Archive of SID

مجله بوم شناسی آبزیان

Journal homepage: http://jae.hormozgan.ac.ir

اثر نانوذرات نقره کلوئیدی و نیترات‌نقره بر شاخص‌های خون‌شناسی عروس‌ماهی زاینده‌رود *Petroleuciscus esfahani*

میثم راکی، فاطمه پیکان حیرتی، سالار درافشان*

گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، صندوق پستی ۸۳۱۱۱-۸۴۱۵۶

نوع مقاله:
پژوهشی

تاریخچه مقاله:
دریافت: ۹۳/۰۳/۲۴
اصلاح: ۹۴/۰۶/۲۰
پذیرش: ۹۴/۰۶/۲۵

کلمات کلیدی:
زاینده‌رود
خون‌شناسی
نانوذرات
نیترات نقره

چکیده

اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره و نیترات‌نقره بر برخی شاخص‌های خون‌شناسی عروس‌ماهی زاینده‌رود (*Petroleuciscus esfahani*) بررسی شد. به این منظور ۱۰۰ قطعه عروس‌ماهی زاینده‌رود (میانگین وزن ۱/۳±۲٦/٤ گرم) در ۵ گروه آزمایشی شامل غلظت‌های ۱ یا ۲۵ µg/L از نانوذرات نقره و یا نیترات نقره و یک گروه شاهد به مدت ۱۰ روز در معرض قرار گرفتند. در پایان، شاخص‌های اولیه خون‌شناسی شامل تعداد گلبول قرمز، گلبول سفید، هماتوکریت و هموگلوبین و ثانویه نظیر محتوای هموگلوبین گلبولی MCH و اندازه حجمی گلبول MCV بررسی شد. نتایج نشان داد که در معرض‌گذاری ماهیان با ترکیبات مختلف منجر به ایجاد تفاوت معنی‌داری در شاخص‌های اولیه و ثانویه خون‌شناسی می‌شود. بیشترین میزان هماتوکریت (۳/۰۹±۴۷/۷۵ ٪) و هموگلوبین (۰/۹۳±۱۵/۶ گرم در دسی‌لیتر) در غلظت ۲۵ µg/L نیترات‌نقره مشاهده شد (p<۰/۰۵). تعداد گلبول قرمز در غلظت ۲۵ µg/L کلوئید نانوذرات نقره کاهش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد نشان داد (p<۰/۰۵). به جز در غلظت متوسط هموگلوبین گلبولی (MCHC)، در سایر فاکتورهای ثانویه خون‌شناسی تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد مشاهده شد (p<۰/۰۵). نتایج کلی بیانگر اثر مخرب کلوئید نانوذرات نقره و نیترات نقره محلول در آب بر شاخص‌های خون‌شناسی عروس‌ماهی زاینده‌رود بود. این اطلاعات می‌تواند جهت درک بهتر اثرات نانوذرات در اکوسیستم‌های آبی مورد استفاده قرار گیرد.

مقدمــه

با رشد کنونی صنعت نانوفناوری و افزایش تعداد محصولاتی که در تولید آن‌ها از خواص غیرعادی نانوذرات استفاده شده است، این صنعت به یک رکن مهم در اقتصاد جهانی تبدیل شده است. افزایش تولیدات و محصولات نانو به ناچار منجر به افزایش فاضلاب نانومواد می‌شوند. محیط‌های آبی که بسیار آسیب‌پذیر هستند، محل رسوب و تجمع بسیاری از این نانوذرات و فاضلاب‌های شیمیایی می‌باشند. در نهایت این نانوذرات وارد واکنش با موجودات زنده و عوامل غیرزنده می‌شوند اما اثرات مضر و تخریب‌کننده آن‌ها هنوز به طور کامل شناخته نشده است و این عدم شناخت کافی منجر به ایجاد نگرانی‌هایی برای سلامت انسان و محیط زیست شده است. نانوذرات نقره به دلیل خاصیت ضدمیکروبی کاربردهای وسیعی داشته‌اند، از جمله در ماشین‌های لباس‌شویی (Johnston *et al*., 2010)، فیلترهای تصفیه آب (Li *et al*., 2008)، پارچه‌ها (Perelshtein *et al*., 2008)، حسگرها (Schrand *et al*., 2008) و داروسازی (Sun *et al*., 2008) از نانوذرات نقره استفاده شده است.

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: sdorafshan@cc.iut.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مطالعات مختلف نشان داده است که نانوذرات نقره می‌توانند منجر به افزایش پراکسیداسیون چربی (Arora *et al*., 2008)، ایجاد اکسیژن واکنش پذیر (ROS)[1]، کاهش عملکرد میتوکندریایی (Schrand *et al*., 2008)، مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی و تنش اکسیداتیو (Hussain *et al*., 2005) شوند. با این وجود مکانیزم سمیت نانوذرات نقره در ماهی‌ها به درستی مشخص نیست. برای ارزیابی میزان سمیت آلاینده‌های محیطی شاخص‌های متفاوتی در ماهی‌ها وجود دارد که از جمله آن‌ها شاخص‌های خون‌شناسی است. پارامترهای خونی غیرطبیعی می‌توانند بیانگر تغییرات شرایط فیزیکی و شیمیایی آب باشند، لذا از ماهی به عنوان یک شاخص هشداردهنده در تشخیص حضور نامطلوب آلاینده در آب استفاده می‌شود (Atef and Attar, 2005). به نظر می‌رسد که از شاخص‌های خون‌شناسی، تغییرات زیست شیمیایی، نرخ رشد و میزان مصرف اکسیژن ماهی می‌توان در تشخیص میزان سمیت آلاینده‌ها استفاده کرد (Mekkawy *et al*., 2011). به دلیل ارتباط سیستم گردش خون و محیط خارجی، متغیرهای خون‌شناسی برای تشخیص اثرات مواد تنش‌زا و سمی می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند. تغییر در شاخص‌های خون و تخریب اندام‌های خون‌ساز در ماهی ممکن است به دلیل شرایط محیط یا آلودگی آب‌ها یا هر دو باشد (Mekkawy *et al*., 2011). فاکتورهای سلولی در خون (تعداد گلبول‌های قرمز و سفید و شمارش افتراقی گلبول‌های سفید) شاخص‌های مفیدی در واکنش‌های حاصله از تنش‌های خارجی هستند که در نهایت سبب تغییرات مورفولوژیکی و توزیع سلولی در خون می‌شوند (Srivastava and Choudhary, 2010). همچنین ناهنجاری‌های مورفولوژیکی در گلبول‌های قرمز شاخص مفیدی در بررسی سمیت سلولی می‌باشند (Bushra *et al*., 2002). این فاکتورها همچنین تحت تأثیر عوامل خارجی نظیر فصل، دمای آب، کیفیت‌های زیست محیطی، غذا، تنش‌ها، انواع آلودگی‌ها و بیماری‌ها دچار تغییر می‌شوند. شجیعی (۱۳۸۱)، با بررسی اثر کادمیوم بر پارامترهای خون‌شناسی در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) نشان داد که در غلظت صفر تا ۵۰ میکروگرم در لیتر کادمیوم اختلاف معنی‌داری در میزان شمارش گلبول‌های قرمز و سفید در خون مشاهده می‌شود. همچنین نانوذرات آهن سبب ایجاد تفاوت معنی‌داری در تعداد گلبول‌های سفید و قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین خون تیلاپیا شد (Chae *et al*., 2009). در حالی که نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم اثر معنی‌داری بر پارامترهای ذکر شده در قزل‌آلای رنگین‌کمان نداشت (Federici *et al*., 2007). بررسی اثر نانوذرات نقره و نیترات نقره بر گربه‌ماهی رنگین کمان (*Pangasianodon hypophthalmus*) نشان داد که در روز اول میزان هموگلوبین، هماتوکریت و تعداد گلبول قرمز تفاوت در بین تیمارها تفاوت معنی‌داری داشت (رزم‌آرا و همکاران، ۱۳۹۳)، همچنین اثرات مخرب این دو ترکیب بر ساختار بافتی این گونه مورد اشاره قرار گرفته است (رزم‌آرا و همکاران، ۱۳۹۲). مزارعی و همکاران (۱۳۹۴) سمیت نانوذرات نقره را برای ماهی گورخری معمولی *Aphanius dispar* جزو گروه ۳ حاد طبقه‌بندی کردند. عروس‌ماهی زاینده‌رود(*Petroleuciscus esfahani*) گونه‌ای بومی از خانواده کپورماهیان (Cyprinidae) در ایران است. این گونه در حوضه دجله، زاینده‌رود و دریاچه نمک پراکنش دارد. اما پراکنش اصلی آن در مناطق میانی و بالادست رودخانه زاینده‌رود است لذا از منظر بوم‌شناختی در این حوضه بسیار حایز اهمیت است. اغلب در گودال‌های ایجاد شده در رودخانه و در لابه‌لای ریشه درختان درون آب پنهان می‌شود و از حشرات آبزی و سایر بی‌مهرگان آبزی تغذیه می‌کند. این گونه همچنین از لحاظ صید ورزشی حایز اهمیت است (عبدلی، ۱۳۷۸). اثر مخرب فلزاتی نظیر نقره به عنوان یک فلز سنگین بر ماهیان اثبات شده است (Grosell *et al*., 1999). لذا به منظور ارایه پاسخ به این سوال که آیا نانوذره نقره اثر متفاوتی نسبت به یون نقره (ترکیب نیترات نقره) بر آبزی دارد، لازم است تا علاوه بر گروه شاهد، ماهیان در معرض غلظت‌های مشابهی از نیترات نقره و نانوذره نقره قرار گیرند. لذا هدف از انجام این تحقیق ارزیابی تاثیر نقره در دو شکل نانوذره و یون نقره بر شاخص‌های خون‌شناسی اولیه نظیر تعداد گلبول قرمز، تعداد گلبول سفید، میزان هموگلوبولین و هماتوکریت و ثانویه نظیر میانگین حجم گلبولی[2] و میانگین هموگلوبین گلبولی[3] عروس ماهی زاینده‌رود به عنوان یک گونه با اهمیت بوم‌شناختی در رودخانه زاینده‌رود بود.

مواد و روش‌ها

[1] Reactive oxygen species
[2] Mean Corpuscular Volume
[3] Mean Corpuscular Hemoglobin

www.SID.ir

Archive of SID

در این آزمایش از کلوئید نانوذرات نقره (Ag-NPs) با نام تجاری Nanocid و غلظت 4000 mg/L شرکت نانونصب پارس (تهران- ایران به شماره ثبت اختراع ۲۰۰۹۰۰۱۳۸۲۵) استفاده گردید. مشخصات نانوذره مورد استفاده در این تحقیق بر اساس آنالیزهای صورت گرفته پیشین به شرح جدول ۱ است (Salari Joo *et al*., 2013).

برای انجام این پژوهش ابتدا ۱۰۰ قطعه عروس‌ماهی زاینده‌رود میانگین وزنی ۱/۳ ± ۲۶/۴ گرم و طولی ۰/۳۳ ± ۱۲/۵ سانتی‌متر (میانگین± خطای استاندارد) از چشمه دیمه واقع در استان چهارمحال و بختیاری با استفاده از تور پره صید گردید. سپس ماهیان با استفاده از کیسه پلاستیکی با اکسیژن خالص پر شده و به سالن آکواریوم واقع در دانشکده منابع‌طبیعی دانشگاه صنعتی اصفهان منتقل شدند. ماهی‌ها به مدت ۷-۱۰ روز جهت سازش با شرایط جدید نگه‌داری شدند و سپس به آکواریوم با حجم کلی ۱۰۰ لیتر و هوادهی شده با سنگ هوای ۱۰ سانتی‌متری و پر شده با آب شیر بدون کلر مستقر شدند. به منظور کلرزدایی، آب لوله‌کشی شهری حداقل به مدت ۴۸ ساعت در مخازن بزرگ ۱۰۰۰ لیتری با هوادهی شدید نگهداری شد. هر آکواریوم شامل ۱۵ قطعه ماهی بود و آزمایش در ۵ گروه شامل غلظت‌های ۱ µg/L نانوذرات نقره (1AgNPs)، ۱µg/L نیترات‌نقره ($1AgNO_3$)، ۲۵ µg/L نانوذرات نقره (25AgNPs) و ۲۵ µg/L نیترات نقره ($25AgNO_3$) و گروه شاهد اجرا شد. غلظت پائین (۱µg/L) به منظور ارزیابی اثرات سمیت این مواد در محیط طبیعی و غلظت بالا (۲۵µg/L) به منظور پی‌بردن به سمیت بحرانی یا کم‌ترین غلظتی که سبب کاهش زنده‌مانی می‌شود، انتخاب شد (راکی، ۱۳۹۳). به منظور مقایسه غلظت یکسان از نقره در دو ترکیب نانوذره و نیترات نقره، مقادیر حقیقی یون نقره در نمک نیترات نقره و نیز درصد خلوص آن مورد توجه قرار گرفت. به طوری که حدود ۶۳٪ از نمک مذکور به یون نقره اختصاص داشت و جهت محاسبه غلظت‌ها برای نیترات نقره این مهم در نظر گرفته شد. ماهی‌ها به مدت ۱۰ روز در تماس با این مواد بودند و در طول این مدت تغذیه نشدند (Sun *et al*., 2008). به لحاظ اینکه اثر نانوذرات بسیار متاثر از قطر آنها است و همچنین به دلیل تمایل آنها به اتصال به یکدیگر و افزایش اندازه، لازم است تا پیش از استفاده از آنها حداقل به مدت ۳۰ دقیقه جهت تفکیک ذرات از یکدیگر و توزیع یکنواخت آنها عمل سونیکاسیون بر روی آنها صورت گیرد (رزم‌آرا و همکاران، ۱۳۹۳). تانک‌های آزمایش ۲۴ ساعت قبل از اضافه کردن ماهی به غلظت مورد نظر رسیدند، سپس شسته شده و مجدداً قبل از اضافه کردن ماهی به غلظت مورد نظر رسیدند تا میزان کاهش غلظت ذرات مورد نظر که در اثر چسبیدن به سنگ‌هوا و شیشه تانک ایجاد می‌شود، به حداقل برسد. تعویض آب و تنظیم غلظت مورد نظر هر ۴۸ ساعت یک‌بار تحت شرایط ساکن- تجدید[1] انجام شد (Schrand *et al*., 2008). به لحاظ اینکه پاسخ‌های فیزیولوژیک آبزیان در مواجهه با شرایط نامطلوب زیستی از جمله حضور آلاینده‌ها خصوصاً فلزات سنگین در آب متاثر از ویژگی‌های فیزیکوشیمایی آب خصوصاً درجه حرارت و سختی است، لذا سنجش این ویژگی‌ها در طول دوره سه مرتبه صورت گرفت. دما با دماسنج و اکسیژن محلول، pH و هدایت الکتریکی به ترتیب به وسیله اکسیژن‌متر (مدل WTW DO meter, USA)، pH متر (مدل Research Jenway 3330, UK) و EC متر (مدلResearch Jenway 4310, UK) اندازه‌گیری شد. میزان آمونیوم به روش تیتراسیون و جذب در طول موج‌های ۲۲۰ و ۲۷۵ نانومتر با اسپکتروفتومتر (مدل Jascov- 530 ساخت کشور ژاپن) اندازه‌گیری شد. برای سنجش فسفات کل از تیتراسیون و اسپکتروفتومتری در طول موج ۸۸۰ نانومتر و قلیائیت از طریق تیتراسیون آب با HCl ۰/۰۲ مولار و سختی با تیتراسیون ۱۰۰ میلی‌لیتر آب با HCl ۰/۱ نرمال اندازه‌گیری شد (Radojevic and Baskin, 1999). میزان غلظت نقره در تیمارهای نانوذرات نقره و نیترات‌نقره به وسیله دستگاه جذب‌اتمی کوره‌دار (مدل پرکین المر A Analyst 700 ساخت آمریکا) چهار بار در طول دوره اندازه‌گیری شد. به این منظور ابتدا محلول استاندارد ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر با استفاده ار فلز نقره، تهیه شد. در مرحله اول با استفاده از محلول استاندارد ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر، محلول استاندارد ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر آماده شد و سپس از آن محلول‌های استاندارد ۱ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر و در نهایت محلول‌های ۰/۰۱، ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر جهت تعیین منحنی کالیبراسیون تهیه شد. پس از تزریق محلول‌های استاندارد به داخل شعله، میزان جذب آن‌ها ثبت گردید و طبق آن، منحنی کالیبراسیون دستگاه ترسیم شد. سپس تزریق نمونه‌های اصلی انجام و هریک از نمونه‌ها به داخل شعله تزریق شد. لازم به ذکر است آن‌چه که طیف سنج جذب اتمی نشان می‌دهد میزان نور جذب شده توسط اتم‌های عنصر مورد نظر پس از تزریق نمونه به داخل شعله است

[1] Static-renewal

www.SID.ir

Archive of SID

که این میزان جذب با تراکم اتم‌ها در شعله متناسب است. از این رو جهت محاسبه غلظت فلزات در نمونه‌ها از منحنی کالیبراسیون استفاده شد. طبق این منحنی، میزان غلظت نقره توسط دستگاه بر حسب میکروگرم بر لیتر گزارش شد.

جدول ۱. برخی از مشخصات اندازه‌گیری شده کلوئید نانوذرات‌نقره توسط Salari Joo و همکاران (۲۰۱۳)

پارامتر	روش سنجش	فراسنجه	توضیحات
غلظت (mg/L)	ICP-AES	۳۹۸۰	با غلظت اعلام شده از کارخانه تولیدی اختلاف ناچیزی دارد.
شکل	TEM	کروی	-
اندازه ذرات (قطر هیدرودینامیکی) (nm)	Zetasizer	۳/۹ تا ۱۶۳/۵	۵۴/۱٪ از ذرات قطر هیدرودینامیکی کم‌تر ازnm ۱۰۰ دارند.
میانگین قطر هیدرودینامیکی (nm)	Zetasizer	۵۴/۸	-
قطر بیشینه (nm)	TEM	۱۲۹	۶۵/۱۴٪ از ذرات قطری بین nm ۱۳-۱ دارند.
خلوص	EDX	تنها عنصر نقره در کلوئید نانوذرات نقره وجود دارد.	

در طول دوره، دما در گستره (۲۰-۲۲/۵ درجه سانتی‌گراد)، اکسیژن محلول (۵/۸-۶/۹ میلی‌گرم بر لیتر)، pH (۷/۸-۸)، هدایت الکتریکی (۴۱۹/۵ میکروزیمنس بر سانتی‌متر)، آمونیوم (۱/۹ میلی‌گرم بر لیتر)، فسفات کل (۰/۰۹ قسمت در میلیون) و سختی (۲۰۴ میلی‌گرم بر لیتر کربنات کلسیم) بود. میانگین میزان نقره سنجش شده برای چهار گروه آزمایشی شامل غلظت‌های ۱ µg/L نانوذرات نقره (1AgNPs)، ۱µg/L نیترات نقره (1AgNO3)، ۲۵ µg/L نانوذرات نقره (25AgNPs) و ۲۵ µg/L نیترات نقره ($25AgNO_3$) به ترتیب معادل ۰/۰۳ ± ۱، ۰/۰۹ ± ۲، ۰/۰۷ ± ۲۳/۵ و ۰/۰۸ ± ۲۶/۵ میکرو گرم در لیتر و در گروه شاهد تقریباً معادل صفر (۰/۰۰۱ ± ۰/۰۰۲) بود. در پایان روز دهم (چهار قطعه از هر تیمار) با استفاده از پودر گل میخک با غلظت ۱۰۰میلی‌گرم در لیتر بیهوش شدند. سپس خون‌گیری از ماهیان پس از خشک کردن ساقه دمی، با استفاده از سرنگ ۲/۵ میلی‌لیتری هپارینه انجام شد و ویژگی‌های مرسوم خون‌شناسی مطابق روش‌های استاندارد خون‌شناسی (Houston, 1997) به شرح زیر اندازه‌گیری شد. شمارش تعداد گلبول سفید (هزار در میلی‌مترمکعب) و گلبول قرمز (میلیون در میلی‌مترمکعب) پس از رقیق‌سازی نمونه خون با استفاده از محلول (دیس Dace)، شامل رنگ بریلیانت کریزل آبی (Brilliant cresyl blue ۰/۱گرم)، سیترات سدیم (۳/۸ گرم)، فرمالین ٪۳۷ (۰/۲ میلی لیتر) و آب مقطر تا حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر با استفاده از پیپت ملانژور سفید یا قرمز و لام هموسایتومتر به صورت دستی اجرا شد. درصد هماتوکریت (Hct) با پر کردن لوله‌های میکروهماتوکریت به میزان حداقل ۲/۳ حجم لوله از خون کامل و سانتریفیوژ (Sigma; Germany) 5 دقیقه در 7000 rpm تعیین گردید. همچنین میزان هموگلوبین (Hb گرم در دسی لیتر)، با استفاده از روش سیان‌مت‌هموگلوبین[1] با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (PerkinElmer lambda Z 800; USA) طول موج ۵۴۰ نانومتر در آزمایشگاه تشخیص طبی میلاد، اصفهان اجرا شد. شمارش افتراقی گلبول‌های سفید با تهیه گسترش خونی و رنگ‌آمیزی آن توسط محلول گیمسا و مطابق با کلید شناسایی صورت گرفت (Blaxhall, 1972). حجم متوسط گلبول‌های قرمز (MCV) برحسب فمتولیتر (میکرومتر مکعب)، مقدار متوسط هـموگلوبین گلبول قرمز (MCH) برحسب پیکوگرم در سلول و غلظـت متوسط هموگلـوبین گلبول قـرمز (MCHC[2]) بر حسب درصد بر اساس روابط زیر محاسبه شد (Dorafshan *et al*., 2008).

$MCV = [HCT (\%) / RBC (10^6 \text{ cell } mm^{-3})] \times 10$, $MCH = [Hb (g/dL) / RBC (10^6 \text{ cell } mm^{-3})] \times 10$, $MCHC = [Hb (g/dL) / HCT (\%)] \times 100$

[1] Cyan methemoglobin
[2] Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration

www.SID.ir

Archive of SID

جهت مقایسه آماری نتایج، ابتدا نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کلموگراف- اسمیرنوف ارزیابی شد. سپس با استفاده از آنالیز آماری یک طرفه (ANOVA) و آزمون چند دامنه آزمون دانکن (Duncan) معنی‌دار بودن تفاوت بین میانگین تیمارها به تفکیک در سطح اعتماد p>۰/۰۵ ارزیابی گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها به کمک نرم‌افزار SPSS 18 انجام شد. جهت رسم نمودارها از Excel 2007 استفاده گردید.

نتایــج

نتایج ارزیابی فراسنجه‌های خونی نشان داد که پس از ده روز در معرض‌گذاری عروس‌ماهی زاینده‌رود در غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره و نیترات‌نقره، میزان هماتوکریت و هموگلوبین در غلظت µg/L ۲۵ نیترات‌نقره نسبت به سایر تیمارها افزایش معنی‌داری داشت و به ترتیب معادل ۳/۰۹±۴۷/۷۵ درصد (شکل۱-الف) و ۰/۹۳±۱۵/۶ گرم بر دسی‌لیتر (میانگین ± خطای استاندارد) بود (شکل ۱-ب)(p<۰/۰۵). همچنین تعداد گلبول‌های قرمز در سایر تیمارها کاهش معنی‌داری نسبت به شاهد داشت (p<۰/۰۵) و کمترین مقدار آن در غلظت ۲۵ میکروگرم در لیتر نانوذره نقره مشاهده شد که معادل ۱/۵۲ میلیون در متر مکعب بود (شکل۱-ج). نتایج حاصل از ارزیابی فراسنجه‌های خونی نشان داد که شاخص‌های ثانویه خون‌شناسی شامل حجم متوسط گلبول قرمز (MCV) و میانگین هموگلوبین ذره‌ای (MCH) افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد داشت (شکل ۲) و به ترتیب معادل ۳۳/۴۵ ± ۲۶۲/۰۵ فمتولیتر یا میکرومتر مکعب (شکل ۲-الف) و ۵۰/۶۸ ±۷۱۶/۷۳ پیکوگرم بر سلول (شکل ۲-ب) بود. غلظت متوسط هموگلوبین گلبولی (MCHC) پس از ده روز مواجهه با نانوذرات نقره و نیترات نقره تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (p>۰/۰۵) و در گستره ۰/۲۹±۳۲/۳۳ تا ۳/۱۴ ±۳۴/۶۹ درصد (شکل ۲-ج) بود. بررسی تعداد گلبول‌های سفید در تیمارهای مختلف نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مختلف وجود داشت (p<۰/۰۵) (جدول ۲). بیشترین تعداد گلبول سفید $۹/۱۲ \times ۱۰^{۳}$ ± ۱۲۰ سلول در میلی متر مکعب در ماهیان گروه شاهد مشاهده شد و کمترین مقدار آن ۴/۲۶ ±۵۱/۰۰ هزار سلول در میلی متر مکعب در غلظت µg/L ۲۵ نیترات نقره مشاهده شد (جدول ۲). در گسترش خونی رنگ‌آمیزی شده با گیمسا گلبول‌های سفید شامل لنفوسیت، ترومبوسیت، مونوسیت و نوتروفیل قابل تفکیک بودند (شکل ۳) که به ترتیب در گستره ۱/۷۶± ۴۰/۶۶ - ۲/۲۳±۶۰/۳۳، ۲/۶۲±۲۸/۳۳ - ۲/۳۳± ۲/۱۷،۳۳/۰۰ ±۳۴/۰۰ - ۱/۳۳±۱۵/۶۶ و ۱/۱۵±۱۰/۰۰- ۰/۸۸±۵/۳۳ درصد قرار داشتند (جدول ۲). درصد لنفوسیت‌ها و مونوسیت‌ها به ترتیب کاهش و افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد داشت (p<۰/۰۵) به طوری که غلظت بالای نیترات‌نقره باعث کاهش درصد لنفوسیت‌ها و افزایش درصد مونوسیت‌ها نسبت به گروه شاهد شد (جدول ۲). همچنین غلظت بالای نیترات‌نقره باعث افزایش درصد نوتروفیل‌ها نسبت به گروه شاهد شد ولی تفاوت معنی‌داری با ماهیان در معرض غلظت یک میکروگرم در لیتر نانوذره نقره نداشت (p>۰/۰۵) (جدول ۲). تیمار ماهیان با نانوذره یا نیترات نقره منجر به تغییر درصد ترومبوسیت‌ها نسبت به گروه شاهد شد به طوری که بیشترین مقدار آن در غلظت کم نیترات‌نقره مشاهده شد (p<۰/۰۵) (جدول ۲).

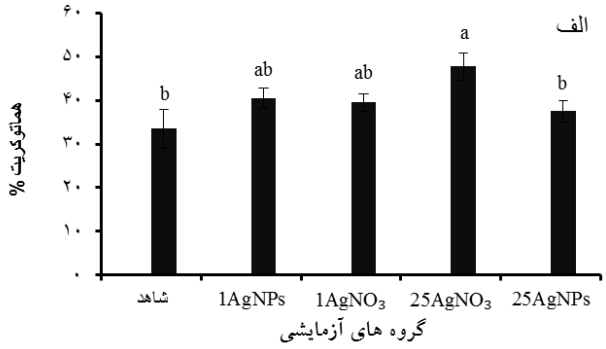
جدول ۲. میانگین± خطای استاندارد تعداد گلبول‌های سفید و شمارش افتراقی گلبول‌های سفید در عروس‌ماهی زاینده‌رود پس از مواجهه با کلوئید نانوذرات نقره و نیترات‌نقره

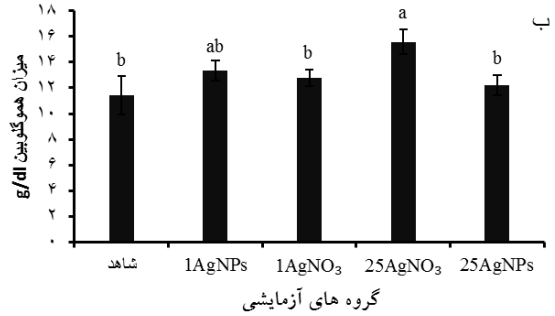
تیمار / فاکتور	شاهد	۱ AgNPs	۱ $AgNO_3$	۲۵ $AgNO_3$	۲۵ AgNPs
گلبول سفید (10^3 mm^3)	۲۸^{a}/±۹۱/۰۰۱۲۰	^{bc}۶۸/±۱۰/۰۰۷۰	۹۳^{b}/۷۶/۰۰±۲۳	۶۹^{c}/۵۱/۲۳±۴۲	۹۱^{bc}/۶۷±۶۲
لنفوسیت (٪)	$۲/۰۸^{b}$±۵۱/۰۰	$۲/۹^{b}$±۴۸/۳۳	$۳/۵^{b}$±۵۲/۰۰	$۱/۷۶^{c}$±۴۰/۶۶	$۲/۲۲^{a}$±۶۰/۳۳
ترومبوسیت (٪)	$۱/۷۶^{b}$±۲۱/۶۶	$۲/۳۳^{b}$±۱۷/۰۰	$۲/۶۶^{a}$±۲۸/۳۳	$۱/۳۳^{b}$±۱۵/۳۳	$۱/۱۵^{b}$±۱۷/۶۶
مونوسیت (٪)	$۱/۱۵^{b}$±/۰۰۲۲	$۲/۰۲^{b}$±۲۵/۳۳	$۱/۳۳^{c}$±۱۵/۶۶	^{a}۳۳/۲±۳۴/۰۰	^{c}۸۴/۲±۱۶/۳۳
نوتروفیل (٪)	$۰/۸۸^{b}$±۵/۳۳	$۱/۴۵^{a}$±۹/۳۳	$۱/۱۵^{b}$±۴/۰۰	$۱/۱۵^{a}$±۱۰/۰۰	$۰/۳۳^{b}$±۵/۶۶

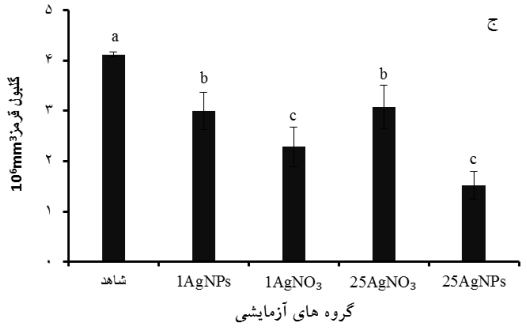
در هر ردیف، وجود حداقل یک حرف مشابه بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار است (p>۰/۰۵).

www.SID.ir

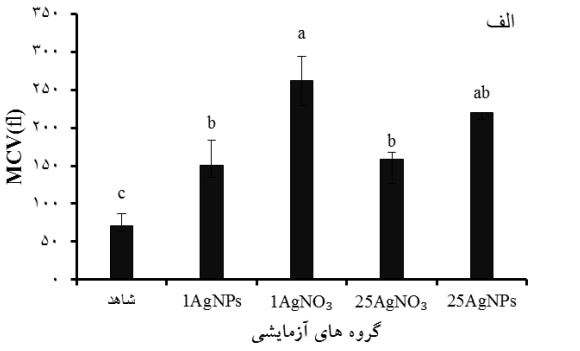
Archive of SID

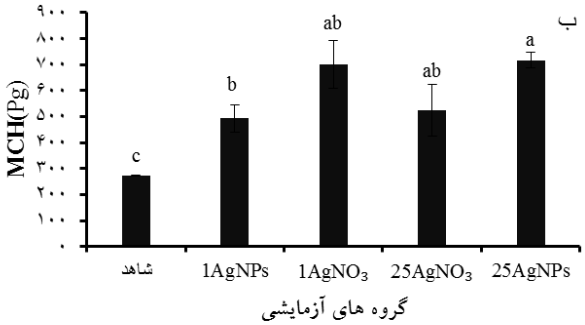


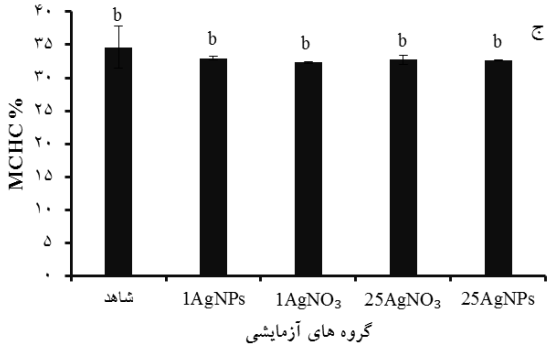




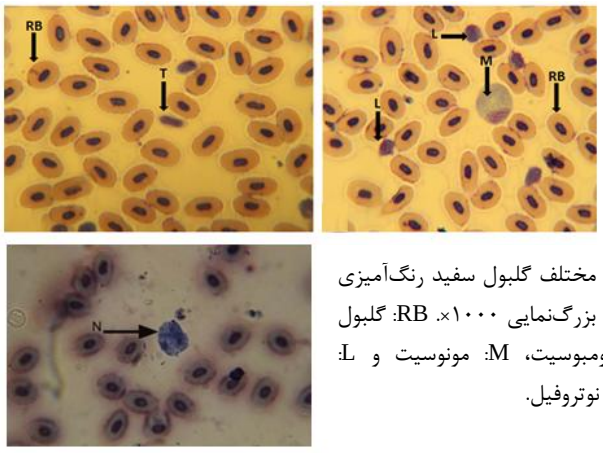
شکل ۱. میانگین ± خطای استاندارد هماتوکریت (٪، الف)، هموگلوبین (گرم بر دسی لیتر، ب)، و تعداد گلبول قرمز (میلیون سلول در میلی متر مکعب، ج) در عروس‌ماهی زاینده‌رود پس از ده روز مواجهه با غلظت‌های مختلف (۱ و ۲۵ میکروگرم بر لیتر) نانوذرات نقره (AgNPs) و نیترات-نقره ($AgNO_3$). وجود حداقل یک حرف مشابه بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار است ($p>0/05$).







شکل ۲. میانگین ± خطای استاندارد حجم گلبولی (MCV، الف) محتوای هموگلوبین ذره‌ای (MCH، ب) و غلظت متوسط هموگلوبین گلبول قرمز (MCHC، ج) در عروس-ماهی زاینده‌رود پس از ده روز مواجهه با غلظت‌های مختلف (۱ و ۲۵ میکروگرم بر لیتر) نانوذرات نقره (AgNPs) و نیترات‌نقره ($AgNO_3$). وجود حداقل یک حرف مشابه بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار است ($p>0/05$).



شکل ۳. انواع مختلف گلبول سفید رنگ‌آمیزی شده با گیمسا بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰×. RB: گلبول قرمز، T: ترومبوسیت، M: مونوسیت و L: لنفوسیت، N: نوتروفیل.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

نانو ذرات نقره به دلیل اندازه بسیار کوچک و نسبت سطح به حجم زیاد (Scown *et al*., 2010) واکنش‌پذیری بالایی با غشاء سلول دارند و به عنوان یک عامل تنش‌زا عمل می‌کنند. پاسخ به تنش در ماهیان شامل سه مرحله است که توسط سیستم پیچیده عصبی- درون‌ریز کنترل می‌شود. اولین تغییری که معمولاً پس از بروز تنش رخ می‌دهد، تحریک محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- کلیه است که باعث آزادسازی کورتیزول و کاته‌کولامین می‌شود. پاسخ ثانویه شامل تغییرات ایمنی‌شناسی، خون- شناسی و متابولیکی است که ناشی از عملکرد کورتیزول و کاته‌کولامین است و باعث تغییر تنظیم اسمزی، افزایش قند و فشار خون می‌شود. پاسخ سوم در مرحله نهایی بروز می‌کند؛ در این مرحله بیماری، کاهش رشد و در نهایت مرگ پدید خواهد آمد (Mommsen *et al*., 1999).

پس از ده روز مواجهه با غلظت ۲۵ میکروگرم در لیتر نیترات نقره میزان هماتوکریت و هموگلوبین نسبت به ماهیان گروه شاهد افزایش یافت در حالی‌که تعداد گلبول قرمز در تمامی غلظت‌های مورد استفاده از نانو یا نیترات نقره در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافت. این سه ویژگی خون‌شناسی اطلاعات با ارزشی را برای زیست‌شناسان شیلاتی و پرورش‌دهندگان آبزیان به عنوان شاخص سلامتی از وضعیت ماهی و واکنش به تنش‌های محیطی فراهم می‌کند (کاظمی و همکاران، ۱۳۸۹). در خصوص تاثیر آلاینده‌ها بر تعداد گلبول‌های قرمز، هماتوکریت و میزان هموگلوبین گزارش‌های متفاوتی وجود دارد.

کاهش تعداد گلبول قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین در ماهی فلاندر *Pleuronectes fleus* پس از در معرض‌گذاری با غلظت‌های ۵، ۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر لیتر دلتا- آمینولولینیک اسیددی هیدرات[1] به مدت ۴ و ۹ هفته (Johansson and Larsson, 2006) و در ماهی تیلاپیا *Oreochromis niloticus* پس از ۱، ۳ و ۵ هفته در معرض‌گذاری با غلظت ۵/۵ میکروگرم بر لیتر کادمیوم گزارش شده است (Atef and Attar, 2005). با این وجود، بررسی اثر نانوذرات نقره و نیترات‌نقره بر گربه‌ماهی رنگین کمان *Pangasianodon hypophthalmus* نشان داد که میزان هماتوکریت، هموگلوبین و تعداد گلبول قرمز پس ده روز مواجهه منجر به بروز تفاوت معناداری در شاخص‌های مورد بررسی نمی‌شود (رزم‌آرا و همکاران، ۱۳۹۳). کاهش میزان گلبول‌های قرمز معمولاً به دلیل تجمع ترکیبات آب‌گریز در غشای آنها و تخریب آن و یا تنش اکسیداتیو (مثلاً عدم توانایی تبدیل مت- هموگلوبین به هموگلوبین توسط سیستم‌های آنزیمی)، آسیب‌های ساختاری در بافت‌های خون‌ساز از قبیل کلیه و طحال و سایر اثرات به حضور آلاینده‌ها نسبت داده می‌شود (Jee *et al*., 2005). این تغییرات را می‌توان به کاهش حجم پلاسما و غلیظ شدن خون و یا شاید افزایش اندازه گلبول‌ها تحت تاثیر حضور نقره نیز نسبت داد. وجود فلزات سنگین در آب همچنین می‌تواند منجر به لیزشدن گلبول‌های قرمز یا تخریب بافت‌های خون‌ساز از قبیل کلیه و در نتیجه کاهش تعداد آنها شود (Houston, 1997). در خصوص تاثیر عوامل تنش‌زا از جمله آلاینده‌های محیطی بر شاخص‌های ثانویه خون‌شناسی ماهیان اطلاعات متناقضی منتشر شده است. به عنوان مثال مواجهه تیلاپیای موزامبیک (*Oreochromis mossambicus*) با نانوذرات اکسید آهن پس از ۹۶ ساعت سبب افزایش MCV و MCH شد (Karthikeyeni *et al*., 2013). رزم‌آرا و همکاران (۱۳۹۳) با بررسی اثرات نانوذرات نقره بر گربه‌ماهی رنگین‌کمان بیان کردند که پس از ده روز تفاوت معنی‌داری در شاخص‌های ثانویه خون‌شناسی مشاهده نمی‌شود. با این وجود کاهش شاخص‌های ثانویه خون‌شناسی در تیلاپیای نیل(*Oreochromis niloticus*) پس از مواجهه با کادمیوم مشاهده شد (Atef and Attar, 2005). مقایسه‌ی اثرات نانوذرات نقره و نیترات‌نقره در مقایسه با گروه شاهد بیانگر افزایش معنی‌دار MCV و MCH بدون تغییر معنی دار در میزان MCHC است. شاید دلیل این تغییر، نیاز ماهی به اکسیژن بیشتر تحت شرایط تنش مواجهه با نقره در آب باشد. به نظر می‌رسد ماهی برای جبران کاهش تعداد گلبول‌های قرمز خون نسبت به افزایش اندازه و محتوای هموگلوبین ذره‌ای آنها اقدام نموده است تا به این طریق ظرفیت حمل اکسیژن هر یاخته گلبول افزایش یافته و به طور موقت به عنوان پاسخ سازشی اولیه مطرح شود (Karthikeyeni *et al*., 2013). با این وجود، به نظر می‌رسد پاسخ شاخص‌های ثانویه خون‌شناسی به عوامل تنش‌زای محیطی متاثر از عوامل مختلفی همچون نوع گونه، شرایط زیستی، مدت زمان در معرض قرار گیری، نوع و غلظت آلاینده باشد. اخیراً تاثیر زمان در معرض‌گذاری و غلظت

[1] delta-aminolevulinic acid dihydrate

www.SID.ir

Archive of SID

نانوذره نقره بر تغییر ویژگی‌های بیوشیمیایی سرم و خون‌شناسی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان مورد تأکید قرار گرفته است (Imani *et al.*, 2015).

گلبول‌های سفید نقش مهمی در ایمنی غیراختصاصی ایفا می‌کنند و تعداد آن‌ها شاخصی از میزان سلامتی در ماهیان است. نتایج این تحقیق نشان داد که تعداد گلبول‌های سفید در غلظت بالای نیترات‌نقره نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری یافته است. بر اساس مطالعات صورت گرفته، تا کنون گزارش‌های اندکی مبنی بر تاثیر نانوذرات نقره بر میزان گلبول‌های سفید در ماهیان منتشر شده است لذا امکان مقایسه دقیق این نتایج با سایر مقالات وجود ندارد. به نظر می‌رسد که پاسخ فیزیولوژیک افزایش یا کاهش تعداد گلبول‌های سفید در مواجهه با آلاینده‌ها متأثر از دوره در معرض‌گذاری و شدت (غلظت) آلاینده باشد. در دراز مدت ممکن است به دلیل تأثیر نامطلوب آلاینده‌ها بر بافت‌های تامین‌کننده گلبول سفید خون، تعداد آنها کاهش یابد. به عنوان مثال رضویان و همکاران (۱۳۸۹) بیان کردند که ۶ ماه استفاده از آب حاوی نانوذرات نقره به عنوان آب آشامیدنی موش‌های صحرایی نژاد ویستار منجر به کاهش معنی‌دار گلبول‌های سفید شد که دلیل آن را مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (آپوپتوز سلولی) عنوان کرده‌اند. اغلب گزارش‌ها بیانگر کاهش تعداد گلبول‌های سفید در معرض آلودگی با فلزات سنگین نظیر کادمیوم به دلیل تخریب بافت خون‌ساز ماهی هستند از آن جمله می‌توان به گزارش‌های موجود در خصوص ماهی باس اروپایی (*Dicentrarchus labrax*) (Lemaire-Gony *et al.*, 1995) و قزل‌آلای رنگین‌کمان (Thuvander, 1989) اشاره کرد. با این وجود غلظت های مختلف کادمیوم اثر معنی‌داری بر شمارش گلبول‌های سفید در بچه‌ماهی استرلیاد نداشته است (عروجعلی و همکاران، ۱۳۹۲). علاوه بر این افزایش تعداد گلبول‌های سفید خون موش‌های تزریق شده با نانوذرات نقره نیز گزارش شده است (Naghsh *et al.*, 2012). تغییر در شمارش افتراقی گلبول‌های سفید می‌تواند به عنوان شاخصی برای ارزیابی ایمنی بدن در مواجهه با مواد آلاینده مورد استفاده قرار گیرد (Adedeji *et al.*, 2009). تغییرات ناشی از تنش می‌تواند تعادل هموستازی را به هم زده و منجر به نابسامانی‌هایی در سیستم ایمنی بدن شود. در بسیاری از موارد، تنش‌های فیزیولوژیک می‌تواند منجر به کاهش تعداد لنفوسیت‌ها و افزایش درصد نوتروفیل‌ها شود (Pickering, 1981). اخیراً افزایش درصد لنفوسیت، مونوسیت و نوتروفیل در گربه‌ماهی رنگین‌کمان پس از مواجهه با نانوذرات نقره گزارش شده است (رزم‌آرا و همکاران، ۱۳۹۳). مقایسه بین یون نقره و نانوذرات نقره نشان می‌دهد که یون نقره اثرات بیشتری بر روی گلبول‌های سفید خون داشته است. کوچک بودن یون‌نقره باعث افزایش نسبت سطح به حجم می‌شود که این باعث افزایش سطح موثر و افزایش واکنش‌پذیری یون با بافت‌های خون‌ساز و سلول‌های خونی می‌شود. با این وجود نتیجه‌گیری قطعی در این خصوص نیازمند اطلاعات تکمیلی است.

به طور کلی، اهمیت شاخص‌های خون‌شناسی به دلیل اثرپذیری آنها از تغییر شرایط فیزیکی و شیمیایی آب است، همچنین تغییر این شاخص‌ها می‌تواند بیانگر میزان سمیت آلاینده‌ها و عملکرد موجود باشد. با توجه به تغییرات ایجاد شده در شاخص‌های اولیه و ثانویه خون‌شناسی و همچنین شمارش افتراقی گلبول‌های سفید در عروس‌ماهی زاینده‌رود پس از مواجهه با نانوذرات نقره و نیترات‌نقره می‌توان به اثرات نامطلوب آنها حتی در غلظت‌های اندک پی‌برد. این تغییرات در درازمدت می‌تواند بر ساختارهای مختلف اثرگذار باشد. با توجه به اینکه بیشتر تغییرات در گروه ۲۵ میکروگرم در لیتر نیترات نقره رخ داده به نظر می‌رسد که نیترات نقره تاثیر بیشتری بر شاخص‌های خون‌شناسی در مقایسه با نانونقره داشته است؛ با این وجود نتیجه‌گیری قطعی در این خصوص نیازمند بررسی‌های تکمیلی است.

تشکر و قدردانی

هزینه‌های انجام این تحقیق از محل پژوهانه پرداختی از سوی معاونت پژوهشی دانشگاه صنعتی‌اصفهان به دکتر فاطمه پیکان حیرتی و نیز حمایت مالی ستاد فناوری نانو ریاست جمهوری در قالب پایان‌نامه دانشجویی مقطع کارشناسی ارشد رشته بوم‌شناسی آبزیان شیلاتی دانشکده منابع طبیعی دانشگاه صنعتی اصفهان تامین شده است.

منابـع

راکی، م. ۱۳۹۳. تأثیر نانوذرات و نیترات‌نقره محلول در آب بر تغییرات آسیب‌شناسی بافتی و خون‌شناسی عروس‌ماهی اصفهانی (*Petroleuciscus esfahani*). پایان‌نامه کارشناسی ارشد بوم شناسی آبزیان شیلاتی، دانشگاه صنعتی اصفهان. ۶۰ ص.

www.SID.ir

Archive of SID

رزم‌آرا، پ.، درافشان، س.، پیکان حیرتی، ف.، طالبی، م.، رنجبر، م. ۱۳۹۲. اثر نانوذرات‌نقره و نیترات نقره محلول در آب بر تغییرات بافتی آبشش گربه‌ماهی‌رنگین‌کمان *Pangasianodon hypophthalmus*. مجله بوم‌شناسی آبزیان. دوره سوم، شماره ۳، صفحات ۱۸-۱۰.

رزم‌آرا، پ.، پیکان حیرتی، ف.، درافشان، س. ۱۳۹۳. اثر نانوذرات نقره بر برخی شاخص‌های خون‌شناسی گربه‌ماهی رنگین‌کمان *Pangasianodon hypophthalmus*. مجله سلول و بافت. دوره پنجم، شماره ۳، صفحات ۲۷۲-۲۶۳.

رضویان، س. م. ح.، صفرپور، الف.، روشنایی، ک.، یزدیان، م. ر.، حیدریه، ن. ۱۳۸۹. بررسی تغییرات برخی از پارامترهای بیوشیمیایی و هماتولوژیک در خون موش‌های صحرایی نژاد ویستار به موازات مصرف خوراکی نانوذرات نقره. مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل. دوره سیزدهم، شماره ۱، صفحات ۲۷-۲۲.

شجیعی، ن. ۱۳۸۱. بررسی اثرات کادمیوم بر غلظت الکترولیت‌ها و فاکتورهای هماتولوژیک در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). پایان‌نامه کارشناسی ارشد شیلات، واحد تهران شمال. دانشگاه آزاد اسلامی. ۱۰۸ ص.

عبدلی، ع. ۱۳۷۸. ماهیان آب‌های داخلی ایران، انتشارات موزه طبیعت و حیات وحش ایران. ۱۴۶ ص.

عروجعلی، م.، پیکان حیرتی، ف.، محبوبی صوفیانی، ن.، درافشان، س. ۱۳۹۲. اثرات غلظت‌های تحت کشنده کادمیوم بر برخی شاخص‌های خون‌شناسی بچه‌ماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*). مجله علوم و فنون شیلات. دوره دوم، شماره ۲، صفحات ۲۲-۱۱.

کاظمی، ر.، پوردهقانی، م.، یوسفی جوردهی، الف.، یارمحمدی، م.، نصری تجن، م. ۱۳۸۹. فیزیولوژی دستگاه گردش خون آبزیان و فنون کاربردی خون‌شناسی ماهیان. انتشارات بازرگان. تهران. ۲۱۰ ص.

مزارعی، س.، سجادی، م.، سوری‌نژاد، الف.، جوهری، س.ع.، اسدی، م. ۱۳۹۴. تعیین غلظت کشنده نانونقره در ماهی گورخری معمولی *Aphanius dispar* (RÜppell, 1829). مجله بوم‌شناسی آبزیان. دوره چهارم، شماره ۴، صفحات ۱۱۵-۱۱۰.

Adedeji, O.B., Adeyemo, O.K., Agbede, S.A. 2009. Effects of diazinon on blood parameters in the African catfish (*Clarias gariepinus*). African Journal of Biotechnology. 8: 3940-3946.

Arora, S., Jain, J., Rajwade, J.M., Paknikar, K.M. 2008. Cellular responses induced by silver nanoparticles *In vitro* studies. Toxicology Letters. 179: 93-100.

Atef, M., Attar, A. 2005. Change in haematological parameters of the fish *Oreochromis niloticus* treated whit sub-lethal concentration of cadmium. Pakistan Journal Biological Sciences. 8: 421-424.

Blaxhall, P.C. 1972. The haematological assessment of the health of fresh water fish. Journal of Fish Biology. 4: 593-604.

Bushra, A., Niamat Ali, M., Ahmad, W. 2002. Induction of micronuclei and erythrocyte alterations in the catfish *Clarias batrachus* by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor. Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 518: 135-144.

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

Dorafshan, S., Kalbassi, M.R., Pourkazemi, M., Mojazi Amiri, B., Soltan Karimi, S. 2008. Effects of triploidy on the Caspian salmon *Salmo trutta caspius* haematology. Fish Physiology and Biochemistry. 34: 195-200.

Federici, G., Shaw, B.J., Handy, R.D. 2007. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. Aquatic Toxicology. 84: 415-430.

Grosell, M., De Boeck, G., Johannsson, O., Wood, C.M. 1999. The effects of silver on intestinal ion and acid-base regulation in the marine teleost fish, *Parophrys vetulus*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, Pharmacology, Toxicology and Endocrinology. 124(3): 259-70.

Houston, H. 1997. Review: are the classical hematological variables acceptable indicators for fish health? Transactions of the American Fisheries Society. 126: 879-894.

Hussain, S.M. Hess, K.L. Gearhart, J.M. Geiss, K.T. Schlager, J.J. 2005. *In vitro* toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. Toxicology *in Vitro*. 19: 975-983.

Imani, M., Halimi, M., Khara, H. 2015. Effects of silver nanoparticles (AgNPs) on hematological parameters of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Comparative Clinical Pathology. 24(3): 491-495.

Jee, J.H., Masroor, F. Kang, J.C. 2005. Responses of cypermethrin induced stress in haematological parameters of Korean rockfish *Sebastes schegeli*. Aquaculture Research. 36: 98-105.

Johansson, M.L., Larsson, A. 2006. The effects of cadmium on the haematology and on the activity of delta-aminolevulinic acid dihydrate (ALAD) in blood and haematopoitic tissue of the flounder (*Pleuronectes fleus*). Environmental Research. 17: 1991-2004.

www.SID.ir

Archive of SID

Johnston, H.J., Semmler-Behnke, M., Brown, D.M., Kreyling, W., Tran, L., Stone, V. 2010. Evaluating the uptake and intracellular fate of polystyrene nanoparticles by primary and hepatocyte cell lines. Toxicology and Applied Pharmacology. 242: 66-78.

Karthikeyeni, S., Siva-Vijayakumar, T., Vasanth, S., Arul Ganesh, M.M., Subramanian, P. 2013. Biosynthesis of iron oxide nanoparticles and its haematological effects on fresh water fish *Oreochromis mossambicus.* Journal Academic Indians Research.10: 645-649.

Lemaire-Gony, S., Lemaire, P., Pulsford, A.L. 1995. Effects of cadmium and benzo (a) pyrene on the immune system, gill ATPase and EROD activity of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Aquatic Toxicology. 31: 297-313.

Li, Q., Mahendra, S., Lyon, D.Y., Brunet, L., Liga, M.V., Li, D., Alvarez, P.J. 2008. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications. Water Research. 42: 4591-4602.

Mekkawy, I.A., Mahmoud, U.M., Sayed, A.H. 2011. Effects of 4-nonylphenol on blood cells of the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). Tissue and Cell Journal. 43: 223-229.

Mommsen, T.P., Vijayan, M.M., Moon, T.W. 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. Reviews in Fish Biology and Fisheries. 9: 211-268.

Naghsh, N., Noori, A., Aqababa, H., Amirkhani-Dehkordi, S. 2012. Effect of nanosilver particles on alanin amino transferase (ALT) activity and white blood cells (WBC) level in male wistar rats, *In Vivo* condition. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences. 14: 34-37.

Perelshtein, I., Applerot, G., Perkas, N., Guibert, G., Mikhailov, S., Gedanken, A. 2008. Sonochemical coating of silver nanoparticles on textile fabrics (nylon, polyester and cotton) and their antibacterial activity. Nanotechnology. 19: 245-257.

Pickering A.D. 1981. Introduction: the concept of biological stress. In: Pickering, A.D. (ed.). Stress and Fish. Academic Press. London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco. 367 p.

Radojevic, M., Baskin, V.N. 1999. Practical Environment Analysis. Royal Society of Chemistry, UK. 375 p.

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: 398-406.

Schrand, A.M., Braydich-Stolle, L.K., Schlager, J.J., Dai, L., Hussain, S.M. 2008. Can silver nanoparticles be useful as potential biological labels? Nanotechnology. 19: 235104.

Scown, T.M., Santos, E.M., Johnston, B.D., Gaiser, B., Baalousha, M., Mitov, S. 2010. Effects of aqueous exposure to silver nanoparticles of different sizes in rainbow trout. Toxicological Sciences. 115: 521-534.

Srivastava, S., Choudhary, S.K. 2010. Effect of artificial photoperiod on the blood cell indices of the catfish, *Clarias batrachus*. Journal of Stress-Physiology and Biochemistry. 6: 22-32.

Sun, L., Singh, A.K., Vig, K., Pillai, S.R., Singh, S.R. 2008. Silver nanoparticles inhibit replication of respiratory syncytial virus. Journal of Biomedical Nanotechnology. 4: 149-158.

Thuvander, A. 1989. Cadmium exposure of rainbow trout, (*Salmo gairdneri*) Richardson: effects on immune functions. Journal of Fish Biology. 35: 521-529.

www.SID.ir