

بررسی سمیت نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از عصاره الکلی جلبک دریایی سارگاسوم آنگوستیفولیوم در ماهی کپور معمولی

سراج بیتا^{۱*}، مهرزاد مصباح^۲، علی شهریاری^۳، مسعود قربانپور نجف آبادی^۴

۱) دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار - ایران
۲) گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز - ایران
۳) گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز - ایران
۴) گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز - ایران

(دریافت مقاله: ۲۴ بهمن ماه ۱۳۹۴، پذیرش نهایی: ۱۷ فروردین ماه ۱۳۹۵)

چکیده

زمینه مطالعه: استفاده از اصول شیمی سبز در سنتز نانو مواد دارای اهمیت ویژه‌ای در بحث نانوبیوتکنولوژی و زیست پزشکی می‌باشد، بنابراین اخیراً سنتز نانوذرات نقره با استفاده از گیاهان و جلبک‌های دریایی با روش بیولوژیکی به دلیل سازگاری این روش با محیط زیست خیلی متداول شده است. **هدف:** هدف از این مطالعه سنتز زیستی نانوذرات نقره با استفاده از عصاره الکلی جلبک *Sargassum angustifolium* و بررسی سمیت آن در ماهی کپور معمولی می‌باشد. **روش کار:** در این مطالعه سنتز زیستی نانوذرات نقره با استفاده از عصاره الکلی جلبک سارگاسوم با روش خارج سلولی انجام شد. در این روش عصاره‌گیری با استفاده از متانول صورت گرفت، سپس غلظت کشنده نانوذره نقره مذکور بر اساس روش استاندارد O.E.C.D به صورت ساکن (static renewal) و به مدت ۹۶ ساعت در ماهی کپور معمولی مورد بررسی قرار گرفت. **نتایج:** بر اساس نتایج میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)، نانوذرات سنتز شده دارای شکل کروی و با اندازه $42/31 \pm 0/062$ nm بودند. نتایج سمیت نشان داد که میزان LC_{50} در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بعد از مجاورت ماهیان با نانوذرات نقره سنتز شده به ترتیب $0/004$ mg/l \pm ، $0/012$ ، $0/017$ ، $0/019$ و $0/019$ mg/l \pm و $0/019$ ، $0/019$ و $0/019$ mg/l \pm محاسبه شد. **نتیجه‌گیری نهایی:** آنالیزهای مربوط به مشخصه‌یابی و تعیین ویژگی‌های نانوذرات نشان دهنده تأیید سنتز نانوذرات نقره و احیاء یون‌های نقره توسط عصاره الکلی جلبک سارگاسوم می‌باشد. طبق نتایج به دست آمده از تست سمیت، میزان تلفات در ماهی کپور معمولی با افزایش غلظت و افزایش زمان مجاورت روند افزایشی نشان داد که نشان دهنده سمی بودن این ماده در غلظت‌های بالا برای ماهی کپور معمولی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: سنتز زیستی، سمیت، جلبک دریایی *Sargassum angustifolium*، نانوذرات نقره، کپور معمولی

مقدمه

در آب‌های آلوده از نظر تاریخی نیز، وجود خواهد داشت که این موضوع نگرانی‌های مربوط به خطرات اکولوژیکی را تشدید می‌سازد (۱۹). به خاطر اثرات مخرب این روش‌ها بر محیط زیست و آبریزان، در حال حاضر یکسری روش‌های جایگزین برای سنتز این نانومواد که با محیط زیست سازگاری بهتری داشته و آلودگی کمتری ایجاد کنند ضروری بنظر می‌رسد یکی از این روش‌ها، روش بیولوژیکی می‌باشد در این روش تلاش شده است که برای سنتز نانو ذرات فلزی به جای مواد شیمیایی و سمی از میکروارگانیسم‌ها و مواد گیاهی که در طبیعت وجود دارند، استفاده شود تا از آلوده شدن محیط زیست جلوگیری شده و اثرات سمی کمتری در مقایسه با نانوذرات سنتز شده با روش شیمیایی داشته باشد. یکی از این منابع که می‌توانند در بحث نانوتکنولوژی و سنتز نانوذرات مورد استفاده قرار گیرند گیاهان دریایی یا جلبک‌های دریایی هستند که به دلیل فراوانی و دارا بودن انواع ترکیبات فیتوشیمیایی متنوع از قبیل پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها، آلکالوئیدها، استروئیدها، فنول‌ها، ساپونین و فلاونوئیدها (۲۰) می‌توانند نقش مهمی در احیاء یون‌های فلزی و تبدیل آن به فرم نانو را به شکل خارج سلولی داشته باشند. ماهی کپور معمولی متعلق به خانواده کپورماهیان و از ماهیان گرمابی پرورشی مهم و با اهمیت اقتصادی بالا در استان خوزستان می‌باشد. در

ویژگی‌های منحصر به فرد نانوذرات مانند اندازه بسیار کوچک به نحوی که قادر به ورود به داخل سلول یا بافت هدف هستند، سبب کاربرد آنها در حوزه‌های متفاوتی از علوم زیستی شده است و در نهایت منجر به تولد گرایش جدیدی از این فناوری، یعنی "نانوبیوتکنولوژی" شده است (۲۰). در صنعت شیلالت و آبی‌پروری نیز، نانوذرات نقره کاربردهای گوناگونی یافته‌اند که از آن جمله می‌توان به ساخت نانو فیلترها، ساخت انکوباتور با استفاده از سطوح پوشش داده شده با نانوذرات نقره و استفاده از رنگ‌های حاوی نانوذرات نقره در دیواره استخرها و حوضچه‌های نگهداری ماهیان به منظور ایجاد سطوح آنتی باکتریال، اشاره کرد (۲۶). معمولاً نانوذرات فلزی با استفاده از روش‌های شیمیایی، مکانیکی (۳، ۳۵) و الکتروشیمیایی (۲۵) سنتز می‌شوند در این روش‌ها جهت سنتز نانوذرات نقره از ترکیبات شیمیایی سمی استفاده می‌شود که می‌توانند اثرات منفی زیادی هم بر روی محیط آب و هم آبریزان داشته باشد اگر استفاده از نانوفناوری‌های نقره گسترش یابد، امکان افزایش غلظت‌های نقره در طبیعت، به صورت محلی و منطقه‌ای، حتی بیشتر از سطوح حداکثر نقره محلول مشاهده شده



آزمایشات سمیت، غذادهی به ماهیان قطع گردید. از آنجا که تاکنون مقادیر دقیق غلظت حدکشندگی نانوذرات نقره سنتز شده از جلبک دریایی *Sargassum angustifolium* در ماهی کپور معمولی تعیین نشده بنابراین برای تعیین دوز کشنده نانوذرات نقره در ابتدا با انجام آزمایشات مقدماتی، مقادیر واقعی حدکشندگی به دست آمد. محدوده کشندگی بر اساس اولین غلظتی که در مدت ۹۶ ساعت تلفات در آن مشاهده می شود و اولین غلظتی که ۱۰۰٪ تلفات را در پی دارد تعیین می گردد. برای این کار، ۵ قطعه ماهی در هر آکواریوم با حجم ۵۰ l مجهز به سیستم هوادهی منتقل شده و با غلظت‌های صعودی ۰/۵ mg/l، ۱، ۲/۵، ۵، ۱۵، ۲۵، ۳۵، ۴۵، ۵۵، ۶۵، ۷۵، ۸۵، ۹۵ و ۱۰۵ نانوذرات نقره سنتز شده از جلبک دریایی *Sargassum angustifolium* مجاور گردیدند. آزمایش‌ها با ۱۴ تیمار و ۳ تکرار با غلظت‌های مذکور انجام شد. در طول هر دو آزمایش مقدماتی و تعیین LC_{50} ، حرکات و رفتار ماهیان از جمله حرکات سرپوش آبششی، از دست دادن تعادل، تنفس از سطح، رنگ بدن، شنای چرخشی، حرکات پرشی، استراحت در کف مورد ارزیابی قرار گرفتند. مرگ و میر به طور مداوم بررسی شده و ماهیان زمانی که حرکات سرپوش آبششی و پاسخ به محرک‌های مکانیکی نشان نمی دادند مرده در نظر گرفته می شدند (۴). پس از انجام آزمایش مقدماتی و مشخص نمودن محدوده کشندگی، آزمایش تعیین LC_{50} بر اساس روش استاندارد O.E.C.D در سال ۱۹۹۸ به صورت ساکن (static renewal) تعویض آب هر ۲۴ ساعت یکبار و جایگزینی مجدد غلظت‌های مورد نظر) و به مدت ۹۶ ساعت در ۶ تیمار با غلظت‌های ۸۰، ۴۰، ۲۰، ۱۰، ۵ و ۲/۵ نانوذرات نقره سنتز شده از جلبک دریایی همراه با یک تیمار شاهد و هر کدام در ۳ تکرار مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور پس از ذخیره سازی ماهیان به تعداد ۵ قطعه ماهی در هر آکواریوم با حجم ۵۰ l تلفات در طی ۴ روز (۹۶ ساعت)، هر ۲۴ ساعت یکبار بررسی و ثبت می گردد. بعد از ثبت تلفات، اقدام به تعیین LC_{10} ، LC_{50} و LC_{90} در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت با حدود اطمینان ۹۵٪ با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ و آزمون استاندارد پروبیت آنالیز شد. حداکثر غلظت مجاز نیز بعد از تعیین ۵۰٪ غلظت کشنده ۹۶ ساعته و تقسیم آن بر عدد ۱۰ محاسبه شد (۳۴). همچنین پیک جذب نانوذرات نقره که با دستگاه UV-vis به دست آمده بود با استفاده از نرم افزار Red-R نسخه ۱/۸۰ رسم شد.

نتایج

پس از اضافه نمودن نیترات نقره به عصاره جلبک سارگاسوم، تغییر رنگ کامل محلول حاصل بعد از گذشت ۹۰ دقیقه حاصل شد به طوری که رنگ محلول حاصل از قهوه‌ای متمایل به زرد به رنگ قهوه‌ای تیره تبدیل شد (تصویر ۱).

جهت اطمینان از سنتز نانوذرات نقره، پیک جذب نانوذرات در فواصل

سال‌های اخیر مطالعات متعددی در رابطه با تأثیر سمیت نانوذرات نقره سنتز شده با روش‌های شیمیایی بر ماهیان توسط محققین مختلف انجام شده است (۱، ۲، ۴، ۸، ۹، ۱۱، ۱۶، ۳۱). بنابراین بررسی سمیت نانوذرات سنتز شده با روش بیولوژیکی نیز قبل از توسعه هر چه بیشتر این روش سنتزی در صنعت نانوتکنولوژی، ضروری به نظر می رسد. مطالعه حاضر اولین مطالعه در زمینه سمیت نانوذرات نقره سنتز شده با روش بیولوژیکی بر روی ماهی کپور معمولی می باشد. نتایج این مطالعه می تواند به وضع استانداردها و قوانین زیست محیطی نانوذرات کمک کند.

مواد و روش کار

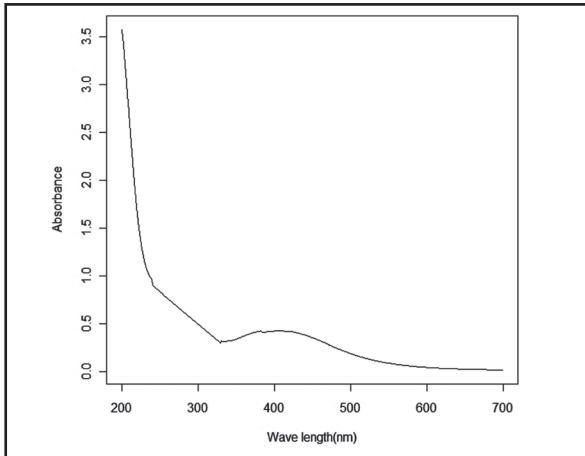
سنتز نانوذرات نقره با جلبک دریایی *Sargassum angustifolium*:

جلبک دریایی *Sargassum angustifolium* پس از جمع آوری از سواحل بوشهر به آزمایشگاه بهداشت آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز انتقال داده شدند. در آنجا پس از شستشو با آب مقطر به مدت یک هفته در زیر سایه قرار داده شدند تا خشک گردند (۳۰). نمونه‌های خشک شده توسط گریندر به شکل پودر در آورده شدند برای تهیه عصاره متانولی، ۱۰g از پودر خشک شده جلبک با ۴۰cc متانول مخلوط مخلوط شده و به مدت ۱۰ ساعت به حالت سکون ماند. سپس عصاره‌ها به مدت ۲۵ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰rpm دوبار سانتریفیوژ گردید و محلول رویی با استفاده از کاغذ صافی واتمن ۱، NO، فیلتر شد. جهت حذف حلال از عصاره از اپراتور تحت خلاء استفاده گردید. برای سنتز نانوذرات نقره از محلول نیترات نقره به عنوان دریافت کننده یا پیش ساز استفاده شد. مقدار ۱۷ mg نیترات نقره در ۱۰۰ cc آب مقطر حل شد. به منظور احیاء یون‌های Ag^+ ، cc عصاره جلبک به ۹۰cc محلول نیترات نقره ۱mM اضافه شد (۱۳). در نهایت برای تعیین ویژگی‌ها و اطمینان از تولید و کیفیت نانوذرات نقره سنتز شده از دستگاه‌های طیف‌سنج فرابنفش مرئی (UV-vis) مدل Perkin-Elmer، Lambda ۱۲ (جهت ی سنتز نانوذرات نقره)، میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) مدل ۹۰۶E LEO (برای تعیین شکل و اندازه نانوذرات و توزیع ذرات) استفاده شد.

تهیه و شرایط نگهداری ماهیان: تعداد ۱۰۰۰ قطعه ماهی کپور معمولی با میانگین وزنی $16/45 \pm 78/99$ (انحراف معیار \pm وزن)، از مزارع پرورش ماهی اطراف شوشتر تهیه و به آزمایشگاه تحقیقاتی بخش بهداشت آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز منتقل گردیدند. ماهی‌ها برای تطابق با شرایط آزمایشگاه به مدت دو هفته در آکواریوم‌های تمیز و کاملاً ضد عفونی شده با حجم ۱۵۰ l همراه با هوادهی ملایم نگهداری شدند و در طول این مدت به میزان ۲٪ وزن بدن، در دو نوبت (صبح و عصر) با غذای کنسانتره تجاری غذادهی شدند.

تعیین سمیت نانوذرات نقره سنتز شده از جلبک دریایی در ماهی کپور معمولی: پس از اتمام دوره سازگاری و ۲۴ ساعت قبل از انجام

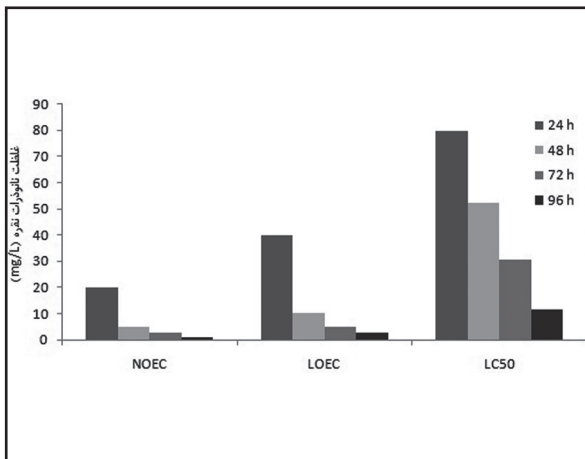




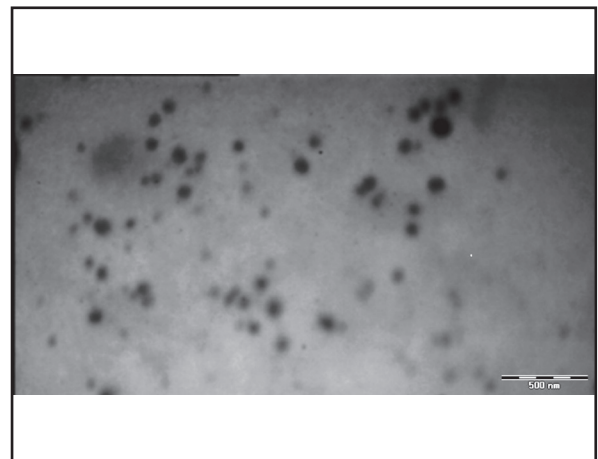
تصویر ۲. طیف UV-Vis نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از جلبک *Sargassum angustifolium*.



تصویر ۱. تغییر رنگ محلول حاصل با گذشت زمان از قهوه‌ای متمایل به زرد کم‌رنگ به قهوه‌ای تیره پس از اضافه نمودن محلول نیترات نقره.



تصویر ۴. مقایسه مقادیر NOEC، LEOC، LC50 نانوذرات نقره سنتز شده از جلبک سارگاسوم در ماهی کپور معمولی در زمان‌های مختلف.



تصویر ۳. تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) از نانوذرات نقره سنتز شده.

زمانی مختلف با استفاده از دستگاه طیف‌سنج فرابنفش مرئی (UV-Vis) در محدوده طول موج‌های ۲۰۰-۷۰۰ nm اندازه‌گیری شد. بهترین پیک بعد از گذشت ۹۰ دقیقه از زمان واکنش و در محدوده ۴۰۰ nm مشاهده شد که پیک تشکیل شده در این محدوده نشان دهنده احیاء یون‌های نقره و در نتیجه سنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره جلبک سارگاسوم می‌باشد (تصویر ۲).

طبق تصاویر به‌دست آمده از TEM، میانگین اندازه نانوذرات نقره سنتز شده، ۳۲/۳۱ nm و با شکل کروی بودند (تصویر ۳). به طوری که بر اساس تصویر ۳، جدا از شکل کروی و اندازه مناسب نانوذرات نقره سنتز شده، تمام ذرات دارای پراکندگی مناسب بوده و تقریباً به خوبی در همه جای سطح نمونه توزیع شده‌اند و در تماس مستقیم با همدیگر نیستند.

آزمایش سمیت حاد: طبق نتایج آزمایشات مقدماتی که در غلظت‌های صعودی ۰/۵، ۱، ۲/۵، ۵، ۱۵، ۲۵، ۳۵، ۴۵، ۵۵، ۶۵، ۷۵، ۸۵، ۹۵ و ۱۰۵ نانوذرات نقره سنتز شده از جلبک دریایی *Sargassum angustifolium* انجام شد، تلفات در ماهیان ۵ ساعت پس از مواجهه بالاترین غلظت شروع شد و تمامی ماهیان قرار گرفته در غلظت‌های



جدول ۱. درصد مرگ و میر ماهیان کپور معمولی در مواجهه با غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره در زمان‌های مختلف.

غلظت نانوذرات نقره (mg/L)	درصد مرگ و میر (%) در زمان‌های مختلف			
	۹۶ ساعت	۷۲ ساعت	۴۸ ساعت	۲۴ ساعت
شاهد	۰	۰	۰	۰
۲/۵	۲۲	۰	۰	۰
۵	۴۸/۵۲	۱۵/۱۰	۰	۰
۱۰	۶۲	۲۷/۵۲	۸/۵۲	۰
۲۰	۸۰	۴۸/۵۲	۲۲	۰
۴۰	۹۵/۱۰	۷۵/۱۰	۵۵/۱۰	۳۵/۱۰
۸۰	۱۰۰	۹۵/۱۰	۷۵/۱۰	۴۲

بالا کمتر مشاهده می‌شد.

طی آزمایش سمیت حاد میزان تلفات در تیمار شاهد در طی ۹۶ ساعت و همچنین در غلظت ۲/۵ mg/l تا مدت زمان ۷۲ ساعت صفر بود. اولین تلفات در غلظت ۴۰ mg/l در زمان ۲۴ ساعت مشاهده شد. عمده تلفات در مواجهه با نانوذرات نقره در زمان و غلظت‌های بالا بوده است (جدول ۱) به طوری که در غلظت ۸۰ mg/l بعد از ۹۶ ساعت مواجهه، ۱۰۰٪ مرگ و میر مشاهده شد. در غلظت ۲/۵ mg/l که کمترین غلظت انتخابی برای تعیین LC₅₀ در مطالعه حاضر مشخص شده است تلفات فقط در زمان ۹۶ ساعت پس از مواجهه با نانوذرات نقره سنتز شده مشاهده گردید.

نتایج نشان داد که میزان LC₅₀ در ماهی کپور معمولی بعد از مواجهه با نانوذرات نقره سنتز شده از جلبک دریایی سارگاسوم در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت به ترتیب 0.004 ± 0.004 ، 0.012 ± 0.012 ، 0.079 ± 0.079 ، 0.050 ± 0.050 ، 0.19 ± 0.19 و 0.73 ± 0.73 می‌باشد. میزان LC₁₀، LC₅₀ و LC₉₀ در طی ۹۶ ساعت به ترتیب 0.019 ± 0.019 ، 0.05 ± 0.05 ، 0.19 ± 0.19 و 0.73 ± 0.73 می‌باشد. تعیین گردید که نشان دهنده سمیت بیشتر نانوذره مذکور در غلظت‌های بالاتر می‌باشد. طبق جدول ۲ میزان LC₅₀ با افزایش زمان مواجهه، کاهش یافته است (0.004 ± 0.004 mg/l، 0.012 ± 0.012 mg/l، 0.079 ± 0.079 mg/l). که نشان می‌دهد هرچقدر زمان مواجهه با نانوذرات نقره در ماهی کپور معمولی افزایش یابد، غلظت کمتری از نانوذرات نقره برای مرگ و میر ۵۰٪ ماهیان نیاز می‌باشد. حداکثر غلظت مجاز نانوذرات نقره مذکور برای ماهی کپور معمولی در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت به ترتیب 0.079 ، 0.05 ، 0.19 و 0.73 mg/l تعیین گردید.

همچنین مقادیر حداقل غلظت مؤثر (LOEC) و غلظت بدون تاثیر نانوذرات نقره (NOEC) و حداکثر غلظت مجاز (MATC) که از مقادیر LC محاسبه شد به ترتیب 0.019 ، 0.05 و 0.73 بدست آمد.

بحث

در انجام تست سمیت مواد شیمیایی در آبزیان، تعیین محدوده کشندگی سم اولین مرحله از مطالعات توکسیکولوژی است که به بررسی

غلظت کشنده میانگین یا LC₅₀ مواد شیمیایی محلول در آب می‌پردازد. سمیت یون نقره نسبت به نانوذرات نقره بهتر درک شده است. یون نقره سمیت بسیار بالایی برای ماهی ایجاد می‌کند (۲۲). سمیت نانوذرات نقره سنتز شده با روش شیمیایی بر ماهیان و سایر آبزیان در مطالعات گوناگون توسط محققین مختلفی گزارش شده است (۳۹، ۱۰، ۴). در روش شیمیایی سنتز نانوذرات، استفاده از ترکیبات شیمیایی سمی بیشتر در مقایسه با روش بیولوژیکی، سبب شده تا استفاده از آنها در زیست پزشکی به ویژه در زمینه‌های کلینیکی، کشاورزی، دامپزشکی و شیلات به دلیل ناسازگاری و آلودگی محیط زیست و اثرات منفی آنها بر روی اکوسیستم‌های آبی با محدودیت مواجه شود، بنابراین، اخیراً سنتز نانوذرات نقره با استفاده از گیاهان و جلبک‌های دریایی به خاطر سازگاری این روش با محیط زیست، خیلی متداول شده است (۳۳، ۱۸). بنابراین لازم است که سمیت نانوذرات نقره سنتز شده با روش بیولوژیکی که در سنتز آن از منابع زیستی موجود در طبیعت استفاده می‌شود نیز شناخته شود. در این تحقیق سنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره آبی جلبک *Sargassum angustifolium* به صورت خارج سلولی و با روش بیوژنیک انجام شد. نانوذرات نقره از طریق احیاء Ag⁺ به Ag⁰ با اضافه نمودن عصاره جلبک به محلول ۱ mM نیترات نقره تشکیل شدند. عمل احیاء یون‌های نقره در محلول حاصل به وسیله برخی از ترکیبات از جمله فلاونوئیدها، آنزیم‌ها، پروتئین‌ها و غیره که در جلبک قهوه‌ای سارگاسوم وجود دارند انجام می‌شود (۱۵). به خوبی شناخته شده که نانوذرات نقره پس از سنتز با استفاده از جلبک‌های قهوه‌ای به رنگ قهوه‌ای متمایل به قرمز یا تیره تبدیل می‌شوند (۱۳)، بنابراین در مطالعه حاضر تغییر رنگ محلول حاصل از قهوه‌ای متمایل زرد کم رنگ به رنگ قهوه‌ای تیره نشان دهنده تشکیل نانوذرات نقره می‌باشد (تصویر ۱). در این مطالعه پیک جذب نانوذرات بعد از گذشت ۹۰ دقیقه از زمان واکنش در طول موج ۴۰۰ nm شناسایی شد (تصویر ۲). این پیک نشان دهنده احیاء یون‌های نقره و تشکیل نانوذرات نقره با استفاده از عصاره جلبک *Sargassum angustifolium* می‌باشد. Singaravelu و همکاران در سال ۲۰۰۷ سنتز نانوذرات طلا با استفاده از عصاره جلبک *Sargassum wightii* را در طی ۲۴ ساعت آنکوباسیون انجام دادند. همچنین در مطالعه‌ای توسط Kumar و همکاران در سال ۲۰۱۲ سنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره جلبک *Sargassum tenerrimum* در طی ۲۰ دقیقه انجام شد که این امر از طریق تغییر رنگ قابل مشاهده است. طبق تصاویر به دست آمده از TEM، میانگین اندازه نانوذرات ۴۲/۳۱ nm و با شکل کروی بودند، نانوذرات نقره سنتز شده در مطالعه حاضر دارای پراکندگی مناسب بوده و تقریباً به خوبی در همه جای سطح نمونه توزیع شده‌اند و در تماس مستقیم با همدیگر نیستند (تصویر ۳). این امر می‌تواند به واسطه نقش پروتئین‌ها در بیوسنتز نانوذرات نقره باشد (۲۳)، زیرا یکی از ترکیباتی که در جلبک‌های دریایی در تشکیل و پایداری نانوذرات نقره نقش



جدول ۲. غلظت کشندگی (LC_{50}) نانوذرات نقره سنتز شده از جلبک سارگاسوم در ماهی کپور معمولی.

غلظت کشنده mg/l (LC_{50})	۲۴ ساعته	۴۸ ساعته	۷۲ ساعته	۹۶ ساعته
LC_1	$34/43 \pm 0/04$	$14/23 \pm 0/12$	$0/11 \pm 0/07$	$0/05 \pm 0/19$
LC_5	$77/91 \pm 0/04$	$50/56 \pm 0/12$	$29/01 \pm 0/07$	$9/73 \pm 0/19$
LC_{95}	$127/40 \pm 0/04$	$86/88 \pm 0/12$	$58/14 \pm 0/07$	$22/81 \pm 0/19$

جدول ۳. غلظت کشندگی نانوذرات نقره در گونه‌های مختلف ماهیان.

منبع	میزان LC_{50} (mg/L)	طول دوره مواجهه (ساعت)	اندازه نانوذرات نقره (nm)	گونه ماهی
(۱۰)	۷۰۷	۴۸	۴۴/۵	زبرا
(۷)	۲۵۰	۲۴	۵-۲۰	زبرا
(۶)	۳۴/۶	۹۶	۴۹/۶	مداکای ژاپنی
(۳۸)	۰/۸۷	۹۶	۲۹/۹	مداکا
(۱۶)	۹	۹۶	۳۵	ماهی قنات سرچرب
(۲)	۵-۱۰۰	۷۲	۲۰-۵	جنین زبرا
(۴)	۶۳	۴۸	۸۱	سوف

و محیط زیست سمی می‌باشند، علاوه بر این سمیت نانوذرات می‌تواند با توجه به گونه مورد آزمایش متفاوت باشد (۱۷). نتایج به دست آمده از LC_{50} در زمان‌های مختلف نشان می‌دهد که مقدار آن در ۲۴ ساعت اولیه آزمایش همواره بیشتر از LC_{50} در پایان ۹۶ ساعت می‌باشد پس می‌توان گفت در مطالعه ما مدت زمان مواجهه با نانوذرات نقره نیز یکی از فاکتورهای مؤثر بر سمیت در ماهی کپور معمولی بوده است که نشان می‌دهد وقتی ماهی در معرض غلظت ثابتی از نانوذرات نقره باشد با گذشت زمان، فرصت بیشتری برای تاثیرگذاری روی ماهی پیدا می‌کند، زیرا یکی از عوامل تاثیرگذار در مسمومیت آبزیان علاوه بر غلظت سم، مدت زمان مواجهه با سم می‌باشد (۲۹). در مطالعات مختلف سمیت نانوذرات نقره در گونه‌های مختلف ماهیان متفاوت گزارش شده است (جدول ۳).

Alishahi و همکاران در سال ۲۰۱۱ میزان LC_{50} نانوذرات نقره در چهار گونه ماهی کپور، برزم، افرا و گویی را به ترتیب $0/77$ ، $0/17$ ، $0/12$ و $7/35$ گزارش نمودند و بیان کردند که ماهیان اکواریومی نسبت به ماهیان وحشی برزم و کپور مقاومت بیشتری در برابر سمیت نانوذرات نقره نشان دادند. Shahbazzadeh و همکاران در سال ۲۰۰۹، LC_{50} $h-96$ نانوذرات نقره را برای بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان، $2/3$ mg/L بدست آوردند. در مطالعه Soltani و همکاران در سال ۲۰۱۱، میزان LC_{50} ۹۶ ساعته در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان مواجهه شده با نانوذرات نقره سنتز شده با روش شیمیایی، 5 mg/l گزارش شد. Hedayati و همکاران در سال ۲۰۱۲ میزان LC_{50} در ماهی کپور معمولی را در مواجهه با دو نوع نانوذره نقره با نام تجاری Nanosil (کمتر از 100 nm) و Nanocid (18 nm) به ترتیب $73/8$ و $0/43$ گزارش نمودند که یکی از دلایل تفاوت در میزان 50% غلظت کشندگی تفاوت در اندازه نانوذرات گزارش شد. Johari و همکاران در سال ۲۰۱۳ حد متوسط کشندگی نانوذرات نقره

دارد پروتئین‌ها هستند. مطالعات نشان داده‌اند که بیومولکول‌هایی مانند پروتئین‌ها، فنول‌ها، فلاونوئیدها و برخی از ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در گیاهان دریایی قادر به احیاء یون‌های فلزی به فرم نانو می‌باشند و همچنین نقش مهمی را در پوشش نانوذرات سنتز شده و پایداری آنها ایفاء می‌نمایند (۳۶). در تعیین بیواندیکاتورها لازم است آنها از بین گونه‌هایی انتخاب شوند که فراوانی زیادی در محیط داشته باشند و کشت و پرورش آنها آسان باشد (۳۳). از طرفی دیگر در حال حاضر با توجه به رهاسازی بیشتر این نانومواد به آب‌های شیرین و آلودگی بیشتر این منابع آبی بیشتر مطالعات در رابطه با اثرات سمی نانوذرات نقره بر روی گونه‌های آب شیرین متمرکز شده است (۲۷) بنابراین در این مطالعه تست سمیت نانوذرات نقره سنتز شده از جلبک دریایی در ماهی کپور معمولی که از گونه‌های رایج و اصلی پرورشی و با سازش پذیری بالا در شرایط اسارت می‌باشد و به وفور در اکثر منابع آبی شیرین یافت می‌شود انجام شد. در آزمایش مقدماتی تلفات در ماهیان ۵ ساعت پس از مواجهه در بالاترین غلظت (105 mg/l) شروع شد. در تست سمیت حاد با نانوذرات نقره با اندازه $29/9$ nm در ماهی مداکا توسط WU و Zhou در سال ۲۰۱۳، در غلظت $4/8$ mg/l پس از ۱۲ ساعت همه ماهیان تلف شدند و میزان LC_{50} ۹۶ ساعته $0/87$ mg/l محاسبه شد. در مطالعه ما میزان LC_{50} در ماهی کپور معمولی بعد از مواجهه با نانوذرات نقره سنتز شده از جلبک دریایی در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت به ترتیب $29/01 \pm 0/07$ ، $50/56 \pm 0/12$ ، $77/91 \pm 0/04$ mg/l و $9/73 \pm 0/19$ تعیین گردید. در مطالعه‌ای توسط Bilberg و همکاران در سال ۲۰۱۲ در ماهی زبرا 50% غلظت کشندگی ۴۸ ساعته نانوذرات 84 $\mu g/l$ نقره بوده است که نشان از سمیت بیشتر این نانوذره که با روش شیمیایی سنتز شده در مقایسه با تحقیق ما می‌باشد زیرا در سنتز نانوذرات نقره با روش شیمیایی از موادی استفاده می‌شود که برای موجودات زنده



تشکر و قدردانی

از جناب آقای مهندس علی فخری کارشناس ارشد محترم مرکز مطالعات و پژوهش‌های خلیج فارس دانشگاه خلیج فارس بوشهر جهت همراهی در جمع آوری جلبک‌ها و معاونت محترم پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز و کلیه عزیزانی که در انجام کار ما را یاری کردند سپاسگزاری می‌نمایم.

References

1. Alishahi, M., Mesbah, M., Ghorbanpoor, M. (2011) Toxicity study of silver nanoparticles in four fish species. *Iran J Vet Res.* 7: 36-41.
2. Asharani, P.V., Wu, Y.L., Gong, Z., Valiyaveetil, S. (2008) Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. *Nanotechnology.* 19: 1-8.
3. Balantrapu, K., Goia, D. (2009) Silver nanoparticles for printable electronics and biological applications. *J Mater Res.* 24: 2828-2836.
4. Bilberg, K., Hovgaard, M.B., Besenbacher, F., Baatrup, E. (2012) In Vivo Toxicity of Silver Nanoparticles and Silver Ions in Zebrafish (*Danio rerio*). *J Toxicol.* 1: 1-9.
5. Bilberg, K., Malte, H., Wang, T., Baatrup, E. (2010) Silver nanoparticles and silver nitrate cause respiratory stress in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*). *Aquat Toxicol.* 96: 159-165.
6. Chae, Y.J., Pham, C.H., Lee, J., Bae, E., Yi, J., Gu, M.B. (2009) Evaluation of the toxic impact of silver nanoparticles on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat Toxicol.* 94: 320-327.
7. Choi, J.E., Kim, S., Ahn, J.H., Youn, P., Kang, J. S., Park, K., Yi, J., Ryu, D.Y. (2010) Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish. *Aquat Toxicol.* 100: 151-9.
8. Monfared, A.L., Soltani, S. (2013) Effects of silver nanoparticles administration on the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): histological and biochemical studies. *EUR J Exp Biol.* 3: 285-289.
9. Griffith, R.J., Hyndman, K., Denslow, N.D, Barber, D.S. (2009) Comparison of molecular and histological changes in zebrafish gills exposed

با اندازه ۱۶/۶nm نانومتر را در جنین، لارو و بچه ماهی جوان قزل آلابی رنگین کمان به ترتیب ۰/۲۵ mg/l، ۰/۷۱ و ۲/۱۶ گزارش کردند. سمیت نانوذرات نه تنها به شکل شیمیایی و اندازه ذرات و روش سنتز شده بلکه به فاکتورهای مختلفی از قبیل نوع گونه، وضعیت فیزیولوژیکی، فعل و انفعالات تغذیه‌ای و روش تجویز بستگی دارد (۱۷). بنابراین لازم است که سمیت نانوذرات به منظور شناخت بهتر اثرات سمی شان در محیط‌های آبی بر روی گونه‌های مختلف جداگانه ارزیابی شود. در مطالعه حاضر علاوه بر متفاوت بودن نوع گونه ماهی، روش سنتز نانوذره مورد آزمایش نیز متفاوت است بنابراین قابل انتظار است که نتایج حاصل از سمیت و LC_{50} در مطالعه حاضر با سایر مطالعات متفاوت باشد. مقایسه نتایج LC_{50} مطالعه حاضر با مطالعات سایر محققین (۱) و (۱۱) که در ماهی کپور معمولی انجام شده است نشان می‌دهد که نانوذرات نقره سنتز شده با روش بیولوژیکی نسبت به نانوذرات سنتز شده با روش شیمیایی دارای سمیت کمتری می‌باشند. یکی از دلایل اختلاف در سمیت علاوه بر تفاوت در اندازه ذرات، شرایط آزمایش و اندازه ماهی، می‌تواند به دلیل پایداری بیشتر نانوذرات به واسطه بیومولکول‌های موجود در جلبک دریایی و در نتیجه رهاسازی کمتر یون‌های نقره در نانوذرات سنتز شده با روش بیولوژیکی باشد. برخی محققین سمیت بالاتر نانوذرات نقره نسبت به یون‌های نقره را علاوه بر خواص فیزیکی شیمیایی ذرات، ناشی از رهاسازی یون‌های نقره از نانوذرات نقره ذکر کرده‌اند (۲۱)، (۳۷). مقایسه میزان مرگ و میر ماهیان در تیمارهای مواجهه با نانوذرات نقره با گروه شاهد که هیچ گونه تلفاتی در آن مشاهده نشد نشان می‌دهد که تنها عامل مرگ و میر ماهیان در تیمارهای مختلف، افزودن نانوذرات نقره به آب بوده است. نتایج LC_{100} ، ۹۶ ساعت به دست آمده در تحقیق حاضر در زمان‌های مختلف نشان از ارتباط مستقیم بین سمیت و غلظت نانوذرات نقره می‌باشد (LC_{100} : ۰/۰۵/mg) و LC_{50} : ۲۲/۸۱ mg/l). از نظر علایم رفتاری فعالیت شدید ماهیان و پریدن آنها از آب بلافاصله پس از مواجهه با غلظت‌های بالای نانوذرات نقره احتمالاً نشان دهنده ایجاد استرس شدید و تاثیر سمیت سریع نانوذره نقره سنتز شده در غلظت‌های بالا در مقایسه با غلظت‌های پایین تر می‌باشد. بنابراین ماهیان در پاسخ به این عوامل و فرار از وضعیت، چنین عکس العمل‌هایی از نظر رفتاری نشان می‌دادند. در مطالعه صورت گرفته توسط Bilberg و همکاران در سال ۲۰۱۲ بر ماهی زیرا در مواجهه با نانوذرات نقره علایم رفتاری غیرطبیعی و استرس بلافاصله ۳۰ دقیقه بعد از مواجهه ظاهر گردید که دلیل احتمالی آن تاثیر سریع سمیت نانوذره نقره ذکر شده است به طوری که ابتدا ماهیان در کف مخزن بی حرکت مانده و میزان تنفس شان افزایش پیدا کرد و سپس با آمدن به ستون آب، تعادل شان را از دست داده و در کف سقوط می‌کردند. همچنین تعدادی از ماهیان قبل از دست دادن تعادل حرکات پرشی و شنای چرخشی از خود نشان دادند که از نظر علایم رفتاری با مطالعه ما تا حدودی مشابه می‌باشد.



- to metallic nanoparticles. *Toxicol Sci.* 107: 404-415.
10. Griffitt, R.J., Luo, J., Gao, J., Bonzongo, J.C., Barber, D.S. (2008) Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. *Environ Toxicol Chem.* 27: 1972-1978.
 11. Hedayati, A., Shaluei, F., Jahanbakhshi, A. (2012) Comparison of Toxicity Responses by Water Exposure to Silver Nanoparticles and Silver Salt in Common Carp (*Cyprinus carpio*). *Global Vet.* 8: 179-184.
 12. Kahru, A., Dubourguier, H.C. (2010) From ecotoxicology to nanoecotoxicology. *Toxicol.* 269: 105-119.
 13. Jegadeeswaran, P., Shivaraj, R., Venkatesh, R. (2012) Green synthesis of silver nanoparticles from extract of *Padina tataromatica* laef. *Dig J Nanomater Biostruct.* 7: 991-998.
 14. Johari, S.A., Kalbassi, M.R., Soltani, M., Yu, I.J. (2013) Toxicity comparison of colloidal silver nanoparticles in various life stages of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Iran J Fish Sci.* 12: 76 -95.
 15. Kumar, P., Senthamil Selvi, S., Lakshmi Prabha, A., Prem Kumar, K., Ganeshkumar, R.S., Govindaraju, M. (2012) Synthesis of silver nanoparticles from *Sargassum tenerrimum* and screening phytochemicals for its antibacterial activity. *Nano Biomed Eng.* 4: 2-16.
 16. Laban, G., Nies, L.F., Turco, R.F., Bickham, J.W., Sepulveda, M.S. (2010) The effects of silver nanoparticles on fathead minnow (*Pimephales promelas*) embryos. *Ecotox.* 19: 185-195.
 17. Li, H., Zhang, J., Wang, T., Luo, W., Zhou, Q., Jiang, G. (2008) Elemental selenium particles at nano-size (Nano-Se) are more toxic to Medaka (*Oryzias latipes*) as a consequence of hyper-accumulation of selenium: A comparison with sodium selenite. *Aquat Toxicol.* 89: 251-256.
 18. Li, S., Shen, Y., Xie, A., Yu, X., Qiu, L., Zhang, L., Zhang, Q. (2007) Green synthesis of silver nanoparticles using *Capsicum annuum* L. extract. *Green Chem.* 9: 852-858.
 19. Luoma, S.N., Rainbow, P.S. (2005) Why is metal bioaccumulation so variable? Biodynamics as a unifying concept. *Environ Sci Technol.* 39: 1921-1931.
 20. Mansuya, P., Aruna, P., Sridhar, S., Kumar, J.S., Babu, S. (2010) Antibacterial activity and qualitative phytochemical analysis of selected seaweeds from Gulf of Mannar Region. *J Exp Sci.* 1: 23-26.
 21. Mayer, G.D., Leach, A., Kling, P., Olsson, P.E., Hogstrand, C. (2003) Activation of the rainbow trout metallothionein—a promoter by silver and zinc. *J Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol.* 134: 181-188.
 22. Naddy, R.B., Mcnerney, G.R., Gorsuch, J.W., Bell, R.A., Kramer, J.R., Wu, K.B., Paquin, P.R. (2011) The effect of food on the acute toxicity of silver nitrate to four freshwater test species and acute-to-chronic ratios. *Ecotox.* 20: 2019-2029.
 23. Nithya, R., Ragunathan, R. (2009) Synthesis of silver nanoparticle using *Pleurotus sajor caju* and its antimicrobial study. *Dig J Nanomater Biostruct.* 4: 623-629.
 24. OECD. (1998) Guidelines for the Testing of Chemicals. Section 2: Effects on Biotic Systems Test Test Guideline No 212: Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages. OECD, Paris, France.
 25. Patakfalvi, R., Dekany, I. (2010) Preparation of silver nano-particles in liquid crystalline systems. *Colloid Polym Sci.* 280: 461-470.
 26. Handy, R.D., Owen, R., Valsami-Jones, E. (2008) The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicol.* 17: 315-325.
 27. Robert, J., Griffitt, Y., Nancy, J., Brown-Peterson, Y., Daniel, A., Savinz, C., Steve, M., Idrissa, B., Ryan, R.A., Marius, B. (2012) Effect of chronic nanoparticle silver exposure to adult and juvenile sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*). *Environ Toxicol Chem.* 31: 160-167.
 28. Shahbazzadeh, D. A., Ahari. H. B., Rahimi. N. M., Dastmalchi. F., Soltani, M. (2009) The effects of Nanosilver on survival percentage of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Pakistan J of Nutr.* 8: 1178-1180.



29. Sharifpoor, E., Soltani, M., Javadi, M. (2003) Determination LC50 and damages caused by pesticide Endosulfan in Beluga juvenile. Iran J Fish Sci. 12: 69-84.
30. Singaravelu, G., Arockiamary, J.S., Ganesh Kumar, V., Govindaraju, K. (2007) A novel extracellular synthesis of monodisperse gold nanoparticles using marine alga, *Sargassum wightii* Greville. Colloids Surf B Biointerfaces. 57: 97-101.
31. Soltani, M., Esfandiary, M., Sajadi, M.M., Khazraenia, S., Bahonar, A. R., Ahari, H. (2011) Effect of nanosilver particles on hatchability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) egg and survival of the produced larvae Iran J Fish Sci. 10: 167-176.
32. Song, K.C., Lee, S.M., Park, T.S., Lee, B.S. (2009) Preparation of colloidal silver nanoparticles by chemical reduction method. Korean J. Chem. Eng. 26: 153-155.
33. Toolabi, A., Zare, M.R., Rahmani, A., Asadi, A., Sarkhosh, M., Hosseinzadeh, A., Abedinezhad, M. (2013) Compare and determine the potential toxicity of nanoparticles ZnO using four common bacteria in sewage sludge. J North Khorasan Uni Medical Sci. 5: 397- 403.
34. Menrad, A., Drobne, D., Jemec, A. (2011). Ecotoxicity of nanosized TiO₂. Review of in vivo data. Environ Pollut. 159: 677-684.
35. Tripathi, R.M., Saxena, A., Gupta, N., Kapoor, H., Singh, R.P. (2010) Biological synthesis of silver nanoparticles by using Onion (*Allium Cepa*) extract and their antibacterial activity. Digest J Nanomat Biostruct. 5: 323-330.
36. Vedpriya, A. (2010) Living Systems: eco-friendly nanofactories. Dig J. Nanomater Bios. 5: 9-21.
37. Walker, P.A., Kille, P., Hurley, A., Bury, N.R., Hogstrand, C. (2008) An in vitro method to assess toxicity of waterborne metals to fish. Toxicol. Appl Pharmacol. 230: 67-77.
38. Wu, Y., Zhou, Q. (2013) Silver nanoparticles cause oxidative damage and histological changes in medaka (*Oryzias latipes*) after 14 days of exposure. Environ Toxicol Chem. 32: 165-173.
39. Yeo, M.K., Kang, M. (2008) Effects of nanometer sized silver materials on biological toxicity during zebrafish embryogenesis. Bull K Chem Soc. 29: 1179-1184.



Toxicity study of silver nanoparticles synthesized using seaweed *Sargassum angustifolium* in common carp, *Cyprinus carpio*

Bitá, S.^{1*}, Mesbah, M.², Shahryari, A.³, Ghorbaanpoor Najafabadi, M.⁴

¹Department of Fisheries, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar- Iran

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

³Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz- Iran

⁴Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz- Iran

(Received 13 February 2016, Accepted 5 April 2016)

Abstract:

BACKGROUND: Application of green chemistry to the synthesis of nanomaterials is of vital importance in medicinal and technological aspects. Recently, synthesis of silver nanoparticles using plants and marine macro algae to adapt this approach to the environment, has become more popular. **OBJECTIVES:** The purpose of this study is biological synthesis of silver nanoparticles using seaweed, *Sargassum angustifolium*, and determining its toxicity in common carp. **METHODS:** First, synthesis of silver nanoparticles using *Sargassum* algae was conducted and then acute toxicity of these silver nanoparticles was investigated at static renewal condition during 96 hours in common carp according to standard methods (1998) OECD. **RESULTS:** TEM analysis showed that the average size of the bionanoparticles was found to be 32.54 nm and spherical in shape. The toxicity results showed that the LC₅₀ at 24, 48, 72 and 96-h after exposure was 79.54 ± 0.007, 52.17 ± 0.006, 30.62 ± 0.008 and 11.34 ± 0.016 mg/l respectively. **CONCLUSIONS:** Analysis related to the characterization of the properties of silver nanoparticles proves bioreduction of silver ions by *sargassum* seaweed extract. According to the results the mortality rates of common carp showed an increasing trend with increasing concentration and exposure time, which indicates the toxicity of this substance in high concentration for common carp.

Keyword: biosynthesis, common carp, *Sargassum angustifolium* seaweed, silver nanoparticles, toxicity

Figure Legends and Table Captions

Figure 1. Change of color from pale yellow to dark brown by the addition of silver nitrate.

Figure 2. UV-Vis absorption spectrum of silver nanoparticles synthesized by treating 1mM AgNO₃ solution with *Sargassum angustifolium* extract.

Figure 3. TEM images of AgNPs synthesized by *Sargassum angustifolium*.

Figure 4. Acute toxicity testing statistical endpoints of AgNP.

Table 1. Mortality rate in common carp exposed to different concentrations of silver nanoparticles at different times.

Table 2. Lethal Concentrations (LC_{10,99}) of synthesis silver nanoparticles (mean ± Standard Error) depending on time (24-96h) for common carp.

Table 3. Lethal Concentrations of silver nanoparticles in different fish species.

