شیلات، مجله منابع طبیعی ایران

دوره ۷۱، شماره ۱، بهار ۱۳۹۷

صفحات ۲۱-۱۱

تعیین غلظت تحت کشنده (LC_{50}) نانو اکسید مس در ماهی آمور (*Ctenopharyngodon idella*) و تأثیر آن بر شاخص‌های خونی و فعالیت آنزیم‌های کبدی

معصومه وفادارنژاد[۱]، احمدقرایی[۲*]*، جواد میردار هریجانی[۳]، محدثه میری[۴]*

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

۲.دانشیار گروه شیلات دانشکده منابع طبیعی و گروه پژوهشی شیلات پژوهشکده تالاب بین المللی هامون، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

۳. استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

۴. مربی گروه پژوهشی شیلات، پژوهشکده تالاب بین المللی هامون، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۱۸ تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۳/۴

چکیده

تحقیق حاضر با هدف بررسی غلظت‌های مختلف نانو ذرات اکسید مس (CuO NPs) بر شاخص‌های خونی و فعالیت آنزیم‌های کبدی ماهی آمور (*Ctenopharyngodon idella*) انجام شد. برای تعیین LC_{50}، تعداد ۱۵۰ قطعه ماهی با میانگین وزن ۵±۳۸ گرم به‌مدت ۹۶ ساعت در معرض غلظت‌های (۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰) میلی‌گرم بر لیتر نانو اکسید مس قرار داده شدند و تلفات روزانه ثبت شد. غلظت سمیت کشنده (LC_{50}) نانواکسید مس برای ماهی آمور ۰/۵±۲۵۸۹/۱۴ میلی‌گرم بر لیتر به‌دست آمد، سپس ماهیان به‌مدت ۱۰ روز در معرض غلظت‌های پایین‌تر از غلظت تحت کشنده (یک بیستم، یک سی‌ام و یک پنجاهم غلظت LC_{50}) نانو ذرات اکسید مس قرار گرفتند و شاخص‌های خونی و آنزیم‌های کبدی ماهیان اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که تغییرات در شاخص‌های خونی با کاهش تعداد گلبول قرمز و درصد هماتوکریت و همچنین افزایش گلبول‌های سفید و آنزیم‌های کبدی در ماهیان تیمارهایی که تحت تأثیر نانو ذرات اکسید مس قرار داشتند، همراه بود ($P<0/05$). نتیجه نهایی این‌که نانو ذرات اکسید مس، در غلظت‌های بالا اثر منفی بر سلامت ماهیان دارند و کنترل محیط های آبی و جلوگیری از ورود این مواد جدید به چرخه غذایی آبزیان ضروری است.

واژگان کلیدی: نانو ذره اکسید مس، هماتوکریت، فعالیت آنزیم‌های کبدی، سمیت تحت کشنده.

* نویسنده مسئول: تلفن: ۰۱۵+۹۸۹۱۲۵۴۷۷ ایمیل: agharaei551@uoz.ac.ir

۱. مقدمه

امروزه از نانو ذرات در گستره وسیعی از علوم و صنایع مختلف استفاده می‌شود، که از آن جمله الکترونیک، پزشکی، داروسازی، لوازم آرایشی و بهداشتی، مواد کامپوزیت، کاتالیزور، بسته‌بندی، روکش‌ها، افزودنی‌های سوخت و مواد منفجره، باتری‌ها و پیل‌های سوختی، روان کننده‌ها، محافظت کننده‌ها، تولید انرژی، محیط زیست و کاتالیزورها را می‌توان نام برد. از کاربردهای فناوری نانو می‌توان نانو سنسورها، نانو واکسن ها و دارو رسانی هوشمندانه به عنوان حل کننده بسیاری از مشکلات مرتبط با سلامت، تولیدمثل و پیشگیری و درمان بیماری‌ها حتی بیماری‌های آبزیان نام برد. اما گفتنی است که با توجه به نوظهور بودن فناوری نانو هنوز در مورد خطرات احتمالی این ذرات برای محیط زیست و سیستم‌های زیستی ارزیابی دقیقی صورت نگرفته است (Handy *et al*., 2008).

انواع گونه‌های ماهی با تغییر یا اصلاح عملکرد متابولیک خود نسبت به ورود ترکیبات آلاینده واکنش نشان می‌دهند و از آن‌جایی که نانو ذرات در حین تولید و در زمان استفاده در وسایل گوناگون امکان جدایی و انتشار دارند، بنابراین همیشه محیط‌های آبی در معرض خطرات ناشی از آلودگی این مواد قرار داشته که در دراز مدت منجر به افزایش مرگ و میر بین آبزیان ساکن در آنان خواهد گردید (Liu *et al*., 2009). علاوه براین، آن‌ها اثر سمی در موجودات آبزی از قبیل فیتوپلانکتون‌ها، آرتمیا، نرم‌تنان، سخت‌پوستان و ماهی‌های آب شیرین و شور ایجاد می‌کنند (Ward *et al*., 2009 ; Ates *et al*., 2013).

نانو ذرات اکسید مس(CuO) در صنایع نجاری و نساجی به‌صورت گسترده‌ای استفاده می‌شوند. مقصد نهایی نانو مواد تولید شده اکوسیستم‌های آبی است و این مواد احتمالاً بر روی میکروارگانیسم‌های آبی اثرات نامطلوب خواهند داشت (Klaine *et al*., 2008; Cho *et al*., 2010). نانو ذرات مس و یون مس به طور گسترده در الکترود لیتیوم، کاتالیزور، ابر رساناها و غیره استفاده می‌شود (Zhou *et al*., 2006). با توجه به تحقیقات انجام شده تا به امروز، کبد، آبشش و سرم خون از اهداف اصلی تجمع نانو ذرات مس و ایجاد سمیت در آن‌ها هستند (Moore, 2006; Wang *et al*., 2014). مطالعات خون‌شناسی روش ارزشمندی برای ارزیابی آثار محیطی آلاینده‌ها روی ماهی‌ها می‌باشد (Stentiford *et al*., 2003). ارزیابی پارامترهای خون‌شناسی و آنزیم‌های کبدی به‌عنوان شاخص‌های مناسبی در تعیین آلودگی‌های محیط زیست است. پارامترهای خونی ماهیان، شرایط نامطلوب محیطی را سریع تر از پارامترهای دیگر نشان می دهند. بنابراین جهت تعیین وضعیت سلامت و نظارت بر پاسخ های استرسی ماهیان و پیش‌بینی سازگاری‌های فیزیولوژیکی آن‌ها از پارامترهای خونی استفاده می‌شود. آنزیم‌های ALT (Alanine aminotransferase)، AST (Aspartate aminotransferase)، ALP (Alkaline phosphatase) و LDH (Lactate dehydrogenase) اساساً داخل سلولی هستند و در بسیاری از اندام‌های مختلف دیگر ماهی نیز یافت می‌شوند. با توجه به این‌که، در حالت طبیعی مقادیر این آنزیم‌ها در داخل سلول بیشتر از خارج سلول است، بنابراین افزایش مقادیر جزیی آن‌ها در محیط خارج سلول اعم ازمایع سلولی و پلاسما به‌عنوان شاخصی حساس، بیانگر نوع آسیب سلولی در مواجهه با انواع آلاینده‌های وارد شده به بدن موجود زنده خواهد بود (Ayalogu *et al*., 2001; Parma *et al*., 2007).

آنزیم آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) فقط در کبد است و آنزیم آسپارتات آمینو ترانسفراز (AST) در انواع مختلف بافت‌ها نظیر کبد، قلب، ماهیچه، کلیه و مغز نیز یافت می‌شود، اگر این دو آنزیم با هم در خون وجود داشته باشند، می‌توان دریافت که کبد دچار آسیب شده است (Burtis *et al*., 2001). آلکالین فسفاتاز (ALP) آنزیمی است که در اپی‌تلیوم مجاری صفراوی، سلول‌های کبدی و مخاط روده و کلیه‌ها یافت می‌شود (Banaee *et al*., 2008). لاکتات دهیدروژناز (LDH) آخرین آنزیم مسیر گلیکولیز بی‌هوازی در مهره‌داران است، دارای اهمیت پزشکی ویژه‌ای می‌باشد زیرا که به طور گسترده در بافت‌های بدن، از جمله گلبول قرمز و عضلات قلب یافت می‌شود و به هنگام آسیب دیدن این بافت‌ها، لاکتات دهیدروژناز درون خود را آزاد می‌کنند و این ویژگی لاکتات دهیدروژناز، آن را به یک شاخص مهم برای شناسایی صدمات و بیماری‌های شایع در

بدن تبدیل می‌کند (Neff *et al.*, 1985). هدف از این تحقیق تعیین میزان غلظت تحت کشنده نانو ذرات مس، اثرات سوء نانوذرات مس بر شاخص‌های خونی و فعالیت آنزیمی در ماهی آمور در غلظت‌های پایین می‌باشد.

۲. مواد و روش‌ها

جهت انجام آزمایش تعداد ۴۰۰ عدد بچه ماهی آمور با میانگین وزن ۵±۳۸ گرم از مرکز تکثیر و پرورش ماهی زهک تهیه و به آزمایشگاه انتقال داده شدند. به منظور سازگاری با شرایط آزمایشگاه، ماهیان به تانک‌های ۳۰۰ لیتری (حاوی ۲۰۰ لیتر آب) فایبرگلاس که از قبل آبگیری و هوادهی شده بودند، منتقل و به مدت یک هفته غذادهی شدند. آب تانک‌ها روزانه به‌روش سیفون کردن به میزان ۵۰ درصد تعویض می‌شد. شرایط محیطی مخازن نگهداری بچه ماهیان، از عوامل محیطی موجود،شامل درجه حرارت، سختی و pH به طور روزانه اندازه گیری شد. پس از پایان دوره سازگاری غذادهی قطع شد و بمدت ۲۴ ساعت، بچه ماهیان در مخازن ۴۰ لیتری جهت انجام آزمایش LC_{50} بطور تصادفی توزیع شدند (TRC, 1984). برای تعیین سمیت این ماده در ماهی آمور از روش استاندارد اتحادیه اروپا (OECD = The Organisation for Economic Co-operation and Development) طی ۹۶ ساعت استفاده شد (Wijnhoven *et al.*, 2009).

در این آزمایش ابتدا جهت تعیین LC_{50} از مخازن ۴۰ لیتری به همراه هوادهی و در هر مخزن ۹ عدد بچه ماهی برای غلظت‌های (mg/l) ۰،۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰با سه تکرار به مدت ۹۶ ساعت به‌عنوان واحدهای آزمایش استفاده شد. آب ظروف به طور روزانه (۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ ساعته) به مقدار ۵۰ درصد تعویض و به همان میزان آب حاوی نانو ذره اکسید مس اضافه می‌شد. تعداد بچه ماهیان تلف شده در طی ۹۶ ساعت به طور روزانه شمارش و ثبت شد و نتایج توسط نرم افزار پروبیت (PROBIT) تجزیه و تحلیل شد(Wijnhoven *et al.*, 2009).

با استناد به نتایج حاصل از آزمون LC_{50}، بچه ماهیان به مدت ۱۰ روز در معرض غلظت‌های مختلفی از نانو ذرات اکسید مس (صفر، ۵۰۰، ۹۰۰، ۱۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر) قرار گرفتند و به ازای هر تیمار، سه تکرار در نظر گرفته شد. ۱۲ عدد بچه ماهی در آکواریوم‌های ۴۰ لیتری توزیع شدند، ضمن هوادهی در آکواریوم‌ها روزانه ۵۰ درصد آب آکواریوم‌ها تعویض و به همان میزان نانو ذره اکسید مس اضافه گردید. به منظور سنجش فاکتورهای خونی، با استفاده از سرنگ از ساقه دمی ماهیان در روزهای ۱، ۴، ۷ و ۱۰ خون‌گیری انجام شد و به لوله‌های آزمایش انتقال داده شد (Gisbert *et al.*, 2004). سپس تعدادگلبول‌های‌سفید (WBC)، تعداد گلبول‌های قرمز (RBC)، درصدهماتوکریت (HCT٪) و آنزیم‌های کبدی(ALT, AST, ALP) و LDH در این نمونه ها مورد سنجش قرار گرفت.

جهت شمارش گلبول‌های قرمز ۰/۵ میلی‌گرم از نمونه خون را به داخل پیپت ملانژور قرمز کشیده و برای رقیق کردن از محلول گاور استفاده شد. سپس تعداد گلبول‌های قرمز با استفاده از لام نئوبار و میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰ شمارش شد (Blaxhall and Daisley, 1973). برای شمارش گلبول‌های سفید مقدار ۰/۵ میلی‌گرم از نمونه خون را به داخل پیپت ملانژور سفید کشیده و برای رقیق کردن از محلول تورک استفاده و با استفاده از لام نئوبار و میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰ شمارش شد (Blaxhall and Daisley, 1973). آزمایش هماتوکریت یا حجم سلول‌های فشرده، در واقع اندازه‌گیری نسبت حجم گلبول‌های قرمز متراکم شده به‌حجم خون کامل است. اندازه‌گیری هماتوکریت به‌صورت مستقیم توسط سانتریفیوژ کردن نمونه در دستگاه میکروهماتوکریت و به کمک خط‌کش هماتوکریت انجام شد (Blaxhall and Daisley, 1973).

جداسازی سرم خونی با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ با ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. سرم خونی جدا شده در میکروتیوپ اپندورف تا زمان آنالیز در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد، میکروتیوپ‌های حاوی سرم خونی جهت اندازه‌گیری آنزیم‌های کبدی از قبیل ALT، AST، LDH و ALP با استفاده از دستگاه اتوآنالایزر مدل PRON و کیت‌های تجاری شرکت پارس آزمون و براساس دستورالعمل شرکت سازنده، سنجیده شد

جدول ۱- غلظت تحت کشنده پس از در معرض قرارگیری با نانو ذرات اکسید مس در بچه ماهیان آمور (واحد میلی گرم بر لیتر است).

غلظت کشنده (mg/l)	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
LC_{10}	۰	۴۸۲۵/۷	۱۱۷۲/۴۱	۶۵۳/۸۹
LC_{50}	۰	۲۹۶۶۷۶/۳	۱۶۹۳۶/۸۲	۲۵۸۹/۱۴
LC_{90}	۰	۱۸۲۳۹۱/۶۶	۱۴۴۶۷۱/۸	۱۰۲۵۱/۹۱

جدول ۲- میانگین تعداد RBC (تعداد در mm^3) در خون ماهی آمور طی ۱۰ روز در معرض قرار گیری با نانو ذرات اکسید مس در غلظت‌های مختلف.

تیمارها / زمان	شاهد (×۱۰۰۰)	۵۰۰ (mg/l) (×۱۰۰۰)	۹۰۰(mg/l) (×۱۰۰۰)	۱۳۰۰ (mg/l) (×۱۰۰۰)
روز اول	۳۰۷۰ ± ۷^{a}	$۲۶۲۳/۳\pm۲۵/۱^{b}$	$۱۲۰۳/۳\pm۱۶/۱^{c}$	$۹۰۶/۶\pm۱۵/۸^{d}$
روزچهارم	$۳۲۸۰\pm۷/۵^{a}$	$۱۸۴۶/۶\pm۱۰/۵^{b}$	$۹۸۳/۳\pm۱۱^{c}$	$۷۷۶/۶\pm۱۴/۶^{d}$
روز هفتم	$۲۶۴۶/۷\pm۲۵/۱^{a}$	$۱۶۲۶/۶\pm۲۵/۱^{b}$	$۷۰۳/۳\pm۷^{c}$	$۶۰۳/۳\pm۱۵/۲^{c}$
روز دهم	$۲۶۷۲/۸\pm۲۰/۸^{a}$	$۱۵۲۶/۶\pm۲۵/۷^{b}$	$۴۴۶/۶\pm۱۵/۲^{c}$	$۴۲۶/۶\pm۱۳/۲^{c}$

حروف انگلیسی نامشابه کوچک بیانگر اختلاف معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) بین‌تیمارهاست. داده‌ها به‌صورت (Mean ± SD) می‌باشد.

جدول ۳- میانگین میزان هماتوکریت خون ماهی آمور طی ۱۰ روز در معرض قرار گیری با نانو ذرات اکسید مس در غلظت‌های مختلف.

تیمارها / زمان	شاهد	۵۰۰ (mg/l)	۹۰۰ (mg/l)	۱۳۰۰ (mg/l
روزاول	$۶۰/۶\pm۳/۸^{A}$	۶۳ ± ۲^{A}	۶۲ ± ۳^{A}	$۵۸\pm۲/۷^{A}$
روزچهارم	$۶۵\pm۲/۷^{Aa}$	$۵۲/۶\pm۳/۸^{Bb}$	$۵۲/۶\pm۴/۷^{Bb}$	$۴۸/۶\pm۶/۴^{Bb}$
روز هفتم	$۵۹/۶\pm۴^{Aa}$	$۵۳\pm۵/۲^{Bb}$	$۴۸/۶\pm۷^{Cb}$	$۴۵/۳\pm۵/۹^{Cc}$
روز دهم	$۵۹/۶\pm۷/۶^{Aa}$	$۵۰\pm۵/۲^{Cb}$	$۴۴/۳\pm۲^{Cb}$	$۳۴/۶\pm۳^{Dc}$

حروف انگلیسی نامشابه کوچک بیانگر اختلاف معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) بین تیمارها است. حروف انگلیسی نامشابه بزرگ بیانگر اختلاف معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) بین روزها است. داده‌ها به‌صورت (Mean ± SD) می‌باشد.

(Acerete, *et al*., 2004).

میزان کشندگی نانو ذرات اکسید مس(LC_{50}) با نرم افزار PROBIT (Statistical System Analysis Institute Inc. 1985) تعیین گردید و به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها، پس از حصول اطمینان از نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون (Kolmogorov–Smirnov)، از آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) و دوطرفه (Two way ANOVA) برای مقایسه بین تیمارها استفاده شد و مقایسه اختلاف معنی داری بین میانگین ها با استفاده از آزمون دانکن (سطح معنی‌داری $P<۰/۰۵$) در سطح اطمینان ۹۵٪ در نرم افزار آماری SPSS انجام شد.

۳. نتایج

۱.۳. تعیین میزان سمیت تحت‌کشنده نانو ذرات اکسید مس در بچه ماهی آمور

پس از انجام آزمایشات، میزان سمیت نانو ذرات اکسید مس (LC_{50}) برای بچه ماهیان آمور ۲۵۸۹/۱۴±۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر بدست آمد. غلظت ایجادکننده ۱۰، ۵۰ و ۹۰ درصد تلفات، در طی ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از مجاورت با نانو ذرات اکسید مس بر اساس خروجی آنالیز نرم افزار پروبیت برای بچه ماهی آمور در جدول ۱ آمده است.

۲.۳. شاخص‌های خون‌شناسی و فعالیت آنزیم‌های کبدی ماهیان

طبق نتایج، نانو ذرات اکسید مس موجب تغییرات در پارامترهای خونی می‌گردد، این تغییرات در شاخص‌های خونی با کاهش تعداد گلبول قرمز و درصد هماتوکریت درتیمارهای تحت تأثیر نانو ذرات اکسید مس، نسبت به گروه شاهد همراه بود ($P<۰/۰۵$) و همچنین افزایش معنی‌دار در تعداد گلبول‌های سفید و آنزیم‌های کبدی (AST، ALP و LDH) به‌دست آمد ($P<۰/۰۵$).

طبق نتایج و کمترین میزان RBC به ترتیب در تیمار شاهد در روز چهارم و غلظت (mg/l) ۱۳۰۰ در

جدول ۴- میانگین تعداد WBC (تعداد در mm^3) در خون طی ۱۰ روز در معرض قرار گیری با نانو ذرات اکسید مس در غلظت‌های مختلف.

تیمارها / زمان	شاهد (×۱۰۰۰)	۵۰۰ (mg/l) (×۱۰۰۰)	۹۰۰ (mg/l) (×۱۰۰۰)	۱۳۰۰ (mg/l) (×۱۰۰۰)
روز اول	۲۹/۷±۱/۶^{c}	۳۱/۸±۱/۴^{c}	۴۹/۷±۲^{b}	۹۰/۹±۳/۲^{a}
روز چهارم	۳۰/۵±۱/۱^{c}	۳۰/۹±۱/۳^{c}	۵۷/۴±۳/۶^{b}	۹۳/۹±۱/۸^{a}
روز هفتم	۲۶/۴±۱/۴^{d}	۳۹/۱±۱/۴^{c}	۶۱±۴/۲^{b}	۱۱۴/۷±۱/۴^{a}
روز دهم	۳۰±۱/۲^{c}	۶۳/۲±۱/۷^{b}	۷۲/۷±۳/۲^{b}	۱۱۶/۴±۱^{a}

حروف انگلیسی نامشابه کوچک بیانگر اختلاف معنی‌دار ($P<$ ۰/۰۵) بین‌تیمارهاست. داده‌ها به‌صورت (Mean ± SD) می‌باشد.

جدول ۵- میانگین فعالیت آنزیم AST (U/L) در خون ماهی آمور طی ۱۰ روز در معرض قرار گیری با نانو ذرات اکسید مس در غلظت‌های مختلف.

تیمارها / زمان	شاهد	۵۰۰ (mg/l)	۹۰۰ (mg/l)	۱۳۰۰ (mg/l)
روز اول	۱۵۰± ۵/۶^{B}	۱۵۷± ۱۰/۴^{B}	۱۶۶± ۸/۸^{B}	۱۷۲± ۸/۹^{B}
روز چهارم	۱۵۴± ۱۲/۷^{Bc}	۱۵۸± ۸/۵^{Bc}	۱۸۰± ۱۱/۸^{Bb}	۱۸۸± ۱۴/۷^{Ba}
روز هفتم	۱۵۶± ۵/۸^{Bc}	۱۷۰± ۶^{Bb}	۱۹۱± ۷/۵^{Ba}	۱۹۵± ۵/۶^{Ba}
روز دهم	۱۶۷± ۹/۷^{Ab}	۲۱۱± ۱۵/۵^{Aa}	۲۱۷± ۷/۵^{Aa}	۲۱۶± ۷/۹^{Aa}

حروف انگلیسی نامشابه کوچک بیانگر اختلاف معنی‌دار ($P<$ ۰/۰۵) بین تیمارها است. حروف انگلیسی نامشابه بزرگ بیانگر اختلاف معنی‌دار ($P<$ ۰/۰۵) بین روزها است. داده‌ها به‌صورت (Mean ± SD) می‌باشد.

جدول ۶ - میانگین فعالیت آنزیم ALT (U/L) در خون ماهی آمور طی ۱۰ روز در معرض قرار گیری با نانو ذرات اکسید مس در غلظت‌های مختلف. داده‌ها به صورت (Mean ± SD) می‌باشد.

تیمارها / زمان	شاهد	۵۰۰ (mg/l)	۹۰۰ (mg/l)	۱۳۰۰ (mg/l)
روز اول	۱±۰/۰۰۱	۱±۰/۰۰۱	۱/۶±۰/۰۰۵	۲±۰/۰۰۱
روز چهارم	۱±۰/۰۰۱	۲/۶±۰/۰۰۵	۲±۰/۰۰۱	۲±۰/۰۰۱
روز هفتم	۱±۰/۰۰۱	۲/۳±۰/۰۰۵	۱/۳±۰/۰۰۵	۳±۰/۰۰۱
روز دهم	۱/۶±۰/۰۰۵	۲±۰/۰۰۱	۲/۳±۰/۰۰۵	۲/۶±۰/۰۰۵

روز دهم است و همان طور که مشاهده می‌شود. هر چه میزان غلظت نانو ذرات افزایش می‌یابد، تعداد گلبول‌های قرمز کاهش داشته است، گرچه در روزهای هفتم و دهم، در غلظت‌های (mg/l) ۹۰۰ و ۱۳۰۰ از این اختلاف کاسته شده و معنی‌دار نیست (جدول ۲).

طبق جدول ۳ با افزایش زمان و دوره آزمایش اختلاف معنی‌دار بین روزها و غلظت‌ها دیده می‌شود ($P<$۰/۰۵). کاهش میزان هماتوکریت خون از ۶۰/۶ تا ۳۴/۶ از روز اول تا روز دهم دیده می‌شود و این تغییرات نشانگر کاهش میزان هماتوکریت با افزایش میزان غلظت نانو ذرات اکسید مس نسبت به گروه شاهد است.

بر اساس نتایج از میزان تغییرات در تعداد گلبول‌های سفید، افزایش معنی‌دار گلبول‌های سفید در ماهیانی که در معرض غلظت‌های نانو ذرات اکسید مس بودند را نسبت به گروه ماهیان شاهد نشان داد ($P<$۰/۰۵). بیشترین میزان در روز دهم در غلظت (mg/l) ۱۳۰۰ است. در واقع هرچه غلظت نانواکسید مس افزایش یافت، مقادیر گلبول قرمز و درصد هماتوکریت کاهش یافته و تعداد گلبول سفید دچار افزایش معنی‌دار نسبت به گروه شاهد شدند (جدول ۴).

طبق جدول ۵ که میزان فعالیت آنزیم AST را نشان می‌دهد، در روز اول اختلاف بین تیمارها وجود ندارد، اما با طولانی‌تر شدن دوره آزمایش میزان فعالیت آنزیم افزایش یافته است و اختلاف معنی‌دار در بین روزها و غلظت‌ها وجود دارد ($P<$۰/۰۵)، به‌طوری‌که درروزهای اول و چهارم و هفتم اختلاف معنی‌دار نیست ($P>$۰/۰۵)، ولی در روز دهم اختلاف معنی‌دار نسبت به سه روز قبل وجود دارد ($P<$۰/۰۵). بیشترین میزان

جدول ۷ - میانگین فعالیت آنزیم LDH (U/L) در خون ماهی آمور طی ۱۰ روز در معرض قرار گیری با نانو ذرات اکسید مس در غلظت‌های مختلف.

تیمارها / زمان	شاهد	۵۰۰ (mg/l)	۹۰۰ (mg/l)	۱۳۰۰ (mg/l)
روز اول	^{B}۳۱۹±۵/۲	^{B}۳۶۰±۸/۳	^{B}۵۵۷±۶/۲	^{B}۷۷۱±۴/۵
روز چهارم	^{Bd}۳۶۲±۹/۱	^{Bc}۴۸۳±۶/۱	^{Bb}۷۴۶±۶/۳	^{Ba}۱۱۷۷±۱/۶
روز هفتم	^{Bd}۳۸۰±۷/۳	^{Bc}۵۰۷±۲/۹	^{Bb}۷۸۲±۱/۵	^{Ba}۱۲۳۹±۳/۲
روز دهم	^{Bd}۴۲۰±۴/۷	^{Ac}۱۰۰۰±۶/۵	^{Ab}۱۱۱۷±۱	^{Aa}۱۳۷۹±۲

حروف انگلیسی نامشابه کوچک بیانگر اختلاف معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) بین تیمارها است. حروف انگلیسی نامشابه بزرگ بیانگر اختلاف معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) بین روزها است. داده‌ها به‌صورت (Mean ± SD) می‌باشد.

جدول ۸ - میانگین فعالیت آنزیم ALP (U/L) در خون ماهی آمور طی ۱۰ روز در معرض قرار گیری با نانو ذرات اکسید مس در غلظت‌های مختلف.

تیمارها / زمان	شاهد	۵۰۰ (mg/l)	۹۰۰ (mg/l)	۱۳۰۰ (mg/l)
روز اول	^{c}۶۸±۴/۳	^{c}۷۱±۳/۵	^{b}۸۶±۴/۹	^{a}۱۰۷±۱۱/۵
روز چهارم	^{c}۶۲±۸/۱	^{c}۶۹±۱۱/۷	^{b}۹۰±۴	^{a}۱۲۰±۳
روز هفتم	^{d}۶۱±۵/۶	^{c}۷۴±۸/۳	^{b}۱۰۰±۶/۸	^{a}۱۲۱±۶/۵
روز دهم	^{c}۶۵±۸	^{c}۷۶±۱۳/۲	^{b}۱۰۰±۴/۱	^{a}۱۳۰±۶/۵

حروف انگلیسی نامشابه کوچک بیانگر اختلاف معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) بین‌تیمارهاست. داده‌ها به‌صورت (Mean ± SD) می‌باشد.

در غلظت (mg/l) ۹۰۰ در روز دهم مشاهده می‌شود که نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌دار داشته است.

براساس جدول ۶، میزان فعالیت آنزیم ALT بین تیمارها در بین روزها و غلظت‌ها اختلاف معنی‌دار وجود ندارد ($P>۰/۰۵$) و با افزایش غلظت نانو ذرات اکسید مس تغییر معنی‌داری در میزان این آنزیم دیده نمی‌شود.

طبق جدول ۷، تغییرات در فعالیت آنزیم LDH را به این گونه می‌توان توصیف نمود که در روز اول اختلافی بین تیمارها وجود ندارد ($P<۰/۰۵$)، اما با طولانی‌تر شدن دوره آزمایش میزان فعالیت آنزیم افزایش یافته و اختلاف معنی‌داری در بین روزها و غلظت‌ها وجود دارد ($P<۰/۰۵$)، درروزهای اول و چهارم و هفتم این اختلاف معنی‌دار نیست ($P>۰/۰۵$)، ولی در روز دهم اختلاف معنی‌دار نسبت به سه روز قبل وجود دارد($P<۰/۰۵$). بیشترین میزان در غلظت (mg/l) ۱۳۰۰ در روز دهم و کمترین در تیمار شاهد در روز اول است.

طبق جدول ۸ بیشترین میزان فعالیت آنزیم ALP در غلظت (mg/l) ۱۳۰۰ در روز دهم ثبت شد که افزایشی معنی‌دار نسبت به کمترین میزان در گروه شاهد مشاهده شد که این اختلاف در غلظت‌های ۹۰۰ و ۱۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بیشتر دیده می‌شود و با افزایش میزان غلظت نانو ذرات اکسید مس میزان این آنزیم هم افزایش می‌یابد.

۴. بحث و نتیجه‌گیری

در این تحقیق غلظت سمیت تحت کشنده (LC_{50}) برای ماهی آمور ۰/۵±۲۵۸۹/۱۴۷ میلی‌گرم بر لیتر به‌دست آمد که نشانه تحمل بالای این گونه نسبت به نانو ذرات اکسید مس می‌باشد، در تحقیق انجام شده روی ماهی آمور، میزان LC_{50} فلز مس طی مدت زمان ۹۶ ساعت برابر با ۰/۲۷ میلی‌گرم بر لیترگزارش شد (شاپوری، ۱۳۸۲)، همچنین در آزمایش دیگری سمیت نانو ذرات نقره در بچه ماهیان آمور با وزن متوسط ۰/۳۲±۱/۷ گرم را ۰/۱۲ میلی‌گرم در لیتر گزارش کرده‌اند (علیشاهی و مصباح، ۱۳۸۹). در بررسی دیگری میزان LC_{50} کلرید مس در ۹۶ ساعت برای ۴ گونه کپور ماهی *Labeo rohita*، *Cirrhinus mrigala*، *Catla catla* و *Ctenopharyngodon idella* ۵/۱۷ تا ۱۵/۷۵ میلی گرم در لیتر متغیر بود. در این بررسی بیشترین حساسیت در ماهی *C. idella* و کمترین حساسیت به کلرید مس در ماهی *L. rohita* گزارش شد

(Kousar and Javed, 2012). در بررسی دیگر میزان غلظت میانه کشنده برای بچه کپور ماهیان در ۹۶ ساعت مواجهه با سولفات مس (mg/l) ۴/۹ محاسبه گردید (مازندرانی، ۱۳۹۴). با بررسی نتایج فوق می‌توان نتیجه گرفت که به‌دلیل وجود فاکتورهای زیاد بر سمیت حاد نانو ذرات به ویژه مس، مانند اختلافات فردی، جنسی، وزنی، طولی و عوامل محیطی، اندازه‌گیری میزان LC_{50} هیچ‌گاه مقدار مطلق و ثابتی نبوده و به تنهایی نمی‌تواند برای ارزیابی سمیت حاد مواد سمی از جمله نانو ذرات کافی باشد. در تجربیات سم‌شناسی آزمایشگاهی، پاسخ موجودات زنده به افزایش غلظت یک ماده سمی در غیاب سایر عوامل استرس‌زا محاسبه می‌شود و غالباً مواد سمی به ویژه نانو ذرات در مقادیر پایین‌تر از غلظت‌های نهایی تعیین شده آزمایشگاهی قادرند در طبیعت برای موجودات زنده اثرات سمی داشته باشند. مثلاً وجود یک نانو ذره در محیط می‌تواند سمیت نانو ذره دیگر را افزایش دهد و مخلوط نانو ذرات در محیط می‌تواند در مقادیر بسیار پایین، منجر به تلفات موجودات زنده گردد (U.S. Environmental Protection Agency, 2004).

هنگامی که ماهیان در معرض غلظت‌های مختلف نانو ذرات اکسید مس به مدت ۱۰ روز قرار گرفتند، نتایج نشان داد که نانو ذرات موجب تغییرات در پارامترهای خونی و فعالیت آنزیم‌های کبدی ماهیان می‌گردد که این تغییرات در شاخص‌های خونی با کاهش میزان گلبول قرمز و درصد هماتوکریت در تیمارهایی که تحت تأثیر نانو ذرات اکسید مس قرار داشتند، همراه بود. افزایش گلبول‌های سفید و آنزیم‌های کبدی در تیمارهایی که ماهیان در معرض غلظت‌های مختلف نانو ذرات اکسید مس بودند نسبت به گروه ماهیان شاهد مشاهده شد. در واقع هر چه غلظت نانواکسید مس افزایش یافت، مقادیر گلبول قرمز و درصد هماتوکریت کاهش یافته و گلبول‌های سفید و آنزیم‌های کبدی دچار افزایش نسبت به گروه شاهد شدند. در این مطالعه گلبول‌های قرمز کاهش یافته به صورتی که منجر به کم خونی و به دنبال آن منجر به کاهش هماتوکریت خون شده است. روند مشابهی در اثر تماس گربه‌ماهی با سولفات مس گزارش شده است که منجر به کم‌خونی گردید (James and Sampath, 1995). کم‌خونی می‌تواند در اثر افزایش تخریب گلبول‌های قرمز یا مهار ساختن آن‌ها رخ دهد. در بعضی از مطالعات وضعیتی برعکس گزارش شده است، برای مثال در ماهی *Prochildus scrofa* در مواجهه با فلز مس افزایش تعداد گلبول‌های قرمز و به دنبال آن هماتوکریت و هموگلوبین خون دیده شده است (Carvalho and Fernandes, 2006). آن‌ها تخلیه گلبول‌های قرمز از مخازن ذخیره‌ای نظیر طحال را عامل این افزایش ذکر کردند زیرا حجم متوسط سلول‌ها تغییری نشان نداده بود. ولی در این مطالعه نانو ذرات اکسید مس موجب کاهش گلبول‌های قرمز و هماتوکریت شد. وضعیت مشابهی در اثر تماس ماهیان با فلزات سنگین گزارش شده است، به‌طوری‌که کاهش چشمگیر تعداد گلبول‌های قرمز خون و مقادیر هموگلوبین و هماتوکریت را که منجر به کم‌خونی ماکروسیتیک (وقتی گلبول‌قرمز بزرگ‌تر از حد نرمال است) در *Heteropeustes fossilis* در اثر تماس با روی گزارش کردند (Goel *et al.*, 1985).

افزایش تعداد گلبول‌های سفید خون یک واکنش معمول ماهی علیه تهاجم مواد خارجی نظیر مس است که می‌تواند عملکرد فیزیولوژیک طبیعی ماهی را مختل کند. در بررسی گلبول‌های سفید ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در مواجهه با غلظت‌های مختلف نانو ذرات اکسید مس، بررسی شاخص‌های هماتولوژیک نشان داد که نانو ذرات مس تأثیرات زیادی بر عملکرد و مقدار سلول‌های خونی گذاشته و اکثر این شاخص‌ها تفاوت معنی‌داری در غلظت‌های مختلف نانو ذرات مس دارند (خبازی، ۱۳۹۴). در مجموع با مقایسه عملکرد نانو ذرات مس در مقایسه با نمک مس می‌توان دریافت که نانو ذرات مس عملکرد مناسب‌تری داشته و آسیب‌ها و عوارض هماتولوژیک کمتری به‌وجود می‌آورند. در نتیجه بهتر است در صنایع و کارخانجات مختلف به جای استفاده از فلزات سنگین از نانو فلزات استفاده شود که اثرات زیان‌بار کمتری بر منابع آبی، آبزیان، محیط زیست و انسان دارد و آلودگی کمتری ایجاد می‌کند (Nussey *et al.*, 1995).

در مطالعه‌ی حاضر، تغییر در فعالیت سطوح آنزیم‌های ALP، LDH، ALT و AST در سرم خون

ماهیانی که در معرض نانو ذرات اکسید مس بودند در مقایسه با گروه شاهد بررسی شدند. در این مطالعه تغییر در میزان فعالیت آنزیم‌های کبدی در AST، LDH و ALP در خون ماهیانی که نانو ذرات اکسید مس را دریافت کردند در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌دار را نشان دادند که احتمالا افزایش فعالیت این آنزیم‌ها نشان دهنده‌ی آسیب و اختلال در عملکرد بافت‌ها (مغز، آبشش، کبد، کلیه، استخوان و...) است (Bhathtachary *et al*., 2008). LDH آخرین آنزیم مسیر گلیکولیز در مهره‌داران بوده و در بافت‌هایی مثل کبد، آبشش و عضله ماهیان جهت مشاهده تاثیر آلاینده ها بر صدمات بافت ها بکار می رود (Heath, 1995) که راه‌یابی آن به بیرون از سلول و افزایش آن در سرم خون در اثر نکروز سلول و یا آسیب غشای سلول‌ها می‌باشد (Costillas and Smith, 1977). در بیان علت معنی‌دار نبودن آنزیم ALT در بین تیمارها، احتمالاً مقادیر یا شدت آسیب در غلظت‌های اعمال شده جهت افزایش آن در سرم خون قابل بحث است، به‌طوری‌که میزان فعالیت این آنزیم در بافت‌ها کمتر از سایر آنزیم‌ها است و یا شدت آسیب وارده به سلول‌ها در حدی نبوده که نشت آن به سرم خون همانند سایر آنزیم‌ها صورت گیرد (De- Smet *et al*., 2001). وضعیت مشابهی در تحقیقاتی که بر روی ماهی *Oreochromis niloticus* انجام شد، مشاهده می‌شود مسمومیت با انواع فلزات سنگین (جیوه، نقره، مس، کادمیوم و...) نشان‌دهنده افزایش میزان آنزیم‌های ALT و AST در بافت کبد بود (Muazzez *et al*., 2009) و همچنین کادمیوم در ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*)، میزان آنزیم‌های AST و ALT را در بافت‌ها و سرم خون تغییر می‌دهد (Almeida *et al*., 2001). بررسی تاثیر سمیت نانو ذرات اکسیدمس در تیلاپیای نیل از لحاظ آنزیم‌های کبدی ALT، AST و ALP انجام شد که در این بررسی میزان فعالیت آنزیم‌ها در معرض نانو ذرات اکسید مس افزایش داشت (Abdel-Khalek *et al*., 2015). از طرفی در تحقیقی تاثیر نانو ذره ZnO برای ۱۲ هفته روی آنزیم‌های AST و ALT ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) مورد مطالعه قرار گرفت و مشخص شد که میزان این آنزیم‌ها در سرم خون ماهیان افزایش یافته و با گروه کنترل اختلاف معنی-داری دارد ($P<۰/۰۵$) و بیان شد که علت افزایش این آنزیم‌ها، آسیب به بافت کبدی است و می‌توان از این آنزیم‌ها به‌عنوان شاخص مناسبی برای آلودگی مربوط به نانو ذره اکسید روی بهره برد (Lee *et al*., 2014).

بررسی شاخص‌های هماتولوژیک نشان داد که نانو ذرات اکسید مس تأثیرات زیادی بر عملکرد و مقدارسلول‌های خونی گذاشته و اکثر این شاخص‌ها تفاوت معنی‌داری در غلظت‌های مختلف نانو ذرات اکسید مس نشان دادند. اما در تحقیقاتی که عملکرد نانو ذرات اکسید مس را در مقایسه با نمک مس انجام داده‌اند دریافتند که نانو ذرات اکسید مس عملکرد مناسب تری داشته و آسیب‌ها و عوارض هماتولوژیک کمتری بوجود آورند. در نتیجه بهتر است در صنایع و کارخانجات مختلف به جای استفاده از فلزات سنگین از نانو فلزات استفاده شود که اثرات زیانبار کمتری بر منابع آبی، آبزیان، محیط زیست و انسان دارد و آلودگی کمتری ایجاد می‌کند.

References

Abdel-Khalek, A.A., Kadry, M.A.M., Badran, S.R., Marie, M.A.S., 2015. Comparative toxicity of copper oxide bulk and nano particles in Nile Tilapia; *Oreochromis niloticus*: Biochemical and oxidative stress. *The Journal of Basic and Applied Zoology* 72(4), 43-57.

Acerete, L., Balasch, J.C., Espinosa, E., Josa, A., Tort, L., 2004. Physiological responses in Eurasian perch (*Percafluvitilis, L*.) subjected to stress by transportand handling. *Aquaculture* 273, 167-178.

Alishahi, M., Mesbah, M., 2009. Comparison of Toxicity of Silver Nanoparticles in *Ctenopharyngodon idella*, *Cichlosoma severums*, *Astronorus ocellatus*, *Barbus grypus. Marine Biology Journal* 2(7), 45-51. (In Persian)

Almeida, J.A., Novelli, E.L.B., Dal Pai Silva, M., Alves Junoir, R., 2001. Environmental cadmium exposure and metabolic response of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environmental Pollution* 114, 169-175.

Banaee, M., Mirvaghefi, A.R., Rafiee, G.R., Mojazi Amiri, B., 2008. Effect of sublethal diazinnon *concentrations on blood plasma biochemistry. International Journal Environmental Research* 2, 189-198.

Bhattacharya, H., Xiao, Q., Lun, L., 2008. Toxicity studies of nonylphenol on rosy barb (*Puntius conchonious*): A Biochemical and Histopathological Evaluation. *Tissue and Cell* 40, 243-249

Blaxhall, P.C., Daisley, K.W., 1973. Routine hematological methods for use with fish blood. *Journal of Fish Biology* 5, 771-781.

Burtis, C.A., Ashwood, R., 2001. Tietz fundament of clinical chemistry. 5th ed. W.B. Saunders, Philadelphia, 352-389.

Carvalho, C.S., Fernandes, M.N., 2006. Effect of temperature on copper toxicity and hematological responses in the Neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high pH. *Aquaculture* 251, 109-117.

Costillas, E., Smith, L.S., 1977. Effect of stress on blood coagulation and haematology in rainbow trout. *Journal of Fish Biology*, 10: 481-491.

De-Smet, H., Blust, R., 2001. Stress responses and changes in protein metabolism in carp (*Cyprinus carpio*) during cadmium exposure. *Ecotoxicological Environmental Safety* 48, 255-262.

Gisbert, E., Rodriguez, A., Cardona, L., Huertas, M., Gallardo, M. A., Sarasquete, C., Sala-Rabanal, M., Ibarz, A., Sanchez, J., Castello-Orvay, F., 2004. Recovery of Siberian sturgeo yearlings after an acute exposure to environmental nitrite changes in the plasmatic ionic balance, Na+/K+ATPase activity, and gill histology. *Aquaculture* 239, 141-154.

Goel, K.A., Mishra, B.P., Gupta, K., Wadhwa, S., 1985. A comparative haematological study on a few fresh water teleosts. *Indian Journal of Fisheries* 31, 108-112.

Handy, R.D., Kammer, F., Lead, J.R., Hasselloöv, M., Owen, R., Crane, M., 2008. The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles Ecotoxicology. *Ecotoxicology* 17(4), 287-314.

Heath, A.G., 1995. Water pollution and fish physiology. CRC Press, New York. 384 p.

James, R., Sampath, K., 1995. S parameters and billiary coublethal effects of mixtures copper and ammonia on selected biochemical and physiological parameters in the cat fish *(Heteropeneustes fossilis). Bulletin of Environment, Contaminant and Toxicology* 55, 188-194.

Janardana, S.R., 2014. Impact of chemathoate nutritional index of freshwater fish, *Cyprinus carpio*. *International Journal of Scientific and Research Publications* 4(3), 2250-3153.

Khabazi, M., Harsij, M., Hedayati, S., Gholipour, H., 2015. Investigation of white blood cell of *Oncorhynchus mykiss* in exposure to various concentrations of copper oxide nanoparticles. 2th National Conference on Fisheries and Aquaculture in Iran 1-7. (In Persian)

Klaine, S.J., Alvarez, P.J., Batley, G.E., Fernandes, T.F., Handy, R.D., Lyon, D.Y., Mahendra, S., McLaughlin, M.J., Lead, J.R., 2008. Nanomaterials in the environment behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environmental Ecotoxicology and Chemistry* 27(5), 1825-1851.

Kock, G., Triendl, M.and Hofer, R., 1996. Seasonal patterns of metal accumulation in Arctic char (*Salvelinus alpinus*) from an oligotrophic Alpine lake related to temperature. *Canadian Journal of Fish Aquatic Sciences* 53(4), 780-786.

Kousar, S., Javed, M., 2012. Evaluation of Acute Toxicity of Copper to Four Fresh Water Fish Species. *International Journal of Agriculture and Biology* 14(5), 802 -804.

Lee, B., Duong, C.N., Cho, J., Lee, J., Kim, K., Seo, Y., Kim, P., Choi, K., Yoon, J., 2014. Toxicity of citrate-capped silver nanoparticles in common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 1-14.

Mazandarani, M., Sodagar, M., Namroudi, S., 2015. Histopathology of kidney, liver and gill of *Cyprinus carpio* in acute exposure to copper sulfate. *Aquatic Ecology Journal* 5(4), 9-16. (In Persian)

Moore, M.N., 2006. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environment International* 32, 967-976.

Neff, J.M., Cardwell, R.D., Purdy, R., Bahner, R.C., 1985. Use of biochomical measurement to detect pollutant-mediated damage to fish. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Seventh Symposium, Philadeldhia: ASTM, STP. 155-183.

Nussey, G., VanVuren, J.H., Du Preez, H., 1995. Effect of copper on the hematology and osmoregulation of the Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae). *Comparative Biochemistry and Physiology* 111, 369-380.

Peter, H.H., Irene, B.H., Oleg, V.S., 2004. Nanoparticles-known and unknown health risks. *Nano Biotechnology* 2(1), 12-27.

Shapoori, M., 2003. Investigation of the acute effects of copper and its LC_{50} on changes in muscle tissue, gonads, common carp liver (*Cyprinus carpio*). M.Sc. Thesis, Azad University, 100 p.

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

Stentiford, G.D., Longshaw, M., Lyons, B.P., Jones, G., Green, M., Feist, S.W., 2003. Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. *Marine Environmental Research* 55, 137-159.

Wang, T., Long, X., Cheng, Y., Liu, Z., Yan, S., 2014. The potential toxicity of copper nanoparticles and copper sulphate on juvenile *Epinephelus coioides. Aquatic Toxicology* 152, 96-104.

Wijnhoven, S.W., Peijnenburg, W.J., Herberts, C.A., Hagens, W.I., Oomen, A.G., 2009. Nanosilver - A review of available data and knowledge gaps in human and environmental

risk assessment. *Nanotoxicology* 3(2), 109-138.

Zhang, X.D., Wu, H.Y., Wu, D., Wang, Y.Y., Chang, J.H., Zhai, Z.B., 2010. Toxicologic effects of gold nanoparticles in vivo by different administration routes. *International Journal of Nanotecnology Medicine* 5, 771-781.