ISSN: 2476-6917; Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(3):465-472

In vivo Comparative Toxicity of Silver Nanoparticles and Bio-productivity in Zebrafish (Embryo and Adult Stages)

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Mashjoor S.[1] *PhD*,
Alishahi M.*[2] *PhD*,
Tulaby Dezfuly Z.[2] *PhD*

How to cite this article
Mashjoor S, Alishahi M, Tulaby Dezfuly Z. In vivo Comparative Toxicity of Silver Nanoparticles and Bio-productivity in Zebrafish (Embryo and Adult Stages). Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(3):465-472.

ABSTRACT

Aims The bio-toxicity of silver nanoparticles (AgNPs) in the aquatic ecosystem and the detection of lethal concentrations of this material are of importance. The aim of this study was in vivo comparative toxicity of silver nanoparticles and bio-productivity in zebrafish (*Danio rerio*) in embryo and adult stages.

Materials & Methods The present experimental study was carried out on 30 fertilized eggs and 30 adult zebrafish and the effects of chemical and bio-productivity of AgNPs were evaluated by brown seaweed (*Sargassum boveanum*) in evolutionary stages of the embryo and adult zebrafish with a control group and in incremental concentrations. The mortality rate was recorded at 24, 48, 72, and 96 hours after exposure and the data were analyzed by EPA Probit Analysis 1.5 and SPSS 19 softwares, using one-way analysis of variance and Duncan's multiple range test.

Findings The toxicity of both types of AgNPs in both evolutionary stages was increased with increasing concentrations and time ($p<0.05$). After 96 hours, the lethal concentration 50 (LC50) in adult fish was 0.788mg/l for chemical AgNPs and 0.409mg/l for bio-produced AgNPs. Mortality rate at the highest concentration (3mg/l) of AgNPs at 72 and 96 hours in all groups was 100%.

Conclusion Comparison of the toxicity result showed that the biosynthesis form of AgNPs is more toxic potential than chemical form of AgNPs. It seems the sensitivity of embryo stage to both of silver nanoparticles more than to mature stage.

Keywords Toxicity; Danio rerio; Brown Seaweed; Silver Nanoparticles

CITATION LINKS

[1] Paradigms to assess the environmental impact of manufactured nanomaterials [2] Nanotechnology-related environmental, health, and safety research: Examining the national strategy [3] Manufactured nanoparticles: an overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications [4] Anti-biofilm activity of silver nanoparticles against different microorganisms [5] Biological synthesis of silver nanoparticles from aqueous extract of endophytic fungus Aspergillus terrus and its antibacterial activity [6] Nanosilver [7] Toxicity effect of silver nanoparticles in brine shrimp Artemia [8] Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods [9] Silver nanoparticles: Mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects [10] Synthesis of silver nanoparticles using extract of Neem leaf and triphala and evaluation of their Antimicrobial activities [11] Intracellular synthesis of gold nanoparticles using alga Tetraselmis kochinensis [12] Green synthesis of silver nanoparticles: An approach to overcome toxicity [13] Zebrafish: An in vivo model for nano EHS studies [14] Study of acute toxicity of aqueous suspensions of chemical and biogenic silver nanoparticles produced by marine algae, Sargassum boveanum on Artemia fransiscana (Nauplius and adult) as model organism [15] The green synthesis, characterization and antimicrobial activities of silver nanoparticles synthesized from green alga Enteromorpha flexuosa (wulfen) [16] Toxicity of various silver nanoparticles compared to silver ions in Daphnia magna [17] Assays with Daphnia magna and Danio rerio as alert systems in aquatic toxicology [18] Test No. 203: Fish, acute toxicity test [19] Toxicity assessment of iron oxide nanoparticles in zebrafish (Danio rerio) early life stages [20] In vivo toxicity of silver nanoparticles and silver ions in zebrafish (Danio rerio) [21] Molecular toxicity mechanism of nanosilver [22] Nanoecotoxicity effects of engineered silver and gold nanoparticles in aquatic organisms [23] Evaluation of the toxic impact of silver nanoparticles on Japanese medaka (Oryzias latipes) [24] Effects of aqueous suspensions of titanium dioxide nanoparticles on Artemia salina: Assessment of nanoparticle aggregation, accumulation, and toxicity [25] Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells [26] Biosynthesis of silver nanoparticles from the marine seaweed Sargassum wightii and their antibacterial activity against some human pathogens [27] Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryos

[1]Marine Biology Department, Marine Science & Technology Faculty, Hormozgan University, Bandar Abbas, Iran
[2]Clinical Sciences Department, Veterinary Medicine Faculty, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Correspondence
Address:Shahid Chamran University of Ahvaz, Golestan Boulevard, Ahvaz, Iran. Postal Code: 8315161357
Phone: -
Fax: +98 (61) 33329763
alishahimoj@gmail.com

Article History
Received: April 28, 2017
Accepted: October 24, 2017
ePublished: September 22, 2018

Copyright© 2018, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

www.SID.ir

مقایسه سمیت نانوذرات نقره شیمی و زیست‌تولیدی "در محیط زنده" در مدل جانوری ماهی گورخری (مرحله جنین و بالغ)

سکینه مشجور PhD
گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، هرمزگان، ایران
مجتبی علیشاهی* PhD
گروه بهداشت آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
زهرا طولابی‌دزفولی PhD
گروه بهداشت آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

چکیده
اهداف: سمیت‌سنجی زیستی نانوذرات نقره در زیست‌بوم آبی و یافتن غلظت‌های کشنده این ماده دارای اهمیت است. هدف این پژوهش، مقایسه سمیت نانوذرات نقره شیمی و زیست‌تولیدی "*در محیط زنده*" در مدل جانوری ماهی گورخری (مرحله جنین و بالغ) بود.
مواد و روش‌ها: مطالعه تجربی حاضر روی ۳۰ قطعه تخم لقاح‌یافته و ۳۰ قطعه ماهی گورخری بالغ اجرا و اثرات سمیت نانوذرات نقره شیمیایی و زیست‌تولیدی توسط عصاره آبی جلبک دریایی قهوه‌ای (*Sargassum boveanum*) در مراحل تکاملی جنین و بالغ با یک گروه شاهد و در غلظت‌های متوالی افزایشی بررسی شد. نرخ تلفات در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بعد از مجاورت، ثبت شد. داده‌ها با نرم‌افزارهای EPA Probit Analysis 1.5 و SPSS 19 توسط آنالیز واریانس یک‌طرفه و پس‌آزمون چنددامنه دانکن تحلیل شدند.
یافته‌ها: سمیت دو نوع نانوذره نقره در دو مرحله تکاملی با افزایش غلظت و زمان روند افزایشی داشت ($p<0/05$). پس از ۹۶ ساعت، غلظت ایجادکننده LC_{50} در ماهی بالغ نسبت به نانوذرات نقره شیمیایی ۰/۷۸۸ و برای نانوذرات زیست‌تولیدشده ۰/۴۰۹میلی‌گرم بر لیتر بود. LC_{50} در مرحله تکاملی جنینی در مواجهه با نانوذرات شیمیایی ۰/۲۵۰ و برای زیست‌تولیدی ۰/۳۷۵میلی‌گرم بر لیتر بود. درصد تلفات در بالاترین غلظت (۳میلی‌گرم در لیتر) از نانوذرات نقره در زمان‌های ۷۲ و ۹۶ ساعت در همه گروه‌ها به نرخ ۱۰۰% تلفات رسید.
نتیجه‌گیری: هر دو مرحله تکاملی این ماهی نسبت به سمیت هر دو نوع نانوذرات نقره حساس بوده، لکن این حساسیت در مراحل جنینی بالاتر است و نانوذرات نقره زیست‌تولیدی در قیاس با همتای شیمیایی آن، اندکی سمی‌تر است.
کلیدواژه‌ها: سمیت، ماهی گورخری، جلبک دریایی قهوه‌ای، نانوذرات نقره

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۲/۰۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۸/۰۲
*نویسنده مسئول: alishahimoj@gmail.com

مقدمه

نانوفناوری یک صنعت نوظهور چندین بیلیون تا تریلیون‌دلاری از تجارت جهانی در قرن ۲۱ بوده[1] که نقش شگرفی در رشد اقتصاد جهانی داشته است[2]. افزایش و گسترش رو به رشد استفاده از تولیدات نانویی در حوزه‌های مختلف علوم در دهه‌های اخیر اهمیت و ضرورت درک اثرات مهلک احتمالی آن بر انسان و اکوسیستم را دوچندان ساخته است، زیرا نانوذرات امروزه به‌عنوان یک گروه جدید از آلاینده‌ها با درجه اهمیت بوم‌سم‌شناسی برای اکوسیستم‌های آبی معرفی شده‌اند و ورود آنها به خاک و نهایتاً مسیرهای آبی امری اجتناب‌ناپذیر محسوب می‌شود[3].

نقره یک آنتی‌بیوتیک باستانی بوده که بسیاری از کاربردهای جدید آن مبتنی بر خصوصیات منحصربه‌فرد آن در مقیاس‌های نانویی است. بین انواع مختلف نانوذرات فلزی، نانوذرات نقره یکی از دستاوردهای شگرف علمی در حوزه فناوری نانو بوده و جزء پُرمصرف‌ترین و پُرکاربردترین نانومواد ساخته دست بشر است. بیشترین کاربرد نانوذرات نقره مبتنی بر خواص ضدمیکروبی قوی آنها نسبت به عوامل بیماری‌زای باکتریایی و ویروسی بوده[4, 5] که باعث شده است تا به‌طور وسیعی در تولیدات مختلفی چون شوینده‌ها، پوشاک، کفش، افزودنی‌های غذایی، مواد آرایشی، تنفسی، فیلترهای تصفیه، تلفن همراه، لپ‌تاپ و غیره کاربرد داشته باشد[6]. رهایش نانوذرات نقره به‌صورت گسست ذره‌ای به فرم کلوئیدهای کامپوزیتی یا آزادسازی یون‌های نقره (Ag^+) انواع مختلفی از منسوجات، رنگ‌ها و غیره صورت می‌گیرد[7]. با این وجود، هنوز اطلاعات اندکی در ارتباط با نرخ رهایش نانوذرات نقره (AgNPs) به اکوسیستم‌های آبی و سنجش غلظت‌های محیطی آن در دست است. از این رو برآورد نرخ ورود AgNPs به اکوسیستم‌های آبی تنها می‌تواند به‌واسطه پیش‌بینی‌های انجام‌شده در رابطه با نیمه‌عمر AgNPs از زمان تولید تا رهایش بر مبنای مدل‌های زنده صورت پذیرد[7].

تولید نانوذرات نقره به روش‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی امکان‌پذیر است[8-10]، اما نانوذرات تولیدی در روش‌های شیمیایی به‌دلیل استفاده از مواد شیمیایی سمی که نقش عوامل احیایی و تثبیت‌کننده را ایفا می‌کنند[11]، می‌توانند نهایتاً آلودگی‌های محیط زیست را در پی داشته باشند. از جمله راهکارهای پیشنهادی برای تولید نانوذرات نقره با اهداف زیست‌مدیریتی، رویکرد تولید زیستی آنها است. سنتز سبز نانوذرات یکی از شیوه‌های تولید نانوذرات محسوب می‌شود که از سیستم‌های زیستی نظیر باکتری‌ها، قارچ‌ها و عصاره‌های گیاهی برای تولید نانوذره بهره می‌گیرد. در حال حاضر توسعه نانوذرات نقره تولیدشده مبتنی بر فناوری‌های زیستی، ساخت نانوذرات را در سراسر جهان دستخوش تحول عظیمی ساخته است[12]. محبوبیت این فناوری بیشتر به‌خاطر بهره‌گیری از مواد گیاهی ایمن، سرشاربودن از مواد متابولیتی، پراکنش وسیع، سهولت دسترسی و نهایتاً مقرون‌به‌صرفه‌بودن آنهاست. در رویکرد سنتز سبز AgNPs، گزینش یک محیط کشت مایع، عوامل احیایی، ترکیبات تثبیت‌کننده غیرسمی و عوامل پوششی ممانعت‌کننده از مجتمع‌سازی نانوذرات امری ضروری است. محصول این رویکرد زیست‌تولیدی، ساخت نانوذراتی با سمیت اندک است که می‌توانند برای درون‌کپسوله‌سازی مولکول‌های دارویی و کاربردهای بسیار دیگر در حوزه زیست‌پزشکی، دارو، صنعت و محیط زیست مفید باشند[12].

به‌منظور حصول اطمینان از رشد مسئولانه و پایدار فناوری‌های نانو بایستی ارزیابی جنبه‌های ایمنی و سلامت زیست‌محیطی (EHS) تولیدات نانویی با نرخ گسترش کاربری‌های آن همسو باشد. در این راستا ماهی گورخری یا زبرا (*Danio rerio*) از خانواده کپورماهیان که ساکن آب‌های شیرین مناطق گرمسیری است، به‌عنوان یک مدل جانوری آبزی مهم برای مطالعات زیست‌شناسی تکوینی، آسیب‌شناسی مولکولی، بیماری‌های انسانی و نیز بررسی اثر آلاینده‌های زیست‌محیطی در علم سم‌شناسی آبزیان به‌منظور اجرای مطالعات با اهداف نانو- EHS "*در محیط زنده*" (in vivo) به‌خصوص از حیث مطالعات با اهدافی چون ارزیابی تغییرات ریخت‌شناسی، آسیب‌شناسی بافتی، دستکاری ژنومی مرتبط با نانومواد مهندسی‌شده در سطوح عملکردی- مکانیزمی بسیار کارآمد و مفید بوده است[13]. از جمله مزیت‌های مهم این جانور مدل، وجود امتیازاتی نظیر اندازه کوچک، قیمت ارزان، داشتن ژنوم شناخته‌شده و پایدار، قابلیت تکثیر (بلوغ در مدت‌زمانی نزدیک به ۳-۲ ماه)، نگهداری آسان در آزمایشگاه، دوره تولید مثل کوتاه،

Archive of SID
www.SID.ir

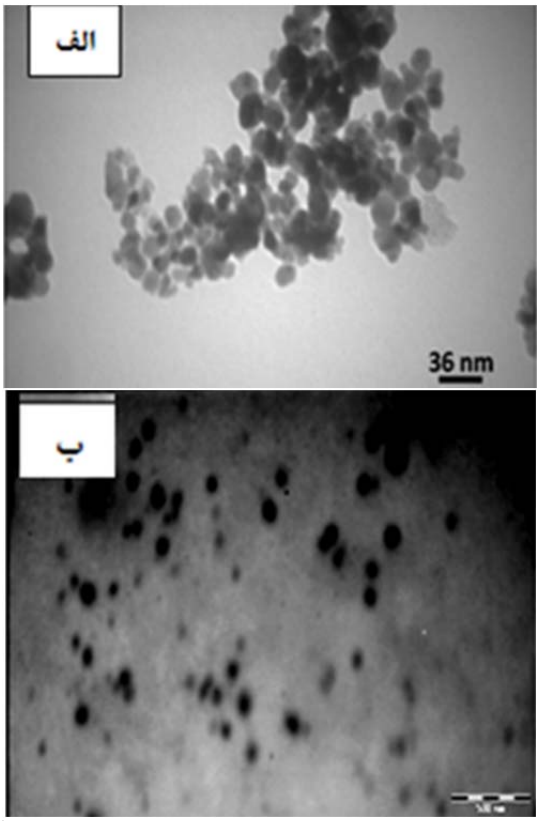
زادآوری سریع و بسیار بالا، شفافیت جنین، رشد و تکامل سریع و با قابلیت دستکاری‌های ژنتیکی است[13]. از لحاظ ژنتیکی این جاندار دارای درجات همولوژی بسیار بالایی با ژنوم انسان است. از این رو مدل قدرتمندی برای مطالعات ژنتیکی، رشد و نمو، سم‌شناسی زیست‌محیط، داروسازی، ترمیم صدمات DNA، سرطان و دیگر بیماری‌ها محسوب شده است و می‌تواند در تایید سمیت‌سنجی‌های انجام‌شده "*در محیط زنده*" مبتنی بر کشت‌های سلولی پستانداران نیز به کار رود و نسبت به دیگر مدل‌های جانوری در اولویت باشد[13]. نظر به اهمیت سمیت‌سنجی زیستی نانوذرات نقره در زیست‌بوم آبی و یافتن غلظت‌های کشنده و حداکثر غلظت مجاز این ماده، در تحقیق حاضر از گونه آبزی مدل ماهی گورخری برای ارزیابی اثرات سمیت و تفاوت میزان حساسیت نسبت به نانوذرات نقره شیمیایی و زیست‌تولیدی توسط جلبک دریایی قهوه‌ای (*Sargassum boveanum*) در مراحل تکاملی جنین و بالغ استفاده شد. بنا بر مطالب ذکرشده، هدف پژوهش حاضر، مقایسه سمیت نانوذرات نقره شیمی و زیست‌تولیدی "*در محیط زنده*" در مدل جانوری ماهی گورخری (مرحله جنین و بالغ) بود.

مواد و روش‌ها

در پژوهش تجربی حاضر، کلوئید نانوذرات نقره شیمیایی (شکل ۱- الف) با نام تجاری نانوسید L2000 (نانونصب پارس؛ ایران) استفاده شد. همچنین از نانوذرات نقره بیوسنتزی که توسط *مشجور* و همکاران[14] با استفاده از عصاره آبی جلبک قهوه‌ای مطابق روش *یوسف‌زادی* و همکاران[15] تولید شده بود، استفاده شد. روند ساخت آن بدین ترتیب بود که عصاره آبی (جوشاندن ۱۰گرم پودر جلبک در ۲۰۰سی‌سی آب دیونیزه) تهیه و فیلترکردن عصاره توسط کاغذ صافی واتمن شماره ۱ انجام شد. احیا و بیوسنتز نانوذرات نقره به‌واسطه افزودن ۱۰سی‌سی از عصاره آبی جلبکی به ۹۰سی‌سی محلول نیترات نقره یک‌میلی‌مولار صورت گرفت و نگهداری این محلول به‌مدت ۲٤ ساعت در روشنایی در دمای ۲۵°C بود و نهایتاً به‌منظور خالص‌سازی این نانوذرات، محلول احیایی به فالکون‌های ۵۰ منتقل و به‌مدت ۲۰دقیقه در دور ٤۰۰۰دور در دقیقه، سانتریفیوژ و مایع رویی دور ریخته شد. پلت ته لوله‌ها در آب مقطر دیونیزه، حل و این عمل سه‌بار تکرار و در آخر پس از تلفیق محتوای لوله‌ها، استوکی از نانوذره نقره با غلظت ۱۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد.

خصوصیات فیزیکی و شیمیایی نانوذرات نقره: غلظت کلوئید نانوذرات نقره شیمیایی بنا بر گزارش شرکت سازنده برابر ٤۰۰۰میلی‌گرم در لیتر و اندازه ذرات نقره در این محصول ۱/۰±۷/۰نانومتر بود. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی که *اصغری* و همکاران[16] برای این محصول کلوئیدی گزارش کرده‌اند عبارت از میانگین پتانسیل زتای ۷/۸٦±۵۳/۳۳میلی‌ولت، اسیدیته ۲/٤ و میانگین هندسی قطر برابر با ۱/٤٦±۱۲/٦۵نانومتر بود و طبق نتایج دستگاه طیف‌سنجی پلاسمای جفت‌شده القایی- طیف‌سنجی انتشار اتمی (ICP-AES)، غلظت واقعی نقره در کلوئید نانوذرات نقره مذکور معادل ۳۹۸۰میلی‌گرم در لیتر اندازه‌گیری شد.

شکل نانوذرات نقره بیوسنتزی مشتق‌شده از جلبک دریایی *قهوه‌ای* طبق نتایج حاصل از تصاویر میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) مدل کروی‌شکل LEO 906E (Zeiss؛ آلمان)، متوسط، اندازه نانوذرات تولیدشده با دستگاه آنالیز اندازه ذره در حدود ۷/۵۷نانومتر (شکل ۱- ب) و جنس ذره با توجه به نتایج آنالیز اشعه ایکس (XRD) و خروجی از طیف‌سنج تبدیل فوریه مادون قرمز (FT-IR)، نانوکریستال‌های نقره به‌همراه گروه‌های عاملی از جلبک دریایی قهوه‌ای بود[14].



شکل ۱) تصاویر TEM نانوذرات نقره شیمیایی و نانوذرات نقره توسط عصاره آبی جلبک دریایی قهوه‌ای؛ الف) تصویر TEM نانوذرات نقره شیمیایی، ب) تصویر TEM نانوذرات نقره توسط عصاره آبی جلبک دریایی قهوه‌ای

زیست‌آزمون ماهی گورخری: زیست‌آزمون روشی است که عکس‌العمل‌های موجودات آبزی را به‌واسطه در معرض قرارگیری با دوزهای مختلف ماده آلوده‌کننده ارزیابی می‌نماید و به‌منظور آشکارسازی و اندازه‌گیری یا تاثیر یک یا چند ماده سمی یا عوامل محیطی به‌تنهایی یا توام با یکدیگر مورد استفاده قرار می‌گیرد[17]. برای این منظور تعداد ۲۰۰ قطعه ماهی گورخری به‌مدت ۱۰ روز در یک آکواریوم ۵۰لیتری همراه با هوادهی و دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی به‌منظور سازگاری با شرایط آزمایشگاهی و غذادهی دوبار در روز به‌میزان ۱% وزن بدن نگهداری شدند. متوسط وزن و طول ماهیان به‌ترتیب ۱/۵گرم و ۲سانتی‌متر بود. برای به‌دست‌آوردن حدود غلظت کشنده نانوذرات نقره ابتدا اقدام به انجام آزمایشات مقدماتی در سطح کوچک بر ماهی گورخری شد و سپس براساس اطلاعات به‌دست‌آمده، این ماهی در غلظت‌های صفر، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲ و ۳میلی‌گرم در لیتر از نانونقره تجاری و بیوسنتزی (هر غلظت ۱۰ قطعه ماهی در سه تکرار در سطل‌های ۱۰لیتری) قرار داده شد، به نحوی که دربرگیرنده غلظت ایجادکننده ۱۰۰% تلفات و غلظت غیرکشنده نیز باشد. یک تیمار نیز به‌عنوان کنترل بدون نانونقره در نظر گرفته شد. با توجه به رهنمود استاندارد شماره ۲۰۳ "سازمان توسعه و همکاری اقتصادی" (OECD) [18]، در ارتباط با ماهیان، تلفات ماهی‌ها در زمان‌های ۲٤، ٤۸ ، ۷۲ و ۹٦ ساعت بعد از مجاورت، ثبت و برای تعیین درصد مرگ‌ومیر در غلظت‌های متفاوت و محاسبه غلظت کشنده میانی یا ۵۰% تلفات (LC_{50}) از نرم‌افزار EPA Probit Analysis 1.5 (منتشرشده توسط سازمان حفاظت محیط زیست ایالات متحده) استفاده شد. غلظت

Archive of SID
www.SID.ir

ایجادکننده ۵۰% تلفات و همچنین حداکثر غلظت قابل قبول این دو نوع نانونقره در ماهی گورخری مشخص شد. حداکثر غلظت مجاز با تقسیم‌نمودن مقدار محاسباتی غلظت کشنده ۹۶ساعته نانوذره نقره در هر گونه بر عدد ۱۰ محاسبه شد.

آزمون سمیت با استفاده از تخم و جنین ماهی گورخری: در تحقیق حاضر با توجه به این که آزمایش زیست‌سنجی باید روی تخم ماهی گورخری صورت پذیرد، ابتدا باید ماهیان گورخری مولد تهیه می‌شدند (شکل ۲). برای این منظور ماهی‌ها تا مرحله بلوغ کامل جنسی در شرایط مناسب از لحاظ محیط پرورش و تغذیه نگهداری شدند. ۵۰ قطعه ماهی ماده و نر پیش‌مولد گورخری در یک تانک ۵۰لیتری مجهز به هوادهی و هیتر ترموستاتیک نگهداری شدند. روزانه ۳بار تغذیه ماهی‌ها ترجیحاً با خوراک زنده (دافنی و روتیفر) یا خوراک دستی باکیفیت (بیومار شماره ۰/۵؛ شیرونومید) انجام پذیرفت و دوره نوری ۱۴:۱۰ (نور:تاریکی) رعایت شد. بعد از مشخص‌شدن کامل جنسیت ماهی، ماهی‌های نر و ماده به دو آکواریوم مجزا منتقل شدند، به‌طوری که ماهی‌های نر و ماده همدیگر را رویت نکنند. بعد از رسیدگی کامل اقدام به تکثیر مولدین شد، به نحوی که در زمان غروب قبل از تخم‌ریزی، ماهی‌های ماده رسیده و نر به نسبت دو به یک در آکواریوم تهیه‌شده برای تکثیر ماهی‌ها قرار داده شدند. به‌منظور جلوگیری از عفونت باکتریایی و قارچی تخم‌ها، برای تکثیر ماهی‌ها از آب اتوکلاوشده در مراحل کار استفاده شد. آکواریوم به‌وسیله یک توری پلاستیکی مخصوص به‌صورت افقی به دو قسمت تقسیم شد تا از خورده‌شدن تخم‌ها به‌وسیله مولدین پس از تخم‌ریزی جلوگیری شود. دمای آب در ۲۸°C تنظیم شد. در طول شب از هیچ نور مصنوعی استفاده نشد، در زمان طلوع آفتاب و شروع سیکل نوری، ماهی‌ها تخم‌ریزی کردند و بعد از خارج‌کردن ماهی‌ها از تانک، تخم‌ها با ملایمت، سیفون و جمع‌آوری شد. سپس تخم‌های لقاح‌یافته که شفاف بودند از تخم‌های لقاح‌نیافته که سفید هستند، جداسازی و برای آزمون سمیت منظور شدند (شکل‌های ۲ و ۳). در ادامه، ارزیابی و مقایسه اثرات سمیت نانوذرات نقره شیمیایی و زیست‌تولیدی با استفاده از تخم‌های لقاح‌یافته ماهی گورخری صورت پذیرفت و در یک طیف غلظتی از نانوذره تجاری و بیوسنتزی در درصدهای حجمی تعیین‌شده غلظت‌های صفر، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر در سه تکرار در پلیت‌های ۶خانه‌ای محتوی ۱۰سی‌سی از غلظت مورد نظر، ۱۰ تخم ماهی گورخری، اضافه و ظروف در انکوباتور در دمای ۲۷°C قرار داده شدند. مشاهده نمونه‌ها به‌طور منظم بعد از ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت در زیر لوپ انجام و تعداد تخم‌های مرده، درصد تخم‌گشایی و بقای تخم و لاروی و بروز ناهنجاری‌های ریخت‌شناسی لارو ماهیان در هر ظرف آزمایش تعیین و ثبت شد. تخم‌های بدون جنین و سفیدشده نشانگر تخم‌های مرده قلمداد می‌شدند.

برای تعیین درصد مرگ‌ومیر در غلظت‌های متفاوت و محاسبه دقیق LC_{50} از نرم‌افزار EPA Probit Analysis 1.5 (منتشرشده توسط سازمان حفاظت محیط زیست ایالات متحده) استفاده شد. آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار IBM SPSS 19 و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel 2007 صورت گرفت و تمامی مقادیر داده‌ها بر حسب میانگین±خطای استاندارد ارایه شد. نرمال‌بودن توزیع داده‌ها و همگنی واریانس‌ها توسط آزمون شاپیرو- ویلک بررسی شد. سپس به‌منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها آنالیز واریانس یک‌طرفه و پس‌آزمون چنددامنه دانکن برای تعیین معنی‌داری اختلاف میان تیمارهای مختلف مورد استفاده قرار گرفت.

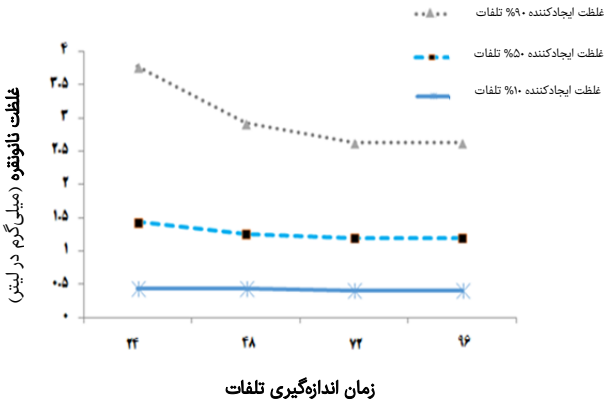
شکل ۲) نمایی از الف) تخم‌های شفاف لقاح‌یافته در ماهی گورخری، ب) ماهی گورخری نر (باله دمی کشیده) و ماده (شکم‌برآمده)

شکل ۳) نمایی از تخم‌های لقاح‌یافته، مرده، مراحل تکوینی جنینی و لارو در ماهی گورخری (*D. rerio*) گروه شاهد و گروه تیمار (پیکان سیاه نشست نانوذرات در اطراف پوسته تخم ماهی را نشان می‌دهد)

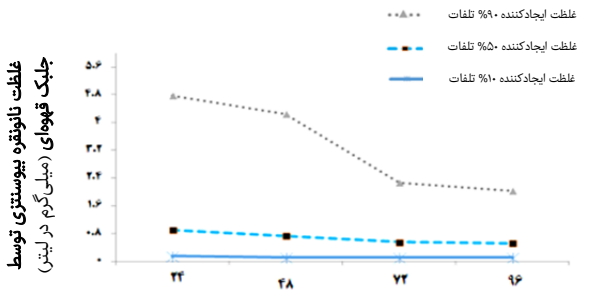
www.SID.ir

یافته‌ها

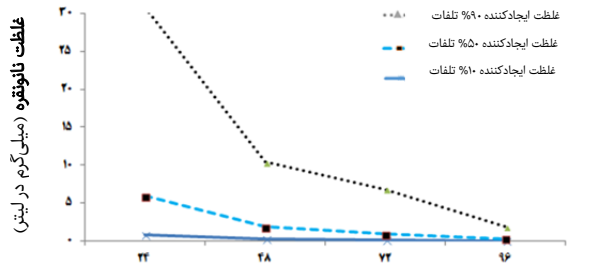
اثرات سمیت هر دو نوع نانوذره نقره بر ماهی گورخری با افزایش غلظت و نیز با افزایش مدت‌زمان مجاورت روند افزایشی داشت ($p<0/05$)، به‌طوری که پس از ۹۶ ساعت، میزان LC_{50} از نانوذرات نقره شیمیایی در ماهی گورخری بالغ ۰/۷۸۸میلی‌گرم بر لیتر بود و برای نانوذرات نقره زیست‌تولیدشده توسط جلبک دریایی قهوه‌ای ۰/۴۰۹میلی‌گرم بر لیتر ارزیابی شد (نمودارهای ۱ و ۲). این غلظت در ارتباط با مرحله تکامل جنینی ماهی گورخری طی مجاورت با نانوذرات نقره شیمیایی برابر با ۰/۲۵۰میلی‌گرم بر لیتر و برای نانوذرات نقره زیست‌تولیدی توسط جلبک ۰/۳۷۵میلی‌گرم بر لیتر ارزیابی شد (نمودارهای ۳ و ٤). هر دو مرحله تکاملی جنینی و بالغ این ماهی نسبت به اثرات سمیت هر دو نوع نانوذرات نقره حساس بود، ولی این حساسیت در مراحل جنینی بالاتر بود و در هر دو مرحله تکاملی، نانوذرات نقره زیست‌تولیدشده در قیاس با همتای شیمیایی آن، اندکی سمی‌تر بودند. توان سمیت نانوذرات نقره بر ماهی گورخری با افزایش زمان مجاورت افزایش یافت. از طرفی نسبت تلفات نیز با غلظت نانوذره نقره در هر دو مرحله تکاملی جنینی و بالغ این ماهی نسبت به دوره زمانی رابطه مستقیمی را نشان داد، به‌طوری که میزان LC_{50}، ۲٤ و ۹٦ ساعت بعد از مجاورت مرحله تکامل جنینی ماهی گورخری با نانوذرات نقره شیمیایی به‌ترتیب ۵/۱۹ و ۰/۲۵۰میلی‌گرم در لیتر و برای نانوذرات نقره زیست‌تولیدی ۷/۷۸ و ۰/۳۷۵میلی‌گرم در لیتر بود و این غلظت برای ماهیان بالغ در مواجهه با نانوذرات نقره شیمیایی به‌ترتیب ۱ و ۰/۷۸میلی‌گرم در لیتر و برای نانوذرات نقره زیست‌تولیدی برابر ۰/۷۵۲ و ۰/٤۰۹میلی‌گرم در لیتر ارزیابی شد (نمودار ۵). در ارتباط با نانوذرات نقره شیمیایی، طی ۹٦ ساعت بعد از مجاورت، غلظت‌های ۰/۰٤، ۰/۲۵ و ۱/۵٦میلی‌گرم در لیتر به‌ترتیب ۱۰، ۵۰ و ۹۰% تلفات در جنین ماهی گورخری را ایجاد نمود و این میزان طی مجاورت جنین‌ها با نانوذرات نقره زیست‌تولیدی در غلظت‌های ۰/۰۲٤، ۰/۳۷۵، ۱/٤۸میلی‌گرم در لیتر ایجاد شد. در این بازه زمانی، غلظت‌های ایجادکننده ۱۰، ۵۰ و ۹۰% تلفات در مرحله بلوغ نسبت به نانوذرات نقره شیمیایی به‌ترتیب ۰/٤۱۱، ۰/۷۸۸ و ۱/٤۳۰میلی‌گرم در لیتر و نسبت به نانوذرات نقره زیست‌تولیدی ۰/۱۱۱، ۰/٤۰۹ و ۱/۵۱۵میلی‌گرم در لیتر بود. درصد تلفات در بالاترین غلظت (۳میلی‌گرم در لیتر) از نانوذرات نقره در این تحقیق در زمان‌های ۷۲ و ۹٦ ساعت در تمامی گروه‌ها به نرخ ۱۰۰% تلفات رسید.



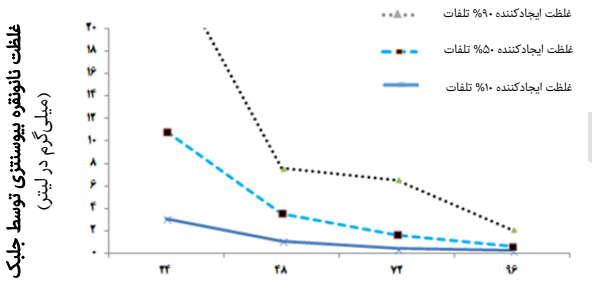
نمودار ۱) روند ایجاد تلفات در ماهی گورخری با افزایش غلظت نانوذرات نقره شیمیایی طی افزایش زمان مجاورت



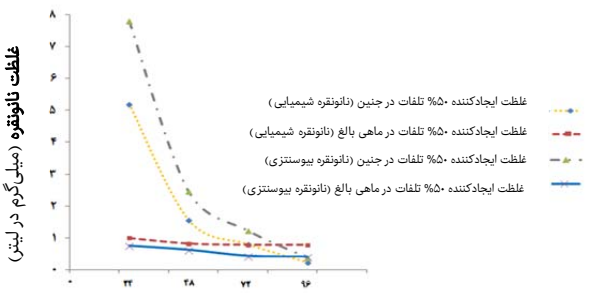
نمودار ۲) روند ایجاد تلفات در ماهی گورخری با افزایش غلظت نانوذرات نقره زیست‌تولیدشده توسط عصاره آبی جلبک دریایی قهوه‌ای طی افزایش زمان مجاورت



نمودار ۳) روند ایجاد تلفات در جنین ماهی گورخری با افزایش غلظت نانوذرات نقره شیمیایی طی افزایش زمان مجاورت



نمودار ٤) روند ایجاد تلفات در جنین ماهی گورخری با افزایش غلظت نانوذرات نقره زیست‌تولیدشده توسط عصاره آبی جلبک دریایی قهوه‌ای طی افزایش زمان مجاورت



نمودار ۵) مقایسه غلظت ایجادکننده LC_{50} در جنین و بالغ ماهی گورخری طی افزایش زمان مجاورت با نانوذرات نقره شیمیایی (AgNPs) و زیست‌تولیدشده توسط جلبک دریایی قهوه‌ای

www.SID.ir

بحث

یکی از روش‌هایی که عکس‌العمل‌های موجودات آبزی را به‌واسطه در معرض قرارگیری با دوزهای مختلف ماده آلاینده ارزیابی می‌نماید، زیست‌آزمون‌های سمیت است[17]، که در مطالعه حاضر بنا بر رهنمود استاندارد شماره ۲۰۳ OECD در ماهیان و به‌منظور اجرای یک زیست‌آزمون سمیت با بهره‌گیری از ماهی گورخری به‌عنوان یک مدل زیستی از آبزیان در علم نانوبوم سم‌شناسی، اثرات سمیت و تفاوت میزان حساسیت مراحل تکاملی جنینی و بالغ این ماهی، نسبت به نانوذرات نقره شیمیایی و زیست‌تولیدی با استفاده از عصاره جلبک قهوه‌ای (*S. boveanum*)، ارزیابی و مقایسه شد که نتایج به‌دست‌آمده نشان داد هر دو مرحله تکاملی جنین و بالغ این ماهی نسبت به اثرات سمیت نانوذرات نقره واجد حساسیت بوده ولی میزان آن در مرحله جنینی بالاتر از بالغ بوده است و اثرات سمیت هر دو نوع نانونقره با افزایش مدت‌زمان مجاورت روند افزایشی را به‌دنبال داشته است، به‌طوری که میزان LC_{50} در طول بازه زمانی ۹۶ساعته کاهش یافته است. با این حال، در هر دو مرحله تکاملی ماهی گورخری، نانوذرات نقره زیست‌تولیدی در قیاس با همتای شیمی تولیدشده آن، قدرت سمیت بالاتری را نشان داده‌اند.

بنا بر نتایج به‌دست‌آمده در تحقیق حاضر هر دو نوع نانوذرات نقره شیمیایی و زیست‌تولیدی از منظر بقا بر مراحل تکاملی جنینی و بالغ ماهی گورخری بسیار اثرگذار بودند، به‌طوری که طبق طیف غلظتی تعریف‌شده در این تحقیق (حدوداً ۰/۱ تا ۳میلی‌گرم در لیتر در هر دو گروه جنین و بالغ)، طی مواجهه با هر دو نوع نانونقره زیستی و شیمیایی، نشانگان بروز سمیت و مرگ‌ومیر بنا بر روندی وابسته به غلظت و زمان مشاهده شد، یعنی غلظت‌های بالای این نانونقره در هر دو گروه تکاملی در زمان‌های ۷۲ و ۹۶ ساعت از مواجهه توانستند حتی به ۱۰۰% تلفات نیز منتهی شوند. با این وجود مقایسه نتایج در هر دو گروه تکاملی و تفاوت موجود در میزان غلظت LC_{50} نشان‌دهنده بالاتربودن حساسیت مرحله تکاملی جنینی ماهی گورخری نسبت به نانوذرات نقره زیستی و شیمیایی در قیاس با مرحله بلوغ بود. در این پژوهش باید به این نکته توجه داشت که تحت یک شرایط بهینه در آزمایشگاه و مقایسه با گروه شاهد، اثرات سمیت هر دو نوع نانوذرات نقره در طول ۲۴ تا ۴۸ ساعت نخست به‌شدت بر نرخ تخم‌گشایی در این ماهی، سفیدشدگی و مرگ تخم‌ها پیش از ورود جنین به مراحل گاسترولاسیون و دیگر مراحل تکاملی تاثیرگذار بود، به‌طوری که بنا بر نتایج ارایه‌شده در این بازه زمانی طی روندی وابسته به غلظت، این تلفات ارتقا یافت و در غلظت بالا به مرگ‌ومیر ۵۰% نیز رسید.

اساساً جنین و لاروی ماهی گورخری، کف‌زی است و می‌تواند در کف بستر نشست کند. این جاندار به‌طور بالقوه هدف و مدل مناسبی برای ارزیابی اکولوژیک نرخ رهایش نانوذرات در زیست‌بوم آبی و بروز اثرات سمیت بر جوامع زیستی بنتیک محسوب می‌شود[19]. از این رو با توجه به این که در مطالعه حاضر آزمون‌های سمیت در ارتباط با جنین و لاروی ماهی گورخری در پلیت‌های ۶خانه‌ای و محیط آبی بدون تحرک درون چاهک‌ها انجام شد، تا حد کمی تجمع و نشست نانوذرات نقره در کف پلیت‌ها را در پی داشت. از حیث دسترسی زیستی مناسب نانوذرات نقره به‌علت قابلیت کف‌زی‌بودن لاروها، این مساله قابل اغماض بود و تاثیری بر نتایج نداشت. *ژو* و همکاران[19] نیز طی مطالعه اثرات سمیت نانوذرات اکسیدآهن مغناطیسی هماتیت (Fe_2O_3) بر مراحل نخست تکاملی (ELS) ماهی گورخری به این امر اذعان داشتند.

از جمله نکاتی که در تحقیق حاضر در ارتباط با مدل جانوری ماهی گورخری شایان توجه بود، برابری تقریبی سمیت هر دو نوع نانونقره و حتی بعضاً بروز اثرات سمیت بالاتر در زیست‌آزمون سمیت نانوذرات نقره زیست‌تولیدشده از عصاره جلبک سارگاسم در قیاس با همتای تجاری تولیدشده به روش شیمیایی آن بود که از جمله موارد نقض رویکرد سنتز سبز در بحث سمیت است و احتمالاً ناشی از حساسیت‌پذیری بالاتر ماهیان گورخری نسبت به سمیت نانوذرات نقره در قیاس با دیگر آبزیان مدل مانند آرتمیا و دافنی باشد. این نتایج حتی با دیگر تحقیقات انجام‌شده توسط نویسندگان این مقاله در ارتباط با ارزیابی سمیت نانوذرات نقره زیست‌تولیدشده از جلبک دریایی قهوه‌ای بر آرتمیا و دافنی هم در تضاد بود[14]، زیرا در آنها نانونقره بیوسنتزی، سمیت کمتری را نسبت به نوع شیمیایی نشان داده است. در تایید این امر نیز می‌توان به تحقیق *بیلبرگ* و همکاران[20] استناد نمود که گزارشی مبنی بر ارزیابی سمیت حاد نانوذرات نقره در مقایسه با یون‌های نقره ($AgNO_3$) در ماهی گورخری است که نتایج آنها نشان داده نانوذرات نقره برای این ماهی بسیار کشنده بوده، به‌طوری که غلظت کشنده میانی ۴۸ساعته نانوذرات نقره و یون‌های نقره به‌ترتیب ۸۴ و ۲۵میکروگرم بر لیتر بوده است و بررسی‌های رفتاری واکنش به استرس نیز در این ماهی نشانه‌هایی از سمیت تنفسی را با توجه به افزایش نرخ فعالیت تنفسی و زنش سرپوش آبششی در مواجهه با نانوذرات نقره ارایه نموده است[20].

به‌طور کلی سمیت نانوذرات نقره (Ag-NPs) در جانداران به حمل یون‌های نقره توسط آنها نسبت داده می‌شود، زیرا این نانوذرات به‌سهولت می‌توانند درون سلول نفوذ کنند، به‌عنوان منبعی از یون‌های نقره درون سلول‌ها عمل کنند[21] و آسیب‌های نگران‌کننده‌ای را بر غشای سلولی و دیگر ترکیبات درون‌سلولی وارد سازند که عمدتاً در ارتباط با استرس‌اکسیداتیو، اثرات القایی آن بر DNA، لیپوپروتئین‌ها و فعالیت‌های متابولیزمی است و می‌تواند وابسته به فاکتورهای مختلفی چون طبیعت نانوذره، شکل، سایز و برخی فاکتورهای محیطی چون شوری، دما و اکسیژن محلول باشد[22]. در همین راستا *چا* و همکاران[23] نیز طی مطالعه‌ای اثرات زیست‌محیطی نانوذرات (Ag-NPs) را روی ماهی مداکای ژاپنی (*Oryzias latipes*) بر مبنای بررسی تغییرات بیان ژن‌های مرتبط با استرس ارزیابی نموده‌اند که یون‌های Ag و نانوذرات Ag-NPs اثرات سمیت متفاوتی را نشان دادند، به‌طوری که یون‌های Ag-NPs منجر به آسیب‌های سلولی، آسیب DNA، اثرات کارسینوژنیک و استرس‌اکسیداتیو شدند و یون‌های نقره در ماهیان تیمار، تنها القای پاسخ‌های التهابی و فعال‌سازی فرآیندهای سم‌زدایی کبدی را به‌دنبال داشتند. از این رو با توجه به فعالیت کاتالیک و کاهش مساحت سطحی ذرات نانونقره[24] می‌توان یکی از علت‌های اصلی احتمال بالای رهایش آنها به محیط زیست و سیستم‌های زیستی را اکسیداسیون سطحی و سریع آنها توسط مولکول‌های O_2 و دیگر اکسنده‌های طبیعی دانست که منجر به رهایش یون‌های نقره می‌شود[21]. از این حیث هنوز به‌درستی مشخص نیست که طی برهم‌کنش‌های نانوذرات Ag-NPs با دیگر پدیده‌های زیستی، سمیت نانوذرات چه میزان مربوط به یون‌های آزادشده از آنها و چه میزان وابسته به خود نانوذرات خواهد بود. با این وجود کیم و همکاران[25] بیان کرده‌اند که سمیت نانوذرات نقره به‌دلیل فعالیت استرس اکسایش ناشی از این ذرات بوده و مستقل از سمیت نقره یونی است.

عمده پژوهش‌های اخیر در رابطه با ارزیابی سمیت نانوذرات نقره

Archive of SID
www.SID.ir

زیست‌تولیدی نظیر بررسی خواص ضدباکتریایی نانوذرات نقره بیوسنتز شده توسط جلبک سارگاسم وایتی (*Sargassum wightii*) در برابر عوامل بیماری‌زای انسانی چون *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*)، *کلبسیلا پنومونیه* (*Klebsiella pneumonia*) و *سالمونلا تیفی* (*Salmonella typhi*) [26]، متمرکز بر ارزیابی اثرات ضدمیکروبی آنها بوده است. تعداد مطالعات نانوبوم‌سم‌شناسی صورت‌گرفته بر نانوذرات نقره زیست‌تولیدشده از جلبک‌های دریایی بسیار اندک بوده و می‌توان تحقیق حاضر را در این حوزه تا حدی پیشگام دانست. از دیگر تحقیقات مشابه در ارتباط با جنین ماهی گورخری، پژوهش *بار-ایلان* و همکاران[27] بوده است که طی بررسی سمیت نانوذرات نقره و طلا در این ماهی سمیت تحت کشندگی بالایی برابر با ۲۵میکرومولار را برای نانوذرات نقره و عدم سمیت را برای نانوذرات طلا گزارش نموده و اذعان داشته‌اند که سمیت در نانوذرات نقره علاوه بر غلظت و زمان مجاورت به میزان بسیار زیادی وابسته به اندازه ذره است، به‌طوری که ذرات با اندازه‌های کوچک‌تر سمیت بسیار بالاتری را نشان می‌دهند[27]. بنابراین فرضیه بالاتربودن سمیت مشاهده‌شده در نانوذرات نقره زیست‌تولیدی نسبت به همتای شیمیایی آن در تحقیق حاضر را می‌توان تا حدودی به کوچک‌تربودن اندازه ذرات نانویی آن نسبت داد، چرا که در مطالعه حاضر متوسط اندازه نانوذرات نقره زیست‌تولیدشده توسط جلبک دریایی قهوه‌ای، ۷/۵۷نانومتر برآورد شد و در نانوذرات نقره شیمیایی L2000 برابر ۱۲/۶۵نانومتر بود. طبق داده‌های به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر، نانوذرات نقره به‌عنوان یک آلاینده زیست‌محیطی بالقوه سمی و ماهی گورخری نیز به‌عنوان یک مدل جانوری آبزی کارآمد، کم‌هزینه و نماینده مناسبی از زیستمندان آبی در مطالعات نانوبوم‌سم‌شناسی معرفی شد که می‌تواند در پویش و پیش‌بینی مخاطرات زیست‌محیطی آتی نانومواد در بوم‌سازگان‌های آبی بسیار سودمند واقع شود.

محدودیت‌هایی در این تحقیق مطرح نبوده است، با این حال پیشنهاد می‌شود که آزمون زیست‌سنجی تاثیرات سمیت نانوذرات نقره بیوسنتزی و شیمیایی در دیگر گونه‌های ماهیان نیز ارزیابی شده و نتایج با این تحقیق مقایسه شود.

نتیجه‌گیری

اثر سمیت نانوذرات نقره شیمی و زیست‌تولیدی در مرحله جنینی و بالغ ماهی گورخری با افزایش غلظت بیشتر می‌شود و نانوذرات نقره زیست‌تولیدی در مقایسه با همتای شیمیایی آن سمی‌تر است. مرحله جنینی و بالغ این ماهی نسبت به اثرات سمیت هر دو نوع نانوذرات نقره حساس است، ولی این حساسیت در مراحل جنینی بالاتر است.

تشکر و قدردانی: این تحقیق در آزمایشگاه آبزیان دانشکده دامپزشکی- دانشگاه شهید چمران اهواز انجام پذیرفته و بدین وسیله از مسئولان محترم گروه بهداشت آبزیان تشکر و تقدیر می‌شود.

تاییدیه اخلاقی: کلیه مراحل تحقیقاتی این پژوهش با حفظ اصول استاندارد اخلاقی و رعایت شرایط رفاه و آسایش جانور آبزی انجام پذیرفته است.

تعارض منافع: بین پژوهشگران این تحقیق تعارض منافع وجود ندارد.

سهم نویسندگان: سکینه مشجور (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۵۰%)؛ مجتبی علیشاهی (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی (۳۰%)؛ زهرا طولابی‌دزفولی (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی (۲۰%)

منابع مالی: این تحقیق تحت حمایت مالی دانشگاه شهید چمران اهواز بوده است.

منابع

1- Klaine SJ, Koelmans AA, Horne N, Carley S, Handy RD, Kapustka L, Nowack B, von der Kammer F. Paradigms to assess the environmental impact of manufactured nanomaterials. Environ Toxicol Chem. 2012;31(1):3-14.

2- Schmidt CW. Nanotechnology-related environmental, health, and safety research: Examining the national strategy. Environ Health Perspect. 2009;117(4):A158-61.

3- Ju-Nam Y, Lead JR. Manufactured nanoparticles: An overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. Sci Total Environ. 2008;400(1-3):396-414.

4- Martinez-Gutierrez F, Boegli L, Agostinho A, Sánchez EM, Bach H, Ruiz F, et al. Anti-biofilm activity of silver nanoparticles against different microorganisms. Biofouling. 2013;29(6):651-60.

5- Arya VR. Biological synthesis of silver nanoparticles from aqueous extract of endophytic fungus Aspergillus terrus and its antibacterial activity. Int J Nanomater Biostruct. 2013;3(2):35-7

6- Fries R, Greßler S, Simkó M, Gazsó A, Fiedeler U, Nentwich M. Nanosilver [Internet]. Vienna: Institute of Technology Assessment of the Austrian Academy of Sciences (ITA); 2010 [cited 10 Nov 2010]. Available from: http://epub.oeaw.ac.at/ita/nanotrust-dossiers/dossier010en.pdf

7- Arulvasu C, Jennifer SM, Prabhu D, Chandhirasekar D. Toxicity effect of silver nanoparticles in brine shrimp Artemia. Sci World J. 2014;2014:256919.

8-Iravani S, Korbekandi H, Mirmohammadi SV, Zolfaghari B. Synthesis of silver nanoparticles: Chemical, physical and biological methods. Res Pharm Sci. 2014;9(6):385-406.

9- Prabhu S, Poulose E. Silver nanoparticles: Mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. Int Nano Lett. 2012;2:32.

10- Gavhane AJ, Padmanabhan P, Kamble SP, Jangle SN. Synthesis of silver nanoparticles using extract of Neem leaf and triphala and evaluation of their Antimicrobial activities. Int J Pharm Bio Sci. 2012;3(3):88-100.

11- Senapati S, Syde A, Moeez S, Kumar A, Ahmah A. Intracellular synthesis of gold nanoparticles using alga Tetraselmis kochinensis. Mater Lett. 2012;79:116-8.

12- Roy N, Gaur A, Jain A, Bhattacharya S, Rani V. Green synthesis of silver nanoparticles: An approach to overcome toxicity. Environ Toxicol Pharmacol. 2013;36(3):807-12.

13- Lin S, Zhao Y, Nel AE, Lin S. Zebrafish: An in vivo model for nano EHS studies. Small. 2013;9(9-10):1608-18.

14- Mashjoor S, Alishahi M, Tulaby dezfuly Z. Study of acute toxicity of aqueous suspensions of chemical and biogenic silver nanoparticles produced by marine algae, Sargassum boveanum on Artemia fransiscana (Nauplius and adult) as model organism. J Wetland Ecobiolo. 2017;8(4):83-94. [Prsian]

15- Yousefzadi M, Rahimi Z, Ghafori V. The green

Archive of SID
www.SID.ir

synthesis, characterization and antimicrobial activities of silver nanoparticles synthesized from green alga Enteromorpha flexuosa (wulfen) J. Agardh. Mater Lett. 2014;137:1-4.
16- Asghari S, Johari SA, Lee JH, Kim YS, Jeon YB, Choi HJ, et al. Toxicity of various silver nanoparticles compared to silver ions in Daphnia magna. J Nanobiotechnol. 2012;10:14.
17- Martins J, Oliva Teles L, Vasconcelos V. Assays with Daphnia magna and Danio rerio as alert systems in aquatic toxicology. Environ Int. 2007;33(3):414-25.
18- OECD. Test No. 203: Fish, acute toxicity test. In: OECD. OECD guidelines for the testing of chemicals, section 2: Effects on biotic systems. Paris: OECD Publishing; 1992.
19- Zhu X, Tian S, Cai Z. Toxicity assessment of iron oxide nanoparticles in zebrafish (Danio rerio) early life stages. PLoS One. 2012;7(9):e46286.
20- Bilberg K, Hovgaard MB, Besenbacher F, Baatrup E. In vivo toxicity of silver nanoparticles and silver ions in zebrafish (Danio rerio). J Toxicol. 2012;2012:293784.
21- Mc Shan D, Ray PC, Yu H. Molecular toxicity mechanism of nanosilver. J Food Drug Anal. 2014;22(1):116-27.
22- Lapresta-Fernández A, Fernández A, Blasco J. Nanoecotoxicity effects of engineered silver and gold nanoparticles in aquatic organisms. TrAC Trends Anal Chem. 2012;32:40-59.
23- Chae YJ, Pham CH, Lee J, Bae E, Yi J, Gu MB. Evaluation of the toxic impact of silver nanoparticles on Japanese medaka (Oryzias latipes). Aquat Toxicol. 2009;94(4):320-7.
24- Ates M, Daniels J, Arslan Z, Farah IO. Effects of aqueous suspensions of titanium dioxide nanoparticles on Artemia salina: Assessment of nanoparticle aggregation, accumulation, and toxicity. Environ Monit Assess. 2013;185(4):3339-48.
25- Kim S, Choi JE, Choi J, Chung KH, Park K, Yi J, et al. Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. Toxicol in Vitro. 2009;23(6):1076-84.
26- Shanmugam N, Rajkamal P, Cholan S, Kannadasan N, Sathishkumar K, Viruthagiri G, et al. Biosynthesis of silver nanoparticles from the marine seaweed Sargassum wightii and their antibacterial activity against some human pathogens. Appl Nanosci. 2014;4(7):881-8.
27- Bar-Ilan O, Albrecht RM, Fako VE, Furgeson DY. Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryos. Small. 2009;5(16):1897-910.

Archive of SID

www.SID.ir