



مقاله پژوهشی

## نانوبوم‌سم‌شناسی نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی فیکوبیوژن در مراحل رویانی و لاروی ماهی گورخری (*Danio rerio*)

سکینه مشجور<sup>۱</sup>، علی شهریاری<sup>۲\*</sup>، مرتضی یوسف‌زادی<sup>۳</sup>، مجتبی علیشاهی<sup>۴</sup>

تاریخ دریافت: فروردین ۹۸

تاریخ پذیرش: خرداد ۹۸

### چکیده

به منظور پیش‌بینی اثرات زیست‌محیطی نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی (مگنتیت یا  $\text{Bio-Fe}_3\text{O}_4$ ) زیست‌تولید شده توسط جلبک سبز دریایی *Ulva flexuosa* در محیط‌های آبی، سمیت آن بر مراحل رویانی و لاروی ماهی گورخری *Danio rerio* به عنوان یک مدل آبی، ارزیابی شد. برای این منظور، تعداد ۱۰ تخم لقاح یافته ماهی در معرض غلظت‌های مختلف نانوذرات  $\text{Bio-Fe}_3\text{O}_4$  (۰، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر) در پلیت های ۶ خانه و در ۶ تکرار قرار گرفت و ارزیابی نمونه‌ها بعد از ۱۲، ۴۸، ۷۲، ۹۶، ۱۱۰ و ۱۳۴ ساعت صورت پذیرفت. نتایج به دست آمده نشان داد که درصد تفریح تخم ماهی گورخری و نرخ بقای لاروی با افزایش زمان مواجهه و غلظت نانوذرات مگنتیت کاهش یافت ( $P < 0/05$ )، به نحوی که در بالاترین غلظت (۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر) پس از ۴۸ ساعت نرخ تفریح تا ۳۶/۶ درصد کاهش نشان داد ( $LC_{50}$  ۴۸h). ۶۳۸/۲ میلی‌گرم در لیتر) و نرخ بقای لاروی نیز پس از ۱۳۴ ساعت به ۴۳/۳ درصد رسید ( $LC_{50}$  ۱۳۴h). ۶۴۵/۴ میلی‌گرم در لیتر). میانگین درصد کل ناهنجاری‌های اسکلتی در ماهیان گورخری به طور معنی‌داری تابع الگوی افزایش غلظت و زمان در طی مجاورت با نانوذرات بود و در بالاترین غلظت (۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر) به ۱۳/۳ درصد رسید ( $P < 0/05$ ). از این رو، احتمال می‌رود اثرات سمیت تا حدودی متاثر از اندازه ذره (۱۳/۸ نانومتر) و عملکرد کینتیکی بالقوه سمی ذرات در مقیاس نانو باشد.

**واژگان کلیدی:** سمیت، ماهی گورخری، زیست‌تولید، نانوذرات اکسید آهن.

۱- دکتری زیست‌شناسی دریا، گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.

۲- دانشیار گروه بیوشیمی و زیست‌شناسی مولکولی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

۳- دانشیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.

۴- استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

\* نویسنده مسئول: a.shahriari@scu.ac.ir

## مقدمه

از نقطه نظر نانوزیست‌سازگاری (Nanobiocompatibility)، زیست‌تولید سبز (Green Synthesis) حوزه‌ای از نانوفناوری است که رویکردی قدرتمند، ایمن، پایدار، پاک و دوستدار محیط زیست را برای تولید نانوذرات با تنوعی کاربردی در حوزه‌های مختلف نانوزیست‌فناوری پزشکی، دارویی، صنعت و محیط زیست ارائه می‌دهد (Kharissova et al., 2013). در این روش از سیستم‌های زیستی و یا زیست‌ماده خام استفاده می‌شود که قادر هستند به عنوان عوامل احیاگر و تثبیت کننده طبیعی یون‌های فلزی عمل کنند و بدون بهره‌گیری از افزودنی‌های شیمیایی مانند حلال‌ها و یا ترکیبات واکنشگر، تولید انواع مختلفی از نانوذرات ارگانیک و با منشأ زیستی را امکان‌پذیر سازند (Nadagouda and Varma, 2009). توسعه این تکنیک جدید در حوزه تولید نانوترکیبات شیمیایی می‌تواند راهکاری امیدبخش در جهت تعدیل نگرانی‌های جهانی مطرح در بحث آلاینده‌گی آتی نانوذرات در اکوسیستم‌های طبیعی باشد (Kharissova et al., 2013). زیرا در روش تولید زیستی نانوذرات، نشست گروه‌های عاملی فیتوشیمیایی گیاهی به عنوان یک فیتوپوش یا لایه پوششی گیاهی بر سطح نانوذرات می‌تواند، تحریک‌پذیری آن‌ها را برای سلول‌های زنده تعدیل بخشد و منجر به کاهش اثرات سمیت در آن‌ها شود (Das et al., 2016). نانوذرات اکسید آهن (مگنتیت یا  $Fe_3O_4$ ) به علت ویژگی‌های منحصر به فرد کوانتومی، مکانیکی، فیزیکی، نوری، دمایی، الکتریکی، سوپرپارامغناطیسی، از کاربری‌های بسیار وسیعی در حوزه زیست‌فناوری-پزشکی-دارویی (افزایش تمایز و کنتراست در تصویربرداری تشدید مغناطیسی (Magnetic Resonance Imaging: MRI) در بافت‌های توموری) (Chouly et al., 1996)، شیمی‌درمانی (Mahmoudi et al., 2011)، مگنتوفکشن (Magnetofection)، انتقال ژن و انتقال ترکیبات دارویی (Dobson, 2006; Sunderland et al., 2006)، حوزه صنعت (مواد جاذب امواج راداری و بیورسانه) (Laurent et al., 2011) و حوزه محیط زیست (تصفیه و پالایش فاضلاب‌ها و پساب‌ها) (Xu et al., 2012; Adeleye et al., 2016)، برخوردار هستند. از این رو با دستیابی به فرمولاسیون دقیق فن‌آوری تولید زیستی نانوذرات اکسید آهن می‌توان، ضمن حفظ ویژگی‌های قدرتمند مغناطیسی-الکتریکی

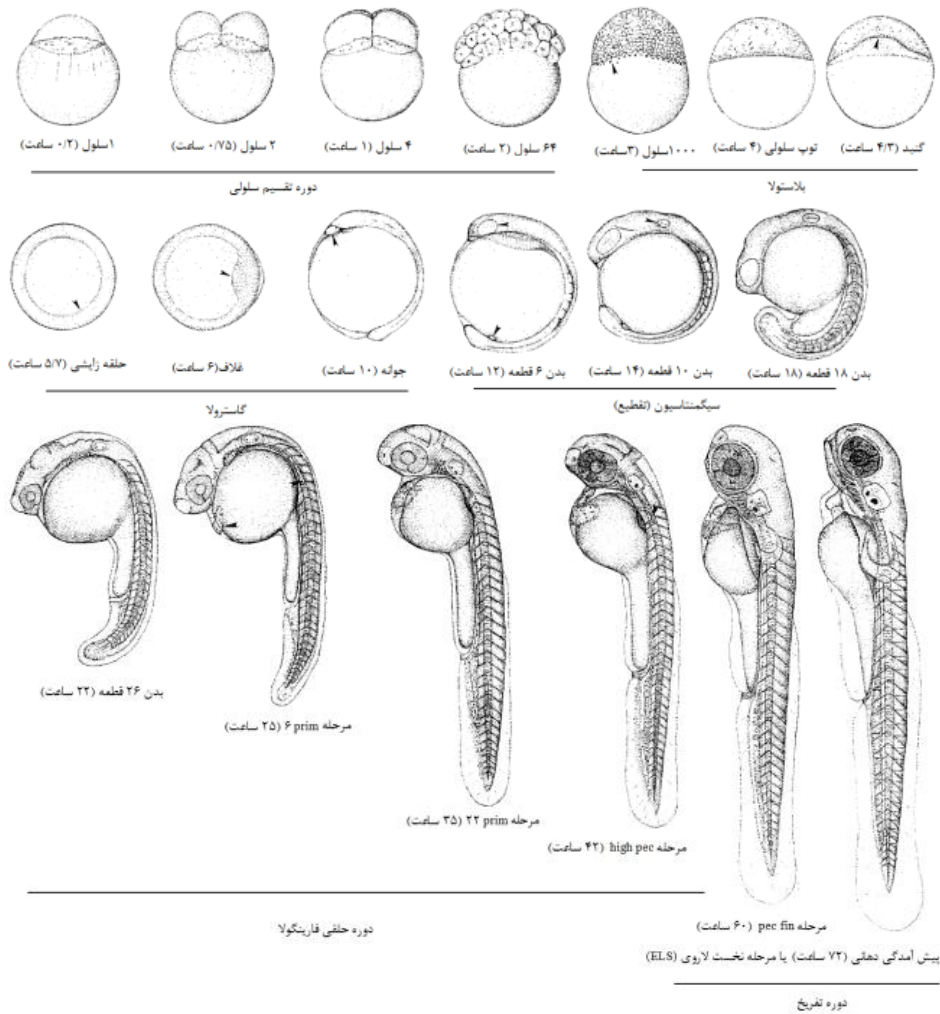
آن‌ها، تولیداتی پاک و زیست سازگار را ارائه کرده است که دیگر جای هیچ گونه نگرانی زیست محیطی بر رهیافت آتی آن‌ها به بوم سازگان‌های آبی و در نتیجه تهدید زیست‌مندان را نیز در پی نداشته باشد.

در حال حاضر یک گروه بسیار ارزشمند از منابع طبیعی گیاهی کشور، ماکرو جلبک‌های دریایی با غنا و تنوع گونه‌ای بسیار بالا هستند که در سطحی بسیار وسیع و با زی‌توده نسبتاً انبوه در نوار ساحلی جنوب کشور رویش دارند، اما به دلیل عدم برنامه‌ریزی و ایجاد زیرساخت‌های بهینه، این منابع بسیار ارزشمند از ترکیبات فیتوشیمیایی تاکنون کمتر مورد توجه و بهره‌برداری قرار گرفته‌اند. جلبک‌های دریایی موادی بسیار مغذی محسوب می‌شوند که غنی از لیپیدها، مواد معدنی و ویتامین‌ها هستند و نظر به وجود ترکیبات فیتوشیمیایی زیست‌فعال و طبیعی چون کاراتنوئیدها، پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدهای سولفاته، اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه (Poly Unsaturated Fatty Acids: PUFAs) و پلی‌فنول‌ها (Suganya et al., 2016) در سال‌های اخیر کنون توجهات بسیاری را در حوزه پزشکی، دارویی، بهداشتی و آرایشی به خود معطوف داشته‌اند. زیرا این جلبک‌های دریایی که از آن‌ها به عنوان زیست‌سازندگان (Bionanofactories) یاد می‌شود (Lewis Oscar et al., 2016)، از توان تجمع و احیای یون‌های فلزات برخوردار هستند و به عنوان واکنشگرهای زیستی هم به صورت زنده و هم به صورت زی‌توده مرده می‌توانند برای زیست‌ساخت و احیای نانوذرات فلزی چون نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی مگنتیت (Iron Oxide Magnetic Nanoparticles) مورد استفاده قرار گیرند. پیشنهاد مطالعات انجام شده نیز نشان می‌دهد که زیست‌ساخت سبز نانوذرات مگنتیت با بهره‌گیری از جلبک‌های دریایی قهوه‌ای (*Sargassum muticum* Mahdavi et al., 2013) و *Padina pavonica* و *acinarium* (EL-Kassa et al., 2016) و نیز جلبک قرمز *Kappaphycus alvarezii* (Yew et al., 2016)، سابقاً گزارش شده است. سال‌ها است که ماهی گورخری (*Danio rerio*, Zebrafish) از خانواده کپورماهیان Cyprinidae ساکن مناطق گرمسیری، به عنوان یک مدل جانوری آبی in vivo بسیار کارآمد در پژوهش‌های زیست‌شناسی تکوینی، آسیب‌شناسی مولکولی و زیست‌بوم‌سنجی آلاینده‌ها، معرفی شده و مورد

تاکید بر نانوذرات با منشا تولیدی شیمیایی مانند نانوذرات منگنز (Ghobadian et al., 2015)، نانوذرات اکسید آهن هماتیت (Zhu et al., 2012)، ۴ گروه فلزی از نانوذرات  $\text{TiO}_2$ ،  $\text{ZnO}$  و  $\text{CeO}_2$  و  $\text{SnO}_2$  (Wehmas et al., 2015) و  $\text{SiNPs}$  (Duan et al., 2013)، انجام پذیرفته‌اند.

در این راستا در پژوهش حاضر، نخست ارائه یک رویکرد زیست‌تولید نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی (مگنتیت:  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-MNPs}$ ) با استفاده از عصاره آبی جلبک سبز دریایی *Ulva flexuosa* هدف‌گیری شده است و در گام بعدی نیز به منظور پیش‌بینی و بررسی جنبه سلامت زیست‌محیطی (Environmental Health and Safety: EHS) این تولیدات بیونانویی که تاکنون بوم‌سم‌شناسی آن در آبزیان در سطح جهان به ندرت بررسی شده است، از مدل جانوری ماهی گورخری *Danio rerio* استفاده شد تا بتوان سمیت زیستی و تفاوت میزان حساسیت مراحل تکامل جنینی و لاروی ماهی گورخری را نسبت به نانوذرات زیست‌تولیدی مگنتیت ارزیابی کرد.

بهره‌برداری قرار گرفته است (Lin et al., 2013). از جمله مزیت‌های مهم این جانور مدل، وجود امتیازاتی مانند اندازه کوچک، قیمت ارزان، قابلیت تکثیر و نگهداری آسان در آزمایشگاه، سن بلوغ کم (۲-۳ ماهگی)، زادآوری سریع و بسیار بالا، شفافیت جنین، رشد و روند تکاملی سریع آن است (Lin et al., 2013; Staal et al., 2018). دوره تکامل رویانی در ماهی گورخری بر حسب زمان (ساعت) بدین قرار است: ۱- تخم تازه لقاح یافته (Zygote): ساعت صفر، ۲- تقسیمات سلولی (Cleavage): ۰/۷۵ ساعت، ۳- بلاستولا (Blastula): ۲/۲۵ ساعت، ۴- گاسترولا (Gastrula): ۵/۲۵ ساعت، ۵- سیگمنتاسیون (Segmentation): قطعه قطعه شدن بدن): ۱۰ ساعت، ۶- فارینگولا (Pharyngula): ۲۴ ساعت، ۷- تفریح (Hatching): ۴۸ ساعت و ۸- مرحله نخست لاروی (Early Larva): ۷۲ ساعت (شکل ۱؛ Kimmel et al., 1995). بنابر یافته‌های موجود، در ارتباط با ارزیابی توان سمیت‌زایی رویانی نانوذرات مگنتیت با منشا بیوسنتزی در ماهی گورخری، تاکنون پژوهشی گزارش نشده است و مطالعات سم‌شناسی پیشین عمدتاً با



شکل ۱: مراحل تکامل رویانی و لاروی ماهی گورخری (*Danio rerio*) بر حسب زمان (ساعت) (Kimmel et al., 1995).

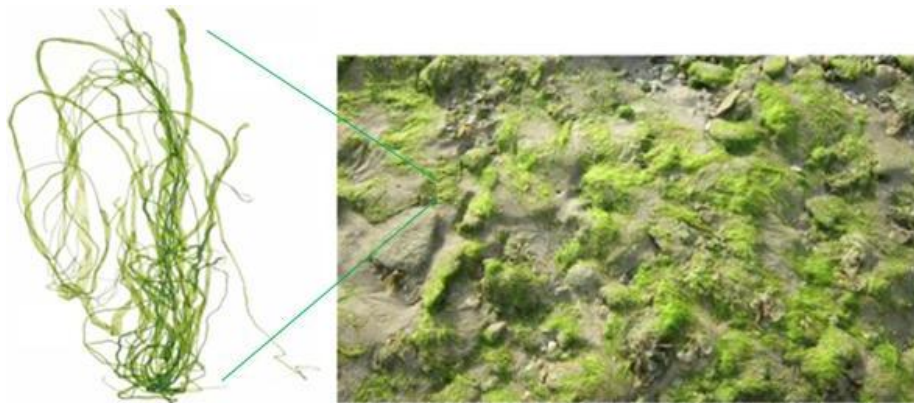
سبزی دریایی *Ulva flexuosa* (Chlorophyceae)، این جلبک (شکل ۲) به صورت دستی از آب‌های ساحلی شمالی خلیج فارس (جزیره قشم) جمع‌آوری شد و بنا بر

مواد و روش‌ها زیست تولید نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی به منظور فرآیند زیست‌تولید جلبکی نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی از ماکرو جلبک

*U. flexuosa*) و نیز ۱۰۰ میلی لیتر از محلول کلرید آهن فرو- فروس با دمای ۸۸ درجه سانتی گراد ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  و  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) با نسبت مولی ۱:۲) و محلول سود یک مولار تیتراسیون انجام شد و مشاهده تغییر رنگ محلول از نارنجی به سمت سیاه رنگ، نشانه‌ای بر تولید زیستی نانوذرات اکسید آهن بود. رسوب سیاه رنگ نانوذرات مگنتیت پس از چندین بار شستشو با آب مقطر استریل و اتانول و خشک شدن در دمای ۹۰ درجه سانتی گراد تخلیص شد (Awwad and Salem, 2012) (شکل ۳- الف). میانگین اندازه قطر هندسی نانوذرات فیکوسنتزی مگنتیت، توسط دستگاه پارتیکل سائزر (PSA Scatterscope-I Qudix، کره) اندازه گیری شد.

کلیدهای تاکسونومیک (Basson, 1978; De Clerck and Coppejans, 1996) شناسایی و پس از شستشو و خشک شدن در سایه، عصاره آبی از این جلبک سبز تهیه شد. به منظور تهیه عصاره آبی، میزان ۱۰ گرم از آن در ۱۵۰ میلی لیتر آب دوبار تقطیر در یک ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد جوشانده شد. عصاره های آبی این جلبک ها پس از جوشانده شدن سرد و با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ فیلتر شد و برای استفاده بعدی در ظرف شیشه ایی تاریک سر بسته در یخچال نگهداری شد (Awwad and Salem, 2012).

در مطالعه حاضر، احیای زیستی نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی فیکوسنتزی با استفاده از ۳۰ میلی لیتر از عصاره آبی جلبک سبز



شکل ۲: نمایی از ماکرو جلبک سبز دریایی *Ulva flexuosa*

## تعیین ویژگی‌های کیفی نانوذرات

ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی مانند توزیع ذرات، اندازه و جنس نانوذرات، طبیعت کریستاله و درصد خلوص فازی آن‌ها هم با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره (Transmission Electron Microscopy: TEM, FEI) (آمریکا) و آنالیز تفرق اشعه X (X-ray Powder Diffraction: XRD) توسط دستگاه (Panalytical, هلند) مجهز به فیلترهای نیکلی تحت ولتاژ ۳۰kV/۳۰mA و نیز با استفاده از منبع تشعشع  $K\alpha$  مس که طول موج تولیدی لوله تولید کننده پرتو ایکس آن برابر با  $1/54$  نانومتر بود ( $\lambda=1/54\text{nm}$ ) و زاویه پراش آن در طیف  $10^\circ \leq 2\theta \leq 80^\circ$  قرار داشت، سنجش شد. محاسبه میانگین اندازه کریستالیت (d) نانوذرات نیز بر مبنای رابطه Debye-Scherrer (رابطه ۱) محاسبه شد (Yuvakkumar and Hong, 2014).

رابطه ۱:

$$d = k \cdot \lambda / \beta \cdot \cos\theta$$

## زیست‌آزمون ماهی گورخری

به منظور زیست‌آزمون اثرات نانوذرات فیکوسنتزی مگنتیت بر جنین و لارو ماهی گورخری (*Danio rerio*) با توجه به

رهنمودهای استاندارد شماره‌های ۲۱۰ و ۲۱۲ «سازمان توسعه و همکاری اقتصادی» (OECD, 1998, 1992)، ابتدا ماهیان مولد تهیه و در شرایط مطلوب تخم‌کشی شدند. سپس تخم‌های لقاح یافته شفاف از تخم‌های مرده جداسازی شدند. برای آزمون سمیت تحت کشندگی نانوذرات اکسید آهن فیکوسنتزی تعداد ۱۰ تخم ماهی گورخری به پلیت‌های ۶ خانه محتوی ۱۰ میلی‌لیتر محلول سوسپانسیون نانوذرات اکسید آهن با غلظت‌های ۰، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر) در ۶ تکرار، اضافه شد و ظروف در انکوباتور ۲۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. مشاهده، عکس‌برداری و شمارش نمونه‌ها به طور منظم بعد از ۱۲، ۴۸، ۷۲، ۹۶، ۱۱۰ و ۱۳۴ ساعت، در زیر استریومیکروسکوپ (Olympus, BX40، آمریکا) انجام شد. در ادامه، تعداد تخم‌های مرده، درصد تفریخ، بقای لارو و درصد مرگ و میر آن‌ها ارزیابی شد. بروز ناهنجاری‌های ریخت‌شناسی (Malformations) لارو ماهیان طی بررسی نمونه‌ها در زیر استریومیکروسکوپ مجهز به دوربین عکس‌برداری، تعیین و ثبت شد (Zhu et al., 2012; Duan et al., 2013; Raghunath and Perumal, 2018). بدین گونه، از گروه‌های مختلف تیمار عکس تهیه شد

*flexuosa* با بهره‌گیری از میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) نشان داد که نانوذرات زیست‌تولید شده ( $U. flexuosa-Fe_3O_4$ -MNPs) (شکل ۳-الف)، شکل کریستالی کروی- مکعبی (Cubo-spherical) داشت (شکل ۳-ب). محاسبه میانگین اندازه ذره بر مبنای تصویر TEM و بنابر اندازه‌گیری بیش از ۱۰۰ عدد از ذرات به صورت تصادفی و نیز آنالیز PSA نشان داد که میانگین قطر نانو ذرات Bio- $Fe_3O_4$ -MNPs برابر ۱۳/۸ نانومتر بود.

بررسی ساختار کریستالوگرافی و تشخیص فازی نانوذرات مگنتیت فیکوسنتزی توسط دستگاه XRD نشان داد که بر پایه الگوی طیفی XRD مربوط به  $U. Fe_3O_4$ -MNPs *flexuosa* زوایای پراش  $2\theta$  در  $30/22^\circ$ ،  $35/57^\circ$ ،  $45/47^\circ$ ،  $57/04^\circ$  و  $62/72^\circ$  به ترتیب مربوط به پیک‌های صفحات کریستالی مگنتیت در  $220$ ،  $311$ ،  $400$ ،  $420$  و  $511$  بود (شکل ۳-ج).

محاسبه میانگین اندازه کریستالیت نانوذره فیکوسنتزی نشان داد که ساختار فازی کریستالی Bio- $Fe_3O_4$ -MNPs دارای اندازه‌ای برابر با ۱۵-۱۰ نانومتر بود.

و انواع ناهنجاری ریخت‌شناسی در هر تیمار شمارش و درصدگیری شد.

برای محاسبه غلظت نیمه کشنده ( $LC_{50}$ ) بر مبنای دوره زمانی تیمار، از نسخه ۱/۵ نرم‌افزار EPA Probit Analysis (منتشر شده توسط سازمان حفاظت محیط زیست امریکا) استفاده شد.

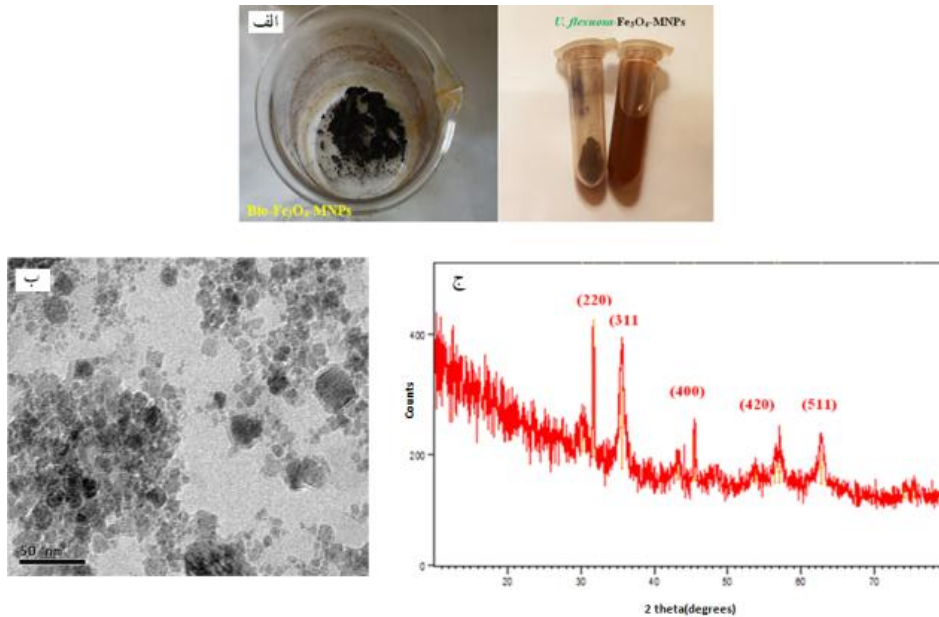
### تجزیه و تحلیل آماری

برای این منظور از نرم‌افزار IBM SPSS 19 استفاده شد و تمامی مقادیر داده‌ها بر حسب میانگین  $\pm$  خطای استاندارد ارائه شده است. نرمال بودن داده‌ها و همگنی واریانس‌ها توسط آزمون Shapiro-Wilk بررسی شد. از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA) به منظور تعیین معنی‌داری اثر غلظت‌های مختلف و زمان در سطح اطمینان ۹۵ درصد ( $P < 0/05$ ) استفاده شد. سپس با استفاده از پس‌آزمون Duncan معنی‌داری اختلاف میان تیمارهای مختلف در قیاس با گروه شاهد مشخص شد.

### نتایج

مشخصات ریزساختار، ریخت‌شناسی و پراکنش اندازه نانوذرات مگنتیت زیست‌تولید شده توسط عصاره آبی جلبک سبز *U.*





شکل ۳: نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی فیکوسنتزی (*Ulva flexuosa*-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-MNPs). الف) زیست تولید نانوذرات مگنتیت به صورت پودر. ب) تصویر میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) نانوذرات (مقیاس ۵۰ نانومتر). ج) الگوی پراش اشعه ایکس (XRD) نانوذرات.

افزایش غلظت نانوذرات مگنتیت کاهش معناداری یافت ( $P < 0/05$ ; شکل‌های ۴ و ۵). به نحوی که در مقایسه با گروه شاهد که نرخ تفریح و بقایی برابر با ۱۰۰ درصد داشت، در گروه تیمار با بالاترین غلظت (۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر) پس از ۱۳۴ ساعت نرخ بقای لاروی تا ۴۳/۳ درصد کاهش نشان داد (شکل ۴) و نرخ تفریح نیز پس از ۴۸ ساعت به ۳۶/۶ درصد رسید (شکل ۵). این نتایج نشان داد که نانوذرات فیکوسنتزی مگنتیت در طول ۲۴ تا ۴۸ ساعت نخست به

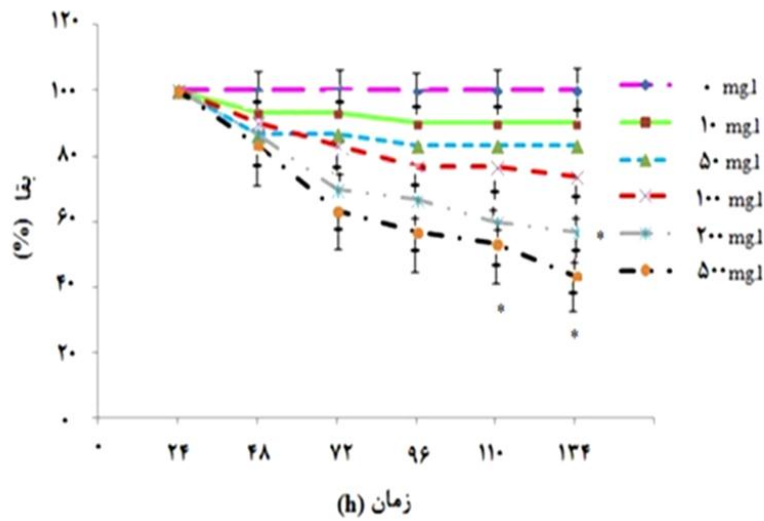
حضور برخی پیک‌های غیرمعمول در الگوی XRD نشانی از احتمال کریستالیزه شدن فازهای بیوارگانیک موجود در عصاره آبی جلبک سبز است (شکل ۳-ج).

نتایج سمیت نانوذرات فیکوسنتزی مگنتیت در مراحل رویانی و لاروی ماهی گورخری (D. *rerio*) در شکل‌های ۷-۴ نشان داده شده است. تجزیه و تحلیل داده‌ها در پژوهش حاضر نشان داد که درصد تفریح تخم ماهی گورخری و نیز نرخ بقای لارو با افزایش زمان مجاورت و نیز

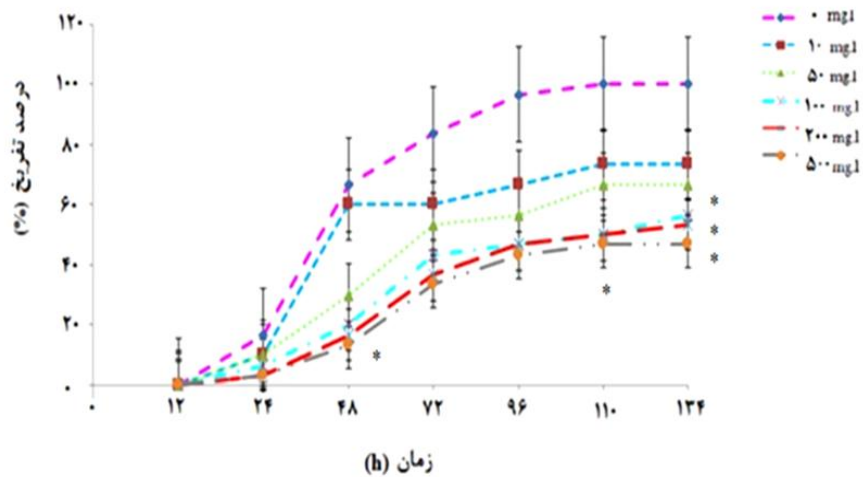
نحوی که پس از ۱۳۴ ساعت، غلظت نیمه کشنده یا ۵۰ درصد تلفات ( $LC_{50}$ ) از بیونانوذرات مگنتیت در لارو ماهی گورخری ۶۴۵/۴ میلی‌گرم در لیتر بود. حال آن که این غلظت در ارتباط با مرحله تکامل جنینی ماهی گورخری (۴۸ ساعت) برابر با ۶۳۸/۲ میلی‌گرم در لیتر ارزیابی شد. مقایسه نتایج نشان داد که هر دو مرحله رویانی و لاروی این ماهی نسبت به اثرات سمیت بیونانوذرات مگنتیت حساس بود و این حساسیت در مراحل جنینی اندکی بالاتر بود. همان طور که در نمودارها قابل مشاهده است، توان سمیت نانوذرات مگنتیت فیکوسنتزی بر ماهی گورخری با افزایش زمان مجاورت افزایش یافت. از طرفی نسبت تلفات نیز با غلظت نانوذره در هر دو مرحله رویان و لارو این ماهی نسبت به دوره زمانی رابطه مستقیم را نشان داد و علاوه بر آن افزایش مدت زمان مجاورت با نانوذرات مگنتیت فیکوسنتزی به ویژه در غلظت‌های بالا، ظهور انواع مختلفی از بدشکلی‌ها و ناهنجاری‌های ریخت‌شناسی را نیز در پی داشت (شکل ۷).

شدت بر نرخ تفریح تخم ماهی گورخری تاثیر گذار بود، به نحوی که بسیاری از تخم‌ها، پیش از اتمام مرحله تقسیمات سلولی و ورود جنین به مراحل گاسترولاسیون و ادامه روند تکاملی لاروی، متوقف شده بودند و تخم‌ها با مرگ و سفیدشدگی مواجه شدند (شکل ۶). حال آن که در گروه شاهد، نرخ مرگ و سفیدشدگی تخم‌ها بسیار ناچیز بود. بنا بر نتایج به دست آمده، نرخ تلفات تخم‌ها در ۴۸ ساعت نخست مواجهه با نانوذرات طی روندی وابسته به غلظت افزایش یافت و در بالاترین غلظت به مرگ و میر ۳۶ درصد نیز رسید (شکل ۴). به علاوه، در بسیاری از جنین‌های تفریح شده نیز به ویژه در غلظت‌های بالای تیمار با نانوذرات مگنتیت تاخیر در زمان تفریح در قیاس با گروه شاهد نیز مشاهده شد (شکل ۵).

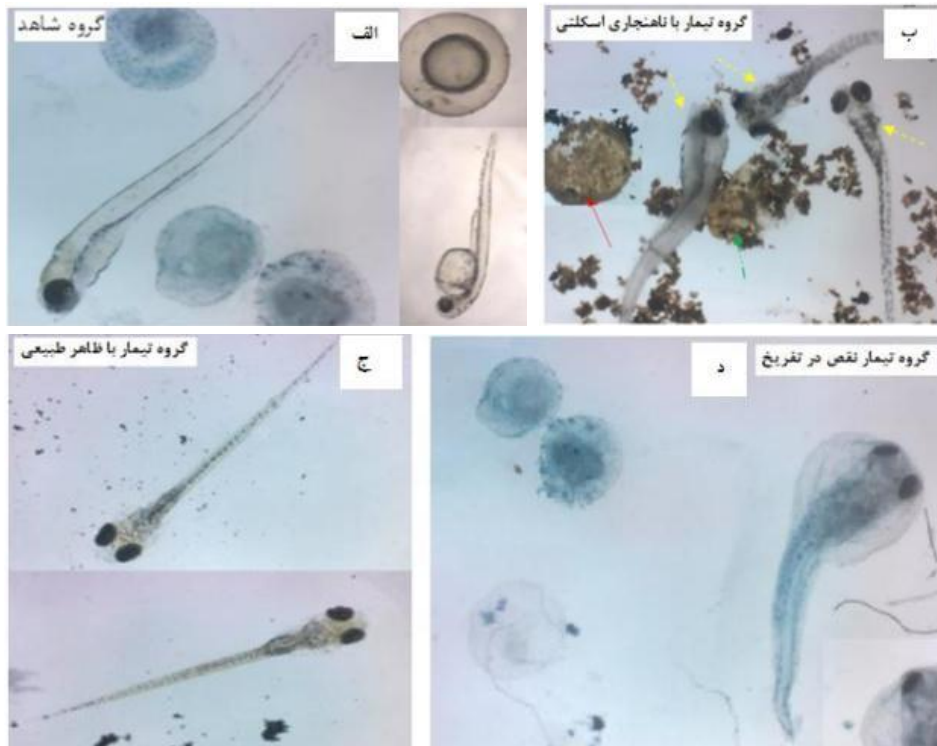
یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که اثرات سمیت نانوذرات مگنتیت فیکوسنتزی بر ماهی گورخری با افزایش غلظت نانوذرات و نیز با افزایش مدت زمان مجاورت روند افزایشی را به دنبال داشت و تفاوت‌ها میان گروه‌های تیمار با نانوذرات و شاهد معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ ). به



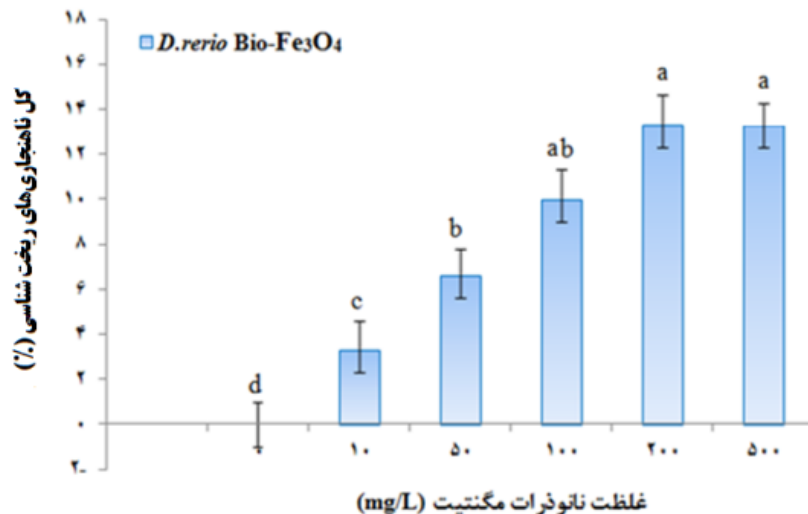
شکل ۴: تغییرات نرخ بقای ماهی گورخری (*Danio rerio*) تحت تاثیر افزایش غلظت نانوذرات فیکوسنتزی اکسید آهن مغناطیسی و مدت زمان مواجهه (میانگین  $\pm$  انحراف معیار). وجود علامت «\*» نشان دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های تیمار و نیز در مقایسه با شاهد است ( $P < 0.05$ ).



شکل ۵: تغییرات نرخ تفریخ تخم ماهی گورخری (*Danio rerio*) تحت تاثیر افزایش غلظت نانوذرات فیکوسنتزی اکسید آهن مغناطیسی و مدت زمان مواجهه (میانگین  $\pm$  انحراف معیار). وجود علامت «\*» نشان دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های تیمار و نیز در مقایسه با شاهد است ( $P < 0.05$ ).



شکل ۶: تغییرات روند تکامل رویانی و لاروی ماهی گورخری (*Danio rerio*) متاثر از نانوذرات مگنتیت. الف) نمایی از تخم‌های لقاح یافته، مرده (سفید شده) و تغییرات مراحل تکوینی جنین و لارو ماهی گورخری در گروه شاهد. ب) تصویری از بدشکلی و ناهنجاری‌های ریخت‌شناسی در ماهیان تحت مجاورت با نانوذرات مگنتیت (پیکان زرد خط چین)، تجمع و نشست نانوذرات در اطراف پوسته (پیکان سبز نقطه خط چین) و نیز در اطراف تخم مرده ماهی گورخری (پیکان قرمز نقطه چین) در گروه تیمار با ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات. ج) ماهیان در گروه تیمار با غلظت پایین نانوذره با ظاهر اسکلتی طبیعی. د) گروه تیمار با نانوذرات با نقص در تفریح رویان (بزرگنمایی ۷۰×).



شکل ۷: میانگین درصد کل ناهنجاری های ریخت شناسی در ماهیان گورخری در مواجهه حاد (Acute Exposure) با سطوح مختلف از غلظت نانوذرات مگنتیت فیکوسنتزی (میانگین  $\pm$  انحراف معیار). حروف متفاوت روی ستون ها نشان دهنده وجود تفاوت معنی دار است ( $P < 0.05$ ).

محاسبه میانگین درصد کل ناهنجاری های ریخت شناسی در ماهیان گورخری در مواجهه حاد با سطوح مختلف غلظت نانوذرات مگنتیت فیکوسنتزی (۵۰۰-۱۰ میلی گرم در لیتر) نشان داد که درصد این ناهنجاری ها در گروه های تیمار با نانوذرات طی روندی تابع افزایش غلظت، نرخ افزایشی را نشان داد و در غلظت های بالا (۲۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم در لیتر) به ۱۳/۳ درصد رسید و اختلاف بروز ناهنجاری ها بین گروه شاهد و تیمارهای دیگر معنی دار بود ( $P < 0.05$ ؛ شکل ۷).

بحث

در سال های اخیر به منظور برآورد احتمال سمیت و ناهنجاری زایی (Teratogenic Effects) نانومواد، در مطالعات نانوسم شناسی آبزیان در سطح گسترده ایی از جنین و مراحل نخست لاروی (Early Life Stage: ELS) ماهی گورخری استفاده و بهره برداری شده است و دستاوردهای این پژوهش ها در حوزه نانوذرات نشان داده است که ماهی گورخری مدل In vivo مناسبی از مهره داران است که به دلیل قرابت ژنتیکی و درجات بسیار بالایی از همولوژی با ژنوم انسان، می تواند پیش بینی اثرات

شدند. با این حال، باید توجه کرد که تاکنون در بحث ارزیابی پتانسیل سمیت نانوذرات اکسید آهن، دیدگاه‌ها و گزارش‌ها متفاوت بوده است. اما در یک چشم انداز کلی، نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی را می‌توان در سطح وسیع و برای کاربردهای متنوع تعریف کرد، زیرا بنابر پژوهش‌های بی‌شمار، این نانوذرات برای ارگانیسم‌های زنده غیرسمی یا دارای سمیت بسیار پایین قلمداد شده‌اند (Jeng and Swanson, 2006; Kim et al., 2006; Karlsson et al., 2009; Wang et al., 2009). با این حال، برخی پژوهشگران گزارش‌هایی را مبنی بر وجود اثرات و پتانسیل‌های سمیت نانوذرات اکسید آهن بر سیستم‌های سلولی و یا مدل‌های زیستی *in vivo* ارائه کرده‌اند (Hafeli and Pauer, 1999; Shubayev et al., 2009; Garcia et al., 2011; Noori et al., 2011). در این راستا، Caceres-Velez و همکاران (۲۰۱۶) نیز نشان دادند که مواجهه حاد ۹۶ ساعته ماهیان گورخری با نانوکامپوزیت اکسید آهن مغناطیسی *Exfoliated Vermiculite* (۶۰nm) در طیف غلظتی تا ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) منجر به بروز آسیب‌های DNA و اثرات ژنوتوکسیک (Genotoxicity) و موتاژنیک (Mutagenicity) شده است. نتایج مشابهی نیز

سمیت‌زایی نانومواد در صورت دسترسی به منابع مصرفی انسانی را نیز به خوبی پوشش دهد (Lin et al., 2013; Ghobadian et al., 2015).

نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که غلظت‌های نیمه کشنده (LC<sub>50</sub>) طی مواجهه حاد ۱۳۴ ساعته با نانوذرات مگنتیت فیکوسنتزی در جنین و لارو ماهی گورخری به ترتیب ۶۳۸/۲ و ۶۴۵/۴ میلی‌گرم در لیتر بود. دسته‌بندی ارائه شده توسط سازمان ملل متحد آمریکا (UN, 2009) بیان می‌دارد که چنانچه ماده‌ای در ماهیان واجد سمیت حاد با غلظت نیمه کشنده ۹۶h LC<sub>50</sub> بیشتر از ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر باشد، جز مواد غیرسمی تلقی می‌شود. از این رو، نظر به نتایج ارائه شده در مطالعه حاضر، نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی در گروه آلاینده‌های غیرسمی برای آبزیان جای می‌گیرند. با این وجود از منظر رویان‌شناسی، نانوذرات Bio-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> نشانه‌هایی مبنی بر وجود پتانسیل‌هایی از سمیت را بروز داده‌اند. زیرا بنابر نتایج ارائه شده، بروز انواعی از ناهنجاری‌های جنینی تحت القای اثرات سمیت نانوذرات به ویژه در مواجهه با غلظت‌های بالای نانوذرات مگنتیت منجر به عدم توان جنین‌ها در تکمیل مراحل جنین‌زایی شد و آن‌ها محکوم به مرگ

مبنی بر اثرات آسیب‌زایی DNA نانوذرات اکسید آهن  $Fe_2O_3$  توسط Qualhato و همکاران (۲۰۱۷) در ماهی گوپی *Poecilia reticulata* گزارش شده است که نشان می‌دهد با وجود این که نانوذرات  $Fe_3O_4$  منجر به بروز اثرات سمیت حاد در این ماهیان نشده‌اند، می‌توانند در سطح سلولی مولکولی (سیتوتوکسیک و اپی‌ژنتیک - Epigenetics) و نیز فیزیولوژی (تحریک و فعال‌سازی سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی برای مقابله با شرایط استرس) از پتانسیل خطر نسبتاً بالایی برای آبیان برخوردار باشند.

پژوهش حاضر بنابر گزارش‌های موجود، نخستین مطالعه در ارزیابی توان سمیت‌زایی رویانی نانوذرات مگنتیت به ویژه نوع فیکوسنتزی آن با منشا جلبک سبز دریایی در ماهی گورخری بوده است و مطالعات پیشین در ارتباط با نانوذرات اکسید آهن شیمیایی، عمدتاً در مدل‌های جانوری پستانداران (موش و رده سلولی) گزارش شده‌اند (Mohseni Kouchesfehani et al., 2013; Parsa et al., 2015). با این حال، این گزارش‌ها نیز همگی تایید کرده‌اند که جنین‌های جانوری در مراحل نخست تکامل جنینی از بالاترین نرخ حساسیت به مواد بالقوه سمی برخوردار هستند (Zhu et

al., 2012) و این امر در شناسایی ماهیت و پتانسیل تنش‌زایی برخی ترکیبات نوظهور مانند نانومواد (Valdiglesias et al., 2015) بسیار حائز اهمیت است. در این راستا، یافته‌های مطالعه حاضر نشان می‌دهد که توان سمیت نانوذرات مگنتیت فیکوسنتزی در هر دو مرحله تکامل جنین و لاروی ماهی گورخری تابعی از غلظت و زمان مجاورت با نانوذرات بود، ولی نرخ حساسیت به اثرات سمیت نانوذرات  $Bio-Fe_3O_4$  و تلفات در مرحله جنینی بیشتر از مرحله تکاملی لاروی بود و در مراحل لاروی اثرات سمیت‌زایی نانوذرات مگنتیت عمدتاً به صورت انوعی از بدشکلی‌ها و ناهنجاری‌های ریخت‌شناسی و نقص در تکمیل مراحل تکاملی جنینی و تفریح لاروی بروز کرد (شکل ۵). Noori و همکاران (۲۰۱۱) نیز طی رویکرد مشابهی نشان دادند که غلظت‌های بالای نانوذرات  $Fe_3O_4$  پوشش دهی شده با دی‌مرکاپتو سوسینیک اسید (Dimercaptosuccinic Acid: DMSA) (< ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) منجر به القای اختلالاتی در روند تکاملی جنینی مدل‌های موشی شده و به طور معنی‌داری نرخ بقای رویانی را کاهش داده است.

مبنی بر اثرات آسیب‌زایی DNA نانوذرات اکسید آهن  $Fe_2O_3$  توسط Qualhato و همکاران (۲۰۱۷) در ماهی گوپی *Poecilia reticulata* گزارش شده است که نشان می‌دهد با وجود این که نانوذرات  $Fe_3O_4$  منجر به بروز اثرات سمیت حاد در این ماهیان نشده‌اند، می‌توانند در سطح سلولی مولکولی (سیتوتوکسیک و اپی‌ژنتیک - Epigenetics) و نیز فیزیولوژی (تحریک و فعال‌سازی سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی برای مقابله با شرایط استرس) از پتانسیل خطر نسبتاً بالایی برای آبیان برخوردار باشند.

پژوهش حاضر بنابر گزارش‌های موجود، نخستین مطالعه در ارزیابی توان سمیت‌زایی رویانی نانوذرات مگنتیت به ویژه نوع فیکوسنتزی آن با منشا جلبک سبز دریایی در ماهی گورخری بوده است و مطالعات پیشین در ارتباط با نانوذرات اکسید آهن شیمیایی، عمدتاً در مدل‌های جانوری پستانداران (موش و رده سلولی) گزارش شده‌اند (Mohseni Kouchesfehani et al., 2013; Parsa et al., 2015). با این حال، این گزارش‌ها نیز همگی تایید کرده‌اند که جنین‌های جانوری در مراحل نخست تکامل جنینی از بالاترین نرخ حساسیت به مواد بالقوه سمی برخوردار هستند (Zhu et

اکسید آهن خود نشانی از در معرض قرارگیری مطلوب این جاندار با نانوذرات Bio-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> است. Zhu و همکاران (۲۰۱۲) نیز در بررسی اثرات سمیت نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی هماتیت Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> بر مراحل نخست تکاملی (ELS) ماهی گورخری، به وقوع انواعی از ناهنجاری‌های لاروی مانند کمائی شدن اسکلتی بدن ماهی (Body Arcuation)، زخم‌ها و آسیب بافتی (Tissue Ulceration) و خیز یا ادم پریکاردیال (Pericardial Edema) (تجمع غیرطبیعی مایع در فضای پریکارد) تحت تاثیر مواجهه حاد ۱۶۸ ساعته با نانوذرات هماتیت اشاره داشته‌اند. از جمله دلایل مطرح شده در تبیین علل و عوامل بروز خمش ستون فقرات و نوتوکورد در مراحل لاروی برخی جانداران تحت تاثیر نانوذرات مانند مشاهده چولگی اسکلتی لاروهای ماهی گورخری گروه تیمار در پژوهش حاضر، احتمال القای آسیب‌های نوروکسیک توسط نانوذرات وجود دارد. در این راستا، Wang و همکاران (۲۰۰۹) طی بررسی اثرات نوروکسیک نانوذرات اکسید آهن (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) در موش‌ها بیان کردند که ذرات اکسید آهن فریک در مقیاس نانو قادر به نفوذ و انتشار در سیستم عصبی مرکزی جاندار بوده، منجر به بروز اثرات استرس اکسیداتیو و تخریب سلول‌های عصبی

از جمله عوامل مهم در بحث سمیت نانوذرات، نرخ حلالیت و پایداری کلوییدی نانوذرات در محیط‌های آبی است، اما نظر به این که جنین و لارو ماهی گورخری کفزی (Demersal) است و می‌تواند در کف بستر قرار گیرد، این جاندار به طور بالقوه هدف و مدل مناسبی برای ارزیابی بوم‌شناسی، میزان رهایش نانوذرات با قدرت رسوب دهی بالا در محیط‌های آبی و بروز اثرات سمیت آن بر جوامع زیستی بنتیک نیز محسوب می‌شود (Zhu et al., 2012) و با توجه به این که در مطالعه حاضر، زیست‌آزمون‌های جنین و لارو ماهی گورخری نسبت به نانوذرات در پلیت‌های ۶ خانه و محیط آبی بدون تحرک درون چاهک‌ها انجام شد و نیز نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی به علت جرم مولی بالا (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: ۲۳۱/۵۳۲۶ گرم در مول) تمایل بسیار بالای به رسوب دهی دارند، با وجود این که در طول روند آزمون‌های سمیت سنجی تجمع و نشست نانوذرات فیکوسنتزی مگنتیت در کف پلیت‌ها تا حدی رخ داده بود از لحاظ دسترسی زیستی مناسب به نانوذرات اکسید آهن، به علت قابلیت کفزی بودن جنین و لاروها، این مسئله تاثیری بر نتایج ارائه شده نداشت و بروز تلفات و انواع ناهنجاری‌های لاروی تحت القای نانوذرات



منتهی می‌شود (Lapresta-Fernandez et al., 2012). از این رو با توجه به میانگین نسبتا کوچک اندازه نانوذرات فیکوسنتزی در پژوهش حاضر (۱۳/۸ نانومتر)، اثرات سمیت آن بر جنین و لارو ماهی گورخری تا حدودی می‌تواند متاثر از عملکرد کینتیکی بالقوه سمی ذرات مگنتیت در مقیاس نانو باشد. در همین راستا، Karthikeyeni و همکاران (۲۰۱۳) نیز ضمن ارائه گزارشی از زیست‌تولید نانوذرات اکسید آهن  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$  NPs با استفاده از عصاره سیب‌زمینی، اثرات سمیت آن را در ماهی آب شیرین *Oreochromis mossambicus* طی یک دوره تیمار ۹۶ ساعته (با غلظت‌های ۰/۵، ۵ و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) بررسی کردند و نشان دادند که این نانوذرات پتانسیل‌هایی از سمیت را بروز داده، تغییرات معنی‌داری را در شاخص‌های خون‌شناسی و بیوشیمیایی این ماهیان در قیاس با گروه شاهد القا کرده‌اند. با این حال، مقایسه نرخ مرگ و میر ۳۶/۶ درصدی جنین و ۴۳/۳ درصدی لارو ماهی گورخری طی مواجهه با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  در مطالعه حاضر با نتایج گزارش شده توسط Zhu و همکاران (۲۰۱۲) در ارتباط با سمیت نانوذرات شیمیایی هماتیت  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر بر ماهی گورخری

شده‌اند که این امر ناهنجارهای ریختی رویانی را در پی داشته است. بسیاری از پژوهشگران عملکرد سمیت نانوذرات را در شرایط *in vivo* تا حد زیادی وابسته به اندازه و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و کینتیک ذرات (Particle Kinetics) در مقیاس نانو (بارالکتریکی، ساختار کریستالی، حلالیت، شکل و ریخت‌شناسی و به ویژه کاهش مساحت سطحی ذرات و نسبت سطح به حجم ذره در حالت نانویی)، رفتار و به ویژه روش زیست‌تولید آن‌ها می‌دانند (Lapresta-Fernandez et al., 2012; Ates et al., 2013; Gatoo et al., 2014). در این میان اساسا نقش اندازه ذره در میزان نفوذ و انتشار آن به سیستم‌های زیستی بسیار تعیین کننده است (Lovric et al., 2005) و بنا بر گزارش‌ها پتانسیل تنش‌زایی نانوذرات با اندازه حدودا ۱۰ نانومتر به طور معمول نگران کننده است (Gatoo et al., 2014). از طرفی نفوذ نانوذرات به سلول می‌تواند القاگر واکنش‌های تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species: ROS) بوده، منجر به اختلال در فرآیندهای فیزیولوژیک - متابولیک و بروز اثرات تنش اکسیداتیو در ارگانسیم شود که نهایتا به آپوپتوزیس و مرگ سلول‌های جاندار

حدودی نامکشوف مانده ست. اما حضور مولکول‌های زیستی مختلف مانند آمینواسیدها، پروتئین‌ها، ویتامین‌ها و بسیاری دیگر از ترکیبات گیاهی که عمدتاً از نوع متابولیت‌های ثانویه هستند به عنوان عوامل زیست‌احیاگر یا پوششی در زیست‌تولید نانوذرات تایید شده است (Iravani, 2011; Saif et al., 2016) که می‌توانند تا حد زیادی قابلیت زیست‌سازگاری نانوذرات زیست‌تولید را در قیاس با همتای شیمیایی آن ارتقا بخشند. با این حال، بنابر داده‌های ارائه شده در مطالعه حاضر، نانوذرات مگنتیت فیکوبیوژن دارای اثرات بالقوه سمی بر مراحل رشد رویانی و لاروی ماهی گورخری قلمداد شدند و با توجه به حساسیت نسبتاً بالای این جاندار مدل آبی نسبت به غلظت نانوذرات آهن مگنتیت و پیش بینی اثرات مخرب زیست‌محیطی آبی آن در صورت رهایش به محیط، توصیه می‌شود که نرخ تولید، مصرف و رهایش این نانوذرات برای کاربری‌های صنعتی و محیط زیستی کاملاً کنترل شده باشد.

### تشکر و قدردانی

این پژوهش در آزمایشگاه آبزیان دانشکده دامپزشکی - دانشگاه شهید چمران اهواز انجام پذیرفت و بدین وسیله از مسئولین محترم

و القای مرگ و میری برابر با ۷۵ درصدی جنین‌ها و ۴۵ درصدی لاروها، نشان می‌دهد که نانوذرات اکسید آهن مگنتیت بیوسنتزی در مقایسه با نانوذرات شیمیایی آهن هماتیت، سمیت القایی کمتری را نشان داده‌اند که احتمال می‌رود این امر نیز متأثر از گروه‌های عاملی فیتوشیمیایی جلبکی (مانند پلی‌فنول‌ها و پلی‌ساکاریدهای سولفات) باشد که توانسته‌اند بر سطح نانوذره نشست کنند و تحریک‌پذیری آن‌ها را برای سلول‌های زنده تعدیل بخشند. نتایج مشابهی نیز در پژوهش‌های دیگر در رابطه با کاهش پتانسیل سمیت نانوذرات فلزی با منشا بیوسنتزی در زیست‌آزمون‌های مدل *in vivo* گزارش شده است مانند مطالعه Kiruba Daniel و همکاران (۲۰۱۱) مبنی بر غیرسمی بودن نانوذرات نقره بیوسنتز شده با استفاده از عصاره آبی گیاه *Ocimum tenuiflorum* در ماهی گورخری و نیز کاهش ۳/۲ برابری سمیت نانوذرات بیوسنتز شده سلنیوم (با استفاده از عصاره بیوفیلم لجنی) نسبت به سلنتیت و کاهش ۱۰ برابری سمیت آن نسبت به نانوذرات شیمیایی سلنیوم در جنین‌های ماهی گورخری (Mal et al., 2017). اگرچه هنوز مکانیسم فیتوشیمیایی حقیقی در فراسوی این زیست‌تولید جلبکی نانوذرات مغناطیسی تا

بیمارستان دامپزشکی و نیز سرکار خانم دانا  
اسحق هارونی تشکر و تقدیر می‌شود.

## منابع

- 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.
- 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.
- Awwad A.M. and Salem N.M. 2012.** A green and facile approach for synthesis of magnetite nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2(6): 208–213.
- Basson P.W. 1978.** Marine algae of the Arabian Gulf coast of Saudi Arabia (first half). *Botanica Marina*, 22: 47–64.
- Caceres-Velez P.R., Fascineli M.L., Grisolia C.K., De Oliveira Lima E.C., Sousa M.H., De Moraes P.C. and Bentes De Azevedo R. 2016.** Genotoxic and histopathological biomarkers for assessing the effects of magnetic exfoliated vermiculite and exfoliated vermiculite in *Danio rerio*. *Science of the Total Environment*, 551-552: 228–237.
- Chouly C., Pouliquen D., Lucet L., Jeune J.J. and Jallet P. 1996.** Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: Effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution. *Journal of Microencapsulation*, 13: 245–255.
- Das R.K., Brar S.K. and Verma M. 2016.** Checking the biocompatibility of plant-derived metallic nanoparticles: Molecular perspectives. *Trends in Biotechnology*, 34(6): 440–449.
- De Clerck O. and Coppejans E. 1996.** Marine algae of the Jubail marine wildlife sanctuary, Saudi Arabia. P: 199–289. In: Krupp F., Abuzinada A.H. and Nader I.A. (Eds.). *A Marine Wildlife Sanctuary for the Arabian Gulf: Environmental Research and Conservation Following the 1991 Gulf War Oil Spill*. NCWCD, Riyadh and Senckenberg Research Institute, Frankfurt.
- Dobson J. 2006.** Gene therapy progress and prospects: Magnetic nanoparticle-based gene delivery. *Gene Therapy*, 13: 283–287.
- Duan J., Yu Y., Shi H., Tian L., Guo C., Huang P., Zhou X., Peng S. and Sun Z. 2013.** Toxic effects of silica nanoparticles on zebrafish

- embryos and larvae. PLoS One, 8(9): 1–9 (e74606).
- El-Kassa H.Y., Aly-Eldeen M.A. and Gharib S.M. 2016.** Green synthesis of iron oxide ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) nanoparticles using two selected brown seaweeds: Characterization and application for lead bioremediation. Acta Oceanologica Sinica, 35(8): 89–98.
- Garcia A., Espinosa R., Delgado L., Casals E., Gonzalez E., Puentes V., Barata C., Font X. and Sánchez A. 2011.** Acute toxicity of cerium oxide, titanium oxide and iron oxide nanoparticles using standardized tests. Desalination, 269: 136–141.
- Gatoo M.A., Naseem S., Arfat M.Y., Dar A.M., Qasim K. and Zubair S. 2014.** Physicochemical properties of nanomaterials: Implication in associated toxic manifestations. BioMed Research International, 2014: 1–8 (498420).
- Ghobadian M., Nabiuni M., Parivar K., Fathi M. and Pazooki J. 2015.** Toxic effects of magnesium oxide nanoparticles on early developmental and larval stages of zebrafish (*Danio rerio*). Ecotoxicology and Environmental Safety, 122: 260–267.
- Hafeli U.O. and Pauer G.J. 1999.** In vitro and in vivo toxicity of magnetic microspheres. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 194: 76–82.
- Iravani S. 2011.** Green synthesis of metal nanoparticles using plants. Green Chemistry, 13: 2638–2650.
- Jeng H.A. and Swanson J. 2006.** Toxicity of metal oxide nanoparticles in mammalian cells. Journal of Environmental Science and Health A, 41: 2699–2711.
- Karlsson H.L., Gustafsson J., Cronholm P. and Moller L. 2009.** Size-dependent toxicity of metal oxide particles- A comparison between nano and micrometer size. Toxicology Letters, 188: 112–118.
- Karthikeyeni S., Vijayakumar S., Vasanth S., Ganesh A., Manimegalai M. and Subramanian P.T. 2013.** Biosynthesis of iron oxide nanoparticles and its haematological effects on fresh water fish *Oreochromis mossambicus*. Journal of Academia and Industrial Research, 1(10): 645–649.
- Kharissova O.V., Dias H.V.R., Kharisov B.I., Perez B.O. and Perez V.M.J. 2013.** The greener synthesis of nanoparticles. Trends in Biotechnology, 31 (4): 240–248.
- Kim J.S., Yoon T.J., Yu K.N., Kim B.G., Park S.J., Kim H.W., Lee K.H., Park S.B., Lee J.K. and Cho M.H. 2006.** Toxicity and tissue distribution of magnetic nanoparticles in mice. Toxicological Sciences, 89: 338–347.

- Kimmel C.B., Ballard W.W., Kimmel S.R., Ullmann B. and Schilling T.F. 1995.** Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203(3): 253–310.
- Kiruba Daniel S.C.G., Kumar R., Sathish V., Sivakumar M., Sunitha S. and Anitha Sironmani T. 2011.** Green synthesis (*Ocimum tenuiflorum*) of silver nanoparticles and toxicity studies in zebra fish (*Danio rerio*) model. *International Journal of NanoScience and Nanotechnology*, 2: 103–117.
- Lapresta-Fernandez A., Fernandez A. and Blasco J. 2012.** Nanoecotoxicity effects of engineered silver and gold nanoparticles in aquatic organisms. *Trends in Analytical Chemistry*, 32: 40–59.
- Laurent S., Dutz S., Hafeli U.O. and Mahmoudi M. 2011.** Magnetic fluid hyperthermia: Focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Advances in Colloid and Interface Science*, 166: 8–23.
- LewisOscar F., Vismaya S., Arunkumar M., Thajuddin N., Dhanasekaran D. and Nithya C. 2016.** Algal nanoparticles: Synthesis and biotechnological potentials. P: 157–182. In: Thajuddin N. and Dhanasekaran D. (Eds.). *Algae-organisms for Imminent Biotechnology*. InTech Publisher, Croatia.
- Lin S., Zhao Y., Nel A.E. and Lin S. 2013.** Zebrafish: An in vivo model for nano EHS studies. *Small*, 9(0): 1608–1618.
- Lovric J., Bazzi H.S., Cuie Y., Fortin G.R.A., Winnik F.M. and Maysinger D. 2005.** Differences in subcellular distribution and toxicity of green and red emitting CdTe quantum dots. *Journal of Molecular Medicine*, 83: 377–385.
- Mahdavi M., Namvar F., Ahmad M.B. and Mohamad R. 2013.** Green biosynthesis and characterization of magnetic iron oxide ( $Fe_3O_4$ ) nanoparticles using seaweed (*Sargassum muticum*) aqueous extract. *Molecules*, 18: 5954–5964.
- Mahmoudi M., Sant S., Wang B., Sophie Laurent S. and Sen T. 2011.** Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63: 24–46.
- Mal J., Veneman W.J., Nancharaiah Y.V., Hullebusch E.D.V., Peijnenburg W.J.G.M., Vijver M.G. and Lens P.N.L. 2017.** A comparison of fate and toxicity of selenite, biogenically, and chemically synthesized selenium nanoparticles to zebrafish (*Danio rerio*) embryogenesis. *Nanotoxicology*, 11(1): 87–97.

- Mohseni Kouchesfehiani H., Kiani S., Rostami A.A. and Fakheri R. 2013.** Cytotoxic effect of iron oxide nanoparticles on mouse embryonic stem cells by MTT assay. *Iranian Journal of Toxicology*, 7(21): 849–853.
- Nadagouda M.N. and Varma R.S. 2009.** Risk reduction via greener synthesis of noble metal nanostructures and nanocomposites. *Nato Science for Peace and Security*, 3: 209–217.
- Noori A., Parivar K., Modaresi M., Messripour M., Yousefi M.H. and Amiri G.R. 2011.** Effect of magnetic iron oxide nanoparticles on pregnancy and testicular development of mice. *African Journal of Biotechnology*, 10: 1221–1227.
- OECD. 1992.** OECD guidelines for the testing of chemicals. Test No. 210: Fish, early-life stage toxicity test. Organization for Economic Cooperation and Development, France. 24P.
- OECD. 1998.** OECD guidelines for the testing of chemicals. Test No. 212: Fish, short term toxicity test on embryo and sac-fry stages. Organization for Economic Cooperation and Development, France. 20P.
- Parsa H., Shamsasjan K., Movassaghpour A.A., Akbarzadeh P., Amoghli Tabrizi B., Dehdilani N., Lotfinegad P. and Soleimanloo F. 2015.** Effect of superparamagnetic iron oxide nanoparticles-labeling on mouse embryonic stem cells. *Cell Journal*, 17(2): 221–230.
- Qualhato G., Rocha T.L., De Oliveira Lima E.C., Silva D.M., Cardoso J.R., Grisolia C.K. and De Saboia-Morais S.M.T. 2017.** Genotoxic and mutagenic assessment of iron oxide (maghemite- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) nanoparticle in the guppy *Poecilia reticulata*. *Chemosphere*, 183: 305–314.
- Raghunath A. and E. Perumal 2018.** Analysis of lethality and malformations during zebrafish (*Danio rerio*) development. P: 337–363. In: Felix L. (Ed.). *Teratogenicity Testing. Methods in Molecular Biology*, Vol. 1797. Humana Press, USA.
- Saif S., Tahir A. and Chen Y. 2016.** Green synthesis of iron nanoparticles and their environmental applications and implications. *Nanomaterials*, 6: 1–26 (209).
- Shubayev V.I., Pisanic T.R. and Jin S. 2009.** Magnetic nanoparticles for theragnostics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61: 467–477.
- Staal Y.C.M., Meijer J., Van Der Kris R.J.C., De Bruijn A.C., Boersma A.Y., Gremmer E.R., Zwart E.P., Beekhof P.K., Slob W. and Van Der Ven L.T.M. 2018.** Head skeleton

- malformations in zebrafish (*Danio rerio*) to assess adverse effects of mixtures of compounds. Archives of Toxicology, 92(12): 3549–3564.
- Suganya T., Varman M., Masjuki H.H. and Renganathan S. 2016.** Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production: A biorefinery approach. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 55: 909–941.
- 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.
- UN (United Nation). 2009.** Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). United Nations, New York and Geneva. P: 215-220.
- Valdiglesias V., Kilic G., Costa C., Fernandez-Bertolez N., Pasaro E., Teixeira J.P. and Laffon B. 2015.** Effects of iron oxide nanoparticles: Cytotoxicity, genotoxicity, developmental toxicity, and neurotoxicity. Environmental and Molecular Mutagenesis, 56(2):125–148.
- Wang B., Feng W.Y., Zhu M.T., Wang Y., Wang M., Gu Y., Ouyang H., Wang H., Li M., Zhao Y., Chai Y. and Wang H. 2009.** Neurotoxicity of low-dose repeatedly intranasal instillation of nano- and submicron-sized ferric oxide particles in mice. Journal of Nanoparticle Research, 11: 41–53.
- Wehmas L.C., Anders C., Chess J., Punnoose A., Pereira C.B., Greenwood J.A. and Tanguay R.L. 2015.** Comparative metal oxide nanoparticle toxicity using embryonic zebrafish. Toxicology Reports, 2: 702–715.
- Xu P., Zeng G.M., Huang D.L., Feng C.L., Hu S., Zhao M.H., Lai C., Wei Z., Huang C., Xie G.X. and Liu Z.F. 2012.** Use of iron oxide nanomaterials in waste water treatment: A review. Science of the Total Environment, 424: 1–10.
- Yew Y.P., Shameli K., Miyake M., Kuwano N., Khairudin N.B.B.A., Mohamad S.E.B. and Lee K.X. 2016.** Green synthesis of magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) nanoparticles using seaweed (*Kappaphycus alvarezii*) extract. Nanoscale Research Letters, 11(1): 1–7 (276).
- Yuvakkumar R. and Hong S.I. 2014.** Green synthesis of spinel magnetite ironoxide nanoparticles. Advanced Materials Research, 1051: 39–42.
- Zhu X., Tian S. and Cai Z. 2012.** Toxicity assessment of iron oxide nanoparticles in zebrafish (*Danio rerio*) early life stages. PLoS ONE, 7(9): 1–6 (e46286).





## Research Paper

## Nanoecotoxicity of phyco-biogenic magnetic iron oxide nanoparticles in embryos and larval stages of zebrafish (*Danio rerio*)

Sakineh Mashjoor<sup>1</sup>, Ali Shahriari<sup>2\*</sup>, Morteza Yousefzadi<sup>3</sup>, Mojtaba Alishahi<sup>4</sup>

Received: April 2019

Accepted: June 2019

### Abstract

In order to predict the environmental effect of biosynthesized magnetic iron oxide nanoparticles (magnetite or bio-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) using marine green algae *Ulva flexuosa* in aquatic ecosystems, its toxicity was assessed on the early life stages and larvae of zebrafish, *Danio rerio* as an aquatic model. For this purpose, 10 fertilized eggs of zebrafish were exposed to serial concentrations of bio-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles (0, 10, 50, 100, 200 and 500 mg/L) in 6 well plates in 6 replicates. After 12, 48, 72, 96, 110 and 134h samples were assessed. Results showed that the percentage of hatching rate and the larval survival rate decreased with increasing exposure time and concentration of magnetite nanoparticles (P<0.05). After 48h of exposure, in the highest concentration (500mg/L), the hatching rate of fish decreased to 36.6% (48 h LC<sub>50</sub> = 638.2 mg/L) and after 134h of experimental periods, the survival rate of larvae reached to 43.3% (134 h LC<sub>50</sub> = 645.4mg/L). The mean of all skeletal malformations in zebrafish would be significant with an increase in a dose- and time-dependent pattern during the exposure to nanoparticles and in the highest dose (500mg/L) reached 13.3% (P<0.05). It seems that the toxicity of bio-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles affected by their particle size (13.8nm) and potentially toxic kinetic actions of particles at the nanoscale.

**Key words:** Toxicity, Zebrafish, Green Synthesis, Iron Oxide Nanoparticles.

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

2- Associate Professor in Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

3- Associate Professor in Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.

4- Professor in Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

\*Corresponding Author: a.shahriari@scu.ac.ir