مجله بوم شناسی آبزیان

ویژه نامه اولین همایش ملی زیست فناوری دریـا

بررسی سمیت نانوذرات اکسید روی بر رشد و تنش اکسیداتیو در جلبک نانوکلروپسیس اکولاتا (*Nannochloropsis oculata*)

نسرین فاضلیان[۱]، مرتضی یوسف زادی[۲*]، علی موافقی[۱]

[۱] دانشگاه تبریز، دانشکده علوم طبیعی، زیست گیاهی، فیزیولوژی گیاهی

[۲] دانشگاه هرمزگان، دانشکده علوم و فنون دریایی، زیست دریا

نوع مقاله:
پژوهشی

کلمات کلیدی:
تنش اکسیداتیو
رشد
نانو ذره اکسید روی
نانوکلروپسیس

چکیده

نانوذرات اکسید روی، ترکیبات ضد میکروبی مهمی هستند که کاربرد وسیعی در مصارف صنعتی دارند. استفاده از نانوذرات منجر به رهائی آنها در محیط می‌گردد و می‌تواند تهدیدی برای ریزجلبک‌هائی باشد که نقش مهمی در اکوسیستم آبی ایفاء می‌کنند. در این پژوهش، برهمکنش غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید روی (۰، ۵، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/L) با جلبک *N. oculata* بررسی شده است. نتایج نشان داد درصد زنده مانی و مقدار کلروفیل a در پاسخ به نانوذرات اکسید روی به طور معنی داری کاهش یافته است. مقدار مالون دآلدئید و فعالیت آنزیم کاتالاز افزایش یافته است در حالیکه میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز با افزایش غلظت نانوذرات اکسید روی در سلول های *N. oculata* کاهش یافته است. همچنین افزایش مقدار کارتنوئیدها احتمالا یکی از روش های دفاعی در این ریزجلبک می‌باشد.

مقدمــه

توسعه فناوری نانو و ورود نانوساختارها به محصولات تجاری باعث تولید گسترده این ترکیبات و ورود آنها به محیط زیست، به ویژه اکوسیستم‌های آب شیرین و دریا می‌گردد. 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 (فرجی و فدوی، ۱۳۹۲). ریزجلبک‌های جنس نانوکلروپسیس از خانواده Eustigmataceae، دارای شش گونه می‌باشند و گونه شاخص در بین آنها *N. oculata* است. همه گونه‌های متعلق به جنس نانوکلروپسیس، تک سلولی و کوچک بوده و قطر آنها تقریبا ۴-۲ میکرومتر و غیر متحرک هستند (Krienitz and Wirth, 2006). نانوکلروپسیس به دلیل داشتن مقدار زیاد اسیدهای چرب به خصوص ایکوزاپنتائنوئیک اسید (EPA)، به عنوان ماده غذایی برای روتیفر و ماهیان مورد استفاده قرار می‌گیرد (Krienitz and Wirth, 2006).

در بین نانوذرات اکسید فلزی، پایداری شیمیایی و جذب بالای نانوذرات اکسید روی (ZnO NPs) باعث کاربرد وسیع آنها در محصولات صنعتی مانند ضدآفتاب‌ها، پوشش‌ها و رنگ‌ها گردیده است (Osmand-McLeod *et al.*, 2013). Franklin و همکاران در سال ۲۰۰۷ سمیت نانوذرات اکسید روی بر روی *P. subcapita* بررسی کرده‌اند. در مطالعات دیگر، سمیت نانوذرات ZnO، TiO_2 و CuO بر جلبک *P. subcapitata* بررسی شده است و در این بررسی، نانوذرات اکسید روی بسیار

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: morteza110110@gmail.com

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2025-06-25]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1396.7.0.1.4]

سمی‌تر از CuO و TiO_2 گزارش شده است. به طور کلی نانوذرات اکسید فلزی معمولا اثرات سمیت متفاوتی دارند و سمیت آنها به ساختار نانو، نسبت سطح به حجم و ماهیت بخش فلزی آنها بستگی دارد (Pendashteh *et al*., 2013).

در مطالعات مربوط به نانوذرات روی، معمولا غلظت یون‌های روی رها شده از اکسید روی تعیین می‌شود و سمیت نانوذرات اکسید روی معمولا از طریق میزان یون روی حل شده تعیین می‌گردد. یون‌های روی با القای تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) باعث القای تنش اکسیداتیو و تخریب سلول جلبکی می‌گردند (Aruoja *et al*., 2009). جلبک‌ها برای تعدیل این تنش، دفاع آنتی اکسیداتیو از جمله تغییر در میزان ترکیبات آنتی اکسیدان غیر آنزیمی (کارتنوئیدها، گلوتاتیون، ترکیبات فنولیکی، آسکوربیک اسید و α-توکوفرول) و آنزیمی (CAT، SOD، APX، GPX وGR) را در پیش می‌گیرند. تاکنون تاثیر نانوذرات بر مسیراکسیداتیو جلبک نانوکلروپسیس بررسی نشده است اما در سال ۲۰۰۳ تاثیر فلز سنگین کادمیوم بر جنبه های اکسیداتیو جلبک *N. oculata* مطالعه شده است، در این مطالعات کادمیوم باعث القای تنش اکسیداتیو شامل پراکسیداسیون لیپیدها، تولید پراکسید هیدروژن و تغییر فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان گردیده است (Lee and Shin, 2003). تاثیر نانوذرات اکسید روی بر رشد ریزجلبک های *P. subcapitata*، *C. vulgaris* و *D. salina* بررسی شده است (Manzo *et al*., 2011; Suman *et al*., 2015; Franklin *et al*., 2007; Pendashteh *et al*., 2013). در حالیکه تاثیر این نانو ذره بر رشد و تنش اکسیداتیو جلبک *N. oculata* مطالعه نشده است. با توجه به اهمیت این جلبک در تولید بیودیزل و تغذیه ماهیان و روتیفرها، در این پژوهش تاثیر نانوذرات اکسید روی بر رشد و القای تنش اکسیداتیو در جلبک *N. oculata* بررسی گردیده است.

مواد و روش ها

کشت جلبک در ارلن و اعمال تیمارها

ریزجلبک مورد آزمایش در این پژوهش، نانوکلروپسیس اکولاتا (*N. oculata*) بود که نمونه استوک آن از پژوهشکده اکولوژی بندرعباس تهیه گردید. در پژوهش حاضر ارلن‌هایی حاوی ۴۰۰ سی‌سی نمونه جلبکی با تراکم اولیه ۴×۱۰^{۴} آماده شدند و به مدت ۴ روز در شرایط آزمایشگاه قرار گرفتند تا به مرحله رشد لگاریتمی برسند. سپس در روز چهارم تیمارهای نانوذرات با پنج غلظت مختلف (۰، ۵، ۱۰، ۵۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ mg/L) انجام شد. برای هر تیمار، ۳ تکرار در نظر گرفته شد و مدت زمان تیمار نانوذرات ۳ روز بود که روزانه جذب نمونه‌ها و شمارش جلبکی انجام گرفت. به منظور جلوگیری از رسوب نانوذرات از دستگاه سونیکاتور و شیکر استفاده گردید.

اندازه‌گیری رنگیزه‌های فتوسنتزی

جهت تعیین میزان کلروفیل و کارتنوئیدها، سوسپانسیون جلبکی به مدت ۱۰ دقیقه با rpm ۳۰۰۰ و دمای ۴- درجه سانتی گراد سانتریفیوژ گردید و به رسوب باقی مانده، یک میلی لیتر استون ۸۵٪ اضافه شد. نمونه ها به مدت ۲۴ ساعت درون یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. پس از سانتریفیوژ نمونه‌ها، جذب محلول رویی در طول موج های ۶۴۷، ۶۶۴ و ۴۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید و میزان کلروفیل و کارتنوئید برحسب میلی گرم بر گرم وزن تر گزارش گردید (Jeffrey and Humphrey, 1975).

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) و آسکوربات پراکسیداز (APX)

فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از روش Dehindsa و همکاران در سال ۱۹۸۱ مورد بررسی قرار گرفت. مخلوط واکنش شامل عصاره آنزیمی، بافر فسفات ۰/۱ مولار (pH = ۷,۰) و پراکسید هیدروژن ۱۴ میلی مولار بود. مصرف پراکسید هیدروژن در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت ۲ دقیقه با اسپکتروفتومترخوانده شد و فعالیت آنزیم برحسب واحد آنزیمی بر میلی گرم پروتئین گزارش گردید. فعالیت آنزیم AXP مطابق با روش Nakano وAsada (۱۹۸۹)، مورد سنجش قرار گرفت. بافرهای سنجش آنزیم APX شامل محلول بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (pH= 7/2) و بافر اندازه گیری حاوی بافر پتاسیم فسفات،۰/۱ EDTA میلی مولار، آسکوربیک اسید ۰/۵ میلی مولار و پراکسید هیدروژن ۱۰ میلی مولار است. سرعت واکنش آنزیمی به صورت تغییرات جذب بر زمان (OD/min) در طول موج ۲۹۰ نانومتر برای ۱ دقیقه ثبت شد. در نهایت میزان فعالیت آنزیم با ضریب خاموشی (۲/۸ mM^{-1}/cm^{-1}) برحسب واحد آنزیمی بر میلی گرم پروتئین محاسبه گردید.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2025-06-25]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1396.7.0.1.4]

اندازه‌گیری محتوای پراکسیداسیون لیپیدی

به منظور سنجش غلظت MDA به عنوان شاخص واکنش پراکسیداسیون لیپیدها، از روش هیت و پاکر (Heath and Packer, 1968) استفاده گردید. طبق این روش ۰/۱ گرم رسوب جلبکی در ۱ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۵ ٪ حل شد و پس از سانتریفیوژ نمونه ها، محلول تیوباربیتوریک اسید ۰/۵٪ (تری‌کلرواستیک اسید ۲۰٪) به محلول روئی اضافه گردید. مخلوط برای ۳۰ دقیقه در بن ماری ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده و بلافاصله در ظرف یخ برای چند دقیقه قرار گرفت و سپس به مدت ۵ دقیقه در ۳۰۰۰ دور مجددا سانتریفیوژ شد تا محلول شفاف به دست آید. جذب روشناور در ۵۳۲ نانومتر اندازه‌گیری شد و جذب بقیه رنگیزه‌های غیر اختصاصی در ۶۰۰ نانومتر قرائت و از میزان جذب در ۵۳۲ کسر شد. برای محاسبه غلظت مالون دآلدئید از ضریب خاموشی معادل $155\ mM^{-1}cm^{-1}$ استفاده گردید.

آنالیز آماری

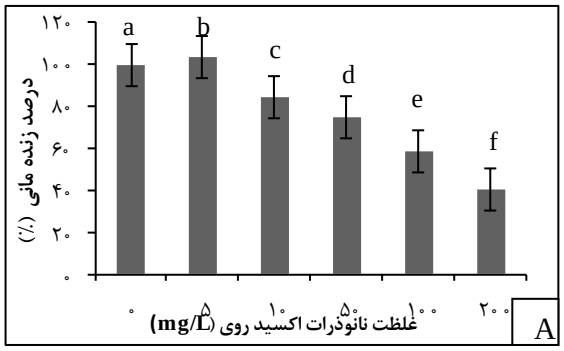
آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی و با ۳ تکرار انجام شد. برای آنالیز داده ها از آزمون ANOVA استفاده گردید و مقایسه میانگین ها در سطح احتمال ۵ درصد و با استفاده از آزمون دانکن صورت گرفت. برای رسم نمودار از نرم افزار Excel استفاده شد.

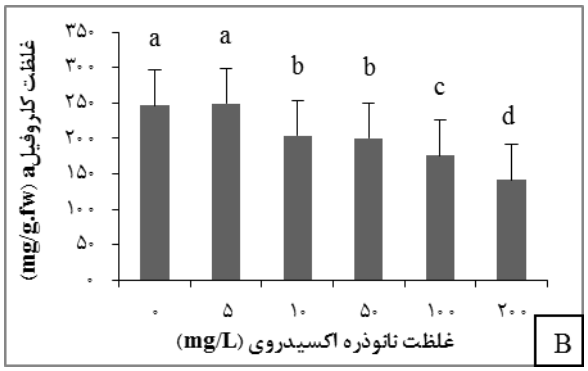
نتایج و بحث

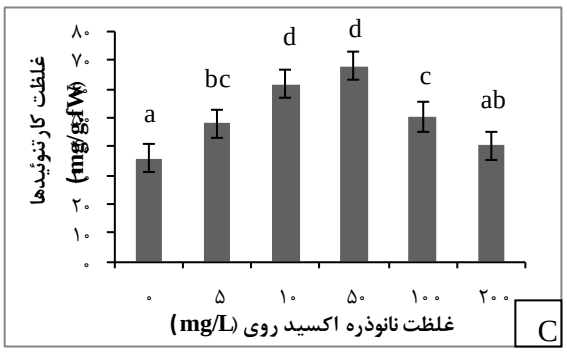
تاثیر نانوذره اکسید روی بر رشد، میزان کلروفیل و کارتنوئید

مطابق با شکل (A.۱)، تاثیر نانوذره اکسید روی بر رشد جلبک نانوکلروپسیس معنی دار بوده است و افزایش غلظت نانوذره باعث کاهش رشد جلبک شده است. تیمار نانوذره اکسید روی (۱۰-۲۰۰mg/L) باعث کاهش معنی دار زنده مانی جلبک شده است در حالی که غلظت ۵ میلی گرم بر لیتر آن افزایش معنی داری نسبت به نمونه های شاهد ایجاد کرده است.

همچنین غلظت های ۱۰ تا ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر نانوذره اکسید روی باعث کاهش معنی دار کلروفیل a نسبت به کنترل شده است. در صورتی که غلظت ۵ میلی گرم بر لیتر تغییر معنی داری در مقدار کلروفیل a ایجاد نکرده است (شکل B.۱).







شکل ۱. تاثیر نانوذره اکسید روی بر رشد (A)، کلروفیل (B) و کارتنوئیدهای (C) جلبک *N. oculata* ($P< 0.05$).

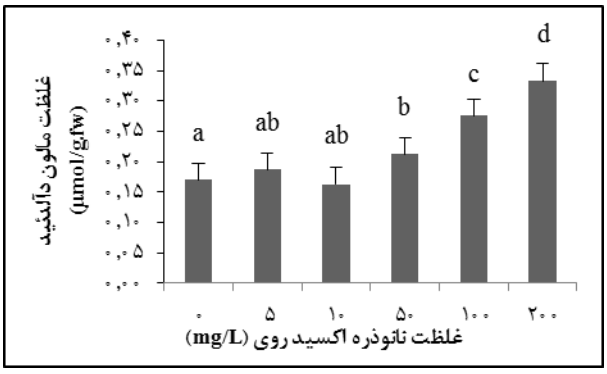
[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2025-06-25]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1396.7.0.1.4]

غلظت های بالای نانوذرات اکسید روی می توانند باعث کاهش رشد ریزجلبک‌ها گردند. بازدارندگی رشد نانوذرات می تواند به دلیل کاهش میزان کلروفیل باشد، چون کاهش کلروفیل باعث کاهش میزان فتوسنتز و در نهایت باعث کاهش رشد ریزجلبک می‌گردد (Aruoja *et al.*, 2009). Suman و همکاران در سال ۲۰۱۵ گزارش کرده‌اند غلظت ۳۰۰-۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات اکسید روی باعث کاهش میزان زنده مانی جلبک کلرلا ولگاریس می‌گردند که مشابه نتایج ما می‌باشد. نتایج آنالیز واریانس داده‌ها نشان می‌دهد که نانوذره اکسید روی باعث افزایش معنی‌دار مقدار کاروتنوئیدهای جلبک نانوکلروپسیس نسبت به نمونه‌های شاهد شده است. با توجه به شکل (۱ .C)، بیشترین میزان کاروتنوئید در غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر نانوذره اکسید روی (۶۸/۰۱۸) و کمترین میزان آن در نمونه کنترل (۳۶/۰۰۱۳) مشاهده گردید. کارتنوئیدها یکی از ترکیبات آنتی اکسیدانت غیرآنزیمی هستند که از طریق جاروب کردن رادیکال‌های آزاد، مهار پراکسیداسیون لیپیدها و حفاظت از دستگاه فتوسنتزی نقش مهمی در دفاع در برابر تنش اکسیداتیو در موجودات فتوسنتز کننده ایفاء می‌کنند (Wang *et al.*, 2016). افزایش میزان کارتنوئیدهای ریزجلبک *N. oculata* در پاسخ به نانوذرات اکسید روی مشابه نتایج Wang و همکاران (۲۰۱۶) می‌باشد.

تاثیر نانوذرات اکسید روی بر مقدار مالون د آلدئید

در تیمار نانوذره اکسید روی، غلظت های ۱۰ تا ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر باعث افزایش معنی دار مقدار مالون دآلدئید شده است اما در غلظت ۵ و ۱۰ میلی گرم بر لیتر تغییر معنی داری نسبت به شاهد مشاهده نگردیده است (شکل ۲). بیشترین مقدار مالون دآلدئید در غلظت ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر (۰/۳۳۳۳) و کمترین مقدار آن در نمونه شاهد (۰/۱۶۹۹) مشاهده گردید. تنش اکسیداتیو فرایندی است که در اثر افزایش غیر قابل کنترل ROS طی رشد گیاه ایجاد می‌گردد. پراکسیداسیون لیپیدها یکی از شاخص‌های تنش اکسیداتیو می‌باشد که با افزایش رادیکال های فعال و تخریب ساختار غشا در سطوح سمی سلول دیده می‌شود و محصول این فرایند، MDA می‌باشد. تشکیل پراکسیدهای لیپیدی معمولا به عنوان یک سیگنال تحریک‌کننده ژن‌های دفاعی جلبک می‌باشد (Lee and shin, 2003). افزایش تجمع مالون دآلدئید، محصول اصلی پراکسیداسیون لیپیدها، احتمالا نتیجه تنش نانوذرات اکسید روی در جلبک نانوکلروپسیس می‌باشد.



شکل ۲. تاثیر نانوذره اکسید روی بر میزان مالون دآلدئید جلبک *N. oculata*.

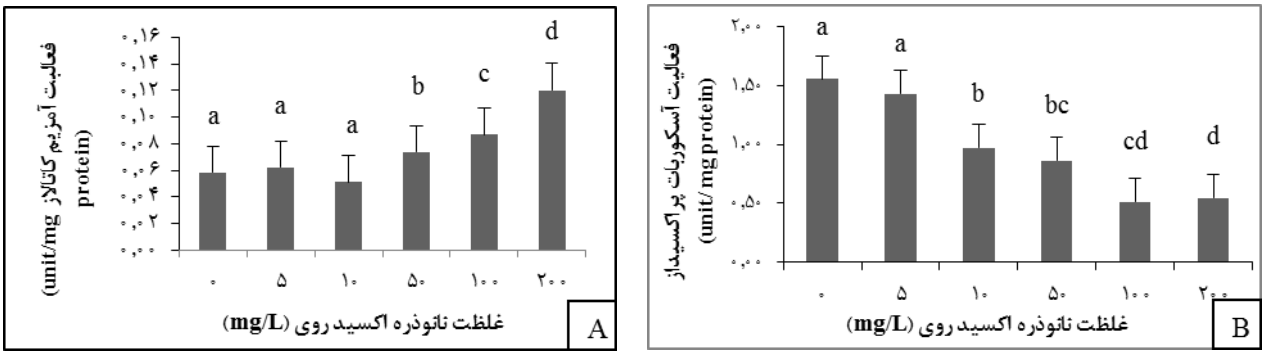
تاثیر نانوذره اکسید روی بر فعالیت آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز

با توجه به شکل (۳. A)، غلظت‌های ۱۰ تا ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر نانوذره اکسید روی باعث افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم کاتالاز شده است اما غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی گرم بر لیتر تغییر معنی داری ایجاد نکرده است. تیمار با نانوذرات اکسید روی منجر به افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز می شود و در نتیجه سطوح پراکسید هیدروژن (H_2O_2) کاهش می‌یابد که یک نقش کلیدی در تحمل تنش اکسیداتیو در ریزجلبک‌ها ایفا می‌کند. همچنین گزارش شده است که نانوذرات اکسید روی باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان کاتالاز و گایاکول پراکسیداز در جلبک کلرلا ولگاریس گردیده است (Chen *et al.*, 2012). همچنین تیمار نانوذره اکسید روی (۱۰ تا ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر) باعث کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم آسکوربات

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2025-06-25]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1396.7.0.1.4]

پراکسیداز شده است اما غلظت ۵ میلی گرم بر لیتر، تغییر معنی داری نسبت به نمونه های شاهد ایجاد نکرده است (شکل ۳. B). آنزیم آسکوربات پراکسیداز یکی از آنزیم های اکسیداتیو است که برای حذف H_2O_2 از آسکوربات به عنوان دهنده الکترون استفاده می‌کند و معمولا در کلروپلاست ها فعالیت بیشتری دارد (Donahue *et al*., 1997). کاهش معنی دار میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز نشان می‌دهد که این آنزیم نقش موثری در حذف H_2O_2 در جلبک نانوکلروپسیس ایفاء نمی‌کند.



شکل ۳. تاثیر نانوذره اکسید روی بر فعالیت کاتالاز (A) و آسکوربات پراکسیداز (B) جلبک *N. oculata*

منابـع

Aruoja, V., Dubourguier, HC., Kasemets, K., Kahru, A. 2009. "Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO_2 to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*". Science of the Total Environment. 407: 1461-1468.

Chen, X.X., Zhu, X., Li, R., Yao, H., Lu, Z., Yan, X. 2012. "Photosynthetic toxicity and oxidative damage induced by nano-Fe_3O_4 on *Chlorella vulgaris* in the aquatic environment". Open Journal of Ecology. 1: 21-28.

Dehindsa, R.S., Plumb-Dehindsa, P., 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. 2: 93-101.

Donahue, J.L., Okpodu, C.M., Gramer, C.L., Grabau, E.A., Alscher, R. 1997. Responses of antioxidant to paraquat in pea leaves. Journal of Plant Physiology. 113: 249-257.

Faraji, Gh., Fadavi, M. 2012. Application of magnetic nanoparticles in the field of food science and industry. Journal of Nutrition Sciences and Food Industry of Iran. 2: 239-252. (in Persian)

Franklin, N.M., Rogers, N.J., Apte, S.C. Batley, G.E., Gadd, G.E., Gasey, P.S. 2007. Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO, and $ZnCl_2$ to a freshwater microalgae (*Pseudokirchneriella subcapitata*): the importance of particles solubility. Environmental Science and Technology. 41: 8484-8490.

Heath, R.L., Packer, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplast, Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics. 125: 189-198.

Lee, M.Y., Shin, H.W. 2003. Cadmium-induced changes in antioxidant enzymes from the marine alga *Nannochloropsis oculata*. Journal of Applied Phycology.15(1): 13-19.

Jeffrey, S.W., Humphrey, G.F. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c_1 and c_2 in higher plants, algae, and natural phytoplankton. Biochemistry and physiology Pflanzen. 167: 191-194.

Manzo, S., Rocco, A., Carotenuto, R., Picione, Fde, L., Miglietta, M.L., Rametta, G., Di Francia, G. 2011. Investigation of ZnO nanoparticles' ecotoxicological effects towards different soil organisms. Environmental science and Pollition research. 18(5): 756-63.

Nakano, Y., Asada, K. 1989. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant and cell physiology. 22: 867-880.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2025-06-25]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1396.7.0.1.4]

Pendashteh, H., Shariati, F., Keshavarz, A., Ramzanpour, A. 2013. Toxicity of ZnO nanoparticles to *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus* algae species. World journal of fish and marine science. 5(5): 563-570.

Suman, T.Y., Radhika Rajasree, S.R., Kirubagaran, R. 2015. Evalution 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.

Wang, X., Yang, X., Chen, S., Li, Q., Wang, W., Hou, Ch., Gao, X., Wang, L., Wang, Sh. 2016. Zinc Oxide Nanoparticles Affect Biomass Accumulation and Photosynthesis in Arabidopsis. Frontiers in plant science. 6: 1-9.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2025-06-25]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1396.7.0.1.4]