Journal of Health

Vol. 9, No. 4, Autumn 2018, Pages 423-431

Investigation the Effects of Humic Acid on Growth Rate and Active Oxygen Radicals (ROS) Production in Chlorella Vulgaris Algae

Mehrasbi M.R[1], Fathi P*[2], Hosseini M.J[4,3], Sadeghi G[5]

1. Associate Professor of Environmental Health, School of Health, Zanjan University of Medical Sciences (ZUMS), Zanjan, Iran.
2. Graduate student of environmental health, School of Health, Zanjan University of Medical Sciences (ZUMS), Zanjan, Iran.
3. Zanjan Applied Pharmacology Research Center, Zanjan University of Medical Sciences (ZUMS), Zanjan, Iran.
4. Associate Professor of Toxicology/Pharmacology, School of Pharmacy, Zanjan University of Medical Sciences (ZUMS), Zanjan, Iran.
5. Assistant Professor of Environmental Health, School of Health, Zanjan University of Medical Sciences (ZUMS), Zanjan, Iran.

* Corresponding author. Tel: +989379014420, E-mail: fathi.parvin@yahoo.com

Received: Aug 23, 2017 Accepted: Apr 15, 2018

ABSTRACT

***Background & objectives**:* Natural organic matter, which is considered the main pollutant of drinking water, is recently increasing. Therefore, assessing the biological effects of these compounds is very important. Algae with a short growth cycle, separate cultivation and high sensitivity to pesticides are among the most important species in assessing the biological effects of pesticides in the environment. The aim of this study was to determine the effects of different concentration of humic acid (4-132 mg/L) on the cell growth rate and Reactive Oxygen Species (ROS) production in Chlorella Vulgaris.

Methods: Algae cells of chlorella species were added to the culture medium with relative density of 1×10^5 cells/ml and different concentrations of humic acid. The number of algae was counted daily and the amount of intracellular active oxygen species was assessed by fluorometric test.

Results: Humic acid at low concentrations (4 mg/l) causes a significant increase in algae growth in 48 hours ($p<0.05$), but higher concentrations (8 ≤ mg/l) and duration time (≥72h), show a toxic effect on algae. However, higher concentrations (≥8 mg/l) and duration time (≥72h) showed toxicity effect on alge. In addition, in the presence of humic acid, the intracellular ROS level significantly increased compared to the control group ($p<0.05$).

Conclusion: Oxidative stress seems to have oxidative stress effects on chlorella algae. These effects are decreasing the relative growth rate and the constant growth rate of algae and increasing intracellular ROS formation.

Keywords: Humic Acid; Toxicity; Chlorella Algae; ROS

بررسی اثر اسیدهیومیک بر میزان رشد و تغییرات رادیکال‌های فعال اکسیژن (ROS) در جلبک کلرلا ولگاریس (*Chlorella vulgaris*)

محمدرضا مهراسبی[۱]، پروین فتحی[۲]*، میر جمال حسینی[۳،٤]، غلامرضا صادقی[۵]

۱. دانشیار گروه بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی زنجان
۲. دانشجوی کارشناسی ارشد بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی زنجان
۳. مرکز تحقیقات فارماکولوژی کاربردی زنجان، دانشگاه علوم پزشکی زنجان
٤. دانشیار گروه سم شناسی/ فارماکولوژی، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی زنجان
۵. استادیارگروه بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی زنجان
* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۹۳۷۹۰۱٤٤۲۰ ایمیل: fathi.parvin@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: در سال‌های اخیر حضور مواد آلی طبیعی که بعنوان عمده ترین آلاینده‌های آب‌های سطحی تامین کننده آب شرب محسوب می‌شوند، بطور فزاینده ای در حال افزایش می‌باشد. در نتیجه نیاز ضروری جهت ارزیابی اثرات بیولوژیکی این ترکیبات روز بروز افزایش می‌یابد. از طرفی جلبک‌ها با چرخه رشد کوتاه، قابلیت کشت جداگانه و حساسیت بالا نسبت به سموم، از مهمترین گونه‌ها در ارزیابی اثرات بیولوژیک سموم در محیط زیست می‌باشند. هدف از این مطالعه، بررسی تاثیرات اسید هیومیک در غلظت‌های مختلف (٤-۳۲mg/l) بر رشد و تغییرات رادیکال‌های فعال اکسیژن در جلبک کلرلا می‌باشد.

روش کار: سلول‌های جلبکی گونه کلرلا با تراکم نسبی ۱×۱۰^{۵} سلول در هر میلی لیتر و غلظت‌های مختلف اسیدهیومیک به محیط کشت اضافه گردید. تعداد جلبک‌ها بصورت روزانه شمارش و میزان گونه‌های اکسیژن فعال درون سلولی، توسط آزمون فلوریمتریک بررسی شد.

یافته ها: اسید هیومیک در غلظت های کم (٤ mg/l) در مدت ٤٨ ساعت سبب افزایش معنی‌دار رشد جلبک‌ها گردید ($p<۰/۰۵$)، اما غلظت‌های بالاتر (≥۸ mg/l) و بعد از مدت ۷۲ ساعت، اثر سمی بر روی جلبک نشان داد. همچنین در حضور اسیدهیومیک، مقدار ROS درون سلولی نسبت به گروه کنترل بطور معنی‌داری افزایش یافت ($p<۰/۰۵$).

نتیجه گیری: بنظر می‌رسد اسیدهیومیک اثر استرس اکسیداتیو بر روی جلبک کلرلا داشته و اثرات آن بصورت کاهش درصد رشد نسبی و ضریب ثابت رشد جلبک‌ها و افزایش تولید ROS درون سلولی جلبک قابل مشاهده است.

واژه های کلیدی: اسیدهیومیک، سمیت، جلبک کلرلا، رادیکال‌های فعال اکسیژن

دریافت: ۹۶/۶/۱ **پذیرش:** ۹۷/۱/۲۶

مقدمه

ریزجلبک‌ها یا فیتوپلانکتون‌ها نقش مهمی در اکوسیستم‌های آبی و زنجیره‌های غذایی در آبها ایفا می‌کنند و عملا بدون وجود آنها عملکرد کلیه زنجیره‌ها و شبکه‌های غذایی موجود در آبها مختل می‌گردد. این موجودات با تثبیت نیتروژن، فسفر و کربن، مهمترین نقش‌های طبیعی را در حذف ترکیبات آلی از محیط‌های آبی فراهم می‌نمایند (۲،۱). در این بین کلرلا ولگاریس یکی از مشهورترین ریزجلبک‌ها است که ساکن آب‌های شیرین می‌باشد و از لحاظ عملکردی مشابه گیاهان بوده و از فعال‌ترین موجودات فتوسنتزکننده با تراکم بالای کلروفیل است

(۳). مزایای استفاده از این گونه شامل سرعت بالای رشد و تکثیر در شرایط گوناگون زیستی می‌باشد که آن را مدلی مطلوب در ارزیابی سمیت سموم و ترکیبات شیمیایی معرفی می‌نماید (٤).

حضور مواد آلی طبیعی از جمله اسیدهیومیک در آب عملا بسیاری از پارامترهای کیفی و کمی فرایندهای تصفیه آب را تحت تأثیر قرار می‌دهد. این ترکیبات در مواجهه با کلر طی فرایند گندزدایی قادر به تولید تری‌هالو متان‌ها بوده که یک ترکیب سرطان‌زای گروه ۱ می‌باشند. از طرفی این ترکیبات قادرند با فلزات و ترکیبات آلی هیدروفوبیک نظیر آفت‌کش‌ها و ترکیبات دارویی ترکیب شده و با افزایش حلالیت آنها باعث انتقال و جابجایی بیشتر در محیط‌های آبی شده و عملاً مواجهه بیشتر انسان را با این ترکیبات سبب می‌شوند (۵). عملکرد اسیدهیومیک که در نتیجه تجزیه گیاهان و باقیمانده‌های آلی ایجاد می‌گردند وابسته به گروه‌های عاملی فنل و کربوکسیلیک‌ها می‌باشد که منجر به رشد گیاهان، ترکیب با فلزات سنگین و فعالیت‌های باکتریایی می‌شود (۶).

مطالعات انجام گرفته در خصوص تاثیر مواد آلی طبیعی بر روی میکروارگانیسم‌ها، اثرات متفاوتی از مواد آلی را در محیط توصیف می‌کنند. برخی از مطالعات نشان دادند که مواد آلی طبیعی سبب تحریک رشد میکروارگانیسم‌های مختلف می‌شود (۸,۷)، در حالی‌که مطالعه دیگری نشان داد مواد آلی طبیعی سبب افزایش قابل توجهی در عوامل استرس اکسیداتیو گردیده و قدرت آنتی اکسیدانی سلول را کاهش داده و سبب مرگ ارگانیسم‌ها می‌شود (۹). در مطالعه دیگری نیز نشان داده شد اسیدهیومیک سبب مرگ سیانوباکترها می‌شود (۱۰). همچنین نتایج مطالعه محققین دیگر اثرات دوگانه ای از اسیدهیومیک نشان داده، بدین‌گونه که اسیدهیومیک در غلظت‌های کم سبب رشد جلبک‌ها می‌شود اما در غلظت‌های بالا رشد جلبک‌ها را مهار می‌کند (۱۱).

تاکنون مطالعات بسیار اندکی بر تاثیر مستقیم سمیت ترکیبات آلی طبیعی بر ارگانیسم‌های زنده صورت گرفته است. لذا در این تحقیق تاثیر اسیدهیومیک بعنوان یک جزء مهم از مواد آلی طبیعی بر جلبک کلرلا بعنوان یکی از ارگانیسم‌های شاخص ارزیابی سمیت، مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار

سلول‌های جلبکی گونه کلرلا به صورت ویال از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی ایران خریداری شد. در این مطالعه از محیط کشت BBM مناسب برای رشد جلبک کلرلا استفاده گردید (۱۲). اسیدهیومیک از شرکت سیگما خریداری شد و محلول استوک اسیدهیومیک (۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر) تهیه گردید. برای این کار ٤ گرم NaOH در ۵۰۰ سی سی آب مقطر حل و سپس ۱ گرم اسیدهیومیک به محلول تهیه شده اضافه شد و حجم محلول به ۱ لیتر رسانده شد و بمدت ۲٤ ساعت بر روی همزن مغناطیسی در دمای اتاق قرار گرفت تا بخوبی همگن شود. سپس pH آن بر روی ۷ تنظیم شد و در نهایت از صافی عبور داده شد و به یخچال انتقال داده شد (۱۳). استوک مورد نظر برای ۱۵ روز کاملاً پایدار بود و در نهایت محلول‌های روزانه از محلول مادر (استوک) تهیه گردید.

شمارش سلولی: تعداد اولیه سلول جلبکی در حدود ۱×۱۰^{۵} cell/ml توسط لام هموسیتومتر شمارش شد. برای محاسبه تعداد جلبک در هر میلی لیتر از رابطه زیر استفاده گردید.

$$\text{تعداد سلول در هر میلی لیتر} = \text{تعداد کل سلول شمارش شده} \times \frac{\text{ضریب رقت}}{\text{تعداد مربع های شمارش شده}} \times 10000$$

سپس محلول جلبک‌های شمارش شده به ارلن‌های ۲۵۰cc حاوی محیط کشت و مواد آزمون (اسیدهیومیک)، در زیر هود اضافه گردید. حجم کلی محلول نهایی هر ارلن ۱۰۰ ml در نظر گرفته شد. سپس ارلن‌ها به مدت ٤ روز در داخل شیکر زیر نور مناسب قرار گرفتند. سلول‌های جلبکی در فواصل زمانی ۲٤ ساعته شمارش شدند و درصد رشد نسبی (G) و ثابت سرعت رشد (K) جلبک‌ها برای هریک از گروه‌ها با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه گردید.

رابطه ۱)

$$G = \text{درصد رشد نسبی } G - \left[\frac{N}{N_0}\right] * 100$$

درصد رشد نسبی، N = تعداد سلول شمارش شده، N_0 = تعدادسلول اولیه

رابطه ۲)

$$\text{ثابت سرعت رشد } K = \mathrm{Ln}(n/n_0)\Big/_{t}$$

K = ثابت سرعت رشد، n = تعداد سلول شمارش شده، n_0 = تعدادسلول اولیه

با استفاده از از یافته‌های مطالعه نمودار $\mathrm{Ln}(n/n_0)$ در مقابل t رسم شد و مقدار K از روی شیب منحنی رسم شده بدست آمد. آنالیز آماری نیز توسط نرم‌افزار سیگما پلات[1] ویرایش ۱۲ و آزمون توکی[2] انجام گرفت. لازم بذکر است که مواد مورد نیاز تهیه محیط کشت بصورت اولیه در شرایط فشار ۰/۱ MPa به مدت ۲۰ دقیقه استریل شدند و محیط شاهد (کنترل) نیز بعنوان معیار مقایسه ای بکار گرفته شد و درصد رشد نسبی، ضریب ثابت رشد و میزان ROS سلول‌های جلبکی بعنوان متغیر وابسته در مقابل متغیر مستقل غلظت اسیدهیومیک مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

اندازه گیری رادیکال‌های فعال اکسیژن (ROS)

میزان ROS درون سلولی تولید شده به کمک آزمون فلوریمتریک با استفاده از اکسیداسیون درون سلولی (H_2DCF-DA) تعیین شد (۱۱). برای این کار ابتدا جلبک‌ها به مدت ٤ روز در محیط کشت BBM[3] در گروه کنترل و سایر گروه‌های تیمار کشت داده شدند. سپس مقدار ۵۰ سی سی از سوسپانسیون‌های فوق بمدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ گردید (٤۰۰۰rpm). مایع رویی دور ریخته شد و جلبک‌های ته نشین شده ۲ بار با محیط کشت BBM شستشو داده شدند و دوباره به حجم ۵۰ سی سی رسانده شد. سپس ۱۰ میکرومولار (H_2DCF-DA) به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی به محیط افزوده شد و شدت فلورسانس با اسپکتروفلوریمتر در طول موج تحریکی ٤۹۵ نانومتر و طول موج نشری ۵۲۵ نانومتر اندازه‌گیری گردید و در نهایت میزان نسبی ROS نسبت به گروه کنترل محاسبه گردید و توسط نرم افزار سیگما پلات با آزمون توکی مورد آنالیز آماری قرار گرفت.

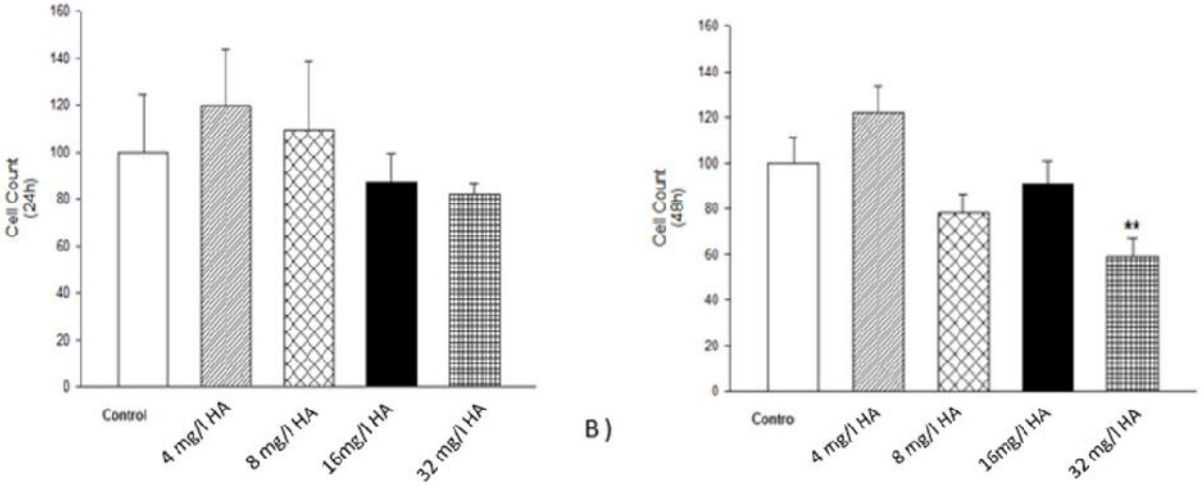
یافته‌ها

تاثیر اسیدهیومیک بر تغییرات رشد سلولی در جلبک کلرلا

افزودن غلظت‌های متفاوت اسیدهیومیک (۳۲- ٤ میلی گرم بر لیتر) به محیط کشت جلبک نشان داد که غلظت‌های ٤ و ۸ میلی گرم بر لیتر اسیدهیومیک، طی مدت ٤۸ ساعت بعنوان مواد غذایی جلبک عمل کرده و سبب افزایش درصد رشد نسبی جلبک‌ها میگردد، در حالی‌که بعد از ۷۲ ساعت کاهش درصد رشد نسبی جلبک‌ها بطور معنی‌داری مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). بعلاوه غلظت ۳۲ میلی گرم بر لیتر اسیدهیومیک بعد از گذشت ٤۸ ساعت درصد رشد نسبی را بطور معنی‌داری کاهش داد ($p<۰/۰۵$). این درحالی است که تمامی غلظت‌های بکار گرفته شده در این مطالعه بعد از ۷۲ ساعت درصد رشد نسبی را بطور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش دادند ($p<۰/۰۵$) که نشان‌دهنده سمیت وابسته به غلظت و زمان ناشی از ترکیب اسیدهیومیک می‌باشد (شکل ۱).

[1] Sigma Plot Instat-18
[2] Tukey
[3] Bold's Basal Medium (Modified)

در نهایت درصد رشد نسبی جلبک کلرلا پس از ۹۶ ساعت مواجهه در مقابل غلظت‌های مختلف اسیدهیومیک رسم گردید و IC_{50} اسیدهیومیک برابر با ۲۵ میلی‌گرم بدست آمد.



شکل ۱. اثر اسیدهیومیک بر میزان رشد سلولی در بازه‌های زمانیA) ۲۴ ساعت B) ۴۸ ساعت C)۷۲ ساعت D (۹۶ ساعت. نتایج بصورت Mean±SD گزارش گردیده است. نتایج، حاصل تکرار حداقل سه آزمایش می‌باشد. $p<0.01$ ** و $p<0.001$ * نشان دهنده تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل است.**

تاثیر اسیدهیومیک بر ضریب ثابت رشد جلبک کلرلا

ضریب ثابت رشد برای جلبک کلرلا در تمامی غلظت‌های تیمار شده با اسیدهیومیک در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بر اساس رابطه ثابت سرعت رشد بر اساس رابطه ۲، نشان داد که بعد از ۷۲ ساعت ضریب رشد جلبکی در همه گروه‌های تحت تیمار نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری یافته است. جدول ۱، میانگین ضریب ثابت رشد جلبک کلرلا را بعد از مواجهه با غلظت‌های مختلف اسیدهیومیک نشان می‌دهد. سپس معادله سینیتیک رشد جلبک کلرلا بر اساس $\mathrm{Ln}(n/n_0)$ برای غلظت‌های مختلف اسیدهیومیک در مقابل زمان تعیین گردید. نتایج نشان داد که ضریب رشد بدست‌آمده توسط معادلات اخیر تفاوت معنی‌داری با ضریب رشد حاصل از محاسبات نقطه به نقطه‌ای آزمایشات نداشته است. بنابراین مدل‌های بدست‌آمده قابل اعتماد می‌باشند. از طرفی تعداد جلبک‌های حاصل از آزمایشات با تعداد جلبک‌های حاصل از محاسبات مدل‌ها نیز با یکدیگر مقایسه شدند. در جدول ۲ مشاهده می‌شود که ضریب رگرسیون بین این مقادیر بالاتر از ۰/۹ می‌باشد.

جدول ۱. میانگین K نتایج آزمایشات سمیت اسیدهیومیک بر روی جلبک کلرلا

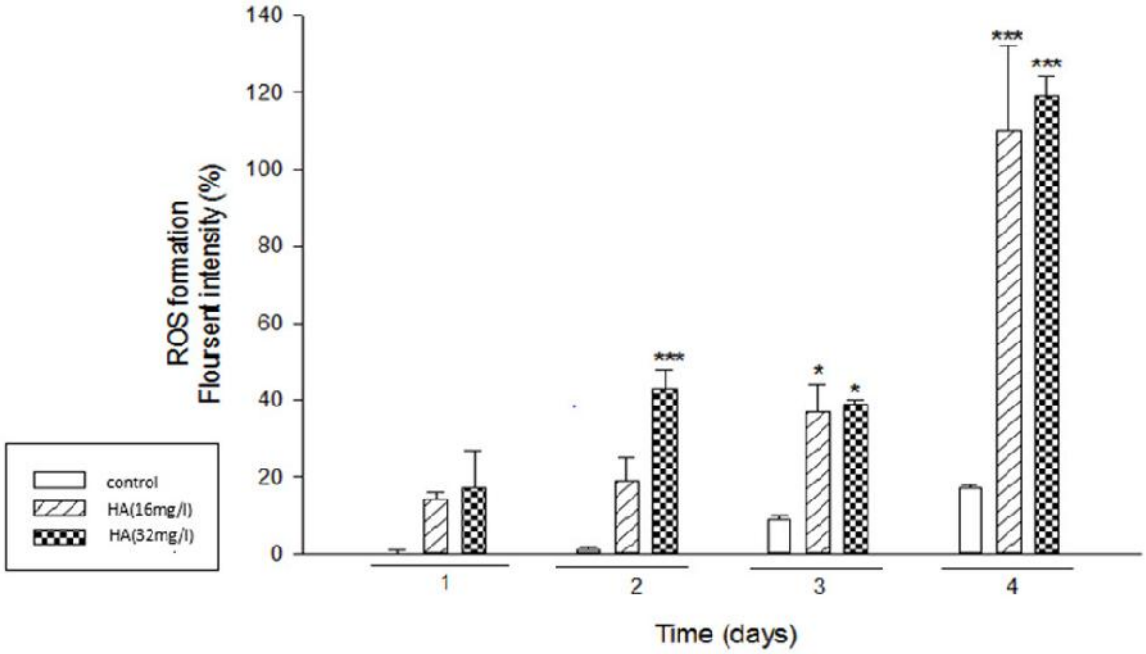
گروه	۲۴ ساعته	۴۸ ساعته	۷۲ ساعته	۹۶ ساعته
(میلی گرم بر لیتر)	K	k	K	K
کنترل	۰/۳۷	۰/۶۸	۰/۸	۰/۷۵
۴	۰/۵۶	۰/۷۸	۰/۶۵	۰/۶۶
۸	۰/۴۷	۰/۵۶	۰/۶۳	۰/۶۳
۱۶	۰/۲۲	۰/۶۳	۰/۶۵	۰/۶۲
۳۲	۰/۱۸	۰/۴۲	۰/۵۲	۰/۵۴

جدول ۲. معادله سینیتیک رشد جلبک کلرلا در مواجهه با غلظت‌های مختلف اسیدهیومیک

همبستگی(R^2) بین تعداد جلبک‌های شمارش شده و جلبک‌های پیش بینی شده با مدل	میانگین k حاصل از محاسبات نقطه به نقطه آزمایشات	R^2	K حاصل از مدل	معادله	گروه (میلی گرم بر لیتر)
۰/۹۹۹	۰/۷۴	۰/۹۷۳	۰/۸۱	$y = ۰/۸۱۳۶x + ۰/۱۸۸$	۰
۰/۹۹۲	۰/۷	۰/۹۷۴	۰/۵۴	$y = ۰/۵۴۰۵x + ۰/۴۲۶۳$	۴
۰/۹۹۵	۰/۶۱	۰/۹۹۵	۰/۶۹	$y = ۰/۶۹۵۲x + ۰/۲۴۷۱$	۸
۰/۹۹۵	۰/۶۳	۰/۹۹۴	۰/۶	$y = ۰/۵۹۸۵x + ۰/۰۹۶۱$	۱۶
۰/۹۹۷	۰/۴۹	۰/۹۹۷	۰/۶۶	$y = ۰/۶۵۹۴x + ۰/۴۶۴$	۳۲

تاثیر اسیدهیومیک بر میزان ROS تولید شده در جلبک کلرلا

تعیین رادیکال‌های آزاد اکسیژن بعنوان یکی از بازیگردان‌های اصلی پدیده استرس اکسیداتیو با استفاده از روش فلوریمتری و در مقایسه با گروه کنترل انجام شد. نتایج حاصل نشان داد که اسیدهیومیک قادر است در غلظت‌های بالا (۳۲ میلی‌گرم بر لیتر)، بعد از ۴۸ ساعت سبب افزایش معنی‌دار در تولید ROS نسبت به گروه کنترل گردد. همچنین این افزایش معنی‌دار در بازه زمانی ۷۲ و ۹۶ ساعت نیز در هر کدام از گروه‌های تیمارشده قابل ملاحظه بود.



شکل ۲. اثر اسیدهیومیک بر میزان تولیدROS در بازه‌های زمانی(A ۲۴ ساعت B) ۴۸ ساعت C)۷۲ ساعت D (۹۶ ساعت. نتایج بصورت Mean±SD گزارش گردیده است. نتایج، حاصل تکرار حداقل سه آزمایش می‌باشد. $p<0.05$ * و $p<0.01$ ** و $p<0.001$ * نشان دهنده تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل است.**

بحث

در این مطالعه تاثیر اسیدهیومیک محلول بر ضریب رشد و میزان تولید ROS در سلول‌های جلبک کلرلا اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان دادند که اسیدهیومیک به تنهایی در مدت ۴۸ ساعت و در غلظت‌های کمتر از ۴ میلی گرم بر لیتر در

محیط کشت جلبک بعنوان ماده غذایی عمل کرده و رشد جلبک‌ها را افزایش می‌دهد به گونه ای که ضریب رشد جلبک را از ۰/۳۷ در گروه کنترل به ۰/۵۶ در مدت ۲٤ ساعت و از ۰/۶۸ به ۰/۷۸ در مدت ٤۸ ساعت افزایش داد. با افزایش غلظت از ۸ تا ۳۲ میلی‌گرم بر لیتر و همچنین با گذشت زمان تا ۹۶ ساعت، اسیدهیومیک بر جلبک‌ها اثر سمیت نشان داده و ضریب ثابت رشد جلبک‌ها را نسبت به گروه کنترل کاهش داد. به گونه ای که در مدت ۹۶ ساعت، IC_{50}=۲۷ میلی گرم بر لیتر برای اسیدهیومیک محاسبه شد و ضریب ثابت رشد از ۰/۷۵ در گروه کنترل به ۰/٥٤ در گروه تیمار با غلظت ۳۲ میلی‌گرم بر لیتر اسیدهیومیک کاهش یافت. بعلاوه نتایج حاصل از ROS درون سلولی جلبک نشان داد که اسیدهیومیک در غلظت‌های بیش از ۳۲ میلی‌گرم بر لیتر بعد از مدت زمان ٤۸ ساعت قادر است میزان تولید ROS را بصورت معنی‌داری افزایش دهد و البته با گذشت زمان نیز تولید ROS در غلظت‌های کمتر از ۱۶ میلی‌گرم بر لیتر نیز مشاهده گردید، بطوری‌که میزان تولید ROS در غلظت ۱۶ میلی‌گرم بر لیتر بعد از ۷۲ ساعت، ۳۷ درصد نسبت به گروه کنترل افزایش یافت که تایید‌کننده نتایج حاصل از کاهش ضریب ثابت رشد جلبک‌ها است.

یافته‌های حاصل از مطالعات در خصوص اسیدهیومیک نشان می‌دهد، اسیدهیومیک در تولید فرایند فتوسنتز، مواد شیمیایی و هورمون‌ها دخالت کرده و اثرات شبه‌هورمون از خود نشان می‌دهد. این فرایند قادر است برخی از ژن‌های موجود در نماتودهای موجود در کمپوست‌ها را تغییر داده و در شرایط استرس‌زا قرار دهد. این شرایط القاءِ استرس اکسیداتیو یا بهم‌ریختگی هموستاز سلولی شامل: تعامل با غشاءِ، اختلالات عملکرد یونی، فعالسازی یک سری پروتئین‌های خاص از قبیل پروتیئن‌های شوک حرارتی (HSP)، در سلول می‌باشد. از طرفی نتایج مطالعات قبلی نشان داده است که اسیدهیومیک می‌تواند اثرات مثبت و منفی متفاوتی بر عملکرد میکرو ارگانیسم‌ها داشته باشد (۱٤).

هوس[1] و همکاران بیان داشتند اثرات ترکیبات آلی محلول DOM[2] بر فرایند تولید مثل نماتودها (*C.elegans*)، بسته به منبع و غلظت DOM نتایج متفاوتی را در شرایط متفاوت نشان می‌دهد. نتایج این مطالعه نشان داد اسید فولویک جدا شده از پساب فاضلاب، تولید مثل *C. elegans* را تحریک می‌کند، در حالی که فرم جدا شده از آب‌های زیرزمینی تأثیری بر تولید مثل نماتودها ندارد. بنظر می‌رسد بین غلظت مواد آلی طبیعی و اثرات منفی تولید مثل ناشی از ترکیبات آلی در دریاچه‌های هیومیکی ارتباط مستقیم وجود دارد. از طرفی اندازه سلولی و فعالیت باکتریایی این ترکیبات تغییر قابل ملاحظه ای نشان نداد بجز اسید فولویک که باعث کاهش معنی‌داری در فعالیت باکتری بعد از گذشت ۷۲ ساعت گردید. بنظر می‌رسد این اثر می‌تواند ناشی از فعالیت باکتریایی پایین در این تیمار بوده یا ناشی از اثرات سمی مستقیم خود DOM باشد. البته پیشنهاد شده است اثرات مثبت DOM بدلیل ساختار آلی این ترکیب بعنوان یک منبع کربن اضافی یا منبع مواد مغذی موثر بر تولید مثل C. elegans می‌باشد (۷).

مطالعه دیگری همبستگی مثبت بین توده باکتریایی و محتوای اسیدهیومیک و پارامتر pH را در باکتری‌های آبزی نشان داد. این نتایج در حقیقت نقش ترکیبات هیومیک در تولید ثانویه آبزی را تایید می‌کند (۸).

مِیر[3] و همکاران بیان داشتند ترکیبات کربنه محلول (DOC) با وزن مولکولی بالا قادرند رشد باکتری‌ها را نسبت به فرم‌های با وزن مولکولی متوسط بیشتر افزایش دهند و کلونی‌های بزرگتری تشکیل دهند، در حقیقت این ترکیبات قادرند منابع زیستی را برای پروتوزوئیدها و سطوح بالاتر از زنجیره غذایی

[1] Höss
[2] Dissolved Organic Mater
[3] Meyer

میکروبی رودخانه فراهم کنند (۱۵). آرووولا[1] و همکاران اثرات مواد آلی محلول طبیعی (DOM) از جمله آلوچتونوس بر رشد باکتری‌ها و جلبک‌ها از یک دریاچه را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد نرخ رشد، تعداد سلول و بیومس باکتری‌ها در حضور DOM بطور قابل توجهی بالاتر از کشت‌های بدون DOM بوده است. بنظر می‌رسد DOM آلوچتونوس ممکن است به شدت بر ساختار و عملکرد زنجیره غذایی پلانکتون در دریاچه‌های هومیک تاثیر گذاشته باشد (۱۶).

تیموفیوا[2] و همکاران نشانگرهای استرس اکسیداتیو، مانند لیپید پراکسیداسیون، غلظت پراکسید هیدروژن داخل سلولی، فعالیت پراکسیداز، کاتالاز و گلوتاتیون S- ترانسفراز را در سخت پوستان آب شیرین مثل دافنی اندازه‌گیری کردند. قرارگرفتن این حیوانات سخت پوست در معرض مواد آلی طبیعی (NOM)[3] باعث افزایش قابل توجهی در فاکتورهای استرس اکسیداتیو و همچنین کاهش قدرت آنتی اکسیدانی در این موجودات گردید. البته در ابتدای مواجهه میزان ROS سلولی بطور معنی‌داری کاهش یافت که نشان‌دهنده اثرات آنتی اکسیدانی است ولی در مرحله دوم افزایش میزان H_2O_2 باعث تخریب ساختارهای چربی در سلول‌ها، آسیب و حتی مرگ ارگانیسم شد که ناشی از القای استرس اکسیداتیو می‌باشد (۹).

مطالعه دیگری اثرات سمی اسیدهیومیک بر سیانوباکترها را به دو عامل تاخیر رشد جلبک و کاهش رشد ماکزیمم نسبت دادند که باعث تکه‌تکه‌شدن و نابودی سلول‌ها می‌گردد، البته هیچ مکانیسم سمیتی را برای اسیدهیومیک ارائه ندادند، اما بنظر می‌رسد تابش اشعه UV در محیط کشت از طریق واکنش‌های فنتونی سبب ایجاد رادیکال‌های آزاد و بروز استرس اکسیداتیو شده و با آسیب به غشای سلولی باعث مرگ سلول می‌شوند (۱۰).

یافته‌های حاصل از این مطالعه با نتایج مطالعه لین[4] و همکاران مطابقت داشته که بیان کردند غلظت‌های کمتر از ۵ میلی گرم بر لیتر اسیدهیومیک در محیط کشت، بعنوان منبع کربن عمل کرده و رشد میکروارگانیسم‌ها را بهبود می‌بخشد و با افزایش اسیدهیومیک از ۵ میلی گرم بر لیتر عملاً رشد جلبک مهار می‌گردد (۱۱).

نتیجه گیری

با توجه به کاهش ضریب ثابت رشد و درصد رشد نسبی و افزایش تولید ROS درون سلولی جلبک کلرلا در حضور اسیدهیومیک، می‌توان استرس اکسیداتیو را علت سمیت ناشی از این ماده در جلبک کلرلا دانست.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از یافته‌های پایان نامه کارشناسی ارشد با عنوان «تاثیر اسیدهیومیک محلول و پیش جذب شده بر روی سمیت نانو ذرات اکسید مس در جلبک کلرلا» مصوب معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی زنجان در سال ۹۴ با کد A-۱۲-۱۹۵-۹ می‌باشد. نویسندگان بدین وسیله از مسئولین محترم دانشگاه علوم پزشکی زنجان به جهت حمایت مالی از این طرح تقدیر و تشکر می‌نمایند.

[1] Arvola
[2] Timofeyeva
[3] Natural Organic Matter
[4] Lin

References

1- Riahi HSN, Shokravi SH. Study on alge florid on orumieh' s lake. Research and construction. 1994; 7: 23-25.
2- Moreno-Garrido I. Microalgae immobilization: current techniques and uses. Bioresource technology. 2008;99(10):3949-64.
3- Reza SBA, Parvaneh T .Investigation on the inhibitory effects of Chlorella vulgaris algae extract on Bacillus subtilis bacteria in laboratory culture.
4- Sing V, Pondy P, Jin D. Alges. Translator: Marandis, Gonobad.1998:1-33-2-264.
5- Hyung H, Kim JH. Natural organic matter (NOM) adsorption to multi-walled carbon nanotubes: effect of NOM characteristics and water quality parameters. Environmental science & technology. 2008;42(12):4416-21.
6- Imai D, Dabwan AH, Kaneco S, Katsumata H, Suzuki T, Kato T, et al. Degradation of marine humic acids by ozone-initiated radical reactions. Chemical Engineering Journal. 2009;148(2):336-41.
7- Höss S, Bergtold M, Haitzer M, Traunspurger W, Steinberg CE. Refractory dissolved organic matter can influence the reproduction of Caenorhabditis elegans (Nematoda). Freshwater Biology. 2001;46(1):1-10.
8- Hessen DO. The relation between bacterial carbon and dissolved humic compounds in oligotrophic lakes. FEMS Microbiology Letters. 1985;31(4):215-23.
9- Timofeyev MA, Shatilina ZM, Kolesnichenko AV, Bedulina DS ,Kolesnichenko VV, Pflugmacher S, et al. Natural organic matter (NOM) induces oxidative stress in freshwater amphipods Gammarus lacustris Sars and Gammarus tigrinus (Sexton). Science of the total environment. 2006;366(2):673-81.
10- Sun B-k, Tanji Y, Unno H. Influences of iron and humic acid on the growth of the cyanobacterium Anabaena circinalis. Biochemical Engineering Journal. 2005;24(3):195-201.
11- Lin D, Ji J, Long Z, Yang K, Wu F. The influence of dissolved and surface-bound humic acid on the toxicity of TiO 2 nanoparticles to Chlorella sp. Water research. 2012;46(14):4477-87.
12- Stein J. Handbook of Phycological methods: Culture methods and growth measurements. Cambridge University Press.1979: 448.
13- Chen KL, Elimelech M. Influence of humic acid on the aggregation kinetics of fullerene (C 60) nanoparticles in monovalent and divalent electrolyte solutions. Journal of Colloid and Interface Science. 2007;309(1):126-34.
14- Steinberg CE, Meinelt T, Timofeyev MA, Bittner M, Menzel R. Humic substances. Environmental Science and Pollution Research. 2008;15(2):128.
15- Meyer JL, Edwards RT, Risley R. Bacterial growth on dissolved organic carbon from a blackwater river. Microbial Ecology. 1987;13(1):13-29.
16- Arvola L, Tulcnen T. Effects of allochthonous dissolved organic matter and inorganic nutrients on the growth of bacteria and algae from a highly humic lake. Environment International. 1998;24(5-6):509-20.