



تاثیر نانوذرات نقره بر رشد، میزان کلروفیل و ترکیبات فنولی ریز جلبک *Nannochloropsis oculata*

نسرین فاضلیان^{۱*}، علی موافقی^۲، مرتضی یوسفزادی^۳، مهسا رحیمزاده^۴

تاریخ دریافت: اسفند ۹۶

تاریخ پذیرش: خرداد ۹۷

چکیده

کاربرد گسترده نانوذرات نقره در صنایع مختلف باعث رهاسازی آن‌ها به اکوسیستم آبی می‌شود. ریزجلبک‌ها در اکوسیستم‌های آبی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند. از این رو در پژوهش حاضر، تاثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره (۰، ۱، ۵، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر) بر ریزجلبک *Nannochloropsis oculata* بررسی شد. نتایج نشان داد که نرخ رشد و مقدار کلروفیل a در سلول‌های تیمار شده با نانوذرات نقره به طور معنی‌داری نسبت به شاهد کاهش یافت. همچنین مقدار کاروتنوئیدها به طور قابل توجهی افزایش یافت. در حالی که ترکیبات فنولی به طور معنی‌داری در پاسخ به نانوذرات نقره کاهش یافت. افزایش کاروتنوئیدها احتمالاً روش دفاعی این ریزجلبک در پاسخ به تنش ناشی از نانوذرات است. تصاویر میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) سلول‌های جلبکی تیمار شده با نانوذرات نقره نیز نشان داد که نانوذرات به دیواره سلولی جلبک آسیب می‌رساند.

واژگان کلیدی: نانوذرات نقره، *Nannochloropsis*، رنگیزه‌های فتوسنتزی، TEM.

- ۱- دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی گیاهی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
 - ۲- استاد گروه زیست‌شناسی گیاهی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
 - ۳- دانشیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندر عباس، ایران.
 - ۴- دانشیار گروه بیوشیمی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندر عباس، ایران.
- * نویسنده مسئول: nasrin_fazelian@yahoo.com

مقدمه

نانوذرات، ذرات جامد کلوئیدی با ابعاد ۱ تا ۱۰۰ نانومتر هستند که واکنش‌پذیری بیشتری نسبت به ذرات سنگین دارند. به طور کلی، با کاهش اندازه ذرات و افزایش نسبت سطح به حجم آن‌ها، میزان واکنش‌پذیری و سمیت ذرات به شدت افزایش می‌یابد (Farre et al., 2009). نانوذرات نقره به دلیل خواص ضد میکروبی، ضد ویروسی و ضد قارچی خود، کاربرد گسترده‌ای در صنایع مختلف مانند نساجی، غذایی، کشاورزی، دامپزشکی، شیلات و آبی‌پروری دارند (Rather et al., 2011). تولید رو به افزایش نانوذرات و ورود آن‌ها به محیط زیست باعث شده است که در سال‌های اخیر به ایمنی نانو ساختارها و تاثیرات آن‌ها بر انسان و محیط زیست خصوصا آب‌های شور و شیرین توجه ویژه‌ای شود (فرجی و فدوی، ۱۳۹۲). نانوذرات برای حیات آبزیان خطرناک هستند و در بین آبزیان، ریز جلبک‌ها به عنوان اولین سطح زنجیره غذایی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند (فرجی و فدوی، ۱۳۹۲). نتایج مطالعات در دسترس بیانگر واکنش متفاوت گونه‌های مختلف ریز جلبک به غلظت‌های متفاوت نانوذرات نقره است. به عنوان مثال Haung و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان دادند

که غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات نقره باعث کاهش رشد، کاهش کلروفیل و القای تنش اکسیداتیو در دیاتومه *Skeletonema costatum* شد. Ksiazyc و همکاران نیز در سال ۲۰۱۵ گزارش کردند که غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات نقره باعث مهار کامل رشد ریز جلبک *Pseudokirchneriella subcapitata* شد. همچنین بررسی سمیت نانوذرات نقره (۰، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) بر *Chlorella vulgaris* (ریز جلبک آب شیرین) و *Dunaliella tertiolecta* (ریز جلبک آب شور) نشان داد که اثر مهاری نانوذرات نقره بر ریز جلبک آب شور شدیدتر از ریز جلبک آب شیرین بود (Hazani et al., 2013). در حالی که Angel و همکاران در سال ۲۰۱۳ گزارش کردند که حساسیت ریز جلبک آب شیرین (*P. subcapitata*) بسیار بیشتر از ریز جلبک آب شور (*Phaeodactylum tricornutum*) بود. مطالعات دیگر نیز نشان دادند که نانوذرات نقره اثرات مهاری بر رشد سیانوباکتری مضر *Microcystis aeruginosa* داشت، اما مقاومت جلبک‌های سبز نسبت به نانوذرات نقره بسیار بالاتر از این سیانوباکترها بود (Park and Graggs, 2010). بنابراین

ریزجلبک‌های جنس *Nannochloropsis* از شاخه *Heterokontophyta* رده *Eustigmatophyceae* و خانواده *Eustigmataceae* هستند. این جنس دارای شش گونه است (Hibberd, 1981). ریزجلبک‌های *Nannochloropsis* دارای رنگیزه‌های مهمی مانند کلروفیل a، آستازانتین، زئازانتین و کانتازانتین هستند و به دلیل داشتن مقادیر بالای اسیدهای چرب، به عنوان منبع غذایی برای ماهی‌ها و رتیفرها استفاده می‌شوند و در صنعت نیز در تهیه سوخت زیستی (بیودیزل) به کار می‌روند (Griffiths and Harrison, 2009). با وجود اهمیت ریزجلبک *Nannochloropsis oculata* در صنایع مختلف، تاکنون تأثیر نانوذرات نقره بر رشد و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی این میکروارگانیسم بررسی نشده است. از این رو در پژوهش حاضر تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بر رشد، میزان کلروفیل، کاروتنوئیدها و ترکیبات فنولی ریزجلبک *N. oculata* بررسی شد و به منظور تأیید برهم‌کنش نانوذره با سلول‌های جلبکی، از آن‌ها تصاویر TEM تهیه شد.

جلبک‌های مختلف واکنش متفاوتی به نانوذرات نقره نشان می‌دهند. به طور کلی مکانیسم عمل نانوذرات نقره در ریزجلبک‌ها هنوز به درستی مشخص نشده است، اما پیشنهاد شده است که نانوذرات نقره سطح تماس بیشتری به ازای واحد جرم دارند و تأثیر بیشتری اعمال می‌کنند (Cole, 2008). همچنین نانوذرات نقره با آزادسازی یون‌های نقره (Ag^+) باعث آسیب به ساختار سلولی می‌شوند و با اثر مهاری بر فتوسنتز در غلظت‌های بالا مانع رشد جلبک‌ها می‌شوند (Cole, 2008; Lubick, 2008). یون‌های نقره با القای تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، باعث پراکسیداسیون لیپیدها، تخریب غشای سلولی و القای تنش اکسیداتیو در ریزجلبک‌ها می‌شوند. تنش اکسیداتیو باعث تغییر در ترکیبات آنتی‌اکسیدان آنزیمی و غیرآنزیمی ریزجلبک‌ها می‌شود (Miura and Shinohara, 2009). لازم به ذکر است که سمیت نانوذراتی مانند نانونقره، برخلاف نانوذرات اکسید روی، نمی‌تواند به تنهایی از طریق غلظت یون‌های نقره حل شده تعیین شود. برهم‌کنش نانوذره با جلبک نیز نقش مهمی در سمیت آن ایفا می‌کند (Lubick, 2008).

مواد و روش‌ها

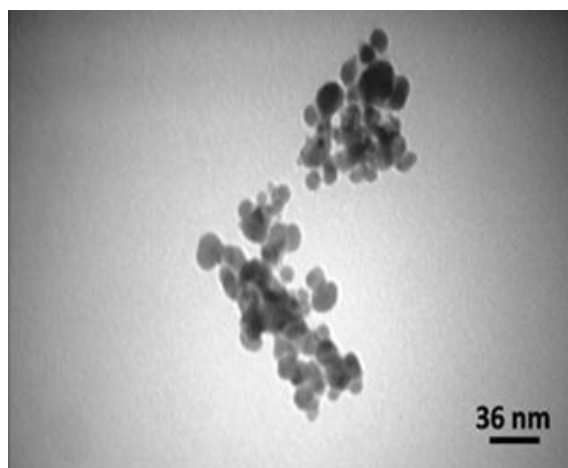
مشخصات نانوذرات نقره

با استفاده از دستگاه زتاسایزر (S90، Malvern، انگلستان)، اندازه ذرات موجود در کلئوئید نانوذرات نقره مورد استفاده در مطالعه حاضر (نانو نصب پارس، ایران) بین ۳/۹ تا ۱۶۳/۵ نانومتر و میانگین قطر آن‌ها، ۵۴/۸ نانومتر به دست آمد. نتایج حاصل از تصاویر TEM نیز نشان داد که میانگین اندازه نانوذرات نقره در حالت خشک نیز $25/90 \pm 8/44$ نانومتر بود (شکل ۱). اختلاف به دست آمده بین اندازه نانوذرات نقره در حالت خشک و کلئوئید ناشی از اختلاف در روش مورد استفاده در اندازه‌گیری و نیز تشکیل توده و افزایش اندازه ذرات در

حالت کلئوئیدی است. طبق نتایج به دست آمده از دستگاه زتاسایزر، بار سطحی نانوذرات نقره موجود در کلئوئید مذکور به طور میانگین $1/03 \pm 0/13$ میلی‌ولت بود.

کشت ریزجلبک و اعمال تیمارها

ریزجلبک مورد آزمایش در پژوهش حاضر، *Nannochloropsis oculata* بود که نمونه استوک آن از پژوهشکده اکولوژی بندرعباس تهیه شد. در این پژوهش، ارلن‌های اتوکلاو شده حاوی ۴۰۰ میلی‌لیتر نمونه جلبکی با تراکم اولیه 4×10^4 آماده شدند و به مدت ۴ روز در شرایط آزمایشگاه قرار گرفتند تا به مرحله رشد لگاریتمی برسند. سپس یک



شکل ۱: تصویر TEM از نانوذرات نقره کلئوئیدی

سانتریفیوژ (K220، Centurion Scientific، انگلستان) شد. محلول رویی به دست آمده از سانتریفیوژ جدا شد و به رسوب جلبکی باقی مانده ۱ میلی لیتر استون ۸۵ درصد اضافه شد و با دستگاه ورتکس (Cole-Parmer، 115VAC، انگلستان) به مدت ۲ دقیقه مخلوط شد و به مدت ۲۴ ساعت درون یخچال در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. از محلول رویی برای اندازه گیری میزان کلروفیل و کاروتنوئیدها استفاده شد. به این ترتیب که جذب محلول رویی نمونه های سانتریفیوژ شده در طول موج های ۶۶۴، ۶۴۷ و ۴۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Jenway، 7305، انگلستان) خوانده شد و میزان کلروفیل (Chl) و کاروتنوئید (Crt) با استفاده از رابطه های ۲ و ۳ بر حسب میکروگرم در میلی لیتر محاسبه شد (Jeffrey and Humphrey, 1975).

رابطه ۲:

$$Chla = [11.93(A_{664}) - 1.93(A_{647})]$$

رابطه ۳:

$$Crt = [(1000(A_{664})) - (2.86(Chla) - 129.2(Chlb))]/245$$

اندازه گیری میزان ترکیبات فنولی

برای اندازه گیری ترکیبات فنولی، ابتدا رسوب جلبکی با سانتریفیوژ سوسپانسیون جلبکی تهیه شد. سپس رسوب جلبکی با ۱

استوک غلیظ ۱۰ گرم در لیتر نانوذرات نقره تهیه شد و با استفاده از این استوک غلظت های مورد نظر نانوذره شامل ۰، ۱، ۵، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میلی گرم در لیتر ساخته شد و در روز چهارم رشد ریزجلبک ها، تیمارهای نانوذرات اعمال شد (هر تیمار با ۳ تکرار). ریزجلبک ها به مدت ۳ روز با نانوذرات تیمار شدند. در طول این مدت، روزانه جذب نمونه ها و شمارش جلبکی انجام گرفت. به منظور جلوگیری از رسوب نانوذرات، ازلن ها در مدت زمان تیمار بر روی دستگاه شیکر (Cortez، ME302، امریکا) با ۲۵۰ دور در دقیقه قرار داده شد. غلظت موثر (EC₅₀) هر یک از نانوذرات با استفاده از رگرسیون و نرم افزار Microsoft Excel 2016 محاسبه شد و نرخ رشد جلبک (μ) با استفاده از رابطه ۱ محاسبه شد (Chiu et al., 2009).

رابطه ۱:

$$\mu = (\ln N_2 - \ln N_1) / (t_2 - t_1)$$

N_2 : تعداد ریزجلبک ها در روز آخر تیمار؛ N_1 : تعداد ریزجلبک ها در روز اول؛ t_2 : زمان انتهای دوره؛ t_1 : زمان ابتدای دوره.

اندازه گیری میزان رنگیزه های فتوسنتزی

برای تعیین میزان کلروفیل و کاروتنوئیدها، سوسپانسیون جلبکی به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰rpm و دمای ۴- درجه سانتی گراد

مراحل بعدی شامل آب‌گیری، قرار دادن در رزین و برش‌گیری بود. در آخرین مرحله، برش‌ها با فلزات سنگین رنگ‌آمیزی شد و به وسیله میکروسکوپ الکترونی گذاره (EM10C-100 KV, Zeiss, آلمان) بررسی و عکس‌برداری شد.

تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و با ۳ تکرار انجام شد. برای تحلیل داده‌ها از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA) استفاده شد و مقایسه میانگین‌ها در سطح اطمینان ۹۵ درصد و با استفاده از پس‌آزمون دانکن صورت گرفت. برای رسم نمودار از نرم‌افزار Microsoft Excel 2016 استفاده شد.

نتایج

تاثیر نانوذرات نقره بر رشد

با توجه به جدول ۱، غلظت‌های ۵۰-۱ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات نقره باعث کاهش معنی‌دار نرخ رشد نسبت به نمونه شاهد شد. بیشترین میزان نرخ رشد در نمونه شاهد (۷۴/۳۶ درصد) و کمترین میزان نرخ رشد در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر (۴/۶۹ درصد) مشاهده شد. همچنین EC₅₀ در غلظت ۲۰/۸۸۲۳ میلی‌گرم در لیتر و EC₉₀ در غلظت

میلی‌لیتر متانول مخلوط و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی نگهداری شد (عصاره متانولی). پس از ۲۴ ساعت، ابتدا در لوله‌های فالکن ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته شد و به هر یک از آن‌ها ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین اضافه شد. برای نمونه بلانک ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر متانول کنار گذاشته شد. پس از ۱ دقیقه به نمونه اول عصاره متانولی اضافه شد و برای نمونه‌های بعدی، عصاره متانولی پس از هر ۳۰ ثانیه اضافه شد. پس از ۶ دقیقه به نمونه بلانک ۱۵۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۲۰ درصد اضافه شد و در دقیقه هفتم همین محلول به نمونه اول و با فاصله ۳۰ ثانیه‌ای به ترتیب به سایر نمونه‌ها اضافه شد. پس از ۳۷ دقیقه جذب نمونه ۱ و به فاصله هر ۳۰ ثانیه جذب نمونه‌های بعدی در طول موج ۷۶۰ نانومتر خوانده شد (Singleton et al., 1999).

تهیه تصاویر میکروسکوپ الکترونی گذاره

به منظور تهیه تصاویر جلبکی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM)، نمونه‌های جلبکی با گلاتار آلدهید ۴ درصد تثبیت شد. سپس نمونه‌ها با بافر کاکودیلات ۰/۱ مولار شسته شد و مجدداً در بافر حاوی تتراکسید اسمیوم ۱ درصد قرار داده شد.

۵۵/۳۵ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات نقره مشاهده شد. بیشترین میزان کاروتنوئید در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات نقره و کمترین میزان آن در نمونه شاهد مشاهده شد.

تأثیر نانوذرات نقره بر مقدار کلروفیل و کاروتنوئیدها

در تیمار نانوذرات نقره، غلظت‌های ۵ تا ۵۰ میلی‌گرم در لیتر باعث کاهش معنی‌دار مقدار کلروفیل a نسبت به نمونه شاهد شد. اما غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر تغییر معنی‌داری در مقدار کلروفیل a ایجاد نکرد (جدول ۱). نتایج تحلیل واریانس داده‌ها نشان داد که نانوذرات نقره باعث افزایش معنی‌دار مقدار کاروتنوئیدهای جلبک *N. oculata* نسبت به

جدول ۱: تأثیر نانوذره نقره بر نرخ رشد و میزان کلروفیل a ریزجلبک *Nannochloropsis oculata* (میانگین \pm خطای استاندارد، n=۳).

غلظت نانوذرات نقره					
۵۰ mg/L	۲۵ mg/L	۱۰ mg/L	۵ mg/L	۱ mg/L	۰ mg/L (شاهد)
۴/۶۹ \pm ۰/۰۴۷ ^f	۲۷/۶۶ \pm ۰/۰۳۲ ^e	۵۰/۸۶ \pm ۰/۰۵۹ ^d	۶۱/۰۰ \pm ۰/۰۵۸ ^c	۶۵/۰۹ \pm ۰/۰۵۷ ^b	۷۴/۳۰ \pm ۰/۰۳۲ ^a
۲/۳۱۰ \pm ۰/۰۴۲ ^c	۳/۰۴ \pm ۰/۰۲۰ ^{bc}	۳/۷۸ \pm ۰/۰۳۰ ^b	۳/۸۴ \pm ۰/۰۳۸ ^b	۵/۰۰۶ \pm ۰/۰۲۹ ^a	۴/۷۸۰ \pm ۰/۰۶۵ ^a

حروف غیرمشابه در هر ردیف بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.05$).

جدول ۲: تاثیر نانوذره نقره بر میزان کاروتنوئیدها و ترکیبات فنولی در ریزجلبک *Nannochloropsis oculata* (میانگین \pm خطای استاندارد، n=۳).

غلظت نانوذرات نقره					
۵۰ mg/L	۲۵ mg/L	۱۰ mg/L	۵ mg/L	۱ mg/L	۰ mg/L (شاهد)
۱/۳۴ \pm ۰/۰۴۷ ^a	۱/۲۵ \pm ۰/۰۲۶ ^{ab}	۱/۱۹ \pm ۰/۰۳۱ ^{ab}	۰/۹۱ \pm ۰/۰۴۲ ^c	۱/۰۵ \pm ۰/۰۷۶ ^{bc}	۰/۶۷ \pm ۰/۱۶۰ ^d
۱۰/۸۲ \pm ۰/۱۶ ^c	۱۱/۱۱ \pm ۰/۹۶ ^c	۱۳/۴۷ \pm ۱/۰۱ ^b	۱۳/۷۶ \pm ۰/۸۴ ^b	۱۵/۲۳ \pm ۰/۷۴ ^{ab}	۱۵/۵۲ \pm ۱/۵۲ ^a

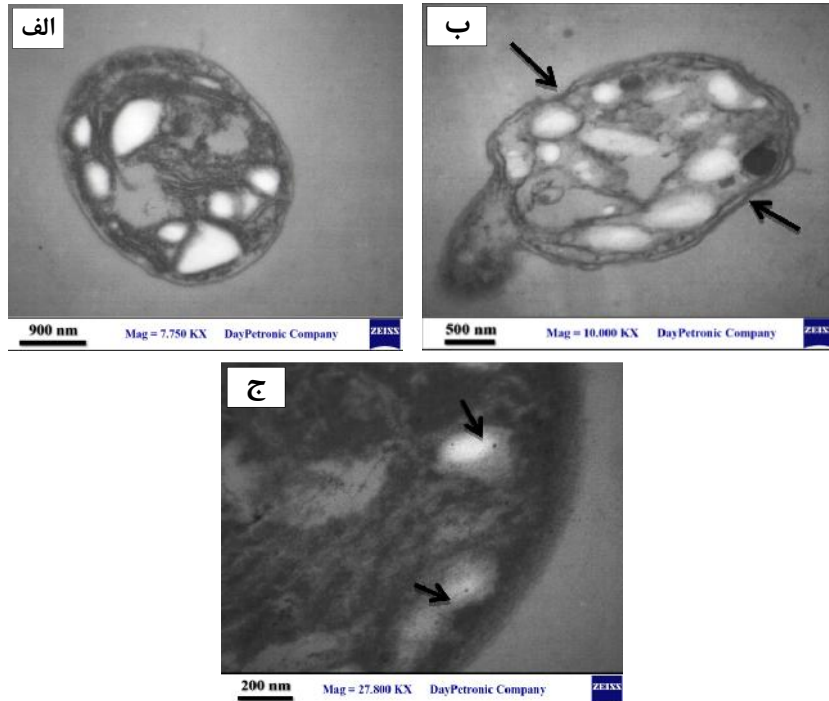
حروف غیرمشابه در هر ردیف بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.05$).

۲- ب دیواره سلولی یکنواخت نیست و نانوذره نقره باعث آسیب‌دیدگی و چروکیدگی دیواره سلولی نسبت به تیمار شاهد شده است.

همچنین در شکل ۲- ج می‌توان ورود نانوذرات نقره به سلول *N. oculata* را مشاهده کرد و نقاط مشکی رنگ موجود در شکل که با پیکان مشخص شده است، نشان دهنده نانوذرات نقره است.

تصاویر TEM سلول‌های جلبکی *Nannochloropsis oculata* تیمار شده با نانوذرات نقره

شکل ۲- الف مربوط به تصویر TEM سلول ریزجلبک *N. oculata* از تیمار شاهد (عدم تیمار با نانوذره نقره) است که دیواره سلولی سالم و یکنواخت دارد. اما در شکل ۲- ب و ج، سلول جلبکی تیمار شده با ۲۵ میلی‌گرم در لیتر نانوذره نقره مشاهده می‌شود. در شکل



شکل ۲: تصویر TEM سلول‌های ریزجلبک *Nannochloropsis oculata* (الف) نمونه شاهد. ب و ج) سلول‌های *N. oculata* تیمار شده با نانوذرات نقره. ب) پیکان‌ها نشان دهنده چروکیدگی دیواره سلولی در پاسخ به نانوذرات نقره در سلول‌های تیمار شده است. ج) پیکان‌ها ورود نانوذرات نقره را به درون سلول نشان می‌دهند.

Hazani و همکاران در سال ۲۰۱۳ گزارش کردند که غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات نقره به ترتیب باعث مهار ۶۸ و ۷۳ درصد سلول‌های زنده *C. vulgaris* (آب شیرین) و *D. tertiolecta* (آب شور) شد. این نتایج مشابه داده‌های حاصل از پژوهش حاضر بود. در حالی که Ksiazzyk و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که نانوذرات نقره (۵، ۲۵ و ۵۰

بحث

در مطالعه حاضر رشد ریزجلبک *Nannochloropsis oculata* در پاسخ به نانوذرات نقره کاهش یافت. مطالعات قبلی نیز نشان داده است که نانوذرات نقره باعث کاهش معنی‌دار رشد و تغییر در ریخت‌شناسی جلبک‌های *Pithophora* و *Chara vulgaris* شد (Dash et al., 2012).

کاروتنوئیدها، یکی دیگر از رنگیزه‌های فتوسنتزی هستند که خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارند. این رنگیزه‌ها در تنش‌های محیطی در حفاظت از دستگاه فتوسنتزی در برابر رادیکال‌های آزاد نقش مهمی ایفا می‌کنند و به عنوان رنگیزه کمکی فتوسنتز عمل می‌کنند (Wang et al., 2016). افزایش میزان کاروتنوئیدهای ریزجلبک *N. oculata* در پاسخ به نانوذرات نقره در مطالعه حاضر مشابه نتایج Wang و همکاران (۲۰۱۶) بود.

ترکیبات فنولی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی غیرآزیمی به شمار می‌روند که مانند کاروتنوئیدها به عنوان جاروب کننده رادیکال‌های آزاد عمل می‌کنند (Zaidi et al., 2014; Wang et al., 2016). کاهش ترکیبات فنولی در ریزجلبک *Chlorella* در پاسخ به نانوذرات نقره توسط Zaidi و همکاران در سال ۲۰۱۵ گزارش شد. نانوذرات نقره نیز مقدار ترکیبات فنولی را در جلبک *N. oculata* کاهش داد. کاهش این ترکیبات آنتی‌اکسیدان یک شاخص بافتی در *N. oculata* است و احتمالاً به دلیل تنش اکسیداتیو ناشی از غلظت‌های بالای این نانوذرات باشد و باعث کاهش توانایی آنتی‌اکسیدانی ریزجلبک *N. oculata* در پاسخ به این نانوذرات می‌شود.

میلی‌گرم در لیتر) باعث کاهش رشد جلبک *P. subcapitata* شد و EC_{50} را در غلظت ۱/۶۳ میلی‌گرم در لیتر گزارش دادند. به طور کلی سمیت نانوذرات به مقدار نانوذره، میزان حلالیت نانوذره، مدت زمان تیمار و نوع ریزجلبک مورد آزمایش بستگی دارد (Ji et al., 2011; Dash et al., 2012).

نتایج مربوط به رشد ریزجلبک *N. oculata* منطبق بر میزان کلروفیل بود بنابراین کاهش کلروفیل (کاهش فتوسنتز) می‌تواند یکی از دلایل احتمالی کاهش رشد ریزجلبک مورد آزمایش باشد. فتوسنتز یکی از ویژگی‌های مهم رشد ریزجلبک‌ها است. نانوذرات نقره می‌تواند از غشای پلاسمایی جلبک‌ها عبور کند و وارد سیتوپلاسم شود و علاوه بر تخریب اندامک‌ها (مثل شبکه آندوپلاسمی) با DNA واکنش داده، در عملکرد آنزیم‌های فتوسیستم II اختلال ایجاد کند، همچنین میزان کلروفیل را کاهش داده، در نهایت فتوسنتز و رشد نیز کاهش می‌یابد (Cole, 2008). Oukarroum و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که غلظت‌های ۰/۱ تا ۱۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات نقره باعث کاهش میزان کلروفیل در *C. vulgaris* و *D. tertiolecta* شد که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت داشت.

می‌کنند (Chang et al., 2012). نانوذرات و یون‌های نقره با برهم‌کنش با پروتئین‌های درون سلولی، باعث تغییرات پس‌ترجمه‌ای و اختلال در فعالیت‌های فیزیولوژیکی سلول می‌شوند (Cole, 2008; Lubick, 2008). Dash و همکاران نیز در سال ۲۰۱۲ گزارشی کردند که برهم‌کنش نانوذرات با اجزای سلولی باعث تغییر در فعالیت آنزیم‌های فتوسنتزی و کاهش میزان کلروفیل می‌شود.

بنابراین نانوذرات نقره با آسیب به دیواره سلولی ریزجلبک *N. oculata* باعث اختلال در عملکرد سلول و کاهش رشد این ریزجلبک شد. همچنین نانوذرات با ورود به داخل سلول یون‌های نقره را آزاد کردند. نانوذرات یا یون‌های نقره با برهم‌کنش با آنزیم‌های فتوسنتزی باعث کاهش میزان کلروفیل، کاهش نرخ فتوسنتز و در نهایت باعث کاهش رشد ریزجلبک *N. oculata* شدند. افزایش کاروتنوئیدها می‌تواند یکی از سیستم‌های دفاعی این ریزجلبک در برابر تنش ناشی از نانوذرات نقره باشد و از آسیب بیشتر دستگاه فتوسنتزی ممانعت کند، در حالی که ترکیبات فنولی در پاسخ به این نانوذرات کاهش یافتند.

تصاویر TEM نشان داد که غلظت‌های بالای نانوذرات نقره باعث آسیب دیواره سلولی ریزجلبک *N. oculata* شد. این نتایج مشابه نتایج به دست آمده از مطالعه Wang و همکاران (۲۰۱۶) است که گزارش کردند تخریب دیواره سلولی نقش مهمی در سمیت نانوذرات TiO_2 در جلبک *Phaeodactylum tricornutum* ایفا می‌کند. به نظر می‌رسد غلظت‌های بالای نانوذرات نقره با آسیب به دیواره سلولی باعث اختلال در عملکرد سلول‌های *N. oculata* شده است. همچنین 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 عبور کنند و وارد سلول شوند (Navarro et al., 2008; Chang et al., 2012; Dash et al., 2012). کانال‌های یونی و پروتئین‌های ناقل نیز اجازه عبور را 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

منابع

- فرجی م. و فدوی ق. ۱۳۹۲. کاربردهای نانوذرات مغناطیسی در زمینه علوم و صنایع غذایی. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، ۸(۲): ۲۳۹-۲۵۲.
- Angel B.M., Batley G.E., Jarolimek C.V. and Rogers N.J. 2013.** The impact of size on the fate and toxicity of nanoparticulate silver in aquatic systems. *Chemosphere*, 93(2): 359-365.
- Chang Y.N., Zhang M., Xia L., Zhang J. and Zing G. 2012.** The toxic effects and mechanisms of CuO and ZnO nanoparticles. *Materials*, 5: 2850-2871.
- Chiu S.Y., Kao C.Y., Tsai M.T., Ong S.C., Chen C. and Lin C.S. 2009.** Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. *Bioresource Technology*, 100(2): 833-838.
- Cole P. 2008.** Nanoparticles in natural aquatic environments: A physical, chemical and ecotoxicological of cerium dioxide and silver. Postgraduate Research Conference Proceedings, UK. P: 20-25.
- 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.
- Farre M., Gajda-Schrantz K., Kantiani L. and Barcelo D. 2009.** Ecotoxicity and analysis of nano-materials in the aquatic environment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393(1): 81-95.
- Griffiths M.J. and Harrison S.T.L. 2009.** Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology*, 21: 493-507.
- Haug J., Cheng J. and Yi J. 2016.** Impact of silver nanoparticles on marine diatom *Skeletonema costatum*. *Journal of Applied Toxicology*, 36: 1343-1354.
- Hazani A.A., Ibrahim M.M., Shehata A.I., El-gaaly G.A., Daoud M., Fouad D., Riwana H. and Moubayed N.M.S. 2013.** Ecotoxicity of Ag-nanoparticles on two microalgae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. *Archives of Biological Sciences Belgrade*, 65(4): 1447-1457.
- Hibberd D.J. 1981.** Notes on the taxonomy and nomenclature of the algal classes Eustigmatophyceae and Tribophyceae (Synonym Xanthophyceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 82(2): 93-119.
- Jeffrey S.W. and Humphrey G.F. 1975.** New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in

- higher plants, algae, and natural phytoplankton. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, 167(2): 191–194.
- Ji J., Long Z. and Lin D. 2011.** Toxicity of oxide nanoparticles to the green algae *Chlorella* sp. *Chemical Engineering Journal*, 170(2): 525–530.
- Ksiazyc M., Asztemborska M., Steborowski R. and Bystrzejewska Piotrowska G. 2015.** Toxic effect of silver and platinum nanoparticles toward the freshwater microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology*, 94: 554–558.
- Lubick N. 2008.** Nanosilver toxicity: Ions, Nanoparticles or both? *Environmental Science and Technology*, 1010–1021.
- Miura N. and Shinohara Y. 2009.** Cytotoxic effect and apoptosis induction by silver nanoparticles in Hela Cells. *Biochemical and Biophysical Researches Communications*, 390(3): 733–737.
- Navarro E., Piccapietra F., Wagner B., Marconi F., Kaegi R., Odzak N., Sigg L. and Behra R. 2008.** Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Science and Technology*, 42: 8959–8964.
- 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.
- Park J.B.K. and Craggs R.J. 2010.** Waste water treatment and algal production in high rate algal ponds with carbon dioxide addition. *Water Science and Technology*, 61: 633–639.
- Rather M.A., Sharma R., Aklakur M., Ahmad S., Kumar N. and Khan M. 2011.** A novel tool for aquaculture and fisheries development. A prospective mini-review. *Fisheries and Aquaculture Journal*, 16: 1–5.
- Singleton V.L., Orthofer R. and Lamuela-Raventos R.M. 1999.** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299: 152–178.
- Wang X., Yang X., Chen S., Li Q., Wang W., Hou C., Gao X., Wang L. and Wang S. 2016.** Zinc oxide nanoparticles affect biomass accumulation and photosynthesis in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 6: 1–9.
- Zaidi S., Maurya C., Shankhadarwar S. and Pius J. 2015.** Silver nanoparticles-*Chlorella* interaction: Effect on metabolites. *Bioscience Discovery*, 6(1): 62–65.



Effect of silver nanoparticles on growth, chlorophyll content and phenolic compounds of *Nannochloropsis oculata*

Nasrin Fazelian^{1*}, Ali Movafeghi², Morteza Yousefzadi³, Mahsa Rahimzadeh⁴

Received: March 2018

Accepted: June 2018

Abstract

Silver nanoparticles (Ag NPs) have been widely used in various industries, thus inevitably released into the aquatic ecosystem. Microalgae have important role in aquatic ecosystem, so in this study, the effect of different concentrations of Ag NPs (0, 1, 5, 10, 25 and 50 mg/L) investigated on *Nannochloropsis oculata*. The results showed that the growth rate and the content of chlorophyll a significantly decreased in algal cells treated with Ag NPs compared to control. Also, the content of carotenoids significantly increased, while the phenolic compounds significantly decreased in response to Ag NPs. Increase of carotenoids probably is a defensive response in this microalga under stress condition. The TEM images of algae cells treated with Ag NPs showed that NPs damaged the algal cell wall.

Key words: *Silver Nanoparticles*, *Nannochloropsis*, *Photosynthetic Pigments*, *TEM*.

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

2- Professor in Department of Plant Biology, Faculty of Natural Sciences, Tabriz University, Tabriz, Iran.

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

4- Associate Professor in Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran.

*Corresponding Author: nasrin_fazelian@yahoo.com