



Effect of Colloidal Silver Nanoparticles on Biodiesel Quality of *Nannochloropsis oculata*

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Fazelian N.^{*1} PhD,
Yousefzadi M.¹ PhD,
Ahmadi A.² PhD

How to cite this article

Fazelian N, Yousefzadi M, Ahmadi A. Effect of Colloidal Silver Nanoparticles on Biodiesel Quality of *Nannochloropsis oculata*. Modares Journal of Biotechnology. 2020;11(2):233-240.

ABSTRACT

Aims In the present study, the effect of different concentrations (1-50mg/L) of colloidal Ag-NPs on the growth of *N. oculata* was evaluated and after estimating EC50 (20.88mg/L), fatty acids profile and biodiesel indices of this microalgae were investigated.

Materials & Methods In this study, *N. oculata* was selected owing to fast growth and its ability to high levels of lipids synthesize for biodiesel production. This microalga exposed to colloidal silver nanoparticles under *in vitro* for 72h. The optical density (OD) and fatty acid profiles were investigated using spectrophotometric analysis and gas chromatography, respectively. Statistical analysis of growth data was performed using ANOVA and Duncan's multiple test at 5% probability level.

Findings The algal growth significantly decreased in *N. oculata* cells treated with the 5-50mg/L of Ag-NPs. The increase of saturated fatty acids (SFAs) and polyunsaturated fatty acids (PUFAs), as well as the decrease of monounsaturated fatty acids (MUFAs) contents, were also observed in response to 25mg/L of Ag-NPs in compared to the control. The important indicators of biodiesel oxidative stability containing LCSF, CFPP, and CP increased in *N. oculata* exposed to Ag-NPs, while the level of DU decreased.

Conclusion Despite the toxicity of silver nanoparticles, these nanoparticles can increase the biodiesel stability from *N. oculata*.

Keywords Silver Nanoparticle; *Nannochloropsis oculata*; Growth; Gas Chromatography; Biodiesel

¹Marine Biology Department, Marine Science & Technology Faculty, University of Hormozgan, Hormozgan, Iran

²Mathematics Department, Science Faculty, University of Hormozgan, Hormozgan, Iran

*Correspondence

Address: Marine Biology Department, Marine Science & Technology Faculty, University of Hormozgan, Iran. Postal Code: 7916193145.
Phone: +98 (76) 33662010
Fax: -
nasrin_fazelian@yahoo.com

Article History

Received: February 17, 2020
Accepted: April 07, 2020
ePublished: June 10, 2020

CITATION LINKS

[1] Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxid ... [2] Silver nanoparticles: Green synthesis and ... [3] Nanotechnology in medical applications ... [4] Applications of magnetic nanoparticles in ... [5] A look back at the US department of energy's aquatic species ... [6] Artemia: Marine ... [7] RETRACTED: A process for high yield and scaleable recovery ... [8] Biodiesel from ... [9] Microalgae as a raw material for biofuels ... [10] A new method for preparing raw material for ... [11] Rotifer and microalgae culture ... [12] Enhanced production of fatty acids in three strains of microalgae using ... [13] Biomass and lipid induction strategies in microalgae for biofuel ... [14] Enhancing lipid productivity of *Chlorella vulgaris* using ... [15] Nanosilver toxicity: Ions, nanoparticles ... [16] Silver nanoparticle- algae interactions: Oxidative dissolution ... [17] Experimental investigations on the effects of cerium oxide ... [18] Influence of alpha and gamma-iron oxide nanoparticles on marine ... [19] Lipid accumulation and CO2 utilization of *Nannochloropsis* ... [20] Algal response to metal oxide nanoparticles ... [21] Fatty acids profiling: A selective criterion ... [22] Ecotoxicity of Ag-nanoparticles on two microalgae, *Chlorella* ... [23] Cytotoxic impacts of CuO nanoparticles on the marine microalga ... [24] Evaluation of zinc oxide nanoparticles toxicity on marine algae ... [25] Ecotoxicity study of titania (TiO2) NPs on two microalgae species ... [26] Nanoparticles in natural aquatic environments ... [27] Quantification of silver nanoparticle toxicity to algae in soil ... [28] Effect of Ag⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺ containing hybrid nanomatrixes ... [29] Photosynthetic carbon partitioning and lipid production ... [30] Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production ... [31] Trace concentrations of iron nanoparticles cause overproduction ... [32] Screening microalgae strains for biodiesel production: Lipid productivity ... [33] Production of biodiesel from algae ...

اثر نانوذره نقره کلويیدی بر کیفیت سوخت زیستی ریزجلبک نانوکروپسیس اکولاتا

نسرين فاضليان* PhD

گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، هرمزگان، ایران

قاسم PhD

گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، هرمزگان، ایران

قاسم PhD

گروه ریاضی، دانشکده علوم، دانشگاه هرمزگان، هرمزگان، ایران

چکیده

اهداف: در مطالعه حاضر، تاثیر غلظت‌های مختلف نانوذره نقره کلويیدی (۵۰-۱ میلی گرم بر لیتر) بر رشد ریزجلبک *N. oculata* ارزیابی و پس از تعیین EC50 (۲۰/۸۸ میلی گرم بر لیتر)، پروفایل اسیدهای چرب و شاخص‌های سوخت زیستی این ریزجلبک در غلظت ۲۵ میلی گرم بر لیتر نانوذره نقره بررسی شد. **مواد و روش‌ها:** در این مطالعه، ریزجلبک *N. oculata* به دلیل رشد سریع و توانایی سنتز مقادیر بالای لیپید برای تولید سوخت زیستی انتخاب شد. این ریزجلبک در شرایط آزمایشگاهی به مدت ۷۲ ساعت تحت تیمار نانوذرات نقره کلويیدی قرار گرفت. جذب نوری ریزجلبک و پروفایل اسیدهای چرب به ترتیب با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری و کروماتوگرافی گازی بررسی شد. تحلیل آماری داده‌های رشد با آزمون تحلیل واریانس و مقایسه میانگین با آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ انجام گرفت.

یافته‌ها: رشد ریزجلبک *N. oculata* در غلظت‌های ۵۰-۵ میلی گرم بر لیتر نانوذره نقره به طور معنی‌داری کاهش یافت. همچنین افزایش میزان اسیدهای چرب اشباع (SFAs) و اسیدهای چرب چند غیراشباعی (PUFAs) و کاهش میزان اسیدهای چرب تک غیراشباعی (MUFA) در پاسخ به غلظت ۲۵ میلی گرم بر لیتر نانوذره نقره در مقایسه با کنترل مشاهده شد. شاخص‌های مهم در پایداری اکسیداتیو سوخت زیستی شامل LCSF، CFPP و CP در ریزجلبک در معرض نانوذره نقره افزایش یافت، در حالی که مقدار شاخص DU کاهش پیدا کرد.

نتیجه‌گیری: علی‌رغم سمیت نانوذرات نقره، این نانوذرات می‌تواند باعث افزایش پایداری سوخت زیستی حاصل از ریزجلبک *N. oculata* شوند.

کلیدواژه‌ها: نانوذره نقره، نانوکروپسیس اکولاتا، رشد، کروماتوگرافی گازی، سوخت زیستی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۱/۱۹

*نویسنده مسئول: nasrin_fazelian@yahoo.com

مقدمه

نانوذرات، ذراتی با ابعاد کمتر از ۱۰۰ نانومتر هستند که رفتار فیزیکی و شیمیایی خاص آنها به دلیل نسبت بالای سطح به حجم و اندازه کوچک آنها است [1]. نانوذرات نقره به دلیل ویژگی‌هایی از قبیل فعالیت ضد میکروبی قوی، سمیت کم برای انسان و سهولت استفاده معمولاً در تولید لوازم خانگی، پلاستیک‌ها، رنگ‌ها، براق‌کننده‌ها و پارچه‌ها به کار می‌روند [2]. همچنین این ذرات در ساخت غشاهای زیستی، گندزدایی آب و کنترل زیستی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرند [3]. تولید، مصرف و دفع محصولات تجاری

تولید شده با استفاده از فناوری نانو موجب می‌شود تا نانو ساختارهای موجود در این محصولات به محیط زیست وارد شوند [4]. تفاوت رفتار زیستی و خصوصیات حرکتی ذرات بسیار ریز نقره نسبت به ذرات بزرگتر باعث می‌شود این ذرات از سدهای زیستی عبور کنند و وارد سلول شوند و نفوذ آنها در موجودات زنده موجب ورود به زنجیره غذایی می‌شود [3]. ریزجلبک‌ها از ساده‌ترین موجودات واجد کلروفیل هستند که با فتوسنتز، مواد آلی را می‌سازند و تمام حلقه‌های بالاتر شبکه غذایی انرژی خود را از مواد آلی ساخته شده توسط این موجودات دریافت می‌کنند [5]. در حال حاضر ارزشمندترین گونه‌های ریزجلبکی به منظور آبی‌پروری براساس اندازه، خوش‌هضم بودن، ارزش غذایی و راحتی کشت، *Isochrysis* (۲-۴ میکرون)، *Nannochloropsis oculata* (۵-۷ میکرون)، *Tetraselmis chuii* (۷-۱۰ میکرون)، *Chaetocerus gracilis* (۶-۸ میکرون)، *Dunaliella tertiolecta* (۷-۹ میکرون) و چندین گونه از جنس کلرولا (۹-۳ میکرون) هستند [6]. به طور کلی برخی ریزجلبک‌ها در مقایسه با گیاهان روغنی دارای طیف وسیعی از اسیدهای چرب به خصوص اسیدهای با ساختار ۱۸ کربنه هستند. این ریزجلبک‌ها منبع بسیار خوبی برای تولید روغن هستند و برخی تا بیش از ۳۱ برابر دانه‌های سویا روغن در خود ذخیره می‌کنند، ولی نکته قابل توجه در آنها کیفیت اسیدهای چرب است که آنها را از گیاهان خشکی متمایز کرده است [7]. بسیاری از جلبک‌ها مقادیر زیادی ذخایر روغنی تولید می‌کنند که به راحتی می‌توانند به بیودیزل (سوخت زیستی) تبدیل شوند. تولید زیست‌توده یک پارامتر کلیدی در ارزیابی اقتصادی تولید سوخت زیستی از جلبک است. اگرچه توسعه مهندسی ژنتیک به علاوه تجهیز بیوراکتورها نیز تاثیر به سزایی در افزایش راندمان خواهند داشت [8]. امروزه بحران انرژی به عنوان یکی از چالش‌های عمده پیش روی بشر خودنمایی می‌کند. استفاده از سوخت‌های فسیلی، افزایش انتشار گازهای گلخانه‌ای و ایجاد پدیده گرمایش جهانی را در پی داشته و باعث توجه بیشتر به منابع انرژی پایدار با انتشار آلودگی کم شده است [9]. در سال‌های اخیر، سوخت زیستی به عنوان یکی از اولویت‌های انرژی تجدیدپذیر، غیرسمی و دوستدار محیط زیست برای جایگزینی سوخت‌های فسیلی به شدت مورد توجه قرار گرفته است [10]. ریزجلبک‌ها به علت سرعت رشد بالا، زمان رشد کم و تولید زیست‌توده زیاد به عنوان کارخانه‌های سلولی تجزیه‌کننده نور خورشید، می‌توانند با تبدیل دی‌اکسیدکربن به سوخت سبز از میزان دی‌اکسیدکربن جو بکاهند. جلبک نانوکروپسیس به دلیل داشتن مقدار زیاد اسیدهای چرب به عنوان ماده غذایی برای روتیفر و ایجاد شرایط مطلوب محیطی در تانک‌های لاروی، در کارگاه‌های تکثیر ماهیان مورد استفاده قرار می‌گیرد. این جلبک همچنین به عنوان منبعی برای تامین اسیدهای چرب چند غیراشباع جیره غذایی مطرح است و در تهیه سوخت زیستی نیز کاربرد دارد [11]. عوامل محیطی و شرایط تغذیه‌ای مختلف می‌توانند مقدار و

و به مدت ۴ روز در شرایط آزمایشگاه قرار گرفتند تا به مرحله رشد لگاریتمی برسند. سپس در روز چهارم تیمارهای نانوذره نقره با پنج غلظت مختلف انجام شد. این غلظت‌های مختلف (۱، ۵، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) با استفاده از محلول غلیظ ۴ گرم بر لیتر نانوذرات نقره تهیه شدند. به‌منظور کاهش رسوب نانوذرات، نانوذرات نقره با استفاده از دستگاه سونیکاتور در محلول پخش و در مدت زمان تیمار، ارن‌ها روی شیکر قرار داده شدند تا رسوب به حداقل مقدار خود برسد.

اندازه‌گیری جذب نوری

برای تعیین میزان رشد ریزجلبک *N. oculata* از هر تیمار سه نمونه برداشته شد و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر Jenway (Jenway؛ انگلستان)، جذب نوری (OD) در طول موج ۶۸۰ نانومتر قرائت شد [19].

آنالیز پروفایل اسید چرب با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی
اسیدهای چرب متیل‌استر شده (FAMES) با یک دستگاه کروماتوگرافی گازی (Varian؛ اسپانیا) مجهز به دتکتور FID و ستون سیلیکائی موئین ۲۵/۰متر و ۲۵/۰ میلی‌متر شناسایی شدند. گاز هلیوم با جریان ۱ میلی بر دقیقه و فشار ۴۹/۷ کیلوپاسکال به‌عنوان حامل استفاده شد. پس از اینکه دمای ستون به مدت ۳ دقیقه، ۴۰°C و به مدت ۴۰ دقیقه به ۲۳۰°C رسید، حجم معینی از نمونه تزریق شد و دمای ۲۴۰°C اعمال شد. اسپکترومتری جرمی با انرژی الکترون ۷۰ الکترون ولت انجام شد. در نهایت پیک FAMES با مقایسه زمان بازداری آنها با محلول استاندارد شناسایی و درصد اسیدهای چرب به کل اسیدهای چرب هر نمونه (میلی‌گرم اسیدهای چرب بر گرم اسیدهای چرب متیل‌استری‌شده) با مقایسه طول منحنی‌های هر اسید چرب با طول منحنی استاندارد محاسبه شد [20].

بررسی شاخص‌های سوخت زیستی

یکی از روش‌های بررسی کیفیت سوخت زیستی تولیدشده از ریزجلبک‌ها، بررسی شاخص‌های این سوخت‌ها است. شاخص CN، با استفاده از SV و IV به دست می‌آید (معادله‌های ۱-۳). شاخص DU یکی دیگر از شاخص‌های مهم است که با توجه به اسیدهای چرب تک غیراشباعی (MUFA) و چند غیراشباعی (PUFA) محاسبه می‌شود (معادله ۴) [21].

معادله (۱)

$$SV = \sum \frac{(560 \times N)}{M}$$

معادله (۲)

$$IV = \sum \frac{(254 \times DN)}{M}$$

معادله (۳)

$$CN = 46.3 + \left(\frac{5.458}{SV} \right) - (0.225 \times IV)$$

معادله (۴)

$$DU = MUFA + (2 \times PUFA)$$

D: تعداد پیوندهای دوگانه، M: جرم مولکولی اسیدچرب و N: درصد اسیدچرب در روغن ریزجلبک *N. oculata* است.

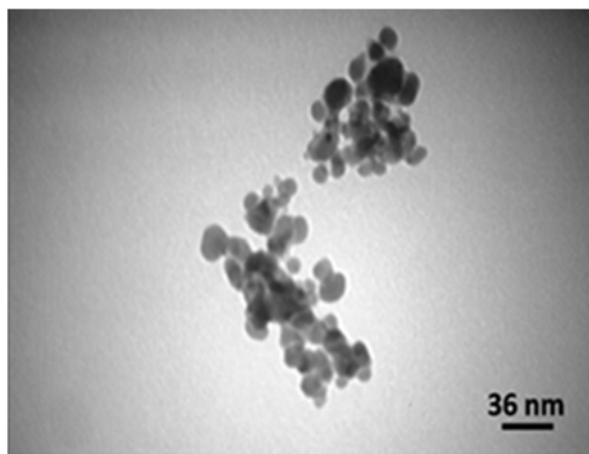
ساختار لیپیدهای ریزجلبک‌ها را تغییر دهند و در صورتی که از نظر اقتصادی مقرون‌به‌صرفه باشند می‌توانند در تهیه سوخت زیستی به کار روند و به‌منظور بهبود کیفیت این سوخت‌ها پیشنهاد شوند [12]. نانوذرات نقره یکی از نانوذرات پرکاربرد در صنایع مختلف هستند که پس از ورود به اکوسیستم آبی، رشد فیتوپلانکتون‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهند و می‌توانند ترکیب اسیدهای چرب آنها را تغییر دهند. *علیشاه آراتبنی* و همکاران بیان کردند که غلظت خاص برخی از نانوذرات فلزی مانند اکسید روی (ZnO)، اکسید مس (CuO)، اکسید آهن (FeO) و نقره (Ag) برای ریزجلبک‌ها بسیار سمی است، چون باعث تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و القای تنش اکسیداتیو در این موجودات می‌شود [13]. نانوذرات با القای تنش اکسیداتیو باعث افزایش سنتز لیپید در ریزجلبک‌ها نیز می‌شوند [13، 14]. افزایش بهره‌وری لیپید ناشی از القای تنش اکسیداتیو در پاسخ به نانوذره TiO₂ در ریزجلبک *Chlorella vulgaris* UTEX 265 مشاهده شده است [14].

لوپیک گزارش کرده است که نانوذره نقره در جلبک *Chlamydomonas reinhardtii* به‌صورت غیرمستقیم سمی است و رشد جلبک را تحت تاثیر قرار می‌دهد [15]. هی و همکاران نشان دادند که غلظت ۲/۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات نقره برای *Chattonella marina* سمی است و یون Ag⁺ نسبت به نانوذرات نقره سمیت بیشتری دارد [16]. همچنین پوشش‌دار کردن نانوذرات نقره با سیستئین باعث کاهش اثر مهاری این نانوذرات در *C. marina* می‌شود [16]. اطلاعات بسیار محدودی در مورد اثر نانوذرات نقره بر ریزجلبک‌ها خصوصاً ریزجلبک‌های آب شور در دسترس است. لازم به ذکر است که در برخی مطالعات، غلظت‌های بسیار پایین نانوذرات به‌عنوان ماده افزودنی برای بهبود سوخت زیستی تولیدشده از جلبک‌ها استفاده شده است [17]. اما تاکنون تاثیر غلظت‌های بالای نانوذرات نقره بر شاخص‌های مهم در کنترل پایداری سوخت زیستی حاصل از ریزجلبک‌ها بررسی نشده است. بنابراین در مطالعه حاضر سعی بر این است که تاثیر نانوذرات نقره کلوییدی بر رشد و پروفایل اسیدهای چرب ریزجلبک آب شور نانوکروپسیس اکولاتا (*N. oculata*) بررسی شود.

مواد و روش‌ها

کشت ریزجلبک نانوکروپسیس و تیمار با نانوذرات نقره

ریزجلبک مورد نظر در مطالعه حاضر، نانوکروپسیس اکولاتا بود که از مرکز تحقیقات شیلات بندر لنگه تهیه شد. این ریزجلبک در محیط کشت f2 و در آب دریای استریل‌شده کشت داده شد. ارن‌های حاوی نمونه جلبکی تحت هوادهی ملایم، دمای ۲۸°C-۲۶°C، شدت نور ۵۰۰۰ لوکس با سیکل روشنایی ۱۲ ساعته و میزان شوری ۲۷ ppm قرار گرفتند و زیست‌توده کافی از نمونه جلبکی تهیه شد [18]. به‌منظور اعمال تیمار نانوذرات، ارن‌هایی حاوی ۴۰۰ میلی‌لیتر نمونه جلبکی با تراکم اولیه ۴×۱۰^۶ سلول آماده شدند



شکل ۱) تصویر TEM نانوذرات نقره

شاخص‌هایی مانند LCSF، CFPP و CP با توجه به اسیدهای چرب اشباع (SFAs) محاسبه می‌شوند (معادله‌های ۵-۷) [22].
معادله (۵)

$$\text{LCSF} = (0.1 \times C_{16}) + (0.5 \times C_{18}) + (1 \times C_{20}) + (1.5 \times C_{22}) + (2 \times C_{24})$$

معادله (۶)

$$\text{CFPP} = (3.1417 \times \text{LCSF})$$

معادله (۷)

$$\text{CP} = (0.526 \times C_{16}) - 4.992$$

میکروسکوپ الکترونی روبشی

به منظور بررسی مورفولوژی سطحی سلول‌های جلبکی از روش FESEM استفاده شد. در این روش ۵۰ میلی‌لیتر نمونه جلبکی سانتیفریوژ و رسوب جلبکی با استفاده از دستگاه فریز-درایر خشک شد. نمونه‌های خشک‌شده با دستگاه FESEM مدل VP-500 (Zeiss-Sigma؛ آلمان) آنالیز شدند [23].

آنالیز آماری

داده‌های رشد با استفاده از نرم‌افزار SPSS 21 و آنالیز واریانس دوطرفه بررسی و اختلاف میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان ۹۵٪ مقایسه شدند.

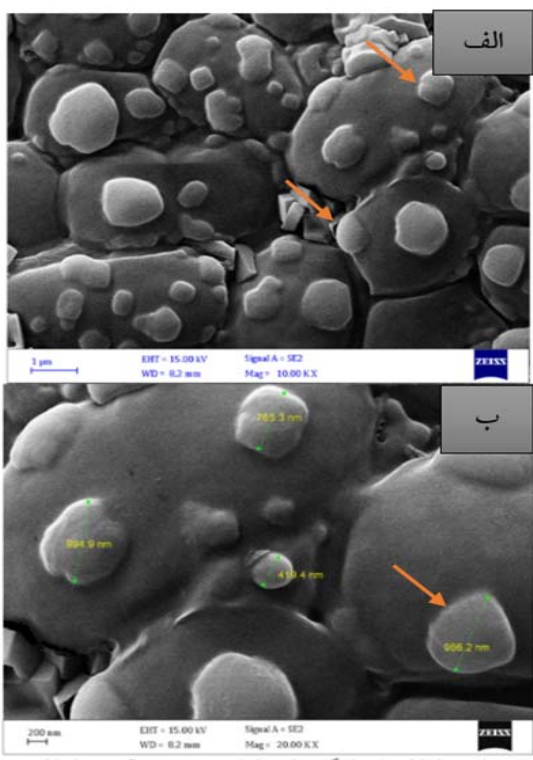
یافته‌ها

مشخصات محلول کلوییدی نانوذره نقره

محلول نانوذره نقره (پیشگامان نانومواد ایرانیان؛ ایران) خریداری شد و با استفاده از دستگاه زتاسایزر مدل (ZEN3600; Malvern؛ انگلستان)، اندازه ذرات موجود در کلویید نانوذرات نقره تهیه‌شده از نانوصب پارس بین ۳/۹ تا ۱۶۳/۵ نانومتر و میانگین قطر آنها، ۵۴/۸ نانومتر به دست آمد. ۵۴/۱٪ ذرات زیر ۱۰۰ نانومتر و ۴۵/۹٪ بین ۱۰۰ تا ۱۶۵ نانومتر قطر داشتند. نتایج حاصل از تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) مدل (EM10C; Zeiss sigma؛ آلمان) نشان داد که میانگین اندازه نانوذرات نقره در حالت خشک ۲۵/۹±۸/۴۴ نانومتر بود. اختلاف به‌دست‌آمده بین اندازه نانوذرات نقره در حالت خشک و کلویید ناشی از اختلاف در روش مورد استفاده در اندازه‌گیری و نیز تشکیل توده و افزایش اندازه ذرات در حالت کلویید بود. طبق نتایج حاصل از دستگاه زتاسایزر، بار سطحی نانوذرات نقره موجود در کلویید مذکور به‌طور میانگین ۱۳±۰/۳ میلی‌ولت بود (شکل ۱).

تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی ریزجلبک نانوکلوپسیس تیمارشده با نانوذره نقره

تأثیر نانوذرات نقره بر دیواره سلولی ریزجلبک *N. oculata* در شکل ۲ نشان داده شده است. تمایل به تجمع و تراکم نانوذرات نقره در این تصاویر قابل مشاهده است. همچنین اندازه توده‌های متراکم‌شده نانوذرات نقره در شکل ۲-ب مشخص شده است.



شکل ۲) تصاویر SEM ریزجلبک *N. oculata* تیمارشده با غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره نقره؛ توده متراکم‌شده نانوذرات نقره با فلش مشخص شده‌اند.

بررسی رشد ریزجلبک نانوکلوپسیس اکولاتا

تأثیر نانوذرات نقره بر رشد ریزجلبک *N. oculata* معنی‌دار بود و تیمار آن باعث کاهش رشد این ریزجلبک شد. غلظت‌های ۵۰-۵ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات نقره، میزان جذب نوری را به‌طور معنی‌داری در مقایسه با کنترل کاهش داد، اما در غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر تغییر معنی‌داری در میزان جذب نوری مشاهده نشد. کاهش جذب نوری ریزجلبک نانوکلوپسیس در پاسخ به نانوذره نقره وابسته به غلظت نبود و در غلظت‌های ۵۰-۱۰ میلی‌گرم بر لیتر اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (نمودار ۱).

نتایج موجود در جدول ۲ نشان داد که غلظت ۲۵ میلی گرم بر لیتر نانوذره نقره باعث کاهش مقدار MUFAs و افزایش مقدار SFAs و PUFAs نسبت به کنترل شد. مقدار SFAs نمونه تیمار شده معادل ۳۲/۵۲ و در نمونه کنترل ۲۷/۵۸ و مقدار MUFAs در نمونه های تیمار شده معادل ۳۶/۰۳ و در نمونه کنترل ۳۸/۳۲ بود. مقدار PUFAs در نمونه های تحت تاثیر این نانوذره ۶/۴۷ و در نمونه کنترل ۵/۹۵ بود. نسبت SFAs/USFAs نیز در پاسخ به نانوذره نقره افزایش یافت.

جدول ۲ تاثیر غلظت ۲۵ میلی گرم بر لیتر نانوذرات نقره بر میزان اسیدهای چرب C16 و C18 و میزان اسیدهای چرب اشباع (SFAs)، تک غیراشباعی (MUFAs) و چند غیراشباعی (PUFAs) ریزجلبک *N. oculata*

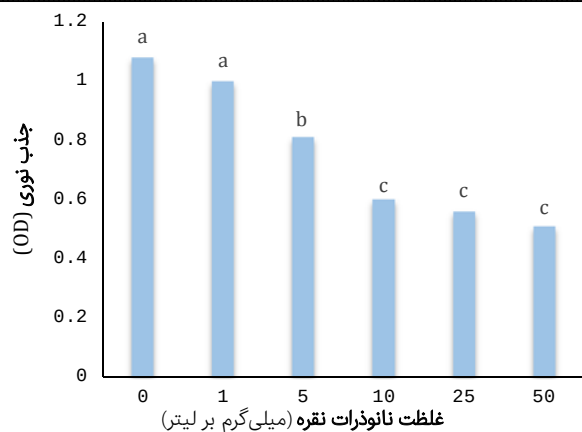
اسید چرب	کنترل	در حضور نانوذرات نقره
C16:0	۱۵/۹۷	۱۸/۰۱
C16:1	۱۸/۹۹	۲۰/۸۳
C18:0	۶/۵۵	۹/۱
C18:1	۵/۶۳	۳/۳۹
C18:2	۴/۳۷	۵/۱
C18:3	۱/۵۸	۱/۳۷
SFAs	۲۷/۵۸	۳۲/۵۲
MUFAs	۳۸/۳۲	۳۶/۰۳
PUFAs	۵/۹۵	۶/۴۷
SFAs/USFAs	۰/۶۲	۰/۷۶

تاثیر نانوذرات نقره بر شاخص های سوخت زیستی

نانوذره نقره تاثیر متفاوتی بر شاخص های سوخت زیستی تولید شده از ریزجلبک *N. oculata* داشت (جدول ۳). شاخص CN با توجه به دو شاخص SV و IV محاسبه شد. نانوذره نقره باعث افزایش مقدار SV و CN شد، در حالی که مقدار IV و DU در پاسخ به این نانوذره کاهش یافت. شاخص های LCSF، CFPP و CP مربوط به پایداری اکسیداتیو سوخت زیستی هستند. شاخص CFPP با توجه به LCSF محاسبه شد و در شاخص CP، مقدار اسیدهای چرب اشباع C16 اهمیت داشت. در این مطالعه، مقدار هر سه شاخص LCSF، CFPP و CP در ریزجلبک *N. oculata* تیمار شده با نانوذره نقره در مقایسه با کنترل افزایش یافت.

جدول ۳ تاثیر غلظت ۲۵ میلی گرم بر لیتر نانوذرات نقره بر شاخص های سوخت زیستی ریزجلبک *N. oculata*

شاخص سوخت زیستی	کنترل	در حضور نانوذرات نقره
SV	۲۰۸/۹۵	۲۱۰/۰۹
IV	۶۷/۴۱	۶۳/۲۶
CN	۳۱/۱۵	۳۲/۰۹
DU	۵۰/۲۲	۴۸/۹۷
LCSF	۵/۵۴	۶/۹۷
CFPP	۰/۹۳	۰/۴۲
CP	۰/۴	۰/۴۸



نمودار ۱ تاثیر نانوذرات نقره بر جذب نوری ریزجلبک *N. oculata*; آنالیز داده ها با استفاده از تست دانکن انجام شد و میانگین های دارای حروف غیرمشابه از نظر آماری اختلاف معنی داری دارند ($p \leq 0.05$).

تعیین EC نانوذرات نقره

پس از بررسی رشد ریزجلبک *N. oculata* و شمارش سلولی با استفاده از لام نئوبار، غلظت موثر (EC50) نانوذرات نقره با استفاده از نرم افزار Excel 2016 و رگرسیون محاسبه شد. EC50 این نانوذرات در ریزجلبک مورد مطالعه معادل ۲۰/۸۸ میلی گرم بر لیتر بود (جدول ۱).

جدول ۱ تعیین EC نانوذرات نقره در ریزجلبک *N. oculata*

EC	غلظت نانوذرات نقره (میلی گرم بر لیتر)
EC30	۳/۶۴
EC50	۲۰/۸۸
EC90	۵۵/۳۴

بررسی پروفایل اسیدهای چرب ریزجلبک *N. oculata*

با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی، اسیدهای چرب کنترل و نمونه تیمار شده با غلظت ۲۵ میلی گرم بر لیتر محلول نقره (غلظت نزدیک به EC50) بررسی شد. نتایج نشان داد که نانوذره نقره تاثیر متفاوتی بر میزان SFAs، MUFAs و PUFAs داشت. لازم به ذکر است که SFAs شامل اسیدهای چرب C12، C14، C15، C16، C17، C18 و C20 و MUFAs شامل اسیدهای چرب C14:1، C16:1، C17:1، C18:1، C20:1، C22:1 و C24:1 بود. فراوان ترین اسیدهای چرب در گروه SFAs، اسید چرب C16:0 (پالمیتیک اسید) و C18:0 (استئاریک اسید) و بین MUFAs، اسید چرب C16:1 (پالمیتولئیک اسید) و C18:1 (اولئیک اسید) بودند. با توجه به اهمیت اسیدهای چرب C16 و C18، تاثیر غلظت ۲۵ میلی گرم بر لیتر نانوذرات نقره بر میزان این اسیدهای چرب در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که نانوذره نقره باعث افزایش مقدار هر دو اسید چرب اشباع C16 و C18 شد، در حالی که بین اسیدهای چرب MUFAs تنها اسیدهای چرب C16:1 افزایش یافتند و اسیدهای چرب C18:1 کاهش پیدا کردند. همچنین بین اسیدهای چرب PUFAs، اسیدهای چرب C18:2 در پاسخ به این نانوذره افزایش یافتند.

بحث و نتیجه‌گیری

تأثیر نانوذرات نقره کلوییدی با سطح دیواره سلولی ریزجلبک *N. oculata* در تصاویر SEM مشاهده شد. برهمکنش نانوذرات با دیواره سلولی می‌تواند منجر به ورود آنها به درون سلول شود. در مورد نحوه ورود نانوذرات به درون سلول گزارشاتی ارائه شده است. براساس گزارشات قبلی هضم فلزات توسط جلبک‌ها شامل دو فاز مجزا شامل جذب سریع (انتقال سریع در مدت زمان ۱۰ دقیقه به درون سیتوپلاسم سلول جلبکی) و جذب یون‌های فلزی در سطح سلولی (این مرحله به ماهیت جایگاه‌های اتصال در سطح سلول بستگی دارد، است [24]). در تصاویر SEM سلول‌های *N. oculata* تمایل به تجمع و انباشتگی نانوذره نقره بر سطح سلول جلبکی نیز مشاهده شد. این تجمع باعث کاهش میزان نور در دسترس جلبک می‌شود و در نهایت میزان فتوسنتز و رشد جلبک را کاهش می‌دهد [25]. همسو با نتایج مطالعه حاضر، اتصال نانوذرات متراکم‌شده TiO_2 به سطح دیواره سلولی جلبک‌های کلرولا و سندسموس در تصاویر SEM گزارش شده است [25].

بررسی رشد ریزجلبک *N. oculata* در پاسخ به غلظت‌های مختلف نانوذره نقره (۵۰-۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) نشان داد که رشد ریزجلبک مورد مطالعه در پاسخ به غلظت‌های بیشتر از ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر این نانوذره در مقایسه با کنترل به‌طور معنی‌دار کاهش یافت. مطالعات مختلفی در زمینه تأثیر نانوذره نقره بر رشد ریزجلبک‌ها انجام شده است. هی و همکاران نشان دادند که غلظت ۲/۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات نقره برای *Chattonella marina* سمی و تولید رادیکال‌های آزاد دلیل سمیت این نانوذرات معرفی شده است [16]. نتایج بررسی اثر نانوذرات نقره بر *C. vulgaris* (گونه آب شیرین) و *D. tertiolecta* (گونه آب شور) نشان داده‌اند که غلظت‌های بالای این نانوذرات (۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) باعث مرگ سلولی و القای استرس اکسیداتیو در این پلانکتون‌ها شده است [26]. در برخی مطالعات سمیت یون نقره با نانوذره و ذرات سنگین نقره مقایسه شده است. به‌عنوان مثال، سمیت یون نقره در جلبک خاک‌زی *C. reinhardtii* بیشتر از نانوذرات نقره و ذرات سنگین گزارش شده و دلیل سمیت نانوذرات نقره، مهار رشد و فعالیت فتوسنتز، افزایش میزان نفوذپذیری غشای سلول جلبکی و القای تنش اکسیداتیو بیان شده است [27].

سمیت نانوذرات نقره ارتباط مستقیمی با میزان آزادسازی یون نقره دارد و یون آزادشده از این نانوذرات به‌عنوان عنصر واسطه عمل می‌کند که اثر بازدارندگی بر نرخ فتوسنتز جلبک‌ها دارد. همچنین نانوذرات نقره به‌دلیل جرم کم، از سطح تماس بیشتری با محیط برخوردار هستند، پس پایداری بیشتری در محیط دارند و در نهایت تأثیر بیشتری بر محیط اعمال می‌کنند [15, 28]. نانوذرات نقره قادر هستند در سطح سلول باقی بمانند و در نهایت سبب از هم گسیختگی سلول شوند. همچنین می‌توانند از غشای پلاسمایی جلبک‌ها عبور کنند، وارد سیتوسل شوند و باعث تخریب اندامک‌ها (مانند شبکه آندوپلاسمی) و مولکول‌های زیستی (DNA و

پروتئین‌ها) شوند [28]. کاهش مقدار کلروفیل و تحریک مسیر اکسیداتیو نیز از مکانیسم‌های سمیت نانوذرات نقره گزارش شده است [29].

ریزجلبک‌ها منبع غنی از پروتئین، کربوهیدرات‌ها و به‌ویژه اسیدهای چرب ضروری هستند. لیپیدهای غیرقطبی مانند تری‌آسیل‌گلیسرول‌ها (TAGs) طی فرآیند فتوسنتز در سلول‌های ریزجلبک‌ها ذخیره می‌شوند و این لیپیدها به‌عنوان ذخیره انرژی برای ریزجلبک‌ها عمل می‌کنند. علاوه بر این، TAGs طی فرآیند ترانس‌استریفیکاسیون به‌راحتی به سوخت زیستی تبدیل می‌شوند که اساساً در ساختار آنها متیل‌استرهای اسیدهای چرب (FAMES) مشاهده می‌شوند [13]. تولید بالای لیپید در جلبک‌ها باعث کاربرد آنها در تولید سوخت زیستی شده است. القای تنش اکسیداتیو در پاسخ به محرک‌های فیزیکی و شیمیایی باعث سنتز و تجمع مقادیر بالای TAGs و تغییر در ترکیب لیپید و اسیدهای چرب در ریزجلبک‌ها می‌شود [30]. نانوذرات نیز، به‌عنوان یک عامل القاکننده تنش اکسیداتیو، در غلظت‌های خاصی می‌توانند باعث تحریک رشد جلبک و تجمع متابولیت‌های ثانویه شوند [16]. با توجه به اینکه این عوامل تنش‌زا در غلظت‌های بالا باعث کاهش رشد جلبک می‌شوند، افزایش مقدار لیپید الزاماً به معنی افزایش بهره‌وری لیپید نیست [14, 30].

علیرغم محدود بودن مطالعات در زمینه بررسی تأثیر نانوذرات بر پروفیل اسید چرب ریزجلبک‌ها، Kang و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند که نانوذرات TiO_2 با القای تنش اکسیداتیو، مقدار PUFAs را در ریزجلبک *C. vulgaris* افزایش می‌دهند [14]. در این مطالعه نیز افزایش مقدار PUFAs در پاسخ به نانوذرات نقره در ریزجلبک *N. oculata* مشاهده شد. افزایش PUFAs نقش مهمی در برابر تنش اکسیداتیو ایفا می‌کند، چون PUFAs به‌عنوان جاروب‌کننده رادیکال‌های آزاد عمل می‌کند و از سلول در برابر آسیب ناشی از افزایش گونه‌های فعال اکسیژن محافظت می‌کند [20, 31]. لازم به ذکر است که سالیان متمادی تصور بر این بود که جلبک قرمز *Porphyridium cruentum* تنها جلبکی است که می‌تواند PUFAs را در خود ذخیره کند، در حالی که مطالعات اخیر نشان دادند که برخی گونه‌های ریزجلبک سبز مانند *Parietochloris incisa* توانایی بهتری برای تولید چربی‌های امگا ۶ (n-6 LC-6) (PUFAs) دارد. سایر انواع آنها مانند *Phaeodactylum tricornutum*، *Thalassiosira pseudonana*، *Pavlova lutheri* و *Nannochloropsis oculata* نیز می‌توانند مقادیر پایین‌تر PUFAs را ذخیره کنند [13].

ترکیب اسیدهای چرب ریزجلبک‌ها تأثیر بسیاری بر کیفیت سوخت زیستی تولیدشده دارد و نسبت USFAs/SFAs تعیین‌کننده کیفیت سوخت زیستی است [32]. فاضلیان و همکاران بیان کردند که مقادیر بالاتر SFAs نقش مهمی در کنترل کیفیت سوخت زیستی ایفا می‌کند، در حالی که دمیریوس نشان داد که درصد بالای اسیدهای چرب غیر اشباع (MUFAs و PUFAs) در

سهم نویسندگان: نسرین فاضلیان (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۵۰٪)؛ مرتضی یوسفزادی (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی (۳۰٪)؛ احمدی (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی/تحلیلگر آماری (۲۰٪)

منابع مالی: در مطالعه حاضر، هزینه‌ها به‌صورت شخصی تامین شده است.

منابع

- 1- Xia T, Kovochich M, Liong M, Madler L, Gilbert B, Shi H, et al. Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. *ACS Nano*. 2008;2(10):2121-34.
- 2- Sharma VK, Yngard RA, Lin Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Adv Colloid Interface Sci*. 2009;145(1-2):83-96.
- 3- De Jong WH, Roszek B, Geertsma RE. Nanotechnology in medical applications: Possible risks for human health [Report]. Bilthoven: Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu; 2005. Report No.: 265001002.
- 4- Faraji M, Fadavi G. Applications of magnetic nanoparticles in the science and food industry. *Iran J Nutr Food Technol*. 2012;8(2):239-52. [Persian]
- 5- Sheehan J, Dunahay T, Benemann J, Roessler P. A look back at the US department of energy's aquatic species program: Biodiesel from algae [Report]. Golden: National Renewable Energy Laboratory; 1998. Report No.: TP-580-24190.
- 6- Hafezieh M. *Artemia: Marine shrimp*. 1st Edition. Tehran: Iranian Fisheries Research Institute; 2003. [Persian]
- 7- Belarbi E, Molina E, Chisti Y. RETRACTED: A process for high yield and scaleable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from microalgae and fish oil. *Process Biochem*. 2000;35(9):951-69.
- 8- Chisti Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv*. 2007;25(3):294-306.
- 9- Gouveia L, Oliveira AC. Microalgae as a raw material for biofuels production. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2009;36(2):269-74.
- 10- Xue F, Zhang X, Luo H, Tan T. A new method for preparing raw material for biodiesel production. *Process Biochem*. 2006;41(7):1699-702.
- 11- Fulks W, Main KL. Rotifer and microalgae culture systems. U.S.- Asia Workshop, 1991 28-31 January, Honolulu, Hawaii, USA. Honolulu: Oceanic Institute; 1991.
- 12- Hong SJ, Park YS, Han MA, Kim ZH, Cho BK, Lee H, et al. Enhanced production of fatty acids in three strains of microalgae using a combination of nitrogen starvation and chemical inhibitors of carbohydrate synthesis. *Biotechnol Bioprocess Eng*. 2017;22(1):60-7.
- 13- Alishah Aratboni H, Rafiei N, Garcia-Granados R, Alemzadeh A, Morones-Ramirez JR. Biomass and lipid induction strategies in microalgae for biofuel production and other applications. *Microb Cell Fact*. 2019;18(1):178.
- 14- Kang NK, Lee B, Choi GG, Moon M, Park MS, Lim J, et al. Enhancing lipid productivity of *Chlorella vulgaris* using oxidative stress by TiO₂ nanoparticles. *Korean J Chem Eng*. 2014;31(5):861-7.
- 15- Lubick N. Nanosilver toxicity: Ions, nanoparticles or both. *Environ Sci Technol*. 2008;42(23):8617.

FAMES، نقش مهمی در تعیین کیفیت نهایی روغن تولیدشده ایفا می‌کند، اما PUFAs با افزایش میزان اکسیداسیون، باعث کاهش پایداری نهایی سوخت زیستی می‌شود [20, 33]. با توجه به نتایج دمیریوس [33]، نانوذرات نقره با افزایش میزان USFAs می‌توانند باعث بهبود کیفیت سوخت زیستی تولیدشده از این ریزجلبک شوند. از طرف دیگر این نانوذرات با افزایش میزان SFAs نسبت به کنترل، باعث افزایش پایداری سوخت زیستی می‌شوند و امکان کاربرد سوخت تهیه‌شده از ریزجلبک *N. oculata* در مناطق گرمسیری را فراهم می‌کنند، چون با افزایش میزان PUFAs، پایداری سوخت زیستی در برابر اکسیداسیون کاهش می‌یابد. بیان قطعی این نتایج مستلزم آزمایشات بیشتر است، اما با بررسی شاخص‌های سوخت زیستی می‌توان نتایج بهتری ارایه کرد. شاخص CFPP ضریبی از LCSF است و همبستگی زیادی بین میزان پالمیتیک اسید و شاخص CP وجود دارد. مطالعات نشان دادند که هر چه مقادیر LCSF، CFPP و CP در سوخت زیستی بیشتر باشند پایداری آن بیشتر خواهد بود و با افزایش میزان DU، حساسیت سوخت در برابر اکسیداسیون (به‌ویژه در مناطق گرمسیری) افزایش می‌یابد [21]. در مطالعه حاضر، میزان شاخص DU در پاسخ به غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره نقره در مقایسه با کنترل کاهش یافت که احتمالاً به‌دلیل کاهش مقدار MUFAs و PUFAs بود، چون این شاخص با توجه به مقدار MUFAs و PUFAs محاسبه شد. از طرف دیگر میزان شاخص‌های LCSF و CFPP در پاسخ به نانوذره نقره افزایش یافت که می‌تواند به‌دلیل افزایش مقدار SFAs در پاسخ به این نانوذره باشد، چراکه در محاسبه این دو شاخص، میزان اسیدهای چرب اشباع طویل‌زنجیر اهمیت داشت. همچنین ارتباط مستقیمی بین مقدار C16:0 و میزان شاخص CP مشاهده شد و با افزایش مقدار C16، مقدار شاخص CP نیز در پاسخ به نانوذره نقره افزایش یافت.

در نهایت می‌توان نتیجه گرفت که غلظت‌های بیش از ۵ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره نقره باعث کاهش چشمگیر رشد ریزجلبک *N. oculata* می‌شوند، اما با وجود سمیت و تاثیر منفی این نانوذره بر ریزجلبک مورد مطالعه، غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر آن با افزایش مقدار SFA، LCSF، CFPP و CP و با کاهش میزان شاخص DU می‌تواند باعث افزایش پایداری اکسیداتیو سوخت زیستی تولیدشده از ریزجلبک *N. oculata* شود و امکان استفاده از این سوخت در مناطق گرمسیری را فراهم می‌کند.

تشکر و قدردانی: نویسندگان از دانشگاه هرمزگان به‌دلیل فراهم‌کردن امکانات پژوهشی این مطالعه کمال تشکر را دارند.

تاییدیه اخلاقی: مطالعه حاضر توسط همه نویسندگان تایید شده است. همچنین این مطالعه در مجله دیگری به زبان فارسی، انگلیسی یا زبان دیگری چاپ نشده یا به‌طور همزمان برای مجله دیگری ارسال نشده است.

تعارض منافع: هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

- Mukherjee A. Ecotoxicity study of titania (TiO₂) NPs on two microalgae species: *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp.. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2011;74(5):1180-7.
- 26- Cole P. Nanoparticles in natural aquatic environments: A physical, chemical and ecotoxicological of cerium dioxide and silver. Postgraduate Research Conference Proceedings: Water-how need Drives Research Underpins Solutions To World-Wide Problems, 2008 20-25 July, Birmingham, UK. Unknown Publisher city: Unknown Publisher; 2008.
- 27- Nam SH, Kwak J, An YJ. Quantification of silver nanoparticle toxicity to algae in soil via photosynthetic and flow-cytometric analyses. *Sci Rep.* 2018;8(1):292.
- 28- Ivanova J, Toncheva-Panova T, Chernev G, Samuneva B. Effect of Ag⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺ containing hybrid nanomatrixes on the green algae *Chlorella keissleri*. *Gen Appl Plant Physiol.* 2008;34(3-4):339-46.
- 29- Li Y, Han D, Sommerfeld M, Hu Q. Photosynthetic carbon partitioning and lipid production in the oleaginous microalga *Pseudochlorococcum* sp. (Chlorophyceae) under nitrogen-limited conditions. *Bioresour Technol.* 2011;102(1):123-9.
- 30- Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert M, et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances. *Plant J.* 2008;54(4):621-39.
- 31- Pádrová K, Lukavský J, Nedbalová L, Čejková A, Cajthaml T, Sigler K, et al. Trace concentrations of iron nanoparticles cause overproduction of biomass and lipids during cultivation of cyanobacteria and microalgae. *J Appl Phycol.* 2015;27(4):1443-51.
- 32- Nascimento IA, Marques SS, Cabanelas IT, Pereira SA, Druzian JI, De Souza CO, et al. Screening microalgae strains for biodiesel production: Lipid productivity and estimation of fuel quality based on fatty acids profiles as selective criteria. *Bioenerg Res.* 2013;6(1):1-13.
- 33- Demirbaş A. Production of biodiesel from algae oils. *Energy Sources Part A Recovery Util Environ Eff.* 2008;31(2):163-8.
- 16- He D, Dorantes-Aranda JJ, Waite TD. Silver nanoparticle- algae interactions: Oxidative dissolution, reactive oxygen species generation and synergistic toxic effects. *Environ Sci Technol.* 2012;46(16):8731-8.
- 17- Sajith V, Sobhan CB, Peterson GP. Experimental investigations on the effects of cerium oxide nanoparticle fuel additives on biodiesel. *Adv Mech Eng.* 2010;2:581407.
- 18- Demir V, Ates M, Arslan Z, Camas M, Celik F, Bogatu C, et al. Influence of alpha and gamma-iron oxide nanoparticles on marine microalgae species. *Bulletin of environmental contamination and toxicology.* 2015 Dec 1;95(6):752-7.
- 19- Chiu SY, Kao CY, Tsai MT, Ong SC, Chen CH, Lin CS. Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. *Bioresour Technol.* 2009;100(2):833-8.
- 20- Fazelian N, Yousefzadi M, Movafeghi A. Algal response to metal oxide nanoparticles: Analysis of growth, protein content, and fatty acid composition. *BioEnergy Res.* 2020.
- 21- Talebi AF, Mohtashami SK, Tabatabaei M, Tohidfar M, Bagheri A, Zeinalabedini M, et al. Fatty acids profiling: A selective criterion for screening microalgae strains for biodiesel production. *Algal Res.* 2013;2(3):258-67.
- 22- Hazani AA, Ibrahim MM, Shehata A, El-Gaaly GA, Daoud M, Fouad D, et al. Ecotoxicity of Ag-nanoparticles on two microalgae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. *Arch Biol Sci.* 2013;65(4):1447-57.
- 23- Fazelian N, Movafeghi A, Yousefzadi M, Rahimzadeh M. Cytotoxic impacts of CuO nanoparticles on the marine microalga *Nannochloropsis oculata*. *Environ Sci Pollut Res.* 2019;26(17):17499-511.
- 24- Suman TY, Radhika Rajasree SR, Kirubakaran R. Evaluation of zinc oxide nanoparticles toxicity on marine algae *Chlorella vulgaris* through flow cytometric, cytotoxicity and oxidative stress analysis. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2015;113:23-30.
- 25- Mohammed Sadiq I, Dalai S, Chandrasekaran N,