



مقایسه اثر شدت‌های مختلف پرتو UV بر ریزجلبک‌های یوکاریوتی سبز *Anabaena* sp. و پروکاریوتی سبز - *Chlorella* sp.

اکرم سادات نعیمی^۱، جنت سرمد^{۱*}، نازنین راهنما^۲، سیده فاطمه فلاح^۳

تاریخ دریافت: خرداد ۹۵

تاریخ پذیرش: شهریور ۹۵

چکیده

اثرات تابش UV بر ترکیبات زیستی طی سه دهه گذشته، از زمان نخستین گزارش‌ها درباره تغییرات ایجاد شده توسط بشر در لایه ازن استراتوسفری که سطح زمین را از اشعه مضر فرابنفش محافظت می‌کند، به یک موضوع مهم تبدیل شده است. هدف از این پژوهش بررسی و مقایسه اثر شدت‌های مختلف اشعه UV بر برخی شاخص‌های فیزیولوژیکی ریزجلبک‌های یوکاریوتی سبز *Chlorella* sp. و پروکاریوتی سبز - *Anabaena* sp. است. پس از تهیه نمونه‌های خالص، نمونه‌های ریزجلبک‌های سبز - *Anabaena* sp. و *Chlorella* sp. به محیط کشت مناسب خود منتقل شدند و سپس در معرض پرتو UV-C در بازه‌های زمانی مختلف (۱، ۳، ۶ و ۱۲ ساعت) با سه تکرار قرار گرفتند. نمونه‌ها در اتاقک کشت در شرایط مطلوب از نظر دما $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ، شدت نوری 2500 لوکس و تناوب نوری روشنایی - تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت در شرایط هوادهی به مدت ۱۲ روز قرار داده شدند. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که با افزایش شدت پرتو UV-C تا ۱۲ ساعت، میزان رشد بر حسب وزن خشک، نرخ رشد، محتوای رنگیزه فتوسنتزی و محتوای پروتئین کل در مقایسه با نمونه شاهد به طور معنی‌داری در ریزجلبک‌های *Chlorella* sp. و *Anabaena* sp. کاهش یافت. همچنین محتوای مالون دی‌آلدهید (MDA) در هر دو ریزجلبک در کلیه تیمارها در مقایسه با شاهد افزایش پیدا کرد. به علاوه مقایسه دو ریزجلبک مشخص کرد که در همه پارامترهای مورد بررسی، ریزجلبک پروکاریوتی سبز - *Anabaena* sp. نسبت به ریزجلبک یوکاریوتی سبز *Chlorella* sp. کاهش بیشتری نشان داد و این امر نشان دهنده حساسیت بیشتر ریزجلبک پروکاریوتی سبز - *Anabaena* sp. است.

واژگان کلیدی: پرتو UV، *Anabaena*، *Chlorella*، پروتئین کل، مالون دی‌آلدهید.

- ۱- استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
 - ۲- دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
 - ۳- کارشناس ارشد فیزیولوژی گیاهی، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران.
- * نویسنده مسئول: sarmad1392@gmail.com

مقدمه

تشکیل کاتالیتیکی گونه‌های اکسیژن فعال دنبال می‌شود. در میان فرآیندهای فیزیولوژیکی مختلف، فرآیند فتوسنتز، نه تنها در گیاهان عالی، بلکه در جلبک‌ها به طور بالقوه هدف اصلی تابش UV است. کاهش فعالیت فتوسنتزی پس از تیمار UV ممکن است در نتیجه تخریب مستقیم اجزای کلیدی مثل پروتئین D1 در فتوسیستم II یا آنزیم رابیسکو، از دست دادن رنگدانه‌های فتوسنتزی و کاهش بیان ژن‌های درگیر در فتوسنتز باشد (Cruces et al., 2012). استراتژی‌های مختلف مقاومت در برابر UV اولین بار در سیانوباکتری‌ها کشف شد که از جمله آن‌ها ترکیبات پوشاننده UV مثل آمینواسیدهای شبه مایکوسپورین (MAAs) و کاروتنوئیدها در پوشش بیرونی سیانوباکتری‌ها است (Franklin et al., 2003). از دیگر استراتژی‌ها می‌توان به پاسخ‌های اجتنابی سیانوباکتری‌ها به وسیله جنبش سر خوردن برای فرار روزانه از شدت‌های بالای UV نیز اشاره کرد. در کنار استراتژی‌های حفاظت یا اجتناب، تعمیر فعال DNA و سنتز ترکیبات مورد هدف UV، در سیانوباکتری‌ها رخ می‌دهد. اکثر سیانوباکتری‌ها در مکانیسم‌های تعمیر DNA کارآمدی بالایی

اصطلاح UV (ماورای بنفش)^۱ برای توصیف ناحیه‌ای از طیف نور با طول موج ۲۸۰ تا ۴۰۰ نانومتر استفاده می‌شود. اشعه ماورای بنفش خود به سه نوار UV-C (۲۸۰-۳۲۰nm) و UV-B (۲۸۰-۳۲۰nm) و UV-A (۳۲۰-۳۹۰nm) تقسیم می‌شود. در طبیعت اشعه فرابنفش فقط در شدت‌های کم منتشر می‌شود، اما اگر اثر ممانعت کننده لایه اوزون در استراتوسفر به طور قابل توجهی در نتیجه اثر اکسیدهای نیتروژن و هیدروکربن‌های هالوژنه تضعیف شود، مقدار آن افزایش می‌یابد (Lutz et al., 1997). زمانی که گیاهان در معرض اشعه UV-B قرار می‌گیرند، تغییرات در بیان تعداد زیادی از ژن‌ها رخ می‌دهد. قبل از این که UV-B بتواند یک پاسخ سلولی را ایجاد کند، باید به وسیله یک رسپتور دریافت شود و اطلاعات از طریق یک مسیر پیام‌رسانی به مولکول‌های هدف (پروتئین‌ها در سیتوپلاسم یا مواد ژنتیکی در هسته) منتقل شود. دریافت سطوح پایینی از UV-B احتمالاً از طریق گیرنده‌های نوری UV-B مفروض رخ می‌دهد و به وسیله مسیرهای پیام‌رسانی مختلف شامل پیامبرهای ثانویه مثل کلسیم و کینازها یا

1- Ultraviolet

مثل *Selenastrum capricornutum* گزارش شده است. از آنجایی که پارامترهای فتوسنتزی ریزجلبک‌های سبز طبیعی به نظر می‌رسد، احتمالاً این سلول‌ها در سطح فیزیولوژیکی متاثر از اشعه UV نشده‌اند. پروکاریوت‌های فتوسنتزی مانند سیانوباکتری‌ها به عنوان قدیمی‌ترین ساکنان کره زمین محسوب می‌شوند که در پرکامبرین اولیه که زمین تحت تابش UV شدید قرار داشت، به فعالیت خود ادامه می‌دادند (Holzinger and Lutz, 2006). ریزجلبک‌ها بیشترین بخش پلانکتون‌ها را در زیستگاه‌های آبی تشکیل می‌دهند و نقش فعالی را به عنوان تولیدکننده اولیه در زیستگاه خود بر عهده دارند. در محیط آبی، ریزجلبک‌ها پایه و اساس تولید ارگانیک را به عنوان تولید کننده اولیه ایجاد می‌کنند و به طور وسیعی به تغییرات فیزیکی و شیمیایی که در محیط رخ می‌دهد، حساس هستند. موقعیت اکولوژیکی آن‌ها در قاعده اغلب زنجیره‌های غذایی و نقش‌های حیاتی آن‌ها در چرخه غذایی و چرخه فسفر برای اکوسیستم‌ها مهم است. بنابراین با در نظر گرفتن آسیب دیدگی لایه ازن و افزایش پرتو فرابنفش، دانستن اثرات این پرتو بر روی این ریزجلبک‌ها بسیار مهم است. بنابراین در پژوهش حاضر میزان مقاومت و

دارند. همچنین تعمیر سریع دستگاه فتوسنتزی و تنوع در پاسخ به تنش‌های القا شده در اثر تابش UV شامل پروتئین‌های تنش UV از دیگر توانمندی‌های آن‌ها است. این پروتئین‌ها به پروتئین‌های شوک حرارتی که در *Anacystis nidulans* گزارش شده است، شباهت دارند. تابش متوسط این اشعه (PAR: $14/7 \text{Wm}^{-2}$ ، UV-A: $1/21 \text{Wm}^{-2}$ و UV-B: $0/18 \text{Wm}^{-2}$) موجب افزایش در تولید گونه‌های اکسیژن فعال، افزایش پراکسیداسیون لیپیدی، شکست زنجیر DNA و کاهش قابل توجه بقا می‌شود. در مقابل، UV-A به تنهایی افزایش قابل توجهی را در سطوح اکسیژن فعال و شکست زنجیر DNA ایجاد می‌کند، در حالی که این اشعه هیچ اثر قابل توجهی را بر پراکسیداسیون لیپیدی، بی‌اثر شدن کلروفیل یا بقا ایجاد نمی‌کند (Gao et al., 2007). ریزجلبک‌های سبز تک‌سلولی آب شیرین در دریاچه‌های کم عمق یا برکه‌های کوچک در سراسر دنیا یافت می‌شوند. حتی در ارتفاع زیاد از سطح دریا حضور دارند. جلبک‌های فوق به اجبار تحت تابش UV در زیستگاه‌های طبیعی قرار می‌گیرند. افزایش تابش UV ممکن است موجب تحریک به افزایش اندازه سلول شود. این حالت در ریزجلبک‌های سبز آب شیرین

ریزجلبک‌ها *Anabaena* sp. و سبز *Chlorella* sp. به ترتیب به درون محیط کشت مایع BG11 و زاندر مثبت انتقال داده شدند. قبل از انتقال آن‌ها، محیط کشت‌های استریل سرد شده، داخل ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری استریل ریخته شد و سپس تلقیح ریزجلبک‌ها از محیط جامد به محیط مایع انجام شد. برای این کار، مقداری از سویه رشد یافته درون پلیت آگار با استفاده از لوپ درون محیط کشت مایع تلقیح شد. سپس دهانه ارلن حاوی محیط کشت توسط پنبه و کاغذ آلومینیوم استریل مسدود شد. در نهایت ارلن‌ها به اتاق کشت منتقل شد و فرصت رشد یک تا سه هفته‌ای برای رشد کامل و قرارگیری در فاز لگاریتمی به آن‌ها داده شد. نمونه‌ها در شرایط مطلوب از نظر دما 28 ± 1 درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و دمای آن توسط ترموستات تنظیم شد. نور سفید فلورسانت با شدت ۲۵۰۰ لوکس با دوره رشد ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، به مدت ۱۲ روز اعمال شد. هوادهی توسط پمپ‌های هوا (Air8000، چین) انجام شد. در ادامه، در این مرحله ۱۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون هر یک از ریزجلبک‌های *Anabaena* sp. و *Chlorella* sp. استوک‌های اصلی که در مرحله لگاریتمی رشد

حساسیت ریزجلبک‌های پروکاریوتی سبز-آبی *Anabaena* sp. و یوکاریوتی سبز *Chlorella* sp. به تابش UV-C در یک بازه زمانی کوتاه (تا ۱۲ ساعت) از طریق بررسی شاخص‌های فیزیولوژیکی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه و آماده‌سازی نمونه‌های جلبکی

سویه *Anabaena* sp. موجود در آزمایشگاه جلبک‌شناسی گروه زیست‌شناسی دانشگاه گیلان، طی چندین بار کشت در محیط جامد BG-11 خالص‌سازی شد. ریزجلبک سبز تک سلولی *Chlorella* sp. به صورت خالص از موسسه تحقیقات ماهیان خاویاری، آزمایشگاه دکتر رمضان پور واقع در شهر رشت تهیه شد. محیط کشت جامد مطابق روش Wegmann و همکاران (۱۹۷۱) تهیه شد. محیط حاوی آگار پس از استریل شدن و قبل از آن که سرد شود به داخل پتری دیش‌های استریل ریخته شد و سویه‌های مورد نظر در کنار شعله روی آن کشت داده شدند. به منظور کاهش میزان تبخیر و جلوگیری از نفوذ آلودگی درب پلیت‌ها با پارافیلیم مسدود شد و برای رشد به اتاقک کشت انتقال داده شد. پس از حصول اطمینان از خالص بودن کلنی‌ها،

سنجش رشد بر حسب وزن خشک برای سنجش رشد ریزجلبک‌ها در کلیه نمونه‌های تحت تیمار با اشعه UV-C و تیمار شاهد، مقدار جذب نوری نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (CamSpec M 501، Single Beam UV/Visible، چین) در طول موج ۷۵۰nm اندازه‌گیری شد. سپس با قرار دادن اعداد جذب نوری هر ریزجلبک در معادله به دست آمده از منحنی استاندارد، وزن خشک نمونه‌ها محاسبه شد (Singh et al., 2012). میزان نرخ رشد ریزجلبک‌های جداسازی شده از رابطه ۱ به دست آمد (Leganes et al., 1987).

رابطه ۱:

$$\mu = \frac{\ln(dW_{9th}) - \ln(dW_{7th})}{t_2 - t_1}$$

μ : نرخ رشد روزانه میلی‌گرم بر میلی‌لیتر؛ dW_{9th} : وزن خشک روز نهم؛ dW_{7th} : وزن خشک روز هفتم؛ t_1 و t_2 : به ترتیب روزهای هفتم و نهم.

سنجش محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی

برای تعیین غلظت رنگیزه‌های فتوسنتزی (کلروفیل a و بتا کارتن) در ریزجلبک سبز تک‌سلولی *Chlorella sp.*، ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون

(روز ۱۲) بودند، برداشته شد و به محیط کشت مایع BG11 برای ریزجلبک *Anabaena sp.* و زاندر مثبت برای ریزجلبک *Chlorella sp.* اضافه شد. سپس ریزجلبک‌ها در مدت زمان‌های ۱، ۳، ۶ و ۱۲ ساعت در معرض اشعه UV-C (با استفاده از هود لامینار دارای اشعه UV-C ۵۰ وات) با فاصله ۳۰ سانتی‌متر از سطح محیط کشت مایع، بر روی شیکر قرار گرفتند. برای هر دو ریزجلبک یک گروه شاهد هم در نظر گرفته شد. کلیه آزمایش‌ها (تیمارها و شاهد) در سه تکرار انجام شدند. پس از تیمار با پرتو UV، ریزجلبک‌های *Anabaena sp.* و *Chlorella sp.* در انتهای فاز لگاریتمی و ابتدای فاز ایستایی رشد خود برداشت شدند (پس از ۱۲ روز)، برای حذف محیط کشت، سوسپانسیون ریزجلبک با دور مناسب سانتریفیوژ شد. زیست‌توده به دست آمده، پس از شوک فریز در نیتروژن مایع برای سنجش پروتئین کل و اندازه‌گیری محتوی مالون دی‌آلدهید (MDA) در فریزر -۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. از ریزجلبک‌های مورد آزمایش برای سنجش شاخص‌های فیزیولوژیکی شامل بررسی تغییرات رشد بر حسب وزن خشک، مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی، محتوای پروتئین کل و مالون دی‌آلدهید استفاده شد.

Car : بتاکاروتن (میکروگرم بر میلی گرم وزن خشک).

سنجش رنگیزه‌های فیکوبیلی پروتئینی در ریز جلبک *Anabaena sp.*

برای اندازه‌گیری محتوای فیکوبیلی پروتئین‌ها از روش Wyman و Fay (۱۹۸۶) استفاده شد. بدین منظور توده جلبکی به مدت دو ساعت در تاریکی و یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد)، با کمک گلیسرول تحت فشار اسمزی شدید قرار گرفت. پس از گذشت این زمان، اسات سدیم و آب مقطر به مقداری افزوده شد تا غلظت اسات سدیم در محلول ۲۰۰ میلی‌مولار شود. در نتیجه، سلول‌ها شکسته و فیکوبیلی پروتئین‌ها آزاد شدند. در نهایت جذب نمونه‌ها در مقابل بلانک تهیه شده از مواد مورد استفاده در استخراج فیکوبیلی پروتئین (بدون وجود نمونه جلبک) در طول موج‌های ۶۱۵، ۶۵۲ و ۵۶۲ نانومتر خوانده شد. برای محاسبه فیکوبیلی پروتئین‌ها بر حسب میکروگرم در میلی‌لیتر از رابطه‌های ۴ تا ۶ استفاده شد.

رابطه ۴:

$$AP = \frac{[1000(A_{652} - A_{750}) - 208(A_{615} - A_{750})]}{5.09}$$

AP: آلفیکوسیانین؛ A: جذب (میکروگرم بر میلی گرم وزن خشک).

جلبکی هر ارلن به طور جداگانه، به لوله‌های پلاستیکی مخصوص میکروسانتریفیوژ منتقل و به مدت ۵ دقیقه با ۷۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی با دقت به کمک سمپلر خارج و به رسوب باقیمانده، یک میلی‌لیتر استون ۸۵٪ اضافه شد. سپس محتویات داخل میکروتیوب‌ها با دستگاه ورتکس مخلوط و پس از آن نمونه‌ها مجدداً با دور ۷۰۰۰، به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ شدند. جذب محلول رویی در طول موج‌های ۶۴۷ و ۶۶۳ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر تعیین شد (برای جلوگیری از تخریب رنگیزه‌ها، نمونه‌ها در سرما و تاریکی نگه داشته شدند) و با استفاده از رابطه‌های ۲ و ۳ میزان کلروفیل a و بتا کارتن بر حسب میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه شد (Eijkelhoff and Dekker, 1997).

رابطه ۲:

$$Chl a = [(12.25 \times OD_{663nm}) - (2.79 \times OD_{647nm})] \times DF$$

Chl a: کلروفیل a میکروگرم بر میلی گرم وزن خشک؛ OD: جذب نوری؛ DF: فاکتور رقت (Dilution Factor).

رابطه ۳:

$$Car = \frac{[(-0.43 \times OD_{412nm}) + (0.251 \times OD_{431nm}) - (4.376 \times OD_{460nm}) + (13.12 \times OD_{480nm})] \times 536 / 1000}{D}$$

رابطه ۵:

$$PC = \frac{[1000(A_{615} - A_{750}) - 474(A_{625} - A_{750})]}{5.34}$$

PC: فیکوسیانین (میکروگرم بر میلی‌گرم وزن خشک).

رابطه ۶:

$$PE = \frac{[1000(A_{562} - A_{750}) - 2.41(PC) - 0.948(AP)]}{9.62}$$

PE: فیکواریترین (میکروگرم بر میلی‌گرم وزن خشک).

سنجش میزان مالون دی‌آلدهید

میزان غلظت مالون دی‌آلدهید (MDA) بر اساس روش Heath و Packer (۱۹۶۸) اندازه‌گیری شد. در این روش ۰/۱ گرم توده ریزجلبکی به کمک ۲ میلی‌لیتر محلول تری‌کلرو استیک اسید (TCA) ۵ درصد توسط دستگاه سونیکاتور به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، سونیکیت و عصاره‌ها به دست آمده استخراج شد. عصاره به دست آمده در دمای اتاق و با سرعت rpm ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس مقدار محلول سوپرناتانت اندازه گرفته شد. سوپرناتانت با حجم مساوی از محلول تیوباربیتوریک اسید (۰/۵ درصد در تری‌کلرو استیک اسید ۰/۲۰٪) مخلوط شد. این مخلوط برای ۲۵ دقیقه در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد و سپس برای مدت ۵ دقیقه

در rpm ۷۵۰۰ سانتریفیوژ شد تا محلول شفاف به دست آید. جذب سوپرناتانت در ۵۳۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. ماده مورد نظر برای جذب در این طول موج کمپلکس MDA-TBA است. جذب بقیه رنگ‌های غیراختصاصی در ۶۰۰ نانومتر تعیین شد و از میزان جذب در ۵۳۲ نانومتر کسر شد. برای محاسبه غلظت MDA از ضریب خاموشی معادل $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ استفاده شد و در نهایت مقدار مالون دی‌آلدهید که محصول پراکسیداسیون لیپیدی است برحسب نانو مول در گرم وزن تر محاسبه شد. برای استخراج عصاره سلولی ریزجلبک، ۵۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون ریزجلبکی به مدت ۱۰ دقیقه در دور rpm ۵۰۰۰ سانتریفیوژ و به رسوب به دست آمده که تقریباً معادل ۰/۱ گرم وزن تر بود، ۱ میلی‌لیتر بافر استخراج اضافه شد. برای پاره کردن کامل غشای سلولی، نمونه‌ها به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و سپس به مدت ۲۰ دقیقه در دور rpm ۱۲۵۰۰ در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. سوپرناتانت به دست آمده تا زمان آزمایش در فریزر ۷۰- نگهداری شد. لازم به ذکر است تمام مراحل استخراج روی یخ انجام گرفت.

سنجش مقدار پروتئین کل

(Bradford, 1976).

به منظور آماده‌سازی نمونه‌ها برای سنجش پروتئین کل، ابتدا استخراج عصاره سلولی ریزجلبک‌ها به کمک بافر استخراج (شامل بافر فسفات ۵۰ میکرومولار، EDTA سدیم‌دار ۰/۵ مولار و گاهی پلی وینیل پیرولیدین (PVP) ۲ درصد) صورت گرفت. برای این کار، پس از شروع آزمایش ۵۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون جلبکی به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۵۰۰ rpm سانتریفیوژ و به رسوب به دست آمده که تقریباً معادل ۰/۱ گرم وزن تر بود، ۱ میلی‌لیتر بافر استخراج اضافه شد. برای پاره کردن کامل غشای سلولی، نمونه‌ها به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و سپس به مدت ۲۰ دقیقه در دور ۱۲۵۰۰ rpm در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. لازم به ذکر است تمام مراحل استخراج روی یخ انجام گرفت. برای تهیه محلول برادفورد، یک دهم گرم کوماسی برلیانت بلو جی ۲۵۰ در ۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد حل شد و ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید اورتو فسفریک ۸۵ درصد به آن اضافه شد و با آب مقطر به حجم نهایی ۲۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. از پروتئین گاما گلوبین پلاسمای گاوی (BSA) به عنوان پروتئین استاندارد برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد

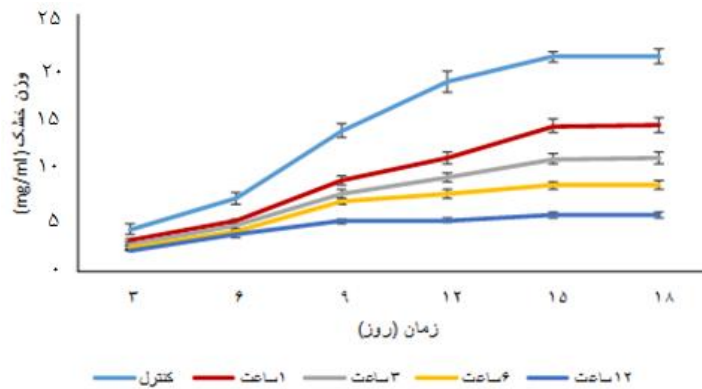
تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های به دست آمده از مطالعه حاضر با آزمون تجزیه واریانس داده‌ها (ANOVA) و پس‌آزمون دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ P توسط نرم افزار SPSS 16 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و رسم نمودارها با نرم افزار Microsoft Excel 2007 انجام شد.

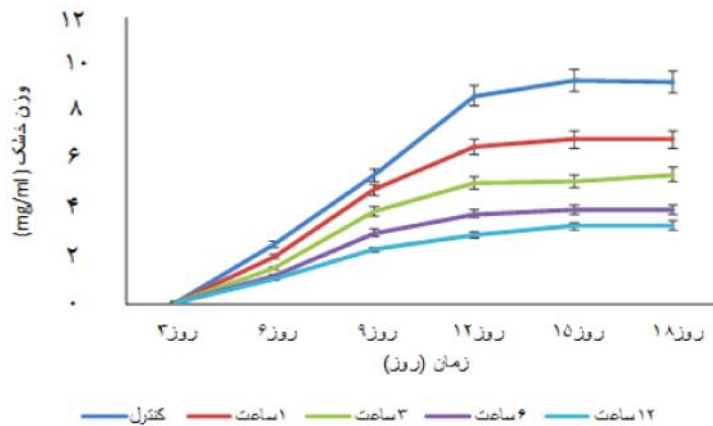
نتایج

تغییرات رشد بر حسب وزن خشک و نرخ رشد همان طور که در شکل ۱ مشخص شده است، درصد کاهش وزن خشک تحت اثر پرتو فرابنفش نسبت به گروه کنترل در انتهای فاز لگاریتمی رشد (روز ۱۲) در ریزجلبک *Anabaena sp.* به طور معنی‌داری بیشتر بود و با افزایش زمان قرارگیری در معرض اشعه فرابنفش، مقدار زیست‌توده نمونه‌ها در روزهای مختلف کاهش یافت، به طوری که این کاهش در وزن خشک بین نمونه شاهد و نمونه‌های تحت تیمار اشعه فرابنفش معنی‌دار بود. با توجه به نتایج این آزمایش ریزجلبک *Chlorella sp.* نسبت به پرتوهای فرابنفش مقاومت بیشتری را نشان داد.

الف



ب



شکل ۱: نمودار رشد بر حسب وزن خشک الف) ریزجلبک *Anabaena sp.* و ب) ریزجلبک *Chlorella sp.* پس از قرارگیری در معرض پرتو فرابنفش در زمان‌های مختلف (میانگین \pm انحراف معیار)

مقایسه نرخ رشد در دو ریزجلبک *Anabaena sp.* و *Chlorella sp.* تحت تاثیر مدت زمان‌های مختلف تابش اشعه فرابنفش کاهش بیشتری یافت. این امر نشان دهنده کاهش بیومس یا ماده زیستی به دلیل مرگ سلول‌ها در اثر تابش اشعه فرابنفش است.

مقایسه نرخ رشد در دو ریزجلبک *Anabaena sp.* و *Chlorella sp.* تحت تاثیر مدت زمان‌های مختلف تابش اشعه فرابنفش (جدول ۱) نشان می‌دهد که نرخ رشد ریزجلبک *Anabaena sp.* نسبت به

جدول ۱: مقایسه نرخ رشد ریزجلبک‌های *Anabaena sp.* و *Chlorella sp.* تحت تأثیر مدت زمان‌های مختلف تابش اشعه فرابنفش (میانگین \pm انحراف معیار)

<i>Chlorella sp.</i>	<i>Anabaena sp.</i>	نرخ رشد
0.16 ± 0.01^a	0.14 ± 0.02^a	شاهد
0.147 ± 0.002^b	0.1 ± 0.003^b	۱ ساعت
0.12 ± 0.001^c	0.083 ± 0.001^c	۳ ساعت
0.107 ± 0.004^d	0.06 ± 0.004^d	۶ ساعت
0.076 ± 0.005^e	0.038 ± 0.005^e	۱۲ ساعت

حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین نمونه‌ها است (P < 0.05).

طوری که بالاترین میزان کلروفیل a مربوط به نمونه شاهد و کمترین مقدار کلروفیل a مربوط به نمونه‌های تیمار ۱۲ ساعت بود. در همه تیمارها، ریزجلبک *Anabaena sp.* به طور معنی‌داری کاهش بیشتری در مقادیر کلروفیل a نسبت به ریزجلبک *Chlorella sp.* داشت. از این رو ریزجلبک *Anabaena sp.* به پرتو فرابنفش حساس‌تر است.

تغییرات محتوای رنگیزه بتاکاروتن در ریزجلبک *Chlorella sp.* و محتوای رنگیزه‌های فیکوبیلی پروتئینی در ریزجلبک *Anabaena sp.* در پایان مرحله لگاریتمی رشد (روز ۱۲)

محتوای بتاکاروتن در کلیه نمونه‌های تحت تیمار و شاهد در روز دوازدهم پس از قرارگیری در معرض اشعه فرابنفش در *Chlorella sp.*

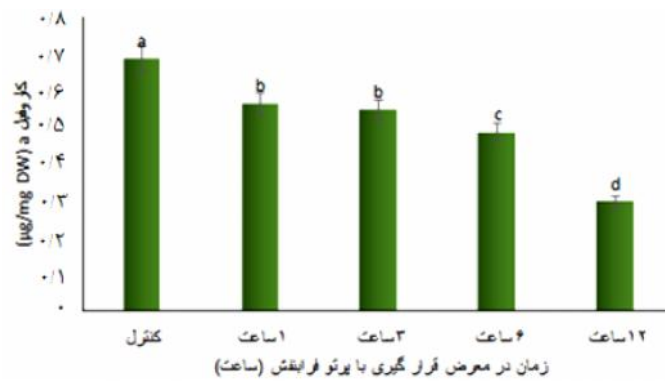
تغییرات رنگیزه‌های فتوسنتزی

کلروفیل a

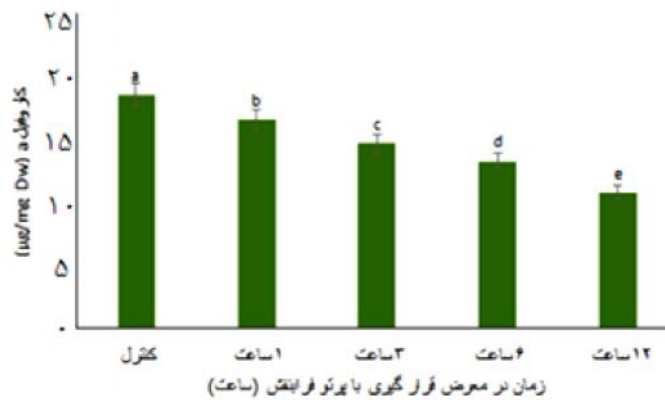
نتایج بررسی روزانه میزان کلروفیل a در ریزجلبک‌های سبز تک سلولی *Anabaena sp.* و *Chlorella sp.* (شکل ۲) تحت اثر مقادیر مختلف اشعه فرابنفش نشان داد که تا روز ششم محتوای کلروفیل a در نمونه‌های تحت تاثیر اشعه فرابنفش، الگوی تقریباً مشابهی را نسبت به شاهد نشان دادند و معنی‌دار نبودن تنش در این تیمار حاکی از عدم اختلاف در میانگین تغییرات کلروفیل a است. از روز ششم به بعد کاهش معنی‌داری در محتوای کلروفیل a در مقایسه با شاهد در هر دو گونه مشاهده شد و هر چه مدت زمان قرارگیری در معرض اشعه فرابنفش بیشتر شد، محتوای کلروفیل a کاهش بیشتری یافت، به

در شکل ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که با افزایش زمان قرارگیری در معرض اشعه فرابنفش، محتوای بتاکاروتن در ریزجلبک، به طور معنی‌داری در مقایسه با شاهد کاهش یافت. به طوری که بالاترین میزان بتاکاروتن مربوط به نمونه شاهد و کمترین مقدار آن مربوط به نمونه‌های تیمار ۱۲ ساعت بود.

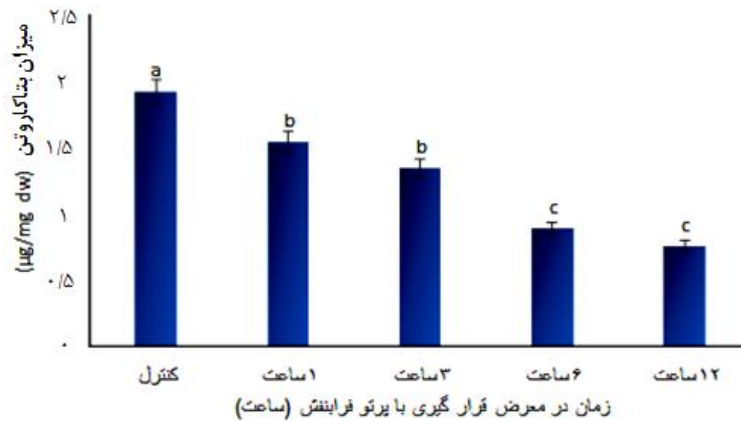
الف



ب



شکل ۲: مقایسه کلروفیل a بر حسب میکروگرم بر میلی‌گرم وزن خشک در الف) ریزجلبک *Anabaena* sp. و ب) *Chlorella* sp. تحت زمان‌های مختلف تابش پرتو فرابنفش (میانگین \pm انحراف معیار). حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین نمونه‌ها است ($P < 0.05$).



شکل ۳: بررسی میزان بتاکاروتن در پایان مرحله لگاریتمی رشد (روز ۱۲) بر حسب میکروگرم بر میلی گرم وزن خشک در ریزجلبک *Chlorella sp.* در تیمارهای مختلف (میانگین \pm انحراف معیار). حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین نمونه‌ها است ($P < 0.05$).

میزان فیکوسیانین و آلفوفیکوسیانین نیز از همین روند پیروی کرد و با افزایش زمان قرارگیری در معرض پرتو فرابنفش، مقادیر آن‌ها به طور معنی داری کاهش یافت و کمترین مقدار این رنگیزه‌ها مربوط به تیمار ۱۲ ساعت بود.

تغییرات محتوای مالون دی‌آلدئید

سنجش میزان مالون دی‌آلدئید (MDA) ریزجلبک‌ها تحت اثر اشعه فرابنفش، پس از اعمال تنش بررسی و نتایج آن در شکل ۴ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که محتوای مالون دی‌آلدئید در هر دو ریزجلبک *Anabaena sp.* و *Chlorella sp.* در کلیه

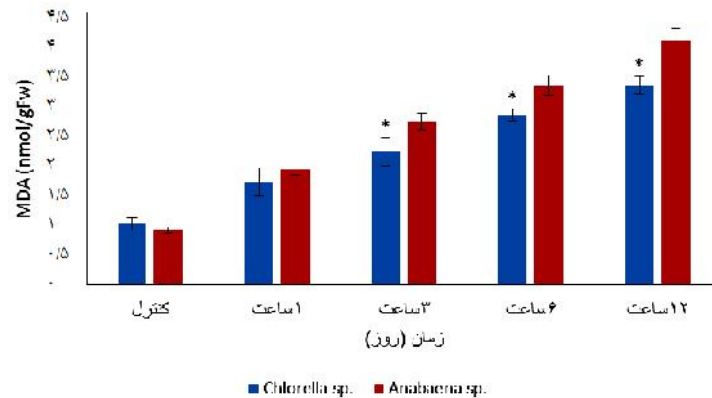
مقادیر رنگیزه‌های فیکوبیلی پروتئینی تحت اثر مقادیر مختلف اشعه فرابنفش در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که محتوای فیکوبیلی پروتئین‌ها در نمونه کنترل به طور معنی داری بیشتر از سایر تیمارها بود و مقدار آن ۵۵/۵۴ میکروگرم بر میلی‌گرم وزن خشک به دست آمد. با افزایش زمان قرارگیری در معرض پرتو فرابنفش، محتوای فیکوبیلی پروتئینی به طور معنی داری کاهش پیدا کرد و کمترین مقدار آن مربوط به تیمار ۱۲ ساعت با مقدار ۱۷/۳۱ میکروگرم بر میلی‌گرم وزن خشک بود. همان طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، مقدار فیکواریترین در ریزجلبک *Anabaena sp.* صفر است.

تیمارها در مقایسه با شاهد افزایش پیدا کرد. ریزجلبک *Anabaena sp.* نسبت به ریزجلبک در هر دو ریزجلبک بیشترین میزان مالون دی‌آلدهید بعد از ۱۲ ساعت تابش اشعه فرابنفش و کمترین مقدار آن در شاهد مشاهده شد، اما افزایش میزان مالون دی‌آلدهید در ریزجلبک *Chlorella sp.* با این که تحت تیمارهای یکسانی قرار داشتند، به طور معنی‌داری بیشتر بود و این حاکی از حساسیت بیشتر این ریزجلبک است.

جدول ۲: مقادیر رنگیزه‌های فیکوبیلی پروتئین‌ها (PE) فیکواریترین (APC) آلوفیکوسیانین (PC) فیکوسیانین (PC) لگاریتمی رشد (روز ۱۲؛ میانگین \pm انحراف معیار)

تیمارها	فیکوبیلی پروتئین‌ها ($\mu\text{g}/\text{mgdw}$)	فیکواریترین (PE) ($\mu\text{g}/\text{mgdw}$)	آلوفیکوسیانین (APC) ($\mu\text{g}/\text{mgdw}$)	فیکوسیانین (PC) ($\mu\text{g}/\text{mgdw}$)
شاهد	۵۵/۵۴ \pm ۵/۳ ^a	.	۶/۹۷ \pm ۱/۵ ^a	۵۰/۱۴ \pm ۳/۲ ^a
۱ ساعت	۴۵/۲۶ \pm ۴/۴ ^a	.	۴/۵۳ \pm ۱/۲ ^b	۳۹/۴۱ \pm ۴/۱ ^b
۳ ساعت	۳۷/۵۱ \pm ۵/۵ ^b	.	۴/۱۶ \pm ۰/۷ ^{bc}	۳۵/۷۰ \pm ۳/۵ ^{bc}
۶ ساعت	۳۰/۰۵ \pm ۳/۸ ^c	.	۳/۴۱ \pm ۰/۹ ^c	۲۷/۴۸ \pm ۴/۴ ^c
۱۲ ساعت	۱۷/۳۱ \pm ۴/۲ ^d	.	۲/۸۲ \pm ۰/۸ ^d	۱۳/۷۰ \pm ۳/۵ ^d

حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین نمونه‌ها است ($P < 0.05$).



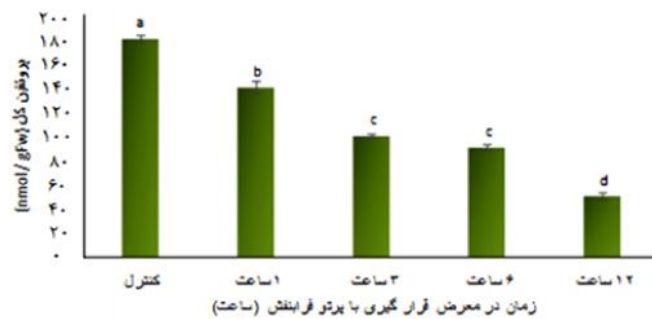
شکل ۴: مقایسه تغییرات غلظت MDA در ریزجلبک‌های *Anabaena sp.* و *Chlorella sp.* در پاسخ به زمان‌های مختلف قرارگیری در معرض پرتو فرابنفش در پایان دوره لگاریتمی رشد (روز ۱۲). علامت «*» نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین دو ریزجلبک است ($P < 0.05$).

تغییرات محتوای پروتئین کل

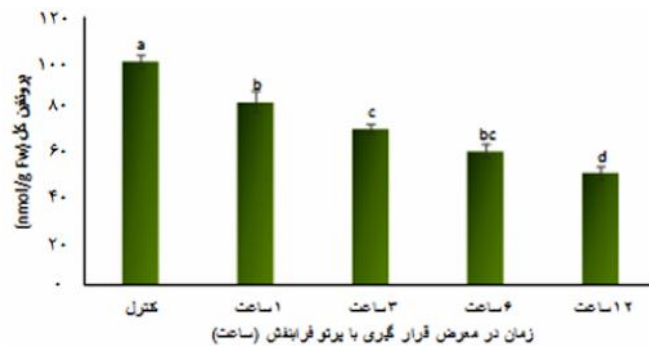
در کلیه تیمارها در مقایسه با شاهد کاهش پیدا کرد. در هر دو ریزجلبک بیشترین میزان پروتئین در شاهد و کمترین مقدار بعد از ۱۲ ساعت تابش اشعه فرابنفش مشاهده شد. مقایسه درصد کاهش پروتئین در این دو ریزجلبک نشان داد که ریزجلبک *Anabaena sp.* در همه تیمارها به طور معنی داری کاهش بیشتری نسبت به *Chlorella sp.* داشت.

نتایج به دست آمده از بررسی تغییرات غلظت پروتئین کل در ریزجلبک‌های *Chlorella sp.* و *Anabaena sp.* تحت اثر مدت زمان‌های مختلف تابش اشعه فرابنفش در پایان دوره لگاریتمی رشد (روز ۱۲) در شکل ۵ مشاهده می‌شود. نتایج نشان داد که محتوای پروتئین کل تحت اثر پرتو فرابنفش در دو ریزجلبک *Chlorella sp.* و *Anabaena sp.*

الف



ب



شکل ۵: مقایسه درصد کاهش پروتئین در الف) ریزجلبک *Anabaena sp.* و ب) ریزجلبک *Chlorella sp.* تحت اثر مدت زمان‌های مختلف تابش اشعه فرابنفش (میانگین \pm انحراف معیار). حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین نمونه‌ها است ($P < 0.05$).

بحث

تغییرات رشد بر حسب وزن خشک و نرخ رشد

از آنجا که رشد یک شاخص اکولوژیکی مهم است که همه تنش‌ها را در پروسه‌های بیوشیمیایی سلولی مختلفی درگیر می‌کند، باید بیشتر مورد توجه قرار گیرد. هر چند هدف اولیه پرتو فرابنفش تاثیر روی عمل فتوسنتز است، ولی مطالعات رشد روی ریزجلبک‌ها نشان داد که بسیاری از فرآیندهای سلولی در کنار فتوسنتز تخریب می‌شوند (Gao et al., 2009). تغییرات روند روزانه رشد در نمودارهای رشد ترسیم شده بر حسب وزن خشک (شکل ۱) برای ریزجلبک‌های *Anabaena sp.* و *Chlorella sp.* اشعه فرابنفش در مقایسه با شاهد نشان داد که پس از گذراندن فاز کندی یا تاخیر رشد که حدود ۳ روز پس از اعمال تنش ادامه داشت، نمونه‌ها وارد مرحله لگاریتمی رشد شدند. با این تفاوت که با افزایش زمان قرارگیری در معرض اشعه فرابنفش تا ۱۲ ساعت، نمونه‌ها با شیب ملایم‌تری نسبت به شیب منحنی نمودار نمونه شاهد به رشد خود ادامه دادند. همچنین بررسی نتایج حاصل از نرخ رشد در جدول ۱ نشان داد که با افزایش زمان قرار گرفتن در

معرض پرتو فرابنفش، نرخ رشد به معنای تولید ماده خشک، در نمونه‌های *Chlorella sp.* و *Anabaena sp.* تحت تیمار در مقایسه با نمونه‌های شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافت. طبق پژوهش‌های انجام شده، پرتو فرابنفش منجر به کاهش رشد و فتوسنتز می‌شود که دلیل آن تخریب لیپیدها، پروتئین‌ها و نوکلئیک اسیدها است (He and Hader, 2002). نتایج آزمایش حاضر با مشاهدات Tao و همکاران (۲۰۱۰) درباره اثر تابش فرابنفش بر روی ریزجلبک سبز-آبی *Microcystis aeruginosa* و سه ریزجلبک سبز *Chlorella ellipsoidea*، *Chlorella vulgaris* و *Scenedesmus quadricanda* مطابقت دارد. آن‌ها دریافتند که شدت‌های مختلف تابش فرابنفش بر رشد این ریزجلبک‌ها اثر مهاری دارد، البته مهار رشد ریزجلبک *Microcystis aeruginosa* بیشتر از سایر ریزجلبک‌ها بود (Tao et al., 2010). همچنین Sheeba و همکاران (۲۰۱۱)، اثر پرتو فرابنفش را بر ریزجلبک‌های *Nostoc muscorum* و *Phormidium foveolarum* بررسی کردند و دریافتند که پرتو فرابنفش منجر به کاهش شدید در زیست‌توده و رنگدانه‌های فتوسنتزی می‌شود. Mitchell و

طی ۱۲ روز پس از قرار گرفتن ریزجلبک *Chlorella sp.* در معرض اشعه فرابنفش (تا انتهای دوره لگاریتمی رشد)، مقدار کلروفیل a از روز اول تا روز سوم تفاوت معنی‌داری را در تیمارها نشان نداد (شکل ۳). بررسی میزان رنگیزه بتاکاروتن در ریزجلبک *Chlorella sp.* نشان داد که میزان این رنگدانه تحت اثر پرتو فرابنفش نسبت به گروه شاهد کاهش یافت و افزایش زمان قرارگیری در معرض پرتو فرابنفش میزان بیشتری از این رنگیزه را تخریب کرد. عدم وجود اختلاف معنی‌داری در میانگین تغییرات کلروفیل a مبنی بر معنی‌دار نبودن اثر تنش در طول مرحله تاخیری رشد بود. اما با ورود به مرحله تصاعدی رشد و نزدیک شدن به روزهای پایانی آن، متناسب با افزایش زمان قرارگیری در معرض اشعه تا پایان آزمایش، کاهش معنی‌دار در مقدار کلروفیل a، بین تیمارها نسبت به شاهد مشاهده شد. نتایج این آزمایش با یافته‌های Gao و همکاران (۲۰۰۷) درباره اثر پرتو فرابنفش بر ریزجلبک *Anabaena sp. PCC 7120* مطابقت می‌کند. آن‌ها دریافتند که تابش فرابنفش مقدار کلروفیل a را در این ریزجلبک به طور معنی‌داری کاهش داد (Gao et al., 2007). همچنین Chen و همکاران (۲۰۱۲) گزارش

Karentz (۱۹۹۳) گزارش کردند پرتو فرابنفش منجر به کاهش رشد می‌شود که علت آن تغییرات غیرقابل برگشت در DNA است. بنابراین کاهش رشد به واسطه پرتو فرابنفش در ریزجلبک می‌تواند به علت کاهش در رنگدانه‌های فتوسنتزی و به دنبال آن فعالیت فتوسنتزی کاهش یافته، باشد. Juan و Tian (۲۰۰۹) گزارش کردند که تراکم سلولی ریزجلبک تک‌سلولی *Dunaliella salina* تحت اثر پرتو فرابنفش نسبت به شاهد کمتر بود و این امر اثبات می‌کند که پرتو فرابنفش رشد *D. salina* را مهار می‌کند.

تغییرات محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی مقدار کلروفیل‌ها و به طور ویژه، کلروفیل a از شاخص‌های فیزیولوژیک رشد است (Kastori et al., 1998). کلروفیل a به عنوان رنگیزه اصلی در فتوسنتز، مسئول دریافت انرژی نورانی و تبدیل آن به انرژی شیمیایی در زنجیره انتقال الکترون است. از آنجا که میزان و شدت فتوسنتز تحت تأثیر تنش‌های محیطی تغییر می‌کند، انتظار می‌رود که تغییراتی در میزان کلروفیل a و پروتئین‌هایی که در ساختار کلروپلاست و در ارتباط با کلروفیل a هستند، ایجاد شود (زمانی، ۱۳۸۵). در مطالعه حاضر،

واسطه اشعه فرابنفش در کمپلکس جمع‌آوری کننده نور (LHCP)، تخریب کمپلکس آزاد کننده اکسیژن (OEC) و پلی پپتیدهای D₁ و D₂ در مرکز واکنش PSII مرتبط است (Greenberg et al., 1989).

تغییرات رنگی‌های فیکوبیلی پروتئینی

در سیانوباکتری‌ها فیکوبیلی پروتئین‌ها که در سطح استرومایی غشا تیلاکوئیدی هستند، به عنوان آنتن‌های اولیه گیرنده نوری برای PSII عمل می‌کنند. انتقال انرژی به وسیله این رنگی‌های اضافی از فیکواریترین (در صورت وجود) به فیکوسیانین و سپس الوفیکوسیانین و در نهایت به گیرنده‌های نور با طول موج بالا صورت می‌گیرد (Soltani et al., 2006). ساختار و عملکرد سیانوباکتری‌ها در پاسخ به تنش تغییر می‌کند (Sundaram and Soumya, 2011). نتایج آزمایش حاضر نشان داد که محتوای فیکوبیلی پروتئین‌ها با افزایش زمان قرارگیری در معرض پرتو فرابنفش کاهش بیشتری نسبت به شاهد پیدا کرد. احتمالاً علت این امر این است که اشعه فرابنفش بر رنگی‌های فیکوبیلی پروتئینی اثرات مخرب دارد و سبب کاهش رنگدانه‌ها در سیانوباکتری می‌شود. مشخص شده است که رنگدانه‌های

کردند که محتوای کلروفیل a در دو ریزجلبک *Anabaena* sp. و *Microcystis viridis* بعد از قرارگیری در معرض پرتو فرابنفش به معنی‌داری داری کاهش پیدا کرد. Gao و همکاران (۲۰۰۹) اثر UV-C را بر ریزجلبک‌های سبز-آبی *Synechococcus* sp. PCC7942 و *Synechocystis* sp. PCC6803 و ریزجلبک‌های سبز *Chlorella* *Chlamydomonas protothecoides* *Phaeodactylum reinhardtii* و *Alexandrium tamarense tricorutum* بررسی کردند و دریافتند که ۶ روز بعد از قرارگیری در معرض پرتو فرابنفش محتوای کلروفیل a و کاروتنوئید در همه گونه‌ها کاهش پیدا کرد. پژوهش‌های صورت گرفته نشان می‌دهند که تابش اشعه فرابنفش می‌تواند به طور مستقیم، رشد و بقا را کاهش دهد و منجر به سفید شدن رنگدانه‌های فتوسنتزی شود. همچنین این پرتو به طور مستقیم بر کلروفیل a تاثیر می‌گذارد (Sinha and Hader, 1998). همچنین گزارش شده است که اشعه UV پارامترهای فتوسنتزی مانند چرخه اکسیژنی، فعالیت فتوسنتتیک و تثبیت CO₂ را کاهش می‌دهد. کاهش در این فرآیندها با تغییرات به

فتوسنتزی مانند کلروفیل a و کاروتنوئیدها درون غشا جای گرفته‌اند، در حالی که فیکوسیانیین به سطح خارجی غشای تیلاکوئیدی متصل است. به همین علت، فیکوسیانیین به شدت به پرتو فرابنفش حساس است. فیکوسیانیین‌ها منبع نیترژن در سیانوباکتری‌ها است (Sheeba et al., 2011)، از این رو افت شدید فیکوسیانیین در *Anabaena sp.* مهار شدید در رشد را در مقایسه با جلبک سبز *C. vulgaris* نشان می‌دهد (Sheeba et al., 2011) و این امر با داده‌های وزن خشک نیز تایید می‌شود. همچنین تاثیرات UV روی تجمع رنگدانه‌های مختلف سیانوباکتری‌های شالیزارهای برنج آشکار می‌کند که رنگدانه فرعی فیکوسیانیین از هر رنگدانه دیگر مثل کلروفیل a یا کاروتنوئیدها با سرعت بیشتری سفید می‌شود. این نشان می‌دهد که اشعه UV قادر به فتواکسید کردن رنگیزه‌ها است. و بنابراین همه انواع رنگدانه‌های فتوسنتزی را سفید می‌کند و همچنین ممکن است باعث کم شدن کلروفیل a و کاروتنوئیدها از طریق کم کردن میزان بیوسنتز آن‌ها شود (Hader and Worrest, 1991). اخیراً در تعدادی از سیانوباکتری‌های شالیزارهای برنج، کاهش در محتوای فیکوبیلی‌پروتئین و تشکیل نشدن کمپلکس فیکوبیلی‌زومی در اثر تابش UV گزارش شده است که نقص انتقال انرژی از رنگدانه‌های کمکی به مراکز واکنش فتوسنتزی را مشخص می‌کند (Sinha et al., 1995). آنالیزهای اسپکتروسکوپی یک کاهش قوی را در جذب و فلئورسنس و همچنین یک تغییر در پیک فلئورسنس به طرف طول موج‌های کوتاه‌تر نشان می‌دهد که حاکی از تشکیل نشدن فیکوبیلوزوم‌ها است و از این جهت به انتقال انرژی از فیکوبیلی‌زوم‌ها به مراکز واکنش فتوسنتزی آسیب می‌زند (Hader and Worrest, 1991; Sinha et al., 1995). این نظریه بیشتر به وسیله آنالیزهای الکتروفورتیک ژل سدیم دودسیل سولفات- پلی آکریل آمید برای فیکوبیلی‌پروتئین‌ها تایید شده است که از دست دادن پروتئین‌های با جرم مولکولی کم بین ۱۶ و ۲۲KD (زیر واحدهای و فیکوبیلی‌پروتئین) و پایه (Rod) با جرم مولکولی بالا و پلی‌پپتیدهای متصل کننده پایه- هسته (جرم‌های مولکولی بین ۲۴ و ۴۵KD)، همچنین پلی‌پپتیدهای اتصال دهنده غشای هسته (جرم‌های مولکولی در حدود ۶۶KD) را نشان می‌دهد. به نظر می‌رسد که سازمان‌دهی مولکول‌های بزرگ فیکوبیلی‌زوم

فرابنفش در مقایسه با شاهد به طور قابل توجهی افزایش پیدا کرد. همچنین Sheeba و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که تحت تابش اشعه فرابنفش پراکسیداسیون لیپیدی به عنوان مثال تشکیل MDA نیز در نتیجه ایجاد گونه‌های مختلف فعال اکسیژن (ROS) افزایش می‌یابد. آسیب‌گشایی از طریق تولید مالون دی‌آلدهید به عنوان یک محصول و شاخص تنش و تولید رادیکال‌های آزاد در سلول‌ها مشخص می‌شود و نشان می‌دهد که مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی نتوانسته‌اند به طور کامل از پیشرفت و افزایش فرآیند پراکسیداسیون لیپیدی غشاهای سلول‌های تحت تنش جلوگیری کنند (Ohkawa et al., 1979).

تغییرات محتوای پروتئین کل

مقایسه نتایج حاصل از اندازه‌گیری پروتئین کل در دو ریزجلبک *Chlorella* sp. و *Anabaena* sp. تحت اثر پرتو فرابنفش نشان داد که محتوای پروتئین کل در هر دو ریزجلبک در کلیه تیمارها در مقایسه با شاهد کاهش پیدا کرد (شکل ۵). مقایسه درصد کاهش پروتئین در این دو ریزجلبک نشان داد که ریزجلبک *Anabaena* sp. در همه تیمارها

تا حد زیادی به علت از دست رفتن پلی‌پپتیدهای اتصال دهنده پس از تابش UV انجام نمی‌شود و این حقیقت به وسیله آنالیزهای الکتروفورتیک نشان داده شد (Sinha et al., 1995; Sinha et al., 1996).

تغییرات محتوای مالون دی‌آلدهید

مقایسه نتایج حاصل از سنجش پراکسیداسیون لیپیدی در دو ریزجلبک *Anabaena* sp. و *Chlorella* sp. تحت اثر پرتو فرابنفش نشان داد که محتوای مالون دی‌آلدهید (MDA) هم در *Chlorella* sp. و هم در *Anabaena* sp. در کلیه تیمارها در مقایسه با شاهد افزایش پیدا کرد (شکل ۴). اما میزان مالون دی‌آلدهید در ریزجلبک *Anabaena* sp. نسبت به ریزجلبک *Chlorella* sp. تحت تیمارهای یکسان به طور معنی‌داری بیشتر بود و این حاکی از حساسیت بیشتر این ریزجلبک است. نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر با مشاهدات Juan و Tian (۲۰۰۹) در بررسی تغییرات در فراساختار و پاسخ سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی در ریزجلبک *Dunaliella salina* تحت تاثیر پرتو فرابنفش افزایش یافته مطابقت دارد، آن‌ها مشاهده کردند که مقدار مالون دی‌آلدهید در تیمارهای پرتو

دنبال آن مرگ جاندارا منجر شود (Booji-
James et al., 2000).

به طور کلی اکثر شاخص‌های فیزیولوژیکی ریزجلبک‌های *Anabaena* sp. و *Chlorella* sp. تحت اثر پرتو فرابنفش تحت تاثیر قرار گرفتند. به این ترتیب که رشد بر حسب وزن خشک، محتوای کلروفیل a، محتوای پروتئین دو ریزجلبک یوکاریوتی سبز *Chlorella* sp. و پروکاریوتی سبز-آبی *Anabaena* sp. نسبت به شاهد تحت اثر پرتو فرابنفش در روزهای مختلف آزمایش کاهش یافت و ریزجلبک پروکاریوتی سبز-آبی *Anabaena* sp. به پرتو فرابنفش حساس‌تر بود. همچنین محتوای بتاکاروتن در ریزجلبک یوکاریوتی سبز *Chlorella* sp. و محتوای فیکوبیلی پروتئین‌ها در ریزجلبک پروکاریوتی *Anabaena* sp. در معرض مقادیر مختلف پرتو فرابنفش کاهش نشان داد. اما میزان مالون دی‌آلدهید در دو ریزجلبک *Chlorella* sp. و *Anabaena* sp. افزایش داشت که این افزایش در ریزجلبک پروکاریوتی سبز-آبی *Anabaena* sp. نسبت به ریزجلبک یوکاریوتی سبز *Chlorella* sp. تحت تیمارهای یکسان، به طور معنی‌داری بیشتر بود و این حاکی از حساسیت بیشتر

به طور معنی‌داری کاهش بیشتری نسبت به *Chlorella* sp. داشت و این حقیقت، نتایج قبلی را در مورد حساسیت بیشتر این ریزجلبک تایید کرد. نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر با مشاهدات Rajesh (۲۰۰۳) مطابقت دارد. وی با بررسی سه ریزجلبک *Nostoc* sp.، *Calothrix pulvinata* و *Plectonema boryanum* مشاهده کردند که تحت اثر پرتو فرابنفش، پروتئین کل هر سه ریزجلبک کاهش معنی‌داری پیدا کرد. همچنین Rajesh (۲۰۰۳) یک کاهش خطی را با افزایش زمان قرارگیری در معرض UV در محتوای پروتئین کل این ریزجلبک‌ها شالیزارهای برنج مشاهده کردند و این مطلب مشخص می‌کند پروتئین‌های سلولی یکی از هدف‌های اصلی UV هستند. در اثر تابش پرتو UV پروتئین‌ها تغییرات زیادی را متحمل می‌شوند که شامل تخریب نوری، افزایش حلالیت آبی پروتئین‌های غشا و قطعه قطعه شدن زنجیره‌های پپتیدی است که منجر به غیر فعال شدن پروتئین (آنزیم) و تخریب ساختار کلی آن می‌شود. تحلیل ساختار و عملکرد پروتئین‌ها تحت اثر پرتو UV می‌تواند به تغییر در نفوذپذیری غشای سلولی و به

ریزجلبک پروکاریوتی سبز- آبی *Anabaena* توسط زمانی و همکاران (۱۳۹۳) را در مورد sp. است و این حقیقت، نتایج به دست آمده حساسیت بیشتر این ریزجلبک تایید می‌کند.

منابع

- زمانی م.، سرمد ج. و داخم م. ۱۳۹۳. مقایسه اثر کادمیم بر جلبک سبز *Chlorella* sp. و سیانوباکتری *Anabaena* sp. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه گیلان. ۱۰۷ص.
- زمانی ن. ۱۳۸۵. اثر جیوه بر رشد، تکثیر و سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی در جلبک *Dunaliella tertiolecta* پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه گیلان. ۱۵۰ص.
- Booji-James I.S., Dube S.K., Jansen M.A.K., Edelman M. and Mattoo A.K. 2000.** Ultraviolet- B radiation impacts light-mediated turnover of the photosystem I reaction center heterodimer signaling. *Plant Growth Regulation*, 26: 290–300.
- Bradford 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.
- Chen L., Xie M., Bi Y., Wang G., Deng S. and Liu Y. 2012.** The combined effects of UV-B radiation and herbicides on photosynthesis, antioxidant enzymes and DNA damage in two bloom-forming cyanobacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 80: 224–230.
- Cruces E., Huovinen P. and Gomez I. 2006.** Stress proteins and auxiliary anti-stress compounds in intertidal macroalgae. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 40(4): 822–834.
- Eijkelhoff C. and Dekker J.P. 1997.** A routine method to determine the chlorophyll a, pheophytin a, and -carotene contents of isolated photosystem II reaction center complexes. *Photosynthesis Research*, 52: 69–73.
- Franklin L.A., Osmond C.B. and Larkum A.W.D. 2003.** Photoinhibition, UV-B and algal photosynthesis. P: 351–384. In: Larkum A.W., Douglas S.E. and Raven J.A. (Eds.). *Advances in Photosynthesis and Respiration Photosynthesis in Algae*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Gao K., Yu H. and Brown M.T. 2007.** Solar PAR and UV radiation affects the physiology and morphology of the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Journal Photochem Photobiol*, 89(2-3): 117–124.
- Gao Y., Cui Y., Xiong W., Li X. and Wu Q. 2009.** Effect of UV-C on algal evolution and differences in growth rate, pigmentation and photosynthesis between prokaryotic and eukaryotic algae.

- Photochemistry and Photobiology, 85(3): 774–782.
- Greenberg B.M., Gaba V., Mattoo A.K. and Edelman M., 1989.** Degradation of 32 kDa photosystem II reaction centre protein in UV-B, visible and far red light occurs through a common 23.5 kDa intermediate. *Zeitschrift fur Naturforschung*, 44: 450–452.
- Hader D.P. and Worrest R.C 1991.** Effects of enhanced solar-ultraviolet radiation on aquatic ecosystems. *Photochem Photobiology Science*, 53: 717–725.
- He Y.Y. and Hader D.P. 2002.** UV-B-induced formation of reactive oxygen species and oxidative damage of the cyanobacterium *Anabaena* sp.: Protective effects of ascorbic acid and N-acetyl-L-cysteine. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 66: 115–124.
- Heath R.L. and Packer L. 1968.** Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives in Biochemistry and Biophysics*, 125: 189–198.
- Holzinger A. and Lutz C. 2006.** Algae and UV irradiation: Effects on ultrastructure and related metabolic functions. *Micron Journal*, 37: 190–207.
- Kastori R., Plesnicar M., Sakac Z., Pankovic D. and Arsenijevic-Maksimovic I. 1998.** Effect of excess lead on sunflower growth and photosynthesis. *Journal Plant Nutrition*, 21: 75–85.
- Leganes F., Sanchez E. and Fernandez-Vaiante E. 1987.** Effect of indoleacetic acid on growth and dinitrogen fixation in cyanobacteria. *Plant Cell Physiology*, 28: 529–533.
- Lutz C., Seidlitz H.K. and Meindl U. 1997.** Physiological and structural changes in the chloroplast of the green alga *Micrasterias denticulata* induced by UV-B simulation. *Plant Ecology*, 128: 54–64.
- Mitchell D.L. and Karentz D. 1993.** The induction and repair of DNA photodamage in the environment. P: 345–377. In: Young A.R.L., Bjorn J. and Nultsch W. (Eds.). *Environmental UV Photobiology*. Plenum Press, London.
- Ohkawa H., Ohishi N. and Yagi K. 1979.** Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95: 351–358.
- Rajesh R.P., and Incharoensakdi A. 2003.** UV radiation-induced accumulation of photoprotective compounds in the green alga *Tetraspora* sp. CU2551. *Plant Physiology and Biochemistry*, 70: 7–13.

- Sheeba P.S.V., Kumar S.P. and Moha P.S. 2011.** Differential physiological and biochemical responses of two cyanobacteria *Nostoc muscorum* and *Phormidium foveolarum* against oxyfluorfen and UV-B radiation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(7): 1981–1993.
- Singh V.P., Srivastava P.K. and Prasad S.M. 2012.** Differential effect of UV-B radiation on growth, oxidative stress and ascorbate-glutathione cycle in two cyanobacteria under copper toxicity. *Plant Physiology Biochemistry Journal*, 61: 61–70.
- Sinha R.P. and Hader D.P. 1998.** Effects of ultraviolet-B radiation in three rice field cyanobacteria. *Plant Physiology*, 153: 763–769.
- Sinha R.P., Lebert M., Kumar A., Kumar H.D. and Hader D.P. 1995.** Disintegration of phycobilisomes in a rice field cyanobacterium *Nosroc* sp. following UV irradiation. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 37: 697–706.
- Sinha R.P., Singh N., Kumar A., Kumar H.D. and Hader D.P. 1996.** Impacts of ultraviolet-B irradiation on nitrogenfixing cyanobacteria of rice paddy fields. *Journal Plant Physiology*, 32: 107–113.
- Soltani N., Khavari-Nejad R.A., Tabatabaei M., Shokravi S. and Fernandez-Valiente E. 2006.** Variation of nitrogenase activity, photosynthesis and pigmentation of cyanobacterium *Fischerella ambigua* strain FS18 under different irradiance and PH values. *Journal of Applied Biotechnology*, 22: 571-576.
- Sundaram S. and Soumya K.K. 2011.** Study of physiological and biochemical alteration in cyanobacterium under organic stress. *American Journal of Plant Physiology*, 6: 1–16.
- Tao Y., Zhang X., Au D.W., Mao X. and Yuan K. 2010.** The effects of sub-lethal UV-C irradiation on growth and cell integrity of cyanobacteria and green algae. *Chemosphere*, 78(5): 541–547.
- Tian J. and Juan Y.J. 2009.** Changes in ultrastructure and responses of antioxidant systems of algae (*Dunaliella salina*) during acclimation to enhanced ultraviolet-B radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 97: 152–160.
- Wegmann T.G., Hellstrom I. and Hellstrom K.E. 1971.** Immunological tolerance: "Forbidden clones" allowed in tetraparental mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68(7): 1644–1647.
- Wyman M. and Fay P. 1986.** Underwater light climate and the growth and pigmentation of

planktonic blue-green algae
(Cyanobacteria). I. The influence
of light quality. Proceedings of the

Royal Society of London. 227:
367–380.



Comparing the effects of different intensities of ultraviolet radiation on the green eukaryotic microalgae, *Chlorella* sp., and blue-green prokaryotic microalgae, *Anabaena* sp.

Akram Sadat Naeemi¹, Jannat Sarmad^{1*}, Nazanin Rahnama²,
Seyed Fatemeh Fallah³

Received: June 2016

Accepted: September 2016

Abstract

Effects of ultraviolet (UV) radiation on biological matter became an important issue over the past three decades since the first reports of man-made changes in stratospheric ozone layer, which covers and protects the earth's surface from harmful ultraviolet radiation. The aim of this study was to evaluate and compare the effects of different intensities of UV radiation on the physiological indices of microalgae *Chlorella* sp. and *Anabaena* sp. After preparation of pure samples *Anabaena* sp. and *Chlorella* sp. were transferred to flasks containing the appropriate medium and then exposed to UV-C radiation at various time intervals (1, 3, 6 and 12 h) with three replicates. The treated and control samples were placed to growth chamber in favorable conditions of temperature $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, with light intensity of 2500 lux and light period of 12 hours light and 12 hours darkness in aerated condition for 12 days. The results showed that by increasing the intensity of UV-C radiation up to 12 hours factors like the growth, growth rate, content of photosynthetic pigments and total protein content based on dry weight was significantly reduced when compared to control. Also, in both microalgae, Malondialdehyde (MDA) content was increased in comparison with control group. Furthermore, comparison of the two microalgae revealed that, *Anabaena* sp. showed more reduction in examined parameters which indicated that the *Anabaena* sp. is a more sensitive species.

Key words: *UV Light, Chlorella, Anabaena, Total Protein, Malondialdehyde.*

1- Assistant Professor in Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran.

2- M.Sc. Student in Plant Physiology, Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran.

3- M.Sc. Student in Plant Physiology, Department of Plant Sciences, Faculty of Biological Sciences, University of Kharazmi, Tehran, Iran.

*Corresponding Author: sarmad1392@gmail.com