اثر غلظت‌های تحت‌کشنده نانوذرات نقره و نیترات نقره بر ماهی کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*. L): تغییرات خون‌شناسی و آنتی‌اکسیدانی

- **خیراله خسروی‌کتولی**: گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
- **علی شعبانی***: گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
- **حامد پاک‌نژاد**: گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
- **محمدرضا ایمانپور**: گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۶

چکیده

با توجه به کاربرد بالای نقره و هم‌چنین احتمال در معرض گرفتن آبزیان، امکان در معرض قرارگیری این موجودات با این فلز زیاد است. لذا این مطالعه با هدف بررسی و مقایسه اثرات تحت حاد نانوذرات نقره و نیترات نقره بر بقاء، شاخص‌های مختلف خونی و هم‌چنین آنزیم‌های شاخص آنتی‌اکسیدانی در ماهی کپورمعمولی انجام شد. ابتدا غلظت کشندگی ۵۰٪ و ۹۶ ساعته برای دو شکل نقره به‌دست آمد و سپس ماهیان به‌مدت ۲۱ روز در معرض ۱۵٪ و ۳۰٪ از غلظت حاد محاسبه شده (۰/٤ و ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات و هم‌چنین ۰/۰۲۵ و ۰/۰٤۵ میلی‌گرم در لیتر نیترات نقره) قرار گرفتند. متوسط غلظت حاد ۹٦ ساعته برای نانوذرات نقره و نیترات نقره به‌ترتیب ۰/۰۲±۰/۲۹ و ۰/۰۵±۰/۱۵ میلی‌گرم در لیتر بود. نتایج نشان‌دهنده اختلالات مختلفی در شاخص‌های خون‌شناسی ازجمله کاهش تعداد گلبول‌های قرمز و افزایش تعداد گلبول‌های سفید بود. هم‌چنین آنزیم SOD در اکثر تیمارهای درمعرض قرار گرفته در مقایسه با گروه شاهد القاء شد. این مطالعه نشان داد نیترات نقره در غلظت‌های پایین‌تری اثرات کشندگی خود را اعمال می‌کند و هر دو شکل نقره تقریباً به شکل یکسان باعث تغییرات در فاکتورهای ایمنی ذاتی و شاخص‌های استرس اکسیداتیو در ماهیان درمعرض قرار گرفته شدند اما در آنزیم SOD این تغییرات در گروه‌های مواجه شده با نیترات نقره کمی بیش‌تر بود.

کلمات کلیدی: ماهی، حالت یونی و نانوذرات نقره، سم‌شناسی، استرس

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: ali_shabany@yahoo.com

مقدمه

نانوفن آوری بدون شک یکی از مهم‌ترین تکنولوژی‌های قرن ۲۱ می‌باشد. به‌طوری‌که تا سال ۲۰۰۷، ۱۴۷ میلیارد دلار از محصولات مختلف نانوذرات به فروش رفته‌اند و تخمین زده می‌شود این رقم تا سال ۲۰۲۰ به ۳ تریلیون دلار برسد و از نانوفن آوری به‌عنوان انقلاب صنعتی بعدی یاد می‌شود (Schmidt، ۲۰۰۹). هرچقدر این صنعت توسعه پیدا کند، انواع نانوذرات و هم‌چنین کاربردهای آن‌ها افزایش پیدا می‌کند، بنابراین احتمال‌ورود ناخواسته آن‌ها به‌محیط نیز افزایش پیدا می‌کند، و درنتیجه منجر به افزایش نگرانی‌ها در زمینه تاثیر این نانوذرات در سلامت انسان و محیط خواهد شد (Dowling و همکاران، ۲۰۰۴؛ Williams و همکاران، ۲۰۰۵). از آن‌جایی‌که محیط‌های آبی مقصد نهایی بسیاری از آلاینده‌ها می‌باشند، به‌طور ویژه احتمال ورود نانوذرات به محیط‌های آبی و هم‌چنین در معرض قرارگیری آبزیان با این نانوذرات افزایش می‌یابد (Williams و همکاران، ۲۰۰۵). منبع ورود نانورذات به محیط‌های آبی می‌تواند شامل ورود فاضلاب‌ها به محیط‌های آبی،خروج اتفاقی از کارخانه‌ها وهم‌چنین تجزیه و استهلاک محصولات حاوی نانوذرات باشد (Schmidt، ۲۰۰۹). با توجه به اندازه کوچک و خواص ویژه فیزیکی و شیمیایی نانوذرات، رفتار آن‌ها در محیط‌های‌آبی،طریقه ورود به بدن، توزیع و تاثیر آن در بدن موجودات زنده می‌تواند در مقایسه با سایر آلاینده‌های محیطی متفاوت باشد (Hao و همکاران، ۲۰۱۳). در حال حاضر، اطلاعات کمی از سرنوشت نانوذرات در محیط، دسترسی زیستی و اطلاعات مرتبط با تاثیرات زیست‌شناسی نانوذرات وجود دارد، بنابراین، نیاز برای انجام مطالعات بیش‌تر در این زمینه ضروری می‌باشد که میزان خطر بالقوه این نانو ذرات را برای انسان و محیط مشخص سازد. در بین نانوذرات مختلف، نانوذرات نقره از پرکاربردترین آن‌ها می‌باشد (Woodrow Wilson Database، ۲۰۱۴) که در صنایع مختلفی ازجلمه منسوجات، مصارف پزشکی و آنتی‌باکتریال، بسته‌بندی مواد غذایی، ساخت پلاستیک و لوازم آرایشی به‌طور گسترده‌ای مورداستفاده قرار می‌گیرند (Grillo و همکاران، ۲۰۱۵). همان‌طورکه اشاره شد، استفاده گسترده از این نانوذرات می‌تواند منجربه افزایش احتمال‌رهاسازی آن‌هادرمحیط‌های آبی شود. به‌رغم مطالعات انجام گرفته در این زمینه، در حال حاضر نمی‌توان به‌طور دقیق میزان ورود این نانوذره را در محیط‌های آبی پیش‌بینی نمود. در چندین مطالعه از طریق مدل‌سازی مقدار احتمالی وجود این نانوذره را در طبیعت پیش‌بینی کرده‌اند. به‌طور مثال در مطالعه Keller و همکاران (۲۰۱۳) میزان رهایش نانوذرات نقره در آب‌های سطحی بیش‌تر از ۶۰ تن در سال گزارش شده است. در مطالعات دیگری غلظت نقره در آب‌های شیرین حدود ۰/۰۱-۱۰۰ نانوگرم در لیتر گزارش‌شده‌است (Rozan و همکاران، ۱۹۹۵؛ Bilberg و همکاران، ۲۰۱۰). با توجه به این‌که خون در تمام بدن ماهیان جریان دارد می‌تواند نشان‌دهنده واکنش بدن ماهیان به عوامل محرک خارجی و داخلی شود و درواقع به‌عنوان شاخص مناسبی برای نشان دادن استرس‌ناشی ازعوامل‌محیطی و درونی باشند (Saravanan و همکاران، ۲۰۱۱). پارامترهای بیوشیمیایی، به‌خصوص کورتیزول و گلوکز و پارامترهای‌شمارشی،به‌صورت‌عمده‌درمطالعات سم‌شناسی‌وپایش‌های محیطی مورد استفاده قرار می‌گیرد (katuli و همکاران، ۲۰۱۴). آلاینده‌ها از طریق محدودسازی فعالیت آنزیم استیل‌کولین استراز و به‌واسطه‌عمل فسفریلاسیون ناشی از تجمع استیل‌کولین، سمیت خود را اعمال می‌کنند (Fulton و Key، ۲۰۰۱). نقره ممکن است از طریق تولید رادیکال آزاد اکسیژن (ROS) باعث القاء واکنش اکسیداتیو شود (Kehrer، ۱۹۹۳). اطلاعات مربوط به القاء استرس اکسیداتیو تحت تأثیر شکل‌های مختلف نقره، به‌خصوص روی آبزیان محدود است. آنزیم‌های کلیدی برای کاهش سمیت ناشی از تولید رادیکال آزاد اکسیژن شامل کاتالاز (CAT)، لاکتات دهیدروژناز (LDH)، گلوتاتیون S ترانسفراز (GST) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) می‌باشد (Oruç و Usta، ۲۰۰۷). در شرایط طبیعی این آنزیم‌ها از سلول‌ها و بافت‌ها در برابر تخریب‌های اکسیداسیونی محافظت می‌کنند و در واقع بین تولید و حذف رادیکال‌های آزاد تعادل وجود دارد. در صورت ایجاد شرایطی که این تعادل را به‌هم بزند، مانند قرارگرفتن در معرض آلاینده‌ها، استرس اکسیداتیو به‌وجود می‌آید و متعاقب آن نیز آسیب‌های جدی سلولی ایجاد می‌شود. در بعضی از مطالعات از این ترکیبات آنتی‌اکسیدانی به‌عنوان شاخصی برای آلاینده‌ها در آبزیان استفاده کرده‌اند (Buffet و همکاران، ۲۰۱۳؛ Völker و همکاران، ۲۰۱۴). با توجه به توسعه روزافزون کاربرد نقره، مطالعات کمی روی بررسی اثرات مختلف سم‌شناسی و مقایسه اثرات اشکال مختلف آن با هم، در آبزیان انجام گرفته است. هدف از این مطالعه بررسی اثرات سم‌شناسی تحت‌حادنانوذرات‌نقره‌روی ماهی کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*) بود و از تیمارهای نیترات نقره نیز به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. ماهی کپورمعمولی یک گونه آب شیرین می‌باشد که ارزش اقتصادی بالایی دارد و در بسیاری از مطالعات نیز به‌عنوان یک گونه مهره‌دار آبزی مورد استفاده قرار گرفته است (Saravanan و همکاران، ۲۰۱۱؛ Hao و همکاران، ۲۰۱۳؛ Xing و همکاران، ۲۰۱۳). در این مطالعه برای بررسی ویژگی‌های نانوذرات نقره در محیط آبی، اندازه ذرات مورد بررسی قرار گرفت. هم‌چنین، جهت بررسی اثرات سم‌شناسی نقره، پس از تعیین غلظت حادکشنده، پارامترهای بیوشیمیایی و عوامل شمارشی خونی و هم‌چنین آنزیم‌های اکسیداتیو در ماهیان کپورمعمولی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نانوذرات نقره و نیترات نقره: نانوذرات نقره صنعتی از شرکت نانونصب (تهران، ایران) خریداری شد. براساس اطلاعات شرکت سازنده، ۴۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر نقره در محلول نانوذرات نقره وجود داشت. میانگین اندازه ذرات ۲۰ نانومتر و ذرات کروی شکل و خلوص بالای ۹۹٪ داشتند. پلت‌های نیترات نقره با خلوص بالای ۹۹٪ محصول شرکت سیگما (آلمان) خریداری شد. برای رسیدن به غلظت‌های مورد نظر، از آب مقطر برای رقیق‌سازی استفاده گردید.

مشخصات نانوذرات نقره: مشخصات نانوذرات نقره، ازجمله اندازه و قطر در مطالعه Katuli و همکاران (۲۰۱۴) به‌طور کامل مورد بررسی قرار گرفت که با توجه به نتایج، غلظت نانوذرات موجود در محلول ۳۸۵۶ میلی‌گرم در لیتر و پتانسیل زتا ۰/۱۵±۰/۵۹+ میلی‌ولت بود. تعیین غلظت کشندگی متوسط براساس روش استاندارد شده سازمان توسعه و همکاری اقتصادی (Organization for Economic Cooperation and Development=OECD) راهنمای شماره ۲۰۳ تحت شرایط پایدار (Static) انجام پذیرفت و جهت انجام این آزمایش ۶ غلظت درنظر گرفته شد. غلظت‌های اسمی برای هر دو شکل نقره شامل ۰، ۰/۱، ۰/۱۲۵، ۰/۱۸۷، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر بود. قبل از ۲۴ ساعت از انجام این آزمایش، تغذیه ماهیان متوقف گردید. برای هر غلظت سه تکرار درنظر گرفته و در هر مخزن (تکرار) ۱۰ قطعه ماهی کپور به‌صورت تصادفی توزیع شد. تلفات ماهیان هر ۲۴ ساعت ثبت و جمع‌آوری شد و این کار تا انتهای ۹۶ ساعت (۴ روز) انجام پذیرفت. غلظت کشندگی متوسط با استفاده از آنالیز Probit انجام پذیرفت (Hedayati و همکاران، ۲۰۱۳). به‌منظور انجام مطالعه تحت حاد، ماهیان در معرض غلظت‌های ۰/۰۴ و ۰/۰۸ میلی‌گرم بر لیتر از نانوذرات نقره و ۰/۰۲۵ و ۰/۰۴۵ میلی‌گرم بر لیتر نیترات نقره به‌مدت ۲۱ روز قرار گرفتند. این غلظت‌ها براساس اطلاعات به‌دست آمده از قسمت قبلی آزمایش (حدود ۱۵ و ۳۰ درصد غلظت کشندگی متوسط) انتخاب شدند. جهت سنجش پارامترهای خون‌شناسی، نمونه‌برداری در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ از شروع آزمایش انجام گرفت و در هنگام نمونه‌برداری، ماهیان با استفاده از عصاره پودر گل میخک (۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) بی‌هوش شدند. با استفاده از سرنگ هپارینه شده، خون از رگ دمی ماهیان جمع شد و بخشی از آن برای شمارش تعداد سلول‌های خونی مورد استفاده قرار گرفت و بخش دیگر آن به‌منظور بررسی فاکتورهای بیوشیمیایی خون، پس از سانتریفوژ در ۱۰۰۰۰ rpm به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق، پلاسما جدا شده و تا زمان انجام ادامه آزمایشات در دمای ۲۰ - درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. به‌منظور بررسی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، در روز ۲۱ بافت کبد ماهیان نمونه‌برداری شد و سپس در دمای ۸۰ - درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

سنجش پارامترهای شمارشی خون: تعداد گلبول‌های قرمز خون و تعداد گلبول‌های سفید خون پس از رقیق‌سازی خون با استفاده از لام هماتوسیتومتر شمارش گردید (Houston، ۱۹۸۵). هموگلوبین به روش استاندارد با استفاده از کیت سنجش هموگلوبین ساخت شرکت زیست‌شیمی تهران مورد سنجش قرار گرفت. هماتوکریت به‌روش میکروهماتوکریت با استفاده از لوله‌های میکروهماتوکریت مورد سنجش قرار گرفت و سانتریفوژ نمونه به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ rpm با استفاده از سانتریفوژ میکروهماتوکریت صورت پذیرفت. سایر شاخص‌های خونی طبق منبع مطالعاتی Campbell و Ellia (۲۰۰۷) محاسبه گردید.

سنجش فعالیت آنزیم‌های شاخص استرس اکسیداتیو: نمونه‌های بافت کبد از فریزر خارج شده و پس از توزین، به نسبت ۱:۱۰ در بافر فسفات سالین (PBS) همگن شدند و نمونه‌ها در ۱۲۰۰۰ rpm و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس محلول رویی جمع‌آوری و جهت سنجش شاخص‌های اکسیداتیو استفاده شد. فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز طبق روش Winterbourn و همکاران (۱۹۷۵) مورد سنجش قرار گرفت. حجم مناسبی از بافت همگن‌شده، EDTA ۰/۱ مولار، سدیم سیانید ۰/۳ میلی‌مولار و ۱/۵ میلی‌مولار NBT (Nitroblue Tetrazolium) در یک کووت اضافه شدند و بعد از مخلوط کردن به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس ریبوفلاوین ۰/۱۲ میلی‌مولار در بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۶۷ مولار با pH ۷/۸ اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه درجه حرارت اتاق قرار گرفتند. جذب در طی ۵ دقیقه در طول‌موج ۵۶۰ نانومتر قرائت و فعالیت ویژه برحسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل آماری: غلظت کشندگی متوسط با استفاده از آنالیز Probit انجام پذیرفت. نرمال بودن داده‌های خون‌شناسی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان با استفاده از آزمون کولموگروف- اسمیرنوف بررسی شد. برای بررسی اثر زمان و تیمار از آزمون آنالیز واریانس دو طرفه (Two-Way ANOVA) و دانکن انجام گرفت و سپس، آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA) با آزمون تعقیبی چنددامنه دانکن برای بررسی اختلافات معنی‌دار بین تیمارها انجام گرفت. آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS و در سطح احتمال ۹۵ درصد ($P<0/05$) در محیط ویندوز ۷ انجام گرفت.

نتایج

غلظت متوسط کشندگی: تلفات ماهیان با افزایش غلظت نانو ذرات نقره و نیترات نقره افزایش پیدا کرد، به‌طوری‌که بیش‌ترین تلفات در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر (در هر دو شکل نقره) مشاهده شد و حداقل تلفات نیز در گروه شاهد مشاهده گردید (جدول ۱).

جدول ۱: میانگین غلظت کشنده نانوذرات نقره و نیترات نقره در ماهی کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*) در ساعات ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶

غلظت کشنده (میلی‌گرم بر لیتر)	زمان درمعرض گذاری (ساعت)
نانوذرات نقره	
۰/۴۳ ± ۰/۰۷	۲۴
۰/۳۱ ± ۰/۰۴	۴۸
۰/۲۹ ± ۰/۰۸	۷۲
۰/۲۹ ± ۰/۰۲	۹۶
نیترات نقره	
۰/۳۸ ± ۰/۰۲	۲۴
۰/۲۱ ± ۰/۰۴	۴۸
۰/۱۶ ± ۰/۰۷	۷۲
۰/۱۵ ± ۰/۰۵	۹۶

مقادیر LC۵۰ در ساعات ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ برای نانوذرات نقره به‌ترتیب شامل ۰/۰۷±۰/۰۴،۰/۴۳±۰/۰۸، ۰/۳۱±۰/۰۸، ۰/۲۹±۰/۰۲ و ۰/۲۹±۰/۰۲ میلی‌گرم‌درلیتر،و برای نیترات نقره شامل ۰/۰۲±۰/۳۸، ۰/۰۴±۰/۲۱، ۰/۰۷±۰/۱۶ و ۰/۰۵±۰/۱۵ میلی‌گرم درلیتر بود.همان‌طورکه‌در بخش قبلی گفته شد، غلظت‌های تحت حاد براساس غلظت حاد ۹۶ ساعته به‌دست آمده در این قسمت از مطالعه انتخاب گردیدند که این مقادیر برای نانوذرات نقره شامل ۰/۰۴ و ۰/۰۸ میلی‌گرم در لیتر و برای نیترات نقره شامل ۰/۰۲۵ و ۰/۰۴۵ میلی‌گرم در لیتر بود.

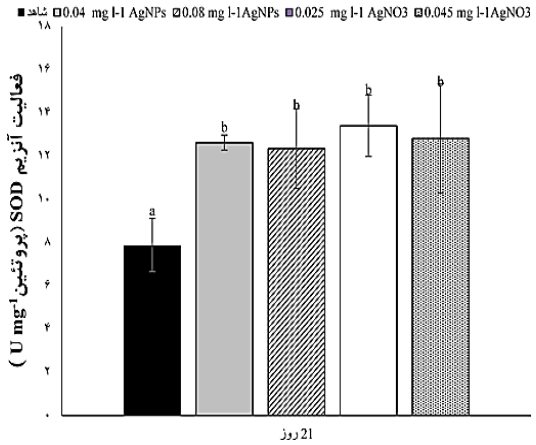
پارامترهای شمارشی و بیوشیمیایی خون: نتایج حاصل از تغییرات پارامترهای خون‌شناسی در جدول ۲ ارائه شده است. روند هموگلوبین در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری متفاوت بود، به‌طوری‌که به‌استثناء روز ۷ و غلظت ۰/۰۸ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات نقره، در سایر زمان‌های نمونه‌برداری مقدار هموگلوبین در گروه‌های در معرض قرارگرفته در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافت. هم‌چنین هموگلوبین ماهیان در معرض قرار گرفته با ۰/۰۲۵ و ۰/۰۴۵ میلی‌گرم از نیترات نقره در زمان‌های ۱۴ و ۲۱ روز و هم‌چنین ۰/۰۸ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات نقره در ۲۱ روز به‌طور معنی‌داری در مقایسه با غلظت‌های مشابه در مرحله قبلی نمونه‌برداری قبلی افزایش معنی‌داری داشتند (P<۰/۰۵). درصد هماتوکریت در روز ۷ به‌طور معنی‌داری در هر دو فرم نقره افزایش یافت(به‌استثناء ۰/۰۸ میلی‌گرم‌درلیتر نانوذرات نقره)، اما در روزهای ۱۴ (هردو غلظت نانوذرات نقره)و ۲۱، هماتوکریت به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافت (P<۰/۰۵). مقایسه بین غلظت‌های مشابه در زمان‌های نمونه‌برداری مختلف نشان داد که در روز ۱۴، میزان هماتوکریت بیش‌تر از مرحله قبل بود. از طرف دیگر، پس از ۲۱ روز درصد هماتوکریت در غلظت‌های مشابه و در مقایسه باروز ۱۴ کاهش معنی‌داری یافت(P<۰/۰۵).در ۰/۰۸ میلی‌گرم در لیتر از نانوذرات نقره و هر دو غلظت نیترات نقره در روزهای ۷ و ۱۴ و هم‌چنین هر دو غلظت نیترات نقره در روز ۲۱، تعداد گلبول‌های قرمز در مقایسه با گروه شاهد افزایش پیدا کرد (P<۰/۰۵). هم‌چنین نتایج نشان داد که گروه‌های شاهد و ۰/۰۴ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات نقره درروزهای ۱۴ و ۲۱ و هم‌چنین غلظت ۰/۰۴۵ نیترات‌نقره‌در روز ۱۴ به‌طور معنی‌داری در مقایسه با تیمارهای مشابه کاهش معنی‌داری داشتند. پس از ۷ روز، تعداد گلبول‌های سفید در غلظت‌های ۰/۰۲۵ میلی‌گرم‌درلیترنیترات نقره به‌طور معنی‌داری کاهش یافت(P<۰/۰۵)، اما‌درروز ۲۱،درغلظت ۰/۰۴۵ میلی‌گرم ازنیترات‌نقره، تعداد گلبول‌های سفید در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش داشت (P<۰/۰۵). مقایسه بین غلظت‌های مشابه در زمان‌های مختلف نشان داد که در ماهیانی که در معرض ۰/۰۴ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات نقره در روز ۱۴ قرار گرفتند، تعداد گلبول‌های سفید کاهش یافت (P<۰/۰۵) و در غلظت ۰/۰۴۵ میلی‌گرم در لیتر در روز ۱۴ و هر دو غلظت نیترات نقره در روز ۲۱ و هم‌چنین ۰/۰۴ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات نقره در روز ۲۱، گلبول سفید کاهش یافت (P<۰/۰۵). در هر دو فرم نقره، مقدار MCV نوسانات زیادی نشان داد به‌طوری‌که در بعضی غلظت‌ها کاهش یافت و در بعضی افزایش. MCV در روز ۱۴ و ۲۱ به‌طور معنی‌داری در مقایسه با غلظت‌های مشابه در زمان‌های مختلف تغییر کرد (P<۰/۰۵). نتایج نشان داد که روند تغییرات MCH و MCHC در ماهیان درمعرض قرار گرفته مشابه با MCV بود و به صورت نامنظم بودند. مقایسه بین غلظت‌های مشابه نشان داد که در روز ۱۴ به‌استثناء ۰/۰۸ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات نقره، سطح MCH در سایر تیمارها به‌طور معنی‌داری کاهش یافت و در روز ۲۱ MCH در هر دو فرم نقره افزایش پیدا کرد (P<۰/۰۵). MCHC در روز ۱۴ (غلظت ۰/۰۲۵ میلی‌گرم در لیتر نیترات نقره) و در روز ۲۱ (در همه غلظت‌های نقره) به‌طور معنی‌داری در مقایسه با سایر غلظت‌ها در زمان‌های‌نمونه‌برداری قبلی افزایش یافت. اما پس از ۱۴ روز در ماهیان درمعرض قرار گرفته با هر دو غلظت نانوذرات نقره و غلظت ۰/۰۴۵ میلی‌گرم در لیتر نیترات نقره، مقدار MCHC در مقایسه با غلظت مشابه در مرحله قبلی کاهش یافت (P<۰/۰۵).

پارامترهای بیوشیمیایی کبد: نتایج فعالیت آنزیم SOD در کبد ماهی کپورمعمولی نشان داد که پس از ۲۱ روز درمعرض قرارگیری با هردونوع نقره، میزان فعالیت این آنزیم در گروه‌های درمعرض قرارگرفته افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد داشت (P<۰/۰۵) و اختلافی نیز بین دو شکل نقره بر القاء این آنزیم مشاهده نشد (P>۰/۰۵)(شکل ۱).

جدول ۲: تغییر در پارامترهای شمارشی و بیوشیمیایی خون در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) هنگام در معرض گذاری با غلظت‌های تحت حاد نانوذرات نقره و نیترات نقره در زمان‌های نمونه‌برداری

پارامتر های خون‌شناسی		زمان‌های نمونه‌برداری (روز)		
		۷	۱۴	۲۱
هموگلوبین ($g\ dl^{-1}$)				
شاهد	۰ میلی گرم در لیتر	۳/۲۱ ± ۰/۱۲^{c}	۳/۶۲ ± ۰/۱۴^{b*}	۴/۴۷ ± ۰/۲۵^{b*}
نانوذرات نقره	۰/۰۴ میلی گرم در لیتر	۲/۲۹ ± ۰/۰۸^{b}	۳/۲۱ ± ۰/۱۷^{ab}	۳/۷۱ ± ۰/۳۱^{ab}
	۰/۰۸ میلی گرم در لیتر	۳/۳۵ ± ۰/۲۴^{c}	۲/۵۶ ± ۰/۵۳^{a}	۴/۲۱ ± ۰/۶۳^{ab*}
نیترات نقره	۰/۰۲۵ میلی گرم در لیتر	۱/۹۱ ± ۰/۱^{a}	۳/۲۱ ± ۰/۲۳^{ab*}	۳/۲۴ ± ۰/۴۶^{a}
	۰/۰۴۵ میلی گرم در لیتر	۳/۰۱ ± ۰/۱^{bc}	۲/۷۴ ± ۰/۳۳^{ab}	۳/۵۲ ± ۰/۱۲^{a*}
هماتوکریت (٪)				
شاهد	۰ میلی گرم در لیتر	۷/۳۲ ± ۰/۵۳^{a}	۱۲/۹۲ ± ۰/۲۴^{b*}	۱۳/۸۱ ± ۰/۸۴^{c}
نانوذرات نقره	۰/۰۴ میلی گرم در لیتر	۹/۱۱ ± ۰/۴۲^{b}	۱۴/۲۱ ± ۰/۹۲^{b*}	۱۲/۴۹ ± ۰/۲۱^{b*}
	۰/۰۸ میلی گرم در لیتر	۸/۲۸ ± ۰/۲۴^{ab}	۱۴/۹۲ ± ۰/۶۳^{b*}	۹/۲۳ ± ۰/۸۴^{a*}
نیترات نقره	۰/۰۲۵ میلی گرم در لیتر	۹/۴۲ ± ۰/۹۱^{b}	۱۱/۷۴ ± ۰/۴۶^{a*}	۸/۹۳ ± ۰/۲۴^{a*}
	۰/۰۴۵ میلی گرم در لیتر	۷/۷۲ ± ۰/۲۴^{ab}	۱۲/۴۲ ± ۰/۳۳^{a*}	۱۰/۳۶ ± ۰/۷۲^{ab*}
گلبول قرمز ($10^{3}MM^{-3}$)				
شاهد	۰ میلی گرم در لیتر	۱/۲۳ ± ۰/۰۷۵^{b}	۱/۰۹ ± ۰/۴^{b*}	۱/۳۲ ± ۰/۰۷۳^{b*}
نانوذرات نقره	۰/۰۴ میلی گرم در لیتر	۱/۹۲ ± ۰/۱۷^{c}	۱/۴۳ ± ۰/۰۶^{c*}	۰/۹۲۳ ± ۰/۰۴^{ab*}
	۰/۰۸ میلی گرم در لیتر	۰/۹۳۵ ± ۰/۰۵^{a}	۰/۹۵۲ ± ۰/۱^{a}	۰/۹۹۴ ± ۰/۰۷۶^{ab}
نیترات نقره	۰/۰۲۵ میلی گرم در لیتر	۰/۹۳۲ ± ۰/۰۸۶^{a}	۰/۹۳۸ ± ۰/۰۳^{a}	۰/۸۳۲ ± ۰/۱۲^{a}
	۰/۰۴۵ میلی گرم در لیتر	۱/۳۵ ± ۰/۱۳^{bc}	۰/۹۳۲ ± ۰/۱۶^{a*}	۰/۹۰۱ ± ۰/۰۹۲^{a}
گلبول سفید ($10^{3}MM^{-3}$)				
شاهد	۰ میلی گرم در لیتر	۳۳/۲۱ ± ۳/۱۱^{b}	۳۰/۷۴ ± ۲/۶۳^{ab}	۳۵/۶۲ ± ۲/۸۴^{a*}
نانوذرات نقره	۰/۰۴ میلی گرم در لیتر	۳۵/۱۴ ± ۲/۴۲^{b}	۲۸/۶۳ ± ۱/۳۲^{a*}	۳۹/۵۲ ± ۲/۶۵^{ab*}
	۰/۰۸ میلی گرم در لیتر	۳۶/۰۱ ± ۲/۳۲^{b}	۳۸/۵۲ ± ۳/۵۲^{b}	۴۰/۶۲ ± ۴/۲۷^{ab}
نیترات نقره	۰/۰۲۵ میلی گرم در لیتر	۲۶/۲۶ ± ۰/۰۸۶^{a}	۲۸/۴۲ ± ۲/۴۶^{a}	۳۴/۳ ± ۲/۵۴^{a*}
	۰/۰۴۵ میلی گرم در لیتر	۳۵/۳۱ ± ۲/۴۲^{b}	۳۸/۳۵ ± ۰/۳۶۴^{b*}	۴۲/۴۲ ± ۱/۵۲^{b*}
(fl) MCV				
شاهد	۰ میلی گرم در لیتر	۵۹۵/۱ ± ۷۰/۶^{b}	۱۱۸۵/۳ ± ۶۰^{b*}	۱۰۴۶/۲ ± ۱۱۵/۶^{b}
نانوذرات نقره	۰/۰۴ میلی گرم در لیتر	۷۹۲/۴ ± ۲۴/۷^{c}	۱۵۱۴/۷ ± ۱۵۳/۳^{d*}	۱۱۸۹/۱ ± ۵۲/۵^{c*}
	۰/۰۸ میلی گرم در لیتر	۸۸۵/۵ ± ۱۸۶^{c}	۱۵۶۷/۲ ± ۶۳^{d*}	۷۳۲/۵ ± ۱۱۰/۵^{a*}
نیترات نقره	۰/۰۲۵ میلی گرم در لیتر	۴۹۰/۷ ± ۱۰۵/۳^{a}	۸۲۰/۵ ± ۱۵۳/۳^{a*}	۱۰۷۳/۳ ± ۲۰^{b*}
	۰/۰۴۵ میلی گرم در لیتر	۵۷۱/۸ ± ۱۸/۴۶^{ab}	۱۳۳۲/۶ ± ۲۰/۶^{c*}	۱۱۴۹/۸ ± ۷۸/۲^{b*}
(pg) MCH				
شاهد	۰ میلی گرم در لیتر	۲۶۰/۹ ± ۱۶^{c}	۳۳۲/۱ ± ۳۵^{b*}	۳۳۸/۶ ± ۳۴/۲۴
نانوذرات نقره	۰/۰۴ میلی گرم در لیتر	۲۵۳/۵ ± ۵/۱۱^{c}	۳۴۲/۴ ± ۲۸/۳^{b*}	۳۵۳/۹ ± ۷۷/۵
	۰/۰۸ میلی گرم در لیتر	۳۵۸/۲ ± ۴۸^{d}	۲۶۸/۹ ± ۵۳^{ab}	۳۳۴/۵ ± ۸۲/۵
نیترات نقره	۰/۰۲۵ میلی گرم در لیتر	۹۹/۹ ± ۱۱/۶۲^{a}	۲۲۴/۲ ± ۷۶/۶^{a*}	۳۸۹/۴ ± ۳۸/۳۳*
	۰/۰۴۵ میلی گرم در لیتر	۲۲۲/۹ ± ۷/۶۹^{b}	۲۹۳/۹ ± ۲۰/۶۲^{ab*}	۳۹۰/۶ ± ۱۳/۰۴*
($g\ dl^{-1}$) MCHC				
شاهد	۰ میلی گرم در لیتر	۴۳/۸۵ ± ۲/۲۶^{c}	۲۸/۰۱ ± ۵/۸۳^{b*}	۳۲/۳۶ ± ۲/۹۷^{a}
نانوذرات نقره	۰/۰۴ میلی گرم در لیتر	۳۱/۹۴ ± ۲/۰۷^{b}	۲۲/۵۸ ± ۱/۸۴^{b*}	۲۹/۷ ± ۱/۴۷^{ab*}
	۰/۰۸ میلی گرم در لیتر	۴۰/۴۵ ± ۲/۶۰^{c}	۱۷/۱۵ ± ۰/۸۴۱^{a*}	۴۵/۶۱ ±۷/۵^{c*}
نیترات نقره	۰/۰۲۵ میلی گرم در لیتر	۲۰/۲۷ ± ۱/۰۹^{a}	۲۷/۳۴ ± ۵^{cb*}	۳۶/۲۸ ± ۱/۹۱^{bc*}
	۰/۰۴۵ میلی گرم در لیتر	۳۸/۹۸ ± ۴/۱۶^{c}	۲۲/۰۶ ± ۱^{b*}	۳۳/۹۷ ± ۱/۶۶^{b*}

وجود حروف غیرمشابه در هر یک از زمان‌های نمونه‌برداری نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف است (P<۰/۰۵)؛ وجود ستاره (*) نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در یک تیمار در زمان‌های مختلف است (P<۰/۰۵). داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار هست.



شکل ۱: فعالیت آنزیم SOD کبد در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) پس از ۲۱ روز قرار گیری با غلظت‌های تحت حاد نانوذرات نقره و نیترات نقره

وجود حروف غیرمشابه در هر یک از زمان‌های نمونه‌برداری نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف است (P<۰/۰۵). داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار هست.

بحث

علم سم‌شناسی نانوفن آوری در مراحل اولیه خود به‌سر می‌برد، اما با توجه به اندازه ریز و اهمیت صنعت نانوفن آوری، می‌توان انتظار داشت این صنعت در آینده نزدیک توسعه بسیار بیش‌تری داشته باشد. ورود ناخواسته این مواد از یک‌سو و از طرفی دیگر با توجه به این‌که محیط‌های آبی مقصد نهایی بسیاری از آلاینده‌ها می‌باشد، احتمال در معرض قرارگیری آبزیان با این نانوذرات بالا می‌باشد. ازجمله مهم‌ترین نانوذرات پرکاربرد، نانوذرات نقره می‌باشد که مطالعات زیادی روی سمیت نقره در موجوات آبزی انجام شده است (Nallamuthu و همکاران، ۲۰۱۳؛ Volker و همکاران، ۲۰۱۴)، اما به‌رغم استفاده گسترده از این فلز و امکان در ورود آن به محیط، نقاط مبهم زیادی در مورد تاثیرات ناخواسته آن بر جنبه‌های سلامتی موجودات زنده وجود دارد. در مطالعه حاضر سعی شد اثرات سم‌شناسی نانوذرات نقره را روی فاکتورهای مختلف خون شناسی و هم‌چنین پاسخ‌های ایمنی در ماهیان جوان کپورمعمولی مورد بررسی قرار گیرد و از نیترات نقره نیز به‌عنوان کنترل مثبت جهت مقایسه اثرات آن با نانوذرات نقره استفاده شده است. در معرض‌گذاری با غلظت‌های تحت حاد نانوذرات نقره و نیترات نقره باعث تغییر در پارامترهای مختلف شمارشی و بیوشیمیایی خون و هم‌چنین القاء آنزیم‌های استرس اکسیداتیو در کبد شد. در بعضی از موارد، نیترات نقره اثرات سم‌شناسی بیش‌تری داشت و در بعضی دیگر، نانوذرات نقره اثرات سم‌شناسی بیش‌تری را نشان می‌داد و هم‌چنین در بعضی پارامترها نیز اختلافی بین سم‌شناسی دو نوع نقره وجود نداشت. مطابق با اطلاعات شرکت، ذرات نقره به شکل کروی و با اندازه‌ای حدود ۲۰ نانومتر بودند. در مطالعه حاضر پتانسیل زتا ۰/۱۵±۰/۵۹+ میلی‌ولت بود، و از آن‌جایی‌که پتانسیل زتا بالا و پایین ۳۰ mV± نشان دهنده پایداری ذرات می‌باشند (Nallamuthu و همکاران، ۲۰۱۳)، می‌توان گفت که نانوذرات استفاده شده در این آزمایش تقریباً پایدار بودند و با گذشت زمان، ته‌نشست کمی داشتند. با توجه به این‌که رفتار نانوذرات در محیط‌های آبی تحت تاثیر عوامل محیطی ازجمله دما (Song و همکاران، ۲۰۱۵)، مقدار و نوع املاح (Grillo و همکاران، ۲۰۱۵) و pH (Baalousha و همکاران، ۲۰۰۸) می‌باشد، بنابراین این عوامل می‌توانند روی سم‌شناسی نانوذرات نیز موثر باشند. غلظت‌های به‌کارگرفته شده در این مطالعه بیش‌تر از غلظت‌های پیش‌بینی شده نانوذرات‌نقره در محیط بود که توسط Gottschalk و همکاران (۲۰۰۹) و Blaser و همکارن (۲۰۰۸) گزارش شده بود. غلظت‌های حاد در مورد نانوذرات نقره در سایر مطالعات انجام شده نیز به‌دست آمده بود. به‌طور مثال در مطالعه Kashiwada (۲۰۰۶)، Wu و همکاران (۲۰۱۰) و Kim و همکاران (۲۰۱۰) این غلظت حاد برای ماهی مداکا (*O. latipes*) بین ۱/۰۳ تا ۳۰ میلی‌گرم در لیتر گزارش شده بود. در زبرافیش (*D. rerio*) بالغ LC۵۰ گزارش شده برای نانوذرات نقره ۷/۰۷ میلی‌گرم در لیتر بوده است (Griffitt و همکاران، ۲۰۰۸). LC۵۰ گزارش شده در این مطالعه ۰/۰۲±۰/۲۹ میلی‌گرم در لیتر برای نانوذرات نقره و ۰/۰۵±۰/۱۵ میلی‌گرم در لیتر برای نیترات نقره بوده است (جدول ۱) که دلیل این اختلاف می‌تواند ناشی از اختلاف گونه‌ای، تغییر در فاکتورهای فیزیکو شیمیایی آب و هم‌چنین چگونگی ساخت نانوذرات و خواص فیزیکو شیمیایی نانوذرات اشاره کرد (Baalousha و همکاران، ۲۰۰۸؛ Grillo و همکاران، ۲۰۱۵). با توجه به نتایج می‌توان گفت که در ماهی کپور معمولی، نیترات نقره سمی‌تر از نانوذرات نقره بوده است و تاثیر بیش‌تری روی سلامتی و بقاء آن‌ها داشته است (جدول ۱). در مطالعه Bilberg و همکاران (۲۰۱۱) مشخص شد که LC۵۰ در ماهی زبرافیش برای نانوذرات نقره و نیترات نقره به‌ترتیب حدود ۸۴ و ۲۵ میکروگرم در لیتر بود. با توجه به این نتایج می‌توان گفت که نیترات نقره با توجه به وابسته بودن سمیت نانوذرات نقره به عوامل مختلف (داخلی و محیطی)، سمیت بیش‌تری داشت که بخشی از این اختلاف نیز به‌علت خواص ذاتی نانوذرات است (Ribeiro، ۲۰۱۴). در مطالعه حاضر، در معرض گذاری با غلظت‌های تحت حاد نانوذرات نقره و نیترات نقره منجر به اختلالاتی در فاکتورهای شمارشی خونی تا روز ۲۱ شد (جدول ۲). در این مطالعه مشاهده شد که در اکثر تیمارهای در معرض قرار گرفته با نقره، تعداد گلبول‌های قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت به‌خصوص در مراحل نهایی نمونه‌برداری (روز ۲۱)، در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافتند که این موضوع می‌تواند به‌دلیل تجمع و تاثیرگذاری

نقره بر بافت آبشش و به‌دنبال آن ایجاد محدودیت‌های تنفسی از طریق کاهش پارامترهای مذکور شود (Thomas و Egee، ۱۹۹۸). MCV شاخصی است که میانگین حجم گلبول‌های قرمز را با تقسیم هماتوکریت بر تعداد گلبول‌های قرمز محاسبه می‌کند. در مطالعه Rajan و همکاران (۲۰۱۷) مشخص شد که پس از در معرض‌گذاری تیلاپیا (*Oreochromis mossambicus*) با غلظت‌های ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات اکسید روی، تعداد گلبول‌های سفید، قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافت. Vignesh و همکاران (۲۰۱۳) و هم‌چنین Larsson و همکاران (۱۹۸۰)، مشاهده کردند که پس از در معرض قرارگذاری به‌ترتیب روهو (*L. rohita*) و فلوندر (*Paralichthys dentatus*) با نانو ذرات نقره و نانوذرات اکسیدتیتانیوم، برخی از پارامترهای خون‌شانسی تغییر کرد. هم‌چنین اختلال در این پارامترها توسط Priya و همکاران (۲۰۱۵) نیز گزارش شد. آن‌ها ماهی روهو (*L. rohita*) را در معرض نانوذرات اکسید سلیسیم قرار دادند و گزارش دادند که پس از ۴ روز از در معرض قراردهی، پارامترهای خون‌شناسی شامل، گلبول قرمز، سفید، هماتوکریت، هموگلوبین، MCV، MCH و MCHC دارای نواسانات غیرعادی در مقایسه با گروه شاهد شدند. محققین معتقدند که کاهش هموگلوبین در مواجهه با آلاینده‌ها می‌تواند به‌علت تاثیر بازدارندگی ماده سمی در سیستم آنزیمی باشد که مسئول سنتز هموگلوبین می‌باشد (Pamila و همکاران، ۲۰۰۸). هم‌چنین مقایسه تعداد گلبول‌های سفید در تیمارهای مختلف نشان از افزایش معنی‌دار این شاخص خونی در بعضی از تیمارها داشت که این تغییرات نشان دهنده افزایش فعالیت سیستم ایمنی برای غلبه بر سیستم استرس‌زای به‌وجود آمده می‌باشد(Karan و همکاران، ۱۹۹۸).مقایسه بین تغییرات در دو شکل نقره (نانوذرات نقره و نیترات نقره) نشان داد که اختلاف روشنی در بین اثرات دو شکل نقره بر شاخص‌های شمارشی خونی وجود نداشت. در موجودات زنده، بین تولید و مصرف رادیکال آزاد اکسیژن توازنی وجود دارد. بنابراین وقتی که این توازن مختل شود (به‌هر دلیلی ازجمله وجود یک عامل آلاینده در محیط) موجود زنده ازطرق مختلفی که یکی از آن‌ها افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مختلف ازجمله SOD،CAT، GST و LDH بر این شرایط به‌وجود آمده غلبه می‌کند (Hao و همکاران، ۲۰۱۳). به‌همین دلیل در مطالعات زیادی از این آنزیم‌ها به‌عنوان شاخص مناسبی جهت پایش ارزیابی میزان آلاینده‌های موجود در محیط مورد استفاده کرده‌اند (Hao و Chen، ۲۰۱۳). در مطالعه حاضر، فعالیت SOD در هر دو نوع نقره افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد داشتند (شکل ۱). رادیکال سوپراکسید (O-2) توسط SOD به پروکسید هیدروژن (H2O2) دیسموتاز می‌شود و پس از کاتالیزشدن توسط آنزیم CAT، به اکسیژن و آب متابولیز می گردد (Hao و همکاران، ۲۰۱۳؛ Volker و همکاران، ۲۰۱۴). مشابه با نتایج این مطالعه، Hao و Chen (۲۰۱۳) و هم‌چنین Muralisankar و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند که پس از در معرض قراردهی به‌ترتیب کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*) و میگوی آب شیرین (*Macrobrachium rosenbergii*) با نانوذرات روی و نانوذرات نقره، فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا کردند. برخلاف نتایج این مطالعه، Hao و Chen (۲۰۱۳) و Hao و همکاران(۲۰۱۳) گزارش کردند که پس از درمعرض قراردهی کپورمعمولی با نانوذرات اکسیدروی، در بیش‌ترین غلظت و زمان، فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافت. این مطالعه با هدف بررسی اثرات سم‌شناسی نانوذرات نقره، مقایسه آن با اثرات سم‌شناسی نیترات نقره بر شاخص‌های هم‌چنین القاء آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در ماهیان کپورمعمولی جوان انجام شده است. با توجه به نتایج این مطالعه می‌توان گفت که نیترات نقره در مقایسه با نانوذرات نقره اثرات کشنده‌تری داشت به‌طوری‌که غلظت کشنده متوسط آن درماهی کپورمعمولی ۰/۱۴ میلی‌گرم در لیتر کم‌تر از غلظت‌کشنده متوسط نانوذرات نقره بود. نقره از طریق تغییر در برخی شاخص‌های شمارشی خون باعث افزایش مقاومت بدن در برابر آلاینده‌ها گردید و تقریباً هر شکل نقره تاثیرات مشابه‌ای داشتند. هر دو شکل‌نقره باعث القاء دفاع آنتی‌اکسیدانی شدند به‌طوری‌که در مورد فعالیت آنزیم SOD، نیترات در غلظت ۰/۰۲۵ میلی‌گرم در لیتر اثرات بیش‌تری را در القاء این سیستم داشت که شاید نشان‌دهنده سمی بودن بیش‌تر این ماده می‌باشد.

منابع

۱. **Baalousha, M.; Manciulea, A.; Cumberland, S.; Kendall, K. and Lead, J.R., 2008.** Aggregation and surface properties of iron oxide nanoparticles: influence of pH and natural organic matter. Environmental Toxicology and Chemistry. Vol. 27, Vol. 9, pp: 1875-1882.

۲. **Bilberg, K.; Hovgaard, M.B.; Besenbacher, F. and Baatrup, E., 2011.** In vivo toxicity of silver nanoparticles and silver ions in zebrafish (*Danio rerio*). Journal of toxicology. Vol. 2012, pp: 1-9.

۳. **Bilberg, K.; Malte, H.; Wang, T. and Baatrup, E., 2010.** Silver nanoparticles and silver nitrate cause respiratory stress in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*). Aquatic Toxicology. Vol. 96, pp: 159-165.

۴. **Blaser, S.A.; Scheringer, M.; MacLeod, M. and Hungerbuhler, K., 2008.** Estimation of cumulative aquatic exposure and risk due to silver: Contribution of nano functionalized plastics and textiles. Science of the Total Environment. Vol. 390, pp: 396-409.

۵. **Buffet, P.E.; Zalouk-Vergnoux, A.; Châtel, A.; Berthet, B.; Métais, I.; Perrein-Ettajani, H.; Luna-Acosta, A.; Thomas-Guyon, H.; Risso-de Faverney, C.; Guibbolini, M.; Gilliland, D.; Valsami-Jones, E. and Mouneyrac, C., 2014.** A marine mesocosm study on the environmental fate of silver nanoparticles and toxicity effects on two endobenthic species: The ragworm Hediste diversicolor and the bivalve mollusc Scrobicularia plana. Science of the Total Environment. Vol. 47, pp: 1151-1159.

oxide nanoparticles were synthesized by chemical precipitation method and characterized using SEM, EDAX, FTIR and XRD. Toxicity tests were conducte. PARIPEX Indian Journal of Research. Vol. 5.

۲۶. **Rozan, T.F.; Hunter, K.S. and Benoit, G., 1995.** Silver in fresh water: Sources, transport and fate in Connecticut riversed.^eds. *Proceedings of the 3th Argentum International* Conference on the Transport, Fate and Effects of Silver in the Environment. pp: 181-184.

۲۷. **Saravanan, M.; Kumar, K.P. and Ramesh, M., 2011.** Haematological and biochemical responses of freshwater teleost fish *Cyprinus carpio* during acute and chronic sublethal exposure to lindane. Pesticide Biochemistry and Physiology. Vol. 100, No. 3, pp: 206-211.

۲۸. **Schmidt, C.W., 2009.** Nanotechnology-related environmental, health and safety research: examining the national strategy. Environmental Health Perspectives. Vol. 117, No. 4, pp: A158-A161.

۲۹. **Song, L.; Vijver, M.G.; Peijnenburg, W.J.; Galloway, T.S. and Tyler, C.R., 2015.** A comparative analysis on the in vivo toxicity of copper nanoparticles in three species of freshwater fish. Chemosphere. Vol. 139, pp: 181-189.

۳۰. **Stevenson, L.M.; Dickson, H.; Klanjscek, T.; Keller, A.A.; McCauley, E. and Nisbet, R.M., 2013.** Environmental feedbacks and engineered nanoparticles: mitigation of silver nanoparticle toxicity to Chlamydomonas reinhardtii by algal produced organic compounds. PLoS One. Vol. 8, No. 9, pp: 744-756.

۳۱. **Thomas, S. and Egée, S., 1998.** Fish red blood cells: characteristics and physiological role of the membrane ion transporters. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology. Vol. 119, pp: 79-86.

۳۲. **Vignesh, V.; Anbarasi, K.F.; Karthikeyeni, S.; Sathiyanarayanan, G.; Subramanian, P. and Thirumurugan, R., 2013.** A superficial phyto-assisted synthesis of silver nanoparticles and their assessment on hematological and biochemical parameters in *Labeo rohita* (Hamilton, 1822). Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. Vol. 439, pp: 184-192.

۳۳. **Völker, C.; Kämpken, I.; Boedicker, C.; Oehlmann, J. and Oetken, M., 2015.** Toxicity of silver nanoparticles and ionic silver: comparison of adverse effects and potential toxicity mechanisms in the freshwater clam *Sphaerium corneum*. Nanotoxicology. Vol. 9, No. 6, pp: 677-685.

۳۴. **Völker, C.; Gräf, T.; Schneider, I.; Oetken, M. and Oehlmann, J., 2014.** Combined effects of silver nanoparticles and 17α-ethinylestradiol on the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*. Environmental Science and Pollution Research. Vol. 21, pp: 10661-10670.

۳۵. **Williams, D.; Amman, M.; Autrup, H.; Bridges, J.; Cassee, F.; Donaldson, K.; Fattal, E.; Janssen, C.; De Jong, W.; Jung, T.; Marty, J-P. and Rydzynski K., 2005.** The appropriateness of existing methodologies to assess the potential risks associated with engineered and adventitious products of nanotechnologies. In: risks Scoeanih, editor: European commission health and consumer protection directorate general. pp: 1-78.

۳۶. **Woodrow Wilson Database. 2014.** Nanotechnology consumer product inventory. http://www.nanotechproject. org/cpi/about/analysis/ accessed at 10/14/2014.

۳۷. **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. Vol. 100, pp: 160-167.

۳۸. **Xing, H.; Li, S.; Wang, X.; Gao, X.; Xu, S. and Wang, X., 2013.** Effects of atrazine and chlorpyrifos on the mRNA levels of HSP70 and HSC70 in the liver, brain, kidney and gill of common carp. Chemosphere. Vol. 90, pp: 910-916.

۶. **Campbell, T.W. and Ellis, C.K., 2007.** Avian and exotic animal hematology and cytology. Ames (IA).

۷. **Dowling, A., 2006.** September. Nanoscience and nanotechnologies. In an international symposium on the nature, purposes, ethics and politics of evidence in a democracy. 61 p.

۸. **Fulton, M. and Key, H., 2001.** Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. Environmental Toxicology and Chemistry. Vol. 20, No. 1, pp: 37-45.

۹. **Gottschalk, F.; Sonderer, T.; Scholz, R.W. and Nowack, B., 2009.** Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO2, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions. Environment science technology. Vol. 43, pp: 9216-9222.

۱۰. **Griffitt,R.J.;Brown-Peterson, N.J.; Savin, D.A; Manning, C.S.; Boube, I.; Ryan, R. and Brouwer, M., 2012.** Effects of chronic nanoparticulate silver exposure to adult and juvenile sheepshead minnows. Environmental Toxicology and Chemisty. Vol. 31, pp: 160-167.

۱۱. **Grillo, R.: Rosa, A.H. and Fraceto, L.F., 2015.** Engineered nanoparticles and organic matter: a review of the state of the art. Chemosphere. Vol. 119, pp: 608-619.

۱۲. **Hao, L.; Chen, L.; Hao, J. and Zhong, N., 2013.** Bioaccumulation and sub-acute toxicity of zinc oxide nanoparticles in juvenile carp (*Cyprinus carpio*): a comparative study with its bulk counterparts. Ecotoxicology Environmental Safty. Vol. 91, No. 52, pp: 52-60.

۱۳. **Hao, L.; Chen, L.; Hao, J. and Zhong, N., 2013.** Bioaccumulation and sub-acute toxicity of zinc oxide nanoparticles in juvenile carp (Cyprinus carpio): A comparative study with its bulk counterparts. Ecotoxicology and Environmental Safety. Vol. 91, pp: 52-60.

۱۴. **Hedayati, A.; Jahanbakhshi, A. and Ghader-Ramazi, F., 2013.** Aquatic Toxicology. Published by Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural. 210 p.

۱۵. **Houston, A.H., 1997.** Are the classical hematological variables acceptable indicators of fish health?. Transactions of the American Fisheries Society. Vol. 126, pp: 879-894.

۱۶. **Karan, V.; Vitorović, S.; Tutundžić, V. and Poleksić, V., 1998.** Functional enzymes activity and gill histology of carp after copper sulfate exposure & recovery. Ecotoxicology and Environmental Safety. Vol. 40, No. 12, pp: 49-55.

۱۷. **Kashiwada, S., 2006.** Distribution of nanoparticles in the see-through medaka (*Oryzias latipes*). Environmental Health Perspective. Vol. 114, 1697 p.

۱۸. **Katuli,K.K.; Massarsky, A.; Hadadi, A.and Pourmehran, Z., 2014.** Silver nanoparticles inhibit the gill Na+/K+ ATPase and erythrocyte AChE activities and induce the stress response in adult zebrafish (*Danio rerio*). Ecotoxicology and environmental safety. Vol. 106, pp: 173-180.

۱۹. **Kehrer, J.P., 1993.** Free radicals as mediators of tissue injury and disease. Critical reviews in toxicology. Vol. 23, No. 1, pp: 21-48.

۲۰. **Keller, A.A.; McFerran, S.; Lazareva, A. and Suh, S., 2013.** Global life cycle releases of engineered nanomaterials. J of Nanoparticle Research. Vol. 15, pp: 1-17.

۲۱. **Kim, J.; Park, Y.; Yoon, T.H.; Yoon, C.S. and Choi, K., 2010.** Phototoxicity of CdSe/ ZnSe quantum dotswith surface coatings of 3-mercaptopropionic acid or tri-n octylphosphine oxide/gum arabic in *Daphnia magna* under environmentally relevant UV-B light. Aquatic Toxicology. Vol. 97, pp:116-124.

۲۲. **Larsson, Å.; Lehtinen, K.J. and Haux, C., 1980.** Biochemical and hematological effects of a titanium dioxide industrial effluent on fish. Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology. Vol. 25, No, 427, pp: 427-435.

۲۳. **Muralisankar, T.; Bhavan, P.S.; Radhakrishnan, S.; Seenivasan, C.; Manickam, N. and Srinivasan, V., 2014.** Dietary supplementation of zinc nanoparticles and its influence on biology, physiology and immune responses of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Biological trace element research. Vol. 160, pp: 56-66.

۲۴. **Oruç, E.Ö. and Usta, D., 2007.** Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*. Environmental Toxicology and Pharmacology. Vol. 23, No. 1, pp: 48-55.

۲۵. **Rajan, M.; Archana, J.; Ramesh, R. and Keerthika, V., 2017.** The present study deals with the toxicity zinc oxide nanoparticles in tilapia *Oreochromis mossambicus*. zinc