مقاله علمی – پژوهشی:

بررسی ویژگی‌های رشد و اثرات ژنوتوکسیک در جلبک سبز *Chlorella vulgaris* در حضور نانو لوله‌های کربنی تک دیواره

مژگان امتیازجو[۱]، سالومه پایور[۱]، فرشته اسلامی*[۲]، حسین مزدرانی[۳]

*Fr_eslami1689@yahoo.com

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال ، تهران، ایران

۲- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات ، آموزش و ترویج کشاورزی ، تهران ، ایران

۳- دانشگاه علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس ، تهران ، ایران

تاریخ دریافت: مهر ۱۴۰۰ تاریخ پذیرش: آذر ۱۴۰۰

چکیده

افزایش کاربری نانولوله های کربنی سبب سنتز گسترده و رهایش آنها در محیط زیست بویژه زیست بوم های آبی گشته است. از این‌رو، بررسی اثرات اکوتوکسیسیتی و ژنوتوکسیسیتی آنها بر جلبک‌ها به عنوان اولین زنجیره از شبکه غذایی حائز اهمیت می‌باشد. در این مطالعه اثرات نانو لوله‌های کربنی تک‌دیواره با قطر ۲-۱ نانومتر با انتخاب ۶ تیمار با غلظت‌های ۰ (شاهد)، ۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر بر جلبک سبز *Chlorella vulgaris* در ساعات مختلف بررسی گردید. تعداد سلول، غلظت کلروفیل *a* و نرخ رشد ویژه، اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان داد که تراکم سلولی دردامنه غلظت‌های مذکور کاهش یافته است و اختلاف تراکم سلولی بین شاهد و تیمارها معنی‌دار بود ($p<0/05$). حداکثر تعداد سلول در تیمار شاهد از ۴۸ ساعت به بعد حدود $6/2\times10^4$ سلول در میلی‌لیتر بود و کمترین آن در غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم برلیتر نانو ذره از ۷۲ ساعت به بعد از معرض‌گذاری برابر 2×10^4 سلول در میلی‌لیتر ثبت شد. غلظت کلروفیل *a* در تیمار ۱۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر نانو ذره تا ۹۶ ساعت در معرض‌گذاری، روند افزایشی داشت به‌طوری‌که حداکثر مقدار به میزان ۰/۱۷۵میکروگرم بر لیتر در ۷۲ ساعت از معرض گذاری ثبت شد. بیشترین نرخ رشد ویژه پس از ۹۶ ساعت در معرض قرار گرفتن سلول جلبکی، در تیمار ۱۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر نانو ذره مشاهده شد که برابر ۰/۰۵۵ بود. به استثناء تیمار ۱۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر نانو ذره، روند نرخ رشد ویژه سایر تیمارها نسبت به شاهد کاهشی بود. جهت بررسی آسیب DNA، سلول‌های جلبکی تیمار شده با روش ژل الکتروفورز تک سلول قلیایی (آزمون کامت) آماده‌سازی شده و با استفاده از رنگ فلوروسنت رنگ‌آمیزی شدند. بررسی تصاویر تهیه شده با میکروسکپ فلوئورسانس نشان داد که سلول‌های آسیب‌دیده‌ای متشکل از توده رنگی که به عنوان سرکامت شناخته می‌شوند به همراه یک دنباله که رشته‌های DNA مهاجرت کرده می‌باشند، دیده می شوند. سلول‌های تیمار نشده (شاهد) فاقد این دنباله می‌باشند. بنابراین، نانو لوله‌های کربنی تک دیواره آسیب DNA را در سلول جلبکی القاء می‌کنند.

لغات کلیدی: نانو لوله های کربنی تک دیواره، *Chlorella vulgaris*، اثرات اکوتوکسیسیتی، آسیب DNA

*نویسنده مسئول

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-09]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1400.30.5.13.6]

مقدمه

از دهه گذشته استفاده از نانوذرات مهندسی شده به‌سرعت در حال افزایش می‌باشد و نیز تعداد ادعاهای مصرف‌کنندگان درخصوص نانو ذرات مهندسی شده افزایش یافته است (Yousefi *et al*., 2020). مهندسی نانو مفهومی است که توسعه و استفاده از نانوذرات ساخته شده با آرایش مشخص در مقیاس نانو را پوشش می‌دهد. نانو ذرات به‌واسطه سطح ویژه بسیار بالا، خواص فیزیکی–شیمیایی و مکانیکی منحصربه‌فردی مانند واکنش‌پذیری شیمیایی، سختی، کش‌سانی، استحکام و الکتریسیته، با سایر مواد متفاوت می‌باشند. این ذرات دارای قطر ۱۰۰-۱ نانومتر می‌باشند. تولید بیشترین نانو ذرات مهندسی شده شامل نانو ذره اکسید تیتانیوم (TiO_2; ۵۵۰۰۰-۵۵۰)، اکسید سیلیسیوم (SiO_2; ۵۵۰۰۰-۵۵)، اکسید الومینیوم (AlO_x; ۵۵۰۰۰-۵۵۰)، اکسید روی (ZnO; ۵۵۰-۵۵)، نانو لوله‌های کربنی (CNTs; ۵۵۰-۵۵)، اکسید آهن (FeO_x; ۵۵۰۰-۵/۵)، اکسید سزیم و نقره (CeO_x و AgO; ۵۵-۵/۵) تن در هر سال می‌باشند (Piccinno *et al*., 2012). نانو لوله‌های کربنی با داشتن لایه‌های گرافیکی در دیواره، ساختار و عملکردی متفاوت دارند. تیپ‌هایی که به طور عمده مطالعه شده‌اند و به طور تجاری در دسترس می‌باشند شامل: نانو لوله‌های کربنی تک دیواره[1]، نانو لوله‌های کربنی دو دیواره[2]و نانو لوله‌های کربنی چند دیواره[3] می‌باشند (Coleman *et al*., 2006). کاربردهای نانو لوله‌های کربنی شامل صفحات لمسی، سلول‌های خورشیدی، باتری‌ها، سوپر خازن‌ها، سنسورها، سلول‌های سوختی و ... می‌باشد (De Volder *et al*., 2013; Bavandi *et al*., 2019).

سنتز و استفاده از نانو لوله‌های کربنی منجر به رهاسازی آنها به محیط زیست به‌ویژه محیط آبی گردیده است. از این‌رو، بررسی سرنوشت و رفتار نانولوله‌های کربنی در تیپ‌های مختلف در سیستم‌های آبی طبیعی به همراه اثرات اکوتوکسیسیتی[4] بالقوه آنها جهت ارزیابی کمی ریسک‌های زیست‌محیطی بسیار ضروری است (Stone *et al*., 2010). جلبک‌ها تولیدکنندگان اولیه هستند که خط اولیه زنجیره غذایی اکوسیستم و شروع رخداد تجمع زیستی را رقم می‌زنند. این گروه نقش مهمی در تعادل زیست‌بوم‌ها دارند. جلبک‌ها به دلیل میزان رشد زیاد، بررسی اثرات تبدیلی در معرض‌گذاری آلاینده‌ها را ممکن می‌سازند و یک مدل انتخابی برای بررسی اثرات بلندمدت آلاینده‌ها می‌باشند (Akcha *et al*., 2008; Emtyazjoo *et al*., 2019). در سال‌های اخیر، مطالعات متعدد در خصوص نانو لوله‌های کربنی بر آبزیان صورت گرفته است که بیانگر کاهش رشد در میکرو جلبک‌هاست که شامل مطالعات محققین مختلف (Kwok *et al*., 2010; Wei *et al*., 2010; Schwab *et al*., 2011; Thakkar *et al*., 2016; Wu *et al*., 2018) می‌باشد.

به‌علاوه، مطالعات متعدد دیگری در خصوص اثرات سمیت نانو ذرات فلزات اکسید شده بر جلبک‌های متعدد انجام شده است که بیانگر اثرات توکسیکولوژیک نانوذرات بر موجودات آبزی می‌باشد که شامل: اثردی اکسید تیتانیوم بر *Chlamydomonas reinhardtii* (Chen *et al*., 2012)، اثرات سمی نانو ذرات اکسید روی (ZnO)، اکسید تیتانیوم (TiO_2) و اکسید الومینیوم (Al_2O_3) بر جلبک سبز *Scenedesmus obliqus* و زئوپلانکتون *Daphnia magna*(Zhu *et al*., 2008)، نانو ذرات اکسید تیتانیوم، اکسید روی و اکسید مس در جلبک *Pseudokirchneriella subcapitata* (Aruoja *et al*., 2009)، نانو ذره اکسید مس بر جلبک *Scenedesmus dimorphus* (کاظمی و شریعتی، ۱۳۹۸)، نانو ذره اکسید روی بر گونه‌های جلبک *C. vulgaris* و *S. dimorphus* (پنداشته و همکاران، ۱۳۹۱)، اثرات استرس سلنییوم بر مقدار پیگمان‌های فتوسنتزی و رشد *C. vulgaris* (Chen *et al*., 2005) می‌باشد. همچنین در مطالعه‌ای سمیت نانو ذرات اکسیدهای آلومینیوم، تیتانیوم، سیلیسیم و روی بر جلبک *Chlorella* sp. بررسی شد و نتایج نشان

[1] Single-Walled Carbon NanoTubes
[2] Double-Walled Carbon NanoTubes
[3] Multi-Walled Carbon NanoTubes
[4] Ecotoxicity

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-09]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1400.30.5.13.6]

داد که نانو ذرات اکسید روی سمیت چشمگیری داشته و سه نانو ذره دیگر سمیت کمتری داشتند (Ji *et al*., 2011).

ژل الکتروفورز قلیایی یا (سنجش کامت قلیایی)، روشی حساس و مفید جهت پایش اثرات ژنوتوکسیسیتی گزارش شده است. این تکنیک ارزشمند توانمندی ارزیابی آسیب DNA در سطح تک سلولی‌ها را ممکن می نماید (Desai *et al*., 2006). مطالعات متعدد در خصوص القاء آسیب DNA در میکرو ارگانیسم به‌وسیله مواد شیمیایی مختلف صورت گرفته است که به مواردی اشاره می‌شود (Akcha *et al*., 2008; Prado *et al*., 2009; Handy *et al*., 2012; Li *et al*., 2014).

در اکوسیستم‌های آبی میکرو جلبک *C. vulgaris* برای آزمایش‌ها جهت تعیین نقش حیاتی آنها در تولید اکسیژن به عنوان تولید کنندگان اولیه در شبکه غذایی به‌کار برده می‌شود و تخریب فعالیت آن منجر به عدم تعادل در محیط آبی می‌شود (Baker *et al*., 2014; Khoshnamvand *et al*., 2020). بیشترین درصد پروتئین بعد از جلبک *Spirulina maxima* به *C. vulgaris* اختصاص دارد (Tartiel, 2005; Um and Kim 2009. Oukarroum و همکاران (۲۰۱۲) بیان می‌کنند که *C. vulgaris* می‌تواند به‌سرعت به صورت غیر جنسی تکثیر شود و به همین دلیل به طور گسترده‌ای به عنوان یک مدل برای مطالعات سمی استفاده می‌شود. هدف این تحقیق بررسی اثرات نانو لوله‌های کربنی تک دیواره بر رشد، فتوسنتز و آسیب DNA در جلبک *C. vulgaris* که یک مدل انتخابی برای بررسی مواد سمی است، می‌باشد.

مواد و روش کار

جلبک سبز *C. vulgaris* از شرکت هزاره سوم ملل تهیه گردید. نانو ذرات لوله‌های کربنی تک دیواره با توجه به اندازه آن از شرکت ژرفا پژوهان علوم نو که محصولات آن تولید آمریکاست، خریداری شد. این نانو ذره پودری سیاه رنگ با درصد خلوص ۹۵٪، قطر خارجی ۲-۱نانومتر، طول تقریبی ۳۰ میکرومتر و سطح ویژه ۳۸۰ گرم بر متر مربع می‌باشد.

آماده سازی محیط کشت و کشت جلبک

در آزمایشگاه، محیط کشت JM (Jaworski's Medium)، برای رشد جلبک مورد استفاده قرار گرفت. جهت صحت خلوص جلبک، ابتدا کشت در محیط نوترینت اگار صورت گرفت و پتریدیش‌ها به مدت ۱۲-۱۰ روز در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد در زیر نور فلورسنت نگهداری شدند. سپس تعدادی از کلنی‌های رشد کرده جلبک به لوله‌های آزمایش دارای محیط کشت مایع اضافه شد و به مدت ۷ روز در دمای محیط در معرض نور فلورسنت قرار گرفتند. در این فاصله زمانی هر روز شمارش سلولی با استفاده از لام نئو بار در زیرمیکروسکوپ نوری (Nikon, Microphot-fxt, Japan) صورت گرفت. میزان تراکم با استفاده از فرمول ذیل محاسبه شد (Banerjee *et al*., 2011):

تراکم سلول بر میلی لیتر = کل سلول های شمارش شده/تعداد بلوک‌ها × 10^4

پس از رسیدن رشد جلبک به فاز نمایی، به عنوان ذخیره در سایر آزمایش‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. کشت مایع جلبک در اتاق کشت استریل با دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و با شدت نور ۳۵۰±۳۵۰۰ لوکس قرار گرفت. پریود نوری یا دوره روشنایی (L) و تاریکی (D) آزمایش با تایمر اتوماتیک به صورت متناوب ۱۲/۱۲ ساعت تنظیم گردید (Andersen, 2005).

آماده‌سازی ذخیره نانو ذرات لوله‌های کربنی تک دیواره

در چند مرحله به منظور تعیین حدود غلظت‌های اصلی آزمایش، چندین مرحله دامنه‌یابی به عنوان پیش تست از نانو ذرات مورد آزمایش قرار گرفت تا محدوده سمیت مشخص شود. در نهایت غلظت های لگاریتمی، ۰ (شاهد)،

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-09]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1400.30.5.13.6]

۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر انتخاب شدند. برای هر تیمار سه تکرار انجام شد.

در معرض قرار گیری جلبک *C. vulgaris* با نانولوله های کربنی تک دیواره

مطابق روش OECD (۲۰۱۱)، تعداد $۱۰^۴$× ۵ سلول جلبک از محلول ذخیره برداشت و به لوله‌های آزمایش دارای محیط کشت استریل و نانو ذره لوله‌های کربنی تک دیواره با غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر با حجم ثابت ۱۰ میلی لیتر در سه تکرار تلقیح صورت گرفت. سپس نمونه‌های مذکور در یک اتاق کشت استریل که با دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد، شدت نور ۳۵۰±۳۵۰۰ لوکس، با تناوب نوری، ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی قرار گرفتند. پس از گذشت زمان‌های ۱۲، ۱۸، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت، میزان سلول‌های جلبکی برحسب تعداد در میلی لیتر محاسبه گردید. قابل توجه هست که همه غلظت‌های مورد نظر همراه با شاهد مقایسه شدند.

اندازه‌گیری کلروفیل*a*

جهت بررسی میزان کلروفیل *a*، ۵ میلی لیتر از کشت جلبکی با ۷۰۰۰ دور در ۱۰دقیقه سانتریفوژ شد. سپس آب رویی تخلیه گردید و ۵ میلی‌لیتر متانول اضافه شد و به‌خوبی هم‌زده شد و جهت استخراج کلروفیل، در درجه حرارت □ ۴ به مدت ۳۰ دقیقه در یخچال نگهداری شدند، سپس با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر درطول موج ۶۶۵ و ۶۵۲ نانومتر برحسب میکروگرم بر لیتردر تیمارها در فاصله زمانی مختلف محاسبه شد (Ritchie, 2006).

بررسی ضریب رشد ویژه

نرخ رشد ویژه بر اساس وزن سلول خشک محاسبه شد. برای وزن خشک سلول، روش محاسبه مواد معلق فرار اعمال شد (Chae and Shine, 2007). در این پروسه، اختلاف بیومس قبل و بعد از سوختن نمونه جلبکی، وزن خشک جلبک به‌دست می‌آید. بر اساس بیومس محاسبه شده نرخ رشد ویژه (μ) با فرمول ذیل به‌دست آمد:

$$\mu=\frac{In(M2/M1)}{T2-T1}$$

μ: نرخ رشد ویژه، M2: زیتوده جلبکی در آخرین روز، M1: زیتوده جلبکی در اولین روز، T2: آخرین روز، T1: اولین روز

بررسی اثرات ژنوتوکسیک نانو لوله‌های کربنی تک دیواره

با استفاده از روش ژل الکتروفورز تک سلولی (سنجش کامت)، سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانو لوله‌های کربنی تک‌دیواره در آگارز با نقطه ذوب پایین قرار گرفت. لام‌ها از قبل با آگاروز پوشش داده شدند و پس از لامل‌گذاری برای ۳۰ دقیقه در یخچال قرار گرفتند. لام‌ها به مدت دو ساعت در محلول لیز کننده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده و پس از آن چهار مرتبه هر بار به مدت ۵ دقیقه با محلول تریس شسته شد تا پاک سازی شوند. لام‌ها را به مدت ۲۰ دقیقه در تانک حاوی بافر الکتروفورز قلیایی (pH>13) قرار داده تا باز شدن DNA و بیان آسیب‌ها امکان‌پذیر گردد. منبع تغذیه بر ۲۵ ولت تنظیم و لام‌ها به مدت ۳۰ دقیقه الکتروفورز شدند. پس از اتمام الکتروفورز، لام‌ها خارج و با بافر خنثی (حاوی تریس) به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شدند. با استفاده از محلول اتیدیوم بروماید ۱ درصد، لام‌ها رنگ‌آمیزی شدند (مزدارانی و خشای، ۱۳۸۴). جهت بررسی آسیب DNA جلبک *C. vulgaris*، ستاره‌های دنباله‌دار (کامت‌ها) رنگ‌آمیزی شده با میکروسکپ فلوئورسانس (NikonE800) به طور چشمی بررسی گردیدند. تمام مسیرهای کشت خطی و کشت انبوه در دانشکده علوم و فنون دریایی دانشگاه آزاد اسلامی صورت گرفت و آزمون کامت در دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام شد. مدت زمان این آزمایش و بررسی تیمارها حدود ۹ ماه طول کشید.

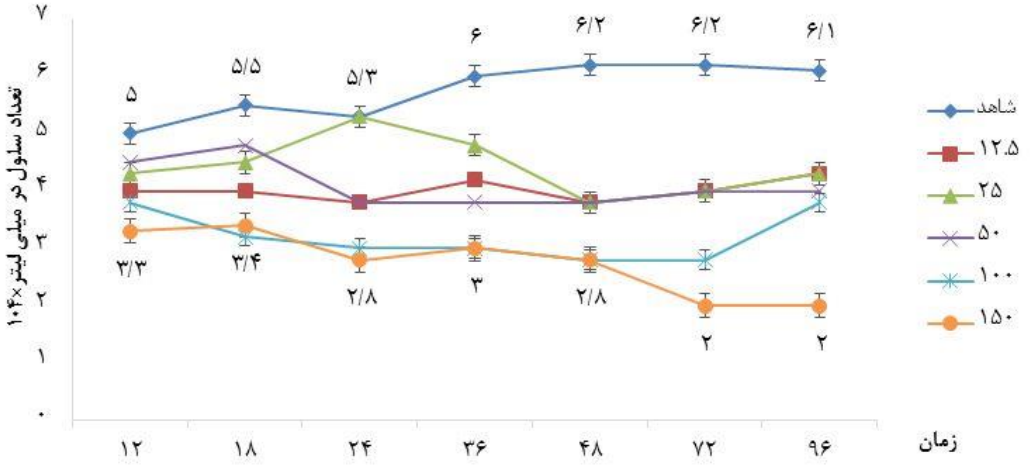
با استفاده از نرم افزار Excel نمودارها رسم گردید و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS 16 و

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-09]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1400.30.5.13.6]

آنالیز واریانس یک طرفه انجام و معنی داربودن اختلاف بین نتایج حاصله درسطح ۹۵٪ بررسی شد.

نتایج

تعداد سلول میکرو جلبک *C. vulgaris* در ۵ تیمار با غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر از نانو لوله‌های کربنی تک‌دیواره در مقایسه با شاهد در ساعات مختلف نشان می‌دهد که در تمامی ساعات در معرض‌گذاری تعداد سلول‌های جلبکی گروه شاهد بیشتر از تیمارها می‌باشد. حداکثر تعداد سلول در شاهد از ۴۸ ساعت از معرض‌گذاری به بعد حدود $۶/۲\times۱۰^{۴}$ سلول در میلی‌لیتر می‌باشد و کمترین آن در غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی تک‌دیواره از ۷۲ ساعت به بعد از معرض‌گذاری برابر ۲×۱۰^{۴} سلول در میلی‌لیتر ثبت شد. تعداد سلول‌ها بین غلظت‌های متفاوت نانو لوله‌های کربنی تک‌دیواره و شاهد اختلاف معنی‌داری داشت (p<۰/۰۵). تعداد سلول در غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر نانو ذره تک دیواره در ۲۴ساعت در معرض‌گذاری افزایش یافت و به تعداد سلول در شاهد رسید و پس از آن کاهش یافت. همچنین تعداد سلول در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو ذره در ۱۸ساعت مواجهه افزایش قابل توجه داشته است. تعداد سلول جلبکی در غلظت‌های متفاوت با افزایش زمان مواجهه دارای نوسات کم می‌باشند (شکل ۱).



شکل ۱: میانگین تعداد سلول‌های جلبک *C. vulgaris* درغلظت‌های متفاوت نانو لوله‌های کربنی تک‌دیواره در زمان‌های مختلف (میانگین±خطای استاندارد)

Figure 1: Compartion of Mean number algal cells of *C.vulgaris* in different concentrations of single – walled carbon nanotubes at different times (mean±SE)

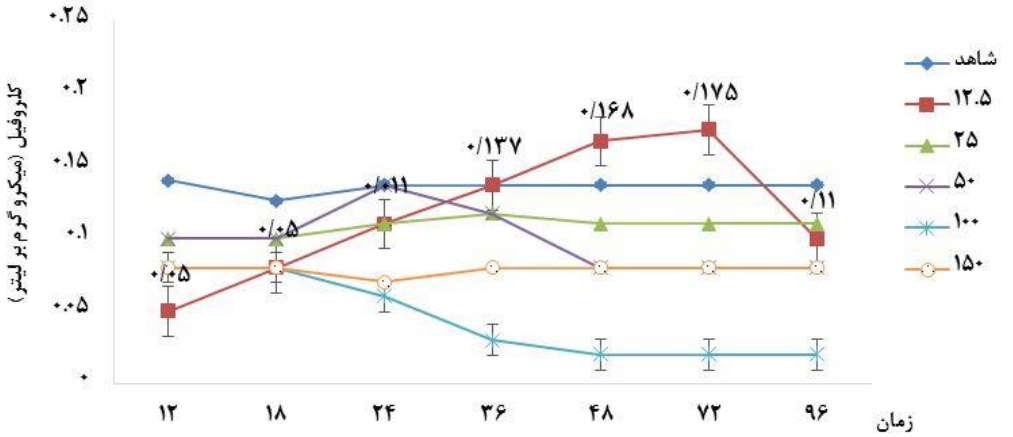
غلظت کلروفیل *a* در تیمار ۱۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نانو ذره لوله‌های کربنی تک‌دیواره با افزایش زمان مواجهه تا ۷۲ ساعت روند افزایش داشت به‌طوری‌که حداکثر مقدار به میزان ۰/۱۷۵ میکروگرم برلیتر در۷۲ ساعت پس از در معرض‌گذاری ثبت شد. کمترین غلظت‌ها مربوط به تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی تک‌دیواره بود که بعد از ۴۸ ساعت به بعد ملاحظه گردید. غلظت کلروفیل در تیمار ۱۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در تمامی ساعات در معرض‌گذاری تقریباً یکسان بود (شکل ۲). با افزایش زمان مواجهه تفاوت میزان کلروفیل شاهد با تیمارها معنی‌دار نمی‌باشد (p>۰/۰۵). میزان غلظت کلروفیل بین شاهد و تیمار ۱۲/۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نانو ذره لوله کربنی معنی‌دار می‌باشد (p<۰/۰۵). نرخ رشد ویژه، *C. vulgaris* در مجاورت نانو لوله‌های کربنی تک‌دیواره در غلظت‌های متفاوت نشان می‌دهد که بیشترین نرخ رشد در تیمار ۱۲/۵ برابر ۰/۰۵۵ طی ۹۶

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-09]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1400.30.5.13.6]

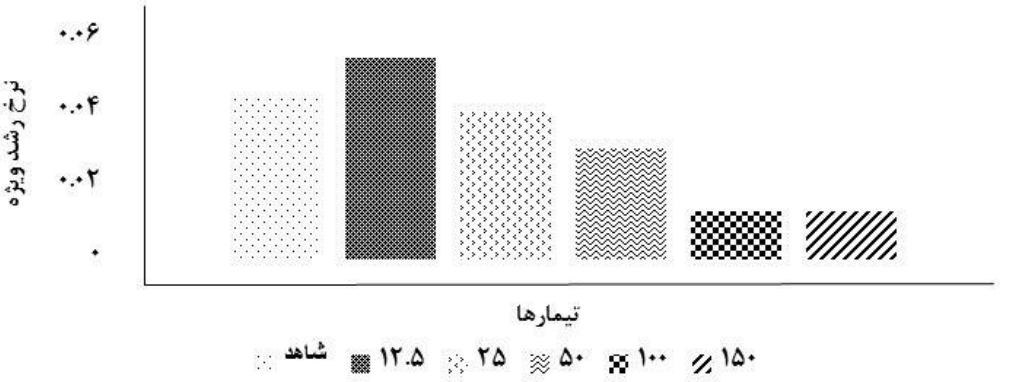
ساعت می‌باشد. در تیمارهای ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نانو ذره دارای کمترین مقدار نرخ رشد می‌باشد.

بین نرخ رشد ویژه تیمار ۱۲/۵و سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار می‌باشد (p<۰/۰۵) (شکل ۳).



شکل ۲: مقایسه میانگین غلظت کلروفیل *a* (میکروگرم بر لیتر) در زمان و غلظت‌های مختلف نانو لوله‌های کربنی تک‌دیواره در *C. vulgaris* (میانگین±خطای استاندارد)

Figure 2: Compartion of mean Chl-*a* concentration (µg/l) of *C. vulgaris* in different concentrations of single –walled carbon nanotubes at different times(mean±SE)



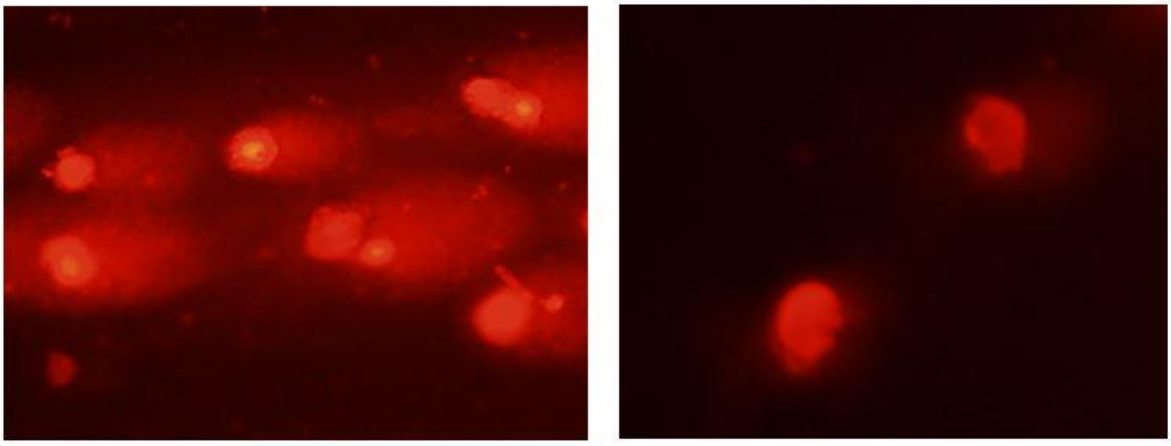
شکل ۳: نرخ رشد ویژه در جلبک *C. vulgaris* طی ۹۶ ساعت درمواجهه با غلظت‌های متفاوت نانو لوله‌های کربنی تک‌دیواره

Figure 3: Spicific growth rate of *C. vulgaris* during 96 hours exposed with different concentrations of single- walled carbon nanotubes

تصویر DNA از جلبک *C. vulgaris* که در معرض نانولوله های کربنی تک دیواره همراه با تصویر شاهد نشان می‌دهد که در نمونه‌های جلبکی که در معرض نانو لوله‌های کربنی تک‌دیواره نبوده‌اند (الف- ۴)، رنگ فلورسنت در ناحیه سر متراکم می‌باشد و فاقد دنباله هستند و هاله‌ای اطراف آن دیده می‌شود. اما در نمونه‌های جلبکی که در معرض نانو ذره قرار گرفته‌اند (شکل ب- ۴)، سر کامت روشن و دنباله در انتها آن دیده می‌شود (شکل ۴).

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-09]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1400.30.5.13.6]



ب الف

شکل ۴: تصویر DNA جلبک *C. vulgaris* (الف: نمونه شاهد، ب: جلبک در معرض نانو لوله‌های کربنی تک‌دیواره)

Figure 4: Image of DNA of *C. vulgaris* (a: control sample, b: algae exposed to single-walled carbon nanotubes)

بحث

میزان رشد و تقسیمات سلولی و کلروفیل *a* از مهم‌ترین شاخص‌های فیزیولوژیک هستند که در علم سم ناسی برای ارزیابی خطر سموم در محیط استفاده می‌شود (Aizdaicher and Berezovskaya, 1997). سمیت نانو ذرات به‌وسیله روش‌های گوناگون تحمیل می‌شود. نانو ذرات به آسانی می‌توانند از غشاء سلولی عبور کنند و با متابولیسم درون سلولی تعامل دارند (Hanley *et al.*, 2009). در این مطالعه، در تمامی ساعات در معرض‌گذاری، تعداد سلول‌های جلبکی شاهد بیشتر از تیمارها می‌باشد. غلظت کلروفیل *a* در تیمار ۱۲/۵ میلی‌گرم برمیلی لیتر نانو ذره با افزایش زمان مواجهه تا ۹۶ ساعت روند افزایش داشته است به‌طوری‌که بیشترین غلظت کلروفیل *a* در طول دوره در معرض‌گذاری در همین غلظت در ۷۲ ساعت مشاهده می‌گردد.

مطالعات متعددی با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. Wu و همکاران (۲۰۱۸) با بررسی اثرات نانو لوله‌های کربنی تک‌دیواره بر جلبک *Microcystis aeruginosa* بیان نمودند که تراکم سلول‌های جلبکی به طور قابل توجهی در غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر این نانو ذره مهار شد و میزان اثرات مهار وابسته به دوز آن بود. کاهش رنگدانه‌های فتوسنتزی، قند محلول و محتوای پروتئین نشان داد که نانو لوله‌های کربنی تک‌دیواره سیستم فتوسنتزی جلبک را به‌شدت تخریب نموده و ساختار مربوط به متابولیسم سلول را از بین برده است. Thakkar و همکاران (۲۰۱۶) اثرات اکوتوکسیتی نانو لوله‌های کربنی تک‌دیواره را بر رشد، فتوسنتز و استرس اکسیداتیو جلبک *Dunaliella tertiolecta* بررسی نمودند. سمیت بر اساس رشد، فعالیت‌های فتوسنتزی، استرس اکسیداتیوگلوتاتیون سلولی[1] در دامنه غلظت‌های ۲۰-۰/۱ میلی‌گرم در لیتر نانو لوله‌های کربنی تک‌دیواره کربوکسیله شده، بررسی گردید. افزایش غلظت نانو ذرات، اثرات سمی را افزایش می‌دهد به‌طوری‌که مهار رشد جلبک حدود ۳۰ درصد، کاهش فتوسنتز به مقدار ۱۸ درصد و کاهش گلوتاتیون داخل سلولی به ۹۵ درصد می‌رسد. همچنین بررسی اثر نانو لوله‌های کربنی تک‌دیواره بر رشد جلبک *Pseudokirchneriella subcapitata* نشان داد که مهار رشد جلبکی در غلظت بیش از ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر نانو لوله‌های کربنی تک دیواره در حضور ۰/۰۲۳ درصد صمغ عربی در محیط کشت اتفاق افتاد. شایان ذکر است، وقتی که غلظت صمغ عربی به بیش از ۰/۰۴۶

[1] Intracellular glutathione

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-09]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1400.30.5.13.6]

درصد کاهش یافت، سمیت از بین رفت و رشد سلول جلبکی افزایش یافت (Youn *et al*., 2012). Long و همکاران (۲۰۱۲) به طور سیستماتیک سمیت سه نمونه لوله‌های کربن چند دیواره را بر جلبک سبز *Chlorella* sp. بررسی نمودند. آنها به بررسی و شناسایی سهم پنج مکانیسم احتمالی مربوط به مهار رشد جلبکی تمرکز کردند. نتایج نشان دادند که لوله‌های نانوکربن چند دیواره به طور معنی‌داری رشد جلبکی را مهار می‌کنند. آثار غلظت‌های مختلف نانو ذره اکسید مس بر رشد، کلروفیل و کارتنویید در جلبک *C. vulgaris* به مدت شش روز بررسی شد و براساس نتایج، تعداد سلول‌ها با افزایش غلظت نانو ذره کاهش معنی‌داری داشت. این نانو ذره باعث افزایش نرخ بازدارندگی در جلبک شد. همچنین میزان کلروفیل کل، کلروفیل آ، کلروفیل ب و کارتنویید در همه غلظت‌های آزمایشی در مقایسه با شاهد کاهش داشتند و میزان کاهش آنها تابعی از غلظت نانو ذره اکسید مس بود (Miri and Khandan Barani, 2016). اثرات استرس سلنییوم بر مقدار پیگمان‌های فتوسنتزی و رشد *C. vulgaris* نشان داد که مقادیر کارتنوییدها (بتا کارتن و گزانتوفیل‌ها) و کلروفیل (کلروفیل *a* و *b*) سلول در معرض گذاشته شده به ۵۰ میلی‌گرم در لیتر سلنییوم در ابتدا افزایش و پس از آن کاهش یافت به‌طوری‌که پیگمان‌های فتوسنتزی در سلول‌های در مواجهه با سلنییوم (۸۰۰ میلی‌گرم در لیتر) به طور معنی‌داری کاهش یافت (Chen *et al*., 2005). Adochite و Andronic (۲۰۲۱) با بررسی مطالعات انجام شده در خصوص اثر نانو ذرات فوتوکاتالیست بر جلبک *C. vulgaris* بیان کردند که مورفولوژی، تراکم و مساحت سطح آنها باعث ایجاد مهار رشد و مرگ جلبکی در آینده می‌شود. نانو ذرات دارای پتانسیل اثر مهار کنندگی بر جلبک‌ها و به طور جدی مختل نمودن غشاء سلولی هستند. مطالعه سمیت حاد نانو لوله‌های کربنی تک‌دیواره بر دو جلبک آب شیرین *Raphidocelis subcapitata* و *C. vulgaris*، دافنی *Daphnia magna* و ماهی *Oryzias latipes* نشان داد که این نانو ذره، رشد جلبک *R. subcapitata* و *C. vulgaris* را با EC50 به‌ترتیب ۲۹/۹۹ و ۳۰/۹۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مهار نموده است، با این‌حال، آزمایش هیچ اثر مرگ و میر یا بی‌حرکتی تا غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر بر ماهی و دافنی نگذاشته است (Sohn *et al*., 2015).

روند نرخ رشد سایر تیمارها به استثناء تیمار ۱۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر نانو ذره نسبت به شاهد نزولی می‌باشد. بدین معنا که با افزایش غلظت نانو لوله‌های کربنی تک‌دیواره، نرخ رشد ویژه کاهش می‌یابد. همچنین ملاحظه می‌شود که بیشترین نرخ رشد در تیمار ۱۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی تک‌دیواره می‌باشد. Wang و Yang (۲۰۱۳) اثرات نانو لوله‌های کربن تک‌دیواره را بر جمعیت ریزجلبک سبز *Chromochloris zofingiensis*، تولید رنگدانه‌ها و اسیدهای چرب بررسی کردند. جلبک به مدت ۶ روز با غلظت ۰ (شاهد)، ۴۰، ۸۰، ۱۶۰ یا ۳۲۰ میلی‌گرم در لیتر با نانو لوله‌های کربنی تک‌دیواره انکوبه شد. هر دو اثر مثبت و منفی را بر رشد *C. zofingiensis* نشان دادند. با افزایش زیست‌توده در سطوح پایین (۱۶۰-۴۰ میلی‌گرم در لیتر)، اما مهار رشد در سطوح بالا (۳۲۰ میلی‌گرم در لیتر) اتفاق افتاد. در مقابل، کاهش تجمع اسیدهای چرب و رنگدانه‌های *C. zofingiensis* در محدوده غلظت‌های مورد آزمایش مشاهده شد. کاظمی و شریعتی (۱۳۹۸) با بررسی نرخ رشد جلبک *Scenedesmus dimorphus* در غلظت‌های متفاوت نانو ذرات اکسید مس (CuO-NP) بیان داشتند که با افزایش غلظت نانو ذره، نرخ رشد ویژه جلبک کاهش می‌یابد.

در تصاویر تهیه شده با میکروسکپ فلوئورسانس دیده می‌شود که نمونه‌های سلول جلبکی که در معرض نانو ذره قرار گرفته‌اند، دارای سرکامت روشن‌تر و دنباله می‌باشند. DNA آسیب‌دیده تحت جریان الکتروفورز به سمت آند حرکت کرده و شکل ستاره دنباله‌دار پیدا می‌کند (مزدرانی، ۱۳۸۴). Prado و همکاران (۲۰۰۹) بیان کردند که DNA سلول‌های *C. vulgaris* تحت تاثیر نانو ذرات لوله‌های کربنی تغییر شکل داده‌اند و DNA به صورت دنباله در انتهای هسته و سر کامت کشیده و از هسته جدا شده است که بیانگر آسیب DNA در سلول می‌باشد و

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-09]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1400.30.5.13.6]

سلول‌های نرمال، فاقد این دنباله می‌باشند. در نمونه شاهد، تصویر دارای هاله‌ای از رنگ می‌باشد که بیانگر این است که آسیب DNA در حد بسیارکم در نمونه شاهد دیده می‌شود. Singh و همکاران (۱۹۸۸) بیان کردند که ایجاد سلول‌های آسیب‌دیده در نمونه شاهد ممکن است مربوط به آسیب DNA مصنوعی باشد که می‌تواند به‌وسیله ناهمگونی‌ها در میدان الکتریکی یا تشکیل رادیکال هنگام الکتروفورز به‌وجود آید. مقدار DNA خروجی از هسته، معیاری برای میزان آسیب DNA به سلول است. هرچه دم DNA روشن‌تر و بلندتر باشد، سطح آسیب بیشتر است. Li و همکاران (۲۰۱۴) با استفاده از آزمون کامت برای تشخیص آسیب DNA در جلبک سبز تک سلولی *Euglena gracilis* نشان دادند که افزایش دوز غلظت مواد شیمیایی ژنوتوکسیک باعث افزایش آسیب DNA می‌شود و درصد سلول‌های دنباله‌دار افزایش می‌یابد و آسیب DNA با طول و حرکت دنباله در DNAمهاجرت کرده، مشخص می‌شود. اثرات ژنوتوکسیک کادمیوم بر فیتوپلانکتون *Chaetoceros tenuissimus*و آسیب DNA با استفاده از آزمون کامت ارزیابی شد و مشخص شد که کادمیوم بر سلول‌های هسته اثر می‌گذارد و با افزایش غلظت آن، تعداد سلول‌های دنباله‌دار و آسیب‌دیده بیشتر می‌شود. آسیب DNA به عنوان درصد تعداد دنباله‌دارها و سلول‌های طبیعی اندازه‌گیری شد (Desai *et al*., 2006). آزمون کامت بر ریز جلبک‌های داینوفلاژله *Karenia mikimotoi* و *Alexandrium minutum* انجام شد. ریزجلبک‌ها در طول رشد نمایی خود در معرض پراکسید هیدروژن با غلظت ۵ و ۱۰۰ میکرومول برای یک ساعت قرار گرفت. آزمون کامت برای*K. mikimotoi* که ژنوتوکسیسیته از کمترین غلظت آزمایش شده ۵ میکرومولار با اثر وابسته به غلظت مشاهده شد، معتبر بود و قرار گرفتن آن در معرض اندوسولفان منجر به آسیب DNA برای هسته‌های آن شد (Akcha *et al* ., 2008). Handy و همکاران (۲۰۱۲) آزمون کامت را جهت بررسی اثرات ژنوتوکسیک نانواکسید سیلیس بر جلبک *D. tertiolecta* به‌کار بردند. در این آزمون نانو ذرات SiO_2 با مقدار ۱۲۵ میلی‌گرم در لیتر، منجر به افزایش اثرات ژنوتوکسیک بعد از ۷۲ ساعت گردید. در مطالعه مشابه بر همین گونه، نانو ذرات TiO_2 برای ۲۴ ساعت منجر به ۷۰٪ آسیب در هسته گردید. علفکش پاراکوت (paraquat) آسیب DNA را در سلول‌های *Chlamydomonas moewusii* بعد از ۲۴ ساعت در معرض‌گذاری غلظت‌های ۰/۰۵ میکرومول یا بیشتر القاء می‌کند. چنانچه غلظت پاراکوات در محیط افزایش یابد، DNA سلول از هسته جدا و به صورت دنباله در انتها دیده می‌شود. در سلول‌های با هسته نرمال که تحت شرایط کنترل و فاقد پاراکوات باشند، فرم کامت‌ها دارای یک ناحیه سر و دنباله کوچک یا فاقد دنباله DNA قطعه قطعه شده می‌باشند. با افزایش آسیب DNA، قطعه قطعه شدن بیشتر آشکار شد و ناحیه سر واضح نیست (Prado *et al*., 2009). Rhiem و همکاران (۲۰۱۵) نانو لوله‌های کربن را بر جلبک *Desmodesmus subspicatus* مورد آزمایش قرار دادند و نشان دادند که نانو لوله‌های کربنی باعث تغییر در خصوصیات بیوشیمیایی این جلبک می‌شوند.

تشکر و قدر دانی

این تحقیق در آزمایشگاه مجتمع آزمایشگاهی فخری‌زاده دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال و آزمایشگاه تحقیقاتی ژنتیک دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است و بر خود لازم می‌دانیم از کارشناسان محترم آزمایشگاه قدردانی و تشکر نماییم.

منابع

پنداشته، ح.، شریعتی، ف.، کشاورزی، ع. و رمضان پور، ز.، ۱۳۹۱. بررسی سمیت نانو ذره اکسید روی بر گونه های جلبک *Chlorella vulgaris* و *Scenedesmus dimorphus*. پانزدهمین همایش ملی بهداشت محیط، رشت.

کاظمی، م. و شریعتی، ف.، ۱۳۹۸. سمیت نانوذرهٔ اکسید مس روی جلبک *Scenedesmus dimorphus*. فصلنامه علمی-پژوهشی زیست

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-09]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1400.30.5.13.6]

شناسی میکرو ارگانیسم ها، ۸(۳۰): ۲۵-۱۳ DOI: 10.22108/BJM.2019.113648.1165

مزدرانی، ح. و خشای، س.، ۱۳۸۴. آسیب های زمینه DNA در اسپرم های افراد سالم و نابارور با استفاده از روش ستاره دنباله دار. حکیم، ۸(۲): ۲۴-۱۷.

Adochite, C. and Andronic, L., 2021. Aquatic Toxicity of Photocatalyst Nanoparticles to Green Microalgae *Chlorella vulgaris*. *Water*, 13(1): 2-13. DOI:10.3390/w13010077.

Akcha, F., Arzul, G., Rousseau, S. and Bardouil, M., 2008. Comet assay in phytoplankton as biomarker of genotoxic effects of environmental pollution. *Marine Environmental Research*, 66(1): 59-61. DOI: 10.1016/j.marenvres.2008.02.022.

Aizdaicher, N.K. and Berezovskaya N.A., 1997. The effect of copper ions and a detergent on green microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Platymonas* sp. *Oceanographic Literature Review*, 2(44): 156.

Andersen, R.A., 2005. Algal Cultural Techniques, Elsevier academic press, London, 592 P.

Aruoja, V., Dubourguier, H.C., Kasemets, K. and Kahru, A., 2009. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO2 to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Science of the Total Environment*, 407(4): 1461–1468. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2008.10.053.

Baker, T.J., Tyler, C.R. and Galloway, T.S., 2014. Impacts of metal and metal oxide nanoparticles on marine organisms. *Environmental Pollution*,186: 257–271. DOI: 10.1016/j.envpol.2013.11.014.

Banerjee, S., Hew, W.E., Khatoon, H. and Shariffi, M., 2011. Growth and proximate composition of tropical marine *Chaetoceros calcitrans* and *Nannochloropsis oculata* cultured outdoors and under laboratory condition. *African Journal of Biotechnology*, 10(8): 1375-1383. DOI: 10.5897/AJB10.1748.

Bavandi, R., Emtyazjoo, M., Nasrollahzadeh Saravi, H.,Yazdian, F. and Sheikhpour, M., 2019, Study of nano-structure zero-valent iron and graphene-oxid capability onbioremoval of trinitrophenol from wastewater in a bubble column bioreactor. *Electronic Journal of Biotechnology*, 39: 8-14.

Chen, T.F., Zheng, W.J., Luo, Y., Yang growth**, F., Bai, Y. and Tu, F., 2005.** Effects of selenium stress on photosynthetic pigment contents and of *Chlorella vulgaris*. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 31(4): 369–373 .

Chae, S.R. and Shin, H.S., 2007. Characteristics of simultaneous organic and nutrient removal in a pilot-scale vertical submerged membrane bioreactor (SMBR) treating municipal wastewater at various temperatures. *Process Biochemistry*, 42: 193-198. DOI: 10.1016/j.procbio.2006.07.033.

Coleman, J.N., Khan, U., Blau, W.J. and Gunko, Y.K., 2006. Small but strong: a review of the mechanical properties of carbon nanotube-polymer composites.

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-09]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1400.30.5.13.6]

Carbon, 44(9): 1624– 1652. DOI: 10.1016/j.carbon.2006.02.038.

Desai, S.R., Verlecar, X.N. and Goswami, U., 2006. Genotoxicity of cadrniurn in marine diatom *Chaetoceros tenuissimus* using the alkaline Comet assay. *Ecotoxicology*, 15(4): 359-363. DOI: 10.1007/s10646-006-0076-2.

De Volder, M.F., Tawfck, S.H., Baughman, R.H. and Hart, A.J., 2013. Carbon nanotubes: present and future commercial applications. *Science*, 339(6119): 535–539.

Emtyazjoo, M., Abbaszadeh, A. and Shahhosseiny, M.H., 2019. Diagnosis toxogenic Saxitoxin Cyanobacteria by molecular method in Amir Kalayeh Lagoon–Iran. *Research in Marine Sciences*, 49(2): 528–538.

Ji, J., Long, Z. and Lin, D., 2011. Toxicity of oxide nanoparticles to the green algae *Chlorella* sp. *Chemical Engineering Journal*, 170(2-3): 525-530. DOI: 10.1016/j.cej.2010.11.026.

Handy, R.D., Brink, N.V.D., Chapple, M., Muhling, M., Behra, R., Dusinska, M., Simpson, P., Ahtiainen, J., Jha, A N., Seiter, J., Bendnar, A., Kennedy, A., Fernandes, T.F. and Riediker, M., 2012. Practical considerations for conducting ecotoxicity test methods with manufactured nanomaterials: what have we learnt so far? *Ecotoxicology*, 21(4): 933–972. DOI: 10.1007/s10646-012-0862-y.

Hanley, C., Thurber, A., Hanna, C., Punnoode, A., Zhang, J. and Wingett, D.G., 2009. The influences of cell type and ZnO nanoparticle size on immune cell cytotoxicity and cytokine induction. *Nanoscale Research Letters*, 4(12): 1409-1420. DOI:10.1007/s11671-009-9413-8.

Khoshnamvand, M., Ashtiani, S., Chen, Y. and Liu, J., 2020. Impacts of organic matter on the toxicity of biosynthesized silver nanoparticles to green microalgae *Chlorella vulgaris*. *Environmental Research*, 185, 109433. DOI: 10.1016/j.envres.2020.109433.

Kwok, K.W.H., Leung, K.M.Y., Flahaut, E., Cheng, J. and Cheng, S.H., 2010. Chronic toxicity of double-walled carbon nanotubes to three marine organisms: influence of different dispersion methods. *Nanomedicine*, 5(6): 951–961. DOI: 10.2217/nnm.10.59.

Li, M., Gao, X., Wu, B., Qian, X., Giesy, J.P. and Cui, Y., 2014. Microalga Euglena as a bioindicator for testing genotoxic potentials of organic pollutants in Taihu Lake, China. *Ecotoxicology*, 23(4): 633-40. DOI: 10.1007/s10646-014-1214-x.

Long, Z., Ji, J., YangK, L.D. and Wu, F., 2012. Investigation of the Mechanism of Carbon Nanotubes' Toxicity toward Alga. EnvironmentalScience *Technology*, 46(15): 8458-8466. DOI: 10.1021/es301802g.

Miri, M. and Khandan Barani, H., 2016. Effect of CuO nanoparticle on growth, protein content, Chlorophyll and carotenoid in *Chlorella vulgaris*. *Journal of Plant Researches*, 29(1): 235-242.

OECD (Guidelines for the Testing of Chemicals), 2011. Freshwater algae and

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-09]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1400.30.5.13.6]

Ritchie, R.J., 2006. Consistent Sets of Spectrophotometric Chlorophyll Equations for Acetone, Methanol and Ethanol Solvents. *Photosynthesis Research*, 89: 26-41.DOI: 10.1007/s11120-006-9065-9.

Schwab, F., Bucheli, T.D., Lukhele, L.P., Magrez, A., Nowack, B., Sigg, L. and Knauer, K., 2011. Are carbon nanotube effects on green algae caused by shading and agglomeration? *Journal of Environmental Science and Technology*, 45(14):36–6144. DOI: 10.1021/es200506b.

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. and Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1): 184-191. DOI: 10.1016/0014-4827(88)90265-0.

Sohn, E.K., Chung, Y.S., Johari, S.A., Kim, T.G., Kim, J.K., Lee, J.H., Lee, Y.H., Kang, S.W. and Yu, I.J., 2015. Acute toxicity comparison of single-walled carbon nanotubes in various freshwater organisms. *BioMed Research International*, 323090: 1 -12.DIO:10.1155/2015/323090.

Stone, V., Nowack, B., Baun, A., Brink, N.V.V., Kammer, F.V., Dusinska, M., Handy, R., Hankin, S., Hassellov, M., Joner, E. and Fernandes, T.F., 2010. "Nanomaterials for environmental studies: classification, reference material issues, and strategies for physico-chemical characterization. *Science of the Total Environment*, 408(7): 1745–1754. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2009.10.035.

cyanobacteria, growth inhibition tests, Test NO.201.

Oukarroum, A., Bras, S., Perreault, F. and Popovic, R., 2012. Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 78: 80–85. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2011.11.012.

Piccinno, F., Gottschalk, F., Seeger, S. and Nowack, B., 2012. Industrial production quantities and udes of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *Journal of Nanoparticle Research*, 14(1109): 11. DOI: 10.1007/s11051-012-1109-9.

Prado, R., Díaz, R., Rioboo, C., Abalde, J., Herrero, C. and Cid, A., 2009. Use of the Comet Assay to Evaluate Pesticide Toxicity on Non-Target Microalgae. In: Kocsis, A. & Molnar H., eds. Genotoxicity: Evaluation, Testing and Prediction. Hauppauge, NY: Nova Science Publishers, pp. 311-319.

Rhiem, S., Riding, M J., Baumgartner, W., Martin, F.l., Semple, K.T., Jone, K.C., Schaffer, A. and Maes, H.M., 2015. Interactions of multi–walled carbon nanotubes with algal cells: Quantification of association, visualization of uptake, and measurement of alterations in the composition of cells. *Environmental Pollution*, 196: 431-439. DOI: 10.1016/j.envpol.2014.11.011.

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-09]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1400.30.5.13.6]

Tartiel, M.B., 2005. Physiological studies on some green algae. Thesis, Faculty of Agriculture, Cairo University, Egypt. Pages??

Thakkar, M., Mitra, S. and Wei, L., 2016. Effect on Growth, Photosynthesis, and Oxidative Stress of Single-Walled Carbon Nanotubes Exposure to Marine Alga *Dunaliella tertiolecta. Journal of Nanomaterials*, 10: 1-9. DOI: 10.1155/2016/8380491.

Um, B.H. and Kim, Y.S., 2009. Review: a chance for Korea to advance algal-biodiesel technology. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 15:1–7. DOI:10.1016/j.jiec.2008.08.002.

Wang, Y. and Yang, K., 2013. Toxicity of single-walled carbon nanotubes on green microalga *Chromochloris zofingiensis*. *Chinese Journal Oceanology And Limnology*, 31(2): 306–311. DOI: 10.1007/s00343-013-2131-1.

Wei, L., Thakkar, M., Chen, Y., Ntim, S.A., Mitra, S. and Zhang, X., 2010. Cytotoxicity effects of water dispersible oxidized multi-walled carbon nanotubes on marine alga, *Dunaliella tertiolecta*. *Aquatic Toxicology*, 100(2): 194–201. DOI: 10.1016/j.aquatox.2010.07.001.

Wu, Y., Wang, Y.J., Li, Y.W., Du, J., Wang, Z.H. and Deng, S.H., 2018. Effects of single- walled carbon nanotubes on growth and physiological characteristics of *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Central South University*, 5: 1628-1641. DOI: 10.1007/s11771-3855-z.

Youn, S., Wang, R., Gao, J., Hovespyan, A., Ziegler, K.J., Claude, J. and Bonzongo, J., 2012. Mitigation of the impact of single-walled carbon nanotubes on freshwater green algae: *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Nanotoxicology*, 6(2): 161–172. DOI: 10.3109/17435390.2011.562329.

Yousefi, N., Emtyazjoo, M., Mohamad Noori, S., Janitabar Darzi, S. and Akhavan Sepahy, A., 2020. Green synthesis of *Pseudomonas aeruginosa* immobilized Fe3O4-multiwalled carbon nanotubes bio-adsorbent for the removal of 2, 4, 6-trinitrophenol from aqueous solution. *Environmental Technology & Innovation*, 20(219):101071. DOI: 10.1016/j.eti.2020.101071.

Zhu, X.S., Zhu, L., Tian, S.Y., Lang, Y.P. and Li, Y., 2008. Aquatic ecotoxicities of nanoscale TiO2, ZnO and Al2O3 water suspensions. *Acta Ecologica Sinica*, 28(8): 3507–3516. DOI: 10.1016/S1001-0742(09)60087-5.

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-09]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1400.30.5.13.6]

Study of growth characteristics and genotoxicity effects in *Chlorella vulgaris* in the presence of single-walled carbon nanotubes

Emtyazjoo M.[1]; Payvar S.[1]; Eslami F.[2*]; Mazdarani H.[3]

[*]Fr_eslami1689@yahoo.com

1-Islamic Azad University, Tehran North Branch, Tehran, Iran.
2- Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research Education and Extension Organization(AREEO), Tehran, Iran
3-Tarbiat Modares University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

The increasing use of carbon nanotubes has led to their synthesis and releasing into the environment, especially aquatic ecosystems. Therefore, it is important to study the effects of their ecotoxicity and their genotoxicity on algae as the first chain of the food web. In this study, the effects of single-walled carbon nanotubes with a diameter of 1-2 nm on green algae *Chlorella vulgaris* were analyzed. Treatments include: 0 (control), 12.5, 25, 50, 100, 150 mg/l were chosen to survey their effects on C. *vulgaris* at different hours. Cells number, chlorophyll *a* concentration and specific growth rate were measured. The results showed that cell density decreased, and there was significant difference between control and other treatments ($p<0.05$). The maximum and minimum number of cells in the control and 150 mg/l treatments were about 6.2×10^4 (after 48 hours) and 2×10^4 cells/ml (After 72 hours) respectively. Increasing trend in chlorophyll *a* concentration was observed by treatment of 12.5 mg/l up to 96 after exposure. After 72 hours, the maximum chlorophyll *a* concentration was recorded (0.175 µg/l). There was significant difference between control and other treatments ($p<0.05$). The specific growth rate at the treatment of 12.5 mg/l nanoparticles was the highest value equal to 0.055 after 96 hours, and decreasing trend of specific growth rate of control sample with other treatments was observed. According to DNA damage, treatmented cells were prepared by Alkaline single-cell gel electrophoresis method (comet assay), and stained with fluorescent dye. Microscopic images showed that damaged cells appear as comets composed of an intensively stained comet head and a tail of migrated DNA fragments. There was not sequence in untreated cells (control). Thus, single-walled carbon nanotubes induced DNA damage in algal cells.

Keywords: Single- walled Carbon Nanotubes, *Chlorella vulgaris*, ecotoxicity effects, DNA damage

[*]Corresponding author

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-09]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1400.30.5.13.6]