مقایسه سمیت نانو ذرات نقره در ماهیان آمور (*Ctenopharyngodon idella*)، شیربت (*Barbus grypus*) ، اسکار (*Astronorus ocellatus*) و سوروم (*Cichlosoma severums*)

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

مجتبی علیشاهی[1]*
مهرزاد مصباح[2]

۲،۱. دانشگاه شهید چمران، دانشکده دامپزشکی، استادیار بخش بیماری های آبزیان، اهواز، ایران

* **نویسنده مسئول مکاتبات**
alishahim@scu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۱/۰۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۰۳/۰۹

چکیده

استفاده از تکنولوژی نانو در صنایع مختلف بطور فزاینده ای در حال افزایش است. برای بررسی امکان استفاده از این مواد در آبزی پروری بصورت مستقیم و اضافه نمودن نانو ذرات نقره به آب، در این تحقیق اثرات سمی، LC_{50} و نیز حداکثر غلظت مجاز (MAC) این ماده در چهار گونه ماهی، آمور (*Ctenopharyngodon idella*)، (ماهی پرورشی)، شیربت (*Barbus grypus*) ، (ماهی بومی وحشی)، اسکار (*Astronorus ocellatus*) و سوروم (*Cichlosoma severums*) (ماهیان آکواریومی) در پاییز و زمستان ۱۳۸۹ مورد بررسی قرار گرفت. برای تعیین سمیت این ماده در ماهی ها از روش استاندارد اتحادیه اروپا (OCED) طی ۹۶ ساعت استفاده گردید. بدین منظور ۴ گونه ماهی به مدت ۹۶ ساعت در معرض ۸ غلظت متوالی از نانو ذرات نقره قرار داده شده و تلفات روزانه ثبت گردید. نتایج توسط نرم افزار پروبیت بررسی و ثبت گردیده، سپس حداکثر غلظت مجاز (MAC) نیز محاسبه گردید. نتایج نشان دهنده وجود تفاوت در غلظت کشنده نانو ذرات نقره در ۴ گونه ماهی مورد بررسی بود، بطوری‌که LC_{50} این ماده در ۹۶ ساعت در ماهی آمور، شیربت، اسکار و سوروم به ترتیب برابر ۰/۱۲، ۰/۰۸۶، ۶/۸۵ و ۷/۸۹ میلی گرم در لیتر بدست آمد. این نتایج نشان داد که هر چند تفاوت معنی داری در سمیت نانو ذرات نقره بین گونه‌های آمور، شیربت و نیز دو ماهی زینتی اسکار و سوروم وجود نداشت ($P>0.05$)، ولی سمیت نانو ذرات نقره در این دو گروه با هم تفاوت معنی داری داشته است ($P<0.05$). حداکثر غلظت مجاز (MAC) نانو ذرات نقره در مورد این چهار گونه ماهی نیز به ترتیب برابر ۰/۰۱، ۰/۰۰۹، ۰/۶۹ و ۰/۷۹ میکروگرم در میلی لیتر محاسبه گردید. بطور کلی می توان نتیجه گرفت که ماهی های آکواریومی (اسکار و سوروم) در برابر نانو ذرات نقره مقاومت بیشتری نسبت به ماهیان پرورشی (آمور) و ماهیان وحشی (شیربت) داشتند. همچنین ماهی شیربت که یک گونه وحشی است بیشتر از سایر ماهی ها به نانوذرات نقره حساس بود.

واژگان کلیدی: نانوذرات نقره، ماهی آمور، ماهی شیربت، ماهی اسکار، ماهی سوروم، LC_{50}.

مقدمه

استفاده از آنتی بیوتیک ها مخاطرات زیادی را در آبزی پروری ایجاد نموده است. ایجاد مقاومت در برابر آنتی بیوتیک‌ها در باکتریهای بیماریزای ماهی از مهمترین این مخاطرات است، لذا اخیراً استفاده از مواد ضد باکتریایی جایگزین، مورد توجه محققین بوده است. در صنعت آبزی پروری علاوه بر معضل ایجاد مقاومت های دارویی در برابر عوامل بیماری زای آبزیان، این مقاومت با مصرف گوشت ماهی و انتقال باقیمانده های آنتی بیوتیکی می تواند به انسان نیز منتقل گردد، همچنین با توجه به روش استفاده از آنتی بیوتیک های غیر سیستمیک در آبزیان، مشکلات زیست محیطی و آسیب به طبیعت اثرات منفی

بیشتری دارد. از این رو معرفی مواد جایگزین آنتی بیوتیک ها در بهداشت آبزیان، شاید ضروری تر از سایر صنایع دامی باشد (Hahm *et al.*, 2001).

استفاده از فلز نقره بعنوان ماده ضد باکتریایی سابقه طولانی در زندگی بشری داشته (Lansdown., 2002) و در سال های اخیر استفاده از ترکیبات حاوی نقره مثل کلوئید نقره، پوشش های نقره و نانو ذرات نقره بعنوان مواد ضد باکتریایی با کارایی بالا و با عوارض جانبی کمتر در صنایع مختلف در حال گسترش است (Rai *et al.*, 2009;Lansdown, 2002). نانوذرات نقره احتمالاً با ایجاد اختلال در تکثیر و سیستم تنفسی باکتری ها باعث ایجاد اثرات ضد باکتریایی می گردند (Gajjar *et al.*, 2009; Holt *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2007).

استفاده از نانوتکنولوژی در تولید مواد ضد باکتریایی موثر، با موفقیت همراه بوده و اثرات ضد باکتریایی برخی نانو ذرات بویژه نانو ذرات نقره به اثبات رسیده است، بطوری که امروزه بعنوان مواد ضد باکتریایی موثر در صنایع مختلف استفاده می گردد (Gong *et al.*, 2007). گرایش به استفاده از این مواد در چند سال اخیر رواج یافته و کاربرد این مواد در زمینه های مختلف در حال گسترش است (Chen *et al.*, 2008). آسیب به محیط زیست و تهدید بهداشت انسانی ناشی از استفاده از نانو ذرات بسیار کمتر از سایر مواد با اثرات مشابه است (Sharma *et al.*, 2009). کاربرد این نانو ذرات در آبزیان، هم به منظور درمان بیماری ها و هم برای کنترل بار باکتریایی آب قابل بررسی می باشد.

با وجود تلاش ها برای استفاده از نانو ذرات نقره در صنایع مختلف، متاسفانه در صنعت آبزی پروری و پرورش ماهیان زینتی، گزارشات بسیار محدود بوده (Griffitt *et al.*, 2008) و از ماهی گورخری دانیو (*Danio rerio*) که شباهت زیاد ژنتیکی به انسان دارد، بیشتر استفاده شده است (Bar-Ilan *et al.*, 2009). از طرفی کشورمان در زمینه تکنولوژی نانو و کاربرد این علم در صنایع مختلف از کشورهای پیشرو می باشد، لذا در این تحقیق میزان سمیت نانو ذرات نقره در ماهیان آمور از خانواده کپور ماهیان، به عنوان یک ماهی پرورشی گرمابی (وثوقی، ۱۳۸۳)، ماهی شیربت از خانواده بابوس ماهیان، به عنوان یک ماهی بومی و رودخانه ای (ستاری، ۱۳۸۴) و دو ماهی آکواریومی، اسکار و سوروم (ارجینی، ۱۳۸۵)، مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

نانو ذرات نقره از تولیدات شرکت نانو نصب پارس با نام تجاری نانوسید، محصول L-2000 مورد استفاده قرار گرفت. این ماده کاملاً محلول در آب بوده و ماده حامل نانو ذرات نقره در این محصول آب مقطر می باشد. غلظت نانو ذرات نقره ۴۰۰۰ میلی-گرم در لیتر و اندازه ذرات در این محصول ۱±۷ نانومتر بوده و طبق توصیه شرکت سازنده با غلظت ۵ تا ۱۰۰ درصد قابل استفاده برای ایجاد اثرات ضد باکتریایی و ضد عفونی کنندگی بود. تا بحال مقاومت نسبت به نانو ذرات در باکتری ها گزارش نشده و بعلت نیمه عمر کم به طبیعت آسیبی نمی رساند (بروشور محصول).

برای تعیین سمیت نانوذرات نقره از روش استاندارد OECD استفاده گردید (Wijnhoven *et al.*, 2009). در چهار گونه ماهی فوق، از آنجا که اطلاعاتی در مورد بررسی سمیت این مواد در گونه های ماهی موجود نبود، ابتدا اقدام به انجام آزمایشات مقدماتی در سطح کوچک برای بدست آوردن حدود غلظت کشنده این ماده در هر ماهی گردید، سپس بر اساس این اطلاعات بین ۸ غلظت بر مبنای ۲، از نانو ذرات نقره برای هر گونه در نظر گرفته شد. بطوری که غلظت ایجاد کننده ۱۰۰ درصد تلفات و غلظت غیر کشنده در بین این غلظت ها قرار گیرد. هر یک از غلظت های نانو ذرات نقره در یک آکواریوم ۱۰ لیتری تهیه شد. غلظت های مورد استفاده در مورد هر گونه در جدول ۱ آورده شده است. از آنجا که نانو ذرات بصورت محلول کاملا قابل حل در آب بودند، بعد از مشخص شدن غلظت، میزان مورد نیاز از ماده به آب آکواریوم اضافه گردید.

جدول ۱: تعداد تیمار و غلظت های بکار رفته برای تعیین LC50 در گونه‌های آمور (*Ctenopharyngodon idella*)، شیربت (*Barbus grypus*)، اسکار (*Astronorus ocellatus*) و سوروم (*Cichlasoma severums*)) در پاییز و زمستان ۱۳۸۹

نوع ماهی	تعداد تیمارها	غلظت نانو ذرات مورد استفاده (میکروگرم/ میلی لیتر)
آمور	۸	۰ ، ۰/۰۳۸، ۰/۰۷۵، ۰/۱۵، ۰/۳، ۰/۶، ۱/۲۵، ۲/۵
شیربت	۸	۰، ۰/۰۳۸،۰/۰۷۵، ۰/۱۵، ۰/۳، ۰/۶، ۱/۲۵، ۲/۵
اسکار	۸	۰ ، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰
سوروم	۸	۰ ، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰

ابتدا ماهی ها بمدت ۳ روز برای آداپتاسیون با شرایط جدید نگهداری گردیدند، سپس با توجه به مایع و محلول بودن نانو ذرات نقره مورد بررسی در آب، غلظت های مورد نظر در هر یک از آکواریوم ها ایجاد شد. ۲۰ قطعه ماهی از هر گونه به هر غلظت اضافه شده و تلفات روزانه ثبت گردید. ثبت تلفات تا ۹۶ ساعت (۴ روز) ادامه یافت. بعد از ثبت تلفات، اقدام به تعیین LC10، LC50 و LC90 ۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعته با استفاده از نرم افزار پروبیت ویرایش ۱/۵ گردید. در این روش از رگرسیون بین دوز نانو ذرات نقره و لگاریتم غلظت استفاده شد. برای مقایسه مقادیر و تعیین معنی دار بودن اختلاف بین دوز کشنده نانو ذرات نقره در گونه های مورد بررسی از هم پوشانی حدود مذکور استفاده شد (TCR, 1984). ترسیم اشکال نیز در فضای نرم افزار اکسل انجام گردید.

نتایج

در این بررسی، دمای آب ۲۷±۱ ° C ، pH = ۸/۷ ، EC= ۹۲۰ میکروزیمنس بر سانتیمتر مربع، میزان اکسیژن محلول ۸ میلی گرم در لیتر، میزان NH3 و NO2 کمتر از ۰/۰۱ میلی گرم در لیتر و میزان NO3 کمتر از ۰/۱ میلی گرم در لیتر بود.

وزن ماهیان مورد بررسی به شرح زیر بود:

ماهی آمور (*Ctenopharyngodon idella*) یا کپور علفخوار با وزن متوسط۱/۷±۰/۲۳ گرم

ماهی شیربت (*Barbus grypus*) با وزن متوسط متوسط ۱/۹±۰/۳ گرم

ماهی اسکار (*Astronorus ocellatus*) با وزن متوسط ۰/۸±۰/۱۲ گرم

ماهی سوروم (*Cichlasoma severums*) با وزن متوسط۰/۹±۰/۱۶ گرم

بعداز ثبت تلفات روزانه در گروه های ماهی اطلاعات به روش پروبیت آنالیز شده و در جدول ۲ آورده شده است. در این جدول غلظت ایجاد کننده ۱۰ درصد تلفات، ۵۰ درصد تلفات و ۹۰ ردصد تلفات بعد از ۱ ، ۲، ۳ و ۴ روز بعد از مجاورت با نانو ذرات نقره مشخص گردیده است.

جدول ۲: غلظت های کشنده نانو ذرات نقره در گونه‌های آمور (*Ctenopharyngodon idella*)، شیربت (*Barbus grypus*) ، اسکار (*Astronorus ocellatus*) و سوروم (*Cichlasoma severums*) (LC10 = غلظت متوسط ایجاد کننده ۱۰ درصد تلفات، LC_{50}= غلظت متوسط ایجاد کننده ۵۰ درصد تلفات، LC_{90} = غلظت متوسط ایجاد کننده ۹۰ درصد تلفات) در پاییز و زمستان ۱۳۸۹

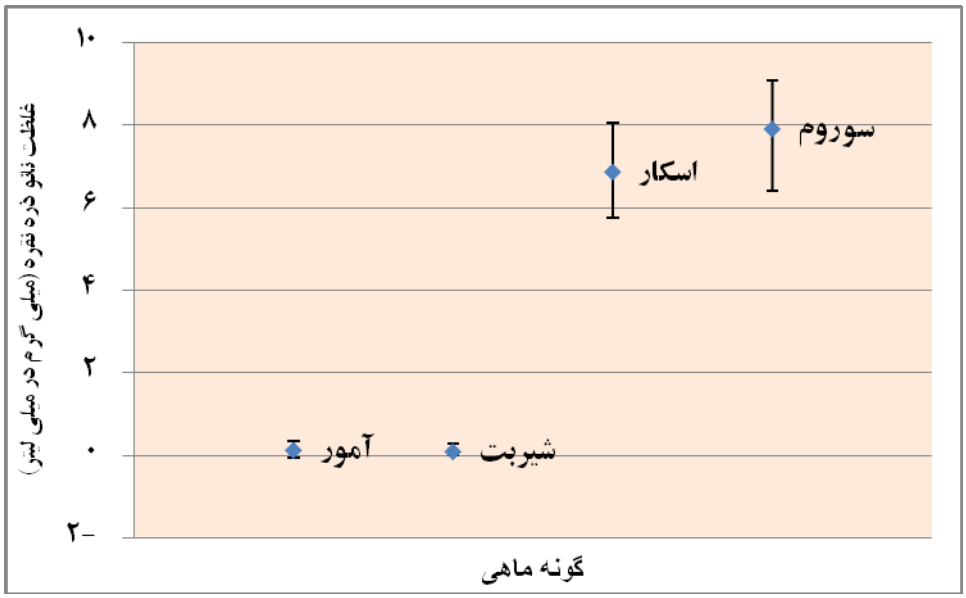
گونه ماهی	دوز کشنده	۲۴ ساعته	۴۸ ساعته	۷۲ ساعته	۹۶ ساعته
آمور	LC_{10}	۰/۳۵	۰/۱۱	۰/۰۸	۰/۰۵
	LC_{50}	۰/۳۹	۰/۲۱	۰/۱۶	۰/۱۲
	LC_{90}	۷/۲۳	۵/۳۲	۳/۶۸	۱/۱۵
شیربت	LC_{10}	۰/۱۲۹	۰/۰۵۸	۰/۰۳۹	۰/۰۳۴
	LC_{50}	۰/۱۸۸	۰/۱۳۱	۰/۱۰۵	۰/۰۸۶
	LC_{90}	۲/۷۳	۲/۰۷	۲/۰۲	۱/۷۰
اسکار	LC_{10}	۳/۱۱	۲/۱۱	۱/۸۷	۱/۶۷
	LC_{50}	۱۳/۴۴	۱۰/۲۱	۸/۵۶	۶/۸۵
	LC_{90}	۴۱/۲۲	۳۴/۵۴	۲۸/۲	۲۳/۲۳
سوروم	LC_{10}	۴/۸۷	۴/۱۴	۴/۳۴	۲/۶۸
	LC_{50}	۱۷/۱۱	۱۳/۱۹	۱۰/۲۳	۷/۸۹
	LC_{90}	۶۴/۱۳	۴۲/۳۵	۲۵/۵۶	۲۱/۱۲

در جدول فوق تفاوت زیادی بین غلظت کشنده نانو ذرات نقره در چهار گونه ماهی مشاهده می گردد، به گونه ای که ماهیان آکواریومی مقاومت بیشتری نسبت به دو گونه دیگر نشان دادند.

در جدول ۳ و شکل ۱ تفاوت غلظت کشنده نانو ذرات نقره در ۴ گونه ماهی و حدود بالا و پایین آن برای مشخص شدن معنی دار بودن تفاوت بین این غلظت ها نشان داده شده است. همچنین در جدول ۳ حداکثر غلظت مجاز نانو ذرات نقره برای هر گونه ذکر شده است.

جدول ۳: میزان LC_{50} ۹۶ ساعته نانو ذرات نقره در گونه‌های آمور (*Ctenopharyngodon idella*)، شیربت (*Barbus grypus*) ، اسکار (*Astronorus ocellatus*) و سوروم (*Cichlasoma severums*) با حدود بالا و پایین آن ها) در پاییز و زمستان ۱۳۸۹ (واحد غلظت میکروگرم در میلی لیتر می باشد)

گونه ماهی	LC_{50}	حد بالا	حد پایین	حداکثر غلظت مجاز(MAC)
آمور	۰/۱۲	۱/۷	۰/۸۱	۰/۰۱۲
شیربت	۰/۰۸۶	۰/۲۶	۰/۴۵.	۰/۰۰۹
اسکار	۶/۸۵	۸/۳۳	۵/۴۵	۰/۶۹
سوروم	۷/۸۹	۹/۱۲	۵/۶۷	۰/۷۹



شکل ۱: مقایسه مقادیر و حدود LC_{50} نانو ذرات نقره در در گونه‌های آمور (*Ctenopharyngodon idella*)، شیربت (*Barbus grypus*) ، اسکار (*Astronorus ocellatus*) و سوروم (*Cichlasoma severums*)) در پاییز و زمستان ۱۳۸۹

بحث و نتیجه گیری

پیشرفت تکنولوژی در زمینه نانو باعث گسترش استفاده از این علم در صنایع مختلف، از جمله آبزی پروری گردیده است (Bar-Ilan *et al.*, 2009)، ولی تا به حال گزارشات اندکی از مطالعه سمیت نانو ذرات نقره در صنعت آبزی پروری ارائه شده است (Griffitt *et al.*, 2008). از طرفی استفاده زیاد از مواد ضد باکتریایی مانند آنتی بیوتیک ها در آبزی پروری بعنوان یک معضل در حال گسترش مطرح بوده و یافتن جایگزین های مناسب دغدغه متولیان این صنعت می باشد. نانو ذرات نقره بیشتر به علت اثرات ضد باکتریایی خود معروف می باشند (Reynolds, 2001). با توجه به این اثرات امکان استفاده از آنها در بهداشت آبزیان وجود دارد، لذا یافتن غلظت کشنده و نیز حداکثر غلظت مجاز این مواد در گونه های مختلف ماهی ضروری می باشد.

در مورد اثرات منفی نانو ذرات نقره بر محیط زیست، نظرات متفاوت بوده است، برخی محققین بعلت نیمه عمر کم این مواد، آنرا دوست با طبیعت شناخته اند (Reynolds, 2001)، ولی Kim و همکاران در سال ۲۰۰۵ اثر منفی نانو ذرات نقره با غلظت ۲ میلی گرم در لیتر در رشد ریشه برخی گیاهان را گزارش نمودند. Gajjar و همکاران در سال ۲۰۰۹ نیز اثرات ضد باکتریایی نانو ذرات نقره را بر نوعی سودوموناس مفید خاک گزارش نمودند. در هر صورت حتی با پذیرفتن اثرات منفی این ماده بر محیط زیست ، این اثرات مطمئناً کمتر از آنتی بیوتیک ها و مواد شیمیایی ضد باکتریایی مرسوم فعلی با اثرات مشابه است (Sharma *et al.*, 2007). همچنین نتایج بررسی سمیت نانو ذرات نقره در چهار گونه ماهی مورد بررسی مشخص نمود که حساسیت ماهی های مختلف نسبت به نانو ذرات نقره نسبتاً زیاد و متفاوت است، بطوری که LC_{50} ۹۶ ساعته این ماده بر ماهیان آمور، شیربت، اسکار و سوروم در شرایط تعریف شده به ترتیب برابر ۰/۱۲، ۰/۰۸۶، ۶/۸۵ و ۷/۸۹ میلی گرم در لیتر بود و همانطور که در شکل ۱ مشخص است، سمیت نانو ذرات نقره در ماهیان زینتی اسکار و سوروم مشابه بوده ($P>0.05$)، ولی نسبت به دو گونه آمور و شیربت تفاوت معنی دار نشان داد ($P<0.05$). در ضمن سمیت نانو ذرات نقره در ماهیان آمور و شیربت نیز فاقد تفاوت معنی دار بود ($P>0.05$). در بین گونه های مورد بررسی، ماهی شیربت بیشترین حساسیت و ماهی سوروم کمترین حساسیت را نسبت به نانو ذرات نقره نشان دادند.

در تحقیقی مشابه، Soltani و همکاران در سال ۲۰۰۹ سمیت نانو ذرات نقره در ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) بررسی نموده و LC_{50} ۹۶ ساعته این ماده در حدود ۵ میلی گرم در لیتر گزارش کردند که به نتایج

این تحقیق در ماهی اسکار نزدیک تر است. Bar-Ilan و همکاران در سال ۲۰۰۹ سمیت نانو ذرات نقره و طلا را در جنین ماهی زبرای دانیو (*Danio rerio*) (ماهی مدل آزمایشگاهی) مطالعه و سمیت بالای نانو ذرات نقره را در این ماهی گزارش نمودند، در صورتیکه نانوذرات طلا فاقد سمیت برای این ماهی بود. حداکثر غلظت مجاز نانو ذرات نقره در این تحقیق برای ماهیان آمور، شیربت، اسکار و سوروم به ترتیب برابر ۰/۰۱، ۰/۰۰۹، ۰/۶۹ و ۰/۷۹ میلی گرم در لیتر مشخص گردید. این یافته با توجه به توسعه نانوتکنولوژی در کشور و استفاده از محصولات این تکنولوژی در صنایع مختلف که امکان راه یابی فاضلاب حاوی نانو ذرات نقره به منابع آبی طبیعی را تایید می نماید، ارزشمند است، یعنی در صورت آلودگی محیط زیست به نانو ذرات نقره مورد استفاده در این تحقیق، حدود اعلام شده در نتایج برای این ماهی ها قابل قبول می باشد.

هرچند بررسی نحوه ایجاد مسمومیت و اثرات مسمومیت با نانو ذرات نقره در ماهی هدف این تحقیق نبوده است، ولی یافتن بافت های هدف نانو ذرات و معرف هایی در فاکتورهای خونی و سرمی ماهی که نشان دهنده مسمومیت با این نانو ذرات باشد، به تشخیص این مواد در ماهی کمک خواهد نمود.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به انجام رسید. همچنین از همکاری جناب آقای دکتر دستمالچی مسئول فنی شرکت نانو نصب پارس در مراحل انجام طرح تشکر و قدردانی می نمایند.

منابع

ارجینی، م.، ۱۳۸۵. تکثیر و پرورش ماهیان زینتی، چاپ اول، انتشارات نگار نور. ۱۳۲ ص.

ستاری، م.، ۱۳۸۴. ماهی شناسی سیستماتیک جلد دوم، چاپ دوم ، انتشارات حق شناس، ۴۷۶ ص.

وثوقی، غ. ح. و مستجیر، ب.، ۱۳۸۳. ماهیان آب شیرین. انتشارات دانشگاه تهران.صفحات ۱۷۵، ۱۷۷، ۱۸۷، ۱۸۸ و۳۱۷.

Bar-Ilan, O., Albrecht, R. M., Fako, V. E. and Furgeson, D. Y., 2009. Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryosSmall, 5, 16,1897-1910.

Chen, X. and Schluesener, H. J., 2008. A nanoproduct in medical application, Toxicology Letters, 176 (1), 1-12.

Gajjar, P., Pettee, B., Britt, D. W. and Huang, W., 2009. Antimicrobial activities of commercial nanoparticles against an environmental soil microbe, Pseudomonas putida KT2440, Journal of Biological Engineering Volume 3, 26, 9.

Gong, P., Li, H., He, X., Wang, K., Hu, J., Tan, W., Zhang, S. and Yang, X., 2007. Preparation and antibacterial activity of Fe_3O_4-Ag nanoparticles. Nanotechnology 18, 604-611.

Griffitt, R. J., Luo, J., Gao, J., Bonzongo, J. C. and 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.

Hahm, D. H., Yeom, M., Lee, E. H., Shim, I., Lee, H. J. and Kim, H. Y., 2001. Effect of *Scutellariae radix* as a novel antibacterial herb on the ppk(Polyphosphate kinase) mutant of *Salmonella typhimurium*, Journal of Microbiology and Biotechnology, 11, 6, 1061-1065.

Holt, K. B. and 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. *Biochemistry*, 44 (39), 13214-13223.

Kim, S. H., Woo, K. S., Liu, B. Y. H. and Zachariah, M. R., 2005. Method of measuring charge distribution of nanosized aerosols. Journal of Colloid and Interface Science 282 (1), pp. 46-57 1-23.

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. and Cho, M. H., 2007. Antimicrobial effects of silver nanopaticles. 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.

Rai, M., Yadav, A. and Gade, A., 2009. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. Biotechnology Advances 27, 76-83.

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

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

Soltani, M., Torabzadeh, N. and Soltani, A., 2010. Toxicity of nanosilver suspension (Nanocide) in rainbow trout. First international congress on Aquatic animal health management and disease, abstract book, 112.

TCR, 1984. OECD guideline for testing of chemicals. Section 2. effect on biotic systems, 1-39.

Wijnhoven, S. W. P., Peijnenburg, W. J. G. M., Herberts, C. A., Hagens, W. I. and Oomen, A. G., 2009. Nanosilver- A review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment, Nanotoxicology, 3, 2, 109-138.