

تأثیر نانوذرات نقره سنتز شده از ماکرو جلبک سیستوسیرا ایندیکا بر برخی شاخص‌های ایمنی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

سراج بیتا^{۱*} و مهرزاد مصباح^۲

^۱ دانشیار گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران

^۲ استاد گروه بهداشت دام، طیور و آبریان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران و عضو قطب بهداشت و بیماری‌های ماهیان گرمابی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۶/۱۶

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۲/۲۶

چکیده

کاربرد نانوذرات نقره در آبی‌پروری در سال‌های اخیر به دلیل خواص ضد میکروبی، ضد قارچی، ضد ویروسی و قابلیت اثرگذاری بر سیستم ایمنی آبزیان مورد توجه فراوان قرار گرفته است. علی‌رغم این که نانوذرات سنتز شده با روش زیستی به دلیل استفاده از ترکیبات طبیعی در سنتز آن‌ها، دوست‌دار محیط زیست بوده اما شناخت اثرات آن بر آبزیان ضروری است. هدف از پژوهش حاضر بررسی تغییرات شاخص‌های ایمنی ماهی کپور معمولی طی مواجهه با نانوذرات نقره سنتز شده از جلبک سیستوسیرا ایندیکا می‌باشد. پس از انتقال ماهیان به آزمایشگاه، به منظور مطالعه تغییرات شاخص‌های ایمنی از جمله فعالیت لیزوزیم، کمپلمان، انفجار تنفسی، پراکسیداز، گلبول‌های سفید، پروتئین کل و ایمونوگلوبولین سرم به مدت ۱۴ روز در معرض سه غلظت نانوذرات نقره سنتز شده از جلبک سیستوسیرا شامل ۱۰ درصد LC_{50} ، ۲۵ درصد LC_{50} و ۵۰ درصد LC_{50} قرار گرفتند. نمونه برداری در روزهای ۱، ۳، ۷ و ۱۴ انجام شد. نانوذرات سنتز شده دارای شکل کروی و با اندازه ۴۲/۳۱ نانومتر بودند. نتایج نشان داد که در مقایسه با گروه شاهد، مواجهه ماهیان کپور معمولی در تیمار ۲ به طور معنی‌داری باعث افزایش فعالیت لیزوزیم و کاهش فعالیت کمپلمان سرم، انفجار تنفسی و پراکسیداز در روز چهاردهم شد. کاهش معنی‌دار فعالیت لیزوزیم نیز در همین روز در تیمار ۳ مشاهده شد. تعداد گلبول‌های سفید در همه غلظت‌های نانوذرات نقره در مقایسه با تیمار شاهد افزایش معنی‌داری داشت. پروتئین کل و ایمونوگلوبولین سرم با وجود نوسانات کاهشی و افزایشی در روزها و تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد نداشتند. نتایج نشان داد تنها غلظت ۲۵ درصد LC_{50} نانوذرات نقره بر شاخص‌های ایمنی کپور معمولی اثرگذار بوده و سایر غلظت‌ها تغییر محسوس ایجاد نکردند، همچنین وابستگی روشنی به غلظت مشاهده نشد.

کلمات کلیدی: نانوذرات نقره، جلبک سیستوسیرا ایندیکا، شاخص‌های ایمنی، کپور معمولی

مقدمه

در سال‌های اخیر، نانو تکنولوژی به عنوان یک حوزه فن‌آوری جدید و زمینه تحقیقاتی متمایز ظهور کرده است و مجموعه‌ای از کاربردهای متنوع را در حوزه‌های پزشکی، کشاورزی و صنعت ارائه می‌کند (Malik et al, 2023). در میان تمام نانوذرات سنتز شده، نانوذرات نقره به دلیل خواص ضد باکتریایی و کنترل انواع بیماری‌های باکتریایی،

* نویسنده مسئول: سراج بیتا، دانشیار گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران

E-mail: serajbita@yahoo.com



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

اثرات نانوذرات نقره سنتز شده با روش زیستی بر ماهی کپور معمولی انجام شده است، به طوری که Liaquat و همکاران در سال ۲۰۲۱ با مقایسه نانوذرات نقره سنتز شده به روش‌های زیستی و شیمیایی، اثرات منفی این نانوذرات را ناشی از القای استرس اکسیداتیو گزارش کردند. همچنین Krishnasamy و همکاران در سال ۲۰۲۳ نشان دادند که نانوذرات نقره زیستی باعث تغییرات معنی‌دار در شاخص‌های خونی در بازه‌های زمانی هفت روزه شده و افزایش فعالیت‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی، حاکی از وجود سمیت این نانوذرات بود. Kakakhel و همکاران در سال ۲۰۲۴ نیز گزارش نمودند که نانوذرات نقره زیستی در غلظت‌های بالا برای این ماهی سمی بوده و از نظر تجمع عمدتاً در روده، سپس در آبشش، عضلات، کبد و مغز تجمع یافته‌اند. افزون بر این، Khan و همکاران در سال ۲۰۲۴ دریافتند که این نانوذرات منجر به تغییرات بافت‌شناسی از جمله تخریب پرزهای روده، بازسازی سلول‌های کبدی و دژنراسیون تیغه‌های آبششی در ماهی کپور معمولی شده‌اند. با توجه به مطالعات انجام شده، می‌توان نتیجه گرفت که نانوذرات نقره سنتز شده از منابع زیستی، اگر چه به عنوان فناوری نوین و سبز شناخته می‌شوند، اما در غلظت‌های بالا می‌توانند باعث بروز سمیت قابل توجه عمدتاً از طریق القای استرس اکسیداتیو در ماهی کپور معمولی شوند، بنابراین به دلیل کاربرد گسترده نانوذرات در صنعت آبی پروری و این که ماهی کپور معمولی به دلیل سازگاری بالا با شرایط محیطی متنوع، رشد سریع و مقاومت در برابر بیماری‌ها یکی از مهم‌ترین گونه‌های پرورشی در کشورهای آسیایی، به ویژه ایران و عراق و نیز در برخی کشورهای اروپایی به شمار می‌رود و می‌تواند به عنوان یک مدل زیستی مناسب در مطالعات سم‌شناسی مورد استفاده قرار گیرد (Javanshir Khoei, 2021; Jha et al, 2022; Akool et al, 2025)، با توجه به موارد اشاره شده مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات نانوذرات نقره سنتز شده از جلبک سیستوسیرا / ایندیکا بر شاخص‌های ایمنی ماهی کپور معمولی انجام شد.

قارچی و ویروسی به ویژه برای مبارزه با پاتوژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک توجه زیادی را در صنعت آبی‌پروری به خود جلب کرده است (Jha et al, 2022). استرس اکسیداتیو غیراختصاصی به عنوان یکی از بزرگترین نگرانی‌های سمیت ناشی از نانوذرات نقره می‌باشد که به دلیل تولید گونه‌های فعال اکسیژن منجر به سمیت‌های سلولی متعددی مانند مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، سمیت ژنتیکی و تغییر عملکرد ایمنی می‌شود (Chen et al, 2021). تکنیک‌های زیادی برای سنتز نانوذرات نقره شامل سنتز فیزیکی، شیمیایی و زیستی یا سبز وجود دارد، سنتز زیستی نانوذرات شامل فرآیندهای سازگار با محیط زیست با استفاده از موجودات بیولوژیکی مانند گیاهان، باکتری‌ها، قارچ‌ها و جلبک‌ها است. این روش نه تنها یک جایگزین سبز برای روش‌های شیمیایی و فیزیکی سنتزی ارائه می‌نماید، بلکه نانوذراتی با خواص زیستی منحصربه‌فرد تولید می‌نماید (El-Sayed et al, 2024). جلبک سیستوسیرا / ایندیکا یک ماکرو جلبک قهوه‌ای متعلق به خانواده سارگاساسه می‌باشد و از نظر فیتوشیمیایی حاوی مقادیر بالایی از متابولیت‌های اولیه و ثانویه مانند پروتئین، کربوهیدرات، استرول‌ها، تریپنئیدها و فنل‌ها می‌باشد که این ترکیبات نقش مهمی در احیاء و سنتز نانوذرات دارند (El-Sayed et al, 2024). توسعه و گسترش کاربرد فناوری نانو موجب ورود محصولات مبتنی بر این فناوری به حوزه‌های مختلف علمی، تجاری و صنعتی شده است (Koohkan et al, 2024). در سال‌های اخیر نیز به دلیل افزایش روزافزون استفاده از نانومواد در این حوزه‌ها، نگرانی‌های زیادی در رابطه با سمیت و رهاسازی این مواد به منابع آب پرورشی آبیان وجود دارد، علاوه بر این برخی از این نانوذرات به دلیل خواص منحصربه‌فرد آن، برای کاربردهای جدید مانند دارو، تغذیه و سلامت آبیان استفاده می‌شوند (Jha et al, 2022). با توجه به این مسایل، ارزیابی سمیت و شناخت اثرات نانوذرات نقره از جمله نانوذرات نقره سنتز شده از منابع زیستی بر آبیان امری ضروری است، که از این نظر مطالعات متعددی پیرامون

مواد و روش کار

برای سنتز نانوذرات نقره از عصاره ماکروجلبک سیستوسیرا/ ایندیکا به عنوان یک ترکیب طبیعی و سازگار با محیط زیست استفاده شد. برای این منظور ماکروجلبک سیستوسیرا/ ایندیکا از منطقه بین جزر و مدی ساحل چابهار جمع‌آوری و در کیسه‌های پلاستیکی حاوی یخ به آزمایشگاه منتقل شد. برای حذف ناخالصی‌ها، نمونه‌ها ابتدا با آب شهری تصفیه شده، سپس با آب مقطر دوبار تقطیر و در نهایت با آب مقطر استریل شسته شدند. پس از خشک‌کردن به مدت یک هفته در سایه، جلبک‌ها پودر شدند. به منظور تهیه عصاره، ۱۰ گرم از پودر خشک شده جلبک با ۴۰ میلی‌لیتر متانول مخلوط و به مدت ۱۰ ساعت در شرایط سکون با استفاده از حلال متانول استخراج شد. سپس محلول به مدت ۲۵ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ فیلتر شد. عصاره حاصل تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد (Singaravelu et al, 2007). برای سنتز نانوذرات نقره ۱۰ سی‌سی عصاره ماکروجلبک به ۹۰ سی‌سی محلول نیترات نقره ۱ میلی‌مولار برند مرک آلمان با کد کاتالوگ ۱۰۱۵۱۲ اضافه شد. برای تعیین ویژگی‌ها و اطمینان از تولید نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره ماکروجلبک سیستوسیرا از دستگاه‌های طیف‌سنج فرابنفش مرئی (UV-vis) مدل Perkin-Elmer, Lambda 12 (جهت تایید سنتز نانوذرات نقره) و TEM مدل LEO 906E (برای تعیین شکل و اندازه نانوذرات) استفاده شد (Bibi et al, 2025). برای این منظور، ابتدا نمونه‌ها با استفاده از دستگاه لیوفیلیزه با روش خشک کردن انجمادی خشک شدند و سپس نمونه‌های خشک شده آنالیز شدند.

تعداد ۴۰۰ قطعه بچه ماهی کپور معمولی با سن تقریبی ۸۰ روزه و میانگین وزنی 1.6 ± 0.4 ، $7.8/9.9$ گرم (انحراف معیار \pm وزن)، از یکی از مزارع پرورشی شهرستان شوشتر تهیه و به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از انتقال به آزمایشگاه و سازش‌پذیری به مدت دو هفته، آزمایش تعیین LC_{50} بر اساس روش استاندارد O.E.C.D در سال ۱۹۹۸، به صورت

ساکن (static renewal): تعویض آب هر ۲۴ ساعت یکبار و جایگزینی مجدد غلظت‌های مورد نظر، و به مدت ۹۶ ساعت انجام شد و غلظت کشندگی میانی این نانوذره در ماهی کپور معمولی $9/65$ میلی‌گرم در لیتر تعیین شد. سپس ماهیان به صورت تصادفی در آکواریوم‌های ۱۰۰ L به تعداد ۲۵ قطعه ماهی در هر آکواریوم در سه تیمار آزمایشی با غلظت‌هایی معادل ۱۰ درصد LC_{50} (تیمار ۱)، ۲۵ درصد LC_{50} (تیمار ۲) و ۵۰ درصد LC_{50} (تیمار ۳) نانوذرات نقره سنتز شده از جلبک سیستوسیرا/ ایندیکا همراه با یک تیمار شاهد (هر کدام با ۳ تکرار) به مدت ۱۴ روز مورد مواجهه قرار گرفتند.

برای سنجش شاخص‌های ایمنی خون‌گیری از ماهیان در روزهای ۱، ۳، ۷ و ۱۴ انجام شد. در هنگام نمونه‌برداری، ماهیان با وارد کردن کم‌ترین استرس و به آرامی به وسیله تور دستی، صید شده و ماهیان مربوط به هر تیمار (۶ عدد ماهی از هر تیمار)، جداگانه در داخل سطل‌های پلاستیکی ۱۰ لیتری حاوی محلول 300 میلی‌گرم در لیتر پودر گل میخک بیهوش شدند. پس از بیهوشی، ماهیان از آب خارج و خون‌گیری از ناحیه ساقه دمی انجام شد. فعالیت لیروزیم با روش ارائه شده توسط Sahoo و همکاران در سال ۲۰۰۵، اندازه‌گیری شد. به این منظور ۱۵ میکرولیتر سرم، به پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای شکل الایزا، افزوده شد. سپس ۱۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری میکروکوکوس لیزودیکتیکوس (سیگما) تهیه شده در بافر سیترات سدیم 0.02 مولار و pH برابر ۵/۵، به میزان 0.02 میلی‌گرم در میلی‌لیتر اضافه گردید، و جذب نوری اولیه در طول موج ۵۳۰ نانومتر توسط دستگاه میکروپلیت ریدر مارک Bio Tek ساخت کشور آلمان، اندازه‌گیری شد و پس از یک ساعت نگهداری در دمای اتاق، مجدداً جذب نوری اندازه‌گیری شد. لیروزیم سفیده تخم مرغ لیوفیلیزه شده (سیگما) نیز به منظور ترسیم منحنی استاندارد استفاده گردید. جهت اندازه‌گیری فعالیت کمپلمان از آزمایش همولیز در ژل آگاروز استفاده شد. برای این کار ابتدا آگاروز $1/5$ درصد در بافر فسفات (pH=7/2) حاوی $0/5$

میلی مول کلرید منیزیم و ۱/۵ میلی مول کلرید کلسیم تهیه گردید. سپس مقدار 1×10^8 گلبول قرمز شسته شده خرگوش در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با بافر فسفات به آگاروز افزوده شد. این مخلوط داخل پلیت ریخته شد و پس از جامد شدن، در چاهک‌های ایجاد شده، ۲۰ میکرولیتر سرم نمونه ریخته شد. پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و محیط مرطوب انکوبه شدند. پس از انکوباسیون، قطر حلقه همولیز اطراف چاهک‌ها با خط‌کش مخصوص اندازه‌گیری گردید و از فرمول $1000 \times$ (حجم نمونه بارگذاری شده (میکرولیتر) / قطر منطقه لیز (میلی لیتر)) = AU/mL برای تبدیل قطر همولیز به واحد استفاده شد (Mohammadian et al, 2016). انفجار تنفسی به روش احیاء نیتروبولوتترازولیوم سنجش شد. به طور خلاصه، ۱۰۰ میکرولیتر از خون هیارینه شده از هر گروه ماهی با ۱۰۰ میکرولیتر محلول ۰/۲ درصد NBT مخلوط گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد انکوبه شد. پس از پایان انکوباسیون، ۵۰ میکرولیتر از مخلوط فوق به ۱ میلی لیتر از محلول N,N- دی اتیل متیل فرمامید اضافه شده و سپس به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید و جذب نوری مایع رویی در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Alishahi and Abdy, 2013). فعالیت پراکسیداز با استفاده از کیت تجاری شرکت رنسل و طبق دستور شرکت سازنده انجام شد. شمارش کلی گلبول‌های سفید به روش مستقیم (با استفاده از لام نئوبار) با رقیق کردن خون به نسبت ۱ به ۲۰۰ با محلول رقیق کننده نات-هریک صورت گرفت. برای این کار و پس از انتقال نمونه رقیق شده به لام هماسیتومتر، تعداد گلبول‌های سفید در ۹ مربع بزرگ اولیه شمارش می‌گردید و سپس تعداد کل گلبول‌های سفید در میلی متر مکعب خون با استفاده از فرمول زیر محاسبه می‌گردید (Alishahi and Abdy, 2013). سنجش پروتئین کل

با روش Bradford در سال ۱۹۷۶ و غلظت ایمنوگلوبولین بر اساس روش شرح McEwan و همکاران در سال ۱۹۷۰ با استفاده از روش کدورت‌سنجی با سولفات روی انجام شد. برای اندازه‌گیری پروتئین به روش برادفورد، به ۲۰ میکرولیتر عصاره پروتئینی رقیق شده از هر نمونه، ۴۰ میکرولیتر محلول برادفورد و ۱۴۰ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه شد، سپس با استفاده از دستگاه قرائت کننده جذب نوری، جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. به منظور سنجش غلظت ایمنوگلوبولین ۲۵ میکرولیتر سرم در داخل میکروتیوب‌های ۱/۵ سی سی افزوده شد، سپس ۱۴۰۰ میکرولیتر سولفات روی ۰/۷ میلی-مولار و pH برابر ۵/۸، به آن اضافه گردید، مخلوط حاصل به خوبی تکان داده شد و پس از ۲ ساعت نگهداری در دمای اتاق، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول حاصل به داخل پلیت-های ۹۶ خانه‌ای شکل الیزا، منتقل شد و جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۹۰ نانومتر، توسط دستگاه قرائت کننده جذب نوری اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری از طریق آنالیز واریانس دو طرفه در نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ صورت گرفت و معنی‌دار بودن میانگین‌ها با آزمون تعقیبی توکی در سطح اطمینان ۹۵ درصد انجام شد.

نتایج

بر اساس آزمون پروبیت مقادیر LC_{50} کپور معمولی در مواجهه با نانوذرات نقره سنتز شده از ماکروجلبک سیستم‌سیرا/ایندیکا طی ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت، به ترتیب ۷۷/۲۰، ۵۰/۱۴، ۲۸/۷۵ و ۹/۶۵ برآورد شد (Table 1). طبق نتایج پیک جذبی نانوذرات بعد از گذشت ۹۰ دقیقه از زمان واکنش در طول موج ۴۰۶ نانومتر شناسایی شد (Figure 1).

Table 1: Time-dependent LC₁₀₋₉₉ of *Cystoseira indica*-synthesized AgNPs in *Cyprinus carpio* (24-96 h)

Lethal Concentration mg/L (LC ₁₀₋₉₉)				
	24	48	72	96
LC ₁₀	33.05	13.66	0.106	0.048
LC ₅₀	77.20	50.14	28.75	9.65
LC ₉₀	120.34	85.95	57.65	22.62
LC ₉₉	127.12	94.83	70.97	35.99

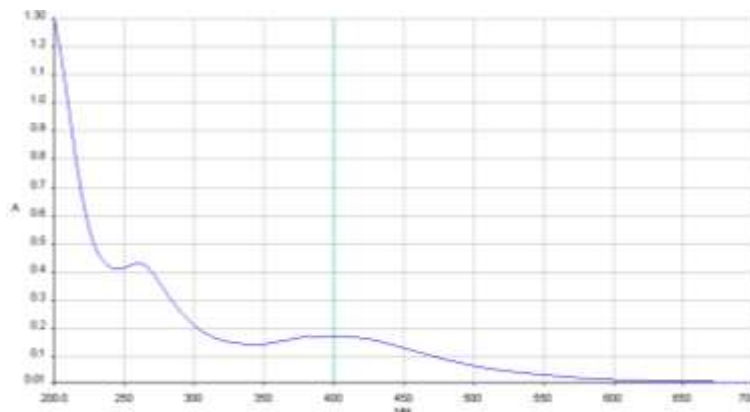


Figure 1: UV-Vis spectrum of AgNPs synthesized using *Cystoseira indica*

مربوط به تیمارهای ۲ و ۳ و در روز چهاردهم نمونه برداری بوده است (Table 2).

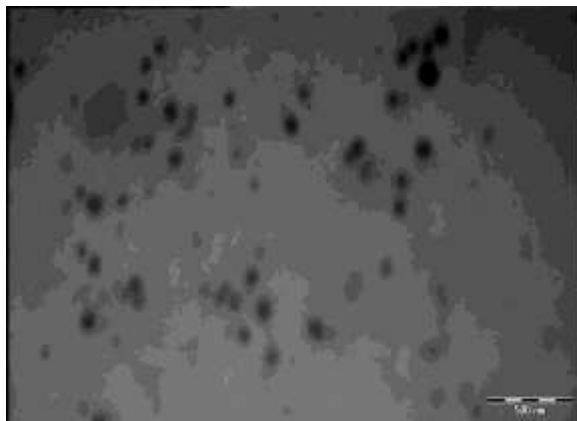


Figure 2: TEM images of AgNPs synthesized using *Cystoseira indica*

بر اساس نتایج TEM، میانگین اندازه نانوذرات نقره سنتز شده در مطالعه حاضر ۴۲/۳۱ نانومتر و با شکل کروی بود و از نظر اندازه و توزیع ذره‌ای، بیشترین درصد فراوانی را در محدوده ۳۰-۴۵ نانومتر نشان دادند (Figure 2).

طبق آزمون آماری آنالیز واریانس دو طرفه و توکی لیزوزیم سرم فقط در روز ۱۴ نمونه برداری در مواجهه با غلظت ۲/۴۱۳ میلی گرم در لیتر نانوذرات نقره (تیمار ۲) افزایش و در مواجهه با غلظت ۴/۸۲۵ میلی گرم در لیتر نانوذرات نقره (تیمار ۳) کاهش معنی داری داشته است ($P < 0.05$). بیشترین و کمترین میزان فعالیت آن به ترتیب

Table 2: Lysozyme activity (U/mL/min) in common carp during exposure to biosynthesized AgNPs

Sampling Days	Control	AgNPs Concentration (mg/L)		
		0.965	2.413	4.825
1	3.48 ± 24.04	2.15 ± 25.41	10.25 ± 26.00	6.32 ± 26.93
3	5.40 ± 27.03	2.93 ± 30.11	7.45 ± 29.05	2.98 ± 31.14
7	9.00 ± 27.95	6.15 ± 29.94	6.32 ± 35.10	9.90 ± 36.49
14	3.48 ± 29.55	1.95 ± 30.24	4.16 ^a ± 68.03	3.09 ^b ± 16.50

In all tables Latin letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

با بقیه تیمارها کاهش معنی‌داری داشت ($P < 0.05$). بیش-ترین و کم‌ترین میزان آن در روز چهاردهم و به ترتیب در تیمارهای شاهد و ۲ مشاهده گردید (Table 3).

طبق آزمون آماری آنالیز واریانس دو طرفه و توکی فعالیت کمپلمان سرم در مواجهه با غلظت ۲/۴۱۳ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات نقره (تیمار ۲) و روز چهاردهم در مقایسه

Table 3: Complement activity (AU/mL) in common carp during exposure to biosynthesized AgNPs

Sampling Days	Control	AgNPs Concentration (mg/L)		
		0.965	2.413	4.825
1	4.61 ± 43.32	3.89 ± 39.77	4.35 ± 40.39	3.49 ± 42.43
3	4.84 ± 40.22	6.94 ± 41.26	2.56 ± 33.67	5.26 ± 37.97
7	4.25 ± 39.87	7.67 ± 41.17	1.72 ± 30.03	6.41 ± 37.22
14	4.90 ± 45.46	4.35 ± 41.54	5.04 ^a ± 22.98	5.98 ± 36.78

میلی‌گرم در لیتر نانوذرات نقره) کاهش معنی‌داری داشته است ($P < 0.05$). بیش‌ترین میزان فعالیت انفجار تنفسی در مواجهه با تیمار ۱ و در روز چهاردهم نمونه‌برداری مشاهده شده است (Table 4).

طبق آزمون آماری آنالیز واریانس دو طرفه فعالیت انفجار تنفسی فقط در روز چهاردهم و در مواجهه با غلظت ۲/۴۱۳ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات نقره (تیمار ۲) نسبت به تیمار شاهد و تیمارهای ۱ و ۳ (غلظت‌های ۰/۹۶۵ و ۴/۸۲۵

Table 4: Respiratory burst activity (OD₅₄₀) in common carp during exposure to biosynthesized AgNPs

Sampling Days	Control	AgNPs Concentration (mg/L)		
		0.965	2.413	4.825
1	0.01 ± 0.54	0.05 ± 0.52	0.08 ± 0.52	0.11 ± 0.51
3	0.02 ± 0.54	0.11 ± 0.52	0.07 ± 0.52	0.13 ± 0.51
7	0.01 ± 0.55	0.02 ± 0.54	0.05 ± 0.50	0.04 ± 0.49
14	0.12 ± 0.57	0.06 ± 0.57	0.05 ^a ± 0.38	0.11 ± 0.49

(تیمار ۲) در مقایسه با تیمار شاهد و بقیه تیمارها کاهش معنی‌داری داشت ($P < 0.05$) و کم‌ترین میزان فعالیت آن در روز چهاردهم نمونه‌برداری مشاهده گردید (Table 5).

فعالیت پراکسیداز سرم بر اساس آنالیز واریانس دو طرفه و آزمون توکی در روزهای سوم، هفتم و چهاردهم در مواجهه با غلظت ۲/۴۱۳ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات نقره

Table 5: Changes in serum peroxidase (U/mL) in common carp during exposure to biosynthesized AgNPs

Sampling Days	Control	AgNPs Concentration (mg/L)		
		0.965	2.413	4.825
1	1.50 ± 81.05	2.26 ± 83.44	5.89 ± 78.45	1.35 ± 80.13
3	3.03 ± 83.12	5.08 ± 82.93	4.25 ^a ± 55.20	3.19 ± 79.60
7	3.25 ± 82.95	1.77 ± 81.99	2.15 ^a ± 53.85	3.20 ± 79.55
14	0.90 ± 93.16	3.50 ± 82.66	2.71 ^a ± 50.00	2.66 ± 79.10

($P < 0.05$) و بیش‌ترین تعداد گلبول‌های سفید در مواجهه با غلظت ۲/۴۱۳ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات نقره (تیمار ۲) و روز چهاردهم مشاهده شد (Table 6).

نتایج آنالیز واریانس دو طرفه نشان داد که تعداد گلبول‌های سفید در مواجهه با غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری داشته است

Table 6: Changes in white blood cells count ($\times 10^3$ cell ml^{-1}) in common carp during exposure to biosynthesized AgNPs

Sampling Days	Control	AgNPs Concentration (mg/L)		
		0.965	2.413	4.825
1	0.45 ^a ± 2.98	0.11 ± 3.00	0.23 ± 3.10	0.27 ± 3.08
3	0.26 ^a ± 2.80	0.15 ± 3.93	0.23 ± 4.78	0.45 ± 4.06
7	0.39 ^a ± 2.77	0.19 ± 3.88	0.16 ± 3.83	0.12 ± 4.18
14	0.14 ^a ± 2.95	0.17 ± 4.00	0.28 ± 4.96	0.15 ^{Aa} ± 4.73

طبق آنالیز واریانس دو طرفه در طول دوره آزمایش و در روزهای مختلف نمونه برداری، تغییرات معنی داری در سطح پروتئین کل درون هر تیمار مشاهده نشد ($P > 0.05$).

طبق Table 7 و بر اساس آزمون توکی میزان پروتئین کل سرم تحت تأثیر تیمارهای مختلف در مقایسه با گروه شاهد تفاوت معنی داری نشان نداد ($P > 0.05$), همچنین،

Table 7: Changes in total protein (mg/mL) in common carp during exposure to biosynthesized AgNPs

Sampling Days	Control	AgNPs Concentration (mg/L)		
		0.965	2.413	4.825
1	10.07 ± 40.22	5.48 ± 42.00	8.35 ± 38.93	1.15 ± 39.39
3	2.24 ± 39.20	2.85 ± 40.18	8.02 ± 38.52	7.85 ± 36.58
7	1.85 ± 36.36	2.15 ± 38.00	3.85 ± 40.10	3.54 ± 42.16
14	2.15 ± 31.98	8.02 ± 38.40	6.71 ± 37.24	5.00 ± 46.10

طبق آنالیز واریانس دو طرفه میزان ایمونوگلوبولین در روزهای مختلف نمونه برداری در هر تیمار نیز اختلاف معنی داری نداشت ($P > 0.05$).

طبق Table 8 و بر اساس آزمون توکی میزان ایمونوگلوبولین سرم در تمام تیمارها با تیمار شاهد از نظر آماری اختلاف معنی داری نشان نداد ($P > 0.05$). همچنین

Table 8: Changes in total immunoglobulin (mg/mL) in common carp during exposure to biosynthesized AgNPs

Sampling Days	Control	AgNPs Concentration (mg/L)		
		0.965	2.413	4.825
1	2.10 ± 9.79	1.65 ± 8.06	0.85 ± 9.90	1.67 ± 10.10
3	0.98 ± 11.18	4.65 ± 9.23	2.12 ± 10.31	1.33 ± 11.02
7	2.17 ± 11.00	1.90 ± 11.55	1.70 ± 8.93	0.55 ± 8.52
14	1.68 ± 11.45	2.36 ± 9.73	2.59 ± 12.00	0.48 ± 8.86

بحث

نانوذرات بعد از گذشت ۹۰ دقیقه از زمان واکنش در طول موج ۴۰۰ نانومتر شناسایی شد، این پیک نشان دهنده احیاء یون‌های نقره و تشکیل نانوذرات نقره است، به طوری که سایر محققین نیز پیک تشکیل شده نانوذرات نقره سنتز شده از ماکروجلبک‌ها را در همین محدوده گزارش نموده‌اند (Thiurunavukkarau et al, 2022; Patel et al, 2024;)

استفاده از روش‌های قابل اطمینان و سازگار با محیط زیست برای سنتز نانوذرات فلزی، یکی از مراحل مهم در زمینه کاربرد این نانوذرات در نانوبیوتکنولوژی می‌باشد، بنابراین در مطالعه حاضر از ماکروجلبک سیستوسیرا اندیکا به عنوان یک ترکیب طبیعی و سازگار با محیط زیست برای سنتز نانوذرات نقره استفاده شد که طبق نتایج پیک جذبی

جایی که لیزوزیم قادر به اتصال با نانوذرات فلزی است این امر می‌تواند سبب کاهش فعالیت آن شود (Torrealba et al, 2019). سیستم کمپلمان به عنوان شاخص پاسخ ایمنی همومورال ذاتی در تعیین وضعیت سلامت ماهیان در مواجهه با بیماری و آلاینده‌های محیطی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Nayak et al, 2018). طبق نتایج نانوذرات نقره سنتز شده از جلبک سیستموسیرا در روز چهاردهم در تیمار ۲ موجب کاهش معنی‌دار فعالیت کمپلمان سرم شده است ($P < 0/05$)، که احتمالاً ناشی از اختلال در عملکرد سلول‌های ایمنی، پاسخ ایمنی ضعیف و حساسیت ماهی به نانوذرات نقره است (Vali et al, 2020) تأثیر نانوذرات در کاهش فعالیت کمپلمان سرم توسط دیگر محققین نیز گزارش شده است (Hajirezaei et al, 2020; Vali et al, 2020; Javnsbir et al, 2021; Rashidian et al, 2021). در تحقیقی افزایش فعالیت کمپلمان سرم ماهی کپور معمولی در مواجهه با نانوذرات اکسید روی گزارش شد که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت ندارد (Chupani et al, 2017). این نتایج نشان می‌دهد که اثرات نانوذرات فلزی بر سیستم ایمنی بسته به گونه ماهی، نوع، مدت زمان و غلظت نانوذرات متفاوت است (Javnsbir Khoei, 2021). فعالیت انفجار تنفسی آزادسازی سریع گونه‌های اکسیژن فعال از انواع مختلف سلول است که به عنوان یک مکانیسم دفاعی کلیدی در برابر طیف گسترده‌ای از عوامل بیماری‌زا و مواد خارجی عمل می‌کند (Hampton et al, 2020). در مطالعه حاضر مواجهه ماهیان کپور معمولی با غلظت ۲/۴۱۳ میلی-گرم در لیتر نانوذرات نقره (معادل ۲۵ درصد LC_{50}) منجر به کاهش معنی‌داری در فعالیت انفجار تنفسی این ماهی در روز چهاردهم در مقایسه با بقیه تیمارها شد ($P < 0/05$) که نشان دهنده نقش نانوذرات در از بین بردن و یا ارتقاء فعالیت ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها است (Kurian and Elumalai, 2021). نتایج به دست آمده از مطالعات برخی محققین در زمینه تأثیر نانوذرات بر فعالیت انفجار تنفسی ماهیان با مطالعه حاضر مطابقت دارد (Guardiola et al, 2017; Auclair et al, 2023; Zaman et al, 2024).

(Bibi et al, 2025). طبق تصاویر به دست آمده از TEM، نانوذرات نقره تولید شده با میانگین اندازه ۴۲/۳۱ نانومتر دارای شکل کره‌ای و توزیع یکنواخت بودند، که یکی از دلایل احتمالی آن می‌تواند به واسطه نقش پروتئین‌ها در تولید نانوذرات نقره باشد، که مولکول‌های پروتئین سبب می‌شوند تا نانوذرات تولید شده، پایدار بوده و از توزیع یکنواختی برخوردار باشند (Nithya and Ragunathan, 2009). سیستم ایمنی، مانند سیستم غدد درون ریز، یک سیستم بسیار پیچیده است که از تنوع عظیمی از اندام‌ها، سلول‌ها و واسطه‌ها و همچنین مولکول‌های مؤثر تشکیل شده است، هدف ایمونوتوکسیکولوژی ماهی درک تأثیر آلاینده‌های محیطی بر سلامت ماهی و ارزیابی عواقب آن برای جمعیت ماهی است. اثرات آلاینده‌های شیمیایی بر ایمنی شامل سرکوب و یا تحریک سیستم ایمنی است. لیزوزیم یک جزء دفاعی قوی از سیستم ایمنی ذاتی در ماهی از طریق عملکرد ضد باکتری آن است که سنجش آن از شاخص‌های زیستی مهم برای ارزیابی سلامت ماهی در مواجهه با نانوذرات است (Rashidian et al, 2021). در مواجهه ماهیان کپور معمولی با غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره در تیمار ۲ میزان لیزوزیم افزایش و تیمار ۳ با گذشت زمان کاهش معنی‌داری داشت ($P < 0/05$)، این افزایش می‌تواند پاسخی برای خنثی نمودن استرس ایجاد شده در ماهی در اثر نانوذرات نقره باشد (Vali et al, 2020)، همچنین این احتمال وجود دارد که نانوذرات سنتز شده به روش زیستی حاوی یک سوبسترای بالقوه برای لیزوزیم هستند که در نتیجه باعث القای فعالیت لیزوزیم می‌شود (Rashidian et al, 2021). در همین راستا افزایش فعالیت لیزوزیم در ماهی تیلایپای نیل (*Oreochromis niloticus*) تغذیه شده با جیره حاوی نانوذرات نقره (Abdelhamid et al, 2020) و ماهی فیتوفاگ مواجهه شده با نانوذرات پلی استرنی (Zaman et al, 2024) و کاهش فعالیت آن در ماهی کپور معمولی طی مواجهه با برخی نانوذرات فلزی گزارش شد (Hajirezaei et al, 2020; Javnsbir Khoei, 2021; Rashidian et al, 2021). از آن

ماهی کپور هندی (*Labeo rohita*) طی مواجهه با نانوذرات اکسید آهن، Vali و همکاران در سال ۲۰۲۲ در ماهی مولی معمولی (*Poecilia sphenops*) طی مواجهه با نانوذرات نقره و Rasheed و همکاران در سال ۲۰۲۳ در ماهی کپور معمولی طی مواجهه با نانوذرات اکسید روی گزارش شد. دلایل این تفاوت‌ها را می‌توان بدین صورت توجیه نمود که پارامترهای خون‌شناسی تحت تأثیر رژیم غذایی حیوان، نوع گونه، شرایط استرس در محیط یا نوع مواد سمی می‌باشد، به طوری که تغییرات تعداد گلبول‌های سفید نشان می‌دهد که ماهی چگونه به استرس ناشی از سموم مختلف واکنش نشان می‌دهد (Ahmed et al, 2024). سطوح پروتئین کل و ایمونوگلوبولین نشان دهنده وضعیت متابولیک و جذب اسید آمینه یا پپتید ارگانیک است و می‌تواند عملکرد ایمنی ماهی را منعکس کند (Liu et al, 2023). نتایج این مطالعه نشان داد که در مقایسه با گروه شاهد، سطوح پروتئین تام و ایمونوگلوبولین علی‌رغم نوسانات افزایشی و کاهش تغییرات معنی‌داری نداشته است ($P > 0.05$). بر خلاف نتایج مطالعه حاضر نتایج تحقیقات دیگر حاکی از افزایش یا کاهش معنی‌دار این شاخص‌ها در ماهیان طی مواجهه با نانوذرات می‌باشد (Vali et al, 2020; Rasheed et al, 2023). این تغییرات را به دلیل اختلال در متابولیسم پروتئین طی مواجهه با نانوذرات نسبت داده‌اند. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات نقره زیستی سنتز شده، به ویژه در غلظت ۲/۴۱۳ میلی‌گرم بر لیتر، به صورت وابسته به زمان باعث تغییر در شاخص‌های ایمنی ذاتی ماهی کپور معمولی شدند. افزایش لیزوزیم و گلبول‌های سفید نشان‌دهنده تحریک ایمنی، در حالی که کاهش کمپلمان، پراکسیداز و انفجار تنفسی بیان‌گر اثرات سرکوب‌گر احتمالی است. عدم تغییر معنی‌دار در پروتئین کل و ایمونوگلوبولین نیز پایداری نسبی پاسخ‌های همورال را نشان می‌دهد. البته افزایش تعداد گلبول‌های سفید (لکوسیت‌ها) به تنهایی لزوماً به معنای تقویت عملکرد ایمنی نیست، بلکه می‌تواند پاسخ اولیه‌ای به استرس یا تحریک سیستم ایمنی باشد. با این حال، کاهش معنی‌دار

همین راستا برخی از محققین افزایش یا عدم تأثیر بر فعالیت آن در ماهیان را طی مواجهه با نانوذرات گزارش نموده‌اند (Ates et al, 2016; Aly et al, 2023) که این اختلاف در نتایج احتمالاً به دلیل تفاوت در نوع، شکل و اندازه نانوذرات است که می‌تواند شاخص‌های ایمنی ماهیان را تحت تأثیر قرار دهند (Ates et al, 2016). پراکسیداز به عنوان یک آنزیم آنتی‌اکسیدانی از آسیب دیدن بسیاری از مولکول‌ها در اثر استرس اکسیداتیو جلوگیری می‌کند (Frederick et al, 2024). فعالیت پراکسیداز سرم در تیمار ۲ طی گذشت زمان کاهش معنی‌داری داشت ($P < 0.05$). این روند منعکس کننده کاهش سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی و ایمنی ماهی در مواجهه با نانوذرات است (Karthigarani and Navaraj, 2012). در همین راستا برخی از محققین کاهش فعالیت پراکسیداز سرم (Karthigarani and Navaraj, 2012; Valerio-García et al, 2017) و برخی دیگر افزایش در میزان آن را طی مواجهه با نانوذرات فلزی گزارش نموده‌اند (Tunçsoy et al, 2017; Lahori et al, 2022; Younas et al, 2022). با توجه به این موضوع می‌توان گفت که سمیت نانوذرات به خصوصیات آن‌ها از قبیل شکل، اندازه، غلظت، پوشش شیمیایی، بار سطحی و روش سنتز بستگی دارد (Chen et al, 2021). بررسی تعداد گلبول‌های سفید یکی از روش‌های مهم برای ارزیابی ساختار سیستم ایمنی است (Tavares-Dias and Moraes, 2007). تعداد گلبول‌های سفید ماهی کپور معمولی در مواجهه با تمام غلظت‌های نانوذرات نقره سنتز شده از جلبک سیستوسیرا به صورت افزایش معنی‌دار نسبت به تیمار شاهد بوده است ($P < 0.05$). همین روند در تحقیقات Shalvei و همکاران در سال ۲۰۱۳ بر روی ماهی فیتوفاگ و Vali و همکاران در سال ۲۰۲۰ بر روی ماهی کپور معمولی در مواجهه با نانوذرات نقره مشاهده شد. این افزایش ممکن است یک مکانیسم محافظتی در برابر اثرات مضر استرس اکسیداتیو نانوذرات باشد (Rasheed et al, 2023). بر خلاف نتایج مطالعه حاضر، کاهش تعداد گلبول‌های سفید توسط Remya و همکاران در سال ۲۰۱۵ در

و نیز استفاده از نیترات نقره در سنتز آن‌ها که یک ماده سمی است، می‌تواند اثرات دوگانه‌ای بر سیستم ایمنی داشته باشند که در ارزیابی کاربرد یا مخاطرات آن‌ها در آبی‌پروری باید مورد توجه قرار گیرد.

در فعالیت کمپلمان، آنزیم پراکسیداز و انفجار تنفسی نشان می‌دهد که عملکرد مؤثر بخش‌هایی از ایمنی غیر اختصاصی دچار تضعیف شده است، بنابراین نانوذرات نقره سنتز شده با روش زیستی با توجه به وجود ترکیبات طبیعی در جلبک

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از کارشناسان محترم مرکز تحقیقات شیلاتی آب‌های دور چابهار به منظور همکاری در جمع‌آوری نمونه‌های جلبک، همچنین از کارشناسان آزمایشگاه مرکزی دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار و بخش بهداشت آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز به دلیل همکاری ارزشمندشان در پیشبرد این پژوهش، صمیمانه قدردانی و تشکر می‌گردد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافی را در این پژوهش شناسایی نکردند.

منابع مالی

منابع مالی پژوهش در قالب پژوهانه از طریق معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار تأمین شده است.

منابع

- Abdelhamid, A. F., Mabrouk, M. M., & Ayoub, H. F. (2020). Immune and Antioxidative effects of Dietary Silver Nanoparticles on Growth of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* Challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Animal and Poultry Production*, 11(12): 495-501.
- Ahmed, S. A., Rhouma, N. R., Younis, E. M., Abdelwarith, A. A., Bazeed, S. M., Elshopakey, G. E., ... & ElHady, M. (2024). Immunosuppression, growth retardation, and transcriptomic profile alterations induced by chronic copper toxicity in *Clarias gariepinus*: The ameliorative effect of zinc oxide nanoparticles. *Aquaculture Reports*, 35: 102029.
- Aakool, M. A. K., Alishahi, M., Peyghan, R., Khosravi, M., & Gharibi, D. (2025). The effect of oral administration of encapsulated *Lactiplantibacillus plantarum* on the efficacy and immunogenicity of *Aeromonas hydrophila* vaccine in common carp. *Iranian Veterinary Journal*, 21(1): 5-24.
- Alishahi, M., & Abdy, E. (2013). Effects of different levels of Aloe vera L. extract on growth performance, hemato-immunological indices of *Cyprinus carpio* L. *Iranian Journal of Veterinary Science and Technology*, 5(2): 33-44.
- Aly, S. M., Eissa, A. E., Abdel-Razek, N., & El-Ramlawy, A. O. (2023). The antibacterial activity and immunomodulatory effect of naturally synthesized chitosan and silver nanoparticles against pseudomonas fluorescence infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): an in vivo study. *Fish & Shellfish Immunology*, 135: 108628.
- Ates, M., Demir, V., Arslan, Z., Kaya, H., Yilmaz, S., & Camas, M. (2016). Chronic exposure of tilapia (*Oreochromis niloticus*) to iron oxide nanoparticles: Effects of particle morphology on accumulation, elimination, hematology and immune responses. *Aquatic toxicology*, 177: 22-32.

- Auclair, J., Turcotte, P., Gagnon, C., Peyrot, C., Wilkinson, K. J., & Gagné, F. (2023). Form-Dependent Toxicity of Silver Nanomaterials in Rainbow Trout Gills. *Nanomaterials*, 13(8), 1356.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2): 248-254.
- Barta, O. (1981). Laboratory techniques of veterinary clinical immunology: a review. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 4(2): 131-160.
- Bibi, S., Abu-Dieyeh, M. H., & Al-Ghouti, M. A. (2025). Biosynthesis of silver nanoparticles from macroalgae *Hormophysa triquetra* and investigation of its antibacterial activity and mechanism against pathogenic bacteria. *Scientific Reports*, 15(1): 2476.
- Chen, R. J., Huang, C. C., Pranata, R., Lee, Y. H., Chen, Y. Y., Wu, Y. H., & Wang, Y. J. (2021). Modulation of innate immune toxicity by silver nanoparticle exposure and the preventive effects of pterostilbene. *International journal of molecular sciences*, 22(5): 2536.
- Chupani, L., Zusková, E., Niksirat, H., Panáček, A., Lünsmann, V., Haange, S. B., ... & Jehmlich, N. (2017). Effects of chronic dietary exposure of zinc oxide nanoparticles on the serum protein profile of juvenile common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Science of the total environment*, 579: 1504-1511.
- El-Sayed, H., Abdelsalam, A., Morad, M. Y., Sonbol, H., Ibrahim, A. M., & Tawfik, E. (2024). Phyto-synthesized silver nanoparticles from *Sargassum subrepandum*: anticancer, antimicrobial, and molluscicidal activities. *Frontiers in Plant Science*, 15: 1403753.
- Frederick, L., Urbina, M. A., & Escribano, R. (2024). Reviews and synthesis: increasing hypoxia in eastern boundary upwelling systems: a major stressor for zooplankton. *EGU sphere*, 2024, 1-16.
- Geng, X., Dong, X. H., Tan, B. P., Yang, Q. H., Chi, S. Y., Liu, H. Y., & Liu, X. Q. (2012). Effects of dietary probiotic on the growth performance, non-specific immunity and disease resistance of cobia, *Rachycentron canadum*. *Aquaculture Nutrition*, 18(1): 46-55.
- Guardiola, F. A., Logothetis, P., Meseguer, J., & Esteban, M. A. (2017). Evaluation of silver nanospheres on viability and innate cellular parameters of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) head-kidney leucocytes. *Fish & Shellfish Immunology*, 69: 99-107.
- Hajirezaee, S., Mohammadi, G., & Naserabad, S. S. (2020). The protective effects of vitamin C on common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to titanium oxide nanoparticles (TiO₂-NPs). *Aquaculture*, 518: 734734.
- Hampton, L. M. T., Jeffries, M. K. S., & Venables, B. J. (2020). A practical guide for assessing respiratory burst and phagocytic cell activity in the fathead minnow, an emerging model for immunotoxicity. *MethodsX*, 7: 100992.
- Khoei, A. J. (2021). Evaluation of potential immunotoxic effects of iron oxide nanoparticles (IONPs) on antioxidant capacity, immune responses and tissue bioaccumulation in common carp (*Cyprinus carpio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 244: 109005.
- Koohkan, O., Morovvati, H., & Taheri Mirghaed, A. (2024). Histomorphological Study and biochemical changes in kidney of gray mullet (*Mugil cephalus*) exposed to iron oxide nanoparticles and *Spirulina platensis*. *Iranian Veterinary Journal*, 19(4): 120-131.
- Jha, N., Annamalai, A., Essakiraj, P., Balamurugan, R., Lakra, A. K., Tilwani, Y. M., & Arul, V. (2022). Effects of polysaccharide-based silver and selenium nanoparticles on growth performance, biochemical parameters, and immune response of *Cyprinus carpio*. *Fish and Shellfish Immunology Reports*, 3: 100062.
- Kakakhel, M. A., Narwal, N., Khan, A., Ayub, H., Jiang, Z., & Xiaotao, S. (2024). Bio-reductive synthesis of silver nanoparticles, its antibacterial efficiency, and possible toxicity in common carp fish (*Cyprinus carpio*). *Microscopy Research and Technique*, 87(2): 349-359.
- Karthigarani, M., & Navaraj, P. S. (2012). Impact of nanoparticle on enzymes activity in *Oreochromis mossambicus*. *International Journal of Scientific & Technology Research*, 1: 13-17.
- Khan, Q., & Yousafzai, A. M. (2024). Plant based synthesis of silver nanoparticles, antimicrobial efficiency, and toxicological assessment using freshwater fish (*Cyprinus carpio*). *Microscopy Research and Technique*, 87(1): 53-64.
- Krishnasamy Sekar, R., Arunachalam, R., Anbazhagan, M., Palaniyappan, S., Veeran, S., Sridhar, A., & Ramasamy, T. (2023). Accumulation, chronicity, and induction of oxidative stress regulating genes through *Allium cepa* L. functionalized silver nanoparticles in freshwater common carp (*Cyprinus carpio*). *Biological Trace Element Research*, 201(2): 904-925.

- Kurian, A., & Elumalai, P. (2021). Study on the impacts of chemical and green synthesized (Leucas aspera and oxy-cyclodextrin complex) dietary zinc oxide nanoparticles in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environmental Science and Pollution Research*, 28: 20344-20361.
- Lahori, S. S., Ullah, K., Baig, M. Z., Khan, F., Shoukat, A. M., Liaqat, U., Hassan, H., & Ghafoor, F. (2021). Variations in catalase and peroxidase activity in *Cyprinus carpio* in response to copper nanoparticles exposure. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 9(3): 01-06.
- Liaqat, F., Hanif, U., Bahadur, S., Faheem, M., Rasool, S., Gulzar, S., ... & Munir, M. (2021). Comparative evaluation of the toxicological effect of silver salt (AgNO₃) and silver nanoparticles on *Cyprinus carpio* synthesized by chemicals and marine algae using scanning electron microscopy. *Microscopy Research and Technique*, 84(7): 1531-1541.
- Liu, Y., Huang, E., Xie, Y., Meng, L., Liu, D., Zhang, Z., & Tong, T. (2023). The Effect of Dietary Lipid Supplementation on the Serum Biochemistry, Antioxidant Responses, Initial Immunity, and mTOR Pathway of Juvenile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fishes*, 8(11): 535.
- Malik, S., Muhammad, K., & Waheed, Y. (2023). Nanotechnology: A revolution in modern industry. *Molecules*, 28(2): 661.
- McEwan, A. D., Fisher, E. W., Selman, I. E., & Penhale, W. J. (1970). A turbidity test for the estimation of immune globulin levels in neonatal calf serum. *Clinica chimica acta*, 27(1): 155-163.
- Mohammadian, T., Alishahi, M., Tabandeh, M. R., Ghorbanpoor, M., Gharibi, D., Tollabi, M., & Rohanizade, S. (2016). Probiotic effects of *Lactobacillus plantarum* and *L. delbrueckii* ssp. *bulguricus* on some immune-related parameters in *Barbus grypus*. *Aquaculture international*, 24: 225-242.
- Nayak, S., Portugal, I., & Zilberg, D. (2018). Analyzing complement activity in the serum and body homogenates of different fish species, using rabbit and sheep red blood cells. *Veterinary immunology and immunopathology*, 199: 39-42.
- Patel, D., Patel, B., Yadav, V. K., Sudhakar, M. P., Alharbi, S. A., Salmen, S. H., & Patel, A. (2024). Silver nanoparticles synthesized from marine algae *Spatoglossum asperum*: antioxidant properties and seed germination enhancement. *Journal of Hazardous Materials Advances*, 16: 100478.
- Rasheed, A., Iqbal, K. J., Safdar, A., Nasir, A., Jabeen, R., Tara, N., & Almarzoug, M. H. (2023). Toxicological effects of zinc oxide nanoparticles on hemato-biochemical profile of common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of King Saud University-Science*, 35(7): 102835.
- Rashidian, G., Lazado, C. C., Mahboub, H. H., Mohammadi-Aloucheh, R., Prokić, M. D., Nada, H. S., & Faggio, C. (2021). Chemically and green synthesized ZnO nanoparticles alter key immunological molecules in common carp (*Cyprinus carpio*) skin mucus. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6): 3270.
- Remya, A. S., Ramesh, M., Saravanan, M., Poopal, R. K., Bharathi, S., & Nataraj, D. (2015). Iron oxide nanoparticles to an Indian major carp, *Labeo rohita*: Impacts on hematology, iono regulation and gill Na⁺/K⁺ ATPase activity. *Journal of King Saud University-Science*, 27(2): 151-160.
- Sahoo, P. K., Kumari, J., & Mishra, B. K. (2005). Non-specific immune responses in juveniles of Indian major carps. *Journal of Applied Ichthyology*, 21(2): 151-155.
- Shaluei, F., Hedayati, A., Jahanbakhshi, A., Kolangi, H., & Fotovat, M. (2013). Effect of subacute exposure to silver nanoparticle on some hematological and plasma biochemical indices in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Human & experimental toxicology*, 32(12): 1270-1277.
- Singaravelu, G., Arockiamary, J. S., Kumar, V. G., & Govindaraju, K. (2007). A novel extracellular synthesis of monodisperse gold nanoparticles using marine alga, *Sargassum wightii* Greville. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 57(1): 97-101.
- Tavares-Dias, M., & Moraes, F. R. (2007). Haematological and biochemical reference intervals for farmed channel catfish. *Journal of Fish Biology*, 71(2): 383-388.
- Thiurunavukkarau, R., Shanmugam, S., Subramanian, K., Pandi, P., Muralitharan, G., Arokiarajan, M., & Shanmugam, V. (2022). Silver nanoparticles synthesized from the seaweed *Sargassum polycystum* and screening for their biological potential. *Scientific Reports*, 12(1): 14757.
- Torrealba, D., More-Bayona, J. A., Wakaruk, J., & Barreda, D. R. (2019). Innate immunity provides biomarkers of health for teleosts exposed to nanoparticles. *Frontiers in immunology*, 9: 3074.

- Tunçsoy, M., Duran, S., Ay, Ö., Cıçık, B., & Erdem, C. (2017). Effects of copper oxide nanoparticles on antioxidant enzyme activities and on tissue accumulation of *Oreochromis niloticus*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 99: 360-364.
- Valerio-García, R. C., Carbajal-Hernández, A. L., Martínez-Ruíz, E. B., Jarquín-Díaz, V. H., Haro-Pérez, C., & Martínez-Jerónimo, F. (2017). Exposure to silver nanoparticles produces oxidative stress and affects macromolecular and metabolic biomarkers in the goodeid fish *Chapalichthys pardalis*. *Science of the Total Environment*, 583: 308-318.
- Vali, S., Majidiyan, N., Yalsuyi, A. M., Vajargah, M. F., Prokić, M. D., & Faggio, C. (2022). Ecotoxicological effects of silver nanoparticles (Ag-NPs) on parturition time, survival rate, reproductive success and blood parameters of adult common molly (*Poecilia sphenops*) and their larvae. *Water*, 14(2): 144.
- Vali, S., Mohammadi, G., Tavabe, K. R., Moghadas, F., & Naserabad, S. S. (2020). The effects of silver nanoparticles (Ag-NPs) sublethal concentrations on common carp (*Cyprinus carpio*): Bioaccumulation, hematology, serum biochemistry and immunology, antioxidant enzymes, and skin mucosal responses. *Ecotoxicology and environmental safety*, 194: 110353.
- Younas, W., Khan, F. U., Zaman, M., Lin, D., Zuberi, A., & Wang, Y. (2022). Toxicity of synthesized silver nanoparticles in a widespread fish: A comparison between green and chemical. *Science of the Total Environment*, 845: 157366.

Received: 16.05.2025

Accepted: 08.09.2025

The Effect of silver nanoparticles synthesized by macroalga *Cystoseira indica* on selected immune parameters of common carp (*Cyprinus carpio*)

Seraj Bita^{1*} and Mehrzad Mesbah²

¹ Associate Professor, Department of Fisheries, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran

² Professor, Department of Livestock, Poultry and Aquatic Animal Health, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran and Member of Excellence Center of Warm Water Fish Health, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Received: 16.05.2025

Accepted: 07.09.2025

Abstract

The application of silver nanoparticles (AgNPs) in aquaculture has received considerable attention in the recent years due to their antimicrobial, antifungal, and antiviral properties, as well as their potential to modulate the immune system of aquatic organisms. Although biologically synthesized nanoparticles are considered environmentally friendly due to the use of natural compounds in their production, it is essential to evaluate their potential effects on aquatic organisms. This study aimed to investigate the impact of silver nanoparticles (AgNPs) biosynthesized by the macroalga *Cystoseira indica* on the immune parameters of common carp (*Cyprinus carpio*). The fish were exposed in the laboratory for 14 days to three sublethal concentrations of AgNPs corresponding to 10%, 25%, and 50% of the LC₅₀. Immune indices including lysozyme activity, complement activity, respiratory burst, peroxidase activity, white blood cell count, total protein, and immunoglobulin levels were assessed on days 1, 3, 7, and 14. Transmission electron microscopy revealed that the synthesized nanoparticles were spherical with an average size of 42.31 nm. The results indicated that, compared to the control group, exposure to 25% LC₅₀ significantly increased lysozyme activity but decreased complement, respiratory burst, and peroxidase activities on day 14. Additionally, the lysozyme activity significantly reduced in the fish exposed to 50% LC₅₀ on day 14. White blood cell counts increased significantly at all exposure concentrations relative to. Although total protein and immunoglobulin levels exhibited some fluctuations, no significant differences were observed compared to the control group. The findings indicated that only 25% LC₅₀ concentration of silver nanoparticles had a measurable effect on the immune indices of common carp, whereas other concentrations produced no significant alterations, and therefore no clear concentration-dependent trend was detected.

Keywords: Silver nanoparticles, *Cystoseira indica*, Immune index, Common carp

* **Corresponding Author:** Seraj Bita, Associate Professor, Department of Fisheries, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran
E-mail: serajbita@yahoo.com



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).