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

سکینه مشجور[1*]
زهرا طولابی دزفولی[2]
مجتبی علیشاهی[3]

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 فعالیت‌های پژوهشی است.

چکیده

آزمون سمیت سنجی آرتمیا یکی از این روش های متداول در پیش‌بینی اثرات منفی احتمالی رهایش 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 نائوپلیوس 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 نائوپلیوس و ۱۰ عدد بالغ آرتمیا، به ترتیب به هر چاهک از پلیت ۲۴ خانه برای آزمون سمیت نائوپلیوس 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 نائوپلیوس 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 ($P<۰/۰۵$). بنحوی که پس از ۴۸ ساعت، غلظت ایجاد کننده‌ی۵۰ 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 نائوپلیوسی 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 آتی 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 امیدبخش‌ترین فناوری‌های قرن حاضر لقب گرفته است و در دوره‌های اخیر طی یک تعامل با زیست‌فناوری منجر به ظهور فناوری جدیدی موسوم به نانو زیست‌فناوری شده است. در فناوری نانو، کنترل مواد در ابعاد ۱ تا ۱۰۰ نانومتر، منجر به ایجاد خواص فیزیکی، شیمیایی و زیستی غیرطبیعی می‌شود که این امر کاربردهای جدید و منحصربه‌فردی را برای

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2025-11-14]

نانو مواد امکان‌پذیر می‌سازد (Kreyling, 2010). علی‌رغم این توسعه وسیع، حضور نانو مواد در محیط‌زیست دریا اجتناب‌ناپذیر به نظر می‌رسد و بدیهی است که با ورود فاضلاب‌ها و پساب‌های حاصل از محصولات نانو فناوری شده به محیط‌زیست و زمین‌های کشاورزی، بوم‌سازگان‌های آبی و زیستگاه‌های آبزیان نیز در معرض نانو ذرات تولیدشده قرار خواهند گرفت. ازاین‌رو اولین مسئله قابل‌طرح این خواهد بود که نانو مواد بر روی محیط‌زیست آبی، ماهیان و دیگر ارگانیسم‌های آبزی چه اثراتی را بر جای خواهند گذاشت (Handy and Shaw, 2007). نانو ذرات نقره، امروزه در ترکیبات مختلفی همانند مواد ضدعفونی‌کننده در کشاورزی و دام‌پروری مورداستفاده قرار می‌گیرند و بیشترین کاربرد نانو ذرات نقره مبتنی بر خواص ضد میکروبی قوی آن‌ها در برابر پاتوژن‌هایی چون باکتری‌ها و ویروس‌ها است (Fidel *et al.*, 2013). بااین‌وجود، افزایش نشت آن‌ها به درون آب‌های جاری و زیرزمینی، نگرانی‌های مربوط به خطرات ناشی از نانو ذرات نقره بر موجودات آبزی و ماهی‌ها را افزایش داده است (Shaluei *et al.*, 2012). مطالعات اخیر نشان داده است که ذرات نانو ازنظر زیستی فعال هستند و در مقایسه با ذرات دانه درشت‌تر از مواد شیمیایی مشابه، اثرات سمیت بیشتری را نشان می‌دهند. ازنظر سم‌شناسی علاوه بر اندازه ذره، مساحت سطح نیز بسیار مهم تلقی می‌شود، زیرا با افزایش نسبت اتم‌ها در سطح، انرژی آزاد نانو ذرات بالا می‌رود که این خود باعث بروز تغییرات زیادی در خواص ماده می‌گردد (Gatoo *et al.*, 2014). ازاین‌رو، مواجهه موجودات زنده با مواد سمی در محیط، تغییراتی را در ساختار بافتی و سلولی به همراه خواهد داشت، به‌طوری‌که آسیب بافتی که در برخی موارد منجر به مرگ‌ومیر شده است در بسیاری از گونه‌های مختلف ماهیان گزارش‌شده است (Shukla *et al.*, 2011; Fanta *et al.*, 2003). تحقیقات اخیر نیز نشان داده است که تنش اکسیداتیو (افزایش سطوح رادیکال‌های آزاد که خود از عوامل اصلی مکانیسم‌هایی است که به مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی منجر می‌شود) و آسیب به DNA از اثرات معمول نانو ذرات نقره، بر موجودات زنده می‌باشند (Farmen *et al.*, 2012). بر این اساس، شناخت اثرات احتمالی این مواد بر موجودات آبزی پیش از کاربری‌های گسترده دارای اهمیت زیادی خواهد بود.

تولید نانو ذرات نقره نیز بهروش‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی امکان‌پذیر است (Amulyavichus *et al.*,1998; Prabhu and Poulose, 2012; Gavhane *et al.*, 2012). لکن نانو ذرات تولیدی در روش‌های شیمیایی و فیزیکی به دلیل استفاده از مواد شیمیایی سمی که نقش عوامل احیایی و تثبیت‌کننده را ایفا می‌کنند (Senapati *et al.*, 2012)، نهایتاً آلودگی‌های محیط‌زیست را به دنبال دارند. ازاین‌رو نظر به‌به مشکلات و برخی معایب زیست‌محیطی احتمالی در امر تولید نانو ذرات نقره، توسعه روش‌های زیستی سازگار و سنتز زیستی نانو ذرات نقره با استفاده از میکروارگانیسم‌ها، قارچ‌ها، گیاهان و جلبک‌ها می‌تواند رویکرد جایگزین مناسبی محسوب شود (Jagtap and Bapat, 2012). دراین‌بین، جلبک‌ها به‌ویژه ماکرو جلبک‌های دریایی، در میان دیگر نامزدهای زیستی، جایگاه ویژه‌ای را به خود اختصاص داده‌اند و بخش عمده‌ای از درآمد حاصل از بیوتکنولوژی دریایی به این موجودات اختصاص دارد؛ زیرا علاوه بر این‌که واجد منابع مهم فیتوشیمیایی ازجمله کارتنوئیدها، اسیدهای چرب ضروری، پلی‌ساکاریدها، مواد معدنی و منافع اقتصادی چون: تولید آگار، کاراجینان (از جلبک-های قرمز) و آلژینات (از جلبک‌های قهوه‌ای) هستند، از توان بالایی نیز برای احیای یون‌های 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 زیست‌بوم دریا، یافتن غلظت‌های کشنده و نیز حداکثر غلظت مجاز این مواد، می‌توان از گونه‌های آبزی مدل نظیر، آرتمیا که سخت‌پوست زئوپلانکتونی متعلق به شاخه بندپایان است، استفاده نمود. آرتمیا به‌عنوان یک ارگانیسم مدل و یک نشانگر زیستی، برای بررسی اثرات آلاینده‌های زیست‌محیطی و توسعه استانداردهای علم سم‌شناسی آبزیان بکار می‌رود (Sharma *et al.*, 2009; Vanhaecke *et al.*, 1981)؛ زیرا علاوه بر اینکه به‌عنوان غذای زنده و حامل مکمل‌های خوراکی، ویتامین‌ها 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 سخت‌پوست شامل مراحل تخم، لارو، نائوپلیوس، متانائوپلیوس و زوآ می‌باشد که مراحل لاروی آن از حساسیت‌های بالایی در مقابل ترکیباتی با اثرات سمیت برخوردار است (Clark and Bowen, 1978). از طرفی با توجه به اینکه آرتمیا ارگانیسمی تنظیم‌کننده هیپو- هایپر اسمزی است و توان تثبیت غلظت یون‌های

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2025-11-14]

همولنف 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). ازاین‌رو، در مطالعه حاضر، اثرات سمیت و تفاوت میزان حساسیت (نرخ بازماندگی) نسبت به نانو ذرات نقره شیمیایی و بیوسنتز 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: کلوئید نانو ذرات نقره شیمیایی بانام تجاری نانوسید L2000 (شرکت نانونصب پارس) (شکل ۱- الف) و در مطالعه حاضر، نانو ذرات نقره بیوسنتزی 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 بیوسنتز 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 روشنایی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و نهایتاً سانتریفیوژ، شستشو و تغلیظ نانو ذرات نقره.

غلظت کلوئید 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 ۱±۷ نانومتر است. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی که Asghari و همکاران (۲۰۱۲) برای این محصول کلوئیدی گزارش کرده‌اند عبارت است از: میانگین پتانسیل زتای ۷/۸۶ ± ۵۳/۳۳ میلی‌ولت، اسیدیته ۲/۴ و میانگین هندسی قطر برابر با ۱/۴۶ ± ۱۲/۶۵ نانومتر بوده و بنابر نتایج دستگاهICP-AES، غلظت واقعی نقره در کلوئید نانو ذرات نقره مذکور معادل۳۹۸۰ میلی‌گرم در لیتر اندازه‌گیری شده است.

در ارتباط با نانو ذرات نقره بیوسنتزی تهیه‌شده از عصاره آبی جلبک دریایی S. boveanum، نتایج حاصله از تصاویر میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) مدل LEO 906E، از نانو ذرات نقره بیوسنتزی 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 طیفFT-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 بیوسنتز در دست انتشار است).

در این روش برای سنجش اثرات سمیت از سیست‌های گونه‌ای سخت‌پوست به نام *A. feranciscana* (تولیدشده در شرکت INVE (Thailand) LTD با درصد تفریخ ۹۰ درصد) استفاده شد. منبع آب مورداستفاده آب‌شور مصنوعی (آب محتوی ۳۰ گرم نمک دریا) بود. تفریخ (تخم گشایی) سیست‌های 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 سیست آرتمیا، نائوپلیوس‌های تازه از سیست 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. آرتمیاها حدوداً بعد از یک ماه بالغ شدند. در ادامه باهدف سمیت سنجی، رقت‌های متوالی از نانو

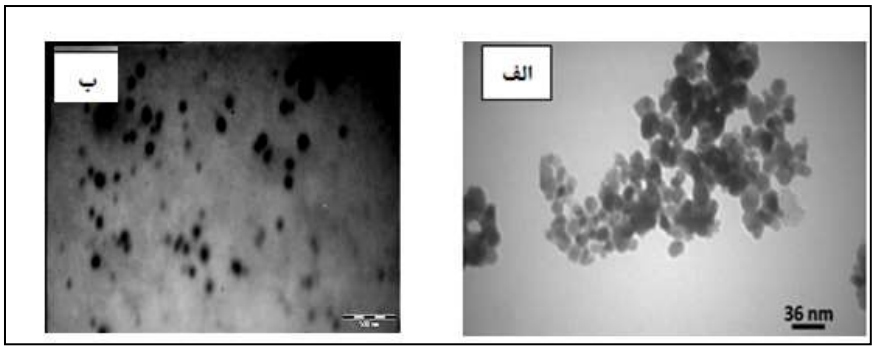
[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2025-11-14]

ذرات نقره شیمیایی و بیوسنتزی (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 آرتمیا و به هر چاهک از پلیت ۶ خانه ۱۰ آرتمیا بالغ اضافه شد و با توجه به رهنمود استاندارد شماره ۲۰۳ "سازمان توسعه و همکاری اقتصادی" (OECD, 1992)، در ارتباط با آبزیان، تعداد تلفات در ساعات ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ بعد از مجاورت با نانو ذرات نقره شیمیایی و بیوسنتزی ثبت گردیده و برای تعیین درصد مرگ‌ومیر در غلظت‌های متفاوت و محاسبه LC_{50} از نسخه ۱/۵ نرم‌افزار EPA Probit Analysis (منتشرشده توسط سازمان حفاظت محیط‌زیست امریکا) استفاده شد.

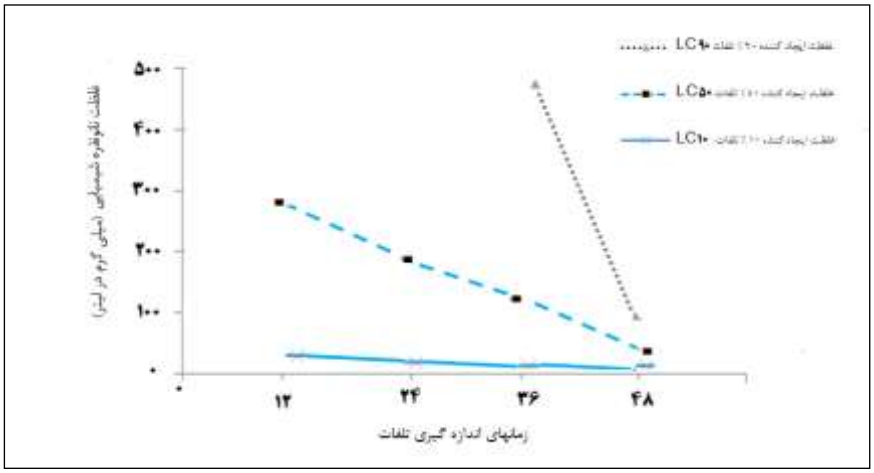
نتایـج

در مطالعه حاضر، نتایج سمیت نانو ذرات نقره شیمیایی و بیوسنتزی در نائوپلیوس و بالغ *A. feranciscana* در اشکال ۶-۲ نشان داده‌شده است. آنالیز داده‌ها در تحقیق حاضر نشان می‌دهد که اثرات سمیت هر دو نوع نانوذره نقره بر لارو آرتمیا با افزایش غلظت و نیز با افزایش مدت‌زمان مجاورت روند افزایشی را به دنبال داشته است و تفاوت‌ها میان آن‌ها معنی‌دار بوده است ($P<۰/۰۵$). به‌نحوی‌که پس از ۴۸ ساعت، غلظت ایجادکننده‌ی ۵۰ درصد کشندگی (LC_{50})، در ناپلی آرتمیا با نانو ذرات نقره شیمیایی L-2000 ۳۱/۸ میلی‌گرم در لیتر و برای نانو ذرات نقره بیوسنتز شده توسط جلبک قهوه‌ای *S. boveanum* ۱۴۱/۱ mg/l ارزیابی‌شده است. حال‌آنکه این غلظت در ارتباط با بالغین آرتمیا طی مجاورت با نانو ذرات نقره شیمیایی برابر با ۴۷ میلی‌گرم در لیتر و برای نانو ذرات نقره بیوسنتز شده توسط جلبک قهوه‌ای ۱۳۲/۵۴ میلی‌گرم 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 بیوسنتزی، از قدرت سمیت بالاتری برخوردارند. حساسیت نائوپلیوس‌های آرتمیا نسبت به نانو ذرات نقره شیمیایی بیشتر از مرحله بلوغ بوده، لکن نسبت به نوع بیوسنتز شده توسط جلبک اندکی کمتر از مرحله بلوغ بوده است (شکل ۶). به‌علاوه همان‌طور که ذکر شد، توان سمیت نانو ذرات نقره بر آرتمیا با افزایش زمان مجاورت افزایش‌یافته است، به‌طوری‌که غلظت کشنده میانی نانو ذرات نقره (LC_{50}) ۱۲ و ۴۸ ساعت بعد از مجاورت نائوپلیوس‌های آرتمیا برای نانو ذرات نقره شیمیایی به ترتیب ۳۱۵/۲ و ۳۱/۸ و برای نانو ذرات نقره بیوسنتزی ۲۷۷/۶ و ۱۴۱/۱ میلی‌گرم در لیتر بوده (شکل ۲ و ۴) و برای آرتمیاهای بالغ این غلظت در مواجهه با نانو ذرات نقره شیمیایی به ترتیب ۵۱/۱ و ۴۷ و برای نانو ذرات نقره بیوسنتزی برابر ۴۵۵/۱۹ و ۱۳۲/۵۴ میلی‌گرم در لیتر ارزیابی‌شده 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. به‌طوری‌که در ارتباط با نانو ذرات نقره شیمیایی، طی مدت‌زمان ۴۸ ساعت بعد از مجاورت، غلظت‌های ۹/۵۴، ۳۱/۸۱ و ۱۰۶/۱۳ میلی‌گرم در لیتر، به ترتیب ایجاد ۱۰، ۵۰ و ۹۰ درصد تلفات در لاروهای نائوپلیوس آرتمیا نموده و این میزان طی مجاورت نائوپلیوس‌های آرتمیا با نانو ذرات نقره بیوسنتزی در غلظت‌های ۴۲/۴۴، ۱۴۱/۱، ۴۶۹/۷ میلی‌گرم در لیتر ایجاد شد. لیکن در این بازه زمانی، غلظت‌های ایجادکننده ۱۰، ۵۰ و ۹۰ درصد تلفات در مرحله بلوغ آرتمیا، نسبت به نانو ذرات نقره شیمیایی به ترتیب ۳۹، ۴۷ و ۵۵ میلی‌گرم در لیتر و نسبت به نانو ذرات نقره بیوسنتزی ۲۳/۰۵، ۱۳۲/۵۴ و ۷۶۱/۸۹ میلی‌گرم در لیتر بود.

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2025-11-14]

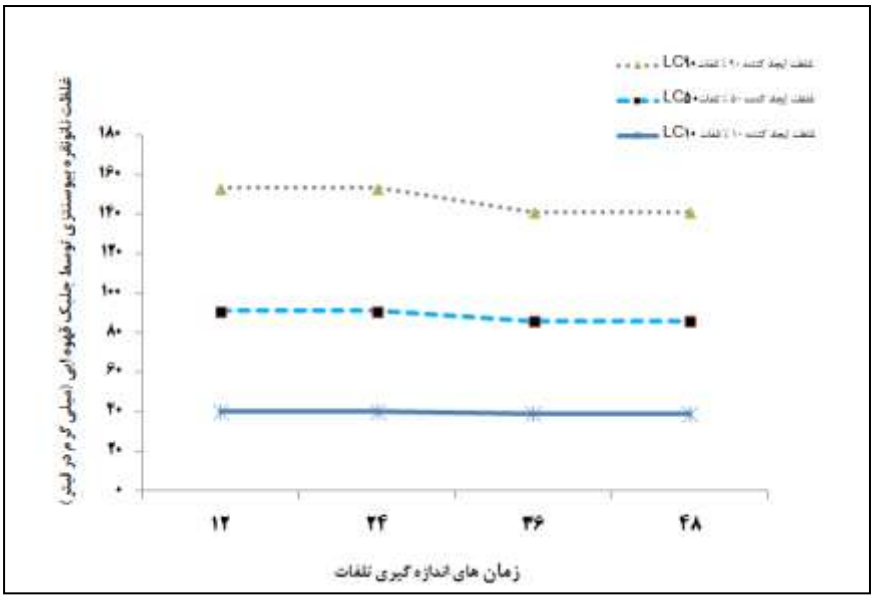


شکل۱: الف) تصویر TEM نانو ذرات نقره شیمیایی. ب). تصویر TEM نانو ذرات نقره توسط عصاره آبی جلبک *Sargassum boveanum*.

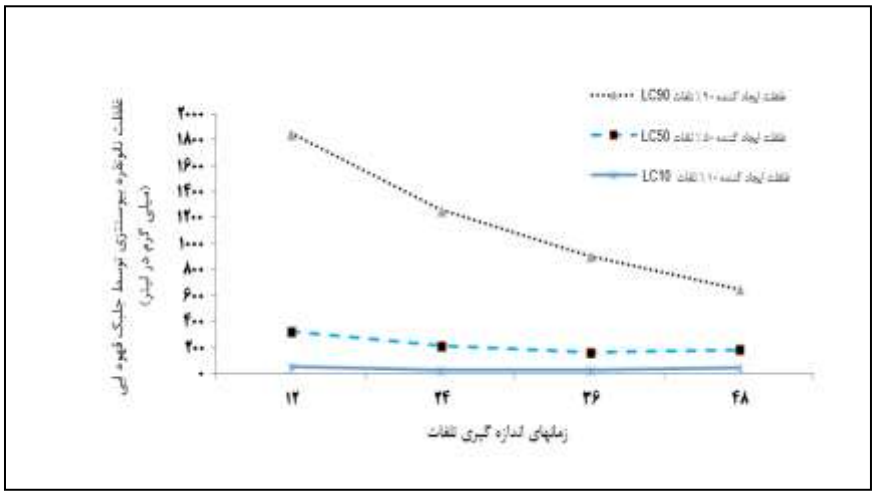


شکل۲: روند ایجاد تلفات با افزایش غلظت نانو ذرات نقره شیمیایی و افزایش زمان مجاورت ناپلی آرتمیا (*Artemia feranciscana*).

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2025-11-14]

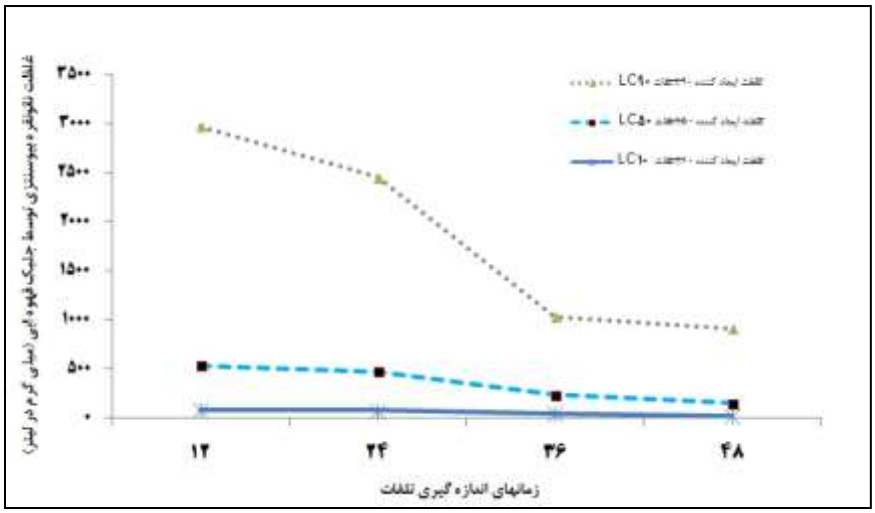


شکل ۳: روند ایجاد تلفات با افزایش غلظت نانو ذرات نقره شیمیایی و افزایش زمان مجاورت آرتمیا بالغ (*Artemia feranciscana*).

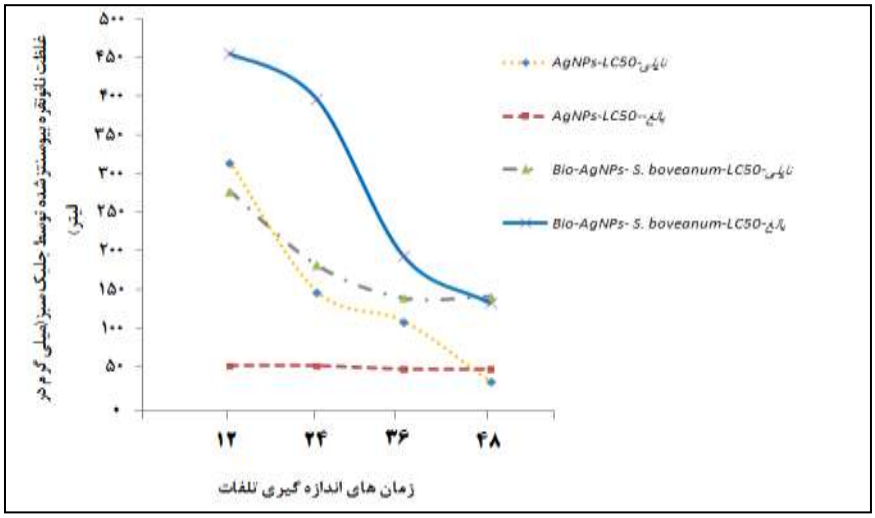


شکل ۴: روند ایجاد تلفات با افزایش غلظت نانو ذرات نقره بیوسنتز شده توسط عصاره آبی جلبک *Sargassum boveanum* و افزایش زمان مجاورت ناپلی آرتمیا (*Artemia feranciscana*).

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2025-11-14]



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 آبزی 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 مورداستفاده 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

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2025-11-14]

مدل استانداردی چون *Daphnia magna* (Nunes *et al.*, 2006) و یا میگوهایی چون *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 به‌عنوان یک مدل زیستی در علم نانو بوم‌سم‌شناسی، اثرات سمیت و تفاوت میزان حساسیت *A. feranciscana* در مراحل نائوپلیوس و بالغ، نسبت به جذب نانو ذرات نقره شیمیایی و بیوژنیک تهیه‌شده از عصاره جلبک قهوه‌ای *S. boveanum*، ارزیابی و مقایسه گردید که نتایج به‌دست‌آمده 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 مدت‌زمان مجاورت روند افزایشی را به دنبال داشته است، بطوریکه میزان LC_{50} در طول بازه زمانی ۴۸ ساعته کاهش‌یافته است. بااین‌حال، در هر دو مرحله زندگی آرتمیا، نانو ذرات نقره شیمیایی در قیاس با بیوسنتزی، از قدرت سمیت بالاتری برخوردار بوده‌اند.

در رابطه با ارزیابی سمیت نانو ذرات نقره بیوسنتز 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 بیوسنتز 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 بیوسنتز 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. ازاین‌رو تعداد مطالعات نانو بوم سم‌شناسی صورت گرفته بر نانو ذرات نقره بیوسنتز شده از جلبک‌های دریایی، بسیار اندک بوده و ازاین‌دست می‌توان تحقیق حاضر را در این امر تا حدی پیشگام دانست.

Sam و همکاران در سال ۲۰۱۵ بیوسنتز نانو ذرات نقره را با استفاده از ۱۱ گونه ماکرو جلبک سبز، قرمز و قهوه‌ای ازجمله جلبک‌های قهوه‌ای *Acanthophora najardiformis, S. wightii, Padina boergesenii* گزارش کرده و از این میان نانو ذرات نقره بیوسنتز شده از جلبک دریایی *Ulva lactuca* را واجد اثرات ضد ریزفولینگ (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_{50} ۲۴ ساعته در ناپلی *A. salina* تحت تأثیر نانو ذرات نقره بیوسنتز شده از جلبک دریایی*S. ilicifolium* را ۱۰ نانو مولار بر میلی‌لیتر عنوان نمودند و در تائید این تحقیق Arulvasu و همکاران (۲۰۱۴) نیز بیان داشتند که غلظت‌های نانو مولار نانو ذرات نقره برای سیست و نائوپلیوس آرتمیا سمی بوده و با افزایش غلظت تا ۱۰ نانو مولار بر میلی‌لیتر کاهش نرخ تخمه گشایی، افزایش نرخ مرگ‌ومیر نائوپلیوس‌ها، تجمع روده ایی 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 به‌اندازه و خصوصیات فیزیکوشیمیایی (بار الکتریکی، ساختار کریستالی، حلالیت، مساحت سطحی ماده، شکل و ریخت‌شناسی) و رفتاری آن‌ها می‌دانند (Lapresta-Ferna´ndez *et al.*, 2012; Gatoo *et al.*, 2014)؛ زیرا اساساً اندازه ذره در میزان نفوذ و انتشار آن به سیستم‌های زیستی بسیار تعیین‌کننده است (Lovri´c *et al.*, 2005)؛ و مخاطرات آتی نانو ذراتی با اندازه کوچک‌تر از ۱۰ نانومتر نگران‌کننده است (Gatoo *et al.*, 2014). زیرابه درون سلول واردسازی NPs از خلال غشای سلولی، توسط فرآیند انتشار ساده و یا به‌واسطه پورین‌ها و یا پروتئین‌های دیواره سلولی صورت می‌پذیرد و ناپایداری غشا خارجی نیز ممکن است توسط برخی از انواع برهمکنش‌ها به‌واسطه پروتئین‌هایی که واجد گروه‌های تیول اند و یا طی یک برهمکنش الکترواستاتیک با شکل هندسی NPs ایجاد گردد (Lapresta-Ferna´ndez *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،

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2025-11-14]

آسیب‌های DNA، بایو مارکرها و فرآیندهای متابولیکی طی واکنش با NPs در ارگانیسم 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-Ferna´ndez *et al.*, 2012). ازاین‌رو افزایش نرخ مرگ‌ومیر آرتمیاها 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 محقیقن 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 جلبکS. boveanum نسبت به نانو ذرات نقره شیمیایی توانسته‌اند، قریب ۵ برابر در مرحله نائوپلیوسی و ۳ برابر در مرحله بلوغ آرتمیا، پتانسیل سمیت کمتری را بروز دهد. ازاین‌رو به نظر می‌رسد حساسیت نائوپلیوس‌های آرتمیا 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. بااین‌حال به نظر می‌رسد با افزایش زمان مجاورت آرتمیا با نانو ذرات نقره حساسیت بدن آرتمیا 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 میلی‌گرم بر لیتر بر *A. salina* مورد ارزیابی قراردادند. نتایج ایشان نشان داد که EC_{50} این ترکیبات بین ۳۰۰۰ و ۳۵۰۰ بوده و ترکیب نانو نقره با این مواد منجر به کاهش اثرات سمیت آن شده است که در تائید 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 آرتمیا 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 $۲۴LC_{50}$ 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 یک‌گونه 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 سولفاته، 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.

منابــع

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 آبزیان، 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.

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2025-11-14]

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 Freiberger, 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 µg/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 avtivity 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 chitosansilver nano-particles as antibiotic synergizers against diabetic foot bacteria. Archives of Clinical Microbiology, 4: 1-8.

Gomez, G. B., Herrara, M. A., Abreu, F. A. and Roque, A., 1998. Bioencapsulation of two different vibrio species in nauplii of the brine shrimp, Microbialogy, 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 *Candidaspp*. 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.

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2025-11-14]

Lovri´c, 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 Poulose, 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., Moeez, S., Kumar, A. and Ahmah, A., 2012. Intracellular synthesis of gold nanoparticles using alga *Tetraselmis kochinensis*. Materials Letters, 79: 116-118.

Shaluei, 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.

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2025-11-14]

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2025-11-14]