



<https://ijpb.ui.ac.ir/?lang=en>
Journal of Plant Biological Sciences
E-ISSN: 3041-9603
Vol. 18, Issue 1, No. 67, 2026
Document Type: Research Paper
Received: 05/05/2026 Accepted: 01/07/2026

Metabolic responses induced by silver nanoparticles in the green microalga *Dunaliella salina*

Alireza Einali¹, Somaye Shoalibor², Omid Azizian-Shermeh¹, Shahla Najafi²

¹ Department of Biology, Faculty of Science, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran

² Department of Biology, Faculty of Science, University of Zabol, Zabol, Iran

Abstract

In the present study, the biochemical responses and antioxidant enzyme activities of the unicellular green alga *Dunaliella salina* were investigated following exposure to phytosynthesized silver nanoparticles synthesized using aqueous extracts of German chamomile (*Matricaria chamomilla*) leaves and flowers. Algal cultures grown in 1.5 M NaCl and harvested during the exponential growth phase were exposed to 0, 5, 15, and 25 picomolar (pM) concentrations of silver nanoparticles. Cell number, reducing sugars, non-reducing sugars, and starch content either increased or remained unchanged following exposure to 5 pM silver nanoparticles. However, at higher nanoparticle concentrations, cell number and soluble sugar contents decreased markedly. In addition, the contents of chlorophyll, β -carotene, starch, proteins, and amino acids, as well as the activities of catalase and ascorbate peroxidase, declined significantly at all nanoparticle concentrations, whereas cell fresh weight increased. These results indicate that silver nanoparticle-induced stress in algal cells is tolerated through changes in carbon partitioning rather than through enhanced antioxidant enzyme activity or β -carotene accumulation. Therefore, tolerance of *D. salina* to silver nanoparticles appears to be associated with physiological and metabolic reprogramming, particularly through the redistribution of carbon toward alternative metabolic pathways, such as glycerol and lipid accumulation, which may contribute to nanoparticle tolerance.

Keywords: Antioxidant enzymes, β -carotene, Soluble sugars, Silver nanoparticles, *Dunaliella salina*.

*Corresponding Author: aeinali@science.usb.ac.ir



Introduction

Silver nanoparticles (AgNPs) are among the most extensively utilized engineered nanomaterials because of their unique physicochemical properties and broad applications in medicine, agriculture, environmental remediation, and industrial processes. The increasing release of these nanoparticles into aquatic environments has raised concerns regarding their potential impacts on aquatic organisms, particularly primary producers such as microalgae. Microalgae constitute the foundation of aquatic food webs and play a vital role in global carbon cycling. Therefore, understanding their physiological and biochemical responses to nanoparticle exposure is essential for evaluating the ecological consequences of nanomaterial contamination.

Dunaliella salina is a unicellular halotolerant green microalga widely recognized as a model organism for investigating stress physiology, carotenoid biosynthesis, and metabolic adaptation. The remarkable ability of this microalga to survive under extreme environmental conditions makes it a valuable system for studying cellular responses to abiotic stress factors. In recent years, increasing attention has been directed toward understanding how nanoparticles influence the metabolism and stress-response mechanisms of *D. salina*. The present study aimed to investigate the metabolic and biochemical responses of *D. salina* exposed to phytosynthesized silver nanoparticles produced using aqueous extracts of German chamomile (*Matricaria chamomilla*).

Materials and methods

Silver nanoparticles were synthesized biologically and characterized using UV–Visible spectroscopy and transmission electron microscopy. The synthesized nanoparticles exhibited a characteristic surface plasmon resonance peak at approximately 410 nm and were predominantly spherical with an average particle size of approximately 13 nm. Exponentially growing cultures of *D. salina* were exposed to different concentrations of silver nanoparticles (0, 5, 15, and 25 pM). After 48 h of treatment, various physiological and biochemical parameters were evaluated, including cell number, fresh biomass, photosynthetic pigments, soluble sugars, starch, proteins, free amino acids, and antioxidant enzyme activities.

Results and discussion

The results revealed that exposure to silver nanoparticles significantly influenced algal growth and metabolism. Cell number decreased progressively with increasing nanoparticle concentration, particularly at 15 and 25 pM. This reduction suggests that silver nanoparticles negatively affect cell division and cellular proliferation. In contrast, fresh biomass increased significantly under nanoparticle treatments, indicating that nanoparticle exposure induced substantial physiological and metabolic modifications. The observed inverse relationship between cell number and fresh biomass suggests that factors other than cell proliferation contribute to biomass accumulation under nanoparticle stress. Photosynthetic pigments were highly sensitive to nanoparticle treatment. Chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, total chlorophyll, and β -carotene contents decreased significantly at higher nanoparticle concentrations. The reduction in chlorophyll content indicates impairment of the photosynthetic apparatus and decreased photosynthetic efficiency. Moreover, the decline in β -carotene accumulation suggests a reduction in photoprotective capacity because β -carotene functions as a major antioxidant pigment in *Dunaliella* species. The decrease in the β -carotene-to-total chlorophyll ratio further confirms the greater sensitivity of carotenoid metabolism to nanoparticle-induced stress.

Silver nanoparticles also altered carbon metabolism. Low nanoparticle concentration (5 pM) stimulated the accumulation of soluble sugars, whereas higher concentrations significantly reduced reducing sugars, non-reducing sugars, total soluble sugars, and starch content. These findings indicate that silver nanoparticles affect carbon allocation and storage metabolism. The observed decline in carbohydrate reserves at elevated nanoparticle concentrations suggests that carbon resources may be redirected toward alternative metabolic pathways involved in stress adaptation and cellular protection. Protein metabolism was similarly affected. Both total protein and soluble protein contents decreased substantially in nanoparticle-treated cells. Total free amino acids exhibited relatively minor changes, suggesting alterations in protein turnover and amino acid homeostasis. The reduction in protein content may result from enhanced proteolytic activity, decreased protein synthesis, or both. These responses indicate extensive metabolic reorganization under nanoparticle stress conditions.

Antioxidant enzyme activities also declined significantly following silver nanoparticle treatment. Catalase and ascorbate peroxidase activities were markedly reduced, especially at higher nanoparticle concentrations. These observations suggest that tolerance to silver nanoparticles is not associated with enhanced antioxidant enzyme activity. Instead, nanoparticle exposure appears to impair antioxidant defense systems, thereby increasing

susceptibility to oxidative damage. Collectively, the results demonstrate that silver nanoparticles induce extensive metabolic disturbances in *D. salina*. The simultaneous reduction of photosynthetic pigments, carbohydrates, proteins, amino acids, and antioxidant enzyme activities indicates that nanoparticle exposure imposes substantial physiological stress. Nevertheless, the increase in fresh biomass suggests the activation of alternative adaptive mechanisms. The findings support the hypothesis that tolerance to silver nanoparticles is achieved primarily through changes in carbon partitioning and metabolic reprogramming rather than through increased antioxidant enzyme activity or carotenoid accumulation.

Conclusion

In conclusion, phytosynthesized silver nanoparticles significantly affect the physiological and metabolic characteristics of *Dunaliella salina*. The observed responses emphasize the importance of nanoparticle properties in determining biological outcomes and highlight the complexity of nanoparticle–microalga interactions. These findings contribute to a better understanding of the ecological implications of silver nanoparticle contamination and provide valuable insights into stress-adaptation mechanisms in microalgae. Future studies should focus on identifying the specific metabolic pathways involved in carbon reallocation and evaluating long-term responses to nanoparticle exposure under environmentally relevant conditions.

پاسخ‌های متابولیکی ناشی از نانو ذرات نقره در ریز جلبک سبز *Dunaliella salina*

علیرضا عینعلی^۱ *، سمیه شعلی بر^۲، امید عزیزبان شرمه^۱، شهلا نجفی^۲

^۱ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران

^۲ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه زابل، زابل، ایران

چکیده

در پژوهش حاضر، پاسخ‌های بیوشیمیایی و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی جلبک سبز تک سلولی *Dunaliella salina* تحت تیمار نانو ذرات نقره فتوسنتز شده با عصاره آبی برگ و گل گیاه بابونه آلمانی (*Matricaria comomilla*) مورد بررسی قرار گرفت. سوسپانسیون‌های جلبکی رشد یافته در شوری ۱/۵ مولار کلرید سدیم در فاز نمایی رشد در معرض غلظت‌های صفر، ۵، ۱۵ و ۲۵ میکومولار نانو ذرات نقره قرار گرفتند. تعداد سلول‌ها، محتوای قندهای احیا کننده، غیر احیا کننده و نشاسته در پاسخ به غلظت ۵ میکومولار نانو ذرات نقره افزایش یافتند و یا بدون تغییر معنی‌دار باقی ماندند. با وجود این، تعداد سلول‌ها و مقدار قندهای محلول در پاسخ به غلظت‌های بالاتر و میزان کلروفیل‌های *a*، *b* و کل، بتاکاروتن، نشاسته، پروتئین‌ها، آمینواسید آزاد کل و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در پاسخ به همه غلظت‌های نانو ذرات نقره به شدت کاهش یافتند، در حالی که وزن تر سلول‌ها افزایش یافت. این نتایج نشان دادند تنش القا شده توسط تیمار نانو ذرات نقره در سلول‌های جلبکی به جای افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی و یا تجمع بتاکاروتن، توسط تغییر در تسهیم کربن تحمل می‌شود. بنابراین به نظر می‌رسد که سازوکار تحمل نانو ذرات نقره توسط جلبک *Dunaliella* با تغییرات فیزیولوژیکی و متابولیکی همراه بوده و هدایت جریان کربن به مسیرهای احتمالی دیگری مثل تجمع گلیسرول و لیپید سبب القای تحمل جلبک به نانو ذرات می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی اکسیدان، بتاکاروتن، قندهای محلول، نانو ذرات نقره، *Dunaliella salina*

مقدمه

نانوذرات، ذرات فلزی یا غیرفلزی با ابعاد کمتر از ۱۰۰ نانومتر هستند که به علت ویژگی‌های منحصر به فرد فیزیکوشیمیایی و زیستی به طور گسترده‌ای در زمینه‌های مختلف صنعتی، دارویی، پزشکی، کشاورزی و بیوتکنولوژی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Wang et al., 2018; Aminzai et al., 2024; Srinivasan & Rana, 2024). کاربردهای وسیع سبب افزایش تولید مهندسی شده نانوذررات شده است، به طوری که نانوذرراتی با ترکیب شیمیایی یکسان و ویژگی‌های کاربردی متفاوت تولید شده‌اند (Azizian-Shermeh et al., 2017; Xiong et al., 2022). تولید گسترده نانوذررات منجر به آزاد شدن آنها در محیط زیست و بر همکنش آنها با موجودات زنده شده است. این مساله می‌تواند اثرات اکولوژیکی و زیست محیطی مختلفی ایجاد نموده و به عنوان یک تهدید برای اکوسیستم در نظر گرفته شود (Zou et al., 2017; Khan et al., 2021; Wang et al., 2024). این اثرات بسته به نوع، غلظت و اندازه نانوذره و همچنین نوع موجود زنده و مدت زمان قرارگیری آن در معرض نانوذررات می‌تواند متفاوت باشند (Lalau et al., 2015; Bandyopadhyay et al., 2015; Aigbe & Osibote, 2024; Rajput et al., 2024). نانوذررات نقره به علت کاربرد گسترده در بسیاری از صنایع، یکی از تجاری‌ترین و پرمصرفترین نانوذررات به حساب می‌آیند (Zou et al., 2016). این کاربرد گسترده احتمال انتشار این نانوذره را در محیط زیست افزایش داده و یک تهدید بالقوه برای سیستم‌های زنده به حساب می‌آید (Panyala et al., 2009; Impellitteri et al., 2008). علاوه بر باکتری‌ها و جانوران، اثرات سمی این نانوذررات بر رشد و متابولیسم گیاهان مختلف مثل آرابیدوپسیس (Ma et al., 2010; Syu et al., 2014)، Lolium (Yin et al., 2011)، Bacopa multiforum (Krishnaraj et al., 2012) و سایر گیاهان آبرزی و جلبک‌ها مثل Wolffia monnieri و globosa (Zou et al., 2017)، (Oukarroumet al., 2012a, 2012b) و Dunaliella tertiolecta گزارش شده است. این اثرات مخرب در سطوح مختلف سلولی، بیوشیمیایی و یا فیزیولوژیک مشاهده شده و شامل کاهش کارایی فتوسیستم II؛ ممانعت از جوانه زنی دانه، بیوستتر کلروفیل، فعالیت چرخه کالوین؛ القای تنش اکسیداتیو و ممانعت از مسیر سیگنالی اتیلن است (Xu et al., 2010; Oukarroumet al., 2012a, 2012b; Syu et al., 2014). علاوه بر این، اثرات تحریک کننده نانوذررات نقره بر رشد ریشه Brassica juncea (Sharma et al., 2012) یا بر تقسیم سلولی، متابولیسم و مسیرهای سیگنالی هورمون اتیلن در آرابیدوپسیس (Syu et al., 2014) نیز گزارش شده‌اند. با این وجود، درک دقیق پاسخ گیاهان به نانوذررات مهندسی شده از جمله نانوذررات نقره نیازمند بررسی سازوکارهای سمیت آنها بر روی گونه‌های بیشتری است.

جلبک سبز تک سلولی Dunaliella یک میکروارگانیسم یوکاریوت فاقد دیواره سلولی بوده که در برابر تنش‌های غیرزیستی تحمل خوبی نشان داده و به همین علت اغلب به عنوان یک سیستم مدل در پژوهش‌های فیزیولوژی تنش مورد استفاده قرار می‌گیرد (Avron & Ben-Amotz, 1992; Borowitzka, 2013; Barbosa et al., 2023). برخی از گونه‌های این جلبک مثل D. salina و D. bardawil می‌توانند به واسطه تجمع مقادیر بالای بتاکاروتن، شرایط نامساعد محیطی را تحمل کنند. این واکنش به عنوان پاسخ اصلی و رایج این گونه‌ها تحت تنش اکسیداتیو گزارش شده است (Ben-Amotz et al., 1982; Shaish et al., 1993; Salguero et al., 2003; Einali & Goswami et al., 2022; Shariati, 2015). با این وجود، گونه‌های Dunaliella که مقادیر اندکی بتاکاروتن ذخیره می‌کنند، از قبیل D. viridis نیز به خوبی تنش اکسیداتیو را تحمل می‌کنند که این امر می‌تواند نشان دهنده دخالت سایر راهکارها از جمله آنزیم‌های آنتی اکسیدان در تحمل تنش باشد (Jimenez & Pick, 1993; Haghjou et al., 2009).

حجمی ۲ به ۱ در درجه حرارت اتاق سنتز شدند. گیاه بابونه از گلخانه جمع‌آوری و بخش‌های مورد استفاده به مدت یک هفته در دمای اتاق و دور از نور خورشید خشک شدند. عصاره آبی صاف شده با غلظت ۵ درصد، از پودر تهیه شده از این بخش‌ها از طریق افزودن آب مقطر و قرار گرفتن در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه تهیه شد. ریخت‌شناسی نانو ذرات نقره بیوسنتز شده توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) تعیین شد. همچنین غلظت مولی نانو ذرات نقره سنتز شده توسط رابطه (۱) ارائه شده توسط Liu et al. (2007) محاسبه شد.

$$C = N_{\text{Total}} / NVN_A \quad \text{رابطه ۱:}$$

که در این رابطه، N_{total} ، معادل مقدار اولیه نمک نقره اضافه شده به محلول واکنش، N ، میانگین تعداد اتم‌های نقره در هر نانوذره، V ، حجم محلول واکنش بر حسب لیتر و N_A عدد آووگادرو است.

کشت جلبک و تیمارهای آزمایشی

جلبک *Dunaliella salina* سویه UTEX 200 از مجموعه کشت جلبک دانشگاه تگزاس آمریکا تهیه شد. سلول‌های جلبکی در محلول غذایی تعدیل شده جانشون (pH=7.5) حاوی غلظت ۱/۵ مولار نمک NaCl، بر اساس روش‌های ذکر شده در منابع پیشین کشت شدند (Johnson et al., 1968; Shariati & Lilley, 1994). سوسپانسیون‌های جلبکی در اتاق کشت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با یک رژیم نوری ۱۶ ساعت روشنایی (شدت نور ۷۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه) و ۸ ساعت تاریکی روی شیکر (۱۰۰ دور بر دقیقه) به صورت مداوم قرار گرفتند تا به مرحله لگاریتمی رشد برسند. سپس سوسپانسیون‌ها با غلظت‌های ۰، ۵، ۱۵ و ۲۵ پیکومولار نانو ذرات نقره تیمار شدند. سوسپانسیون تیمار نشده با نانو ذرات به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. هر تیمار در سه تکرار و نمونه‌برداری قبل

جلبک *Dunaliella* یک مدل بسیار مفید برای پژوهش‌های نانو ذرات است، زیرا برخلاف اکثر ریز جلبک‌ها، فاقد دیواره سلولی سلولزی بوده و در عوض، تنها توسط یک غشای پلاسمایی و یک لایه خارج سلولی شبیه گلیکوکالیکس احاطه شده است. این امر سبب می‌شود که نسبت به برهمکنش‌ها و جذب نانو ذرات-سلول حساس‌تر باشد (Johari et al., 2018; Bahador et al., 2019). جذب نانو ذرات نقره توسط سلول‌های جلبکی مانند *Dunaliella* معمولاً توسط ترکیبی از فرآیندهای غیرفعال و فعال، شامل جذب سطحی روی سطح سلول از طریق برهمکنش‌های الکترواستاتیکی، نیروهای وان در والس، اتصال به پلی‌ساکاریدها و پروتئین‌های خارج سلولی و یا نفوذ به غشاء شامل نفوذ مستقیم به غشاء، جذب شبه اندوسیتوز و انتقال توسط کانال‌های غشایی، رخ می‌دهد (Miao et al., 2010). از آنجایی که استفاده نانو ذرات می‌تواند قابلیت تولید ترکیبات زیستی مهم اقتصادی توسط ریز جلبک‌ها را به شدت تحت تأثیر قرار دهد (Bahador et al., 2019; Nguyen et al., 2019; Yuan et al., 2023)، بنابراین تغییرات متابولیکی القا شده توسط نانو ذرات نقره می‌تواند بر میزان تولید و تجمع این ترکیبات زیستی با ارزش در ریز جلبک *Dunaliella* تأثیرگذار بوده و بیانگر اهمیت تأثیر هر دو جنبه بیوتکنولوژیک و اکولوژیک نانو ذرات باشد. بنابراین، هدف از پژوهش حاضر، بررسی پاسخ‌های متابولیکی و آنتی اکسیدانی جلبک سبز *D. salina* به نانو ذرات نقره به عنوان یک نانوذره پر کاربرد است.

مواد و روش‌ها

بیوسنتز و مشخصه‌یابی نانو ذرات نقره

در این پژوهش، نانو ذرات نقره توسط روش سنتز سبز توصیف شده توسط (Azizian-Shermeh et al., 2017) توسط ترکیب محلول ۱ میلی مولار نترات نقره (AgNO_3) و عصاره آبی گیاه بابونه آلمانی (*Matricaria comomilla*) شامل برگ و گل به عنوان یک عامل احیا کننده در نسبت

استخراج و اندازه‌گیری قندهای محلول و نشاسته

قندهای محلول شامل قندهای احیاکننده، غیراحیاکننده و کل، از رسوب جلبکی (حاصل از ۳۰ میلی لیتر سوسپانسیون جلبکی، همانطور که در بالا توصیف شد) رنگبری شده با استون، توسط اتانول ۸۰٪ در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه استخراج شدند (Mirshekari et al., 2017). از عصاره‌های اتانولی تغلیظ شده برای تعیین میزان قندهای محلول استفاده شد. قندهای احیاکننده بر اساس روش دی نیتروسالیسلیک اسید توصیف شده توسط (Miller 1959) در طول موج ۵۷۵ نانومتر و توسط گلوکز به عنوان استاندارد اندازه‌گیری شدند. قندهای غیراحیاکننده از طریق روش van Handle (1968) و پس از حذف قندهای احیاکننده از طریق افزودن محلول هیدروکسید پتاسیم ۳۰ درصد به عصاره اتانولی و حرارت در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، در طول موج ۶۲۰ نانومتر توسط سوکروز به عنوان استاندارد تعیین شدند. میزان قند محلول کل از مجموع قندهای احیاکننده و غیراحیاکننده به دست آمد. بقایای حاصل از استخراج قندهای محلول برای استخراج نشاسته با استفاده از روش اصلاح شده هیدرولیز اسیدی مورد استفاده قرار گرفتند (McCready et al., 1950; Mirshekari et al., 2017). بر اساس این روش، پس از افزودن اسید پرکلریک ۵۲٪ به بقایای حاصل از استخراج قندهای محلول، میزان گلوکز حاصل از شکستن نشاسته موجود در بقایا از روش آنترن با استفاده از گلوکز به عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد (McCready et al., 1950). جهت انجام این کار، ۰/۲ میلی لیتر از عصاره حاصل از هیدرولیز اسیدی نشاسته با ۳ میلی لیتر معرف آنترن (۱۵۰ میلی گرم آنترن در ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۱۳ مولار) مخلوط و پس از ۲۰ دقیقه حرارت در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد، میزان جذب نمونه در ۶۲۰ نانومتر ثبت شد. غلظت نشاسته توسط اعمال ضریب ۰/۹ در مقدار گلوکز به دست آمده محاسبه شد (McCready et al., 1950).

از تیمار با نانوذرات نقره (به‌عنوان زمان صفر) و ۴۸ ساعت پس از آن انجام شد.

شمارش سلولی، وزن تر و میزان رنگیزه‌ها

شمارش سلول‌های جلبکی توسط لام هموسایتمتر زیر میکروسکوپ نوری انجام شد (Schoen, 1988). رسوب جلبکی حاصل از سانتریفیوژ ۳۰ میلی لیتر سوسپانسیون جلبکی برای مدت ۱۰ دقیقه با نیروی g ۲۰۰۰، با استفاده از محیط کشت تازه حاوی ۰/۲ مولار نمک شستشو داده شده و پس از سانتریفیوژ دوباره، وزن تر آن تعیین شد (Haghjou et al., 2014). جهت استخراج رنگیزه‌های فتوسنتزی شامل کلروفیل و بتاکاروتن، رسوب جلبکی حاصل از سانتریفیوژ یک میلی لیتر سوسپانسیون جلبکی برای مدت ۵ دقیقه با نیروی g ۲۰۰۰ با ۱ میلی لیتر استون ۸۰ درصد مخلوط و پس از ورتکس شدید دوباره به مدت ۲ دقیقه در نیروی g ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شد. جهت اندازه‌گیری میزان کلروفیل‌ها، جذب محلول رویی در طول موج‌های ۶۶۳، ۶۴۵ و ۶۵۲ تعیین و غلظت کلروفیل‌ها توسط روابط ۲ تا ۴ محاسبه شدند (Arnon, 1949).

رابطه ۲:

$$\text{Chl } a \text{ (mg ml}^{-1}\text{)} = 0.0127 A_{663} - 0.00269 A_{645}$$

رابطه ۳:

$$\text{Chl } b \text{ (mg ml}^{-1}\text{)} = 0.0229 A_{645} - 0.00468 A_{663}$$

رابطه ۴:

$$\text{Total Chl (mg ml}^{-1}\text{)} = A_{652}/34.5$$

همچنین، جذب محلول رویی در طول موج ۴۸۰ نانومتر نیز اندازه‌گیری و مقدار بتاکاروتن توسط ضریب جذب برابر با $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2273$ محاسبه شد (Ben-Amotz & Avron, 1983).

تعیین مقادیر پروتئین کل و آمینواسید آزاد کل

استخراج پروتئین کل از رسوب جلبکی (حاصل از ۳۰ میلی لیتر سوسپانسیون جلبکی) رنگبری شده با استون با استفاده از روش توصیف شده توسط (Stone & Gifford 1997) همراه با تغییراتی (Mirshekari et al., 2017) انجام شد. به طور خلاصه، ۰/۵ میلی لیتر بافر استخراج پروتئین کل (شامل ۶۰ میلی مولار بافر تریس (pH=6.8)، ۱۰٪ گلیسرول و ۲٪ سدیم دودسیل سولفات) به رسوب جلبکی اضافه و مخلوط حاصل به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از سانتریفیوژ با نیروی g ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه، میزان پروتئین کل عصاره حاصل طبق روش فولین توصیف شده توسط (Markwell 1981) et al. در طول موج ۷۵۰ نانومتر با استفاده از منحنی استاندارد آلبومین سرم گاوی تعیین شد. استخراج اسیدهای آمینه آزاد مشابه قندهای محلول انجام شد با این تفاوت که رسوب تازه جلبکی به جای رسوب رنگبری شده مورد استفاده قرار گرفت (Mirshekari et al., 2019). رنگ‌زدایی عصاره اتانولی غلیظ با افزودن کلروفرم به عصاره به نسبت ۱ به ۵ انجام شد. مقدار کل محتوای اسید آمینه آزاد، با روش نین هیدرین (Yemm et al. 1955) توسط گلیسین به عنوان استاندارد تعیین شد. بدین منظور، ۰/۱ میلی لیتر عصاره الکلی با ۱ میلی لیتر اتانول ۸۰٪، ۱ میلی لیتر بافر سیترات (pH=5) و ۲ میلی لیتر معرف نین هیدرین (۱٪ نین هیدرین و ۰/۰۶٪ سیانید پتاسیم در استون) مخلوط و حجم نهایی با آب مقطر به ۵/۱ میلی لیتر رسید. مخلوط واکنش به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد قرار گرفته و جهت توقف واکنش به مدت ۵ دقیقه در آب معمولی قرار داده شد. جذب هریک از نمونه‌ها پس از افزودن ۸ میلی لیتر آب مقطر، در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد.

استخراج و سنجش پروتئین‌های محلول و آنزیم‌ها

عصاره سلولی حاوی پروتئین‌های محلول و آنزیم‌ها از رسوب تازه جلبکی (حاصل از ۳۰ میلی لیتر سوسپانسیون جلبکی) با ۱ میلی لیتر از بافر استخراج آنزیمی حاوی ۱۰۰ میلی مولار بافر پتاسیم فسفات سرد (pH 7.0)، ۱۰ درصد گلیسرول، ۱ میلی مولار EDTA، ۱۰ میلی مولار KCl، ۱ میلی مولار $MgSO_4$ ، ۱ میلی مولار فنیل متیل سولفونیل فلوراید (PMSF)، ۵۰ میلی مولار ۲-مرکاپتواتانول، ۱٪ تریتن-۱۰۰-X و ۱٪ پلی وینیل پلی پیرولیدون (PVPP) استخراج شد. برای استخراج آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX)، ۵ میلی مولار آسکوربیک اسید به بافر استخراج اضافه شد. سوسپانسیون جلبکی برای دو دوره ۳۰ ثانیه ای با فاصله زمانی دو دقیقه در معرض امواج اولتراسونیک قرار داده شده و سپس در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ ساعت قرار گرفت. رنگ‌زدایی از مخلوط با افزودن ۱۰ میلی گرم زغال فعال و سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه در نیروی g ۱۰۰۰۰ تحت دمای ۴ درجه سانتی گراد انجام شد. مایع رویی (حاوی پروتئین‌های محلول) برای تعیین فعالیت آنزیمی استفاده شد. محتوای پروتئین محلول بر اساس روش Bradford (1976) در طول موج ۵۹۵ نانومتر با استفاده از منحنی استاندارد آلبومین سرم گاوی اندازه گیری شد. مقدار فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) با روش Lück (1965) تعیین شد. مخلوط واکنش (۱ میلی لیتر) شامل ۵۰ میلی مولار بافر فسفات پتاسیم (pH 7.0)، ۱۲/۵ میلی مولار H_2O_2 و ۳۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. نرخ تجزیه هیدروژن پراکسید در مدت زمان یک دقیقه در ۲۴۰ نانومتر با استفاده از ضریب خاموشی $0.0394 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$ تعیین شد. میزان فعالیت APX با روش Chen & Asada (1992) تعیین شد. مخلوط واکنش (۱ میلی لیتر) شامل ۵۰ میلی مولار بافر فسفات پتاسیم (pH 7.0)، ۱ میلی مولار H_2O_2 ، ۰/۵ میلی مولار آسکوربیک اسید و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. میزان تولید دهیدروآسکوربات در مدت زمان یک

(شکل ۱-۱A)، که می‌توان آن را به احیای یون‌های نقره توسط عصاره آبی برگ و گل گیاه بابونه آلمانی، به علت سرشار بودن این بخش‌ها از اسانس و ترکیبات طبیعی (Rehmat et al., 2020)، نسبت داد (Rajasekharreddy et al., 2010; Azizian-Shermeh et al., 2017). طیف جذبی نانوذرات نقره (شکل ۱-۱B)، پیک جذب در ۴۱۰ نانومتر را نشان داد که مربوط به رزونانس پلاسمون سطحی (SPR) نانوذرات نقره است (Kouvaris et al., 2012). همچنین در تصویر TEM، نانوذرات نقره به صورت ذرات منفرد پراکنده با شکل کروی همگن و اندازه ۵ تا ۲۰ نانومتر با اندازه متوسط ۱۳ نانومتر مشاهده شدند (شکل ۱-۱C). هیستوگرام توزیع اندازه نانوذرات نقره، نانوذراتی با بیشترین فراوانی با قطر ۱۵ نانومتر را نشان داد (شکل ۱-۱D).

دقیقه در ۲۹۰ نانومتر با فرض ضریب خاموشی cm^2 $2/8 \mu\text{mol}^{-1}$ تعیین شد.

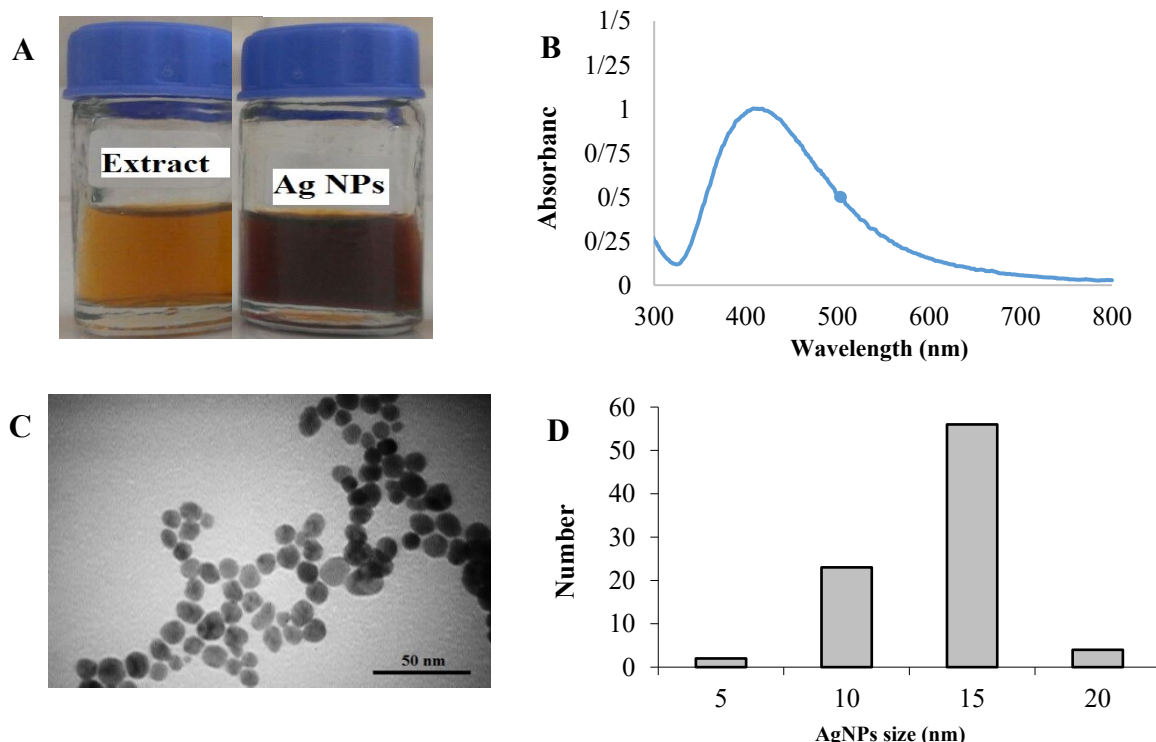
تجزیه و تحلیل آماری

نتایج به صورت میانگین و انحراف معیار (SD) سه اندازه‌گیری از سه سوسپانسیون جلبکی مجزا بیان شد. تفاوت معنی‌دار آماری بین تیمارها توسط آنالیز واریانس (ANOVA) و آزمون دانکن در سطح $0/05$ ($P < 0.05$) تعیین شد.

نتایج و بحث

ویژگی‌های نانوذرات نقره بیوسنتز شده:

تغییر رنگ مخلوط واکنش از قهوه‌ای کم‌رنگ به قهوه‌ای به شدت تیره، بلافاصله پس از ترکیب نمک نترات نقره و عصاره آبی گیاه، نشان‌دهنده تشکیل نانوذرات نقره است.



شکل ۱- تغییر رنگ (A)، طیف جذبی (B)، تصویر میکروسکوپ الکترونی گذاره (C) و توزیع اندازه نانوذرات (D) نقره سنتز شده از طریق ترکیب محلول ۱ میلی‌مولار نترات نقره (AgNO_3) و عصاره آبی برگ‌ها و گل‌های بابونه آلمانی (*Matricaria comomilla*) با نسبت ۱:۲ (حجمی/حجمی) در دمای اتاق.

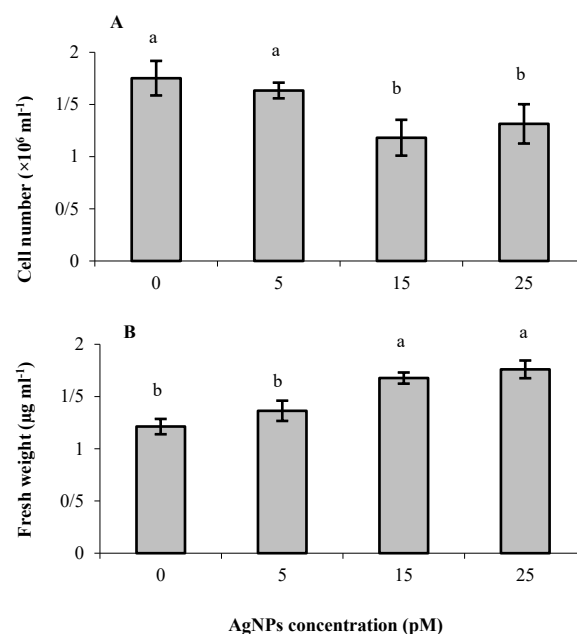
Figure 1- Color change (A), Absorption spectrum (B), Transmission electron microscope image (C) and particle size distribution (D) of synthesized AgNPs by combining 1 mM silver nitrate (AgNO_3) solution and the aqueous extract of leaves and flowers of German chamomile (*Matricaria comomilla*) at a ratio of 1: 2 (v/v) at room temperature.

تغییرات در تعداد سلول، وزن تر و میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی:

تعداد سلول‌ها در پاسخ به غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره به ویژه در ۱۵ و ۲۵ میکومولار در مقایسه با کنترل کاهش پیدا کرد (شکل ۲-۱). این امر بیانگر آن است که نانوذرات نقره می‌تواند بر تقسیم سلولی در غلظت‌های بالا تأثیر داشته باشد، به عبارت دیگر، سلول‌های جلبکی این غلظت‌ها را به خوبی تحمل می‌کنند. اثرات منفی نانوذرات فلزی به ویژه نانوذرات نقره بر شاخص میتوزی و تقسیم سلولی گیاهان مختلف از جمله جلبک *D. salina* قبلاً نیز گزارش شده است (Fouad & Hafez, 2018; Bahador et al., 2019; Wang et al., 2020). بنابراین، نقطه هدف نانوذرات نقره در سلول‌های جلبکی که موجب کاهش تعداد سلول‌ها شده است می‌تواند چرخه و تقسیم سلولی باشد. با وجود این، گزارش‌هایی در مورد نقش مثبت نانوذرات نقره به ویژه در غلظت‌های پائین در بهبود تجمع پروتئین‌های دخیل در چرخه سلولی در ریشه‌های گیاه آرابیدوپسیس که منجر به افزایش طولی ریشه شده وجود دارد (Syu et al., 2014; Wang et al., 2020). این نقش مثبت در برخی دیگر از گیاهان نیز مشاهده شده است (Salama, 2012; Latif et al., 2017; Nghia et al., 2017). همچنین طبق پژوهش‌ها مشخص شده است که نانوذرات نقره با ریخت شناسی و اندازه‌های مختلف که می‌تواند به منشاء ساخت آنها مربوط باشد (Azizian-Shermeh et al., 2017)، پاسخ‌های متفاوتی را در رشد گیاه و بیان ژن‌ها در گیاهچه‌های آرابیدوپسیس موجب شده‌اند (Syu et al., 2014). همچنین اثرات متفاوت دو نوع نانوذره نقره سنتز شده توسط زیستی و شیمیایی بر صفات فیزیولوژیکی گیاه *Eschscholzia californica* نیز مشاهده شده است (Hajian et al., 2022). به این ترتیب، پاسخ‌های متفاوت موجودات مختلف به نانوذرات نقره می‌تواند ناشی از اختلاف در فرم‌های این نانوذرات باشد. بر عکس، وزن تر سلول‌های جلبکی به تدریج تحت تأثیر نانوذرات نقره افزایش یافته و در

غلظت‌های ۱۵ و ۲۵ میکومولار افزایش معناداری نسبت به کنترل نشان دادند (شکل ۲-۲). مقایسه اثرات نانوذرات نقره بر تعداد و وزن تر سلول‌های جلبکی (شکل ۲) نشان می‌دهد که یک همبستگی منفی بین آنها وجود دارد. مشابه با نتایج ما، یک رابطه عکس بین تعداد سلول و وزن تر در *D. tertiolecta* در معرض تابش فرا بنفش (Garcia-Gomez et al., 2012)، *D. viridis* تیمار شده با مناداین (Haghjou et al., 2014)، *D. bardawil* در معرض پروپیل گالات (Einali, 2018)، *D. salina* تحت کمبود نیتروژن (Mirshekari et al., 2019) و *D. salina* تیمار شده با نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره برگ *Momordica charantia* (Bahador et al., 2019) گزارش شده است. به هر حال، بر خلاف پژوهش‌های ذکر شده که در آنها افزایش وزن تر ناشی از تجمع لیپیدها یا سایر متابولیت‌ها است، در *D. bardawil* تیمار شده با نانوذرات اکسید مس (Bamary et al., 2025) فاکتورهای دیگری مثل سنتز گلیسرول ممکن است نقش داشته باشند. در پژوهش حاضر، فاکتورهایی مثل افزایش آگروپلیمرهای خارجی سلول جلبک (شامل پلی ساکاریدها، پروتئین‌ها، لیپیدها، مواد موکوسی و مواد پلیمری خارج سلولی) (Nguyen et al., 2020; Vargas-Estrada et al., 2020)، سنتز احتمالی گلیسرول یا لیپید، اختلال در قابلیت و سلامت غشاءها و همچنین اختلال در نفوذپذیری غشاء (Bhuvaneshwari et al., 2015; Wang et al., 2016) ممکن است در افزایش وزن تر سلول‌ها دخیل باشند.

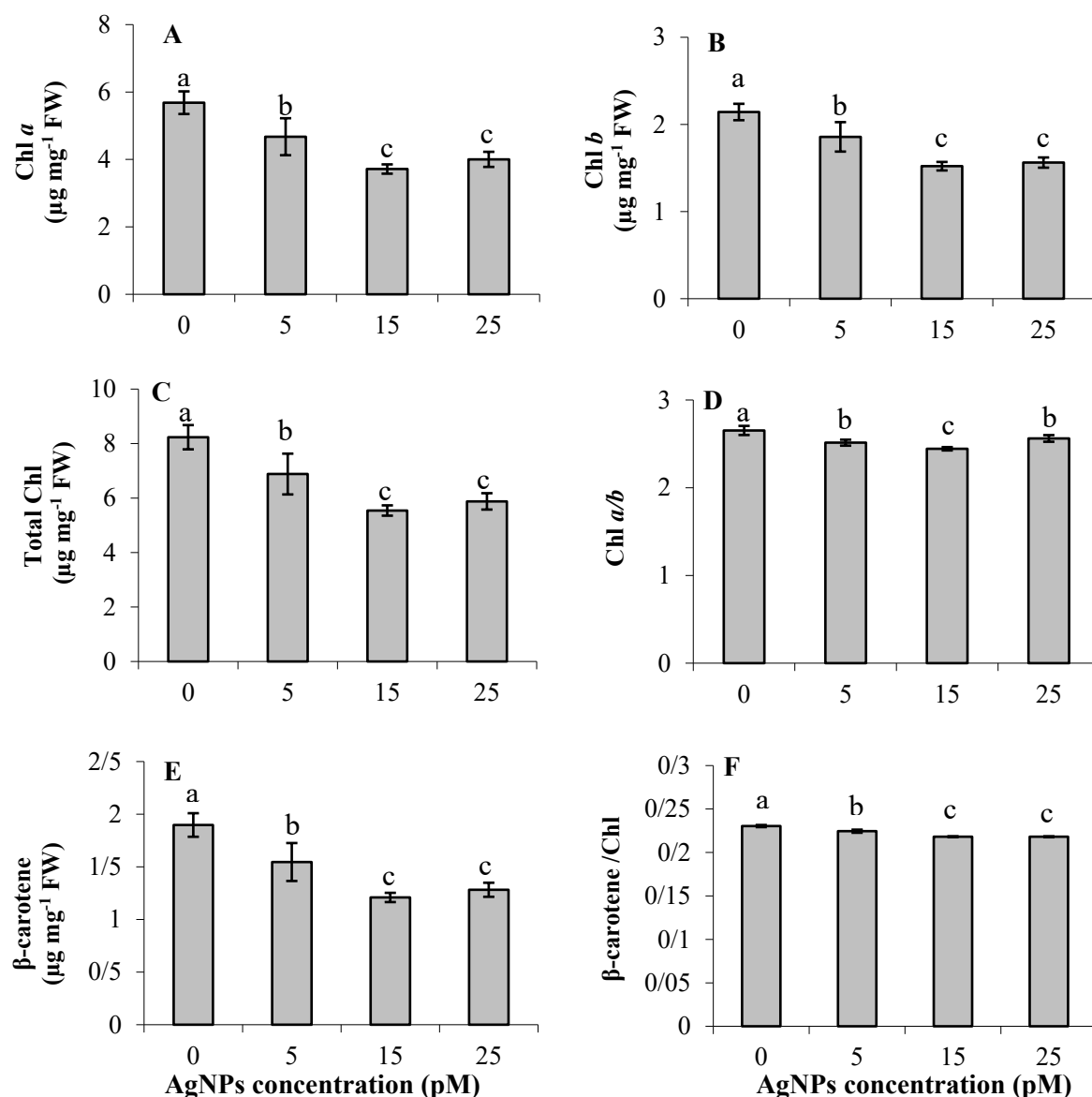
(C). این کاهش بیانگر تأثیر منفی نانوذرات نقره بر سیستم فتوسنتزی سلول‌های جلبکی است. اثر منفی نانوذرات نقره بر تجمع رنگیزه‌ها نیز قبلاً گزارش شده است (Oukarroum et al., 2012b; Zou et al., 2017). با وجود این، گزارش‌هایی در مورد تأثیر مثبت این نانوذرات بر میزان رنگیزه‌ها و فتوسنتز نیز وجود دارد (Farghaly & Nafady, 2015; Latif et al., 2017; Sadak, 2019; Bahador et al., 2019). این اختلاف در میزان رنگیزه‌ها در پاسخ به نانوذرات نقره می‌تواند بطور روشن بیان کننده آن باشد که اثر نانوذرات نقره بر فتوسنتز بسته به نوع و ویژگی‌های نانوذره ستر شده متفاوت است. نسبت کلروفیل a/b در همه تیمارهای نانوذرات به ویژه در غلظت ۱۵ میکومولار در مقایسه با کنترل به شدت کاهش پیدا کرد (شکل ۳-D). این کاهش بیانگر حساسیت بیشتر کلروفیل a سلول‌های جلبکی به نانوذرات نقره در مقایسه با کلروفیل b است. میزان بتاکاروتن سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های ۱۵ و ۲۵ میکومولار نانوذرات بیشترین کاهش را نسبت به کنترل نشان داد (شکل ۳-E). از آنجا که بتاکاروتن یک آنتی اکسیدان بسیار مهم در اغلب سلول‌های *Dunaliella* به شمار می‌رود (Ben-Amotz & Avron, 1983; Jahnke & White, 2003; Mishra et al., 2008; Mishra & Jha, 2011; Einali, 2018)، کاهش مقدار آن تحت تأثیر نانوذرات نقره، حساسیت سیستم‌های فتوسنتزی سلول‌های جلبکی به این نانوذرات را بیشتر تأیید می‌کند.



شکل ۲- تغییرات در تعداد (A) و وزن تر (B) سلول‌های *Dunaliella salina* تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره پس از ۴۸ ساعت نشان داده شده است. ستون‌ها میانگین $\pm$ انحراف معیار سه اندازه‌گیری جداگانه هستند. تغییرات آماری معنی‌دار بین تیمارهای مختلف در سطح معنی‌داری $P < 0.05$ با استفاده از آزمون دانکن تعیین و با حروف متفاوت نشان داده شده‌اند.

Figure 2- Changes in number (A) and fresh weight (B) of *Dunaliella salina* cells treated with different concentrations of phytosynthesized AgNPs are shown after 48 h. Columns are mean $\pm$ SD of three separate measurements. Statistically significant changes between different treatments at $P < 0.05$ were determined using Duncan's test and indicated by different letters.

میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی شامل کلروفیل a ، b و کل در پاسخ به تیمارهای نانوذرات نقره به شدت کاهش نشان دادند، به عبارت دیگر، بیشترین کاهش در غلظت‌های ۱۵ و ۲۵ میکومولار نانوذرات مشاهده شد (شکل‌های ۳-A تا



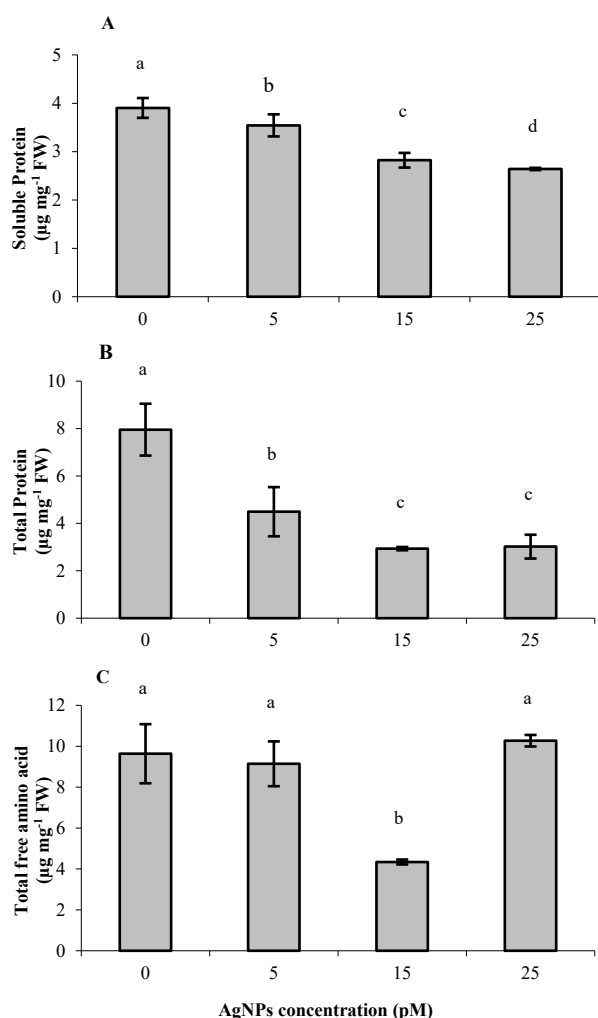
شکل ۳- تغییرات در محتوای کلروفیل a (A)، کلروفیل b (B)، کلروفیل کل (C)، نسبت کلروفیل a/b (D)، بتاکاروتن (E) و نسبت بتاکاروتن به کلروفیل کل (F) در سلول‌های *Dunaliella salina* تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره پس از ۴۸ ساعت. نتایج میانگین $\pm$ انحراف معیار سه آزمایش جداگانه هستند. حروف متفاوت نشان دهنده تغییرات معنی‌دار بین تیمارهای مختلف در سطح معنی‌داری $P < 0.05$ بر اساس آزمون دانکن هستند.

Figure 3- Changes in the content of Chl a (A), Chl b (B), total Chl (C), Chl a/b (D), β-carotene (E), and the ratio of β-carotene to total Chl (F) in *Dunaliella salina* cells treated with different concentrations of AgNPs after 48 h. Results are the mean $\pm$ SD of three separate experiments. Different letters show significant changes between different treatments at $P < 0.05$ based on Duncan's test.

شده با عصاره برگ *Momordica charantia* بر میزان بتاکاروتن جلبک *D. salina* است (Bahador et al., 2019). این اختلاف می‌تواند به تفاوت در ویژگی‌های نانوذرات ساخته شده نسبت داده شود. نسبت بتاکاروتن به کلروفیل کل در همه تیمارهای نانوذرات به ویژه غلظت‌های ۱۵ و ۲۵ میکومولار به صورت معنی‌دار کاهش پیدا کرد

با توجه به نقش محافظتی بتاکاروتن در حفظ کلروفیل در برابر رادیکال‌های آزاد اکسیژن در این جلبک (Einali, 2021; Panjekobi & Einali, 2018)، چنین کاهشی در میزان بتاکاروتن می‌تواند کاهش محتوای کلروفیل را در سلول‌های تیمار شده با نانوذرات نقره توضیح دهد. به هر حال، این نتایج بر خلاف تأثیر مثبت نانوذرات نقره سنتز

جلبکی باشد. تغییر فرآیند بازچرخ پروتئین در نتیجه تغییر فعالیت‌های پروتئولیتیک در سلول‌های *D. salina* تیمار شده با نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره برگ *Momordica charantia* نیز مشاهده شده است (Bahador et al., 2019).



شکل ۴- تغییرات در سطوح پروتئین محلول (A)، پروتئین کل (B) و اسیدهای آمینه آزاد کل (C) سلول‌های *Dunaliella salina* تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره پس از ۴۸ ساعت. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار سه اندازه‌گیری مستقل بیان شدند. حروف متفاوت نشان دهنده تغییرات معنی‌دار بین تیمارهای مختلف در سطح معنی‌داری $P < 0.05$ بر اساس آزمون دانکن هستند.

Figure 4- Changes in the levels of soluble protein (A), total protein (B) and total free amino acids (C) of *Dunaliella salina* cells treated with different concentrations of AgNPs after 48 h. Data were expressed as the mean $\pm$ SD of three independent measurements. Different letters indicate significant changes between different treatments at $P < 0.05$ based on Duncan's test.

(شکل ۳-F). کاهش این نسبت در سلول‌های جلبکی، بیانگر حساسیت بیشتر رنگدانه بتاکاروتن به نانوذرات نقره در مقایسه با کلروفیل است.

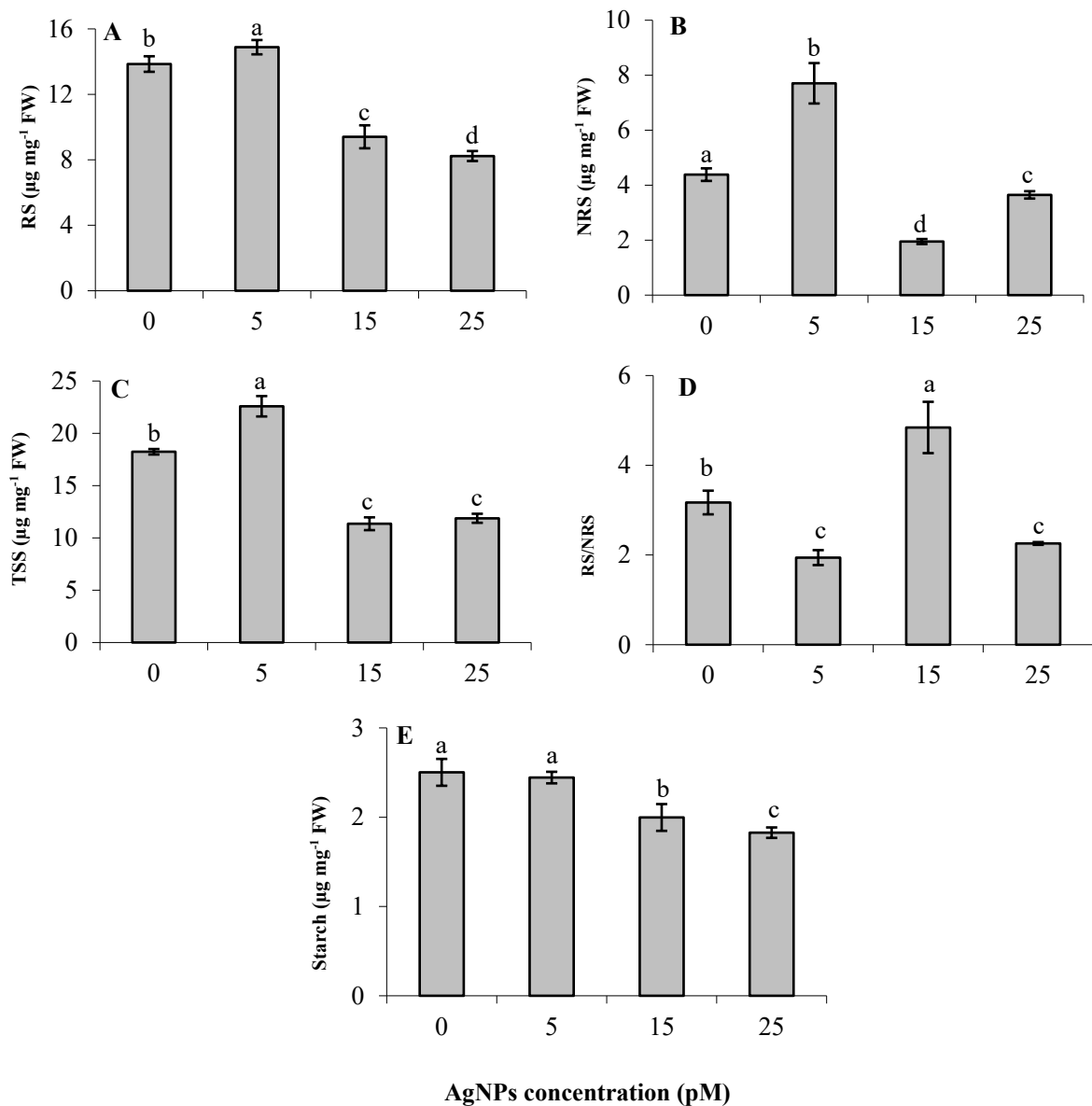
تغییرات در میزان پروتئین کل، پروتئین محلول و آمینواسید آزاد کل:

منظور از پروتئین کل، پروتئین‌های استخراج‌شده با بافر استخراج در حضور سدیم دودسیل سولفات است (Stone & Gifford, 1997; Einali & Sadeghipour, 2007)، در حالی که پروتئین محلول، پروتئین‌های استخراج‌شده با بافر استخراج آنزیم است (Einali & Sadeghipour, 2007). مقدار پروتئین‌های سلول‌های جلبکی استخراج‌شده با بافر استخراج پروتئین کل در حالت کنترل بیش از دو برابر بیشتر از پروتئین‌های استخراج‌شده با بافر استخراج آنزیمی بود (شکل ۴-A و B). میزان پروتئین‌های محلول و پروتئین کل سلول‌های جلبکی تیمار شده با نانوذرات نقره نسبت به شاهد به شدت کاهش یافت و بیشترین کاهش در تیمار ۲۵ میکومولار مشاهده شد (شکل ۴-A و B). محتوای آمینواسید آزاد کل تنها در غلظت ۱۵ میکومولار نانوذرات کاهش یافته و در سایر تیمارها نسبت به کنترل تغییر نکرد (شکل ۴-C). این الگو می‌تواند ناشی از تغییر در بازچرخ پروتئین (protein turnover) باشد. باز چرخ پروتئین یک فرایند مهم سلولی است که نقش بسیار مهمی در هموستازی آمینواسید، بازآرایی پروتئین‌ها و تعادل آنزیمی در طول تنش را دارد (Hildebrandt, 2018). فعالیت‌های مرتبط با بیوسنتز و شکسته شدن پروتئین‌ها در شرایط تنش پیشتر مشخص شده است (Khedr et al., 2003; Hildebrandt et al., 2015; Huang & Jander, 2017; Hildebrandt, 2018; Mirshekari et al., 2019). از آنجا که تغییر در بازچرخ پروتئین با فعالیت‌های پروتئولیتیک مرتبط است (Bahador et al., 2019; Mirshekari et al., 2019)، بنابراین این تغییرات پروتئینی و آمینواسیدی می‌تواند نشان دهنده تغییر در فعالیت آنزیم‌های پروتئاز در سلول‌های

تغییرات در میزان قندهای محلول و نشاسته:

میزان قندهای محلول شامل قندهای احیاکننده، غیراحیاکننده و قند کل در تیمار ۵ پیکومولار نانوذرات به صورت معنی‌دار افزایش نشان داد، اما در دوزهای بالاتر نانوذره به شدت کاهش پیدا کرد (شکل ۵- A تا C). میزان

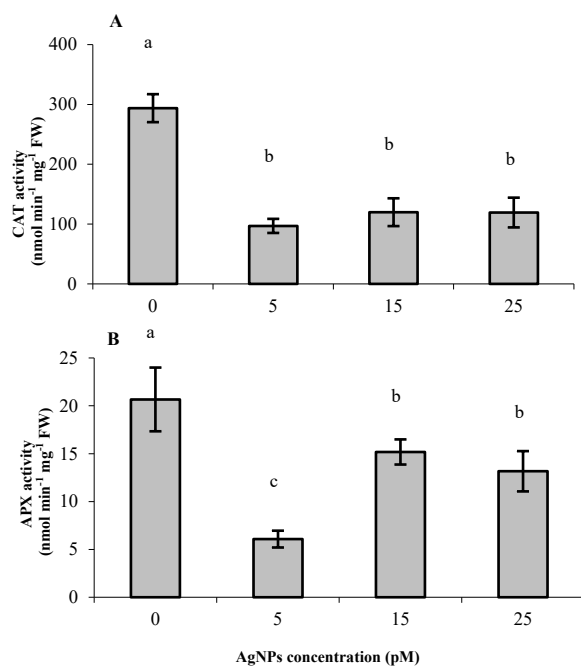
قندهای احیاکننده در پاسخ به غلظت ۲۵ پیکومولار نانوذره بیشترین کاهش را نشان داد (شکل ۵- A)، در حالی که بیشترین کاهش قندهای غیر احیایی در تیمار ۱۵ پیکومولار مشاهده شد (شکل ۵- B).



شکل ۵- تغییرات در میزان قندهای احیاکننده (A)، قندهای غیراحیاکننده (B)، قندهای محلول کل (C)، نسبت قندهای احیاکننده به غیراحیاکننده (D) و نشاسته (E) سلول‌های *Dunaliella salina* تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره پس از ۴۸ ساعت. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار سه اندازه‌گیری مستقل بیان شدند. حروف متفاوت نشان دهنده تغییرات معنی‌دار بین تیمارهای مختلف در سطح معنی‌داری $P < 0.05$ بر اساس آزمون دانکن هستند.

Figure 5- Changes in reducing sugars, RS (A), non-reducing sugars, NRS (B), total soluble sugars, TSS (C), RS/NRS ratio (D), and starch (E) contents of *Dunaliella salina* cells treated with different concentrations of AgNPs after 48 h. Values are the mean $\pm$ SD of three independent experiments. Different letters indicate statistically significant changes at $P < 0.05$ with Duncan's test.

آسکوربات پراکسیداز به تجمع پراکسید هیدروژن است (Hiner et al., 2000). شواهد این احتمال از آنجا ناشی می شود که تیمار سلول های *Dunaliella* با نانوذرات اکسید مس سبب افزایش پراکسید هیدروژن متناسب با غلظت نانوذره شده، اما این الگو با تغییرات آنزیم های آنتی اکسیدان کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز کاملاً متضاد است، به طوری که با افزایش غلظت نانوذرات، فعالیت این آنزیم ها کاهش یافته است (Bamary et al., 2025). همچنین، پاسخ غیرخطی نانوذرات به پدیده های فیزیولوژیک از جمله فعالیت های آنتی اکسیدانی و بنابراین ممانعت از آنزیم های آنتی اکسیدان در مقادیر پائین نانوذرات نیز می تواند در این امر دخیل باشد (Agathokleous et al., 2019).



شکل ۶- تغییرات در فعالیت آنزیم های کاتالاز (A) و آسکوربات پراکسیداز (B) سلول های *Dunaliella salina* تیمار شده با غلظت های مختلف نانوذرات نقره پس از ۴۸ ساعت. داده ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار سه اندازه گیری مستقل بیان شدند. حروف متفاوت نشان دهنده تغییرات معنی دار بین تیمارهای مختلف در سطح معنی داری $P < 0.05$ بر اساس آزمون دانکن هستند.

Figure 6- Changes in catalase, CAT (A) and ascorbate peroxidase, APX (B) activities of *Dunaliella salina* cells treated with different concentrations of AgNPs after 48 h. Values are the mean $\pm$ SD of three independent experiments. Different letters indicate statistically significant changes at $P < 0.05$ with Duncan's test.

کاهش در میزان قند کل در هر دو غلظت ۱۵ و ۲۵ پیکومولار نانوذرات مشاهده شد (شکل ۵-C). نسبت قندهای احیاکننده به غیر احیاکننده در غلظت های ۵ و ۲۵ پیکومولار نانوذرات به شدت کاهش نشان داد، اما در تیمار ۱۵ پیکومولار افزایش چشمگیری نسبت به کنترل نشان داد (شکل ۵-D).

افزایش این نسبت تنها در غلظت ۱۵ پیکومولار نانوذره بیانگر کاهش بیشتر قندهای غیر احیاکننده در پاسخ به تیمار نانوذرات نقره نسبت به قندهای احیاکننده است. محتوای نشاسته در غلظت ۵ پیکومولار نانوذرات تغییر معناداری پیدا نکرد، اما در دوزهای بالاتر به شدت کاهش یافت و بیشترین کاهش در تیمار ۲۵ پیکومولار مشاهده شد (شکل ۵-E). افزایش میزان قندهای احیاکننده و غیر احیاکننده در غلظت پائین نانوذرات نقره نشان دهنده تأثیر این نانوذرات در متابولیسم قندها است. این تأثیر مثبت در سلول های *D. salina* تیمار شده با نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره برگ *Momordica charantia* نیز گزارش شده است (Bahador et al., 2019). با وجود این، کاهش تجمع قندهای محلول و نشاسته در مقادیر بالای نانوذرات نقره می تواند نشان دهنده تغییر در تسهیم کربن و استراتژی متابولیسم قندها در سلول تحت تأثیر نانوذرات نقره باشد. تغییر در تسهیم کربن در سلول های *Dunaliella* تحت تأثیر نانوذرات نقره (Bahador et al., 2019)، نانوذرات اکسید مس (Bamary et al., 2025) و سایر تنش ها (Mirshakari et al., 2019; Bamary & Einali, 2022) قبلاً گزارش شده است.

تغییرات در فعالیت های آنزیمی:

فعالیت آنزیم های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در سلول های جلبکی تیمار شده توسط نانوذرات نقره در مقایسه با کنترل به شدت کاهش نشان داد، به طوری که این کاهش در غلظت ۵ پیکومولار نانوذره به ویژه برای آنزیم آسکوربات پراکسیداز شدیدتر بود (شکل ۶). علت احتمالی در این مورد، حساسیت این آنزیم ها به ویژه آنزیم

پروتئین‌های محلول سلول‌های جلبکی تحت تأثیر نانو ذرات نقره نیز نشان دهنده این مطلب است. همچنین نتایج مقایسه پاسخ‌های بیوشیمیایی و متابولیکی سلول‌های جلبک *Dunaliella salina* به نانو ذرات نقره سنتز شده با دو گیاه خربزه تلخ (Bahador et al., 2019) *Momordica charantia* و بابونه آلمانی *Matricaria comomilla* در (جدول ۱) نشان داده شده است.

کاهش فعالیت‌های آنزیمی در سلول‌های جلبکی تحت تأثیر نانو ذرات نقره می‌تواند به علت تخریب پروتئین‌های آنزیمی کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز تحت تأثیر آنزیم‌های پروتئازی و همچنین تغییر در باز چرخ پروتئین و کاهش بیوسنتز پروتئین‌ها نسبت به تجزیه آنها باشد. مشابه این کاهش فعالیت آنزیمی، در گیاهچه‌های گوجه فرنگی تیمار شده با نانو ذرات نقره تحت شرایط *in vitro* مشاهده شده است (Razavizadeh, 2019). همچنین کاهش میزان

جدول ۱- مقایسه پاسخ‌های بیوشیمیایی و متابولیکی سلول‌های جلبک *Dunaliella salina* به نانو ذرات نقره سنتز شده با دو گیاه خربزه تلخ (Bahador et al., 2019) *Momordica charantia* و بابونه آلمانی *Matricaria comomilla* (پژوهش حاضر).

Table 1- Comparison of biochemical and metabolic responses of *Dunaliella salina* algae cells to silver nanoparticles synthesized with two plants, bitter melon, *Momordica charantia* (Bahador et al., 2019) and German chamomile, *Matricaria comomilla* (present study).

فاکتورهای مورد مقایسه	پاسخ سلول‌های جلبک به نانو ذرات نقره سنتز شده با <i>Momordica charantia</i> گیاه (Bahador et al., 2019)	پاسخ سلول‌های جلبک به نانو ذرات نقره سنتز شده با <i>Matricaria comomilla</i> گیاه (پژوهش حاضر)
تعداد سلول	کاهش	کاهش
وزن تر	افزایش	افزایش
کلروفیل‌ها	افزایش	کاهش
بتاکاروتن	افزایش	کاهش
قندهای محلول	افزایش	کاهش
نشاسته	افزایش	کاهش
پروتئین کل	افزایش	کاهش
پروتئین محلول	افزایش	کاهش
آمینواسیدهای آزاد	افزایش	کاهش
فعالیت آنزیمی	افزایش	کاهش

جمع بندی

واسطه تغییر در تسهیم کربن القا می‌شود. به این ترتیب، به نظر می‌رسد که سازوکار تحمل جلبک به نانو ذرات نقره با تغییرات متابولیکی همراه بوده و توسط هدایت جریان کربن به مسیرهای احتمالی دیگر مثل سنتز گلیسرول یا لیپید سبب القای تحمل جلبک به نانو ذرات می‌شود. علاوه بر این، مقایسه نتایج حاضر با پژوهش‌های قبلی نشان می‌دهد که نوع سنتز و ویژگی‌های نانو ذرات نقره می‌تواند نقش مهمی را در نوع پاسخ سلول‌های جلبکی ایفا نماید.

نتایج حاصل از این پژوهش نشان دادند تیمار نانو ذرات نقره سبب کاهش تعداد سلول، رنگیزه‌های فتوسنتزی، فعالیت‌های آنزیمی و میزان متابولیت‌ها شامل قندهای محلول، نشاسته، پروتئین‌ها و آمینواسیدهای آزاد می‌شود، اما در عین حال وزن تر سلول‌های جلبکی افزایش می‌یابد. این امر نشان می‌دهد که تحمل تنش ناشی از نانو ذرات نقره در سلول‌های جلبکی نه تنها توسط فعالیت‌های آنزیمی یا تجمع بتاکاروتن، بلکه احتمالاً به

algae and plants. *Environment International*, 131, 105044.

<https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105044>

References

Agathokleous, E., Feng, Z., Iavicoli, I., & Calabrese, E. J. (2019). The two faces of nanomaterials: A quantification of hormesis in

- Aigbe, U. O., & Osibote, O. A. (2024). Green synthesis of metal oxide nanoparticles, and their various applications. *Journal of Hazardous Materials Advances*, 13, 100401. <https://doi.org/10.1016/j.hazadv.2024.100401>
- Aminzai, M. T., Yildirim, M., & Yabalak, E. (2024). Metallic nanoparticles unveiled: Synthesis, characterization, and their environmental, medicinal, and agricultural applications. *Talanta*, 280, 126790. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2024.126790>
- Arnon, D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24(1), 1-15. <https://doi.org/10.1104/pp.24.1.1>
- Avron, M., & Ben-Amotz, A. (1992). *Dunaliella: Physiology, Biochemistry, and Biotechnology*. CRC Press,
- Azizian-Shermeh, O., Einali, A., & Ghasemi, A. (2017). Rapid biologically one-step synthesis of stable bioactive silver nanoparticles using Osage orange (*Maclura pomifera*) leaf extract and their antimicrobial activities. *Advanced Powder Technology*, 28(12), 3164-3171. <https://doi.org/10.1016/j.apt.2017.10.001>
- Bahador, E., Einali, A., Azizian-Shermeh, O., & Sangtarash, M. H. (2019). Metabolic responses of the green microalga *Dunaliella salina* to silver nanoparticles-induced oxidative stress in the presence of salicylic acid treatment. *Aquatic Toxicology*, 217, 105356. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105356>
- Bamary, S., Einali, A., & Azizian-Shermeh, O. (2025). Oxidative stress tolerance induced by copper oxide nanoparticles in the green microalga *Dunaliella bardawil* is independent of β -carotene accumulation and osmoprotectant metabolites. *Aquaculture*, 605, 742426. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2025.742426>
- Bamary, Z., & Einali, A. (2022). Changes in carbon partitioning and pattern of antioxidant enzyme activity induced by arginine treatment in the green microalga *Dunaliella salina* under long-term salinity. *Microbial Ecology*, 84(1), 198-212. <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01843-3>
- Bandyopadhyay, S., Plascencia-Villa, G., Mukherjee, A., Rico, C. M., José-Yacamán, M., Peralta-Videa, J. R., & Gardea-Torresdey, J. L. (2015). Comparative phytotoxicity of ZnO NPs, bulk ZnO, and ionic zinc onto the alfalfa plants symbiotically associated with *Sinorhizobium meliloti* in soil. *Science of the Total Environment*, 515, 60-69. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.02.014>
- Barbosa, M., Inácio, L. G., Afonso, C., & Maranhão, P. (2023). The microalga *Dunaliella* and its applications: a review. *Applied Phycology*, 4(1), 99-120. <https://doi.org/10.1080/26388081.2023.2222318>
- Ben-Amotz, A., & Avron, M. (1983). On the factors which determine massive β -carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiology*, 72(3), 593-597. <https://doi.org/10.1104/pp.72.3.593>
- Ben-Amotz, A., Katz, A., & Avron, M. (1982). Accumulation of β -carotene in halotolerant alga: purification and characterization of β -carotene-rich globules from *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology*, 18(4), 529-537. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1982.tb03225.x>
- Bhuvaneshwari, M., Iswarya, V., Archanaa, S., Madhu, G. M., Kumar, G. S., Nagarajan, R., Chandrasekaran, N., & Mukherjee, A. (2015). Cytotoxicity of ZnO NPs towards fresh water algae *Scenedesmus obliquus* at low exposure concentrations in UV-C, visible and dark conditions. *Aquatic Toxicology*, 162, 29-38. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.03.004>
- Borowitzka, M. A. (2013). *Dunaliella*: Biology, Production, and Markets. In A. Richmond & Q. Hu (Eds.), *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology* (pp.359-368). John Wiley and Sons. <https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch18>
- 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*, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Chen, G. X., & Asada, K. (1992). Inactivation of ascorbate peroxidase by thiols requires

- hydrogen peroxide. *Plant and Cell Physiology*, 33(2), 117-123.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078229>
- Einali, A. (2018). The induction of salt stress tolerance by propyl gallate treatment in green microalga *Dunaliella bardawil*, through enhancing ascorbate pool and antioxidant enzymes activity. *Protoplasma*, 255(2), 601-611. <https://doi.org/10.1007/s00709-017-1173-1>
- Einali, A. R., & Sadeghipour, H. R. (2007). Alleviation of dormancy in walnut kernels by moist chilling is independent from storage protein mobilization. *Tree Physiology*, 27(4), 519-525.
<https://doi.org/10.1093/treephys/27.4.519>
- Einali, A., & Shariati, M. (2015). Effects of propyl gallate on photosystem II efficiency in *Dunaliella bardawil* under high illumination as investigated by chlorophyll fluorescence measurements. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 27(1), 61-73. <https://doi.org/10.1007/s40626-014-0032-0>
- Farghaly, F. A., & Nafady, N. A. (2015). Green synthesis of silver nanoparticles using leaf extract of *Rosmarinus officinalis* and its effect on tomato and wheat plants. *Journal of Agricultural Science*, 7(11), 277-287.
<https://doi.org/10.5539/jas.v7n11p277>
- Fouad, A. S., & Hafez, R. M. (2018). The effects of silver ions and silver nanoparticles on cell division and expression of *cdc2* gene in *Allium cepa* root tips. *Biologia Plantarum*, 62(1), 166-172. <https://doi.org/10.1007/s10535-017-0750-7>
- García-Gómez, C., Parages, M. L., Jiménez, C., Palma, A., Mata, M. T., & Segovia, M. (2012). Cell survival after UV radiation stress in the unicellular chlorophyte *Dunaliella tertiolecta* is mediated by DNA repair and MAPK phosphorylation. *Journal of Experimental Botany*, 63(14), 5259-5274.
<https://doi.org/10.1093/jxb/ers179>
- Goswami, R. K., Agrawal, K., & Verma, P. (2022). Microalgae *Dunaliella* as biofuel feedstock and β -carotene production: An influential step towards environmental sustainability. *Energy Conversion and Management: X*, 13, 100154.
<https://doi.org/10.1016/j.ecmx.2021.100154>
- Haghjou, M. M., Colville, L., & Smirnoff, N. (2014). The induction of menadione stress tolerance in the marine microalga, *Dunaliella viridis*, through cold pretreatment and modulation of the ascorbate and glutathione pools. *Plant Physiology and Biochemistry*, 84, 96-104.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.09.003>
- Hajian, M. H., Ghorbanpour, M., Abtahi, F., & Hadian, J. (2022). Differential effects of biogenic and chemically synthesized silver-nanoparticles application on physiological traits, antioxidative status and californidine content in California poppy (*Eschscholzia californica* Cham). *Environmental Pollution*, 292, 118300.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118300>
- Hildebrandt, T. M. (2018). Synthesis versus degradation: directions of amino acid metabolism during *Arabidopsis* abiotic stress response. *Plant Molecular Biology*, 98(1-2), 121-135. <https://doi.org/10.1007/s11103-018-0767-0>
- Hildebrandt, T. M., Nesi, A. N., Araújo, W. L., & Braun, H. P. (2015). Amino acid catabolism in plants. *Molecular Plant*, 8(11), 1563-1579.
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.09.005>
- Hiner, A. N., Rodríguez-López, J. N., Arnao, M. B., Raven, E. L., García-Cánovas, F., & Acosta, M. (2000). Kinetic study of the inactivation of ascorbate peroxidase by hydrogen peroxide. *Biochemical Journal*, 348(2), 321-328.
<https://doi.org/10.1042/0264-6021:3480321>
- Huang, T., & Jander, G. (2017). Absciscic acid-regulated protein degradation causes osmotic stress-induced accumulation of branched-chain amino acids in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 246(4), 737-747.
<https://doi.org/10.1007/s00425-017-2727-3>
- Impellitteri, C. A., Tolaymat, T. M., & Scheckel, K. G. (2009). The speciation of silver nanoparticles in antimicrobial fabric before and after exposure to a hypochlorite/detergent solution. *Journal of Environmental Quality*, 38(4), 1528-1530.
<https://doi.org/10.2134/jeq2008.0368>
- Jahnke, L. S., & White, A. L. (2003). Long-term hyposaline and hypersaline stresses produce distinct antioxidant responses in the marine

- alga *Dunaliella tertiolecta*. *Journal of Plant Physiology*, 160(10), 1193-1202.
<https://doi.org/10.1078/0176-1617-01050>
- Jiménez, C., & Pick, U. (1993). Differential reactivity of β -carotene isomers from *Dunaliella bardawil* toward oxygen radicals. *Plant Physiology*, 101(2), 385-390.
<https://doi.org/10.1104/pp.101.2.385>
- Johari, S. A., Sarkheil, M., Tayemeh, M. B., & Veisi, S. (2018). Influence of salinity on the toxicity of silver nanoparticles (AgNPs) and silver nitrate (AgNO₃) in halophilic microalgae, *Dunaliella salina*. *Chemosphere*, 209, 156-162.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.102>
- Johnson, M. K., Johnson, E. J., MacElroy, R. D., Speer, H. L., & Bruff, B. S. (1968). Effects of salts on the halophilic alga *Dunaliella viridis*. *Journal of Bacteriology*, 95(4), 1461-1468.
<https://doi.org/10.1128/jb.95.4.1461-1468.1968>
- Khan, M., Khan, M. S. A., Borah, K. K., Goswami, Y., Hakeem, K. R., & Chakrabartty, I. (2021). The potential exposure and hazards of metal-based nanoparticles on plants and environment, with special emphasis on ZnO NPs, TiO₂ NPs, and AgNPs: a review. *Environmental Advances*, 6, 100128.
<https://doi.org/10.1016/j.envadv.2021.100128>
- Khedr, A. H. A., Abbas, M. A., Wahid, A. A. A., Quick, W. P., & Abogadallah, G. M. (2003). Proline induces the expression of salt stress responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancreaticum maritimum* L. to salt stress. *Journal of Experimental Botany*, 54(392), 2553-2562.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erg277>
- Kouvaris, P., Delimitis, A., Zaspalis, V., Papadopoulos, D., Tsipah, S. A., & Michailidis, N. (2012). Green synthesis and characterization of silver nanoparticles produced using *Arbutus unedo* leaf extract. *Materials Letters*, 76, 18-20.
<https://doi.org/10.1016/j.matlet.2012.02.025>
- Krishnaraj, C., Jagan, E. G., Ramachandran, R., Abirami, S. M., Mohan, N., & Kalaichelvan, P. T. (2012). Effect of biologically synthesized silver nanoparticles on *Bacopa monnieri* (Linn.) Wettst. plant growth metabolism. *Process Biochemistry*, 47(4), 651-658.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.01.006>
- Lalau, C. M., Mohedano, R. D., Schmidt, E. C., Bouzon, Z. L., Ouriques, L. C., dos Santos, R. W., da Costa, C. H., Vicentini, D. S., & Matias, W. G. (2015). Toxicological effects of copper oxide nanoparticles on the growth rate, photosynthetic pigment content, and cell morphology of the duckweed *Landoltia punctata*. *Protoplasma*, 252(1), 221.
<https://doi.org/10.1007/s00709-014-0677-4>
- Latif, H. H., Ghareib, M., & Tahon, M. A. (2017). Phytosynthesis of silver nanoparticles using leaf extracts from *Ocimum basilicum* and *Mangifera indica* and their effect on some biochemical attributes of *Triticum aestivum*. *Gesunde Pflanzen*, 69(1), 39-46.
<https://doi.org/10.1007/s10343-016-0385-2>
- Liu, X., Atwater, M., Wang, J., & Huo, Q. (2007). Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 58(1), 3-7.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.08.005>
- Lück, H. (1965). Catalase. In H.U. Bergmeyer (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis* (pp.885-894). Verlage Chemie.
- Ma, X., Geiser-Lee, J., Deng, Y., & Kolmakov, A. (2010). Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: phytotoxicity, uptake and accumulation. *Science of the Total Environment*, 408(16), 3053-3061.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.04.012>
- Markwell, M. A. K., Haas, S. M., Tolbert, N. E., & Bieber, L. L. (1981). Protein determination in membrane and lipoprotein samples: Manual and automated procedures. *Methods in Enzymology*, 72, 296-303.
[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(81\)72027-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(81)72027-6)
- McCready, R. M., Guggolz, J., Silveira, V., & Owens, H. S. (1950). Determination of starch and amylose in vegetables. *Analytical Chemistry*, 22(9), 1156-1158.
<https://doi.org/10.1021/ac60045a016>
- Miao, A. J., Luo, Z., Chen, C. S., Chin, W. C., Santschi, P. H., & Quigg, A. (2010). Intracellular uptake: a possible mechanism for

- silver engineered nanoparticle toxicity to a freshwater alga *Ochromonas danica*. *Plos One*, 5(12), e15196. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015196>
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Mirshekari, M., Einali, A., & Valizadeh, J. (2017). Physiological and biochemical responses of *Hibiscus sabdariffa* to drought stress in the presence of salicylic acid. *Journal of Plant Biological Sciences*, 9(2), 21-38. <https://doi.org/10.22108/IJPB.2017.100883.1002> [In Persian].
- Mirshekari, M., Einali, A., & Valizadeh, J. (2019). Metabolic changes and activity pattern of antioxidant enzymes induced by salicylic acid treatment in green microalga *Dunaliella salina* under nitrogen deficiency. *Journal of Applied Phycology*, 31(3), 1709-1719. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1715-8>
- Mishra, A., & Jha, B. (2011). Antioxidant response of the microalga *Dunaliella salina* under salt stress. *Botanica Marina*, 54, 195-199. <https://doi.org/10.1515/BOT.2011.037>
- Mishra, A., Mandoli, A., & Jha, B. (2008). Physiological characterization and stress-induced metabolic responses of *Dunaliella salina* isolated from salt pan. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(10), 1093-1101. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0396-6>
- Nghia, L. T., Tung, H. T., Huy, N. P., Luan, V. Q., & Nhut, D. T. (2017). The effects of silver nanoparticles on growth of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. cv." Jimba" in different cultural systems. *Vietnam Journal of Science and Technology*, 55(4), 503-514. <https://doi.org/10.15625/2525-2518/55/4/9322>
- Nguyen, M. K., Moon, J. Y., & Lee, Y. C. (2020). Microalgal ecotoxicity of nanoparticles: An updated review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 201, 110781. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110781>
- Nguyen, M. K., Moon, J. Y., Bui, V. K. H., Oh, Y. K., & Lee, Y. C. (2019). Recent advanced applications of nanomaterials in microalgae biorefinery. *Algal Research*, 41, 101522. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101522>
- Oukarroum, A., Bras, S., Perreault, F., & Popovic, R. (2012a). Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 78, 80-85. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.11.012>
- Oukarroum, A., Polchtchikov, S., Perreault, F., & Popovic, R. (2012b). Temperature influence on silver nanoparticles inhibitory effect on photosystem II photochemistry in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. *Environmental Science and Pollution Research*, 19(5), 1755-1762. <https://doi.org/10.1007/s11356-011-0681-6>
- Panjekobi, M., & Einali, A. (2021). Trehalose treatment alters carbon partitioning and reduces the accumulation of individual metabolites but does not affect salt tolerance in the green microalga *Dunaliella bardawil*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 27(10), 2333-2344. <https://doi.org/10.1007/s12298-021-01068-4>
- Panyala, N. R., Peña-Méndez, E. M., & Havel, J. (2008). Silver or silver nanoparticles: a hazardous threat to the environment and human health? *Journal of Applied Biomedicine*, 6(3), 117-129. <https://doi.org/10.32725/jab.2008.015>
- Rajasekharreddy, P., Usha Rani, P., & Sreedhar, B. (2010). Qualitative assessment of silver and gold nanoparticle synthesis in various plants: a photobiological approach. *Journal of Nanoparticle Research*, 12(5), 1711-1721. <https://doi.org/10.1007/s11051-009-9714-9>
- Rajput, P., Singh, A., Agrawal, S., Ghazaryan, K., Rajput, V.D., Movsesyan, H., Mandzhieva, S., Minkina, T., & Alexiou, A. (2024). Effects of environmental metal and metalloid pollutants on plants and human health: exploring nano-remediation approach. *Stress Biology*, 4(1), 27. <https://doi.org/10.1007/s44154-024-00155-0>
- Razavizadeh, R. (2019). The effect of silver nanoparticles on the antioxidant capacity and total soluble protein pattern in tomato seedlings under in vitro culture. *Journal of Applied Biology*, 32(3), 22-38.

<https://www.magiran.com/paper/2100388> [In Persian]

- Rehmat, S., Khera, R. A., Hanif, M. A., Ayub, M. A., & Zubair, M. (2020). *Chamomilla*. In *Medicinal Plants of South Asia* (pp. 101-112). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102659-5.00008-6>
- Sadak, M. S. (2019). Impact of silver nanoparticles on plant growth, some biochemical aspects, and yield of fenugreek plant (*Trigonella foenum-graecum*). *Bulletin of the National Research Centre*, 43(1), 1-6. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0180-3>
- Salama, H. M. (2012). Effects of silver nanoparticles in some crop plants, common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and corn (*Zea mays* L.). *International Research Journal of Biotechnology*, 3(10), 190-197. <https://B2n.ir/uh5728>
- Salguero, A., de la Morena, B., Vigar, J., Vega, J. M., Vilchez, C., & León, R. (2003). Carotenoids as protective response against oxidative damage in *Dunaliella bardawil*. *Biomolecular Engineering*, 20(4-6), 249-253. [https://doi.org/10.1016/S1389-0344\(03\)00047-9](https://doi.org/10.1016/S1389-0344(03)00047-9)
- Schoen, M. (1988). Cell counting. In C. S. Lobban, D. J. Champan & B. P. Kermer (Eds.), *Experimental phycology: a laboratory manual* (pp.16-22). Cambridge University Press.
- Shaish, A., Avron, M., Pick, U., & Ben-Amotz, A. (1993). Are active oxygen species involved in induction of β -carotene in *Dunaliella bardawil*? *Planta*, 190(3), 363-368. <https://doi.org/10.1007/BF00196613>
- Shariati, M., & Lilley, R. M. (1994). Loss of intracellular glycerol from *Dunaliella* by electroporation at constant osmotic pressure: subsequent restoration of glycerol content and associated volume changes. *Plant, Cell and Environment*, 17(12), 1295-1304. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1994.tb02019.x>
- Sharma, P., Bhatt, D., Zaidi, M. G. H., Saradhi, P. P., Khanna, P. K., & Arora, S. (2012). Silver nanoparticle-mediated enhancement in growth and antioxidant status of *Brassica juncea*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167(8), 2225-2233. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9759-8>
- Srinivasan, L. V., & Rana, S. S. (2024). A critical review of various synthesis methods of nanoparticles and their applications in biomedical, regenerative medicine, food packaging, and environment. *Discover Applied Sciences*, 6(7), 371. <https://doi.org/10.1007/s44352-024-00168-8>
- Stone, S. L., & Gifford, D. J. (1997). Structural and biochemical changes in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) seeds during germination and early-seedling growth. I. Storage protein reserves. *International Journal of Plant Sciences*, 158(6), 727-737. <https://doi.org/10.1086/297487>
- Syu, Y. Y., Hung, J. H., Chen, J. C., & Chuang, H. W. (2014). Impacts of size and shape of silver nanoparticles on *Arabidopsis* plant growth and gene expression. *Plant Physiology and Biochemistry*, 83, 57-64. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.07.010>
- van Handel, E. (1968). Direct microdetermination of sucrose. *Analytical Biochemistry*, 22(2), 280-283. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(68\)90317-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(68)90317-5)
- Vargas-Estrada, L., Torres-Arellano, S., Longoria, A., Arias, D. M., Okoye, P. U., & Sebastian, P. J. (2020). Role of nanoparticles on microalgal cultivation: A review. *Fuel*, 280, 118598. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.118598>
- Wang, F., Zhou, L., Mu, D., Zhang, H., Zhang, G., Huang, X., & Xiong, P. (2024). Current research on ecotoxicity of metal-based nanoparticles: from exposure pathways, ecotoxicological effects to toxicity mechanisms. *Frontiers in Public Health*, 12, 1390099. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2024.1390099>
- Wang, L., Sun, J., Lin, L., Fu, Y., Alenius, H., Lindsey, K., & Chen, C. (2020). Silver nanoparticles regulate *Arabidopsis* root growth by concentration-dependent modification of reactive oxygen species accumulation and cell division. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 190, 110072. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.110072>
- Wang, S., Lv, J., Ma, J., & Zhang, S. (2016). Cellular internalization and intracellular

- biotransformation of silver nanoparticles in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nanotoxicology*, 10, 1129-1135.
<https://doi.org/10.1080/17435390.2016.1179809>
- Wang, X. P., Li, Q. Q., Pei, Z. M., & Wang, S. C. (2018). Effects of zinc oxide nanoparticles on the growth, photosynthetic traits, and antioxidative enzymes in tomato plants. *Biologia Plantarum*, 62(4), 801-808.
<https://doi.org/10.1007/s10535-018-0813-4>
- Xiong, J. Q., Cui, P., Ru, S., Kurade, M. B., Patil, S. M., Yadav, K. K., ... & Jeon, B. H. (2022). A comprehensive review on the effects of engineered nanoparticles on microalgal treatment of pollutants from wastewater. *Journal of Cleaner Production*, 344, 131121.
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.131121>
- Xu, Q. S., Hu, J. Z., Xie, K. B., Yang, H. Y., Du, K. H., & Shi, G. X. (2010). Accumulation and acute toxicity of silver in *Potamogeton crispus* L. *Journal of Hazardous Materials*, 173(1-3), 186-193.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.08.067>
- Yemm, E. W., Cocking, E. C., & Ricketts, R. E. (1955). The determination of amino-acids with ninhydrin. *Analyst*, 80(948), 209-214.
<https://doi.org/10.1039/AN9558000209>
- Yin, L., Cheng, Y., Espinasse, B., Colman, B.P., Auffan, M., Wiesner, M., Rose, J., Liu, J., & Bernhardt, E. S. (2011). More than the ions: the effects of silver nanoparticles on *Lolium multiflorum*. *Environmental Science and Technology*, 45(6), 2360-2367.
<https://doi.org/10.1021/es103301t>
- Yuan, X., Gao, X., Liu, C., Liang, W., Xue, H., Li, Z., & Jin, H. (2023). Application of nanomaterials in the production of biomolecules in microalgae: a review. *Marine Drugs*, 21(11), 594.
<https://doi.org/10.3390/md21110594>
- Zou, X., Li, P., Huang, Q., & Zhang, H. (2016). The different response mechanisms of *Wolffia globosa*: Light-induced silver nanoparticle toxicity. *Aquatic Toxicology*, 176, 97-105.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.04.006>
- Zou, X., Li, P., Lou, J., & Zhang, H. (2017). Surface coating-modulated toxic responses to silver nanoparticles in *Wolffia globosa*. *Aquatic Toxicology*, 189, 150-158.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.06.009>