



University of Guilan

University of Guilan with collaboration of Iranian  
Aquaculture Society

## Aquatic Animals Nutrition

Vol. 8, No. 4, 2023, pages: 31-42  
DOI: 10.22124/janb.2023.24071.1189



### Effects of zinc oxide nanoparticles on photosynthetic pigments, zinc accumulation, and activity of antioxidant enzymes of *Dunaliella salina*

Elaheh Hanifi<sup>1</sup>, Nasrollah Ahmadifard<sup>1\*</sup>, Behrouz Atashbar<sup>2</sup>, Saeed Meshkini<sup>3</sup>

1- Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran

2- Department of Ecology and Resource Assessment, Artemia & Aquaculture Research Institute, Urmia University, Urmia, Iran

3- Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

Received 10 November 2022

Revised 10 February 2023

Accepted 16 February 2023

#### KEYWORDS

*Dunaliella salina*

Nanotechnology

Bioaccumulation

Chlorophyll

Superoxide

dismutase

Catalase

#### ABSTRACT

Zinc oxide nanoparticles (ZnO-NP) are widely used in various industries. Their release into the aquatic environment has caused concerns about their potential consequences on aquatic organisms and ultimately human health. In the food chain, algae as primary organisms play an important role in absorbing water-soluble particles and transporting them to high nutritional levels. In this study, we investigated the effect of different concentrations (0, 0.1, 1, and 10 mg/L; T<sub>0</sub>, T<sub>0.1</sub>, T<sub>1</sub> and T<sub>10</sub> respectively) of ZnO-NP on photosynthetic factors, zinc accumulation, and antioxidant enzymes of *Dunaliella salina*. By the increased concentration of ZnO-NP in the algae medium, the amount of zinc accumulation in the algae upraised, so that, the highest amount of zinc was significantly observed in T<sub>10</sub> mg/L (p<0.05). Based on the results of photosynthetic pigments, the highest amount of chlorophyll a and b was significantly found in T<sub>10</sub> (p<0.05). The maximum amount of total carotenoid was observed in T<sub>1</sub>; however, other treatments did not exhibit any significant difference from the control treatment (T<sub>0</sub>; p>0.05). In the case of the activity of antioxidant enzymes, by elevation in the ZnO-NPs concentration in the culture medium, the activity of catalase in algae increased, so that, the highest enzyme activity was observed in T<sub>10</sub> (p<0.05). The activity of the superoxide dismutase (SOD) in the algae exposed to ZnO-NP was significantly decreased compared to T<sub>0</sub> (p<0.05). In this study, it was found that high concentrations of ZnO-NP, by accumulating in algae, could upraise the activity of antioxidant enzyme, i.e., catalase, decline that of SOD, and increase photosynthetic pigments in response to stress conditions.

\*Corresponding author: nasrollah@gmail.com





"مقاله پژوهشی"

تأثیر نانوذره اکسید روی بر رنگدانه‌های فتوسنتزی، تجمع روی و فعالیت آنزیم‌های ضداکسایشی جلبک  
*Dunaliella salina*

الهه حنیفی<sup>۱</sup>، نصرالله احمدی فرد<sup>۱\*</sup>، بهروز آتشبار<sup>۲</sup>، سعید مشکینی<sup>۳</sup>

۱- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، آذربایجان غربی

۲- گروه اکولوژی و مدیریت ذخایر آبزیان، پژوهشکده آرتیمیا و آبی‌پروری، دانشگاه ارومیه، آذربایجان غربی

۳- گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، آذربایجان غربی

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۲۷

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۱۱/۲۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۱۹

کلمات کلیدی

چکیده

*Dunaliella salina*

فناوری نانو

تجمع زیستی

کلروفیل

سوپراکسید

دیسموتاز

کاتالاز

نانوذرات اکسید روی به طور گسترده در صنایع مختلف استفاده می‌شوند و رهایش آنها به محیط زیست آبی، سبب نگرانی‌هایی در مورد پیامدهای بالقوه آن‌ها بر موجودات آبی و در نهایت سلامت انسان‌ها شده است. جلبک‌ها به عنوان موجودات اولیه در جذب مواد محلول در آب و انتقال آن به سطوح تغذیه‌ای بالا در زنجیره غذایی نقش مهمی ایفا می‌کنند. در مطالعه حاضر، تأثیر غلظت‌های مختلف (۰، ۰/۱، ۱ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر) نانوذرات اکسید روی بر رنگدانه‌های فتوسنتزی، تجمع روی و آنزیم‌های ضداکسایشی جلبک *Dunaliella salina* بررسی شد. براساس نتایج، با افزایش غلظت نانوذرات اکسید روی در محیط کشت جلبک، میزان تجمع روی در یاخته‌های جلبکی افزایش داشت و بالاترین میزان روی به طور معنی‌دار در تیمار ۱۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات اکسید روی مشاهده شد ( $p < 0/05$ ). همچنین، از نظر رنگدانه‌های فتوسنتزی، بیشترین مقدار کلروفیل a و b به‌طور معنی‌دار در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات اکسید روی یافت شد ( $p < 0/05$ ). بیشینه مقدار کاروتنوئید کل در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر نانوذره اکسید روی مشاهده شد، اما دیگر تیمارها با تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار نشان ندادند ( $p > 0/05$ ). براساس نتایج، از نظر فعالیت آنزیم‌های ضداکسایشی، با افزایش میزان غلظت نانوذرات اکسید روی در محیط کشت فعالیت آنزیم کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در جلبک افزایش داشته و در تیمار ۱۰ میلی‌گرم بیشتر فعالیت آنزیمی مشاهده شد ( $p < 0/05$ ). این پژوهش نشان داد که غلظت‌های بالای نانوذرات اکسید روی با ورود و تجمع در جلبک می‌تواند باعث افزایش فعالیت کاتالاز (CAT) و کاهش سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، اما افزایش رنگدانه‌های فتوسنتزی در پاسخ به شرایط استرسی باشد.

## مقدمه

امروزه فناوری نانو به عنوان یکی از زمینه‌های گسترش سریع علم و فناوری در نظر گرفته شده است (Wan et al. 2018). در حال حاضر بیشترین تولید و مصرف نانوذرات شامل نانو لوله‌های نقره، فولران و کربن، اکسید روی، سیلیس و دی اکسید تیتانیوم بوده که به مقدار ۲۰۰۰ تن در سال ۲۰۰۴ و ۵۸۰۰۰ تن در سال ۲۰۲۰ است (Dontsova et al. 2019). بسیاری از مصرف کنندگان مواد شیمیایی، مقادیر زیادی از نانوذرات تولید شده را به اقیانوس‌ها و یا رودخانه‌ها تخلیه می‌کنند (Handy et al. 2008). حضور نانوذرات در محیط زیست آبی امری اجتناب ناپذیر است و بدیهی است که با ورود فاضلاب‌ها و پساب‌های حاصل از محصولات نانو به زمین‌های کشاورزی و بوم‌سازگان‌های آبی، زیستگاه‌های آبیان نیز در معرض نانوذرات تولید شده قرار می‌گیرند. اولین سؤال این است که نانوذرات بر محیط آبی و جانوران آبی و دیگر جانداران آبی چه تاثیری خواهد گذاشت (Handy and Shaw, 2007). مواجهه موجودات زنده با مواد سمی تغییراتی را در ساختار بافتی و یاخته‌ای به همراه خواهد داشت، به طوری که در برخی از موارد باعث مرگ و میر گونه‌های مختلف ماهیان شده است (Shukla et al. 2003; Fanta et al. 2011). بر این اساس شناخت اثرات احتمالی این مواد بر موجودات آبی از نظر کاربردی دارای اهمیت است (Prabhu and Poulouse, 2012). اثرات سمی نانوذرات نه تنها در باکتری‌ها و ویروس‌ها دیده شده، بلکه در دیگر موجودات آبی مانند جلبک‌ها، زئوپلانکتون‌ها و ماهی‌ها نیز قابل مشاهده است (Ates et al. 2013a, b). موجوداتی با سطوح مختلف غذایی از جمله تولیدکنندگان اولیه (جلبک‌ها)، مصرف‌کنندگان (پستانداران، سخت‌پوستان) و تجزیه‌کننده‌ها (میکروب‌ها) برای ارزیابی سمیت محیطی نانوذرات انتخاب می‌شوند (Bondarenko et al. 2016). در میان آنها جلبک‌ها که در بوم‌سازگان آبی در پایین‌ترین سطح تغذیه‌ای قرار دارند و اساس بسیاری از شبکه‌های غذایی هستند، بیشترین استفاده را در ارزیابی سمیت محیطی نانوذرات دارند (Wang et al. 2016a). جلبک‌ها نقش مهمی در بوم‌سازگان‌های آبی دارند و تولیدکنندگان اصلی زنجیره‌های غذایی آب هستند (Bhuvaneshwari et al. 2015). آنها نه تنها اکسیژن

و غذا را برای موجودات آبی دیگر از طریق فتوسنتز در بدن خود تأمین می‌کنند، بلکه به تصفیه آب نیز یاری می‌رسانند (Wang et al. 2019). جلبک‌ها به دلیل توانایی بالا در تجمع زیستی به عنوان نشانگر زیست محیطی آلاینده‌ها استفاده می‌شوند (Bhuvaneshwari et al. 2015). زیرا یاخته‌های جلبکی به بسیاری از سموم حساس هستند، دوره رشد کوتاه دارند، به راحتی قابل جداسازی و کشت هستند و علائم مسمومیت را در سطح یاخته‌ای نشان می‌دهند (Dalai et al. 2013). بسیاری از کشورها از جلبک برای ارزیابی خطرهای مواد شیمیایی استفاده می‌کنند. بنابراین، جلبک‌ها را می‌توان به عنوان موجودات مدل برای بررسی سمیت زیستی نانوذرات استفاده کرد. در حال حاضر، مطالعات انجام شده نشان می‌دهند که نانوذرات بر رشد، مقدار کلروفیل، مقدار پروتئین و فعالیت جلبک‌ها تأثیر داشته‌اند. اثرات سمی با ریخت‌شناسی، اندازه یاخته، ترکیب شیمیایی، غلظت و حلالیت مرتبط بوده و پراکندگی نانوذرات به ساختار یاخته‌های و فیزیولوژیک نیز وابسته است (Bundschuh et al. 2016). جلبک *Dunaliella* یک جلبک سبز تک یاخته‌ای متحرک و فاقد دیواره‌ی یاخته‌ای است. این جلبک حاوی رنگدانه‌ی بتاکاروتن، مواد محرک ایمنی مانند فیکوسیانین، پلی-ساکارید، آهن و روی (Giordano et al. 2000) و همچنین حاوی مقادیر ویتامین C و ویتامین E است (Hosseini Tafreshi and Shariyati, 2009). در مطالعات مختلف، تأثیر ترکیبات معدنی و نانوذرات بر جلبک‌ها بررسی شده است. Fazelian و همکاران (۲۰۱۸) برهمکنش غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید روی (mg/L صفر، ۵، ۱۰، ۱۰۰، ۲۰۰) بر جلبک *Nannochloropsis oculata* را بررسی کرده‌اند. براساس نتایج، درصد زنده‌مانی و مقدار کلروفیل a در پاسخ به نانوذرات اکسید روی به طور معنی‌دار کاهش یافته است. مقدار مالون دالدئید و فعالیت آنزیم کاتالاز افزایش یافته، در حالی که میزان فعالیت آنزیم آسکوربات با افزایش غلظت نانوذرات اکسید روی در یاخته‌های *N. oculata* کاهش یافته است. در مطالعه Nahali و همکاران (۲۰۱۸) تأثیر روی معدنی بر جلبک *Dunaliella* مطالعه شده است. براساس نتایج آنها، جلبک *D. Salina* قابلیت بالایی برای انباشت روی با استفاده از سولفات روی را دارد. در پژوهشی دیگر Wang و همکاران (۲۰۱۹) اثرات سمی نانوذرات بر

جلبک انجام شد. ظروف کشت جلبک تحت شرایط استاندارد نوری (۳۰۰۰ لوکس با استفاده از دستگاه لوکس-متر)، دما (۲۵ درجه سانتی‌گراد) و هوادهی (هوادهی مداوم) قرار گرفتند و بعد از گذشت ۱۱ تا ۱۳ روز رشد بیشینه (فاز لگاریتمی) حاصل شد.

### تیمارهای آزمایش

نمونه جلبک در فاز لگاریتمی برداشته شد و بر اساس مطالعه Cimén و همکاران (۲۰۲۰) در ۴ گروه شامل (۱) تیمار شاهد بدون ZnO-NP، (۲) تیمار حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر ZnO-NP، (۳) تیمار حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر ZnO-NP، (۴) تیمار حاوی ۱۰ میلی‌گرم در لیتر ZnO-NP تیمار بندی شد. کمیت توده زنده جلبک با استفاده از لام نفوبار طی آزمایش بررسی شد. طبق دستورالعمل OECD 201 (OECD, 1984) بعد از ۷۲ ساعت نمونه‌های جلبک تیمار شده برداشته شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۵۰۰۰ سانتریفوژ شد. مایع رویی دور ریخته و جلبک‌های رسوب کرده با استفاده از سمپلر در ریزلوله‌های (میکروتیوب‌های) از قبل توزین شده ریخته شد. از جلبک‌های برداشت شده برای تعیین میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی و سنجش میزان فعالیت آنزیم‌های ضد اکسایشی و همچنین، میزان جذب روی استفاده شد.

### اندازه‌گیری رنگدانه‌های فتوسنتزی

یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون یاخته جلبکی در دور ۷۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴°C سانتریفوژ شد. توده جلبکی رسوب کرده با استفاده از آب دریای استریل شسته و سپس در یک میلی‌لیتر از متانول ۹۶٪ به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی قرار داده شد. بعد از مدت زمان گرمخانه‌گذاری، نمونه‌ها دوباره سانتریفوژ شد و میزان جذب قسمت رویی حاوی رنگدانه کلروفیل با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۴۷۰، ۶۵۲ و ۶۶۵ نانومتر سنجش شد (Lichtenthaler, 1987).

غشای یاخته، متابولیسم یاخته و فتوسنتز جلبک‌ها بررسی شده است. آنها بیان داشتند که نانوذرات با تخریب دیواره یاخته‌ای و آزادسازی لاکتات دهیدروژناز به داخل محلول آزمایش، سبب مرگ یاخته‌های جلبکی می‌شود.

با توجه به گسترش روز افزون صنایع مرتبط به نانوذرات و تخلیه پساب این صنایع مرتبط به منابع آبی، بررسی تأثیر این نانوذرات بر موجودات داخل آن از اهمیت زیادی برخوردار است. لذا در تحقیق حاضر نانوذرات اکسید روی به خاطر کاربرد فراوان آن انتخاب و تأثیرات آن بر میزان انباشت زیستی، فعالیت رنگدانه‌های فتوسنتزی و آنزیم‌های ضد اکسایشی شامل آنزیم کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز جلبک *D. salina* به عنوان یک مدل زیستی ساکن در منابع آبی بررسی شد.

### مواد و روش کار

#### تهیه مواد اولیه آزمایش

نانوذرات اکسید روی (ZnO-NP) با خلوص ۹۹.۹۸٪ و اندازه ذرات ۲۵-۲۰ نانومتر (2-13-314 CAS number) از شرکت نانو مواد گستران پارس با نام تجاری TENAN به صورت پودر خشک خریداری شد. برای تهیه سوسپانسیون معادل ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر، ۱ گرم پودر خشک نانوذره در ۱۰ میلی‌لیتر آب ۲ بار تقطیر به مدت ۱۰ دقیقه به شدت ۳۵ کیلو هرتز در حمام اولتراسونیک (Intersonic, IS-2, 300W, 35 kHz) پخش شد. این سوسپانسیون در بطری تیره و در دمای اتاق در آزمایشگاه تا زمان استفاده ذخیره شد (Mohammadi et al. 2021). جلبک *Dunaliella salina* از پژوهشکده آرمیا و آبزی-پروری دانشگاه ارومیه تهیه و با استفاده از محیط کشت والنه (Walne's Medium) کشت شد. آب با شوری ۱۰۰ گرم در لیتر در یک مخزن ۱۰ لیتری از طریق رقیق کردن آب دریاچه ارومیه با استفاده از دستگاه رفراکتومتر تهیه شد. آب تهیه شده در شرایط استاندارد با استفاده از اتوکلاو استریل شد (Nahali et al. 2018). بعد از سرد شدن آب با استفاده از استوک اولیه جلبک و محیط کشت والنه کشت

$$\text{Chlorophyll a } (\mu\text{g/mL}) = \text{Chl-a } (\text{mg/L}) = 16.72 \text{ A665.2} - 9.16 \text{ A652.4}$$

$$\text{Chlorophyll b } (\mu\text{g/mL}) = \text{Chl-b } (\text{mg/L}) = 34.09 \text{ A652.4} - 15.28 \text{ A665.2}$$

$$\text{Total carotenoids } (\mu\text{g/mL}) = (1000 \times \text{A } 470 - 1.63 \text{ Chl-a} - 104.9 \text{ Chl-b}) / 221$$

### بررسی فعالیت آنزیم‌های ضد اکسایشی

یاخته‌های جلبکی مواجه شده با نانوذرات در ۷۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۷ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. یاخته‌ها در بافر فسفات ۰/۵ مولار (pH=7.5) همگن شده و سپس در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. ماده رویی برای سنجش آنزیم‌های ضد اکسایشی استفاده شد (Cimen et al. 2020).

فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD) با استفاده از پروتکل بیان شده توسط Kono (۱۹۷۸) سنجش شد. حدود ۵۰ میلی‌مولار از  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  pH10، ۹۶ میلی‌مولار NBT، ۰/۶٪ تریتون X-100 و ۲۰ میلی‌مولار هیدروکسیل آمین هیدروکلراید به ۷۰ میکرولیتر از مایع رویی اضافه شد. مخلوط واکنش در حضور نور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری شد و سپس فعالیت آنزیم SOD با ثبت مقادیر جذب در ۵۶۰ نانومتر با استفاده از طیف سنجی UV-VIS اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) براساس روش Yilancioglu و همکاران (۲۰۱۴) تعیین شد. به‌طور خلاصه به مایع رویی جمع‌آوری شده (۱۰۰ میکرولیتر)، ۲ میلی‌لیتر محلول پراکسید هیدروژن (۱۰/۸ میلی‌مولار) و ۱۰۰ میکرولیتر از بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=7.0) اضافه شد و ترکیب مخلوط واکنش برای در نظر گرفتن فعالیت آنزیم CAT با استفاده از یک اسپکتوفتومتر UV-vis در ۲۴۰ نانومتر با در نظر گرفتن همان مخلوط واکنش بدون  $\text{H}_2\text{O}_2$  به عنوان شاهد اندازه‌گیری شد.

### اندازه‌گیری انباشت زیستی عنصر روی

نمونه‌های جلبک بعد از سانتریفیوژ و شستشو با کمک آون در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. نمونه‌های

خشک جلبک به کمک اسید نیتریک (۰/۶۵٪) در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت برای سنجش مواد معدنی هضم و با آب مقطر تا حجم ۵۰ برابر رقیق شدند. غلظت عنصر روی با استفاده از دستگاه جذب اتمی مدل NOV AA 400 (Analytic Jena, Germany) و با استفاده از کوره گرافیت به‌دست آمد (Lowry and Lopez, 1946).

### سنجش آماری

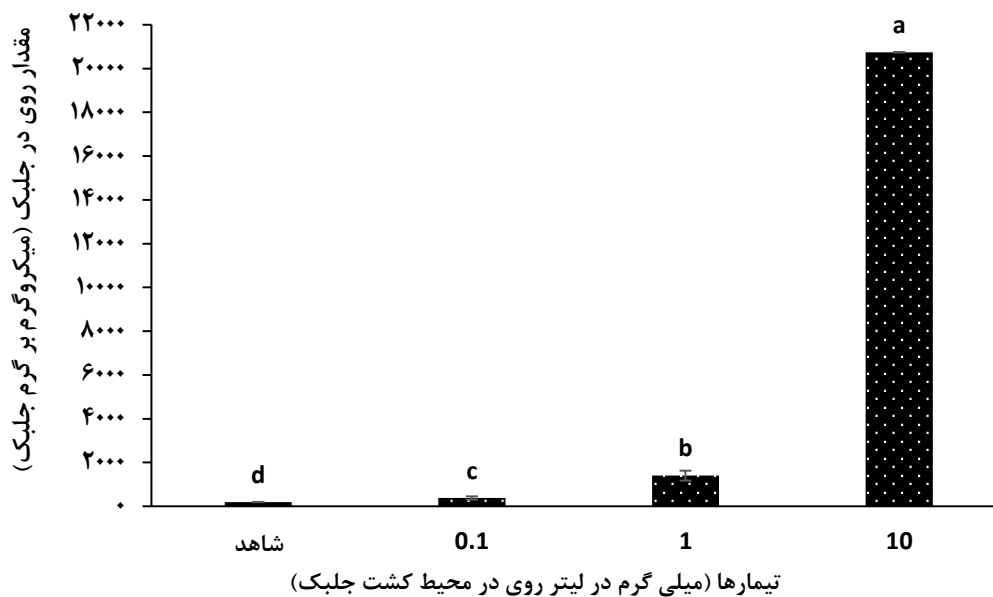
آزمایش‌ها در قالب یک طرح کاملاً تصادفی انجام شد. برای انجام سنجش آماری از نرم‌افزار SPSS با نسخه ۲۱ و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel نسخه ۲۰۱۶ استفاده شد. بعد از انجام آزمایش، نرمال بودن داده‌های خام با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شد. برای سنجش داده‌های نرمال از آزمون تجزیه واریانس یک طرفه و برای مقایسه میانگین بین تیمارهای مختلف از آزمون دانکن استفاده شد. حداقل سطح معنی‌دار بودن آزمون‌ها  $p \leq 0/05$  در نظر گرفته شد. داده‌های به دست آمده به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه شدند.

### نتایج

#### تأثیر نانوذرات اکسید روی بر میزان انباشت زیستی

##### عنصر روی در جلبک *Dunaliella salina*

بر اساس شکل ۱ میزان تجمع نانوذره روی در جلبک *D. salina* در تیمارهای مختلف دارای اختلاف معنی‌دار بود و بیشینه میزان روی در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات اکسید روی مشاهده شد ( $p < 0/05$ ). با افزایش غلظت ذره روی در محیط کشت جلبک، میزان تجمع روی به طور معنی‌داری در یاخته‌های جلبکی افزایش نشان داد.

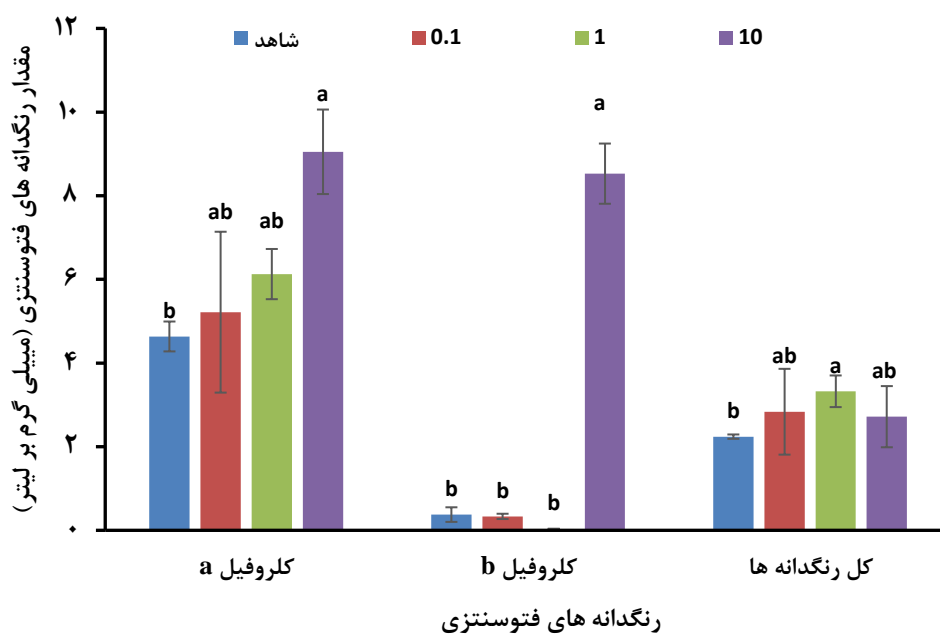


شکل ۱ میزان انباشت زیستی روی در جلبک *Dunaliella salina* در مواجهه با ZnO-NP.

داشت، اما با دیگر تیمارها اختلاف معنی‌دار نداشت ( $p < 0.05$ ). مقدار کلروفیل b در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر اختلاف معنی‌دار با شاهد و دیگر تیمارها داشت ( $p < 0.05$ ). مقدار کاروتنوئید کل در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر اختلاف معنی‌دار با شاهد داشت ( $p < 0.05$ ), اما اختلاف معنی‌دار با غلظت‌های ۱ و ۱۰ نشان نداد ( $p > 0.05$ ).

#### رنگدانه‌های فتوسنتزی در جلبک *D. salina* مواجه شده با ZnO-NP

نتایج مربوط به رنگدانه‌های فتوسنتزی در جلبک *D. salina* مواجه شده با ZnO-NP در شکل ۲ آورده شده است. بر اساس نتایج به‌دست آمده، مقدار کلروفیل a در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر اختلاف معنی‌دار با شاهد

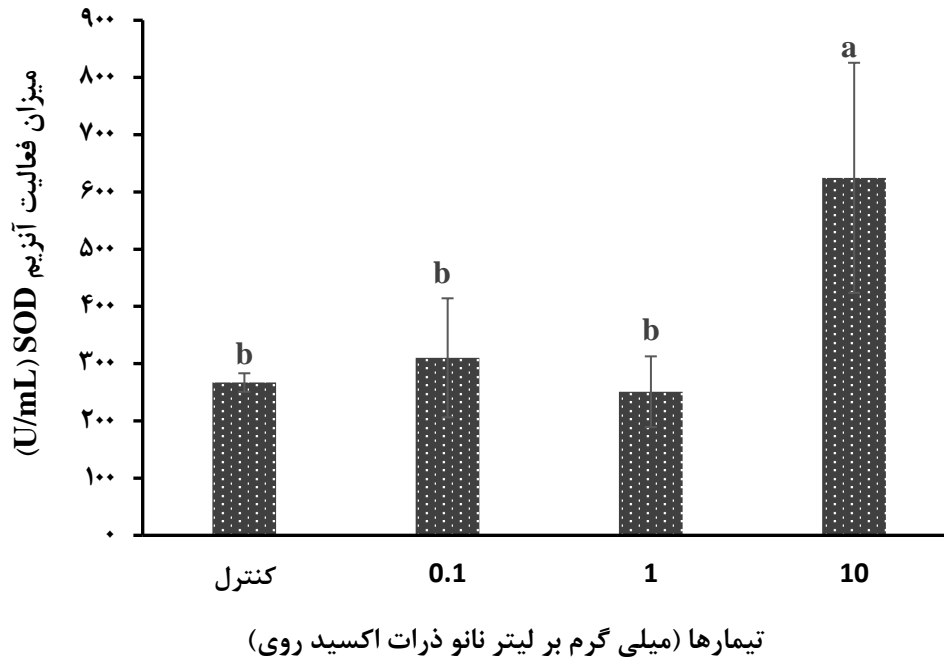


شکل ۲ تغییرات رنگدانه‌های فتوسنتزی در جلبک *Dunaliella salina* در مواجهه با ZnO-NP.

### فعالیت آنزیم های ضد اکسایشی

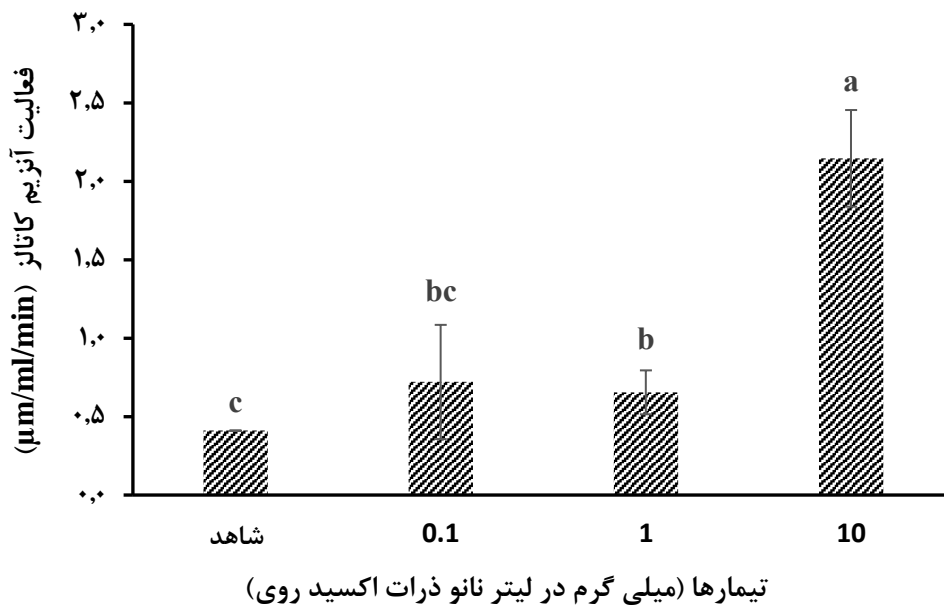
نتایج مربوط به فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) در جلبک *D. salina* مواجه شده با ZnO-NP در نمودار ۳ آورده شده است. براساس نتایج به دست آمده، در تیمار

۱۰ میلی گرم در لیتر فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز به طور معنی دار بیش از دیگر تیمارها و شاهد بود ( $p < 0.05$ ) اما تیمارهای ۰/۱ و ۱ میلی گرم در لیتر اختلاف معنی داری با شاهد نشان ندادند ( $p > 0.05$ ).



شکل ۳ میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) در جلبک *Dunaliella salina* در مواجهه با ZnO-NP.

نتایج مربوط به آنزیم کاتالاز در جلبک *D. salina* مواجه شده با نانو ذره اکسید روی در نمودار ۴ آورده شده است. براساس نتایج، فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار ۰/۱ میلی گرم در لیتر اختلاف معنی دار با شاهد نداشت ( $p > 0.05$ )، اما تیمارهای ۱ و ۱۰ میلی گرم در لیتر اختلاف معنی داری با شاهد نشان دادند ( $p < 0.05$ ). با افزایش غلظت نانو ذرات اکسید روی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز افزایش یافت و بیشترین مقدار در تیمار ۱۰ میلی گرم در لیتر مشاهده شد.



شکل ۴ میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در جلبک *Dunaliella salina* در مواجهه با ZnO-NP.

Cardoso و همکاران (۲۰۱۴) براساس تحقیق (2015). براساس تحقیق Cardoso و همکاران (۲۰۱۴) جلبک *D. salina* تحت تأثیر نانو ذرات جیوه در محیط کشت خود قرار گرفته و توانایی جذب و انتقال جیوه تجمع یافته به سطوح بالایی تغذیه را دارد. Harja و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند که با افزایش غلظت نانو ذرات در محیط کشت جلبک میزان جذب و تجمع نانو ذرات در جلبک افزایش می‌یابد که هم‌راستا با مطالعه حاضر است. براساس یافته‌های تحقیق حاضر، بیشترین فعالیت آنزیم SOD در بالاترین غلظت نانو ذره‌ی اکسیدروی مشاهده شد و در تیمارهای ۰/۱ و ۱ تفاوتی با شاهد مشاهده نشد. همچنین، فعالیت آنزیم CAT نیز با افزایش غلظت نانو ذرات اکسید روی روند افزایشی را نشان داد. بالاترین غلظت نانو ذره‌ی اکسیدروی (۱۰ میلی گرم در لیتر)، بیشترین تأثیر را در افزایش فعالیت این آنزیم‌ها داشته است. یاخته‌ها آنزیم‌های ضد اکسایشی SOD و CAT را به عنوان یک دستگاه دفاعی برای محافظت در برابر استرس اکسیداتیو آزاد می‌کنند. مشابه یافته‌های تحقیق حاضر، در تحقیق Li و همکاران، (۲۰۱۵)، افزایش فعالیت CAT و SOD در جلبک‌های دریایی *Karenia brevis* در معرض نانوذرات TiO<sub>2</sub> مشاهده شد. جلبک که تولید کننده اصلی در زنجیره غذایی آبزیان است، نقش عمده‌ای در حفظ و تعادل بوم سازگان آبی ایفا می‌کند. کاهش رشد جلبک و میزان کلروفیل می‌تواند به‌طور مستقیم تأثیر آلاینده‌ها در سازگان آبی را منعکس کند (Ji et al. 2011). میزان رشد،

#### بحث

در مطالعه حاضر تأثیر نانو ذرات اکسید روی با غلظت‌های مختلف بر جلبک *D. salina* بررسی شد و نتایج نشان داد که نانو ذرات اکسیدروی بر انباشت زیستی، فعالیت رنگدانه‌های فتوسنتزی و آنزیم‌های ضد اکسایشی کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز جلبک *D. salina* تأثیرگذار است. همان‌طور که در نمودار ۱ مشاهده شد، با افزایش میزان غلظت نانو ذره اکسید روی در محیط کشت، میزان تجمع عنصر روی در جلبک *D. salina* افزایش می‌یابد. با توجه به نتایج به دست آمده، افزایش وابسته به غلظت در جذب ذرات ZnO در یاخته‌های جلبکی مشاهده شد، به طوری که بیشترین مقدار تجمع در تیمار ۱۰ میلی گرم در لیتر و کمترین در ۰/۱ میلی گرم در لیتر بود. برای بررسی سمیت نانو ذرات ضروری است تا از جلبک‌ها به عنوان یک مدل زیستی استفاده شود (Wang et al. 2019). توانایی جذب سطحی جلبک‌ها در مطالعات مختلف بررسی شده است. جلبک *Chlorella vulgaris* مواجهه شده با ۲ mg/L از نانو ذره جیوه به مدت ۴ ساعت توانایی جذب ۱۲۰۰-۳۳۰۰ میکروگرم بر گرم وزن خشک را نشان داد (Kalman et al. 2015). در حالی که جلبک *Raphidocelis subcapitata* زمانی که در معرض ۱۵-۳۰ میکروگرم در لیتر نانو ذرات جیوه به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت، توانست ۹۳/۷-۴۵ میکروگرم بر گرم وزن خشک جلبک نانو ذره جذب کند (Ribeiro et al.).



یاخته‌های جلبک مشاهده نشده است و جلبک رشد بیشتری تا غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر داشته است. از طرف دیگر، افزایش مقدار کاروتنوئیدها تا غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر احتمالاً یکی از روش‌های دفاعی در این ریزجلبک بوده است. در مقابل، Gang و همکاران (۲۰۱۹) و Silva و همکاران (۲۰۲۰) کاهش رشد و رنگدانه کلروفیل جلبک‌های مواجه شده با نانو ذرات را به دلیل کاهش فتوسنتز گزارش کردند. یون‌های مس رها شده از نانو ذرات با کاهش مهار آب از فتوسیستم دو بر روی فتوسنتز جلبک تأثیر می‌گذارد. به علاوه، با حضور نانو ذره اکسید مس میزان مواد فتوشیمیایی فتوسیستم دو کاهش می‌یابد.

در جمع‌بندی می‌توان بیان کرد که نانوذرات اکسید روی بر میزان انباشت زیستی عنصر روی در جلبک *D. salina* تأثیر گذار بوده و با افزایش غلظت نانو ذره اکسیدروی در محیط کشت جلبک، میزان انباشت زیستی نیز در جلبک افزایش می‌یابد. رنگدانه‌های فتوسنتزی (کلروفیل a، کلروفیل b و کل رنگدانه‌ها) نیز به حضور نانو ذرات اکسید روی در محیط کشت جلبک واکنش نشان دادند و غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر نانو ذرات اکسید روی بیشترین تأثیر افزایشی را داشت. علاوه بر این، غلظت بالای این نانو ذره با تأثیر بر ترکیبات بیوشیمیایی جلبک *D. salina*، باعث افزایش فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز در جلبک شد.

#### منابع

Ates, M., Daniels, J., Arslan, Z., Farah, I.O., Rivera, H.F. 2013a. 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 & Impacts 15: 225-233.

Ates, M., Daniels, J., Arslan, Z., Farah, I.O. 2013b. Effects of aqueous suspensions of titanium dioxide nanoparticles on *Artemia salina*: assessment of nanoparticle aggregation, accumulation, and toxicity. Environmental Monitoring and Assessment 185: 3339-3348.

تقسیمات یاخته ای و کلروفیل از مهم‌ترین شاخص‌های فیزیولوژیک هستند که در علم سم شناسی برای ارزیابی خطر سموم در محیط استفاده می‌شوند (Kastori et al. 1998). پنج نوع کلروفیل a, b, c, d, و e در جلبک‌ها وجود دارد (Nkechinyere and Ugochi, 2011). کلروفیل رنگدانه سبز موجود در گیاهان است که به جذب نور خورشید و تبدیل آن به انرژی کمک می‌کند. این ماده به عنوان یک عامل ضد اکسایش قوی باعث کاهش تخریب یاخته‌ها توسط عوامل سرطان‌زای محیطی می‌شود. کاهش زنده‌مانی یاخته‌ها به دلیل به دام افتادن و جذب نانو ذره است که دسترسی به نور را کاهش داده و جذب مواد مغذی رو را محدود کرده است (Wang et al. 2012). Dash و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که برهمکنش نانوذرات با اجزای یاخته‌ای باعث تغییر در فعالیت آنزیم‌های فتوسنتزی و کاهش میزان کلروفیل می‌شود. مطالعه Wang و همکاران (۲۰۱۶b) نشان داد که تخریب دیواره یاخته‌ای نقش مهمی در سمیت نانوذرات  $TiO_2$  در جلبک *Phaeodactylum tricornutum* ایفا می‌کند. همچنین دیواره یاخته‌ای 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 به‌طور مستقیم از غشای یاخته‌ای عبور کنند و وارد آن شوند (Navarro et al. 2008; Chang et al. 2012; Dash et al. 2012). بر اساس نتایج مطالعه حاضر به نظر می‌رسد تا غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر نانوذرات اکسید روی آسیب منجر به تخریب دیواره یاخته‌ای و اختلال در عملکرد

Bhuvaneshwari, M., Iswarya, V., Archana, S., Madhu, G.M., Kumar, G.S., Nagarajan, R., Mukherjee, A. 2015. Cytotoxicity of ZnO NPs towards fresh water algae *Scenedesmus obliquus* at low exposure concentrations in UV-C, visible and dark conditions. Aquatic Toxicology 162: 29-38.

Bondarenko, O.M., Heinlaan, M., Sihtmäe, M., Ivask, A., Kurvet, I., Joonas, E., Kahru, A. 2016. Multilaboratory evaluation of 15 bioassays for (eco) toxicity screening and hazard ranking of engineered nanomaterials: FP7 project

- NANOVALID. *Nanotoxicology* 10: 1229-1242.
- Bundschuh, M., Seitz, F., Rosenfeldt, R.R., Schulz, R. 2016. Effects of nanoparticles in fresh waters: risks, mechanisms and interactions. *Freshwater Biology* 61: 2185-2196.
- Cimen, I.C.C., Danabas, D., Ates, M. 2020. Comparative effects of Cu (60-80 nm) and CuO (40 nm) nanoparticles in *Artemia salina*: Accumulation, elimination and oxidative stress. *Science of the Total Environment* 717: 137-230.
- Cardoso, P.G., Pereira, E., Duarte, A.C., Azeiteiro, U.M. 2014. Temporal characterization of mercury accumulation at different trophic levels and implications for metal biomagnification along a coastal food web. *Marine Pollution Bulletin* 87: 39-47.
- Chang, Y. N., Zhang, M., Xia, L., Zhang, J., Xing, G. 2012. The toxic effects and mechanisms of CuO and ZnO nanoparticles. *Materials* 5: 2850-2871.
- Dalai, S., Pakrashi, S., Nirmala, M. J., Chaudhri, A., Chandrasekaran, N., Mandal, A.B., Mukherjee, A. 2013. Cytotoxicity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles and their detoxification in a freshwater system. *Aquatic Toxicology* 138: 1-11.
- Dash, A., Singh, A.P., Chaudhary, B.R., Singh, S.K., Dash, D. 2012. Effect of silver nanoparticles on growth of eukaryotic green algae. *Nano-micro-Letters* 4: 158-165.
- Dontsova, T.A., Nahirniak, S.V., Astrelin, I.M. 2019. Metaloxide nanomaterials and nanocomposites of ecological purpose. *Journal of Nanomater.* 2020: 5942194.
- Fanta, E., Rios, F.S.A., Romão, S., Vianna, A.C.C., Freiburger, S. 2003. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54: 119-130.
- Fazilian, N., Yousefzadi, M. 2018. Investigating the toxicity of zinc oxide nanoparticles on growth and oxidative stress in *Nannochloropsis oculata* algae. *Journal of Aquatic Ecology* 7: 1-6
- Gang, M., Vyas, S. 2019. Heavy metal remediation by nanosorbents: A short review. *Research and Reviews: Journal of Chemistry* 8: 15-19.
- Giordano, M., Pezzoni, V., Hell, R. 2000. Strategies for the allocation of resources under sulfur limitation in the green alga *Dunaliella salina*. *Plant Physiology* 124: 857-864.
- Handy, R.D., Shaw, B.J. 2007. Toxic effects of nanoparticles and nanomaterials: implications for public health, risk assessment and the public perception of nanotechnology. *Health, Risk & Society* 9: 125-144.
- Handy, R. D., Owen, R., Valsami-Jones, E. 2008. The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicology* 17: 315-325.
- Harja, M., Buema, G., Bulgariu, L., Bulgariu, D., Sutiman, D. M., Ciobanu, G. 2015. Removal of cadmium (II) from aqueous solution by adsorption onto modified algae and ash. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 32: 1804-1811.
- Hosseini Tafreshi, A., Shariati, M. 2009. *Dunaliella* biotechnology: methods and applications. *Journal of Applied Microbiology* 107: 14-35.
- Kalman, J.; Kai, B.P., Khan, F.R., Stone, V., Fernandes, T.F. 2015. Characterization of bioaccumulation dynamics of three differently coated silver nanoparticles and aqueous silver in a simple freshwater food chain. *Environmental Chemistry* 12: 662-672.
- Ji, J., Long, Z., Lin, D. 2011. Toxicity of oxide nanoparticles to the green algae *Chlorella sp.* *Chemical Engineering Journal* 170: 525-530.
- Kastori, R., Plesničar, M., Sakač, Z., Panković, D., Arsenijević-Maksimović, I. 1998. Effect of excess lead on

- sunflower growth and photosynthesis. *Journal of Plant Nutrition* 21: 75-85.
- Kono, Y. 1978. Generation of superoxide radical during autoxidation of hydroxylamine and an assay for superoxide dismutase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 186: 189-195.
- Li, F., Liang, Z., Zheng, X., Zhao, W., Wu, M., Wang, Z. 2015. Toxicity of nano-TiO<sub>2</sub> on algae and the site of reactive oxygen species production. *Aquatic Toxicology* 158: 1-13.
- Lichtenthaler, H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In *Methods in Enzymology* 148: 350-382. Academic Press.
- Lowry O.H., Lopez J.A. 1946. The determination of inorganic phosphate in the presence of labile phosphate esters. *Journal of Biological Chemistry* 162: 421-428.
- Mohammadi, S., Ahmadifard, N., Atashbar, B., Nikoo, A., Manaffar, R. 2021. Long-term effect of zinc oxide nanoparticles on population growth, reproductive characteristics and zinc accumulation of marine rotifer, *Brachionus plicatilis*. *International Journal of Aquatic Biology* 9: 333-343
- Navarro, E., Baun, A., Behra, R., Hartmann, N.B., Filser, J., Miao, A.J., Sigg, L. 2008. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology* 17: 372-386.
- Nahali, S., Ahmadifard, N., Agh, N., Samadi, N. 2018. Effect of zinc-enriched *Dunaliella salina* on growth, survival and reproduction performance of *Artemia parthenogenetica* around the Urmia Lake. *Aquaculture Sciences* 6: 1-10.
- Nkechinyere Onyekwere, N., Ugochi Elizabeth, O. 2011. Phycological Effects of Eutrophication with Fertilizers in Nike Lake, Nigeria. *Journal of Water Resource and Protection* 3: 856-860
- OECD. 1984. Organization for Economic Cooperation and Development. Alga, growth inhibition test. OECD Guidelines for Testing of Chemicals 1: 1-14.
- Prabhu, S., Poulouse, E.K. 2012. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International nano letters* 2: 1-10.
- Ribeiro, F., Gallegourrea, J.A., Goodhead, R.M., Van Gestel, C.A., Moger, J., Soares, A.M., Loureiro, S. 2015. Uptake and elimination kinetics of silver nanoparticles and silver nitrate by *Raphidocelis subcapitata*: The influence of silver behavior in solution. *Nanotoxicology* 9: 686-695.
- Silva, L.P., da Rocha Vaz, G.M., Pupe, J.M., Chafran, L.S., Neto, L.A.A., Santiago, T.R., Polez, V.L.P. 2020. Green nanoparticles for biomedical and bioengineering applications. *Nanoparticles and their Biomedical Applications* 1: 225-262.
- Shukla, D., Saxena, S., Purushothaman, J., Shrivastava, K., Singh, M., Shukla, S., Bansal, A. 2011. Hypoxic preconditioning with cobalt ameliorates hypobaric hypoxia induced pulmonary edema in rat. *European Journal of Pharmacology* 656: 101-109.
- Wan, J.K., Chu, W.L., Kok, Y.Y., Cheong, K.W. 2018. Assessing the toxicity of copper oxide nanoparticles and copper sulfate in a tropical chlorella. *Journal of Applied Phycology* 30: 3153-3165.
- Wang, F., Guan, W., Xu, L., Ding, Z., Ma, H., Ma, A., Terry, N. 2019. Effects of nanoparticles on algae: Adsorption, distribution, ecotoxicity and fate. *Applied Sciences* 9: 1-14.
- Wang, Y., Zhu, X., Lao, Y., Lv, X., Tao, Y., Huang, B., Cai, Z. 2016a. TiO<sub>2</sub> nanoparticles in the marine environment: physical effects responsible for the toxicity on algae *Phaeodactylum tricorutum*. *Science of the Total Environment* 565: 818-826.

- Wang, S., Lv, J., Ma, J., Zhang, S. 2016b. Cellular internalization and intracellular biotransformation of silver nanoparticles in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nanotoxicology* 10: 1129-1135.
- Wang, N.X., Zhang, X.Y., Wu, J., Xiao, L., Yin, Y., Miao, A.J., Yang, L.Y. 2012. Effects of microcystin-LR on the metal bioaccumulation and toxicity in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Water Research* 46: 369-377.
- Yilancioglu, K., Cokol, M., Pastirmaci, I., Erman, B., Cetiner, S. 2014. Oxidative stress is a mediator for increased lipid accumulation in a newly isolated *Dunaliella salina* strain. *PLoS One* 9: 91957.
- Zhou, Q.C., Buentello, J.A., Gatlin III, D.M. 2010. Effects of dietary prebiotics on growth performance, immune response and intestinal morphology of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture* 309: 253-257.