

## The Toxicity Effect of Copper Oxide Nanoparticle on Algae *Scenedesmus Dimorphus*

Mansooreh Kazemi

Department of environment, natural Resources faculty, Islamic Azad university, Lahijan,

Fatemeh Shariati \*

Department of environment, Natural resources faculty, Islamic Azad university, Lahijan branch, lahijan, Iran

### Abstract

**Introduction:** Due to very small dimensions, nano-materials can have different properties compared to their bulk form. The nanoparticle size dominates some of the atom-related properties of nanoparticles. Such behavior changes may adversely affect biological organism, especially phytoplankton as the basis of food chain cycle. For this reason, in current research, the toxicity effect of CuO nanoparticles (CuO NP) on *Scenedesmus dimorphus* has been evaluated.

**Materials and Methods:** The toxic effect of CuO NP was investigated at 5 different concentrations of 2.5, 6.5, 17.4, 45.7, 120 mg/L against control in three replicates for each treatment and control. All samples were treated at constant temperature of 24 °C and 12-hour period of light and dark for 72 hours. Algae count was done at time intervals of 24, 48 and 72h. Chlorophyll assay was done according to ASTM standard.

**Results:** EC<sub>10</sub>, EC<sub>50</sub>, and EC<sub>90</sub> amounts for 72 hours were 0.18, 28.84 and 4477.35 mg/L, respectively. Over time, chlorophyll concentration was decreased in all treatments except for 57.68 mg/L. Carotenoid showed significant decrease between all treatments and the control and also among different treatments (p<0.05) and in 72h three treatments had different carotenoids (p<0.05).

**Discussion and Conclusion:** These results showed that CuO NP had significant toxic effect on *Scenedesmus dimorphus* and resulted in reduction, growth rate, and increase in doubling time. Also, the percent inhibition was increased with increasing CuO NP concentration. The chlorophyll and carotenoid levels decreased in *Scenedesmus dimorphus* by increasing CuO NP concentration.

**Keywords:** Algae *Scenedesmus dimorphus*, Toxicity, Chlorophyll, Growth Inhibition, CuO Nanoparticle.

---

\* Corresponding author

**Received:** January 1, 2019 / **Accepted:** May 21, 2019

فصلنامه علمی - پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها  
سال هشتم، شماره ۳۰، تابستان ۱۳۹۸، صفحه ۱۳-۲۵  
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۸/۰۹ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۴/۲۵

## سمیت نانوذره اکسید مس روی جلبک *Scenedesmus dimorphus*

**منصوره کاظمی:** گروه محیط‌زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، ایران، masi.kazemi61@gmail.com  
**فاطمه شریعتی\*:** استادیار گروه محیط‌زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، ایران، shariati@liau.ac.ir

### چکیده

**مقدمه:** نانومواد به علت اندازه بسیار کوچک، ویژگی‌های متمایزی نسبت به همان ماده در حالت توده‌ای دارند. اندازه نانویی باعث غالبیت برخی ویژگی‌های مربوط به اتم در نانوذرات می‌شود. این ویژگی‌ها ممکن است بر فیتوپلانکتون‌ها در پایه زنجیره غذایی آثار منفی داشته باشند. در پژوهش حاضر، اثر سمیت نانوذره اکسید مس (CuO-NP) روی *Scenedesmus dimorphus* به روش OECD201 بررسی شد.

**مواد و روش‌ها:** سمیت نانوذرات مس در پنج غلظت متفاوت ۲/۵، ۶/۵، ۱۷/۴، ۴۵/۷ و ۱۲۰ میلی‌گرم بر لیتر CuO-NP با سه تکرار در برابر شاهد بررسی شد. نمونه‌ها در دمای ثابت و شرایط کنترل‌شده روشنایی و تاریکی نگه داشته شدند و شمارش جلبک‌ها در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انجام شد. سنجش کلروفیل و کاروتنوئید به روش ASTM انجام شد.

**نتایج:** در پژوهش حاضر، EC<sub>10</sub>، EC<sub>50</sub> و EC<sub>90</sub> برای ۷۲ ساعت به ترتیب ۰/۱۸، ۲۸/۸۴ و ۴۶۷۷/۳۵ میلی‌گرم بر لیتر حاصل شد. غلظت کلروفیل در همه تیمارها به جز ۵۷/۶۸ میلی‌گرم بر لیتر با گذشت زمان افزایش یافت. بررسی کاروتنوئید اختلاف معنادار بین شاهد و تیمارها و همچنین تیمارها با یکدیگر را با افزایش زمان مواجهه نشان داد و در زمان ۷۲ ساعت، هر سه تیمار با شاهد اختلاف معنادار داشتند (p<0.05).

**بحث و نتیجه‌گیری:** نتایج نشان دادند نانوذرات مس اثر سمیت درخور توجهی بر جلبک دارند و باعث کاهش نرخ رشد ویژه و افزایش زمان دوبرابر شدن می‌شود. درصد بازدارندگی با افزایش غلظت CuO-NP افزایش یافت. همچنین افزایش غلظت نانوذره باعث کاهش میزان کلروفیل a و کاروتنوئید در جلبک *S. dimorphus* شد.

**واژه‌های کلیدی:** جلبک *Scenedesmus dimorphus*، سمیت، کلروفیل، ممانعت از رشد، نانو اکسید مس

\* نویسنده مسئول مکاتبات

## مقدمه

امروزه با پدیدار شدن نانو فناوری و استفاده روزافزون از آن در جنبه‌های مختلف علوم و فناوری، محصولات بیشماری به وجود آمده‌اند که در ترکیب و ساخت آنها از نانو مواد استفاده شده است. نانوذرات به علت اندازه بسیار کوچکی (۱ تا ۱۰۰ نانومتر) که دارند، ویژگی‌ها و رفتارهای متفاوتی نسبت به ذرات درشت (توده) از خود نشان می‌دهند؛ از این رو، کاربرد نانوذرات در زمینه‌های مختلف در حال گسترش است. نانوذره اکسیدمس<sup>۱</sup> (CuO-NP) به اشکال مختلف وجود دارد و کاربردهای متنوعی نظیر استفاده در ساخت حسگرهای گاز، باتری‌ها، سلول‌های فتوولتائیک<sup>۲</sup>، مایعات انتقال حرارت و به عنوان کاتالیست دارد؛ پساب هریک از فعالیت‌های یاد شده ممکن است حاوی نانوذرات اکسیدمس باشد و سبب ورود آنها به محیط زیست آبی شود (۱-۵). پژوهش‌ها نشان می‌دهند نانوذرات رفتارهای زیستی متفاوتی ایجاد می‌کنند؛ از جمله اینکه عامل اندازه ذرات (در حد نانومتر) توانایی عبور و امکان پشت سر گذاشتن سد های زیستی را به ذره می‌دهد که دستیابی به آن برای ذرات درشت دانه و توده‌ای ممکن نیست (۶ و ۷). اندازه ذره ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی نانو مواد را تغییر می‌دهد و باعث افزایش جذب این مواد و تعامل بیشتر آنها با بافت‌های موجودات زنده می‌شود؛ جذب نانوذرات در موجودات آبی اهمیت فراوانی دارد. در سطح سلولی، پروکاریوت‌هایی<sup>۳</sup> مانند باکتری‌ها و جلبک‌ها ممکن است به علت نداشتن سازوکارهای جلوگیری کننده از انتقال توده ذرات کلونیدی و سوپر کلونیدی از طریق دیواره سلولی در برابر جذب بسیاری از انواع نانوذرات آسیب پذیر شوند (۸-۱۰). اگرچه سازوکار اصلی عملکرد نانوذرات هنوز به طور کامل شناخته نشده است، مطالعه‌های گوناگون در

محیط‌های مصنوعی<sup>۴</sup> و طبیعی<sup>۵</sup> نشان می‌دهند آنها قادرند گونه‌های فعال اکسیژن<sup>۶</sup> (ROS) را تولید کنند و بنابراین می‌توانند در غلظت کلسیم درون سلولی، فعال کردن عوامل رونویسی و ایجاد تغییر در سایتوکین‌ها<sup>۷</sup> نقش داشته باشند. ROS به روش‌های مختلفی مانند آسیب رساندن به DNA، تداخل با مسیرهای علامت‌دهی<sup>۸</sup> سلولی، تغییر در روند رونویسی ژن‌ها و ... به سلول‌ها آسیب می‌زنند (۱۱ و ۱۲). مرگ سلولی ناشی از ROS در نتیجه واکنش‌های اکسیداتیوی نظیر پراکسیداسیون اسیدهای چرب غشا، اکسیداسیون پروتئین‌ها، ممانعت از فعالیت آنزیم‌ها و خسارت به DNA و RNA در اثر تولید رادیکال‌های آزاد رخ می‌دهد (۱۱، ۱۳-۱۶). در مطالعه‌ای، نقش گونه‌های ROS در سمیت مس برای دو گونه جلبک *Chlorella* و *Pseudokirchneriella subcapitata vulgaris* بررسی و مشخص شد با افزایش زمان مواجهه، آزادسازی ROS در غشای پلاسمایی اتفاق می‌افتد (۱۷). در اکوسیستم‌های آبی، جلبک‌ها و فیتوپلانکتون‌ها بخش مهمی از زنجیره غذایی موجودات آبی و ماهی‌ها را تشکیل می‌دهند (۱۸ و ۱۹). پژوهش درباره سمیت نانوذرات بر جلبک‌های مختلف طی چند سال اخیر آغاز شده و در حال گسترش است. بکارو<sup>۹</sup> و همکاران در سال ۲۰۱۵، سمیت ذرات نانوقره تثبیت شده با پلی‌وینیل‌الکل<sup>۱۰</sup> را روی جلبک‌ها و سخت پوستان میکروسکوپی (شامل سه گونه *Artemia salina*، *Daphnia* و *Pseudokirchneriella subcapitata similis*) بررسی و تأیید کردند (۲۰). در مطالعه‌ای، سمیت حاد نانوذرات اکسیدمس (CuO) و اکسیدروی (ZnO) روی دو گونه سخت پوست و یک گونه پروتوزوآ<sup>۱۱</sup> بررسی شد؛ EC<sub>50</sub><sup>۱۱</sup> نانو اکسیدمس برای دو سخت پوست در محدوده ۹۰ تا ۲۲۴ میلی گرم بر لیتر و

تک سلولی *Scenedesmus dimorphus* منتشر نشده است؛ از این رو در پژوهش حاضر، آثار سمیت نانوذره اکسیدمس بر جلبک *S. dimorphus* بررسی شد.

### مواد و روش‌ها

جلبک *S. dimorphus* از آزمایشگاه کاوشگران طبیعت پاک<sup>۱۹</sup> تهیه شد. نانوذرات اکسیدمس از شرکت پیشگامان نانومواد ایران<sup>۲۰</sup> (نانو ثانی) تهیه شد که محصولات آن تولید کشور آمریکاست (شکل ۱).

#### آماده‌سازی محیط کشت و کشت جلبک: در مطالعه

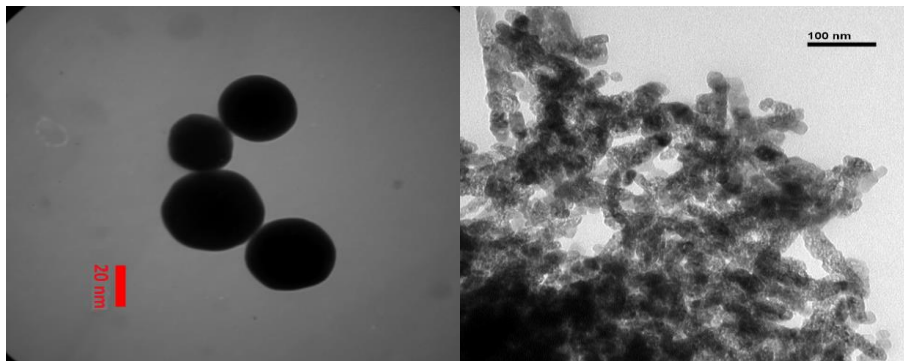
حاضر، محیط کشت BBM<sup>۲۱</sup> برای رشد جلبک استفاده شد. به منظور اطمینان یافتن از خلوص جلبک، ابتدا کشت در محیط نوترینت آگار<sup>۲۲</sup> انجام شد و پتری‌دیش‌ها به مدت ۱۰ تا ۱۲ روز در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد و در معرض نور فلورسنت نگهداری شدند؛ سپس تعدادی از کلنی‌های *Scenedesmus* در لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت مایع کشت و مدت ۷ روز در آنها نگهداری شدند. به منظور اطمینان یافتن از خلوص جلبک، نمونه‌ها طی پنج مرحله سانتریفیوژ و شستشو شدند و سپس به محیط کشت یک لیتری انتقال یافتند و به مدت ۷ روز در دمای محیط و در معرض نور فلورسنت قرار گرفتند. طی این مدت، میزان رشد نمونه‌ها هر روز از طریق شمارش سلولی تا زمان ورود به فاز نمایی رشد کنترل شد؛ به این ترتیب، حجم زیادی از سلول‌های *S. dimorphus* برای انجام مراحل بعدی آزمایش تهیه شد.

#### آماده‌سازی ذخیره<sup>۲۳</sup> نانوذرات: پس از سه مرحله

آزمون دامنه‌یابی، محدوده اصلی غلظت‌ها بر مبنای لگاریتمی شامل صفر (شاهد)، ۲/۵، ۶/۵، ۱۷/۴، ۴۵/۷ و ۱۲۰ میلی‌گرم بر لیتر انتخاب و بررسی‌ها با سه تکرار برای هر تیمار و شاهد انجام شدند.

حدود ۱۰ برابر کمتر از EC<sub>50</sub> برای حالت توده‌ای<sup>۱۳</sup> اکسیدمس بود (۲). در بررسی دیگری، آثار سمی نانوسوپانسیون‌های<sup>۱۴</sup> اکسیدمس بر سلول‌های جلبک ماکروفیت<sup>۱۵</sup> *Nitellopsis obtusa*، جلبک میکروفیت<sup>۱۶</sup> *Chlorella* sp.، میگوی *Thamnocephalus platyurus* و روتیفر<sup>۱۷</sup> *Brachionus calyciflorus* بررسی و تأیید شد (۲۱). در مطالعه‌ای، سمیت نانوذرات اکسیدهای آلومینیوم، تیتانیوم، سیلیسیم و روی بر جلبک *Chlorella* sp. بررسی شد و طبق نتایج، نانوذرات اکسیدروی سمیت چشمگیری داشتند و سه نانوذره دیگر سمیت درخور توجهی نداشتند (۲۲).

طی مطالعه‌ای، ماهی گورخری، دافنی<sup>۱۸</sup> و گونه‌های جلبک در معرض اشکال نانویی و نمک‌های محلول عناصر نقره، مس، آلومینیوم، نیکل و نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم قرار گرفتند؛ بر اساس نتایج، نانوقره و نانومس در هر سه موجود زنده سمیت داشتند و حساسیت گونه‌های مختلف در برابر نانوفلزات متفاوت بود (۲۳). در پژوهشی، بازدارندگی رشد و میزان رنگدانه فتوسنتزی در جلبک *Scenedesmus obliquus* پس از رویارویی با نانوسیلیکا بررسی شد و EC<sub>50</sub> برای ۷۲ ساعت ۳۸۸/۱ میلی‌گرم بر لیتر به دست آمد. مقدار کلروفیل در غلظت‌های میانی و زیاد (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) پس از ۹۶ ساعت به طور چشمگیری کاهش یافت، اما کاروتنوئید کم نشد (۲۴). اگرچه تاکنون پژوهش‌هایی درباره آثار غلظت‌های مختلف نانوذرات روی ممانعت از رشد، میزان فتوسنتز و ویژگی‌های ریختی و تغییر شکل جلبک‌ها در جهان انجام شده است (۲۵-۲۸)، در داخل ایران و خارج از آن گزارشی درباره تأثیر نانوذره اکسیدمس روی جلبک سبز



شکل ۱- عکس میکروسکوپ الکترونی عبوری<sup>۲۴</sup> (TEM) (سمت چپ)، میکروسکوپ الکترونی روبشی<sup>۲۵</sup> (SEM) (سمت راست) نانوذرات اکسیدمس تهیه شده توسط شرکت نانومواد ایران

و سپس برای تعیین مقادیر EC از معادله خطی رگرسیون<sup>۲۸</sup> استفاده شد (۳۰). به منظور بررسی وجود داشتن یا نداشتن اختلاف معنادار بین شاهد و تیمارهای غلظت در هر زمان مواجهه از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) و در ادامه از آزمون توکی استفاده شد؛ سطح معناداری ۹۵ درصد در نظر گرفته شد.

زمان دوبرابر شدن (G)، مدت زمان لازم برای دوبرابر شدن اندازه یا تعداد سلول‌هاست. زمان دوبرابر شدن ویژگی مناسبی برای رابطه رشد نمایی است (۳۱). مقدار NOEC و همچنین مقادیر  $\mu$  و G از رابطه‌های پیشنهادی محاسبه شد (۳۲).

$$\mu = \ln x_1 - \ln x_0 (t_1 - t_0)^{-1} \quad \text{رابطه (۲)}$$

$\mu$ : نرخ رشد ویژه،  $x_1$ : میانگین تعداد سلول‌ها در زمان  $t_1$ ،  $x_0$ : میانگین تعداد سلول‌ها در زمان  $t_0$

$$G = \ln 2 \mu^{-1} \quad \text{رابطه (۳)}$$

G: زمان دوبرابر شدن

$$I = \mu_c - \mu_t / \mu_c \times 100 \quad \text{رابطه (۴)}$$

I: درصد ممانعت از نرخ رشد ویژه،  $\mu_t$ : نرخ رشد در تیمار،  $\mu_c$ : میانگین نرخ رشد در شاهد

### قراردادن جلبک‌ها در معرض نانوذرات: مطابق

روش OECD، تعداد  $5 \times 10^4$  سلول جلبک به لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت استریل و نانوذره با حجم ثابت ۱۰ میلی‌لیتر و در سه تکرار تلقیح شد (۲۹). لوله‌های آزمایش به مدت ۷۲ ساعت داخل اتاقک رشد<sup>۲۶</sup> (مدل JG-300، شرکت ژال طب، ساخت ایران) و در شرایط ۱۲ ساعت نوردهی با لامپ فلورسنت سرد و شدت نور ۵۰۰۰ لوکس و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای  $24 \pm 1$  درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. نمونه‌ها هر ۱۲ ساعت بررسی شدند.

### بررسی ممانعت از رشد: پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت

از آغاز آزمایش، نمونه‌ها ابتدا با مخلوط کن هم زده شدند و سپس از محلول لوله‌های آزمایش با سمپلر نمونه برداری شد. نمونه با لام توما زیر میکروسکوپ نوری (صایران مدل 180MN) با بزرگنمایی  $40 \times$  در ۶ تکرار شمارش شد. تعداد سلول‌ها از رابطه زیر به دست آمد:

$$\text{تراکم سلولی در میلی‌لیتر} = \text{کل سلول‌های} \quad \text{رابطه (۱)}$$

$$\text{شمارش شده در مربع بزرگ} \times 10^4$$

محاسبه مقادیر  $EC_{10}$ ،  $EC_{50}$  و  $EC_{90}$  بر اساس روش پرویت<sup>۲۷</sup> انجام شد؛ به این ترتیب که ابتدا اعداد پرویت مربوط به غلظت‌های مدنظر از جدول آن استخراج شدند

$$C_a = 11.85 (A664) - 1.54 (A647) - 0.08 (A630) \quad \text{رابطه (۶)}$$

$$g/ml \mu C_{aa} = C_a \times \text{Vaceton} / V_{\text{water}} \times 1000 \quad \text{رابطه (۷)}$$

$$C_c = 10 (A470) \times \text{Vaceton} / V_{\text{water}} \times 1000 \mu g/ml \quad \text{رابطه (۸)}$$

$C_{aa}$ : غلظت کلروفیل،  $C_c$ : غلظت کاروتنوئید

$$\text{NOEC} = \text{EC}_{50} / 10 \quad \text{رابطه (۵)}$$

NOEC: غلظت بدون اثر قابل مشاهده یک شاخص

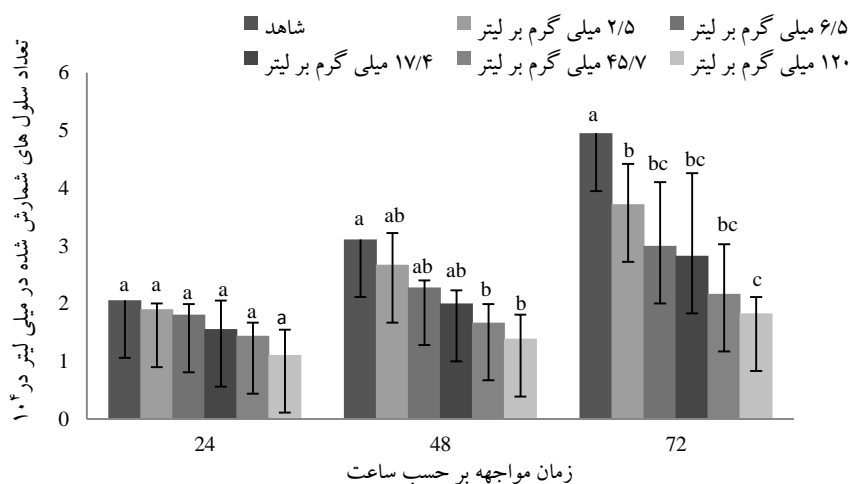
است که غلظتی از یک آلاینده را نشان می‌دهد که باتوجه به تأثیر مورد مطالعه به گونه مورد بررسی صدمه نمی‌زند.

#### اندازه‌گیری کلروفیل و کاروتنوئید: به منظور بررسی

اثر غلظت‌های مختلف نانو اکسیدمس بر میزان رنگدانه جلبک *Scenedesmus* به روش ASTM D3731- (2012) 87 (۳۳)، چهار تیمار با غلظت‌های صفر، ۱۲/۴۲، ۲۸/۸۴ و ۵۷/۶۸ میلی گرم بر لیتر که به ترتیب نصف، برابر و دو برابر  $\text{EC}_{50}$  بودند، در سه تکرار تهیه شدند و در شرایط کنترل شده نور و دما قرار گرفتند. نمونه برداری در فواصل زمانی منظم ۲۴ ساعته انجام شد. ابتدا نمونه‌ها به منظور جداسازی محیط کشت از محلول جلبکی سانتریفیوژ شدند و سپس محلول رویی جدا شد؛ سپس استون ۹۰ درصد به رسوب جلبکی باقیمانده اضافه و مقدار جذب نوری در طول موج‌های ۶۳۰، ۶۴۷ و ۶۶۴ نانومتر خوانده شد.

#### نتایج

**ممانعت از رشد:** همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، داده‌های آزمایش ممانعت از رشد نشان می‌دهند تعداد سلول‌ها در تمام تیمارها طی ۷۲ ساعت روند افزایشی داشته است؛ اما با افزایش غلظت نانوذره اکسیدمس، رشد جلبک در تیمارها نسبت به نمونه شاهد کاهش یافته است و هرچه غلظت نانوذره بیشتر شده، کاهش رشد نیز بیشتر اتفاق افتاده است و این اختلاف بین شاهد و تیمارها و بین غلظت‌های مختلف تیمارها در زمان مواجهه ۴۸ و ۷۲ ساعت معنادار بوده است ( $p < 0.05$ )؛ این نتیجه آثار منفی نانوذره اکسیدمس را بر رشد جلبک *Scenedesmus* نشان می‌دهد.



شکل ۲- میانگین تعداد سلول‌های جلبکی شمارش شده بر حسب زمان در غلظت‌های مختلف نانوذره اکسیدمس. اعداد میانگین ۱۸ تکرار ± انحراف معیار است. حرف‌های یکسان نبود اختلاف معنادار در سطح اطمینان ۹۵ درصد را با استفاده از آزمون توکی نشان می‌دهند.

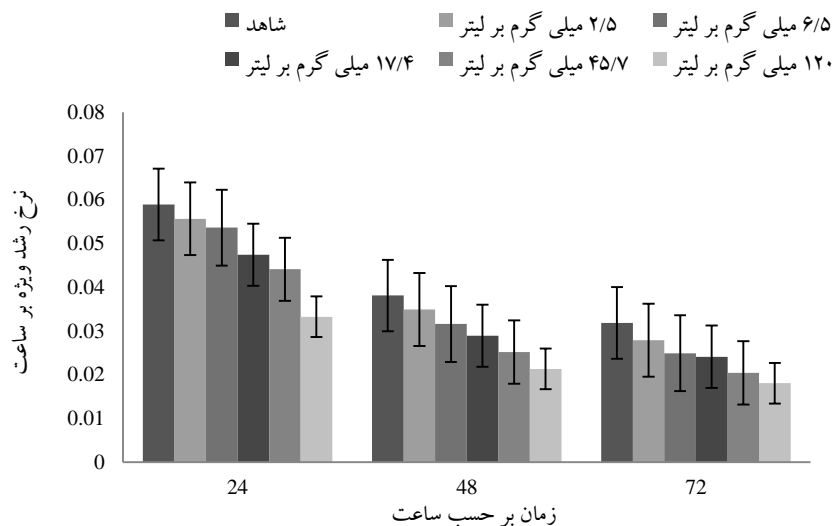
**نرخ رشد ویژه جلبک *S. dimorphus* در اثر تماس با نانوذره اکسیدمس:** در بررسی نرخ رشد ویژه ( $\mu$ ) گونه *Scenedesmus dimorphus* در اثر تماس با نانو اکسیدمس، کاهش بیشتر نرخ رشد با افزایش غلظت نانوذره نسبت به شاهد مشاهده شد (شکل ۳). حداکثر نرخ رشد ویژه ( $\mu_{max}$ ) بین تیمارهای مختلف، متفاوت بود و از غلظت کمتر به غلظت بیشتر روند کاهشی وجود داشت و مشاهده شد پس از گذشت ۷۲ ساعت، نرخ رشد نسبت به ۲۴ و ۴۸ ساعت کاهش بیشتری می‌یابد. همچنین نرخ رشد طی ۲۴ ساعت اول آزمایش نسبت به بازه‌های زمانی بعدی کاهش کمتری نشان داد که این مسئله به علت رشد نمایی جلبک است و همه تیمارها با غلظت‌های مختلف نانوذره از این الگوی رشد پیروی می‌کنند.

**غلظت مؤثر بازدارندگی (EC) نانوذره اکسیدمس بر گونه جلبک *S. dimorphus*:** طبق جدول ۱، غلظت مؤثر  $EC_{50}$  نانو اکسیدمس طی ۷۲ ساعت مقدار ۲۸/۸۴ میلی گرم بر لیتر و  $EC_{90}$  طی ۷۲ ساعت مقدار ۴۶۷۷/۳۵ میلی گرم بر لیتر محاسبه شد. همچنین  $EC_{10}$ ،  $EC_{50}$  و  $EC_{90}$  با گذشت زمان روند کاهشی داشتند که نشان‌دهنده افزایش سمیت نانوذره با گذشت زمان است.

جدول ۱- مقادیر  $EC_{10}$ ،  $EC_{50}$ ،  $EC_{90}$  و NOEC نانوذره

اکسیدمس برای جلبک *Scenedesmus dimorphus*

غلظت مؤثر (میلی گرم بر لیتر)	۲۴ ساعته	۴۸ ساعته	۷۲ ساعته
$EC_{10}$	۴/۰۷	۰/۹۳	۰/۱۸
$EC_{50}$	۱۶۲/۱۸	۶۵/۵۶	۲۸/۸۴
$EC_{90}$	۶۴۵۶/۵۴	۴۶۷۷/۳۵	۴۶۷۷/۳۵
NOEC	۱۶/۲۲	۶/۵۵	۲/۸۸



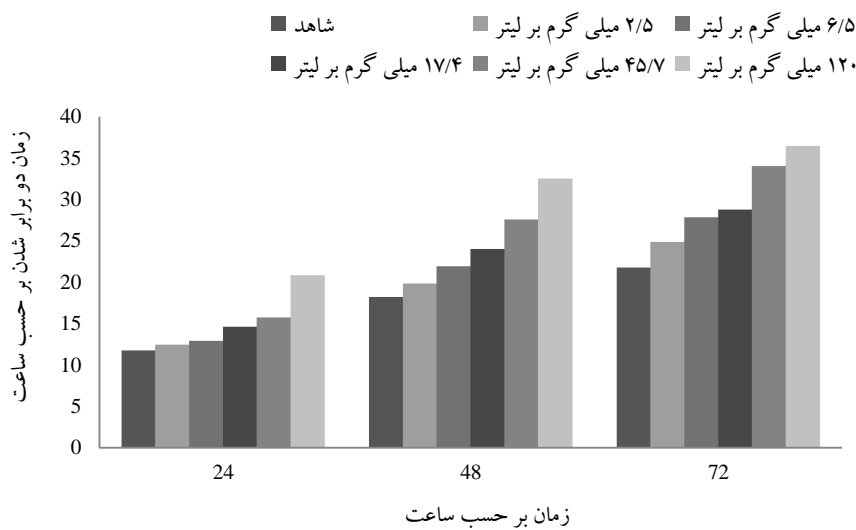
شکل ۳- نمودار نرخ رشد ویژه جلبک *Scenedesmus dimorphus* در اثر تماس با CuO-NP

مورد آزمایش روند افزایشی نشان داد و کمترین زمان دوبرابر شدن سلول‌ها در نمونه شاهد محاسبه شد؛ همچنین با پیشرفت آزمایش، زمان دوبرابر شدن

**زمان دوبرابر شدن جلبک *S. dimorphus* در اثر تماس با نانوذره اکسیدمس:** شاخص G یا زمان دوبرابر شدن با افزایش غلظت نانوذره در تیمارهای

می یابد (به جز در روز سوم و غلظت ۱۲۰ میلی گرم بر لیتر که تفاوت چندانی با روز دوم آزمایش ندارد)؛ صرف نظر از این مورد، درصد بازدارندگی از رشد جلبک *Scenedesmus* در معرض نانوذره اکسیدمس همواره افزایشی است و رشد آن کاهش می یابد.

سلول های جلبک به تدریج افزایش یافت که علت آن کاهش نرخ رشد جلبک در همه تیمارها و شاهد نسبت به زمان آغاز آزمایش است (شکل ۴). بررسی درصد ممانعت از رشد (I) در گونه *S. dimorphus* با افزایش غلظت نشان داد روند بازدارندگی از رشد نسبت به نمونه شاهد همواره افزایشی است (جدول ۲)؛ همچنین با افزایش زمان مواجهه، میزان ممانعت از رشد افزایش



شکل ۴- زمان دوبرابر شدن (G) سلول های جلبک *Scenedesmus dimorphus* در مدت آزمایش در غلظت های مختلف CuO-NP

#### تأثیر غلظت نانو اکسیدمس بر مقدار کلروفیل:

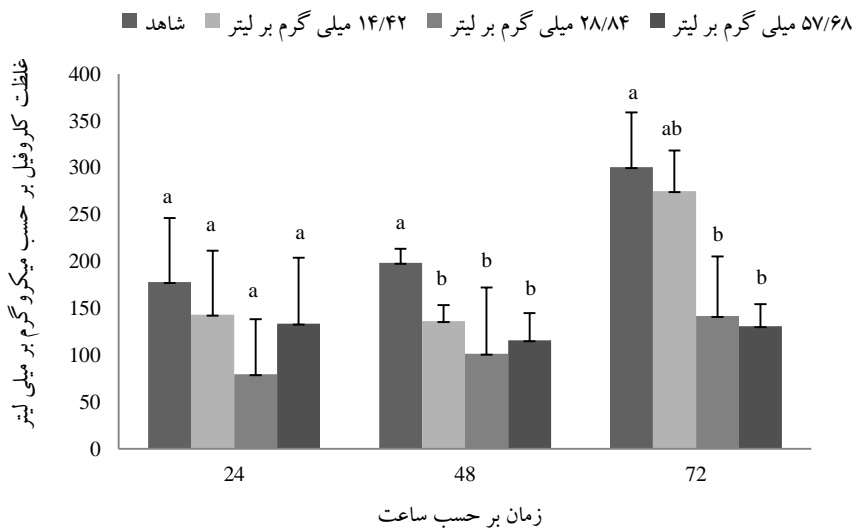
بررسی داده های مربوط به سنجش کلروفیل نشان دهنده کاهش غلظت کلروفیل در همه تیمارها و زمان ها نسبت به شاهد بود؛ همچنین مقدار کلروفیل در همه تیمارها (به جز ۵۷/۶۸ میلی گرم بر لیتر) با گذشت زمان افزایش یافت، هرچند میزان افزایش در شاهد بیشتر از سایر تیمارها بود (شکل ۵). این امر آثار منفی نانوذره اکسیدمس را بر فرایند فتوسنتز در جلبک *S. dimorphus* نشان می دهد. در شکل ۵ مشاهده می شود با افزایش زمان مواجهه، تفاوت میزان کلروفیل شاهد با تیمارها معنادار می شود ( $p < 0.05$ ).

#### جدول ۲- درصد بازدارندگی رشد ویژه (I) جلبک

*Scenedesmus dimorphus* نسبت به نمونه شاهد در اثر تماس با

CuO-NP			
غلظت (میلی گرم بر لیتر)	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
۲/۵	۵/۵۷ درصد	۸/۳۵ درصد	۱۲/۴۲ درصد
۶/۵	۹/۰۱ درصد	۱۷/۰۴ درصد	۲۱/۸۰ درصد
۱۷/۴	۱۹/۵۲ درصد	۲۴/۱۵ درصد	۲۴/۳۵ درصد
۴۵/۷	۲۵/۱۸ درصد	۳۴/۰۲ درصد	۳۵/۹۹ درصد
۱۲۰	۴۳/۵۹ درصد	۴۴/۰۶ درصد	۴۳/۳۷ درصد



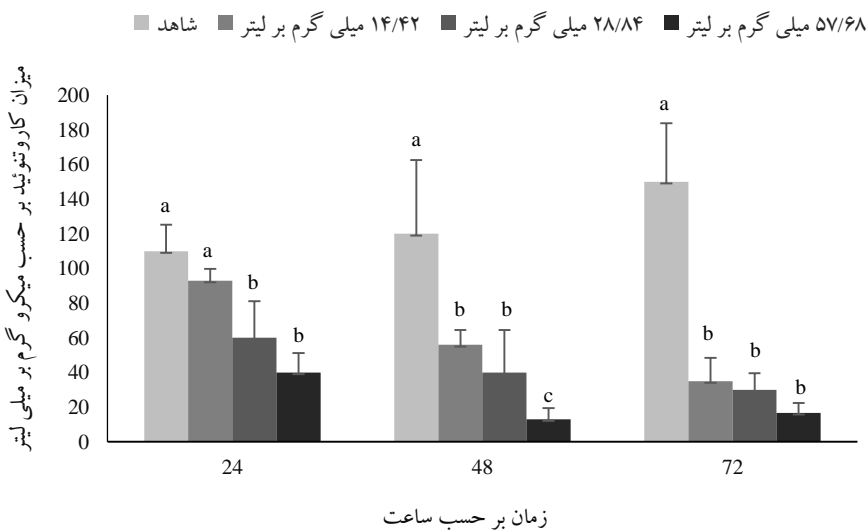


شکل ۵- میانگین کلروفیل a در جلبک *Scenedesmus dimorphus* با غلظت‌های مختلف CuO-NP. میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار است و حرف‌های یکسان نشان‌دهنده نبود اختلاف معنادار در سطح اطمینان ۹۵ درصد با آزمون توکی است.

**بررسی تأثیر غلظت نانو اکسیدمس بر مقدار**

**کاروتنوئید:** میزان کاروتنوئید در نمونه شاهد همواره افزایشی بود و طی ۳ روز به میزان ۱۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر رسید؛ در حالی که این رنگدانه در همه تیمارها روند به شدت کاهشی داشت و میزان

کاهش آن با افزایش غلظت تیمار متناسب بود (شکل ۶). اختلاف معنادار بین شاهد و تیمارها و نیز تیمارها با یکدیگر با افزایش زمان مواجهه بیشتر شد و در زمان ۷۲ ساعت، هر سه تیمار با شاهد اختلاف معنادار داشتند ( $p < 0.05$ ).



شکل ۶- میانگین کاروتنوئید در جلبک *Scenedesmus dimorphus* با غلظت‌های مختلف CuO-NP. میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار است و حرف‌های یکسان نشان‌دهنده نبود اختلاف معنادار در سطح اطمینان ۹۵ درصد با آزمون توکی است.

## بحث

پژوهش حاضر نشان داد سمیت نانوذرات بسته به غلظت و زمان در معرض بودن متفاوت است. اکسیدهای فلزی نانوذرات قدرت سمیت و کشندگی متفاوتی دارند که نشان می‌دهد سمیت نانوذرات علاوه بر ساختار نانویی و نسبت زیاد سطح به جرم و قابلیت تحرک به سایر عوامل نیز بستگی دارد. جلبک‌ها و فیتوپلانکتون‌ها به‌عنوان پایه زنجیره غذایی در تعادل اکوسیستم نقش حیاتی دارند و برخی نانوذرات به‌علت سمیتی که دارند، باعث کاهش جمعیت جلبک‌ها در محیط و عواقب ناشی از آن می‌شوند.

در پژوهش حاضر، سمیت نانوذره اکسیدمس بر جلبک سبز *S. dimorphus* بررسی و کاهش رشد جلبک با افزایش غلظت نانوذره مشاهده شد. همچنین  $EC_{50}$  اکسیدمس روی جلبک *Scenedesmus* طی ۷۲ ساعت برابر ۲۸/۸۴ میلی‌گرم بر لیتر محاسبه شد که در مقایسه با پژوهشی که پنداشته<sup>۲۹</sup> و همکاران (۲۰۱۳) انجام داده‌اند و در آن،  $EC_{50}$  نانو اکسیدروی ۰/۰۹ میلی‌گرم بر لیتر روی این جلبک به دست آمده است، سمیت بسیار بیشتر نانو اکسیدروی روی جلبک *S. dimorphus* را نشان می‌دهد (۲۶).

در پژوهشی، سمیت نانو اکسیدتیتانیوم بر جلبک *Scenedesmus* بررسی و میزان  $EC_{50}$  آن ۴۴ میلی‌گرم بر لیتر گزارش شد که در مقایسه با نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد سمیت نانوذره اکسیدمس از نانو اکسیدتیتانیوم طی ۷۲ ساعت حدود ۱/۵۲ برابر بیشتر است (۲۷). در بررسی دیگری، آثار غلظت‌های مختلف نانوذره اکسیدمس روی رشد، کلروفیل a و کاروتنوئید جلبک *Chlorella vulgaris* به‌مدت شش روز بررسی شد و بر اساس نتایج، تعداد سلول‌ها با افزایش غلظت نانوذره کاهش معناداری داشت. این نانوذره باعث افزایش نرخ بازدارندگی در *Chlorella vulgaris* شد؛

همچنین میزان کلروفیل کل، کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئید در همه غلظت‌های آزمایشی در مقایسه با شاهد کاهش داشتند و میزان کاهش آنها با غلظت نانوذره متناسب بود (۳۴). طی پژوهش دیگری که وانگ<sup>۳۰</sup> و همکاران در سال ۲۰۱۳ انجام دادند، اکسیدمس در سه حالت نانویی، میکروبی و یونی روی جلبک‌های خانواده *Chlorellaceae* آزمایش شد؛ طبق یافته‌های ایشان،  $EC_{50}$  ۹۶ ساعته برای یون‌های  $Cu^{2+}$  معادل ۱/۰۶ و برای نانو  $CuO$  معادل ۷۴/۶۱ میلی‌گرم بر لیتر بود. مقایسه این نتایج با یافته‌های پژوهش حاضر نشان می‌دهد سمیت  $CuO-NP$  برای جلبک *Scenedesmus* بیشتر از *Chlorella* است و این گونه حساسیت بیشتری نسبت به ذرات نانویی مس دارد (۲۸). همچنین آزاد شدن یون  $Cu^{2+}$  از نانوذرات اکسیدمس با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر باعث ممانعت از تشکیل کلروفیل a در جلبک *Chlorella* شد. ضمناً پس از مواجهه با نانوذرات اکسیدمس با غلظت ۱۶۰ میلی‌گرم بر لیتر، میزان کلروفیل ۲/۸۹ میلی‌گرم در  $10^8$  سلول بود که نسبت به مقدار شاهد یعنی ۴/۷۵ میلی‌گرم در  $10^8$  سلول کاهش داشت؛ در پژوهش حاضر نیز نتایج مشابهی به دست آمد (۲۸).

در مطالعه‌ای به بررسی اثر سمیت نانوذره و بالک (توده) اکسیدمس بر جلبک *Pseudokirchneriella subcapitata* پرداخته و طی آن،  $EC_{50}$  طی ۷۲ ساعت برای نانوذره اکسیدمس ۰/۷۱ میلی‌گرم بر لیتر و برای حالت توده ۱۱/۵۵ میلی‌گرم بر لیتر گزارش شد (۲۵). اختلاف سمیت محاسبه شده طی این آزمایش‌ها با نتایج پژوهش حاضر، علاوه بر احتمال وجود خطاهای شخصی و تفاوت در جزئیات روش مانند دامنه دمایی، شدت نور و نوع محیط کشت که آثاری هرچند اندک دارند، از تفاوت گونه‌های جلبک در دو پژوهش ناشی می‌شود. تفاوت بین گونه‌ای در جلبک‌های مختلف به‌علت تفاوت

کلروفیل و نرخ رشد در پژوهش حاضر مطابقت دارد. در مطالعه دیگری، تأثیر نانوذره اکسیدمس بر برنج بررسی و مشاهده شد میزان فتوسنتز، میزان تعرق و میزان رنگدانه در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم برلیتر کاهش می‌یابد (۴۰).

بر اساس نتایج پژوهش حاضر، نانوذره اکسیدمس باعث کاهش تعداد سلول‌ها و نیز رنگدانه‌ها در جلبک سبز *Scenedesmus dimorphus* می‌شود. باتوجه به آثار کشف‌نشده و بعضاً منفی برخی نانوذرات بر موجودات زنده و محیط‌زیست ضروریست آثار واقعی نانوفناوری پیش از اینکه پسماندهای نانو در محیط ظاهر شوند و همچنین پیش از معرفی نانوتولیدات جدید به بازار تعیین و شناسایی شوند.

## References

- (1) Abboud Y., Saffaj T., Chagraoui A., El Bouari A., Brouzi K., Tanane O., et al. Biosynthesis, characterization and antimicrobial activity of copper oxide nanoparticles (CuNPs) produced using brown alga extract (*Bifurcaria bifurcata*). *Applied Nanoscience* 2014; 4(5): 571-576.
- (2) Blinova I., Ivask A., Heinlaan M., Mortimer M., Kahru A. Ecotoxicity of nanoparticles of CuO and ZnO in natural water. *Environmental Pollution* 2010; 158(1): 41-47.
- (3) Chang Y-N., Zhang M., Xia L., Zhang J., Xing G. The toxic effects and mechanisms of CuO and ZnO nanoparticles. *Materials* 2012; 5(12): 2850-2871.
- (4) Studer AM., Limbach LK., Van Duc L., Krumeich F., Athanassiou EK., Gerber LC., et al. Nanoparticle cytotoxicity depends on intracellular solubility: comparison of stabilized copper metal and degradable copper oxide nanoparticles. *Toxicology Letters* 2010; 197(3): 169-174.

در نرخ جذب از طریق غشای پلاسمایی در سازوکارهای اتصال داخلی و یا سازوکارهای سمیت‌زدایی است (۳۵). مقایسه این دو پژوهش نشان می‌دهد حساسیت جلبک *Pseudokirchneriella subcapitata* نسبت به نانوذره اکسیدمس ۴۰/۵۶ برابر بیشتر از جلبک *Scenedesmus dimorphus* است. طی پژوهشی درباره سمیت نانوذره اکسیدمس پوسته هسته<sup>۳۱</sup> روی جلبک سبز *Chlamydomonas reinhardtii* در محدوده ۴ تا ۲۰ میلی‌گرم برلیتر به مدت ۶ ساعت، ساختار جمعیت جلبک تغییر کرد؛ همچنین این نانوذره بر کلروفیل اثر تخریبی داشت و کاهش فتوسنتز در آن به تشکیل گروه‌های ROS نسبت داده شد (۳۶). در مطالعه دیگری، تأثیر همین نانوذره به دو شکل دارای روکش و بدون روکش بر جلبک *Chlamydomonas reinhardtii* بررسی و مشاهده شد هر دو شکل در غلظت‌های ۵ تا ۴۰ میلی‌گرم برلیتر پس از ۶ ساعت مواجهه برای جلبک سمی‌اند، اما سمیت نانوذره دارای روکش بیشتر از نوع بدون روکش است و علت آن، افزایش قابلیت نفوذ به داخل سلول است (۳۷). در پژوهش دیگری، تأثیر غلظت‌های صفر تا ۱۰ میلی‌گرم برلیتر نانوذره نقره بر دو گونه جلبک شامل *Dunaliella* و *Chlorella vulgaris* طی ۲۴ ساعت مواجهه بررسی و مشاهده شد میزان کلروفیل به شدت کاهش می‌یابد (۳۸)؛ در پژوهش حاضر نیز کاهش کلروفیل در اثر رویارویی با CuO-NP مشاهده شد.

آل سعدی<sup>۳۲</sup> و همکاران در پژوهشی به بررسی آثار سمیت فلزات سنگین کادمیوم و سرب بر جلبک *Scenedesmus quadricauda* پرداختند. طبق نتایج ایشان، نرخ رشد جلبک با افزایش غلظت فلزات کاهش می‌یابد و مقدار کلروفیل در مقایسه با شاهد کاهش معناداری نشان می‌دهد (۳۹)؛ این نتایج با یافته‌های میزان

- (5) Zhou K., Wang R., Xu B., Li Y. Synthesis, characterization and catalytic properties of CuO nanocrystals with various shapes. *Nanotechnology* 2006; 17(15): 3939.
- (6) Ayatallahzadeh Shirazi M., Shariati, F., Ramezani, Z. Toxic effect of aluminum oxide nanoparticles on green micro-algae *Dunaliella salina*. *International Journal of Environmental Research* 2015; 9(2): 585-594.
- (7) Monteiro-Riviere NA., Lang Tran C., Nanotoxicology: characterization, dosing and health effects. New York: CRC Press; 2007.
- (8) Moore M. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environment International* 2006; 32(8): 967-976.
- (9) Navarro E., Baun A., Behra R., Hartmann NB., Filser J., Miao A-J., et al. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology* 2008; 17(5): 372-386.
- (10) Nowack B., Bucheli TD. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution* 2007; 150(1): 5-22.
- (11) Hassibi P. Physiological changes of low temperature tension on different genotypes of the rice in seedling stage. Ahvaz: Shahid Chamran University; 2007.
- (12) Kamali M., Rostami, A. and Mohseni Koochesfehiani, H. Cellular toxicity of nanoparticles *in vitro*. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal* 2013; 3(12): 62-75.
- (13) Hassibi P., Moradi, F., Nabipour, M. The effect of low temperature on antioxidants metabolism of sensitive and tolerant rice genotypes in seedling stage. *Iranian Journal of Crop Sciences* 2008; 10(39): 262-280
- (14) Klaine SJ., Alvarez PJ., Batley GE., Fernandes TF., Handy RD., Lyon DY., et al. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environmental Toxicology* 2008; 27(9): 1825-51.
- (15) Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*. 2002; 7(9): 405-410.
- (16) Suman T., Rajasree SR., Kirubakaran R. Evaluation of zinc oxide nanoparticles toxicity on marine algae *Chlorella vulgaris* through flow cytometric, cytotoxicity and oxidative stress analysis. *Ecotoxicology Environmental Safety* 2015; 113: 23-30.
- (17) Knauert S., Knauer K. The role of reactive oxygen species in copper toxicity to two freshwater green algae 1. *Journal of Phycology* 2008; 44(2): 311-319.
- (18) Pourafrahyabi MaR, Z. (2011) Phytoplanktons as pollution indicators. The 5<sup>th</sup> Conference on Environment Engineering, Environment Faculty, University of Tehran, Tehran, Iran.
- (19) Li F., Liang Z., Zheng X., Zhao W., Wu M., Wang Z. Toxicity of nano-TiO<sub>2</sub> on algae and the site of reactive oxygen species production. *Aquatic Toxicology* 2015; 158: 1-13.
- (20) Becaro AA., Jonsson CM., Puti FC., Siqueira MC., Mattoso LH., Correa DS., et al. Toxicity of PVA-stabilized silver nanoparticles to algae and microcrustaceans. *Environmental Nanotechnology, Monitoring* 2015; 3: 22-29.
- (21) Manusadzianas L., Caillet C., Fachetti L., Gylytė B., Grigutyte R., Jurkonienė S., et al. Toxicity of copper oxide nanoparticle suspensions to aquatic biota. *Environmental Toxicology Chemistry*. 2012; 31(1): 108-114.
- (22) Ji J., Long Z., Lin D. Toxicity of oxide nanoparticles to the green algae *Chlorella* sp. *Chemical Engineering Journal* 2011; 170(2-3): 525-530.
- (23) Griffitt RJ., Luo J., Gao J., Bonzongo JC., Barber DS. Effects of particle composition and species on toxicity of

- metallic nanomaterials in aquatic organisms. *Environmental Toxicology Chemistry* 2008; 27(9): 1972-1978.
- (24) Wei C., Zhang Y., Guo J., Han B., Yang X., Yuan J. Effects of silica nanoparticles on growth and photosynthetic pigment contents of *Scenedesmus obliquus*. *Journal of Environmental Sciences* 2010; 22(1): 155-160.
- (25) Aruoja V., Dubourguier H-C., Kasemets K., Kahru A. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO<sub>2</sub> to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Science of the Total Environment* 2009; 407(4): 1461-1468.
- (26) Pendashte H., Shariati F., Keshavarz A., Ramzanpour Z. Toxicity of zinc oxide nanoparticles to *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus* algae species. *World Journal of Fish Marine Sciences* 2013; 5(5): 563-570.
- (27) Sadiq IM., Dalai S., Chandrasekaran N., Mukherjee A. Ecotoxicity study of titania (TiO<sub>2</sub>) NPs on two microalgae species: *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. *Ecotoxicology Environmental Safety* 2011; 74(5): 1180-1187.
- (28) Wang L., Wang M., Peng C., Pan J. Toxic Effects of Nano-CuO, Micro-CuO and Cu<sup>2+</sup> on *Chlorella* sp. *Journal of Environmental Protection* 2013; 4(01): 86.
- (29) OECD guidelines for testing of chemical. Freshwater algae and cyanobacteria growth inhibition tests, 2011; Test NO.201.
- (30) Finny D. *Probit analysis*. Cambridge: Cambridge University Press; 1971.
- (31) Levasseur M., Thompson PA., Harrison PJ. Physiological acclimation of marine phytoplankton to different nitrogen sources 1. *Journal of Phycology* 1993; 29(5): 587-595.
- (32) Fogg GE., Thake B. Algal culture and phytoplankton ecology. 3rd ed. Madison: The University of Wisconsin press; 1987.
- (33) ASTM. Standard Practices for Measurement of Chlorophyll Content of Algae in Surface Waters 2012; D3731-87(2012).
- (34) Miri MaKB H. Effect of CuO nanoparticle on growth, protein content, Chlorophyll and carotenoid in *Chlorella Vulgaris*. *Journal of Plant Researches* 2016; 29(1): 235-242
- (35) Levy JL, Stauber JL, Jolley DF. Sensitivity of marine microalgae to copper: the effect of biotic factors on copper adsorption and toxicity. *Science of the Total Environment* 2007; 387(1-3): 141-154.
- (36) Saison C., Perreault F., Daigle J-C., Fortin C., Claverie J., Morin M., et al. 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* 2010; 96(2): 109-114.
- (37) Perreault F., Oukarroum A., Melegari SP., Matias WG., Popovic R. Polymer coating of copper oxide nanoparticles increases nanoparticles uptake and toxicity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Chemosphere*. 2012; 87(11): 1388-1394.
- (38) Oukarroum A., Bras S., Perreault F., Popovic R. Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. *Ecotoxicology Environmental Safety* 2012; 78: 80-85.
- (39) Al-Saadi, HA., Kassin, TI., Use of alga *Scenedesmus quadricauda* in control and treatment of some Heavy metals. *Proceedings of International Symposium on Environmental Pollution Control and Waste Management* 2002; 7: 147-154.
- (40) Da Costa M., Sharma P. Effect of copper oxide nanoparticles on growth, morphology, photosynthesis, and antioxidant response in *Oryza sativa*. *Photosynthetica* 2016; 54(1): 110-119.

- 
- 1- Copper oxide Nanoparticles
  - 2- Photovoltaics
  - 3- Prokaryotes
  - 4- *In vitro*
  - 5- *In vivo*
  - 6- Reactive Oxygen Species
  - 7- Cytokine
  - 8- Signaling pathways
  - 9- Becaro
  - 10- Polyvinyl alcohol
  - 11- Protozoa
  - 12- Effective Concentration
  - 13- Bulk
  - 14- Nano-suspension
  - 15- Macrophyte
  - 16- Microphyte
  - 17- Rotifers
  - 18- Daphnia
  - 19- Clean Nature Explorer
  - 20- Iranian Nanotechnology Pioneers
  - 21- Bold Basal's Medium
  - 22- Nutrient agar
  - 23- Stock
  - 24- Transmission electron microscopy
  - 25- Scanning electron microscope
  - 26- Germinator
  - 27- Probit analysis
  - 28- Regression
  - 29- Pendashte
  - 30- Wang
  - 31- Core-shell
  - 32- AL-Saadi