

مقاله کوتاه

تأثیر نانو ذره اکسید مس بر رشد، مقدار پروتئین، کلروفیل‌ها و کاروتن جلبک گونه

(Chlorella vulgaris)

محدثه میری* و هاشم خندان بارانی

زابل، دانشگاه زابل، پژوهشکده تالاب بین‌المللی هامون، گروه مدیریت اکوسیستم‌های طبیعی

تاریخ دریافت: ۹۴/۶/۷

تاریخ پذیرش: ۹۴/۹/۲۳

چکیده

نانو ذرات اکسید مس به طور گسترده در تولیدات صنعتی استفاده می‌شوند که رهایش این نانو ذرات به محیط زیست باعث سمیت برای ارگانیسم‌های آبی می‌شود. در این مطالعه اثرات نانو ذره اکسید مس بر روی رشد، پروتئین کل، کلروفیل‌ها و کاروتن جلبک گونه *(Chlorella vulgaris)* در غلظت‌های مختلف (شاهد، ۰/۱، ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر) به مدت شش روز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تعداد سلول‌ها و میزان پروتئین کل جلبک با افزایش غلظت نانو ذره اکسید مس به طور معنی‌دار کاهش یافته است ($P < 0/05$). نانو ذره اکسید مس باعث افزایش درصد نرخ بازدارندگی در جلبک *Ch. vulgaris* شده است. میزان کلروفیل کل، کلروفیل a، b و کاروتن در غلظت‌های مختلف نانو ذره اکسید مس در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی‌داری داشته، که نشان دهنده تأثیر این نانو ذره بر فتوسنتز می‌باشد. همبستگی مثبت و معنی‌دار بین رشد سلول‌های جلبک گونه *(Ch. vulgaris)* با کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتن وجود دارد. طبق بررسی‌های انجام شده می‌توان نتیجه گرفت که نانو ذره اکسید مس رشد، تکثیر و فتوسنتز را در جلبک گونه *Ch. vulgaris* کاهش داده است.

واژه‌های کلیدی: *Chlorella vulgaris*، نانو ذره، CuO.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۵۱۹۶۰۵۵۴، پست الکترونیکی: mirimohadeseh@uoz.ac.ir

مقدمه

به طور گسترده استفاده می‌شود. در نهایت این نانو مواد به صورت زباله‌های خانگی و صنعتی به بدنه آبی زمین وارد خواهند شد (۴).

جلبک‌ها تولیدکنندگان اولیه هستند که خط اولیه زنجیره غذایی اکوسیستم و منشا تجمع زیستی را تشکیل می‌دهند و نقش مهمی در تعادل اکوسیستم دارند. جلبک‌ها به دلیل حساسیت زیاد، کوتاه بودن چرخه رشد، قابلیت کشت به صورت جداگانه و مشاهده اثرات سمی در سطح سلولی به

در حال حاضر نانو تکنولوژی در مقیاس بزرگی از تولیدات صنعتی و خانگی استفاده می‌شود و حتی در برنامه‌های آینده نیز کاربرد بیشتری پیدا خواهد کرد (۲۰). نانو ذره اکسید مس به علت داشتن هدایت گرمایی خوب به عنوان مایع انتقال حرارت در ابزار و ماشین آلات استفاده می‌شود (۶). همچنین نانو ذره اکسید مس به عنوان کاتالیزور، ابر رساناها، مواد ترموالکتربیک، مواد سنسور، شیشه، سرامیک و دیگر مواد کاربرد دارد (۲۶). به طور کلی از این نانو ذره

۱۰۰، ۱۰، ۱، ۰/۱ (میلی گرم بر لیتر) و شاهد با سه تکرار از هر تیمار بوده است. تراکم سلول‌ها توسط لام هموسیتمتر و میکروسکوپ نوری در هر روز مورد محاسبه قرار گرفت.

اندازه‌گیری رنگیزه‌ها: به منظور اندازه‌گیری رنگیزه‌های کلروفیل a، b و کاروتن، ۳ میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی داخل لوله آزمایش منتقل و در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه توسط دستگاه سانتریفیوژ مدل (Eppendorf) سانتریفیوژ گردید. سپس محلول رویی خارج و به رسوب جلبکی ۳ میلی‌لیتر استون (Merck) 90% اضافه و توسط همزن مخلوط گردید و مجدد عمل سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محلول حاصله را جدا نموده و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Jenway)، جذب نوری در طول موج‌های مختلف ۴۱۲، ۴۳۱، ۴۶۰، ۴۸۰، ۴۴۵، ۶۶۳ و ۶۶۵ خوانده و میزان رنگیزه‌ها توسط فرمول‌های مربوطه بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر محاسبه شد (۱۱).

نرخ بازدارندگی رشد جلبک: نرخ بازدارندگی رشد جلبک‌ها در غلظت‌های مختلف اکسید مس از فرمول زیر محاسبه شده (۹):

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

N: تراکم سلول‌ها در هر میلی لیتر در غلظت‌های مختلف اکسید مس، N_0 : تراکم سلول‌ها در هر میلی لیتر در کنترل **سنجش پروتئین:** ۵۰ میلی‌لیتر از هر غلظت برداشت و از صافی با مش ۲۵ میکرون عبور داده شد و به مدت یک روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به منظور از دست دادن آب اضافی جلبک‌ها نگه‌داری شدند و سپس در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان سنجش پروتئین در آنجا نگه‌داری شد. میزان پروتئین به روش کلدال سنجیده شد. ۲۰ میلی‌گرم وزن خشک جلبک با ۶ گرم کاتالیزور (3.5 g $K_2SO_4 + 0.4 \text{ g } CuSO_4 \times 5H_2O$) و ۱۵ میلی‌لیتر اسید

عنوان یکی از فاکتورهای حساس به مواد سمی در محیط زیست مورد استفاده قرار می‌گیرند (۲۲). جلبک *Chlorella* به علت داشتن مقاومت بالا معمولاً برای ارزیابی مواد سمی و مضر به کار می‌رود (۸). این ارگانیسم‌ها به حضور گونه‌های مختلف مس در محیط بسیار حساس می‌باشند (۷، ۲۱). در حال حاضر مطالعه اثرات سمی نانو ذره اکسید مس بر روی جلبک کلرلا اندک است. بنابراین در این مطالعه اثرات سمی نانو ذره اکسید مس بر جلبک گونه (*Ch. vulgaris*) با هدف ارزیابی ایمنی مواد نانو مورد بررسی قرار گرفته است تا شواهدی بر استفاده از نانو مواد استاندارد فراهم گردد.

مواد و روشها

آماده سازی نانو ذره اکسید مس: نانو ذرات اکسید مس (CuO-NPs) مورد استفاده در این تحقیق با نام تجاری (US NANO) از شرکت پیشگامان نانو مواد ایران خریداری شد. سایز نانو ذرات ۴۰ نانومتر می‌باشد. ابتدا محلول همگنی از نانو ذرات در محیط کشت Guillard F/2 (۲۳) تهیه شد و قبل استفاده توسط دستگاه التراسونیک مدل (Bandelin)، فرایند التراسونیک به مدت ۳۰ دقیقه صورت گرفت (۴، ۹). این فرایند برای تهیه سوسپانسیون همگن از نانو ذره اکسید مس انجام شد.

کشت جلبک: جلبک سبز گونه (*Ch. vulgaris*) در محیط کشت Guillard F/2 و شرایط آزمایشگاهی با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۲۰۰۰ لوکس روشنایی و دوره ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی و هوادهی مداوم پرورش یافت. به منظور کشت انبوه، ۱۰ میلی‌لیتر از استوک خالص جلبک به ارلن مایر حاوی ۵۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت استریل انتقال داده شد. بعد از گذشت ۵ روز میزان جلبک-ها دو برابر شده و به فاز یکنواختی رسیدند. سپس یک میلی گرم بر لیتر از جلبک در یک لیتر محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف نانو ذره اکسید مس قرار داده شد. این آزمایش شامل ۵ تیمار از غلظت‌های مختلف اکسید مس

شاهد در روزهای دوم، چهارم و ششم را نشان می‌دهد. بین غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید مس و گروه شاهد در هر روز اختلاف معنی‌دار مشاهده شده است ($P < 0.05$). بیشترین و کمترین میزان رشد سلول‌های جلبکی به ترتیب در گروه شاهد به میزان 1.74×10^6 (سلول در میلی‌لیتر) در روز ششم و به میزان 0.21×10^6 (سلول در میلی‌لیتر) در غلظت ۱۰۰ (میلی‌گرم بر لیتر) نانوذره اکسید مس در روز دوم مشاهده شد. روز ششم بیشترین میزان رشد جلبک نسبت به روزهای دوم و چهارم مشاهده شد (نمودار ۱).

نرخ بازدارندگی رشد میکروجلبک (نمودار ۲) با افزایش غلظت نانوذره اکسید مس افزایش می‌یابد. بیشترین و کمترین میزان بازدارندگی به ترتیب در روز دوم و روز ششم مشاهده شده است. به طوری که در روز ششم نرخ بازدارندگی در نقطه صفر و منفی است (نمودار ۲).

مقایسه میانگین میزان پروتئین کل جلبک‌ها در روز ششم در غلظت‌های مختلف اختلاف معنی‌دار نشان نداد ($P > 0.05$). بیشترین و کمترین میزان پروتئین به ترتیب در گروه شاهد به میزان ۰/۳۸ (میکروگرم بر گم وزن خشک) و غلظت ۱۰۰ به میزان ۰/۱۹ (میکروگرم بر گم وزن خشک) مشاهده شد (نمودار ۳).

سولفوریک در دمای ۴۰۰ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۴۵ دقیقه هضم شد. سپس با دستگاه کلدال مدل (V40) عملیات تقطیر و با محلول (HCL 0/1M) فرایند تیتراسیون انجام شد و میزان نیتروژن کل به دست آمد. با استفاده از فرمول زیر میزان پروتئین کل محاسبه گردید (۱۶):

$$\text{Total protein} = N \times N \text{ factor}$$

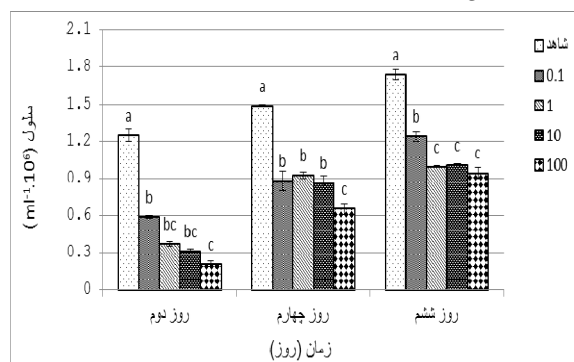
N = میزان نیتروژن موجود در نمونه‌ها

N factor = فاکتور تبدیل نیتروژن به پروتئین، ۶/۲۵ برای جلبک می‌باشد.

تحلیل آماری: آنالیز داده‌های آماری توسط نرم افزار SPSS(16) انجام شد. پس از تعیین نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون آنالیز واریانس دو طرفه (Two-Way ANOVA) اختلاف بین تیمارهای مختلف و روزهای متفاوت در سطح ($P < 0.05$) مورد تحلیل قرار گرفت. همبستگی بین رشد سلول‌های جلبک گونه (*Ch. vulgaris*) با کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتن با استفاده از پس آزمون Pearson انجام شد.

نتایج

نمودار (۱) رشد میکروجلبک (*Ch. vulgaris*) در ۴ تیمار با غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید مس در مقایسه با



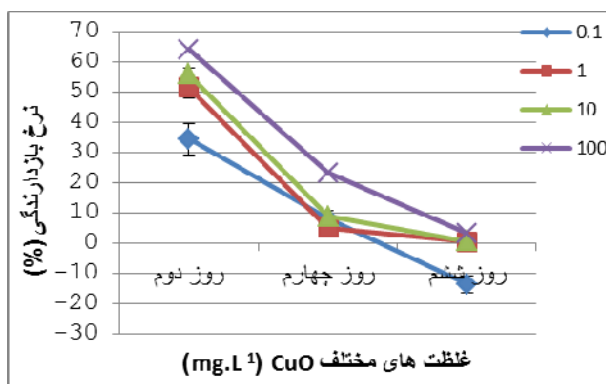
نمودار ۱- مقایسه میانگین رشد سلول‌های جلبک (*Ch. vulgaris*) در غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید مس (میلی‌گرم بر لیتر) در سه زمان متفاوت (میانگین \pm خطای استاندارد).

Chlorella مشخص شد که با افزایش میزان غلظت نانوذره اکسید مس میزان کلروفیل‌ها در هر روز به طور معنی‌داری

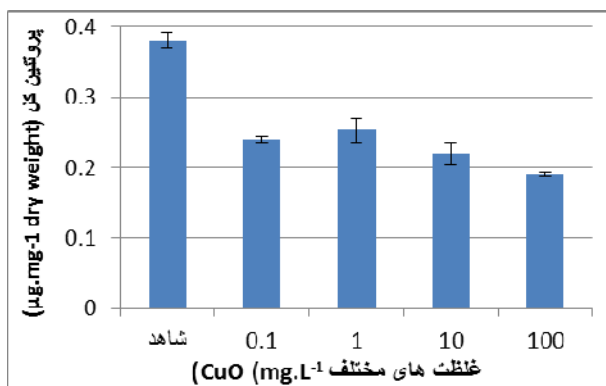
طبق بررسی انجام شده در مورد اثر غلظت‌های متفاوت نانوذره اکسید مس بر میزان کلروفیل‌های جلبک

کاهش می‌یابد ($P < 0.05$). میزان کلروفیل‌ها با گذشت زمان افزایش یافته اما اختلاف معنی‌دار بین روزهای مختلف مشاهده نشد ($P > 0.05$). بیشترین و کمترین میزان کلروفیل

به ترتیب در گروه شاهد در روز ششم به میزان $2/12 \pm 0/05$ و غلظت 100 میلی‌گرم بر لیتر نانو ذره اکسید مس در روز دوم به میزان $0/09 \pm 0/009$ مشاهده شد.



نمودار ۲- مقایسه میانگین نرخ بازدارندگی رشد جلبک (*Ch. vulgaris*) در غلظت‌های مختلف نانو ذره اکسید مس (میلی‌گرم بر لیتر) در سه زمان متفاوت (میانگین \pm خطای استاندارد).

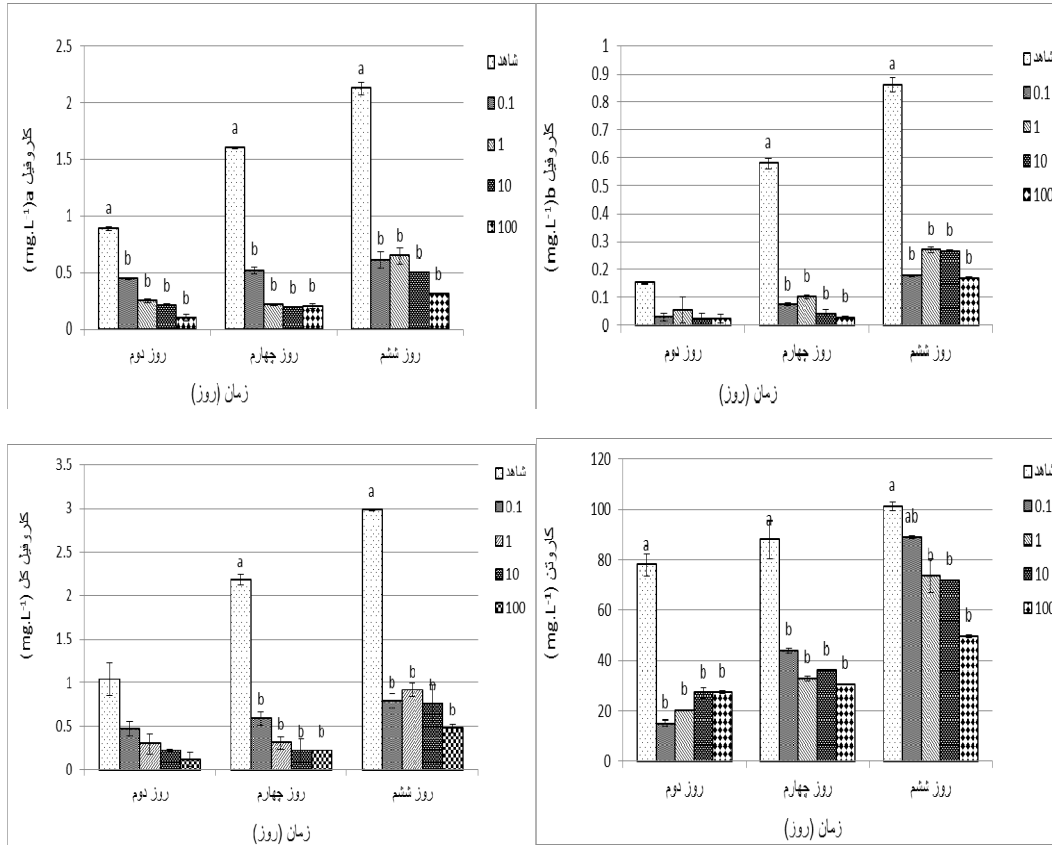


نمودار ۳- مقایسه میانگین پروتئین کل جلبک (*Ch. vulgaris*) در غلظت‌های مختلف نانو ذره اکسید مس (میلی‌گرم بر لیتر) در روز ششم (میانگین \pm خطای استاندارد).

بیشترین و کمترین میزان کلروفیل b به ترتیب مربوط به گروه شاهد در روز ششم به میزان $0/86 \pm 0/02$ و غلظت 10 و 100 میلی‌گرم بر لیتر نانو ذره اکسید مس در روز دوم به میزان $0/02 \pm 0/004$ (میلی‌گرم بر لیتر) بود و در مورد کلروفیل کل هم به ترتیب در گروه شاهد در روز ششم $2/98 \pm 0/009$ و غلظت 100 میلی‌گرم بر لیتر نانو ذره اکسید مس در روز دوم به میزان $0/11 \pm 0/008$ (میلی‌گرم بر لیتر) مشاهده شد. کاروتن در جلبک *Chlorella* با افزایش میزان غلظت نانو ذره اکسید مس بین تیمارهای

مختلف به طور معنی‌دار کاهش یافته است. به طوری‌که بیشترین و کمترین میزان کاروتن به ترتیب در گروه شاهد در روز ششم $101/26 \pm 1/02$ و در غلظت $0/1$ میلی‌گرم بر لیتر نانو ذره اکسید مس در روز دوم به میزان $15/13 \pm 0/1$ (میلی‌گرم بر لیتر) مشاهده شد (نمودار ۴).

نتایج همبستگی بین رشد سلول‌های جلبک گونه (*Ch. vulgaris*) با کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتن در جدول ۱ آمده است. رشد جلبک *Chlorella* با کلروفیل‌ها و کاروتن همبستگی مثبت و معنی‌دار نشان داد.



نمودار ۴- مقایسه میانگین کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتن در جلبک (*Ch. vulgaris*) در غلظت‌های مختلف نانو ذره اکسید مس (میلی گرم بر لیتر) در سه زمان متفاوت (میانگین \pm خطای استاندارد).

جدول ۱- همبستگی بین رشد سلول‌های جلبک گونه (*Ch. vulgaris*) با کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتن

	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کاروتن
رشد سلول‌های جلبک گونه <i>(Chlorella vulgaris)</i>	$r^2=0/607$ $P=0/00^*$	$r^2=0/620$ $P=0/00^*$	$r^2=0/640$ $P=0/00^*$	$r^2=0/757$ $P=0/00^*$

* اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۱ می‌باشد.

بحث

رشد سریع و گسترده نانو مواد و به خصوص کاربرد گسترده نانو ذره اکسید مس در تولیدات صنعتی (۲۳) و ورود به اکوسیستم‌های آبی و تاثیر بر تولیدکنندگان اولیه زنجیره غذایی، بررسی تاثیر این نانو مواد بر متابولیسم و شاخص‌های فیزیولوژیک حائز اهمیت می‌باشد (۷، ۱۵).

در مطالعه حاضر، میزان رشد جلبک *Chlorella* با افزایش غلظت نانو ذره اکسید مس به طور معنی دار ($P<0/05$)

میزان رشد و تقسیمات سلولی و کلروفیل از مهمترین شاخص‌های فیزیولوژیک هستند که در علم سم شناسی برای ارزیابی خطر سموم در محیط استفاده می‌شود (۱۳)، کاروتن نیز از رنگیزه‌های مهم در جلبک‌ها است که نقش حیاتی در رشد آنها دارد (۵، ۲۶). بنابراین با توجه به

کاهش یافته بود و با گذشت زمان این میزان افزایش یافته است (نمودار ۱). Oukarrom و همکاران (۲۰۱۲)، نشان دادند که نانو ذره نقره می‌تواند به طور مستقیم بر روی سطح جلبک *Chlorella* تاثیر می‌گذارد (۱۷). در نتیجه سلول‌ها بزرگتر و متراکم به نظر می‌رسند. زیرا نانو ذره نقره که ۵۰ نانومتر است ممکن است نتواند وارد سلول شود اما می‌تواند به عنوان یک پل ارتباطی به سلول دیگر باشد که در نهایت باعث سرعت بخشیدن در تجمع سلولی می‌شود (۱۲، ۱۷). تجمع نانو ذرات اکسید روی و اکسید تیتانیوم باعث محصور شدن دریچه‌های سلولی جلبک *Chlorella* شده است (۱۲). همچنین نانو ذره اکسید سلیسیم توسط سطح جلبک *Chlorella* جذب شده و این باعث کاهش رشد شده است (۲۴). با جذب سطحی نانوذرات توسط جلبک‌های *Chlorella* و *Scenedesmus* نرخ جذب نور کاهش یافته، که می‌تواند دلیل کاهش رشد و افزایش نرخ بازدارندگی باشد (۱۲، ۲۴). بنابراین خاصیت تراکم نانو ذرات و جذب سطحی توسط جلبک‌ها از دلایل سمیت نانو ذره اکسید مس برای جلبک گونه *Ch. vulgaris* است.

فتوستنتز از عوامل موثر رشد جلبک‌ها است. کلروفیل a ماده اساسی فتوستنتز است که مقدارش نشان دهنده وضعیت رشد جلبک‌ها است (۲۳). نمودار ۴ تغییرات میزان کلروفیل a، b و کاروتن را تحت تاثیر نانو ذره اکسید مس در شش روز نشان می‌دهد. میزان کلروفیل‌ها و کاروتن با افزایش غلظت نانو ذره اکسید مس کاهش یافته است. نتایج مطالعه Wang و همکاران (۲۰۱۳)، مشابه مطالعه حاضر است. آنها کاهش میزان کلروفیل a و b را در جلبک *Chlorella* در غلظت‌های بالای نانو ذره اکسید مس در ۹۶ ساعت مشاهده و بیان کردند که نانو ذره اکسید مس با کاهش کلروفیل، فتوستنتز را در جلبک گونه *Ch. vulgaris* مهار می‌نماید (۲۳). Shi و همکاران (۲۰۱۱)، گزارش کردند که میزان کلروفیل در خزه با حضور نانو ذره اکسید مس به دلیل افزایش رهایی یون‌های مس از نانو ذرات

کاهش یافته است (۲۲). همچنین Gang و همکاران (۲۰۱۱) و Arouja و همکاران (۲۰۰۹) نیز کاهش رشد و کلروفیل را در جلبک‌های در معرض قرار گرفته با نانو ذرات به دلیل کاهش فتوستنتز گزارش کردند (۴، ۹). یون-های مس رها شده از نانو ذرات با کاهش مهار آب از فتوسیستم دو بر روی فتوستنتز جلبک تاثیر می‌گذارند. به علاوه با حضور نانو ذره اکسید مس میزان مواد فتوشیمیایی فتوسیستم دو کاهش می‌یابد (۲). طبق مطالعاتی که Perreault و همکاران (۲۰۱۰) و Patsikka و همکاران (۲۰۰۲) انجام دادند نانو ذره اکسید مس بر روی عملکرد رادیکال‌های اکسیژن ROS داشته و استرس اکسیداتیو را به علت ترکیب شدن با آهن به عنوان یک عنصر ضروری افزایش داده است (۱۵، ۱۸، ۱۹). استرس اکسیداتیو نقش مهمی در سمیت نانو ذره اکسید مس در ارگانسیم‌های فتوستنتیک گیاه دارد (۲۳) که با توجه به نقش آنتی اکسیدانی کاروتنوئیدها (۱، ۸)، شاید دلیل افزایش کاروتن در روز ششم در غلظت‌های مختلف نانو ذره اکسید مس در جلبک *Ch. vulgaris* باشد (۹). مقادیر پروتئین در جلبک مورد مطالعه در غلظت‌های مختلف نانو ذره در مقایسه با کنترل کاهش یافته اما اختلاف معنی‌دار مشاهده نشده است ($P > 0.05$). نتایج مطالعات Gang و همکاران (۲۰۱۱) نیز با مطالعه حاضر مطابقت دارد. آنها بیان کردند که پروتئین می‌تواند بعنوان یک فاکتور مهم در فرآیند تجزیه زیستی مورد ارزیابی قرار گیرد (۹). همچنین یداللهی و همکاران (۱۳۹۰)، گزارش کردند که پروتئین در جلبک (*Dunaliella salina*) با افزایش غلظت آلومینیوم افزایش معنی‌داری نداشته است (۲). همبستگی بین رشد سلول‌های جلبک *Chlorella* با کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتن وجود دارد.

نتیجه‌گیری نهایی

نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان داد که نانو اکسید مس مانع رشد جلبک کلرلا شده است و میزان سلول‌ها در

فتوستت در جلبک کلرولا شده است. با توجه به این نتایج باید تحقیقات بیشتری بر روی ایمنی نانو مواد انجام شود.

حضور نانو ذرات کمتر از گروه شاهد است. همچنین میزان کلروفیل a، b و کاروتن در غلظت‌های مختلف نانو ذره اکسید مس کاهش یافته است. بنابراین باعث کاهش

منابع

- ۱- کسایی، س. م. سروش نسب، ل. ساطعی، آ. آریز. ۱۳۹۱. اثر الومینیوم بر رشد، PH، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، اسمولیت‌ها و تجمع آن در جلبک کلرولا ولگاریس (*Ch. vulgaris*). فصلنامه پژوهش‌های علوم گیاهی، ۷(۲): ۵۹-۶۷.
- ۲- یدالهی، ف. ساطعی، آ. قربانعلی، م. ل. ۱۳۹۰. اثر آلومینیوم بر رشد، مقدار پروتئین، کلروفیل‌ها و میزان تجمع آلومینیوم در جلبک (*Dunaliella salina* Teodoresco). فصلنامه پژوهش‌های علوم گیاهی. ۶(۲): ۱۱-۱۷.
- 3- Arellano J.B., Lazaro, J.J., Lopez-Gorge, J., Bar'ón, M., 1995. The donor side of Photosystem II as the copper-inhibitory binding site. *Photo. Re.* 45(2): 127-134.
- 4- Aruoja, V., Dubourguier, H.C., Kasemets, K., Kahru, A., 2009. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Sci. Total. Environment.* 407: 1461-1468.
- 5- Ben-Amotz, A., 1995. New mode of *Dunaliella* biotechnology: two-phase growth for B-carotene production. *J. A. Phycol.* 7: 65-68.
- 6- Chang, H., Jwo, C.S., Lo, C.H., Tsung, T.T., Kao, M.J., Lin, H.M., 2005. Rheology of CuO nanoparticle suspension prepared by ASNSS. *Rev. Adv. Mater. Sci.* 10: 128-32.
- 7- Dewez, D., Geoffroy, L., Vernet, G., Popovic, R., 2005. Determination of photosynthetic and enzymatic biomarkers sensitivity used to evaluate toxic effects of copper and fludioxonil in alga *Scenedesmus obliquus*. *Aquatic. Toxicol.* 74(2): 150-159.
- 8- Dicango, R., Guid, R.L., De Gara, L., Soldatini, G.F., 2001. Combined cadmium and azone treatment effect photosynthesis and ascorbate-dependent defences in sunflower. *Newphytol. Chemosphere.* 151: 622-636.
- 9- Gong, N., Shao, K., Feng, W., Lin, Z., Liang, C., Sun, Y., 2011. Biototoxicity of nickel oxide nanoparticles and bioremediation by microalgae *Chlorella vulgaris*. 83: 510-516.
- 10- Grant, W.F., Zinoveva Stahevitch, A.E., Zura, K.D., 1981. In short term tests for chemical carcinogens. *New York San. Springerverlag.* 200 -216.
- 11- Jensen, A., 1987. Chlorophyll and carotenoid, *Hand book of physiological and biochemical method.* Cambridge.
- 12- Ji, J., Long, Z., Lin, D., 2011. Toxicity of oxide nanoparticles to the green algae *Chlorella sp.* *Chem. Engineering. J.* 170: 525-530.
- 13- Kastori, R., Plesnicar, M., Sakac, Z., Pankovic, D., Arsenijevic_Maksimovic, I., 1998. Effect of excess lead on sunflower growth and photosynthesis. *J. Plant nutrition.* 21: 75-85.
- 14- Khristo Forova, N.K., Aizdaicher, N.A., Berezovskaya, O., 1996. The effect of copper ions and a detergent of green microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Platymonas sp.* *Russian. J. Marine. Bio.* 22: 109-114.
- 15- Knauert, S., Knauer, K., 2008. The role of reactive oxygen species in copper toxicity to two freshwater green algae. *J. Phycol.* 44(2): 311-319.
- 16- Ördög, V., Stirk, W. A., Bálint, P., Staden J. V., Lovász, C., 2011. Changes in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogen-stressed *Chlorella minutissima* cultures. *J. Appl. Phycol.* 24: 907-914.
- 17- Oukarroum, A., Bras, S., Perreault, F., Popovic, R., 2012. Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. *Eco. Environment. Safety.* 78: 80-85.
- 18- Patsikka, E., Kairavuo, M., Sersen, F., Aro, E.M., Tyystjarvi, E. 2002. Excess copper predisposes photosystem II to photoinhibition in vivo by outcompeting iron and causing decrease in leaf chlorophyll. *Plant. Physiol.* 129(3): 1359-1367.
- 19- Perreault, F., Oukarroum, A., Pirastru, L., Sirois, L., Gerson, W., Popovic, R., 2010. Evaluation of copper oxide nanoparticles toxicity using chlorophyll a fluorescence imaging in *Lemna gibba*. *J. Botany.* 1-9.
- 20- Popov, A.P., Priezzhev, A.V., Lademann, J., Myllylä, R., 2005. TiO₂ nanoparticles as an

- effective UV-B radiation skin protective compound in sunscreens. J. Phys. D. Appl. Phys. 38: 2564-70.
- 21- Saison, C., Perreault, F., Daigle, J.C., Fortin, C., Claverie, J., Morin, M., Popovic, R., 2009. Effect of core-shell copper oxide nanoparticles on cell culture morphology and photosynthesis (photosystem II energy distribution) in the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. Aquatic Toxicol. 96: 109-114.
- 22- Shi, J., Abid, A.D., Kennedy, I.M., Hristova, K.R., Silk, W.K., 2011. To duckweeds (*Landoltia punctata*), nanoparticulate copper oxide is more inhibitory than the soluble copper in the bulk solution. Environ. Pollut. 159: 1277-1282.
- 23- Wang, L., Wang, M., Peng, C., Pan, J., 2013. Toxic Effects of Nano-CuO, Micro-CuO and Cu²⁺ on *Chlorella* sp. J. Environment. Protection. 4: 86-91.
- 24- Wei, C.X., Zhang, Y.B., Guo, J., Han, B., Yang, X., Yuan, J.L., 2010. Effects of silica nanoparticles on growth and photosynthetic pigment contents of *Scenedesmus obliquus*. J. Environmen. Sci. 22(1): 155-160.
- 25- Yang, A., britton, g., 1990. Carotenoids and stress. In: stress responses in plants: Adaptation and acclimation mechanisms. Wiley-Liss, Inc.
- 26- Yang, D., Sun, W., 2003. Structural characters and special properties of nanomaterials. Mater. Review. 17(10): 7-10.

Short paper

Effect of copper oxide nanoparticle on growth, protein content, chlorophylls and carotenoid in (*Chlorella vulgaris*)

Miri M. and Khandan Barani H.

Faculty of Natural Ecosystems, International Center of Hamoon Wetland, University of Zabol, Zabol, I.R. of Iran

Abstract

Copper oxide nanoparticles are widely used in industrial production, are released in the environment and can induce toxicity to aquatic organisms. In this study, effects of copper oxide nanoparticles on growth, total protein content, chlorophylls and carotene of *Chlorella vulgaris* in various concentrations (control, 0/01, 1. 10 and 100 mg/l) were investigated for six days. The results showed that the number of algae cells and total protein significantly decreased with increasing concentrations of copper oxide nanoparticles ($P < 0/05$). Copper oxide nanoparticles increased the percentage interception rate in *Chlorella*. The total chlorophyll, chlorophyll a, b and carotene had significant reduction in different concentrations of copper oxide nanoparticles compared with control group, indicating the impact of nanoparticles on photosynthesis. There is a significant positive correlation between the growth of algae cells (*Ch. vulgaris*) with chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll and carotene. The investigation concluded that copper oxide nanoparticle reduced growth and photosynthesis in *Ch. vulgaris*.

Key words: *Chlorella vulgaris*, Nanoparticle, CuO.