

## اثرات بازدارندگی نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم بر رشد جلبک‌های آب

شیرین

نازلی عابدینی<sup>۱</sup> و هومن رجبی اسلامی<sup>۲\*</sup>

۱- دانش آموخته تکثیر و پرورش آبزیان، گروه شیلات، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- استادیار گروه شیلات، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۵ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۲/۱)

### چکیده:

تاثیر نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم بر ۶ نمونه جلبک آب شیرین در این پژوهش مطالعه گردید. جلبک‌های آزمایشی پس از خالص‌سازی با روش‌های مولکولی شناسایی و برای ۰، ۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت تحت تاثیر غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۱، ۱ میلی‌گرم در لیتر نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم قرار گرفتند تا میزان کلروفیل *a* و پراکسیداسیون چربی آنها مشخص گردد. نتایج نشان داد که نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم دارای اثر بازدارندگی بر رشد جلبک‌های *Chlamydomonas moewusii*، *Chlamydomonas sp.*، *Chlorococcum oleofaciens* (strain 1)، *Scenedesmus obliquus* (strain 2) و *Chlorococcum oleofaciens* (strain 3) در تمام غلظت‌های آزمایشی پس از گذشت دست کم ۴۸ ساعت از شروع تماس داشته است و همچنین میزان پراکسیداسیون چربی آنها افزایش یافت. در مقابل میزان کلروفیل *a* جلبک کاهش پیدا کرد. یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که پاسخ گونه‌های مختلف به نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم متفاوت بوده که می‌تواند به تغییر غالبیت گونه‌ای در منابع آبی منجر شود.

**کلید واژگان:** نانوذره، جلبک آب شیرین، دی‌اکسید تیتانیوم، کلروفیل *a*، پراکسیداسیون چربی.

## ۱. مقدمه

حدود زیادی ناشناخته باقی مانده است ( Maynard et al., 2006; Nowack and Bucheli, 2007).

دی اکسید تیتانیوم ( $TiO_2$ ) از جمله ترکیباتی است که امروزه به صورت نانو در صنایع مختلف نظیر ساخت فتوکاتالیست‌ها، تصفیه آب و فاضلاب و تولید رنگدانه‌های صنعتی کاربرد وسیعی پیدا کرده است. گزارشات مختلفی از سمیت این ترکیب بر آبزیان ارائه شده است که بیانگر اثرات متفاوت نانودی اکسید تیتانیوم بر موجودات زنده مختلف است ( Lin et al., 2009; Heinlaan et al., 2008; Duan et al., 2010). Aruoja و همکاران (۲۰۰۹) برای مثال سمیت نانو ذرات  $ZnO$ ،  $CuO$  و  $TiO_2$  را روی میکرو جلبک *Pseudokirchneriella subcapitata* بررسی کرده و نشان دادند که نانو ذرات اکسید روی، اکسید مس و دی اکسید تیتانیوم به ترتیب بیشترین اثرات سمی را بر رشد این جلبک دارند. با این وجود یافته‌هایی نیز وجود دارند که نشان از اثرات متفاوت نانودی اکسید تیتانیوم دارند به طوری که گزارش شده نانودی اکسید تیتانیوم برای باکتری *Vibrio fischeri* و سخت پوست *Thamnocephalus platyurus* سمی نمی‌باشد (Heinlaan et al., 2008).

ریز جلبک‌ها یکی از اجزای اصلی محیط‌های آبی هستند که به عنوان منبع غذایی مورد استفاده ژئوپلانکتون‌ها، نرم تنان فیلترکننده و ماهیان قرار می‌گیرند. بیشتر این موجودات ساده میکروسکوپی دارای کلروفیل و اندامک‌های اولیه فتوسنتزکننده بوده و بیش از ۵۰ درصد اکسیژن مصرفی جهان را در چرخه غذایی آب‌های شیرین و دریاها به عنوان پایه و اساس هرم‌های غذایی تولید می‌نمایند ( Lee,

فناوری نانو در محدوده تحقیق و مطالعه ترکیباتی با ابعاد بین ۱ تا ۱۰۰ نانومتر (ترجیحاً ۲ تا ۵۰ نانومتر) قرار دارد. ساختارهای نانو با کمک این فناوری از خصوصیات میکروسکوپی متفاوتی برخوردار می‌گردند که از آن جمله می‌توان به افزایش نسبت سطح به حجم و همچنین تغییر ویژگی‌های کوانتومی آنها اشاره نمود ( Tanaka and Nishiyabu, 2008). نانو ذرات به دلیل اندازه خاص، ساختار کریستالینی و قابلیت فعالیت بالا از کاربرد وسیعی در صنایع مختلف برخوردار هستند ( Cao et al., 2012; Van Amerongen et al., 2005). امروزه اکسیدهای فلزی نانو ذرات در سطوح مختلف صنعتی تولید و به صورت گسترده‌ای به منظور بهبود کیفیت آب، مصارف پزشکی، تولید لوازم آرایشی و علوم مختلف مهندسی به کار می‌روند (USEPA, 2005).

طیف وسیعی از ذرات نانو در حال حاضر ساخته می‌شوند که از معمول‌ترین آنها می‌توان به اکسیدهای فلزی نظیر تیتانیوم، روی، آلومینیوم، آهن و همچنین سیلیکات اشاره نمود ( Bello and Isaacs, 2010). با توجه به کاربرد وسیع نانو اکسیدهای فلزی طی سالیان اخیر انتظار می‌رود که این ذرات به مسیر خود در محیط‌های آبی، مصب‌ها و اتمسفر ادامه دهند. اثرات سمی بسیاری از نانو مواد روی انسان‌ها و دیگر موجودات زنده مشاهده شده است (Wang et al., 2008). با این وجود شکل و عملکرد نانو ذرات در این محیط‌ها تا

مختلفی شامل استفاده از محیط کشت اختصاصی، رقیق‌سازی، کشت آگار و برداشت تک‌سلولی انجام گرفت (Andersen *et al.*, 1999). عملیات خالص‌سازی در هر یک از روش‌های رقیق‌سازی، برداشت تک‌سلولی و محیط کشت اختصاصی هر ۷ تا ۱۰ روز و روش خالص‌سازی توسط آگار هر ۱۵ تا ۲۰ روز یک بار تا جایی تکرار شد که خلوص ۱۰۰ درصد نمونه‌ها به دست آید. گونه‌های خالص در ادامه با کمک کلیدهای شناسایی از قبیل Steidinger و Walker (۱۹۸۳)، Verlenca و Desai (۲۰۰۴) و Saburova و همکاران (۲۰۱۲) زیر میکروسکوپ نوری در حد جنس شناسایی شدند. نمونه‌های خالص در ادامه برای استخراج DNA به منظور شناسایی در حد گونه مورد استفاده قرار گرفتند.

## ۲-۲. شناسایی مولکولی

استخراج DNA با تغییراتی در روش Zhou و همکاران (۱۹۹۶) انجام شد. ابتدا محلول‌های بافری استخراج طبق جدول ۱ تهیه شدند. غلظت DNA حاصله با استفاده از دستگاه نانودراپ مدل Thermofcientific 1000 اندازه‌گیری شد. سپس ۴ میکرولیتر از DNA نمونه در ژل آگارز ۱/۲ درصد همراه با یک نشانگر وزنی بارگذاری و در ولتاژ ۹۰ به مدت ۱ ساعت الکتروفورز گردید. آغازگرهای عمومی مورد استفاده از شرکت سیناژن جهت تکثیر ژن SrDNA۱۶ تهیه و به صورت لیوفلیزه در آب مقطر استریل حل شدند. آغازگرها در این شرایط دارای غلظتی برابر با ۱۰۰ پیکومول در میکرولیتر بوده که برای استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به نسبت ۱ به ۱۰ رقیق شدند.

۲۰۰۸). ریز جلبک‌ها همچنین کارخانه‌های سلولی وابسته به نوری هستند که دی‌اکسیدکربن را ضمن فتوسنتز به سوخت‌های زیستی و سایر ترکیبات ارزشمند تبدیل می‌نمایند (Amin, 2009). تحقیقات محدودی در رابطه با تاثیر نانوذرات بر گونه‌های جلبکی ایران انجام پذیرفته است (Mouivand and Falahi, 2011). پژوهش حاضر بر این اساس طراحی گردید تا اثر نانوذره تیتانیوم را بر رشد شش گونه از جلبک‌های بومی در منابع آب شیرین ایران بررسی نماید تا اثرات احتمالی افزایش کاربرد نانوذرات بر پایه زنجیره‌های غذایی در منابع آب شیرین بررسی گردد.

## ۲. مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری به منظور کشت و خالص‌سازی جلبک‌های مختلف از یکی از شاخه‌های فرعی رودخانه درکه، شمیران انجام گرفت. با توجه به نمونه‌های پلانکتونی موجود در آب از محیط کشت های عمومی BG-11 و زایندر و محیط کشت‌های اختصاصی JM و DM برای کشت جلبک‌ها در شرایط آزمایشگاهی استفاده شد. دمای انتخابی در این مطالعه برابر ۲۵ درجه سانتی‌گراد، شدت بهینه تابش نور برابر ۱۵۰۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه و طول دوره نوری در این تحقیق به صورت ۸:۱۶ ساعت روشنایی به تاریکی در نظر گرفته شد.

## ۲-۱. خالص‌سازی جلبک‌ها

خالص‌سازی جلبک‌ها با کمک روش‌های

جدول ۱. ترکیب بافر استخراج DNA

محلول‌های ذخیره	حجم برداشتی
1M Tris HCl pH 8.0	۱۰ میلی‌لیتر
4M NaCl	۳۵ میلی‌لیتر
0.5M EDTA	۴ میلی‌لیتر
CTAB	۲ گرم

سانتی‌گراد برای تکمیل طول قطعات تکثیر شده در واکنش صورت گرفت. کیفیت واکنش توسط تکنیک الکتروفورز تعیین شد. جهت انجام الکتروفورز ابتدا بافر TBE شامل ۱/۶ گرم Tris base، ۷۲/۲ گرم اسید بوریک، ۰/۹۳ گرم EDTA و ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر آماده و به نسبت ۱ به ۲ با آگارز مخلوط و در سینی مخصوص تانک الکتروفورز ریخته شد. محصول به دست آمده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز جهت توالی‌یابی به شرکت Source Bioscience فرستاده و طبق روش Sanger و همکاران (۱۹۷۴) توالی‌یابی گردید.

دستگاه ترموسایکلر مورد استفاده در این تحقیق از نوع BioRad مدل myCycler (آمریکا) و آنزیم مورد استفاده از نوع SmarTaq DNA polymerase خریداری شده از شرکت سیناژن با حجم ۵ واحد بود. محلول ۱۰ buffer X، نمک MgCl<sub>2</sub> و dNTP با غلظت ۱۰۰ میلی‌مول به همراه آنزیم در آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۲).

اتصال آغازگر به DNA به مدت ۱ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد انجام شده و توسعه برای ۲ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و یک مرحله ۱۰ دقیقه‌ای توسعه نهایی در دمای ۷۲ درجه

جدول ۲. اجزاء واکنش PCR نمونه‌های جلبکی برای شناسایی در حد گونه

اجزاء واکنش	غلظت اولیه	حجم برداشتی
dH <sub>2</sub> O	————	۱۸ میکرولیتر
10X buffer	10 X	۲/۵ میکرولیتر
dNTP mix	۲/۵ میلی‌مول	۰/۵ میکرولیتر
MgCl <sub>2</sub>	۲/۵ میلی‌مول	۰/۸ میکرولیتر
SmarTaq DNA Polymerase	۵ واحد در میکرولیتر	۰/۲ میکرولیتر
Primer F acccgctgaatttaagcata	۱۰ پیکنومول	۰/۵ میکرولیتر
Primer R ccttggtccgtgttcaaga	۱۰ پیکنومول	۰/۵ میکرولیتر
DNA	۱۰۰ میکرولیتر در نانوگرم	۲ میکرولیتر
حجم نهایی	۲۵ میکرولیتر	

زمان از یک هواده مدل 2013 VIPERO (آلمان) برای هوادهی ظروف استفاده شد. تمام لوله‌های هوادهی و دهنه ورودی هواده برای جلوگیری از آلودگی‌های ثانویه در محیط کشت ذخیره برای ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد سترون گردیدند. همچنین یک فیلتر میلی‌پور با چشمه ۰/۴۵ میکرومتر (Whatman GC) در مسیر لوله هواده تعبیه شد تا هوای آلوده وارد محیط کشت نگردد. جلبک‌ها طی این زمان به فاز نمایی رشد رسیده و آمادگی انتقال به ظروف آزمایشی برای کشت را پیدا کردند.

#### ۲-۴. آماده‌سازی محلول نانوذره

خصوصیات نانوذره مورد استفاده در جداول شماره ۳ ارایه گردیده است. میزان ۱۰۰۰ میلی‌گرم از نانوذره دی اکسید تیتانیوم برای آماده‌سازی محلول نانوذرات به ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت اختصاصی هر جلبک اضافه گردید. ارلن‌ها در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ دقیقه سترون شده و اختلاط نمونه‌ها برای ۳۰ دقیقه توسط پروب فراصوتی (۱۰۰ وات، ۴۰ کیلو هرتز) صورت گرفت. محلول به دست آمده به عنوان محلول ذخیره نانوذرات آزمایشی برای بررسی تاثیرات سمی روی جلبک‌ها استفاده شد.

ویرایش و آماده‌سازی توالی‌های به دست آمده برای عملیات Blast با استفاده از نرم افزار Cromass Momigliano (Version 1.5) انجام گرفت (et al., 2009). مقایسه توالی مورد مطالعه با دیگر توالی‌های موجود در سایر پایگاه‌های اطلاعاتی ژنتیکی شامل NCBI، EMBL و DDBJ با استفاده از برنامه Blast (یکی از ابزارهای هم‌ردیفی توالی‌های DNA و پروتئین) انجام شد و میزان تشابه، همپوشانی و شناسایی اولیه بر اساس داده‌های مولکولی تعیین گردید. توالی‌های DNA گونه‌های مشابه یا نسبتاً مشابه با نمونه‌های مورد مطالعه بعد از شناسایی اولیه نمونه‌ها بر اساس برنامه Blast از بانک‌های اطلاعات ژنتیکی استخراج گردید.

#### ۲-۳. تهیه محیط کشت ذخیره

محلول محیط کشت ذخیره برای تهیه حدود ۱۰۰ لیتر محیط کشت پس از خالص‌سازی نمونه‌ها و تعیین محیط کشت اختصاصی هر جلبک آماده شد. همزمان با شروع آزمایش ۲ میلی‌لیتر از هر لوله حاوی جلبک زیر هود میکروبی و در کنار شعله به ارلن‌های یک لیتری حاوی ۵۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت اختصاصی هر جلبک انتقال یافت. سپس ظروف به انکوباتورهای یخچال‌دار منتقل و برای ۷ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. نور توسط دو عدد لامپ کوچک فلورسنت با شدت ۱۵۰۰ میلی‌مول بر مترمربع بر ثانیه تامین گردید. طی این

## محیط زیست طبیعی، منابع طبیعی ایران، دوره ۶۹، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۵ صفحه ۷۷۸

جدول ۳. خصوصیات نانوذره دی اکسید تیتانیوم مورد استفاده در این پژوهش

نوع نانوذره	اندازه نانوذره	سطح ویژه	درصد خلوص	شکل ظاهری	چگالی ظاهری
آناناز	<30nm	>60g/m <sup>2</sup>	+99/9	پودر سفید	0/7 g/m <sup>3</sup>

بلافاصله پایین تر از کمترین غلظت با تاثیر بازدارندگی معنی دار بر رشد قرار دارد.

میزان کلروفیل *a* در این تحقیق در ابتدا و انتهای آزمایش برای هر یک از گونه های جلبکی بر اساس روش استاندارد ارزیابی آب و فاضلاب تعیین گردید (APHA, 1996). میزان ۱۰ میلی لیتر از نمونه برای این منظور به مدت ۳۰ دقیقه با شتاب گرانشی  $900 \times g$  سانتریفیوژ گردید. سپس مایع رویی جدا و سلول های جلبکی در محلول با غلظت ۱:۱۰ کربنات منیزیم در استون معلق شدند. این مخلوط برای مدت ۱ دقیقه همگن شده و در ادامه با ۵ میلی لیتر محلول کربنات منیزیم ترکیب گردید. نمونه ها برای مدت ۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد در محیط تاریک باقی مانده و مجدداً برای ۳۰ دقیقه با شتاب گرانشی  $900 \times g$  سانتریفیوژ شدند. میزان جذب نوری مایع فوقانی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج های ۶۶۴ و ۷۵۰ نانومتر قرائت شد. سپس نمونه ها با ۰/۱ میلی لیتر اسید کلریدریک ۰/۱ مولار اسیدی شده و برای ۹۰ ثانیه به حالت ساکن باقی ماندند. جذب نوری مجدداً در طول موج های ۶۶۵ و ۷۵۰ نانومتر قرائت گردید. میزان جذب در ۶۶۴ و ۶۶۵ نانومتر با تفریق میزان جذب در ۷۵۰ نانومتر قبل و بعد از اسیدی شدن اصلاح شد.

پراکسیداسیون چربی بر اساس اندازه گیری میزان تولید مالون دی آلدئید (MDA) جهت ارزیابی

## ۲-۵. آزمایشات تاثیر نانوذره روی گونه های

### جلبکی

آزمایش های رشد جلبکی با تهیه محیط کشت هایی با غلظت های ۱، ۰/۱، ۰/۰۱، ۰/۰۰۱ میلی لیتری از طریق رقیق سازی محلول ذخیره نانو ذرات تهیه شد. این آزمایش ها در ارلن های ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت اختصاصی هر جلبک در عدم حضور یا حضور مقادیر مختلف نانوذره دی اکسید تیتانیوم انجام پذیرفت. ارلن ها در انکوباتورهای یخچال دار مجهز به لامپ های مهتابی در دمای ۲۵ سانتی گراد قرار گرفتند. شدت نور برابر ۱۵۰۰ میلی مول بر مترمربع بر ثانیه و دوره نوری منطبق با ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی تنظیم گردید. دهانه ارلن ها توسط پنبه سترون بسته شده و درون اتاقک رشد روی شیکرهای چرخشی با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. این کار علاوه بر ممانعت از ترسیب جلبک ها موجب تماس مستقیم آنها با مقادیر یکسانی از نانوذرات گردید.

میزان رشد هر نمونه پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت از شروع تماس با نانوذی اکسید تیتانیوم نسبت به تیمار شاهد (فاقد نانوذره) با اندازه گیری غلظت کلروفیل *a* سنجیده شد. غلظت بدون تاثیر قابل مشاهده به صورت غلظتی تعریف گردید که

کشیده شدند. تمام تیمارها در این تحقیق با سه تکرار انجام پذیرفت و نتایج به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد حاصل از تکرارها ارائه گردید.

### ۳. نتایج

#### ۳-۱. شناسایی گونه‌های جلبکی

فعالیت پژوهشی حاضر منجر به خالص‌سازی ۶ نمونه جلبکی شامل *Chlamydomonas moewusii* (شماره مسلسل KF584222)، *Chlamydomonas* sp. (شماره مسلسل KF584223)، *Chlorococcum oleofaciens* (شماره مسلسل KF584224) و *Chlorococcum oleofaciens*- strain 2 (شماره مسلسل KF584225)، *Scenedesmus obliquus* و *Chlorococcum oleofaciens*- strain 3 گردید که ۴ گونه خالص سازی شده در سامانه اطلاعاتی NCBI ثبت گردیدند. لازم به ذکر است که سه نژاد مربوط به *Chlorococcum oleofaciens* از لحاظ ظاهری و ژنتیکی به قدری با یکدیگر تفاوت داشتند که امکان قرارگیری آنها در یک نژاد از گونه وجود نداشت. همچنین یکی از نمونه‌های *Chlamydomonas* تنها در حد جنس شناسایی و گونه آن مشخص نشد که می‌تواند به دلیل بومی بودن این جلبک در آب‌های داخلی ایران و در نتیجه عدم ثبت اطلاعات ژنتیکی آن در بانک NCBI باشد. مطالعات ریخت‌شناسی در مورد این جلبک می‌تواند به شناسایی و معرفی آن به عنوان یک گونه جدید بومی ایران منجر شود.

استرس اکسیداتیو استفاده می‌شود. مالون دی‌آلدئید حاصل از پراکسیداسیون چربی‌ها با شکست و تفکیک اسیدهای چرب غیراشباع متناسب بوده و از این رو شاخص مناسبی برای تعیین تخریب غشای سلولی در شرایط تنش به دلیل تولید گونه‌های واکنشی اکسیژن (ROS یا Reactive Oxygen Species) می‌باشد (Jambunathan, 2010).

مقدار پراکسیداسیون چربی نیز طبق روش Maness و همکاران (۱۹۹۹) در فواصل زمانی ۰، ۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت تعیین شد. میزان ۱ میلی‌لیتر از نمونه جلبکی برای این کار به ۲ میلی‌لیتر تری‌کلرو استیک اسید (TCA) ۱۰ درصد اضافه و برای ۴۵ دقیقه در شتاب‌گرانشی  $10000 \times g$  سانتریفیوژ گردید. مایع فوقانی پس از جداسازی با ۳ میلی‌لیتر ترکیب ۲-تیوباربیتوریک اسید (TBA) ۱۰ درصد مخلوط و برای ۱۰ دقیقه در آب مقطر جوشانده شد. میزان جذب نوری پس از رسیدن به دمای اتاق در ۵۳۲ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و با تیمار شاهد مقایسه شد.

#### ۲-۶. تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS انجام و برای صفاتی که آزمون F مربوطه آنها در یک زمان از نمونه‌برداری معنی‌دار گردید، از آزمون LSD جهت مقایسه بین میانگین‌های متغیرها استفاده شد. سطح اطمینان کمتر از ۵ درصد به منزله اختلاف معنی‌دار و سطوح اطمینان ۱ و ۰/۱ درصد به معنی اختلاف بسیار معنی‌دار در نظر گرفته شد. نمودارها توسط نرم افزار SigmaPlot طراحی و

### ۲-۳. میزان جذب نوری

یافته‌های مربوط به غلظت کلروفیل  $a$  جلبک‌های آزمایشی در زمان‌های ۰، ۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت در شکل ۱ نشان داده شده است. این نتایج نشان داد که میزان کلروفیل  $a$  جلبک *Chlamydomonas moewusii* (شکل ۱-الف) در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر نانوذره  $TiO_2$  پس از طی زمان ۹۶ ساعت دارای کمترین مقدار در مقایسه با تیمار شاهد بود ( $p < 0.01$ ). همچنین اختلاف معنی‌داری در میزان کلروفیل  $a$  این جلبک در تیمارهای حاوی غلظت‌های ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ نانوذره پس از ۹۶ ساعت مشاهده شد، به طوری که میزان کلروفیل  $a$  در تماس با غلظت ۰/۰۰۱ نانوذره به طور معنی‌داری بیش از غلظت ۰/۰۱ بود.

رشد جلبک *Chlamydomonas sp.* بر اساس نتایج به دست آمده با افزایش غلظت نانودی‌اکسید تیتانیوم در تمام زمان‌های مطالعاتی کاهش یافت (شکل ۱-ب). کمترین میزان کلروفیل  $a$  بین تیمارهای آزمایشی در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم پس از ۹۶ ساعت مشاهده شد که به شکل بسیار معنی‌داری کمتر از تیمار شاهد (فاقد نانودی‌اکسید تیتانیوم) بود ( $p < 0.01$ ).

غلظت کلروفیل  $a$  در زمان‌های مختلف زیست‌سنجی برای جلبک *Chlorococcum oleofaciens* (strain 1) در شکل ۱-ج نشان داده شده است. نتایج مشخص نمود که میزان کلروفیل  $a$  در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم پس از گذشت ۹۶ ساعت در مقایسه با تیمار

شاهد دارای کمترین مقدار است، بدین معنی که با افزایش زمان در این غلظت اثر بازدارندگی نانوذره نیز افزایش می‌یابد. میزان کلروفیل  $a$  در غلظت ۰/۰۰۱ میلی‌گرم در لیتر در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت تاثیر بازدارندگی معنی‌داری ( $p > 0.05$ ) بر رشد جلبک *Chlorococcum oleofaciens* (strain 1) از خود نشان نداد ولی کاهش در میزان این پارامتر پس از ۹۶ ساعت تماس معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) گردید.

مقایسه میزان جذب نوری در زمان‌های مختلف آزمایشی برای جلبک *Chlorococcum oleofaciens* (strain 2) نشان داد که میزان کلروفیل  $a$  در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت در غلظت ۰/۰۰۱ میلی‌گرم در لیتر نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم در مقایسه با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نشان نداد و دارای اثر بازدارندگی بر رشد نیست ( $p > 0.05$ )، اما در زمان ۹۶ ساعت تاثیر بازدارندگی بر رشد را اعمال می‌نماید (شکل ۱-د). همچنین میزان کلروفیل  $a$  در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر پس از ۹۶ ساعت تماس با نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم دارای کمترین مقدار در مقایسه با تیمار شاهد بود.

میزان کلروفیل  $a$  جلبک *Chlorococcum oleofaciens* (strain 3) بر اساس نتایج به دست آمده پس از گذشت ۲۴ ساعت در هیچ کدام از غلظت‌های آزمایشی نانودی‌اکسید تیتانیوم تغییری در مقایسه با تیمار شاهد نشان نداد (شکل ۱-ه). گذشت زمان تماس جلبک با نانوذره به ۴۸ و ۹۶ ساعت موجب افزایش معنی‌دار رشد جلبک در تیمارهای حاوی غلظت‌های ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم نانودی‌اکسید تیتانیوم در لیتر نسبت به تیمارهای رقیق‌تر گردید



چربی به ترتیب در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ کمتر از میزان آن در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر پس از ۹۶ ساعت به دست آمد. همچنین پراکسیداسیون چربی از یک الگوی افزایشی با افزودن میزان نانوآکسید تیتانیوم برخوردار بود که در تمام غلظت‌های آزمایشی جلبک *C. moewusii* دارای مقادیر بالاتری نسبت به تیمار شاهد است.

جلبک *Chlamydomonas sp.* نیز با افزایش غلظت نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم دارای میزان بالاتری از پراکسیداسیون چربی در تمام تیمارهای آزمایشی بود (شکل ۲-ب). بیشترین میزان پراکسیداسیون چربی این جلبک بین زمان‌های آزمایشی در تیمار ۱ میلی‌گرم نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم به دست آمد که به تدریج از میزان آن با کاهش غلظت نانوذره کاسته شد.

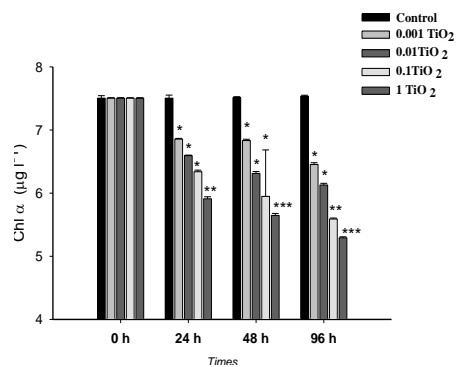
روند معنی‌دار افزایشی در میزان پراکسیداسیون چربی *Chlorococcum oleofaciens* (strain 1) نیز پس از ۴۸ ساعت تماس با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر نسبت به تیمار شاهد به دست آمد که البته این اختلاف با گذشت زمان افزایش یافته و در ۹۶ ساعت تماس در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر به بیشترین مقدار نسبت به تیمار شاهد رسید (شکل ۲-ج).

( $p < 0.01$ ). البته تفاوت معنی‌داری در میزان رشد جلبک در تیمار حاوی ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ میلی‌گرم در لیتر نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم با تیمار شاهد پس از گذشت ۴۸ ساعت از زمان تماس به دست نیامد.

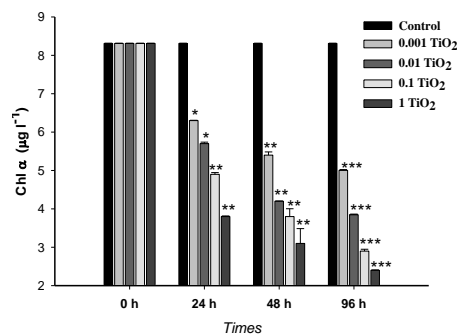
میزان کلروفیل *a* در جلبک *Scenedesmus obliquus* بر اساس نتایج به دست آمده پس از گذشت ۲۴ ساعت در تیمار حاوی غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم در مقایسه با تیمار شاهد به شدت کاهش یافته و با گذشت زمان و در ۹۶ ساعت پس از شروع آزمایش به سمت صفر نزدیک شد (شکل ۱-ی). غلظت‌های پایین‌تر (۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ میلی‌گرم نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم در لیتر) نیز پس از گذشت ۹۶ ساعت تماس موجب کاهش معنی‌دار کلروفیل *a* نسبت به تیمار شاهد گردید، به طوری که کمترین میزان کلروفیل *a* در تمامی غلظت‌ها پس از ۹۶ آزمایش ثبت گردید.

### ۳-۳. میزان پراکسیداسیون چربی

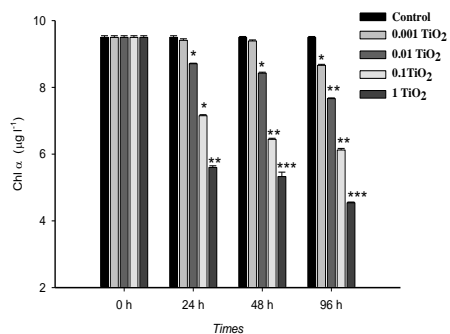
میزان پراکسیداسیون چربی در تیمار *Chlamydomonas moewusii* پس از طی زمان ۹۶ ساعت در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر نسبت به تیمار شاهد دارای بیشترین مقدار بود که نشان‌دهنده تاثیر بازدارندگی نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم بر رشد این جلبک بود (شکل ۲-الف). میزان پراکسیداسیون



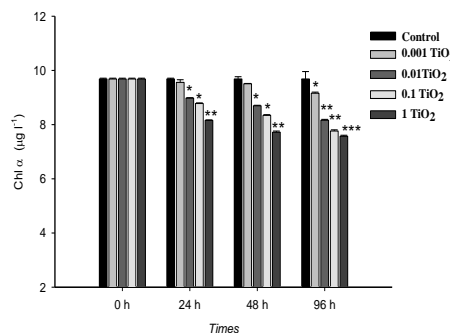
(الف)



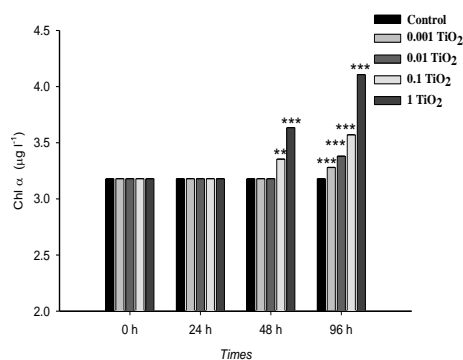
(ب)



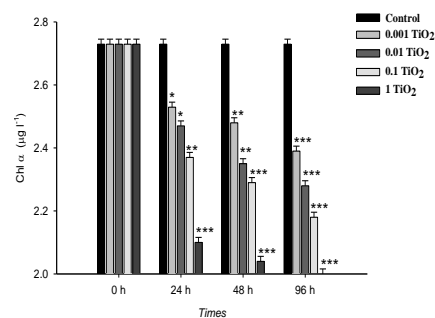
(ج)



(د)



(ه)



(و)

شکل ۱. غلظت کلروفیل *a* (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد) جلبک‌های *Chlamydomonas moewusii* (الف)، *Chlamydomonas sp.* (ب)، *Chlorococcum oleofaciens* (strain 1) (ج) و *Chlorococcum oleofaciens* (strain 2) (د)، *Chlorococcum oleofaciens* (strain 3) (و) و *Scenedesmus obliquus* (ه).

Significant=  $p < 0.05$ , \* $p = < 0.05$ , \*\* $p = < 0.01$ , \*\*\* $p = < 0.001$

افزایشی در میزان پراکسیداسیون چربی این جلبک با گذشت زمان به سمت انتهای آزمایش وجود دارد، به طوری که بیشترین میزان پراکسیداسیون چربی پس از ۹۶ ساعت تماس در غلظت ۱ میلی‌گرم نانودی‌اکسید تیتانیوم در لیتر به دست آمد.

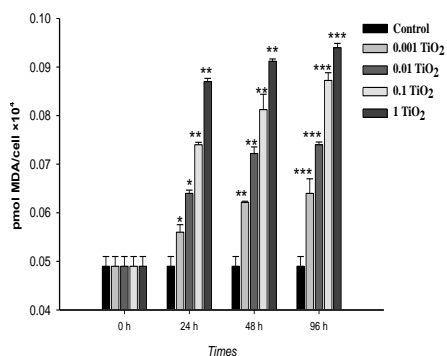
#### ۴. بحث و نتیجه‌گیری

گسترش روز افزون فناوری نانو سبب افزایش استفاده از نانوذرات و ریز مواد در تکنولوژی‌های مدرن شده است. با این وجود همچنان نگرانی‌هایی در زمینه اثرات سوء این ترکیبات بر سلامتی انسان و محیط وجود دارد. مطالعات اولیه سم‌شناسی نشان داده است که مواد نانو می‌توانند سلامتی انسان را تحت تاثیر قرار داده و اثرات زیست‌محیطی متعددی در بلندمدت به همراه داشته باشند (Bar-ilan et al., 2009). البته سمیت نانوذرات با خصوصیات فیزیکوشیمیایی آنها در مقیاس نانو ارتباط داشته که موجب بروز رفتارهای جدید شیمیایی و فیزیکی در سامانه‌های زیستی می‌گردد (Seaton, 2006). بسیاری از ریزمواد غیرمحلول در آب بوده و در نتیجه قابلیت تجمع زیستی این مواد در سیستم‌های زنده افزایش می‌یابد (Seaton, 2006).

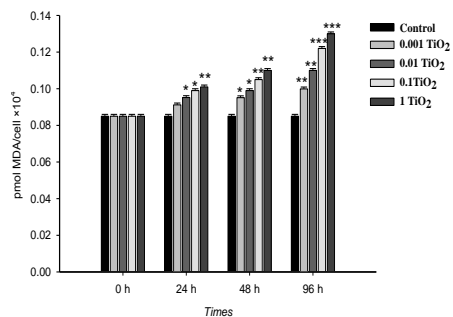
میزان پراکسیداسیون چربی در جلبک *Chlorococcum oleofaciens* (strain 2) پس از طی ۹۶ ساعت در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر نسبت به تیمار شاهد دارای بیشترین مقدار بود که نشان‌دهنده تاثیر بازدارندگی نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم در این غلظت بر رشد این جلبک است (شکل ۲-د). همچنین اختلاف معنی‌داری در میزان پراکسیداسیون چربی تحت تاثیر غلظت ۰/۰۰۱ میلی‌گرم در لیتر نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم در زمان‌های کمتر از ۹۶ ساعت نسبت به تیمار شاهد به دست نیامد ( $p > 0.05$ ).

میزان پراکسیداسیون چربی در این جلبک *Chlorococcum oleofaciens* (strain 3) پس از طی ۹۶ ساعت در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر نسبت به تیمار شاهد دارای کمترین مقدار بود که نشان‌دهنده تاثیر محرک این نانوذره بر رشد بود. کاهش معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) مقدار پراکسیداسیون چربی این جلبک نیز در غلظت ۰/۰۰۱ میلی‌گرم در لیتر پس از ۹۶ ساعت تماس با دی‌اکسید تیتانیوم در مقایسه با تیمار شاهد مشاهده گردید (شکل ۲-ه).

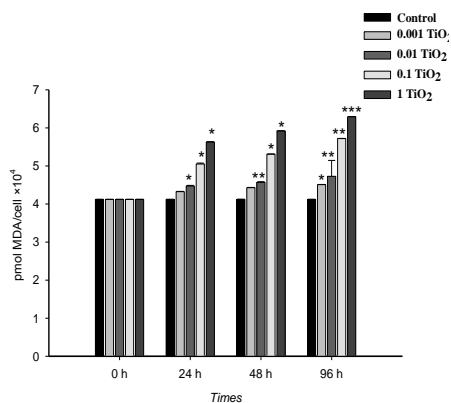
اثر تماس نانودی‌اکسید تیتانیوم بر مقدار پراکسیداسیون چربی *Scenedesmus obliquus* در شکل ۲-ی ارایه شده است. نتایج نشان داد که روند



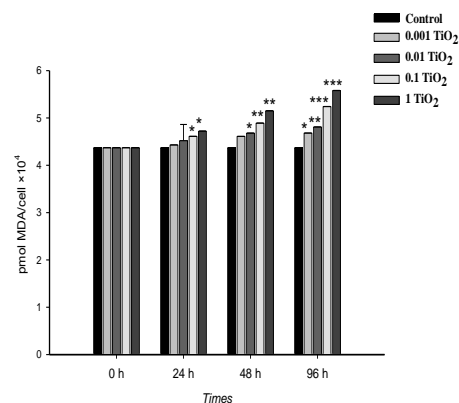
(الف)



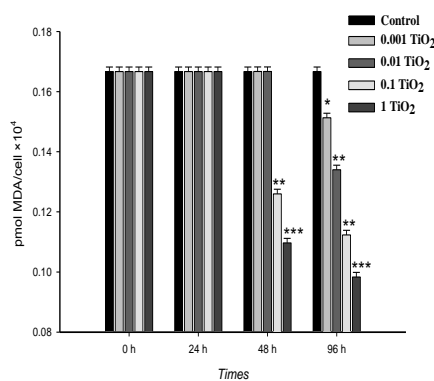
(ب)



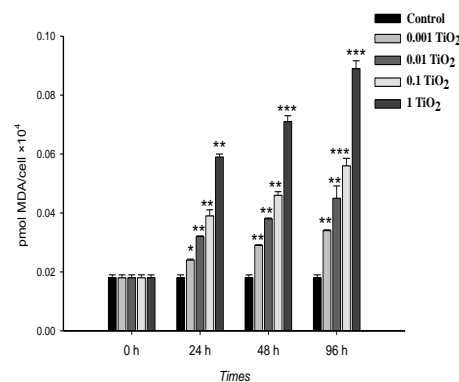
(ج)



(د)



(ه)



(و)

شکل ۲. پراکسیداسیون چربی (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد) جلبک‌های *Chlamydomonas moewusii* (الف)، *Chlamydomonas sp.* (ب)، *Chlorococcum oleofaciens* (strain 1) (ج) و *Chlorococcum oleofaciens* (strain 2) (د)، *Chlorococcum oleofaciens* (strain 3) (ه) و *Scenedesmus obliquus* (و).

Significant=  $p < 0.05$ , \* $p = < 0.05$ , \*\* $p = < 0.01$ , \*\*\* $p = < 0.001$

سلولی شوند (Maness et al., 1999). *Chlamydomonas moewusii* از جمله گونه‌هایی است که در بیشتر منابع آبی حتی در فقدان نور نیز یافت شده و با تولید اکسیژن موجب فعالیت باکتری‌های هوازی و تسریع فرآیند تصفیه می‌گردد. بنابراین حذف این گونه جلبکی در منابع آبی تحت تاثیر حتی غلظت‌های پایین نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم می‌تواند سبب کاهش تولید اکسیژن گردیده و گونه‌های حساس به اکسیژن را با مشکلات جدی مواجه سازد (Collard and Matagne, 1990).

بررسی تاثیر نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم بر رشد جلبک‌های *Chlorococcum oleofaciens* (strain 1) و *Chlorococcum oleofaciens* (strain 2) نشان داد که میزان کلروفیل *a* پس از ۹۶ ساعت تماس در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم در مقایسه با تیمار شاهد دارای کمترین مقدار بود. اثر بازدارندگی نانوذره با افزایش زمان در این غلظت نیز افزایش یافت. میزان کلروفیل *a* در غلظت ۰/۰۰۱ میلی‌گرم در لیتر در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت تاثیر بازدارندگی بر رشد جلبک‌های *Chlorococcum oleofaciens* (strain 1) و *Chlorococcum oleofaciens* (strain 2) از خود نشان نداد ولی در زمان ۹۶ ساعت موجب کاهش در میزان کلروفیل و افزایش میزان پراکسیداسیون چربی مشاهده شد. عدم تاثیر نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم بر سلول‌های جلبک در زمان‌های کمتر از ۹۶ ساعت می‌تواند به دلیل تراوش ملکول‌های خاصی چون

نتایج این مطالعه نشان داد که افزایش غلظت و زمان تماس با نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم موجب کاهش میزان کلروفیل *a* و افزایش پراکسیداسیون چربی *Chlamydomonas moewusii* می‌گردد. غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم دارای بیشترین اثر بازدارندگی بر رشد *Chlamydomonas moewusii* در تمام زمان‌ها بود. با این وجود حتی غلظت ۰/۰۰۱ میلی‌گرم در لیتر نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم نیز سبب کاهش رشد این جلبک گردید که بیانگر تاثیر نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم در غلظت‌های بسیار پایین نیز بر رشد جلبک مذکور است. اثرات بازدارندگی این نانوذره در ترکیب با اشعه ماوراء بنفش موجب غیر فعال شدن و از بین رفتن جلبک‌هایی مانند *Microcystis Anabaena* و *Melosira* نیز شده است (Kim and Lee, 2005). همچنین اثر سمیت نانوذره  $TiO_2$  بر باکتری‌ها در حضور اشعه ماوراء بنفش نیز به اثبات رسیده است که علت این امر می‌تواند به دلیل تولید رادیکال‌های هیدروکسیل توسط نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم در حضور اشعه ماوراء بنفش باشد (Wei et al., 1994; Armelao et al., 2007; Maness et al., 1999). نحوه تاثیر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر رشد جلبکی می‌تواند به دلیل تحریک تولید فوتوکاتالیستی گونه‌های واکنشی اکسیژن و در نتیجه افزایش استرس اکسیداتیو باشد. تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در حضور نور منجر به تخریب غشای سلولی گردیده و این رادیکال‌ها می‌توانند باعث آسیب DNA

رشد جلبک *Scenedesmus obliquus* با افزایش زمان و غلظت نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم سیر نزولی داشت، به طوری که میزان رشد در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر این نانوذره در زمان ۲۴ ساعت دارای کاهش بسیار معنی‌داری در مقایسه با تیمار شاهد بوده ( $p < 0.01$ ) و با گذشت زمان نیز بیشتر شده و حتی تراکم جلبکی پس از ۹۶ ساعت به صفر نزدیک شد. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری نمود که رشد جلبک *Scenedesmus obliquus* در تمام غلظت‌های آزمایشی به شکل معنی‌داری کاهش می‌یابد ( $p < 0.05$ ). علت این امر می‌تواند به دلیل پوشش سطح سلول‌های جلبک با نانوذرات و کاهش میزان نور در دسترس سلول باشد. افزایش غلظت مورد استفاده نانوذره با توجه به وجود زوائد مختلف روی *Scenedesmus obliquus* موجب پوشش بیشتر سطح این جلبک، کاهش نور در دسترس سلول و در نتیجه کاهش رشد خواهد شد (Metzler et al., 2011). جلبک *Scenedesmus obliquus* یکی از گونه‌هایی است که مورد تغذیه بسیاری از آبزیان شیلاتی اقتصادی قرار می‌گیرد. بنابراین کاهش این جلبک در منابع آبی تحت تاثیر ورود نانوذرات می‌تواند در دراز مدت به حذف این گونه و دیگر زئوپلانکتون‌های وابسته به آن شده و ذخایر آبزیان را تحت تاثیر قرار دهد.

نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم تاثیرات بازدارندگی معنی‌دار بر رشد جلبک‌های *Chlamydomonas moewusii* sp. *Chlamydomonas*، *Chlamydomonas* (strain 1) *Chlorococcum oleofaciens*

پلی‌ساکاریدها توسط سلول‌های جلبک باشد که با تاثیر این مواد بر سطح نانوذرات، جایگاه‌های فعال این نانوذرات برای ایجاد پیوند بین سلولی کاهش یافته و فعل و انفعالات بین سلول‌های جلبک و نانوذرات کاهش می‌یابد (Wang et al., 2008).

البته غلظت‌های مختلف نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم تاثیر بازدارندگی بر جلبک *Chlorococcum oleofaciens* (strain 3) در زمان ۲۴ ساعت نشان نداد و پس از ۴۸ ساعت از شروع آزمایش حتی موجب افزایش میزان کلروفیل *a* و کاهش پراکسیداسیون چربی در مقایسه با تیمار شاهد گردید که بیانگر اثر محرک نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم بر رشد جلبک *Chlorococcum oleofaciens* (strain 3) پس از گذشت دو روز است. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری نمود که نانودی‌اکسید تیتانیوم دارای تاثیر انتخابی بر رشد جلبک‌ها است که لازم است در سطح گونه‌ای و حتی نژادهای متعلق به هر گونه مورد مطالعه قرار گیرد. تاثیر این نانوذره بر رشد جلبک *Chlorococcum oleofaciens* (strain 3) با پاسخ آزمایش‌های پیشین در مورد سایر گونه‌ها متفاوت بود، به طوری که Wang و همکاران (۲۰۰۸) بیان نمودند که نانودی‌اکسید تیتانیوم موجب کاهش رشد *Chlorococcum oleofaciens* می‌گردد. تفاوت‌های موجود در پاسخ گونه‌ای به یک نانوذره را می‌توان در عواملی همچون اندازه متفاوت نانوذره مورد استفاده، تراکم اولیه سلول‌های جلبک، پاسخ متفاوت جنس‌های مختلف، غلظت مورد استعمال، فیزیولوژی و ویژگی‌های ژنتیکی آن گونه ارتباط داد (Ji et al., 2010; Wei et al., 2010).

زنده عبور کرده و سبب آسیب به دیواره سلولی و در نهایت مرگ آنها می‌شوند (Navarro et al., 2008). به نظر می‌رسد که واکنش‌های متفاوت جلبک‌ها به نانوذرات در یک زیست‌بوم سبب تغییر غالبیت گونه‌ای در بلندمدت گردد. برای مثال افزایش رشد جلبک *Chlorococcum oleofaciens* (strain 3) تحت تاثیر نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم باعث می‌گردد که این جلبک در محیطی با غلظت بالاتر این نانوذره به تدریج از شرایط بهتری برای رشد در مقایسه با سایر گونه‌ها برخوردار گردیده و در محیط غالب شود.

*Chlorococcum oleofaciens* (strain 2) و *Scenedesmus obliquus* در حالی که موجب افزایش معنی‌دار رشد *Chlorococcum oleofaciens* (strain 3) گردید. بنابراین پاسخ گونه‌های مختلف به نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم متفاوت بوده و رشد گونه‌های مورد آزمایش به شکل متفاوتی تحت تاثیر این نانوذره قرار دارد. نانوذرات به شکل مصنوعی وارد زیست‌بوم‌های آبی شده و به طور ناخواسته بر سطح اول زنجیره غذایی (جلبک‌ها) اثر می‌گذارند. این ذرات از غشاء سلولی موجودات

## References

- Amin, S., 2009. Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae. *Energy Conversion and Management* 50, 1834-1840.
- Andersen, R.A., Van de Peer, Y., Potter, D., Sexton, J.P., Kawachi, M., La Jeunesse, T., 1999. Phylogenetic analysis of the ssu rRNA from members of the Chrysophyceae. *Protist* 71, 150-184.
- APHA, (2001) Standard methods for the examination of water and wastewater (20th ed.). American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Pollution Control Federation, Washington, DC, 20005 p.
- Armelaio, L., Barreca, D., Bottaro, G., Gasparotto, A., Maccato, C., Maragno, C., Tondello, E., Štangar, U.L., Bergant, M., Mahne, D., 2007. Photocatalytic and antibacterial activity of TiO<sub>2</sub> and Au/TiO<sub>2</sub> nanosystems. *Nanotechnology* 18, 3757-94.
- Aruoja, V., Dubourguier, H., Kasemets, K., Kahru, A., 2008. Toxicity of nano-particles of CuO, ZnO and TiO<sub>2</sub> to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Science of the Total Environment* 407, 1461-1468.
- Ayatolahzadeh, M., Shariati, F., Keshavarz, A., Ramezani, Z., 2013. Toxicity effect of Nano Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> on *Dunaliella Salina*. Proceedings of Sixteen national conference of Environmental Health, Tabriz, Iran. pp. 1-18 (in Persian).
- Bar-Ilan, O., Albrecht, R.M., Fako, V.E., Furgeson, D.Y., 2009. Toxicity assessments of multi sized gold and silver nanoparticles in zebra fish embryos. *Small* 5(16), 1897-1910.
- Bello, D., Isaacs, J.A., 2010. Safety Assessment of Nanotechnology Products. In: McQueen, C., (Ed.), *Comprehensive Toxicology (Second Edition)*. Elsevier Publishing, USA, pp. 53-64.
- Cao, M., Li, Z., Wang, J., Ge, W., Yue, T., Li, R., Colvin, V.L., Yu, W.W., 2012. Food related applications of magnetic iron oxide nanoparticles: Enzyme immobilization, protein purification, and food analysis. *Trends in Food Science and Technology* 27, 47-56.
- Collard, J., Matagne, R., 1990. Isolation and genetic analysis of *Chlamydomonas reinhardtii* strains resistant to cadmium. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 2051-2055.

- Duan, Y., Li, N., Liu, C., Liu, H., Cui, Y., Wang, H., Hong, F., 2010. Interaction between nanoparticulate anatase TiO<sub>2</sub> and lactate dehydrogenase. *Biological Trace Elements Research* 136, 302-313.
- EPA, 2005. Supplemental guidance for assessing cancer susceptibility from early-life exposure to carcinogens. Risk Assessment Forum, Washington, DC. Available from: <http://www.epa.gov/ncea/raf>. Accessed 19th January 2015.
- Heinlaan, M., Ivask, A., Blinova, I., Dubourguier, H.C., Kahru, A., 2008. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO<sub>2</sub> to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere* 71, 1308-1316.
- Jambunathan, N., 2010. Determination and detection of reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation, and electrolyte leakage in plants. In: Sunkar, R., (Ed), Plant stress tolerance. Humana Press. New York, USA, pp. 291-297.
- Jing, J., Zhifeng, L., Daohui, L., 2010. Toxicity of oxide nanoparticles to the green algae *Chlorella sp.* *Chemical Engineering Journal* 173(3-4), 525-530.
- Kim, S.C., Lee, D.K., 2005. Preparation of TiO<sub>2</sub>-coated hollow glass beads and their application to the control of algal growth in eutrophic water. *Microchemistry* 80, 227-32.
- Lee, R.E., 2008. phycology, forth edition. Cambridge University Press, USA, 547 p.
- Lin, D.H., Ji, J., Tian, X., Liu, N., Yang, K., Wu, F.C., Wang, Z.Y., Xing, B.S., 2009. Environmental behavior and toxicity of engineered nanomaterials. *Chinese Science Bulletin* 54, 3590-3604.
- Maynard, D.C., Joseph, T.A., Maynard, A.M., 2006. Under employment, job attitudes, and turnover intentions. *Journal of Organizational Behavior* 27, 509-536.
- Maness, P. C., Smolinski, S., Blake, D.M., Huang, Z., Wolfrum, E.J., Jacoby, W.A., 1999. Bactericidal activity of photocatalytic TiO<sub>2</sub> reaction : toward an understanding of its killing mechanism. *Applied and Environment Microbiology* 65, 4094-4098.
- Metzler, D.M., Li, M., Erdem, A., Huang, C.P., 2011. Responses of algae to TiO<sub>2</sub> particles with an emphasis on the effect of particle size-photocatalytic nano. *Chemical Engineering Journal* 170, 538-546.
- Momigliano, P., Blair, D., Heimann, K., 2009 . Development of genetic probes for the identification of marine microalgae. June Interim Report (Part 2) to the Marine and Tropical Sciences Research Facility. Reef and Rainforest Research Centre Limited, Cairns, 13 p.
- Mouivand, G., Falahi, M., 2011. Effect of nanosilver on growth rate, reproduction of *Anabaena flos-aquae*. *Journal of Marine Biology* 3(8), 53-58 (in Persian).
- Navarro, E., Piccapietra, F., Wagner, B., Marconi, F., Kaegi, R., Ozdak, N., Sigg, L., 2008. Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Science and Technology* 42(23), 8959-8964.
- Nowack, B., Bucheli, T.D., 2007. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution* 150, 5-22.
- Saburova, M., Polikarpov, I., Al-Yamani, F., 2012. First record of *Kryptoperidinium foliaceum* (Dinophyceae: Peridinales) from a hypersaline environment in Kuwait, north-western Persian Gulf. *Marine Biodiversity Records* 5, e104.
- Sanger, F., Donelson, J.E., Coulson, A.R., Kösse, L.H., Fischer, D., 1974. Determination of a nucleotide sequence in bacteriophage  $\phi$ 1 DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology* 90(2), 315-333.
- Seaton, A., 2006. Nanotechnology and the occupational physician. *Occupational Medicine* 56, 312-316.



Steidinger, k., walker, L., 1983. Marine plankton life cycle strategies. Florida, CRC Press, Florida, USA, 168 p.

Tanaka, S., Nishiyabu, K., 2008. Small is better if testing MIM nano theorie. Metal Powder Report 63(3), 28-34.

Van Amerongen, A., Barug, D., Lauwaars, M., 2005. Rapid methods for biological and chemical contaminants in food and feed. Wageningen Academic Publishers, Netherland, 416p.

Verlencar, X.N., Desai, S., 2004. Phytoplankton Identification Manual. National Institute of Oceanography, Dona Paula, Goa, 35 p.

Wang, J.X., Zhang, X.Z., Chen, Y.S., Sommerfeld, M., 2008. Toxicity assessment of manufactured nanomaterials using the

unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Chemospher 73(7):1121-1128.

Wei, C., Lin, W.Y., Zainal, Z., Williams, N.E., Zhu, K., Kruzic, A.P., Smith, R.L., Rajeshwar, K., 1994. Bactericidal activity of TiO<sub>2</sub> photocatalyst in aqueous media: toward a solar-assisted water disinfection system. Environmental Science and Technology 28, 934-938.

Wei, C.X., Zhang, Y.B., Guo, J., Han, B., Yang, X., Yuan, J.L., 2010. Effects of silica nanoparticles on growth and photosynthetic pigment content of *Scenedesmus obliquus*. Environmental Science 22, 155-160.

Zhou, J., Bruns, M.A., Tiedje, J.M., 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. Applied Environment and Microbiology 62, 316-322.

## Inhibitory Effect of Titanium Dioxide Nanoparticles on the Growth of Freshwater Algae

Nazli Abedini<sup>1</sup>, Houman Rajabi Islami<sup>2\*</sup>

1- Graduated of Aquaculture, Department of Fisheries, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Assistant Professor, Department of Fisheries, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: 25-Jan.-2015

Accepted: 21-Apr-2015

### Abstract

In this research, the effect of titanium dioxide nanoparticles on 6 samples of freshwater algae specimens was studied. The experimental algae were recognized after purification by molecular methods and put under the effect of nano-titanium dioxide densities of 0/001, 0/01, 0/1 and 1 mgL<sup>-1</sup>. The results indicated that nano titanium dioxide has inhibitory effect on the growth of *Chlamydomonas moewusii*, *Chlamydomonas* sp., *Chlorococcum oleofaciens* (strain 1), *Chlorococcum oleofaciens* (strain 2) and *Scenedesmus obliquus*, whilst their lipid peroxidation was increased after at least 48 h exposure. In contrast, chlorophyll *a* of *Chlorococcum oleofaciens* (strain 3) was increased after 96 hours exposure with nano titanium dioxide, while its lipid peroxidation decreased. Finding of the present research indicated that different species could differently respond to nano titanium dioxide exposure that may result in changing of species dominance of water resources.

**Keywords:** Nanoparticle, Freshwater Alga, Titanium Dioxide, Chlorophyll *a*, Lipid Peroxidation.

\* Corresponding Author: Phone: +98-2144865464,

Email: rajabi.h@srbiau.ac.ir