



تعیین محدوده کشندگی (LC_{50}) نانوذرات اکسید روی (ZnO) در فرشته ماهی آب شیرین (*Pterophyllum scalare*)

محمد حسین ناصری^۱، محمد رضا ایمان پور^{۲*}، ولی... جعفری^۱، امید صفری^۲

^۱ گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

^۲ گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه فردوسی مشهد

نوع مقاله:	چکیده
پژوهشی	هدف از این مطالعه، تعیین غلظت کشنده نانوذرات اکسید روی بر فرشته ماهی آب شیرین بود. بر همین اساس، ۱۲۶ قطعه فرشته ماهی با میانگین طول استاندارد 3 ± 0.51 سانتی‌متر و میانگین وزن تقریبی $3/5 \pm 0.3$ گرم تهیه و بعد از سازگاری با محیط جدید، آزمایش سمیت در قالب طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار به مدت ۹۶ ساعت انجام گردید. با احتساب گروه شاهد، ۶ تیمار با غلظت‌های ۰، ۴۰، ۸۰، ۱۲۰، ۱۶۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات اکسید روی آماده شد. پس از اتمام آزمایش، داده‌های به دست آمده با روش آماری آنالیز پروبیت با سطح اطمینان ۹۵ درصد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و میزان محدوده کشندگی ۵ تا ۹۵ درصد، از جدول پروبیت محاسبه گردید. سپس، میزان غلظت کشنده ۵۰ درصد در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت به ترتیب $1.88/0.4$ ، $1.19/9.3$ ، $8.3/7.5$ و $7.4/9.9$ میلی‌گرم در لیتر از طریق آنالیز پروبیت تعیین شد. نتایج در این آزمایش نشان می‌دهد که نانوذرات اکسید روی، به لحاظ درجه‌بندی سمیت برای فرشته ماهی آب شیرین در سطح کمی سمی قرار می‌گیرد.
کلمات کلیدی:	
اکسید روی	
پروبیت	
سمیت	
فرشته ماهی	
نانوذره	

مقدمه

نانوذرات اکسید روی (ZnO) یک ماده مغذی ضروری برای انسان محسوب می‌شود ولی در مقادیر زیاد سمی هستند. به دلیل اندازه بسیار کوچک این مواد (مخصوصاً اندازه‌های کوچک‌تر از ۲۰ نانومتر)، دارای ویژگی‌های مفید نوری، مغناطیسی و شیمیایی می‌باشند. در میان اکسیدهای فلزی، نانوذرات اکسید روی رتبه سوم بیشترین سهم تولید جهانی را بعد از اکسید تیتانیوم (TiO_2) و اکسید سیلیس (SiO_2) به خود اختصاص داده است (Piccinno *et al.*, 2012). از آنجا که نانوذرات اکسید روی به شکل پودرهای سفید و بدون بو می‌باشند و همانند دیگر نانوذرات فلزی دارای ویژگی‌هایی از قبیل اشتعال ناپذیری، پایداری و کاتالیزوری هستند، به طور گسترده‌ای در صفحات خورشیدی، مواد آرایشی و بهداشتی، رنگ‌ها، کاغذ، پلاستیک، سرامیک و مواد ساختمانی استفاده می‌شوند (Dastjerdi and Montazer, 2010; Song *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2013). نانوذرات اکسید روی همانند نانوذرات نقره خاصیت ضد میکروبی دارند و به همین دلیل به طور گسترده‌ای در صنایع غذایی، ضد آفتاب‌ها و مواد آرایشی و بهداشتی استفاده می‌شوند (Osmond and McCall, 2010). علاوه بر این، از آن‌ها برای ضد عفونی کردن آب و درمان انواع خاصی از سرطان‌ها استفاده می‌شود (Hackenberg *et al.*, 2012). با وجود اینکه در نانومواد، دامنه

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: imanpoor@gau.ac.ir

وسیع‌تری از فلزات و اکسیدهای فلز استفاده می‌شوند، ولی اثرات احتمالی نانوذرات هنوز به طور کامل درک نشده است. به همین دلیل در سال‌های اخیر اثرات مضر نانوذرات بر محیط زیست آبی و ارگانسیم‌های آبی، بیشتر مورد توجه محققین قرار گرفته است.

در حال حاضر، اثرات سمی نانوذرات اکسید روی بر انواع مختلف موجودات مورد مطالعه قرار گرفته است. از آنجایی که نانوذرات اکسید روی به طور گسترده‌ای در کرم‌های ضد آفتاب استفاده می‌گردد، پوست انسان یکی از مسیرهای مهمی است که می‌تواند بر آن اثر بگذارد (Chang *et al.*, 2012). از طرفی، Cross و همکاران (۲۰۰۷)، جذب نانوذرات اکسید روی در پوست را به صورت سطحی گزارش کردند و هیچ‌گونه علامتی مبنی بر نفوذ آن مشاهده نکردید. علاوه بر این، در آزمایش Zheng و همکاران (۲۰۰۹)، وضعیت سلول‌های طحال و مغز موش‌ها در مقایسه با گروه شاهد طبیعی بودند؛ در حالی که دیگر ارگان‌ها (شامل قلب، شش، کبد و کلیه) آسیب دیده بودند. این نتایج با یافته‌های Wang و همکاران (۲۰۰۸) مطابقت دارد که نشان دادند تغییرات پاتولوژیک به وسیله نانوذرات اکسید روی القا می‌شوند. مطالعات سمیت دیگر نشان دادند که ایزوپودهای خاکی (*Porcellio scaber*) قرار گرفته در معرض نانوذرات اکسید روی به دنبال تجمع زیستی از بین رفتند (Pipan-Tkalec *et al.*, 2010).

نانوذرات می‌توانند در بافت‌های مختلف آبزیان پس از در معرض گذاری، تجمع و انتشار یابند که باعث ایجاد صدمات اکسیداتیو و تغییرات بافت‌شناسی می‌گردد (Hao *et al.*, 2013). برای مثال تجمع نانوذرات اکسید روی در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)، منجر به آسیب قابل توجهی به کبد می‌گردد (Subashkumar and Selvanayagam, 2014). در مطالعه Suman و همکاران (۲۰۱۵) سمیت نانوذرات اکسید روی بر ریزجلبک *Chlorella vulgaris* مورد ارزیابی قرار گرفت و تغییرات ریخت‌شناختی اساسی و آسیب‌های دیواره سلولی ریزجلبک کلرلا مشاهده شد. در تحقیق دیگری که توسط Kaya و همکاران (۲۰۱۶) انجام شد، اثر اندازه‌های مختلف نانوذرات اکسید روی بر ماهی تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این آزمایش، آسیب‌های اندامی، تغییرات در تنظیم اسمزی و اختلال سیستم ایمنی بدن ماهی را تأیید کردند.

در سال‌های اخیر، کنترل اکوسیستم‌های آبی، از سنجش کمی مقدار آلاینده در آب، رسوب و بافت ماهی به سمت سنجش‌های کیفی اثرات آلاینده‌ها و بررسی وضعیت سلامت آبزیان و در نهایت اکوسیستم‌ها هدایت شده است (Hedayati, 2013). پایش سنتی آلودگی فلزات سنگین در اکوسیستم‌های دریایی شامل اندازه‌گیری آن‌ها در آب، رسوب و گونه‌های هر منطقه است. همچنین، استفاده از آب در سنجش فلزات سنگین، مشکلاتی را به همراه دارد و ارزیابی‌های مربوط به آن پرهزینه است. از طرفی، معمولاً غلظت‌های پائینی از فلزات سنگین در آب دریا وجود دارد، در نتیجه، اندازه‌گیری آن‌ها در آب نیازمند تغلیظ حجم زیادی از آب می‌باشد که علاوه بر افزایش هزینه‌های آزمایش، منجر به بروز اشتباه در سنجش نیز می‌گردد. همچنین تمام اشکال فلزات در آب قابل دسترس نبوده و یک میانگین مناسب برای پیش‌بینی دقیق اثرات نامطلوب فلزات سنگین در آب‌ها وجود ندارد (Hedayati, 2013). علاوه بر این، مهم‌ترین مشکل در پایش فلزات سنگین با استفاده از عوامل غیرزنده (آب و رسوبات)، عدم تطابق مقادیر به دست آمده فلزات با میزان دسترس بودن آلاینده‌های پایدار برای موجودات آبی می‌باشد (Rogival *et al.*, 2006). امروزه از گونه‌های مختلفی از موجودات زنده می‌توان به عنوان پایشگر زیستی محیط‌های آبی استفاده کرد (Hedayati, 2013). این موجودات به عنوان شاخص زیستی معروفند و توانایی تجمع آلاینده‌ها را در بافت‌های خود دارند به نحوی که این تجمع‌ها، همسو با تغییرات آلاینده‌ها در محیط می‌باشند (Flammarion *et al.*, 2002).

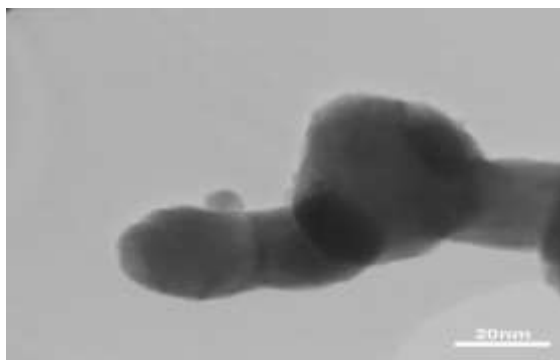
فرشته ماهی آب شیرین (*Pterophyllum scalare*)، یکی از ماهیان بومی آمریکای جنوبی متعلق به خانواده سیکلیده می‌باشد و از زمان ورود به آکواریوم‌ها در سال ۱۹۱۱ میلادی جایگاه منحصر به فردی در صنعت ماهیان زینتی داشته است. از نظر تغذیه‌ای جزء گروه همه‌چیز خوار طبقه‌بندی شده است و می‌توان با استفاده از جیره‌های غذایی دست‌ساز در شرایط محیطی

مناسب از آن نگهداری نمود (Shelar *et al.*, 2014). فرشته ماهی، جزو آن دسته از ماهیانی است که بعد از رسیدگی جنسی در یک بازه زمانی مشخص به صورت متوالی تخم‌ریزی می‌کنند (Degani *et al.*, 1997). همچنین، به‌راحتی در اندازه‌های مختلف در بازار موجود است و به آسانی با شرایط محیطی جدید سازگار می‌شود. در واقع، فرشته ماهی آب شیرین به دلیل دارا بودن ظرفیت اکولوژیکی زیاد می‌تواند به عنوان نماینده ماهیان گرمسیری، از جمله ماهیان خانواده سیکلیده، در انواع مختلفی از تحقیقات، از جمله آزمایش‌های سمیت، مورد مطالعه قرار گیرد (Iranshahi *et al.*, 2011). با توجه به اینکه اطلاعاتی در خصوص محدوده کشندگی نانوذرات فلز در فرشته ماهی آب شیرین وجود ندارد، هدف از این مطالعه، تعیین محدوده کشندگی (LC₅₀ 96h) نانوذرات اکسید روی است.

مواد و روش‌ها

تهیه سوسپانسیون نانوذرات اکسید روی

پودر نانوذرات اکسید روی (ZnO NPs) (میانگین اندازه نانوذرات، 20 nm) به منظور تعیین محدوده کشندگی در ماهی *P. scalare* از شرکت پیشگامان نانومواد ایرانیان (ایران، خراسان رضوی، مشهد) خریداری شد. شکل ذرات در سوسپانسیون، توسط میکروسکوپ الکترونی (TEM¹) تأیید شد (شکل ۱). میانگین اندازه ذرات (APS) ۱۰ تا ۳۰ نانومتر با خلوص ۹۹ درصد و مساحت سطح ویژه (SSA) آن بین 20-60 m²/g بود. سوسپانسیون نانوذرات اکسید روی، از طریق پخش کردن پودرهای آن در آب مقطر با دستگاه اولتراسونیک به مدت ۳۰ دقیقه (Parsonic, 15s, ultrasonic cleaner, at 100 W and 40 kHz) آماده گردید و سپس به صورت دستی به مدت ۲ تا ۳ دقیقه تکان داده شد تا توده‌های مترکم شده را هر چه بیشتر پراکنده کند. (Wang *et al.*, 2009).



شکل ۱. تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) نانوذرات اکسید روی

طراحی آزمایش

این مطالعه در آزمایشگاه آبریزان دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست دانشگاه فردوسی مشهد انجام گردید. تعداد ۱۲۶ قطعه فرشته ماهی از مرکز فروش ماهیان آکواریومی در شهر مشهد تهیه شد. قبل از انجام آزمایش، تمامی ماهیان در یک آکواریوم ۳۰۰ لیتری به مدت یک هفته جهت سازگاری با محیط جدید (درجه حرارت بین ۲۹-۲۷ درجه سانتی‌گراد و pH بین ۷/۸ تا ۹) نگهداری شدند و برای ایجاد نور در آکواریوم (۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی) نیز از لامپ رشته‌ای فلوئورسنت استفاده گردید (Ortega-Salas *et al.*, 2009). از آنجایی که اطلاعات منتشر شده سمیت نانوذرات اکسید روی در فرشته ماهی در دسترس نمی‌باشد و محدوده کشندگی نانوذرات اکسید روی در این ماهی مشخص نیست، جهت تعیین غلظت کشندگی حاد، تست اولیه تعیین محدوده کشندگی انجام شد (Hedayati, 2013) و محدوده کشندگی بین ۲۰۰-۱ میلی‌گرم در لیتر به دست آمد. با استناد به نتایج به دست آمده از آزمایش اولیه تعیین محدوده کشندگی، با احتساب گروه شاهد، ۶ تیمار با غلظت‌های ۰، ۴۰، ۸۰، ۱۲۰، ۱۶۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آماده شد. برای هر غلظت در سه تکرار، ۲۱ قطعه ماهی با میانگین

¹ Transmission Electron Microscopy

طول استاندارد 3 ± 0.51 سانتی‌متر و میانگین وزن تقریبی $3/5 \pm 0.3$ گرم در ظروف ۳ لیتری قرار داده شد. میزان اکسیژن محلول $7/7$ تا 8 میلی‌گرم در لیتر، pH بین $6/8$ تا $7/2$ و دمای آب تمامی ظروف آزمایش بین 24 تا 26 درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید (Swan, 1999). در این آزمایش ماهیان به مدت ۹۶ ساعت در معرض غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید روی قرار گرفتند و در حین آزمایش غذادهی انجام نگرفت. تلفات ماهیان در حین آزمایش که چهار روز به طول انجامید به سرعت از ظروف جمع‌آوری و آمار مرگ و میر ماهیان نیز در هر ۲۴ ساعت ثبت شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌های به دست آمده با روش آماری آنالیز پروبیت (probit analysis) با سطح اطمینان ۹۵ درصد توسط نرم افزار آماری SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. پس از اتمام آزمایش، میزان سمیت حاد در فاصله زمانی ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت ثبت و بر اساس آن درصد تغییرات مرگ و میر فرشته ماهیان ($LC_5 - LC_{95}$) نسبت به گروه شاهد محاسبه و از جدول پروبیت، عدد مربوط به هر یک از تغییرات استخراج و در ستون جدول پروبیت جدول تلفات قرار گرفت (Finney, 1990).

نتایج

بر اساس نتایج به دست آمده از این مطالعه (جدول ۱)، پس از گذشت ۲۴ ساعت از شروع آزمایش، هیچ‌گونه تلفاتی از فرشته ماهیان در گروه شاهد و تیمار دوم (۴۰ میلی‌گرم در لیتر)، مشاهده نگردید. در حالی که میزان تلفات فرشته ماهیان در تیمارهای سوم تا ششم (به ترتیب ۸۰، ۱۲۰، ۱۶۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر)، به طور معنی‌داری ($p < 0.05$) افزایش یافت. بیشترین میزان تلفات در ۲۴ ساعت اولیه آزمایش مربوط به تیمارهای پنجم و ششم (۱۶۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) (به ترتیب ۷ و ۱۲ قطعه) مشاهده گردید. همچنین، با گذشت زمان و پس از ۴۸ ساعت از شروع آزمایش، مجدداً بیشترین میزان تلفات فرشته ماهیان در تیمارهای پنجم و ششم (به ترتیب ۸ و ۵ قطعه) مشاهده گردید. تلفات ماهیان پس از ۷۲ و ۹۶ ساعت از شروع آزمایش ادامه یافت تا جایی که بیشترین میزان در مجموع سه تکرار در تیمارهای پنجم و ششم (۲۰ قطعه) ثبت شد.

پس از پایان آزمایش و با توجه به نتایج به دست آمده، اقدام به تعیین محدوده کشندگی (LC_{50}) نانوذرات اکسید روی در فرشته ماهیان گردید و تمامی غلظت‌های به دست آمده ($LC_5 - LC_{95}$) در جدول ۲ ثبت شدند. LC_{50} در این آزمایش با در نظر گرفتن اختلاف در سطح اطمینان بالای ۹۵ درصد، پس از ۹۶ ساعت قرارگیری فرشته ماهیان در معرض نانوذرات اکسید روی، $74/9$ میلی‌گرم در لیتر به دست آمد. بر اساس نتایج به دست آمده و محاسبه میزان پروبیت (جدول ۳)، معادله خطی $y = 3/87x - 2/25$ به دست آمد که در شکل ۲ مشاهده می‌گردد. در این معادله، حرف x ، لگاریتم غلظت و حرف y ، میزان پروبیت را نشان می‌دهد. با فرض اینکه مقدار LC_{50} در بازه زمانی ۹۶ ساعت برابر با ۵ باشد، مقدار عدد $x = 1/87$ به دست آمد.

جدول ۱. میزان مرگ و میر فرشته ماهیان در آزمایش تعیین غلظت کشندگی (LC_{50}) نانوذرات اکسید روی

زمان (ساعت)				غلظت (میلی‌گرم در لیتر)
۲۴	۴۸	۷۲	۹۶	شاهد
۰	۰	۰	۰	دوم (۴۰)
۱	۴	۳	۲	سوم (۸۰)
۶	۳	۳	۲	چهارم (۱۲۰)
۷	۸	۴	۱	پنجم (۱۶۰)
۱۲	۵	۲	۱	ششم (۲۰۰)

جدول ۲. غلظت ایجاد کننده ۵ تا ۹۵ درصد تلفات فرشته ماهیان در یک دوره آزمایش ۹۶ ساعت پس از قرارگیری در معرض نانوذرات اکسید روی

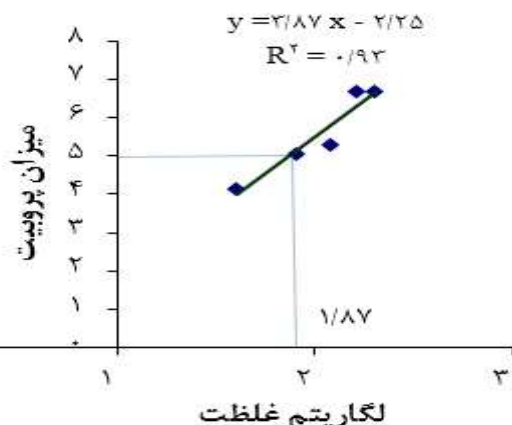
غلظت (میلی گرم در لیتر) (سطح اطمینان ۹۵٪)				
مقدار	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
LC ₅	۶۳/۱۸	۴۱/۶۷	۲۵/۸۵	۲۷/۶۲
LC ₁₀	۸۰/۴۱	۵۲/۶۳	۳۳/۵۲	۳۴/۴۴
LC ₂₀	۱۰۷/۶۲	۶۹/۸۳	۴۵/۸۹	۴۴/۹۸
LC ₃₀	۱۳۲/۸۱	۸۵/۶۲	۵۷/۶	۵۴/۵۵
LC ₄₀	۱۵۸/۹۶	۱۰۱/۹۱	۶۹/۹	۶۴/۳۱
LC ₅₀	۱۸۸/۰۴	۱۱۹/۹۳	۸۳/۷۵	۷۴/۹۹
LC ₆₀	۲۲۲/۴۴	۱۴۱/۱۴	۱۰۰/۴	۸۷/۵
LC ₇₀	۲۶۶/۲۴	۱۶۷/۹۹	۱۲۱/۸۳	۱۰۳/۱۲
LC ₈₀	۳۲۸/۶	۲۰۵/۹۷	۱۵۲/۸۲	۱۲۵/۰۳
LC ₉₀	۴۳۹/۸۶	۲۷۳/۲۷	۲۰۹/۳	۱۶۳/۳۱
LC ₉₅	۵۵۹/۶۹	۳۴۵/۱۳	۲۷۱/۳۲	۲۰۳/۶۲

جدول ۳. محاسبه مقادیر پروبیت برای فرشته ماهیان در زمان قرارگیری در معرض غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید روی (۰، ۴۰، ۸۰، ۱۲۰، ۱۶۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر)

غلظت (میلی گرم بر لیتر)	لگاریتم غلظت (x)	تعداد ماهیان	تکرار			میانگین تعداد مرگ و میر	درصد مرگ و میر	میزان پروبیت
			۳	۲	۱			
۰	۰	۲۱	۰	۰	۰	۰	-	
۴۰	۱/۶	۲۱	۲	۱	۱	۱/۳	۴/۱۲	
۸۰	۱/۹	۲۱	۲	۴	۴	۳/۳	۵/۰۶	
۱۲۰	۲/۰۸	۲۱	۴	۶	۴	۴/۷	۵/۳	
۱۶۰	۲/۲	۲۱	۶	۷	۷	۶/۷	۶/۶۷	
۲۰۰	۲/۳	۲۱	۶	۷	۷	۶/۷	۶/۶۷	

بحث

موجودات آبی که زنجیره غذایی را در اکوسیستم‌های آبی تشکیل می‌دهند به دلیل اثرات نانوذرات رهاسده ناشی از فعالیت‌های انسانی با خطرات بالقوه‌ای مواجه می‌شوند (Gottschalk et al., 2013). ورود این مواد به اکوسیستم‌های آبی و تجمع آن‌ها در آبزیان به دلیل خطراتی که برای انسان و موجودات دیگر ایجاد می‌کنند از نظر بهداشتی، اقتصادی و اکولوژیکی حائز اهمیت می‌باشد (Hosseini et al., 2015). هنوز مباحث و ابهامات زیادی در خصوص اثرات سمی و مکانیزم‌های نانوذرات



شکل ۲. میزان پروبیت و غلظت لگاریتم تلفات فرشته ماهیان تحت تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید روی

اکسید فلز وجود دارد. از این رو، درک فراگیر اثر سمی آن‌ها برای توسعه بدون تهدید استفاده از نانوذرات اکسید فلز بسیار ضروری است (Asghar *et al.*, 2015). به همین دلیل، در سال‌های اخیر اثرات مضر نانوذرات بر محیط زیست آبی و موجودات آبی، بیشتر مورد توجه محققین قرار گرفته است.

روی، یک عنصر ضروری برای ارگانیسم‌ها محسوب می‌شود ولی در غلظت‌های زیاد سبب القاء سمیت می‌شود (Asghar *et al.*, 2015). مطالعات انجام شده اخیر، این موضوع را تأیید کردند که رها شدن یون‌های آزاد روی (Zn) در آب، به عنوان منبع اولیه سمیت شناخته شده است (Blinova *et al.*, 2010; Buerki-Thurnherr *et al.*, 2013). نانوذرات اکسیدروی، می‌توانند استرس-های اکسیداتیو (ROS) (Reactive Oxidative Species) را القاء نمایند و به دنبال آن، پاسخی ایجاد می‌شود که یک الگوی پذیرفته شده برای اثرات سلولی نانوذرات می‌باشد (Dineley *et al.*, 2003; Heng *et al.*, 2010). همچنین تولید مضاعف ROS ممکن است اثرات سمیت سلولی و فسادآمیز را القاء نماید (Nel *et al.*, 2006). در نتیجه، نانوذرات اکسید روی می‌توانند سبب تسریع در روند مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌ها (آپوپتوزیز) و سمیت حاد در غلظت‌های زیاد شوند (Buerki-Thurnherr *et al.*, 2013).

در این آزمایش، مشاهده گردید که در هر تیمار آزمایشی، با افزایش زمان قرارگیری در معرض نانوذرات اکسید روی، میزان تلفات فرشته ماهیان، افزایش یافت. علت اصلی تلفات می‌تواند ناشی از آسیب بافت پوششی دستگاه تنفس و شکل‌گیری یک لایه موکوسی در سراسر آبشش ماهی باشد که سبب اختلال در روند انتقال اکسیژن می‌گردد (Nilkanth and Sawant, 1993; Das and Sahu, 2005). این موضوع در مطالعه Sharma و همکاران (۲۰۰۹) نیز تأیید شده است که سمیت القاء شده توسط نانوذرات اکسید روی، وابسته به غلظت و زمان می‌باشد. همچنین، Xiong و همکاران (۲۰۱۱) ثابت کردند که سمیت حاد نانوذرات اکسید روی در ماهی گورخری وابسته به غلظت می‌باشد. در این مطالعه، محدوده کشندگی (LC₅₀ 96h) نانوذرات اکسید روی در ماهیان گورخری (*Danio rerio*) با میانگین وزن 0.22 ± 0.05 گرم برابر با $4/92$ میلی‌گرم در لیتر محاسبه گردید.

مطالعات محدود انجام گرفته در خصوص تعیین محدوده کشندگی در آبزیان، نشان می‌دهند که اثرات نانوذرات اکسید روی در گونه‌های مختلف ماهی، متفاوت است. زیرا گونه‌های مختلف ماهی ممکن است در جذب، تجمع، انتشار، متابولیسم و دفع مواد شیمیایی با هم متفاوت باشند (Hedayati, 2013). محدوده کشندگی (LC₅₀) نانوذرات اکسید روی در این مطالعه برای فرشته ماهیان، $74/99$ میلی‌گرم در لیتر تعیین شد. درحالی‌که نتایج به دست آمده در مطالعه Zhu و همکاران (۲۰۰۸)، نشان داد سمیت حاد نانوذرات اکسید روی در ماهی گورخری (*Danio rerio*) (LC₅₀ 96h, 4/9 mg/L) می‌باشد. همچنین در مطالعه Hedayati و همکاران (۲۰۱۴) میزان سمیت کشنده نانوذرات اکسید روی در بچه ماهیان کلمه (*Rutilus rutilus caspicus*)، $0/909$ میلی‌گرم در لیتر تعیین شده است. Al-Hamdani و Al-Taee (۲۰۱۳)، میزان محدوده کشندگی نانوذرات اکسید روی در بچه ماهیان کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) با میانگین وزن تقریبی 150 ± 10 گرم را 30 میلی‌گرم در لیتر تعیین

کردند. از طرفی، در مطالعه Selvanayagam و Subashkumar (۲۰۱۴)، سمیت حاد نانوذرات اکسید روی برای بچه ماهیان کپور معمولی با میانگین وزنی $0/05 \pm 0/22$ گرم، $4/897$ میلی‌گرم در لیتر محاسبه گردید. با توجه به نتایج به دست آمده، نانوذرات اکسید روی، به لحاظ درجه‌بندی سمیت برای فرشته ماهی آب شیرین در سطح کمی سمی قرار می‌گیرد (Louis *et al.*, 1996).

به طور کلی، عوامل مختلفی بر نتایج آزمایش‌های سمیت تأثیرگذار می‌باشند که می‌توان به خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آب و ویژگی‌های زیستی گونه‌های مورد آزمایش اشاره کرد. بنابراین در انجام آزمایش‌های سمیت حاد لازم است با استفاده از روش‌های آزمایش استاندارد، متغیرهای خارجی و تصادفی به حداقل برسد و همچنین باید از سالم بودن گونه‌های مورد آزمایش اطمینان کسب کرد و پس از آن به طور تصادفی توزیع نمود (Hedayati *et al.*, 2016). این آزمایش با هدف توسعه اطلاعات، جهت درک بهتر اثرات زیستی ناشی از نانوذرات اکسید روی بر فرشته‌ماهی آب شیرین و افزایش داده‌ها برای انجام مطالعات آینده بر روی این گونه ماهی صورت گرفت. با در نظر گرفتن نتایج به دست آمده در این آزمایش و مقایسه آن با مطالعات مشابه انجام گرفته قبلی، عدم یکسان بودن اثرات نانوذرات اکسید روی در بین این گونه‌ها مشاهده گردید.

منابع

- Al-Tae, S.K.I., Al-Hamdani, A.H.A. 2013. Pathological study of lethal concentration of n-ZnO in common carp *Cuprinus carpio* L. Basrah Journal of Veterinary Research. 12(1): 200-207.
- Asghar, M.S., Qureshi, N.A., Jabeen, F., Khan, S., Shakeel, M., Noureen, A. 2015. Toxicity of zinc oxide nanoparticles in fish: a critical review. Journal of Biodiversity and Environmental Sciences. 7(1): 431-439.
- Blinova, I., Ivask, A., Heinlaan, M., Mortimer, M., Kahru, A. 2010. Ecotoxicity of nanoparticles of CuO and ZnO in natural water. Journal of Environmental Pollution. 158(1): 41-47.
- Buerki-Thurnherr, T., Xiao, L., Diener, L., Arslan, O., Hirsch, C., Maeder-althaus, X. 2013. In vitro mechanistic study towards a better understanding of ZnO nanoparticle toxicity. Nanotoxicology. 7(4): 402-416.
- Chang, Y.N., Zhang, M., Xia, L., Zhang, J., Xing, G. 2012. The toxic effects and mechanisms of CuO and ZnO nanoparticles. Journal of Materials. 5: 2850-2871.
- Cross, S.E., Innes, B., Roberts, M.S., Tsuzuki, T., Robertson, T.A., McCormick, P. 2007. Human skin penetration of sunscreen nanoparticles: in-vitro assessment of a novel micronized zinc oxide formulation. Journal of Skin Pharmacological Physiology. 20:148-154.
- Das, S., Sahu, B. 2005. Interaction of pH with mercuric chloride toxicity to penaeid prawns from a tropical estuary, East Coast of India: enhanced toxicity at low pH. Journal of Chemosphere. 58(9): 1241-1248.
- Dastjerdi, R., Montazer, M. 2010. A review on the application of inorganic nanostructured materials in the modification of textiles: focus on anti-microbial properties. Journal of Colloids Surface Biointerfaces. 79: 5-18.
- Degani, G., Boker, R., Gal, E., Jackson, K. 1997. Oogenesis and steroid profiles during the reproductive cycle of female angelfish *Pterophyllumsalare* (Cichlidae). Indian Journal of Fisheries. 44(1): 1-10.
- Dineley, K.E., Votyakova, T.V., Reynolds, I.J. 2003. Zinc inhibition of cellular energy production: implications for mitochondria and neurodegeneration. Journal of Neurochemistry. 85(3): 563-570.
- Finney, D. 1990. Probit analysis. Cambridge University Press. 222 p.
- Flammarion, P., Devaux, A., Nehls, S., Migeon, B., Noury, P., Garric, J. 2002. Multi biomarker responses in fish from the Moselle River (France). Journal of Ecotoxicological Environmental Safety. 51: 145-153.
- Gottschalk, F., Sun, T.Y., Nowack, B. 2013. Environmental concentrations of engineered nanomaterials: review of modeling and analytical studies. Journal of Environmental Pollution. 181: 287- 300.

- Hackenberg, S., Scherzed, A., Harnisch, W., Froelich, K., Ginzkey, C., Koehler, C. 2012. Antitumor activity of photo-stimulated zinc oxide nanoparticles combined with paclitaxel or cisplatin in HNSCC Cell lines. *Journal of Photochemosphere Photobiol.* 114: 87-93.
- Hao, L., Chen, L., Hao, J., Zhong, N. 2013. Bioaccumulation and sub-acute toxicity of zinc oxide nanoparticles in juvenile carp (*Cyprinus carpio*): a comparative study with its bulk counterparts. *Journal of Ecotoxicology and Environmental Safety.* 91: 52-60.
- Hedayati, S.A.A. 2013. Aquatic toxicology. Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources Publications. 210 p. (in Persian)
- Hedayati, A., Jahanbakhshi, A., Moradzadeh, M., Javadimoosavi, M. 2014. Effects of sub-acute toxicity nano-zinc oxide (ZnO NPs) on hematological factor of roach (*Rutilus rutilus caspicus*). *Journal of Aquatic Physiology and Biotechnology.* 2(1): 1-13. (in Persian)
- Hedayati, S.A.A., Jebele, A., Jahanbakhshi, A. 2016. Lethal concentration (LC_{50-96h}) determination of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and roach (*Rutilus rutilus*) exposed to diazinon pesticide. *Journal of Aquatic Ecology.* 6(3): 138-143. (in Persian)
- Heng, B.C., Zhao, X., Xiong, S., Ng, K.W., Boey, F.Y.C., Loo, J.S.C. 2010. Toxicity of zinc oxide (ZnO) nanoparticles on human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) is accentuated by oxidative stress. *Journal of Food Chemistry and Toxicology.* 48(6): 1762-1766.
- Hosseini, S., Movahedinia, A.A., Heydari, M., Mahdavi, J., Jaddi, Y., Feizi, Z. 2015. Determination of the lethal range and lethal concentration (LC₅₀) of copper sulphate in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Aquatic Physiology and Biotechnology.* 3(2): 1-12. (in Persian)
- Iranshahi, F., Faramarzi, M., Kiaalvandi, S., Jalae, M.H., Dehghan, M. 2011. Effectiveness of Edta in mobilizing of the contaminant metal ions, especially cadmium from tissue of angelfish (*Pterophyllum scalare schultze*) subjected to chronic poisoning with cadmium acetate. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences.* 11(4): 519-527.
- Kaya, H., Aydin, F., Gurkan, F., Yilmaz, S., Ates, M., Demir, V., Arslan, Z. 2016. A comparative toxicity study between small and large size zinc oxide nanoparticles in tilapia (*Oreochromis niloticus*): Organ pathologies, osmoregulatory responses and immunological parameters. *Journal of Chemosphere.* 144: 571-582.
- Louis, A.H., Diana, L.W., Patricia, H., Elizabeth, R.S. 1996. Pesticides and aquatic animals. Virginia Cooperation Extension. Virginia State University. 24 p.
- Ma, H., Williams, P.L., Diamond, S.A. 2013. Ecotoxicity of manufactured ZnO nanoparticles-a review. *Journal of Environmental Pollution.* 172: 76-85.
- Nel, A., Xia, T., Madler, L., Li, N. 2006. Toxic potential of materials at nano level. *Journal of Science.* 311: 622-627.
- Nilkanth, G.V., Sawant, K.B. 1993. Studies on accumulation and histopathology of gills after exposure to sublethal concentration of hexavalent chromium and effect of the oxygen consumption in *Scylla serrata* (Forsk.) *Journal of Pollution Research.* 12(1): 11-18.
- Ortega-Salas, A.A., Cortes, I., Reyes-Bustamante, H. 2009. Fecundity, growth and survival of the angelfish *Pterophyllum scalare* (Perciformes: Cichlidae) under laboratory conditions. *Journal of Revista de Biologia Tropical.* 57(3): 741-747.
- Osmond, M.J., McCall, M.J. 2010. Zinc oxide nanoparticles in modern sunscreens: an analysis of potential exposure and hazard. *Journal of Nanotoxicology.* 4: 15-41.
- Piccinno, F., Gottschalk, F., Seeger, S., Nowack, B. 2012. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials for Europe and the world. *Journal of Nanoparticles Researches.* 14: 1-11.
- Pipan-Tkalec, Z., Drobne, D., Jemec, A., Romih, T., Zidar, P., Bele, M. 2010. Zinc bioaccumulation in a terrestrial invertebrate fed a diet treated with particulate ZnO or ZnCl₂ solution. *Journal of Toxicology.* 29(2-3): 198-203.
- Rogival, D., Scheirs, J., De Coen, W., Verhagen, R., Blust, R. 2006. Metal blood levels and hematological characteristics in wood mice (*Apodemus sylvaticus* L.) along a metal pollution gradient. *Journal of Environmental Toxicology and Chemistry.* 25: 149- 157.
- Sharma, V., Shukla, R.K., Saxena, N., Parmar, D., Das, M., Dhawan, A. 2009. DNA damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells. *Journal of Toxicology Letters.* 185: 211-218.

- Shelar, G., Shelar, P., Singh, H.D. 2014. Angelfish nutrition, reproduction and farming. LAP LAMBERT Academic Publishing. 64 p.
- Song, W., Zhang, J., Guo, J., Zhang, J., Ding, F., Li, L. 2010. Role of the dissolved zinc ion and reactive oxygen species in cytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Journal of Toxicology Letters*. 199: 389-397.
- Subashkumar, S., Selvanayagam, M. 2014. Zinc oxide (ZnO) nanoparticles induced histopathological changes in the liver of freshwater fish, *Cyprinus carpio*. *Journal of Zoology*. 3(3): 74-77.
- Suman, T.Y., Rajasree, S.R.R., Kirubakaran, R. 2015. Evaluation of zinc oxide nanoparticles toxicity on marine algae *Chlorella vulgaris* through flow cytometric, cytotoxicity and oxidative stress analysis. *Journal of Ecotoxicology and Environmental Safety*. 113: 23-30.
- Swan, L.D. 1999. Reproduction of angelfish (*Pterophyllum scalare*). Illinois: Aquaculture Extension. Indiana Sea Grant Programme. Purdue University. 6 p.
- Wang, B., Feng, W., Wang, M., Wang, T., Gu, Y., Zhu, M., Ouyang, H., Shi, J., Zhang, F., Zhao, Y. 2008. Acute toxicological impact of nano- and submicro-scaled zinc oxide powder on healthy adult mice. *Journal of Nanoparticles Researches*. 10: 263-276.
- Wang, H., Wick, R., Xing, B. 2009. Toxicity of nanoparticulate and bulk ZnO, Al₂O₃ and TiO₂ to the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Environmental Pollution*. 157: 1171-1177.
- Xiong, D., Fang, T., Yu, L., Sima, X., Zhu, W. 2011. Effects of nano-scale TiO₂, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. *Journal of Science of the Total Environment*. 409: 1444-1452.
- Zheng, Y., Li, R., Wang, Y. 2009. In vitro and in vivo biocompatibility of ZnO nanoparticles. *International Journal of Modern Physics B*. 23: 1566-1571.
- Zhu, X.S., Zhu, L., Duan, Z.H., Qi, R.Q., Li, Y., Lang, Y.P. 2008. Comparative toxicity of several metal oxide nanoparticle aqueous suspensions to zebrafish (*Danio rerio*) early developmental stage. *Journal of Environmental Science & Health*. 3(3): 278-284.