مقایسه سمیت نانوذرات نقره تولید شده به روش‌های شیمیایی و زیستی بر مراحل ناپلیوس و بالغ *Artemia franciscana*

سکینه مشجور[1*]، مجتبی علیشاهی[2]، زهرا طولابی دزفولی[2]

۱- گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندر عباس، ایران

۲- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

* مسئول مکاتبات: sakynemashjoor@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۲/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/٤/۹

چکیده

در مطالعه حاضر، اثرات سمیت و تفاوت میزان حساسیت مراحل تکاملی ناپلیوس و بالغ *Artemia fransiscana*، نسبت به جذب نانوذرات نقره شیمیایی و بیوسنتز شده توسط عصاره آبی جلبک دریایی سبز *Ulva flexuosa*، ارزیابی گردید. به این منظور ناپلی و بالغ آرتمیا، در غلظت های متوالی افزایشی نانوذرات نقره شیمیایی و بیوسنتزی قرار داده شدند. تلفات در هر گروه در زمان‌های ۱۲،۲٤، ۳٦ و ٤۸ ساعت بعد از مجاورت ثبت و با نرم افزار Probit آنالیز گردید. نتایج نشان داد که سمیت هر دو نوع نانوذره نقره بر ناپلیوس و بالغ آرتمیا با افزایش غلظت و نیز با افزایش مدت زمان مجاورت روند افزایشی داشته و تفاوت‌ها میان آنها معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$). بنحوی که پس از ٤۸ ساعت، غلظت ایجاد کننده‌ی۵۰٪ تلفات (LC_{50})، در ناپلی آرتمیا با نانوذرات نقره شیمیایی ۳۱/۸ میلی‌گرم در لیتر و برای نانوذرات نقره بیوسنتز شده توسط جلبک سبز ۳٦٦/۹ میلی‌گرم در لیتر بود. حال آنکه این غلظت در ارتباط با بالغین آرتمیا طی مجاورت با نانوذرات نقره شیمیایی برابر با ٤۷ میلی‌گرم در لیتر و برای نانوذرات نقره بیوسنتزی۲٤۰ میلی‌گرم در لیتر ارزیابی شد. مقایسه نتایج سمیت نشان می دهد که در هر دو مرحله زندگی آرتمیا، نانوذرات نقره شیمیایی در قیاس با بیوسنتزی، از قدرت سمیت بالاتری برخوردار بوده، لکن حساسیت ناپلیوس‌های آرتمیا نسبت به نانوذرات نقره شیمیایی بیشتر از مرحله بلوغ ولی نسبت به نوع زیست تولیدی کمتر است. این تحقیق می‌تواند در توسعه کاربری نانوذرات زیست سازگار با اهداف بوم مدیریتی پیشگام باشد.

کلمات کلیدی: سمیت، *Artemia fransiscana*، ماکروجلبک دریایی، نانوذرات نقره.

مقدمه

نانوفناوری صنعتی نوظهور است که با سطح وسیعی از پتانسیل‌های کاربردی به سرعت در حال رشد می-باشد. با این وجود در ارتباط با خطرات احتمالی این ذرات بر محیط زیست، ابهامات موجود بسیار است. نانوذرات طبیعی، از همان دوره‌های آغازین حیات در کره زمین وجود داشته و موجودات زنده در طی روند تکامل، توانسته‌اند با آنها سازش یابند، با این حال نانوذرات مصنوعی تولید دست بشر یا نانوذرات مهندسی شده (ENPs)، پسخوردهای فرآیند تکامل را طی ننموده و به عنوان نسل جدیدی از آلاینده‌ها نگرانی‌های زیادی را در جوامع علمی مطرح ساخته‌اند (۱٦).

مطالعات نشان داده که اندازه بسیار کوچک نانوذرات نقش مهمی را در سمیت این مواد ایفا می‌کند، بویژه

این که اندازه این ذرات کوچکتر از ۱۰۰ نانومتر است از این رو با برخی از اجزا زیستی بدن نظیر گلبول‌های قرمز (۷۰۰ nm) قابل قیاس بوده و این توانایی را دارند که غشاء سلولی را پشت سر گذاشته و به سلول‌ها وارد شوند (۳۵). در سال‌های اخیر، طی توافقات سیاستگذاری‌های پژوهشی بین‌المللی نظیر US CEINT گام‌های پیشرو در رویکردهای نانو بوم سم‌شناسی دریایی عمدتاً در جهت ارزیابی و شناسایی تاثیرات منفی این نانوذرات بر جانداران هدف و تغییر ماهیت‌های زیستی و شیمیایی نانومواد در محیط زیست آبی برداشته شده است و با وجود اینکه بوم-سازگان‌های دریایی یک مخزن بالقوه برای دفن نانومواد محسوب می‌شوند در حال حاضر اطلاعات موجود در ارتباط با سناریوی چرخه حیات این تولیدات نانویی در زیست بوم دریا بسیار اندک است.

نانوذرات نقره (AgNPs)، با کاربرد در ۳۸۳ محصول، جز پر مصرف‌ترین نانومواد تولیدی هستند (۲۷) و عمدتاً به اثرات ضدباکتریایی معروف می‌باشند. از این رو، امکان کاربری‌های متنوع آنها در بخش بهداشت آبزیان دور از ذهن نیست (۳۱، ۱۹).

تولید نانوذرات نقره، به روش‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی امکان‌پذیر است (٤، ۱۳، ۲۸). با این حال نانوذرات تولیدی در روش‌های شیمیایی به دلیل استفاده از مواد شیمیایی سمی مانند سدیم، نیترات سدیم و الکل که نقش عوامل احیایی و تثبیت کننده را ایفا می‌کنند (۳۲)، در طبیعت تا حدی تجزیه ناپذیر باقی مانده و نهایتاً آلودگی‌های محیط زیست را به دنبال دارند. حال آنکه روش‌های زیستی سازگار با محیط زیست، مقرون به صرفه و عاری از مواد شیمیایی بوده و می‌توانند با بهره‌گیری از ارگانیسم‌های زیستی در تولید نانوذرات، رویکرد جایگزین مناسبی محسوب شوند (۱۷).

پژوهش‌های اخیر نشان داده است که ماکرو جلبک‌های دریایی به عنوان کاندیداهای زیستی ارزشمند، جایگاه ویژه ایی را در تولید نانوذرات، به خود اختصاص داده‌اند، زیرا علاوه بر این که در فصول رشد به میزان انبوه در اکثریت سواحل یافت شده و دارای منابع مهم فیتوشیمیایی از جمله کارتنوئیدها، اسیدهای چرب ضروری، پلی ساکاریدها و مواد معدنی هستند، از توان بالایی نیز برای احیای یون‌های نقره و تولید نانوذرات نقره پایدار، نسبتاً غیر سمی و ایمن با قابلیت دستکاری برخوردارند (۳۰). در این راستا و نظر به اهمیت سمیت‌سنجی زیستی نانوذرات نقره در زیست بوم دریا، یافتن غلظت‌های کشنده و نیز حداکثر غلظت مجاز این مواد، می‌توان از گونه‌ای آبزی نظیر آرتمیا که سخت‌پوست زئوپلانکتونی متعلق به شاخه بندپایان است، استفاده نمود. آرتمیا به عنوان غذای زنده و حامل مکمل‌های خوراکی، ویتامین‌ها و داروها در تغذیه لاروی آبزیان، کاربردهای بسیار داشته (۱۵) و نیز یک نشانگر زیستی آلودگی، در آب‌هایی با شوری بالا محسوب می‌شود (۳۳).

چرخه زندگی این سخت پوست شامل مراحل تخم، لارو، ناپلیوس، متاناپلیوس و زوآ می‌باشد، که مراحل لاروی آن از حساسیت‌های بالا و متفاوتی در مقابل ترکیباتی با اثرات سمیت برخوردار است (۹).

از این رو، در مطالعه حاضر با بهره‌گیری از گونه‌ای از آرتمیا موسوم به *Artemia feranciscana*، اثرات سمیت و تفاوت میزان حساسیت نسبت به نانوذرات نقره شیمیایی و زیست‌تولید شده توسط جلبک دریایی سبز *Ulva flexuosa* در مراحل مختلف لاروی آرتمیا (ناپلیوس و بالغ)، ارزیابی و مقایسه گردید.

مواد و روش کار

نانوذرات نقره: دو نوع نانوذره نقره با ویژگی‌های زیر، در این پژوهش مورد ارزیابی قرار گرفت:

۱. کلوئید نانوذرات نقره شیمیایی با نام تجاری نانوسید L2000 (تولیدی شرکت نانونصب پارس)، که به روش احیای فوتوشیمیایی محلول نیترات نقره در حضور هیدرازین و آلکیل بنزن سولفونات تولید شده است (۲۹) (شکل ۱ – الف).

۲. نانوذرات نقره زیست تولید شده از عصاره آبی جلبک دریایی (جلبک سبز) *U. flexuosa* که بنا بر روش ارائه شده توسط رحیمی و همکاران (۲)، تولید گردید (شکل ۱– ب).

غلظت کلوئید نانوذرات نقره شیمیایی با نام تجاری نانوسید L2000 بنابر گزارش شرکت سازنده، برابر ٤۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر و اندازه ذرات نقره در این محصول ۱±۷ نانومتر است. ویژگی های فیزیکی و شیمیایی که Asghari و همکاران (۵) برای این محصول کلوئیدی گزارش کرده اند عبارتست از: میانگین پتانسیل زتای ۷/۸٦ ± ۵۳/۳۳ میلی‌ولت، اسیدیته ۲/٤ و میانگین قطر هندسی برابر با ۱/٤٦ ± ۱۲/٦۵نانومتر. همچنین بنابر نتایج دستگاه ICP-AES، غلظت واقعی نقره در کلوئید نانو ذرات نقره مذکور معادل ۳۹۸۰ میلی‌گرم در لیتر اندازه گیری شده است. در ارتباط با نانوذرات نقره زیست تولیدی تهیه شده از عصاره آبی جلبک دریایی *U. flexuosa* مطابق بر گزارش Yousefzadi و همکاران (۳۹)، نانوذرات از اندازه متوسطی در محدوده ۲۵ نانومتر، شکل دایره‌ای و با اندازه بین ۲ تا ۳۲ نانومتر و متوسط قطر ۱/۵ ± ۱۵ نانومتر برخورداند و نتایج آنالیز اشعه ایکس منتشر کننده انرژی آن نشان داده است که تنها ماده اصلی موجود در این کلوئید، نقره می باشد.

در مطالعه حاضر بنا بر نتایج حاصله از دستگاه آنالیز اندازه ذره مدل: Scatterscope I qudix، از نانوذرات نقره زیست تولید شده از عصاره آبی *U. flexuosa* با متوسط اندازه ۵/۵۳ نانومتر استفاده شد و تصویر ارائه شده در شکل ۱ توسط دستگاه میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) مدل LEO 906E تهیه شده و برای این منظور نانوذرات نقره زیست تولیدی بر روی یک صفحه کربنی پوشانیده شده از مس، قرار داده شده و تصویربرداری گردیدند. تصاویر موید کروی بودن شکل نانوذرات است (شکل ۱).

زیست‌تولید نانوذرات نقره از ماکروجلبک دریایی: در این پژوهش نانوذرات نقره زیست‌تولیدی با استفاده از عصاره آبی جلبک‌های دریایی *U. flexuosa* جمع‌آوری شده از سواحل قشم و بوشهر، به روش توصیه شده توسط رحیمی و همکاران (۲) ساخته شد. مراحل اجرای این روش به طور خلاصه عبارت است از: تهیه عصاره آبی (جوشاندن ۱۰ گرم پودر جلبک در ۲۰۰ سی‌سی آب دیونیزه)، فیلتر کردن عصاره با استفاده از کاغذ صافی واتمن و زیست تولید نانوذرات نقره از طریق افزودن cc ۱۰ از عصاره آبی جلبکی به cc ۹۰ محلول نیترات نقره ۱ میلی‌مولار و نگهداری این محلول به مدت ۲٤ ساعت در روشنایی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد.

مشاهده تغییر رنگ و تیره شده محلول نشانی از احیای زیستی یون‌های نقره توسط عصاره آبی جلبک دریایی و تولید نانوذرات نقره می‌باشد.

به منظور تغلیظ و خالص سازی این نانوذرات، محلول احیایی به فالکون‌های ۵۰ منتقل شده، به مدت ۲۰ دقیقه در دور rpm ٤۰۰۰ سانتریفیوژ گردیده، مایع رویی دور ریخته شده و پلت ته لوله ها در آب مقطر دیونیزه حل شد و به جهت خالص سازی این عمل سه بار تکرار گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از این محلول خشک و توزین شده و مبنای تعیین غلظت

نهایی استوک نانوذرات نقره زیست تولیدی قرار گرفت.

آزمون سمیت با استفاده از آرتمیا: در این روش برای سنجش اثرات سمیت از سیست های گونه ای سخت پوست به نام *A. feranciscana* (تولید شده در شرکت LTD INVE (Thailand) با درصد تفریخ (تخم گشایی) ۹۰٪) استفاده شد. منبع آب مورد استفاده آب شور مصنوعی (آب لوله کشی و ۳۰ گرم نمک دریا (شرکت اروم گوهر نگین) بود، که به منظور کلرزدایی از قبل به مدت یک هفته تحت هوادهی شدید قرار گرفته بود. زیرا در بررسی سمیت نانوذرات نقره به دلیل احتمال واکنش نقره با ترکیبات سولفاته نمی‌توان برای کلر زدایی آب از تیوسولفات-سدیم استفاده نمود. تخم‌گشایی سیست‌های آرتمیا، بر اساس روش Sorgeloos و همکاران (۳٤)، در pH ۷/۸، دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد و نور ۲۰۰۰ لوکس (مدل KIMO LX50 ساخت شرکت Kimo فرانسه) صورت پذیرفت. ۲٤ ساعت بعد از اضافه نمودن سیست آرتمیا، ناپلیوس‌های تازه از سیست خارج شده، لاروهای آرتمیا به یک بشر در مکانی تاریک منتقل شده و ناپلی‌های سالم و متحرک بر مبنای نورگرایی مثبت و تجمع در سطح بشر با استفاده از یک پیپت پاستور جمع‌آوری گردیدند (۳٤).

به منظور بالغ‌سازی آرتمیاهای تازه تفریخ شده از روز دوم، لاروها با ریزجلبک دریایی *Nannochloropsis oculata* و مخمر نان *Saccharomyces cerevisiae* تغذیه شدند.

آرتمیاها حدوداً بعد از یک ماه بالغ شدند. در ادامه با هدف سمیت سنجی، غلظت‌های متوالی از نانوذرات نقره شیمیایی و زیست تولیدی (هر غلظت در ۳ تکرار) در چاهک‌های پلیت‌های کشت سلول ۲٤ خانه برای آزمون سمیت ناپلیوس‌ها و پلیت ٦ خانه برای آزمون سمیت بالغین در حضور کنترل (گروه فاقد نانو نقره به عنوان گروه شاهد)، ایجاد گردید.

چاهک‌ها محتوی آب با شوری ۳۰ppt بوده و به هر چاهک از پلیت ۲٤ خانه، ۳۰ ناپلیوس آرتمیا و به هر چاهک از پلیت ٦ خانه ۱۰ آرتمیا بالغ اضافه شد. با توجه به اینکه آرتمیا زیر شاخه سخت پوستان است.

در تحقیق حاضر طی یک رویکرد شبیه‌سازی از سمیت سنجی ترکیبات شیمیایی برای سخت پوستانی چون دافنی (*Daphnia* sp)، مطابق با رهنمود استاندارد شماره ۲۰۲ "سازمان توسعه و همکاری اقتصادی" (۲٦)، استفاده شد و تعداد تلفات آرتمیاها در ساعات ۱۲، ۲٤، ۳٦، و ٤۸ بعد از مجاورت با نانوذرات نقره شیمیایی و زیست تولیدی ثبت شده و درصد مرگ و میر آنها در غلظت‌های متفاوت تعیین گردید.

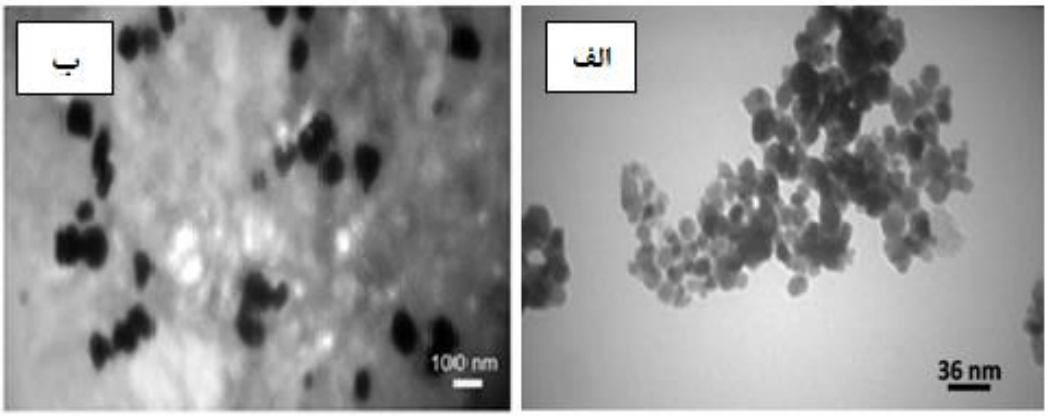
برای محاسبه LC_{50} از نسخه ۱/۵ نرم افزار EPA Probit Analysis (منتشر شده توسط سازمان حفاظت محیط زیست امریکا) استفاده شد.

نتایـج

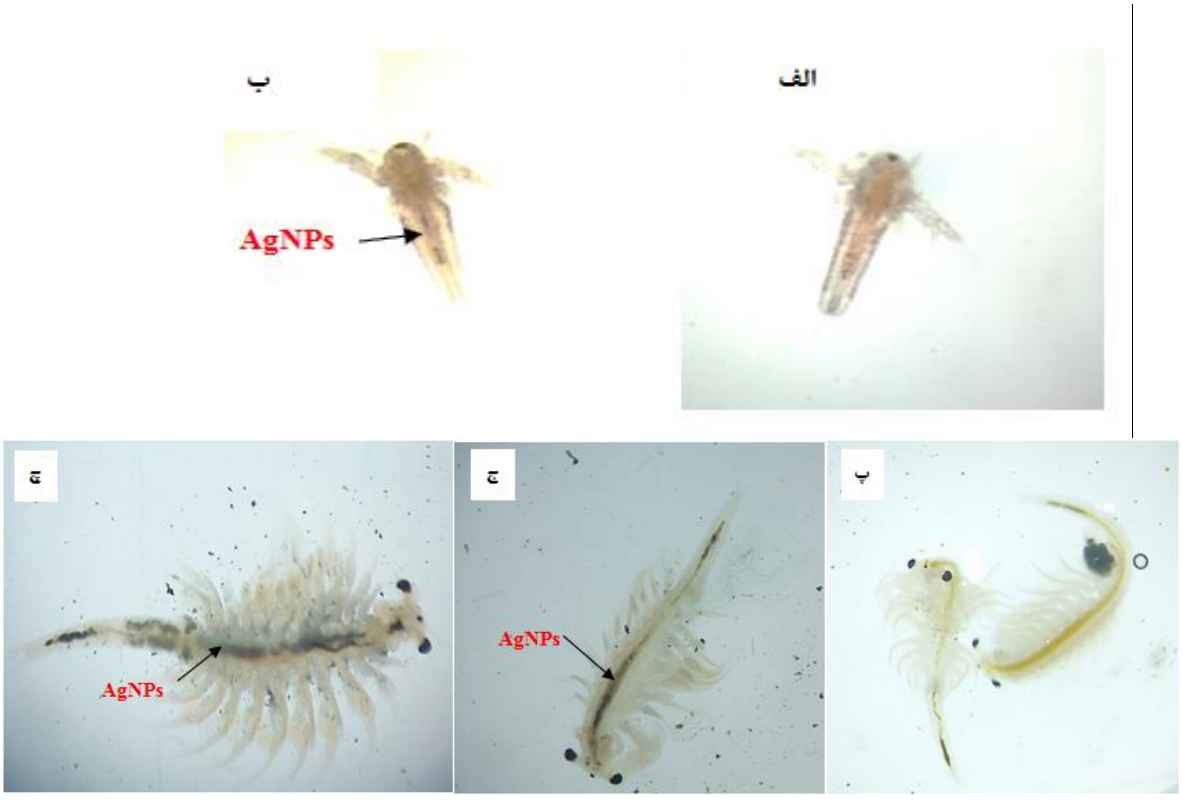
در مطالعه حاضر نتایج سمیت نانوذرات نقره شیمیایی و زیست تولیدی در ناپلیوس و بالغ *A. feranciscana* در اشکال ۳ تا ۷ نشان داده شده است. همانطور که در شکل ۲ مشاهده می شود، ۲٤ ساعت پس از مجاورت آرتمیاهای ناپلیوس و بالغ با نانوذرات نقره شیمیایی و زیست‌تولید شده توسط جلبک سبز دریایی *U. flexuosa*، این نانوذرات در مجرای گوارشی آرتمیا تجمع یافته اند.

آنالیز داده‌ها در پژوهش حاضر نشان می دهد که اثرات سمیت هر دو نوع نانوذره نقره بر لارو آرتمیا با افزایش غلظت و نیز با افزایش مدت زمان مجاورت روند افزایشی را به دنبال داشته است و تفاوت ها میان آنها معنی‌دار بوده است ($p< ۰/۰۵$).

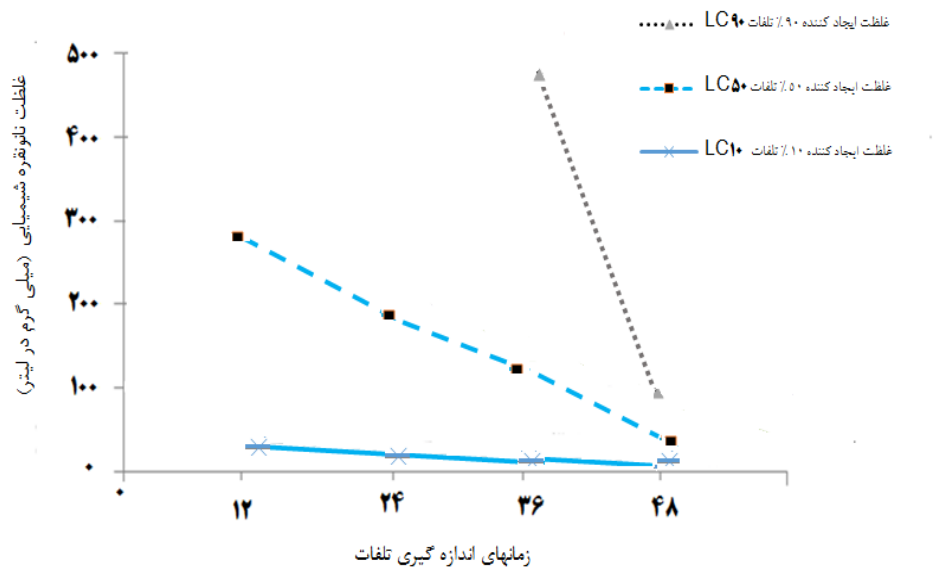
پس از ٤٨ ساعت، غلظت ایجاد کننده‌ی ۵۰٪ تلفات (LC_{50})، در ناپلیوس آرتمیا در مواجهه با نانوذرات نقره شیمیایی L-2000 ۳۱/۸ میلی‌گرم در لیتر و برای نانوذرات نقره زیست تولید شده توسط جلبک سبز *U. flexuosa* ۳٦٦/۹ میلی‌گرم در لیتر بود. حال آنکه این غلظت در ارتباط با بالغین آرتمیا طی مجاورت با نانوذرات نقره شیمیایی برابر با ٤٧ میلی‌گرم در لیتر و برای نانوذرات نقره زیست تولید شده توسط جلبک سبز ۲٤۰ میلی‌گرم در لیتر ارزیابی شد (شکل ۷-۳). مقایسه نتایج سمیت این دو نوع نانوذره، نشان می‌دهد که هر دو مرحله تکاملی ناپلیوس و بالغ، آرتمیای *A. feranciscana* نسبت به اثرات سمیت نانوذرات نقره حساس بوده و در هر دو، نانوذرات نقره شیمیایی در قیاس با همتای زیست تولیدی آن، از سمیت بالاتری برخوردار است. حساسیت ناپلیوس‌های آرتمیا نیز نسبت به نانوذرات نقره شیمیایی بیشتر از مرحله بلوغ بوده، با این وجود حساسیت نسبت به نوع زیست تولید شده از جلبک کمتر از مرحله بلوغ بوده است (شکل ۷). این نتایج نشان می‌دهد، نانوذرات نقره زیست تولید شده از جلبک *U. flexuosa* نسبت به نانوذرات نقره شیمیایی توانسته است، قریب ۱۰ برابر در مرحله ناپلیوس و ۵ برابر در مرحله بلوغ آرتمیا، سمیت کمتری را بروز دهند. به علاوه همانطور که ذکر شد، توان سمیت نانوذرات نقره بر آرتمیا با افزایش زمان مجاورت افزایش یافته است، به طوری که غلظت کشنده میانی نانوذرات نقره (LC_{50}) ۱۲ و ٤٨ ساعت بعد از مجاورت ناپلیوس های آرتمیا برای نانوذرات نقره شیمیایی به ترتیب ۳۱۵/۲ و ۳۱/۸ و برای نانوذرات نقره زیست تولیدی ۷۵۵/٤ و ۳٦٦/۹ میلی‌گرم در لیتر بوده (شکل‌های ۳ و ۵) و برای آرتمیاهای بالغ این غلظت در مواجهه با نانوذرات نقره شیمیایی به ترتیب ۵۱/۱ و ٤٧ و برای نانوذرات نقره زیست تولیدی برابر ۵۵۱/۱ و ۲٤۰ میلی‌گرم در لیتر ارزیابی شده است (شکل‌های ٤ و ٦). از طرفی نسبت تلفات نیز با غلظت نانوذره نقره در هر دو مرحله تکاملی ناپلیوس و بالغ *A. feranciscana* نسبت به دوره زمانی رابطه مستقیم را نشان داد. به طوری که در ارتباط با نانوذرات نقره تولیدی به روش شیمیایی، طی مدت زمان ٤٨ ساعت بعد از مجاورت، غلظت‌های ۹/۵٤، ۳۱/۸۱ و ۱۰٦/۱۳ میلی‌گرم در لیتر، به ترتیب ایجاد ۱۰، ۵۰ و ۹۰ درصد تلفات در لاروهای ناپلیوس آرتمیا نموده و این میزان طی مجاورت ناپلیوس‌های آرتمیا با نانوذرات نقره زیست تولیدی در غلظت‌های ۷۵/٤، ۳٦٦/۹، ۹/ ۱۷۸۳میلی‌گرم در لیتر ایجاد شد. با این وجود در طول این بازه زمانی، غلظت های ایجاد کننده ۱۰، ۵۰ و ۹۰ درصد تلفات در مرحله بلوغ آرتمیا، نسبت به نانوذرات نقره شیمیایی به ترتیب ۳۹، ٤٧ و ۵۵ میلی گرم در لیتر و نسبت به نانوذرات نقره زیست تولیدی ۱۹۳/۸، ۲٤۰ و ۲۸٦/۳ میلی‌گرم در لیتر بود.



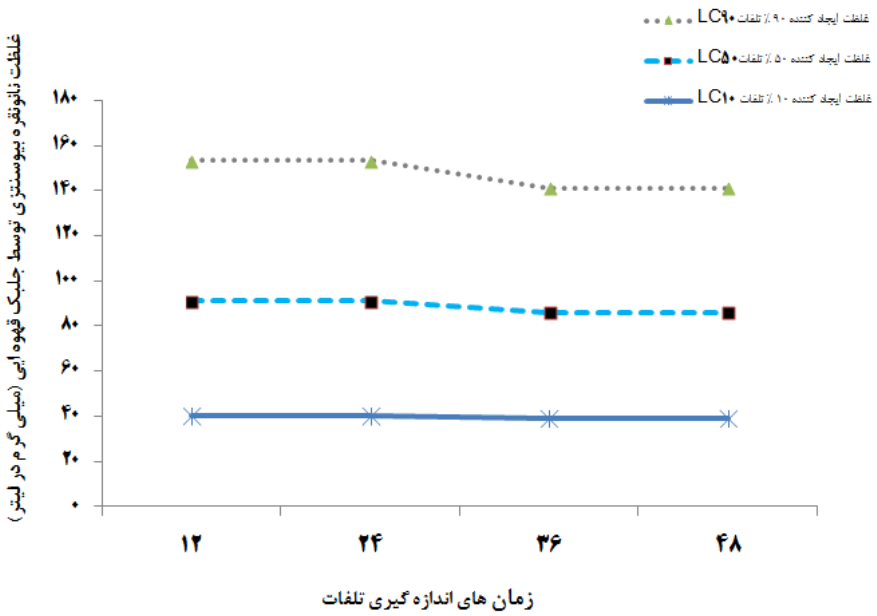
شکل ۱- تصویر میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) از نانوذرات نقره، الف) نانوذرات نقره شیمیایی ب) نانوذرات نقره زیست‌تولید شده از جلبک سبز *Ulva flexuosa*



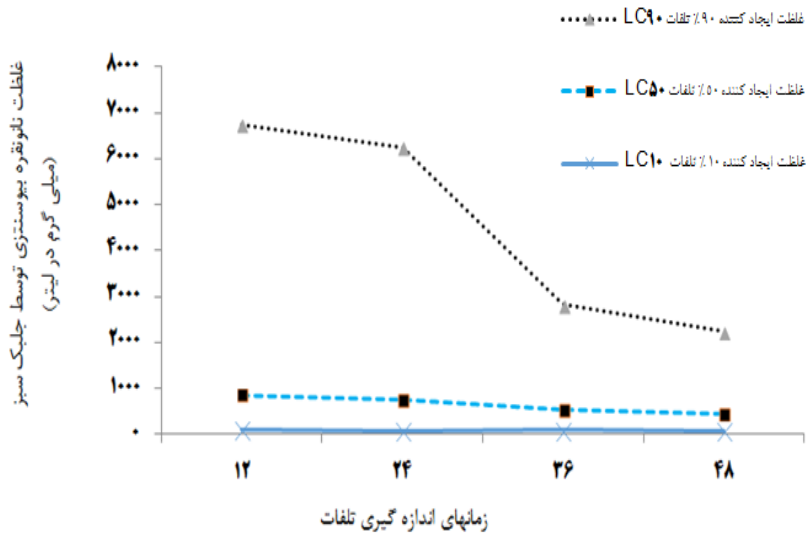
شکل ۲- الف- نمایی از ناپلیوس آرتمیا *Artemia feranciscana* در گروه شاهد، ب- ناپلیوس آرتمیا در گروه تیمار، ۲٤ ساعت پس بعد از مجاورت با نانوذرات نقره، پ- نمایی از آرتمیا بالغ نر و ماده در گروه شاهد، ج- آرتمیا بالغ نر و چ- آرتمیا بالغ ماده (دارای کیسه های تخمی)، ۲٤ ساعت پس بعد از مجاورت با نانوذرات نقره. تجمع نانوذرات نقره در مجرای گوارشی آرتمیا با پیکان سیاه رنگ نشان داده شده است.



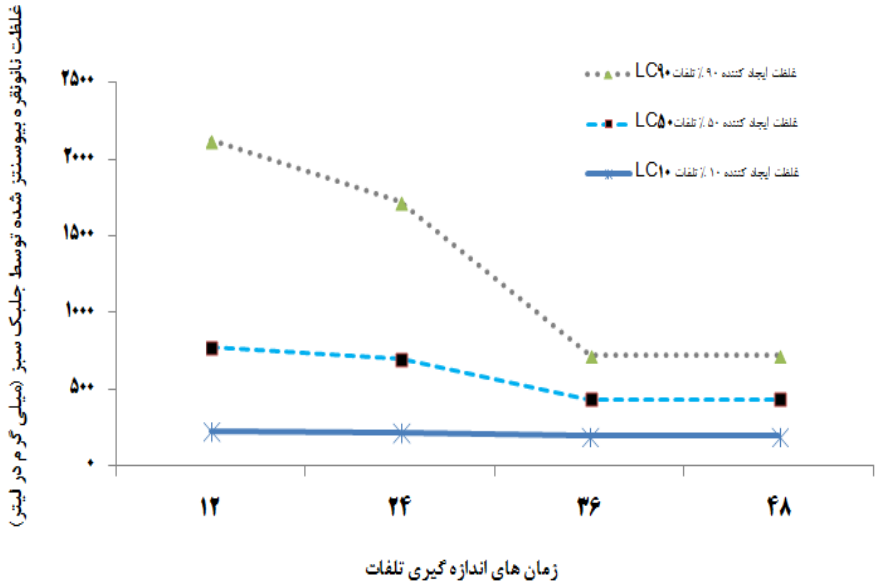
شکل ۳- روند ایجاد تلفات با افزایش غلظت نانوذرات نقره شیمیایی و افزایش زمان مجاورت ناپلی آرتمیا



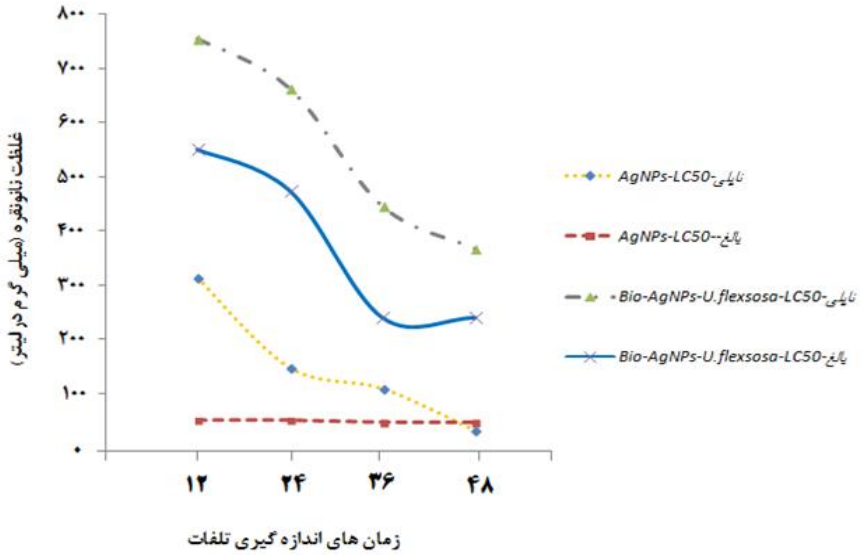
شکل ٤- روند ایجاد تلفات با افزایش غلظت نانوذرات نقره شیمیایی و افزایش زمان مجاورت آرتمیا بالغ



شکل ۵-روند ایجاد تلفات با افزایش غلظت نانوذرات نقره زیست تولید شده توسط عصاره آبی جلبک *U. flexuosa* و افزایش زمان مجاورت ناپلی آرتمیا.



شکل ٦-روند ایجاد تلفات با افزایش غلظت نانوذرات نقره زیست تولید شده توسط عصاره آبی جلبک *Ulva flexuosa* و افزایش زمان مجاورت آرتمیای بالغ.



شکل ۷ - مقایسه غلظت ایجاد کننده نیمی از تلفات (LC_{50}) در مراحل تکاملی ناپلیوس و بالغ آرتمیا *Artemia feranciscana*، طی افزایش زمان مجاورت با نانوذرات نقره شیمیایی (AgNPs) و زیست تولید شده توسط جلبک (Bio-AgNPs-*Ulva flexuosa*).

بحث

در حال حاضر جنس *Artemia spp* (بالاخص دو گونه پرطرفدار این جنس که عبارتند از: *A. salina* و *A. franciscana*) علی رغم اینکه که در سطح وسیعی در مطالعات سم شناسی در سراسر جهان مورد بهره برداری و توجه بوده است (۱۰)، در علم نانوبوم سم‌شناسی، هنوز در آغاز راهی به سوی تبدیل شدن به یک مدل زیستی محسوب می‌شود، هرچند این موجود از توان بالای سازش پذیری در برابر آلاینده‌ها و استرس‌های مختلف زیستی برخوردار است (۲٤).

نانوذرات نقره، در میان انواع نانوذرات مهندسی شده تولیدی در سطح جهان جزء یکی از گروه‌ها با کاربری های بسیار وسیع است که گزارش‌های مختلفی از ارزیابی سمیت و مخاطرات آن بر گروه‌های مختلف آبزیان در اکوسیستم‌های دریایی موجود است (۲٤، ۲۵).

از این رو در مطالعه حاضر و نظر به ویژگی مهم آرتمیا بعنوان یک سخت پوست زئوپلانکتونی با ویژگی فیلترکنندگی غیرانتخابی برای ذرات کمتر از ۵۰ میکرون، اثرات سمیت و تفاوت میزان حساسیت *A. feranciscana* در مراحل ناپلیوس و بالغ، نسبت به دریافت نانوذرات نقره شیمیایی و زیست تولید شده توسط جلبک دریایی سبز *U. flexuosa* در آب دریا، ارزیابی و مقایسه گردید که نتایج بدست آمده نشان داد که هر دو مرحله تکاملی ناپلیوس و بالغ *A. feranciscana* نسبت به اثرات سمیت نانوذرات نقره حساس بوده و اثرات سمیت آن با افزایش مدت زمان مجاورت روند افزایشی را به دنبال داشته است به

طوری که میزان LC_{50} در طول بازه زمانی ٤٨ ساعته کاهش یافته است. با این حال، در هر دو مرحله زندگی آرتمیا، نانوذرات نقره شیمیایی در قیاس با زیست تولیدی، از قدرت سمیت بالاتری برخوردار بوده اند. به نحوی که نانوذرات نقره زیست تولید شده توسط جلبک *U. flexuosa*، تقریباً ۱۰ برابر در مرحله ناپلیوسی و ۵ برابر در مرحله بلوغ آرتمیا، پتانسیل سمیت کمتری را نسبت به نانوذرات نقره شیمیایی نشان داده‌اند. از این رو به نظر می‌رسد حساسیت ناپلیوس های آرتمیا نسبت به نانوذرات نقره شیمیایی بیشتر از مرحله بلوغ بوده ولی نسبت به نوع زیست تولید شده توسط جلبک کمتر از مرحله بلوغ می‌باشد. وانگهی اثرات سمیت مشاهده شده در پژوهش حاضر، می‌تواند ناشی از فعالیت کاتالیکی و کاهش مساحت سطحی ذرات در حالت نانویی باشد (۷)، بویژه زمانی که این نانوذرات در مجرای گوارشی آرتمیا مجتمع شده و به احتمال زیاد تحت تاثیر کشش سطحی و دیگر فرآیندهای گردهم آوری نانوذرات در اندازه‌های میکرونی در محیط آبی و نیز درون مجرای گوارشی آرتمیاها می‌رسند. از این رو بروز مرگ و میر می تواند ناشی از تجمع و ماندگاری نانوذرات در مجرای گوارشی آرتمیا و اختلال در فرآیند دفع مواد زائد باشد (۷).

با این حال به نظر می رسد با افزایش زمان مجاورت آرتمیا با نانوذرات نقره حساسیت بدن آرتمیا در مراحل ناپلیوسی تحت تاثیر فرآیند دگردیستی لاروی بیشتر شده و در مرحله بلوغ علی‌رغم افزایش مقاومت بدن، به علت بروز تغییرات فیزیولوژیک متاثر از بلوغ جنسی حساسیت به نانوذرات نقره کماکان بالاست، هرچند در هر دو مرحله، تفاوت حساسیت نسبت به نوع زیست تولیدی و شیمیایی نانوذرات نقره کاملاً مشهود است.

وابستگی سمیت حاد نانوذرات نقره به غلظت در مطالعه Falugi و همکاران (۱۱)، طی ارزیابی در چندین مدل زیستی مختلفی چون لارو توتیای دریایی، لارو بارناکل، آرتمیا و گوره خر ماهی نیز مشاهده گردید. نتایج ایشان در ارتباط با سخت پوستان نشان داد که علی رغم اینکه نرخ مرگ و میر در لارو بارناکل در یک بازه زمانی ٢٤ ساعته، در غلظت‌های ۰/۱ تا ۰/۰۰۱ گرم در لیتر همگی۱۰۰ درصد بوده است ولی در آرتمیا میزان حساسیت به نانوذرات نقره کمتر بوده و تنها در بالاترین غلظت مرگ و میر به ۱۰۰ درصد رسیده است و با افزایش زمان مواجهه بیشتر از ٤٨ ساعت نرخ مرگ و میر ارتقا یافته است.

یکی از پژوهش‌های جالب توجه مبتنی بر اهمیت آرتمیا به عنوان یک شاخص مهم زیستی در بوم سم-شناسی دریایی، شبیه سازی نرخ انتقال و دسترسی زیستی نانوذرات نقره در طول زنجیره غذایی از آرتمیا (جانور زئوپلانکتونیک) تا ماهی مداکای دریایی (*Oryzias melastigma*) است که توسطWang و Wang (۳۷) انجام پذیرفت. نتایج آنها نشان داد که بواسطه تجمع زیستی نانوذرات نقره در ناپلیوس آرتمیا *A. salina* و تغذیه ماهیان دریای مداکا طی یک دوره ۲۸ روزه از آنها، نرخ انتقال نانوذرات نقره در طول زنجیره غذایی کمتر از ٦ درصد بوده است. با این حال همین نرخ پایین دسترسی زیستی نانوذرات نقره، ممانعت از فعالیت پمپ Na^+/ K^+-ATPase، تحریک سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) را در ماهی مداکا القا نموده است و می‌تواند تاییدی بر سمیت بالقوه نانوذرات نقره برای ماهیان در محیط زیست دریایی طی فرآیند تجمع زیستی باشد.

در مطالعه حاضر، علاوه بر اثرات سمیت تحت تاثیر تجمع نانوذرات نقره شیمیایی و زیست تولیدی در

مجرای گوارشی آرتمیا (شکل ۲)، بروز تغییرات رفتاری نظیر: کندی سرعت حرکت، شنای نامتعارف و سکون نیز مشاهده گردید.

که در این راستا، Gambardella و همکاران (۱۲) توانستند سمیت نانوذرات اکسیدهای فلزی (Fe_3O_4، CeO_2، SnO_2) را بر میگوی آب شور *A. salina* بواسطه ارزیابی مرگ و میر و واکنش‌های رفتاری (تغییرات سرعت شنا) و فعالیت بیوشیمیایی (ChE، GST، CAT) بررسی نمایند، که مشاهدات میکروسکوپی و آنالیزهای شیمیایی ایشان نشان داد که لاروها نانوذرات فلزی را درون مجرای گوارشی یشان مجتمع کرده، هرچند بعد از ٤٨ ساعت این تجمع منجر به مرگ و میر شایان توجهی نشده است. با این وجود، بسته به نوع نانوذرات سنجشی، این عدم القای مرگ و میر در لاروها، تغییرات رفتاری چون کاهش قابل توجه سرعت شنا و تغییرات فاکتورهای بیوشیمیایی را نیز در پی داشته است. در پژوهشی مشابه با مطالعه حاضر، Ates و همکاران (۷)، سمیت حاد ۹٦ ساعته و میزان محتوای نانوذرات دی اکسید تیتانیوم با اندازه ۱۰-۳۰ نانومتر را در مراحل تکاملی ناپلیوس و بالغ *A. salina* ارزیابی نمودند که نتایج ایشان نشان داد که نرخ تجمع نانوذرات TiO_2 در مجرای گوارشی بالغین در طول این بازه زمانی بیشتر از ناپلیوس ها بوده و درصد مرگ و میر ناشی از سمیت و عدم دفع این نانوذرات نیز در بالاترین غلظت مطالعه شده در این پژوهش (۱۰۰mg/l)، در ناپلیوس‌ها ۱۸درصد و در بالغین ١٤درصد با LC_{50} >۱۰۰mg/l بوده است. بعلاوه Ates و همکاران بر این باورند که افزایش زمان مجاورت و تجمع نانوذرات دی اکسید تیتانیوم در مجرای گوارشی آرتمیاها، اختلال در جذب مواد غذایی و بروز آسیب‌های استرس اکسیداتیو ناشی از افزایش سطوح رادیکال‌های آزاد اکسیژن را در پی داشته است به نحوی که در مقایسه با نمونه‌های شاهد، تغییرات سطح پراکسیداسیون لیپیدی (MDA) در طول ۹٦ ساعت مجاورت در نمونه های تیمار رخ داده است.

در رابطه با ارزیابی سمیت نانوذرات نقره زیست تولید شده از جلبک های سبز دریایی، پژوهش ها عمدتاً، متمرکز بر ارزیابی اثرات ضدمیکروبی آنها بوده است نظیر بررسی خواص ضدباکتریایی نانوذرات نقره زیست تولید شده توسط جلبک‌های سبز *U. flexuosa* (۳۹) و *U. lactuca* (۲۱)، در برابر عوامل بیماری زای انسانی.

از این رو تعداد مطالعات نانوبوم سم شناسی صورت گرفته بر نانوذرات نقره زیست تولید شده از جلبک-های دریایی، بسیار اندک بوده و از این دست می‌توان به پژوهش Kumar و همکاران (۲۲) اشاره نمود. در این مطالعه میزان LD_{50} ٢٤ ساعته در ناپلی *A. salina* تحت تاثیر نانوذرات نقره زیست تولید شده از جلبک دریایی و *Sargassum ilicifolium* ۱۰ nM/ml گزارش شده است و در تایید این پژوهش Arulvasu و همکاران (٦) بیان داشتند که غلظت‌های نانومولار نانوذرات نقره برای سیست و ناپلیوس آرتمیا سمی بوده و با افزایش غلظت تا ۱۰ nM/ml کاهش نرخ تخم‌گشایی، افزایش نرخ مرگ و میر ناپلی‌ها، تجمع درون مجرای گوارشی و نهایتاً بروز اثرات کارسینوژنیک و آسیب DNA، را می‌تواند در پی داشته باشد.

صادقی و همکاران (۳)، در بررسی اثرات ضد مزاحمت زیستی (Biofouling) نانوذرات نقره تهیه شده از شرکت‌های مختلف (Inc (آمریکا)، Pioneers (ایران)، نانو نصب پارس(ایران)، سمیت این نانوذرات را نیز بر لارو بارناکل *Amphibalanus amphitrite* مورد سنجش قرار داده و بیان داشتند که در تمامی مراحل لاروی این سخت‌پوست، پایین‌ترین میزان

زنده ماندنی در غلظت ۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نانوذرات نقره مشاهده شده است.

مراحل ناپلیوسی V و VI که در طول این مراحل بارناکل در حال دگردیسی به مرحله لاروی سیپریس است، حساس‌ترین مرحله لاروی بارناکل‌ها نسبت به نانو ذرات نقره بشمار می‌روند.

Becaro و همکاران نیز اثرات سمیت نانوذرات نقره تثبیت شده با پلی‌ونیل الکل (PVA) را در غلظت‌های مختلف طی جذب زیستی توسط میکروجلبک *Pseudokirchneriella subcapita*، *Artemia salina* و *Daphnia similis* بعنوان مدل‌های زیستی ارزیابی نمودند که نتایج ایشان نشان داد که مقدار EC_{50} به ترتیب برای *P. subcapita* و *A. salina* برابر با ۱/۰۹ و $۵/۵ \times ۱۰^{-۲}$ mg/l است و برای دافنی EC_{50} ۴۸ ساعته برابر با و $۲/۶۲ \times ۱۰^{-۴}$ mg/l است (۸).

از این رو نظر به دسته‌بندی ارائه شده توسط سازمان ملل متحده آمریکا (۳۶)، چنانچه ماده ای واجد EC_{50} ۴۸ ساعته با سمیت کمتر از ۰/۱ mg/l باشد، جز مواد بسیار سمی تلقی گردیده و از این حیث، نانوذرات نقره در این گروه جای می گیرند.

سمیت نانوذرات نقره (Ag-NPs) در جانداران به حمل یون‌های نقره (Ag) توسط آنها نسبت داده می‌شود که آسیب‌های نگران‌کننده‌ای را بر غشای سلولی و نیز دیگر ترکیبات درون سلولی وارد می‌سازد و عمدتاً در ارتباط با استرس اکسیداتیو، اثرات القایی آن بر DNA، لیپوپروتئین‌ها و فعالیت‌های معین متابولیسمی است که می‌تواند وابسته به فاکتورهای مختلفی چون طبیعت نانوذره، شکل، سایز و برخی فاکتورهای محیطی چون شوری، دما و اکسیژن محلول باشد (۲۳).

در ارتباط با شوری، بایست توجه داشت که نانوذرات نقره در آب‌های شور، سمیت کمتری را نسبت به آب شیرین نشان می‌دهند زیرا عوامل مداخله گر یونی موثر در تغییر خاصیت الکترواستاتک و جذب سطحی نانوذرات، در آب‌های شیرین کمتر هستند. در حقیقت مهمترین اثر شوری، القای اثرات تجمعی آن است زیرا شوری باعث کاهش تشکیل حالت کلوئیدی- تجمعی در آب شده و فرآیند رسوب‌گذاری کلوئیدی را تحت تاثیر قرار می‌دهد به نحوی که پایداری نانوذرات با افزایش شوری کاهش می‌یابد (۲۳).

از این رو نظر به تفاوت تاثیرات نانوذرات در آب‌های شور و شیرین و نیز مقاومت بالای آرتمیا نسبت به آلایندها در قیاس با آبزیان آب شیرین می‌توان توصیه نمود، اثرات زیست محیطی نانوذرات نقره در منابع آبی شیرین بیشتر ارزیابی گردد. اگرچه هنوز به درستی مشخص نیست که سمیت نانوذرات تا چه میزان مربوط به یون‌های آزاده شده از آنها و چه میزان مربوط به خود نانوذرات است، Kim و همکاران (۲۰)، پیشنهاد می‌کنند که سمیت نانو ذرات نقره به دلیل استرس اکسایش ناشی از این ذرات، مستقل از سمیت نقره یونی است.

با این حال Johari و همکاران (۱۸) نشان داد که بیشترین غلظت فاقد اثر سمیت، کمترین غلظت ایجاد کننده سمیت، حداکثر غلظت قابل قبول و غلظت کشنده میانی کلوئید نانو نقره بر مدل زیستی ماهی گوره خری *Danio rerio* به ترتیب ۲۵۰، ۲۴۰، ۲۴۸/۹، ۳۰۰/۶ برابر کمتر از نانوذرات نقره است. لذا سمیت کلوئید نانو نقره، بیشتر از آن که مربوط به نانوذرات نقره باشد، می تواند ناشی از یون‌های آزاد نقره موجود در این کلوئید باشد.

در این راستا توانا و همکاران (۱)، میزان جذب و رهایش ۴۸ ساعته نانوذرات نقره و دی اکسید تیتانیوم در ناپلیوس *A. franciscana* را در شوری‌های مختلف ارزیابی نموده و نتایج ایشان نشان داد که میزان جذب نانوذرات تیتانیوم به صورت معنی‌داری

بیش از نقره است، ولی میزان رهایش نانونقره در مقایسه با تیتانیوم در ناپلیوس‌ها بیشتر بوده است و این امر می‌تواند در آب‌های شور، منجر به افزایش نرخ رسوب‌گذاری نانوذرات شده و انتقال بخش باقیمانده جذبی توسط آرتمیا به مصرف کنندگان ثانویه گردد.

نتیجه‌گیری

بنابر داده‌های بدست آمده از مقایسه نتایج سمیت دو نوع نانوذرات نقره شیمیایی و زیست تولیدی در هر دو مرحله تکاملی ناپلیوس و بالغ *A. feranciscana* و کاهش پتانسیل سمیت نانوذرات نقره زیست تولیدی تهیه شده از جلبک دریایی نسبت نانوذرات نقره شیمیایی در هر دو مرحله زندگی آرتمیا، می‌توان نتیجه گرفت که رویکرد سنتز سبز نانوذرات فلزی با استفاده از بافت‌های گیاهی با محتوای آنتی‌اکسیدانی بالا (پلی‌فنول‌ها) و پلی ساکاریدهای سولفاته، می‌تواند ضمن ایفای نقش مضاعف در احیاء یون‌های فلزی چون نقره، رویکرد جایگزین و نوید بخشی در تولید نانوذرات ایمن و دوستدار محیط زیست باشد.

منابع

۱. توانا، م.، کلباسی، م.ر.، عابدیان کناری، ع.م.، جوهری، س.ع.، ۱۳۹۳. ارزیابی میزان جذب و رهایش نانوذرات نقره و دی اکسید تیتانیوم در ناپلی آرتمیا فرانسیسکانا در شوری‌های مختلف. مجله اقیانوس شناسی ، سال پنجم، شماره ۱۹، صفحات ۱۰۳-۹۱.

۲. رحیمی، ز.، یوسف‌زادی، م.، نوری، ا.، اکبرزاده، آ.، ۱۳۹۳. سنتز نانوذرات نقره با استفاده از سه گونه ماکروجلبک دریایی خلیج فارس. مجله اقیانوس شناسی ، سال پنجم، شماره ۱۹، صفحات ۷۸-۷۱.

۳. صادقی، ف.، یوسف‌زادی، م.، مشجور، س.، رحیم زاده، ز.، ۱۳۹٤. بررسی خواص آنتی فولینگ نانو ذرات بر لارو سیپریس بارناکل گونه *Amphibalanus amphitrite* پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه هرمزگان.

4. Amulyavichus A., Daugvila A., Davidonis R., Sipavichus C., 1998. Study of chemical composition of nanostructural materials prepared by laser cutting of metals. *The Physics of Metals and Metallography*, 85: 111–117.

5. 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: 10-14.

6. Arulvasu C., Jennifer S., Prabhu D., Chandhirasekar D., 2014. Toxicity effect of silver nanoparticles in brine shrimp *Artemia*. *The Scientific World Journal*, 2014: 1-10.

7. Ates M., Daniels J., Arslan Z., Farah I.O., 2013. Effects of aqueous suspensions of titanium dioxide nanoparticles on *Artemia salina*: assessment of nanoparticle aggregation, accumulation, and toxicity. *Environmental Monitoring* and *Assessment*, 185(4): 3339-3348.

8. Becaro A.A., Jonsson C.M., Puti F.C., Siqueira M.C., Mattoso L.H.C., Correa D.S., Ferreira, M.D., 2015. Toxicity of PVA-stabilized silver nanoparticles to algae and microcrustaceans. *Environmental Nanotechnology, Monitoring* and *Management*, 3: 22-29.

9. Clark L.S., Bowen S.T., 1978. The genetic of *Artemia salina*. *The Journal Heredity*, 67: 385-388.

10. Costa-Lotufo L.V., Khan M.T., Ather A., Wilke D.V., Jimenez P.C., Pessoa C., de Moraes M.E., de Moraes M.O., 2005. Studies of the anticancer potential of plants used in Bangladeshi folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 99: 21-30.

11. Falugi C., Aluigi M.G.A., Faimali M., Ramoino P., 2012. Dose dependent effects of silver nanoparticles on reproduction and development of different biological models. *Environmental Quality*, 8: 61-65.

12. Gambardella C., Mesaric, T., Milivojević T., Sepcic, K., Gallus L., Carbone S., Ferrando S., Faimali M., 2014. Effects of selected metal oxide nanoparticles on *Artemia salina* larvae: evaluation of mortality and behavioural and biochemical responses. *Environmental Monitoring and Assessment*, 186: 4249-59.

13. Gavhane A.J., Padmanabhan P., Kamble S.P., Jangle S.N., 2012. Synthesis of silver nanoparticles using extract of Neem leaf and triphala and evaluation of their antimicrobial activities. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 3(3): 88-100.

14. Godwin H.A., Chopra K., Bradley K.A., Cohen Y., Herr Harthorn B., Hoek E.M.V., Hoden P., Keller A.A., Lenihan H.S., Nisbet R.M., Nel A.E., 2009. The University of California center for the environmental implications of nanotechnology. *Environmental Science and Technology*, 43: 6453-6457.

15. Gomez G.B., Herrara M.A., Abreu F.A., Roque A., 1998. Bioencapsulation of two different *vibrio* species in nauplii of the brine shrimp, *Microbialogy*, 64: 2318-2322.

16. Herre Dasht M., Mirvaghefi A.R., 2013. Applications of nanotechnology in fisheries. *Journal of Nanotechnology*, 11(6):13-15.

17. Jagtap U.B., Bapat V.A., 2013. Green synthesis of silver nanoparticles using *Artocarpus heterophyllus* lam. seed extract and its antibacterial activity. *Industrial Crops and Products*, 46: 132-137.

18. Johari S.A, Habibi L., Hosseini S.J., 2014. Toxicity of colloidal nano-silver to zebrafish, *Danio rerio*: ions, nanoparticles, or both?. *Aquaculture Nutrition and Biochemistry*,1(1): 59-68.

19. Johari S.A, Kalbassi M.R., Soltani M., Yu I.J., 2016. Application of nanosilver-coated zeolite as water filter media for fungal disinfection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs. *Aquaculture International*, 24: 23-28.

20. 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.

21. Kumar P., Senthamil Selvi S., Govindaraju M., 2012. Seaweed-mediated biosynthesis of silver nanoparticles using *Gracilaria corticata* for its antifungal activity against *Candidaspp*. *Applied Nanoscience*, 3: 495-500.

22. Kumar P., Selvi S.S., Praba A.L., Selvaraj M., Rani L.M., Suganthi P., Sarojini Devi B., Govindaraju M., 2012. Antibacterial activity and in-vitro cytotoxicity assay against brine shrimp using silver nanoparticles synthesized from *Sargassum ilicifolium*. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 7: 1447-1455.

23. Lapresta-Fernandez A., Fernandez A., Blasco J., 2012. Nanoecotoxicity effects of engineered silver and gold nanoparticles in aquatic organisms. *Trends* in *Analytical Chemistry*, 32: 40-59.

24. Libralato G., 2014. The case of *Artemia* spp. in nanoecotoxicology. *Marine Environmental Research*, 101: 38-43.

25. Matranga V., Corsi I., 2012. Toxic effects of engineered nanoparticles in the marine environment: Model organisms and molecular approaches. *Marine Environmental Research*, 76: 32-40.

26. OECD, 20O4. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Test No. 202: Daphnia sp., Acute Immobilisation Test and Reproduction, Paris, France.

27. 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.

28. Prabhu S., Poulose E. K., 2012. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and

toxicity effects. *International Nano Letters*, 2: 32.

29. Rahman Nia J., 2009. Preparation of colloidal nanosilver. US Patent application docket 20090013825, 15 January 2009.

30. Rajeshkumar S., Malarkodi C., Gnanajobitha G., Paulkumar K., Vanaja M., Kannan C., Annadurai G., 2013. Seaweed-mediated synthesis of gold nanoparticles using *Turbinaria conoides* and its characterization. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 3: 44.

31. Reynolds G.H., 2001. Environmental Regulation of Nanotechnology: Some Preliminary Observations, *Nano Archive* 31, 10681-10688.

32. Senapati S., Syde A., Moeez S., Kumar A., Ahmah A., 2012. Intracellular synthesis of gold nanoparticles using alga *Tetraselmis kochinensis*. *Materials Letters*, 79: 116-118.

33. Sharma K., Yngard R.A., Lin Y., 2009. Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities, *Advances in Colloid and Interface Science*, 145: 83-96.

34. Sorgeloos P., Dehert P., Candreva P., 2001. Use of the brine shirinp, *Artemia spp*., in marine fish larviculture, *Aquaculture*, 200: 147-759.

35. Tolstoshev A., 2006. Nanotechnology, assessing the environmental risks for Australia, 1nd edition. Earth Policy Centre. PP. 317.

36. UN United Nation. 2009. Globally harmonized system of classification and labelling of chemicals (GHS), New York and Geneva.

37. Wang J., Wang W.X., 2014. Low Bioavailability of Silver Nanoparticles Presents Trophic Toxicity to Marine Medaka (*Oryzias melastigma*). *Environmental Science and Technology*, 48: 8152−8161.

38. Wiesner M.R., Lowry G.V., Jones K.L., Hochella Jr. M.F., Di Giulio R.T., Casman E., Bernhardt E.S., 2009. Decreasing uncertainties in assessing environmental exposure, risk and ecological implications of nanomaterials. *Environmental Science and Technology*, 43: 6458-6462.

39. Yousefzadi M., Rahimi Z., Ghafori V., 2014. The greensynthesis, characterization and antimicrobial activities of silver nanoparticles synthesized from green alga *Enteromorpha flexuosa* (wulfen) J.*Agardh. Materials Letters*, 137: 1-4.