

سمیت کلونید نانو نقره در ماهی گورخری (*Danio rerio*): یون ها، نانو ذرات یا هر دو؟

سید علی جوهری*، لیلا حبیبی، سیده ژینو حسینی

گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

تاریخ دریافت: ۹۳/۷/۳ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۱۵

چکیده

تولید و استفاده روز افزون نانو ذرات نقره می تواند به رهايش این مواد به بوم سازگان آبی و آثار سمی در آبزیان منجر شود. هنوز به درستی مشخص نیست که آثار سمی مشاهده شده پس از رویارویی آبزیان با کلونید نانو نقره، ناشی از نانو ذرات نقره موجود در کلونید بوده یا یون های نقره آزاد موجود در آن و یا ترکیبی از این دو در این امر نقش دارند. در این مطالعه آثار سمیت حاد "کلونید نانو نقره" (حاوی یون های آزاد و نانو ذرات نقره) در مقایسه با سمیت "نانو ذرات نقره" جدا شده از کلونید نانو نقره (فاقد یون های آزاد نقره) در ماهی گورخری (*Danio rerio*) مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش های سم شناسی حاد بر اساس استاندارد سازمان همکاری و توسعه اقتصادی برنامه ریزی و اجرا گردید. نتایج نشان داد که بیشترین غلظت فاقد اثر سمیت، کمترین غلظت ایجاد کننده سمیت، حداکثر غلظت قابل قبول و غلظت کشنده میانی "کلونید نانو نقره" به ترتیب ۲۵۰، ۲۴۰، ۲۴۸/۹۰ و ۳۰۰/۶۴ برابر کمتر از مقادیر مربوط به "نانو ذرات نقره" بود. بنابراین سمیت کلونید نانو نقره، بیشتر از آن که مربوط به نانو ذرات نقره باشد، ناشی از یون های آزاد نقره موجود در این کلونید می باشد. در مجموع "کلونید نانو نقره" و "نانو ذرات نقره" به ترتیب جزو مواد شیمیایی "بسیار سمی" و "سمی" برای آبزیان طبقه بندی می شوند و باید از رهايش این مواد به محیط زیست پیشگیری شود.

کلمات کلیدی: نانو سم شناسی آبزیان، نانو ذرات نقره، کلونید نانو نقره، نقره یونی، ماهی گورخری

مقدمه

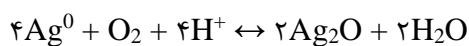
فن آوری نانو عبارت از دانش دست‌کاری مواد در مقیاس مولکولی و اتمی است. امروزه فن آوری نانو در زمینه های متنوعی همچون کالاهای مصرفی، صنایع نوین، پزشکی، محیط زیست، انرژی، ارتباطات و فن آوری اطلاعات کاربرد یافته است. در ۱۸ اکتبر ۲۰۱۱، کمیسیون اروپا تعریف جدیدی را به تصویب رسانید که بر اساس آن نانو مواد عبارتند از مواد طبیعی تولید شده به صورت اتفاقی و یا ساخت دست بشر، که حاوی ذراتی به صورت آزاد (Unbound)، تجمع یافته (Agglomerate) و یا کلوخه شده (Aggregate) بوده و از نظر توزیع اندازه، حداقل ۵۰ درصد ذرات آن حداقل در یک بُعد دارای اندازه ای بین ۱ تا ۱۰۰ نانومتر باشند. در موارد ویژه همچون مسائل مربوط به بهداشت و سلامت، ایمنی و محیط زیست، از نظر شرط توزیع اندازه، حتی موادی که ۱ تا ۵۰ درصد آن ها بین ۱ تا ۱۰۰ نانومتر باشند نیز در حیطه نانو مواد قرار می گیرند (<http://europa.eu/nanotech>).

با گسترش روز افزون فن آوری نانو و کاربرد نانو مواد در زمینه های مختلف، نگرانی های زیادی در خصوص خطرهای احتمالی ناشی از رهائش این مواد به محیط زیست به وجود آمده است. آمار بدست آمده از مطالعه بازار در ۳۰ کشور جهان نشان می دهد که تعداد محصولات مصرفی انسان که در آن ها از نانو مواد استفاده شده است، تنها طی سال های ۲۰۰۵ تا ۲۰۱۳ بیش از ۳۰ برابر افزایش یافته است و پیش بینی می شود که این تعداد در سال های آینده نیز با روند سریعی افزایش یابد (Woodrow Wilson Database, 2013). بر اساس همین آمار، در حال حاضر نانو نقره نسبت به نانو مواد دیگر، کاربرد تجاری بیشتری یافته است و به عنوان ماده ضد میکروب در انواع متفاوتی از محصولات همچون مواد آرایشی، مواد شوینده، پوشاک، کفش، افزودنی های غذایی و نیز بصورت پوشش ماسک های تنفسی، فیلترهای آب، گوشی های تلفن، لپ تاپ، اسباب بازی و سیستم های تصفیه آب خانگی (همچون Kinetic, Aquapure و QSI-Nano) کاربرد دارد (Woodrow Wilson Database, 2013). مقدار تولید نانو ذرات نقره در جهان حدود ۵۵ تن در سال تخمین زده شده است (Piccinno et al. 2012)؛ از طرفی مقدار پیش بینی شده حضور نانو ذرات نقره در محیط زیست آبی، برابر

۰/۰۳ تا ۰/۳۲ میکروگرم در لیتر برآورد شده است (Batley et al. 2013).

ورود عمدی یا تصادفی نانو مواد به بوم سازگان های آبی، ممکن است باعث تأثیرات نامطلوب این مواد بر زیستمدان آبی شود و به همین دلیل مطالعه این تأثیرات دارای اهمیت بسیار است. در همین رابطه، نانو سم شناسی آبزیان (Aquatic Nanotoxicology) شامل بررسی اثرات سمی نانو مواد بر زیستمدان آبی اعم از باکتری های آبی، جلبک های تک سلولی و پرسلولی، پلانکتون های جانوری، نرم تنان، سخت پوستان، دوزیستان، ماهی ها و غیره می باشد (جوهری، ۱۳۹۰).

امروزه یکی از انواع محصولات محتوی نانو ذرات نقره که به عنوان ماده ضد عفونی کننده و ضد میکروب به صورت گسترده در بازار عرضه گردیده است، کلوئید نانو نقره است. در ایران نیز انواعی از کلوئید نانو نقره با نام های تجاری همچون "نانوسید"، "نانونپ"، "نانوویس"، "نانوفارم"، "نانوکلین" و غیره در حال تولید و عرضه هستند. در واقع همگی این محصولات که در بازار به نام کلوئید نانو نقره شناخته می شوند، تشکیل شده اند از سوسپانسیون آبی که در آن نقره به سه صورت شامل ذرات فلزی (Ag^0) در ابعاد نانومتری، یون های آزاد نقره (Ag^+) و یون های نقره (Ag^+) متصل به سطح نانو ذرات وجود دارد (Liu and Hurt, 2010; Lowry et al. 2012) حتی با این فرض که در ابتدا صد در صد نقره موجود در این سوسپانسیون ها به صورت نانو ذرات فلزی باشد و میزان نقره یونی صفر باشد، این نانو ذرات به تدریج و تحت شرایط اکسیداسیون، طبق معادله دو طرفه زیر، تبدیل به یون های نقره خواهند شد (Liu and Hurt, 2010; Xiu et al. 2012):



نشان داده شده است که از طریق حذف اکسیژن محیط، افزودن مواد آلی طبیعی (همچون اسید هیومیک و اسید فولویک)، افزودن لیگاندهای پایدار کننده (همچون سیترات)، کاهش دما و افزایش pH، مقدار رهائش نقره یونی از نانو ذرات نقره کاهش خواهد یافت (Liu and Hurt, 2010).

بر اساس نتایج مطالعات انجام شده، انواع کلوئید نانو نقره دارای خواص سمی بر آبزیان می باشند (علیشاهی و مصباح، ۱۳۸۹؛ علیشاهی و همکاران، ۱۳۹۰؛ سالاری جو

استفاده از نرم افزار پردازش تصاویر دیجیتالی Axio Vision (Carl Zeiss Micro Imaging GmbH) اندازه گیری شد. قطر هیدرودینامیکی ذرات نقره موجود در کلونید، به کمک روش آنالیز ردیابی نانو ذره (NTA) و با استفاده از دستگاه نانو دوربین (مدل LM10-HS، ساخت شرکت Nanosight انگلستان) تعیین شد. همچنین پتانسیل زتای نانو ذرات در کلونید نیز با استفاده از دستگاه زتاسایزر مدل 3000HSa (Malvern Instruments Ltd) سنجیده شد. غلظت کل نقره در کلونید، با استفاده از دستگاه ICP-AES (مدل 3410 ARL، سوئیس) اندازه گیری گردید.

به منظور حذف نقره یونی و جدا سازی نانو ذرات نقره از کل کلونید نانو نقره، از روش سانتریفیوژ و شستشوی متوالی و مکرر کلونید فوق استفاده شد. در این روش شستشو، ابتدا کلونید نانو نقره به مدت ۶۰ دقیقه، با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه (معادل ۵۲۰۰g) سانتریفیوژ شد. در پایان این مرحله نانو ذرات نقره در ته لوله آزمایش ته نشین شده و محلول رویی که محتوی نقره یونی بود، توسط پیپت پاستور و به آهستگی و با دقت حذف شد. سپس نانو ذرات ته نشین شده از طریق افزودن آب دو بار تقطیر مجدداً به حالت سوسپانسیون در آورده شدند و سوسپانسیون حاصله به شدت مخلوط گردید. به منظور شستشوی کامل و حذف مطمئن نقره یونی از این سوسپانسیون، مراحل سانتریفیوژ و شستشوی فوق سه بار دیگر تکرار شد (در مجموع ۴ بار سانتریفیوژ، ۴ بار حذف محلول فوقانی و ۴ بار افزودن آب دو بار تقطیر انجام شد). در نهایت عدم وجود نقره یونی در محلول فوقانی حاصل از سانتریفیوژ چهارم، توسط دستگاه جذب اتمی مجهز به کوره گرافیتی (مدل فونیکس ۹۶۱، ساخت شرکت Biotech) مورد تأیید قرار گرفت. نانو ذرات ته نشین شده در پایان سانتریفیوژ چهارم توسط آب دو بار تقطیر به حجم رسانده شد و غلظت نقره در سوسپانسیون حاصله، پس از هضم اسیدی، توسط دستگاه جذب اتمی مذکور اندازه گیری شد تا برای آزمون های سم شناسی اطلاعات کافی از این سوسپانسیون وجود داشته باشد.

آزمون های زیست سم شناسی

همانطور که در قسمت مقدمه اشاره گردید، در پژوهش حاضر سمیت ناشی از "کل کلونید نانو نقره" و "نانو ذرات

و همکاران، ۱۳۹۱؛ Bar-Ilan et al. 2009; Wu et al. 2010; Kalbassi et al. 2011; Asghari et al. 2012; Johari et al. 2013; Salari Joo et al. 2013). نکته ای که در هیچ کدام از این مطالعات به آن توجه نشده، این است که مشخص نیست ویژگی های سمی مشاهده شده پس از رویارویی آبزیان با کلونید نانو نقره، ناشی از نانو ذرات نقره موجود در کلونید بوده یا یون های نقره موجود در آن و یا ترکیبی از این دو. هدف از این پژوهش، تفکیک سمیت ناشی از "کل کلونید نانو نقره" و سمیت ناشی از "نانو ذرات نقره موجود در کلونید نانو نقره" بود تا بر این اساس درک صحیح تری نسبت به ویژگی های سمی کلونید نانو نقره به دست آید و مشخص گردد که چه مقدار از سمیت کلونید نانو نقره ناشی از نانو ذرات نقره موجود در آن است. بنابراین در مطالعه حاضر، ابتدا اثرات سمیت حاد ناشی از رویارویی ماهی گورخری (*Danio rerio*) با کل کلونید نانو نقره مورد بررسی قرار گرفت؛ در مرحله بعد نانو ذرات نقره موجود در کلونید مذکور جدا سازی گردیده و سمیت حاد ناشی از آن در این ماهی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش ها

کلونید نانو نقره مورد استفاده و روش حذف یون های نقره از نانو ذرات نقره

کلونید نانو نقره استفاده شده در این پژوهش با نام تجاری نانوسید L2000، از طریق کاهش فوتوشیمیایی محلول نیترات نقره در حضور هیدرازین و آلکیل بنزن سولفونات (Rahman Nia, 2009) و توسط شرکت نانو نصب پارس تولید شده بود. به دلیل اهمیت خصوصیات فیزیکی و شیمیایی نانو مواد در مطالعات زیست سم شناسی، قبل از شروع آزمایشات سم شناسی، برخی از این ویژگی ها بدین ترتیب مورد بررسی قرار گرفت. به منظور تعیین شکل هندسی و اندازه ذرات نقره موجود در کلونید، تصاویر میکروسکوپ الکترونی، توسط دستگاه TEM مدل H-7100FA (Hitachi) با ولتاژ شتاب دهنده الکترون ۱۲۵kV تهیه شد. این دستگاه همچنین مجهز به آنالایزر اشعه ایکس منتشر کنند انرژی (EDX) مدل EX200 (Horiba) بود. در تصاویر با بزرگنمایی ۱۰۰۰۰۰ برابر، تعداد ۷۰۰ ذره به صورت کاملاً تصادفی انتخاب و با

نقره موجود در کلونید نانو نقره" در ماهی گورخری مورد مقایسه قرار گرفت (از این پس برای اختصار به ترتیب از واژه های "کلونید نقره" و "نانو ذرات نقره" استفاده خواهد شد).

ماهیان گورخری استفاده شده در این پژوهش از میان یک جمعیت ۱۰۰۰ عددی با میانگین وزن 0.28 ± 1.58 گرم انتخاب و به منظور سازگاری با شرایط آزمایشگاه، به مدت یک هفته در یک تانک هزار لیتری همراه با هوادهی و دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی نگهداری شدند. میانگین دمای آب طی دوره سازگاری، 1 ± 23 درجه سانتیگراد بود و ماهیان روزانه به میزان یک درصد وزن بدن با غذای مخصوص ماهیان آکواریومی تغذیه می شدند. آب مورد استفاده برای نگهداری ماهیان در طی دوره سازگاری و همچنین انجام آزمایشات سم شناسی، آب شرب شهر سنج بود که برای کلر زدایی از آن، حداقل به مدت ۲ هفته هوادهی شدید شده بود. نکته بسیار مهمی که در بررسی سمیت زیستی ترکیبات نقره باید به آن توجه نمود، این است که به دلیل احتمال واکنش نقره با ترکیبات سولفات، نمی توان به منظور کلر زدایی آب از تیوسولفات سدیم استفاده کرد. برخی از ویژگی های آب هوادهی شده با استفاده از کیت سنجش ویژگی های شیمیایی آب (شرکت Sera، ایتالیا) اندازه گیری شد؛ بر این اساس میزان آمونیاک و کلر آب صفر میلی گرم در لیتر، میزان کلسیم ۱۰۰ میلی گرم در لیتر و میزان pH برابر ۸/۵ بود.

آزمایش های سم شناسی در آکواریوم های محتوی ۱۰ لیتر آب هوادهی شده و بر اساس استاندارد "سازمان همکاری و توسعه اقتصادی (OECD)" برای انجام آزمون سمیت حاد در ماهیان، برنامه ریزی و اجرا گردید (OECD, 1992). در مدت زمان انجام آزمایش ها، میانگین دمای آب 1 ± 25 درجه سانتیگراد و میزان اکسیژن محلول همواره بالاتر از ۸ میلی گرم در لیتر بود. بر اساس استاندارد فوق غذادهی به ماهیان، ۲۴ ساعت قبل از شروع آزمایش های سم شناسی و در طی انجام آن قطع شد. بر همین اساس ابتدا آزمایش تعیین محدوده کشندگی "کلونید نقره" و "نانو ذرات نقره" به طور جداگانه انجام شد. بدین منظور، تعداد ۱۰۰ عدد ماهی گورخری در معرض ۱۰ غلظت شامل ۱، ۳، ۵، ۱۰، ۰/۵، ۰/۳، ۰/۱، ۰/۰۵، ۰/۰۳ و ۰/۰۱ میلی گرم در لیتر "کلونید

نقره" و نیز تعداد ۷۰ عدد ماهی گورخری در معرض ۷ غلظت شامل ۱۰، ۷/۵، ۵، ۲/۵، ۱، ۰/۵ و ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر "نانو ذرات نقره" قرار گرفتند. هر یک از غلظت های فوق در دو تکرار بررسی شد و در هر تکرار تعداد ۵ عدد ماهی گورخری در معرض مواد فوق قرار گرفتند. از ۱۰ عدد ماهی گورخری نیز در دو تکرار ۵ تایی به عنوان گروه شاهد استفاده شد و این ماهیان در آکواریوم های کاملا مشابه (پر شده با آب معمولی و فاقد هر نوع ماده افزوده) قرار گرفتند. در تمام تیمارها و تکرارها، تعداد ماهیان تلف شده در طی ۹۶ ساعت، هر ۲۴ ساعت یک بار شمارش و ثبت شد. بر اساس داده های به دست آمده از آزمایش های اولیه، محدوده کشندگی "کلونید نقره"، بین ۰/۰۳ و ۰/۰۱ میلیگرم در لیتر و محدوده کشندگی "نانو ذرات نقره" بین ۷/۵ و ۲/۵ میلیگرم در لیتر به دست در ادامه و با توجه به محدوده های کشندگی به دست آمده در مرحله قبل، برای انجام آزمایش های اصلی، تعداد ۲۷۰ عدد ماهی گورخری در معرض ۹ غلظت شامل ۰/۰۳، ۰/۰۲۸، ۰/۰۲۵، ۰/۰۲۳، ۰/۰۲، ۰/۰۱۸، ۰/۰۱۵، ۰/۰۱۳ و ۰/۰۱ میلی گرم در لیتر "کلونید نقره" و نیز تعداد ۲۷۰ عدد ماهی گورخری در معرض ۹ غلظت شامل ۷، ۶/۵، ۶، ۵/۵، ۵، ۴/۵، ۴، ۳/۵، ۳ میلی گرم در لیتر "نانو ذرات نقره" قرار گرفتند. هر یک از غلظت های نامبرده در سه تکرار انجام شد و در هر تکرار تعداد ۱۰ عدد ماهی در معرض هر یک از مواد مذکور قرار گرفتند. در آزمایش های اصلی نیز، تلفات ماهیان طی ۹۶ ساعت و هر ۲۴ ساعت یک بار شمارش و ثبت شد. نتایج به دست آمده از شمارش مرگ و میر ماهیان طی آزمایش های اصلی، با استفاده از نسخه ۱/۵ نرم افزار EPA Probit Analysis (منتشر شده توسط سازمان حفاظت محیط زیست امریکا) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و مقادیر غلظت های کشنده محاسبه شد.

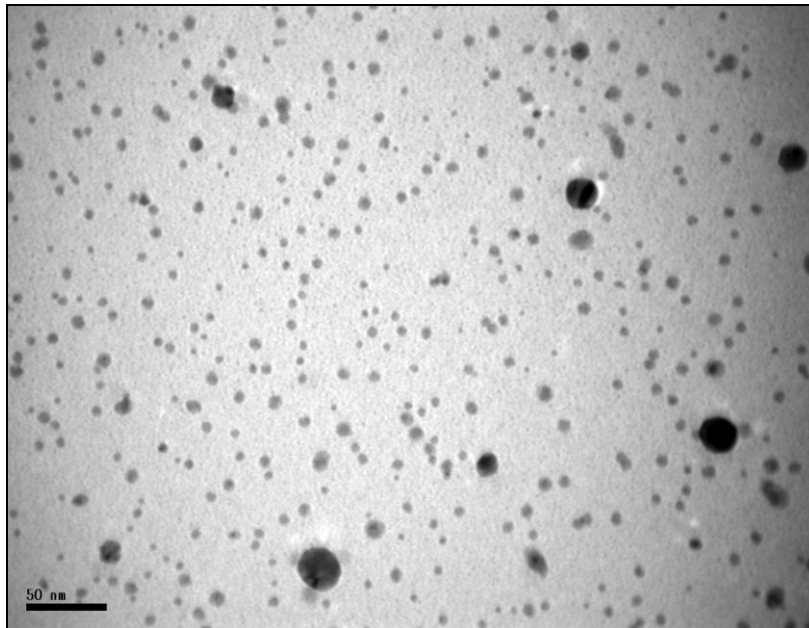
نتایج

ویژگی های فیزیکی و شیمیایی نانو ذرات نقره مورد استفاده

بررسی تصاویر میکروسکوپ الکترونی گذاره (شکل ۱)، مشخص کرد که نانو ذرات نقره موجود در کلونید نانو نقره مورد استفاده کروی شکل و با میانگین قطر 114 ± 254 نانومتر بوده اند. نتایج آنالیز اشعه ایکس منتشر کننده

در لیتر اندازه گیری شد که آزمون های سم شناسی مربوط به "کلوئید نقره" بر اساس این غلظت اجرا شد. همچنین بر اساس نتایج دستگاه جذب اتمی، غلظت نهایی نقره در سوسپانسیون حاصل از سانتریفیوژ "کلوئید نقره"، معادل ۱۶۳۰ میلی گرم در لیتر اندازه گیری شد و آزمون های سم شناسی مربوط به "نانو ذرات نقره" نیز بر اساس این غلظت اجرا شد.

انرژی نیز نشان داد که تنها ماده اصلی موجود در کلوئید، نقره است. بر اساس نتایج آنالیز ردیابی نانو ذره، میانگین قطر هیدرودینامیک ذرات نقره در کلوئید، 24 ± 63 نانومتر تعیین شد. نتایج دستگاه زتاسایزر نیز نشان داد که پتانسیل زتای ذرات نقره در کلوئید برابر $7/86 \pm 53/33$ میلی ولت است. بر اساس نتایج دستگاه ICP-AES، غلظت نقره کل در کلوئید مذکور معادل ۳۹۸۰ میلی گرم



شکل ۱- تصویر میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) تهیه شده از کلوئید نانو ذرات نقره مورد استفاده.

نوع نانو ذرات نقره برای ماهی مذکور، برابر ۰/۰۱۱ میلی گرم در لیتر محاسبه شد؛ بر همین اساس غلظت کشنده میانی (LC₅₀) "کلوئید نقره" طی ۹۶ ساعت برای ماهی گورخری به میزان $0/001 \pm 0/014$ میلی گرم در لیتر برآورد گردید.

در مورد "نانو ذرات نقره"، بیشترین غلظت فاقد اثر سمیت، کمترین غلظت ایجاد کننده سمیت و حداکثر غلظت قابل قبول، به ترتیب برابر ۲/۵، ۳ و ۲/۷۳۸ میلی گرم در لیتر به دست آمد. غلظت کشنده میانی "نانو ذرات نقره" نیز طی ۹۶ ساعت برای ماهی گورخری به میزان $0/293 \pm 4/209$ میلی گرم در لیتر برآورد شد.

نتایج مطالعات زیست سم شناسی

مقادیر غلظت های کشنده به دست آمده از آنالیز داده های مربوط به مرگ و میر ماهیانی که در معرض "کلوئید نقره" و "نانو ذرات نقره" قرار گرفته بودند، به طور خلاصه در جدول ۱ نشان داده شده است. بر اساس نتایج به دست آمده از آزمایش های سم شناسی، بیشترین غلظت فاقد اثر سمیت (NOEC) و کمترین غلظت ایجاد کننده سمیت (LOEC) "کلوئید نقره" برای ماهی گورخری به ترتیب برابر ۰/۰۱ و ۰/۰۱۲۵ میلی گرم در لیتر بودند. همچنین بر اساس بررسی داده های مرگ و میر با نرم افزار Probit، حداکثر غلظت قابل قبول (MATC) این

جدول ۱- میانگین غلظت های کشنده (LC) کلوئید نقره و نانو ذرات نقره در ماهی گورخری طی ۹۶ ساعت (اعداد بر حسب میلی گرم در لیتر است؛ LC10، LC50 و LC90 عبارتند از غلظت هایی از ماده شیمیایی که به ترتیب باعث تلفات ۱۰، ۵۰

و ۹۰ درصد ماهیان شده اند). کمترین و بیشترین مقادیر حدود اعتماد ۹۵ درصدی هر یک از غلظت های کشنده در داخل پرائنتر آورده شده است.

ماده شیمیایی		زمان (ساعت)	شاخص سمیت
نانو ذرات نقره	کلوئید نقره		
۳/۲۰۷ (۲/۳۱۰-۳/۵۴۹)	۰/۰۱۲ (۰/۰۱۱-۰/۰۱۳)	۲۴	LC ₁₀
۳/۱۹۰ (۲/۵۹۰-۳/۵۷۵)	۰/۰۱۱ (۰/۰۰۹-۰/۰۱۲)	۴۸	
۳/۱۸۸ (۲/۶۹۶-۳/۵۱۴)	۰/۰۱۱ (۰/۰۰۹-۰/۰۱۲)	۷۲	
۳/۱۶۷ (۲/۶۷۶-۳/۴۹۲)	۰/۰۱۱ (۰/۰۰۹-۰/۰۱۲)	۹۶	
۴/۸۹۵ (۴/۴۵۴-۵/۳۷۳)	۰/۰۱۶ (۰/۰۱۵-۰/۰۱۷)	۲۴	
۴/۵۰۸ (۴/۱۵۳-۴/۸۵۹)	۰/۰۱۵ (۰/۰۱۳-۰/۰۱۵)	۴۸	LC ₅₀
۴/۲۴۱ (۳/۹۳۶-۴/۵۲۴)	۰/۰۱۴ (۰/۰۱۳-۰/۰۱۵)	۷۲	
۴/۲۰۹ (۳/۹۰۴-۴/۴۹۰)	۰/۰۱۴ (۰/۰۱۳-۰/۰۱۵)	۹۶	
۷/۸۱۳ (۶/۷۶۸-۱۰/۳۲۳)	۰/۰۲۲ (۰/۰۲۱-۰/۰۲۴)	۲۴	LC ₉₀
۶/۴۱۰ (۵/۷۷۸-۷/۷۱۳)	۰/۰۱۹ (۰/۰۱۸-۰/۰۲۱)	۴۸	
۵/۶۴۲ (۵/۲۰۴-۶/۴۳۱)	۰/۰۱۹ (۰/۰۱۸-۰/۰۲۱)	۷۲	
۵/۵۹۳ (۵/۱۶۲-۶/۳۶۹)	۰/۰۱۹ (۰/۰۱۸-۰/۰۲۱)	۹۶	

بحث

با توجه به وجود ترکیبی از ذرات فلزی نقره (Ag^0) در ابعاد نانومتری (نانو ذرات نقره) و یون های آزاد نقره (Ag^+) در کلوئیدهای نانو نقره، هدف از پژوهش حاضر، پاسخ به این سوال بود که آیا نانو ذرات نقره موجود در کلوئید نانو نقره عامل سمیت این کلوئیدها هستند یا یون های نقره ای که به تدریج و بر اثر اکسیداسیون نانو ذرات در این کلوئید ها آزاد شده اند. بالا بودن نسبت سطح به حجم در نانو ذرات فلزی، باعث افزایش احتمال رهایش یون های فلزی از این نانو مواد می شود (Bian et al. , 2011; Mudunkotuwa and Grassian, 2011).

بر اساس داده های فوق، بیشترین غلظت فاقد اثر سمیت، کمترین غلظت ایجاد کننده سمیت، حداکثر غلظت قابل قبول و غلظت کشنده میانی "کلوئید نقره" به ترتیب ۲۴۸/۹۰، ۲۴۰، ۲۵۰، ۳۰۰/۶۴ و ۳۰۰/۶۴ برابر کمتر از مقادیر مربوط به "نانو ذرات نقره" بود. این اعداد نشان می دهند که سمیت "نانو ذرات نقره" حداقل ۲۴۰ برابر کمتر از سمیت "کلوئید نقره" است و بنابراین سمیت کلوئید نانو نقره، بیشتر از آن که مربوط به نانو ذرات نقره باشد، ناشی از یون های آزاد نقره موجود در این کلوئید است.

نقره مورد بررسی در دافنی ماگنا، متأثر از میزان یون نقره ای است که از آنها آزاد می شود.

بر اساس قوانین اتحادیه اروپا (EC, 2008) و راهنمای شماره 67/548/EEC شورای این اتحادیه، مصوب ۲۷ ژوئن ۱۹۶۷ میلادی (EC, 1999)، مواد شیمیایی با توجه به میزان غلظت های کشنده میانی (LC50) به دست آمده از آزمون های سم شناسی ۹۶ ساعته بر روی ماهی، بدین صورت طبقه بندی می شوند: اگر میزان LC50 کمتر از ۱ میلی گرم در لیتر باشد، ماده شیمیایی برای آبیان "بسیار سمی" است و دارای اثرات نامطلوب بر بوم سازگان آبی می باشد، اگر میزان LC50 بین ۱ و ۱۰ میلی گرم در لیتر باشد، ماده شیمیایی برای آبیان "سمی" است و باعث اثرات نامطلوب بر بوم سازگان آبی می شود و در نهایت اگر میزان LC50 بین ۱۰ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر باشد، ماده شیمیایی برای آبیان "مضر" است و ممکن است دارای اثرات نامطلوب بر بوم سازگان آبی باشد. از آنجا که با توجه به نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر، میزان غلظت های کشنده "کلئوئید نانو نقره" و "نانو ذرات نقره موجود در کلئوئید نانو نقره"، برای ماهی گورخری به ترتیب برابر 0.001 ± 0.014 و 0.293 ± 4.209 میلی گرم در لیتر برآورد گردید، این مواد به ترتیب جزو مواد شیمیایی "بسیار سمی" و "سمی" برای این آبیان طبقه بندی می شوند و در صورت رهایش به بوم سازگان آبی، دارای اثرات نامطلوب بر آبیان خواهند بود.

در مجموع با توجه به نتایج این پژوهش و مطالعات پیشین، به نظر می رسد که سمیت کلئوئید های نقره متأثر از میزان رهایش یون های نقره از نانو ذرات باشد و بنابراین در صورتی که بتوان میزان رهایش این یون ها را تحت کنترل در آورد، اثرات سمی نانو ذرات نقره نیز قابل کنترل خواهد بود. از طرفی با توجه به مشخص شدن اهمیت مقدار یون نقره رها شده از نانو ذرات نقره در سمیت آنها، در مطالعات نانو سم شناسی که در آینده انجام می شود، ضروری است سهم نقره یونی و نقره نانویی موجود در سوسپانسیون ها و کلئوئید های نانو نقره با دقت تعیین شود. همچنین ابداع روش های ارزان و اجرایی به منظور تعیین جداگانه غلظت نقره یونی و نقره نانویی نیز ضروری به نظر می رسد. با توجه به این که نانو ذرات نقره

اگرچه هنوز به درستی مشخص نیست که سمیت نانو ذرات تا چه میزان مربوط به یون های آزاد شده از آن ها و چه میزان مربوط به خود نانو ذرات است. Kim و همکاران در سال ۲۰۰۹ پیشنهاد کردند که سمیت نانو ذرات نقره به دلیل استرس اُکسایشی ناشی از این ذرات و مستقل از سمیت نقره یونی است. پژوهشگران دیگر گزارش کرده اند که مقدار یون نقره اندازه گیری شده در سوسپانسیون نانو ذرات نقره، نمی تواند سمیت مشاهده شده این سوسپانسیون ها را به طور کامل توجیه کند و لذا نتیجه گرفته اند که هم نقره یونی و هم نانو ذرات نقره در ایجاد سمیت مشارکت دارند (Navarro et al. 2008; Kawata et al. 2009)، هرچند سهم مشارکت هر یک از این دو در سمیت مشاهده شده، مشخص نشده است.

در پژوهش حاضر، با توجه به نتایج به دست آمده از رویارویی ماهیان گورخری با کلئوئید نانو نقره و سوسپانسیون محتوی نانو ذرات نقره ای که از طریق سانتریفیوژ از همان کلئوئید تفکیک شده و فاقد یون های نقره بود، مشخص شد که سمیت "نانو ذرات نقره" به مراتب کمتر از سمیت "کلئوئید نقره" است. بنابراین اگرچه هر دوی این ترکیبات نقره سمی هستند، اما به نظر می رسد که سمیت کلئوئید نانو نقره، بیشتر به دلیل حضور یون های آزاد نقره در آن است تا اینکه به خود نانو ذرات مربوط باشد. در تأیید این نظر، نکته جالب توجه این است که در بررسی که Doleželová و همکاران (۲۰۰۸) در مورد سمیت حاد نیترات نقره در ماهی گورخری انجام دادند، LC50 ۹۶ ساعته نقره یونی برابر 0.0052 ± 0.015 میلی گرم در لیتر به دست آمد، که این میزان به عدد به دست آمده مربوط به LC50 ۹۶ ساعته کلئوئید نقره در پژوهش حاضر (0.001 ± 0.014 میلی گرم در لیتر) بسیار نزدیک است. همچنین در مطالعه ای که Beer و همکاران (۲۰۱۲) انجام دادند، مشخص شد که سوسپانسیون نانو ذرات نقره ای که محتوی درصد های بالاتری از یون های آزاد نقره باشند، باعث ایجاد سمیت بیشتری در سلول های شش در محیط *In vitro* می شوند. Newton و همکاران (۲۰۱۳) با اندازه گیری غلظت یون های نقره آزاد شده از نانو ذرات نقره ای که توسط مواد مختلف پوشش داده شده بودند، نشان دادند که سمیت ناشی از هر یک از انواع نانو ذرات

- Batley, G.E., Kirby, J.K., McLaughlin, M. J. 2013. Fate and risks of nanomaterials in aquatic and terrestrial environments. *Accounts of Chemical Research* 46: 854-862.
- Beer, C., Foldbjerg, R., Hayashi, Y., Sutherland, D.S., Autrup, H. 2012. Toxicity of silver nanoparticles - nanoparticle or silver ion. *Toxicology Letters* 208: 286-292.
- Bian, S.W., Mudunkotuwa, I.A., Rupasinghe, T., Grassian, V.H. 2011. Aggregation and dissolution of 4 nm ZnO nanoparticles in aqueous environments: influence of pH, ionic strength, size, and adsorption of humic acid. *Langmuir* 27: 6059-6068.
- Doleželová, P., Mácová, S., Pištěková, V., Svobodová, Z., Bedáňová, I., Voslářová, E. 2008. Comparison of the sensitivity of *Danio rerio* and *Poecilia reticulata* to silver nitrate in short-term tests. *Interdisciplinary Toxicology* 1: 200-202.
- EC, 1999. Annex VI of Directive 1999/45/EC to consolidated version of directive 67/548/EEC. General classification and labeling requirements for dangerous substances and preparations.
- EC, 2008. Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and Council of 16 December 2008 on classification, labeling and packaging of substances and mixtures, Official Journal of the European Union.
- 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*). *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 12: 76-95.
- Kalbassi, M.R., Salari Joo, H., Johari, S.A. 2011. Toxicity of silver nanoparticles in aquatic ecosystems: salinity as the main cause of reducing toxicity. *Iranian Journal of Toxicology* 5: 436-443.
- دارای آثار سمیت با درجات مختلف در آبزیان هستند، ضروری است از رهایش آن ها به محیط زیست پیشگیری شود.
- ### منابع
- جوهری، س.ع.، ۱۳۹۰. کاربرد نانوذرات نقره در کاهش عفونت های قارچی تخم در دوره انکوباسیون و اثرات احتمالی رهایش آن ها بر تغییرات برخی شاخص های فیزیولوژیکی و ژنومیکی ماهی قزل آلابی رنگین کمان. رساله دکترا، دانشگاه تربیت مدرس، ۱۹۰ ص.
- سالاری جو، ح.، کلباسی، م. ر.، جوهری، س.ع. ۱۳۹۱. تأثیر شوری آب بر سمیت حاد نانو ذرات نقره کلونیدی در بچه ماهیان قزل آلابی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) مجله سلامت و محیط، شماره ۵: ۱۲۱-۱۳۲.
- علیشاهی، م.، مصباح، م. ۱۳۸۹. مقایسه سمیت نانو ذرات نقره در ماهیان آمور (*Ctenopharyngodon idella*)، شیریت (*Barbus grypus*)، اسکار (*Astronorus ocellatus*) و سوروم (*Cichlosoma severums*) مجله علمی پژوهشی بیولوژی دریا - دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز، شماره ۲: ۴۵-۵۱.
- علیشاهی، م.، مصباح، م.، قربانپور، م. ۱۳۹۰. بررسی سمیت نانوذرات نقره در چهار گونه ماهی. مجله دامپزشکی ایران، شماره ۷: ۳۶-۴۱.
- Asghari, S., Johari, S.A., Lee, J.H., Kim, Y.S., Jeon, Y.B., Choi, H.J., Moon, M.C., Yu, I.J. 2012. Toxicity of various silver nanoparticles compared to silver ions in *Daphnia magna*. *Journal of Nanobiotechnology* 10: 1-14.
- Bar-Ilan, O., Albrecht, R.M., Fako, V.E., Furgeson, D.Y. 2009. Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryos. *Small* 5: 1897-1910.
- Kawata, K., Osawa, M., Okabe, S. 2009. In vitro toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human

- hepatoma cells. *Environmental Science and Technology* 43: 6046-6060.
- Kim, S., Choi, J.E., Choi, J., Chung, K.H., Park, K., Yi, J., Ryu, D.Y. 2009. Oxidative stress dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicology In Vitro* 23: 1076-1084.
- Liu, J., Hurt, R.H. 2010. Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-Silver colloids. *Environmental Science and Technology* 44: 2169-2175.
- Lowry, G.V., Espinasse, B.P., Badireddy, A.R., Richardson, C.J., Reinsch, B.C., Bryant, L.D., Bone, A.J., Deonarine, A., Chae, S., Therezien, M., Colman, B.P., Hsu-Kim, H., Bernhardt, E.S., Matson, C.W., Wiesner, M.R. 2012. Long-term transformation and fate of manufactured Ag nanoparticles in a simulated large scale freshwater emergent wetland. *Environmental Science and Technology* 46: 7027-7036.
- Mudunkotuwa, I.A., Grassian, V.H. 2011. The devil is in the details (or the surface): impact of surface structure and surface energetics on understanding the behavior of nanomaterials in the environment. *Journal of Environmental Monitoring* 13: 1135-1144.
- Navarro, E., Piccapietra, F., Wagner, B., Marconi, F., Kaegi, R., Odzak, N., Sigg, L., Behra, R. 2008. Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Science and Technology* 42: 8959-8964.
- Newton, K.M., Puppala, H.L., Kitchens, C.L., Colvin, V.L., Klaine, S.J. 2013. Silver nanoparticle toxicity to *Daphnia magna* is a function of dissolved silver concentration. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32: 2356-2364.
- OECD, 1992. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
- Piccinno, F., Gottschalk, F., Seeger, S., Nowack, B. 2012. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials for Europe and the world. *Journal of Nanoparticle Research* 14: 1109-1120.
- Rahman Nia, J. 2009. Preparation of colloidal nanosilver. US Patent application docket 20090013825, 15 January 2009.
- Salari Joo, H., Kalbassi, M.R., Yu, I.J., Lee, J.H., Johari, S.A. 2013. Bioaccumulation of silver nanoparticles in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Influence of concentration and salinity. *Aquatic Toxicology* 140-141: 398-406.
- Wu, Y., Zhou, Q., Li, H., Liu, W., Wang, T., Jiang, G. 2010. Effects of silver nanoparticles on the development and histopathology biomarkers of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) using the partial-life test. *Aquatic Toxicology* 100: 160-167.
- Woodrow Wilson Database, 2013. Nanotechnology consumer product inventory (www.nanotechproject.org).
- Xiu, Z.M., Zhang, Q.B., Puppala, H.L., Colvin, V.L., Alvarez, P.J. 2012. Negligible particle specific antibacterial activity of silver nanoparticles. *Nano Letters* 12: 4271-4275.

Toxicity of colloidal nano-silver to zebrafish, *Danio rerio*: ions, nanoparticles, or both?

Seyed Ali Johari*, Leyla Habibi, Seyedeh Jino Hosseini

Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Kurdistan, Sanandaj, Kurdistan, Iran

Received 25 September 2014; accepted 6 March 2015

Abstract

Increasing production and utilization of silver nanoparticles can lead to their release into aquatic ecosystems and tend to toxic effects on aquatics. It is not yet clearly specified whether observed toxic effect following exposure of aquatic organisms to colloidal nano-silver is caused by silver nanoparticles contained in the colloid, by free silver ions, or by a combination of both. In this study, acute toxicity of "nanosilver colloid" (containing free ionic silver and silver nanoparticles) compared to the toxicity of "silver nanoparticles" separated from colloidal nanosilver (without free Ag^+ ions) were investigated in zebra fish, *Danio rerio*. Acute toxicity tests were planned and performed according to standards of Organization for Economic Cooperation and Development. The results showed that No Observed Effect Concentrations (NOECs), Lowest Observed Effect Concentrations (LOECs), Maximum Acceptable Toxicant Concentrations (MATCs), and Median Lethal Concentrations (LC_{50} s) of "nano-silver colloid" were 250, 240, 248.90, and 300.64 times less than those of "silver nanoparticles", respectively. Therefore, toxicity of colloidal nanosilver is mostly due to the free silver ions (Ag^+) rather than silver nanoparticles present in it. In general "nano-silver colloid" and "silver nanoparticles" are respectively classified as "highly toxic" and "toxic" chemicals for aquatics and the release of these substances into the environment should be prevented.

Keywords: Aquatic Nanotoxicology, Silver nanoparticles, Nano-silver colloid, Ionic silver, Zebrafish.

* Corresponding Author: a.johari@uok.ac.ir