شانزدهمین کنگره علوم خاک ایران

دانشگاه زنجان، ۵ تا ۷ شهریور ۱۳۹۸

محور مقاله: آلودگی زیست‌بوم، سلامت انسان و زیست‌پالایی

ارزیابی سمیت نانوذرات اکسید آهن بر نارنج در شرایط درون شیشه ای

محمد هادی غفاریان مقرب[۱*]، موسی موسوی[۲]، زهره جلالی[۳]، مسعود داوری[۵]، حجت قربانی واقعی[۵]

[۱] استادیار بخش تحقیقات خاک و آب، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان زنجان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

[۲] استادیار گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز

[۲] استادیار گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان

[۴] استادیار گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان

[۵] استادیار گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه گنبد کاووس

چکیده

بیشترین تحقیقات انجام شده تاکنون مربوط به اثرات سمیت‌شناسی نانوذرات بر شاخص‌های مورفولوژیکی گیاهان همچون جوانه‌زنی بذر و طول ریشه‌چه متمرکز بوده است. اما از آنجاکه تکثیر گیاهان به روش کشت بافت بصورت غیر جنسی بوده و در محیط کشت حاوی مواد غذایی با غلظت و ترکیب کنترل شده است، انتخاب روش مناسب برای ارزیابی خطر سمیت نانوذرات در کاربرد در محیط کشت بافت گیاهی ضروری به نظر می رسد. در این پژوهش با هدف شناسایی روشی مناسب برای ارزیابی سمیت نانوذرات اکسید آهن، از آزمون تست تنفس سلولی(MTT[۱]) در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه نارنج استفاده گردید. نتایج نشان داد که کاربرد تترازولیوم برای ارزیابی تنفس سلولی روشی دقیق و سریع در ارزیابی سمیت نانوذرات اکسید آهن(Fe_3O_4) در محیط کشت (MS[۲]) تا غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر بود و درصد توان زیستی یاخته های گیاه نارنج در محیط با غلظت نانوذرات ۱۰ برابر غلظت مورد نیاز آهن در محیط کشت نسبت به تیمار شاهد (با کلات آهن) از نظر آماری در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. به طور کلی این پژوهش نشان داد که کاربرد نانوذرات اکسید آهن در محیط کشت MS بر یاخته های گیاه نارنج اثر سمی نداشته و تست تنفس سلولی روشی مناسب برای ارزیابی خطر سمیت نانوذرات در کشت بافت گیاهی است.

کلمات کلیدی: تکثیر غیرجنسی، ارزیابی تنفس سلولی ، کشت بافت

مقدمه

ارزیابی سمیت نانوذرات در محیط بیولوژیک با تاکید بیشتر تعامل و تحول نانوذرات، انتقال در زنجیره غذایی، تعیین فاکتور انتقال و ارزیابی خطرپذیری صورت پذیرفته است. برای تعیین خطرات کاربرد نانوذرات ارزیابی سمیت نانوذرات، جذب و تجمع آنها در گیاهان و انتقال به نسل و یا زنجیره بالاتر غذایی ضروری می‌باشد (Nowack and Bucheli, 2007). تا همین اواخر دستور العمل اختصاصی برای ارزیابی سمیت نانوذرات بر گیاهان وجود نداشته ولی دستور العمل‌های سازمان حفاظت محیط زیست آمریکا U.S. EPA[۳] و OECD[۴] که برای ارزیابی اثرات سمی مواد شیمیایی بکار می‌رود جهت ارزیابی نانوذرات به کرات به‌کار رفته است. سمیت‌شناسی نانوذرات برای گیاهان با ارزیابی درصد جوانه‌زنی و طول ریشه‌چه برای بر روی گونه‌های مهم تک لپه و دولپه‌ای که از لحاظ اکولوژیکی و اقتصادی مورد ارزیابی قرار گرفته است. ارزیابی سمیت گیاهی در دو مرحله توسعه گیاه صورت می‌پذیرد. ۱. در خلال جوانه‌زنی که با سرعت جوانه‌زنی ارزیابی می‌شود. ۲. در زمان رشد جوانه که طول ریشه‌چه مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. این دستورالعمل در شرایط آزمایشگاهی، کیفی، در زمان محدود، مرحله خاص رشد گیاه و دامنه غیر واقعی غلظت نانوذرات صورت می‌پذیرد (Lin and Xing, 2007). در روش ارزیابی سمیت گیاهی نانوذرات بر اساس دستور العمل‌های سازمان حفاظت محیط زیست آمریکا، تفکیکی بین اثرات سمی ناشی از یون‌های آزاد شده از سطح نانوذرات و تاثیر نانوذرات صورت نپذیرفته است. لذا نتایج این تحقیقات متناقض، غیر قابل تعمیم و استاندارد سازی

* ایمیل نویسنده مسئول: hghafarm@yahoo.com

[1] MTT: 0/5% Tetrazolium test
[2] Murashig and Skoog
[3] United States Environmental Protection Agency
[4] Organization for Economic Co-operation and Development

است. به دلایل عدم مطابقت شرایط آزمایش با شرایط طبیعی، وابستگی نتایج به نوع گونه گیاهی، کیفی و مورفولوژیک بودن مطالعات سمیت نانوذرات، نامناسب بودن دامنه غلظت مورد آزمایش و کامل نبودن مراحل رشد گیاه لازم است در کاربرد این نتایج احتیاط لازم به عمل آید (Rico *et al.*, 2011). بنابراین باید به جای روش‌های آزمون سمیت کیفی از آزمون‌های کمی که در شرایط کشت قابل کاربرد باشد، استفاده نمود. بنابراین در این آزمایش برای بدست آوردن یک روش استاندارد برای ارزیابی سمیت نانوذرات در محیط کشت جامد از توانایی حفظ توان زیستی یاخته های گیاهی در محیط کشت گیاهی با تست تنفس سلولی استفاده گردید.

مواد و روش‌ها

در اجرای این روش، به ترتیب زیر عمل شده است: سلولهای حاصل از یاخته‌ای نارنج با غلظت (۱۰۰ µg/mL) به مدت ۵۶ ساعت در چاهک حاوی ۱۰۰ mL محیط کشت MS تیمار شده با غلظت های آهن مختلف (۵ mg/L، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰) حاصل از بکارگیری نانوذرات اکسید آهن و کلات آهن (Fe-EDDHA 6%) به منظور چسبیدن به کف پلیت کشت داده شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متیل تترازولیوم (۵ میلی‌گرم در میلی-لیتر PBS) به هر چاهک اضافه و یاخته‌ها به مدت ۴ ساعت در شرایط کشت انکوبه قرار داده شدند(Jalali *et al.*, 2010). پس از انکوباسیون یاخته‌ها، محلول رویی خارج و ۱۰۰ میکرولیتر حلال DMSO به یاخته‌ها اضافه گردید و پس از ۱۰ دقیقه میزان جذب فورمازانی توسط دستگاه میکروپلیت ریدر[5]، در طول موج ۵۴۰ nm-۵۷۰ اندازه‌گیری شد. درصد یاخته‌های زنده توسط فرمول زیر محاسبه گردید (Cai *et al.*, 2010).

۱۰۰×[جذب کنترل/جذب نمونه]= درصد توان زیستی یاخته‌های نارنج

این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی و با ۳ تکرار صورت گرفت. رسم نمودارها با کمک نرم‌افزار EXCEL و بررسی معنادار بودن داده‌ها با کمک آزمون T و در سطح $p\leq ۰/۰۵$ صورت گرفت.

نتایج و بحث

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بین میزان تاثیر سطوح مختلف غلظت نانوذرات بردرصد توان زیستی یاخته های سلولی گیاه نارنج در سطوح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری وجود داشت. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که با افزایش غلظت آهن ناشی از افزودن نانوذرات اکسید آهن در صد توان زیستی یاخته ها در مقایسه با تیمار شاهد کاهش یافت (جدول۱) که این نتایج با تست اثر سمیت بر جوانه زنی کیفی (سازمان محیط زیست آمریکا) نارنج توسط سعیدی و همکاران، ۱۳۹۳ دال بر عدم سمیت نانو ذرات در تا غلظتی معادل ۲۰ برابر غلظت موجود در محیط کشت بافت و تامین آهن مورد نیاز گیاه برای نارنج بدون کاهش در کلروفیل برگ و طول ریشه با کلات آهن مطابقت دارد و می توان منبع مناسبی برای کاربرد در محیط کشت بافت باشد.

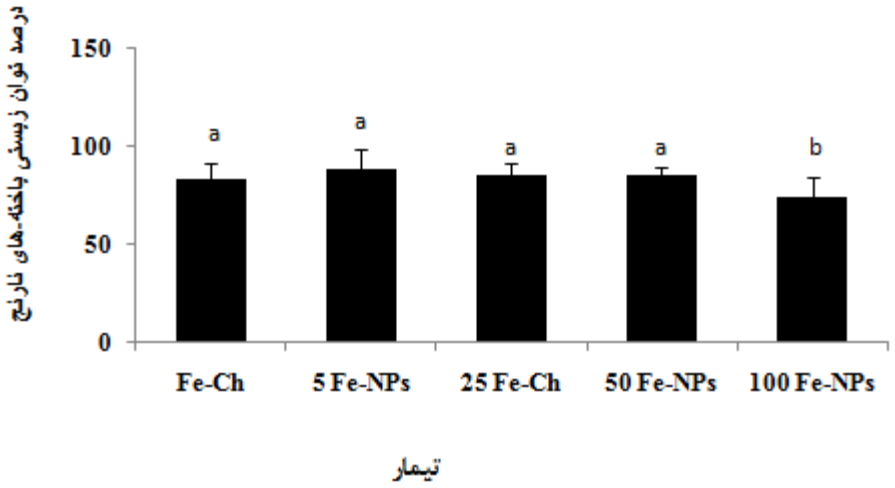
جدول ۱- نتایج تجزیه درصد توان زیستی یاخته های گیاهی در محیط کشت

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
تکرار	۲	۹۴ ns
درصد زنده مانی	۴	۸۳/۹ *
خطای آزمایشی	۸	۰/۳۳۵۲۹۷
ضریب تغییرات	۱۱/۱۵	۱۲/۰۵

ns و *: به ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطح پنج درصد.

[5] ELISA(Enzyme-Linked Immuno sorbent Assay) reader-µQunt, Biotek,Canada

سیستم‌های ساده کشت سلولی تحت تنش های زیستی و غیرزیستی بطور گسترده برای فهم مکانیسم‌های بیولوژیکی در گیاهان مورد استفاده قرار می گیرند و آزمون تست تنفس سلولی در سطح سلولی می تواند روش مناسبی برای ارزیابی سمیت نانوذرات در محیط کشت (MS) بافت گیاهی باشد. نتایج نشان داد با افزایش تا ۱۰ برابری غلظت مورد نیاز آهن در محیط کشت توسط نانوذرات اکسید آهن، تفاوت معنی‌داری بین میزان درصد توان زیستی یاخته های گیاهی با تیمار شاهد (با کلات آهن) از نظر آماری در سطح ۵ درصد وجود نداشت. بنابراین کاربرد تترازولیوم روشی دقیق و سریع در ارزیابی سمیت نانوذرات اکسید آهن(Fe_3O_4) در محیط کشت جامد تا غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر بود. غفاریان و همکاران (۲۰۱۳) نیز با بررسی اثر به کارگیری تست تنفس سلولی در ابعاد بافت گیاهی با ارتقائ روش تست جوانه زنی سازمان محیط زیست آمریکا از یک روش کیفی به یک روش کمی توانستند نتایج مشابهی از کاربرد این روش در کاربرد تست سمیت برای نانوذرات اکسید آهن(Fe_3O_4) در سطح بافت گیاهی گزارش نمودند.



شکل (۱) اثر سطوح مختلف نانوذرات اکسید آهن بر درصد توان زیستی یاخته های سلولی گیاه نارنج را نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری

نتایج این بررسی نشان داد تست تنفس سلولی (تترازولیوم) روشی مناسب برای ارزیابی سمیت نانوذرات در کشت بافت گیاهی است. به علت دقت، کاهش زمان و هزینه ارزیابی، کاهش خطر آلودگی نمونه‌ها و از همه مهمتر ارزیابی کمی سلولی در غیاث بافت های حاصل از جوانه زنی، کاربرد این روش را در ارزیابی اثر سمیت نانوذرات بر گیاه از مزیت ترجیهی برخوردار است. ارزیابی درصد جوانه‌زنی به روش تترازولیوم به زمانی معادل یک پنجم روش مورفولوژیکی زمان نیاز داشت. علاوه بر این دقت داده‌ها به علت کاهش خطای انسانی بالاتر از روش مورفولوژیکی بود(غفاریان مقرب و همکاران، ۲۰۱۳). لذا در این پژوهش، برای اولین بار از روش تست تنفس سلولی در ارزیابی ریسک کاربرد نانوذرات در تکثیر غیر جنسی گیاهان استفاده و کاربرد آن برای سایر محققینی که قصد کاربرد روش ارزیابی مورفولوژیکی را دارند، توصیه می‌گردد

منابع

M.-Q. Cai, Z.-H. Ling, and L.-R. Dai. Target-filtering model based articulatory movement prediction for articulatory control of HMM-based speech synthesis. In Signal Processing (ICSP), 2012 IEEE 11th International Conference on, volume 1, pages 605–608, Oct 2012.

Jalali Mahboobeh, Ghanati Faezeh, Modarres-Sanavi Ali Mohammad (2016) Effect of Fe3O4 nanoparticles and iron chelate on the antioxidant capacity and nutritional value of soil-cultivated maize (Zea mays) plants. Crop and Pasture Science **67**, 621-628.

Lin, D., and Xing, B. (2008). Root uptake and phytotoxicity of ZnO nanoparticles. Environmental science & technology 42, 5580-5585

Mohammad H. Ghafariyan, Mohammad J. Malakouti, Mohammad R. Dadpour, Pieter Stroeve, and Morteza Mahmoudi 2013. Effects of Magnetite Nanoparticles on Soybean Chlorophyll.Environmental Science & Technology 47 (18), 10645-10652 DOI: 10.1021/es402249b

Nowack, B., and Bucheli, T. D. (2007). Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. Environmental Pollution 150, 5-22.

Saeedi, S., M Mousavi, Mohammad H. Ghafariyan 2016. In-vitro analysis of the efficacy of Fe oxide nanoparticles in prevention of iron deficiency chlorosis in citrus rootstock (Citrus volkameriana). Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences 2016 4 (5), 484-492

Rico, C. M., Majumdar, S., Duarte-Gardea, M., Peralta-Videa, J. R., and Gardea-Torresdey, J. L. (2011). Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain. Journal of agricultural and food chemistry 59, 3485-3498.

Topic for submission: Ecosystem Pollution, Human Health and Bioremediation

Evaluation of toxicity risk of iron oxide nanoparticles application on sour orange under in vitro condition

Ghaffarian Mogharab[1*], M.H., Mousavi[2], M., Jalali[3], M., Ghorbani[4], H., Davari[5], M

[1*]Assistant Prof., Soil and water research Department, Agricultural Research,Education and Extension Organization (AREEO), Zanjan, Iran

[2]Assistant Prof., Horticulture Department, Faculty of Agriculture University of Ahvaz, Iran

[3]Assistant Prof., Soil Science Department, Faculty of Agriculture University of Lorestan, Iran

[4]Assistant Prof., Soil Science Department, Faculty of Agriculture University of Ghonbad, Iran

[5]Assistant Prof., Soil Science Department, Faculty of Agriculture University of Kurdistan, Iran

Abstract

The most studies were done until recently that focused on the toxicological properties of nanoparticles on the morphological parameters of plants such as seed germination and root length. In tissue culture not only vegetative propagation is unsexual method but also the concentration and composition in medium is controlled so selective the appropriate method is necessary to evaluation of nanoparticles toxicity. In this study, in order to identify a suitable method for evaluating the toxicity risk of iron oxide nanoparticles in the cell suspension culture of sour orange (*Citrus aurantium* L.), a cell-based respiration test (MTT Assay) was used. The results showed that the cellular respiration was a precise and rapid method for diagnosis the toxicity of iron oxide nanoparticles (Fe_3O_4) in culture medium (MS) to a concentration of 100 mg / L. There was no significant difference on percent bioavailability of sour orange plant cells in a medium with nanoparticle concentrations compared to the control (iron chelate) at 5% level. In general, the results showed that the application of iron oxide nanoparticles in Murashige and Skoog medium did not have accute toxic effects on the sour orange cell and the cellular respiration test was a suitable method for diagnnosis the toxicity of nanoparticles in plant tissue culture.

Keywords: unsexual propagation, cellular respiration evaluation, plant tissue culture

[*] Corresponding author, Email: hghafarm@yahoo.com