

ارزیابی سمیت سوسپانسیون آبی نانوذرات مگنتیت (Fe_3O_4) بر شاخص‌های زیستی آب شور (بارناکل) و آب شیرین (روتیفر)

سکینه مشجور^۱، مرتضی یوسف‌زادی^{۲*}، مجتبی علیشاهی^۲

morteza110110@gmail.com*

۱- گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
۲- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹۶

تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۷

چکیده

با توجه به احتمال رهایش نانو ذرات به زیست‌بوم آبی، محدودیت گزارش‌های موجود و عدم شناخت صحیح از واکنش‌های زیستی احتمالی آن‌ها با زیست‌مندان آبی، در پژوهش حاضر سمیت سوسپانسیون آبی نانو ذرات مگنتیت (Fe_3O_4) در جانداران زئوپلانکتونی مدل چون لارو بارناکل *Amphibalanus amphitrite* (شاخص آب شور) و روتیفر *Brachionus rotundiformis* (شاخص آب شیرین/ لب شور) ارزیابی گردید. برای این منظور غلظت‌های متوالی (۰، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر) از نانوذرات مگنتیت در پلیت‌های ۲۴ خانه و در ۵ تکرار تهیه شده و پس از معرفی زئوپلانکتون‌های مذکور (۵۰ ناپلی بارناکل و ۲۰ نوزاد روتیفر به هر چاهک)، حساسیت نمونه‌ها به سمیت نانوذرات در بازه زمانی ۱۲ تا ۴۸ ساعت ارزیابی شد. نتایج در پژوهش حاضر نشان می‌دهد که اثرات سمیت نانو ذرات مگنتیت بر لارو ناپلیوس بارناکل و نوزادان روتیفر با افزایش غلظت و نیز با افزایش مدت زمان رویارویی روند افزایشی را به دنبال داشته است و تفاوت‌ها میان تیمار و گروه شاهد معنی‌دار بوده است ($p < 0.05$). با این وجود، نرخ مرگ میر در بالاترین غلظت (۵۰۰ mg/l) پس از ۴۸ ساعت در بارناکل‌ها برابر ۶۲٪ ($\text{LC}_{50} = 466/5 \text{ mg/l}$) و در روتیفرها ۳۴٪ ($\text{EC}_{50} > 1000 \text{ mg/l}$) بوده است. صرف‌نظر از تفاوت‌های گونه‌ای بارناکل و روتیفر، بنابر نتایج بدست آمده نانو ذرات مگنتیت در گروه آلاینده‌های غیرسمی برای این دو جانور زئوپلانکتونی قرار می‌گیرند.

لغات کلیدی: سمیت، شاخص زیستی، زئوپلانکتون، نانوذرات Fe_3O_4 ، شوری

*نویسنده مسئول

مقدمه

نظر به افزایش رو به رشد تولید و گسترش نانومواد اکسیدهای فلزی همچون ذرات اکسید آهن مغناطیسی در مقیاس نانو (مگنتیت یا Fe_3O_4) با تنوع کاربردی در حوزه‌های زیست‌پزشکی، داروسازی، محیط‌زیست و صنعت [نظیر تصویربرداری¹ MRI (Bulte et al., 2001)، مگنتوفکشن²، انتقال ژن- دارو (Sunderland et al., 2006) و نانوجاذب‌ها در تصفیه و پالایش سساب‌ها (Adeleye et al., 2016)]، نرخ رهایش جهانی ۲۲-۸٪ نانوذرات مهندسی شده (ENM³) (مشتمل بر نانوذرات اکسید آهن) (Keller and Lazareva 2013)، ناکافی بودن اطلاعات و داده‌ها در ارتباط با پتانسیل اثرات منفی احتمالی نانو ذرات مگنتیت و پیش‌بینی احتمال دسترسی و مواجهه آن‌ها با زیست‌مندان در زیست‌بوم‌های آبی، اهمیت و ضرورت ارزیابی مخاطرات زیست‌محیطی آبی نانو مواد به عنوان نسل جدیدی از آلاینده‌ها را در بوم‌سازگان‌های دریایی دوچندان ساخته است، چراکه ورود این مواد به خاک و در نهایت مسیرهای آبی منتهی به دریاها و اقیانوس‌ها امری اجتناب‌ناپذیر به نظر می‌رسد (Ju-Nam and Lead, 2008). تاکنون در ارتباط با اثرات سمیت نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی Fe_3O_4 بر زئوپلانکتون‌های شاخصی چون روتیفر و بارناکل گزارشی در سطح جهان منتشر نشده است. یکی از شاخص‌های زیستی حساس نسبت به تغییرات سلامت زیست بوم آبی، جانداران زئوپلانکتونی هستند که در سال‌های اخیر در حوزه نانوبوم‌شناسی گزارشاتی مبنی بر استفاده از مدل‌های زئوپلانکتونی چون دافنی (*Daphnia spp*) و آرتمیا (*Artemia spp*) (جوهری و همکاران، ۱۳۹۵؛ محمدی و همکاران ۱۳۹۵؛ Blinova et al., 2017; Zhang et al., 2016; Nogueira et al., 2015; Gambardella et al., 2014; Zhu et al., 2017; Liu et al., 2017) ارائه شده است. با این وجود تاکنون در ارتباط با واکنش‌زیستی زئوپلانکتون‌های

شاخص آب شیرین تا لب شور نظیر روتیفرها و یا همتای مشابه آن در آب‌های شور و دریایی نظیر سخت‌پوستانی همچون بارناکل‌ها نسبت به اثرات سمیت نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی Fe_3O_4 و تفاوت عملکردی نانو ذرات مگنتیت در محیط‌هایی با شوری متفاوت گزارشی در سطح جهان منتشر نشده است. روتیفر و بارناکل‌ها جانورانی میکروسکوپی و مژه‌دار هستند که قادرند یوده‌های آلی را از محیط‌های آبی جذب نموده و نقشی کلیدی را در بازچرخش مواد مغذی در ستون آب ایفا نمایند (Baker et al., 2014). از جمله مطالعاتی که در سال‌های اخیر در ارتباط با نانو ذرات و اثرات آن بر روتیفرها گزارش شده است پژوهش Snell و Hicks (۲۰۱۱) است که نشان می‌دهد که روتیفرهای *Brachionus manjavacas* که به مدت ۲ روز در معرض نانو ذرات قرار گرفته بودند، توانسته‌اند، نانوذراتی با اندازه ۸۳ نانومتر را در معده و روده خود تجمع نموده و نانوذرات با اندازه ۳۷ نانومتر را به بافت‌های دیواره روده خود انتقال دهند. از این رو، در جذب و نفوذ نانو ذرات به بافت جانداران، اندازه نانو ذرات بسیار حائز اهمیت است. از جمله معدود گزارش‌ها در ارتباط با اثرات نانوذرات بر بارناکل‌ها می‌توان به پژوهش‌های Bhargava و همکاران (۲۰۱۸) اشاره نمود که بواسطه ردیابی نانوذرات PMMA رنگ آمیزی شده با رنگ فلورسنتس⁴ PTE درون بدن بارناکل *Amphibalanus amphitrite* نشان دادند که نانوذرات در طول مراحل دگردیستی بارناکل درون بدنشان پایدارند. با این حال، کماکان سمیت سنجی نانوذرات مگنتیت (Fe_3O_4) در بارناکل‌ها نامکشوف است. از این رو، در پژوهش حاضر طی اقدامی پیشگام در ارزیابی سمیت نانو-زئوپلانکتونی سوسپانسیون آبی نانوذرات مگنتیت (Fe_3O_4) از دو جاندار زئوپلانکتونی مدل مشتمل بر روتیفر *B. rotundiformis* (گونه ایی یوری‌هالین و شاخص آب های شیرین / لب شور تا شور) و لارو بارناکل *A. amphitrite* (شاخص ماکروفولینگ در آب های دریایی) استفاده گردید.

¹-Magnetic resonance imaging

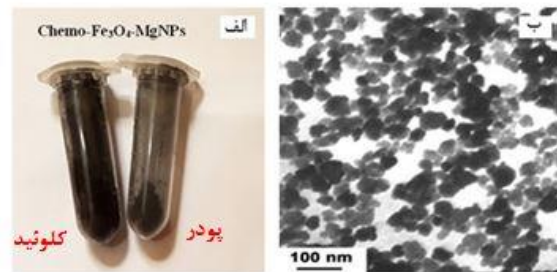
²-Magnetofection

³-Engineered nanomaterials

⁴-Perylene tetraester

مواد و روش کار

در مطالعه حاضر، پودر خالص و سیاه رنگ نانو ذرات اکسید آهن مغناطیسی مگنتیت (Fe_3O_4) که به روش شیمیایی تولید شده‌اند با درجه خلوص ۹۹/۵٪ بدون پوشش با محدوده اندازه ذرات ۱۵-۲۰ نانومتر و شکل کروی (محصول شرکت US NANO، آمریکا)، خریداری شدند. برخی ویژگی‌های این محصول همچون شکل، توزیع ذرات و اندازه نانو ذرات با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره (Transmission Electron Microscopy: TEM) (FEI، آمریکا) سنجش گردید (شکل ۱، جدول ۱).



شکل ۱: الف) نمایی از نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی در حالت پودری و کلوئیدی، ب) تصویر میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) از نانوذرات در مقیاس ۱۰۰ نانومتر.

Figure 1: A- View of magnetic iron oxide nanoparticles in powder and colloid state B- TEM image of nano- Fe_3O_4 sample (scale:100nm).

جدول ۱: ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی نانوذرات مگنتیت (Fe_3O_4) که توسط شرکت سازنده (US NANO) ارائه شده است.

Table 1: Physicochemical properties of magnetite nanoparticles (Fe_3O_4) provided by the manufacturer (US NANO).

| مقادیر | خصوصیات فیزیکی شیمیایی نانوذرات Fe_3O_4 |
|---------------------------|---|
| +۹۹/۵٪ | درصد خلوص |
| ۱۵-۲۰ nm | میانگین اندازه ذره |
| ۸۱/۹۸ m ² /g | BET |
| سیاه تا قهوه ای تیره | رنگ |
| کروی (Spherical) | ریخت شناسی |
| ~ ۰/۸۵ g/cm ³ | چگالی جرمی |
| ۴/۸-۵/۱ g/cm ³ | چگالی خاص |
| + ۱۷/۲±۶/۰۷ mv | پتانسیل زتا |
| ۸/۰۵ nm | اندازه ذره بر مبنای آنالیز TEM |
| ۴۰/۷۵ emu g ⁻¹ | قدرت مغناطیسی |

برای دستیابی به یک سوسپانسیون پایدار و نیز اجتناب از ته نشینی نانو ذرات Fe_3O_4 ، استوک‌های تهیه شده از غلظت‌ها به مدت ۴ ساعت در دستگاه اولتراسونیکانتور از نوع حمام دار (Elma، آلمان) با شرایط (۱۰۰W و ۴۰kHz) و با فواصل زمانی خاموش/ روشن دستگاه (۳۰:۱۰ دقیقه) سونیکیت شدند (Hao and Chen, 2012) به منظور آزمون سمیت سنجی ۴۸ ساعته بارناکل، پس از مراجعه میدانی به سواحل بندرعباس در بازه زمانی جذر توده‌های ماکروفولینگ بارناکل‌های بالغ گونه A. *amphitrite* که چسبیده به تخته سنگ‌ها بودند، جمع‌آوری شده و در آزمایشگاه پس از حذف سایر گونه‌های بایوفولینگ، چندین بار با آب لوله شستشو شدند. سپس این سنگ‌ها درون ظروف کوچک دو لیتری محتوی آبی با دمای ۲۵°C و شوری ۳۰٪ و هوادهی مناسب قرار گرفتند (شکل ۲-الف). پس از گذشت ۱۲ ساعت لاروهای تازه تخم گشایی شده ناپلیوسی اینستار I و II بارناکل برمبنای نورگرایی مثبت آنها و با ایجاد باریکه نقطه ای از نور با استفاده از پپیت جمع‌آوری شده و به یک بشر منتقل گردیدند (Chen et al., 2008). در ادامه با هدف سمیت‌سنجی و طی یک رویکرد مشابه با سمیت‌سنجی ترکیبات شیمیایی برای سخت‌پوستانی چون دافنی (*Daphnia spp*)، مطابق با رهنمود استاندارد شماره ۲۰۲ "سازمان توسعه و همکاری اقتصادی" (OECD, 2004)، رقت‌های متوالی از نانو ذرات مگنتیت در غلظت‌های (۰، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر) در ۵ تکرار درون چاهک‌های پلیت‌های کشت سلول ۲۴ خانه با احتساب گروه شاهد (فاقد نانو ذرات) ایجاد گردیده و به هر چاهک ۵۰ ناپلی بارناکل اضافه گردید. در سمیت‌سنجی ۴۸ ساعته روتیفر نیز مطابق بر روش استاندارد (Snell, 1998) و توصیه پیشنهادی Snell و Hicks (۲۰۱۱) از سویه *B. rotundiformis* تیپ S استفاده شد. روتیفرهای بالغ از ایستگاه تحقیقاتی تکثیر و پرورش ماهیان دریایی بندر امام خمینی تهیه شده و در این مرکز در آب با شوری ۲۵٪، دمای ۲۵-۳۲°C، ۲۸-۸/۱- pH- ۷/۹ و تاریکی عمدتاً به هدف تکثیر برای تغذیه ۱۴۳

همان طیف غلظتی مشابه سمیت‌سنجی بارناکل‌ها در تعداد ۲۰ نوزاد به ازای هر چاهک در پلیت ۲۴ خانه با ۵ تکرار برای هر غلظت توزیع شدند. سپس تعداد تلفات بارناکل‌ها در ساعات ۲۴ و ۴۸ و تعداد تلفات نوزادان روتیفرهای در ساعات ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ بعد از رویارویی با نانوذرات مگنتیت و مشاهده توسط میکروسکوپ نوری ثبت شده و درصد مرگ و میر آن‌ها در غلظت‌های مختلف محاسبه گردید. برای تعیین درصد مرگ و میر در غلظت‌های متفاوت و محاسبه LC_{50} از نسخه ۱/۵ نرم افزار EPA Probit Analysis (منتشر شده توسط سازمان حفاظت محیط زیست آمریکا) استفاده شد.

بچه‌ماهیان دریایی نگهداری می‌شوند. ولی با توجه به اینکه این گونه روتیفر یک گونه یوری‌هالین است و قادر به تحمل طیف وسیعی از شوری از ۱ تا بیش از ۴۰% می‌باشد و بنابر گزارش Sarma و همکاران (۲۰۱۴) این گونه در شوری ۶-۹ نیز بهینه رشد را نشان داده است، در تحقیق حاضر برای زیست‌آزمون سمیت‌سنجی نانوذرات اکسید آهن مگنتیت، این روتیفرها در آب شیرین (آب شهری اهواز) و به عنوان شاخص آب شیرین مورد ارزیابی قرار گرفتند (شکل ۲-ب). برای این منظور نوزادهای تازه از تخم خارج شده روتیفر توسط میکروپیت جمع‌آوری و مطابق بر راهنمای استاندارد (USEPA, 1985) و در



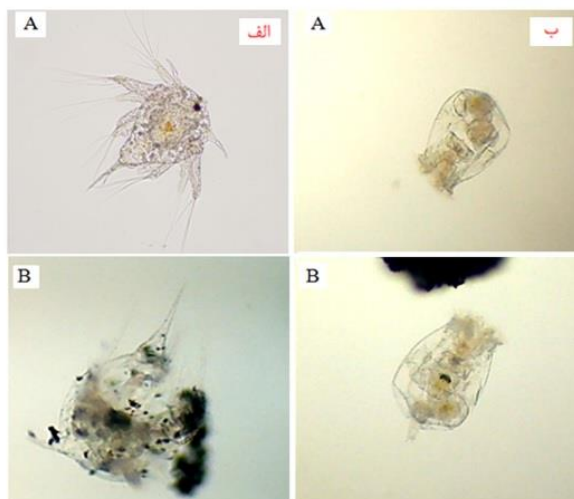
شکل ۲. نمایی از محیط تکثیر و پرورش بارناکل *Amphibalanus amphitrite* (الف) و روتیفر *Brachionus rotundiformis* (ب) در آزمایشگاه.

Figure 2: View of the barnacle, *Amphibalanus amphitrite* (A) and rotifer, *Brachionus rotundiformis* (B) hatching and rearing laboratory conditions.

است ($p < 0.05$) (شکل ۴، جدول ۲). با توجه به نتایج ارائه شده در جدول شماره ۲، در گروه تیمار و در بالاترین غلظت (500 mg/l)، نرخ مرگ و میر در ناپلیوس‌های بارناکل پس از ۲۴ ساعت رویارویی با نانو ذرات مگنتیت برابر ۴۰٪ بوده و با افزایش مدت زمان رویارویی تا ۴۸ ساعت، میزان مرگ و میر تا ۶۲٪ نیز افزایش یافته است که نشان دهنده سمی بودن نانو ذرات Fe_3O_4 برای بارناکل‌ها و حساسیت نسبتاً بالای مرحله ناپلیوسی لاروهای بارناکل نسبت به این ماده است.

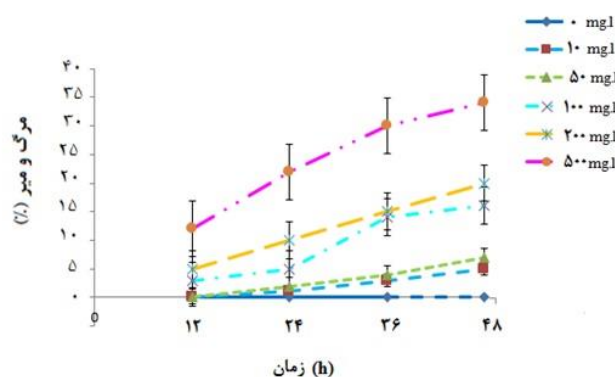
نتایج

همانطوریکه در شکل ۳ مشاهده شد، ۲۴ ساعت پس از رویارویی ناپلیوس‌های بارناکل و نوزادان روتیفر با نانو ذرات مگنتیت (Fe_3O_4)، این نانو ذرات در معده و مجاری گوارشی آنها به صورت کلوخه‌های سیاه‌رنگ تجمع یافته و این امر می‌تواند از دلایل اصلی بروز اثرات سمیت و تلفات در این دو جاندار باشد. آنالیز داده‌ها در پژوهش حاضر نشان می‌دهد که اثرات سمیت نانو ذرات مگنتیت بر لارو ناپلیوس بارناکل و نوزادان روتیفر با افزایش غلظت و نیز با افزایش مدت زمان رویارویی روند افزایشی را دنبال داشته است و تفاوت‌ها میان گروه تیمار و شاهد معنی‌دار بوده



شکل ۳: تصویر میکروسکوپی از بارناکل *Amphibalanus amphitrite* (گروه الف) و روتیفر *Brachionus rotundiformis* (گروه ب) پس از گذشت ۲۴ ساعت از رویارویی با نانو ذرات مگنتیت. تجمع سیاه‌رنگ نانوذرات در معده این زئوپلانکتون‌ها در گروه تیمار (B) در مقایسه با گروه شاهد (A) با معده خالی قابل تشخیص است (بزرگنمایی ۴۰۰x).

Figure 3: Photomicrograph of the barnacle, *Amphibalanus amphitrite* (A) and rotifer, *Brachionus rotundiformis* (B) revealing the accumulated magnetite iron oxide nanoparticles inside the stomach after 24 h of exposure to magnetite nanoparticles. (A) control group with empty gut, and (B) Treatment group (400x magnification).



شکل ۴: نرخ مرگ و میر روتیفر (*Brachionus rotundiformis*) تحت تاثیر افزایش زمان و غلظت نانوذرات مگنتیت.

Figure 4: The mortality rate of rotifer (*Brachionus rotundiformis*) is influenced by the increase in time and concentration of magnetite nanoparticles.

جدول ۲: نرخ مرگ و میر بارناکل (*Amphibalanus amphitrite*) تحت تاثیر افزایش زمان و غلظت نانوذرات مگنتیت.

Table 2: The mortality rate of barnacle (*Amphibalanus amphitrite*) is influenced by the increase in time and concentration of magnetite nanoparticles.

| جانور آبی | دوره زمانی (ساعت) | درصد مرگ و میر / غلظت (mg/L) | | | | | | EC ₅₀ (mg/L) |
|--|-------------------|------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|-------------------------|
| | | ۰ | ۱۰ | ۵۰ | ۱۰۰ | ۲۰۰ | ۵۰۰ | |
| <i>Amphibalanus amphitrite</i> (nauplii) | ۲۴ | ۰±۰ | ۰±۰ | ۱۰/۲±۰/۵ | ۱۶/۰±۰/۳ | ۲۶/۰±۰/۷ | ۴۰/۰±۰/۲ | ۵۸۳/۸ |
| | ۴۸ | ۰±۰ | ۱۶/۰±۲/۰ | ۳۴/۲±۰/۴ | ۴۲/۳±۰/۱ | ۵۴/۰±۰/۲ | ۶۲/۰±۲/۰ | ۴۶۶/۵ |

(جدول ۱)، احتمال اثرات القایی برهمکنش الکترومغناطیس نانوذرات مگنتیت شیمیایی (بار مثبت) با غشای سطحی سلولی (بار منفی) و تشدید اثرات اکسایشی و تولید گونه های فعال اکسیژن (ROS^1)، باشد. با این حال، نظر به دسته بندی ارائه شده توسط سازمان ملل متحده آمریکا (United Nation, 2009)، مبنی بر این که چنانچه ماده ایی در آبیان دارای سمیت حاد با LC_{50} ۹۶ h بیشتر از 100 mg/l باشد، جز مواد غیر سمی تلقی می گردد، در تحقیق حاضر نانوذرات Fe_3O_4 در گروه آلاینده های غیرسمی برای جانداران زئوپلانکتونی مورد آزمون قرار می گیرند. نتایج مشابهی نیز در ارتباط با سمیت سوسپانسیون آبی نانو ذرات اکسید آهن در سایر زئوپلانکتون ها همچون روتیفر *B. plicatilis*، دافنی *D. magna* و آرتمیا *A. saline* گزارش شده است (Nogueira et al., 2015; Blinova et al., 2017; Gambardella et al., 2014). یکی از شواهد پژوهش حاضر مبنی بر وجود پتانسیل سمیت زئوپلانکتونی نانو ذرات Fe_3O_4 ، مشاهده تجمع و کلوخه ای شدن نانو ذرات مگنتیت در معده و مجاری گوارشی این جانداران بوده است که می تواند از جمله دلایل احتمالی بروز تلفات در این جانداران باشد، زیرا هر دوی این جانوران زئوپلانکتونی همانند دافنی و آرتمیا جزء گروه صافی خواران بوده و در امر تغذیه، دارای رفتار تغذیه غیرانتخابی هستند و قادرند جلبک ها، باکتری ها و ریزه ذرات بترتیب با طیف اندازه $0.3-3 \mu\text{m}$ و $3-5 \mu\text{m}$ ، میکرون و نیز هر نوع ذره ای با اندازه کوچکتر از $50 \mu\text{m}$ میکرون را جذب نمایند (Vadstein et al., 1993). لذا، اندازه نانو ذرات در توانایی جذب و نفوذ آنها به معده و بافت های این جانداران و القاء اثرات سمیت ثانویه نقش تعیین کننده ای داشته است (Snell and Hicks, 2011) و این امر جذب نانوذرات توسط زئوپلانکتون ها را بسیار آسان نموده است. همانطوریکه در شکل ۳ قابل مشاهده است، این نانو ذرات توانسته اند به ماتریکس، سودوسلوم و مجاری روده ایی این جانداران زئوپلانکتونی نفوذ داشته باشند. با این وجود، بر

غلظت ایجاد کننده ی 50% تلفات (LC_{50}) نیز در ناپلیوس بارناکل پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت رویارویی با نانو ذرات مگنتیت به ترتیب برابر $583/8$ و $466/5$ میلی گرم در لیتر بود (جدول ۲). برخلاف بارناکل ها نتایج بدست آمده از روتیفرها و رویارویی ۴۸ ساعته آنها با نانو ذرات مگنتیت نشان داد که سمیت این نانو ذرات بر روتیفرها تا حدودی خفیف تر بوده و نرخ مرگ و میر آنها با افزایش زمان مجاورت از ۱۲ تا ۴۸ ساعت در بالاترین غلظت از 5% به 34% ($EC_{50} > 1000 \text{ mg/l}$) نیز رسید (شکل ۴).

بحث

در راستای پیروی از رهنمود OECD (۲۰۱۴) مبنی بر بوم‌شناسی و تعیین سرنوشت زیست محیطی نانو مواد در محیط زیست آبی و با توجه به اینکه پیش از این پژوهش، اطلاعات بسیار محدودی آنها در ارتباط با ارزیابی پتانسیل خطر نانو ذرات مگنتیت غیرارگانیک (شیمیایی) در جانداران زئوپلانکتونی همچون آرتمیا (*Artemia spp*) (Gambardella et al., 2014) و دافنی (*Daphnia spp*) (Blinova et al., 2017; Zhang et al., 2016) موجود بوده است و این جانوران به عنوان مدل های جانوری نانوبوم‌شناسی و نیز نمایندگان از گروه مصرف کنندگان ثانویه در هرم ماده و انرژی در زنجیره های غذایی آبیان از جایگاه بسیار مهمی برخوردار بوده اند و می توانند ایفاگر نقش انتقال دهندگی نانو مواد حتی به سطوح بالاتر زنجیره های غذایی باشند (Zhu et al., 2010a). از این رو در مطالعه حاضر سنجش سمیت حاد نانو ذرات Fe_3O_4 در دو جاندار زئوپلانکتونی مدل از آب های شور و شیرین ارزیابی و مقایسه گردید. یافته های حاصل از این پژوهش نشان می دهد که اثرات سمیت نانو ذرات مگنتیت بر لارو ناپلیوس بارناکل و نوزادان روتیفر تابعی از غلظت و زمان رویارویی با نانو ذرات مگنتیت بوده و این نانو مواد با توجه به نرخ تلفات در این دو جاندار، پتانسیل هایی از سمیت زئوپلانکتونی را بروز داده اند. این توان سمیت زایی می تواند متاثر از، کینتیک و فعالیت کاتالیکی ذرات در اندازه نانویی (Ates et al., 2013)، افزایش مساحت سطح به حجم، مثبت بودن پتانسیل زتا

¹-Reactive oxygen species (ROS)

دانسته شده‌اند (Lapresta-Fernández *et al.*, 2012)، با این وجود، بنا بر نتایج ارائه شده در پژوهش حاضر این احتمال نیز می‌رود که شوری در جذب سطحی، تجمع و کلوخه‌ای شدن بیشتر نانو ذرات در معده بارناکل‌ها در قیاس با روتیفرها و به تبع آن سمیت‌زایی بیشتر آن در زیست‌مندان آب‌های شور در قیاس با آب شیرین تاثیر گذار باشد (Lapresta-Fernández *et al.*, 2012)، زیرا با توجه به بیشتر بودن چگالی آب شور در قیاس با آب شیرین و به تبع آن افزایش تعداد برخی ضمامت تعادلی در اسکلت خارجی زئوپلانکتون‌های آب شور نظیر ستاها، شاخک‌ها و آنتنک‌ها نسبت به زئوپلانکتون‌های آب شیرین، نشست و جذب بیشتر نانو ذرات مگنتیت بر ضمامت بدن زئوپلانکتون‌های آب‌های شور وزن مخصوص این جانداران را افزایش داده است و این امر منجر به کندی شنا، شناوری نامتعادل و از دست رفت سهم بیشتری از انرژی (Zhang *et al.*, 2016) و در نتیجه افزایش نرخ مرگ و میر آنها در قیاس با همتای ساکن آب شیرین می‌گردد. در شکل ۳ نیز مقایسه میزان نشست نانو ذرات مگنتیت بر سطح بارناکل‌ها نسبت به روتیفرها این تفاوت را بوضوح نشان می‌دهد. هرچند اختصاصات گونه‌ای نیز می‌تواند در بروز سمیت در سطح زئوپلانکتون‌ها اثرگذار باشد و به عنوان نمونه نتایج سمیت نانو ذرات مگنتیت در ناپلی آرتمیا *A. salina* در غلظت 500 mg/l تنها ۴٪ گزارش شد و جذب سطحی نانو ذره به ضمامت اسکلتی نیز مشاهده نشد (Mashjoor *et al.*, 2015). از سویی، سمیت نانو ذرات در ارگانسیم‌ها به حمل یون‌های آنها نیز نسبت داده می‌شود که آسیب‌های نگران کننده‌ای را بر غشای سلولی و نیز دیگر ترکیبات درون سلولی وارد می‌سازد و عمدتاً در ارتباط با استرس اکسیداتیو، اثرات القایی آن بر DNA، لیبوپروتئین‌ها و فعالیت‌های معین متابولیسمی است که می‌تواند وابسته به فاکتورهای مختلفی چون طبیعت نانو ذره، شکل، اندازه ذره و برخی فاکتورهای محیطی چون شوری، دما و اکسیژن محلول باشد از این رو برهمکنش‌های نانو ذرات با پدیده‌های زیستی در آب‌های شور و شیرین نتایج متفاوتی را نشان داده است (Lapresta-Fernández *et al.*,

خلاف گزارش Gambardella و همکاران (۲۰۱۴)، مبنی بر اینکه در ناپلیوس‌های آرتمیا توان زدایش^۱ این کلوخه‌های نانو ذره‌ای تا حدودی پتانسیل سمیت‌زایی نانو ذرات مگنتیت را بر *A. salina* تعدیل بخشیده است. در مطالعه حاضر نرخ تلفات نسبتاً بالای بارناکل‌های *A. amphitrite* با این امر در تضاد بوده است و بنظر می‌رسد اختلافات عمدتاً ناشی از تفاوت‌های ریخت‌شناسی، آناتومیک و شکل مجاری گوارشی در بارناکل‌ها نسبت به آرتمیایها باشد، زیرا در بارناکل‌ها و روتیفرها همچون *D. magna* مجاری روده‌ای تا حدی پیچ‌دار هستند و نظیر آرتمیایها یک راست و مستقیم نمی‌باشد (Zhu *et al.*, 2010b; Lu *et al.*, 2018). از اینرو، این جانداران نمی‌توانند عمل دفع را به تمامی انجام دهند و با تمدید زمان مجاورت و سخت و حجیم شدگی تجمعات نانو ذره‌ای، این جانداران دیگر قادر به جذب ذرات غذایی و عمل دفع نمی‌باشند و لذا محکوم به مرگ خواهند بود. با توجه به اینکه تحقیق حاضر طیف غلظتی نسبتاً وسیعی از نانو ذرات مگنتیت ($500 - 10 \text{ mg/l}$) را پوشش داده است و این نانو ذرات اثرات سمیت بیشتری را بر بارناکل‌ها (ساکنین آب‌هایی با شوری بالا) نسبت به روتیفرها (ساکنین آب‌های شیرین) نشان داده‌اند. بنظر می‌رسد پیامدهای زیست محیطی رهایش نانو ذرات مگنتیت در سیستم‌های زیستی دریایی قابل چشم‌پوشی نیست و در رویارویی طولانی مدت تر ممکن است تهدیدی برای زنده‌مانی و دوام جمعیت‌های زئوپلانکتونی محسوب شوند. بعلاوه، در ارتباط با وابستگی افزایش سمیت نانو ذرات با شوری نیز، بایست توجه داشت که اساساً عوامل مداخله‌گر یونی موثر در تغییر ویژگی‌های الکترواستاتیک و جذب سطحی نانو ذرات، در آب‌های شیرین کمتر است و در واقع، مهمترین تاثیر شوری طی برهمکنش با نانو ذرات، کاهش پایداری نانو ذرات، القاء اثرات کلوئیدی-تجمعی در آب و تسریع فرآیند رسوب‌گذاری آنهاست و در اکثریت گزارش‌های ارائه شده نیز این عوامل در تعدیل سمیت نانو ذرات در آب‌های شور نسبت به آب شیرین بسیار موثر

¹-Elimination

- شیلات ایران، ۶۳-۷۵ (۴): ۲۵. DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110299
- Adeleye, A.S., Conway, J.R., Garner, K., Huang, Y., Su, Y., and Keller, A.A., 2016.** Engineered nanomaterials for water treatment and remediation: Costs, benefits, and applicability. *Chemical Engineering Journal*, 286: 640-662. DOI: 10.1016/j.cej.2015.10.105
- Ates, M., Daniels, J., Arslan, Z., and Farah, I.O., 2013.** Effects of aqueous suspensions of titanium dioxide nanoparticles on *Artemia salina*: assessment of nanoparticle aggregation, accumulation, and toxicity. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185(4): 3339-3348. DOI: 10.1007/s10661-012-2794-7
- Baker, T.J., Tyler, C.R., and Galloway, T.S., 2014.** Impacts of metal and metal oxide nanoparticles on marine organisms. *Environmental Pollution*, 186: 257-71. DOI: 10.1016/j.envpol.2013.11.014
- Bhargava, S., Lee, S.S.C., Ying, L.S.M., Neo, M. L., Teo, S. L.M., Valiyaveettil, S., 2018.** Fate of Nanoplastics in Marine Larvae: A Case Study Using Barnacles, *Amphibalanus amphitrite*. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, DOI: 10.1021/acssuschemeng.8b00766
- Blinova, I., Kanarbik, L., Irha, N., and Kahru, A., 2017.** Ecotoxicity of nanosized magnetite to crustacean *Daphnia magna* and duckweed *Lemna minor*, *Hydrobiologia*, 798: 141-149. DOI: 10.1007/s10750-015-2540-6

(2012)، هرچند هنوز بدرستی مشخص نیست که سمیت نانو ذرات تا چه میزان مربوط به یون‌های آزاد شده از آنها و چه میزان مربوط به خود نانو ذرات می‌تواند باشد. در همین راستا Kim و همکاران (۲۰۰۹) پیشنهاد می‌کنند که سمیت نانو ذرات نقره به دلیل تنش اکسایشی ناشی از این ذرات، مستقل از سمیت نقره یونی است. با این وجود تاکنون هیچ مطالعه‌ای نتوانسته نشان دهد که نانوذرات اکسیدهای فلزی (Me(O)NPs) در غلظت‌های زیست محیطی سمیتی بالاتر از یون‌هایشان را بروز خواهند داد، زیرا حضور مواد آلی طبیعی (NOM¹) و سایر پیچیدگی‌های زیست‌محیطی در بوم‌سازگان‌های آبی می‌تواند سمیت نانو ذرات را تعدیل بخشیده (Baker *et al.*, 2014) و پیامدهای پیش بینی نشده‌ای را نیز به نمایش گذارد. در انتها می‌توان عنوان نمود که پژوهش حاضر ضمن ارتقاء دانش و درک نانوبوم‌شناسی از رفتار و تاثیرپذیری سمیت نانوذرات مگنتیت در محیط‌های آبی شور و شیرین نشان می‌دهد که جانداران زئوپلانکتونی چون بارناکل‌ها و روتیفرها نسبت به اثرات آلاینده‌ی نانو ذرات مگنتیت تاثیرپذیر بوده و می‌توانند شاخص‌های زیستی مناسبی برای پیش‌بینی اثرات احتمالی رهایش نانو مواد به بوم‌سازگان‌های آبی باشند. از اینرو، بهره‌برداری بیشتر از آنها در سایر پژوهش‌های آتی توصیه می‌گردد.

منابع

- جوهری، س.ع.، نعمتی، ط. و دکانی، ل. ۱۳۹۵. بررسی قابلیت انباشت نانوذرات اکسیدروی در آرتمیا و انتقال تغذیه‌ای آن به ماهی دانیوگورخری (*Danio rerio*). *مجله علمی شیلات ایران*، ۲۹-۲۱ (۱): ۲۵. DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110220
- محمدی، ش.، سروری مغالو، ک.، آتشبار، ب. و ایمانی، ا. ۱۳۹۵. مطالعه اثرات مزمن نانو ذرات نقره بر رشد، بازماندگی و ویژگی‌های تولید مثلی آرتمیای دریاچه ارومیه (*Artemia urmiana*). *مجله علمی*

¹-Natural organic matter (NOM)

- Bulte, J.W., Douglas, T., Witwer, B., Zhang, S. C., Strable, E., Lewis, B.K., Zywicke, H., Miller, B., van Gelderen, P., Moskowitz, B.M., Duncan, I.D., and Frank, J.A., 2001.** Magnetodendrimers allow endosomal magnetic labeling and *in vivo* tracking of stem cells. *Nature Biotechnology*, 19:1141-1147. DOI: 10.1038/nbt1201-1141
- Chen, J.D., Feng, D.Q., Yang, Z.W., Wang, Z.C., Qiu, Y., and Lin, Y.M., 2008.** Antifouling metabolites from the mangrove plant *Ceriops tagal*. *Molecules*, 13(2): 212-219. DOI: 10.3390/molecules13020212
- Gambardella, C., Mesaric, T., Milivojevic, T., Sepcic, K., Gallus L., Carbone S., Ferrando S., and Faimali, M., 2014.** Effects of selected metal oxide nanoparticles on *Artemia salina* larvae: evaluation of mortality and behavioural and biochemical responses. *Environmental Monitoring and Assessment*, 186: 4249-59. DOI: 10.1007/s10661-014-3695-8
- Hao, L. and Chen. L., 2012.** Oxidative stress responses in different organs of carp (*Cyprinus carpio*) with exposure to ZnO nanoparticles. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 80, 103-110. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2012.02.017
- Ju-Nam, Y., and Lead, J.R., 2008.** Manufactured nanoparticles: an overview of their chemistry, interactions and potential environmental problems. *Science of the Total Environment*, 400, 396-414. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2008.06.042
- Keller, A.A., Lazareva, A., 2013.** Predicted releases of engineered nanomaterials: from global to regional to local. *Environmental Science and Technology Letters*. 1:65-70. DOI: 10.1021/ez400106t
- Kim, S., Choi, J.E., Choi, J., Chung, K.H., Park, K., Yi, J., and Ryu, D.Y. 2009.** Oxidative stress dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicology In Vitro*, 23: 1076-1084. DOI: 10.1016/j.tiv.2009.06.001
- Lapresta-Ferna'ndez, A., Ferna'ndez, A., and Blasco, J., 2012.** Nanoecotoxicity effects of engineered silver and gold nanoparticles in aquatic organisms. *Trends in Analytical Chemistry*, 32: 40-59. DOI: 10.1016/j.trac.2011.09.007
- Liu, Y., Fan, W., Xu, Z., Peng, W., Luo, S., 2017.** Transgenerational effects of reduced graphene oxide modified by Au, Ag, Pd, Fe₃O₄, Co₃O₄ and SnO₂ on two generations of *Daphnia magna*. *Carbon*, 122: 669-679. DOI: 10.1016/j.carbon.2017.06.087
- Lu, J., Tian, S., Lv, X., Chen, Z., Chen, B., Zhu, X., and Cai, Z., 2018.** TiO₂ nanoparticles in the marine environment: Impact on the toxicity of phenanthrene and Cd²⁺ to marine zooplankton *Artemia salina*. *Science of the Total Environment*, 615: 375-380. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.09.292
- Mashjoor, S., Yosefzadi, M., Alishahi, M., Shokoohmand, M., and Molayemraftar, T., 2015.** Toxicity assessment of BioFe₃O₄ and Fe₃O₄ magnetic nanoparticles on nauplii and adults of brine shrimp (*Artemia salina*). *Middle. East. Central. Asia. Aqua*.

- Confer, 14-16 Dec, Tehran. Iran, 2015, pp. 275.
- Nogueira, V., Lopes, I., Rocha-Santos, T. A. P., Rasteiro, M. G., Abrantes, N., Goncalves, F., Soares, A. M. V. M., Duarte, A. C., and Pereira, R., 2015.** Assessing the ecotoxicity of metal nano-oxides with potential for wastewater treatment. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(17): 13212-13224. DOI: 10.1007/s11356-015-4581-9
- OECD., 2004.** OECD Guideline for the Testing of Chemicals”, Test No. 202: Daphnia sp., Acute Immobilisation Test and Reproduction, Paris, France.
- OECD., 2014.** Ecotoxicology and environmental fate of manufactured nanomaterials: test guidelines. expert meeting report. Series on the safety of manufactured nanomaterials No. 40. ENV/JM/MONO(2014)1.
- Sarma, S.S.S., Elguea-Sánchez, B., and Nandini, S., 2014.** Effect of salinity on competition between the rotifers *Brachionus rotundiformis* Tschugunoff and *Hexarthra jenkiniae* (De Beauchamp) (Rotifera). *Hydrobiologia*, 474 (1-3): 183–188. DOI: 10.1023/A:1016535821741
- Snell, T.W., 1998.** Estimating chronic toxicity using rotifers. In: Standard methods for the examination of water and wastewater. vol. 20 (8420), pp. 8-62-8-65.
- Snell, T.W., and Hicks, D.G., 2011.** Assessing toxicity of nanoparticles using *Brachionus manjavacas* (Rotifera). *Environmental Toxicology*, 26(2):146-152. DOI:10.1002/tox.20538
- Sunderland, C.J., Steiert, M., Talmadge, J.E., Derfus, A.M., and Barry, S. E., 2006.** Targeted nanoparticles for detecting and treating cancer. *Drug Development and Delivery*, 67:70-93. DOI: 10.1002/ddr.20069
- United Nation (UN). 2009.** Globally harmonized system of classification and labelling of chemicals (GHS), Third revised edition, United Nations, New York and Geneva, pp. 215-220.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA)., 1985.** Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms. EPA/600/4-85/013, pp. 216.
- Vadstein, O., Øie, G., and Olsen, Y., 1993.** Particle size dependent feeding by the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia*, 255(1): 261-267. DOI: 10.1007/BF00025847
- Zhang, Y.Q., Dringen, R., Petters, C., Rastedt, W., Koser, J., Filser, J., and Stolte, S., 2016.** Toxicity of dimercaptosuccinate-coated and unfunctionalized magnetic iron oxide nanoparticles towards aquatic organisms. *Environmental Science. Nano*, 3: 754-767. DOI:10.1039/C5EN00222B
- Zhu, S., Xue, MY., Luo, F., Chen, WC., Zhu B., Wang GX., 2017.** Developmental toxicity of Fe₃O₄ nanoparticles on cysts and three larval stages of *Artemia salina*.

Environmental Pollution. 230: 683-691.

DOI:10.1016/j.envpol.2017.06.065

Zhu, X., Wang, J., Zhang, X., Chang, Y., and Chen, Y., 2010a. Trophic transfer of TiO₂ nanoparticles from *Daphnia* to zebrafish in a simplified freshwater food

chain. *Chemosphere*, 79: 928-933. DOI:

10.1016/j.chemosphere.2010.03.022

Zhu, X., Chang, Y., and Chen, Y., 2010b. Toxicity and bioaccumulation of TiO₂ nanoparticle aggregates in *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 78: 209-215. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2009.11.013

Evaluation of the toxicity of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticle aqueous suspensions on bio-indices of sea water (barnacle) and fresh water (rotifer)

Mashjoor S.¹, Yousefzadi M.^{1*}, Alishahi M.²

*morteza110110@gmail.com

1-Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.

2-Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

Abstract

Due to the inevitable achievement of nanoparticles to aquatic ecosystems, the limitation of existing reports, and the inadequate understanding of their possible biological reactions with aquatic organisms, this study in the pioneering step was aimed to toxicity assessment of aqueous suspension of chemical magnetic nanoparticles (Fe₃O₄) in zooplanktonic species such as barnacle larvae *Amphibalanus amphitrite* (sea water index) and rotifer *Brachionus rotundiformis* (fresh water index). For this purpose, serial concentrations (0, 10, 50, 100, 200, 500 mg / l) of magnetite nanoparticles were prepared in 24 well plates with 5 replicates. After that, the zooplanktons (50 barnacle nauplii and 20 neonate rotifer to each well) were introduced to plates and the sensitivity of the samples were evaluated for the toxicity of nanoparticles at a time interval of 12-48 hours. The results of this study showed that the toxicity effects of chemical magnetite nanoparticles on barnacle nauplii larvae and neonate rotifer were increased with increasing time and concentration of magnetite nanoparticles. Differences between control and treatment groups were significant (P<0.05). However, after 48 hours of exposure, the mortality rate at the highest concentration (500 mg/l) in barnacles was 62% (LC₅₀= 466.5 mg/l) and in rotifer 34% (E₅₀>1000 mg/l). Regardless of species variation in barnacles and rotifers, according to the results, magnetite nanoparticles are in the group of non-toxic contaminants for these zooplanktonic organisms.

Keywords: Toxicity, Biomarker, Zooplankton, Fe₃O₄ nanoparticles, Salinity

* Corresponding author