INSO
22852
1st Edition
2020
Modification of:
ISO 20787:
2017

جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran
سازمان ملی استاندارد ایران
Iranian National Standardization Organization

استاندارد ملی ایران
۲۲۸۵۲
چاپ اول
۱۳۹۹

فناوری نانو – ارزیابی سمیت نانومواد ساخته‌شده، در آبزیان دریاچه‌های آب شور، با استفاده از ناپلی گونه‌های *آرتمیا* (*Artemia sp.*)

Nanotechnologies - Aquatic toxicity assessment of manufactured nanomaterials in saltwater lakes using *Artemia sp.* Nauplii

ICS: 07.120

استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۲۸۵۲ (چاپ اول): سال ۱۳۹۹

سازمان ملی استاندارد ایران

تهران، ضلع جنوب غربی میدان ونک، خیابان ولیعصر، پلاک ۲۵۹۲

صندوق‌پستی: ۶۱۳۹-۱۴۱۵۵ تهران- ایران

تلفن: ۵-۸۸۸۷۹۴۶۱

دورنگار: ۸۸۸۸۷۰۸۰ و ۸۸۸۸۷۱۰۳

کرج، شهر صنعتی، میدان استاندارد

صندوق پستی: ۱۶۳-۳۱۵۸۵ کرج - ایران

تلفن: ۸-۳۲۸۰۶۰۳۱ (۰۲۶)

دورنگار: ۳۲۸۰۸۱۱۴ (۰۲۶)

رایانامه: standard@isiri.gov.ir

وبگاه: http://www.isiri.gov.ir

Iranian National Standardization Organization (INSO)

No. 2592 Valiasr Ave., South western corner of Vanak Sq., Tehran, Iran

P. O. Box: 14155-6139, Tehran, Iran

Tel: + 98 (21) 88879461-5

Fax: + 98 (21) 88887080, 88887103

Standard Square, Karaj, Iran

P.O. Box: 31585-163, Karaj, Iran

Tel: + 98 (26) 32806031-8

Fax: + 98 (26) 32808114

Email: standard@isiri.gov.ir

Website: http://www.isiri.gov.ir

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

سازمان ملی استاندارد ایران به موجب بند یک مادهٔ ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفهٔ تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) ایران را به عهده دارد.

تدوین استاندارد در حوزه‌های مختلف در کمیسیون‌های فنی مرکب از کارشناسان سازمان، صاحب‌نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می‌شود و کوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانهٔ صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف‌کنندگان، صادرکنندگان و واردکنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان‌های دولتی و غیردولتی حاصل می‌شود. پیش‌نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی‌نفع و اعضای کمیسیون‌های مربوط ارسال می‌شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادها در کمیتهٔ ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی (رسمی) ایران چاپ و منتشر می‌شود.

پیش‌نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان‌های علاقه‌مند و ذی‌صلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می‌کنند درکمیته ملی طرح، بررسی و درصورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می‌شود. بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می‌شود که بر اساس مقررات استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ تدوین و در کمیتهٔ ملی استاندارد مربوط که در سازمان ملی استاندارد ایران تشکیل می‌شود به تصویب رسیده باشد.

سازمان ملی استاندارد ایران از اعضای اصلی سازمان بین‌المللی استاندارد (ISO)[1]، کمیسیون بین‌المللی الکتروتکنیک (IEC)[2] و سازمان بین‌المللی اندازه‌شناسی قانونی (OIML)[3] است و به عنوان تنها رابط[4] کمیسیون کدکس غذایی (CAC)[5] در کشور فعالیت می‌کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی‌های خاص کشور، از آخرین پیشرفت‌های علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین‌المللی بهره‌گیری می‌شود.

سازمان ملی استاندارد ایران می‌تواند با رعایت موازین پیش‌بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف‌کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست‌محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور و/یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری کند. سازمان می‌تواند به منظور حفظ بازارهای بین‌المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری کند. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده‌کنندگان از خدمات سازمان‌ها و مؤسسات فعال در زمینهٔ مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدور گواهی سیستم‌های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست‌محیطی، آزمایشگاه‌ها و مراکز واسنجی (کالیبراسیون) وسایل سنجش، سازمان ملی استاندارد این‌گونه سازمان‌ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می‌کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامهٔ تأیید صلاحیت به آن‌ها اعطا و بر عملکرد آن‌ها نظارت می کند. ترویج دستگاه بین المللی یکاها، واسنجی وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این سازمان است.

1- International Organization for Standardization
2- International Electrotechnical Commission
3- International Organization for Legal Metrology (Organisation Internationale de Metrologie Legals)
4- Contact point
5- Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد

«فناوری نانو - ارزیابی سمیت نانومواد ساخته‌شده، در آبزیان دریاچه‌های آب شور، با استفاده از ناپلی گونه‌های *آرتمیا* (*Artemia* sp.)»

رئیس:	**سمت و/یا محل اشتغال:**
قاضی‌خوانساری، محمود (دکتری تخصصی سم‌شناسی)	عضو هیئت علمی – دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران
دبیر:	
جوهری، سیّد علی (دکتری تخصصی تکثیر و پرورش آبزیان)	عضو هیئت علمی - دانشگاه کردستان
اعضا: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)	
اسلامی‌پور، الهه (کارشناسی ارشد زیست‌شناسی)	کارشناس -گروه استاندارد و ایمنی ستاد ویژه توسعه فناوری نانو
پوی‌پوی، حسن (کارشناسی ارشد شیمی)	دبیر- کمیته فنی متناظر فناوری نانو ISIRI/TC 229
حجازی، مرضیه (دکتری تخصصی سم‌شناسی)	عضو هیئت علمی – دانشگاه تبریز
کوهی، محمّد کاظم (دکتری تخصصی سم‌شناسی)	عضو هیئت علمی – دانشگاه تهران
سیفی، مهوش (کارشناسی ارشد مدیریت دولتی)	نایب رئیس- کمیته فنی متناظر فناوری نانو ISIRI/TC 229
شیخ‌زاده، نجمه (دکتری تخصصی بهداشت و بیماری‌های آبزیان)	عضو هیئت علمی – دانشگاه تبریز
منهاج‌نیا، رابعه (دکتری تخصصی سم‌شناسی)	کارشناس مسئول - کمیته فناوری نانو سازمان دامپزشکی کشور
ویراستار:	
سیفی، مهوش (کارشناسی ارشد مدیریت دولتی)	نایب رئیس- کمیته فنی متناظر فناوری نانو ISIRI/TC 229

فهرست مندرجات

عنوان	صفحه
پیش‌گفتار	ز
مقدمه	ح
۱ هدف و دامنه کاربرد	۱۱
۲ مراجع الزامی	۱۱
۳ اصطلاحات و تعاریف	۱۲
۴ مواد	۱۹
۴-۱ جاندار موردآزمون	۱۹
۴-۲ مواد شیمیایی	۱۹
۵ تجهیزات فنّی	۱۹
۶ آماده‌سازی و مشخصه‌یابی پراکنش نانوماده	۲۰
۶-۱ آماده‌سازی پراکنش	۲۰
۶-۲ مشخصه‌یابی پراکنش	۲۱
۶-۳ پایداری پراکنش در تعلیقه ذخیره	۲۱
۶-۴ پایداری پراکنش در آب دریای مصنوعی	۲۱
۶-۵ آماده‌سازی محیط مواجهه برای آزمون‌های سمیت	۲۱
۷ روش اجرایی تخم‌گشایی	۲۲
۷-۱ کلیات	۲۲
۷-۲ آب رقیق‌سازی	۲۲
۷-۳ ذخیره‌سازی سیست‌های *آرتمیا*	۲۲
۷-۴ ضدعفونی سیست‌های *آرتمیا*	۲۲
۷-۵ روش تخم‌گشایی سیست‌های *آرتمیا*	۲۳
۷-۶ برداشت ناپلی‌های *آرتمیا*	۲۳
۷-۷ محاسبه درصد تخم‌گشایی	۲۳
۸ تاثیر نانومواد بر ناپلی *آرتمیا*	۲۴
۸-۱ گروه‌های آزمون و کنترل	۲۴
۸-۲ غلظت‌های آزمون	۲۴
۸-۳ شرایط مواجهه	۲۵
۸-۴ طول دوره آزمون	۲۵
۸-۵ مشاهدات	۲۵
۸-۶ اندازه‌گیری‌های تحلیلی	۲۵

عنوان **صفحه**

۹ تحلیل داده‌ها ۲۶
۱۰ گزارش آزمون ۲۶
۱۰-۱ روش اجرایی آزمون ۲۶
۱۰-۲ اطلاعاتی که باید در گزارش آزمون درج شود ۲۶
۱۱ صحّه‌گذاری نتایج ۲۸
پیوست الف (آگاهی‌دهنده) تغییرات اعمال‌شده در متن استاندارد ملی در مقایسه با منبع ۲۹
کتاب‌نامه ۳۰

پیش‌گفتار

استاندارد «فناوری نانو - ارزیابی سمیت نانومواد ساخته‌شده، در آبزیان دریاچه‌های آب شور، با استفاده از ناپلی گونه‌های *آرتمیا* (*Artemia* sp.)» که پیش‌نویس آن در کمیسیون‌های مربوط بر مبنای پذیرش استانداردهای بین‌المللی/منطقه‌ای به‌عنوان استاندارد ملی ایران به روش اشاره شده در مورد پ، بند ۷، استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ تهیه و تدوین شده، در نودمین اجلاسیه کمیتهٔ ملی استاندارد فناوری نانو مورخ ۱۳۹۹/۷/۲۳ تصویب شد. اینک این استاندارد به استناد بند یک مادهٔ ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱، به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.

استانداردهای ملی ایران بر اساس استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ (استانداردهای ملی ایران- ساختار و شیوهٔ نگارش) تدوین می‌شوند. برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت‌های ملی و جهانی در زمینه صنایع، علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران درصورت لزوم تجدیدنظر خواهند شد و هر پیشنهادی که برای اصلاح یا تکمیل این استانداردها ارائه شود، در هنگام تجدیدنظر درکمیسیون فنی مربوط، موردتوجه قرار خواهد گرفت. بنابراین، باید همواره از آخرین تجدیدنظر استانداردهای ملی ایران استفاده کرد.

این استاندارد ملی بر مبنای پذیرش استاندارد بین‌المللی زیر به روش «ترجمهٔ تغییر یافته» تهیه و تدوین شده و شامل ترجمه تخصصی کامل متن آن به زبان فارسی همراه با اعمال تغییرات با توجه به مقتضیات کشور است:

ISO/TS 20787: 2017, Nanotechnologies - Aquatic toxicity assessment of manufactured nanomaterials in saltwater lakes using *Artemia sp. Nauplii*

مقدمه

با افزایش توسعه و استفاده از نانومواد ساخته‌شده (MNMs)[1] در محصولات مصرفی، نگرانی درباره امکان تاثیر این مواد بر سلامتی انسان و محیط‌زیست افزایش یافته‌است. درحال‌حاضر آبزیان گوناگون (همچون ماهی، دافنی، جلبک و غیره) برای پیش‌بینی اثرات احتمالی و نامطلوب مواد شیمیایی از جمله نانومواد در محیط‌های آبی استفاده می‌شوند. گونه‌های میگوی ریز آب شور[2] یا *آرتمیا* (*Artemia* sp.) در سرتاسر جهان در حوضچه‌ها و دریاچه‌های با شوری بالای آب یافت می‌شوند [42] یکی از گسترده‌ترین آبزیان یوری‌هالین[3] هستند که برای آزمون‌های اکوتوکسیسیتی مناسب هستند. گونه‌های ناپلی *آرتمیا* گزینه‌ای بسیار مناسب برای ارزیابی اثرات نانومواد در بوم‌سازگان‌های[4] آب شور و به‌ویژه دریاچه‌های آب شور هستند. *آرتمیا* معمولا در دریاچه‌های آب شور زندگی می‌کند و معمولا هرگز در دریاهای آزاد یافت نمی‌شود. این گونه‌ها به دامنه گسترده‌ای از شوری (۵ گرم در لیتر تا ۳۰۰ گرم در لیتر) و دمای (۶ درجه سانتی‌گراد تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد) سازگاری دارند. در واقع سطوح بهینه شوری برای *آرتمیا* مطابق فیزیولوژی این جانور در حدود ۳۰ گرم در لیتر تا ۳۵ گرم در لیتر است؛ با این وجود به دلیل توانایی زیستن شکارچیان *آرتمیا* در این سطح از شوری، *آرتمیا* در زیستگاه‌های طبیعی به‌ندرت در سطوح شوری پایین‌تر از ۴۵ گرم در لیتر و یا حتی تا ۸۰ گرم در لیتر دیده می‌شود. از طرفی به‌دلیل نبود رقبای غذایی و شکارچیان *آرتمیا* در دریاچه‌های با شوری بالا، گونه‌های *آرتمیا* می‌توانند با تراکم جمعیتی بالایی در این مکان‌ها گسترش یافته و زندگی کنند.

مزایای بسیار زیادی برای استفاده از گونه‌های *آرتمیا* به‌عنوان مدل زیستی در توکسیکولوژی آبزیان آب شور وجود دارند:

الف- استفاده از جانور بی‌مهره‌ای همچون *آرتمیا* باعث نگرانی کم‌تری در مورد رفاه حیوانات[5] نسبت به استفاده از گونه‌های حیوانات مهره دار می‌شود.

ب- دانش و اطلاعات مناسبی درباره بوم‌شناسی و زیست‌شناسی گونه‌های مختلف *آرتمیا* وجود دارد.

پ- آرتمیا دارای پراکندگی جغرافیایی بسیار بالایی در استخرها و دریاچه‌های آب شور در نقاط مختلف دنیا است.

ت- انجام آزمون‌های زیستی بر روی *آرتمیا*، ساده و مقرون به‌صرفه است.

ث- اندازه کوچک بدن ناپلی *آرتمیا* اجازه می‌دهد تا انجام آزمون بر روی این جاندار در پلیت‌ها یا بشرهای کوچک و به‌راحتی انجام شود.

ج - آرتمیا به دامنه گسترده‌ای از شوری و دمای آب سازگاری دارد و بنابراین استفاده از این جاندار برای بررسی اثرات تغییر اقلیم همچون تغییرات دمایی و نوسانات شوری در بوم سازگان‌های آبی امکان‌پذیر است.

1- Manufactured Nnano Materials
2- Brine shrimp
3- Euryhaline
4- Ecosystem
5- Animal welfare

چ- نگهداری و پرورش *آرتمیا* در آزمایشگاه بسیار ساده و ارزان است.

ح- چرخه زندگی *آرتمیا* کوتاه است، بنابر این برای آزمون‌های رشد، تولیدمثل و آزمون‌های سمیت کوتاه مدت مناسب است.

خ- تخم‌های نهفته یا سیست[1]های *آرتمیا* به‌صورت تجاری و به‌آسانی قابل‌دسترس هستند و این امر باعث می‌شود تا انجام آزمون‌ها بر روی این‌گونه برای پژوهشگران در سرتاسر دنیا امکان‌پذیر باشد. تخم یا سیست این جاندار را می‌توان برای سال‌ها در شرایط سرد (دمای یخچال) و خشک نگهداری کرد بدون اینکه تأثیری بر قابلیت ادامه زندگی آن‌ها پس از خروج از تخم ایجاد شود. سیست‌ها به فاصله زمانی کمی پس از غوطه‌وری در آب دریا، تخم‌گشایی شده و تا زمان شنای آزاد ناپلی‌ها، فقط حدود ۲۴ ساعت زمان لازم است.

د- پس از تخم‌گشایی سیست‌ها، جاندارانی با سن، ژنوتیپ[2] و شرایط فیزیولوژیکی یکسان و مشابه به‌دست می‌آید.

در سال‌های اخیر، پژوهشگران متعددی در نقاط مختلف جهان از آرتمیا به‌عنوان گونه مناسب برای انجام آزمون‌های نانوتوکسیکولوژی در آبزیان استفاده کرده‌اند (به مراجع [1] تا [35] مراجعه شود). با این وجود، نبود یک پروتکل استاندارد برای انجام آزمون‌های توکسیکولوژی با استفاده از *آرتمیا*، قابلیت اطمینان و تکرارپذیری مطالعات انجام‌شده در این رابطه را تا حد زیادی کاهش داده‌است [22]. هدف این استاندارد، ارائه یک پروتکل برای تولید داده‌های توکسیکولوژی قابل اطمینان در محیط‌های آبی در زمان انجام آزمون با گونه‌هایی است، که می‌تواند برای ارزیابی اکوتوکسیکولوژی نانومواد در بوم‌سازگان‌های دریاچه‌ای آب شور مورداستفاده قرار گیرد.

1- Cyst
2- Genotype

فناوری نانو - ارزیابی سمیت نانومواد ساخته‌شده، در آبزیان دریاچه‌های آب شور، با استفاده از ناپلی گونه‌های آرتمیا (*Artemia* sp.)

۱ هدف و دامنهٔ کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد ارائه یک روش آزمون برای تعیین پتانسیل سمیت نانومواد ساخته‌شده[۱]، در آبزیان، به‌ویژه ناپلی گونه‌های *آرتمیا* به منظور به حداکثر رساندن قابلیت اطمینان و تکرارپذیری آزمون است.

این استاندارد، برای استفاده در آزمایشگاهای اکوتوکسیکولوژی که توانایی تخم‌گشایی و پرورش گونه‌های *آرتمیا* و ارزشیابی سمیت نانومواد با استفاده از گونه‌های مختلف ناپلی *آرتمیا* را دارند، درنظر گرفته شده‌است.

در این روش از گونه‌های ناپلی *آرتمیا* و محیط‌زیست‌های شبیه‌سازی شده، آب دریای مصنوعی، برای ارزیابی اثرات نانومواد استفاده می‌شود.

این استاندارد برای نانومواد ساخته‌شده که حاوی نانواشیائی همچون نانوذرات، نانوپودرها، نانولیف‌ها، نانولوله‌ها، نانوسیم‌ها و همچین انبوهه‌ها و کلوخه‌های MNMs هستند، کاربرد دارد.

۲ مراجع الزامی

در مراجع زیر ضوابطی وجود دارد که در متن این استاندارد به‌صورت الزامی به آن‌ها ارجاع داده شده است. بدین‌ترتیب، آن ضوابط جزئی از این استاندارد محسوب می‌شوند.

درصورتی‌که به مرجعی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده شده باشد، اصلاحیه‌ها و تجدیدنظرهای بعدی آن برای این استاندارد الزام‌آور نیست. در مورد مراجعی که بدون ذکر تاریخ انتشار به آن‌ها ارجاع داده شده‌است، همواره آخرین تجدیدنظر و اصلاحیه‌های بعدی برای این استاندارد الزام‌آور است.

استفاده از مراجع زیر برای کاربرد این استاندارد الزامی است.

۲-۱ استاندارد ملی ایران شماره ۴-۱۸۳۹۲، فناوری نانو – واژه‌نامه - قسمت ۴: مواد نانوساختاریافته

۲-۲ استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۱-۸۰۰۰۴، فناوری نانو – واژه‌نامه - قسمت ۱: اصطلاحات اصلی

۲-۳ استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۲-۸۰۰۰۴: فناوری نانو – واژه‌نامه - قسمت ۲: نانواشیاء

2-4 ISO 10993-12, Biological evaluation of medical devices — Part 12: Sample preparation and reference materials

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۱۲-۷۲۱۶: سال ۱۳۹۲، ارزیابی بیولوژیکی وسایل پزشکی- قسمت ۱۲: آماده‌سازی نمونه و مواد مرجع، با استفاده از استاندارد ISO 10993-12: 2012 تدوین شده‌است.

۱- منظور از نانومواد ساخته‌شده، نانومواد‌ی است که به‌دست انسان ساخته شده‌اند و می‌توانند بر اثر رهایش عمدی یا تصادفی از محصولات محتوی نانومواد، وارد محیط‌زیست آبزیان شوند.

2-5 ISO/TS 11931, Nanotechnologies — Nanoscale calcium carbonate in powder form — Characteristics and measurement

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۱۷۲۲۲: سال ۱۳۹۲، فناوری‌نانو- پودر نانوکلسیم‌کربنات- مشخصات و اندازه‌گیری، با استفاده از استاندارد ISO 11931: 2012 تدوین شده‌است.

2-6 ISO/TS 12805, Nanotechnologies — Materials specifications — Guidance on specifying nano-objects

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۱۶۴۶۴: سال ۱۳۹۲، فناوری نانو – ویژگی‌های مواد – راهکاری برای تعیین ویژگی‌های نانواشیاء، با استفاده از استاندارد ISO 12805: 2011 تدوین شده‌است.

2-7 ISO/TR 13014, Nanotechnologies — Guidance on physico-chemical characterization of engineered nanoscale materials for toxicologic assessment

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۲۱۲۰۶: سال ۱۳۹۵، فناوری نانو - راهنمای مشخصه‌یابی فیزیکوشیمیایی مواد نانومقیاس مهندسی‌شده برای ارزیابی توکسیکولوژیک، با استفاده از استاندارد ISO 13014: 2012 تدوین شده‌است.

2-8 ISO 15088, Water quality — Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*)

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۱۸۰۷۸: سال ۱۳۹۲، کیفیت آب - تعیین سمیت بحرانی پساب برای تخم‌های ماهی گورخری، با استفاده از استاندارد ISO 15088: 2007 تدوین شده‌است.

2-9 ISO/TS 16195, Nanotechnologies — Guidance for developing representative test materials consisting of nano-objects in dry powder form

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۱۷۱۵۰: سال ۱۳۹۲، فناوری نانو - راهنما برای توسعه مواد معرف آزمون حاوی نانواشیاء در حالت پودر خشک، با استفاده از استاندارد ISO 16195: 2013 تدوین شده‌است.

2-10 ISO/TS 17200, Nanotechnology — Nanoparticles in powder form — Characteristics and measurements

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۱۹۷۸۵: سال ۱۳۹۴، فناوری نانو - نانوذرات پودری شکل – مشخصه‌ها و اندازه‌گیری‌ها، با استفاده از استاندارد ISO 17200: 2013 تدوین شده‌است.

2-11 ISO 26824, Particle characterization of particulate systems — Vocabulary

۳ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد، اصطلاحات و تعاریف زیر به‌کار می‌رود:[1]

برای اهداف این استاندارد، علاوه بر اصطلاحات و تعاریف ارائه‌شده در استاندارد ملی ایران ۴-۱۸۳۹۲، استانداردهای ملی ایران- ایزو ۱- ۴-۸۰۰۰۴-۱، ۲- ۸۰۰۰۴ و استانداردهای ISO 10993-12، ISO/TS 11931، ISO/TS 12805، ISO 15088، ISO/TS 16195، ISO/TS 17200، ISO 26824، اصطلاحات و تعاریف زیر نیز به‌کار می‌رود:

۳-۱

۱- اصطلاحات و تعاریف به کاررفته در استانداردهای ISO و IEC در وبگاه‌های https://www.iso.org/obp و http://www.electropedia.org/ قابل‌دسترس است.

کلوخه

agglomerate

مجموعه‌ای از ذرات که به شکلی ضعیف یا نسبتا قوی به یکدیگر متصل شده‌اند، به‌طوری‌که مساحت سطح خارجی منتجه آن‌ها مشابه مجموع مساحت سطوح تک تک اجزای تشکیل‌دهنده باشد.

یادآوری ۱- نیروهایی که کلوخه را نزدیک به یکدیگر نگه‌می‌دارد نیروهای ضعیفی هستند، مثلا نیروهای واندروالانس یا درهم‌تافتگی‌های فیزیکی ساده.

یادآوری ۲- کلوخه‌ها به عنوان ذرات ثانویه نیز درنظر گرفته می‌شوند و ذرات اصلی منشاء، ذرات نوع اول نامیده می‌شوند.

[منبع: استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۲-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵]

۲-۳

انبوهه

aggregate

مجموعه‌ای از ذرات با پیوندهای قوی یا جوش‌خورده که مساحت سطح خارجی منتجه آن‌ها به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای کم‌تر از مجموع مساحت سطوح تک تک اجزای تشکیل‌دهنده باشد.

یادآوری ۱ – نیروهایی که انبوهه را کنار یکدیگر نگه‌می‌دارد، نیروهای قوی هستند، مثلا پیوندهای کووالانسی یا یونی و یا نتیجه جوش‌خوردن و گره‌خوردگی فیزیکی پیچیده، یا درغیراین‌صورت، ذرات اولیه به‌هم چسبیده قبلی.

یادآوری ۲- انبوهه‌ها به‌عنوان ذرات ثانویه نیز درنظر گرفته می‌شوند و ذرات اصلی منشاء، ذرات اولیه نامیده می‌شوند.

[منبع: استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۲-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵]

۳-۳

ظرف تخم‌گشایی

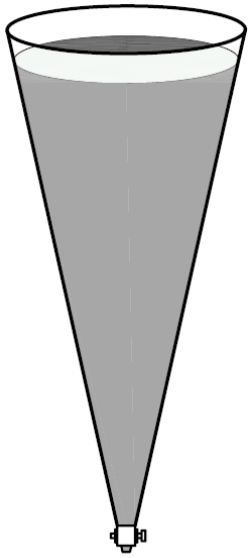
hatching vessel

هر نوع ظرفی که برای تخم‌گشایی سیست *آرتمیا* مناسب باشد.

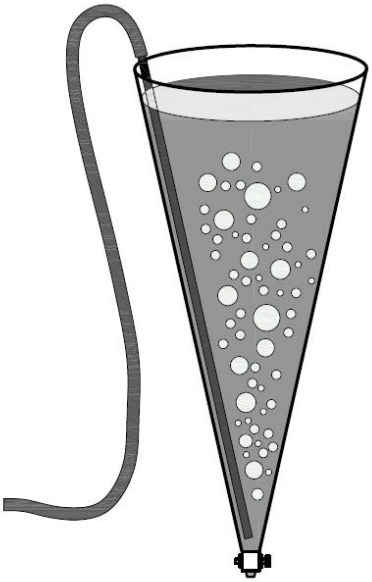
یادآوری ۱- توصیه می‌شود ظروف مخروطی شکل مورداستفاده برای تخم‌گشایی سیست‌های آرتمیا، شفاف یا نیمه شفاف باشند (ترجیحا بی رنگ) و نور به آسانی از آن‌ها عبور کند.

یادآوری ۲- همانطور که در شکل ۱ نشان داده‌شده، سیست‌ها باید از طریق هوادهی پایدار و مداومی که از کف ظرف تخم‌گشایی انجام می‌شود همیشه به حالت معلق در محیط نگه‌داشته شوند و همچنین سطوح اکسیژن موردنیاز برای تخم‌گشایی سیست‌ها نیز از طریق هوادهی تامین شود.

یادآوری ۳- ظرف تخم‌گشایی شامل مخزن شیشه‌ای یا پلاستیکی با بخش V شکل در قسمت زیرین است (شکل ۱).



شکل ۱- طرحواره‌ای از ظرف تخم‌گشایی مناسب برای سیست‌های *آرتمیا*



شکل ۲- طرحواره‌ای از نحوه هوادهی ظرف تخم‌گشایی *آرتمیا* از کف

۴-۳

ظرف آزمون

test vessel

ظرفی که برای پرورش گونه‌های *آرتمیا* مناسب است.

یادآوری ۱- توصیه می‌شود ظروف آزمون و دیگر وسایلی که در تماس با محلول‌های مورداستفاده در آزمون هستند از شیشه یا از دیگر مواد شیمیایی بی‌اثر ساخته شده‌باشند.

یادآوری ۲- ظروف آزمون شامل انواع فلاسک آزمایشگاهی یا بشر است.

۵-۳

کنترل مثبت

positive control

ماده و/ یا موادی به‌خوبی مشخصه‌یابی‌شده که هرگاه به‌وسیله یک روش معین مورد ارزشیابی قرارگیرد، مناسب بودن سامانه و تکرارپذیری پاسخ ها و نتایج یا پاسخ واکنشی حاصل از آن را نشان می‌دهد. در اینجا منظور از کنترل مثبت، ماده شیمیایی است که درصورت بررسی سمیت آن در آب شور با استفاده از ناپلی *آرتمیا*، همواره نتایج تکرارپذیری به‌دست آید.

یادآوری ۱- دی‌کرومات پتاسیم ($K_2Cr_2O_7$) به‌عنوان یک کنترل مثبت مناسب در آزمون سمیت با ناپلی گونه‌های *آرتمیا* پیشنهاد می‌شود.

۶-۳

نانوماده موردآزمون

test nanomaterial

نانوماده ساخته‌شده در حالت پراکنش[1] که آزمون زیستی یا شیمیایی بر روی آن انجام می‌شود.

۷-۳

تعلیقه[2] (سوسپانسیون) ذخیره

stock suspension

تعلیقه‌ای غلیظ که برای تهیه تعلیقه‌های با غلظت‌های پایین‌تر در زمان انجام آزمون رقیق‌سازی می‌شود.

۸-۳

نانومقیاس

nanoscale

گستره اندازه بین تقریبا یک نانومتر تا صد نانومتر است.

یادآوری ۱- خواصی که از اندازه‌های بزرگتر برون‌یابی نمی‌شوند غالبا در این گستره اندازه نشان داده می‌شوند.

[منبع: استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۲-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵]

1- Dispersion
2- Suspension

۳-۹

نانوشیء

nano-object

هر قطعه مجزا از یک ماده با یک، دو یا سه بُعد خارجی در نانومقیاس است.

یادآوری ۱- ابعاد خارجی بُعد دوم و سوم عمود بر بُعد اول و همچنین عمود بر یکدیگر هستند.

[منبع: استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۲-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵]

۳-۱۰

نانوذره

nanoparticle

نانوشیئی با تمام ابعاد خارجی در مقیاس نانو که در آن طول بلندترین و کوتاه‌ترین محورهای نانوشیء به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای با یکدیگر تفاوت نداشته باشد.

یادآوری ۱- چنانچه ابعاد به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای با یکدیگر تفاوت داشته‌باشند (معمولا بیش‌تر از سه برابر)، ممکن است اصطلاحاتی همچون نانولیف یا نانوصفحه بر نانوذره ترجیح داده‌شود.

[منبع: استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۲-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵]

۳-۱۱

ذره

particle

قطعه کوچکی از ماده که با مرزهای فیزیکی معین است.

یادآوری ۱- مرز فیزیکی را می‌توان به عنوان سطح مشترک نیز توصیف کرد.

یادآوری ۲- ذره می‌تواند به عنوان یک واحد جابجا شود.

یادآوری ۳- این تعریف کلی از ذره، برای نانواشیاء کاربرد دارد.

۳-۱۲

نانولیف

nanofibre

نانوشیئی با دو بُعد خارجی در مقیاس نانو و بُعد سوم که به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای بزرگ‌تر است.

یادآوری ۱- بزرگ‌ترین بُعد خارجی لزوما در مقیاس نانو نیست.

یادآوری ۲- واژگان نانولیفچه[1] و نانورشته[2] نیز می‌توانند استفاده شوند.

یادآوری ۳- به یادآوری ۱ در تعریف نانوذره مراجعه شود.

[منبع: استاندارد ملی ایران-ایزو شماره ۲-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵]

۱۳-۳

نانوصفحه

nanoplate

نانوشیئی با یک بُعد خارجی در مقیاس نانو و دو بُعد خارجی دیگر که به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای بزرگ‌ترند.

یادآوری ۱- ابعاد خارجی بزرگتر لزوما در مقیاس نانو نیستند.

[منبع: استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۲-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵]

۱۴-۳

گونه‌های *آرتمیا*

***Artemia* sp.**

گونه‌هایی از جنس سخت‌پوستان آبزی که به نام میگوی ریز آب شور شناخته می‌شوند.

۱۵-۳

ناپلی

nauplii

لاروها یا نوزادان *آرتمیا* که به‌تازگی از تخم خارج شده‌اند.

یادآوری ۱- ناپلی یا نوزادان *آرتمیا* وقتی تازه از تخم خارج می‌شوند اندازه‌ای کمتر از ۰٫۴ میلی‌متر دارد.

یادآوری ۲- در حالت مفرد به نوزاد *آرتمیا*، ناپلیوس[3] گفته می‌شود.

۱۶-۳

1- Nanofibril
2- Nanofilament
3- Nauplius

سیست

cyst

تخم‌های نهفته یا در حال کُمون گونه‌های *آرتمیا* است.

یادآوری ۱- سیست ممکن است برای دوره‌های طولانی ذخیره شود و در زمان نیاز تخم‌گشایی شود.

۳-۱۷

تخم‌گشایی

hatching

فرآیند تبدیل سیست به ناپلی تحت شرایط مناسب محیطی است.

۳-۱۸

محلول کنترل

control solution

محیط آزمونی که نمونه موردآزمون در آن وجود ندارد.

۳-۱۹

عدم تحرک

immobilization

عدم توانایی ناپلی *آرتمیا* برای شنا کردن است، به‌طوری‌که اگر در محلول آزمون و محلول کنترل به مدت ۱۵ ثانیه تلاطم ملایم ایجاد شود، توان شنا نداشته باشد، حتی درصورتی‌که ناپلی بتواند ضمائم خود را حرکت دهد.

[منبع: زیربند 3.3 ,ISO 6341:2012، تغییریافته: در تعریف جدید کلمه «جاندار» با «ناپلی» و کلمه «آنتن» با «ضمائم» جایگزین شده است]

۳-۲۰

EC50 [1]

غلظتی که بر اساس معیار موردنظر در آزمون، بر پنجاه درصد از جانداران موردبررسی تاثیر داشته‌باشد.

[منبع: استاندارد ملی ایران شماره ۱۸۰۷۸:سال ۱۳۹۲]

1- Median Effective Concentration

۴ مواد

۴-۱ جاندار موردآزمون

ازگونه‌های مختلفی از آرتمیا می‌توان استفاده کرد، اما گونه‌های *Artemia salina* و *Artemia franciscana* گونه‌های ترجیحی در انجام این آزمون هستند. منابع تجاری بسیار زیادی برای خرید سیست‌های *آرتمیا* وجود دارند. توصیه می‌شود ناپلی *آرتمیا* (نوزاد تازه متولدشده) از طریق تخم‌گشایی سیست‌های با کیفیت در آزمایشگاه تولید شود.

۴-۲ مواد شیمیایی

۴-۲-۱ آب دریای مصنوعی؛

۴-۲-۲ دی‌کرومات پتاسیم؛

۴-۲-۳ محلول لوگول[1]؛

۴-۲-۴ محلول هیپوکلریت سدیم (NaOCl ٪ ۵/۲۵)؛

۴-۲-۵ محلول هیدروکسید سدیم (۴۰۰g/L NaOH).

۵ تجهیزات فنّی

۵-۱ دستگاه مناسب با قابلیت کنترل دما (همچون گرم‌خانه آزمایشگاهی[2] یا حمام آب)؛

۵-۲ میکروسکوپ؛

۵-۳ استریوسکوپ دو چشمی؛

۵-۴ سانتریفیوژ؛

۵-۵ پمپ هوا؛

۵-۶ پیپت‌های تک‌کاناله؛

۵-۷ ترازوی آزمایشگاهی؛

۵-۸ دستگاه تولید آب دیونیزه و یا دستگاه تولید آب دوبار تقطیر؛

۵-۹ آون آزمایشگاهی؛

۵-۱۰ اتوکلاو آزمایشگاهی؛

۵-۱۱ سانتریفیوژ؛

1- Lugol's solution
2- Incubator

۵-۱۲ سونیکاتور؛

۵-۱۳ همزن مغناطیسی گرمکن‌دار؛

۵-۱۴ اکسیژن‌سنج؛

۵-۱۵ دماسنج؛

۵-۱۶ pH سنج؛

۵-۱۷ شوری‌سنج؛

۵-۱۸ فتومتر یا اسپکتروفوتومتر؛

۵-۱۹ منبع نور؛

۵-۲۰ دستگاه‌های مناسب برای کنترل سامانه‌های نوری و همچنین اندازه‌گیری شدت نور (لوکس‌متر)؛

۵-۲۱ تجهیزات تعیین کل کربن آلی؛

۵-۲۲ تجهیزات تعیین اکسیژن خواهی شیمیایی (COD)[1].

۶ آماده‌سازی و مشخصه‌یابی پراکنش نانوماده

۶-۱ آماده‌سازی پراکنش

بیشتر نانومواد به‌طور ذاتی گرایش قوی به کلوخه / انبوهه‌شدن در آب دارند و این حالت می‌تواند در آب شور افزایش یابد. قبل از ارزیابی سمیت یک نانوماده با استفاده از گونه‌های *آرتمیا*، نانوماده ساخته‌شده موردنظر باید به‌خوبی در آب شور پراکنده شود. از آنجا که مرحله آماده‌سازی پراکنش نانومواد ساخته‌شده بر ماده موردآزمون تاثیرات شناخته‌شده دارد، توصیه می‌شود به‌خوبی مستند شده و برای این کار از یک روش اجرایی استاندارد استفاده شود (به مراجع [36] و [37] مراجعه شود). پراکنده‌سازی اغلب طی یک روش اجرایی دو مرحله‌ای انجام می‌شود، ابتدا یک تعلیقه ذخیره‌شده آماده می‌شود و سپس با رقیق‌سازی آن، غلظت‌های بعدی برای شروع آزمون آماده می‌شوند. پراکنده‌سازی تعلیقه ذخیره نانوماده موردآزمون، می‌تواند از طریق هم‌زدن، سونیکیت کردن و یا با استفاده از گروه‌های عامل‌دار و پراکنده‌ساز سازگار با محیط‌زیست انجام شود. سونیکیت کردن به‌نحوی انجام شود که تا حدامکان هیچ ماده دیگری تولید نشود و توصیه می‌شود تاثیر سونیکیت کردن ارزشیابی شود. از به‌کار بردن مواد شیمیایی که تاثیر مخربی بر *آرتمیا* دارند به‌عنوان پراکنده‌ساز، اجتناب شود. وقتی که از ماده‌ای به‌عنوان پراکنده‌ساز استفاده می‌شود، توصیه می‌شود یک کنترل اضافه نیز بررسی شود که حاوی آن ماده با بیش‌ترین غلظتی باشد که در تعلیقه‌های نانوماده

1- Chemical Oxygen Demand

موردآزمون استفاده شده‌است. درهرصورت، غلظت حلال‌های آلی، امولسیون‌کننده‌ها یا پراکنده‌سازهای مورداستفاده نباید از ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر بیشتر باشد.

۶-۲ مشخصه‌یابی پراکنش

وضعیت پراکندگی نانوماده موردبررسی باید با روش‌هایی همچون پراکندگی نوری پویا (DLS)[1] همانگونه که در استاندراد ISO 22412[2] شرح داده شده‌است و یا طیف‌سنجی ضعیف اولتراسونیک[3] همانگونه که در استاندارد ISO 20998-1 توضیح داده شده_است، مشخص شود.

۶-۳ پایداری پراکنش در تعلیقه ذخیره

توزیع اندازه نانومواد موردبررسی و پایداری آن در طی زمان باید در فواصل زمانی مشخصه‌یابی شود. همچنین توصیه می‌شود غلظت نانوماده مورد بررسی در تعلیقه ذخیره با استفاده از روش‌های مناسبی ارزشیابی شود. در مورد نانومواد پایه فلزی که گرایش به تبدیل‌شدن به یون‌های فلزی (و بالعکس) را دارند، نسبت یون‌های فلزی به نانوماده فلزی موردنظر باید تعیین شود.

۶-۴ پایداری پراکنش در آب دریای مصنوعی

پایداری پراکندگی و غلظت واقعی نانوماده ساخته‌شده مورداستفاده در آب دریای مصنوعی باید در محدوده مناسبی از غلظت‌های موردآزمون و در طول دوره آزمون (پس از ۶ ساعت، ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت) صحه‌گذاری شود. از آنجایی که آب دریا ممکن است بر خواص فیزیکوشیمیایی نانوماده موردآزمون تأثیر بگذارد، بهتر است ویژگی‌های نانومواد موردآزمون پس از ترکیب با آب دریا نیز موردبررسی تکمیلی قرار گیرند. در این رابطه، درجه کلوخه‌شدن و انبوهه‌شدن (یا تغییر توزیع اندازه ذرات) و مقدار یون‌های فلزی در محیط مواجهه، باید ارزیابی شود.

۶-۵ آماده‌سازی محیط مواجهه برای آزمون‌های سمیت

تمام محیط‌های مواجهه به‌صورت تازه از تعلیقه‌های ذخیره (مثلا با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) آماده می‌شوند. برای دستیابی به غلظت‌های مربوطه از نانوماده ساخته‌شده مورد بررسی در محیط مواجهه، مقادیر مناسبی از تعلیقه ذخیره باید به‌طور مستقیم به آب دریای مصنوعی استریل‌شده اضافه شوند. هرچند گونه‌های *آرتمیا* برای تخم‌گشایی و رشد نیازی به محیط استریل ندارند، برای به حداقل رساندن رشد گونه‌های جلبک‌های تک سلولی و یا آلودگی‌های باکتریایی، توصیه می‌شود استریل کردن انجام شود. بهترین روش برای استریل کردن آب دریای مصنوعی به‌گونه‌ای که در شیمی آن تغییر زیادی ایجاد نشود، استفاده از روش فیلتر کردن است؛ بنابراین بهتر است که برای استریل کردن آب دریا از روش فیلتراسیون استفاده شود تا آب شور به‌دست آمده عاری از هرگونه باکتری باشد.

1- Dynamic Light Scattering

۲- استاندارد ملی ایران شماره ۱۶۲۴۷: سال ۱۳۹۲، آنالیز اندازه ذره- پراکندگی نور دینامیک DLS. با استفاده از استاندارد ISO 2241: 2017 تدوین شده‌است.

3- Ultrasonic Attenuation Spectroscopy

۷ روش اجرایی تخم‌گشایی

۷-۱ کلیات

ظروف کشت و تخم‌گشایی را باید با محلول کلرین ضعیف (٪ ۱) کاملا شسته، آب‌کشی و در جریان هوا قرار دهید تا خشک شود. از صابون استفاده نکنید، زیرا اگر مقدار کمی از آن هم باقی بماند، در طول هوادهی در فرآیند تخم‌گشایی ایجاد کف خواهد کرد و سیست‌ها را در بالای سطح آب نگه خواهدداشت که این کار بازده تخم‌گشایی را کاهش می‌دهد. اگرچه استریل کردن کامل تمام مواد و وسایل موردنیاز ضروری نیست، توصیه می‌شود رشد جلبک‌های تک‌سلولی و آلودگی‌های باکتریایی به حداقل ممکن برسد.

۷-۲ آب رقیق‌سازی

۷-۲-۱ آب دریای مصنوعی استاندارد با شوری ۱±۳۵ گرم در لیتر باید برای تخم‌گشایی و همچنین برای آزمون‌های سمیت تهیه و استفاده شود. پس از ۲۴ ساعت هوادهی و تثبیت، آب رقیق‌سازی باید دارای pH = ۰٫۵±۸٫۰ و محتوی حداقل ٪ ۹۰ اکسیژن اشباع باشد. درصورت لزوم، میزان pH باید با اندکی HCl یا NaOH بازتنظیم شود. توصیه می‌شود آب شور قبل از استفاده، از فیلتر یک میکرومتری عبور داده شود.

۷-۲-۲ درحال‌حاضر، استاندارد بین‌المللی برای ساختن آب دریای مصنوعی، استاندارد ASTM D1141-98 است [38]. ترکیب شیمیایی آب دریای مصنوعی پیشنهادی ASTM عبارت است از: NaCl (۲۴٫۵۳ گرم در لیتر)، $MgCl_2$ (۵٫۲۰ گرم در لیتر)، Na_2SO_4 (۴٫۰۹ گرم در لیتر)، $CaCl_2$ (۱٫۱۶ گرم در لیتر)، KCl (۰٫۶۹۵ گرم در لیتر)، $NaHCO_3$ (۰٫۲۰۱ گرم در لیتر)، KBr (۰٫۱۰۱ گرم در لیتر)، H_3BO_3 (۰٫۰۲۷گرم در لیتر)، $SrCl_2$ (۰٫۰۲۵ گرم در لیتر) و NaF (۰٫۰۰۳ گرم در لیتر).

۷-۳ ذخیره‌سازی سیست‌های آرتمیا

قوطی‌های مهروموم‌شده محتوی سیست‌های آرتمیا را می‌توان برای سال‌ها در دمای اتاق نگهداری کرد، اما اگر این قوطی یک بار باز شود، باید طی دو ماه استفاده شود. پس از هر بار استفاده، می‌توان قوطی را با یک پوشش پلاستیکی محکم پیچیده و در یخچال نگهداری کرد. اگر انتظار می‌رود که کل مقدار نگهداری‌شده در یخچال در طی دو ماه استفاده نمی‌شود، قسمت اضافه را باید در یک ظرف با پوشش پلاستیکی محکم کرده و تا زمان نیاز، داخل فریزر نگهداری کرد.

۷-۴ ضدعفونی سیست‌های آرتمیا

۷-۴-۱ محلول ۲۰۰ قسمت در میلیون هیپوکلریت سدیم را آماده کنید.

۷-۴-۲ سیست‌ها را به مدت ۳۰ دقیقه و در تراکم[1] ۵۰ گرم سیست به ازای هر لیتر آب، بخیسانید.

۷-۴-۳ سیست‌ها را سه بار بر روی غربال با چشمه ۱۲۵ میکرومتر و با آب مقطر کاملا بشویید.

۷-۴-۴ سیست‌ها برای گرم‌خانه‌گذاری به منظور تخم‌گشایی آماده هستند.

1- Density

۷-۵ روش تخم‌گشایی سیست‌های آرتمیا

۷-۵-۱ از یک ظرف تخم‌گشایی شفاف یا نیمه‌شفاف (ترجیحا بی‌رنگ) برای تخم‌گشایی سیست‌ها استفاده کنید.

۷-۵-۲ هوا را از طریق یک لوله هوادهی از قسمت پایین ظرف تخم‌گشایی مخروطی شکل به داخل آن هدایت کنید.

۷-۵-۳ به هر ظرف تخم‌گشایی ۱۰۰۰ میلی لیتر آب دریای مصنوعی استریل اضافه کنید.

۷-۵-۴ دما را در محدوده ۲۷ درجه سانتی‌گراد تا ۲۹ درجه سانتی‌گراد تنظیم کنید.

۷-۵-۵ pH را با افزودن مقدار مناسبی بی‌کربنات سدیم یا کربنات سدیم بین ۸ تا ۸٫۵ تنظیم کنید.

۷-۵-۶ کمینه روشنایی در سطح آب را برابر با ۲۰۰۰ لوکس تنظیم کنید.

۷-۵-۷ سیست‌های ضدعفونی‌شده را با تراکم ۲ گرم در لیتر گرم‌خانه‌گذاری کنید.

۷-۵-۸ معمولا پس از ۲۴ ساعت از زمان گرم‌خانه‌گذاری، ناپلی‌ها آماده برداشت هستند.

یادآوری- زمان برداشت با توجه به دمای گرم‌خانه‌گذاری و سویه جغرافیایی آرتمیای استفاده‌شده، متغیر است.

۷-۶ برداشت ناپلی‌های آرتمیا

۷-۶-۱ هوادهی را برای ۵ دقیقه الی ۱۰ دقیقه قطع کنید. پوسته‌های سیست شناور شده و می‌توانید آن‌ها را از روی سطح آب جمع کنید درحالی‌که ناپلی‌ها و سیست‌های گشوده نشده در ته ظرف تخم‌گشایی متراکم می‌شوند.

۷-۶-۲ از آنجایی که ناپلی‌ها واکنش مثبت به نور (فتوتاکسیس مثبت[1]) دارند، می‌توانید آن‌ها را از طریق ایجاد تاریکی (سایه) در قسمت بالای ظرف تخم‌گشایی و متمرکز کردن نور در قسمت شفاف پایینی ظرف تخم‌گشایی در محل تابش نور گردهم آورده و سپس به راحتی جمع‌آوری کنید.

۷-۶-۳ ناپلی‌های متراکم‌شده را می‌توانید از طریق سیفون کردن بر روی غربال چشمه ریز (کمتر از ۱۵۰ میکرومتر) جمع‌آوری کنید. در تمام مدت باید فیلتر را درون آب غوطه‌ور نگه‌دارید تا از آسیب به ناپلی‌ها جلوگیری شود.

۷-۶-۴ ناپلی‌های جمع‌آوری‌شده را باید با آب دریای مصنوعی به‌خوبی آب‌کشی کنید تا آلودگی‌ها و مواد باقی‌مانده از متابولیسم در طی تخم‌گشایی (همچون گلیسرول) حذف شوند.

۷-۶-۵ برای هر بار تخم‌گشایی باید از آب دریای مصنوعی تازه استفاده کنید.

۷-۷ محاسبه درصد تخم‌گشایی

1- Positive phototaxis

۷-۷-۱ درصد تخم‌گشایی به تعداد ناپلی‌هایی گفته می‌شود که تحت‌شرایط استاندارد از هر ۱۰۰ عدد سیست سالم به وجود می‌آیند.

۷-۷-۲ بعد از ۲۴ ساعت، از هر گرم‌خانه (ظرف تخم‌گشایی) ۶ زیرنمونه ۲۵۰ میلی‌لیتری خارج کنید. هریک از زیرنمونه‌ها را داخل ویال‌های کوچک پیپت کنید و با افزودن چند قطره محلول لوگول (محلول آبی شامل ۲ گرم یدید پتاسیم (KI)، ۱ گرم یدین (I_2) و ۱۰۰ گرم آب (H_2O))، نمونه‌ها را تثبیت کنید.

۷-۷-۳ با استفاده از یک استریو میکروسکوپ، تعداد ناپلی‌های تخم‌گشایی‌شده در هر زیرنمونه را شمارش کنید و میانگین تعداد ناپلی‌های تخم‌گشایی‌شده در ۶ زیرنمونه (N) را محاسبه کنید همچنین تعداد جنین‌های مرحله چتری در هر نمونه را شمرده و میانگین تعداد آن‌ها را در ۶ زیرنمونه (U)، محاسبه کنید.

۷-۷-۴ سیست‌های تخم‌گشایی‌نشده را به‌وسیله افزودن یک قطره محلول سدیم هیدروکسید و ۵ قطره محلول سدیم هیپوکلریت ٪ ۳ تا ٪ ۶ به هر ویال، کپسول‌زدایی کنید تا پوسته‌های سیست خالی حل شوند.

۷-۷-۵ با استفاده از استریوسکوپ، جنین‌های تخم‌گشایی‌نشده (که به رنگ نارنجی مشخص هستند) در هر زیرنمونه را شمارش کنید و تعداد میانگین آن‌ها را در ۶ زیر نمونه (U)، محاسبه کنید.

۷-۷-۶ درصد تخم‌گشایی (H%) برای هر زیرنمونه را از طریق فرمول محاسبه کنید (میانگین ۶ تکرار را محاسبه کنید):

$$H\ \% = (N \times ۱۰۰) \div (N + U + E)$$

۸ تاثیر نانومواد بر ناپلی *آرتمیا*

۸-۱ گروه‌های آزمون و کنترل

۸-۱-۱ ظروف آزمون را با مقادیر مناسبی از آب دریای مصنوعی و تعلیقه نمونه موردآزمون پر کنید. حجم نهایی پرشده در هر ظرف حداقل ۵ میلی‌لیتر به ازای هر ۵ عدد ناپلی باشد.

۸-۱-۲ سپس ناپلی‌ها را درون ظرف‌های آزمون قرار دهید. بهتر است برای هر یک از غلظت‌های موردنظر و همچنین گروه کنترل، حداقل ۲۰ عدد ناپلی به ۴ گروه تقسیم شوند که هر یک شامل ۵ عدد ناپلی باشد.

۸-۱-۳ زمانی که غلظت نانوماده مورد آزمون ناپایدار باشد، ممکن است آزمون به‌صورت نیمه‌ساکن تجدید شود. بدین معنی که محلول آزمون در دوره‌های زمانی مشخص (مثلا هر ۱۲ ساعت یک بار یا هر ۲۴ ساعت یک بار) با محلول تازه جایگزین شود (می‌توان به جای جایگزینی محلول‌های آزمون، ناپلی‌ها را به ظروف جدید محتوی غلظت‌های متناظر از محلول‌های آزمون منتقل کرد).

۸-۱-۴ یک مجموعه گروه کنترل و همچنین، اگر لازم باشد، یک مجموعه گروه کنترل محتوی عامل پراکنده‌ساز، در همان غلظتی که در تیمارها استفاده شده‌است، باید به‌صورت اضافه در کنار تیمار (غلظت)های اصلی موردبررسی قرار گیرد.

۸-۲ غلظت‌های آزمون

۸-۲-۱ ممکن است ابتدا لازم باشد که یک آزمون تعیین محدوده اثر انجام شود تا محدوده غلظت‌های موردنیاز برای انجام آزمون اصلی مشخص شود. برای این منظور، ناپلی‌ها را در معرض مجموعه‌هایی از غلظت‌های فاصله‌دار از نانوماده موردبررسی قراردهید. حداقل باید ۵ ناپلی را به مدت ۴۸ ساعت یا کم‌تر در معرض هر یک از این غلظت‌ها قراردهید و هیچ تکراری مورد نیاز نیست. چنانچه داده‌ها به اندازه کافی مناسب باشند، حتی ممکن است دوره مواجهه ناپلی‌ها با نانوماده موردبررسی کوتاه‌تر هم بشود (۲۴ ساعت یا کم‌تر).

۸-۲-۲ برای آزمون اصلی حداقل از ۵ غلظت استفاده کنید. توصیه می شود غلظت‌ها در مجموعه‌های هندسی با ضریب بیش از ۲٫۲ مرتب شده‌باشند. درصورتی‌که کمتر از ۵ غلظت استفاده می‌شود، حتما باید توجیهی برای این کار داشته باشید. بالاترین غلظت مورد آزمون باید باعث ٪ ۱۰۰ عدم تحرک شود و پایین‌ترین غلظت مورد آزمون باید هیچ تاثیر قابل‌مشاهده‌ای بر ناپلی‌ها نشان ندهد.

۸-۳ شرایط مواجهه

۸-۳-۱ توصیه می‌شود دمای آب را در گستره بین ۲۵ درجه سانتی‌گراد تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد تنظیم کنید و برای هر آزمون مجزا باید حداکثر تغییرات دمایی در گستره ۱± درجه سانتی‌گراد باشد. دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی توصیه می‌شود. تاریکی کامل نیز قابل‌قبول است، به‌ویژه برای نانومواد‌ی که نسبت به نور حساس هستند.

۸-۳-۲ ناپلی‌ها را نباید در طول آزمون تغذیه کنید.

۸-۴ طول دوره آزمون

طول مدت آزمون ۴۸ ساعته است.

۸-۵ مشاهدات

پس از گذشت ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت از شروع آزمون، ناپلی‌های موجود در هر ظرف آزمون را از نظر عدم تحرک موردبررسی قرار دهید. علاوه بر عدم تحرک، هرگونه رفتار و ظاهر غیرطبیعی را نیز گزارش کنید.

۸-۶ اندازه‌گیری‌های تحلیلی

۸-۶-۱ حداقل در شروع و پایان آزمون، مقادیر اکسیژن محلول و pH آب را در گروه‌های کنترل(ها) و تیماری که بالاترین غلظت نانومواد را دارند اندازه‌گیری کنید. به‌طور معمول، pH نباید بیش‌تر از ۱٫۵ واحد در بین هیچ‌یک از تیمارها تفاوت داشته باشد. دما معمولا در داخل ظروف مربوط به گروه‌های کنترل (دمای آب) و یا در هوای مجاور ظروف (دمای هوا) اندازه‌گیری می‌شود و اندازه‌گیری دما یا باید به‌طور مداوم در طول اجرا و یا حداقل در شروع و پایان آزمون انجام شود.

۸-۶-۲ توصیه می‌شود در شروع و پایان هر آزمون، حداقل در تیمارهای با بیش‌ترین غلظت و کم‌ترین غلظت از نانوماده موردآزمون، غلظت واقعی نانومواد مورد آزمون را بسنجید. نتایج را بر اساس این غلظت‌های اندازه‌گیری‌شده گزارش کنید. با این وجود چنانچه شواهدی به‌دست آید که ثابت کند غلظت‌های اندازه‌گیری‌شده در پایان آزمون به میزان کم‌تر از ٪ ۲۰± با غلظت‌های اندازه‌گیری‌شده در شروع آزمون و یا با غلظت‌های اسمی اختلاف داشته است، می‌توانید نتایج آزمون را بر اساس مقادیر اندازه‌گیری‌شده در شروع آزمون ویا غلظت‌های اسمی بیان کنید.

۸-۶-۳ در شروع و پایان هر آزمون، باید نانومواد موردآزمون را از نظر پایداری، پراکندگی و توزیع اندازه ذرات، حداقل در تیمارهای دارای بیش‌ترین غلظت و کم‌ترین غلظت موردبررسی قرار دهید.

۹ تحلیل داده‌ها

۹-۱ داده‌های به‌دست آمده از آزمون‌ها را در جداول طراحی‌شده در فرم‌های ویژه‌ای خلاصه‌سازی کنید و در این جداول تعداد ناپلی‌های مورداستفاده و درصد عدم تحرک در گروه‌های کنترل و دیگر تیمارها را نشان دهید. در این جدول درصد عدم تحرک در ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت را در مقابل هر یک از غلظت‌های موردآزمون قرار دهید. به‌منظور محاسبه غلظت موثره میانی (EC_{50}) با حدود اطمینان ٪ ۹۵، ($P=۰/۹۵$)، داده‌ها را با استفاده از روش‌ها و مدل‌های آماری مناسب (همچون آنالیز پروبیت و غیره) موردتحلیل قراردهید [41] [40].

۹-۲ هر جا که داده‌های به‌دست آمده با استفاده از روش‌های استاندارد موجود برای محاسبه EC_{50}، قابل تجزیه‌وتحلیل نباشند، باید میانگین هندسی[1] بالاترین غلظت به‌کاررفته که اصلا موجب عدم تحرک نشده و پایین‌ترین غلظت مورداستفاده که باعث ٪ ۱۰۰ عدم تحرک شده را به‌عنوان برآورد تقریبی EC_{50} استفاده کنید.

۱۰ گزارش آزمون

۱۰-۱ روش اجرایی آزمون

گزارش آزمون باید کاملا مطابق با روش اجرایی به‌کاررفته در آزمون باشد.

۱۰-۲ اطلاعاتی که باید در گزارش آزمون درج شود

۱۰-۲-۱ نانوماده موردآزمون

- مشخصه‌های فیزیکی و شیمیایی نانوماده موردآزمون به طور کامل (همچون شکل، خلوص، اندازه و ...) مطابق با استاندارد ISO/TR 13014؛

1- Geometric mean

- ویژگی‌های ریخت‌شناسی نانوماده موردآزمون با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)[1] و میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)[2]؛

- ویژگی‌های تجاری نانوماده موردآزمون (همچون کد سازنده، شماره کاتالوگ و فرمولاسیون، شماره بهر یا تاریخ تولید، نام تجاری و غیره)؛

- تمام تجهیزات و دستگاه‌های مورد استفاده (همچون مدل سازنده یا شماره کاتالوگ، شماره سریال یا تاریخ تولید، نام برند (نمانام) و غیره)؛

- مشخصه‌یابی پراکندگی و پایداری نانوماده موردآزمون هم در تعلیقه ذخیره و هم در آب دریای مصنوعی.

۱۰-۲-۲ گونه موردآزمون

- منبع *آرتمیا*، نژاد، گونه و درصورت امکان شماره بهر برند تجاری سیست‌ها؛

- مرحله لاروی ناپلی مورداستفاده (اینستار[3] ۱، ۲ و غیره).

۱۰-۲-۳ شرایط آزمون

- توصیف ظروف آزمون: نوع و حجم ظروف، حجم محلول، تعداد ناپلی در هر ظرف آزمون، تعداد ظروف آزمون (تعداد تکرارها) در هر غلظت؛

- روش آماده‌سازی محلول‌های آزمون و ذخیره، استفاده احتمالی از حلّال‌ها یا پراکنده‌سازها، همچنین غلظت‌های استفاده شده؛

- جزئیات آب رقیق‌سازی: منبع و مشخصات کیفی آب (حداقل pH و شوری)؛

- شرایط گرم‌خانه‌گذاری: دما، شدت و دوره نوری، اکسیژن محلول، pH و غیره؛

- غلظت‌های اسمی نانوماده موردآزمون و نتایج حاصل از همه تحلیل‌ها برای تعیین غلظت واقعی نانوماده موردآزمون در ظروف آزمون.

۱۰-۲-۴ نتایج زیست آزمون

- تعداد و درصد ناپلی‌هایی که بی‌تحرّک شده‌اند و یا هرگونه اثرات غیرطبیعی دیگر در آن‌ها مشاهده شده‌است (همچون رفتار غیرمعمول) در گروه‌های کنترل و هر کدام از دیگر تیمارهای مورد آزمون، در هر یک از زمان‌های مورد بررسی؛

- EC_{50} ۴۸ ساعته محاسبه‌شده با حدود اطمینان ٪ ۹۵؛

1- Transmission Electron Microscope
2- Scanning Electron Microscope
3- Instar

- داده‌هایی که اعتبار نتایج را تائید می‌کنند:

- EC_{50} دی‌کرومات پتاسیم؛

- درصد مرگ و میر در گروه‌های کنترل.

۱۱ صحّه‌گذاری نتایج

اگر شرایط زیر وجود داشته باشد، آزمون انجام‌شده را می‌توان دارای اعتبار درنظر گرفت:

- در گروه کنترل، از جمله گروه‌های کنترل حاوی عامل پراکنده‌ساز، نباید بیش‌تر از ٪ ۱۰ ناپلی‌ها بی‌تحرّک شده باشند.

- EC_{50} دی‌کرومات پتاسیم (کنترل مثبت) باید در محدوده غلظت گزارش‌شده برای گونه مورد آزمون *آرتمیا* باشد.

- غلظت اکسیژن محلول در پایان آزمون باید بالاتر از ۳ میلی‌گرم بر لیتر در گروه کنترل و دیگر ظروف آزمون باشد.

پیوست الف
(آگاهی‌دهنده)
تغییرات اعمال شده در متن استاندارد ملی در مقایسه با منبع

الف- ۱ موارد زیر به متن استاندارد اضافه شده‌است:

- مقدمه: این جمله به بند «ج» اضافه شده‌است: «و بنابراین استفاده از این جاندار برای بررسی اثرات تغییر اقلیم همچون تغییرات دمایی و نوسانات شوری در بوم سازگان‌های آبی امکان‌پذیر است».
- زیربند ۵-۳ (کنترل مثبت): این جمله اضافه شده‌است: «در اینجا منظور از کنترل مثبت ماده شیمیایی است که درصورت بررسی سمیت آن در آب شور با استفاده از ناپلی آرتمیا، همواره نتایج تکرارپذیری به‌دست آید».
- زیربند ۳-۱۵: یادآوری ۲ اضافه شده‌است: «یادآوری ۲- در حالت مفرد به نوزاد آرتمیا ناپلیوس گفته می‌شود».
- زیربند ۵-۱، این عبارت اضافه شده‌است: «(همچون گرم‌خانه آزمایشگاهی یا حمام آب)».
- زیربند ۳-۱-۸، این عبارت اضافه شده‌است: «بدین معنی که محلول آزمون در دوره‌های زمانی مشخص (مثلا هر ۱۲ ساعت یک‌بار یا هر ۲۴ ساعت یک‌بار) با محلول تازه جایگزین شود (می‌توان به جای جایگزینی محلول‌های آزمون، ناپلی‌ها را به ظروف جدید محتوی غلظت‌های متناظر از محلول‌های آزمون منتقل کرد)».

الف-۲ موارد زیر در متن تغییر داده شده‌است:

- زیربند ۸-۵: عبارت «دستگاه تولید آب دیونیزه و یا دستگاه تولید آب دوبار تقطیر» جایگزین "Laboratory water purification system" شده‌است.
- زیربند ۱۲-۵: "«سونیکاتور»: جایگزین "Sonication system" شده‌است.

کتاب‌نامه

[1] Ashtari, K., Khajeh, K., Fasihi, J., Ashtari, P., Ramazani, A., Vali, H. Silica-encapsulated magnetic nanoparticles: Enzyme immobilization and cytotoxic study. International Journal of Biological Macromolecules. 2012, 50(4) 1063-1069.

[2] Ates, M., Daniels, J., Arslan, Z., Farah, I.O., Rivera, H.F. Comparative evaluation of impact of Zn and ZnO nanoparticles on brine shrimp (*Artemia salina*) larvae: effects of particle size and solubility on toxicity. Environmental Science: Processes & Impacts. 2013a, 15, 225–233.

[3] Ates, M., Daniels, J., Arslan, Z., Farah, I.O. Effects of aqueous suspensions of titanium dioxide nanoparticles on *Artemia salina*: assessment of nanoparticle aggregation, accumulation, and toxicity. Environmental Monitoring and Assessment. 2013b, 185(4), 3339-3348.

[4] Ates, M., Demir, V., Arslan, Z., Daniels, J., Farah, I.O., Bogatu, C. Evaluation of alpha and gamma aluminum oxide nanoparticle accumulation, toxicity, and depuration in *Artemia salina* larvae. Environmental Toxicology. 2015, 30(1), 109-118.

[5] Ates, M., Demir, V., Arslan, Z., Camas, M., Celik, F. Toxicity of engineered nickel oxide and cobalt oxide nanoparticles to *Artemia salina* in seawater. Water, Air, & Soil Pollution. 2016, 227(3) 70.

[6] Becaro, A.A., Jonsson, C.A., Puti, F.C., Siqueira, M.C., Mattoso, L.H.C., Correa, D.S., Ferreira, M.D. Toxicity of PVA-stabilized silver nanoparticles to algae and microcrustaceans. Environmental Nanotechnology, monitoring and management. 2015, 3, 22-29.

[7] Bergami, E., Bocci, E., Vannuccini, M.L., Monopoli, M., Salvati, A., Dawson, K.A., Corsi, I. Nano-sized polystyrene affects feeding, behavior and physiology of brine shrimp *Artemia franciscana* larvae. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2016, 123, 18–25.

[8] Bhuvaneshwari, M., Sagar, B., Doshi, S., Chandrasekaran, N., Mukherjee, A. Comparative study on toxicity of ZnO and TiO_2 nanoparticles on *Artemia salina*: effect of pre-UV-A and visible light irradiation. Environmental Science and Pollution Research. 2017, 24(6) 5633-5646.

[9] Blaise, C., Gagné, F., Férard, J.F., Eullaffroy, P. Ecotoxicity of selected nano-materials to aquatic organisms. Environmental Toxicology. 2008, 23(5), 591-598.

[10] Callegaro, S., Minetto, D., Pojana, G., Bilanicová, D., Libralato, G., Volpi Ghirardini, A., Hassellöv, M., Marcomini, A. Effects of alginate on stability and ecotoxicity of nano-TiO_2 in artificial seawater. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2015, 117, 107–114.

[11] Clemente, Z., Castro, V.L., Jonsson, C.M., Fraceto, L.F. Minimal levels of ultraviolet light enhance the toxicity of TiO_2 nanoparticles to two representative organisms of aquatic systems. Journal of Nanoparticle Research. 2014, 16:2559.

[12] Cornejo-Garrido, H., Kibanova, D., Nieto-Camacho, A., Guzmán, J., Ramírez-Apan, T., Fernández-Lomelín, P., Garduño, M.L., Cervini-Silva, J. Oxidative stress, cytoxicity, and

cell mortality induced by nano-sized lead in aqueous suspensions. Chemosphere. 2011, 84, 1329–1335.

[13] Falugi, C., Aluigi, M., Faimali, M., Ferrando, S., Gambardella, C., Gatti, A., Ramoino, P. Dose dependent effects of silver nanoparticles on reproduction and development of different biological models. International Journal of Environmental Quality. 2012, 8, 61-65.

[14] Fatouros, D.G., Power, K., Kadir, O., Dékány, I., Yannopoulos, S.N., Bouropoulos, N., Bakandritsos, A., Antonijevic, M.D., Zouganelis, G.D., Roldo, M. Stabilisation of SWNTs by alkyl-sulfate chitosan derivatives of different molecular weight: towards the preparation of hybrids with anticoagulant properties. Nanoscale. 2011, 3(3) 1218-1224.

[15] Gambardella, C., Mesarič, T., Milivojević, T., Sepčić, K., Gallus, L., Carbone, S., Ferrando, S., Faimali, M. Effects of selected metal oxide nanoparticles on *Artemia salina* larvae: evaluation of mortality and behavioural and biochemical responses. Environmental Monitoring and Assessment. 2014, 186(7), 4249-4259.

[16] Gambardella, C., Costa, E., Piazza, V., Fabbrocini, A., Magi, E., Faimali, M., Garaventa, F. Effect of silver nanoparticles on marine organisms belonging to different trophic levels. Marine Environmental Research. 2015, 111, 41–49.

[17] Jemec, A., Kahru, A., Potthoff, A., Drobne, D., Heinlaan, M., Böhme, S., Geppert, M., Novak, S., Schirmer, K., Rekulapally, R., Singh, S., Aruoja, V., Sihtmäe, M., Juganson, K., Käkinen, A., Kühnel, D. An interlaboratory comparison of nanosilver characterisation and hazard identification: Harmonising techniques for high quality data. Environment International. 2016, 87, 20–32.

[18] Johari, S.A., Nemati, T., Dekani, L. Study on accumulation potential of zinc oxide nanoparticles in Artemia and its trophic transfer to Zebrafish (*Danio rerio*). Iranian Scientific Fisheries Journal. 2016, 25(1) 21-28.

[19] Kos, M., Kahru, A., Drobne, D., Singh, S., Kalčíková, G., Kühnel, D., Rohit, R., Gotvajn, A.Ž, Jemec, A. A case study to optimise and validate the brine shrimp *Artemia franciscana* immobilisation assay with silver nanoparticles: The role of harmonisation. Environmental Pollution. 2016, 213, 173-183.

[20] Kowalska-Góralska, M., Ława, P. Senze, M. Impact of silver contained in the nano silver preparation on the survival of brine shrimp (*Artemia salina* Leach 1819) larvae. Ecological Chemistry and Engineering. 2011, A 18(3) 371-376.

[21] Lacave, J.M., Fanjul, Á., Bilbao, E., Gutierrez, N., Barrio, I., Arostegui, I., Cajaraville, M.P., Orbea, A. Acute toxicity, bioaccumulation and effects of dietary transfer of silver from brine shrimps exposed to PVP/PEI-coated silver nanoparticles to zebrafish. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. 2017, 199, 69-80.

[22] Libralato, G., The case of *Artemia* sp. in nanoecotoxicology, Marine Environmental Research. 2014, 101, 38-43.

[23] Madhav, M.R., David, S.E.M., Kumar, R.S.S., Swathy, J.S., Bhuvaneshwari, M., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N. Toxicity and accumulation of copper oxide (CuO) nanoparticles in different life stages of *Artemia salina*. Environmental Toxicology and Pharmacology. 2017, 52, 227-238.

[24] Mesaric, T., Gambardella, C., Milivojević, T., Faimali, M., Drobne, D., Falugi, C., Makovec, D., Jemec, A., Sepčić, K. High surface adsorption properties of carbon-based nanomaterials are responsible for mortality, swimming inhibition, and biochemical responses in *Artemia salina* larvae. Aquatic Toxicology. 2015, 163, 121–129.

[25] Nogueira, V., Lopes, I., Rocha-Santos, T.A., Rasteiro, M.G., Abrantes, N., Gonçalves, F., Soares, A.M., Duarte, A.C., Pereira, R. Assessing the ecotoxicity of metal nano-oxides with potential for wastewater treatment. Environmental Science and Pollution Research. 2015, 22(17), 13212-13224.

[26] Ozkan, Y., Altinok, I., Ilhan, H., Sokmen, M. Determination of TiO_2 and $AgTiO_2$ nanoparticles in *Artemia salina*: Toxicity, morphological changes, uptake and depuration. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 2016, 96(1), 36-42.

[27] Pretti, C., Oliva, M., Pietro, R.D., Monni, G., Cevasco, G., Chiellini, F., Pomelli, C., Chiappe, C. Ecotoxicity of pristine graphene to marine organisms. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2014, 101,138–145.

[28] Radhika, S.R., Kumar, V.G., Abraham, L.S., Manoharan, N. Assessment on the toxicity of engineered nanoparticles on the lifestages of marine aquatic invertebrate *Artemia salina*. International Journal of Nanoscience. 2011, 10(4 & 5), 1153-1159.

[29] Rahmani, R., Mansouri, B., Johari, S.A., Azadi, N., Davari, B., Asghari, S., Dekani, L., Trophic transfer potential of silver nanoparticles from *Artemia salina* to *Danio rerio*. AACL Bioflux. 2016, 9(1), 100-104.

[30] Rajabi, S., Ramazani, A., Hamidi, M., Naji, T. Artemia salina as a model organism in toxicity a ssessment of nanoparticles. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences. 2014, 23:20.

[31] Rodd, A.L., Creighton, M.A., Vaslet, C.A., Rangel-Mendez, J.R., Hurt, R.H., Kane, A.B. Effects of Surface-Engineered Nanoparticle-Based Dispersants for Marine Oil Spills on the Model Organism Artemia franciscana. Environmental Science & Technology. 2014, 48(11), 6419–6427.

[32] Tavana, M., Kalbassi, M.R. Abedian Kenari, A.M., Johari, S.A. Assessment of assimilation and elimination of silver and TiO_2 nanoparticles in *Artemia franciscana* in different salinities. Oceanography. 2014, 5(19), 91-103.

[33] Vijayan, S.R., Santhiyagu, P., Singamuthu, M., Kumari Ahila, N., Jayaraman, R., Ethiraj, K. Synthesis and characterization of silver and gold nanoparticles using aqueous extract of seaweed, Turbinaria conoides, and their antimicrofouling activity. The Scientific World Journal. 2014, 3, 938272.

[34] Wang, C., Jia, H., Zhu, L., Zhang, H., Wang, Y. Toxicity of α-Fe_2O_3 nanoparticles to *Artemia salina* cysts and three stages of larvae. Science of the Total Environment. 2017, 598, 847-855.

[35] Zhu, M., Luo, F., Chen, W., Zhu, B., Wang, G. Toxicity evaluation of graphene oxide on cysts and three larval stages of *Artemia salina*. Science of the Total Environment. 2017, 595, 101-109.

[36] OECD 2012. Guidance on Sample Preparation and Dosimetry for the Safety testing of Manufactured Nanomaterials. ENV/JM/MONO(2012)40.

[37] Hartmann, N.B., Jensen, K.A., Baun, A., Rasmussen, K., Rauscher, H., Tantra, R., Cupi, D., Gilliland, D., Pianella, F., Riego Sintes, J.M. Techniques and Protocols for Dispersing Nanoparticle Powders in Aqueous Media – is there a Rationale for Harmonization? Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Reviews. 2015, 18(6), 299-326.

[38] ASTM D1141 98 (2013). Standard Practice for the Preparation of Substitute Ocean Water.

[39] Michael B. New. Farming Freshwater Prawns: A Manual for the Culture of the Giant River Prawn. FAO Fisheries Technical Paper. 2002, 428.

[40] Finney D.J. Statistical Method in Biological Assay. 3. ed. Charles Griffin & Co., London and High Wycombe 1978, Griffin, Weycombe, UK.

[41] Stephan C.E. Methods for calculating an LC50. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). ASTM STP 634 - American Society for Testing and Materials. 1977, Pp 65-84. Also is accessible at: https://www.astm.org/DIGITAL_LIBRARY/STP/SOURCE_PAGES/STP634.htm.

[42] Lavens P., Sorgeloos P. Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture. FAO FISHERIES TECHNICAL PAPER 361. 1996, Pages 90-100.

[43] ISO 6341:2012, Water quality — Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) — Acute toxicity test.

[44] ISO 20998-1, Measurement and characterization of particles by acoustic methods — Part 1: Concepts and procedures in ultrasonic attenuation spectroscopy.

[45] ISO 22412, Particle size analysis — Dynamic light scattering (DLS).

یادآوری–استاندارد ملی ایران شماره ۱۶۲۴۷: سال ۱۳۹۲، آنالیز اندازه ذره- پراکندگی نور دینامیک DLS. با استفاده از ISO 2241:2017 تدوین شده‌است.