

## Bioremediation of textile dye Direct Blue 129, by green alga *Chlorella vulgaris* Beijerinck and cyanobacter *Spirulina (Arthrospira) platensis* Gomont, and influence of dye on their physiological and biochemical indices

Zahra Moradi<sup>1</sup>, Maryam Madadkar Haghjou<sup>1\*</sup>, Mahmoud Zarei<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Lorestan University, Khorramabad, Iran

<sup>2</sup> Department of Applied Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Tabriz, Iran

### Abstract

Removal of undesirable pollutants from aquatic ecosystems, which is caused by discharge of large amounts of industrial and urban pollutants into water resources, requires efficient, cost-effective and environmentally friendly technologies, such as phycoremediation. In this biological process, the physiological ability of some algal and cyanobacterial species in detoxifying pollutants such as textile dyes is used. In the present study, the ability of eukaryotic green alga *Chlorella vulgaris* and prokaryotic cyanobacter *Spirulina platensis* for decolorization of Direct Blue 129 (DB129) dye at zero (control), 20 and 60 mg. L<sup>-1</sup> was studied during one week. Evaluations of physiological indices were performed on 1, 3 and 7 days of growth. *C. vulgaris* showed a higher percentage in removal efficiency than *S. platensis*. Dye treatment increased growth indices; X<sub>m</sub> (maximum cell concentration), P<sub>x</sub> (cell productivity) and μ<sub>m</sub> (maximum specific growth rate) and decreased t<sub>d</sub> (doubling time) in *C. vulgaris*, compared to the control, but astaxanthin showed a higher increase in *S. platensis*. Chl *a*, Chl *b* and total carotenoid contents were increased in *C. vulgaris* alga at both concentrations of dye, and at 20 mg. L<sup>-1</sup> in *S. platensis*, compared to control. Phycobilins were also increased in treated *S. platensis*. The highest concentration of dye (60 mg. L<sup>-1</sup>) caused the highest soluble carbohydrate production in both microorganisms. Along with an increase in dye concentration (unlike *S. platensis*) protein content was also increased in *C. vulgaris*. In general, it seems that *C. vulgaris* has a higher ability in decolorization and is more tolerant to DB129 dye stress than *S. platensis*.

**Keywords:** Bioremediation, Decolorization, Pollution, Textile effluent

\* Corresponding Author: m\_madadkar@lu.ac.ir

## زیست‌پالایی رنگ نساجی Direct Blue 129 توسط جلبک سبز *Chlorella vulgaris* و سیانوباکتر *Spirulina (Arthrospira) platensis* Gomont و ارزیابی شاخص‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی آنها تحت تأثیر رنگ

زهرا مرادی<sup>۱</sup>، مریم مددکار حق‌جو<sup>۱\*</sup>، محمود زارعی<sup>۲</sup>  
<sup>۱</sup> گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران  
<sup>۲</sup> گروه شیمی کاربردی، دانشکده شیمی، دانشگاه تبریز، ایران

### چکیده

حذف آلاینده‌های نامطلوب از اکوسیستم‌های آبی که به‌علت تخلیه آلاینده‌های صنعتی و شهری حاصل شده‌اند، به فناوری‌های کارا، مقرون‌به‌صرفه و سازگار با محیط‌زیست نیاز دارد؛ در این فرایند زیستی، توانایی فیزیولوژیک جلبک‌ها و باکتری‌ها برای حذف و سمیت‌زدایی آلاینده‌هایی نظیر مواد رنگ‌زا استفاده می‌شود. در پژوهش حاضر، توانایی جلبک سبز *Chlorella vulgaris* و سیانوباکتر *Spirulina platensis* در رنگ‌زدایی ماده Direct Blue-129 (DB129) در غلظت‌های صفر (شاهد)، ۲۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر رنگ طی یک هفته بررسی شد و شاخص‌های فیزیولوژیک در روزهای اول، سوم و هفتم رشد اندازه‌گیری شدند. درصد رنگ‌زدایی *C. vulgaris* بیشتر از *S. platensis* بود. تیمار رنگ سبب افزایش شاخص‌های رشد  $X_m$  (بیشینه تولید سلولی)،  $P_x$  (تولیدات سلولی)،  $\mu_m$  (بیشترین سرعت رشد ویژه) و کاهش  $t_d$  (زمان دوبرابرسدن سلول‌ها) در *C. vulgaris* در مقایسه با نمونه شاهد (برخلاف تأثیر آن بر *S. platensis*) شد، اما مقدار آستاگزانتین در *S. platensis* افزایش بیشتری نشان داد. مقادیر کلروفیل  $a$ ، کلروفیل  $b$  و کاروتنوئید کل در *C. vulgaris* در هر دو غلظت رنگ و صرفاً در غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر در *S. platensis* نسبت به شاهد و فیکوبیلین‌ها در *S. platensis* افزایش یافتند. غلظت ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر سبب بیشترین تولید مقدار کربوهیدرات محلول در هر دو ریز موجود شد و با افزایش غلظت ماده رنگ‌زا، مقدار پروتئین در *C. vulgaris* برخلاف *S. platensis* افزایش یافت؛ در مجموع، به نظر می‌رسد توانایی *C. vulgaris* در رنگ‌زدایی و تحمل آن نسبت به تنش حاصل از ماده رنگ‌زای DB129 در مقایسه با *S. platensis* بیشتر است.

**واژه‌های کلیدی:** آلاینده‌گی، پالایش زیستی، پساب نساجی، رنگ‌زدایی

\* نگارنده مسئول: نشانی پست الکترونیک: m\_madadkar@lu.ac.ir، شماره تماس: ۰۹۱۲۵۲۶۶۵۶۳

## مقدمه

این موضوع سبب معطوف شدن توجه زیاد به این موجودات برای تصفیهٔ پساب‌های حاوی مواد رنگ‌زای نساجی شده است (Saratale *et al.*, 2011). سلول‌های جلبکی به‌علت گسترده‌بودن سطح و وجود گروه‌های شیمیایی روی دیوارهٔ سلولی دارای قابلیت جذب زیادی‌اند؛ درحقیقت، دیوارهٔ سلولی جلبک‌ها نقش مهمی در فرایند جذب دارد و جایگاه‌هایی را برای جذب الکترواستاتیک فراهم می‌کند که ترکیبات متفاوتی را به خود متصل می‌کنند (Rasolzadeh *et al.*, 2019)؛ همچنین پژوهش‌ها نشان داده‌اند این سلول‌ها به‌واسطهٔ برخی آنزیم‌های خود می‌توانند ترکیبات کربنی آلی و غیرآلی را متابولیزه کنند و این ویژگی آنها را قادر می‌کند آلاینده‌ها را تجزیه و مواد تجزیه‌شده را به‌شکل منبع غذایی برای تولید زیست‌تودهٔ سلولی استفاده کنند (Rawat *et al.*, 2011; Dmytryk *et al.*, 2014; Osundeko *et al.*, 2014). زیست‌تودهٔ جلبکی منبع رنگیزه‌ها، لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای چرب است که در صنایع مختلف نظیر کشاورزی، داروسازی، رنگرزی و تولید سوخت‌های زیستی استفاده می‌شوند. این ریزموجودات ظرفیت فتوسنتزی زیادی دارند و اکسیژن محلول محیط را از طریق فتوسنتز افزایش می‌دهند و سبب کاهش دی‌اکسید کربن و در نتیجه، کاهش گازهای گلخانه‌ای می‌شوند (Rawat *et al.*, 2011; Renuka *et al.*, 2015). استفاده از جلبک‌ها برای پالایش پساب‌ها و تولید هم‌زمان سوخت زیستی و ترکیبات ارزشمند غذایی و دارویی، علاوه‌بر اینکه سبب کاهش هزینهٔ پالایش پساب‌ها می‌شود،

در میان ترکیبات آلایندهٔ محیط‌زیست، مواد رنگ‌زای حاصل از صنایع رنگرزی و نساجی قابلیت پالایش شدن ساده را ندارند و ازاین‌رو، دشواری‌های فراوانی در زمینهٔ حذف آنها از محیط وجود دارند؛ یکی از مهم‌ترین دلایل این امر آن است که مواد رنگ‌زای مصنوعی معمولاً ساختار مولکولی آروماتیک و پیچیده‌ای دارند که سبب پایداری آنها و دشوار شدن فرایند تجزیهٔ این مواد می‌شود (Fu and Viraraghavan, 2001). برخی بررسی‌ها در زمینهٔ آثار منفی مواد رنگ‌زا بر موجودات آبزی نظیر ماهی‌ها، سخت‌پوستان، گیاهان آبزی و جلبک‌ها نشان داده‌اند مواد رنگ‌زای آزو (Azo dyes) سبب اختلال در فرایندهایی مانند زنده‌مانی، تکثیر و مصرف اکسیژن در ماهی‌ها و مژه‌داران کوچک می‌شوند و از طریق کاهش دادن نفوذ نور، در فتوسنتز و رشد گیاهان آبزی و جلبک‌ها اختلال ایجاد می‌کنند (Novotný *et al.*, 2006; Almeida and Corso, 2014; Movafeghi *et al.*, 2015). استفاده از زیست‌پالایی برای رنگ‌زدایی و تصفیهٔ مواد رنگ‌زای مصنوعی به‌علت سازگار بودن با محیط‌زیست، مقرون‌به‌صرفه بودن، تولید پسماندهای کمتر، تولید فراورده‌های غیرسمی و مصرف آب کمتر در مقایسه با روش‌های فیزیکوشیمیایی مناسب‌تر است (Bafana *et al.*, 2011). موجودات فتوسنتزکننده نظیر سیانوباکترها و جلبک‌ها پراکنندگی منحصربه‌فرد و گسترده‌ای در بیشتر زیستگاه‌های طبیعی سراسر جهان و تحمل درخور توجهی نسبت به تنش‌های زیست‌محیطی دارند که

پرسلولی‌اند و در محیط‌ها و آب‌های گرم و نیمه‌گرم دنیا زندگی می‌کنند و دیواره سلولی آنها از شبکه‌ی ماکرومولکولی چندبعدی متخلخل شامل پپتیدوگلیکان‌ها، تیکورونیک‌اسید (Teichuronic acid)، تیکوئیک‌اسید (Teichoic acid)، برخی پلی‌ساکاریدها و پروتئین‌ها تشکیل شده است که گروه‌های کربوکسیلی، هیدروکسیلی و فسفات دارند (Sánchez et al., 2003). گزارش‌ها نشان می‌دهند برخی گروه‌های روی دیواره *Spirulina* (مشابه با *Chlorella*) برخی مواد را روی خود متصل و آنها را از محیط اطراف جدا می‌کنند (Dmytryk et al., 2014)؛ این سیانوباکتر اهمیت غذایی بسیاری نیز دارد.

نظر به اهمیت میکروجلبک *Chlorella* و سیانوباکترهایی نظیر *Spirulina* در تصفیه‌ی پساب‌های رنگی نساجی‌ها و سایر مصارف مراکز صنعتی، این ریزموجودات در کنار یکدیگر در برخی مطالعه‌ها بررسی و از نظر توانایی و میزان تصفیه‌ی تعدادی از رنگ‌ها مقایسه شده‌اند (Lebron et al., 2018 ; El-Sheekh et al., 2018)؛ هرچند مطالعه‌ی شاخص‌های فیزیولوژیک آنها کمتر مدنظر قرار گرفته و مطالعه‌ی مقایسه‌ای در زمینه‌ی رنگ دایرکت بلو ۱۲۹ (DB 129) انجام نشده است. بر اساس منابع، فتواتوتروف‌هایی نظیر میکروجلبک‌ها و سیانوباکترها از موجودات بسیار مهم در تصفیه‌ی پساب‌های صنعتی به شمار می‌آیند؛ زیرا علاوه‌بر انجام عمل تصفیه، گاهی از رنگ به‌شکل ماده‌ی مغذی استفاده می‌کنند و میزان برخی ترکیبات مغذی درون سلول‌ها یا رشد خود را افزایش می‌دهند. زیست‌توده‌ی تر یا خشک حاصل در تغذیه

کاهش هزینه‌ی کشت جلبک‌ها و صرفه‌جویی در مصرف آب شیرین را در پی دارد؛ زیرا پساب‌های حاوی مواد رنگ‌زا تمام مواد و عناصر ضروری لازم برای رشد جلبک‌ها مانند کربن، نیتروژن، فسفات، آمونیوم و برخی فلزات مانند آهن، کادمیوم و روی را دارند (Diniz et al., 2017; Yaseen and Scholz, 2019). پژوهش‌ها نشان می‌دهند سیانوباکترها، موجودات پروکاریوتی فتوسنتزکننده‌ای‌اند که توانایی بسیار خوبی در تصفیه‌ی پساب‌ها از جمله رنگ‌های نساجی دارند (Dellamatrice et al., 2017).

میکروجلبک *Chlorella vulgaris*، جلبک تک‌سلولی یوکاریوتی و فتوسنتزکننده است. بر اساس منابع، دیواره سلولی ریزجلبک *Chlorella* قادر به جذب سطحی برخی مواد و ترکیبات است (Dmytryk et al., 2014). رشد سریع، آسان و تحمل زیاد ریزجلبک *C. vulgaris* در برابر تنش‌های محیطی سبب شده است این جلبک برای استفاده در تصفیه‌ی پساب‌ها، صنایع غذایی، دارویی، کشاورزی و تولید سوخت زیستی مناسب باشد (Safi et al., 2014).

سیانوباکتر *Spirulina platensis*، ریزموجودی است که سازوکار خود را بسته به شرایط محیطی تغییر می‌دهد. این ریزموجود می‌تواند رشد فتوتروفی (Photoautotrophic)، هتروتروفی (Heterotrophic) یا میکسوتروفی (Mixotrophic) داشته باشد و این ویژگی، زیست سلول را در شرایط کمبود نور و حضور مواد آلی و آلاینده‌ها میسر می‌کند (Sánchez et al., 2003). این ریزموجودات پروکاریوتی، ریسسه‌ای و

غلظت‌های مختلف ماده رنگ‌زای مطالعه‌شده (ترکیب آلاینده) بر میزان رشد و زیست‌توده نمونه‌های یادشده است؛ همچنین مطالعه احتمال افزایش ترکیبات ارزشمندی نظیر پروتئین، کربوهیدرات و رنگدانه‌ها تحت تأثیر غلظت‌های مختلف ماده رنگ‌زا در دستور کار پژوهش حاضر قرار دارد.

### مواد و روش‌ها

**آماده‌سازی محیط کشت‌ها و طراحی تیمارها:**  
 جلبک *C. vulgaris* از مجموعه جلبکی دانشگاه اصفهان و سیانوبا کتر *S. platensis* از مجموعه جلبکی دانشگاه لرستان و تمام مواد لازم برای تهیه محیط کشت سلول‌ها از شرکت‌های سیگما یا مرک تهیه شدند. محیط کشت جانسون (Johnson *et al.*, 1968) با استفاده از  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (۰/۲ میلی مولار)،  $\text{KNO}_3$  (۵ میلی مولار)،  $\text{MgSO}_4$  (۵ میلی مولار)،  $\text{CaCl}_2$  (۰/۲ میلی مولار)،  $\text{FeCl}_3$  (۵ میکرومولار)،  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  (۵ میکرومولار)،  $\text{CoCl}_2$  (۱ میکرومولار)،  $\text{MnCl}_2$  (۷ میکرومولار)،  $\text{ZnCl}_2$  (۱ میکرومولار)،  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (۱ میکرومولار)،  $(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (۱ میکرومولار)،  $\text{CuCl}_2$  (۱ میکرومولار)،  $\text{NaHCO}_3$  (۳۰ میلی مولار) و محیط کشت زاروک (Raouf *et al.*, 2006) با استفاده از  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (۲ میلی مولار)،  $\text{NaNO}_3$  (۲۹ میلی مولار)،  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (۸ میلی مولار)،  $\text{K}_2\text{SO}_4$  (۵ میلی مولار)،  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (۰/۲ میلی مولار)،  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (۰/۳ میلی مولار)،  $\text{EDTA}$  (۰/۴ میلی مولار)،  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (۴۶ میلی مولار)،  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (۹ میلی مولار)،  $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (۱ میلی مولار)،  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  (۰/۰۷ میلی مولار)،  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (۰/۵ میلی مولار)،

و نیز به شکل کود برای گیاهان استفاده می‌شود (Brar *et al.*, 2017).

نتایج تجزیه و تحلیل شیمیایی ریزموجودات *S. vulgaris* و *platensis* نشان داده‌اند این ریزموجودات سرشار از رنگدانه‌های زیستی آستاگزانتین هستند. آستاگزانتین، کاروتنوئیدی از نوع گزانتوفیل و مکمل غذایی مفید حاوی عوامل آنتی‌اکسیدان و ضدتومور است (Sánchez *et al.*, 2003; Safi *et al.*, 2014). ریزموجودات یادشده حاوی پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها، ویتامین‌ها، آمینواسیدهای ضروری، مواد معدنی مغذی و اسیدهای چرب ضروری‌اند که ارزش غذایی و دارویی فراوانی دارند (Ambati *et al.*, 2014; Yaakob *et al.*, 2014). ریزموجود *Spirulina* منبع رنگدانه‌های زیستی فیکوبیلی‌پروتئین از جمله فیکوسیانین و آلفو فیکوسیانین است که کاربردهای مختلفی در صنایع غذایی و دارویی دارند (Yaakob *et al.*, 2014).

نتایج برخی آزمایش‌ها و پژوهش‌ها نشان داده‌اند مقدار و نوع ترکیبات ارزشمند درون جلبک‌ها و سیانوبا کترها نظیر رنگیزه‌ها، پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی بر اثر تغییر شرایط محیطی یا به واسطه وجود برخی محرک‌ها و مواد شیمیایی موجود در محیط زیست ریزموجود و پساب‌ها تغییر می‌کند (Sharma *et al.*, 2012; Battah *et al.*, 2013; Cheng and He, 2014; Renuka *et al.*, 2015; Akbari and Madadkar Haghjou, 2017; Pourbozorgi Rudsari *et al.*, 2019). بنابراین هدف پژوهش حاضر، بررسی و مقایسه قابلیت جلبک سبز *C. vulgaris* و سیانوبا کتر *S. platensis* در رنگ‌زدایی ماده رنگ‌زای DB129 و بررسی تأثیر

لیتر در ساعت (Mezzomo *et al.*, 2010) قرار گرفتند. نمونه برداری سلول‌ها برای اندازه‌گیری و ارزیابی شاخص‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی در روزهای اول، سوم و هفتم انجام شد. روش فریز کردن (در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد) و آب کردن بافت تر و روش سونیکیشن (سه مرتبه و هر بار ۱۰ دقیقه در ۸۰ هرتز) و ورتکس شدید در حضور گلوله‌های شیشه‌ای کوچک برای استخراج ترکیبات درون سلولی نمونه‌ها استفاده شدند (Moraes *et al.*, 2011).

### آزمون‌های رنگ‌زدایی

**درصد حذف ماده رنگ‌زا:** ارلن‌های حاوی هریک از سوسپانسیون‌های سلولی در محیط کشت همراه با ماده رنگ‌زا در دمای  $25 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد آزمایشگاه قرار داده شدند. درصد حذف ماده رنگ‌زا از رابطه ۱ تعیین شد.

$$\text{رابطه ۱} \quad \text{Dye removal (\%)} = [C_0 - C_n / C_0] \times 100$$

$C_0$  و  $C_n$  به ترتیب غلظت‌های ابتدایی و انتهایی ماده رنگ‌زای DB129 (بر حسب میلی‌گرم بر لیتر) در محیط کشت را پس از زمان‌های مدنظر نشان می‌دهند (Movafeghi *et al.*, 2015). غلظت نهایی رنگ با استفاده از منحنی کالیبراسیون و با توجه به مقادیر متفاوت جذب در برابر غلظت با اسپکتروفوتومتر (مدل T80 UV-Visible، شرکت PG Instruments، انگلستان) در طول موج بیشینه ماده رنگ‌زا (۵۹۸ نانومتر) سنجش شد. محلول رویی (پس از سانتریفیوژ) سوسپانسیون سلولی بدون تیمار رنگ برای بلانک و نمونه محلول رنگ با غلظت مشخص اولیه و بدون سلول برای شاهد مثبت استفاده شد.

NaCl (۱۷ میلی‌مولار) و  $\text{NaHCO}_3$  (۱۹۶/۴ میلی‌مولار) تهیه شدند. اسیدیته محیط کشت جانشین معادل ۷/۵ و اسیدیته محیط کشت زاروک با توجه به قلیادوست بودن سیانوباکتر *S. platensis* روی ۱۰/۵ تنظیم شد.

ماده رنگ‌زای DB129 با فرمول شیمیایی  $\text{C}_{30}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{Na}_2\text{O}_7\text{S}_2$  به گروه مواد رنگ‌زای آزو تعلق دارد و در پژوهش حاضر، به منظور بررسی توانایی رنگ‌زدایی ریزموجودات *C. vulgaris* و *S. platensis* و تأثیر این ماده بر مقدار و نوع برخی از ترکیبات درون سلولی آنها استفاده شد. به منظور اعمال تیمار ماده رنگ‌زا، مقدار ۲۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر ماده رنگ‌زای DB129 به سوسپانسیون سلولی هریک از نمونه‌های *C. vulgaris* و *S. platensis* در هریک از محیط کشت‌های یادشده اضافه و یک نمونه نیز شاهد (بدون ماده رنگ‌زا) در نظر گرفته شد. میزان ماده رنگ‌زا بر اساس آزمون‌های مقدماتی به شکلی انتخاب شد که از آثار شدید و کشنده روی سوسپانسیون سلولی اجتناب شود، ولی تأثیر تحریک‌کنندگی محتمل آن بر رشد و تغییر مقدار ترکیبات درون سلولی ریزموجودات میسر شود (Walsh, 1988). سوسپانسیون‌های سلولی هریک از نمونه‌ها با کدورت نوری ۰/۳ (در طول موج ۷۵۰ نانومتر) در شرایط استریل به محیط کشت‌ها اضافه شدند (روز صفر) و پس از آن، نمونه‌ها به مدت هفت روز در دمای  $25 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد، شرایط نوری ۱۰۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه، دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و هوادهی با پمپ هوا به میزان ۲۰

هفتم را بیان می‌کنند (Madkour et al., 2012).

$$\text{رابطه ۴} \quad t_d (\text{day}^{-1}) = (\ln 2/\mu) = 0.693/\mu$$

در رابطه ۴،  $t_d$ : زمان دوبرابر شدن توده سلولی و  $\mu$ : بیشترین سرعت رشد ویژه به دست آمده از رابطه ۲ را نشان می‌دهد (Madkour et al., 2012).

#### سنجش میزان کلروفیل‌های $a$ ، $b$ و کاروتنوئید

کل در *C. vulgaris* و *S. platensis*: به منظور استخراج کلروفیل‌های  $a$  و  $b$  و کاروتنوئیدها در جلبک *C. vulgaris* از حلال استون ۸۰ درصد (Lichtenthaler and Buschmann, 2001) و به منظور استخراج کلروفیل  $a$  و کاروتنوئید کل در *S. platensis* از حلال متانول (Zavřel et al., 2015) استفاده شد. رسوب سلولی از طریق سانتریفیوژ کردن (مدل Sigma، شرکت 16-4KS، آلمان) سلول‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۵۰۰ دور در دقیقه حاصل شد. پس از استخراج رنگیزه‌های یادشده به کمک حلال‌های مربوطه (استون ۸۰ درصد و متانول خالص)، لوله‌های حاوی عصاره‌ها به مدت ۷ دقیقه در ۷۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. مقادیر کلروفیل‌های  $a$ ،  $b$  و کاروتنوئید کل جلبک *C. vulgaris* بر اساس جذب نوری عصاره استونی با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل UV-Visible T80، شرکت PG Instruments، انگلستان) در طول موج‌های ۴۷۰، ۶۴۵ و ۶۶۲ نانومتر و از روابط ۵، ۶ و ۷ محاسبه و محتوای کلروفیل  $a$  و کاروتنوئید کل *S. platensis* بر اساس جذب نوری عصاره متانولی با دستگاه اسپکتروفتومتر یادشده در طول موج‌های ۴۷۰، ۶۶۵ و ۷۲۰ نانومتر و از روابط ۸ و ۹ محاسبه و بر حسب میلی‌گرم رنگدانه در گرم وزن تر گزارش شدند.

#### بررسی تأثیر ماده رنگ‌زا بر شاخص‌های رشد

##### *S. platensis* و *C. vulgaris*

اندازه‌گیری وزن خشک نمونه‌ها: به منظور اندازه‌گیری وزن خشک جلبک، مقادیر همگنی از سوپانسیون سلولی به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و به منظور حذف محیط کشت، سطح زیست توده تر دو تا سه بار با آب دوبار تقطیر شستشو شد. پس از خارج شدن کامل محلول روئی، زیست توده تر به دست آمده به مدت ۸ ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد درون آون خشک و سپس وزن شد. وزن خشک بر اساس گرم در لیتر گزارش شد.

##### ارزیابی سایر شاخص‌های رشد: رابطه‌های ۲، ۳ و

۴ برای محاسبه برخی از شاخص‌های رشد شامل  $X_m$  (بیشینه توده سلولی)،  $P_x$  (تولیدات سلولی)،  $\mu_m$  (بیشترین سرعت رشد ویژه) و  $t_d$  (زمان دوبرابر شدن سلول‌ها) استفاده شدند.

$$\text{رابطه ۲} \quad P_x (\text{mg/L/day}) = (X_m - X_i) / t_m$$

در رابطه ۲،  $X_m$ : مقدار بیشینه توده سلولی بر حسب میلی‌گرم وزن خشک در لیتر،  $X_i$ : مقدار اولیه توده سلولی بر حسب میلی‌گرم وزن خشک در لیتر و  $t_m$ : سن کشت (روز) است (Madkour et al., 2012).

$$\text{رابطه ۳} \quad \mu_m (\text{division/day}) = \ln(x_2 - x_1) / (t_2 - t_1)$$

در رابطه ۳،  $\mu_m$ : بیشترین سرعت رشد ویژه (Maximum specific growth rate)،  $x_1$ : وزن خشک توده سلولی در زمان  $t_1$  و  $x_2$ : وزن خشک توده سلولی در زمان  $t_2$  را نشان می‌دهد. زمان‌های  $t_1$  و  $t_2$  به ترتیب زمان‌های ابتدا و انتهای دوره در فواصل زمانی روز صفر تا اول، روز اول تا سوم و روز سوم تا

|  |         |
|--|---------|
| Chl <i>a</i> =11.24 A 661.6-2.04 A644.8                | رابطه ۵ |
| Chl <i>b</i> =20.13 A 644.8-4.19 A 661.6               | رابطه ۶ |
| Cx+c=(1000 A 470-1.90 Ca-63.14 Cb)/214                 | رابطه ۷ |
| Chl <i>a</i> =12.9447(A 665-A 720)                     | رابطه ۸ |
| Carotenoids=[1000(A 470-A 720)-2.86 Chl <i>a</i> ]/221 | رابطه ۹ |

۶۱۵، ۶۵۲ و ۵۶۲ نانومتر با دستگاه اسپکترومتر (مدل Epoch، شرکت BioTek، انگلستان)، مقدار فیکوبیلین‌ها طبق روابط ۱۰ تا ۱۳ محاسبه و مقادیر بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن خشک ارائه شدند.

|   |          |
|---|----------|
| Phycocyanin(C-PC)={ A <sub>615</sub> -(0.474×A <sub>652</sub> )/5.34    | رابطه ۱۰ |
| Allophycocyanin(APC)={ A <sub>652</sub> -(0.208×A <sub>615</sub> )/5.09 | رابطه ۱۱ |
| Phycocerythrin(PE)={ A <sub>562</sub> -(2.41×PC)-(0.849×APC)/9.62       | رابطه ۱۲ |
| Total phycobiliprotein=PC+APC+PE  | رابطه ۱۳ |

در ۱۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و محلول رویی تخلیه شد؛ سپس به منظور حذف تداخل رنگدانه‌ها، ابتدا استون ۱۰۰ درصد افزوده و دوباره سانتریفیوژ در ۱۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد (Marshall, 1986). رسوب برداشت شده در اتانول ۸۰ درصد با حداقل سه بار فریز-ذوب-سونیک و ورتکس هموژن و دوباره سانتریفیوژ شد. پس از جداسازی مایع رویی، رسوب باقیمانده دوباره با اتانول هموژن شد و پس از ورتکس شدید و سانتریفیوژ، مایع رویی جدا و با محلول به دست آمده از مرحله پیش مخلوط شد و سپس به روش آنترون بر اثر واکنش با سولفوریک اسید (۷۲ درصد) در گرما (۱۰۰ درجه سانتی‌گراد) سنجیده شد (Irigoyen *et al.*, 1992). میزان جذب در طول موج ۶۲۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Epoch، شرکت BioTek، انگلستان) خوانده

#### سنجش میزان رنگیزه‌های فیکوبیلین در *S.*

*platensis* به منظور بررسی میزان فیکوبیلین‌های موجود در *S. platensis*، استخراج رنگیزه‌ها بر اساس روش Ajayan و همکاران (۲۰۱۲) انجام شد و پس از خواندن جذب عصاره در طول موج‌های

#### سنجش آستاگزانتین: به منظور اندازه‌گیری

آستاگزانتین، ابتدا محلول دی‌متیل سولفو کساید (DMSO) به رسوب خشک نمونه‌ها افزوده شد و سپس نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم (۹۵ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفتند و پس از آن، سانتریفیوژ شدند. پس از برداشت مایع رویی و افزودن استون، دوباره عصاره جلبک‌ها سانتریفیوژ شد. میزان جذب محلول‌ها در طول موج ۴۸۹ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Epoch، شرکت BioTek، انگلستان) خوانده شد. مقدار آستاگزانتین بر حسب میلی‌گرم رنگدانه بر گرم وزن خشک جلبک‌ها با استفاده از ضریب خاموشی  $10^5 \times 1/25$  لیتر بر مول بر سانتی‌متر محاسبه شد و نتایج گزارش شدند (Régnier *et al.*, 2015).

#### سنجش میزان کربوهیدرات محلول کل:

سوسپانسیون سلولی برداشت شده به مدت ۱۵ دقیقه



و گلوکز خالص برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد.

**سنجش مقدار پروتئین محلول:** به منظور تهیهٔ عصاره، سوسپانسیون سلولی برداشت شده پس از سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۵۰۰ دور در دقیقه و دورریختن محلول رویی، بافر استخراج روی آن ریخته شد و سه بار مراحل فریز-ذوب و سونیک را گذراند. بافر استخراج با اسیدیتهٔ ۷/۸ شامل ۱۰۰ میلی‌مولار Tricine-KOH، PVP-40 ۵ درصد، ۵ میلی‌مولار مرکاپتواتانول و گلیسرول ۲۰ درصد (Smirnoff and Colombe, 1988) بود که به رسوب حاصل از سانتریفیوژ در مرحلهٔ پیش اضافه شد. پس از اتمام مراحل فریز-ذوب و سونیک، دوباره سانتریفیوژ انجام و از محلول رویی حاصل برای سنجش مقدار پروتئین محلول و از پروتئین آلبومین گاوی برای استاندارد (مطابق با روش Bradford, 1979) استفاده شد. جذب نمونه‌ها در

طول موج ۵۹۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Epoch، شرکت BioTek، انگلستان) خوانده شد و نتایج بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر گزارش شدند.

**تحلیل آماری:** تمام آزمایش‌ها در ۳ تکرار انجام شدند و آنالیز واریانس ANOVA روی داده‌ها انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها از طریق آزمون دانکن در سطح احتمال  $P < 0.05$  انجام و نرم‌افزار SPSS، نسخهٔ ۱۶ برای بررسی آماری نتایج استفاده شد.

### نتایج

تحلیل آماری واریانس داده‌ها (جدول‌های ۱ و ۲) نشان می‌دهد آثار اصلی و متقابل نوع ریز موجود، غلظت رنگ و زمان نمونه‌برداری روی تمام شاخص‌های ارزیابی شده در سطح ۱ درصد معنادار است.

جدول ۱- میانگین مربعات جدول تجزیه واریانس شاخص‌های ارزیابی شده شامل وزن خشک، کلروفیل *a*، کلروفیل *b*، کاروتنوئید، آستاگزانتین در *S. platensis* و *C. vulgaris* بر اثر نوع ریز موجود، غلظت رنگ (صفر، ۲۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر) و روز نمونه‌برداری (روزهای اول، سوم و هفتم)؛ \* و \*\* به ترتیب معناداری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد را نشان می‌دهند.

| منبع تغییرات                   | درجهٔ آزادی | وزن خشک                 | کلروفیل <i>a</i>     | کلروفیل <i>b</i>     | کاروتنوئید           | آستاگزانتین |
|--------------------------------|-------------|-------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-------------|
| نوع ریز موجود                  | ۱           | $1.7 \times 10^{-2}$ ** | ۰/۰۰۴**              | ۰/۱۵**               | ۰/۰۵**               | ۰/۰۲**      |
| غلظت رنگ                       | ۲           | $1.5 \times 10^{-2}$ ** | ۰/۰۰۶**              | ۰/۰۰۲**              | ۰/۰۰۱**              | ۰/۰۰۶**     |
| روز                            | ۲           | $1.3 \times 10^{-2}$ ** | ۰/۰۱۵**              | ۰/۰۰۱**              | ۰/۰۰۴**              | ۰/۰۰۸**     |
| نوع ریز موجود × غلظت رنگ       | ۲           | $9.8 \times 10^{-3}$ ** | ۰/۰۰۳**              | ۰/۰۰۱**              | ۰/۰۰۲**              | ۰/۰۰۴**     |
| نوع ریز موجود × روز            | ۲           | $2.8 \times 10^{-2}$ ** | ۰/۰۰۵**              | ۰/۰۰۲**              | ۰/۰۰۴**              | ۰/۰۱**      |
| غلظت رنگ × روز                 | ۴           | $1.2 \times 10^{-2}$ ** | ۰/۰۰۴**              | ۰/۰۰۴**              | ۰/۰۰۸**              | ۰/۰۰۸**     |
| نوع ریز موجود × غلظت رنگ × روز | ۴           | $1.5 \times 10^{-2}$ ** | ۰/۰۰۲**              | ۰/۰۰۴**              | ۰/۰۰۲**              | ۰/۰۱**      |
| خطا                            | ۳۶          | $7.7 \times 10^{-1}$    | $1.1 \times 10^{-1}$ | $2.5 \times 10^{-6}$ | $2.2 \times 10^{-6}$ | ۰/۰۰۰       |
| جمع کل                         | ۵۴          |                         |                      |                      |                      |             |

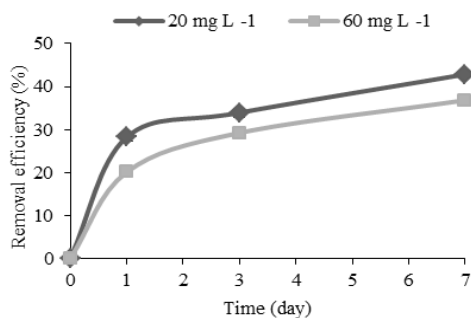
جدول ۲- میانگین مربعات جدول تجزیه واریانس شاخص‌های ارزیابی شده شامل PC (فیکوسیائین)، APC (آلوفیکوسیائین)، PE (فیکواریترین)، PBP (فیکوبیلی پروتئین)، کربوهیدرات محلول و پروتئین در *C. vulgaris* و *S. platensis* بر اثر نوع ریزموجود، غلظت رنگ (صفر، ۲۰ و ۶۰ میلی گرم بر لیتر) و روز نمونه برداری (روزهای اول، سوم و هفتم)؛ \* و \*\* به ترتیب معناداری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد را نشان می‌دهند.

| منبع تغییرات                  | درجه آزادی | PC     | APC    | PE      | PBP     | کربوهیدرات محلول | پروتئین  |
|-------------------------------|------------|--------|--------|---------|---------|------------------|----------|
| نوع ریزموجود                  | ۱          | ۲۷/۴** | ۸۵/۳** | ۳/۶**   | ۲۶۷/۷** | ۴۶۲/۷**          | ۰/۵**    |
| غلظت رنگ                      | ۲          | ۲/۹**  | ۱/۴**  | ۰/۱۱۵** | ۱۰/۴**  | ۳۴۶۶/۴**         | ۰/۰۱۴**  |
| روز                           | ۲          | ۰/۳**  | ۱/۸**  | ۰/۰۲۲** | ۳/۴**   | ۲۶۶۸/۵**         | ۰/۰۸۴**  |
| نوع ریزموجود × غلظت رنگ       | ۲          | ۲/۹**  | ۱/۴**  | ۰/۱۱۵** | ۱۰/۴**  | ۱۰۶۳/۰۶**        | ۰/۰۱۷**  |
| نوع ریزموجود × روز            | ۲          | ۰/۳**  | ۱/۸**  | ۰/۰۲۲** | ۳/۴**   | ۲۶۶۶/۹**         | ۰/۰۵۷**  |
| غلظت رنگ × روز                | ۴          | ۰/۲**  | ۰/۵**  | ۰/۰۰۱*  | ۱/۴**   | ۴۱۰/۳**          | ۰/۰۱۸**  |
| نوع ریزموجود × غلظت رنگ × روز | ۴          | ۰/۲**  | ۰/۵**  | ۰/۰۰۱** | ۱/۴**   | ۲۱۵۷/۱**         | ۰/۰۱۶**  |
| خطا                           | ۳۶         | ۰/۰۰۱  | ۰/۰۰۲  | ۰/۰۰    | ۰/۰۰۵   | ۰/۵۴۹            | ۲/۶ × ۱۰ |
| جمع کل                        | ۴۱         |        |        |         |         |                  |          |

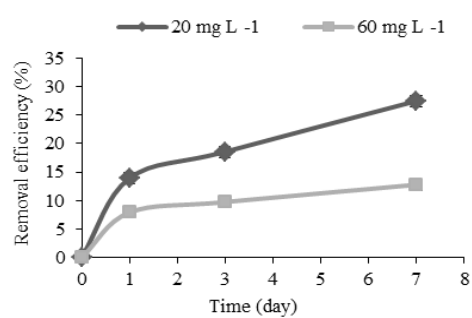
ماده رنگ‌زا منجر می‌شود. بیشترین مقدار حذف در دو ریزموجود *C. vulgaris* (A) و *S. platensis* (B) در غلظت ۲۰ میلی گرم بر لیتر به ترتیب معادل ۴۲/۸۵ و ۲۷/۵ درصد بود؛ همچنین میزان حذف رنگ در نمونه‌های یادشده با افزایش غلظت ماده رنگ‌زا به ۶۰ میلی گرم بر لیتر به ترتیب به ۳۵/۱۵ و ۱۲/۷۸ درصد کاهش یافت.

**تأثیر غلظت اولیه ماده رنگ‌زا در میزان حذف آن توسط ریزموجودات *C. vulgaris* و *S. platensis*:** کارایی *C. vulgaris* و *S. platensis* در حذف غلظت‌های مختلف (۲۰ و ۶۰ میلی گرم بر لیتر) ماده رنگ‌زای DB129 طی دوره هفت‌روزه آزمایش و میزان حذف ماده رنگ‌زا تعیین شد (شکل ۱). نتایج نشان دادند افزایش غلظت ماده رنگ‌زای DB129 از ۲۰ به ۶۰ میلی گرم بر لیتر به کاهش کارایی حذف

A



B



شکل ۱- تأثیر غلظت اولیه ماده رنگ‌زای DB129 بر درصد حذف آن به وسیله *C. vulgaris* (A) و *S. platensis* (B) در روزهای اول، سوم و هفتم. مقادیر میانگین سه تکرار  $\pm$  SD هستند.

$\mu_m$  و کاهش  $t_d$  در جلبک *C. vulgaris* در مقایسه با نمونه شاهد می‌شود (جدول ۳، الف)؛ برعکس، تیمار یادشده در *S. platensis* به کاهش مقادیر شاخص‌های رشد  $P_x$ ،  $X_m$  و  $\mu_m$  و افزایش  $t_d$  در این ریزموجود نسبت به نمونه شاهد منجر شد (جدول ۳، ب).

### تأثیر مادهٔ رنگ‌زا روی شاخص‌های فیزیولوژیک

رشد *C. vulgaris* و *S. platensis*: نتایج تیمار سوسپانسیون‌های سلولی با غلظت‌های متفاوت رنگ در دو سطح ۲۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر نشان داد تیمار ریزموجودات با هر دو غلظت رنگ سبب افزایش شاخص‌های رشد نظیر  $X_m$ ،  $P_x$  Cell productivity،

جدول ۳- شاخص‌های رشد بیشترین مقدار وزن خشک ( $X_m$ )، Cell productivity ( $P_x$ )، بیشترین سرعت رشد ویژه ( $\mu_m$ )، زمان دوبرابردن تودهٔ سلولی ( $t_d$ ) در *C. vulgaris* (الف) و *S. platensis* (ب) در روزهای اول (A)، سوم (B) و هفتم (C) در محیط کشت‌های نمونه شاهد (غلظت صفر مادهٔ رنگ‌زا) و تیمار شده با غلظت‌های ۲۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر مادهٔ رنگ‌زای DB129. داده‌ها میانگین ۳ تکرار  $\pm$  انحراف معیار هستند و حرف‌های متفاوت، اختلاف در سطح احتمال  $p < 0.05$  بر اساس آزمون دانکن را بیان می‌کنند.

### (الف)

| $t_d$ (day <sup>-1</sup> ) | $\mu_m$ (div. day <sup>-1</sup> ) | $P_x$ (mg. l <sup>-1</sup> . d <sup>-1</sup> ) | $X_m$ (g. l <sup>-1</sup> ) | تیمار<br>(غلظت رنگ -<br>روز) |
|----------------------------|-----------------------------------|--|-----------------------------|------------------------------|
| ۰/۱۵ ± ۰/۰۰۰۶ <sup>f</sup> | ۴/۷ ± ۰/۰۲ <sup>d</sup>           | ۱۰۸/۳ ± ۲/۰۸ <sup>e</sup>                      | ۰/۶ ± ۰/۰۰۴ <sup>g</sup>    | 0-A                          |
| ۰/۴ ± ۰/۰۰۵ <sup>d</sup>   | ۱/۸ ± ۰/۰۲ <sup>f</sup>           | ۷۳/۵ ± ۳/۸ <sup>g</sup>                        | ۰/۷ ± ۰/۰۲ <sup>e</sup>     | 0-B                          |
| ۰/۸ ± ۰/۰۰۶ <sup>a</sup>   | ۰/۹ ± ۰/۰۰۷ <sup>h</sup>          | ۶۰/۹ ± ۳ <sup>h</sup>                          | ۰/۹ ± ۰/۰۲ <sup>c</sup>     | 0-C                          |
| ۰/۱۴ ± ۰/۰۰۰۸ <sup>g</sup> | ۵/۲ ± ۰/۰۳ <sup>b</sup>           | ۱۷۶/۷ ± ۵/۸ <sup>c</sup>                       | ۰/۶ ± ۰/۰۲ <sup>f</sup>     | 20-A                         |
| ۰/۱۴ ± ۰/۰۰۱ <sup>f</sup>  | ۴/۸ ± ۰/۰۵ <sup>c</sup>           | ±۱۲۰ ۵/۸ <sup>d</sup>                          | ۰/۸ ± ۰/۰۱ <sup>d</sup>     | 20-B                         |
| ۰/۸ ± ۰/۰۰۳ <sup>b</sup>   | ۰/۹ ± ۰/۰۰۳ <sup>g</sup>          | ۸۳/۳ ± ۲/۲ <sup>f</sup>                        | ۱/۰۲ ± ۰/۰۳ <sup>b</sup>    | 20-C                         |
| ۰/۱۲ ± ۰/۰۰۰۳ <sup>h</sup> | ۵/۹ ± ۰/۰۱ <sup>a</sup>           | ۳۸۳/۳ ± ۵/۸ <sup>a</sup>                       | ۰/۸ ± ۰/۰۲ <sup>d</sup>     | 60-A                         |
| ۰/۳ ± ۰/۰۰۱ <sup>e</sup>   | ۲/۲ ± ۰/۰۱ <sup>e</sup>           | ۲۳۴/۶ ± ۴/۹ <sup>b</sup>                       | ۱/۱ ± ۰/۰۳ <sup>a</sup>     | 60-B                         |
| ۰/۷۳ ± ۰/۰۰۷۹ <sup>c</sup> | ۰/۹۴ ± ۰/۰۱ <sup>g</sup>          | ۱۰۵/۲ ± ۷/۳ <sup>e</sup>                       | ۱/۲ ± ۰/۰۶ <sup>a</sup>     | 60-C                         |

### (ب)

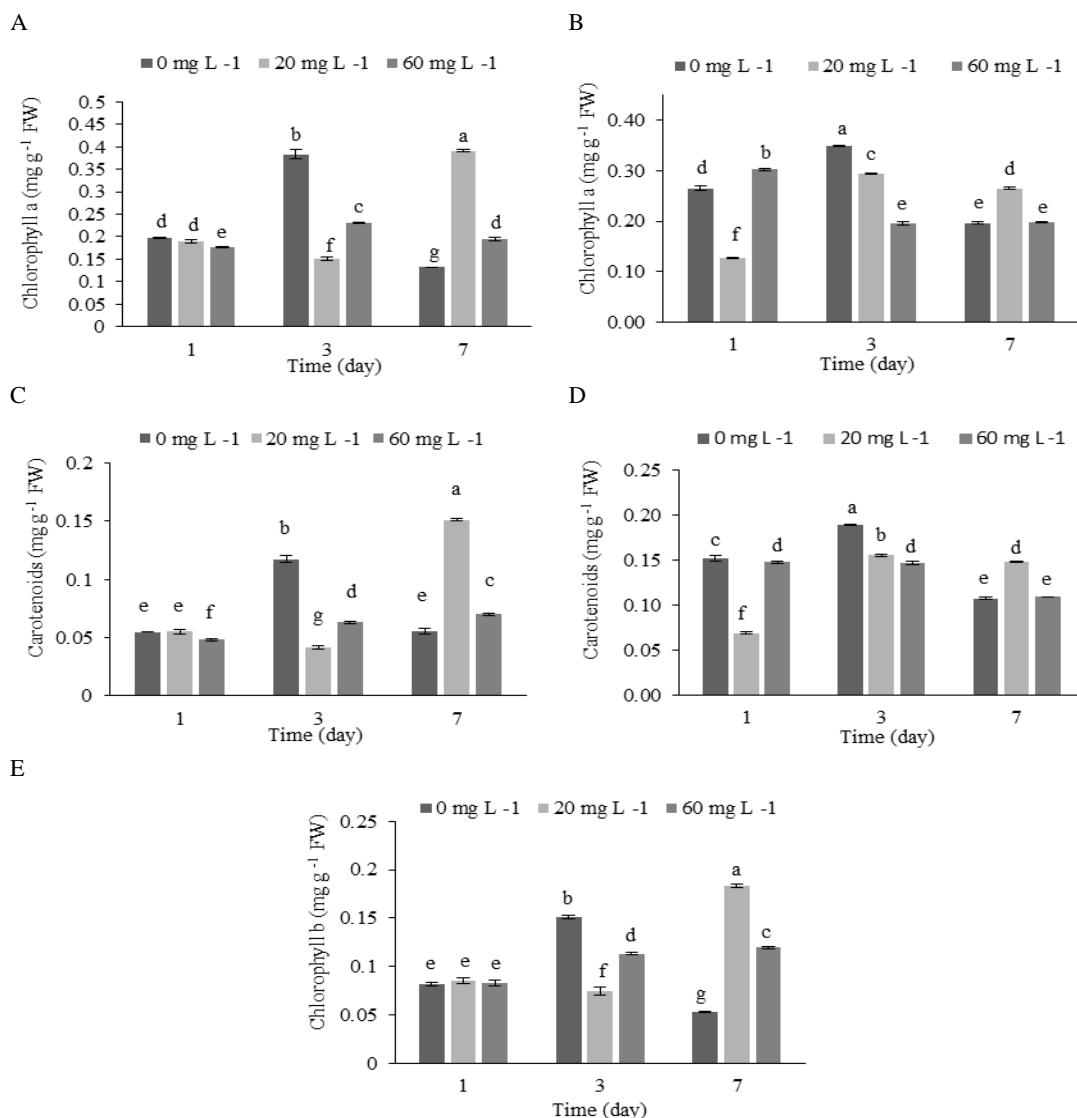
| $t_d$ (day <sup>-1</sup> ) | $\mu_m$ (div. day <sup>-1</sup> ) | $P_x$ (mg. l <sup>-1</sup> . d <sup>-1</sup> ) | $X_m$ (g. l <sup>-1</sup> ) | تیمار<br>(غلظت رنگ -<br>روز) |
|----------------------------|-----------------------------------|--|-----------------------------|------------------------------|
| ۰/۱ ± ۰/۰۰۰۵ <sup>g</sup>  | ۶/۸ ± ۰/۰۰۶ <sup>a</sup>          | ۸۹۳/۳ ± ۵/۸ <sup>a</sup>                       | ۱/۲ ± ۰/۰۰۱ <sup>b</sup>    | 0-A                          |
| ۰/۳۱ ± ۰/۰۰۴ <sup>e</sup>  | ۲/۲ ± ۰/۰۰۶ <sup>d</sup>          | ۲۶۴/۴ ± ۱/۹ <sup>d</sup>                       | ۱/۱ ± ۰/۰۰۱ <sup>b</sup>    | 0-B                          |
| ۰/۶۸ ± ۰/۰۱ <sup>c</sup>   | ۱/۰۲ ± ۰/۰۲ <sup>f</sup>          | ۱۸۴/۸ ± ۰/۸ <sup>f</sup>                       | ۱/۵ ± ۰/۰۰۰۲ <sup>a</sup>   | 0-C                          |
| ۰/۱ ± ۰/۰۰۱۴ <sup>f</sup>  | ۶/۴ ± ۰/۰۹ <sup>b</sup>           | ۶۰۳/۳ ± ۵/۸ <sup>c</sup>                       | ۰/۹ ± ۰/۰۰۱ <sup>c</sup>    | 20-A                         |
| ۰/۱۳ ± ۰/۰۰۲ <sup>f</sup>  | ۵/۳ ± ۰/۰۹ <sup>c</sup>           | ۲۰۱/۱ ± ۱/۹ <sup>e</sup>                       | ۰/۹ ± ۰/۰۰۱ <sup>c</sup>    | 20-B                         |
| ۰/۸ ± ۰/۰۱۳ <sup>b</sup>   | ۰/۹ ± ۰/۰۲ <sup>f</sup>           | ۹۷/۶ ± ۲/۲ <sup>g</sup>                        | ۰/۹ ± ۰/۰۰۱ <sup>c</sup>    | 20-C                         |
| ۰/۱ ± ۰/۰۰۱۲ <sup>g</sup>  | ۶/۶ ± ۰/۱۲ <sup>a</sup>           | ۷۸۸/۳ ± ۵ <sup>b</sup>                         | ۱/۲ ± ۰/۰۰۱ <sup>b</sup>    | 60-A                         |
| ۰/۳۸ ± ۰/۰۰۲۶ <sup>d</sup> | ۱/۸ ± ۰/۰۱۳ <sup>e</sup>          | ۶۶/۷ ± ۱/۸ <sup>h</sup>                        | ۰/۶ ± ۰/۰۰۱ <sup>d</sup>    | 60-B                         |
| ۱/۱ ± ۰/۰۲۷ <sup>a</sup>   | ۰/۶ ± ۰/۰۰۶ <sup>g</sup>          | ۱۲/۹ ± ۱/۴ <sup>i</sup>                        | ۰/۴ ± ۰/۰۰۰۱ <sup>e</sup>   | 60-C                         |

## تأثیر غلظت‌های مختلف ماده رنگ‌زا بر مقدار

رنگیزه‌های فتوسنتزی در *C. vulgaris* و *S. platensis*: شکل ۲، مقدار رنگیزه‌های *C. vulgaris* و *S. platensis* را تحت تأثیر تیمار ماده رنگ‌زا نشان می‌دهد (A-E). روند تغییرات رنگدانه‌ها از روز اول تا هفتم در نمونه‌های تیمار شده با غلظت‌های متفاوت رنگ نسبت به یکدیگر یکسان نبود و در زمینه نمونه شاهد، بیشترین مقدار در روز سوم و سپس کاهش در روز هفتم در هر دو نمونه مشاهده شد. نمونه‌های تیمار شده در غلظت‌های ۲۰ و ۶۰ میلی گرم ماده رنگ‌زا، گاهی در روز سوم و گاهی در روز هفتم، بیشترین محتوای رنگدانه‌ای را نشان دادند. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود، محتوای کلروفیل *a* (شکل ۲، A)، کلروفیل *b* (شکل ۲، E) و کاروتنوئید کل (شکل ۲، C) جلبک *C. vulgaris* در غلظت ۲۰ میلی گرم برلیتر ماده رنگ‌زا به ترتیب به میزان ۱۹۶/۶۳، ۲۴۷/۸۹ و ۱۷۳/۸۱ درصد و در غلظت ۶۰ میلی گرم برلیتر ماده رنگ‌زا به ترتیب به میزان ۴۸/۳۸، ۱۲۶/۵۵ و ۲۶/۵۴۵ درصد نسبت به نمونه شاهد در روز هفتم افزایش یافت؛ در حالی که، مقدار کلروفیل *a* (شکل ۲، B) و کاروتنوئید کل (شکل ۲، D) در *S. platensis* تیمار شده با ماده رنگ‌زا در روز هفتم صرفاً در غلظت ۲۰ میلی گرم برلیتر به ترتیب به میزان ۳۴/۹۱ و ۳۷/۹۶ درصد نسبت به نمونه شاهد افزایش نشان داد و در غلظت ۶۰ میلی گرم برلیتر افزایش نیافت. بیشترین میزان کلروفیل *a* و کاروتنوئید در *S. platensis* در روز سوم رشد و در نمونه شاهد مشاهده شد (شکل ۲، B و D).

## تأثیر غلظت‌های مختلف ماده رنگ‌زا روی

رنگیزه‌های فیکوبیلین در *S. platensis*: همان‌گونه که در شکل ۳ مشاهده می‌شود معمولاً مقادیر انواع فیکوبیلین‌های *S. platensis* در تیمارهای ماده رنگ‌زا در روزهای اول، سوم و هفتم نسبت به نمونه‌های شاهد (در همان روزها) افزایش نشان می‌دهند؛ به طوری که در روز اول، بیشترین میزان افزایش این رنگیزه‌ها نسبت به نمونه شاهد مشاهده می‌شود. مقادیر فیکوسیانیین (شکل ۳، A)، آلفوفیکوسیانیین (شکل ۳، B) و فیکوارترین (شکل ۳، C) در غلظت ۲۰ میلی گرم برلیتر ماده رنگ‌زا در روز اول به ترتیب به میزان ۷۱/۰۳، ۴۷/۷ و ۳۳/۲ درصد و در غلظت ۶۰ میلی گرم برلیتر ماده رنگ‌زا در روز اول به ترتیب به میزان ۳۱۷/۶، ۱۴۴/۵ و ۸۶/۰ درصد نسبت به نمونه شاهد افزایش یافتند؛ با وجود این، مقدار فیکوارترین در روز هفتم و در غلظت ۶۰ میلی گرم برلیتر ماده رنگ‌زا بیشتر از سایر تیمارها بود. روند افزایشی در تمام روزهای آزمون از نمونه‌های شاهد به سمت غلظت ۶۰ میلی گرم برلیتر ماده رنگ‌زا برای محتوای فیکوسیانیین و فیکوارترین مشاهده شد و در زمینه رنگدانه آلفوفیکوسیانیین دیده نشد. در مجموع، محتوای رنگدانه فیکوبیلین کل سلول (شکل ۳، D) در نمونه تیمار شده با غلظت ۶۰ میلی گرم برلیتر ماده رنگ‌زا از نمونه شاهد و نیز نمونه تیمار شده با غلظت ۲۰ میلی گرم برلیتر بیشتر بود و بیشترین مقدار آن در روز اول و ۲۴ ساعت پس از تیمار رنگ مشاهده شد.



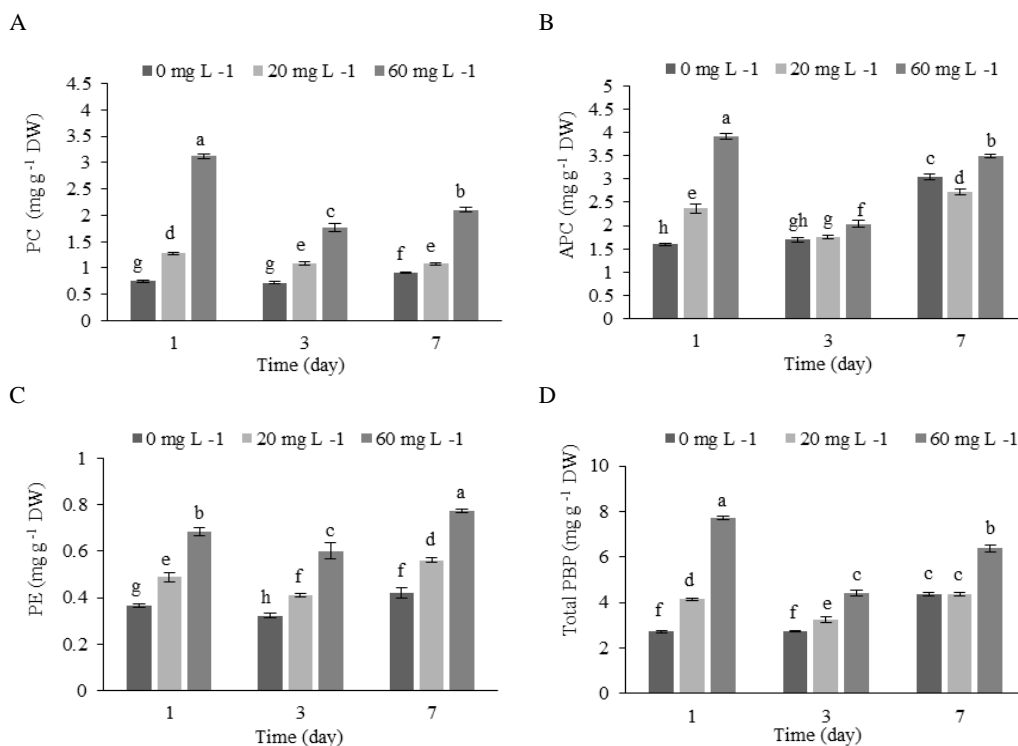
شکل ۲- مقادیر کلروفیل a (A)، کلروفیل b (E) و کاروتنوئید کل (C) در جلبک *C. vulgaris* و مقادیر کلروفیل a (B) و کاروتنوئید کل (D) در *S. platensis* تیمار شده با غلظت‌های مختلف مادهٔ رنگ‌زای DB129 در روزهای اول، سوم و هفتم. داده‌ها میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار هستند و حرف‌های متفاوت، اختلاف در سطح احتمال  $p < 0.05$  بر اساس آزمون دانکن را بیان می‌کنند.

مختلف نمونه‌برداری و تیمارهای مختلف بیشتر از جلبک *Chlorella* است. در جلبک *C. vulgaris*، مقدار آستاگزانتین در غلظت‌های ۲۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر مادهٔ رنگ‌زا در روز اول به ترتیب به میزان ۷/۱ و ۴/۳ درصد و در روز هفتم به ترتیب به مقدار ۱۶/۱ و ۱۳/۰ درصد نسبت به نمونهٔ شاهد خود افزایش یافت (شکل ۴، A)؛ در حالی که در *S. platensis* مقدار آستاگزانتین در غلظت‌های ۲۰ و

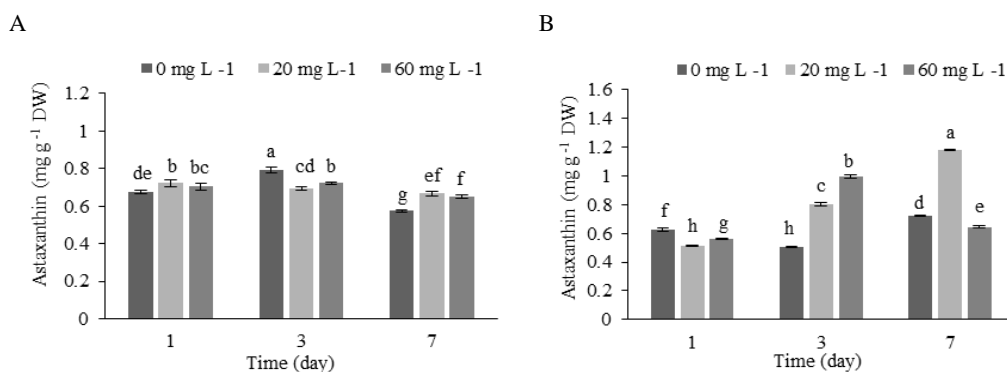
**تأثیر غلظت‌های مختلف مادهٔ رنگ‌زا بر محتوای رنگدانهٔ آستاگزانتین در *C. vulgaris* و *S. platensis*:** شکل ۴ مقدار کاروتنوئید آستاگزانتین در جلبک *C. vulgaris* (شکل ۴، A) و *S. platensis* (شکل ۴، B) را نشان می‌دهد. نتایج پژوهش حاضر نشان دادند مقدار آستاگزانتین بر گرم وزن خشک در *S. platensis* بیشتر از مقدار آن در *C. vulgaris* است و تغییرات آن در این سیانوباکتر طی روزهای

بیشترین مقدار آستاگزانتین در غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر و در روز هفتم رشد در این نمونه مشاهده شد.

۶۰ میلی‌گرم بر لیتر ماده رنگ‌زا در روز سوم به ترتیب به میزان ۵۸/۸ و ۹۶/۱ درصد نسبت به نمونه شاهد افزایش یافت (شکل ۴، B)؛ هرچند



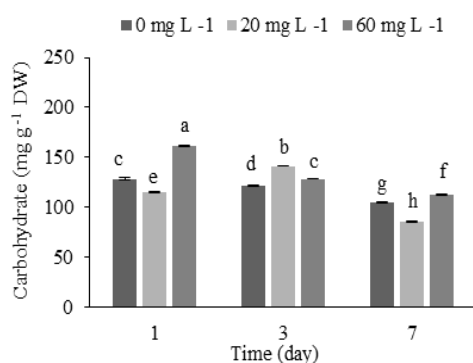
شکل ۳- مقادیر رنگیزه‌های فیکوسیانین (A)، آلفو فیکوسیانین (B)، فیکواریترین (C) و فیکوبیلی پروتئین کل (D) در *S. platensis* تیمار شده با غلظت‌های ۲۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر ماده رنگ‌زای DB129 در روزهای اول، سوم و هفتم. داده‌ها میانگین  $\pm$  تکرار ۳ انحراف معیار هستند و حرف‌های متفاوت، اختلاف در سطح احتمال  $p < 0.05$  بر اساس آزمون دانکن را بیان می‌کنند.



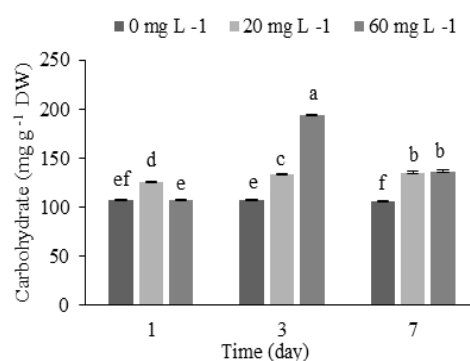
شکل ۴- محتوای رنگیزه آستاگزانتین در ریزموجودات *C. vulgaris* (A) و *S. platensis* (B) تیمار شده با غلظت‌های ۲۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر ماده رنگ‌زای DB129 در روزهای اول، سوم و هفتم. داده‌ها میانگین  $\pm$  تکرار ۳ انحراف معیار هستند و حرف‌های متفاوت، اختلاف در سطح احتمال  $p < 0.05$  بر اساس آزمون دانکن را بیان می‌کنند.

جلبک *C. vulgaris*، بیشترین محتوای کربوهیدرات محلول در روز اول بر اثر تیمار با غلظت ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر رنگ مشاهده شد؛ هرچند کمتر از محتوای کربوهیدراتی بود که در *S. platensis* در همین غلظت و طی روز سوم مشاهده شد (شکل ۵، B). در کل، غلظت ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر مادهٔ رنگ‌زا سبب بیشترین تحریک تولید مقدار کربوهیدرات محلول در هر دو نمونه شد.

A



B

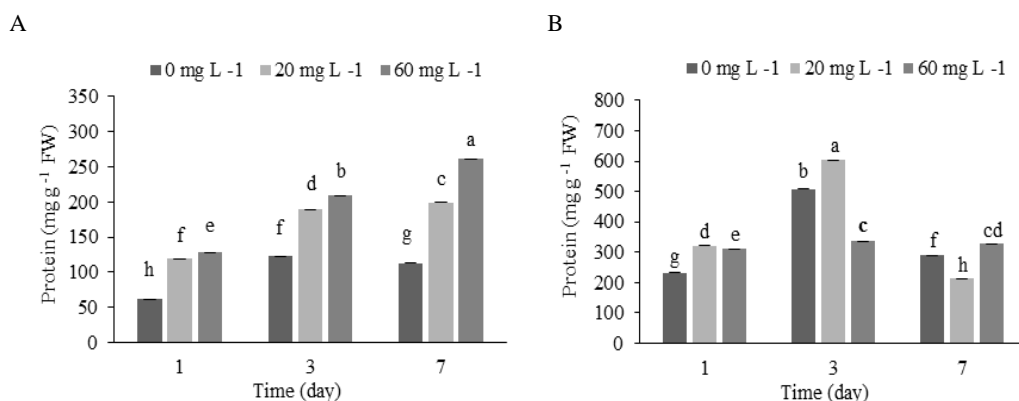


شکل ۵- محتوای کربوهیدرات محلول در *S. platensis* (A) و *C. vulgaris* (B) تیمار شده با غلظت‌های ۲۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر مادهٔ رنگ‌زای DB129 در روزهای اول، سوم و هفتم. داده‌ها میانگین ۳ تکرار  $\pm$  انحراف معیار هستند و حرف‌های متفاوت، اختلاف در سطح احتمال ۰/۰۵  $p <$  بر اساس آزمون دانکن را بیان می‌کنند.

*S. platensis* روند افزایشی در مقدار پروتئین *C. vulgaris* هم‌گام با تیمار نمونه‌ها با مادهٔ رنگ‌زا و افزایش غلظت آن از ۲۰ به ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر از روز اول تا هفتم رشد مشاهده می‌شود (شکل ۶، A)؛ با وجود این، بیشترین میزان پروتئین در *S. platensis* در روز سوم و در تیمار با غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده می‌شود (شکل ۶، B).

تأثیر غلظت‌های مختلف مادهٔ رنگ‌زا روی

محتوای پروتئین *C. vulgaris* و *S. platensis*: شکل ۶ محتوای پروتئین محلول در *C. vulgaris* (شکل ۶، A) و *S. platensis* (شکل ۶، B) را نشان می‌دهد. نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهند محتوای پروتئین محلول در *S. platensis* حدوداً بیش از دو برابر مقدار آن در *C. vulgaris* است؛ اما برخلاف *S.*



شکل ۶- مقدار پروتئین‌ها در *S. platensis* (B) تیمار شده با غلظت‌های ۲۰ و ۶۰ میلی گرم بر لیتر ماده رنگ‌زای DB129 در روزهای اول، سوم و هفتم. داده‌ها میانگین ۳ تکرار  $\pm$  انحراف معیار هستند و حرف‌های متفاوت، اختلاف در سطح احتمال  $p < 0.05$  بر اساس آزمون دانکن را بیان می‌کنند.

(Fawwaz and Abdullah, 2016)

داده‌های حاصل نشان می‌دهند تأثیر رنگ بر فیزیولوژی سلول و شاخص‌های رشد بسته به غلظت رنگ، زمان نمونه‌برداری و نوع ریز موجود متفاوت است. سرعت رشد ویژه یا  $\mu_m$  مهم‌ترین شاخص رشد برای بیان موفقیت اکولوژیک یا توانایی سازگاری گونه نسبت به تغییر شرایط محیط طبیعی یا آزمایشگاهی است (Guevara et al., 2005)؛ از این رو، در پژوهش حاضر به منظور تعیین اثر ماده رنگ‌زای DB129 بر رشد ریز موجودات مطالعه شده به مقایسه سرعت رشد ویژه و سایر شاخص‌های رشد بین تیمارهای مختلف پرداخته شد و برخلاف *S. platensis*، ماده رنگ‌زای DB129 تأثیر مثبتی بر رشد نسبی و سایر شاخص‌های رشد جلبک *C. vulgaris* اعمال کرد؛ به طوری که با افزایش غلظت ماده رنگ‌زا، شاخص‌های رشد جلبک بهبود و افزایش یافتند؛ بنابراین، به نظر می‌رسد جلبک *C. vulgaris* در مقایسه با سیانوباکتر *S. platensis* تحمل و سازگاری بیشتری نسبت به شرایط تنشی آلاینده‌گی رنگ DB129 دارد. بررسی‌های علمی

## بحث

تحلیل آماری داده‌های حاصل از تیمار *C. vulgaris* و *S. platensis* با غلظت‌های مختلف ماده رنگ‌زای DB129 نشان داد تأثیر عوامل نوع ریز موجود، غلظت رنگ و زمان نمونه‌برداری بر بیشتر شاخص‌های رشد و شاخص‌های فیزیولوژیک ارزیابی شده در سطح ۱ درصد معنادار است. بر اساس نتایج، افزایش غلظت ماده رنگ‌زا از ۲۰ به ۶۰ میلی گرم بر لیتر به کاهش کارایی هر دو نوع سلول در حذف ماده رنگ‌زا منجر می‌شود. برخی گزارش‌ها نشان داده‌اند سطح جذب بیشتر و تمایل زیاد گروه‌های عاملی (مانند گروه‌های هیدروکسیل، کربوکسیل، آمینو، فسفات و ...) موجود روی سطح دیواره ریز موجودات برای اتصال به عوامل خارجی، راهکاری برای جداسازی آلاینده‌ها از پساب‌ها به شمار می‌آید (Dmytryk, et al., 2014). کاهش کارایی دو نمونه *C. vulgaris* و *S. platensis* در حذف رنگ در غلظت‌های زیاد ماده رنگ‌زا به ظرفیت معین اتصال زیست توده به عوامل خارجی و میزان سمیت ماده رنگ‌زا نسبت داده می‌شود (AI-



به شاهد نشان می‌دهد؛ این مطلب و افزایش مقدار کلروفیل *a* و کاروتنوئیدهایی مانند آستاگزانتین (در نمونهٔ ۲۰ میلی گرم برلیتر) و نیز رنگدانه‌های فیکوبیلین (در نمونهٔ ۶۰ میلی گرم برلیتر) به‌ویژه در روز هفتم رشد که یک هفته از اعمال تنش گذشته است (شکل‌های ۲، ۳ و ۴)، احتمال وجود اختلال شدید در میزان فتوسنتز *S. platensis* بر اثر عامل رنگ‌زا را کاهش می‌دهد؛ از سوی دیگر، بررسی و مقایسهٔ مقدار پروتئین سلولی در *C. vulgaris* و *S. platensis* (شکل ۶)، افزایش درخورد توجه و متناسب با غلظت رنگ‌زا در *C. vulgaris* طی تمام روزهای نمونه‌برداری و برعکس، افزایش نیافتن درخورد توجه آن و در برخی نمونه‌ها، کاهش آن را در *S. platensis* نشان می‌دهد. پژوهش‌ها نشان داده‌اند تنش‌های محیطی (نظیر تنش خشکی، شوری، تنش آلاینده‌ها و ...) متابولیسم پروتئین را تحت تأثیر قرار می‌دهند و بیوسنتز بسیاری از پروتئین‌های ویژه و جدید (*de novo*) را سبب می‌شوند. این پروتئین‌ها ممکن است در انتقال سیگنال، دفاع آنتی‌اکسیدانی، بیوسنتز اسمولیت‌ها، باندا کردن فلزات و ... مشارکت کنند (Boo and Jung, 1999). بیوسنتز برخی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان تحت تأثیر تنش اکسیداتیو مشاهده شده است (Sharma and Dubey, 2005; Sharma and Dubey, 2019) بنابراین، محتمل است حداقل بخشی از افزایش مقدار پروتئین در پاسخ به شرایط تنش‌زای حاصل از سمیت مواد رنگ‌زا به علت فعالیت سازوکارهای مقابله با تنش از جمله حذف گونه‌های فعال اکسیژن باشد. همان‌طور که گفته شد، توانایی

نشان می‌دهند پاسخ فیزیولوژیک و میزان رشد انواع مختلف ریزموجودات در شرایط تنش‌زا متفاوت است (Charioui et al., 2017)؛ اما سازوکارهای دقیقی که سبب سازگاری برخی ریزموجودات با شرایط تنش‌زای حاصل از پساب‌ها می‌شوند، هنوز به‌خوبی شناسایی نشده‌اند (Osundeko et al., 2014). بروز آثار منفی مادهٔ رنگ‌زا بر سرعت رشد ویژه و سایر شاخص‌های رشد در *S. platensis* (برای نمونه، افزایش زمان دوبرابردن زیست‌تودهٔ سلولی) را می‌توان به عوامل مختلفی نسبت داد؛ از جمله اینکه حضور مواد رنگ‌زا در آب سبب کاهش نفوذ نور می‌شود و کاهش میزان نور، عامل مهمی در کاهش رشد برخی موجودات فتوسنتزکننده به شمار می‌آید (Zhang et al., 2018). گزارش‌ها نشان داده‌اند شرایط تنش‌زا سبب کاهش کارایی فتوسنتز و در نتیجه، کاهش فعالیت‌های متابولیسمی می‌شود که این امر به کاهش سرعت رشد نسبی سوسپانسیون سلولی منجر می‌شود (Benavente-Valdés et al., 2016).

پژوهش‌های مختلف نشان داده‌اند تأثیر میزان نور بر فتوسنتز و تولیدات فتوسنتزی انواع موجودات فتوسنتزکننده شدت یکسانی ندارد (Singh and Singh, 2015; Petsas and Vagi, 2017) و می‌تواند عامل تفاوت *C. vulgaris* و *S. platensis* و برتری *C. vulgaris* در زمینهٔ متابولیسم و رشد سلولی باشد؛ با وجود این، بررسی مقدار کربوهیدرات محلول در *S. platensis* طی پژوهش حاضر (شکل ۵، B) نشان داد مقدار قند در شرایط تنش مادهٔ رنگ‌زا کاهش نمی‌یابد، بلکه مقدار آن در نمونه‌های تیمار شده با ۲۰ و ۶۰ میلی گرم برلیتر مادهٔ رنگ‌زا مقداری افزایش نسبت

فرآورده‌های پایدار می‌شوند و از واکنش‌های زنجیره‌ای رادیکالی جلوگیری می‌کنند؛ علاوه‌براین، پلی‌ساکاریدها در جداسازی و خارج کردن رادیکال‌های آزاد از سلول‌ها ایفای نقش می‌کنند؛ در نتیجه، این مواد سبب افزایش تحمل سلول و سازگاری آن نسبت به تنش می‌شوند (El-sheekh *et al.*, 2012).

همان‌طور که گفته شد، مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی (به‌ویژه کلروفیل و کاروتنوئیدها) در نمونه‌های بررسی شده در پژوهش حاضر که در معرض تیمار ماده رنگ‌زای DB129 بودند، در روز هفتم آزمون افزایش یافت. به نظر می‌رسد کاهش رنگدانه‌ها در روز سوم رشد با کاهش اولیه رنگدانه‌ها تحت تأثیر تنش و نیاز به زمان برای سازگاری با محیط مرتبط باشد. پژوهش‌ها نشان داده‌اند وجود مواد رنگ‌زا در آب سبب کاهش نفوذ نور می‌شود و در پاسخ به کاهش مقدار نور، سیستم‌های گیرنده نور در سازوکاری با عنوان سازگاری سایه-نور (Light-Shade adaptation) همراه با رنگیزه‌های فتوسنتزی کلروفیل‌های *a* و *b* گسترش می‌یابند (Novotný *et al.*, 2006; Movafeghi *et al.*, 2015; Ferreira *et al.*, 2016). افزایش کاروتنوئیدها در پاسخ به شرایط تنش‌زای حاصل از سمیت مواد رنگ‌زا، سازوکار دفاعی به شمار می‌آید و نقش حفاظتی در حذف گونه‌های فعال اکسیژن ایفا می‌کند (Saranya *et al.*, 2014; Movafeghi *et al.*, 2015). گزارش‌های مشابهی در زمینه افزایش مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی در پاسخ به تنش‌ها ارائه شده‌اند (Danesi *et al.*, 2004).

افزایش بیوسنتز پروتئین در شرایط تنش دارای نقش مهمی در افزایش دادن پتانسیل سازگاری موجود با شرایط تنشی است و قدرت متابولیکی سلول را افزایش می‌دهد (Lee *et al.*, 2019)؛ پژوهش‌های مختلف در این زمینه به افزایش مقدار پروتئین‌هایی نظیر HSP، USP، Psb Q و Psb R در تنش‌های مختلف از جمله تنش مواد رنگ‌زا (Danesi *et al.*, 2004; Sasi *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2019) اشاره کرده‌اند.

برخی پژوهش‌ها ارتباط قوی بین محتوای قند محلول و تحمل تنش را گزارش کرده‌اند (Danesi *et al.*, 2004; Rosa *et al.*, 2009). افزایش مقدار کربوهیدرات‌های محلول در پاسخ به شرایط تنش‌زای حاصل از سمیت مواد رنگ‌زا به روش‌های متفاوتی در مقابله با تنش مؤثر است؛ برای نمونه، قندهای محلول در شرایط تنش‌زا به شکل منابع تولید انرژی یا مولکول‌های پیام‌رسان عمل می‌کنند و سبب تغییر بیان ژن‌های سنتز آنتی‌اکسیدان‌ها و نیز فعال‌شدن مسیرهای انتقال هورمون‌ها می‌شوند؛ همچنین قندهای محلول سبب تحریک بیوسنتز کاروتنوئیدها (آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی) می‌شوند (Couée *et al.*, 2006; Saranya *et al.*, 2014; Movafeghi *et al.*, 2015).

این واقعیت که ریزموجودات انرژی خود را در شرایط تنش‌زا برای ساخت ساختارهای پلی‌ساکاریدی به کار می‌گیرند، نشان می‌دهد پلی‌ساکاریدها ارتباط مهمی با غلبه بر شرایط تنش‌زا دارند و احتمالاً سبب بقای سلول می‌شوند (Tannin-Spitz *et al.*, 2005). برخی گزارش‌ها نشان داده‌اند پلی‌ساکاریدها با فراهم کردن هیدروژن سبب تبدیل رادیکال‌های آزاد به

انرژی (به‌ویژه در شرایط تنش) می‌شوند (Fatma, 2009).

در جلبک *Chlorella*، وزن خشک سلول‌ها هم‌گام با افزایش سرعت رشد ناشی از تیمار رنگ افزایش یافت؛ در حالی که مقدار وزن خشک در *Spirulina* به‌ویژه در تیمار با غلظت زیاد (۶۰ میلی‌گرم بر لیتر) رنگ کاهش نشان داد (جدول ۳). پژوهش‌ها نشان می‌دهند آلاینده‌های آلی و غیر آلی از طریق افزایش رادیکال‌های آزاد سبب تسریع فرایند پیری و مرگ سلولی می‌شوند (Movafeghi et al., 2015) و بنابراین می‌توانند به کاهش وزن خشک و رشد نسبی منجر شوند. گزارش‌های متعددی در زمینه تفاوت گونه‌های مختلف ریزموجودات فتوسنتزکننده از نظر حساسیت به تنش اکسیداتیو حاصل از آلاینده‌ها وجود دارند که این امر از تفاوت در غلظت یا روش مقابله با آن ناشی می‌شود (Charioui et al., 2017).

### نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر، ریزموجودات *C. vulgaris* و *S. platensis* قابلیت‌های متفاوتی در رنگ‌زدایی پساب‌های حاوی مادهٔ رنگ‌زای DB129 و افزایش ترکیبات ارزشمند درون‌سلولی در حضور آلایندهٔ رنگ نشان دادند؛ از این رو، کشت این سلول‌ها در پساب‌های حاوی مواد رنگ‌زا از نظر اقتصادی و زیست‌محیطی ارزشمند است. روش پالایش زیستی علاوه بر اینکه به رنگ‌زدایی پساب‌ها و پالایش آنها منجر می‌شود، سبب افزایش ترکیبات مفید مانند پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و رنگیزه‌های موجود در ریزموجودات فتواتوتروف نظیر سیانوباکترها و جلبک‌ها می‌شود؛ بنابراین، شناسایی نمونه‌های

آستاگزانتین یکی از انواع کاروتنوئیدهای گزانتوفیلی است که در نتیجهٔ فعالیت برخی جلبک‌ها، باکتری‌ها و مخمرها تولید می‌شود (Kobayashi et al., 1993; Pelah et al., 2004; Hu et al., 2008). پژوهش‌ها نشان داده‌اند این ماده در پاسخ به افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن در تنش نوری، تنش نمکی یا تنش دمایی (برای نمونه، در جلبک سبز *Haematococcus pluvialis*) تجمع می‌یابد (Kobayashi, 2003; Doria et al., 2018). در پژوهش حاضر، مقدار آستاگزانتین در سیانوباکتر *Spirulina* نسبت به مقدار آن در جلبک *Chlorella* افزایش بیشتری را نشان داد و غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر رنگ نیز تأثیر القایی بیشتری نسبت به غلظت ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر داشت. به نظر می‌رسد تولید این رنگدانهٔ گزانتوفیلی در پاسخ به تنش اکسیداتیو ناشی از تیمار رنگ و به‌منظور کاهش آثار آن در سیانوباکتر *Spirulina* بیشتر از تولید آن در *Chlorella* تحریک شود.

گزارش‌هایی وجود دارند که نشان می‌دهند سیانوباکترها مقدار و ترکیب فیکوبیلی پروتئین‌های خود را در پاسخ به تغییر شرایط محیطی تغییر می‌دهند (Fatma, 2009). بر اساس پژوهش‌ها، سنتز فیکوبیلی پروتئین‌ها در سیانوباکترها تحت تأثیر شدت‌های کم نور تحریک می‌شود؛ زیرا انرژی کمی برای محافظت و تولید این رنگیزه‌ها لازم است. در تابش‌های اندک نور، این رنگیزه‌ها بخش‌هایی از طیف نور را استفاده می‌کنند که کلروفیل‌ها نمی‌توانند جذب کنند و به‌این ترتیب، سبب برقراری تعادل در توزیع انرژی نوری بین دو فتوسیستم و در نتیجه، بهینه‌سازی سرعت تبدیل

- Aswathanarayana, R. (2014) Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications—a review. *Marine Drugs* 12(1): 128-152.
- Bafana, A., Devi, S. S. and Chakrabarti, T. (2011) Azo dyes: past, present and the future. *Environmental Reviews* 19: 350-371.
- Battah, M., El-Ayoty, Y., Abomohra, A. E. F., El-Ghany, S. A. and Esmael, A. (2013) Optimization of growth and lipid production of the Chlorophyte microalga *Chlorella vulgaris* as a feedstock for biodiesel production. *World Applied Science Journal* 28(11): 1536-1543.
- Benavente-Valdés, J. R., Aguilar, C., Contreras-Esquivel, J. C., Méndez-Zavala, A. and Montañez, J. (2016) Strategies to enhance the production of photosynthetic pigments and lipids in Chlorophyceae species. *Biotechnology Reports* 10: 117-125.
- Boo, Y. C. and Jung, J. (1999) Water deficit- induced oxidative stress and antioxidative defenses in rice plants. *Journal of Plant Physiology* 155(2): 255-261.
- 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(1): 248-254.
- Brar, A., Kumar, M., Vivekanand, V. and Pareek, N. (2017) Photoautotrophic microorganisms and bioremediation of industrial effluents: current status and future prospects. *Biotech* 7: 18.
- Charioui, I., Chikhaoui, M., El Filali, F., Abbassi, M., Banaoui, A. and Kaaya, A. (2017) Production in cell biomass and carotenoids under the effect of a saline stress in microalgae *Dunaliella* sp. isolated from Moroccan Saharian Saline. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6(8): 286-94.
- مقاوم ریزموجودات در پساب‌های حاوی مواد رنگ‌زا از جنبه زیست‌محیطی و صنعتی اهمیت بسیار زیادی دارد؛ در این زمینه، میزان حذف ماده رنگ‌زا و نیز سرعت رشد نسبی میکروجلبک *C. vulgaris* نسبت به سیانوباکتر *S. platensis* در حضور ماده رنگ‌زای DB129 بیشتر بود.
- ### سپاسگزاری
- از معاونت پژوهشی دانشگاه لرستان برای پشتیبانی مالی از پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.
- ### References
- Ajayan, K. V., Selvaraju, M. and Thirugnanamoorthy, K. (2012) Enrichment of chlorophyll and phycobiliproteins in *Spirulina platensis* by the use of reflector light and nitrogen sources: An *in vitro* study. *Biomass and Bioenergy* 47: 436-441.
- Akbari, F. and Madadkar Haghjou, M. (2017) Improvement of nutritional values of two *Dunaliella* (Green microalgae) species, by changing in medium factors. *Journal of Fisheries (Iranian Journal of Natural Resources)* 70(3): 243-261 (in Persian).
- Al-Fawwaz, A. T. and Abdullah, M. (2016) Decolorization of Methylene blue and Malachite green by immobilized *Desmodesmus* sp. isolated from north Jordan. *International Journal of Environmental Science and Development* 7(2): 95-99.
- Almeida, E. J. R. and Corso, C. R. (2014) Comparative study of toxicity of Azo dye Procion red MX-5B following biosorption and biodegradation treatments with the fungi *Aspergillus niger* and *Aspergillus terreus*. *Chemosphere* 112: 317-322.
- Ambati, R., Phang, S. M., Ravi, S. and

- Cheng, D. and He, Q. (2014) Assessment of environmental stresses for enhanced microalgal biofuel production—an overview. *Frontiers in Energy Research* 2: 1-8.
- Couée, I., Sulmon, C., Gouesbet, G. and El Amrani, A. (2006) Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 57(3): 449-459.
- Dellamatrice, P. M., Silva-Stenico, M. E., de Moraes, L. A. B., Fiore, M. F. and Monteiro, R. T. R. (2017) Degradation of textile dyes by cyanobacteria. *Brazilian Journal of Microbiology* 48(1): 25-31.
- Danesi, E. D. G., Rangel-Yagui, C. O., Carvalho, J. C. M. and Sato, S. (2004) Effect of reducing the light intensity on the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. *Biomass and Bioenergy* 26(4): 329-335.
- Diniz, G. S., Tourinho, T. C., Silva, A. F. and Chaloub, R. M. (2017) Environmental impact of microalgal biomass production using wastewater resources. *Clean Technologies and Environmental Policy* 19(10): 2521-2529.
- Dmytryk, A., Saeid, A. and Chojnacka, K. (2014) Biosorption of microelements by *Spirulina*: towards technology of mineral feed supplements. *The Scientific World Journal* 1(12): 1-15.
- Doria, E., Temporiti, M. E. E., Damiani, M. C., Popovich, C. A., Leonardi, P. I. and Nielsen, E. (2018) Influence of light stress on the accumulation of xanthophylls and lipids in *Haematococcus Pluvialis* CICALA 1081 grown under autotrophic or mixotrophic conditions. *Journal of Marine Biology and Aquaculture* 4(1): 30-35.
- El-Sheekh, M. M., Khairy, H. M. and El-Shenody, R. (2012) Algal production of extra and intra-cellular polysaccharides as an adaptive response to the toxin crude extract of *Microcystis aeruginosa*. *Iranian Journal of Environmental Health Science and Engineering* 9(1): 1-7.
- El-Sheekh, M. M., Abou-El-Souod, G. W. and El Asrag, H. A. (2018) Biodegradation of some dyes by the green alga *Chlorella vulgaris* and the cyanobacterium *Aphanocapsa elachista*. *Egyptian Journal of Botany* 58(3): 311-320.
- Fatma, T. (2009) Screening of cyanobacteria for phycobiliproteins and effect of different environmental stress on its yield. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 83(4): 509-515.
- Ferreira, V. S., Pinto, R. F. and Sant'Anna, C. (2016) Low light intensity and nitrogen starvation modulate the chlorophyll content of *Scenedesmus dimorphus*. *Journal of Applied Microbiology* 120(3): 661-670.
- Fu, Y. and Viraraghavan, T. (2001) Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. *Bioresource Technology* 79(3): 251-262.
- Guevara, M., Lodeiros, C., Gómez, O., Lemus, N., Núñez, P., Romero, L. and Rosales, N. (2005) Carotenogenesis of five strains of the algae *Dunaliella* sp.(Chlorophyceae) isolated from Venezuelan hypersaline lagoons. *Revista de Biología Tropical* 53: 331-337.
- Hu, Z., Li, Y., Sommerfeld, M., Chen, F. and Hu, Q. (2008) Enhanced protection against oxidative stress in an astaxanthin-overproduction *Haematococcus* mutant (Chlorophyceae). *European Journal of Phycology* 43(4): 365-376.
- Irigoyen, J. J., Einerich, D. W. and Sánchez-Díaz, M. (1992) Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated Alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiologia Plantarum* 84(1): 55-60.

- Johnson, M. K., Johnson, E. J., MacElroy, R. D., Speer, H. L. and Bruff, B. S. (1968) Effects of salts on the halophilic alga *Dunaliella viridis*. *Journal of Bacteriology* 95(4): 1461-1468.
- Kobayashi, M., Kakizono, T. and Nagai, S. (1993) Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of a green unicellular algae, *Haematococcus pluvialis*. *Applied and Environmental Microbiology* 59(3): 867-873.
- Kobayashi, M. (2003) Astaxanthin biosynthesis enhanced by reactive oxygen species in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 8: 322-330.
- Lebron, Y. A. R., Moreira, V. R., Santos, L. V. S. and Jacob, R. S. (2018) Remediation of methylene blue from aqueous solution by *Chlorella pyrenoidosa* and *Spirulina maxima* biosorption: Equilibrium, kinetics, thermodynamics and optimization studies. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 6(5): 6680-6690.
- Lee, S. Y., Chi, Y. H., Koo, S. S., Oh, H. T., Lee, E. S., Park, J. H. and Kim, M. G. (2019) The physiological functions of universal stress proteins and their molecular mechanism to protect plants from environmental stresses. *Frontiers in Plant Science* 10: 1-13.
- Lichtenthaler, H. K. and Buschmann, C. (2001) Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* 1(1): 3-4.
- Madkour, F. F., Kamil, A. E. W. and Nasr, H. S. (2012) Production and nutritive value of *Spirulina platensis* in reduced cost media. *Egyptian Journal of Aquatic Research* 38: 51-57.
- Marshall, J. D. (1986) Drought and shade interact to cause fine-root mortality in Douglas-fir seedlings. *Plant and Soil* 91: 51-60.
- Mezzomo, N., Saggiorato, A. G., Siebert, R., Tatsch, P. O., Lago, M. C., Hemkemeier, M. and Colla, L. M. (2010) Cultivation of microalgae *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) from biological treatment of swine wastewater. *Food Science and Technology* 30(1): 173-178.
- Moraes, C. C., Sala, L., Cerveira, G. P. and Kalil, S. J. (2011) C-phycoerythrin extraction from *Spirulina platensis* wet biomass. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 28(1): 45-49.
- Movafeghi, A., Khataee, A. R., Moradi, Z. and Vafaei, F. (2016) Biodegradation of direct blue 129 diazo dye by *Spirodela polyrrhiza*: an artificial neural networks modeling. *International Journal of Phytoremediation* 18(4): 337-347.
- Novotný, Č., Dias, N., Kapanen, A., Malachová, K., Vándrovcová, M., Itävaara, M. and Lima, N. (2006) Comparative use of bacterial, algal and protozoan tests to study toxicity of azo- and anthraquinone dyes. *Chemosphere* 63(9): 1436-1442.
- Osundeko, O., Dean, A. P., Davies, H. and Pittman, J. K. (2014) Acclimation of microalgae to wastewater environments involves increased oxidative stress tolerance activity. *Plant and Cell Physiology* 55(10): 1848-1857.
- Pelah, D., Sintov, A. and Cohen, E. (2004) The effect of salt stress on the production of canthaxanthin and astaxanthin by *Chlorella zofingiensis* grown under limited light intensity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 20(5): 483-486.
- Petsas, A. S. and Vagi, M. C. (2017) Effects on the photosynthetic activity of algae after exposure to various organic and inorganic pollutants. *Chlorophyll* 37-77.
- Raof, B., Kaushik, B. D. and Prasanna, R.

- (2006) Formulation of a low-cost medium for mass production of *Spirulina*. *Biomass and Bioenergy* 30(6): 537-542.
- Rasolzadeh, F., Hashemi, P., Madadkar Haghjou, M. and Safdarian, M. (2019) *Chlorella Vulgaris* Microalgae as a green packing for the microextraction by packed sorbent of Nitrofurantoin in Urine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry Research* 6(2): 419-429.
- Rawat, I., Kumar, R. R., Mutanda, T. and Bux, F. (2011) Dual role of microalgae: phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy* 88(10): 3411-3424.
- Régnier, P., Bastias, J., Rodriguez-Ruiz, V., Caballero-Casero, N., Caballo, C., Sicilia, D. and Gueguen, V. (2015) Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* prevents oxidative stress on human endothelial cells without toxicity. *Marine Drugs* 13(5): 2857-2874.
- Renuka, N., Sood, A., Prasanna, R. and Ahluwalia, A. S. (2015) Phycoremediation of wastewaters: A synergistic approach using microalgae for bioremediation and biomass generation. *International Journal of Environmental Science and Technology* 12(4): 1443-1460.
- Rosa, M., Prado, C., Podazza, G., Interdonato, R., González, J. A., Hilal, M. and Prado, F. E. (2009) Soluble sugars: metabolism, sensing and abiotic stress: a complex network in the life of plants. *Plant Signaling and Behavior* 4(5): 388-393.
- Rudsari, N. P., Haghjou, M. M. and Ghiasvand, A. (2019) Comparative study of growth, physiological and biochemical indices of blue-green alga *Spirulina platensis* in two Zarrouk and Johnson nutrient media under vanillin treatment. *Iranian Journal of Plant Biology* 10(4): 81-110 (in Persian).
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y. and Vaca-Garcia, C. (2014) Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 35: 265-278.
- Sánchez, M., Bernal-Castillo, J., Rozo, C. and Rodríguez, I. (2003) *Spirulina (Arthrospira)*: An edible microorganism: a review. *Universitas Scientiarum* 8(1): 7-24.
- Saranya, C., Hemalatha, A., Parthiban, C. and Anantharaman, P. (2014) Evaluation of antioxidant properties, total phenolic and carotenoid content of *Chaetoceros calcitrans*, *Chlorella salina* and *Isochrysis galbana*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 3(8): 365-377.
- Saratale, R. G., Saratale, G. D., Chang, J. S. and Govindwar, S. P. (2011) Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: A review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 42(1): 138-157.
- Sasi, S., Venkatesh, J., Daneshi, R. and Gururani, M. (2018) Photosystem II extrinsic proteins and their putative role in abiotic stress tolerance in higher plants. *Plants* 7(4): 1-15.
- Sharma, P. and Dubey, R. S. (2005) Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Growth Regulation* 46(3): 209-221.
- Sharma, K. K., Schuhmann, H. and Schenk, P. M. (2012) High lipid induction in microalgae for biodiesel production. *Energies* 5(5): 1532-1553.
- Sharma, P. and Dubey, R. S. (2019) Protein synthesis by plants under stressful conditions. In: *Handbook of plant and crop stress* (Ed. Pessaraki, M.) 469-487. CRC Press, Boca Raton.

- Singh, S. P. and Singh, P. (2015) Effect of temperature and light on the growth of algae species: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 50, 431-444.
- Smirnoff, N. and Colombe, S. V. (1988) Drought influences the activity of enzymes of the chloroplast hydrogen peroxide scavenging system. *Journal of Experimental Botany* 39: 1097-1108.
- Tannin-Spitz, T., Bergman, M., van-Moppes, D., Grossman, S. and Arad, S. M. (2005) Antioxidant activity of the polysaccharide of the red microalga *Porphyridium* sp. *Journal of Applied Phycology* 17(3): 215-222.
- Walsh, G. E. (1988) Principles of toxicity testing with marine unicellular algae. *International Journal of Environmental Toxicology and Chemistry* 7(12): 979-987.
- Yaakob, Z., Ali, E., Zainal, A., Mohamad, M. and Takriff, M. S. (2014) An overview: biomolecules from microalgae for animal feed and aquaculture. *Journal of Biological Research-Thessaloniki* 21(6): 1-10.
- Yaseen, D. A. and Scholz, M. (2019) Textile dye wastewater characteristics and constituents of synthetic effluents: A critical review. *International Journal of Environmental Science and Technology* 16(2): 1193-1226.
- Zavřel, T., Sinetova, M. A. and Červený, J. (2015) Measurement of chlorophyll a and carotenoids concentration in cyanobacteria. *Bio-protocol* 5(9): 1-5.
- Zhang, W. W., Zhou, X. F., Zhang, Y. L., Cheng, P. F., Ma, R., Cheng, W. L. and Chu, H. Q. (2018) Enhancing astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* by coupled light intensity and nitrogen starvation in column photobioreactors. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 28(12): 2019-2028.