

تأثیر تغذیه‌ای جلبک پادینا (*Padina australis*) بر بافت کبد و آبشش کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در مواجهه با نانو اکسید روی

سید علی اکبر هدایتی*^۱، ساناز عالیه^۱، فرحناز کاکاوند^۱، عاطفه ابری^۱، روح ا. شیخ ویسی^۱، حسن صحرائی^۲، فاطمه محمودی^۲

^۱گروه تولید و بهره‌برداری آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
^۲گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران.

*نویسنده مسئول: hedayati@gau.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۱/۱۷

تاریخ دریافت: ۹۸/۹/۱۷

چکیده

تحقیق حاضر به منظور بررسی تأثیر پیش تیمار جلبک پادینا (*Padina australis*) بر بافت آبشش و کبد ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در مواجهه با نانو ذرات اکسید روی انجام گرفت. از این رو ابتدا تعداد ۲۵۰ قطعه ماهی کپور معمولی با محدوده وزنی حدود $20 \pm 2/4$ گرم در ۴ تیمار و هر تیمار با ۳ تکرار شامل غذای فاقد جلبک (تیمار ۱، شاهد)، غذای حاوی درصد‌های مختلف جلبک در جیره شامل ۰/۵ درصد جلبک (تیمار ۲)، غذای حاوی ۱ درصد جلبک (تیمار ۳) و غذای حاوی ۲ درصد جلبک (تیمار ۴) توزیع و به مدت ۴۲ روز به میزان ۳ درصد وزن بدن مورد تغذیه قرار گرفتند، سپس بچه ماهیان در مجاورت ۵۰ درصد غلظت کشنده نانو ذرات اکسید روی به مدت ۱۴ روز قرار گرفتند. نتایج تغییرات بافت آبشش در تیمارهایی که تنها تحت تأثیر نانو روی بودند شامل هایپرپلازی راسی، هایپرپلازی پایه‌ای، کوتاه شدن تیغه‌های آبششی برآمدگی اپی‌تلیال، خمیدگی سلول‌های تیغه ثانویه، چسبندگی لاملایی به صورت شدید بود، که میزان این تغییرات و آثار هیستوپاتولوژیک آبشش در تیمارهای ترکیبی نانو روی و جلبک با افزایش میزان غلظت جلبک پادینا به طرز چشم‌گیری کاهش یافت. همچنین تیمار نانو روی منجر به بروز آسیب‌های بافتی از جمله آتروفی، تورم صفراوی، آماس سینوزوئید، خونریزی هموراژی، آب آوردگی، تغییر شکل ابری در کبد کپور ماهیان گردید، گرچه این عوارض (کبدی) در تیمارهای ترکیب نانوروی و جلبک نیز مشاهده شد، اما شدت آسیب‌ها با افزایش غلظت جلبک پادینا کاهش یافت. از این رو با توجه به نتایج فوق چنین می‌توان استنباط کرد که جلبک پادینا می‌تواند نقش موثری در کاهش عوارض بافتی (کبد و آبشش) ناشی از مواجهه با نانو ذرات روی داشته باشد.

واژگان کلیدی: کبد، آبشش، جلبک پادینا، کپور معمولی، نانو اکسید روی.

مقدمه

اسماعیل‌زاده و همکاران (۱۳۹۱) تأثیر پودر جلبک دریایی پادینا (*Padina gymnospora*) و سارگاسوم (*Sargassum ilicifolium*) بر رشد و بقاء خیار دریایی (*Holothuria scabra*) را بررسی کردند. تأثیر مثبت جلبک دریایی (*Gracilaria cornea*) روی نرخ کارائی پروتئین نیز گزارش شده است (Valente et al., 2006). در چندین تحقیق دیگر هم گزارش شده که استفاده از مکمل‌های تغذیه ای جلبکی به صورت پودر یا عصاره توانسته سبب ارتقای سیستم ایمنی و بقای میگوها در چالش باکتری‌ها شود (Chotiegat et al., 2004; Cheng et al., 2005).

توسعه سریع ترکیبات نانو و نانو تکنولوژی در

جلبک‌های دریایی ۸۵ درصد از کل تولید جهانی گیاهان آبی را تشکیل می‌دهند و به‌عنوان یکی از بزرگترین تولیدکنندگان دریا محسوب می‌شوند (Fleurence et al., 2012). هم‌چنین آن‌ها غنی از مواد معدنی، پروتئین، ویتامین، فیبرهای خوراکی و نیز پلی‌ساکاریدهایی با عملکرد مختلف و ضروری برای تغذیه انسان می‌باشند و به‌خاطر داشتن خصوصیات بیوتکنولوژیکی، از آن‌ها عموماً برای استخراج ترکیبات زیست‌فعال استفاده می‌کنند (Cheng et al., 2005). جلبک پادینا یک جلبک پرسلولی است که در آب‌های غنی از مواد مغذی ضروری رشد می‌کند (Choi et al., 2015).

آبشش ماهی به صورت فرایندهای ذره خواری نظیر اگزوسیتوز انجام می‌پذیرد. قرار گرفتن در معرض آلاینده‌های شیمیایی می‌تواند ضایعات و آسیب‌های متعددی را به بافت‌ها و سلول‌های مختلف ماهی وارد کند. آزمایشات آسیب شناسی بافتی، ابزاری مفید به منظور ارزیابی میزان آلودگی و بررسی اثرات آلاینده، به ویژه اثرات حاد و مزمن بر موجودات زنده می‌باشد. در واقع تغییرات بافتی که در اثر قرار گرفتن موجود زنده در معرض غلظت تحت حاد از یک سم بروز می‌دهد، واکنشی از موجود زنده است که اطلاعاتی در مورد ماهیت مواد سمی را فراهم می‌کند. حساسیت گونه‌های مختلف ماهیان به مواد سمی، متغیر است، از این رو ضروری است آزمایش‌های سم‌شناسی برای ماهیان مختلف صورت گیرد (Finney, 1971).

در این راستا تحقیق حاضر به منظور بررسی تاثیر پیش تیمار جلبک پادینا (*Padina astraulis*) بر بافت آبشش و کبد ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در مواجهه با نانو ذرات اکسید روی انجام گرفت. کپور معمولی یکی از مهم‌ترین ماهیان پرورشی و تجاری در دنیا و ایران محسوب می‌گردد (ستاری، ۱۳۸۲).

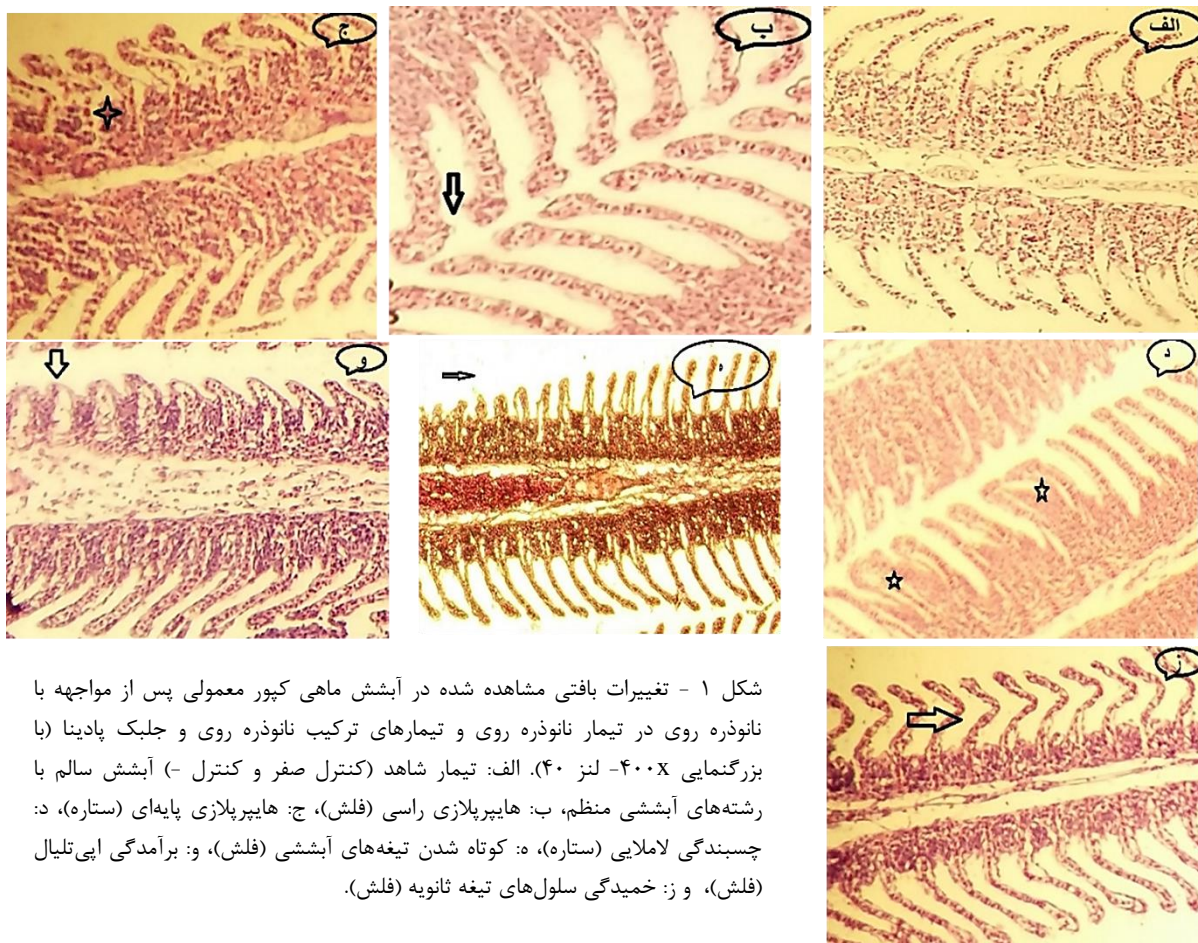
مواد و روش‌ها

آماده‌سازی نمونه‌ها و شرایط آزمایشگاهی: این تحقیق در دو مرحله انجام گرفت که عبارت بودند از ۴۲ روز تغذیه با جلبک پادینا و ۱۴ روز قرار گرفتن در معرض نانو اکسید روی، در محل مرکز تحقیقات آبی پروری شهید ناصر فضلی برآبادی گروه شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. ابتدا تعداد ۲۵۰ بچه ماهی کپور معمولی با محدوده وزنی حدود $20 \pm 2/4$ گرم از مراکز تکثیر و پرورش بخش خصوصی تهیه گردید. بعد از ضدعفونی و آماده‌سازی آکواریوم‌ها، آبیگری آن‌ها صورت گرفت و سپس به آکواریوم‌های آزمایشگاه منتقل شدند. برای سازگار شدن با محیط آزمایش به مدت یک هفته در داخل تانک‌های پرورشی نگهداری شدند. در طول دوره‌ی آزمایش فاکتورهای فیزیکی شیمیایی آب شامل دمای آب 21 ± 1 درجه سانتی‌گراد، پی‌اچ (PH) $6/7-7/9$ ، غلظت اکسیژن محلول $7-9$ میلی‌گرم در لیتر و سختی آب 210 میلی‌گرم کربنات کلسیم در

سال‌های اخیر افق جدیدی به روی بسیاری از صنایع و بخش‌های مختلف گشوده که سرچشمه انقلاب صنعتی جدید گردیده است. در سال‌های اخیر، نانو تکنولوژی تبدیل به یکی از مهم‌ترین و مهیج‌ترین حوزه‌های رو به پیشرفت در فیزیک، شیمی، علوم مهندسی و زیست‌شناسی شده است. ذرات نانو به خاطر خصوصیت‌های غیرمعمول نوری، شیمیایی، فوتوالکتروشیمیایی و الکتریکی، مورد توجه دانشمندان قرار گرفته است (Gong *et al.*, 2007).

نانو اکسید روی ترکیبی غیرآلی با فرمول ZnO می‌باشد و معمولاً به صورت پودری سفیدرنگ است که ظرفیت کاتالیزوری بالا و خاصیت ضد میکروبی دارد (Stoimenov *et al.*, 2002). همزمان با افزایش تولید و استفاده از نانوذرات روی در محصولات تجاری، امکان رهایش آن‌ها به محیط زیست و از جمله به بوم‌سازگان‌های آبی افزایش می‌یابد، به طوری که میزان ورود این نانوذرات را به محیط آبی 3700 تن در سال برآورد کرده‌اند (Zhao *et al.*, 2013). از آن جایی که نانوذرات مصنوعی تولید بشر هستند و در فرآیند تکامل وجود نداشته‌اند، در حال حاضر، نگرانی زیادی پیرامون آلودگی موجودات زنده با آن‌ها وجود دارد اگرچه روی از نظر تغذیه‌ای جزو عناصر مغذی و ضروری برای زندگی جانوران و از جمله آبزیان محسوب می‌شود (Houng-Yung, 2014). اما غلظت‌های بالای آن در محیط زیست یا خوراک موجودات آبی باعث ایجاد مسمومیت می‌شود (Zheng *et al.*, 2014).

هدایتی و همکاران (۱۳۹۲) به بررسی اثرات سمیت کشنده نانو اکسید روی، نانو اکسید مس و نانو دی اکسید تیتانیوم و بررسی اثرات سمیت تحت کشنده آن‌ها بر فاکتورهای خون و بافت آبشش ماهی قرمز، کپور معمولی و کلمه (*Rutilus rutilus*) پرداختند. نتایج نشان‌دهنده وجود تفاوت در غلظت کشنده نانو ذرات روی (Zn-NPs)، مس (Cu-NP) و تیتانیوم (TiO₂ NPs) در ۳ گونه ماهی مورد مطالعه بود. Handy و همکاران (۲۰۰۸) با مطالعه بر ساختار و نحوه عملکرد ذرات نانو بر بدن ماهی بیان نمودند که جذب نانوذرات تیتانیوم و کبالت در بافت آبشش و موکوس موجود، بر روی آن به یک صورت انجام می‌گردد ولی جذب این مواد در بافت اپی تلیال



شکل ۱ - تغییرات بافتی مشاهده شده در آبشش ماهی کپور معمولی پس از مواجهه با نانوذره روی در تیمار نانوذره روی و تیمارهای ترکیب نانوذره روی و جلبک پادینا (با بزرگنمایی ۴۰۰X - لنز ۴۰). الف: تیمار شاهد (کنترل صفر و کنترل -) آبشش سالم با رشته‌های آبششی منظم، ب: هایپرپلازی راسی (فلش)، ج: هایپرپلازی پایه‌ای (ستاره)، د: چسبندگی لاملایی (ستاره)، ه: کوتاه شدن تیغه‌های آبششی (فلش)، و: برآمدگی اپی‌تلیال (فلش)، ز: خمیدگی سلول‌های تیغه ثانویه (فلش).

زیست‌سنجی از طریق اندازه‌گیری طول، وزن و تخصیص کد به هر ماهی نمونه‌ها مشخص شدند. برای بررسی بافت آبشش از کمان دوم آبششی، نمونه آبشش تهیه و در تثبیت کننده مناسب تثبیت شد و پس از قالب‌گیری در پارافین با ضخامت ۵ میکرون برش خورد و به روش اتوزین-هماتوکسیلین رنگ-آمیزی گردید و پس از آن تغییرات بافت‌شناسی بررسی شد. برای بررسی آسیب‌های بافتی، از مقایسه بافت‌های مورد نظر با نمونه‌های شاهد و نیز منابع موجود، آسیب‌های ایجاد شده تشخیص و به‌وسیله میکروسکوپ مجهز به دوربین عکس‌برداری صورت گرفت (هدایتی و همکاران، ۱۳۹۲).

نتایج

تغییرات هیستوپاتولوژیک بافت آبشش: با بررسی تغییرات آسیب‌شناسی بافت آبشش کپور معمولی در گروه‌های مختلف مشاهده گردید که گروه شاهد (کنترل صفر = بدون هیچ گونه شرایط آزمایشگاهی و کنترل - (منفی) = گروه مواجهه با

لیتر بود.

آزمایش‌های تغذیه‌ای: بعد از گذشت یک هفته از دوره سازگاری، ماهی‌ها در ۴ تیمار و هر تیمار با ۳ تکرار شامل غذای فاقد جلبک (تیمار ۱، شاهد)، غذای حاوی درصد‌های مختلف جلبک در جیره شامل ۰/۵ درصد جلبک (تیمار ۲)، غذای حاوی ۱٪ جلبک (تیمار ۳) و غذای حاوی ۲٪ جلبک (تیمار ۴) توزیع و به مدت ۴۲ روز به میزان ۳ درصد وزن بدن مورد تغذیه قرار گرفتند.

آزمایش مواجهه با نانو ذرات: بعد از گذشت ۴۲ روز تغذیه، بچه ماهیان در مجاورت ۵۰ درصد غلظت کشنده نانو اکسید روی به مدت ۱۴ روز قرار گرفتند (هدایتی و همکاران، ۱۳۹۲).

نمونه‌برداری از ماهی‌های آزمایشی: در پایان آزمایش از هر تیمار ۹ نمونه بافت کبد و آبشش گرفته شد. جهت نمونه‌برداری، ماهیان در داخل تشت‌های پلاستیکی محتوی آب همسان با آکواریوم هر ماهی که دارای ماده بیهوش کننده یوژینول با غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام بود، بی‌هوش شدند. پس از

جدول ۱ - درجه بندی نیمه کمی آسیب بافت آبشش کپور معمولی در گروه‌های مختلف آزمایشی.

آسیب							تیمار		
شاهد	جلبک پادینا ۰/۵ درصد	جلبک پادینا ۱ درصد	جلبک پادینا ۲ درصد	نانو روی	نانو روی و پادینا ۱ درصد	نانو روی و پادینا ۲ درصد			
هایپرپلازی راسی	-	-	-	+++	++	++			
هایپرپلازی پایه‌ای	-	-	-	+++	++	+			
کوتاه شدن تیغه‌های آبششی	-	-	-	++	++	+			
برآمدگی اپی‌تلیال	-	-	-	+++	+	+			
خمیدگی سلول‌ها	-	-	-	+++	+	-			
چسبندگی لاملائی	-	-	-	++	-	-			

ارزش نمره: عدم وجود عارضه -، ضعیف +، متوسط ++، شدید +++

جدول ۲ - درجه بندی نیمه کمی آسیب بافت کبد کپور معمولی در گروه‌های مختلف آزمایشی.

آسیب							تیمار		
شاهد	جلبک پادینا ۰/۵ درصد	جلبک پادینا ۱ درصد	جلبک پادینا ۲ درصد	نانو روی	نانو روی و پادینا ۱ درصد	نانو روی و پادینا ۲ درصد			
آتروفی	-	-	-	+++	++	++			
تورم صفراوی	-	-	-	+++	+	+			
آماس سینوزوئید	-	-	-	+++	++	+			
خونریزی هموراژی	-	-	-	+++	++	+			
آب آوردگی	-	-	-	++	+	+			
تغییر شکل ابری	-	-	-	+++	++	++			

ارزش نمره: عدم وجود عارضه -، ضعیف +، متوسط ++، شدید +++

شدید بوده است. در تیمار ترکیب نانو روی و جلبک ۰/۵ درصد عارضه آبشش شامل موارد بیان شده با شدت کمتر از تیمار نانو روی (کنترل +) بود. تیمار ترکیب نانو روی و جلبک ۱ درصد، عارضه آبشش شامل موارد نام برده بدون وجود چسبندگی لاملائی، با شدت بسیار کمتر از تیمار نانو روی بوده و در آخر در تیمار ترکیب نانو روی و جلبک ۲ درصد عوارض شامل عارضه‌های بیان شده بدون وجود هایپرپلازی پایه‌ای و چسبندگی لاملائی، به صورت ضعیف از تیمار نانو روی دیده شد (جدول ۱).

تغییرات هیستوپاتولوژیک بافت کبد: تغییرات هیستوپاتولوژی بافت کبد کپور معمولی در گروه‌های مختلف آزمایشی در شکل ۲ ارائه شده است. بافت کبد سالم با فضاهای سینوزوئیدی و سلول‌های هپاتوسیت مربوط به گروه شاهد است. اگرچه تغییرات هیستوپاتولوژی بافت کبد در تمامی گروه‌های نانو روی و ترکیب نانو روی و جلبک وجود داشت؛ اما شدت آن از تیمار ترکیب نانو روی و

سطوح مختلف جلبک پادینا) دارای آبشش سالم با رشته‌های آبششی منظم است. همچنین در تیمار نانو روی (کنترل +) آسیب‌های متعددی به صورت شدید مشاهده شد. با این وجود با افزایش غلظت جلبک پادینا در تیمارهای ترکیب نانو روی و جلبک شدت آسیب‌ها به طرز چشمگیری کاهش یافت و در بعضی موارد به طور کامل از بین رفت. هایپرپلازی راسی، هایپرپلازی پایه‌ای، کوتاه شدن تیغه‌های آبششی، برآمدگی اپی‌تلیال، خمیدگی سلول‌های ثانویه، چسبندگی لاملائی از جمله عوارض شایع در بافت آبشش ماهیان در معرض قرارگیری با نانو روی و ترکیب نانو روی و جلبک بود (شکل ۱).

در کپورهای گروه شاهد هیچ گونه عارضه و ناهنجاری در بافت آبشش دیده نشد. تغییرات بافت آبشش کپور ماهی تحت تاثیر نانو روی شامل هایپرپلازی راسی، هایپرپلازی پایه‌ای، کوتاه شدن تیغه‌های آبششی برآمدگی اپی‌تلیال، خمیدگی سلول‌های تیغه ثانویه، چسبندگی لاملائی به صورت

هیستوپاتولوژیک ایجاد شده در آبشش و کبد ماهی کپور معمولی در این تحقیق پس از مواجهه با نانوذره روی نوعی پاسخ فیزیولوژیک است که جاندار برای ممانعت از ورود این مواد به بدن خود و جلوگیری از آسیب‌های وارده ایجاد کرده است. تغییرات مشاهده شده در این مطالعه با فلز روی (نانوذره روی) خاص این فلز نیست و ممکن است با آلاینده‌های دیگری یا در پاسخ مزمن به عفونت‌های انگلی یا باکتریایی هم دیده شود. آبشش‌ها یکی از اندام‌های اصلی در معرض قرارگیری مستقیم با فلزات هستند که نقش مهمی در جذب، ذخیره و انتقال فلزات به محیط داخلی دارند (پیریگی، ۱۳۹۲).

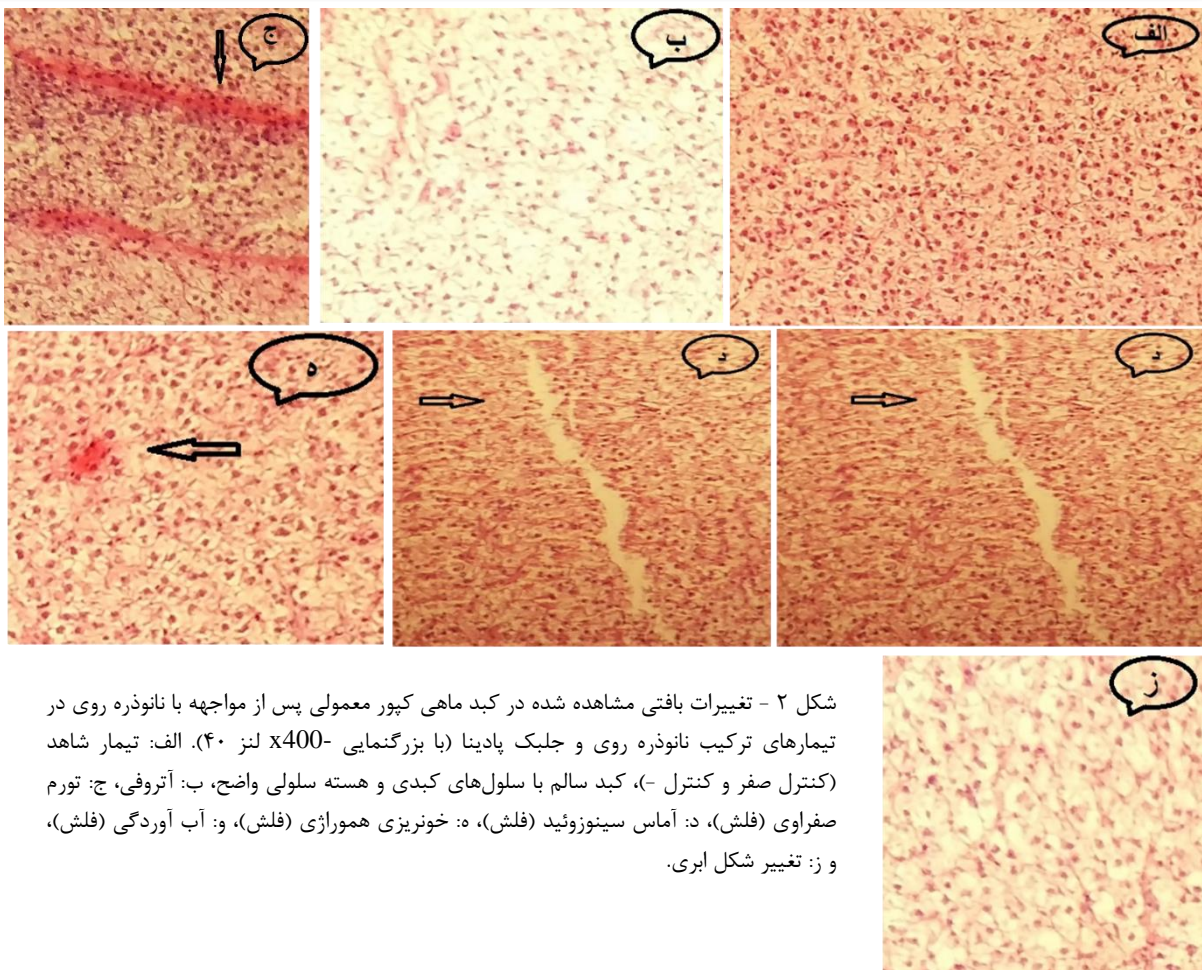
به نظر می‌رسد فلزات سنگین با اثر بر روی سلول‌های آبشش باعث از بین بردن سلول و کاهش جذب اکسیژن از طریق آبشش و اختلال در دفع مواد زائد و بهم زدن تنظیم اسمزی شوند. در مطالعه حاضر آثار هیستوپاتولوژیک بافت آبشش در تیمار نانو روی در مقایسه بافت آبشش ماهیان تیمار شاهد مشهود بود؛ اما با افزایش میزان غلظت جلبک پادینا در تیمارهای ترکیب نانو روی و جلبک آثار هیستوپاتولوژیک در بافت آبشش کاهش یافت. به نظر می‌رسد جلبک پادینا توانسته اثر هیستوپاتولوژیک ناشی از حضور نانو روی را کاهش دهد و در برخی موارد باعث عدم حضور علائم هیستوپاتولوژیک گردد. در حالی که روی عنصری ضروری برای انجام متابولیسم سلولی است دارای سمیت جزئی نیز می‌باشد ولی در صورتی که مقدار آن از حد معینی تجاوز کند از عناصر سمی به شمار می‌رود. سمیت حاد این فلز بر گونه ماهی کپور معمولی طی تحقیقی در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد و بافت آبشش بچه ماهی کپور معمولی از نظر ضایعات میکروسکوپی و هیستوپاتولوژیک بررسی شدند، نتایج نشان داد که این عمل منجر به بروز آسیب‌هایی مانند هایپرتروفی و هایپرپلازی سلول‌های پوششی آبشش، فیوژن یا چسبندگی لاملاهای ثانویه و افزایش و تکثیر سلول‌های مخاطی گردید (Naji et al., 2006). از آن-جا که بافت آبشش دارای محافظت کمتری نسبت به سایر بافت‌ها است و به‌طور مستقیم با آب مجاورت دارد از حساسیت بیشتری برخوردار است. در مطالعه‌ای اثرات هیستوپاتولوژی برخی از فلزات

جلبک ۰/۵ درصد تا تیمار ترکیب نانو روی و جلبک ۲ درصد کاهش یافت. از جمله عوارض شایع در بافت کبد کپور ماهیان در معرض قرارگیری با نانو روی و ترکیب نانو روی و جلبک شامل آتروفی، تورم صفراوی، آماس سینوزوئید، خونریزی هموراژی، آب آوردگی و تغییر شکل ابری بود (شکل ۲).

در مقایسه نیمه کمی تغییرات هیستوپاتولوژیک بافت کبد، عوارض با شدت متفاوت در ماهیان نمونه-برداری شده از تمامی تیمارهای آزمایشی به جز گروه شاهد مشاهده شد (جدول ۲). در بافت سالم کبد ماهیان گروه شاهد، سلول‌های کبدی و با هسته سلولی واضح قابل تشخیص بود. در تیمار نانو روی، آتروفی، تورم صفراوی، آماس سینوزوئید، خونریزی هموراژی، آب آوردگی، تغییر شکل ابری بصورت شدید مشاهده شد. در تیمار ترکیب نانو روی و جلبک ۰/۵ درصد، آتروفی و تغییر شکل ابری همانند تیمار نانو روی (کنترل +) شدید دیده شد و تورم صفراوی، آماس سینوزوئید، خونریزی هموراژی و آب آوردگی متوسط ارزیابی شد. در تیمار ترکیب نانو روی و جلبک ۱ درصد آتروفی، آماس سینوزوئید، خونریزی هموراژی و تغییر شکل ابری متوسط ارزیابی گردید و تورم صفراوی و آب آوردگی ضعیف دیده شد. در تیمار ترکیب نانو روی و جلبک ۲ درصد آتروفی و تغییر شکل ابری به‌صورت متوسط دیده شد و تورم صفراوی، آماس سینوزوئید، خونریزی هموراژی، آب آوردگی به‌صورت ضعیف مشاهده گردید (جدول ۲).

بحث

یکی از مهمترین و کاربردی‌ترین راه‌هایی که می‌توان میزان آلودگی محیط (اکوسیستم‌های آبی) و اثرات سوء آن بر موجودات را مطالعه کرد، یکی از روش‌ها، بررسی تغییرات بافتی آبزیان در نتیجه تأثیر فلزات سنگین می‌باشد (Esmaili et al., 2007). آبشش، کبد و مغز اندام‌های پاسخ حساس‌تر بوده و روده اندامی با حداقل حساسیت است. تغییرات در آبشش، به‌عنوان یک نشانگر زیستی ریخت‌شناسی در ارزیابی آلودگی محیط زسیت بکار می‌رود (جوهری، ۱۳۹۰). بسیاری از سموم به‌خصوص فلزات سنگین مانند روی می‌توانند با آسیب‌های بافتی آبشش و کبد ارتباط داشته باشند به نظر می‌رسد. تغییرات



شکل ۲ - تغییرات بافتی مشاهده شده در کبد ماهی کپور معمولی پس از مواجهه با نانوذره روی در تیمارهای ترکیب نانوذره روی و جلبک پادینا (با بزرگنمایی -400x لنز ۴۰). الف: تیمار شاهد (کنترل صفر و کنترل -)، کبد سالم با سلول‌های کبدی و هسته سلولی واضح، ب: آتروفی، ج: تورم صفراوی (فلش)، د: آماس سینوزوئید (فلش)، ه: خونریزی هموراژی (فلش)، و: آب آوردگی (فلش)، و ز: تغییر شکل ابری.

تیغه‌های تنفسی، هایپرتروفی تیغه‌های آبششی، هایپرپلازی اپی‌تلیال سطحی رشته‌های تنفسی و همجوشی در رشته‌های آبششی مشاهده شد. نتایج همچنین نشان داد که نانوذرات نقره اثرات مخربی بر بافت آبشش داشته و می‌تواند سبب دوشاخگی رشته‌های آبششی، افزایش در اندازه و تعداد سلول‌های موکوسی و هایپرپلازی اپیتلیوم لاملا شود. در ماهی سوف (*Perca fluviatilis*) نیز نانوذرات نقره سبب اختلال در عملکرد آبشش برای گرفتن اکسیژن در شرایط کمبود اکسیژن در آب شد. به نظر می‌رسد این مواد بر سطح آبشش اثر گذاشته که در نهایت منجر به اختلال در تبادل گازها می‌شود (Bilberg *et al.*, 2010). آبشش‌ها می‌توانند عناصر فلزی را در تماس مستقیم از آب و غیرمستقیم از مواد غذایی جذب نمایند و محل‌هایی برای جذب یون‌های موجود در آب بوده و این موضوع می‌تواند بر سطوح فلزات تأثیر بگذارد. بدین ترتیب فلزات با موکوس آبشش‌ها تشکیل کمپلکس داده و این عامل خروج فلزات از بافت را تقریباً غیرممکن ساخته و

سنگین (سولفات مس، سولفات روی و سولفات جیوه-کلرور کادمیوم) بر بافت‌های ماهی کپور معمولی، نتایج نشان داد که در آبشش، چسبندگی لاملاها، پرخونی و خونریزی، آنوریسم، تلانژیکتازی و نفوذ سلول‌های آماسی و هایپرپلازی سلول‌های پوششی رشته‌های آبششی قابل مشاهده بود (Rostami, 2000). در سنجش میزان فلزات سنگین (نیکل کبالت، کادمیوم، کروم و روی) در بافت‌های مختلف سیاه‌ماهی (*Capoeta fusca*) نتایج نشان داد که بیشترین تجمع در بافت کبد و سپس آبشش و کمترین آن در بافت پوست بود، از طرفی فلز روی بیشترین و فلز کادمیوم کمترین میزان تجمع را در بافت‌های سیاه‌ماهی داشته است. Gardner و همکاران (۱۹۷۰) نشان دادند که تغییرات هیستوپاتولوژیک در تیغه‌های آبشش و لاملاهای تنفسی ماهی *Fundulus heteroclitus* پس از ۲۰ ساعت در معرض قرارگیری کادمیوم با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر صورت می‌گیرد. در بررسی آسیب‌شناسی، نکروز و آسیب شدید به

باعث تجمع فلزات در آبشش می‌شود (Bahnasawy *et al.*, 2009).

کبد، اندامی مهم برای تنظیم سوخت و ساز و فعالیت سم‌زدایی در بدن ماهی است که نسبت به حضور آلاینده‌ها بسیار حساس است. تحقیقات متعددی به بررسی پاسخ آسیب‌شناسی بافت کبد پس از مواجهه با مواد آلاینده پرداخته است. به‌عنوان مثال، بررسی غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر فلز سرب بر بافت کبد ماهی کلمه نشان داد که فلز سرب باعث تغییرات آسیب‌شناسی بافتی در کبد از جمله واکنش‌ها شدن، پرخونی، پیکنوزیس هسته‌ای، نکروز کانونی و تجمع هموسیدرین در سلول‌های ملانوماکروفاژها شد (Mohammadzadeh *et al.*, 2011). هر دو ترکیب نانوذره (CuNPs) و سولفات مس (CuSO₄) تأثیر مشابهی بر بافت کبد در قزل‌آلای رنگین‌کمان را پس از چهار روز مواجهه نشان دادند که شامل پیکنوزیس هسته‌ای، واکنش شدن سیتوپلاسم، نکروز کانونی و همچنین افزایش ملانوماکروفاژها بود (Al-Bairuty *et al.*, 2013). بندانی و همکاران (۱۳۹۴) سطح عناصر فلزی (سرب، کادمیوم، کروم و روی) را در بافت عضله و کبد ماهی کپور در سواحل استان گلستان بررسی کردند آن‌ها بالاترین میزان روی را در بافت کبد به‌دست آوردند. سمیت نانوذره اکسید روی در پنج گونه آبی دریایی بررسی شد و مشاهده گردید که این نانوذره می‌تواند با ایجاد استرس اکسیداتیو به سلول‌ها آسیب برساند (Wong *et al.*, 2010). گزارش دیگری اضافه می‌کند روی موجب کاهش بعضی آنزیم‌های کبدی مانند آلکالین فسفاتاز می‌شود (Batra *et al.*, 2002). نانوذره اکسید روی به‌طور عمده در استخوان و پوست تجمع می‌یابد، گرچه کبد، آبشش و کلیه میزان قابل توجهی از این عنصر را جمع می‌کنند (جلالی جعفری و آقازاده مشگی، ۱۳۸۶). در تحقیق حاضر نیز تیمار نانو روی منجر به بروز آسیب‌های بافتی در کبد کپور ماهیان گردید؛ اگرچه عارضه هیستوپاتولوژیک در تیمارهای ترکیب نانوروی و جلبک نیز مشاهده شد، اما شدت آسیب‌ها با افزایش غلظت جلبک پادینا کاهش یافت به‌نظر می‌رسد اثر گذاری منفی نانوذرات روی بر بافت کبد کپور معمولی توسط جلبک پادینا به حداقل رسیده است. به‌طور

کلی بروز این ضایعات بافتی به دلیل تجمع ترکیبات سمی در داخل سلول‌های کبدی است چراکه کبد به عنوان یکی از جایگاه‌های سم‌زدایی در بدن عمل می‌کند. علاوه بر این هجوم ماکروفاژها برای از بین بردن ترکیبات خارجی می‌تواند سبب ایجاد اتساع و تورم فضای بین‌هپاتوسیت‌ها شود. در مجموع رخداد چنین تغییراتی در ساختار معمول سلول‌های کبدی می‌تواند فعالیت طبیعی کبد در متابولیسم نمودن مواد غذایی و تولید آنزیم‌ها و ترکیبات ضروری بدن را مختل سازد (راکی و همکاران، ۱۳۹۵).

در نهایت نتایج نشان داد که نانو ذره روی به تنهایی آسیب‌های بافتی متعددی بر بافت آبشش ماهی کپور از جمله هایپرپلازی راسی، هایپرپلازی پایه‌ای، کوتاه شدن تیغه‌های آبششی برآمدگی اپی‌تلیال، خمیدگی سلول‌های تیغه ثانویه، چسبندگی لاملایی ایجاد می‌کند. همچنین مشخص شد که افزودن جلبک پادینا به‌خصوص در میزان ۰/۲ جیره غذایی، تغییرات بافتی و آثار هیستوپاتولوژیک آبشش را به طرز چشم‌گیری کاهش می‌دهد. همچنین القای نانو روی به تنهایی منجر به بروز آسیب‌های بافتی کبدی متعدد از جمله آتروفی، تورم صفاوی، آماس سینوزوئید، خونریزی هموراژی، آب آوردگی، تغییر شکل ابری می‌شود، گرچه این عوارض (کبدی) در تیمارهای ترکیب نانو روی و جلبک نیز مشاهده شد، اما شدت آسیب‌ها با افزایش غلظت جلبک پادینا کاهش یافت. به‌نظر می‌رسد افزودن غذایی جلبک پادینا به میزان ۰/۲ می‌تواند اثرات نامطلوب نانوذرات روی بر بافت کبد ماهی کپور معمولی را به حداقل برساند، هرچند افزودن جلبک به جیره غذایی تجاری ماهی نیاز به تحقیقات بیشتر بر سایر شاخص‌های فیزیولوژیکی ماهی دارد.

منابع

- اسماعیل‌زاده ع، ساریان ح، رامشی ح، موحدت نیا م. ۱۳۹۱. اثر پودر جلبک‌های دریایی *Sargassum ilicifolium* و *Padina gymnospora* در بسترهای مختلف بر روی رشد و بقاء نوجوان‌های خیار دریایی *Holothuria scabra*. مجله آبیان و شیلات، ۳(۴۳): ۵۵-۱۶.
- بندانی غ، خوشباور رستمی ح، یلقی س، شکرزاده م.

- (*Perca fluviatilis*). *Aquatic Toxicology* 96, 159-165.
- Cheng W., Liu C.H., Kuo C.M. and Chen J.C. 2005. Dietary administration of sodium alginate enhance the immune ability of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish and Shellfish Immunology* 18, 1-12.
- Choi Y.H., Lee B.J., Nam T.J. 2015. Effect of dietary inclusion of *Pyropia yezoensis* extract on biochemical and immune responses of olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 435, 347-353.
- Chotigeat W., Tongsupa Supamattaya S., Phongdara A. 2004. Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. *Aquaculture* 233, 23-30.
- Esmaili A. 2007. Cycle of heavy metals lead, mercury, cadmium and their uptake and effects on aquatic. Proceedings of the First National Conference on proper operation of the Persian Gulf and Oman Sea fish stocks. *Fisheries Corporation* 269-277. (In Persian).
- Finney D. 1971. Probit analysis, a statistical treatment of the sigmoid response curve. Cambridge. 256 p.
- Fleurence J., Moranais M., Dumay J., Decottingnies P., Turpin V., Munier M., GarciaBueno N., Jaouen P. 2012. What are the prospects for using seaweed in human nutrition and for marine animals raised through aquaculture? *Trends Food Science and Technology* 27, 57-61.
- Gardner G.R., Yevich P.P. 1970. Histological and hematological responses of an estuarine teleost to cadmium. *International Journal of Fisheries Research Board of Canada* 27, 2185-2196.
- Gong P., Li H., He X., Wang K., Hu J., Tan W., Yang X. 2007. Preparation and antibacterial activity of Fe₃O₄@ Ag nanoparticles. *Nanotechnology* 18(28), 285604.
- Handy R.D. 2008. Manufactured nanoparticles: their uptake and effects on fish—a mechanistic analysis. *Ecotoxicology* 17(5), 396-409.
- Houng-Yung C., Yu-Chun C., Li-Chi H., Meng-Hsien C. 2014. Dietary zinc requirements of juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus*. *Aquaculture* 432, 360-364.
- نظری ح. ۱۳۹۴. سطح فلزات سنگین (سرب، کادمیوم، کروم و روی) در بافت عضله و کبد ماهی کپور (*Cyprinus carpio*) سواحل استان گلستان. مجله علمی شیلات ایران، ۴: ۱۰-۱.
- پیریگی ع. ۱۳۹۲. اثرات هیستوپاتولوژیک سم دیازینون بر کبد، آبشش و خون سیاه ماهی (*Capoeta damascina*)، پایان نامه کارشناسی ارشد دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ۸۶ ص.
- جلالی جعفری ب. آقازاده مشگی م. ۱۳۸۶. مسمومیت ماهیان در اثر فلزات سنگین آب و اهمیت آن در بهداشت عمومی. انتشارات مان کتاب، ۱۳۴ ص.
- جوهری ع. ۱۳۹۰. کاربرد نانوذرات نقره در کاهش عفونت‌های قارچی تخم در دوره انکوباسیون و اثرات احتمالی رهایش آنها بر تغییرات برخی شاخص‌های فیزیولوژیکی و ژنومیکسی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان. دانشکده منابع طبیعی. دانشگاه تربیت مدرس. راکي م، پیکان حیرتی ف. درافشان س. ۱۳۹۵. تغییرات آسیب شناسی بافت آبشش و کبد عروس ماهی *Petroleuciscus esfahani* Coad & Bogutskaya, 2010 پس از مواجهه با نانو ذرات نقره و نیترات نقره محلول در آب. نشریه، پژوهش‌های ماهی شناسی کاربردی. ۱۸ ص.
- ستاری م، شاهسونی د. شفيعی ش. ۱۳۸۲. ماهی-شناسی ۲. نشر حق شناس. ۵۹۷ ص.
- هدایتی ع، جهانبخشی ع. قادری رمازی ف. ۱۳۹۲. سم شناسی آبزیان، جلد اول، چاپ اول، ص ۷۰-۷۶.
- Al-Bairuty G.A., Shaw B.J., Handy R.D., Henry T.B. 2013. Histopathological effects of waterborne copper nanoparticles and copper sulphate on the organs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 126, 104-115.
- Bahnasawy M., Khidr A.A. And Dheina N. 2009. Seasonal variations of heavy metals concentrations in mullet, *Mugil cephalus* and *Liza ramada* (Mugilidae) from Lake Manzala, Egypt. *Journal of Applied Sciences Research* 5, 845-852.
- Batra N., Nehru B., Bansal M.P. 2002. Influence of lead and zinc on rat male reproduction at, biochemical and histopathological levels. *Journal of Applied Toxicology* 1, 507-512.
- Bilberg K., Malte H., Wang T., Baatrup E. 2010. Silver nanoparticles and silver nitrate cause respiratory stress in Eurasian perch

- Mansouri B., Ebrahimpour M., Babaei H. 2010. Determine the amount of heavy metals in different tissues of black fish in the central part of Birjand Qnathay: *Capoeta capoeta*. *Journal of Veterinary Medicine* (89), 45-54. (In Persian)
- Mohammadzadeh P., Jamili Sh., Mashinchian A., Matinfar A., Rostami M. 2011. Study on the lead effect on liver and gill tissues of *Rutilus rutilus caspius*. *Animal Environment* 3(1), 59-68. (In Persian)
- Naji T., Safaeyan SH., Rostami M., Sabrjoo M. 2006. Effects of zinc sulfate on gill tissue of Common Carp. *Environmental Science and Technology* 9(2), 29. (In Persian)
- Rostami bashman M., Soltani M., Sasani F. 2000. Study of the effects histopathological of heavy metals (Copper sulfate, zinc sulfate and mercurycadmium chloride) the tissues of Common Carp. *Journal of Veterinary Research (Tehran University)* 55(4), 1-3.
- Stoimenov P.K., Klinger R.L., Marchin G.L., Klabunde K.J. 2002. Metal oxide nanoparticles a bactericidal agent. *Langmuir* 18, 6679-6686.
- Valante L.M., Goueia A., Rema P., Motas J., Gonez E.F. 2006. Evaluation of three seaweeds *Gracilaria bursa-pastoris*, *Ulva rigida* and *Gracilaria corneaas* dietary ingredients in European seabass juveniles. *Aquaculture* 252, 85-91.
- Wong S.W., Leung P.T., Djurisc A.B., Leung K.M. 2010. Toxicities of nanozinc oxide to five marine organisms: in fluencies of aggregate size and ion solubility. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396, 609-618.
- Zhao L., Hernandez-Viezcas J.A., Peralta-Videa J.R., Bandyopadhyay S., Peng B., Munoz B., Keller A.A., Gardea-Torresdey J.L. 2013. ZnO nanoparticle fate in soil and zinc bioaccumulation in corn plants (*Zea mays*) influenced by alginate. *Environmental Science: Processes and Impacts* 15(1), 260-266.
- Zheng J.L., Luo Z., Zhu Q.L., Hu W., Zhuo M.Q., Pan Y.X., Song Y.F., Chen Q.L. 2015. Different effect of dietborne and waterborne Zn exposure on lipid deposition and metabolism in juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Aquatic Toxicology* 159, 90-98.

Dietary effect of *Padina* algae (*Padina astraulis*) on liver and gill tissues of Common Carp (*Cyprinus carpio*) exposed to nano ZnO

Aliakbar Hedayati^{*1}, Sanaz Alieh¹, Farahnaz Kakavand¹, Atefeh Iri¹, Rouhollah Sheikh Veisi¹, Hassan Sahraei², Fatemeh Mahmoudi²

¹Department of Fisheries and aquatic ecology, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

²Department of Fisheries, Faculty of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran.

*Corresponding author: hedayati@gau.ac.ir

Received: 2019/12/6

Accepted: 2020/2/6

Abstract

The present study was conducted to investigate the effect of *Padina astraulis* pretreatment on the gill and liver tissues of common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to ZnO nanoparticles. A total of 250 fish, weighing 20 ± 2.4 g, were distributed into 5 treatments, including no algae (treatment 1, control), diet containing 0.5% algae (treatment 2), 1% algae (treatment 3) and 2% algae (treatment 4), each treatment in triplicates and fed 3% body weight for 42 days. Upon finishing feeding trial, fish were exposed to 50% lethal concentration of zinc oxide nanoparticles for 14 days. The results of gill histopathology in nano-zinc-only treatments showed apical hyperplasia, basal hyperplasia, shortening of the epithelial gill glands, bending of the secondary lamella cells, and intense lamellar adhesion and these histopathologic alternations significantly decreased in those treatments with higher concentration of padina algae. Nano-zinc and algae significantly decreased with the elevation concentration of padina algae. In addition, nano-zinc treatments were caused tissue damage such as atrophy, biliary edema, sinusoidal inflammation, hemorrhage, and flooding, and cloudy deformity in the liver, however, these effects were observed in nano and algae combination treatments, but their severity decreased with increasing the concentrations of padina algae. It can be concluded that application of *Padina* algae can play an effective role in reducing tissue lesions (liver and gill) in exposure to zinc nanoparticles.

Keywords: Liver, Gill, *Padina* Algae, Common Carp, Zinc Nano Oxide.