تعیین غلظت کشندگی میانی (LC50) نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم سنتز شده با روش شیمیایی و زیستی در ماهی پلاتی تاکسیدو (*Xiphophorus maculatus*)

مصطفی کشاورز، سراج بیتا*

گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران.

*نویسنده مسئول serajbita@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱/۳

چکیده

افزایش استفاده از نانو مواد، منجر به رهاسازی این ذرات در محیط‌های آبی می شود که می‌توانند روی آبزیان اثراتی داشته باشند، بنابراین مطالعه حاضر با هدف بررسی سمیت نانوذرات دی اکسید تیتانیوم تولید شده با روش شیمیایی و زیستی در ماهی پلاتی تاکسیدو (*Xiphophorus maculatus*) انجام شد. ابتدا وضعیت بقاء و توان‌زیستی ماهی‌ها در شرایط مشابه با شرایط آزمایشات سمیت بررسی شد، سپس ماهیان پلاتی تاکسیدو برای تعیین غلظت کشندگی میانی نانوذرات در ۱۲ تیمار (هرکدام با سه تکرار) شامل ۶ تیمار حاوی غلظت‌های صفر، ۸۰، ۱۶۰، ۳۲۰، ۶۴۰ و ۱۲۸۰ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم تولیدشده به روش شیمیایی و ۶ تیمار حاوی غلظت‌های صفر، ۲۴۰، rcx3sss، ۴۸۰، ۹۶۰، ۱۹۲۰ و ۳۸۴۰ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم تولیدشده به روش زیستی در مخازن ۶۰ لیتری به تعداد ۱۵ ماهی در هر تیمار به مدت ۹۶ ساعت مواجهه شدند و تلفات ماهیان در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت ثبت شد. نتایج آزمایشات بقاء نشان داد که تا ۹۶ ساعت پس از نگهداری ماهیان، هیچ گونه تلفاتی مشاهده نشد و مقدار بقاء ۱۰۰٪ بوده است. با افزایش غلظت نانوذرات و افزایش زمان مواجهه درصد مرگ و میر ماهیان افزایش یافت. غلظت کشندگی میانی نانوذرات دی اکسید تیتانیوم تولید شده با روش شیمیایی و زیستی طی ۹۶ ساعت مواجهه به ترتیب برابر با ۲۵۵/۴۹ و ۷۲۰/۷۶ میلی‌گرم در لیتر محاسبه شد. بر اساس نتایج این مطالعه نانوذرات تولید شده با روش شیمیایی نسبت به نانوذرات تولید شده با روش زیستی دارای سمیت بیشتری بودند.

واژگان کلیدی: سم‌شناسی، غلظت کشندگی، نانوذرات دی اکسید تیتانیوم، ماهی پلاتی تاکسیدو.

مقدمه

نانوذرات با ابعاد زیر ۱۰۰ نانومتر دارای خواص شیمیایی، فیزیکی، الکتریکی و مکانیکی منحصر به فردی هستند که به‌طور متنوعی در زمینه پزشکی، بیوتکنولوژی، میکروبیولوژی، داروسازی و شیمی، مهندسی و مطالعه سمیت سلولی و غیره مورد استفاده قرار می‌گیرند (Roopan *et al*., 2015; Gebre and Sendeku, 2019). روش‌های سنتز نانومواد به دلیل مساحت زیاد آن به دو روش فیزیکی و شیمیایی تقسیم می‌شوند. روش‌های فیزیکی سنتز نانوذرات معمولاً نیاز به دما یا فشار عملیاتی بالا دارند. در روش شیمیایی سنتز نانوذرات، استفاده از ترکیبات شیمیایی سمی سبب شده تا استفاده از آن‌ها در زیست‌پزشکی به‌ویژه در زمینه‌های کلینیکی، کشاورزی، دامپزشکی و شیلات به دلیل ناسازگاری و آلودگی محیط زیست و اثرات منفی آن‌ها روی اکوسیستم‌های آبی با محدودیت مواجه شود، بنابراین، محققان به دنبال یک مسیر سنتز سبز برای تهیه نانو مواد هستند زیرا روش سنتز سبز ساده، سازگار با محیط زیست و مقرون به صرفه است (Li *et al*., 2011; Hussain *et al*., 2016).

در میان نانومواد مهندسی شده، نانوذرات دی اکسید تیتانیوم (TiO_2) کاربرد گسترده‌ای در صنعت رنگ، جوهر چاپ، کاغذ، لوازم آرایشی، داروسازی، ضد آفتاب، سرامیک‌های زیست‌پزشکی و بیومواد کاشته شده، فرآیندهای فوتوکاتالیستی صنعتی و تجزیه مواد آلی در فاضلاب دارد (Natarajan *et al*., 2015). این نانوذرات دارای ویژگی‌های الکتریکی، مغناطیسی

و نوری خوبی در مقایسه با سایر نانوذرات هستند (Khan *et al*., 2002; Wang *et al*., 2008). دی اکسید تیتانیوم ازلحاظ ساختار بلوری دارای سه شکل کریستالی آناتاز، روتایل و بروکیت هست (Mahshid *et al*., 2007). در بررسی اثر سمیت روی نانو ذرات اکسید فلزی، دی‌اکسید تیتانیوم، بیشترین سهم را به خود اختصاص می‌دهد. یکی از دلایلی که باعث می‌شود، تحقیقات زیادی بر روی سنجش سمیت دی‌اکسید تیتانیوم، انجام بگیرد، سازگاری و کاربرد زیاد این نانوذرات در صنایع مختلف است. در سال‌های اخیر به دلیل تولید و کاربرد گسترده نانوذرات دی اکسید تیتانیوم، ورود این نانو مواد به محیط‌زیست اجتناب‌ناپذیر بـه نظـر می‌رسد، که به دنبال آن با ورود پساب حاصل از محصولات نانو فناوری شده، به محیط‌زیست آبی، زیستگاه آبزیان در معرض نانو ذرات تولیدشده قـرار خواهنـد گرفت (Aravind *et al*., 2021). این نانوذرات پس از ورود به محیط‌های آبی بیشتر در محیط به حالت انباشته و کلوخه در می‌آیند و وارد رسوبات می‌شوند و با تأثیر بر مواد آلی یا هر ماده‌ی دیگر قادر به تغییر تعادل محیط‌زیست هستند (Gagne *et al*., 2008).

ماهی پلاتی تاکسیدو (*Xiphophorus maculatus*) از خانواده Poecilidae و از دسته ماهیان زنده‌زا است. بخش زیادی از بدن این ماهی توسط لکه‌های سیاه فراوانی پوشیده شده است. مطالعاتی در ارتباط با سمیت نانوذرات دی اکسید تیتانیوم در ماهیان توسط محققین انجام شده است (Natarajan *et al*., 2015; Tabassum *et al*., 2020; Kaviani *et al*., 2020; Abdulrahman *et al*., 2021). سیستم آبی، آسیب‌پذیرترین سیستم در برابر آلودگی نانو مواد مهندسی شده است و دانش در مورد ورود، رفتار و سمیت موجودات بسیار محدود بود (Scown *et al*., 2009)، بنابراین مقایسه سمیت نانوذرات دی اکسید تیتانیوم سنتزشده با روش شیمیایی و زیستی نیز قبل از توسعه تولید بیشتر این نوع نانوذرات در صنعت نانوتکنولوژی، ضروری به‌نظر می‌رسد. مطالعه حاضر با هدف تعیین غلظت کشندگی دو روش سنتزی نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم در ماهی پلاتی تاکسیدو انجام شد که نتایج حاصل از این مطالعه می‌تواند در تدوین استانداردها و قوانین زیست محیطی نانوذرات موثر باشد.

مواد و روش‌ها

نانوذرات مورد استفاده: در مطالعه حاضر از نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم تولید شده با روش شیمیایی با اندازه ذرات ۱۵ نانومتر که از شرکت نانونصب تهران خریداری شده بود و نیز نانوذرات دی اکسید تیتانیوم تولید شده با روش زیستی با اندازه ۴۲/۳۱ نانومتر که با استفاده از عصاره الکلی جلبک دریایی *Cystoseira indica* بر اساس روش ارائه‌شده توسط بیتا و همکاران (۲۰۱۶) استفاده گردید (Bita *et al*., 2016).

تأمین ماهی پلاتی تاکسیدو و سازگاری با شرایط کارگاه به‌منظور انجام این مطالعه ۲۱۰ قطعه ماهی پلاتی تاکسیدو (*Xiphophorus maculatus*) با میانگین وزنی ۰/۴۵ ± ۲/۶۵ گرم استفاده شد. ماهی‌ها با استفاده از کیسه‌های مخصوص حمل و نقل آبزیان که دارای یک‌سوم آب و دوسوم اکسیژن بودند در جعبه‌های عایق حرارتی قرار داده شده و از مقداری پودر یخ جهت تنظیم و کاهش دمای آب در اطراف کیسه‌ها استفاده شد و بلافاصله به کارگاه تکثیر و پرورش آبزیان دانشگاه دریانوردی چابهار منتقل شدند. پس از انتقال، ماهی‌ها از نظر ظاهری، سلامت، تعادل و رفتار شنا بررسی و ماهی‌های ضعیف و با رفتار غیرعادی جمع‌آوری و حذف شدند، این عمل اطمینان می‌دهد که غیر از دی‌اکسید تیتانیوم عامل دیگری در مرگ‌ومیر احتمالی ماهی‌ها دخالت نداشته است (Sharifpour *et al*., 2003)، سپس ماهیان برای سازش‌پذیری با شرایط جدید به مدت یک هفته در مخازن ۶۰ لیتری نگهداری و پرورش داده شدند. در طول دوره سازش‌پذیری غذادهی به میزان ۲ درصد

وزن بدن و دو بار در روز با استفاده از غذای تجاری با نام Magic mix در دو نوبت صبح و عصر انجام شد. هوادهی در مخازن برای تأمین اکسیژن موردنیاز ماهی‌ها به‌صورت ملایم و مداوم انجام می‌شد. درصد تعویض آب هر ۴۸ ساعت ۲۰٪ بود. قبل از هر وعده غذادهی جهت خارج کردن فضولات دفعی ماهی از مخازن، عمل سیفون کردن آن‌ها صورت می‌گرفت (هدایتی و همکاران، ۱۳۹۵).

آزمایشات توان‌زیستی و بقاء ماهی: در این آزمایش هیچ‌گونه عامل متغیر مستقلی وجود نداشت، اما ازنظر شرایط نگهداری و پرورشی مشابه شرایط آزمایشات حاد و تعیین LC_{50} بود. قبل از انجام آزمایشات سمیت و مواجهه ماهی پلاتی تاکسیدو (*Xiphophorus maculatus*) با غلظت‌های حاد و تحت کشنده دی‌اکسید تیتانیوم، ابتدا وضعیت بقاء توان‌زیستی ماهی‌ها در شرایط مشابه با شرایط آزمایشات سمیت (بدون افزودن دی‌اکسید تیتانیوم) بررسی شد. آزمایش بقاء در سه تکرار انجام شد. بدین منظور ۲۴ ساعت قبل از شروع آزمایش تغذیه ماهی‌ها قطع شد و ماهی‌ها با تراکم ۱۰ عدد در هر مخزن ذخیره‌سازی شدند. هوادهی به مخازن با استفاده از سنگ هوا به‌صورت مداوم انجام شد. آب مورداستفاده در این آزمایش مشابه همان آبی است که در مرحله سازش‌پذیری و آزمایشات سمیت استفاده می‌شود و کلیه پارامترهای کیفی آب نیز با بقیه مراحل آزمایشات تحقیق یکسان بودند. در طول دوره آزمایش بقاء غذادهی به ماهی‌ها نیز انجام نشد و مدت زمان آزمایش نیز مشابه مدت زمان آزمایشات حاد و تعیین LC_{50} بوده است (Sharifpour *et al*., 2003). به‌منظور تلفات احتمالی، کلیه مخازن هر ۲۴ ساعت یک‌بار جهت جمع‌آوری ماهی‌ها تلف‌شده، ثبت تلفات و تعیین درصد بقاء بررسی می‌شدند.

تعیین محدوده کشندگی: پس از انجام آزمایش توان‌زیستی و بقاء در ماهی‌ها و اطمینان از سالم بودن آن‌ها اقدام به انجام آزمایشات سمیت جهت محاسبه غلظت متوسط کشندگی (LC_{50}) شد، اما از آنجایی که تاکنون مقادیر دقیق غلظت حد کشندگی دی‌اکسید تیتانیوم در ماهی پلاتی تاکسیدو تعیین نشده و محدوده کشندگی آن بر این‌گونه ماهی مشخص نبوده، بنابراین جهت تعیین غلظت کشندگی حاد دی‌اکسید تیتانیوم ابتدا آزمودن تعیین محدوده کشندگی دی‌اکسید تیتانیوم (Range Finding Test) بر ماهی‌های موردمطالعه انجام شد و سپس آزمایشات بعدی جهت تعیین غلظت متوسط کشندگی (LC_{50}) انجام شدند. محدوده کشندگی بر اساس اولین (کمترین) غلظتی که در مدت ۹۶ ساعت، تلفات در آن مشاهده می‌شود و اولین غلظتی که ۱۰۰٪ تلفات را در پی دارد، تعیین می‌گردد.

تعیین غلظت کشندگی میانی (LC_{50}): غلظت کشندگی میانی در ماهی‌ها طی مدت‌زمان ۹۶ ساعت مواجهه طبق روش استاندارد تعیین سمیت مواد در آبزیان (OECD guideline for testing of chemicals, No. 203) انجام شد. ماهیان در ۱۲ تیمار (هرکدام با سه تکرار) شامل ۶ تیمار حاوی غلظت‌های صفر، ۸۰، ۱۶۰، ۳۲۰، ۶۴۰ و ۱۲۸۰ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم تولیدشده به روش شیمیایی و ۶ تیمار حاوی غلظت-های صفر، ۲۴۰، ۴۸۰، ۹۶۰، ۱۹۲۰ و ۳۸۴۰ میلی-گرم در لیتر نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم تولیدشده به روش زیستی در مخازن ۶۰ لیتری به تعداد ۱۵ ماهی در هر تیمار مواجهه شدند. در این روش اجرای آزمایشات به‌صورت ساکن بوده و میزان مرگ‌ومیر هر ۲۴ ساعت یک‌بار در فواصل زمانی ۲۴،۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت ثبت می‌شود. بعد از ثبت تلفات، میانگین غلظتی از دی‌اکسید تیتانیوم که در طول این دوره زمانی قادر به ایجاد ۵۰٪ تلفات در ماهی‌های موردمطالعه بود محاسبه‌شده و میزان LC_{50} طی ۹۶ ساعت مواجهه به دست آمد. پس از به‌دست آوردن میزان تلفات، میانگین هر سه تکرار با استفاده از آزمون پروبیت در نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ محاسبه و میزان LC_{10}، LC_{50}، LC_{90} دی‌اکسید تیتانیوم در ماهی‌ها

جدول ۱- نتایج حاصل از آنالیز تلفات ایجادشده در ماهی پلاتی تاکسیدو مجاور شده با غلظت‌های مختلف نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم شیمیایی.

غلظت کشنده (LC_{10-99}) mg/L	نانوذرات تیتانیوم سنتز شده با روش شیمیایی			
	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
LC_{10}	۸۱۶/۹۴۸	۳۹۵/۲۶۴	۸۹/۱۰۰	۷۸/۲۳۴
LC_{30}	۱۲۶۸/۶۱۱	۷۸۲/۶۱۳	۳۷۳/۶۷۷	۱۱۸/۹۳۰
LC_{50}	۱۵۸۱/۴۳۱	۱۰۵۰/۸۹۰	۵۷۰/۷۷۴	۲۵۵/۴۹
LC_{70}	۱۸۹۴/۲۵۲	۱۳۱۹/۱۶۷	۷۶۷/۸۷۲	۳۹۲/۰۴۰
LC_{90}	۲۳۴۵/۹۱۴	۱۷۰۶/۵۱۶	۱۰۵۲/۴۴۹	۵۸۹/۲۰۴
LC_{99}	۲۹۶۹/۱۶۶	۲۲۴۱/۰۲۲	۱۴۴۵/۱۳۸	۸۶۱/۲۷۲

در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت با حدود اطمینان ۹۵٪ مشخص گردید. همچنین غلظت بدون اثر بازدارنده (No-Observed Effect Concentration) و حداقل غلظت مؤثر (Lowest Observed Effect Concentration) نیز تعیین گردیده (هدایتی و همکاران، ۱۳۹۵) و حداکثر غلظت مجاز نیز بعد از تعیین ۵۰٪ غلظت کشنده ۹۶ ساعته و تقسیم آن بر عدد ۱۰، محاسبه شد.

نتایج

آزمایشات بقاء به‌منظور اطمینان از سلامتی ماهیان انجام شد و نشان داد که تا ۹۶ ساعت پس از نگهداری ماهیان، هیچ گونه تلفاتی مشاهده نشد و مقدار بقاء ۱۰۰٪ بوده است. در طی آزمایشات تعیین محدوده کشندگی، بلافاصله پس از افزودن نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم، تلفات در غلظت‌های بالا آغاز شد و در بقیه غلظت‌ها نیز این تلفات به‌صورت تدریجی مشاهده شد، اما میزان تلفات در تیمار شاهد تا زمان ۹۶ ساعت ساعت صفر بود. میزان LC_{50} نانوذرات دی اکسید تیتانیوم شیمیایی و زیستی طی ۹۶ ساعت مواجهه به‌ترتیب برابر با ۲۵۵/۴۹ و ۷۲۰/۷۶ میلی‌گرم در لیتر تعیین شد (جدول ۱ و ۲). همچنین در طی مرحله آزمایشات سمیت حاد مقادیر حداکثر غلظت مجاز (Maximum Acceptable Toxicant Concentration) دی‌اکسید تیتانیوم، حداقل غلظت مؤثر (Lowest Observed Effect Concentration) و غلظت بی‌اثر دی‌اکسید تیتانیوم (No-Observed Effect Concentration) برای ماهی پلاتی تاکسیدو نیز محاسبه شد که طبق نتایج هرکدام از آن‌ها در طی ۹۶ ساعت، به ترتیب ۷۲/۰۷۶، ۲۴۰، ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر تعیین شد (جدول ۳). همچنین مقادیر حداقل غلظت مؤثر و غلظت بی‌اثر نانو ذرات تیتانیوم و حداکثر غلظت مجاز در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت، نیز از میزان LC_{50} محاسبه شد که نتایج بررسی فاکتورهای مذکور و مقایسه آن‌ها با LC_{50} در شکل ۱ و ۲ آمده است. طبق این نمودار شاخص NOEC و MATC طی مواجهه با هر دو نوع نانوذره با گذشت زمان مواجهه، کاهش داشته است اما میزان LC_{50} و LOEC با گذشت زمان افزایش داشته است. نتایج حاصل از مقایسه دو نوع نانوذره نشان داد که میزان LC_{50} طی ۹۶ ساعت مواجهه در نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم تولید شده با روش زیستی نسبت به روش شیمیایی کمتر است (شکل ۳).

بحث

آزمایشات سمیت حاد معمولاً به‌عنوان آزمایش‌های کوتاه‌مدت (۹۶ ساعت) برای تعیین غلظت کشندگی میانی (LC_{50}) سموم در موجودات زنده استفاده می‌شوند (Johari *et al.*, 2014). مقایسه میزان مرگ‌و میر ماهی‌ها در تیمارهای مواجهه با نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم با گروه شاهد که هیچ‌گونه تلفاتی نداشته است، نشان می‌دهد که تنها عامل مرگ‌ومیر ماهی‌ها در تیمارهای آزمایشی، افزودن نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم به آب مخازن پرورشی بوده است.

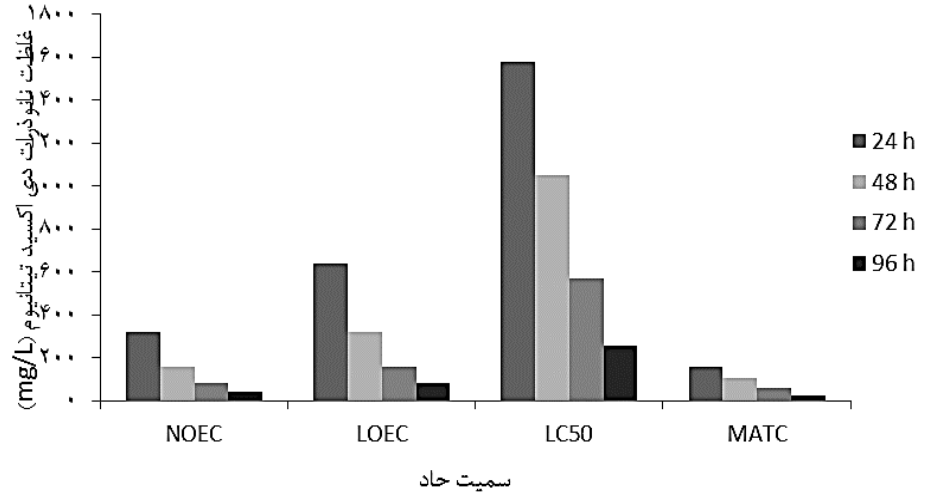
جدول ۲- نتایج حاصل از آنالیز تلفات ایجادشده در ماهی پلاتی تاکسیدو مجاور شده با غلظت‌های مختلف نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم زیستی.

غلظت کشنده	نانوذرات تیتانیوم سنتز شده با روش زیستی			
	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
LC_{10}	۲۰۲۷/۳۵۰	۹۲۲/۲۷۱	۷۲/۷۰۸	۷/۸۲۰
LC_{30}	۳۴۸۷/۱۶۵	۲۰۴۰/۸۷۸	۱۱۱۲/۲۵۴	۴۲۲/۶۲۸
LC_{50}	۴۴۹۸/۲۲۸	۲۸۱۵/۶۲۲	۱۸۳۲/۲۴۱	۷۲۰/۷۶
LC_{70}	۵۵۰۹/۲۹۱	۳۵۹۰/۳۶۶	۲۵۵۲/۲۲۸	۱۰۱۸/۸۸۲
LC_{90}	۶۹۶۹/۱۰۶	۴۷۰۸/۹۷۳	۳۵۹۱/۷۷۵	۱۴۴۹/۳۲۹
LC_{99}	۸۹۸۳/۵۱۱	۶۲۵۲/۵۴۴	۵۰۲۶/۲۵۰	۲۰۴۳/۳۰۶

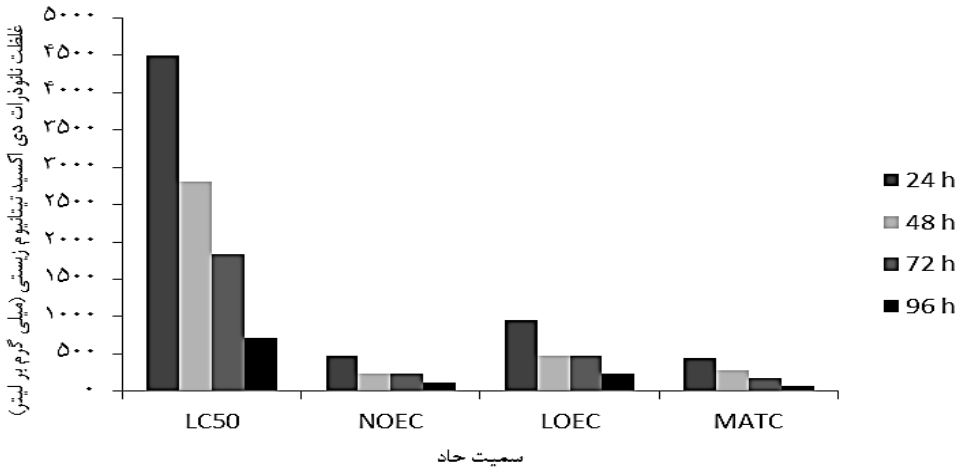
جدول ۳- مقادیر NOEC، LOEC و MATC ماهی پلاتی تاکسیدو طی ۹۶ ساعت مواجهه با دو نوع نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم.

نوع نانو ذره	NOEC (mg/L)	LOEC (mg/L)	MATC (mg/L)
نانوذرات تیتانیوم سنتز شده با روش زیستی	۱۲۰	۲۴۰	۷۲/۰۷۶

همچنین نتایج نشان داد که با افزایش غلظت نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم شیمیایی و زیستی و افزایش زمان مواجهه درصد مرگ‌ومیر افزایش یافت، زیرا یکی از عوامل تأثیرگذار در مسمومیت آبزیان علاوه بر غلظت سم، مدت‌زمان مواجهه با سم هست (Ivask *et al.*, 2014) که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. مطابق با نتایج مطالعه حاضر در مطالعه‌ای بر روی ماهی تیلاپیا (*Oreochromis mossambicus*) توسط Vidya و Chitra (۲۰۱۷) و ماهی کپور هندی (*Labeo rohita*) توسط Tabassum و همکاران (۲۰۲۰) طی مواجهه با نانوذرات دی اکسید تیتانیوم جز در تیمار شاهد در سایر تیمارهای حاوی غلظت های مختلف نانوذرات دی اکسید تیتانیوم مرگ و میر مشاهده شده است. نتایج LC_{10-99}، ۹۶ ساعته به‌دست‌آمده در تحقیق حاضر در زمان‌های مختلف نیز نشان از ارتباط مستقیم بین سمیت و غلظت نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم هست. طبق نتایج، غلظت کشنده میانی نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم سنتز شده با روش شیمیایی و زیستی در ماهی پلاتی تاکسیدو (*Xiphophorus maculatus*) طی ۹۶ ساعت مواجهه به ترتیب برابر با ۲۵۵/۴۹ و ۷۲۰/۷۶ میلی‌گرم در لیتر تعیین شد که نشان از سمیت کمتر نانوذرات تولید شده با روش زیستی است، زیرا در سنتز نانوذرات با روش شیمیایی از موادی سمی استفاده می‌شود که برای موجودات زنده سمیت بالاتری ایجاد می‌کنند. هر چند که در ارتباط با مقایسه سمیت دو نوع نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم تولید شده با روش شیمیایی و زیستی ماهی پلاتی تاکسیدو (*Xiphophorus maculatus*) گزارشی منتشر نشده است، Hall و همکاران (۲۰۰۹) غلظت کشندگی میانی نانوذرات دی اکسید تیتانیوم در ماهی قنات سرچرب (*Pimephales promelas*) را بالای ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر گزارش نمودند. در مطالعه هدایتی و همکاران (۱۳۹۵)، میزان سمیت نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم تولید شده با روش شیمیایی برای کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) و ماهی کلمه (*Rutilus rutilus*) به‌ترتیب برابر با ۱۲۵۲۳/۴۴ و ۸۶۹۳/۳۷ تعیین شد. در مطالعه‌ای دیگر توسط Bita و همکاران (۲۰۱۶)، غلظت کشنده میانی نانوذرات نقره تولید شده با روش زیستی از عصاره آبی و عصاره الکلی جلبک سارگاسوم در ماهی شیربت (*Barbus sharpeyi*) به ترتیب ۵/۶۵ و ۰/۴۵ میلی‌گرم در لیتر محاسبه شد. Suganthi و همکاران (۲۰۱۹) غلظت کشندگی میانی نانوذرات دی اکسید تیتانیوم در ماهی تیلاپیا (*Oreochromis mossambicus*) را ۹۰-۸۰ میلی‌گرم در لیتر گزارش نمودند. در مطالعه‌ای توسط Kaviani و همکاران (۲۰۲۰) میزان LC_{50} نانوذرات دی اکسید تیتانیوم در ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) ۱۶۰/۵۴ میلی‌گرم در لیتر گزارش شد، دلایل این اختلاف با مطالعات سایر



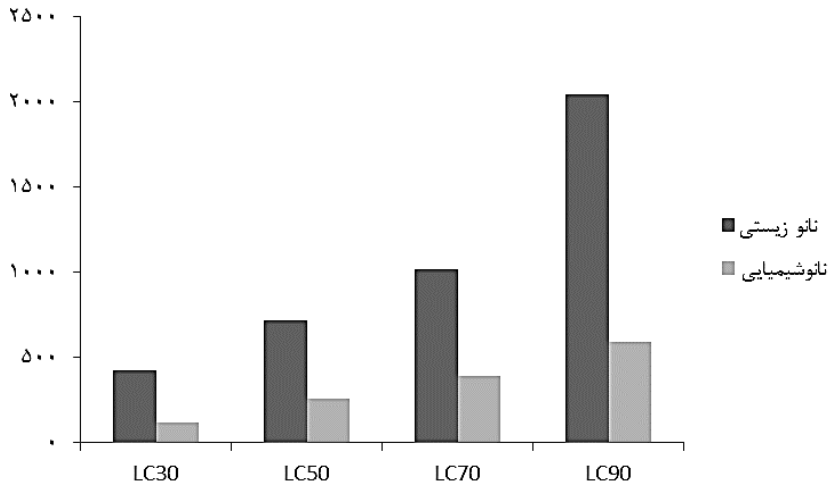
شکل ۱- مقایسه نتایج تست‌های مختلف مواجهه با نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم شیمیایی در ماهی پلاتی تاکسیدو طی زمان‌های مختلف.



شکل ۲- مقایسه نتایج تست‌های مختلف مواجهه با نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم زیستی در ماهی پلاتی تاکسیدو طی زمان‌های مختلف.

محققین، سمیت کمتر نانوذرات نقره سنتز شده با روش زیستی نسبت به روش شیمیایی ذکر شد. مقایسه نتایج محققین مختلف با مطالعه حاضر نشان می‌دهد که سمیت نانوذرات نه‌تنها به شکل شیمیایی و اندازه ذرات و روش سنتز شده بلکه به فاکتورهای مختلفی از قبیل وضعیت فیزیولوژیکی، نوع گونه، روش مواجهه و فعل و انفعالات تغذیه‌ایی بستگی دارد (Li *et al.*, 2008). در مطالعه حاضر نانوذرات دی اکسید تیتانیوم سنتز شده با روش زیستی نسبت به روش شیمیایی سمیت کمتری نشان داد، میکروارگانیسم‌ها به دلیل مکانیسم‌های مقاومت آن، برای سم‌زدایی فلزات سمی استفاده می‌شوند که احتمالاً یکی از دلایل سمیت کمتر این نانوذرات هست. اخیراً عصاره جلبک‌های دریایی به دلیل توانایی آن‌ها برای سرعت بخشیدن در احیاء یون‌های فلزی به فرم نانو نسبت سایر میکروارگانیسم‌ها مانند باکتری ها، قارچ‌ها و گیاهان بیشتر موردمطالعه قرارگرفته‌اند. جلبک‌های دریایی به‌عنوان مواد مغذی غنی و مقوی هستند که می‌توانند برای بیوسنتز نانوذرات فلزی استفاده شوند. عوامل احیاء کننده موجود در جلبک‌ها برای تبدیل یون‌های فلزی به فرم نانو شامل پلی ساکاریدها، پلی فنل‌ها، پروتئین‌ها/آنزیم‌ها و سایر ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در آن‌ها هستند. ظرفیت جلبک‌های دریایی جهت احیاء یون‌ها بستگی به ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در آن مانند پلی ساکاریدها، ترکیبات فنلی، پروتئین/آنزیم‌ها و سایر عوامل کلاته کننده دارد.

گزارش‌شده است که جلبک‌های دریایی متعلق به



شکل ۳- مقایسه غلظت کشنده نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم تولید شده با روش شیمیایی و زیستی، بر اساس غلظت‌های ایجادکننده ۳۰، ۵۰، ۷۰ و ۹۰ درصد تلفات بعد از ۹۶ ساعت مواجهه ماهی پلاتی تاکسیدو.

گروه‌های Chlorophyta، Rhodophyta و Phaeophyta قادر به بیوسنتز نانوذرات فلزی هستند که نانو ذرات فلزی سنتز شده از این میکروارگانیسم‌ها در مقایسه با نانو ذرات فلزی سنتز شده با روش شیمیایی سمیت کمتری داشته و روش سازگار با محیط زیست هستند (Shalaby, 2022). در این مطالعه مشاهده شد که غلظت کشندگی میانی (LC_{50}) با افزایش زمان مواجهه، افزایش‌یافته است که نشان می‌دهد هرچقدر زمان مواجهه با نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم در ماهی پلاتی تاکسیدو افزایش یابد، غلظت بیشتری از نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم برای مرگ‌ومیر ۵۰٪ ماهی‌ها نیاز هست. در مجموع طبق نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر نشان داد که نانوذرات تولید شده با روش زیستی در مقایسه با نانوذرات تولید شده با روش شیمیایی به دلیل دارا بودن ترکیبات سمی کمتر و نیز وجود ترکیبات فیتوشیمیایی دارای سمیت کمتری بوده، بنابراین نانوذرات تولید شده با روش شیمیایی می‌توانند به‌عنوان یک آلاینده زیست‌محیطی بالقوه سمی محسوب شده و ماهی پلاتی تاکسیدو نیز به‌عنوان یک مدل جانوری آبزی کارآمد، کم‌هزینه و نماینده مناسبی از زیستمندان آبی در مطالعات نانو بوم‌شناسی معرفی شد که می‌تواند در پیش‌بینی و پویش مخاطرات زیست‌محیطی آتی نانو مواد در بوم‌سازگان‌های آبی بسیار سودمند واقع شود.

منابع

هدایتی س. ع.، دارابی تبار ف.، احمدوند ش. ۱۳۹۵. ارزیابی سمیت حاد نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بر شاخص‌های خون شناسی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) و ماهی کلمه (*Rutilus rutilus*). مجله علمی پژوهشی فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان ۴(۲): ۳۴-۱۹.

Abdulrahman A.A., Zhang L., Yang J., Wei F., Chen C., Sun D. 2021. Toxicity assessment of synthesized titanium dioxide nanoparticles in fresh water algae Chlorella pyrenoidosa and a zebrafish liver cell line. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 211, 111948.

Aravind M., Amalanathan M., Mary M.S.M. 2021. Synthesis of TiO 2 nanoparticles by chemical and green synthesis methods and their multifaceted properties. *SN Applied Sciences* 3(4), 1-10.

Bita S. Keikha A.J., Abdollahzadeh M.Y. 2016. Toxicity study of silver nanoparticles synthesized using aqueous and alcoholic extract of seaweed *Sargassum angustifolium* in *Barbus sharpeyi*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 8(5), 707-712.

Gagné F., Auclair J., Turcotte P., Fournier M., Gagnon C., Sauvé S., Blaise C. 2008. Ecotoxicity of CdTe quantum dots to freshwater mussels: impacts on immune system, oxidative stress and genotoxicity.

nanoparticles trigger loss of function and perturbation of mitochondrial dynamics in primary hepatocytes. *PloS one* 10(8), 34-45.

Roopan S.M., Kumar S.H.S., Madhumitha G., Suthindhiran K. 2015. Biogenic-production of SnO 2 nanoparticles and its cytotoxic effect against hepatocellular carcinoma cell line (HepG2). *Applied Biochemistry and Biotechnology* 175(3), 1567-1575.

Scown T.M., van Aerle R., Johnston B.D., Cumberland S., Lead J.R., Owen R., Tyler C.R. 2009. High doses of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles accumulate in the kidneys of rainbow trout but with no observable impairment of renal function. *Toxicological Sciences* 109(2), 372-380.

Shalaby E.A. 2022. Algae-mediated silver nanoparticles: Synthesis, properties, and biological activities. In *Green Synthesis of Silver Nanomaterials* (pp. 525-545). Elsevier.

Sharifpour E., Soltani M., Javadi M. 2003. Determination LC_{50} and damages caused by pesticide Endosulfan in Beluga juvenile. *Iranian Journal of Fisheries Science* 12, 69-84.

Suganthi P., Murali M., Athif P., Bukhari A.S., Mohamed H.S., Basu H., Singhal R.K. 2019. Haemato-immunological studies in ZnO and TiO2 nanoparticles exposed euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 66, 55-61.

Tabassum S., Ahmed M.S., Ahmed K.S., Thiemann T., Habib R.Z., Shamas S. 2020. *Labeo rohita* fingerlings exposed to titanium dioxide (TiO2 NPs): A concentration-dependent bi-modal effect on growth. *The Egyptian Journal of Aquatic Research* 46(4), 341-346.

Vidya P.V., Chitra K.C. 2017. Assessment of acute toxicity (LC50-96 h) of aluminium oxide, silicon dioxide and titanium dioxide nanoparticles on the freshwater fish, *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852). *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies* 5(1), 327-332.

Xu H., Wang X., Zhang, L. 2008. Selective preparation of nanorods and micro-octahedrons of Fe2O3 and their catalytic performances for thermal decomposition of ammonium perchlorate. *Powder Technology* 185(2), 176-180.

Aquatic Toxicology 86(3), 333-340.

Gebre S.H., Sendeku M.G. 2019. New frontiers in the biosynthesis of metal oxide nanoparticles and their environmental applications: an overview. *SN Applied Sciences* 1 (8), 1-28.

Hall S., Bradley T., Moore J.T., Kuykindall T., Minella L. 2009. Acute and chronic toxicity of nano-scale TiO2 particles to freshwater fish, cladocerans, and green algae, and effects of organic and inorganic substrate on TiO2 toxicity. *Nanotoxicology* 3(2), 91-97.

Hussain I., Singh N.B., Singh A., Singh H., Singh S.C. 2016. Green synthesis of nanoparticles and its potential application. *Biotechnology Letters* 38(4), 545-560.

Ivask A., Kurvet I., Kasemets K., Blinova I., Aruoja V., Suppi S., Vija H., Käkinen A., Titma T., Heinlaan M., Visnapuu M. 2014. Size-dependent toxicity of silver nanoparticles to bacteria, yeast, algae, crustaceans and mammalian cells in vitro. *PloS one* 9(7), 10-21.

Kaviyani F.E., Naeemi A.S., Salehzadeh A. 2020. Acute toxicity and effects of titanium dioxide nanoparticles (TiO_2 NPs) on some metabolic enzymes and hematological indices of the endangered Caspian trout juveniles (*Salmo trutta caspius* Kessler, 1877). *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 19(3), 1253-1267.

Khan S.U., Al-Shahry M., Ingler W.B. 2002. Efficient photochemical water splitting by a chemically modified n-TiO2. *Science* 297(5590), 2243-2245.

Li H., Zhang J., Wang T., Luo W., Zhou Q., Jiang G. 2008. Elemental selenium particles at nano-size (Nano-Se) are more toxic to Medaka (*Oryzias latipes*) as a consequence of hyper-accumulation of selenium: a comparison with sodium selenite. *Aquatic Toxicology* 89(4), 251-256.

Li X., Xu H., Chen Z.S., Chen G. 2011. Biosynthesis of nanoparticles by microorganisms and their applications. *Journal of Nanomaterials* 1-16.

Mahshid S., Askari M., Ghamsari M.S. 2007. Synthesis of TiO2 nanoparticles by hydrolysis and peptization of titanium isopropoxide solution. *Journal of Materials Processing Technology* 189(3), 296-300.

Natarajan V., Wilson C.L., Hayward S.L., Kidambi S. 2015. Titanium dioxide

Determination of lethal concentration (LC50) of chemically and biologically synthesized titanium dioxide nanoparticles in *Xiphophorus maculatus*

Mostafa Keshavarz, Seraj Bita*

Department of Fisheries, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran.
*Corresponding author: serajbita@yahoo.com
Received: 2022/2/27 Accepted: 2022/3/23

Abstract
Increasing the use of nanomaterials leads to the release of these particles in aquatic environments that can have effects on aquatic animals, therefore, the present study aimed to investigate the toxicity of titanium dioxide nanoparticles produced by the Chemical and biological method on *Xiphophorus maculatus*. First, the survival rate of fish under similar conditions to toxicity experiments were investigated and then *Xiphophorus maculatus* fish to determine the intermediate lethal concentration (LC_{50}) of nanoparticles in 12 treatments (each with three replications) including 6 treatments containing concentrations of 0, 80, 160, 320, 640 and 1280 mg /L nanoparticles titanium oxide produced chemically and 6 treatments containing concentrations of 0, 240, 480, 960, 1920 and 3840 mg /L titanium dioxide produced biologically method in 60 liter tanks with 15 fish per treatment were exposed for 96 h and fish mortality were recorded at 24, 48, 72 and 96 h. Survival tests showed that up to 96 hours after stocking fish, no mortality were observed and the survival rate was 100%. With increasing the concentration of nanoparticles and increasing the exposure time, the percentage of fish mortality increased. The intermediate lethal concentrations (LC_{50}) of titanium dioxide nanoparticles produced by chemical and biological methods during 96 h of exposure were 255.49 and 720.76 mg/l, respectively. Based on the results of the present study, chemically produced nanoparticles are more toxic than nanoparticles produced biologically method.

Keywords: Toxicology, Lethal concentration, Titanium dioxide nanoparticles, *Xiphophorus maculatus*.