



سمیت نانوذرات مبتنی بر اکسیدگرافن در مقابل ریزجلبک *Chaetoceros muelleri*

سولماز سلیمانی^۱، آرش قادری^۲، مرتضی یوسف‌زادی^{۳*}، مریم معزی^۴

^۱ گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

^۲ گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

^{۳*} گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه قم، قم، ایران

^۴ پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران

نوع مقاله:	چکیده
پژوهشی	تقاضای روزافزون برای استفاده از فناوری نانو در سال‌های اخیر منجر به انتشار نانو مواد در محیط‌زیست شده است. هدف از مطالعه حاضر، سنتز نانوذرات مبتنی بر اکسیدگرافن با استفاده از عصاره آبی جلبک دریایی سبز و ارزیابی سمیت آن‌ها در مقابل ریزجلبک <i>Chaetoceros muelleri</i> به عنوان یک خوراک زنده مهم در پرورش آبزیان است. در مطالعه آزمایشگاهی حاضر، ابتدا فرایند سنتز زیستی نانوذرات گرافن با استفاده از عصاره آبی جلبک سبز <i>Ulva flexuosa</i> انجام شد و در ادامه ارزیابی فعالیت ضدجلبکی و تعیین میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی و پروتئین ریزجلبک صورت پذیرفت. نتایج مربوط به آنالیزهای مشخصه‌یابی، احیا اکسیدگرافن به کمک عصاره آبی جلبک سبز <i>U. flexuosa</i> و تبدیل آن به گرافن را تأیید کرد. ارزیابی فعالیت ضدجلبکی نمونه‌های مورد مطالعه نشان داد که اکسیدگرافن احیا شده دارای فعالیت ضدجلبکی بالاتری نسبت به اکسیدگرافن است. همچنین نتایج نشان داد که با افزایش غلظت نانوذرات سنتز شده میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی و پروتئین کاهش یافت. اثرات سمی نانوذرات آزاد شده می‌تواند به ذخایر <i>C. muelleri</i> به عنوان یک خوراک زنده مهم در پرورش آبزیان آسیب برساند.
تاریخچه مقاله:	
دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۲۹	
پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۲۵	
کلمات کلیدی:	
جلبک دریایی سبز	
نانوذرات	
سنتز زیستی	
کلروفیل	
سمیت	

مقدمه

امروزه تحقیقات و فناوری در زمینه علوم زیستی، انرژی و محیط زیست با چالش‌هایی با عملکرد و دوام مواد کلیدی مواجه است (Peña-Bahamonde et al., 2018). از این رو مواد پیشرفته‌ای مانند نانو مواد مبتنی بر کربن از جمله گرافن مورد توجه محققان قرار گرفته است (Chabot et al., 2014). علاوه بر این، اکسیدگرافن یک محصول کلیدی برای تهیه سایر مواد مبتنی بر گرافن است که به طور گسترده در زمینه‌های مختلف از جمله پزشکی، شیمی، دریایی و غیره استفاده می‌شود (Huang et al., 2012; Martín-de-Lucía et al., 2018). به دلیل واکنش‌پذیری سطحی اکسیدگرافن و همچنین پراکندگی سریع در آب، پتانسیل بالایی برای وقوع در محیط آبی دارد (Goodwin Jr et al., 2018). اکسیدگرافن در بسیاری از فرآیندهای شیمیایی به دلیل گروه‌های عاملی اکسیژن‌دار در سطح شرکت می‌کند و از این رو برای موجودات آبی سمی است (Zhang et al., 2011). بر این اساس، مطالعه سمیت اکسیدگرافن بر روی موجودات آبی برای ارزیابی خطرات آن برای محیط زیست و

امروزه تحقیقات و فناوری در زمینه علوم زیستی، انرژی و محیط زیست با چالش‌هایی با عملکرد و دوام مواد کلیدی مواجه است (Peña-Bahamonde et al., 2018). از این رو مواد پیشرفته‌ای مانند نانو مواد مبتنی بر کربن از جمله گرافن مورد توجه محققان قرار گرفته است (Chabot et al., 2014). علاوه بر این، اکسیدگرافن یک محصول کلیدی برای تهیه سایر مواد مبتنی بر گرافن است که به طور گسترده در زمینه‌های مختلف از جمله پزشکی، شیمی، دریایی و غیره استفاده می‌شود (Huang et al., 2012; Martín-de-Lucía et al., 2018). به دلیل واکنش‌پذیری سطحی اکسیدگرافن و همچنین پراکندگی سریع در آب، پتانسیل بالایی برای وقوع در محیط آبی دارد (Goodwin Jr et al., 2018). اکسیدگرافن در بسیاری از فرآیندهای شیمیایی به دلیل گروه‌های عاملی اکسیژن‌دار در سطح شرکت می‌کند و از این رو برای موجودات آبی سمی است (Zhang et al., 2011). بر این اساس، مطالعه سمیت اکسیدگرافن بر روی موجودات آبی برای ارزیابی خطرات آن برای محیط زیست و

بسیاری از مطالعات گزارش کرده‌اند که جلبک‌های دریایی حاوی ترکیباتی از جمله پلی‌فنل‌ها، فلاونوئیدها، کاروتنوئیدها، ترپن‌ها، پلی‌ساکاریدها، استروئیدها، پروتئین‌ها، لیپیدها، ویتامین‌ها هستند که متابولیت‌های ثانویه نامیده می‌شوند و به عنوان عوامل احیاکننده زیستی عمل می‌کنند (Abu-Khudir *et al.*, 2021; Mousavi-Kouhi *et al.*, 2021; Yosri *et al.*, 2021; Yuan *et al.*, 2018). این مطالعات نشان می‌دهند که جلبک‌های دریایی جایگزین پایدارتری برای احیای اکسیدگرافن هستند (Sharma *et al.*, 2014). جلبک‌های دریایی سبز به دلیل محتوای بالای ترکیبات آلكالوئیدی، فنولی، استروئیدی و کلروفیل می‌توانند کاندیدای خوبی برای احیای اکسیدگرافن باشند (Bhagavathy *et al.*, 2011). در این مطالعه، سنتز نانوذره گرافن مبتنی بر اکسیدگرافن با استفاده از جلبک دریایی سبز *Ulva flexuosa* ارائه شده است و سمیت نانوذره گرافن سنتز شده در مقابل ریزجلبک *Chaetoceros muelleri* بررسی شد. سمیت نانوذره گرافن سنتز شده می‌تواند درک بهتری از پتانسیل سمی و خطرات نانوذرات بر موجودات آبی ارائه دهد و مزایای زیست‌سازگاری یا نگرانی‌های نانوذرات سنتز شده را با رویکرد زیستی بررسی کند.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

جلبک دریایی سبز گونه *U. flexuosa* در پاییز از آب‌های ساحلی خلیج فارس، بندرعباس (E ۵۶°۱۹'۱۴" و N ۲۷°۱۰'۵۸") جمع‌آوری شدند. جلبک‌های دریایی سبز چندین بار با آب مقطر شسته شدند و سپس در دمای محیط در حدود ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ روز در هوا خشک شدند. جهت شناسایی جلبک دریایی سبز از کلید شناسایی معتبر استفاده شد و یک نمونه با کد هرباریوم ۳۰۳۰ در دانشگاه هرمزگان نگهداری شد (Mačić *et al.*, 2021).

سلامت انسان ضروری است (Dong *et al.*, 2015). ریزجلبک‌های دریایی که تولیدکنندگان اصلی در محیط‌های دریایی هستند، به‌طور گسترده در این اکوسیستم‌ها پراکنده شده‌اند و پایه‌های شبکه‌های غذایی دریایی را شکل می‌دهند. پس از ورود نانومواد مهندسی شده به اکوسیستم‌های آبی، ریزجلبک‌ها می‌توانند به عنوان شاخص‌های زیستی آلودگی عمل کنند (Parmar *et al.*, 2016).

تاکنون مواد در مقیاس نانو با روش‌های مختلفی سنتز شده‌اند (Manjari, 2018). افزایش آگاهی از سنتز سبز و سایر فرآیندهای زیستی منجر به استفاده از مواد شیمیایی غیرسمی و حلال‌های سازگار با محیط زیست شده است (Rosi *et al.*, 2006). بسیاری از مطالعات سنتز نانوذرات را با منابع زیستی مختلف از جمله باکتری‌ها (Tsekhmistrenko *et al.*, 2020)، قارچ‌ها (Guilger-Singh *et al.*, 2019)، گیاهان (Casagrande & Lima, 2019) و سایر موجودات (Ahmad *et al.*, 2003) گزارش کرده‌اند که محصولات آن‌ها نانوذرات غیرسمی، سازگار با محیط زیست هستند (Raghupathi *et al.*, 2011). تاکنون، گرافن با استفاده از معرف‌های مختلفی مانند هیدرازین یا دی‌متیل هیدرازین سنتز شده است (Shin *et al.*, 2007; Stankovich *et al.*, 2009). علاوه بر این، تلاش‌های زیادی برای احیا اکسیدگرافن زیستی با استفاده از تریپتوفان (Yang *et al.*, 2014)، اسید آسکوربیک (Jeon *et al.*, 2013)، گلوکز (Tang *et al.*, 2013) و برخی گیاهان مانند *Allium cepa* (Khanam & Hasan, 2019)، *Euphorbia milii* (Lin *et al.*, 2019)، *Aloe vera* (Ramanathan *et al.*, 2017) و *Capsicum annuum* (Hashmi *et al.*, 2020) صورت گرفته است. با این وجود، مطالعات کمی استفاده از جلبک‌های دریایی را به عنوان یک عامل احیاکننده برای اکسیدگرافن گزارش کرده‌اند، از جمله *Kappaphycus alvarezii* (Sharma *et al.*, 2014)، *Scenedesmus Chloroidium Saccharophilum* (Ahmad *et al.*, 2019) و *Leptolyngbya vacuolatus*.



شکل ۱- نقشه محل نمونه برداری و جلبک دریایی سبز *U. flexuosa*

اکسیدگرافن در ۸۰ میلی لیتر آب مقطر ریخته و برای ۹۰ دقیقه سونیکیت شد. سپس ۸۰ میلی لیتر عصاره‌ی بدست آمده از مرحله‌ی قبل به آن اضافه و مخلوط حاصل برای ۳۰ دقیقه سونیکیت شد. سپس مخلوط در دمای ۹۰ درجه سانتی گراد برای ۲۴ ساعت قرار گرفت. بعد از ۲۴ ساعت، مخلوط به رنگ سیاه تغییر رنگ داد. بعد از خنک شدن مخلوط در دمای محیط در دور ۱۵۰۰۰ rpm برای ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. در نهایت نمونه چندین بار با آب مقطر و اتانول شستشو شد. رسوب نهایی در دمای ۵۰ درجه‌ی سانتی گراد خشک گردید. این رسوب را اکسیدگرافن احیا شده می‌نامیم (Mhamane et al., 2011). در آخر، برای سنجش نانوذرات سنتز شده از طیف‌سنجی پراش پرتو ایکس (XRD) و میکروسکوپ الکترون روبشی گسیل میدانی (FE-SEM) استفاده شد.

کشت ریزجلبک مورد آزمایش

ریزجلبک *Chaetoceros muelleri* به عنوان یک دیاتوم معمولی برای آزمایش ضدجلبک انتخاب شد و از پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، بندرعباس تهیه شد. فعالیت ضدجلبکی همه نانوذرات با روش اندازه‌گیری رشد ریزجلبک با استفاده از طیف‌سنجی UV مورد ارزیابی قرار گرفت. *C. muelleri* در آب دریای استریل شده با محیط F/2 غنی شده با سیلیکات در دمای ۲۲ درجه سانتی گراد با چرخه ۱۲ ساعت روشنایی/تاریکی کشت داده شد. به طور خلاصه، برای تهیه محیط F/2، ابتدا آب دریا فیلتر شد و سپس با استفاده از اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه استریل شد. پس از خنک شدن آب دریا، یک محلول غذایی حاوی

سنتز اکسیدگرافن

سنتز اکسیدگرافن با روش مارکانو انجام شد. به طور خلاصه، به یک گرم گرافیت، ۱۳۴ میلی لیتر مخلوطی از اسید سولفوریک/اسید فسفریک (۹ : ۱) اضافه و در دمای اتاق برای ۲ ساعت روی استیرر قرار گرفت تا محلول همگنی به دست آید. سپس ۶ گرم پرمنگنات پتاسیم به آرامی در دمای ۴۵ درجه‌ی سانتی گراد به مخلوط اضافه شد. در این لحظه به آرامی رنگ محلول به سبز تیره تبدیل شد و در همین وضعیت برای ۱۲ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت تا به خوبی مواد مخلوط شوند. پس از گذشت این مدت، مخلوط به رنگ قهوه‌ای تبدیل و در دمای اتاق خنک شد. سپس به آن ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر خنک اضافه شد و دما تا ۸۳ درجه سانتی گراد افزایش یافت و مخلوط برای ۳۰ دقیقه روی استیرر قرار گرفت. پس از آن آب اکسیژنه ۳۵ درصد به آرامی به مخلوط اضافه و برای ۳۰ دقیقه دیگر روی استیرر قرار گرفت. به محض اضافه کردن آب اکسیژنه تغییر رنگ زرد مشاهده گردید. در نهایت، مخلوط ابتدا با اسید کلریدریک ۱۰ درصد و سپس با آب مقطر شستشو داده شد تا به pH خنثی برسد و در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی گراد برای ۲۴ ساعت خشک شد (Marcano et al., 2010).

سنتز اکسیدگرافن احیا شده یا نانوغرافن با جلبک دریایی سبز

جهت احیا اکسیدگرافن ابتدا ۶ گرم جلبک دریایی سبز در ۸۰ میلی لیتر آب مقطر ریخته و برای ۲۰ دقیقه جوشانده و با کاغذ صافی شماره یک صاف شد. سپس ۳۰ میلی گرم

پروتئینی به ۲/۵ میلی لیتر معرف برادفورد (۱۰۰ میلی گرم کوماسی برلیانت بلو در ۵۰ میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد، اضافه کردن ۱۰۰ میلی لیتر اسید فسفریک ۸۵ درصد در حجم نهایی ۱ لیتر) اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه ورتکس شد. سپس جذب محلول در طول موج ۵۹۵ نانومتر ثبت شد. مقدار پروتئین از طریق یک منحنی استاندارد ساخته شده با استفاده از آلومین سرم گاوی اندازه گیری شد (Bradford, 1976).

تجزیه و تحلیل آماری

در این مطالعه، تمامی آزمایشات در سه تکرار انجام شد و چگونگی همسان بودن پراش و پیروی داده‌ها از توزیع طبیعی توسط آزمون شاپیرویلک بررسی شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و همچنین مقایسه میانگین به روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۹۵ درصد توسط نرم‌افزار آماری SPSS 21 انجام شد. همچنین رسم نمودار با نرم‌افزار Excel 2013 صورت گرفت.

نتایج

آنالیز مشخصه‌یابی نانوذرات سنتز شده

نتایج آنالیز و بررسی ساختار بلوری و تشخیص فاز اکسیدگرافن از طریق دستگاه پراش پرتو ایکس در شکل ۲ نشان داده شده است. براساس الگوی طیفی پراش پرتو ایکس مربوط به اکسیدگرافن سنتز شده زوایای پراش 2θ در $11/37$ ، $26/61$ و $42/65$ به ترتیب مربوط به صفحات (002) ، (102) و (002) است. الگوی پراش پرتو ایکس در شکل ۲- الف تغییرات ساختاری اکسیدگرافن را برای تشکیل اکسیدگرافن احیا شده تأیید می‌کند. الگوی پراش پرتو ایکس مربوط به جلبک دریایی سبز به عنوان عامل احیاکننده نشان می‌دهد (شکل ۲- ب) که پیک حاصل از صفحه‌ی (002) در اکسیدگرافن به صورت یک پیک آشکار به $26 = 2\theta$ درجه جابه‌جا شده است که نشان‌دهنده‌ی احیا شدن اکسیدگرافن و تبدیل آن به گرافن است. میانگین اندازه‌ی ذرات مطابق با رابطه‌ی دبای- شرر بدست آمد. اندازه‌ی ذرات اکسیدگرافن $19/26$ نانومتر و اکسیدگرافن احیا شده $81/6$ نانومتر محاسبه شد. نتایج نشان داد که بعد از احیا اکسیدگرافن با جلبک دریایی سبز اندازه‌ی ذرات افزایش یافته است.

درشت مغذی‌ها (NaNO_3 و $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)، فلزات کمیاب (Na_2EDTA ، $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ، $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ، $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ، $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ، and $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) و ویتامین‌های ضروری (سیانوکوبالامین، تیامین-HCl و بیوتین) به آب دریا اضافه شد (Guillard and Rytter, 1962).

ارزیابی آزمون ضدجلبک

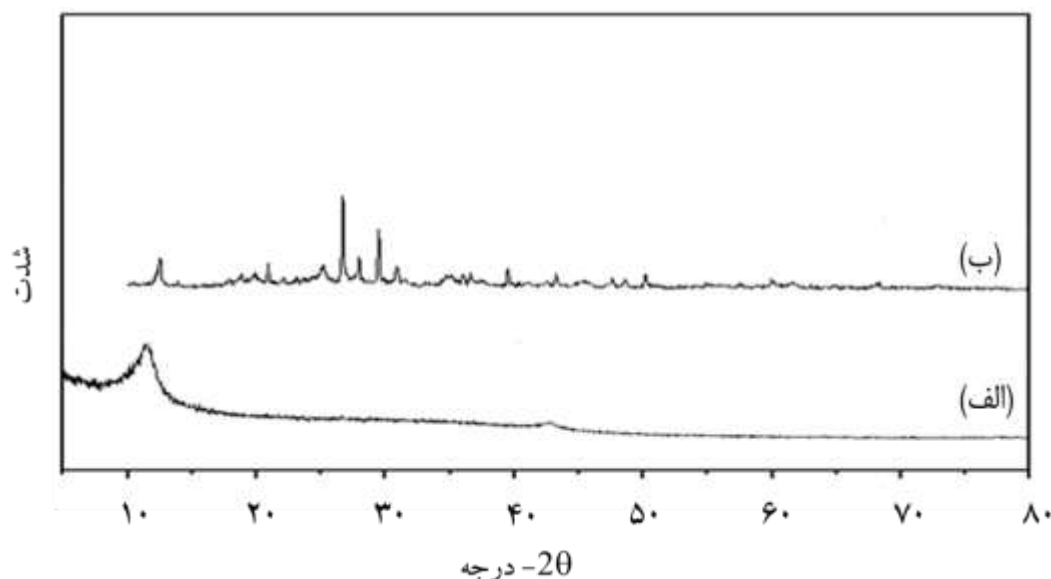
جهت ارزیابی آزمون ضدجلبکی نانوذرات سنتز شده از سوسپانسیون جلبکی با غلظت 4×10^4 سلول در میلی لیتر استفاده شد. در ارن‌های ۵۰۰ میلی لیتری، ۲۵۰ میلی لیتر سوسپانسیون جلبکی و نانوذرات با غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی گرم در لیتر ریخته شد. نمونه‌ها در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد با چرخه ۱۲ ساعت روشنایی/تاریکی و ۱۲۰ دور در دقیقه به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند (Siedlewick *et al.*, 2020). برای ارزیابی رشد هر ارن، چگالی نوری هر ارن در ساعت اولیه و پس از ۲۴ ساعت در طول موج ۶۸۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر UV خوانده شد، همچنین سلول‌ها با استفاده از لام نئوبار و عدسی میکروسکوپ ۴۰ در ساعت اولیه و بعد از ۲۴ ساعت شمارش شدند. غلظت‌هایی که باعث مهار رشد ۵۰ درصدی *C. muelleri* شدند به عنوان نقاط انتهایی سمی تعیین شدند و به صورت EC_{50} بیان شدند.

اندازه‌گیری رنگدانه‌های فتوسنتزی

برای اندازه‌گیری رنگدانه‌های فتوسنتزی، نمونه‌های جلبک با سانتریفیوژ با دور ۶۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه جمع‌آوری شدند. مقدار ۰/۱ گرم جلبک رسوب داده شده با استون (۹۰ درصد) مخلوط و ورتکس شد، سپس برای ۲۴ ساعت در مکانی تاریک و خنک قرار داده شد. پس از طی ۲۴ ساعت، مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۶۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد و مایع رویی جدا گردید. جذب مایع رویی در طول موج‌های ۶۳۰ و ۶۶۴ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. میزان کلروفیل a و c بر حسب میلی گرم در لیتر محاسبه گردید (Jeffrey & Humphrey, 1975).

تعیین محتوای پروتئین

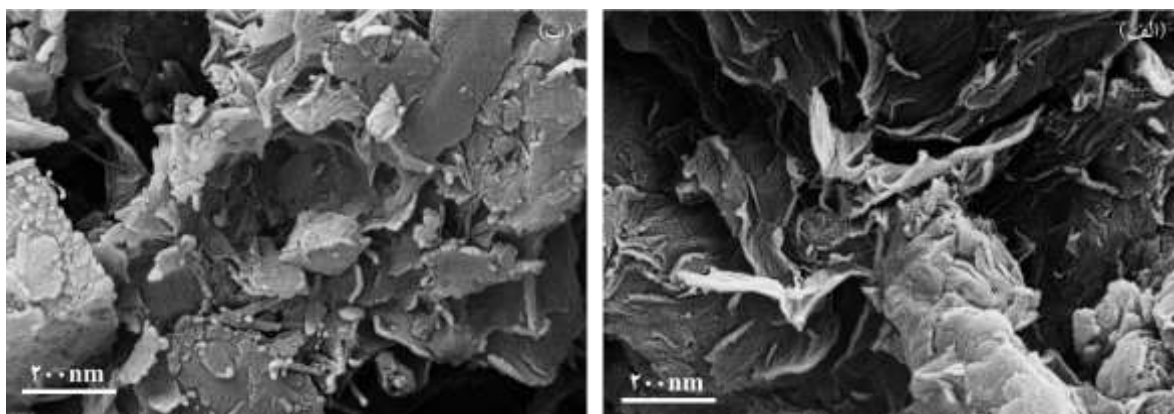
محتوای کل پروتئین محلول با روش برادفورد با استفاده از آلومین سرم گاوی به عنوان استاندارد تعیین شد. محتوای پروتئین نمونه جلبک توسط بافر فسفات ۰/۱ مولار استخراج شد. مقدار ۰/۱ میلی لیتر از عصاره



شکل ۲- مقایسه‌ی الگوی پراش پرتو ایکس (XRD) مربوط به نمونه‌های (الف) اکسیدگرافن (ب) اکسیدگرافن احیا شده جلبک دریایی سبز

متصل شده‌اند. قطر تقریبی صفحات در اکسیدگرافن در محدوده‌ی ۳۳/۴۹ تا ۴۹/۱۲ نانومتر و اکسیدگرافن احیا شده با جلبک دریایی سبز در محدوده‌ی ۱۷/۴۶ تا ۴۶/۸۶ نانومتر متغیر است.

برای مقایسه‌ی ریخت‌شناسی اکسیدگرافن و اکسیدگرافن احیا شده با جلبک دریایی سبز از میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی استفاده شده است. شکل ۳ نشان می‌دهد که نمونه سنتز شده به صورت صفحه‌ای است و به دلیل پدیده‌ی کلوخه شدن بعضی از صفحات آن‌ها به هم



شکل ۳- تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی نمونه‌های (الف) اکسیدگرافن (ب) اکسیدگرافن احیا شده با جلبک دریایی سبز

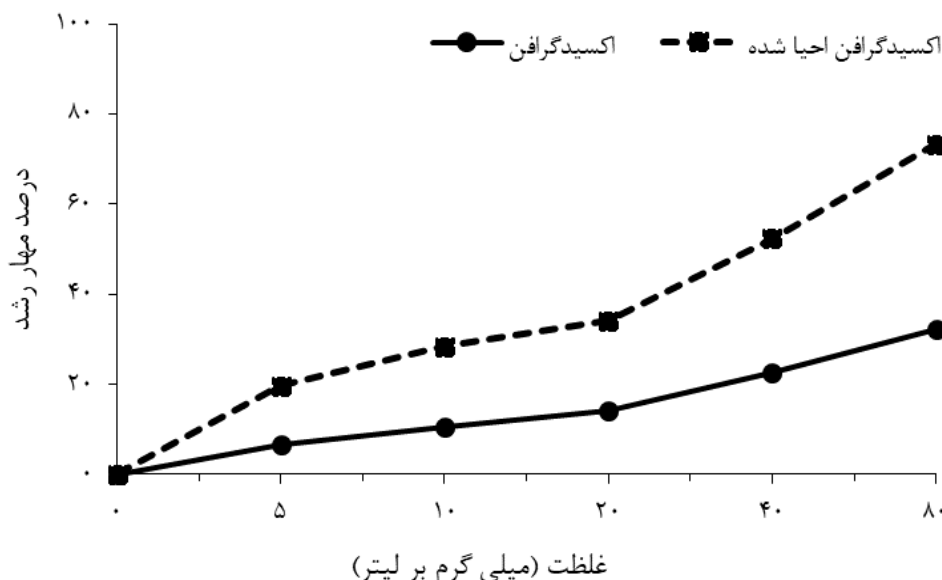
وابسته به غلظت را در برابر *C. muelleri* نشان داد. بیشترین درصد مهار رشد *C. muelleri* مربوط به اکسیدگرافن احیا شده با جلبک دریایی سبز (۷۳/۲۴ درصد در غلظت ۸۰ میلی‌گرم در لیتر) و کمترین درصد مهار رشد *C. muelleri* مربوط به اکسیدگرافن (۳۲/۱۲ درصد در غلظت ۸۰ میلی‌گرم در لیتر) بود. مقدار EC_{50}

ارزیابی فعالیت ضدجلبکی

ارزیابی فعالیت ضدجلبکی نانوذرات اکسیدگرافن و اکسیدگرافن احیا شده با جلبک دریایی سبز در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ میلی‌گرم در لیتر در برابر ریزجلبک‌های *C. muelleri* مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۴). نتایج در نانوذرات آزمایش شده، اثر مهار رشد

برای نانوذره اکسیدگرافن احیا شده با جلبک دریایی سبز ۳۹/۲ میلی گرم بر لیتر محاسبه شد. براساس نتایج، نانوذره اکسیدگرافن احیا شده با جلبک دریایی سبز توانایی مهار رشد بیشتری نسبت به نانوذره اکسیدگرافن در مقابل

C. muelleri دارد. به طور کلی، نتایج نشان داد که بین نانوذرات مورد آزمایش و غلظت‌های مختلف تفاوت معنی داری وجود ندارد ($P \leq 0.05$).



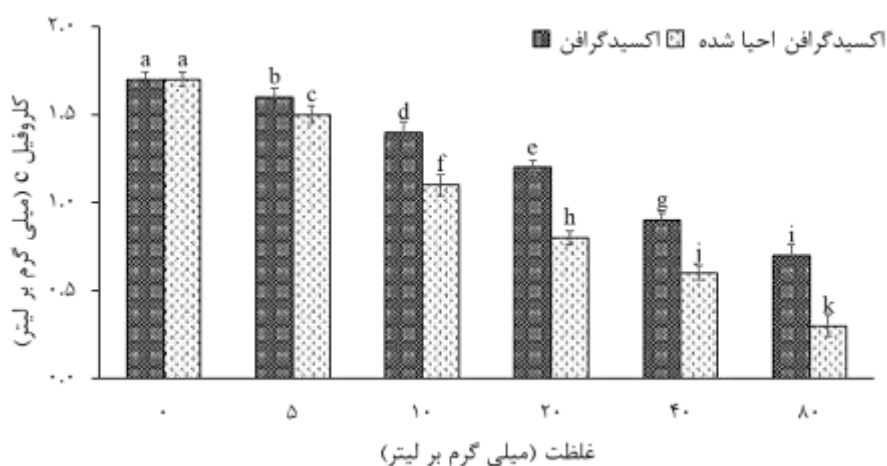
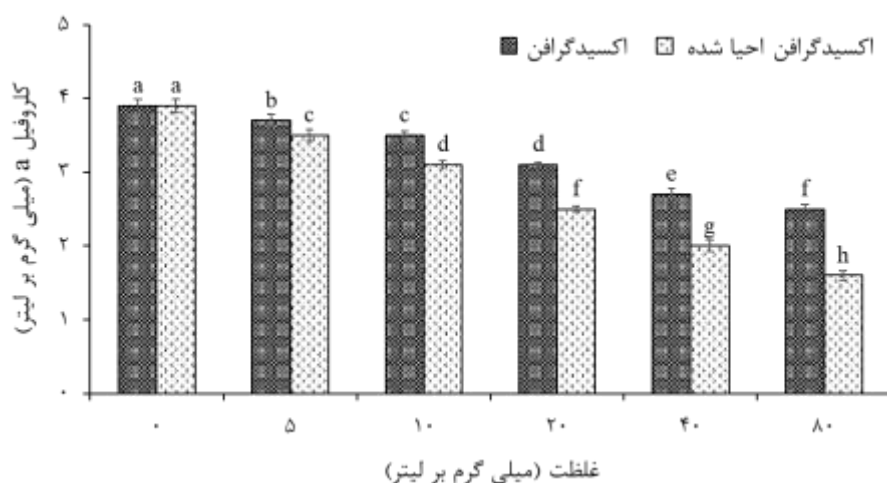
شکل ۴- مهار رشد دیاتومه *C. muelleri* به روشی وابسته به غلظت پس از قرار گرفتن در معرض نانوذرات سنتز شده به مدت ۲۴ ساعت

تعیین محتوای پروتئین

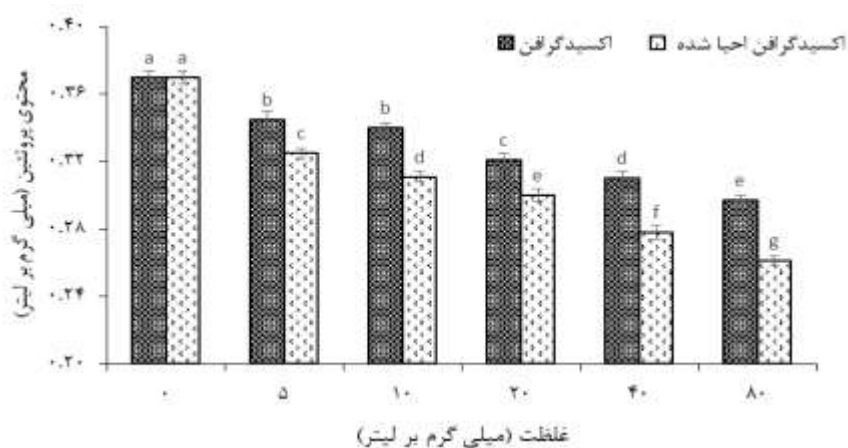
تأثیر نانوذرات اکسیدگرافن و اکسیدگرافن احیا شده با جلبک دریایی سبز در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ میلی گرم در لیتر بر میزان پروتئین ریزجلبک *C. muelleri* در شکل ۶ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت نانوذرات میزان پروتئین در ریزجلبک *C. muelleri* کاهش یافت. بیشترین میزان پروتئین در غلظت ۵ میلی گرم بر لیتر اکسیدگرافن و کمترین میزان پروتئین در غلظت ۸۰ میلی گرم بر لیتر اکسیدگرافن احیا شده با جلبک دریایی سبز مشاهده شد. اکسیدگرافن احیا شده با جلبک دریایی سبز تأثیر بیشتری بر کاهش میزان پروتئین نشان داد. به طور کلی، نتایج آنالیز آماری نشان داد که اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات مورد آزمایش بر کاهش میزان پروتئین دارای تفاوت معنی داری هستند ($P \leq 0.05$).

اندازه‌گیری رنگدانه‌های فتوسنتزی

تأثیر نانوذرات اکسیدگرافن و اکسیدگرافن احیا شده با جلبک دریایی سبز در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ میلی گرم در لیتر بر میزان رنگدانه‌های کلروفیل a و c در شکل ۵ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت نانوذرات میزان رنگدانه‌های کلروفیل a و c در ریزجلبک *C. muelleri* کاهش یافت. همان‌طور که در شکل ۵ قابل مشاهده است، نانوذره اکسیدگرافن احیا شده با جلبک دریایی سبز نسبت به نانوذره اکسیدگرافن توانایی بیشتری در کاهش میزان کلروفیل a و c در ریزجلبک *C. muelleri* داشت. بیشترین میزان کاهش کلروفیل a و c در غلظت ۸۰ میلی گرم بر لیتر نانوذره اکسیدگرافن احیا شده با جلبک دریایی سبز و کمترین میزان کاهش کلروفیل a و c در غلظت ۵ میلی گرم بر لیتر نانوذره اکسیدگرافن مشاهده شد. به طور کلی، نتایج آنالیز آماری نشان داد که اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات مورد آزمایش بر کاهش میزان کلروفیل a و c دارای تفاوت معنی داری هستند ($P \leq 0.05$).



شکل ۵- تأثیر نانوذرات سنتز شده بر میزان کلروفیل a و c ریزجلبک *C. muelleri*. حروف غیرمشابه بیانگر وجود اختلاف معنی دار بین نمونه‌ها است ($P \leq 0.05$).



شکل ۶- تأثیر نانوذرات سنتز شده بر میزان کلروفیل a و c ریزجلبک *C. muelleri*. حروف غیرمشابه بیانگر وجود اختلاف معنی دار بین نمونه‌ها است ($P \leq 0.05$).

بحث

استفاده از مواد مبتنی بر نانوذرات در صنایع مختلف نگرانی‌هایی را در مورد اثرات منفی آن بر محیط‌های آبی ایجاد کرده است. بنابراین، ارزیابی سرنوشت آن‌ها در محیط‌های آبی و جذب آن‌ها توسط موجودات دریایی مهم است. سنتز اکسیدگرافن احیا شده با استفاده از روش‌های سازگار با محیط زیست یکی از روش‌هایی است که مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است. در حالت معمول، احیای اکسیدگرافن برای تشکیل اکسیدگرافن احیا شده توسط عوامل احیاکننده مختلف مانند هیدرازین (Park et al., 2011)، هیدرازین هیدرات (Park and Ruoff, 2009)، اسید آسکوربیک (Salas et al., 2010)، تیوره (Liu et al., 2011) و سدیم بوروهیدرید (Shin et al., 2009) انجام شده است. با این حال، این روش‌های شناخته شده که از عوامل احیاکننده شیمیایی استفاده می‌کنند، ماهیت سمی دارند و برای محیط زیست مضر هستند. برای رفع این معضلات، استفاده از عصاره‌های گیاهی به عنوان عوامل احیاکننده برای احیای اکسیدگرافن نتیجه امیدوارکننده‌ای ارائه می‌دهد. چای ابتدا به عنوان یک احیاکننده برای تبدیل اکسیدگرافن به اکسیدگرافن احیا شده مورد استفاده قرار گرفت و پس از آن بیش از ۶۰ گونه گیاهی به عنوان عوامل احیاکننده استفاده شد (Wang et al., 2011).

یکی از رایج‌ترین روش‌ها برای احیای اکسیدگرافن، روش هیدروترمال است. در این روش، وجود عصاره گیاهی به عنوان یک عامل احیاکننده، برای اکسایش‌زدایی از اکسیدگرافن و تثبیت اکسیدگرافن احیا شده حاصل، تعیین کننده است (Ismail, 2019). در این مطالعه، احیای اکسیدگرافن با عصاره آبی جلبک دریایی سبز *U. flexuosa* به روش هیدروترمال در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در شرایط رفلاکس انجام شد. تا به امروز، مکانیسم دقیق سنتز سبز نانومواد با استفاده از عصاره‌های گیاهی توضیح داده نشده است. با این حال، پیشنهاد شده است که گروه‌های قطبی مسئول سنتز نانومواد هستند. تعدادی متابولیت در جلبک دریایی سبز *U. flexuosa* گزارش شده است، از جمله ترکیبات آلکالوئیدی، فنولی، استروئیدی و کلروفیل (Bhagavathy et al., 2011). مکانیسم احتمالی کاهش اکسیدگرافن

توسط جلبک‌های دریایی پیوند واندروالسی ترکیبات قطبی جلبک‌های دریایی با گروه‌های اپوکسی و کربوکسیل روی سطح اکسیدگرافن است که تا حدودی آن‌ها را احیا می‌کند (Nazari et al., 2020).

مکانیسم سمیت مواد مبتنی بر اکسیدگرافن دقیقاً مشخص نیست، اما محققان مکانیسم‌های مختلفی را شناسایی کرده‌اند. برای توضیح فعالیت ضدجلبکی نانوذرات، دو مکانیسم احاطه کردن - از بین بردن (Capturing-Killing Mechanism) و اثر سایه‌زنی (Shading Effect Mechanism) پیشنهاد شده است (Faria et al., 2012; Hou et al., 2019). مکانیسم احاطه کردن - از بین بردن شامل دو فرآیند است: تجزیه فیزیکی غشای باکتری و تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) (Zhong & Yun, 2015).

نانوذرات مبتنی بر گرافن از طریق روش‌های مختلف از جمله اندوسیتوز وارد سلول می‌شوند و باعث تولید ROS می‌شوند (Ou et al., 2016). میزان سمیت سلولی نانوذرات مبتنی بر گرافن به میزان تولید ROS و استرس اکسیداتیو بستگی دارد (Ott et al., 2007). شکل دیگری از استرس اکسیداتیو ناشی از نانوذرات مبتنی بر اکسیدگرافن، انتقال بار است که باعث آسیب سلول جلبکی می‌شود (Li et al., 2020; Zou et al., 2017). سمیت نانوذرات در برابر ریزجلبک‌ها با آسیب به عملکرد سلولی که منجر به مرگ سلولی می‌شود، همراه است. سمیت می‌تواند به اندازه نانوذرات، شکل کریستال و روش‌های آزمایش مربوط باشد (Ji et al., 2011). از سوی دیگر، سلول‌های جلبکی توانایی ایجاد ویژگی‌های فیزیولوژیکی مانند دیواره‌های سلولی، اندام‌های حرکتی و سازگاری‌های مورفولوژیکی خاص را برای کاهش استرس محیطی دارند (Yin et al., 2020a).

در مکانیسم اثر سایه، تجمع نانوذرات با اتصال به سطح سلول‌های ریزجلبک، نور را برای فتوسنتز آن‌ها کاهش می‌دهد (Hou et al., 2019). از این رو، نشان داده شده است که نانوذرات بزرگتر منجر به اثرات سایه بیشتر می‌شود (Hu et al., 2018). بنابراین، اندازه نانوذرات یک عامل کلیدی در مکانیسم اثر سایه است. علاوه بر این، تعدادی از محققین گزارش دادند که تولید ROS با افزایش غلظت و اندازه نانوذرات افزایش می‌یابد (Hou et

این نیز به کاهش محتوای کلروفیل کمک می‌کند (Das & Roychoudhury, 2014). مکانیسم‌های احتمالی دیگر برای کاهش رنگدانه‌های فتوسنتزی، تداخل نانوذرات با سنتز رنگدانه، آسیب در ریبوزوم کلروپلاست و مهار زنجیره انتقال الکترون در مرکز اهداکننده است (Sendra et al., 2017).

Deng و همکاران (۲۰۱۷) بیان کردند که با افزایش غلظت نانوذرات میزان پروتئین موجود در دیاتومه دریایی *P. tricorutum* کاهش یافت (Deng et al., 2017). کاهش مقدار پروتئین به طور کلی در پاسخ به استرس‌های شدید محیطی مشاهده می‌شود و می‌تواند ناشی از کاهش بیوسنتز پروتئین یا تسریع فرآیند کاتالیزوری باشد. هیدرولیز پروتئین‌ها به اسیدهای آمینه ممکن است به دلیل سازگاری سلولی با کمبود کربوهیدرات باشد (Parida & Das, 2005). نانوذرات ممکن است آنزیم‌های دخیل در بیوسنتز کلروفیل را تخریب و باعث تولید ROS شوند و در نهایت استرس اکسیداتیو را القاء کنند که منجر به آسیب به ساختارهای پروتئین فتوسنتزی و به دنبال آن کاهش محتوای پروتئین می‌شود. کاهش محتوای کلروفیل و پروتئین نیز می‌تواند دلیل دیگری برای کاهش رشد جلبک باشد (Fazelian et al., 2020).

به طور خلاصه، نتایج این مطالعه نشان داد که جلبک دریایی سبز *U. flexuosa* توانایی احیا اکسیدگرافن و تبدیل آن به گرافن را دارد. نتایج مشخصه‌یابی این مطالعه تایید کرد که گرافن سنتز شده با جلبک دریایی سبز کاملاً ورقه‌ای بوده و دارای اندازه‌ای کمتر از اکسیدگرافن است. همچنین نتایج فعالیت ضدجلبکی نمونه‌های سنتز شده نشان داد که اکسیدگرافن توانایی کمتری نسبت به گرافن سنتز شده با جلبک دریایی سبز در مهار رشد ریزجلبک *C. muelleri* دارد. همچنین نتایج نشان داد که با افزایش غلظت نانوذرات سنتز شده، میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی و پروتئین کاهش یافت. نتایج به‌دست آمده در این مطالعه، می‌تواند درک بهتری از خطرات محیط‌زیستی نانوذرات آزاد شده برای ریزجلبک *C. muelleri* که به عنوان یک منبع تغذیه‌ای مهم در کشت محسوب می‌شود، بدهد.

(al., 2019; Lei et al., 2016; Oukarroum et al., 2012). در این مطالعه، نتایج XRD نشان داد که اندازه اکسیدگرافن احیا شده با جلبک دریایی سبز بزرگتر از نانوذره اکسیدگرافن سنتز شده است و احتمالاً نور را برای فتوسنتز ریزجلبک‌ها کاهش می‌دهد و منجر به مرگ ریزجلبک‌ها می‌شود.

Yin و همکاران (۲۰۲۰) بیان کردند که خواص فیزیولوژیکی ریزجلبک‌ها می‌تواند برای هر یک از مکانیسم‌های سمیت متفاوت باشد (Yin et al., 2020b). همچنین گزارش شده است که *M. aeruginosa* و *Cyclotella* sp. توانایی بهبود یافته‌ای برای به دست آوردن نور و مواد مغذی در طول اثر سایه‌زنی با دسترسی به سطوح نور کافی با حرکت عمودی در آب دارند (Wang et al., 2017). اکسیدگرافن به دلیل وجود گروه‌های عاملی اکسیژن‌دار در لبه نانوصفحات باعث آسیب مکانیکی به سلول‌های ریزجلبک می‌شود (Malina et al., 2019). Yin و همکاران (۲۰۲۰) گزارش کردند که به دلیل نواحی شکننده در اطراف منافذ روی دیواره سلولی *Cyclotella* sp. ممکن است به راحتی توسط لبه‌های تیز اکسیدگرافن آسیب ببیند و باعث آسیب شدید به دیواره‌های سلولی و افزایش نفوذپذیری غشاء شود (Yin et al., 2020b).

تغییرات در محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی در جلبک‌ها می‌تواند به عنوان اندازه‌گیری وضعیت سلامت فیزیولوژیک مورد استفاده قرار گیرد (Tayemeh et al., 2020). محتوای کلروفیل جلبک‌ها شاخص مؤثری برای وضعیت رشد است (Li et al., 2015). محتویات رنگدانه‌های فتوسنتزی اغلب در پاسخ به قرار گرفتن در معرض نانوذرات تغییر می‌کند (Middepogu et al., 2018). مطالعات بسیاری بیان کردند که نانوذرات با مکانیسم اثر سایه‌زنی به‌ویژه در غلظت بالا منجر به کاهش محتوای کلروفیل و رشد سلولی ریزجلبک می‌شود (Gong et al., 2011; Schwab et al., 2011). نانوذرات همچنین ممکن است فعالیت آنزیم‌های مسؤول تخریب کلروفیل از جمله کلروفیل‌از را تحریک کنند یا فعالیت آنزیم‌های مسؤول سنتز کلروفیل را محدود کنند (Fazelian et al., 2019). به گفته Das و Roychoudhury (۲۰۱۴)، قرار گرفتن در معرض نانوذرات ممکن است باعث آسیب اکسیداتیو به کلروپلاست‌های ریزجلبک‌ها شود و

- contaminants: a review and perspective. *Environment international*. Vol.85, No.3, pp: 120-132.
10. **Faria, A.F., Martinez, D.S.T., Moraes, A.C., Maia da Costa, M.E., Barros, E.B., Souza Filho, A.G., Paula, A.J., Alves, O.L. 2012.** Unveiling the role of oxidation debris on the surface chemistry of graphene through the anchoring of Ag nanoparticles. *Chemistry of Materials*. Vol.24, No. 21, pp: 4080-4087.
 11. **Fazelian, N., Movafeghi, A., Yousefzadi, M., Rahimzadeh, M. 2019.** Cytotoxic impacts of CuO nanoparticles on the marine microalga *Nannochloropsis oculata*. *Environmental Science and Pollution Research*. Vol.26, No. 17, pp: 17499-17511.
 12. **Fazelian, N., Yousefzadi, M., Movafeghi, A. 2020.** Algal response to metal oxide nanoparticles: analysis of growth, protein content, and fatty acid composition. *BioEnergy Research*. Vol.13, No. 3, pp: 944-954.
 13. **Gong, N., Shao, K., Feng, W., Lin, Z., Liang, C., Sun, Y. 2011.** Biototoxicity of nickel oxide nanoparticles and bio-remediation by microalgae *Chlorella vulgaris*. *Chemosphere*. Vol.83, No. 4, pp: 510-516.
 14. **Goodwin Jr, D.G., Adeleye, A.S., Sung, L., Ho, K.T., Burgess, R.M., Petersen, E.J. 2018.** Detection and quantification of graphene-family nanomaterials in the environment. *Environmental science & technology*. Vol.52, No. 8, pp: 4491-4513.
 15. **Guilger-Casagrande, M., Lima, R.d. 2019.** Synthesis of silver nanoparticles mediated by fungi: a review. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. Vol.7, No.2, pp: 287.
 16. **Guillard, R.R., Ryther, J.H. 1962 .** Studies of marine planktonic diatoms: *I. Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian journal of microbiology*. Vol.8, No. 2, pp: 229-239.
 17. **Hashmi, A., Singh, A., Khan, A.A.P., Asiri, A.M. 2020.** Novel and green reduction of graphene oxide by *Capsicum annum*: its photo catalytic activity. *Journal of Natural Fibers*: Vol.34, No.4, pp: 1-16.
 18. **Hou, J., Wang, L., Wang, C., Zhang, S., Liu, H., Li, S., Wang, X. 2019.** Toxicity and mechanisms of action of titanium dioxide nanoparticles in living organisms. *Journal of environmental sciences*. Vol.75, No.2, pp: 40-53.
- منابع**
1. **Abu-Khudir, R., Ismail, G.A., Diab, T. 2021.** Antimicrobial, antioxidant, and anti-tumor activities of *Sargassum linearifolium* and *Cystoseira crinita* from Egyptian Mediterranean Coast. *Nutrition and cancer*. Vol.73, No. 5, pp: 829-844.
 2. **Ahmad, S., Ahmad, A., Khan, S., Ahmad, S., Khan, I., Zada, S., Fu, P. 2019 .**Algal extracts based biogenic synthesis of reduced graphene oxides (rGO) with enhanced heavy metals adsorption capability. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. Vol.72, No.2, pp: 117-124.
 3. **Ahmad, A., Senapati, S., Khan, M.I., Kumar, R., Sastry, M. 2003.** Extracellular biosynthesis of monodisperse gold nanoparticles by a novel extremophilic actinomycete, *Thermomonospora* sp. *Langmuir*. Vol.19, No. 8, pp: 3550-3553.
 4. **Bhagavathy, S., Sumathi, P., Bell, L.J.S. 2011.** Green algae *Chlorococcum humicola*-a new source of bioactive compounds with antimicrobial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. Vol.1, No. 1, pp: S1-S7.
 5. **Bradford, M.M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. Vol.72, No. 1-2, pp: 248-254.
 6. **Chabot, V., Higgins, D., Yu, A., Xiao, X., Chen, Z., Zhang, J. 2014.** A review of graphene and graphene oxide sponge: material synthesis and applications to energy and the environment. *Energy & Environmental Science*. Vol.7, No. 5, pp: 1564-1596.
 7. **Das, K., Roychoudhury, A. 2014.** Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in environmental science*. Vol.2, No.2, pp: 53.
 8. **Deng ,X.Y., Cheng, J., Hu, X.L., Wang, L., Li, D., Gao, K. 2017.** Biological effects of TiO₂ and CeO₂ nanoparticles on the growth, photosynthetic activity, and cellular components of a marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Science of the Total Environment* Vol.57, No. 5, pp: 96-87.
 9. **Dong, Z., Liu, Y., Duan, L., Bekele, D., Naidu, R. 2015.** Uncertainties in human health risk assessment of environmental

29. **Lin, S., Ruan, J., Wang, S. 2019.** Biosynthesized of reduced graphene oxide nanosheets and its loading with paclitaxel for their anti cancer effect for treatment of lung cancer. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. Vol.191, No. 3, pp: 13-17.
30. **Liu, Y., Li, Y., Yang, Y., Wen, Y., Wang, M. 2011.** Reduction of graphene oxide by thiourea. Journal of nanoscience and nanotechnology. Vol.11, No. 11, pp: 10082-10086.
31. **Mačić, V., Antolić, B., Žuljević, A. 2021.** A Checklist of the Benthic Marine Macroalgae in Montenegrin Coastal Waters. The Montenegrin Adriatic Coast: Vol.21, No. 3, pp: 232-246.
32. **Malina, T., Maršalková, E., Holá, K., Tuček, J., Scheibe, M., Zbořil, R., Maršálek, B. 2019.** Toxicity of graphene oxide against algae and cyanobacteria: Nanoblade-morphology-induced mechanical injury and self-protection mechanism. Carbon. Vol.155, No. 4, pp: 386-396.
33. **Manjari, G. 2018.** Green synthesis of silver and copper nanoparticles using *Aglaia elaeagnoidea* and its catalytic application on dye degradation. Department of Ecology and Environmental Sciences, Pondicherry University p.
34. **Marcano, D.C., Kosynkin, D.V., Berlin, J.M., Sinitskii, A., Sun, Z., Slesarev, A., Alemany, L.B., Lu, W., Tour, J.M. 2010.** Improved synthesis of graphene oxide. ACS nano. Vol.4, No. 8, pp: 4806-4814.
35. **Martín-de-Lucía, I., Campos-Mañas, M.C., Agüera, A., Leganés, F., Fernández-Piñas, F., Rosal, R. 2018.** Combined toxicity of graphene oxide and wastewater to the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Environmental Science: Nano. Vol.5, No. 7, pp: 1729-1744.
36. **Mhamane, D., Ramadan, W., Fawzy, M., Rana, A., Dubey, M., Rode, C., Lefez, B., Hannoyer, B., Ogale, S. 2011.** From graphite oxide to highly water dispersible functionalized graphene by single step plant extract-induced deoxygenation. Green Chemistry. Vol.13, No. 8, pp: 1990-1996.
37. **Middepogu, A., Hou, J., Gao, X., Lin, D. 2018.** Effect and mechanism of TiO₂ nanoparticles on the photosynthesis of *Chlorella pyrenoidosa*. Ecotoxicology and
19. **Hu, J., Wang, J., Liu, S., Zhang, Z., Zhang, H., Cai, X., Pan, J., Liu, J. 2018.** Effect of TiO₂ nanoparticle aggregation on marine microalgae *Isochrysis galbana*. Journal of environmental sciences. Vol.66, No.3, pp: 208-215.
20. **Huang, Y., Liang, J., Chen, Y. 2012.** An overview of the applications of graphene-based materials in supercapacitors. small. Vol.8, No. 12, pp: 1805-1834.
21. **Ismail, Z. 2019.** Green reduction of graphene oxide by plant extracts: a short review. Ceramics International. Vol.45, No. 18, pp: 23857-23868.
22. **Jeffrey, S.t., Humphrey, G. 1975.** New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c₁ and c₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton. Biochemie und physiologie der pflanzen. Vol.167, No. 2, pp: 191-194.
23. **Jeon, E.K., Seo, E., Lee, E., Lee, W., Um, M.K., Kim, B.S. 2013.** Mussel-inspired green synthesis of silver nanoparticles on graphene oxide nanosheets for enhanced catalytic applications. Chemical Communications. Vol.49, No. 33, pp: 3392-3394.
24. **Ji, J., Long, Z., Lin, D. 2011.** Toxicity of oxide nanoparticles to the green algae *Chlorella* sp. Chemical Engineering Journal. Vol.170, No. 2-3, pp: 525-530.
25. **Khanam, P.N., Hasan, A. 2019.** Biosynthesis and characterization of graphene by using non-toxic reducing agent from *Allium Cepa* extract: Anti-bacterial properties. International journal of biological macromolecules. Vol.126, No.3, pp: 151-158.
26. **Lei, C., Zhang, L., Yang, K., Zhu, L., Lin, D. 2016.** Toxicity of iron-based nanoparticles to green algae: effects of particle size, crystal phase, oxidation state and environmental aging. Environmental Pollution. Vol.218, No. 4, pp: 505-512.
27. **Li, X., Li, S., Bai, Q., Sui, N., Zhu, Z. 2020.** Gold nanoclusters decorated amine-functionalized graphene oxide nanosheets for capture, oxidative stress, and photothermal destruction of bacteria. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. Vol.196, No. 3, pp: 111313.
28. **Li, F., Liang, Z., Zheng, X., Zhao, W., Wu, M., Wang, Z. 2015.** Toxicity of nano-TiO₂ on algae and the site of reactive oxygen species production. Aquatic Toxicology. Vol.158, No. 3, pp: 1-13.

- life sciences. Journal of nanobiotechnology. Vol.16, No. 1, pp: 1-17.
48. **Raghupathi, K.R., Koodali, R.T., Manna, A.C. 2011.** Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles. Langmuir. Vol.27, No. 7, pp: 4020-4028.
 49. **Ramanathan, S., Elanthamilan, E., Obadiah, A., Durairaj, A., Merlin, J.P., Ramasundaram, S., Vasanthkumar, S. 2017.** *Aloe vera* (L.) Burm. f. extract reduced graphene oxide for supercapacitor application. Journal of Materials Science: Materials in Electronics. Vol.28, No. 22, pp: 16648-16657.
 50. **Rosi, N.L., Giljohann, D.A., Thaxton, C.S., Lytton-Jean, A.K., Han, M.S., Mirkin, C.A. 2006.** Oligonucleotide-modified gold nanoparticles for intracellular gene regulation. Science. Vol.312, No. 57, pp: 1027-1036.
 51. **Salas, E.C., Sun, Z., Lüttge, A., Tour, J.M. 2010.** Reduction of graphene oxide via bacterial respiration. ACS nano. Vol.4, No. 8, pp: 4852-4856.
 52. **Schwab, F., Bucheli, T.D., Lukhele, L.P., Magrez, A., Nowack, B., Sigg, L., Knauer, K. 2011.** Are carbon nanotube effects on green algae caused by shading and agglomeration? Environmental science & technology. Vol.45, No. 14, pp: 6136-6144.
 53. **Sendra, M., Yeste, M.P., Gatica, J.M., Moreno-Garrido, I., Blasco, J. 2017.** Direct and indirect effects of silver nanoparticles on freshwater and marine microalgae (*Chlamydomonas reinhardtii* and *Phaeodactylum tricorutum*). Chemosphere. Vol.179, No. 3, pp: 279-289.
 54. **Sharma, M., Mondal, D., Das, A.K., Prasad, K. 2014.** Production of partially reduced graphene oxide nanosheets using a seaweed sap. RSC Advances. Vol.4, No. 110, pp: 64583-64588.
 55. **Shin, H.J., Kim, K.K., Benayad, A., Yoon, S.M., Park, H.K., Jung, I.S., Jin, M.H., Jeong, H.K., Kim, J.M., Choi, J.Y. 2009.** Efficient reduction of graphite oxide by sodium borohydride and its effect on electrical conductance. Advanced Functional Materials. Vol.19, No. 12, pp: 1987-1992.
 56. **Siedlewicz, G., Żak, A., Sharma, L., Kosakowska, A., Pazdro, K. 2020.** Effects of oxytetracycline on growth and chlorophyll a fluorescence in green algae (*Chlorella vulgaris*), diatom environmental safety. Vol.161, No. 3, pp: 497-506.
 38. **Mousavi-Kouhi, S.M., Beyk-Khormizi, A., Mohammadzadeh, V., Ashna, M., Es-haghi, A., Mashreghi, M., Hashemzadeh, V., Mozafarri, H., Nadaf, M., Taghavizadeh Yazdi, M.E. 2021.** Biological synthesis and characterization of gold nanoparticles using *Verbascum speciosum* Schrad. and cytotoxicity properties toward HepG₂ cancer cell line. Research on Chemical Intermediates: Vol.24, No. 2, pp: 1-12.
 39. **Nazari, F., Jafarirad, S., Movafeghi, A., Kosari-Nasab, M., Kazemi, E.M. 2020.** Toxicity of microwave-synthesized silver-reduced graphene oxide nanocomposites to the microalga *Chlorella vulgaris*: Comparison with the hydrothermal method synthesized counterparts. Journal of Environmental Science and Health, Part A. Vol.55, No. 6, pp: 639-649.
 40. **Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S., Zhivotovsky, B. 2007.** Mitochondria, oxidative stress and cell death. Apoptosis. Vol.12, No. 5, pp: 913-922.
 41. **Ou, L., Song, B., Liang, H., Liu, J., Feng, X., Deng, B., Sun, T., Shao, L. 2016.** Toxicity of graphene-family nanoparticles: a general review of the origins and mechanisms. Particle and fibre toxicology. Vol.13, No. 1, pp: 1-24.
 42. **Oukarroum, A., Bras, S., Perreault, F., Popovic, R. 2012.** Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. Ecotoxicology and environmental safety. Vol.78, No.3, pp: 80-85.
 43. **Parida, A.K., Das, A.B. 2005.** Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. Ecotoxicology and environmental safety. Vol. 60, No. 3, pp: 324-349.
 44. **Park, S., An, J., Potts, J.R., Velamakanni, A., Murali, S., Ruoff, R.S. 2011.** Hydrazine-reduction of graphite-and graphene oxide. Carbon. Vol.49, No. 9, pp: 3019-3023.
 45. **Park, S., Ruoff, R.S. 2009.** Chemical methods for the production of graphenes. Nature nanotechnology. Vol.4, No. 4, pp: 217-224.
 46. **Parmar, T.K., Rawtani, D., Agrawal, Y. 2016.** Bioindicators: the natural indicator of environmental pollution. Frontiers in life science. Vol.9, No. 2, pp: 110-118.
 47. **Peña-Bahamonde, J., Nguyen, H.N., Fanourakis, S.K., Rodrigues, D.F. 2018.** Recent advances in graphene-based biosensor technology with applications in

- situ green synthesis of silver-graphene oxide nanocomposites by using tryptophan as a reducing and stabilizing agent and their application in SERS. Applied Surface Science. Vol.316, No. 2, pp: 22-27.
65. **Yin, J., Dong, Z., Liu, Y., Wang, H., Li, A., Zhuo, Z., Feng, W., Fan, W. 2020a.** Toxicity of reduced graphene oxide modified by metals in microalgae: Effect of the surface properties of algal cells and nanomaterials. Carbon. Vol.169, No.4, pp: 182-192.
 66. **Yin, J., Fan, W., Du, J., Feng, W., Dong, Z., Liu, Y., Zhou, T. 2020b.** The toxicity of graphene oxide affected by algal physiological characteristics: A comparative study in cyanobacterial, green algae, diatom. Environmental Pollution. Vol.260, No. 3, pp: 113847.
 67. **Yosri, N., Khalifa, S.A., Guo, Z., Xu, B., Zou, X., El-Seedi, H.R. 2021.** Marine organisms: Pioneer natural sources of polysaccharides/proteins for green synthesis of nanoparticles and their potential applications. International journal of biological macromolecules. Vol.193, No. 4, pp: 179-198.
 68. **Yuan, Y., Zhang, J., Fan, J., Clark, J., Shen, P., Li, Y., Zhang, C. 2018.** Microwave assisted extraction of phenolic compounds from four economic brown macroalgae species and evaluation of their antioxidant activities and inhibitory effects on α -amylase, α -glucosidase, pancreatic lipase and tyrosinase. Food Research International. Vol.113, No. 4, pp: 288-297.
 69. **Zhang, M., Yin, B.C., Wang, X.F., Ye, B.C. 2011.** Interaction of peptides with graphene oxide and its application for real-time monitoring of protease activity. Chemical Communications. Vol.47, No. 8, pp: 2399-2401.
 70. **Zhong, L., Yun, K. 2015.** Graphene oxide-modified ZnO particles: synthesis, characterization, and antibacterial properties. International journal of nanomedicine. Vol.10, No. 3, pp: 79.
 71. **Zou, F., Zhou, H., Jeong, D.Y., Kwon, J., Eom, S.U., Park, T.J., Hong, S.W., Lee, J. 2017.** Wrinkled surface-mediated antibacterial activity of graphene oxide nanosheets. ACS applied materials & interfaces. Vol.9, No. 2, pp: 1343-1351.
 - (*Phaeodactylum tricornutum*) and cyanobacteria (*Microcystis aeruginosa* and *Nodularia spumigena*). Oceanologia. Vol.62, No. 2, pp: 214-225.
 57. **Singh, J., Kumar, V., Kim, K.-H., Rawat, M. 2019.** Biogenic synthesis of copper oxide nanoparticles using plant extract and its prodigious potential for photocatalytic degradation of dyes. Environmental Research. Vol.177, No. 3, pp: 108569.
 58. **Stankovich, S., Dikin, D.A., Piner, R.D., Kohlhaas, K.A., Kleinhammes, A., Jia, Y., Wu, Y., Nguyen, S.T., Ruoff, R.S. 2007.** Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide. Carbon. Vol.45, No. 7, pp: 1558-1565.
 59. **Tang, X.Z., Li, X., Cao, Z., Yang, J., Wang, H., Pu, X., Yu, Z.Z. 2013.** Synthesis of graphene decorated with silver nanoparticles by simultaneous reduction of graphene oxide and silver ions with glucose. Carbon. Vol.59, No. 3, pp: 93-99.
 60. **Tayemeh, M.B., Esmailbeigi, M., Shirdel, I., Joo, H.S., Johari, S.A., Banan, A., Nourani, H., Mashhadi, H., Jami, M.J., Tabarrok, M. 2020.** Perturbation of fatty acid composition, pigments, and growth indices of *Chlorella vulgaris* in response to silver ions and nanoparticles: A new holistic understanding of hidden ecotoxicological aspect of pollutants. Chemosphere. Vol.238, No.3, pp: 124576.
 61. **Tsekhmistrenko, S., Bityutskyy, V., Tsekhmistrenko, O., Horalskyi, L., Tymoshok, N., Spivak, M. 2020.** Bacterial synthesis of nanoparticles: A green approach. Biosystems Diversity. Vol.28, No. 1, pp: 9-17.
 62. **Wang, Y., Shi, Z., Yin, J. 2011.** Facile synthesis of soluble graphene via a green reduction of graphene oxide in tea solution and its biocomposites. ACS applied materials & interfaces. Vol.3, No. 4, pp: 1127-1133.
 63. **Wang, L., Zi, J., Xu, R., Hilt, S., Hou, X., Chang, X. 2017.** Allelopathic effects of *Microcystis aeruginosa* on green algae and a diatom: evidence from exudates addition and co-culturing. Harmful algae. Vol.61, No. 3, pp: 56-62.
 64. **Yang, B., Liu, Z., Guo, Z., Zhang, W., Wan, M., Qin, X., Zhong, H. 2014.** In

Toxicity of Graphene Oxide-Based Nanoparticles against *Chaetoceros Muelleri microalgae*

Soolmaz Soleimani¹, Arash Ghaderi², Morteza Yousefzadi^{3*},
Maryam Moezzi⁴

1 -Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran

2 -Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran

3- Department of Biology, Faculty of Science, University of Qom, P.O. Box 37161-46611, Qom, Iran

4 -Persian Gulf and Oman Sea Ecology Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Abbas, Iran. REEO), Bandar Abbas, Iran

Abstract

The growing demands for nanotechnology in recent years have resulted in the environmental release of nanomaterials. The aim of the present study was to synthesize graphene oxide-based nanoparticles using an aqueous extract of green macroalgae and evaluate their toxicity against *Chaetoceros muelleri* microalgae as an important live feed in mariculture. In a laboratory study, first, the biosynthesis process of graphene nanoparticles was performed using the aqueous extract of the green alga *Ulva flexuosa* and then the anti-algae activity was evaluated and the content of photosynthetic pigments and microalgae protein was determined. The results of characterization analyses of graphene oxide reduction with the aqueous extract of the green alga *U. flexuosa* and its conversion to graphene were confirmed. Evaluation of the anti-algae activity of the studied samples showed that the reduced graphene oxide has a higher anti-algae activity than graphene oxide. The results also showed that with increasing the concentration of synthesized nanoparticles, the content of photosynthetic pigments and proteins decreased. The toxic effects of the released nanoparticles can damage the stocks of *C. muelleri* as an important live feed in mariculture.

Keywords: Green Macro-Algae, Graphene Oxide, Green Synthesis, Chlorophyll, Toxicity