

## سمیت نانوذرات نقره در مراحل ابتدایی تکامل تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) و ازون برون (*Acipenser stellatus*)

اشکان بنان<sup>۱</sup>، محمدرضا کلباسی مسجدشاهی<sup>۲\*</sup>، محمود بهمنی<sup>۳</sup>، محمدعلی یزدانی ساداتی<sup>۴</sup>

۱- دانشجوی دکتری، گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

۲- استاد، گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

۳- استاد، موسسه تحقیقات بین‌المللی تاس ماهیان دریای خزر، رشت، ایران

۴- دانشیار، موسسه تحقیقات بین‌المللی تاس ماهیان دریای خزر، رشت، ایران

پذیرش: ۹۴/۱۱/۰۷

دریافت: ۹۴/۰۴/۰۸

\*نویسنده مسئول مقاله: [kalbassi\\_m@modares.ac.ir](mailto:kalbassi_m@modares.ac.ir)

### چکیده:

نانوذرات نقره بیشتر به دلیل ویژگی ضدمیکروبی آنها کاربرد گسترده‌ای در محصولات مصرفی یافته‌اند. افزایش روزافزون استفاده از این نانوذرات باعث توجه به اثرهای احتمالی زیست سم‌شناسی آنها شده است. در این مطالعه، ابتدا اثرهای حاد کلویید نانوذرات نقره در دوران جنینی دو گونه تاس ماهی ایرانی و ازون برون بررسی شد و سپس اثرهای کوتاه مدت آن در مراحل ابتدایی تکامل (پیش از شروع تغذیه فعال) گونه ازون برون ارزیابی گردید. براساس نتایج به دست آمده از آزمون‌های سمیت حاد، نانوذرات نقره در هر دو گونه مورد بررسی سمیت وابسته به غلظت را در مراحل ابتدایی تکامل به دنبال داشتند. سه غلظت ۰/۲۵، ۰/۵۰ و ۰/۱ میلی گرم در لیتر کلویید نانوذرات نقره به همراه تیمار شاهد برای بررسی اثرهای کوتاه مدت در نظر گرفته شد. میزان تجمع نقره در تیمار ۰/۱ میلی گرم در لیتر به طور معناداری بیشتر از تیمار شاهد ثبت گردید ( $p < 0/05$ ). هر چند در میزان بازماندگی تفاوت معناداری بین تیمارها مشاهده نگردید.

**کلید واژگان:** نانو زیست سم‌شناسی، کلویید نانوذرات نقره، ماهیان خاویاری، تجمع زیستی

مقدمه:

نانوذرات به دلیل دارا بودن شکل، ساختار سطحی، اندازه و خصوصیات شیمیایی و فیزیکی خاص دارای ویژگی‌های منحصر به فردی می‌باشند. به طور ویژه، از آنجایی که ۴۰ تا ۵۰ درصد اتم‌های تشکیل‌دهنده نانوذرات بر روی سطح آنها حضور دارند، نانوذرات از واکنش‌پذیری بالاتری در مقایسه با مواد خارج از مقیاس نانو برخوردارند. از این‌رو، نانوذرات اثرهای زیست‌شناختی متفاوتی نسبت به نمونه‌های میکرومتری و ماکرومتری خود دارند (Salari و Joo و همکاران، ۲۰۱۳). نانوفناوری به طور فزاینده در حال گسترش است و شواهد زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد نانوذرات پتانسیل ایجاد اثرهای سمی جدی را در آبزیان دارند (Johari و همکاران، ۲۰۱۳؛ Kalbassi و همکاران، ۲۰۱۳؛ Johari، ۲۰۱۴). در این میان، نانوذرات نقره به دلایل مختلفی کاربرد فراوانی دارند که مهم‌ترین آن، ویژگی ضد میکروبی آنها است (Baker و همکاران، ۲۰۰۵؛ Li و همکاران، ۲۰۱۱؛ Samberg و همکاران، ۲۰۱۱). این ویژگی مصارف فراوانی را برای نانوذرات نقره در صنایع مختلف به ارمغان آورده است که در مطالعات مختلف بدان توجه شده است (Rhimi و همکاران، ۲۰۰۶؛ Sun و همکاران، ۲۰۰۹؛ Zodrow و همکاران، ۲۰۰۹). یکی از این مصارف که تاکنون کمتر به آن پرداخته شده است در صنعت آبی‌پروری و برای فیلتراسیون آب می‌باشد. قهرمانی (۱۳۸۹) به مطالعه کارایی زئولیت و کربن پوشش یافته با نانوذرات نقره در سیستم فیلتراسیون آب برای مقابله با عفونت ناشی از باکتری استرپتوکوکوس اینیائی (*Streptococcus iniae*) طی پرورش بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) پرداخت. شهیم (۱۳۹۱) از فوم‌های پلی‌اورتان محتوای نانوذرات نقره برای کنترل عفونت ناشی از استرپتوکوکوس اینیائی طی پرورش

بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بهره برد. Johari و همکاران (۲۰۱۵) اقدام به استفاده از زئولیت پوشش داده شده با نانوذرات نقره برای مبارزه با عفونت قارچی دوران انکوباسیون قزل‌آلای رنگین‌کمان نمودند. این کاربردهای متعدد، امکان رهایش این ذرات به محیط‌های آبی را نیز فراهم می‌سازد. از این‌رو، درک تأثیر این ذرات بر محیط‌های آبی با اهمیت است و دریاچه خزر نیز به‌عنوان یکی از پهنه‌های مهم آبی کشور که زیستگاه گونه‌های با ارزش اقتصادی بالا و اهمیت بین‌المللی ویژه‌ای چون تاس‌ماهیان می‌باشد، از این امر مستثنا نیست. نانوذرات نقره قادر به ایجاد انواع سمیت در آبزیان می‌باشند و به‌عنوان مثال سمیت سلولی و ژنی (Wise و همکاران، ۲۰۱۰؛ Nair و همکاران، ۲۰۱۱)، اختلال در تکامل جنینی (Scown و همکاران، ۲۰۱۰؛ Cho و همکاران، ۲۰۱۳)، تجمع در بافت‌ها، ایجاد آسیب‌های بافتی و اختلال در بیان ژن‌ها (Griffitt و همکاران، ۲۰۱۲ و ۲۰۱۳؛ Johari و همکاران، ۲۰۱۴) گزارش شده است. با در نظر گرفتن حساسیت بالای دوران جنینی طی تکامل ماهیان، بررسی اثرهای حاد و کوتاه مدت نانوذرات نقره در گونه‌های مختلف ماهیان حائز اهمیت است. از این‌رو پژوهش حاضر سعی بر آن دارد تا به بررسی اثرهای حاد و کوتاه مدت این نانوذره در دوران جنینی دو گونه ارزشمند تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) و ازون‌برون (*Acipenser stellatus*) بپردازد.

#### مواد و روش کار

##### نانوذرات نقره و ویژگی‌های آن

در این بررسی از کلونید نانوذرات نقره با نام تجاری نانوسید و غلظت اسمی ۴۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، خریداری شده از شرکت نانو نصب پارس (تهران، ایران) که در

پرورش و نگهداری مولدین در حوضچه‌های بتنی حاوی آب با درجه حرارت  $18 \pm 1/5$  سانتی‌گراد و pH  $7/6$  تا  $7/9$  صورت گرفت. برای القای رسیدگی جنسی از تزریق عضلانی هورمون سنتتیک گنادوتروپینی (-LHRH  $A_2$ )<sup>۱</sup> به میزان ۵ تا ۱۰  $\mu\text{g/kg}$  بهره گرفته شد (Aramli و همکاران، ۲۰۱۴). استحصال تخمک و اسپرم از مولدین رسیده و لقاح به روش Amini و همکاران (۲۰۱۲) صورت گرفت و بخشی از تخم‌های لقاح یافته برای پژوهش حاضر استفاده شدند.

سازمان ثبت اختراعات ایالات متحده امریکا با شماره ۲۰۰۹۰۰۱۳۸۲۵ به ثبت رسیده است (Nia، ۲۰۱۱)، استفاده شد. برخی ویژگی‌های کلونید به کار رفته در این بررسی براساس آزمایش‌های Salari Joo و همکاران (۲۰۱۳) در جدول ۱ آورده شده است.

تکثیر مصنوعی دو گونه مورد مطالعه مولدین به‌کار رفته در پژوهش حاضر از ساحل جنوبی دریای خزر و به‌طور خاص از صیدگاه‌های محدوده بهشهر (استان مازندران) صید و به مرکز تکثیر، پرورش و بازسازی ذخایر آبزیان شهید رجایی (ساری، مازندران) منتقل شدند.

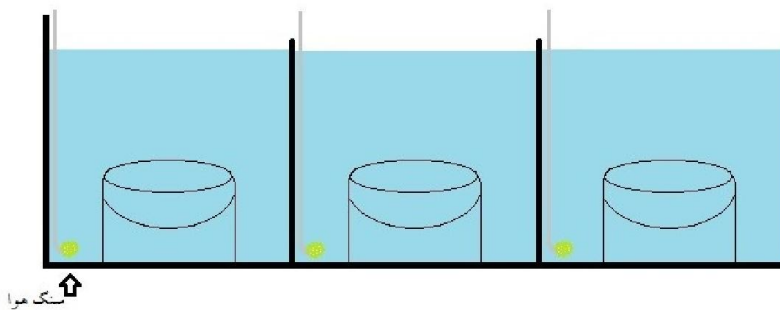
جدول ۱ ویژگی‌های اندازه‌گیری شده کلونید نانوذرات نقره مورد استفاده (Salari Joo و همکاران ۲۰۱۳)

ویژگی	روش اندازه‌گیری	فراسنج	توضیحات
شکل	TEM	کروی	-----
قطر بیشینه	TEM	۱۲۹	۶۵/۱۴ درصد از ذرات قطری بین ۱ تا ۱۳ نانومتر دارند.
غلظت (میلی‌گرم در لیتر)	ICP-AES	۳۹۸۰	با غلظت اعلام شده از شرکت تولیدی اختلاف ناچیزی دارد.
قطر هیدرودینامیکی (نانومتر)	Zetasizer	۱۶۳/۵ تا ۳/۹	۵۴/۱ درصد از ذرات قطر هیدرودینامیکی کمتر از ۱۰۰ نانومتر دارند.
میانگین قطر هیدرودینامیکی (نانومتر)	Zetasizer	۵۴/۸	-----
خلوص	EDX	----	در کلونید نانوذرات نقره تنها عنصر نقره وجود دارد.

#### بررسی سمیت حاد نانوذرات نقره در دوره جنینی گونه‌های مورد بررسی

با توجه به شرایط خاص دوران انکوباسیون در تاس‌ماهیان (وجود جریان آب در انکوباتور و حرکت تخم‌های لقاح یافته)، سیستم متفاوتی برای انجام آزمون‌های پژوهش حاضر طراحی گردید (شکل ۱). از مخازن شیشه‌ای ۹ لیتری که با استفاده از دو دیواره شیشه‌ای به ۳ قسمت کاملاً مجزا (هر یک با گنجایش ۳ لیتر) تقسیم و با سیستم مرکزی هوادهی می‌شدند، استفاده شد. در هر قسمت یک سینی پایه‌دار مشبک قرار داده شد. تخم‌های لقاح یافته پس از رفع چسبندگی و جذب آب به این سینی‌ها منتقل شدند. غلظت‌های آزمایشی نانوذرات نقره براساس جمع‌بندی انجام شده از مطالعات مشابه در گونه‌های دیگر به ترتیب ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۴ و ۸ میلی‌گرم در لیتر انتخاب گردید (Cho و همکاران، ۲۰۱۳؛ Johari و همکاران، ۲۰۱۳) و به همراه تیمار شاهد (آب کارگاه) تخم‌های لقاح یافته به مدت ۹۶ ساعت و در ۳ تکرار در معرض غلظت‌های مذکور قرار گرفتند. تعداد ۷۵ تخم لقاح یافته در هر تکرار لحاظ

گردید. اکسیژن محلول، درجه حرارت و pH به صورت روزانه ارزیابی می‌شد. مطالعه سمیت تحت شرایط نیمه‌ساکن (semi-static) انجام شد و آب مخازن هر ۲۴ ساعت یکبار تعویض و غلظت‌های مورد نظر دوباره در مخازن برقرار می‌شد. به منظور جلوگیری از قارچ‌زدگی در تیمار شاهد (با توجه به اینکه در سایر تیمارها نانوذرات نقره به‌عنوان عامل ضد میکروبی مانع از قارچ‌زدگی می‌شد)، ۱ میلی‌گرم در لیتر فرمالدئید به‌طور روزانه و پس از تعویض آب به مخازن اضافه می‌شد. در طول دوره آزمایش، درصد نسبی تلفات (هرگونه اختلال در روند تکامل جنینی همچون بروز ناهنجاری در تقسیم‌های جنینی، عدم وقوع اندام‌زایی و عدم تفریح به‌عنوان تلفات ثبت شدند) براساس روش Dettlaff و Ginsburg (۱۹۹۲) در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت ثبت گردید. براساس نتایج به‌دست آمده در این بخش، مقادیر غلظت‌های کشنده میانی (LC50) کلونید نانوذرات نقره طی ۹۶ ساعت برای جنین‌های کیسه زرده‌دار دو گونه فوق با استفاده از نرم‌افزار EPA Probit Analyzer محاسبه گردید.



شکل ۱ طرح کلی سیستم انکوباسیون تحقیق حاضر

میلی لیتر پراکسید هیدروژن (۳۰ درصد) به ۰/۲ گرم از نمونه‌ها در دمای °C ۱۵۰ صورت گرفت (دستگاه هضمی میکروویو- Milestone MLS 1200). نمونه‌های هضم شده در دمای اتاق خنک شد و به دنبال آن رقیق‌سازی با افزودن آب مقطر به آنها انجام گرفت (Jarić و همکاران، ۲۰۱۱). سنجش میزان نقره با دستگاه طیف‌سنج نشری نوری با پلاسمای جفت شده القایی (ICP-OES) انجام شد ( Varian 720-ES ICP-OES, Agilent Technologies). حد تشخیص نقره با این دستگاه ۱۰۰ میکروگرم در لیتر بود.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نسخه ۱۶ نرم‌افزار SPSS و رسم نمودارها با استفاده از نسخه ۲۰۱۳ نرم‌افزار Excel انجام شد. به منظور مقایسه داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) استفاده گردید و معناداری آنها با استفاده از آزمون Tukey بررسی شد.  $p < 0.05$  به عنوان سطح تفاوت معنادار در نظر گرفته شد.

#### نتایج

براساس نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر درباره آزمایش سمیت حاد، غلظت کشنده میانی ۹۶ ساعته کلونید نانوذرات نقره در جنین‌های کیسه زرده‌دار دو گونه

#### بررسی سمیت کوتاه مدت<sup>۲</sup> نانوذرات نقره طی مراحل ابتدایی تکامل ازون پرون

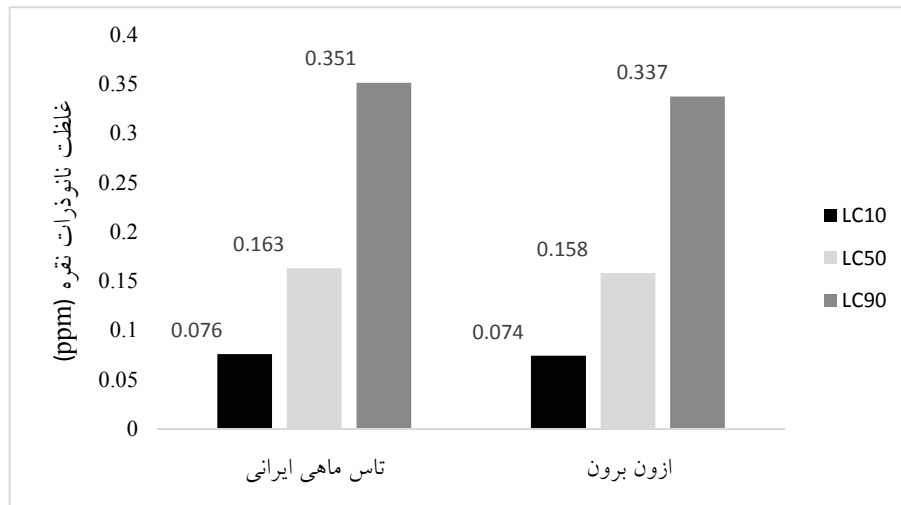
براساس نتایج به دست آمده از بررسی سمیت حاد، در کنار تیمار شاهد، سه غلظت غیرکشنده از نانوذرات نقره شامل ۰/۲۵، ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر برای این بررسی انتخاب شدند. تعداد ۵۰ تخم لقاح یافته در هر تکرار لحاظ گردید. با توجه به ماهیت گونه‌های مورد بررسی، طول دوره این آزمون ۸ روز در نظر گرفته شد، به طوری که پیش از شروع تغذیه فعال، نمونه‌برداری از لاروها برای سنجش تجمع یون‌های فلزی صورت گرفت. همچنین در طی این دوره درصد تفریح و درصد بازماندگانی ثبت شدند.

#### تعیین میزان نقره در لاروهای مورد مطالعه

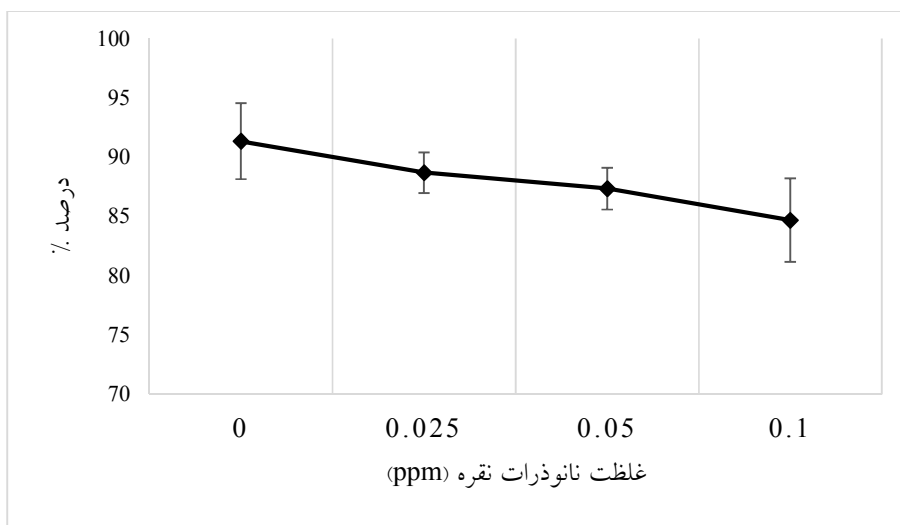
این ارزیابی برای مشخص کردن میزان تجمع یون نقره در لاروها انجام شد. این ویژگی می‌تواند به عنوان شاخصی برای درک اثرهای کوتاه مدت و مزمن نانوذرات نقره به کار رود. بدین منظور، نمونه‌های جمع‌آوری شده ابتدا با دستگاه خشک‌کن انجمادی (Freeze dryer) خشک شده و به صورت پودر در آمدند. سپس به آزمایشگاه گروه شیمی دانشگاه Nebraska امریکا منتقل شده، عمل هضم با اضافه کردن ۶ میلی‌لیتر اسید نیتریک (۶۵ درصد) و ۴

تاس‌ماهی ایرانی و ازون‌برون به ترتیب  $0/163$  و  $0/158$  میلی‌گرم در لیتر محاسبه گردید (شکل ۲). نتایج نشان می‌دهد که با گذشت زمان و در ۲۴ ساعت پایانی، غلظت‌های پایین نانوذرات نقره نیز سبب تلفات شدند. نتایج حاصل از بررسی سمیت کوتاه مدت کلونید نانوذرات نقره در گونه ازون‌برون بیانگر نبود اختلاف معنادار در درصد تفریح و بازماندگی بین تیمارهای مورد بررسی و تیمار شاهد طی ۸ روز دوره مطالعه بود (شکل ۵).

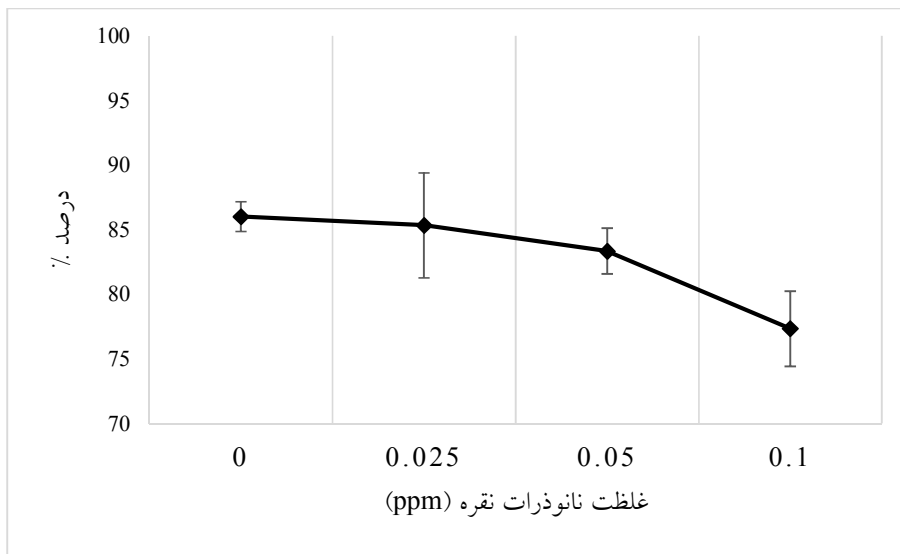
( $p > 0/05$ ). هرچند با افزایش غلظت نانوذرات نقره، درصد تفریح و بازماندگی کاهش نشان دادند (شکل‌های ۳ و ۴). نتایج به‌دست آمده از سنجش میزان تجمع یون نقره در لاروهای بررسی شده نشان داد که میزان تجمع در تیمار  $0/1$  میلی‌گرم در لیتر به‌طور معناداری بیشتر از تیمار شاهد بود ( $p < 0/05$ ) (شکل ۵). هرچند اختلاف معناداری بین تیمارهای مختلف نانوذرات نقره مشاهده نشد ( $p > 0/05$ ) (شکل ۵).



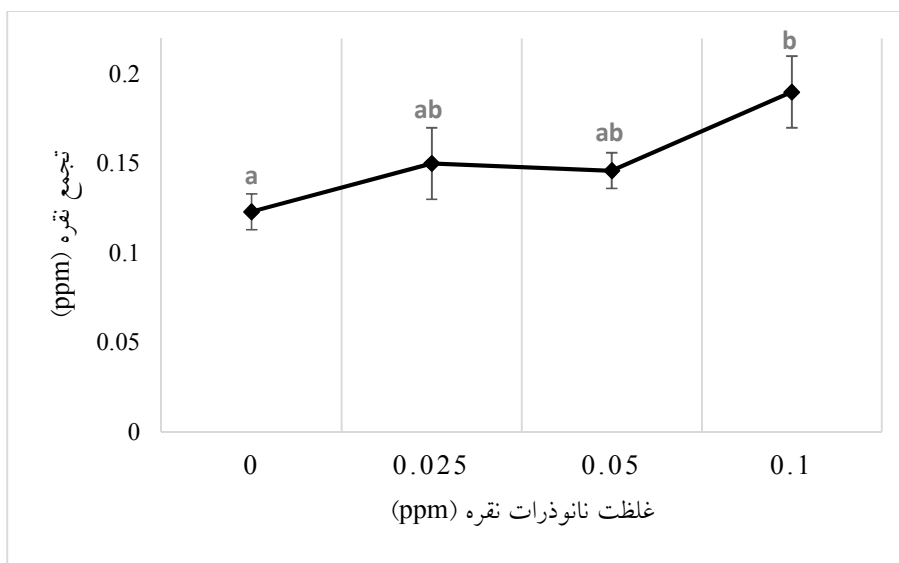
شکل ۲ مقایسه غلظت‌های کشنده ۹۶ ساعته حاصل از کلونید نانوذرات نقره در تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) و ازون‌برون (*Acipenser stellatus*)



شکل ۳ درصد تفریح در تیمار شاهد و سایر تیمارهای حاوی نانوذرات نقره در گونه ازون برون



نمودار ۴ درصد بازماندگی جنینها از لقاح تا پایان دوره پژوهش در تیمار شاهد و سایر تیمارهای حاوی نانوذرات نقره در گونه ازون برون



شکل ۵ میزان تجمع یون نقره در تیمار شاهد و سایر تیمارهای حاوی نانوذرات نقره در گونه ازون برون (وجود حروف لاتین در بالای نقاط نشان‌دهنده معنادار بودن اختلاف‌ها در ویژگی مذکور است ( $p < 0.05$ ))

## بحث

مطالعات مختلف در این زمینه بسته به نوع گونه و طول مدت آزمون نتایج متفاوتی به دنبال داشته‌اند (جدول ۲). نتایج به دست آمده در اکثر مطالعات نشان می‌دهد که حساسیت جنین‌های کیسه زرده‌دار به نانوذرات نقره بیشتر از حساسیت آنها در سایر مراحل زندگی می‌باشد. Korwin-Kossakowski (۲۰۰۸) نشان دادند که زمان سپری شده پس از تفریخ، حساس‌ترین مرحله چرخه زندگی ماهیان است و از این رو آن را مرحله جبرانی تکامل نامیدند. این موضوع با نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر کاملاً همخوانی دارد به طوری که مرگ و میر کامل لاروهای تفریخ شده در غلظت‌های بالای ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات نقره ثبت شد. همچنین، تفاوت‌ها در نتایج به دست آمده در مطالعات مختلف (جدول ۲) به این دلیل است که عوامل متعددی بر میزان سمیت نانو مواد تأثیرگذار می‌باشد که از این میان می‌توان به اندازه ذرات، شکل آنها، درصد ناخالصی‌ها و حتی مدت زمان و شرایط نگهداری آنها اشاره کرد (Kittler و همکاران، ۲۰۱۰).

آزمون سمیت حاد برای تعیین غلظت‌هایی از یک ماده که در مدت زمان کوتاه اثرهای مضر ویژه‌ای برای موجود به دنبال دارند، اختصاص دارد و با توجه به اینکه تعیین میزان مرگ و میر به روشنی قابل انجام است، آزمون تلفات حاد رایج‌ترین آزمون سمیت کوتاه مدت است. در بسیاری از کشورها، فرایند ثبت یک ماده شیمیایی ترکیبی شامل شماری از آزمون‌ها برای بررسی ابعاد اثرهای محیط زیستی آن است که آزمون سمیت حاد یکی از آنها است (Johari و همکاران، ۲۰۱۳). براساس قوانین اتحادیه اروپا (EC)، دستورالعمل ۶۷/۵۴۸/EEC (EC، ۱۹۹۹) هر ماده‌ای که غلظت کشنده میان ۹۶ ساعته آن در ماهیان کمتر از یک میلی‌گرم در لیتر تعیین گردد به عنوان «بسیار سمی» برای آن گونه تلقی می‌گردد. از این رو، نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که کاربرد نانوذرات نقره در این مرحله از چرخه زندگی (جنینی) هر دو گونه تاس‌ماهی ایرانی و ازون برون به‌طور حاد کشنده است.



به طور خاص، ذرات با قطر ۳۹/۴ نانومتر طی تکامل جنینی به داخل کیسه زرده و صفرا انتقال می‌یابند. در مطالعه‌ای با استفاده از ردیاب‌های فلوروسنت نشان داده شد که نانوذرات نقره (با قطر ۵ تا ۴۶ نانومتر) از طریق انتشار وارد مجاری کوریون ماهی گورخری (*Danio rerio*) می‌شوند (Lee و همکاران، ۲۰۰۷) و می‌توانند از طریق مسدود کردن کانال‌های کوریون سبب ایجاد آسیب‌های جدی طی تکامل جنینی شوند. نتایج مطالعه حاضر نیز با فرضیه فوق همخوانی دارد به طوری که با افزایش غلظت نانوذرات نقره، کاهش درصد تفریخ و در نهایت درصد بازماندگی مشاهده شد.

در این مطالعه، پس از بررسی اثرهای حاد کلویید نانوذرات نقره در کوتاه مدت، به منظور شناخت واکنش آنها به غلظت‌های غیرکشنده این نانوذره در مدت زمان به نسبت طولانی‌تر از آزمون سمیت کوتاه مدت در گونه ازون‌برون استفاده شد. نتایج به دست آمده در پایان دوره ۸ روزه این آزمون، حاکی از کاهش غیرمعنادار و البته وابسته به غلظت نانوذرات نقره در درصد تفریخ و بازماندگی بود (شکل‌های ۳ و ۴) که از این نظر با نتایج به دست آمده از سوی Cho و همکاران (۲۰۱۳) مطابقت داشت. Kashiwada و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که ذرات با قطر ۳۹/۴ تا ۴۲۰۰۰ نانومتر در لایه کوریون تخم‌های لقاح یافته گونه مداکا جذب شده و در آنجا درون قطرات چربی تجمع می‌یابند و

جدول ۲ آزمون سمیت حاد نانوذرات نقره در مراحل مختلف چرخه زندگی چند گونه ماهی آب شیرین

منبع	غلظت کشنده میانی (میلی‌گرم در لیتر)	طول مدت آزمون حاد (ساعت)	گونه (مرحله زندگی)
Johari و همکاران، ۲۰۱۳	۰/۲۵	۹۶	قزل‌آلای رنگین‌کمان (جنین کیسه زرده‌دار)
Johari و همکاران، ۲۰۱۳	۰/۷۱	۹۶	قزل‌آلای رنگین‌کمان (لارو)
Johari و همکاران، ۲۰۱۳	۲/۱۶	۹۶	قزل‌آلای رنگین‌کمان (بچه ماهی)
Jahanbakhshi و همکاران، ۲۰۱۲	۶۶/۴	۹۶	کپور نقره‌ای (بالغ)
Jahanbakhshi و همکاران، ۲۰۱۲	۸۳/۹	۹۶	کپور معمولی (بالغ)
Cho و همکاران، ۲۰۱۳	۰/۸۴	۹۶	مداکا (جنین کیسه زرده‌دار)
Kashiwada و همکاران، ۲۰۱۲	۱/۳۹	۹۶	مداکا (جنین کیسه زرده‌دار)
Wu و همکاران، ۲۰۱۰	۱/۰۳	۴۸	مداکا (بالغ)
Chae و همکاران، ۲۰۰۹	۰/۰۳۴۶	۹۶	مداکا (بالغ)

(۲۰۱۱) در بررسی اثرهای سه نانوذره طلا، نقره و پلاتینیوم در مرحله جنینی ماهی گورخری، میزان تجمع فلزها را در تیمارهای مورد بررسی ارزیابی کردند که در مورد هر سه نانوذره با افزایش غلظت آنها، میزان تجمع فلزها افزایش را نشان می‌داد. از این‌رو، نانوذرات علاوه بر اثرهای حاد

سنجش میزان نقره در لاروهایی که تحت شرایط آزمون کوتاه مدت سمیت پرورش یافته بودند اگرچه در تیمار ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر در مقایسه با تیمار ۰/۰۲۵ نشانگر کاهش اندک بود، اما به طور کلی با افزایش غلظت نانوذرات نقره، افزایش نشان داد. Asharani و همکاران

قهرمانی، م.، ۱۳۸۹. مطالعه کارایی نانوذرذرات نقره (زئولیت و کربن) و یون نقره (زئومیک گرانولی و الیاف) در سیستم فیلتراسیون آب پرورش بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان جهت کاهش باکتری استرپتوکوکوس اینیایی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس.

Amini, K. Siraj S. S. Mojazi Amiri, B. Mirhashemi Rostami, S. A. Sharr, A. and Hossienzadeh, H. 2012. Evaluation of LHRH-a acute release implantation on final maturation and spawning in not-fully matured broodstocks of Persian sturgeon (*Acipenser persicus* Borodin, 1897).

Aramli, M. S. Kalbassi, M. R. Gharibi, M. R. 2014. Effects of multiple collections on spermatozoa quality of Persian sturgeon, *Acipenser persicus*: motility, density and seminal plasma composition. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. 99(1): 66-72.

Asharani, P. V. Wu, Y. L. Gong, Z. Valiyaveettil, S. 2008. Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. Nanotechnology. 19(25), 255102.

Baker, C. Pradhan, A. Pakstis, L. Pochan, D. J. and Shah, S. I. 2005. Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles. Journal of Nanoscience and Nanotechnology 5, 244-249.

Chae, Y. J. Pham, C. H. Lee, J. Bae, E. Yi, J. and Gu, M. B. 2009. Evaluation of the toxic impact of silver nanoparticles on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Aquatic Toxicology. 94, 320-327.

Cho, J. Kim, K. Ryo, T. Lee, J. Kim, J. Kim, J. Lee, B. Jo, E. Yoon, J. Eom, I. Choi, K. and Kim, P. 2013. Stepwise embryonic toxicity of silver nanoparticles on *Oryzias latipes*. BioMed Research International 2013:494671.

Dettlaff, T. A. Ginsburg, A. S. and Schmalhausen, O.I. 1992. Sturgeon Fishes: Developmental Biology and Aquaculture. Translated by Gause G.G. and Vassetzky. Springer -Verlag. Germany. pp. 300.

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.

زیانبار، از طریق ورود و تجمع تدریجی داخل بدن جنین می‌تواند سبب ایجاد نقص‌های عمده‌ای چون از کارافتادگی اندام شوند (Asharani و همکاران، ۲۰۱۱).

بنابراین توسعه تجاری فناوری نانو بدون درک تأثیر و سرانجام نانوذرذرات در محیط زیست، یک خطر زیستی بالقوه محسوب شده و مسئولانه نیست. در این تحقیق، روشی کارآمد برای بررسی سمیت نانوذرذرات در تاس ماهیان ارائه شد. اگرچه مقادیر به دست آمده غلظت‌های کشنده میانی (LC50) در دو گونه مورد بررسی از نقطه‌نظر سمیت‌شناسی، نقطه آغاز مناسبی محسوب می‌شوند، اما انجام مطالعات تکمیلی درباره سازوکار و همچنین وسعت تأثیر نانوذرذرات نقره بر تخم لقاح یافته و لارو این خانواده از ماهیان از طریق بررسی‌های بافتی و میکروسکوپی بسیار حائز اهمیت است.

#### تشکر و قدردانی

از جناب آقای مهندس نوری، مسئول کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری و سایر کارکنان مرکز تکثیر، پرورش و بازسازی ذخایر آبزیان شهید رجایی به دلیل همکاری‌های‌شان قدردانی می‌نمایم. بخشی از هزینه‌های انجام این تحقیق از محل حمایت مالی ستاد فناوری نانو ریاست جمهوری در قالب رساله دکتری تأمین شده است.

#### منابع

شهیم، ا.س.، ۱۳۹۱. کاربرد فوم های پلی اورتان محتوی نانوذرذرات نقره و زئولیت نقره در سیستم فیلتراسیون آب پرورش بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به منظور کنترل عفونت ناشی از استرپتوکوکوس اینیایی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس.

(*Oncorhynchus mykiss*) eggs. *Aquac Int.* DOI: 10.1007/s10499-015-9906-7

**Kalbassi, M. R. Johari, S. A. Soltani, M. and Yu, I. 2013.** Particle size and agglomeration affect the toxicity levels of silver nanoparticle types in aquatic environment. *Ecopersia* 1 (3), 273–290.

**Kashiwada, S. Ariza, M. E. Kawaguchi, T. Nakagame, Y. Jayasinghe, B. S. Gärtner, K. Nakamura, H. Kagami, Y. Sabo-Attwood, T. Ferguson, P. L. and Chandler, G.T. 2012.** Silver nanocolloids disrupt medaka embryogenesis through vital gene expressions. *Environmental Science and Technology*. 46 (11): 6278-6287.

**Kittler, S. Greulich, C. Diendorf, J. Koller, M. and Epple, M. 2010.** Toxicity of silver nanoparticles increases during storage because of slow dissolution under release of silver ions. *Chemistry of Materials* 22, 4548–4554.

**Korwin-Kossakowski, M. 2008.** The influence of temperature during the embryonic period on larval growth and development in carp, *Cyprinus carpio* L., and grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Val.): theoretical and practical aspects. *Archives of Polish fisheries*. 16, 231–314.

**Lee, K. J. Nallathamby, P. D. Browning, L. M. Osgood, C. J. and Xu, X. 2007.** *In vivo* imaging of transport and biocompatibility of single silver nanoparticles in early development of Zebrafish embryos. *ACS Nano*. 1 (2), 133-143.

**Li, W. R. Xie, X. B. Shi, Q. S. Duan, S. S. Ouyang, Y. S. Chen, Y. B. 2011.** Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *Biometals* 24, 135–141.

**Nair, P. M. Park, S. Y. Lee, S. W. and Choi, J. 2011.** Differential expression of ribosomal protein gene, gonadotrophin releasing hormone gene and balbiani ring protein gene in silver nanoparticles exposed *Chironomus riparius*. *Aquatic Toxicology* 101, 31–37.

**Nia, J. R. 2011.** Preparation of colloidal nanosilver. Google Patents.

**Rhim, J-W. Hong, S-I. Park, H-M. Ng, P. K. W. 2006.** Preparation and characterization of chitosan-based nanocomposite films with anti- microbial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54:5814–5822.

**Salari Joo, H. Kalbassi, M. R. Yu, I. J. Lee, J. H. and Johari, S. A. 2013.** Bioaccumulation of silver

**EC, 2008.** Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labeling and packaging of substances and mixtures, Official J. Eur. Union, 31.12.2008.

**Griffitt, R. J. Brown-Peterson, N. J. Savin, D. A. Manning, C. S. Boube, I. Ryan, R. A. and Brouwer, M. 2012.** Effects of chronic nanoparticulate silver exposure to adult and juvenile sheepshead minnows (*Cyprinodon variegatus*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 31, 160–167.

**Griffitt, R. J. Lavelle, C. M. Kane, A. S. Denslow, N. D. and Barber, D. S. 2013.** Chronic Nanoparticulate Silver Exposure Results in Tissue Accumulation and Transcriptomic Changes in Zebrafish. *Aquatic Toxicology* 130-131, 192-200.

**Jahanbakhshi, A. Shaluei, F. and Hedayati, A. 2012.** Detection of silver nanoparticles (Nanosil) LC50 in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and goldfish (*Carassius auratus*). *World Journal of Zoology*. 7, 126–130.

**Jarić, I. Višnjić-Jeftić, Ž. Cvijanović, G. Gačić, Z. Jovanović, L. Skorić, S. and Lenhardt, M. 2011.** Determination of differential heavy metal and trace element accumulation in liver, gills, intestine and muscle of sterlet (*Acipenser ruthenus*) from the Danube River in Serbia by ICP-OES. *Microchemical Journal* 98, 77–81.

**Johari, S. A. Kalbassi, M. R. Soltani, M. and Yu, I. J. 2013.** Toxicity comparison of col- loidal silver nanoparticles in various life stages of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 12 (1), 76–95.

**Johari, S. A. 2014.** Toxicity effect of colloidal silver nanoparticles on fertilization capacity and reproduction success of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Nanomedicine Research* 1, 000001.

**Johari, S. A. Kalbassi, M.R. Yu, I.J. and Lee, J.H. 2014.** Chronic effect of waterborne silver nanoparticles on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): histopathology and bioaccumulation. *Comparative Clinical Pathology*. DOI: 10.1007/s00580-014-2019-2.

**Johari SA, Kalbassi MR, Sltani M, Yu IJ 2015.** Application of nanosilver-coated zeolite as water filtermedia for fungal disinfection of rainbow trout

- Wise Sr, J. P. Goodale, B. C. Wise, S. S. Craig, G. A. Pongan, A. F. Walter, R. B. Thompson, W. D. Ng, A. K. Aboueissa, A. M. Mitani, H. Spalding, M. J. and Mason, M. D. 2010.** Silver nanospheres are cytotoxic and genotoxic to fish cells. *Aquatic Toxicology*. 97, 34–41.
- Wu, Y. Zhou, Q. Li, H. Liu, W. Wang, T. and 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(2), 160-167.
- Zodrow, K. Brunet, L. Mahendra, S. Li, D. Zhang, A. Li, Q. Alvarez, P. J. J. 2009.** Polysulfone ultrafiltration membranes impregnated with silver nanoparticles show improved biofouling resistance and virus removal. *Water Research*. 43:715–723.
- nanoparticles in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Influence of concentration and salinity. *Aquatic Toxicology*, 140-141 (7): 398-406.
- Samberg, M. E. Orndorff, P. E. and Monteiro-Riviere, N. A. 2011.** Antibacterial efficacy of silver nanoparticles of different sizes, surface conditions and synthesis methods. *Nanotoxicology* 5, 244–253.
- Scown, T. M. Santos, E. M. Johnston, B. D. Gaiser, B. Baalousha, M. Mitov, S. Lead, J. R. Stone, V. Fernandes, T. F. Jepson, M. van Aerle, R. and Tyler, C. R. 2010.** Effects of aqueous exposure to silver nanoparticles of different sizes in rainbow trout. *Toxicological Sciences* 115, 521–534.
- Sun, H. Choy, T.S. Zhu, D. R. Yam, W. C. Fung, Y. S. 2009.** Nano-silver- modified PQC/DNA biosensor for detecting *E. coli* in environmental water. *Biosensors and Bioelectronics*. 24:1405–1410.



## Toxicity of silver nanoparticles in Persian Sturgeon (*Acipenser persicus*) and Starry Sturgeon (*Acipenser stellatus*) during early life stages

Ashkan Banan<sup>1</sup>, Mohammad Reza Kalbassi Masjed Shahi<sup>2\*</sup>, Mahmoud Bahmani<sup>3</sup>, Mohammad Ali Yazdani Sadati<sup>4</sup>

1- Ph.D Student, Fisheries Department, School of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran

2- Professor, Fisheries Department, School of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran

3- Professor, International Sturgeon Research Institute, Rasht, Iran

4-Associate Professor, International Sturgeon Research Institute, Rasht, Iran

Received: 29.06.2015 Accepted: 27.012016

\*Corresponding author: kalbassi\_m@modares.ac.ir

### Abstract:

Silver nanoparticles (AgNPs) are widely used in consumer products mainly due to their antimicrobial action. The rapid increase in the use of nanoparticles has driven more attention to their possible ecotoxicological effects. In this study: first, acute effects of colloidal AgNPs during embryonic stage of Persian sturgeon and Starry sturgeon were investigated and then in Starry sturgeon, their short-term effects during early life stages (before active feeding commences) were analyzed. Based on the obtained results from the acute toxicity tests, AgNPs induced a dose-dependent toxicity in both species during early life stages. The short-term toxicity test was performed using 0, 0.025, 0.05 and 0.1 mg/l of colloidal AgNPs. Silver accumulation in larvae exposed to 0.1 mg/l AgNPs was recorded significantly higher than the control treatment ( $P < 0.05$ ). However, the obtained survival rate data did not indicate any significant differences among treatments.

**Keywords:** Nanoecotoxicology, Colloidal silver nanoparticles, Sturgeons, Bioaccumulation