



University of Guilan

University of Guilan with collaboration of Iranian
Aquaculture Society

Aquatic Animals Nutrition

Vol. 11, No. 2, 2025, pages: 1-19
DOI: 10.22124/janb.2025.29961.1283



RESEARCH PAPER

OPEN ACCESS

Histopathology of dietary exposure to selenium and iron nanoparticles on the intestine in reared beluga, *Huso huso*

Forouzan Bagherzadeh Lakani*, Soheil Bazari Moghaddam, Mehdi Masoumzadeh, Ayoub Yousefi Jourdehi, Jalil Jalilpour

International Sturgeon Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute,
Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Guilan, Iran.

Received 08 April 2025

Revised 11 June 2025

Accepted 13 June 2025

Published online 04 November 2025

KEYWORDS

Beluga (*Huso
huso*)

Nanoparticle

Selenium

Iron

Histopathology

Intestine

ABSTRACT

Introduction: Sustainable aquaculture relies on balanced diets that ensure optimal growth and health. Nanotechnology applications in aquaculture, such as using selenium and iron nanoparticles (Se-NPs, Fe-NPs), show promise for enhancing nutrition. However, their combined effects on intestinal health in beluga are unclear. Therefore, this study aimed to investigate the individual and combined effects of different dietary levels of Se-NPs and Fe-NPs on the intestinal histopathology of juvenile beluga, to identify the optimal and safest supplementation ratio.

Materials and methods: A total of 135 beluga juveniles (with an initial weight of 276.4 ± 32.3 g and an initial length of 40 ± 2 cm) were randomly distributed in 27 fiberglass tanks at 9 different treatments with 3 replicates. Treatments included T₁ (control, no added NPs), T₂ (1 mg/kg Se-NPs), T₃ (2 mg/kg Se-NPs), T₄ (100 mg/kg Fe-NPs), T₅ (100 mg/kg Fe-NPs +1 mg/kg Se-NPs), T₆ (100 mg/kg Fe-NPs +2 mg/kg Se-NPs), T₇ (200 mg/kg Fe-NPs), T₈ (200 mg/kg Fe-NPs +1 mg/kg Se-NPs), and T₉ (200 mg/kg Fe-NPs +2 mg/kg Se-NPs). Before starting the experiment, the fish were adapted to the rearing conditions for a week. The amount of feed during the rearing period was 2-3% of the fish's weight, adjusted according to water temperature. The fish were fed three times a day (8:00-15:00 and 21:00) for 8 weeks. To find the histopathological changes, six fish intestine tissues from each group (two fish of each replicate) were sampled at the end of the experiment. Samples were dehydrated by routine methods and embedded in paraffin wax. They were sectioned by microtome and stained with Hematoxylin and Eosin (H&E).

Results and discussion: Histopathological examination revealed intestinal alterations including villi degeneration, inflammatory cell infiltration in both

submucosal and muscular layers, hyperemia, and necrosis. Evaluation of treatment responses showed that the combination of 100 mg/kg Fe-NPs with 1 mg/kg Se-NPs (T₅) demonstrated the most favorable outcome, with tissue integrity comparable to the control group. The T₈ treatment also showed relatively preserved intestinal morphology. In contrast, treatments with higher nanoparticle concentrations exhibited significantly more severe pathological changes, including prominent hyperemia and inflammatory infiltration. These findings indicate that the 100:1 Fe-NPs to Se-NPs ratio effectively mitigates the adverse effects of both elements.

Conclusions: It is concluded that the combined use of iron and selenium nanoparticles at doses of 100 mg/kg Fe-NPs and 1 mg/kg Se-NPs in the diet of beluga is the most appropriate and optimal combination, resulting in minimal histopathological damage to the intestinal tissue. This ratio effectively balances the pro-oxidant potential of iron with the antioxidant capacity of selenium, thereby preserving intestinal health and integrity.

Conflicts of interest: The authors have no conflicts of interest to declare for the publication of the present work.

Funding: This article is a part of the project number 12-32-12-011-98001-991148, which was carried out with the agricultural research education and extension organization (AREEO).

Acknowledgments: The authors are grateful to researchers of the International Sturgeon Research Institute for their support during this study.

*Corresponding author: f.bagherzadeh.1@areeo.ac.ir





"مقاله پژوهشی"

آسیب‌شناسی بافت روده در فیل‌ماهی *Huso huso* پرورشی تغذیه شده با نانوذرات سلنیوم و آهن

فروزان باقرزاده لاکانی^{*}، سهیل بازاری مقدم، مهدی معصوم زاده، ایوب یوسفی جوردهی، جلیل جلیل پور
انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
(AREEO)، رشت، گیلان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۱/۱۹ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۳/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۳/۲۳ تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۰۸/۱۳

کلمات کلیدی	چکیده
فیل‌ماهی	این مطالعه با هدف بررسی تأثیر سطوح مختلف نانوذرات سلنیوم (Se-NPs) و نانوذرات آهن (Fe-NPs) بر ساختار بافت روده فیل‌ماهی (<i>Huso huso</i>) پرورشی انجام شد. تعداد ۱۳۵ عدد فیل‌ماهی پرورشی (با میانگین وزنی $32/3 \pm 276/4$ گرم و میانگین درازای کل 40 ± 2 سانتی متر) به طور تصادفی در ۲۷ مخزن فایبرگلاس (<i>Huso huso</i>) در ۹ تیمار مختلف با ۳ تکرار توزیع شدند. تیمارها شامل تیمار ۱: شاهد (بدون افزودن نانوذرات)، تیمار ۲: Se-NPs ۱ mg/kg، تیمار ۳: Se-NPs ۲ mg/kg، تیمار ۴: Fe-NPs ۱۰۰ mg/kg، تیمار ۵: mg/kg، تیمار ۶: Se-NPs ۱۰۰ mg/kg + Fe-NPs ۱۰۰ mg/kg، تیمار ۷: Se-NPs ۱۰۰ mg/kg + Fe-NPs ۲۰۰ mg/kg، تیمار ۸: Se-NPs ۱۰۰ mg/kg + Fe-NPs ۲۰۰ mg/kg، تیمار ۹: Fe-NPs ۲۰۰ mg/kg، تیمار ۱۰: Se-NPs ۲۰۰ mg/kg + Fe-NPs ۲۰۰ mg/kg بود. میزان غذایی به ماهی‌ها در طی دوره پرورشی بر اساس وزن و درجه حرارت آب ۲-۳٪ زی‌توده بود و روزانه در سه نوبت (ساعات ۸، ۱۵ و ۲۱) و به مدت ۸ هفته انجام شد. در پایان آزمایش از بافت روده شش ماهی از هر تیمار نمونه‌برداری شد. نمونه‌ها طبق روش استاندارد بافت‌شناسی با استفاده از دستگاه عمل‌آوری بافت، آبگیری، شفاف‌سازی، پارافینه و قالب‌گیری شدند. سپس توسط دستگاه میکروتوم برش داده شد و با روش هماتوکسیلین-ئوزین (H&E) رنگ‌آمیزی و توسط میکروسکوپ نوری بررسی شدند. آسیب‌های مشاهده شده در بافت روده شامل استحاله (دژنراسیون) پرزها، نفوذ یاخته‌های التهابی در لایه زیر مخاطی، نفوذ یاخته‌های التهابی در لایه عضلانی، پرخونی (زیر لایه سروزی) و نکروز در لایه عضلانی بود. در مجموع کمترین میزان آسیب در تیمار ۵ (برابر با شاهد) و سپس تیمار ۸ مشاهده شد. نتایج نشان می‌دهد که استفاده تلفیقی از نانوذرات آهن و سلنیوم به ترتیب با دوزهای ۱۰۰ میلی‌گرم نانوذره آهن و ۱ میلی‌گرم نانوذره سلنیوم در هر کیلوگرم جیره غذایی فیل‌ماهی مناسب‌تر است.

مقدمه

پایداری تولید آبزی پروری به عوامل زیادی از جمله ارائه جیره‌های متعادل و کامل بستگی دارد که مواد مغذی ضروری را به صورت کمی و کیفی تأمین، و بیشینه رشد ماهی را تضمین کند، شیوع بیماری‌ها و عفونت‌های بیماری‌زا را کنترل، و وضعیت سلامت را در سطح استاندارد بالا حفظ کند (NRC, 2011; Ogunji et al. 2011; Iheanacho et al. 2018). در همین راستا، استفاده از مکمل‌های غذایی برای نیل به این اهداف اهمیت به سزایی یافته است. ساختار شیمیایی و اندازه مکمل‌های غذایی، اثربخشی آن‌ها را در داخل بدن آبزیان تعیین می‌کند.

به کارگیری نانوذرات (NPs) ریزمغذی در آبزی پروری با دو روش افزودن به جیره غذایی و یا افزودن به محیط پرورش انجام می‌شود. نانوذرات ویژگی‌های خاص و جدید دارند و در جریان خون برای مدت طولانی باقی می‌مانند و این امر سبب افزایش فراهمی زیستی آن‌ها می‌شود. فرم نانو برخی از عناصر مانند سلنیوم، مس و آهن به‌عنوان مکمل غذایی توان بالقوه زیادی برای بهبود بهره‌وری تولید آبزی پروری نشان داده‌اند (Nair et al. 2016; Khosravi-Katulil et al. 2017; Terova et al. 2018; Abdel-Tawwab et al. 2018; Nasr-Eldahan et al. 2021; Kord et al. 2021; Abdel-Tawwab et al. 2021; Khalil et al. 2023).

در سال‌های اخیر فناوری نانو در صنایع مختلف، به‌ویژه در کشاورزی و آبزی پروری، توجه زیادی را به خود جلب کرده است. نانوذرات مختلف با اهداف گوناگون از جمله افزایش رشد، ارتقای عملکرد دستگاه ایمنی ماهیان، بهبود فیزیولوژی و ساختار بافتی ماهیان استفاده می‌شوند. در همین راستا نانوذرات سلنیوم و آهن به‌عنوان مکمل‌های غذایی در تغذیه ماهیان، نه تنها می‌توانند رشد و عملکرد دستگاه ایمنی ماهیان را افزایش دهند، بلکه تأثیرات مثبتی بر ساختار بافتی و فیزیولوژیک آن‌ها نیز دارند.

نانومواد می‌توانند به راحتی در غلظت‌های پایین جذب شوند و از طریق دستگاه گوارش و روده کوچک عبور کنند تا به خون برسند و در اندام‌های حیاتی مختلف توزیع شوند تا عملکرد خود را به طور مؤثرتر انجام دهند (Bhattacharyya et al. 2015). ترکیب برخی از

نانوذرات فلزی مانند سلنیوم، روی و آهن به‌عنوان مکمل‌های جیره‌های غذایی مزایای زیادی در بقاء، رشد و سلامت ماهی دارد (Chris et al. 2018).

سلنیوم یک عنصر کمیاب ضروری برای حیوانات از جمله ماهی است و به‌عنوان یک ماده مغذی ضروری بسیار عالی برای افزایش محصول در آبزی پروری در نظر گرفته می‌شود. سلنیوم یک جزء از آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز است که از غشای یاخته‌ای در مقابل استرس اکسیداتیو محافظت می‌کند و به‌عنوان کوفاکتور یا کوآنزیم در تولید و فعال شدن آنزیم‌های گوارشی منجر به بهبود جذب مواد مغذی و متعاقباً بهبود استفاده از خوراک و عملکرد رشد ماهیان می‌شود (Watanabe et al. 1997; Shenkin, 2006; Dawood et al. 2020c). با توجه به افزایش علاقه به موضوع مصرف سلنیوم در جیره غذایی، نانوذره سلنیوم به‌عنوان مکمل تغذیه‌ای جدید پیشنهاد شده است. به نانوذره سلنیوم با توجه به مزایای متعددی از قبیل پایداری شیمیایی، زیست فراهمی بالا، سازگاری زیستی و سمیت پایین، توجه شده است (Shi et al. 2010; Wang et al. 2013). افزودن نانوذرات سلنیوم به جیره غذایی ممکن است به طور مؤثر کمبود سلنیوم در ماهی را برطرف کند. همان‌طور که توسط Abd El-Kader و همکاران (۲۰۲۱) ذکر شده است، عدم وجود نانوذره سلنیوم در جیره می‌تواند منجر به ناهنجاری در ماهی شود. Dawood و همکاران (۲۰۲۰ a, b) مطالعه‌ای بر روی تیلاپای نیل (*Oreochromis niloticus*) انجام دادند و دریافتند که افزودن نانوذره سلنیوم به میزان یک میلی‌گرم در کیلوگرم در جیره غذایی منجر به بهبود ایمنی، ظرفیت ضداکسایشی و ساختار روده می‌شود. Saffari و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کردند که نانو سلنیوم اضافه شده به جیره غذایی سبب بهبود چشمگیر در عملکرد رشد، کارایی تغذیه، بافت شناسی روده، و فراسنجه‌های خونی-ایمنی و بیوشیمیایی سرم ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) می‌شود. از سوی دیگر سلنیوم می‌تواند ایمنی، ظرفیت ضداکسیدانی، ساختار روده، فراسنجه‌های رشد را در گونه‌های مختلف ماهی را بهبود بخشد. در مطالعه Ghazi و همکاران (۲۰۲۲) بر روی ماهی تیلاپای نیل افزودن نانوذرات سلنیوم و روی به طور معنی‌دار ساختار

بافت روده را نسبت به گروه شاهد بهبود بخشید. در مطالعه Ghaniem و همکاران (۲۰۲۲) در ماهی تیلاپپای نیل سه تیمار سلینیوم آلی، معدنی و نانوذره سلینیوم به میزان یک میلی‌گرم در کیلوگرم جیره غذایی را با جیره شاهد مقایسه کردند. در ماهیان تغذیه شده با جیره‌های حاوی سلینیوم نسبت به گروه شاهد به صورت معنی‌دار درازای پرزهای روده افزایش یافت و بیشترین درازای روده نیز در تیمار نانو سلینیوم مشاهده شد.

آهن یکی از ریز معدنی‌های ضروری است و می‌تواند برخی از فرایندهای فیزیولوژیک از جمله انتقال اکسیژن، اکسایش چربی، تشکیل هموگلوبین، تحمل استرس، فعالیت بهینه آنزیم، سنتز DNA، تولید ATP، انتقال الکترون و بهبود عملکرد ایمنی را حفظ کند (Kazemi et al. 2016; Antony Jesu Prabhu et al. 2020). کمبود آهن با کم‌خونی، کاهش رشد، تغییرات در ریخت‌شناسی روده (درازا یا پهنای پرز)، سرکوب دستگاه ایمنی، ناهنجاری‌های خونی و حساسیت به بیماری مرتبط است (Behera et al. 2014). ماهی‌ها می‌توانند آهن مورد نیاز خود را از آبشش‌ها و یا از طریق رژیم غذایی خود به دست آورند. با وجود این، به دلیل محدودیت جذب از طریق آبشش، جیره غذایی مسیر اصلی در نظر گرفته می‌شود. همچنین، استفاده از مکمل‌های غذایی با دسترسی بالا به عنوان یکی از نکات مهمی در نظر گرفته می‌شود که باید در فرمول جیره‌های غذایی در آبی‌پروری رعایت شود تا سبب بهبود کیفیت خوراک شده و نیاز غذایی ماهیان را برآورده کند و به بیشینه رساندن بهره‌وری ماهیان پرورشی را به همراه داشته باشد (Watanabe et al. 1997; Lall, 2002). مکمل‌های آهن در اشکال مختلف موجود هستند: آلی، معدنی و نانوذراتی که در درجه فراهمی زیستی متفاوت هستند. با بهره‌گیری از فناوری نانو در صنعت آبی‌پروری اشکال جدید و متنوعی از مواد معدنی به‌ویژه آهن در مدل‌های متفاوت مانند نانوذرات صفر ظرفیتی (خنثی) و نانوذرات اکسید آهن در مقیاس‌های مختلف تولید می‌شود. گزارش شده است که نانوذرات به دلیل دارا بودن سطح انرژی، اندازه کوچک، محتوای اتم‌های فعال و توانایی عبور سریع‌تر از

غشای یاخته‌ای، سرعت جذب و بهره‌برداری بالاتری نسبت به دیگر اشکال شیمیایی دارند (Wang et al. 2018). در همین راستا، Mohammady و همکاران (۲۰۲۴) گزارش کردند که نانوذره آهن در جیره غذایی تیلاپپای نیل، نیازهای آهن ماهی را برآورده کرده و سبب بهبود رشد، ایمنی، قابلیت‌های ضد اکسیدانی و ساختار روده آن می‌شود.

با توجه به اهمیت تغذیه متعادل و استفاده از مکمل‌های غذایی در آبی‌پروری، به‌ویژه در گونه‌های با ارزش اقتصادی مانند فیل‌ماهی (*Huso huso*)، بررسی تأثیر نانوذرات سلینیوم و آهن بر ساختار بافت روده و سلامت ماهی از جنبه‌های علمی و کاربردی حائز اهمیت است. نانوذرات به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد خود، از جمله زیست‌فراهمی بالا، پایداری شیمیایی و توانایی عبور از غشای یاخته‌ای، می‌توانند به عنوان مکمل‌های غذایی مؤثر در بهبود رشد، عملکرد دستگاه ایمنی و سلامت بافت‌های مختلف ماهی استفاده شوند. این مطالعه با هدف ارزیابی تأثیر سطوح مختلف نانوذرات سلینیوم و آهن بر ساختار بافت روده فیل‌ماهی پرورشی انجام شده است تا بهترین ترکیب این نانوذرات را برای بهبود سلامت روده این گونه ارزشمند شناسایی کند. نتایج این تحقیق می‌تواند به توسعه جیره‌های غذایی کارآمدتر و پایدارتر در صنعت آبی‌پروری کمک کرده و راهکارهایی برای کاهش آسیب‌های بافتی و بهبود سلامت ماهیان ارائه دهد. بنابراین، این مطالعه نه تنها از جنبه علمی حائز اهمیت است، بلکه از نظر اقتصادی و کاربردی نیز می‌تواند نقش مهمی در توسعه پایدار صنعت آبی‌پروری ایفا کند.

مواد و روش‌ها

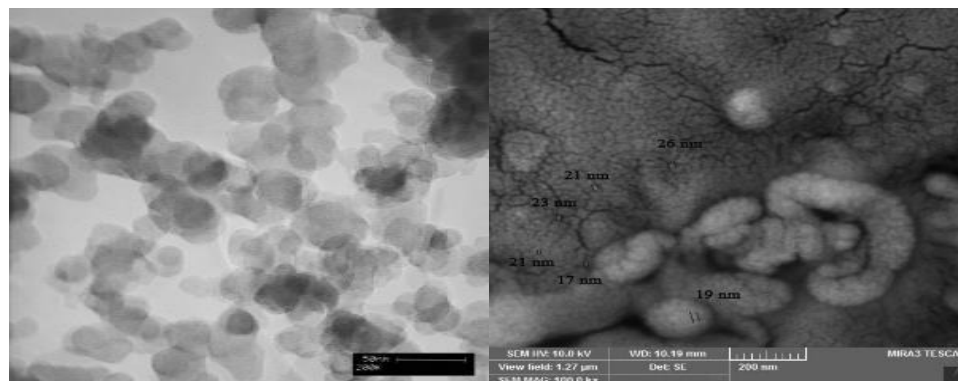
نانوذرات مورد استفاده

محلول کلونیدی نانوذره سلینیوم در آب با خلوص بالا (۹۹٪/۹۵) و ابعاد ۱۰-۴۵ nm از شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان تهیه شد. تصاویر SEM^۱ و TEM^۲ نانو ذره سلینیوم در اشکال ۱ و ۲ ارایه شده است.

^۲ Transmission electron microscope

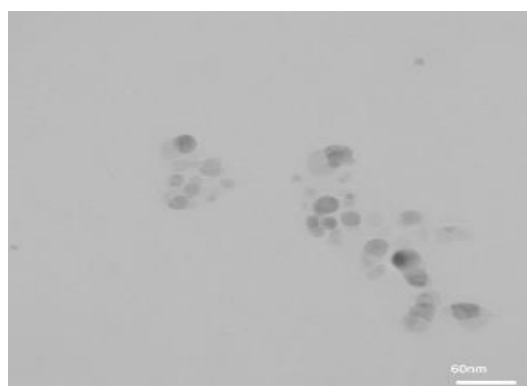
^۱ Scanning electron microscopy

نانوذره آهن با خلوص بالا (۹۹/۵٪) و ابعاد ۳۵-۴۵ nm از شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان تهیه شد. تصاویر SEM و TEM نانو ذره آهن در شکل‌های ۳ و ۴ ارایه شده است.



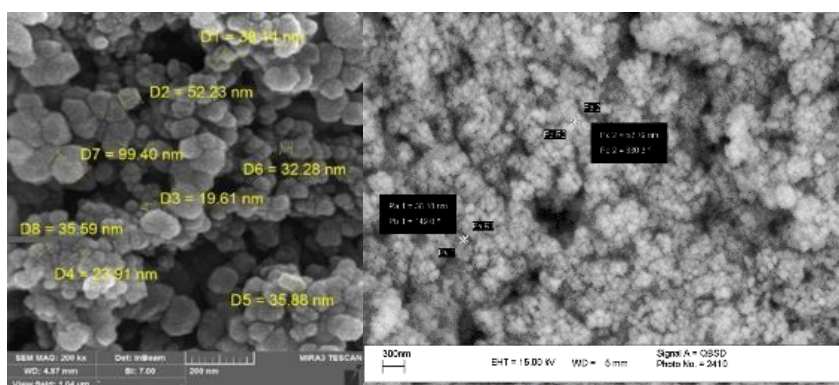
شکل ۱ تصاویر میکروسکوپ الکترونی (SEM) نانوذرات سلنیوم

Figure 1 Scanning electron microscopy (SEM) images of selenium nanoparticles



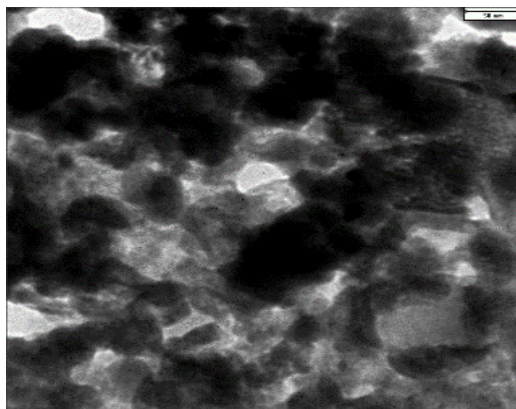
شکل ۲ تصویر میکروسکوپ الکترونی (TEM) نانوذرات سلنیوم

Figure 2 Transmission electron microscope (TEM) images of selenium nanoparticles



شکل ۳ تصاویر میکروسکوپ الکترونی (SEM) نانوذرات آهن

Figure 3 Scanning electron microscopy (SEM) images of iron nanoparticles



شکل ۴ تصویر میکروسکوپ الکترونی (TEM) نانوذرات آهن

Figure 4 Transmission electron microscope (TEM) images of iron nanoparticles

نانو ذرات) نیز ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر (فاقد نانوذرات) نیز بر روی غذا افشانه شد. برای محافظت غذاها و جلوگیری از رها شدن نانو ذرات و ورود آن‌ها به محیط آب، غذاهای آماده شده، توسط لایه ای از روغن پوشانده شد (Ramsden et al. 2009). میزان غذادهی در طی دوره پرورشی بر اساس وزن و درجه حرارت آب ۳-۲٪ زی‌توده بود و روزانه در سه نوبت (ساعات ۸، ۱۵ و ۲۱) ماهیان غذادهی شدند. آب مخازن جریان دار بود و هوادهی انجام شد.

فراسنجه‌های فیزیکی و شیمیایی آب

برای حفظ شرایط مناسب فیزیکی و شیمیایی آب فراسنجه‌های کیفی آب در طی دوره اندازه‌گیری و ثبت شد. اندازه‌گیری درجه‌حرارت، اکسیژن و pH آب به‌صورت روزانه انجام شد. اکسیژن با استفاده از دستگاه اکسی‌متر (OXI3230B/SET)، pH با استفاده از دستگاه pH meter (pH330i/SET) اندازه‌گیری شد. میانگین درجه حرارت آب $17.8 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ ، اکسیژن 9.1 ± 0.2 میلی‌گرم در لیتر و pH آب 7.7 ± 0.1 بود.

ماهی و شرایط آزمایش

کارگاه پرورشی در یک مکان سرپوشیده (بخش آبی‌پروری انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری) قرار داشته و دوره نوری به‌صورت ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی بود. این تحقیق در قالب ۹ تیمار (هر تیمار دارای ۳ تکرار) انجام شد. قبل از شروع آزمایش ماهیان به مدت یک هفته با شرایط مخازن سازگار شدند. سپس ۱۳۵ عدد فیل‌ماهی پرورشی (با میانگین وزنی 32.3 ± 27.4 گرم و میانگین درازای کل 40 ± 2 سانتی‌متر) در قالب طرح کاملاً تصادفی^۱ در ۲۷ مخزن فایبرگلاس نیم تنی (حاوی ۳۰۰ لیتر آب) توزیع شدند. غذای مورد استفاده در این مطالعه غذای تجاری آماده با قطر غذا ۳ میلی‌متر حاوی مقادیر پروتئین خام ۴۸٪، چربی خام ۱۵٪، فیبر خام ۳٪، فسفر ۱/۵٪، خاکستر ۹٪، رطوبت ۱۱٪، کلسیم ۱/۸٪ و سدیم ۰/۵٪ بود. به منظور افزودن نانوذرات به غذا و تهیه جیره غذایی، از روش انحلال نانوذرات در آب مقطر و افشانه کردن در سطوح غذا و سپس آمیختن کامل این ترکیبات استفاده شد. لذا برای آماده سازی جیره‌های حاوی نانوذرات مطابق جدول ۱، در هر تیمار، مقدار محاسبه شده نانوذرات سلنیوم و آهن برای دستیابی به دوزهای مورد نظر، ابتدا با آب مقطر به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده و سپس به‌صورت جداگانه به یک کیلوگرم غذا برای تیماربندی اضافه، و پس از ترکیب با غذای مصرفی، استفاده شد. به منظور یکسان کردن شرایط، در مورد تیمار شاهد (فاقد

¹ Completely Randomized Design

جدول ۱ سطوح مختلف نانوذرات سلنیوم و نانوذرات آهن مورد استفاده جهت آماده سازی جیره های آزمایشی.

Table 1 Different levels of selenium nanoparticles and iron nanoparticles used to prepare experimental diets.

Treatments	Fe-NPs (mg/kg)	Se-NPs (mg/kg)
T1	0	0
T2	0	1
T3	0	2
T4	100	0
T5	100	1
T6	100	2
T7	200	0
T8	200	1
T9	200	2

مطالعات آسیب شناسی روده

در پایان دوره پرورش از روده شش بچه ماهی از هر تیمار (دو ماهی از هر تکرار) نمونه برداری شد و نمونه ها در محلول بوئن (شامل ۷۵٪ اسید پیکریک اشباع، ۲۵٪ فرمالین و ۵٪ اسید استیک) تثبیت شدند. نمونه های تثبیت شده طبق روش استاندارد بافت شناسی با استفاده از دستگاه عمل آوری بافت، آبیگری، شفاف سازی، پارافینه و قالب گیری شدند. سپس به وسیله دستگاه میکروتوم مقاطع میکروسکوپی با ضخامت ۷ میکرون تهیه شد. مقاطع به روش هماتوکسیلین-ئوزین (H&E) رنگ آمیزی شد (Hung et al. 1990) و با میکروسکوپ نوری (Olympus, BH2, Japan) مجهز به دوربین (Zeiss, Cyber-Shot, Japan Sony) بررسی شد. برای بررسی میزان آسیب ها به صورت کمی، تمام سطح مقطع در کلیه نمونه های بافت بررسی شد و شدت عارضه ها به صورت زیر طبقه بندی شد (Schwaiger et al. 1997):

❖ ۰ = طبیعی (بدون آسیب)

❖ ۱ = آسیب با شدت کم (۰-۲۵٪ بافت)

❖ ۲ = آسیب با شدت متوسط (۲۶-۵۰٪ بافت)

❖ ۳ = آسیب با شدت زیاد (۷۵-۱۰۰٪ از بافت)

❖ ۴ = آسیب خیلی شدید (۱۰۰-۷۶٪ بافت)

نتایج

نتایج بافت شناسی روده فیل ماهیان پرورشی تغذیه شده با جیره های حاوی نانوذرات سلنیوم و آهن در اشکال ۵ تا ۱۳ ارائه شده است. عارضه های مشاهده شده در بافت روده شامل دژنراسیون (استحاله) پرزها^۱، نفوذ یاخته های التهابی در لایه زیر مخاطی^۲، نفوذ یاخته های التهابی در لایه عضلانی^۳، پرخونی (زیر لایه سروزی)^۴ و نکروز در لایه عضلانی^۵ بود. شدت عارضه های مشاهده شده نیز در جدول ۲ ارائه شده است. در مجموع کمترین میزان آسیب در تیمار ۵ (برابر با شاهد) و سپس تیمار ۸ مشاهده شد.

⁴ Hyperemia (under serous layer)

⁵ Necrosis in muscular layer

¹ Villi degeneration

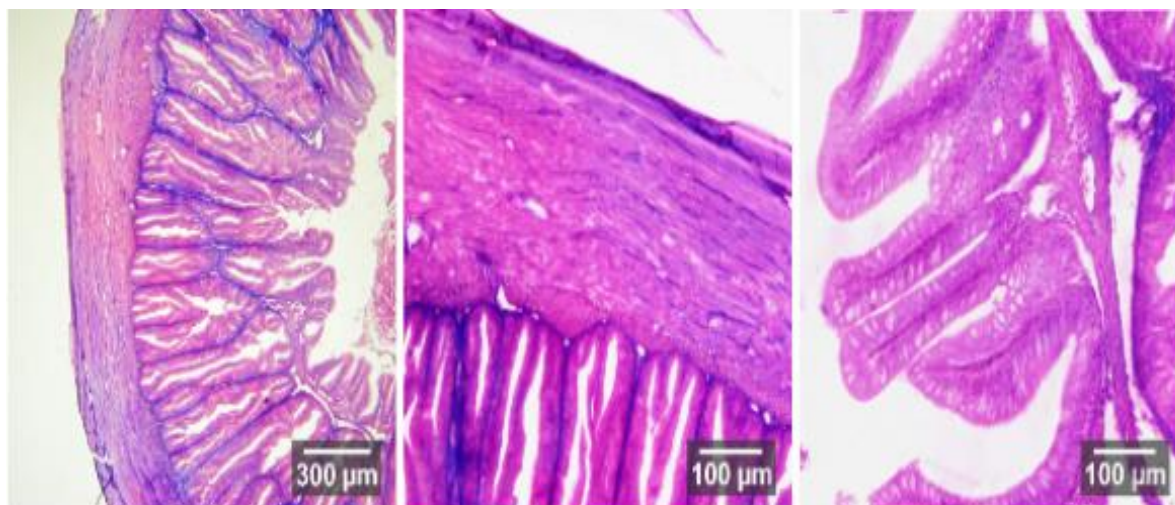
² Inflammatory cells infiltration in submucosal layer

³ Inflammatory cells infiltration in muscular layer

جدول ۲ عارضه‌های مشاهده شده در بافت روده فیل ماهیان *Huso huso* پرورشی تغذیه شده با جیره‌های حاوی نانوذرات سلنیوم و آهن (n=6). تیمار ۱: شاهد (بدون افزودن نانوذرات)، تیمار ۲: ۱ mg/kg Se-NPs، تیمار ۳: ۲ mg/kg Se-NPs، تیمار ۴: ۱۰۰ mg/kg Fe-NPs، تیمار ۵: ۱۰۰ mg/kg Fe-NPs + ۱ mg/kg Se-NPs، تیمار ۶: ۱۰۰ mg/kg Fe-NPs + ۲ mg/kg Se-NPs، تیمار ۷: ۲۰۰ mg/kg Fe-NPs، تیمار ۸: ۲۰۰ mg/kg Fe-NPs + ۱ mg/kg Se-NPs، تیمار ۹: ۲۰۰ mg/kg Fe-NPs + ۲ mg/kg Se-NPs. شدت عارضه‌ها: ۰= بدون آسیب، ۱= آسیب با شدت کم، ۲= آسیب با شدت متوسط، ۳= آسیب با شدت زیاد و ۴= آسیب خیلی شدید.

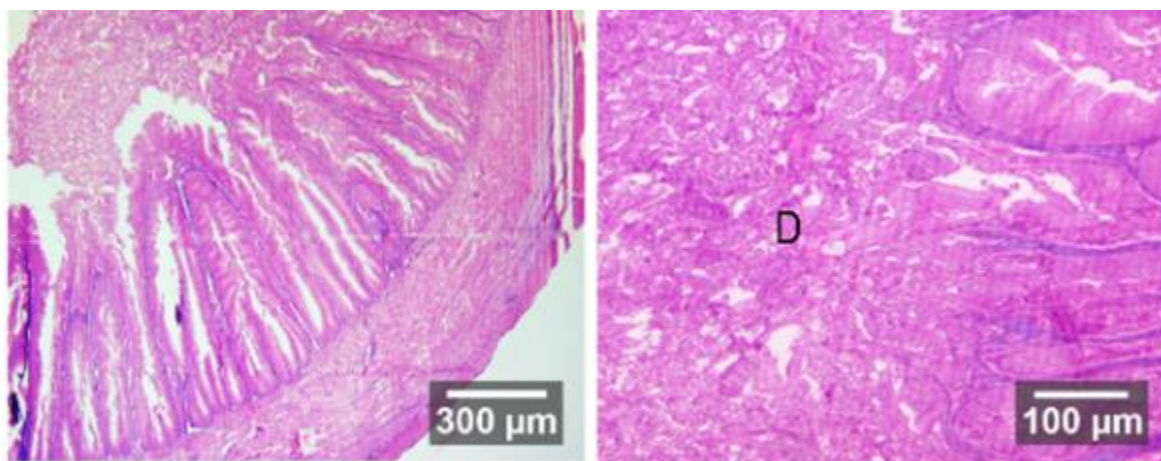
Table 2 Lesions observed in the intestinal tissue of beluga *Huso huso* reared with diets containing selenium and iron nanoparticles (n=6). Treatments including T1 (control, no added NPs), T2 (1 mg/kg Se-NPs), T3 (2 mg/kg Se-NPs), T4 (100 mg/kg Fe-NPs); T5 (100 mg/kg Fe-NPs +1 mg/kg Se-NPs); T6 (100 mg/kg Fe-NPs +2 mg/kg Se-NPs); T7 (200 mg/kg Fe-NPs); T8 (200 mg/kg Fe-NPs +1 mg/kg Se-NPs); T9 (200 mg/kg Fe-NPs +2 mg/kg Se-NPs). Severity of complications: 0=no damage, 1=low damage, 2=moderate damage, 3=high damage and 4=very severe damage.

Treatments	Necrosis in muscular layer	Hyperemia (under serous layer)	Inflammatory cell infiltration in muscular layer	Inflammatory cell infiltration in submucosal layer	Villi degeneration
T1	1	0	1	2	1
T2	3	1	2	1	3
T3	3	3	2	4	2
T4	2	2	2	4	1
T5	1	2	1	1	1
T6	2	4	2	3	3
T7	2	2	2	1	3
T8	2	1	2	1	2
T9	1	4	1	4	2



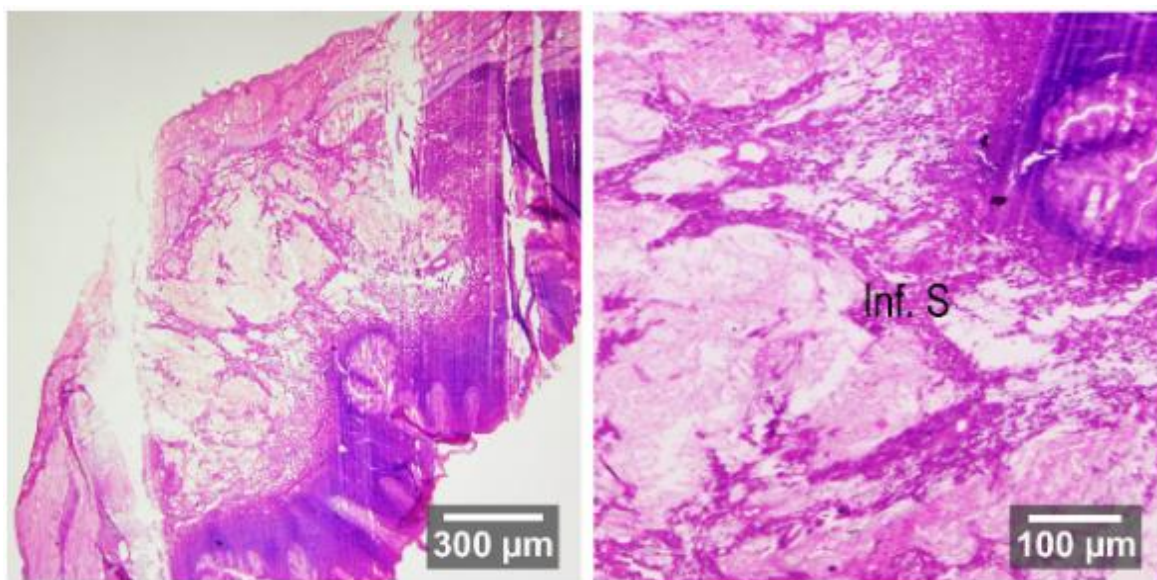
شکل ۵ بافت روده تیمار ۱ (شاهد؛ بدون افزودن نانوذرات) فیل ماهیان *Huso huso* پرورشی تغذیه شده با جیره‌های حاوی نانوذرات سeleniوم و آهن (H&E).

Figure 5 Intestinal tissue of T1 (control; without adding nanoparticles) beluga *Huso huso* fed with diets containing selenium and iron nanoparticles (H&E).



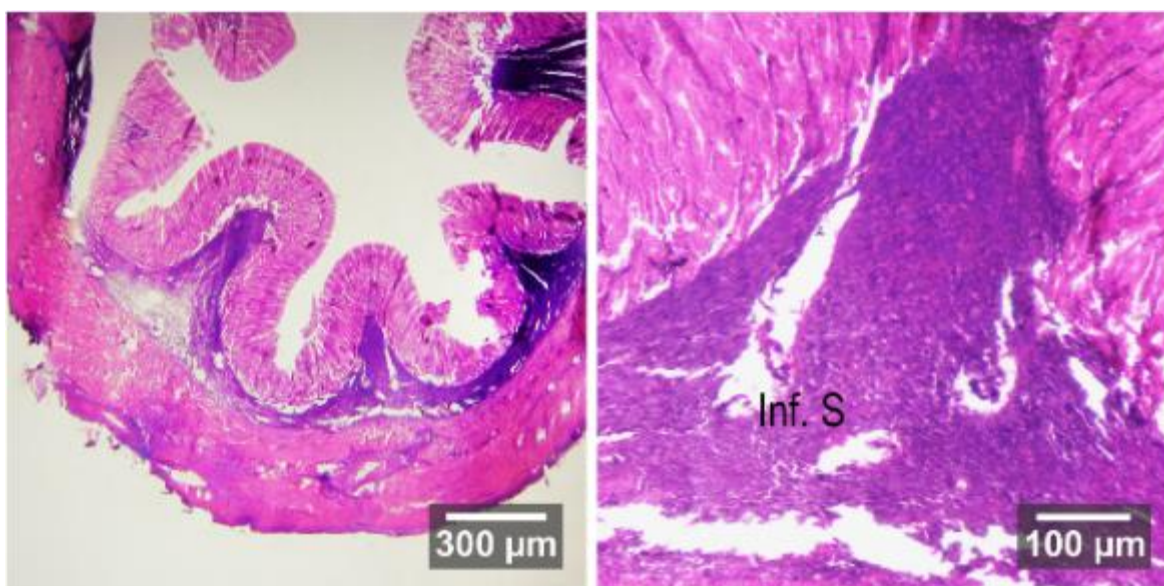
شکل ۶ بافت روده تیمار ۲ (۱ mg/kg Se-NPs) فیل ماهیان *Huso huso* پرورشی تغذیه شده با جیره‌های حاوی نانوذرات سeleniوم و آهن (H&E). D: نکروز وسیع و پوسته پوسته شدن یاخته‌های پوششی روده.

Figure 6 Intestinal tissue of T2 (1 mg/kg Se-NPs) beluga *Huso huso* fed with diets containing selenium and iron nanoparticles (H&E). D: Extensive necrosis and sloughing the enterocytes.



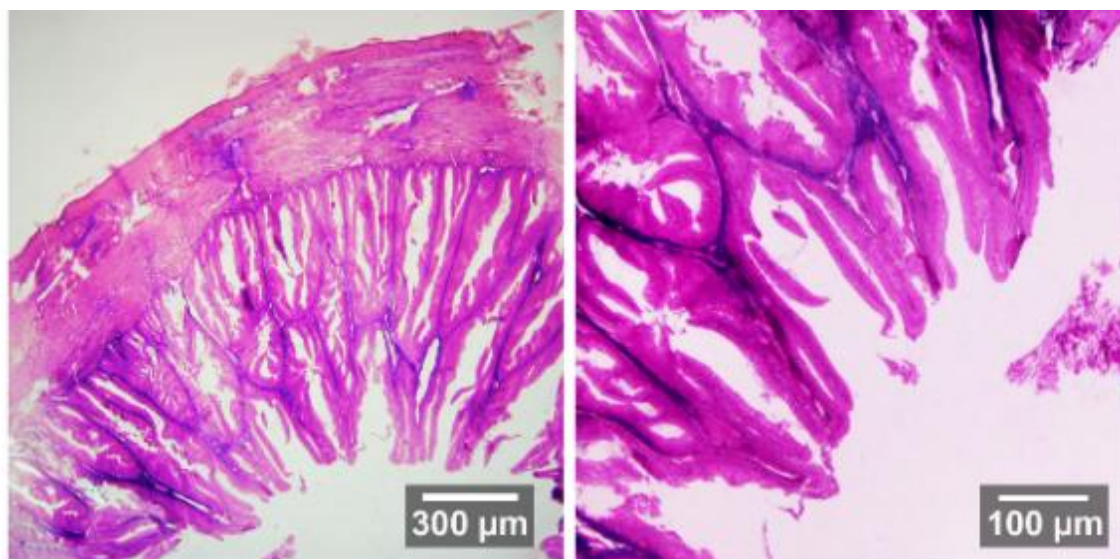
شکل ۷ بافت روده تیمار ۳ (۲ mg/kg Se-NPs) فیله‌ماهیان *Huso huso* پرورشی تغذیه شده با جیره‌های حاوی نانوذرات سلنیوم و آهن (H&E). Inf. S: نفوذ سلول‌های التهابی در لایه زیر مخاطی.

Figure 7 Intestinal tissue of T3 (2 mg/kg Se-NPs) beluga *Huso huso* fed with diets containing selenium and iron nanoparticles (H&E). Inf. S: Inflammatory cells infiltration in submucosal layer.



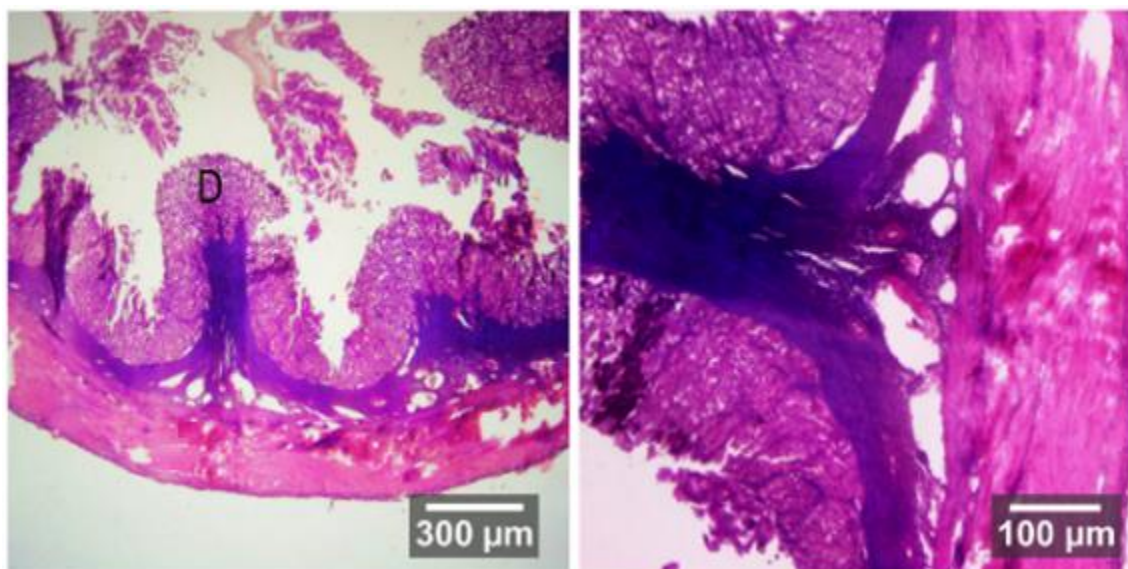
شکل ۸ بافت روده تیمار ۴ (۱۰۰ mg/kg Fe-NPs) فیله‌ماهیان *Huso huso* پرورشی تغذیه شده با جیره‌های حاوی نانوذرات سلنیوم و آهن (H&E). Inf. S: نفوذ سلول‌های التهابی در لایه زیر مخاطی.

Figure 8 Intestinal tissue of T4 (100 mg/kg Fe-NPs) beluga *Huso huso* fed with diets containing selenium and iron nanoparticles (H&E). Inf. S: Inflammatory cells infiltration in submucosal layer.



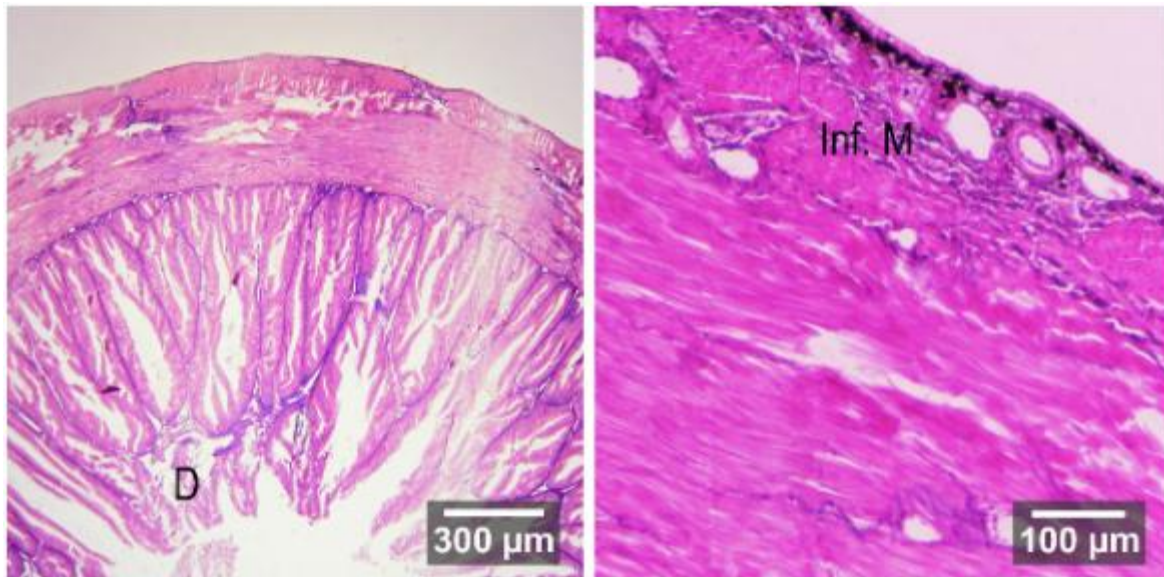
شکل ۹ بافت روده تیمار ۵ (۱ mg/kg Se-NPs + ۱۰۰ mg/kg Fe-NPs) فیل ماهیان *Huso huso* پرورشی تغذیه شده با جیره-های حاوی نانوذرات سلنیوم و آهن (H&E).

Figure 9 Intestinal tissue of T5 (100 mg/kg Fe-NPs +1 mg/kg Se-NPs) beluga *Huso huso* fed with diets containing selenium and iron nanoparticles (H&E).



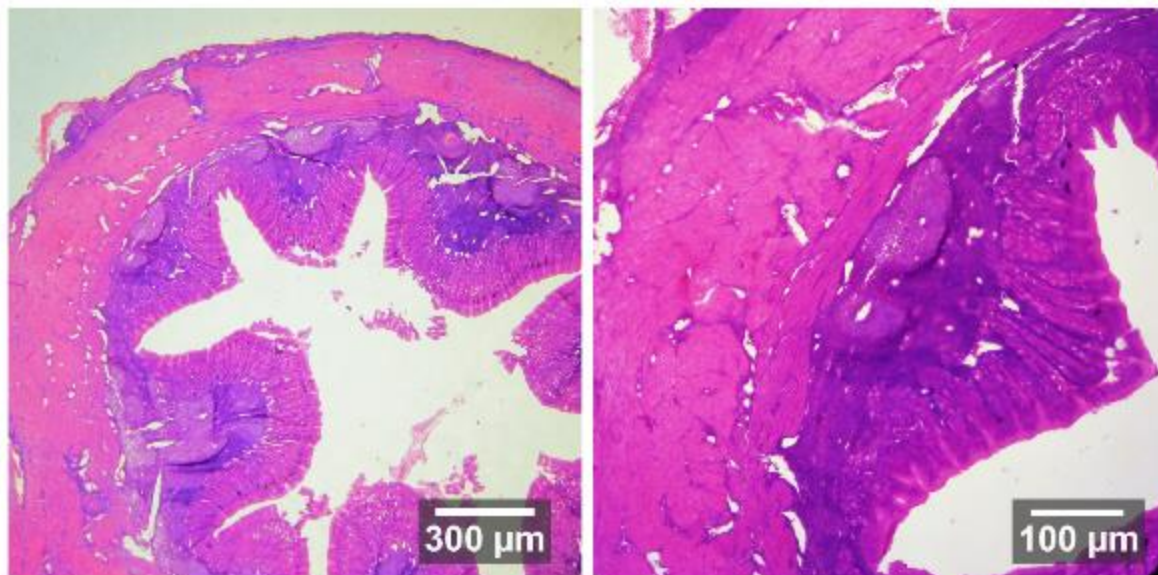
شکل ۱۰ بافت روده تیمار ۶ (۲ mg/kg Se-NPs + ۱۰۰ mg/kg Fe-NPs) فیل ماهیان *Huso huso* پرورشی تغذیه شده با جیره-های حاوی نانوذرات سلنیوم و آهن (H&E). D: نکروز وسیع و پوسته پوسته شدن یاخته های پوششی روده،

Figure 10 Intestinal tissue of T6 (100 mg/kg Fe-NPs +2 mg/kg Se-NPs) beluga *Huso huso* fed with diets containing selenium and iron nanoparticles (H&E). D: Extensive necrosis and sloughing the enterocytes.



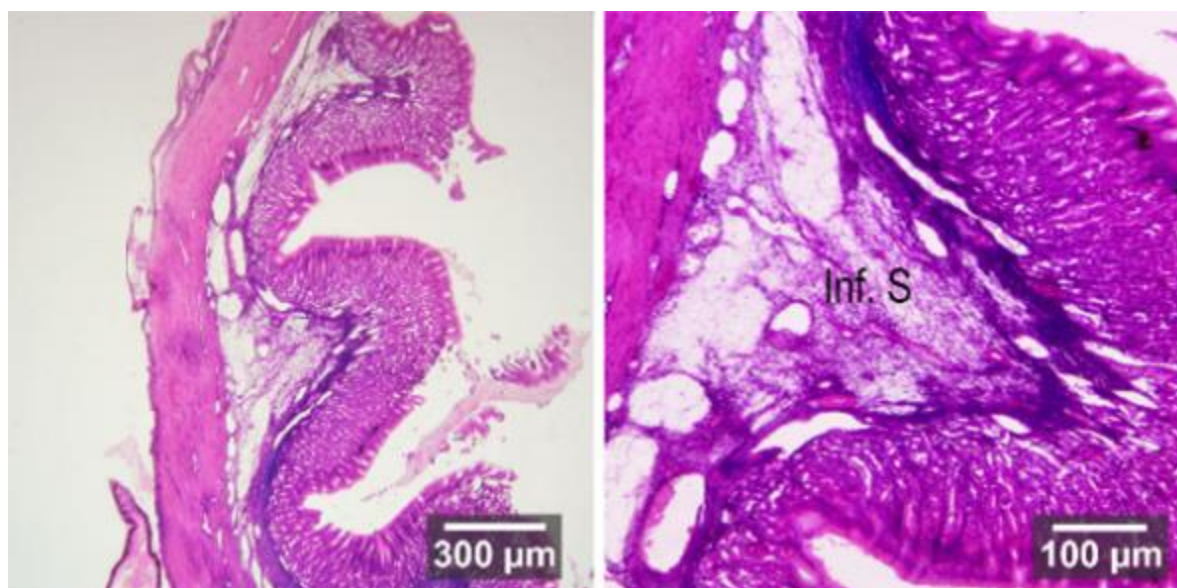
شکل ۱۱ بافت روده تیمار ۷ (۲۰۰ mg/kg Fe-NPs) فیل‌ماهیان *Huso huso* پرورشی تغذیه شده با جیره‌های حاوی نانوذرات سلینیوم و آهن. D: نکروز وسیع بافت پوششی و چسبیدن چین‌های روده‌ای به یکدیگر، Inf. M: نفوذ سلول‌های التهابی در لایه عضلانی.

Figure 11 Intestinal tissue of T7 (200 mg/kg Fe-NPs) beluga *Huso huso* fed with diets containing selenium and iron nanoparticles (H&E). D: Extensive necrosis of enterocytes and adhering intestinal villi to each other; Inf. M: Inflammatory cells infiltration in muscular layer.



شکل ۱۲ بافت روده تیمار ۸ (۱ mg/kg Se-NPs + ۲۰۰ mg/kg Fe-NPs) فیل‌ماهیان *Huso huso* پرورشی تغذیه شده با جیره‌های حاوی نانوذرات سلینیوم و آهن (H&E).

Figure 12 Intestinal tissue of T8 (200 mg/kg Fe-NPs + 1 mg/kg Se-NPs) beluga *Huso huso* fed with diets containing selenium and iron nanoparticles (H&E).



شکل ۱۳ بافت روده تیمار ۹ (۲ mg/kg Se-NPs + ۲۰۰ mg/kg Fe-NPs) فیل ماهیان *Huso huso* پرورشی تغذیه شده با جیره‌های حاوی نانوذرات سلینیوم و آهن (H&E). Inf. S: نفوذ سلول‌های التهابی در لایه زیر مخاطی.

Figure 13 Intestinal tissue of T9 (200 mg/kg Fe-NPs+2mg/kg Se-NPs) beluga *Huso huso* fed with diets containing selenium and iron nanoparticles (H&E). Inf. S: Inflammatory cells infiltration in submucosal layer.

این مطالعات نشان داده‌اند که نانو ذرات می‌توانند به طور معناداری ساختار بافت روده را تحت تأثیر قرار دهند. به عنوان مثال، نتایج مطالعه El-Sharawy و همکاران (۲۰۲۱) نشان داد که با مکمل‌سازی نانوذره سلینیوم در غلظت‌های بین ۱/۰۲ تا ۱/۱۱ میلی گرم در کیلوگرم جیره غذایی، می‌توان به بهبودهای قابل توجهی در پاسخ رشد و نسبت راندمان خوراک گربه‌ماهی راه راه (*Pangasianodon hypophthalmus*) دست یافت. نکته مهم این است که این مکمل تأثیر منفی بر کبد، روده و آبشش ماهی نداشته است و علاوه بر این که می‌تواند فعالیت ضد اکسایشی را بهبود بخشد، از بافت روده و کبد محافظت می‌کند. مطالعه Ibrahim و همکاران (۲۰۲۱) نشان داد که افزودن نانو سلینیوم به جیره غذایی تیلاپیا تأثیر مثبتی بر ساختار روده این ماهی دارد. نتایج نشان داد که ماهی‌های تغذیه شده با ۰/۸ میلی گرم در کیلوگرم نانوذره سلینیوم، بالاترین ارتفاع و عرض پرزهای روده‌ای و تعداد یاخته‌های جامی^۱ را در روده قدامی نشان دادند. همچنین، نسبت تقویت غشایی و مساحت جذب پرزها نیز در ماهی‌های

بحث

در مطالعه حاضر، اثرات نانوذرات سلینیوم و آهن بر ساختار بافت روده فیل ماهیان پرورشی بررسی شد. عارضه‌های مشاهده شده در بافت روده فیل ماهیان پرورشی پس از ۸ هفته تغذیه با جیره‌های حاوی سطوح مختلف نانوذرات سلینیوم و آهن شامل تخریب پرزها، نفوذ یاخته‌های التهابی در لایه زیر مخاطی، نفوذ یاخته‌های التهابی در لایه عضلانی و نکروز در لایه عضلانی بود. در مجموع کمترین میزان آسیب در تیمارهای ۵ (برابر با شاهد) و سپس ۸ مشاهده شد. نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که در استفاده تلفیقی از نانوذرات آهن و سلینیوم به ترتیب دوزهای ۱۰۰ میلی گرم نانو ذره آهن و ۱ میلی گرم نانوذره سلینیوم در هر کیلوگرم جیره غذایی فیل ماهی مناسب تر و بهینه است. مشاهده آسیب‌های بافت روده از جمله دژنراسیون پرزها و نفوذ یاخته‌های التهابی، نشان‌دهنده اهمیت دقت در انتخاب دوز مناسب نانوذرات است. در دیگر مطالعات نیز اثرات نانوذرات اضافه شده به جیره غذایی بر ساختار بافت روده ماهیان بررسی شده است و نتایج

¹ Goblet cells

تغذیه شده با ۰/۴ میلی‌گرم در کیلوگرم نانوذره سلینیوم به حداکثر رسید. در روده خلفی، ماهی‌های تغذیه شده با ۰/۸ میلی‌گرم در کیلوگرم نانوذره سلینیوم، بالاترین مقادیر ارتفاع و عرض پرزها، نسبت تقویت غشایی و ضخامت کریپت را داشتند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که نانو سلینیوم می‌تواند به بهبود ساختار روده و افزایش سطح جذب مواد مغذی کمک کند، که به نوبه خود می‌تواند عملکرد رشد و سلامت کلی ماهی را ارتقا دهد. در مطالعه Ghazi و همکاران (۲۰۲۲)، افزودن نانوذرات سلینیوم و روی به جیره غذایی ماهی تیلاپیا موجب بهبود قابل توجهی در ساختار بافت روده شد. در این مطالعه، ماهی تیلاپای نیل به مدت ۶۰ روز با جیره‌های مختلف تغذیه شدند. تیمارها شامل شاهد (بدون افزودن نانوذرات سلینیوم و روی)، ۱ میلی‌گرم در کیلوگرم نانوذرات سلینیوم، ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم نانوذرات روی و ترکیب ۱ میلی‌گرم نانوذره سلینیوم و ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم نانوذره روی بود. افزودن نانوذرات سلینیوم و روی به طور معنی‌داری ساختار بافت روده را نسبت به گروه شاهد بهبود بخشید. در روده قدامی، تعداد یاخته‌های جامی در همه تیمارها افزایش یافت و در تیمار ترکیبی نانوذرات سلینیوم و روی، درازا و پهنای پرزهای روده نیز افزایش یافت. در روده میانی، درازای پرزهای روده در ماهی‌های تغذیه‌شده با نانوذره سلینیوم یا روی افزایش یافت و بیشترین میزان آن به ترتیب در تیمار ترکیبی نانوذرات سلینیوم و روی و سپس نانوذره سلینیوم مشاهده شد. همچنین، تعداد یاخته‌های جامی در تیمار ترکیبی افزایش یافت. در قسمت خلفی روده، افزایش درازای پرزهای روده در ماهیان تغذیه شده با نانوذره سلینیوم یا روی مشاهده شد. بیشترین درازای پرزهای روده در ماهی‌های تیمار ترکیبی نانوذرات سلینیوم و روی و سپس نانوذرات روی و سلینیوم ثبت شد. تعداد یاخته‌های جامی نیز در ماهی‌های تیمار ترکیبی افزایش یافت. در مطالعه دیگری، Ghaniem و همکاران (۲۰۲۲) ماهی تیلاپای نیل را به مدت ۶۵ روز با چهار تیمار غذایی شامل شاهد (بدون افزودن سلینیوم) و سه تیمار سلینیوم آلی، معدنی و نانوذره سلینیوم به میزان ۱ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره غذایی تغذیه کردند. در ماهیان تغذیه شده با

جیره‌های حاوی سلینیوم نسبت به گروه شاهد به‌صورت معنی‌دار درازای پرزهای روده افزایش یافت و بیشترین درازا در تیمار نانوسلینیوم مشاهده شد، اما در پهنای تیمارها اختلاف معنی‌دار وجود نداشت. در قسمت خلفی روده، درازای پرز و تعداد یاخته‌های جامی شکل روده به طور قابل توجهی در ماهی‌های تغذیه شده با سلینیوم آلی یا نانوذره سلینیوم تغذیه شدند، نسبت به دیگر تیمارها بیشتر بود. علاوه بر این، پهنای پرز و عمق کریپت روده به طور قابل توجهی در ماهی‌های تغذیه شده با تمام جیره‌های غذایی غنی شده با سلینیوم در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت و جیره‌های حاوی سلینیوم آلی یا نانوذره سلینیوم بالاترین مقادیر را در بین گروه‌ها داشتند.

یافته‌های مطالعه حاضر نشان دهنده تأثیر دوز و تعادل بین سمیت و فواید نانوذرات است. دوزهای بالاتر نانوذرات آهن حتی در ترکیب با سلینیوم، آسیب‌های بافتی بیشتری نسبت به دوزهای پایین تر ایجاد می‌کند. این موضوع احتمالاً ناشی از تعادل بین اثرات ضداکسایشی سلینیوم و پتانسیل پیش‌اکسایشی (پرواکسیدانی) آهن است. آهن می‌تواند از طریق واکنش فنتون^۱ رادیکال‌های آزاد تولید کند (Papanikolaou and Pantopoulos, 2005; Halliwell and Gutteridge, 2015). در حالی که سلینیوم به عنوان جزء آنزیم‌های ضداکسایشی (مانند گلوکاتایون پراکسیداز) این استرس اکسیداتیو را خنثی می‌کند (Brigelius-Flohé and Maiorino, 2013). با وجود این، در دوزهای بالاتر آهن، ممکن است ظرفیت ضداکسایشی سلینیوم کافی نباشد، که منجر به آسیب بافتی می‌شود. این مکانیسم با مطالعاتی مانند El-Sharawy و همکاران (۲۰۲۱) همسو است که نشان دادند دوزهای بهینه سلینیوم از بافت‌های ماهی در برابر استرس اکسیداتیو محافظت می‌کند. از سوی دیگر احتمال همکاری سینرژیک آهن و سلینیوم نیز باید مد نظر قرار گیرد. با توجه به نتایج مطالعه حاضر ترکیب نانوذرات آهن و سلینیوم در تیمارهای ۵ و ۸ ممکن است اثرات سینرژیک داشته باشند. سلینیوم نه تنها جذب آهن را بهبود می‌بخشد، بلکه از سمیت ناشی از تجمع آهن در بافت‌ها

¹ $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + \bullet OH$

است ناشی از تجمع نانوذرات در لایه‌های مخاطی روده و ایجاد پاسخ ایمنی ذاتی باشد. مطالعاتی مانند Ibrahim و همکاران (۲۰۲۱) نشان می‌دهد که نانوذرات فلزی می‌توانند با فعال‌سازی مسیرهای التهابی باعث جذب ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها شوند.

در جمع بندی نهایی، نتایج مطالعه حاضر تأکید می‌کند که ترکیب نانوذرات آهن و سelenium در دوزهای بهینه (۱۰۰ میلی گرم آهن + ۱ میلی گرم سelenium در کیلوگرم جیره غذایی) نه تنها ایمن است، بلکه می‌تواند جایگزین جیره‌های معمولی بدون افزودنی شود و در بهبود سلامت بلندمدت ماهی مؤثر باشد. با وجود این، استفاده از دوزهای بالاتر آهن (۲۰۰ میلی گرم در کیلوگرم جیره غذایی) حتی با وجود سelenium، به دلیل افزایش خطر نکروز و التهاب، توصیه نمی‌شود.

منابع

- Abd El-Kader, M.F., Fath El-Bab, A.F., Abd-Elghany, M.F., Abdel-Warith, A.W.A., Younis, E.M., Dawood, M.A. 2021. Selenium nanoparticles act potentially on the growth performance, hemato-biochemical indices, antioxidative, and immune-related genes of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Biological Trace Element Research 199: 3126-3134. DOI: 10.1007/s12011-020-02431-1
- Abdel Tawwab, M., Samir, F., Abd El-Naby, A.S., Monier, M.N. 2018. Antioxidative and immunostimulatory effect of dietary cinnamon nanoparticles on the performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) and its susceptibility to hypoxia stress and *Aeromonas hydrophila* infection. Fish & Shellfish Immunology 74: 19-25. DOI: 10.1016/j.fsi.2017.12.033.
- Abdel-Tawwab, M., Shukry, M., Farrag, F.A., El-Shafai, N.M., Dawood, M.A., Abdel-Latif, H.M. 2021. Dietary sodium butyrate nanoparticles enhanced growth, digestive enzyme activities, intestinal

جلوگیری می‌کند. این تعامل مثبت در ماهیان گرمابی مانند تیلاپیا نیز گزارش شده است (Ghazi et al. 2022). با وجود این، در گونه‌های حساس مانند فیلماهی، به نظر می‌رسد نسبت دقیق آهن به سelenium (مثلاً ۱:۱۰۰ در تیمار ۵) برای حفظ سلامت روده حیاتی است. این موضوع اهمیت تناسب دوز در فرمول جیره را برجسته می‌کند.

توجه به تفاوت‌های گونه شناسی در پاسخ به نانوذرات نیز حائز اهمیت است. اگرچه دیگر مطالعات بهبود ساختار روده با نانوذرات را نشان داده‌اند، در فیلماهی، حتی دوزهای پایین نانوذرات (مانند تیمار ۲ و ۳) باعث آسیب شدیدتر نسبت به شاهد شدند. این تفاوت ممکن است ناشی از حساسیت بالاتر گونه‌های خاویاری به نانوذرات یا تفاوت در متابولیسم معدنی باشد. برای مثال، ماهیان خاویاری به دلیل دوره پرورشی طولانی‌تر و فیزیولوژی گوارشی خاص، ممکن است به دوزهای پایین‌تر نانوذرات حساس‌تر باشند. آسیب‌های مشاهده‌شده در مطالعه حاضر (مانند نفوذ یاخته‌های التهابی و نکروز) ممکن

- histomorphometry, and transcription of growth-related genes in Nile tilapia juveniles. Aquaculture 536: 736467. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2021.736467.
- Antony Jesu Prabhu, P., Schrama, J.W., Kaushik, S.J. 2016. Mineral requirements of fish: a systematic review. Reviews in Aquaculture 8: 172-219. DOI: 10.1111/raq.12090.
- Behera, T., Swain, P., Rangacharulu, P.V., Samanta, M. 2014. Nano-Fe as feed additive improves the hematological and immunological parameters of fish *Labeo rohita* H. Applied Nanoscience 6: 687-694. DOI: 10.1007/s13204-013-0251-8.
- Bhattacharyya, A., Reddy, S.J., Hasan, M.M., Adeyemi, M.M., Marye, R.R., Naika, H. 2015. Nanotechnology-a unique future technology in aquaculture for the food security. International Journal of Bioassays 4: 4115-4126.
- Brigelius-Flohé, R., Maiorino, M. 2013. Glutathione peroxidases. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects

- 1830: 3289-3303. DOI: 10.1016/j.bbagen.2012.11.020.
- Chris, U.O., Singh, N., Agarwal, A. 2018. Nanoparticles as feed supplement on growth behaviour of cultured catfish (*Clarias gariepinus*) fingerlings. Materials Today: Proceedings 5: 9076-9081. DOI: 10.1016/j.matpr.2017.10.023.
- Dawood, M.A., Zommara, M., Eweedah, N.M., Helal, A.I. 2020a. The evaluation of growth performance, blood health, oxidative status and immune-related gene expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed dietary nanoselenium spheres produced by lactic acid bacteria. Aquaculture 515: 734571. DOI: 10.1016/j.aquaculture.734571.
- Dawood, M.A., Eweedah, N.M., Moustafa, E.M., El-Sharawy, M.E., Soliman, A.A., Amer, A.A., Atia, M.H. 2020b. Copper nanoparticles mitigate the growth, immunity, and oxidation resistance in common carp (*Cyprinus carpio*). Biological Trace Element Research 198: 283-292. DOI: 10.1007/s12011-020-02068-0.
- Dawood, M.A., Zommara, M., Eweedah, N.M., Helal, A.I. 2020c. Synergistic effects of selenium nanoparticles and vitamin E on growth, immune-related gene expression, and regulation of antioxidant status of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Biological Trace Element Research 195: 624-635. DOI: 10.1007/s12011-019-01857-6.
- El-Sharawy, M.E., Hamouda, M., Soliman, A.A., Amer, A.A., El-Zayat, A.M., Sewilam, H., Younis, E.M., Abdel-Warith, A.W.A., Dawood, M.A. 2021. Selenium nanoparticles are required for the optimum growth behavior, antioxidative capacity, and liver wellbeing of Striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). Saudi Journal of Biological Sciences 28: 7241-7247. DOI: 10.1016/j.sjbs.2021.08.023.
- Ghaniem, S., Nassef, E., Zaineldin, A.I., Bakr, A., Hegazi, S. 2022. A comparison of the beneficial effects of inorganic, organic, and elemental nano-selenium on Nile tilapia: growth, immunity, oxidative status, gut morphology, and immune gene expression. Biological Trace Element Research 200: 5226-5241. DOI: 10.1007/s12011-021-03075-5.
- Ghazi, S., Diab, A. M., Khalafalla, M. M., Mohamed, R. A. 2022. Synergistic effects of selenium and zinc oxide nanoparticles on growth performance, hemato-biochemical profile, immune and oxidative stress responses, and intestinal morphometry of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Biological Trace Element Research 200: 364-374. DOI: 10.1007/s12011-021-02631-3.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M. 2015. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, Oxford, New York, 823 p.
- Hung, S.S., Groff, J.M., Lutes, P.B., Fynn-Aikins, F.K. 1990. Hepatic and intestinal histology of juvenile white sturgeon fed different carbohydrates. Aquaculture 87: 349-360. DOI: 10.1016/0044-8486(90)90072-U
- Ibrahim, M.S., El-gendy, G.M., Ahmed, A.I., Elharoun, E.R., Hassaan, M.S. 2021. Nanoselenium versus bulk selenium as a dietary supplement: Effects on growth, feed efficiency, intestinal histology, haemato-biochemical and oxidative stress biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758) fingerlings. Aquaculture Research 52: 5642-5655. DOI: 10.1111/are.15439.
- Iheanacho, S.C., Ikwo, N., Igweze NO, Chukwuidha C, Ogueji EO, Onyeneke R. 2018. Effect of different dietary inclusion levels of melon seed (*Citrullus lanatus*) peel on growth, haematology and histology of *Oreochromis niloticus* juvenile. Turkish Journal of Fisheries and

- Aquatic Sciences 18: 377-384. DOI: 10.4194/1303-2712-v18_3_03.
- Kazemi E, Sourinejad I, Ghaedi A, Johari SA, Ghasemi Z. 2020. Effect of different dietary zinc sources (mineral, nanoparticulate, and organic) on quantitative and qualitative semen attributes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 515: 734529. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2019.734529.
- Khalil, H.S., Maulu, S., Verdegem, M., Abdel-Tawwab, M. 2023. Embracing nanotechnology for selenium application in aquafeeds. Reviews in Aquaculture 15: 112-129. DOI: 10.1111/raq.12705.
- Khosravi-Katuli, K., Prato, E., Lofrano, G., Guida, M., Vale, G., Libralato, G. 2017. Effects of nanoparticles in species of aquaculture interest. Environmental Science and Pollution Research 24: 17326-17346. DOI: 10.1007/s11356-017-9360-3.
- Kord, M.I., Srour, T.M., Farag, A.A., Omar, E.A., Nour, A.M., Khalil, H.S. 2021. The immunostimulatory effects of commercial feed additives on growth performance, non-specific immune response, antioxidants assay, and intestinal morphometry of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Frontiers in Physiology 12: 111. DOI: 10.3389/fphys.2021.627499.
- Lall, S.P. 2002. The minerals. In: Hardy, R.H., Halver, J.E. (Eds.). Fish Nutrition, 3rd edn. Academic Press, San Diego, CA, USA, 259-308.
- Mohammady, E.Y., Elashry, M.A., Ibrahim, M.S., Elarian, M., Salem, S.M., El-Haroun, E.R., Hassaan, M.S. 2024. Nano iron versus bulk iron forms as functional feed additives: growth, body indices, hematological assay, plasma metabolites, immune, anti-oxidative ability, and intestinal morphometric measurements of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Biological Trace Element Research 202: 787-799. DOI: 10.1007/s12011-023-03708-x.
- Nair, M., Jayant, R.D., Kaushik, A., Sagar, V. 2016. Getting into the brain: Potential of nanotechnology in the management of NeuroAIDS. Advanced Drug Delivery Reviews 103: 202-217. DOI: 10.1016/j.addr.2016.02.008.
- Nasr-Eldahan, S., Nabil-Adam, A., Shreadah, M.A., Maher, A.M., Ali, TE-S. 2021. A review article on nanotechnology in aquaculture sustainability as a novel tool in fish disease control. Aquaculture International 29: 1-22. DOI: 10.1007/s10499-021-00677-7.
- National Research Council (NRC). 2011. Nutrient requirements of fish and shrimp. National Academy Press. Washington: DC., 392 p.
- Stankus, A. 2021. State of world aquaculture 2020 and regional reviews: FAO webinar series. FAO Aquaculture Newsletter 63: 17-18.
- Ogunji, J.O., Nimptsch, J., Wiegand, C., Schulz, C., Rennert, B. 2011. Effect of housefly maggot meal (maggot) diets on catalase, and glutathione S-transferase in the liver and gills of carp *Cyprinus carpio* fingerling. International Aquatic Research 3: 11-20.
- Papanikolaou, G., Pantopoulos, K. 2005. Iron metabolism and toxicity. Toxicology and Applied Pharmacology 202: 199-211. DOI: 10.1016/j.taap.2004.06.021.
- Ramsden, S.R., Smith, T.J., Shaw, B.J. Handy, R.D. 2009. Dietary exposure to titanium dioxide nanoparticles in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): No effect on growth, but subtle biochemical disturbances in the brain. Ecotoxicology 18: 939-951. DOI: 10.1007/s10646-009-0357-7.
- Saffari, S., Keyvanshokooh, S., Zakeri, M., Johari, S.A., Pasha-Zanoosi, H., Mozanzadeh, M.T. 2018. Effects of dietary organic, inorganic, and

- nanoparticulate selenium sources on growth, hemato-immunological, and serum biochemical parameters of common carp (*Cyprinus carpio*). *Fish Physiology and Biochemistry* 44: 1087-1097. DOI: 10.1007/s10695-018-0496-y.
- Schwaiger, J., Wanke, R., Adam, S., Pawert, M., Honnen, W., Triebkorn, R. 1997. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* 6: 75-86.
- Shenkin, A. 2006. Micronutrients in health and disease. *Postgraduate Medical Journal* 82: 559-567. DOI: 10.1136/pgmj.2006.047670.
- Shi, J., Votruba, A.R., Farokhzad, O.C., Langer, R. 2010. Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: from discovery to applications. *Nano Letters* 10: 3223-30. DOI: 10.1021/nl102184c.
- Terova, G., Rimoldi, S., Izquierdo, M., Pirrone, C., Ghrab, W., Bernardini, G. 2018. Nano-delivery of trace minerals for marine fish larvae: influence on skeletal ossification, and the expression of genes involved in intestinal transport of minerals, osteoblast differentiation, and oxidative stress response. *Fish Physiology and Biochemistry* 44: 1375-1391. DOI: 10.1007/s10695-018-0528-7.
- Wang, H., Zhu, H., Wang, X., Li, E., Du, Z., Qin, J., Chen, L. 2018. Comparison of copper bioavailability in copper-methionine, nano-copper oxide and copper sulfate additives in the diet of Russian sturgeon *Acipenser gueldenstaedtii*. *Aquaculture* 482: 146-154. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2017.09.037.
- Wang, Y., Yan, X., Fu, I. 2013. Effect of selenium nanoparticles with different sizes in primary cultured intestinal epithelial cells of crucian carp, *Carassius auratus gibelio*. *International Journal of Nano Medicine* 8: 4007-4013. DOI: 10.2147/IJN.S43691.
- Watanabe, T., Kiron, V., Satoh, S. 1997. Trace mineral in fish nutrition. *Aquaculture* 151: 185-207. DOI: 10.1016/S0044-8486(96)01503-7.