



<https://ijpb.ui.ac.ir/?lang=en>
IRANIAN JOURNAL OF PLANT BIOLOGY
E-ISSN: 2322-2204
Vol. 14, Issue, No. 1. Spring 2022
Document Type: Research Paper
Received: 21/09/2022 Accepted: 09/01/2023

Physiological responses of *Spirulina platensis* to nanoparticles of TiO₂ and citrate

Nahid Pourbozorgi Rudsari¹, Maryam Madadkar Haghjou^{*1}, Alireza Ghiasvand²

¹ Department of Biology, Plant Physiology, Faculty of Science, Lorestan University, Iran

² Department of Chemistry, Faculty of Science, Lorestan University, Iran

Abstract

In order to investigate the stimulating effect of TiO₂ nanoparticles on the growth rate and the increase of some metabolites in the microalgae *Spirulina platensis*, the anatase and rutile forms of the TiO₂ nanoparticle were compared to the bulk form, in the presence or absence of citrate, on the microalga. The highest chlorophyll, carotenoid, phycocyanin (PC), allophycocyanin (APC), and phycoerythrin (PE) were observed on 3rd day. The highest PC and APC/PE were obtained by rutile and anatase, respectively. Rutile NPs could stimulate the increase of dry biomass and maximum specific growth rate (μ_m) better than anatase and even the bulk form. Carbohydrate production was stimulated by bulk and rutile. Low concentrations of nanoparticles often had a better effect in increasing PC, APC, and PE pigments. The addition of citrate without TiO₂ stimulated the production of astheaxanthin, lipid, protein, and ROS. The simultaneous treatment by citrate-TiO₂ was able to reduce the negative effect of nanoparticles on dry weight, but totally, its effect was dependent on the form of TiO₂ and stress time. Antioxidant activity was stimulated by the bulk form and caused a decrease in Malondialdehyde (MDA), but an increase in MDA was observed by nanoparticles. The highest ROS was observed in the treatment with rutile (with citrate) on the 3rd day. In general, the stimulating effect of TiO₂ on the improvement of indices or its negative effects on *S.platensis* microalga depended on the form and concentration of TiO₂, the presence or absence of citrate, and the duration of treatments.

Introduction

The titanium element, in some cases, improves plant metabolic processes (Gohari *et al.*, 2022; Carvajal and Alcaraz 1998). TiO₂ nanoparticles in different forms have many applications in industry, and it is possible to find their way into aquatic ecosystems (Yang *et al.*, 2015). The two forms of anatase and rutile have different surfaces, structural, and toxicity properties (Parrino *et al.*, 2021). Some studies have shown that

*Corresponding author: madadkar.m@lu.ac.ir



anatase has more cytotoxicity and photocatalytic activity than the rutile form (Clément *et al.*, 2013). Of course, some sources mention TiO₂ with low toxicity (Parrino *et al.*, 2021). However, the effects of TiO₂ nanoparticles depend on the type of organism under investigation, nanoparticle concentration, physicochemical and morphological characteristics such as its size and crystal structure. *S. platensis*, a spiral filamentous blue-green microalgae, has attracted the attention of researchers due to its numerous economic applications, including as a fertilizer and enhancer in agriculture, and has valuable minerals, vitamins, and nutritional compounds (Godlewska *et al.*, 2019; Deng and Chow, 2010). Citric acid is required for various biological processes (Mudunkotuwa and Grassian, 2010). The citrate-nanometal complex can facilitate the entry of NPs along with citrate into the cell (Rupasinghe, 2011); hence the citrate form of nanometals has been recommended for the growth of plants (Chandrika *et al.*, 2021). Some studies on plants have also shown that citrate reduces the adverse effects of nanoparticles (Tirani *et al.*, 2018). Citrate can be adsorbed on the oxides of nanoparticles through Van der Waals bonds and prevent particles from aggregation (Park and Shumaker-Parry 2014; Rupasinghe 2011; Mudunkotuwa and Grassian, 2010). The aim of research

The goal of this research was a comparative evaluation of the possible stimulating or adverse effects of bulk forms and nanoparticles of TiO₂ (anatase and rutile), with or without citrate (in concentrations of 12.5, 25, 50, 100 and 200 mg. L⁻¹) on the growth, biomass and intracellular compounds of microalgae *S. platensis* in 5 days.

Materials and Methods

Zarrouk nutrient medium was used for the growth of microalgae. Anatase nanoparticles 10-25 nm (Purity 99.9%, Specific surface area, SSA 200-240 m² g⁻¹), rutile nanoparticles 30 nm, (Purity 99.9%, SSA 35-60 m² g⁻¹) and bulk sample (diameter <500 nm) were used. Thirty-two (32) treatments were designed as follows: sample S, control culture without any treatment; Samples B1 to B5 treatments containing concentrations of 12.5, 25, 50, 100 and 200 mg L⁻¹ of bulk TiO₂ respectively; samples A1 to A5 containing concentrations of 12.5, 25, 50, 100 and 200 mg L⁻¹ NPs anatase respectively; Samples R1 to R5 containing concentrations of 12.5, 25, 50, 100 and 200 mg L⁻¹ of NPs rutile, respectively; C, samples containing citrate. In samples containing both citrate and TiO₂, citrate to titanium dioxide was used in a molar ratio of 3.5 to 1 (Mudunkotuwa and Grassian, 2010). In sample C, which only had citrate, the amount of citrate was considered equal to it in 200 mg/liter TiO₂. Then all the samples were placed in controlled conditions of 100 μmol m⁻²s⁻¹, 16/8 h of light/darkness and a temperature of 28 ± 2 °C for five days. Sampling and measurement of indicators were done on days zero (day of inoculation), 3, and 5 experiments. Various parameters were evaluated, including dry weight, maximum specific growth rate (μm), pigments chlorophyll *a*, total carotenoid, phycobilins, astaxanthin, total soluble sugar, total soluble protein, lipid, lipid peroxidation, antioxidant activity (DPPH radical inhibition), and ROS levels.

Results and discussion

Rutile nanoparticles in the presence of citrate or without it caused an increase in dry biomass and μm index, while anatase nanoparticles caused a decrease. This can be attributed to the difference in particle size and the difference in specific surface area (SSA) of rutile particles (about 30 nm) and Anatase (about 10-25 nm) (Parrino *et al.*, 2021). The high content of ROS was not observed in most of the anatase treatments, but

the level of ROS was high on the 5 d in control C, while the simultaneous presence of titanium and citrate caused a significant reduction of it. Surface adsorption of citrate on TiO₂ nanoparticles prevents the aggregation of TiO₂ and increases cell access to nanometal (Mudunkotuwa and Grassia 2010). However, exopolymers attached to the outer surface of the cells can increase the contribution of citrate-nanometal complex surface adsorption on the cell surface and reduce its entry into the cells (Zhou *et al.*, 2016). On the 3 d, antioxidant system activity increased in anatase treatments, which caused at least a partial reduction of ROS in anatase samples without citrate. The amount of antioxidant activity was often higher in bulk nanoparticles. Sendra *et al.* (2017), showed that the rate of exopolymers in the treatment with TiO₂ nanoparticles was much higher than when they were treated with TiO₂ bulk form. The concentration of 100 mg L⁻¹ caused the highest amount of chlorophyll *a*, carotenoid, and astaxanthin, and the lowest concentration (12.5 mg L⁻¹) caused the highest levels of APC, PC, PE and total phycobilin pigments. Anatase stimulated the production of the highest amount of chlorophyll, APC, and PE, especially on the 3 d, and rutile specifically induced the production of carotenoid, astaxanthin, and PC. The carbohydrate amount was increased by bulk and nano-rutile form. Lipid content was increased by the treatment of citrate, TiO₂ (with or without citrate), and bulk form with citrate.

Conclusion

The effects of the treatments were observed as stimulating and positive or negative effects depending on the form and concentration of TiO₂, the presence or absence of citrate, and the duration of treatment with nanoparticles. Biomass (dry weight) increased by the treatment with rutile nanoparticles and, to some extent, by treatment with a bulk form of rutile. An increase in chlorophyll, carotenoid, astaxanthin, phycobilins, carbohydrate, lipid, and protein was also observed. It is possible that *Spirulina* with the improved indices containing a certain level of nanoparticles can be used as a fertilizer in agriculture. Citrate did not always show the same effects, and its effects depend on the type of accompanying nanoparticle, TiO₂ concentration, and duration of stress.

Keywords: Algal metabolites, Anatase, Antioxidant potential, Bulk form, Nanoparticle, Rutile

پاسخ‌های فیزیولوژیک *Spirulina platensis* به نانوذرات تیتانیوم و سیترات

ناهید پوربزرگی رودسری^۱، مریم مددکار حق جو^{۱*}، علیرضا غیاثوند^۱
^۱ گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران
^۲ گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

چکیده

به‌منظور بررسی اثر تحریک‌کنندگی نانوذرات TiO_2 بر میزان رشد و افزایش برخی متابولیت‌ها در میکرو جلبک *Spirulina platensis*، فرم‌های آناتاز و روتایل نانوذره در مقایسه با فرم بالک، در حضور و یا عدم حضور سیترات، بر روی میکرو جلبک تأثیر داده شدند. بیشترین مقدار کلروفیل a، کاروتنوئید، فیکوسیانین (PC)، آلفیکوسیانین (APC) و فیکواریترین (PE) در روز سوم آزمون مشاهده شد. بیشترین PC، توسط روتایل و بیشترین مقدار APC و PE توسط آناتاز (با سیترات یا بدون آن) به دست آمدند. نانوذره روتایل (با سیترات یا بدون آن)، بهتر از نانوذره آناتاز و حتی فرم بالک سبب افزایش زی‌توده خشک و سرعت رشد ویژه ماکزیم (μm) شد. افزایش کربوهیدرات توسط نوع بالک و تاحدودی نانوذره روتایل تحریک شد. غلظت‌های کم نانوذرات در افزایش رنگدانه‌های PC، APC و PE غالباً تأثیر بهتری داشتند. افزودن سیترات بدون TiO_2 ، سبب تحریک تولید آستاگزانتین، لیپید، پروتئین و ROS شد. تیمار همزمان سیترات و تیتانیوم، توانست تاحدودی تأثیرات منفی نانوذرات بر شاخص‌هایی نظیر وزن خشک را کاهش دهد، اما درکل، تأثیر آن به فرم TiO_2 و نیز زمان تنش بستگی داشت. فعالیت آنتی‌اکسیدانی، توسط فرم بالک تحریک و سبب کاهش مالون دی‌آلدهید (MDA) شد، اما افزایش میزان MDA توسط نانوذرات مشاهده و بیشترین میزان ROS در تیمار با روتایل به همراه سیترات در روز سوم، ملاحظه شد. در مجموع، تأثیرات تحریک‌کننده TiO_2 بر بهبود شاخص‌های میکرو جلبک *S. platensis* و یا تأثیرات منفی آن به فرم و غلظت TiO_2 ، وجود و یا عدم وجود سیترات و نیز مدت زمان تیمار بستگی داشت.

واژه‌های کلیدی: آناتاز، پتانسیل آنتی‌اکسیدانی، روتایل، متابولیت‌های جلبکی، نانوذره

مقدمه

تتراگونال است که از چهار واحد آناتاز تشکیل شده و فرم کریستالی روتایل یک فرم تتراگونال متشکل از دو واحد TiO_2 روتایل است. پایداری روتایل در دماهای مختلف محیطی از آناتاز بیشتر است (Oi et al., 2016). دو فرم آناتاز و روتایل، خواص سطحی مختلف، واکنش‌پذیری و سمیت‌زایی متفاوتی دارند (Parrino et al., 2021). روتایل چربی دوست، و آناتاز آب دوست است (Clement et al., 2013; Warheit et al., 2007). برخی مطالعات نشان داده‌اند که آناتاز سمیت سلولی و فعالیت فتوکاتالیستی بیشتری نسبت به فرم روتایل نشان می‌دهد (Clement et al., 2013)، زیرا سبب وقوع واکنش‌های اکسیداسیون بر روی سطح و در

عنصر تیتانیوم، جزو عناصر ضروری برای رشد گیاهان نیست ولی برخی شواهد نشان می‌دهد که در مواردی به بهبود، فرآیندهای متابولیکی آنها منجر شده است (Gohari et al., 2022; Carvajal and Alcaraz 1998). نانوذرات TiO_2 در فرم‌های مختلف، کاربردهای فراوانی در صنعت دارند و بنابراین، امکان راهیابی آنها به اکوسیستم‌های آبی و تأثیر بر موجودات آبی وجود دارد. در واقع، نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم (TiO_2 NPs) نسبت به سایر نانوذرات فلزی، دارای سمیت کمتری بوده و در سه شکل کریستالی آناتاز، روتایل و بروکیت وجود دارند (Yang et al., 2015). فرم کریستالی آناتاز یک

* نگارنده مسؤل: نشانی پست الکترونیک: madadkar.m@lu.ac.ir، شماره تماس: ۰۹۱۲۵۲۶۶۵۶۳



افزایش مقدار لیپید در کشت‌های *Arthrospira* و *Desmodesmus subspicatus maxima* و *Parachlorella kessleri* به کارگرفته شده است (Padrova et al., 2014). یون‌های فلزی آزاد شده از نانوذرات می‌توانند رشد جلبک‌های سبز و سبز-آبی را القا کنند (Miazek et al., 2015) با این حال، نانوفلزات ممکن است سبب کاهش رشد میکروجلبک‌ها نیز شوند (Chen et al., 2012). در واقع، نانوذرات فلزی (NPs) پاسخ‌های سلولی را از طریق تولید ROS، یون‌های فلزی آزاد شده، آسیب مکانیکی یا ایجاد سایه و برهم‌کنش با اجزای محیط کشت القا می‌کنند (Xia et al., 2015; Suman et al., 2015; Manier et al., 2013; Sadiq et al., 2011).

اسید سیتریک یک اسید تری‌کربوکسیلیک طبیعی آلی است که در بسیاری از فرایندهای بیولوژیک مانند تنفس سلولی و اکسیداسیون کربوهیدرات‌ها، چربی‌ها و پروتئین‌ها دخالت دارد (Mudunkotuwa and Grassian, 2010). تحقیقات نشان داده که کمپلکس سیترات-نانوفلز می‌تواند، سبب تسهیل ورود نانوفلز به همراه سیترات به درون سلول شود (Rupasinghe, 2011) و از این‌رو فرم سیتراته نانوفلزات برای پرورش گیاهان توصیه شده‌اند (Chandrika et al., 2021). برخی تحقیقات بر روی گیاهان نیز نشان داده‌اند که سیترات سبب کاهش آثار منفی نانوذرات می‌شود (Tirani et al., 2018).

در واقع، در نقش کلاتوری سیترات در کمپلکس‌هایی نظیر سیترات-آهن، پیوند ایجاد شده با فلز محکم است (Yang et al., 2016)، اما سیترات می‌تواند بر روی اکسیدهای نانوذرات، از طریق پیوندهای واندروالس جذب سطحی شده مانع از چسبیدن ذرات به یکدیگر و بنابراین، سبب پراکنده‌شدن نانوذرات در محیط می‌شود (Park and Shumaker-Parry 2014; Rupasinghe 2011; Mudunkotuwa and Grassian, 2010). این مسأله نشان می‌دهد که بنابراین، جذب ترکیبات آلی بر روی سطح نانوذرات می‌تواند رفتار آنها و تأثیر آنها بر سلول زنده را تغییر دهد (Rupasinghe, 2011). در مجموع، علی‌رغم استفاده‌های گسترده از فرم‌های مختلف نانو TiO_2 ، هنوز تأثیرات احتمالی تحریک کننده آن در القای پاسخ‌های سلولی میکروجلبک‌ها و همین‌طور آثار منفی آن

شعاع اطراف ذرات و در نتیجه تولید ROS زیادی می‌شود. تشکیل رادیکال‌های آزاد هیدروکسیل و هیدروپراکسیل می‌توانند موجب آسیب به غشاهای سلولی شوند (Odling and Robertson, 2015). البته برخی منابع TiO_2 را دارای سمیت پایین و کم ذکر می‌کنند (Parrino et al., 2021). با این حال تأثیرات نانوذره TiO_2 بستگی به نوع موجود زنده مورد بررسی، غلظت نانوذره، ویژگی‌های فیزیوشیمیایی و مورفولوژیک نظیر اندازه و ساختار کریستالی آن دارد.

میکروجلبک *S. platensis*، یک میکروجلبک سبز-آبی رشته‌ای، مارپیچی و فتوسنتزکننده از خانواده Oscillatoriaceae است که به دلیل کاربردهای اقتصادی متعدد از جمله به‌عنوان کود و تقویت کننده در کشاورزی، مورد توجه محققان قرار دارد (Godlewska et al., 2019; Deng and Chow, 2010). رنگدانه اصلی فتوسنتزی در این میکروجلبک، کلروفیل a بوده و همچنین، دارای رنگدانه‌های فیکوبیلین، گزانتوفیل و کاروتن‌ها است که از نظر اقتصادی حائز اهمیت هستند (Yaakob et al., 2014; Hoseini et al., 2013). میکروجلبک *S. platensis* دارای مقدار زیادی پروتئین در حدود ۵۵ تا ۷۰ درصد وزن خشک هست که حاوی کلیه اسیدهای آمینه ضروری است (Sharma et al., 2019). این میکروجلبک همچنین، دارای کربوهیدرات و مقادیر زیادی اسیدهای چرب غیر اشباع با زنجیره بلند و امگا-۶ بوده و دارای ویتامین‌ها، عناصر معدنی و آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی نیز است (Habib et al., 2008). در مقایسه با سایر جلبک‌های سبز-آبی هیچ اثر سمیتی از *S. platensis* گزارش نشده است (Habib et al., 2008). در سال‌های اخیر، توجهات زیادی به ترکیبات بیواکتیو جلیک‌ها شده است و تنش‌های نانوفلزات، ممکن است روشی برای تحریک بیوسنتز محصولات زیستی در فتوبیوراکتورهای رشد میکروجلبک‌ها باشند. مطالعات نشان داده است که افزودن ۰/۱ گرم در لیتر نانوذره TiO_2 در حضور تابش UV-A، تولید اسیدهای چرب را بدون کاهش رشد در سلول‌های *Chlorella vulgaris* افزایش داده (Kang et al., 2014) یا نانوذرات آهن (۵/۱ میلی‌گرم در لیتر) برای

۵ آزمایش انجام شد. به‌منظور استخراج کامل ترکیبات درون سلولی، بر روی بیوماس جلبکی پس از برداشت، چند بار مراحل فریز شدن- گرم کردن و سپس سونیکیشن (۸۰ هرتز دمای ۴۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه) انجام شد.

کلیه مراحل اسپکتروفتومتری و خوانش جذب نمونه‌ها، به جز شاخص‌های ROS، MDA، و DPPH، با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر، (آمریکا - مدل JEN 6405) Way، انجام شد. میزان جذب نمونه‌ها در سنجش‌های ROS، MDA، و DPPH با اسپکتروفتومتر 96-well microplate reader، Epoch-BioTek، Winooski، USA، خوانده شدند.

اندازه‌گیری وزن خشک

مقادیر همگنی از سوسپانسیون سلولی، پس از سانتریفیوژ (g، ۱۰۰۰۰، ۱۵ دقیقه) وزن شد. برای حذف هر گونه نمک، سطح بیوماس تر جلبک، ۲ تا ۳ بار با آب مقطر شستشو و سپس در دمای ۷۵ درجه سانتیگراد به مدت ۶ ساعت خشک و وزن شد.

سرعت رشد ویژه ماکزیمم (μ_m , maximum specific growth rate)

نرخ یا سرعت رشد ویژه یکی از شاخص‌های رویتین برای رشد سلولی است و بر اساس وزن خشک و زمان از رابطه محاسبه می‌شود. رابطه ۱:

$$\mu_m (\text{Cell weight day}^{-1}) = \ln (x_2 - x_1) (t_2 - t_1)^{-1}$$

X_1 : وزن توده خشک جلبک در زمان t_1 ، X_2 ،
وزن توده خشک جلبک در زمان t_2 (Madkour *et al.*, 2012).

سنجش کلروفیل a

برای سنجش رنگدانه کلروفیل از بیوماس تر جلبک و متانول ۹۵ درصد و حمام آب گرم ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه برای خروج رنگدانه‌ها، استفاده شد. جذب کلروفیل در طول موج ۶۶۵ نانومتر خوانده و مقدار آن بر اساس

به طور کامل مشخص نشده است. همچنین، بررسی تأثیر تعامل ذرات با سیترات در تأثیر بر میکروجلبک، نیز از اهداف این تحقیق است. بنابراین، در این مطالعه تأثیر فرم‌های آناتاز و روتایل نانو TiO_2 در مقایسه با فرم بالک (توده‌ای) به همراه سیترات یا بدون آن، بر روی رشد، بیوماس و ترکیبات درون سلولی میکروجلبک *S. platensis* در یک دوره ۵ روزه، بررسی شد.

مواد و روش‌ها

کلیه مواد لازم برای تهیه محیط کشت‌های جلبک از شرکت سیگما یا مرک آلمان خریداری شدند. برای رشد میکروجلبک از محیط کشت Zarrouk استفاده شد (Raouf *et al.*, 2006). نانوذرات آناتاز ۱۰-۲۵ نانومتر (Purity 99.9%, Specific surface area, SSA 200-240 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ ، نانوذرات روتایل ۳۰ نانومتر، Purity 99.9%, SSA 35-60 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$) و نمونه بالک (قطر ذرات کمتر از ۵۰۰ نانومتر) از شرکت US Research Nanomaterials, Inc، خریداری و استفاده شدند.

طراحی تیمارهای آزمون و شرایط کشت

تیمارها به تعداد ۳۲ عدد و به‌صورت جدول شماره ۱ طراحی شدند. نمونه S، سوسپانسیون جلبکی شاهد بدون هرگونه تیمار بود. در نمونه‌های حاوی سیترات و TiO_2 ، مقدار سیترات به دی اکسید تیتانیوم به نسبت مولی ۳/۵ به ۱ استفاده شد (Mudunkotuwa and Grassian, 2010). در نمونه C که صرفاً دارای سیترات بود، مقدار سیترات معادل مقدار آن در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر TiO_2 ، در نظر گرفته شد.

نمونه‌های شاهد و تیمار پس از تهیه، همگی در محیط آزمایشگاهی کنترل شده از نظر شرایط نوری (۱۰۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه) با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای 2 ± 28 درجه سانتیگراد در مدت ۵ روز قرار داده شدند. هوادهی توسط پمپ‌های هوا انجام و نمونه‌برداری و سنجش شاخص‌ها در روزهای صفر (روز تلقیح)، ۳ و

سنجش فیکوبیلین‌ها
استخراج با استفاده از بافر فسفات نمکی (۰/۰۵) مولار فسفات سدیم، ۰/۱۵ مولار نمک و اسیدپتیک (7)، انجام (Moraes et al., 2011) و جذب محلول در طول موج‌های ۶۱۵، ۶۵۲ و ۵۶۲ نانومتر خوانده شد و مقادیر رنگدانه‌های فیکوسیانیین، آلفو فیکوسیانیین و فیکواریترین محاسبه شدند (Bennett and Bogorad, 1978).

فرمول‌های مربوطه محاسبه شد (Bennett and Bogorad, 1978).

سنجش کاروتنوئید کل
برای سنجش کاروتنوئید کل، از بیوماس تر جلیبک و از استون ۸۵ درصد به عنوان حلال استفاده و جذب در ۴۵۰ نانومتر خوانده و مقدار آن بر اساس فرمول مربوطه محاسبه شد (Devanathan and Ramanathan, 2013).

جدول ۱. شرح تیمارهای طراحی شده نانو دی اکسید تیتانیوم.

Table 1- Description of designed Nano TiO₂ treatments.

شماره گروه ها	نوع TiO ₂	غلظت (پلی گرام بر لیتر)	سیترات	شماره گروه ها	نوع TiO ₂	غلظت (پلی گرام بر لیتر)	سیترات
۱	S0	-	-	-	-	-	-
۲	S	-	ندارد	۳	C	-	دارد
۴	B1	۱۲/۵	ندارد	۱۹	B1+C	۱۲/۵	دارد
۵	B2	۲۵	ندارد	۲۰	B2+C	۲۵	دارد
۶	B3	۵۰	ندارد	۲۱	B3+C	۵۰	دارد
۷	B4	۱۰۰	ندارد	۲۲	B4+C	۱۰۰	دارد
۸	B5	۲۰۰	ندارد	۲۳	B5+C	۲۰۰	دارد
۹	A1	۱۲/۵	ندارد	۲۴	A1+C	۱۲/۵	دارد
۱۰	A2	۲۵	ندارد	۲۵	A2+C	۲۵	دارد
۱۱	A3	۵۰	ندارد	۲۶	A3+C	۵۰	دارد
۱۲	A4	۱۰۰	ندارد	۲۷	A4+C	۱۰۰	دارد
۱۳	A5	۲۰۰	ندارد	۲۸	A5+C	۲۰۰	دارد
۱۴	R1	۱۲/۵	ندارد	۲۹	R1+C	۱۲/۵	دارد
۱۵	R2	۲۵	ندارد	۳۰	R2+C	۲۵	دارد
۱۶	R3	۵۰	ندارد	۳۱	R3+C	۵۰	دارد
۱۷	R4	۱۰۰	ندارد	۳۲	R4+C	۱۰۰	دارد
۱۸	R5	۲۰۰	ندارد	۳۳	R5+C	۲۰۰	دارد

سنجش قند محلول کل
اندازه‌گیری قند کل بر مبنای روش Albalasme و همکاران (۲۰۱۳) انجام شد. بیوماس تر حاصل از ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون همگن جلیبکی (پس از انجام مراحل فریز-آب نمودن، سونیکیشن، سانتریفیوژ و دور ریختن محلول رویی) با ۱/۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ به سرعت مخلوط و ورتکس شد. افزایش دمای محلول حاصل از افزودن اسیدسولفوریک غلیظ، به سرعت بر روی یخ (تا رسیدن به

سنجش آستاگزانتین
استخراج برای سنجش آستاگزانتین با استفاده از وزن خشک جلیبک و حلال دی متیل سولفوکسید (DMSO) در حمام آب گرم ۶۰ درجه سانتیگراد انجام و پس از سانتریفیوژ به آن استون اضافه شد. میزان جذب محلول در طول موج ۴۸۹ نانومتر خوانده و مقدار رنگدانه بر حسب میلی‌گرم در گرم وزن خشک تعیین شد (Ni et al., 2008).

استفاده از محلول ۱:۱۰ متانول: اتانول انجام شد و سپس محلول DPPH در متانول اضافه شد. پس از انکوباسیون در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه، جذب در ۵۲۰ نانومتر خوانده و فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل محاسبه شد (Shalaby and Shanab, 2013).

سنجش ROS

برای ارزیابی مقدار رادیکال‌های آزاد اکسیژن از معرف زاینول اورنج اسیدی استفاده شد (Bindschedler et al., 2001). به‌منظور استخراج ROS از وزن تر جلبک و بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۶/۸ استفاده و پس از استخراج رادیکال‌های آزاد، جذب نوری محلول حاصل در طول موج ۵۶۰ نانومتر خوانده شد. از $30\text{H}_2\text{O}_2$ درصد برای رسم منحنی استاندارد استفاده و نتایج حاصل بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر جلبک بیان شدند.

آنالیز آماری داده‌ها

آزمون‌ها در قالب یک طرح کاملاً تصادفی به صورت فاکتوریل در سه تکرار انجام شدند. تحلیل آماری واریانس ANOVA و مقایسات میانگین چند دامنه‌ای دانکن با نرم افزار (SPSS 16) انجام شد.

نتایج

در بررسی مقایسه‌ای تأثیر تیمارهای بالک و نانوذرات آناتاز و روتایل، تغییرات وزن خشک و سایر شاخص‌های رشد، رنگیزه‌های فتوسنتزی و فعالیت‌های اکسیدانی/آنتی‌اکسیدانی بررسی شدند. براساس نتایج به‌دست آمده از آنالیز واریانس (جدول ۲ و ۳) کلیه تأثیرات متقابل چهارتایی معنی‌دار ($P < 0.01, 0.05$) بودند.

تأثیر تیمارهای TiO_2 بر تغییرات شاخص‌های رشد میکروجلبک

شکل ۱- الف، تأثیر تیمارها بر بیوماس خشک میکروجلبک *S. platensis* را نشان می‌دهد. در نمونه شاهد S، بیوماس خشک بر اثر گذشت زمان افزایش یافت. تیمار زمان به جز در غلظت‌های نانوذره روتایل، تقریباً در اغلب غلظت‌های مختلف فرم بالک و نانوذره آناتاز

دمای اتاق) کاهش یافت. در نهایت تغییرات جذب نوری محلول در ۳۱۵ نانومتر خوانده شد. از D-گلکز برای تهیه سریال غلظت و ترسیم منحنی استاندارد استفاده شد.

سنجش پروتئین محلول کل

محتوای پروتئین با استفاده از معرف کوماسی برلیانت بلو و خواندن جذب نمونه در طول موج ۵۹۵ نانومتر سنجش شد. از سرم آلبومین گاوی (BSA) برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد (Bradford, 1976).

سنجش لیپید کل

از بیوماس تر *S. platensis* و مخلوط ۲:۱ کلروفرم: متانول (V/V) استفاده و سپس سونیکیشن (۸۰ هرتز، ۱۵ دقیقه و ۴۵ درجه سانتیگراد) انجام شد. از کاغذ صافی شماره ۱، برای جداسازی محلول حاوی لیپید از باقیمانده سلولی استفاده شد و محلول به دست آمده در g ۵۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و وزن لیپید خالص هر نمونه محاسبه و تعیین شد (Bligh and Dyer, 1959).

سنجش شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی/اکسیدانی

ارزیابی میزان پراکسیداسیون لیپیدی میزان پراکسیداسیون لیپیدی غشاها بر اساس سنجش غلظت مالون‌دی‌آلدهید (MDA) با روش Hodges و همکاران (۱۹۹۹) انجام شد. استخراج بهینه به کمک محلول ۲۰:۸۰ (v/v)، از آب: اتانل انجام شد. پس از سانتریفیوژ، محلول رویی یکبار با TBA- (فاقد تیوباربیئوریک اسید) و بار دیگر و به طور جداگانه با TBA+ (دارای تیوباربیئوریک اسید) حل شد. نمونه‌ها به شدت ورتکس و در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۵ دقیقه قرار داده شدند و سپس سرد شدند. میزان جذب نوری در طول موج‌های ۴۴۰، ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر خوانده شد. مقادیر مالون‌دی‌آلدهید محاسبه و به صورت درصد در وزن خشک جلبک گزارش شد.

سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی (مه‌ار رادیکال آزاد DPPH)

فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل به وسیله مه‌ار رادیکال آزاد او-۱- دی فنیل -۲- پیکریل هیدرازیل (DPPH) سنجش شد. استخراج با

بررسی تأثیر سیترات به تنهایی (C)، حاکی از عدم تغییر معنی‌دار ($p < 0.05$) مقدار بیوماس خشک نسبت به نمونه شاهد فاقد سیترات (S) در هر دو روز سوم و پنجم بود. در تأثیر همزمان سیترات و تیتانیوم، در غالب غلظت‌ها در فرم بالک و نانوذره آنتاز کاهش وزن خشک وجود داشت اما در کلیه غلظت‌های نانو ذره روتایل افزایش معنی‌دار ($p < 0.05$) وزن خشک نسبت به شاهد C مشاهده شد. در مجموع، اکثر تیمارهای مختلف اکسید تیتانیوم به جز نانوذره روتایل به تنهایی و یا با افزودن سیترات (R, R+C)، سبب کاهش بیوماس خشک شدند اما نانو ذره روتایل در روز پنجم در کلیه غلظت‌ها و تیمارهای بالک صرفاً در روز سوم، سبب افزایش معنی‌دار ($p < 0.05$) بیوماس خشک شدند.

سبب کاهش معنی‌دار ($p < 0.05$) بیوماس خشک در روز پنجم نسبت به شاهد S شد. نانوذره روتایل چه با سیترات و چه بدون آن، سبب افزایش قابل توجه بیوماس خشک در روز پنجم تنش شد. مقایسه نتایج تأثیر فرم‌های مختلف تیتانیوم فاقد سیترات با نمونه شاهد بدون سیترات (S)، نشان می‌دهد که کاهش وزن خشک در تیمارهای فرم بالک و آنتاز در روز پنجم مشاهده شد، درحالی‌که بیشترین افزایش در تیمار نانوذره روتایل هم در غلظت‌های اولیه ۱۲/۵ و ۲۵ میلی‌گرم در لیتر و هم در بیشترین غلظت (۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) وجود داشت و غلظت‌های میانی در نانوذره روتایل فاقد سیترات افزایش کمتری نسبت به سایر غلظت‌ها در این تیمار و نیز نسبت به نمونه S نشان دادند.

جدول ۲- تجزیه واریانس شاخص‌های فیزیولوژیک جلبک *S. platensis* تحت تأثیر فرم‌های TiO_2 ، غلظت TiO_2 ، وجود یا عدم وجود سیترات و مدت زمان تنش (۰، ۳ و ۵ روز). Df: درجه آزادی، Dw: وزن خشک، μm : نرخ رشد ویژه ماکزیمم، Chl a، کلروفیل a، PC: فیکوسیانین، APC: آلو فیکوسیانین.

Table 2- Variance analysis of the physiological indices of *S. platensis* algae under treatment of the TiO_2 forms, TiO_2 concentration, presence or absence of citrate and duration of stress (0, 3 and 5 days). Df, degree of freedom; DW, dry weight; μm , maximum specific growth rate; Chl a, chlorophyll a; PC, phycocyanin; APC, allophycocyanin.

تیمارها	درجه آزادی	DW	μm	Chl a	PC	APC
TiO_2	۳	۲/۵۳**	۰/۰۰۹**	۲/۸۱×۱۰ ^{-۵} **	۵۲/۴**	۰/۰۰۵**
غلظت	۴	۰/۰۴۲*	۰/۰۰۱*	۴/۵×۱۰ ^{-۷} **	۴/۴۵**	۰/۰۰۲**
سیترات	۱	۰/۱۱**	۳×۱۰ ^{-۵} ns	۸/۲×۱۰ ^{-۸} ns	۳/۱۲**	۰/۰۰۲**
زمان	۲	۱۱/۸**	۰/۰۰۴**	۸/۳×۱۰ ^{-۶} ns	۴۳/۳**	۰/۰۰۴**
$TiO_2 \times$ غلظت	۸	۰/۱**	۰/۰۰۲**	۷/۳×۱۰ ^{-۷} **	۲/۳۹**	۰/۰۰۰**
$TiO_2 \times$ سیترات	۳	۰/۳۳**	۰/۰۱۵**	۸/۶×۱۰ ^{-۷} **	۱/۳**	۰/۰۰۱**
$TiO_2 \times$ زمان	۲	۱۰/۹**	۰/۱۲۶**	۴/۳×۱۰ ^{-۶} **	۹/۹۲**	۰/۰۰۶**
سیترات × غلظت	۴	۰/۲۴**	۰/۰۰۴**	۶/۸×۱۰ ^{-۷} **	۰/۸۲**	۰/۰۰۰**
زمان × غلظت	۴	۰/۱۱**	۰/۰۰۲**	۶/۴×۱۰ ^{-۷} **	۲/۹۷**	۰/۰۰۱**
زمان × سیترات	۲	۰/۲۰**	۰/۰۰۱**	۲/۲×۱۰ ^{-۸} ns	۱/۱۸**	۰/۰۰۱**
سیترات × غلظت $TiO_2 \times$	۸	۰/۱۳**	۰/۰۰۲**	۳/۲×۱۰ ^{-۷} **	۲/۱۹**	۰/۰۰۱**
زمان × سیترات $TiO_2 \times$	۲	۰/۳۴**	۰/۰۱۷**	۳/۵×۱۰ ^{-۷} **	۱/۳۱**	۰/۰۰۰**
زمان × غلظت $TiO_2 \times$	۸	۰/۱۳۵**	۰/۰۰۲**	۳/۷×۱۰ ^{-۷} **	۳/۴۱**	۰/۰۰۱**
زمان × سیترات × غلظت	۴	۰/۰۳ns	۰/۰۰۰*	۳/۲×۱۰ ^{-۷} **	۱/۲۷**	۰/۰۰۰**
زمان × سیترات × غلظت $TiO_2 \times$	۸	۰/۰۹۴**	۰/۰۰۲**	۱/۵×۱۰ ^{-۷} **	۱/۱۴**	۰/۰۰۰**
خطا	۲۱۶	۰/۰۱۵	۰/۰۰۰	۶/۶×۱۰ ^{-۸}	۰/۰۰۶	۷/۶×۱۰ ^{-۶}
کل	۲۸۸					

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ و ۰/۰۱ و ns، نشان دهنده عدم معنی‌داری هستند.

جدول ۳- تجزیه واریانس شاخص‌های فیزیولوژیک جلبک *S. platensis* تحت تأثیر فرم‌های TiO_2 ، غلظت TiO_2 ، وجود یا عدم وجود سیترات و مدت زمان تنش (۰، ۳ و ۵ روز). Df: درجه آزادی، PE: فیکواریترین، MDA: مالون دی آلدیید، ROS: گونه‌های فعال اکسیژن.

Table 3- Variance analysis of the physiological indices of *S. platensis* algae under treatment of the TiO_2 forms, TiO_2 concentration, presence or absence of citrate and duration of stress (0, 3 and 5 days). Df, degree of freedom; PE, phycoerythrin; MDA, malondialdehyde; ROS, reactive oxygen species.

تیمارها	درجه آزادی	PE	کربو هیدرات	پروتئین	لیپید	MDA	فعالیت آنٹی اکسیدانی	ROS
TiO_2	۳	۱۳۱۵**	۲/۴۰**	۰/۶۳۴**	۰/۰۰۱**	۰/۱۰۵**	۷۵۶۲**	۰/۰۲۴**
غلظت	۴	۳/۸۴**	۰/۲۶**	۰/۰۲۰**	۰/۰۰۰**	۰/۰۰۲**	۱۳۴/۷**	۰/۰۲۸**
سین	۱	۸۸/۳**	۰/۰۱**	۰/۰۰۷**	۰/۰۰۵**	ns	۶۰۳/۸**	۰/۱۳۳**
زمان	۲	۱۹۸/۱**	۰/۹۵**	۰/۱۳۹**	۰/۰۰۴**	۰/۱۰۷**	۳۸۶۳**	۰/۰۰۴**
غلظت × TiO_2	۸	۴/۹۱**	۰/۱۴**	۰/۰۸۵**	۰/۰۰۰**	۰/۰۲۱**	۵۲/۴۵**	۰/۰۰۹**
سیترات × TiO_2	۳	۵۳/۵۶**	۰/۰۰ns	۰/۰۴۶**	۰/۰۰۱**	۰/۰۰۵**	۴۸۹/۴**	۰/۰۱۴**
زمان × TiO_2	۲	۸۶/۷۶**	۰/۲۶**	۰/۰۹۱**	۰/۰۰۲**	۰/۰۹۰**	۶۳۷/۳**	۰/۰۱۹**
سیترات × غلظت	۴	۶/۳۹**	۰/۲۲**	۰/۰۲۷**	ns	۰/۰۱۹**	۵۰/۸**	۰/۰۱۸**
زمان × غلظت	۴	۵۱/۹۵**	۰/۰۵**	۰/۰۷۰**	۰/۰۰۰**	۰/۰۰۴**	۱۲۸/۳**	۰/۰۲۱**
زمان × سیترات	۲	۳/۲۱**	۰/۰۱*	۰/۳۴۸**	۰/۰۰۱**	۰/۰۰۴**	۲۶۶/۹**	۰/۰۱۷**
سیترات × غلظت × TiO_2	۸	۱۳/۴۰**	۰/۱۵**	۰/۰۰۷**	۰/۰۰۰**	۰/۰۱۰**	۳۳/۲۱**	۰/۰۰۶**
زمان × سیترات × TiO_2	۲	۶۴/۹۹**	۰/۱۵**	۰/۱۹۶**	۰/۰۰۰**	۰/۰۰۶**	۱۱۱۴/۶**	۰/۰۲۰**
زمان × غلظت × TiO_2	۸	۲۴/۰۴**	۰/۰۶**	۰/۱۰۵**	۰/۰۰۱**	۰/۰۱۲**	۱۴۶/۷**	۰/۰۰۷**
زمان × سیترات × غلظت	۴	۱۶/۴۸**	۰/۱۷**	۰/۰۱۳**	۰/۰۰۰**	۰/۰۲۳**	۱۵/۳۴**	۰/۰۵۷**
زمان × سیترات × غلظت × TiO_2	۸	۱۵/۵۱**	۰/۱۲**	۰/۰۵۸**	۰/۰۰۰**	۰/۰۰۹**	۵۷/۸**	۰/۰۰۳**
خطا	۲۱۶	۰/۰۴۴	۰/۰۰۲	۵/۲×۱۰ ^{-۵}	ns	۳/۳×۱۰ ^{-۵}	۰/۲۶۲	۰/۰۰۰
کل	۲۸۸							

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ و ۰/۰۱ و ns، نشان دهنده عدم معنی‌داری هستند.

غلظت‌های ابتدایی و انتهایی روتایل (R5) در روز پنجم مشاهده شد. بررسی تأثیر سیترات نشان داد با آنکه میزان μ_m تحت تأثیر تیمار سیترات (C) در روز سوم، نسبت به مقدار آن در شاهد بدون سیترات (S) به‌صورت معنی‌دار ($p < 0.05$) افزایش یافت، اما این افزایش قابل توجه نبود. همچنین، در مورد تأثیر همزمان سیترات و تیتانیوم، تیمارهای فرم روتایل-سیترات سبب افزایش شاخص μ_m شدند، درحالی‌که غلظت‌های بیشتر R+C، سبب کاهش سرعت رشد شدند. در کل، فرم‌های مختلف اکسید تیتانیوم به تنهایی و یا با افزودن سیترات، به جز تیمارهای روتایل (R، R+C) سبب کاهش شاخص μ_m در روز پنجم

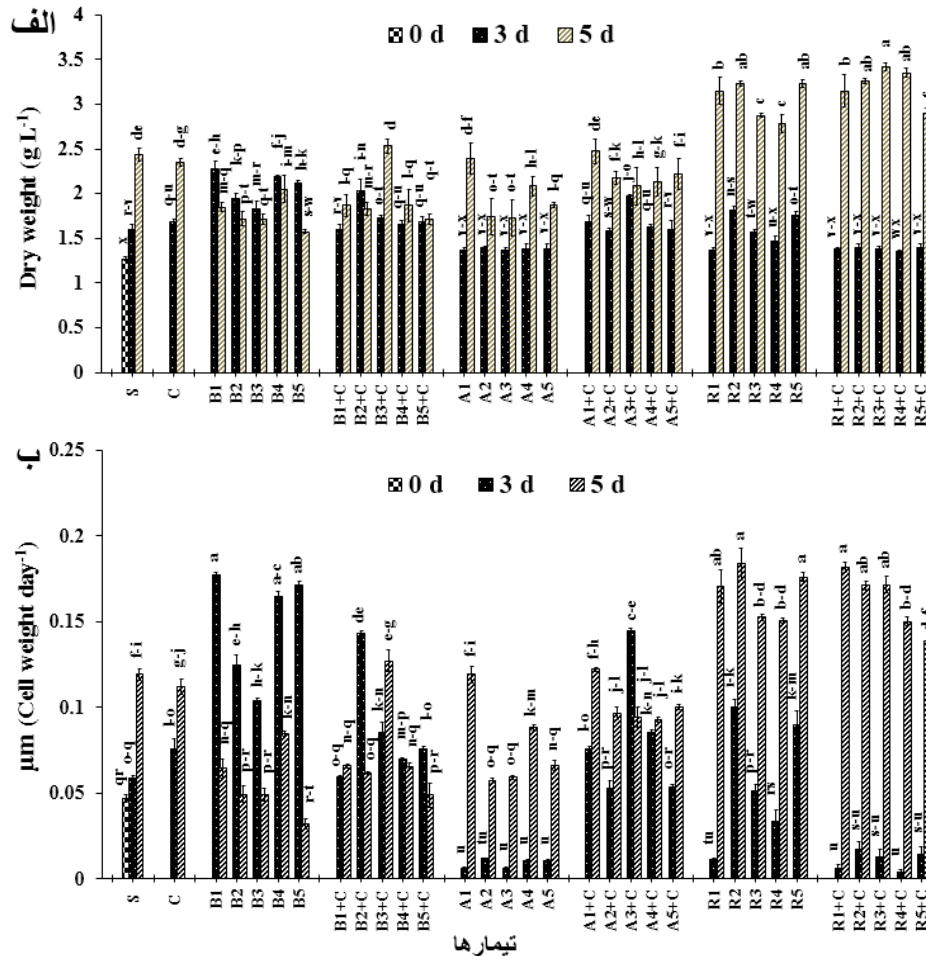
شکل ۱-ب، تأثیر تیمارها بر سرعت رشد ویژه ماکزیم (μ_m) در میکروجلبک *S. platensis* را نشان می‌دهد. در شاهد S، شاخص μ_m بر اثر گذشت زمان (از روز سوم به پنجم) افزایش یافت. از میان تیمارها، کلیه غلظت‌های فرم بالک سبب افزایش شاخص μ_m و تیمارهای آناتاز و روتایل-سیترات (R+C) سبب کاهش آن، در روز سوم تنش شدند. در روز پنجم آزمون، غالب غلظت‌های فرم‌های آناتاز و روتایل، سبب افزایش سرعت رشد، نسبت به روز سوم شدند. در مقایسه تأثیر تیمارهای فاقد سیترات با نمونه شاهد بدون سیترات (S)، نانوذره روتایل سبب افزایش معنی‌دار ($p < 0.05$) شاخص μ_m شد و بیشترین مقدار در

نسبت به شاهد‌های S و C شدند. اما تأثیر نانوذره آناتاز، به صورت دارا بودن محتوای بیشتر کلروفیل *a* در سلولها نسبت به سایر تیمارها نمایان شد. بررسی تأثیر سیترات (C)، نشان‌دهنده عدم تغییر معنی‌دار ($p < 0.05$) مقدار کلروفیل *a* نسبت به نمونه شاهد فاقد سیترات (S) بود.

شدند، و نانوذره روتایل در روز پنجم تنش سبب افزایش شاخص μ_m شد.

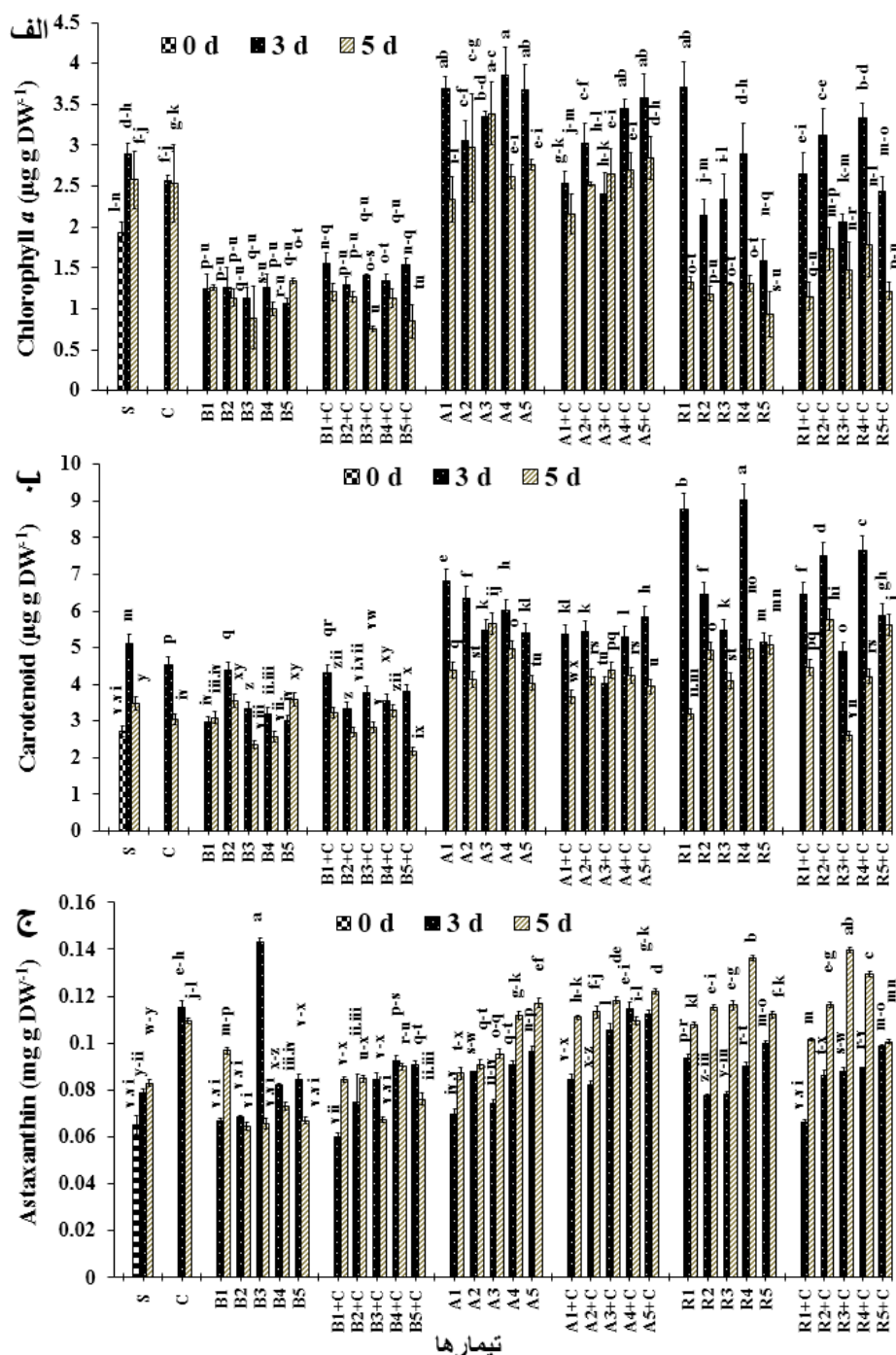
تأثیر تیمارها بر رنگیزه‌های فتوسنتزی

بر اساس شکل ۲-الف، در نمونه شاهد S، مقدار کلروفیل *a* با گذشت زمان تغییر نکرد. همه غلظت‌های بالک (با یا بدون سیترات) و غالب تیمارهای روتایل (به‌ویژه در روز پنجم) سبب کاهش معنی‌دار ($p < 0.05$) مقدار کلروفیل



شکل ۱- بیوماس خشک (الف) و سرعت رشد ویژه ماکزیمم (μ_m) (ب). S: سوسپانسیون میکروجلبک فاقد سیترات (شاهد S)، C: سوسپانسیون میکروجلبک دارای سیترات (شاهد C)، B1 تا B5 بالک TiO₂، B1+C تا B5+C بالک و سیترات، A1 تا A5 نانواناتاز TiO₂، A1+C تا A5+C نانواناتاز و سیترات، R1 تا R5 نانوروتایل TiO₂، R1+C تا R5+C نانو روتیل و سیترات، اعداد ۱ تا ۵، به ترتیب غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر TiO₂ در روزهای سوم و پنجم آزمون. داده‌ها میانگین سه تکرار \pm SD بوده و حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح $p < 0.05$ است.

Figure 1-dry biomass (A) and maximum specific growth rate (μ_m) (B). S, microalgal suspension without citrate (control S); C, microalgal suspension with citrate (control C); B1 to B5 bulk TiO₂; B1+C to B5+C bulk and citrate; A1 to A5 nanoanatase TiO₂; A1+C to A5+C nanoanatase and citrate; R1 to R5 nanorutile TiO₂; R1+C to R5+C nano rutile and citrate; Numbers 1 to 5, respectively, concentrations of 12.5, 25, 50, 100, and 200 mg L⁻¹ TiO₂ at 3 and 5 days of the experiment. The data is the average of three replicates \pm SD, and different letters indicate significant differences based on Duncan's test at $p < 0.05$.



شکل ۲- رنگدانه های کلروفیل *a* (الف)، کاروتنوئید کل (ب)، آستاگزانتین (ج). S: سوسپانسیون میکروجلبک فاقد سیترات (شاهد S)، C: سوسپانسیون میکروجلبک دارای سیترات (شاهد C)، B1 تا B5 با TiO_2 بالک، B1+C تا B5+C بالک و سیترات، A1 تا A5 نانواناتاز TiO_2 ، A1+C تا A5+C نانواناتاز و سیترات، R1 تا R5 نانوروتیل TiO_2 ، R1+C تا R5+C نانوروتیل و سیترات، اعداد ۱ تا ۵ به ترتیب غلظت های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر TiO_2 در روزهای سوم و پنجم آزمون. داده‌ها میانگین سه تکرار \pm SD بوده و حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح $p < 0.05$ است.

Figure 2- Pigments Chlorophyll *a* (A), Total Carotenoid (B), Astaxanthin (C). S, microalgal suspension without citrate (control S); C, microalgal suspension with citrate (control C); B1 to B5 bulk TiO_2 ; B1+C to B5+C bulk and citrate; A1 to A5 nanoanatase TiO_2 ; A1+C to A5+C nanoanatase and citrate; R1 to R5 nanorutile TiO_2 ; R1+C to R5+C nano rutile and citrate; Numbers 1 to 5, respectively, concentrations of 12.5, 25, 50, 100, and 200 $mg L^{-1}$ TiO_2 at 3 and 5 days of the experiment. The data is the average of three replicates \pm SD, and different letters indicate significant differences based on Duncan's test at $p < 0.05$.

تحت تأثیر تیمارهای تیتانیوم و حتی تیمار C، مقدار رنگدانه PC، در غالب اوقات در روز پنجم کاهش یافت. افزایش قابل ملاحظه و معنی‌دار ($p < 0.05$) مقدار PC، تحت تأثیر تیمارهای بالک و فرم نانوروتایل، به ویژه نسبت به S مشاهده شد، درحالی‌که نانوذره آنتاز، مشابه بالک و روتایل بر افزایش آستاگزانتین تأثیر تحریک‌کنندگی نداشت. تیمار سیترات سبب تحریک تولید قابل ملاحظه PC در روز سوم نسبت به S، و کاهش آن در روز پنجم شد. بیشترین مقدار فیکوسیانیین تحت تأثیر غلظت ۱۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر نانوروتایل (R1) در روز سوم تنش به دست آمد.

بر اساس شکل ۳-ب، علیرغم ثبات نسبی مقدار APC در نمونه شاهد S، مقدار رنگدانه تقریباً در کلیه تیمارها، در روز پنجم (نسبت به روز سوم)، کاهش یافت. برخلاف تأثیر فرم بالک و نانوذره روتایل، نانوذره آنتاز (با یا بدون سیترات) سبب تحریک تولید یا تجمع قابل ملاحظه و معنی‌دار ($p < 0.05$) APC نسبت به تیمارهای بالک و روتایل شد. در مقایسه با شاهد S، سیترات (C) سبب کاهش معنی‌دار ($p < 0.05$) مقدار رنگدانه شد، همچنین، تأثیر همزمان آن با TiO_2 ، در غالب موارد سبب افزایش مقدار APC، نسبت به شرایط تیمار بدون سیترات نشد. بیشترین مقدار رنگدانه در غلظت ۱۲/۵ میلی‌گرم در لیتر (A1) و در روز سوم مشاهده شد.

شکل ۳-ج مقدار رنگدانه PE را برحسب میکروگرم در گرم وزن خشک نشان می‌دهد. تغییر در مقدار رنگدانه PE تقریباً مشابه تغییرات APC بود، به جز آنکه اختلاف مقادیر رنگدانه در تیمارهای مختلف، مثلاً میان تأثیر تیمارهای بالک و روتایل نسبت به تأثیر آنتاز کمتر بود، بنابراین، دوباره تیمارهای آنتاز سبب تحریک تولید معنی‌دار ($p < 0.05$) PE نسبت به سایر تیمارهای دی‌اکسید تیتانیوم شدند و مقدار شاخص در روز پنجم در اغلب تیمارها، کاهش یافت.

تأثیر تیمارها بر ترکیبات درون سلولی و فرآورده‌های متابولیکی

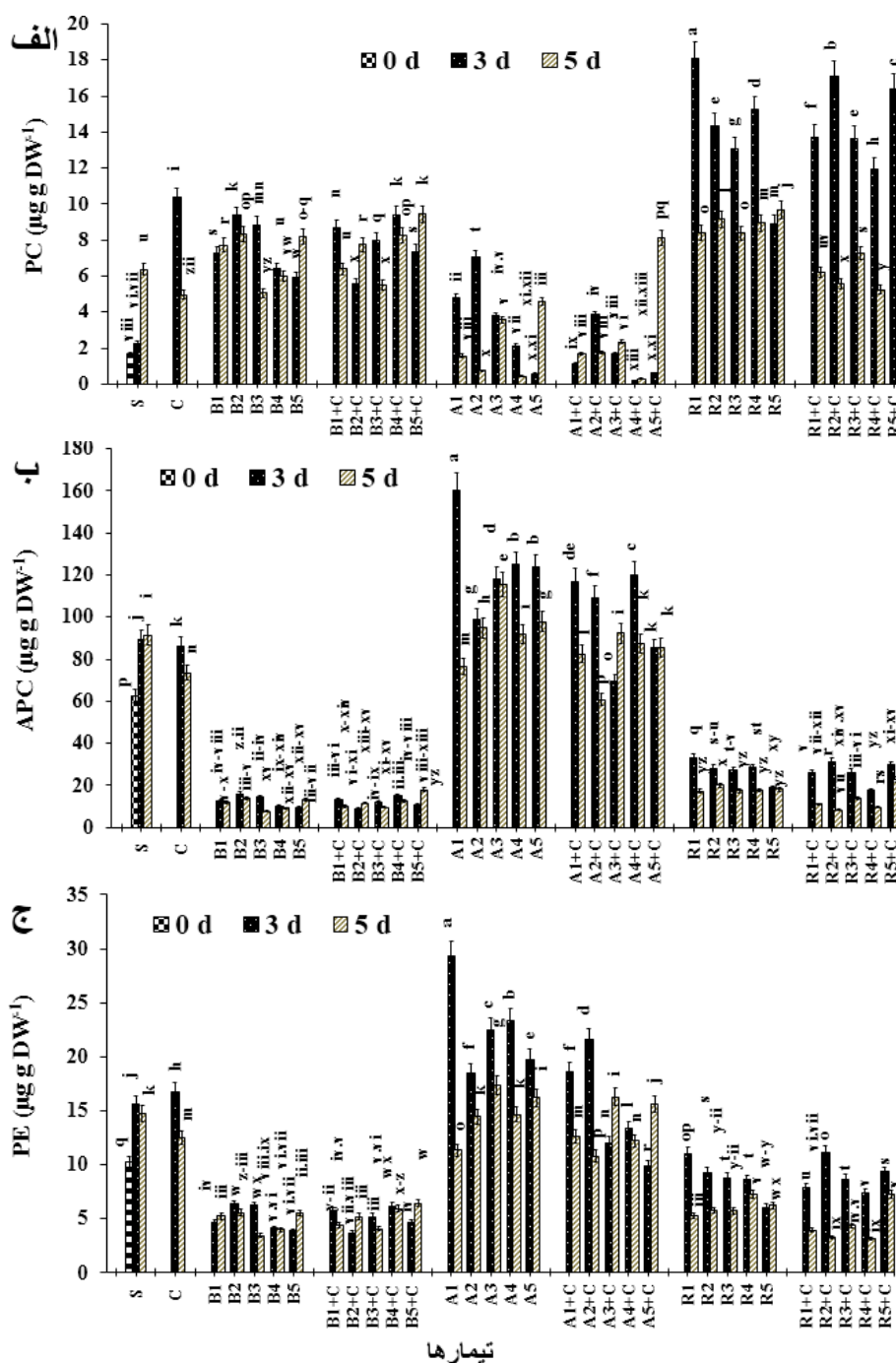
شکل ۴، مقدار کربوهیدرات، پروتئین و لیپید را نشان می‌دهد. مقدار کربوهیدرات در نمونه

شکل ۲-ب، مقدار کاروتنوئید کل جلبک را برحسب میکروگرم در گرم وزن خشک نشان می‌دهد. در نمونه شاهد S، مقدار کاروتنوئید با گذشت زمان تنش کاهش یافت. روند کاهش مقدار کاروتنوئید در روز پنجم تنش نسبت به روز سوم، تقریباً در کلیه تیمارها مشاهده شد. بیشترین مقدار کاروتنوئید تحت تأثیر نانوذره روتایل در غلظت ۱۰۰ (R4) و سپس در غلظت ۱۲/۵ میلی‌گرم در لیتر (R1) مشاهده شد. سیترات به تنهایی (C) سبب کاهش معنی‌دار ($p < 0.05$) مقدار کاروتنوئید نسبت به نمونه شاهد فاقد سیترات (S) شد. تقریباً کلیه غلظت‌های نانوذرات آنتاز و روتایل، سبب افزایش معنی‌دار ($p < 0.05$) مقدار کاروتنوئید، و فرم بالک سبب کاهش یا بی‌تغییر ماندن آن شدند.

شکل ۲-ج مقدار آستاگزانتین تولید شده را برحسب میلی‌گرم در گرم وزن خشک در تیمارهای مختلف در روزهای سوم و پنجم تنش نشان می‌دهد. در نمونه شاهد S، مقدار آستاگزانتین با افزایش روزهای تنش ثابت ماند. برخی تیمارهای فرم بالک سبب کاهش مقدار آستاگزانتین از روز سوم به پنجم شدند، به جز غلظت میانی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر (B3) که افزایش معنی‌دار ($p < 0.05$) مقدار آستاگزانتین را نسبت به سایر تیمارها نشان داد. نانوآنتاز و نانوروتایل، سبب افزایش معنی‌دار ($p < 0.05$) مقدار آستاگزانتین نسبت به شاهد S، (به ویژه در روز پنجم) شدند.

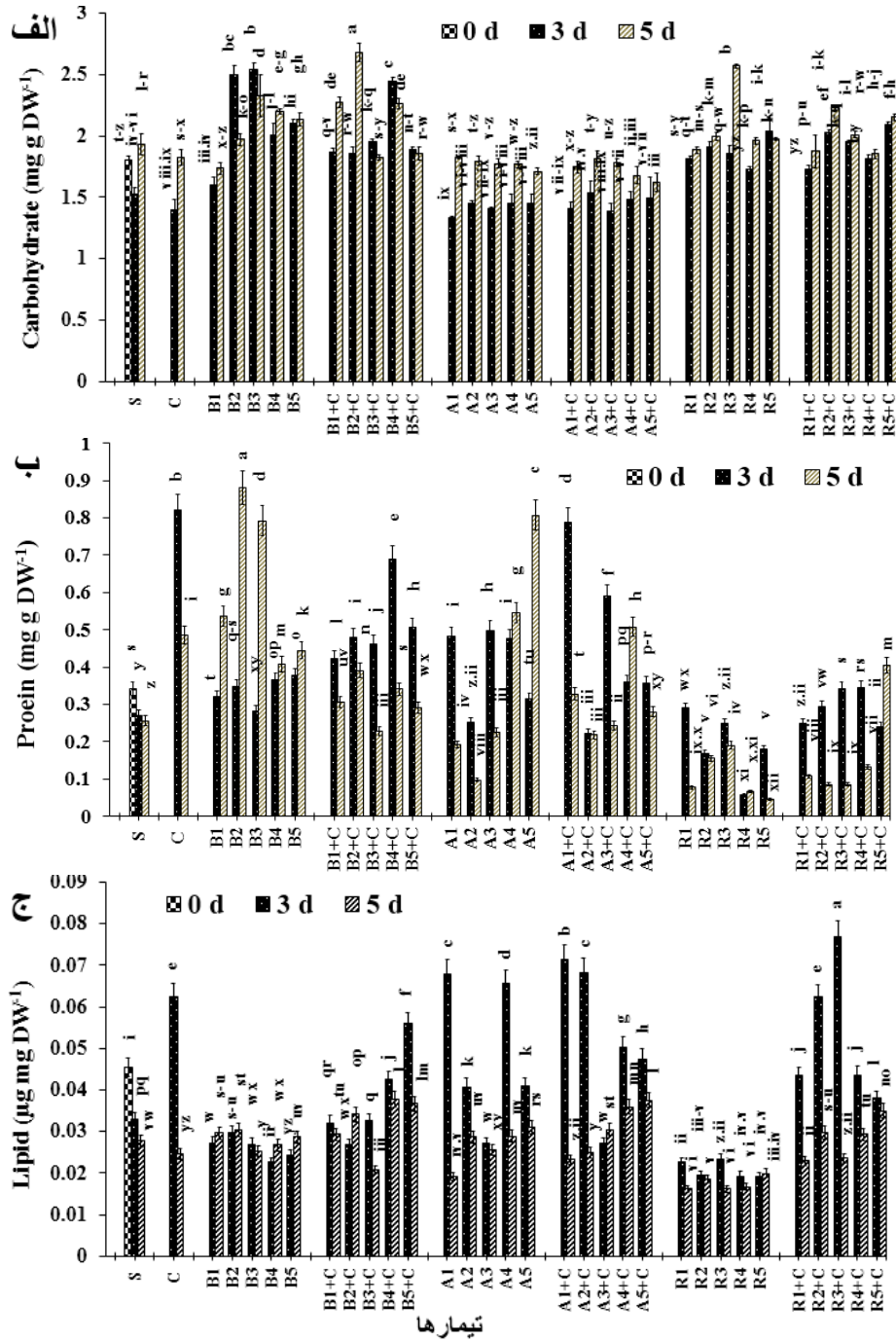
سیترات (C) سبب افزایش قابل توجه مقدار آستاگزانتین نسبت به شاهد S شد، با اینحال تأثیر همزمان آن با تیمار تیتانیوم، بسته به نوع فرم تیتانیوم متفاوت بود، مثلاً تحت تأثیر آنتاز و سیترات (A+C)، افزایش بیشتری نسبت به تأثیر آنتاز بدون سیترات (A) مشاهده شد. در مجموع، غالباً غلظت‌های ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات تیتانیوم و بالاتر از آن سبب افزایش آستاگزانتین نسبت به C شدند.

شکل ۳، تغییرات رنگدانه‌های فیکوسیانیین (الف)، آلفیکوسیانیین (ب) و فیکواریترین (ج) را برحسب میکروگرم در گرم وزن خشک جلبک نشان می‌دهد. بر اساس شکل ۳-الف، در نمونه شاهد S، مقدار رنگدانه فیکوسیانیین با افزایش روزهای تنش افزایش یافت، درحالی‌که



شکل ۳- رنگدانه‌های فیکوسیانین (PC) (الف)، آلفیکوسیانین (APC) (ب) و فیکوارترین (PE) (ج). S: سوسپانسیون میکروجلبک فاقد سیترات (شاهد S)، C: سوسپانسیون میکروجلبک دارای سیترات (شاهد C)، B1 تا B5 بالک TiO₂، B1+C تا B5+C بالک و سیترات، A1 تا A5 نانواناتاز TiO₂، A1+C تا A5+C نانواناتاز و سیترات، R1 تا R5 نانوروتیل TiO₂، R1+C تا R5+C نانو روتیل و سیترات، اعداد ۱ تا ۵ به ترتیب غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر TiO₂ در روزهای سوم و پنجم آزمون. داده‌ها میانگین سه تکرار ±SD بوده و حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار براساس آزمون دانکن در سطح p < 0.05 است.

Figure 3- Pigments Phycocyanin (PC) (A), Allophycocyanin (APC) (B), Phycoerithrin (PE) (C). S, microalgal suspension without citrate (control S); C, microalgal suspension with citrate (control C); B1 to B5 bulk TiO₂; B1+C to B5+C bulk and citrate; A1 to A5 nanoanatase TiO₂; A1+C to A5+C nanoanatase and citrate; R1 to R5 nanorutile TiO₂; R1+C to R5+C nano rutile and citrate; Numbers 1 to 5, respectively, concentrations of 12.5, 25, 50, 100, and 200 mg L⁻¹ TiO₂ at 3 and 5 days of the experiment. The data is the average of three replicates±SD, and different letters indicate significant differences based on Duncan's test at p<0.05.



شکل ۴- کربوهیدرات محلول کل (الف)، پروتئین محلول کل (ب)، لیپید (ج). S: سوسپانسیون میکروجلبک فاقد سیترات (شاهد S)، C: سوسپانسیون میکروجلبک دارای سیترات (شاهد C)، B1 تا B5 بالک TiO₂، B1+C تا B5+C بالک و سیترات، A1 تا A5 نانوذرات TiO₂، A1+C تا A5+C نانوذرات TiO₂ و سیترات، R1 تا R5 نانوذرات روتایل TiO₂، R1+C تا R5+C نانوذرات روتایل و سیترات، اعداد ۱ تا ۵ به ترتیب غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر TiO₂ در روزهای سوم و پنجم آزمون. داده‌ها میانگین سه تکرار ±SD بوده و حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار براساس آزمون دانکن در سطح p < 0.05 است.

Figure 4- Total soluble carbohydrate (A), Total soluble protein (B), Lipid (C). S, microalgal suspension without citrate (control S); C, microalgal suspension with citrate (control C); B1 to B5 bulk TiO₂; B1+C to B5+C bulk and citrate; A1 to A5 nanoanatase TiO₂; A1+C to A5+C nanoanatase and citrate; R1 to R5 nanorutile TiO₂; R1+C to R5+C nano rutile and citrate; Numbers 1 to 5, respectively, concentrations of 12.5, 25, 50, 100, and 200 mg L⁻¹ TiO₂ at 3 and 5 days of the experiment. The data is the average of three replicates±SD, and different letters indicate significant differences based on Duncan's test at p < 0.05.

تیتانیوم به دست آمد. مقدار MDA در نمونه های تیمار شده با نانوذره روتایل در روز پنجم، خیلی بیشتر از نمونه های تیمار شده با آناتاز کاهش یافت. تحت تأثیر تیمارهای بالک، چه در روز سوم و چه در روز پنجم، مقدار مالون دی آلدیید نسبت به هر دو S و C به صورت معنی‌دار ($p < 0.05$) کاهش یافت.

در نمونه شاهد S، پتانسیل آنتی اکسیدانی کل سلول، در روز پنجم نسبت به روز سوم، به شدت کاهش یافت (شکل ۵-ب). تیمار بالک تیتانیوم توانست سبب تحریک پتانسیل آنتی اکسیدانی سلولها، به مقدار بسیار قابل توجه و معنی‌دار ($p < 0.05$) در هر دو روز سوم و پنجم نسبت به شاهد های S و C شود. مقدار فعالیت آنتی اکسیدانی در روز سوم در نمونه های تیمار شده با آناتاز (A) نیز به شدت افزایش یافت، اما در روز پنجم مقدار آن نسبت به روز سوم بسیار کاهش پیدا کرد. پتانسیل آنتی اکسیدانی تحت تأثیر شاهد سیترات (C) در روز پنجم قدری بالاتر از نمونه شاهد S بود، اما تفاوت زیادی در مقدار شاخص تحت تأثیر نمونه های دارای سیترات و فاقد آن در R و B ملاحظه نشد، در حالی که سیترات سبب کاهش زیاد و معنی‌دار ($p < 0.05$) فعالیت آنتی اکسیدانی در نمونه های تیمار شده آناتاز (A+C) نسبت به نمونه آناتاز بدون سیترات (A) شد.

مقدار ROS در نمونه شاهد S، در روز پنجم قدری افزایش پیدا کرد (شکل ۵-ج) و این افزایش به میزان بسیار بیشتری تحت تأثیر تیمار سیترات مشاهده شد. سیترات در تیمار همزمان با بالک و روتایل سبب تحریک تولید ROS شد. غالباً غلظت های ابتدایی و نیز بالاترین غلظت ها، سبب تحریک تولید ROS شدند. بیشترین مقدار ROS به طور معنی‌دار ($p < 0.05$) در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر تیمار روتایل به همراه سیترات (R+C) ملاحظه شد.

بحث

این تحقیق، با هدف ارزیابی مقایسه ای تأثیرات احتمالی تحریک کنندگی و یا بررسی تأثیرات منفی تیمارهای بالک و نانوذرات TiO_2 آناتاز و روتایل به همراه یا فاقد ترکیب سیترات، در غلظت های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰

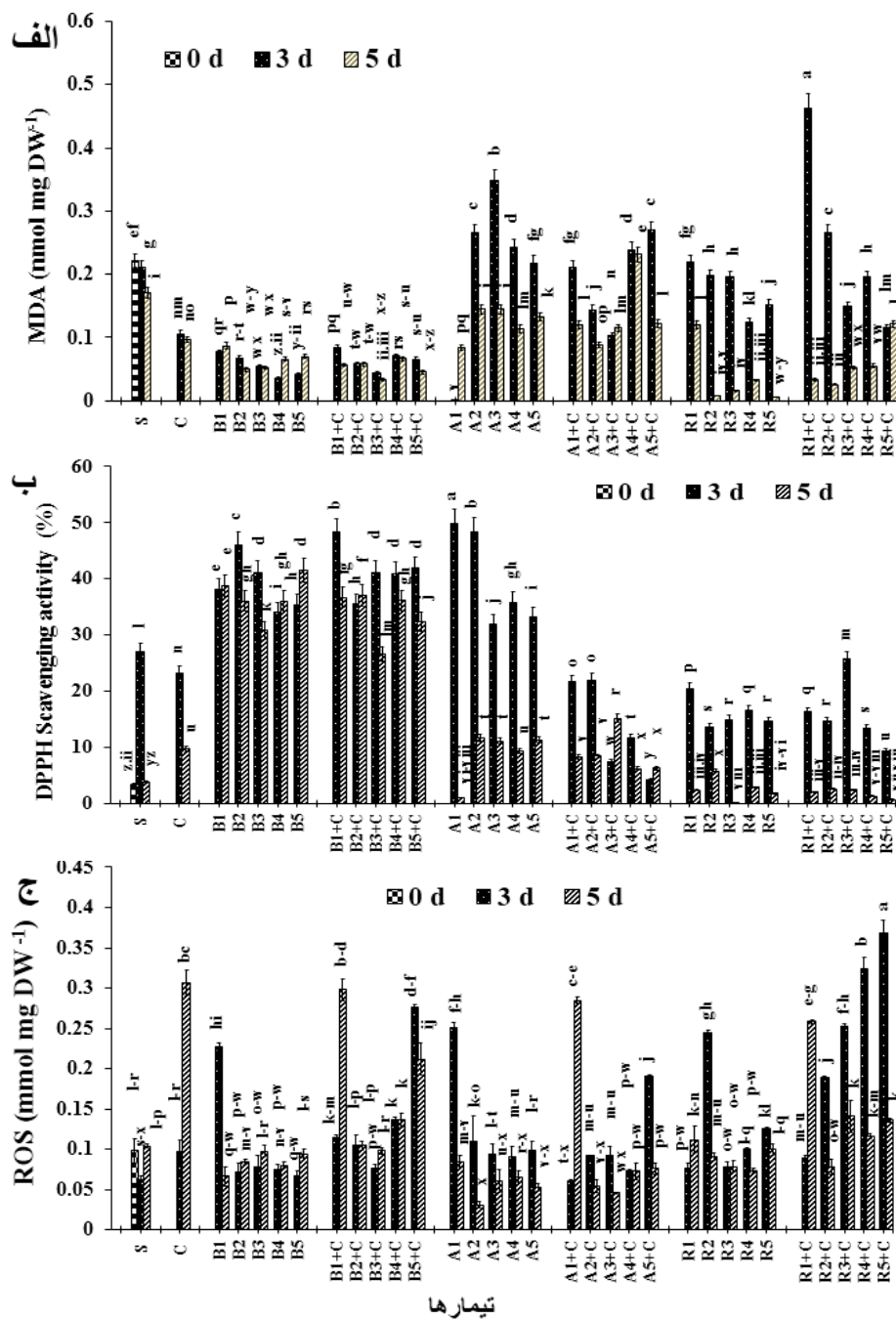
شاهد S و نیز اکثر تیمارها، در روز پنجم افزایش پیدا کرد (شکل ۴-الف). بیشترین مقدار کربوهیدرات در تیمار با فرم بالک و سیترات در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر (B2+C) و در روز پنجم تنش تولید شد. برخلاف فرم روتایل، فرم آناتاز با یا بدون سیترات (A, A+C) سبب کاهش مقدار کربوهیدرات نسبت به S شد، در حالی که تیمارهای فرم بالک، سبب افزایش قابل توجه و معنی‌دار ($p < 0.05$) مقدار کربوهیدرات نسبت به S و C شد. سیترات (C) سبب کاهش مقدار کربوهیدرات نسبت به نمونه شاهد فاقد سیترات (S) شد و نانوذرات به همراه سیترات، سبب بهبود شاخص نشدند.

مقدار پروتئین در نمونه شاهد S، با افزایش روزهای تنش تغییر زیادی نکرد ولی تیمار سیترات (C) مقدار آن را به ویژه در روز سوم، به صورت معنی‌دار ($P < 0.05$) افزایش داد (شکل ۴-ب). سایر تیمارها، به ویژه تیمارهای بالک و آناتاز نیز، سبب تحریک تولید پروتئین شدند. سیترات در تیمار با بالک (B+C)، سبب تحریک معنی‌دار ($p < 0.05$) تولید پروتئین در روز سوم (در مقایسه با تأثیر تیمار B) شد، اما میزان آن را در روز پنجم نسبت به تیمار B کاهش پیدا کرد.

شکل ۴-ج مقدار لیپید کل را بر حسب میکروگرم در گرم وزن خشک نشان می‌دهد. سیترات مقدار لیپید را در روز سوم نسبت به شاهد به صورت معنی‌دار ($p < 0.05$) افزایش و در روز پنجم کاهش داد. از میان سایر تیمارها، بیشترین تأثیر افزایشی به تیمارهای آناتاز (A, A+C) و تیمار روتایل (R+C) در روز سوم مربوط بود.

تغییرات شاخص های اکسیدانی/ آنتی اکسیدانی

مقدار MDA در روز پنجم در شاهد S، نسبت به روز سوم، به مقدار کمی کاهش یافت (شکل ۵-الف)، در حالی که تحت تأثیر سیترات تغییر نکرد. نانوذرات آناتاز و روتایل، سبب افزایش معنی‌دار ($p < 0.05$) پراکسیداسیون لیپیدی غشاء و MDA در روز سوم، نسبت به شاهد S شدند. بیشترین مقدار MDA تحت تأثیر تیمار روتایل با سیترات (R+C) و در غلظت ۱۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر و سپس غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر آناتاز (A) یعنی غلظت های ابتدایی دی اکسید



تیمارها

شکل ۵- مقدار مالون‌دی‌آلدهید (MDA) (الف)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل (درصد مهار DPPH) (ب) و میزان رادیکال‌های فعال اکسیژن (ROS) (ج). S: سوسپانسیون میکروجلبک فاقد سیترات (شاهد S)، C: سوسپانسیون میکروجلبک دارای سیترات (شاهد C)، B1 تا B5 بآلک TiO₂، B1+C تا B5+C بآلک و سیترات، A1 تا A5 نانواناتاز TiO₂، A1+C تا A5+C نانواناتاز و سیترات، R1 تا R5 نانوروتیل TiO₂، R1+C تا R5+C نانو روتیل و سیترات، اعداد ۱ تا ۵ به‌ترتیب غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر TiO₂ در روزهای سوم و پنجم آزمون. داده‌ها میانگین سه تکرار ±SD بوده و حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار براساس آزمون دانکن در سطح p < 0.05 است.

Figure 5- Malondealdehyde (MDA) (A), Total antioxidant potential (percentage of DPPH Scavenging) (B), Reactive oxygen species (ROS) (C). S, microalgal suspension without citrate (control S); C, microalgal suspension with citrate (control C); B1 to B5 bulk TiO₂; B1+C to B5+C bulk and citrate; A1 to A5 nanoanatase TiO₂; A1+C to A5+C nanoanatase and citrate; R1 to R5 nanorutile TiO₂; R1+C to R5+C nano rutile and citrate; Numbers 1 to 5, respectively, concentrations of 12.5, 25, 50, 100, and 200 mg L⁻¹ TiO₂ at 3 and 5 days of the experiment. The data is the average of three replicates ±SD, and different letters indicate significant differences based on Duncan's test at p < 0.05.

نسبت به تیمار با روتایل در غلظت‌های ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نشان داد (Ghazaei and Shariati, 2019).

با این حال نتایج سنجش میزان ROS در پژوهش حاضر، در میکروجلبک *S. platensis*، بالا بودن محتوای ROS در اکثر تیمارهای نانوذره آنتاز در روزهای سوم و پنجم نمونه برداری را نشان نداد (شکل ۵-ج)، بالعکس تیمارهای نانوذره R+C و تا حدودی B+C (به‌ویژه در روز سوم تنش)، مقادیر بیشتر ROS را نسبت به شاهد بدون سیترات (S) نشان دادند. همچنین، بررسی مقدار ROS در شاهد C نشان داد که محتوای رادیکال‌های آزاد اکسیژن در روز پنجم در این نمونه زیاد است، در حالی‌که حضور همزمان تیتانیوم و سیترات، سبب کاهش قابل توجه ROS در کلیه تیمارهای حاوی سیترات، در روز پنجم، (نسبت به شاهد C) شد.

بر اساس آزمایشات Mudunkotuwa و Grassia (2010)، جذب سطحی سیترات بر روی نانوذرات TiO_2 و تشکیل کمپلکس سیترات-نانوفلز در محلول، موجب ممانعت از تجمع و به هم پیوستگی نانوذرات TiO_2 می‌شود. این مسأله دسترسی سلول به نانوفلز را افزایش می‌دهد. همچنین، Zhou و همکارانش (۲۰۱۶) نشان دادند که کمپلکس شدن سیترات با نانوذرات Ag، به خاطر وجود بار منفی سطحی سیترات، سبب محدود نمودن جذب الکترواستاتیک نانوذره به سطح سلول *Chlorella* شده و بنابراین، ورود کمپلکس نانوفلز-سیترات به درون سلول را تسهیل می‌کند. با این وجود، همین محققان (Zhou et al., 2016) در بخش دیگری از تحقیقات خود نشان دادند که آگروپلیمرهای متصل به سطح خارجی سلول جلبک (نظیر ترکیبات پلی ساکارییدی، پروتئین‌ها و غیره) سبب جذب سطحی بخشی از کمپلکس نانوفلز-سیترات می‌شوند و حذف این آگروپلیمرها از سطح سلول، می‌تواند جذب صرفاً سطحی کمپلکس سیترات-نانوفلز را کاهش و ورود آن به داخل سلول را افزایش دهد. بنابراین، افزایش میزان این آگروپلیمرها بر اثر شرایط محیطی، می‌تواند سهم جذب سطحی کمپلکس سیترات-نانوفلز بر روی سطح سلول را افزایش داده و

میلی‌گرم در لیتر بر روی میکروجلبک *S. platensis* در یک دوره ۵ روزه آزمون انجام شد.

بر اساس نتایج به‌دست آمده از تأثیر تیمار نانوذرات TiO_2 بر شاخص‌های فیزیولوژیک میکروجلبک *S. platensis*، نانوذره روتایل در حضور سیترات یا بدون آن، در مقایسه با شاهد، بهتر از فرم بالک توانست سبب افزایش بیوماس خشک (شکل ۱-الف) و شاخص μ_m (شکل ۱-ب) شود، در حالی‌که نانوذره آنتاز، سبب کاهش بیوماس شد. این مسأله را می‌توان به اختلاف در سایز ذرات و بیش از آن به اختلاف سطح ویژه (SSA) ایجاد شده توسط ذرات روتایل و آنتاز نسبت داد. هنگامی که اندازه ماده در مقیاس نانومتر کوچکتر می‌شود، خواص فیزیکی و شیمیایی جدیدی ظاهر می‌شوند که تا حد زیادی تحت تأثیر اندازه و هندسه هستند (Parrino et al., 2021). در این تحقیق، اندازه نانوذرات آنتاز در محدوده ۱۰ تا ۲۵ نانومتر و کوچکتر از سایز ذرات روتایل (حدود ۳۰ نانومتر) و همچنین، سطح ویژه نانوذره آنتاز تقریباً ۵ برابر بیشتر از سایز نانوذره روتایل بوده است. این ویژگی‌ها می‌توانند بر تأثیرات نانوذره بر سلول تأثیر بگذارند و هرچه سطح تماس سلول با نانوذرات بیشتر باشد، در القای پاسخ سلولی نسبت به آنها مؤثرتر است (Gao et al., 2018). کلمنت و همکاران (۲۰۱۳) اظهار کردند که نانوذرات روتایل، به دلیل چربی دوستی ساختار کریستالیشان، مولکول‌های بزرگتری را در محیط آبی تشکیل می‌دهد و بنابراین، از طریق کاهش سطح تماس، سمیت کمتری نسبت به شکل کریستالی آنتاز دارند (Clement et al., 2013). در مطالعه دیگری، برهمکنش جلبک سبز *Chlorella pyrenoidosa* با آنتاز و روتایل TiO_2 -NPs و سمیت آنها مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایشات نیز نانوذرات آنتاز دارای سمیت سلولی بالاتری نسبت به نانوذره روتایل بودند که به افزایش میزان ROS و در نتیجه آسیب اکسیداتیو بیشتر آنتاز ربط داده شدند (Odling and Robertson, 2015). آزمایشات دیگری که بر روی جلبک *Dunaliella* انجام شد، کاهش بیشتر μ_m سلولها بر اثر تیمار با دی‌اکسید تیتانیوم آنتاز را

نسبت به شرایط جدید، این فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی به شرایط قبل از تلقیح، بازگشت نموده‌اند.

بررسی فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی تیمارهای حاوی نانوذرات (شکل ۵-ب) نشان داد که در روز سوم، فعالیت مهار رادیکال DPPH توسط سیستم آنتی‌اکسیدانی سلول در تیمارهای نانوذرات افزایش یافته و احتمال می‌رود که دست کم بخشی از کاهش مقدار ROS در نمونه‌های آنتاز فاقد سیترات به همین دلیل اتفاق افتاده باشد. اگرچه در یک تحقیق نشان داده شده که نانوذرات Cu و Ag می‌توانند مستقیماً به رادیکال DPPH الکترون داده و آنرا احیا نمایند (Mallikarjuna et al., 2020). در واقع این عمل مستقل از فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی سلول انجام می‌شود و این احتمال که در سنجش میزان مهار DPPH در نمونه‌های تحقیق حاضر، نیز (هرچند به مقدار کم اتفاق افتاده باشد) وجود دارد.

مقدار فعالیت آنتی‌اکسیدانی برای خاموش سازی DPPH، در هر دو روز سوم و پنجم غالباً در نمونه‌های حاوی نانوذره بالک، از سایر نمونه‌ها بیشتر بود. نتایج تحقیقات Sendra و همکاران (۲۰۱۷)، نشان داد که میزان ترشح آگزوپلیمرهای سلول‌های جلبک‌های *Chlamydomonas* و *Phaeodactylum* در تیمار با نانوذرات TiO_2 ، بسیار بیشتر از زمانی است که با نمونه بالک TiO_2 تیمار می‌شوند. این مساله ممکن است، به تجمع بیشتر و متراکم شدن ذرات نانوفلز در مقایسه با نمونه بالک اشاره داشته باشد که از تأثیر بر سلول و تحریک فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن، در مقایسه با ذرات نمونه بالک می‌کاهد و این تأثیر در روز پنجم، بیشتر خود را نشان می‌دهد. با این حال آثار منفی ذرات نانو بر غشاهای سلول و افزایش میزان MDA در کلیه تیمارهای حاوی نانوذره (در مقایسه با بالک)، دست کم در روز سوم قابل مشاهده است (شکل ۵-الف).

بر اساس شکل ۱- الف، نانوذره روتایل (R, R+C)، در روز پنجم و نمونه بالک بدون سیترات (B) در روز سوم، موجب افزایش وزن خشک و μ_m نسبت به شاهد S شدند که سرعت رشد ویژه بالاتری بر اساس وزن خشک را نشان داد. بررسی‌های محققان نشان

بالعکس ورود آن به درون سلول را کاهش دهد. برخی مطالعات، افزایش و تحریک تولید آگزوپلیمرهای سیانوباکترها در پاسخ به تنش های فلزی را نشان داده‌اند (Behzadian et al., 2020).

از آنجا که سیترات به‌عنوان یک مخزن کربنی و یک عامل کلیدی در چرخه کربس و روند کاتابولیسم کربوهیدرات نقش دارد، ورود آن به داخل سلول و تغییرات مقدار آن در درون سلول می‌تواند با طولانی شدن زمان در معرض قرارگیری تشدید شود و ممکن است، حالت تعادل انرژیایی سلول و تعادل مخزن کربن به نیتروژن را دستخوش تغییر نماید (Kynshi et al., 2021) و این عدم تعادل سبب تولید ROS بیشتر شود. اختلاف زیاد در مقدار ROS در شاهد C در روز پنجم و سوم نسبت به عدم اختلاف مقدار ROS در این دو روز در شاهد S، می‌تواند با ورود بیشتر سیترات به درون سلول در طی زمان مرتبط باشد.

محتوای ROS غالب تیمارها در روز پنجم نسبت به روز سوم، مقدار کمتری را نشان داد که می‌تواند حاکی از سازگار شدن سلول با شرایط تیمار، در نتیجه پاسخ‌های سلولی باشد که بخشی از آنها فعالیت‌های انجام شده برای مهار رادیکال‌های آزاد است. بخش دیگری از پاسخ‌های سلولی می‌توانند افزایش تولید و ترشح آگزوپلیمرهایی باشند که قادر هستند چه در داخل سلول و چه بر روی سطح آن، سبب تجمع نانوذرات تیتانیوم و کاهش ورود و تأثیر آنها بر سلول شوند. در زمینه تولید آگزوپلیمرهایی نظیر پلی ساکاریدها، پروتئین‌ها و غیره از سلول‌های میکروجلبکی که در معرض تنش نانوفلزات قرار گرفته‌اند، گزارش‌های زیادی وجود دارد (Sendra et al., 2017; Zhou et al., 2016).

بررسی نتایج به‌دست آمده از سنجش مهار رادیکال آزاد DPPH، بالارفتن فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی در روز سوم در نمونه S که در واقع فاقد هر گونه تیمار است را نسبت به نمونه استوک مادر نشان داد (شکل ۵-ب). تلقیح سلول‌ها در محیط جدید، به خاطر تغییر شرایط کشت و نیز شرایط نوری سلولها، می‌تواند برای مدتی سبب القای آنتی‌اکسیدان‌های سلول شود و در روز پنجم، با سازگار شدن سلولها

زیادی تأیید شده است. کلمنت و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که مدت زمان در معرض بودن نانوذرات از عوامل مؤثر در سمیت نانوذرات است. در تحقیق حاضر نیز تأثیر زمان به‌صورت القاکننده و یا مهار کننده ظاهر شد. با آنکه طول عمر ROS کوتاه است، اما اتصال نزدیک بین NPs و سلول‌های میکروجلبک سبب القای تولید ROS درون سلولی به‌صورت پیوسته می‌شود. همچنین، اتصال نانوذرات بر سطح سلول می‌تواند سبب ایجاد سموم ثانویه دیگر و به‌راه افتادن مسیرهای آسیب فیزیکی یا برهم‌کنش با پروتئین‌ها، فسفولیپیدها و سایر بیوماکرومولکول‌ها شود.

در تحقیق حاضر، بیشترین میزان رنگدانه‌های کلروفیل، کاروتنوئید، فیکوسیانین، آلفیکوسیانین و فیکواریترین (شکل ۳) در روز سوم تنش، تقریباً در اکثر تیمارها مشاهده شد. این امر اهمیت مدت زمان در معرض قرار بودن میکروجلبک به TiO_2 را نشان می‌دهد، به‌طوری‌که با افزایش مدت زمان تنش (تا روز پنجم تنش)، مقدار رنگدانه‌ها در میکروجلبک کاهش یافته است. گزارش‌هایی از تأثیر منفی TiO_2 در فرم بالک یا نانوذره بر کاهش مقدار کاروتنوئیدها در میکروجلبک *Chaetoceros muelleri* یا بر کاهش میزان کلروفیل در گیاهان دارویی وجود دارد (Baharlooeian and Haq, 2020; Rico et al., 2015).

از میان تیمارهای غلظت TiO_2 ، غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر توانست بیشترین مقدار تولید کلروفیل *a*، کاروتنوئید و آستاگزانتین را در میکروجلبک القا کند. در تطابق با این نتیجه، افزایش کلروفیل‌های *a* و *b* در گیاه مریم‌گلی، بر اثر تیمار با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات TiO_2 نسبت به شاهد و نیز غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شده است (مزارعی و همکاران، ۱۳۹۷). بهترین غلظت برای افزایش رنگدانه‌های APC، PC، PE و فیکوبیلین کل، کمترین غلظت یعنی ۱۲/۵ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات بود. همچنین، نانوذره آنتاز تولید بیشترین میزان کلروفیل، APC و PE، به‌ویژه در روز سوم را در میکروجلبک تحریک نمود. نانوذره روتایل به

داده است که نانو ذره تیتانیوم می‌تواند با پروتئین‌ها و یا لیپیدها، واکنش دهد و بر فیزیولوژی سلول تأثیر بگذارد (Saptarshi et al., 2013). افزایش ذی توده جلبکی بر اثر تیمار با نانودی اکسیدتیتانیوم گزارش شده است (Kulacki and Cardinale 2012).

در پژوهش حاضر، غلظت‌های اولیه یعنی ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر TiO_2 ، (برای مثال، تیمار A1 در شاخص‌های APC، PE و نیز B1-B3 در شاخص پروتئین و ...) موجب بروز پاسخ‌های مشخص‌تری نسبت به سایر غلظت‌ها شدند. اگرچه، تمرکز زیادی بر بررسی تأثیرات نامطلوب یا سمی غلظت‌های زیاد نانومواد بر سلول‌های زنده، متمرکز شده، اما داده‌های تجربی نشان می‌دهند که غلظت‌های پایین نانومواد مهندسی‌شده نظیر TiO_2 و ZnO، با غلظت کمتر از ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم، معمولاً سبب تحریک بیشتر و مثبت سلول‌های گیاهی می‌شوند (Agathokleous et al., 2019). یک دلیل اصلی در واقع تجمع بیشتر و سریع‌تر ذرات در غلظت‌های بالا است که سبب کاهش تأثیر نانو ذرات منفرد و پراکنده در محیط می‌شود، و از این‌رو سمیت در غلظت‌های بالا را کاهش می‌دهد. بحث سمیت سلولی علاوه بر جنبه فوق، از چندین منظر دیگر نیز قابل بررسی است. اثر سایه زنی، عامل شناخته شده دیگری است که در آن توده‌های تیتانیوم بالک و نانو، به‌ویژه در غلظت‌های زیاد، مانعی بین سلول‌های جلبک و منبع نور ایجاد می‌کنند و مانع از فتوسنتز کارا می‌شوند (Baharlooeian et al., 2021; Thiagarajan et al., 2019).

در برخی تحقیقات، مهار رشد و تقسیمات سلولی جلبک *Phaeodactylum tricornutum* در غلظت‌های بالاتر از ۲۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذره TiO_2 در ۲۴ ساعت اول تنش (Wang et al., 2016)، مشاهده شد، اما برخی گزارش‌ها نیز حاکی از عدم کاهش رشد *D. tertiolecta* در تماس با غلظت‌های کم نانوذرات TiO_2 در طی زمان طولانی‌تر ۷۲ ساعت هستند (Morelli et al., 2018). این مطالعات ممکن است وابستگی تأثیر نانو TiO_2 به نوع گونه جلبک مورد بررسی را نشان دهند. با این‌همه، تأثیر زمان در مطالعات

طور مشخص سبب القای تولید رنگدانه‌های کاروتنوئید، آستاگزانتین و PC شد. به نظر می‌رسد، تأثیر TiO_2 نوع بالک بر روی سلول‌های میکروجلبک که (در مقایسه با رفتار نانوذرات) دارای تعاملات با سطح سلول‌ها برای تولید و تکثیر ROS نیست به ویژه در روز سوم تنش، به صورت تحریک سرعت تقسیمات سلولی (μ_m)، افزایش مقدار وزن خشک و نیز تحریک فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، بروز می‌نماید که در نتیجه مقدار MDA را در مقایسه با شاهد و نیز سایر تیمارها به میزان قابل ملاحظه‌ای، کاهش می‌دهد (شکل ۵). کاهش قابل توجه رنگدانه‌هایی نظیر کلروفیل، کاروتنوئید و برخی فیکوبیلین‌ها و نیز افزایش مقدار پروتئین نیز می‌تواند یک پاسخ سریع به تنش، به حساب آید که با کاهش مقدار جذب نور توسط رنگدانه‌های اصلی و کمکی (Hamida et al., 2020) از اکسیداسیون نوری سلولها جلوگیری می‌نماید. تفاوت رفتار انواع بالک و نیز TiO_2 در تحقیقات دیگر نیز گزارش شده است (Baharlooecian and Haq, 2020; Baharlooecian et al., 2021).

با این‌حال تحریک تولید و القای تجمع کاروتنوئیدها، آستاگزانتین و فیکوبیلین‌ها تحت تأثیر تیمارهای نانو روتایل و نانواتاز و نیز افزایش مقدار کربوهیدرات توسط نوع بالک و نانوروتایل مشاهده شد، (شکل ۳). محتمل است که بتوان از *Spirulina* با شاخص‌های بهبود یافته که حاوی سطح مشخصی از نانوذره است، به عنوان کود در کشاورزی استفاده کرد (Avila-Quezada et al., 2022; Joshi et al., 2019). البته باتوجه به بر اساس منابع متعدد و تگرانی‌های زیادی که در رابطه با استفاده از منابع حاوی نانوذرات وجود دارد، در استفاده‌های دارویی و غذایی، بهتر است از عدم آلودگی میکروجلبک به نانوذرات تیتانیوم و یا کاهش آن تا سطح سلامت غذایی مطمئن شد (Gao et al., 2018).

افزایش مقدار پروتئین‌ها در شرایط تنش، می‌تواند دلیل بر بیوسنتز برخی پروتئین‌ها برای سازگاری با تنش، و کاهش آنها می‌تواند به علت برطرف شدن عوامل تحریک کننده و یا صدمه به پروتئین‌ها در طی تنش، اتفاق افتاده باشد (Pereira et al., 2018; Singh and

(Tewari, 2003). بر اساس یک مطالعه، تیمار جلبک *Gracilaria* با نانو TiO_2 سبب افزایش اندک غلظت پروتئین محلول در طی ۳ روز اول و سپس کاهش تدریجی طی روزهای بعدی شد (Liu et al., 2018).

در این تحقیق، افزایش مقدار لیپید تحت تأثیر تیمار سیترات و نیز نمونه‌های نانوتیتانیوم (بایا بدون سیترات) و نیز نمونه بالک دارای سیترات مشاهده شد (شکل ۳). مقدار لیپیدها و ترکیب اسیدهای چرب جلبک می‌تواند تحت تأثیر نانوذرات تغییر نماید (Sarkar et al., 2021). علاوه بر شرکت لیپیدها در ساختار غشاهای و تشکیل وزیکول‌هایی که در ورود نانوذرات به داخل سلول نقش دارند، چربی‌ها همچنین، می‌توانند در سیگنال‌دهی سلولی و تنظیم سیالیت غشاء مداخله نمایند (Ibarguren et al., 2014). تحریک تولید لیپید در سلول‌های سرطانی توسط تیمار سیترات نیز مشاهده شده است (Zhao et al., 2022). مقدار آستاگزانتین نیز که یک ترکیب محلول در چربی است، نیز تحت تأثیر تیمار سیترات افزایش یافت. در خصوص بیوسنتز کربوهیدرات‌ها، رفتار سیترات در تیمار منفرد با حضور آن در تیمار همزمان با نانو ذره TiO_2 متفاوت بود. افزودن سیترات به طور منفرد به محیط کشت، سبب تغییر کاهشی جزئی در مقدار کربوهیدرات ($p < 0.05$) و افزایش قابل توجه و معنی‌دار ($p < 0.05$) مقدار پروتئین مشابه با بیوسنتز لیپید، در نمونه C نسبت به S شد.

سیترات می‌تواند در ممانعت و یا بالعکس تحریک فعالیت آنزیمهایی که در ورودی یا خروجی مسیر گلیکولیز، سیکل کربس، گلوکونئوزنز و بیوسنتز اسیدهای چرب قرار دارند، نقش ایفا نماید (Lacobazzi and Infantino, 2014). در درون سیتوپلاسم، سیترات همچنین، می‌تواند از طریق آنزیم سیترات لیاز (وابسته به ATP) به استیل کوآنزیم A تبدیل شود که یک متابولیت واسطه مهم در گذرگاه مسیرهای متفاوت آنابولیکی و کاتابولیکی است و در اکسیداسیون کربن حاصل از کاتابولیسم کربوهیدراتها، لیپیدها و یا پروتئین‌ها نقش دارد (Fatland et al., 2002). استیل کوآنزیم A در تولید اسیدهای چرب و طویل شدن آنها نقش دارد

طور مشخص سبب القای تولید رنگدانه‌های کاروتنوئید، آستاگزانتین و PC شد. به نظر می‌رسد، تأثیر TiO_2 نوع بالک بر روی سلول‌های میکروجلبک که (در مقایسه با رفتار نانوذرات) دارای تعاملات با سطح سلول‌ها برای تولید و تکثیر ROS نیست به ویژه در روز سوم تنش، به صورت تحریک سرعت تقسیمات سلولی (μ_m)، افزایش مقدار وزن خشک و نیز تحریک فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، بروز می‌نماید که در نتیجه مقدار MDA را در مقایسه با شاهد و نیز سایر تیمارها به میزان قابل ملاحظه‌ای، کاهش می‌دهد (شکل ۵). کاهش قابل توجه رنگدانه‌هایی نظیر کلروفیل، کاروتنوئید و برخی فیکوبیلین‌ها و نیز افزایش مقدار پروتئین نیز می‌تواند یک پاسخ سریع به تنش، به حساب آید که با کاهش مقدار جذب نور توسط رنگدانه‌های اصلی و کمکی (Hamida et al., 2020) از اکسیداسیون نوری سلولها جلوگیری می‌نماید. تفاوت رفتار انواع بالک و نیز TiO_2 در تحقیقات دیگر نیز گزارش شده است (Baharlooecian and Haq, 2020; Baharlooecian et al., 2021).

با این‌حال تحریک تولید و القای تجمع کاروتنوئیدها، آستاگزانتین و فیکوبیلین‌ها تحت تأثیر تیمارهای نانو روتایل و نانواتاز و نیز افزایش مقدار کربوهیدرات توسط نوع بالک و نانوروتایل مشاهده شد، (شکل ۳). محتمل است که بتوان از *Spirulina* با شاخص‌های بهبود یافته که حاوی سطح مشخصی از نانوذره است، به عنوان کود در کشاورزی استفاده کرد (Avila-Quezada et al., 2022; Joshi et al., 2019). البته باتوجه به بر اساس منابع متعدد و تگرانی‌های زیادی که در رابطه با استفاده از منابع حاوی نانوذرات وجود دارد، در استفاده‌های دارویی و غذایی، بهتر است از عدم آلودگی میکروجلبک به نانوذرات تیتانیوم و یا کاهش آن تا سطح سلامت غذایی مطمئن شد (Gao et al., 2018).

افزایش مقدار پروتئین‌ها در شرایط تنش، می‌تواند دلیل بر بیوسنتز برخی پروتئین‌ها برای سازگاری با تنش، و کاهش آنها می‌تواند به علت برطرف شدن عوامل تحریک کننده و یا صدمه به پروتئین‌ها در طی تنش، اتفاق افتاده باشد (Pereira et al., 2018; Singh and

بیوماس (وزن خشک سلول‌ها)، تحت تأثیر تیمار نانوروتایل و تا حدودی فرم بالک، افزایش یافت. افزایش مقدار کلروفیل، کاروتنوئید، آستاگزانتین، فیکوبیلین‌ها، کربوهیدرات، لیپید و پروتئین تحت تأثیر تیمارها مشاهده شد. بنابراین، به نظر می‌رسد که تیمار TiO_2 در برخی از غلظت‌های به کار برده شده، می‌تواند برای تحریک تولید متابولیت‌های سلولی به کار گرفته شود. سیترات در همه موارد تأثیر یکسانی نشان نداد و آثار آن به نوع نانوذره همراه، غلظت TiO_2 و مدت زمان تنش وابسته بود. این تأثیرات همچنین، می‌تواند به نوع میکروارگانیسم مورد آزمون و پاسخ‌های آن به تنش TiO_2 بستگی داشته باشد.

References

- مزارعی، ا. و.، موسوی نیک، س.م.، قنبری، ا.، فهمیده، ل. (۱۳۹۸) تأثیر محلول پاشی غلظت‌های مختلف جاسمونیک اسید و نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم بر برخی صفات‌های فیزیولوژیکی و فعالیت آنٹی اکسیدانی مریم گلی (*Salvia officinalis*) (L. زیست‌شناسی گیاهی ایران، ۱۱(۱): ۱-۲۲.
- Avila-Quezada, G. D., Ingle, A. P., Golinska, P. and Rai, M. (2022) Strategic applications of nano-fertilizers for sustainable agriculture: Benefits and bottlenecks. *Nanotechnology Reviews*. 11(1): 2123-2140.
- Agathokleous, E., Feng, Z. Z., Iavicoli, I. and Calabrese, E. J. (2019) The two faces of nanomaterials: A quantification of hormesis in algae and plants. *Environment International* 131: 105044.
- Albalasmeh, A., Berhe, A. and Ghezzehei, T. (2013) A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. *Carbohydrate Polymers* 97: 253-61.

(Fatland *et al.*, 2002). بنابراین، به نظر می‌رسد ورود سیترات به سلول میکرو جلبک *Spirulina*، مسیرهای بیوسنتز و تجمع لیپید و پروتئین را فعال نموده است. افزایش میزان لیپید و اسیدهای آمینه ضروری بر اثر تیمار با پساب حاوی اسید سیتریک، در جلبک *Chlorella* نیز گزارش شده است (Li *et al.*, 2013).

جمع‌بندی

در این تحقیق، تأثیر تیمارها به صورت وابسته به فرم و غلظت TiO_2 ، وجود یا عدم وجود سیترات و مدت زمان در معرض قرارگیری سوسپانسیون سلولی به نانوذرات مشاهده شد که شامل تأثیرات تحریک کننده و مثبت و در شرایطی منفی بر بهبود شاخص‌ها بود. شاخص

- Baharlooian, M. and Haq, M. A. B. (2020) Toxic effect of nano and bulk TiO_2 on growth, chlorophyll a content and oxidative stress of marine diatom *Chaetoceros muelleri*. *Nippon Journal of Environmental Science* 1: 1-8.
- Baharlooian, M., Kerdgari, M. and Shimada, Y. (2021) Ecotoxicological effects of TiO_2 nanoparticulates and bulk Ti on microalgae *Chaetoceros muelleri*. *Environmental Technology and Innovation* 23: 101720.
- Behzadian, Z., Khavari-Nejad, R. Soltani, N. and Dezfulian, M. (2020) Exopolysaccharide production from *Nostoc* sp. under different nutritional. *Journal of Phycological Research*, 4(1): 508-522.
- Bennett, A. and Bogorad, L. (1978). Complementary chromatic adaption in a filamentous blue-green alga. *The Journal of Cell Biology* 58: 419-435.
- Bindschedler, L. V., Minibayeva, F., Gardner, S. L., Gerrish, C., Davies, D. R. and Bolwell, G. P. (2001) Early signalling events in the apoplasmic oxidative burst in suspension cultured French bean cells involve

- cAMP. *New Phytologist* 151(1): 185-194.
- Bligh, E. G. and Dyer, W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37: 911-917.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 254: 248-254.
- Carvajal, M. and Alcaraz, C. F. (1998) Why titanium is a beneficial element for plants. *Journal of Plant Nutrition* 21: 655-664.
- Chandrika, K. S. V. P., Patra, D., Yadav, P., Qureshi, A. A. and Gopalan, B. (2021) Metal citrate nanoparticles: A robust water-soluble plant micronutrient source. *RSC Advanced*. 11: 20370-20379.
- Chen, L., Zhou, L., Liu, Y., Deng, S., Wu, H. and Wang, G. (2012) Toxicological effects of nanometer titanium dioxide (nano-TiO₂) on *Chlamydomonas reinhardtii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 84: 155-162.
- Clement, L., Hurel, C. and Marmier, N. (2013) Toxicity of TiO₂ nanoparticles to cladocerans, algae, rotifers and plants. Effects of size and crystalline structure. *Chemosphere* 90: 1083-1090.
- Deng, R. and Chow, T. (2010) Hypolipidemic, antioxidant, and antiinflammatory activities of microalgae *Spirulina*. *Cardiovascular Therapeutics* 28: 33-45.
- Devanathan, J. and Ramanathan, N. (2013) Utilization of seawater as a medium for mass production of *Spirulina platensis*-A novel approach. *International Journal of Recent Scientific Research* 4: 597-602.
- Gao, X., Zhou, K., Zhang, L., Yang, K. and Lin, D. (2018) Distinct effects of soluble and bound exopolymeric substances on algal bioaccumulation and toxicity of anatase and rutile TiO₂ nanoparticles. *Environmental Science Nano* 5: 720-729.
- Ghazaei, F. and Shariati, M. (2019) Effects of titanium nanoparticles on the photosynthesis, respiration and physiological parameters in *Dunaliella salina* and *Dunaliella tertiolecta*. *Protoplasma* 257(1): 75-88.
- Godlewska, K., Michalak, I., Pacyga, P., Basladyńska, S. and Chojnacka, K. (2019) Potential applications of cyanobacteria: *Spirulina platensis* filtrates and homogenates in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 35 (6): 80.
- Gohari, G., Mohammadi, A., Akbari, A., Panahirad, S., Dadpour, M. R., Fotopoulos, V. and Kimura, V. (2020) Titanium dioxide nanoparticles (TiO₂ NPs) promote growth and ameliorate salinity stress effects on essential oil profile and biochemical attributes of *Dracocephalum moldavica*. *Scientific Reports* 10(1): 912.
- Habib, M. A. B., Parvin, M., Huntington, T. C. and Hasan, M. R. (2008) A review on culture, production and use of *Spirulina* as food for humans and feeds for domestic animals and fish, in: *FAO Fisheries and Aquaculture Circular*, Rome, 1034: 1-41.
- Haider, A. J., Jameel, Z. N. and Al-Hussaini, I. H. M. (2019) Review on: Titanium dioxide applications. *Energy Procedia* 157: 17-29.
- Hamida, R. S., Ali, M. A., Redhwan, A. and Bin-Meferij, M. M. (2020) Cyanobacteria – A promising platform in green nanotechnology: A

- review on nanoparticles fabrication and their prospective applications. *International Journal of Nanomedicine* 15: 6033-6066.
- Hodges, D. M., DeLong, J. M. and Forney, C. F. and Perange, R. K. (1999) Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207: 604-611.
- Hoseini, S. M., Khosravi-Darani, K. and Mozafari, M. R. (2013) Nutritional and medical applications of *Spirulina* microalgae. *Medicinal Chemistry* 13: 1231-1237.
- Ibarguren, M., Lopez, D. J. and Escriba, P. V. (2014) The effect of natural and synthetic fatty acids on membrane structure, microdomain organization, cellular functions and human health. *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes* 1838: 1518-1528.
- Joshi, M., Sarup, R., Behl, K., Sharma, M. and Nigam, S. (2019) Applications of algal nanoparticles in agriculture. In: *Nanoscience for sustainable agriculture*. (Eds. Pudake, R., Chauhan, N. and Kole, C.) 265-280. Springer, Cham.
- Kang, N. K., Lee, B., Choi, G., Moon, M., Park, M., Lim, J. and Yang, J. (2014) Enhancing lipid productivity of *Chlorella vulgaris* using oxidative stress by TiO₂ nanoparticles. *Korean Journal of Chemical Engineering* 31: 861-867.
- Kulacki, K. J. and Cardinale, B. J. (2012) Effects of nano-Titanium dioxide on freshwater algal population dynamics. *PLoS ONE* 7(10): e47130.
- Kynshi, B. L., Sachu, M. and Syiem, M. B. (2021) Modulation in isocitrate dehydrogenase activity under citrate enrichment affects carbon and nitrogen fixations in the cyanobacterium *Nostoc muscorum* Meg 1. *Biochimie* 186: 94-104.
- Li C., Yang, H., Xia, X., Li, Y. Chen, L. Zhang, M. Zhang, L. and Wang, W. (2013) High efficient treatment of citric acid effluent by *Chlorella vulgaris* and potential biomass utilization. *Bioresource Technology*, 127: 248-255.
- Liu, J., Yin, P. and Zhao, L. (2018) Adverse effect of nano-TiO₂ on the marine macroalgae: *Gracilaria lemaneiformis* (*Gracilariales, Rhodophyta*): Growth and antioxidant activity. *RSC Advances* 8: 29172-29178.
- Madkour, F. F., Kamil, A. E. W. and Nasr, H. S. (2012) Production and nutritive value of *Spirulina platensis* in reduced cost media. *Egyptian Journal of Aquatic Research* 38: 51-57.
- Mallikarjuna, K., Al-Mohaimed, A. M., Al-Farraj, D. A., Reddy, M. R. V. and Mohammed, A. (2020) Facile synthesis, characterization, antimicrobial and anti-oxidant properties of alkylamine functionalized dumb-bell shaped Copper-Silver nanostructures. *Crystals* 10: 1-11.
- Manier, N., Bado-nilles, A., Delalain, P., Aguerre-chariol, O. and Pandard, P. (2013) Ecotoxicity of non-aged and aged CeO₂ nanomaterials towards freshwater microalgae. *Environmental Pollution* 180: 63-70.
- Miazek, K., Iwanek, W., Remacle, C., Richel, A. and Goffin, D. (2015) Effect of metals, metalloids and metallic nanoparticles on microalgae growth and industrial product biosynthesis: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* 16: 23929-23969.
- Moraes, C. C., Sala, L., Cerveira, G. P. and Kalil, S. J. (2011) C-Phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* wet biomass.

- Brazilian Journal of Chemical Engineering 28: 45-49.
- Morelli, E., Gabellieri, E., Bonomini, A., Tognotti, D. and Grassi, G. (2018) TiO₂ nanoparticles in seawater: aggregation and interactions with the green alga *Dunaliella tertiolecta*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 148: 184-193.
- Mudunkotuwa, I. A. and Grassian, V. H. (2010) Citric acid adsorption on TiO₂ nanoparticles in aqueous suspensions at acidic and circumneutral pH: surface coverage, surface speciation, and its impact on nanoparticle - Nanoparticle interactions. *American Chemical Society* 132(42): 14986-14994.
- Ni, H., Chen, Q. H., HE, G. G., WU, G. B. and Yang, Y. F. (2008) Optimization of acidic extraction of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. *Journal of Zhejiang University Science B* 9: 51-59.
- Odling, G. and Robertson, N. (2015) Why is Anatase a better photocatalyst than Rutile? The importance of free hydroxyl radicals. *Chemistry Sustainability Energy Materials* 8: 1838-1840.
- Padrova, K., Lukavsky, J., Nedbalova, L., Cejkova, A., Cajthaml, T., Sigler, K., Vitova, M. and Rezanka, T. (2014). Trace concentrations of iron nanoparticles cause overproduction of biomass and lipids during cultivation of cyanobacteria and microalgae. *Journal of Applied Phycology* 27(4): 1-10.
- Park, J. W. and Shumaker-Parry, J. S. (2014) Structural study of citrate layers on gold nanoparticles: Role of Intermolecular Interactions in stabilizing nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* 136: 1907-1921.
- Parrino, F., Pomilla, F. R., Camera-Roda, G., Loddo, V. and Palmisano, L. (2021). Titanium dioxide (TiO₂) and its applications, 2-Properties of titanium dioxide. *Metal Oxides* 1: 13-66.
- Raooof, B., Kaushik, B. D. and Prasanna, R. (2006) Formulation of a low-cost medium for mass production of *Spirulina*. *Biomass and Bioenergy* 30: 537-542.
- Pereira, P. S. Mario, P. S., Liliana, S. D., Teresa, M., Elsa, P., Paixao, S. M. and Picado, A. (2018) Protein profiling as early detection biomarkers for TiO₂ nanoparticle toxicity in *Daphnia magna*. *Ecotoxicology* 27: 430-439.
- Rico, C. M. M., Peralta-Videa, J. R. and Gardea-Torresdey, J. L. (2015) Chemistry, biochemistry of nanoparticles, and their role in antioxidant defense system in plants. In: *Nanotechnology and Plant Sciences*. (Eds. Siddiqui, M., Al-Whaibi, M. and Mohammad, F.) 1-17. Springer, Switzerland.
- Rupasinghe, R. A. T. P. (2011) Dissolution and aggregation of zinc oxide nanoparticles at circumneutral pH; a study of size effects in the presence and absence of citric acid. A thesis, Master of Science (MS), University of Iowa, Iowa City, Iowa.
- Sadiq, I. M., Pakrashi, S., Chandrasekaran, N. and Mukherjee, A. (2011) Studies on toxicity of aluminum oxide (Al₂O₃) nanoparticles to microalgae species: *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. *Journal of Nanoparticle Research* 13: 3287-3299.
- Saptarshi, S. R., Duschl, A. and Lopata, A. L. (2013) Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle.

- Journal of Nanobiotechnology 11, 26.
- Sarkar, R. D., Singh, H. B. and Kalita, M. C. (2021) Enhanced lipid accumulation in microalgae through nanoparticle-mediated; approach, for biodiesel production: A mini-review. *Heliyon*, 22: 7(9), e08057.
- Sendra, M., Moreno-garrido, I., Yeste, M. P., Gatica, J. M. and Blasco, J. (2017) Toxicity of TiO₂ in nanoparticle or bulk form to freshwater and marine microalgae under visible light and UV-A radiation. *Environmental Pollution* 227: 39-48.
- Shalaby, E. A. and Shanab, S. M. M. (2013) Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences* 42: 556-564.
- Sharma, A., Kaur, K. and Marwaha, D. (2019) *Spirulina platensis* an "ultimate food": A review. *International Journal of Research and Analytical Reviews (IJRAR)* 6: 428-437.
- Singh, P. K. and Tewari, R. K. (2003) Cadmium toxicity induced changes in plant water relations and oxidative metabolism of *Brassica juncea* L. plants. *Journal of Environmental Biology* 24(10): 107-112.
- Suman, T. Y., Rajasree, S. R. R. and Kirubakaran, R. (2015) Evaluation of zinc oxide nanoparticles toxicity on marine algae *Chlorella vulgaris* through flow cytometric, cytotoxicity and oxidative stress analysis. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 113: 23-30.
- Thiagarajan, V., Ramasubbu, S., Natarajan, C. and Mukherjee, A. (2019) Differential sensitivity of marine algae *Dunaliella salina* and *Chlorella* sp. to P25 TiO₂ NPs. *Environmental Science and Pollution Research* 4: 1-10.
- Tirani, M. M., Haghjou, M. M., Sulieman, S., Colville, L. and Ismaili, A. (2018). The influence of organic and inorganic chelators on the toxicity of bulk and nanoparticles of zinc oxide during germination and seedling growth of *Nicotiana tabacum* L. *Plant Biosystems* 153(3): 436-449.
- Wang, Y., Zhu, X., Lao, Y., Lv, X., Tao, Y. Y., Huang, B., Wang, J., Zhou, J. and Cai, Z. (2016) TiO₂ nanoparticles in the marine environment: Physical effects responsible for the toxicity on algae *Phaeodactylum tricorutum*. *Science of the Total Environment* 565: 818-826.
- Warheit, D. B., Webb, T. R., Reed, K. L., Frerichs, S. and Sayes, C. M. (2007) Pulmonary toxicity study in rats with three differential responses related to surface properties. *Toxicology* 230: 90-104.
- Xia, B., Chen, B., Sun, X., Qu, K., Ma, F. and Du, M. (2015) Interaction of TiO₂ nanoparticles with the marine microalga *Nitzschia closterium*: Growth inhibition, oxidative stress and internalization. *Science of the Total Environment* 508: 525-533.
- Yaakob, Z., Ali, E., Zainal, A., Mohamad, M. and Takriff, M. S. (2014) An overview: biomolecules from microalgae for animal feed and aquaculture. *Journal of Biological Research-Thessaloniki* 21: 1-10.
- Yang, Z., Chen, J., Dou, R., Gao, X., Mao, C. and Wang, L. (2015) Assessment of the phytotoxicity of metal oxide nanoparticles on two crop plants, maize (*Zea mays* L.) and Rice (*Oryza sativa* L.). *International Journal of Environmental Research* 12: 15100-15109.

- Yang, J., Wang, J., Pan, W., Regier, T., Hu, Y., Rumpel, C., Bolan, N. and Sparks, D. (2016) Retention mechanisms of citric acid in ternary Kaolinite-Fe(III)-citrate acid system using Fe K-edge EXAFS and L_{3,2}-edge XANES spectroscopy. *Science Reports* 6, 26127.
- Zhao, Y., Liu, X., Si, F., Huang, L., Gao, A., Lin, W. and Hoft, D. F. (2022) Citrate promotes excessive lipid biosynthesis and senescence in tumor cells for tumor therapy. *Advanced Science* 2101553: 1-20.
- Zhou, K., Hu, Y., Zhang, L., Yang, K. and Lin, D. (2016) The role of exopolymeric substances in the bioaccumulation and toxicity of Ag nanoparticles to algae. *Scientific Reports* 6(1): 32998.