اثر نانوذرات اکسیدآهن بر سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و پراکسیداسیون چربی در بافت کبد ماهی کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*)

- **مهنا محمدی***: گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان، ایران
- **مسعود ستاری**: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه‌سرا، ایران
- **آریا باباخانی**: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه‌سرا، ایران
- **سیدعلی جوهری**: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران
- **حسین غفوری**: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه‌سرا، ایران

تاریخ دریافت: آذر ١٣٩٦ تاریخ پذیرش: اسفند ١٣٩٦

چکیده

نانوذرات آهن با تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن منجر به استرس اکسیداتیو شده و در نتیجه فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را تحت تاثیر قرار می‌دهند. هدف از این پژوهش بررسی میزان سمیت، در غلظت‌های مختلف نانوذرات آهن در کبد ماهی کپور بود. بررسی تغییرات در میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ناشی از نانوذرات می‌تواند به‌عنوان شاخص استرس اکسیداتیو باشد. بدین‌منظور بچه‌ماهیان کپور با طول کل ٨/٠±١١ سانتی‌متر و وزن ٦/٠±١٧ گرم در معرض غلظت‌های (ppm ٥٠،٣٠،١٠،٠) نانوذره آهن قرار گرفتند. نمونه‌برداری در روزهای ٠، ١، ٧ و ١٤ انجام شد. در این تحقیق آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسیددیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون‌پراکسیداز در بافت کبد و میزان پراکسیداسیون چربی (MDA) به‌عنوان شاخص استرس اکسیداتیو مورد سنجش قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که قرارگیری در معرض نانوذرات آهن منجر به افزایش معنی‌دار در میزان پراکسیداسیون چربی و تغییر درفعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی با گذشت زمان می‌شود($p<0/05$). تغییرات مشاهده شده در سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی در واقع، پاسخی بیولوژیک در هنگام قرار گرفتن در معرض نانوذرات اکسیدآهن است. بنابراین، پایش شاخص‌های زیستی مانند آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و سطح مالون‌دی‌آلدهید می‌تواند به‌عنوان شاخص مناسب برای سنجش استرس اکسیداتیو وارد شده به ماهی کپورمعمولی باشد.

کلمات کلیدی: نانو ذرات اکسیدآهن، پراکسیداسیون، دفاع آنتی‌اکسیدانی، استرس اکسیداتیو، *Cyprinus carpio*

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول:mohanamohamadi.m@gmail.com

مقدمه

نانوتکنولوژی باکاربردهای جدیدی درزمینه‌های مختلف پزشکی، علم مواد، ساخت ساز و تکنولوژی‌های دیگر همراه بوده است. تولید و گسترش نانوذرات از هر عنصر منجر به افزایش تنوع محصولات موجود در طبیعت شده‌اند (Schmid و Riediker، ۲۰۰۸) تا جایی‌که این تکنولوژی به‌عنوان تکنولوژی مهم و تاثیرگذاری در قرن ۲۱ مطرح شده است. محیط‌های آبی معمولاً در معرض ورود نانوذرات قرار دارند (Scown و همکاران، ۲۰۱۰؛ Farre و همکاران، ۲۰۰۹) که این مواد به سادگی توسط موجودات آبزی از قبیل نرم‌تنان، سخت‌پوستان و ماهی‌ها جذب می‌شوند (George و همکاران، ۲۰۱۴؛ Johnston و همکاران، ۲۰۱۰؛ Ward و Kach، ۲۰۰۹). خصوصیات نانوذرات به شکل قابل توجهی از مولکول‌های کوچک متفاوت می باشد و می‌تواند اثرات خطرناک زیادی بر محیط زیست و هم‌چنین بر سلامت انسان داشته باشد (Moore، ۲۰۰۶؛ Colvin، ۲۰۰۳). جذب و اثرات نانوذرات بر آبزیان موضوع بسیار مهمی است که منجر به مطالعات گسترده زیست‌سم‌شناسی دراین زمینه شده‌است (Griffitt و همکاران، ۲۰۰۷). بنابراین با توجه به کاربرد وسیع نانو ذرات و ورود نانو ذرات به محیط زیست ازجمله اکوسیستم‌های آبزی مطالعه و بررسی اثر سمیت به‌خصوص در مورد نانوذرات، پرکاربرد ضروری به‌نظر می‌رسد. اکسید آهن به‌عنوان عنصر ایجادکننده تضاد در MRI استفاده می‌شود. امروزه ازنانوذرات اکسیدآهن جهت نشانه‌گذاری (Labeling) سلول‌های بنیادی و ردیابی آن‌ها استفاده می‌شود (Au و همکاران، ۲۰۰۹) و به‌دلیل ویژگی‌های سوپرپارا مغناطیسی امروزه کاربرد وسیعی در ساخت لوازم پزشکی مانند عوامل کنتراست مغناطیسی نیز رو به افزایش است (Thierry و همکاران، ۲۰۰۷). نانوذرات اکسیدآهن به‌طور گسترده‌ای با کاربردهای بیولوژیکی و هم‌چنین در ساخت رنگدانه‌ها مورد استفاده قرارمی‌گیرند (Cornell و همکاران، ۱۹۹۷). درسال‌های‌اخیراز نانوذرات آهن صفر ظرفیتی به‌طور گسترده به‌منظور اصلاح آب‌های زیر زمینی و تصفیه مواد زائد خطرناک استفاده شده است (Sun و همکاران، ۲۰۰۷) ویژگی نانوذرات آهن قابلیت تجزیه حلال‌های آلی کلردار و رنگ آلی است (Zhang، ۲۰۰۳). استرس اکسیداتیو عدم تعادل بین تولید وحذف رادیکال‌های واکنشگر اکسیژن (ROS) درظرفیت آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها می‌باشد که درنتیجه آن آسیب اکسیداتیو در بافت سلولی ایجاد می‌شود (Lopes و همکاران، ۲۰۰۱). مکانیسم سمیت نانوذرات به‌علت تولیدرادیکال‌های آزاد مانند رادیکال‌های فعال اکسیژن (ROS) است که منجر به ایجاد استرس اکسیداتیو می‌شود. در بین نانو موادها اکسیدهای فلزی مانند نانوذرات آهن به‌علت کاربرد گسترده مورد توجه قرار گرفته‌اند. تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد توسط نانوذرات آهن به‌عنوان یک فاکتور اصلی در ایجادو توسعه استرس اکسیداتیو در آبزیان نقش داشته باشد. بنابراین می‌توان میزان استرس اکسیداتیو را باسنجش فعالیت آنزیم‌های سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و پراکسیداسیون چربی در ماهیان مورد سنجش قرار داد. هدف از این مطالعه بررسی اثرات نانوذره آهن بر دفاع آنتی‌اکسیدانی و پراکسیداسیون چربی ماهی کپورمعمولی به‌عنوان گونه شاخص در مطالعات سم‌شناسی می‌باشد. بدین‌منظور فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسیددیسموتاز و کاتالاز و میزان غلظت مالون‌دی‌آلدهید به‌عنوان بیومارکر اکسیداسیون چربی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تعداد ۲۰۰ عدد ماهی کپور با میانگین وزنی ۰/۶±۱۷ و میانگین طولی ۰/۰۸±۱۱ از استخر پرورش ماهی گرمابی تهیه و پس از انتقال به‌سالن تکثیر و پرورش دانشکده، در داخل مخازن که از قبل ضدعفونی شده بودند نگه‌داری شد. پس از آن به‌منظور انجام آزمایش در داخل آکواریوم‌های ۶۰لیتری توزیع گشته و به‌مدت ۷روز با شرایط آزمایشگاهی سازش یافتند. پس از طی دوره سازش ماهیان در ۴ تیمار با سه تکرار و هر تکرار شامل ۲۰ قطعه ماهی، به‌صورت تصادفی توزیع شدند. در طی دوره آزمایش غذادهی قطع شد. مدت زمان آزمایش ۱۴ روز بوده و نمونه‌برداری در روزهای ۰ و ۱ و ۷ و ۱۴ انجام شد (Chen و همکاران، ۲۰۱۱). بافت کبد هر ماهی پس از جداسازی در داخل فریزر ۸۰- قرار گرفتند. سپس بافت‌های جداسازی شده با وزن مساوی در داخل لوله‌های آزمایش حاوی بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی مول pH =۷ (۰/۰۰۳ گرم EDTA، ۰/۲۶ گرم مونوفسفات پتاسیم، ۰/۵۳ گرم دی فسفات پتاسیم) قرار گرفته در داخل یخ ، به نسبت ۱:۵ (حجم:وزن) توسط هموژنایزر با دور rpm ۲۵۰۰۰ به‌مدت ۳۰ تا ۶۰ ثانیه هموژن شدند. میکروتیوپ‌های حاوی عصاره در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در دور g×۱۲۰۰۰ به‌مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفیوژ یخچال‌دار، سانتریفیوژ شده و سپس مایع رویی بدون فاز چربی جداسازی شده و جهت آنالیز میکروتیوپ‌های حاوی مایع رویی در دمای ۸۰- قرار گرفتند. فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) طبق روش گیانوپلیتیس و رایس و از طریق اسپکتوفتومتری اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم کاتالاز به

دنبال کاهش جذب H2O2 با ضریب خاموشی (۱- mM-۱cm ۳۹/۴) به‌مدت ۱ دقیقه در ۲۴۰نانومتر طبق‌روش Chance وهمکاران (۱۹۵۵) تعیین شد. فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز با استفاده از کیت BIOREX ساخت آمریکا سنجیده شد.

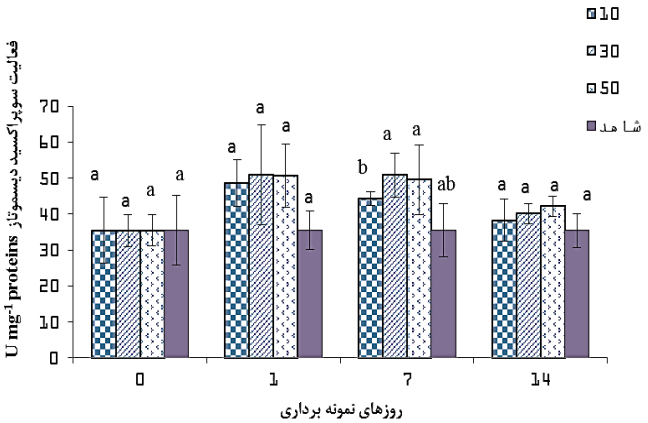
اندازه غلظت مالون‌دی‌آلدئید(MDA) به‌عنوان شاخصی از میزان پراکسیداسیون لپیدهای غشا با استفاده از تیوباربیتوریک اسید انجام شد.برای‌محاسبه‌غلظت MDA حجم‌مساوی‌از‌نمونه را با تیوباربیتوریک اسید ۰/۵٪ در تری کلرواستیک ۲۰٪ مخلوط کرده و برای ۲۵ دقیقه در ۹۵درجه سانتی‌گراد جوشانده و سپس برای مدت ۵ دقیقه در ۷۵۰۰ g سانتریفیوژ شده تامحلول شفاف به‌دست آید. در نهایت جذب مایع رویی را در ۵۳۵ nm اندازه‌گیری کرده و برای محاسبه غلظت MDA از ضریب خاموشی معادل mM-1cm-1 ۱۵۵استفاده گردید (Heath و Packer، ۱۹۶۸).

تجزیه‌وتحلیل‌داده‌ها با استفاده از‌نرم‌افزار SPSS۱۹ انجام گرفت. از آزمون اسمیرنف- کلموگروف جهت بررسی نرمال بودن داده‌ها استفاده شد. مقایسه میانگین از طریق آزمون One-Way ANOVA و آزمون چنددامنه Tukey در سطح معنی‌داری ۹۵ درصد ($p<0/05$) صورت گرفت. داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شد.

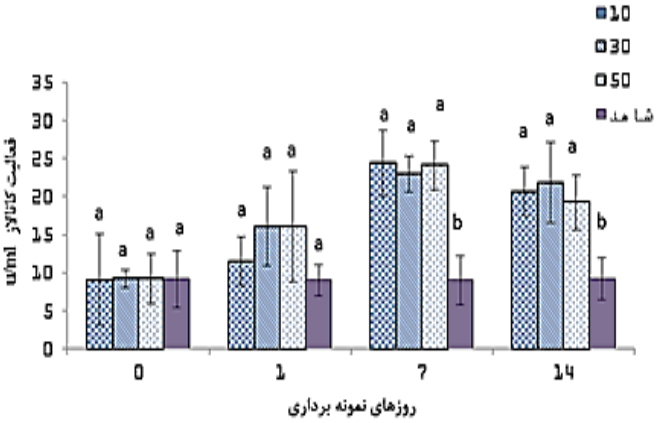
نتایج

سوپراکسید دیسموتاز: سنجش فعالیت آنزیم SOD در کبد نشان‌داد میانگین فعالیت آنزیم SOD در تیمارها نسبت به تیمار شاهد در روز ۱ نمونه‌برداری افزایش پیدا کرده است ($p<0/05$). با افزایش زمان در روز ۷ میزان فعالیت آنزیم در تیمارهای ۱۰ppm و ۵۰ روند کاهشی داشته است و پس از آن فعالیت آنزیم SOD در روز ۱۴ در همه تیمارها نسبت به روز ۷ نمونه‌برداری روند کاهشی داشته است که بیش‌ترین مقدار آن در تیمار ۱۰ppm در روز ۱۴ بوده است (شکل ۱).

کاتالاز: میزان فعالیت کاتالاز دربافت کبد در روز ۱ نمونه‌برداری درهمه تیمارها نسبت به تیمارشاهد افزایش داشته‌است.میزان فعالیت آنزیم با افزایش زمان در همه تیمارها روند افزایشی داشته است. افزایش میزان فعالیت در تیمارهای مختلف تا روز ۷ نمونه‌برداری مشاهده شده و از روز ۷ تا انتهای روز ۱۴ مهار فعالیت در همه تیمارها مشاهده شده است (شکل ۲).



شکل ۱: مقایسه میانگین فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز بر حسب (u.ml-1) در بافت کبد ماهی کپور معمولی در چهار تیمارنانوذره آهن

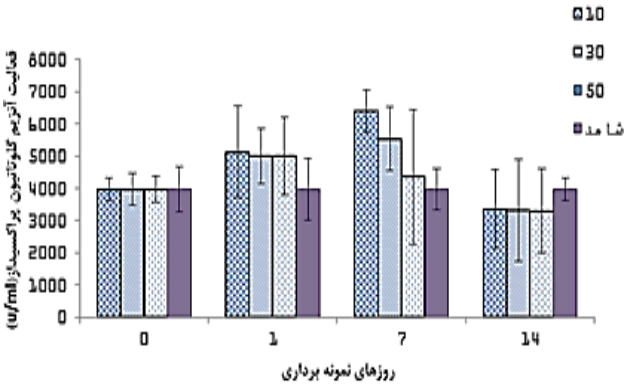


کل ۲.: مقایسه میانگین فعالیت آنزیم کاتالاز بر حسب (u.ml- ۱) در بافت کبد ماهی کپور معمولی در چهار تیمارنانوذره آهن

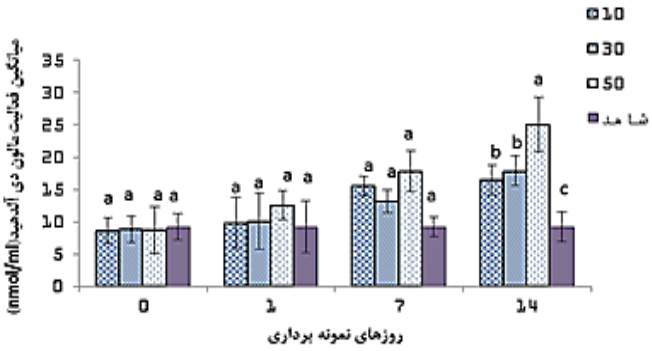
گلوتاتیون پراکسیداز: نتایج میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز درکبد در شکل ۳ آورده شده است.دراولین‌روز‌نمونه‌برداری فعالیت آنزیم گلوتاتیون‌پراکسیداز در همه تیمارها روند افزایشی داشته است که بیش‌ترین آن مربوط به تیمار ۵۰ppm (بالاترین غلظت نانوذرات) بوده است (شکل ۳).

براساس نتایج به‌دست آمده از سنجش میزان غلظت MDA در تیمارهای مختلف نسبت به تیمار شاهد، مشخص شد که میانگین غلظت MDA در تیمار ۵۰ppm نسبت به سایر تیمارها بیش‌تر بوده است. بررسی غلظت مالون‌دی‌آلدهید درکبد تیمارهای مختلف نسبت به تیمار شاهد، یک ارتباط مستقیم و معنی‌دار بین میزان غلظت نانو

ذرات آهن و افزایش زمان در معرض قرارگیری را نشان می‌دهد (شکل ۴).



شکل ۳: مقایسه میانگین فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز بر حسب (u.ml-۱) در بافت کبد ماهی کپور معمولی در چهار تیمارنانوذره آهن



شکل ۴: میانگین فعالیت میزان مالون دی آلدهید (nmol/ml) کبد ماهی کپور معمولی در چهار تیمارنانوذره آهن

بحث

نانوذرات رهاسازی شده در محیط‌های آبی می‌توانند تاثیراتی بر روی موجودات آبزی ازجمله ماهیان داشته باشند. سطوح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسیددیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پرکسیداز در کبد ماهیان بیومارکرهایی هستند که در صورت تغییر در میزان آن‌ها می‌توان به وجود عاملی غیرطبیعی در آن محیط پی برد.

سوپراکسیددیسموتاز (SOD) یک متالوآنزیم است که با تجزیه رادیکال‌های سوپراکسید به اکسیژن مولکولی و پراکسید هیدروژن، اولین سد دفاعی را علیه رادیکال‌های آزاد تشکیل می‌دهد. کاهش مشاهده شده در فعالیت SOD نتیجه اثر نانوذرات اکسیدآهن، تولید بیش از حد ROS و در نتیجه آسیب به پروتئین SOD است. دراین مطالعه روند فعالیت این آنزیم در بافت کبد مورد بررسی قرار گرفت. فعایت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در بافت کبد روند کاهشی داشته و با افزایش زمان میزان فعالیت آنزیم کم شده است که می‌تواند بیانگر مهار اولیه‌ای آنزیم توسط ROS باشد و حساسیت بیش‌تر این بافت نسبت به نانوذرات بوده است. Regoli و همکاران (۲۰۱۱) بیان کردند تغییر در فعالیت و یا سطح آنتی‌اکسیدان‌ها هنگام قرارگیری در معرض آلاینده‌های فلزی می‌تواند به‌عنوان یک بیومارکر درنظر گرفته‌شود. در مطالعات Hao و همکاران(۲۰۰۹) گزارش شده که فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در کبد، آبشش و مغز کپور حساسیت بیش‌تری نسبت به سایر آنزیم‌ها داشته که با تراکم و زمان قرارگیری در معرض نانوذرات اکسید تیتانیوم نوسان پیدا می‌کند.

در مطالعه حاضر فعالیت آنزیم کاتالاز دربافت کبد نشان داد که بیش‌ترین میزان فعالیت کاتالاز مربوط به تیمار ppm ۱۰ در روز ۷ بوده است و با افزایش زمان میزان فعالیت آنزیم در هر دو بافت کاهش یافته است. روند افزایشی در فعالیت کاتالاز پاسخ این آنزیم در برابر افزایش رادیکال‌های آزاد می‌باشدو کاهش روند نشان‌دهنده مهار شدن این آنزیم توسط رادیکال‌های آزادو شکست سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. Moraes و همکاران (۲۰۰۹) اثر اندوسولفان را بر روی ماهی *Jenynsia multidentata* بررسی کردندنتایج کاهش فعالیت کاتالاز را در کبد نشان داد. jin و همکاران (۲۰۱۰) افزایش فعالیت CAT پس از مواجهه با غلظت۱-L. µg ۱۰۰۰آترازین در طی ۱۴ روز در کبد ماهی‌گورخری (*Danio rerio*) مشاهده کردند. Qu و همکاران (۲۰۱۴) بیان کردند مهار فعالیت CAT در کبد ماهی *C. auratus* در مواجه با روی‌را می‌توان به‌وسیله جریان رادیکال‌های سوپراکسیدناشی‌از استرس اکسیداتیو توضیح داد. گزارش‌هایی در ارتباط با کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز در کبد ماهی استخوانی (*Leporinu obtusidens*) و گربه ماهی نقره‌ای(*Schilbe intermedius*) پس‌ازمواجهه با علف‌کش‌هاوجود دارد. هم‌چنین نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد، فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز در کبد با زمان و غلظت روند متغیری داشته‌است بیش‌ترین میزان فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز در کبد مربوط به تیمار ppm۱۰ در روز هفت نمونه‌برداری بوده است. در انتهای دوره، فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز بافت کبد درهمه تیمارها روند کاهشی داشته است. Li و همکاران (۲۰۱۱) بیان کردند که کاهش فعالیت GPx می‌تواند به‌علت -O2 باشد یا بر اثر آفت‌کش بر روی سنتز آنزیم باشد. به‌طورکلی آنتی‌اکسیدان‌ها به‌صورت هماهنگ عمل می‌کنند

تا حفاظت بهینه را در برابر استرس اکسیداتیو به‌وجود آورند، کاهش فعالیت GPx دریافت‌می‌تواند نشان‌دهنده تجمع بیش از حد محصولات هیدروپراکسید در برابر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی باشد (Michiles و همکاران، ۱۹۹۴).

مالون دی آلدئید که به‌واسطه پراکسیداسیون چربی به‌وجود می‌آید، به‌عنوان یکی از مارکرهای استرس اکسیداتیو می‌باشد. MDA به‌دلیل میل ترکیبی بالا خود را برای گروه‌های تیول، آمینه و پپتید، آنزیم‌ها و اسیدهای نوکلئیک برای بسیاری از سلول‌ها سمی است (Viarengo، ۱۹۸۹). در مطالعه حاضر سطح MDA نسبت به تیمار شاهد بیش‌تر بوده و این بیش‌ترین مقدار آن مربوط به تیمار ppm ۵۰ در روز ۱۴ بوده است. Avci و همکاران (۲۰۰۵) بیان کردند کبد به اندام اصلی سم‌زدایی است و واکنش‌های اکسیداتیو متعدد در آن رخ می‌دهد و حداکثر میزان رادیکال آزاد در آن وجود دارد. نتایج مشابه با تحقیق حاضر را می‌توان در مطالعات Oberdorster و همکاران (۲۰۰۴)در مغز بچه‌ماهیان باس‌دهان‌بزرگ‌هنگام قرارگیری‌در معرض فلورین (C60) و Hao و Chen (۲۰۱۲) اثر نانوذرات اکسید تیتانیوم (TiO2) در مغز بچه‌ماهیان کپور و هم‌چنین مطالعات Zhang (۲۰۰۳) بر روی مغز کپور در معرض نانوذرات Cuo اشاره کرد. Elia و همکاران (۲۰۰۲) گزارش دادند برای ارزیابی میزان سمیت سلولی غلظت حاد آترازین در خورشید ماهی *Lepomis macrochirus* می‌توان سطح GSH و MDA اندازه‌گیری کرد.

تغییرات مشاهده شده در سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی در واقع پاسخ بیولوژیکی هنگام قرار گرفتن در غلظت‌های پایین کشندگی نانوذرات‌اکسیدآهن‌می‌باشد.اختلال در تعادل آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسیددسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز در کبد بچه‌ماهیان کپور و افزایش میزان MDA به‌عنوان شاخص استرس اکسیداتیو است و بیانگر اثر نانوذرات آهن در ایجاد استرس اکسیداتیو با تولید رادیکال‌های‌آزادمی‌باشد.بنابراین پایش شاخص زیستی‌مانندآنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (سوپراکسیددیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز) و سطح‌مالون‌دی‌آلدهید می‌تواند به‌عنوان شاخص مناسب برای سنجش استرس اکسیداتیو باشد. هم‌چنین نیاز است، مطالعات بیش‌تری در زمینه نانوتوکسیکولوژی به‌ویژه بررسی اثرات مستقیم و غیرمستقیم احتمالی نانوذرات پرکاربرد مانند نانوذرات اکسید فلزی را در گونه‌های مختلف انجام داد.

منابع

۱. **فریمل، ف.، ۲۰۱۰.** نانوذرات در چرخه آب. ترجمه خانی م.، شهاب پور، گ.، خانی، م.، ۱۳۹۴. انتشارات آوای قلم. ۳۲۳ صفحه.

۲. **زرنگار، ز. و صفری، ج.، ۱۳۸۹.** هوش مغناطیسی نانوذرات. ماهنامه فناوری نانو. سال ۹، شماره ۷، صفحات ۲۳ تا ۳۴.

۳. **Au, K.; Wing, L.; Song, Y.L.; Yee, K.L.; Wing, H.N.; Kwong, M.C.; Yau, C.L. and Ronald, A., 2009.** Effects of iron oxide nanoparticles on cardiac differentiation of embryonic stem cells. Biochemical and biophysical research communications. Vol. 379, No. 4, pp: 898-903.

۴. **Avci, A.; Kaçmaz, M. and Durak, İ., 2005.** Peroxidation in muscle and liver tissues from fish in a contaminated river due to a petroleum refinery industry. Ecotoxicology and environmental safety. Vol. 60, No. 1, pp: 101-105.

۵. **Baun, A., 2008.** Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: a brief review and recommendations for future toxicity testing. Ecotoxicology. Vol. 17, No. 5, pp: 387-395.

۶. **Colvin, V.L., 2003.** The potential environmental impact of engineered nanomaterials. Nature biotechnology. Vol. 21, No. 10, pp: 1166-1170.

۷. **Cornell, R.M. and Schwertmann, U., 2006.** The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences and uses: John Wiley & Sons.

۸. **Elia, A.C.; Waller, W.T. and Norton, S.J., 2002.** Biochemical responses of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*, Rafinesque) to atrazine induced oxidative stress. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. Vol. 68, No. 6, pp: 809-816.

۹. **Farré, M.; Gajda-Schrantz, K.; Kantiani, L. and Barceló, D., 2009.** Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment. Analytical and Bioanalytical Chemistry. Vol. 393, No. 1, pp: 81-95

۱۰. **George, S.; Gardner, H.; Seng, E.; Khuan, C.; Hengky, W.; Chunyan, Y.; Fang, C.; Hay, C. and Woon, K., 2014.** Differential effect of solar light in increasing the toxicity of silver and titanium dioxide nanoparticles to a fish cell line and zebrafish embryos. Environmental science & technology. Vol. 48, No. 11, pp: 6374-6382.

۱۱. **Griffitt, R.J.; Weil, R.; Hyndman, K.A.; Denslow, N.D.; Powers, K.; Taylor, D. and Barber, D.S., 2007.** Exposure to copper nanoparticles causes gill injury and acute lethality in zebrafish (*Danio rerio*). Environmental Science & Technology. Vol. 41, No. 23, pp: 8178-8186.

۱۲. **Hao, L. and Chen, L., 2012.** Oxidative stress responses in different organs of carp (*Cyprinus carpio*) with exposure to ZnO nanoparticles. Ecotoxicology and environmental safety. Vol. 80, pp: 103-110.

۱۳. **Johnston, H.J.; Hutchison, G.R.; Christensen, F.M.; Peters, S.; Hankin, S.; Aschberger, K. and Stone, V., 2010.** A critical review of the biological mechanisms underlying the in vivo and in vitro toxicity of carbon nanotubes: The contribution of physico-chemical characteristics. Nanotoxicology. Vol. 4, No. 2, pp: 207-246.

۱۴. **Klaine, S.J., 2008.** Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. Environmental Toxicology and Chemistry. Vol. 27, No. 9, pp: 1825-1851.

۱۵. **Moore, M.N., 2006.** Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? Environment international. Vol. 32, No. 8, pp: 967-976.

۱۶. **Moraes, B.S.; Loro, V.L.; Pretto, A.; da Fonseca, M.B.; Menezes, C.; Marchesan, E. and de Avila, L.A., 2009.** Toxicological and metabolic parameters of the teleost fish (*Leporinus obtusidens*) in response to commercial herbicides.

۱۷. **Navarro, E., 2008.** Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. Ecotoxicology. Vol. 17, No. 5, pp: 372-386.

۱۸. **Oberdörster, G.1.; Sharp, Z.; Atudorei, V.; Elder, A.; Gelein, R.; Kreyling, W. and Cox, C., 2004.** Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. Inhal Toxicol. Vol. 16, No. 6-7, pp: 437-445.

۱۹. **Regoli, F.; Bocchetti, R. and Filho, D., 2011.** Spectrophotometric Assays of Antioxidants. Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems. pp: 367-380.

۲۰. **Schmid, K. and Riediker, M., 2008.** Use of nanoparticles in Swiss industry: a targeted survey. Environmental science and technology. Vol. 42, No. 7, pp: 2253-2260.

۲۱. **Scown, T.M.; Van Aerle, R. and Tyler, C.R., 2010.** Review: do engineered nanoparticles pose a significant threat to the aquatic environment? Critical reviews in toxicology. Vol. 40, No. 7, pp: 653-670.

۲۲. **Sun, Y.P.; Li, X.Q.; Zhang, W.X. and Wang, H.P., 2007.** A method for the preparation of stable dispersion of zero valent iron nanoparticles. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. Vol. 308, No. 1, pp: 60-66.

۲۳. **Thierry, B.; Majewski, P.; Ngothai, Y. and Shi, Y., 2007.** Preparation of monodisperse functionalised super paramagnetic nanoparticles. International Journal of Nanotechnology. Vol. 4, No. 5, pp: 523-530.

۲۴. **Viarengo, A., 1989.** Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. Rev. Aquat. Sci. Vol. 1, No. 2, pp: 295-317.

۲۵. **Ward, J.E. and Kach, D.J., 2009.** Marine aggregates facilitate ingestion of nanoparticles by suspension-feeding bivalves. Marine Environmental Research. Vol. 68, No. 3, pp: 137-142.

۲۶. **Zhang, W., 2003.** Nanoscale iron particles for environmental remediation: an overview. Journal of nanoparticle Research. Vol. 5, No. 3-4, pp: 323-332.