

## Survey on the histological alterations of the gill of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larva exposed to various concentrations of the silver nanoparticles

A. Louei Monfared<sup>1\*</sup>, A. Khalili<sup>2</sup>, L. Khalili<sup>3</sup>,  
M. R. Kalbasi<sup>4</sup>

1. Associated Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Para-Veterinary Medicine, University of Ilam, Ilam, Iran

2. M.Sc. Student of histology, Tarbiat Modares University, Noor, Iran

3. Ph.D. Student of histology, Shiraz University, Shiraz, Iran

4. Associated Professor, Tarbiat Modares University, Noor, Iran

(Received: Nov. 5, 2014; Accepted: Feb. 1, 2015)

## بررسی تغییرات بافتی آبشش در لاروهای تازه تفریخ شده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) متعاقب تجویز غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره

علی لوثی منفرد<sup>۱\*</sup>، عباس خلیلی<sup>۲</sup>، لیلا خلیلی<sup>۳</sup>،  
محمد رضا کلباسی<sup>۴</sup>

۱. دانشیار، گروه علوم پایه دانشکده پیرادامپزشکی، دانشگاه ایلام

۲. دانشجوی کارشناسی ارشد بافت‌شناسی، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریا، دانشگاه تربیت مدرس، نور

۳. دانشجوی دکتری بافت‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز

۴. دانشیار، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریا، دانشگاه تربیت مدرس، نور  
(تاریخ دریافت: ۹۳/۸/۱۴، تاریخ تصویب: ۹۳/۱۱/۱۲)

### Abstract

Present work investigates the effects of nanosilver administration on histology of gill by direct and indirect methods in rainbow trout larva. In the direct mode, 300 larvae were divided to 6 equal groups randomly and exposed to 0.015, 0.031, 0.062, 0.125, 0.25 and 0.5 ppm over 25 days. In the indirect mode, 50 larvae were exposed to zeolite covered by silver nanoparticles. In addition, 50 larvae were kept in the incubators which free of any additive nanomaterials as control. In all of the experimental groups, on the days 4, 8, 12 and 25 after treating tissue samples were taken and histological alterations of the gill were examined. In the gill tissues of the direct exposed to nanosilver as 0.062 and greater concentrations; severe histological and histometrical alterations include aneurism in the secondary lamellae of gills, hyperplasia of epithelium of gills as well as the adhesion of the gill lamellae were seen, as compared with control animals. In addition, in the direct exposing method; any increasing in the silver nanoparticles concentrations could lead to significant elevation in the gill lamellar as well as filament diameters ( $p \leq 0.05$ ). Furthermore, indirect exposure to silver nanoparticles could not affect the gill integrity. It is concluded that nanosilver administration in the larval stage of the trout must be taken by zeolite covered by silver nanoparticles.

**Keywords:** Silver nanoparticles, Larva, Gill, Histology, *Oncorhynchus mykiss*.

### چکیده

پژوهش حاضر به بررسی تغییرات بافتی آبشش در لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان متعاقب تجویز نانو ذرات نقره به روش مستقیم (نانوذرات نقره به صورت کلونید) و غیرمستقیم (به صورت فیلتر زئولیت پوشش یافته توسط نانو ذرات نقره) می‌پردازد. ۳۰۰ قطعه لارو تازه تفریخ شده به صورت تصادفی به شش گروه مساوی تقسیم و به ترتیب در معرض کلونید نانو ذرات نقره با غلظت‌های ۰/۰۱۵، ۰/۰۳۱، ۰/۰۶۲، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵ و ۰/۵ ppm و در مدت زمان ۲۵ روز قرار گرفت. در روش غیرمستقیم ۵۰ قطعه لارو در انکوباتور مجهز به فیلتر زئولیت پوشش یافته توسط ۰/۵ درصد نانو ذرات نقره قرار گرفت. ۵۰ قطعه لارو در انکوباتور فاقد هر گونه مواد افزودنی به عنوان گروه شاهد قرار گرفتند. در روزهای ۴، ۸، ۱۲ و ۲۵ از دوره آزمایش، مقاطع بافتی آبشش تهیه و به روش هماتوکسیلین-ئوزین رنگ‌آمیزی و تغییرات بافتی با میکروسکوپ نوری به صورت کیفی و کمی مطالعه شد. تماس مستقیم با دوز ۰/۰۶۲ نانو ذرات نقره موجب بروز آسیب‌های بافتی شامل آنورسم در تیغه‌های ثانویه آبششی، هیپرپلازی بافت پوششی تیغه‌های آبششی، پیچ خوردگی و به هم چسبیدگی تیغه‌های آبشش، ادم و تغییر بافت پوششی سطح تیغه‌های آبششی شد. همچنین با افزایش میزان غلظت نانو ذرات نقره، میانگین قطر لاملا و فیلامنت نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری یافت ( $P < 0.05$ ). بر اساس این مطالعه در صورت بکارگیری نانو ذرات نقره به عنوان یک ماده ضد عفونی کننده در لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بهتر است از انکوباتور مجهز به فیلتر زئولیت استفاده گردد.

**واژه‌های کلیدی:** نانو نقره، لارو، آبشش، بافت‌شناسی، *Oncorhynchus mykiss*.

## مقدمه

فناوری نانو، دانش شناسایی و سنتز مواد در ابعادی بین ۱ تا ۱۰۰ نانومتر است. نانو مواد به دلیل اندازه کوچک ممکن است اثرات فیزیکی، شیمیایی و آنتی‌بیوتیکی جدیدی از خود نشان دهند. همچنین کاربردهای جدید و منحصر به فردی از این مواد نانومتری گزارش شده است (Kreyling, 2010). یکی از نانو موادی که اخیراً به دلیل داشتن خواص ضد میکروبی بسیار مطلوب، مورد توجه محققین قرار گرفته است، نانو ذرات نقره می‌باشد (Jabbari, 2008; Yoon et al., 2009)، به طوری که در حال حاضر ۵۶٪ نانو مواد تولید شده در جهان را نانو ذرات نقره تشکیل می‌دهد (Okkyoung, 2009; Mühling, 2003; Thabet, 2010). مطالعات بسیار زیادی در مورد استفاده از نانو ذرات نقره و بخصوص کلئوئید آن برای کنترل میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا (اعم از باکتری، قارچ و ویروس) وجود دارد. (Roy et al., 2008; Sanpui et al., 2008). رهایش نانو نقره در محیط زیست آبریان ممکن است صدماتی به آنها وارد نماید. به عنوان نمونه، نانو نقره باعث ایجاد مسمومیت کبدی در ماهیان گورخری می‌شود و در ماهیان بالغی که در معرض نانو نقره قرار گرفته بودند شکستگی طناب سلولی کبدی، تغییرات آپوپتوتیک، صدمه به DNA و تغییر در بیان ژن در بافت کبدی مشاهده شده است (Choi, 2009). همچنین مطالعات انجام شده بر سلول‌های ماهی ماکا (*Oryzia slatipes*) نشان داد که نانو نقره واجد اثرات سیتوتوکسیک و ژنوتوکسیک می‌باشد. با افزایش میزان نانو نقره میزان بازماندگی سلول‌ها به شکل کلنی کاهش پیدا می‌کند و نیز ناهنجاری‌های کروموزومی افزایش می‌یابد (Wise et al., 2010). نانو ذرات در گونه‌های مختلف ماهیان در بافت‌هایی مانند آبشش، کبد و کلیه تجمع پیدا می‌کنند و نیز باعث ایجاد آسیب‌هایی در بافت آبشش و کبد، تأخیر در بیان ژن، ناهنجاری در ریخت

شناسی جنین و کاهش درصد بازماندگی می‌شوند (Laban et al., 2010; Wu et al., 2010; Yeo et al., 2008). با توجه به اهمیت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان از نظر اقتصادی و اینکه پرورش آن در نقاط مختلف جهان توسعه یافته است و با توجه به رایج شدن استفاده از فن آوری نانو در صنعت و بویژه احتمال استفاده از نانو ذرات نقره در آینده برای ضدعفونی کردن استخرهای پرورش و تکثیر ماهی و نیز احتمال رهاسازی آن در فاضلاب‌ها و رودخانه‌ها، مطالعه در این زمینه قابل اهمیت است. از طرفی، آبشش ماهیان به علت تماس مستقیم و دائمی با آب، بیش از سایر اندام‌ها در معرض آلاینده‌های محیطی قرار داشته، و به خاطر اهمیت زیادی که در تنفس، تنظیم اسمزی، تعادل اسید و باز و دفع نیترژن زاید در ماهیان دارند، هرگونه آسیب به آنها می‌تواند باعث اثرات جدی بر روی ماهیان گردد (Simonto, 2008). از آنجا که تغییرات بافتی می‌توانند باعث بروز اختلال در عملکرد طبیعی اندام‌ها شوند، در پژوهش حاضر تأثیر استفاده مستقیم و غیرمستقیم نانو ذرات نقره بر ساختار بافتی آبشش به عنوان ارگان اصلی دخیل در تنفس و تنظیم اسمزی در لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به عنوان مهمترین گونه سردابی پرورشی در ایران بررسی شد.

## مواد و روش‌ها

### نمونه برداری

برای انجام آزمایشات تخم ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در مرحله چشم زدگی و ۳ روز مانده به تفریح از کارگاه تکثیر و پرورش مرزن قزل واقع در استان مازندران، شهرستان مرزن آباد تهیه شد و پس از انتقال به کارگاه تکثیر و پرورش آبریان واقع در دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس تا زمان تفریح نگهداری شدند. بعد از تفریح در مجموع تعداد ۴۰۰ قطعه لارو کیسه زرده‌دار ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد استفاده قرار گرفت.

### تیمارها

برای بررسی تأثیر مستقیم نانو ذرات نقره؛ ۳۰۰ قطعه لارو تازه تفریخ شده (با میانگین طول  $28/95 \pm 3/69$  میلی‌متر و میانگین وزن  $0/13 \pm 0/47$  گرم) به صورت تصادفی به شش گروه مساوی ( $n=50$ ) تقسیم و به ترتیب در معرض کلئید نانو ذرات نقره با غلظت‌های  $0/15$ ،  $0/31$ ،  $0/62$ ،  $0/125$ ،  $0/25$  و  $0/5$  ppm و مدت زمان ۲۵ روز متوالی قرار گرفت. از آنجائی که لاروهای کیسه زرده‌داری که در معرض غلظت‌های  $0/25$  و  $0/5$  میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات نقره قرار داشتند، در روز هفتم به طور کامل تلف گردیدند، نمونه‌برداری از آنها میسر نگردید. به همین دلیل، برای به دست آوردن نتایج بهتر، گروه دیگری از لاروها، که ۲۱ روز سن داشتند، مجدداً در معرض غلظت‌های  $0/25$  و  $0/5$  میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات نقره قرار گرفتند و در روز ۲۵ از آنها برای مطالعات بافت‌شناسی نمونه‌برداری گردید.

برای بررسی تأثیر غیرمستقیم نانو ذرات نقره؛ ۵۰ قطعه لارو در انکوباتور مجهز به فیلتر ژئولیت پوشش یافته توسط  $0/5$  درصد نانو ذرات نقره و در مدت زمان مشابه قرار گرفت. در این سیستم انکوباسیون، ابتدا آب از روی فیلتر مذکور عبور کرده و در یک سیستم چرخشی مجدداً وارد انکوباتور می‌گردید. همچنین ۵۰ قطعه لارو در انکوباتور فاقد هر گونه مواد افزودنی به عنوان گروه شاهد قرار گرفتند.

### روش مطالعه تغییرات بافتی

در همه گروه‌ها در روزهای ۴، ۸، ۱۲ و ۲۵ از دوره آزمایش، مقاطع بافتی آبشش تهیه گردید. در مرحله بعد سایر مراحل معمول آماده‌سازی بافت مانند آبگیری، شفاف‌سازی و آغستگی به پارافین در دستگاه پاساژ بافت انجام شد. در نهایت از قالب‌های پارافینی برش‌هایی به ضخامت ۶ میکرون توسط میکروتوم ساخت آلمان تهیه گردید. نمونه‌ها به روش

آب مورد استفاده در این پژوهش، آب شهر کلرزدایی شده بود که برای کلرزدایی آب شهر از تیوسولفات سدیم با غلظت  $248/18$  میلی‌گرم بر لیتر همراه با هوادهی شدید استفاده شد. قبل از شروع آزمایشات، شاخص‌های مهم شیمیایی آب اندازه‌گیری گردید. همچنین میانگین میزان اکسیژن محلول در طی انجام آزمایشات در آب‌های شیرین  $8 \pm 0/3$  میلی‌گرم بر لیتر اندازه‌گیری گردید. میانگین دمای آب در طول انجام آزمایشات  $11/5 \pm 0/5$  درجه سانتی‌گراد، و شرایط نوری به صورت ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی بود. میزان بار سطحی یا پتانسیل زتا<sup>۱</sup> و نیز اندازه ذرات در کلئید نانو ذرات نقره توسط دستگاه Zetasizer (Malvern Instruments Inc, UK, Model: 3000HSA) اندازه‌گیری شد.

کلئید نانوذرات نقره مورد استفاده در این آزمایش با نام تجاری نانوسید و غلظت اسمی ۴۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، از شرکت نانو نصب پارس (تهران-ایران) خریداری گردید. این محصول در سازمان ثبت اختراعات ایالات متحده امریکا با شماره ۲۰۰۹۰۰۱۳۸۲۵ به ثبت رسیده است (Rahman, 2009). غلظت واقعی نقره موجود در کلئید نانو ذرات نقره نیز توسط روش طیف‌سنجی اتمی نشری پلاسما جفت شده القایی (ICP-AES, Model: 3410 ARL, Switzerland) تعیین شد. همچنین شکل و اندازه نانو ذرات نقره در حالت خشک با بررسی تصویر میکروسکوپ الکترون عبوری (TEM) تعیین گردید. جهت اطمینان از پوشش صحیح فیلتر ژئولیتی توسط نانو ذرات نقره، از آزمایشات XRD و XRF و نیز تهیه تصاویر میکروسکوپ پیمایشگر الکترون (SEM) استفاده گردید.

1. Zeta potential

رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین رنگ شدند. سپس مقاطع بافتی حاصله در زیر میکروسکوپ نوری مدل Olympus BX60 مطالعه شدند و تغییرات بافتی به صورت کیفی و کمی مطالعه شد سپس فتومیکروگراف‌های لازم با استفاده از دوربین دیجیتال (COOLPIX 950, Nikon, China) تهیه گردید. به منظور کمی‌سازی تغییرات ایجاد شده در ساختار بافتی آبشش، نسبت به انجام یک بررسی هیستومتریک اقدام شد. برای این کار از هر گروه تعداد ۲۰ مقطع بافتی به صورت تصادفی انتخاب و قطر رشته‌ها و تیغه‌های آبششی به کمک نرم افزار Axio Vision Rel.4.8.2 اندازه‌گیری و مورد مقایسه قرار گرفتند (Varsamos, 2002).

رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین رنگ شدند. سپس مقاطع بافتی حاصله در زیر میکروسکوپ نوری مدل Olympus BX60 مطالعه شدند و تغییرات بافتی به صورت کیفی و کمی مطالعه شد سپس فتومیکروگراف‌های لازم با استفاده از دوربین دیجیتال (COOLPIX 950, Nikon, China) تهیه گردید. به منظور کمی‌سازی تغییرات ایجاد شده در ساختار بافتی آبشش، نسبت به انجام یک بررسی هیستومتریک اقدام شد. برای این کار از هر گروه تعداد ۲۰ مقطع بافتی به صورت تصادفی انتخاب و قطر رشته‌ها و تیغه‌های آبششی به کمک نرم افزار Axio Vision Rel.4.8.2 اندازه‌گیری و مورد مقایسه قرار گرفتند (Varsamos, 2002).

### آنالیز آماری

به منظور تجزیه و تحلیل آماری نتایج، از نرم‌افزار SPSS 16 استفاده گردید. برای بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون Kolmogorov-smirnov و جهت آنالیز آماری داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) و برای بررسی اختلاف بین میانگین پارامترهای مورد بررسی از آزمون LSD استفاده گردید. یافته‌ها به صورت میانگین  $\pm$  خطای معیار بیان شد و  $P < 0.05$  به عنوان معنی‌دار تلقی گردید.

### نتایج

**نتایج مربوط به بررسی‌های نانوذرات نقره**  
طبق نتایج حاصل از آزمایشات دستگاه زتاسایزر، اندازه ذرات نقره موجود در کلئوئید نانو ذرات نقره، بین ۳/۹ تا ۱۶۳/۵ نانومتر و میانگین قطر آنها ۵۴/۸ نانومتر برآورد گردید. ۵۴/۱ درصد این ذرات کمتر از ۱۰۰ نانومتر و ۴۵/۹ درصد آنها بین ۱۰۰ تا ۱۶۵ نانومتر قطر داشتند. نتایج حاصل از آنالیزهای انجام شده توسط میکروسکوپ الکترون عبوری نشان داد که متوسط اندازه نانو ذرات نقره در حالت خشک

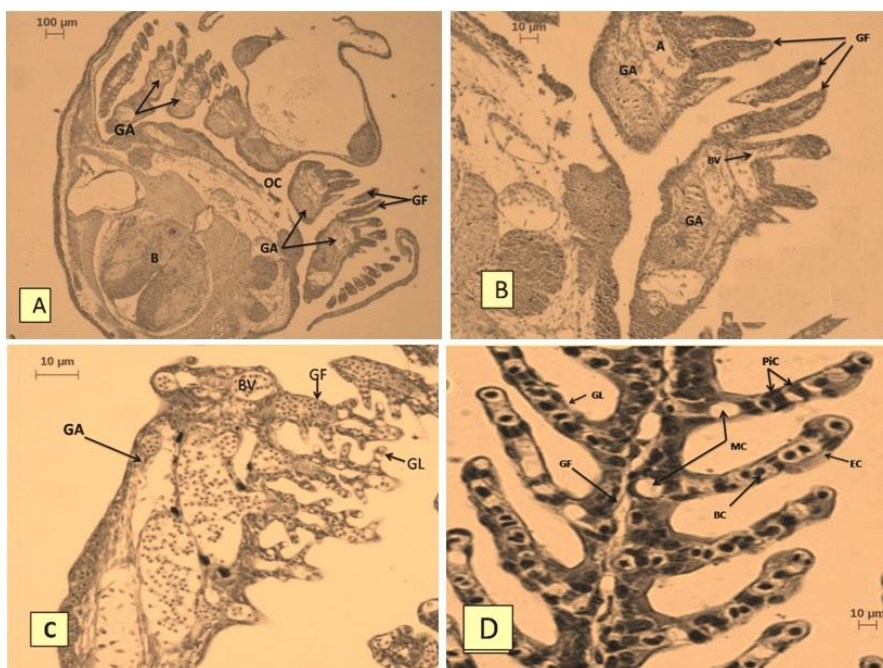
### نتایج مربوط به ساختار بافت‌شناسی آبشش در لاروهای گروه شاهد

در لاروهای قزل‌آلای رنگین‌کمان گروه شاهد هیچ گونه تغییر غیرطبیعی در ساختار بافت‌شناسی آبشش‌ها دیده نشد. شکل ۱ جزئیات ساختار بافتی آبشش در این گروه شامل کمان آبششی، تیغه‌های ثانویه آبشش، سلول کلراید، سلول اپیتلیال و سلول پیلاز قابل مشاهده می‌باشد (شکل ۱) (جدول‌های ۱ و ۲).

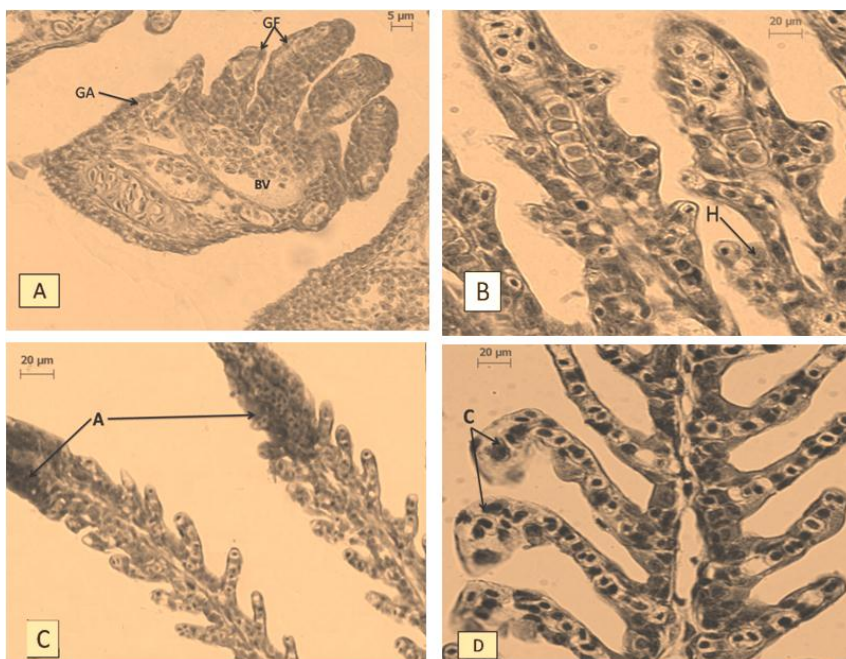
### نتایج مربوط به ساختار بافت‌شناسی آبشش در لاروهای تحت تأثیر مستقیم نانو ذرات نقره

نتایج مطالعات بافت‌شناسی نشان داد که در ساختار آبشش لاروهای تیمار شده با غلظت ۰/۰۱۵ میلی‌گرم در لیتر و ۰/۰۳۱ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات نقره، نسبت به گروه شاهد تفاوتی مشاهده نمی‌شود.

در بافت آبشش لاروهایی که با غلظت‌های ۰/۰۶۲ و ۰/۱۲۵ میلی‌گرم در لیتر تیمار شده بودند، آسیب‌هایی مانند آنوریسم، پرخونی شدید، چماقی شدن لاملا و هایپرپلازی، در روزهای هشتم، دوازدهم و بیست و پنجم مشاهده شد (شکل ۲). بر اساس نتایج مطالعه هیستومتری در این تیمارها، میانگین قطر لاملا و فیلامنت نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری یافته بود ( $P < 0.05$ ) (جدول‌های ۱ و ۲).



شکل ۱. مقطع عرضی آبشش لارو ماهی قزل آلی رنگین کمان گروه شاهد در روزهای چهارم (A)، هشتم (B)، دوازدهم (C) و بیست و پنجم (D) این تصویر بیانگر ساختار طبیعی آبشش می باشد. [رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین، بزرگنمای ۲۰۰×].  
 A: B: (Brain) ;BC: (Blood Cell) ;OC: (Oral Cavity) ;GL: (Gill Lamellae) ;GF: (Gill Filament) ;GA: (Gill arch) ;PiC: (Pillar Cell) ;BV: (Blood Vessel) ;EC: (Epithelial Cell) ;BC: (Blood Cell) ;RBC: (Red Blood Cell) ;(Artery)

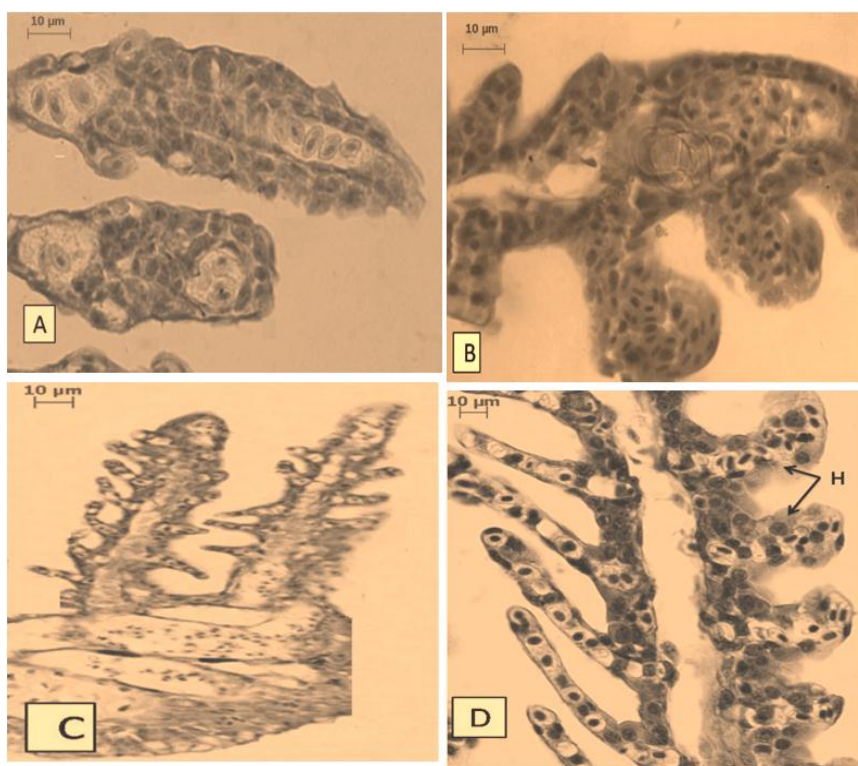


شکل ۲. ساختار بافت آبشش لارو ماهی قزل آلی رنگین کمان بیمار شده با غلظت ۰/۰۶۲ میلی گرم در لیتر [رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین، بزرگنمایی ۲۰۰×]. A: برش عرضی لارو در روز چهارم، کمان آبششی (GA) و فیلامنتها (GF) تشکیل شده ولی لاملا تشکیل نشده است. B: برش عرضی آبشش در روز هشتم، هایپرپلازی در آبشش مشاهده می شود. C: برش عرضی آبشش در روز دوازدهم، پرخونی شدید در آبشش مشاهده می شود. D: برش عرضی آبشش در روز بیست و پنجم، چماقی شدن (clubbing) در انتهای لاملا مشاهده می شود. ;BV: (Blood Vessel) ;GL: (Gill Lamellae) ;GF: (Gill Filament) ;GA: (Gill arch) ;A: (Acute congestion) ;C: (Clubbing) ;H: (Hyperplasia)

معنی‌داری یافته بود ( $P < 0.05$ ) (جدول‌های ۱ و ۲).

نتایج مربوط به ساختار بافت شناسی آبشش در لاروهای تحت تأثیر غیرمستقیم نانو ذرات نقره بر اساس نتایج این مطالعات در ساختار آبشش لاروهای تیمار شده با فیلتر زئولیت محتوی ۰/۵٪ نانوذرات نقره، نسبت به گروه شاهد تفاوتی مشاهده نمی‌شود (جدول‌های ۱ و ۲).

در بافت آبشش لاروهایی که از سن ۴ روزگی با غلظت‌های ۰/۱۲۵، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات نقره تیمار شده بودند، در روزهای ۴، ۸، ۱۲ و ۲۵ آسیب‌هایی مانند چماقی‌شدن و همجوشی لاملاها، آنوریسم، پرخونی شدید و خارج‌شدن سلول‌های خونی در لاملا، و هایپرپلازی در آبشش مشاهده گردید (شکل ۳). براساس یافته‌های هیستومتریک در این تیمارها میانگین قطر لاملا و فیلامنت نسبت به گروه شاهد افزایش



شکل ۳. ساختار بافت آبشش لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تیمار شده با غلظت ۰/۱۲۵ میلی‌گرم در لیتر (E&H). [رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئئوزین، بزرگنمایی ۲۰×]. A: برش عرضی لارو در روز چهارم، کمان آبششی GA و فیلامنت‌ها GF تشکیل شده و لاملا تشکیل نشده است. B: برش عرضی آبشش در روز هشتم، چماقی‌شدن (clubbing) و پر خونی در انتهای لاملا مشاهده می‌شود. C: برش عرضی آبشش در روز دوازدهم، پرخونی و خارج شدن سلول‌های خونی در لاملا مشاهده می‌شود. D: برش عرضی آبشش در روز بیست و پنجم، هایپرپلازی در آبشش مشاهده می‌شود.

جدول ۱. تأثیر نانو ذرات نقره بر قطر فیلامنت آبشش در لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بعد از تفریح

تیمار روز	شاهد	۰/۱۵ ppm	۰/۳۱ ppm	۰/۶۲ ppm	۰/۱۲۵ ppm	۰/۲۵ ppm	۰/۵ ppm
هشتم	۶/۷۸±۰/۵۸ <sup>aA</sup>	۶/۷۵±۰/۵۶ <sup>aA</sup>	۶/۹۱±۰/۵۲ <sup>aA</sup>	۷/۱۹±۰/۵۹ <sup>bA</sup>	۸/۲۱±۰/۸۲ <sup>cA</sup>	.....	.....
دوازدهم	۶/۸۱±۰/۵۳ <sup>aA</sup>	۶/۸۱±۰/۵۱ <sup>aA</sup>	۶/۹۳±۰/۶۱ <sup>aA</sup>	۸/۳۱±۰/۷۷ <sup>aB</sup>	۱۰/۱۸±۱/۲۱ <sup>cB</sup>	.....	.....

حروف کوچک a, b... نشان‌دهنده اختلاف تیمارها و حروف بزرگ A, B, ... نشان‌دهنده اختلاف روزهای تیمار است.

..... نشانه تلف شدن کلیه نمونه‌ها که امکان نمونه‌برداری برای بافت‌شناسی وجود نداشت.

جدول ۲. تأثیر نانو نقره بر قطر لاملا در لارو ماهی قزل‌آلای رنگین کمان بعد از تفریح (میانگین  $\pm$  خطای معیار)

تیمار روز	شاهد	۰/۰۱۵	۰/۰۳۱	۰/۰۶۲	۰/۱۲۵	۰/۲۵	۰/۵	فیلترتولیت با نانو نقره ۰/۵٪
		Ppm	Ppm	Ppm	Ppm	Ppm	Ppm	
چهارم	۳۱/۳۰±۱/۳۳ <sup>aA</sup>	۳۱/۷۷±۱/۶۱ <sup>aA</sup>	۳۱/۳۳±۱/۶۱ <sup>aA</sup>	۳۲/۲۰±۱/۰۲ <sup>bA</sup>	۳۲/۲۱±۱/۰۰ <sup>bA</sup>	۳۲/۳۱±۱/۰۲ <sup>bA</sup>	۳۲/۷۱±۱/۰۲ <sup>bA</sup>	۳۱/۳۰±۱/۳۳ <sup>aA</sup>
هشتم	۱۶/۷۸±۰/۷۶ <sup>aB</sup>	۱۶/۹۵±۰/۸۵ <sup>aB</sup>	۱۶/۹۶±۱/۳۱ <sup>aB</sup>	۱۸/۳۱±۰/۸۹ <sup>bB</sup>	۱۸/۱۵±۰/۷۱ <sup>bB</sup>	۱۸/۳۱±۰/۸۹ <sup>bB</sup>	۱۶/۸۰±۰/۷۱ <sup>aB</sup>	
دوازدهم	۱۶/۴۸±۰/۷۱ <sup>aB</sup>	۱۶/۷۲±۰/۷۷ <sup>aB</sup>	۱۶/۷۳±۰/۷۶ <sup>aB</sup>	۱۷/۶۸±۰/۷۳ <sup>bB</sup>	۱۸/۱۰±۰/۷۶ <sup>cC</sup>	۱۷/۶۸±۰/۷۳ <sup>bB</sup>	۱۶/۷۰±۰/۶۴ <sup>aB</sup>	
بیست پنجم	۱۷/۱۸±۰/۵۴ <sup>aC</sup>	۱۷/۳۱±۰/۴۸ <sup>aC</sup>	۱۷/۳۲±۰/۷۵ <sup>aB</sup>	۲۲/۴۷±۱/۲۰ <sup>bC</sup>	۲۲/۱۳±۱/۸۰ <sup>bD</sup>	۲۲/۱۳±۱/۸۰ <sup>bD</sup>	۱۷/۱۸±۰/۴۸ <sup>aC</sup>	

حروف کوچک a, b... نشان دهنده اختلاف تیمارها و حروف بزرگ A, B, ... نشان دهنده اختلاف روزهای تیمار است. .... نشانه تلف شدن کلیه نمونه‌ها که امکان نمونه‌برداری برای بافت‌شناسی وجود نداشت.

## بحث و نتیجه‌گیری

این ماهیان را نشان داد (Scown *et al.*, 2010). این یافته‌ها با نتایج پژوهش حاضر مطابقت ندارد، که ممکن است به خاطر استفاده از غلظت‌های خیلی پایین‌تر نانو ذرات نقره در آزمایش فوق‌الذکر نسبت به غلظت‌های مورد استفاده در پژوهش حاضر باشد. در مطالعه دیگری که توسط Griffitt *et al.* (2009) انجام شد، بررسی بافت آبشش ماهیان گورخری که در معرض نانو فلزات قرار گرفته بودند، نشان داد که نانو ذرات مس در مدت ۲۴ ساعت قطر فیلامنت را ۳/۵ برابر افزایش می‌دهند در حالی که در مدت مشابه، نانو ذرات نقره فقط به مقدار اندکی باعث افزایش قطر فیلامنت‌ها می‌شوند. همچنین نانو ذرات مس در مدت ۴۸ ساعت باعث افزایش ۳ برابری قطر فیلامنت‌ها گردیدند. در حالی که نانو ذرات نقره و نانو ذرات تیتانیوم تغییرات معنی‌داری ایجاد نکردند. از طرفی مس و نقره محلول، هر کدام باعث افزایش دو برابری قطر فیلامنت‌ها گردیدند. همچنین نانو ذرات مس نسبت به یون‌های محلول مس بیشتر باعث تغییر فیلامنت شده بود در حالی که نانو ذرات نقره نسبت به یون نقره کمتر باعث افزایش قطر فیلامنت آبشش شده بود (Griffitt *et al.*, 2008). نتایج پژوهش فوق با یافته‌های تحقیق حاضر مطابقت دارد. این تشابه نتایج ممکن است به خاطر شباهت غلظت‌ها و گونه‌های مورد استفاده باشد.

Federici *et al.* (2007) به مدت ۱۴ روز تأثیر نانو ذرات تیتانیوم (۱/۰، ۰/۵، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر را بر ماهی قزل‌آلای رنگین کمان مورد بررسی قرار

با توجه به پیشرفت‌های سریع فناوری نانو و کاربردهای گسترده، آگاهی از عوارض جانبی آن در آبزیان بسیار ضروری است زیرا پیشرفت تکنولوژی در زمینه نانو باعث گسترش استفاده از این علم در صنایع مختلف، از جمله آبی‌پروری گردیده است (Asharani *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2008). نتایج بررسی حاضر نشان داد که تماس مستقیم با غلظت‌های ۰/۰۶۲ و بالاتر نانو ذرات نقره موجب بروز آسیب‌های بافتی شدید آبششی شامل آنورسم در تیغه‌های ثانویه آبششی، هیپرپلازی بافت پوششی تیغه‌های آبششی و تغییر بافت پوششی سطح تیغه‌های آبششی می‌شود. در حالی که تماس غیرمستقیم با نانو ذرات نقره هیچ گونه اثر سوئی به جا نمی‌گذارد.

به طور کلی یکی از شاخص‌هایی که در مطالعات سم‌شناسی در ماهی‌ها مورد توجه قرار گرفته است، اثر نانو مواد بر بافت‌های مختلف آبزیان، از جمله بافت آبشش است که به عنوان نمونه می‌توان به مطالعات ذیل اشاره نمود. Scown *et al.* (2010) تأثیر اندازه‌های مختلف نانو ذرات نقره (غلظت ثابت 100  $\mu\text{g/l}$ ) بر بافت‌شناسی آبشش بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان را مورد مطالعه قرار دادند که نتایج حاصله بیانگر عدم ایجاد آسیب مشخص در این بافت بود؛ در مقابل در آبشش ماهیانی که در معرض نیترات نقره قرار گرفته بودند آسیب‌های بافتی مشاهده گردید. همچنین تصاویر میکروسکوپ الکترونی TEM، انباشتگی نانو ذرات نقره در آبشش

شده با غلظت‌های بالای نانو ذرات نقره می‌باشد. این تغییرات بافتی به دلیل کولاپس شدن سیستم سلول‌های پیلار و از بین رفتن نظم سلولی در ساختار می‌عروقی آبش‌هاست (Laban et al., 2010).

گزارش شده است که هیپرپلازی رشته‌های آبش‌ی بیشتر یک پاسخ بلندمدت سلول‌های سنگفرشی است که اغلب در پاسخ به میزان کم عوامل آسیب‌رسان اتفاق می‌افتد (Schreck et al., 1990). از طرف دیگر گزارش شده است که هیپرپلازی ایجاد شده در سلول‌های پوششی آبش‌ی در اثر تماس با آلایندگی‌هایی همچون فلزات سنگین، ناشی از عدم توانایی سلول‌ها در پوسته پوسته و تفکیک شدن می‌باشد که منجر به افزایش تقسیم سلولی یا میتوز می‌انجامد.

فرآیند اتساع و پرخونی عروق در آبش‌ها، پاسخی حاد و سریع نسبت به حضور آلایندگی‌ها در محیط تلقی می‌شود که در نتیجه تخریب سلول‌های پیلار در اثر مواد زیان‌آور روی بافت آبش‌ی پدید می‌آید. تخریب سلول‌های پیلار ناشی از جریان شدید خون به درون تیغه‌های آبش‌ی و یا حتی اثر مستقیم آلایندگی‌ها بر روی این سلول‌ها می‌باشد (Roberts, 2001).

اگرچه مکانیسم یا مکانیسم‌های احتمالی برای ایجاد اختلال در ساختار بافتی آبش‌ی ناشی از تجویز نانو ذرات نقره کاملاً مشخص نیست، اما مطالعات قبلی اثبات نموده‌اند که نانو ذرات نقره می‌تواند باعث تولید انواع اکسیژن فعال رادیکال آزاد و استرس اکسیداتیو ایجاد می‌کند و با مکانیسم استرس اکسایشی یعنی حمله رادیکال‌های آزاد به بافت‌ها، می‌تواند به اندام‌ها و بافت‌های مختلف آسیب برسانند. در واقع تولید انواع اکسیژن فعال مکانیسم اصلی سمیت با نانو ذرات نقره است (Choi et al., 2009; Federici et al., 2004).

بر اساس نتایج این مطالعه شدت تغییرات بافتی ایجاد شده بستگی به غلظت یا دوز نانو ذرات تجویزی داشته و با افزایش غلظت ضایعات بافتی آبش‌ی بیشتر می‌شود.

دادند و نتایج مطالعه بر روی بافت آبش‌ی، ایجاد دم در لاملای ثانویه، تغییر در شکل سلول‌های موکوسی، ایجاد هیپرپلازی در لاملای اولیه، ایجاد آنیوریسم، همجوشی و افزایش ضخامت فیلامنت‌ها را نشان داد (Federici et al., 2007). نتایج پژوهش فوق با یافته‌های تحقیق حاضر مطابقت دارد. این تشابه نتایج ممکن است به خاطر شباهت غلظت‌ها و گونه‌های مورد استفاده باشد.

سمیت نانو مواد به فاکتورهای مختلفی مانند اندازه نانو ذره، غلظت نانو ذره، شکل نانو ذره، بار سطحی نانو ذرات و ... بستگی دارد (Oberdorster 2003; Pinto 2010; Park 2005). در مطالعه حاضر در غلظت‌های بالاتر از ۰/۰۶۲ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات نقره، همگام با افزایش غلظت این ماده، قطر لاملا و فیلامنت آبش‌ی افزایش یافت؛ این افزایش قطر ممکن است به چند دلیل از جمله هایپرپلازی سلول‌ها در سطح لاملا و فیلامنت‌های آبش‌ی، پرخون شدن رشته‌ها و تیغه‌های آبش‌ی و ایجاد آنیوریسم باشد. احتمالاً همجوشی لاملاها به دلیل انعقاد موکوس از طریق تغییر در ترکیب گلیکوپروتئین موکوس سطح سلول‌های آبش‌ی رخ دهد (Federici et al., 2007)؛ این امر باعث ایجاد هیپوکسی شده و سبب می‌شود ماهی به منظور جذب اکسیژن به سطح آب بیاید؛ از سوی دیگر تماس رشته‌های آبش‌ی با هوا برای دریافت اکسیژن، باعث افزایش چسبندگی رشته‌ها و تیغه‌های آبش‌ی می‌شود و نهایتاً عدم وجود جریان آب کافی بین رشته‌ها و تیغه‌های آبش‌ی به کاهش سطح تنفسی انجامیده و ماهی دچار مشکل تنفسی می‌شود.

در مطالعه حاضر وقوع آسیب‌های بافتی شدید شامل هیپرپلازی بافت پوششی تیغه‌ها و تغییر شکل بافت پوششی سطح تیغه‌های آبش‌ی؛ پاسخ‌های مستقیم دفاع بافتی در برابر عملکرد سوء نانو ذرات نقره می‌باشد. همچنین نتایج این مطالعه بیانگر وقوع آنوریسم در برخی از نواحی تیغه‌های ثانویه آبش‌ی در ماهیان تیمار



## REFERENCES

- Asharani, P.V.; Wu, Y.L.; Gong, Z.; Valiyaveetil, S.; (2008). Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. *Nanotechnology*; 19: 255102.
- Choi, T.E.; et.al. (2009). Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nano particles in the liver of adult zebrafish. *Aquat. toxicol.* 12-120
- Chen, X.; Schluesener, HJ.; Nanosilver, A.; (2008). nanoparticle in medical application. *ToxicolLett*; 176: 1-12.
- Federici, G.; Shaw, B.; Handy, R.; (2007). Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquatic toxicology Amsterdam Netherlands Issue*; 4: 415-430.
- Griffitt, R.J.; Hyndman, K.; Denslow, N.D.; Barber, D.S.; (2009). Comparison of molecular and histological changes in zebrafish gills exposed to metallic nanoparticles. *Toxicol Sci*; 107: 404-15.
- Griffitt, R.J.; Luo, J.; Gao, J.; Bonzongo, J.C.; Barber, D.S.; (2008). Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. *Environ Toxicol Chem*; 27: 1972-8.
- Jabbari, H.; Mansouri, N.; Abdollahi, A.; Chehrehei, M.; Naddafi, K.; (2009). Studying the Effect of Nanosilver Painting on Control of Air-Transmitted Fungi. *IJHE*; 2(1): 28-35.
- Kreyling, W.G.; (2010). A complementary definition of nanomaterial. *Nano Today*; 5: 165-168.
- Laban, G.; Nies, L.F.; Turco, R.F.; Bickham, J.W.; Sepúlveda, M.S.; (2010). The effects of silver nanoparticles on fathead minnow (*Pimephales promelas*) embryos. *Ecotoxicology*; 19: 185-95.
- Mühling, M.; Bradford, A.; Readman, J.W.; Somerfield, P.J.; Richard, D.H.; (2009). An investigation into the effects of silver nanoparticles on antibiotic resistance of naturally occurring bacteria in an estuarine sediment. *Mar Environ Res*; 68: 278-283.
- Okkyoung, C.; Clevenger, T.E.; Deng, B.; Rao, Y.S.; Ross, L.Jr.; Zhiqiang, Hu.; (2009). Role of sulfide and ligand strength in controlling nanosilver toxicity. *Water Res*; 43: 1879-1886.
- Oberdorster, G.; Oberdorster, E.; Oberdorster, J.; (2005). Nano toxicology. An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect*; 113: 823-39.
- Park, K.H.; Chhowalla, M.; Iqbal, Z.; (2003). Single-walled carbon nanotubes are a new class of ion channel blockers. *J Biol Chem*; 278: 50212-26.
- Pinto, V.V.; Ferreira, M.J.; Ricardo Hélder, A.S.; Silva, F.; Carlos, M.P.; (2010). Long time effect on the stability of silver nanoparticles in aqueous medium: Effect of the synthesis and storage conditions. *Colloid Surface Physicochem Eng Aspect*; 364: 19-25.
- Rahman Nia, J.; (2009). Preparation of colloidal nanosilver. US Patent application docket 20090013825. 2009.
- Roberts, R.J.; (2001). *Fish Pathology*. W. B. Saunders. P. 472.
- Roy, R.; Hoover, R.; Dey, S.; (2006). Nano concentration of nano particles of silver in pure water produce a world class antibiotic. *MS&T '06 Symposium Abstract, Cincinnati, OH*; 11-1.
- Sanpui, P.; Murugadoss, A.; Prasad, P.V.D.; Ghosh, S.S.; Chattopadhyay, A.; (2008). The antibacterial properties of a novel chatoyant Ag-nanoparticle composite. *International Journal of Food Microbiology*; 124, 142- 146.
- Schreck, C.B.; Moyle, P.B.; (1990). *Methods for fish biology*. American Fisheries Methods for fish biology. American Fisheries Society, pp: 491-525.
- Scown, T.M.; Santos, E.M.; Johnston, B.D.; Gaiser, B.; Baalousha, M.; Mitov, S.; Lead, G.R.; Stone, V.; Fernandez,

- T.F.; Jepson, M.; Aerle, R.V.; Tyler, C.R.; (2010). Effects of Aqueous Exposure to Silver Nanoparticles of Different Sizes in Rainbow Trout. *Toxicological Sciences*; 115(2), 521-534.
- Simonto, J.D.; Guedes, C.L.B.; Martinez, C.B.R.; (2008). Biochemical, physiological, and histological changes in the Neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil, *Ecotoxicol. Environ. Saf. Society*, pp: 491-525.
- Thabet, MT.; Amro, B.; Genaidy, A.; Kirk, G.S.; (2010). An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and applications: A systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers. *Sci Total Environ*; 408: 999-1006.
- Wise, J.P.; Goodale, B.C.; Wise, S.S.; Craig, G.A.; Pongan, A.F.; Walter, R.B.; Thompson, W.D.; Ng, A.K.; Aboueissa, A.M.; Mitani, H.; Spalding, M.J.; Mason, M.D.; (2010). Silver nanospheres are cytotoxic and genotoxic to fish cells. *Aquat Toxicol*; 1; 97(1): 34-41.
- Wu, Y.; Zhou, Q.; Li, H.; Liu, W.; Wang, T.; Jiang, G.; (2010). Effects of silver nanoparticles on the development and histopathology biomarkers of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) using the partial-life test. *Aquat Toxicol*; 100: 160.
- Yeo, M.K.; Kang, M.; (2008). Effects of nanometer sized silver materials on biological toxicity during zebrafish embryogenesis. *Bull Korean Chem Soc*; 29: 1179-84.
- Yoon, KY.; Hoon-Byeon, J.; Park, JH.; Hwang, J.; (2007). Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles. *Sci Total Environ*; 373: 572-5.