فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال نهم، شماره چهارم، زمستان ۱۴۰۰

مقاله پژوهشی

اثر سمیت نیترات نقره بر برخی شاخص‌های خونی ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) تغذیه شده با سطوح مختلف پربیوتیک قارچ صدفی (*Pleurotus ostreatus*)

فرحناز کاکاوند[۱]، عاطفه ایری[۲]، مریم رضایی شادگان[۱]*، مسعود بیگدلی[۳]، دانیال حیدرزاده برزگر[۳]، وحید زمانی[۴،۵]، محسن برخوردار[۶]، پریا هوشمند[۷]، اسماعیل زارع مهرآبادی[۸]، سید علی اکبر هدایتی[۹]

تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۹ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۴۰۰

چکیده

هدف از انجام این مطالعه، تعیین تاثیر سطوح مختلف پربیوتیک قارچ صدفی (*Pleurotus ostreatus*) بر شاخص‌های خونی ماهی تیلاپیای نیل مواجهه شده با نیترات نقره بود. به همین منظور، ۱۲۰ قطعه بچه ماهی تیلاپیا به مدت ۴۲ روز در ۴ تیمار با جیره‌های حاوی ۰ (تیمار ۱، شاهد)، ۰/۰۵ (تیمار ۲)، ۰/۱ (تیمار ۳) و ۰/۲ (تیمار ۴) درصد پربیوتیک قارچ صدفی تغذیه شدند. سپس به هرکدام از گروه‌ها ۰/۵ppm نیترات نقره به مدت ۱۶ روز اضافه شد. شاخص‌های خونی ماهیان در تیمارهای مختلف قبل و بعد از قرارگیری در معرض نیترات نقره ارزیابی شد. پربیوتیک به تنهایی اثر معنی‌داری بر RBC، MCV، هماتوکریت و هموگلوبین نداشت (P<۰/۰۵)، ولی تیمارهای تغذیه شده با پربیوتیک و مواجهه با سم نیترات نقره افزایش شاخص‌های WBC، MCHC (در تیمارهای ۰/۱ و ۰/۲)و MCH را نسبت به گروه شاهد نشان دادند. طبق نتایج به دست آمده، پربیوتیک در روش خوراکی، ایمنی غیراختصاصی را در ماهی تیلاپیا تحریک کرد و استفاده از پربیوتیک قارچ اثرات تخریبی ناشی از سم نیترات نقره را بر شاخص‌های خونی کاهش داد. در مجموع، سطوح ۰/۱ و ۰/۲ درصد پربیوتیک قارچ صدفی در تیمارهایی که در معرض ۰/۵ppm سم نیترات نقره بودند، توانست سبب بهبود وضعیت شاخص‌های خونی ماهی تیلاپیا شود.

واژگان کلیدی: *پربیوتیک، نیترات نقره، ماهی تیلاپیا، شاخص‌های خونی.*

۱- دانشجوی دکتری تکثیر و پرورش آبزیان، گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
۲- دانشجوی دکتری بوم شناسی آبزیان، گروه تولید و بهره‌برداری آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
۳- کارشناس ارشد شیلات، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی امام حسن مجتبی(ع)، دانشگاه صنعتی خاتم الانبیاء (ص) بهبهان، بهبهان، ایران.
۴- استادیار گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.
۵- استادیار گروه پژوهشی مطالعات محیطی دریاچه زریبار، پژوهشکده کردستان‌شناسی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.
۶- استادیار پژوهشی گروه علوم دامی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، مشهد، ایران.
۷- دانشجوی دکتری صید و بهره‌برداری آبزیان، گروه تولید و بهره‌برداری آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
۸- کارشناس ارشد بوم‌شناسی دریا، دانشکده محیط زیست، دانشگاه تهران، کرج، ایران.
۹- استاد گروه تولید و بهره‌برداری آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
* نویسنده مسئول: rezaie.m26@gmail.com

مقدمه

پرورش در اکوسیستم‌های آبی همواره با مشکلاتی مواجه است که یکی از آن‌ها وجود آلاینده‌ها است. ورود پساب‌های صنعتی، کشاورزی و شهری بدون هیچ تصفیه‌ای به محیط آبی سبب آلودگی این اکوسیستم می‌شود. ورود آلاینده‌ها از منابع مختلف صنعتی و بهداشتی به اکوسیستم‌های آبی می‌تواند تعادل آن‌ها را بر هم زند و اکوسیستم‌ها را در معرض خطر نابودی قرار دهد. این آلاینده‌ها در نهایت می‌توانند وارد زنجیره غذایی و بدن انسان شوند و آسیب‌های ایمنی زیادی را در پی داشته باشند (هدایتی و همکاران، ۱۳۹۲). از این رو، شناخت اثرات متقابل عوامل استرس‌زا و اثرات آسوء آن‌ها بر جوامع زیستی، متخصصین امر را در تعیین استانداردهای محدود کننده و اثرات فلزات و دیگر آلاینده‌ها بر مکانیسم‌های زیستی و فیزیولوژیکی موجودات و در نهایت حفاظت از محیط‌زیست یاری می‌کند. سمیت یک ماده، به قابلیت ذاتی آن ماده در صدمه زدن به موجود زنده اطلاق می‌شود. نیترات نقره به عنوان عامل ایجاد کننده گروه‌های فعال اکسیژنی (ROS) شناخته شده است و به وسیله مکانیسم‌های متنوع شامل برهم‌کنش با گروه‌های سولفیدریل، پروتئین‌ها و آنزیم‌ها به سلول آسیب می‌رساند (تربالی و همکاران، ۱۳۹۱). نقره دارای خواص فیزیکی و شیمیایی ویژه‌ای است و به همین دلیل در مصارف بهداشتی، دارویی، نوری و الکترونیکی کاربرد دارد. یون نقره دارای اثر ضدباکتریایی است و برای طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها بالاترین درجه سمیت را دارد. این یون به صورت طبیعی در آب‌های سطحی وجود دارد و فعالیت‌های بشری سبب افزایش سطوح نقره در اکوسیستم‌های آبی می‌شود. مقصد نهایی تمام آلاینده‌ها، محیط آبی است و در این محیط، ماهی‌ها در بالاترین سطح زنجیره غذایی قرار دارند که یکی از شاخص‌های آلودگی هستند (ابرقویی و همکاران، ۱۳۹۵).

توسعه روزافزون آبزی‌پروری در بسیاری از مناطق دنیا منجر به افزایش تقاضا برای به کارگیری مواد شیمیایی جدید شده است. به گونه‌ای که در سال‌های اخیر استفاده از مواد شیمیایی و ترکیبات صنعتی تحت مطالعات دقیق قرار گرفته‌اند تا از نظر جنبه‌های اقتصادی و دامنه سلامتی طبقه‌بندی و در آبزی‌پروری مورد استفاده قرار گیرند. از جمله این ترکیبات شیمیایی پربیوتیک‌ها (Prebiotics) هستند. پربیوتیک ماده غذایی غیرقابل هضمی است که در اثر تخمیر به اسیدهای چرب زنجیره کوتاه

تبدیل می‌شود و از طریق تحریک رشد و فعالیت یک یا تعداد محدودی از باکتری‌های موجود در روده اثرات سودمندی برای میزبان دارد و سلامتی میزبان را بهبود می‌بخشد (Mahious et al., 2005). استفاده از پربیوتیک‌ها موجب بهبود عملکرد ایمنی، فیزیولوژی روده و کاهش پاسخ‌های آلرژیک می‌شود (Douglas and Sander, 2008). در طی سال‌های گذشته استفاده از پربیوتیک و دیگر افزودنی‌ها (که در بالا بردن ایمنی مصرف‌کنندگان نقش اساسی داشته‌اند) افزایش یافته است. به طوری که اثرات مثبت و فراوان این مواد در انواع جانداران ثابت شده است. افزایش تحریک پاسخ‌های ایمنی به وسیله مکمل‌های غذایی مانند قارچ خوراکی می‌تواند از اهمیت بالایی در منابع آبی برخوردار باشد. این مکمل‌های غذایی می‌توانند به طور مستقیم سازوکارهای دفاعی اولیه را از طریق اثر برگیرنده‌ها و ژن‌های مسئول فعال سازند. تمام پژوهش‌هایی که روی قارچ‌ها صورت گرفته است، آن‌ها را به علت داشتن شمار زیادی از ترکیبات فعال زیستی به عنوان یک مکمل غذایی طبیعی مورد تایید قرار داده‌اند (Wasser, 2002). ارزیابی شاخص‌های خون یکی از شاخص‌های مهم و قابل اطمینان در تعیین وضعیت سلامتی و کنترل زیستی آبزیان است (کیخسروی و همکاران، ۱۳۸۹؛ Orum et al., 2003). تغییرات شاخص‌های خونی دلالت بر تغییرات نامطلوب کیفیت آب محیط دارد و این تغییر مقادیر با افزایش یا کاهش برخی از شاخص‌های خونی در ایجاد بیماری تاثیرگذار است (حیدری و همکاران، ۱۳۹۲؛ Verma et al., 1982). شاخص‌های خونی ماهیان به منظور توصیف سلامت آنها در پاسخ به عوامل تنش‌زا به کار برده می‌شود و در واقع رابطه سیستماتیک و سازگاری فیزیولوژیک موجودات را در برابر این عوامل پیش‌بینی می‌کند (Soivio and Oikari, 1976). بنابراین، پروفایل خون می‌تواند اطلاعات مهمی را در مورد وضعیت فیزیولوژیکی ماهی ارائه دهد و به منظور ارزیابی اثرات سوء آفت‌کش‌ها استفاده شود (Dogan and Can, 2011). به طور کلی، درباره اثر پربیوتیک‌ها بر شاخص‌های خونی ماهیان، در مقایسه با شاخص‌های رشد و تغذیه، مطالعات گسترده‌ای انجام نشده است. در این باره مطالعاتی بر گونه‌های تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*) توسط Hisano و همکاران (۲۰۰۷)، راهو (*Labeo rohita*) توسط Andrews و همکاران (۲۰۰۹) و کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) توسط رازقی منصور و همکاران (۱۳۹۴) انجام شده است. به طور کلی،

یکی از تاثیرات احتمالی پربیوتیک‌ها افزایش عملکرد ایمنی است.

تیلاپیا از راسته سوف‌ماهیان و خانواده Cichlidae است که به علت رشد سریع و پرورش ساده و ارزان مورد توجه بسیاری از کشورهای جهان قرار گرفته است. یکی از مهم‌ترین گونه‌های پرورشی آن، تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) است.

کیفیت نامناسب آب و وجود آلاینده‌هایی همچون نیترات نقره در اکوسیستم‌های آبی موجب تنش در ماهیان می‌شود و با کاهش عملکرد ایمنی ماهیان سبب به خطر افتادن سلامتی آن‌ها شود. از این رو، با توجه به ورود فلزات سنگین به اکوسیستم‌های آبی به عنوان آلاینده و همچنین با توجه به اثرات مثبت پربیوتیک قارچ صدفی (*Pleurotus ostreatus*) بر بهبود ایمنی ناشی از اثرات سمیت مواد آلاینده بر عملکرد بافتی، افزایش رشد و برخی از شاخص‌های زیستی آبزیان مانند شاخص‌های خونی و بافتی، در مطالعه حاضر به بررسی جنبه‌های خون‌شناسی اثرات نیترات نقره بر ماهی تیلاپیای نیل پرداخته شد و این فرضیه که احتمال کاهش اثرات نیترات با پربیوتیک قارچ صدفی وجود دارد، نیز مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه ماهیان و شرایط نگهداری

این پژوهش در سالن آبزی‌پروری شهید ناصر فضلی برآبادی دانشکده شیلات دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. بچه ماهیان تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) با محدوده وزنی حدود ۲۰ گرم از مرکز خصوصی تکثیر و پرورش پاکنژاد بجنورد تهیه شد و پس از انتقال به مدت یک هفته، سازگاری اولیه صورت پذیرفت. پس از عادت‌دهی، بچه ماهی‌ها با تراکم ۱۰ قطعه در مخازن فایبرگلاس ۱۰۰ لیتری ذخیره‌سازی شدند. ماهیان با غذای تجاری کپور (فرادانه، ایران) به عنوان جیره پایه به میزان ۳ درصد وزن بدن در ۲ نوبت (صبح و عصر) تغذیه شدند (ریکی و همکاران، ۱۳۹۸). درصد ترکیبات تشکیل دهنده جیره پایه در جدول ۱ ارائه شده است.

در طی دوره آزمایش شاخص‌های فیزیکوشیمیایی آب شامل اکسیژن محلول در محدوده ۹-۷ میلی‌گرم در لیتر و دمای در محدوده ۲۸-۲۵ درجه سلسیوس (به وسیله هیتر و دماسنج) ثابت نگه داشته شد.

جدول ۱: اجزا و ترکیبات شیمیایی جیره پایه

اجزای جیره	درصد (ماده خشک)
آرد گندم	۸/۱۴
آرد سویا	۲۵/۰۶۸
آرد ذرت	۱/۳۳۴
آرد جو	۱۸/۰۲۶
بذر کتان	۱۰/۵۱
پودر ماهی	۹/۹۱۵
روغن ذرت	۰/۰۱۷
روغن آفتابگردان	۰/۰۳۵
منوکلسیم فسفات	۲
روغن کانولا	۰/۱۰۸
روغن ماهی	۰/۱۳۳
نشاسته	۲۱/۷۱۴
لسیتین	۱
مکمل معدنی	۲
ترکیب شیمیایی جیره	
پروتئین خام	۲۵
چربی خام	۴
کربوهیدرات خام	۵۶

جیره آزمایشی در این پژوهش حاوی پربیوتیک به عنوان مکمل غذایی بود که به این منظور از قارچ صدفی (*Pleurotus ostreatus*) استفاده شد. قارچ‌های (پارس قارچ، ایران) تهیه شده، به علت میزان بالای آب موجود در آنها به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری شدند و سپس در آون (Binder، آلمان) با دمای ۴۵ درجه سلسیوس به مدت ۲ روز خشک شدند. در آخر قارچ‌ها آسیاب (Parses، ایران) و برای تهیه جیره غذایی استفاده شدند (Sevik et al., 2013). مطالعه حاضر در ۴ تیمار با سه تکرار شامل تیمار (۱) شاهد، جیره پایه فاقد پربیوتیک قارچ صدفی، تیمار (۲) جیره پایه حاوی ۰/۰۵ درصد پربیوتیک قارچ صدفی، تیمار (۳) جیره پایه حاوی ۰/۱ درصد پربیوتیک قارچ صدفی، تیمار (۴) جیره پایه حاوی ۰/۲ درصد پربیوتیک قارچ صدفی به مدت ۴۲ روز تغذیه شدند. سپس همه تیمارها به مدت ۱۶ روز در معرض سم نیترات نقره (Sigma، آمریکا) با غلظت ۰/۵ قسمت در میلیون قرار گرفتند (هدایتی و همکاران، ۱۳۹۲). همچنین لازم به یادآوری است که تعویض آب روزانه به میزان ۵۰ درصد حجم مخازن با حفظ غلظت سم در هر تیمار (با استفاده از رابطه ۱)، صورت می‌گرفت.

رابطه ۱:

$$M1V1= M2V2$$

M: جرم؛ V: حجم.

نمونه‌گیری و خون‌گیری

نمونه‌گیری از ماهیان قبل و بعد از مواجهه با نیترات نقره صورت گرفت. ۲۴ ساعت قبل از خون‌گیری تغذیه ماهیان قطع شد. سپس از هر

تکرار سه ماهی به ظاهر سالم، به طور تصادفی انتخاب شد و از سیاهرگ ساقه دمی آنها با سرنگ ۲/۵ میلی‌لیتری هپارینه خون‌گیری به عمل آمد (Brown, 1988).

بررسی شاخص‌های خونی

به منظور انجام آزمایش‌های خونشناسی، شمارش تعداد گلبول‌های قرمز (RBC) و سفید (WBC) پس از رقیق‌سازی نمونه خون با محلول ریس، با استفاده از لام هموسیتومتر انجام شد. هماتوکریت (PVC) بر اساس روش میکروهماتوکریت و هموگلوبین (Hb) بر اساس روش Sahli تعیین شد. مقادیر حجم متوسط گلبولی (MCV)، مقدار متوسط هموگلوبین سلولی (MCH) و میانگین غلظت هموگلوبین گلبول‌های قرمز (MCHC) بر اساس رابطه‌های استاندارد ۲ تا ۴ محاسبه شد (Kakavand et al., 2020).

رابطه ۲:

$$MCV\ (fL) = [PCV\ (\%) / RBC\ (\times 10^{-6}/mm^3)] \times 10$$

رابطه ۳:

$$MCH\ (pg) = [Hb\ (g/dL) / RBC\ (\times 10^{-6}/mm^3)] \times 10$$

رابطه ۴:

$$MCHC\ (g/dL) = [Hb\ (g/dL) / PCV\ (\%)] \times 100$$

تجزیه و تحلیل آماری

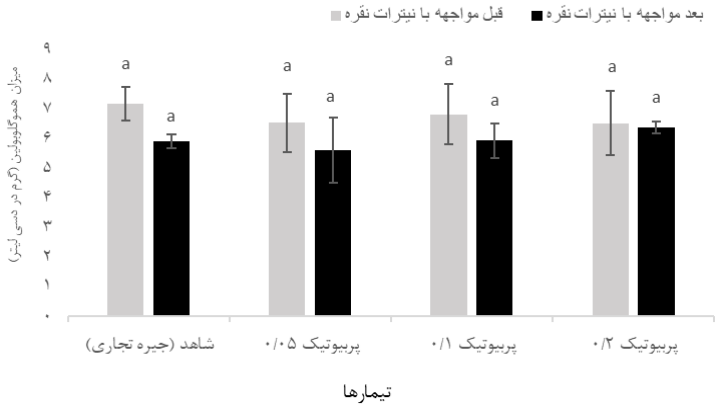
این آزمایش در قالب یک طرح کاملا تصادفی برنامه‌ریزی و اجرا شد. پس از ثبت داده‌ها همگنی آنها با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov بررسی شد. برای مقایسه بین تیمارها و نیز بررسی وجود اختلاف معنی‌دار بین آنها از آزمون تحلیل واریانس دوطرفه (Multiple ANOVA) و پس‌آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncan's Multiple-Range Test) در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P<۰/۰۵$) استفاده شد. تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS (ویرایش ۲۰) و ترسیم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Microsoft Excel 2007 انجام شد.

نتایج

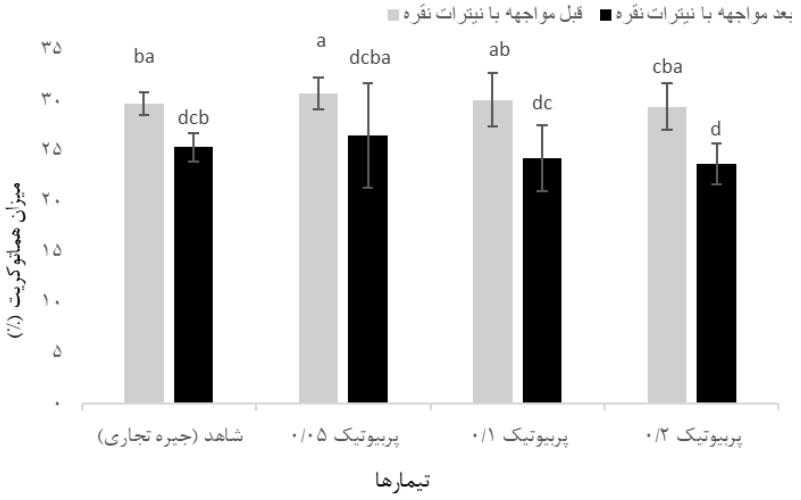
نتایج نشان داد که پربیوتیک قارچ صدفی به تنهایی اثر معنی‌داری بر شاخص هموگلوبین (HB) خون ماهی تیلاپیای نیل نداشت. اما بعد از مواجهه با سم (نیترات نقره) در تیمارهایی که پربیوتیک دریافت کرده بودند، مقدار این شاخص نسبت به شاهد (بدون دریافت پربیوتیک) کاهش داشت (شکل ۱). تیمار با پربیوتیک به تنهایی اثر معنی‌داری بر شاخص‌های هماتوکریت و RBC خون نداشت.

اما بعد از مواجهه با نیترات نقره در تیمارهایی که پربیوتیک دریافت کرده بودند، مقدار شاخص‌های هماتوکریت در تیمارهای ۳ و ۴ (به ترتیب ۰/۱ و ۰/۲ درصد پربیوتیک) و RBC در هر سه تیمار پربیوتیک نسبت به شاهد کاهش داشت (شکل‌های ۲ و ۳). مقدار شاخص MCHC در تیمارهای پربیوتیک به تنهایی کاهش یافت. اما بعد از مواجهه با نیترات نقره در تیمارهایی که پربیوتیک دریافت کرده بودند، مقدار این شاخص در تیمارهای ۳ و ۴ نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری مشاهده شد (شکل ۴). تیمار با پربیوتیک به تنهایی اثر معنی‌داری بر شاخص MCV خون نداشت. اما بعد از مواجهه با نیترات نقره در تیمارهایی که پربیوتیک دریافت کرده بودند، مقدار این شاخص نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری داشت (شکل ۵). مقدار شاخص MCH در تیمارهای پربیوتیک به تنهایی تغییر معنی‌داری نداشت. اما بعد از مواجهه با نیترات نقره در تیمارهایی که پربیوتیک دریافت کرده بودند، مقدار این شاخص در تیمارهای ۳ و ۴ نسبت به شاهد افزایش یافت، به طوری که این افزایش در تیمار ۴ (غلظت ۰/۲ درصد پربیوتیک) معنی‌دار بود (شکل ۶).

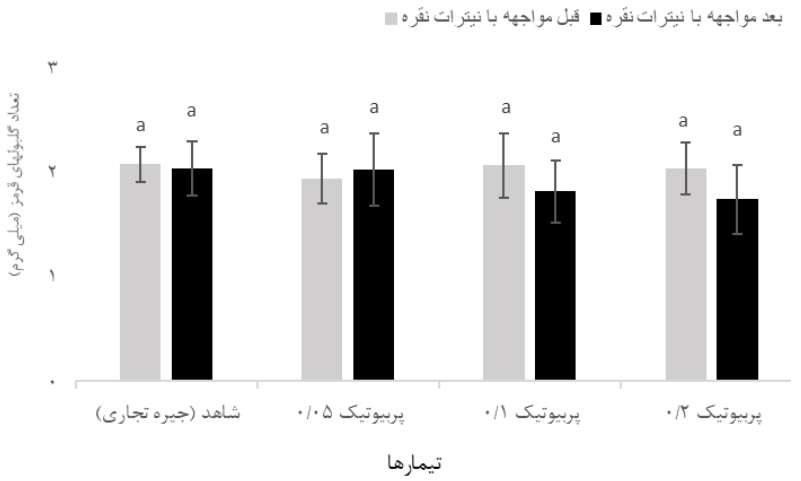
در تیمار با پربیوتیک به تنهایی و همچنین بعد از مواجهه با نیترات نقره در تیمارهایی که پربیوتیک دریافت کرده بودند، افزایش معنی‌داری در شاخص WBC مشاهده شد، به طوری که در غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۱ درصد پربیوتیک این افزایش معنی‌دار بود (شکل ۷).



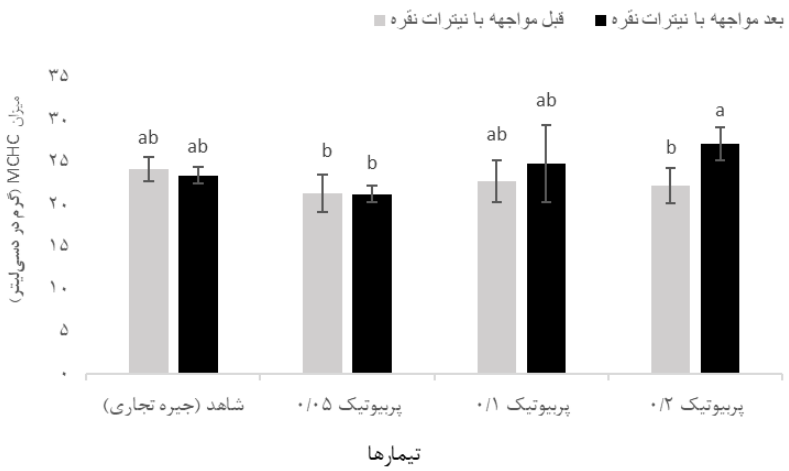
شکل ۱: تغییرات سطوح هموگلوبین خون ماهی تیلاپیای نیل در تیمارهای مختلف پربیوتیک قبل و بعد از مواجهه با سم نیترات نقره (میانگین ± خطای استاندارد). اختلاف معناداری بین تیمارها مشاهده نشد (P>۰/۰۵).



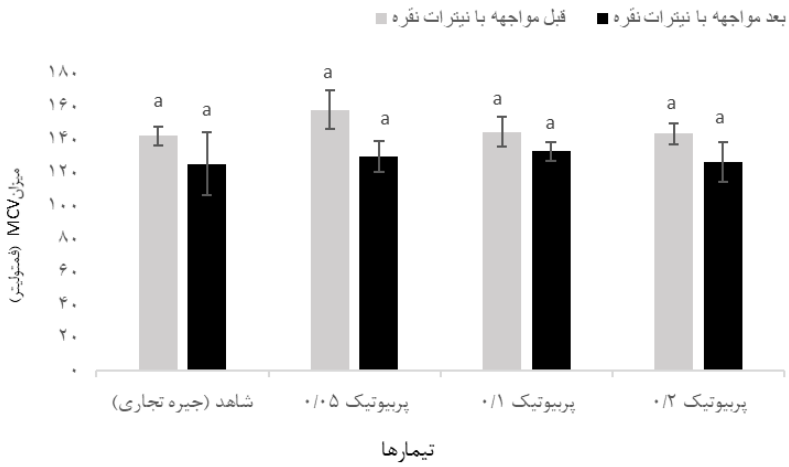
شکل ۲: تغییرات میزان هماتوکریت خون ماهی تیلاپیای نیل در تیمارهای مختلف پربیوتیک قبل و بعد از مواجهه با سم نیترات نقره (میانگین ± خطای استاندارد). حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنادار بین تیمارها است (P<۰/۰۵).



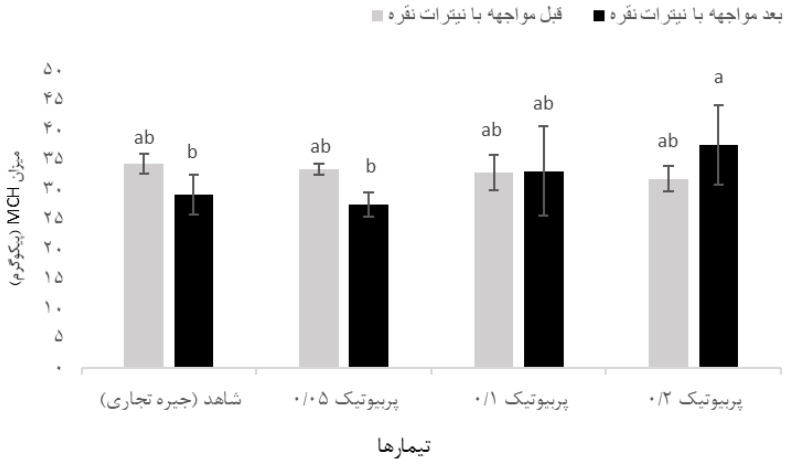
شکل ۳: تغییرات تعداد گلبول‌های قرمز در خون ماهی تیلاپیای نیل در تیمارهای مختلف پربیوتیک قبل و بعد از مواجهه با سم نیترات نقره (میانگین ± خطای استاندارد). اختلاف معناداری بین تیمارها مشاهده نشد (P>۰/۰۵).



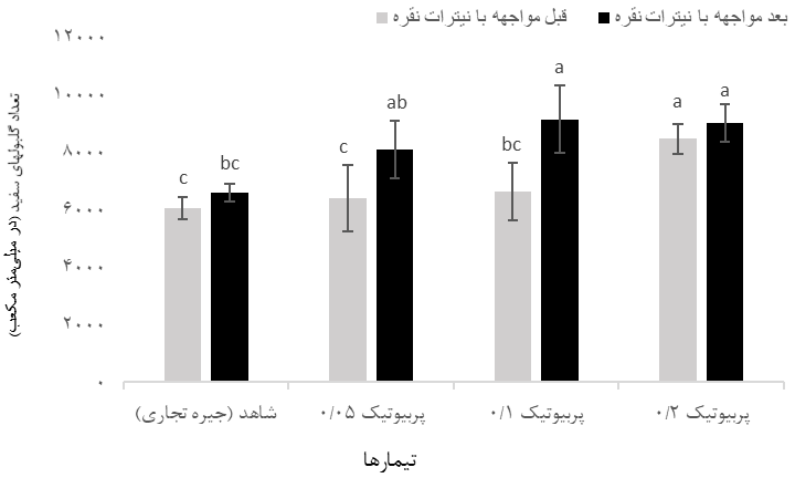
شکل ۴: تغییرات غلظت متوسط هموگلوبین در گلبول‌های قرمز (MCHC) ماهی تیلاپیای نیل در تیمارهای مختلف پربیوتیک قبل و بعد از مواجهه با سم نیترات نقره (میانگین ± خطای استاندارد). حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معناداری بین تیمارها است (P<۰/۰۵).



شکل ۵: تغییرات حجم متوسط گلبول‌های قرمز (MCV) ماهی تیلاپیای نیل در تیمارهای مختلف پربیوتیک قبل و بعد از مواجهه با سم نیترات نقره (میانگین ± خطای استاندارد). اختلاف معناداری بین تیمارها مشاهده نشد (P>۰/۰۵).



شکل ۶: تغییرات متوسط هموگلوبین در گلبول‌های قرمز (MCH) ماهی تیلاپیای نیل در تیمارهای مختلف پربیوتیک قبل و بعد از مواجهه با سم نیترات نقره (میانگین ± خطای استاندارد). حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معناداری بین تیمارها است (P<۰/۰۵).



شکل ۷: تغییرات تعداد گلبول‌های سفید خون ماهی تیلاپیای نیل در تیمارهای مختلف پربیوتیک قبل و بعد از مواجهه با سم نیترات نقره (میانگین ± خطای استاندارد). حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معناداری بین تیمارها است (P<۰/۰۵).

بحث

امروزه در صنعت آبزی‌پروری استفاده از انواع ترکیبات پروبیوتیکی، پربیوتیکی و سین‌بیوتیکی به طورگسترده‌ای رواج یافته است. این ترکیبات با تاثیرات مثبت خود بر رشد و مقاومت بدن میزبان و همچنین در برخی موارد به عنوان جایگزین مناسب آنتی‌بیوتیک و واکسیناسیون مورد استفاده قرار می‌گیرد. اکثر مطالعات پربیوتیک‌ها در آبزیان با شاخص‌های رشد مانند ضریب رشد ویژه، ضریب تبدیل غذایی و شاخص‌های ایمنی سنجیده شده است و مطالعات خونشناسی بسیار کمی در ارتباط با تاثیرات پربیوتیک بر میزبان آبزی صورت پذیرفته است. زیست‌نشانگرها اغلب در بررسی فرآیندهای طبیعی زیستی، فرایندهای بیماری‌زا و یا پاسخ دارویی به یک درمان ویژه ارزیابی می‌شوند، از جمله مهم‌ترین شاخص‌های زیستی شاخص‌های خون‌شناسی، بیوشیمیایی، هورمونی و بافتی است (Van Der Oost et al., 2003). ورود فلزات سنگین و آلاینده‌ها به صورت مداوم و گسترده در اکوسیستم‌های آبی ذخایر ژنی آن‌ها را در معرض تهدید قرار می‌دهد و موجب کوچک شدن مبنای ژنی (Shrinking Genetic Base) و کاهش تنوع زیستی فون و فلور اکوسیستم می‌شود (Rahman et al., 2002). این فرایندها نهایتا برای انسان خطرآفرین هستند، چرا که انسان وابسته به غذاهای موجود در محیط‌های آبی از جمله ماهی‌ها هستند (Mellanby, 1967). آلاینده‌ها می‌توانند وارد رگ‌ها و بافت‌های بدن شوند و از این راه می‌توانند قابلیت دسترسی زیستی را افزایش دهند. این مسئله ممکن است منجر به تاثیرات سمی و پاسخ‌های التهابی در مغز و تخریب سیستم عصبی مرکزی شود (Irianto and Austine, 2002). با توجه به آلودگی محیط زیست آبزیان و افزایش روزافزون آلاینده‌ها در اکوسیستم‌های آبی و ایجاد عوارض و آسیب به آبزیان، مطالعه این اکوسیستم‌ها امری ضروری است (اکرمی و همکاران، ۱۳۹۰). تغییرات شاخص‌های خونی در ماهیان وابسته به شرایط محیط پرورش است. بیماری، نوع تغذیه، مکمل‌های غذایی، آلودگی، تغییرات دما، استرس و موارد دیگر می‌توانند در تغییر شاخص‌های خونی موثر باشند (Keiffer, 2000). پربیوتیک‌ها عمدتا به خاطر دارا بودن پلی‌ساکارید بتاگلوکان و اولیگوساکارید مانان باعث افزایش کارایی تغذیه، کاهش تلفات، بهبود ضریب تبدیل غذایی و افزایش مصرف غذا در موجودات می‌شوند (Pryor et al., 2003).

در مطالعه حاضر، ماهیان تحت تیمارهای پربیوتیک قارچ صدفی و مواجهه با نیترات نقره (ترکیبی) افزایشی را در شاخص‌های هماتوکریت، هموگلوبین و تعداد گلبول‌های سفید، MCHC و MCH نسبت به تیمارهای پربیوتیک به تنهایی و گروه شاهد نشان دادند. بیشترین شاخص هموگلوبین، MCHC، MCH، MCV و گلبول سفید در تیمار ترکیبی ۰/۲ و ۰/۱ درصد پربیوتیک قارچ خوراکی به همراه ۰/۵ppm سم نیترات نقره نشان داده شد. گلبول‌های سفید یکی از مهم‌ترین سلول‌هایی هستند که می‌توانند واکنش‌های ایمنی غیراختصاصی و اختصاصی را در ماهیان تحریک کنند (سلطانی، ۱۳۸۷). در مطالعه حاضر، تعداد گلبول‌های سفید در تیمارهای ترکیبی پربیوتیک قارچ صدفی و سم افزایشی را نسبت به گروه شاهد و تیمارهای پربیوتیک به تنهایی داشتند. تیمار حاوی ۰/۱ درصد پربیوتیک قارچ خوراکی به همراه ۰/۵ppm سم نیترات نقره دارای تعداد گلبول سفید بیشتری نسبت به تیمارهای دیگر بود که نشان دهنده تقویت سیستم ایمنی در ماهیان تغذیه شده با این استراتژی تغذیه‌ای است. افزایش تعداد گلبول سفید شاخص خوبی است و نشان دهنده افزایش توان ایمنی در برابر عوامل بیماری‌زای مهاجم است. چون در اثر استرس و طولانی شدن کمبود اکسیژن آب، تعداد گلبول سفید کاهش می‌یابد (کاظمی و همکاران، ۱۳۸۹). استرس نیز موجب تعداد گلبول سفید و قند خون را افزایش می‌دهد و در عوض موجب کاهش تعداد گلبول قرمز می‌شود. مشخص شده است که تعداد گلبول‌های قرمز و غلظت هموگلوبین تغییرات وابسته به گونه را از خود نشان می‌دهند. این تفاوت‌ها حتی می‌توانند فصلی باشند. بویژه تغییرات دما و غلظت اکسیژن محلول نیز روی این شاخص‌ها اثر می‌گذارند. با توجه به ثابت بودن شرایط محیطی و ماهی مورد آزمایش، می‌توان از تاثیر این عوامل بر تغییرات این شاخص در تیمارهای مختلف چشم‌پوشی کرد. گلبول‌های قرمز نقش مهمی در انتقال اکسیژن در بدن ایفا می‌کنند. مقادیر ناکافی گلبول‌های قرمز اثر منفی روی متابولیسم دارد و باعث کاهش پروتئین کل پلاسمای خون می‌شود (Stoskopf, 1993). علاوه بر این، میزان هموگلوبین و هماتوکریت نیز تابعی از تغییرات گلبول‌های قرمز هستند و رابطه مستقیم با آن دارند. استفاده از سطوح مختلف ۰ تا ۲ درصد پربیوتیک الیگوساکارید مانان (MOS) در ماهی تیلاپیای نیل جوان منجر به افزایش سطح گلبول سفید و تفاوت

معنی‌دار در شاخص‌های خونی در مقایسه با گروه شاهد نشد (Sado et al., 2008). Aly و همکاران (۲۰۰۸) افزایش میزان هماتوکریت را در تیلاپیای نیل تغذیه شده با پربیوتیک گزارش کردند. در بررسی شاخص‌های خونی ماهی کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) در مسمومیت با تریکلروفن که توسط نظیفی و همکاران (۱۳۸۰) انجام شد، نتایج نشان داد که بین گروه شاهد و تیمارهای دیگر در همه شاخص‌های خونی اختلاف معنی‌داری وجود داشت که این امر با افزایش غلظت مصرفی اتفاق افتاد. با افزایش سم در تعداد گلبول‌های سفید و قرمز ماهی کاهش معنی‌داری مشاهده شد (نظیفی و همکاران، ۱۳۸۰). نتایج بررسی شاخص‌های خون‌شناسی بچه فیل‌ماهی پرورشی در معرض سطوح مختلف پربیوتیک الیگوفروکتوز که توسط حسینی‌فر و همکاران (۱۳۹۰) انجام شد، نشان داد که افزودن سطوح مختلف پربیوتیک به جیره غذایی این ماهیان اثری بر تعداد گلبول‌های قرمز و سفید نداشت. همچنین Sado و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که افزودن سطوح ۰/۲ تا ۱ درصد پربیوتیک مانان اثری بر شاخص‌های خونی از جمله تعداد گلبول‌های سفید و قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین، MCV، MCH و MCHC نشان نداد. درباره مطالعات صورت گرفته ناشی از اثر نیترات نقره بر شاخص‌های خونی ماهی تیلاپیای نیل و ماهیان دیگر تاکنون مطالعه‌ای در ایران و در دنیا گزارش نشده است. اما در مطالعات دیگر، اثرات سموم و آلاینده‌های مختلف بر تغییرات شاخص‌های خونی و ضعیف شدن سیستم ایمنی بدن ماهیان مختلف به اثبات رسیده است که به عنوان مثال می‌توان به اثر سم دیازینون که از سموم متداول کشاورزی مورد استفاده در استان‌های شمالی کشور است، بر روی کپور ماهیان به صورت کاهش میزان هموگلوبین و هماتوکریت در ماهی کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*) ۸۵۰ گرمی، ماهی کپور علفخوار ۵ گرمی (شریعتی فیض‌آبادی، ۱۳۸۰) و در ماهی کپور معمولی (Sastry and Sharma, 1980) اشاره کرد که نتایج آن‌ها در رابطه با شاخص هموگلوبین با مطالعه حاضر همسو نبود ولی با شاخص هماتوکریت همخوانی داشت.

بر اساس یافته‌های به دست آمده در بررسی حاضر و یافته‌های دیگر پژوهشگران مشاهده می‌شود که شاخص‌های مانند عوامل محیطی (فصول سال، شوری، دوره نوری، دما، تراکم و غیره)، عوامل فیزیولوژیکی (گونه آبزی، چرخه تولیدمثلی، وضعیت بلوغ، سن، جنس و شرایط

تغذیه‌ای)، زمان نمونه‌گیری، چگونگی تهیه نمونه و دقت و حساسیت روش‌های اندازه‌گیری می‌توانند بر فعالیت‌های شاخص‌های خونی تاثیر بگذارند و باعث اختلاف در تفسیر نتایج شوند. از این رو، استفاده از نتایج سمیت گونه‌های مشابه در محیط‌های مختلف جغرافیایی جایز نیست و اجرا کردن آزمون سمیت حاد قبل از هر گونه مطالعه سم‌شناسی پیشنهاد می‌شود (Louis et al., 1996).

منابع

ابرقویی ص.، هدایتی س.ع.ا.، قربانی ر.، کلنگی میاندره ح. و باقری ط. ۱۳۹۵. تعیین و مقایسه سمیت کشنده نانوذرات نقره و نمک نیترات نقره در ماهی کاراس طلایی. فصلنامه علوم و تکنولوژی محیط زیست، ۳(۲): ۴۲۹-۴۳۸.

اکرمی ر.، قلیچی ا. و احمدی ا. ۱۳۹۰. تاثیر پربیوتیک اینولین جیره غذایی بر پارامترهای هماتولوژی و بیوشیمی سرم خون فیل‌ماهیان (*Huso huso*) جوان پرورشی. مجله تحقیقات دامپزشکی، ۷(۲): ۱۳۶-۱۳۱.

تربالی ن.، بهاور م.، عین اللهی ن. و نباتچیان ف. ۱۳۹۱. بررسی اثر نیترات نقره بر فعالیت آنزیم پراکسیداز ترب کوهی. مجله علمی پژوهشی فیض، ۱۶(۷): ۷۲۱-۷۱۳.

حسینی‌فر س.ح.، میر واقفی ع.، مجازی امیری ب.، خوش‌باور رستمی ح. و درویش بسطامی ک. ۱۳۹۰. بررسی تاثیر پربیوتیک الیگوفروکتوز بر پاره‌ای از شاخص‌های خونی، بیوشیمیایی سرمی و آنزیم‌های کبدی بچه فیل‌ماهی. مجله علمی شیلات ایران، ۲۰(۲): ۳۶-۲۷.

حیدری ب.، گلچین‌راد ع.، حقی ن. و یاوری ل. ۱۳۹۲. مطالعه پاسخ فیزیولوژیکی ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*) در پاسخ به شوینده‌های آنیونی. نشریه اقیانوس‌شناسی، ۳(۱۴): ۷۶-۶۹.

رازقی منصور م.، اکرمی ر.، امانی دنجی ک.، قبادی ش. و صالحی م. ۱۳۹۴. تاثیر سطوح مختلف پربیوتیک مانان الیگوساکارید جیره‌ی غذایی در برخی پیراسنجه‌های هماتولوژیک و بیوشیمی سرم خون بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان. مجله منابع طبیعی ایران، ۲(۲): ۱۸۶-۱۷۷.

ریکی ف.، سوداگر م.، پاک‌نژاد ح. و یوسفی سیاهکلرودی س. ۱۳۹۸. تاثیر سطوح مختلف پروتئین و چربی جیره غذایی بر شاخص‌های رشد و عملکرد تولیدمثلی ماهی زبرا (*Danio rerio*). فیزیولوژی و تکوین جانوری، ۱۲(۲): ۵۱-۶۲.

سلطانی م. ۱۳۸۷. ایمنی‌شناسی ماهیان و سخت‌پوستان. انتشارات دانشگاه تهران. ۲۶۴ص.

شریعتی فیض‌آبادی ف. ۱۳۸۰. تعیین فنل، نفتول و قارچ‌کش هینوزان بر روی ماهیان سیم، سفید و کپور نقره‌ای. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال. ۱۶۰ص.

کیخسروی ع.، عتباتی آ.، وطن‌دوست ج.، شمس ه.، جلیلی م. و روکی ح. ۱۳۸۹. تاثیر غلظت‌های نزدیک به کشنده کادمیوم بر برخی پارامترهای بیوشیمیایی در خون ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*). نشریه اقیانوس‌شناسی، ۱(۲): ۱۶-۱۱.

کاظمی ر.، پوردهقانی م.، یوسفی جوردهی ا.، یارمحمدی م. و نصری تجن م. ۱۳۸۹. فیزیولوژی دستگاه گردش خون آبزیان و فنون کاربردی خون‌شناسی ماهیان. انتشارات بازرگان. ۱۹۴ص.

نظیفی س.، فیروزبخش ف. و قاضی‌زاده م. ۱۳۸۰. بررسی پارامترهای هماتولوژیک خون ماهی کپور نقره‌ای در مسمومیت باتری کلروفن. مجله تحقیقات دامپزشکی، ۸(۲): ۲۷-۲۳.

هدایتی س.ع.ا، جهانبخشی ع. و قادری رمازی ف. ۱۳۹۲. سم‌شناسی آبزیان. انتشارات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ۲۱۰ص.

Aly S.M., Abdel-Galil A.Y., Ghareeb A. and Mohamed M.F. 2008. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. Fish and Shellfish Immunology, 25(2): 128–136.

Andrews S.R., Sahu A.K. and Kumar S. 2009. Haematological modulation and growth of *Labeo rohita* fingerlings: Effect of dietary mannan oligosaccharide, yeast extract, protein hydrolysate and chlorella. Aquaculture Research, 41(4): 61–69.

Brown B.A. 1988. Routine hematology procedures. P: 7–122. In: Brown B.A. (Ed.). Hematology: Principles and Procedures. Lea and Febiger, USA.

Dogan D. and Can C. 2011. Hematological, biochemical, and behavioral responses of *Oncorhynchus mykiss* to dimethoate. Fish Physiology and Biochemistry, 37(4): 951–958.

Douglas L.C. and Sanders M.E. 2008. Probiotics and prebiotics in dietetics practice. Journal of the American Dietetic Association, 108(3): 510–521.

Hisano H., Barros M. and Pezzato L.E. 2007. Levedura e zinco como pro-nutrientes em racoes para tilapia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). Aspectos hematologicos. Boletim do Instituto de Pesca, 33(2): 35–42.

Irianto A. and Austin B. 2002. Probiotics in aquaculture. Journal of Fish Diseases, 25(11): 633–642.

Kakavand F., Hedayati S.A., Jafar A., Madah S. and Rezaie Shadegan M. 2020. The effect of prebiotic pretreatment on hematological characteristics of tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to silver nanoparticles. Animal Physiology and Development, 13(3): 1–13.

Keiffer J.D. 2000. Limits to exhaustive exercise in fish.

Comparative Biochemistry and Physiology, 126: 161–179.

Louis A.H., Diana L.W., Patricia H. and Elizabeth R.S. 1996. Pesticides and Aquatic Animals. Virginia Cooperative Extension, Virginia State University, USA. 24P.

Mahious A.S., Gatesoupe F.J., Hervi M., Metailler R., Ollever F. 2005. Effect of dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning turbot, *Psetta maxima* (Linnaeus, C.1758). Aquaculture International, 14(3): 219–222.

Mellanby K. 1967. Pesticide and Pollution. The Fontana New Naturalist. Collins Clear Type Press, UK. 411P.

Orum I., Dorucu M. and Yazlak H. 2003. Hematological parameters of three cyprinid fish species from Karakaya Darn Lake, Turkey. Online Journal of Biological Sciences, 3(3): 320–328.

Pryor G.S., Royes J.B., Chapman F.A. and Miles R.D. 2003. Mannan oligosaccharides in fish nutrition: Effects of dietary supplementation on growth and gastrointestinal villi structure in Gulf of Mexico sturgeon. North American Journal of Aquaculture, 65(2): 106–111.

Rahman M.Z., Hossain Z., Mollah M.F.A. and Ahmad G.U. 2002. Effect of diazinon 60EC on *Anabas testudineus*, *Channa punctatus* and *Barbodes gonionotus*. Naga IOSR, 25(2): 8–12.

Sado R.J., Bicudo A.J.D.A. and Cyrno J.E.P. 2008. Feeding dietary mannan oligosaccharide to juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), has no effect on hematological parameters and showed decreased feed consumption. Word Aquaculture Society, 39(4): 821–826.

Sastry K.V. and Sharma K. 1980. Effects of mercuric chloride on the activities of brain enzymes in a fresh water teleost, *Ophiocephalus* (*Channa*) *punctatus*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 9(4): 425–430.

Sevik S., Aktaş M., Dogan H. and Koçak S. 2013. Mushroom drying with solar assisted heat pump system. Journal of Energy Conversion and Management, 72(2): 171–178.

Soivio A. and Oikari A. 1976. Hematological effects of stress on a teleost, *Esox lucius* L. Fish Biology, 8(5): 397–411.

Stoskopf M.K. 1993. Fungal diseases of catfishes. P: 520–521. In: Stoskopf M.K. (Ed.). Fish Medicine. W.B. Saunders Company, USA.

Van Der Oost R., Beyer J. and Vermeulen N.P.E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers. Journal of Environmental

Toxicology and Pharmacology, 13(2): 49–57.

Verma S.R., Rani S. and Dalela R.C. 1982. Indicator of stress induced by pesticides in *Mystus vittatus* Hematological parameters. Indian Journal of Environmental Health, 24(1): 58–64.

Wasser S.P. 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. Journal of Microbiology and Biotechnology, 60(3): 258–274.

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 9, No. 4, Winter 2022

Research Paper

Toxicity effect of silver nitrate on some hematological indices of Nil tilapia (*Oreochromisniloticus*) fed with different levels of prebiotic oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*)

Farahnaz Kakavand[1], Atefeh Iri[2], Maryam Rezaei Shadegan[1]*, Masoud Bigdeli[3], Danial Heydarzadeh Barzegar[3], Vahid Zamani[4,5], Mohsen Barkhordar[6], Paria Houshmand[7], Esmaeil Zare Mehrabadi[8], Seyed Ali Akbar Hedayati[9]

Received: January 2021 Accepted: September 2021

Abstract

The aim of this study was to investigate the effect of different prebiotic levels of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on hematological indices of Nil tilapia exposed to silver nitrate. For this purpose, 120 juveniles of tilapia were fed with diet containing 0 (treatment 1, control), 0.05 (treatment 2), 0.1 (treatment 3) and 0.2% (treatment 4) prebiotic oyster mushroom) for 42 days. Then, 0.5ppm of silver nitrate was added to each group for 16 days. Before and after exposing to silver nitrate, fish blood indices were evaluated. Prebiotics alone had no significant effect on RBC, MCV, hematocrit and hemoglobin ($P<0.05$). But, treatments fed with prebiotics and exposure to silver nitrate toxin showed an increase in WBC, MCHC (in 0.1 and 0.2 treatments), MCH indices compared to the control group. According to the results, oral prebiotics stimulated nonspecific immunity in tilapia and using mushroom prebiotics reduced the destructive effects of the silver nitrate toxin on blood indices. In conclusion, levels of 0.1 and 0.2% of prebiotic oyster mushroom in treatments which exposed to 0.5ppm silver nitrate toxin could improve the blood factor status of tilapia.

Key words: *Prebiotic, Silver Nitrate, Tilapia, Blood Indices*.

1- Ph.D. Student in Aquaculture, Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
2- Ph.D. Student in Aquatic Ecology, Department of Aquatic Production and Exploitation, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
3- M.Sc. in Fisheries, Department of Fisheries, Imam Hassan Mojtaba Faculty of Natural Resources, Behbahan Khatam Alanbia University of Technology, Behbahan, Iran.
4- Assistant Professor in Department of Environmental Science, Faculty of Natural Resources, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran.
5- Assistant Professor in Department of Environmental Studies of Zrebar Lake, Kurdistan Studies Institute, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran.
6- Assistant Professor in Animal Science Research Department, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resource Research and Education Center, AREEO, Mashahd, Iran.
7- Ph.D. Student in Fisheries and Exploitation, Department of Aquatic Production and Exploitation, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
8- M.Sc. in Aquatic Ecology, Faculty of Environment, University of Tehran, Karaj, Iran.
9- Professor in Department of Fisheries and Aquatic Sciences, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

*Corresponding Author: rezaie.m26@gmail.com