



<https://bjm.ui.ac.ir/?lang=en>

Journal of Microbial Biology  
E-ISSN: 3060-7647  
13<sup>rd</sup> Year, Vol. 13, No. 50, 2024 pp. 1-25  
Received: 15/01/2024 Accepted: 16/03/2024

**(Research Paper)**

## The effect of GABA on physiological responses of *Spirulina platensis* under HgCl<sub>2</sub> stress

**Saba Valizadeh**

Department of Biology, Plant Physiology, Faculty of Science, Lorestan University, Khoramabad, Iran  
valizadeh.sa@fs.lu.ac.ir

**Maryam Madadkar Haghjou** 

Department of Biology, Plant Physiology, Faculty of Science, Lorestan University, Khoramabad, Iran  
madadkar.m@lu.ac.ir

### Abstract

Heavy metals such as mercury (Hg) can cause disturbances in the metabolic and phycoremediation activities of microalgae.  $\gamma$ -aminobutyric acid or GABA is a non-protein amino acid and has a signaling role that can regulate the homeostasis of reactive oxygen species (ROS) under environmental stress. In this research, the effect of exogenous GABA on the physiological responses of blue-green algae (cyanobacterium) *Spirulina platensis* under mercury stress was investigated. HgCl<sub>2</sub> in 4 and 8  $\mu$ M, and GABA in 2 and 4 mM, individually and as a combined treatment, were applied to the microalgal cell suspensions for 48 hours. Then, the indices; dry weight, chlorophyll a, carotenoid, phycobilins, phenol, carbohydrate, protein, malondialdehyde, and polyphenol oxidase and peroxidase activities were evaluated. HgCl<sub>2</sub> treatment (individually) decreased dry weight, chlorophyll a, carotenoid, phycoerythrin, phenol, carbohydrate and protein compared to those in control and increased the level of lipid peroxidation and the activities of polyphenol oxidase and peroxidase enzymes. Single treatment of GABA increased dry weight, phycobillin, phenol, malondialdehyde, protein and enzyme activity. But the combined treatments (GABA + HgCl<sub>2</sub>) improved most of the physiological indices. HgCl<sub>2</sub> treatment in one or both concentrations caused a negative effect on the physiological indicators of *Spirulina platensis* and decreased metabolites such as phenol and proteins, but GABA treatment in most cases reduced the negative effects of mercury and improved the indices. According to the literature, Hg toxicity can be caused by disrupting the biosynthesis of photosynthetic pigments and the activity of enzymes and the occurrence of oxidative stress. While, exogenous GABA can improve the metabolic and physiological cell condition as a signaling molecule through the occurrence of some intracellular events.

**Key words:** Blue-green algae, Heavy metal stress, Mercury, Phenol, Phycobillin, *Spirulina*

---

\* Corresponding Author  
3060-7647/ © 2024 The Authors



## Introduction

*Spirulina platensis* is a filamentous multicellular blue-green alga and one of the most important studied microorganisms due to its nutritional value and presence of bioactive compounds. This microalga has also been studied intensely because of its valuable biotechnological qualities. *Spirulina* is also important in metal pollutant removal studies. Heavy metal  $\text{Hg}^{+2}$  can have adverse effects on the environment and living organisms. Although, microalgae can play a role in the removal of metals, but depending on the chemical properties of heavy metals, high concentrations of metal can disrupt the metabolic and phycoremediation activities of microalga and cause its death.  $\gamma$ -aminobutyric acid or GABA is a non-protein amino acid that is widely present in microorganisms, animals and plants and intervenes as a signaling molecule in various biotic and abiotic stresses. Considering that exogenous GABA can regulate the homeostasis of reactive oxygen species in microalgae under environmental stress, and that heavy metal stress stimulates more GABA production compared to drought, salinity and high temperature stresses, and also due to the lack of sufficient information on the effect of GABA on microalgae under metal stress, therefore, the effect of exogenous GABA was investigated on the physiological responses of *S. platensis* microalga under  $\text{Hg}^{+2}$  stress. In addition, the possibility of increasing biomass and some algal metabolites, such as protein, carbohydrates and photosynthetic pigments (chlorophyll *a*, total carotenoids, phycocyanin, allophycocyanin and phycoerythrin) in samples without  $\text{Hg}^{+2}$  pollution (those will be treated only with GABA), was considered.

## Materials and Methods

Zarrouk nutrient medium was prepared aseptically in the Erlenmeyer flasks for the culture and growth of microalgae. Treatment of mercury chloride ( $\text{HgCl}_2$ ) were applied in the concentrations 4 (4H) and 8 (8H)  $\mu\text{M}$  and treatment of GABA was used in concentrations 2 (2G) and 4 (4G) mM, individually and in a combined form; i.e.  $\text{HgCl}_2$  + GABA and (4H+2G, 4H+4G, 8H+2G, 8H+4G) to the microalgal cell suspensions. Samples without  $\text{HgCl}_2$  and/or without GABA were considered as controls. Then all samples were placed in controlled conditions of  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 16/8 h of light/darkness and at a temperature of  $25 \pm 2$  °C. Treatments were applied during 48 h and sampling and measurement of indicators were done after this time. Various physiological and biochemical parameters were evaluated, which were including; dry weight, chlorophyll *a*, total carotenoids, phycobilins, phenol, total soluble carbohydrates, total soluble protein, malondialdehyde contents, and polyphenol oxidase and peroxidase activities.

## Results

Examining the results of physiological indices evaluation of *Spirulina* after treatment with  $\text{HgCl}_2$  (alone) showed a decrease in dry weight, chlorophyll *a*, carotenoid, phycoerythrin, phenol, total soluble carbohydrate and protein compared to the control, and an increase in the amount of malondialdehyde and the antioxidant enzyme activities of polyphenol oxidase and peroxidase. Treatment with GABA in one or both concentrations increased the amount of dry weight, phycocyanin, allophycocyanin and phycoerythrin, phenol, malondialdehyde, protein and the activity of antioxidant enzymes. But the combined treatment of GABA and  $\text{HgCl}_2$  improved most of the indices, compared to the *Spirulina* treated by  $\text{HgCl}_2$  or control (or both).

## Discussion

The obtained results showed that  $\text{HgCl}_2$  decreased the dry weight of *Spirulina* and GABA treatment

caused a slight increase in dry weight (Fig. 1). Some researchers reported that HgCl<sub>2</sub> is able to reduce the number of algal cells *Botryococcus braunii* and inhibit their growth. The content of photosynthetic pigments chlorophyll *a* and total carotenoids were negatively affected by separate treatments of HgCl<sub>2</sub> and GABA (Figures 2A, B). While, combined treatments (H+G), often did not cause a decrease, or under certain conditions, even caused slight increases. It has been observed that exposure to HgCl<sub>2</sub> can inhibit the biosynthesis of chlorophyll *a* by replacing the central magnesium. But, depending on the stress conditions, GABA can improve the situation of the cell by reducing or increasing the photosynthetic pigments. The pattern of increasing and decreasing phycobilins under HgCl<sub>2</sub> and GABA treatments were not similar to each other and phycoerythrin often decreased and allophycocyanin and phycocyanin showed an increasing trend in this regard (Fig. 3A, B, C). Some scientists showed that the binding of different metals to each of the phycobilin pigments happens in a different way and with a different affinity. The effect of GABA was observed as an increase in phycobilins (Fig. 3). According to the literature, GABA increases nitrogen absorption and protein and phycobilin production by stimulating the activity and gene expression of nitrogen metabolism enzymes. Although the content of phenolic compounds decreased due to HgCl<sub>2</sub> treatment, both concentrations of 2 and 4 μM GABA caused increase in these compounds (Fig. A4). There are some reports of the stimulating effect of exogenous GABA on the production of phenols under stress conditions and increasing the antioxidant potential in plants. A decrease in the amount of soluble carbohydrates in *Spirulina* was observed under the influence of HgCl<sub>2</sub> and GABA stress (Fig. 4B). According to the literature, the decrease in the carbohydrate content of cells under cadmium stress can be because of the possible inhibition of carbon metabolism due to the interaction of cadmium with the active sites of essential enzymes. The malondialdehyde level increased in all treatments compared to the control (Fig. A5) and was higher in HgCl<sub>2</sub> treatments without GABA than in the other treatments. By binding to chloroplasts, HgCl<sub>2</sub> can affect photosynthesis and cause the production of ROS. Exogenous GABA can stimulate the production of endogenous GABA and it seems that during the first hours of treatment, it causes signaling and some intracellular events that may disturb the balance of ROS. The activity of peroxidase enzymes were increased almost in most cases of HgCl<sub>2</sub> and GABA treatment (Fig. 5C). According to the literature, the exogenous GABA can induce the activity of catalase, peroxidase and superoxide dismutase antioxidant enzymes.


## Conclusion

In general, our results indicated the negative effects of mercury chloride on the cyanobacterium *Spirulina platensis* during the first 48 hours of stress, which were appeared in the form of rising in lipid membrane peroxidation and decreasing the amount of important cell metabolites (e.g. carbohydrates, proteins and photosynthetic pigments). At the same time, GABA improved physiological *Spirulina* indices at the presence of HgCl<sub>2</sub>. GABA treatment in the absence of mercury caused the stimulation of the algal oxidant/antioxidant system. This can implies occurrence of a series of events during the early hours of stress which are related to the GABA's signaling effect and changes in cellular metabolism. According to the literature, a stimulated increase in endogenous GABA can also be happened quickly in treated cells with exogenous GABA, which can be resulted in a series of events and intracellular signaling cascades for adaptation to the new conditions.

تأثیر GABA بر پاسخ‌های فیزیولوژیک اسپیرولینا پلاتنسیس، در شرایط تنش  $HgCl_2$ \*

صبا ولی‌زاده:

دانشجوی دکتری گروه زیست‌شناسی، فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران valizadeh.sa@fs.lu.ac.ir

مریم مددکار حق جو\* : دانشیار گروه زیست‌شناسی، فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران madadkar.m@lu.ac.ir

## چکیده

فلزات سنگین نظیر جیوه (Hg) می‌توانند سبب بروز اختلال در فعالیت‌های متابولیسمی و زیست‌پالایی میکرو جلبک‌ها شوند. ۷-آمینوبوتیریک اسید یا گابا، یک اسید آمینه غیر پروتئینی و دارای نقش سیگنالی است که می‌تواند هموستازی انواع فعال اکسیژن<sup>۲</sup> را در تنش‌های محیطی تنظیم کند. در این تحقیق، اثر گابای آگزوزن بر پاسخ‌های فیزیولوژیک جلبک سبز - آبی (سیانوباکتر) اسپیرولینا پلاتنسیس<sup>۳</sup> تحت تنش جیوه و در فقدان آن بررسی شد. کلرید جیوه در غلظت‌های ۴ و ۸ میکرومولار و گابا در غلظت‌های ۲ و ۴ میلی‌مولار، به صورت منفرد و نیز به صورت تیمار تلفیقی، به مدت ۴۸ ساعت به سوسپانسیون‌های سلولی میکرو جلبک اعمال شدند. سپس شاخص‌های وزن خشک، کلروفیل *a*، کاروتنوئید، فیکوبیلین‌ها، فنل، کربوهیدرات، پروتئین، مالون دی‌آلدئید و فعالیت‌های پلی‌فنل اکسیداز و پراکسیداز سنجش شدند. تیمار جیوه (به‌طور منفرد)، وزن خشک، کلروفیل *a*، کاروتنوئید، فیکواریترین، فنل، کربوهیدرات و پروتئین را نسبت به شاهد، کاهش و مقدار پراکسیداسیون لیپیدی و فعالیت آنزیم‌های پلی‌فنل اکسیداز و پراکسیداز را افزایش داد. تیمار منفرد گابا، وزن خشک، فیکوبیلین، فنل، مالون دی‌آلدئید، پروتئین و فعالیت آنزیم‌ها را افزایش داد؛ اما تیمارهای تلفیقی (گابا + جیوه)، بیشتر شاخص‌های فیزیولوژیک را بهبود بخشیدند. تیمار جیوه در یک یا هر دو غلظت به کار برده شده، سبب اعمال تأثیر منفی بر شاخص‌های فیزیولوژیک اسپیرولینا پلاتنسیس و کاهش متابولیت‌هایی نظیر فنل و پروتئین‌ها شد؛ اما تیمار گابا در بیشتر موارد سبب تخفیف آثار منفی جیوه و بهبود شاخص‌ها شد. براساس منابع، سمیت جیوه می‌تواند به دلیل ایجاد اختلال در بیوسنتز رنگدانه‌های فتوسنتزی و مختل کردن فعالیت آنزیم‌ها و بروز تنش اکسیداتیو باشد؛ درحالی‌که گابای آگزوزن می‌تواند به‌عنوان یک مولکول سیگنالی، از طریق وقوع برخی وقایع درون‌سلولی، سبب بهبود وضعیت متابولیسمی و فیزیولوژیک سلول شود.

واژه‌های کلیدی: تنش فلز سنگین، جلبک سبز - آبی، اسپیرولینا، فنل، فیکوبیلین، جیوه

نویسنده مسئول مکاتبات\*

ولی‌زاده، صبا، مددکار حق جو، مریم. تأثیر GABA بر پاسخ‌های فیزیولوژیک اسپیرولینا پلاتنسیس، در شرایط تنش  $HgCl_2$  زیست‌شناسی میکروبی. ۱۴۰۳،۱۳ (۵۰): ۱-۲۵. <http://dx.doi.org/10.22108/BJM.2024.140440.1580>

3060-7647/ © 2024 The Authors

This is an open access article under the CC BY-NC-ND/4.0/ License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## مقدمه

میکرو جلبک‌ها، میکروارگانیسم‌های فتوسنتزکننده و سرشار از مواد مغذی (پروتئین، کربوهیدرات، لیپیدها و ...) هستند که هم به‌عنوان فیتوپلانکتون در آبی‌پرووری و هم به‌عنوان مدل‌های تحقیقاتی از اهمیت فراوانی برخوردار هستند (۱-۳). همچنین، این میکروارگانیسم‌های مفید با حذف فلزات سنگین، کربن، نیتروژن و فسفر از اکوسیستم‌های آبی، نقش مهمی در تصفیه پساب‌ها دارند (۱). اسپیرولینا پلاتنسیس<sup>۶</sup> یک جلبک سبز - آبی و سیانوباکتر غیرسمی است و به‌دلیل ارزش غذایی زیاد و وجود ترکیبات زیست‌فعال، یکی از میکرو جلبک‌های مهم مطالعه‌شده از جنبه‌های مختلف در سراسر جهان است (۴). اسپیرولینا دارای مقادیر زیادی پروتئین (۷۰-۵۵ درصد)، کربوهیدرات (۲۵-۱۵ درصد)، اسیدهای چرب ضروری (۱۸ درصد)، ویتامین‌ها، مواد معدنی و رنگدانه‌هایی نظیر کلروفیل *a*، کاروتنوئید و فیکوبیلی پروتئین‌ها است (۵، ۶). علاوه بر این، اسپیرولینا در مطالعات پالایش آلاینده‌های فلزی حائز اهمیت است؛ زیرا علاوه بر احتمال بودن ورود بخشی از فلز به داخل سلول، سطوح سلولی سیانوباکترها به‌دلیل داشتن برخی گروه‌های عاملی شیمیایی، محل اتصال بسیاری از کاتیون‌های سمی و فلزات سنگین هستند و از طریق جذب سطحی، فلزات را از محیط حذف می‌کنند (۷، ۸). جیوه (Hg) از گروه فلز سنگین است و اثرات نامطلوبی بر محیط زیست و موجودات زنده آن می‌گذارد (۹). فعالیت‌های فراصنعتی مانند احتراق سوخت (زغال‌سنگ و روغن‌های فسیلی)، استفاده از قارچ‌کش‌ها در کشاورزی و کاتالیزورهای حاوی جیوه در صنعت، به افزایش مداوم میزان جیوه محیط منجر شده‌اند (۱۰). در اکوسیستم‌های آبی، جیوه

معدنی ( $Hg^{+2}$ ) ممکن است به جیوه متیله‌شده آلی، تبدیل و خطرناک‌تر شود؛ زیرا جیوه آلی سمی‌تر است و به غشاهای سلولی می‌تواند نفوذ کند و حتی در سلول‌های جانوران آبی تجمع یابد (۹، ۱۱).

میکرو جلبک‌ها می‌توانند در حذف فلزات سنگین از محیط آبی نقش داشته باشند؛ با این حال، تحقیقات نشان می‌دهند با توجه به خواص شیمیایی فلزات سنگین، غلظت‌های زیاد فلزات می‌تواند فعالیت‌های متابولیسمی و زیست‌پالایی سلول جلبک را مهار کند و موجبات مرگ میکرو جلبک را فراهم آورند (۱۲). در این رابطه، تنش فلزات سنگین موجب القای تنش اکسیداتیو و تولید انواع اکسیژن فعال<sup>۵</sup>، مهار فتوسنتز، تخریب غشای سلولی، مهار آنزیم‌ها و کاهش رشد مورفولوژیک غیرمعمول می‌شود (۱۳، ۱۴). در این رابطه برخی مولکول‌هایی که نقش سیگنالی دارند، ممکن است بتوانند سلول را در شرایط تنش فلزات سنگین یاری کنند و وضعیت را بهبود ببخشند (۱۵، ۱۶).

γ-آمینوبوتیریک اسید یا گابا<sup>۷</sup>، یک اسید آمینه غیرپروتئینی است که به‌طور گسترده در میکروارگانیسم‌ها، جانوران و گیاهان وجود دارد و به‌عنوان یک مولکول سیگنالی در تنش‌های زیستی و غیرزیستی مختلف دخالت می‌کند (۱۷). در واقع، گابا یک ترکیب طبیعی امیدوارکننده سازگار با محیط زیست است (۱۸) و طی سال‌های اخیر، مطالعات متعددی نشان داده‌اند کاربرد خارجی گابا نیز می‌تواند به روش‌های مختلف از سلول‌ها در برابر آسیب تنش اکسیداتیو، محافظت و به حفظ یکپارچگی غشای سلولی کمک کند (۱۹). تحقیقات دیگری نشان داده‌اند استفاده از گابا به‌صورت اگزوزن<sup>۷</sup> می‌تواند سطح گابای درون‌زا یا اندوزن<sup>۸</sup> را افزایش دهد و پاسخ‌های فیزیولوژیک و

برای کشت آن از محیط کشت مغذی زاروک<sup>۱</sup> (۱۹۹۶) استفاده شد (۲۲). مقادیر مساوی میکروجلبک به ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری استریل شده انتقال پیدا کردند. تیمار کلرید جیوه<sup>۱۱</sup> در غلظت‌های ۴ (4H) و ۸ (8H) میکرومولار و تیمار گابا در غلظت‌های ۲ (2G) و ۴ (4G) میلی‌مولار هر یک به صورت مجزا و نیز به صورت تلفیق شده دارای کلرید جیوه به علاوه گابا (HgCl<sub>2</sub> + GABA)، (4H+2G, 4H+4G, 8H+2G, 8H+4G)، به سوسپانسیون‌های سلولی میکروجلبک اعمال شدند. نمونه‌های فاقد کلرید جیوه و فاقد گابا به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. تمام آزمون‌ها در سه تکرار انجام گرفتند و نمونه‌ها قبل از شروع آزمون و همین‌طور در طی تیماردهی (به مدت ۴۸ ساعت)، در شرایط کنترل شده نوری، ۱۰۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه و دمای ۲۵±۲ درجه سانتی‌گراد با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. غلظت‌های استفاده شده کلرید جیوه براساس آزمون‌های مقدماتی به گونه‌ای انتخاب شدند که تأثیر کشندگی بر اسپیروولینا نداشته باشند و غلظت‌های گابا با استفاده از برخی مقالات (۲۳-۲۵) انتخاب شدند. پس از ۴۸ ساعت تیماردهی، شاخص‌های فیزیولوژیک سنجش شدند. به منظور استخراج کامل ترکیبات درون سلولی میکروجلبک، چند مرحله فریز - ذوب و ورتکس در مجاورت گلوله‌های شیشه‌ای و سپس سونیکیشن توسط دستگاه سونیکاتور (مدل SONIC 4D، شرکت جیمز انگلستان) هر مرتبه به مدت ۵ دقیقه، در فرکانس ۸۰ هرتز انجام شد.

#### سنجش وزن خشک: برای اندازه‌گیری وزن

خشک‌جلبک، مقادیر همگنی از سوسپانسیون سلولی به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۵۰۰ g سانتریفوژ شد و برای

مولکولی نظیر جذب نیتروژن، تحریک چرخه کربس و تولید انرژی در میتوکندری، تنظیم مسیر تولید پلی‌آمین‌ها، تحریک سیستم آنتی‌اکسیدانی و تولید اسید آسکوربیک، گلوکاتیون، آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز، گلوکاتیون و اسمولیت‌ها را فعال کند (۱۸). گابا در مسیر گابا شانت<sup>۹</sup> از گلوکاتامات تولید می‌شود و در نهایت به سوکسینات، مبدل و وارد چرخه کربس می‌شود؛ بنابراین، گابا می‌تواند با دو مسیر متابولیکی اصلی کربن و نیتروژن مرتبط باشد (۲۰).

با توجه به اینکه گابای آگروژن می‌تواند هموستازی گونه‌های فعال اکسیژن در میکروجلبک‌ها را در تنش‌های غیرزیستی تنظیم کند (۱۵) و نیز مشاهده شده است که تنش فلزات سنگین، سبب تحریک تولید و تجمع بیشتر گابا در مقایسه با تنش‌های خشکی، دما و شوری می‌شود (۲۱) که نشان‌دهنده نقش احتمالی گابا در مقابله با تنش است و همچنین به دلیل نبودن اطلاعات کافی در زمینه تأثیر گابا بر تنش‌های فلزی در میکروجلبک‌ها، بررسی تأثیر گابای آگروژن بر پاسخ‌های فیزیولوژیک میکروجلبک اسپیروولینا پلاتنسیس تحت تنش جیوه دستور کار این تحقیق قرار گرفت. علاوه بر این، احتمال افزایش بیوماس و برخی ترکیبات ارزشمند جلبک، نظیر پروتئین، کربوهیدرات و رنگدانه‌ها در نمونه‌های فاقد آلایندگی جیوه مدنظر قرار گرفت که فقط با گابا تیمار خواهند شد.

#### مواد و روش‌ها

##### آماده‌سازی محیط کشت جلبک *S. platensis*

**و طراحی تیمارها:** در این تحقیق، مواد شیمیایی مورد نیاز برای تهیه محیط کشت میکروجلبک اسپیروولینا پلاتنسیس از شرکت‌های مرک و سیگما تهیه شدند و

کلروفیل *a* (Chl *a*) و کاروتنوئید کل (Car)، با استفاده از متانول خالص از بیوماس تر اسپیرولینا استخراج شدند (۲۷). جذب نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر ۹۶ چاهکی (مدل Epoch، شرکت بیوتک انگلستان) در طول موج‌های ۴۷۰، ۶۶۵ و ۷۲۰ نانومتر خوانده شد. سپس نتایج با استفاده از روابط زیر برحسب میکروگرم بر میلی‌گرم وزن تر ارائه شدند.

$$\text{Chl } a = 12.9447 (A_{665} - A_{720})$$

$$\text{Car} = [1000 (A_{470} - A_{720}) - 2.86 (\text{Chl } a)] / 221$$

موج‌های ۶۱۵، ۶۵۲ و ۵۶۲ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر ۹۶ چاهکی، محاسبه مقدار فیکوبیلین‌ها طبق روابط ۳ تا ۶ انجام شد (۲۹) و مقادیر برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن خشک ارائه شدند.

$$\text{Phycocyanin (C-PC)} = \{A_{615} - (0.474 \times A_{652})\} / 5.34$$

$$\text{Allophycocyanin (APC)} = \{A_{652} - (0.208 \times A_{615})\} / 5.09$$

$$\text{Phycocerythrin (PE)} = \{A_{562} - (2.41 \times \text{PC}) - (0.849 \times \text{APC})\} / 9.62$$

$$\text{Total phycobiliprotein} = \text{PC} + \text{APC} + \text{PE}$$

**سنجش کربوهیدرات محلول کل:** پس از سانتریفیوژ کردن سوسپانسیون سلولی برداشت شده در ۱۳۵۰۰ (به مدت ۱۵ دقیقه) و تخلیه محلول رویی، به منظور حذف تداخل رنگدانه‌ها، ابتدا از استون خالص، استفاده و سپس مجدداً سانتریفیوژ انجام شد (۳۱). رسوب برداشت شده در اتانول ۸۰ درصد با چندین بار فریز - ذوب - سونیک و ورتکس هموژن شد و مجدداً سانتریفیوژ شد. پس از تخلیه محلول رویی، رسوب باقی مانده بار دیگر با اتانول هموژن شد و پس از ورتکس شدید و سانتریفیوژ، مایع رویی، جدا و با محلول به دست آمده از مرحله قبل مخلوط شد. سپس

حذف محیط کشت، سطح بیوماس تر، ۲ تا ۳ بار با آب دو بار تقطیر شستشو داده شد و پس از تخلیه کامل محلول رویی، بیوماس تر به دست آمده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد داخل آون، خشک و سپس توزین شد. وزن خشک براساس میلی‌گرم در میلی‌لیتر گزارش شد (۲۶).

### سنجش رنگدانه‌های فتوسنتزی: رنگدانه‌های

رابطه ۱

رابطه ۲

### سنجش رنگدانه‌های فیکوبیلین: به منظور

اندازه‌گیری میزان فیکوبیلین‌های موجود در اسپیرولینا، استخراج رنگدانه‌ها براساس روش مورائس<sup>۱۲</sup> و همکاران (۲۰۱۱) با استفاده از بیوماس خشک میکروجلبک انجام شد (۲۸). پس از خواندن جذب عصاره در طول

رابطه ۳

رابطه ۴

رابطه ۵

رابطه ۶

### سنجش فنل: عصاره حاوی فنل با استفاده از بیوماس

خشک و آب مقطر، پس از انجام ورتکس و سونیک به مدت ۵ دقیقه و قراردادن در بن‌ماری (دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه) استخراج شد. پس از مخلوط کردن سلول‌ها با معرف فولین، محلول کربنات سدیم ۲۰ درصد به آنها اضافه شد، نمونه‌ها ورتکس شدند و به مدت ۱ ساعت در تاریکی و در دمای اتاق انکوبه شدند (۳۰). میزان جذب در طول موج ۷۶۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر ۹۶ چاهکی خوانده شد. برای رسم منحنی استاندارد از گالیک اسید استفاده شد و مقدار فنل برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن خشک ارائه شد.

(۳۳). عصاره‌گیری با استفاده از بیوماس تازه و تری کلرواستیک اسید ۵ درصد، تیوباریتوریک اسید ۰/۵ درصد انجام شد. جذب نمونه‌ها در طول موج‌های ۴۵۰، ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر ۹۶ چاهکی خوانده شد و محاسبه میزان مالون دی‌آلدئید، طبق رابطه ۷ انجام گرفت. مقادیر برحسب میکرومول بر گرم وزن تر گزارش شد.

$$MAD = 6.45 \times (A532 - A600) - 0.56 \times A450$$

آنزیم پلی‌فنل اکسیداز از بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار و کلرید پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار استفاده شد و سنجش فعالیت آنزیم براساس روش ریموند<sup>۱۷</sup> و همکاران (۱۹۹۳) (۳۷) و خوانش جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۱۲ نانومتر انجام شد.

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

### نتایج

نتایج به‌دست آمده از تحلیل واریانس داده‌ها نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اثرات اصلی عوامل تیمارهای گابا و کلرید جیوه ( $P < 0.01$ ) بر شاخص‌های ارزیابی شده میکروجلبک/اسپیرولینا پلاتنسیس است (جدول ۱ و ۲).

از طریق روش آنترون بر اثر واکنش با اسید سولفوریک (۷۲ درصد) سنجش شد (۳۲). میزان جذب در طول موج ۶۲۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر ۹۶ چاهکی، خوانده و برای رسم منحنی استاندارد از گلوکز خالص استفاده شد.

### سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدی:

پراکسیداسیون لیپیدی براساس میزان مالون دی‌آلدئید توسط روش هاجز<sup>۱۳</sup> و همکاران (۱۹۹۹) ارزیابی شد رابطه ۷

### سنجش پروتئین محلول کل: برای تهیه عصاره،

از Tricine-KOH براساس روش اسمیرنف و کولومب<sup>۱۴</sup> (۱۹۹۸) (۳۴)، استفاده و مقدار پروتئین محلول براساس روش برادفورد<sup>۱۵</sup> (۱۹۷۶) (۳۵) در طول موج ۵۹۵ نانومتر سنجش شد. نتایج برحسب میکروگرم بر میلی‌گرم وزن تر گزارش شدند و از پروتئین آلبومین گاوی به‌عنوان استاندارد استفاده شد.

### سنجش فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز کل و پلی‌فنل اکسیداز:

عصاره‌گیری برای سنجش آنزیم پراکسیداز به روش اسمیرنف و کولومب (۱۹۹۸) انجام شد و سپس مراحل فریز-ذوب و اولتراسونیک روی نمونه انجام شدند. پس از سانتریفیوژ در  $g \times 13500$  و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه، فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از پیروگالل در طول موج ۴۳۰ نانومتر و با استفاده از ضریب خاموشی  $2/47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  براساس روش چنس و مائهل<sup>۱۶</sup> (۱۹۹۵) (۳۶) سنجش شد. برای

جدول ۱- تجزیه واریانس شاخص‌های فیزیولوژیک میکرو جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس پس از تیمار با غلظت‌های مختلف گابا (۲ و ۴ میلی‌مولار) و کلرید جیوه (۴ و ۸ میکرومولار)؛ وزن خشک، کلروفیل *a*، کاروتنوئید کل، فیکوسیانین، آلفوفیکوسیانین، فیکواریترین و فیکوبیلین کل.

Table 1- Variance analysis of physiological indices of *S. platensis* microalga after treatment by different concentrations of GABA (2 and 4 mM) and HgCl<sub>2</sub> (4 and 8 μM); Dry weight, Chlorophyll *a*, Phycocyanin, Allophycocyanin, Phycoerythrin and Total Phycobilin.

منبع تغییرات	درجه آزادی	وزن خشک	کلروفیل <i>a</i>	کاروتنوئید کل	فیکوسیانین	آلفوفیکوسیانین	فیکواریترین	فیکوبیلین کل
تیمار	۹	۱/۴۶**	۰/۳۶۴**	۰/۰۲۳**	۴۵/۷۰۶**	۱۶۶/۸۳۶**	۱۲/۴۵۸**	۵۱۲/۵۳۶**
خطا	۱۸	× ۱۰ <sup>-۵</sup>	× ۱۰ <sup>-۶</sup>	۵/۷۸۹ × ۱۰ <sup>-۶</sup>	۰/۰۲۴	۰/۰۴۳	۰/۰۱۰	۰/۱۳۰
کل	۲۷							

\*, \*\* و ns به ترتیب بیان‌کننده معنی‌داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و عدم معنی‌داری هستند.

جدول ۲- تجزیه واریانس شاخص‌های فیزیولوژیک میکرو جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس پس از تیمار با غلظت‌های مختلف گابا (۲ و ۴ میلی‌مولار) و کلرید جیوه (۴ و ۸ میکرومولار)؛ فنل، کربوهیدرات، پروتئین، مالون دی‌آلدهید و فعالیت آنزیم‌های پلی‌فنل اکسیداز و پراکسیداز.

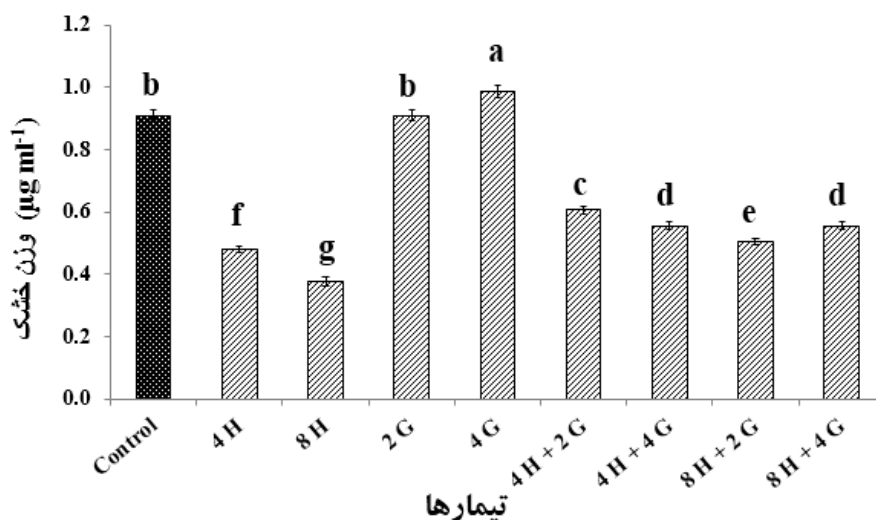
Table 2- Variance analysis of physiological indices of *S. platensis* microalga after treatment by different concentrations of GABA (2 and 4 mM) and HgCl<sub>2</sub> (4 and 8 μM); Phenol, Carbohydrate, Protein, Malondialdehyde, Polyphenol oxidase and Peroxidase enzyme activities.

منبع تغییرات	درجه آزادی	فنل	کربوهیدرات	پروتئین	مالون دی‌آلدهید	پلی فنل اکسیداز	پراکسیداز
تیمار	۹	۱/۱ × ۱۰ <sup>-۸</sup> **	۱/۸ × ۱۰ <sup>-۷</sup> **	۲۳/۴۴**	۲۴۸۲/۱**	۰/۰۱۸**	۵/۵ × ۱۰ <sup>-۶</sup> **
خطا	۱۸	۴۵۸۰/۴	۹۱۶۴/۸	۰/۳۱۱	۱/۵۸	۱/۷ × ۱۰ <sup>-۵</sup>	۴/۵ × ۱۰ <sup>-۹</sup>
کل	۲۷						

\*, \*\* و ns به ترتیب بیان‌کننده معنی‌داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و عدم معنی‌داری هستند.

نشان می‌دهد؛ با این حال، تیمار گابا سبب بهبود وضعیت وزن خشک و افزایش آن نسبت به شرایط تیمار جیوه بدون گابا شد.

بررسی نتایج حاصل از وزن خشک اسپیرولینا مطابق شکل ۱، افزایش اندک مقدار وزن خشک تحت تأثیر تیمار 4G و کاهش آن در تمام تیمارهای حاوی جیوه را

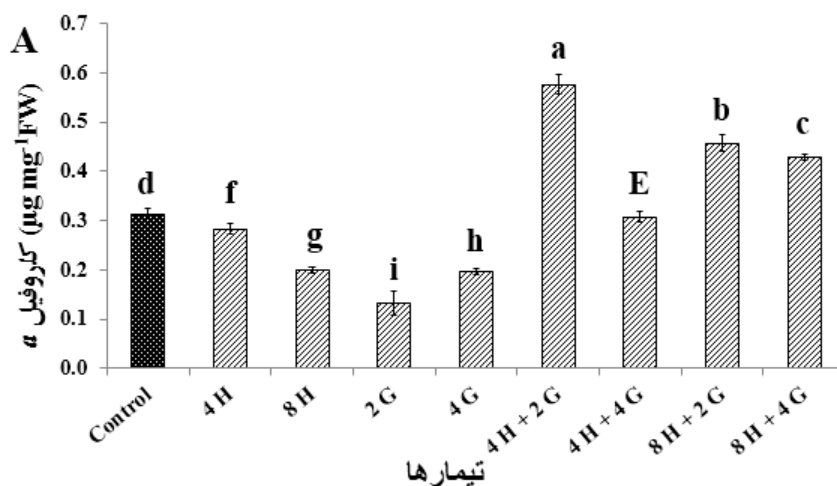


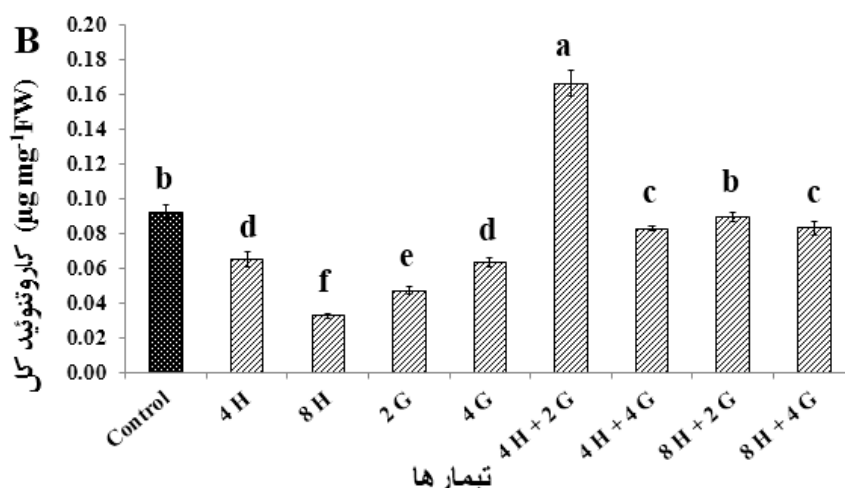
شکل ۱. وزن خشک میکرو جلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* پس از تیمار با غلظت‌های مختلف ۲ و ۴ میلی‌مولار گابا (G) و ۴ و ۸ میکرومولار کلرید جیوه (H) به هر دو صورت منفرد و تلفیقی. مقادیر میانگین سه تکرار  $\pm$ SD هستند. حروف متفاوت، بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح  $P < 0.05$  بر اساس آزمون دانکن هستند.

Figure 1- Dry biomass of *S. platensis* microalga after treatment by different concentrations of GABA (G, 2 and 4 mM) and  $HgCl_2$  (H, 4 and 8  $\mu$ M), both individually and combined. Data is the average of three replicates  $\pm$ SD, and different letters indicate significant differences based on Duncan's test at  $p < 0.05$ .

افزایش مقادیر آنها در غالب تیمارهای تلفیقی (گابا + کلرید جیوه) نسبت به تیمارهای منفرد ملاحظه شد. مقدار کلروفیل *a* حتی در تیمارهای 4H+2G، 8H+2G و 8H+4G از مقدار آنها در شاهد نیز بیشتر بود.

بر اساس نمودارهای A و B در شکل ۲، تأثیر تیمارها بر مقدار کلروفیل *a* و کاروتنوئید کل، حاکی از وجود یک الگوی تقریباً مشابه در تغییرات رنگدانه‌ها تحت تأثیر تیمارهای کلرید جیوه و گابا بود که کاهش مقدار رنگدانه‌ها در تمام تیمارهای منفرد (کلرید جیوه یا گابا) و



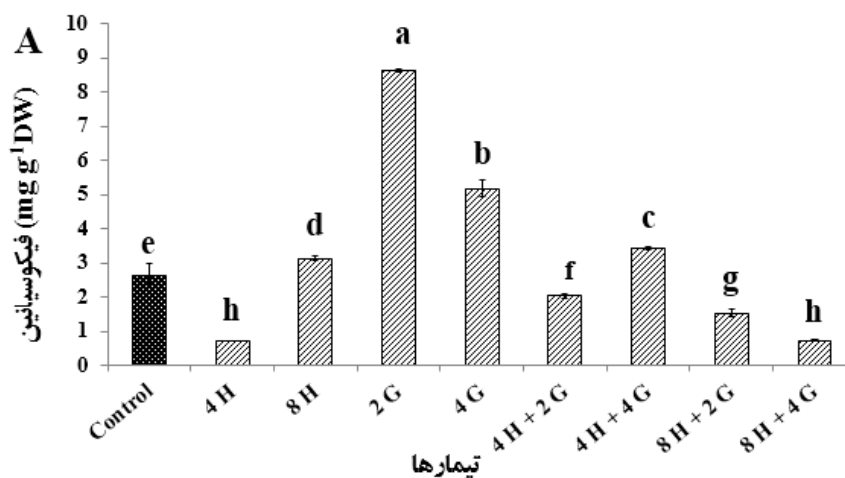


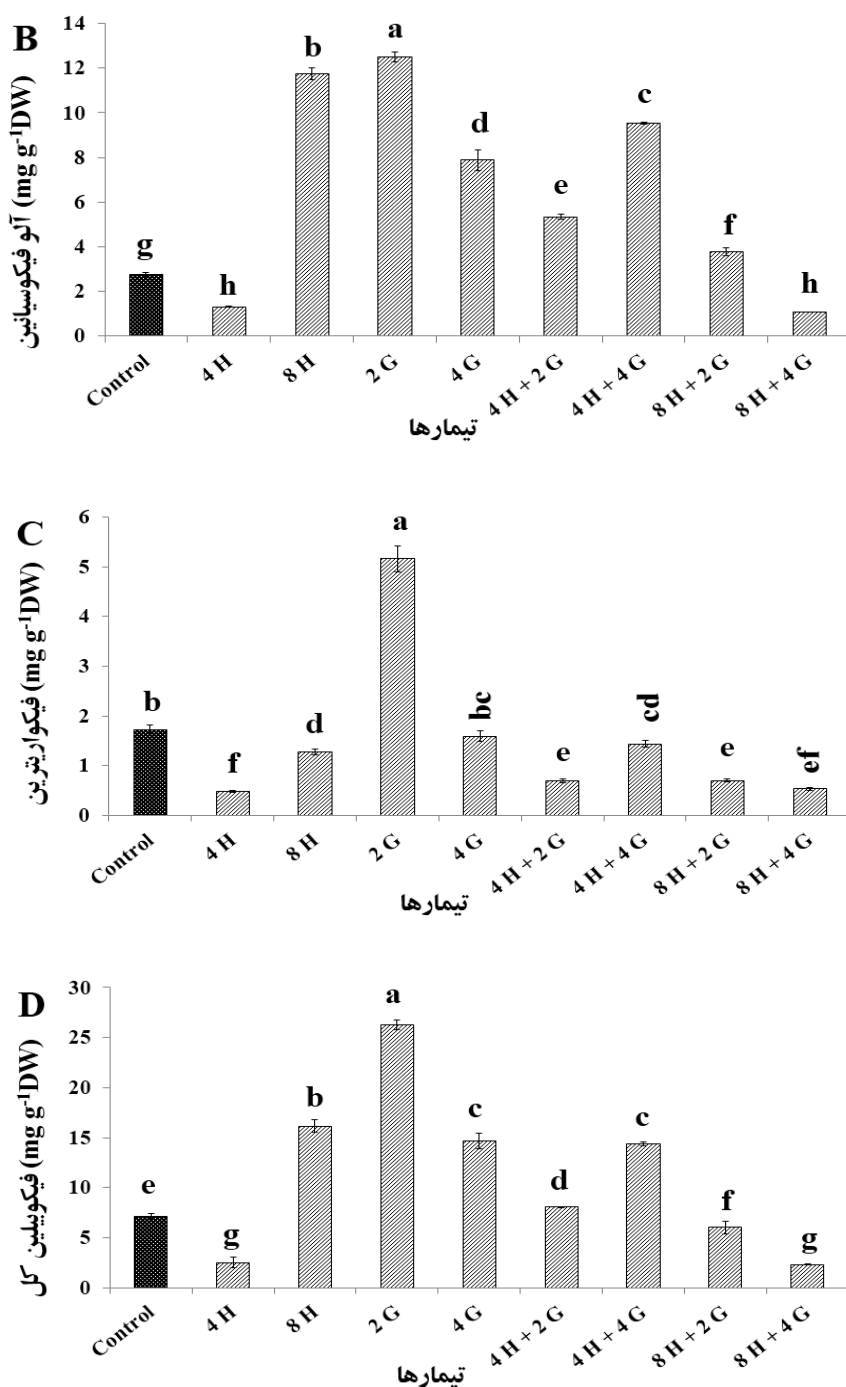
شکل ۲. مقدار کلروفیل *a* (A) و کاروتنوئید کل (B) در میکرو جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس پس از تیمار با غلظت‌های مختلف ۲ و ۴ میلی‌مولار گابا (G) و ۴ و ۸ میکرومولار کلرید جیوه (H) به هر دو صورت منفرد و تلفیقی. مقادیر میانگین سه تکرار  $\pm$  SD هستند. حروف متفاوت، بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح  $P < 0.05$  بر اساس آزمون دانکن هستند.

Figure 2- Chl *a* and total Carotenoid contents of *S. platensis* microalga after treatment by different concentrations of GABA (G, 2 and 4 mM) and  $HgCl_2$  (H, 4 and 8  $\mu$ M), both individually and combined. Data is the average of three replicates  $\pm$  SD, and different letters indicate significant differences based on Duncan's test at  $p < 0.05$ .

PC نسبت به APC، افزایش کمتری تحت تأثیر تیمارها نشان داد. ۲ میلی‌مولار گابا سبب افزایش چشمگیر و معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) در تمام فیکوبیلین‌ها نسبت به شاهد شد؛ اما ۴ میلی‌مولار گابا و تیمارهای ۸H و 4H+4G نیز افزایش مقدار فیکوبیلین کل را نسبت به شاهد موجب شدند. دو تیمار 4H و 8H+4G سبب بیشترین کاهش در مقادیر فیکوبیلین‌ها شدند.

میزان رنگدانه‌های فیکوسیانین (PC)، آلفوفیکوسیانین (APC) و فیکواریترین (PE)، تحت تأثیر تیمارهای مختلف کلرید جیوه و گابا، به‌طور مشابه و یکسان تغییر نکرد (شکل ۳A, B, C, D)؛ به‌طوری‌که مقدار PE در اغلب تیمارها نسبت به شاهد کاهش یافت؛ اما مقدار APC در غالب تیمارها افزایش نشان داد و فقط در دو تیمار 4H و 8H + 4G نسبت به شاهد کاهش مشاهده شد. رنگدانه





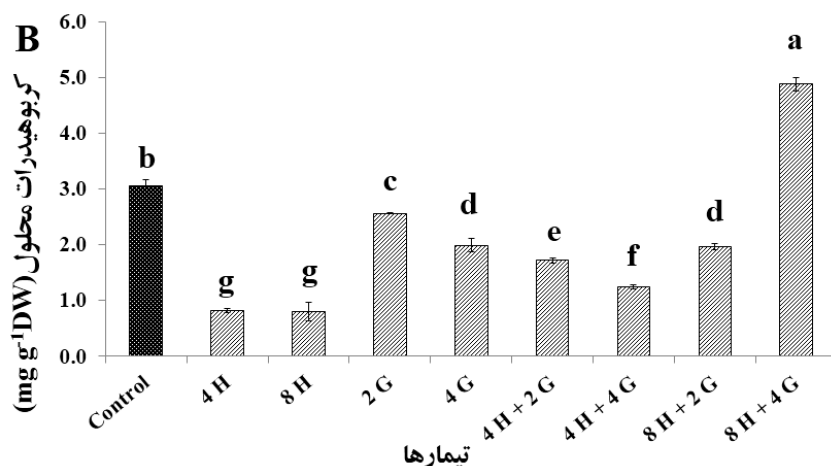
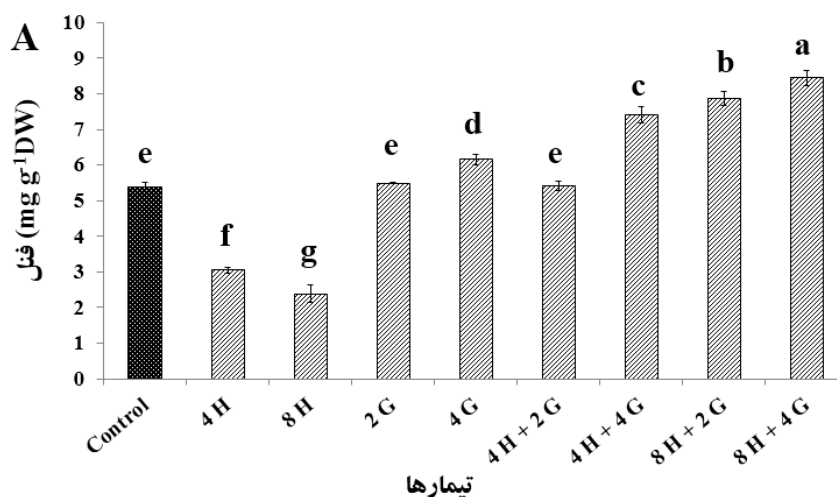
شکل ۳. مقادیر رنگزده‌های فیکوسیانین (A)، آلفوفیکوسیانین (B)، فیکواریتترین (C) و فیکوبیلی پروتئین کل (D) در میکروجلبکک *اسپیرولینا پلاتنسیس* پس از تیمار با غلظت‌های مختلف ۲ و ۴ میلی‌مولار گابا (G) و ۴ و ۸ میکرومولار کلرید جیوه (H) به هر دو صورت منفرد و تلفیقی. مقادیر میانگین سه تکرار  $\pm$  SD هستند. حروف متفاوت، بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح  $P \leq 0.05$  براساس آزمون دانکن هستند.

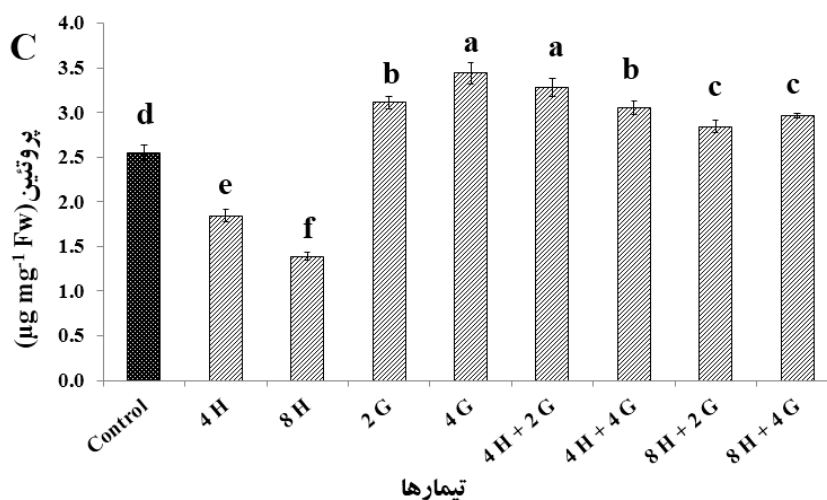
Figure 3- The content of Phycocyanin (A), Allophycocyanin (B), Phycoerythrin (C) and Total Phycobilin (D) of *S. platensis* microalgae after treatment by different concentrations of GABA (G, 2 and 4 mM) and  $HgCl_2$  (H, 4 and 8  $\mu M$ ), both individually and combined. Data is the average of three replicates  $\pm$  SD, and different letters indicate significant differences based on Duncan's test at  $p < 0.05$ .

گرفت (شکل ۴B)؛ اما تیمار 8H+4G، افزایش چشمگیر مقدار قند نسبت به شاهد را موجب شد. بیشترین کاهش‌ها تحت تأثیر تیمارهای منفرد کلرید جیوه اتفاق افتادند.

محتوای پروتئین میکروجلبک در آزمون تحت تأثیر تیمارهای منفرد گابا و تیمارهای تلفیقی آن با کلرید جیوه نسبت به شاهد افزایش یافت؛ اما تیمارهای کلرید جیوه مقدار پروتئین سلول را کاهش دادند (شکل ۴C).

مقدار فنل سلول‌ها تحت تأثیر تیمار 4G و تیمارهای تلفیقی آن با غلظت‌های متفاوت جیوه (4H+4G، 8H+4G) و نیز تیمار 8H+2G افزایش یافت (شکل ۴A). کاهش چشمگیر در میزان فنل، تحت تأثیر غلظت‌های ۴ و ۸ تیمارهای منفرد کلرید جیوه یعنی 4H و 8H نسبت به شاهد مشاهده شد؛ اما تیمار گابا بر آن تأثیر مثبت و افزایشی داشت. مقدار کربوهیدرات محلول کل در بیشتر موارد به‌طور کاهشی تحت تأثیر تیمارهای جیوه و گابا قرار





شکل ۴. مقادیر فنل (A)، کربوهیدرات محلول کل (B) و پروتئین (C) در میکرو جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس پس از تیمار با غلظت‌های مختلف ۲ و ۴ میلی‌مولار گابا (G) و ۴ و ۸ میکرومولار کلرید جیوه (H) به هر دو صورت منفرد و تلفیقی. مقادیر میانگین سه تکرار  $\pm$  SD هستند. حروف متفاوت، بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح  $P < 0.05$  براساس آزمون دانکن هستند.

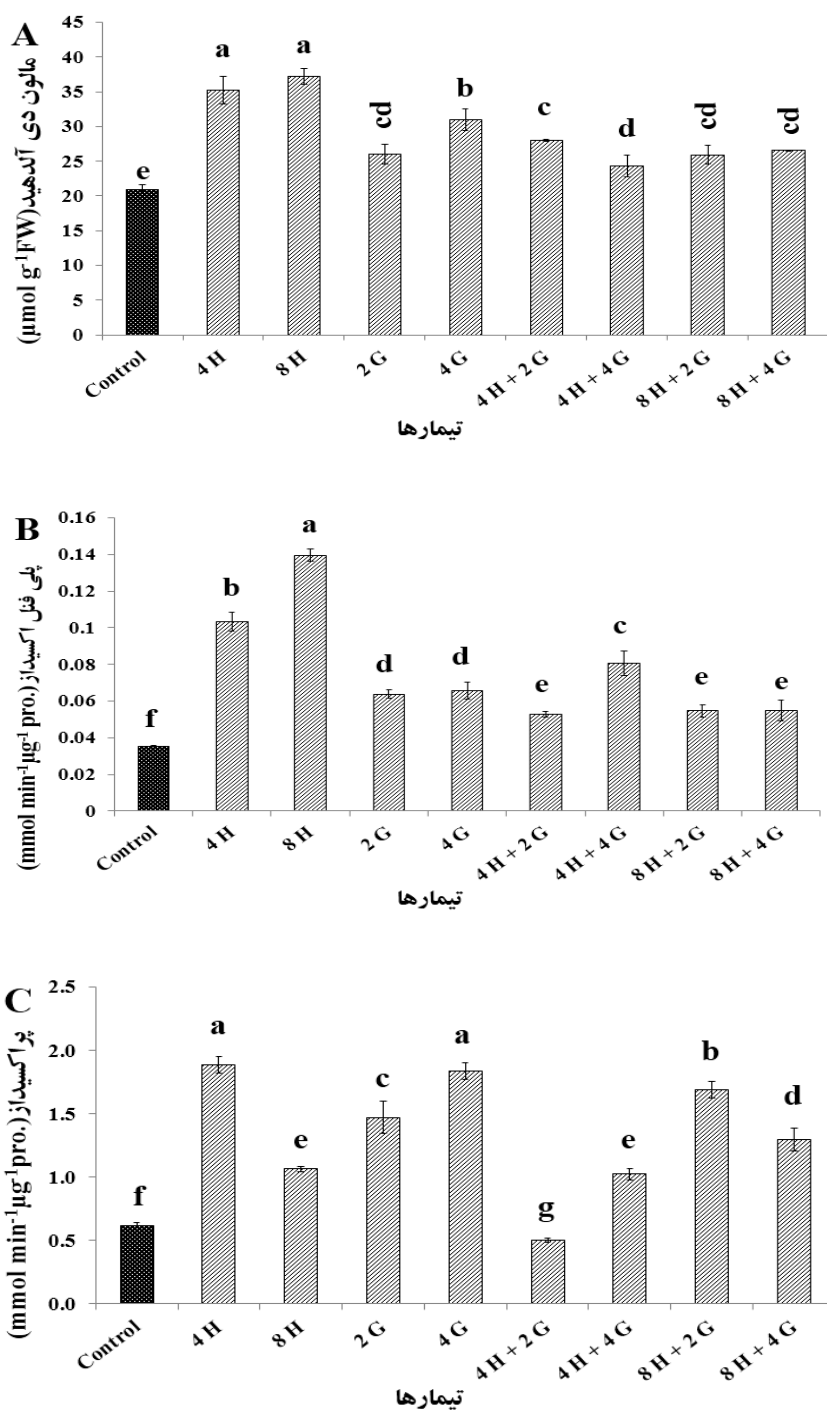
Figure 4- The content of Phenol (A), total soluble carbohydrate (B) and Protein (C) of *S. platensis* microalga after treatment by different concentrations of GABA (G, 2 and 4 mM) and  $\text{HgCl}_2$  (H, 4 and 8  $\mu\text{M}$ ), both individually and combined. Data is the average of three replicates  $\pm$  SD, and different letters indicate significant differences based on Duncan's test at  $p < 0.05$ .

موارد مقدار فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز را نسبت به تیمارهای منفرد کاهش دادند.

مقدار فعالیت آنزیم پراکسیداز کل نیز تحت تأثیر تمام تیمارها به استثنای تیمار تلفیقی 4H+2G، نسبت به شاهد افزایش یافت (شکل ۵C)؛ با این حال، غلظت بالاتر جیوه (8H) سبب افزایش کمتری در فعالیت آنزیم نسبت به غلظت پایین‌تر کلرید جیوه (4H) شد؛ اما هر دو غلظت گابا سبب افزایش بیشتر مقدار فعالیت آنزیم در تیمار تلفیقی آن با 8H نسبت به شاهد شدند.

مقدار پراکسیداسیون لیپیدی غشا تحت تأثیر تمام تیمارهای آزمایش، نسبت به شاهد افزایش یافت (شکل ۵A)؛ اما مقدار آن توسط تیمارهای منفرد کلرید جیوه از بقیه بیشتر افزایش یافت. بیشتر تیمارهای تلفیقی کلرید جیوه + گابا، مقدار مالون دی‌آلدهید را نسبت به تیمارهای منفرد کاهش دادند.

فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در تمام تیمارها نسبت به شاهد افزایش یافت (شکل ۵B). بیشترین میزان افزایش‌ها تحت تأثیر غلظت‌های مختلف کلرید جیوه یعنی 4H و 8H مشاهده شد. تیمارهای تلفیقی در بیشتر



شکل ۵. مقدار مالون دی‌آلدئید (A)، فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز (B) و فعالیت آنزیم پراکسیداز کل (C) در میکرو جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس پس از تیمار با غلظت‌های مختلف ۲ و ۴ میلی‌مولار گابا (G) و ۴ و ۸ میکرومولار کلرید جیوه (H) به هر دو صورت منفرد و تلفیقی. مقادیر میانگین سه تکرار  $\pm$  SD هستند. حروف متفاوت، بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح  $P < 0.05$  براساس آزمون دانکن هستند.

Figure 5- The content of Malondialdehyde (A), Polyphenol oxidase enzyme activity (B) and Peroxidase enzyme activity (C) of *S. platensis* microalga after treatment by different concentrations of GABA (G, 2 and 4 mM) and  $\text{HgCl}_2$  (H, 4 and 8  $\mu\text{M}$ ), both *individually and combined*. Data is the average of three replicates  $\pm$  SD, and different letters indicate significant differences based on Duncan's test at  $p < 0.05$ .

## بحث و نتیجه گیری

گابا به عنوان یک مولکول سیگنال دهنده، به طور گسترده در گیاهان و جانوران مطالعه شده است؛ اما بررسی‌ها درباره تأثیرات آن بر سیانوباکترها اندک است. به نظر می‌رسد گابا در شرایط نامطلوب، نقش مهمی در موجودات زنده دارد (۳۸). در تحقیق حاضر، تأثیر گابا بر فیزیولوژی سیانوباکتر اسپیرولینا پلاتنسیس در شرایط تنش فلزی جیوه بررسی شد.

نتایج به دست آمده از تأثیر تیمار کلرید جیوه بر اسپیرولینا نشان دادند جیوه در هر دو غلظت به کار برده شده، سبب کاهش مقدار وزن خشک میکروجلبک اسپیرولینا شد (شکل ۱)؛ اما تیمار گابا سبب بهبود وضعیت و افزایش مقداری وزن خشک در شرایط تنش جیوه شد؛ اگرچه مقدار آن در تیمارهای تلفیقی (H+G) کمتر از وزن خشک در شاهد باقی ماند. برخی دانشمندان نظیر سیمانجاتاک<sup>۱۸</sup> و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند تیمار کلرید جیوه سبب کاهش تعداد سلول‌های میکروجلبک بوتریوکوکوس برونسی<sup>۱۹</sup> و مهار رشد آن شد. در واقع به علت سمیت جیوه، غلظت‌های فلز بیش از مقدار تحمل سلول، رشد سلول را مهار می‌کنند (۳۹). این نتایج با نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر مطابقت دارد که در آن غلظت ۸ میکرومولار جیوه، رشد و تکثیر را بیش از غلظت ۴ میکرومولار کاهش می‌دهد.

کاهش رشد بر اثر تأثیر فلزات سنگین نظیر جیوه، می‌تواند به دلایل ایجاد تغییر در نفوذپذیری غشا (۴۰)، مهار جذب مواد مغذی (۴۱)، تداخل با فعالیت آنزیم‌ها (۴۲)، افزایش فعالیت آنزیم کلروفیلاز (۴۳)، جایگزین شدن فلز سنگین به جای یون منیزیم در رنگدانه کلروفیل و سایت‌های فعال آنزیم‌ها (۴۴)، بروز تنش اکسیداتیو و تحریک تولید رادیکال‌های آزاد (۴۵)

صورت بگیرد. همچنین، کاهش رشد می‌تواند به دلیل نیاز به انرژی سلول‌ها به منظور مقابله با تجمع فلز جیوه اتفاق افتاده باشد (۴۶).

برخی گزارش‌ها حاکی از آن هستند که مولکول گابا می‌تواند بر مراحل مختلف رشد و ویژگی‌های سلول تأثیر بگذارد. در آزمایشی غلظت‌های مناسب گابای اگزوزن سبب رشد سلول‌های هماتوکوکوس پلویالیس<sup>۲۰</sup> در شرایط تنش شوری و نور شدند (۴۷). گابا می‌تواند از طریق افزایش اسمولیت‌های سازگار و تنظیم اسمزی نیز سبب بهبود وضعیت رشد شود (۴۸). در این تحقیق، گابا در غلظت بالاتر (۴ میلی‌مولار) و در عدم حضور جیوه، سبب تحریک افزایش وزن خشک به میزان کمی شد که تأثیر مثبت گابا بر تحریک متابولیسم سلول‌ها را نشان می‌دهد.

نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان دادند مقدار رنگدانه‌های فتوسنتزی کلروفیل *a* و کاروتنوئید کل به صورت منفی تحت تأثیر تیمارهای جیوه و گابای منفرد قرار گرفتند (شکل ۲A, B)؛ در حالی که تیمارهای تلفیقی، یعنی تیمار گابا در شرایط تنش جیوه (H+G)، اغلب سبب کاهش مقدار رنگدانه‌های فتوسنتزی نشده‌اند یا در شرایطی، حتی سبب مقداری افزایش شدند.

مشاهده شده است که قرار گرفتن در معرض جیوه می‌تواند بیوستز کلروفیل *a* را با جایگزین شدن به جای اتم منیزیم مرکزی ( $Mg^{2+}$ ) مهار کند (۴۹، ۵۰) و سبب ممانعت فتوسنتزی شود. علاوه بر جایگزین شدن جیوه، به جای یون‌های فلزی در رنگدانه‌های فتوسنتزی، کاهش مقدار کلروفیل همچنین به تنش اکسیداتیو ناشی از جیوه و کاهش جذب عناصر ضروری مانند منگنز و پتاسیم نسبت داده شده است (۵۱). مهار فعالیت آنزیم‌هایی که بیوستز کلروفیل را کاتالیز می‌کنند نیز بر اثر تیمار جیوه

فیکوبیلی پروتئین‌ها رنگدانه‌های فتوسنتزی مهمی در سیانوباکترها هستند و از آنها می‌توان در صنایع غذایی و دارویی به‌عنوان رنگ‌های فلورسانس، داروهای ضدسرطان و التهاب و در کل ترکیبات آنتی‌اکسیدان استفاده کرد (۶۱). فیکوبیلین‌ها همچنین دارای قابلیت اتصال به فلزات هستند (۶۲). در نتایج به‌دست آمده از این تحقیق، الگوی افزایش و کاهش فیکوبیلین‌ها تحت تیمارهای جیوه و همین‌طور گابا، با یکدیگر مشابه نبود و فیکواریترین غالباً حالت‌های کاهشی و آلفوکوسیانیین و فیکوسیانیین در این رابطه، روند افزایشی نشان دادند (شکل ۳A, B, C). بررسی‌های بلامی - کارتر<sup>۳۳</sup> و همکاران (۲۰۲۲) نشان دادند اتصال فلزات مختلف به هریک از رنگدانه‌های فیکوبیلین به‌صورت متفاوت و با شدت تمایل متفاوتی اتفاق می‌افتد؛ برای مثال، نقره بیشتر به آلفوکوسیانیین متصل می‌شود تا فیکوسیانیین و همچنین مس تأثیر اندکی بر ساختار آلفوکوسیانیین و اما تأثیر بسیار زیادی بر فیکوسیانیین می‌گذارد (۶۲). براساس منابع، در بیشتر آزمایش‌های انجام شده در حضور فلزات، میزان فیکوبیلین‌ها به‌دلیل اتصال به فلز و از بین رفتن ساختار رنگدانه، کاهش نشان داده است (۶۲، ۶۳)؛ با این حال، در برخی موارد نظیر تحقیقات زاکارو<sup>۳۴</sup> در سال ۲۰۰۱، بر اثر تیمار با سرب، چهار برابر شدن میزان فیکوبیلین‌ها مشاهده شد. این مورد با نتایج به‌دست آمده از تحقیق حاضر که در غلظت ۸ میکرومولار جیوه، میزان فیکوبیلین کل افزایش یافت مشابهنه دارد. زاکارو و همکاران، افزایش فیکوبیلین‌ها را با وقوع برخی مکانیسم‌های محافظتی فتوسنتز و افزایش گیرنده‌های نوری تراپیروول در شرایط تنش مرتبط دانسته‌اند. برخی نیز معتقدند غالباً در شرایط تنش، حجم منابع نیتروژنی سلول (مثلاً فیکوبیلین‌ها) افزایش می‌یابد (۶۴).

تأیید شده است (۵۲). در پژوهشی کاهش بازده کوانتومی فتوسنتز و بروز تغییرات در فتوشیمی فتوسیستم ۲ میکروجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس مشاهده شد که به مدت ۲ ساعت در معرض حداکثر ۲۰ میکرومولار جیوه قرار گرفته بود (۵۳).

براساس گزارش‌ها، بروز تأثیر منفی فلزات سنگین بر بیوسنتز و تجمع کاروتنوئیدها نیز مشاهده شده است (۵۴، ۵۵). در تحقیقی بیوسنتز کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها به‌دلیل بروز اختلال و تأخیر در پیوستن این رنگدانه‌ها به فتوسیستم‌ها به‌دلیل تنش فلز سنگین مس کاهش یافت (۵۶). در تحقیق دیگری، تنش کادمیوم بیوسنتز کلروفیل و کاروتنوئید را در میکروجلبک‌های مونورافیدوم<sup>۳۱</sup> و کلرلا وولگاریس<sup>۳۲</sup> مهار کرد (۵۷، ۵۸).

در تحقیق حاضر، غلظت بالاتر جیوه (8H) و غلظت بالاتر گابا (4G) به‌ترتیب سبب کاهش بیشتر و کمتر مقدار رنگدانه‌های کلروفیل و کاروتنوئید در مقایسه با غلظت‌های پایین‌تر این ترکیبات شدند (شکل ۲). بررسی‌ها نشان می‌دهند گابا می‌تواند با توجه به شرایط تنش، از طریق کاهش یا افزایش رنگدانه‌های فتوسنتزی، سبب کنترل شرایط و بهبود وضعیت سلول شود (۵۹). نقش گابا در کاهش اثرات تنش فلزی کادمیوم در برخی از جلبک‌ها نظیر مونورافیدوم گزارش شده است (۱۵). نقش محافظتی گابا در قبال فتوسنتز، می‌تواند با تنظیم بیوسنتز کلروفیل و با کاهش تجمع بیش‌ازحد کلروفیل  $a$  و پیش‌سازهای آن و حفظ یکپارچگی ساختار غشای کلروپلاست اعمال شود (۵۹). از میان تیمارهای تلفیقی، صرفاً تیمار  $4H+2G$  سبب افزایش چشمگیر کلروفیل و کاروتنوئید شد (شکل ۲). مطالعات متعددی تأثیرات وابسته به غلظت گابا را در تنش‌ها نشان داده‌اند (۴۷، ۶۰).

تأثیر گابا (در هر دو غلظت استفاده‌شده) به‌طور منفرد و نیز در غالب تیمارهای تلفیقی به‌همراه جیوه، به‌صورت افزایش فیکوبیلین‌ها مشاهده شد (شکل ۳). براساس منابع، گابا جذب نیتروژن را افزایش و تولید پروتئین را با تحریک فعالیت و نیز بیان ژن آنزیم‌های متابولیسم نیتروژن افزایش می‌دهد (۶۵). این مورد، با نتایج ما مطابقت دارد که علاوه بر مقدار فیکوبیلین، در آن میزان پروتئین محلول کل نیز بر اثر تمام تیمارهای گابا (با جیوه یا بدون جیوه) افزایش می‌یابد (شکل ۴)؛ اما برعکس، مقدار پروتئین سلول‌ها بر اثر هر دو غلظت ۴ و ۸ میکرومولار جیوه کاهش یافت. سمیت زیاد  $Hg^{+2}$  به‌علت میل ترکیبی زیاد آن با گروه‌های تیول است (۵۰) و در میکروجلبک‌ها، سمیت فلزاتی نظیر جیوه می‌تواند به‌علت اتصال آنها به گروه‌های سولفیدریل پروتئین‌ها و تغییر ساختار آنها اتفاق بیفتد (۶۶). در یک تحقیق، کاهش مقدار پروتئین سلول در گیاه نخود، در حضور فلز کادمیوم، به افزایش روند تخریب پروتئین به‌دلیل افزایش فعالیت آنزیم پروتئاز در شرایط تنش، نسبت داده شده است (۶۷). همچنین، کاهش پروتئین در سلول‌های اسپیرولینا بر اثر تیمار با آلومینیوم مشاهده شده است (۶۸).

ترکیبات فنلی از گروه متابولیت‌های ثانویه و دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی هستند (۶۹). حضور گروه‌های هیدروکسیل و کربوکسیل در آنها به کلاته کردن فلزات کمک می‌کند و از این طریق سبب کاهش سمیت فلزات می‌شوند (۷۰، ۷۱). این ترکیبات با ارزش در شرایط طبیعی به میزان کمی در میکروجلبک اسپیرولینا یافت می‌شوند؛ بنابراین، برخی تحقیقات به‌منظور افزایش مقدار آنها در این میکروجلبک صورت گرفته است (۷۲). در تحقیق حاضر، محتوای ترکیبات فنلی بر

اثر تیمار با جیوه کاهش یافت؛ اما هر دو غلظت ۲ و ۴ میکرومولار گابا به‌طور منفرد و همین‌طور در تلفیق با تیمار جیوه سبب افزایش این ترکیبات شدند (شکل ۴A). گزارش‌هایی از تأثیر تحریک‌کننده گابای اگزوزن بر تولید فنل‌ها در شرایط تنش و افزایش پتانسیل آنتی‌اکسیدانی در گیاهان وجود دارند (۷۳). براساس تحقیقات برنارد و گواینگن<sup>۲۵</sup> در سال ۲۰۲۳، تنش فلزی بیش از اینکه بر تعداد ترکیبات فنلی میکروارگانیزم *اوگننا*<sup>۲۶</sup> مؤثر باشد، بر تنوع مولکولی ترکیبات فنلی آن مؤثر بوده است (۷۴)؛ بنابراین، افزایش نیافتن ترکیبات فنلی در میکروجلبک اسپیرولینا تحت تأثیر هر دو غلظت فلز جیوه ممکن است به همین دلیل باشد. افزایش فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در اسپیرولینای تیمار شده با جیوه، نشان‌دهنده افزایش اکسیداسیون ترکیبات فنلی در این شرایط است (شکل ۵B)؛ درحالی‌که با افزودن گابا، فعالیت این آنزیم، کاهش و به‌دنبال آن مقدار ترکیبات فنلی افزایش می‌یابد. افزایش فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در پاسخ به تنش‌های محیطی، در گذشته نیز گزارش شده است (۷۵، ۷۶).

در میکروجلبک اسپیرولینا بخش عمده‌ای از کربوهیدرات کل سلول را قندهای محلول تشکیل می‌دهند؛ درحالی‌که در گیاهان عالی، این بخش، بیشتر از قندهای نامحلول نظیر نشاسته تشکیل شده است (۷۷). کاهش مقدار کربوهیدرات‌های محلول در اسپیرولینا تحت تأثیر تنش جیوه و همین‌طور گابا (به‌جز تیمار تلفیقی 8H+4G که بیشترین غلظت هر دو ترکیب را شامل شده است) مشاهده شد (شکل ۴B) که می‌تواند به‌دلیل مصرف سریع قندهای محلول برای مقابله با تنش طی ساعات اولیه یا به‌دلیل اختلال در متابولیسم کربن اتفاق افتاده باشد. استیپوروا<sup>۲۷</sup> و همکارانش در سال

منفرد) نشان‌دهنده به راه افتادن پیام‌های درون‌سلولی و نشانه تغییر شرایط سلولی به دلیل دریافت پیام‌های تأثیر گابای اگزوزن است. تحقیقات نشان می‌دهند گابا علاوه بر تأثیر بر سلول‌ها در شرایط تنش، بر سلول‌ها در شرایط غیرتنش نیز تأثیرگذار است و سبب به راه افتادن یکسری پیام‌های سلولی، مثلاً در خصوص بهبود وضعیت رشدی گیاهان می‌شود (۸۵). همچنین، گابا در تمام موارد، به جز در یک مورد، افزایش مقدار پروتئین‌ها و کاهش مقدار کربوهیدرات را سبب شد که براساس منابع، نشان‌دهنده نقش گابا در تنظیم نسبت کربن به نیتروژن به‌ویژه در شرایط تنش است (۸۶).

### نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست آمده در کل، حاکی از تأثیرات منفی کلرید جیوه بر سیانوباکتر اسپیرولینا پلاتنسیس بود که به‌صورت بروز بیشترین مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشا و افت مقدار متابولیت‌های مهم سلول نظیر کربوهیدرات، پروتئین و رنگدانه‌های فتوسنتزی (کلروفیل  $a$  و کاروتنوئید) در ۴۸ ساعت اول نمایان شد؛ در عین حال، گابا وضعیت شاخص‌های اسپیرولینا را در حضور کلرید جیوه در ساعات اولیه تنش بهبود بخشید. تیمار گابا در شرایط عدم حضور جیوه سبب تحریک سیستم اکسیدان / آنتی‌اکسیدان سلول شد که براساس منابع، نشان‌دهنده بروز یکسری وقایع در ساعات اولیه مرتبط با حالت سیگنالی گابا و تغییر متابولیسم سلولی می‌تواند باشد. تحقیقات نشان می‌دهند تحریک افزایش میزان گابای اندوزن نیز می‌تواند به‌سرعت در تیمار سلول با گابای اگزوزن اتفاق بیافتد که در نتیجه سبب به راه افتادن یکسری وقایع و پیام‌های درون‌سلولی و سازگاری سلول با شرایط جدید می‌شود.

۱۹۸۷ گزارش کردند کاهش محتوای کربوهیدرات سلول در شرایط تنش کادمیوم می‌تواند به دلیل مهار احتمالی متابولیسم کربن بر اثر برهمکنش کادمیوم با سایت‌های فعال آنزیم‌های ضروری مانند رویسکو رخ داده باشد (۷۸). همچنین رزا<sup>۲۸</sup> و همکاران در سال ۲۰۰۹، تخلیه سریع محتوای قندهای محلول در شرایط تنش را به دلیل ایجاد اختلال در فتوسنتز دانستند (۷۹).

بروز اختلال در فتوسنتز و تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن بر اثر تنش اکسیداتیو می‌تواند سبب آسیب‌رسانی به غشاها شود و پراکسیداسیون لیپیدی را افزایش دهد (۸۰). مقدار مالون دی‌آلدهید که یک ترکیب حاصل از پراکسیداسیون لیپیدی غشاها است (۸۱)، در تحقیق حاضر، در تمام تیمارها نسبت به شاهد افزایش یافت (شکل ۵۸) و این افزایش در تیمارهای جیوه فاقد گابا از باقی تیمارها بیشتر بود. جیوه با اتصال به کلروپلاست‌ها بر فتوسنتز تأثیر می‌گذارد و سبب تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود (۸۲).

مقدار فعالیت آنزیم‌های پراکسیدازی تقریباً در بیشتر موارد تیمار جیوه و نیز گابا افزایش یافت (شکل ۵۷). پراکسیدازها آنزیم‌های کلیدی در شرایط تنش اکسیداتیو هستند که حذف پراکسید هیدروژن در شرایط تنش و کاهش اکسیژن فعال را موجب می‌شوند (۸۳). همچنین، بررسی‌ها نشان دادند گابای اگزوزن می‌تواند سبب القای فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز شود (۸۴). این اتفاقات درون‌سلولی، در ۴۸ ساعت اولیه مواجهه با تیمار کلرید جیوه برای وقوع سازگاری با تنش فلز سنگین ضروری می‌نماید؛ اما تحریک برخی شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی سلول (نظیر آنزیم‌های پلی‌فنل اکسیداز و پراکسیداز) بر اثر تیمار با گابا (به‌طور

## References

- (1) Marella TK., López-Pacheco IY., Parra-Saldívar R., Dixit S., Tiwari A. Wealth from waste: Diatoms as tools for phycoremediation of wastewater and for obtaining value from the biomass. *Science of the Total Environment*, 2020; 724: 137960. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137960>
- (2) Akbari F., Madadkar Haghjou M. Increase in biomass and growth of *Dunaliella* microalga under vanillin treatment. *Journal of Plant Process and Function* 2018; 7 (24): 211-228. <https://jisp.iut.ac.ir/article-1-691-fa.html> [In Persian].
- (3) Madadkar-Haghjou M., Shariati M., Pozveh MH. The effect of low light intensities on oxidative stress induced by short-term chilling in *Dunaliella salina* teod. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2006; 9: 2048-2054. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2006.2048.2054>
- (4) Borges JA., Rosa GMD., Meza LHR., Henrard AA., Souza MDRAZD., Costa JAV. *Spirulina* sp. LEB-18 culture using effluent from the anaerobic digestion. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 2013; 30: 277-288. <https://doi.org/10.1590/S0104-66322013000200006>
- (5) Rodrigues RD., de Castro FC., de Santiago-Aguiar RS., Rocha MV. Ultrasound-assisted extraction of phycobiliproteins from *Spirulina (Arthrospira) platensis* using protic ionic liquids as solvent. *Algal research*, 2018; 31: 454-462. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.02.021>
- (6) Silva AD., Moreira LM., de Magalhães WT., Farias WL., Rocha MV., Bastos AK. Extraction of biomolecules from *Spirulina platensis* using non-conventional processes and harmless solvents. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2017; 5 (3): 2101-2106. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.04.008>
- (7) Dheetcha A., Mishra S. Biosequestering potential of *Spirulina platensis* for uranium. *Current Microbiology*, 2008; 57: 508-514. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9277-7>
- (8) Samadani M., Perreault F., Oukarroum A., Dewez D. Effect of cadmium accumulation on green algae *Chlamydomonas reinhardtii* and acid-tolerant *Chlamydomonas* CPCC 121. *Chemosphere*, 2018; 191: 174-82. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.017>
- (9) Kumari S., Jamwal R., Mishra N., Singh DK. Recent developments in environmental mercury bioremediation and its toxicity: A review. *Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management*, 2020; 13: 100283. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2020.100283>
- (10) Zhu W., Li Z., Li P., Yu B., Lin CJ., Sommar J., et al. Re-emission of legacy mercury from soil adjacent to closed point sources of Hg emission. *Environmental Pollution* 2018; 242: 718-27. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.07.002>
- (11) Danouche M., El Ghachtouli N., El Arroussi H. Phycoremediation mechanisms of heavy metals using living green microalgae: physicochemical and molecular approaches for enhancing selectivity and removal capacity *Heliyon*, 2021; 7 (7). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07609>
- (12) Yan C., Qu Z., Wang J., Cao L., Han Q. Microalgal bioremediation of heavy metal pollution in water: Recent advances, challenges, and prospects. *Chemosphere*, 2022; 286: 131870. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131870>
- (13) Priyadarshini E., Priyadarshini SS., Pradhan N. Heavy metal resistance in algae and its application for metal nanoparticle synthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019; 103: 3297-3316. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09685-3>
- (14) Manoj K., Padhy PK. Oxidative stress and heavy metals: an appraisal with reference to environmental biology. *International Research Journal of Biological Sciences*, 2013; 2 (10): 91-101.
- (15) Zhao Y., Song X., Zhong DB., Yu L., Yu X.  $\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA) regulates

- lipid production and cadmium uptake by *Monoraphidium* sp. QLY-1 under cadmium stress. *Bioresource Technology*, 2020; 297: 122500. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122500>
- (16) Cuypers A., Hendrix S., Amaral dos Reis R., De Smet S., Deckers J., Gielen H., et al. Hydrogen peroxide, signaling in disguise during metal phytotoxicity. *Frontiers in Plant Science*, 2016; 7: 470. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00470>
- (17) Ueno H. Enzymatic and structural aspects on glutamate decarboxylase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2000; 10 (1-3): 67-79. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(00\)00114-4](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(00)00114-4)
- (18) Li L., Dou N., Zhang H., Wu C. The versatile GABA in plants. *Plant Signaling and Behavior*, 2021a; 16 (3): 1862565. <https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1862565>
- (19) Rodrigues-Corrêa KC., Fett-Neto AG. Abiotic stresses and non-protein amino acids in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2019; 38 (5-6): 411-430. <https://doi.org/10.1080/07352689.2019.1707944>
- (20) Albert B., Menny K., Nicole G. The transporter GAT1 plays an important role in GABA-mediated carbon-nitrogen interactions in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 2015; 6: 785. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00785>
- (21) Bor M., Seckin B., Ozgur R., Yilmaz O., Ozdemir F., Turkan I. Comparative effects of drought, salt, heavy metal and heat stresses on gamma-aminobutyric acid levels of sesame (*Sesamum indicum* L.). *Acta Physiologiae Plantarum*, 2009; 31: 655-659. <https://doi.org/10.1007/s11738-008-0255-2>
- (22) Zarrouk C. Contribution a l'etude d'une Cyanophyce. Influence de Divers Facteurs Physiques et Chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina mixima*. [Dissertation]. Paris Univ; 1966.
- (23) Bown AW., Zhang G. Mechanical stimulation, 4-aminobutyric acid (GABA) synthesis, and growth inhibition in soybean hypocotyl tissue. *Canadian Journal of Botany*, 2000; 78 (1): 119-123. <https://doi.org/10.1139/b99-169>
- (24) Gu M., Yang J., Tian X., Fang W., Xu J., Yin Y. Enhanced total flavonoid accumulation and alleviated growth inhibition of germinating soybeans by GABA under UV-B stress. *Royal Society of Chemistry Advances*, 2022; 12 (11): 6619-6630. [10.1039/D2RA00523A](https://doi.org/10.1039/D2RA00523A)
- (25) Li L., Chen Z., Huang Q. Exogenous  $\gamma$ -aminobutyric acid promotes biomass and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis*. *Algal Research*, 2020; 52: 102089. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102089>
- (26) Khademi S., Oraghi Ardebili N. Changes in antioxidant systems and biomass in response to selenate in blue-green microalgae *Spirulina platensis*, Cyanophyta. *Journal of Plant Process and Function*, 2017; 6 (20): 9-16. <https://jispp.iut.ac.ir/article-1-592-fa.html> [In Persian].
- (27) Zavřel T., Sinetova MA., Červený J. Measurement of chlorophyll a and carotenoids concentration in cyanobacteria. *Bio-Protocol*, 2015; 5 (9): 1-5. <http://doi.org/10.21769/BioProtoc.1467>
- (28) Moraes CC., Sala L., Cerveira GP., Kalil SJ. C-phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* wet biomass. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 2011; 28: 45-49. <https://doi.org/10.1590/S0104-66322011000100006>
- (29) Bennett A., Bogorad L. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *The Journal of Cell Biology*, 1973; 58 (2): 419-35. <https://doi.org/10.1083/jcb.58.2.419>
- (30) Machu L., Misurcova L., Vavra Ambrozova J., Orsavova J., Mlcek J., Sochor J., et al. Phenolic content and antioxidant capacity in algal food products. *Molecules*, 2015; 20 (1): 1118-1133. <https://doi.org/10.3390/molecules20011118>
- (31) Marshall, JD. Drought and shade interact to cause fine-root mortality in Douglas-fir seedlings. *Plant and Soil*, 1986; 91: 51-60. <https://doi.org/10.1007/BF02181818>

- (32) Irigoyen JJ., Einerich DW., Sánchez-Díaz M. Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated Alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiologia Plantarum*, 1992; 84 (1): 55-60. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1992.tb08764.x>
- (33) Hodges DM., DeLong JM., Forney CF., Prange RK. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 1999; 207: 604-611. <https://doi.org/10.1007/s004250050524>
- (34) Smirnoff N., Colombe SV. Drought influences the activity of enzymes of the chloroplast hydrogen peroxide scavenging system. *Journal of Experimental Botany*, 1988; 39 (8): 1097-1108. <https://doi.org/10.1093/jxb/39.8.1097>
- (35) Bradford MMA. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976; 72 (1): 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- (36) Chance B., Maehly AC. Assay of catalases and peroxidases. *Methods Enzymol*, 1955; 764-775. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(55\)02300-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(55)02300-8)
- (37) Raymond J., Rakariyatham N., Azanza J.L. Purification and some properties of polyphenoloxidase from sunflower seeds. *Phytochemistry*, 1993; 34: 927-931. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)90689-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)90689-7)
- (38) Mahawar L., Pandey A., Ramasamy KP., Pandey S., Prasad SM. GABA as a signalling molecule: Possible mechanism for its enhanced commercial production by cyanobacteria. *Journal of Applied Phycology*, 2022; 34 (5): 2355-2369. <https://doi.org/10.1007/s10811-022-02791-2>
- (39) Simanjuntak G., Mantiri D., Kemer K. The effect compound of growth and pigment chlorophyll microalgae *Botryococcus braunii*. *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis*, 2016; 2 (1): 23-29. <https://doi.org/10.35800/jplt.4.2.2016.14080>
- (40) Overnell J. The effect of heavy metals on photosynthesis and loss of cell potassium in two species of marine algae, *Dunaliella tertiolecta* and *Phaeodactylum tricornerutum*. *Marine Biology*, 1975; 29: 99-103. <https://doi.org/10.1007/BF00395531>
- (41) Rueter JrJG., Chisholm SW., Morel FM. Effect of copper toxicity on silicic acid uptake and growth in *Thalassiosira pseudonana*. *Journal of Phycology*, 1981; 17 (3): 270-278. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1981.tb00850.x>
- (42) Fisher NS., Jones GJ. Heavy metals and marine phytoplankton: correlation of toxicity and sulphhydryl binding. *Journal of Phycology*, 1981; 17 (1): 108-111. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1981.tb00827.x>
- (43) Rosko JJ., Rachlin JW. The effect of cadmium, copper, mercury, zinc and lead on cell division, growth, and chlorophyll a content of the chlorophyte *Chlorella vulgaris*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 1977; 104: 226-233. <https://doi.org/10.2307/2484302>
- (44) Vajpayee P., Tripathi RD., Rai UN., Ali MB., Singh SN. Chromium (VI) accumulation reduces chlorophyll biosynthesis, nitrate reductase activity and protein content in *Nymphaea alba* L. *Chemosphere*, 2000; 41 (7): 1075-1082. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00426-9](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00426-9)
- (45) Mallick N. Copper-induced oxidative stress in the chlorophycean microalga *Chlorella vulgaris*: response of the antioxidant system. *Journal of Plant Physiology*, 2004; 161 (5): 591-607. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-01230>
- (46) Israr M., Sahi S., Datta R., Sarkar D. Bioaccumulation and physiological effects of mercury in *Sesbania drummondii*. *Chemosphere*, 2006; 65 (4): 591-598. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.02.016>
- (47) Li Q., Zhao Y., Ding W., Han B., Geng S., Ning D., Gamma-aminobutyric acid facilitates the simultaneous production of biomass, astaxanthin and lipids in *Haematococcus pluvialis* under salinity and

- high-light stress conditions. *Bioresource Technology*, 2021b; 320: 124418. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124418>
- (48) Sikder RK., Wang X., Zhang H., Gui H., Dong Q., Jin D., et al. Nitrogen enhances salt tolerance by modulating the antioxidant defense system and osmoregulation substance content in *Gossypium hirsutum*. *Plants*, 2020; 9 (4): 450. <https://doi.org/10.3390/plants9040450>
- (49) Singh R., Dubey G., Singh VP., Srivastava PK., Kumar S., Prasad SM. High light intensity augments mercury toxicity in cyanobacterium *Nostoc muscorum*. *Biological Trace Element Research*, 2012; 149: 262-72. <https://doi.org/10.1007/s12011-012-9421-x>
- (50) Nowicka B. Heavy metal-induced stress in eukaryotic algae—mechanisms of heavy metal toxicity and tolerance with particular emphasis on oxidative stress in exposed cells and the role of antioxidant response. *Environmental Science and Pollution Research*, 2022; 29 (12): 16860-16911. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-18419-w>
- (51) Zhang T., Lu Q., Su C., Yang Y., Hu D., Xu Q. Mercury induced oxidative stress, DNA damage, and activation of antioxidative system and Hsp70 induction in duckweed (*Lemna minor*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2017; 143: 46-56. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.04.058>
- (52) Souri Z., Cardoso AA., da-Silva CJ., de Oliveira LM., Dari B., Sihi D., et al. Heavy metals and photosynthesis: Recent developments. *Photosynthesis, Productivity and Environmental Stress*, 2019; 4: 107-134. <https://doi.org/10.1002/9781119501800.ch7>
- (53) Lu CM., Chau CW., Zhang JH. Acute toxicity of excess mercury on the photosynthetic performance of cyanobacterium, *S. platensis*—assessment by chlorophyll fluorescence analysis. *Chemosphere*, 2000; 41 (1-2): 191-196. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00411-7](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00411-7)
- (54) Kummerová M., Zezulka Š., Kráľová K., Masarovičová E. Effect of zinc and cadmium on physiological and production characteristics in *Matricaria recutita*. *Biologia Plantarum*, 2010; 54: 308-314. <https://doi.org/10.1007/s10535-010-0053-8>
- (55) Mazaheri Tirani M., Madadkar-Haghjoui M., Sulieman S., Ismaili A., Comparative evaluation of zinc oxide effects on tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) grown in different media. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2018; 20 (4): 787-802. <https://jast.modares.ac.ir/article-23-19968-en.html>
- (56) Caspi V., Droppa M., Horváth G., Malkin S., Marder JB., Raskin VI. The effect of copper on chlorophyll organization during greening of barley leaves. *Photosynthesis Research*, 1999; 62: 165-174. <https://doi.org/10.1023/A:1006397714430>
- (57) Cheng J., Qiu H., Chang Z., Jiang Z., Yin W. The effect of cadmium on the growth and antioxidant response for freshwater algae *Chlorella vulgaris*. *SpringerPlus*, 2016; 5 (1): 1-8. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2963-1>
- (58) Zhao Y., Song X., Yu L., Han B., Li T., Yu X. Influence of cadmium stress on the lipid production and cadmium bioresorption by *Monoraphidium* sp. QLY-1. *Energy Conversion and Management*, 2019; 188: 76-85. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2019.03.041>
- (59) Xiang L., Hu L., Xu W., Zhen A., Zhang L., Hu X. Exogenous  $\gamma$ -aminobutyric acid improves the structure and function of photosystem II in muskmelon seedlings exposed to salinity-alkalinity stress. *PLoS one*, 2016; 11(10): e0164847. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164847>
- (60) Liu S., Zhang J., Hu C., Sun X., Xu N. Physiological and transcriptome analysis of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) in improving *Gracilariopsis lemaneiformis* stress tolerance at high temperatures. *Algal Research*, 2021; 60: 102532. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102532>
- (61) Wu Q., Liu L., Miron A., Klímová B.,

- Wan D., Kuča K. The antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities of *Spirulina*: an overview. *Archives of Toxicology*, 2016; 90: 1817-1840. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1744-5>
- (62) Bellamy-Carter J., Sound JK., Leney AC. Probing heavy metal binding to phycobiliproteins. *The Federation of European Biochemical Societies Journal*, 2022; 289 (15): 4646-4656. <https://doi.org/10.1111/febs.16396>
- (63) Murthy SD., Mohanty P. Time-dependent alterations in the antenna pigment-protein complex by mercury ions in the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *BioMetals*, 1993; 6: 45-48. <https://doi.org/10.1007/BF00154231>
- (64) Zaccaro MC., Salazar C., Zulpa de Caire G., Storni de Cano M., Stella AM. Lead toxicity in cyanobacterial porphyrin metabolism. *Environmental Toxicology: An International Journal*, 2001; 16 (1): 61-67. [https://doi.org/10.1002/1522-7278\(2001\)16:1<61::AID-TOX70>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/1522-7278(2001)16:1<61::AID-TOX70>3.0.CO;2-L)
- (65) Huang XJ., Jian SF., Wan S., Miao JH., Zhong C. Exogenous  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) alleviates nitrogen deficiency by mediating nitrate uptake and assimilation in *Andrographis paniculata* seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2023; 198: 107700. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.107700>
- (66) Tripathi BN., Gaur JP. Physiological behavior of *Scenedesmus* sp. during exposure to elevated levels of Cu and Zn and after withdrawal of metal stress. *Protoplasma*, 2006; 229: 1-9. <https://doi.org/10.1007/s00709-006-0196-9>
- (67) Palma JM., Sandalio LM., Corpas FJ., Romero-Puertas MC., McCarthy I., del Río LA. Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2002; 40 (6-8): 521-530. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(02\)01404-3](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(02)01404-3)
- (68) Murali O., Reddy CS., Kumar PV., Raju MA., Mehar KS. Efficient bioremediation of aluminium by using ecofriendly cyanobacteria from heavy metal contaminated water. *International Journal of Advanced Research*, 2014; 2 (10): 144-149.
- (69) Naikoo MI., Dar MI., Raghieb F., Jaleel H., Ahmad B., Raina A., et al. Role and regulation of plants phenolics in abiotic stress tolerance: An overview. *Plant Signaling Molecules*, 2019: 157-168. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816451-8.00009-5>
- (70) Michalak A. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish journal of Environmental Studies*, 2006; 15 (4): 523-530. <https://www.pjoes.com/Phenolic-Compounds-and-Their-Antioxidant-Activity-in-Plants-Growing-under-Heavy-Metal.87899,0,2.html>
- (71) Korzeniowska K., Łęska B., Wiczorek PP. Isolation and determination of phenolic compounds from freshwater *Cladophora glomerata*. *Algal Research*, 2020; 48: 101912. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101912>
- (72) Kepekçi RA., Saygideger SD. Enhancement of phenolic compound production in *Spirulina platensis* by two-step batch mode cultivation. *Journal of Applied Phycology*, 2012; 24: 897-905. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9710-3>
- (73) Ma Y., Wang P., Wang M., Sun M., Gu Z., Yang R. GABA mediates phenolic compounds accumulation and the antioxidant system enhancement in germinated hullless barley under NaCl stress. *Food Chemistry*, 2019; 270: 593-601. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.092>
- (74) Bernard E., Guéguen C. Molecular changes in phenolic compounds in *Euglena gracilis* cells grown under metal stress. *Frontiers in Plant Science*, 2023; 14: 1099375. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1099375>
- (75) García-Rodríguez R., Romero-Segura C., Sanz C., Sánchez-Ortiz A., Pérez AG. Role of polyphenol oxidase and peroxidase in shaping the phenolic profile of virgin olive oil. *Food Research International*, 2011; 44 (2): 629-635. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.12.023>
- (76) Ortega-García F., Peragon J. The

- response of phenylalanine ammonia-lyase, polyphenol oxidase and phenols to cold stress in the olive tree (*Olea europaea* L. cv. Picual). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2009; 89 (9): 1565-1573. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3625>
- (77) Kumar A., Ramamoorthy D., Verma DK., Kumar A., Kumar N., Kanak KR., et al. Antioxidant and phytonutrient activities of *Spirulina platensis*. *Energy Nexus*, 2022; 6: 100070. <https://doi.org/10.1016/j.nexus.2022.100070>
- (78) Stiborov'a M., Ditrichov'a M., B. REzinov'a A. Effect of heavy metal ions on growth and biochemical characteristics of photosynthesis of barley and maize seedlings. *Biology of Plant* (Prague), 1987; 29: 453-467. <https://doi.org/10.1007/BF02882221>
- (79) Rosa M., Prado C., Podazza G., Interdonato R., González JA., Hilal M., et al. Soluble sugars: Metabolism, sensing and abiotic stress: A complex network in the life of plants. *Plant Signaling and Behavior*, 2009; 4 (5): 388-393. <https://doi.org/10.4161/psb.4.5.8294>
- (80) Allen DJ., Ort DR. Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. *Trends in Plant Science*, 2001; 6 (1): 36-42. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01808-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01808-2)
- (81) Meng Jie A., Hai Jiang W. Effects of modifiers on the growth, photosynthesis, and antioxidant enzymes of cotton under cadmium toxicity. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2019; 38: 1196-1205. <https://doi.org/10.1007/s00344-019-09924-x>
- (82) Le Faucheur S., Campbell PG., Fortin C., Slaveykova VI. Interactions between mercury and phytoplankton: speciation, bioavailability, and internal handling. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2014; 33 (6): 1211-1224. <https://doi.org/10.1002/etc.2424>
- (83) Vinocur B., Altman A. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology*, 2005; 16 (2): 123-132. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.02.001>
- (84) Yang J., Sun C., Zhang Y., Fu D., Zheng X., Yu T. Induced resistance in tomato fruit by  $\gamma$ -aminobutyric acid for the control of *alternaria* rot caused by *Alternaria alternata*. *Food Chemistry*, 2017; 221: 1014-1020. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.061>
- (85) Ramos-Ruiz R., Martinez F., Knauf-Beiter G. The effects of GABA in plants. *Cogent Food and Agriculture*, 2019; 5 (1): 1670553. <https://doi.org/10.1080/23311932.2019.1670553>
- Fait A., Fromm H., Walter D., Galili G., Fernie AR. Highway or byway: the metabolic role of the GABA shunt in plants. *Trends in Plant Science*, 2008; 13 (1): 14-19. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.10.005>

1- Gama-aminobutyric acid (GABA)

2- Reactive oxygen species (ROS)

3- *Spirulina platensis*

4- *Spirulina platensis*

5- Reactive oxygen species (ROS)

6- Gama-aminobutyric acid (GABA)

7- Exogen

8- Endogen

9- GABA shunt pathway

10- Zarrouk

11-  $HgCl_2$

12- Moraes

13- Hodges

14- Smirnoff and Colombe

15- Bradford

16- Chance and Maehly

17- Raymond

18- Simanjuntak

19- *Botryococcus braunii*

20- *Haematococcus pluvialis*

21- *Monoraphidium* sp. QLY-1

22- *Chlorella vulgaris*

23- Bellamy-Carter

24- Zaccaro

25- Bernard and Guéguen

26- *Euglena*

27- Stiborov'a

28- Rosa