INSO
23222
1st Edition
2023
Modification of
ISO/TS 4988:
2022

جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran
سازمان ملی استاندارد ایران
Iran National Standards Organization

استاندارد ملی ایران
۲۳۲۲۲
چاپ اول
۱۴۰۱

فناوری نانو – ارزیابی سمیت و درون‌هضم‌زیستی حالت تعلیقه نانواشیاء ساخته‌شده، با استفاده از جاندار تک‌یاخته *تتراهایمنا*

(*Tetrahymena* sp.)

Nanotechnologies — Toxicity assessment and bioassimilation of manufactured nano-objects in suspension using the unicellular organism *Tetrahymena* sp.

ICS: 07.120

سازمان ملی استاندارد ایران

تهران،ضلع جنوب‌غربی میدان ونک،خیابان ولی‌عصر، پلاک ۲۵۹۲

صندوق‌پستی: ۶۱۳۹-۱۴۱۵۵ تهران- ایران

تلفن:۵-۸۸۸۷۹۴۶۱

دورنگار: ۸۸۸۸۷۰۸۰ و۸۸۸۸۷۱۰۳

کرج، شهر صنعتی، میدان استاندارد

صندوق پستی: ۱۶۳-۳۱۵۸۵ کرج - ایران

تلفن: ۸-۳۲۸۰۶۰۳۱(۰۲۶)

دورنگار: ۳۲۸۰۸۱۱۴(۰۲۶)

رایانامه: standard@inso.gov.ir

وبگاه: http://www.inso.gov.ir

Iran National Standards Organization (INSO)

No.2592 Valiasr Ave., South western corner of Vanak Sq., Tehran, Iran

P. O. Box: 14155-6139, Tehran, Iran

Tel: + 98 (21) 88879461-5

Fax: + 98 (21) 88887080, 88887103

Standard Square, Karaj, Iran

P.O. Box: 31585-163, Karaj, Iran

Tel: + 98 (26) 32806031-8

Fax: + 98 (26) 32808114

Email: standard@inso.gov.ir

Website:http://www.inso.gov.ir

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

سازمان ملی استاندارد ایران به موجب بند یک مادهٔ ۷ قانون تقویت و توسعه نظام استاندارد، ابلاغ شده در دی ماه ۱۳۹۶، وظیفهٔ تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی را به‌عهده دارد.

تدوین استاندارد در حوزه‌های مختلف در کمیسیون‌های فنی مرکب از کارشناسان سازمان، صاحب‌نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می‌شود و کوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانهٔ صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف‌کنندگان، صادرکنندگان و واردکنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان‌های دولتی و غیردولتی حاصل می‌شود. پیش‌نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی‌نفع و اعضای کمیسیون‌های مربوط ارسال می‌شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادها در کمیتهٔ‌ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی (رسمی) ایران چاپ و منتشر می‌شود.

پیش‌نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان‌های علاقه‌مند و ذی‌صلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می‌کنند درکمیته ملی طرح، بررسی و درصورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می‌شود. بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می‌شود که بر اساس مقررات استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ تدوین و در کمیتهٔ‌ملی استاندارد مربوط که در سازمان ملی استاندارد ایران تشکیل می‌شود به تصویب رسیده باشد.

سازمان ملی استاندارد ایران از اعضای اصلی سازمان بین‌المللی استاندارد (ISO)[1]،کمیسیون بین‌المللی الکتروتکنیک (IEC)[2] و سازمان بین‌المللی اندازه‌شناسی قانونی (OIML)[3] است و به عنوان تنها رابط[4] کمیسیون کدکس غذایی (CAC)[5] در کشور فعالیت می‌کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی‌های خاص کشور، از آخرین پیشرفت‌های علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین‌المللی بهره‌گیری می‌شود.

سازمان ملی استاندارد ایران می‌تواند با رعایت موازین پیش‌بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف‌کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست‌محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور و/یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری کند. سازمان می‌تواند به منظور حفظ بازارهای بین‌المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری کند. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده‌کنندگان از خدمات سازمان‌ها و مؤسسات فعال در زمینهٔ مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدور گواهی سیستم‌های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست‌محیطی، آزمایشگاه‌ها و مراکز واسنجی (کالیبراسیون) وسایل سنجش، سازمان ملی استاندارد این‌گونه سازمان‌ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می‌کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامهٔ تأیید صلاحیت به آن‌ها اعطا و بر عملکرد آن‌ها نظارت میکند. ترویج دستگاه بین‌المللی یکاها، واسنجی وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گران‌بها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این سازمان است.

1- International Organization for Standardization
2- International Electrotechnical Commission
3- International Organization of Legal Metrology (Organisation Internationale de Metrologie Legals)
4-Contact point
5- Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد

«فناوری نانو- ارزیابی سمیت و درون‌هضم‌زیستی حالت تعلیقه نانواشیاء ساخته‌شده، با استفاده از جاندار تک‌یاخته *تتراهایمنا* (*Tetrahymena* sp.)»

رئیس:	**سمت و/یا محل اشتغال:**
قاضی‌خوانساری، محمود (دکتری تخصصی سم‌شناسی)	عضو هیئت علمی- دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران
دبیر:	
جوهری، سیّدعلی (دکتری تخصصی تکثیر و پرورش آبزیان)	عضو هیئت علمی- دانشگاه کردستان
اعضا: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)	
اسلامی‌پور، الهه (کارشناسی‌ارشد زیست‌شناسی)	کارشناس- کارگروه استاندارد و ارزیابی محصولات ستاد ویژه توسعه فناوری نانو
رضوی، شبنم (دکتری تخصصی بیوتکنولوژی پزشکی)	عضو هیئت علمی- دانشگاه علوم پزشکی ایران
سهرابی‌جهرمی، ابوذر (دکتری تخصصی نانوفناوری)	رئیس هیئت مدیره- شرکت راصد توسعه فناوری‌های پیشرفته
سوری‌نژاد، ایمان (دکتری تخصصی تکثیر و پرورش آبزیان)	عضو هیئت علمی-دانشگاه هرمزگان
سیفی، مهوش (کارشناسی‌ارشد مدیریت دولتی)	نایب رئیس- کمیته فنی متناظر فناوری نانو ISIRI/TC 229
صادق‌حسنی، صدیقه (دکتری تخصصی شیمی تجزیه - الکتروشیمی)	مدیر تحقیق و توسعه- شرکت آرال تجهیز آزما
قاسمی لله‌وجه‌سری، زهرا (دکتری تخصصی آلودگی محیط‌زیست)	عضو هیئت علمی- دانشگاه هرمزگان
کوهی، محمّدکاظم (دکتری تخصصی سم‌شناسی)	عضو هیئت علمی- دانشگاه تهران

اعضا : (اسامی به ترتیب حروف الفبا)

سمت و/یا محل اشتغال:

منهاج بناء، رابعه
(دکتری تخصصی سم‌شناسی)

کارشناس مسئول- کمیته فناوری نانو- سازمان دامپزشکی کشور

ویراستار:

سیفی، مهوش
(کارشناسی‌ارشد مدیریت دولتی)

نایب رئیس- کمیته فنی متناظر فناوری نانو ISIRI/TC 229

فهرست مندرجات

عنوان **صفحه**

پیش‌گفتار ح
مقدمه ط
۱ هدف و دامنه کاربرد ۱
۲ مراجع الزامی ۱
۳ اصطلاحات و تعاریف ۲
۴ کوته‌نوشت‌ها ۶
۵ مواد ۶
۵-۱ جاندار موردآزمون و محیط کشت ۶
۵-۲ مواد شیمیایی ۷
۶ تجهیزات فنّی ۹
۷ آماده‌سازی و مشخصه‌یابی نانواشیاء ۹
۷-۱ مشخصه‌یابی نانواشیاء ۹
۷-۲ آماده‌سازی پراکنه ۹
۷-۳ مشخصه‌یابی پراکنه ۱۰
۷-۴ آماده‌سازی محیط برای آزمون‌های سمیت ۱۰
۸ کشت گونه‌های *تتراهایمنا* ۱۱
۸-۱ کلیات ۱۱
۸-۲ شرایط کشت *تتراهایمنا* ۱۱
۹ تأثیر نانواشیاء بر گونه‌های *تتراهایمنا* ۱۲
۹-۱ غلظت‌های آزمون ۱۲
۹-۲ مدت زمان ۱۳
۹-۳ مشاهدات ۱۳
۹-۴ شرح تفصیلی شرایط مواجهه ۱۳
۹-۵ ارزیابی سمیت ۱۵
۹-۶ فعالیت ذره‌خواری و درون‌هضم‌زیستی مواد ۱۷
۱۰ تحلیل داده‌ها ۱۷

عنوان	صفحه
۱۱ گزارش آزمون	۱۷
۱۲ صحّه‌گذاری نتایج با کنترل منفی	۱۹
پیوست الف (آگاهی‌دهنده) تغییرات اعمال‌شده در متن استاندارد ملی در مقایسه با منبع	۲۰
کتاب‌نامه	۲۲

پیش‌گفتار

استاندارد «فناوری نانو - ارزیابی سمیت و درون‌هضم‌زیستی حالت تعلیقه نانواشیاء ساخته‌شده، با استفاده از جاندار تک‌یاخته *تتراهایمنا* (*Tetrahymena* sp.)» که پیش‌نویس آن در کمیسیون‌های مربوط بر مبنای پذیرش استانداردهای بین‌المللی/منطقه‌ای به‌عنوان استاندارد ملی ایران به روش اشاره شده در مورد پ، بند ۷، استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ تهیه و تدوین شده، در یکصدوبیست‌وهفتمین اجلاسیه کمیتهٔ ملی استاندارد فناوری نانو مورخ ۱۴۰۱/۱۲/۱۶ تصویب شد. اینک این استاندارد به استناد بند یک مادهٔ ۷ قانون تقویت و توسعه نظام استاندارد، ابلاغ شده در دی ماه ۱۳۹۶، به‌عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.

استانداردهای ملی ایران بر اساس استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ (استانداردهای ملی ایران- ساختار و شیوهٔ نگارش) تدوین می‌شوند. برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت‌های ملی و جهانی در زمینه صنایع، علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران در صورت لزوم تجدیدنظر خواهند شد و هر پیشنهادی که برای اصلاح یا تکمیل این استانداردها ارائه شود، در هنگام تجدیدنظر در کمیسیون فنی مربوط، مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین، باید همواره از آخرین تجدیدنظر استانداردهای ملی ایران استفاده کرد.

این استاندارد ملی بر مبنای پذیرش استاندارد بین‌المللی زیر به روش «ترجمهٔ تغییریافته» تهیه و تدوین شده و شامل ترجمه تخصصی کامل متن آن به زبان فارسی همراه با اعمال تغییرات با توجه به مقتضیات کشور است:

ISO/TS 4988: 2022, Nanotechnologies — Toxicity assessment and bioassimilation of manufactured nano-objects in suspension using the unicellular organism *Tetrahymena* sp.

مقدمه

در سال‌های اخیر، مطالعات زیادی به‌منظور بررسی اثر نانواشیاء ساخته‌شده (MNOs)[1] بر جانداران آبزی و بوم‌سازگان[2] آن‌ها انجام شده‌است. گسترش استفاده از نانواشیاء ساخته‌شده در محصولات مصرفی، می‌تواند منجر به افزایش مواجهه شود که درصورت وجود اثرات نامطلوب، می‌تواند باعث افزایش احتمال تاثیر بر سلامت انسان و محیط‌زیست شود. نانوذرات در محصولات مختلف با کاربردهای گوناگونی استفاده می‌شوند، به‌عنوان مثال در محصولات مختلف خانگی، فرآیندهای صنعتی، ساخت‌وساز، سلامت و تناسب اندام. نانواشیاء ساخته‌شده می‌توانند سرانجام وارد محیط‌زیست شده، به‌عنوان مثال، به لجن فاضلاب متصل شده و در نهایت وارد محیط آبی شوند.

درحال‌حاضر جانداران آبزی مختلفی (از قبیل ماهی، دافنی، آرتمیا و جلبک) برای پیش‌بینی اثرات بالقوه زیان‌آور مواد شیمیایی (شامل نانواشیاء ساخته‌شده) بر محیط‌زیست آبزیان استفاده می‌شوند. تک‌یاختگان[3] تک‌سلولی[4] از جنس *تتراهایمنا* (*Tetrahymena* sp.)، موجودات آب شیرین با توزیع گسترده در محیط‌های آبی هستند و در پایین‌دست زنجیره غذایی بوم‌سازگان‌های آبی قرار دارند. گونه‌های *تتراهایمنا* (فرمانرو تک‌یاختگان[5]، شاخه مژک‌دارن[6]، رده اولیگوهایمنوفورا[7])، یوکاریوت‌های[8] غیربیماری‌زا و دارای زندگی آزاد هستند که در همه‌جای[9] طبیعت پراکندگی داشته و ارتباط مهمی بین حلقه میکروبی بسیار مولّد[10] و نگهدارنده مواد مغذی را با جانداران پُریاخته زنجیره غذایی رایج، تشکیل می‌دهند. این یوکاریوت تک‌سلولی که از بسیاری از سلول‌های پستانداران بزرگتر است (تقریباً ۳۰ میکرومتر تا ۵۰ میکرومتر)، می‌تواند در محیط‌های آب شیرین معتدل یافت شود و «دوشکلی هسته‌ای»[11] (وجود دو نوع هسته در سلول) را نشان می‌دهد. این جانداران دارای یک ماکرونوکلئوس[12] بزرگتر از نوع غیررگه‌زایشی[13] و یک میکرونوکلئوس[14] کوچک و از نوع رگه‌زایشی[15] هستند. گونه‌های *تتراهایمنا* تولیدمثل سریعی دارند، پیچیدگی بالایی را نشان می‌دهند و شبیه به سلول‌های یوکاریوتی معمولی در موجودات چندسلولی[16]، از جمله انسان هستند. علاوه‌بر این، اگرچه *تتراهایمنا* یک جاندار تک‌سلولی است، اما دارای بسیاری از

1- Manufactured Nano-Objects
2- Ecosystem
3- Protozoa
4- Unicellular
5- Protozoa
6- Ciliata
7- Oligohymenophorea
8- Eucaryotes
9- Ubiquitously
10- Productive
11- Nuclear dimorphism
12- Macronucleus
13- Non-germline
14- Micronucleus
15- Germline
16- Multicellular

فرآیندهای هسته‌ای است که در تنوّع گسترده‌ای از یوکاریوت‌ها (از جمله انسان) حفظ شده‌اند و در دیگر مدل‌های تک‌سلولی (مانند مخمرهای *ساکارومایسس سرویزیه*[1]) یافت نمی‌شوند.

جاندار تک‌یاخته *تتراهایمنا* یک مدل تجربی شناخته‌شده در مطالعات زیست‌شناختی است و بیش از شش دهه است که به‌طور گسترده به‌عنوان یک جاندار مدل توکسیکولوژیکی برای آزمودن سمیت مواد مختلف با استفاده از نقاط‌پایانی متعدّد مورداستفاده قرار گرفته است [12]. در طول سالیان گذشته، تلاش قابل‌توجهی به مدل‌سازی محاسباتی سمیت مواد شیمیایی در *تتراهایمنا پیریفورمیس*[2] برای مجموعه داده‌های با اندازه متوسط و بزرگ اختصاص یافته است [27]. این بدان معنی است که داده‌های به‌دست‌آمده از آزمون‌های استانداردشده، بسیار موردنیاز هستند. همچنین در سال‌های اخیر، سنجش زنده‌مانی سلول‌های گونه‌های *تتراهایمنا* به‌عنوان یک آزمون رایج برای تعیین میزان سمیت نانواشیاء ساخته‌شده پیشنهاد شده‌است [24] -[1]. استفاده از گونه‌های *تتراهایمنا* به‌عنوان یک مدل توکسیکولوژیکی زیست‌شناختی برای آبزیان آب‌شیرین و آزمایشات درون‌هضم‌زیستی[3]، دارای چندین مزیت است:

الف- اطلاعات فراوانی در مورد استفاده از گونه‌های *تتراهایمنا* در زیست‌شناسی سلولی، بوم‌شناسی و اکوتوکسیکولوژی و نقش آن در شبکه غذایی میکروبی در دسترس است؛

ب- سلول‌های *تتراهایمنا* به سادگی در تراکم‌های بالا قابل‌کشت هستند؛

پ- گونه‌های *تتراهایمنا* همزمان شاخصه‌های یوکاریوت‌های تک‌سلولی و موجودات کامل را از خود نشان می‌دهند؛

ت- گونه‌های *تتراهایمنا* دارای نقش مهمی به‌عنوان تغذیه‌کنندگان (چراکنندگان)[4] از میکروب‌ها در محیط‌های آبی و ایجاد تعادل در تولید باکتریوپلانکتون‌ها[5] هستند.

ث- گونه‌های *تتراهایمنا* دارای حساسیت قابل‌قبول در مواجهه با بیگانه‌زیست‌های[6] مختلف هستند.

ج- ماکرونوکلئوس برخی از گونه‌های *تتراهایمنا* از نظر ژنتیکی کاملا توالی‌یابی‌شده است و بنابراین مطالعه تغییرات در الگوهای بیان ژن تحت‌تأثیر تنش آلودگی «توکسیکوژنومیکس»[7] در این گونه‌ها تسهیل می‌شود.

چ- *تتراهایمنا* یک بی‌مهره است که اگرچه مشخصه مهره‌داران را ندارد، اما همچنان گزینه مناسبی برای جایگزینی استفاده از حیوانات در مراحل اولیه در آزمون سمیت است.

1- *Saccharomyces cerevisiae*
2- *Tetrahymena pyriformis*
3- Bioassimilation
4- Grazers
5- Bacterioplanktons
6- Xenobiotic
7- Toxicogenomics

ح- *تتراهایمنا* هرچیزی را که به اندازه دهانش باشد می‌خورد؛ این جانداران یک سیستم بسیار توسعه‌یافته برای درونی‌سازی ذرات در مقیاس نانو و میکرو دارند که آن‌ها را به یک سیستم مدل ایده‌آل در تحقیقات سمیت‌نانویی[1] و درونی‌سازی‌سلولی[2] مواد (درون‌هضم‌زیستی) تبدیل می‌کند.

برای اطمینان از توسعه پایدار فناوری نانو، نیاز به شناسایی مخاطره و ارزیابی ریسک نانواشیاء ساخته‌شده وجود دارد. این استاندارد پروتکلی را برای تولید داده‌های قابل‌اطمینان سمیت و درون‌هضم‌زیستی با استفاده از گونه‌های *تتراهایمنا*، به‌منظور ارزشیابی نانواشیاء ساخته‌شده در هرگونه تعلیقه آزمایشی موردنظر یا در نمونه‌های به‌دست‌آمده از بوم‌سازگان‌های آب شیرین ارائه می‌کند.

از آنجا که *تتراهایمنا* در زنجیره‌غذایی آب شیرین در جایگاه اولین مصرف‌کننده قرارگرفته است، به‌عنوان یک حامل بالقوه آلاینده‌های محیط‌زیستی درنظر گرفته می‌شود. ارزیابی فعالیت ذره‌خواری[3] *تتراهایمنا* یک روش مناسب، سریع و مقرون‌به‌صرفه برای بررسی درونی‌سازی سلولی (برداشت و امکان درون‌هضمی) آلاینده‌ها و از جمله ذرات است [4]. این جاندار می‌تواند به‌عنوان یک شاخص اولیه و بسیار حساس برای بررسی اثرات سمی ترکیبات بیگانه‌زیست متنوع و همچنین نشانه‌ای از درونی‌سازی/درون‌هضم‌زیستی آن‌ها عمل کند. اثر نانواشیاء ساخته‌شده بر *تتراهایمنا* می‌تواند ناشی از نانواشیاء بلعیده‌شده (ذرات خورده‌شده) و همچنین از طریق تماس جاندار با این نانواشیاء ساخته‌شده (بدون درونی‌سازی) یا از طریق یون‌های فلزی رهاشده از نانواشیاء حاوی فلز در حالت تعلیقه ایجاد شود. تأثیر مواد بلعیده‌شده (خورده‌شده) از طریق سنجش قابلیت زنده‌مانی سلول (به‌عنوان نقطه پایان اثر) اندازه‌گیری می‌شود. فعالیت ذره‌خواری، درونی‌سازی ذرات توسط سلول‌ها است که در مورد *تتراهایمنا* از طریق شمارش تعداد و بررسی ظاهری واکوئل‌های غذایی قابل‌سنجش است. مشاهده نانواشیاء ساخته‌شده در سلول‌های زنده مواجه‌شده با یک تعلیقه نشان می‌دهد که آن تعلیقه حاوی نانواشیائی بوده است که توانسته‌اند توسط سلول‌های زنده درونی‌سازی شوند. این موضوع را می‌توان به‌عنوان ویژگی اهمیت زیستی یک تعلیقه حاوی نانواشیاء ساخته‌شده درنظر گرفت. «اهمیت زیست‌شناختی» در این مورد به این معنی است که مواد می‌توانند توسط سلول‌ها درونی‌سازی شوند. درصورت قرارگرفتن در مواجهه با نانواشیاء ساخته‌شده، تعداد و ظاهر واکوئل‌های غذایی نیز می‌تواند به‌عنوان معیاری برای اثبات وجود ذرات با اندازه مشخص در یک تعلیقه (که این ذرات متناسب با اندازه دهان *تتراهایمنا* هستند) استفاده شود. این موضوع می‌تواند به‌عنوان یک نشانه زیستی در مواجهه استفاده شود و به موازات آن می‌توان اثرات مواد بلعیده‌شده را مطالعه کرد. *تتراهایمنا* هم دارای ویژگی‌های سلول‌های منفرد یوکاریوتی و هم موجودات کامل است. چندین مطالعه، پتانسیل گونه‌های *تتراهایمنا* را به‌عنوان مدل‌هایی در ارزیابی توکسیکولوژیکی برون‌تنی[4] آلاینده‌های شیمیایی با استفاده از نقاط‌پایانی مختلف برجسته کرده‌اند. آزمایشی مبتنی بر *تتراهایمنا* در سال ۲۰۰۷، «آزمون حلقه»[5]، توسط «آژانس

1- Nanotoxicity
2- Cellular Internalization
3- Phagocytic
4- *in vitro*
5- Ring Test

فدرال محیط‌زیست آلمان»[1] برای ارزیابی ریسک بوم‌شناختی آغاز شده‌است [35] و نیز توسط سازمان همکاری اقتصادی و توسعه (OECD)[2] برای لجن فعال بیشتر توضیح داده شده‌است [28]. اگرچه، گروه‌کاری سازمان همکاری اقتصادی و توسعه در زمینه نانومواد ساخته‌شده[3] به‌تازگی قابلیت استفاده از رهنمودهای آزمایشی مختلف خود در مورد جانداران مدل تجربی سنتی را برای آزمایش بر روی نانواشیاء ساخته‌شده بررسی کرده‌است (به مرجع [31] مراجعه شود)، مرجع [31] به هیچ روشی که از *تتراهایمنا* استفاده شده باشد، اشاره نکرده است. همانطور که قبلا ذکر شد، بررسی فعالیت ذره‌خواری *تتراهایمنا*، یک نقطه‌پایانی فیزیولوژیکی مقرون‌به‌صرفه است که می‌تواند به‌عنوان یک شاخص اولیه و بسیار حساس برای مطالعه اثر سمی ترکیبات بیگانه‌زیست متنوع و همچنین نشانه‌ای از درونی‌سازی یا درون‌هضم‌زیستی بیگانه‌زیست‌ها عمل کند. در رابطه با مواجهه با نانواشیاء ساخته‌شده، این نقطه‌پایانی همچنین می‌تواند به‌عنوان معیاری برای مواجهه با نانواشیاء در هر تعلیقه‌ای از نانواشیاء ساخته‌شده که درونی‌سازی سلولی آن‌ها موردنظر است، عمل کند.

یادآوری- آزمون حلقه که به نام‌های «آزمون مهارت»[4] و «مقایسات بین‌آزمایشگاهی»[5] نیز نامیده می‌شود، بخشی از یک برنامه تضمین کیفیت[6] برای سنجش دقت و کارایی یک روش اندازه‌گیری و یا روش انجام آزمونی خاص است. معمولا یک مؤسسه مرجع نمونه‌های مشابهی را که باید برای پارامترهایی خاص و یا طبق روشی خاص آنالیز شوند به آزمایشگاه‌های مختلف ارسال می‌کند. به این آزمایشگاه‌های صنعتی، پزشکی و یا پژوهشی، مهلت زمانی محدودی برای ارسال نتایج و تحلیل داده می‌شود. ارزیابی آماری و تفسیر نتایج ارسال‌شده توسط آزمایشگاه‌های مختلف، نه‌تنها کمک بزرگی برای خود آزمایشگاه‌های شرکت‌کننده است، زیرا امکان ارزیابی کیفیت آنالیز آن‌ها را در مقایسه با آزمایشگاه‌های دیگر فراهم می‌کند، بلکه به شناسایی نقاط ضعف و قوّت روش اندازه‌گیری و یا روش انجام آزمون خاص کمک می‌کند.

1- German Federal Environmental Agency
2- Organisation for Economic Cooperation and Development
3- OECD’s working party on manufactured nanomaterials
4- Proficiency Test
5- Interlaboratory Test
6- Quality assurance

«فناوری نانو – ارزیابی سمیت و درون‌هضم‌زیستی حالت تعلیقه نانواشیاء ساخته‌شده، با استفاده از جاندار تک‌یاخته *تتراهایمنا* (*Tetrahymena* sp.)»

۱ هدف و دامنهٔ کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد، ارائه یک روش قابل‌اطمینان و تکرارپذیر برای ارزیابی همزمان مواجهه و سمیت نانواشیاء ساخته‌شده با استفاده از *تتراهایمنا* است. مواد بلعیده‌شده و درونی‌سازی‌شده (نانواشیاء) نشان‌دهنده مواجهه از طریق آب است.

این استاندارد برای تمام مراکزی که بر روی نانو(اکو)توکسیستی[1] نانواشیاء ساخته‌شده کار می‌کنند و قادر به کشت گونه‌های *تتراهایمنا* هستند، قابل‌کاربرد است. این استاندارد از *تتراهایمنا* برای ارزیابی مواجهه و اثرات نانواشیاء ساخته‌شده استفاده می‌کند. همچنین، این استاندارد می‌تواند توسط مراکز (آزمایشگاه‌های) علاقمند به بررسی برهم‌کنش زیست‌شاختی نانواشیاء ساخته‌شده با سلول‌های زنده، مورد استفاده قرار گیرد.

این استاندارد برای نانواشیائی همچون نانوذرات، نانوالیاف با اندازه مشخص (در محدوده اندازه میکرومتری)، نانوصفحات و همچنین انبوهه‌ها و کلوخه‌های آن‌ها کاربرد دارد.

۲ مراجع الزامی

در مراجع زیر ضوابطی وجود دارد که در متن این استاندارد به‌صورت الزامی به آن‌ها ارجاع داده شده‌است. بدین‌ترتیب، آن ضوابط جزئی از این استاندارد محسوب می‌شوند.

درصورتی‌که به مرجعی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده شده باشد، اصلاحیه‌ها و تجدیدنظرهای بعدی آن برای این استاندارد الزام‌آور نیست. در مورد مراجعی که بدون ذکر تاریخ انتشار به آن‌ها ارجاع داده شده‌است، همواره آخرین تجدیدنظر و اصلاحیه‌های بعدی برای این استاندارد الزام‌آور است.

استفاده از مرجع زیر برای کاربرد این استاندارد الزامی است:

[1] ISO 80004 (all parts), Nanotechnologies – Vocabulary – Part 1: Core terms

یادآوری: مجموعه استانداردهای ملی ایران- ایزو شماره ۸۰۰۰۴ و ۱۸۳۹۲ فناوری نانو، واژه‌نامه با استفاده از برخی قسمت‌های مجموعه استاندارد ISO80004 تدوین شده است.

1- Nano(eco)toxicity

۳ اصطلاحات و تعاریف

علاوه بر اصطلاحات و تعاریف ارائه‌شده در استاندارد ISO 80004 (all parts) اصطلاحات و تعاریف زیر نیز به‌کار می‌رود[۱]:

۳-۱

کلوخه

agglomerate

مجموعه‌ای از ذرات که به شکلی ضعیف یا نسبتا قوی به یکدیگر متصل شده‌اند، به‌طوری‌که مساحت سطح خارجی منتجه آن‌ها مشابه مجموع مساحت سطوح تک تک اجزای تشکیل‌دهنده باشد.

یادآوری ۱- نیروهایی که کلوخه را نزدیک به یکدیگر نگه‌می‌دارد نیروهای ضعیفی هستند، مثلا نیروهای واندروالانس یا درهم‌تافتگی‌های فیزیکی ساده.

یادآوری ۲- کلوخه‌ها به‌عنوان ذرات ثانویه نیز درنظر گرفته می‌شوند و ذرات اصلی منشاء، ذرات نوع اول نامیده می‌شوند.

[منبع: زیربند ۳-۴ استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۲-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵]

۳-۲

انبوهه

aggregate

مجموعه‌ای از *ذرات* (زیربند ۳-۷) با پیوندهای قوی یا جوش‌خورده که مساحت سطح خارجی منتجه آن‌ها به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای کم‌تر از مجموع مساحت سطوح تک تک اجزای تشکیل‌دهنده باشد.

یادآوری ۱- نیروهایی که انبوهه را کنار یکدیگر نگه‌می‌دارد، نیروهای قوی هستند، مثلا پیوندهای کووالانسی یا یونی و یا نتیجه جوش‌خوردن و گره‌خوردگی فیزیکی پیچیده، یا درغیراین‌صورت، ذرات اولیه به‌هم چسبیده قبلی.

یادآوری ۲- انبوهه‌ها به‌عنوان ذرات ثانویه نیز درنظر گرفته می‌شوند و ذرات اصلی منشاء، ذرات اولیه نامیده می‌شوند.

[منبع: زیربند ۳-۵ استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۲-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵]

۱- اصطلاحات و تعاریف به‌کاررفته در استانداردهای ISO و IEC، در وبگاه‌های https://www.iso.org/obp و http://www.electropedia.org/ قابل-دسترس است.

۳-۳

تعلیقه ذخیره

stock suspension

تعلیقه‌ای غلیظ که برای تهیه تعلیقه‌های با غلظت‌های پایین‌تر در زمان انجام آزمون، رقیق‌سازی می‌شود.

[منبع: زیربند ۳-۷ استاندارد ملی ایران شماره ۲۲۸۵۲: سال ۱۳۹۹]

۴-۳

نانومقیاس

nanoscale

گستره اندازه بین تقریبا یک نانومتر تا صد نانومتر است.

یادآوری – خواصی که از اندازه‌های بزرگتر برون‌یابی نمی‌شوند غالبا در این گستره اندازه نشان داده می‌شوند.

[منبع: زیربند ۲-۱ استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۱-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵]

۵-۳

نانوشیء

nano-object

هر قطعه مجزا از یک ماده با یک، دو یا سه بُعد خارجی در نانومقیاس است.

یادآوری – ابعاد خارجی بُعد دوم و سوم عمود بر بُعد اول و همچنین عمود بر یکدیگر هستند.

[منبع: زیربند ۲-۲ استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۱-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵]

۶-۳

نانوذره

nanoparticle

نانوشیئی با تمام ابعاد خارجی در مقیاس نانو که در آن طول بلندترین و کوتاه‌ترین محورهای نانوشیء به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای با یکدیگر تفاوت نداشته باشد.

یادآوری – چنانچه ابعاد به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای با یکدیگر تفاوت داشته‌باشند (معمولا بیش‌تر از سه برابر)، ممکن است اصطلاحاتی همچون نانولیف یا نانوصفحه بر نانوذره ترجیح داده‌شود.

[منبع: زیربند ۴-۴ استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۲-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵]

۳-۷

ذره

particle

قطعه کوچکی از ماده که با مرزهای فیزیکی معین است.

یادآوری ۱- مرز فیزیکی را می‌توان به عنوان سطح مشترک نیز توصیف کرد.

یادآوری ۲- ذره می‌تواند به عنوان یک واحد جابه‌جا شود.

یادآوری ۳- این تعریف کلی از ذره، برای نانواشیاء کاربرد دارد.

[منبع: بند ۳-۱ استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۲-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵]

۳-۸

نانولیف

nanofibre

نانوشیئی با دو بُعد خارجی در مقیاس نانو و بُعد سوم که به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای بزرگ‌تر است.

یادآوری ۱- بزرگ‌ترین بُعد خارجی لزوما در مقیاس نانو نیست.

یادآوری ۲- واژگان نانولیفچه[1] و نانورشته[2] نیز می‌توانند استفاده شوند.

یادآوری ۳- به یادآوری ۱ در تعریف نانوذره مراجعه شود.

[منبع: زیربند ۴-۵ استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۲-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵]

۳-۹

نانوصفحه

nanoplate

نانوشیئی با یک بُعد خارجی در مقیاس نانو و دو بُعد خارجی دیگر که به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای بزرگترند.

یادآوری - ابعاد خارجی بزرگتر لزوما در مقیاس نانو نیستند.

[منبع: زیربند ۴-۶ استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۲-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵]

1- Nanofibril
2- Nanofilament

۳-۱۰

نمونه

sample

یک یا چند قلم نمونه‌برداری‌شده برای ارائه اطلاعات درباره یک جمعیت یا یک ماده است.

۳-۱۱

نقطه‌پایانی

endpoint

هر نوع پارامتر ثبت‌شده در یک مطالعه انجام‌شده به‌منظور تعیین مخاطرات مرتبط با یک ماده است.

یادآوری – نقاط پایانی در مطالعات سمیت شامل پارامترهای اندازه‌گیری‌شده در سطوح مختلف پیچیدگی‌زیست‌شناختی هستند (مرگ‌ومیر، رفتار، وضعیت تولید مثل، تغییرات فیزیولوژیکی (کاراندام‌شناختی)، زیست‌شیمیایی و غیره).

۳-۱۲

غلظت موثر میانه

median effective concentration

غلظتی که براساس معیار موردنظر در آزمون، بر پنجاه درصد از جانداران موردبررسی تاثیر داشته باشد.

یادآوری– این غلظت اختصارا به‌صورت EC_{50} نوشته می‌شود.

[منبع: زیربند ۳-۳، استاندارد ملی ایران شماره ۱۸۰۷۸: سال ۱۳۹۱، تغییریافته- یادآوری ۱ حذف و یاد آوری دیگری اضافه شده‌است]

۳-۱۳

غلظت ایجادکننده ۵۰ درصد اختلال در رشد

50 % impairment growth concentration

غلظتی از یک ماده که رشد جمعیت موردآزمون (به‌عنوان مثال، گونه‌های *تتراهایمنا*) را در طی یک دوره مشخص (به‌عنوان مثال برای گونه‌های *تتراهایمنا* در ۲۴ ساعت)، به میزان ۵۰ درصد متوقف می‌کند.

۳-۱۴

درون‌هضم‌زیستی

bioassimilation

جذب[1] یا برجذب[2] و هضم غذا یا مواد مغذی توسط یک موجود زنده و حالت یا شرایط جذب‌شدن یا برجذب‌شدن آن‌ها در موجود زنده است.

۴ کوته‌نوشت‌ها

ATP	Adenosine triphosphate	آدنوزین تری فسفات
CCD	Charge-coupled device	افزاره بارجفت‌شده
DDW	Double distilled water	آب دوبار تقطیر
DLS	Dynamic light scattering	پراکندگی پویای نوری
EC_{50}	Median effective concentration	غلظت موثر میانه
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	اتیلن‌دی‌آمین‌تترااستیک اسید
IGC_{50}	50 % impairment growth concentration	غلظت ایجادکننده ۵۰ درصد اختلال در رشد
LDH	Lactate dehydrogenase	لاکتات دهیدروژناز
MIAN	Minimal information about nanomaterials	کمینه اطلاعات در مورد نانومواد
MNO	Manufactured nano-object	نانواشیاء ساخته‌شده
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide	۳-(۴و۵-دی‌متیل‌تیازول-۲-yl)-۲و۵-دی‌فنیل-۲H-تترازولیوم بروماید
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) + hydrogen (H)	نیکوتین‌آمید آدنین دی‌نوکلئوتید (NAD) + هیدورژن (H)
PCC	Physicochemical characterization	مشخصه‌یابی فیزیکوشیمیایی
SEM	Scanning electron microscope	میکروسکوپ الکترونی روبشی
TEM	Transmission electron microscope	میکروسکوپ الکترونی عبوری
AAS	Atomic absorption spectroscopy	طیف‌سنجی جذب اتمی
ICP-MS	Inductively coupled plasma mass spectrometry	طیف‌سنجی جرمی پلاسمای جفت‌شده القایی

۵ مواد

۵-۱ جاندار موردآزمون و محیط کشت

تتراهایمنا یکی از جنس‌های مژک‌داران دارای زندگی آزاد است که در حوضچه‌های آب‌شیرین یافت می‌شود و در پژوهش‌های زیست‌پزشکی به‌عنوان جاندار مدل مورد استفاده قرار می‌گیرد. گونه‌های مختلفی از *تتراهایمنا*،

1- Adsorption
2- Absorption

همچون *تتراهایمنا ترموفیلا*[1] و *تتراهایمنا پیریفورمیس* وجود دارند که در پژوهش‌های زیست‌پزشکی به‌عنوان جاندار مدل استفاده می‌شوند. گونه‌های مختلف پاسخ متنوعی نسبت به انواع گوناگون مواد سمی نشان می‌دهند که این تفاوت‌ها ناشی از اختلاف در فرآیندهای جذب و سوخت‌وساز (متابولیسم)[2] آن‌ها است. گونه *تتراهایمنا ترموفیلا* متداول‌ترین گونه است که به‌طور معمول در آزمون‌های سمیت مورد استفاده قرار می‌گیرد. این ریزجاندار گلابی‌شکل آب شیرین (با ابعاد ۳۰ میکرومتر در ۵۰ میکرومتر) به سادگی در تراکم‌های بالا در آزمایشگاه رشد می‌کند.

کشت‌های آکسنیک[3] گونه *تتراهایمنا ترموفیلا* همچون کیت‌های Protoxkit FTM (شرکت MicroBioTests)[4] به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی در دمای ۳۲ درجه سلسیوس در یک محیط نیمه‌تعریف‌شده مبتنی بر پروتئوز-پپتون که یک محیط غنی از مواد مغذی است رشد می‌کنند [19] (اطلاعات تفصیلی در زیربند ۸-۲ ارائه شده‌است). تراکم سلولی به‌دست‌آمده در این شرایط کشت، تقریبا برابر 10^5 سلول در میلی‌لیتر است. پس از آن، سلول‌ها طبق روش توصیف‌شده توسط شولتز[5] (۱۹۹۷) [19] در محیطی فقیر از مواد مغذّی کشت و نگهداری می‌شوند. تمام آزمایش‌ها در «کشت‌های دسته‌ای»[6] به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر در ارلن انجام شده و از طریق تکان‌دادن (۹۰ دور در دقیقه) در تاریکی هوادهی می‌شوند.

یادآوری – منظور از آکسنیک، کشتی است که عاری از تمام موجودات زنده، به‌غیر از گونه هدف (در اینجا، *تتراهایمنا*) است.

۵-۲ مواد شیمیایی

۵-۲-۱ مواد شیمیایی عمومی

- پتاسیم دی‌کرومات ($K_2Cr_2O_7$)؛
- هیدروژن پراکسید (H_2O_2)؛
- آب یون‌زدایی‌شده[7]؛
- آب دوبار تقطیر.

یادآوری ۱– آب یون‌زدایی‌شده، آبی است که از دستگاه‌های آزمایشگاهی یون‌زدایی آب که املاح آب را از طریق فیلتراسیون شیمیایی و روش اسمز معکوس[8] حذف می‌کنند، به‌دست می‌آید. همچنین برخی از مدل‌های این دستگاه‌ها مجهز به لامپ فرابنفش

1- *Tetrahymena thermophila*
2- Metabolism
3- Axenic
۴- کیت‌های Protoxkit FTM (شرکت MicroBioTests) نمونه‌ای است از یک محصول تجاری مناسب و در دسترس. این اطلاعات برای راحتی کاربران این استاندارد ارائه شده‌است و به منزله تأیید این محصول توسط سازمان ملی استاندارد ایران نیست.
5- Schultz
6- Batch cultures
7- Milli-Q water
8- Reverse osmosis

هستند که میکروب‌های داخل آب را نیز از بین می‌برند. امروزه علاوه‌بر مدل‌های وارداتی، انواع دستگاه‌های تولید آب خالص[1] و آب فوق‌خالص[2] ساخت ایران نیز در بازار موجود است.

یادآوری ۲- آب مقطر، آبی است که از طریق تبخیر و میعان مجدد آب املاح آن گرفته شده‌است. چنانچه این فرآیند دوبار تکرار شود، آب دوبار تقطیر به‌دست می‌آید.

۵-۲-۲ مواد شیمیایی تکمیلی برای محیط مغذی

- پروتئوز-پپتون (پپتون باکتریولوژی)؛
- دی-گلوکز ($C_6H_{12}O_6$)؛
- عصاره مخمر (مخصوص میکروبیولوژی)؛
- تریزما-باز®[3و4] (باز تریس هیدروکسی‌متیل آمینومتان، $(HOCH_2)_3CNH_2$)؛
- کلسیم کلرید دو آبه ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)؛
- مس (II) کلرید دو آبه ($CuCl_2 \cdot 2H_2O$)؛
- آهن کلرید (III) شش آبه ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)؛
- منیزیم سولفات هفت آبه ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)؛
- آمونیم آهن سولفات شش آبه ($Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$)؛
- منیزیم کلرید شش آبه ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)؛
- روی کلرید ($ZnCl_2$)؛
- EDTA؛
- محلول آبی ۳۷ درصد هیدروژن کلرید (HCl)؛
- کیت تکثیر سلولی I (MTT)[5]؛
- کیت سنجش زیست‌درخشایی[6] ATP؛
- تریپان بلو.

1- Pure water
2- Ultrapure water
3- Trizma-base ®

۴- «تریزما-باز» نمونه‌ای از یک محصول تجاری مناسب و در دسترس است. این اطلاعات برای راحتی کاربران این استاندارد ارائه شده‌است و به منزله تأیید این محصول توسط سازمان ملی استاندارد ایران نیست.

۵- کیت «تکثیر سلولی I» نمونه‌ای از یک محصول تجاری مناسب و در دسترس است. این اطلاعات برای راحتی کاربران این استاندارد ارائه شده‌است و به‌منزله تأیید این محصول توسط سازمان ملی استاندارد ایران نیست.

6- Bioluminescent

۶ تجهیزات فنّی

۶-۱ دستگاه مناسب کنترل دما (همچون گرم‌خانه آزمایشگاهی[1])؛

۶-۲ میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین تصویربرداری؛

۶-۳ مرکزگریزانه[2] (سانتریفیوژ)؛

۶-۴ پیپت؛

۶-۵ آون آزمایشگاهی؛

۶-۶ اتوکلاو؛

۶-۷ امواج‌ده‌صوتی[3] (افزاره فراصوت)؛

۶-۸ همزن صفحه‌ای؛

۶-۹ طیف‌نورسنج[4].

۷ آماده‌سازی و مشخصه‌یابی نانواشیاء

۷-۱ مشخصه‌یابی نانواشیاء

مشخصه‌های کامل فیزیکی-شیمیایی نانواشیاء موردآزمون (مانند: شکل، خلوص و اندازه) باید مطابق استاندارد ISO/TR 13014 تعیین شود. ریخت‌شناسی ذرات نانواشیاء موردآزمون باید با استفاده از TEM یا SEM تعیین شود.

۷-۲ آماده‌سازی پراکنه

آماده‌سازی پراکنه نانواشیاء ساخته‌شده باید به‌خوبی مستند شود و از آنجا که این مرحله از آزمون بر روی مواد موردآزمون تأثیر می‌گذارد، ترجیحا باید از طریق یک روش عملیاتی استاندارد انجام شود. پراکنده‌سازی اغلب طی دو مرحله انجام می‌شود، ابتدا یک تعلیقه ذخیره تهیه می‌شود و سپس مقدار کمی از آن در زمان شروع آزمایش رقیق می‌شود. پراکنده‌سازی نانواشیاء ساخته‌شده داخل تعلیقه ذخیره را (بسته به نوع MNOs) می‌توان با حداقل ۱۵ دقیقه هم‌زدن یا امواج‌دهی‌صوتی[5] با استفاده از افزاره فراصوت انجام داد. تعلیقه‌های ذخیره ابتدا

1- Incubator
2- Centrifuge
3- Sonicator
4- Spectrophotometer
5- Sonication

باید وُرتکس[1] شوند و سپس حداقل به مدت ۱۵ دقیقه (بسته به نوع MNOs) با استفاده از افزاره فراصوت برای زمان مناسب امواج‌دهی‌صوتی شوند. امواج‌دهی‌صوتی باید به‌گونه‌ای انجام شود که هیچ ماده جدید دیگری تولید نشود و تاثیر امواج‌دهی‌صوتی برای هر ماده باید ارزشیابی شود. باید از مرجع [32] پیروی شود و یا از فهرستی استفاده شود که توسط MIAN توصیه گردیده و برای نشان دادن کیفیت و کمیت مشخصه‌یابی فیزیکوشیمیایی انجام شده برای آن نانومواد طراحی شده است [25].

۷-۳ مشخصه‌یابی پراکنه

پیش از هر آزمون سمیت، تعلیقه‌های ذخیره باید وُرتکس شوند و سپس با استفاده از افزاره فراصوت حداقل به مدت ۱۵ دقیقه (بسته به نوع MNOs) امواج‌دهی‌صوتی شوند و در محیط کشت سلولی متناظر تا غلظت نهایی رقیق شوند. تعلیقه‌ها باید با استفاده از TEM، DLS و اندازه‌گیری‌های پتانسیل زتا (ζ) مشخصه‌یابی شوند. آماده‌سازی آزمونه‌ها برای آنالیز TEM را می‌توان با خشک‌کردن تعلیقه آبی محتوی نانواشیاء ساخته‌شده، در دمای اتاق و بر روی یک فویل کربن شفاف که خود بر روی یک شبکه (گرید) مسی (یا هر شبکه مناسب دیگری) سوار شده‌است انجام داد. وضعیت پراکندگی نانواشیاء را می‌توان با روش DLS، همان‌طور که در استاندارد ISO 22412 توضیح داده شده‌است، یا دیگر روش‌های مناسب، مانند طیف‌سنجی تضعیف فراصوتی[2]، همان‌طور که در استاندارد ISO 20998-1 توضیح داده شده‌است، مشخص کرد. همچنین غلظت نانواشیاء در تعلیقه ذخیره باید با استفاده از روش مناسب ارزشیابی شود. در مورد نانواشیائی که تمایل به رهاسازی یون‌ها دارند، انحلال باید با روش مناسب ارزیابی شود. به‌عنوان مثال، در مورد نانواشیاء فلزی، می‌توان از AAS یا ICP-MS استفاده کرد. توزیع اندازه پراکنش نانواشیاء ساخته‌شده و پایداری آن در طول زمان باید پیش و پس از مواجهه مشخصه‌یابی شود. تا آنجا که ممکن است، مشخصه‌های نانواشیاء ساخته‌شده و نانواشیاء در تعلیقه باید براساس کمینه اطلاعات استاندارد در مورد مشخصه‌یابی نانواشیاء به دنبال توصیفگرهای فیزیکوشیمیایی «ثبت نانومواد»[3] (MIANs' PCC) ارزشیابی شوند [16-25].

۷-۴ آماده‌سازی محیط برای آزمون‌های سمیت

تمام محیط‌های مواجهه باید به‌صورت تازه از محلول‌های ذخیره ساخته شوند (به زیربند ۸-۲-۲ مراجعه شود). حجم‌های مناسب از محلول‌های ذخیره که به‌خوبی مخلوط (همگن) شده‌اند باید به‌صورت مستقیم به آب یون‌زدایی‌شده (به استتاندارد ISO 3696 مراجعه شود) اضافه شوند و برای دستیابی به غلظت‌های مرتبط با نانواشیاء در محیط‌های مواجهه، نانواشیاء پراکنش‌یافته نیز به آن اضافه می‌شود.

1- Vortex
2- Ultrasonic Attenuation Spectroscopy
3- Nanomaterial Registry

۸ کشت گونه‌های *تتراهایمنا*

۸-۱ کلیات

تتراهایمنا اولین سلول یوکاریوتی جانورمانندی بود که به‌صورت آکسنیک رشد کرد (کشتی که در آن فقط یک گونه وجود دارد) و تا زمانی که نیازهای اولیه آن از نظر تغذیه، هوادهی، دما و تراکم سلولی فراهم باشد، می‌توان به سادگی با استفاده از انواع گوناگونی از محیط‌های کشت، ظروف و شرایط محیطی آن را کشت داد. توجه به این نکته مهم است که، صرف‌نظر از روش کشت به‌کاررفته، برای حفظ زنده‌مانی سلول‌ها، ضروری است که در هنگام برداشت یا دستکاری آن‌ها، دقت لازم انجام شود. سلول‌های *تتراهایمنا*، بسیار بیشتر از باکتری‌ها و مخمّرها، به‌شدّت به تغییرات هوادهی، تراکم سلولی و فشار ناشی از نیروی مرکزگریز، حساس هستند.

۸-۲ شرایط کشت *تتراهایمنا*

۸-۲-۱ شرایط رشد *تتراهایمنا*

کشت‌های آکسنیک گونه‌های *تتراهایمنا* باید به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و دمای ۳۲ درجه سلسیوس در یک محیط غذایی غنی که محتوی مواد زیر است، رشد داده‌شوند:

- ۵ گرم دی‌گلوکز؛
- ۸ گرم پروتئوز-پپتون؛
- ۱ گرم عصاره مخمّر؛
- ۱٫۲ گرم تریزما باز®؛
- کلریدها (۲٫۲۸ میکرومول $CaCl_2.2H_2O$، ۰٫۲۹ میکرومول $CuCl_2.2H_2O$، ۰٫۰۵ میکرومول $FeCl_3.6H_2O$، ۰٫۰۳ میکرومول $MnCl_2.6H_2O$ و ۰٫۰۰۴ میکرومول $ZnCl_2$)؛
- سولفات‌ها (۴٫۱ میکرومول $MgSO_4.7H_2O$ و ۰٫۶۴ میکرومول $(Fe(NH_4)_2(SO_4)_2.6H_2O$)؛
- تا ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر؛
- تنظیم pH به میزان ۷٫۳۵ با استفاده از HCl.

بعد از ۲۴ ساعت، تراکم سلولی در این شرایط کشت باید تقریبا 10^5 سلول در میلی‌لیتر باشد.

یادآوری ۱- گونه‌های *تتراهایمنای* کشت‌داده‌شده را می‌توان تا یک هفته برای تلقیح (به میزان ۵ درصد) استفاده کرد.

یادآوری ۲- نگهداری گونه *تتراهایمنا ترموفیلا* سخت است، چرا که به‌صورت منجمد زنده نمی‌ماند. بنابراین ضروری است که هر یک تا دوهفته یک‌بار از کشت‌های اصلی، مجددا کشت[1] داده شود.

1- Subcultured

۸-۲-۲ شرایط *تتراهایمنا* طی مواجهه

براساس روشی که در منبع [19] توضیح داده شده‌است، سلول‌ها در یک محیط غذایی فقیر (NPM)[1] که محتوی مواد زیر است نگهداری می‌شوند:

- ۵ گرم دی‌گلوکز؛
- ۱٫۲ گرم تریزما باز®؛
- ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر؛
- تنظیم pH به میزان ۷٫۴ با استفاده از HCl؛
- دمای ۳۲ درجه سلسیوس برای تمام دوره آزمایش.

۹ تأثیر نانواشیاء بر گونه‌های *تتراهایمنا*

۹-۱ غلظت‌های آزمون

۹-۱-۱ آزمون محدوده‌یابی

چنانچه میزان سمیت نانواشیاء ساخته‌شده موردآزمون شناخته‌شده نیست، ضروری است یک آزمون محدوده‌یابی انجام شود تا محدوده غلظتی که باید در آزمون اصلی استفاده شود را مشخص کند. برای آزمون محدوده‌یابی، باید گونه‌های *تتراهایمنا* در مواجهه با مجموعه‌ای از غلظت‌ها از ماده شیمیایی (مثلا ۰٫۰۱ mg/L، ۰٫۱ mg/L، ۱ mg/L، ۱۰ mg/L و ۱۰۰ mg/L) مورد آزمون قرار داده شوند. *تتراهایمنا* با تراکم $۱۰^۵$ سلول در میلی‌لیتر باید به مدّت ۲۴ ساعت در مواجهه با هریک از غلظت‌های نانواشیاء ساخته‌شده قرارگیرد. چنانچه بتوان در زمان کوتاه‌تری به داده‌های موردنیاز برای محدوده‌یابی دست‌یافت، زمان مواجهه می‌تواند کوتاه‌تر شود. سه تکرار نیاز است و غلظت‌های اسمی ماده شیمیایی قابل‌قبول هستند.

۹-۱-۲ آزمون اصلی

هدف از آزمون اصلی، تعیین منحنی‌های غلظت-پاسخ و مقادیر EC_{50} h ۲۴ است.

مجموعه رقت‌های موردآزمون، محدوده غلظتی را شامل می‌شود که کمترین آن، در آزمون تعیین محدوده اثر ۱۰ درصد تأثیر داشته و بالاترین آن، در آزمون تعیین محدوده اثر، کمتر از ۱۰۰ درصد تأثیر داشته‌است.

تتراهایمنا باید در مواجهه با پنج یا تعداد بیشتری از غلظت‌های نانواشیاء ساخته‌شده قرار داده شود که این غلظت‌ها باید در مجموعه‌های هندسی[2] با نسبت ۱٫۵ تا ۲٫۰ انتخاب شده‌باشند (مثلا ۲ mg/L، ۴ mg/L، ۸ mg/L، ۱۶ mg/L، ۳۲ mg/L و ۶۴ mg/L). تراکم‌های یکسان از *تتراهایمنا* باید در سه یا تعداد تکرار بیشتری قرار

1- Nutrient Poor Medium
2- Geometric series

داده شوند. چنانچه باید از حلّال‌ها، عوامل حل‌کننده یا امولسیون‌کننده‌ها استفاده شود، این مواد نباید اثر هم‌افزایی[1] یا هم‌ستیزانه[2] بر آزمون سمیت داشته باشند (همچنین اثر این مواد باید در نمونه‌های گروه کنترل بدون نانواشیاء ساخته‌شده به‌کار رود).

غلظت حلّال نباید از ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر فراتر رود.

مدت زمان آزمون ۲۴ ساعت است. چنانچه بیش از ۱۰ درصد جانداران گروه کنترل در طی دوره ۲۴ ساعته بمیرند، آزمون غیرقابل‌قبول است. هر یک از محفظه‌های آزمون باید ۲۴ ساعت پس از شروع آزمون از نظر سلول‌های مرده بررسی شوند. منحنی‌های غلظت-پاسخ و مقادیر EC_{50} h ۲۴ یا EC_{50} h ۴۸ مربوط به سلول‌های مرده باید با حدود اطمینان ٪ ۹۵ تعیین شوند.

این آزمون در پلیت‌های ۹۶ خانه از جنس پُلی‌استایرن و یا هر ظرف آزمون مناسب دیگر قابل‌انجام است.

۹-۲ مدت‌زمان

تاثیر نانواشیاء ساخته‌شده بر تتراهایمنا و نیز واکنش این جاندار نسبت به نانواشیاء ساخته‌شده مستقیما تحت‌تأثیر مدت زمان مواجهه قرار دارد. به‌ور معمول، در ساعات ابتدایی مواجهه، سلول‌ها تحت شرایط تنش هستند ولی بعد از حدود یک روز (تقریبا ۲۴ ساعت) می‌توانند خود را با نانواشیاء ساخته‌شده سازگار کنند. مناسب‌ترین مدت زمان مواجهه، ۲۴ ساعت است.

۹-۳ مشاهدات

هنگامی که پویایی یک فرآیند مطالعه می‌شود، برای هر آزمون می‌توان هر ۲ ساعت یک بار نمونه‌برداری انجام داد. همچنین هرگونه رفتار یا ظاهر غیرمعمول باید گزارش شود. اگرچه امکان پایش پارامترهای گوناگونی که می‌توانند برهم‌کنش‌ها یا سازوکارهای سازگاری *تتراهایمنا* با نانواشیاء ساخته‌شده را توضیح دهند، وجود دارد (مانند: ذرّه‌خواری، شکل یا رفتار سلول‌ها)، اما این واقعاً بخش اصلی سنجش مهار رشد نیست. همچنین تشکیل سیست نیز می‌تواند نوعی پاسخ سلول‌ها به شرایط نامطلوب باشد (اما این اتفاق چندان قابل توجه نیست).

۹-۴ شرح تفصیلی شرایط مواجهه

از آنجا که آلودگی می‌تواند به سرعت رخ دهد، تمام روش‌های اجرایی باید با استفاده از روش‌ها و شرایط ضدعفونی‌شده انجام شوند (مثلا استفاده از هود لامینار). گرم‌خانه‌گذاری در طی مدت مواجهه باید در تاریکی انجام شود، مگر هنگامی که هدف ارزیابی اثرات مرتبط با نور بر برخی نانواشیاء ساخته‌شده باشد (مشخص است که برخی از نانواشیاء ساخته‌شده زمانی که توسط نور فعال می‌شوند می‌توانند سمی‌تر شوند).

1- Synergistic
2- Antagonistic

دما می‌تواند بین ۲۵ درجه سلسیوس تا ۳۲ درجه سلسیوس نوسان داشته باشد ولی در طول انجام هر آزمون باید بین ۱± درجه سلسیوس قرار گیرد و pH باید به میزان ۷٫۴ تنظیم شود. *تتراهایمنا* باید در طول مدت آزمون در شرایط گرسنگی باشد. سلول‌های *تتراهایمنا* را می‌توان تا چندین روز در محیط غذایی فقیر نگهداری کرد (به‌منظور کاهش انبوهه‌شدن MNO)، اگرچه این کار باعث کاهش زنده‌مانی سلول‌ها می‌شود.

توجه به این نکته مهم است که، صرف‌نظر از روش کشت به‌کار گرفته‌شده، در هنگام برداشت یا دستکاری سلول‌ها، باید مراقب زنده ماندن آن‌ها بود. پیش از در مواجهه با نانواشیاء ساخته‌شده، سلول‌ها باید با استفاده از سانتریفوژ کردن در سرعت پایین (مثلا ۳ دقیقه با ۶۰ واحد نیروی گریزازمرکز نسبی (RCF)[1]) برداشت، شسته و سپس مجددا در محیط غذایی فقیر، بازتعلیق[2] شوند. سلول‌های *تتراهایمنا* بسیار بیشتر از سلول‌های باکتری و مخمر نسبت به تغییرات هوادهی و تراکم سلولی ناشی از سانتریفیوژ کردن حساسیت شدید دارند و بنابراین ضروری است نکات زیر مورد توجّه قرار گیرند:

- از آنجا که گونه‌های *تتراهایمنا* شناگران قوی هستند، ضروری است که بلافاصله پس از پایان سانتریفیوژ، قسمت مایع روماند[3] حذف شود، درغیر این‌صورت تعداد قابل‌توجّهی از سلول‌هایی که به حالت رسوب در کف لوله سانتریفیوژ ته‌نشین شده‌اند، مجددا به حالت شناور درآمده و در نتیجه سلول‌های جمع‌آوری‌شده، از دست می‌روند.
- سرعت‌های گریزازمرکز بالا، به‌ویژه اگر با تغییرات ناگهانی و چشمگیر دما همراه باشد، می‌تواند باعث لیزشدن[4] تعداد زیادی از سلول‌ها و همچنین بازتعلیق سلول‌های رسوب‌یافته می‌شود. بنابراین می‌توان از زمان کوتاه برای سانتریفیوژ و دمای اتاق استفاده کرد.

در شروع و پایان آزمون، غلظت کل نانواشیاء ساخته‌شده موردبررسی باید حداقل در ظروف با بیشترین و کمترین غلظت‌های آزمون اندازه‌گیری شود. نتایج باید براساس غلظت‌های اندازه‌گیری‌شده گزارش شوند. با این وجود، اگر شواهدی وجود داشته‌باشد که نشان دهد غلظت نانواشیاء ساخته‌شده موردبررسی، به‌صورت رضایت‌بخشی، بین ٪ ۲۰± غلظت اسمی و یا غلظت اندازه‌گیری‌شده ابتدایی، در طول آزمون حفظ شده‌است، در این حالت می‌توان نتایج را براساس غلظت اسمی و یا غلظت اندازه‌گیری‌شده ابتدایی گزارش کرد.

در شروع و پایان آزمون، پایداری پراکنه و توزیع اندازه ذرات نانواشیاء ساخته‌شده باید در بیشترین و کمترین غلظت‌های آزمون بررسی شود.

1- Relative Centrifugal Force
2- Resuspension
3- Supernate
4- Lysis

توصیه می‌شود که هر آزمون دارای گروه‌های کنترل باشد که شامل آب رقیق‌سازی، حامل نانواشیاء، شرایط و روش‌های اجرائی و *تتراهایمنا* با تراکم مشابه باشد.

دما و pH باید در ابتدا و انتهای آزمون در هر محفظه اندازه‌گیری شود.

۹-۵ ارزیابی سمیت

۹-۵-۱ زنده‌مانی سلولی

تعداد کل سلول‌ها و تعداد سلول‌های مرده، باید از طریق روش متداول شمارش میکروسکوپی مستقیم، با استفاده از میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین افزاره بارجفت‌شده (CCD) با بزرگنمایی ۲۰۰ برابر و به کمک محفظه نئوبار[1]، برآورد شود. نمونه‌ای به حجم ۱۰ میکرولیتر از کشت برداشته و به محفظه نئوبار منتقل می‌شود و سلول‌های مرده شامل سلول‌های غیرجنبنده[2] و سلول‌هایی با ریخت‌شناسی تغییریافته که به‌وسیله تریپان‌بلو رنگ گرفته‌اند، شمارش می‌شوند. سپس ۵ میکرولیتر فرمالین اضافه می‌شود تا سلول‌ها را بکُشد و شمارش کل سلول‌ها انجام می‌شود.

۹-۵-۲ آزمون‌های اختلال در رشد جمعیت

آزمون اختلال در رشد جمعیت، براساس اختلال ایجادشده در رشد جمعیت است. از آنجا که، به‌ویژه برای فاز انفجاری رشد[3] و یا مرحله نزدیک به فاز انفجاری رشد[4]، چگالی نوری (OD)[5] کشت مستقیما با تعداد مژکداران در واحد حجم مرتبط است، اندازه‌گیری طیف‌نورسنجی، روشی سریع برای برآورد تراکم جمعیت است. این سنجش ایستای کوتاه مدت از سنجش تراکم جمعیت با روش طیف‌نورسنجی در طول موج ۵۴۰ نانومتر استفاده می‌کند و غلظت ایجادکننده ۵۰ درصد اختلال در رشد (IGC_{50})، به‌عنوان نقطه‌پایانی ثبت می‌شود.

۹-۵-۳ سنجش ATP

برای تعیین کمّی زیست‌درخشایی ATP، می‌توان از کیت سنجش زیست‌درخشایی ATP استفاده کرد. برای استخراج ATP، ۱۰۰ میکرولیتر نمونه از کشت تک‌یاخته باید به ۹۰۰ میکرولیتر بافر استخراج در حال جوش اضافه شود، می‌توان ۰٫۱ مول تریس و ۲ میلی‌مول EDTA هم اضافه کرد و pH را با HCl تا ۷٫۸ تنظیم کرد. یکاهای نسبی نور (RLU)[6] باید ثبت شوند. غلظت ATP با استفاده از فرمول زیر محاسبه می‌شود:

1- Neubauer chamber
2- Non-motile cells
3- Log-growth phase
4- Near log-growth phase
5- Optical density
6- Relative Light Units

$$C_{ATP} = ۱۰^{(\log LUM-b)/a} * x \qquad (۱)$$

که در آن:

C_{ATP} غلظت ATP بر حسب میکرومول در میلی‌لیتر؛

a ثابت تناسب؛

b مقدار اولیه در منحنی کالیبراسیون خطی؛

x ضریب رقّت.

۹-۵-۴ سنجش MTT

سنجش MTT برای اندازه‌گیری فعالیت متابولیک سلولی به‌عنوان شاخص زنده‌مانی سلول، تکثیر و سمیت سلولی استفاده می‌شود. همچنین در اینجا «کیت تکثیر سلولی I» (MTT) قابل‌استفاده است (به استاندارد ISO 19007 مراجعه شود). این سنجش رنگ‌سنجی بر اساس کاهش نمک زردرنگ تترازولیوم (۳-(۴و۵-دی‌متیل‌تیازول-۲-yl)-۲و۵-دی‌فنیل-H2-تترازولیوم بروماید یا MTT) به بلورهای ارغوانی‌رنگ فرمازین، به‌وسیله سلول‌های متابولیکی فعال، می‌باشد. اثر نانواشیاء ساخته‌شده بر زنده‌مانی سلول می‌تواند از طریق اندازه‌گیری جذب فرمازین (تغییر رنگ) آشکارسازی شود.

در مواردی که واکنشگرهای مورداستفاده در سنجش MTT با ذرات موردسنجش تداخل داشته‌باشند، می‌توان از سنجش LDH به‌عنوان جایگزین استفاده کرد.

۹-۵-۵ سنجش LDH

سنجش LDH، که با نام آزمون رهایش LDH نیز شناخته می‌شود، یک سنجش سمیت سلولی است که برای ارزیابی سطح آسیب غشای پلاسمایی در یک جمعیت سلولی استفاده می‌شود. LDH یک آنزیم پایدار است که در تمام سلول‌ها وجود دارد و بلافاصله پس از آسیب به غشاء پلاسما، در محیط کشت سلول رها می‌شود. سنجش LDH پرکاربردترین نشانگر مورد استفاده برای آزمایش سمیت سلولی است.

پروتکل سنجش LDH براساس یک واکنش جفت آنزیمی است: LDH آزادشده از سلول، لاکتات را اکسید می‌کند تا NADH تولید شود که سپس با معرف WST واکنش نشان می‌دهد و رنگ زرد ایجاد می‌کند. شدت رنگ ایجاد شده مستقیما با تعداد سلول‌های لیز شده ارتباط دارد.

۹-۶ فعالیت ذره‌خواری و درون‌هضم‌زیستی مواد

جذب نانواشیاء ساخته‌شده درون واکوئل‌های غذایی باید از دو دیدگاه مطالعه شود که عبارتند از زمان‌های مختلف و غلظت‌های مختلف. واکوئل‌های غذایی ایجادشده از طریق ذره‌خواری (نانواشیاء ساخته‌شده مورد آزمون) به‌روش چشمی[1] با کمک میکروسکوپ نوری قابل‌شمارش هستند. درصد سلول‌هایی که حداقل محتوی یک واکوئل غذایی پُرشده با نانواشیاء ساخته‌شده هستند، با استفاده از فرمول زیر محاسبه می‌شود:

$$V = C / T \times ۱۰۰ \qquad (۲)$$

که در آن:

V درصد تشکیل واکوئل؛

C تعداد سلول‌های حاوی حداقل یک واکوئل دارای نانواشیاء؛

T تعداد کل سلول‌های موردبررسی.

علاوه‌بر این، نوسان فعالیت ذره‌خواری، به‌عنوان یک نقطه‌پایانی غیرمتعارف، برای تنش/سمیت فیزیولوژیکی مورد بررسی قرار می‌گیرد.

۱۰ تحلیل داده‌ها

مقدار EC_{50} با استفاده از نرم‌افزارهای گوناگونی همچون برنامه probit «آژانس حفاظت از محیط زیست ایالات متحده» (EPA)[2]، PriProbit، SPSS، نرم‌افزار REGTOX برای Excel مایکروسافت و غیره قابل‌محاسبه است و مقادیر EC_{50} (غلظت موثره‌ای که منجر به ۵۰ درصد مرگ‌سلولی می‌شود) همراه با حدود اطمینان ۹۵ درصدی آن‌ها را نیز می‌توان محاسبه کرد.

۱۱ گزارش آزمون

گزارش آزمون باید شامل اطلاعات زیر باشد:

الف- نانوشیء موردآزمون:

- مشخصه‌یابی کامل نانوشیء و پراکنه آن براساس گزارش استاندارد MIAN برای نانواشیاء؛

1- Oculometrically
2- U.S. Environmental Protection Agency

- مادّه نانوشیء موردآزمون (کد سازنده، شماره کاتالوگ (کالانما)[1] یا فرمولاسیون، شماره دسته[2] یا تاریخ ساخت، نام تجاری و غیره)؛
- تمام تجهیزات و دستگاه‌های استفاده‌شده (مدل سازنده یا شماره کالانما، شماره سری یا تاریخ ساخت، نام تجاری و غیره).

ب- گونه موردآزمون: منبع و گونه‌های *تتراهایمنا*، تأمین‌کننده منبع (درصورت مشخص بودن) و شرایط کشت (شامل منبع، نوع و مقدار بستره/محیط‌کشت).

پ- شرایط آزمون:

- توضیح در مورد چاهک‌های آزمون: نوع و حجم چاهک، حجم محلول، تعداد *تتراهایمنا* در هر ظرف آزمون، تعداد چاهک‌های مورداستفاده برای هر غلظت (تعداد تکرارها)؛
- روش آماده‌سازی محلول‌های ذخیره و آزمون، شامل استفاده از هرنوع حلّال یا پراکنده‌ساز و غلظت‌های استفاده‌شده؛
- جزئیات آب رقیق‌سازی: منشاء آب و مشخصه‌های کیفی آب (pH، سختی، نسبت کلسیم به منیزیم، نسبت سدیم به پتاسیم، قلیائیت، رسانایی‌الکتریکی و غیره)؛
- شرایط گرم‌خانه‌گذاری: دما، شدت و دوره نوری، اکسیژن محلول، pH و غیره؛
- غلظت‌های اسمی نانوشیء موردآزمون و نتایج تمام آنالیزهایی که به منظور تعیین غلظت کل نانوشیء در مدت انجام آزمون انجام شده‌است.

ت- نتایج سنجش‌زیستی:

- درصد *تتراهایمنا*هایی که در هر یک از زمان‌های مشاهده‌گری در گروه‌های کنترل و در هر یک از تیمارها رنگ گرفته‌اند و یا هرنوع اثرات نامطلوب (شامل رفتار غیرمعمول) نشان داده‌اند.
- درصد واکوئل‌های پرشده از نانوشیء ساخته‌شده، در هریک از گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه کنترل در هر یک از زمان‌های مشاهده‌گری.
- مقدار محاسبه‌شده EC_{50} h ۲۴ با حدود اطمینان ۹۵ درصد.
- داده‌هایی که صحه‌گذاری نتایج را تأیید می‌کند:
  - درصد مرگ-ومیر کنترل؛

1- Catalogue
2- Batch number

- توضیح در مورد هرگونه انحراف از این استاندارد و اینکه آیا انحراف بر نتایج آزمون تأثیر می‌گذارد یا خیر.

ث- استاندارد ملی استفاده شده (شامل سال انتشار آن)؛

ج- هرگونه شاخصه غیرعادی مشاهده شده؛

چ- تاریخ انجام آزمون.

۱۲ صحه‌گذاری نتایج با کنترل منفی

اگر شرایط زیر وجود داشته‌باشد، آزمون انجام‌شده را می‌توان صحه‌گذاری کرد:

- در طول دوره آزمون، وضعیت کشت در گروه کنترل باید از نظر اندازه، تعداد و جنبندگی[1] تک‌یاخته‌ها، از طریق مشاهده سلول‌ها در زیر میکروسکوپ نوری ارزیابی شود. سلول ها باید جنبنده[2] باشند. تراکم آن‌ها به روش طیف‌سنجی تعیین می‌شود.
- تعداد سلول‌ها در کشت گروه کنترل فقط می‌تواند کاهش جزئی (حداکثر تا ۱۵ درصد در طی ۲۴ ساعت) داشته‌باشد، منظور سلول‌های فعال و جنبنده می‌باشد. دراین‌صورت، می‌توان نتایج آزمایش‌ها را قابل اطمینان در نظر گرفت.
- محتوای ATP در کشت گروه کنترل نباید بیش از ۲۵ درصد کاهش یابد.

1- Motility
2- Motile

پیوست الف

(آگاهی‌دهنده)

تغییرات اعمال‌شده در متن استاندارد ملی در مقایسه با منبع

الف-۱ بخش‌های اضافه‌شده:

- انتهای مقدمه: یادآوری: «**یادآوری** – آزمون حلقه که به نام‌های «آزمون مهارت»[1] و «مقایسات بین‌آزمایشگاهی»[2] نیز نامیده می‌شود، بخشی از یک برنامه تضمین کیفیت[3] برای سنجش دقت و کارایی یک روش اندازه‌گیری و یا روش انجام آزمونی خاص است. معمولا یک مؤسسه مرجع نمونه‌های مشابهی را که باید برای پارامترهایی خاص و یا طبق روشی خاص آنالیز شوند به آزمایشگاه‌های مختلف ارسال می‌کند. به این آزمایشگاه‌های صنعتی، پزشکی و یا پژوهشی، مهلت زمانی محدودی برای ارسال نتایج و تحلیل داده می‌شود. ارزیابی آماری و تفسیر نتایج ارسال‌شده توسط آزمایشگاه‌های مختلف، نه‌تنها کمک بزرگی برای خود آزمایشگاه‌های شرکت‌کننده است، زیرا امکان ارزیابی کیفیت آنالیز آن‌ها را در مقایسه با آزمایشگاه‌های دیگر فراهم می‌کند، بلکه به شناسایی نقاط ضعف و قوّت روش اندازه‌گیری و یا روش انجام آزمون خاص کمک می‌کند.» اضافه شده‌است.

- زیربند ۳-۱۲: یادآوری «**یادآوری**– این غلظت اختصارا به‌صورت EC_{50} نوشته می‌شود.» اضافه شده‌است.

- بند ۴، کوته‌نوشت‌ها: دو کوته‌نوشت زیر به جدول کوته‌نوشت‌ها اضافه و تعریف شده‌است:

AAS	Atomic absorption spectroscopy	طیف‌سنجی جذب اتمی
ICP-MS	Inductively coupled plasma mass spectrometry	طیف‌سنجی جرمی پلاسمای جفت‌شده القایی

- زیربند ۵-۱: یادآوری «**یادآوری**– منظور از آکسنیک، کشتی است که عاری از تمام موجودات زنده، به‌غیر از گونه هدف (در اینجا، *تتراهایمنا*) است.» اضافه شده‌است.

- زیربند ۵-۲-۱: یادآوری‌های ۱ و ۲ اضافه شده‌اند:

«**یادآوری ۱**– آب یون‌زدایی‌شده، آبی است که از دستگاه‌های آزمایشگاهی یون‌زدایی آب که املاح آب را از طریق فیلتراسیون شیمیایی و روش اسمز معکوس[4] حذف می‌کنند، به‌دست می‌آید. همچنین برخی از مدل‌های این دستگاه‌ها مجهز به لامپ فرابنفش هستند که میکروب‌های داخل آب را نیز از بین می‌برند. امروزه، علاوه‌بر مدل‌های وارداتی، انواع دستگاه‌های تولید آب خالص[5] و آب فوق‌خالص[6] ساخت ایران نیز در بازار موجود است.»

1- Proficiency Test
2- Interlaboratory Test
3- Quality assurance
4- Reverse osmosis
5- Pure water
6- Ultrapure water

«**یادآوری ۲**- آب مقطر، آبی است که از طریق تبخیر و میعان مجدد آب املاح آن گرفته شده‌است. چنانچه این فرآیند دوبار تکرار شود، آب دوبار تقطیر بدست می‌آید.»

- **بند ۶**: داخل پرانتز «(همچون گرم‌خانه آزمایشگاهی[1])» اضافه شده‌است.

الف-۲ بخش‌های تغییریافته:

- زیربند ۳-۱۱ مورد ۳: بدین‌صورت تغییر داده شده‌است: «هر نوع پارامتر ثبت‌شده در یک مطالعه انجام شده به‌منظور تعیین مخاطرات مرتبط با یک ماده است.»

1- Incubator

کتاب‌نامه

[1] Cassidy-Hanley, D.M., *Tetrahymena* in the laboratory: strain resources, methods for culture, maintenance, and storage. Methods in cell biology. 2012, 109: 237-276. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385967-9.00008-6

[2] Collins, K. and M.A. Gorovsky, *Tetrahymena thermophila*. Current Biology, 2005. 15(9): R317-R318. https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.04.039

[3] De Coninck, J., et al., Factorial designs: an efficient approach to choosing the main factors influencing growth and hydrolase production by *Tetrahymena thermophila*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2004. 31(5): 204-208. https://doi.org/10.1007/s10295-004-0135-8

[4] Fekete-Kertész, I., Ullmann, O., Csizmár, P., Molnár, M. *Tetrahymena pyriformis* phagocytic activity test for rapid toxicity assessment of aquatic micropollutants. Periodica Polytechnica Chemical Engineering, 2018. 62(2), 167-174. https://doi.org/10.3311/PPch.10667

[5] Gallego, A., et al., Flow cytometry assessment of cytotoxicity and reactive oxygen species generation by single and binary mixtures of cadmium, zinc and copper on populations of the ciliated protozoan *Tetrahymena thermophila*. Chemosphere, 2007. 68(4): 647-661. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.02.031

[6] Gerhardt, A., A. Ud-Daula, and K.-W. Schramm, *Tetrahymena* spp. (Protista, Ciliophora) as test species in rapid multilevel ecotoxicity tests. Acta Protozoologica, 2015. 49(4): 271-280.

[7] ISO/TR 13014, Nanotechnologies — Guidance on physico-chemical characterization of engineered nanoscale materials for toxicologic assessment.

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۲۱۲۰۶: سال ۱۳۹۵، فناوری نانو - راهنمای مشخصه‌یابی فیزیکوشیمیایی مواد نانو مقیاس مهندسی‌شده برای ارزیابی توکسیکولوژیک با استفاده از استاندارد ISO/TR 13014: 2012/Cor.1: 2012تدوین شده‌است.

[8] ISO 19007, Nanotechnologies — In vitro MTS assay for measuring the cytotoxic effect of nanoparticles.

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۲۳۱۰۸: سال ۱۴۰۰، فناوری نانو- سنجش برون‌تنی MTS برای اندازه‌گیری اثر سمیت سلولی نانوذرات با استفاده از استاندارد ISO19007: 2018 تدوین شده‌است

[9] Jemec, A., et al., An interlaboratory comparison of nanosilver characterisation and hazard identification: harmonising techniques for high quality data. Environment International, 2016. 87: 20-32. https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.10.014

[10] Juganson, K., et al., Extracellular conversion of silver ions into silver nanoparticles by protozoan *Tetrahymena thermophila*. Environmental Science: Processes & Impacts, 2013. 15(1): 244-250. https://doi.org/10.1039/C2EM30731F

[11] Juganson, K., et al., Mechanisms of toxic action of silver nanoparticles in the protozoan *Tetrahymena thermophila*: From gene expression to phenotypic events. Environmental Pollution, 2017. 225: 481-489. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.03.013

[12] Juganson, K., et al., *Tetrahymena thermophila* converts toxic silver ions to less toxic silver nanoparticles. Toxicology Letters, 2012. 211: S206.

[13] Larsen, J., Schultz, T.W. Rasmussen, L., Hooftman, R., Pauli, W. Progress in an ecotoxicological standard protocol with protozoa: Results from a pilot ringtest with *Tetrahymena pyriformis*. Chemosphere, 1997. 35(5): 1023-1041. https://doi.org/10.1016/S0045-6535(97)00170-7

[14] Maurya, R., KumarPandey, A. Importance of protozoa *Tetrahymena* in toxicological studies: A review. Science of The Total Environment, 2020. 741: 140058. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140058

[15] Mielke, R.E., et al., Differential growth of and nanoscale TiO_2 accumulation in *Tetrahymena thermophila* by direct feeding versus trophic transfer from *Pseudomonas aeruginosa*. Applied and Environmental Microbiology, 2013. 79(18): 5616-5624. https://doi.org/10.1128/AEM.01680-13

[16] Mortimer, M., K. Kasemets, and A. Kahru, Toxicity of ZnO and CuO nanoparticles to ciliated protozoa *Tetrahymena thermophila*. Toxicology, 2010. 269(2-3): 182-189.

[17] Mortimer, M., Kahru, A., Slaveykova, V.I. Uptake, localization and clearance of quantum dots in ciliated protozoa *Tetrahymena thermophila*. Environmental Pollution, 2014. 190, 58-64. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.03.021

[18] Mortimer, M., Petersen, E.J., Buchholz, B.A., Orias, E., Holden, P.A. Bioaccumulation of multiwall carbon nanotubes in *Tetrahymena thermophila* by direct feeding or trophic transfer. Environmental Science & Technology, 2016. 50(16): 8876-8885. https://doi.org/10.1021/acs.est.6b01916

[19] Ostraat M.L., Mills KC, Guzan KA, Murry D, The Nanomaterial Registry: facilitating the sharing and analysis of data in the diverse nanomaterial community. International Journal of Nanomedicine, 2013. 8: 7-13. https://doi.org/10.2147/IJN.S40722

[20] Rajapakse, K., et al., Acclimation of *Tetrahymena thermophila* to bulk and nano-TiO_2 particles by changes in membrane fatty acids saturation. Journal of Hazardous Materials, 2012. 221: p. 199-205. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.04.029

[21] Schultz, T., TETRATOX: *Tetrahymena pyriformis* population growth impairment endpoint a surrogate for fish lethality. Toxicology Methods, 1997. 7(4): 289-309. https://doi.org/10.1080/105172397243079

[22] Shi, J., et al., Light induced toxicity reduction of silver nanoparticles to *Tetrahymena Pyriformis*: effect of particle size. Aquatic Toxicology, 2013. 132: 53-60. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.02.001

[23] Shi, J.P., et al., Effect of light on toxicity of nanosilver to *Tetrahymena pyriformis*. Environmental Toxicology and Chemistry, 2012. 31(7): 1630-1638. https://doi.org/10.1002/etc.1864

[24] Ud-Daula, A., G. Pfister, and K.-W. Schramm, Method for toxicity test of titanium dioxide nanoparticles in ciliate protozoan *Tetrahymena*. Journal of Environmental Science and Health, Part A, 2013. 48(11): 1343-1348. https://doi.org/10.1080/10934529.2013.781878

[25] Xiong, J., Feng, L., Yuan, D., Fu, C., Miao, W. Genome-wide identification and evolution of ATP-binding cassette transporters in the ciliate *Tetrahymena thermophila*: A case of functional divergence in a multigene family. BMC Evolutionary Biology, 2010. 10(1): 330. https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-330

[26] Yang, W.W., Wang, Y., Huang, B., Wang, N.X., Wei, Z.B., Luo, J., Miao, A.J., Yang, L.Y. TiO_2 nanoparticles act as a carrier of Cd bioaccumulation in the ciliate *Tetrahymena thermophila*. Environmental Science & Technology, 2014. 48(13): 7568-7575. https://doi.org/10.1021/es500694t

[27] Mills, K.C., Murry, D., Guzan, K.A., Ostraat, M.L., Nanomaterial registry: database that captures the minimal information about nanomaterial physico-chemical characteristics. Journal of Nanoparticle Research, 2014. 16: 2219. https://doi.org/10.1007/s11051-013-2219-8

[28] OECD 2017. OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment, No. 266. Effects of chemicals on waste water treatment: Final validation study of the protozoan activated sludge test to establish an OECD Test Guideline.

[29] Yu, X. Prediction of chemical toxicity to *Tetrahymena pyriformis* with four descriptor models. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2020. 190: 110146. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.110146

[30] ISO 22412, Particle size analysis — Dynamic light scattering (DLS).

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۱۶۲۴۷: سال ۱۳۹۶، آنالیز اندازۀ ذره- پراکندگی نور دینامیک (DLS) با استفاده از استاندارد ISO 22412: 2017 تدوین شده‌است.

[31] OECD 2021. OECD Series on Testing and Assessment, No. 317. Guidance document on aquatic and sediment toxicological testing of nanomaterials. ENV/JM/MONO(2020)8. Free access via: https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2020)8&doclanguage=en

[32] The Minimum Information for Nanomaterial Characterization (MINChar) Initiative Parameters List https://characterizationmatters.wordpress.com/parameters/

[33] ISO/TS 12805, Nanotechnologies — Materials specifications — Guidance on specifying nano-objects.

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۱۶۴۶۴: سال ۱۳۹۲، فناوری نانو- ویژگی‌های مواد -راهکاری برای تعیین ویژگی‌های نانواشیاء با استفاده از استاندارد ISO/TS 12805: 2011 تدوین شده‌است.

[34] ISO/TR 18196, Nanotechnologies — Measurement technique matrix for the characterization of nano-objects.

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۲۲۶۱۱: سال ۱۳۹۶، فناوری نانو- ماتریس روش اندازه‌گیری برای مشخصه‌یابی نانواشیاء با استفاده از استاندارد ISO/TR 18196: 2016 تدوین شده‌است

[35] Pauli, W. & Poka, V., 2007. Performing a ring study to validate the protozoan activated sludge test, Environmental Research Plan of the Federal Ministry for the Environment, Nature Conservation and Nuclear Safety: German Federal Environmental Agency (UBA).