

ارزیابی سمیت نانوذره اکسید مس بر سیانوباکتری *Anabaena sp.* بومی تالاب‌های گیلان

رضا کریمی^۱، اکبر نورسته‌نیا^{۲*}، حسین عباسپور^۳، سکینه سعیدی‌سار^۴، اکرم سادات نعیمی^۵

تاریخ دریافت: فروردین ۹۶

تاریخ پذیرش: شهریور ۹۶

چکیده

با توجه به این که افزایش نانوذرات تهدیدی جدی برای انسان، موجودات و اکوسیستم‌های آبی به شمار می‌آید، سمیت نانوذرات اکسید مس (CuO-NPs) روی سیانوباکتری *Anabaena sp.* با استفاده از آزمون مهار رشد (OECD201) در غلظت‌های مختلف مورد مطالعه قرار گرفت. بدین ترتیب که سیانوباکتری مذکور در محیط کشت زاینده منفی (Z-8-N) و در شرایط بهینه نور و دما و تحت شرایط هوادهی در اتاقک کشت رشد داده شد. پس از شروع فاز لگاریتمی رشد، نمونه‌ها در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در معرض غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید مس قرار داده شدند. تعداد سلول‌های سیانوباکتریایی هر روز شمارش شد و تجزیه و تحلیل داده‌ها بر اساس روش Probit Analysis انجام شد. مقدار غلظت موثر (EC₅₀)، غلظت بدون اثر (NOEC)، نرخ رشد ویژه (μ)، زمان دو برابر شدن (G)، درصد مهار رشد (I%) و مقدار کلروفیل محاسبه شد. شاهد (رشد در محیط فاقد نانوذرات اکسید مس) و تیمارها در فواصل زمانی مشخص از نظر تراکم سلولی و درصد مهار رشد تفاوت معنی‌دار نشان دادند. علاوه بر این در محتوای کلروفیلی تیمارهای مختلف نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری مشاهده شد. به نظر می‌رسد، کاهش کارایی فتوسنتز یکی از مسیرهایی باشد که باعث خسارت قابل توجه نانوذرات اکسید مس بر *Anabaena sp.* می‌شود.

واژگان کلیدی: اکسید مس، آنابنا، آلودگی نانوذرات، اکوسیستم آبی، مهار رشد.

- ۱- دانشجوی دکتری فیزیولوژی گیاهی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران.
- ۲- دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
- ۳- دانشیار گروه زیست‌شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران.
- ۴- استادیار گروه زیست‌شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران.
- ۵- استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

* نویسنده مسئول: norasteh@guilan.ac.ir

مقدمه

ژن‌های موثر بر فسفریلاسیون اکسیداتیو ایفا می‌کند. اما افزایش بیش از حد این یون اثرات مخرب بر دستگاه سلولی میکروارگانیسم‌ها می‌گذارد (Perreault et al., 2010). تاکنون سمیت نانوذرات اکسید مس در تعدادی از ارگانیسم‌ها بررسی شده است (Bondarenko et al., 2013) از جمله جلبک‌های فتوسنتز کننده که اولین چرخه غذایی محسوب می‌شوند و نقش بسیار مهمی در تعادل اکوسیستم دارند، همواره در خطر سمیت این نانوذرات قرار دارند. امروزه، استفاده از میکروارگانیسم‌های آبی برای مصرف انسان به عنوان یک منبع با ارزش مواد غذایی، بهداشتی و پزشکی و همچنین برای تولید محصولات بیوشیمیایی مثل ویتامین‌ها، کارتنوئیدها، فیکوسیانیین و اسیدهای چرب توسعه یافته است (Falch et al., 1995) جلبک‌های سبز-آبی معروف به سیانوباکتری‌ها، یکی از شاخه‌های مهم این گروه از موجودات زنده هستند که در زیستگاه‌های مختلف از جمله آب‌های شیرین، شور و خشکی وجود دارند و برخی از آن‌ها انواعی از متابولیت‌های ثانویه مانند آنتی‌بیوتیک، جلبک‌کش، سیتوتوکسیک و آنزیم‌های مهارتی تولید می‌کنند (Mundt et al., 2001). سیانوباکتری‌ها از لحاظ تولید

امروزه با پیشرفت‌های روزافزون نانوتکنولوژی مواد نانو در اشکال و ابعاد مختلف و در کالاها و تولیدات صنعتی استفاده می‌شوند. از آنجا که اطلاعات موجود در مورد مواجهه با نانوذرات بسیار محدود است، مخاطرات احتمالی ناشی از افزایش نانوذرات در اکوسیستم‌ها ممکن است کم‌اهمیت در نظر گرفته شود. با این حال، سطح بالقوه قرار گرفتن در معرض نانوذرات بسیار بالا است (Joh et al., 2011). به عنوان مثال، استفاده از ترکیبات ضد رسوب رنگ مانند نانوذرات اکسید مس در بدنه قایق به منظور کاهش رشد و کلنی شدن میکرو و ماکرو جلبک‌های دریایی ممکن است به پراکندگی این نانوذرات در اکوسیستم‌های آبی و ورود آن به پیکر آبزیان منجر شود (Saison et al., 2010). اثرات سمی نانوذرات اکسید مس در جلبک‌ها به دلیل حضور یون مس است. مس ریزمغذی ضروری مورد نیاز برای رشد طبیعی گیاهان است. همچنین در پروتئین‌های تنظیمی، انتقال الکترون فتوسنتزی، تنفس میتوکندریایی پاسخ به استرس‌های اکسیداتیو، متابولیسم دیواره سلولی و مسیرهای انتقال پیام هورمونی نقش قابل توجهی دارد. مس در سطح سلولی نقش مهمی در پیام‌رسانی برای رونویسی

اساس، به منظور تعیین شدت آسیب‌پذیری سیانوباکتری *Anabaena* sp. سمیت ناشی از غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید مس (CuO-NPs) با استفاده از آزمون مهار رشد (OECD201) مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه

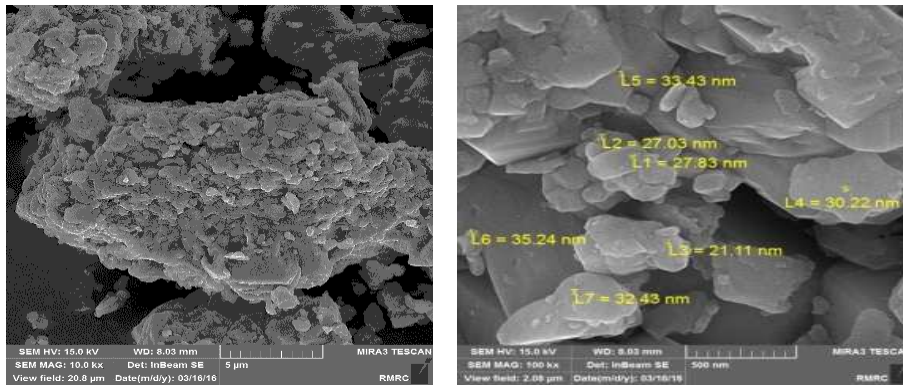
سیانوباکتری *Anabaena* sp. سویه IR از پژوهشکده آبی‌پروری انزلی (جداسازی شده از تالاب‌های گیلان) تهیه شد.

نانوذرات

نانوذرات اکسید مس (US Research Nanomaterials، آمریکا) استفاده شده در مطالعه حاضر دارای اندازه ذرات ۴۰ نانومتر (شکل ۱) با خلوص ۹۹ درصد بود (جدول ۱). استوک اصلی با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر تهیه شد و سپس غلظت‌های مورد نیاز برای استفاده در تیمارها از آن ساخته شد.

اکسیژن و هم‌چنین از لحاظ تثبیت نیتروژن هوا، به ویژه در آب‌های کم‌نیتروژن اهمیت زیادی دارند. نیتروژن حاصل از فعالیت سیانوباکتری‌ها نقش مهمی در چرخه پروتئین‌سازی اکوسیستم‌ها دارد (Vijaya et al., 2010). به هر حال امکان آلودگی‌های محیطی توسط نانوذرات، منجر به مطالعات متنوعی در ارزیابی اثرات سمی و تجمع آن‌ها در میکروجلبک‌ها شده است (Silvia et al., 2013).

در حال حاضر بیشتر پژوهش‌ها به پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی در برابر استرس‌ها و جذب زیستی جلبک‌ها و سیانوباکتری‌ها در پاسخ به فلزات سنگین اختصاص یافته است. با این وجود مطالعات بسیار اندکی در مورد سمیت فلزات و نانوذرات صورت گرفته است (Bulgariu and Bulgariu, 2012). پاسخ به استرس‌های محیطی از جمله نانوذرات در گونه‌های مختلف متفاوت است. بنابراین، این تفاوت می‌تواند یکی از عوامل مهم در افزایش میزان آسیب ناشی از تنش نانوذرات در اکوسیستم‌ها باشد. بر این



شکل ۱: تصاویر میکروسکوپ الکترونی SEM از نانوذرات اکسید مس

جدول ۱: ویژگی‌های نانوذرات اکسید مس (CuO-NPs)

ویژگی	مقدار
درجه خلوص	۹۹٪
رنگ	سیاه
اندازه ذرات	۴۰ nm
سطح ویژه	~۲۰ m ² /g
شکل	نسبتا کروی
چگالی ظاهری	۰/۷۹g/cm ³
چگالی واقعی	۶/۴g/m ³

آماده سازی محیط کشت سیانوباکتری *Anabaena sp.* از محیط کشت زایندر منفی برای کشت سیانوباکتری *Anabaena sp.* استفاده شد که شامل ترکیبات NaCl، Na₂CO₃، CaCO₃، KH₂PO₄، MgSO₄+7H₂O، HCl، MnCl₂+4H₂O، Na₂EDTA، Na₂CO₃+9H₂O، CO(NO₃)₂+6H₂O، LiCl، KI(NH₄)₆، CuSO₄+5H₂O، ZnSO₄+7H₂O، Al₂(SO₄)₃+18H₂O، H₃BO₃، MO₇O₂₇+4H₂O بود (Komarek, 1973;) (Miller et al., 1978). محیط کشت مورد نظر

هموسیتومتر مطابق روش Schoen (۱۹۸۸) و با میکروسکوپ نوری شمارش شد. سپس تعداد سلول‌ها در هر میلی‌لیتر با استفاده از رابطه ۱ محاسبه شد:

رابطه ۱:

$$N_T = N_C \times 10^4 \times D$$

N_T : تعداد سلول‌ها در هر میلی‌لیتر؛ N_C : میانگین تعداد سلول‌های شمارش شده؛ D : ضریب رقت.

پس از شمارش سلولی در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، ابتدا میزان EC_{50} با استفاده از جدول Probit Analysis استخراج و سپس مقدار NOEC محاسبه شد (رابطه ۲).

رابطه ۲:

$$NOEC = EC_{50} / 10$$

نرخ رشد ویژه در هر ساعت (μ)، زمان دو برابر شدن در هر ساعت (G)، و درصد مهار رشد (%I) توسط معادلات پیشنهادی Fogg و Thake (۱۹۸۷) محاسبه شد (رابطه‌های ۳ تا ۵).

رابطه ۳:

$$\mu = (-\ln X_0 \times \ln X_1) / (t_1 - t_0)$$

X_0 : میانگین تعداد سلول‌ها در زمان t_0 ؛ X_1 : میانگین تعداد سلول‌ها در زمان t_1 .

رابطه ۴:

$$G = \ln(2\mu^{-1})$$

قبل از کشت سیانوباکتری با استفاده از دستگاه اتوکلاو (F2000، تایوان) در فشار ۱ اتمسفر و دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه استریل شد.

آماده‌سازی تیمارها

ابتدا استوک اصلی نانوذرات ۶۰ دقیقه اولتراسونیک (Misonix, 3000، آمریکا) شده، غلظت‌های مختلف ۰ (شاهد)، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر از آن در سه تکرار با محیط کشت زاینده منفی تهیه شد. سپس ۱۰ میلی‌لیتر از استوک اصلی سیانوباکتریایی به هر یک از تیمارها اضافه شد که در این حالت تعداد سلول‌ها در هر تیمار برابر با 4×10^4 بود. پس از کشت، برای رشد مناسب، ارلن‌های حاوی محیط کشت و سیانوباکتری به اتاقک کشت منتقل شدند و برای مدت ۷۲ ساعت در شرایط پایه 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۲۵۰۰ لوکس با دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی همراه با هوادهی، قرار گرفتند.

بررسی رشد *Anabaena sp.* در محیط کشت

اثر مهاری طبق روش OECD201 بررسی شد (Fogg and Thake, 1987; Handy et al., 2012). پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از شروع آزمایش تعداد سلول‌ها با استفاده از لام

رشد طی ۲۴ روز ترسیم شد. رشد سیانوباکتری از طریق اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج ۷۵۰nm طی زمان رشد و هر دو روز یکبار توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (M501 Single, CamSpec Ltd., Beam UV/Visible انگلستان) بررسی شد. برای تعیین غلظت رنگیزه‌های کلروفیل a و بتاکاروتن از روش Eijkelhoff و Dekker (۱۹۹۷) استفاده شد (رابطه ۶).

رابطه ۶:

$$\text{Chl a} = [(12.25 \times \text{OD}_{663}) - (2.79 \times \text{OD}_{647})] \times D$$

Chl a: غلظت کلروفیل a؛ OD_{663} : میزان جذب در طول موج ۶۶۳ نانومتر؛ OD_{647} : میزان جذب در طول موج ۶۴۷ نانومتر؛ D: ضریب رقت.

نتایج

طبق شکل ۲، سیانوباکتری *Anabaena* sp. تا ۴ روز در فاز تاخیری رشد قرار داشت. بعد از آن وارد فاز لگاریتمی شد که تا روز شانزدهم ادامه یافت و از روز شانزدهم به بعد مرحله ایستایی شروع شد. برای اعمال تنش نانوذرات، سیانوباکتری‌هایی که در مرحله لگاریتمی رشد (روزهای ۶ تا ۱۶) قرار داشتند به واسطه داشتن سلول‌های فعال از نظر متابولیسمی مورد استفاده قرار گرفتند.

رابطه ۵:

$$I\% = (\mu_c - \mu_t) / \mu_c$$

μ_c : نرخ رشد ویژه (μ) در شاهد؛ μ_t : نرخ رشد ویژه در تیمار.

آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و آزمون t-Test در سطح احتمال $P \leq 0.05$ برای تعیین معنی‌دار بودن تفاوت میانگین داده‌های تیمارهای مختلف نانوذرات اکسید مس مورد استفاده قرار گرفت.

تهیه تصاویر میکروسکوپ الکترونی

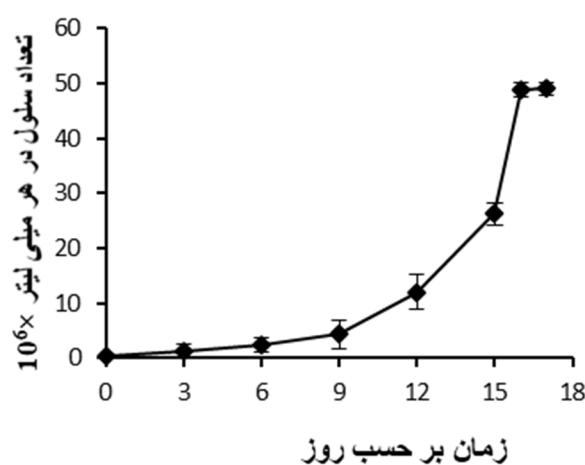
از تصاویر میکروسکوپ الکترونی (SEM، MIRA3 TESCAN، چک) برای بررسی اثر نانوذرات بر شکل و اندازه سلول‌ها و همچنین تایید حضور نانوذرات اکسید مس بر سطح سیانوباکتری مذکور استفاده شد. بدین منظور تصاویر سطوح نمونه‌های شاهد و تیمارهای تحت تنش نانوذرات اکسید مس، پس از ۷۲ ساعت در غلظت EC_{30} ($26/2 \text{ mg/L}$) تهیه شد.

سنجش کلروفیل

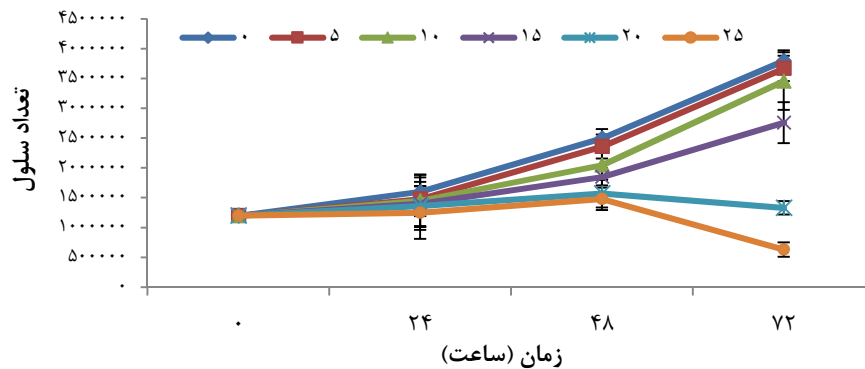
به منظور بررسی روند رشد و تعیین مرحله لگاریتمی جهت اعمال شرایط تعریف شده برای تنش، قبل از انجام آزمایش‌های اصلی، منحنی

نتایج مربوط به رشد سیانوباکتری‌ها در غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید مس (CuO-NPs) نشان داد که افزایش غلظت نانوذره سبب کاهش رشد در سیانوباکتری شد (شکل ۳). ۲۴ ساعت پس از شروع آزمایش، تعداد سلول‌ها با افزایش غلظت نانوذرات کاهش یافت و این کاهش در غلظت ۲۵ میلی‌گرم در لیتر قابل توجه بود. تعداد سلول‌ها در تیمارهای تحت تنش نانوذرات اکسید مس در غلظت‌های

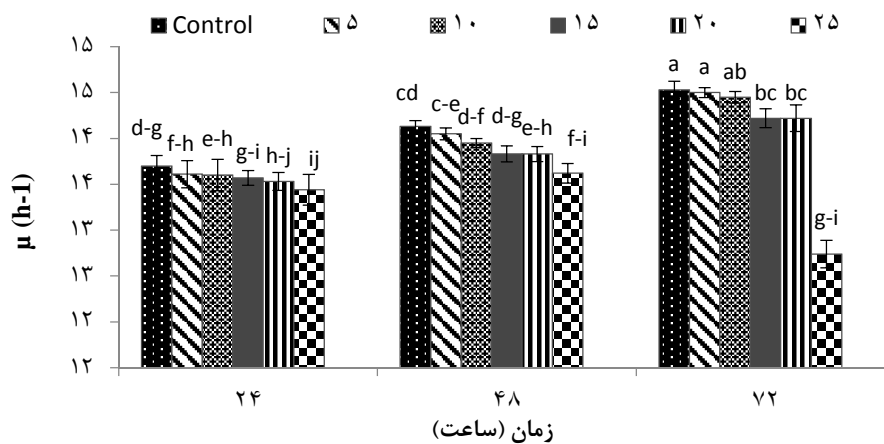
۱۵ میلی‌گرم در لیتر و بالاتر در برداشت‌های پس از گذشت ۴۸ و ۷۲ ساعت، نسبت به شاهد تفاوت معنی‌دار نشان داد. علاوه بر این نرخ رشد ویژه در این گونه کاهش یافت (شکل ۴). این کاهش پس از ۷۲ ساعت و از غلظت ۱۵ میلی‌گرم در لیتر به بالا نسبت به شاهد معنی‌دار بود، در حالی که در نمونه شاهد، نرخ رشد ویژه با گذشت زمان به طور پیوسته افزایش نشان داد.



شکل ۲: منحنی رشد سیانوباکتری *Anabaena sp.* در شرایط پایه اتاقت کشت با دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۲۵۰۰ لوکس با دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در شرایط هوادهی (میانگین \pm خطای استاندارد)



شکل ۳: تعداد سلول‌های *Anabaena sp.* در زمان‌های مختلف و غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید مس بر حسب میلی‌گرم در لیتر (میانگین \pm خطای استاندارد)



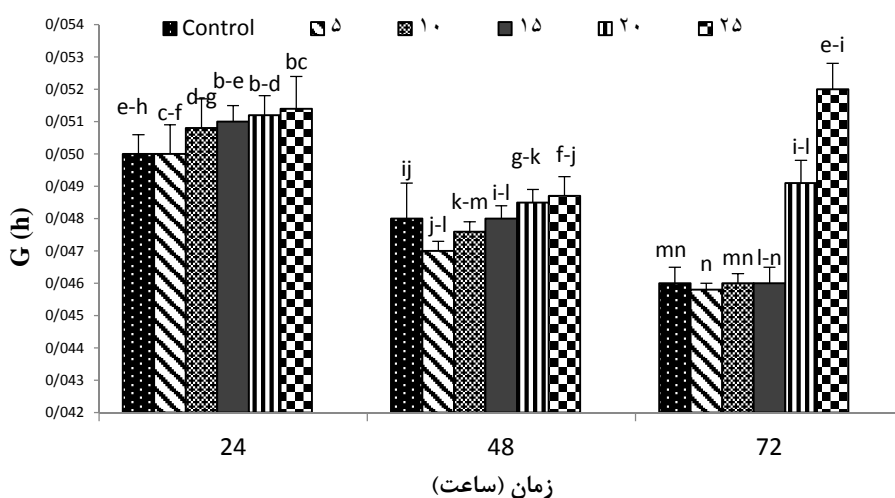
شکل ۴: نرخ رشد ویژه (μ) در *Anabaena sp.* در معرض نانوذرات اکسید مس در زمان‌های مختلف (میانگین \pm خطای استاندارد؛ $n=3$). حروف انگلیسی متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($P \leq 0.05$).

زمان دو برابر شدن (G) در نمونه شاهد طی
معنی‌داری زمان دو برابر شدن افزایش یافت
۷۲ ساعت کاهش نشان داد، اما در سایر تیمارها
با افزایش غلظت نانوذرات در طول زمان به طور
(شکل ۵).

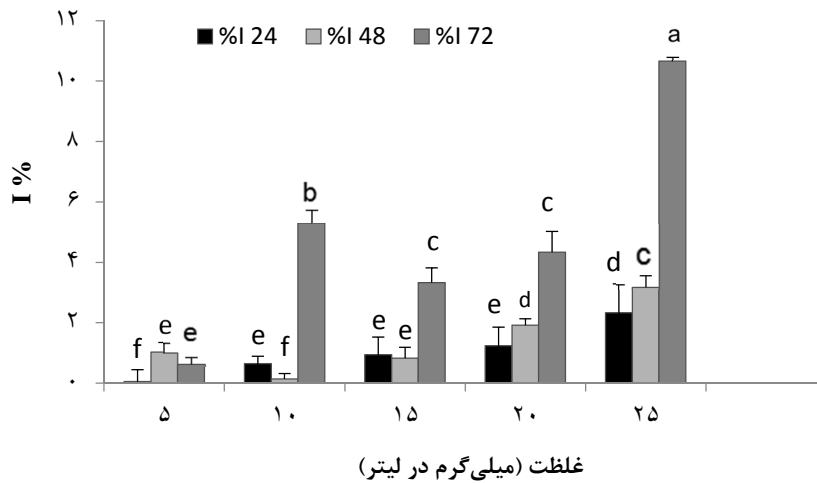
کلروفیل نمونه‌های آزمایشی داشت و با افزایش غلظت نانوذرات میزان کلروفیل نسبت به شاهد کاهش بیشتری نشان داد (شکل ۷). این تفاوت معنی‌دار به ویژه بین همه تیمارهایی که ۷۲ ساعت در معرض نانوذرات اکسید مس قرار گرفته بودند با اختلاف بیشتری دیده شد.

برای همه تیمارها با افزایش غلظت و زمان تیمار، درصد مهار رشد (I%) نیز افزوده شد (شکل ۶). این درصد برای شاهد پیوسته صفر بود. غلظت موثر برای EC_{50} و $NOEC$ ۷۲-h به ترتیب ۱۷/۳۷ و ۱/۷۳ میلی‌گرم در لیتر بود (جدول ۲).

تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که تیمار نانوذرات اکسید مس تاثیر معنی‌داری بر محتوای



شکل ۵: زمان دوبرابر شدن (G) در *Anabaena sp.* در طول آزمایش در غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید مس (میانگین \pm خطای استاندارد؛ $n=3$). حروف انگلیسی متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($P \leq 0/05$).



شکل ۶: درصد مهار رشد ویژه (I%) در *Anabaena sp.* در معرض غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید مس در زمان‌های مختلف (میانگین \pm خطای استاندارد؛ $n=3$). حروف انگلیسی متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($P \leq 0.05$).

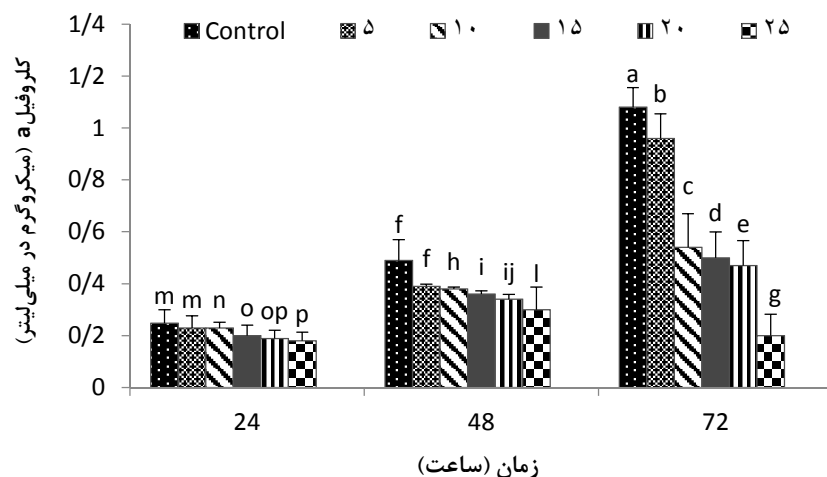
جدول ۲: ارتباط غلظت و پاسخ *Anabaena sp.* به نانوذرات اکسید مس در آزمون سمیت کوتاه مدت

زمان	معادله منحنی استاندارد	R^2	EC_{50} (mg/L)	$NOEC$ (mg/L)
۲۴	$Y = 0.16881X + 2.9371$	۰/۹۱	۱۰/۴۷/۱۲	۱۰/۴/۷
۴۸	$Y = 2.4969X + 1.3426$	۰/۹۵۵	۲۹/۵۱	۲/۹/۵
۷۲	$Y = 3.6848X + 0.425$	۰/۸۷	۱۷/۳۷	۱/۷/۳

R^2 : ضریب همبستگی

Y: درصد مهار

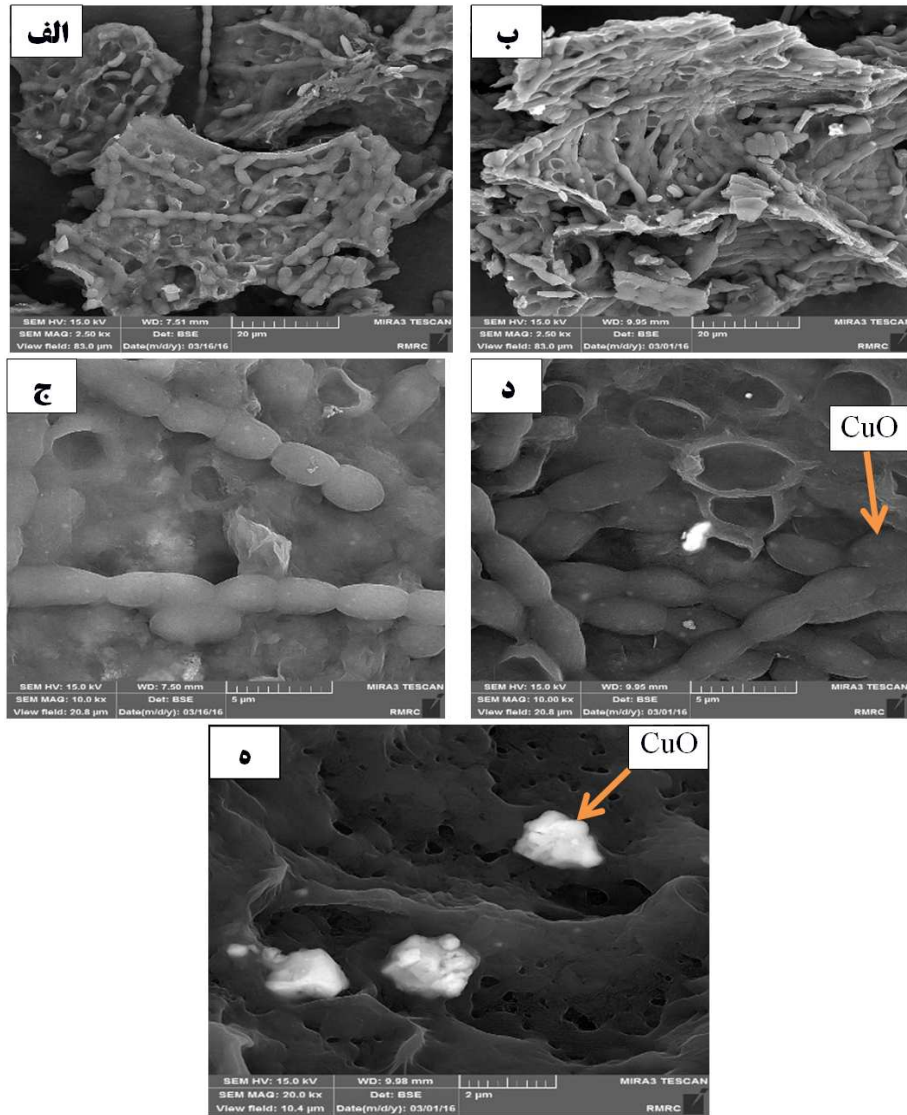
X: غلظت (mg/L)



شکل ۷: تغییرات کلروفیل a بر حسب میکروگرم در میلی‌لیتر در سیانوباکتری *Anabaena sp.* طی ۷۲ ساعت در غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید مس (میانگین \pm خطای استاندارد؛ $n=3$). حروف انگلیسی متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($P \leq 0.05$).

نانوذرات اکسید مس نقش پلی را بین سلول‌ها بازی کرده، سبب ایجاد تجمعات سلولی در بخش‌هایی شد که این نانوذرات تجمع یافته بودند (شکل ۸).

به طور کلی تصاویر میکروسکوپ الکترونی بیانگر اتصال نانوذرات به یکدیگر و به سطح سیانوباکتری و ایجاد تغییرات در شکل ظاهری از طریق از هم گسیختگی سلول‌ها و افزایش تعداد سلول‌های تخریب شده بود. علاوه بر این



شکل ۸: تصاویر میکروسکوپ الکترونی SEM از *Anabaena sp.* (الف) و (ج): به هم چسبیدن و تخریب سلولی نمونه‌ها پس از ۷۲ ساعت قرار گرفتن در معرض نانوذرات اکسید مس در غلظت ۱۲/۵۸ میلی‌گرم در لیتر. (ب)، (د) و (ه): سلول‌های نمونه شاهد؛ این سلول‌ها در زمان شروع تیمار با نانوذرات اکسید مس حالت طبیعی داشتند.

بحث

در مورد شیوه بازداری نانوذرات تاکنون اتفاق نظر جامعی وجود ندارد. برخی از مطالعات، سمیت نانوذرات را ناشی از آزاد شدن یون‌های فلزی می‌دانند و برخی اعتقاد دارند که سمیت بیشتر به طور مستقیم از سطح سلولی بر سیانوباکتری‌ها اثر می‌گذارد، چرا که موجودات تک‌سلولی کوچکی هستند (Wei et al., 2010). Rico و همکاران (۲۰۱۱) گزارش دادند که نانوذرات ممکن است بسته به اندازه از طریق پروتئین‌های حامل، آکوپورین‌ها، کانال‌های یونی، فاز مایع اندوسیتوز، انتقالات پلاسمودسماتا، تسهیل طبیعی ورود ماده، ترشحات آلی و یا زخم و منافذ وارد سلول‌های گیاهی شوند.

نانوذرات همواره به صورت محلول در محیط‌های آبی قادر به تاثیرگذاری بر سیانوباکتری‌ها و ایجاد سمیت از طریق استرس اکسیداتیو هستند. این ذرات همان طور که در شکل ۸ نشان داده شده است، بر روی سطح سلول تجمع می‌یابند و تراکم‌های فلزی را بر سطح سلول ایجاد می‌کنند. در واقع اگر نانوذرات محلول باشند، از آن‌ها یون‌های فلزی آزاد می‌شود که این یون‌ها خود عامل ایجاد سمیت در سیستم سلولی هستند (Perreault et al.,

2014). افزایش غلظت نانوذرات در سلول باعث افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) و تخریب سلول از طریق اختلال در فرآیندهای فیزیولوژیکی می‌شود. در واقع ROSها منجر به اکسیداسیون مولکول‌های زیستی از جمله آسیب به پروتئین‌ها، چربی‌ها و اسیدهای نوکلئیک و همچنین رنگدانه‌های فتوسنتزی به ویژه کلروفیل a می‌شوند (et al., 2008 Klaine). کلروفیل a ماده اساسی فتوسنتز است و محتوای آن نشان دهنده وضعیت رشد جلبک‌ها و سیانوباکتری‌ها است. در این مطالعه کاهش معنادار محتوای کلروفیل پس از ۷۲ ساعت از غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات اکسید مس به بالاتر بیانگر سمیت این نانوذرات است. Deniz و همکاران (۲۰۱۱) نیز نشان دادند در سیانوباکتری *Spirulina sp.* با افزایش غلظت نانوذرات محتوای کلروفیل کاهش می‌یابد که این اثر می‌تواند از طریق بازداری از سنتز کلروفیل اعمال شود.

در برخی پژوهش‌های زیستی نشان داده شده است که با توجه به طبیعت سطح نانوذرات، قرار دادن سلول‌ها در معرض نانوذرات ممکن است موجب تغییر چسبندگی (Adhesion) سلول‌ها شود که این امر خود بر روی ویژگی‌های سلول مانند ریخت‌شناسی، اسکلت سلولی، تکثیر

بررسی قرار دادند. آن‌ها گزارش دادند که افزایش غلظت نانوذرات نقره سبب کاهش رشد در سیانوباکتری *Anabaena flos-aquae* (مویوند و فلاحی، ۱۳۸۹). در مطالعه‌ای دیگر مویوند و فلاحی (۱۳۸۹) نشان دادند که در سیانوباکتری *Anabaena flos-aquae* افزایش غلظت نانوذرات نقره سبب کاهش محتوای کلروفیل و نرخ بهره‌وری از نور شد که این می‌تواند دلیلی برای مهار رشد آن‌ها باشد. بنابراین اثر نانوذرات اکسید مس بر تجمع سلولی در *Anabaena* sp. می‌تواند یکی از دلایل اصلی در توضیح سمیت آن باشد.

Miao و همکاران (۲۰۰۹) سمیت حاصل از حضور نانوذرات نقره را در *Thalassiosira* ناشی از آزاد شدن یون Ag^+ دانستند، به طوری که بعد از فیلتر شدن Ag^+ آزاد به وسیله غشا سلولی و یا حذف آن از طریق تشکیل کمپلکس در حضور مرکاپتان، سمیتی مشاهده نشد. Aruoja و همکاران (۲۰۰۹) دریافتند که یون Cu^{+2} دلیل اصلی اثرات سمی نانوذرات اکسید مس در *Pseudokirchneriella subcapitata* است.

افزایش میزان استرس اکسیداتیو ناشی از تنش‌های نانوذرات اکسید مس در *Anabaena* sp. نیز به دلیل جریان همزمان یون مس و یون

و در نهایت بر بقای سلول تاثیرگذار است (Couvreur et al., 2012).

نانوذرات مس به رشته‌های سیانوباکتری متصل شده، سبب رسوب آن‌ها می‌شوند. این رسوب در غلظت‌های بالاتر مشهودتر است. به طور مشابه، مطالعات نشان دادند که نانوذرات نقره به طور مستقیم می‌توانند سطح سلول‌های *Chlorella* sp. را تحت تاثیر قرار داده، توده بزرگی را تشکیل دهند. اگرچه نقره ۵۰ نانومتری قادر به ورود به سلول نیست اما می‌تواند به عنوان پلی برای اتصال سلول‌ها به یکدیگر و تسریع سرعت توده‌ای شدن سلولی مطرح باشد (Oukarroum et al., 2012). چنانچه نشان داده شده است که سمیت $N-SiO_2$ در *Scenedesmus* احتمالاً به دلیل جذب نانوذرات به سطح سلول‌های جلبکی است (Wei et al., 2010). نتایج نشان داد نرخ رشد ویژه و زمان دو برابر شدن با افزایش غلظت نانوذرات مس (مطالعه حاضر) مشابه با سمیت نانوذرات اکسید روی بر *Scenedesmus dimorphus* (Pendashte et al., 2013) به ترتیب کاهش و افزایش نشان دادند. به طور مشابه، مویوند و فلاحی (۱۳۸۹) تاثیر غلظت‌های مختلف نانوذره نقره را بر میزان رشد و تکثیر سیانوباکتری *Anabaena* به صورت آزمایشگاهی مورد

گمان وجود دارد که فلزات سنگین به گروه‌های عملکردی از جمله کربوکسیل، آمینو، آمید و هیدروکسیل که در سطح غشا سلولی وجود دارند، متصل شده، منجر به تغییرات ساختاری سطح سلول‌ها می‌شوند (Mehta et al., 2002).

ویژگی‌های منحصر به فرد نانوذرات از جمله اندازه کوچک، نسبت سطح به حجم بالا، توده‌ای شدن و تحرک زیاد، سبب آسیب‌های شدید زیست‌محیطی می‌شود. بنابراین ضروری است که مضرات استفاده از آن‌ها بر گونه‌های زنده قبل از به کارگیری آن‌ها در صنعت مطالعه شود. اگر غلظت مناسبی از نانوذرات اکسید مس برای کاربردهای مختلف در نظر گرفته شود، می‌توان بسیاری از نگرانی‌های زیست‌محیطی و زیست‌شناختی پژوهشگران را بر طرف کند، ضمن آن که استفاده از این غلظت‌های بهینه تا حدود زیادی موجب تامین نظر موافقین استفاده از نانوذرات (به علت مزایای آن در کشاورزی و صنایع) در مسائل زیستی خواهد بود.

پتاسیم به داخل سلول، موجب تخریب غشای سلول‌های سیانوباکتریایی قرار داده شده در معرض نانوذرات اکسید مس می‌شود. این مسئله در مطالعه Mehta و Mrinamala Devi در سال ۲۰۱۴ روی سیانوباکتری *Nostoc muscorum* تحت تنش مس نیز نشان داده شد.

نانوذرات مس اغلب در نقش پل بین سلولی عمل می‌کنند و سبب افزایش تجمع سلولی می‌شوند. آن‌ها به سطح سلول‌های سیانوباکتری‌ها متصل می‌شوند. این اتصال مستقیم و به وضوح توسط تصاویر SEM در شکل ۷ دیده می‌شود. دیواره سلولی سیانوباکتری قرار گرفته در معرض نانوذره در مقایسه با دیواره سلولی شاهد، شروع به شکستن کرد. تغییر ساختار دیواره سلولی توسط یون‌های فلزی در شکل ۷-ه نشان داده شده است. به طور مشابه تغییرات فراساختار سلولی در *Microcystis aeruginosa* که در معرض Ag-NPs (1mg/L) بود نیز مشاهده شد (Duong et al., 2016). بعد از ۴۸ ساعت قرار گرفتن در معرض نانوذرات نقره، ساختار ریخت‌شناسی *M. aeruginosa* به سلول چروکیده و تخریب شده تغییر یافت. تغییرات در ساختمان ترکیبات سلولی احتمالاً توسط یون‌های فلزی صورت می‌گیرد. بنابراین این

منابع

- مویوند گ. و فلاحی م. ۱۳۸۹. تاثیر نانوسیلور بر بیولوژی رشد و تکثیر جلبک سبز آبی
- Anabaena* مجله بیولوژی دریا، ۲(۸): ۵۸-۵۳.
- Aruoja V., Dubourguier H.C., Kasemets K. and Kahru A. 2009.** Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Science of Total Environment*, 407: 1461-1468.
- Bondarenko O., Juganson K., Ivask A., Kasemets K., Mortimer M. and Kahru A. 2013.** Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: A critical review. *Archives of Toxicology*, 87: 1181-1200.
- Bulgariu D. and Bulgariu L. 2012.** Equilibrium and kinetics studies of heavy metal ions biosorption on green algae waste biomass. *Bioresource Technology*, 103: 489-493.
- Couvreur P., Reddy L.H., Arias J.L. and Nicolas J. 2012.** Magnetic nanoparticles. *Chemical Reviews*, 112: 5818-5878.
- Deniz F., Saygideger S.D. and Karaman S. 2011.** Response to Copper and Sodium Chloride Excess in *Spirulina* sp. (Cyanobacteria). *The Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 87: 11-15.
- Duong T.T., Le T.S., Huong Tran T.T., Nguyen T.K., Ho C.T., Dao T.H., Le T.P.Q., Nguyen H.C., Dang D.K., Le T.T.H and Ha P.T. 2016.** Inhibition effect of engineered silver nanoparticles to bloom forming cyanobacteria. *Advances in Natural Sciences, Nanoscience and Nanotechnology*, 7(3): 1-7.
- Eijkelhoff C. and Dekker J.P. 1997.** A routine method to determine the chlorophyll a, pheophytin a, and carotene contents of isolated photosystem II reaction center complexes. *Photosynthesis Research*, 52: 69-73.
- Falch B.S., Konig G.M. and Bachmann H. 1995.** Biological activities of cyanobacteria: Evaluation of extracts and pure compounds. *Planta Medica*, 61(4): 321-328.
- Fogg G.E. and Thake B. 1987.** *Algal Cultures and Phytoplankton Ecology*. University of Wisconsin Press, US. 1266P.
- Handy R.D., Van Den Brinke N., Chappell M., Muhling M., Behra R., Dusinska M., Simpson P., Ahtiainen J., Jha A.N., Seiter J., Bednar A., Kennedy A., Fernandes T.F. and Riediker M.**

2012. Practical consideration for conducting ecotoxicity test methods with manufactured nanomaterials: What have we learnt so far? *Ecotoxicology*, 21(4): 933–972.
- Joh D.Y., Kinder J., Herman L.H., Ju S.Y., Segal M.A., Johnson J.N., ChanGarnet K.L. and Park J. 2011.** Single-walled carbon nanotubes as excitonic optical wires. *Nature Nanotechnology*, 6: 51–56.
- Klaine S.J., Alvarez P.J.J. and Batley G.E. 2008.** Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27: 1825–1851.
- Komarek J. 1973.** Culture collections. In: Carr N.G. and Whitton B.A. (Eds.). P: 519–524. *The Biology of Blue-green Algae*. Blackwell Scientific Publications, UK.
- Mehta S.K., Singh A. and Gaur J.P. 2002.** Kinetics of adsorption and uptake of Cu^{2+} by *Chlorella vulgaris*: Influence of pH, temperature, culture age, and cations. *Journal of Environmental Science and Health A*, 37(3): 399–414.
- Miao A.J., Schwehr K.A. and Xu C. 2009.** The algal toxicity of silver engineered nanoparticles and detoxification by exopolymeric substances. *Environmental Pollution*, 157: 3034–3041.
- Miller D.E., Green J.C. and Shiroyama T. 1978.** The *Selenustrum capricornatum* Printz. Algal Assay Bottle Test. Environmental Protection Agency, Washington D.C., U.S. 126P.
- Mrinamala Devi Y. and Mehta S.K. 2014.** Changes in antioxidative enzymes of cyanobacterium *Nostoc muscorum* under copper (Cu^{2+}) stress. *Science Vision*, 14(4): 207–214.
- Mundt S., Kreitlow S., Nowotny A. and Effmert U. 2001.** Biochemical and pharmacological investigations of selected cyanobacteria. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 203: 327–334.
- Oukarroum A., Bras S., Perreault F. and Popovic R. 2012.** Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 78: 80–85.
- Pendashte H., Shariati F., Keshavarz A. and Ramzanpour Z. 2013.** Toxicity of zinc oxide nanoparticles to *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus* algae species. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 5(5): 563–570.
- Perreault F., Oukarroum A. and Pirastru L. 2010.** Evaluation of copper oxide nanoparticles toxicity using chlorophyll a fluorescence

- imaging in *Lemna gibba*. Journal of Botany, 1–9.
- Perreault F., Samadani M. and Dewez D. 2014.** Effect of soluble copper released from copper oxide nanoparticles solubilisation on growth and photosynthetic processes of *Lemna gibba* L. Nanotoxicology, 8: 374–382.
- Rico C.M., Majumdar S. and Duarte-Gardea M. 2011.** Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain. Journal of Agricultural Food Chemistry, 59: 3485–3498.
- Saison C., Perreault F.O. and Daigle J.C. 2010.** Effect of core-shell copper oxide nanoparticles on cell culture morphology and photosynthesis (photosystem II energy distribution) in the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. Aquatic Toxicology, 96: 109–114.
- Schoen S. 1988.** Cell counting. P: 16–22. In: Lobban C.S., Chapmans D.J. and Kremer B.P. (Eds.). Experimental Phycology, A Laboratory Manual. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- Silvia P.M., Perreault F., Costa R.H.R., Popovic R. and Matias W.G. 2013.** Evaluation of toxicity and oxidative stress induced by copper oxide nanoparticles in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Aquatic Toxicology, 142–143: 431–440.
- Vijaya B., Sethubathi G. and Ashok Prabu V. 2010.** Antibacterial activity of cyanobacterial species from Adirampattinam coast, southeast coast of Palk Bay. Current Research Journal of Biological Sciences, 2(1): 24–26.
- Wei C.X., Zhang Y.B. and Guo J. 2010.** Effects of silica nanoparticles on growth and photosynthetic pigment contents of *Scenedesmus obliquus*. Journal of Environmental Sciences, 22(1): 155–160.



Evaluation of copper oxide nanoparticle toxicity to cyanobacteria *Anabaena* sp. in Guilan wetlands

Reza Karimi¹, Akbar Norastehnia^{2*}, Hossein Abbaspour³, Sakineh Saeidi Sar⁴, Akram Sadat Naeemi⁵

Received: April 2017

Accepted: September 2017

Abstract

Since nanoparticles cause increase of serious threat to human, animals and aquatic ecosystems, toxicity of copper oxide nanoparticles (CuO-NPs) on cyanobacteria *Anabaena* sp. in different concentrations were studied using growth inhibition test (OECD201). The negative Zander cyanobacteria were grown in the culture medium (Z-8-N) under optimum conditions of light, temperature and aeration in growth chamber. After starting the logarithmic growth phase, samples were exposed to various concentrations of copper oxide nanoparticles at intervals of 24, 48 and 72 hours. The number of cyanobacterial cells was daily counted and analyzed based on Probit analysis. The effective concentration (EC₅₀), no effect concentration (NOEC), specific growth rate (μ), doubling time (G), percentage growth inhibition (I%) and chlorophyll content was calculated. Treatments and control were significantly different in terms of cell density and growth inhibition percentage at specific intervals. In addition, the chlorophyll content of different treatments showed significant difference compared to control. It seems reducing the efficiency of photosynthesis is one of the routes that lead to considerable damage of copper oxide nanoparticles on *Anabaena* sp.

Key words: *Copper Oxide*, *Anabaena*, *Nanoparticle Pollution*, *Aquatic Ecosystem*, *Growth Inhibition*.

1- Ph.D. Student in Plant Physiology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran.

2- Associate Professor in Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran.

3- Associate Professor in Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran.

4- Assistant Professor in Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran.

5- Assistant Professor in Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran.

*Corresponding Author: norasteh@guilan.ac.ir

