14(2) 259-266, Summer 2022

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

Investigation the toxicity of silver nanoparticles on the growth, viability, and pigment content of *chlorella vulgaris*

Haniyeh Nikokherad [1], Abbas Esmaili Sari [2], Ali Mashinchian Moradi [*1], Nader Bahramifar [2], Pargol Ghavam Mostafavi [1]

[1] *Department of Marine Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran*
[2] *Department of Environmental Sciences, Faculty of Natural Resources, Tarbiat Modares University, Noor, Iran*

Key Words
Silver nanoparticles
Pigment content
Chlorella vulgaris
Growth factor
Cell viability

Abstract

Introduction: Nanotechnology is one of the emerging and advanced sciences that has been highly developed in recent years and has caused environmental pollution. Therefore, in this study, the toxicity of silver nanoparticles on the green alga Chlorella vulgaris was investigated.
Materials & Methods: *Chlorella vulgaris* cells were exposed to concentrations of 0, 0.005, 0.001, 0.05, 0.01, 0.5 and 0.1 mg / l silver nanoparticles over a period of 96 hours.
Results: The results showed that the cell density of *Chlorella vulgaris* decreased with increasing concentration of silver nanoparticles compared to the control group and even at the lowest concentration of 0.005 mg / l caused the cell growth inhibition ($p < 0.05$). With increasing concentration of silver nanoparticles, the survival rate decreased compared to the control group and did not change during the 96-hour period. The amount of chlorophyll a, b and total pigments in the concentrations of 0.05 and 0.1 mg / l and the duration of 24 hours were the highest, but the values of carotenoids showed the highest in 96 h and the concentration of 0.01 mg / l of silver nanoparticles.
Conclusion: Silver nanoparticles are highly toxic to *Chlorella vulgaris* and if silver nanoparticles are released, the production, survival and chlorophyll content of this microalgae, as one of the main primary producers in freshwater ecosystems, is damaged.

* Corresponding Author's email: ali2m@yahoo.com
Received: 23 March 2021; Reviewed: 29 April 2021; Revised: 3 July 2021; Accepted: 7 August 2021
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.294774.2585

مقاله پژوهشی

سمیت نانوذرات نقره بر فاکتورهای رشد، زنده‌مانی و محتوای رنگدانه‌ای در جلبک *Chlorella vulgaris*

هانیه نیکوخرد[۱]، عباس اسماعیلی‌ساری[۲]، علی ماشینچیان‌مرادی[۱*]، نادر بهرامی[۲]، پرگل قوام مصطفوی[۱]

[۱] گروه علوم دریایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[۲] گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

کلمات کلیدی

نانو ذرات نقره
محتوای رنگدانه‌ای
ریز جلبک کلرلا
فاکتور رشد
فاکتور زنده‌مانی

چکیده

مقدمه: نانوتکنولوژی یکی ازعلوم نوظهور و پیشرفته‌ای است که طی سال‌های اخیر بسیارتوسعه یافته وموجب آلودگی محیط‌زیست شده است. لذا در این‌مطالعه سمیت نانوذرات نقره بر روی جلبک سبز کلرلا *Chlorella vulgaris* مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: سلول‌های جلبکی کلرلا در یک‌دوره زمانی ۹٦ ساعت تحت تاثیر غلظت‌های ۰، ۰/۰۰۵، ۰/۰۰۱، ۰/۰۵، ۰/۰۱، ۰/۵ و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات نقره قرار گرفتند و فاکتورهای رشد، زنده‌مانی و محتوای رنگدانه‌ای سلول‌های جلبکی بررسی شد.

نتایج: میزان تراکم سلولی جلبک کلرلا با افزایش غلظت نانوذرات نقره نسبت به گروه شاهد کاهش داشت و حتی در کم‌ترین غلظت یعنی ۰/۰۰۵ میلی‌گرم بر لیتر نقش مهارکنندگی رشد سلول‌ها را داشته است ($p<0/05$). با افزایش غلظت نانوذرات نقره میزان زنده‌مانی در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافته و در طی دوره ۹٦ ساعته تغییری نکرده است. میزان رنگدانه کلروفیل a، b و کل در غلظت‌های ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر و مدت زمان ۲٤ ساعت بیش‌ترین مقدار را داشتند ولی مقادیر کارتنوئید بیش‌ترین مقدار را در زمان ۹٦ ساعت و غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات نقره نشان داد.

بحث و نتیجه‌گیری: نانوذرات نقره از سمیت بالایی برای جلبک‌کلرلا برخوردار هستند و درصورت انتشار درمحیط‌تولید، زنده‌مانی و محتوای کلروفیل ریزجلبک کلرلا به‌عنوان یکی از اصلی‌ترین تولیدکنندگان اولیه در اکوسیستم‌های آب‌شیرین آسیب می‌بینند.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول:ali2m@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۳ فروردین ۱٤۰۰؛ تاریخ داوری: ۹ اردیبهشت ۱٤۰۰؛ تاریخ اصلاح: ۱۲ تیر ۱٤۰۰؛ تاریخ پذیرش: ۱٦ مرداد ۱٤۰۰
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.294774.2585

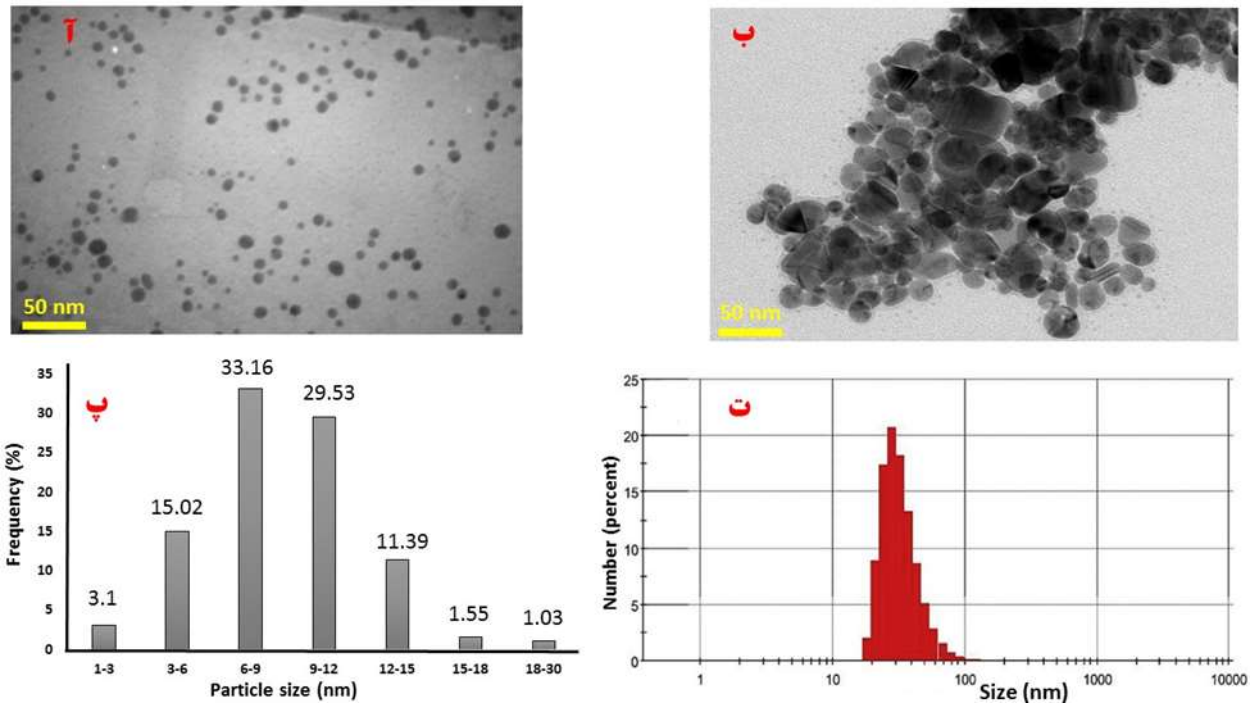
مقدمه

نانوتکنولوژی یکی از علوم بسیار پیشرفته‌ای است که در طی سال‌های اخیر توسعه چشمگیری را در همه ابعاد زندگی بشر تجربه کرده است (۱). استفاده از ذرات با اندازه در حد نانومتر خواص بی نظیری را به این نوع ترکیبات داده است که ازجمله آن‌ها می‌توان به ویژگی‌های ضدباکتریایی، قارچی و ویروسی و انتقال داروها و مواد اشاره نمود (۲). نانوذرات در حوزه علم نانوتکنولوژی به‌روش‌های مختلفی تولید می‌شوند که یکی از آن‌ها تولید به‌روش صنعتی است که طی آن با استفاده از فلزات مختلف اقدام به تولید انواعی از نانوذرات فلزی می‌کنند که می‌توان از نانوذرات نقره، آهن، مس، روی، طلا، اکسیدآهن و آلومینیوم نام برد (۳). نانوذرات نقره به‌شکل‌های مختلف جامد و کلوئیدی با اهداف گوناگون استفاده می‌شوند. استفاده از این نانوذرات در کنترل عوامل عفونی و باکتریایی در مواد غذایی و همین‌طور درمان بسیاری از بیماری‌ها مورد توجه زیاد قرار گرفته است (۴). همین عامل موجب گردیده است که امروزه طیف وسیعی از نانوذرات با کاربردهای بسیار متنوع در صنایع مختلف دارویی، پزشکی، کشاورزی و علوم غذایی استفاده شود و حجم زیادی از این ترکیبات به شکل کنترل نشده از طریق انواع فاضلاب‌های شهری، صنعتی، کارخانجات و کشاورزی روانه محیط زیست گردد (۵). نانو ذرات قادر هستند در محیط‌های آبی به شکل فعالی رهایش یافته و در بافت‌های مختلف گیاهی و جانوری تجمع یابند. نانوذرات نقره از این قابلیت برخوردارند که در اکوسیستم‌های آبی به‌واسطه یون نقره Ag^+ از غشاء یا دیواره سلولی عبور کرده و با برهم زدن تعادلات یونی داخل و بیرون سلولی باعث کاهش عملکرد و تولید سلول‌های جلبکی شوند (۶). در این بین اکوسیستم‌های آبی با توجه به حساسیت و شکنندگی بالایی که دارند بیش از سایر محیط‌های طبیعی در معرض خطر آلودگی‌های ناشی از نانوذرات نقره هستند (۷). علاوه بر این اکوسیستم‌های آبی به‌عنوان اصلی‌ترین مقصد تخلیه انواع فاضلاب‌های صنعتی و شهری هستند که خود نیز حاوی غلظت‌های بالایی از نانوذرات نقره هستند (۸). موجودات آبزی بسیار متنوعی در شاخه‌ها و رده‌های جانوری و گیاهی متعددی در اکوسیستم‌های آب‌شیرین یافت می‌شوند. از کوچک‌ترین موجودات آبزی یعنی باکتری‌ها گرفته تا بزرگ‌ترین آن‌ها یعنی پستانداران و پرندگان که همگی در این محیط آبی زیست می‌کنند. در این بین اما اهمیت ریزجلبک‌ها به‌دلیل نقش به‌سزایی که در تولید اولیه بوم‌سازگان آبی دارند از سایر موجودات آبزی بیش‌تر می‌باشد (۹). پلانکتون‌های گیاهی به‌دلیل این‌که در اولین سطح از زنجیره غذایی قرار گرفته‌اند نقش مهمی را در تعادل و ثبات شبکه غذایی به‌عهده دارند. علاوه بر این پلانکتون‌های گیاهی اهمیت زیادی در تامین اکسیژن و حذف مواد سمی از آب دارند (۷). هم‌چنین این موجودات به‌عنوان منابع غنی از پروتئین، اسیدهای چرب ضروری، رنگدانه‌ها و آنتی اکسیدان‌ها در صنایع تغذیه‌ای انسان و آبزی‌پروری کاربرد فراوان دارند. در حوزه علوم سم‌شناسی محیطی نیز ریزجلبک‌ها به‌عنوان گونه‌های مدل جهت تعیین میزان سمیت مواد شیمیایی و آلاینده‌ها در اکوسیستم‌های آبی استفاده می‌شوند (۱۰). ریزجلبک کلرلا *Chlorella vulgaris* یکی از جلبک‌های تک‌سلولی آب‌شیرین می‌باشد که به‌علت مقاومت بالا نسبت به تغییرات محیطی قادر به زیستن در آب‌های شور و لب‌شور نیز می‌باشد (۱۱). این جلبک به‌علت دارا بودن دیواره سلولی زخیم و حاوی فیبر بالا قادر است در محیط‌های با حجم بالای آلاینده‌ها و سموم زیست نماید (۱۲). به‌دلیل وجود دیواره سلولی ضخیم هضم این جلبک در سیستم گوارش موجودات طولانی بوده و از هضم‌پذیری پایینی برخوردار است. با این‌حال کلرلا حاوی طیف گسترده‌ای از اسیدهای آمینه ضروری، عناصر کمیاب، آنتی‌اکسیدان‌ها، رنگدانه‌های مفید و اسیدهای چرب ضروری است که نقش موثری در کارایی و راندمان دستگاه گوارش و ایمنی بدن موجودات از جمله انسان دارد (۱۳). هم‌چنین این گونه به‌عنوان یکی از گونه‌های شاخص زیستی در مطالعات و برنامه‌های مدیریت آلاینده‌های موجود در اکوسیستم‌های آب استفاده می‌گردد (۱۴). با توجه به نو ظهور بودن علم نانوتکنولوژی و استفاده از نانوذرات در علوم و صنایع مختلف مطالعات محدودی درخصوص اثرات سمی این ترکیبات بر فاکتورهای زیست‌شناسی ریزجلبک‌ها انجام شده است. در این خصوص Behzadi Tayemeh و همکاران، به بررسی اثرات سمی نانوذرات نقره و یون‌های نیترات نقره بر فاکتورهای رشد، بازماندگی و محتوی رنگدانه‌ای جلبک کلرلا *Chlorella vulgaris* پرداختند. آن‌ها گزارش کردند که سمیت یون‌های نقره بیش از سمیت نانوذرات نقره می‌باشد و میزان رشد، زنده‌مانی و رنگدانه این جلبک در طول مدت زمان ۷۲ ساعت مواجه با این مواد کاهش یافته است (۲). در مطالعه دیگری Oukarroum و Popovic، اثرات نانو ذرات نقره را بر دو گونه جلبک آب شیرین *Chlorella vulgaris* و آب‌شور *Dunaliella tertiolecta* مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که نانو ذرات نقره در ابعاد ۵۰ نانومتر توانستند میزان کلروفیل و زنده‌مانی جلبک‌ها را کاهش دهند و باعث افزایش تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) و پراکسیداسیون چربی‌ها شوند (۱۵). Angel و همکاران، نشان دادند که جلبک‌های آب شور و شیرین مقاومت‌های مختلفی در برابر سمیت نانو ذرات نقره دارند و گونه‌های دریایی و آب‌شور نظیر *Phaeodactylum tricornutum* همواره مقاومت بالاتری در مقایسه با گونه‌های آب‌شیرین مانند *Pseudokirchneriella subcapitata* در مواجه با این ترکیبات دارند (۱۶). علاوه بر این Hazani، نشان داد که غلظت‌های بالای نانوذرات

نقره در محدوده ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر می‌تواند موجب مرگ سلولی گسترده و ایجاد استرس‌های اکسیداتیو در جمعیت جلبک *Chlorella vulgaris* گردد (۱۷). Johari و همکاران، عنوان کردند که یون‌های نقره از قابلیت تجمع و سمیت بالا برای ریزجلبک‌های آبی برخوردار هستند و می‌توانند به شکل فعالانه وارد سلول‌های جلبکی شده و سایر فعالیت‌های زیستی اعم از تولید رنگدانه‌ها، پروتئین‌ها، فاکتورهای رشد و تکثیر را مختل کنند (۱۸). بنابراین در این مطالعه اثرات سمی نانوذرات نقره بر فاکتورهای رشد، زنده‌مانی و محتوای رنگدانه‌ای جلبک کلرلا مورد مطالعه قرار گرفته است تا عوارض ناشی از این نانو ذرات را بر زیست‌شناسی این گونه جلبکی به‌عنوان یکی از مهم‌ترین تولیدکنندگان اولیه در اکوسیستم‌های آب شیرین نشان دهد.

مواد و روش‌ها

مشخصات ریخت‌شناسی و فیزیکی نانوذرات نقره: در این مطالعه نانوذرات نقره به شکل کلوئید با نام تجاری نانوسید (Nanocid L2000) از شرکت نانو نصب تهران تهیه گردید. براساس آنالیزهای انجام شده مشخصات فیزیکی و شکلی نانو ذرات نقره براساس روش ارائه شده توسط Behzadi Tayemeh و همکاران، انجام گردید (۲). بر این اساس میانگین قطر نانو ذرات نقره با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری (Transition Electron Microscope:TEM) ۳۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. هم‌چنین توزیع سایز هیدرودینامیکی (DHS) در محدوده ۱۰ تا ۱۰۰ نانومتر مشخص گردید و نانوذرات از نظر ظاهری شکل کروری را نشان دادند (شکل ۱).



شکل ۱: ریخت‌شناسی نانوذرات نقره (آ و ب)، قطر ذرات (پ) و اندازه هیدرودینامیکی (ت)

پرورش جلبک کلرلا و آزمایشات سم‌شناسی: به‌منظور پرورش جلبک کلرلا در جمعیت‌های موردنظر از محیط کشت (BBM) با کمی تغییرات استفاده گردید. به‌همین منظور غلظت اولیه 10^7 سلول بر میلی‌لیتر به‌عنوان منبع اصلی برای معرفی جمعیت این جلبک درنظر گرفته شد. پرورش جلبک‌ها با استفاده از مخازن کوچک شیشه‌ای ۱/۵ لیتری با کنترل سایر شرایط دمایی (۱ ± ۲۶)، نوری (۱۲ ساعت تاریکی:۱۲ ساعت روشنایی به‌میزان ۱۰۰۰ میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه با استفاده از لامپ‌های فلورسنت ۴۰ وات)، تغذیه‌ای و محیلی به‌مدت ۹۶ ساعت انجام گردید. آزمایش سم‌شناسی با در معرض قرار دادن غلظت‌های ۰، ۰/۰۰۵، ۰/۰۰۱، ۰/۰۵، ۰/۰۱، ۰/۵ و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر در ۷ تیمار صورت گرفت. غلظت‌های در نظر گرفته شده براساس غلظت‌های محیطی گزارش شده در آب‌های سطحی (۱۰ میکروگرم در لیتر) براساس روش Akter، انجام گردید (۱۹). برای هر تیمار ۵ تکرار درنظر گرفته شد و آزمایشات سم‌شناسی براساس دستورالعمل شماره ۲۰۱ سازمان بین‌المللی توسعه و همکاری اقتصادی (OECD) انجام گردید.

اندازه‌گیری رشد سلول‌های جلبکی: در طول دوره آزمایش (۹۶ ساعت) تراکم سلولی در فواصل زمانی یکسان هر ۲۴ ساعت به وسیله دو روش دستگاه طیف‌سنج نوری و میکروسکوپ نوری چشمی براساس استاندارد اندازه‌گیری گردید (۲۰). شمارش سلولی در روش طیف‌سنج نوری با دستگاه اسپکتروفتومتر با طول موج ۶۸۰ نانومتر و در روش میکروسکوپی از لام‌های نئوبار و در سه تکرار برای هر تیمار انجام شد.

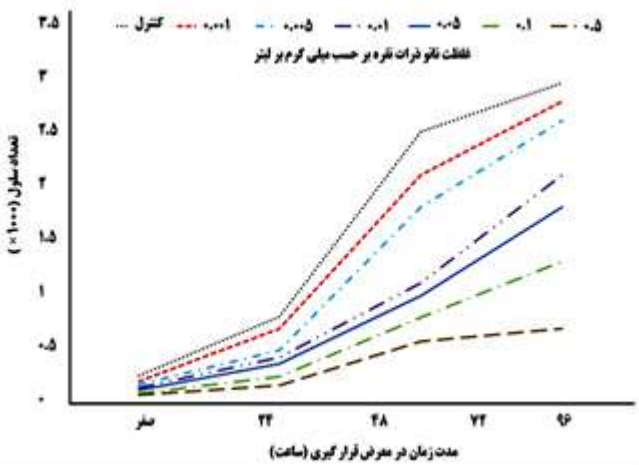
اندازه‌گیری میزان زنده‌مانی سلول‌های جلبکی: به‌منظور بررسی میزان زنده‌مانی و سلامت سلول‌های جلبکی از روش رنگ آمیزی تریپان بلو (شرکت زیگما امریکا، کد محصول TY-124-P712، ۲۰۱۸) در مدت زمان‌های ۰، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت استفاده گردید. در این روش از نسبت ۱ به ۱ مخلوط سوسپانسون سلولی و غلظت ۰/۴ درصد محلول رنگ تریپان بلو استفاده شد و سلول‌های رنگ‌آمیزی شده به‌مدت ۵ دقیقه در دمای محیط نگه‌داری شدند. با توجه به این‌که مواد رنگی به‌راحتی وارد فضای پروتوپلاسم سلولی سلول‌های مرده و آسیب دیده می‌شوند، لذا این نوع سلول‌ها به‌راحتی از سایر سلول‌های فاقد رنگ که همواره به رنگ‌سبز طبیعی بودند تفکیک و شمارش گردیدند.

اندازه‌گیری رنگدانه‌های سلولی: در این مطالعه میزان رنگدانه‌های کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئید براساس روش Silkina و همکاران، با مقداری تغییرات انجام گردید (۲۱). براساس این آزمایش مقدار ۱۳ میلی‌لیتر از سوسپانسون سلولی در زمان‌های مختلف ۰، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت و غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره برداشت گردید. سپس محلول سلولی به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با دور ۲۰۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ گردید. در ادامه محلول رویی حذف گردید و سلول‌های ته‌نشین شده جهت نگه‌داری در فریزر منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد برداشت شدند. به‌منظور جدا سازی رنگدانه‌های موجود در سلول‌های جلبکی از ۱/۵ میلی‌لیتر محلول اتانول ۹۰ درصد استفاده شد و سلول‌ها به‌مدت ۲ دقیقه به شدت مخلوط گردیدند و در ادامه به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگه‌داری شدند. بعد از انجام سانتریفیوژ مقدار ۱۵۰ میکرولیتر از محلول رویی برداشت گردید و به‌کمک یک مایکروپلیت میزان کلروفیل در طول موج‌های ۴۸۰، ۶۴۷ و ۶۶۴/۵ نانومتر برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر سنجش گردید.

آنالیز آماری: داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ بررسی شدند. همه داده‌ها به‌صورت میانگین±SD بیان شدند. آزمون کولموگروف-اسمیرنوف به‌منظور تعیین نرمالیتی و همگنی داده استفاده شد. تفاوت آماری داده‌ها با استفاده از آزمون‌های آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون دانکن برای مقایسه میانگین‌ها استفاده شد. تفاوت آماری داده‌ها و گروه‌های آزمایشی به‌صورت $p<0/05$ نشان داده شد.

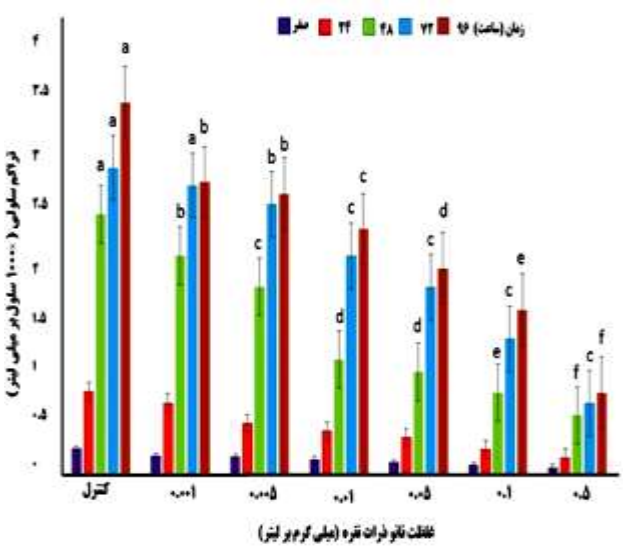
نتایج

شکل ۲ میزان تغییرات تراکم سلولی ریزجلبک‌های کلرلا را در دوره زمانی ۹۶ ساعته در مواجه با غلظت‌های استفاده شده نانوذرات نقره نشان می‌دهد. بر این اساس رشد سلول‌های جلبکی در همه تیمارهای شاهد و نانوذرات نقره با افزایش زمان از صفر تا ۹۶ ساعت افزایش یافته است ولی با افزایش غلظت نانوذرات نقره از صفر تا ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر رشد سلولی کاهش داشته است($p<0/05$)(شکل ۲). هم‌چنین مشخص گردید که رشد سلول‌های جلبکی کلرلا از یک رابطه وابسته به زمان و وابسته به غلظت نانو ذرات نقره پیروی می‌کند که با افزایش زمان آزمایش تا ۹۶ ساعت رشد سلولی افزایش یافته ولی با افزایش غلظت ماده سمی این رشد کاهش می‌یابد (شکل ۳). براساس نتایج بیش‌ترین و کم‌ترین تراکم سلولی به‌ترتیب در گروه شاهد فاقد نانوذرات نقره و زمان ۹۶ ساعت و گروه غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر و زمان صفر بوده است.

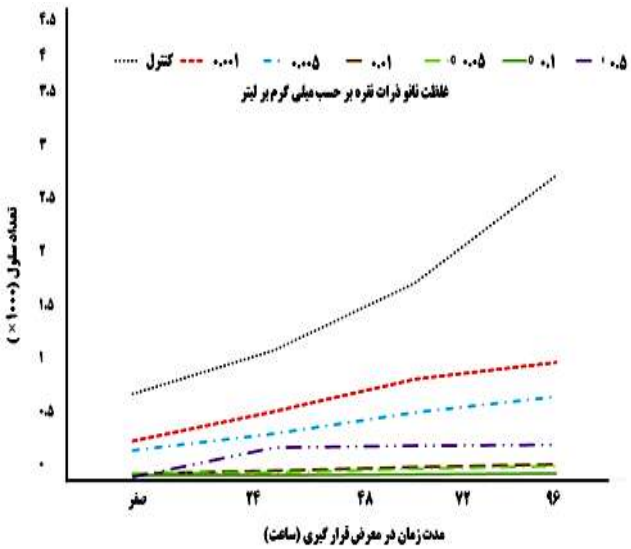


شکل ۲: منحنی رشد سلول‌های جلبکی کلرلا در مدت زمان‌ها و غلظت‌های مختلف نانو ذرات نقره

هم‌چنین شکل ۴ میزان زنده‌مانی سلول‌های جلبک را در بازه زمانی ۹۶ ساعت و در غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره نشان می‌دهد. بر این اساس در تیمار شاهد فاقد نانوذرات نقره میزان زنده‌مانی سلول‌های جلبکی افزایش یافته است و نسبت به جمعیت‌های تیمار شده با نانوذرات نقره دارای تعداد سلول‌های سالم و زنده بیش‌تری هست.

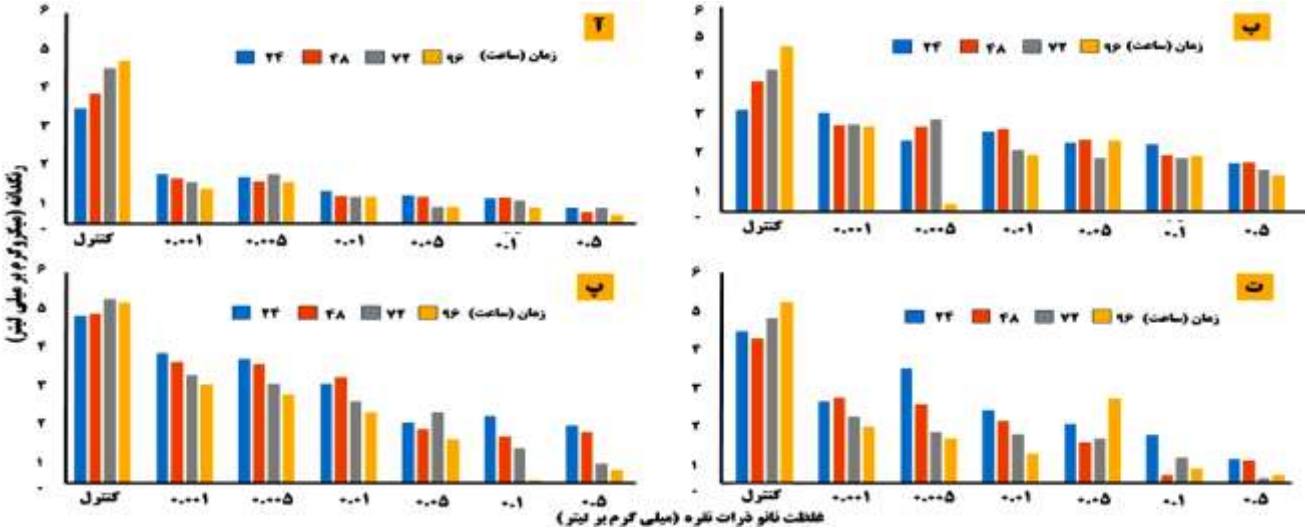


شکل ۳: تغییرات تراکم سلول‌های جلبکی کلرلا در مدت زمان‌ها و غلظت‌های مختلف نانو ذرات نقره



شکل ۴: میزان زنده‌مانی سلول‌های جلبکی کلرلا در مدت زمان‌ها و غلظت‌های مختلف نانو ذرات نقره

نتایج نشان داد که با افزایش زمان و افزایش غلظت نانو ذرات نقره میزان زنده‌مانی سلول‌ها کاهش یافته است به‌نحوی‌که کم‌ترین تعداد سلول‌های مرده یا ناقص در غلظت‌های بالاتر یعنی ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده‌گردید. درشکل ۵ محتوای رنگدانه‌ای سلول‌های جلبکی کلرلا در زمان‌ها و غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره ارائه گردیده است. به‌طورکلی با افزایش زمان و غلظت مواجه با نانوذرات نقره میزان کلروفیل a (شکل ۵ آ)، کلروفیل b (شکل ۵ ب)، کلروفیل کل (شکل ۵ پ) و کاروتنوئید (شکل ۵ ت) در جمعیت‌های مورد مطالعه جلبک کلرلا کاهش یافته‌است. براساس نتایج بیش‌ترین میزان کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئید در مدت زمان ۹۶ ساعت و کم‌ترین میزان آن در گروه تحت تاثیر غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر ثبت گردید. کاهش میزان محتوای رنگدانه‌ای جلبک کلرلا از رابطه وابسته به غلظت پیروی نمود (شکل ۵).



شکل ۵: تغییرات محتوای رنگدانه‌های کلروفیل a (آ)، کلروفیل b (ب)، کلروفیل کل (پ) و کاروتنوئید (ت)

بحث

جلبک‌های تک سلولی نقش به‌سزایی در اکوسیستم‌های آبی به‌منظور تولید اولیه، تولید اکسیژن و پالایش آلاینده‌های شیمیایی و سموم دارند (۲۲). در این بین طیف وسیعی از جلبک‌های آب‌شیرین و دریایی تاکنون شناخته شده‌اند ولی جلبک تک‌سلولی کلرلا به‌علت دارا بودن دیواره سلولی ضخیم و مقاومت بسیار بالا به تغییرات محیطی و مواد شیمیایی و سموم داخل آب، بیش از سایر جلبک‌ها مورد توجه قرار گرفته است (۲۳). نانوذرات نقره در محیط آب این قابلیت را دارند که به‌راحتی در بدن و بافت‌های موجودات آبزی تجمع پیدا کنند(۲۴). پس از ورود این ذرات به محیط درون سلولی ریزجلبک‌ها اندام‌های درون سلولی دچار اختلال شده و روند تکثیر و رشد سلولی متوقف می‌گردد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تاثیر نانوذرات نقره بر ریزجلبک کلرلا وابسته به غلظت می‌باشد. هم‌چنین پاسخ این جلبک به سمیت نانوذرات نقره نیز وابسته به زمان بوده و اختلاف بین گروه شاهد و مدت‌زمان صفر با گروهای دیگر در مدت زمان‌های بالاتر نیز مشخص می‌باشد (۲۵). براساس مطالعات انجام‌شده مشخص گردیده است که عامل اصلی سمیت نانوذرات نقره در محیط‌های آبی به‌علت رهاسازی و انتشار یون‌های نقره Ag^{+} می‌باشد. علاوه بر این احتمال عبور نانوذرات فلزی مانند نقره از منافذ با قطر ۵ تا ۲۰ نانومتر دیواره سلولی می‌تواند مسیری جهت ورود مستقیم این ذرات به فضای داخل سلولی باشد. مطالعات بسیاری درخصوص اثرات سمی نانوذرات نقره بر گونه‌های آبزی انجام گردیده است. Kazemi و Shariati، اقدام به مطالعه اثرات سمی نانوذرات اکسیدمس روی جلبک *Scenedesmus dimorphus* کردند. نتایج نشان داد که میزان رشد سلول‌ها و محتوای کلروفیل a و کارتنوئید آن‌ها تحت تاثیر غلظت‌های ۲/۵، ۶/۵ ، ۱۷/۴ ، ۴۵/۷ و ۱۲۰ میلی‌گرم بر لیتر طی ۷۲ ساعت کاهش یافت که با نتایج تحقیق حاضر مطابق بود (۲۶). در تحقیق پیش‌رو جمعیت‌های جلبک کلرلا که تحت تاثیر نانوذرات نقره نبودند (غلظت صفر) به‌طور طبیعی در یک شرایط طبیعی با افزایش زمان از زمان صفر تا ۹۶ ساعت رشد معنی‌داری را تجربه کردند و تعداد سلول‌ها از ۲۰۰ عدد در مدت زمان صفر به ۳۴۵۰ عدد در مدت زمان ۹۶ ساعت در هر میلی‌لیتر رسیدند. با این‌حال در تیمارهای تحت تاثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره این مقادیر از غلظت ۰/۰۰۱ تا ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر کاهش داشته است. در مطالعه دیگری Miri و Khandan Barani، اقدام به مطالعه تاثیر نانو ذرات اکسید مس بر رشد، مقدار پروتئین، کلروفیل‌ها و کارتنوئید گونه *Chlorella vulgaris* کردند. نتایج نشان داد که تعداد سلول‌ها و میزان پروتئین کل جلبک با افزایش با افزایش غلظت نانو ذرات اکسیدمس به‌طور معنی‌دار کاهش یافته است. همین‌طور مقادیر کلروفیل کل، کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئید در جمعیت‌های تحت تاثیر نانوذرات در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش یافتند (۲۷). این نتایج نیز با یافته‌های تحقیق حاضر تطابق داشت. مکانسیم تکثیر و رشد سلول‌های جلبکی در حضور مواد شیمیایی و سمی نظیر فلزات مختل می‌گردد و سلول‌ها انرژی خود را به جای تکثیر و تولید صرف دفع و سازگاری با این نوع مواد می‌کنند. در مطالعه دیگری Johari و همکاران، اقدام به بررسی اثر سمیت نانو ذرات نقره کلوئیدی بر ریزجلبک دریایی *Nannochloropsis oculata* کردند. نتایج نشان داد که نانو ذرات نقره حتی در کم‌ترین مقادیر ۰/۰۰۵ میلی‌گرم بر لیتر توانستند باعث کاهش رشد و تراکم سلولی جلبک‌ها شوند (۱۸). این یافته‌ها نیز با نتایج تحقیق حاضر نیز هم‌خوانی داشت و رشد سلولی در مجاورت کم‌ترین غلظت ۰/۰۰۵ میلی‌گرم بر لیتر کاهش یافت. میزان زنده‌مانی سلول‌های جلبکی همواره فاکتور مهمی جهت تشخیص سلامت و پایداری سلول‌های جلبکی می‌باشد. در این خصوص نتایج این مطالعه نشان داد که با افزایش غلظت نانو ذرات نقره مقدار زنده‌مانی سلول‌های جلبکی کاهش یافته‌است. Behzadi Tayemeh و همکاران، عنوان کردند که زنده‌مانی سلول‌های جلبکی کلرلا در مواجه با یون‌های نیترات نقره کم‌تر از مواجه با نانوذرات نقره بوده است (۲). اگرچه یون‌های نقره سمیت بالاتری را در جهت کاهش زنده‌مانی سلول‌های کلرلا نشان دادند ولی در مطالعه حاضر نانوذرت نقره توانستند موجب کاهش معنی‌دار فاکتور زنده‌مانی سلول‌ها شوند. رنگدانه‌ها یکی از مهم‌ترین اجزای درون سلولی جلبک‌ها محسوب می‌گردد و عملکرد عمده ریزجلبک‌ها جهت تولید مواد آلی و انرژی وابسته به این مواد می‌باشد (۲۸). در شرایط معمول و محیا بودن شرایط نوری، دمایی، کیفیت و عوامل محیطی مناسب ریزجلبک‌ها اقدام به تولید انواع کلروفیل و رنگدانه‌هایی نظیر کارتنوئید، آستازانتین و فیکوسیانین می‌کنند (۲۹). زمانی‌که این موجودات با شرایط غیر طبیعی و انواعی از آلاینده‌ها مواجه باشند لذا مجبورند بیش‌تر انرژی خود را صرف مبارزه با آلاینده‌ها و سازگاری با محیط اطراف خود کنند و تولید رنگدانه‌ها کاهش می‌یابد (۳۰). کارتنوئیدها نقش آنتی اکسیدانی فعالی داشته و با افزایش غلظت یک آلاینده در بدن سلول‌های جلبکی افزایش می‌یابند تا از این طریق به مبارزه با رادیکال‌های فعال اکسیژن بپردازد (۳۱). در مطالعه پیش‌رو نتایج نشان داد که مقادیر بالای نانوذرات نقره بر میزان تولید کاروتنوئید جلبک کلرلا اثر کاهنده شدید داشته است و کم‌ترین میزان کاروتنوئید در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده گردید. هم‌چنین میزان محتوای کلروفیل‌ها با افزایش غلظت نانو ذرات نقره کاهش یافته است که این نتایج با یافته‌های Wang و همکاران، تطابق داشت. آن‌ها گزارش نمودند که نانو ذرات

مس قادر هستند محتوای کلروفیل ریزجلبک کلرلا را کاهش داده و از این طریق باعث اخلال در روند فرایند فتوسنتز شوند (۳۲). اکوسیستم‌های آبی از نظر تولیدات اولیه و برقراری تعادل بین شبکه‌ها و زنجیره‌های غذایی به‌شدت به تولیدکننده‌های اولیه نظیر ریزجلبک کلرلا وابسته بوده و هرگونه اخلال در سلامت این گونه‌های با ارزش می‌تواند کل اکوسیستم آبی و جامعه را تحت تاثیر قرار دهد.

تشکر و قدردانی

تمامی نویسندگان از خانم دکتر صاحبی مدیرآزمایشگاه زیست پویا لب و جناب آقای دکتر علی کاظمی به‌علت همکاری‌ها و رهنمودهای ارزشمندشان در تکمیل مراحل انجام این مطالعه کمال تشکر و قدردانی را دارند.

منابع

1. **Yoo-iam, M., Ratcha, Ch. and Tunlawit, S., 2014.** Toxicity, Bioaccumulation and Biomagnification of Silver Nanoparticles in Green Algae (*Chlorella* Sp.), Water Flea (*Moina macrocopa*), Blood Worm (*Chironomus* Spp.) and Silver Barb (*Barbonymus gonionotus*). Chemical Speciation and Bioavailability. 26(4): 257-265.
2. **Behzadi Tayemeh, M., Esmailbeigi, M., Shirdel, I., Salari Joo, H., Johari, S.A., Banan, A., Nourani, H., Mashhadi, H., Jami, M.J. and Tabarrok, M., 2020.** Perturbation of Fatty Acid Composition, Pigments, and Growth Indices of Chlorella Vulgaris in Response to Silver Ions and Nanoparticles: A New Holistic Understanding of Hidden Ecotoxicological Aspect of Pollutants. Chemosphere. 238 p.
3. **Yue, Y., 2017.** Interaction of Silver Nanoparticles with Algae and Fish Cells: A Side by Side Comparison. Journal of Nanobiotechnology. 15(1): 1-11.
4. **An, H.J., 2019.** Comparative Toxicity of Silver Nanoparticles (AgNPs) and Silver Nanowires (AgNWs) on Saltwater Microcrustacean, Artemia Salina. Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology. 218: 62-69.
5. **Salari Joo, H., 2013.** Bioaccumulation of Silver Nanoparticles in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*): Influence of Concentration and Salinity. Aquatic Toxicology. 140-141: 398-406.
6. **Cáceres-Saez, I., Haro, D., Blank, O., Aguayo-Lobo, A., Dougnac, C., Arredondo, C., Cappozzo, H.L. and Ribeiro Guevara, S., 2019.** Stranded false killer whales, Pseudorca crassidens, in Southern South America reveal potentially dangerous silver concentrations. Marine Pollution Bulletin. 145: 325-333. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.05.047.
7. **Asghari, S., 2012.** Toxicity of Various Silver Nanoparticles Compared to Silver Ions in Daphnia Magna. Journal of Nanobiotechnology. 10: 1-11.
8. **Salari Joo, H., Kalbassi, M.R. and Johari, S.A., 2018.** Hematological and Histopathological Effects of Silver Nanoparticles in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*), How about Increase of Salinity? Environmental Science and Pollution Research. 25(16): 15449-15461.
9. **Ashouri, S., 2015.** Effects of Different Levels of Dietary Selenium Nanoparticles on Growth Performance, Muscle Composition, Blood Biochemical Profiles and Antioxidant Status of Common Carp (*Cyprinus Carpio*). Aquaculture. 446: 25-29. http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.04.021.
10. **Kalbassi, M.R., Salari joo, H. and Johari, S.A., 2011.** Toxicity of Silver Nanoparticles in Aquatic Ecosystems: Salinity as the Main Cause in Reducing Toxicity. 436-443.
11. **Hamed, I., Fatih, Ö., Yesim, Ö. and Joe, M.R., 2015.** Marine Bioactive Compounds and Their Health Benefits: A Review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 14(4): 446-465.
12. **Bashir, Sh., Sharif, M.K., Butt, M.S. and Shahid, M., 2016.** Functional Properties and Amino Acid Profile of Spirulina Platensis Protein Isolates. Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research Series B. Biological Sciences. 59(1): 12-19.
13. **Nazih, H. and Bard, J.M., 2018.** Microalgae in Health and Disease Prevention Microalgae in Human Health: Interest as a Functional Food. Elsevier Inc. 211-226. https://doi.org/10.1016/ B978-0-12-811405-6.00010-4.
14. **Rai, P.K., 2008.** Heavy Metal Pollution in Aquatic Ecosystems and Its Phytoremediation Using Wetland Plants: An Ecosustainable Approach. International Journal of Phytoremediation. 10(2): 133-160.
15. **Oukarroum, A. and Popovic, R., 2012.** Effects of Silver Nanoparticles in Two Green Algae, *Chlorella Vulgaris* and *Dunaliella Tertiolecta*. Ecotoxicology and Environmental Safety Inhibitory. 78: 80-85.
16. **Angel, B.M., Batley, G.E., Jarolimek, Ch.V. and Rogers, N.J., 2013.** The Impact of Size on the Fate and Toxicity of Nanoparticulate Silver in Aquatic Systems. Chemosphere. 93(2): 359-365. http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.04.096.
17. **Hazani, A.A., 2013.** Ecotoxicity of Ag-Nanoparticles on Two Microalgae, Chlorella Vulgaris and Dunaliella Tertiolecta. Archives of Biological Sciences. 65(4): 1447-1457.
18. **Johari, S.A., GhaderSarbaz, Z. and Sourinejad, I., 2016**. Toxicity Effect of Colloidal Silver Nanoparticles to Marine Microalgae, *Nannochloropsis oculata*. Journal of Aquatic Ecology. 6(2): 83-90. (In Persian)
19. **Akter, M., 2018.** A Systematic Review on Silver Nanoparticles-Induced Cytotoxicity: Physicochemical Properties and Perspectives. Journal of Advanced Research 9: 1-16. https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.10.008.
20. **OECD. 2011.** OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
21. **Silkina, A., Bazes, A. and Mouget, J., 2012.** Comparative efficiency of acroalgal extracts and booster biocides as antifouling agents to control growth of three diatom species. Marine Pollution Bulletin. 64: 2039-2046 .
22. **Akbary, P. and Gorgij, Sh., 2018.** Effect of dietary Chlorella vulgarissupplementation on growth performance, feed and body chemical composition of grey mullet, *Mugil cephalus* Linnaeus 1758. Journal of Animal Environment. 10(3): 153-158. (In Persian)
23. **Azarm, L., Javadzadeh, N. and Jalilzadeh, R., 2020.** Investigation of *Chlorella vulgaris* capacity in absorption of Nitrate and Phosphate from wastewater of fish farming pool in Khuzestan Province. Journal of Animal Environment. 12(2): 291-298. (In Persian)

24. **Taneh, B., Yousozadeh, M., Hedayti, S.A.A. and Amroulahi, N., 2020.** Investigation of Bio absorption of silver nanoparticle contamination by the dressina poly morpha in a long period. Journal of Animal Environment. 11(4): 331-336. (In Persian)

25. **Noori, V., Hedayati, S.A., Hosseinifar, S.H., Bagheri, T. and Khaleghi, S.R., 2020.** Effect of polyphenol pre-treatment on mucus immune indices of common carp *Cyprinus carpio* in exposed to silver nanoparticles. Journal of Animal Environment. 12(3): 305-314. (In Persian)

26. **Kazemi, M. and Shariati, F., 2019.** The Toxicity Effect of Copper Oxide Nanoparticle on Algae *Scenedesmus Dimorphus*. Biological Journal of Microorganism. 8(30): 13-25. (In Persian)

27. **Miri, M. and Khandan Barani, H., 2016.** Effect of copper oxide nanoparticle on growth, protein content, chlorophylls and carotenoid in (*Chlorella vulgaris*). Journal of Plant Research. 29(1): 235-242. (In Persian)

28. **Osório, C., Machado, S., Peixoto, J., Bessada, S., Pimentel, F.B., Alves, R.C., and Oliveira, M.B.P.P., 2020.** Pigments content (Chlorophylls, fucoxanthin and phycobiliproteins) of different commercial dried algae. Separations. 7(2): 1-14. https://doi.org/10.3390/separations 7020033.

29. **González-Vega, R.I., Cárdenas-López, J.L., López-Elías, J.A., Ruiz-Cruz, S., Reyes-Díaz, A., Perez-Perez, L.M., Cinco-Moroyoqui, F.J., Robles-Zepeda, R.E., Borboa Flores, J. and Del-Toro-Sánchez, C.L., 2021.** Optimization of growing conditions for pigments production from microalga Navicula incerta using response surface methodology and its antioxidant capacity. Saudi Journal of Biological Sciences. 28(2): 1401-1416. https://doi.org/10. 1016/j.sjbs.2020.11.076.

30. **Zamani-Ahmadmahmoodi, R., Malekabadi, M.B., Rahimi, R. and Johari, S.A., 2020.** Aquatic pollution caused by mercury, lead, and cadmium affects cell growth and pigment content of marine microalga, Nannochloropsis oculata. Environmental Monitoring and Assessment. 192(6). https://doi.org/10.1007/s10661-020-8222-5

31. **Rezayian, M., Niknam, V. and Ebrahimzadeh, H., 2019.** Oxidative damage and antioxidative system in algae. Toxicology Reports. 6: 1309-1313. https://doi.org/10.1016/j. toxrep.2019.10.001.

32. **Wang, L., Wang, M., Peng, C. and Pan, J., 2013.** Toxic Effects of Nano-CuO, Micro-CuO and Cu2+ on Chlorella sp. J. Environment. Protection. 4: 86-91.