

تأثیر شوری آب بر سمیت حاد نانوذرات نقره کلویدی در بچه ماهیان قزل آلا‌ی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

حمید سالاری جو^۱، محمد رضا کلباسی^۲، سیدعلی جوهری^۳

نویسنده مسئول: مازندران، شهرستان نور، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، گروه شیلات Kalbassi_m@modares.ac.ir

پذیرش: ۹۰/۱۱/۰۸

دریافت: ۹۰/۰۸/۱۷

چکیده

زمینه و هدف: فن‌آوری نانو، شناخت و کنترل مواد در ابعادی بین ۱ تا ۱۰۰ نانومتر است که در این ابعاد خواص فیزیکی، شیمیایی و زیستی ماده غیر معمول است. با توسعه روزافزون این فن‌آوری، نگرانی‌ها در رابطه با خطرات احتمالی رهاش مواد محتوی ذرات نانو به محیط زیست در حال افزایش است. هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر شوری بر میزان سمیت حاد کلویدی نانوذرات نقره در بچه ماهی قزل آلا‌ی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) است.

روش بررسی: جهت انجام آزمایشات سمیت، از آب دریای خزر ($12 \pm 0.2 ppt$) به عنوان منبع آب لب شور و از آب شهر کلرزدایی شده (ppt ۰/۴) به عنوان منبع آب شیرین، استفاده شد. سمیت نانوذرات نقره در آب لب شور، در غلظت‌های ۶۴، ۳۲، ۱۶، ۸، ۴، ۲، ۱ و در آب شیرین، در غلظت‌های ۰/۱۲، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۴ و ۸ مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین جهت بررسی کیفیت نانوذرات نقره از دستگاه‌های ICP Zetasiser و TEM استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج دوز گشوده میانه ($LC50$) ۹۶ ساعته، نشان داد که در آب لب شور نسبت به آب شیرین، سمیت کلویدی نانوذرات نقره برای بچه ماهی قزل آلا‌ی رنگین ۱۲ برابر کاهش می‌یابد.

نتیجه‌گیری: تحلیل نتایج نشان داد که در مورد ماهیان یک گرمی قزل آلا‌ی رنگین کمان، نانوذرات نقره در آب شیرین و لب شور به ترتیب به عنوان ماده ای بسیار سمی و کمی سمی دسته‌بندی می‌شوند.

واژگان کلیدی: نانو اکوتوکسیکولوژی، نانوذرات نقره، قزل آلا‌ی رنگین کمان، شوری، سمیت حاد

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس

۲- دکترای شیلات، دانشیار دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس

۳- دانشجوی دکترای شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه

فن آوری نانو شناخت و کنترل مواد در ابعاد بین ۱۰۰ - ۱ نانومتر است که در این ابعاد خواص فیزیکی، شیمیایی و زیستی ماده غیر معمول بوده و کاربردهای جدید و منحصر به فردی از این مواد نانومتری ممکن می شود (۱). طی سال های اخیر نانو مواد مهندسی ساز در ایران و کشورهای مختلف جهان، به طور فزاینده ای تولید و به مصرف رسیده اند، به طوری که پیش بینی می شود تا سال ۲۰۱۴ بیش از ۱۵ درصد محصولات موجود در بازارهای جهانی به نوعی از این فن آوری استفاده خواهند نمود (۲). از طرفی با توسعه روزافزون این فن آوری، نگرانی ها در رابطه با خطرات احتمالی رهایش مواد محتوی ذرات نانو به محیط زیست در حال افزایش است (۳ و ۴). در همین راستا نانو اکوتوکسیکولوژی آبریان زمینه تحقیقاتی نسبتاً جدیدی است که توجه محققین را به خود جلب کرده است (۵)، چرا که مقصد نهایی نانو مواد تولید شده، اکوسیستم های آبی است و این مواد احتمالاً روی زیست‌مندان آبی تأثیرات نامطلوبی خواهند داشت (۶ و ۷). در رابطه با اثرات نانو مواد مهندسی ساز بر آبریان، قطعه قطعه شدن کروموزوم ها، شکسته شدن مولکول DNA، موتاسیون نقطه ای، اکسیداسیون مولکول DNA، سمیت سلولی و پاسخ های التهابی گزارش شده است (۸-۱۱).

یکی از نانو موادی که اخیراً به دلیل داشتن خواص ضد میکروبی بسیار مطلوب، توجه شدیدی به تولید آن شده، نانو نقره است (۱۵-۱۲)، به طوری که در حال حاضر ۵۶٪ نانو مواد تولید شده در جهان را نانوذرات نقره تشکیل می دهد (۹، ۱۶ و ۱۷) و پیش بینی شده که فقط در حوزه کشورهای اتحادیه اروپا تا پایان سال ۲۰۱۰، نانو نقره موجود در مواد پلاستیکی و منسوجات ۱۵٪ از کل نقره رها شده به محیط های آبی را به خود اختصاص دهند (۹، ۱۷ و ۱۸).

بر اساس اطلاعات سازمان بهداشت جهانی (WHO) در آب های شور به دلیل ترکیب آنیون ها با یون های آزاد نقره (۱۹) (Ag^+) و همچنین رقابت کاتیون ها با یون های نقره جهت اتصال به

آبشش ماهی، سمیت یون نقره بسیار کاهش می یابد. (۲۱ و ۲۰) از طرفی ممکن است خواص فیزیکی و شیمیایی نانو مواد در اکوسیستم های دریایی در مقایسه با اکوسیستم های آب شیرین متفاوت باشد، هرچند تا به امروز اطلاعات بسیار کمی در ارتباط با خطرات احتمالی نانو مواد حاوی نقره روی موجودات زنده اکوسیستم های آب شور گزارش شده است (۲۰) و در مطالعات موجود نیز مقایسه خاصی بین سمیت نانو مواد در موجودات آب شور با موجودات آب شیرین انجام نشده است.

امروزه اطلاعات نسبتاً زیادی در رابطه با کاهش سمیت یون های نقره همزمان با افزایش شوری، در ماهیان به دست آمده است (۲۱-۲۴) با این حال هنوز مشخص نیست که آیا اثر شوری بر سمیت نانو ذرات نقره، همانند اثر آن بر نقره یونی است یا خیر. به همین دلیل در مطالعه حاضر، به بررسی تأثیر شوری بر میزان سمیت حاد کلویید نانو ذرات نقره در بچه ماهی قزل آلا ی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، به عنوان یک مدل، پرداخته شده است.

مواد و روش ها

نانو ذرات نقره

کلویید نانوذرات نقره (Ag-NPs) مورد استفاده در این آزمایش با نام تجاری Nanocid و غلظت اسمی ۴۰۰۰ میلی گرم بر لیتر، از شرکت نانو نصب پارس (تهران- ایران) خریداری گردید. این محصول در سازمان ثبت اختراعات ایالات متحده آمریکا با شماره ۲۰۰۹۰۰۱۳۸۲۵ به ثبت رسیده است (۲۵). جهت اطمینان از کیفیت نانوذرات نقره خریداری شده، قبل از انجام آزمایشات سمیت، برخی خواص آن مورد سنجش قرار گرفت. میزان بار سطحی یا پتانسیل زتا (*Zeta potential*) و نیز اندازه ذرات در کلویید نانوذرات نقره توسط دستگاه (Malvern Zetasizer (Instruments Inc, UK, Model: 3000HSA اندازه گیری شد. غلظت واقعی نقره موجود در کلویید نانوذرات

آزمون سمیت

آزمایشات رویارویی ماهیان با نانوذرات نقره در مخازن شیشه‌ای ۱ لیتری که توسط سیستم مرکزی، هوادهی می‌گردیدند، انجام گردید. قبل از آن، ابتدا جهت برآورد توان زیستی و تعیین وضعیت بقای بچه ماهیان در شرایط طبیعی آزمایش و محیط عاری از کلویید نانو ذرات نقره، آزمایش بقا در ۳ تکرار انجام شد. آزمون‌های سمیت مطابق روش‌های استاندارد سازمان توسعه و همکاری‌های اقتصادی (OECD) و تحت شرایط ساکن (static-renewal) انجام شد و آب مخازن هر ۲۴ ساعت یک بار تعویض و دوزهای مورد نظر مجدداً در مخازن برقرار می‌شد. جهت تعیین حدود بالا و پایین سمیت کلویید نانوذرات نقره در آب‌های شیرین و لب شور، آزمایش تعیین محدوده کشندگی (Range Finding Test) انجام شد (۲۷) و سپس محدوده کشندگی به دست آمده به روش تصاعد هندسی به ۷ قسمت مساوی تقسیم شد. بر این اساس غلظت‌های آزمایشی نانو ذرات نقره در آب لب شور به صورت ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲ و ۶۴ میلی‌گرم بر لیتر و در آب شیرین نیز به صورت ۰/۱۲، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۴ و ۸ میلی‌گرم بر لیتر انتخاب گردید و ماهیان به مدت ۵ روز و در سه تکرار در معرض دوزهای مذکور قرار گرفتند. در طول دوره آزمایش، مرگ و میر بچه ماهیان در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت ثبت گردید، همچنین حرکات غیرعادی قابل رویت از قبیل عدم تعادل، تغییر در نحوه تنفس، نحوه شنا، ایجاد رنگدانه و تغییر شکل ظاهری کاملاً ثبت شد.

براساس میزان مرگ و میر ثبت شده، مقادیر غلظت کشنده (LC) در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت و با استفاده از نسخه ۱/۵ نرم‌افزار EPA Probit analyzer تعیین گردید. همچنین ترسیم نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel انجام شد. با در نظر گرفتن سطوح سمیت (جدول ۱)، درجه بندی سمیت نانوذرات نقره برای بچه ماهی قزل آلا رنگین کمان در هر کدام از آب‌های شیرین و لب شور تعیین گردید. همچنین مقادیر حداقل غلظت موثر (LOEC)، غلظت غیر

نقره نیز، توسط روش طیف‌سنجی اتمی نشری پلاسما (ICP-AES, Model: 3410 ARL, Switzerland) تعیین شد. همچنین شکل و اندازه نانوذرات نقره در حالت خشک با بررسی تصویر میکروسکوپ الکترون عبوری (TEM) تعیین گردید.

شرایط نگهداری ماهی

در این تحقیق از آب دریای خزر به عنوان منبع آب لب شور و از آب شهر کلرزداپی شده (با شوری ناچیز) به عنوان منبع آب شیرین برای انجام آزمایش‌های سمیت استفاده گردید. جهت کلرزداپی آب شهر از تیوسولفات سدیم با غلظت ۲۴۸/۱۸ میلی گرم بر لیتر همراه با هوادهی شدید استفاده شد. آب دریا قبل از استفاده به مدت یک هفته در مخازن ۳۰۰ لیتری نگهداری شد تا رسوبات و مواد معلق موجود در آن ته‌نشین شوند و از آب شفاف موجود در ستون آب جهت آزمایش‌های سمیت استفاده گردید. قبل از شروع آزمایش‌ها، شاخص‌های مهم شیمیایی آب‌های مذکور اندازه‌گیری گردید. همچنین میانگین میزان اکسیژن محلول در طی انجام آزمایش‌ها در آب‌های شیرین و شور به ترتیب $8 \pm 0/2$ و $8 \pm 0/3$ میلی‌گرم بر لیتر اندازه‌گیری گردید. میانگین درجه حرارت آب‌ها در طول انجام آزمایشات $13/5 \pm 0/5$ درجه سانتی‌گراد، و شرایط نوری به صورت ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی بود.

تعداد ۴۸۰ عدد بچه ماهی قزل آلا رنگین کمان با میانگین وزنی $1/54 \pm 2/16$ گرم از یک جمعیت مشترک تهیه و جهت سازگاری با شرایط آزمایش، به مدت یک هفته در مخازن ۳۰۰ لیتری آب شیرین یا لب شور نگهداری و در این مدت با غذای تجاری ساخت کارخانه چینه تغذیه شدند. ۴۸ ساعت قبل از شروع آزمایش‌ها، غذادهی به ماهیان قطع گردید تا از جذب نانوذرات به مواد غذایی و مدفوع ماهیان جلوگیری شود. همچنین این کار باعث جلوگیری از افزایش کربن آلی محلول در آب می‌شود که عامل اخیر در صورت وجود، می‌تواند باعث برآورد اشتباه سمیت در سیستم‌های ساکن گردد (۲۶).

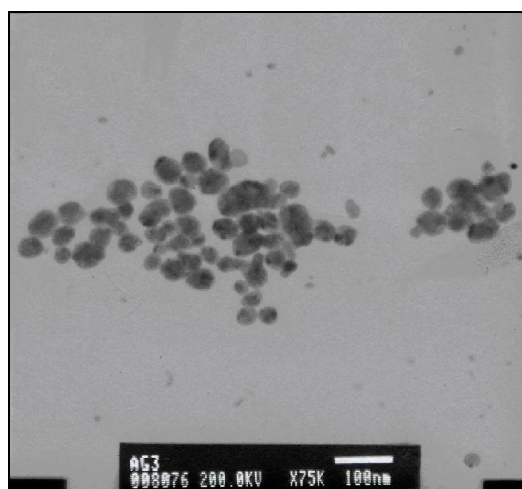
موثره (NOEC) و حداکثر غلظت مجاز (MATC) ناشی از کلویید نانوذرات نقره در این آب‌ها با توجه به مقادیر LC تخمین زده شد.

جدول ۱: دسته‌بندی سطوح سمیت مواد شیمیایی بر اساس LC50 در سمیت های حاد (۲۸)

درجه سمیت	LC50 (mg/L)
نسبتاً غیرسمی	$100 <$
کمی سمی	$10-100$
نیمه سمی	$1-10$
بسیار سمی	$0.1-1$
شدیداً سمی	$0.1 >$

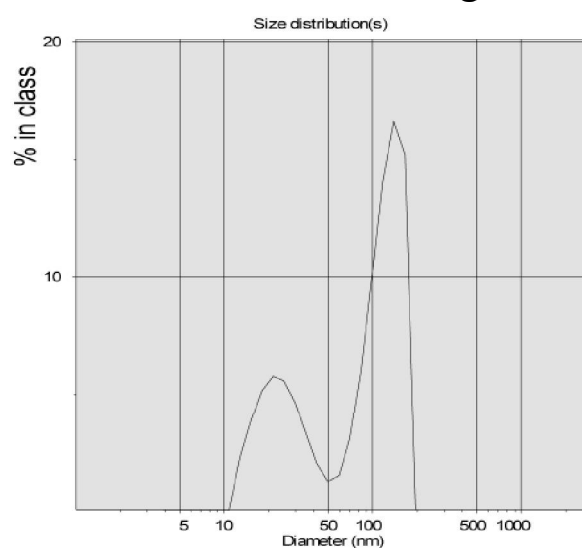
یافته‌ها

تصویر میکروسکوپ الکترون عبوری (شکل ۲) نشان داد که میانگین اندازه نانو ذرات نقره در حالت خشک $25/90 \pm 8/44$ نانومتر است. اختلاف به دست آمده بین اندازه نانوذرات نقره در حالت خشک و کلویید ناشی از اختلاف در روش مورد استفاده در اندازه‌گیری و نیز تشکیل توده و افزایش اندازه ذرات در حالت کلویید است.



شکل ۲: تصویر میکروسکوپ الکترون عبوری (TEM) نانو ذرات نقره

براساس نتایج حاصل از آزمایشات انجام شده توسط دستگاه زتاسایزر، اندازه ذرات موجود در کلویید نانو ذرات نقره استفاده شده در این تحقیق، بین $3/9$ تا $163/5$ نانومتر و میانگین قطر آنها $54/8$ نانومتر تعیین شد (شکل ۱). همچنین به طور کلی مشخص شد که $54/1$ درصد این ذرات زیر 100 نانومتر و $45/9$ درصد آن‌ها بین 100 تا 165 نانومتر قطر داشته‌اند. نتایج حاصل از بررسی های صورت گرفته بر روی



شکل ۱: توزیع اندازه ذرات در کلویید نانو ذرات نقره بر اساس نتایج دستگاه ZetaSizer

اختلاف بسیار ناچیزی با غلظت اعلام شده از طرف کارخانه تولیدکننده (۴۰۰۰ میلی گرم بر لیتر) دارد.

فاکتورهای شیمیایی آب های شیرین و لب شور استفاده شده در آزمایش حاضر در جدول ۲ نشان داده شده است.

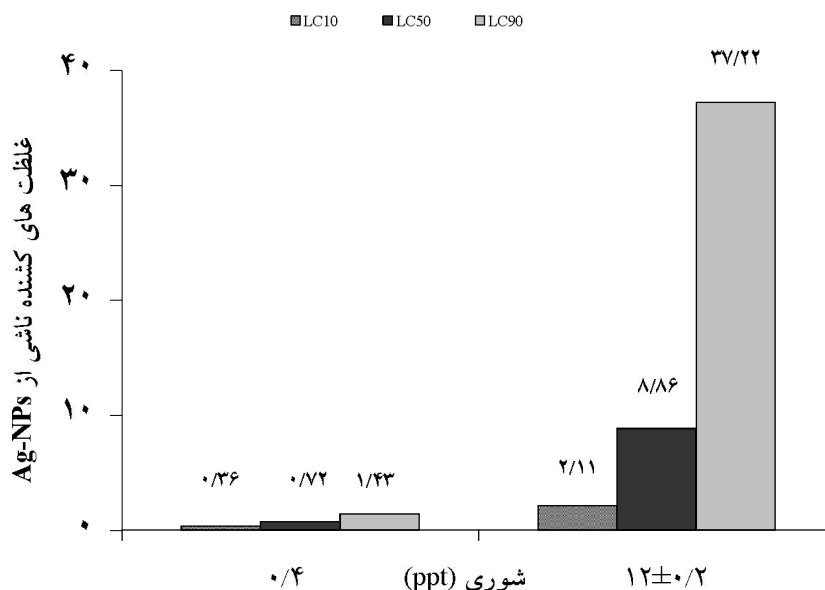
طبق نتایج حاصل از دستگاه زتاسایزر، بار سطحی نانوذرات نقره موجود در کلویید مذکور به طور میانگین $1/03 \pm 0/13$ میلی ولت است. همچنین براساس نتایج روش طیف سنجی اتمی نشری پلاسمای جفت شده القایی، غلظت واقعی نقره در کلویید نانو ذرات نقره ۳۹۸۰ میلی گرم بر لیتر به دست آمد که

جدول ۲: فاکتورهای شیمیایی اندازه گیری شده در آب های شیرین و لب شور، قبل از انجام آزمایش ها

نوع آب	شوری (ppt)	pH	بی کربنات (mg/L)	کربنات کلسیم (mg/L)	سدیم (mg/L)	کلراید (mg/L)	آمونیم کل (mg/L)	قلیائیت کل (mg/L)	منیزیم (mg/L)
شیرین	۰/۴	۷/۹-۸/۲	۳۲۰	۱۰۲	۱۳/۸	۲۴/۹	۰/۱	۳۲۶	۴۱
لب شور	$12 \pm 0/2$	۷/۸-۸/۳	۲۳۱	۱۷۶	۳۰۸۴/۸	۵۵۱۶	۰/۵	۱۸۳	۷۲

نمونه دوز کشنده میانه (LC50) ۹۶ ساعته حاصل از کلویید نانو ذرات نقره در آب شیرین و لب شور به ترتیب ۰/۷۲ و ۸/۸۶ میلی گرم بر لیتر تعیین شد (شکل ۳) که براین اساس در آب شیرین سمیت نانو ذرات نقره مورد بررسی برای بچه ماهی قزل آلائی رنگین کمان حدود ۱۲ برابر آب لب شور است (جدول ۳).

اعداد مربوط به غلظت های کشنده کلویید نانو ذرات نقره، در طی ۵ روز آزمایش، به طور خلاصه در جدول ۳ نشان داده شده است. همان طور که از نتایج این جدول مشخص است، در طی ۵ روز آزمایش و قرار گرفتن بچه ماهیان قزل آلائی رنگین کمان در معرض کلویید نانوذرات نقره در آب های شیرین و لب شور، مشخص شد که با افزایش شوری سمیت حاد کلویید نانو ذرات نقره به میزان قابل توجهی کاهش می یابد. به عنوان



شکل ۳: مقایسه غلظت های کشنده (LC10, 50, 90) ۹۶ ساعته حاصل از کلویید نانو ذرات نقره در بچه ماهی قزل آلائی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در آب های شیرین و لب شور

جدول ۳: مقادیر غلظت‌های کشنده ($LC_{10}, 50, 90$) حاصل از کلویید نانوذرات نقره در بچه ماهی قزل آلائی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در آب‌های شیرین و لب شور

سمیت	LC_{10} (ppm)					LC_{50} (ppm)					LC_{90} (ppm)				
زمان (ساعت)	۱۲۰	۹۶	۷۲	۴۸	۲۴	۱۲۰	۹۶	۷۲	۴۸	۲۴	۱۲۰	۹۶	۷۲	۴۸	۲۴
شوری															
شیرین	۰/۲۷۹	۰/۳۶۲	۰/۵۳۴	۰/۶۰۲	۰/۶۹۹	۰/۴۷۲	۰/۷۱۸	۰/۹۶۰	۱/۰۲۲	۱/۰۹۲	۰/۸۰۸	۱/۴۲۵	۱/۷۲۵	۱/۷۳۷	۱/۷۵۵
لب شور	۱/۸۴۲	۲/۱۰۷	۳/۳۲۶	۱۵/۱۱۳	۳۰/۶۱۹	۸/۲۵۹	۸/۸۵۶	۱۷/۷۴۹	۳۰/۵۶۵	۸۱/۸۶۶	۳۷/۰۳۱	۳۷/۲۱۹	۶۱/۸۱۴	۹۴/۷۱۸	۹۷/۹۱۷
نسبت سمیت در آب															
لب شور به آب شیرین	۶/۶۰۲	۵/۸۲۰	۶/۲۲۸	۲۵/۱۰۴	۴۳/۸۰۴	۱۷/۳۷۸	۱۲/۳۳۴	۱۸/۴۸۸	۲۹/۹۰۷	۸۱/۳۷۹	۴۵/۸۳۰	۲۶/۱۱۸	۳۵/۸۳۴	۵۴/۵۲۹	۱۴۶/۹۶

در آب لب شور، تنها در دوزهای بالا (۳۲ و ۶۴ ppm)، بعضی از ماهیان بیرون زدگی چشم و تیرگی بدن را نشان دادند. از جمله مشاهدات مهم ثبت شده در این مطالعه این بود که در آب‌های لب شور، ساعاتی پس از وارد کردن دوزهای بالاتر از ۸ میلی‌گرم بر لیتر کلویید نانوذرات نقره، رسوبات قهوه‌ای متمایل به سیاه رنگ تشکیل می‌گردید.

اثر کلویید نانو ذرات نقره بر رفتار بچه ماهیان قزل آلائی رنگین کمان در آب‌های شیرین و لب شور متفاوت بود؛ به طوری که در آب شیرین ماهیان به محض قرار گرفتن در معرض کلویید نانو ذرات نقره دچار عکس‌العمل هیجانی شدید به صورت حرکات ناگهانی شدند و در تمام غلظت‌های آزمایش شده در آب شیرین، موکوس فراوان روی سطح بدن ماهیان، به خصوص روی آبشش، مشاهده گردید. این در حالی است که

جدول ۴: مقادیر $NOEC$ ، $LOEC$ ، $MATC$ کلویید نانو ذرات نقره در آب‌های شیرین و لب شور برای بچه ماهیان قزل آلائی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

نوع آب	$LOEC$ (mg/L)	$NOEC$ (mg/L)	$MATC$ (mg/L)
آب شیرین	۰/۳۶	۰/۱۲	۰/۰۷
آب لب شور	۲/۱۰	۰/۲۵	۰/۸۸

بحث

ناشی از یون‌های نقره ساطع شده از سطح این نانو مواد می‌باشد (۲۹)، بنابراین به نظر می‌رسد مکانیسم ایجاد سمیت توسط نانوذرات نقره تا حدود زیادی با مکانیسم ایجاد سمیت توسط یون نقره مشابه باشد. فاکتورهای شیمیایی و فیزیولوژیکی متعددی بر سمیت ایجاد شده توسط یون نقره تأثیر گذارند. ثابت شده است که برخی پارامترهای شیمیایی آب از قبیل مواد آلی محلول (۳۰)، کربنات کلسیم (۳۱)، تیوسولفات (۳۲) و کلراید (۳۳) بر سمیت ناشی از یون نقره در محیط‌های آبی تأثیر گذارند.

هدف از مطالعه حاضر بررسی رابطه شوری با سمیت نانو ذرات نقره در ماهی قزل آلائی رنگین کمان، به عنوان یک مدل، در اکوسیستم‌های آبی بود. همان‌طور که از نتایج این بررسی مشخص است، افزایش شوری باعث کاهش سمیت حاد نانوذرات نقره در بچه ماهی قزل آلائی رنگین کمان می‌گردد، به طوری که به عنوان مثال در آب شور و بر مبنای LC_{50} ۹۶ ساعته، میزان سمیت نانو ذرات نقره حدود ۱۲ برابر نسبت به آب شیرین کاهش نشان داد. Kittler و همکاران نشان دادند که بخش زیادی از سمیت ایجاد شده توسط نانو ذرات نقره،

مکانیسم‌های ایجاد سمیت ناشی از ترکیبات نقره در آب‌های شیرین و شور، در مطالعات مختلف مورد بررسی قرار گرفته است (۳۲، ۳۹، ۴۰، ۳۰، ۲۱ و ۲۲). در آب‌های شیرین یون نقره با اختلال در فعالیت آنزیم $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ (۲۱، ۳۲ و ۴۰) و کاهش آنزیم آنیدراز-کربونیک در آبشش به ترتیب منجر به ممانعت در جذب یون‌های کلر و سدیم توسط آبشش‌ها و اسیدی شدن خون ماهی می‌شود (۳۴ و ۳۶). همچنین در این آب‌ها، یون نقره با کاهش فعالیت آنزیم آمیونو-ترانسفراز کبد، باعث افزایش آمونیای پلاسما شده و در ماهی ایجاد مسمومیت می‌نماید (۳۴). در روده ماهیان آب شور و ماهیانی که در آب شور سازگاری یافته‌اند، در اثر ترکیب یون‌های دو ظرفیتی کلسیم (Ca^{2+}) و منیزیم (Mg^{2+}) با یون‌های بی‌کربنات (HCO_3^-) بلورهایی به نام پلت‌های کربناته تشکیل می‌شوند (۴۱ و ۴۲). در بعضی از مطالعات نشان داده شده که پلت‌های کربناته در مسمومیت زدایی آلاینده‌های مختلف از جمله یون نقره نقش دارند (۲۱ و ۴۳). احتمالاً در مطالعه حاضر نیز با شکل‌گیری پلت‌های کربناته در روده بچه ماهیانی که به آب شور سازگاری یافته‌اند، سمیت ناشی از نانو ذرات نقره کاهش پیدا کرده است.

بنابراین با توجه به این که سمیت حاصل از نانو ذرات نقره به میزان زیادی وابسته به یون‌های نقره تولید شده از سطح آن است و نیز وجود رابطه معکوس بین افزایش شوری و سمیت یون نقره، نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر می‌تواند تاییدی بر وجود رابطه معکوس بین میزان شوری با میزان سمیت حاصل از نانوذرات نقره در بچه ماهی قزل آلا رنگین کمان باشد.

از میان این عوامل مختلف، شوری مهم‌ترین عامل شیمیایی است (۲۱) که به دلیل بالا بودن نیروهای کشش یونی، به خصوص نسبت به یون کلر، به میزان زیادی سمیت یون نقره را کاهش می‌دهد (۶ و ۳۴). در این زمینه اطلاعات نسبتاً زیادی در مورد کاهش سمیت یون‌های نقره همزمان با افزایش شوری در ماهیان گزارش شده است (۲۴-۲۱ و ۳۵). با افزایش شوری و به دنبال آن افزایش یون کلر، سهم نسبی هرکدام از ترکیبات کلر-نقره ($\text{AgCl}_{(\text{aq})}$ ، AgCl_2^- ، AgCl_3^- و AgCl_4^{3-}) در آب‌های شور افزایش می‌یابد (۲۲، ۲۴ و ۳۶). ترکیبات کلر-نقره، به استثنای فرم محلول آن ($\text{AgCl}_{(\text{aq})}$) که در مقایسه با یون نقره سمیت آن بسیار کمتر است، بعد از شکل‌گیری در محیط‌های آب شور رسوب یافته و از دسترس آبزیانی که در ستون آب زندگی می‌کنند، خارج می‌شوند (۲۲).

در مواقعی که مقادیر زیادی نقره به صورت یک‌جا و ناگهانی وارد آب‌های لب شور شوند، ترکیب قابل رسوبی به نام Cerargyrite ($\text{AgCl}_{(\text{s})}$) ایجاد می‌شود (۳۴، ۳۰، ۳۷ و ۳۸). سرارجیرات ماده‌ای قهوه‌ای رنگ و غیر محلول است که در ساختار خود ۷۵/۳٪ یون نقره و ۲۴/۷٪ یون کلر دارد (<http://information-mineral/com.gems-outback-nevada/htm.info-mineral-cerargyrite>). در طی مطالعه حاضر، مشاهده گردید که در تیمارهای آب لب شور، دوزهای بالاتر از ۸ میلی‌گرم بر لیتر کلویید نانو ذرات نقره، پس از مدتی ابتدا باعث ایجاد رسوبات قهوه‌ای متمایل به سیاه و سپس رسوبات قهوه‌ای رنگ گردید؛ بنابراین به نظر می‌رسد در آب‌های لب شور و غلظت‌های بالای نانو ذرات نقره، میزان زیادی از نانوذرات تشکیل سرارجیرات داده و از ستون آب خارج می‌شوند.

در محیط‌های آب شیرین به دلیل پایین بودن میزان یون کلر، ترکیبات کلر-نقره تشکیل نمی‌شوند و بنابراین در صورت ورود یون‌های نقره به آب شیرین، این یون‌ها در ستون آب به صورت یون آزاد (Ag^+) - که سمی‌ترین حالت نقره است - باقی‌مانده و موجب سمیت در آبزیان می‌شوند (۳۶).

نتیجه گیری

براساس دسته بندی سمیت مواد شیمیایی (جدول ۱) و با توجه به داده‌های به دست آمده از مطالعه حاضر (بر مبنای LC_{50} ۹۶ ساعته) این نتیجه حاصل می‌گردد که برای بچه ماهیان ۱ گرمی قزل آلاي رنگین کمان، نانو ذرات نقره در آب شیرین به عنوان ماده‌ای بسیار سمی (Toxic Highly) و در آب لب شور به عنوان ماده کمی سمی (Slightly Toxic) دسته‌بندی می‌شوند. در حال حاضر به دلیل عدم انجام مطالعات جامع در خصوص فرایندهای فیزیولوژیک سمیت ناشی از نانوذرات نقره در آب‌های شور و شیرین، امکان اظهار نظر قطعی و صریح در مورد مکانیسم سمیت نانوذرات نقره در آب‌های شیرین و شور وجود ندارد. بنابراین شناسایی عوامل و مکانیسم‌های فیزیولوژیک تأثیرگذار بر رابطه بین خصوصیات شیمیایی آب و سمیت نانو ذرات مختلف، از جمله نانو نقره، در آبه‌یان مختلف باید مورد توجه و بررسی بیشتر قرار گیرد. همچنین در کلیه مطالعات نانو اکوتوکسیکولوژی بر روی آبه‌یان، باید توجه به خصوصیات کیفی آب مد نظر محققین قرار گیرد.

منابع

1. Kreyling WG, Semmler-Behnke M, Chaudhry Q. A complementary definition of nanomaterial. *Nanotoday*. 2010;5(3):165-8.
2. Dawson NG. Sweating the small stuff: environmental risk and nanotechnology. *BioScience*. 2008;58(8):690.
3. Asharani PV, Wu YL, Gong Z, Valiyaveetil S. Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. *Nanotechnology*. 2008;19(25):1-8.
4. Blaise C, Gagne F, Ferard JF, Eullaffroy P. Ecotoxicity of selected nano-materials to aquatic organisms. *Environmental Toxicology*. 2008;23(5):591-8.
5. Colvin VL. The potential environmental impact of engineered nanomaterials. *Nature Biotechnology*. 2003;21(10):1166-70.
6. Klaine SJ, Alvarez PJJ, Batley GE, Fernandes TF, Handy RD, Lyon DY, et al. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2008;27(9):1825-51.
7. Choi JE, Kim S, Ahn JH, Youn P, Kang JS, Park K, et al. Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish. *Aquatic Toxicology*. 2010;100(2):151-9.
8. Singh N, Manshian B, Jenkins GJS, Griffiths SM, Williams PM, Maffei TGG, et al. NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*. 2009;30(23-24):3891-914.
9. Choi O, Clevenger TE, Deng B, Surampalli RY, Ross Jr L, Hu Z. Role of sulfide and ligand strength in controlling nanosilver toxicity. *Water Research*. 2009;43(7):1879-86.
10. 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*). *Aquatic Toxicology*. 2009;94(4):320-7.
11. Reijnders L. The release of TiO₂ and SiO₂ nanoparticles from nanocomposites. *Polymer Degradation and Stability*. 2009;94(5):873-6.
12. Jabbari H, Mansouri N, Abdollahi A, Chehrehei M, Naddafi K. Studying the effect of nanosilver painting on control of air-transmitted fungi. *Iranian Journal of Health and Environment*. 2009;2(1):28-35 (in Persian).
13. Yoon KY, Hoon Byeon J, Park JH, Hwang J. Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles. *Science of The Total Environment*. 2007;373(2-3):572-5.
14. Chen X, Schluesener HJ. Nanosilver: a nanoparticle in medical application. *Toxicology Letters*. 2008;176(1):1-12.
15. Pinto VV, Ferreira MJ, Silva R, Santos HA, Silva F, Pereira CM. Long time effect on the stability of silver nanoparticles in aqueous medium: Effect of the synthesis and storage conditions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2010;364(1-3):19-25.
16. Mühling M, Bradford A, Readman JW, Somerfield PJ, Handy RD. An investigation into the effects of silver nanoparticles on antibiotic resistance of naturally occurring bacteria in an estuarine sediment. *Marine Environmental Research*. 2009;68(5):278-83.
17. Tolaymat TM, El Badawy AM, Genaidy A, Scheckel KG, Luxton TP, Suidan M. An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and applications: A systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers. *Science of The Total Environment*. 2010;408(5):999-1006.
18. Bilberg K, Malte H, Wang T, Baatrup E. Silver nanoparticles and silver nitrate cause respiratory stress in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*). *Aquatic Toxicology*. 2010;96(2):159-65.
19. Howe PD, Dobson S. Silver and silver compounds: environmental aspects. Geneva: World Health Organization; 2002. Report No.: Concise international chemical assessment document; 44.
20. Ward TJ, Kramer JR. Silver speciation during chronic toxicity tests with the mysid, *Americanysis bahia*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2002;133(1-2):75-86.
21. Nichols JW, Brown S, Wood CM, Walsh PJ, Playle RC. Influence of salinity and organic matter on silver accumulation in Gulf toadfish (*Opsanus beta*). *Aquatic*

- Toxicology. 2006;78(3):253-61.
22. Webb NA, Wood CM. Bioaccumulation and distribution of silver in four marine teleosts and two marine elasmobranchs: influence of exposure duration, concentration, and salinity. *Aquatic Toxicology*. 2000;49(1-2):111-29.
 23. Shaw JR, Wood CM, Birge WJ, Hogstrand C. Toxicity of silver to the marine teleost (*Oligocottus maculosus*): Effects of salinity and ammonia. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 1998;17(4):594-600.
 24. Ferguson EA, Hogstrand C. Acute silver toxicity to seawater-acclimated rainbow trout: Influence of salinity on toxicity and silver speciation. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 1998;17(4):589-93.
 25. Rahman Nia J, inventor; Preparation of colloidal nanosilver. United States Patent 7892317. 2011 Feb 22.
 26. Welsh PG, Lipton J, Mebane CA, Marr JCA. Influence of flow-through and renewal exposures on the toxicity of copper to rainbow trout. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2008;69(2):199-208.
 27. Organisation for Economic Co-operation and Development. OECD guidelines for testing of chemicals. Paris Cedex: Organisation for Economic Co-operation and Development; 1998.
 - Foley KM, Gelband H. Improving palliative care for cancer. Washington: National Academy Press; 2001 [cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.nap.edu/books/0309074029/html/>.
 28. USEPA. Technical overview of ecological risk assessment, analysis phase: Ecological effects characterization. Washington, DC; 2010 [cited 2010 Jul 9]. Available from: http://www.epa.gov/oppefed1/ecorisk_ders/toera_analysis_eco.htm#Ecotox
 29. Kittler S, Greulich C, Diendorf J, Koller M, Eppler M. Toxicity of silver nanoparticles increases during storage because of slow dissolution under release of silver ions. *Chemistry of Materials*. 2010;22(16):4548-54.
 30. Bury NR, McGeer JC, Wood CM. Effects of altering freshwater chemistry on physiological responses of rainbow trout to silver exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 1999;18(1):49-55.
 31. Karen DJ, Ownby DR, Forsythe BL, Bills TP, La Point TW, Cobb GB, et al. Influence of water quality on silver toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), fathead minnows (*Pimephales promelas*), and water fleas (*Daphnia magna*). *Environmental Toxicology and Chemistry*. 1999;18(1):63-70.
 32. Grosell M, Hogstrand C, Wood CM, Hansen HJM. A nose-to-nose comparison of the physiological effects of exposure to ionic silver versus silver chloride in the European eel (*Anguilla anguilla*) and the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*. 2000;48(2-3):327-42.
 33. Bielmyer G, Brix K, Grosell M. Is Cl⁻ protection against silver toxicity due to chemical speciation?. *Aquatic Toxicology*. 2008;87(2):81-7.
 34. Hogstrand C, Wood CM. Toward a better understanding of the bioavailability, physiology, and toxicity of silver in fish: implications for water quality criteria. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 1998;17(4):547-61.
 35. Ward TJ, Boeri RL, Hogstrand C, Kramer JR, Lussier SM, Stubblefield WA, et al. Influence of salinity and organic carbon on the chronic toxicity of silver to mysids (*Americamysis bahia*) and silversides (*Menidia beryllina*). *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2006;25(7):1809-16.
 36. Eisler R. Copper Hazards To Fish, Wildlife, And Invertebrates: A Synoptic Review. Pennsylvania: Diane Pub Co; 1998.
 37. Bury NR, Galvez F, Wood CM. Effects of chloride, calcium, and dissolved organic carbon on silver toxicity: Comparison between rainbow trout and fathead minnows. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 1999;18(1):56-62.
 38. Wood CM, Playle RC, Hogstrand C. Physiology and modeling of mechanisms of silver uptake and toxicity in fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 1999;18(1):71-83.
 39. Guadagnolo CM, Brauner CJ, Wood CM. Effects of an acute silver challenge on survival, silver distribution and ionoregulation within developing rainbow trout eggs (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*. 2000;51(2):195-211.
 40. Webb NA, Shaw JR, Morgan J, Hogstrand C, Wood CM. Acute and chronic physiological effects of silver exposure in three marine teleosts. *Aquatic Toxicology*. 2001;54(3-4):161-78.

41. Kurita Y, Nakada T, Kato A, Doi H, Mistry AC, Chang MH, et al. Identification of intestinal bicarbonate transporters involved in formation of carbonate precipitates to stimulate water absorption in marine teleost fish. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2008;294(4):R1402-12.
42. Whittamore JM, Cooper CA, Wilson RW. HCO_3^- secretion and CaCO_3 precipitation play major roles in intestinal water absorption in marine teleost fish in vivo. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2010;298(4):R877-86.
43. Grosell M, Farrell AP, Brauner CJ. *The Multifunctional Gut of Fish*. Salt Lake City: Academic Press; 2011.

Effect of Water Salinity on Acute Toxicity of Colloidal Silver Nanoparticles in Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Larvae

Hamid Reza Salari-joo, *Mohammad Reza Kalbassi, Ali Johari

Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources and Marine Science, Tarbiat Modares University, Masandaran (Noor), Iran

Received: 8 November 2011

Accepted: 28 January 2012

ABSTRACT

Background and Objectives: Nanotechnology defined as understanding and controlling of materials at dimension between 1-100 nm, which show unusual physical and chemical properties. With Increasing development of nanotechnology, concerns associated with release of materials containing nanoparticles into the environment is rising. The purpose of this study is investigation of salinity effect on the acute toxicity of silver nanoparticles in rainbow trout fry (*Oncorhynchus mykiss*).

Materials and Methods: In order to conduct the toxicity tests, the Caspian Seawater (12 ± 0.2 ppt) and (0.4 ppt) as sources of brackish water and freshwater were used, respectively. Toxicity of silver nanoparticles were evaluated in brackish water and freshwater at concentrations of 1, 2, 4, 8, 16, 32 and 64 ppm and 0.12, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 and 8 ppm, respectively. In addition, in order to investigate the quality of the used silver nanoparticles the Zetasizer, ICP, and TEM method were applied.

Results: Results of 96-hour median lethal concentration (LC₅₀ 96h), showed that toxicity of silver nanoparticles for rainbow trout fry in brackish water is 12 times less than its toxicity in freshwater. Conclusion: According to the toxicity categories, analysis of the results showed that, for rainbow trout fry (1g), silver nanoparticles are classified as highly toxic agent substances in fresh water, and little toxic in brackish water, respectively.

Keywords: Nano-Eco-toxicology, Silver nanoparticles, Rainbow trout, Salinity, Acute Toxicity

*Corresponding Author: *Kalbassi_m@modares.ac.ir*
Tel: +98 911 2204336 Fax: +98 122 6253499