ژنتیکی محسوب می‌شوند، PAHها که در بسیاری از نمونه‌های محیطی مثل خاک، آب، نفت، دود و زباله‌های غذایی یافت شده‌اند، می‌توانند باعث آلودگی موجودات آبی و به صورت مزمن باعث ایجاد تغییرات ژنتیکی در سلول‌ها یا بافت شده و در مقادیر زیاد موجبات مرگ سلولی را فراهم نمایند (Manaffar *et al.*, 2014). در کشورهای در حال توسعه مشکل فاضلاب صنعتی بسیار شدید است و ممکن است یک خطر جدی برای محیط زیست آبی و انسان باشد. بر اساس گزارش‌های موجود و تجزیه و تحلیل میزان و تنوع PAH در موجودات مختلف، این مواد در صدف‌ها، حلزون‌ها، سایر بی‌مهرگان و جلبک‌ها وجود داشته و که PAH اغلب حتی در مناطقی دور از انتظار و تراکم جمعیت نیز گزارش می‌شود. اما بایستی توجه کرد که میزان و انواع آن در موجودات مختلف متفاوت بوده و غلظت‌های مختلفی از این مواد در موجودات گونه‌های مختلف خصوصاً جلبک‌ها ذخیره می‌شود (Kirso and Irha, 1998). به همین دلیل بنظر می‌رسد ریزجلبک‌ها به دلیل انطباق پذیری خوب، نرخ تبدیل بالا و سازگار با محیط زیست به عنوان یک منبع تجدیدپذیر، پایدار و اقتصادی امیدوارکننده برای تصفیه مواد شیمیایی در نظر گرفته می‌شوند (Ge *et al.*, 2020). در تحقیقات علمی اطلاعاتی در مورد تاثیر دو ماده هیدروکربنی فنانترن و آنتراسن بر روی جلبک‌ها در دست نیست، لذا در مطالعه حاضر تاثیر آلودگی این دو ماده بر ریز جلبک اسپیرولینا بررسی شده است.

مواد و روش کار

کشت جلبک در آزمایشگاه

استوک جلبکی مورد نظر از شرکت دانش بنیان زیست فن گستر اسپوتا ارومیه و دو ماده آنتراسن و فنانترن از شرکت آلمانی مرک خریداری شدند. سپس جلبک داخل یک بطری پنج لیتری به مدت ۱۲ روز در آزمایشگاه کشت داده شد و بعد روز دوازدهم به سه تیمار در غلظت‌های مختلف PAHs به صورت کاملاً تصادفی در سه تکرار و سه شاهد به مقدار ۲۰۰ سی‌سی استوک جلبکی و ۳۰۰ سی‌سی محیط کشت زاروک حل شده در ۱۵ لیتر آب به داخل تیمارهای کل آزمایش اضافه شد. ارلن-های موجود داخل یک ظرف تانکر برای کنترل دمای آن‌ها نگهداری شده و از طریق بخاری برقی دما کنترل شد. نور مورد نیاز برای پرورش جلبک توسط لامپ‌های فلورسنت تامین گردید. برای اینکار لوله‌های ذخیره، لوله‌های آزمایش و ارلن‌های مختلف

توسط دو عدد لامپ فلورسنت از فاصله ۱۵cm سانتی متر نوردهی شدند. دمای نمونه‌ها 28 ± 1 درجه سانتی‌گراد متغییر بود، pH محیط پرورش نیز در حد ۹/۵-۹ حفظ گردید. هوادهی در مراحل مختلف توسط لوله‌های هوادهی متصل به پمپ مرکزی انجام گرفت. برای جلوگیری از ورود هر گونه آلودگی از طریق هوا، با استفاده از پیپت‌های فیلتردار، هوادهی به جلبک‌ها صورت پذیرفت، و در شرایط نوری LUX ۴۰۰۰-۵۰۰۰ بصورت ۱۲ساعته، با محلول غذایی زاروک پرورش داده شد (Soni et al., 2019).

افزودن PAHs و آنالیز بیوشیمیایی بعد از اعمال استرس

جلبک کشت داده شده در مراحل پیشین ابتدا در ۳ تیمار کلی و در هشت غلظت مختلف و ۳ تکرار تقسیم و میزان بقاء آن‌ها در معرض غلظت‌های تصادفی مختلف PAHs بررسی شد. مقادیر این مواد در غلظت‌های ۵، ۲۵، ۵۰، ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر برای آنتراسن و ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر برای فنانترن به صورت کاملاً تصادفی تنظیم شد.

شمارش سلولی جلبک‌ها

شمارش جلبک با کمک لام نئوبار انجام گرفت. ابتدا از جلبکی که قرار است شمارش شود یک میلی‌لیتر به یک بالن ژوژه با حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر انتقال داده شد. بعداً این حجم توسط آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. لامل سنگی مخصوص به روی لام قرار گرفته و یک قطره از جلبک برای شمارش بین لام و لامل قرار داده شد. لام دارای ۲ بخش شمارش است که هر دو بخش به عنوان ۲ تکرار شمرده شد. میانگین شمارش در فرمول ویژه قرار داده می‌شود. با شمارش جلبک‌های موجود در دو بخش و بدست آوردن میانگین، با کمک فرمول زیر تراکم جلبک در ۱ ml میلی‌لیتر محلول بدست می‌آید (N): میانگین تعداد سلول‌های جلبک شمارش شده، d: میزان رقیق‌سازی جلبک (Soni et al., 2019).

$$\text{Cell / ml} = \{N\} \times 10000 \times \{d\}$$

سنجش میزان پرولین

سنجش میزان پرولین بر اساس روش (Bates et al., 1973) انجام گرفت. بدین صورت که به ۰/۱g گرم از نمونه جلبکی ۱۰ میلی‌لیتر اسیدسولفوسالیسیلیک ۳٪ افزوده شد. سپس وورتکس شدید باعث شکسته شدن سلول‌ها شد. نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه با دور شتاب جذب ۳۵۰۰ سانتریفوژ شدند تا اضافات سلول جدا شود. به ۲ ml میلی‌لیتر از محلول رویی، ۲ ml اسیداستیک گلاسیال، همراه با ۲ ml میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین اضافه شد. (معرف نین‌هیدرین شامل ۲۰ ml میلی‌لیتر اسیدفسفریک ۶ M، ۳۰ ml میلی‌لیتر اسیداستیک گلاسیال و ۱/۵۲ g نین‌هیدرین می‌باشد). سپس نمونه‌ها به مدت ۶۰ دقیقه جوشانده شده و سپس سرد شدند. پس از آن به مخلوط حاصل ۴ ml میلی‌لیتر تولوئن اضافه شد. لوله‌ها به شدت هم زده شدند تا دو فاز مجزا تشکیل و سپس جذب آن در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد. منحنی استاندارد رسم شد. و محتوای پرولین بر حسب mg/gDW بیان گردید (Siripornadulsil et al., 2002).

سنجش میزان مالون دی آلدئید

میزان مالون دی آلدئید با استفاده از واکنش ۲-تیوباربیستوریک اسید اندازه گیری شد. بدین ترتیب ۰/۲ گرم از نمونه جلبک سانتریفوژ شده برداشته و در ۳ ml میلی لیتر تری کلرواستیک اسید ۵٪ (w/v) هموژنیزه شد. سپس به مدت ۵ دقیقه شتاب جاذبه با دور ۳۵۰۰ سانتیفریوژ شد. محلول رویی با حجم مساوی از ۲-تیوباربیستوریک اسید (حاوی ۵٪ در تری کلرواستیک اسید ۲۰٪ (w/v) مخلوط شد و مخلوط حاصل به مدت ۲۵ دقیقه جوشانده شد. پس از آن برای ۵ دقیقه شتاب جاذبه با دور ۳۵۰۰ سانتیفریوژ شده و میزان جذب محلول رویی در طول موج ۵۳۲ نانومتر از میزان جذب در ۶۰۰ نانومتر کم شد. و میزان مالون دی آلدئید بر اساس فرمول زیر (معادله ۱) محاسبه شد. که در آن A، میزان جذب خوانده شده $\epsilon = 155 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ، ضریب خاموشی C، غلظت و L، نیز ضخامت کووت می باشد (Siripornadulsil *et al.*, 2002).

$$A = \epsilon cl \quad (\text{معادله ۱})$$

سنجش فعالیت کاتالاز

برای استخراج عصاره گیاهی از روش Kang و Saltiveit (۲۰۰۲) با اندکی تغییرات استفاده شد. ۰/۵ گرم از بافت تر به همراه ۳ میلی لیتر بافر استخراج تریس-اسید کلریدریک ۵۰ میلی مولار (pH=۷) محتوی ۳ میلی مولار MgCl_2 ، ۱ میلی مولار EDTA در هاون سرد ساییده شد. بافر استخراجی برای آنزیم کاتالاز محتوی ۰/۲ میلی مولار AA نیز بود. هموژنات حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد با سرعت ۵۰۰۰ دور سانتیفریوژ شد. محلول رویی برای سنجش فعالیت آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت. سنجش فعالیت آنزیم CAT با استفاده از روش Aebi (۱۹۸۴) انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (pH=۷) محتوی ۰/۲ میلی لیتر H_2O_2 ۱ درصد و ۰/۳ میلی لیتر عصاره گیاهی استخراجی بود. فعالیت آنزیم CAT به صورت کاهش در جذب طی ۱ دقیقه در طول موج ۲۴۰ نانومتر محاسبه شد. در این فرمول میزان فعالیت آنزیم بر اساس میلی مول بر دقیقه محاسبه شد در حالیکه ضریب خاموشی ($0.0436 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) و doD میزان چگالی نوری مشاهده شده در رقیق سازی مورد نظر (dilution) در مدت ۱ دقیقه بود (معادله ۲). (Kang and Saltiveit 2002).

$$\text{Units (mM/min)} = \frac{\frac{\text{doD}}{\text{min(slope)}} \times \text{Vol. of assay (0.002)}}{\text{Extinction coefficient (0.0436)}} \quad (\text{معادله ۲})$$

سنجش میزان قند محلول

میزان قند به روش فنل سولفوریک (Keum *et al.*, 2006) انجام شد. که مبتنی بر پایه هیدرولیز محلول، و ایجاد ترکیب فورفورال و تشکیل کمپلکس رنگی با فنل است. ۰/۱ گرم از نمونه جلبک انتخاب شده و با ۵ ml میلی لیتر آب دیونیزه به خوبی وورتکس شدند. سپس به مدت ۵ دقیقه با دور شتاب جاذبه ۳۵۰۰ سانتیفریوژ شده و ۲ ml میلی لیتر از محلول رویی برداشته شد، به روی آن فنل ۵٪ (w/v) (۰/۵ ml) و اسید سولفوریک ۹۸٪ (w/v)، (۱/۵ ml) اضافه شد. لوله های آزمایش به مدت یک ساعت به حال خود رها شدند تا رنگ ظاهر شده و تثبیت گردد. پس از ظهور رنگ میزان جذب آنها در طول موج ۴۸۵ نانومتر خوانده شد. برای نمونه شاهد به جای عصاره گیاهی از آب مقطر استفاده شد و تمام مراحل فوق همانند نمونه های دیگر بر روی آن انجام گردید. برای تعیین غلظت های مجهول قندهای محلول از معادله خط منحنی استاندارد رسم شده با غلظت های معلوم گلوکز استفاده شد.

سنجش میزان پروتئین محلول

برای سنجش میزان پروتئین ۱۰ گرم از نمونه جلبکی را وزن شد و به هر میکروتیوب میزان μ2501 بافر K و μ251 آنتی-پروتئاز (Cocktail) اضافه شد و روی یخ هموژنیزه گردید. برای جداسازی مواد زاید میکروتیوبها با دور $\text{g } 1700$ به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ شدند. در مرحله بعد محلول رویی (μ2001) توسط سمپلر برداشت شد و به میکروتیوبهای جدید منتقل گردید (Parab *et al.*, 2008).

جدول ۱ نسبت مواد موجود در بافر K

نسبت مواد بر حسب گرم	مواد موجود در بافر K
۰/۰۲۷	Sorbirol
۰/۱۶	Potassium gluconate
۰/۰۷	MgCl ₂
۰/۰۰۷	NaH ₂ PO ₄
۰/۰۰۹۵	Hepes

سنجش پروتئین هر نمونه توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر صورت گرفت. بدین صورت که ابتدا استاندارد (BSA Bovin Serum) برای دستگاه در نظر گرفته شد و از طریق میزان جذب در 280 نانومتر غلظت هر نمونه با رقت ($10 + \mu\text{3901}$) بر حسب mg/ml (با سه تکرار) تعیین شد.

نتایج

بررسی اثر فنانترون و آنتراسن بر روی میزان رشد جلبک اسپیرولینا

بر اساس (جدول ۲) افزایش غلظت مواد نفتی موجب کاهش تراکم جلبک در تیمارهای مختلف شده است. در روز یازدهم غلظت 50 میلی گرم آنتراسن در مقایسه با روز هفتم افزایش معنی داری داشته است، در روز شانزدهم غلظت 10 میلی گرم فنانترون نسبت به روز یازدهم کاهش معنی دار داشته است. و در بین دو تیمار فنانترون و آنتراسن بیشترین میزان تراکم جلبک، در غلظت 100 میلی گرم بر لیتر فنانترون در روز یازدهم و در غلظت 5 میلی گرم بر لیتر آنتراسن در روز شانزدهم می باشد. همچنین در تیمار آنتراسن در غلظت 250 میلی گرم بر لیتر هیچ گونه جلبکی مشاهده نشد. اثر مهارکنندگی رشد هر دو ماده هیدروکربنی در همه تیمارها نسبت به شاهد در سطح احتمال 5% معنی دار بود.

نتایج نشان داد (جدول ۳) که در تیمار شاهد با گذشت مدت زمان 16 روز، زایش جلبک ادامه داشته ولی رویش آن کم شده و در تیمار فنانترون غلظت 100 میلی گرم بر لیتر که دارای تعداد پیچ جلبک بیشتر از سه می باشد، نشان می دهد علاوه بر زایش جلبک رویش آن ادامه داشته. و در غلظت 5 میلی گرم بر لیتر آنتراسن نشان می دهد که زایش آن ادامه داشته و همچنین رویش جلبک نسبت به زایش عملکرد بهتری را از خود نشان می دهد.

جدول ۲. تراکم سلولی جلبک اسپیرولینا در غلظت‌های مختلف آنتراسن و فنانترن. تعداد سلولی در هر میلی‌لیتر محاسبه شده است.

An/A	An/B	An/C	An/D	Ph/A	Ph/B	Ph/C	Ph/D	شاهد	تیمار
۵mg/L	۲۵mg/L	۵۰mg/L	۲۵۰mg/L	۱۰mg/L	۵۰mg/L	۱۰۰mg/L	۵۰۰mg/L		(زمان)
۲۵۴۱۹	۳۸۷۹۰	۸۰۶۷		۲۸۶۵۸	۳۲۶۰۰	۲۸۰۲۸	۴۴۹۶	۴۱۴۴۰	روز ۳
±	±	±	.	±	±	±	±	±	
c۱۸۵۳	b۲۹۷۵	d۸۹۰		c۱۹۲۵	b۲۳۲۳	c۱۸۴۲	e۲۳۶	a۲۷۹۳	روز ۷
۳۳۵۳۸	۴۰۵۷۷	۱۲۳۱۷	.	۳۰۹۸۶	۴۲۱۱۵	۳۶۰۴۳	۴۴۹۶	۴۵۴۳۷	
±	±	±		±	±	±	±	±	روز ۱۱
b۲۱۰۴	a۲۴۸۳	c۱۶۴۰	.	b۱۸۸۰	a۲۸۷۱	b۲۴۱۶	d۲۳۶	a۳۱۶۵	
۳۵۵۲۶	۴۵۲۹۲	۴۷۳۰۳	.	۵۳۲۴۲	۴۹۹۹۵	۶۱۷۳۷	۴۴۹۶	۶۹۰۴۷	روز ۱۶
±	±	±		±	±	±	±	±	
c۲۲۸۰	b۲۹۲۹	b۷۲۷۹		b۳۵۰۹	b۳۶۸۷	a۴۲۰۱	d۲۳۶	a۳۸۶۶	
۶۲۴۲۱	۴۵۲۹۸	۴۵۹۱۵		۴۱۹۵۳	۵۸۷۴۱	۵۹۴۴۵	۴۴۹۶	۵۵۸۰۱	
±	±	±		±	±	±	±	±	
a۳۴۶۶	d۳۲۴۱	d۶۷۹۲		d۲۴۷۱	b۴۱۰۵	b۳۹۵۱	e۲۳۶	c۲۵۸۶	

در جدول An معرف آنتراسن و Ph معرف فنانترن می‌باشد. اعداد در هر ردیف با حروف لاتین یکسان فاقد اختلاف آماری می‌باشند ($P > 0.05$).

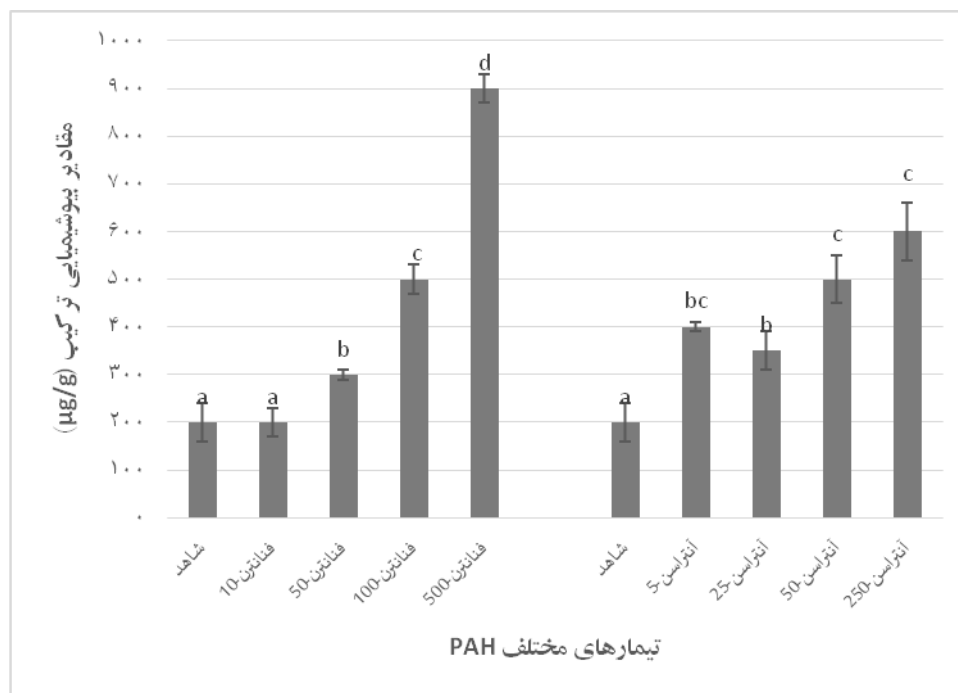
جدول ۳. اندازه تعداد پیچ جلبک‌ها در غلظت‌های مختلف آنتراسن و فناترن طی ۱۶ روز

تیمار (زمان)	پیچ (%)	شاهد	Ph/D ۵۰۰ mg/L	Ph/C ۱۰۰ mg/L	Ph/B ۵۰ mg/L	Ph/A ۱۰ mg/L	An/D ۲۵۰ mg/L	An/C ۵۰ mg/L	An/B ۲۵ mg/L	An/A ۵ mg/L
روز ۳	۱	%۵	۰	%۵	۰	۰	۰	%۴۰	%۱۰	%۵
	۳	%۱۰	%۱۰۰	%۵	%۲۰	%۱۵	۰	%۴۰	%۴۰	%۳۰
روز ۷	>۳	%۸۵	۰	%۹۰	%۸۰	%۸۵	۰	%۲۰	%۵۰	%۶۵
	۱	%۵	۱۰۰%	۰	%۵	%۲۰	۰	۰	۱۰%	۱۰%
روز ۱۱	۳	%۸۰	۰	%۵	%۱۵	%۴۰	۰	%۱۰	%۱۰	%۳۰
	>۳	%۱۵	۰	%۹۵	%۸۰	%۴۰	۰	%۹۰	%۸۰	%۶۰
روز ۱۶	۱	%۵	۰	۰	۰	%۵	۰	%۱۰	%۵	۰
	۳	%۵	۰	%۵	%۲۰	%۵	۰	%۳۰	%۵	%۱۰
	>۳	%۹۰	%۱۰۰	%۹۵	%۸۰	%۹۰	۰	%۶۰	%۹۰	%۹۰
	۱	%۱۰	۱۰۰%	%۱	۰	۰	۰	%۲۰	۰	۰
	۳	%۵	۰	%۴	%۱۰	%۵	۰	%۱۰	%۱۰	%۵
	>۳	%۸۵	۰	%۹۵	%۹۰	%۹۵	۰	%۷۰	%۹۰	%۹۵

An معرف آنتراسن و Ph معرف فناترن می‌باشد. اعداد در هر دریف تعداد پیچ‌های جلبک فوق را در طی بازه زمانی نشان می‌دهد.

بررسی تاثیر فناترن و آنتراسن بر میزان مالون‌دی‌آلدئید (MDA) در جلبک اسپیرولینا

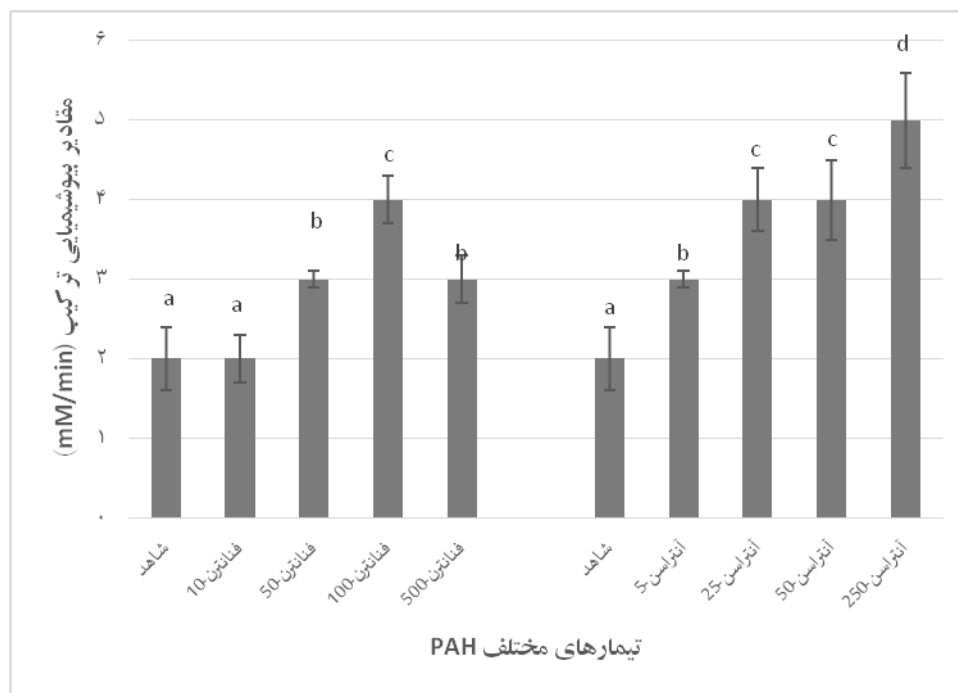
طبق این نتایج میزان MDA بطور قابل ملاحظه‌ای در تیمارها افزایش می‌یابد. این تغییر در تمامی تیمارها به جز غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر فناترن نسبت به شاهد در سطح %۵ معنی‌دار است. بنابراین طبق نتایج فناترن در غلظت‌های کمتر از ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر، MDA افزایش مشخصی نسبت به شاهد نشان نمی‌دهد ($P > 0.05$). اما غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر موجب روند افزایشی میزان MDA در مقایسه با شاهد (con) می‌شود. اما طبق شواهد موجود PAH آنتراسن در غلظت‌های کمتر از ۵ میلی‌گرم بر لیتر موجب افزایش مالون‌دی‌آلدئید در سلول‌های جلبک اسپیرولینا می‌شود. در نتیجه افزودن PAH به محیط جلبک باعث افزایش میزان MDA در جلبک فوق می‌شود که این افزایش وابسته به غلظت می‌باشد.



شکل ۱. تغییرات مالون دی آلدئید در اسپیرولینا تحت تیمار با هیدروکربن‌های نفتی. حروف لاتین یکسان در هر گروه نشان دهنده عدم اختلاف آماری هستند ($P > 0.05$).

بررسی تاثیر فنانترن و آنتراسن بر فعالیت آنزیم کاتالاز در جلبک اسپیرولینا

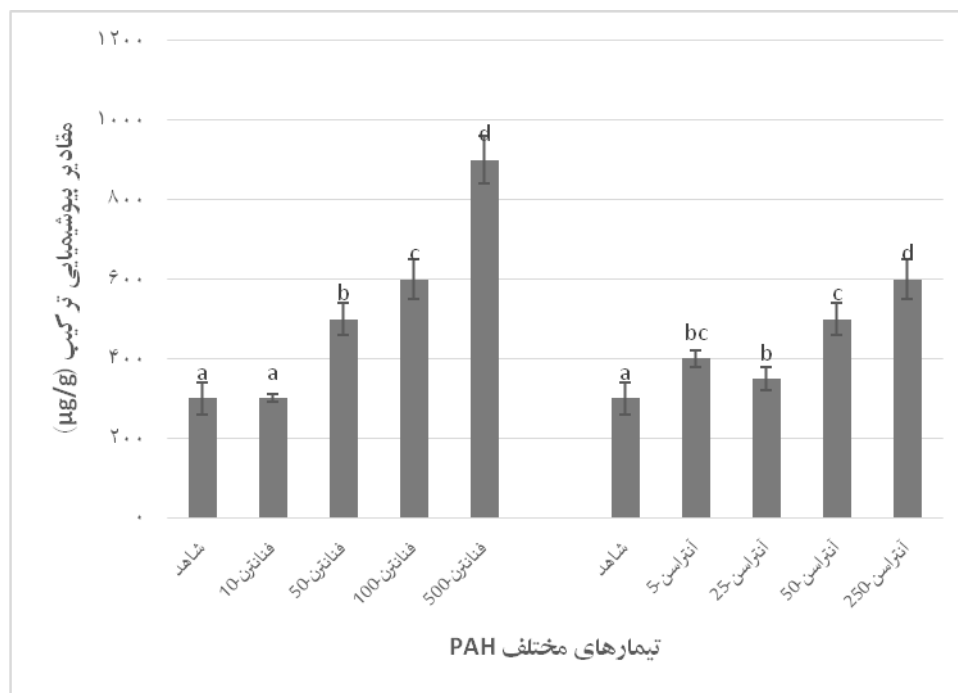
بر اساس نتایج بدست آمده میزان فعالیت آنزیم کاتالاز با غلظت ۱۰ میلی گرم بر لیتر فنانترن در مقایسه با نمونه شاهد (con) تغییرات مشخصی از خود نشان نداد ($P > 0.05$). اما در سایر غلظت‌های فنانترن ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر تغییرات معنی دار و مشخصی از خود نشان داده ($P < 0.05$). و همچنین در غلظت ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر تحت هیدروکربن‌های فنانترن فعالیت آنزیم آسکوربات پر اکسیداز روند کاهشی به خود گرفته است که تحت تنش با جلبک فوق قرار دارد. اما میزان فعالیت آنزیم کاتالاز تحت PAH ماده آنتراسن نسبت به تیمار شاهد (con) و در مقابل تمامی غلظت‌های موجود در آزمایش (۵، ۲۵، ۵۰، ۲۵۰) روند رو به رشدی را نشان می‌دهد.



شکل ۲. تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز در اسپیرولینا تحت تیمار با هیدروکربن‌های نفتی. حروف لاتین یکسان در هر گروه نشان دهنده عدم اختلاف آماری هستند ($P > 0.05$)

بررسی تاثیر فنانترن و آنتراسن بر محتوای قند در جلبک اسپیرولینا

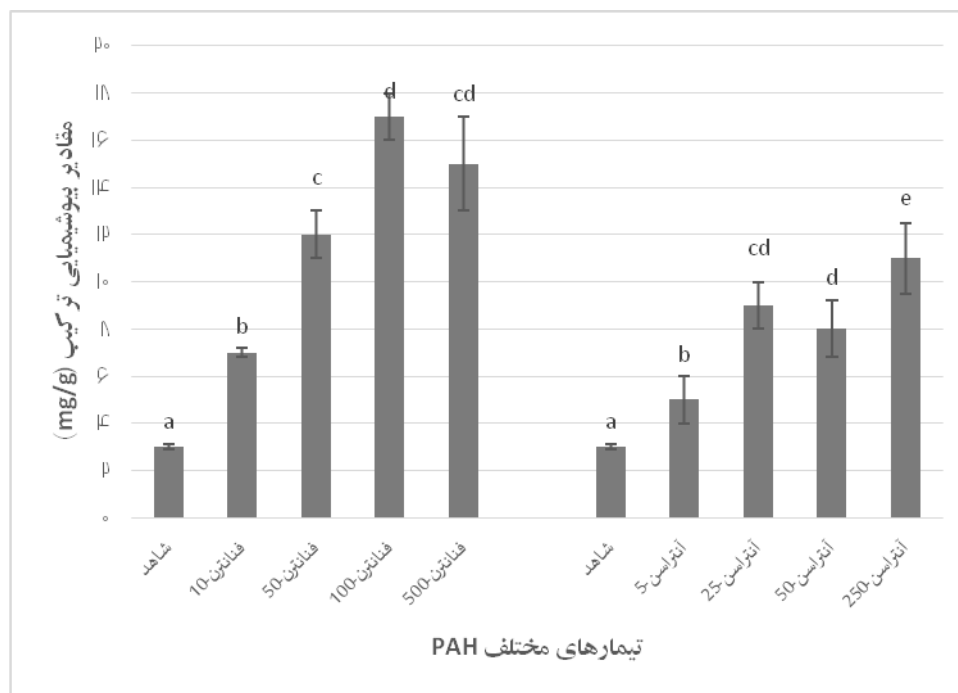
طبق نتایج به دست آمده همانند MDA فنانترن در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر، میزان قند افزایش مشخصی نسبت به تیمار شاهد نشان نمی‌دهد ($P > 0.05$). بنابر در سایر غلظت‌های فنانترن (۵۰، ۱۰۰، ۵۰۰) میزان قند در غلظت‌های مختلف PAH روند افزایشی را به خود می‌گیرد. با توجه به نتایج به دست آمده در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر در ماده آنتراسن میزان قند نسبت به شاهد (con) افزایش معنی‌داری نشان می‌دهد ($P < 0.05$). و در دیگر غلظت‌های آنتراسن (۲۵، ۵۰، ۲۵۰) روند افزایشی قند در سطح ۵٪ معنی‌دار باشد.



شکل ۳. تغییرات میزان قند در اسپیرولینا تحت تیمار با هیدروکربن های نفتی. حروف لاتین یکسان در هر گروه نشان دهنده عدم اختلاف آماری هستند ($P > 0.05$).

بررسی تاثیر فنانترن و آنتراسن بر میزان پرولین در جلبک اسپیرولینا

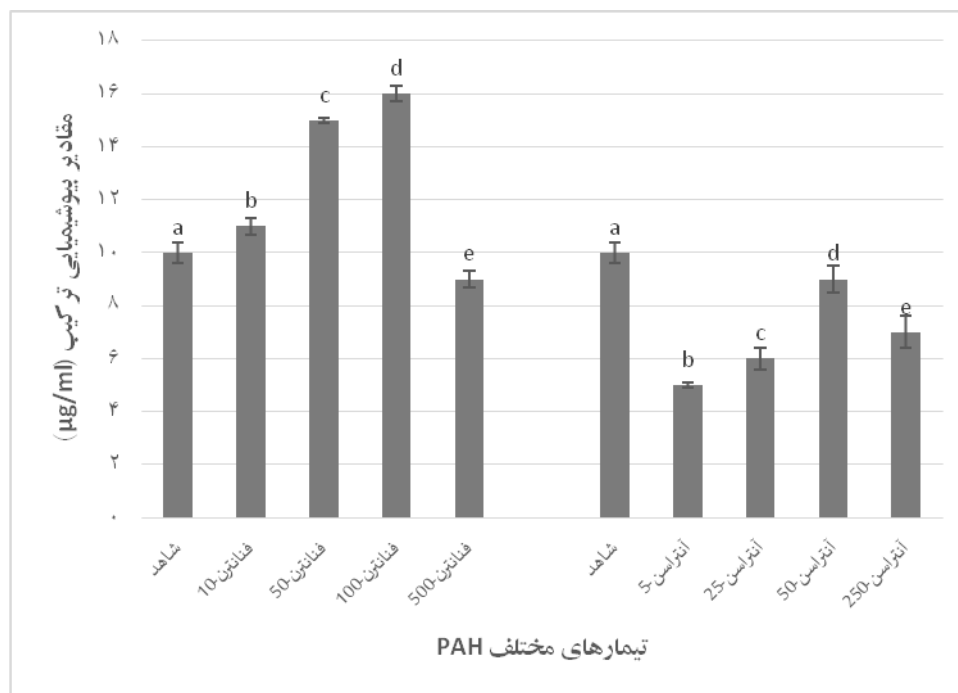
این نتایج نشان می‌دهد که جلبک اسپیرولینا تحت تاثیر هر دو ماده نفتی در پاسخ به همه غلظت‌های فنانترن و آنتراسن افزایش معنی‌دار داشته است ($P < 0.05$). بنابراین طبق نتایج به دست آمده محتوای پرولین در مقایسه با جلبک شاهد تحت تیمار با هیدروکربن‌های نفتی (فنانترن و آنتراسن) در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار است. همچنین طبق نتایج ارزیابی شده میزان پرولین در هر دو ماده هیدروکربنی در غلظت‌های مختلف نسبت به شاهد افزایش معنی‌دار داشته است.



شکل ۴. تغییرات مقدار پرولین در اسپیرولینا تحت تیمار با هیدروکربن های نفتی. جروف لاتین یکسان در هر گروه نشان دهنده عدم اختلاف آماری هستند ($P > 0.05$)

بررسی تاثیر فنانترن و آنتراسن بر میزان پروتئین های محلول در جلبک اسپیرولینا

نتایج حاصل از اثر تنش تاثیر فنانترن و آنتراسن بر میزان پروتئین محلول کل در شکل (۴-۶) نشان داده شده است. نتایج حاصل بیانگر روند افزایشی این پارامتر طی تنش در فنانترن، روند کاهشی در پاسخ به آنتراسن می باشد. طبق نتایج بدست آمده میزان پروتئین های محلول در تیمار آنتراسن در غلظت های مختلف نسبت به شاهد (con) کاهش معنی دار داشته است اما در تیمار فنانترن در غلظت های مختلف به غیر از غلظت ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر افزایش معنی دار داشته است.



شکل ۵. تغییرات پروتئین محلول در اسپیرولینا تحت تاثیر فنانترن و آنتراسن. حروف لاتین یکسان در هر گروه نشان دهنده عدم اختلاف آماری هستند ($P > 0.05$)

بحث

Echeveste و همکاران در سال (۲۰۱۱) با تحقیق بر روی *M. pusilla*, *synechococcus*, *Chorella sp.*, *P. marina* و *Phaeodactylum.tricornutum* پی بردند که با افزایش میزان غلظت PAH، فراوانی سلول‌ها کاهش می‌یابد (Echeveste et al., 2010). Paskova و همکاران در سال ۲۰۰۶ با انجام آزمایشاتی بر روی سه گیاه *Sinapis. alba*, *Triticum. aestivum* و *Phaseolus vulgaris* تحت تیمار PAH و مشتقات N هتروسیکلیک آن‌ها، کاهش فاکتورهای رشد مانند طول و وزن ریشه یا هیپوکوتیل را مشاهده کردند (Pašková et al., 2006). Hong و همکاران در سال (۲۰۰۸) با تحقیقاتی بر روی *Skeletonema costatum* و *Nitzschia sp.* دریافتند که موادی مانند فنانترن و فلئوراسن به طور کاملاً واضح و مشخص موجب مهار رشد می‌شود. که یافته‌های این سه پژوهش با نتایج حاضر همخوانی دارد. Qian و همکاران در سال 2009 با پژوهش‌های خود بر روی جلبک *C. vulgaris* نشان دادند که میزان MDA به طور مشخصی بعد از اعمال تیمار کوتاه‌مدت با N-phenyl-2-naphthylamine افزایش می‌یابد. همچنین با اعمال تیمار بلند مدت بر روی *C. vulgaris* محتوای MDA به میزان بیشتری افزایش خواهد یافت. که با نتایج حاضر همخوانی دارد. Abdel-Baky و همکاران در سال 2004 با مطالعه بر روی *D. salina* تحت تنش پرتو UV-B، افزایش میزان MDA را گزارش کردند. که با یافته‌های حاضر هم‌جهت می‌باشد. مطالعات Liu و همکاران در سال (۲۰۰۹) بر روی آرابیدوپسیس تالیانا افزایش فعالیت این آنزیم را تحت تیمار PAH گزارش داد و فعالیت آن وابسته به غلظت بود. که با نتایج حاضر در یک جهت می‌باشد. Qian و همکاران در سال (۲۰۰۹) با بررسی بر روی *Chlorella. vulgaris* افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز طی ۴۸ ساعت تیمار با N phenyl-2-naphthylamine را گزارش کرده‌اند. که با نتایج حاضر هم سو می‌باشد. Mishra و همکاران در سال (۲۰۰۸) با تحقیق بر روی جلبک *D. salina* تحت تنش شوری، افزایش میزان قند را گزارش کرده‌اند. قندهای محلول دارای نقش کلیدی در تنظیم اسمزی سلول ایفاء می‌کند. که با نتایج

تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد. Mishra و همکاران در سال (۲۰۰۸) با بررسی بر روی جلبک *D.salina* تحت تنش شوری افزایش میزان پرولین را نشان دادند. که این نتایج با یافته حاضر همخوانی دارد. گزارش شده است که تولید و افزایش پرولین همزمان با ایجاد تنش‌های محیط در گیاهان و جلبک‌ها افزایش پیدا می‌کند. بر این اساس El-Sheek و همکاران در سال ۲۰۰۰ با آزمایشاتی بر روی *Chlorella. vulgaris* و *Chlorella. homosphaera* پیشنهاد دادند که افزایش میزان پروتئین مکانیسمی جهت کاهش آثار سمیت می‌باشد. همچنین Mishra و همکاران در سال ۲۰۰۸ با بررسی بر روی جلبک *D.salina* تحت تنش شوری افزایش میزان پرولین را نشان دادند که این نتایج با یافته حاضر همخوانی دارد. در این تحقیق نیز مشاهده شد که در هر دو تیمار از PAH میزان پرولین افزایش یافته است که این افزایش اغلب نسبت به شاهد معنی‌دار و در آنتراسن با شیب تندتری می‌باشد. لازم به ذکر است افزایش پرولین در زمان استرس درون سلولی می‌تواند موجب کاهش پرواکسیداسیون لیپیدهای غشاء شود (Dhir et al., 2004) و این واکنش شیمیایی تا حدی می‌تواند مانع تخریب غشاء سلولی شده و از مرگ و میر سلولی جلوگیری نماید. در این تحقیق بر اساس نتایج حاصل از کاهش رشد جلبک و افزایش پرولین مشخص شد که هر دو ماده آنتراسن و فنانترن بر روی این جلبک اثر مهارکنندگی رشد داشتند ($p < 0.05$) و همزمان پرولین نیز افزایش یافته است. این نتایج نشان داد که بیان ژن‌های مربوط به پرولین تا حد ممکن به عنوان یک فیدبک مثبت به حضور عوامل استرس-زا و اکسیدکننده سلولی افزایش یافته است ولی نهایتاً نتوانسته است مانع مهار رادیکال‌های آزاد شده و همچنان با افزایش پرواکسیداسیون لیپیدها کاهش معنی‌داری در رشد و تکثیر سلولی رخ داده است. به همین دلیل پیش از این نیز گزارش شده بود که نمی‌توان یک رابطه خطی و منطقی بین افزایش پرولین و کاهش میزان پرواکسیداسیون اسیدهای چرب غشایی پیدا کرد که منجر به شناسایی دقیق میزان عامل استرس‌زا شود (Dhir et al., 2004).

نتیجه‌گیری

بر اساس پژوهش به عمل آمده مشخص شده است که PAH ها می‌توانند جذب غشاء فسفولیپیدی سلول شده و فعالیت‌های سلول را مختل نمایند، بر اساس این تحقیقات آنتراسن می‌تواند به عنوان یک محرک کننده تنش‌های اکسیداتیو در سلول‌ها عمل نماید. فنانترن همچنین می‌تواند باعث آسیب رساندن به فعالیت‌های اکسیداتیو شده و اکسید شدن پروتئین و لیپیدها شود که نهایتاً غشای سلول آسیب دیده و باعث مرگ سلولی می‌شود. اثر مهارکنندگی رشد هر دو ماده هیدروکربنی در همه تیمارها نسبت به شاهد در سطح احتمالی ۵٪ معنی‌دار بود. بدین ترتیب افزایش محتوای قند، پروتئین در این جلبک نشان می‌دهد که این اسپیرولینا توانایی تغییر در این مواد را دارند و می‌توانند آن‌ها را متابولیزه کرده و به مواد مفید تبدیل کنند. همچنین بنظر می‌رسد به علت افزایش تنفس ناشی از افزایش کربوهیدرات‌ها، محتوای پروتئین محلول در اثر تایید این دسته از مواد روند افزایشی را نشان داد که با نتایج تحقیقات پیشین هم‌خوانی داشت. لذا می‌توان گفت که گونه جلبک اسپیرولینا در برابر آلودگی با دو ماده مورد آزمایش فنانترن و آنتراسن تحت تاثیر قرار گرفته ولی تا حدودی نسبت به این مواد مقاوم بوده است.

منابع

- Abd El-baky, HH., El Baz, FK., El-Baroty, GS. 2004. Production of antioxidant by the green alga *Dunaliella salina*. *Int J Agric Biol* 6:49-57.
- Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. In *Methods in enzymology* (Vol. 105, pp. 121-126). Academic press.
- Alshuniaber, MA., Krishnamoorthy, R., AlQhtani, WH. 2020. Antimicrobial Activity of Polyphenolic Compounds from *Spirulina* against Food-Borne Bacterial Pathogens. *Saudi J Biol Sci* 0-5.
- Bates, LS., Waldren, RP., Teare, ID. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant*

- Soil* 39:205–207.
- Beyrer, M., Pina-Perez, MC., Martinet, D., Andlauer, W. 2020. Cold plasma processing of powdered *Spirulina* algae for spore inactivation and preservation of bioactive compounds. *Food Control* 118:107378.
- Dhir, B., Sharmila, P., & Saradhi, P. P. (2004). Hydrophytes lack potential to exhibit cadmium stress induced enhancement in lipid peroxidation and accumulation of proline. *Aquatic toxicology*, 66(2), 141-147.
- Echeveste, P., Agustí, S., Dachs, J. 2010. Cell size dependent toxicity thresholds of polycyclic aromatic hydrocarbons to natural and cultured phytoplankton populations. *Environ Pollut* 158:299–307.
- El-Sheekh, MM., El-Naggar, AH., Osman, MEH., Haieder, A. 2000. Comparative studies on the green algae *Chlorella homosphaera* and *Chlorella vulgaris* with respect to oil pollution in the river Nile. *Water Air Soil Pollut* 124:187–204.
- Ge, Y., Zhu, S., Chang, JS., Jin, C., Ho, SH. 2020. Immobilization of Hg (II) on high-salinity *Spirulina* residue-induced biochar from aqueous solutions: Sorption and transformation mechanisms by the dual-mode isotherms. *Environ Pollut* 265:115087.
- Guo, M., Li, M., Fu, H., Zhang, Y., Chen, T., Tang, H., Zhang, T., Li, H. 2023. Quantitative analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in water by surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) combined with Random Forest. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 287, p.122057.
- Hong, Y-W., Yuan, D-X., Lin, Q-M., Yang, T-L. 2008. Accumulation and biodegradation of phenanthrene and fluoranthene by the algae enriched from a mangrove aquatic ecosystem. *Mar Pollut Bull* 56:1400–1405
- Kang, H., Saltveit, ME. 2002. Chilling tolerance of maize, cucumber and rice seedling leaves and roots are differentially affected by salicylic acid. *Physiol Plant* 115:571–576.
- Keum, Y-S., Seo, J-S., Hu, Y., Li, QX. 2006. Degradation pathways of phenanthrene by *Sinorhizobium* sp. C4. *Appl Microbiol Biotechnol* 71:935–941.
- Kirso, U., Irha, N. 1998. Role of algae in fate of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. *Ecotoxicology and environmental safety*, 41(1), 83-89.
- Lafarga, T., Fernández-Sevilla, JM., González-López, C., Ación-Fernández, FG. 2020. *Spirulina* for the food and functional food industries. *Food Res Int* 137:109356.
- Manaffar, R., Sehat, Nia, B., Sabzi, R., Ehsani, A. 2014. Measurement of polycyclic aromatic hydrocarbons in water resources using an electrochemical biosensor (DNA). *Health and Environment Journal*, 8th Volume, 2nd Issue, 2014, pp. 225-236.(in Persian)
- Liu, H., Weisman, D., Ye, YB., Cui, B., Huang, YH., Colón-Carmona, A., Wang, ZH. 2009. An oxidative stress response to polycyclic aromatic hydrocarbon exposure is rapid and complex in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* 176:375–382.
- Mishra, A., Mandoli, A., Jha, B. 2008. Physiological characterization and stress-induced metabolic responses of *Dunaliella salina* isolated from salt pan. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35:1093.
- Molino, A., Mehariya, S., Karatza, D., Chianese, S., Iovine, A., Casella, P., Marino, T., Musmarra, D. 2019. Bench-scale cultivation of microalgae *scenedesmus almeriensis* for CO2 capture and lutein production. *Energies* 12:2806.
- Parab, SR., Pandit, RA., Kadam, AN., Indap, MM. 2008. Effect of Bombay high crude oil and its water-soluble fraction on growth and metabolism of diatom *Thalassiosira* sp.
- Pašková, V., Hilscherová, K., Feldmannová, M., Bláha, L. 2006. Toxic effects and oxidative stress in higher plants exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons and their N- heterocyclic derivatives. *Environ Toxicol Chem An Int J* 25:3238–3245.
- Qian, H., Xu, X., Chen, W., Jiang, H., Jin, Y., Liu, W., Fu, Z. 2009. Allelochemical stress causes oxidative damage and inhibition of photosynthesis in *Chlorella vulgaris*. *Chemosphere* 75:368–375.
- Siripornadulsil, S., Traina, S., Verma, DPS., Sayre, RT. 2002. Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. *Plant Cell* 14:2837–2847.
- Soni, RA., Sudhakar, K., Rana, RS. 2019. Comparative study on the growth performance of *Spirulina platensis* on modifying culture media. *Energy Reports* 5:327–336.



Investigating the effect of phenanthrene and anthracene on biochemical compounds and growth in *Spirulina platensis* algae

(J. Leonard, 1960) *Arthospira*-sp

Valid Hooti* and Ramin Manaffar

Department of Fisheries and Aquatics, Faculty of Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran

Abstract

Polyaromatic hydrocarbons (PAH) with a benzene ring are petroleum compounds and are known as the most important cause of environmental pollution. Phenanthrene and anthracene are PAHs found in the aquatic environment. In the present study, the effect of these two substances on a freshwater algae, *Spirulina platensis*, was investigated at biochemical levels. Algae mass cultivation was performed in laboratory conditions in nine treatments and 27 repetitions of anthracene (5, 25, 50, 250 mg/l) and phenanthrene (10, 50, 100, 500 mg/l) for 72 h. A control treatment with no anthracene and phenanthrene was also considered. The amount of malondialdehyde (MDA) in the treatment of phenanthrene and anthracene increased compared to the control treatment, which was significant at the 5% level, but the amount of MDA in the treatment of phenanthrene at a concentration of 10 mg/L did not show a significant difference ($P>0.05$). Sugar content showed a significant difference except in the concentration of 10 mg/liter of phenanthrene ($P<0.05$). Proline content increased significantly in response to both hydrocarbons ($P<0.05$). There was a significant increase in proline in both anthracene and phenanthrene treatments compared to the control group at a probability level of 5%. Catalase activity showed significant changes between the treatments compared to the control ($P<0.05$). The amount of total protein significantly increased in phenanthrene stress and significantly decreased in anthracene stress in all concentrations compared to the control group ($P<0.05$). The results showed that both hydrocarbon substances at different concentrations had significant effects on the biochemical characteristics of spirulina algae.

ARTICLE TYPE Research

Received: 9 May 2022
Accepted: 2 May 2023
ePublished: 22 September 2023

* Corresponding Author:
hooti.valid@gmail.com

Keywords: growth, spirulina algae, pollution, Petroleum compounds, Hydrocarbon material