



## تعیین غلظت کشنده نانو نقره در ماهی گورخری معمولی

### *Aphanius dispar* (Rüppell, 1829)

ساجده مزارعی<sup>۱</sup>، میرمسعود سجادی<sup>۲\*</sup>، ایمان سوری نژاد<sup>۱</sup>، سید علی جوهری<sup>۳</sup>، محمد اسدی<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup>گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی و جوی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس

<sup>۲</sup>گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، صندوق پستی ۱۱۴۴

<sup>۳</sup>گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه کردستان

#### چکیده

نوع مقاله:

مقاله کوتاه

هدف از پژوهش حاضر، مطالعه سمیت حاد کلونید نانو ذرات نقره از طریق تعیین غلظت کشنده میانی (LC<sub>50</sub>) آن در ماهی گورخری معمولی *Aphanius dispar* بود. آزمایشات سم‌شناسی طبق استاندارد شماره ۲۰۳ OECD، طی ۹۶ ساعت انجام و تلفات ماهیان پس از رویارویی با غلظت‌های اسمی ۰، ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میلی گرم در لیتر نانو ذرات نقره، هر ۲۴ ساعت یکبار ثبت شد. داده‌های حاصل از مرگ و میر ماهیان به کمک نرم افزار probit آنالیز گردید. مقدار غلظت کشنده میانی ۹۶ ساعته کلونید مذکور، ۱۰/۶۳۱ میلی گرم در لیتر به دست آمد. بنابراین طبق سیستم هماهنگ جهانی (GHS) طبقه بندی و برچسب گذاری مواد شیمیایی، نانو نقره مورد مطالعه برای ماهی مذکور جزو گروه ۳ حاد طبقه بندی شده و بر اساس قوانین استاندارد اتحادیه اروپا، حضور این ماده در محیط زیست این ماهی مضر می‌باشد.

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۹۳/۰۷/۲۴

اصلاح: ۹۳/۱۱/۱۶

پذیرش: ۹۳/۱۱/۲۵

کلمات کلیدی:

نانو ذرات نقره

نانو سم‌شناسی

ماهی گورخری

LC<sub>50</sub>

#### مقدمه

فن آوری نانو، شناخت و کنترل مواد در ابعاد بین ۱-۱۰۰ 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 می‌شود (سالاری جو و همکاران، ۱۳۹۱). امروزه استفاده از نانومواد در محصولات کشاورزی که در زندگی روزمره استفاده می‌شوند به طور وسیعی در حال گسترش می‌باشد، به طوریکه از سال ۲۰۰۶ استفاده از آنها به میزان ۵۲٪ افزایش یافته است و انتظار می‌رود کاربرد آنها در آینده رشد بیشتری نیز داشته باشد (Nickel et al., 2012). با توجه به توسعه روزافزون تولید و کاربرد نانو مواد، نگرانی‌ها در رابطه با خطرات احتمالی آزادسازی مواد محتوی ذرات نانو به محیط زیست در حال افزایش است (Bucheli and Nowack, 2007). بسیاری از فاضلاب‌های صنعتی و شهری به گستره‌های آبی شامل رودخانه‌ها، دریاچه‌ها، آب‌های ساحلی و غیره می‌ریزند که نگرانی آزادسازی نانو ذرات در محیط زیست را افزایش داده است (Valavanidis and Vlachogianni, 2010). انتشار نانوذرات به محیط زندگی آبریزان از مشکلات جدید زیست محیطی به شمار می‌آید که باید مورد مطالعه قرار گیرد. در همین راستا نانو زیست سم شناسی آبریزان زمینه تحقیقاتی نسبتاً جدیدی است که توجه محققین را به خود جلب کرده است چراکه مقصد نهایی نانو مواد

\* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: [mmsajjadi@hotmail.com](mailto:mmsajjadi@hotmail.com)

تولید شده، اکوسیستم های آبی است و این مواد احتمالاً بر موجودات زنده آبی تأثیرات نامطلوبی خواهند گذاشت (سالاری جو و همکاران، ۱۳۹۱). ماهیان شاخص های بسیار خوبی از سلامت محیط زیست بوده و حساسیت آنها به طیف گسترده ای از مواد شیمیایی از جمله ترکیبات Xenobiotic بسیار زیاد است (Scown *et al.*, 2010). Xenobiotic ها ترکیباتی هستند که در طبیعت وجود ندارند، بلکه به صورت شیمیایی ساخته شده و بنابراین برای زیست کره بیگانه بوده و بسته به سرنوشتشان در آب، هوا، خاک و رسوبات ممکن است در قسمت های مختلف طبیعت در دسترس موجودات زنده قرار گیرند، از جمله این مواد Xenobiotic، نانو مواد ساخت دست بشر می باشند (Prabhu and Poulouse, 2012). در سال های اخیر، تولید نانو ذرات نقره به دلیل خواص ضد میکروبی، ویژگی های نوری، الکتریکی و مغناطیسی آن افزایش یافته است، به طوری که ۵۶٪ تولید جهانی نانو مواد اختصاص به نانو ذرات نقره دارد (Kalbassi *et al.*, 2011). ورود فاضلاب های آلوده به نانو ذرات نقره به محیط آبی می تواند باعث تغییراتی در زیست بوم آبیان شده که این تغییرات ممکن است بر موجودات زنده آبی اثر گذار باشند. آزمون های سمیت حاد در ماهی ها طی ۹۶ ساعت انجام می گردد و منجر به تعیین غلظت کشنده میانی  $LC_{50}$  به عنوان یک شاخص زیستی به منظور اندازه گیری استعداد و پتانسیل مرگ و میر توده جانوری به مواد شیمیایی خاص می گردد و نشان دهنده غلظتی از مواد شیمیایی است که باعث مرگ ۵۰ درصد جمعیت مورد مطالعه می شود (Shah and Altindag, 2005). در سال های اخیر توجه ویژه ای به بحث سم شناسی نانومواد در زیست بوم های آبیان شده است و مطالعات متعددی نیز در زمینه اثرات سمی نانو ذرات نقره بر آبیان انجام شده است که از جمله مطالعات انجام شده توسط پژوهشگران ایرانی می توان به مطالعه Johari و همکاران (۲۰۱۳) اشاره کرد که درصد بازماندگی مراحل مختلف زندگی ماهی قزل آلی رنگین کمان را در اثر مواجهه با نانو ذرات نقره مورد بررسی قرار دادند. همچنین علیشاهی و حیدری (۱۳۹۰) به بررسی سمیت نانو ذرات نقره در ناپلی آرتمیای دریاچه ارومیه پرداختند. Asghari و همکاران (۲۰۱۲) سمیت انواع مختلف نانو ذرات نقره را در مقایسه با یون نقره در *Daphnia magna* بررسی کردند. Salari Joo و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که شوری آب تأثیر مشخصی بر تجمع نانو ذرات نقره در بافت های آبشش، روده، کلیه و ماهیچه در ماهی قزل آلی رنگین کمان دارد. همچنین Johari و همکاران (۲۰۱۴a) به بررسی اثرات مواجهه بلند مدت ماهی قزل آلی رنگین کمان با نانو ذرات نقره کلونیدی و پودری بر تجمع نقره در بافت های مختلف و همچنین فراوانی انواع آسیب های بافتی در این ماهی پرداختند. در مطالعه ای دیگر، Johari و همکاران (۲۰۱۴b)، نشان دادند که روش های فیزیکی و شیمیایی تولید نانو ذرات نقره، بر سمیت آن ها در ماهی گورخری (*Danio rerio*) تأثیر دارد. علاوه بر این، Johari (۲۰۱۴) نشان داد که حضور نانو ذرات نقره در زمان لقاح تخمک و اسپرم، بر قابلیت لقاح و موفقیت تولید مثلی ماهی قزل آلی رنگین کمان تأثیر منفی دارد. حسینی و همکاران (۱۳۹۳) نیز به تعیین غلظت کشنده نانو ذرات نقره تولید شده به روش ساییش لیزری در ماهی گامبوزیا پرداختند.

جنس *Aphanius* تنها جنس از تیره کپور دندان ماهیان (Cyprinodontidae) موجود در ایران است. کپور دندان ماهیان، آبیان بسیار زیبایی هستند که اغلب در تجارت ماهیان آکواریومی مورد استفاده قرار می گیرند. (Rüppell, 1829) *Aphanius dispar* یا ماهی گورخری معمولی، گونه ای است که تحمل نسبتاً بالایی نسبت به شوری دارد و آب های لب شور نواحی ساحلی خلیج فارس را ترجیح می دهد. اطلاعات اندکی در مورد جمعیت های مختلف جنس *Aphanius* در ایران وجود دارد (Hrbek *et al.*, 2006)، بنابراین انجام مطالعات مختلف از جمله بررسی آثار مواد شیمیایی بر این ماهیان، زمینه حفاظت بیشتر از ذخایر محدود آنان را فراهم می سازد. با توجه به استفاده روز افزون از نانو ذرات در صنایع مختلف و احتمال آزادسازی آن در محیط زیست آبی، هدف از پژوهش حاضر، بررسی سمیت حاد کلونید نانو ذرات نقره در ماهی گورخری معمولی می باشد.

## مواد و روش ها

کلونید نانو ذرات نقره نوع L-2000 با نام تجاری نانوسید از شرکت نانونصب پارس (تهران) خریداری شد. مشخصات این کلونید قبلاً به طور کامل سنجش و گزارش شده است (Asghari *et al.*, 2012; Johari *et al.*, 2013). بر اساس مطالعات مذکور و به طور خلاصه، کلونید مورد استفاده حاوی نانو ذرات نقره با غلظت واقعی ۳۹۸۰ میلی گرم در لیتر، پتانسیل زتای  $53/33 \pm 7/86$  میلی ولت و pH ۲/۴۰ می باشد؛ همچنین میانگین قطر نانو ذرات نقره در کلونید مذکور ۱۶/۶ نانومتر می باشد.

<sup>1</sup>. Median Lethal Concentration

به منظور انجام آزمایشات سم‌شناسی ابتدا، ۲۵۰ قطعه ماهی گورخری معمولی از خوریات بندر عباس به وسیله ساچوک و تور سدی (سکار) صید و به آزمایشگاه آبی پرووری دانشگاه هرمزگان منتقل شدند. سپس به منظور سازگاری با شرایط آزمایشگاه، ماهیان به مدت یک هفته در مخازن پلی اتیلنی ۳۰۰ لیتری و تحت دوره نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی نگهداری و روزانه دو بار با غذای مخصوص ماهیان تزئینی تغذیه شدند. میانگین وزن و طول کل ماهیان به ترتیب برابر با  $1/01 \pm 0/053$  گرم و  $3/92 \pm 0/13$  سانتی‌متر اندازه‌گیری شد.

در پژوهش حاضر آزمایشات سم‌شناسی در آکواریوم‌های شیشه‌ای ۲۰ لیتری محتوی ۱۰ لیتر آب هوادهی شده، به روش ساکن (بدون تعویض آب) و بر اساس استاندارد سازمان همکاری و توسعه اقتصادی برنامه‌ریزی و اجرا گردید (OECD, 1992). براساس استاندارد فوق، غذاهای ماهیان ۲۴ ساعت قبل از شروع آزمایش‌های سم‌شناسی و در طی انجام آن قطع گردید. بر همین اساس نیز ابتدا آزمایش‌های اولیه به منظور تعیین محدوده کشندگی نانو ذرات نقره انجام شد و با توجه به نتایج به دست آمده از این آزمایش‌ها، در مرحله بعد ماهیان در معرض غلظت‌های اسمی ۰، ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کلئوئید نانو ذرات نقره طی ۹۶ ساعت قرار گرفتند. بنابراین در پژوهش حاضر هفت تیمار اصلی شامل گروه شاهد و غلظت‌های مختلف کلئوئید نانو ذرات نقره و ۳ تکرار برای هر تیمار (در مجموع ۲۱ آکواریوم) در نظر گرفته شد. در این مرحله تعداد ماهیان هر تکرار ۱۰ عدد بود و در مجموع از ۲۱۰ ماهی استفاده گردید. ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی آب در طی آزمایش به صورت روزانه اندازه‌گیری و ثبت می‌گردید. بر این اساس محدوده دما بین ۲۴ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد، pH برابر با ۸/۲، اکسیژن محلول ۷/۹ میلی‌گرم در لیتر، هدایت الکتریکی برابر ۸۷۵ میکروزیمنس بر سانتی‌متر و شوری ۰/۲ ppt بود. بعد از تیمار بندی، به منظور تعیین غلظت واقعی نقره در هر تیمار، از هر آکواریوم به میزان ۶۰ سی‌سی نمونه آب برداشته و ابتدا با استفاده از اسید نیتریک ۰/۱ نرمال، pH آن به زیر ۲ رسانده شد؛ سپس با دستگاه جذب اتمی مقدار غلظت واقعی نقره در آب مورد سنجش قرار گرفت. تلفات ماهیان طی ۹۶ ساعت و هر ۲۴ ساعت یکبار شمارش و ثبت شد و داده‌های به دست آمده به وسیله نرم افزار probit (این نرم افزار توسط سازمان حفاظت محیط زیست آمریکا (US EPA) و برای آنالیز نتایج داده‌های مربوط به سمیت حاد ناشی از مواد شیمیایی طراحی گردیده است) برای تعیین غلظت کشنده میانی مورد استفاده قرار گرفت. لازم به ذکر است که مقادیر غلظت‌های کشنده در این مطالعه بر اساس غلظت واقعی نقره محاسبه گردیدند.

### نتایج

در ساعات اولیه در معرض‌گذاری با غلظت‌های مختلف نانو ذرات نقره، حرکات غیر عادی ماهیان شامل آمدن به سطح آب، شنای سریع، بی‌حالی، تجمع ماهیان در یک نقطه از آکواریوم و حرکات سریع سرپوش آبششی ثبت گردید، هم‌چنین رسوب قهوه‌ای رنگ تیره در کف آکواریوم به خصوص در غلظت‌های بالا مشاهده گردید. نتایج سنجش غلظت‌های واقعی نقره در آب آکواریوم‌ها در جدول ۱ آورده شده است. در غلظت‌های آزمایش شده در ماهیان ترشح موکوس به خصوص بر روی پوست و آبشش ماهیان مشاهده شد. نتایج حاصل از شمارش تعداد ماهیان تلف شده در زمان‌های مختلف پس از رویارویی با نانو ذرات نقره در جدول ۲ خلاصه گردیده است. با توجه به این جدول، تلفات ماهیان با افزایش غلظت و افزایش زمان در معرض‌گذاری، بیشتر شده است به این صورت که با افزایش غلظت یک روند افزایشی در میزان تلفات مشاهده شد. بر اساس نتایج به دست آمده در این پژوهش، بیشترین غلظت فاقد اثر سمیت (NOEC<sup>۲</sup>) و کمترین غلظت ایجاد کننده سمیت (LOEC<sup>۳</sup>) نانو ذرات نقره برای ماهی گورخری معمولی به ترتیب برابر ۱/۲ و ۲/۷۱۵ میلی‌گرم در لیتر بودند. هم‌چنین بر اساس بررسی داده‌های مرگ و میر با نرم افزار پروبیت، غلظت کشنده میانی ۹۶ ساعته کلئوئید نانو ذرات نقره برای ماهی گورخری معمولی به میزان ۱۰/۶۳۱ میلی‌گرم در لیتر برآورد گردید (جدول ۳).

2. No Observed Effect Concentration

3. Lowest Observed Effect Concentration

جدول ۱. نتایج سنجش غلظت واقعی نقره در هر یک از غلظت های مختلف استفاده شده در آزمایش (غلظت اسمی) با استفاده از دستگاه جذب اتمی (اعداد بر حسب میلی گرم در لیتر می باشند).

غلظت اسمی	۵	۱۰	۲۰	۳۰	۴۰	۵۰
غلظت واقعی	۲/۷۱۵	۵/۸۴۲	۱۱/۲۰۵	۱۹/۳۷	۲۲/۳۴۵	۲۷/۲۵۵

جدول ۲. تلفات ماهیان گورخری معمولی پس از رویارویی با کلونید نانو ذرات نقره طی دوره ۹۶ ساعته.

مجموع تعداد تلفات هر ساعت	غلظت اسمی کلونید نانو ذرات نقره (میلی گرم در لیتر)				
	۲۴	۴۸	۷۲	۹۶	۰
۰	۰	۰	۰	۰	۰
۳	۰	۱	۲	۳	۳
۶	۰	۱	۴	۶	۶
۱۱	۱	۳	۶	۱۱	۱۱
۱۶	۳	۶	۱۲	۱۶	۱۶
۲۲	۷	۱۴	۱۹	۲۲	۲۲
۳۰	۳۰	۳۰	۳۰	۳۰	۳۰

جدول ۳. غلظت های کشنده کلونید نانو ذرات نقره در ماهی گورخری معمولی محاسبه شده بر اساس غلظت های واقعی نقره در آب آکواریوم ها (سنجش شده توسط دستگاه جذب اتمی).

حد بالایی اطمینان	حد پایینی اطمینان	غلظت های کشنده (میلی گرم در لیتر)
۳/۳۴۶	۰/۰۳۲۵	LC <sub>1</sub> = ۱/۳۷۸
۴/۹۵۳۵	۰/۱۶۴	LC <sub>5</sub> = ۲/۵۰۷
۶/۱۶۲	۰/۳۸۴۵	LC <sub>10</sub> = ۳/۴۴۹
۷/۱۹۲۵	۰/۶۷۸	LC <sub>15</sub> = ۴/۲۷۸
۱۷/۸۲۴۵	۵/۷۹۱۵	LC <sub>50</sub> = ۱۰/۶۳۱
۱۳۴/۵۴۸	۱۶/۲۳۹	LC <sub>85</sub> = ۲۶/۴۱۷۸
۲۳۵/۹۷۲۵	۱۹/۰۶۳۵	LC <sub>90</sub> = ۳۲/۷۶۶
۵۵۰/۳۸۷	۲۳/۸۲۸۵	LC <sub>95</sub> = ۴۵/۰۸۲
۲۷۵۶/۴۰۸	۳۵/۳۹۶۵	LC <sub>99</sub> = ۸۲/۰۲

### بحث

در پژوهش حاضر غلظت کشنده میانی ۹۶ ساعته نانو ذرات نقره کلونیدی در ماهی گورخری معمولی برابر با ۱۰/۶۳۱ میلی گرم در لیتر به دست آمد. در پژوهش دیگری که بر روی چهار گونه ماهی آمور، شیریت، اسکار و سوروم توسط علیشاهی و مصباح (۱۳۸۹) انجام شد، غلظت های کشنده میانی نانو ذرات نقره برای گونه های مذکور به ترتیب برابر با ۰/۰۸۶، ۰/۱۸۵ و ۷/۸۹ میلی گرم در لیتر به دست آمد. همچنین در مطالعه دیگری که توسط Zhou و Wu (۲۰۱۳) بر روی ماهی مداکای ژاپنی (*Oryzias latipes*) انجام شد، غلظت های کشنده میانی بعد از ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت رویارویی با نانو ذرات نقره به ترتیب برابر با ۱/۳۸، ۱/۱۲ و ۰/۸۷ میلی گرم در لیتر به دست آمد. Bilberg و همکاران (۲۰۱۲) نیز میزان غلظت کشنده میانی ۴۸ ساعته نانو ذرات نقره و یون نقره را در ماهی گورخری دانیو (*Danio rerio*) به ترتیب برابر ۸۴ و ۲۵ میکروگرم در لیتر گزارش کردند. همچنین Johari و همکاران (۲۰۱۳) غلظت های کشنده میانی ۹۶ ساعته کلونید نانو ذرات نقره را در مراحل جنینی، لاروی و

نوجوانی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) به ترتیب برابر ۰/۲۵، ۰/۷۱ و ۲/۱۶ میلی‌گرم در لیتر به دست آوردند که این نتایج نشان‌دهنده حساسیت بیشتر مراحل اولیه زندگی این ماهی به نانو ذرات نقره بود. با توجه به نتایج تحقیقات اشاره شده، مقادیر غلظت‌های کشنده میانی به دست آمده در پژوهش حاضر برای ماهی گورخری معمولی بالاتر از مقادیر گزارش شده در سایر مطالعات برای گونه‌های دیگر است. این مقایسه نشان‌دهنده مقاومت بسیار بالاتر ماهی گورخری معمولی در برابر نانوذرات نقره نسبت به این گونه‌ها می‌باشد. به طور کلی مقاومت بالا نسبت به شرایط محیطی از ویژگی‌های کپور ماهیان دنداندار است که اگرچه در پژوهش حاضر هم این موضوع مورد تأیید قرار گرفت، اما انجام مطالعات بیشتر در زمینه تکرار پذیری این مسئله در هنگام رویارویی این ماهی با سایر نانو مواد یا سایر مواد شیمیایی بسیار ضروری به نظر می‌رسد.

بر اساس نتایج پژوهش حاضر و مطابق سیستم هماهنگ جهانی (GHS) طبقه بندی و برچسب گذاری مواد شیمیایی (UN, 2009)، کلئوئید نانو نقره مورد مطالعه برای ماهی گورخری معمولی جزو گروه ۳ حاد طبقه‌بندی می‌شود و در نتیجه بر اساس قوانین اتحادیه اروپا (EC, 2008) حضور این ماده در محیط زیست این ماهی مضر بوده و در بلند مدت می‌تواند اثرات نامطلوبی بر بوم‌سازگان آبی داشته باشد.

## منابع

حسینی، س. ژ.، حبیبی، ل.، جوهری، س. ع.، سوری‌نژاد، ا. ۱۳۹۳. بررسی سمیت حاد کلئوئید نانو ذرات نقره سنتتیک تولید شده از طریق سایش لیزری بر ماهی گامبوزیا *Gambusia holbrooki*. مجله بوم‌شناسی آبزیان. دوره چهارم، شماره ۲، صفحات ۳۰-۳۴.

سالاری جو، ح.، کلباسی، م. ر.، جوهری، س. ع. ۱۳۹۱. تأثیر شوری آب بر سمیت حاد نانوذرات کلئوئیدی در بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله سلامت و محیط. دوره پنجم، شماره اول، صفحات ۱۳۲-۱۲۱.

علیشاهی، م. و حیدری، ب. ۱۳۹۰. بررسی سمیت نانوذرات نقره در ناپلی آرتیمیای دریاچه ارومیه. مجله پژوهش‌های نوین دامپزشکی. سال دوم، شماره ۸، صفحات ۵۴-۴۹.

علیشاهی، م.، و مصباح، م. ۱۳۸۹. مقایسه سمیت نانوذرات نقره در ماهیان آمور (*Ctenopharyngodon idella*). شیریت (*Barbus grypus*). اسکار (*Astronorus ocellatus*) و سوروم (*Cichlosoma severums*). مجله بیولوژی دریا. دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز. سال دوم، شماره ۷، صفحات ۵۱-۴۵.

- 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(14). DOI: 10.1186/1477-3155-10-14.
- Bilberg, K., Hovgaard, M.B., Besenbacher, F., Baatrup, F. 2012. In Vivo Toxicity of Silver Nanoparticles and Silver Ions in zebrafish (*Danio rerio*). Journal of Toxicology. DOI:10.1155/2012/293784.
- EC, 2008. Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and Council of 16 December 2008 on Classification, Labeling and Packaging of Substances and Mixtures. Official Journal of the European Union. 31.12.2008.
- Hrbek, T.F., Keivany, Y., Coad, B.W. 2006. New species of *Aphanius* (Teleostei, Cyprinodontidae) from Isfahan province of Iran and a reanalysis of other species. Copeia. 2: 244-255.
- Johari, S.A., Kalbassi M.R., Soltani M., Yu I.J. 2013. Toxicity comparison of colloidal silver nanoparticles in various life stages of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Iranian Journal of Fisheries Sciences. 12(1): 76-95.
- Johari, S.A. 2014. Toxicity effect of colloidal silver nanoparticles on fertilization capacity and reproduction success of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Nanomedicine Research. 1(1): 00001. DOI: 10.15406/jnmr.2014.01.00001.
- Johari, S.A., Kalbassi, M.R., Yu, I.J., Lee, J.H. 2014a. Chronic effect of waterborne silver nanoparticles on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): histopathology and bioaccumulation. Comparative Clinical Pathology. DOI: 10.1007/s00580-014-2019-2.
- Johari, S.A., Sourinejad, I., Bärsch, N., Saed-Moocheshi, S., Kaseb, A., Nazdar, N. 2014b. Does physical production of nanoparticles reduce their ecotoxicity? A case of lower toxicity of AgNPs produced by laser ablation to zebrafish. International Journal of Aquatic Biology. 2(4): 188-192.

- Kalbassi, M.R., Salari-Joo, H., Johari, S.A. 2011. Toxicity of silver nanoparticles in aquatic ecosystems: Salinity as the main cause in reducing toxicity. *Iranian Journal of Toxicology*. 5(182): 436-443.
- Nickel, C., Hellack, B., Gartiser, S., Flach, F., Schiwy, A., Maes, H., Schaeffer, A., Erdinger, L., Gabsch, S., Stintz, M., Erdinger, L., Kuhlbusch, T.A.J. 2012. Fate and behaviour of TiO<sub>2</sub> nanomaterials in the environment, influenced by their shape, size and surface area. UBA Report 25/2012, pp. 163.
- Nowack, B., Bucheli, T.D. 2007. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution*. 150: 5-22.
- OECD, 1992. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
- Prabhu, S., Poulouse, E.K. 2012. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International Nano Letters*. 2(32): DOI:10.1186/2228-5326-2-32.
- Salari Joo, H., Kalbassi, M.R., Yu, I.J., Lee, J.H., Johari, S.A. 2013. Bioaccumulation of silver nanoparticles in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): influence of concentration and salinity. *Aquatic Toxicology*. 140-141: 398-406.
- Scown, T.M., Santos, E.M., Johnston, B.D., Gaiser, B., Baalousha, M., Mitov, S., Lead, J.R., Stone, V., Fernandes, T.F., Jepson, M., Aerle, R.V., Tyler, Ch.R. 2010. Effects of aqueous exposure to silver nanoparticles of different sizes in rainbow trout. *Toxicological Sciences*. 115(2): 521-534.
- Shah, S.L., Altindag, A. 2005. Effects of heavy metal accumulation on the 96-h LC<sub>50</sub> values in Tench *Tinca tinca* L., 1758. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 29: 139-144.
- UN (United Nations), 2009. GHS (Globally harmonized system of classification and labeling of chemicals). New York and Geneva.
- Valavanidis, A., Vlachogianni, T. 2010. Nanomaterials and nanoparticles in the aquatic environment: Toxicological and ecotoxicological risks. *Science Advances on Environment, Toxicology & Ecotoxicology*. 1-10.
- Wu, Y., Zhou, Q. 2013. Silver nanoparticles cause oxidative damage and histological changes in Medaka (*Oryzias latipes*) after 14 days of exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 32(1): 165-173.