بهره‌برداری و پرورش آبزیان
جلد هفتم، شماره چهارم، زمستان ۱۳۹۷
http://japu.gau.ac.ir
DOI: 10.22069/japu.2019.11637.1313

بررسی اثر آلودگی فلز سنگین سرب بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریز جلبک *Spirulina Platensis*

***زهرا عرب بالاجلینی[۱]، سید عباس حسینی[۲]، رسول قربانی[۳] و صادق آتشی[۴]**

[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد شیلات بوم‌شناسی آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،
[۲]استاد گروه تولید و بهره‌برداری شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،
[۳]دانشیار گروه تولید و بهره‌برداری شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،
[۴]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۵/۲۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۶/۲۳

چکیده

وجود انواع مختلف ترکیباتی از جمله رنگدانه‌هایی نظیر کاروتنوئیدها و ترکیبات فنولی باعث بروز عملکرد آنتی‌اکسیدانی می‌شوند. ریز جلبک اسپیرولینا به‌علت سطوح بالای رنگدانه فایکوسیانین و ترکیبات فنولی فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی از خود نشان می‌دهد. عوامل بسیاری در بروز تنش در ریزجلبک‌ها مؤثرند؛ که باعث تغییر در ترکیبات درونی ریز جلبک‌ها می‌شوند. یکی از مهم‌ترین این عوامل تنش شوری است که جزء فاکتورهای محیطی است، که باعث تغییرات بسیاری در ساختمان و مواد مغذی ریز جلبک‌ها می‌شود. در این کار تحقیقاتی فعالیت آنتی‌اکسیدانی ناشی از ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی آن، تحت تأثیر غلظت‌های مختلف نمک برآورد شد. نتایج حاکی از آن بود که تنش شوری اثرات قابل توجهی بر روی میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریز جلبک اسپیرولینا و ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی آن می‌گذارد. کمترین میزان رشد در گروه شاهد دیده شد و بیشترین میزان رشد ویژه در غلظت ۰/۰۲ نمک دیده شد و همچنین بیشترین میزان ترکیبات فنولی در روز ششم همه تیمارها دیده شد. در مورد محتوای فلاونوئیدی بیشترین میزان مربوط به روز ششم شاهد بوده و در سایر تیمارها بیشترین میزان ترکیبات فنولی در روز چهارم مشاهده شد و پس از آن روند نزولی داشته است. در غلظت ۰/۰٤ و ۰/۰۸ نمک، روز هشتم وضعیت به نسبت بهتری را در ترکیبات فلاونوئیدی دیده شد.

واژه‌های کلیدی: آلودگی فلز سنگین سرب، *Spirulina Platensis*، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، محتوای فنولی و فلاونوئیدی

مقدمه

از انواع آلاینده‌ها می‌توان به فلزات سنگین اشاره کرد که به‌طور طبیعی از اجزای تشکیل‌دهنده اکوسیستم‌های آبی محسوب می‌گردند. فلزات سنگین یکی از آلاینده‌های پایدار غیر قابل تجزیه بیولوژیکی است، که می‌تواند در محیط زیست آب وارد شود و از آنجا جذب فیتوپلانکتون‌های موجود در آب شود و بدین ترتیب وارد زنجیره‌ی غذایی شود. متأسفانه رشد

*مسئول مکاتبه: mzarab69@gmail.com

سریع جمعیت و توسعه صنایع و افزایش بی رویه جمعیت شهرها و روستاها و درپی آن توسعه مناطق کشاورزی و استفاده از کودها و سموم دفع آفات موجب می‌گردد تا مقادیر زیادی فاضلاب‌های صنعتی و شهری و همچنین پساب‌های کشاورزی که دارای ترکیبات شیمیایی مختلف خصوصاً عناصر سنگین هستند وارد اکوسیستم‌های آبی شوند (ویچر و گانت، ۱۹۹٤؛ پلاسکت و پتر، ۱۹۷۹).

در شرایط آلودگی‌ها اثرات مضر اکسیدان‌ها ظاهر می‌گردد. از جمله این اثرات می‌توان به مرگ سلولی، افزایش سیتوکین‌های التهابی، فعال‌سازی ژن‌ها، شکستن DNA، غیر فعال کردن پروتئین‌ها و آنزیم‌ها، اکسید کردن قندها و چربی‌ها به‌خصوص اسیدهای چرب غیراشباع و لیپیوپروتئین‌های غشای سلولی اشاره کرد (بلوخینا و همکاران، ۲۰۰۳). آسیب‌های اکسیداتیو متوجه DNA، پروتئین‌ها و دیگر ماکرومولکول‌ها شده و باعث بروز بیماری‌هایی مانند پیری، سرطان، بیماری‌های قلبی عروقی، نقص سیستم ایمنی، عملکرد غیر طبیعی مغز می‌شود (آمس و همکاران، ۱۹۹۳).

سیانوباکترها پتانسیل بسیار بالایی برای شکوفایی در فاضلاب‌های آلوده به فلزات سنگین دارند و برای اهداف مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند. اسپیرولینا جزء سیانوباکترها محسوب می‌شود. این ریزجلبک‌ها در محیط‌های مختلف پراکنده شده‌اند و به واسطه تنوع وسیع گونه‌ای و رویشگاهی، به‌عنوان نشانگرهای زیستی زیستگاه‌های آبی محسوب می‌شوند (ویکتوری، ۲۰۰۸). اسپیرولینا علاوه‌بر داشتن رنگدانه‌هایی نظیر فایکوسیانین که اثرات آنتی‌اکسیدانی دارد، سرشار از ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی است که اثرات آنتی‌اکسیدانی ایجاد می‌کنند (کارادنیز و کمک، ۲۰۰۷).

افزایش سطوح فلزات سنگین در محیط‌های آبی اثرات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی بسیاری بر روی ریزجلبک‌ها دارد. با توجه به جذب زیستی و انتقال از سطوح پایین زنجیره غذایی، برآورد اثرات آلودگی فلز سرب بر مواد آنتی‌اکسیدانی ریزجلبک‌ها بسیار حائز اهمیت است. ریزجلبک‌ها سطوح بالاتری از مواد آنتی‌اکسیدانی نسبت به سایر مواد طبیعی داشته است. ریزجلبک‌ها تحت تنش فلز سرب محتوای بیوشیمیایی را تغییر داده تا حالت پایدار خود را حفظ کنند. با توجه به غلظت فلز و نوع آلودگی فلز میزان تغییرات آنتی‌اکسیدانی متغیر بوده است بنابراین بررسی اثرات فلزات مختلف بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی ضروری است.

مواد و روش‌ها

در این بررسی ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس در بهمن ماه سال ۱۳۹٤ از کلینیک تخصصی ریزجلبک کاسپین ساری تهیه شد. مراحل بعدی کار در آزمایشگاه کشت جلبک دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. محیط کشت مناسب برای اسپیرولینا پلاتنسیس زاروک می‌باشد، چون غنی از ترکیبات بی‌کربنات است و برای اسپیرولینا که نیاز به محیط قلیایی دارد مناسب است (آروناکومارو و ژانگ، ۲۰۰۸). در این بررسی برای کشت جلبک از محیط کشت تلفیقی Z_8 و زاروک استفاده شد. به‌طوری که کلیه ارلن‌های مورد استفاده با ۲۰ درصد محیط کشت زاروک و ۸۰ درصد محیط کشت Z_8 پر شد. برای تهیه محیط کشتZ_8، ۳ میلی‌لیتر از محلول A را با ۱ میلی‌لیتر از محلول B و ۲۰ میلی‌لیتر از محلول مخلوط و ۰/۰۸ میلی‌لیتر محلول D مخلوط کرده و به حجم ۱ لیتر رسانده شد. برای تهیه محیط کشت زاروک مواد موردنیاز برای محلول ۱ در ۸۰۰ میلی‌لیتر آب حل شده و مواد ۲ در ۲۰۰ میلی‌لیتر آب حل شده، در

نهایت ۱ میلی‌لیتر از محلول A_5 به آن اضافه شد. کلیه محیط کشت‌های مورد استفاده در این تحقیق مطابقت با روش فرامرزی (۱۳۸۷) انجام شد. کلیه ظروف حاوی محیط کشت، آلات هوادهی و پیپت پاستورهای مورد استفاده برای هوادهی، به‌مدت ۱۵ دقیقه داخل اتوکلاو پارسونیک ساخت ایران در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد استریل می‌شد. میزهای کشت روزانه با الکل پاکسازی می‌شد. برای استریل کردن فضای داخلی آزمایشگاه و اتاق کشت، روزانه ۱۵ دقیقه لامپ‌های فرابنفش روشن می‌شد. محیط کشت‌ها، پس از خارج شدن از اتوکلاو در اتاق کشت قرار داده می‌شد تا به دمای اتاق رسیده و در نهایت برای معرفی جلبک آماده بود. برای سریع‌تر شدن روند کار و بلوم سریع‌تر جلبک‌ها از کشت‌های غلیظ استفاده می‌شد. به‌طوری‌که نیمی از ارلن‌ها جلبک بوده و نیمی دیگر با محیط کشت پر می‌شد. کلیه مواد مورد استفاده در این تحقیق از شرکت مرک و سیگما خریداری شد. برای برآورد نرخ رشد، روزانه شمارش سلول‌های جلبکی با استفاده از لام نئوبار و میکروسکوپ اینورت برآورد شد و نرخ رشد با توجه به فرمول محاسبه شد (حسین‌زاده و همکاران، ۱۳۹۳).

$$SGR = \mathrm{Ln}\frac{(mt2-mt1)}{t2-t1} \;\; ; t2 > t1$$

m_2= تراکم سلولی در آخرین روز

m_1= تراکم سلولی در اولین روز

t_2= روز آخر

t_1= روز اول

برای تهیه عصاره جلبکی، ۵۰ میلی‌لیتر از جلبک‌ها در لوله فالکن ریخته شد و در داخل سانتریفیوژ یخچال‌دار Eppendorf AG ساخت آلمان، در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد، به‌مدت ۱۰ دقیقه، در دور ٤۰۰۰ قرار داده شد. فاز رویی تخلیه شد و نمونه‌ها به آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهان باغی دانشکده تولید گیاهی منتقل شد و عصاره متانولی جلبکی تهیه شد. برای تهیه عصاره، ۱ گرم از نمونه جلبک سانتریفیوژ شده را با ۱۰ میلی‌لیتر از متانول ۸۰ درصد مخلوط کرده و به‌مدت ٢٤ ساعت در داخل شیکر مدل بهداد ساخت ایران قرار داده شد. عصاره‌ها را از کاغذ صافی واتمن عبور داده و جذب توسط دستگاه اسپکتوفتومتری مدل UV 2800 ساخت کشور ژاپن خوانده شد (مشایخی و آتشی، ۱۳۹۳).

برای برآورد میزان فنول کل ۲۰ میکرولیتر از عصاره متانولی ریزجلبک، ۳۰۰ میکرو لیتر کربنات سدیم (۲۰ درصد)، ۱/۱٦ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالچو (۵۰ درصد) اضافه شد. بعداز قرار دادن عصاره در بن ماری مدل بهداد ساخت ایران و گذشت نیم ساعت جذب آن‌ها در طول موج ۷۲۰ نانومتر نسبت به شاهد ثبت گردید. اسید گالیک به عنوان استاندارد برای رسم منحنی استاندارد به‌ار رفت. محتوای فنول کل عصاره‌ها بر اساس میلی‌گرم معادل اسید گالیک بر گرم وزن تر ریزجلبک گزارش شد (مشایخی و آتشی، ۱۳۹۳).

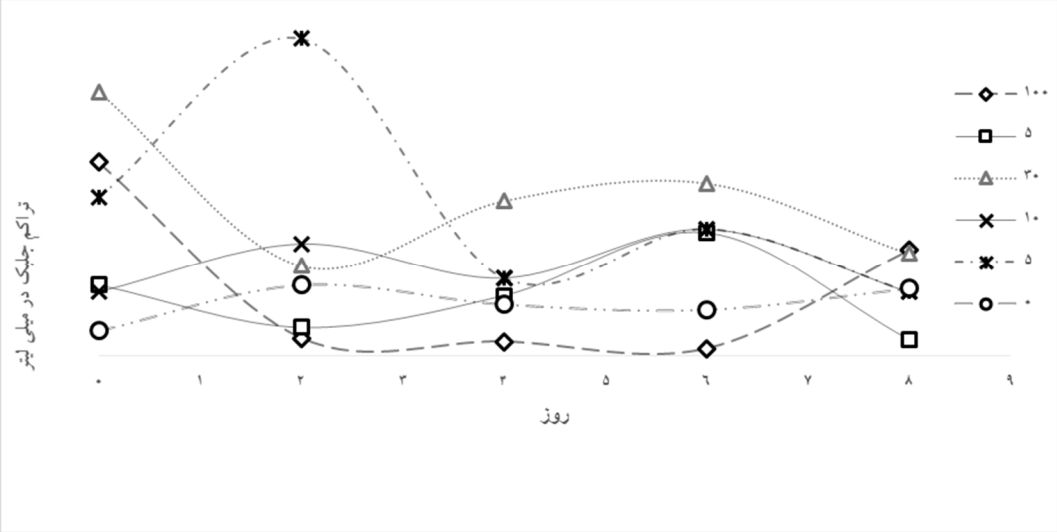
برای سنجش میزان فلاونوئید ۵۰۰ میکرولیتر از هر عصاره ۱/۵ میلی‌لیتر متانول (۸۰ درصد)، ۱۰۰ میکرولیتر محلول آلومینیوم کلراید (۱۰ درصد)، ۱۰۰ میکرولیتر محلول استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. جذب مخلوط بعد از گذشت ٤۰ دقیقه در طول موج ٤۱۵ نانومتر نسبت به شاهد اندازه‌گیری گردید. شاهد حاوی تمام ترکیبات ذکر شده در بالا بود اما به‌جای عصاره، همان حجم متانول ۸۰ درصد به آن اضافه شده بود. برای رسم منحنی استاندارد از کوئرستین استفاده شد. میزان فلاونوئید کل عصاره‌ها بر اساس میلی‌گرم معادل کوئرستین بر گرم وزن تر ریزجلبک گزارش شد (چانگ و همکاران، ۲۰۰۲).

آنالیز آماری

برای مقایسه نتایج آزمون آنالیز واریانس دو طرفه و پس آزمون LSD و برای مقایسه نتایج حاصل برای روز و غلظت به تفکیک استفاده شد. آنالیز آماری داده‌ها با نرم‌افزار SPSS 20 در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ انجام شد.

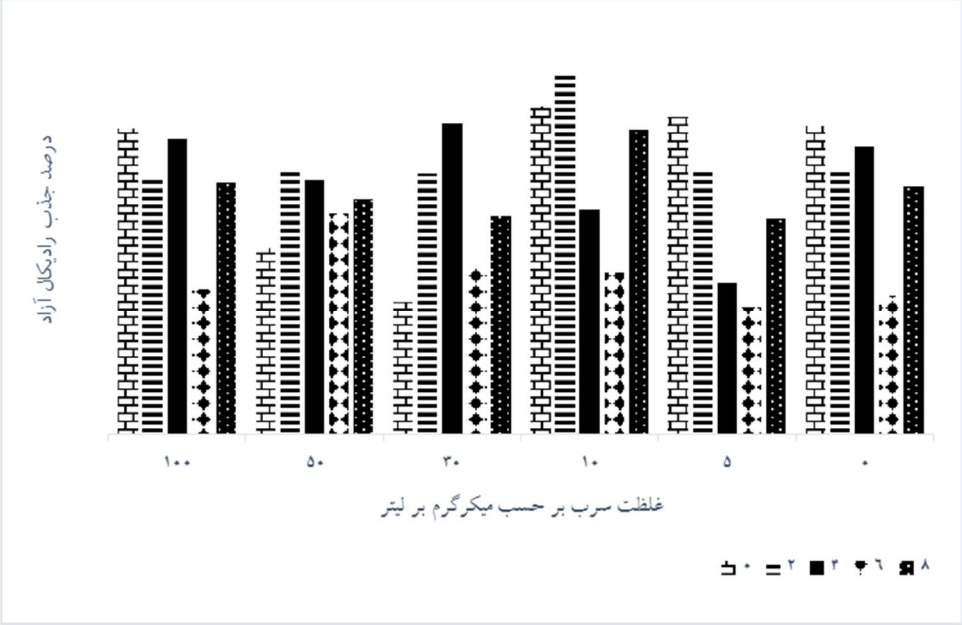
نتایج

برآورد نرخ رشد نشان داد که بیشترین نرخ رشد مربوط به گروه شاهد بوده و در مورد اکثر تیمارها منفی بوده و در واقع فلز سرب باعث کاهش رشد سلول‌های جلبکی شده است. به‌طور معمول با افزایش غلظت فلز سرب کاهش بیشتری در نرخ رشد اتفاق افتاده است (مطابق با شکل ۱).



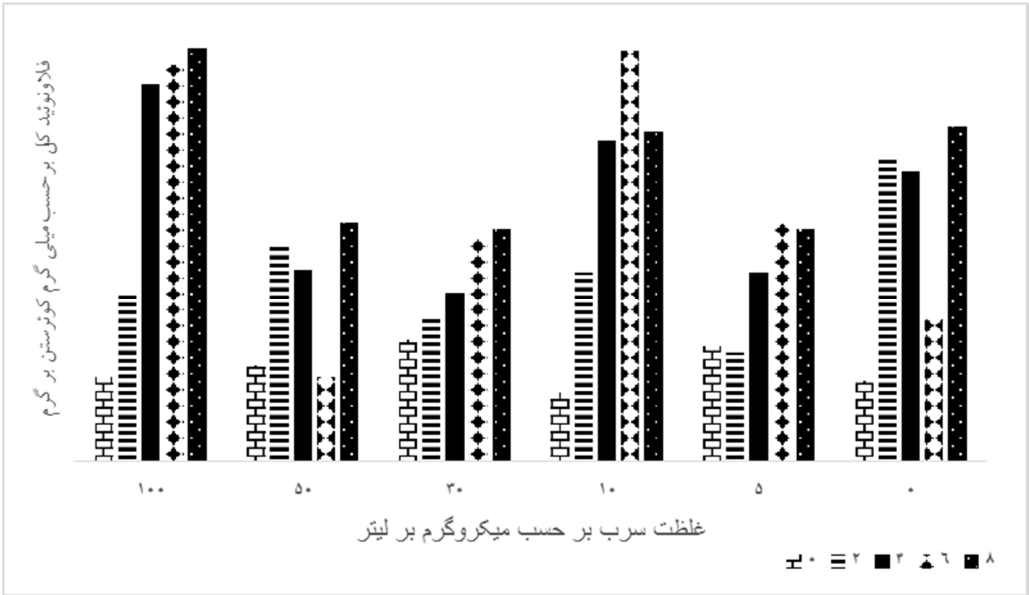
شکل ۱- بررسی روند سلول‌های ریزجلبک *Spirulina platensis* تحت غلظت‌های مختلف سرب بر حسب میکروگرم بر لیتر

بررسی میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی مطابق با شکل ۲ بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در روز ششم غلظت ۵۰ میکروگرم بر لیتر دیده شد و به طور کلی با افزایش میزان غلظت فلز سرب فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش یافته است. در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به روز ششم است و در روز دوم و چهارم کاهش قابل ملاحظه‌ای در محتوای آنتی‌اکسیدانی دیده شد اما در روز ششم و هشتم فعالیت آنتی‌اکسیدانی به میزان زیادی افزایش یافت. میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در روز دوم و چهارم اختلاف معنی‌داری ندارد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی در روز ششم و هشتم اختلاف معنی‌داری دارد اما به‌طور کلی با روز دوم و چهارم اختلاف بسیار زیادی دارد. در غلظت ۵۰ میکروگرم بر لیتر اختلاف معنی‌داری بین روز صفر و دوم دیده نشد میزان آنتی‌اکسیدان در غلظت ۵ میکروگرم بر لیتر در روزهای مختلف تغییر زیادی نداشته اما در روز ششم افزایش قابل ملاحضه‌ای در فعالیت آنتی‌اکسیدانی اتفاق افتاد. در سایر غلظت‌ها بیش‌ترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در روز ششم دیده شد.



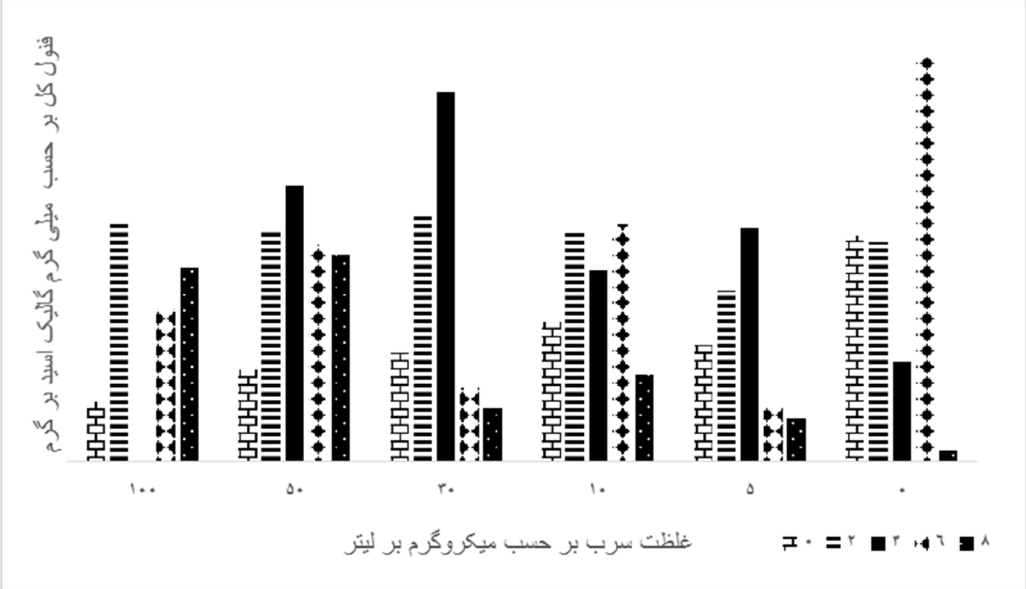
شکل ۲- بررسی میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریزجلبک *Spirulina platensis* تحت غلظت‌های مختلف سرب.

مطابق با شکل ۳ بیشترین میزان محتوای فلاونوئیدی کل در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر دیده شد. به‌طور کلی میزان فلاونوئید، در طول دوره آزمایش افزایش یافته و بیشترین مقدار در سایر غلظت‌ها در روز هشتم دیده شد. در غلظت ۵۰ میکروگرم بر لیتر در روز دوم و چهارم افزایش فلاونوئید دیده شد اما در روز ششم کاهش اتفاق افتاد و در روز هشتم افزایش چشمگیری در میزان فلاونوئید دیده شد. در غلظت ۳۰ میکروگرم بر لیتر روند صعودی کاملاً مشهود است. در غلظت ۵ میکروگرم بر لیتر اختلاف معنی‌داری بین روز صفر و دوم دیده نشد، اما در سایر روزها افزایش اتفاق افتاد.



شکل ۳- بررسی میزان محتوای فلاونوئیدی ریزجلبک *Spirulina platensis* تحت غلظت‌های مختلف سرب

بیشترین میزان محتوای فنولی در روز ششم غلظت شاهد دیده شد (مطابق با شکل ٤). همچنین روز چهارم و ششم غلظت ۳۰ میکروگرم بر لیتر میزان بالایی از فنول رؤیت شد. در روز دوم هیچ‌گونه اختلافی بین غلظت‌های مختلف دیده نشد. به‌طور کلی میزان فنول در طی انجام آزمایش روند صعودی داشته است.



شکل ٤- بررسی میزان محتوای فنولی ریزجلبک *Spirulina platensis* تحت غلظت‌های مختلف سرب

حضور فلزات سنگین در اکوسیستم‌های آبی مشکلات بسیار زیادی ایجاد می‌کند، توسط سلول‌های جلبکی جذب شده و در آن‌ها انباشته می‌شود. این فلزات در سیستم غشایی ریزجلبک‌ها اختلال ایجاد کرده و باعث تشدید اثرات رادیکال‌های آزاد و تنش اکسیداتیو ناشی از آن‌ها شده است. زمانی‌که محیط‌های آبی به فلز سرب آلوده شوند، سطح آنتی‌اکسیدان‌ها و موادی که عملکرد آنتی‌اکسیدانی داشته بالا رفته تا جلبک موردنظر قادر به تحمل و رشد در شرایط تنش ایجاد شده باشد. در واقع ریزجلبک‌ها در هنگام آلودگی فلز سنگین، میزان ترکیبات فنولی را افزایش داده تا از اکسیداسیون لیپیدها جلوگیری کنند. مطابق با مطالعات انجام شده توسط آروناکومارو و ژانگ (۲۰۰۸)، میزان رشد ریزجلبک اسپیرولینا تحت تنش فلز سرب در غلظت‌های پایین افزایش یافته است، در واقع بهترین رشد در گروه شاهد و غلظت‌های پایین‌تر سرب دیده شد و در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر شاهد کاهش رشد بودند، که کاملاً در راستای نتایج حاصل از این تحقیق بوده است. هانا و همکاران (۲۰۰۷) میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسپیرولینا را تحت تنش فلز سرب برآورد کردند و نتایج آن‌ها نشان داد که با افزایش غلظت ماده القاکننده تنش میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی افزایش یافت. فلز سرب از طریق بلوکه کردن کانال‌های آبی به‌واسطه برهم‌کنش با گروه‌های سولفیدریل کانال‌های آبی سبب بسته شدن آن‌ها و عدم نفوذ آب به درون سلول‌های ریزجلبکی می‌شوند، این عناصر با اثر سریع بر ارتباطات آبی سلول‌های ریزجلبک به‌علت کاهش سریع قابلیت هدایت آبی سلول‌ها سمیت خود را آشکار می‌نمایند و تأثیر بر

کاهش قابلیت انتقال آبی غالباً سریع‌تر و بیشتر از تأثیر سمیت عناصر سنگین بر غشای پلاسمایی در جلبکی آشکار می‌گردد (بارسلو و پوچن ریدر، ۲۰۰٤). زمانی‌که ریزجلبک اسپیرولینا در معرض فلز سنگین سرب قرار می‌گیرد، ابتدا فلز در ساختار ترکیباتی نظیر کربوکسیل، فسفات، هیدروکسیل، گروه‌های آمینی، سولفور و سولفید قرار می‌گیرد و در روی غشای جلبکی مستقر شده و در نهایت وارد سلول می‌شود (وانگ و چن، ۲۰۰۹). میزان انباشتگی فلز سنگین سرب در اسپیرولینا، در روزهای مختلفی که در معرض قرار می‌گیرد، متفاوت می‌باشد. همچنین میزان انحنا و پیچ و تاب این ریزجلبک و تعداد سلول در هر رشته جلبکی نیز پس از قرارگیری در معرض فلز سنگین سرب، کاهش می‌یابد که کاملاً در مطالعه انجام شده به وضوح دیده شد. حضور فلز سرب، عملکرد سیستم غشایی را دچار اختلال کرده و در فعالیت الکترون‌های انتقالی در سیستم فتوسنتزی اختلال ایجاد می‌کند. همئوستازی یون‌های فلزی را از بین برده و از این طریق، ممانعت رشد ایجاد می‌کند. فلز سرب در ساختار پروتئین‌های فلزی تغییراتی ایجاد می‌کند و اثرات سویی بر روی ترکیبات فسفات و ساختار لیپید و نوکلئوتیدها گذاشته و باعث تنش اکسیداتیو شده و مهم‌ترین اثر فلز سرب بر سلول‌های اسپیرولینا، اثر پوششی است که بر روی غشای تیلاکوئیدی دارد که در غلظت‌های بالا باعث بستن غشا و در نهایت مرگ سلول جلبکی می‌شود. سوپروبوتی و هریاتی (۲۰۱٤) بیان کردند، میزان رشد *Spirulina platensis* تحت تنش سرب در روزهای آغازین کمتر از گروه شاهد بوده و اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف (۱، ۳ و ۵ میلی‌گرم بر لیتر) وجود نداشته اما بیشترین میزان رشد جلبک در روز ۸ تا ۱۰ دیده شد که بیشتر از شاهد بوده اما از روز دهم به بعد رشد جلبک‌های تحت تنش کاهش یافته در صورتی‌که میزان رشد شاهد دوباره روند صعودی داشته است. به‌طور کلی میزان تنش در حدی باشد که سلول‌های جلبکی با افزایش محتوای آنتی‌اکسیدانی بتوانند حالت پایدار را حفظ کنند سطوح آنتی‌اکسیدان‌ها را بالا برده اما اگر تنش ایجاد شده در حد قابل تحمل ریزجلبک‌ها نباشد کاهش اتفاق می‌افتد. در تحقیق حاضر نیز اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های سرب وجود نداشته اما در روزهای مختلف اختلاف دیده شد. در واقع در سایر غلظت‌ها تا روز چهارم افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی اتفاق افتاده و روز ششم کمترین میزان را بخود اختصاص داده است. در روز هشتم میزان آنتی‌اکسیدانی ریزجلبک افزایش یافته که این بیان کننده قابلیت سازگاری ریزجلبک‌ها با تنش ایجاد شده است. محتوای فنولی و فلاونوئیدی در طی انجام آزمایش روند صعودی داشته و به‌طور کلی بیشترین میزان مربوط به روزهای آخر بوده است. اما میزان فنول در گروه شاهد و غلظت‌های پایین سرب در روز آخر برآوردها کاهش یافته که در واقع نشان دهنده حالت پایداری ایجاد شده است. سطوح بالای فنول در غلظت‌های بالای سرب توجیه کننده استرس ایجاد شده بوده است. در واقع سلول‌های جلبکی حالت پایدار خود را به‌دست نیاورده و کاهش مواد فنولی دیده نشد. در مورد میزان فلاونوئید روند افزایشی تا روزهای آخر آزمایش کاملاً مشهود بوده است که نشان‌دهنده آن است که تنش ایجاد شده در حدی بوده که سلول‌ها سطوح فلاونوئید را بالا نگه داشته و تنش به‌قدری شدید نبوده که فلاونوئید کاهش یابد.

منابع

1. Ames, B.N., Shegenaga, M.K., and Hagen, T.M. 1993. Oxidative, Antioxidants and the degenerative diseases of aging. Prodceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 20(17): 7915-7922.
2. Arunakumara, K., Zhang, X., and Song, X. 2008. Bioaccumulation of Pb^{2+} and its effects on growth, morphology and pigment contents of *Spirulina (Arthrospira) platensis*. J. of Ocean University of China., 7(4): 397-403.
3. Barcelo, J., and Poschenrieder, C. 2004. Structural and ultrastructural changes in heavy metal exposed plants. In: Prasad MNV (eds) Heavy metal stress in plants, 3rd edn. Springer, Berlin; 223-248.
4. Blokhina, O., Virolainen, E., and Fangerstedt, K.V. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. Ann Bot., 91(2): 179- 94.
5. Chang, C., Yang, M., Wen, H., and Chern, J. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. J. of Food and Drug Analysis 10(1): 178-182.
6. Davies, A.G. 1978. Pollution Studies with marine Plankton; Part 2. Heavy Metals. Advances in Marin Biology. 15: 381-508.
7. Hanaa, H., Baky, A.E., Baz, F.K.El., and Gamal, S. 2007. Enhancement of Antioxidant Production in *Spirulina Platensis* under Oxidative Stress. Eurasian J. of Scientific Research. 2(2): 170- 179.
8. Hossein zade, KH., Ganjian Khenari, A., and Jafari, M. 2013. Effects of Water Enrichment on microalgae *Spirulina Platensis* growth Parameters in the Southern Caspian Sea. J. Biochemistry Aquatich. 1(1): 71- 81. (In Persian)
9. Karadeniz, A., and Cemek, M. 2006. Protective Effect of *Spirulina Platensis* Against Lead Toxication in Rats. J. of Animal and Veterinary Advances. 5(1): 1113- 1116.
10. Mashayekhi, K., and Atashi, S. 2014. The analyzing methods in Plant Physiology. 1 th edn. Vajhegane Sirang, Gorgan, Iran. 317p. (In Persian)
11. Plasket, D., and Potter, I. 1979. Heavy metal concentrations in the muscle tissue of 12 species of teleosts from corborn sound, Western Australia. Australia J. of Marin and freshwater research. 30(5). 607p.
12. Retnaningsih Soeprobowati, T., Hariyati, R. 2014. Phycoremediation of Pb^{+2}, Cd^{+2}, Cu^{+2} and Cr^{+2} by Spirulina Platensis (Gomont Geitler). American Journal of Bio Science. 2(4): 165-170.
13. Victory, KJ. 2008. Isolation and Characterization of Antimicrobial Compounds Synthesized by Microcystis SP. Phd Thesis. School of Chemical Engineering, Faculty of Engineering Computer and Mathematical Sciences. 36-38.
14. Wicher, A.M., and Gantt, L.K. 1994. Contaminant assessment of fish rangia clams and sediments in the lower Pamlico river, North Carolina, U.S fish and wildfish service Ecological services 3(5): 213-220.