

The effect of silver nanoparticles on the immune parameters and blood serum enzymes of farmed Shirbut (*Barbus grypus*)

تأثیر نانوذرات نقره بر شاخص‌های ایمنی و آنزیم‌های سرم خون ماهی شیربت (*Barbus grypus*)

Bitra Seraj¹, Mesbah Mehrzad², Paria Akbary^{1*}

1. Assistant Professor, Fisheries group, Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran
2. Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran

(Received: Jan. 31, 2017 - Accepted: Aug. 4, 2018)

بی‌تا سراج^۱، مصباح مهرزاد^۲، پریا اکبری^{۱*}

۱. استادیار، گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران
۲. استادیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۲۲ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۵/۱۳)

Abstract

In this study, in addition to the LC50 and the maximum allowable concentration, effects of silver nanoparticles on several of immune and blood serum enzymes parameters of *Barbus grypus* were determined. For this purpose, 240 shirbut, to investigate the effects of sub lethal toxicity were divided as follows- control treatment (G1), the concentration LC50 1% (0.012 mg/L AgNP) (G2), concentration LC50 2% (0.025 mg/L AgNP) (G3) and concentration LC50 4% (0.05 MG/L AgNP) (G4) and concentration LC50 8% (0.1 Mg/ L AgNP) (G5). Then on days zero, 7, 14 and 21 immune responses and serum enzymes (ALT, LDH, SGOP, SGPT) in *Barbus grypus* were measured. In the study, WBC counts increased significantly ($P < 0.05$) in G2, G3, G4 and G5 treatments compared to control (G1). Serum anti-bacterial activity was enhanced in G3 in twenty first day and G4 and G5 in 14th and 21s days in compared to control. Serum lysozyme activity enhanced significantly ($P < 0.05$) in (G4) in 14th and (G5) 14th and 21s in days compared to control. ALT and LDH Level decreased significantly in (G2), (G3), (G4) and (G5) treatments in 21s day compared to control. SGPT level decreased significantly in (G2), (G3), (G4) and (G5) in 21s day compared to control. SGOT level decreased significantly in (G3), (G4) and (G5) treatments in 21s day compared to control. According to the results of this study concentrations toxicity of nano silver increased immune responses and serum enzymes.

Keywords: Aminotransferase, *Barbus grypus*, lysozyme, Silver nanoparticles.

چکیده

در این تحقیق علاوه بر تعیین LC50 و حداکثر غلظت مجاز، تأثیر نانو ذرات نقره بر برخی شاخص‌های ایمنی و آنزیم‌های سرم خون ماهی شیربت مشخص گردید. به این منظور ۲۴۰ قطعه ماهی شیربت به صورت زیر برای بررسی اثر سمیت تحت حاد به مدت ۲۱ روز تیمار بندی شدند. ۱- تیمار شاهد، غلظت ۱ درصد (۵۰ mg/L AgNP) LC در روزهای ۰، ۷، ۱۴ و ۲۱ شاخص‌های ایمنی و آنزیم‌های سرم خون اندازه‌گیری شد. تعداد گلبول سفید در تمامی تیمارها در روز ۲۱ افزایش معنی‌داری را نسبت به تیمار شاهد نشان داد ($p < 0.05$). قدرت باکتری کشی سرم در تیمارهای ۱ درصد، ۲ درصد و ۴ درصد LC50 در روز ۲۱ و در تیمار ۸ درصد LC50 در روزهای ۱۴ و ۲۱ افزایش معنی‌داری را نسبت به تیمار شاهد نشان داد ($p < 0.05$). همچنین میزان فعالیت لیروزیم سرم در تیمار ۴ درصد LC50 در روز ۲۱ و در تیمار ۸ درصد LC50 در روز ۱۴ و ۲۱ افزایش معنی‌داری را نسبت به تیمار شاهد نشان داد ($p < 0.05$). میزان آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز (ALP) و لاکتات دهیدروژناز (LDH) در تیمار ۸ درصد LC50 در روز ۲۱ افزایش معنی‌داری پیدا کرد ($p < 0.05$). همچنین میزان آنزیم‌های گلوتامیک اگزال استیک ترانس آمیناز (SGOT) و گلوتامیک پیروویک ترانس آمیناز (SGPT) در تیمار ۲ درصد LC50 در روزهای ۱۴ و ۲۱ و در تیمارهای ۴ و ۸ درصد LC50 در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد پیدا کرد ($p < 0.05$). لذا می‌توان نتیجه گرفت که غلظت‌های تحت کشنده نانو ذرات نقره علاوه بر تأثیر مثبت بر روی شاخص‌های ایمنی سبب افزایش آنزیم‌های سرم خون ماهی شیربت می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: آمینو ترانسفرازها، بیوشیمیایی، لیروزیم، ماهی شیربت، نانو ذرات نقره.

مقدمه

استفاده از فلز نقره به‌عنوان ماده ضد باکتریایی سابقه طولانی در زندگی بشری دارد (Lansdown, 2002). نقره عنصر سفید و براق فلزی می‌باشد و در موقعیت چهل و هفتم جدول تناوبی قرار گرفته و با نماد Ag نشان داده می‌شود. نقره خالص دارای بالاترین هدایت الکتریکی و گرمایی در بین تمامی عناصر می‌باشد. از جمله کاربردهای نقره می‌توان به جواهرات، ابزار آشپزخانه، پول، آلیاژهای دندانی، عکاسی و غیره اشاره کرد (Fabrega et al., 2009; Gong et al., 2007; Peralta et al., 2010; Baun et al., 2008). ولی نانوذرات نقره بیشتر به‌خاطر اثرات ضد باکتریایی خود معروف می‌باشند و اثرات ضد باکتریایی ثابت‌شده‌ای دارند (Sharma et al., 2009). نقره به اندازه نانو به دو صورت کلی موجود است؛ الف) به‌صورت پودر، در این مورد نانو سیلور بر روی ذرات دیگر نظیر TiO_2 وجود دارد، ب) درحالت مایع، در این مورد نانوسیلور به‌صورت معلق در یک مایع (آب، گلیکول و ...) وجود دارد. با وجود تلاش‌ها برای استفاده نانوذرات نقره در صنعت آبی‌پروری و پرورش ماهیان زینتی، مطالعات بسیار محدودی در ارتباط با اثرات این مواد در ماهی انجام شده است (Griffitt et al., 2008). لذا سعی می‌شود میزان سمیت مناسب‌ترین تولید قابل حل در آب نانوذرات نقره در داخل کشور (تولید شرکت نانو نصب پارس) بر گونه ماهی شیربت (*Barbus grypus*) (نماینده ماهیان پرورشی بومی خوزستان)، مورد بررسی قرار گیرد. استفاده از نانوذرات در صنایع مختلف از جمله در مبارزه با بیماری‌ها و عوامل بیماری‌زا توسعه بی‌سابقه‌ای یافته است، در بین نانوذرات فلزی، نانوذرات نقره، با توجه به اثرات ضد باکتریایی بالا، در مبارزه با عوامل بیماری‌زا، بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند (Chae et al., 2009).

از طرفی خطرات استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد ضد باکتریایی رایج، مثل ایجاد مقاومت‌های باکتریایی، مشکلات زیست‌محیطی، انتقال مقاومت دارویی به

عوامل بیماری‌زای انسانی و هزینه بالای مصرف، باعث گرایش بیشتر محققین به مواد جایگزین شده است در سال‌های اخیر استفاده از ترکیبات حاوی نقره مثل کلوئید نقره، پوشش‌های نقره و نانوذرات نقره به‌عنوان مواد ضد باکتریایی با کارایی بالا و با عوارض جانبی کمتر در صنایع مختلف در حال گسترش است (Lansdown, 2002; Rai et al., 2009). نانوذرات نقره احتمالاً یا ایجاد اختلال در تکثیر و سیستم تنفسی باکتری‌ها باعث ایجاد اثرات ضد باکتریایی می‌گردند (Chopra, 2007; Holt & Bard, 2005; Kim et al., 2007).

آسیب به محیط زیست و تهدید بهداشت انسانی ناشی از استفاده از نانوذرات بسیار کمتر از سایر مواد با اثرات مشابه است (Sharma et al., 2009).

نانوذرات نقره در بسیاری موارد به‌عنوان جایگزین مناسب برای مواد ضد میکروبی رایج معرفی شده‌اند، حتی اخیراً تحقیقاتی در مورد امکان استفاده این نانو ذرات نقره در آبزیان انجام شده است. با وجود مزیت‌های نسبی نانوذرات نقره، تا به حال اطلاعات کمی در مورد اثر نانوذرات نقره بر روی خون ماهی گزارش شده است از جمله می‌توان به مطالعات انجام شده بر تیلاپیسای موزامبیک (*Oreochromis mossambicus*) (Karthikeyeni et al., 2013) و قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onchorhynchus mykiss*) (Federici et al., 2007) اشاره نمود. از آنجاکه کشور ایران یکی از کشورهای پیشرو در علم نانو تکنولوژی است و احتمالاً کاربرد بیشتر نانوذرات را در صنایع مختلف از جمله صنعت آبی‌پروری خواهیم داشت، در نظر است در این تحقیق غلظت‌های سمی نانوذرات نقره محلول در آب (با حامل آب مقطر) برای یک گونه ماهی پرورشی گرمابی کشور را بر اساس استانداردهای علمی محاسبه نماییم و دوز مجاز این نانوذرات برای این گونه‌ها را به‌دست آوریم و با به‌دست آوردن دوز کشنده این محلول تأثیر غلظت‌های مختلف آن را روی فاکتورهای ایمنی و آنزیم‌های سرم

قبل از استفاده به منظور کلرزدایی درون تانک های ذخیره سازی آب نگهداری شده بودند، استفاده گردید. $EC=870$ ، $pH=8/7$ ، درجه سانتی گراد، میزان اکسیژن محلول برابر ۸ میلی گرم در لیتر، میزان NH_3 و NO_2 کمتر از $0/1$ میلی گرم در لیتر و میزان NO_3 کمتر از $0/1$ میلی گرم در لیتر بود.

روش تعیین سمیت کشندگی (LC50) نانو نقره
برای تعیین سمیت نانوذرات نقره از روش استاندارد OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) راهنمای شماره ۲۰۳ (Static-renewal test condition) استفاده گردید (Banaee et al., 2004). ابتدا اقدام به انجام آزمایشات مقدماتی در سطح کوچک برای به دست آوردن حدود غلظت کشنده این ماده گردید و سپس بر اساس این اطلاعات بین ۶ تا ۸ غلظت متوالی از محلول نانوذرات نقره (در سه تکرار) از نانوذرات نقره در نظر گرفته شد (حداکثر $3 \times 2 \times 3 \times 8 = 144$ تیمار). به طوری که غلظت ایجادکننده ۱۰۰ درصد تلفات و غلظت غیر کشنده در بین این غلظت ها قرار گیرد. هر یک از غلظت های نانوذرات نقره در سه تکرار و هر تکرار در یک مخزن ۱۰ لیتری ایجاد گردید. به این منظور تعداد ۲۴۰ قطعه بچه ماهی شیریت با میانگین وزن گرم ۵۰-۳۰ گرم و اندازه ۲۰ الی ۲۵ سانتی متر از مزارع پرورش ماهی اطراف اهواز تهیه و به دانشکده دامپزشکی منتقل شدند. پس از همدماکردن آب، به هر مخزن ۱۰ قطعه ماهی به صورت تصادفی معرفی شد. هر مخزن مجهز به سیستم هوادهی جداگانه ای بود با توجه به روش مورد استفاده (Static-renewal test condition) برای جلوگیری از اثر متابولیت ها و مواد آلی دفعی ماهی و نگهداری غلظت نانوذرات نقره در حد غلظت اولیه در نظر گرفته شده، آب تمام مخازن روزانه با آب حاوی همان غلظت نانوذرات نقره تعویض می گردید. ماهی های بی حرکت و فاقد حرکت

خون ماهی شیریت (*Barbus grypus*) بررسی کنیم تا علاوه بر آگاهی از غلظت های سمی این مواد در مطالعات آینده در مورد کاربرد نانو ذرات نقره در آبی پروری، غلظت های مجاز این مواد در آب های مشروب کننده استخرهای پرورش ماهی که با فاضلاب صنایع استفاده کننده از نانوذرات آلوده می شوند، مشخص گردد. با توجه به سیاست های سازمان شیلات کشور در جهت توسعه و ترویج پرورش ماهیان بومی هر منطقه، اداره شیلات استان خوزستان در نظر دارد نسبت به توسعه پرورش ماهی شیریت در استان مبادرت ورزد. با توجه به محدود بودن پراکندگی جغرافیایی این گونه به کشورهای ایران، عراق، ترکیه و سوریه، فقدان وجود اطلاعات پایه از وضعیت ایمنی و آنزیم های سرمی ماهی مذکور به شدت احساس می شود.

با توجه به محدودیت مطالعات علمی در زمینه تأثیر نانوذرات بر آبزیان، این تحقیق با هدف ارزیابی اثر نانوذرات نقره بر سیستم ایمنی و آنزیم های سرم خون ماهی شیریت طراحی و اجراء شد.

مواد و روش ها

تهیه نانوذرات نقره

برای تهیه نانوذرات نقره از تولیدات شرکت نانونصب پارس محصول L-2000 استفاده شد. که مشخصات این محصول به قرار زیر است. این محصول به صورت مایع بوده و حاوی غلظت ۲۰۰۰ ppm نانو ذرات نقره می باشد. این محلول ضد باکتری، ضد قارچ و ضد ویروس قوی است. در انواع میکرو ارگانیسم مقاومت ایجاد نمی کند. حتی در غلظت های پایین مؤثر است. همچنین سازگار با محیط زیست بوده و در صورت تماس به پوست آسیب نمی رساند. ماده ای تیره رنگ بوده و حاوی نانوذرات نقره در حد ۱۰۰ نانومتر می باشد.

شرایط فیزیکی و شیمیایی آب مورد آزمایش

در این آزمایش از آب فیلتر شده شهری که ۲۴ ساعت

علاوه بر LC_{50} ، مقادیر کشنده دیگر شامل LC_{10} ، LC_{30} ، LC_{70} ، LC_{90} با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و آزمون استاندارد پروبیت آنالیز شد (Mohammadi, 2011).

تیمار بندی ماهی

بعد از به‌دست‌آوردن LC_{50} نانوذرات نقره برای ایجاد مسمومیت مزمن ماهی شیربت ۴ تیمار با دوزهای ۱ درصد (G2)، ۲ درصد (G3)، ۴ درصد (G4) و ۸ درصد (G5) میزان LC_{50} ۹۶ ساعته نانوذرات نقره (۰/۰۸۶ میکروگرم بر لیتر) و یک تیمار نیز به‌عنوان تیمار شاهد (G1) (در مجموع ۵ تیمار و هر کدام با ۳ تکرار) در ۱۵ آکواریوم ۲۰۰ لیتری در نظر گرفته شد (Neff, 2002)، به هر آکواریوم ۳۰ قطعه ماهی با وزن متوسط حدود ۲۵۰-۲۰۰ گرم اضافه گردید. هر سه روز یک بار آب آکواریوم‌ها با همان غلظت مواد تعویض گردید. هر سه روز یک بار آب آکواریوم‌ها با همان غلظت مواد تعویض گردید. در روزهای صفر، ۷، ۱۴ و ۲۱ از ۴ ماهی از هر تیمار نمونه خون تهیه شده و آزمایش‌های زیر روی نمونه‌ها انجام گرفت. با توجه به‌روش مورد استفاده (Static-renewal test condition) برای جلوگیری از اثر متابولیت‌ها و مواد آلی دفعی ماهی و نگهداری غلظت نانوذرات نقره در حد غلظت اولیه در نظر گرفته شده، آب تمام مخازن روزانه با آب حاوی همان غلظت نانوذرات نقره تعویض می‌گردید (Mohammadi, 2011).

خون‌گیری

از هر تیمار ۴ قطعه ماهی در فواصل زمانی ۱، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز از آکواریوم خارج نموده و پس از بیهوشی با داروی ۲- فنوکسی اتانول (۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) به روش حمام بیهوش شدند. ابتدا ماهیان را با یک حوله خشک و تمیز پاک کرده تا کاملاً آب آن گرفته شود. سپس از ناحیه ساقه دم ماهیان (Caudal vein) با استفاده از سرنگ‌های هپارینه‌شده (سرنگ ۵ سی‌سی

سرپوش آبششی مرده محسوب شده و از آب خارج می‌گردیدند ثبت تلفات به‌صورت روزانه (۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت) انجام شده و بعد از ثبت تلفات، اقدام به تعیین LC_{10} ، LC_{50} و LC_{90} ، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت با استفاده از نرم‌افزار Probit ویرایش ۱/۵ گردید. در این روش از رگرسیون بین تعداد تلفات و لگاریتم غلظت نانوذرات نقره استفاده شد (Aydın & Köprücü, 2005). برای مقایسه مقادیر و تعیین معنی‌دار بودن اختلاف بین دوز کشنده نانوذرات نقره در گونه‌های مورد بررسی از همپوشانی حدود مذکور استفاده شد (TCR, 1984) و ترسیم نمودار در فضای نرم‌افزار اکسل (۲۰۰۷) صورت گرفت.

حداکثر غلظت مجاز (Maximum acceptable concentration (MAC) با تقسیم‌نمودن غلظت ایجادکننده ۵۰ درصد تلفات در ۹۶ ساعت نانوذرات نقره در هر گونه بر عدد ۱۰ محاسبه گردید. تمامی ماهیان به‌مدت ۹۶ ساعت در غلظت‌های مورد نظر نگهداری شده و میزان مرگ‌ومیر در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت محاسبه شد (Hogstrand & Wood, 1998).

مقادیر LC_{50} و محدوده اطمینان ۹۵ درصد مطابق دستورالعمل (Boudou & Ribeyre, 1997) با روش Probit analysis مرگ‌ومیر در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ محاسبه شد (جدول ۱). در روش پروبیت لگاریتم غلظت‌های نانوذرات نقره در محور X و مقادیر پروبیت درصد مرگ‌ومیر در محور Y قرار می‌گیرد. محدوده اطمینان ۹۵ درصد با فرمول Mohapatra & Rengarajan (1995) محاسبه شد.

جدول ۱. تعداد تیمار و غلظت‌های به‌کاررفته برای تعیین

LC50 در ماهی شیربت		
نوع ماهی	تعداد تیمارها	غلظت نانو ذرات مورد استفاده (µg/ml)
شیربت	۷	صفر، ۰/۱۵، ۰/۳، ۰/۶، ۰/۲۵، ۰/۵

پلیت الیزا مخلوط گردید و جذب نوری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در زمان‌های ۱ و ۶ دقیقه بعد از مخلوط‌سازی در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. فعالیت لیزوزیم باعث تخریب باکتری و کاهش جذب نوری گردید. میزان فعالیت لیزوزیم سرم و مخاط با توجه به منحنی استاندارد میزان فعالیت لیزوزیم سفیده تخم مرغ سیگما تعیین گردید.

بررسی قدرت باکتری‌کشی سرم

برای اندازه‌گیری قدرت باکتری‌کشی سرم از روش توصیه‌شده توسط *Kajita et al.* (1990) با کمی تغییرات استفاده گردید. ابتدا باکتری آئروموناس هیدروفیلا به مدت ۴۸ ساعت در محیط TSB کشت داده شد و سپس سلول‌های باکتریایی با سانتریفوژ ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه جمع‌آوری و با افزودن مقداری بافر فسفات سدیم استریل به آن‌ها جذب نوری سوسپانسیون حاصله در طول موج ۵۴۰ نانومتر برابر ۱ تنظیم گردید. تعداد باکتری در سوسپانسیون حاصل شمارش شده و با استفاده از روش تهیه رقت‌های متوالی بر مبنای ۱۰، سوسپانسیون 10^5 باکتری در میلی‌لیتر در ژلاتین ورونال بافر استریل (pH= ۷/۵) و حاوی ۰/۵ میلی‌مول در میلی‌لیتر یون کلسیم و ۰/۱۵ میلی‌مول در میلی‌لیتر یون منیزیم) تهیه گردید.

نمونه‌های سرمی به نسبت ۱:۳ با بافر فوق رقیق گردیدند. سوسپانسیون باکتریایی حاصل به نسبت ۱:۱ با سرم رقیق شده ترکیب شده و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با حرکت ملایم انکوبه گردیدند. سپس ۵ میکرولیتر از مخلوط سرم و باکتری در محیط کشت TSA در سه تکرار کشت داده شد. محیط‌های کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیده و سپس به کمک دستگاه کلونی کانتز تعداد پرگنه باکتریایی رشدیافته در روی محیط کشت شمارش گردید. نتایج به صورت متوسط تعداد باکتری شمارش شده در سه تکرار برای

و سرسوزن شماره ۲۱) خون‌گیری صورت گرفت و پس از خون‌گیری نمونه به دو قسمت تقسیم گردید، یک بخش برای مطالعات خون‌شناسی مورد استفاده قرار گرفت و بخش دوم در لوله‌های آزمایش فاقد ماده ضد انعقاد جمع‌آوری گردید. نمونه‌های خون فاقد ماده ضد انعقاد پس از لخته شدن به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و پس از تفکیک سرم از سلول‌های خون، سرم آن برای اندازه‌گیری فاکتورهای خونی و بیوشیمیایی برداشت گردید. نمونه سرم در میکروتیوب‌های ۲/۵ میلی‌لیتری تخلیه و تا زمان انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی در فریزر منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (*Ademuyiwa et al.*, 2007).

شمارش کلی گلبول‌های سفید

شمارش کلی گلبول‌های سفید به روش مستقیم (هماسیتومتر) با رقیق کردن خون به نسبت ۱ به ۲۰۰ با محلول رقیق‌کننده نات-هریک صورت گرفت. برای این کار و پس از انتقال نمونه رقیق‌شده به لام هماسیتومتر تعداد گلبول‌های سفید در ۹ مربع بزرگ اولیه شمارش می‌گردید و سپس تعداد کل گلبول‌های سفید در میلی‌متر مکعب خون با استفاده از فرمول زیر محاسبه می‌گردید (*Thrall*, 2004).

= تعداد کل گلبول‌های سفید در میکرولیتر خون

$$200 \times (10 \text{ درصد} + \text{تعداد کل گلبول‌های سفید})$$

شمارش شده در ۹ مربع بزرگ)

اندازه‌گیری لیزوزیم سرم

برای اندازه‌گیری میزان فعالیت لیزوزیم و سرم از روش کدورت‌سنجی که توسط *Ellis* (1990) توصیه شده است با مقداری تغییرات استفاده گردید. در این روش ابتدا ۱۰ میکرولیتر از سرم نمونه با ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر باکتری میکروکوکوس لیزودایکتیکوس (سیگما) در بافر فسفات سدیم ۰/۰۵ مولار (pH=۶/۲) در گوده‌های

هر نمونه مشخص شده و تعداد باکتری شمارش شده در هر تیمار نسبت به تیمار شاهد مقایسه گردید.

نموده و جذب نوری کووت تست‌ها قرائت گردید (Kaneko, 1989).

اندازه‌گیری آنزیم‌های سرمی اندازه‌گیری آلکالین فسفاتاز

دو لوله آزمایش انتخاب کرده به هر یک ۱ میلی‌لیتر سوپسترای بافری (۱۰۰ میلی‌لیتر پارانیتروفیل فسفات دی سدیم + ۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر + ۲۵ میلی‌لیتر بافر گلی سین) ریخته و در بن ماری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. به لوله بلانک ۰/۱ میلی‌لیتر آب مقطر و به لوله تست ۰/۱ میلی‌لیتر سرم اضافه شد. محتویات لوله‌ها بخوبی مخلوط گردید و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت. سپس به هر یک از لوله‌ها ۱۰ میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم ۰/۰۲ نرمال اضافه و به‌خوبی مخلوط شد. جذب نوری لوله‌های تست در مقابل بلانک در طول موج ۴۱۰ نانومتر قرائت گردید (Keneko, 1989).

اندازه‌گیری اسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) یا گلوکات اگزال استات ترانس آمیناز (GOT) به‌استثنای سوپسترا (۰/۲۹۲ گرم اسید آلفا کتوگلوئاریک + ۱/۷۸ گرم از دی ال آلانین + ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر) همانند سنجش GPT است (Keneko, 1989).

اندازه‌گیری لاکتات دهیدروژناز (LDH)

طول موج اسپکتروفتومتر را روی ۳۴۰ نانومتر قرار داده و جذب نوری را با آب مقطر صفر کرده دمای سوپسترا (۱/۲۵ میلی‌لیتر اسید ال لاکتیک + ۵/۹۷ گرم پیروفسفات سدیم + ۹/۵ میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم ۱ نرمال + ۰/۸۹ گرم نیکوتینامید آدنین دی نوکلئوتید) به ۳۲ درجه سانتی‌گراد رسانده شد سپس ۰/۲ میلی‌لیتر سرم به آن اضافه شد و مخلوط گردید و جذب نوری در طول موج ۳۴۰ نانومتر قرائت گردید (Annino & Gese, 1976).

اندازه‌گیری آلانین آمینوترانسفراز (ALT) یا گلوکات پیروات ترانس آمیناز (GPT)

یک میلی‌لیتر سوپسترا (۰/۵۸۴ گرم اسید آلفا گلوئاریک + ۵/۳۲ گرم اسید دی ال اسپارتیک + ۴۰ میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم ۱ نرمال + چند قطره کلروفورم) به داخل دو کووت اضافه کرده و دمای آنها را به ۳۷ درجه سانتی‌گراد رسانده سپس ۰/۲ میلی‌لیتر سرم را به داخل کووت تست و ۰/۲ میلی‌لیتر آب را به داخل کووت بلانک ریخته و محتویات کووت به‌خوبی مخلوط گردید. و یک ساعت در بن ماری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. ۱ میلی‌لیتر معرف رنگی (۰/۳۹۶ گرم دی نیترو فیل هیدرازین + ۲۰۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک نرمال) به کووت ها اضافه شد و سپس ۲۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق قرار گرفتند. ۱۰ میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم ۰/۴ نرمال به آنها اضافه و مخلوط گردید. بعد از ۵ دقیقه جذب نوری لوله بلانک را در طول موج ۵۰۵ نانومتر روی عدد ۰/۲۵ تنظیم

آنالیز آماری

برای آنالیز اطلاعات از نرم‌افزار SPSS 16 استفاده گردید. نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون کالموگراف اسمیرنف همچنین برابری واریانس‌ها نیز توسط تست لون مورد بررسی قرار گرفت. از One Way ANOVA برای بررسی تفاوت میانگین بین تیمارهای تحقیق استفاده گردید. برای بررسی معنی‌دار بودن تفاوت میانگین‌ها از تست تکمیلی Duncan در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ استفاده شد پارامترهای ایمنی سرم خون شامل تعداد کلی گلبول‌های سفید، میزان قدرت باکتری‌کشی سرم خون، میزان فعالیت لایزوزیم سرم خون و همچنین میزان آنزیم‌های سرم خون شامل LDH، ALP، SGOT و SGPT به روش‌های متداول آزمایشگاهی مورد سنجش و تجزیه و تحلیل

شده است. حداکثر غلظت مجاز نانو ذرات نقره در ماهی شیربت در ۹۶ ساعت برابر با ۰/۱۲۷ میکروگرم بر میلی لیتر بود.

قرار گرفت. نمودارها و جدول های آماری با استفاده از نرم افزار اکسل ترسیم شد.

نتایج

نتایج مربوط به تعیین سمیت نانوذرات نقره در ماهی شیربت در زمان های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت در جدول ۲ آورده شده است. LC50 در ۹۶ ساعت بعد از مجاورت با نانوذرات نقره برابر ۰/۱۲۷ میکروگرم بر لیتر بود.

جدول ۳. حداکثر غلظت مجاز و سمیت نانوذرات نقره در ماهی شیربت (با اطمینان ۹۵٪) در ماهی شیربت با حدود بالا و پایین بعد از ۹۶ ساعت مجاورت

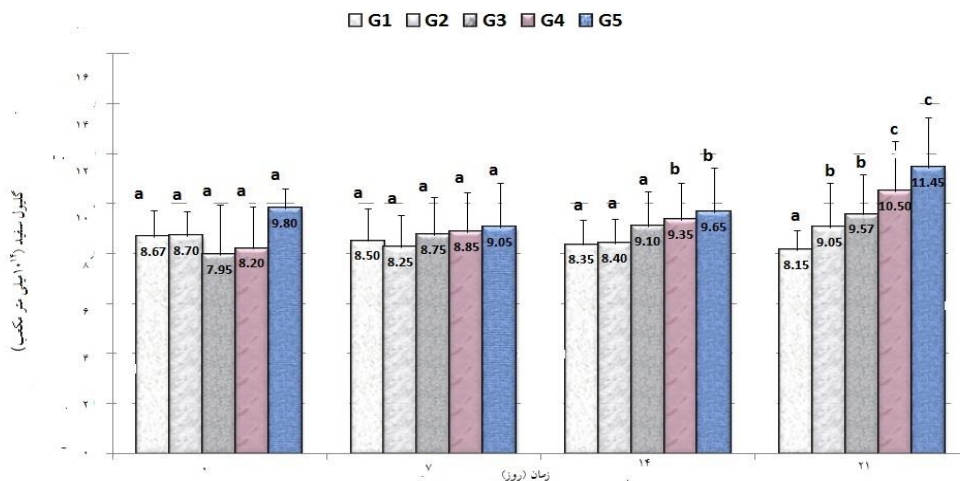
حد بالا	حد پایین	حداکثر غلظت مجاز (MAC μ g/l)	LC ₅₀ ۹۶ ساعته
۰/۱۸۵	۰/۰۸۸	۰/۰۱۳	۰/۱۲۷

جدول ۲. میزان سمیت نانوذرات نقره در ماهی شیربت در زمان های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بعد از مجاورت

غلظت کشنده	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
LC ₁₀	۰/۱۲۹	۰/۰۵۸	۰/۰۳۹	۰/۰۳۴
LC ₅₀	۰/۱۸۸	۰/۱۳۱	۰/۲۰۵	۰/۱۲۷
LC ₉₀	۲/۷۳	۲/۳۱۹	۲/۲۹۴	۱/۲۵۸
LC ₉₉	۲/۹۹	۲/۴۷۱	۲/۴۷۳	۱/۴۵۸

تغییرات میزان میانگین تعداد گلبول سفید در تیمارهای مختلف در زمان های مختلف نمونه گیری در شکل ۱ آورده شده است. تعداد گلبول سفید ماهی در تیمارهای G4 و G5 در روزهای ۱۴ و ۲۱ و در تیمارهای G2 و G3 در روز ۲۱ نسبت به روز صفر افزایش معنی داری یافت ($P < 0.05$). با افزایش میزان دوز و همچنین با افزایش مدت طول تماس ماهی با نانو ذرات نقره تعداد گلبول سفید خون افزایش یافت و بیشترین میزان تعداد گلبول سفید، در روز ۲۱ و مربوط به تیمار G5 مشاهده شد.

حداکثر غلظت مجاز و سمیت نانوذرات نقره در ماهی شیربت (با اطمینان ۹۵ درصد) با حد بالا و پایین بعد از ۹۶ ساعت مجاورت، در جدول ۳ آورده



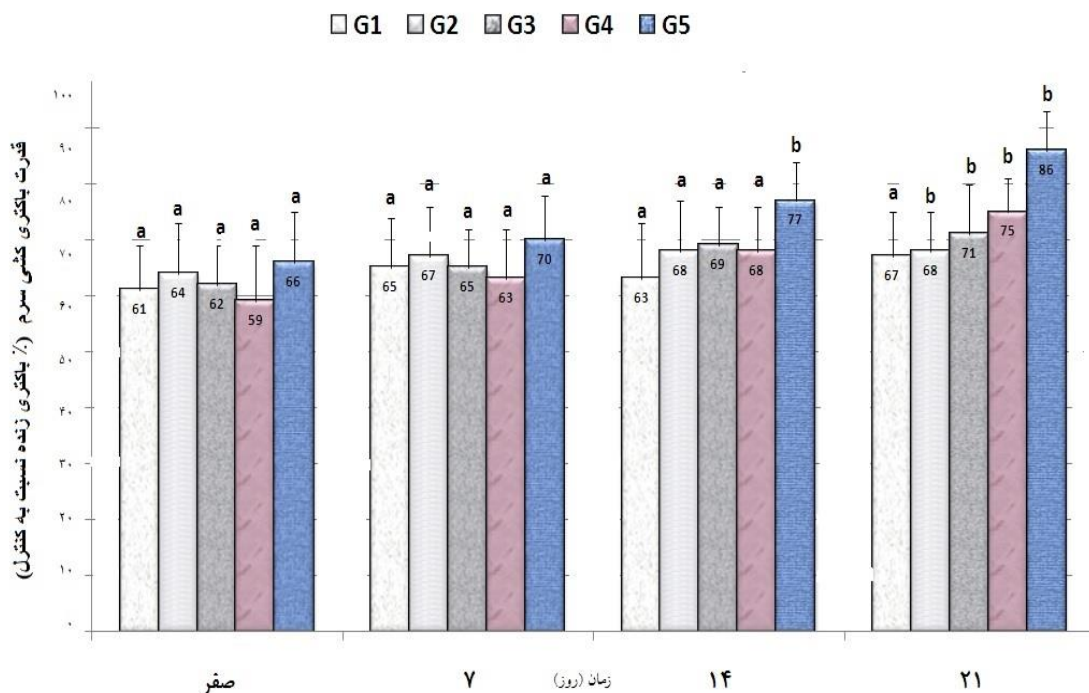
شکل ۱. تغییرات میزان میانگین (±خطای استاندارد) تعداد گلبول سفید در تیمارهای مختلف در زمان های مختلف نمونه گیری. حروف نامشابه نشان دهنده تفاوت معنی دار می باشد ($P < 0.05$). تیمار G1، G2، G3، G4 و G5 به ترتیب حاوی ۰، ۱، ۲، ۴ و ۸ درصد غلظت LC50 در ۹۶ ساعت بعد از مجاورت با نانوذرات نقره (۰/۱۲۷ میکروگرم بر لیتر) می باشد.

تغییرات میانگین آلکالین فسفاتاز در تیمارهای مختلف در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری در شکل ۴ نشان داده شده است. تنها در تیمار G5 در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ افزایش معنی‌داری در میزان آلکالین فسفاتاز نسبت به روز صفر مشاهده شد ($P < 0.05$).

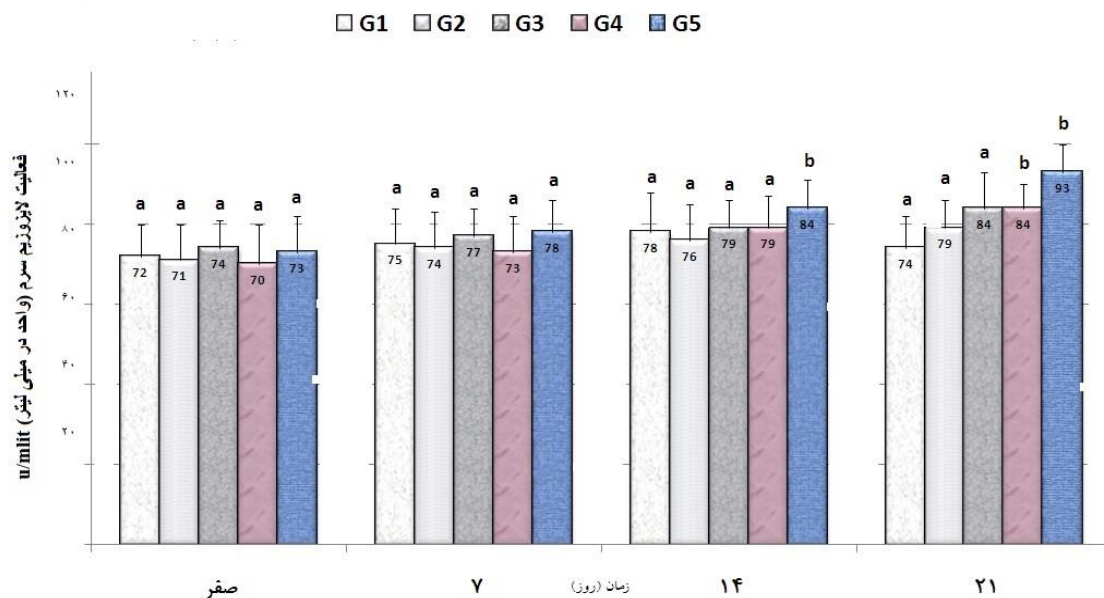
تغییرات میانگین لاکتات دهیدروژناز در تیمارهای مختلف در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری در نمودار ۵ نشان داده شده است. در تیمار G5 در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ افزایش معنی‌داری نسبت به روز صفر مشاهده شد ($P < 0.05$). همچنین میزان آن در تیمار G3 در روز ۱۴ افزایش معنی‌داری نسبت به سایر زمان‌های نمونه‌گیری را نشان داد ($P < 0.05$). در بررسی سایر تیمارها نیز اگرچه در ابتدا میزان آنزیم لاکتات دهیدروژناز، افزایش یافته است ولی در انتهای دوره کاهش نسبی را نشان داد که نسبت به گروه کنترل معنی‌دار نبود ($P > 0.05$).

تغییرات میانگین قدرت باکتری‌کشی در تیمارهای مختلف در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری در شکل ۲ نشان داده شده است. قدرت باکتری‌کشی سرم در تیمار G5 در روزهای ۱۴ و ۲۱ و در سایر تیمارها به جز تیمار G1 در روز ۲۱ به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0.05$). با افزایش طول مدت تماس ماهی با نانوذرات نقره و همچنین افزایش غلظت میزان قدرت باکتری‌کشی افزایش یافت. بیشترین میزان افزایش در تیمار G5 و در روز ۲۱ مشاهده شد.

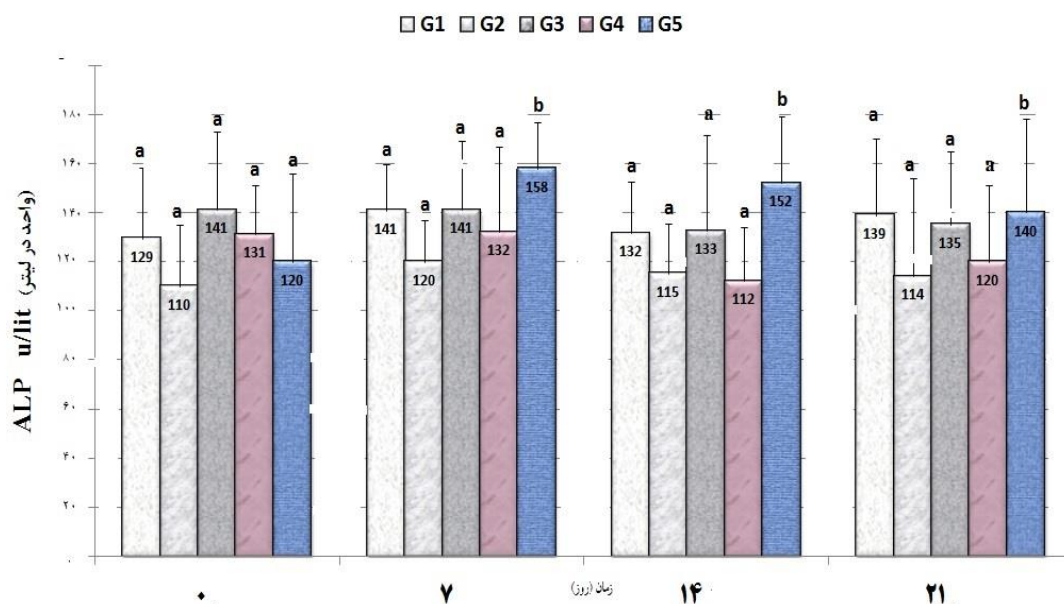
تغییرات میانگین فعالیت لیزوزیم در تیمارهای مختلف در زمان‌های مختلف برداری در شکل ۳ نشان داده شده است. میزان فعالیت لیزوزیم سرم در تیمار G5 در روزهای ۱۴ و ۲۱ و در تیمار G4 در روز ۲۱ نسبت به روز صفر افزایش معنی‌داری را نشان داد ($P < 0.05$). بیشترین فعالیت لیزوزیم از نظر عددی در تیمار G5 مشاهده شد.



شکل ۲. تغییرات میزان میانگین (\pm خطای استاندارد) قدرت باکتری‌کشی در تیمارهای مختلف در زمان‌های مختلف نمونه‌گیری. حروف نامشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار می‌باشد ($P < 0.05$). تیمار G1، G2، G3، G4 و G5 به ترتیب حاوی ۰، ۱، ۲، ۴ و ۸ درصد غلظت LC50 در ۹۶ ساعت بعد از مجاورت با نانوذرات نقره (۰/۱۲۷ میکروگرم بر لیتر) می‌باشد.



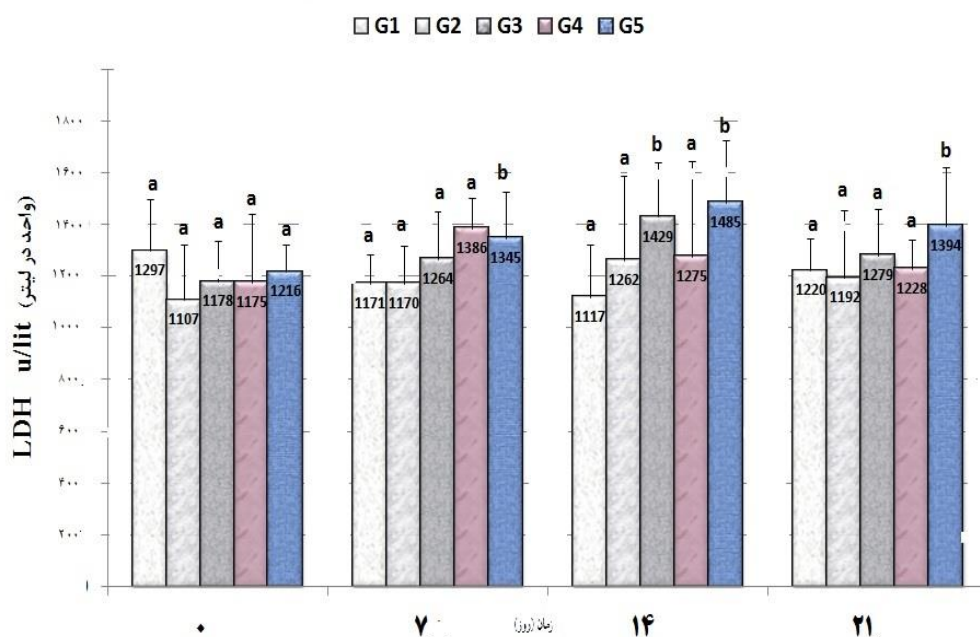
شکل ۳. تغییرات میزان میانگین (±خطای استاندارد) فعالیت لیزوزیم در تیمارهای مختلف در زمان های مختلف نمونه گیری. حروف نامشابه نشان دهنده تفاوت معنی دار می باشد ($P < 0.05$). تیمار G1, G4, G3, G4, G5 به ترتیب حاوی ۰، ۱، ۲، ۴ و ۸ درصد غلظت LC50 در ۹۶ ساعت بعد از مجاورت با نانوذرات نقره (۰/۱۲۷ میکروگرم بر لیتر) می باشد.



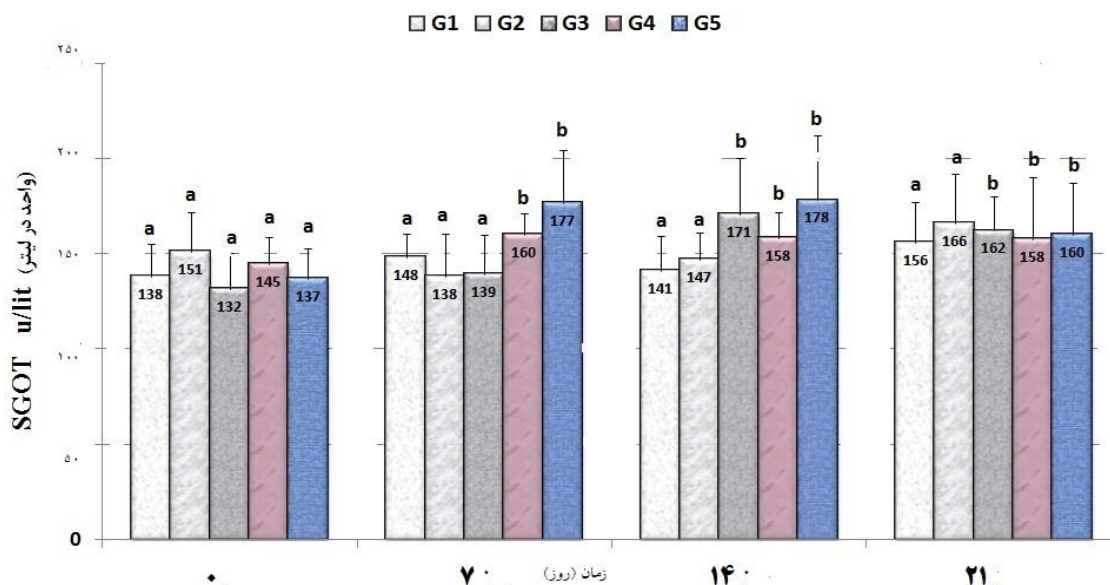
شکل ۴. تغییرات میزان میانگین (±خطای استاندارد) آلکالین فسفاتاز در تیمارهای مختلف در زمان های مختلف نمونه گیری. حروف نامشابه نشان دهنده تفاوت معنی دار می باشد ($P < 0.05$). تیمار G1, G4, G3, G4, G5 به ترتیب حاوی ۰، ۱، ۲، ۴ و ۸ درصد غلظت LC50 در ۹۶ ساعت بعد از مجاورت با نانوذرات نقره (۰/۱۲۷ میکروگرم بر لیتر) می باشد.

GOT در تیمار G3 در روزهای ۱۴ و ۲۱ و در تیمارهای G4 و G5 در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ افزایش معنی داری نسبت به روز صفر نشان داد ($P < 0.05$).

تغییرات میانگین گلوکات اگزال استیک ترانس آمیناز (GOT) در تیمارهای مختلف در زمان های مختلف نمونه برداری در شکل ۶ آورده شده است. میزان آنزیم



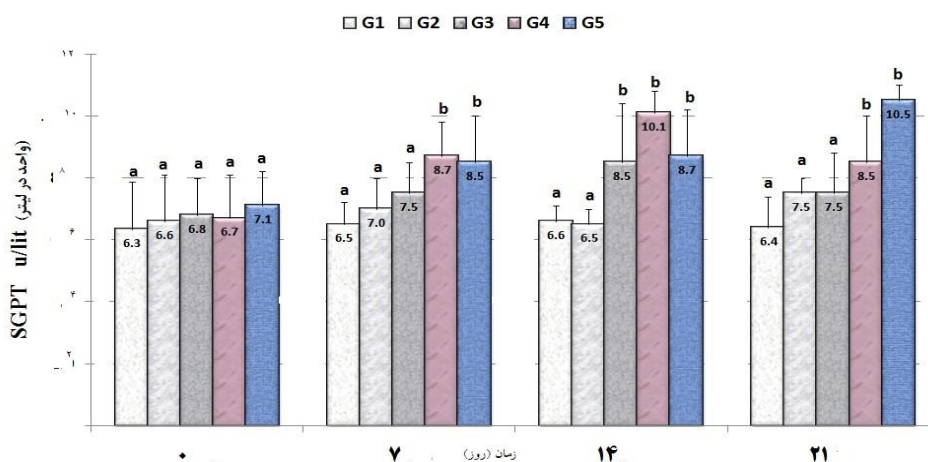
شکل ۵. تغییرات میزان میانگین (\pm خطای استاندارد) لاکتات دهیدروژناز در تیمارهای مختلف در زمان‌های مختلف نمونه‌گیری. حروف نامشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار می‌باشد ($P < 0.05$). تیمار G1، G3، G4، G5 به ترتیب حاوی ۰، ۱، ۲، ۴ و ۸ غلظت LC50 در ۹۶ ساعت بعد از مجاورت با نانوذرات نقره (۰/۱۲۷ میکروگرم بر لیتر) می‌باشد.



شکل ۶. تغییرات میزان میانگین (\pm خطای استاندارد) گلوکات اگزال استیک ترانس آمیناز در تیمارهای مختلف در زمان‌های مختلف نمونه‌گیری. حروف نامشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار می‌باشد ($P < 0.05$). تیمار G1، G3، G4، G5 به ترتیب حاوی ۰، ۱، ۲، ۴ و ۸ غلظت LC50 در ۹۶ ساعت بعد از مجاورت با نانوذرات نقره (۰/۱۲۷ میکروگرم بر لیتر) می‌باشد.

GPT در تیمارهای G4 و G5 در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ و در تیمار G3 در روز ۱۴ افزایش معنی‌داری نسبت به روز صفر مشاهده شد ($P < 0.05$).

تغییرات میانگین گلوکاتامات پیرووات ترانس آمیناز (GPT) در تیمارهای مختلف در زمان‌های مختلف نمونه برداری در شکل ۷ مشاهده شد. میزان آنزیم



شکل ۷. تغییرات میزان میانگین (\pm خطای استاندارد) گلو تامات پیرووات ترانس آمیناز در تیمارهای مختلف در زمان های مختلف نمونه گیری. حروف نامشابه نشان دهنده تفاوت معنی دار می باشد ($P < 0.05$). تیمار G1, G4, G3, G4 و G5 به ترتیب حاوی ۰، ۱، ۲، ۴ و ۸ غلظت LC50 در ۹۶ ساعت بعد از مجاورت با نانوذرات نقره (۰/۱۲۷ میکروگرم بر لیتر) می باشد.

با اندازه ذرات نزدیک با نانوذرات تحقیق جاری در ماهی مداکای ژاپنی (*Oryzias latipes*) ۵۰ میلی گرم در لیتر بعد از ۲۴ ساعت بود. که مقاومت بالایی نسبت با سمیت این ماده می باشد. اندازه ذرات نانو در با سمیت آنها مرتبط است و هرچه اندازه ذرات نانو کوچک تر باشد کارایی آنها بیشتر و سمیت آنها نیز بالاتر خواهد بود به طوری که Choi et al. (2010) در تحقیقی دوز کشنده نانو ذرات نقره با اندازه ۲۰ نانو متر را طی ۲۴ ساعت، در ماهی گورخری (*Aphanius vladykovi*) ۱۲۰ میلی گرم در لیتر گزارش نمودند. همچنین استفاده از نانوذرات نقره در اندازه بزرگ تر در ماهی قزل آلا نیز کاهش سمیت با به دنبال داشته است به طوری که Bilberg et al. (1997) دوز کشنده نانو ذرات نقره با سایز ۱۵۰ نانومتر را در ماهی قزل آلا رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در حدود ۱۰ تا ۱۰۰ میلی گرم گزارش نمودند. علی رغم ویژگی های مناسب نانوذرات نقره، به ویژه اثرات ضد باکتریایی و ضد ویروسی، که در تحقیقات مختلف گزارش شده است در این تحقیق مشخص شد که علاوه بر تأثیر مثبت این نانو ذره بر روی فاکتورهای ایمنی، دارای اثراتی بر روی میزان آنزیم های سرمی نیز می باشد.

بحث و نتیجه گیری

نتایج تحقیق جاری نشان داد که نانوذرات نقره L-2000 دارای سمیت بالایی در ماهی شیریت (*Barbus grypus*) بوده و غلظت ایجادکننده ۵۰ درصد تلفات (LC50) بعد از مجاورت ۹۶ ساعته با L-2000 برای ماهی شیریت برابر ۰/۱۲۷ میلی گرم در لیتر مشخص گردید. سمیت نانوذرات مختلف در گونه های اقتصادی ماهی در تحقیقات مختلف اندازه گیری شده است که از آن جمله می توان به موارد زیر اشاره نمود: Shabzadeh et al. (2009) غلظت نوعی نانو ذرات نقره در ماهی قزل آلا (*Oncorhynchus mykiss*) را حدود ۵ میلی گرم در لیتر گزارش نمودند که نشان دهنده مقاومت بالاتر ماهی قزل آلا نسبت به ماهی شیریت به نانوذرات نقره می باشد. همچنین Bar Ilan et al. (2009) نیز سمیت نانوذرات نقره و طلا را در جنین ماهی زبرا (*Danio rerio*) مطالعه و سمیت بالای نانوذرات نقره را در این ماهی گزارش نمودند، در صورتی که نانوذرات طلا فاقد سمیت برای این ماهی بود. که البته در نانوذرات طلا به علت قدرت ضد باکتریایی پایین و قیمت بالا، کاربرد زیادی در ضد عفونی کننده ها ندارند. Chae et al. (2009) در گزارشی اعلام کردند که غلظت کشنده نانو ذرات نقره

LDH، SGOT، SGPT میزان آنزیم ALP فقط در تیمار G5 و در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ افزایش معنی‌داری نسبت به روز صفر یافت ($p < 0.05$) و در سایر تیمارها میزان آنزیم از نظر عددی ابتدا افزایش و سپس کاهش نسبی یافت که معنی‌دار نبود. میزان آنزیم LDH در تیمار G5 در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ افزایش معنی‌داری نسبت به روز صفر یافت ($p < 0.05$). همچنین در تیمار G3، در روز ۱۴ افزایش معنی‌داری نسبت به سایر زمان‌های نمونه‌گیری مشاهده شد ($p < 0.05$). میزان آنزیم SGOT در تیمار G3 در روزهای ۱۴ و ۲۱ و در تیمارهای G4 و G5 در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ افزایش معنی‌داری نسبت به روز صفر یافت ($p < 0.05$). همچنین میزان آنزیم SGPT در تیمارهای G4 و G5 در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ و در تیمار G3 در روز ۱۴ افزایش معنی‌داری نسبت به روز صفر مشاهده شد ($p < 0.05$).

نتایج فوق نشان می‌دهد، با افزایش طول مدت تماس ماهی با نانوذرات نقره و همچنین افزایش غلظت نانونقره میزان آنزیم‌های سرم افزایش می‌یابد و کاهش نسبی در میزان آنزیم‌ها در انتهای دوره در اثر آداپته شدن ماهی می‌باشد. در تحقیقی که بر روی سم دیازینون در ماهی بنی انجام شد میزان آنزیم‌های سرمی شامل ALP و LDH افزایش معنی‌داری داشته ولی سایر آنزیم‌ها کاهش و یا افزایش خاصی نداشتند (Mohammadi, 2011). همچنین در مطالعه‌ای که Farkas *et al.* (2009) بر روی سلول‌های کبد ماهی (*Oncorhynchus mykiss*) انجام داد مشخص گردید که نانوذرات نقره باعث آسیب کبدی و همچنین کاهش متابولیت‌های داخل سلولی، سلول‌های کبدی می‌شود.

با توجه به نتایج این تحقیق، با افزایش میزان غلظت و همچنین با افزایش مدت طول تماس ماهی با نانو ذرات نقره تعداد گلبول سفید خون و قدرت باکتری کشی افزایش یافت و بیشترین میزان تعداد گلبول سفید، قدرت باکتری‌کشی، لیزوزیم، آلکالین

تأثیر غلظت‌های تحت کشنده نانوذرات نقره بر فاکتورهای ایمنی ماهی شیربت باعث افزایش فاکتورهای ایمنی گردید به طوری که تعداد گلبول‌های سفید در تیمارهای G4 و G5 در روزهای ۱۴ و ۲۱ و در تیمارهای G2 و G3 در روز ۲۱ نسبت به روز صفر افزایش معنی‌داری یافت ($p < 0.05$). میزان فعالیت لیزوزیم سرم در تیمار G5 در روزهای ۱۴ و ۲۱ و در تیمار G4 در روز ۲۱ نسبت به روز صفر افزایش معنی‌داری را نشان داد ($p < 0.05$). همچنین قدرت باکتری کشی سرم در تیمار G5 در روزهای ۱۴ و ۲۱ و در سایر تیمارها به جزء تیمار G1 در روز ۲۱ به طور معنی‌داری افزایش یافت ($p < 0.05$). Gopalakannan & Arul (2006) افزایش تعداد لکوسیت‌ها را در افزودن کیتین، کیتوزان و لوامیزول به تغذیه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) گزارش دادند. همچنین در مطالعات متعددی اثرات ضد باکتریایی مناسب نانوذرات نقره بر باکتری اشرشیا کولی و برخی باکتری‌های بیماری‌زای انسانی گزارش شده است. لیزوزیم پروتئینی با ارزش در ماهی است که یکی از اجزای مهم ایمنی غیر اختصاصی ماهی بوده و باعث تخریب جدار باکتری‌ها، فعال‌سازی کمپلمان و افزایش فعالیت بیگانه‌خواری، به‌عنوان اپسونین، در ماهی می‌گردد. افزایش فعالیت لیزوزیم بعد از تجویز محرک‌های ایمنی، واکنش‌ها و برخی پروبیوتیک‌ها در ماهی گزارش گردیده است. همچنین افزایش فعالیت لیزوزیم سرم در ماهی (*Pseudosciaena crocea*) و ماهی کپور معمولی بعد از تجویز محرک‌های ایمنی گزارش شده است. قدرت باکتری کشی سرم بیشتر تحت تأثیر میزان و فعالیت پروتئین‌های موجود در سرم می‌باشد این پروتئین‌ها در سرم افزایش تخریب عوامل میکروبی را به صورت غیر اختصاصی باعث شده و باعث افزایش قدرت پاسخ ایمنی ماهی می‌شوند (Choi *et al.*, 1990; Raa *et al.*, 1992; Kajita *et al.*, 2010). در مورد آنزیم‌های سرمی، سرم شامل ALP،

در کل می توان گفت که استفاده از نانوذرات نقره در دوزهای بالا، سمیت نسبتاً بالایی در ماهی شیربت داشته اگرچه دارای خواص ضد باکتریایی بوده و سیستم ایمنی را تقویت می کند ولی چون باعث القای برخی تغییرات استرسی در فاکتورهای سرمی ماهی می گردند. لذا در استفاده از این نانوذرات باید با دوزهای اعلام شده از طرف مراکز علمی توجه نموده و حتی الامکان زمان مصرف نانوذرات نیز حداقل باشد. در ضمن استفاده زیاد نانوذرات می تواند به عنوان تهدیدی برای محیط زیست مطرح باشد.

فسفاتاز و لاکتات دهیدروژناز در روز ۲۱ و مربوط به تیمار G5 مشاهده شد. با افزایش میزان آنزیم های SGPT و SGOT در تیمارهای G4 و G5 در روز ۲۱ می توان بیان نمود که نانو ذرات نقره می تواند باعث آسیب کبدی و همچنین کاهش متابولیت های داخل سلولی، سلول های کبدی شود. از آنجاکه غلظت های بالای نانوذرات نقره سمیت بیشتری را برای ماهی شیربت ایجاد نمود می توان گفت که ماهی شیربت در مقایسه با سایر گونه ها مقاومت بالایی را نشان می دهد.

REFERENCES

- Ademuyiwa, O.; Ugbaja, R.; Rotimi, S.; Abam, E.; Okediran, B.; Dosumu, O.; Onunkwor, B. (2007). Erythrocyte acetylcholinesterase activity as a surrogate indicator of lead-induced neurotoxicity in occupational lead exposure in Abeokuta, Nigeria. *Environ. Toxicol. Pharmacol*; 24: 183-188.
- Annino, J.S.; Gese, R.S. (1976). Clinical chemistry principle and procedures .Fourth edition. Little Brown and Company Boston.
- Aydın, R.; Köprücü, K. (2005). Acute toxicity of diazinon on the common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryos and larvae. *Pestic. Biochem. Physiol*; 82, 220-225.
- Banaee, M.; Mirvaghefi, A.R.; Rafei, G.R.; Majazi Amir, B. (2008). Effects of sub-lethal diazinon concentration on blood plasma biochemistry, *International Journal Environmental Research*; 2; 189-198.
- Bar-Ilan, O.; Albrecht, R.M.; Fako, V.E.; Furgeson, D.Y. (2009). Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in zebra fish embryos *Small*; 5(16): 1897-1910.
- Baun, A.; Hartmann, N.B.; Grieger, K.; Kusk, K.O. (2008). Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: a brief review and recommendations for future toxicity testing, *Ecotoxicology*; 17: 387-395.
- Bilberg, K.; Malte, H.; Wang, T.; Baatrup, E. (2010). Silver nanoparticles and silver nitrate cause respiratory stress in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*). *Aquat Toxicol*; 96: 32-38.
- Boudou, A.; Ribeyre, F. (1997). Aquatic ecotoxicology: From the ecosystem to the cellular and molecular levels. *Environmental Health Perspectives*; 105: 21-35.
- 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(4): 320-327.
- Chen, X.; Schluesener, H.; Nanosilver, J. (2008). A nanoparticle in medical application. *Toxicology Letters*; 176 (1): 1-12.
- Choi, O.; Yu, C.Y.; Fernández, E.; Choi, Z.H. (2010). Interactions of nanosilver with *Escherichia coli* cells in planktonic and biofilm cultures, *Water Res.*, doi:10.1016/j.watres.2010.06.069.
- Chopra, I. (2007). The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: A useful development or a cause for concern? *Journal of Antimicrobial chemotherapy*; 59 (4): 587-590.

- Ellis, A.E. (1990). Lysozyme assay. In: Stolen, J.S.; Fletcher, D.P.; Anderson, B.S.; Robertson, B.S. (Eds.), *Techniques in Fish Immunology*. SOS Publication, Fair Haven, NJ, pp. 101-103
- Fabrega, J.; Fawcett, S.R.; Renshaw, J.C.; Lead, J.R. (2009). Silver nanoparticle impact on bacterial growth: effect of pH, concentration, and organic matter. *Environ Sci Technol*; 43: 7285-90.
- Farkas, J.; Christianc, P.; Alberto, A.; Urread, G.; Roose, N.; Hassellvd, M.; Tollefsena, K.E.V.; Thomasa, K. (2009). Effects of silver and gold nanoparticles on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic Toxicology*; 96: 44-52.
- 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, *Aquat. Toxicol*; 84: 415-430
- Gong, P.; Li, H.; He, X.; Wang, K.; Hu, J.; Tan, W.; Zhang, S.; Yang, X. (2007). Preparation and antibacterial activity of Fe₃ O₄-Ag nanoparticles. *Nanotechnology*; 18: 604-611.
- Gopalakannan, A.; Arul, V. (2006). Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. *Aquaculture*; 255: 179-187.
- Griffitt, R.J.; Luo, J.; Gao, J.; Bonzongo, J.C.; Barber, D.S. (2008). Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms, *Environmental Toxicology and Chemistry*; 27(9): 1972-1978.
- Hogstrand, C.; Wood, C.M. (1998). Toward a better understanding of the bioavailability, physiology, and toxicity of silver in fish: Implications for water quality criteria. *Environmental Toxicology and Chemistry*; 17 (4): 547-561.
- Holt, K.B.; Bard, A.J. (2005). Interaction of silver (I) ions with the respiratory chain of *Escherichia coli*: An electrochemical and scanning electrochemical microscopy study of the antimicrobial mechanism of micromolar Ag (2005) *Biochemistry*; 44 (39): 13214-13223.
- Iwama, G.; Nakanishi, T. (1996). The fish immune system. Academic Press, London. Chapter 3: innate Immunity in fish, pp: 73-114.
- Kajita, Y.; Sakai, M.; Atsuta, S.; Kobayash, M. (1990). The immunomodulatory effects of levamisole on rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Pathol*; 25: 93-98.
- Kaneko, J.J. (1989). *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Fourth edition. Academic press, Inc.
- Karthikeyeni, S.; Vijayakumar, T.S.; Vasanth, S.; Ganesh, A.; et al. (2013). Biosynthesis of Iron oxidenanoparticles and its haematological effects on freshwater fish *Oreochromis mossambicus*, *J. Acad. Indus. Res.*; 1(10): 645-649.
- Kim, J.S.; Kuk, E.; Yu, K.N.; Kim, J.H.; Park, S.J.; Lee, H.I.; Kim, S.H.; Park, S.J.; Park, Y.H.; Hwang, C.Y.; Kim, Y.K.; Lee, Y.S.; Jeong, D.H.; Cho, M.H. (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine; Nanotechnology, Biology, and Medicine*; 3, 95-101.
- Lansdown, A.B. (2002) Silver 1. Its antibacterial properties and mechanism of action. *Journal of wound Care*; 11, 125-130.
- Mohammadi, A. (2011). Effects of exposure to diazinon on some hematological parameters and serum lysozyme activity benni (*Barbus sharpeyi*). Ph.D. thesis Faculty of Veterinary medicine Shahid Chamran University, Ahvaz.
- Mohapatra, B.C.; Rengarajan, K. (1995). *A Manual of Bioassays in the Laboratory and Their Techniques*.

- CMFRI Special Publication, 64, CMFRI, Cochin, India, p. 75.
- Peralta, J.R.; Zhao, L.; Lopez, M.M. (2010). Nanomaterials and the environment: A review for the biennium 2008-2010, *Journal of Hazardous Materials*, under publish.
- Raa, J.; Roerstad, G.; Engstad, R.; Robetsen, B. (1992). The use of immune stimulants to increase resistance of aquatic organisms to microbial infections. *Aquacult*; 1: 39-50.
- Rai, M.; Yadav, A.; Gade, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*; 27: 76-83.
- Shahbazzadeh, D.A.; Ahari, H.B.; Rahimi, N.M.; Dastmalchi, F.; Soltani, M. (2009). The effects of Nanosilver on survival percentage of *rainbow trout*, *Pakistan Journal of Nutrition*; 8(8): 1178-1180.
- Sharma, V.K.; Yngard, R.A.; Lin, Y. (2009). Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities, *Advances in Colloid and Interface Science*; 145; 83-96.
- Thrall, M.A. (2004). *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. Lippincott Williams & Wilkins, USA, pp: 241, 277-288, 402.