

مطالعه پارامترهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی پاسخ به تنش اکسایشی در جلبک

پرسلولی شارا به دنبال حذف ماده رنگزای مالاکیت سبز

ملیحه دشتی^۱، غلامرضا دهقان^{۲*}، علیرضا ختایی^۳

۱. کارشناسی ارشد زیست‌شناسی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، dashti.n14@gmail.com

۲. استاد بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ar_khataee@yahoo.com

۳. استاد شیمی، گروه شیمی کاربردی، دانشکده شیمی، دانشگاه تبریز، تبریز

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۰۲/۱۰

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۷/۰۵/۱۳

چکیده

رشد جمعیت جهانی و افزایش نیاز به صنایع مختلف منجر به تجمع انواع مختلف آلاینده‌ها در محیط‌زیست و منابع طبیعی شده است. در این میان صنایع رنگ نساجی در طول فرایندهای رنگرزی میزان قابل توجهی فاضلاب رنگی را به محیط‌زیست تخلیه می‌کند که پساب آن حاوی بسیاری از آلاینده‌های با‌دارنده و اکوتوکسیک است. در این کار پژوهشی، پارامترهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی (میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی و ترکیبات فنولی، فعالیت آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز) برای سنجش میزان سمیت ماده رنگزای مالاکیت سبز در جلبک پرسلولی شارا ارزیابی شد. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان سوپراکسید دیسموتاز ۴۱/۲ درصد و پراکسیداز ۴۴ درصد در غلظت‌های متفاوت از مالاکیت افزایش یافت. در مقابل، فعالیت آنزیم کاتالاز در غلظت‌های متفاوت ماده رنگزا کاهش ۳۱/۹ درصدی داشت که نشان می‌دهد پاسخ جلبک شارا به تنش اکسایشی، در بیان ژن‌های این سه آنزیم متفاوت است. ترکیبات فنولی ۷۲/۹ درصد و کاروتنوئید کل ۴۸ درصد در غلظت‌های بالای مالاکیت سبز افزایش یافت در حالی که میزان کلروفیل a و b در مالاکیت سبز کاهش ۱۸/۳ درصدی نشان داد. ولی میزان مالون دی آلدئید، به‌عنوان شاخص اکسیداسیون لیپیدی، تغییر معناداری نشان نداد.

کلیدواژه

آنتی‌اکسیدان‌ها، جلبک شارا، گونه‌های فعال اکسیژن‌دار، مواد رنگزای سنتتیک.

۱. سرآغاز

بوده و با دفع نامناسب پساب‌ها مشکلات زیست‌محیطی فراوانی ایجاد می‌کنند (Deniz & Saygideger., 2011; Aksu et al., 2005). فرایندهای مرسوم تصفیه آب و فاضلاب اغلب بر آلاینده‌های مقاوم تأثیری نمی‌گذارند و با توجه به وجود این مواد در اکثر پساب‌های صنعتی، لزوم استفاده از فرایندهای مختلف مؤثر در تجزیه این آلاینده‌ها ضروری به نظر می‌رسد (آیتی، ۱۳۹۵؛ Khataee et al., 2010). لذا برای برگشت دوباره پساب به محیط‌زیست باید

آلودگی آب‌ها معضل بزرگ زیست‌محیطی محسوب می‌شود که به علت پیشرفت صنایع و تکنولوژی، با افزایش روزافزون آن مواجه هستیم (چمنی، ۱۳۹۶). حدود ده هزار نوع ماده رنگزا و رنگدانه تجاری گوناگون وجود دارد که میزان تولید آن‌ها در سراسر جهان به بیش از 7×10^5 تن در سال می‌رسد (Khataee et al., 2009). مواد رنگزا، گروهی از آلاینده‌ها هستند که جزو مواد مرئی موجود در پساب‌ها

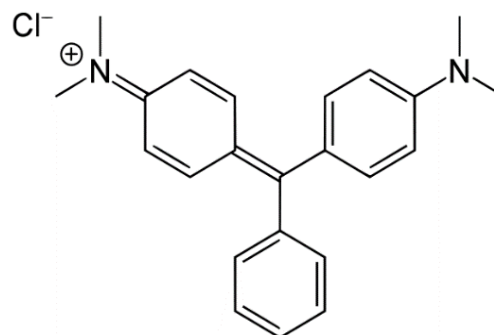
جلبک‌های سبز و کوچک در مسیر کانال خروجی مخازن بزرگ و کم عمق فاضلابی سریع‌ترین و کم‌هزینه‌ترین روشی است که به‌طور مؤثر مواد فاسد و خطرناک را به کودهای با ارزش و بدون بو تبدیل می‌کند (Bekci et al., 2009; Daneshvar et al., 2005; Daneshvar et al., 2007). جلبک‌ها مواد رنگزای موجود را بسته به ساختار مولکولی رنگ‌ها و گونه‌های جلبک تا حدی کاهش می‌دهند، از این‌رو نقش مؤثری در تصفیه بیولوژیک آلاینده‌ها دارند (Khataee et al., 2010). در این مطالعه، جلبک پرسلولی شارا (*Chara sp.*) برای رنگدایی محلولی رنگی حاوی مالاکیت سبز استفاده شد. جلبک شارا از جلبک‌های پرسلولی و از گروه میکروارگانیسم‌های یوکاریوتی است. این جلبک خانواده‌ای از جلبک‌های سبز تالوئیدی با تنوع بالا است که پراکنش وسیع جهانی در آب‌های شور و شیرین دارد. این جلبک‌ها به‌صورت آزاد، شناور یا چسبیده به سطح زندگی می‌کنند. حضور آلاینده‌ها در آب توسط جلبک‌ها حس شده و پاسخ فیزیولوژیکی در برابر این تنش‌ها ایجاد می‌شود (Andrews et al., 1987; Davies et al., 2009).

وقتی گیاهان و جلبک‌ها در معرض تنش محیطی قرار می‌گیرند، مقدار زیادی گونه‌های فعال اکسیژن‌دار، مانند آنیون سوپر اکسید ($O_2^{\cdot-}$)، رادیکال هیدروکسیل (OH^{\cdot}) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) تولید می‌کنند. گیاهان و جلبک‌های سبز برای از بین بردن این گونه‌های فعال، دارای سیستم‌های دفاع آنزیمی، همانند سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و پراکسیداز (POD) و غیر آنزیمی نظیر ترکیبات فنولی و رنگیزه‌های فتوستتزی (کلروفیل a, b و کاروتنوئیدها) هستند. اثر تنش‌های محیطی در این موجودات از طریق تغییر در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مشخص شده است (Cakmak & Horst., 1991; Foyer., 1993; Ragan & Glombitza., 1986).

هدف از مطالعه حاضر تعیین آثار ماده رنگزای مالاکیت سبز در غلظت‌های مختلف به‌عنوان عامل ایجاد تنش

آلاینده‌ها به‌صورت دقیق تصفیه شوند. از این‌رو محققان روش‌های مختلفی برای تصفیه آب‌های آلوده به کار گرفته‌اند که یکی از کارآمدترین این روش‌ها، تصفیه و حذف آلاینده‌ها با استفاده از فرایندهای بیولوژیکی توسط میکروارگانیسم‌ها و موجودات پرسلولی دیگر است که با تنوع و نیازهای اکولوژیکی کاملاً متفاوتی که دارند، قادرند در محیط‌های کاملاً متفاوت رشد کنند (Ayla & Meral., 2006).

ماده رنگزای مالاکیت سبز از گروه رنگ‌های تری آریل متان و از دسته رنگ‌های کاتیونی است که در رنگرزی کتان، چرم، ابریشم و غیره از آن استفاده می‌شود. مالاکیت سبز در حال حاضر به علت خطراتی که برای مصرف‌کنندگان و موجودات آبی ایجاد می‌کند به‌عنوان یکی از بحث برانگیزترین ترکیبات رنگزا در آمده است (Daneshvar et al., 2007; Zahang & Jing., 2008).



شکل ۱. ساختار شیمیایی مالاکیت سبز

جلبک‌ها موجودات فتوستتز کننده بوده و در شرایط متفاوت اکولوژیکی قادر به رشد هستند. آن‌ها برای ادامه زندگی به حداقل مواد نیاز دارند و از طرفی نگره‌داری و پرورش جلبک‌ها، به‌ویژه انواع پرسلولی آن‌ها از نظر اقتصادی مقرون به صرفه بوده و با توجه به اینکه دارای پتانسیل پالایش زیستی هستند، بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند (Heumann, 1987; Khataee et al., 2010; Khataee et al., 2009). جلبک‌ها اغلب در معرض فاضلاب‌های صنعتی و خانگی هستند. با این حال رشد

کرده و از آن برای سنجش آنزیم‌های SOD, POD, CAT و میزان پروتئین تام استفاده شد (Bradford., 1976). برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز از روش تست گایاکول و تبدیل آن به تتراگایاکول استفاده شد. بیشینه جذب تتراگایاکول در ۴۷۰ نانومتر و با استفاده از اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. واحد فعالیت این آنزیم بر اساس مقدار آنزیم مورد نیاز برای تشکیل ۱ میکرو مولار تتراگایاکول در یک دقیقه گزارش شد (Davies et al., 2009). فعالیت آنزیم کاتالاز با کاهش در جذب H_2O_2 در ۲۴۰ نانومتر از طریق اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد (Tayefi-Nasrabadi., 2008). فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به روش ممانعت از احیای NBT وابسته به O_2^- با آنزیم تعیین شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۶۰ نانومتر با اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. یک واحد فعالیت آنزیمی مقداری از پروتئین آنزیم است که موجب ۵۰ درصد ممانعت از احیای NBT شود (Winterbourn et al., 1976). مقدار پروتئین کل، در عصاره استفاده شده در سنجش‌های آنزیمی با روش برادفورد تعیین شد. مقدار پروتئین نمونه‌ها برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر در طول موج نانومتر ۵۹۵ گزارش شد (Khataee et al., 2010).

۵.۲. سنجش‌های غیر آنزیمی

برای سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی از روش سنجش مالون دی‌آلدهید در حضور معرف تیوباربیتریک اسید در طول موج ۵۳۲ نانومتر استفاده شد. نمونه‌ها قبل از اندازه‌گیری به مدت ۳۰ دقیقه در دمای $95^{\circ}C$ حرارت داده شدند (Stewart & Bewley., 1980).

استخراج کلروفیل از بافت با کمک استون ۸۰ درصد و به روش Lichtenthaler انجام گرفت (Lichtenthaler & Wellburn., 1984). بعد با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج‌های ۶۶۲ و ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر جذب محلول اندازه‌گیری و در نهایت میزان کلروفیل a و b و کاروتن تعیین شد.

$$\text{Chlorophyll}_a = 11.75 A_{661.6} - 2.350 A_{644.8}$$

اکسایشی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، متابولیت‌های غیر آنزیمی و میزان پراکسیداسیون لیپید غشا در جلبک پرسلولی شارا بوده است.

۲. بخش تجربی

۱.۲. نمونه جلبکی و دستگاه‌های مورد استفاده

نمونه‌های جلبکی استفاده شده از تالاب‌های آذربایجان شرقی جمع‌آوری شدند و به آکواریوم موجود در آزمایشگاه انتقال یافتند. گونه‌های جلبک با آب مقطر برای حذف آلودگی‌های ماکرو و میکروسکوپی شسته شده و برای آزمایش‌ها استفاده شد. مطالعات اسپکتروسکوپی برای سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از دستگاه UV-visibleمدل (T-60, PG Instrument, UK) انجام شد.

۲.۲. مواد مورد استفاده

مالاکیت سبز، Na_2HPO_4 ، NaH_2PO_4 ، سیتریک اسید، بوریک اسید، پلی‌وینیل پیرولیدون (PVP)، نیتروبلو تترازولیوم (NBT)، EDTA، فولین سیوکالتو، آلومینیوم کلرید، تیوباربیتریک اسید، سدیم کربنات، TCA، $NaNO_2$ ، گایاکول و H_2O_2 از شرکت مرک آلمان و ریپوفلاوین و کرسین از شرکت سیگما تهیه شدند.

۳.۲. تیمار با مواد رنگزا

تیمار با غلظت‌های مختلف مواد رنگزا و در pHهای ۵/۵- ۸/۵ و طول بازه زمانی ۱ تا ۸ ساعت انجام شد. تیمارها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و $pH = 8$ و غلظت‌های ۰، ۷/۵ و ۱۵ ppm انجام گرفت. دو ساعت پس از انجام تیمار سنجش‌های متابولیتی و آنزیمی صورت گرفت.

۴.۲. سنجش‌های آنزیمی

استخراج آنزیم‌های مورد بررسی با استفاده از بافر فسفات ۰/۱ مولار با $pH = 7$ حاوی ۰/۲ درصد PVP انجام شد. محلول رویی نمونه‌های جلبکی را پس از سانترفورژ جدا

سبز شارا بررسی شد. غلظت‌های مختلف ماده رنگزای مالاکیت سبز با جلبک شارا در شرایط بهینه و در بازه زمانی ۴۸ ساعت در حدود ۹۵ درصد حذف شده است (شکل ۲). عوامل مختلف محیطی اعم از مقدار جلبک، غلظت اولیه ماده رنگزا، دما و pH بررسی شد. با افزایش وزن جلبک، درصد حذف رنگ افزایش می‌یابد که این موضوع در ارتباط با افزایش سطح جلبک و افزایش مکان‌های پیوندی است که عامل اصلی تجزیه زیستی هستند. همچنین درباره غلظت ماده رنگزا سیستم مورد مطالعه در نمونه جلبکی شارا به صورت وابسته به غلظت عمل کرده و آستانه غلظتی برای افزایش درصد حذف ماده رنگزا وجود دارد، که با افزایش غلظت ماده رنگزا درصد حذف ماده رنگزا افزایش می‌یابد. در pH اسیدی، درصد حذف ماده رنگزا کم بوده ولی در pH خنثی افزایش یافته است. پس با افزایش هر کدام از این عوامل درصد حذف رنگ مالاکیت سبز نیز افزایش می‌یابد. (Khataee et al., 2010)

$$\text{Chlorophyll}_b = 18.61 A_{644.8} - 3.96 A_{661.6}$$

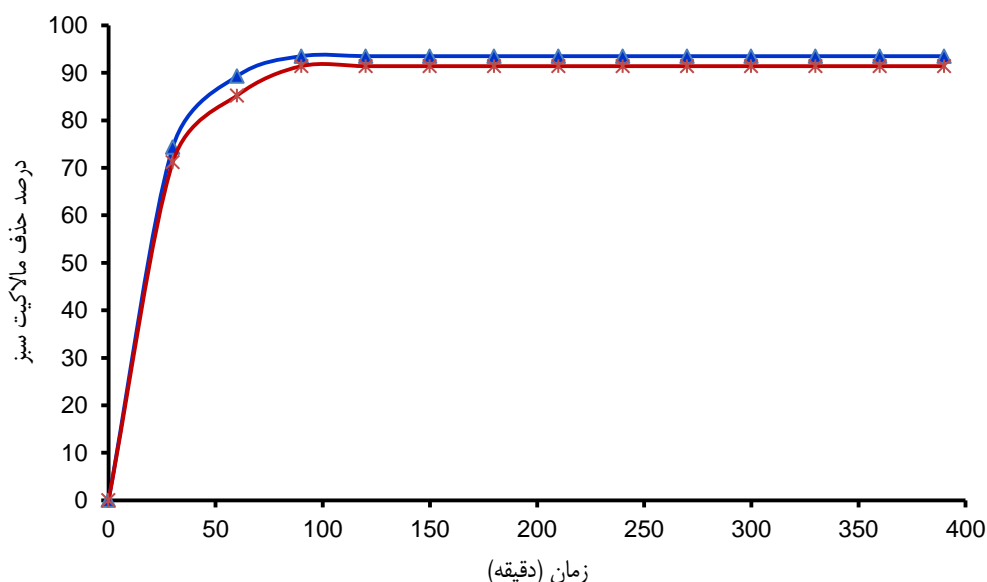
$$\text{Chlorophyll}_{a+b} = 7.05 A_{661.6} + 18.09 A_{644.8}$$

$$\text{Carotenoid} = 1000 A_{470} - 2.27 \text{Chlo}_a - 81.4 \text{Chlo}_b / 227$$

برای سنجش فنول تام پس از تهیه عصاره با متانول، ۰/۲ میلی لیتر از عصاره با ۴ میلی لیتر کربنات سدیم ۲ درصد مخلوط شده و در دمای اتاق قرار داده شد. پس از دو دقیقه ۰/۲ میلی لیتر معرف فولین سیوکالتو ۵۰ درصد به محلول افزوده و ۲۰ دقیقه دیگر در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. پس از آن جذب محلول در ۷۲۰ nm قرائت شد. برای رسم منحنی استاندارد از غلظت‌های مختلف کرسستین استفاده شد (Prabhasankar et al., 2009). محتوای فلاونوئید بر اساس روش رنگ سنجی آلومینیوم کلراید انجام شد. بعد از ۵ دقیقه جذب در طول موج ۵۰۷ نانومتر قرائت شد (Liu et al., 2009).

۳. نتایج

در این مطالعه فعالیت رنگزدایی مالاکیت سبز توسط جلبک



شکل ۲. حذف مالاکیت سبز با استفاده از جلبک شارا (شرایط آزمایش: pH=۸/۵، دما ۲۵ °C، وزن جلبک ۴g)

جدول ۱. نتایج تجزیه آماری داده‌های غلظت مالون دی آلدئید، فنول و فلاونوئید در جلبک *sp. Chara* تحت تیمار دو غلظت متفاوت از ماده رنگزای مالاکیت سبز ($p \leq 0.05$, $N=4$, test Tukey)

غلظت MG (ppm)	مالون دی آلدئید (mM/gFW)	فنول کل (mM/gFW)	فلاونوئید کل (mM/gFW)
۰	^a ۱/۲۵±۰/۰۰۷	^c ۳/۷۳±۰/۱۶	^c ۷/۶±۰/۸۴
۷/۵	^a ۱/۴۶±۰/۲۰۵	^b ۴/۵۲±۰/۱۳	^b ۱۶/۴۹±۱/۳۲
۱۵	^a ۱/۳۷±۰/۰۵	^a ۶/۴۵±۰/۳۱	^a ۲۱/۹۶±۰/۱۲

a, b, c: میزان هر فاکتور در دو غلظت متفاوت و حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنادار ($p < 0.05$) با یکدیگر است.

جدول ۲ فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان جلبک شارا را در حضور دو غلظت متفاوت از رنگ مالاکیت سبز نشان می‌دهد. مقایسه میانگین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز تحت تیمار دو غلظت متفاوت از رنگ نشان داد که سطح فعالیت این آنزیم در غلظت ۱۵ ppm از مالاکیت سبز بیشتر از فعالیتش در ۷/۵ ppm است که می‌تواند نشان دهنده اثر این آنزیم در کاهش خسارت ناشی از تنش اکسایشی در غلظت‌های بیشتر ماده رنگزا باشد. به‌طور کلی می‌توان چنین عنوان داشت که علت افزایش فعالیت این آنزیم در غلظت ۱۵ ppm از مالاکیت سبز به خاطر نقش مهم آن در مقابله با رادیکال‌های اکسیژن که در اثر غلظت بیشتر ماده رنگزا به وجود می‌آید و با آسیب به برخی از ترکیبات سلولی نظیر لیپیدها، کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها است. تحلیل واریانس داده‌ها نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم پراکسیداز در دو غلظت ماده رنگزا نسبت به گروه کنترل به‌طور معناداری افزایش می‌یابد ($p < 0.05$). مقایسه میانگین داده‌ها در دو غلظت متفاوت ماده رنگزا نشان می‌دهد که فعالیت POD در ۱۵ ppm بیشتر افزایش نشان می‌دهد. افزایش فعالیت پراکسیداز در گیاهان تحت تنش با واکنش‌های اکسیدکننده به وجود آورنده رادیکال‌های آزاد و پراکسیدهای آلی همبستگی دارد و POD نقش مؤثری در پاک‌سازی H_2O_2 دارد. فعالیت آنزیم کاتالاز با افزایش غلظت ماده رنگزا به‌طور معناداری کاهش می‌یابد ($p < 0.05$).

تغییرات سیستم آنتی‌اکسیدانی جلبک شارا در حضور غلظت‌های مختلف رنگ مالاکیت سبز مطالعه شد. میزان پراکسیداسیون لیپیدی در غشای سلولی جلبک شارا در حضور غلظت‌های فزاینده رنگ افزایش یافته است (جدول ۱). این افزایش از نظر آماری نسبت به گروه کنترل معنادار نیست. به طوری که مقایسه غلظت‌های ۷/۵ ppm و ۱۵ ppm ماده رنگزا نسبت به گروه کنترل این افزایش را نشان می‌دهد. این ممکن است به دلیل مناسب و کافی نبودن غلظت‌های مورد استفاده از ماده رنگزای مالاکیت سبز برای ایجاد سمیت غشایی بوده باشد. در مطالعه‌ای دیگر نتیجه مشابه روی گیاه آبی *Hydrocotyle vulgaris* فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در جریان حذف رنگ بازی قرمز ۴۶ افزایش پیدا می‌کند. افزایش فعالیت این آنزیم‌ها کاملاً وابسته به اندام گیاه بوده است (Vafaei et al., 2013). جدول ۱ نشان می‌دهد که در جلبک شارا با افزایش غلظت ماده رنگزا تجمع ترکیبات فنولی افزایش می‌یابد. در مقایسه با گروه کنترل غلظت فنول با افزایش غلظت ماده رنگزا به‌طور معناداری افزایش می‌یابد ($p < 0.05$). میزان فنل تام در جلبک افزایش یافته است. مقایسه غلظت ۱۵ ppm با گروه کنترل نشان می‌دهد که میزان فنل تام به‌طور معناداری ($p < 0.05$) افزایش می‌یابد. میزان فلاونوئید با افزایش غلظت مالاکیت سبز به‌طور معناداری افزایش می‌یابد ($p < 0.05$). میزان فلاونوئید با افزایش غلظت ماده رنگزا نسبت به گروه کنترل دو یا سه برابر افزایش نشان می‌دهد. افزایش میزان فلاونوئید نسبت به فنول بیشتر بوده است.

جدول ۲. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در جلبک *Chara* تحت تیمار سه غلظت مختلف از رنگ مالاکیت سبز

فعالیت POD ($\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$)	فعالیت SOD (Unit/mg)	فعالیت CAT (Unit/mg/min)	غلظت MG (ppm)
۷۲/۵±۱/۸۲ ^a	۲۳/۶±۲/۱۶ ^a	۷/۱۹±۰/۳۸ ^a	۰
۶۰/۹±۰/۳۳ ^a	۱۸/۷±۱/۳۳ ^a	۴/۸۱±۰/۷۷ ^a	۷/۵
۸۷/۷±۷/۵۷ ^a	۲۶/۴±۰/۷۹ ^a	۴/۸۹±۰/۷۴ ^a	۱۵

a, b, c: میزان هر فاکتور در دو غلظت متفاوت و حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنادار ($p < 0.05$) با یکدیگر است.

جدول ۳. نتایج تجزیه آماری داده‌های غلظت کلروفیل کل، a، b و کاروتن در جلبک *Chara* تحت تیمار دو غلظت متفاوت از ماده رنگزای مالاکیت سبز ($p \leq 0.05$, N=4, test Tukey)

غلظت MG (ppm)	کلروفیل a (mgL^{-1})	کلروفیل b (mgL^{-1})	کلروفیل a+b (mgL^{-1})	کاروتن (mgL^{-1})
۰	۷/۷۱±۰/۵۷ ^a	۳/۱۸±۰/۱۶ ^a	۱۱/۰۱±۰/۷۲ ^a	۲/۲۹±۰/۰۲ ^b
۷/۵	۴/۵۴±۰/۲۱ ^{ab}	۲/۵±۰/۵۲ ^a	۸/۷۵±۰/۸۹ ^a	۱/۶۱±۰/۱۹ ^{ab}
۱۵	۶/۳۱±۰/۰۳ ^b	۳/۲۲±۰/۱۹ ^a	۱۰/۱۶±۰/۹۱ ^a	۳/۳۷±۰/۱۵ ^a

a, b, c: میزان هر فاکتور در دو غلظت متفاوت و حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنادار ($p < 0.05$) با یکدیگر است.

۴. بحث

یکی از روش‌های برتر و مفید در پالایش آلاینده‌های رنگزا، حذف رنگ توسط میکرو و ماکرو ارگانسیم‌ها است. گیاهان و جلبک‌های سبز در ضمن رنگزدایی خود دچار تنش اکسایشی می‌شوند که ممکن است ناشی از تولید رادیکال‌های آزاد طی فعالیت آنزیم‌های درگیر در فرایند پالایش باشد (Daneshvar et al., 2005; Daneshvar et al., 2007). تنش‌های محیطی موجب تنش اکسایشی از طریق تولید و تجمع گونه‌های فعال اکسیژن‌دار (ROS) می‌شوند. تحت شرایط نرمال توسط ترکیبات آنتی‌اکسیدان و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان پاک‌سازی می‌شود، اما تحت شرایط تنش که میزان ROS افزایش می‌یابد توان سیستم آنتی‌اکسیدانی سلول کاهش پیدا کرده و احتمال آسیب جدی به اجزای سلولی وجود دارد (Wang et al., 2009). ROS عامل به وجود آورنده صدمات اکسایشی غشای پلاسمایی است که در نهایت به تجزیه اسیدهای

جدول ۳ نشان می‌دهد که غلظت کلروفیل کل، a و b افزایش غلظت رنگ مالاکیت سبز کاهش می‌یابد. کاهش غلظت کلروفیل a در غلظت ۷/۵ ppm نسبت به ۱۵ ppm بیشتر است اما در کل با افزایش غلظت رنگ غلظت کلروفیل a نسبت به گروه کنترل به‌طور معناداری کاهش می‌یابد ($p < 0.05$). غلظت کلروفیل کل و b با افزایش غلظت رنگ کاهش یافته اما این کاهش معنادار نبوده است. مقایسه میانگین غلظت کاروتن نشان می‌دهد که میزان کاروتن در غلظت ۱۵ ppm از رنگ مالاکیت سبز نسبت به گروه کنترل به‌طور معناداری افزایش می‌یابد. در ضمن کاروتن در غلظت ۱۵ ppm بیشتر از ۷/۵ ppm افزایش نشان می‌دهد. نتیجه مشابه در *Brassica pekinensis* در اثر تنش حاصل از سمیت مس دیده شده است (Xiong & Wang., 2005).

دی آلدئید به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپید مشاهده نشد، که نشان دهنده کارایی بالای سیستم آنتی اکسیدانی گیاه در از بین بردن گونه‌های فعال اکسیژن دار حاصل در جریان تجزیه ماده رنگزای فوق بوده است (Vafaei et al., 2013). پس می‌توان چنین بیان کرد که جلبک پرسلولی شارا تحت تنش‌های محیطی مثل تنش ایجاد شده توسط ماده رنگزای مالاکیت سبز به جای پراکسیداسیون لیپیدی از حضور آنزیم‌ها و متابولیت‌های آنتی اکسیدانی برای مقابله با تنش استفاده کرده است.

میزان فنول و فلاونوئید در هر دو غلظت ماده رنگزای مالاکیت سبز افزایش معناداری نسبت به گروه کنترل نشان داد. افزایش میزان فلاونوئید نسبت به فنول بیشتر بوده است. پس افزایش فلاونوئیدها و ترکیبات فنولی به عنوان متابولیت‌های ثانویه که دارای نقش محافظتی و آنتی اکسیدانی هستند، نشان می‌دهد که در جلبک شارا این متابولیت‌ها نقش پاک‌سازی گونه‌های فعال اکسیژن را دارند. به عبارتی از میان ترکیبات آنتی اکسیدانی غیر آنزیمی ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها و همچنین کاروتنوئیدها نقش مهمی در حفظ گیاهان و جلبک‌ها در برابر تنش اکسایشی دارند (Amel et al., 2008; Asada., 1994). ترکیبات فنولی در شرایط تنش اکسایشی حاصل از یون‌های سمی برای کاهش آثار اکسایشی القا شده توسط یون‌های سمی، می‌توانند با آن‌ها پیوند تشکیل داده و آثار آن‌ها را خنثی یا کاهش دهند (Ragan & Glombitza., 1986). در جلبک‌های تک‌سلولی و پرسلولی، تحت تنش زنبیوتیک‌ها، سنتز ترکیبات فنولی افزایش می‌یابد و این یافته پیشنهاد می‌کند که وجود ترکیبات فنولی در آن‌ها می‌تواند باعث افزایش تحمل در برابر تنش شود (Liu et al., 2009; Ragan & Glombitza., 1986). از آنجا که متابولیسم فنول‌ها و فلاونوئیدها در سیتوپلاسم سلولی انجام می‌گیرد، گمان می‌رود فنول‌ها خود حذف کننده ROS باشند. ترکیبات فنولی به دلیل ساختار اسکلتی و وجود حلقه فنولی در ساختار خود نقش مهمی در از بین

چرب چندتایی غیراشباع به دلیل فعالیت پراکسیداسیون لیپیدی غشا می‌انجامد (Panda & Upadhyay., 2004). ممکن است ROS توسط سیستم آنتی اکسیدانی حذف شده و از پراکسیداسیون لیپیدی با حذف ROS ها جلوگیری کرده و میزان MDA را کاهش می‌دهد (زینالی یادگاری و همکاران ۱۳۸۸). در ضمن کاروتنوئیدها و α -توکوفرول‌ها که آنتی اکسیدان‌های متصل به غشا در جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدی و در پایداری غشاها مؤثر هستند. کاهش میزان مالون دی آلدئید هماهنگ با افزایش کاروتنوئیدها و فنول‌ها است (امینی و حداد، ۱۳۹۲; Liu et al., 2009). در تحقیق حاضر میزان ترکیبات فنولی و کاروتنوئیدها افزایش یافته است. همچنین میزان پراکسیداسیون لیپیدی در غشای سلولی جلبک شارا در حضور غلظت‌های بالای ماده رنگزای مالاکیت سبز افزایش یافته که این افزایش معنادار نبوده است ($p > 0.05$). مقایسه گروه کنترل ($1/25 \pm 0/007$) با گروه تحت تیمار غلظت $7/5$ ppm ($1/46 \pm 0/205$) از ماده رنگزای مالاکیت سبز نشان می‌دهد که میزان پراکسیداسیون لیپیدی افزایش معناداری ندارد. ممکن است غلظت‌های مورد استفاده از ماده رنگزای مالاکیت سبز برای ایجاد سمیت غشایی کافی نبوده‌اند یا اینکه سیستم آنتی اکسیدانی جلبک سبز شارا غشاها را از آسیب‌های احتمالی مصون نگه‌داشته است (Arbona et al., 2009; Teresa et al., 2005). در مطالعه‌ای مشابه تأثیر ماده رنگزای آبی AB92 بر فتوسنتز و سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی شامل سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز و کاتالاز در ریشه و برگ گیاه *Hydrocotyle vulgaris* ارزیابی شد. نتایج نشان داد که کاهش محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی تحت رنگ آمیزی پاسخ‌های آنزیم آنتی اکسیدان تغییرات غنی داری را نسبت به ارگان گیاهی و غلظت رنگ در محیط نشان دادند. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان تحت تنش AB92 در ریشه‌ها بسیار بالاتر از برگ گیاه مشاهده شد. با وجود این، در ریشه‌ها یا برگ‌ها هیچ‌گونه افزایش معناداری در محتوای مالون

پراکسیداز در گیاهان تحت تنش با واکنش‌های اکسیدکننده ایجاد کننده رادیکال‌های آزاد و پراکسیدهای آلی همبستگی دارد و POD نقش مؤثری در پاک‌سازی H_2O_2 دارد (زینالی یادگاری و همکاران، ۱۳۸۸; Lichtenthaler & Wellburn., 1987). کاهش در فعالیت CAT می‌تواند به علت تولید بیش از حد اکسیژن منفرد یا رادیکال هیدروکسیل باشد. یا این کاهش می‌تواند به علت جریان رادیکال سوپراکسید تحت تأثیر استرس اکسایشی هنگام مواجه با آلودگی باشد (Shan & Guo., 2009).

در اکثر موجودات فتوسنتز کننده مثل گیاهان و جلبک‌های سبز علائم بروز تنش‌های اکسایشی شامل کاهش پروتئین‌ها، کاهش محتوی کلروفیل و نفوذپذیری غشاء هستند که به کاهش فتوسنتز و در نتیجه رشد گیاه می‌انجامند. تنش سبب افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن در کلروپلاست شده و تخریب مولکول کلروفیل و غشاء کلروپلاست را در پی دارد که خود به کاهش فتوسنتز و رشد منجر می‌شود (امینی و حداد ۱۳۹۲). تیمار جلبک شارا با محلول‌های مواد رنگزا کاهش معناداری در محتوی کلروفیل a و کاهش غیر معناداری در محتوی کلروفیل کل و b را نشان داد. غلظت کلروفیل کل، a و b با افزایش غلظت رنگ مالاکیت سبز کاهش می‌یابد. کاهش غلظت کلروفیل a در غلظت ۷/۵ ppm ($4/54 \pm 0/21$) از رنگ مالاکیت سبز نسبت به ۱۵ ppm ($6/31 \pm 0/03$) بیشتر است اما در کل با افزایش غلظت رنگ غلظت کلروفیل a نسبت به گروه کنترل ($7/71 \pm 0/57$) به‌طور معناداری ($p < 0/05$) کاهش می‌یابد. در چنین شرایطی مولکول کلروفیل به‌عنوان فوتودینامیک برای کاهش اثر مخرب نیاز دارد در غیر این صورت، تخریب کلروفیل توسط گونه‌های فعال اکسیژن دار افزایش می‌یابد (امینی و حداد، ۱۳۹۲; Ganesan & Thomas., 2001). میزان پیگمان‌های فتوسنتزی با افزایش غلظت رنگ کاهش می‌یابند (Ganesan & Thomas., 2001). با کاهش کلروفیل‌ها، کاروتنوئید افزایش می‌یابد که نشان می‌دهد کاروتنوئیدها، رنگیزه کمکی مؤثرند و

بردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن دار در شرایط تنشی دارند. به‌این ترتیب ساختارهای سیتوپلاسمی و کلروپلاستی را از تأثیرات منفی تنش محافظت می‌کنند و همچنین با جلوگیری از عمل لیپو اکسیژنازی از اکسیداسیون لیپیدها جلوگیری می‌کنند (Amel et al., 2008). افزایش سنتز فلاوونوئید نیز یکی از اساسی‌ترین سازوکارهای دفاعی در برابر تنش است. افزایش غلظت ماده رنگزا یا افزایش تنش باعث افزایش غلظت ترکیبات فنولی به‌عنوان سیستم حفاظتی گیاه در برابر تنش اکسایشی می‌شود (Asada., 1994).

فعالیت آنزیم پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز افزایش معناداری را نشان دادند. فعالیت آنزیم کاتالاز کاهش نشان داد. مقایسه میانگین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز تحت تیمار دو غلظت متفاوت از رنگ نشان داد که سطح فعالیت این آنزیم در غلظت ۱۵ ppm از مالاکیت سبز ($26/4 \pm 0/79$) بیشتر از فعالیتش در ۷/۵ ppm ($18/7 \pm 1/33$) است. به‌طور کلی می‌توان گفت که علت افزایش فعالیت آنزیم SOD در غلظت ۱۵ ppm از مالاکیت سبز به خاطر نقش مهم آن در مقابله با رادیکال‌های اکسیژناساز که در اثر غلظت بیشتر ماده رنگزا به وجود می‌آید و به برخی از ترکیبات سلولی نظیر لیپیدها، کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها آسیب می‌رساند. القاء آنزیم SOD در سلول‌های گیاهی در پاسخ به تنش‌های محیطی مختلف نشان دهنده نقش مهم این آنزیم در سازوکار دفاعی گیاهان است. شرایط تنش حاصل از حضور ماده رنگزا فعالیت آنزیم SOD را افزایش داد (Andrews et al., 1987; Davies et al., 2009).

تجزیه واریانس داده‌ها نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم پراکسیداز در غلظت ۱۵ ppm از رنگ ($87/7 \pm 7/57$) نسبت به گروه کنترل ($72/5 \pm 1/82$) به‌طور معناداری ($p < 0/05$) افزایش می‌یابد. مقایسه میانگین داده‌ها در دو غلظت متفاوت رنگ نشان می‌دهد که فعالیت POD در ۱۵ ppm بیشتر افزایش داشته است. افزایش فعالیت

مقابله با آن‌ها بیان می‌کنند که یکی از آن‌ها استفاده از میکروارگانیزم‌ها از جمله جلبک‌های پرسلولی است که به‌عنوان پالاینده‌های زیستی عمل می‌کنند و رفع آلودگی انجام می‌دهند. زمانی که جلبک‌ها با تنش‌های محیطی مختلف مثل مواد رنگزای صنعتی مواجه می‌شوند پاسخ‌های فیزیولوژیکی در برابر تنش مربوطه نشان می‌دهند و از طریق فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها باعث کاهش آسیب‌ها می‌شوند. در این مطالعه فعالیت آنزیم‌ها و متابولیت‌های آنتی‌اکسیدانی در جلبک پرسلولی شارا، در طول رنگ‌زدایی و با کاهش غلظت ماده رنگزای ملاکیت سبز بررسی شد. فعالیت آنزیم پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز افزایش معناداری را نشان دادند. فعالیت آنزیم کاتالاز کاهش و میزان مالون دی‌آلدهید که فرآورده نهایی پراکسیداسیون لیپیدی است با کاهش غلظت رنگ تغییر چندانی نمی‌یابد. میزان پیگمانت‌های فتوسنتزی با افزایش غلظت رنگ کاهش می‌یابند اما معنادار نیست و ترکیبات فنولی به‌طور معناداری افزایش می‌یابد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که جلبک پرسلولی شارا در حالی که در حذف ماده رنگزای ملاکیت سبز بسیار فعال عمل می‌کند، در عین حال توان خود را در هموستازی سیستم آنتی‌اکسیدانی با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی یا ترکیبات فلاونوئیدی و فنولی حفظ می‌کند.

تشکر و قدردانی

با تشکر و سپاس از حمایت و پشتیبانی گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم طبیعی و گروه شیمی کاربردی دانشگاه تبریز.

یادداشت‌ها

1. Malachite Green
2. Sodium dihydrogen phosphate
3. Sodium hydrogen phosphate
4. Trichloro Acetic Acid
5. Sodium nitrite
6. Hydrogen proxide
7. Quercetin
8. Reactive oxygen species
9. Singlet oxygen

نقش‌های مهم دیگری چون محافظت از غشاهای تیلاکوئیدی و جلوگیری از فتواکسیداسیون کلروفیل‌ها را نیز بر عهده دارند (Lichtenthaler & Wellburn., 1987). کاروتنوئیدها آنتی‌اکسیدان‌های چربی‌دوست با وزن مولکولی کم در کلروپلاست هستند که غشاهای کلروپلاستی را در مقابل تنش اکسیداتیو محافظت می‌کنند. کاروتنوئیدها علاوه بر نقش ساختمانی و جذب نور می‌توانند به‌صورت مستقیم رادیکال اکسیژن یکتایی را غیرفعال کنند یا از طریق فرو نشاندن کلروفیل برانگیخته شده، به‌صورت غیرمستقیم از تشکیل اکسیژن یکتایی جلوگیری کنند (امینی و حداد ۱۳۹۲). در مطالعه‌ای دیگر روی گیاه آبری *Spirodela polyrrhiza* تأثیر ماده رنگزای بر برخی شاخص‌های فیزیولوژیک گیاه شامل سرعت رشد، رنگدانه‌های فتوسنتزی، پراکسیداسیون چربی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بررسی شد. نتایج نشان داد پس از قرار گرفتن گیاه در معرض محلول رنگی رنگدانه‌های فتوسنتزی کاهش و ضخامت برگ گیاه افزایش نشان می‌دهد. در مقابل، محتوای مالون دی‌آلدهید و همچنین فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز به‌طور چشمگیری افزایش می‌یابد که احتمالاً به دلیل توانایی گیاه برای غلبه بر استرس اکسیداتیو بوده است (Movafeghi et al., 2016).

۵. نتیجه‌گیری کلی

امروزه یکی از مهم‌ترین زمینه‌های تحقیقاتی در اکثر نقاط جهان، بررسی و ارائه راه‌هایی برای جلوگیری از ایجاد آلودگی و به دنبال آن تنش اکسایشی حاصل توسط آلاینده‌هایی مانند رنگ‌های صنعتی و غیرصنعتی است. وجود رنگ در آب باعث کاهش نفوذ نور به آب شده و موجب کاهش فتوسنتز در ارگانیزم‌های فتوسنتزی آبری می‌شود به همین دلیل محققان روش‌های مختلفی برای

منابع

- امینی، ز. حداد، ر. ۱۳۹۲. نقش رنگیزه‌های فتوسنتزی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در مقابل تنش اکسیداتیو، مجله زیست‌شناسی ایران، ۲۶(۳): ۲۵۱-۲۶۵.
- آیتی، ب. گلجی دوست، ح. نظیریان، پ. ۱۳۹۵. مقایسه کارایی فتوکاتالیستی نانو ذرات اکسید بر تثبیت شده و معلق در حذف رنگزای اسید نارنجی ۷، محیط‌شناسی، ۴۲(۴): ۸۵۵-۸۶۷.
- چمنی، ع. مشتاقی، م. مکاره شیر، م. ۱۳۹۶. بررسی تأثیر آلودگی به سرب و کادمیوم در خصوصیات ریخت‌شناختی خرچنگ منزوی *Coenobita (Scaevola)*، محیط‌شناسی، ۴۲(۴): ۷۱۳-۷۲۳.
- زینالی یادگاری، ل. حیدری، ر. کاراپتیان، ژ. ۱۳۸۸. تغییر نفوذپذیری غشاهای زیستی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گیاه سویا در پاسخ به دمای پایین، مجله زیست‌شناسی ایران، ۲۲(۲): ۲۲۹-۲۳۶.
- Aksu, Z. 2005. Application of biosorption for the removal of organic pollutants. *Process Biochem.* 40: 10-997.
- Amel, A., Mohamed, A. and Amina, A.A. 2008. *American-Eurasian journal of scientific research.* 32: 139-146.
- Andrews, M., Davison, I.R., Andrews, M.E. and Raven, J.A. 1987. Growth of chara hispida. *Journal of Ecology.* 72: 873-884.
- Arbona, V., Lopez-Climent, M. F., Perez-Clemente, R.M. and Gomez-Cadenas, A. 2009. Maintenance of a high photosynthetic performance is linked to flooding tolerance in citrus. *Experimental and Environmental Botany.* 66: 135-142.
- Asada, K. 1994. Chloroplast: formation of active oxygen and its scavenging. *Method in Enzymology.* 105: 422-429.
- Ayla, Ö. and Meral, T. 2006. Biosorption of Acid Blue 290 (AB 290) and Acid Blue 324 (AB 324) dyes on *Spirogra rhizopus*. *Journal of Hazardous Materials.* 135: 355-364.
- Bekci, Z., Sekia, Y. and Cavas, L. 2009. Removal of malachite green by using an invasive marine alga *Caulerpa racemosa* var. *claydracea*. *Journal Hazard Mater.* 161: 1454-1460.
- 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.
- Carias, C.C., Novias, J.M. and Martins-Dias, S. 2008. Are *Phragmites australis* enzymes involved in the degradation of the textile azo dye acid orange 7? *Bioresource Technology.* 99: 243-251.
- Cakmak, I. and Horst, W. 1991. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxidodismutase, catalase and peroxidase activities in root tip of soybean (*Glysin max*). *Plant Physiology.* 83: 463-468.
- Daneshvar, N., Aleboye, A. and Khataee, A.R. 2005. The evaluation of electrical energy per order (EEO) for photooxidative decolorization of four textile dye solutions by the kinetic model. *Chemosphere.* 59: 761-767.
- Daneshvar, N., Khataee, A. R., Rasoulifard, M. H. and Pourhassan, M. 2007. Biodegradation of dye solution containing Malachite Green: optimization of effective parameters using Tajuchi Method. *Journal of Hazardous Material.* 143: 214-219.
- Davies, L.C., Cabrita, G.J.M., Ferreira, R.A., Carias, C.C. and Novais, J.M., Martins-Dias, S. 2009. Integrated study of the role of *Phragmites australis* in azo-dye treatment in a constructed wetland: From pilot to molecular scale. *Ecological Engineering.* 35: 961-970.
- Deniz, F. and Saygideger, S.D. 2011. Removal of Basic Red 46 dye from aqueous solution by pine tree leaves. *Chemical Engineering Journal.* 170: 67-74.
- Foyer, C.H. 1993. Ascorbate, pp. 31-52. In: Eds. R.G. Alscher, and J.L. Hess. *Antioxidant in Higher Plants.* CRC Press. Boca Raton.
- Ganesan, V. and Thomas, G. 2001. Salicylic acid response in rice: influence of salicylic acid on H₂O₂ accumulation and oxidative stress. *Plant Science.* 160: 1095-11.
- Ghamsari, L. Keyhani, E. and Golkhoo, S. 2007. Kinetics Properties of Guaiacol Peroxidase Activity in *Crocus sativus* L. Corm during Rooting. *Iranian Biomedical Journal.* 11 (3): 137-146.
- Heumann, H. G. 1987. Effects of heavy metals on growth and ultrastructure of *Chara vulgaris*. *Protoplasma.* 136: 37-48.

- Johnstone, C., Day, J.G., Staines, H. and Benson, E.E. 2006. An in vitro oxidative stress test for determining pollutant tolerance in algae. *Ecological Indicators*. 6: 770-779.
- Khataee, A.R., Dehghan, G., Ebadi, A., Zarei, M., Pourhassan, M. 2010. Biological Treatment of a Dye Solution by Macroalgae *Chara* sp.: Effect of Operational Parameters, Intermediates Identification and Artificial Neural Network Modeling. *Bioresource Technology*, 101: 2252-2258.
- Khataee, A. R., Pourhassan, M. and Ayazloo, M. 2009. Biological decolorization of C.I. Basic Green 4 solution by *Chlorella* sp.: effect operational parameters. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*. 15: 110-114.
- Lichtenthaler, H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: Lester Packer, R.D. (Ed.), *Methods in Enzymology*. Academic Press, London, pp. 350-382.
- Liu, W.Y., Jie, F., Yua-Gang, Z., Me -Hong, T., Nan, u., Xia -Lei, L. and Zhang, S. 2009. Supercritical carbon dioxide extraction of seed oil from *Opuntia dillenii* Haw and its antioxidant activity. *Food Chemistry*. 114: 334- 339.
- Movafeghi, A., Khataee, A.R., Moradi, Z. and Vafaei, F. Biodegradation of direct blue 129 diazo dye by *Spirodela polyrrhiza*: An artificial neural networks modeling. *International Journal of Phytoremediation*. 18 (4): 337-347.
- Panda, S. K. and Upadhyay, R. K. 2004. Salt stress induces oxidative alterations and antioxidative defense in the roots of *Lemna minor*. *Biology Plant*. 48(2): 249-253.
- Prabhasankar, P., Ganesan, P., Bhaskar, N.A., Stephen, N.R., Gowda, L., Hosokawa, M. and Miyashita, K. 2009. Edible Japanese seaweed, wakame (*Undaria pinnatifida*) as an ingredient in pasta: Chemical, functional and structural evaluation. *Food Chemistry*. 115: 501-508.
- Ragan, M.A., Glombitza, K.W. 1986. Phlorotannins, brown algal polyphenols. In: Round FE, Chapman DJ (eds) *Progress in phycollogical research*. Biopress, Bristol, pp. 129-241.
- Shan, W.X. and Guo, H.J. 2009. Changes of proline content, activity, and active isoforms of antioxidative enzymes in two Alfalfa cultivars under salt stress. *Agricultural Sciences in China*. 8(4): 431-440.97
- Stewart, R.C. and Bewley, J.D. 1980. Lipid peroxidation associated aging of soybean axes. *Plant Physiol* 65: 245-248.
- Tayefi-Nasrabadi, H. 2008. Catalytic properties of three catalases from Kohlrabi (*Brassica oleracea gongylodes*). *African Journal of Biotechnology*. 7(4): 472-475.
- Teresa, C.S., Siquaud-Kutner., Ana, M.P., Neto-Ernani, P., Pio, C. 2005. Diel activities of antioxidant enzymes, photosynthetic pigments and malondialdehyde content in stationary-phase cells of *Tetraselmis gracilis* (*Prasinophyceae*). *Aquatic Botany*. 82: 239-249.
- Vafaei, F., Movafeghi, A., Khataee, A.R. 2013. Evaluation of antioxidant enzymes activities and identification of intermediate products during phytoremediation of an anionic dye (C.I. Acid Blue 92) by pennywort (*Hydrocotyle vulgaris*). *Journal of Environmental Sciences*. 25: 2214-2222.
- Vafaei, F., Movafeghi, A., Khataee, A. R., Zarei, M. and Salehi Lisar, S. Y. 2013. Potential of *Hydrocotyle vulgaris* for phytoremediation of a textile dye: Inducing antioxidant response in roots and leaves. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 93: 128-134.
- Winterbourn, C.C., McGrath, B.M., Carrell, R.W. 1976. Reactions involving superoxide and normal and unstable haemoglobins. *Biochem. J*. 155, 493-502.
- Wang, W. B., Kim, Y. H., Lee, H. S., Kim, K. Y., Denga, X. P. 2009. Analysis of antioxidant enzyme activity during germination of alfalfa under salt and drought stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*. 47: 570-577.
- Xiong, Z.T. and Wang, H. 2005. Copper toxicity and bioaccumulation in Chinese cabbage (*Brassica pekinensis* Rupr.). *Environmental Toxicology*. 20(2): 188-94.
- Zahang, C., Jing, Y. 2008. Adsorption of malachite green from aqueous solution onto carbon prepared from *Arundonax* root. *Journal Hazard Material*. 150: 774.782.