



## مقایسه تاثیر نانوذرات اکسید مس و اکسید آهن بر تنش اکسیداتیو در ریز جلبک *Nannochloropsis oculata*

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

DOI: 10.22124/japb.2022.20717.1438

تاریخ پذیرش: خرداد ۱۴۰۱

تاریخ دریافت: مهر ۱۴۰۰

### چکیده

در این پژوهش تاثیر غلظت‌های مختلف (۵، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم در لیتر) نانوذرات اکسید مس و اکسید آهن بر رشد، پراکسیداسیون لیپیدها و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز بررسی شد. نتایج نشان داد که غلظت‌های بیش از ۵ میلی گرم در لیتر نانوذره اکسید مس و غلظت‌های بیش از ۱۰ میلی گرم در لیتر نانوذره اکسید آهن باعث کاهش رشد ریزجلبک *Nannochloropsis oculata* شد. مقدار آلدئیدها در پاسخ به برخی از غلظت‌های هر دو نانوذره اکسید فلزی به طور معنی‌دار نسبت به شاهد افزایش یافت ( $P < 0.05$ ). اما افزایش مقدار آلدئیدها در پاسخ به نانوذره اکسید مس بسیار شدیدتر از نانوذره اکسید آهن بود. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در پاسخ به هر دو نانوذره به طور معنی‌دار افزایش یافت اما تاثیر افزایشی نانوذره اکسید مس بر فعالیت این آنزیم بیشتر از نانوذره اکسید آهن بود. فعالیت آنزیم کاتالاز در پاسخ به نانوذره اکسید مس افزایش معنی‌داری را نشان داد، در حالی که نانوذره اکسید آهن، فعالیت این آنزیم را کاهش داد. نتایج نشان داد که سمیت نانوذرات اکسید مس در ریزجلبک *N. oculata* بسیار شدیدتر از نانوذرات اکسید آهن بود.

**واژگان کلیدی:** *Nannochloropsis*، نانوذرات اکسید مس، نانوذرات اکسید آهن، تراکم سلولی، تنش اکسیداتیو.

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، دانشکده علوم پایه، دانشگاه قم، قم، ایران.

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

## مقدمه

ترکیب شیمیایی یک ماده در تعیین سمیت آن دارای اهمیت است، اندازه کوچک نیز می‌تواند معیار مهمی برای بروز اثرات سمی باشد. تفاوت رفتار زیستی و ویژگی‌های حرکتی ذرات بسیار ریز نسبت به ذرات بزرگ‌تر باعث می‌شود این ذرات بسیار ریز از سدهای زیستی عبور کند و وارد سلول شوند. نفوذ این ذرات در موجودات زنده موجب ورود آنها به زنجیره غذایی می‌شود (De Jong et al., 2005). رهایش نانوذرات به اکوسیستم‌های آبی ممکن است تاثیرات نامطلوبی را به همراه داشته باشد. ریزجلبک‌ها به عنوان اولین تولید کنندگان آبی و به دلیل موقعیت ویژه در هرم غذایی دریایی بیش از هر موجود دیگری در محیط زیست دارای اهمیت هستند و در تحقیقات زیست‌محیطی به عنوان گزینه‌های اول مورد بررسی قرار می‌گیرند (فرجی و فدوی، ۱۳۹۲).

Aruoja و همکاران (۲۰۰۹) برای اولین بار سمیت نانوذره CuO را در ریزجلبک‌ها بررسی کردند. نتایج مطالعه آنها نشان داد که غلظت های پایین نانوذرات CuO در ریزجلبک *Pseudokirchneriella subcapitata* نسبت به ذرات سنگین آن حلالیت و سمیت بیشتری دارند و سمیت ذرات سنگین و نانوذرات CuO

نانو ذرات، ذراتی با ابعاد کمتر از ۱۰۰ نانومتر هستند که خواص آنها با حالت توده تفاوت زیادی دارد. بیشتر عناصر جامد و اکسیدهای فلزی می‌توانند در ابعاد نانو تولید شوند (فرجی و فدوی، ۱۳۹۲). نانوذرات اکسید مس (CuO) یکی از ساده‌ترین اعضای خانواده ترکیبات مس هستند و معمولاً در ساختار سوپرکنداکتورها، مواد حساس، شیشه، سرامیک و به عنوان عامل آنتی‌فولینگ در ترکیب رنگ‌های موجود بر بدنه کشتی‌ها و قایق‌ها استفاده می‌شوند (Chang et al., 2012; Bao et al., 2015). نانوذرات اکسید آهن ( $Fe_2O_3$ ) به دلیل ساخت نسبتاً آسان، هزینه اندک تولید و امکان هدایت مغناطیسی کاربردهای گسترده‌ای در علوم مختلف پیدا کرده‌اند. این نانوذرات در علوم پزشکی به عنوان حامل دارویی، عامل ایجاد کننده تضاد در MRI و همچنین برای تجزیه زیستی و جداسازی و خالص‌سازی در علوم زیستی و صنایع غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Kadar et al., 2012).

رفتار فیزیکی و شیمیایی خاص نانوذرات به دلیل نسبت بالای سطح به حجم، اندازه کوچک و ویژگی‌های ظاهری مرتبط با اندازه آنها است (Xiao et al., 2008). به همان اندازه که

اسیدهای چرب چند غیراشباع جیره غذایی مطرح است (Fulks and Main, 1991). با توجه به اهمیت ریزجلبک *N. oculata* در صنعت آبی‌پروری و تولید بیودیزل، در این پژوهش تاثیر دو نانوذره  $\text{CuO}$  و  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  بر رشد و القای تنش اکسیداتیو در این ریزجلبک بررسی شده است.

#### مواد و روش‌ها

##### کشت ریزجلبک *Nannochloropsis oculata*

##### و تیمار با نانوذرات $\text{CuO}$ و $\text{Fe}_2\text{O}_3$

##### ریزجلبک *Nannochloropsis oculata*

در این پژوهش به کار گرفته شد و نمونه استوک آن از مرکز تحقیقات شیلات بندر لنگه تهیه شد. ارلن‌های حاوی نمونه جلبکی تحت هوادهی ملایم، در دمای ۲۸-۲۶ درجه سانتی‌گراد، شدت نور ۵۰۰۰ لوکس با دوره روشنایی ۱۲ ساعته و میزان شوری ۲۷ ppt قرار گرفتند و زی‌توده کافی از نمونه جلبکی تهیه شد (Fazelian et al., 2020)

از نانوذرات اکسید مس ( $\text{CuO}$ ) و اکسید آهن ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) (پیشگامان نانومواد ایرانیان، ایران) استوکی با غلظت ۱۰ گرم بر لیتر (آب دیونیزه + پودر نانوذرات) ساخته شد و برای جلوگیری از رسوب نانوذرات، به مدت ۳۰ دقیقه

شدیدا تحت تاثیر حلالیت یون‌های مس قرار می‌گیرد (Aruoja et al., 2009). Demir و همکاران (۲۰۱۵) تاثیر فرم آلفا و گامای نانوذرات  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  را بر دو ریزجلبک *Isochrysis* و *Nannochloropsis oculata* بررسی کردند. در این مطالعات، هر دو نوع نانوذره برای دو گونه جلبکی یاد شده سمی گزارش شد، اما نانوذره نوع آلفا نسبت به نوع گاما سمیت کمتری داشت (Demir et al., 2015). لازم به ذکر است که سمیت نانوذره  $\text{CuO}$  بر رشد و تنش اکسیداتیو ریزجلبک *Nannochloropsis oculata* نیز مطالعه شده است (Fazelian et al., 2019). همچنین Fazelian و همکاران (۲۰۲۰) تاثیر سه نانوذره اکسید فلزی روی، مس و آهن را بر رشد و شاخص‌های بیودیزل ریزجلبک *N. oculata* مطالعه کردند، اما تاثیر این نانوذرات بر تنش اکسیداتیو ریزجلبک مورد نظر بررسی نشد. ریزجلبک *N. oculata* به دلیل داشتن مقدار زیاد اسیدهای چرب بویژه ایکوز اپنتانوئیک اسید (EPA: Eicosapentaenoic Acid) به عنوان ماده غذایی برای روتیفر و ایجاد شرایط مطلوب محیطی در وان‌های پرورش لارو، در کارگاه‌های تکثیر ماهیان مورد استفاده قرار می‌گیرد. این گونه همچنین به عنوان منبعی برای تامین

استفاده شد. طبق این روش ۰/۱ گرم رسوب جلبکی در ۱ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۵ درصد حل شد و در دستگاه سونیکاتور به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و عصاره به دست آمده به مدت ۱۵ دقیقه در ۹۰۰ rpm سانتریفیوژ (Centurion, K220 Scientific, انگلستان) شد. حجم محلول روشن‌آور یادداشت و هم حجم آن، محلول تیوباربتوریک اسید ۰/۵ درصد (در تری‌کلرواستیک اسید ۲۰ درصد) به آن اضافه شد. مخلوط برای ۳۰ دقیقه در بن ماری ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد و بلافاصله چند دقیقه در ظرف یخ قرار گرفت. سپس دوباره به مدت ۵ دقیقه با ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد تا محلول شفاف به دست آید. جذب روشن‌آور در ۴۵۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. ماده مورد نظر برای جذب در این طول موج، کمپلکس قرمز رنگ است. جذب بقیه رنگی‌های غیراختصاصی در ۶۰۰ نانومتر خوانده و از میزان جذب در ۴۵۵ کسر شد. برای محاسبه غلظت آلدئیدهای دیگر از ضریب خاموشی معادل ۱۵۵ در میلی‌مول در سانتی‌متر استفاده و در نهایت مقدار آلدئیدهای دیگر که محصول پراکسیداسیون لیپیدها است برحسب نانومول بر گرم وزن تر گزارش شد.

در دستگاه سونیکاتور (WUC-A03H، WiseClean، کره جنوبی) قرار داده شد و به منظور همگن کردن، نمونه‌ها ورتکس شدند (Fazelian et al., 2020). غلظت‌های مختلف نانوذرات  $\text{CuO}$  و  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  (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 قرار داده شدند.

### تراکم سلولی

تعداد سلول‌ها با کمک لام نئوبار و میکروسکوپ نوری شمارش و تراکم سلولی (D) با استفاده از رابطه ۱ تعیین شد (Fazelian et al., 2019).

رابطه ۱:

$$D(\text{mm}^{-3}) = N \times 10^4$$

N: میانگین تعداد سلول‌های شمارش شده.

### اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون لیپیدها

به منظور سنجش غلظت آلدئیدهای دیگر، به عنوان شاخص واکنش پراکسیداسیون لیپیدها، از روش Heath و Packer (۱۹۶۸)

A: جذب؛ ε: ضریب خاموشی (در میلی مول در سانتی متر)؛ b: عرض کوت (سانتی متر)؛ c: غلظت پراکسید هیدروژن (میلی مول).

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) مطابق با روش Nakano و Asada (۱۹۸۱) مورد سنجش قرار گرفت. در این روش، نمونه حاوی ۹۸۰ میکرولیتر بافر فسفات (حاوی EDTA، آسکوربات و پراکسید هیدروژن) و ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. سرعت واکنش آنزیمی به صورت تغییرات جذب در زمان (جذب در دقیقه) در طول موج ۲۹۰ نانومتر برای ۱ دقیقه ثبت شد. در نهایت میزان فعالیت آنزیم با ضریب خاموشی ۲/۸ در میلی مول در سانتی متر بر حسب واحد آنزیمی در ۱ گرم بافت تازه محاسبه شد.

#### تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل های آماری در این مطالعه با سه تکرار صورت گرفت و داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۶ با آزمون تحلیل واریانس دوطرفه قرار گرفتند و اختلاف میانگین ها با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد مقایسه شدند.

#### اندازه گیری فعالیت آنزیم های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از محاسبه کاهش جذب پراکسید هیدروژن در ۲۴۰ نانومتر و با روش Dehindsa و همکاران (۱۹۸۱) انجام شد. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار (pH ۷) و پراکسید هیدروژن ۱۵ میلی مولار بود. با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به مخلوط یاد شده، واکنش شروع شد. شاهد شامل مخلوط واکنش اما فاقد عصاره آنزیمی بود. تغییرات جذب (یعنی تفاضل جذب در زمان شروع واکنش از جذب در زمان یک دقیقه)، پس از شروع واکنش محاسبه شد. میزان پراکسید هیدروژن موجود در مخلوط واکنش پس از ۱ دقیقه با استفاده از ضریب خاموشی ۰/۲۸ در میلی مول در سانتی متر و رابطه ۲ محاسبه شد که نشان دهنده میزان فعالیت آنزیم کاتالاز است (Dehindsa et al., 1981).

رابطه ۲:

$$A = \epsilon bc$$

## نتایج

مشخصات نانوذرات  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  و  $\text{CuO}$ 

مشخصات مربوط به نانوذرات  $\text{CuO}$  و  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$  در جدول ۱ خلاصه شده است. تصاویر میکروسکوپ الکترونی TEM دو نانوذره مورد مطالعه را می‌توان در شکل ۱ مشاهده کرد.

رشد ریزجلبک *Nannochloropsis oculata*

برای بررسی رشد ریزجلبک *N. oculata* در پاسخ به نانوذرات  $\text{CuO}$  و  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ، تعداد سلول‌های ریزجلبکی با استفاده از لام نئوبار شمارش شدند. نتایج بررسی داده‌ها نشان داد که تعداد

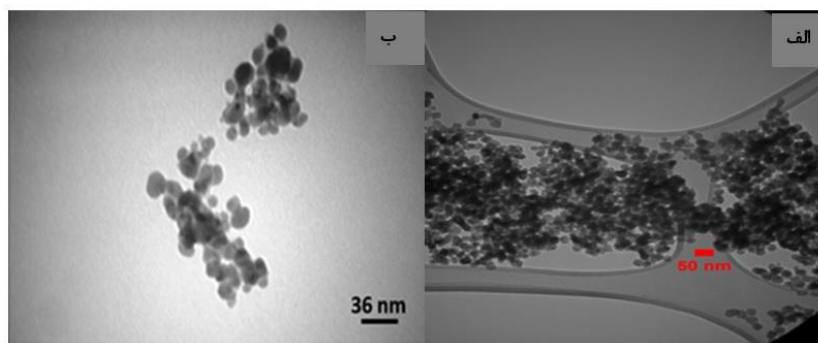
سلول‌های ریزجلبک *N. oculata* در پاسخ به دو نانوذره مورد مطالعه کاهش یافت. طبق شکل ۲، تاثیر نانوذره  $\text{CuO}$  بر تراکم سلولی این ریزجلبک شدیدتر از نانوذره  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  بود.

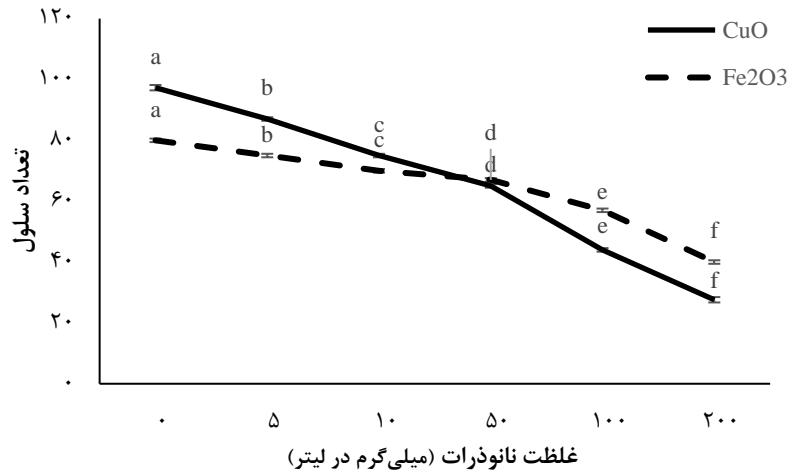
مقدار آلدئیدهای دیگر ریزجلبک *Nannochloropsis oculata*

غلظت‌های ۱۰-۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذره  $\text{CuO}$  و غلظت‌های ۵۰-۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذره  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  باعث افزایش معنی‌دار مقدار آلدئیدها شدند (شکل ۳).

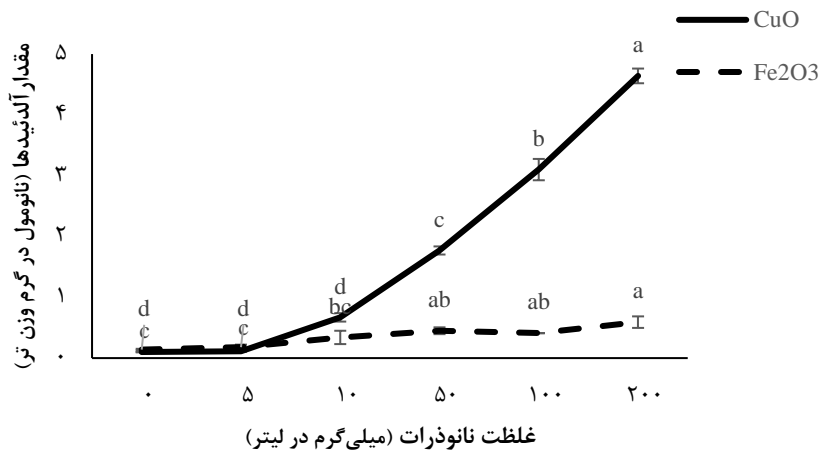
جدول ۱: مشخصات نانوذرات اکسید مس و اکسید آهن

چگالی ( $\text{g/cm}^3$ )	رنگ	ناحیه سطحی ویژه ( $\text{m}^2/\text{g}$ )	اندازه (nm)	درجه خلوص (%)	نانوذرات
۶/۴	سیاه	۲۰	۱۰-۴۰	۹۹	اکسید مس
۴/۸-۵/۱	سیاه	۴۰-۶۰	۲۰-۴۰	۹۸	اکسید آهن (فرم آلفا)

شکل ۱: تصویر میکروسکوپ الکترونی TEM. الف) نانوذرات  $\text{CuO}$ ؛ ب) نانوذرات  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ .



شکل ۲: تاثیر نانوذرات CuO و Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> بر تعداد سلول‌های ریز جلبک *Nannochloropsis oculata* (میانگین ± خطای استاندارد). حروف متفاوت روی نمودار نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف هر یک از نانوذرات است ( $P < 0.05$ ).

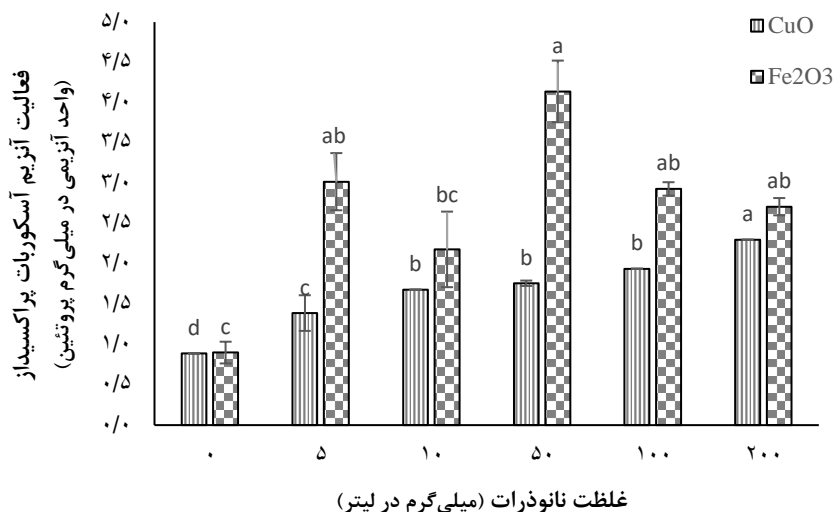


شکل ۳: تاثیر نانوذرات CuO و Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> بر مقدار آلدئیدهای ریز جلبک *Nannochloropsis oculata* (میانگین ± خطای استاندارد). حروف متفاوت روی نمودار نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف هر یک از نانوذرات است ( $P < 0.05$ ).

در غلظت ۵ میلی گرم در لیتر نانوذره CuO و غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی گرم در لیتر نانوذره Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> تغییر معنی‌داری در مقدار آلدئیدها مشاهده نشد. نتایج موجود در شکل ۳ نشان داد که افزایش مقدار آلدئیدها در پاسخ به نانوذره CuO بسیار شدیدتر از نانوذره Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> بود.

میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز ریزجلبک *Nannochloropsis oculata* غلظت‌های ۵-۲۰۰ میلی گرم در لیتر نانوذره CuO باعث افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم APX در مقایسه با شاهد شد. غلظت ۲۰۰

میلی گرم در لیتر نانوذره CuO فعالیت این آنزیم را حدود ۲/۵۸ برابر نسبت به شاهد افزایش داد (شکل ۴). تاثیر نانوذره Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> بر فعالیت آنزیم APX مانند نانوذرات CuO بود و غلظت‌های ۵-۲۰۰ میلی گرم در لیتر این نانوذره باعث افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم APX شد. غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر نانوذره Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> تنها غلظتی بود که تغییر معنی‌داری در فعالیت این آنزیم ایجاد نکرد و غلظت ۲۰۰ میلی گرم در لیتر این نانوذره فعالیت آنزیم را به میزان ۲/۰۴ برابر نسبت به شاهد افزایش داد (شکل ۴).



شکل ۴: تاثیر نانوذرات CuO و Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز ریزجلبک *Nannochloropsis oculata* (میانگین ± خطای استاندارد). حروف متفاوت روی ستون‌ها نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف هر یک از نانوذرات است ( $P < 0.05$ ).



نانوذره فعالیت آنزیم CAT را حدود ۱۷ درصد نسبت به شاهد کاهش داد. همچنین غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر تاثیر خاصی بر فعالیت این آنزیم نداشت (شکل ۵).

#### بحث

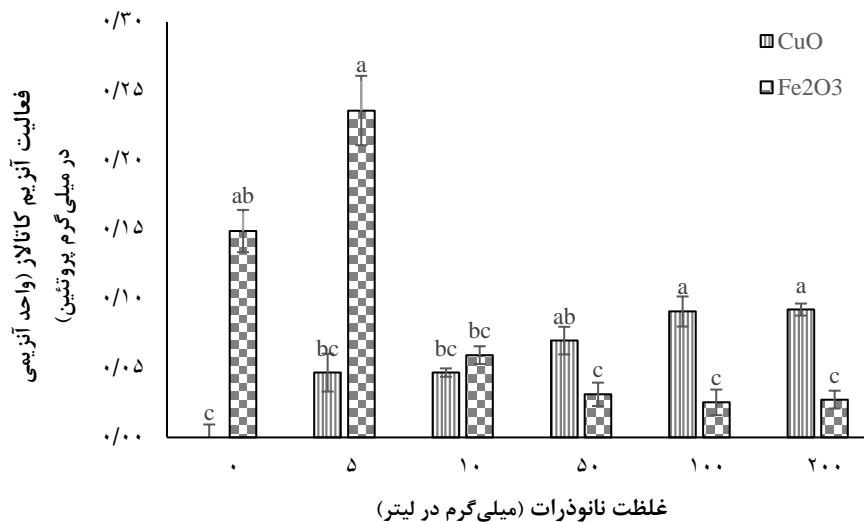
نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان داد که غلظت‌های بیش از ۵ میلی‌گرم در لیتر نانوذره CuO و غلظت‌های بیش از ۱۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذره Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>، رشد ریزجلبک *N. oculata* را به طور معنی‌داری کاهش داد.

میزان فعالیت آنزیم کاتالاز ریزجلبک

#### *Nannochloropsis oculata*

فعالیت آنزیم CAT مانند آنزیم AXP

ریزجلبک *N. oculata* در پاسخ به نانوذره CuO افزایش یافت. غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذره CuO فعالیت آنزیم CAT را حدود ۲/۴۸ برابر افزایش داد، اما در غلظت‌های پایین (۱۰-۵ میلی‌گرم در لیتر) تغییر چشمگیری در فعالیت این آنزیم ایجاد نشد (شکل ۵). نانوذره Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> برخلاف نانوذره CuO باعث کاهش فعالیت آنزیم CAT شد و بالاترین غلظت این



شکل ۵: تاثیر نانوذرات CuO و Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> بر فعالیت آنزیم کاتالاز ریزجلبک *Nannochloropsis oculata* (میانگین ± خطای استاندارد). حروف متفاوت روی ستون‌ها نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف هر یک از نانوذرات است ( $P < 0.05$ ).

هستند (Lei et al., 2016; Fazelian et al., 2020). حلالیت نانوذرات و آزادسازی یون فلزی نیز یکی دیگر از عوامل موثر بر سمیت نانوذرات است، چون با افزایش حلالیت نانوذرات، میزان آزادسازی یون فلزی افزایش می‌یابد و منجر به افزایش میزان سمیت نانوذرات می‌شود (Suman et al., 2015).

نانوذرات می‌توانند با افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و القای تنش اکسیداتیو باعث ایجاد سمیت در ریزجلبک‌ها شوند (Fazelian et al., 2019). گونه‌های فعال اکسیژن باعث اختلال در عملکرد سلول و افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشا و تغییر در نفوذپذیری غشا می‌شوند (Dawes, 2000). بنابراین اندازه‌گیری آلدئیدهای تولید شده در طی پراکسیداسیون لیپیدها، شاخص خوبی برای اندازه‌گیری میزان آسیب اکسیداتیو وارد شده به غشا است (Ates et al., 2013). در مطالعه حاضر مقدار آلدئیدهای دیگر ریزجلبک *N. oculata* در پاسخ به هر دو نانوذره CuO و Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> افزایش یافت. اما تاثیر نانوذره CuO بر میزان آلدئیدهای این ریزجلبک شدیدتر از نانوذره Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> بود. Melegari و همکاران (۲۰۱۳) سمیت و القای تنش اکسیداتیو ناشی از نانوذرات CuO را در ریزجلبک

بررسی تاثیر نانوذرات CuO بر رشد ریزجلبک *Chlamydomonas P. subcapitata reinhardtii* نیز نشان دهنده کاهش رشد این ریزجلبک‌ها بود (Aruoja et al., 2009; Melegari et al., 2013). آزمایش‌های انجام شده بر نانوذره Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> در ریزجلبک *Scenedesmus obliquus* نشان داده است که غلظت‌های ۲۰-۰ میلی‌گرم در لیتر این نانوذره باعث تحریک رشد می‌شود. در حالی که مهار رشد ریزجلبک در پاسخ به غلظت‌های بیشتر از ۴۰ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شده است (He et al., 2017).

کاهش رشد در پاسخ به نانوذرات می‌تواند به دلیل تغییر در مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی و تغییر در میزان فتوسنتز باشد. تنش اکسیداتیو و اکسیداسیون ترکیبات مهم زیستی از جمله پروتئین‌ها، پراکسیداسیون لیپیدها و یا آسیب به غشاهای زیستی از جمله غشاهای تیلاکوئیدی از دیگر دلایلی است که در کاهش رشد در پاسخ به نانوذرات در گزارش‌های مختلف ذکر شده است (Barhoumi and Dewez, 2013; Melegari et al., 2013; Suman et al., 2015; Fazelian et al., 2019). نوع، اندازه و غلظت نانوذره، نوع محیط کشت و نوع ریزجلبک از عوامل موثر بر سمیت نانوذرات

CuO باعث افزایش فعالیت آنزیم CAT شدند درحالی که نانوذره  $Fe_2O_3$  فعالیت این آنزیم را در ریزجلبک *N. oculata* کاهش داد. He و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که نانوذره  $Fe_2O_3$  باعث افزایش فعالیت آنزیم CAT در ریزجلبک *S. obliquus* می‌شود که برخلاف نتایج مطالعه حاضر بود. Sharma و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند که نانوذره ZnO باعث کاهش میزان فعالیت آنزیم CAT می‌شود که مشابه نتایج مربوط به نانوذره  $Fe_2O_3$  در مطالعه حاضر بود. کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز نشان می‌دهد که این آنزیم نقش موثری در حذف  $H_2O_2$  در *N. oculata* در پاسخ به نانوذره  $Fe_2O_3$  ایفا نمی‌کند.

در مطالعه حاضر فعالیت آنزیم APX ریزجلبک *N. oculata* در پاسخ به دو نانوذره CuO و  $Fe_2O_3$  افزایش یافت. افزایش فعالیت آنزیم CAT و APX در ریزجلبک *Chlorella sp.* در پاسخ به نانوذره ZnO و در دو ریزجلبک سبز *Chlorella sorokiniana* و *Scenedesmus acuminatus* در پاسخ به تنش اکسیداتیو ناشی از مس گزارش شده است (Chen et al., 2012; Hamed et al., 2017). نتایج بالا مشابه نتایج مربوط به نانوذره CuO بود که باعث افزایش فعالیت هر دو آنزیم

*C. reinhardtii* بررسی کردند. مطالعات دیگر نشان داده‌اند که نانوذرات اکسید فلزی در محیط‌های آبی، یون‌های فلزی آزاد می‌کنند و این یون‌ها موجب القای تولید رادیکال‌های آزاد می‌شوند. رادیکال‌های آزاد تولید شده موجب اکسیداسیون لیپیدهای غشایی، پروتئین‌ها و همچنین تخریب DNA و RNA می‌شوند. علاوه بر این نانوذرات می‌توانند پس از ورود به سیتوپلاسم باعث اختلال در عملکرد اندام‌های سلولی و سیستم اسکلت سلولی شوند (Barhoumi and Dewez, 2013).

برای مقابله با تنش اکسیداتیو تغییر ظرفیت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی ضروری است. آنزیم‌هایی مانند سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POD)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و گلوکاتایون ردوکتاز (GR) از آنزیم‌های مهم سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی در گیاهان هستند. اگر چه SOD در خط مقدم دفاع علیه گونه‌های فعال اکسیژن عمل می‌کند، اما محصول عمل آن یعنی  $H_2O_2$  همچنان برای سلول سمی است و باید از سلول حذف شود. آنزیم‌های CAT و APX در حذف  $H_2O_2$  در سلول نقش دارند (Sarvajeet and Narendera, 2010). در این مطالعه نانوذرات

رادیکال‌های آزاد و تنش اکسیداتیو ناشی از تجمع گونه‌های فعال اکسیژن در ریزجلبک *N. oculata* کافی نبوده، میزان تولید گونه های فعال اکسیژن از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی جلبک بیشتر بوده است. بنابراین نانوذرات  $\text{CuO}$  و  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  باعث القای تنش اکسیداتیو (پراکسیداسیون لیپید)، آسیب به غشا و کاهش رشد در *N. oculata* شدند. همچنین سمیت نانوذرات  $\text{CuO}$  در ریزجلبک *N. oculata* بسیار شدیدتر از نانوذرات  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  بود که احتمالاً به دلیل افزایش شدیدتر میزان پراکسیداسیون لیپیدها و آسیب به غشای ریزجلبک مورد مطالعه است.

*N. oculata* در APX و CAT افزایش فعالیت آنزیم APX و CAT یک سیستم حفاظتی در برابر اکسیداسیون ناشی از تنش اکسیداتیو در ریزجلبک *N. oculata* فراهم می‌کند. با وجود افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان به نظر می‌رسد که این افزایش برای کاهش گونه‌های فعال اکسیژن کافی نبوده، میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی جلبک بیشتر است، از این رو در پاسخ به نانوذرات، آسیب به غشا و پراکسیداسیون لیپیدها رخ داده است. در مجموع، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان APX و CAT احتمالاً برای کاهش

## منابع

- فرجی ق. و فدوی م. و. ۱۳۹۲. کاربردهای نانوذرات مغناطیسی در زمینه علوم و صنایع غذایی. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، ۲: ۲۳۹-۲۵۲.
- Aruoja V., Dubourguier H.C., Kasemets K. and Kahru A. 2009.** Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO<sub>2</sub> to microalgae *Pseudokircehneriella subcapitata*. Science of the Total Environment, 407: 1461–1468.
- Ates M. Daniels J. Arslan Z. Farah I.O. and Rivera H.F. 2013.** Comparative evaluation of impact of Zn and ZnO nanoparticles on brine shrimp (*Artemia salina*) larvae: Effects of particle size and solubility on toxicity. Environmental Science Processes and Impacts, 15(1): 225–33.
- 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.
- Barhoumi L. and Dewez D. 2013.** Toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles on green alga *Chlorella vulgaris*. Biomed Research International, 2013: 1–11 (47974).
- 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.
- Dawes I.W. 2000.** Response of eukaryotic cells to oxidative stress. Agriculture Chemistry and Biotechnology, 43: 211–217.
- De Jong W.H., Roszek B. and Geertsma R.E. 2005.** Nanotechnology in medical applications: Possible risks for human health. Rivm Rapport, Netherlands. 46P.
- Dehindsa R.S., Plumb-Dehindsa P. and Torne T.A. 1981.** Leaf senescence correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. Journal of Experimental Botany, 32: 93–101.
- Demir V., Ates M., Arslan Z., Camas M., Celik F., Bogatu C. and Can S.S. 2015.** Influence of alpha and gamma-iron oxide nanoparticles on marine microalgae species. Bulletin of

- Environmental Contamination and Toxicology, 95(6): 752–757.
- 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.
- Fulks W. and Main K.L. 1991.** Rotifer and microalgae culture systems. Proceedings of a U.S.-Asia Workshop. USA. 364P.
- Hameda S.M., Selimb S., Klockd G. and AbdElgawade H. 2017.** Sensitivity of two green microalgae to copper stress: Growth, oxidative and antioxidants analysis. Ecotoxicology and Environmental Safety, 144: 19–25.
- He M., Yan Y., Pei F., Wu M., Gebreluel T., Zou S. and Wang C. 2017.** Improvement on lipid production by *Scenedesmus obliquus* triggered by low dose exposure to nanoparticles. Scientific Reports, 7: 15526–15538.
- Heath R.L. and Packer L. 1968.** Photoperoxidation in isolated chloroplast, kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics, 12: 189–198.
- 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.
- Lei C., Zhang L., Yang K., Zhu L. and Lin D. 2016.** Toxicity of iron-based nanoparticles to green algae: Effects of particle size, crystal phase, oxidation state and environmental aging. Environmental Pollution, 218: 505–512.
- Melegari S.P., 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.
- Nakano Y. and Asada K. 1981.** Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant and Cell Physiology, 22: 867–880.
- Sarvajeet S.G. and Narendera T. 2010.** Reactive oxygen species and antioxidant machinery in a biotic stress tolerance in crop plants. Annual Review. Plant Physiology and Biochemistry, 3: 1–22.

- Sharma V., Shukla R.K., Saxena N., Parmar D., Das M. and Dhawan A. 2009.** DNA damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicology Letters*, 185: 211–218.
- 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.
- Xiao T., Kovoich M., Liang M., Madler L., Gilbert B., Shi H., Yeh J.I., Zink J.I. and Nei A.E. 2008.** Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. *ACS Nano*, 2: 2121–2134.



Research Paper

## Comparison of the effect of copper oxide and iron oxide nanoparticles on oxidative stress in *Nannochloropsis oculata*

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

Received: October 2021

Accepted: June 2022

### Abstract

In this study, the effects of various concentrations (5, 10, 50, 100 and 200mg/L) of copper oxide (CuO) and iron oxide (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) nanoparticles (NPs) on growth, lipid peroxidation and activity of catalase and ascorbate peroxidase enzymes were investigated. The results showed that concentrations of more than 5mg/L of CuO-NPs and more than 10mg/L of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NPs reduced the growth of *Nannochloropsis oculata*. The content of aldehydes in response to some of concentrations of both metal oxide nanoparticles significantly increased compared to control ( $P < 0.05$ ). However, the increase of aldehydes in response to CuO-NPs was higher than Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NPs. The activity of ascorbate peroxidase increased significantly in response to both nanoparticles, but the effect of CuO-NPs on the activity of this enzyme was higher than that of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NPs. Catalase activity showed a significant increase in response to CuO-NPs, but Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NPs decreased the activity of this enzyme. The results showed that the toxicity of CuO-NPs in *N. oculata* was much more severe than Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NPs.

**Key words:** *Nannochloropsis*, *CuO Nanoparticles*, *Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Nanoparticles*, *Cell Density*, *Oxidative Stress*.

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 Biology, Faculty of Science, University of Qom, Qom, Iran.

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