

مقاله پژوهشی

اثرات یون و نانوذرات نقره محلول در آب بر برخی شاخص‌های فیزیولوژیک ماهی
پرت خونی (*Cichlasoma citrinellum* ♂ × *Cichlasoma synspilum* ♀)

امین مخلص آبادی فراهانی^۱، فاطمه پیکان حیرتی^{۲*}، سالار درافشان^۳

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۹۹

تاریخ پذیرش: شهریور ۹۹

چکیده

تولید و استفاده روزافزون از نانوذرات نقره می‌تواند باعث رهايش این مواد در بوم‌سازگان آبی و آسیب به آبزیان شود. در این مطالعه اثرات یون نقره و نانوذرات نقره محلول در آب بر برخی از شاخص‌های بیوشیمیایی خون ماهی پرت مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور، تعداد ۶۰ قطعه ماهی پرت با میانگین وزنی $25/5 \pm 6/5$ گرم، به مدت ۵ روز در سه تیمار شاهد (بدون تنش)، نانوذرات نقره (مواجه شده با غلظت ۲۵۰ میکروگرم در لیتر نانوذرات نقره) و یون نقره (مواجه شده با غلظت ۲۵۰ میکروگرم در لیتر یون نقره) تحت تنش قرار گرفتند و در طی این مدت تغذیه نشدند. اثر یون نقره بر شاخص‌های اکسیداتیو و سطوح آنزیم‌های کبدی پلاسما به صورت معناداری بیشتر از اثر نانوذرات نقره بود و با این وجود هر دو تیمار به صورت معنی‌داری منجر به افزایش شاخص‌ها نسبت به تیمار شاهد شدند ($P < 0/05$). تنش یاد شده منجر به افزایش پروتئین کل، آلومین و گلوبولین نسبت به گروه شاهد شد، با این وجود تفاوت معنی‌داری در مقادیر این شاخص‌ها در بین دو گروه در معرض قرار گرفته با یون یا نانوذره نقره وجود نداشت ($P > 0/05$). در مجموع می‌توان بیان کرد که هر دو ترکیب یون و نانوذره نقره منجر به اختلالات فیزیولوژیک در ماهی پرت شد، با این وجود اثر یون نقره به مراتب شدیدتر از نانوذره نقره بود.

واژگان کلیدی: یون نقره، نانوذرات نقره، ماهی پرت خونی، تنش اکسیداتیو.

۱- دانشجوی دکتری شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران.

۲- استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران.

۳- دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران.

* نویسنده مسئول: fheyрати@iut.ac.ir

مقدمه

افزایش یابد. در حال حاضر نانوذرات نقره نسبت به نانومواد دیگر، کاربرد تجاری بیشتری دارد و به عنوان ماده ضد میکروبی در محصولات مختلفی مانند مواد آرایشی، شوینده، پوشاک، کفش، افزودنی‌های غذایی و نیز به صورت پوشش ماسک‌ها تنفسی، فیلترهای آب، گوشی‌های تلفن، اسباب‌بازی و سیستم‌های تصفیه خانگی استفاده می‌شود (Luther and Zweck, 2013). از طرفی مقدار پیش‌بینی شده حضور نانوذرات نقره در محیط‌های آبی، برابر $0/03$ تا $0/32$ میکروگرم در لیتر برآورد شده است (Akbari and Jahanbakhshi, 2019).

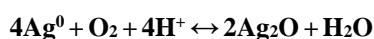
نانوذرات نقره نسبت سطح به حجم بالایی دارند و از این رو به سرعت با غشای سلولی واکنش می‌دهند و رادیکال‌های آزاد تولید می‌کنند. اختلال در روند اکسیداسیون ممکن است از طریق تولید پراکسیدها و رادیکال‌های آزاد ایجاد شود و باعث آسیب اکسیداتیو شود که طی آن تمام اجزای سلول از جمله پروتئین‌ها، لیپیدها و DNA آسیب می‌بیند. نبود تعادل بین اکسیدان‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها و افزایش اکسیدها، تنش اکسیداتیو نامیده می‌شود. این امر ممکن است به صدمه دیدن مولکول‌های

فناوری نانو دانش دست‌کاری مواد در مقیاس مولکولی و اتمی است. امروزه فناوری نانو در حوزه‌های متنوعی همچون صنایع نوین، پزشکی، محیط زیست، انرژی، ارتباطات و فناوری اطلاعات کاربرد دارد. کمیسیون اروپا در سال ۲۰۱۱ تعریف جدیدی را به تصویب رساند که بر اساس آن نانو مواد شامل مواد طبیعی تولید شده به صورت تصادفی و یا ساخت دست بشر که دارای ذراتی به صورت آزاد (Unbound)، تجمع یافته (Agglomerate) و یا کلوخه شده (Aggregate) هستند و از نظر توزیع اندازه، حداقل ۵۰ درصد ذرات آن حداقل در یک بعد دارای اندازه بین ۱ تا ۱۰۰ نانومتر باشد (جوهری و همکاران ۱۳۹۴).

با گسترش روزافزون نانوفناوری و کاربرد نانومواد در حوزه‌های متنوع، نگرانی‌های زیادی درباره خطرهای احتمالی ناشی از ورود این مواد به محیط زیست به وجود آمده است. بر اساس آمار مطالعات، بیش از ۳۰ کشور جهان از نانومواد استفاده می‌کنند. میزان استفاده از نانومواد تنها طی سال‌های ۲۰۰۵ تا ۲۰۱۳ بیشتر از ۳۰ برابر افزایش یافته است (Akbari and Jahanbakhshi, 2019) و پیش‌بینی می‌شود که این تعداد در سال‌های آتی نیز به سرعت

دوزیستان و ماهی‌ها است (Demarchi et al., 2020). امروزه کلئوئید نانونقره که یکی از انواع محصولات حاوی نانوذرات نقره است به عنوان ماده ضدعفونی‌کننده و ضد میکروب به صورت گسترده در بازار عرضه می‌شود. در کشور ایران نیز انواعی از کلئوئید نانونقره با نام‌های تجاری همچون نانوسید، نانونیت، نانوویس، نانوفارم و نانوکلین در بازار ارائه می‌شود. در واقع همگی این محصولات که در بازار به نام کلئوئید نانونقره شناخته می‌شوند، از سوسپانسیون آبی که در آن نقره به سه صورت شامل ذرات فلزی نقره (Ag) در ابعاد نانومتری، یون‌های آزاد نقره (Ag^+) و یون‌های نقره متصل به سطح نانوذرات وجود دارد، تشکیل شده‌اند (Liu and Hurt, 2010). اگر فرض شود که در ابتدا تمام نقره موجود در این ترکیبات به صورت نانوذرات فلزی باشد و میزان نقره یونی صفر باشد، این نانوذرات به تدریج و تحت شرایط اکسیداسیون، طبق یک معادله دوطرفه (معادله ۱)، به یون‌های نقره تبدیل خواهند شد (Xiu et al., 2012).

معادله ۱:



بر اساس نتایج مطالعات انجام شده، کلئوئید نانونقره دارای خواص سمی بر آبزیان است و

زیستی منجر شود و در نتیجه ادامه حیات موجود زنده به مخاطره می‌افتد. ساز و کار سیستم دفاع آنتی‌اکسیدان‌ها در ماهی شامل سیستم آنزیمی و آنتی‌اکسیدان‌ها با وزن مولکولی پایین است که این امر مشابه با پستانداران است. با این وجود، سیستم ایزوفرم‌های خاص آنزیم‌ها، در گونه‌های مختلف ماهی به خوبی مطالعه نشده است (Di Giulio and Meyer, 2008). سیستم‌های دفاعی که به جلوگیری از شکل‌گیری اکسی رادیکال‌ها گرایش دارند شامل آنزیم‌های اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و مالون دی‌آلدئید هستند. گلووتاتیون پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز به صورت حیاتی در سم‌زدایی رادیکال‌ها به مولکول‌های واکنش‌ناپذیر اهمیت دارند.

ورود نانومواد به محیط‌های زیست آبی، ممکن است اثرات نامطلوبی بر موجودات آبی داشته باشد و به همین دلیل مطالعه تأثیرات این مواد دارای اهمیت ویژه‌ای است. در همین رابطه، نانوسم‌شناسی آبزیان (Aquatic Nanotoxicology) بررسی اثرات سمی نانومواد بر موجودات آبی شامل باکتری‌های آبی، جلبک‌های تک‌سلولی و پرسلولی، پلانکتون‌های جانوری، نرم‌تنان، سخت‌پوستان،

و یون نقره بر شاخص‌های اکسیداتیو و بیوشیمیایی سرم خون ماهی پرت خونی مورد بررسی قرار گرفت. هدف از این پژوهش بررسی سمیت ناشی از نانوذرات نقره و یون نقره است تا بر این اساس درک صحیح‌تری نسبت به ویژگی‌های سمی نانوذرات نقره و یون نقره و اثرات آن بر شاخص‌های فیزیولوژیک ماهی به دست آید.

مواد و روش‌ها شرایط آزمایش

در این مطالعه از ۶۰ قطعه ماهی پرت خونی ($\text{Cichlasoma synspilum}$ ♀ × ♂) با میانگین وزنی $25/5 \pm 6/2$ گرم (میانگین \pm انحراف معیار) و میانگین طولی $6/34 \pm 0/43$ سانتی‌متر که از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان زینتی دکتر ملک‌پوری واقع در شهر اصفهان تهیه شد، استفاده شد. این ماهی‌ها پس از انتقال به سالن آکواریوم دانشکده منابع طبیعی دانشگاه صنعتی اصفهان طی دو هفته با شرایط آزمایشگاهی سازگار شدند و در طی این مدت با جیره دست‌ساز (جدول ۱) روزانه سه بار (در ساعت‌های ۸، ۱۲ و ۱۶) به میزان ۲ درصد وزنی تغذیه شدند.

می‌تواند تغییرات متعددی را در بافت‌های مختلف آبزیان از جمله در خون (رزم‌آرا و همکاران، ۱۳۹۳؛ مخلص آبادی فراهانی و همکاران، ۱۳۹۸)، آبشش (رزم‌آرا و همکاران، ۱۳۹۲) و کبد (Pournori et al., 2017) ایجاد کند. این تغییرات شامل تغییرات در شاخص‌های خونشناسی اولیه و ثانویه و تغییرات خفیف تا برگشت ناپذیر در بافت‌های مختلف بدن است (علیشاهی و همکاران، ۱۳۹۷). مطالعه حاضر بر ماهی پرت خونی (Blood parrot) که یکی از ماهیان محبوب زینتی است و از دگرآمیزی دو گونه $\text{Cichlasoma synspilum}$ ♀ و $\text{Cichlasoma citrinellum}$ ♂ ایجاد می‌شود، انجام شده است. این ماهی در سال ۱۹۸۰، برای اولین بار در کشور تایلند تولید شد. سپس در سال‌های بعد پرورش آن به کشورهای ژاپن و چین راه یافت. این ماهی یک ماهی زینتی پرطرفدار است و با توجه به این که در برخی از فیلترهای آکواریومی از نانوذرات نقره برای تصفیه آب استفاده می‌شود، ممکن است در معرض نانوذرات نقره و یون نقره قرار گیرد. از طرف دیگر، این ماهی به دلیل حساسیت نسبت به شرایط محیطی، سریعاً به تغییرات واکنش نشان می‌دهد. از این رو، الگویی مناسب برای مطالعه است. در مطالعه حاضر، اثر نانوذرات نقره

جدول ۱: ترکیب جیره پایه

مقدار (درصد)	ترکیب
۲۱/۱۶	پودر ماهی
۲۱/۱۶	سویا
۱۵/۸۷	کلزا
۲۴/۹۳	ذرت
۱۱/۱۲	جو
۰/۵	روغن آفتابگردان
۲/۳۸	مکمل‌های معدنی*
۲/۳۸	مکمل‌های ویتامینی**

*: مکمل معدنی (خوراک دام و آبزیان مازندران، ایران): آهن ۲۱/۶۲ درصد، روی ۳۶/۰۵ درصد، سلنیوم ۰/۰۷ درصد، کبالت ۰/۳۶ درصد، مس ۲۱/۶۳ درصد، منگنز ۱۸/۰۲ درصد، ید ۲/۱۶ درصد، کولین کلرید ۰/۰۴ درصد.

** : مکمل ویتامینی (ارس بازار، ایران): ویتامین‌های A ۱۵/۲۴ درصد، D₃ ۳/۰۴ درصد، K₃ ۰/۶۰ درصد، E ۳/۰۴ درصد، B₁ ۶/۰۹ درصد، B₂ ۰/۹۱ درصد، B₆ ۰/۹۱ درصد، C ۳۰/۴۸ درصد، کلسیم پنتوتنات ۹/۱۴ درصد، متیونین ۱۸/۲۹ درصد، سیستین ۹/۱۴ درصد.

در این آزمایش از آکواریوم‌هایی به ابعاد ۱۰۰×۴۰×۳۵ سانتی‌متر برای نگهداری ماهی‌ها استفاده شد. آب سیستم پرورشی مورد استفاده از لوله‌کشی شهری تامین و پس از کلرزدایی (به‌واسطه نگهداری آب به مدت دو روز) در آکواریوم‌های ۹۰ لیتری توزیع شد. آکواریوم‌ها دارای هوادهی مداوم بودند. در طول دوره آزمایش، میانگین دمای آب ۲۶±۱/۵ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول ۵/۸±۰/۵ میلی‌گرم در لیتر، میزان pH ۷/۰±۰/۱، هدایت الکتریکی ۴۸۲/۲±۴۲ میکروزیمنس، آمونیم ۱/۳۷±۰/۴ میلی‌گرم در لیتر، فسفات کل ۰/۰۲±۰/۰۹ قسمت در میلیون و سختی حدود ۱۴۰ میلی‌گرم در لیتر (تستر دیجیتال، Yk-Lutron, 2001CT, آلمان) بود.

تنش نانوذرات نقره

شده با غلظت ۲۵۰ میکروگرم در لیتر تا پنج روز پس از مواجهه زنده ماندند، بنابراین از این غلظت برای آزمایش اصلی استفاده شد. برای پخش شدن یکنواخت و مناسب نانوذرات نقره، قبل از هر بار استفاده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد سونیکیت شد. آکواریوم‌های آزمایش ۲۴ ساعت قبل از اضافه کردن ماهی به غلظت مورد نظر رسیدند، سپس شسته شدند و دوباره قبل از اضافه کردن ماهی به غلظت مورد نظر رسیدند تا میزان کاهش غلظت که در اثر چسبیدن به سنگ هوا و شیشه آکواریوم ایجاد می‌شود، به حداقل برسد. تعویض آب به مقدار ۹۰ درصد و تنظیم غلظت هر ۴۸ ساعت یک‌بار انجام شد (مخلص آبادی فراهانی و همکاران، ۱۳۹۸).

طرح آزمایش

این آزمایش در سه تیمار، هر تیمار با ۲۰ قطعه ماهی شامل تیمار شاهد (بدون تنش)، تیمار نانو ذرات نقره (مواجه شده با غلظت ۲۵۰ میکروگرم در لیتر نانوذرات نقره) و تیمار یون نقره (مواجه شده با غلظت ۲۵۰ میکروگرم در لیتر سولفات نقره) تنظیم شد. سپس ماهیان به مدت پنج روز تحت تنش قرار گرفتند و در

در این آزمایش از کلئید نانوذرات نقره (Ag-NPs) با نام تجاری Nanocid (نانو نصب پارس، ایران) با غلظت ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر، اندازه ذرات (قطر هیدرودینامیکی) ۳/۹ تا ۱۶۳/۵ نانومتر، میانگین قطر هیدرودینامیکی ۵۴/۸ نانومتر، خلوص ۱۰۰ درصد و قطر بیشینه ۱۲۹ نانومتر استفاده شد (مخلص آبادی فراهانی و همکاران، ۱۳۹۶). سولفات نقره با فرمول شیمیایی $AgSO_4$ (Merck، آلمان) نیز به عنوان یون نقره در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. به دلیل مشخص نبودن میزان LC_{50} نانوذرات و یون نقره محلول در آب برای ماهی پرت، ابتدا این ماهیان در معرض غلظت‌های ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در لیتر از نانوذرات نقره و یون قرار داده شدند تا بیشترین غلظتی که باعث کاهش زنده‌مانی نمی‌شود، مشخص شود (Govindasamy and Rahuman, 2012). به این منظور پنج قطعه ماهی پرت برای هر غلظت در نظر گرفته شد. ماهی‌ها پس از گذراندن دوره تطابق در معرض غلظت‌های یاد شده قرار گرفتند. ماهی‌های مواجه شده با غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در لیتر نانوذرات نقره و یون نقره، کمتر از ۲۴ ساعت تلف شدند و ماهی‌های مواجه

آمینوترانسفراز (AST) و آلکالین فسفاتاز (ALP) به وسیله دستگاه بیوشیمی آنالایزر (Eppendorf، آلمان) و با استفاده از کیت‌های آزمایشگاهی (پارس آزمون، ایران) طبق دستور العمل شرکت سازنده به روش آنزیمی، سنجش شدند (Borges et al., 2004).

پروتئین، آلبومین و گلوبولین پلاسما

برای اندازه‌گیری میزان پروتئین کل پلاسما از روش Bradford (۱۹۷۶) و برای بررسی شاخص آلبومین از روش Moss و همکاران (۲۰۰۸) استفاده شد. میزان گلوبولین پلاسما نیز از تفاضل میزان آلبومین از پروتئین کل برای هر نمونه محاسبه شد (Jones-Trower et al., 2005).

تحلیل آماری

در این مطالعه داده‌های آماری به صورت میانگین \pm خطای استاندارد گزارش شد. طرح آزمایش به صورت طرح کاملا تصادفی بود. تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 22 و آزمون نرمال بودن نیز با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov صورت گرفت. پس از اطمینان از توزیع نرمال داده‌ها، از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA) و پس‌آزمون Duncan در سطح

طی این مدت تغذیه نشدند (Scown et al., 2010).

نمونه‌برداری

نمونه‌برداری از ۵ قطعه ماهی از هر تیمار به صورت تصادفی بعد از قرار گرفتن در معرض تنش انجام شد. برای بی‌هوش کردن ماهیان از پودر گل میخک (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) استفاده شد. خون‌گیری با استفاده از سرنگ ۲/۵ میلی‌لیتری هپارینه از ساقه دمی انجام گرفت و سپس برای به دست آوردن پلاسما، در دستگاه سانتریفیوژ (DEJUN، PRP، چین) با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. پلاسما پس از جداسازی فوراً به یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد منتقل شد.

شاخص‌های تنش اکسیداتیو پلاسما

آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و مالون دی‌آلدئید (MDA) پلاسما با استفاده از کیت (پارس‌آزمون، ایران) سنجش شدند (Marklund and Marklund, 1974).

آنزیم‌های کبدی پلاسما

در این مطالعه، آنزیم‌های کبدی پلاسما شامل آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپاراتات

اطمینان ۹۵ درصد ($P < 0/05$) برای تحلیل داده‌ها استفاده شد. برای رسم نمودارها نیز از نرم‌افزار Microsoft Excel 2010 استفاده شد.

نتایج

شاخص‌های تنش اکسیداتیو پلاسما

اعمال تنش یون یا نانوذره نقره در ماهی پرت منجر به افزایش معنی‌دار میزان شاخص‌های کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز پلاسما در مقایسه با تیمار شاهد شد ($P < 0/05$ ؛ شکل ۱- الف و ج). بیشترین میزان تمامی شاخص‌های اکسیداتیو سنجش شده در تیمار یون نقره مشاهده شد که به صورت معناداری بیش از دو تیمار دیگر بود ($P < 0/05$ ؛ شکل ۱).

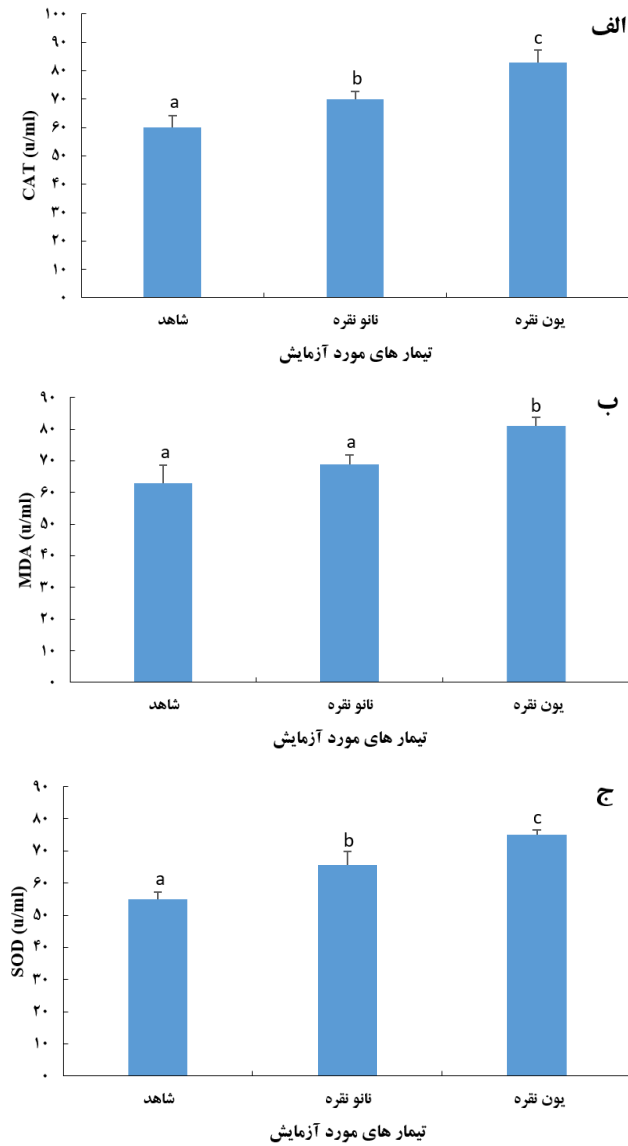
آنزیم‌های کبدی پلاسما

به طور کلی، افزایش معنی‌داری در سطوح آنزیم‌های کبدی پلاسما در مقایسه با تیمار

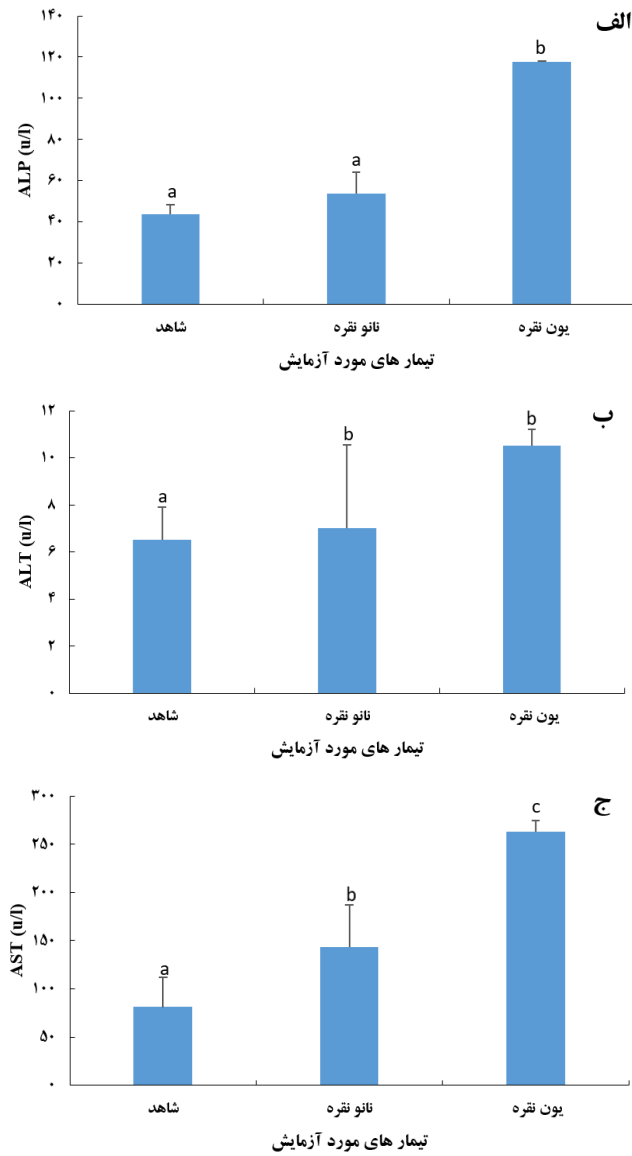
شاهد در اثر تنش یون و نانوذره نقره مشاهده شد ($P < 0/05$ ؛ شکل ۲). بیشترین میزان آنزیم‌های کبدی در تیمار یون نقره مشاهده شد که مقدار آن در شاخص آلکالین فسفاتاز (ALP) به $117/5 \pm 0/7$ واحد در لیتر، در شاخص آلانین آمینوترانسفراز (ALT) $10/5 \pm 0/7$ واحد در لیتر و در شاخص آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) $263/3 \pm 11/3$ واحد در لیتر بود ($P < 0/05$ ؛ شکل ۲).

پروتئین، آلبومین و گلوبولین پلاسما

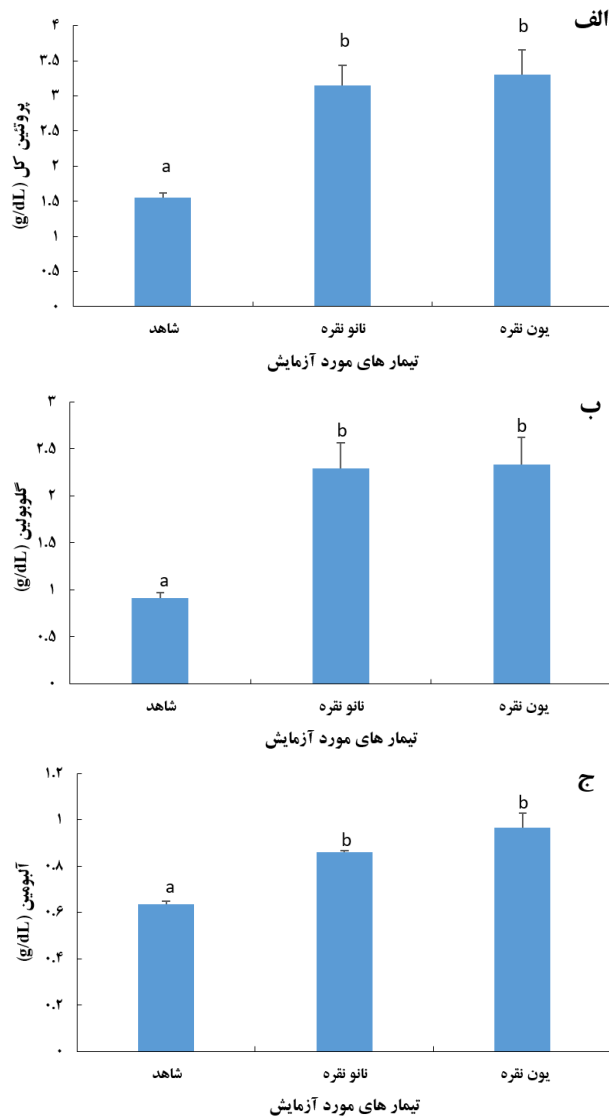
در مورد شاخص‌های آلبومین، پروتئین کل، گلوبولین اختلاف معناداری بین تیمارهای نانوذرات نقره و یون نقره مشاهده نشد ($P > 0/05$ ؛ شکل ۳). با این وجود در مواجهه ماهیان با یون یا نانوذره نقره منجر به افزایش معنی‌دار مقادیر این شاخص‌ها در مقایسه با گروه شاهد شد ($P < 0/05$ ؛ شکل ۳).



شکل ۱: سطوح شاخص‌های تنش اکسیداتیو پلاسمای خون ماهی پرت پس از قرار گرفتن در معرض نانوذرات نقره و یون نقره با غلظت ۲۵۰ میکروگرم در لیتر به مدت ۵ روز (میانگین \pm خطای استاندارد). الف) کاتالاز (CAT). ب) مالون دی‌آلدئید (MDA). ج) سوپر اکسید دیسموتاز (SOD). در هر شکل، حروف متفاوت بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.05$).



شکل ۲: سطوح آنزیم‌های کبدی پلاسماي خون ماهی پرت پس از قرار گرفتن در معرض نانوذرات نقره و یون نقره با غلظت ۲۵۰ میکروگرم در لیتر به مدت ۵ روز (میانگین \pm خطای استاندارد). الف) آلکالین فسفاتاز (ALP). ب) آلانین آمینوترانسفراز (ALT). ج) آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST). در هر شکل، حروف متفاوت بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.05$).



شکل ۳: سطوح پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین پلاسمای خون ماهی پرت پس از قرار گرفتن در معرض نانوذرات نقره و یون نقره با غلظت ۲۵۰ میکروگرم در لیتر به مدت ۵ روز (میانگین \pm خطای استاندارد). الف) پروتئین کل. ب) گلوبولین. ج) آلبومین. در هر شکل، حروف متفاوت بیانگر وجود اختلاف معنی دار است ($P < 0.05$).

بحث**آنزیم‌های اکسیداتیو**

در مطالعه حاضر سطح آنزیم‌های اکسیداتیو پلاسما ماهی پرت خونی در تیمارهای تحت تنش بیش از تیمار شاهد بود و میزان این افزایش در تیمار یون نقره به صورت معناداری بیش از تیمار نانوذرات نقره بود. آنزیم‌های مورد بررسی، هر یک به نحوی تنش اکسیداتیو را کاهش می‌دهند. آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) رادیکال آنیوسوپر اکسید را به اکسیژن و H_2O_2 تبدیل می‌کند، آنزیم کاتالاز رادیکال H_2O_2 به دست آمده از فرآیند آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز و دیگر فرآیندهای فیزیولوژیک را مهار می‌کند و MAD باعث جلوگیری از اکسیداسیون چربی‌های بدن می‌شود (Yang et al., 2020). با توجه به این که رادیکال‌های آزاد پتانسیل بالایی در آسیب رساندن به ساختار زیستی آبزیان دارند، طی فرآیند اکسیداسیون، در مولکول‌های زیستی، از جمله لیپیدها و پروتئین‌ها، رادیکال‌های آزاد مانند پروکسیل به وجود می‌آید و با آغاز واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیداسیون سبب آسیب بافتی می‌شوند (Martinez-Alvarez et al., 2005). در مطالعه حاضر آنزیم‌های اکسیداتیو در تیمارهای یون نقره و نانوذرات نقره سطح بالاتری

نسبت به تیمار شاهد داشت. افزایش آنزیم‌های اکسیداتیوهای یون نقره و نانوذرات نقره می‌تواند به دلیل حضور ذرات فلزی نقره در ابعاد نانومتری، یون‌های آزاد نقره و یون‌های نقره متصل به سطح نانو ذرات نقره باشد. در مطالعه Attia در سال ۲۰۱۴، نتایج نشان داد میزان سوپر اکسید دیسموتاز به صورت معناداری در تیمارهایی که تحت تنش نانونقره بودن افزایش یافت. بر اساس نتایج مطالعات انجام شده، انواع نانوذرات نقره خواص سمی برای آبزیان دارند (Baldissera et al., 2020) و این امر نیز در این مطالعات به خوبی دیده می‌شود و امکان حضور آن در محیط‌های طبیعی به دلیل تبدیل نانوذرات نقره و حتی خود نقره به یون نقره انکار ناپذیر است.

شاخص‌های کبدی

سطوح آنزیم‌های کبدی پلاسما شامل آلکالین فسفاتاز، آسپارات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز اصولاً برای ارزیابی آسیب‌های کبدی مورد بررسی قرار می‌گیرند. میزان این آنزیم‌های کبدی در تیمارهای یون نقره و نانوذرات نقره به صورت معناداری بیش از تیمار شاهد بود. افزایش در فعالیت این آنزیم‌های می‌تواند منعکس کننده تخریب کبد

حاضر میزان آنزیم آسپاراتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز در تیمار نانوذرات نقره و یون نقره در مقایسه با تیمار شاهد به صورت معناداری بیشتر بود که شاید دلیل آن به مدت زمان اعمال تیمار، تفاوت‌های فیزیولوژیک بین گونه‌ها یا شرایط کیفی آب مرتبط باشد. تنش کوتاه مدت می‌تواند باعث افزایش متابولیسم، اکسیداسیون و گلوکوزنر (Martinez-Alvarez et al., 2005) و در نتیجه افزایش شاخص‌های کبدی شود. در صورتی که مدت زمان تنش طولانی‌تر شود، ممکن است بافت کبد دچار آسیب شود و آنزیم‌های کبدی کاهش یابند. در مطالعه ابراهیم‌زاده و همکاران (۱۳۹۹) مشاهده شد که اعمال تنش نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo caspius*) باعث آسیب‌های کبدی می‌شود ولی میزان آسیب‌ها به دلیل کوتاه بودن زمان اعمال تنش زیاد نبود و باعث تلفات در این ماهیان نشد.

نقره می‌تواند از طریق تولید رادیکال‌های آزاد، سبب تخریب سلول‌های کبدی و افزایش میزان آلانین آمینوترانسفراز در خون شود (Serafini et al., 2019) و افزایش میزان آنزیم‌های کبدی در تیمارهای تنش، در مقایسه با تیمار شاهد این امر را تایید می‌کند. با توجه

باشد (Serafini et al., 2019). شاخص آلکالین فسفاتاز عموماً در بیشتر بافت‌های بدن یافت می‌شود و معمولاً این آنزیم توسط سلول‌های کبده صفر تولید می‌شود (Ghelichpour et al., 2020). افزایش سطح آن را می‌توان ناشی از توقف ترشح اسیدهای صفراوی و اختلالات کبدی دانست (Ye et al., 2019). در مطالعات دیگر نیز افزایش سطح آلکالین فسفاتاز پلاسما به توقف ترشح نمک‌های صفراوی نسبت داده شده است (Akbari and Jahanbakhshi, 2019). با این وجود درباره آنزیم‌های مورد بررسی، همواره روند تغییرات ثابتی تحت تاثیر حضور آلاینده‌ها مشاهده نمی‌شود. به عنوان مثال در مطالعه سلطانی و خوش‌باور رستمی (۱۳۸۱) درباره اثر فلزات سنگین بر تاس‌ماهی روسی (*Acipenser gueldenstaedtii*) نتایج نشان داد که میزان آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز و آسپاراتات آمینوترانسفراز در تیمارهای تحت تاثیر فلزات سنگین به صورت معناداری کاهش یافت. در مطالعه اسماعیلی و همکاران (۱۳۹۵) نیز مواجهه به مدت ۴۲ روز با نانوذرات نقره به صورت محلول در آب نوشیدنی جوجه‌های گوشتی، منجر به کاهش میزان آنزیم‌های آسپاراتات آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز شد. بر خلاف نتیجه یاد شده، در مطالعه

به نتایج به دست آمده از آنزیم‌های اکسیدایتو و این امر که میزان شاخص‌های کبدی در تیمار یون نقره به صورت معناداری بیش از تیمارهای شاهد و نانوذرات نقره بود، به نظر می‌رسد شدت آسیب یون نقره به مراتب بیشتر از نانوذرات نقره باشد.

پروتئین، آلبومین و گلوبولین پلاسما

سلول‌های بافت کبد یکی از مراکز مسئول ساخت پروتئین‌های پلاسما خون مانند آلبومین، فیبرینوژن و گلوبولین هستند (Bera et al., 2020). از این رو، هر گونه تغییر در مقادیر این شاخص‌ها می‌تواند به عنوان یک شاخص بالینی در بررسی سلامت سیستم ایمنی، کلیه و کبد جانوران محسوب شود (Helfman et al., 2009). محتوای پروتئین بافتی در آبزیان، به عنوان شاخص تنش ایجاد شده در اثر عوامل خارجی در نظر گرفته می‌شود (Singh and Sharma, 1998). در مطالعه حاضر میزان پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین در تیمارهای نانوذرات نقره و یون نقره به صورت معناداری بیشتر از تیمار شاهد بود. با این وجود، کاهش معنادار پروتئین پلاسما خون کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در معرض سمیت حاد فلزات سنگین

گزارش شد (Sancho et al., 1997). در مطالعه Ghelichpour و همکاران (۲۰۲۰) فلز سنگین روی در غلظت $0/1 \text{ LC}_{50}$ ۹۶ ساعته باعث کاهش معنادار میزان پروتئین پلاسما در خون ماهی کپور معمولی شد. در پژوهش دیگری، غلظت پروتئین پلاسما در خون کپور معمولی در مواجه با روی و کادمیوم، افزایش داشت که دلیل آن، تفاوت در شرایط آزمایش و نوع فلز مورد مطالعه بیان شده است (Serafini et al., 2019). به نظر می‌رسد تفاوت‌های گونه‌ای یا تفاوت در زمان اعمال تنش دلیل این تفاوت در پاسخ‌ها باشد. شاید کوتاه بودن مدت تنش ماهی پرت، منجر به افزایش شدت متابولیسم شده در حالی که هنوز آسیب شدیدی به بافت‌ها نرسیده است (Helfman et al., 2009). با این وجود به دلیل عدم بررسی بافتی و تغییرات متابولیسمی ماهی مورد بررسی، امکان اظهار نظر در این باره به صورت قطعی وجود ندارد.

امروزه استفاده از نانوذرات نقره در صنعت رواج پیدا کرده است. قابل توجه است که این ذرات می‌توانند مستقیماً یا به واسطه ایجاد یون‌های نقره به آبزیان آسیب برسانند. بر اساس نتایج این مطالعه یون نقره اثرات سمی‌تری را نسبت به نانوذرات نقره دارد و آسیبی که به آبزی

می‌رساند جدی‌تر است. بنابراین ضرورت دارد که از رهائش این مواد به منابع آبی جلوگیری شود. همچنین، ارزیابی شاخص‌های بافت‌شناسی و تغییر مدت زمان اعمال تنش در مطالعات آتی پیشنهاد می‌شود.

منابع

- ابراهیمزاده س.م.، کلباسی م.ر.، حبیبی انبوهی م. و فرزانه پ. ۱۳۹۹. آثار هیستوپاتولوژیک سمیت حاد نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر بافت‌های آبشش، کبد و روده ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo caspius*). مجله تحقیقات دامپزشکی، ۷۵(۱): ۶۵-۷۳.
- اسماعیلی م.، هاشمی س.ر.، داودی د. و آهنگری ی. ۱۳۹۵. تاثیر افزودن زئولیت پوشش داده‌شده با نانو ذرات نقره در جیره بر عملکرد، جمعیت میکروبی آخرین بخش روده کوچک و ویژگی‌های ریخت‌شناختی روده جوجه‌های گوشتی. علوم دامی ایران، ۴۰(۸): ۵۷۹-۵۸۸.
- جوهری س.ع.، حبیبی ل. و حسینی س.ژ. ۱۳۹۴. سمیت کلوتید نانوقره در ماهی گورخری (*Danio rerio*): یونها، نانوذرات یا هر دو؟ تغذیه آبزیان، ۱(۱): ۵۹-۶۸.
- رزم‌آرا پ.، پیکان حیرتی ف. و درافشان س. ۱۳۹۳. اثر نانوذرات نقره بر برخی شاخص‌های خون‌شناسی گربه ماهی رنگین‌کمان (*Pangasius hypophthalmus*). مجله سلول و بافت، ۵(۳): ۲۶۳-۲۷۲.
- رزم‌آرا پ.، درافشان س.، پیکان حیرتی ف.، طالبی م. و رنجبر م. ۱۳۹۲. اثر نانوذرات نقره کلوتیدی و نیترات نقره محلول در آب بر تغییرات بافتی آبشش گربه‌ماهی رنگین‌کمان *Pangasianodon hypophthalmus*. مجله بوم‌شناسی آبزیان، ۳(۳): ۱۸-۱۰.
- سلطانی م. و خوش‌باور رستمی ح.ع. ۱۳۸۱. مطالعه اثر دیازینون بر برخی شاخص‌های خونی و بیوشیمیایی تاس ماهی روسی (چالباش) (*Acipenser gueldenstaedtii*). مجله علوم و فنون دریایی ایران، ۱(۴): ۶۵-۷۵.
- علیشاهی م.، حاجی‌پور ع.، قربانپور م. و مصباح م. ۱۳۹۷. بررسی اثر ادجوانی نانوکیتوزان بر ایمنی زایی واکسن کشته آئروموناس هیدروفیلا در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). مجله تحقیقات دامپزشکی (دانشگاه تهران)، ۳۲(۴): ۳۲۹-۳۴۶.
- مخلص آبادی فراهانی ا.، درافشان س. و پیکان حیرتی ف. ۱۳۹۶. کاهش آسیب‌های هیستوپاتولوژیک آبشش ماهی پرت (*Cichlasoma synspilum* × *Cichlasoma citrinellum*) در مواجهه با نانوذرات نقره محلول در آب از طریق تغذیه با جیره حاوی آستاگزانتین و نمک صفراوی. دو فصلنامه علوم آبزی‌پروری، ۵(۲): ۱۱-۱.
- مخلص آبادی فراهانی ا.، درافشان س. و پیکان حیرتی ف. ۱۳۹۸. شاخص‌های خون‌شناسی ماهی پرت (*Cichlasoma synspilum* × *Cichlasoma citrinellum*) تغذیه شده با مکمل غذایی آستاگزانتین و نمک صفراوی در مواجهه با نانوذرات نقره. نشریه علمی بوم‌شناسی آبزیان، ۹(۳): ۱۴۲-۱۳۴.

- Akbary P. and Jahanbakhshi A. 2019.** Nano and macro iron oxide (Fe_2O_3) as feed additives: Effects on growth, biochemical, activity of hepatic enzymes, liver histopathology and appetite-related gene transcript in goldfish (*Carassius auratus*). *Aquaculture*, 510: 191–197.
- Attia A.A. 2014.** Evaluation of the testicular alterations induced by silver nanoparticles in male mice: Biochemical, histological and ultrastructural studies. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 5(4): 1558–1589.
- Baldissera M.D., Souza C.F., Da Silva H.N.P., Zeppenfeld C.C., Dornelles J.L., Henn A.S., Duarte F.A., Da Costa S.T., Da Silva A.S., Cunha M.A. and Baldisserotto B. 2020.** Diphenyl diselenide dietary supplementation protects against fumonisin B1-induced oxidative stress in brains of the silver catfish *Rhamdia quelen*. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 36: 108–138.
- Bera K.K., Kumar S., Paul T., Prasad K.P., Shukla S.P. and Kumar K. 2020.** Triclosan induces immunosuppression and reduces survivability of striped catfish *Pangasianodon hypophthalmus* during the challenge to a fish pathogenic bacterium *Edwardsiella tarda*. *Environmental Research*, 66: 57–66.
- Borges A., Scotti L.V., Siqueira D.R., Jurinitz D.F. and Wassermann G.F. 2004.** Hematologic and serum biochemical values for jundia (*Rhamdia quelen*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 30(1): 21–25.
- Bradford M.M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2): 248–254.
- Demarchi C.A., Da Silva L.M., Niedzwiecka A., Slawska-Waniewska A., Lewinska S., Dal Magro J., Calisto J.F.F., Martello R. and Rodrigues C.A. 2020.** Nanoecotoxicology study of the response of magnetic O-carboxymethylchitosan loaded silver nanoparticles on *Artemia salina*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 66: 103–198.
- Di Giulio R.T. and Meyer J.N. 2008.** Reactive oxygen species and oxidative stress. P: 273–324. In: Di Giulio R.T. and Hinton D.E. (Eds.). *The Toxicology of Fishes*. CRC Press, USA.
- Ghelichpour M., Mirghaed A.T., Hoseini S.M. and Jimenez A.P. 2020.** Plasma antioxidant and hepatic enzymes activity, thyroid

- hormones alterations and health status of liver tissue in common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to lufenuron. *Aquaculture*, 56: 34–66.
- Govindasamy R. and Rahuman A.A. 2012.** Histopathological studies and oxidative stress of synthesized silver nanoparticles in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Journal of Environmental Sciences*, 24(6): 1091–1098.
- Helfman G., Collette B.B., Facey D.E. and Bowen B.W. 2009.** *The Diversity of Fishes: Biology, Evolution, and Ecology*. John Wiley and Sons, Malaysia. 550P.
- Jones-Trower A., Garcia A., Meseda C.A., He Y., Weiss C., Kumar A., Weir J.P. and Merchlinsky M. 2005.** Identification and preliminary characterization of vaccinia virus (Dryvax) antigens recognized by vaccinia immune globulin. *Virology*, 343(1): 128–140.
- Liu J. and Hurt R.H. 2010.** Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids. *Environmental Science and Technology*, 44(6): 2169–2175.
- Luther W. and Zweck A. 2013.** Economic impact and applications of nanomaterials. *Safety Aspects of Engineered Nanomaterials*, 66: 63–78.
- Marklund S. and Marklund G. 1974.** Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry*, 47(3): 469–474.
- Martinez-Alvarez R.M., Morales A.E. and Sanz A. 2005.** Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 15(1): 75–88.
- Moss M.L., Sklair-Tavron L. and Nudelman R. 2008.** Drug insight: Tumor necrosis factor-converting enzyme as a pharmaceutical target for rheumatoid arthritis. *Nature Clinical Practice Rheumatology*, 4(6): 300–309.
- Pournori B., Paykan Heyrati F. and Dorafshan S. 2017.** Histopathological alterations in various tissues of striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus*, fed on dietary nucleotides and exposed to water-borne silver nanoparticles or silver nitrate. *Iranian Journal of Aquatic Animal Health*, 3(2): 36–52.
- Sancho E., Ferrando M.D. and Andreu E. 1997.** Sublethal effects of an organophosphate insecticide on the European eel, *Anguilla anguilla*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 36(1):57–65.

- Scown T.M., Santos E.M., Johnston B.D. and Gaiser B. 2010.** Effects of aqueous exposure to silver nanoparticles of different sizes in rainbow trout. *Toxicological Sciences*, 115(2): 521–534.
- Serafini S., De Freitas Souza C., Baldissera M.D., Baldisserotto B., Picoli F., Segat J.C., Baretta D. and Da Silva A.S. 2019.** Fish exposed to eprinomectin show hepatic oxidative stress and impairment in enzymes of the phosphotransfer network. *Aquaculture*, 508(11): 199–205.
- Singh R.K. and Sharma B. 1998.** Carbofuran induced biochemical changes in *Clarias batrachus*. *Pesticide Science*, 53(4): 285–290.
- Xiu Z., Zhang Q., Puppala H.L., Colvin V.L. and Alvarez P.J.J. 2012.** Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles. *Nano Letters*, 12(8): 4271–4275.
- Yang C., Lim W. and Song G. 2020.** Mediation of oxidative stress toxicity induced by Pyrethroid pesticides in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 66: 106–111.
- Ye H., Zhou Y., Su N., Wang A., Tan X., Sun Z., Zou C., Liu Q. and Ye C., 2019.** Effects of replacing fish meal with rendered animal protein blend on growth performance, hepatic steatosis and immune status in hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂). *Aquaculture*, 511(10): 734–743.



Research Paper

Effects of water-borne silver ions and nanoparticles on some physiological characteristics of hybrid Blood parrot (*Cichlasoma synspilum* ♀ × *Cichlasoma citrinellum* ♂)

Amin Mokhles Abady Farahany¹, Fatemeh Peykan Heyrati^{2*}, Salar Dorafshan³

Received: May 2020

Accepted: September 2020

Abstract

The effects of water-borne silver ions and nanoparticles on oxidative stress responses, plasma liver enzymes and some other biochemical characteristics of blood parrot fish were investigated. For this study, 60 parrot fishes (average weight 25.5 ± 6.5 g) were randomly distributed into three different treatments including control, silver nanoparticles (250 μ g/L) and silver ions (250 μ g/L) for 5 days, without feeding during stress. The results showed that the effect of silver ions on plasma oxidative indices and liver enzyme levels was significantly higher than silver nanoparticles meanwhile they were significantly higher than control ($P < 0.05$). Silver ion and nanoparticles also induced significant elevation on plasma protein, albumin and globulin levels in comparison to the control, but the effects of both chemicals on the recently mentioned characteristics were the same ($P > 0.05$). In general, the results showed that both nano silver and ion could affect some physiological aspects of the blood parrot, but silver ions showed the highest effects.

Key words: *Silver Ion, Silver Nanoparticles, Blood Parrot Fish, Oxidative Stress.*

1- Ph.D. Student in Fisheries, Faculty of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.

2-Assistant Professor in Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.

3- Associate Professor in Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.

*Corresponding Author: fheyрати@iut.ac.ir