

## سمیت حاد سوپانسیون آبی نانوذرات نقره شیمیایی و بیوژنیک تولید شده توسط جلبک دریایی *Sargassum boveanum* بر مدل زیستی *Artemia fransiscana* (نئوپلیوس و بالغ)

### چکیده

آزمون سمیت سنجی آرتمیا یکی از این روش های متداول در پیش بینی اثرات منفی احتمالی رهايش نانومواد در مطالعات نانوبوم سم شناسی دریایی محسوب می شود. از این رو نظر به افزایش تولید و کاربری نانوذرات نقره در حوزه های مختلف صنعتی، در مطالعه حاضر اثرات سمیت و تفاوت میزان حساسیت مراحل تکاملی نئوپلیوس و بالغ *Artemia fransiscana* نسبت به جذب نانوذرات نقره شیمیایی و بیوسنتز شده توسط عصاره آبی جلبک دریایی قهوه ای *Sargassum boveanum* ارزیابی و مقایسه گردید. به این منظور مطابق بر رویکرد استاندارد، ۳۰ عدد نئوپلیوس و ۱۰ عدد بالغ آرتمیا، به ترتیب به هر چاهک از پلیت ۲۴ خانه برای آزمون سمیت نئوپلیوس ها و پلیت ۶ خانه برای آزمون سمیت بالغین در حضور گروه شاهد، در غلظت های متوالی افزایشی نانوذرات نقره شیمیایی و بیوژنیک (هر غلظت در ۳ تکرار) قرار داده شده و نرخ تلفات در هر گروه در زمان های ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت بعد از مجاورت ثبت و با نرم افزار Probit آنالیز گردید. نتایج بدست آمده نشان داد که سمیت هر دو نوع نانوذره نقره بر نئوپلیوس و بالغ آرتمیا با افزایش غلظت و نیز با افزایش مدت زمان مجاورت روند افزایشی داشته و تفاوت ها میان آنها معنی دار بوده است ( $P < 0.05$ ). بنحوی که پس از ۴۸ ساعت، غلظت ایجاد کننده ۵۰ درصد کشندگی ( $LC_{50}$ )، در ناپلی آرتمیا با نانوذرات نقره شیمیایی ۳۱/۸ میلی گرم در لیتر و برای نانوذرات نقره بیوسنتز شده توسط جلبک جلبک قهوه ای *S. boveanum* ۱۴۱/۱ میلی گرم در لیتر بود. حال آنکه این غلظت در ارتباط با بالغین آرتمیا طی مجاورت با نانوذرات نقره شیمیایی برابر با ۴۷ میلی گرم در لیتر و برای نانوذرات نقره بیوسنتزی ۱۳۲/۵ میلی گرم در لیتر ارزیابی شد. مقایسه نتایج سمیت نشان می دهد که در هر دو مرحله زندگی آرتمیا، نانوذرات نقره شیمیایی در قیاس با بیوسنتزی، از قدرت سمیت بالاتری برخوردار بوده، لکن نانوذرات نقره بیوسنتزی قریب ۵ برابر در مرحله نئوپلیوسی و ۳ برابر در مرحله بلوغ آرتمیا، پتانسیل سمیت کمتری را نسبت به نانوذرات نقره شیمیایی نشان داده اند. این تحقیق توسعه و جایگزینی رویکرد سبز در تولید نانوذرات به منظور پیشگیری از مخاطرات زیست محیطی آبی را توصیه می کند.

**واژگان کلیدی:** سمیت، *Artemia fransiscana*، جلبک دریایی قهوه ای، نانوذرات نقره.

### مقدمه

فناوری نانو با ارائه رویکردی جدید در توسعه علم و صنعت یکی از امیدبخش ترین فناوری های قرن حاضر لقب گرفته است و در دوره های اخیر طی یک تعامل با زیست فناوری منجر به ظهور فناوری جدیدی موسوم به نانو زیست فناوری شده است. در فناوری نانو، کنترل مواد در ابعاد ۱ تا ۱۰۰ نانومتر، منجر به ایجاد خواص فیزیکی، شیمیایی و زیستی غیرطبیعی می شود که این امر کاربردهای جدید و منحصربه فردی را برای

سکینه مشجور<sup>۱\*</sup>

زهره طولابی دزفولی<sup>۲</sup>

مجتبی علیشاهی<sup>۳</sup>

۱. گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون

دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندر عباس، ایران

۲، ۳. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی،

دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

\*مسئول مکاتبات:

sakynemashjoor@gmail.com

کد مقاله: ۱۳۹۵۰۴۰۴۴۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۶/۰۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۶/۲۲

**این مقاله برگرفته از سایر فعالیت های**

**پژوهشی است.**



نانو مواد امکان پذیر می سازد (Kreyling, 2010). علی رغم این توسعه وسیع، حضور نانو مواد در محیط زیست دریا اجتناب ناپذیر به نظر می رسد و بدیهی است که با ورود فاضلاب ها و پساب های حاصل از محصولات نانو فناوری شده به محیط زیست و زمین های کشاورزی، بوم سازگان های آبی و زیستگاه های آبزیان نیز در معرض نانو ذرات تولید شده قرار خواهند گرفت. از این رو اولین مسئله قابل طرح این خواهد بود که نانو مواد بر روی محیط زیست آبی، ماهیان و دیگر ارگانیسم های آبی چه اثراتی را بر جای خواهند گذاشت (Handy and Shaw, 2007). نانو ذرات نقره، امروزه در ترکیبات مختلفی همانند مواد ضد عفونی کننده در کشاورزی و دام پروری مورد استفاده قرار می گیرند و بیشترین کاربرد نانو ذرات نقره مبتنی بر خواص ضد میکروبی قوی آن ها در برابر پاتوژن هایی چون باکتری ها و ویروس ها است (Fidel et al., 2013). با این وجود، افزایش نشت آن ها به درون آب های جاری و زیرزمینی، نگرانی های مربوط به خطرات ناشی از نانو ذرات نقره بر موجودات آبی و ماهی ها را افزایش داده است (Shaluei et al., 2012). مطالعات اخیر نشان داده است که ذرات نانو از نظر زیستی فعال هستند و در مقایسه با ذرات دانه درشت تر از مواد شیمیایی مشابه، اثرات سمیت بیشتری را نشان می دهند. از نظر سم شناسی علاوه بر اندازه ذره، مساحت سطح نیز بسیار مهم تلقی می شود، زیرا با افزایش نسبت اتم ها در سطح، انرژی آزاد نانو ذرات بالا می رود که این خود باعث بروز تغییرات زیادی در خواص ماده می گردد (Gatoo et al., 2014). از این رو، مواجهه موجودات زنده با مواد سمی در محیط، تغییراتی را در ساختار بافتی و سلولی به همراه خواهد داشت، به طوری که آسیب بافتی که در برخی موارد منجر به مرگ و میر شده است در بسیاری از گونه های مختلف ماهیان گزارش شده است (Shukla et al., 2011; Fanta et al., 2003). تحقیقات اخیر نیز نشان داده است که تنش اکسیداتیو (افزایش سطوح رادیکال های آزاد که خود از عوامل اصلی مکانیسم هایی است که به مرگ برنامه ریزی شده سلولی منجر می شود) و آسیب به DNA از اثرات معمول نانو ذرات نقره، بر موجودات زنده می باشد (Farmen et al., 2012). بر این اساس، شناخت اثرات احتمالی این مواد بر موجودات آبی پیش از کاربری های گسترده دارای اهمیت زیادی خواهد بود.

تولید نانو ذرات نقره نیز به روش های فیزیکی، شیمیایی و زیستی امکان پذیر است (Amulyavichus et al., 1998; Prabhu and Poulouse, 2012; Gavhane et al., 2012). لکن نانو ذرات تولیدی در روش های شیمیایی و فیزیکی به دلیل استفاده از مواد شیمیایی سمی که نقش عوامل احیایی و تثبیت کننده را ایفا می کنند (Senapati et al., 2012)، نهایتاً آلودگی های محیط زیست را به دنبال دارند. از این رو نظر به به مشکلات و برخی معایب زیست محیطی احتمالی در امر تولید نانو ذرات نقره، توسعه روش های زیستی سازگار و سنتز زیستی نانو ذرات نقره با استفاده از میکروارگانیسم ها، قارچ ها، گیاهان و جلبک ها می تواند رویکرد جایگزین مناسبی محسوب شود (Jagtap and Bapat, 2012). در این بین، جلبک ها به ویژه ماکرو جلبک های دریایی، در میان دیگر نامزدهای زیستی، جایگاه ویژه ای را به خود اختصاص داده اند و بخش عمده ای از درآمد حاصل از بیوتکنولوژی دریایی به این موجودات اختصاص دارد؛ زیرا علاوه بر این که واجد منابع مهم فیتوشیمیایی از جمله کارتنوئیدها، اسیدهای چرب ضروری، پلی ساکاریدها، مواد معدنی و منافع اقتصادی چون: تولید آگار، کاراجینان (از جلبک های قرمز) و آلژینات (از جلبک های قهوه ای) هستند، از توان بالایی نیز برای احیای یون های فلزی چون نقره و تولید نانو ذرات پایدار، غیر سمی و ایمن برخوردارند (Rajeshkumar et al., 2013). نظر به اهمیت سمیت سنجی زیستی نانو ذرات نقره در زیست بوم دریا، یافتن غلظت های کشنده و نیز حداکثر غلظت مجاز این مواد، می توان از گونه های آبی مدل نظیر، آرتمیا که سخت پوست زئوپلانکتونی متعلق به شاخه بندپایان است، استفاده نمود. آرتمیا به عنوان یک ارگانیسم مدل و یک نشانگر زیستی، برای بررسی اثرات آلاینده های زیست محیطی و توسعه استانداردهای علم سم شناسی آبزیان بکار می رود (Sharma et al., 2009; Vanhaecke et al., 1981)؛ زیرا علاوه بر اینکه به عنوان غذای زنده و حامل مکمل های خوراکی، ویتامین ها و داروها همانند دافنی و کپه پوداها در تغذیه لاروی آبزیان نیز کاربردهای بسیار دارد (Gomez et al., 1998). در زنجیره غذایی دریایی نیز از نقش مهمی برخوردار است. چرخه زندگی این سخت پوست شامل مراحل تخم، لارو، نائوپلیوس، متانائوپلیوس و زوآ می باشد که مراحل لاروی آن از حساسیت های بالایی در مقابل ترکیباتی با اثرات سمیت برخوردار است (Clark and Bowen, 1978). از طرفی با توجه به اینکه آرتمیا ارگانیسمی تنظیم کننده هیپو-هایپر اسمزی است و توان تثبیت غلظت یون های

همولف خود را در طیف وسیعی از شوری از ۰/۲۶ درصد NaCl تا شوری‌های فوق اشباع را دارد، به نظر می‌رسد مدل مناسبی برای ارزیابی و پیش‌بینی آزمایشگاهی، سرنوشت نهایی نانو مواد در اکوسیستم‌های دریایی باشد (Ates et al., 2013). از این‌رو، در مطالعه حاضر، اثرات سمیت و تفاوت میزان حساسیت (نرخ بازماندگی) نسبت به نانو ذرات نقره شیمیایی و بیوستنز شده توسط جلبک دریایی قهوه‌ای *Sargassum boveanum* با بهره‌گیری از گونه مدلی چون آرتمیا *Artemia feranciscana* در مراحل تکوینی مختلف (مرحله لاروی نائوپلیوس و بالغ) ارزیابی و مقایسه گردید.

## مواد و روش‌ها

دو نوع نانوذره نقره به در این تحقیق مورد ارزیابی قرار گرفت: کلئید نانو ذرات نقره شیمیایی بانام تجاری نانوسید L2000 (شرکت نانونصب پارس) (شکل ۱- الف) و در مطالعه حاضر، نانو ذرات نقره بیوستنزی با استفاده از عصاره آبی جلبک دریایی (جلبک قهوه‌ای) *S. boveanum* مطابق بر روش ارائه‌شده توسط رحیمی و همکاران (۱۳۹۳)، تولید گردید (شکل ۱- ب) که روند ساخت آن به‌طور خلاصه عبارت است از: تهیه عصاره آبی (جوشاندن ۱۰ گرم پودر جلبک در ۲۰۰ سی‌سی آب دیونیزه)، فیلتر کردن عصاره توسط کاغذ صافی واتمن، احیا و بیوستنز نانو ذرات نقره، به‌واسطه افزودن ۱۰ سی‌سی از عصاره آبی جلبکی به ۹۰ سی‌سی محلول نیترات نقره ۱ میلی مولار و نگهداری این محلول به مدت ۲۴ ساعت در روشنائی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و نهایتاً سانتریفیوژ، شستشو و تغلیظ نانو ذرات نقره.

غلظت کلئید نانو ذرات نقره شیمیایی بانام تجاری نانوسید L2000 بنا بر گزارش شرکت سازنده، برابر ۴۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر و اندازه ذرات نقره در این محصول ۷±۱ نانومتر است. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی که Asghari و همکاران (۲۰۱۲) برای این محصول کلئیدی گزارش کرده‌اند عبارت است از: میانگین پتانسیل زتای ۷/۸۶ ± ۵۳/۳۳ میلی‌ولت، اسیدیته ۲/۴ و میانگین هندسی قطر برابر با ۱۲/۶۵ ± ۱/۴۶ نانومتر بوده و بنابر نتایج دستگاه ICP-AES، غلظت واقعی نقره در کلئید نانو ذرات نقره مذکور معادل ۳۹۸۰ میلی‌گرم در لیتر اندازه‌گیری شده است.

در ارتباط با نانو ذرات نقره بیوستنزی تهیه‌شده از عصاره آبی جلبک دریایی *S. boveanum*، نتایج حاصله از تصاویر میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) مدل LEO 906E، از نانو ذرات نقره بیوستنزی تولیدشده توسط *S. boveanum* نشان داد که شکل نانو ذرات تولیدشده کروی شکل است (شکل ۱). دستگاه آنالیز اندازه ذره نیز متوسط اندازه نانو ذرات تولیدشده را در حدود ۷/۵۷ نانومتر برآورد نمود. بعلاوه نتایج آنالیز اشعه ایکس منتشرکننده انرژی و طیف FT-IR با استفاده از طیف‌سنج تبدیل فوریه مادون‌قرمز (FT-IR) مدل Nicolet IR100 نیز نشان داد که تنها فلز اصلی سنتز شده توسط عصاره جلبک قهوه‌ای، نانو کریستال‌های نقره به همراه گروه‌های عاملی از *S. boveanum* می‌باشد (نتایج تأییدی بیوستنز در دست انتشار است).

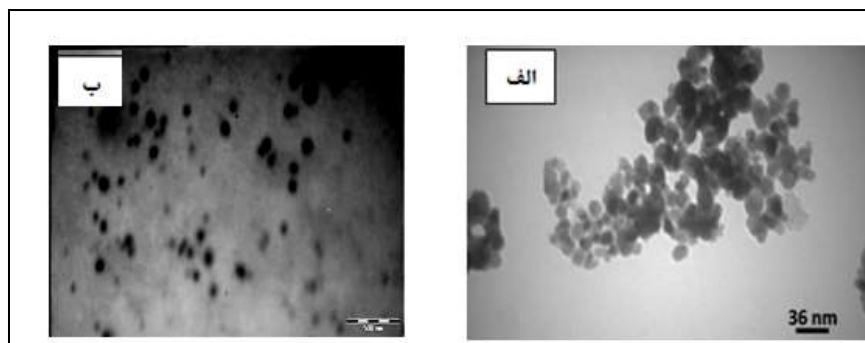
در این روش برای سنجش اثرات سمیت از سیستم‌های گونه‌ای سخت‌پوست به نام *A. feranciscana* (تولیدشده در شرکت INVE LTD (Thailand) با درصد تفریخ ۹۰ درصد) استفاده شد. منبع آب مورد استفاده آب‌شور مصنوعی (آب محتوی ۳۰ گرم نمک دریا) بود. تفریخ (تخم‌گذاری) سیستم‌های آرتمیا، بر اساس روش Sorgeloos و همکاران در سال ۲۰۰۱، در pH ۷/۸، دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد و نور ۲۰۰۰ لوکس صورت پذیرفت. ۲۴ ساعت بعد از اضافه نمودن سیستم آرتمیا، نائوپلیوس‌های تازه از سیستم خارج‌شده، با توجه به نورگرایی، به یک بشر در مکانی تاریک منتقل‌شده و ناپلی‌های سالم و متحرک بر مبنای نورگرایی مثبت و تجمع در سطح بشر با استفاده از یک پیپت پاستور جمع‌آوری گردیدند (Sorgeloos et al., 2001).

به‌منظور بالغ سازی آرتمیاهای تازه تفریخ شده از روز دوم، لاروها با ریز جلبک دریایی *Nannochloropsis oculata* و مخمر نان *Saccharomyces cerevisiae* تغذیه شدند. آرتمیاهای حدوداً بعد از یک ماه بالغ شدند. در ادامه باهدف سمیت سنجی، رقت‌های متوالی از نانو

ذرات نقره شیمیایی و بیوستنتزی (هر غلظت در ۳ تکرار) در چاهک‌های پلیت‌های کشت سلول ۲۴ خانه برای آزمون سمیت نائوپلیوس‌ها و پلیت ۶ خانه برای آزمون سمیت بالغین در حضور کنترل (گروه فاقد نانو نقره به‌عنوان گروه شاهد)، ایجاد گردید. چاهک‌ها محتوی آب با شوری ۳۰ قسمت در هزار بوده و به هر چاهک از پلیت ۲۴ خانه، ۳۰ نائوپلیوس آرتیمیا و به هر چاهک از پلیت ۶ خانه ۱۰ آرتیمیا بالغ اضافه شد و با توجه به رهنمود استاندارد شماره ۲۰۳ "سازمان توسعه و همکاری اقتصادی" (OECD, 1992)، در ارتباط با آبیان، تعداد تلفات در ساعات ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ بعد از مجاورت با نانو ذرات نقره شیمیایی و بیوستنتزی ثبت گردیده و برای تعیین درصد مرگ‌ومیر در غلظت‌های متفاوت و محاسبه LC<sub>50</sub> از نسخه ۱/۵ نرم‌افزار EPA Probit Analysis (منتشر شده توسط سازمان حفاظت محیط‌زیست امریکا) استفاده شد.

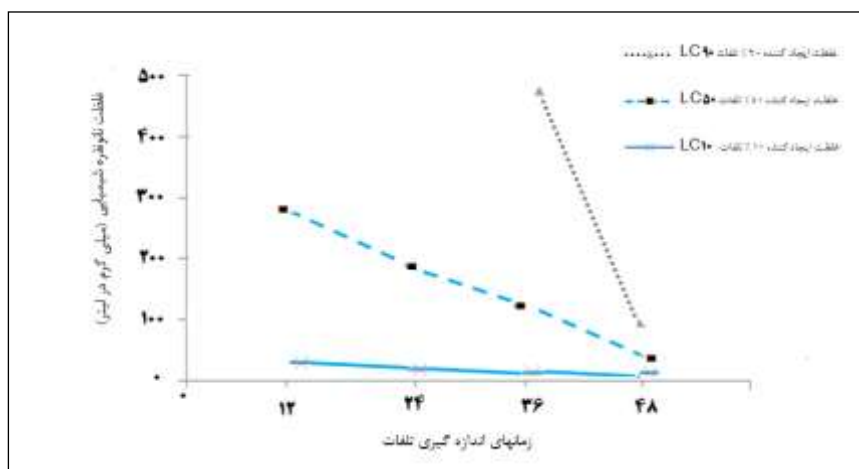
## نتایج

در مطالعه حاضر، نتایج سمیت نانو ذرات نقره شیمیایی و بیوستنتزی در نائوپلیوس و بالغ *A. feranciscana* در اشکال ۶-۲ نشان داده شده است. آنالیز داده‌ها در تحقیق حاضر نشان می‌دهد که اثرات سمیت هر دو نوع نانوذره نقره بر لارو آرتیمیا با افزایش غلظت و نیز با افزایش مدت‌زمان مجاورت روند افزایشی را به دنبال داشته است و تفاوت‌ها میان آن‌ها معنی‌دار بوده است ( $P < 0.05$ ). به‌نحوی که پس از ۴۸ ساعت، غلظت ایجادکننده ۵۰ درصد کشندگی (LC<sub>50</sub>)، در ناپلی آرتیمیا با نانو ذرات نقره شیمیایی L-2000 ۳۱/۸ میلی گرم در لیتر و برای نانو ذرات نقره بیوستنتز شده توسط جلبک قهوه‌ای *S. boveanum* ۱۴۱/۱ mg/l ارزیابی شده است. حال آنکه این غلظت در ارتباط با بالغین آرتیمیا طی مجاورت با نانو ذرات نقره شیمیایی برابر با ۴۷ میلی گرم در لیتر و برای نانو ذرات نقره بیوستنتز شده توسط جلبک قهوه‌ای ۱۳۲/۵۴ میلی گرم در لیتر ارزیابی شد (شکل ۷-۳). مقایسه نتایج سمیت این دو نوع نانوذره، نشان می‌دهد که هر دو مرحله تکاملی نائوپلیوس و بالغ *A. feranciscana* نسبت به اثرات سمیت نانو ذرات نقره حساس بوده و در هر دو، نانو ذرات نقره شیمیایی در قیاس با بیوستنتزی، از قدرت سمیت بالاتری برخوردارند. حساسیت نائوپلیوس‌های آرتیمیا نسبت به نانو ذرات نقره شیمیایی بیشتر از مرحله بلوغ بوده، لکن نسبت به نوع بیوستنتز شده توسط جلبک اندکی کمتر از مرحله بلوغ بوده است (شکل ۶). به‌علاوه همان‌طور که ذکر شد، توان سمیت نانو ذرات نقره بر آرتیمیا با افزایش زمان مجاورت افزایش یافته است، به‌طوری که غلظت کشنده میانی نانو ذرات نقره (LC<sub>50</sub>) ۱۲ و ۴۸ ساعت بعد از مجاورت نائوپلیوس‌های آرتیمیا برای نانو ذرات نقره شیمیایی به ترتیب ۳۱۵/۲ و ۳۱/۸ و برای نانو ذرات نقره بیوستنتزی ۲۷۷/۶ و ۱۴۱/۱ میلی گرم در لیتر بوده (شکل ۲ و ۴) و برای آرتیمیا‌های بالغ این غلظت در مواجهه با نانو ذرات نقره شیمیایی به ترتیب ۵۱/۱ و ۴۷ و برای نانو ذرات نقره بیوستنتزی برابر ۴۵۵/۱۹ و ۱۳۲/۵۴ میلی گرم در لیتر ارزیابی شده است (شکل ۳ و ۵). از طرفی نسبت تلفات نیز با غلظت نانوذره نقره در هر دو مرحله تکاملی نائوپلیوس و بالغ *A. feranciscana* نسبت به دوره زمانی رابطه مستقیم را نشان داد. به‌طوری که در ارتباط با نانو ذرات نقره شیمیایی، طی مدت‌زمان ۴۸ ساعت بعد از مجاورت، غلظت‌های ۹/۵۴، ۳۱/۸۱ و ۱۰۶/۱۳ میلی گرم در لیتر، به ترتیب ایجاد ۱۰، ۵۰ و ۹۰ درصد تلفات در لاروهای نائوپلیوس آرتیمیا نموده و این میزان طی مجاورت نائوپلیوس‌های آرتیمیا با نانو ذرات نقره بیوستنتزی در غلظت‌های ۴۲/۴۴، ۱۴۱/۱، ۴۶۹/۷ میلی گرم در لیتر ایجاد شد. لیکن در این بازه زمانی، غلظت‌های ایجادکننده ۱۰، ۵۰ و ۹۰ درصد تلفات در مرحله بلوغ آرتیمیا، نسبت به نانو ذرات نقره شیمیایی به ترتیب ۳۹، ۴۷ و ۵۵ میلی گرم در لیتر و نسبت به نانو ذرات نقره بیوستنتزی ۲۳/۰۵، ۱۳۲/۵۴ و ۷۶۱/۸۹ میلی گرم در لیتر بود.



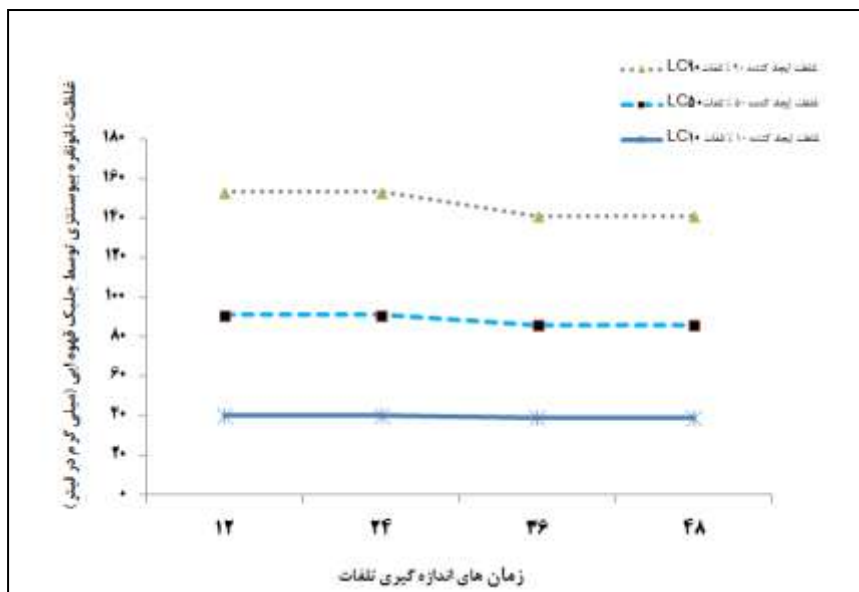
شکل ۱: الف) تصویر TEM نانو ذرات نقره شیمیایی. ب) تصویر TEM نانو ذرات نقره توسط عصاره آبی جلبک

*Sargassum boveanum*

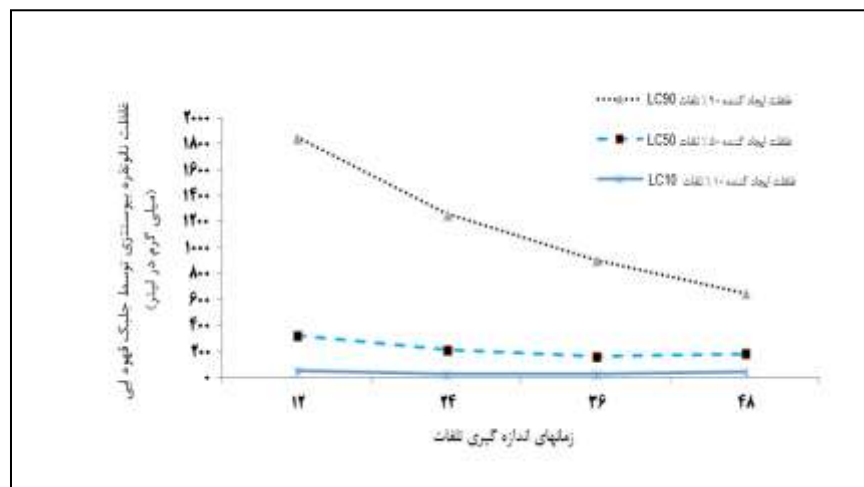


شکل ۲: روند ایجاد تلفات با افزایش غلظت نانو ذرات نقره شیمیایی و افزایش زمان مجاورت ناپلی آرتمیا

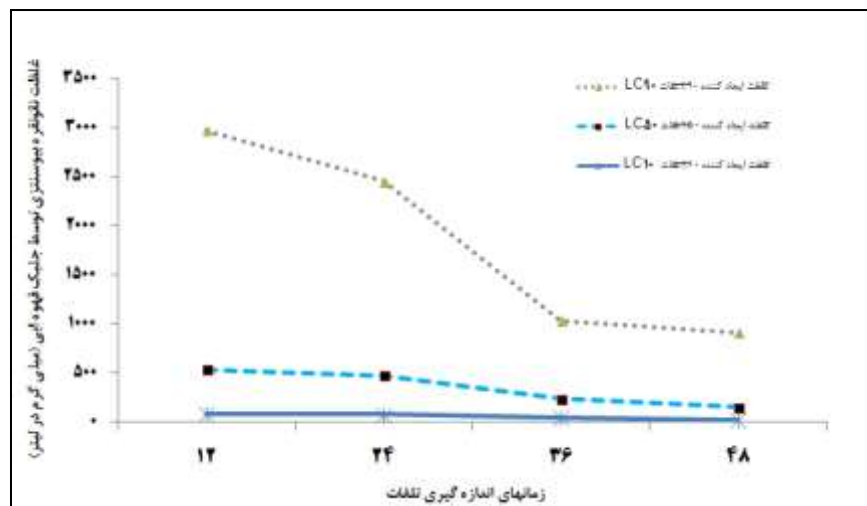
*(Artemia feranciscana)*



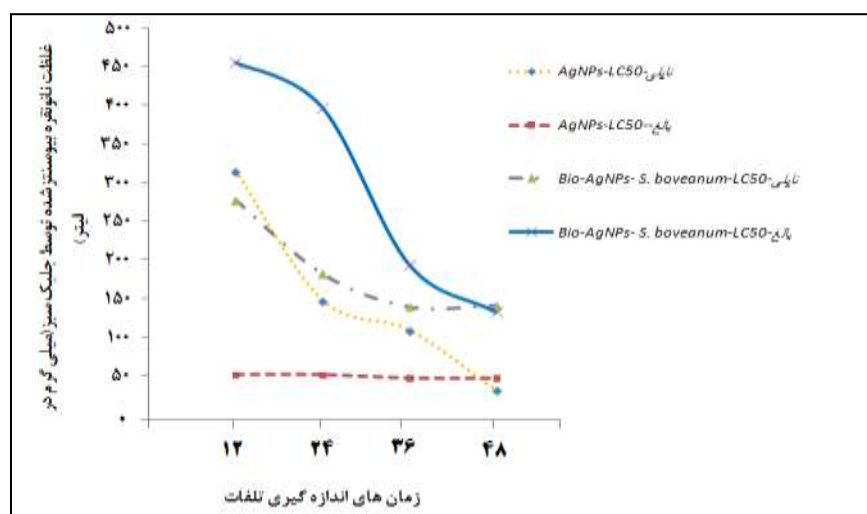
شکل ۳: روند ایجاد تلفات با افزایش غلظت نانو ذرات نقره شیمیایی و افزایش زمان مجاورت آرتیمیا بالغ (*Artemia feranciscana*).



شکل ۴: روند ایجاد تلفات با افزایش غلظت نانو ذرات نقره بیوستترز شده توسط عصاره آبی جلبک *Sargassum boveanum* و افزایش زمان مجاورت ناپلی آرتیمیا (*Artemia feranciscana*).



شکل ۵: روند ایجاد تلفات با افزایش غلظت نانو ذرات نقره بیوسنتز شده توسط عصاره آبی جلبک *Sargassum boveanum* و افزایش زمان مجاورت آرتمیای بالغ (*Artemia feranciscana*).



شکل ۶: مقایسه غلظت ایجادکننده نیمی از تلفات ( $LC_{50}$ ) در ناپلی و بالغ آرتمیا (*Artemia feranciscana*)، طی افزایش زمان مجاورت با نانو ذرات نقره شیمیایی (AgNPs) و بیوسنتز شده توسط جلبک *Sargassum boveanum* (Bio-AgNPs- *Sargassum boveanum*).

### بحث و نتیجه‌گیری

زیست آزمون سمیت سنجی (Toxicity bioassay) روشی است که عکس‌العمل‌های موجودات آبی را به‌واسطه در معرض قرارگیری با دوزهای مختلف ماده آلاینده ارزیابی نموده و به‌منظور آشکارسازی، اندازه‌گیری یا تأثیر یک یا چند ماده سمی یا عوامل محیطی به‌تنهایی یا توأم با یکدیگر مورد استفاده قرار می‌گیرد (Martins et al., 2007). یکی از این روش‌های متداول آزمون سمیت سنجی آرتمیا است که مبتنی بر مقاومت بالا و حساسیت کمتر مراحل نخست زندگی آرتمیا در مطالعات سم‌شناسی در قیاس با دیگر موجودات در شرایط مشابه نظیر ارگانیسم

مدل استاندارد *Daphnia magna* (Nunes et al., 2006) و یا میگوهای *Streptocephalus rubricaudatus* و *S. texanus* (Crisinel et al., 1994) و جنین توتیا *Echinometra lucunter* است (Nascimento et al., 2000). در مطالعه حاضر نظر به این ویژگی مهم آرتمیا به عنوان یک مدل زیستی در علم نانو بوم‌شناسی، اثرات سمیت و تفاوت میزان حساسیت *A. feranciscana* در مراحل نائوپلیوس و بالغ، نسبت به جذب نانو ذرات نقره شیمیایی و بیوژنیک تهیه شده از عصاره جلبک قهوه‌ای *S. boveanum*، ارزیابی و مقایسه گردید که نتایج به دست آمده نشان داد که هر دو مرحله تکاملی نائوپلیوس و بالغ *A. feranciscana* نسبت به اثرات سمیت نانو ذرات نقره واجد حساسیت بوده و اثرات سمیت آن با افزایش مدت زمان مجاورت روند افزایشی را به دنبال داشته است، بطوریکه میزان LC<sub>50</sub> در طول بازه زمانی ۴۸ ساعته کاهش یافته است. بالین حال، در هر دو مرحله زندگی آرتمیا، نانو ذرات نقره شیمیایی در قیاس با بیوستتزی، از قدرت سمیت بالاتری برخوردار بوده‌اند.

در رابطه با ارزیابی سمیت نانو ذرات نقره بیوستتز شده از جلبک‌های دریایی، عمده تحقیقات اخیر، متمرکز بر ارزیابی اثرات ضد میکروبی آن‌ها بوده است. می توان به بررسی خواص ضد باکتریایی نانو ذرات نقره بیوستتز شده توسط جلبک سارگاسوم *S. wightii* در برابر پاتوژن‌هایی چون *Staphylococcus aureus*، *Klebsiella pneumoniae* و *Salmonella Typhi* (Shanmugam et al., 2014) و نیز دیگر گزارش‌های مبتنی بر بیوستتز Ag-NPs توسط ماکرو جلبک‌های قهوه‌ای، نظیر کار تحقیقاتی Azizi و همکاران (۲۰۱۳) توسط جلبک *S. muticum* و Kumar و همکاران (۲۰۱۲)، توسط *Gracilaria corticata* اشاره نمود. از این رو تعداد مطالعات نانو بوم‌شناسی صورت گرفته بر نانو ذرات نقره بیوستتز شده از جلبک‌های دریایی، بسیار اندک بوده و از این دست می‌توان تحقیق حاضر را در این امر تا حدی پیشگام دانست.

Sam و همکاران در سال ۲۰۱۵ بیوستتز نانو ذرات نقره را با استفاده از ۱۱ گونه ماکرو جلبک سبز، قرمز و قهوه‌ای از جمله جلبک‌های قهوه‌ای *Acanthophora najardiiformis*، *S. wightii*، *Padina boergesenii*، *Ulva lactuca* را واجد اثرات ضد ریزوفولینگ (که شامل جلبک‌ها و باکتری‌های تک‌سلولی می‌باشد)، دانسته است و نرخ مرگومیر *A. salina* را در غلظت ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر از Ag-NPs بیوژنیک، تنها ۱۵ درصد گزارش نموده‌اند. Kumar و همکاران نیز در سال ۲۰۱۲، نرخ LD<sub>50</sub> ۲۴ ساعته در ناپلی *A. salina* تحت تأثیر نانو ذرات نقره بیوستتز شده از جلبک دریایی *S. ilicifolium* را ۱۰ نانو مولار بر میلی‌لیتر عنوان نمودند و در تأیید این تحقیق Arulvasu و همکاران (۲۰۱۴) نیز بیان داشتند که غلظت‌های نانو مولار نانو ذرات نقره برای سیستم و نائوپلیوس آرتمیا سمی بوده و با افزایش غلظت تا ۱۰ نانو مولار بر میلی‌لیتر کاهش نرخ تخمه‌گشایی، افزایش نرخ مرگومیر نائوپلیوس‌ها، تجمع روده‌ای و نهایتاً بروز اثرات کارسینوژنیک و آسیب DNA را می‌تواند در پی داشته است؛ که مؤید داده‌های تحقیق حاضر است. در مطالعه حاضر از حیث اندازه ذره هر دو نوع بیوژنیک و شیمیایی نانو ذرات نقره در محدوده ۷ نانومتر و کروی شکل بودند و بسیاری از محققین عملکرد سمیت نانو ذرات را در شرایط *in vivo* و در ارگانیسم‌های مدل وابسته به اندازه و خصوصیات فیزیکوشیمیایی (بار الکتریکی، ساختار کریستالی، حلالیت، مساحت سطحی ماده، شکل و ریخت‌شناسی) و رفتاری آن‌ها می‌دانند (Lapresta-Fernández et al., 2012; Gatoo et al., 2014)؛ زیرا اساساً اندازه ذره در میزان نفوذ و انتشار آن به سیستم‌های زیستی بسیار تعیین‌کننده است (Gatoo et al., 2005; Lovrić et al., 2014)؛ و مخاطرات آتی نانو ذراتی با اندازه کوچک‌تر از ۱۰ نانومتر نگران‌کننده است (Gatoo et al., 2014). زیرا به درون سلول واردسازی NPs از خلال غشای سلولی، توسط فرآیند انتشار ساده و یا به واسطه پورین‌ها و یا پروتئین‌های دیواره سلولی صورت می‌پذیرد و ناپایداری غشا خارجی نیز ممکن است توسط برخی از انواع برهمکنش‌ها به واسطه پروتئین‌هایی که واجد گروه‌های تیول اند و یا طی یک برهمکنش الکترواستاتیک با شکل هندسی NPs ایجاد گردد (Lapresta-Fernández et al., 2012) که هر دو پدیده یک تداخلی را در گرادیان الکتروشیمیایی غشا ایجاد می‌کنند که جریان الکترونی تولیدشده را در زنجیره‌های تنفسی بر هم زده و باعث تولید نوعی اکسیژن واکنشی (ROS) طی فرآیندهای مختلف می‌گردد. ROS بر روی پراکسیداسیون لیپیدها، تغییرات پروتئین‌ها، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی،

آسیب‌های DNA، بایو مارکرها و فرایندهای متابولیکی طی واکنش با NPs در ارگانسیم اثرگذار بوده و نهایتاً با ایجاد گسست در مسیر انتقال یون، بروز تغییرات غشا و افزایش قابلیت نفوذپذیری آن نسبت به ورود NPs ها به درون سلول، منجر به آپوپتوزیس و مرگ سلولی می‌گردد (Lapresta-Fernández et al., 2012). از این رو افزایش نرخ مرگ‌ومیر آرمیها طی افزایش زمان مجاورت می‌تواند ناشی از تولید ROS و بروز اثرات استرس اکسیداتیو باشد. حتی در ارتباط با اثرات ضد میکروبی قوی Ag-NPs ها، نیز محققین این تأثیرات را ناشی از اندازه ذره و شکل آن دانسته و وجود یک طرح مشبک - مثلث کریستالی را در نانو ذرات نقره بر فعالیت ضد میکروبی (Biocidal) آن‌ها بسیار اثرگذار می‌دانند، زیرا می‌تواند پارگی غشا باکتریایی را در پی داشته باشد.

نتایج به‌دست‌آمده در مطالعه پیش رو نشان داد که نانو ذرات نقره بیوسنتز شده توسط جلبک *S. boveanum* نسبت به نانو ذرات نقره شیمیایی توانسته‌اند، قریب ۵ برابر در مرحله نائوپلیوسی و ۳ برابر در مرحله بلوغ آرمیا، پتانسیل سمیت کمتری را بروز دهد. از این رو به نظر می‌رسد حساسیت نائوپلیوس‌های آرمیا نسبت به نانو ذرات نقره شیمیایی بیشتر از مرحله بلوغ بوده ولی نسبت به نوع بیوسنتز شده توسط جلبک اندکی کمتر از مرحله بلوغ می‌باشد. با این حال به نظر می‌رسد با افزایش زمان مجاورت آرمیا با نانو ذرات نقره حساسیت بدن آرمیا در مراحل نائوپلیوسی تحت تأثیر فرآیند دگردیستی لاروی بیشتر شده و در مرحله بلوغ علی‌رغم افزایش مقاومت بدن، به علت بروز تغییرات فیزیولوژیک متأثر از بلوغ جنسی حساسیت به نانو ذرات نقره کماکان بالاست، هرچند در هر دو مرحله تفاوت حساسیت نسبت به نوع بیوژنیک و شیمیایی نانو ذرات نقره با توجه به پتانسیل سمیت این نوع نانو ماده کاملاً مشهود است. در این راستا Gohar و همکاران در سال ۲۰۱۳، سمیت سنجی ۲۴ ساعته نانو ذرات نقره پیوست شده با کیتوزان، cephadrin و piperacillin را در طیف غلظتی ۲۵۰۰-۵۰۰۰ میلی گرم بر لیتر بر *A. salina* مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج ایشان نشان داد که  $EC_{50}$  این ترکیبات بین ۳۰۰ و ۳۵۰۰ بوده و ترکیب نانو نقره با این مواد منجر به کاهش اثرات سمیت آن شده است که در تأیید این امر، مطالعه حاضر نیز نشان می‌دهد سنتز زیستی نانو ذرات نقره علی‌رغم حفظ اثرات کینتیکی نانو مواد توانسته کاهش تأثیرات سمیت را در پی داشته باشد. وانگهی داده‌های به‌دست‌آمده در تحقیق حاضر نشان می‌دهد که اساساً تأثیرات سمیت نانو ذرات نقره در هر دو نوع بیوژنیک و شیمیایی کاملاً تابع روندی وابسته به غلظت بوده و با افزایش غلظت و زمان مجاورت نرخ تجمع این نانو ذرات نقره در روده آرمیا رشد یافته و نهایتاً به بروز اثرات سمیت و مرگ این سخت‌پوست مقاوم منتهی گردیده است در همین رابطه Vijayan و همکاران در سال ۲۰۱۴ برآورد اثرات کشندگی و  $LC_{50}$  ۲۴ ساعته نانو ذرات نقره و طلا بیوسنتز شده از جلبک دریایی *Turbinaria conoides* بر *A. salina* را برابر با ۸۸/۹۱ میکرو لیتر بر میلی‌لیتر گزارش نموده و ایشان نیز تأثیرات کشندگی را کاملاً وابسته به دوز معرفی نموده و تنها Ag-NPs بیوژنیک را واجد عملکرد ضد بیوفیلمی دانسته‌اند.

در انتها بنا بر داده‌های به‌دست‌آمده از *Artemia* به‌عنوان یک گونه مدل کارآمد و کم‌هزینه در ارزیابی‌های نانو بوم سم‌شناسی دریایی و طی یک قیاس اثرات سمیت دو نوع نانو ذرات نقره شیمیایی و بیوسنتزی در هر دو مرحله تکاملی نائوپلیوس و بالغ *A. feranciscana* می‌توان نتیجه گرفت که رویکرد سنتز سبز نانو ذرات فلزی با استفاده از ترکیبات گیاهی با محتوای بالای پلی فنول ها و پلی ساکاریدهای سولفات، توانسته منجر به کاهش چشمگیر پتانسیل سمیت نانو ذرات نقره بیوسنتزی تهیه‌شده از جلبک قهوه‌ای دریایی نسبت به نانو ذرات نقره شیمیایی گردد و این امر توانسته روشی ایمن و دوستدار محیط‌زیست را برای تولید نانو ذرات فلزی معرفی نماید.

## منابع

رحیمی، ز.، یوسف‌زادی، م.، نوری، ا. و اکبرزاده، آ.، ۱۳۹۳. سنتز نانو ذرات نقره با استفاده از سه گونه ماکرو جلبک دریایی خلیج فارس. مجله بوم‌شناسی آبریان، دوره ۵، شماره ۱۹، صفحات ۷۸-۷۱.

Amulyavichus, A., Daugvila, A., Davidonis, R. and Sipavichus, C., 1998. Study of chemical composition of nanostructural materials prepared by laser cutting of metals. The Physics of Metals and Metallography. 85: 111-117.

**Arulvasu, C., Jennifer, S., Prabhu, D. and Chandhirasekar, D., 2014.** Toxicity Effect of Silver Nanoparticles in Brine Shrimp *Artemia*. Scientific World Journal, 2014: 1-10.

**Asghari, S., Johari, S. A., Lee, J. H., Kim, Y. S., Jeon, Y. B., Choi, H. J., Moon, M. C. and Yu, I. J., 2012.** Toxicity of various silver nanoparticles compared to silver ions in *Daphnia magna*. Journal of Nanobiotechnology, 10: 10-14.

**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: 3339-3348.

**Azizi, S., Namvar, F., Mahdavi, M., Bin Ahmad, M. and Mohamad, R., 2013.** Biosynthesis of silver nanoparticles using brown marine macroalga, *Sargassum Muticum* aqueous extract. Materials, 6: 5942-5950.

**Clark, L. S. and Bowen, S. T., 1978.** The genetic of *Artemia salina*. The Journal Heredity, 67: 385-388.

**Crisinel, A., Delaunay, L., Rossel, D., Tarradellas, J., Meyer, H., Saiah, H., Vogel, P., Delisle, C., Blaise, C. and Hansen, P.D., 1994.** Cyst-based ecotoxicity test using Anostracans: comparison of two species of Streptocephalus. Environmental Toxicology and Water Quality, 9: 317.

**Fanta, E., Rios, F. S. S., Rom, S., Vianna, S. C. C. and Freiburger, S., 2003.** Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. Ecotoxicology and Environmental Safety, 54: 119- 130.

**Farmen, E., Mikkelsen, H. N., Evensen, O., Einset, J., Heier, L. S., Rosseland, B. O., Salbu, B., Tollefsen, K. E. and Oughton, D. H., 2012.** Acute and sub-lethal effects in juvenile *Atlantic salmon* exposed to low  $\mu\text{g/L}$  concentrations of Ag nanoparticles. Aquatic Toxicology, 108: 78-84.

**Fidel, M., Laura, B., Alessandra, A., Elpidio, M., Sanchez, H., Horacio, B., Facundo, R. and Garth, J., 2013.** Antibiofilm activity of silver nanoparticles against different microorganisms. Bioadhesion and Biofilm Research, 6: 651-660.

**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.

**Gavhane, A. J., Padmanabhan P, Kamble, S. P. and Jangle, S. N., 2012.** Synthesis of silver nanoparticles using extract of Neem leaf and triphala and evaluation of their Antimicrobial activities. International Journal of Pharma and Bio Sciences, 3: 88-100.

**Gohar, Y. M., Barakat, K. M., Abu Yousef, M. A. and Ghonam, H. B., 2013.** Marine chitosan silver nanoparticles as antibiotic synergizers against diabetic foot bacteria. Archives of Clinical Microbiology, 4: 1-8.

**Gomez, G. B., Herrera, M. A., Abreu, F. A. and Roque, A., 1998.** Bioencapsulation of two different vibrio species in nauplii of the brine shrimp, Microbiology, 64: 2318-2322.

**Handy, R. D. and Shaw, B. J., 2007.** Toxic effects of nanoparticles and nanomaterials: implications for public health, risk assessment and the public perception of nanotechnology. Health Risk and Society, 9:125-144.

**Jagtap, U. B. and Bapat, V. A., 2013.** Green synthesis of silver nanoparticles using *Artocarpus heterophyllus* lam. seed extract and its antibacterial activity. Industrial Crops and Products, 46: 132-137.

**Kreyling, W. G., 2010.** Acomplementary definition of nanomaterial. Nano Today, 5:165-168.

**Kumar, P., Selvi, S. S. and Govindaraju, M., 2012.** Seaweed-mediated biosynthesis of silver nanoparticles using *Gracilaria corticata* for its antifungal activity against *Candidasp.* Applied Nanoscience, 3: 495-500.

**Kumar, P., Selvi, S. S., Praba, A. L., Selvaraj, M., Rani, L. M., Suganthi, P., Sarojini Devi, B. and Govindaraju, M., 2012.** Antibacterial activity and in-vitro cytotoxicity assay against brine shrimp using silver nanoparticles synthesized from *Sargassum ilicifolium*. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, 7: 1447-1455.

**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.

**Lovrić, 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.

**Martins, J., Oliva, T. L. and Vasconcelos, V., 2007.** Assays with *Daphnia magna* and *Danio rerio* as alert systems in aquatic toxicology. *Environment International*, 33: 414-25.

**Nascimento, A., Smith, D. H., Pereira, S. A., Sampaio de Araujo, M. M., Silva, M. M. and Mariani, A. M., 2000.** Integration of varying responses of different organisms to water and sediment quality at sites impacted and not impacted by the petroleum industry. *Aquatic Ecosystem Health and Management*, 3: 449-458.

**Nunes, B. S., Carvalho, F. D., Guilhermino, L. M. and Van Stappen, G., 2006.** Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. *Environmental Pollution*, 144: 453-462.

**OECD. 1992.** OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.

**Prabhu, S. and Poulouse, E. K., 2012.** Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International Nano Letters*, 2: 32.

**Rajeshkumar, S., Malarkodi, C., Gnanajobitha, G., Paulkumar, K., Vanaja, M., Kannan, C. and Annadurai, G., 2013.** Seaweed-mediated synthesis of gold nanoparticles using *Turbinaria conoides* and its characterization. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 3: 44.

**Sam, N., Palanichamy, S., Chellammal, S., Kalaiselvi, P. and Subramanian, G., 2015.** Antifouling effects of silver nano particles synthesized from tropical seaweeds. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4: 1029-1042.

**Senapati, S., Syde, A., Moez, S., Kumar, A. and Ahmah, A., 2012.** Intracellular synthesis of gold nanoparticles using alga *Tetraselmis kochinensis*. *Materials Letters*, 79: 116-118.

**Shalvei, F., Hedayati, A., Jahanbakhshi, A. and Baghfalaki, M., 2012.** Effects of nanometer-sized silver materials on survival response of Caspian roach (*Rutilus rutilus caspicus*). *Toxicology and Industrial Health*, 28: 157-163.

**Shanmugam, N., Rajkamal, P., Cholan, S., Kannadasan, N., Sathishkumar, K., Viruthagiri, G. and Sundaramanickam A., 2014.** Biosynthesis of silver nanoparticles from the marine seaweed *Sargassum wightii* and their antibacterial activity against some human pathogens. *Applied Nanoscience*, 4: 881-888.

**Sharma, K., Yngard, R. A. and Lin, Y., 2009.** Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities, *Advances in Colloid and Interface Science*, 145: 83-96.

**Shukla, D., Saxena, S., Purushothaman, J., Shrivastava, K., Singh, M., Shukla, S., Malhotra, V. K., Mustoori, S. and Bansal, A., 2011.** Hypoxic preconditioning with cobalt ameliorates hypobaric hypoxia induced pulmonary edema in rat. *European Journal of Pharmacology*, 656: 101-109.

**Sorgeloos, P., Dehert, P. and Candreva, P., 2001.** Use of the brine shirinp, *Artemia spp.*, in marine fish larviculture, *Aquaculture*, 200: 147-759.

**Vanhaecke, P., Persoone, G., Claus, C. and Sorgeloos, P., 1981.** Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia nauplii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 5: 382-387.

**Vijayan, S. R., Santhiyagu, P., Singamuthu, M., Kumari Ahila, N., Jayaraman, R. and Ethiraj, K., 2014.** Synthesis and characterization of silver and gold nanoparticles using aqueous extract of seaweed, *Turbinaria conoides*, and their antimicrofouling activity. *Scientific World Journal*. 2014: 1-10.

