

Comparison of the acute and chronic effects of copper sulfate and copper nanoparticles on some antioxidant enzymes of *Gammarus pseudosyriacus*.

Shokrollahi, F.¹, Fattollahi, M.^{1*}, Rahimi, R.^{1*}, Shaloui, F.¹

1-Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources and Earth Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

Received: 24 January 2024

Accepted: 3 April 2024

Abstract

Introduction: Copper is a vital trace element in aquatic ecosystems, but in high concentrations or certain forms it can become toxic. With the increasing use of nanoparticles, concerns about their impact on aquatic life have grown. This study focused on how copper, in two different chemical forms copper sulfate and copper oxide nanoparticles affects a native amphipod species, *Gammarus pseudosyriacus*. We aimed to compare their toxic effects and how they trigger changes in important biological enzymes related to stress.

Materials and Methods: First, we determined the acute toxicity level (LC₅₀ over 96 hours) for both copper sulfate and copper oxide nanoparticles. After that, we exposed *Gammarus* individuals to lower, sub-lethal concentrations (10% and 20% of LC₅₀) for longer periods 8 and 15 days to observe the effects of chronic exposure. To understand how their bodies reacted, we measured three enzymes: catalase (which helps break down harmful molecules), glutathione peroxidase (GPx, which fights oxidative stress), and malondialdehyde (MDA, a marker of cell damage due to lipid peroxidation).

Results: The results were clear: copper sulfate was much more toxic in the short term, with a lethal concentration almost 10 times lower than that of the copper nanoparticles. In other words, even small amounts of copper sulfate led to higher mortality. Enzyme analysis showed that copper sulfate caused stronger oxidative stress, especially visible in the GPx levels. On the other hand, although copper nanoparticles seemed safer in the short term, they still caused measurable damage over time particularly an increase in MDA levels, which hints at cellular damage building up gradually.

Conclusion: While copper sulfate has a more immediate and severe impact, long-term exposure to copper oxide nanoparticles isn't harmless. The data suggest that switching from copper sulfate to nanoparticles could reduce short-term deaths among aquatic organisms like *G. pseudosyrriacus*, but it doesn't eliminate ecological risks altogether. Monitoring stress-related enzymes like GPx and MDA can help us detect early signs of harm before population-level effects become visible.

Keywords: copper sulfate, copper nanoparticles, antioxidant enzymes, *Gammarus pseudosyrriacus*

* Corresponding Author: mehrdadfattollahi@gmail.com • rrahimi@sku.ac.ir

"مقاله پژوهشی"

مقایسه اثرات حاد و مزمن سولفات مس و نانو ذرات مس بر برخی از آنزیم های آنتی اکسیدانی گاماروس *Gammarus pseudosyriacus*

فریدون شکرالهی^۱، مهرداد فتح الهی^{۱*}، روح اله رحیمی^{۱*}، فردین شالویی^۱

۱- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم زمین، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱/۱۵

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۴

چکیده

در این تحقیق برای برآوردی از میزان تاثیر مس بر مقاومت زیستی و نیز تغییرات آنزیم های همی لافی گونه بومی گاماروس (*Gammarus pseudosyriacus*) انجام شد. بعد از تعیین کشندگی حاد ۹۶ ساعته (LC50 96h)، گاماروس ها در غلظت های ۱۰ و ۲۰ درصد LC50₉₆ برای آزمایش سمیت مزمن بعد از هشت و پانزده روز در تانک های جداگانه مورد سنجش آنزیمی قرار گرفتند. آنزیم های آنتی اکسیدانی کاتالاز، مالون دی آلدئید و گلوتاتیون پراکسیداز، معیار تغییرات در جاندار در اثر سمیت مزمن در این آزمایش بودند. نتایج نشان داد که سولفات مس با اثر دوز بسیار پایین تر به میزان ۰/۰۷۱ میلی گرم در لیتر در مقایسه با نانو ذرات مس به میزان ۰/۷۳ میلی - گرم در لیتر بر روی مرگ و میر تاثیر بیشتری دارد و کاربری نانو ذرات به صورت نانو اکسید مس به جای سولفات مس برای کاهش تلفات بر جمعیت گاماروس های *G. pseudosyriacus* ایمن تر است. با توجه به غلظت پایین تر کشندگی سولفات مس نسبت به نانو اکسید مس، تغییرات آنزیمی ناشی از استرس اکسیداتیو نیز به ویژه در پارامتر گلوتاتیون پراکسیداز نمایان تر بود و نقش نانو ذرات مس در بروز عوارض در طولانی مدت بر جمعیت در خصوص نتایج مالون دی آلدئید بروز نمود.

کلمات کلیدی: سولفات مس، نانو ذرات مس، آنزیم های آنتی اکسیدانی، *Gammarus pseudosyriacus*

* عهده دار مکاتبات: mehردادfattollahi@gmail.com، rrahimi@sku.ac.ir

مقدمه

با توجه به میزان روز افزون مصرف و تولید نانو ذرات، نگرانی‌ها در مورد سرنوشت و اثر بقایای این مواد در موجودات زنده و در نهایت در انسان افزایش یافته است و موضوع آثار نانو ذرات بر انسانها، سرنویس بسیاری از پژوهش‌ها است (Thorne-Bazarra, 2022). برای دسته بندی ذرات نانو به خواص مختلف آنها از نظر خواص شیمیایی آنها توجه می‌شود. ابعاد ذرات، مرفولوژی یا شکل، ترکیب، تک شکلی عمده آنها (Uniformity)، تجمع ذرات در کنار هم (Agglomeration) برای تعاریف آنها مورد نظر قرار می‌گیرد (Buzea, et al., 2007; Ju-Nam and Lead, 2008; Tounscoy, 2018).

به دلیل پراکنش گسترده نانو ذرات در زنجیره‌های غذایی و همچنین حضورشان در محیط‌های مختلف آبی، خشکی و اقلیمهای مختلف، در خصوص آثار نانو ذرات بر بدن و زندگی حشرات و بی‌مهرگان نیز تحقیقات مختلفی مورد نظر پژوهشگران قرار گرفته است (Gestin et al., 2022; Thorne-Bazarra, 2022). در آبریان مطالعات متعددی درباره اثرات نانوذرات صورت گرفته است (Hoseyni et al., 2017; Karimian et al., 2021). برای نمونه اثر ذرات نانو سلیکا که یک ماده بی اثر در طبیعت بوده و فعالیت بیوشیمیایی خاصی از آن بر جانوران مشاهده نمی‌شود، می‌تواند در صورت ورود به محیط زیست، باعث افزایش مرگ و میر زیادی در گونه شپشک برنج *Sitophilus oryzae* گردد (Debnath et al., 2011).

بدیهی است سوال‌های زیادی برای ورود نانو ذرات به داخل سلول‌ها و تاثیرات آنها بر فیزیولوژی بی‌مهرگان وجود دارد. به دلیل شباهت اندازه نانو ذرات

به ذرات پروتئینی، ذرات نانویی می‌توانند از سدهای بیولوژیکی سلولها عبور کنند. با توجه به نظر محققین (Moore, 2006) احتمالاً بیشترین ورود نانو ذرات بیش از ۱۰۰ نانومتر به داخل غشای سلولها توسط اندوسیتوز صورت می‌گیرد (Gestin et al., 2022; Moore et al., 2009; Unfried et al., 2007).

سازوکار مسمومیت نانو ذرات شامل تخریب غشای سلولی، اکسیداسیون پروتئینها، اثر سم بر ژن‌ها، تخریب مسیر انرژی‌زایی، ایجاد گونه‌های با اکسیژن فعال ROS (Reactive Oxygen Speices) و آزاد شدن بخش سمی مواد نانو ذره است. چسبیدن به سطح سلول و چسبیدن به غشای سلولی و در نتیجه تاثیر بر توانایی محدودیت‌های عبور سلولی، نفوذ سلولی و نیز تنفس سلولی نیز از جمله همین ساز و کار است (Gestin et al., 2022; Tounscoy, 2018; Benelli, 2018; Morones et al., 2005).

بر اساس گزارش Choi و همکاران در سال ۲۰۱۰ استفاده کاربردی و اقتصادی محصولات نانو ذرات نقره بر بیان ژن‌های گلو‌تامین اس ترانسفراز مرتبط با وقوع استرس اکسیداتیو در پشه آبرزی *Chironomus riparius* تاثیر داشته است. Yasur و Usha-Rani نیز نشان دادند که اثر بر استرس اکسیداتیو در دو گونه حشره *Achaea janata* و *Spodoptera litura* در معرض نانو ذره نقره در مرحله لاروی با افزایش میزان آنزیمهای آنتی‌اکسیدانی در آنها قابل اثبات است (Yasur and Usha-Rani, 2015). Mao و همکاران (۲۰۱۸) دریافتند که نانو ذرات نقره منجر به مرگ و میر در مگس‌های سرکه و نیز تاثیرات تاخیری بر نمو آنها می‌شود. ذرات نانو نقره باعث فزونی تجمع گونه‌های با اکسیژن فعال ROS در بافتهای پروازی مگس سرکه

ناشی از آپتوزیس یا مرگ سلولی، مرتبط با گونه‌های با اکسیژن فعال ROS در این بافتها می‌گردد، صدمه به مواد وراثتی دی‌ان‌ای، و نیز آتروفی در دوزهای کمتر از کشنده از عوارض این نانو ذرات بر مگس سرکه گزارش شده است. ورود ذرات نانو یا با عبور مستقیم از غشای سلولی یعنی از داخل روزنه‌های مربوط به شبکه هسته یا با به دام افتادن آنها در هسته در خلال میتوز در هنگام تجزیه‌ی غشای هسته خواهد بود که در نتیجه به DNA صدمه خواهد زد (Kadim and Risjani, 2021; Gomes *et al.*, 2011, 2013; Kádár *et al.*, 2011; Choi *et al.*, 2010). داده‌های ژنوتوکسیکی برای ذرات نانو در حشرات بسیار کم بوده و کمتر مورد بررسی قرار گرفته‌اند، ولی در بی‌مهرگان بزرگ و انسانها کم و بیش مورد توجه بوده‌اند. پژوهشگران مشخص کرده‌اند که غلظت بالایی از ذرات کوانتومی تلوراید کادمیوم در بافت‌های *Elliptio complanate* تجمع و تشکیل می‌شود و منجر به آسیب‌های دی‌ان‌ای در آبشش‌ها و نیز غده‌های گوارشی آنها می‌شود (Kadim and Risjani, 2021; Gagné *et al.*, 2008). Dziewięcka و همکاران با انجام مطالعه‌ای بر افزایش فعالیت کاتالاز و گلوکاتایون پرواکسیداز نظیر پروتئین شوک گرمایی و ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی جیرجیرک *Acheta domestica* در هنگامی که در معرض نانوذرات گرافنی قرار می‌گیرند، صحنه گذاشتند (Dziewięcka *et al.*, 2016).

مطالعه حاضر با هدف یافتن سرنوشت نانو ذرات و نیز رفتار بقایای نانوذرات در محیط زندگی زیست‌مندان و با توجه به آثار و گزارشهای ثبت شده از سوی پژوهشگران صورت پذیرفته است (Kontas, 2008; Rožič *et al.*, 2012). به علت کاربرد زیاد مواد و

ترکیبات دارای ذرات مس در سموم و کودهای ویژه کشاورزی و نیز ترکیبات ویژه تامین کننده میکروالمانها در خوراک ماهی تولیدی کارخانجات، این ماده برای آزمایش‌یر روی گونه بومی گاماروس به عنوان یک گونه مقاوم، سازگار و با پراکنش بالا در زنجیره‌های غذایی زیستگاههای آبهای جاری، ساکن و تالابهای منطقه کوهستانی زاگرس مرکزی انتخاب شد و بررسی اثر زیستی مس بر زیست، مقاومت ماندگاری و نیز آنزیم‌های همی لنفی آنها از طریق تعیین میزان دوز کشنده LC50 96h از دو ماده سولفات مس و نانو ذرات اکسید مس بر گاماروسهای بومی *Gammarus pseudosyrriacus* انجام شد (Kontas, 2008; Rožič *et al.*, 2012). در این تحقیق سنجش میزان تاثیرات مزمن سولفات مس و نانو اکسید مس بر میزان نشانگرهای آنزیمی همی لنفی گلوکاتایون پراکسیداز، کاتالاز و مالون دی‌آلدئید و مقایسه آنها در گاماروس بومی به عنوان یک سخت پوست با چرخه زندگی سالیانه در آب و نیز نقش آن به عنوان یک مصرف کننده اول و نیز طعمه برای ماهیان صورت پذیرفت. با استفاده از غلظت کشنده حاد سمی که در سنجش اولیه به دست آمد، برای جمعیت تحت تیمار به ازای ۱۰ درصد و یا ۲۰ درصد کشندگی مواد نانو اکسید مس و سولفات مس یعنی غلظت سمیت حاد LC50 96h (Zamani-Ahmadmoodi *et al.*, 2020)، سنجش آنزیم‌های کاتالاز، گلوکاتایون پراکسیداز و مالون دی‌آلدئید در جمعیت صورت پذیرفت که بیانگر وضعیت‌های بایومارکری جاندار در معرض مواد سمی است (Gestin *et al.*, 2022; Shonouda *et al.*, 2016).

مواد و روش‌ها

سازگاری گاماریدها

گونه تعیین شده *Gammarus pseudosyriacus* در منطقه چهارمحال و بختیاری (Khalaji-Pirbalouty and Sari, 2004) از جمعیت موجود در زیستگاه طبیعی آنها صید و به مخزن ذخیره و سازگاری در آزمایشگاه شیلات دانشکده منابع طبیعی دانشگاه شهرکرد انتقال و در درجه حرارت آب ۱۴ درجه سانتی‌گراد به منظور سازگاری و تثبیت شرایط زیست جمعیت نگهداری شدند. با توجه به کیفیت آب محل زیست، علاوه بر تعبیه هواده و سنگ هوا جهت تامین اشباعیت اکسیژنی (۰/۱۸ ± ۶/۴۹ میلی گرم در لیتر) و تثبیت آب تانک ذخیره در ۱۴ درجه سانتی‌گراد، pH و آمونیاک آب (شرایط نوری طبیعی پاییزه محیط) نیز اندازه گیری و پایش می شد (pH برابر ۷/۴ تا ۷/۸، آمونیاک < ۰/۱ میلی گرم در لیتر) و در هر سه روز یک سوم آب مخزن ذخیره تعویض می شد. با توجه به عدم تغییر میزان هدایت الکتریکی سنجش شده از آب در مخزن ذخیره و تانک‌های تیمار از ۴۶۸ تا ۵۱۸ میکروزیمنس بر سانتی‌متر، ثبات نسبی این پارامتر در طی آزمایش معلوم شد. از این تعداد گاماریدهای شناسایی شده سازگار شده در مخزن ذخیره از گونه *Gammarus pseudosyriacus* تعداد مورد نیاز در نظر گرفته شده در طرح برای هر تانک آزمایشی در تیمارها انتخاب شدند. با الهام از طبیعت زیستگاه این گونه بومی برای تغذیه از برگ‌های خشک شده خزان کرده درختان نارون استفاده شد.

روش اجرای تحقیق

تعیین سمیت حاد گاماروس‌ها به مدت ده روز با یک طرح آزمایشی کاملاً تصادفی انجام شد. تیمارهای

سولفات مس و نانو ذرات اکسید مس با روش استاتیک یعنی در آب بدون گردش در بشرهای با حجم ۲ لیتر به کاربرده شدند. برای تهیه تیمارهای محلول سولفات مس با تهیه محلول اولیه ۰/۱ میلی گرم در لیتر در مخزن‌های ۱۰ لیتری آب مقطر از طریق حل کردن ۱ میلی گرم سولفات مس بلور در ده لیتر آب مقطر و رساندن آن به حجم متناسب با دوز در نظر گرفته شده برای هر تیمار در آب، رقت سازی‌های لازم انجام شد. برای تهیه محلول‌های اولیه نانو اکسید مس نیز نانو ذرات با نسبت ۱ میلی گرم در لیتر با یکنواخت سازی در آب با همزن مغناطیسی محلول سازی و سپس رقت سازی‌های مربوط برای تیمارها انجام شد. برای بدست آوردن محدوده کشندگی سولفات مس، ۷ عدد گاماروس در سه تکرار درون بشرهای ۲ لیتری در معرض غلظت‌های ۰، ۰/۰۵، ۰/۱۰، ۰/۱۵، ۰/۲۰ و ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر سولفات مس قرار گرفتند. این غلظت‌ها برای تعیین سمیت حاد در محدوده بیشترین غلظت بدون کشندگی و کمترین غلظت انتخاب شدند. میزان تلفات در دوره‌های زمانی ۲۴ ساعته به مدت ۹۶ ساعت در هر غلظت در ساعات روشنایی طبیعی روزانه (ساعت ۱۱:۰۰)، از گاماروس‌های تلف شده و بی حرکت شمارش و مقدار تجمعی تلفات به دست آمده ثبت شد. گاماروس‌ها در زمان نگهداری و انجام آزمایش‌ها در شرایط ثابت نگهداری شدند. فراسنجه‌های فیزیکی و شیمیایی آب شامل دما (۱۴ درجه سانتی‌گراد)، اکسیژن محلول (۸/۵ میلی گرم بر لیتر) و pH (۷/۸) با استفاده از دستگاه پرتابل مدل HQ30d (آمریکا) اندازه‌گیری شدند. همچنین برای به دست آوردن سمیت حاد نانو ذرات مس مانند روش توضیح داده شده در بالا گاماروس‌ها در معرض غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲

و ۲/۵ میلی گرم در لیتر نانو ذرات مس قرار گرفتند. در روند تعیین غلظت کشنده با استفاده از آنالیز احتمال یا پروبیت میزان احتمال کشته شدن ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۹۰ درصد جمعیت در غلظت‌های متناسب با کشته شدگان به دست آمد.

سنجش آنزیم‌ها

در سنجش تغییرات آنزیم‌های آنتی اکسیدانی، میزان تاثیر ۱۰ درصد و ۲۰ درصد دوز سنجش شده کشنده LC50 96h نانو اکسید مس و سولفات مس به عنوان معیار آزمایشی مورد مشاهده قرار گرفتند. بعد از وارد کردن گاماریدها در تانک‌های ۱۰ لیتری با دوزهای ۱۰ و ۲۰ درصد کشندگی ۵۰ درصد جمعیت یعنی دوزکشنده حاد LC50 96h که در آزمایش قبلی به دست آمد و در تانک‌های شاهد بدون مواد سمی در روز ۸ و ۱۴، نمونه‌هایی به میزان سه گرم برداشت شدند. بعد از آبگیری، از مخلوط هموژن آنها در سه دقیقه با دور ده هزار، از آنها عصاره سانتریفوژ شده (فاز بالایی لوله آزمایش) تهیه و در یخ برای سنجش استاندارد با کیت‌های مربوط به آزمایشگاه منتقل شدند (Falahi et al., 2017). به منظور سنجش مالون دی آلدئید از روش کالریمتری استفاده شد. براین اساس، بافت هموژن شده در یک لوله آزمایش با اسید فسفریک و سپس با تیوباریتوریک اسید مخلوط و پس از مخلوط شدن به مدت ۴۵ دقیقه در بن ماری جوش قرارگرفت، پس از سرد شدن، بوتانول نرمال به این ترکیب اضافه گشت. پس از سانتریفوژ، جذب نوری مایع در طول موج ۵۳۲ نانومتر ثبت گردید (Goudarzi et al., 2007). همچنین فعالیت آنزیم‌های گلوتامین پراکسیداز و کاتالاز در قسمت بالایی محلول

سانتریفیوز شده بافت همی لشف هموژن شده با استفاده از کیت‌های بایو رکس (Biorex-) (https://biorexfars.ir.siteindices.com/ -) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده اندازه‌گیری در طول موج توصیه شده (مدل دستگاه اسپکتروفوتومتر) انجام پذیرفت. گزارش میزان آنزیم‌های آنتی اکسیدانی کاتالاز، مالون دی آلدئید و گلوتاتیون پراکسیداز، براساس واحدهای استاندارد در واحد نمونه‌های سنجش شده انجام شد (Pazhand et al., 2003; Falahi et al., 2017).

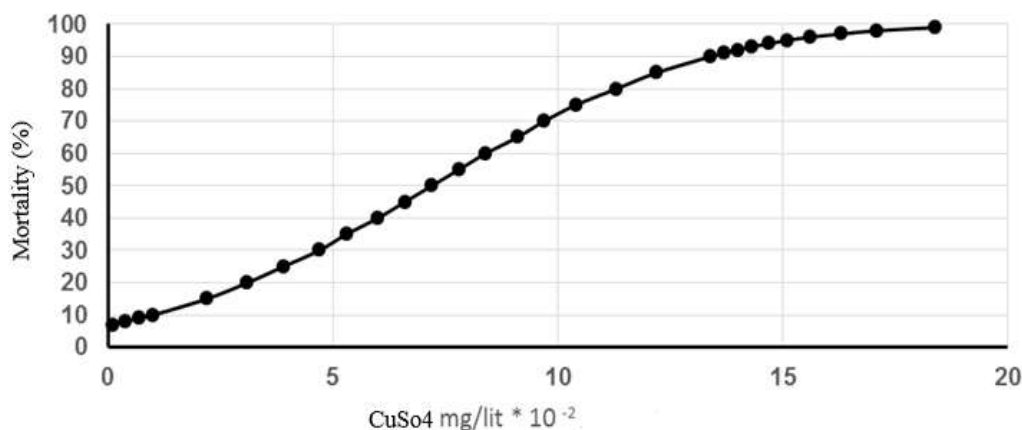
تجزیه و تحلیل آماری

از آنالیز پروبیت برای به دست آوردن غلظت‌های سمیت کشنده و حاد دو شکل از ذرات مس کاربردی یعنی نانو ذرات اکسید و سولفات مس محلول و نیز مقایسه میانگین‌ها برای میزان تاثیر آن بر متابولیت‌های سنجش شده در آزمایشگاه با استفاده از نرم افزار آماری SPSS ver. 20 انجام شد. رسم جداول و نمودارها براساس داده‌های به دست آمده با نرم افزار اکسل نسخه ۲۰۱۰ صورت گرفت. مقایسه و سنجش معنی‌داری میانگین تغییرات ($p < 0.05$) (با آزمون تی استیوننت t-) (student) مابین دو میانگین از تیمارهای مختلف بر اساس تغییر در روزهای مختلف انجام شد.

نتایج

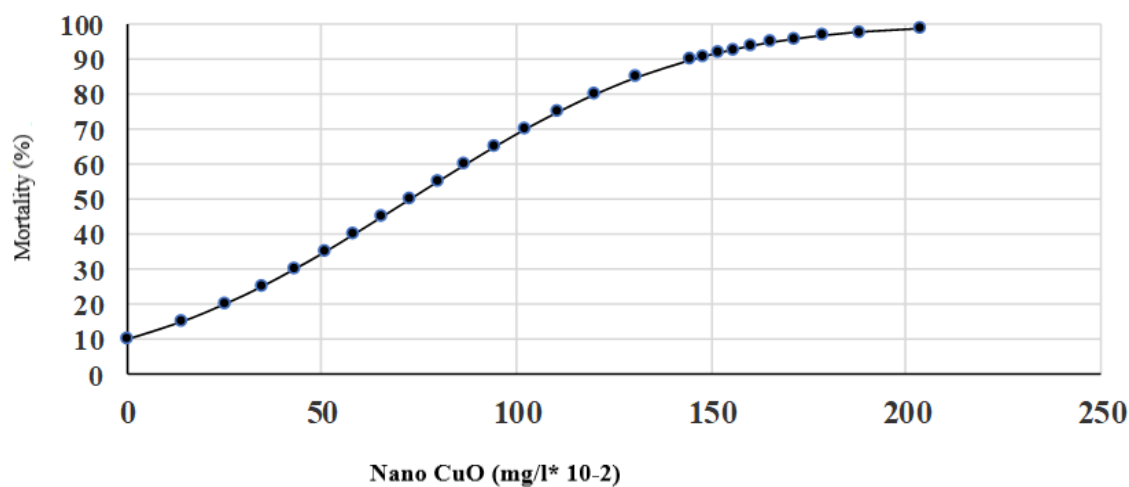
نتایج تست‌های سمیت حاد

با تعداد شمارش شده از نمونه‌های مرگ و میر در مخازن آزمایشی، برآورد دوز کشنده حاد LC50 96h برای سولفات مس ۰/۰۷۲ میلی گرم در لیتر و نانو مس ۰/۷۱ میلی گرم در لیتر انجام شد (شکل ۱ و ۲).



شکل ۱: نمودار برآورد تلفات گاماروس *Gammarus pseudosyriacus* در غلظت‌های مختلف سولفات مس

Figure 1: Estimated mortality rate of *Gammarus pseudosyriacus* at different concentrations of copper sulfate



شکل ۲: نمودار برآورد تلفات گاماروس *Gammarus pseudosyriacus* در غلظت‌های مختلف نانو ذرات مس

Figure 2: Estimated mortality rate of *Gammarus pseudosyriacus* at different concentrations of copper nanoparticles

نیز ۱۰ درصد و ۲۰ درصد از میزان سمیت کشنده حاد نانو اکسید مس (میلی گرم در لیتر ۰/۷۲ = LC50 96h) در مخازن ۱۰ لیتری قرار داده شدند، میزان آنزیم‌های کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و غلظت مالون دی‌آلدئید در جدول‌های ۱ و ۲ بیان شده است.

نتایج سنجش آنزیم‌های همی لنف در نمونه‌ها

بعد از سنجش میزان سمیت حاد دو محلول سولفات مس و نانواکسید مس در آزمایش نخستین، جمعیت حدود ۳۰۰ تایی از گاماروس‌ها در محیط دارای سولفات مس با غلظت ۱۰ درصد و ۲۰ درصد از سمیت کشنده حاد (میلی گرم در لیتر ۰/۰۷۱ = LC50 96h) و

جدول ۱: میزان آنزیمهای سنجش شده در گاماروس براساس دو سنجش ۱۰٪ و ۲۰٪ میزان LC50 96h از محلول سولفات مس در روزهای ۸ و ۱۵ آزمایش

Table 1: Measured enzyme levels in *Gammarus* based on 10% and 20% of the LC50 96h concentration of copper sulfate solution on the eighth and fifteenth days of the experiment

Treatment	Day	Catalase U.gr ⁻¹ tissue	GPx mU.gr ⁻¹ pro.	MDA μMol.gr ⁻¹ pro.
Control group	8	0.00±0.053	3320.0±653.78	4.11±0.17
Control group	15	0.00±0.020	2610.0±713.0	3.62±0.14
10% LC50 CuSO4	8	0.050±0.01	2008/0±130.7	3.69±1.13
10% LC50 CuSO4	15	0.083±0.02	1653.0±229.5	2.78±0.32
20% LC50 CuSO4	8	0.053±0.00	705.1±56.42	3.06±0.67
20% LC50 CuSO4	15	0.107±0.05	665.0±89.30	2.80±0.28

جدول ۲: میزان آنزیمهای سنجش شده در گاماروس براساس دو سنجش در معرض ۱۰٪ و ۲۰٪ میزان LC50 96h برای محلول نانو اکسید مس در روزهای ۸ و ۱۵ آزمایش

Table 2: Measured enzyme levels in *Gammarus* exposed to 10% and 20% of the LC50 96h concentration of copper oxide nanoparticles solution on the eighth and fifteenth days of the experiment

Treatment	Day	Catalase U.gr-1 tissue	GPX mU.gr-1	MDA μMol.gr-1
Control group	8	0.053±0.00	3320±653.78	4.11±0.17
Control group	15	0.020±0.000	2610±713.0	3.62±.14
10% LC50 Nano CuO	8	2.41±0.5	1122.00±280.6	0.073±.02
10% LC50 Nano CuO	15	2.26±0.2	907.13±39.2	0.019±0.01
20% LC50 Nano CuO	8	1.93±0.2	1146.00±451.8	0.095±0.03
20% LC50 Nano CuO	15	2.15±0.4	883.53±52.7	0.115±0.14

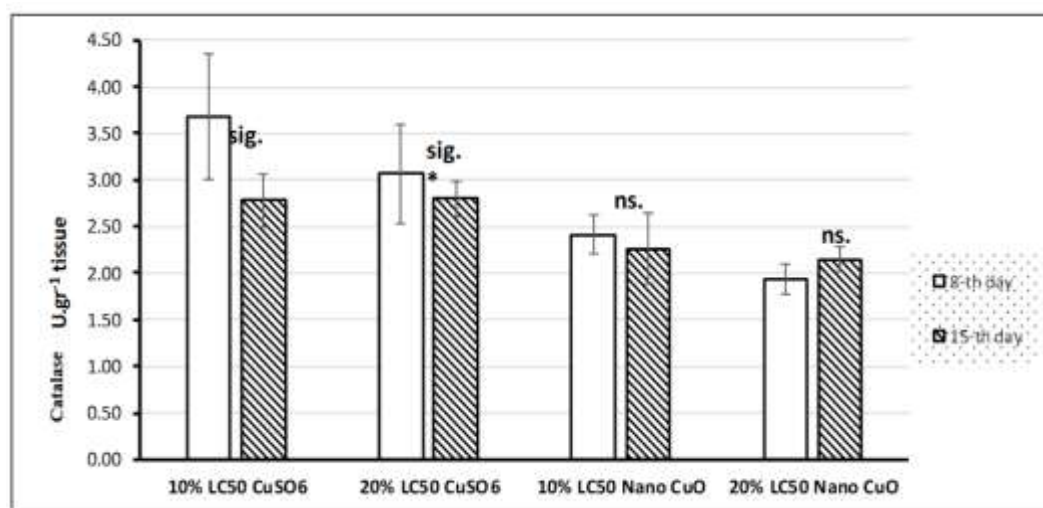
مس در هشت روز بعد از مواجهه، نسبت به بافت‌های گاماروس‌های شاهد کمتر بود ($p<0.05$). اختلاف میزان کاتالاز سنجش شده در تیمار ۱۰ درصد غلظت کشنده سولفات مس در روز ۸ و ۱۵ معنی‌دار نبود ولی در دوز ۲۰ درصد دوز کشنده، میزان کاتالاز سنجش شده، برای روز ۸ تا ۱۵ کاهش معنی‌داری داشت ($p<0.05$). برای نانو ذرات اکسید مس میزان کاهش کاتالاز برای دوزهای ۱۰ و ۲۰ درصد غلظت کشنده نسبت به شاهد در روز ۸ و ۱۵ سنجش معنی‌دار بود

از داده‌های مستخرج از جدول‌های ذکر شده مقایسه شدت اثر دو محلول سولفات مس و نانو ذرات مس در دو غلظت ۱۰ و ۲۰ درصد قدرت کشندگی حاد LC50 96h مشخص شده است. با توجه به مقادیر جدول ۱ و ۲ مقایسه میانگین آنزیم‌های همی لوف در معرض اکسیدهای مس با هم انجام شده است (شکل‌های ۳، ۴ و ۵) آورده شده است. میزان کاتالاز سنجش شده در بافت گاماروس‌های در معرض غلظت ۱۰ و ۲۰ درصد LC50 96h از سولفات

(شکل ۴) ($p>0.05$). میزان مالون دی آلدئید سنجش شده در گاماروسهای در معرض ۱۰ و ۲۰ درصد LC50 96h از سولفات مس در هشت روز بعد از مواجهه، نسبت به شاهد میزان افزایش معنی داری را نشان نداده و میزان این آنزیم نسبت به هم اختلاف معنی داری نداشته است ($p>0.05$). در روز ۱۵ مواجهه، این افزایش نسبت به شاهد معنی دار بود و برای سولفات مس محلول با هر دو دوز ۱۰ درصد و ۲۰ درصد LC50 96h در روز ۱۵، میزان ترشح مالون دی آلدئید به طور معنی داری افزایشی بوده است ($p<0.05$) (شکل ۵). در شکل ۵ تغییرات افزایش ناشی از عملکرد نانو ذرات اکسید مس در روزهای ۸ تا ۱۵ به ازای افزایش میزان دوز اگرچه کاملاً صعودی بود ولی اختلاف میان تغییرات در روز ۸ با شاهد معنی دار نبود. اختلاف معنی دار میان میزان مالون دی آلدئید در روز پانزدهم در غلظت ۱۰ درصد و ۲۰ درصد کشندگی نسبت به شاهد کاملاً معنی دار شد ($p<0.05$) (شکل ۵).

($p>0.05$) ولی میزان تغییرات در روز ۸ و ۱۵ سنجش برای هر دو دوز نانو اکسید مس نسبت به هم معنی دار نبود ($p>0.05$) (شکل ۳).

میزان گلو تاتیون پراکسیداز در بافت گاماروسهای در معرض سولفات مس غلظت ۱۰ و ۲۰ درصد از LC50 96h ساعت در ۸ و ۱۵ روز بعد از مواجهه نسبت به شاهد کمتر بود ($p<0.05$). کاهش میزان آنزیم در ۸ تا ۱۵ روز نسبت به هم، در دوز ۱۰ درصد نیز معنی دار بود ($p<0.05$) ولی در دوز ۲۰ درصد از غلظت کشنده در روزهای ۸ و ۱۵ مواجهه، تغییرات نسبت به هم معنی دار نشد و میزان روند کاهش یافته‌ی این آنزیم شکلی تثبیت شده را نشان داد ($p>0.05$). برای نانو ذرات اکسید مس میزان کاهش گلاتاتیون پراکسیداز برای دوزهای ۱۰ و ۲۰ درصد از LC50 96h ساعت نسبت به شاهد در روز ۸ و ۱۵، معنی دار مشاهده شد ($p>0.05$), ولی میزان تغییرات در هر دو دوز ۱۰ و ۲۰ درصد کشندگی در روز ۸ و ۱۵ مواجهه معنی دار نبود



شکل ۳: مقدار کاتالاز در گاماروسهای در معرض دو ماده سولفات مس CuSO₄ و نانو اکسید مس Nano CuO بر اساس ۱۰ و ۲۰ درصد LC50 96h بعد از ۸ و ۱۵ روز

Figure 3: Catalase activity in *Gammarus* exposed to two substances, copper sulfate (CuSO₄) and nano copper oxide (Nano CuO), at 10% and 20% of LC50 96h after 8 and 15 days

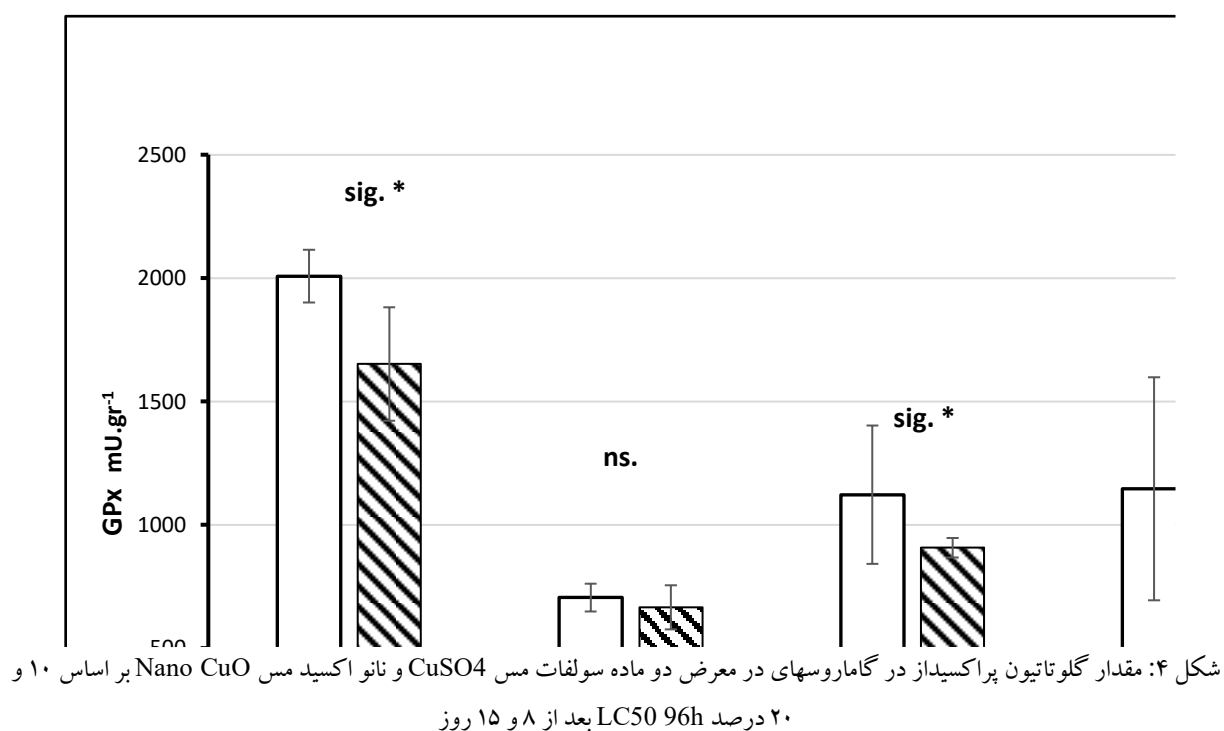


Figure 4: Glutathione peroxidase concentrations in *Gammarus* exposed to two substances, copper sulfate (CuSO_4) and nano copper oxide (Nano CuO), at 10% and 20% of LC_{50} 96h after 8 and 15 days

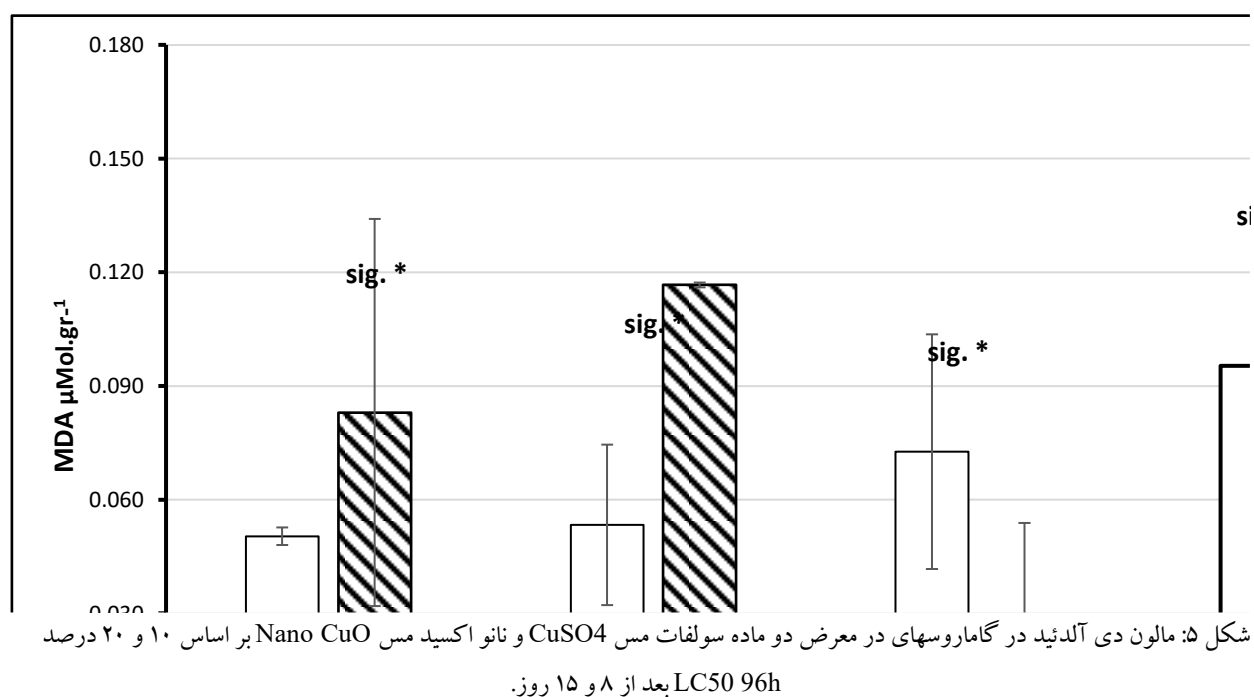


Figure 5: Malondialdehyde (MDA) concentrations in *Gammarus* exposed to two substances, copper sulfate (CuSO_4) and nano copper oxide (Nano CuO), at 10% and 20% of LC_{50} 96h after 8 and 15 days.

بحث

نتایج نشان داد که سولفات مس با اثر در دوز بسیار پایین‌تر $0.071 \text{ mg.lit}^{-1}$ (نسبت به 0.72 mg.lit^{-1} $\text{LC50}_{96 \text{ hour NP. CuO}}$) روی مرگ و میر جمعیت گاماروس تاثیر بیشتری دارد. به نظر می‌رسد کاربرد نانو ذرات به صورت اکسید مس به جای مس به شکل سولفات مس برای کاهش تلفات بر جمعیت گاماروس‌های *G. pseudosyrriacus* ایمن‌تر است. ولی برای تصمیم‌گیری در خصوص فعالیت زیستی این دو ماده بر فیزیولوژی احتمالی گاماروس‌های بررسی شده، سنجش میزان آنزیم‌های ترشح شده در همی لئف قضاوت بهتری را به همراه خواهد داشت. فعالیت آنزیم کاتالاز نشان دهنده دفاع و قدرت دفاعی جاندار در مقابل سوء تاثیرات آنتی‌اکسیدانی است (Kadim and Risjani, 2021). در نتیجه مقایسه میزان این آنزیم همی لئف در افراد جمعیت گاماروس در معرض غلظت‌های ۱۰ درصد و ۲۰ درصد از غلظت کشنده ۵۰ درصد جمعیت در ۹۶ ساعت، طی ۸ و ۱۵ روز، تاثیر فیزیولوژیک بیشتر سموم دارای ترکیبات نانو اکسید مس را نسبت به سولفات مس بر جمعیت گاماروس‌ها نشان می‌دهد. غلظت سولفات مس محلول نسبت به نانو ذرات اکسید مس تاثیری کشنده‌تر بر گاماروس‌ها داشته است، ولی عملکرد میزان فعالیت کاتالازی و افزایش این آنزیم با کاربرد نانو اکسید مس با غلظت ۱۰ و ۲۰ درصد غلظت‌های کشنده، در بافت و همی لئف افراد جمعیت گاماروس بیشتر بوده است. با این حال غلظت کم سولفات مس به شکلی مطلق و نه در مقیاس نسبی از غلظت کشندگی، اثرات معنی‌داری در پایین ماندن فعالیت دفاعی

کاتالازی نسبت به شاهد دارد که نباید در کاربرد این ماده نادیده انگاشته شود.

افزایش و کاهش برخی از آنزیم‌ها در نتیجه افزایش بعضی مواد، فرآیندها و سیگنال‌های بیوشیمیایی برای مقابله با فرآیندهایی سلولی و بافتی مثل سم زدایی و یا حتی عملکرد آنها برای بازداري گروهی دیگر از مواد و نیز آنزیم‌ها رخ می‌دهد که برای بیان آنها باید به چرخه‌های شناخته شده آنها در گزارش‌های محققین مراجعه کرد (Gestin et al., 2022; Thorne-). برای نمونه فرآیند کاهش پروتئین‌ها می‌تواند برای رویکرد مصرف آنها در بدن برای تولید برخی از آنزیم‌های سم زدا و از بین بردن آنها در ازای ورود سموم رخ دهد. آنزیم‌هایی مانند گلوکاتایون پراکسیداز، گلوکاتایون احیاء و کاتالاز کنشگرهای شناخته شده برای مقابله با عملکرد سموم هستند (El-Samad et al., 2015). میزان کاتالاز سنجش شده در بافت گاماروس‌های در معرض ۱۰ و ۲۰ درصد از غلظت کشندگی پنجاه درصد جمعیت در ۹۶ ساعت از سولفات مس در ۸ روز و نیز در روز ۱۵ بعد از مواجهه میزان کمتری را در جمعیت نشان داده است، ولی باید توجه نمود که میزان غلظت کشنده در سولفات مس بسیار کمتر از نانو ذرات اکسید مس است. میانگین بیشتر میزان کاتالاز سنجش شده در جمعیت در معرض نانو اکسید مس نسبت به سولفات مس نشان از پر خطر بودن سولفات مس به علت کاهش میزان دفاع کاتالازی در جمعیت گاماروس هاست.

گلوکاتایون پراکسیداز به عنوان یکی عوامل دفاعی بدن جانداران در مقابل افزایش ROS عاملی مهم برای بررسی تاثیر مقابله با این عوامل خطرناک است

(Armstrong *et al.*, 2013). میزان گلوکاتینون پراکسیداز سنجش شده در بافت گاماروس‌های در معرض ده و بیست درصد از غلظت کشندگی پنجاه درصد جمعیت در ۹۶ ساعت از نانواکسید مس در هشت روز بعد از مواجهه و نیز در روز ۱۵ نسبت به شاهد میزان کمتری را نشان داده و در روز ۸ و ۱۵ گاماروس‌ها در مواجهه با محلول‌های تیمار نسبت به شاهد بدون مواد سمی میزان گلوکاتینون پراکسیداز ترشح شده کمتری را نشان داده‌اند. کاهش زیاد گلوکاتینون پراکسیداز در محلول تیماری سولفات مس در مدت طولانی‌تر ۱۵ روزه نسبت به روز ۸، در محلول با غلظت ۱۰ درصد کشندگی در مقایسه با غلظت ۲۰ درصد کشندگی در گروه‌های تیماری نشان می‌دهد که میزان سولفات مس با وجود غلظت کمتر در کشندگی نسبت به نانو اکسید مس، فعالیت فیزیولوژیک طولانی‌تری را در جمعیت گاماروس‌های متأثر داشته، در نتیجه جمعیت در مقابل استرس‌های اکسیداتیو سولفات مس تاثیر پذیری طولانی‌تری نسبت به نانواکسید مس خواهند داشت. در هر دو روز ۸ و ۱۵ در معرض قرار گرفتن جمعیت، با تغییر غلظت از ۱۰ در صد غلظت کشنده به ۲۰ درصد غلظت کشنده در تیمار نانو اکسید مس تغییرات و کاهش میزان گلوکاتینون پراکسیداز نسبت به آنچه در تیمارهای سولفات مس مشاهده شد، کمتر بود. به نظر می‌رسد میزان این آنزیم در اثر تماس با ماده با سمیت بیشتر یعنی سولفات مس نسبت به نانواکسید مس، تاثیر بیشتر را بر جمعیت نشان داده و کاهش بیشتری را نسبت به شاهد نشان می‌دهد.

بیومارکر مالون دی آلدئید به عنوان نشان دهنده پتانسیل بدن برای تخریب و تاثیرات مواد سمی محیط روی DNA تحت تاثیر استرس‌های اکسیدهای ناشی از

مواد مورد استناد قرار می‌گیرد و محصولی از تخریب‌های سلولی در بدن است (Kadim and Risjani, 2021; Farmer and Davoine, 2007). میزان این مارکر در صورت افزایش می‌تواند به علت تولید بالای ROS به ویژه HO در اثر تخریب چربی‌های پرشاخه غیر اشباع یا بر اثر تولید ROS و نیز برای جلوگیری از فعالیت کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز باشد (Armstrong *et al.*, 2011; Aslanturk *et al.*, 2013). افزایش مالون دی آلدئید بر اثر آلودگی حشرات به فلزات سنگین نیز گزارش شده است به این ترتیب کاهش میزان مالون دی آلدئید نشانه دفاع ارگانسیم در مقابل و برای مقابله و کاهش میزان ROS بدن باشد.

میزان مالون دی آلدئید سنجش شده در بافت گاماروس‌های در معرض ۱۰ و ۲۰ درصد از غلظت کشندگی پنجاه درصد جمعیت در ۹۶ ساعت از سولفات مس در ۸ روز بعد از مواجهه نسبت به شاهد میزان کاهش معنی‌داری را نشان داده است. به نظر می‌رسد با توجه به عدم اختلاف معنی‌دار میزان مالون دی آلدئید سنجش شده در روزهای ۸ و ۱۵ آزمایش در عین حال غلظت پایین‌تر کشندگی سولفات مس، این ماده را باید نسبت به نانو اکسید مس از نظر مکانیسم ایجاد مقابله در برابر جمعیت گاماروس‌ها، برای ایجاد ضایعات ژنتیکی موثرتر و فعال‌تر دانست. با تماس بیشتر جمعیت در مخزن‌های حاوی محلول‌های سولفات مس و نانو ذرات اکسید مس و در روز ۱۵ میزان کاهش مالون دی آلدئید در ازای قرار گرفتن در معرض نانو ذرات اکسید مس نشان دهنده تاثیر زیستی بیشتر این ماده نسبت به سولفات مس است. آزمایش‌های سنجش مواد مارکر نشان دهنده ایجاد صدمات در کنار تست سمیت نانوذرات مس و سولفات مس نشان می‌دهد که

pigmentation reveals intervention of copper homeostasis. *Plos One*, 8(1), pp.e53186.

DOI:10.1371/journal.pone.0053186

2. Aslanturk A., Kalender S., Uzunhisarcikli M. and Kalender Y., 2011. Effects of methidathion on antioxidant enzyme activities and malondialdehyde level in midgut tissues of *Lymantria dispar* (*Lepidoptera*) larvae. *Journal of the Entomological Research Society*, 13(3), pp.27-35.
3. Benelli, G., 2018. Mode of action of nanoparticles against insects. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(13), pp.12329–12341. DOI: 10.1007/s11356-018-1850-4
4. Buzea, C., Blandino, I.P. and Robbie, K., 2007. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*, 2(4), pp.MR17–MR172. DOI: 10.1116/1.2815690
5. Choi, J.E., Kim, S., Ahn, J.H., Youn, P., Kang, J.S., Park, K., Yi, J. and Ryu, D.Y., 2010. Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish. *Aquatic Toxicology*, 100(2), pp.151–159. DOI:10.1016/j.aquatox.2010.06.012
6. Debnath, N., Das, S., Seth, D., Chandra, R., Bhattacharya, S.C. and Goswami, A., 2011. Entomotoxic effect of silica nanoparticles against *Sitophilus oryzae* (L.). *Journal of Pest Science*, 84(1), pp.99–105. DOI: 10.1007/s10340-010-0332-3
7. Dziewięcka, M., Karpeta-Kaczmarek, J., Augustyniak, M., Majchrzycki, Ł. and Augustyniak-Jabłokow, M.A., 2016. Evaluation of in vivo graphene oxide toxicity for *Acheta domesticus* in relation to nanomaterial purity and time passed from the exposure. *Journal of Hazardous Materials*, 305, pp.30–40. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2015.11.021
8. El-Samad L., El-Hassan M., Wafaa O. and Shonouda M., 2015. The ground beetle, *Blaps polycresta* (*Coleoptera:Tenebrionidae*) as

علی‌رغم غلظت پایین کشندگی سولفات مس در جمعیت گاماروس‌ها و نیز تاثیر آن با غلظت‌های کمتر از غلظت کشندگی، در نانو اکسید مس نیز توجه به آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو به ویژه در پارامتر گلوکوتایون پراکسیداز به مانند کشندگی از سوی سولفات مس، اثر و بروز صدمات در جمعیت مشخص و نمایان است (Kadim and Risjani, 2021; Farmer and Davoine, 2007).

نتیجه گیری

بنابر مباحث مطروحه و با توجه به غلظت پایین‌تر کشندگی سولفات مس نسبت به نانو اکسید مس، تغییرات آنزیمی ناشی از استرس اکسیداتیو به ویژه در پارامتر گلوکوتایون پراکسیداز نمایان‌تر بود و نقش نانو ذرات مس در بروز عوارض در طولانی مدت بر جمعیت در خصوص نتایج مالون دی‌آلدئید بروز نمود. پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی به مباحث بیان ژن‌های مرتبط با این آنزیم‌ها پرداخته شود، تا مکانیسم‌های مرتبط به تاثیر سمیت این مواد را روشنتر و دقیقتر بتوان بررسی کرد.

سپاسگزاری

لازم می‌دانیم از همکاری آقای مهندس حسین رحیمی پردنجانی کارشناس محترم آزمایشگاه شیلات دانشگاه شهرکرد، بابت یاری در انجام این تحقیق سپاسگزاری نمایم.

منابع

1. Armstrong, N., Ramamoorthy, M., Lyon, D., Jones, K. and Duttaroy, A., 2013. Mechanism of silver nanoparticles action on insect

- H. and Ansari, M., 2007. Oxidative damage to DNA and lipids and its relationship with protein calcification in patients with type 1 diabetes. *Scientific Journal of Hamadan University of Medical Sciences and Health Services*, 14(4), pp.33–37. [In Persian]
16. Hoseyni, S.J., Ziaei-nejad, S. and Johari, S.A., 2017. Effects of nanosized titanium dioxide on gill histopathological changes in common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to oil water-soluble phase. *Journal of Aquaculture Development*, 11(3), pp.13–27. [In Persian]
 17. Ju–Nam, Y. and Lead, J.R., 2008. Manufactured nanoparticles: An overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. *Science of the Total Environment*, 400(1-3), pp.396–414.
DOI:10.1016/j.scitotenv.2008.06.042
 18. Kádar, E., Tarran, G.A., Jha, A.N. and Al–Subiai, S.N., 2011. Stabilization of engineered zero– valent nanoiron with Na–acrylic copolymer enhances spermioxicity. *Environmental Science and Technology*, 45(8), pp.3245–3251.
DOI:10.1021/es103848
 19. Kadim M. Kh. and Risjani Y., 2021. Biomarker for monitoring heavy metal pollution in aquatic environment: An overview toward molecular perspectives. *Emerging Contaminants*, 8, pp.195–205.
DOI:10.1016/j.emcon.2022.02.003
 20. Karimian Kakolaki, S., Shalooei, F., Shadkhast, M. and Arab Markadeh, M., 2021. Effect of replacing copper sulfate with copper oxide nanoparticles in the diet on digestive enzyme activity and histopathology of the intestine in crucian carp (*Carassius auratus*). *Journal of Aquaculture Development*, 15(2), pp.45–59. DOI: 10.52547/aquadev.15.2.115 [In Persian]
 21. Kontas, A. 2008. Trace metals (Cu, Mn, Ni, Zn, Fe) contamination in marine sediment and zooplankton Samples from Izmir Bay. (Aegean Sea, Turkey). Bioindicator of Heavy Metals Soil Pollution. *Journal of Advances in Biology*, 7, pp.1153–1160. DOI: 10.24297/jab.v7i1.4862
 9. Falahi, K.M., Rahbari, Sh. and Shamsaee, M., 2017. Determination of the permissible limit of the herbicide Diuron on the survival of *Daphnia magna*. *Advanced Aquaculture Sciences Quarterly*, 1(1), pp.1–11.
 10. Farmer E.E. and Davoine C., 2007. Reactive electrophile species. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(4), pp.380–386.
DOI:10.1016/j.pbi.2007.04.019
 11. Gagné, F., Auclair, J., Turcotte, P., Fournier, M., Gagnon, C., Sauvé, S. and Blaise, C., 2008. Ecotoxicity of CdTe quantum dots to freshwater mussels: Impacts on immune system, oxidative stress and genotoxicity. *Aquatic Toxicology*, 86(3), pp.333–340. DOI: 10.1016/j.aquatox.2007.11.013
 12. Gestin, O., Lopes Ch, Delorme N., Garnerio L., Geffard O. and Lacoue-Labarthe, Th., 2022. Organ-specific accumulation of cadmium and zinc in *Gammarus fossarum* exposed to environmentally relevant metal concentrations. *Environmental Pollution*, 308, pp.119625. DOI:10.1016/j.envpol.2022.119625
 13. Gomes, T., Pinheiro, J.P., Cancio, I., Pereira, C.G., Cardoso, C. and Bebianno, M.J., 2011. Effects of copper nanoparticles exposure in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environmental Science and Technology*, 45(21), pp.9356–9362. DOI: 10.1021/es200955s
 14. Gomes, T., Araújo, O., Pereira, R., Almeida, A.C., Cravo, A. and Bebianno, M.J., 2013. Genotoxicity of copper oxide and silver nanoparticles in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Environmental Research*, 84, pp.51–59. DOI: 10.1016/j.marenvres.2012.11.009
 15. Goudarzi, M.T., Navidi Abbaspour, A.A., Rezaei, M., Baba Ahmadi Rezaei,

- aquacultural activity of marine sediments (Central Adriatic, Croatia). *Environmental Science and Pollution Research International*, 19(7), pp.2708–2721. DOI:10.1007/s11356-012-0769-4
29. Shonouda, M.L., Lamia M. El-Samad, L.El., Mokhamer, El.H. and Toto, N., 2016. Use of oxidative and genotoxic biomarkers in aquatic beetles *Anaceana glubolous* (Coleoptera: Hydrophilidae) as biomonitors of water pollution. *Journal of Entomology*, 13(4), pp.122-131. DOI: 10.3923/je.2016.122.131
30. Thorne-Bazarra, T., Lozano-Bilbao, E., Triay-Portella, R., Hardisson, A., Paz, S., Rubio-Armendariz, C., Martín, V. and Gutiérrez, A.J., 2022. Metallic Study of the Invasive Species *Cronius ruber*—Assessment of Toxic Risk. *Applied sciences*, 12(7), pp.3217. DOI: 10.3390/app12073217
31. Tounscoy S.B., 2018. Toxicity of nanoparticles on insects: A Review. *Adana Science and Technology University Journal of Science*, 1(2), pp.49-61.
32. Unfried, K., Albrecht, C., Klotz, L., Mikecz, A.V., Grether-Beck, S. and Schins, R.P.F., 2007. Cellular responses to nanoparticles: target structures and mechanisms. *Nanotoxicology*, 1(1), pp.52–71. DOI:10.1080/00222930701314932
33. Yasur, J. and Usha-Rani, P., 2015. Lepidopteran insect susceptibility to silver nanoparticles and measurement of changes in their growth, development and physiology. *Chemosphere*, 124(1), pp.92–102. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2014.11.029
34. Zamani-Ahmadmoodi, R., Beygi, M.M., Rahimi, R. and Johari S.A., 2020. Aquatic pollution caused by mercury, lead, and cadmium affects cell growth and pigment content of marine microalga, *Nannochloropsis oculata*. *Environment Monitoring Assessment*, 192(6), pp.330. DOI:10.1007/s10661-020-8222-5
- Water, Air, and Soil Pollution*, 188(1), pp.323–333. DOI:10.1007/s11270-007-9547-1
22. Khalaji-Pirbalouty, V. and Sari, A., 2004. Biogeography of amphipods (Crustacea: Amphipoda: Gammaridae) from the central Zagros Mountains, Iran, with descriptions of two new species. *Journal of Natural History*, 38(19), pp.2425–2445. DOI:10.1080/00222930310001647406
23. Mao, B.H., Chen, Z.Y., Wang, Y.J. and Yan, S.J., 2018. Silver nanoparticles have lethal and sublethal adverse effects on development and longevity by inducing ROS-mediated stress responses. *Scientific Reports*, 8(1), pp.24-45. DOI:10.1038/s41598-018-20728-z
24. Moore, M.N., 2006. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environmental International*, 32(8), pp.967–976. DOI:10.1016/j.envint.2006.03.014
25. Moore, M.N., Readman, J.A.J., Readman, J.W., Lowe, D.M., Frickers, P.E. and Beesley, A., 2009. Lysosomal cytotoxicity of carbon nanoparticles in cells of the molluscan immune system: an in vitro study. *Nanotoxicology*, 3(1), pp.40–45. DOI: 10.1080/17435390802593057
26. Morones, J.R., Elechiguerra, J.L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J.B., Ramírez, J.T. and Yacaman, J.M., 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16, pp.2346–2353. DOI:10.1088/0957-4484/16/10/059
27. Pazhand, Z., Esmaeili Sari, A. and Piri Zirkuhi, M., 2003. The role and effect of the insecticide diazinon in ecotoxicological studies on sturgeon juveniles (*Acipenser persicus* and *Acipenser stellatus*). *Pajouhesh va Sazandegi*, 58, pp.64–68. [In Persian]
28. Rožič, P. Ž., Dolenec, T., Baždarić, B., Karamarko, V., Kniewald, G. and Dolenec, M., 2012. Major, minor and trace element content derived from