View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Aquatic Commons

مطالعه اثرات مزمن نانو ذرات نقره بر رشد، بازماندگی و ویژگی‌های تولید مثلی آرتمیای دریاچه ارومیه (*Artemia urmiana*)

شیوا محمدی[۱]، کوروش سروی مغانلو[۱*]، بهروز آتشبار[۲]، احمد ایمانی[۱]

* k.sarvimoghanlou@urmia.ac.ir

۱- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه
۲- مرکز مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه

تاریخ دریافت: تیر ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۵

چکیده

فناوری نانو و مخاطرات محیط زیستی آن بویژه برای آبزیان به شکل روز افزونی در حال گسترش است. در همین راستا پژوهش حاضر با هدف بررسی تأثیر نانوذره نقره بر میزان رشد و بازماندگی *Artemia urmiana* اجرا شد. این پژوهش در قالب ۵ تیمار شامل، گروه شاهد، ۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۰/۱و ۱ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره نقره در ۴ تکرار انجام شد. بدین منظور تعداد ۵۰۰ ناپلی تازه از تخم خارج شده پس از شمارش و انتقال به ظروف پرورش یک لیتری در معرض غلظت های مختلفی از نانو ذره پرورش یافتند. طی دوره پرورش از جلبک تک سلولی *Dunaliella tertiolecta* و مخمر نانوایی برای تغذیه آرتمیاها استفاده گردید. در طول دوره آزمایش میزان رشد و بازماندگی آرتمیاها در روزهای ۸، ۱۱، ۱۷، ۲۰ و ۲۳ مورد بررسی قرار گرفت. آرتمیاها بعد از بلوغ به انکوباتورها و محیطی عاری از نانوذرات انتقال داده شدند. ویژگی‌های تولید مثلی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل بیانگر این بود که با افزایش غلظت نانوذرات نقره و با گذر زمان، میزان بازماندگی کاهش و میزان رشد افزایش یافت ($p<۰/۰۵$). ویژگی های تولید مثلی نظیر تعداد کل زاده‌ها، تعداد زاده‌ها در هر روز، تعداد زاده‌ها در هر بار تولید مثل و طول عمر آرتمیا در تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره نقره کمترین بود ($p<۰/۰۵$). بنابراین می توان چنین نتیجه گرفت که ورود نانو ذرات نقره به بوم‌سازگان‌های طبیعی *A. urmiana* می تواند بر چرخه تولید مثلی آن تاثیر گذاشته و موجب کاهش بازماندگی و توان تولید مثل آن گردد.

کلمات کلیدی: سمیت مزمن، نانوذره نقره، رشد، بازماندگی، ویژگی‌های تولید مثلی، *Artemia urmiana*

* نویسنده مسئول

مقدمه

فناوری نانو به زبان ساده استفاده از مواد و ساختارهایی در اندازه نانو (حداقل در یک بعد ۱۰۰-۱ نانومتر) است. نانو مواد عمدتا نسبت به مواد با ترکیب مشابه، از ویژگی‌های منحصر به فرد فیزیکی، شیمیایی و زیستی برخوردارند. استفاده‌های تجاری از نانو ذرات بطور مثال در مواد شوینده و مواد آرایشی، غذا و مواد مورد استفاده در پزشکی و دندانپزشکی به طور چشمگیری در حال افزایش است (Cedervall *et al*., 2012). فلزات سنگین و شکل نانو ذره این فلزات در غلظت‌های کم، باکتری‌ها را از بین می‌برند. سازوکار اصلی تأثیر نانوذرات بر باکتری‌ها از طریق آسیب رساندن به اسید نوکلئیک‌ها، پروتئین و تخریب دیواره‌ی سلولی می‌باشد (رزم‌آرا و همکاران، ۱۳۹۲). علاوه بر این همه‌ی نانوذرات یک اثر سمیت انتخابی نسبت به باکتری‌ها و سلول‌های سرطانی از خود نشان می‌دهند و همچنین جزو مواد ضدعفونی کننده محسوب می‌شوند (Lin *et al*., 2008; Hanley *et al*., 2008) برای مثال، نانوذرات نقره دارای اثر کشندگی علیه باکتری‌ها و ویروس‌های بیماری‌زا هستند (Perello, 2013). این ویژگی‌های ضد میکروبی باعث شده است که نانو ذره‌ی نقره به عنوان ضدعفونی کننده و کنترل کننده مناسب موجودات ذره‌بینی شناخته شود (رزم‌آرا و همکاران، ۱۳۹۲).

خطرات احتمالی ناشی از رهایش مواد حاوی نانو ذرات به محیط زیست در حال افزایش است (سالاری‌جو و همکاران، ۱۳۹۱). با افزایش میزان تولید و استفاده از نانوذرات، مقدار ورود آن‌ها به فاضلاب‌ها و در نتیجه بوم-سازگان‌های پذیرنده افزایش خواهد یافت. مطالعات بوم-شناختی مختلف اثرات سمی نانوذرات نقره را بر باکتری‌ها، ویروس‌ها جلبک‌ها، زئوپلانکتون‌های مختلف و ماهی‌ها نشان داده است (Perello, 2013). در این میان احتمال جذب فلزات سنگین و نانو ذرات در سخت‌پوستان کوچک مانند دافنی و آرتمیا بالاتر است، چراکه این موجودات فیلتر کننده بوده و می‌توانند نانو ذرات را به راحتی جذب کنند (Ates *et al*., 2013a; Libralato, 2014).

آرتمیا یکی از سخت پوستان زئوپلانکتونی می باشد که از توزیع جغرافیایی گسترده‌ای در دنیا برخوردار است. گونه های مختلف آرتمیا توانایی تحمل غلظت های مختلف شوری را داشته (Libralato, 2014) قادر به زیست در محیط‌های آب شور مانند دریاچه‌ها ، مرداب‌های ساحلی و ... هستند (Nunes *et al*., 2006). آرتمیا همانند زئوپلانکتون‌هایی چون کوپه‌پودها و دافنی‌ها به عنوان غذای زنده برای تغذیه‌ی لارو ماهیان مورد استفاده قرار می گیرد(Ates *et al*., 2013b; Gambardella *et al*., 2014) و به دلیل داشتن ویژگی‌هایی مانند تولید زاده‌های بیشتر، چرخه‌ی زندگی کوتاه و نیاز کم آن‌ها به غذا در کل دوره‌ی آزمایش، موجود آزمایشی مناسبی برای پژوهش‌های سم‌شناسی هستند (Gambardella *et al*., 2014).

در یک پژوهش Arulvasu و همکاران (2014) اثر نانو ذرات نقره را روی درصد تخم‌گشایی آرتمیا، میزان تجمع نانوذرات در شکم لارو آرتمیا، مرگ و میر ناپلی‌ها و میزان آسیب به DNA سیست آرتمیا طی ۲۴ تا ۴۸ ساعت بررسی کردند. نتایج حاکی از آن بود که با افزایش غلظت نانوذرات نقره میزان تمامی این شاخص‌ها بالا رفته بود.

توانا و همکاران (۱۳۹۳) در پژوهشی ناپلی آرتمیا فرانسیسکانا (*Artemia franciscana*) را در معرض غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره و نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم در دو دوره‌ی زمانی ۱۲ و ۴۸ ساعت قرار دادند و مشاهده کردند که میزان تجمع نانوذرات بعد از ۴۸ ساعت به مقدار قابل توجهی افزایش یافت. از طرفی دیگر مقدار تجمع دی‌اکسید تیتانیوم بسیار بیشتر از نانوذرات نقره بود. همچنین در آن پژوهش، یک سری ناپلی‌هایی که نانوذرات نقره و تیتانیوم دی اکسید را جذب کردند را به آب شیرین برگرداندند. این ناپلی‌ها به مدت زمانهای ۵، ۱۵، ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه در آب شیرین ماندند و مشخص گردید که میزان رهایش نانوذرات نقره در این بازه‌های زمانی به نسبت بیشتر از تیتانیوم دی‌اکسید بوده است.

در مطالعه دیگری سمیت نانوذرات نقره بر ناپلی *A. urmiana* بررسی و مشخص شد که میزان مرگ و میر آرتمیاها با افزایش غلظت و همچنین با افزایش مدت زمان رویارویی با نانوذرات افزایش می‌یابد که گویای سمی بودن این ماده برای آرتمیا می‌باشد. در این آزمایش حداکثر

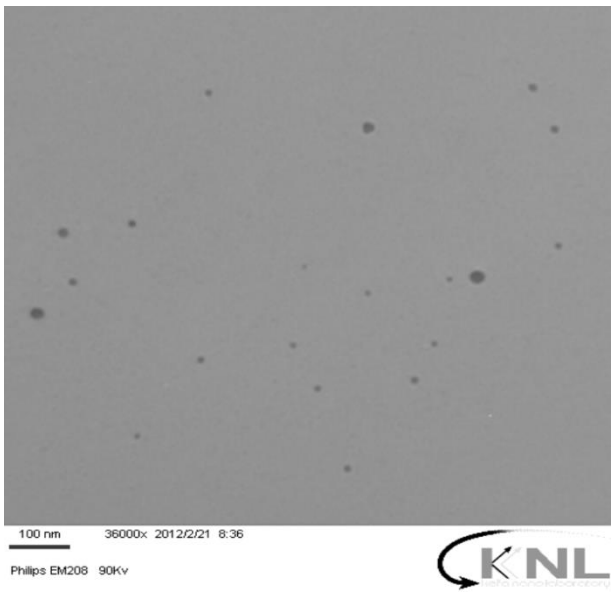
غلظت قابل قبول نانوذرات نقره برای آرتمیا ۳/۲ میلی گرم در لیتر عنوان گردید (علیشاهی و حیدری، ۱۳۹۰). بر اساس نتایج مطالعه‌ی دیگر، مقایسه نتایج سمیت نانوذرات نقره در آرتمیا با سمیت آن‌ها در ماهیان آب شیرین نشان داد که مقاومت آرتمیا نسبت به نانوذرات نقره بسیار بالاتر از ماهی‌ها می‌باشد (علیشاهی و حیدری، ۱۳۹۰). همچنین مشخص شده است که نانوذره‌ی نقره تثبیت شده با PVA (پلی ونیل الکل) از سمیت کمتری نسبت به نانوذره نقره معمولی در *Artemia salina* برخوردار است (Arulvasu *et al.*, 2014). بطوری که بر اساس پژوهشی اثر حاد نانوذرات نقره تثبیت شده با PVA (پلی ونیل الکل) را بر جلبک *Pseudokrichneriella subcubcapitata* و آرتمیا سالینا (*A. salina*) بررسی و LC50 را در جلبک ۱/۰۹ میلی‌گرم بر لیتر و در آرتمیا سالینا ۰/۰۵۵ میلی‌گرم بر لیتر گزارش کردند (Becaro *et al.*, 2015). مقایسه اثر حاد و کوتاه مدت نانوذرات نقره و نیترات نقره بر درصد بازماندگی آرتمیا سالینا نیز بیانگر این است که درصد بازماندگی آرتمیاهای تحت تأثیر نانوذرات نقره دو برابر بیشتر از درصد بازماندگی آرتمیاهای تحت تأثیر نیترات نقره با همان غلظت‌ها (از ۰/۵ تا ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر) بود (Kowalska-Góralska *et al.*, 2011).

با توجه به اینکه در مطالعات ذکر شده اثرات حاد نانوذره نقره در بازه های زمانی کوتاه مورد بررسی قرار گرفته و اثرات طولانی مدت این نانو ذره مورد ارزیابی قرار نگرفته است، این پژوهش با هدف بررسی اثرات مزمن غلظت‌های مختلف نانوذره بر رشد، بازماندگی و ویژگی‌های تولید مثلی *A. urmiana* انجام گردید.

مواد و روش‌ها

تهیه نانو ذره نقره

به منظور تهیه نانو ذرات نقره، ابتدا ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول ۱ میلی مولار نیترات نقره با حل کردن ۰/۰۱۴۴ گرم از نمک نیترات نقره در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه تهیه شد. به طور جداگانه ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول ۱ میلی‌مولار سیترات سدیم و ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول ۱٪ گلوکز آماده شد. در مرحله‌ی بعد مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول سیترات سدیم تهیه شده به ۵۰ میلی‌لیتر محلول نیترات نقره افزوده شد و به مدت ۱۵ دقیقه درون دستگاه التراسونیک قرار گرفت. سپس ۵۰ میلی‌لیتر محلول گلوکز ۱٪ به آن اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه درون حمام آب گرم با دمای ۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. در نهایت کلوئید زرد شفاف نانوذرات نقره حاصل شده و برای استفاده‌های بعدی در دمای اتاق و شرایط تاریک نگهداری شد (Farhadi *et al.*, 2012) (شکل ۱).



شکل ۱: عکس TEM تهیه شده از نانوذره نقره (Farhadi *et al.*, 2014)

Figure 1: TEM micrograph of silver nanoparticles (Farhadi *et al.*, 2014)

تخم‌گشایی و پرورش *A. urmiana*

سیست‌های آرتمیا تحت شرایط استاندارد آب شور ۳۵ گرم در لیتر ، دمای ۲۷-۲۸ °C، نور ۲۰۰۰ لوکس و هوادهی مناسب) در ظروف مخروطی تخم‌گشایی شدند (Agh *et al.*, 2009). سپس تعداد ۵۰۰ عدد ناپلی تازه هچ شده، شمارش و در چهار تکرار به داخل ظروف ته مخروطی حاوی۸۰۰ میلی لیتر آب دریاچه با شوری۸۰ گرم در لیتر جهت پرورش منتقل گردیدند. دمای محیط پرورش در حدود ۲۸ °C تنظیم گردید و ظروف ته مخروطی پلاستیکی به کمک پیپت پلاستیکی و لوله‌های هوادهی از ته ظروف هوادهی گردیدند. تمامی تیمارها

توسط غذای ترکیبی (جلبک *دونالیلا ترتیولکتا* و مخمر نانوایی) و طبق جدول Coutteau (جدول ۱) غذادهی شدند (Coutteau *et al*., 1992).

جدول ۱: جدول غذادهی ۲۰۰ عدد آرتمیا که توسط (Coutteau *et al*., 1992) ارائه شده است.

Table1: Feeding schedule of artemia postulated by Coutteau *et al*. (1992).

روز پرورش	دونالیلا ترتیکولکتا (میلی لیتر)	مخمر نانوایی (میلی لیتر)
۱	۰/۴۱۸	۰/۴۱۸
۲، ۳، ۴	۰/۸۲۶	۰/۸۲۶
۵، ۶	۱/۲۵	۱/۲۵
۷	۱/۶۵	۱/۶۵
۸	۲/۱۲	۲/۱۲
۹	۳/۴	۳/۴
۱۰، ۱۱	۴	۴
۱۲، ۱۳	۵	۵
۱۴، ۱۵	۶	۶
۱۶، ۱۷	۷	۷
۱۸، ۱۹	۸/۵	۸/۵
روز ۲۰ به بعد	۱۰	۱۰

غلظت جلبک: ۱۸×۱۰^{۶} cell/ml و غلظت مخمر نانوایی: ۴ گرم در ۶۰۰ سی سی آب

تیمار های آزمایشی

تیمارهای مورد نظر نانوذرات نقره بر اساس اطلاعات موجود در منابع علمی (Falugi *et al*., 2012) و پیش آزمون‌های انجام شده انتخاب شدند. مشخصات تیمارهای مختلف آزمایشی در جدول ۲ ارائه شده است.

بررسی رشد و بازماندگی آرتمیا

بازماندگی در روزهای ۸، ۱۱، ۱۷، ۲۰ و ۲۳ پرورش با شمارش آرتمیاهای زنده در هر یک از ظروف به‌طور جداگانه بررسی و نتایج بدست آمده بصورت درصد بیان گردید. با توجه به اینکه در روزهای شمارش تعویض آب محیط نیز بصورت کامل انجام می شد، لذا برای تامین غلظت نانو ذرات در محیط به مقدار لازم از کلوئید نانوذرات نقره اولیه که غلظت آن ۱۸ میلی‌گرم در لیتر بود، به محیط اضافه می گردید. رشد آرتمیاها (طول بدن از سر تا انتهای آخرین بند شکمی) در روزهای تعیین بازماندگی بعد از تثبیت در محلول لوگول (۳۰ نمونه برای هر تیمار) توسط استریومیکروسکوپ مجهز به دستگاه دیجیتایزر تعیین شد.

جدول ۲:تیمارهای مختلف آزمایشی.

Table 2: Different experimental groups.

تیمار	غلظت نانو ذرات نقره (میلی گرم در لیتر)
شاهد	بدون نانوذره نقره
تیمار ۱	۰/۰۰۱
تیمار ۲	۰/۰۱
تیمار ۳	۰/۱
تیمار ۴	۱

بررسی ویژگی‌های تولید مثلی آرتمیا

بعد از مشاهده‌ی علائم بلوغ در جمعیت‌ها، تعداد ۳۰ جفت آرتمیای بالغ از هر تیمار انتخاب و هر جفت (یک نر و یک ماده) بطور جداگانه داخل ظرف استوانه‌ای ته مخروطی کوچک ۵۰ میلی‌لیتری (فالکون) قرار داده شدند. در این مرحله نیز شوری محیط پرورش ۸۰ گرم بر لیتر بود و محیط نگهداری مولدین عاری از نانو ذره بود. فالکون‌ها داخل رک‌های ۳۰ تایی قرار داده شدند و همه رک‌ها در داخل آکواریوم حاوی آب با دمای°C ۲۸ قرار داده شدند. آب فالکون‌ها به صورت روزانه تعویض و سیست‌ها و ناپلی های تولید شده از هر جفت آرتمیا پس از جمع آوری با استفاده از استریومیکروسکوپ Zeiss SV 11 (stereomicroscope, Germany) شمارش می‌گردید. برای این کار ابتدا آرتمیاهای والد موجود در ظرف فالکون به کمک پیپت مخصوص برداشته شده و داخل میکروپلیت‌های ۲۴ خانه نگهداری و پس از تعویض آب به داخل فالکون‌ها برگردانده می‌شدند. در مرحله‌ی تولید مثلی، تغذیه‌ی آرتمیا با جلبک تک‌سلولی *Donaliella tertiolecta* و بر اساس جدول استاندارد غذادهی (۲۰۰ میکرولیتر جلبک با تراکم ۱۸ میلیون سلول در هر سی-سی) انجام می‌شد (Agh *et al*., 2008).

ویژگی‌های تولید مثلی مورد مطالعه شامل تعداد دفعات تولید مثل[1]، تعداد زاده‌ها در هر بار تولید مثل[2]، تعداد زاده‌ها در هر روز[3]، طول دوره زندگی[4] با توجه به زمان مرگ آرتمیای ماده (از ناپلی تا مرگ)، طول دوره‌ی پیش تولید مثل[5] (مدت زمان بعد از بلوغ تا شروع اولین سیست‌زایی)، طول دوره‌ی تولید مثل[6]، تعداد کل زاده‌ها[7] و درصد سیست زایی[8] بود (Agh *et al*., 2008).

برای بررسی اثر نانو ذرات و همچنین اثر زمان بر میزان بازماندگی و رشد (طول آرتمیا) از رگرسیون چند متغیره استفاده شد. پیش از انجام رگرسیون، از حصول مفروضات آن شامل نرمال بودن توزیع داده‌ها، خطی بودن، عدم وجود همخطی (Collinearity) و همگنی واریانس‌ها اطمینان حاصل شد. با استفاده از آزمون ماهالانوبیس در سطح معنی داری (p□۰/۰۰۱) از عدم وجود داده‌های پرت اطمینان حاصل گردید. برای بررسی اثر غلظت نانوذره نقره بر شاخص تعداد کل زاده‌ها از صفت تعداد دفعات تولید مثل به عنوان کوواریانس استفاده گردید. همچنین قبل از انجام آنالیز کوواریانس، مفروضات آن شامل همگنی واریانس‌ها و نرمال بودن توزیع داده‌ها و وجود رابطه خطی میان تعداد کل زاده‌ها و تعداد دفعات تولید مثل اطمینان حاصل شد. البته برای برقراری مفروضات فوق از تبدیل Cox Box استفاده گردید.

برای مقایسه‌ی شاخص‌های تعداد زاده‌ها در هر روز، تعداد زاده‌ها در هر بار تولید مثل، طول دوره‌ی پیش تولید مثل، طول دوره‌ی تولید مثل، طول عمر و درصد سیست-زایی از آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) استفاده گردید. مشابه موارد فوق، پیش از انجام آنالیز واریانس از حصول مفروضات آن شامل نرمال بودن توزیع داده‌ها و همگنی واریانس‌ها اطمینان حاصل شد. برای مقایسه میانگین‌ها، در صورت معنی دار بودن نتیجه آنالیز واریانس، از آزمون توکی استفاده شد. سطوح معنی‌داری در تمام آزمون‌ها p=۰/۰۵ بود. نتایج به صورت Mean±SE گزارش گردیدند.

نتایج

رشد آرتمیا ارومیانا در تیمارهای مختلف آزمایشی

نتایج آنالیز رگرسیون مربوط به رشد (طول آرتمیا) در تیمارهای مختلف و زمان‌های مورد بررسی در زیر آمده است. ۶۶/۱ درصد تغییرات مربوط به طول آرتمیا در تیمارهای مختلف توسط معادله ارائه شده قابل تفسیر بود ($F(۳، ۴۴۹)=۲۹/۷۲, p= ۰/۰۰۰$). همچنین عامل زمان و غلظت نانوذرات و اثر متقابل این دو در مدل رگرسیون مشارکت دارند.

$$Length= ۷/۱۴۹+ ۱/۹۴۶ (Z_{time}) + ۰/۲۵۶ (Z_{dosage}) + ۰/۱۹۹ (Z_{dosage} \times Z_{time})$$

طبق نتایج بدست آمده با افزایش غلظت انوذره نقره میزان طول افزایش یافت و در بالاترین دوز (۱mg/l) بیشترین

[1] Number of broods
[2] Number offspring per brood
[3] Number offspring per day
[4] Life span
[5] Pre reproduction period
[6] Reproduction period
[7] Total offspring
[8] Percent of encysted

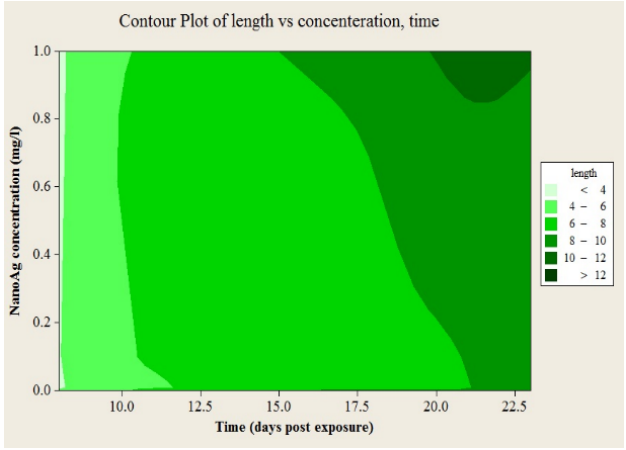
میزان رشد مشاهده شد. اثر متقابل زمان و غلظت نانوذره نیز معنی دار بود اما عامل زمان تأثیر بیشتری در افزایش رشد *Artemia urmiana* داشت (β=۰/۸۰) (شکل ۲).

درصد بازماندگی آرتمیا ارومیانا در تیمارهای مختلف آزمایشی

نتایج آنالیز رگرسیون درصد بازماندگی آرتمیا در تیمارهای مختلف و در زمان‌های مورد مطالعه نشان‌دهنده آن است در تیمارهای مختلف توسط مدل زیر قابل توضیح است (F(۲/۹۷)=۱۱۱/۷۵, p= ۰/۰۰۰)

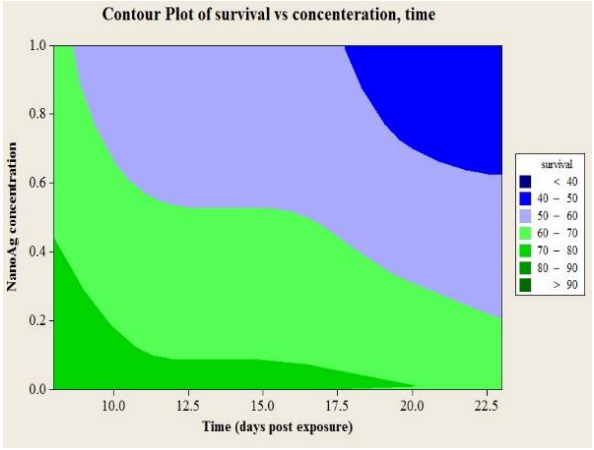
Survival= ۶۸/۳۸۸ - ۴/۸۶۹ (Z_{time}) - ۸/۶۸۸ (Z_{dosage})

این نتایج نشان داد که افزایش غلظت نانوذرات نقره منجر به کاهش میزان بازماندگی شده است (β= -۰/۷۳). کمترین میزان بازماندگی مربوط به غلظت ۱mg/l بود که در روز ۲۳ به کمترین میزان خود کاهش پیدا کرد (شکل ۳).



شکل ۲: نتایج مربوط به رشد *آرتمیا ارومیانا*

Figure 2: Growth rate of *Artemia urmiana* exposed to silver nanoparticles



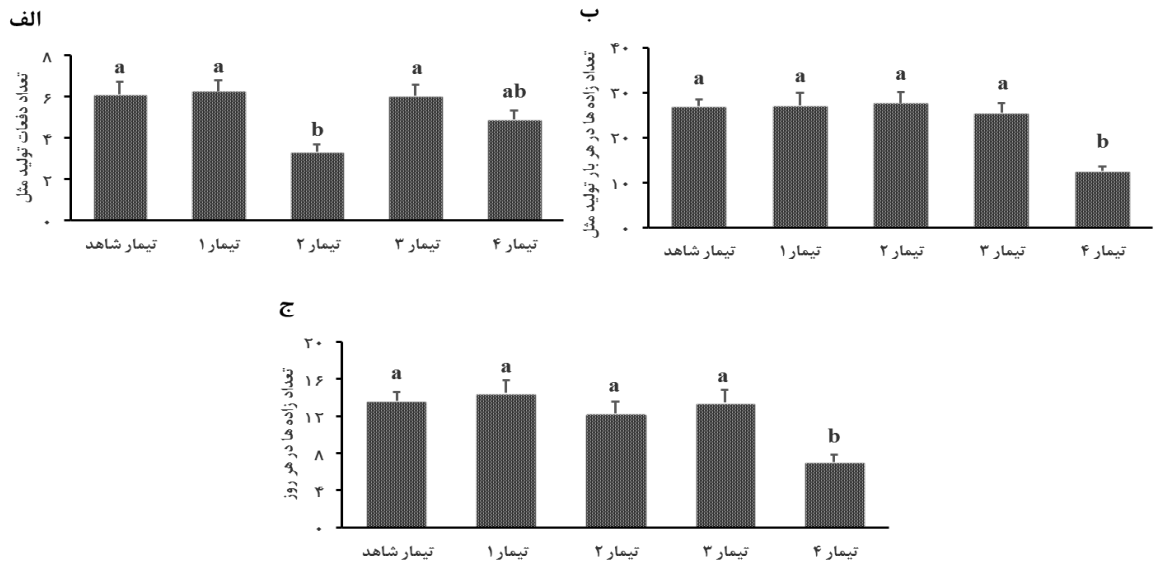
شکل ۳: نتایج مربوط به بازماندگی آرتمیا *ارومیانا*

Figure 3: Survival rate of *Artemia urmiana* exposed to silver nanoparticles

ویژگی‌های تولید مثلی

در پژوهش حاضر، ویژگی‌های مختلف تولید مثلی شامل تعداد دفعات تولید مثل، تعداد زاده‌ها در هر بار تولید مثل، تعداد زاده‌ها در هر روز، طول دوره زندگی، طول دوره‌ی پیش تولید مثل، طول دوره‌ی تولید مثل، تعداد کل زاده‌ها و درصد سیست زایی مورد بررسی قرار گرفت.

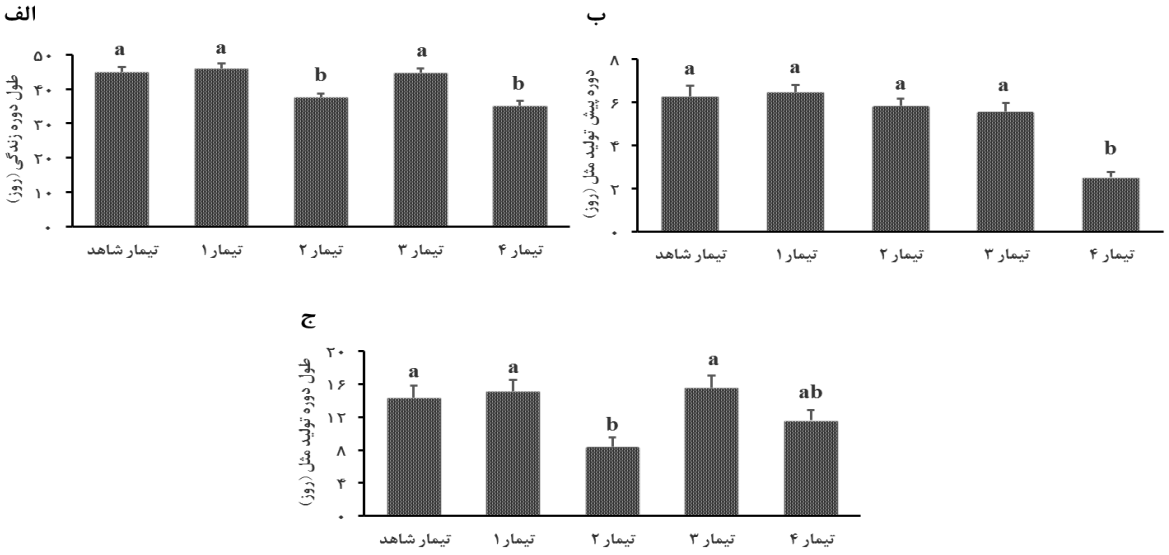
نتایج مربوط به شاخص تعداد دفعات تولید مثل در شکل ۴- الف آمده است. بر این اساس تیمار ۲ (۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر) دارای اختلاف معنی‌دار با تیمارهای شاهد، ۰/۰۰۱ و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر داشت (p<۰/۰۵) و از تعداد دفعات تولید مثل پایین‌تری برخوردار بود. شاخص تعداد زاده‌ها در هر بار تولید مثل نیز در شکل ۴- ب ارائه شد. در این شاخص تیمار ۴ حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر نانوذره نقره دارای اختلاف معنی‌دار با سایر تیمارها بود (p<۰/۰۵)، با افزایش غلظت نانوذره نقره تا ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد و در تیمار حاوی ۱میلی‌گرم در لیتر کمترین تعداد زاده‌ها در هر بار تولید مثل مشاهده شد. کمترین تعداد زاده‌ها در هر روز نیز به تیمار ۴ (۱ میلی‌گرم نانوذره نقره در لیتر) تعلق داشت که دارای اختلاف معنی‌دار با سایر تیمارها بود (p<۰/۰۵، شکل ۴- ج).



شکل۴: نتایج تعداد دفعات تولید مثل (الف)، تعداد زادهها در هر بار تولید مثل (ب) و تعداد زادهها در هر روز (ج) در تیمارهای مختلف آزمایشی.

Figure 4: Reproduction rate (A), number of broods per reproduction (B) and number of broods per day (C) of diferent experimental groups.

نتایج مربوط به شاخص طول دوره زندگی در شکل ۵- الف آورده شده است. کمترین مدت طول دوره زندگی در تیمارهای ۴ (۱ میلیگرم در لیتر) و تیمار ۲ (۰/۰۱ میلی-گرم در لیتر) مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). همچنین کمترین دوره پیش تولید مثلی در تیمار ۴ (۱ میلیگرم در لیتر) مشاهده شد که از لحاظ آماری اختلاف قابل توجهی با سایر گروههای آزمایشی داشت ($p<۰/۰۵$، شکل ۵- ب). کمترین طول دوره تولید مثلی نیز در تیمار۲ (۰/۰۱ میلیگرم در لیتر) مشاهده شد. این اختلاف با تیمارهای شاهد، ۰/۰۰۱ و ۰/۱ میلیگرم بر لیتر، معنیدار بود ($p<۰/۰۵$، شکل ۵- ج).



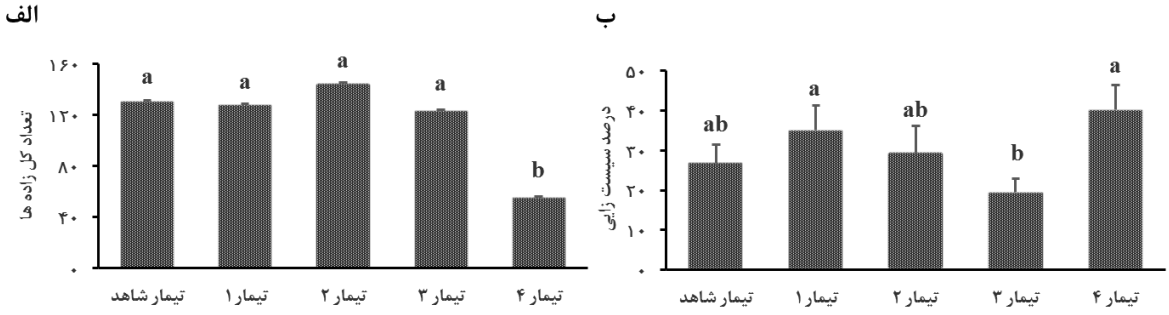
شکل ۵: نتایج طول دوره زندگی (الف)، طول دورهی پیش تولید مثل (ب) و طول دورهی تولید مثل (ج) در تیمارهای مختلف آزمایشی.

Figure 5: Life time (A), pre-reproduction period (B) and reproductive period (C) of different experimental groups.

نتایج مربوط به میانگین تعداد کل زاده‌ها و شاخص درصد سیست‌زایی در شکل ۶ آورده شده است. بر این اساس کمترین تعداد زاده‌های کل در تیمار ۴ (۱ میلی گرم در لیتر) مشاهده شد که طبق نتایج آنالیز کوواریانس با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت ($p<۰/۰۵$) ولی سایر تیمارها با هم اختلاف معنی داری نداشتند ($p>۰/۰۵$، شکل ۶- الف). بررسی نتایج سیست‌زایی بیانگر این بود که بیشترین درصد سیست‌زایی در تیمار ۱میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد و با تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر اختلاف معنی‌دار داشت، با این حال تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای ۰/۱ و ۰/۰۰۱ میلی‌گرم در لیتر و شاهد وجود نداشت ($p<۰/۰۵$، شکل ۶- ب).

بحث

ورود آلاینده‌ها از جمله نانوذرات به بوم‌سازگانهای آبی موجب اختلال در کارکردهای سطوح مختلف زیستی آن‌ها می گردد (Handy *et al.*, 2008). به طور مثال نانوذرات فلزی باعث پراکسید شدن چربی‌های غشاء سلولی در ماهیان و آبزیانی چون آرتمیا می‌شود(Gambardella *et al.*, 2014). این ترکیبات همچنین باعث هایپرپلازی آبششی شده و سرانجام موجب هایپوکسی آبزی، تخریب ساختار اسیدهای نوکلئیک و تغییر بیان ژن‌های مهمی نظیر ژن Selenoprotein N1 می‌گردند(Griffitt *et al.*, 2007; Yeo & Kang, 2008; Lee *et al.*, 2012). علاوه بر این در ماهی گوره‌خری، ناهنجاری‌های جنینی تحت تأثیر نانوذرات نقره گزارش شده است(Griffitt *et al.*, 2008). نتیجه آنکه بازماندگی و پویایی جمعیت آبزی و سرانجام پایداری منابع آبی تحت تاثیر قرار می‌گیرد (Bilberg *et al.*, 2012).



شکل ۶: نتایج تعداد کل زاده‌ها (الف) و درصد سیست‌زایی (ب) در تیمارهای مختلف آزمایشی.

Figure 6: Total number of broods (A) and cyst production rate (B) of different experimental groups.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که افزایش غلظت نانوذره منجر به کاهش بازماندگی آتمیا گردید و با گذشت زمان میزان مرگ و میر در تیمارهای مختلف بویژه در تیمار ۱ میلی گرم در لیتر بالا رفت. در مطالعه اثر نانوذرات نقره بر بازماندگی بارناکل (*Amphibalanus amphitrite*) در غلظت ۱میلی‌گرم بر لیتر مشخص شد که بعد از گذشت ۲۴ ساعت همه بارناکل‌ها تلف شدند. محاسبات نشان داد که LC_{50} نانوذره نقره ۰/۰۳ میلی‌گرم بر لیتر بود، همچنین در این پژوهش مشخص شد که *A. salina* حساسیت کمتری به نانوذرات نقره در مقایسه با بارناکل داشت و LC_{50} آن بعد از گذشت ۲۴ ساعت ۰/۳ میلی‌گرم بر لیتر بود (Falugi *et al.*, 2012). در پژوهش دیگری اثر حاد نانوذرات روی با تاکید بر اندازه نانوذرات بر ناپلی *A. salina* بررسی شد در این پژوهش غلظت‌های ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر نانوذرات روی مورد استفاده گرفت و این آزمایش در بازه‌های زمانی ۲۴ و ۹۶ ساعت بررسی شد. نتایج به صورت ۴۲ درصد مرگ و میر برای Zn (۶۰-۴۰) نانومتر و ۳۴ درصد مرگ و میر برای Zn (۱۰۰-۸۰) در بازه زمانی ۹۶ ساعت بوده است(Ates *et al.*, 2013a). در مطالعه‌ی دیگری سمیت نانوذرات دی-اکسید تیتانیوم در آرتمیا سالینا مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایش غلظت‌های ۱۰۰-۱۰ میلی‌گرم بر لیتر به

مدت ۹۶ ساعت اعمال شد. طی ۲۴ ساعت نخست در هیچ‌کدام از غلظت‌های مورد مطالعه مرگ و میری مشاهده نشد، اما پس از گذشت ۹۶ ساعت، بالاترین میزان مرگ و میر شامل ۱۴ درصد در بالغین و ۱۸ درصد در ناپلی‌ها در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد(Ates *et al*., 2013b). در پژوهشی سمیت نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم و نانوذرات نقره بر آرتمیا بررسی شد ، در این تحقیق همچنین سمیت نانوذرات نقره با نقره نیترات بررسی گردید. نتایج نشان داد که سمیت نقره نیترات بیشتر از نانوذرات نقره بوده و بین تیمارهای نانوذرات نقره و دی-اکسید تیتانیوم تفاوت معنی‌داری وجود نداشت(Bareld *et al*., 2010). همراستا با پژوهش‌های پیشین، در پژوهش حاضر نیز با افزایش غلظت نانوذره نقره از بازماندگی آرتمیا در تیمارهای مختلف کاسته شد. البته نکته ای که باید به آن اشاره داشت این است که در مطالعات گذشته بیشتر سمیت حاد مدنظر پژوهشگران بوده است، در حالیکه در مطالعه حاضر هدف اصلی مشاهده اثرات طولانی مدت و مزمن رویارویی با نانوذره بر کارکردهای تولید مثلی حیوان بود و به همین دلیل غلظت‌ها به نحوی انتخاب شدند که حداکثر بازماندگی برای ادامه آزمایش حاصل گردد.

قرار دادن طولانی‌تر آبزیان در معرض سموم از جمله نانوذرات، می‌تواند رشد و تولید مثل آبزیان را تحت تأثیر قرار دهد (Manfra *et al*., 2012). با این وجود بیشتر مطالعات پیشین برای یک دوره زمانی کوتاه و یا صرفا با هدف تعیین غلظت‌های کشنده این ترکیبات انجام شده‌اند و هیچ پژوهشی با هدف تعیین اثرات رویارویی با این سموم در مراحل اولیه زندگی روی موفقیت تولید مثلی این آبزی انجام نشده است. بنابراین در پژوهش حاضر اثر مزمن نانوذرات نقره بر ویژگی‌های تولید مثلی آرتمیا ارومیانا انجام گرفت و نتایج نشان داد که بالاترین غلظت نانوذرات مورد بررسی یعنی تیمار ۱ میلی‌گرم نانوذرات نقره در لیتر در بیشتر شاخص‌های تولید مثلی اختلاف معنی‌داری با سایرین داشت و دارای کمترین تعداد زاده-های کل، کمترین تعداد زاده‌ها در هر روز، کمترین تعداد زاده‌ها در هر بار تولید مثل، بیشترین درصد سیست‌زایی، کمترین میزان طول عمر و همچنین کمترین دوره‌ی پیش‌تولید مثلی به دلیل بلوغ زودرس بود. در معدود مطالعات انجام شده در مورد اثر نانوذرات نقره بر تولیدمثل آبزیان، با افزایش غلظت نانوذرات نقره در محیط، اختلال در روند تکامل جنینی عروس دریایی *Paracenerotus lividus* مشاهده شده است. در ماهی دانیو گورخری (*Danio reiro*) نیز با افزایش غلظت نانوذرات نقره از ۰/۰۰۰۱ به ۰/۱ گرم بر لیتر، تکامل جنینی دچار مشکل شده است (Falagui *et al*., 2012). مشابه نتایج پژوهش حاضر، کارایی تولید مثلی دافنی ماگنا (*Daphnia magna*) تحت تأثیر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم، به طور محسوس کاهش یافته و تعداد زاده‌ها ناچیز بوده است (Setiz *et al*., 2013). علیرغم کمبود اطلاعات در مورد اثر نانوذرات بر تولید مثل آرتمیا، گزارشاتی در مورد دیگر فلزات وجود دارد. برای مثال بررسی اثر سمیت کادمیوم بر زمان رسیدگی جنسی و تولید مثل آرتمیای تک جنس (*Artemia parthenogenetica*) بیانگر این نکته بود که افزایش غلظت کادمیوم از ۰/۰۱ تا ۵ میلی‌گرم بر لیتر باعث کاهش کارایی تولید مثلی شده و منجر به بلوغ زود رس می‌شود (Sabria *et al*., 2003). در پژوهش Sabria و همکاران (2008) نیز با افزایش غلظت روی، تعداد آرتمیاهای بارور و تعداد زاده ها در آرتمیای تک جنس (*Artemia parthenogenetica*) کاهش یافت. بررسی سمیت مزمن آرسنیک بر رشد، بازماندگی و تولید مثل آرتمیا فرانسیسکانا (*Artemia franciscana*) در دو نسل والدین و F_1 نیز نشانگر آن بود که میزان بازماندگی در نسل والدین از غلظت ۸ تا ۱۵ میلی گرم بر لیتر رو به کاهش بود، اما در نسل F_1 بازماندگی در ۵۶ میلی‌گرم بر لیتر کاهش پیدا کرد. کاهش میزان رشد و نرخ تولید مثل نیز در هر دو نسل والدین و F_1 در غلظت ۵۶ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد (Brix *et al*., 2003). همچنین در پژوهشی دیگر اثر آنتی بیوتیک‌های دامپزشکی بر تولید مثل دافنی ماگنا (*Daphnia magna*) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در غلظت‌های ۴۶/۲ میلی‌گرم بر لیتر اوکسی تتراسایکلین (Oxytetracycline)، ۴۴/۸ میلی‌گرم بر لیتر تتراسایکلین (Tetracycline)، ۱۳/۷ میلی‌گرم بر لیتر سولفادیازین (Sulfadiazine) و ۵/۴ میلی‌گرم بر لیتر تیامولین (Tiamulin) کارایی تولید مثلی

کاهش پیدا می‌کند (Wollenberger *et al.*, 2000) که نتایج پژوهش حاضر با نتایج پژوهشگران پیشین همخوانی دارد و می‌توان اینگونه بیان کرد که حضور آلاینده‌های مختلف بویژه نانوذرات در محیط‌های آبی می‌تواند موفقیت تولیدمثلی آبزی را محدود سازد. البته نکته‌ای که پژوهش حاضر را از گزارش‌های پیشین متمایز می‌سازد این است که در این مطالعه، نانوذره در زمان تولید مثل آبزی در محیط وجود نداشت و اثرات سوء آن تنها به مراحل آغازین تکامل اندام‌های تولیدمثلی آرتمیا و مراحل رشد آن بوده است. این‌که چگونه نانوذرات نقره موجب کاهش کارایی تولید مثلی *A. urmiana* شده است، نیازمند بررسی‌های ملکولی بیشتری است. از سوی دیگر برای مقابله با شرایط نامناسب زیستی موجود در محیط زندگی، رویکرد تولیدمثلی آرتمیا تغییر پیدا کرده و درصد سیست زایی افزایش می یابد. در پژوهش حاضر نیز درصد سیست‌زایی در گروه ۱ میلی‌گرم نانوذرات نقره بر لیتر به طور معنی داری بالاتر از سایر تیمارها بود که نشان دهنده نامناسب بودن وضعیت زیستی در این گروه می‌باشد. مشابه نتایج پژوهش حاضر، گزارش‌هایی در مورد تأثیر تنش شوری بر نوع تولیدمثل آرتمیا وجود دارد. برای مثال Dana و Lenz (۱۹۸۶) و Triantaphyllidis و همکاران (۱۹۹۵) گزارش کرده اند که شوری تاثیر عمده ای بر ویژگی‌های مختلف چرخهٔ زندگی آرتمیا نظیر بلوغ جنسی، طول دورهٔ تولیدمثل، طول عمر، دفعات تولیدمثل، فاصله بین تولیدمثل‌های متوالی، تعداد زاده ها و نوع تولیدمثل آرتمیا دارد. در آرتمیای مهارلو و *A. urmiana* نیز با افزایش شوری، فاصله بین تولیدمثل‌ها زیاد می گردد و درصد سیست زایی در شوری‌های بالا بیشتر از شوری-های پایین می باشد (لطفی و همکاران، ۱۳۸۲). جمعبندی نتایج پژوهش نشان داد که ورود نانو ذرات نقره به بوم‌سازگان‌های طبیعی *A. urmiana* می تواند بر چرخه تولید مثلی آن تاثیر گذاشته و موجب کاهش بازماندگی و توان تولید مثل آن گردد. بنابراین در ارتباط با چگونگی استفاده از نانوذرات در محیط‌های آبی و همچنین مدیریت دفع پساب‌های آلوده باید توجه و جدیت بیشتری از سوی مراجع ذیربط صورت پذیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از حمایت های مالی دانشگاه ارومیه تشکر و قدردانی بعمل می آورند.

منابع

توانا، م.، کلباسی، م. ر.، عابدیان کناری، ع. و جوهری، س.ع.، ۱۳۹۳. ارزیابی میزان جذب و رهایش نانوذرات نقره و دی اکسید تیتانیوم در ناپلی *آرتمیا فرانسیسکانا* در شوری های مختلف. مجله اقیانوس شناسی، شماره ۱۹، صفحات۱۰۳-۹۱.

رزم‌آرا، پ.، درافشان، س.، پیکان‌حیرتی، ف. و رنجبر، م.،۱۳۹۲. اثر نانوذرات نقره کلوییدی و نیترات نقره محلول در آب بر تغییرات بافت‌شناسی گربه‌ماهی رنگین‌کمان (*Pangasianodon hypophthalmus*). مجله‌ی بوم‌شناسی آبزیان، دوره ۳، شماره ۳، صفحات ۱۸-۱۰.

سالاری جو، ح.، کلباسی، م. ر. و جوهری، س.ع.، ۱۳۹۱. تأثیر شوری آب بر سمیت حاد نانوذرات کلوئیدی در بچه ماهیان قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله سلامت و محیط، دوره ۵، شماره ۱، صفحات۱۳۲-۱۲۱.

علیشاهی، م. و حیدری، م.، ۱۳۹۰. بررسی سمیت نانوذره نقره در ناپلی آرتمیای دریاچه ارومیه. مجله پژوهش‌های نوین دامپزشکی، شماره ۸، صفحات ۴۹-۵۴.

لطفی گورچین قلعه، و.، آق، ن. و سپهری، ح.، ۱۳۸۲. اثرات شوریهای مختلف محیط بر درصد بقا، میزان رشد و صفات تولید مثلی و طول عمر سه جمعیت از آرتمیای ایران. مجله علوم دانشگاه تهران، دوره ۲۹، شماره ۲، صفحات ۳۱۶-۳۰۵.

Agh, N., Bossier, P., Abatzoponlos, T.J., Beardmore, J.A., Stappen, G.V., Mohammadyari, A., Rahimian, H. and Sorgeloos, P., 2009. Morphometric and Preliminary Genetic Characteristics of *Artemia* Populations from Iran.

International Review Hydrobiology, 94(2): 194-207. DOI: 10.1002/iroh.200811077.

Agh, N., Stappen, G.V., Bossier, P., Mohammadyari, A., Rahimian, H. and Sorgeloos, P., 2008. Life Cycle Characteristics of Six Artemia Population from Iran. Pakistan Jornal of Biological Sciences, 11(6): 854-861. DOI: 10.3923/pjbs.2008.854.861.

Arulvasu, C., Jennifer, S.M., Prabhu, D. and Chandhirasekar, D., 2014. Toxicity effect of silver nanoparticles in brine shrimp artemia. The Scientific World Jornal, article ID 256919: 1-10. DOI: 10.1155/2014/256919.

Ates, M., Daniels, J., Arsalan, Z. and Farahi, I.O., 2013a. Comparative evaluation of impact of Zn and ZnO on brine shrimp *(Artemia salina)* larvae: effects of particle size and solubility on toxicity. The Royal Society of Chemistry, 15: 225-233. DOI: 10.1039/C2EM30540B.

Ates, M., Daniels, J., Arsalan, Z. and Farahi, I.O., 2013b. Effects of aqueous suspensions of titanium dioxide nanoparticles on *Artemia salina* assessment of nanoparticle aggregation, accumulation and toxicity. Euvironmental Monitoring and Assessment, 85: 3339-3348. DOI: 10.1007/s10661-012-2794-7.

Barelds, H., 2010. The uptake and effects on survival of nanosilver and nano titanium dioxide in brine shrimp *(Artemia)* naplii. PhD thesis. Faculty of Veterinary Medicine Thesis, University of Utrecht, Netherlands.

Becaro, A.A., Jonsson, C.M., Puti, F.C., Siqueira, M.C., Mattoso, L.H., Correa, D.S. and Ferreira, M.D., 2015. Toxicity of PVA-stabilized silver nanoparticles to algae and microcrustaceans. Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management, 3: 22-29. DOI: 10.1016/j.enmm.2014.11.002.

Bilberg, K., Hovgaard, M.B., Besenbacher, F. and Baatrup, F., 2012. In Vivo Toxicity of Silver Nanoparticles and Silver Ions in zebrafish (*Danio rerio*). Journal of Toxicology, 2012: 1-9. DOI: 10.1155/2012/293784.

Brix, K.V., Cardewell, R.D. and Adans, J.V., 2003. Chronic toxicity of arsenic to the Great Salt Lake brine shrimp, Artemia franciscana. Ecotoxicology and Enviromental Safety, 54: 169-175. DOI: 10.1016/S0147-6513(02)00054-4.

Cedervall, T., Hansson, L.A., Lard, M., Frohm, B. and Line, S., 2012. Food chain transport of nanoparticles affects behavior and fat metabolism in fish. Plos one, 7(2): 1-6. DOI: 10.1371/journal.pone.0032254.

Coutteau, P., Brendonck, L., Lavens, P. and Sorgeloos, P., 1992. The use of manipulated baker's yeast as an algal substitute for the laboratory culture of Anostraca. Journal of Hydrobiologia, 234: 25-32. DOI: 10.1007/BF00010776.

Dana, G.L. and Lenz, P.H., 1986. Effects of increasing salinity on an Artemia population from Mono Lake, California.

Oecologia, 68: 428-436. DOI: 10.1007/BF01036751.

Falugi, C., Aluigi, M.G., Ferrando, S., Gambardella, C., Gatti, A.M. and Ramino, P., 2012. Dose dependent effects of silver nanoparticles on reproduction of different biological models. Enviormental quality, 8: 61-65. DOI: 10.6092/issn.2281-4485/3828.

Farhadi, K., Forough, M., Pourhossein, A. and Molaei, R., 2014. Highly sensitive and selective colorimetric probe for determination of L-cysteine in aqueous media based on Ag/Pd bimetallic nanoparticles. Sensors and Actuators B: Chemical, 202: 993-1001. DOI: 10.1016/j.snb.2014.05.129.

Gambardella, C., Mesaric, T., Milivojevic, T., Sepcic, K., Gallus, L., Cabone, S., Ferrando, S. and Fammali, M., 2014. Effects of selected metal oxide nanoparticles on *Artemia salina* larvae evaluation of mortality and behavionral and biochemical responses. Enviromental Monitoring and Assessment, 186(7): 4249-4259. DOI: 10.1007/s10661-014-3695-8

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 and Technology, 41(23): 8178-8186. DOI: 10.1021/es071235e.

Griffitt, R.J., Luo, J. Cao, J., Bonzongo, J.C. and Barber, D.S., 2008. Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. Environmental Toxicology and Chemistry, 27(9): 1972-1978. DOI: 10.1897/08-002.1.

Handy, R.D, Henry, T.B, Scown, T.M., Johnston, B.D. and Tyler, C.R., 2008. Manufactured nanoparticles: their uptake and effects on fish-a mechanistic analysis. Ecotoxicology, 17(5): 396-409. DOI: 10.1007/s10646-008-0205-1.

Hanley, C., Lane, J., Punnoos, A., Reddy, K.M., Coombs, I., Coombs, A., Feris, K. and Wingett, D., 2008. Preferential killing of cancer cells and activated human T cells using ZnO nanoparticles. Nanotechnology, 19(29): 1-20. DOI: 10.1088/0957-4484/19/29/295103.

Johari, S.A., Kalbassi, M.R., Soltani, M. and Yu, I.J., 2013. Toxicity comparison of colloidal silver nanoparticles in various life stages of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Iranian Journal of Fisheries Sciences, 12(1): 76 – 95.

Kowalska-Góralska, M., Ława, P. and Senze, M., 2011. Impact of silver contained in the Nano silver preparation on the survival of brine shrimp (*Artemia salina* Leach 1819) larvae, Ecological Chemistry and Engineering. A, 18(3): 371-377.

Lee, K.J., Nallathamby, P.D., Browning L.M., Osgood, C.J. and Xu, X.H.N., 2007. In vivo imaging of transport and biocompatibility of single silver nanoparticles in early development of

zebrafish embryos. ACS Nano, 1(2): 133-143. DOI: 10.1021/nn700048y.

Libralato, G., 2014. The case of *Artemia* spp. In nanoecotoxicology. Marine environmental research, 101: 38-43. DOI: 10.1016/j.marenvres.2014.08.002.

Lin, D., Xing, B., 2008. Root uptake and phytotoxicity of ZnO nanoparticles. Environmental Science and technology, 42(15): 5580-5585. DOI: 10.1021/es800422x.

Manfra, L., Savorelli, F., Pisapia, M., Magaletti, E. and Cicero, A.M., 2012. Long-term Lethal Toxicity Test with the Crustacean *Artemia franciscana*. Journal of Visualize Experiments, 62: 3790-3795. DOI: 10.3791/3790.

Nunes, B.S., Carvalho, F.D., Guilhermino, L.M. and Stappen, G.V., 2006. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. Environmental pollution, 144: 453-462. DOI: 10.1016/j.envpol.2005.12.037.

Perello, M., 2013. Effects of direct and dietary exposure to nanoparticle on tritrophic system. Proceedings of the National Conference On Undergraduate Research (NCUR), University of Wisconsin La Crosse, WI, April 11–13, 117-124.

Sabria, R., Delramo, J., Diaz-Mayans, J. and Toreblanca, A., 2003. Developmental and Reproductive Effects of LowCadmium Concentration on Artemia parthenogenetica. Journal of Enviromental science and health, 38(6): 1065-1071. DOI: 10.1081/ESE-120019864.

Sabria, R., Delarmo, J., Varo, I., Diaz-mayans, J. and Toreblanca, A., 2008. Sublethal zinc exposure has a detrimental effect on reproductive performance but not on the cyst hatching success of *Artemia parthenogenetica*. Sience of the Total Environment, 398(1): 48-52. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2008.03.002.

Seitz, F., Bundschuh, M., Rosenfeldt, R.R. and Schulz, R., 2013. Nanoparticle toxicity in *Daphnia magna* reproduction studies: the importance of test design. Aquatic toxicology, 126: 163-168. DOI: 10.1016/j.aquatox.2012.10.015.

Triantaphyllidis, G.V., Poulopoulou, K., Abatzopoulos, T.J., Pérez, C.A.P. and Sorgeloos, P., 1995. International study on Artemia XLIX. Salinity effects on survival, maturity, growth, biometrics, reproductive and lifespan characteristics of a bisexual and a parthenogenetic population of Artemia. Hydrobiologia, 302(3): 215-227. DOI: 10.1007/BF00032111.

Wollenberger, L., Halling-Srensen, B. and Kusk, K.O., 2000. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. Chemosphere, 40: 723-730. DOI: 10.1016/S0045-6535(99)00443-9.

Yeo, M.K. and Kang, M.S., 2008. Effects of nanometer sized silver materials on biological toxicity during zebrafish embryogenesis. Bulletin of the Korean Chemical Society, 29(6): 1179-1184. DOI : 10.5012/bkcs.2008.29.6.1179.