



مطالعه اثر سمیت ذرات احیاء شده نقره کلوئیدی با استفاده از عصاره الکلی بره‌موم پرتوتابی شده و نمک نیترات نقره بر ریز جلبک *Chlorella vulgaris*

سید محمودرضا آقامیری^۱، مرضیه حیدریه^{۲*}، سعیده نعیمی^۳، آوارضایی^۴

۱. استاد، گروه آموزشی پرتوپزشکی، دانشکده مهندسی هسته‌ای، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۲. دانشیار، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، تهران، ایران

۳. استادیار، گروه آموزشی علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

۴. دکتری دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۲۷

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۳۰

چکیده

انتشار نانوذرات، از جمله نانوذرات نقره استفاده شده در صنایع مختلف به محیط‌زیست و اثرات سمی احتمالی آن‌ها بر رشد گیاهان و سلامت انسان‌ها نگرانی جامعه را فراهم آورده و نیاز به تحقیق و بررسی در این زمینه را پررنگ‌تر نموده است. هدف از این مطالعه بررسی اثر سمیت مواجهه با غلظت‌های مختلف (۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میکروگرم/لیتر) ذرات احیاء شده نقره با استفاده از عصاره الکلی بره‌موم پرتودهی شده با پرتو گاما در سطح ۱۰ کیلوگری (AgNPs- γ)، ذرات احیاء شده نقره با استفاده از عصاره الکلی بره‌موم پرتودهی نشده (AgNPs) و نمک نیترات نقره (AgNO_3) بر ریزجلبک‌های کلرلا و لگاریس (*Chlorella vulgaris*) بود. نتایج نشان داد که درصد مهار رشد در گروه‌های مواجهه یافته با AgNPs و AgNPs- γ و AgNO_3 به صورت وابسته به غلظت افزایش یافت ($P < 0/05$). همچنین در این گروه‌ها درصد زنده‌مانی سلول‌ها، غلظت جلبک (میکروالیترا) و میزان کلروفیل a کاهش و درصد تغییر شاخص هدایت الکترولیتی/سلول زنده (میزان نشت الکترولیتی) به صورت معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0/05$). براساس نتایج به دست آمده، به ترتیب $\text{AgNPs} > \text{AgNPs-}\gamma > \text{AgNO}_3$ موجب ایجاد سمیت و کاهش رشد و فتوسنتز در ریزجلبک کلرلا و لگاریس می‌شوند.

واژگان کلیدی: بره‌موم، ذرات احیاء شده نقره، پرتوتابی، کلرلا و لگاریس



Toxic Effects of Colloidal Silver Particles Biosynthesized using Gamma-irradiated Propolis Extract and Silver Nitrate Salts on Microalgae *Chlorella vulgaris*

Seyed Mahmoud Reza Aghamiri¹, Marzieh Heidarieh^{2*}, Saeideh Naeimi, Ava Resae³

1. Professor, Medical Radiation Engineering, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

2. Associate professor, Nuclear Science and Technology Research Institute, Tehran, Iran

3. Assistant Professor in the Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran

4. DVM, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran

Accepted: 17-May-2023

Received: 19-Feb-2022

Abstract

The potential toxic effects of nanoparticles, including silver nanoparticles commonly used in various industries, on plants, animals, and humans have raised concerns about their release into the environment. This has highlighted the need for further research on the topic. The study aimed to investigate the toxicity of different forms of silver particles, including silver nitrate salt (AgNO_3), γ -irradiated (10 KGy) ($\text{AgNPs-}\gamma$), and non-irradiated (AgNPs) silver particles. The silver particles were synthesized by the alcoholic extract of bee propolis and tested at different concentrations (10, 50, 100, 200 $\mu\text{g/l}$) on the microalgae *Chlorella vulgaris*. The findings showed that exposure to $\text{AgNPs-}\gamma$, AgNPs , and silver nitrate salts increased growth inhibition (%) in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). Moreover, cell viability (VC %), microalgal cell density/biomass (μL), and chlorophyll-a concentration decreased. In contrast, electrolyte conductivity/living cells (electrolyte leakage (EL %)) increased in the exposed groups compared to the control group ($P < 0.05$). It was observed that $\text{AgNO}_3 < \text{AgNPs} < \text{AgNPs-}\gamma$ in inducing toxicity, inhibiting growth, and photosynthesis in *Chlorella vulgaris*.

Keywords: Propolis, Silver Nanoparticles, Irradiation, *Chlorella vulgaris*

۱. مقدمه

نانوفناوری، علم بکارگیری ذرات اتمی و مولکولی با ابعاد کمتر از ۱۰۰ نلومتر می‌باشد (Vishwakarma et al., 2017). نانوذرات می‌توانند با استفاده از روش‌های مختلف زیستی، شیمیایی و فیزیکی سنتز شوند. مواد شیمیایی مورد استفاده به‌منظور سنتز نانوذرات سمی هستند که می‌توانند با ایجاد محصولات جانبی مضر باعث آلودگی محیط‌زیست شوند (Kumar et al., 2012a, b). بنابراین استفاده از روش زیستی به‌منظور بیوسنتز نانوذرات فلزی با کمک خاصیت احیاءکنندگی مواد طبیعی و میکروارگانیسم‌ها مورد توجه قرار گرفته است (Kumar et al., 2012a, b, c). زیرا بکارگیری روش‌های زیستی برای تولید نانوذرات موجب کاهش استفاده از واکنش‌گرها و حلال‌های شیمیایی و در نتیجه کاهش آلودگی محیط‌زیست می‌شوند (Shanab et al., 2021). یکی از این منابع طبیعی که می‌توانند در بحث بیوسنتز نانوذرات مورد استفاده قرار گیرد، بره‌موم زنبور عسل است که به‌دلیل دارا بودن انواع ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی می‌توانند نقش مهمی در احیاء یون‌های فلزی و تبدیل آن به نانوذره داشته باشد (Barbosa et al., 2019).

نانوذرات نقره نیز از اجزای پرکاربرد فناوری نانو به‌شمار می‌روند. این ذرات در مواد ضدعفونی‌کننده، لوازم آرایش، پزشکی، صنایع غذایی و نساجی بکار می‌روند. براساس مطالعات، استفاده فراوان از این ذرات در صنایع گوناگون موجب پراکندگی و نشست آن‌ها به محیط اطراف و آلودگی محیط‌زیست به‌ویژه منابع آبی می‌شود (Hedayati et al., 2019). نانوذرات نقره موجب انتشار یون‌های نقره به محیط اطراف شده، و قابلیت جذب و ایجاد تغییرات احتمالی در موجودات زنده را به‌همراه دارند (Vishwakarma et al., 2017). مطالعات مختلف نتایج متفاوتی را پیرامون اثرات نلنوذرات فلزات بر رشد جلبک‌های مختلف، مانند بررسی اثر نانوذره مس بر رشد دو ریزجلبک کلرا ولگاریس (*Chlorella vulgaris*) و

سیانوباکتری *آنابنا* (*Cyanobacteria Anabaena*) و همچنین اثر فلز سرب بر رشد ریزجلبک *C. Vulgaris* نشان داده‌اند (Karimi et al., 2017, 2018; Naeemi et al., 2018). علاوه بر این، مواجهه با یون‌های نقره آزاد شده از نیترات نقره نیز به‌صورت بالقوه قابلیت ایجاد سمیت و آسیب به گیاهان، حیوانات و انسان را داراست (Ebrahimzadeh et al., 2020).

جلبک‌ها نقش مهمی را در تثبیت اکوسیستم آبی و تغذیه موجودات آبی ایفاء می‌کنند. با این وجود به‌دلیل احتمال گسترش آلاینده‌های زیست‌محیطی، به‌ویژه یون‌ها، فلزات سنگین و نانوذرات در طبیعت، تنوع و تعداد آن‌ها رو به کاهش است و این موضوع می‌تواند محیط‌زیست را با پیامدهای جبران‌ناپذیری روبه‌رو نماید (Jiang et al., 2012). ریزجلبک *C. vulgaris* یک ریزجلبک سبز تک سلولی حاوی رنگدانه‌های گوناگون از جمله کلروفیل و کاروتنوئید، و با قابلیت رشد به‌صورت اتوتروف، هتروتروف و میکسوتروف می‌باشد (Kitada et al., 2009). جلبک‌ها به خاطر قدرت جذب قابل توجه و حساسیت بالا در مقابل فلزات سنگین، گزینه مناسبی جهت بررسی میزان سمیت آلاینده‌های گوناگون در اکوسیستم آبی به‌شمار می‌روند (Johari et al., 2018; Naeemi et al., 2016).

استفاده از پرتو گاما در فرآوری محصولات طبیعی می‌تواند ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در عصاره گیاهان و سایر مواد طبیعی را تجزیه کند و یا حتی برخی از اجزاء را به اجزای آنتی‌اکسیدانی تبدیل نماید. بنابراین، محتوای آنتی‌اکسیدانی کل در ماده می‌تواند تحت تأثیر قرار گیرد. زیرا پرتو گاما می‌تولند پیوندهای شیمیایی پلی‌فنل‌های موجود در عصاره گیاهان مختلف و مواد طبیعی حاوی گروه‌های فنلی را بشکند، بنابراین ترکیبات فنلی محلول با وزن مولکولی کم آزاد خواهند شد و این ترکیبات فعالیت آنتی‌اکسیدانی ماده را افزایش می‌دهند. مکانیسم اثر پلی‌فنل‌های مختلف در فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌عنوان مهار مستقیم رادیکال‌های آزاد توسط مکانیسم‌های انتقال اتم هیدروژن یا انتقال تک الکترون و مکانیسم شلاته‌شدن

چشمه کبالت-۶۰ (Gamma Cell 220) در یک محدوده دز ۱/۰۲ گری در ثانیه در حضور اکسیژن و در دمای اتاق-پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای پرتوتابی شد.

۲.۲. کشت ریز جلبک

حجم ریز جلبک *C. vulgaris* از دانشکده علوم دامپزشکی دانشگاه شیراز تهیه و به آزمایشگاه دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان منتقل شد. قبل از شروع کشت، اتاق کشت به وسیله لامپ UV به مدت نیم ساعت استریل گردید. تمامی وسایل در آن ۱۸۰ درجه سانتیگراد به مدت یک ساعت خشک و ارلن‌های حاوی محیط کشت در دستگاه اتوکلاو به طور کامل استریل شدند. از محیط کشت BMM برای کشت اولیه جلبک استفاده شد. جلبک در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و شدت نور ۱۰۰ میکرومول فوتون/مترمربع/ثانیه و دوره نوری (تاریکی/روشنایی) (۸:۱۶) طی ۱۴ روز کشت داده شد (Zuliani et al., 2016). ریز جلبک تحت کشت در مرحله حد شکوفایی جمع‌آوری شد (۳/۳×۵۱۰ سلول/میلی‌لیتر) و در نهایت سوسپانسیون‌های جلبکی با حجم و تعداد سلول برابر تهیه گردید. نمک نترات نقره ($AgNO_3$)، ذرات احیاء شده نقره حاصل از مواجهه‌سازی نترات نقره با عصاره الکلی بره‌موم پرتوتابی شده با دز ۱۰ کیلوگری پرتو گاما ($AgNPs-\gamma$) و پرتوتابی نشده ($AgNPs$) بیوسنتز شده توسط Ghanizadeh (۱۴۰۱) در غلظت‌های مختلف ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم/لیتر به صورت تیمار به این محیط‌ها اضافه و در شرایط یکسان آزمایشگاهی به مدت ۹۶ ساعت هوادهی شد. به منظور کاهش رسوب نمک نترات نقره و $AgNPs-\gamma$ و $AgNPs$ ارلن‌ها حاوی تیمارهای مختلف و ریز جلبک روی شیکر قرار داده شدند تا رسوب آن‌ها به حداقل مقدار خود برسند. اثر تیمارهای مختلف نقره طی یک دوره ۴ روزه بر میزان مهار رشد، زنده‌مانی سلول، غلظت کلروفیل a و میزان تغییرات نشت الکترولیت‌ها در ریز جلبک در ۳ تکرار و در شرایط یکسان پرورشی مورد آزمایش قرار گرفتند.

یا تشکیل کمپلکسی با فلزات سنگین در نظر گرفته می‌شود (Huang and Mau, 2007; Bhuyan and Handique, 2022). تمام این موارد می‌تواند خاصیت احیاء‌کنندگی عصاره‌ها را بهبود بخشد.

در بررسی حاضر فرض بر این است که استفاده از روش پرتوفاوری عصاره الکلی بره‌موم زنبور عسل با استفاده از پرتو گاما و بکارگیری این عصاره با هدف احیاء ذرات نقره نسبت به عصاره الکلی پرتوفاوری نشده آن و نمک نترات نقره بسیار اثرگذارتر خواهد بود. بنابراین مطالعه حاضر اولین مورد در زمینه بررسی اثر ذرات نقره کلونیدی احیاء شده به دنبال مواجهه با عصاره الکلی بره‌موم زنبور عسل به دو صورت پرتوفاوری نشده ($AgNPs$) و پرتوفاوری شده با پرتو گاما ($AgNPs-\gamma$) و نمک نترات نقره ($AgNO_3$) بر ریز جلبک *C. Vulgaris* به عنوان یک پلانکتون گیاهی آبی و یک ریز جلبک مهم از نظر آبی‌پروری است.

۲. مواد و روش‌ها

۲.۱. تهیه عصاره الکلی بره‌موم زنبور عسل

به منظور تهیه عصاره الکلی بره‌موم، ابتدا قطعات بزرگ بره‌موم تهیه شده از زنبورداری واقع در منطقه مرودشت-استان فارس توسط ازت مایع به قطعات ریز خرد شده سپس ۲۵ گرم از آن با ۲۵۰ میلی‌لیتر محلول اتانل ۸۰ درصد مخلوط و به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق تکان داده شد (۱۵۰ دور در دقیقه به صورت افقی). سپس عصاره الکلی حاصل توسط کاغذ صافی نمره ۴ واتمن دو بار صاف شد و به کمک دستگاه روتاری الکلی آن تبخیر و عصاره الکلی خالص به دست آمد. عصاره خالص به دست آمده توزین و محلول ۱۰ درصد (وزن به حجم) آن در الکلی ۸۰ درجه تهیه و تا زمان استفاده در ظرف شیشه‌ای تیره و دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد (Bosio et al., 2000). عصاره الکلی به دست آمده به ۲ قسمت تقسیم گردید و یک قسمت آن براساس گزارش Heidarieh و همکاران (۲۰۲۱) در سطح مطلوب ۱۰ کیلوگری پرتو گاما توسط

۲.۳. شمارش سلول‌های جلبکی

شمارش سلول‌های ریزجلبک‌ها در هر میلی‌لیتر پس از همگن نمودن محیط کشت ریزجلبک با استفاده از لام هموسیتومتر و با روش پیشنهاد شده توسط Martinez و همکاران (۲۰۰۰) به صورت روزانه انجام شد. در این روش مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از محیط کشت همگن شده برداشته و بر روی لام هموسیتومتری قرار داده شد و سپس عمل شمارش زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰ انجام گرفت (Martinez et al., 2000). ماده شیمیایی فرمالین (۱۰ درصد) برای ثابت کردن سلول‌ها استفاده شد. میزان تراکم با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد (Banerjee et al., 2011):

$$100 \times \frac{\text{تعداد کل سلول شمارش شده}}{\text{تعداد بلوک‌ها}} = \text{تعداد سلول در هر میلی‌لیتر}$$

۲.۴. نرخ بازدارندگی رشد جلبک

نرخ بازدارندگی رشد جلبک‌ها در مواجهه‌سازی با نمک نیترات نقره و γ -AgNPs و AgNPs از رابطه زیر محاسبه شد (Gong et al., 2011):

$$100 \times (N_0/N-1) = \text{درصد نرخ بازدارندگی رشد}$$

N: تراکم سلول‌ها در هر میلی‌لیتر در گروه‌های تیماری مختلف

N₀: تراکم سلول‌ها در هر میلی‌لیتر در گروه شاهد

۲.۵. اندازه‌گیری میزان نشت الکترولیت‌ها (EI)

پایداری غشاهای سلولی به وسیله ثبت میزان نشت الکترولیت‌ها براساس روش Liu و همکاران (۲۰۱۱) تعیین شد. ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی کلرلا ولگاریس در ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب جلبک حاصل با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر دوبار تقطیر آبکشی و در نهایت در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی نگهداری شد. میزان نشت اولیه

الکترولیت (EC 1) با دستگاه هدایت‌سنج مدل JENWAY بعد از سپری شدن این زمان اندازه‌گیری شد. سپس نمونه‌ها در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه حرارت داده شد و دوبار با هدایت‌سنج، نشت ثانویه الکترولیت (EC2) اندازه‌گیری شد. میزان نشت یون‌ها با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید.

$$(EI) (\%) = ((EC1/EC2) \times 100)$$

۲.۶. سنجش میزان کلروفیل نوع a در ریزجلبک

به منظور عصاره‌گیری به‌ازای هر گرم جلبک ۵۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد اضافه شده و به مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه حمام التراسونیک مدل Sonics Vibra cell با بیشینه توان خروجی ۷۵۰ وات و با فرکانس ثابت راهبری ۲۰ کیلوهرتز قرار داده شد. سپس ۳ ساعت در شیکر انکوباتور یخچال‌دار مدل TSHER 600-A با ۱۶۰-۱۵۰ دور در دقیقه و دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس در دستگاه سانتریفیوژ یخچال‌دار به مدت ۵ دقیقه با دور $3600 \times g$ در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. مایع رویی با فیلتر سرسرنگی ۰/۴۵ میکرون فیلتر شد. جهت تغلیظ نمونه‌ها از دستگاه Evaporator Rotary استفاده شد. جذب نمونه‌ها جهت بررسی میزان کلروفیل a در طول موج‌های ۶۵۳ و ۶۶۶ نانومتر در برابر بلانک متانول با اسپکتروفتومتر مدل UV-2601, ROYLEIGH قرائت شد. پس از جای‌گذاری جذب‌های خوانده‌شده در رابطه زیر میزان کلروفیل a محاسبه گردید (Dere et al., 1998).

$$C_a = 15/65 A_{666} - 7/340 A_{653}$$

۲.۷. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

در این بررسی نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون Shapiro-Wilk مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها از طریق آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و مقایسه میانگین بین تیمارها

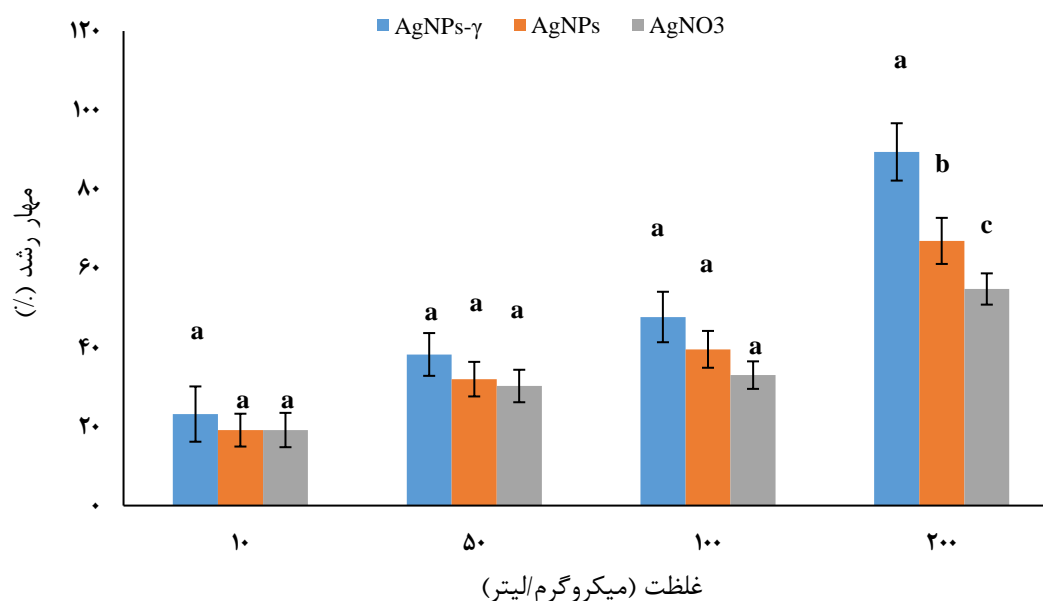
میکروگرم/لیتر)، درصد مهار رشد ریز جلبک در گروه مواجهه یافته با AgNPs- γ بالاتر بود ($P < 0/05$). درصد مهار رشد در غلظت ۲۰۰ میکروگرم/لیتر از سایر غلظت‌ها بالاتر بود ($P < 0/05$). درصد مهار رشد در گروه مواجهه یافته با AgNPs در غلظت‌های پایین (۱۰ و ۵۰ میکروگرم/لیتر) تفاوت معنی داری نشان نداد ($P > 0/05$), با این وجود در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم/لیتر بالاتر از گروه‌های مواجهه یافته با AgNO₃ بود ($P < 0/05$). در همه گروه‌های مواجهه یافته با AgNPs- γ , AgNPs و AgNO₃، میزان افزایش درصد مهار رشد به صورت وابسته به مقدار مصرف بود و با افزایش غلظت مواجهه افزایش مهار رشد ریز جلبک مشاهده شد ($P < 0/05$).

براساس آزمون دانکن (Duncan's multiple-range test) انجام شد. وجود یا عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۵ درصد با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰۱۷ و رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel (۲۰۱۹) انجام شد.

۳. نتایج

۳.۱. درصد مهار رشد

شکل ۱ نمودار درصد مهار رشد را در گروه‌های مواجهه یافته با AgNPs- γ , AgNPs و AgNO₃ نشان می‌دهد. در همه غلظت‌ها (۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰

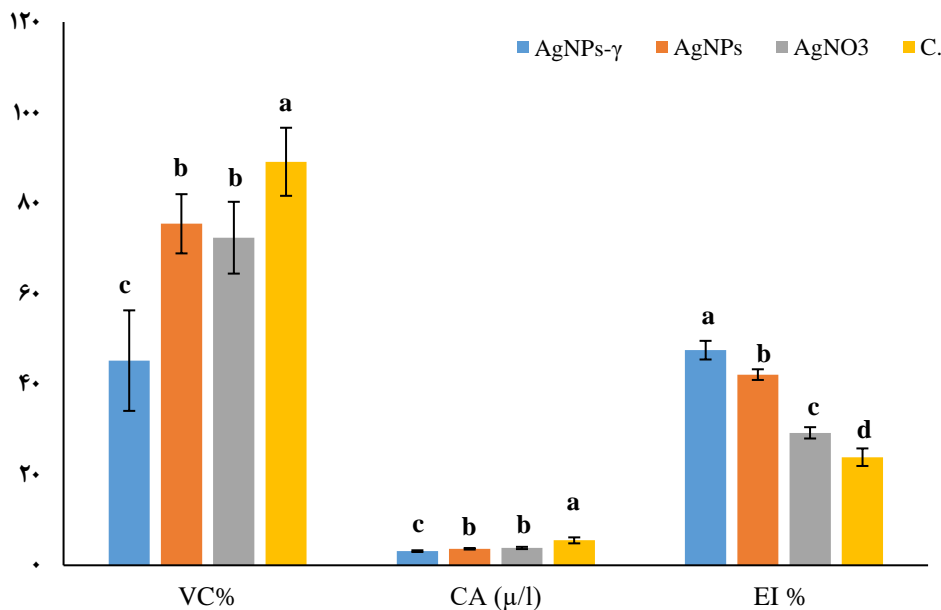


شکل ۱- نمودار درصد مهار رشد ریز جلبک در غلظت‌های ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ (میکروگرم/لیتر) در تیمارهای مختلف (بارها نشان دهنده انحراف استاندارد است و میانگین‌های دارای حروف غیرمشترک، در سطح احتمال $< 0/05$ تفاوت معنی داری با هم دارند).

گروه مواجهه یافته با AgNPs- γ دارای پایین‌ترین درصد زنده‌مانی سلولی بود ($P < 0/05$). درصد زنده‌مانی سلولی در گروه مواجهه یافته با AgNO₃ اندکی کمتر از گروه مواجهه یافته با AgNPs بود، اگرچه این اختلاف از نظر آماری معنی دار نبود ($P > 0/05$).

۳.۲. درصد زنده‌مانی

شکل ۲ نمودار درصد زنده‌مانی در گروه شاهد و گروه‌های مواجهه یافته با AgNPs- γ , AgNPs و AgNO₃ را نشان می‌دهد. درصد زنده‌مانی سلول‌ها به طور معنی داری در گروه شاهد بالاتر از سایر گروه‌ها بود



شکل ۲- نمودار درصد زنده‌مانی سلول ریزجلبک (VC%) (الف)، غلظت ریزجلبک (CA µl) (ب)

و درصد هدایت الکتریکی (EI %) (ج) در تیمارهای مختلف و گروه شاهد

(بارها نشان‌دهنده انحراف استاندارد است و میانگین‌های دارای حروف غیرمشترک، در سطح احتمال $0.05 < P$ تفاوت معنی‌داری با هم دارند).

مواجهه یافته با AgNPs بود ($P < 0.05$).

۳.۳. غلظت جلبک

شکل ۲ نمودار غلظت جلبک (میکرولیتر) در گروه شاهد و گروه‌های مواجهه یافته با AgNPs، AgNPs-γ و AgNO₃ را نشان می‌دهد. غلظت جلبک (میکرولیتر) در گروه شاهد به‌طور معنی‌داری از سایر گروه‌ها بالاتر بود ($P < 0.05$) و بین سایر گروه‌ها با یکدیگر اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P < 0.05$).

۳.۵. میزان کلروفیل a

شکل ۳ میزان کلروفیل a را در گروه شاهد و گروه‌های مواجهه یافته با AgNPs، AgNPs-γ و AgNO₃ نشان می‌دهد. میزان کلروفیل a در گروه‌های مواجهه یافته با AgNPs، AgNPs-γ و AgNO₃ کاهش یافته و میزان آن در گروه شاهد به‌طور معنی‌داری بالاتر از سایر گروه‌ها بود ($P < 0.05$)، ولی بین گروه‌های مواجهه یافته با AgNPs-γ، AgNPs و AgNO₃ با یکدیگر اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0.05$).

۳.۴. تغییرات شاخص هدایت الکترولیتی/سلول

زنده

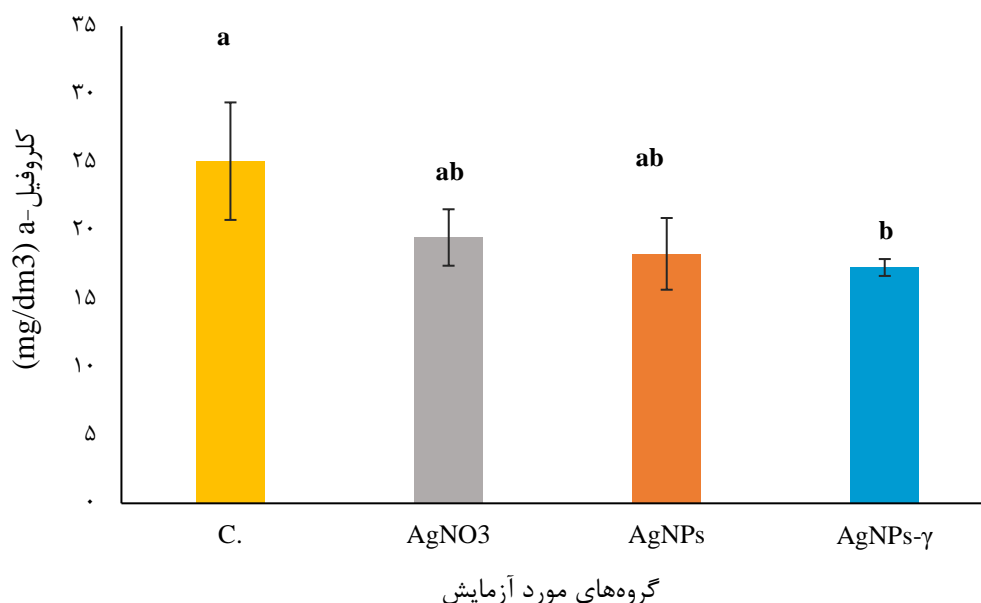
شکل ۲ تغییرات شاخص هدایت الکترولیتی/سلول زنده در گروه شاهد و گروه‌های مواجهه یافته با AgNPs-γ، AgNPs و AgNO₃ را نشان می‌دهد. بیشترین درصد تغییرات هدایت الکترولیتی و نشت الکترولیت‌ها در گروه AgNPs-γ، و کمترین درصد تغییرات آن در گروه شاهد مشاهده شد ($P < 0.05$). میزان نشت الکترولیتی در گروه مواجهه یافته با AgNO₃ به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه

۴. بحث و نتیجه‌گیری کلی

جلبک‌های دریایی مانند گیاهان خشکی‌زی در معرض ترکیبی از نور و اکسیژن هستند که منجر به تشکیل رادیکال‌های آزاد و عوامل اکسیدکننده قوی می‌گردد. عدم

و نور مرئی بکار می‌گیرند. به‌عنوان مثال جلبک‌ها دارای رنگدانه‌های مختلف هستند که طول موج‌های مختلفی از نور را جذب می‌کنند. این رنگدانه‌ها علاوه بر بهبود استفاده از انرژی نورانی، توانایی محافظت در برابر پرتوهای مضر نور خورشید و خاصیت آنتی‌اکسیدانی را هم فراهم می‌کنند (Wang *et al.*, 2022).

وجود آسیب اکسیداتیو در اجزای ساختار این جلبک‌ها نشان‌دهنده پایداری آن‌ها نسبت به اکسیداسیون و داشتن سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی آن‌ها است (Rossa *et al.*, 2002). موجودات فتوسنتزکننده مکانیسم‌های متفاوتی را برای سازگاری با نوسانات محیط‌های ساحلی و حفاظت خود در برابر پرتو فرابنفش



شکل ۳- مقایسه میانگین کلروفیل a در تیمارهای مختلف

(بارها نشان‌دهنده انحراف استاندارد است و میانگین‌های دارای حروف غیرمشترک، در سطح احتمال ۰/۰۵ < تفاوت معنی‌داری با هم دارند).

متمرکز بر ارزیابی تأثیرات منفی نانوذرات است. بنابراین یافتن غلظت‌های کشنده و نیز حداکثر غلظت مجاز این نانومواد در گونه‌های آبی نظیر ریزجلبک‌ها به‌عنوان نشانگر زیستی آلودگی در سیستم‌های آبی می‌تواند حائز اهمیت باشد (Sumi, 2009; Parker *et al.*, 2008).

در مطالعه حاضر، AgNPs و AgNPs-γ موجب کاهش نرخ رشد و افزایش درصد مهار رشد ریزجلبک‌ها شدند. بیشترین اثر بازدارندگی رشد در گروه‌های تیمار شده با غلظت ۲۰۰ میکروگرم/لیتر و کمترین اثر در گروه‌های تیمار شده با غلظت ۱۰ میکروگرم/لیتر مشاهده شد. مطالعات دیگر نیز اثر سمیت نانوذرات نقره را در گیاهان مختلف از جمله *Spirodela polyrrhiza*

ریزجلبک‌ها از پلانکتون‌های مهم آب‌های شیرین و شور هستند، ۴۰ تا ۵۰ درصد فتوسنتز در کره زمین را بر عهده داشته و اکسیژن محیط را تأمین می‌نمایند. علاوه بر این، ریزجلبک‌ها توانایی جذب و دفع فلزات سنگین و برخی مواد آلی سمی محیط اطراف را دارند و بدین ترتیب در پاک‌سازی و سم‌زدایی محیط ایفای نقش می‌کنند (Parker *et al.*, 2008). یون‌های فلزات سنگین در صورت ورود به درون جلبک سم‌زدایی شده و یا موجب آسیب به سلول و کاهش فتوسنتز، رشد و تقسیم سلولی می‌شوند که این نمایانگر سمیت برخی از فلزات سنگین برای میکروارگانیسم‌هاست (Arunakumara and Zhang, 2008). امروزه مطالعات نانوبوم سم‌شناسی دریایی عمدتاً

تحقیقی دیگر گزارش گردید که مواجهه جلبک *Scenedemus sp.* با نانوذرات نقره در غلظت‌های ۵ میکروگرم/لیتر فاقد تأثیر معنی‌دار بود و همانند تحقیق حاضر در غلظت‌های بالاتر ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم/لیتر موجب کاهش قابل توجه میزان کلروفیل a شد (Pham, 2019).

در این مطالعه درصد زنده‌مانی سلول‌ها در گروه تیمار شده با γ -AgNPs بیشترین کاهش را در مقایسه با گروه شاهد نشان داد. درصد زنده‌مانی گروه تیمار شده با γ -AgNPs اندکی پایین‌تر از گروه تیمار شده با γ -AgNPs بود. زیرا γ -AgNPs و γ -AgNPs می‌توانند به‌علت اندازه کوچک‌تر قابلیت برهم‌کنش بیشتری با سلول‌های ریزجلبک داشته و تجمع آن‌ها در محیط آبی مانع رسیدن نور خورشید و مواد غذایی کافی به ریزجلبک‌ها می‌شود و این دلایل می‌توانند موجب کاهش رشد آن‌ها شوند (Johari et al., 2018). اما برخلاف نتایج به‌دست آمده در تحقیق حاضر، در مطالعه Johari و همکاران (۲۰۱۸) گزارش شد که نمک نیترات نقره در مقایسه با نانوذرات نقره اثر مهاری بیشتری بر رشد جلبک *D. salina* داشته است. این اختلاف در نتایج ممکن است به علت تفاوت‌های بین گونه‌ای جلبک‌ها در میزان حساسیت آن‌ها به نانوذرات نقره باشد. به‌عنوان مثال می‌توان بیان نمود که حساسیت و کاهش نرخ رشد ناشی از مواجهه با نانوذرات نقره در ریزجلبک‌های آب شیرین مانند *Scenedemus sp.* بیشتر از ریزجلبک‌های آب شور مانند *Thalassiosira sp.* است (Pham, 2019). همچنین نانوذرات نقره توانایی نفوذ بالایی به درون جلبک‌های فاقد دیواره سلولی مانند *Ochromonas danica* دارند، در حالی که این نانوذرات قابلیت نفوذ و ماندگاری پایین‌تری در جلبک‌های واجد دیواره سلولی گلیکوپروتئینی و مستحکم‌ملندند *Chlamydomonas reinhardtii* دارند و در نتیجه سمیت کمتری برای آن‌ها به‌دنبال خواهند داشت (Li et al., 2015). این موضوع نقش تنوع گونه و ساختار دیواره سلولی بر میزان جذب و سمیت نانوذرات نقره را پررنگ‌تر می‌نماید. همچنین در این بررسی شاخص غلظت

Pennisetum glaucum و برخی ریزجلبک‌ها از جمله *Anabaena flosaquae* و *Dunaliella salina* (Jiang et al., 2012; Johari et al., 2018; Khan et al., 2019; Ebrahimzadeh et al., 2020). همچنین، طبق تحقیقات انجام شده، اثرات سمی نانوذرات نقره در آب‌های شور به‌علت ترکیب شدن آن‌ها با کلر و تشکیل کلرید نقره، کمتر از آب شیرین است (Pham, 2019). برخی از محققان معتقدند که اثر سمی نانوذرات نقره به‌خاطر وجود یون نقره است. درحالی‌که سایر محققان بر این باورند که علت سمیت نانوذرات نقره علاوه بر آزادسازی یون نقره، ناشی از ویژگی‌های مربوط به اندازه و بار الکتریکی نانوذرات و نوع تعاملات متفاوت آن‌ها با سلول‌هاست (Gruyer et al., 2014).

در تحقیق حاضر جهت بررسی این موضوع، اثر نمک نیترات نقره با میزان ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر در ریزجلبک کلرلا و لگاریس مورد بررسی قرار گرفت. تعداد سلول‌های زنده و غلظت کلروفیل a ریزجلبک پس از ۹۶ ساعت کشت در محیط BBM اندازه‌گیری شد. میزان رشد، تقسیمات سلولی و کلروفیل از مهم‌ترین شاخص‌های فیزیولوژیک هستند که در علم سم‌شناسی برای ارزیابی خطر سموم در محیط‌زیست استفاده می‌شوند (Khristo Foreva et al., 1996; Kastori et al., 1998). فتوسنتز از عوامل مؤثر در رشد جلبک‌ها است. کلروفیل a ماده اساسی فتوسنتز است که مقدار آن نشان‌دهنده کیفیت فتوسنتز و وضعیت رشد جلبک‌ها است (Wang et al., 2013; Pham, 2019). در این مطالعه مشاهده شد که اثر بازدارندگی رشد و شدت آن در گروه‌های تیمار شده با نمک نیترات نقره همانند سایر گروه‌های تحت تیمار با افزایش غلظت مواجهه افزایش یافت، ولی میزان این اثر در این گروه مواجهه شده با نمک γ -AgNPs کمتر از گروه‌های مواجهه شده با γ -AgNPs بود. این در حالی است که γ -AgNPs بیشترین اثر بازدارندگی رشد را در ریزجلبک‌ها داشت. در برخی مطالعات، سمیت نمک نیترات نقره بیشتر از نانوذرات نقره گزارش شده است (Jiang et al., 2012; Johari et al., 2018). در

حجم بیشتر این نانوذرات موجب عبور آسان تر آن‌ها از منافذ کوچک دیواره سلولی، نفوذ به درون سلول و افزایش استرس اکسیداتیو و اختلال در واکنش‌های بیوشیمیایی درون سلول می‌شود (Shanab *et al.*, 2021). این موضوع می‌تواند توجیه‌کننده علت سمیت سلولی بیشتر در ریزجلبک‌های گروه γ -AgNPs در بررسی حاضر باشد.

نتیجه‌گیری نهایی

طبق نتایج به‌دست آمده از این مطالعه، احیاء و بیوسنتز AgNPs و γ -AgNPs با استفاده از خاصیت احیاءکنندگی بالای عصاره بره‌موم الکلی پرتوفاوری نشده و پرتوفاوری شده در سطح مطلوب ۱۰ کیلوگری پرتو گاما می‌تواند به‌عنوان جایگزینی برای روش‌های شیمیایی با هدف احیاء و سنتز نانوذرات باشد. علی‌رغم دوستدار محیط‌زیست بودن این روش زیستی، نانوذرات نقره احیاء و بیوسنتز شده در هر دو حالت به‌طور کلی می‌توانند مانع رشد جلبک کلرلا و لگاریس شوند و میزان غلظت سلولی در حضور نانوذرات کمتر از گروه شاهد مشاهده شد. میزان این سمیت در گروه مواجهه با γ -AgNPs بیشتر از نوع AgNPs بود. همچنین میزان کلروفیل a در ریزجلبک‌های مواجهه با غلظت‌های مختلف γ -AgNPs و AgNPs کاهش یافته و موجب کاهش فتوسنتز گردید. که نتایج می‌تواند تأییدی بر احیاء و سنتز نانوذرات نقره در دو حالت و همچنین کوچک‌تر بودن سایز ذرات و نفوذ بیشتر آن‌ها به درون ریزجلبک در نوع γ -AgNPs نسبت به AgNPs باشد. با توجه به این نتایج لازم است تحقیقات بیشتری بر میزان ایمن بودن استفاده از نانومواد، انجام شود. همچنین می‌توان به این مهم نیز اشاره نمود که انجام مطالعات نانوبوم‌شناسی بر موجودات آبی می‌تواند به‌عنوان شاخص مناسبی برای پیش‌بینی اثرات احتمالی رهائش انواع نانومواد در بوم‌سازگان‌های آبی مورد توجه قرار گیرد.

جلبک (میکرولیتر) در همه گروه‌های تحت تیمار به میزان مشابه کاهش نشان داد. میزان کلروفیل a نیز در همه گروه‌های تحت تیمار به نسبت گروه کنترل کاهش یافت ولی میزان این کاهش در همه گروه‌های تیمار شده تقریباً یکسان بود و اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده نشد. با این وجود در مطالعه‌ای دیگر، میزان کاهش کلروفیل و کاروتنوئید در گروه مواجهه شده با نمک نیترات نقره بیشتر از گروه مواجهه شده با نانوذرات نقره بود (Khan *et al.*, 2019). که البته کاهش میزان رشد و سنتز کلروفیل در جلبک‌های مواجهه شده با نانوذرات نقره به‌دلیل کاهش فتوسنتز در تحقیقات بسیاری گزارش شده است (Arouja *et al.*, 2009; Gong *et al.*, 2011). علت کاهش میزان کلروفیل a و به‌دنبال آن کاهش فتوسنتز می‌تواند آسیب رنگدانه‌های گیاهی، مهار زنجیره انتقال الکترون، افزایش فعالیت آنزیم کلروفیل‌از و یا افزایش استرس اکسیداتیو در اثر مواجهه با نانوذرات باشد (Pham, 2019).

شاخص هدایت الکترولیتی/سلول زنده (نشست الکترولیتی) نیز شاخص دیگری است که با میزان پراکسیداسیون غشا در ارتباط است و معیاری برای نشان دادن میزان نفوذپذیری و آسیب به غشای سلول در شرایط تنش است (Wang *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2015). در این مطالعه میزان نشت سلولی در همه گروه‌های تیمار شده، به‌ویژه در جلبک‌های مواجهه شده با γ -AgNPs افزایش پیدا کرد. این موضوع می‌تواند به‌علت افزایش آسیب‌پذیری غشای سلولی در اثر افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن و مالون‌دی‌آلدهید به‌عنوان شاخص زیستی پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از مواجهه با γ -AgNPs و AgNPs یا AgNO_3 باشد (Khan *et al.*, 2019).

استفاده از عصاره الکلی پرتوفاوری شده با پرتو گاما بره‌موم به‌منظور احیاء نانوذرات نقره از نمک نیترات نقره طبق گزارش Ghanizadeh (۱۴۰۱) به‌علت داشتن خاصیت احیاءکنندگی بالاتر نسبت به عصاره الکلی بره‌موم پرتوفاوری نشده منجر به سنتز نانوذرات با اندازه‌های کوچک‌تری شد. بنابراین اندازه کوچک‌تر و نسبت سطح به

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی پژوهشگاه علوم و فنون

هسته‌ای در قالب طرح مربوط به دوره فرصت مطالعاتی
اعضای هیأت علمی و گرنت پژوهشی و دانشکده مهندسی
هسته‌ای دانشگاه شهید بهشتی انجام گرفت.

۵. منابع

References

- Arunakumara, K.K.I.U., Zhang, X., 2008. Heavy metal bioaccumulation and toxicity with special reference to microalgae. *Journal of Ocean University of China* 7(1), 60-64. DOI:10.1007/s11802-008-0060-y.
- Aruoja, V., Dubourguier, H.C., Kasemets, K., Kahru, A., 2009. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microal-gae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Science of the Total Environment* 407(4), 1461-1468. DOI 10.1016/j.scitotenv.2008.10.053
- Banerjee, S., Hew Khatoun, W.E.H., 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
- Barbosa, V.T., Souza, J.K.C., Alvino, V., Meneghetti, M.R., Florez-Rodriguez, P.P., Moreira, R.E., Paulino, G.V.B., Landell, M.F., Basílio-Júnior, I.D., do Nascimento, T.G., Luciano A. M. Grillo, L.A.M., Camila B. Dornelas, C.B., 2019. Biogenic synthesis of silver nanoparticles using Brazilian propolis. *Biotechnology Progress* 35(7), e2888. DOI: 10.1002/btpr.2888
- Bhuyan, U., Handique, J.G., 2022. Chapter 6 - Plant polyphenols as potent antioxidants: Highlighting the mechanism of antioxidant activity and synthesis/development of some polyphenol conjugates, Editor(s): Atta-ur-Rahman, *Studies in Natural Products Chemistry*, Elsevier 75, 243-266.
- Bosio, K., Avanzini, C., Avolio, A.D., Ozino, O., Savoia D., 2000. In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. *Letters in Applied Microbiology* 31(2), 174-177. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2000.00785.x
- Deres, S., Gunes, T., Sivaci, R., 1998. Spectrophotometric determination of chlorophyll a, b and total carotenoid content of some algae species using different solvent. *Turkish Journal of Botany* 22(1), 13-17.
- Ebrahimzadeh, Z., Salehzadeh, A., Naeemi, A.S., Jalali A., 2020. Silver nanoparticles biosynthesized by *Anabaena flosaquae* enhance the apoptosis in breast cancer cell line. *Bulletin of Materials Science* 43(1), 1-7. DOI: 10.1007/s12034-020-2064-1
- Ghanizadeh, F., 1401. Biosynthesis of silver nanoparticles using gamma irradiated of Iranian propolis. MSc Thesis, Faculty of Nuclear Engineering, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran. DOI:10.21203/rs.3.rs-2012454/v1
- Gong, N., Shao, K., Feng, W., Lin, Z., Liang, C., Sun, Y., 2011. Biototoxicity of nickel oxide nanoparticles and bioremediation by microalgae *Chlorella vulgaris*. *Chemosphere* 83(4), 510-516. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2010.12.059
- Gruyer, N., Dorais, M., Bastien, C., Dassylva, N., Triffault-Bouchet, G., 2013. Interaction between silver nanoparticles and plant growth. *In International Symposium on New Technologies for Environment Control, Energy-Saving and Crop Production in Greenhouse and Plant* 1037, 795-800. DOI:10.17660/ActaHortic.2014.1037.105

- Hedayati, S.A., Farsani, H.G., Naserabad, S.S., Hoseinifar, S.H., Van Doan, H., 2019. Protective effect of dietary vitamin E on immunological and biochemical induction through silver nanoparticles (AgNPs) inclusion in diet and silver salt (AgNO₃) exposure on Zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 222, 100-107. DOI: 10.1016/j.cbpc.2019.04.004
- Heidarieh, M., Chakoli Nabipour, A., Shahbazi, S., Shawrang, P., Zhang, B., 2021. Effect of gamma irradiation processing on total phenol and antioxidant capacities of the Iranian extract of propolis. *Radiochimica Acta* 109(8), 635-641. DOI: 10.1515/ract-2021-1042
- Huang, S.J., Mau, J.L., 2007. Antioxidant properties of methanolic extracts from *Antrodia camphorata* with various doses of γ -irradiation. *Food Chemistry* 105(4), 1702-1710. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.04.046
- Jiang, H.S., Li, M., Chang, F.Y., Li, W., Yin, L.Y., 2012. Physiological analysis of silver nanoparticles and AgNO₃ toxicity to *Spirodela polyrhiza*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31(8), 1880-1886. DOI:10.1002/etc.1899
- Johari, S.A., Sarkheil, M., Tayemeh, M.B., Veisi, S., 2018. Influence of salinity on the toxicity of silver nanoparticles (AgNPs) and silver nitrate (AgNO₃) in halophilic microalgae, *Dunaliella salina*. *Chemosphere* 209(C), 156-162. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.06.098
- Karimi, R., Norastehnia, A., Abbaspour, H., Saeidi Sar, S., Naemi, A.S., 2018. Evaluation of copper oxide nanoparticle toxicity to cyanobacteria *Anabaena* sp. in Guilan wetlands. *Aquatics Physiology and Biotechnology* 6(1), 1-20. DOI:10.22124/japb.2018.7224.1157
- Karimi, R., Norastehnia, A., Abbaspour, H., Saeidi Sar, S., Naemi, A.S., 2017. Effects of copper oxide nanoparticles on the growth of *Chlorella vulgaris*. *Progress in Biological Sciences* 7(1), 11-20. DOI: 10.22059/pbs.2018.226951.1253
- Kastori, R., Plesnicar, M., Sakac, Z., Pankovic, D., Arsenijevic Maksimovic, I., 1998. Effect of excess lead on sunflower growth and photosynthesis. *Journal of Plant Nutrition* 21(1), 75-85. DOI: 10.1080/01904169809365384
- Khan, I., Raza, M.A., Khalid, M.H.B., Awan, S.A., Raja, N.I., Zhang, X., Min, S., Wu, B.C., Hassan, M.J., Huang, L., 2019. Physiological and biochemical responses of pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.) seedlings exposed to silver nitrate (AgNO₃) and silver nanoparticles (AgNPs). *International Journal of Environmental Research and Public Health* 16(13), 2261. DOI: 10.3390/ijerph16132261
- Khristo Forova, N.K., Aizdaicher, N.A., Berezovskaya, O., 1996. The effect of copper ions and a detergent of green microalga *Dunaliella tertiolecta* and *Platymonas* sp. *Russian Journal of Marine Biology* 22, 109-114.
- Kitada, K., Machmudah, S., Sasaki, M., Goto, M., Nakashima, Y., Kumamoto, S., Hasegawa, T., 2009. Supercritical CO₂ extraction of pigment components with pharmaceutical importance from *Chlorella vulgaris*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology* 84(5), 657-661. DOI:10.1002/jctb.2096
- Kumar, P., Senthamil Selvi, S., Govindaraju, M., 2012a. Seaweed-mediated biosynthesis of silver nanoparticles using *Gracilaria corticata* for its antifungal activity against *Candida* spp. *Applied Nanoscience* 3(6), 495-500. DOI: 10.1007/s13204-012-0151-3
- Kumar, P., Senthamil Selvi, S., Lakshmi Prabha, A., Prem Kumar, K., Ganeshkumar, R.S., Govindaraju, M., 2012b. Synthesis of silver nanoparticles from *Sargassum tenerrimum* and screening phytochemicals for its antibacterial activity. *Nano Biomedicine and Engineering* 4(1), 2-16. DOI: 10.5101/nbe. V4i1.p12-16
- Kumar, P., Senthamil Selvi, S., Lakshmi Prabha, A., Selvaraj, M., Macklin Rani, L., Suganthi, P., Sarojini D., Govindaraju, M., 2012c. Antibacterial activity and in-vitro cytotoxicity assay against brine shrimp using silver nanoparticles synthesized from *Sargassum ilicifolium*. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* 7(4), 1447-1455.

- Li, X., Schirmer, K., Bernard, L., Sigg, L., Pillai, S., Behra, R., 2015. Silver nanoparticle toxicity and association with the alga *Euglena gracilis*. *Environmental Science: Nano* 2(6), 594-602. DOI: 10.1039/C5EN00093A
- Liu, C., Liu, Y., Guo, K., Fan, D., Li, G., Zheng, Y., 2011. Effect of drought on pigments, osmotic adjustment and antioxidant enzymes in six woody plant species in karst habitats of southwestern China. *Environmental and Experimental Botany* 71(2), 174-183. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2010.11.012
- Liu, J., Wang, W., Wang, L., Sun, Y., 2015. Exogenous melatonin improves seedling health index and drought tolerance in tomato. *Journal of Plant Growth Regulation* 77(3), 317-326. DOI: 10.1007/s10725-015-0066-6
- Martinez, M., Sánchez, S., Jimenez, J., El Yousfi, F., Munoz, L., 2000. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology* 73(3), 263-272. DOI: 10.1016/S0960-8524(99)00121-2.
- Naeemi, A.S., Sarmad, J., Mohseni, N., Chaibakhsh, N., 2016. Modeling, kinetics and isotherm of lead biosorption by *Chlorella vulgaris*. *Aquatics Physiology and Biotechnology* 4(1), 85-109. DOI: 20.1001.1.23453966.1395.4.1.6.3
- Naeemi, A.S., Sarmad, J., Mohseni, N., Kehtari, F., 2018. The effects of different concentrations of lead on the growth, photosynthetic pigments and malondialdehyde content of the unicellular green algae *Chlorella Vulgaris*. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)* 30(4), 940-947. DOI: 20.1001.1.23832592.1396.30.4.19.4
- Parker, M.S., Mock, T., Armbrust, E.V., 2008. Genomic insights into marine microalgae. *Annual Review of Genetics* 42(1), 619-645. DOI: 10.1146/annurev.genet.42.110807.091417
- Pham, T.L., 2019. Effect of silver nanoparticles on tropical freshwater and marine microalgae. *Journal of Chemistry* 9658386. DOI:10.1155/2019/9658386
- Rossa, M.M., oliveira, M.C., Okamoto, O.K., lopes, P.F., Colepicolo, P., 2002. Effect of visible light on super oxidase dismutase SOD activity in the red Alga *Gracilariopsis tenuifrons* (*Gracilariaceae*, *Rhodophyta*). *Journal of applied phycology* 14(3), 151-157. DOI: 10.1023/A: 1019985722808
- Shanab, S.M.M., Partila, A.M., Ali, H.E.A., Abdullah, M.A., 2021. Impact of gamma-irradiated silver nanoparticles biosynthesized from *Pseudomonas aeruginosa* on growth, lipid, and carbohydrates of *Chlorella vulgaris* and *Dictyochloropsis splendida*. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* 14(1), 70-81. DOI:10.1080/16878507.2020.1856599
- Sumi, Y., 2009. Microalgae pioneering the future-application and utilization. *Science and Technology Trends* 34, 9-21
- Vishwakarma, K., Upadhyay, N., Singh, J., Liu, S., Singh, V.P., Prasad, S.M., Chauhan, D.K., Tripathi, D.K., Sharma, S., 2017. Differential phytotoxic impact of plant mediated silver nanoparticles (AgNPs) and silver nitrate (AgNO₃) on *Brassica Sp.* *Frontiers in Plant Science* 8, 1501. DOI: 10.3389/fpls.2017.01501
- Wang, L., Cui, Y.R., Lee, H.G., Fu, X., Wang, K., Xu, J., Gao, X., Jeon, Y.J., 2022. Fucoidan isolated from fermented *Sargassum fusiforme* suppresses oxidative stress through stimulating the expression of superoxidase dismutase and catalase by regulating Nrf2 signaling pathway. *International Journal of Biological Macromolecules* 209(part A), 935-941. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.04.083
- Wang, L., Wang, M., Peng, C., Pan, J., 2013. Toxic Effects of Nano-CuO, Micro-CuO and Cu²⁺ on *Chlorella Sp.* *Journal of Environmental Protection* 4(1B), 86-91. DOI: 10.4236/jep.2013.41B016
- Zuliani, L., Frison, N., Jelic, A., Fatone, F., Bolzonella, D., Ballottari, M., 2016. Microalgae cultivation on anaerobic digestate of municipal wastewater, sewage sludge and agro-waste. *International Journal of Molecular Sciences* 17(10), E1692. DOI: 10.3390/ijms17101692

