

## بررسی اثرات نانوذرات آهن بر رشد میکروجلبک کلرلا (*Chlorella sp.*)

پردیس پورسرتی<sup>1</sup>، اکبر نورسته‌نیا<sup>2</sup> و شبنم سهراب‌نژاد<sup>2</sup>

<sup>1</sup> گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت - [norasteh@guilan.ac.ir](mailto:norasteh@guilan.ac.ir)  
<sup>2</sup> گروه شیمی معدنی، دانشکده شیمی، دانشگاه گیلان، رشت

### چکیده

با وجود توسعه قابل توجه فناوری نانو، اثرات مضر نانوذرات آهن نسبتاً ناشناخته است و سمیت زیست محیطی آنها به ندرت مورد بررسی قرار گرفته است. برای ارزیابی اثرات تغذیه‌ای و تنش‌زایی نانوذرات آهن بر جلبک کلرلا، شاخص‌های مختلف رشد این ریزجلبک در حضور سطوح متفاوتی از نانوذرات آهن (20، 10، 5 و 0 میکرومولار) مورد بررسی قرار گرفت. جهت بررسی کیفیت نموی، نرخ رشد ویژه، محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی و غلظت پروتئین و برای پایش شدت تنش اکسایشی، محتوای مالون‌دی‌الدهید، آنتوسیانین، ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی اندازه‌گیری شد. تیمارهای نانوذرات آهن با غلظت‌های 5، 10 و 20 میکرومولار موجب افزایش و غلظت 40 میکرومولار سبب کاهش رشد شد. با افزایش غلظت نانوذرات آهن، کاهش در محتوای کلروفیل کل و افزایش پراکسیداسیون لیپیدی مشاهده شد ولی پروتئین بدون تغییر معنی‌داری باقی ماند. تنش اکسیداتیو ناشی از نانوذرات آهن، موجب افزایش محتوای ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی، آنتوسیانین و کاروتنوئیدها شد. به نظر می‌رسد که محدودیت دسترسی به یون‌های آهن نامحلول و حضور فلز کلوئیدی نانوذرات آهن می‌تواند محیط مناسبی برای رشد فراهم کند. غلظت‌های بالاتر منجر به تنش‌زایی شده و در این شرایط، جلبک کلرلا با تقویت سیستم دفاع پاداکسایشی این تنش را تعدیل می‌نماید.

**واژه‌های کلیدی:** آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی، تنش اکسیداتیو، جلبک کلرلا، رنگیزه‌های فتوسنتزی

### مقدمه

با وجود توسعه قابل توجه فناوری نانو، اثرات مضر نانوذرات آهن نسبتاً ناشناخته است و سمیت زیست محیطی آنها به ندرت مورد بررسی قرار گرفته است (Plachtova et al. 2018). با توجه به ورود نانوذرات آهن به علوم زیستی، مطالعات زیادی برای کشف برهمکنش سلول‌های زنده با این نانوساختارها انجام شده است. با توجه به این بررسی‌ها، مشخص شد که نانوذرات آهن بر روی سلول‌ها اثر اسیب به غلظت دارند. در غلظت‌های پایین، نانوذرات می‌توانند به عنوان منبع آهن برای تامین یون‌های از رزمنده آهن و پیش‌نبرد رشد اثر و عمل کنند. با افزایش غلظت نانوذرات آهن، اثرات سمی به‌طور فزاینده‌ای غالب می‌شود و کاهش رشد و مرگ سلول‌ها مشاهده می‌شود (Gholami et al. 2016). نانوذرات آهن همچنین تأثیر چشمگیری بر رشد و شرایط متابولیسمی میکروارگانیسم‌های ازی مانند ریزجلبک‌ها دارند. ریزجلبک‌ها، در قاعده هرم اکولوژیکی قرار داشته و نقش کلیدی در سیستم‌های اکولوژیکی دارند. بنابراین، در زمان حاضر دست‌یابی به استراتژی‌هایی برای بهبود کشت ریزجلبک‌ها با غلظت نسبتاً بالاتر زیست توده، نیازی مبرم است (Rana et al. 2020). بنا بر آنچه گفته شده، بررسی اثرات نانوذرات آهن در حمله نانوذرات آهن بر رشد و محتوای ریزجلبک‌ها مانند ریزجلبک کلرلا ضروری است. در این تحقیق، اثرات غلظت‌های مختلف نانوذرات آهن بر رشد و محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی، آنتوسیانین کل، پراکسیداسیون لیپیدی، فنل، فلاونوئید و پروتئین کل ریزجلبک کلرلا مورد بررسی قرار گرفت.

### مواد و روش‌ها

در این مطالعه، از محیط‌کشت مایع زایندر (Zaindar) مثبت (Z+8-N) برای کشت جلبک *Chlorella sp.* استفاده شد. pH محیط‌کشت در محدوده 8/6- تنظیم شد. محیط‌کشت در دستگاه اتوکلاو در فشار 1 اتمسفر و دمای 121 درجه سانتیگراد جهت حذف آلودگی‌های میکروبی و قارچی، استریل و سپس به ارضای 2000 میلی‌لیتری منتقل شد. به ازای هر لیتر محیط‌کشت مایع، 100 میلی‌لیتر سوسپانسیون جلبک که در مرحله لگاری می‌باشد، اضافه شد. به هدف دستیابی به رشد پایدار، ارضای به اتمک کشت با شرایط پایه در دمای 25 ± 2 درجه سانتیگراد و شدت نوری 35 ± 1000 μmol/m<sup>2</sup>/s ساعت نوب و 12 ساعت نوب و 12 ساعت نوب و تحت شرایط هوادهی منتقل شدند. چهار غلظت از محلول نانو ذرات آهن در مقادیر 5، 10، 20 و 40 میکرومولار تهیه و به محیط کشت اضافه شد. از آنجاییکه غلظت 40 میکرومولار محدودیت رشد ایجاد کرد، در مابقی مراحل از این محلول استفاده نشد.

**سنجش محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی**  
اندازه‌گیری غلظت سه رنگیزه فتوسنتزی شامل کلروفیل *a*، کلروفیل *b* و بتاکاروتن، با کمک رابطه‌های جدول 1 و برحسب میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه شد. نمونه‌برداری برای انجام این کار، هنگام پایان تنش یعنی پس از 21 روز صورت گرفت.

جدول 1. رابطه‌های محاسبه مقادیر رنگیزه‌های فتوسنتزی

رنگیزه فتوسنتزی	رابطه
Chl <i>a</i>	$12.25 A_{665} - 2.79 A_{645}$
Chl <i>b</i>	$21.50 A_{645} - 5.1 A_{665}$
Y-Chl	$10.00 A_{665} + 1.82 Chl a - 95.02 Chl b + 980$
β-Car	

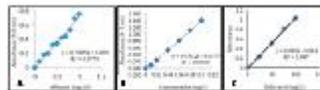
### سنجش محتوای آنتوسیانین کل

پس از استخراج آنتوسیانین با استفاده از محلول استخراج، جذب نمونه‌ها در طول موج 550 نانومتر (nm) خوانده شد. غلظت آنتوسیانین با استفاده از ضریب خاموشی  $1.33000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$  و با کمک رابطه  $A = \epsilon bc$  مقدار آنتوسیانین محاسبه شد. که در آن *A* نماد جذب، *b* نماد عرض کیوبت (برابر با 1 سانتی‌متر) و *c* نماد غلظت آنتوسیانین (که بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر بدست آمد) می‌باشد.

**سنجش محتوای پراکسیداسیون لیپیدی:**  
میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء، غلظت مالون‌دی‌الدهید (MDA) و دیگر آلدئیدها محاسبه شد و سپس مقدار مالون‌دی‌الدهید (محصول پراکسیداسیون لیپیدی)، برحسب نانومول در گرم وزن تر به دست آمد. نحوه تهیه عصاره ریزجلبک برای سنجش محتوای فنل و فلاونوئید، 100 گرم زیست توده تر ریزجلبک به 2 لیتر استریل‌شده، عصاره رویی حاصل از سانتریفیوژ، در مرحله بعد برای سنجش فنل و فلاونوئید مورد استفاده قرار گرفت. دمای 4 درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد.

**سنجش محتوای فنل، فلاونوئید و پروتئین کل:**  
محتوای فنل نمونه‌ها با استفاده از محلول استخراج و با کمک معادله منحنی استاندارد اسید گالیک (شکل 1-A) بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن خشک، محاسبه شد.

محتوای فلاونوئید، با استفاده از محلول استخراج و با کمک منحنی استاندارد کوئرستین (شکل 1-B) و برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن خشک به دست آمد. برای استخراج عصاره سلولی ریزجلبک، بافر استخراج تهیه و سنجش پروتئین کل به کمک منحنی استاندارد پروتئین البومین (شکل 1-C) اندازه‌گیری شد.



شکل 1. منحنی استاندارد گالیک اسید (A)، کوئرستین (B) و پروتئین البومین گاوی (C)

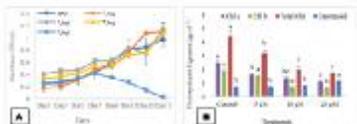
آنالیز آماری

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و با 3 تکرار انجام شد. میانگین داده‌ها با اطمینان 95 درصد ( $P < 0.05$ ) و با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یکطرفه (One-way ANOVA) و پس‌ازهمون دانکن مقایسه شد. اجزای از میانگین داده‌ها به وسیله خطای استاندارد (SE) نشان داده شد. تحلیل آماری به وسیله نرم افزار SPSS v.25 انجام شد و برای رسم نمودار نرم افزار Microsoft Excel (2016) استفاده شد.

### نتایج و بحث

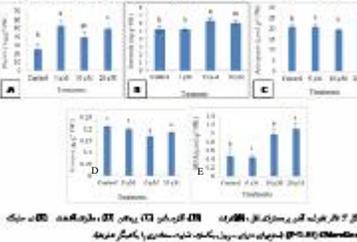
**تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات آهن بر رشد جلبک کلرلا**  
رشد جلبک در حضور غلظت‌های 5، 10 و 20 میکرومولار نانوذرات آهن افزایشی و مشابه با تیمار شاهد بود. درحالی که روند رشد جلبک در حضور 40 میکرومولار نانوذرات آهن (تیمار 4) طی هفته اول برابر با شاهد و پس از آن کاهش بود. کاهش روند رشد ادامه داشت تا در نهایت در روز 15، رشد جلبک کاملاً متوقف شد. به همین دلیل در بررسی‌های بعدی نمونه‌های تیمار 4 (غلظت 40 میکرومولار نانوذرات آهن) حذف شد (شکل 1-A).  
تغییرات و همکاران (2022) از جلبک کلرلا برای بررسی اثرات نانوذرات آهن پوشیده شده با L-Lysine، بر تشکیل بیوفیلم میکروبیکی استفاده کردند. نتایج نشان داد که این نانوذرات، تأثیر داشته و زمان و غلظت بر تشکیل بیوفیلم دارد. به طوری که غلظت‌های پایین (12.5-200 میکروگرم در میلی‌لیتر) آن، سرعت رشد سلول‌ها و تشکیل بیوفیلم جلبکی را افزایش می‌دهد. از سوی دیگر، این نانوذرات در غلظت‌های بالا (این‌تر از 400 میکروگرم در میلی‌لیتر) تشکیل بیوفیلم را در یک دوره زمانی محدود کاهش می‌دهد. نتایج مطالعه حاضر نیز در راستا با مقالات پیشین، اثر غلظت و زمان بر رشد جلبک را تأیید می‌نماید.

**تأثیر نانوذرات آهن بر محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی**  
نتایج نشان می‌دهد که مقادیر کلروفیل *a* و کلروفیل *b* در نمونه‌های جلبک‌های تیمار شده با نانوذرات آهن به طور معناداری نسبت به نمونه جلبک شاهد کاهش می‌یابد. به طوری که بیشترین کاهش معنادار مقادیر کلروفیل‌ها،  $10 \mu\text{g}$  کل در تیمار دارای غلظت 20 میکرومولار نانوذرات آهن مشاهده شد. مقدار کلروفیل *a* در تیمار 5 میکرومولار نانوذرات آهن نسبت به نمونه کنترل تفاوت معناداری نشان نداد. اما در غلظت‌های 10 و 20 میکرومولار، مقدار این کلروفیل کاهش یافت. این در حالیست که مقدار کاروتنوئید با افزایش غلظت نانوذرات آهن، افزوده می‌شود. به طوری که افزایش معنادار محتوای کاروتنوئید در غلظت 20 میکرومولار نانوذرات آهن در بالاترین میزان می‌باشد (شکل 1-B-2). بررسی‌های پیشین نشان داد که محتوای کلروفیل جلبک کلرلا، تحت تاثیر نانوذرات آهن، کاهش می‌یابد که نشان‌دهنده اختلال در مکانیسم فتوسنتزی در سلول‌های جلبک تیمار شده است (Saxena et al. 2021). کاروتنوئیدها به عنوان خاموش کننده‌های موثر حساسی کنده‌های نوری سه‌گانه، اکسیژن منفرد و رادیکال‌ها را شناخته می‌شوند. این افزایش محتوای کاروتنوئید، ممکن است یک مکانیسم دفاعی در سلول‌های جلبک در مواجهه با نانوذرات فلزی باشد.



شکل 1. نمودار رشد جلبک در حضور غلظت‌های 5، 10، 20، 40 (T4) و 0 (T0) میکرومولار نانوذرات آهن. (A) تغییرات غلظت کلروفیل *a* و *b* در طول 21 روز در تیمارهای مختلف. (B) تغییرات غلظت کاروتنوئیدها در تیمارهای مختلف. داده‌ها به وسیله نرم افزار SPSS v.25 تحلیل آماری شدند.  $P < 0.05$

**سنجش محتوای فنل، فلاونوئید، آنتوسیانین و پروتئین کل**  
همان‌گونه که در نمودار سنجش محتوای فنل (شکل 1-A) مشاهده می‌شود، نمونه‌های تیمار شده با نانوذرات آهن، افزایش معنادار در میزان محتوای فنل نشان دادند. با توجه به نمودار سنجش محتوای فلاونوئیدی (شکل 1-B-3)، نمونه‌های تیمار شده با کمترین غلظت (5 میکرومولار) از نانوذرات آهن، تغییر معناداری در میزان محتوای فلاونوئیدی نشان ندادند در حالی که در غلظت‌های بالاتر این تغییر معنادار و افزایشی بود. به طوری که در غلظت‌های 5، 10 و 20 میکرومولار، افزایش محتوای فلاونوئیدی مشاهده می‌شود. همانطور که در نمودار شکل 1-C-3 دیده می‌شود، در غلظت‌های 5 و 10 میکرومولار نانوذرات آهن تفاوت معناداری بین محتوای آنتوسیانین کل در نمونه‌های تیمار شده و نمونه کنترل وجود ندارد. در حالی که در غلظت 20 میکرومولار نانوذرات آهن، محتوای آنتوسیانین کل به طور معناداری افزایش یافته است. نتایج اندازه‌گیری مقدار پروتئین کل با استفاده از روش برادفورد نشان داد که محتوای پروتئین کل در جلبک‌های تیمار شده با نانوذرات آهن، نسبت به جلبک‌های تیمار شده با نانوذرات آهن شاهد، افزایش معنادار نبود (شکل 1-D-3). این نتیجه در مورد هر سه غلظت صادق است. با استفاده از سنجش سطح مالون‌دی‌الدهید، مشاهده شد که این کاهش معنادار نبود (شکل 1-D-3). این نتیجه در مورد هر سه غلظت صادق است. با استفاده از سنجش سطح مالون‌دی‌الدهید، محتوای پراکسیداسیون لیپیدی ارزیابی شد. طبق آنچه در شکل 1-E-3 مشاهده می‌شود، سطح مالون‌دی‌الدهید در جلبک‌های تیمار شده با غلظت 5 میکرومولار نانوذرات آهن، تغییری نداشت. اما، در غلظت‌های بالاتر 10 و 20 میکرومولار نانوذرات آهن، میزان مالون‌دی‌الدهید نمونه‌ها به طور معناداری بیشتر از این مقدار در تیمار کنترل بود. بنابراین، افزایش پراکسیداسیون لیپیدی در نمونه‌های حاوی نانوذرات سنتز شده در غلظت 10 و 20 میکرومولار مشاهده شد. Saxena و همکاران (2021) نشان دادند که پراکسیداسیون لیپیدی در جلبک کلرلا تحت تیمار نانوذرات آهن افزایش داشت. همانطور که انتظار می‌رفت، افزایش پراکسیداسیون لیپیدی که نشان از بالا رفتن استرس اکسیداتیو است، افزایش محتوای کاروتنوئیدی، فنل، فلاونوئید و آنتوسیانین را به دنبال داشته که می‌تواند نشان از اعمال مکانیسم دفاعی باشد.



شکل 2. نمودار رشد جلبک در حضور غلظت‌های 5، 10، 20، 40 (T4) و 0 (T0) میکرومولار نانوذرات آهن. (A) تغییرات غلظت کل فنل. (B) تغییرات غلظت کل فلاونوئید. (C) تغییرات غلظت کل آنتوسیانین. (D) تغییرات غلظت کل پروتئین. (E) تغییرات غلظت مالون‌دی‌الدهید. داده‌ها به وسیله نرم افزار SPSS v.25 تحلیل آماری شدند.  $P < 0.05$

### منابع

Gholami, A., Rasoul-Amini, S., Ebrahimezhad, A., Abootalibi, N., Niroumand, U., Ebrahimi, N., and Ghasemi, Y. (2016). Magnetic properties and antimicrobial effect of amino and lipopamine coated iron oxide nanoparticles. *Minerva Biotechnologica*, 28: 177-86. DOI:10.1016/j.mbs.2016.04.008

Hara, M., Oki, K., Hoshino, K., and Kuboi, T. (2003). Enhancement of anthocyanin biosynthesis by sugar in radish (*Raphanus sativus*) hypocotyl. *Plant Science*, 164: 259-65. doi: 10.1016/S0168-9452(02)00408-9

Plachtova, V., Zdenka, M., Radek, Z., Jiri, T., Rajender, S.V., and Blahoslav M. (2018). Iron and iron oxide nanoparticles synthesized with green tea extract: differences in ecotoxicological profile and ability to degrade malachite green. *ACS sustainable chemistry & engineering*, 6(7): 8679-79. doi:10.1021/acscuschemeng.8b00986

Rana, M. S., Bhusan, S., Sudhakar, D.R., and Prajapati, S.K. (2020). Effect of iron oxide nanoparticles on growth and biofuel potential of *Chlorella sp.* *Algal research*, 49: 101942. doi.org/10.1016/j.algal.2020.101942

Saxena, P., Saharan, V., Baroliya, P.K., Gour, V.S., and Rai, M.K. (2021). Mechanism of nanotoxicity in *Chlorella vulgaris* exposed to zinc and iron oxide. *Toxicology reports*, 8: 724-31. doi:10.1016/j.toxrep.2021.03.023

Taghizadeh, S.M., Ebrahimezhad, A., Rane, M.J., Ramezani, H., Berenjan, A., and Ghasemi, Y. (2022). A study of lysine-stabilized iron oxide nanoparticles (IONPs) on microalgae biofilm formation of *Chlorella vulgaris*. *Molecular biotechnology*, 64: 702-10. doi:10.1007/s12033-022-00454-8