



اثرات نانو TiO_2 و توده Ti بر روی رشد و محتوای کلروفیل a ریز جلبک *Chaetoceros muelleri*

مائه بهارلوییان^۱، ابوالفضل ناجی^{۱*}، مرتضی یوسف زادی^۲

^۱ گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریا، دانشگاه هرمزگان

^۲ گروه زیست دریا، دانشکده علوم و فنون دریا، دانشگاه هرمزگان

چکیده

نوع مقاله:

پژوهشی

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۹۶/۱۱/۰۳

اصلاح: ۹۶/۱۲/۲۳

پذیرش: ۹۷/۰۳/۰۳

کلمات کلیدی:

آلودگی

فیتوپلانکتون

کلروفیل a

نانوذره

TiO_2

افزایش استفاده از نانومواد منجر به ایجاد نگرانی‌هایی در مورد خطرات سلامتی موجودات و اثرات زیست‌محیطی آن‌ها شده است. بنابراین، توجه‌های زیادی به بررسی پارامترهای زیست‌محیطی که کیفیت تغذیه جلبک‌ها را تغییر می‌دهند، وجود دارند. در این تحقیق، مهار رشد در دو مرحله و محتوای کلروفیل a ریزجلبک *Chaetoceros muelleri* در روزهای سوم، ششم و نهم از در معرض قرارگیری ریزجلبک با نانوماده TiO_2 و توده Ti ، مورد بررسی قرار داده شد. نتایج نشان دادند که پس از ۲۴ ساعت، رشد جلبک‌هایی که در معرض ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوماده TiO_2 و توده Ti قرار گرفتند به ترتیب ۷۰ و ۵۰٪ مهار شد و کاهش محتوای کلروفیل نسبت به نمونه شاهد مشاهده شد. همچنین مشخص شد که روند کاهش کلروفیل در روز نهم بیشتر از ششم و در روز ششم بیشتر از روز سوم بوده است. علاوه بر این مشخص شد میزان سمیت نانو TiO_2 در مقایسه با توده Ti به مقدار بیشتری است. بنابراین، مطالعات بیشتری در زمینه بررسی اثرات سمیت نانوماده TiO_2 و توده Ti بر روی موجودات در زنجیره غذایی و انتقال این مواد در طول زنجیره و نهایتاً، تحت تأثیر قرار دادن سلامت انسان و محیط‌زیست، پیشنهاد می‌گردد.

مقدمه

نانوذرات، ذراتی با ابعاد بین ۱ و ۱۰۰ نانومتر می‌باشند که بیشتر با توجه به قطرشان طبقه‌بندی می‌شوند (Klaine et al., 2008). خواص متفاوت نانوذرات که مربوط به اندازه آن‌ها است به طور قابل توجهی آن‌ها را از ذرات ریز یا مواد فله (توده) و یونی خود متمایز می‌کند. در نتیجه واکنش‌پذیری بیشتری نسبت به مواد توده یا سایر اشکال خود دارند. بنابراین، انتظار می‌رود که نانوذرات اثرات بیولوژیکی متفاوتی نسبت به ترکیبات اولیه یا دیگر ترکیبات خود داشته باشند. خواص سطحی و اندازه بسیار کوچک نانوذرات و نانولوله‌ها، سطوحی را فراهم می‌کنند که ممکن است آلاینده‌های شیمیایی سمی به آن‌ها متصل و از طریق آن‌ها حمل شوند و احتمال سمی بودن آن‌ها با تولید رادیکال‌های واکنش‌پذیر ممکن می‌گردد (Farré et al., 2009). همچنین هنگامی که اندازه ذرات کاهش می‌یابد، تمایل به افزایش سمیت در آن‌ها به وجود می‌آید، حتی اگر همان مواد در شکل فله و یا دیگر حالت‌ها و ساختارها بی‌اثر باشند (Farré et al., 2009). در طول سال‌های اخیر مطالعات مختلف

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: Abolfazlnaji@gmail.com

انجام شده نشان می‌دهد که نانومواد می‌توانند رفتارهای بیولوژیکی سطح سلول، درون سلول و سطح پروتئین‌ها را تحت تأثیر قرار دهند (Oberdörster *et al.*, 2005). در میان نانومواد، نانوذرات اکسید بیشتر مورد استفاده هستند و با توجه به اثرات بالقوه زیست‌محیطی‌شان، در زمینه‌های پزشکی، نوری، الکترونیکی و غیره بسیار مورد توجه می‌باشند (Taylor *et al.*, 2013; Taylor *et al.*, 2012). نانوذرات اکسید اگرچه خواص مفیدی دارند اما اثرات زیستی و زیست‌محیطی آن‌ها موجب نگرانی‌های زیادی شده است. بنابراین، توجه بسیاری را در زمینه اثرات نانوذرات بر روی موجودات آبی به خود معطوف کرده‌اند (Hund-*et al.*, 2008; Rinke and Simon, 2006; Zhu *et al.*, 2008). از سوی دیگر، مطالعات مختلف دیگری، مهار رشد این نانوذرات را بر روی جلبک‌ها نشان داده‌اند (Navarro *et al.*, 2008). نحوه مهار رشد جلبکی به این صورت است که این نانوذرات با در بر گرفتن و پوشاندن سلول‌های جلبکی، باعث به دام افتادن سلول‌ها و مانع رسیدن نور کافی به آن‌ها می‌شود (Ji *et al.*, 2011). همچنین مطالعات محدودی در مورد اثرات مستقیم و غیرمستقیم نانوذرات بر روی جلبک‌ها وجود دارد (Pal *et al.*, 2007). اثرات غیرمستقیم نانوذرات، به طور عمده باعث ایجاد محدودیت‌های فیزیکی و یا انتشار یون‌های سمی و یا تولید گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن^۱ (ROS) می‌شوند. علاوه بر این، نانوذرات، خود ممکن است به عنوان حامل آلاینده عمل کنند؛ در نتیجه دستیابی زیستی دیگر مواد سمی را افزایش و یا کاهش می‌دهند. به عنوان مثال از محدودیت فیزیکی، تجمع نانوذرات در سطوح فتوسنتزی موجودات بوده که ممکن است فعالیت فتوسنتزی را به دلیل اثرات سایه^۲ و کاهش دسترسی^۳ به نور مختل کند (Chen and Elimelech, 2007). از سوی دیگر، موجودات ممکن است ترکیباتی را برای پاسخ به تغییر سمیت نانوذرات تولید کنند (Hussain *et al.*, 2005). آزمون مهار رشد جلبکی در ارزیابی ریسک آبی به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار گرفته است (Blinova, 2004). بنابراین، اثر سم‌شناسی نانوذرات می‌تواند بسته به انواع و اندازه ذرات، گونه‌های زیستی مورد آزمون و روش آزمون متفاوت باشد (Ji *et al.*, 2011). هرچند انتشار نانوذرات تولید شده به محیط‌های آبی عمدتاً ناشناخته است (Farré *et al.*, 2009) ولی انتظار می‌رود این محصولات عمدتاً از طریق فاضلاب شهری و صنعتی به سیستم‌های آبی تخلیه شوند (Keller *et al.*, 2013). رواناب‌ها و پساب‌های وارد شده به محیط آبی، می‌توانند باعث آلودگی محیط‌زیست دریایی شوند (Klaine *et al.*, 2008). از آنجایی که TiO_2 خاصیت فوتوکاتالیستی دارد، با ورود این نانوذره به آب علاوه بر آلودگی محیطی ممکن است باعث تخریب فوتوکاتالیستی مواد دیگر موجود در آب از جمله مواد نفتی شود که خود موجب تشدید یا تحریک آلودگی نفتی نیز می‌شود (Zioli and Jardim, 2002). البته، رادیکال‌های آزاد تولید شده توسط چنین تجزیه‌ای می‌تواند باعث آلودگی موجودات در میکروولایه‌های سطحی گردد (Klaine *et al.*, 2008). از این نظر، جلبک‌های دریایی که به شدت در اکوسیستم‌های ساحلی منتشر شده‌اند (Behrenfeld *et al.*, 2006) و به خصوص به آلاینده‌های مرتبط با منابع انسانی حساس هستند، می‌توانند به عنوان یک شاخص مناسب برای آلودگی آب‌های دریایی به وسیله نانوذرات در نظر گرفته شوند. بررسی اثرات نانوذرات بر فیتوپلانکتون‌های دریایی، در واقع یک گام ضروری برای پیش‌بینی تأثیر بالقوه آن‌ها بر روی شبکه‌های غذایی دریایی، ساحلی و اکوسیستم‌هایی که آن‌ها حمایت می‌کنند، به شمار می‌رود (Manzo *et al.*, 2015). در این مطالعه، هدف، بررسی اثرات سمیت نانو TiO_2 و توده Ti بر روی محیط‌زیست و تأثیر آن‌ها بر میکروارگانیسم‌ها و انتقال این مواد در طول زنجیره غذایی و آلوده شدن آن‌ها و در نهایت تأثیر بر روی سلامت انسان‌ها می‌باشد.

مواد و روش‌ها

پودرهای نانو TiO_2 (آناناز) و توده Ti با خلوص ۹۹٪ و اندازه ۲۲ نانومتر (شرکت پیشگامان نانومواد ایرانیان) تهیه شدند. بعد از اضافه کردن آب دیونیزه (DDW) و فراصوت دادن^۴ به مدت ۳۰ دقیقه و سپس ورتکس به منظور همگن کردن^۵، نمونه‌ها به محیط کشت جلبکی که از قبل تهیه شده بود اضافه شد. جلبک *Chaetoceros muelleri* تهیه شده از پژوهشکده ملی خلیج فارس با تراکم سلولی اولیه 10^4 سلول بر لیتر، در محیط کشت $f/2$ تحت نوردهی و هوادهی مداوم کشت داده شد. پس

¹ Reactive Oxygen Species

² Shading effects

³ Reducing light availability

⁴ Sonicate

⁵ Homogenization

از رسیدن سلول‌های جلبکی به فاز نهایی رشد، سوسپانسیون‌های نانو TiO_2 و توده Ti در غلظت‌های مختلف (۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) به محیط کشت‌ها اضافه و برای تعیین دوز کشندگی^۶، به مدت ۹۶ ساعت تحت بررسی قرار گرفت. تمامی آزمایش‌ها در ۳ تکرار انجام شد. پس از تعیین دوز کشندگی به‌وسیله مشاهده‌ی ۵۰٪ مرگ و میر برای نمونه‌های جلبکی در غلظت ۵۰ ppm برای هر دو ماده از طریق اندازه‌گیری میزان جذب نوری سلولی (OD)^۷ در ۹۶ ساعت، میزان رشد جلبکی در ۸ روز در مقایسه با نمونه شاهد (اندازه‌گیری OD) در غلظت مورد نظر بررسی شد. علاوه بر این محتوای کلروفیل a برای تمام نمونه‌ها (کنترل و تیمار) در روزهای سوم، ششم و نهم سنجیده شد. سنجش کلروفیل، پس از برداشتن مقدار مشخصی از نمونه و سانتریفیوژ کردن و استخراج با استون ۹۹٪ و نگهداری در محیط سرد و تاریک به مدت ۲۴ ساعت، در طول موج ۶۳۰ و ۶۶۴ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر انجام گرفت (Jeffrey and Humphrey, 1975).

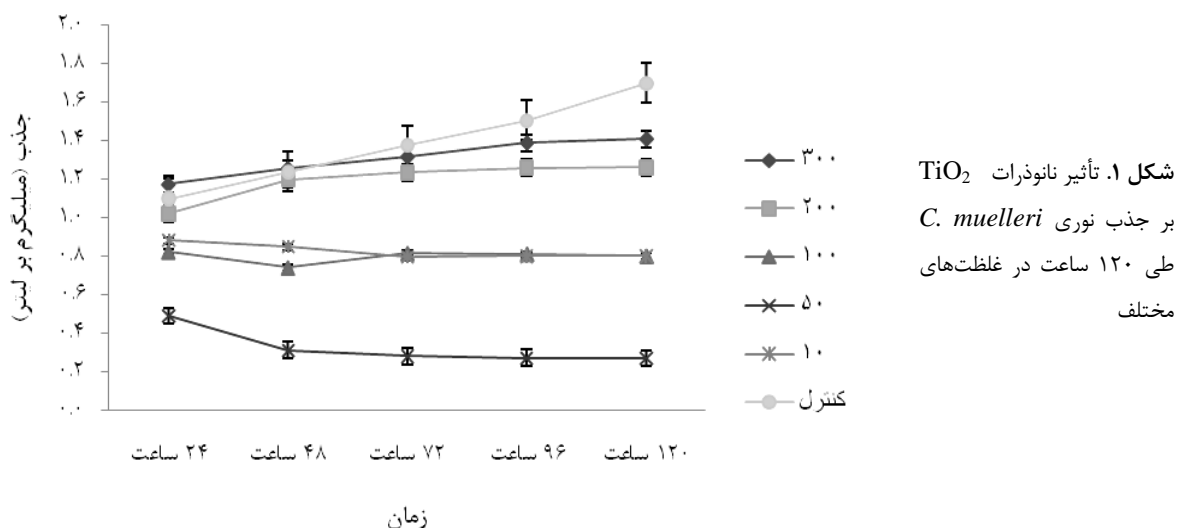
آنالیز آماری

به منظور آنالیز اطلاعات و محاسبه پارامترهای سمیت از نرم‌افزار جمع‌آوری اطلاعات Excel استفاده شد و پردازش آماری با کمک نرم‌افزار SPSS صورت گرفت. به دلیل مقایسه مشاهدات و آنالیز داده‌های چند پارامتر و تعیین معنی‌داری میان مقادیر اندازه گرفته شده از نمونه‌های مختلف جلبکی، از روش آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) استفاده شد. سطح معنی‌داری در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($\alpha=0.05$) در نظر گرفته شد.

نتایج

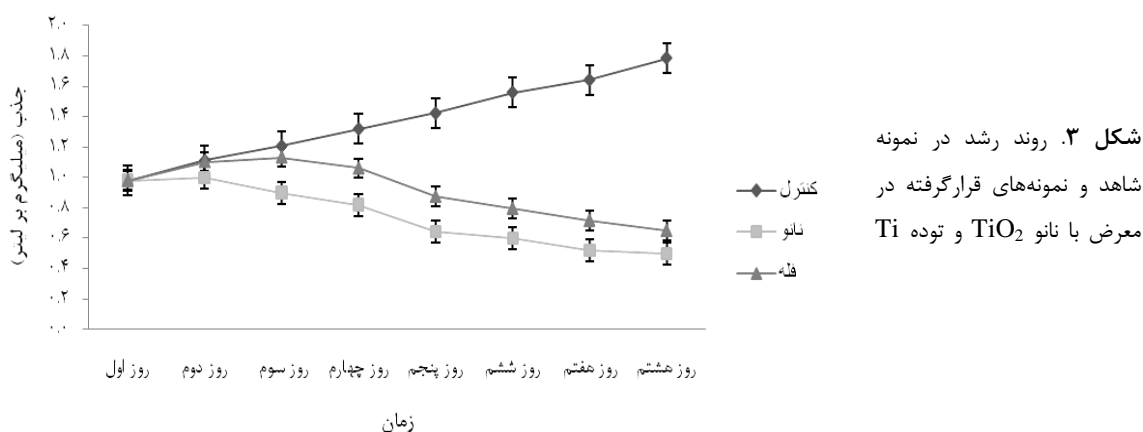
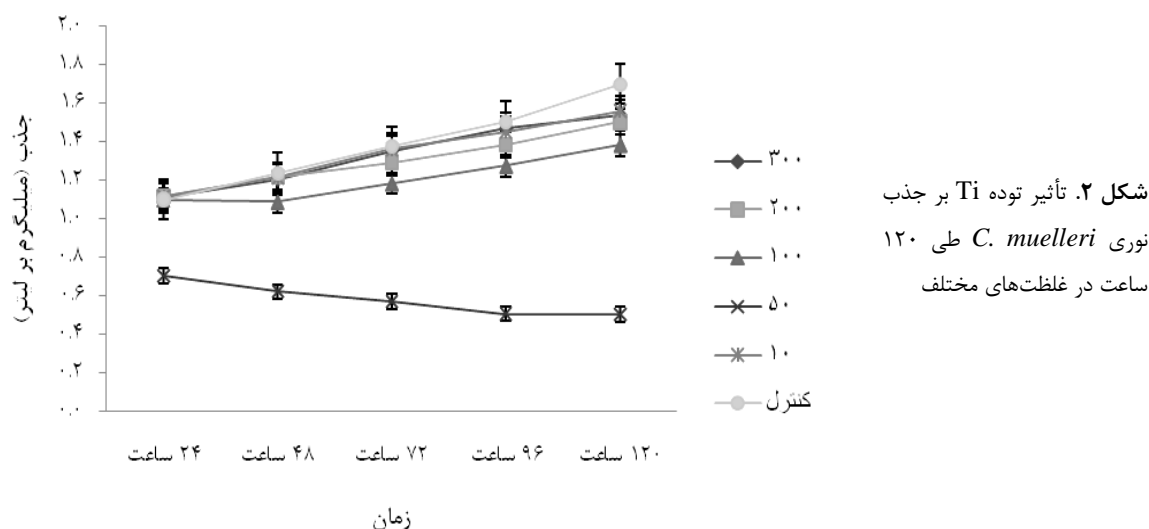
اثر نانو TiO_2 و توده Ti بر رشد جلبک

در مرحله اول بر اساس شکل ۱ بعد از ۲۴ ساعت برای نانو TiO_2 در غلظت ۵۰ میلی‌گرم و سپس در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم، میزان OD به ترتیب ۰/۴۸ و ۰/۸۲ میلی‌گرم بر لیتر به دست آمد و پس از آن یک روند کاهشی منظم (کاهش رشد جلبکی) برای نانو TiO_2 مشاهده شد. در نمونه شاهد روند افزایشی روزانه از ۱/۱ تا ۱/۷ میلی‌گرم بر لیتر در میزان OD مشاهده شد. در غلظت‌های دیگر هیچ نوع اثر کشندگی یا مهاری قابل توجهی مشاهده نشد. همچنین بر اساس شکل ۲ برای توده Ti در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر پس از ۲۴ ساعت میزان OD به ۰/۷۰ میلی‌گرم بر لیتر رسید. سپس یک روند کاهشی منظم برای توده Ti مشاهده شد. در غلظت‌های دیگر هم هیچ نوع اثر مهاری قابل توجهی مشاهده نشد.



^۶ Lethal concentration

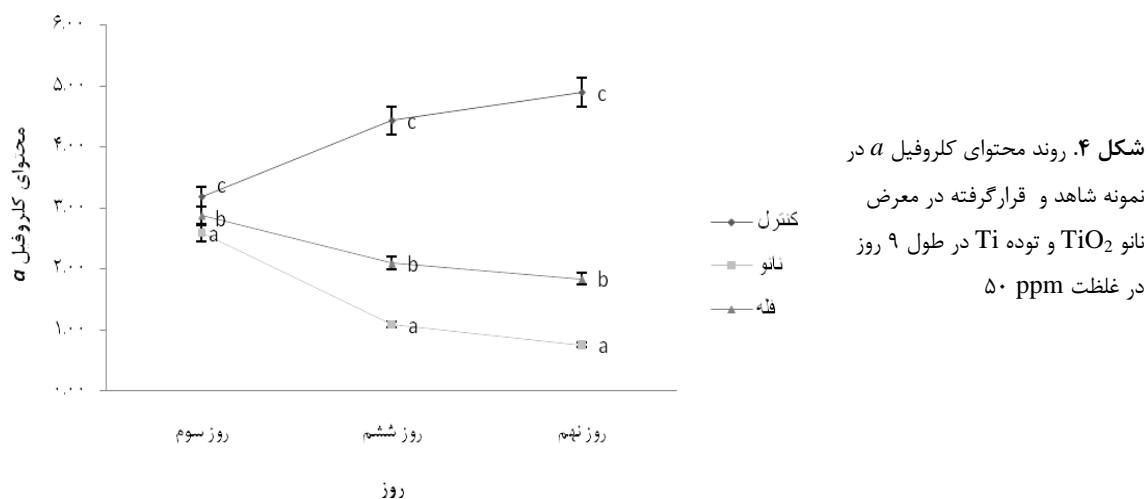
^۷ Optical Density



در مرحله دوم همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است، در نمونه میزان OD (جذب نوری) سلولی از $0/98$ میلی‌گرم بر لیتر در روز اول با یک روند افزایشی به $1/78$ میلی‌گرم بر لیتر در روز هشتم رسید. همچنین برای نمونه‌هایی که در معرض نانو TiO_2 قرار گرفتند، میزان OD از $0/98$ میلی‌گرم بر لیتر قبل از تیمار به $0/5$ میلی‌گرم بر لیتر در روز هشتم و برای نمونه‌هایی که در معرض توده Ti قرار گرفتند این پارامتر از $0/98$ میلی‌گرم بر لیتر در روز اول به $0/65$ میلی‌گرم بر لیتر در روز هشتم رسید. همچنین نتایج میزان OD ریزجلبک، یک روند افزایشی در روز دوم برای نانو TiO_2 و در روز دوم و سوم برای توده Ti را نشان داد. سپس یک روند کاهشی برای هر دو نمونه تا روز ششم و پس از آن یک روند ایستایی ثبت شد. روند OD ها در نمونه شاهد روز به روز افزایشی بود درحالی‌که نمونه‌هایی که در معرض نانو TiO_2 و توده Ti قرار گرفته بودند در روزهای اول با اختلاف کمتر از نمونه‌های شاهد و در روزهای بعد از آن با روند به شدت کاهشی برای هر دو ماده همراه بود. با این تفاوت که TiO_2 توده سمیت کمتری از نانو TiO_2 نشان داد و بنابراین میزان OD های بالاتری به نسبت TiO_2 داشته است.

اثر نانو TiO_2 و توده Ti بر روی کاهش کلروفیل a

محتوای کلروفیل برای تمامی تیمارها در مقایسه با نمونه‌ی شاهد به میزان کمتری در روزهای سوم، ششم و نهم بوده است همچنین روند کاهش در محتوای کلروفیل به ترتیب در روز نهم بیشتر از روز ششم و در روز ششم بیشتر از روز نهم بوده است. هر چند که محتوای کلروفیل برای نمونه‌هایی که در معرض با توده Ti قرار گرفتند دارای سمیت کمتری بودند (در شکل ۴ نشان داده شده است). نتایج حاکی از آن بود که بین محتوای کلروفیل a در میان تمام نمونه‌ها در روزهای مختلف، اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($\alpha=0.05$).



شکل ۴. روند محتوای کلروفیل *a* در نمونه شاهد و قرار گرفته در معرض نانو TiO_2 و توده Ti در طول ۹ روز در غلظت ۵۰ ppm

بحث

مه‌ار رشد جلبکی

همان‌طور که نتایج نشان دادند نانو و توده TiO_2 باعث کاهش رشد ریزجلبک نسبت به نمونه شاهد در بیشتر غلظت‌ها در مرحله اول و در مرحله دوم در غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر (Wang *et al.*, 2016) شدند، در حالی که در غلظت‌های بالاتر و پایین‌تر کاهش رشد قابل توجهی مشاهده نشد. دلیل اینکه در تحقیقات مختلف سمیت نسبتاً بالایی در غلظت‌های ۱۰۰ میلی‌گرم یا حتی کمتر از ۱۰ میلی‌گرم در گونه‌های آب شور و شیرین مشاهده شده؛ می‌تواند مربوط به تشکیل ذرات بزرگ‌تر در محیط کشت جلبکی باشد که از نفوذ ذرات به درون سلول‌ها جلوگیری می‌کنند و یا منجر به برخورد و ارتباط کمتر بین نانو و توده TiO_2 با سلول‌های جلبکی می‌شوند (Manzo *et al.*, 2015). بر اساس نتایج می‌توان مشاهده کرد که اولین مرحله از تأثیر سمیت، به دام انداختن سلول‌های جلبکی به وسیله ذرات بسیار بزرگ است (Manzo *et al.*, 2015). از طرفی نانوذرات TiO_2 خواص فیزیکوشیمیایی خاصی دارند که باعث تجمع در محیط‌های آبی می‌شوند. در بعد عملی، سطح نانوذرات TiO_2 معلق اغلب توسط سورفکتانت‌ها اصلاح می‌شود که می‌تواند انحلال ذرات را تقویت و اندازه ذرات را کنترل کند و باعث بهبود توزیع و پراکندگی یکنواخت آن در آب شود (Chen *et al.*, 2012; Shan *et al.*, 2006). اکثر محققان گمان می‌کنند جذب نانوذرات بر روی سطح سلول، می‌تواند تا حدودی به سمیت ناشی از نانوذرات کمک کند (Li *et al.*, 2015; Wei *et al.*, 2010; Xia *et al.*, 2015). بنابراین، جای تعجب نیست اگر سلول‌های جلبکی احاطه شده در نانو TiO_2 اثرات فیزیکی مستقیم، مانند آسیب دیواره سلولی (Lin *et al.*, 2012)، یا اثرات فیزیکی غیرمستقیم مانند کاهش دسترسی به نور (اثر سایه‌ای) را متحمل شوند (Arguoa *et al.*, 2011; Ji *et al.*, 2009). اگرچه نسبت بالای غلظت نانوذرات TiO_2 در سلول‌های جلبک ممکن است باعث سمیت شود ولی با افزایش زمان در معرض قرارگیری، تعداد سلول‌ها هم به مراتب افزایش می‌یابد در حالی که مقدار نانو TiO_2 ثابت باقی می‌ماند و افزایش پیدا نمی‌کند که منجر به کاهش نسبت غلظت نانوذرات TiO_2 در سلول‌های جلبک در روز پنجم در معرض قرارگیری می‌شود. این یافته ممکن است یکی از دلایل سمیت "کم" در ۵ روز با EC_{50} بالا باشد. این رابطه نسبت به سمیت نانوذرات هنوز مشخص نیست (Wang *et al.*, 2016).

محتوای کلروفیل *a*

نتایج حاضر، کاهش در محتوای کلروفیل *a* در روزهای مختلف در نمونه‌هایی که در معرض نانو TiO_2 و توده Ti قرار گرفتند را در مقایسه با نمونه شاهد نشان داد. این یافته هم ردیف و شبیه گزارشاتی بود که توسط محققین دیگر ارائه شده است (Gong *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2010). محتوای کلروفیل اغلب برای تخمین زیست‌توده جلبک‌ها و پاسخ آن‌ها به استرس‌های زیست‌محیطی استفاده می‌شود (Zhang *et al.*, 2011). با توجه به غلظت سلولی، محتوای رنگ‌دانه‌های

فتوسنتزی، شامل کلروفیل a شاخص مناسبی برای وضعیت رشد جلبک است (Li *et al.*, 2015). کاهش در محتوای کلروفیل a به دنبال در معرض قرار گرفتن با نانو TiO_2 دیده شد که ممکن است تا حدودی رخداد اثرات سایه را روشن کند و توضیح دهد (Wang *et al.*, 2016). نقش اثرات سایه در سمیت نانوذرات در میکروجلبکها مورد بحث است. همانطور که قبلا اشاره شد، بسیاری از محققین معتقدند که احاطه شدن سلولها توسط نانوذرات یا جذب نانوذرات منجر به کاهش دسترسی به نور برای سلولهای جلبکی و در نتیجه مهار رشد می شود (Aruoja *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2012; Gong *et al.*, 2011; Xia *et al.*, 2015). همچنین از آنجایی که سوسپانسیونهای نانوذرات، تیره رنگ و کدر هستند بنابراین می توانند باعث مهار رشد جلبک از طریق جذب نور شوند (Aruoja *et al.*, 2009). از آنجا که رشد و متابولیسم جلبکها برای عملکرد اکوسیستمها و ساختار شبکههای غذایی آبی اساسی و مهم است، بررسیها نشان می دهند نانو TiO_2 پتانسیل تغییرات مهم در ویژگیهای اکوسیستم و جوامع زیستی در زیستگاههای آب شیرین را دارد. حضور نانوذرات TiO_2 ، در بوم سازگان آب شیرین و شور به طور مداوم رشد گونههای جلبکی را مهار می کند (Cardinale *et al.*, 2012). علاوه بر مکانیسمهای سمی که در بالا ذکر شد، مواد مغذی مانند روی و فسفر در محیط کشت جلبکی توسط نانو TiO_2 جذب می شوند و لذا دسترسی این مواد مغذی را برای جلبک محدود و به مسمومیت کمک می کنند (Kuwabara *et al.*, 1986).

نتایج بالا نشان می دهد که هر دو فرم TiO_2 (نانو TiO_2 و توده Ti) باعث مهار رشد جلبکی (کاهش فتوسنتز و کلروفیل) می شوند که به دلیل به دام انداختن سلولهای جلبکی و در نتیجه، عدم دسترسی جلبک به نور و مواد مغذی کافی روی می دهد. اگرچه، میزان سمیت توده Ti کمتر از نانو TiO_2 بود. در نهایت، تحقیقات نشان دادند که شکل آنتاز TiO_2 دارای واکنش پذیری قابل توجهی است که موجب اثرات سمی سلولی شناخته شده ای نسبت به شکل های دیگر این نانوذره می شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از پژوهشکده ملی خلیج فارس هرمزگان که در تهیه استوک جلبکی ما را یاری کردند، قدردانی می نمایند.

منابع

- Aruoja, V., Dubourguier, H.C., Kasemets, K., Kahru, A. 2009. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO_2 to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. Science of the Total Environment. 407(4): 1461-1468.
- Behrenfeld, M.J., O'Malley, R.T., Siegel, D.A., McClain, C.R., Sarmiento, J.L., Feldman, G.C., Boss, E.S. 2006. Climate-driven trends in contemporary ocean productivity. Nature. 444(7120): 752-755.
- Blinova, I. 2004. Use of freshwater algae and duckweeds for phytotoxicity testing. Environmental Toxicology. 19(4): 425-428.
- Cardinale, B.J., Bier, R., Kwan, C. 2012. Effects of TiO_2 nanoparticles on the growth and metabolism of three species of freshwater algae. Journal of Nanoparticle Research. 14(8): 913-920.
- Chen, K.L., Elimelech, M. 2007. Influence of humic acid on the aggregation kinetics of fullerene (C60) nanoparticles in monovalent and divalent electrolyte solutions. Journal of Colloid and Interface Science. 309(1): 126-134.
- Chen, L., Zhou, L., Liu, Y., Deng, S., Wu, H., Wang, G. 2012. Toxicological effects of nanometer titaniumdioxide (nano- TiO_2) on *Chlamydomonas reinhardtii*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 84: 155-162.
- Farré, M., Gajda-Schranz, K., Kantiani, L., Barceló, D. 2009. Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 393(1): 81-95.
- 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. 83(4): 510-516.
- Hund-Rinke, K., Simon, M. 2006. Ecotoxic effect of photocatalytic active nanoparticles (TiO_2) on algae and daphnids. Environmental Science and Pollution Research. 13(4): 225-232.

- Hussain, S.M., Hess, K.L., Gearhart, J.M., Geiss, K.T., Schlager, J.J. 2005. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3 A rat liver cells. *Toxicology in Vitro*. 19(7): 975-983.
- Jeffrey, S.T., Humphrey, G.F. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemie and Physiologie der Pflanzen*. 167(2): 191-194.
- Ji, J., Long, Z., Lin, D. 2011. Toxicity of oxide nanoparticles to the green algae *Chlorella* sp. *Chemical Engineering Journal*. 170(2): 525-530.
- Keller, A.A., McFerran, S., Lazareva, A., Suh, S. 2013. Global life cycle releases of engineered nanomaterials. *Journal of Nanoparticle Research*. 15(6): 1-17
- Klaine, S.J., Alvarez, P.J., Batley, G.E., Fernandes, T.F., Handy, R.D., Lyon, D.Y., Lead, J.R. 2008. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 27(9): 1825-1851.
- Kuwabara, J.S., Davis, J.A., Chang, C.C. 1986. Algal growth response to particle-bound orthophosphate and zinc. *Limnology and Oceanography*. 31(3): 503-511.
- 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*. 158: 1-13.
- Lin, D., Ji, J., Long, Z., Yang, K., Wu, F. 2012. The influence of dissolved and surface-bound humic acid on the toxicity of TiO₂ nanoparticles to *Chlorella* sp. *Water Research*. 46(14): 4477-4487.
- Lin, D., Tian, X., Wu, F., Xing, B. 2010. Fate and transport of engineered nanomaterials in the environment. *Journal of Environmental Quality*. 39(6): 1896-1908.
- Manzo, S., Buono, S., Rametta, G., Miglietta, M., Schiavo, S., Di Francia, G. 2015. The diverse toxic effect of SiO₂ and TiO₂ nanoparticles toward the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta*. *Environmental Science and Pollution Research*. 22(20): 15941-15951.
- Navarro, E., Piccapietra, F., Wagner, B., Marconi, F., Kaegi, R., Odzak, N., Behra, R. 2008. Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Science and Technology*. 42(23): 8959-8964.
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., Oberdörster, J. 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives*. 113(7): 823-839.
- Pal, S., Tak, Y.K., Song, J.M. 2007. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(6): 1712-1720.
- Shan, F.J., Gao, J., Jia, W.D., Xu, Q.X., Xu, Z.C. 2006. Study on the dispersion of nanometer TiO₂ powder by Sol-Gel method. *Huaxue Gongcheng (Chemical Engineering)*. 33(1): 52-54.
- Taylor, R.A., Otanicar, T., Rosengarten, G. 2012. Nanofluid-based optical filter optimization for PV/T systems. *Light. Science and Applications*. 1(10): e34- e34.
- Taylor, R.A., Otanicar, T.P., Herukerrupu, Y., Bremond, F., Rosengarten, G., Hawkes, E.R., Coulombe, S. 2013. Feasibility of nanofluid-based optical filters. *Applied Optics*. 52(7): 1413-1422.
- Wang, Y., Zhu, X., Lao, Y., Lv, X., Tao, Y., Huang, B., Cai, Z. 2016. TiO₂ nanoparticles in the marine environment: physical effects responsible for the toxicity on algae *Phaeodactylum tricoratum*. *Science of the Total Environment*. 565: 818-826.
- Wei, L., Thakkar, M., Chen, Y., Ntim, S.A., Mitra, S., Zhang, X. 2010. Cytotoxicity effects of water dispersible oxidized multiwalled carbon nanotubes on marine alga, *Dunaliella tertiolecta*. *Aquatic Toxicology*. 100(2): 194-201.
- Xia, B., Chen, B., Sun, X., Qu, K., Ma, F., Du, M. 2015. Interaction of TiO₂ nanoparticles with the marine microalgae *Nitzschia closterium*: Growth inhibition, oxidative stress and internalization. *Science of the Total Environment*. 508: 525-533.
- Zhang, N., Jin, X.L., Li, X. 2011. Progress of toxic effects of artificial nano-material on alga. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*. 39(10): 6000-6003.
- Zhu, M.T., Feng, W.Y., Wang, B., Wang, T.C., Gu, Y.Q., Wang, M., Chai, Z.F. 2008. Comparative study of pulmonary responses to nano-and submicron-sized ferric oxide in rats. *Toxicology*. 247(2): 102-111.
- Zioli, R.L., Jardim, W.F. 2002. Photocatalytic decomposition of seawater-soluble crude-oil fractions using high surface area colloid nanoparticles of TiO₂. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 147(3): 205-212.