فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال چهارم، شماره اول، تابستان ۱۳۹۵

ارزیابی سمیت حاد نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم (TiO_2 NPs) بر شاخص‌های خون‌شناسی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) و ماهی کُلمه (*Rutilus rutilus*)

سید علی اکبر هدایتی[۱]، فاطمه دارابی‌تبار[۲]*، شیدا احمدوند[۳]، شراره احمدوند[۳]

تاریخ دریافت: فروردین ۹۵ تاریخ پذیرش: خرداد ۹۵

چکیده

با وجود گسترش نانوفناوری در صنایع مختلف، مطالعات در زمینه تعیین غلظت کشندگی نانوذرات برای ماهیان به حد کافی صورت نگرفته است. از این رو در پژوهش حاضر میزان سمیت نانوذرات تیتانیوم (دی‌اکسید تیتانیوم) در بچه ماهیان کپور معمولی و کلمه مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام این آزمایش ۱۰۵ قطعه بچه ماهی کلمه و کپور معمولی به ترتیب با طول کل ۵/۴۶±۰/۵۷ سانتی‌متر و ۷/۳۶±۰/۳۰ سانتی‌متر در آکواریوم‌های ۶۰ لیتری با سه تکرار به مدت ۹۶ ساعت قرار داده شدند. طبق مقادیر LC_{50} پس از انجام آزمایش‌ها، میزان سمیت نانوذرات تیتانیوم برای کپور معمولی و کُلمه به ترتیب ۱۲۵۲۳/۴۴±۰/۴۷ و ۸۶۹۳/۳۷±۱/۹۶ قسمت در میلیون به دست آمد. بعد از ۷ روز قرارگیری ماهیان در معرض غلظت تحت کشنده نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم، از آن‌ها خونگیری شد. با مقایسه شاخص‌های خونی بچه ماهیان، در اغلب شاخص‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. میزان گلبول قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت در غلظت تحت‌کشنده نانو دی اکسید تیتانیوم نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری داشت ($P<۰/۰۵$). نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم می‌توانند اثر منفی بر پارامترهای خونی ماهی کپور معمولی و کلمه داشته باشند و باعث کاهش میزان گلبول قرمز و هموگلوبین در خون و در نهایت سبب مرگ ماهیان شوند.

واژگان کلیدی: *نانو دی‌اکسید تیتانیوم، غلظت کشندگی، کپور معمولی، کُلمه، شاخص‌های خونی.*

۱- استادیار گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
۲- دانشجوی دکتری بوم‌شناسی آبزیان، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران.
۳- کارشناس ارشد تکثیر و پروش آبزیان، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.
* نویسنده مسئول: darabitabar@gmail.com

مقدمه

با گسترش روزافزون فناوری نانو، استفاده از نانوذرات و ریزمواد در تکنولوژی‌های مدرن افزایش یافته است (باکند و فرشاد، ۱۳۸۶). به منظور برآورده کردن این نیازها، علم سم‌شناسی نانومواد، نقشی بسیار مهم در توسعه و گسترش نانوفناوری پایدار و ایمن خواهد داشت. اگر چه هم اکنون اطلاعات کمی در ارتباط با اثر سم‌شناسی زیست‌محیطی و اثر سم‌شناسی انسانی نانومواد در دسترس است، با این وجود با توجه به ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نانو مواد پیش‌بینی می‌شود که این مواد با اجزای زیستی برهم‌کنش داشته باشد و اثرات زیادی بر رفتار و ویژگی‌های ماکرومولکول‌ها، سلول‌ها و بدن موجود زنده به جای بگذارند (Revell, 2006). نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم به وفور تولید می‌شود و به طور گسترده‌ای به دلیل پایداری بالا، ضدخوردگی بودن و قابلیت فوتوکاتالیستی به کار می‌رود (Hao and Chen, 2012).

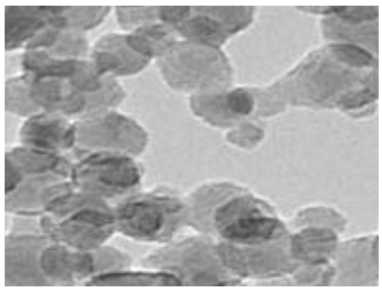
دی‌اکسید تیتانیوم که با نام‌های اکسید تیتانیوم IV یا تیتانیا شناخته می‌شود دارای فرمول شیمیایی TiO_2 است و زمانی که به عنوان رنگدانه مورد استفاده قرار می‌گیرد، نام‌های تیتانیوم سفید، رنگدانه سفید و CI77891 به خود می‌گیرد. تمام ویژگی‌های دی‌اکسید تیتانیوم نیز در نانو دی‌اکسید تیتانیوم وجود دارد با این تفاوت که اندازه ذرات آن بسیار کوچک‌تر است و از این رو قابلیت و تاثیر بیش‌تری دارد چرا که به واسطه کوچک بودن اندازه ذرات، سطح تماس بیش‌تر می‌شود و کارایی افزایش می‌یابد. زمانی که اندازه ذرات TiO_2 به مقیاس نانو کاهش می‌یابد فعالیت فتوکاتالیستی می‌تواند افزایش یابد چرا که مساحت سطح موثر افزایش می‌یابد (Sawhney and Condon, 2008). نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم اثرات سمی زیادی از جمله التهاب، سمیت سلولی، فیتوتوکسیسیتی و ناپایداری ژنومی در پستانداران، گیاهان و میکروارگانیسم‌ها دارند (Warheit et al., 2007). کشورمان در زمینه تکنولوژی نانو و کاربرد این علم در صنایع مختلف از کشورهای پیشرو است. با توجه به این‌که نگرانی فزاینده ایمنی نانوذرات و مسئله سمیت آن‌ها وجود دارد، در کنار تمامی مزایای خاص حاصل از نانوذرات، باید به خطرساز بودن آن‌ها برای موجودات زنده هم توجه داشت و نباید با مشاهده برخی دستاوردهای فناوری نانو از مضرات احتمالی آن‌ها چشم پوشی کرد (شبه‌رنگ هره‌دشت و میرواقفی، ۱۳۹۱). با

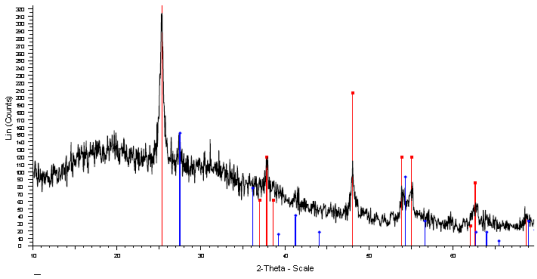
توجه به این که پارامترهای خونی، شرایط نامطلوب محیطی را سریع‌تر از سایر پارامترها برای ماهیان نشان می‌دهند و تا حد زیادی برای تعیین وضعیت سلامت و نظارت بر پاسخ‌های استرسی ماهیان برای پیش‌بینی سازگاری‌های فیزیولوژیکی آن‌ها استفاده می‌شوند، در این پژوهش پارامترهای خونی ماهیان مورد بررسی قرار گرفته است. نظر به این که مطالعات خون‌شناسی روش ارزشمندی برای ارزیابی آثار محیطی آلاینده‌ها روی ماهی‌ها است، با تعیین این نوع آسیب‌ها، از آن‌ها می‌توان به عنوان نشانگرهای زیستی به منظور بررسی وجود آلاینده‌ها در اکوسیستم‌های طبیعی استفاده کرد (Oliveira Ribeiro et al., 2002). با وجود گسترش نانوفناوری در صنایع مختلف، مطالعات در زمینه تعیین غلظت کشندگی نانوذرات برای ماهیان به حد کافی صورت نگرفته است. از این رو در پژوهش حاضر میزان سمیت نانوذرات تیتانیوم در بچه ماهیان کپور معمولی و کلمه مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

برای انجام این آزمایش، ۱۰۵ قطعه بچه ماهی کُلمه با طول کل ۰/۵۷±۵/۴۶ سانتی‌متر و ۱۰۵ قطعه بچه ماهی کپور معمولی با طول کل ۰/۳۰±۷/۳۶ سانتی‌متر بعد از گذشت دوره آداپتاسیون (یک هفته) به طور تصادفی در آکواریوم‌های ۶۰ لیتری تقسیم شدند و غلظت‌های مختلف نانوذرات تیتانیوم (دی‌اکسید تیتانیوم) به آکواریوم‌ها اضافه شد، در هر تیمار ۷ قطعه ماهی و برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد.

در طی دوره سازگاری، غذادهی دوبار در روز صورت گرفت و در دوره آزمایش غذادهی قطع شد. پس از زمان غذادهی، غذای مصرف نشده با سیفون کردن از کف تانک‌ها خارج شد تا از آلودگی آب آکواریوم‌ها جلوگیری شود. برای شبیه‌سازی حضور آتی نانوذرات در اکوسیستم‌های آبی، نانو دی‌اکسید تیتانیوم (TiO_2 NPs) مورد استفاده از محصولات تکنان است که از شرکت نوترینو، خریداری شد. نانوپودرها به صورت پودر خریداری و با دستگاه اولتراسونیک در آب مقطر حل شد (ماده حامل نانوذرات آب مقطر است). اندازه ذرات نانو دی‌اکسید تیتانیوم، طبق فایل ارائه شده شرکت نوترینو برابر با ۱۵-۱۰ نانومتر عنوان شد. استوک تهیه شده با غلظت نانوذره ۱ گرم در لیتر بود که از آن استوک‌های مختلفی تهیه شد (شکل ۱).





شکل ۱: تصویر میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM؛ سمت راست) و اندازه نانوذرات تیتانیوم (سمت چپ)

در طی آزمایش، تا حد امکان، شرایط فیزیکوشیمیایی کنترل شد و تمام شرایط در طی دوره آزمایش یکسان نگه داشته شد تا تنها عامل متغیر دوزهای مختلف آلودگی باشد. هوادهی در تمامی آکواریوم‌ها به گونه‌ای که حداقل آشفتگی در آب ایجاد شود صورت گرفت. تمامی ماهیان به مدت ۹۶ ساعت در غلظت (LC_{50}) نگهداری شده و میزان مرگ و میر در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت محاسبه شد.

نمونه‌های خون بچه ماهیان بعد از ۷ روز قرارگیری در معرض غلظت تحت کشنده (۵۰٪ غلظت LC_{50}) نانو دی‌اکسید تیتانیوم به همراه بچه ماهیانی که در معرض نانومواد نبودند، برداشت شد.

نمونه‌گیری خون به وسیله قطع ساقه دمی و بدون فشار و به آرامی، به صورتی‌که منجر به پاره شدن گلبول‌های قرمز نشود، انجام شد. نمونه‌های خون داخل لوله‌های هپارینه و غیرهپارینه ریخته شد. این لوله‌ها در مجاورت یخ قرار داده شدند تا برای تعیین میزان هموگلوبین، درصد هماتوکریت، مقادیر گلبول‌های قرمز و سفید و بررسی شاخص‌های خونی مورد استفاده قرار بگیرند.

داده‌های مربوط به آنالیزهای مختلف به صورت میانگین ± خطای استاندارد بیان شده است. اختلاف بین این داده‌ها و مقایسه میانگین نمونه‌ها در تیمارهای مختلف با آنالیز واریانس یک‌طرفه با استفاده از برنامه نرم‌افزاری SPSS ۱۶ تحت سیستم عامل ویندوز ۷ انجام شد. در صورت وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها، از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد و اختلاف در سطح اطمینان ۵٪ در نظر گرفته شد.

نتایج

تعیین میزان سمیت کشنده نانو دی‌اکسید تیتانیوم در کپور معمولی و کُلمه

نتایج به دست آمده از آزمایش‌ها نشان داد که میزان سمیت نانو ذرات تیتانیوم برای کپور معمولی و کُلمه به ترتیب ۰/۴۷±۱۲۵۲۳/۴۴ و ۱/۹۶±۸۶۹۳/۳۷ قسمت در میلیون بود. غلظت ایجاد کننده ۱، ۳۰، ۵۰، ۷۰، ۹۰ و ۹۹ درصد تلفات بعد از ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از مجاورت با نانو دی‌اکسید تیتانیوم در کپور معمولی و کلمه در جدول‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است.

تغییرات شاخص‌های خونی تحت تاثیر نانو دی‌اکسید تیتانیوم

مقایسه شاخص‌های خونی بچه ماهیانی که در معرض غلظت تحت کشنده (۵۰٪ LC_{50}) نانو دی‌اکسید تیتانیوم قرار گرفتند با بچه ماهیانی که در معرض نانومواد قرار نگرفتند اختلاف معنی‌داری را نشان داد. نتایج بررسی شاخص‌های خونی در جدول‌های ۳ و ۴ و شکل‌های ۲ تا ۸ نشان داده شده است.

در ماهی کپور معمولی میزان گلبول قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت در غلظت تحت کشنده نانو دی‌اکسید تیتانیوم نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری نشان دادند ($P<0/05$). شاخص‌های گلبول سفید، MCHC و MCV نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد ($P<0/05$). اما افزایش MCH نسبت به گروه شاهد معنی‌داری نبود ($P>0/05$).

در ماهی کلمه هموگلوبین و هماتوکریت در غلظت تحت کشنده نانو دی‌اکسید تیتانیوم نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد ($P<0/05$). میزان گلبول سفید، MCH و MCV نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشت ($P<0/05$). اما افزایش MCHC نسبت به گروه شاهد معنی‌داری نبود ($P>0/05$).

جدول ۱: غلظت ایجاد کننده ۱، ۳۰، ۵۰، ۷۰، ۹۰ و ۹۹ درصد تلفات بعد از ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت مجاورت با نانو دی‌اکسید تیتانیوم در کپور معمولی

مقدار	غلظت (قسمت در میلیون)			
	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
LC_1	۹۶۴۱/۱±۰۲/۶۵	۷۴۸۴/۱±۶۵/۰۷	۳۵۰۳/۰±۱۱/۵۰	۲۹۹۶/۰±۹۲/۴۷
LC_{10}	۱۴۱۴۶/۱±۵۹/۶۵	۱۲۰۰۱/۱±۹۶/۰۷	۸۶۷۰/۰±۱۱/۵۰	۷۲۷۵/۰±۴۲/۴۷
LC_{30}	۱۷۴۱۱/۱±۷۲/۶۵	۱۵۲۷۵/۱±۶۰/۰۷	۱۲۴۱۴/۰±۵۷/۵۰	۱۰۳۷۵/۰±۹۹/۴۷
LC_{50}	**۱۹۶۷۳/۱±۱۴/۶۵**	**۱۷۵۴۲/۱±۹۲/۰۷**	**۱۵۰۰۷/۰±۹۸/۵۰**	**۱۲۵۲۳/۰±۴۴/۴۷**
LC_{70}	۲۱۹۳۴/۱±۶۹/۶۵	۱۹۸۱۰/۱±۲۳/۰۷	۰±۱۷۶۰۱/۵۰	۱۴۶۷۰/۰±۸۹/۴۷
LC_{90}	۲۵۱۹۹/۱±۶۹/۶۵	۲۳۰۸۳/۱±۸۷/۰۷	۲۱۳۴۵/۰±۸۵/۵۰	۱۷۷۷۱/۰±۴۷/۴۷
LC_{99}	۲۹۷۰۵/۱±۲۶/۶۵	۲۷۶۰۱/۱±۱۹/۰۷	۲۶۵۱۲/۰±۸۵/۵۰	۲۲۰۴۹/۰±۹۷/۴۷

جدول ۲: غلظت ایجاد کننده ۱، ۳۰، ۵۰، ۷۰، ۹۰ و ۹۹ درصد تلفات بعد از ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت مجاورت با نانو دی‌اکسید تیتانیوم در ماهی کلمه

مقدار	غلظت (قسمت در میلیون)			
	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
LC_1	۵۰۳۹/۱±۷۸/۲۰	۴۳۶۷/۱±۲۷/۱۱	۴۴۲۵/۱±۸۶/۲۰	۵۸۴۷/۱±۷۲/۹۶
LC_{10}	۸۸۴۳/۱±۹۴/۲۰	۷۳۳۱/۱±۱۴/۱۱	۶۹۲۳/۱±۰۳/۲۰	۷۱۲۵/۱±۷۴/۹۶
LC_{30}	۱۱۶۰۰/۱±۷۷/۲۰	۹۴۷۹/۱±۰۲/۱۱	۸۷۳۲/۱±۷۰/۲۰	۸۰۵۱/۱±۹۱/۹۶
LC_{50}	**۱۳۵۱۰/۱±۱۵/۲۰**	**۱۰۹۶۶/۱±۶۴/۱۱**	**۹۹۸۶/۱±۰۷/۲۰**	**۸۶۹۳/۱±۳۷/۹۶**
LC_{70}	۱۵۴۱۹/۱±۵۲/۲۰	۱۲۴۵۴/۱±۲۵/۱۱	۱۱۲۳۹/۱±۴۴/۲۰	۹۳۳۴/۱±۸۳/۹۶
LC_{90}	۱۸۱۷۶/۱±۳۵/۲۰	۱۴۶۰۲/۱±۱۳/۱۱	۱۳۰۴۹/۱±۱۱/۲۰	۱۰۲۶۰/۱±۹۹/۹۶
LC_{99}	۲۱۹۸۰/۱±۵۱/۲۰	۱۷۵۶۶/۱±۰۱/۱۱	۱۵۵۴۶/۱±۲۸/۲۰	۱۱۵۳۹/۱±۰۱/۹۶

جدول ۳: شاخص‌های خونی در بچه ماهیان کپور معمولی قرار گرفته در معرض غلظت تحت کشنده (٪۵۰ غلظت LC_{50}) نانو دی‌اکسید تیتانیوم در مقایسه با تیمار شاهد (میانگین± انحراف معیار)

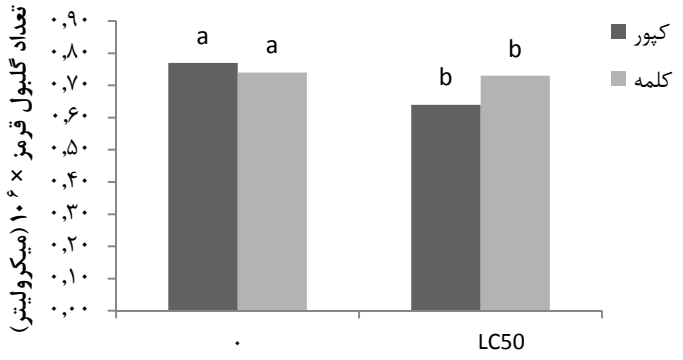
	گلبول سفید	گلبول قرمز	هموگلوبین	هماتوکریت	MCH*	MCHC	MCV
شاهد	۷۷۰۰/۵۷±۰/۷۳	۰/۰±۷۷/۰۰	۷/۰±۷۶/۰۳	۲۳/۰±۶۶/۰۸	۹۶/۱±۶۷/۴۹	۳۱/۰±۵۷/۰۲	۱±۲۶۶/۲۳
٪۵۰ غلظت LC_{50}	۸۷۳۳/۸۸±۳۳/۱۹	۰/۰±۶۴/۰۰	۶/۰±۸۳/۰۳	۲۱/۰±۸۳/۰۳	۹۸/۰±۰۰/۲۴	۳۲/۰±۰۵/۰۰	۰±۲۷۵/۶۶

: به استثنای ستونی که با علامت «» مشخص شده، ستون‌های دیگر دارای اختلاف آماری معنی‌دار هستند (P<۰/۰۵).

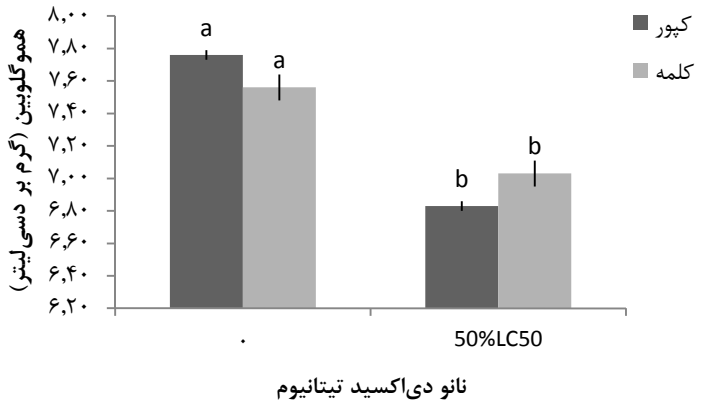
جدول ۴: شاخص‌های خونی در بچه ماهیان کلمه قرار گرفته در معرض غلظت تحت کشنده (٪۵۰ غلظت LC_{50}) نانو دی‌اکسید تیتانیوم در مقایسه با تیمار شاهد (میانگین± انحراف معیار)

	گلبول قرمز	هموگلوبین	هماتوکریت	گلبول سفید	MCH	MCHC*	MCV
شاهد	۰/۰±۷۴/۰۰	۷/۰±۵۶/۰۸	۲۲/۰±۵۳/۰۸	۶۶۰۰/۵۷±۰۰/۷۳	۹۰/۰±۵۱/۳۶	۳۱/۰±۵۳/۰۵	۰±۲۵۷/۸۸
٪۵۰ غلظت LC_{50}	۰/۰±۷۳/۰۰	۷/۰±۰۳/۰۸	۲۱/۰±۴۳/۰۸	۷۵۰۰/۵۷±۰۰/۷۳	۹۶/۰±۲۶/۱۲	۳۱/۰±۷۰/۲۸	۰±۲۸۹/۰۱

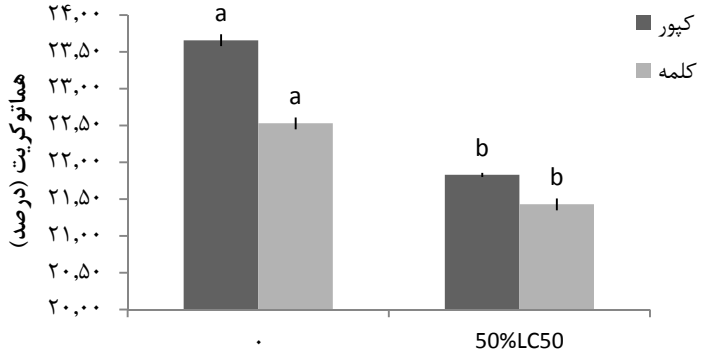
: به استثنای ستونی که با علامت «» مشخص شده، ستون‌های دیگر دارای اختلاف آماری معنی‌دار هستند (P<۰/۰۵).



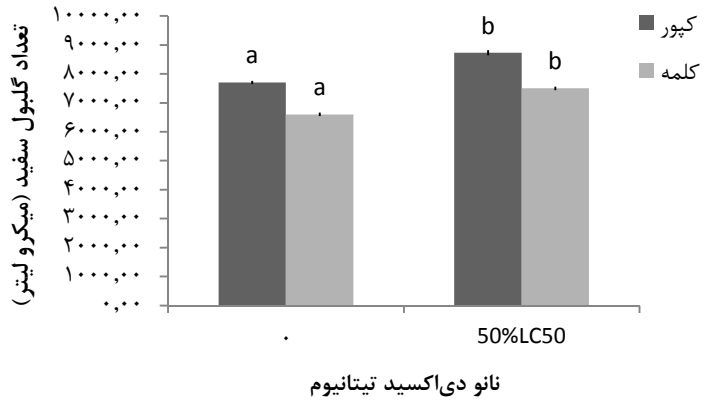
شکل ۲: تغییرات تعداد گلبول‌های قرمز خون ماهی کپور معمولی و ماهی کُلمه پس از ۷ روز قرارگیری در معرض نانو دی‌اکسید تیتانیوم (حروف انگلیسی متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار است)



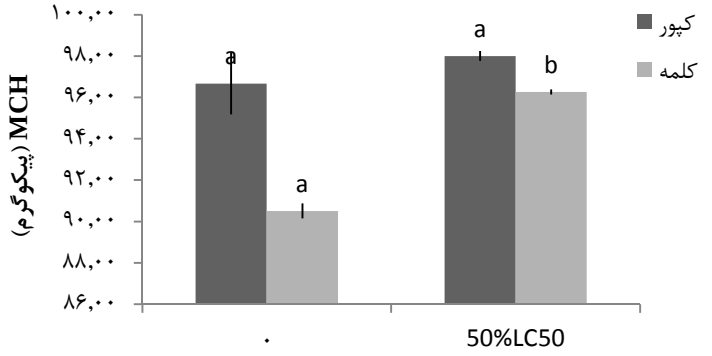
شکل ۳: تغییرات میزان هموگلوبین خون ماهی کپور معمولی و ماهی کُلمه پس از ۷ روز قرارگیری در معرض نانو دی‌اکسید تیتانیوم (حروف انگلیسی متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار است)



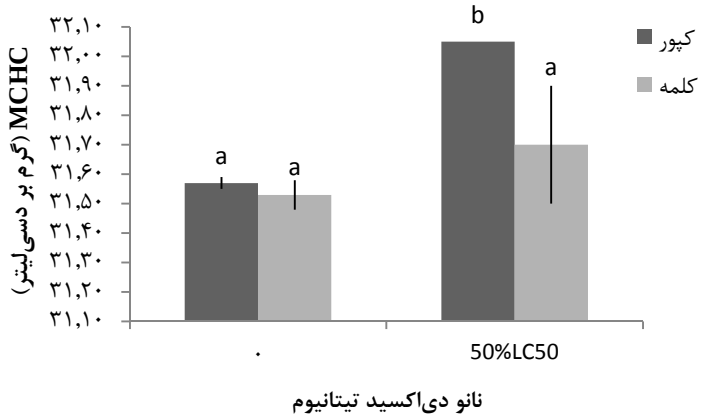
شکل ۴: تغییرات میزان هماتوکریت خون ماهی کپور معمولی و ماهی کُلمه پس از ۷ روز قرارگیری در معرض نانو دی‌اکسید تیتانیوم (حروف انگلیسی متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار است)



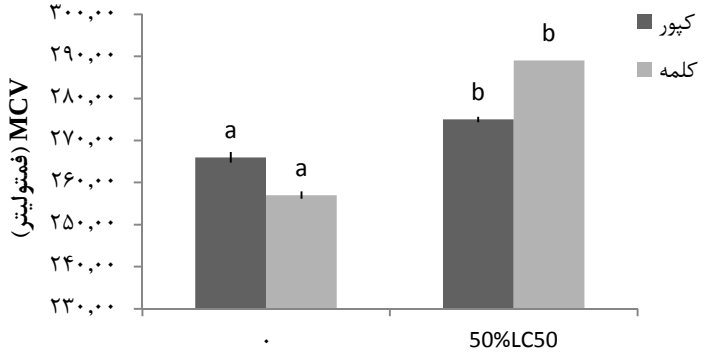
شکل ۵: تغییرات تعداد گلبول سفید خون ماهی کپور معمولی و ماهی کُلمه پس از ۷ روز قرارگیری در معرض نانو دی‌اکسید تیتانیوم (حروف انگلیسی متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار است)



شکل ۶: تغییرات میزان MCH خون ماهی کپور معمولی و ماهی کُلمه پس از ۷ روز قرارگیری در معرض نانو دی‌اکسید تیتانیوم (حروف انگلیسی متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار است)



شکل ۷: تغییرات میزان MCHC خون ماهی کپور معمولی و ماهی کُلمه پس از ۷ روز قرارگیری در معرض نانو دی‌اکسید تیتانیوم (حروف انگلیسی متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار است)



شکل ۸: تغییرات میزان MCV خون ماهی کپور معمولی و ماهی کُلمه پس از ۷ روز قرارگیری در معرض نانو دی‌اکسید تیتانیوم (حروف انگلیسی متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار است)

بحث

امروزه آلودگی‌های ناشی از نانوذرات به عنوان مساله‌ای جدید و خطرناک مطرح شده است. هر چند استفاده از نانو ذرات بسیار کم‌تر از سایر مواد با اثرات مشابه به محیط زیست آسیب رسانده و بهداشت انسانی را تهدید

می‌کند (Sharma et al., 2009). اما ماندگاری نانوذرات اکسید فلزی در محیط و زنجیره غذایی زیاد است که تداوم مسمومیت‌های ناشی از آن‌ها را به‌دنبال دارد (Hoet et al., 2004). نتایج نشان داد که نانوذرات موجب تغییرات در پارامترهای خونی شد که این تغییرات جز در چند مورد در اغلب شاخص‌های خونی معنی‌دار بود. در بیش‌تر تیمارهایی که ماهیان در معرض غلظت تحت کشنده نانومواد بودند افزایش گلبول‌های سفید نسبت به گروه ماهیان شاهد مشاهده شد که با مطالعه رضایی زارچی (۱۳۹۰) همخوانی دارد. نتایج وی نشان داد نانو ذرات اکسید تیتانیوم طی چهارده روز تیمار موجب تغییراتی در سلول‌های خونی شد که در مورد بعضی از سلول‌های خونی مانند گلبول‌های سفید (لنفوسیت، مونوسیت، ائوزینوفیل و بازوفیل) این تغییرات معنادار بود. همچنین کاهش تعداد گلبول‌های قرمز و افزایش غلظت آنزیم‌های کبدی مشاهده شد (رضایی زارچی ۱۳۹۰). این نتایج حاکی از اثر سمیت نانوذرات اکسید تیتانیوم بر بدن است که بیان می‌دارد در ابتدا بدن در برای مقابله با نانوذرات ورودی تولید گلبول‌های سفید را افزایش می‌دهد. تحت شرایط استرس‌زا گلبول‌های قرمز نابالغ از طحال آزاد شده و با افزایش متابولیسم، اکسیژن‌رسانی به ارگان‌های مهم افزایش می‌یابد و به دنبال آن گلبول‌های قرمز، غلظت هموگلوبین و سطح هماتوکریت افزایش می‌یابد (Molinero and Gonzalez, 1995). در مطالعه‌ای بر روی اثرات استرس بر ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مشخص شد که استرس به هر دلیلی سبب افزایش هموگلوبین، هماتوکریت و تعداد گلبول‌های قرمز می‌شود (Casillas aand Smith, 1974). فراوانی گلبول‌های سفید خون شاخص سلامت ماهی محسوب می‌شود. زیرا آمادگی بدن در برابر دفاع سلولی را نمایان می‌کند. اما افزایش شدید گلبول‌های سفید نیز بیانگر التهاب بالینی است و هجوم انگل‌ها و باکتری‌ها را نشان می‌دهد (Karimi et al., 2011). به طور کلی، در پاسخ به استرس‌های موجود در محیط آبی، کاهش تعداد گلبول‌های سفید می‌تواند بیانگر سرکوب ایمنی جاندار و افزایش میزان آن‌ها نشان دهنده پاسخ به استرس یا عفونت باشد (Adams, 2002).

در مورد برخی پارامترهای خونی مثل تعداد گلبول‌های سفید نتایج نشان داد که تعداد آن‌ها در گروه شاهد بیش‌تر بود علت را می‌توان این طور بیان کرد که با تضعیف بدن در غلظت‌های بالا، ماهی با کاهش تولید

گلبول‌های سفید مواجه است (رضایی زارچی، ۱۳۹۰). در جریان مسمومیت ناشی از نانوذرات اکسید تیتانیوم پیش‌بینی می‌شود واکنش‌های استرس اکسیداتیو در سلول‌های سیستم ایمنی افزایش یابد (Chen et al., 2006). بعضی از این عوامل باعث کاهش و برخی باعث افزایش میانگین تعداد گلبول‌های سفید خونی می‌شوند. بسته به این که نانوذرات اکسید تیتانیوم در چه غلظتی و طی چه مدتی استفاده شود، می‌تواند کاهش و یا افزایش گلبول‌های سفید خونی را موجب شود. افزایش درگیری سلول‌ها در فرآیندهای ایمنی کاهش تعداد سلول‌های خونی را به دنبال دارد (Chen et al., 2006). در مسمومیت‌های شدید تعداد سلول‌های خونی کاهش می‌یابد (Revell, 2006). نتایج به دست آمده از مطالعه Hedayati و همکاران (۲۰۱۵) بر سمیت کشنده نانواکسید روی بر شاخص‌های خونی ماهی کپور معمولی، نشان داد که نانوذرات روی موجب تغییراتی در پارامترهای خونی این ماهی شد. این تغییرات در شاخص‌های خونی با کاهش سطح گلبول قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت در تیماری که تحت تاثیر نانوذرات روی قرار داشت، همراه بود و افزایش گلبول‌های سفید در تیماری که ماهیان در معرض غلظت تحت کشنده نانوذرات روی بودند نسبت به گروه شاهد مشاهده شد. MCHC در تیماری که در معرض نانواکسید روی قرار داشت افزایش معناداری را نشان داد در حالی که شاخص‌های MCV و MCH در طی آزمایش فاقد تغییرات معنادار بودند. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که سمیت تحت کشنده نانو ذرات روی می‌تواند بر شاخص‌های خونی ماهی کپور معمولی تاثیر منفی داشته باشد، بنابراین باید از ورود این گونه مواد به اکوسیتم‌های آبی جلوگیری کرد (Hedayati et al., 2015). در مطالعه‌ای که ابرقویی (۱۳۹۳) بر مقایسه سمیت حاد و بررسی عوارض هماتولوژیک و هیستوپاتولوژیک نانوذرات نقره با نمک نیترات نقره ($AgNO_3$) در ماهی کاراس طلایی (*Carassius auratus*) انجام دادند، نتایج نشان داد که در بررسی شاخص‌های خونی نانونقره نانوکا و نیترات نقره بر اغلب شاخص‌های گلبول قرمز خون تاثیرگذار است اما نیترات نقره بر برخی از شاخص‌های گلبول سفید خون هم تاثیرگذار است (ابرقویی، ۱۳۹۳). در مطالعه Hedayati و همکاران (۲۰۱۴) بر تاثیر سمیت تحت کشنده نانو اکسید روی (ZnO NPs) بر شاخص‌های خونی ماهی کلمه (*Rutilus rutilus caspicus*) نشان داده شد که نانوذرات روی موجب

تغییراتی در پارامترهای خونی ماهی کلمه می‌شود که این تغییرات در شاخص‌های خونی با کاهش سطح گلبول قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت در ماهیان تیمار شده با نانوذرات روی، همراه بود (Hedayati et al., 2014).

نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم می‌تواند اثر منفی بر پارامترهای خونی ماهی کپور معمولی و کلمه داشته باشد به طوری که باعث کاهش میزان گلبول قرمز و هموگلوبین در خون آن‌ها شد. عکس العمل فیزیولوژیکی گونه‌های ماهی نسبت به نانوذرات مختلف، متفاوت است. در تلفات ناشی از سمیت مواد نانو باید به این نکته نیز توجه داشت که احتمال بروز اثرات ناشی از سمیت مزمن هم وجود دارد که با توجه به پژوهش‌های انجام شده در این زمینه به نظر می‌رسد این مسئله در مورد نانو دی‌اکسید تیتانیوم نیز صادق باشد. نتایج پژوهش حاضر با توجه به توسعه نانوتکنولوژی در کشور و استفاده از محصولات آن در صنایع مختلف که امکان راه‌یابی فاضلاب حاوی نانوذرات را به منابع آبی طبیعی تایید می‌کند، حائز اهمیت است.

منابع

ابرقویی ص. ۱۳۹۳. مقایسه سمیت حاد و بررسی عوارض هماتولوژیک و هیستوپاتولوژیک نانو ذرات نقره با نمک نیترات نقره ($AgNO_3$) در ماهی کاراس طلایی (*Carassius auratus*). پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ۹۴ص.

باکند ش. و فرشاد ع. ۱۳۸۶. مروری بر فناوری نانو و سم‌شناسی نانوذرات. فصلنامه سلامت کار ایران، ۴(۱): ۳-۱.

رضایی زارچی س. ۱۳۹۰. اثر نانوذرات اکسید تیتانیوم روی میزان سلول‌های خونی و آنزیم‌های کبدی موجود در خون رت نژاد ویستار. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، ۱۹(۵): ۶۱۸- ۶۲۶.

شبه‌رنگ هره‌دشت م. و میرواقفی ع.ر. ۱۳۹۱. کاربردهای فناوری نانو در شیلات. ماهنامه فناوری نانو، ۱۱: ۱۵-۱۳.

Adams S.M. 2002. Biological indicators of aquatic ecosystem stress. Aqua International Journal, 11(3): 318–319.

Casillas E. and Smith L.S. 1974. Effect of stress on blood coagulation and haematology in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Journal of Fish Biology. 10(5): 481–491.

Chen Z., Meng H., Xing G., Chen C., Zhao Y., Jia G. and Wan L. 2006. Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo. Toxicology Letters, 163(2): 109–120.

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, 80: 103–110.

Hedayati A., Jahanbakhshi A. and Moradzadeh M. 2014. Effect of sub-acute toxicity nano-zinc oxide (ZnO NPs) on hematological factor of roach (*Rutilus rutilus caspicus*). Aquatic Physiology and Biotechnology, 2(1): 41–53.

Hedayati A., Jahanbakhshi A. and Moradzadeh M. 2015. The effect of sub-acute concentration of nano-zinc oxide (ZnO NPs) on hematological indices of Common carp (*Cyprinus carpio*). Experimental Animal Biology, 4(1): 27–34.

Karimi S., Kochinian P. and Salati A.P. 2011. The effect of sexuality on some haematological parameters of the yellowfin seabream, *Acanthopagrus latus* in Persian Gulf. Iranian Journal of Veterinary Research, 14(1): 65–68.

Molinero A. and Gonzalez J. 1995. Comparative effects of MS222 and 2-phenoxyethanol on gilthead sea

bream (*Sparus aurata* L.) during confinement. Comparison of Physical and Biochemical Energy Balances, 3(3): 405–414.

Oliveira Ribeiro C.A., Belger L., Pelletier E. and Rouleau C. 2002. Histopathological evidence of inorganic mercury and methylmercury toxicity in the artic charr (*Salvelinus alpinus*). Environmental Research, 90(3): 217–225.

Hoet P.H.M., Hohlfeld I.B. and Salata O.V. 2004. Nanoparticles-known and unknown health risks. Journal of Nanobiotechnology, 2(12): 1-15.

Revell P.A. 2006. The biological effects of nanoparticles. Nanotechnology Perceptions, 2: 283–298.

Sawhney A.P.S., Condon B., Singh K.V., Pang S.S., Li G. and Hui D. 2008. Modern Applications of Nanotechnology in Textiles. Textile Research Journal, 78(8): 731–739.

Sharma V.K., Yngard R.A. and Lin Y. 2009. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. Advances in Colloid and Interface Science, 45(1-2): 83–96.

Warheit D.B., Webb T.R., Reed K.L., Frerichs S. and Sayes C.M. 2007. Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine-TiO_2 particles: Differential responses related to surface properties. Toxicon, 230(1): 90–104.

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 4, No. 1, Spring 2016

Toxic effects of titanium dioxide nanoparticles (TiO_2 NPs) on hematological indices in common carp (*Cyprinus carpio*) and roach (*Rutilus rutilus*)

Seyed Ali Akbar Hedayati[1], Fatemeh Darabitabar[2]*, Sheyda Ahmadvand[3], Sharareh Ahmadvand[3]

Received: April 2016 Accepted: June 2016

Abstract

Despite the expansion of nanotechnology in various industries, a proper evaluation of lethal concentration of nanoparticles on fishes has not been investigated. In present study, the toxicity of titanium nanoparticles was studied in juveniles of common carp and roach. For this study, 105 pieces of roach and common carp with total length of 5.46±0.57cm and 7.36±0.30 cm, respectively, were placed in 60L glass water tanks. According to the LC50 test, toxicity of titanium for common carp and roach were obtained as 12523.44±0.47 and 8693.37±1.96 ppm respectively. After 7 days of exposure to sub-lethal concentrations of titanium dioxide, blood samples were taken. The haematological indices showed significant decrease in red blood cells, hemoglobin and hematocrit values ($P<0.05$) exposed to sub-lethal concentrations when compared to the control group. The results of this study showed that titanium dioxide nanoparticles can have a negative effect on blood parameters and reduced the amount of red blood cells and hemoglobin content of blood which caused fish death.

Key words: *Nano-titanium Dioxide, Lethal Concentration, Common Carp, Roach, Haematological Indices.*

1- Assistant Professor in Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
2- Ph.D. Student in Marine Ecology, Faculty of Marine Natural Resources, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran.
3- M.Sc. in Fisheries, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.
*Corresponding Author: darabitabar@gmail.com