

ẢNH HƯỞNG CỦA KÍCH THƯỚC HẠT NANO ĐỒNG ĐẾN SỰ SINH TRƯỞNG CỦA VI KHUẨN LAM *MICROCYSTIS AERUGINOSA*

Nguyễn Trung Kiên¹, Trần Thị Thu Hương^{1,2,3}, Nguyễn Hoài Châu^{1,3}, Đặng Đình Kim^{1,3}, Dương Thị Thủy^{1,3,✉}

¹Viện Công nghệ môi trường, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Trường Đại học Mỏ - Địa chất

³Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: duongthuy0712@yahoo.com

Ngày nhận bài: 16.6.2017

Ngày nhận đăng: 25.12.2017

TÓM TẮT

Vi khuẩn lam độc và độc tố của chúng thường gây ra những vấn đề môi trường nghiêm trọng ảnh hưởng tới hệ sinh thái tại các thủy vực nước ngọt. Sử dụng vật liệu nano trong kiểm soát bùng phát vi tảo đang là hướng đi mới có tiềm năng ứng dụng thực tế do khả năng kháng khuẩn cũng như các đặc tính lý-hóa của vật liệu. Kích thước vật liệu là một trong những yếu tố quyết định đến sự khác biệt của các hạt nano so với dạng thông thường. Tuy nhiên, các nghiên cứu về ảnh hưởng của kích thước tới độc tính của vật liệu nano còn ít được biết đến. Nghiên cứu này có mục tiêu đánh giá ảnh hưởng của ba kích thước hạt nano đồng khác nhau ($d \leq 10$ nm; $30 \text{ nm} \leq d \leq 40$ nm và ≥ 50 nm) đối với vi khuẩn lam độc *Microcystis aeruginosa*. Vật liệu nano đồng được chế tạo bằng phương pháp khử hóa học và được phủ bằng chitosan để làm tăng tính bền của vật liệu trong môi trường nước. Dải nồng độ nano đồng sử dụng trong nghiên cứu bao gồm 0 (đối chứng); 0,01ppm; 0,05ppm; 0,1ppm; 1ppm và 5 ppm. Sau 10 ngày thí nghiệm, sự ức chế sinh trưởng *Microcystis aeruginosa* chủ yếu xảy ra ở các nồng độ 1 ppm và 5 ppm và không có sự khác biệt ở cả ba kích thước với hiệu suất ức chế đều đạt trên 80% so với mẫu đối chứng. Kích thước hạt $30 \text{ nm} \leq d \leq 40$ nm thể hiện độc tính mạnh nhất đối với *Microcystis aeruginosa* với giá trị $EC_{50} = 0,73$ ppm; thấp hơn hai kích thước $d \geq 50$ nm ($EC_{50} = 2,62$ ppm) và $d \leq 10$ nm ($EC_{50} = 5,02$ ppm) tương ứng $3 \div 7$ lần tại cùng thời điểm.

Từ khóa: Vật liệu, độc tính, kích thước hạt nano, *Microcystis aeruginosa*, ức chế sinh trưởng

ĐẶT VẤN ĐỀ

Sự bùng phát vi tảo thường gây ra các tác động tiêu cực tới hệ sinh thái môi trường nước do ảnh hưởng trực tiếp tới cấu trúc và chức năng của chuỗi thức ăn trong thủy vực, làm suy giảm hàm lượng oxy hòa tan và chất lượng nguồn nước (Havens, 2008; Robarts *et al.*, 2005). Ngoài ra, một số loài vi tảo trong quá trình phát triển có khả năng sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp mang độc tính gây nguy hại cho sức khỏe con người và động vật thông qua sự phơi nhiễm cấp tính hoặc trường diễn (Codd, 1995; Wu *et al.*, 2012).

Chi vi khuẩn lam (VKL) độc *Microcystis* là nhóm sinh vật sinh trưởng nhanh, chiếm ưu thế trong quần xã thực vật phù du ở các thủy vực nước ngọt nhờ các cơ chế thích nghi đặc biệt với điều kiện ngoại cảnh (Đặng Đình Kim *et al.*, 2014). Độc tố

microcystin sản sinh bởi chi *Microcystis* thuộc nhóm hepatotoxin gây ra các tổn thương ở gan, tăng trọng lượng gan do xuất huyết máu và rối loạn nhịp tim ở động vật (Sinoven, 1996). Đây là dạng độc tố mạnh, tồn tại khá bền trong môi trường nước và được tổ chức Y tế thế giới (WHO) đưa vào danh mục các tác nhân gây bệnh cần phải được giám sát với hàm lượng tối đa cho phép trong nước uống không được vượt quá $1 \mu\text{L}$ (WHO, 1996).

Sử dụng các vật liệu nano kim loại để kiểm soát vi tảo đang là hướng đi mới có tiềm năng trong việc ứng dụng và thay thế các phương pháp truyền thống. Cơ chế gây độc chính của vật liệu nano nói chung liên quan đến sự hình thành các gốc ôxy hóa tự do ROS (Reactive Oxygen Species) (Kohen, Nyska, 2002) là nguyên nhân dẫn đến biến tính lipid, carbohydrate, protein và DNA (Carmona *et al.*, 2015). Trong đó, quá trình peroxide hóa lipid

được cho là có tác động nghiêm trọng nhất do trực tiếp gây ra những thay đổi trong tính chất lớp màng ngoài tế bào dẫn đến sự xáo trộn các chức năng thiết yếu bên trong của tế bào sinh vật (Rikans, Hornbrook, 1997).

Kích thước là một trong những yếu tố quan trọng quyết định khả năng xâm nhập qua màng tế bào của vật liệu nano cũng như tạo ra các đặc tính khác biệt của vật liệu so với dạng khối (Geiser *et al.*, 2005; Oberdörster *et al.*, 2005). Thông thường, theo cơ chế nhập bào, để được hấp thụ vật liệu nano cần phải liên kết đủ với các thụ thể và cơ quan thụ cảm bề mặt nhằm tạo ra sự giảm cục bộ mức năng lượng tự do Gibbs trên màng tế bào (Chithrani *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2008). Vì vậy, những hạt nano có kích thước nhỏ cần ít các thụ thể để liên kết hơn, do đó dễ dàng qua màng tế bào và tích tụ tại các bào quan nhiều hơn các vật liệu có kích thước lớn (Gao *et al.*, 2005). Tuy nhiên, trong nhiều trường hợp, các nghiên cứu độc học cho thấy kích thước không hoàn toàn tỉ lệ với độc tính của vật liệu. Kennedy và đtg. (2010) đã ghi nhận không có sự khác biệt giữa các liều lượng gây chết (LC_{50}) của *Daphnia magna* khi phơi nhiễm với vật liệu nano bạc ở các kích thước 10, 30 và 50nm. Nghiên cứu của Yang và đtg. (2012) cũng cho rằng các kích thước hạt nano bạc khác nhau hầu như không ảnh hưởng tới giun tròn *Caenorhabditis elegans*. Một số đánh giá độc tính của vật liệu nano trên người cho thấy, các hạt vật liệu có đường kính lớn hơn 200nm ít thể hiện độc tính hơn do khi vào cơ thể sẽ được xử lý bởi hệ thực bào đơn nhân (The mononuclear phagocyte system) ở lá lách và gan. Trong khi đó, những vật liệu có kích thước nhỏ hơn 6nm sẽ nhanh chóng bị loại bỏ khỏi cơ thể qua thận và chỉ có thể được giữ lại, gây độc khi chúng kết hợp với các dạng vật liệu khác để làm tăng kích thước như polymer, lipid hay hydrogel

(Choi *et al.*, 2007).

Nano đồng đã được nghiên cứu và áp dụng trong nhiều lĩnh vực hiện nay như công nghệ dệt may, chất xúc tác, bán dẫn, tế bào quang điện (Jiang *et al.*, 2002)... Đối với sinh vật, ngoài khả năng kháng khuẩn, độc tính của nano đồng đã được ghi nhận ở các loài giáp xác (Heinlaan *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2016), động vật nguyên sinh (Mortimer *et al.*, 2010), một số loài cá (Handy *et al.*, 2011) và vi tảo (Aruoja *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011). Bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của các kích thước hạt nano đồng khác nhau đến sinh trưởng của VKL độc *Microcystis aeruginosa*.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu nano đồng

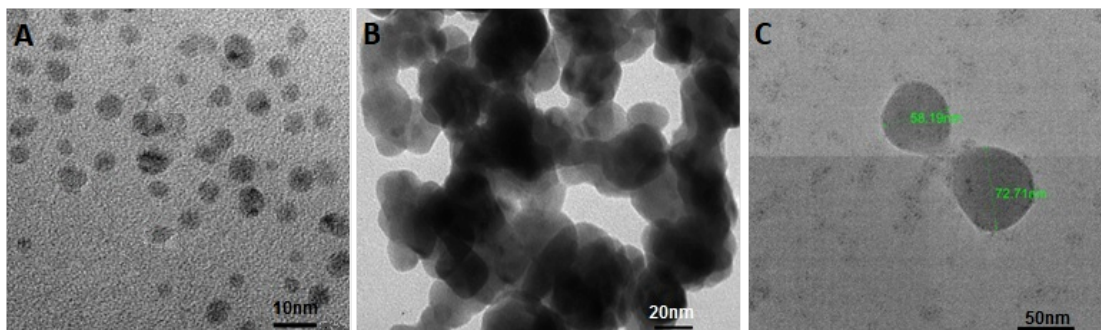
Nano đồng được tổng hợp bằng phương pháp khử hóa học và phủ bằng chitosan để tạo tính bền cho vật liệu, tiền chất được sử dụng là $CuSO_4$ (>99%) với chất khử $NaBH_4$ (>98%) trong môi trường nước (Ngo *et al.*, 2014). Quá trình điều chế dung dịch nano đồng được thực hiện tại Phòng Công nghệ thân môi trường, Viện Công nghệ môi trường, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (Hình 1).

Điều kiện chế tạo vật liệu nano đồng:

- $d \leq 10$ nm: Nồng độ Cu^0 tạo thành: 0,5 g/L; Tỷ lệ mol $NaBH_4$: $Cu^{2+} = 2,5:1$; Tốc độ khuấy: 2000 vòng/phút.

- $30 \text{ nm} \leq d \leq 40$ nm: Nồng độ Cu^0 tạo thành: 3,0 g/L; Tỷ lệ mol $NaBH_4$: $Cu^{2+} = 2:1$; Tốc độ khuấy: 1500 vòng/phút.

- $d \geq 50$ nm: Nồng độ Cu^0 tạo thành: 5,0 g/L; Tỷ lệ mol $NaBH_4$: $Cu^{2+} = 2:1$; Tốc độ khuấy: 500 vòng/phút.



Hình 1. Ảnh TEM vật liệu nano đồng được tổng hợp bằng phương pháp khử hóa học A: $d \leq 10$ nm; B: $30 \text{ nm} \leq d \leq 40$ nm; C: $d \geq 50$ nm.

Microcystis aeruginosa

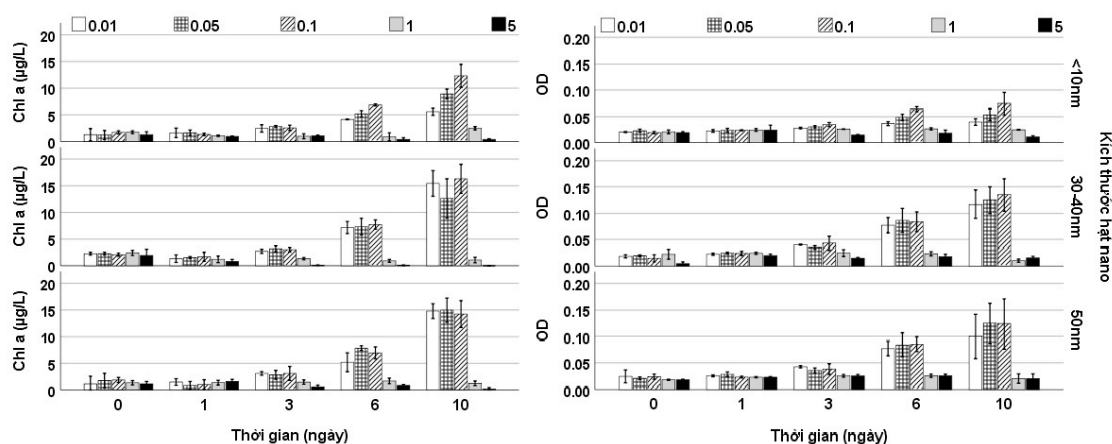
Chủng *Microcystis aeruginosa* dùng cho các thí nghiệm đánh giá độc tính được phân lập từ hồ Kẻ Gỗ và nuôi cấy trên môi trường CB tại nhiệt độ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ với cường độ chiếu sáng 1000 lux, chu kỳ 14 h sáng: 8h tối (Shirai *et al.*, 1989).

Bố trí thí nghiệm

Vật liệu nano đồng với các kích thước ≤ 10 nm; $30\text{nm} \div 40$ nm và ≥ 50 nm được bổ sung vào các bình nuôi chứa sinh khối *M. aeruginosa* để tạo thành các nồng độ 0; 0,01 ppm; 0,05 ppm; 0,1 ppm; 1 ppm và 5 ppm. Dung dịch CuSO_4 được sử dụng làm đối chứng so sánh hiệu quả diệt *M. aeruginosa* với nano đồng. Các công thức thí nghiệm được lặp lại 3 lần và

tiến hành trong điều kiện nuôi cấy tiêu chuẩn (Shirai *et al.*, 1989). Động thái sinh trưởng của chủng *M. aeruginosa* được theo dõi ở các ngày 0, 1, 3, 6 và 10 của thí nghiệm. Sinh trưởng của chủng *M. aeruginosa* được đánh giá qua qua mật độ quang học (OD) ở bước sóng 680 nm sử dụng máy đo quang phổ UV-VIS (Shimadzu) (Wetherell, 1961) và hàm lượng chlorophyll a (Chla) (Lorezen, 1967).

Dữ liệu được phân tích bằng phần mềm SPSS 23. So sánh sự khác biệt giữa 3 kích thước hạt và các công thức thí nghiệm sử dụng phân tích phương sai ANOVA (one-way) và kiểm định student t-test với ý nghĩa thống kê được chấp nhận ở mức $p < 0,05$. Ước tính giá trị EC_{50} của nano đồng đối với *M. aeruginosa* bằng phương pháp Probit (Finney, 1971).



Hình 2. Biến động hàm lượng Chlorophyll a (A) và mật độ quang (B) của chủng *M. aeruginosa* theo thời gian dưới tác động của các kích thước hạt khác nhau.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của các kích thước hạt vật liệu nano đồng (Cu) đến vi khuẩn lam *Microcystis aeruginosa*

Biến động hàm lượng Chla và mật độ quang dưới tác động của các kích thước hạt khác nhau có xu hướng phụ thuộc chủ yếu vào nồng độ nano đồng trong dung dịch (Hình 2). Cụ thể ở cả ba kích thước hạt, khả năng ức chế mạnh nhất được ghi nhận ở các nồng độ 1 ppm và 5 ppm với mật độ quang tăng không đáng kể $13 \div 18\%$ (nồng độ 1ppm) hoặc giảm hơn nhiều lần so với ban đầu $-42\% \div -66\%$ (nồng độ 5 ppm). Tương ứng, hàm lượng Chla của hai nồng độ này cũng thấp hơn so với các công thức còn lại. Trong đó, nồng độ 5ppm thể hiện khả năng ức chế

mạnh nhất với hàm lượng Chla giảm trung bình khoảng 68% so với công thức không sử dụng vật liệu. Đối với nồng độ 1 ppm hiệu quả ức chế VKL *M. aeruginosa* có xu hướng phụ thuộc vào các kích thước hạt nano đồng thí nghiệm. Biểu hiện ở kích thước hạt $d \leq 10$ nm sự phát triển của *M. aeruginosa* hầu như không có hiện tượng bị ảnh hưởng với hàm lượng Chla cao hơn khoảng 20% so đối chứng. Trong khi đó, các kích thước lớn ($30 \text{ nm} \leq d \leq 40\text{nm}$ và $d \geq 50\text{nm}$) sự ức chế thể hiện rõ khi hàm lượng Chla giảm tương ứng khoảng $17 \div 55\%$.

Ở các nồng độ thấp hơn (0,01 ppm, 0,05 ppm và 0,1 ppm) sự ảnh hưởng là tương đối khác nhau đối với ba kích thước hạt. Trong các thí nghiệm sử dụng vật liệu nano Cu kích thước lớn ($30 \text{ nm} \div 40 \text{ nm}$ và $\geq 50 \text{ nm}$), mật độ quang và hàm lượng Chla đo được tăng

dần theo thời gian với các giá trị đo được khi kết thúc thí nghiệm tương ứng tăng khoảng 5÷6 lần so với ban đầu và cao hơn 20% ÷ 30% lần so với đối chứng. Trong khi đó, kích thước hạt ≤ 10 nm mặc dù có cùng xu hướng với hai kích thước trên. Tuy nhiên, khả năng ức chế *M. aeruginosa* được thể hiện rõ hơn khi các giá trị OD và Chla thấp đối chứng không sử dụng kim loại khoảng 15% tại cùng thời điểm.

Kiểm định student t-test cho thấy không có sự khác biệt về mật độ thống kê giữa hai giá trị OD và Chla ($p > 0,05$). Đồng thời, phân tích tương quan Correlations cho hệ số Pearson khá cao (0,906) phản ánh mối quan hệ chặt chẽ của hai thông số này đối với sự biến thiên mật độ sinh khối *M. aeruginosa* trong thí nghiệm. Phân tích phương sai một nhân tố one-way ANOVA thể hiện có sự khác biệt về hiệu quả ức chế *M. aeruginosa* của các kích thước hạt nano Cu khác nhau cũng như đối với các nồng độ thí nghiệm trong cùng một kích thước hạt ($p < 0,05$). Ngoài ra, đánh giá hậu kiểm Post Hoc sử dụng hàm Tukey và Dunnett's T3 mô tả các khác biệt chủ yếu tập chung vào nhóm kích thước hạt có nồng độ thấp (0,01; 0,05 và 0,1), cho thấy ở hai nồng độ 1 ppm và 5 ppm sự ảnh hưởng của kích thước hạt tới hiệu quả ức chế VKL *M. aeruginosa* là không đáng kể.

Ước tính nồng độ ức chế sinh trưởng của VKL *M. aeruginosa* của các kích thước hạt nano đồng

Kết quả ước tính nồng độ hiệu quả trung bình (Effective concentration 50%, hay EC₅₀) trong Bảng 1 thể hiện xu hướng độc tính của vật liệu nano đồng đối với *M. aeruginosa* ít bị phụ thuộc bởi kích thước hạt. Trong đó, vật liệu có kích thước 30 nm ÷ 40 nm thể hiện độc tính khá mạnh với các giá trị EC₅₀ đều thấp hơn từ 4 ÷ 8 lần so với hai kích thước còn lại. Đáng chú ý là vật liệu ≤ 10 nm có độc tính thấp nhất, liều lượng ức chế 50% ghi nhận được sau 3 và 10 ngày tương ứng đạt 7,9 mg/L và 5,02 mg/L. Điều này có thể được giải thích bởi tính co cụm của vật liệu nano khi tồn tại ở kích thước nhỏ làm giảm tỉ lệ giữa thể tích và diện tích bề mặt dẫn tới hạn chế khả năng giải phóng ion Cu²⁺, do đó hạn chế độc tính của vật liệu (Matzke *et al.*, 2014). Ngoài ra, lớp phủ chitosan cũng có thể là nguyên nhân cản trở sự giải phóng ion Cu²⁺, biểu hiện qua giá trị EC₅₀ sau 3 ngày trong nghiên cứu này thấp hơn so với nghiên cứu của Wang *et al.*, (2011) sử dụng nano CuO không phủ đối với *M. aeruginosa* ở cùng kích thước < 10 nm (EC₅₀ = 1,42 mg/L). Sự giảm độc tính khi phủ vật liệu cũng được Matzke *et al.*, (2014) ghi nhận ở vi khuẩn *Pseudomonas putida* giữa vật liệu nano bạc 20 nm có phủ citrate (EC₅₀ = 13,4 mg/L) và không phủ (EC₅₀ = 0,25 mg/L).

Bảng 1. Ước tính nồng độ ức chế sinh trưởng của các kích thước hạt nano đồng và dung dịch CuSO₄ đối với *Microcystis aeruginosa*.

Thời gian (ngày)	d ≤ 10 nm		30 nm ≤ d ≤ 40 nm		d ≥ 50 nm		CuSO ₄	
	3	10	3	10	3	10	3	10
EC ₁	0,67	1,84	0,11	0,01	0,10	0,19	0,00	0,00
EC ₁₀	2,03	2,89	0,38	0,08	0,46	0,61	0,02	0,00
EC ₂₀	3,23	3,49	0,62	0,17	0,88	1,01	0,06	0,02
EC ₃₀	4,53	4,00	0,90	0,30	1,42	1,44	0,14	0,05
EC ₄₀	6,04	4,50	1,23	0,47	2,14	1,96	0,31	0,11
EC ₅₀	7,90	5,02	1,64	0,73	3,13	2,62	0,65	0,25
EC ₆₀	10,33	5,59	2,20	1,14	4,57	3,50	1,35	0,55
EC ₇₀	13,77	6,29	3,00	1,81	6,87	4,76	2,95	1,28
EC ₈₀	19,28	7,21	4,33	3,14	11,07	6,83	7,37	3,48
EC ₉₀	30,75	8,72	7,18	6,72	21,42	11,26	26,24	13,81
EC ₉₉	93,15	13,68	23,90	40,91	102,89	36,94	53,634	36,577

Tuy nhiên, so với một số loài vi tảo có lợi, độc tính của nano đồng đối với *M. aeruginosa* là khá cao nhưng hầu như không có sự ức chế tảo lục *Chlorella vulgaris* (Saranya *et al.*, 2017). Trong khi nồng độ gây ức chế 50% mật độ vi tảo *Chlorella pyrenoidosa*

sau 72h của dung dịch nano CuO là 45,7 mg/L (Zhao *et al.*, 2016). Nguyên nhân *M. aeruginosa* nhạy cảm cao với độc tính của vật liệu nano chủ yếu liên quan đến màng tế bào được cấu tạo bởi lớp peptidoglycan mỏng (2-6 nm), đặc trưng của các vi khuẩn Gram

âm. Trong khi các loài tảo lục khác có lớp peptidoglycan dày (20-40 nm) và thành tế bào cấu tạo bởi polysaccharide khiến cho các hạt nano khó thâm nhập hơn (Park *et al.*, 2010).

Kết quả bảng 1 cũng cho thấy dung dịch CuSO₄ ức chế *M. aeruginosa* hiệu quả hơn các thí nghiệm sử dụng vật liệu nano với giá trị EC₅₀ = 0,65 mg/L sau 3 ngày và 0,25 mg/L sau 10 ngày. Zeng và cộng sự (2010) cho rằng trong nhóm thực vật phù du, *M. aeruginosa* là loài có tính nhạy cảm cao với CuSO₄. Ngoài ra, thực tế cho thấy, độc tính của dung dịch CuSO₄ không chỉ thể hiện qua việc giải phóng ion Cu²⁺ gây ra hiện tượng stress oxy hóa. Sự hiện diện của CuSO₄ trong môi trường có khả năng ảnh hưởng tới quá trình trao đổi chất (Mela *et al.*, 2013), khả năng tổng hợp chất béo (Fokina *et al.*, 2013) chức năng miễn dịch và ức chế hoạt động của các emzym đặc biệt là emzyme Na⁺/K⁺-ATPase của tế bào (Shaw, Handy, 2011).

KẾT LUẬN

Các kích thước hạt nano đồng thí nghiệm ($d \leq 10$ nm; $30 \text{ nm} \leq d \leq 40 \text{ nm}$ và $\geq 50 \text{ nm}$) đều thể hiện độc tính đối với VKL *M. aeruginosa*. Trong đó, kích thước 30nm ÷ 40 nm có độc tính mạnh hơn hai kích thước còn lại với liều lượng ức chế 50% sau 10 ngày thấp hơn tương ứng từ 3,5 ÷ 6,8 lần. Tuy nhiên, hiệu quả ức chế *M. aeruginosa* có xu hướng phụ thuộc chủ yếu vào nồng độ nano đồng trong dung dịch cũng như độc tính của vật liệu nano đồng thấp hơn nhiều lần so với CuSO₄ cho thấy cần tiếp tục các nghiên cứu tiếp theo nhằm phát triển tạo ra vật liệu nano có khả năng ức chế cao đối với sự bùng phát vì tảo nói chung và chi VKL độc *M. aeruginosa* nói riêng, đồng thời ít gây ảnh hưởng tới hệ sinh thái hơn các phương pháp truyền thống.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được hoàn thành trong khuôn khổ đề tài VAST0701/15-16. Tập thể tác giả chân thành cảm ơn Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tài trợ kinh phí thực hiện.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Aruoja V, Dubourguier HC, Kasemets K, Kahru A (2009) Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Sci Total Environ*. 407(4): 1461-1468.

Carmona ER, Inostroza-Blancheteau C, Obando V, Rubio L, Marcos R (2015) Genotoxicity of copper oxide

nanoparticles in *Drosophila melanogaster*. *Mut Res - Genet Toxicol Environ Mut* 791: 1-11.

Chithrani BD, Ghazani AA, Chan WC (2006) Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett* 6(4): 662-668

Choi HS, Liu W, Misra P, Tanaka E, Zimmer JP, Ipe BI, Bawendy MG, Frangioni JV (2007) Renal clearance of quantum dots. *Nat Biotechnol* 25:1165-70

Codd GA (1995) Cyanobacterial Toxins: Occurrence, Properties and Biological Significance. *Water Sci Technol* 32(4): 149-156.

Đặng Đình Kim, Dương Thị Thủy, Nguyễn Thị Thu Liên, Đào Thanh Sơn, Lê Thị Phương Quỳnh, Đỗ Hồng Lan Chi (2014) Vi khuẩn lam độc nước ngọt. *NXB Khoa học Tự nhiên và Công nghệ*. Hà Nội.

S Saranya, K Vijayarana, S Pavithra, N Raihana, K Kumanan (2017) In vitro cytotoxicity of zinc oxide, iron oxide and copper nanopowders prepared by green synthesis. *Toxicol Rep* 24(4): 427-430

Fokina NN, Ruokolainen TR, Nemova NN, Bakhmet IN (2013) Changes of blue mussels *Mytilus edulis* L. lipid composition under cadmium and copper toxic effect. *Biol Trace Element Res* 154(2): 217-225.

Gao H, Shi W, Freund LB (2005) Mechanics of receptor-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(27): 9469-9474

Geiser M, Rothen-Rutishauser B, Kapp N, Schürch S, Kreyling W, Schulz H, Semmler M, Im-Hof V, Heyder J, Gehr P (2005) Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ Health Persp* 113(11): 1555-1560.

Handy RD, Al-Bairuty G, Al-Jubory A, Ramsden CS, Boyle D, Shaw BJ, Henry TB (2011) Effects of manufactured nanomaterials on fishes: a target organ and body systems physiology approach. *J Fish Biol* 79: 821-853.

Havens KE (2008) Cyanobacterial blooms: effects on aquatic ecosystems. *Advances in Exper Med Biol* 619: 733-747

Heinlaan M, Ivask A, Blinova I, Dubourguier HC, Kahru A (2008) Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere* 71(7): 1308-1316.

Jiang W, Kim BY, Rutka JT, Chan WC (2008). Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nat Nanotechnol* 3:145-150

Jiang X, Herricks T, Xia Y (2002) CuO nanowires can be synthesized by heating copper substrates in air. *Nano Lett* 2(12): 1333-1338.

- Kohen R, Nyska A (2002) Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* 30(6): 620–650.
- Lorenzen CJ (1967) Determination of Chlorophyll and Pheopigments: Spectrophotometric Equations. *Limnol Oceanogr* 12: 343–346.
- Matzke M, Jurkschat K, Backhaus T (2014) Toxicity of differently sized and coated silver nanoparticles to the bacterium *Pseudomonas putida*: risks for the aquatic environment? *Ecotoxicology* 23(5): 818–829.
- Mela M, Guiloski IC, Doria HB, Rabitto IS, da Silva CA, Maraschi AC, Prodócimo V, Freire CA, Randi MA, Ribeiro CA, de Assis HC (2013) Risks of waterborne copper exposure to a cultivated freshwater Neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). *Ecotoxicol Environ Safety* 88: 108–116.
- Mortimer M, Kasemets K, Kahru A (2010) Toxicity of ZnO and CuO nanoparticles to ciliated protozoa *Tetrahymena thermophila*. *Toxicology* 269(2-3): 182–189.
- Ngo QB, Dao TH, Nguyen HC, Tran XT, Nguyen TV, Khuu TD, Huynh TH (2014) Effects of nanocrystalline powders (Fe, Co and Cu) on the germination, growth, crop yield and product quality of soybean (Vietnamese species DT-51). *Adv Nat Sci: Nanosci Nanotechnol* 5(1): 1-7.
- Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J (2005) Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Persp* 113(7): 823–839.
- Park MH, Kim KH, Lee HH, Kim JS, Hwang SJ (2010) Selective inhibitory potential of silver nanoparticles on the harmful cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Biotechnol Lett* 32(3): 423–428
- Rikans LE, Hornbrook KR (1997) Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochim Biophys Acta* 1362 (2-3): 116–127.
- Roberts RD, Waiser MJ, Arts MT, Evans MS (2005) Seasonal and diel changes of dissolved oxygen in a hypertrophic prairie lake. *Lake Reserv: Res Manag* 10(3): 167–177.
- Shaw BJ, Handy RD (2011) Physiological effects of nanoparticles on fish: a comparison of nanometals versus metal ions. *Environ Int* 37(6): 1083–1097.
- Shirai M, Matumaru K, Ohtake A, Takamura Y, Aida T, Nakano M (1989) Development of a solid medium for growth and isolation of *Axenic microcystis* strains (Cyanobacteria). *Appl Environ Microbiol* 55(10): 2569–2571.
- Sinoven K (1996) Cyanobacteria toxins and toxin product. *Phycologia* 35(6): 12–24
- Song L, Vijver MG, De-Snoo GR, Peijnenburg WJ (2016) Assessing toxicity of copper nanoparticles across five cladoceran species. *Environ Toxicol Chem* 34(8): 1863–1869.
- Wang ZY, Li J, Zhao J, Xing BS (2011) Toxicity and Internalization of CuO Nanoparticles to Prokaryotic Alga *Microcystis Aeruginosa* as Affected by Dissolved Organic Matter. *Environ Sci Technol* 45(14): 6032–6040.
- Wetherell DF (1961) Culture of fresh water algae in enriched natural seawater. *Plant Physiol (Copenh)* 14: 1–6.
- WHO (1996) *Guidelines for drinking-water quality-Second edition*, Addendum to Volume 2 Health criteria and other supported information, World Health Organisation, Geneva.
- Wu X, Jiang J, Wan Y, Giesy JP, Hu J (2012) Cyanobacteria Produce Teratogenic Retinoic Acids. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(24): 9477–9482.
- Zeng J1, Yang L, Wang WX (2010) High sensitivity of cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to copper and the prediction of copper toxicity. *Environ Toxicol Chem* 29(10): 2260–2268
- Zhao J, Cao X, Liu X, Wang Z, Zhang C, White JC, Xing B (2016) Interactions of CuO nanoparticles with the algae *Chlorella pyrenoidosa*: Adhesion, uptake and toxicity. *Nanotoxicology* 10(9): 1297–1305.

SIZE EFFECT OF COPPER NANOPARTICLES ON *MICROCYSTIS AERUGINOSA*

Nguyễn Trung Kiên¹, Trần Thị Thu Hương^{1,2,3}, Nguyễn Hoài Châu^{1,3}, Đặng Đình Kim^{1,3}, Dương Thị Thủy^{1,3}

¹Institute of Environmental Technology, Vietnam Academy of Science and Technology

²Faculty of Environment, Hanoi University of Mining and Geology

³Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Cyanobacterial and toxins produced in cyanobacterial water blooms cause serious environmental problems which effects on freshwater ecosystems. The use of nanomaterials to control algal blooms is a new potential

way for practical application due to its antibacterial as well as distinct physicochemical properties of nanomaterials. The particle size is one of the most determinant characteristics creating the different between nanomaterials and their larger bulk counterparts. However, size-dependent toxicity of nanoparticles has remained largely unknown. This study aimed to evaluate effect of three different nanoparticle sizes ($d \leq 10$ nm; $30 \text{ nm} \leq d \leq 40$ nm and $d \geq 50$ nm) on toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*. The copper nanoparticles were synthesized by electrochemical method and coated with chitosan to enhance the stability of materials in the water environment. The copper nanoparticle concentrations selected for toxic test were range from 0 (control); 0,01ppm; 0,05ppm; 0,1 ppm; 1ppm and 5 ppm. After ten days of experiment, the growth of *M. aeruginosa* was mainly affected at concentrations of 1 ppm and 5 ppm and there are no differences in inhibition between the particle sizes with efficiency of more than 80% in comparison to control. The highest toxicity of copper nanoparticles in *M. aeruginosa* was observed at particle size of $30 \text{ nm} \leq d \leq 40$ nm with $EC_{50} = 0,73$ ppm, which was respectively three to seven times less than the particle sizes of $d \geq 50$ nm ($EC_{50} = 2,62$ ppm) and $d \leq 10$ nm ($EC_{50} = 5,02$ ppm) at the same time.

Keywords: *Growth inhibition, material, Microcystis aeruginosa, nanoparticle size, toxicity*