تأثیر پیش تیمار پلی‌فنول برشاخص‌های ایمنی موکوس پوست ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در مواجهه با نانو ذرات نقره

- **وجیهه نوری**: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
- **سیدعلی‌اکبر هدایتی***: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
- **سیدحسین حسینی‌فر**: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
- **طاهره باقری**: مرکز تحقیقات آب‌های دور، موسسه تحقیقات شیلات ایران، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، چابهار، ایران
- **سیدرضا خالقی**: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۸

چکیده

با توجه به کاربرد روز افزون نانوذرات و استفاده از مکمل‌های غذایی در صنعت آبزی پروری، تحقیق حاضر به‌منظور بررسی اثرات بهینه مکمل غذایی در مقابل نانوذرات در آبزی پروی با بررسی پیش تیمار پلی‌فنول برشاخص‌های ایمنی موکوس پوست ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در مواجهه با نانو ذرات نقره انجام گرفت. ۲۳۰ عدد بچه‌ماهی با میانگین وزن ۰/٤±۱۵/٦ گرم به پنج تیمار بدون تغذیه با مکمل غذایی و عدم مواجهه با نانو ذرات نقره (شاهد منفی)، بدون تغذیه با مکمل غذایی و مواجهه با نانو ذرات نقره (شاهد مثبت)، تغذیه شده به‌ترتیب با ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ گرم پودر پلی‌فنول در کیلوگرم غذا به‌مدت ٦۰ روز تغذیه گردیدند، پس از آن طی ١٤ روز در مواجهه ۵۰٪ غلظت کشنده نانو ذرات نقره قرار گرفتند. نتایج نشان داد فعالیت آنزیم لیزوزیم، میزان پروتئین محلول و ایمونوگلوبولین کل موکوس پوست در تیمارهای تغذیه شده با غلظت‌های مختلف عصاره پلی‌فنولی شاه بلوط طی مواجهه با نانو ذرات نقره افزایش معنی‌دار داشتند (P<۰/۰۵). در کل نانو ذرات نقره دارای اثرات نامطلوب برشاخص‌های ایمنی ماهی کپورمعمولی بود. غلظت ۰/۰۵ گرم عصاره پلی‌فنولی شاه بلوط در غلظت‌های مورد استفاده دارای اثرات مطلوب بر شاخص‌های فیزیولوژیکی ماهی کپورمعمولی مواجهه یافته با نانوذرات نقره بود.

کلمات کلیدی: نانو ذرات نقره، سیستم ایمنی، موکوس، مکمل غذایی، ماهی کپور معمولی

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: Hedayati@gau.ac.ir

(DOI): 10.22034/aej.2020.119618

مقدمه

به‌علت ویژگی‌های ضدمیکروبی نانوذرات نقره، از آن به‌طور گسترده در موارد مختلفی مانند صنایع پوشاک، ظروف، مواد غذایی، اسباب بازی و ماشین‌های لباس‌شویی استفاده می‌شود (Shahare و همکاران، ۲۰۱۳). استفاده از محصولات حاوی نانو ذرات نقره می‌توانند موجب رهایش و ورود غلظت‌های بالای آن به منابع آبی شود. به‌طور مثال، یک پیراهن ورزشی شسته‌شده در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب لوله‌کشی، موجب رهایش ۲۷ میکروگرم نانو ذرات نقره می‌گردد (Benn و همکاران، ۲۰۱۰).نقره در ابعاد بزرگ، فلزی با خاصیت واکنش‌دهی کم می‌باشد، ولی زمانی‌که به ابعاد کوچک در حد نانومتر تبدیل می‌شود، خاصیت میکروب‌کشی آن بیش از ۹۹٪ افزایش می‌یابد، به‌حدی که می‌توان از آن جهت بهبود جراحات و عفونت‌ها استفاده کرد(Hedayatiو همکاران، ۲۰۱۳).نقره در ابعاد نانو بر متابولیسم، تنفس و تولیدمثل میکروارگانیسم اثر می‌گذارد (Blaise و همکاران، ۲۰۰۸). از سال ۲۰۱۰ تا ۲۰۱۵ رهایش نانونقره از پساب و فاضلاب ناشی از تولید محصولات بیوشیمیایی ۶۸ درصد افزایش یافته است. در اکوسیستم آبی، نانونقره به ۴ حالت اکسیداسیونی(Ag، +Ag، +Ag2 و +Ag3) وجود دارد که از میان آن‌ها Ag و +Ag بیش‌تر مشاهده شده است (Khan و همکاران، ۲۰۱۵). در حال حاضر فناوری نانو پیشرفته‌ترین و جدیدترین فن‌آوری بشری است که از همگرایی علوم فیزیک، شیمی و زیست‌شناسی به‌وجود آمده است. توسعه قابل توجه نانو تکنولوژی و استفاده گسترده نانو مواد در زمینه‌های مختلف صنعتی باعث ضرورت بررسی اثرات تخریبی آن‌ها بر سیستم بیولوژیک می‌باشد. از این‌رو در استفاده از نانو ذرات باید به سمیت آن‌ها توجه نمود. زیرا می‌تواند با پاسخ‌هایی چون التهاب مزمن و تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن همراه باشد نانوذرات دارای ویژگی‌های بسیار خاص شیمیایی و فیزیکی از نظر اندازه، شکل و نسبت بالای سطح به حجم می‌باشند. گاهی اندازه آن‌ها کوچک‌تر و یا در حد ساختارهای سلولی، ویروس، پروتئین و یا یک ژن می‌باشند. هم‌چنین ویژگی‌های جدید مانند انحلال‌پذیری، تحرک بسیار زیاد در بدن انسان و توانایی نفوذ به غشا سلولی را می‌توان نام برد که این امر سبب شده مقیاس نانو بیش از مقیاس‌های دیگر مورد توجه قرار گیرد با توجه به خصوصیات منحصر به فرد فیزیکوشیمیایی نانوذرات ممکن است نوع سمیت آن‌ها با موادی که از نظر ساختمان شیمیایی با آن‌ها یکسان اما اندازه متفاوت دارند، فرق داشته باشد. حتی امکان دارد که نانو ذره‌ها سمیت بیش‌تری در مقایسه با ذرات بزرگ‌تر ایجاد کنند نانوذرات اکسید فلزی می‌توانند وارد رگ‌ها و بافت‌های مغز شوند و از این طریق می‌توانند قابلیت دسترسی زیستی را افزایش دهند. این مسئله ممکن است منجر به تأثیرات سمی و پاسخ‌های التهابی در مغز و تخریب سیستم عصبی مرکزی شود (Chang و همکاران، ۲۰۱۲). پلی‌فنول‌ها گروهی از ترکیبات زیست‌فعال موجود در منابع غذایی گیاهی خصوصاً انواع میوه‌ها، سبزیجات، غلات کامل، حبوبات، انواع چای سبز و سیاه، قهوه و کاکائو هستند. بیش از ۸۰۰۰ نوع از ترکیبات پلی‌فنولیک مورد شناسایی قرار گرفته است، اسیدهای فنولیک، فلاونوئیدها، استیلبن‌ها، لیگنان‌ها و لیگنان‌های پلیمریک ازجمله مهم‌ترین این ترکیبات به‌شمار می‌روند.فعالیت‌های بیولوژیک و خواص مفید متنوعی برای پلی‌فنول‌ها درنظر گرفته شده است. شناخته شده‌ترین آن‌ها اثرات مستقیم آنتی اکسیدانی، ضدآلرژی، ضدالتهابی، خواص ضدسرطانی، ضدمیکروبی و ضدویروسی، قدرت بالا در جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد، تنظیم چرخه سلولی و مرگ برنامه‌ریزی شده سلول و نیز القا سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی است.علاوه‌بر این پلی‌فنول‌ها قادرند در تعدیل برخی مسیرهای کلیدی پیام‌رسانی درون‌سلولی مرتبط با تنظیم متابولیسم به ایفای نقش بپردازند (Han و همکاران، ۲۰۰۷). تأثیرات محافظتی پلی‌فنول‌ها در مقابل بیماری‌های قلبی عروقی عموماً به توانایی این ترکیبات به تعدیل عملکرد اندوتلیوم عروق، خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی، القاء تولید نیتریک اکساید و انبساط عروق، مهار بیش‌فعالی پلاکت‌ها، مهار پرولیفراسیون و آنژیوژنز نسبت داده می‌شود (Vita و همکاران، ۲۰۰۷؛ Stoclet و همکاران، ۲۰۰۴). Sheikhzadeh و همکاران (a ۲۰۱۲) طی مطالعاتی تأثیر مخمر ساکارومایسس سروزیه و ارگوسان را بر افزایش میزان لیزوزیم و آنزیم فسفاتاز قلیایی در موکوس قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان دادند. در مطالعه‌ای دیگر Sheikhzadeh و همکاران (b ۲۰۱۲) در بررسی اثر ارگوسان به‌میزان ۵ گرم در کیلوگرم به‌مدت ۵۰ روز در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، مشخص شد که ارگوسان موجب بالا بردن فاکتورهای ایمنی موکوسی ازجمله آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز قلیایی، پروتئاز، لیزوزیم و فعالیت ضدباکتریایی شده است. در این راستا Griffitt و همکاران (۲۰۰۸) در بررسی اثر نانو ذرات نیکل، کروم، نقره، مس و آلومینیوم بر ماهی گورخری نشان دادند که مقادیر بیش از ۶۰ میکروگرم/لیتر از نانوذرات یاد شده می‌تواندبر ماهیان گورخری اثر کشنده داشته باشد. درصورتی که نانو ذرات طلا فاقد سمیت برای این ماهیان بودند، بنابراین وجود آلاینده‌هایی هم‌چون نانو ذرات نقره در اکوسیستم‌های آبی موجب تنش در ماهیان شده و می‌تواند سیستم ایمنی ماهیان را تضعیف نماید. Tingting Li و همکاران (۲۰۱۲) طی مطالعه‌ای اثر پوشش پلی‌فنول چای و عصاره رزماری ترکیب شده با کیتوزان را در کیفیت ذخیره‌سازی ماهی *Larimichthys crocea* بررسی نمودند. اثر محافظتی پلی‌فنول چای یا عصاره رزماری عمدتاً به‌علت مهار برخی از آنزیم‌هاو در نتیجه جلوگیری از اکسیداسیون چربی است که نشان‌دهنده توان بالقوه آن به‌عنوان نگه‌دارنده‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها در صنایع

(DOI): 10.22034/aej.2020.119618

غذایی می‌باشد. سراسر پوست ماهی توسط لایه موکوس پوشیده شده است که به‌طور مداوم جایگزین می‌شود. پوست ماهی خط مقدم دفاع در برابر انواع استرس‌های شیمیایی،فیزیکی و زیستی محسوب می‌شود. موکوس پوست یک جزء کلیدی در ماهیان می‌باشد که شامل عوامل فعال بیولوژیکی متنوعی مثل لیزوزیم، آنزیم‌های پروتئولیتیک، فلاووآنزیم‌ها، ایمونوگلوبین‌ها و پپتیدهای ضدمیکروبی بوده و به‌عنوان یک جزء کلیدی در ایمنی ذاتی در پیشگیری از ازدیاد انگل‌ها، باکتری‌ها و قارچ‌ها ایفای نقش می‌کند. هم‌چنین موکوس ماده‌ای ضروری جهت محافظت ماهی در برابر مواجهه زنوبیوتیک (Xenobiotic exposure) می‌باشد و ترشح زیاد موکوس (Mucus hypersecretion) در برابر سموم و محرک‌ها پاسخ تنشی طبیعی است. ترشحات موکوسی نه‌تنها با به‌دام انداختن دوز بالای سموم مانع ورود آن‌ها به بدن ماهی می‌گردند، بلکه پروتئین‌های ایمنی ذاتی مانند لیزوزیم و ایمونوگلوبولین M از طریق موکوس با پاتوژن‌ها مقابله می‌نمایند. هم‌چنین تجمع فلزات در موکوس ماهیان گزارش شده است و قرارگیری در معرض فلزات تولید موکوس در پوست و آبشش را افزایش می‌دهد (Magnadottir، ۲۰۰۶). کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) از رده ماهیان استخوانی و متعلق به خانواده کپورماهیان است و در حوضه دریای خزر و تمام حوضه‌های آبریز ایران پراکنش دارد و از گونه‌های مهم پرورشی در ایران و دنیا محسوب می‌شود. این گونه استنوهالین آب شیرین بوده و دمای بهینه برای رشد آن حدود ۲۵ درجه سانتی‌گراد است (ستاری، ۱۳۸۲). با توجه به کاربردهای گسترده نانوذرات ازجمله نانوذرات نقره و تجمع در اکوسیستم‌های آبی و اهمیت مقاوم‌سازی آبزیان در مواجهه به این آلاینده‌های نوظهور در تحقیق حاضر بررسی تأثیر استفاده از مکمل غذایی عصاره پلی‌فنولی شاه بلوط بر روی شاخص‌های سیستم ایمنی موکوس پوست ماهی کپورمعمولی و درنهایت امکان کاهش سمیت نانوذرات نقره در بچه‌ماهیان کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) صورت پذیرفت.

مواد و روش‌ها

این پژوهش به‌مدت ۶۰ روز در مرکز تحقیقات آبزی‌پروری شهیدفضلی گروه تکثیر و پرورش آبزیان دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان صورت گرفت. ۲۳۰ عدد بچه‌ماهی کپورمعمولی با میانگین وزنی (±SD) ۱۵/۶±۰/۴ گرم از یک کارگاه خصوصی واقع در استان گیلان تأمین گردید. ابتدا به‌منظور انگل‌زدایی و بهبود تنش ناشی از حمل و نقل، ماهیان در آب‌نمک با غلظت ۲٪ به‌مدت ۱۵ دقیقه حمام داده شدند و برای کاهش تلفات احتمالی و تنش به‌مدت ۴۸ ساعت غذادهی نیز انجام نشد. ماهیان پس از یک هفته دوره سازگاری به تعداد ۱۵ عدد در ۱۵ مخزن فایبرگلاس یک مترمکعب نگه‌داری شدند.

ماده استفاده شده در جیره: ماده اضافه شده در جیره عصاره پلی‌فنولی شاه بلوط بود که استخراج پلی‌فنول از پوسته شاه بلوط توسط حلال‌های مختلف و با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی فراوان جداسازی شده و توسط دستگاه طیف‌سنج مادون قرمز FTIR مورد تحلیل قرار گرفته است (Coccia و همکاران، ۲۰۱۶).

درست کردن جیره و نحوه افزودن عصاره پلی‌فنولی شاه بلوط به غذای مصرفی: در این آزمایش جهت ساخت جیره‌های آزمایشی در سطوح مورد نظراز ترکیب عصاره پلی‌فنولی شاه بلوط (۰/۰۵، ۰/۱و ۰/۲ گرم به‌ازای هر کیلوگرم) با استفاده از ژلاتین به جیره پایه (جیره تجاری فرادانه) که آنالیز جیره در جدول ۱ آمده است و به جیره گروه شاهد نیز ژلاتین اسپری شده. جیره‌های تهیه‌شده تازمان مصرف در کیسه‌های زیپ‌دار در یخچال نگه‌داری شدند.

جدول ۱: درصد ترکیبات تشکیل‌دهنده جیره تجاری (شرکت فرادانه) مورد استفاده در تغذیه بچه‌ماهیان کپورمعمولی پرورشی

اجزای جیره	پروتئین خام	چربی خام	فیبر خام	خاکستر	رطوبت	فسفر کل
درصد اجزاء جیره (٪)	۳۶	۹	۵	۱۰	۱۰	۱/۱

تیمارهای غذایی: آزمایش در قالب ۵ تیمار شامل تیمار ۱: تیمار شاهد منفی بدون تغذیه با مکمل غذایی و عدم مواجهه با نانو ذرات نقره (شاهد منفی)، تیمار ۲: تیمار شاهد مثبت بدون تغذیه با مکمل غذایی+مواجهه با نانو ذرات نقره (شاهد مثبت)، تیمار ۳: تیمار تغذیه شده با ۰/۰۵ گرم پودر پلی‌فنول در کیلوگرم غذا و مواجهه با ۵۰٪ غلظت کشنده نانو ذرات نقره. تیمار ۴: تیمار تغذیه شده با ۰/۱ گرم پودر پلی‌فنول در کیلوگرم غذا و مواجهه با ۵۰٪ غلظت کشنده نانو ذرات نقره و تیمار ۵: تیمار تغذیه شده با ۰/۲ گرم پودر پلی فنول در کیلوگرم غذا و مواجهه با ۵۰٪ غلظت کشنده نانو ذرات نقره صورت گرفت (هدایتی و همکاران،۱۳۹۲)

رویارویی با نانو ذرات نقره: بعد از پایان دوره ۶۰ روز غذادهی با مکمل غذایی عصاره پلی‌فنولی شاه بلوط سم‌دهی ماهیان آغاز شد. طی دوهفته باتوجه به مقدار آب درمخازن ۵۰٪ LC_{50} سم اضافه شد. هر دوروز درمیان نصف حجم آب سیفون و نصف سم اولیه استفاده شده به مخزن اضافه شد. مجموعاً ۱۵ مخزن آب و ۳ تیمار بوده که از هر تیمار ۵ نمونه ماهی گرفته و از ماهیان نمونه‌های موکوسی مورد بررسی قرار گرفت.

(DOI): 10.22034/aej.2020.119618

تعیین LC_{50} ۹۶ ساعته نانو ذرات نقره: با بررسی غلظت‌های گسترده، مقادیر نزدیک به LC_{50} انتخاب گردید. برای انجام آزمایش LC_{50} نانو ذرات نقره، ماهیان کپور در ۵ تیمار با سه تکرار (یک گروه به‌عنوان شاهد و در هر تیمار ۶ ماهی) به‌صورت تصادفی در مخازن ۱۰۰ لیتری در غلظت‌های ۰/۵، ۲، ۳ و ۵ میلی‌گرم بر لیتر قرار گرفتند (هدایتی و همکاران، ۱۳۹۲).با شروع آزمایش کشندگی حاد، هیچ‌گونه تعویض آبی در مخازن آزمایش صورت نگرفت و غلظت آلاینده‌ها هم تجدید نشد. هوادهی در تمامی مخازن به گونه‌ای که حداقل آشفتگی در آب ایجاد شود صورت گرفت. زمان انجام آزمایش غلظت کشندگی، ۹۶ ساعت بود و میزان مرگ و میر در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت محاسبه شد. پس از محاسبه LC_{50} که ۲/۴۹ میلی‌گرم بر لیتر بود، آزمایش سمیت تحت کشنده انجام شد. با توجه به این‌که، آزمایش تحت حاد در دوره ۲۸-۷ روزه صورت می‌گیرد (Di Giulio و Hinton، ۲۰۰۸)، این آزمایش در ۱۴ روز و با انتخاب ۵۰ درصد از غلظت سمیت کشنده (۱/۱۵ میلی‌گرم بر لیتر) استفاده شد و تمام تیمارهای آزمایشی طی این ۱۴ روز، در رویارویی با نانوذرات نقره قرار گرفتند.

جمع‌آوری موکوس پوست: موکوس پوست ماهیان براساس Subramanian و همکاران (۲۰۰۷) جمع‌آوری شد. بعد از بی‌هوشی با پودر گل میخک (۵ میلی‌گرم در لیتر) از هر مخزن ۵ قطعه ماهی به‌صورت جداگانه درون کیسه‌های پلی‌اتیلنی حاوی ۱۰ میلی‌لیتر کلرید سدیم ۵۰ میلی‌مولار قرار گرفته و پس از ۲ دقیقه ماهیان از کیسه خارج و به تشتی با اکسیژن‌دهی مناسب منتقل شدند. مخلوط موکوس و کلریدسدیم جمع‌آوری شده را درون لوله‌های فالکون ۱۵ میلی‌لیتر ریخته و به‌مدت ۱۰دقیقه با دور g×۱۵۰۰ سانتریفیوژ شد و سوپرناتانت جدا شده (موکوس) در میکروتیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتر ریخته و جهت بررسی‌های بیش‌تر در فریزر منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

سنجش فعالیت آنزیم لیزوزیم: اندازه‌گیری لیزوزیم موکوس پوست به‌روش کدورت‌سنجی و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Biochrom Libra S12 انجام‌شد.برای‌سنجش این آنزیم از باکتری *Micrococcus luteus* به‌عنوان سوبسترا استفاده گردید. برای تهیه این سوسپانسیون، باکتری لیوفلیزه شده میکروکوکوس لوتئوس را در بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۴ مولار حل نموده و جذب این محلول در مقابل شاهد (کووت حاوی فسفات سدیم)، در طول موج ۴۵۰ نانومتر، برابر ۰/۷-۰/۶ تنظیم شد، سپس کاهش در جذب سلول‌های *Micrococcus luteus* در مدت ۱۰ دقیقه ثبت گردید. که درواقع یک واحد فعالیت آنزیم، به‌صورت مقدار آنزیمی که در طول موج ۴۵۰ نانومتر و دمای ۲۵ درجه‌سانتی‌گراد کاهشی معادل ۰/۰۰۱ در دقیقه در جذب سلول‌های میکروکوکوس لوتئوس ایجاد می‌کند، بیان می‌شود (Subramanian و همکاران، ۲۰۰۷).

سنجش فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی: برای تعیین سطح فعالیت این آنزیم از کیت مخصوص سنجش فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی (شرکت پارس آزمون) دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۰۵ نانومتر استفاده شد.

سنجش پروتئین محلول: برای این منظور از روش Lowry و همکاران (۱۹۵۱) و منحنی استاندارد آلبومین سرم گاوی استفاده شد. اندازه‌گیری با اضافه نمودن معرف رنگی فولین فنول سیوکالتیو (Folin-Ciocalteu's phenol reagent) به ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های رقیق‌شده موکوس و استاندارد و قرائت نوری با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۵۰ نانومتر انجام گرفت. با انتقال جذب نوری به‌دست آمده به منحنی استاندارد، میزان پروتئین محلول بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محاسبه گردید.

سنجش ایمونوگلوبولین کل: جهت اندازه‌گیری این پارامتر، از روش Siwicki و Anderson (۱۹۹۳) استفاده شد. ابتدا میزان پروتئین موکوس تعیین شده و سپس به نمونه موکوس پلی‌اتیلن گلیکول ۱۲ درصد اضافه می‌شود. پس از ۲ ساعت انکوباسیون در دمای اتاق و تاریکی، نمونه‌ها سانتریفیوژ شده (۵۰۰۰rpm به‌مدت ۵ دقیقه) و غلظت پروتئین در قسمت بالایی محلول بار دیگر توسط روش Lowry و همکاران (۱۹۵۱) اندازه‌گیری شد. درواقع پلی‌اتیلن گلیکول باعث رسوب ایمونوگلوبولین موجود در پروتئین می‌شود و میزان ایمونو گلوبولین کل از محاسبه اختلاف غلظت پروتئین در نمونه اولیه (پروتئین محلول) و غلظت پروتئین پس از افزودن پلی‌اتیلن گلیکول محاسبه شد (Siwicki و Anderson، ۱۹۹۳)

تجزیه و تحلیل داده‌ها: این آزمایش بر مبنای طرح کاملاً تصادفی با ۵ تیمار (شاهد مثبت و منفی و تیمار های تغذیه شده با غلظت‌های مختلف پلی‌فنول) در ۳ تکرار صورت پذیرفت. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه نرم‌افزار SPSS ۲۲ استفاده شد و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان ۵ درصد انجام گرفت. نمودارها در اکسل ۲۰۱۳ رسم شدند.

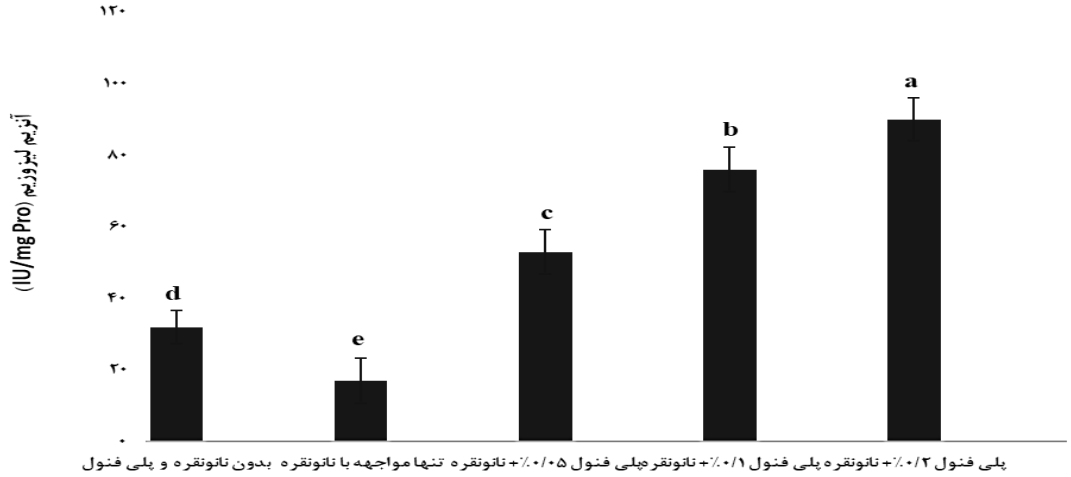
نتایج

در این بخش نتایج به‌دست آمده از سنجش فعالیت آنزیم‌های لیزوزیم و فسفاتاز قلیایی، پروتئین محلول و ایمونوگلوبولین کل تیمارهای تغذیه شده با مکمل غذایی عصاره پلی‌فنولی شاه بلوط رویارویی با غلظت تحت کشنده نانو ذرات نقره آورده شده است.

فعالیت آنزیم لیزوزیم: نتایج سنجش فعالیت آنزیم لیزوزیم موکوس پوست، افزایش معنی‌دار این آنزیم را در تیمارهای

(DOI): 10.22034/aej.2020.119618

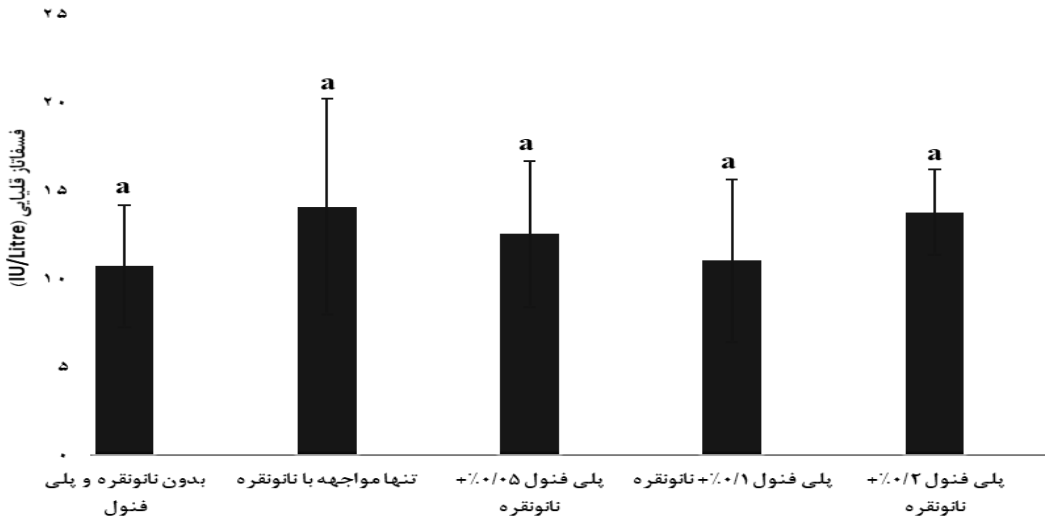
تغذیه‌شده با غلظت‌های مختلف عصاره پلی‌فنولی شاه بلوط در مقایسه با تیمار شاهد مثبت و منفی نشان داد($P<0/05$). کم‌ترین میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم موکوس پوست در تیمار شاهد مثبت مشاهده شد. روند فعالیت آنزیم لیزوزیم موکوس پوست در تیمارهای تغذیه شده با غلظت‌های مختلف عصاره پلی‌فنولی شاه بلوط در مواجهه با نانونقره روند افزایشی و تفاوت معنی‌داری‌داشت ($P<0/05$). میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم موکوس پوست در تیمار شاهد منفی در مقایسه با شاهد مثبت بیش‌تر بوده است و تفاوت معنی‌دار داشته است($P<0/05$). میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم موکوس پوست در تیمارهای حاوی غلظت‌های مختلف عصاره پلی‌فنولی شاه بلوط و در مواجهه با نانو نقره قرار گرفته نسبت به تیمار شاهد مثبت و منفی بیش‌تر بوده و تفاوت معنی‌داری داشته است ($P<0/05$).



شکل ۱: مقایسه میانگین فعالیت آنزیم لیزوزیم موکوس در تیمارهای تغذیه شده باغلظت‌های مختلف عصاره پلی‌فنولی شاه بلوط در مواجهه با نانو ذرات نقره

حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری بین تیمارها می‌باشند ($P<0/05$).

فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی: نتایج سنجش آنزیم فسفاتاز قلیایی نشان داد که این آنزیم افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه شاهد مثبت و منفی نداشته است ($P>0/05$). سنجش فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی نشان داد که از بین تیمارهای تغذیه شده با غلظت‌های مختلف عصاره پلی‌فنولی شاه بلوط کم‌ترین آن مربوط به تیمار تغذیه شده با عصاره پلی‌فنولی شاه بلوط ۰/۱ ٪و بیش‌ترین آن مربوط به تیمار تغذیه شده با عصاره پلی‌فنولی‌شاه بلوط ۰/۲٪ می‌باشد.سنجش فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی در تیمارهای‌حاوی‌غلظت‌های مختلف عصاره پلی‌فنولی شاه بلوط و در مواجهه با نانو نقره قرار گرفته نسبت به تیمار شاهد مثبت و منفی تفاوت معنی‌داری نداشته است ($P>0/05$).

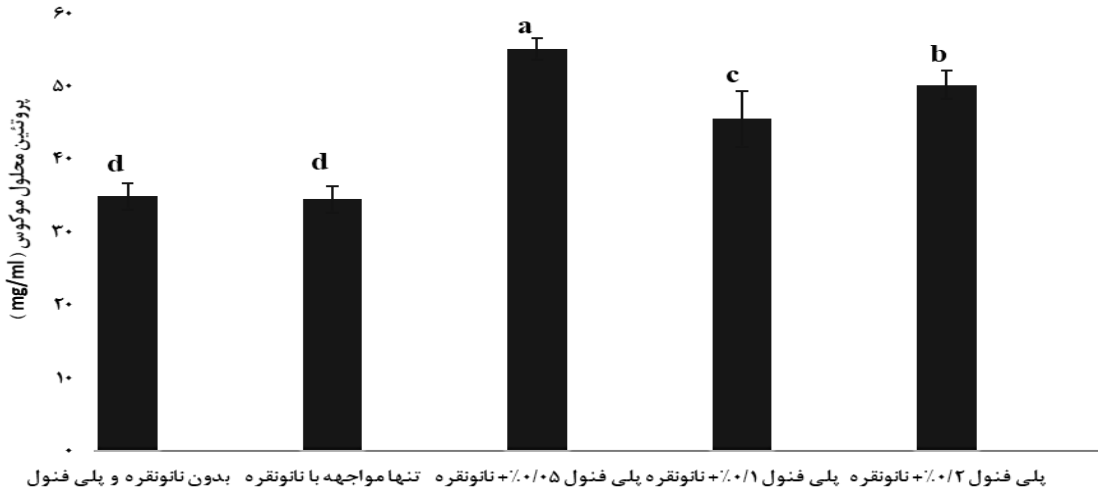


شکل ۲: مقایسه میانگین فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی موکوس در تیمارهای تغذیه شده با غلظت‌های مختلف عصاره پلی‌فنولی شاه بلوط درمواجهه با نانو ذرات نقره

حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری بین تیمارها می‌باشند ($P>0/05$).

(DOI): 10.22034/aej.2020.119618

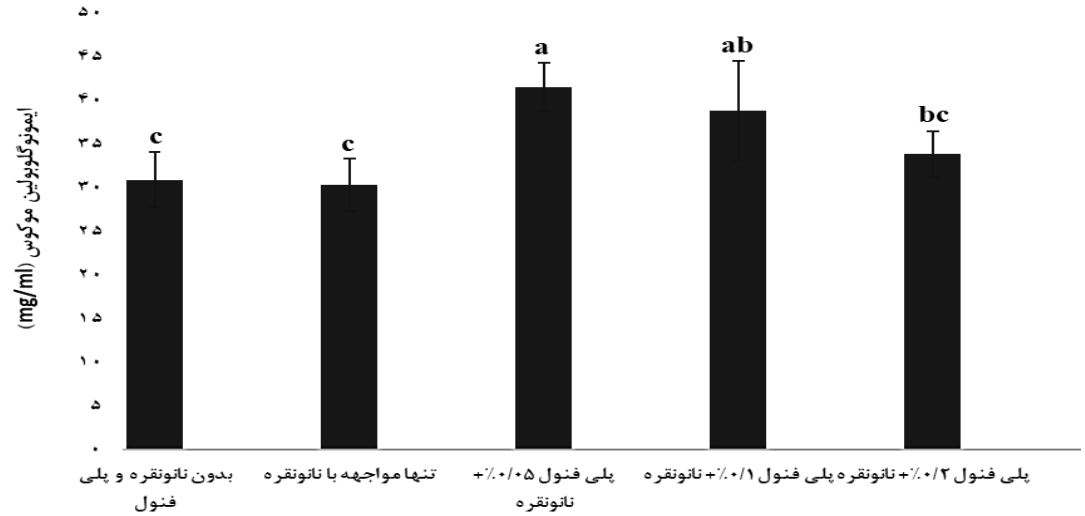
سنجش پروتئین محلول کل موکوس: سطح پروتئین محلول موکوس کل نشان داد که تیمارهای حاوی غلظت‌های مختلف مکمل غذایی نسبت به تیمار شاهد مثبت و منفی بیش‌تر شده و تفاوت معنی‌داری داشته است ($P<0/05$). در تیمارهای تغذیه شده با غلظت‌های مختلف عصاره پلی‌فنولی شاه بلوط بیش‌ترین سطح مربوط به تیمار تغذیه شده با عصاره پلی‌فنولی شاه بلوط ۰/۰۵٪ و کم‌ترین آن مربوط به تیمار تغذیه شده با عصاره پلی‌فنولی شاه بلوط ۰/۱٪ می‌باشد و تفاوت در تیمارهای تغذیه شده با غلظت‌های مختلف مکمل غذایی معنی‌دار بوده است ($P<0/05$). سطح پروتئین محلول موکوس نشان داد که سطح گروه شاهد منفی در مقایسه با شاهد مثبت بوده و تفاوت معنی‌دار داشت ($P<0/05$).



شکل ۳: مقایسه میانگین پروتئین محلول موکوس در تیمارهای تغذیه شده باغلظت‌های مختلف عصاره پلی‌فنولی شاه بلوط در مواجهه با نانو ذرات نقره

حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری بین تیمارها می‌باشند ($P<0/05$).

سنجش ایمونوگلوبولین کل: میزان ایمونوگلوبین کل موکوس در تیمار تغذیه شده با عصاره پلی‌فنولی شاه بلوط ۰/۰۵٪ بیش‌ترین میزان و در شاهد مثبت کم‌ترین میزان را داشت. میزان ایمونوگلوبین در تیمارهای حاوی غلظت‌های مختلف مکمل غذایی نسبت به گروه شاهد مثبت و منفی بیش‌تر بوده و تفاوت معنی‌داری داشته است ($P<0/05$). میزان فعالیت ایمونوگلوبین موکوس در شاهد منفی نسبت به شاهد مثبت تفاوت معنی‌داری نداشته است ($P<0/05$). میزان ایمونوگلوبین موکوس افزایش معنی‌دار در تیمارهای تغذیه شده با غلظت‌های مختلف عصاره پلی‌فنولی شاه بلوط در مقایسه با تیمار شاهد مثبت و منفی را نشان داد ($P<0/05$). میزان ایمونوگلوبین موکوس در تیمارهای تغذیه شده با غلظت‌های مختلف عصاره پلی‌فنولی شاه بلوط در مواجهه با نانو نقره روند کاهشی و تفاوت معنی‌داری داشت ($P<0/05$).



شکل ۴: مقایسه میانگین ایمونوگلوبولین کل موکوس در تیمارهای تغذیه شده با غلظت های مختلف عصاره پلی فنولی شاه بلوط درمواجهه با نانو ذرات نقره

حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری بین تیمارها می‌باشند ($P<0/05$).

(DOI): 10.22034/aej.2020.119618

بحث

عدم‌دانش کافی از اثرات مضر و زیان‌بار نانوذرات برای منابع طبیعی و موجودات، نگرانی‌هایی را درخصوص ورود آن‌ها به اکوسیستم‌های طبیعی به‌وجود آورده است. از این‌رو توسعه دانسته‌های علمی در مورد اثرات نانوذرات به‌منظور ارزیابی خطرات آن بر آبزیان ضروری می‌باشد. استفاده از مکمل‌های غذایی برای کنترل زیستی بیماری‌ها و بهبود سیستم ایمنی در ماهیان گسترش یافته است (Hoseinifar*et* و همکاران، ۲۰۱۱؛ Bricknell و Dalmo، ۲۰۰۵). استفاده از محرک‌های ایمنی، به‌صورت مکمل‌های غذایی، می‌تواند ایمنی ذاتی ماهی را به‌منظور مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا در فرآیندهای پر تنش بهبود بخشد (Bricknell و Dalmo، ۲۰۰۵). در این مطالعه فعالیت آنزیم لیزوزیم تیمارهای تغذیه شده با مکمل‌های غذایی با افزایش غلظت‌های عصاره پلی‌فنولی شاه بلوط افزایش معنی‌داری یافت (P<۰/۰۵). تیمار تغذیه شده با عصاره پلی‌فنولی شاه بلوط ۰/۲٪ و تیمار شاهد منفی ۹۰،۱۷ واحد بر میلی‌گرم پروتئین، بیش‌ترین و کم‌ترین مقدار این آنزیم را دارا بودند. نتایج به‌دست آمده از تحقیق حاضر مشابه با نتایج به‌دست آمده از فعالیت آنزیم لیزوزیم موجود در موکوس بسیاری از گونه‌های ماهی می‌باشد (Guardiola و همکاران، ۲۰۱۵). لیزوزیم یک آنزیم هضم‌کننده موکوس با منشا لکوسیتی است که قوی‌ترین آنزیم ضد باکتریایی در سیستم ایمنی می‌باشد. که در ترشحات مختلف حیوانات مثل مخاط، بزاق و بسیاری از بافت ها مثل خون یافت می‌گردد. میزان لیزوزیم در گونه‌های مختلف می‌تواند بسته به فاکتورهای زیادی ازجمله پاسخ به استرس، دستکاری بلوغ، جیره غذایی، جنسیت، تنوع گونه‌ای و تنوع ژنتیکی باشد (Subramanian و همکاران، ۲۰۰۷). بررسی لیزوزیم در مطالعه حاضر اختلاف معنی‌داری را بین تیمارهای مختلف نشان می‌دهد که با نتایج حاصل از بررسی افزودن محرک ایمنی ساکرومایسس سروزیه و ارگوسان توسط Sheikhzadeh و همکاران (a و b ۲۰۱۲) به جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مطابقت دارد. هم‌چنین استفاده از انار در جیره ماهی فلاندر باعث افزایش معنی‌دار لیزوزیم تیمارهای با گروه شاهد گردید (Harikrishnan و همکاران، ۲۰۱۱). Miandare و همکاران (۲۰۱۶) تأثیر محرک ایمنی گالاکتوالیگوساکارید را در جیره‌غذایی ماهی قرمز بررسی و بیان کردند که میزان آنزیم لیزوزیم در ماهیان تغذیه شده با گالاکتوالیگوساکارید افزایش یافته است.

فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی: یکی از آنزیم‌های لیزوزیمی آنزیم فسفاتاز قلیایی می‌باشد که در pHهای قلیایی بیش‌ترین فعالیت را دارد که در زمان ایجاد زخم و در طول مراحل ابتدایی بهبود و در شرایط استرس‌زا توسط سلول‌های اپیدرمی ترشح می‌شود و در واقع کارایی حفاظتی در برابر پاتوژن را دارا می‌باشد (Iger و Abraham، ۱۹۹۷). فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی شاخص بالقوه استرس است که در موکوس پوست سالمون اتلانتیک به‌اثبات رسیده است (Ross و همکاران، ۲۰۰۰). آنزیم آلکالین فسفاتاز آنزیم لیزوزیمی بوده که به‌عنوان عامل ضدباکتریایی دارای نقش محافظتی در هنگام زخم شدن، استرس و آلودگی‌های انگلی در ماهی می‌باشد (Palaksha و همکاران، ۲۰۰۸). کم‌ترین و بیش‌ترین مقدار این آنزیم به‌ترتیب ۱۰/۷۲ و ۱۴/۹ واحد بین‌المللی در لیتر مربوط به تیمار شاهد منفی و تیمار شاهد مثبت در مواجهه با نانوذرات نقره بود. موکوس کپورمعمولی بیش‌ترین سطوح فسفاتاز قلیایی را دارد که به‌علت زیستگاه این ماهی در آب‌های کم عمق و نزدیک بستر و تحت شرایط گل آلود است و حضور این آنزیم در جهت افزایش مقاومت سیستم ایمنی ذاتی این ماهی می‌باشد (Subramanian و همکاران، ۲۰۰۷). سنجش فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی در تیمارهای حاوی غلظت‌های مختلف عصاره پلی‌فنولی شاه بلوط و در مواجهه با نانو نقره قرار گرفته نسبت به تیمار شاهد مثبت و منفی تفاوت معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵). نتایج این تحقیق با نتایج مطالعه عادل و همکاران (۱۳۹۳) که دریافتند استفاده از نعناع فلفلی در سطوح مختلف در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغییر محسوسی در میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز قلیایی در مقایسه با تیمار شاهد نداشته است، مطابقت دارد. مطالعه‌ای که حسینی‌فر و همکاران (۲۰۱۸) با افزودن پودر جلبک گراسیلاریا گراسیلیس به جیره ماهی زبرا انجام دادند، فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در ماهی‌هایی که با پودر جلبک گراسیلاریا گراسیلیس تغذیه شدند بیش‌تر از گروه شاهد بود، نتایج فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در این مطالعه، با نتایج مطالعه حاضر مطابقت نداشت.

سنجش پروتئین محلول: آنالیز مقدار پروتئین محلول موکوس ماهی کپور معمولی بین تیمارهای مختلف نشان داد که مقدار آن بین تیمارهای تغذیه شده با عصاره پلی‌فنولی شاه بلوط و گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشت. بیش‌ترین و کم‌ترین مقدار این فاکتور به ترتیب با ۵۵/۱۹ و ۳۴/۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در تیمار تغذیه شده با عصاره پلی‌فنولی شاه بلوط ۰/۰۵٪ و شاهد مثبت بود. Miandare و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که افزودن محرک ایمنی گالاکتوالیگو ساکارید در جیره غذایی ماهی قرمز منجر به افزایش معنی‌دار پروتئین محلول موکوس نسبت به گروه شاهد شده است (P<۰/۰۵) که این دو پژوهش با نتایج حاصل از مطالعه کنونی هم‌سو می‌باشد. در اپیدرم ماهیان سلول‌های کیسه‌ای‌شکلی وجود دارند که با ترشح پروتئین‌هایی، از ماهی در برابر عفونت‌های انگلی و قارچی محافظت می‌کنند. لکتین‌ها وگلیکوپروتئین‌ها ازجمله پروتئین‌های با باندهای کربوهیدراتی بوده که به همراه فاکتورهای دیگر موکوس، به پاتوژن مورد نظر هجوم برده و آن را آگلوتینه می‌کنند (Fast و همکاران، ۲۰۰۲).

(DOI): 10.22034/aej.2020.119618

نتایج این مطالعه افزایش میزان پروتئین کل را در ماهیان تغذیه شده با زنجبیل نسبت به گروه شاهد نشان می‌دهدکه این نتایج هم راستا با نتایج به‌دست آمده از مطالعات انجام‌شده توسط Sheikhzadeh و همکاران(۲۰۱۲b)می‌باشدکه‌با افزودن‌محرک‌ایمنی ساکارومایسس سروزیه به جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان داد که پروتئین کل موجود در موکوس افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه شاهد نشان می‌دهد. در مطالعه‌ای که حسینی‌فر و همکاران (۲۰۱۸) با به‌کارگیری پودر جلبک گراسیلاریا گراسیلیس در جیره ماهی زبرا انجام دادند، بالاترین میزان پروتئین کل و ایمونوگلوبولین کل را در تیمار ۱٪ بعد از ۸ هفته تغذیه با پودر جلبک گراسیلاریا گراسیلیس گزارش کردند.نتایج بررسی‌میزان پروتئین کل موکوس در این مطالعه، با نتایج مطالعه حاضر مطابقت نداشت.

سنجش ایمنوگلوبولین کل: ایمنوگلوبولین در ماهیان از سلول‌های B ترشح می‌شوند که یکی از مؤلفه‌های ایمنی اختصاصی می‌باشد (Esteban، ۲۰۱۲).میزان ایمونوگلوبین در تیمارهای حاوی غلظت‌های مختلف مکمل غذایی بیش‌ترین میزان ۴۶/۴۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مربوط به عصاره پلی‌فنولی شاه بلوطی ۰/۰۵٪ و کم‌ترین میزان ۳۰/۳۱ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر مربوط به شاهدمثبت و تفاوت بین آن‌هامعنی‌دار بوده است (P<۰/۰۵). در تحقیق حاضر سطح ایمونوگلوبولین موکوس تیمارهای تغذیه شده با عصاره پلی‌فنولی شاه بلوط در مقایسه با تیمار شاهد افزایش معنی‌دار داشت.این افزایش ایمنوگلوبولین توسط محقق دیگر که در جیره ماهی از محرک‌های ایمنی مانند قارچ و باکتری‌ها استفاده کرده‌اند مورد تأیید واقع شده است که عبارت است از استفاده عصاره قارچ *Lentinula edodes* در جیره قزل‌آلا (Baba و همکاران، ۲۰۱۵) که موجب افزایش این پارامتر شده‌اند. نتایج به‌دست آمده از آنالیزآماری نشان داد افزودن پلی‌فنول به جیره غذایی ماهی می‌تواند موجب افزایش‌معنی‌دار شاخص‌های موکوسی شامل فعالیت‌های آنزیم لیزوزیم، پروتئین محلول و ایمونوگلوبولین کل شود و این شاخص‌ها درمجموع عملکرد مناسب‌تری داشتند. هم‌چنین افزودن مکمل غذایی پلی‌فنول در جیره غذایی ماهی کپور معمولی باعث بهبود شاخص‌های موکوسی در مواجهه با نانونقره شد. آنالیز نتایج موکوسی نشان داد غلظت ۰/۰۵٪ بالاترین تاثیر را در بین غلظت‌های عصاره پلی‌فنولی شاه بلوط داشته است. جمع‌بندی نتایج با تکیه بر اهداف تحقیق مؤید آن است که عصاره پلی‌فنولی شاه بلوط باعث خنثی‌سازی اثرات نامطلوب نانوذرات نقره و افزایش کارایی سیستم ایمنی شده است، نانوذرات نقره دارای اثرات نامطلوب فیزیولوژیک بر ماهی کپور معمولی بوده و نهایتاً عصاره پلی‌فنولی شاه بلوط در غلظت‌های مورد استفاده اثرات مطلوبی بر شاخص‌های فیزیولوژیکی ماهی کپورمعمولی مواجهه یافته با نانوذرات نقره داشت.

منابع

۱. **عادل، م.؛ صفری، ر.؛ منجی، ه. و وحیدفارابی، س.م.، ۱۳۹۴.** تاثیر سطوح مختلف عصاره نعناع فلفلی بر شاخص‌های رشد، بازماندگی و ترکیبات لاشه بچه ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*). مجله بوم‌شناسی آبزیان. دوره ۵، شماره ۱، صفحات ۹۵ تا ۱۰۲.

۲. **ستاری، م.؛ شاهسونی، د. و شفیعی، ش.، ۱۳۸۲.** ماهی‌شناسی ۲. نشر حق‌شناس. ۵۹۷ صفحه.

۳. **هدایتی، ع.؛ قربانی، ر.؛ باقری، ط.؛ احمدوند، ش. و جهانبخشی، ع.، ۱۳۹۲.** بررسی اثرات سمیت کشنده نانو اکسید روی، نانو اکسید مس (CuO NPs) و نانو دی‌اکسید تیتانیوم (TiO2 NPs) و بررسی اثرات سمیت تحت کشنده آن‌ها بر فاکتورهای خون و بافت آبشش ماهی قرمز (*Carassius auratus*)، کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) و کلمه (*Rutilus rutilus*). طرح پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ۶۱ صفحه.

۴. **Baba, E.; Uluköy, G. and Öntaş, C., 2015.** Effects of feed supplemented with Lentinula edodes mushroom extract on the immune response of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, and disease resistance against *Lactococcus garvieae*. Aquaculture. Vol. 448, pp: 476-482.

۵. **Benn, T.; Cavanagh, B.; Hristovski, K.; Posner, J.D. and Westerhoff, P., 2010.** The release of nanosilver from consumer products used in the home. Journal of environmental quality. Vol. 39, No. 6, pp: 1875-1882.

۶. **Blaise, C.; Gagne, F.; Ferard, J.F. and Eullaffroy, P., 2008**. Ecotoxicity of selected nano-materials to aquatic organisms. Environmental toxicology. Vol. 23, No. 5, pp: 591-598.

۷. **Bricknell, I. and Dalmo, R.A., 2005.** The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. Fish and Shellfish immunology. Vol. 19, pp: 457-472.

۸. **Chang, Ya.; Xia, L.; Zhang, M.; Zhang, J. and Xing, G., 2012**. The Toxic Effects and Mechanisms of CuO and ZnO Nanoparticles. Materials. Vol. 5, No. 12, pp: 2850-2871.

۹. **Di Giulio, R.T. and Hinton, D.E., 2008.** The Toxicology of Fishes dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning Turbot (*Psetta maxima*).Aquaculture International. Vol. 14, pp: 219-229.

۱۰. **Esteban, M.A, 2012.** An overview of the immunological defenses in fish skin. ISRN Immunology. International Scholarly Research Network. Article ID 853470, 29.

(DOI): 10.22034/aej.2020.119618

۱۱. **Fast, M.D.; Ross, N.W.; Mustafa, A.; Sims, D.E.; Johnson, S.C.; Conboy, G.A. and Burka, J.F., 2002.** Susceptibility of rainbow trout Oncorhynchus mykiss, Atlantic salmon Salmo salar and coho salmon Oncorhynchus kisutch to experimental infection with sea lice Lepeophtheirus salmonis. Diseases of aquatic organisms. Vol. 52, No. 1, pp: 57.

۱۲. **Griffitt, R.J.; Luo, J.; Gao, J.; Bonzongo, J.C. and Barber, D.S., 2008.** Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. Environmental Toxicology and Chemistry. Vol. 27, No. 9, pp: 1972-1978.

۱۳. **Guardiola, F.A.; Dioguardi, M.; Parisi, M.G.; Trapani, M.R.; Meseguer, J.; Cuesta, A. and Esteban, M.A., 2015.** Evaluation of waterborne exposure to heavy metals in innate immune defences present on skin mucus of gilthead seabream *(Sparus aurata*). Fish and shellfish immunology. Vol. 45, pp: 112-123.

۱۴. **Han, X.; Shen, T. and Lou, H., 2007.** Dietary polyphenols and their biological significance. Int J Mol Sci. Vol. 8, No. 9, pp: 950-88.

۱۵. **Harikrishnan, R.; Balasundaram, C. and Heo, M.S., 2011**. Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. Aquaculture. Vol. 317, No. 1, pp: 1-15.

۱۶. **Hedayati, A.; Jahanbakhshi, A. and Qaderi Rmazy, F., 2013.** Aquatic Toxicology, GAU publication. Vol. I, First edition. pp: 70-76.

۱۷. **Hoseinifar, S.H.; Mirvaghefi, A.; Merrifield, D.L.; Amiri, B.M.; Yelghi, S. and Bastami, K.D., 2011.** The study of some haematological and serum biochemical parameters of juvenile beluga (*Huso huso*) fed oligofructose. Fish physiology and biochemistry. Vol. 37, No. 1, pp: 91-96.

۱۸. **Hoseinifar, S.H.; Yousefi, S.; Capillo, G.; Paknejad, H.; Khalili, M.; Tabarraei, A.; Van Doan, H.; Spanò, N. and Faggio, C., 2018.** Mucosal immune parameters, immune and antioxidant defence related genes expression and growth performance of zebrafish (*Danio rerio*) fed on *Gracilaria gracilis* powder. Fish & shellfish immunology. Vol. 83, pp: 232-237.

۱۹. **Iger, Y. and Abraham, M., 1997.** Rodlet cells in the epidermis of fish exposed to stressors. Tissue and Cell. Vol. 29, No. 4, pp: 431-438.

۲۰. **Khan, M.S.; Jabeen, F.; Qureshi, N.A.; Asghar, M.S.; Shakeel, M. and Noureen, A., 2015.** Toxicity of silver nanoparticles in fish: a critical review. J Bio Environ Sci. Vol. 6, No. 5, pp: 211-227.

۲۱. **Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. and Randall, R.J., 1951.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of biological chemistry. Vol. 193, No. 1, pp: 265-275.

۲۲. **Magnadottir, B., 2006.** Innate immunity of fish (overview). Fish and shellfish immunology. Vol. 20, pp: 137-151.

۲۳. **Mahmoud, R.; El-Sayed, I.; Doaa, B. and El-Sayed, M., 2013.** Effect of supplementation of broiler diets with guava leaves and/or olive oil on growth, meat composition, blood metabolites and immune response. Benha Veterinary Medical Journal. Vol. 25, No. 2, pp: 23-32.

۲۴. **Miandare, H.K.; Yarahmadi, P. and Abbasian, M., 2016.** Immune related transcriptional responses and performance of Litopenaeus vannamei post-larvae fed on dietary probiotic PrimaLac®. Fish and shellfish immunology. Vol. 55, pp: 671-678.

۲۵. **Palaks ha, K.J.; Shin, G.W.; Kim, Y.R. and Jung, T.S., 2008.** Evaluation of non-specific immune components from the skin mucus of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Fish and shellfish immunology. Vol. 24, No. 4, pp: 479-488.

۲۶. **Ross, N.W.; Firth, K.J.; Wang, A.; Burka, J.F. and Johnson, S.C., 2000.** Changes in hydrolytic enzyme activities of naive Atlantic salmon Salmo salar skin mucus due to infection with the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* and cortisol implantation. Diseases of aquatic organisms. Vol. 41, No. 1, pp: 43-51.

۲۷. **Shahare, B.; Yashpal, M. and Singh, G., 2013.** Toxic effects of repeated oral exposure of silver nanoparticles on small intestine mucosa of mice. Toxicology Mechanisms and Methods. Vol. 23, No. 3, pp: 161-167.

۲۸. **Sheikhzadeh, N.; Heidarieh, M.; Pashaki, A.K.; Nofouzi, K.; Farshbafi, M.A. and Akbari, M., 2012a.** Hilyses, fermented *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the growth performance and skin non-specific immune parameters in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish and shellfish immunology. Vol. 32, No. 6, pp: 1083-1087.

(DOI): 10.22034/aej.2020.119618

۲۹. **Sheikhzadeh, N.; Pashaki, A.K.; Nofouzi, K.; Heidarieh, M. and Tayefi-Nasrabadi, H., 2012b.** Effects of dietary Ergosan on cutaneous mucosal immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish and shellfish immunology. Vol. 32, No. 3, pp: 407-410.

۳۰. **Siwicki, A.K. and Anderson, D.P., 1993.** Nonspecific defense mechanisms assay in fish: II. Potential killing activity of neutrophils and macrophages, lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin level in serum. Fish Disease Diagnosis and Prevention Methods Olsztyn, Poland. pp: 105-12.

۳۱. **Stoclet, J.C.; Chataigneau, T.; Ndiaye, M.; Oak, M.H.; El Bedoui, J. and Chataigneau, M., 2004.** Vascular protection by dietary polyphenols. Eur J Pharmacol. Vol. 500, No. 1-3, pp: 299-313.

۳۲. **Subramanian, S.; MacKinnon, Sh.L. and Ross, N.W., 2007.** A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. Comprative Biochemistry and Physiology. Vol. 148, pp: 256-263.

۳۳. **Vita, J.A., 2005.** Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function. Am J Clin Nutr. Vol. 81, No. 1, pp: 292S-297S.

(DOI): 10.22034/aej.2020.119618

Scientific Research Journal of Animal Environment Vol. 12, No. 3, Autumn 2020

Effect of polyphenol pre-treatment on mucus immune indices of common carp *Cyprinus carpio* in exposed to silver nanoparticles

- **Vajihe Noori:** Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
- **Seyed Aliakbar Hedayati*:** Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
- **Seyed Hossein Hosseinifar:** Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
- **Tahere Bagheri:** Off-shore Fisheries Research Center, Iran Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Promotion Organization, Chabahar, Iran
- **Seyed Reza Khaleghi:** Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Received: July 2019 Accepted: October 2019

Keyword: Silver Nanoparticles, Immune System, Mucus, Dietary Supplements, Common Carp

Abstract

Due to the increasing use of nanoparticles and also dietary supplements in aquaculture industry, the present study was conducted to investigate the effects of dietary supplementation and nanoparticles by investigating polyphenol pre-treatment on the immune indices of common carp skin mucus (*Cyprinus carpio*) in exposed to silver nanoparticles. 230 fish with mean weight of 15.6±0.4 g were distributed in five treatments without dietary supplementation and no exposure to silver nanoparticles (negative control), without dietary supplementation and exposure to silver nanoparticles (positive control), Fed with 0.05, 0.1 and 0.2 g of polyphenol/kg of food for 60 days then exposure to 50% lethal concentration of silver nanoparticles for 14 days. The results showed that in treatments fed different concentrations of polyphenol diet during exposure to silver nanoparticles lysozyme activity and soluble protein, total mucosal immunoglobulin level were significantly increased ($P<0.05$). In general, silver nanoparticles had adverse effects on common carp. The 0.05 g of dietary polyphenol supplementation had more positive effects on physiological parameters of common carp in exposed to silver nanoparticles.

* Corresponding Author's email: Hedayati@gau.ac.ir