

مقاله پژوهشی

## تأثیر نانوذرات اکسیدهای فلزی بر ساختار دیواره سلولی ریز جلبک *Nannochloropsis oculata*

نسرین فاضلیان<sup>۱\*</sup>، مرتضی یوسفزادی<sup>۲</sup>

تاریخ دریافت: تیر ۱۴۰۰

تاریخ پذیرش: شهریور ۱۴۰۰

### چکیده

دیواره سلولی جلبک‌ها، جایگاه اولیه برای برهمکنش با نانوذرات است و سدی در برابر ورود نانوذرات به درون سلول خود ایجاد می‌کند. از این رو، در پژوهش حاضر تأثیر نانوذرات روی اکسید (ZnO)، مس (II) اکسید (CuO) و آهن (III) اکسید (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) بر ساختار دیواره سلولی ریز جلبک *Nannochloropsis oculata* بررسی شد. محاسبه EC<sub>50</sub> با استفاده از شمارش سلولی ریز جلبک نشان داد که ترتیب سمیت نانوذرات در ریز جلبک *N. oculata* به صورت Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> < ZnO < CuO بود. برهمکنش نانوذرات ZnO، CuO و Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> با دیواره سلولی ریز جلبک در نتایج FTIR اثبات شد. سه نانوذره مورد مطالعه بیشترین برهمکنش را با گروه‌های عاملی کربونیل (C=O)، متوکسی (C-O) و متیل (C-H) دیواره سلولی *N. oculata* نشان دادند. از طرف دیگر، تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) نشان داد که نانوذرات ZnO و CuO باعث چروکیدگی دیواره سلولی ریز جلبک *N. oculata* شدند. همچنین تجمع این دو نانوذره در سطح دیواره سلولی نیز مشاهده شد. تجمع نانوذرات و چروکیدگی دیواره سلولی می‌تواند دلیل احتمالی سمیت بیشتر نانوذرات CuO و ZnO نسبت به نانوذرات Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> در ریز جلبک *N. oculata* باشد.

واژگان کلیدی: *Nannochloropsis*، نانوذرات اکسید فلزی، FTIR، TEM.

۱- دکتری فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست‌شناسی گیاهی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.  
۲- دکتری فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندر عباس، ایران.

۳- استاد گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندر عباس، ایران.

\* نویسنده مسئول: [nasrin\\_fazelian@yahoo.com](mailto:nasrin_fazelian@yahoo.com)

## مقدمه

اکوسیستم آبی و ایجاد خطر برای جانداران آبی می‌شود. اما با وجود حساسیت جلبک‌ها، مطالعه کمی در این زمینه صورت گرفته است (Fazelian et al., 2020).

ریزجلبک‌ها از ساده‌ترین موجودات دارای کلروفیل هستند که با فتوسنتز، مواد آلی را می‌سازند و غذای آغازین همه جانوران را در اکوسیستم‌های آبی تشکیل می‌دهند. تمام حلقه‌های بالاتر شبکه غذایی انرژی خود را از مواد آلی ساخته شده توسط ریزجلبک‌ها دریافت می‌کنند (Sheehan et al., 1998). فیتوپلانکتون‌ها علاوه بر اهمیت در زنجیره غذایی آبزیان، نقش مهمی در تولید اکسیژن و همچنین در پاک‌سازی آب‌های آلوده دارند. به علاوه از پلانکتون‌های گیاهی به عنوان موجودات مدل در بررسی سمیت مواد شیمیایی مختلف از جمله نانومواد استفاده می‌شود و به عنوان یک شاخص زیستی سلامت اکوسیستم محسوب می‌شوند. با توجه به توانایی سمیت نانوذرات، جذب آنها توسط میکروارگانیسم‌های آبی از اهمیت بالایی برخوردار است (Roy et al., 2003).

در برخی مطالعات، سمیت نانوذرات ZnO را با نانوذرات دیگر مقایسه شده است.

نانوذرات اکسیدهای فلزی به دلیل داشتن سطح ویژه بالا، جایگاه‌های جذب زیاد، مسافت نفوذ بین ذره‌ای کوتاه، استفاده مجدد و سوپر پارامغناطیس بودن، از مهم‌ترین گروه نانوذرات به شمار می‌روند (نعمت‌بخش و همکاران، ۱۳۹۴). نانوذرات روی اکسید (ZnO) یکی از نانوذرات اکسیدهای فلزی هستند که امروزه بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند و به دلیل پایداری شیمیایی و جذب بالا، کاربرد گسترده‌ای در محصولات صنعتی مانند ضدآفتاب‌ها، پوشش‌ها و رنگ‌ها پیدا کرده‌اند (Osmond and McCall, 2010). نانوذرات مس (II) اکسید (CuO) در ساختار ابرهادی‌ها، مواد حساس، شیشه و سرامیک استفاده می‌شوند و به عنوان عامل آنتی‌فولینگ در ترکیب رنگ‌های موجود بر بدنه کشتی‌ها و قایق‌ها به کار می‌روند (Nations et al., 2011; Chang et al., 2012; Bao et al., 2015). نانوذرات آهن (III) اکسید ( $Fe_2O_3$ ) به دلیل تولید نسبتاً آسان، هزینه اندک تولید و امکان هدایت مغناطیسی کاربردهای گسترده‌ای در علوم پزشکی و صنایع غذایی پیدا کرده‌اند (Kadar et al., 2012). استفاده از نانوذرات اکسیدهای فلزی در صنایع مختلف باعث ورود آنها به

ریز جلبک *Nannochloropsis oculata* بررسی کردند اما به اثر این سه نانوذره بر ساختار دیواره سلولی ریز جلبک مورد نظر اشاره‌ای نکردند. به طور کلی تاکنون تأثیر نانوذرات بر ساختار دیواره سلولی ریز جلبک‌ها مقایسه نشده است. دیواره سلولی جایگاه اولیه برهمکنش و ورود نانوذرات به درون سلول جلبکی است. تغییر در گروه‌های شیمیایی سطحی دیواره سلولی می‌تواند نشان دهنده برهمکنش نانوذرات با دیواره و ایجاد سمیت در جلبک باشد (Mohammed Sadiq et al., 2011). همچنین نانوذرات به دلیل داشتن ناحیه سطحی ویژه و اندازه کوچک می‌توانند از عرض دیواره و غشای سلول جلبکی عبور کنند، جذب سلول شوند و فعالیت‌های سلول را تحت تأثیر قرار دهند (Chen et al., 2012). با توجه به اهمیت دیواره سلولی ریز جلبک‌ها در سمیت نانوذرات و نقش ریز جلبک *N. oculata* در صنعت آبزی پروری (به دلیل میزان زی‌توده و لیپید بالا)، در این پژوهش سمیت نانوذرات ZnO، CuO و Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> و برهمکنش آنها با دیواره سلولی ریز جلبک *N. oculata* مورد بررسی و مقایسه قرار گرفته است.

Aruoja و همکاران (۲۰۰۹) تأثیر سه نانوذره ZnO، CuO و TiO<sub>2</sub> بر ریز جلبک *Pseudokirchneriella subcapitata* بررسی کردند و سمیت نانوذرات ZnO را بیشتر از CuO و TiO<sub>2</sub> گزارش کردند. از طرف دیگر سمیت نانوذرات ZnO در گونه‌های *Scenedesmus* چندین برابر سمیت نانوذرات TiO<sub>2</sub> در این گونه‌ها گزارش شده است (Pendashte et al., 2013). مطالعات مختلف نشان داده‌اند که یون‌های فلزی مانند یون Cu<sup>2+</sup> و Zn<sup>2+</sup> نقش مهمی در حفظ هومئوستازی ارگانیسم‌ها ایفا می‌کنند و مقادیر پایین یا بالای این یون‌ها باعث اختلال در مکانیسم‌های هومئوستاتیک سلول می‌شوند. اگر تغییر هومئوستازی خارج از تحمل فیزیولوژیکی سلول باشد باعث سمیت نانوذرات در سلول می‌شود (Chang et al., 2012). به طور کلی نانوذرات اکسیدهای فلزی اثرات سمیت متفاوتی دارند و سمیت آنها به ساختار نانو، نسبت سطح به حجم، ماهیت بخش فلزی و میزان آزادسازی یون فلزی بستگی دارد (Pendashteh et al., 2013). لازم به ذکر است که Fazelian و همکاران در سال ۲۰۲۰ تأثیر سه نانوذره اکسید فلزی ZnO، CuO و Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> را بر رشد و میزان لیپید

## مواد و روش‌ها

ریز جلبک مورد آزمایش در این پژوهش، *Nannochloropsis oculata* بود که نمونه استوک آن از مرکز تحقیقات شیلات بندر لنگه تهیه شد. ریز جلبک *N. oculata* در محیط کشت f2 و در آب دریای استریل شده کشت داده شد (Guillard and Ryther, 1962). ارلن‌های حاوی نمونه جلبکی تحت هوادهی ملایم، دمای ۲۸-۲۶ درجه سانتی‌گراد، شدت نور ۵۰۰۰ لوکس با دوره روشنایی ۱۲ ساعته و میزان شوری ۲۷ ppm قرار گرفتند و زی‌توده کافی از نمونه جلبکی تهیه شد. در این مدت با استفاده از لام نفوبار نمونه‌ها شمارش شدند. به منظور اعمال تیمار نانوذرات، ارلن‌هایی حاوی ۴۰۰ میلی‌لیتر نمونه جلبکی با تراکم اولیه  $4 \times 10^4$  آماده شدند و به مدت ۴ روز در شرایط آزمایشگاهی قرار گرفتند تا به مرحله رشد لگاریتمی برسند. سپس در روز چهارم، تیمارهای نانوذرات با غلظت‌های مختلف (۰ (شاهد)، ۵، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) انجام شد. برای هر تیمار، سه تکرار در نظر گرفته شد و مدت زمان تیمار نانوذرات ۳ روز بود (Fazelian et al., 2019, 2020).

## مشخصات نانوذرات

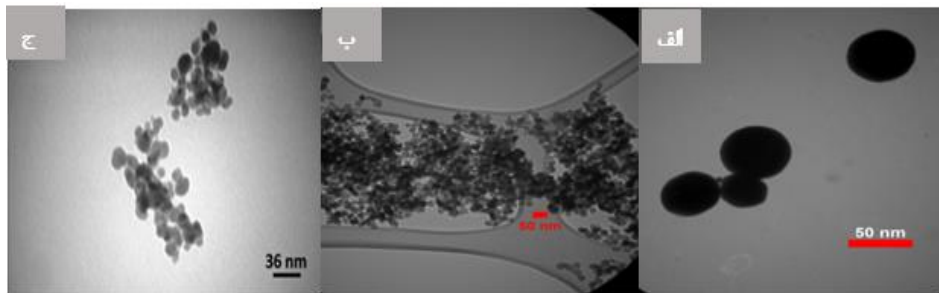
نانوذرات ZnO، CuO و  $Fe_2O_3$  به صورت جامد و پودری (پیشگامان نانومواد ایرانیان، ایران) تهیه شد. اطلاعات مربوط به نانوذرات ZnO، CuO و  $alpha-Fe_2O_3$  در جدول ۱ خلاصه شده است. تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) (Philips, EM 208) هلند) سه نانوذره را نیز می‌توان در شکل ۱ مشاهده کرد.

## نحوه آماده‌سازی محلول‌ها

استوکی با غلظت ۱۰ گرم در لیتر (آب دیونیزه و پودر نانوذرات) از نانوذرات اکسیدهای فلزی ساخته شد و برای ممانعت از رسوب نانوذرات، به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه سونیکاتور (WiseClean, WUC-A03H) کره جنوبی) قرار داده شد و به منظور همگن کردن، نمونه‌ها ورتکس شدند (Fazelian et al., 2020). غلظت‌های مختلف نانوذرات ZnO، CuO و  $Fe_2O_3$  (۵، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) از استوک غلیظ تهیه و به ارلن‌های حاوی نمونه جلبکی اضافه شد. ارلن‌ها به مدت ۷۲ ساعت در شرایط آزمایشگاهی و بر روی دستگاه شیکر (Cortez, ME 302) قرار گرفتند (OECD, 1984).

جدول ۱: مشخصات نانوذرات اکسیدهای فلزی

| نانوذرات             | درجه خلوص (%) | اندازه (nm) | مساحت سطحی ویژه (m <sup>2</sup> /g) | رنگ  | چگالی (g/cm <sup>3</sup> ) |
|----------------------|---------------|-------------|-------------------------------------|------|----------------------------|
| اکسید روی            | ۹۹            | ۱۰-۳۰       | ۲۰-۶۰                               | سفید | ۵/۶۰۶                      |
| اکسید مس             | ۹۹            | ۱۰-۴۰       | ۲۰                                  | سیاه | ۶/۴                        |
| اکسید آهن (فرم آلفا) | ۹۸            | ۲۰-۴۰       | ۴۰-۶۰                               | سیاه | ۴/۸-۵/۱                    |

شکل ۱: تصاویر میکروسکوپ الکترونی TEM از نانوذرات اکسیدهای فلزی. الف) ZnO؛ ب) CuO؛ ج) Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

## تعیین غلظت موثر

تعداد سلول‌های جلبکی در پایان روز سوم تیمار، با استفاده از لام نئوبار شمارش شد و با استفاده از نرم‌افزار Microsoft Excel 2016 و آزمون رگرسیون، میزان غلظت موثر (EC<sub>50</sub>) هر یک از نانوذرات تعیین شد (Fazelian et al., 2020). پس از محاسبه EC<sub>50</sub> نزدیک‌ترین غلظت به EC<sub>50</sub> انتخاب شد و نمونه‌های ریزجلبکی تیمار شده با آن غلظت‌ها برای FTIR و بررسی‌های میکروسکوپ الکترونی انتخاب شدند.

## تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری

برای تهیه تصاویر میکروسکوپ (TEM)، تثبیت اولیه نمونه‌های جلبکی تیمار شده با نانوذرات مختلف و نمونه شاهد با محلول گلو تار آلدئید ۲/۵ درصد انجام شد. محلول گلو تار آلدئید در محلول بافر کاکودیلات ۰/۱ مولار آماده شد. تثبیت ثانویه نمونه‌ها با تتراکسید اسمیوم (OsO<sub>4</sub>) صورت گرفت. آبگیری نمونه‌ها با استفاده از اتانول انجام شد و پس از برش‌گیری، نمونه‌ها رنگ‌آمیزی شدند. نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده با استفاده از دستگاه

TEM (Zeiss, EM10C-100 KV, آلمان) بررسی شدند (Fazelian et al., 2019).

میانگین‌ها با استفاده از پس‌آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد مقایسه شد.

### آزمون FTIR

از آزمون FTIR برای بررسی برهمکنش گروه‌های سطحی دیواره سلولی ریزجلبک با نانوذرات استفاده شد. برای این آزمون، حجم معینی از نمونه‌های جلبکی تیمار شده با نانوذرات و نمونه شاهد در ۶۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ (Centurion, K220, Scientific) شد. رسوب جلبکی با استفاده از بافر فسفات نمکی سه بار شستشو داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه فریز درایر (Christ, آلمان) قرار داده شد. سپس با استفاده از تکنیک پتاسیم برمید (KBr), FTIR (Tensor 27, Bruker) نمونه‌ها انجام شد و طیف‌های FTIR توسط قرص پتاسیم برمید ثبت شدند (Mohammed Sadiq et al., 2011; Fazelian et al., 2019).

### نتایج

بررسی برهمکنش نانوذرات با دیواره سلولی *Nannochloropsis oculata*

نتایج FTIR نمونه شاهد ریزجلبک *N. oculata* پیک‌هایی را در  $3412/23\text{cm}^{-1}$  (گروه O-H: آب)،  $614/37-2926/24\text{cm}^{-1}$  (گروه C-H: لیپید)،  $1639/91\text{cm}^{-1}$  (گروه C=O: پروتئین) و  $1079/88-1020/30\text{cm}^{-1}$  (گروه C-O-C و C-O) نشان داد (جدول ۲). تیمار ریزجلبک *N. oculata* با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذره ZnO باعث ایجاد پیک‌هایی در  $1637/28\text{cm}^{-1}$  (گروه C-H)،  $1617/06-$  (گروه C=O)،  $1023/46\text{cm}^{-1}$  (گروه C-O)، و پیک جدیدی در  $480/15\text{cm}^{-1}$  شد که پیک جدید مشاهده شده احتمالاً مربوط به حضور نانوذره ZnO بر روی سطح دیواره سلولی جلبک بود (جدول ۲). تیمار ریزجلبک مورد مطالعه با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذره CuO باعث ظهور پیک‌هایی در  $1617/01\text{cm}^{-1}$  (گروه C-H)،

### تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل‌های آماری در این مطالعه با سه تکرار صورت گرفت و داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ با آزمون تحلیل واریانس دوطرفه بررسی شدند و اختلاف

(گروه C=O)،  $1118/74 \text{ cm}^{-1}$  (گروه C-O) و مربوط به حضور نانوذره CuO شد (جدول ۲).  
 ظهور یک پیک جدید در  $479/85 \text{ cm}^{-1}$  (احتمالا

جدول ۲: آزمون FTIR نمونه‌های *Nannochloropsis oculata* تیمار شده با نانوذرات اکسیدهای فلزی و شاهد

| منبع                     | Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -NPs | CuO-NPs | ZnO-NPs | شاهد    | محدوده فرکانس (cm <sup>-1</sup> ) | گروه‌های عاملی           |
|--------------------------|-------------------------------------|---------|---------|---------|-----------------------------------|--------------------------|
| Suman et al., (2015)     |                                     |         | 3412/70 | 3412/22 | 3003-3512                         | آب (O-H)                 |
| Sukarni et al., (2014)   |                                     |         |         |         |                                   | پروتئین (N-H)            |
| Sukarni et al., (2014)   |                                     | 2923/75 | 2925/10 | 2926/24 | 2897-2940                         | لیپید (CH <sub>2</sub> ) |
| Phukan et al., (2011)    | 1639/13                             | 1617/01 | 1637/28 | 1639/91 | 1599-1692                         | پروتئین (C=O)            |
| Christoph et al., (1994) | 1023/26                             | 1118/74 | 1023/46 | 1020/30 | 970-1160                          | کربوهیدرات‌ها (C-O)      |
| Suman et al., (2015)     |                                     |         |         | 1079/88 |                                   | فسفولیپیدها، DNA و       |
|                          |                                     |         |         | 1154/33 |                                   | (P=O) RNA                |
| Suman et al., (2015)     | 609/25                              |         |         | 614/37  |                                   | لیپید (CH <sub>2</sub> ) |
| Suman et al., (2015)     |                                     |         | 480/15  |         |                                   | احتمالا نانوذرات ZnO     |
| Fazelian et al., (2019)  |                                     | 479/85  |         |         |                                   | احتمالا نانوذرات CuO     |

نمونه جلبکی تیمار شده با غلظت ۲۰۰ سالم بودند و دیواره سلولی آنها یکنواخت بود (شکل ۲- الف). غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر نانوذرات ZnO باعث آسیب و چروکیدگی دیواره سلولی شد (شکل ۲- ب). تصاویر TEM مربوط به سلول‌های جلبکی تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر نانوذرات CuO نشان دهنده تجمع و انباشتگی این نانوذرات در سطح دیواره سلولی بود (شکل ۲- ج). تصاویر TEM مربوط

نمونه جلبکی تیمار شده با غلظت ۲۰۰ میلی گرم در لیتر نانوذره Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> پیک‌هایی را در  $1639/13 \text{ cm}^{-1}$  (گروه C=O)،  $1023/26 \text{ cm}^{-1}$  (گروه C-O) و  $609/25 \text{ cm}^{-1}$  (گروه C-H) نشان داد (جدول ۲).

#### بررسی تصاویر TEM

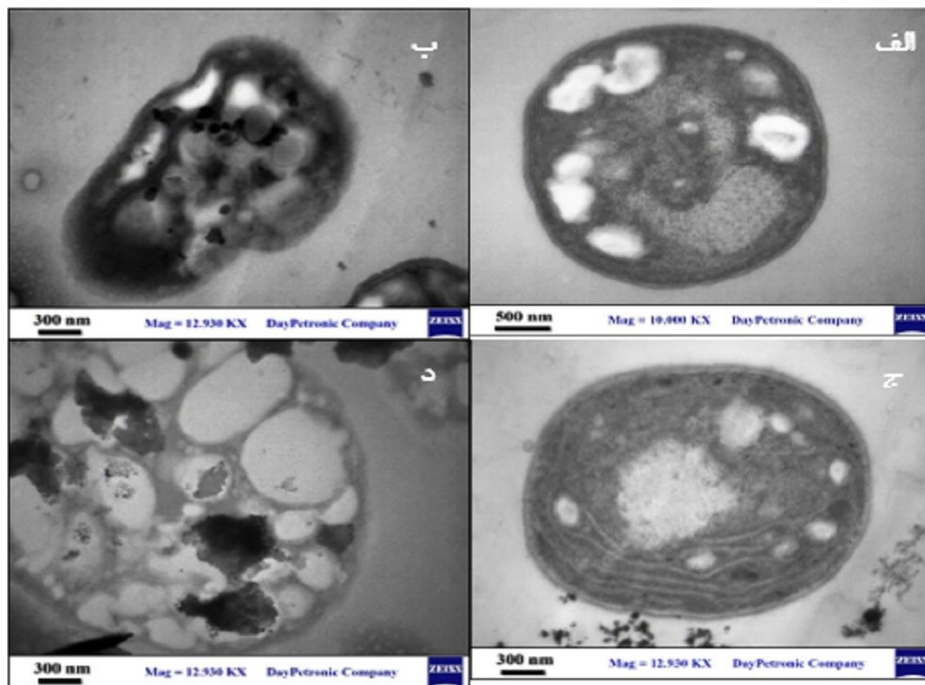
تصاویر TEM مربوط به نمونه شاهد ریزجلبک *N. oculata* نشان داد که سلول‌ها

ترتیب ۱۵۳/۷۲، ۱۱۶/۹۸ و ۲۰۲/۹۲ میلی گرم در لیتر بود. با توجه به  $EC_{50}$  نانوذرات، بیشترین سمیت مربوط به نانوذره CuO و کمترین سمیت مربوط به نانوذره  $Fe_2O_3$  بود. مطالعات مختلفی در زمینه بررسی سمیت نانوذرات اکسیدهای فلزی در جانداران مختلف انجام شده است. به عنوان مثال Pendashteh و همکاران (۲۰۱۳) ترتیب سمیت نانوذرات در ریزجلبک‌های *Chlorella* و *Scenedesmus* را

به سلول‌های تیمار شده با غلظت ۲۰۰ میلی گرم در لیتر نانوذرات  $Fe_2O_3$  نسبت به تصاویر دیگر از وضوح کمتری برخوردار بود و در این تصاویر چروکیدگی دیواره سلولی در پاسخ به این نانوذره مشاهده نشد (شکل ۲-د).

### بحث

شمارش سلولی ریزجلبک‌ها نشان داد که میزان  $EC_{50}$  نانوذرات ZnO، CuO و  $Fe_2O_3$  به



شکل ۲: تصاویر TEM سلول‌های ریزجلبک *Nannochloropsis oculata* در تیمارهای مختلف. الف) تیمار شاهد؛ ب) تیمار شده با نانوذرات ZnO؛ ج) تیمار شده با نانوذرات CuO؛ د) تیمار شده با نانوذرات  $Fe_2O_3$ .



تغییر در گروه‌های شیمیایی سطحی دیواره سلولی می‌تواند نشان دهنده برهمکنش نانوذرات با دیواره و ایجاد سمیت در جلبک باشد. برای مطالعه گروه‌های سطحی دیواره سلول جلبکی معمولاً از FTIR استفاده می‌شود (Mohammed Sadiq et al., 2011; Fazelian et al., 2019). بررسی FTIR نمونه شاهد ریزجلبک *N. oculata* پیک‌هایی نشان داد که مربوط به گروه‌های عاملی O-H، C-H، C=O و C-O بود. تیمار نانوذرات باعث تغییراتی در ساختار دیواره سلولی شد و تغییراتی در پیک‌های مشاهده شده ایجاد کرد. برخی از نانوذرات پیک جدیدی نیز ایجاد کردند. نانوذرات ZnO و CuO با گروه‌های عاملی C-O (کربوهیدرات)، C=O (پروتئین) و C-H (لیپید) دیواره سلولی *N. oculata* برهمکنش نشان دادند و پیک جدیدی نیز ایجاد کردند که احتمالاً مربوط به حضور نانوذرات ZnO و CuO در سطح دیواره بود. برهمکنش نانوذره Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> نیز با گروه‌های عاملی C-O (کربوهیدرات)، C=O (پروتئین) و C-H (لیپید) بود. بر اساس گزارش‌های قبلی دیواره سلولی جلبکی دارای جایگاه اتصال (سلولز، پلی‌ساکارید و گلیکوپروتئین‌ها) برای نانوذرات است (Chen et al., 2012). همچنین نانوذرات به دلیل

به صورت CeO<sub>2</sub><TiO<sub>2</sub><Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub><ZnO بیان کردند. سمیت نانوذرات CuO، ZnO و TiO<sub>2</sub> در ریزجلبک *P. subcapitata* نیز بررسی و ترتیب سمیت این نانوذرات به صورت ZnO<TiO<sub>2</sub><CuO گزارش شد (Aruoja et al., 2009). برخلاف مطالب بالا، نتایج پژوهش حاضر نشان داد که بیشترین سمیت نانوذرات اکسیدهای فلزی در ریزجلبک *N. oculata* مربوط به نانوذره CuO بود و ترتیب سمیت این نانوذرات در ریزجلبک مورد مطالعه به صورت Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub><ZnO<CuO مشاهده شد. سمیت بیشتر نانوذرات CuO نسبت به دو نانوذره اکسید فلزی مورد بررسی در مطالعات Fazelian و همکاران (۲۰۲۰) نیز ارائه شده است. سمیت نانوذرات به غلظت و اندازه نانوذره، میزان حلالیت، مدت زمان تیمار و نوع جلبک مورد مطالعه بستگی دارد (Suman et al., 2015; Fazelian et al., 2020). لازم به ذکر است که سمیت کمتر نانوذرات Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> نسبت به دو نانوذره دیگر می‌تواند مربوط به اثر خودتجمعی این ذرات باشد که این اثر ناشی از خاصیت مغناطیسی آنها است (Singh et al., 2010). دیواره سلولی جایگاه اولیه برهمکنش و ورود نانوذرات به درون سلول جلبکی است.

فلزی هستند و یون‌های فلزی با برهمکنش با این گروه‌های عملکردی می‌توانند به داخل سلول جلبکی منتقل شوند (Suman et al., 2015). کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها از مهم‌ترین اجزای دیواره سلولی هستند که معمولاً نانوذرات با گروه سطحی آنها (C=O و C-O) واکنش نشان می‌دهند. گروه‌های فعال سطحی اثرات زیستی مهمی دارند و تغییر در گروه‌های شیمیایی سطحی در تعیین سمیت ذره از اهمیت زیادی برخوردار است. مطالعات FTIR، تغییرات شیمیایی گروه‌های سطحی دیواره سلول جلبکی ناشی از برهمکنش با نانوذرات را مشخص می‌کند (Mohammed Sadiq et al., 2011).

تصاویر TEM سلول‌های تیمار شده با نانوذرات ZnO نشان دهنده آسیب دیدگی و چروکیدگی دیواره سلولی ریزجلبک *N. oculata* بود. در تصاویر سلول‌های تیمار شده با نانوذرات CuO تجمع و انباشتگی این نانوذرات بر سطح دیواره سلولی قابل مشاهده بود. تجمع و انباشتگی این نانوذرات باعث اثر سایه‌اندازی (Shading Effect) و کاهش دسترسی ریزجلبک به نور خورشید می‌شود. از طرف دیگر چروکیدگی دیواره در پاسخ به نانوذره CuO نسبت به نانوذره ZnO کمتر بود.

داشتن مساحت سطحی ویژه و اندازه کوچک می‌تواند از عرض دیواره و غشای سلول جلبکی عبور کنند و جذب سلول شوند (Chen et al., 2012). بررسی سمیت نانوذرات ZnO بر ریزجلبک *Chlorella vulgaris* نیز نشان داده است که نانوذرات ZnO با رهايش یون‌های فلزی باعث اتصال یون‌های  $Zn^{2+}$  به سطح سلول و آسیب به غشا می‌شوند و برهمکنش این نانوذرات با دیواره سلولی از طریق FTIR قابل بررسی است (Suman et al., 2015). مطالعات دیگر نشان دادند که مشاهده گروه‌های سطحی معمول واکنش‌پذیر با نانوذرات  $TiO_2$  در FTIR گونه‌های جلبکی *Chlorella sp.* و *Scenedesmus sp.* نشان دهنده جذب نانوذرات متراکم شده  $TiO_2$  در سطح سلول جلبکی است (Mohammed Sadiq et al., 2011). در پژوهش حاضر نیز نتایج FTIR نشان دهنده جذب نانوذرات بر سطح دیواره سلولی ریزجلبک *N. oculata* بود.

به طور کلی دیواره سلولی در گیاهان، جلبک‌ها و قارچ‌ها، جایگاه اولیه برای برهمکنش با نانوذرات است و سدی در برابر ورود نانوذرات به درون سلول ایجاد می‌کند. همچنین دیواره سلولی دارای تعدادی گروه‌های عملکردی با بار خالص منفی و میل ترکیبی بالا به یون‌های

al., 2012). نانوذرات و یون‌های فلزی با برهمکنش با پروتئین‌های درون سلولی، باعث تغییرات پس‌ترجمه‌ای و اختلال در فعالیت‌های فیزیولوژی سلول می‌شوند (Lubick, 2008). همچنین گزارش شده است که برهمکنش نانوذرات با اجزای سلولی باعث تغییر در فعالیت آنزیم‌های فتوسنتزی و کاهش میزان کلروفیل می‌شود (Dash et al., 2012). Chang و همکاران (۲۰۱۲) نیز گزارش کردند که نانوذرات می‌توانند، به تنهایی یا با برهمکنش با اندامک‌های اکسیداتیو مانند میتوکندری، گونه‌های فعال اکسیژن تولید کنند و باعث القای تنش اکسیداتیو در جانداران و حتی مرگ سلول شوند (Chang et al., 2012).

در مجموع، با توجه به تصاویر TEM و نتایج به دست آمده از مطالعات قبلی (Fazelian et al., 2019, 2020)، برهمکنش نانوذرات ZnO، CuO و Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> با دیواره سلولی ریزجلبک *N. oculata* احتمالاً باعث تسهیل ورود این نانوذرات به درون این ریزجلبک شده است و برهمکنش نانوذرات وارد شده به درون سلول با مولکول‌های زیستی و اندامک‌های درون سلول باعث اختلال در عملکرد سلول و کاهش رشد این ریزجلبک شده است.

چروکیدگی دیواره سلولی *N. oculata* در پاسخ به نانوذرات ZnO و CuO مشابه نتایج به دست آمده توسط Wang و همکاران (۲۰۱۶) بود که گزارش کردند تخریب دیواره سلولی نقش مهمی در سمیت نانوذرات TiO<sub>2</sub> در جلبک *Phaeodactylum tricornutum* ایفا می‌کند. در مطالعه حاضر به نظر می‌رسد غلظت‌های بالای نانوذرات با آسیب به دیواره سلولی باعث اختلال در عملکرد سلول‌های *N. oculata* شده است.

مطالعات متعددی مبنی بر ورود نانوذرات و روش‌های ورود این ذرات به درون سلول جلبکی ارائه شده است. دیواره سلولی ریزجلبک‌ها دارای منافذی به قطر ۲۰-۵ نانومتر است و ذرات با قطر کمتر از ۲۰ نانومتر می‌توانند از این منافذ عبور کنند و به دلیل اندازه کوچک و داشتن بار مثبت در سطح خود می‌توانند به طور مستقیم از غشای سلولی بگذرند و وارد سلول شوند (Chang et al., 2012; Dash et al., 2012). کانال‌های یونی و پروتئین‌های ناقل نیز اجازه عبور به نانوذرات می‌دهند تا بتوانند از عرض غشای سلولی عبور کنند. تعدادی از نانوذرات از طریق اندوسیتوز وارد سلول می‌شوند و کانال‌های یونی وابسته به ولتاژ، امکان عبور یون‌های فلزی را فراهم می‌کنند (Chang et

## منابع

- نعمت‌بخش ح.، طلائی خوزانی ا. و احمدوند ف. ۱۳۹۴. مروری بر کاربرد نانوفناوری در محیط زیست. چهارمین همایش ملی فناوری نانو: از
- تئوری تا کاربرد. موسسه آموزش عالی جامی اصفهان. ص: ۲۰-۱.
- Aruoja V., Dubourguier H.C., Kasemets K. and Kahru A. 2009.** Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO<sub>2</sub> to microalgae *Pseudokircehnieriella subcapitata*. *Science of the Total Environment*, 407: 1461–1468.
- Bao S., Lu Q., Fang T., Dai H. and Zhang C. 2015.** Assessment of the toxicity of CuO nanoparticles by using *Saccharomyces cerevisiae* mutants with multiple genes deleted. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(23): 8098–8107.
- Chang Y.N., Zhang M., Xia L., Zhang J. and Xing G. 2012.** The toxic effects and mechanisms of CuO and ZnO nanoparticles. *Materials*, 5(12): 2850–2871.
- Chen P., Powell B.A., Mortimer M. and Ke P.C. 2012.** Adaptive interactions between zinc oxide nanoparticles and *Chlorella* Sp. *Environmental Science and Technology*, 46: 12178–12185.
- Dash A., Singh A.P., Chaudhary B.R., Singh S.K. and Dash D. 2012.** Effect of silver nanoparticles on growth of eukaryotic green algae. *Nano-Micro Letters*, 4(3): 158–165.
- Fazelian N., Movafeghi A., Yousefzadi M. and Rahimzadeh M. 2019.** Cytotoxic impacts of CuO nanoparticles on the marine microalga *Nannochloropsis oculata*. *Environmental Science and Pollution Research*, 26: 17499–17511.
- Fazelian N., Yousefzadi M. and Movafeghi A. 2020.** Algal response to metal oxide nanoparticles: Analysis of growth, protein content, and fatty acid composition. *Bioenergy Research*, 13(2): 1–11.
- Guillard R.I. and Ryther J.H. 1962.** Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve). *Canadian Journal of Microbiology*, 8: 229–239.
- Kadar E., Rooks P., Lakey C. and White D.A. 2012.** The effect of engineered iron nanoparticles on growth and metabolic status of marine microalgae cultures. *Science of the Total Environment*, 439: 8–17.
- Lubick N. 2008.** Nanosilver toxicity: Ions, nanoparticles or both. *Environmental Science and Technology*, 42(23): 8617–8617.

- Mohammed Sadiq I., Dalai S., Chandrasekaran N. and Mukherjee A. 2011.** Ecotoxicity study of titania (TiO<sub>2</sub>) NPs on two microalgae species: *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74: 1180–1187.
- Nations S., Wages M., Canas J.E., Maul J., Theodorakis C. and Cobb G.P. 2011.** Acute effects of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, TiO<sub>2</sub>, ZnO and CuO nanomaterials on *Xenopus laevis*. *Chemosphere*, 83: 1053–1061.
- OECD. 1984.** Alga, growth inhibition test. OECD Guideline for Testing of Chemicals. OECD, France. P: 1–14.
- Osmond M.J. and McCall M.J. 2010.** Zinc oxide nanoparticles in modern sunscreens: An analysis of potential exposure and hazard. *Nanotoxicology*, 4: 15–41.
- Pendashteh H., Shariati F., Keshavarz A. and Ramzanpour A. 2013.** Toxicity of ZnO nanoparticles to *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus* algae species. *World Journal of Fish and Marine Scienc*, 5(5): 563–570.
- Phukan M.M., Chua R.S., Konwar B.K. and Katak R. 2011.** Microalgae *Chlorella* as a potential bio-energy feedstock. *Applied Energy*, 88: 3307–3312.
- Roy I., Ochulchansky T.Y., Pudavar H.E., Bergey E.J., Oseroff A.R., Morgan J., Dougherty T.H. and Prasad P.N. 2003.** Ceramic-based nanoparticles entrapping waterinsoluble photosensitizing anticancer drugs: A novel drug-carrier system for photodynamic therapy. *Journal of the American Chemical Society*, 125: 7860–7865.
- Sheehan J., Dunahay T., Benemann J. and Roessler P.G. 1998.** A Look back at the US department of energy's aquatic species program-biodiesel from algae, close out report TP-580-24190. US Department of Energy's Office of Fuels Development. Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory, USA. 328P.
- Singh N., Jenkins G.J., Asadi R. and Doak S.H. 2010.** Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). *Nano Review*, 1: 1–15.
- Sukarni S., Hamidi N., Yanuhar U. and Wardana I.N.G. 2014.** Thermogravimetric kinetic analysis of *Nannochloropsis oculata* combustion in air atmosphere. *Frontiers in Energy*, 9: 125–133.
- Suman T.Y., Radhika Rajasree S.R. and Kirubakaran R. 2015.** Evaluation of zinc oxide nanoparticles toxicity on marine algae *Chlorella vulgaris* through flow cytometric, cytotoxicity and oxidative stress analysis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 113: 23–30.

**Wang Y., Zhu X., Lao Y., Lv X., Tao Y., Huang B., Wang J., Zhou J. and Cai Z. 2016.** TiO<sub>2</sub> nanoparticles in the marine environment: Physical effects

responsible for the toxicity on algae *Phaeodactylum tricorutum*. Science of the Total Environment, 565: 818–826.



Research Paper

## Influence of metal oxide nanoparticles on the cell wall structure of *Nannochloropsis oculata*

Nasrin Fazelian<sup>1,2\*</sup>, Morteza Yousefzadi<sup>3</sup>

Received: July 2021

Accepted: September 2021

### Abstract

The algal cell wall is the primary site for interaction with nanoparticles and creates a barrier against the entry of nanoparticles into its cell. Therefore, the effect of zinc oxide (ZnO), copper (II) oxide (CuO) and iron (III) oxide (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) nanoparticles was investigated on the cell wall structure of *Nannochloropsis oculata*. Calculation of EC<sub>50</sub> using microalgae cell count showed that the order of nanoparticles toxicity in *N. oculata* was CuO>ZnO>Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. The interaction of ZnO, CuO and Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles with microalgae cell wall was proved in FTIR analysis. The highest interaction of the studied nanoparticles was with carbonyl (C=O), methoxy (C-O) and methyl (C-H) functional groups of *N. oculata* cell wall. On the other hand, transmission electron microscopy (TEM) images showed that ZnO and CuO nanoparticles caused the shrinkage of cell wall. The accumulation of these nanoparticles was observed on the surface of the cell wall. Accumulation of nanoparticles and shrinkage of the cell wall could be the possible reason for the higher toxicity of CuO and ZnO nanoparticles than Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles in *N. oculata*.

**Key words:** *Nannochloropsis*, *Metal Oxide Nanoparticles*, *FTIR*, *TEM*.

1- Ph.D. in Plant Physiology, Department of Plant Biology, Faculty of Natural Sciences, Tabriz University, Tabriz, Iran.

2- Ph.D. in Plant Physiology, Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.

3- Professor in Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.

\*Corresponding Author: [nasrin\\_fazelian@yahoo.com](mailto:nasrin_fazelian@yahoo.com)

