


Original Article / Araştırma Makalesi

**Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, TiO<sub>2</sub> VE ZnO NANOPARÇACIKLARININ CHLAMYDOMONAS  
REINHARDTII ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

**Investigation of the Effect of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, TiO<sub>2</sub> and ZnO Nanoparticles on Microalga**

***Chlamydomonas reinhardtii***

Nesrin ÖZMEN<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>İnönü üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Malatya

Geliş Tarihi / Received: 07.12.2023

Kabul Tarihi / Accepted: 11.01.2024

**ÖZ**

Bu çalışmada tek hücreli bir alg olan *Chlamydomonas reinhardtii*'nin Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, TiO<sub>2</sub>, ve ZnO NP'lerin farklı konsantrasyonlarına (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> için 1.8-61.22 mg/L, TiO<sub>2</sub> için 0.39-10.48 mg/L aralığında) 24, 72 ve 120 saat süre ile maruz bırakılması sonucu ortaya çıkan toksik etkilerin değerlendirilmesi amaçlandı. Bu NP konsantrasyonları ön testlere göre belirlendi. Toksisitenin ölçütü olarak, NP'lerin kullanılan her konsantrasyonu için belirtilen süre sonunda kültür ortamlarında toplam hücre sayıları, ortamdaki canlı hücre sayıları, toplam hücre kütlesi ve hücre boyutlarındaki değişim kullanıldı. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve kullanılan her üç nanoparçacığın da kültürdeki toplam hücre sayısını azalttığı (Ti < Fe < Zn), canlı hücre oranlarını düşürdüğü gözlenmiştir. Ayrıca her üç NP, hücre boyutlarında artışa neden olmuştur.

**Anahtar kelimeler:** Metal Nanoparçacıklar, *Chlamydomonas reinhardtii*, Toksikite, Titanyum Dioksit, Demir (III) Oksit, Çinko Oksit.

**ABSTRACT**

The aim of this study was to evaluate the toxic effects of *Chlamydomonas reinhardtii*, a single-celled alga, exposed to different concentrations of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, TiO<sub>2</sub>, and ZnO NPs (1.8-61.22 mg/L for Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and TiO<sub>2</sub>, 0.39-10.48 mg/L for ZnO) for 24, 72 and 120 hours. These NP concentrations were determined according to preliminary tests. As a measure of toxicity, the total number of cells in the culture media, the number of viable cells in the media, the total cell mass and the change in cell size at the end of the specified time for each concentration of NPs used were used. The results were statistically evaluated and it was observed that all three nanoparticles used decreased the total number of cells in culture (Ti < Fe < Zn) and decreased the rate of viable cells. In addition, all three NPs caused an increase in cell size.

**Keywords:** Metal Nanoparticles, *Chlamydomonas reinhardtii*, Toxicity, Titanium Dioxide, Iron (III) Oxide, Zinc Oxide.

## GİRİŞ

Nanomateriyal teriminin farklı tanımları bulunmakla birlikte yaygın kabul gören ve Amerikan Test ve Malzeme Kurumu (ASTM) ve İngiliz Standartları Enstitüsü (BSI) tarafından da önerilen tanımı, “en az bir boyutu 100 nm’den küçük olan materyaller” şeklindedir. Bu materyal grubundan olan ve 1 ile 100 nm arasında en az iki boyuta sahip malzemeler ise nanoparçacık (NP) olarak tanımlanmaktadır (Klaine vd. 2008) NP’ler, bulk (hacimli) muadillerinden farklı olarak, küçük parçacık boyutları nedeniyle yüksek yüzey-hacim oranına sahiptirler. Metal nanoparçacıkların (NP) çeşitli amaçlar için kullanımı giderek artmaktadır. Bununla birlikte özellikle sucul ekosistemlerde sucul organizmalara oluşturabileceği riskleri yeterince bilinmemektedir ya da çelişkili sonuçlar verilmektedir.

1990’ların başından itibaren ortaya çıkan bir bilim dalı olan nanoteknoloji sayesinde çeşitli amaçlar için kullanılan metal nanoparçacıkların (MNP) çeşitliliği ve üretimi giderek büyük artış göstermektedir. Nanoboyutlu malzeme olarak tanımlanan yapılar; nanokristaller, nanoparçacıklar, nanotüpler, nanoteller, nanoçubuklar veya nano ince filmler gibi farklı sınıflara ayrılır. MNP’ler yapısal özellikleri ve boyutlarına bağlı olarak çok farklı karakterler sergileyebildiklerinden, farklı kullanım alanlarına sahiptir. Nanomalzeme çeşitliliğinde ortaya çıkan gelişmeler nedeniyle MNPlar ilaç ve kimya sanayi, su arıtımı, endüstriyel teknolojiler, kozmetik ürünler, daha dayanıklı ve daha hafif malzemeler üretilmesi gibi çok farklı alanlarda önemli avantajlar sağlaması ve önemli potansiyellere sahip olması nedenleri ile kullanılmaktadır. Nano metaller birçok patojen mikroorganizmaya karşı pasif antimikrobiyal aktiviteye sahip olmakla birlikte, insan sağlığı ve çevre üzerinde yüksek derecede toksik etki gösterebilmektedir (Burges ve Varadharajan, 2022; Yang vd. 2022). Doğaya karışan MNPlerin özellikle sucul çevrede giderek birikmesine neden olabileceğinden, ekosistem için bir risk oluşturmakta, konunun çeşitli organizmalar yönünden değerlendirilmesi önem taşımaktadır. Özellikle parçacık boyutuna bağlı olarak yüzeylerinde taşıdıkları atom sayısının farklılaşması MNP’leri daha reaktif hale getirmektedir (Vaseem, Umar ve Hahn, 2010). Bu durumda MNPler kütlece büyük yapıları olanlara (bulk) kıyasla özellikle sucul organizmalarda daha fazla birikim riski taşıyabilir (Banu, Kudesia, Raut, Pakrudheen ve Wahengbam, 2021).

Demir oksit (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) nanoparçacıklar (FeONP) biyomedikal, çevresel ve tarımsal uygulamalarda giderek daha fazla kullanılmaktadır ancak bunların biyolojik sistemlerle etkileşimleri yeterince iyi anlaşılammıştır. Süperparamanyetizma dahil benzersiz fizikokimyasal özellikleri nedeniyle, FeO NPlar, özellikle biyomedikal alanda önemli bir konuma sahiptir (Hurtado-Gallego vd., 2020). FeONP lerin alglere potansiyel toksisiteleri

hakkında bilgiler kısıtlıdır ve çelişkili sonuçlar ortaya konulmuştur. Bir çalışmada Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP etkisine maruz bırakılan *Chlorella* sp. ve *Daphnia magna*'da gelişimin azaldığı, ancak önemli bir toksik etki gözlenmediği iddia edilmiştir (Ertit, Kars ve Ateş, 2020). Sucul ekosistemlerde su kalitesini iyileştirmek ve metal absorpsiyonunu sağlamak amacı ile kullanılabilen bir alg olan *Coelastrella terrestris*'in Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'lere 25 gün süre ile maruz bırakılmalarının 50 mg/L üzeri konsantrasyonlarda toksik etkiyi arttırdığı, oksidatif stres nedeniyle alg büyümesini engellediği bildirilmiştir (Fazelian, Yousefzadi ve Movafeghi, 2023; Saxena, Sangela ve Harish, 2020). Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> etkisine farklı konsantrasyonlarda maruz bırakılan *Chlorella vulgaris*'de konsantrasyon artışına paralel olarak klorofil miktarının azaldığı, tatlı su ekosistemlerinde algler için bir tehdit olabileceği rapor edilmiştir (Farsi, Khodadadi, Sabzalipour, Jaafarzadeh Haghighi Fard ve Jamali-Sheini, 2021).

Titanyum dioksit (TiO<sub>2</sub>), düşük toksisiteye ve ihmal edilebilir biyolojik etkilere sahip titanyum elementinin doğal bir oksitidir. Hücre hasarının boyutu ve tipi büyük ölçüde TiO<sub>2</sub> NP'lerin boyutu, kristal yapısı ve foto-aktivasyonu dahil olmak üzere kimyasal ve fiziksel özelliklerine bağlıdır (Grande, ve Tucci, 2016). 20. yy'ın başlarında ticari olarak üretiminden bugüne, titanyum dioksit (TiO<sub>2</sub>) NP'ler, güneş koruyucuları, kişisel bakım ürünleri, gıda da dahil olmak üzere çok sayıda endüstriyel alanda ve tüketim mallarında yaygın şekilde kullanılmaktadır (Haynes, Ward, Russell, ve Agrios, (2017). Bu nedenle, insan maruziyeti hem üretim süreci hem de kullanım sırasında yutma ve deriye nüfuz etme veya soluma yoluyla gerçekleşebilir. TiO<sub>2</sub> NP'lerin yaygın olarak kullanılmasına rağmen, biyolojik etkileri ve hücresel yanıt mekanizmaları hala tam olarak aydınlatılamamıştır ve bu nedenle bu bileşiğin toksikolojik profilinin derinlemesine anlaşılması gerekmektedir (Baranowska-Wójcik, Szwajgier, Oleszczuk ve Winiarska-Mieczan, 2020; Grande ve Tucci, 2016; Rashid, Forte Tavčer ve Tomšič, 2021).

Çinko oksit NP'ler, son yıllarda çok sayıda endüstriyel süreçte ve endüstriyel ürünün üretiminde (ör. plastikler, seramik, cam, çimento, kauçuk, boyalar, pigmentler, gıdalar ve piller gibi) kullanılmaktadır. Günümüzde yüksek UV emilim özelliğinden dolayı, ZnO NP'ler dış macunu, güneş kremi ve kozmetik malzemeleri gibi kişisel bakım ürünlerinde kullanılmaktadır. Buna ek olarak, bu NP'ler, bakterilere karşı seçici toksisitesi nedeniyle su dezenfeksiyonu için potansiyel materyallerden biri olarak düşünülmektedir (Ateş, Daniels, Arslan, Farah ve Rivera, 2013). Ayrıca, antibakteriyel, bakteriyostatik ve fungisidal özellikleri, boyalarda ve hatta gıda paketlemesinde kullanılmalarını sağlamaktadır (da Silva, Caetano, Chiari-Andréo, Pietro, ve Chiavacci 2019; Espitia vd, 2012). ZnO NP'lerin antibakteriyel aktivitesini için gerekli miktarı ve tüketici ürünlerinde bu nanoparçacıkların belirtilen miktarları, canlı organizmalar üzerinde

olumsuz bir etki yaratır. Etkilerine en duyarlı olanlar insan hücreleridir ve sitotoksosite mekanizması esas olarak çinko iyonlarının etkisinin neden olduğu oksidatif stres oluşumuyla ilişkilidir (Czyżowska, ve Barbasz, 2022).

ZnO NP'lerin çözünürlüğü, bu NP'lerin toksisitesi ve ekosistem üzerindeki etkileri için çok önemlidir. Ayrıca, yüksek stabiliteleri, ZnO NP'lerin organizmalara nüfuz etmesine ve organizmada birikmesine yol açmaktadır (Ates vd 2013; Choi, R. O. Kim, Yoon ve W. K. Kim, 2016). ZnO NP'lerin oldukça reaktif olduğu ve 10 µg/ml dan daha yüksek konsantrasyonlarda, reaktif oksijen türleri ile (ROS) tek sarmallı DNA kırılmalarına neden olduğu bildirilmektedir. (Sruthi, Ashtami ve Mohanan, 2018).

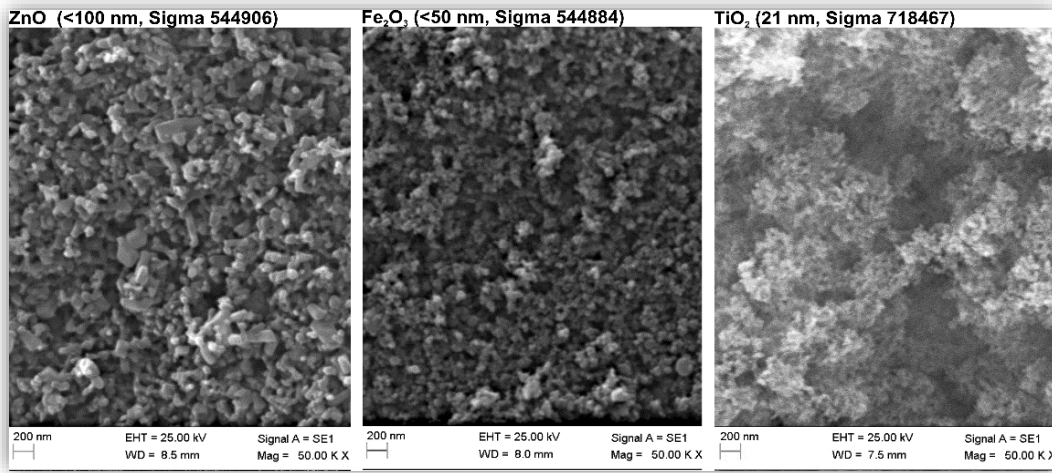
Algler, özellikle sucul ortamlarda besin zincirinde önemli rolü olan ve ekosistemin niteliklerinin geliştirilmesine katkı sağlayan basit, çoğu tek hücreli olan organizmalardır. Yeşil algler hem fotosentez ile suda oksijen üretimine sağladıkları katkı, hem de besin zincirinin ilk halkalarında bulunan canlılar arasında olmaları nedeniyle önem taşımaktadır. Ancak, algler buldukları ortamlarda kirleticilerden yoğun olarak etkilenebilir ve metaller gibi kirleticileri bünyelerinde biriktirebilirler. Alglerin hücre duvarlarındaki gözenekler, NP'lerin çift yönlü hareketlerine izin verir. Parçacıklar ne kadar küçük olursa, alglerin hücre duvarlarından geçmesi o kadar kolay olur. Farklı alglerde, NP'lerin difüzyon hızı, hücre duvarlarının yapısındaki ve kimyasal bileşimindeki farklılıklar nedeniyle değişkenlik gösterebilmektedir. NP'lerin hücre içine alınması ayrıca parçacıkların agregasyonundan da etkilenir (Izak-Nau, Voetz, Eiden, Duschl ve Puentes, 2013).

Çeşitli sucul organizmalar üzerinde MNP'lerin toksik etkilerinin saptanmasına yönelik çalışmalar bulunmaktadır (Kumari, Singh, Bauddh, Mallick ve Chandra, 2019; Ozmen N., OzhanTurhan, Güngördü, Çağlar Yılmaz, ve Ozmen, M, 2023). Ancak yürütülen çalışmaların çoğu sucul ekosistemlerde hayvansal organizmalar ile ilişkilidir ve besin zincirinin ilk halkasındaki canlılardan biri olan algler ile yürütülen çalışmalar nispeten kısıtlıdır. Çalışmamızda test organizması için seçilen *C. reinhardtii*, kozmopolit olarak sucul çevrede bulunan bir türdür ve biyolojik çalışmalar için iyi bir model organizmadır. Bu çalışmada yaygın olarak farklı amaçlar için kullanılan üç farklı MNP'ğin *C. reinhardtii*'de toksik etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Dolayısıyla nanomateryallerin ekotoksikolojik ve insan ve çevre güvenliğini üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesinde katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Test Edilen Nanometaller

Test edilen NP'lerden titanyum (IV) oksit (TiO<sub>2</sub>, Sigma 718467, ABD) 21 nm boyutludur. Diğer test materyallerinden çinko oksit NP, <100 nm (ZnO, Sigma 544906, ABD) ve demir (III) oksit NP, ise <50 nm (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Sigma 544884, ABD) boyutludur. Test edilen NP'lerin daha önceki çalışmalar için alınmış olan taramalı elektron mikroskobu görüntüleri Şekil 1.'de verilmiştir.



Şekil 1. Test Edilen Nanoparçacıkların Elektron Mikroskobu Görüntüleri

### Test Organizması

Çalışmada kullanılan *Chlamydomonas reinhardtii* (UTEX, 2243) Dr. Stacey L. Harper Laboratuvarından (Oregon State University, USA) temin edildi. Kültür 14:10 saat aydınlık: karanlık fotoperiyodunda günışığı aydınlatması sağlayan bir floresan lamba yardımı ile yaklaşık 2500 Lümen ışık şiddetinde aydınlatma sağlayan, havalandırılmalı bir düzenek vasıtası ile steril koşullarda yaşatılmaktadır. 100 ml erlenmayerlerde Tris-Acetate-Phosphate (TAP) sıvı besiyeri ortamında (Gorman ve Levine, 1965) 22±2 °C üretilmekte ve devamlı taze kültür olarak yaşatılmaktadır.

### DeneySEL Çalışmalar

Çalışma için kullanılacak olan hücreler stok kültürden 24 saat süre ile üretim ile elde edilen taze kültürden alınarak kullanıldı. NP toksisitesinin belirlenmesi için steril hücre kültürü flasklarında (25 mL, kapasiteli, nontreated flasklar) her kapta 15 mL TAP ortamında 1 mL alg kültürü inkübe edilerek test başlatıldı. Bu amaçla bir otomatik hücre sayım cihazında (Luna-II, Logos Biosystems, G. Kore) ve sisteme uyumlu tek kullanımlık sayım lamları ile hücre sayımı

yapıldıktan sonra, ortamda 10<sup>5</sup> canlı hücre bulunacak şekilde alg ekimleri yapıldı ve bir seri nanometal konsantrasyonuna hücreler maruz bırakıldı. Bunun için TAP ortamında nanometallerin bir seri konsantrasyonu taze olarak hazırlandı. Hazırlanan süspansiyon bir ultrasonik banyoda 30 dk süre ile sonifiye edilerek metallerin TAP ortamında süspansiyon olması sağlandı. Her uygulama grubu için her konsantrasyonda testler üç tekrarlı olarak çalışıldı ve çalışmalara toplam beş flask için kontrol grubu örnekleri dahil edildi. Test flaskları yatık pozisyonda ve tüm kaplar eşit ve ışık kaynağından aynı düzeyde ışık alacak şekilde yatık olarak yerleştirilerek statik koşullarda inkübe edildi. Hücrelerin flask yüzeyine yapışmasını önlemek ve süspansiyon etmek amacıyla, 24 saatte bir hafifçe çalkalanarak hücreler süspansiyon edildi. *Chlamydomonas* hücresi üremesi, 24, 72 ve 120 saatlerde hücre sayım cihazında kontrol edilerek ortamdaki toplam hücre sayısı ve canlılık oranı (%) ve büyüklükleri tespit edildi.

Çalışmanın son gününde süspansiyon edilerek sayımı yapılan hücrelerden 1 mL örnek pipetlenerek dara ağırlığı kaydedilen mikrosantrifüj tüplerinde 5.000 rpm devirde 15 dakika santrifüj edildi ve toplam hücre kütlesi tartılarak belirlendi. Tüm nanometal uygulamaları için toksik etki belirlenmesi kontrol grubu örnekleri ile karşılaştırılarak yapıldı.

### İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS 21.0 kullanılarak yapıldı. Parametrik veriler ONE WAY ANOVA Duncan Testi (Post Hoc testi) kullanılarak grupların ikili karşılaştırmaları yapıldı.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

### Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP Uygulaması

15 mL TAP ortamına 10<sup>5</sup> canlı hücre olacak şekilde eklenen *C.reinhardtii* hücreleri, farklı konsantrasyonlarda (1.8-61.22 mg/L) Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'lerine 24, 72 ve 120 saat maruz bırakılmış ve otomatik hücre sayım cihazında ölçümler yapılmış ve elde edilen sonuçlar Tablo 1'de verilmiştir.

**Tablo 1.** Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'lerin Farklı Konsantrasyonlarının 24-120 Saat Süreyle *Chlamydomonas reinhardtii* Üzerinde Etkileri

Kons. (mg/L)	Uygulama Süresi (h)	Toplam Hücre (x10 <sup>3</sup> )	Canlılık (%)	Hücre Büyüklüğü (um)
Kontrol	24	2195 ± 286	92.6 ± 1.29	6.63 ± 0.09
	72	5403 ± 524	95.2 ± 1.56	6.73 ± 0.12
	120	7267 ± 391	94.5 ± 2.77	6.87 ± 0.13
1.8	24	2037 ± 127	87.9 ± 3.32	7.80 ± 0.44
	72	3607 ± 480	90.0 ± 2.32	7.30 ± 0.06
	120	5243 ± 882	89.7 ± 0.51	7.93 ± 0.38
3.24	24	1153 ± 685	92.2 ± 1.57	7.43 ± 0.07
	72	2847 ± 342	91.7 ± 0.60	7.30 ± 0.06

	120	6170 ± 1746	87.9 ± 3.15	7.60 ± 0.06
5.83	24	2473 ± 360	91.6 ± 0.91	6.63 ± 0.23
	72	4933 ± 927	88.6 ± 0.96	7.33 ± 0.07
	120	6170 ± 1746	86.5 ± 1.43	7.57 ± 0.09
10.49	24	2207 ± 1062	80.9 ± 7.23	7.27 ± 0.23
	72	4693 ± 703	90.6 ± 0.13	7.23 ± 0.07
	120	6403 ± 2415	87.2 ± 3.28	7.50 ± 0.10
18.9	24	2250 ± 610	84.8 ± 7.29	7.17 ± 0.13
	72	3823 ± 1120	90.5 ± 0.90	7.30 ± 0.12
	120	5507 ± 627	88.0 ± 0.92	7.47 ± 0.03
34	24	1903 ± 324	90.6 ± 1.75	6.83 ± 0.07
	72	4180 ± 1019	92.0 ± 1.04	7.30 ± 0.06
	120	5220 ± 395	86.0 ± 1.19	7.50 ± 0.00
61.22	24	2410 ± 467	94.7 ± 0.54	6.73 ± 0.03
	72	4090 ± 376	80.1 ± 6.40	7.37 ± 0.09
	120	7285 ± 355	84.6 ± 0.35	7.60 ± 0.10

Farklı konsantrasyonlarda (1.8-61.22 mg/L) Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'lerine maruz bırakılan alglerde kontrol ve uygulama gruplarında konsantrasyona bağlı olmaksızın toplam hücre sayısı, 24. saatten 120. saat sonunda kadar lineer olarak artış göstermiştir. Bütün uygulama gruplarında 120. saatte gözlenen artış, kontrol grubu ile paralellik göstermiştir (P<0.05).

Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> etkisine maruz kalan *C. reinhardtii*'de konsantrasyon artışı ve maruziyet süresine bağlı olarak yapılan değerlendirmede 24 h, 72 h ve 120 h uygulama örneklerinde saptanan hayatta kalma oranlarının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 3.24 mg/L ve üzeri konsantrasyonlardaki uygulama gruplarında 120 saat sonunda önemli oranda azalış gösterdiği saptanmıştır (Tablo 1) (P<0.05).

Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP etkisine maruz kalan *C. reinhardtii* kültüründe hayatta kalma oranlarındaki azaltırken, hücre büyüklüklerinde tüm konsantrasyonlarda 24. saatten itibaren kontrole göre artış gözlenmiştir (P<0.05). MNP uygulamasına maruz kalan tüm deney gruplarında canlı hücrelerdeki azalışa karşın, hücre büyüklüklerinde artış, besin miktarı / hücre, oranının artmasıyla açıklanabilir (Tablo 1). Ortama Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP eklenmesinin toplam ağırlık üzerine etkisi gözlenmemiştir (P<0.05).

Saxena vd.'nin (2020) yaptıkları çalışmada da Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>'in toksik etkiyi arttırmasının oksidatif stresle ilişkili olduğu ve buna bağlı olarak büyümeyi engellediği rapor edilmiştir. Lei ve arkadaşları (2016) yeşil bir alg olan *Chlorella pyrenoidosa*'da NP'lerin, parçacık boyutu, kristal faz, oksidasyon durumu ve çevresel yaşlanmanın etkileri üzerine yaptıkları çalışmada, özellikle sıfır değerlikli FeNP'in (nZVI), parçacık boyutu küçüldükçe alg büyümesinin baskılandığını ve oksidatif strese bağlı olarak alg toksisitesine neden olduğu belirtilmiştir. Ayrıca NP, hücre heteroaglomerasyonu ve fiziksel etkileşimler de nanotoksitesiyi artırırken, NP çözünmesinin etkisinin önemsiz olduğu vurgulanmıştır (Lei, Zhang, Yang, Zhu ve Lin, 2016). Ayrıca Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'lerin yüksek değerlerinin, DNA bozulmasına neden olduğunu ve alg

büyümesini engelleyen önemli bir etkiye sahip olduğunu belirtmiştir (Al-Khazali ve Alghanmi, 2023). Dolayısıyla araştırmamızda Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'lerin toksik etkisinin, oksitatif strese bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Bazı çalışmalarda sıfır değerlikli nano demir (nZVI)'in kümeleşmeye bağlı olarak gölgeleme etkisi oluşturarak fotosentezi etkileyebileceği ve organizmalarda önemli hasara neden olabileceği ya da nZVI'nın Fenton reaksiyonuna katılarak yüksek reaktiviteye sahip serbest radikaller üretmesine yol açabileceği, bu da algal büyümenin inhibisyonunu açıklayabileceği ileri sürülmüştür (Ateş vd., 2020; Fu, Dionysiou ve Liu, 2014).

Bizim çalışmada kullanılan NP Fe boyutu <50 nm dir. Ayrıca Antonietta Quigg ve ark. alglerde Fe, Mn gibi bazı iz elementlerin besleyici role sahip olduklarını belirtmişlerdir (Quigg vd., 2013).

### TiO<sub>2</sub> NP Uygulaması

TAP ortamına 10<sup>5</sup> canlı hücre olacak şekilde eklenen *C.reinhardtii* hücreleri, farklı konsantrasyonlarda (1.8-61.22mg/L) TiO<sub>2</sub> NP'lerine maruz bırakılmış ve hücre sayım cihazında ölçümler yapılarak, ortamdaki toplam hücre sayısı, canlı hücre oranı ve hücre büyüklüğü bakımından değerlendirildiğinde sonuçlar Tablo 2'de verildiği gibidir.

TiO<sub>2</sub> NP'nin etkisine maruz bırakılan alg kültüründe elde edilen verilerde, toplam hücre sayısı 1.8, 3.24, 5.83 mg/L konsantrasyon uygulamalarında kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli oranda azalış gösterdiği, buna karşın, 10.49 ve daha yüksek konsantrasyonda maruziyetin hücre sayısı artışına neden olduğu bulundu. Ancak zamana bağlı olarak hücre sayısında gözlenen bu artış, kontrol grubundaki hücresel artışa kıyasla daha düşük bir oranda saptandı (Tablo 2), (p<0.05). TiO<sub>2</sub> uygulanan kültürde 61.22 mg/L'de hücre sayısı kontrole göre 24 saat sonunda %18 artış, 72 ve 120 saat sonunda ise %15 azalış gözlenmiştir. Kang vd. (2014) *Chlorella vulgaris* ile yaptıkları bir çalışmada, 2.5-5 g/L uygulanmış TiO<sub>2</sub> NP lerin hücre büyümesini %42 azalttığını belirtmişlerdir. Bulgularımızda uygulama süresinin artması ile toksisitenin arttığı saptanmıştır (Tablo 2).

**Tablo 2.** TiO<sub>2</sub> NP'lerin Farklı Konsantrasyonlarının 24.72 ve 120 Saat Süreyle *Chlamydomonas reinhardtii*'ye Etkileri

Kons. (mg/L)	Uygulama Süresi (h)	Toplam Hücre (x10 <sup>3</sup> )	Canlılık (%)	Hücre Büyüklüğü (um)
Kontrol	24	2195 ± 286	92.6 ± 1.29	6.63 ± 0.09
	72	5403 ± 524	95.2 ± 1.56	6.73 ± 0.12
	120	7267 ± 391	94.5 ± 2.77	6.87 ± 0.13
1.8	24	2107 ± 312	96.9 ± 0.69	6.57 ± 0.03
	72	3967 ± 697	92.4 ± 1.19	7.17 ± 0.03



	120	4047 ± 514	87.4 ± 1.17	7.83 ± 0.13
3.24	24	2337 ± 223	92.0 ± 3.52	6.60 ± 0.26
	72	4183 ± 173	93.7 ± 0.35	7.20 ± 0.06
	120	4603 ± 1701	91.0 ± 2.51	7.60 ± 0.12
5.83	24	2293 ± 612	97.2 ± 1.03	6.47 ± 0.18
	72	3727 ± 405	93.0 ± 0.27	7.10 ± 0.00
	120	4757 ± 2067	89.5 ± 2.22	7.90 ± 0.12
10.49	24	2493 ± 26	98.2 ± 0.54	6.53 ± 0.03
	72	4160 ± 771	93.0 ± 2.34	7.20 ± 0.06
	120	6597 ± 2653	85.6 ± 3.98	7.60 ± 0.12
18.9	24	3970 ± 170	88.3 ± 3.05	6.75 ± 0.35
	72	4875 ± 225	92.1 ± 0.20	7.30 ± 0.10
	120	6315 ± 1285	84.3 ± 1.75	7.55 ± 0.05
34	24	4050 ± 95	93.5 ± 3.07	6.57 ± 0.07
	72	5555 ± 645	83.9 ± 8.90	7.30 ± 0.20
	120	4213 ± 524	87.8 ± 0.72	7.50 ± 0.00
61.22	24	4027 ± 749	97.0 ± 0.89	7.03 ± 0.38
	72	4643 ± 1035	90.6 ± 1.54	7.33 ± 0.03
	120	6207 ± 1373	86.7 ± 1.99	7.67 ± 0.03

Deney gruplarında ortamdaki canlı hücre sayısı, TiO<sub>2</sub> maruziyetine bağlı olarak 72 ve 120. saatte azalış gösterdi (p<0.05). Özellikle 10.49 mg/L ve daha yüksek konsantrasyonlardaki uygulamaların, hücrelerin hayatta kalışını daha fazla olumsuz yönde etkilediği gözlemlendi (Tablo 2). Kontrolle kıyaslandığında, 10.49 mg/L konsantrasyona maruz kalan hücrelerde % 13 bir azalış gözlenirken, 61.22 mg/L uygulama grubunda canlılık 120 saat sonunda % 11.5 oranında azaldığı hesaplanmıştır. Gunawan ve arkadaşları'nın (2013) yapmış oldukları bir çalışmada, tatlı su ortamında, mikron altı ve nano TiO<sub>2</sub>, asılı agregatlar halinde bulunduğunu ve katı TiO<sub>2</sub>'nin hücreye alınmasının hücrel ROS oluşumunu uyardığı belirtilmiştir. Ayrıca hem çözülmüş hem de katı TiO<sub>2</sub>'nin alg çoğalması üzerinde olumlu etkiler göstermesine rağmen hem mikron altı hem de nano TiO<sub>2</sub> maruziyeti için hücrel redoks dengesizliğine neden olduğunu belirtmişlerdir (Gunawan, Sirimanoonphan, Teoh, Marquis ve Amal, 2013).

Toplam hücre sayısındaki azalmaya rağmen, tüm uygulama gruplarında hücre büyüklükleri 72. ve 120. saatlerde artış gösterdi. Hücre büyüklüğündeki zamana bağlı olarak gözlenen bu artışın, kontrol grubu hücreleriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli olduğu saptandı (Tablo 2), (p<0.05).

### ZnO NP Uygulaması

15mL TAP ortamına 10<sup>5</sup> canlı hücre olacak şekilde eklenen *C. reinharthii* kültürü, farklı konsantrasyonlarda (0.39-10.48mg/L) 24,72 ve 120 saat ZNO'e maruz bırakılmıştır. Toplam hücre, canlılık oranı ve hücre büyüklüğü yönünden elde edilen değerler Tablo 3'te verildiği gibidir. ZnO'e maruz kalmayan kontrol grubunda, ortamdaki hücre sayısı zamana bağlı olarak artış gösterdiği saptanmıştır. En düşük konsantrasyondan (0.39 mg/L) itibaren hücre sayıları 24. saate göre,72. saatte artarken, 120. saat sonunda azalmıştır (p<0.05). Kontrol grubu ile en

yüksek konsantrasyon (10.48mg/L) uygulanan grubun 120. saatteki değerleri karşılaştırıldığında toplam hücre sayısı bakımından %44 oranında azaldığı hesaplanmıştır.

**Tablo. 3** ZnO NP'lerin Farklı Konsantrasyonlarının 24-120 Saat Süreyle *Chlamydomonas reinhardtii*'ye Etkileri

Kons. (mg/L)	Uygulama Süresi (h)	Toplam Hücre (x10 <sup>3</sup> )	Canlılık (%)	Hücre Büyüklüğü (um)
Kontrol	24	2195 ± 286	92.6 ± 1.29	6.63 ± 0.09
	72	5403 ± 524	95.2 ± 1.56	6.73 ± 0.12
	120	7267 ± 391	94.5 ± 2.77	6.87 ± 0.13
0.39	24	3113 ± 799	89.5 ± 1.29	6.73 ± 0.09
	72	4603 ± 1265	88.2 ± 1.56	7.27 ± 0.07
	120	2995 ± 195	90.4 ± 2.77	7.80 ± 0.20
0.625	24	2570 ± 670	97.6 ± 5.13	6.60 ± 0.00
	72	6307 ± 533	92.4 ± 4.49	7.03 ± 0.07
	120	4450 ± 266	88.0 ± 2.65	7.37 ± 0.03
1	24	2980 ± 21	92.1 ± 0.35	6.53 ± 0.03
	72	7463 ± 986	92.8 ± 0.29	6.83 ± 0.09
	120	4480 ± 543	90.4 ± 2.20	7.37 ± 0.03
1.6	24	3150 ± 115	94.2 ± 5.23	6.47 ± 0.09
	72	5400 ± 821	92.2 ± 0.86	7.10 ± 0.06
	120	5233 ± 1279	85.4 ± 0.93	7.53 ± 0.09
2.56	24	2513 ± 83	85.6 ± 0.98	6.80 ± 0.10
	72	7237 ± 1018	92.5 ± 0.33	6.97 ± 0.12
	120	5037 ± 549	88.8 ± 2.91	7.40 ± 0.00
4.1	24	2510 ± 172	89.1 ± 6.37	6.67 ± 0.03
	72	6297 ± 1253	91.6 ± 0.43	7.47 ± 0.09
	120	6083 ± 1482	85.7 ± 1.01	7.63 ± 0.07
6.55	24	3335 ± 285	94.8 ± 8.15	6.50 ± 0.10
	72	6023 ± 395	92.8 ± 1.45	6.97 ± 0.09
	120	5110 ± 1003	88.3 ± 1.62	7.47 ± 0.03
10.48	24	2097 ± 393	88.3 ± 3.05	6.63 ± 0.15
	72	5783 ± 378	82.2 ± 0.61	7.07 ± 0.03
	120	4076 ± 1584	86.3 ± 1.16	7.57 ± 0.03

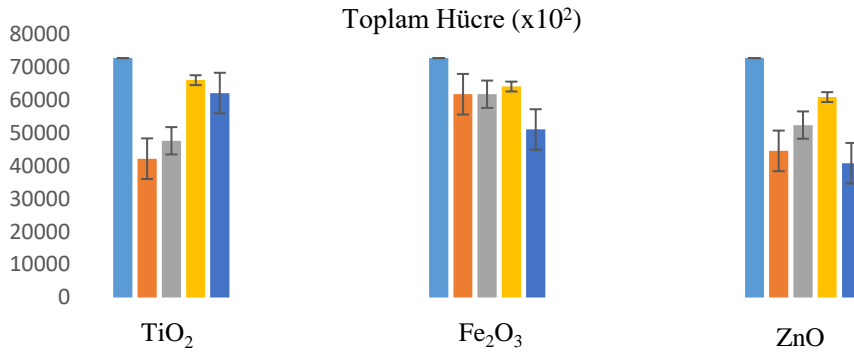
Ortamdaki hücrelerin canlılık yüzdelerine bakıldığında, 0.625 mg/L konsantrasyondan itibaren 72. saate anlamlı bir değişim görülmezken (p<0.05), 120 saat maruziyet sonucunda canlılık yüzdesinin azaldığı saptanmıştır. Kontrol grubu ile en yüksek konsantrasyonların (10.49 mg/L) 120. saatleri karşılaştırıldığında ise yaklaşık % 10 azalma tespit edildi.

Yapılan bu çalışmada hücre büyüklüğü, kontrol grubunda olduğu gibi en düşük konsantrasyondan itibaren zamana bağlı olarak artmıştır (p<0.05). 120 saat maruziyet sonunda 10.48 mg/L konsantrasyondaki uygulama grubundaki artış, kontrole göre %10 daha fazladır (Tablo 3).

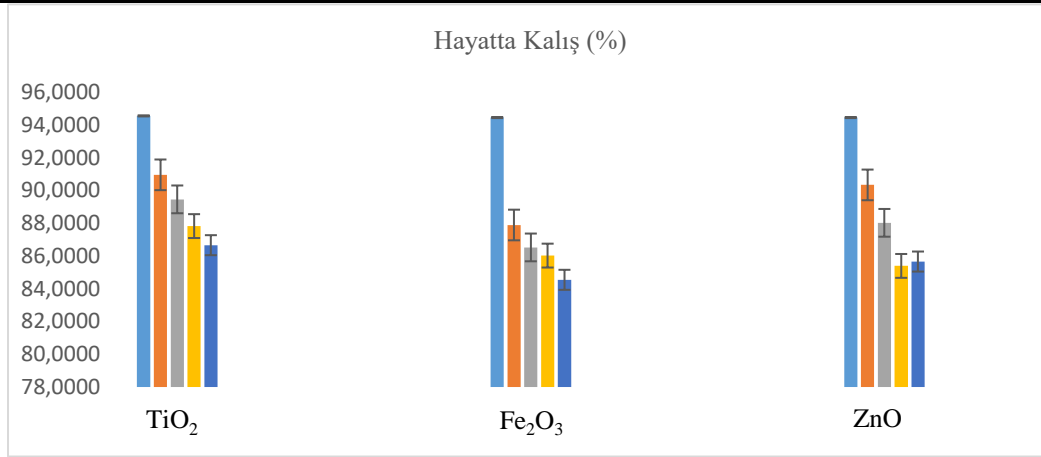
Sonuçlarımız bazı çalışmalarla uygunluk gösterirken, bazılarıyla uyuşmamaktadır. Suman ve arkadaşları (2015) 200 mg/L olarak uygulanan ZnO NP lerin 72 saat sonunda *Chlorella vulgaris*'in hücre canlılığını %35 azalttığını tespit etmişlerdir (Suman, Rajasree ve Kirubakaran, 2015). Bu durum, toksisitenin konsantrasyona bağlı değişebildiğini göstermektedir. Başka bir araştırmada *C. reinhardtii*'nin mikron altı ve nano ZnO'te paralel

maruziyeti hem çözülmüş hem de katı ZnO'in hücreye alındığı ve bunun sonucunda alg gelişimini engellediği rapor edilmiştir. Araştırmacılar hücrelerin ZnO'e olan duyarlılığına rağmen, 100 mg/L ZnO maruziyetinde bile çinko kaynaklı hücrel ROS üretimi saptamamışlardır. Bu gözlemler, parçacıkların hücrel oksidatif stres kaynaklı sitotoksitesine ilişkin genel kabul görmüş paradigmayla çelişmektedir (Djearamane, Wong, Lim ve Lee, 2020; Gunawan vd., 2013)

Wong ve arkadaşları (2010), algler üzerinde nano ZnO'nin, ZnO'ten daha toksik, ancak kabuklular ve balıklar üzerinde daha az toksik olduğunu söylemişlerdir. ZnO NP'lerin olumsuz etkilerinin NP'lerin kendisinden ziyade NP'lerden salınan çinko iyonlarıyla ilişkili olduğunu belirtmişlerdir (Wong, Leung, Djurišić ve Leung, 2010). Ayrıca *T. pseudonana*'da (deniz diatomu) 48 saat maruziyetten sonra, çözümlü Zn<sup>2+</sup> iyonlarının alg sayısında bir azalmaya neden olduğunu ve fotosentetik süreci azalttığını belirtmişlerdir. Deniz mikroalgi *Dunaliella tertiolecta* ile yapılan bir çalışmada, ZnO NP'lerin toksitesinin, esas olarak alg hücrelerine tutunarak, bulk ZnO parçacıklarından daha büyük agregatların oluşumundan kaynaklandığını ve bunun da populasyon büyümesini ve fotosentetik süreçleri engellenmesine yol açtığını göstermişlerdir (Schiavo, Oliviero, Miglietta, Rametta ve Manzo, 2016).



**Şekil 2.** MNP'lere 120 Saat Süreyle Maruz Kalmış *C. reinhardtii* Kültüründe Toplam Hücre Sayılarındaki Değişim



Şekil 3. MNP'lere 120 Saat Süreyle Maruz Kalmış *C. reinhardtii* Hücrelerinin Hayatta Kalma Oranları

Villem Aruoja ve arkadaşlarının nano metal oksitlerle yaptıkları bir çalışmada, en çok toksik etki gösteren maddenin nano ZnO olduğunu belirtmişlerdir (Aruoja, Dubourguier, Kasemets ve Kahru, 2009). Bulgularımızda elde ettiğimiz verilerde kullanılan NP'ler ZnO TiO<sub>2</sub> ve Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP'ler de canlılık oranı ve toplam hücre sayısını azaltırken ortamda kalan hücrelerin büyüklüklerinde artış saptanmıştır. Bu durumu, populasyon yoğunluğundaki azalmanın hücre boyutlarında artışı teşvik etmesiyle açıklayabiliriz. Hücre sayısında ki azalmanın en fazla ZnO NP'de görülmesi Aruoja ve arkadaşlarının (2009) yaptığı çalışmayı desteklemektedir.

Canlı organizmalar, ağır metaller ve metaloidleri suda çözünür iyon formunda, aktif taşıma ve metal şelatlayıcı proteinleri endositoz ile yapılarına katabilirler (Arunakumara ve Zhang, 2008). Özellikle su ortamları farklı kaynaklardan gelen çeşitli NP'ler ile de kirlenebilmekte ve bu kirleticiler NP karışımları ve NP kombinasyonlarına bağlı olarak toksik etkilere yol açabilmektedir (López, Fabiani, Lassalle, Spetter ve Severini, 2022). Bununla birlikte özellikle sucul ekosistemlerde nanoparçacıkların toksikolojik riskleri hakkında bilinenler yeterli düzeyde değildir. NP'lerin çeşit ve fizikokimyasal niteliklerine bağlı olarak membrandan kolaylıkla geçerek hücrede temel metabolik reaksiyonlara karıştığı ve toksik etkilere neden olabildiği belirtilmektedir. (Biswas ve Billare, 2022). Ayrıca metal oksit NP'lerin toksik etkisinde reaktif oksijen türleri de (ROS) önemli rol oynayabilir (Yu vd., 2020).

Bu araştırmada kullanılan Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, TiO<sub>2</sub> ve ZnO NP'ler ile elde edilen sonuçlarda da hücre sayısı ve hücrenin hayatta kalma oranı üzerinde toksik etki gösterdiği saptanmıştır (Şekil 1,2; Tablo 1,2,3). Ayrıca başka bir çalışmada nano ZnO'nin, büyük boyutlu ZnO'den daha toksik olduğunu ve düşük konsantrasyonlardan itibaren bir deniz algı olan *D. tertiolecta*'da büyüme hızını olumsuz yönde etkilediğini belirtmişlerdir. Ancak bu etkinin serbest Zn iyonlarıyla açıklanamayacağını vurgulamışlardır. (Manzo, Miglietta, Rametta, Buono ve Di Francia, 2013)

Alg hücrelerine nüfuz edebilen MNP'ler, hacim/boyut oranına kıyasla geniş yüzey alanları nedeniyle genellikle büyük kütleli muadillerine kıyasla daha yüksek biyolojik reaktivite sergiler ve antropojenik faaliyetlerden kaynaklanan toksik MNP'lerin sucül ekosistemlere artan girişi alg türleri üzerinde olumsuz etki yapar (Kráľová ve Jampílek, 2021). Metal NP'lerin canlı organizmalara aktif veya pasif yollardan girebildiği ve belirli bir süre boyunca maruz kalmanın, farklı organ ve dokulardaki demir birikimine neden olduğu rapor edilmiştir. Diğer yandan NP'lerin toksisitesinin, NP boyutu, boyut dağılımı, yüzey morfolojisi, yüzey yük yoğunluğu, kaplama maddesinin kimyasal yapısı, konsantrasyonu, hücre tipleri ve maruz kalma yolları gibi çeşitli etkenlere bağlı olduğu bilinmektedir (Seabra ve Haddad, 2013). NP'lerin bu çok yönlü özelliklerinden dolayı, farklı çalışmaların toksikolojik sonuçlarının karşılaştırılması zordur. Zira bu parametreler, çalışmalar arasında değişiklik gösterebilmektedir (Biswas vd., 2022; Manzo vd., 2013; Wong vd., 2010; Yu vd., 2020).

## SONUÇ

Bu çalışmada Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, TiO<sub>2</sub> ve ZnO NP'lerin *C. reinhardtii* üzerinde toksik etkileri araştırılarak daha önce mikro alglerle yapılan çalışmalardan farklı bir toksik etki yapıp yapmadığı ortamdaki hücre sayısı, canlılık oranı, hücre büyüklüğü ve toplam kütle bakımından değerlendirilmiştir. Kullanılan her üç nanoparçacığın da kültürdeki toplam hücre sayısını azalttığı, canlı hücre oranlarını düşürdüğü gözlenmiştir. Ayrıca her üç NP, hücre boyutlarında artışa neden olurken, toplam hücre kütlelerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır.

Bu nedenle, insan sağlığı üzerindeki potansiyel etkileri dikkate alındığında tıbbi ve endüstriyel alanlarda nanoparçacıkların güvenli bir şekilde kullanılmasını önermek için hücreler, dokular, organlar ve organizmalar üzerindeki etkisinin daha fazla araştırılmasına gereksinim vardır.

**Not:** Bu çalışma "11th International Congress of the Turkish Society of Toxicology" Antalya, 2-5 Kasım 2022 tarihinde poster bildiri olarak sunulmuştur.

## KAYNAKLAR

- Al-Khazali, Z. K., & Alghanmi, H. A. (2023). Environmental Toxicity of Nano Iron Oxides (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs) on Algal Growth *Klisonema persicum* and Cellular DNA Damage Using Comet Assay. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 27(1), 431-453.
- Arunakumara, K. K. I. U., & Zhang, X. (2008). Heavy metal bioaccumulation and toxicity with special reference to microalgae. *Journal of ocean university of china*, 7, 60-64.
- Aruoja, V., Dubourguier, H. C., Kasemets, K., & Kahru, A. (2009). Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO<sub>2</sub> to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Science of the total environment*, 407(4), 1461-1468.

- Ates, M., Cimen, I. C., Unal, I., Kutlu, B., Ertit Tastan, B., Danabas, D., ... Arslan, Z. (2020). Assessment of impact of  $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles on phytoplankton species *Selenastrum capricornutum* and *Nannochloropsis oculata*. *Environmental toxicology*, 35(3), 385-394.
- Ates, M., Daniels, J., Arslan, Z., Farah, I. O., & Rivera, H. F. (2013). Comparative evaluation of impact of Zn and ZnO nanoparticles on brine shrimp (*Artemia salina*) larvae: effects of particle size and solubility on toxicity. *Environmental science: Processes & impacts*, 15(1), 225-233.
- Banu, A. N., Kudesia, N., Raut, A. M., Pakrudheen, I., & Wahengbam, J. (2021). Toxicity, bioaccumulation, and transformation of silver nanoparticles in aqua biota: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 19(6), 275-4296.
- Baranowska-Wójcik, E., Sz wajgier, D., Oleszczuk, P., & Winiarska-Mieczan, A. (2020). Effects of titanium dioxide nanoparticles exposure on human health: a review. *Biological trace element research*, 193, 118-129.
- Biswas, S., & Bellare, J. (2022). Bioactivity, biocompatibility, and toxicity of metal oxides. In *Metal Oxides for Biomedical and Biosensor Applications* (pp. 3-33). Elsevier.
- Burges, R., & Varadharajan, S. (2022). A Short Review on Effects of Nano Metals on Human Health. *Advances in Sustainable Development: Proceedings of HSFEA 2020*, 275-281.
- Djearmane, S., Wong, L. S., Lim, Y. M., & Lee, P. F. (2020). Oxidative stress effects of zinc oxide nanoparticles on fresh water microalga *Haematococcus pluvialis*. *Ecology, Environment and Conservation*, 26(2), 663-668.
- Choi, J. S., Kim, R. O., Yoon, S., & Kim, W. K. (2016). Developmental toxicity of zinc oxide nanoparticles to zebrafish (*Danio rerio*): a transcriptomic analysis. *Plos one*, 11(8), e0160763.
- Czyżowska, A., & Barbasz, A. (2022). A review: zinc oxide nanoparticles—friends or enemies? *International journal of environmental health research*, 32(4), 885-901.
- da Silva, B. L., Caetano, B. L., Chiari-Andréo, B. G., Pietro, R. C. L. R., & Chiavacci, L. A. (2019). Increased antibacterial activity of ZnO nanoparticles: Influence of size and surface modification. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 177, 440-447.
- Ertit Taştan B., Kars Durukan İ. ve Ateş M., (2020). “Ecotoxicity study of iron oxide nanoparticles on *Chlorella* sp. and *Daphnia magna*”, *Politeknik Dergisi*, 23(4), 1073-1079.
- Espitia, P. J. P., Soares, N. D. F. F., Coimbra, J. S. D. R., de Andrade, N. J., Cruz, R. S., & Medeiros, E. A. A. (2012). Zinc oxide nanoparticles: synthesis, antimicrobial activity and food packaging applications. *Food and bioprocess technology*, 5, 1447-1464.
- Farsi, L., Khodadadi, M., Sabzalipour, S., Jaafarzadeh Haghighi Fard, N., & Jamali-Sheini, F. (2021). Effects of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and Co<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles on Organisms in Freshwater. *Anthropogenic Pollution*, 4(2), 28-34.
- Fazelian, N., Yousefzadi, M., & Movafeghi, A. (2023). Toxicity of iron-based nanoparticles to *Nannochloropsis oculata*: effects of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NPs on oxidative stress and fatty acid composition. *Marine Biology Research*, 1-11.
- Fu, F., Dionysiou, D. D., & Liu, H. (2014). The use of zero-valent iron for groundwater remediation and wastewater treatment: a review. *Journal of hazardous materials*, 267, 194-205.
- Gorman, D. S., & Levine, R. P. (1965). Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 54(6), 1665-1669.
- Grande, F., & Tucci, P. (2016). Titanium dioxide nanoparticles: a risk for human health?. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 16(9), 762-769.3.

- Gunawan, C., Sirimanoonphan, A., Teoh, W. Y., Marquis, C. P., & Amal, R. (2013). Submicron and nano formulations of titanium dioxide and zinc oxide stimulate unique cellular toxicological responses in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Hazardous Materials*, 260, 984-992.
- Haynes, V. N., Ward, J. E., Russell, B. J., & Agrios, A. G. (2017). Photocatalytic effects of titanium dioxide nanoparticles on aquatic organisms—Current knowledge and suggestions for future research. *Aquatic Toxicology*, 185, 138-148.
- Hurtado-Gallego, J., Pulido-Reyes, G., González-Pleiter, M., Salas, G., Leganés, F., Rosal, R., & Fernández-Piñas, F. (2020). Toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles to the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Chemosphere*, 238, 124562.
- Izak-Nau, E.; Voetz, M.; Eiden, S.; Duschl, A.; Puentes, V.F. (2013). Altered characteristics of silica nanoparticles in bovine and human serum: The importance of nanomaterial characterization prior to its toxicological evaluation. *Part. Fibre Toxicol*, 10, 56.
- Kang, N. K., Lee, B., Choi, G. G., Moon, M., Park, M. S., Lim, J., & Yang, J. W. (2014). Enhancing lipid productivity of *Chlorella vulgaris* using oxidative stress by TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 31, 861-867.
- Klaine, S.J., Alvarez, P.J., Batley, G.E., Fernandes, T.F., Handy, R.D., Lyon, D.Y., Mahendra, S., McLaughlin, M.J., Lead, J.R., 2008. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environ Toxicol Chem* 27, 1825-1851.
- Kumari, K., Singh, P., Baudh, K., Mallick, S., & Chandra, R. (2019). Implications of metal nanoparticles on aquatic fauna: A review. *Nanoscience & Nanotechnology-Asia*, 9(1), 30-43.
- Kráľová, K., & Jampílek, J. (2021). Impact of metal nanoparticles on marine and freshwater algae. *Handbook of plant and crop physiology*, 889-921.
- Lei, C., Zhang, L., Yang, K., Zhu, L., & Lin, D. (2016). Toxicity of iron-based nanoparticles to green algae: Effects of particle size, crystal phase, oxidation state and environmental aging. *Environmental Pollution*, 218, 505-512.
- López, A. F., Fabiani, M., Lassalle, V. L., Spetter, C. V., & Severini, M. F. (2022). Critical review of the characteristics, interactions, and toxicity of micro/nanomaterials pollutants in aquatic environments. *Marine Pollution Bulletin*, 174, 113276.
- Manzo, S., Miglietta, M. L., Rametta, G., Buono, S., & Di Francia, G. (2013). Toxic effects of ZnO nanoparticles towards marine algae *Dunaliella tertiolecta*. *Science of the Total Environment*, 445, 371-376.
- Rashid, M. M., Forte Tavčer, P., & Tomšič, B. (2021). Influence of titanium dioxide nanoparticles on human health and the environment. *Nanomaterials*, 11(9), 2354.
- Ozmen, N., Ozhan Turhan, D., Güngördü, A., Caglar Yilmaz, H., & Ozmen, M. (2023). Investigation of the effects of metal oxide nanoparticle mixtures on *Danio rerio* and *Xenopus laevis* embryos. *Chemistry and Ecology*, 39(3), 215-234.
- Quigg, A., Chin, W. C., Chen, C. S., Zhang, S., Jiang, Y., Miao, A. J., ... & Santschi, P. H. (2013). Direct and indirect toxic effects of engineered nanoparticles on algae: role of natural organic matter. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 1(7), 686-702.
- Saxena, P., Sangela, V., & Harish. (2020). Toxicity evaluation of iron oxide nanoparticles and accumulation by microalgae *Coelastrella terrestris*. *Environmental science and pollution research*, 27, 19650-19660.
- Schiavo, S., Oliviero, M., Miglietta, M., Rametta, G., & Manzo, S. (2016). Genotoxic and cytotoxic effects of ZnO nanoparticles for *Dunaliella tertiolecta* and comparison with SiO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub> effects at population growth inhibition levels. *Science of the Total Environment*, 550, 619-627.

- 
- Seabra, A. B., & Haddad, P. S. (2013). Cytotoxicity and genotoxicity of iron oxides nanoparticles. In *Nanotoxicology: Materials, Methodologies, and Assessments* 265-279. New York, NY: Springer New York.
- Sruthi, S., Ashtami, J., & Mohanan, P. V. (2018). Biomedical application and hidden toxicity of Zinc oxide nanoparticles. *Materials today chemistry*, 10, 175-186.
- Suman, T. Y., Rajasree, S. R., & 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.
- Vaseem, M. Umar, A., & Hahn, Y. B. (2010). ZnO nanoparticles: growth, properties, and applications. *Metal oxide nanostructures and their applications*, 5(1), 10-20.
- Wong, S. W, Leung, P. T., Djurišić, A. B., & Leung, K. M. (2010). Toxicities of nano zinc oxide to five marine organisms: influences of aggregate size and ion solubility. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 396, 609-618.
- Yang, X. Zheng, G., Wang, Q., Chen, X., Han, Y., Zhang, D., Zhang, Y. 2022. Functional application of multi-element metal composite materials. *J. Alloys Comp.*, 895, 2, 162622.
- Yu, Z, Li, Q. Wang, J. Yu, Y., Wang, Y., Zhou, Q., & Li, P. (2020). Reactive oxygen species-related nanoparticle toxicity in the biomedical field. *Nanoscale research letters*, 15(1), 115.