

تأثیر پیش تیمار پریبیوتیکی بر شاخص‌های خون شناسی ماهی تیلاپیا مواجهه یافته با نانو ذرات نقره

فرحناز کاکاوند^۱، سید علی اکبر هدایتی^۱، علی جعفر نوده^۱، سعید مداح^۲، مریم رضایی شادگان^۱

۱- دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. Hedayati@gau.ac.ir

۲- دانشکده محیط زیست، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۸/۱۰/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۹/۲/۱۸

چکیده

زمینه و هدف: وجود آلاینده‌های نوظهور نانو ذرات در بدن‌های آبی باعث پاسخ استرس در آبزیان و به خصوص ماهی‌ها می‌شود که نهایتاً بر وضعیت فیزیولوژیک ماهیان اثرگذار بوده و باعث کاهش عملکرد ایمنی در آن‌ها می‌شود. از این رو استفاده از محرک‌های ایمنی نظیر پریبیوتیک‌ها بسیار ضروری به نظر می‌رسد. هدف از انجام این مطالعه بررسی تأثیر سطوح مختلف پریبیوتیک قارچ صدفی (*Pleurotus ostreatus*) بر شاخص‌های هماتولوژی خون ماهی تیلاپیا مواجهه شده با نانو ذرات نقره بود.

روش کار: به همین منظور تعداد ۱۲۰ بچه ماهی تیلاپیا به مدت ۴۲ روز در ۴ تیمار: تیمار (۱) شاهد، فاقد پریبیوتیک قارچ صدفی، تیمار (۲) غذای حاوی ۰/۰۵ تیمار (۳) غذای حاوی ۰/۱ و تیمار (۴) غذای حاوی ۰/۲ درصد پریبیوتیک قارچ صدفی تقسیم شدند. سپس به هر کدام از گروه‌ها غلظت ۰/۵ ppm نانو ذرات نقره به مدت ۱۶ روز اضافه شده و شاخص‌های خونی ماهیان در سطوح مختلف ارزیابی شد.

یافته‌ها: پریبیوتیک به تنهایی اثر معنی‌داری بر تعداد گلبول‌های قرمز، حجم متوسط گلبولی (MCV)، هموگلوبین، متوسط سلولی (MCH)، غلظت متوسط هموگلوبین گلبول قرمز (MCHC)، هماتوکریت، هموگلوبین و گلبول سفید نداشته ($P < 0/05$) ولی تیمار در معرض نانو ذرات نقره و پریبیوتیک به صورت ترکیبی سبب افزایش فاکتورهای ذکر شده در مقایسه با گروه شاهد و تیمارهای پریبیوتیک به تنهایی شدند. با این وجود مقادیر گلبول سفید و گلبول قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت، MCH در تیمار ترکیبی ۰/۲ پریبیوتیک و نانو ذرات نقره بیشتر از سایر تیمارها بود.

نتیجه‌گیری: پریبیوتیک در روش خوراکی، ایمنی غیراختصاصی را در ماهی تیلاپیا تحریک نموده و استفاده ترکیبی نانو نقره و پریبیوتیک قارچ صدفی مقدار شاخص‌های خونی را افزایش و اثرات تخریبی ناشی از نانو نقره بر شاخص‌های خونی را نیز کاهش دهد. چنین نتیجه‌گیری می‌شود که سطح ۰/۲ پریبیوتیک قارچ صدفی و ۰/۵ نانو ذرات نقره در جیره می‌تواند بهترین تأثیر را بر فاکتورهای خونی ماهی تیلاپیا داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: پریبیوتیک، قارچ صدفی، ماهی تیلاپیا، شاخص‌های خونی.

مقدمه

خونی و هم چنین جفت عبور کنند در نتیجه، به راحتی می‌توانند با مولکول‌های مستقر بر روی سطح یا داخل سلول‌ها تعامل داشته باشند. این مسئله باعث می‌شود سلامتی موجودات زنده زیادی تحت تأثیر قرار گیرد (۲۷). استفاده از محصولات حاوی نانو نقره می‌تواند موجب رهایش و ورود غلظت‌های بالای آن به منابع آبی شود. به‌طور کلی غلظت‌های نانو نقره در

با توجه به نوظهور بودن فناوری نانو هنوز از خطرات احتمالی این ذرات برای محیط زیست ارزیابی دقیقی صورت نگرفته است. از آن جا که نانو ذرات مصنوعی تولید بشر هستند و در فرآیند تکامل وجود نداشته‌اند، در حال حاضر، نگرانی زیادی پیرامون آلودگی موجودات زنده به‌خصوص آبزیان با آن‌ها وجود دارد. نانو ذرات می‌توانند از جداره رگ‌های

ثابت شده است (۲۱). افزایش تحریک پاسخ‌های ایمنی به وسیله مکمل‌های غذایی مانند باکتری، قارچ خوراکی و تیمار ترکیبی می‌تواند از اهمیت بالایی در منابع آبی برخوردار باشد. این مکمل‌های غذایی می‌توانند به‌طور 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 دارا بودن شمار زیادی از ترکیبات فعال زیستی به‌عنوان یک مکمل غذایی طبیعی مورد تأیید قرار داده‌اند. بتاگلوکان موجود در قارچ می‌تواند با اتصال به گیرنده‌های پروتئینی موجود در سطح ماکروفاژها منجر به فعال شدن آن‌ها و در نتیجه حفظ و تقویت سیستم ایمنی گردد (۲۹). فاکتورهای خونی ماهیان در گونه‌های مختلف باهم تفاوت داشته و وابستگی زیادی با شرایط محیطی، تغذیه‌ای، سن، گونه، جنسیت، دمای آب، ترکیبات شیمیایی، سختی و pH آب، روش‌های نمونه‌گیری، شمارش سلولی و رنگ‌آمیزی و عوامل استرس‌زایی مانند صید و دست‌کاری دارد. خون به‌عنوان یک بافت سیال یکی از مهم‌ترین مایعات بیولوژیک بدن بوده که تحت تأثیر حالات مختلف فیزیولوژیک و پاتولوژیک ترکیبات آن دستخوش نوسان و تغییر می‌گردد. لذا در اختیار داشتن مقادیر طبیعی پارامترهای خونی و بررسی چگونگی تغییرات آن‌ها می‌تواند در شناسایی بیماری‌ها، تعیین شرایط بهداشتی و سلامت آبیان مفید باشد. جمیلی و همکاران (۱) سنجش پارامترهای خونی برای تعیین احتیاجات غذایی، اجزا غذایی جدید و سایر افزودنی‌ها می‌توانند مفید واقع شوند؛ بنابراین باید برای هر گونه ماهی در شرایط اقلیمی هر منطقه مقادیر طبیعی این فاکتورها وجود داشته باشد. به‌طور کلی، درباره اثر پریبوتیک‌ها در پیراسنجه‌های خونی ماهیان، در مقایسه با پیراسنجه‌های رشد و تغذیه، تحقیقات گسترده‌ای

پس‌آب تصفیه‌خانه‌ها $0.02 \mu\text{g/L}$ و در آب سطحی $0.094 \mu\text{g/L}$ تخمین زده شده است (۲۷). ورود آلاینده‌ها در پیکره موجود زنده می‌تواند موجب تغییر قابل توجه و معنی‌داری در پروفایل بیوشیمیایی خون شود که در واقع بازتابی از ایجاد تغییرات در پروسه متابولیسم طبیعی بدن ماهی است که در نتیجه متابولیسم آلاینده طی فرایند سم‌زدایی حاصل می‌شود (۱۱). توسعه روزافزون آبی‌پروری در بسیاری از مناطق دنیا منجر به افزایش تقاضا در به‌کارگیری از مواد شیمیایی جدید شده است به‌طوری‌که در سال‌های اخیر استفاده از مواد شیمیایی و ترکیبات صنعتی تحت مطالعات دقیق قرار گرفته تا از نظر جنبه‌های اقتصادی و دامنه سلامتی طبقه‌بندی و در آبی‌پروری مورد استفاده قرار گیرند. از جمله این ترکیبات شیمیایی پریبوتیک‌ها هستند. پریبوتیک ماده غذایی غیرقابل هضمی است که در اثر تخمیر به اسیدهای چرب زنجیره کوتاه تبدیل می‌شوند و از طریق تحریک رشد و فعالیت یک یا تعداد محدودی از باکتری‌های موجود در روده اثرات سودمندی برای میزبان داشته و سلامتی میزبان را بهبود می‌بخشد (۱۹). از خواص پریبوتیک‌ها می‌توان به تحریک و ارتقاء سیستم ایمنی بدن، افزایش کارایی غذایی که این امر از طریق تولید ویتامین‌ها، افزایش قابلیت جذب مواد معدنی و عناصر کمیاب انجام می‌گیرد اشاره کرد. عوامل مختلفی می‌توانند بر کارایی تکثیر و پرورش ماهیان تأثیر گذار باشند. از جمله ترکیباتی که به‌عنوان مکمل غذایی و جایگزین برای ترکیبات ضد میکروبی مطرح می‌باشند می‌توان به پریبوتیک‌ها، نوکلئوتیدها، پریبوتیک‌ها اشاره کرد. در طول سال‌های گذشته استفاده از پریبوتیک و سایر افزودنی‌ها (که در بالا بردن ایمنی مصرف‌کنندگان نقش اساسی داشته‌اند) افزایش یافته است، به‌طوری‌که اثرات مثبت و فراوان این مواد در انواع جانداران

صورت پذیرفت. پس از عادت دهی بچه ماهی ها با تراکم ۱۰ عدد در وان های فایبرگلاس ۱۰۰ لیتری ذخیره سازی شدند. ماهیان با غذای تجاری کپور به میزان ۳ درصد وزن بدن در ۲ نوبت (صبح و عصر) تغذیه شدند. در طی دوره آزمایش فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب شامل اکسیژن محلول ۷-۹ میلی گرم، دمای ۲۵-۲۸ درجه سانتی گراد ثابت نگه داری شد. غذای مورد استفاده در این پژوهش حاوی پربیوتیک به عنوان مکمل غذایی بود که به این منظور از قارچ صدفی استفاده شد، قارچ ها را پس از ریز کردن برای تبخیر، آب اضافه آن به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. سپس در آن با دمای ۴۵ درجه به مدت ۲ روز خشک گردید و در آخر قارچ ها را آسیاب کرده و در نهایت برای تهیه جیره غذایی استفاده شد (۲۵). مطالعه فوق در ۴ تیمار با سه تکرار شامل: تیمار (۱) شاهد، فاقد پربیوتیک قارچ صدفی، تیمار (۲) غذای حاوی ۰/۰۵ درصد پربیوتیک قارچ صدفی، تیمار (۳) غذای حاوی ۰/۱ درصد پربیوتیک قارچ صدفی، تیمار (۴) غذای حاوی ۰/۲ درصد پربیوتیک قارچ صدفی به مدت ۴۵ روز تغذیه شدند. ۱۶ روز در مجاورت سم نانو نقره با غلظت ۰/۵ ppm قرار گرفتند. هم چنین لازم به یادآوری است روزانه ۵۰ درصد حجم تانک ها تعویض آب صورت گرفت به طوری که غلظت سم در هر یک از تیمارها حفظ شد.

نمونه گیری و خون گیری: نمونه گیری از ماهیان

جهت آزمایش های خونی در انتهای دوره پرورش صورت گرفت. ۲۴ ساعت قبل از خون گیری تغذیه ماهیان قطع شد و سپس ۳ عدد ماهی (۳ ماهی به ازای هر تکرار) به ظاهر سالم به طور تصادفی انتخاب شدند و از ورید ساقه دمی آن ها با سرنگ ۲/۵ سی سی حاوی هپارین خون گیری به عمل آمد و به ویال های ۲ سی سی منتقل شد، نمونه ها در سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰ به مدت

انجام نشده است. در این خصوص مطالعاتی بر گونه های تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*) هیسانو و همکاران (۲۰۰۷)(۱۴)، اندرز و همکاران (۲۰۰۹)(۸) راهو (*Labeo rohita*)، رازقی و همکاران (۲۰۱۱)(۲۳) کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)، فدایی (۲۰۱۳)(۱۲) فیل ماهی (*Huso huso*) انجام شده است. به طور کلی یکی از تأثیرات احتمالی پربیوتیک ها افزایش عملکرد ایمنی است. تیلاپیا از راسته سوف ماهیان و خانواده *Cichlidae* می باشد که به علت رشد سریع و پرورش ساده و ارزان مورد توجه بسیاری از کشورهای جهان قرار گرفته است. یکی از مهم ترین گونه های پرورشی، تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) است. بنابراین وجود آلاینده هایی هم چون نانو ذرات نقره در اکوسیستم های آبی موجب تنش در ماهیان شده و می تواند سیستم ایمنی ماهیان را تضعیف نماید. کیفیت نامناسب آب و وجود آلاینده هایی هم چون نانو ذرات نقره در آن می تواند باعث ایجاد استرس در ماهیان شده و با کاهش عملکرد ایمنی ماهیان سبب به خطر افتادن سلامتی آن ها شود. لذا با توجه به جنبه های روزافزون کاربرد نانو ذرات و ورود آن به اکوسیستم های آبی به عنوان آلاینده نوظهور، در تحقیق حاضر به بررسی جنبه های هماتولوژی اثرات نانو ذرات نقره بر ماهی تیلاپیا پرداخته شد و این فرضیه که احتمال کاهش اثرات نانو ذرات با پربیوتیک قارچ صدفی وجود دارد نیز مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش ها

این تحقیق به مدت ۴۲ روز در محل مرکز تحقیقات آبرزی پروری شهید ناصر فضلی برآبادی گروه شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. بچه ماهی تیلاپیا نیل با محدوده وزنی حدود ۲۰ گرم از مراکز تکثیر و پرورش بخش خصوصی تهیه شد و پس از انتقال به مدت یک هفته سازگاری اولیه

۵ دقیقه قرار داده شد.

روش اندازه‌گیری: به منظور انجام آزمایش‌های هماتولوژی، شمارش تعداد گلبول‌های قرمز و سفید پس از رقیق سازی با استفاده از هموسیتومتر انجام شد. هم‌چنین شمارش افتراقی گلبول‌های سفید شامل هتروفیل (نوتروفیل)، لنفوسیت، ائوزینوفیل، منوسیت و بازوفیل نیز پس از تهیه گسترش و رنگ آمیزی صورت پذیرفت. هماتوکریت (PVC) بر اساس روش میکروهماتوکریت و هموگلوبین (Hb) بر اساس روش Sahli تعیین شد. مقادیر حجم متوسط گلبولی (MCV)، هموگلوبین متوسط سلولی (MCH) و غلظت متوسط هموگلوبین گلبول‌های قرمز (MCHC) بر اساس فرمول‌های استاندارد مشخص گردید. باید خاطر نشان کرد که نوع رنگ آمیزی در شمارش گلبول‌های سفید از نوع گیمسا بود و از محلول ریس برای رقیق کردن خون استفاده شد (۹).

تجزیه و تحلیل آماری: این آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی برنامه‌ریزی و اجرا گردید. پس از ثبت داده‌ها همگنی آن‌ها با استفاده از Kolmogorove-Smirnove بررسی شد. برای مقایسه بین تیمارها و نیز وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح احتمال (P<۰/۰۵) از آنالیز واریانس یک‌طرفه ANOVA و آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncans multiple-range test) استفاده گردید کلیه آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS (ویرایش ۲۰) و ترسیم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel, ۲۰۰۷ انجام شد.

نتایج

میزان هموگلوبین خون ماهی تیلاپیا

بررسی تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نشان داد که در مجموع تیمارهای آزمایشی بر شاخص هموگلوبین خون تأثیر معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). نتایج نشان داد

که پریبوتیک به تنهایی اثر معنی‌داری بر شاخص هموگلوبین خون نداشت. اما ترکیب پریبوتیک و سم (نانونقره) مقدار این شاخص را افزایش داد (نمودار ۱).

میزان هماتوکریت خون ماهی تیلاپیا

بررسی تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نشان داد که در مجموع تیمارهای آزمایشی بر شاخص هماتوکریت خون تأثیر معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). نتایج نشان داد که پریبوتیک به تنهایی اثر معنی‌داری بر شاخص هماتوکریت خون نداشت. اما ترکیب پریبوتیک و سم (نانونقره) مقدار این شاخص را افزایش داد (نمودار ۲).

میزان گلبول‌های قرمز (RBC) خون ماهی تیلاپیا

بررسی تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نشان داد که در مجموع تیمارهای آزمایشی بر شاخص RBC خون تأثیر معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). نتایج نشان داد که پریبوتیک به تنهایی اثر معنی‌داری بر شاخص RBC خون نداشت. اما ترکیب پریبوتیک و سم (نانونقره) مقدار این شاخص را افزایش داد (نمودار ۳).

غلظت متوسط هموگلوبین گلبول‌های قرمز (MCHC) خون ماهی تیلاپیا

بررسی تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نشان داد که در مجموع تیمارهای آزمایشی بر شاخص MCHC خون تأثیر معنی‌داری داشت (P<0.05). نتایج نشان داد که پریبوتیک به تنهایی اثر معنی‌داری بر شاخص MCHC خون نداشت. اما ترکیب پریبوتیک و سم (نانونقره) مقدار این شاخص را افزایش داد (نمودار ۴).

مقادیر حجم متوسط گلبولی (MCV) خون ماهی تیلاپیا

بررسی تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نشان داد که در مجموع تیمارهای آزمایشی بر شاخص MCV خون تأثیر معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). نتایج نشان داد که

مقدار این شاخص را افزایش داد (نمودار ۷). حروف لاتین متفاوت بیانگر معنی داری در سطوح مختلف است ($P < 0.05$).

تأثیر پریوتیک قارچ صدفی و نانو ذرات نقره در پیراسنجه های هماتولوژی

جدول (۱) تأثیر جیره غذایی حاوی سطوح مختلف پریوتیک قارچ خوراکی به تنهایی و پریوتیک به همراه نانوذرات نقره را در برخی پیراسنجه های هماتولوژی در ماهی تیلاپیا نشان می دهد. تغییرات عمده خونی در ماهی تیلاپیا در مقابل افزایش سطوح مختلف پریوتیک در جیره را می توان به صورت افزایش در درصد لنفوسیت و منوسیت و کاهش در درصد نوتروفیل در مقایسه با گروه شاهد ذکر کرد. اما تغییرات عمده خونی در ماهی تیلاپیا در مقابل افزایش سطوح ترکیبی پریوتیک و سم (نانو نقره) در جیره را می توان به صورت افزایش در درصد لنفوسیت و منوسیت و کاهش در درصد نوتروفیل در مقایسه با گروه شاهد ذکر کرد.

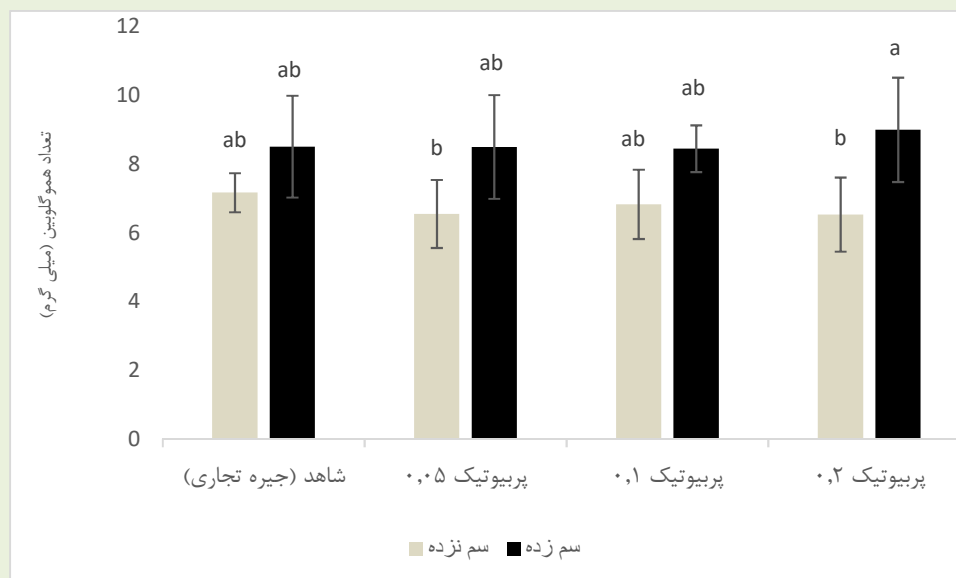
پریوتیک به تنهایی مقدار این شاخص را افزایش داد. اما ترکیب پریوتیک و سم (نانونقره) مقدار این شاخص را کاهش داد (نمودار ۵).

مقادیر هموگلوبین متوسط سلولی (MCH) خون ماهی تیلاپیا

بررسی تجزیه و تحلیل آماری داده ها نشان داد که در مجموع تیمار های آزمایشی بر شاخص MCH خون تأثیر معنی داری داشت ($P < 0.05$). نتایج نشان داد که پریوتیک به تنهایی اثر معنی داری بر شاخص MCH خون نداشت. اما ترکیب پریوتیک و سم (نانونقره) مقدار این شاخص را افزایش داد (نمودار ۶).

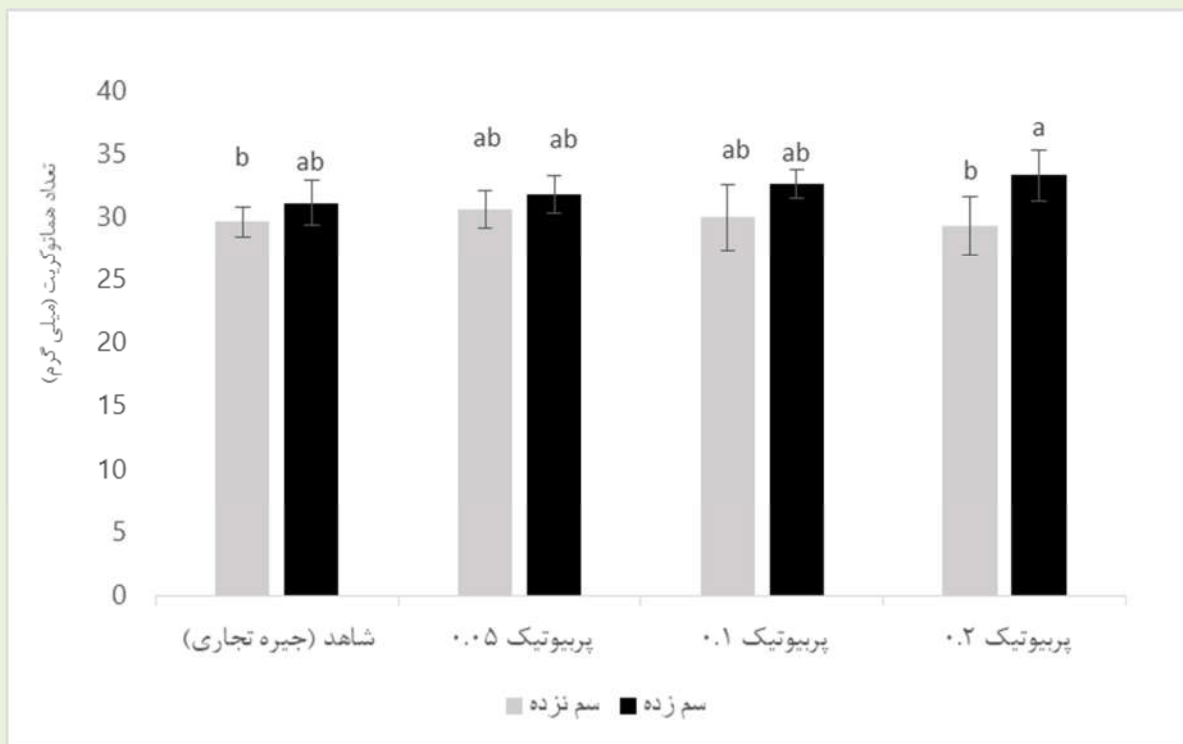
تعداد گلبول های سفید (WBC) خون ماهی تیلاپیا

بررسی تجزیه و تحلیل آماری داده ها نشان داد که در مجموع تیمار های آزمایشی بر شاخص WBC خون تأثیر معنی داری داشت ($P < 0.05$). نتایج نشان داد که پریوتیک به تنهایی اثر معنی داری بر شاخص WBC خون نداشت به جز دوز ۰/۲ پریوتیک که سبب افزایش این شاخص شد، اما ترکیب پریوتیک و سم (نانونقره)

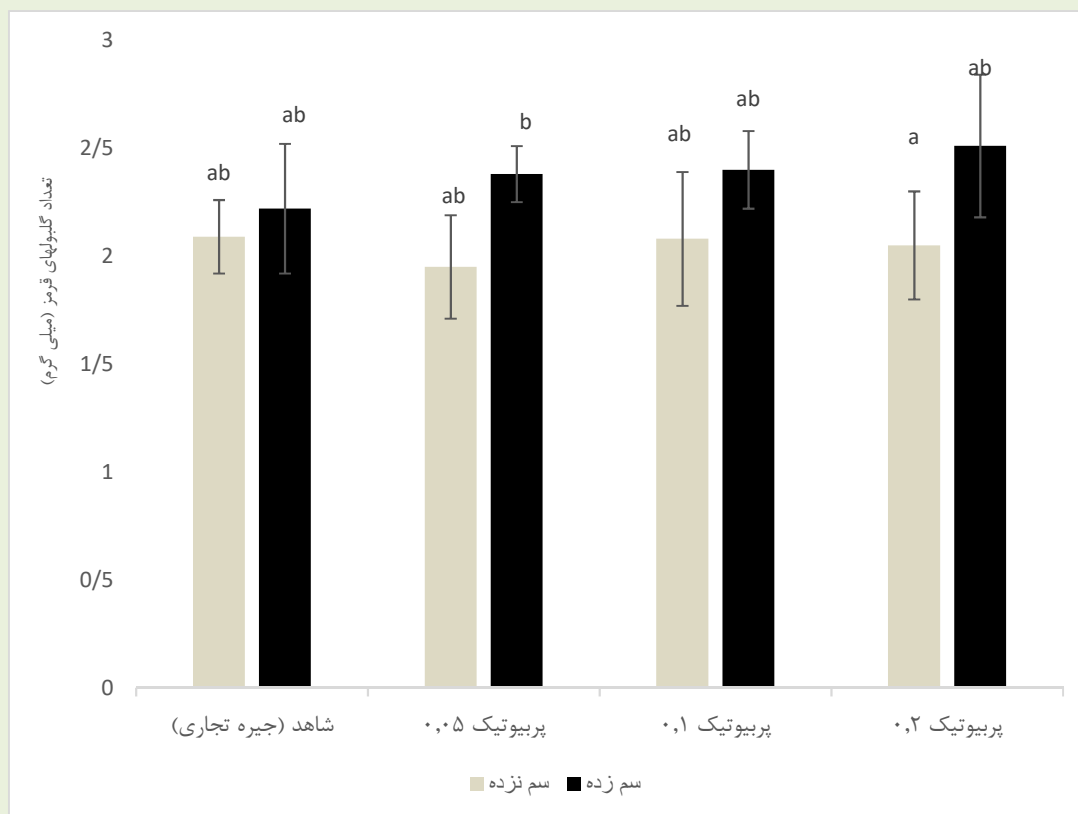


نمودار ۱- میزان هموگلوبین خون ماهی تیلاپیا در تیمار های مختلف آزمایشی.

حروف لاتین متفاوت بیانگر معنی داری در سطوح مختلف است ($P < 0.05$)

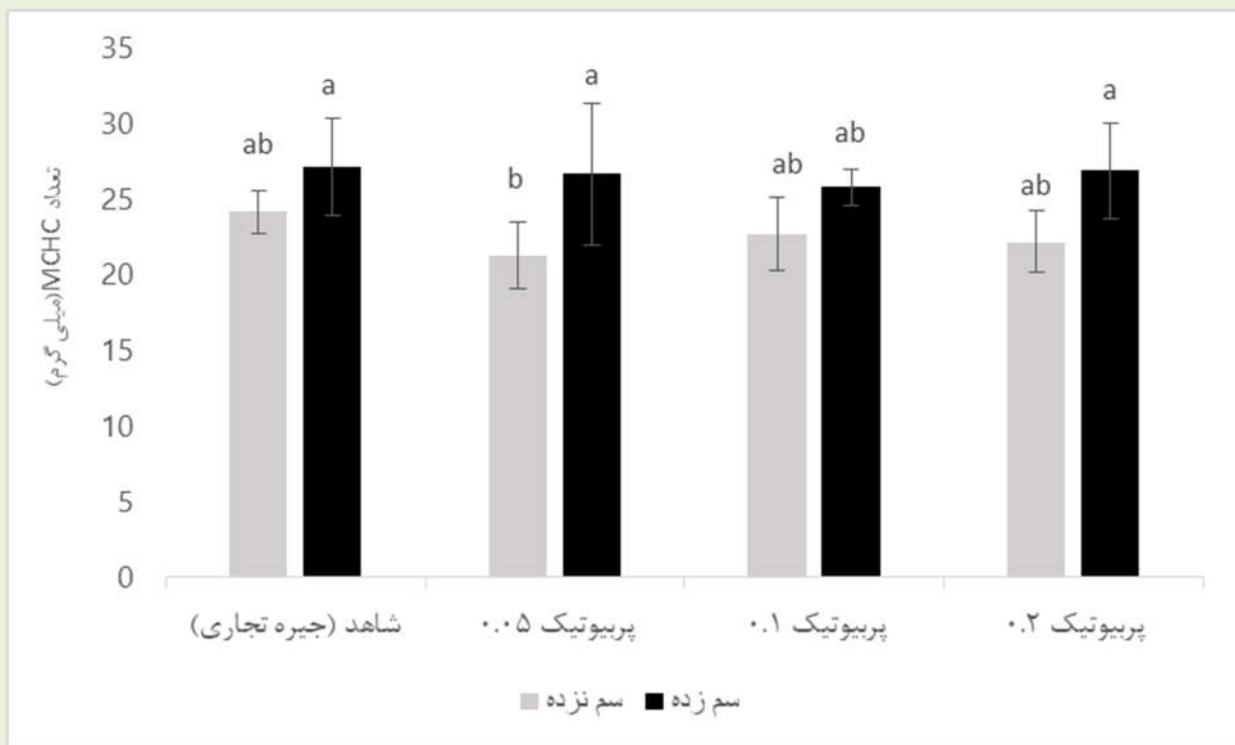


نمودار ۲- میزان هماتوکریت خون ماهی تیلاپیا در تیمار های مختلف آزمایشی

حروف لاتین متفاوت بیانگر معنی داری در سطوح مختلف است ($p \leq 0.05$)

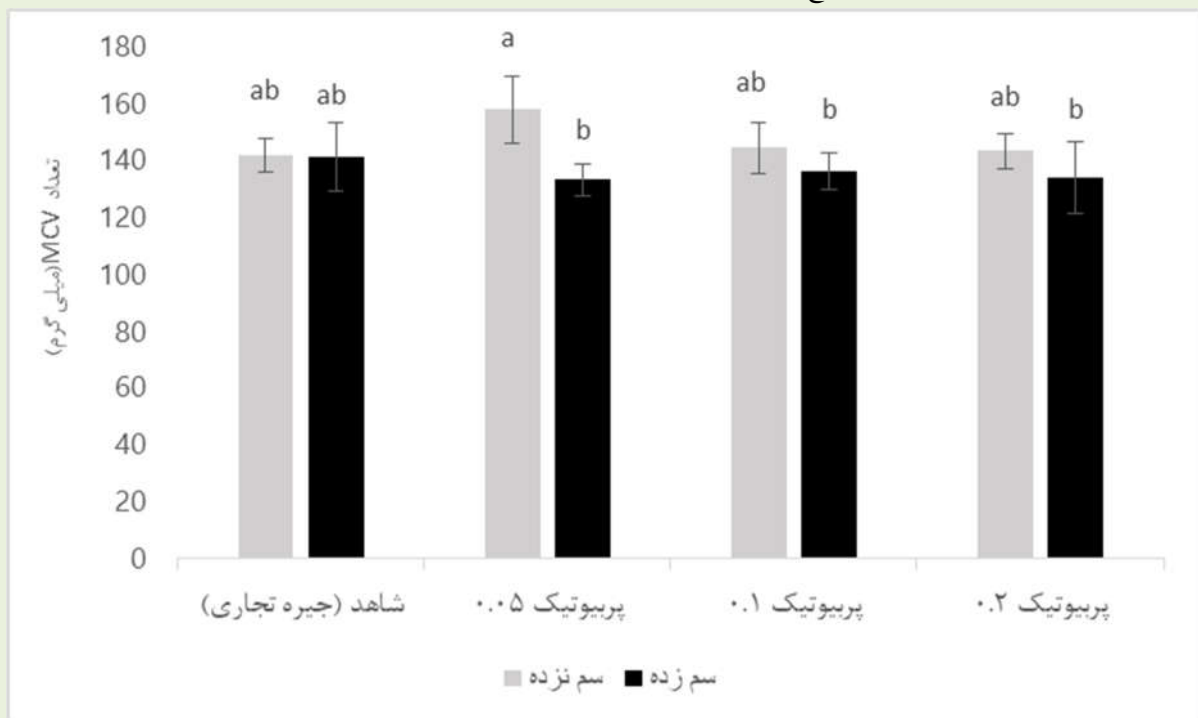
نمودار ۳- میزان RBC خون ماهی تیلاپیا در تیمار های مختلف آزمایشی

حروف لاتین متفاوت بیانگر معنی داری در سطوح مختلف است ($p \leq 0.05$)



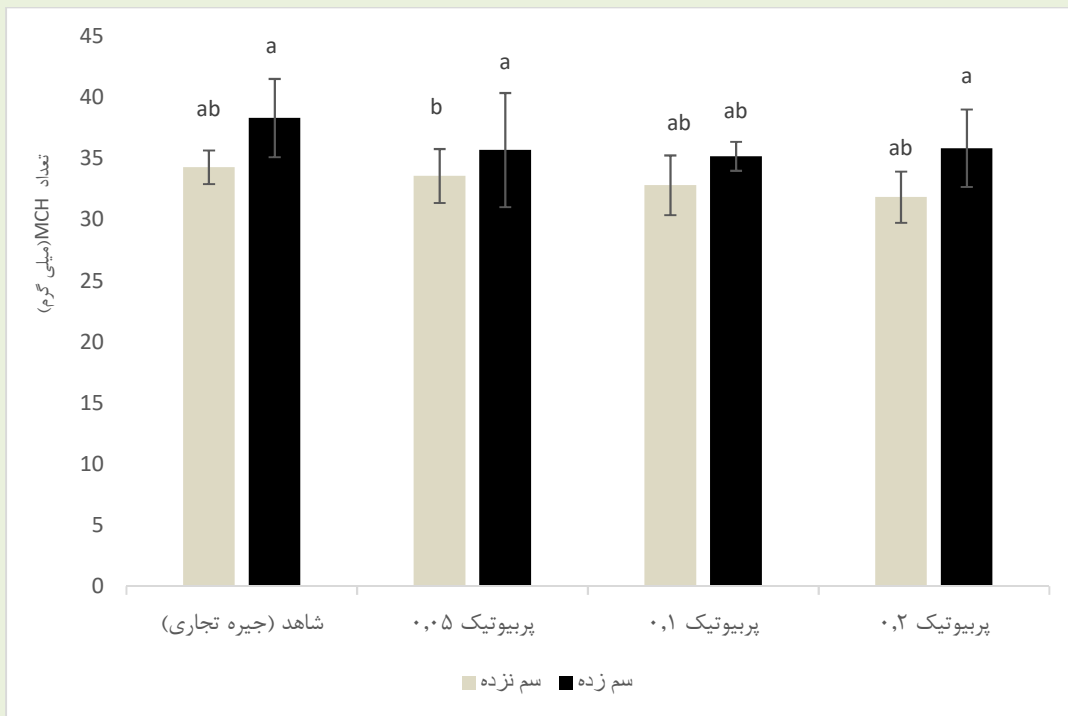
نمودار ۴- میزان MCHC خون ماهی تیلاپیا در تیمارهای مختلف آزمایشی

حروف لاتین متفاوت بیانگر معنی داری در سطوح مختلف است ($p \leq 0.05$).



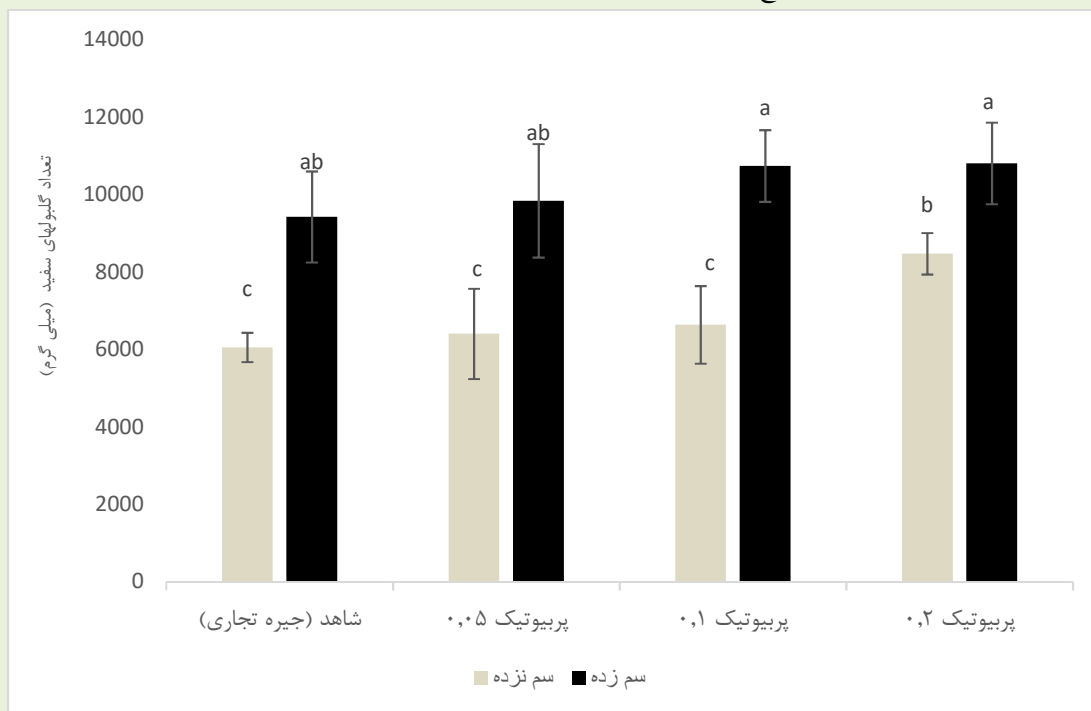
نمودار ۵- میزان MCV خون ماهی تیلاپیا در تیمارهای مختلف آزمایشی

حروف لاتین متفاوت بیانگر معنی داری در سطوح مختلف است ($p \leq 0.05$).



نمودار ۷- میزان MCH خون ماهی تیلاپیا در تیمارهای مختلف آزمایشی

حروف لاتین متفاوت بیان گر معنی داری در سطوح مختلف است ($p \leq 0.05$)



نمودار ۷- میزان WBC خون ماهی تیلاپیا در تیمارهای مختلف آزمایشی

حروف لاتین متفاوت بیان گر معنی داری در سطوح مختلف است ($p \leq 0.05$)

جدول ۱- اثر تیمارهای مختلف پریوتیک قارچ صدفی و نانوذرات نقره روی درصد شمارش افتراقی گلبول های سفید ماهی تیلاپیا

| تیمارها | لنفوسیت | نوتروفیل | منوسیت | اُئوزینوفیل |
|----------------------------|---------|----------|--------|-------------|
| شاهد | ۸۸ | ۱۱ | ۱ | ۰ |
| پریوتیک ۰/۰۵ | ۹۱ | ۷ | ۲ | ۰ |
| پریوتیک ۰/۱ | ۹۳ | ۷ | ۰ | ۰ |
| پریوتیک ۰/۲ | ۹۳ | ۶ | ۱ | ۰ |
| شاهد+سم | ۹۰ | ۸ | ۲ | ۰ |
| پریوتیک ۰/۰۵+۰/۰۵ نانونقره | ۹۴ | ۵ | ۱ | ۰ |
| پریوتیک ۰/۰۵+۰/۱ نانونقره | ۸۹ | ۸ | ۳ | ۰ |
| پریوتیک ۰/۰۵+۰/۲ نانونقره | ۹۳ | ۶ | ۱ | ۰ |

بحث و نتیجه گیری

پریوتیک ها عمدتاً به خاطر دارا بودن بتاگلوکان و مانان اولیگوساکارید باعث افزایش کارایی تغذیه، کاهش تلفات، بهبود ضریب تبدیل غذایی و افزایش مصرف غذا در موجودات می شوند (۲۲، ۱۳، ۱۰). نانو ذرات اکسید فلزی می توانند وارد رگ ها و بافت های مغز شوند و از این طریق می توانند قابلیت دسترسی زیستی را افزایش دهند. این مسئله ممکن است منجر به تأثیرات سمی و پاسخ های التهابی در مغز و تخریب سیستم عصبی مرکزی شود (۱۶). تغییرات شاخص های خونی در ماهیان وابسته به شرایط محیط پرورش است، بیماری، نوع تغذیه، مکمل های غذایی، آلودگی، تغییرات دما، استرس و سایر موارد می توانند در تغییر شاخص های خونی مؤثر باشند (۱۷). گلبول های سفید یکی از مهم ترین سلول هایی هستند که می توانند واکنش های ایمنی غیراختصاصی و اختصاصی را در ماهیان تحریک کنند (۴، ۵). در تحقیق حاضر، تعداد گلبول های سفید در تیمارهای ترکیبی پریوتیک قارچ صدفی و نانو ذرات نقره افزایشی را نسبت به گروه شاهد و تیمارهای پریوتیک به تنهایی داشتند. تیمار حاوی ۰/۰۵ پریوتیک قارچ خوراکی + ۰/۰۵ سم نانو نقره دارای تعداد لنفوسیت بیشتری نسبت به سایر

تیمارها بود که نشان دهنده تقویت سیستم ایمنی در ماهیان تغذیه شده با این استراتژی تغذیه ای می باشد. افزایش تعداد لنفوسیت شاخص خوبی است و نشان دهنده افزایش توان ایمنی در برابر عوامل بیماری زای مهاجم می باشد. چون در اثر استرس و طولانی شدن کمبود اکسیژن آب، تعداد لنفوسیت ها کاهش می یابد (۵). در تحقیق حاضر بیشترین درصد گلبول های سفید خون را لنفوسیت ها و نوتروفیل ها تشکیل می دادند و این مسئله در سایر ماهیان نیز به اثبات رسیده است (۱۵). استرس نیز موجب افزایش تعداد گلبول سفید و قند خون شده و در عوض موجب کاهش هموگلوبین و تعداد گلبول قرمز می گردد (۲۶). در مطالعه حاضر، ماهیان تحت تیمار ترکیبی پریوتیک قارچ صدفی و نانو ذرات نقره افزایشی را در شاخص های هماتوکریت، هموگلوبین و تعداد گلبول های قرمز، MCH، MCHC نسبت به تیمارهای پریوتیک به تنهایی و گروه شاهد نشان دادند. بیشترین شاخص هموگلوبین، هماتوکریت، MCHC، گلبول قرمز، گلبول سفید در تیمار ترکیبی ۰/۲ پریوتیک قارچ خوراکی + ۰/۵ سم نانو نقره نشان داده شد. مشخص شده که تعداد گلبول های قرمز و غلظت هموگلوبین تغییرات وابسته به گونه را از خود نشان می دهند. این

تعداد لنفوسیت‌های بچه ماهی‌های تغذیه شده با سطح ۱ و ۲ درصد پریوتیک نشان داد (۲). نتایج مشابهی در مطالعه اثرات پریوتیک اینولین بر قرل آلابی رنگین کمان گزارش شده است. اکرمی و همکاران (۱۳۸۷) (۳)، Welker و همکاران (۲۰۰۷) (۳۱) نشان دادند که افزودن ۰/۲ درصد پریوتیک مانان الیگوساکارید به جیره غذایی گر به ماهی رو گاهی (*Ictalurus punctatus*) هیچ اثری بر شاخص‌های خونی از جمله تعداد گلبول قرمز و سفید، هماتوکریت و هموگلوبین ندارند. همچنین Sado و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که افزودن سطوح ۰/۲ تا ۱ درصد پریوتیک مانان اثری بر فاکتورهای خونی از جمله تعداد گلبول‌های سفید، گلبول‌های قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین، مقادیر حجم متوسط گلبولی (MCV)، هموگلوبین متوسط سلولی (MCH)، غلظت متوسط هموگلوبین گلبول قرمز (MCHC) نشان نداد (۲۴). بر اساس یافته‌های موجود در این بررسی و یافته‌های دیگر پژوهشگران مشاهده می‌شود که فاکتورهایی مانند عوامل محیطی (فصول سال، شوری، دوره نوری، درجه حرارت، تراکم) عوامل فیزیولوژیکی (گونه آبی، سیکل تولیدمثلی و وضعیت بلوغ، سن، جنس و شرایط تغذیه‌ای) زمان نمونه‌گیری، چگونگی تهیه نمونه، دقت و حساسیت روش‌های اندازه‌گیری می‌توانند بر فعالیت‌های پارامترهای هماتولوژی تأثیر بگذارند و باعث اختلاف در تفسیر نتایج شوند.

نتایج مطالعه حاضر حاکی از آن است که افزایش سطح پریوتیک در تیمارهای مجزا و در تیمارهای ترکیبی در جیره منجر به افزایش شاخص‌های هماتولوژی در مقایسه با گروه شاهد گردید. بنابراین پریوتیک قارچ صدفی در سطوح بالا می‌تواند مکمل مناسبی برای جیره‌های غذایی ماهی تیلاپیا باشد و چنین نتیجه‌گیری می‌شود که سطح ۰/۲ پریوتیک قارچ صدفی و ۰/۵ نانو ذرات نقره در جیره می‌تواند دارای

تفاوت‌ها حتی می‌توانند فصلی باشند به‌ویژه تغییرات دما و غلظت اکسیژن محلول نیز روی این فاکتورها اثر می‌گذارند. با توجه به ثابت بودن شرایط محیطی و ماهی مورد آزمایش، می‌توان از تأثیر این عوامل بر تغییرات این شاخص در تیمارهای مختلف چشم‌پوشی کرد. گلبول‌های قرمز نقش مهمی در انتقال اکسیژن در بدن ایفا می‌کنند و مقادیر ناکافی گلبول‌های قرمز اثر منفی روی متابولیسم داشته و باعث کاهش پروتئین کل پلاسما خون می‌شو (۱۸). علاوه بر این میزان هموگلوبین و هماتوکریت نیز تابعی از تغییرات گلبول‌های قرمز بوده و رابطه مستقیم با آن دارد. استفاده از سطوح مختلف ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ درصد پریوتیک مانان الیگوساکارید (MOS) در ماهی تیلاپیا جوان (*Oreochromis niloticus*) منجر به افزایش سطح لوکوسیت و تفاوت معنی‌دار در پارامترهای هماتولوژی در مقایسه با گروه شاهد نگردید (۲۴). Aly و همکاران (۲۰۰۸) افزایش میزان هماتوکریت را در تیلاپیا تغذیه‌شده با پریوتیک گزارش نمودند (۷). در بررسی پارامترهای هماتولوژیک خون ماهی کپور نقره‌ای در مسمومیت با تریکلوروفن که توسط نظیفی و همکاران (۱۳۸۰) انجام شد، نتایج نشان داد که بین گروه شاهد و تیمارهای دیگر در همه پارامترهای هماتولوژیک اختلاف آماری معنی‌دار وجود دارد که این امر با افزایش دوز مصرفی اتفاق افتاد. با افزایش سم در تعداد پارامترهای اریتروسیته و لوکوسیته ماهی کاهش معنی‌داری مشاهده شد (۶). در بررسی پارامترهای خون شناسی فیل ماهی پرورشی در معرض سطوح مختلف پریوتیک اولیگوفروکتوز که توسط حسینی فر و همکاران (۱۳۸۹) انجام شد نتایج نشان داد که افزودن سطوح مختلف پریوتیک به جیره غذایی بچه فیل ماهی پرورشی اثری بر تعداد گلبول‌های قرمز و سفید ندارد. هرچند شمارش تفریقی گلبول‌های سفید افزایش معنی‌داری در

را نیز کاهش دهد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب پایان‌نامه کارشناسی ارشد و با حمایت دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام گرفت.

M.Sc. Thesis .Zabol University, 85 pp.(In Persian).

10.Gibson, G.R., Roberfroid, M.B. (1999). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr*, 125; 1401-1412.

11.Hisano, H., Barros, M. M., Pezzato, L. E. (2007). Levedura e zinco como pro-nutrientes em racoes para tilapia-do-nylo(*Oreochromis niloticus*). *Aspectos Hematologicos. Boletim do Instituto de Pesca*, 33;35-42.

12.Houston, A. H. (1990). Blood and circulation . In : *Methods for fish biology* . Schreck , C.B., Moyle, P.B. (Eds).American fisheries Society , Bethesda, Maryland,USA . P: 273-334.

13.Irianto, A., Austine, B. (2002). Probiotics in aquaculture. *Fish Dis*, 25; 633-642.

14.Keiffer, J.D. (2000). Limits to exhaustive exercise in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 126; 161-179.

15.Klontz, G.W. (1994). Fish hematology. In: *Techniques in Fish Immunology*, 3; 121-132.

16.Mahious, A. S., Gatesoupe, F. J., Hervi, M., Metailler, R., Ollevier, F. (2005). Effect of dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning turbot(*Psetta maxima*). *Aquacult. Int.*, 14;219-229.

17.Nezami, S.J., Kirjavainen, P.V., Salminen, H.S., Ahokas, J.T., Wright, F.A. (1999). The effect of orally administered viable probiotic and dairy lactobacilli on mouse lymphocyte proliferation. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 26; 131-135.

18.Pryor, G.S., Royes, J.B., Chapman, F.A., Miles, R.D. (2003). Mannan oligosaccharides in fish nutrition: effects of dietary supplementation on growth and gastrointestinal villi structure in Gulf of Mexico sturgeon. *N Am J Aquacult*, 65; 106.

19.Razeghi Mansour, M., Akrami, R., Ghobadi, Sh., Amani Denji, K., Ezatrahimi, N., Gharaei, A. (2011). Effect of dietary mannan oligosaccharide on growth performance, body composition and some hematological parameters

اثرات مثبتی بر فاکتورهای خونی ماهی تیلاپیا باشد. به عبارتی پر بیوتیک در روش خوراکی، ایمنی غیراختصاصی را در ماهی تیلاپیا تحریک نموده و قادر است باعث بهبود شاخص‌های هماتولوژی گردد و اثرات تخریبی ناشی از نانو نقره بر شاخص‌های خونی

منابع

۱- جمیلی، ش.، ماشینچیان مرادی، ع.، بهمنی، م.، کیانی ضیابری، ک. ۱۳۸۷. بررسی و شناخت فاکتورهای خونی اردک ماهی تالاب انزلی، اولین همایش ملی علوم شیلات و آبیان ایران، لاهیجان، صفحات ۳۷ تا ۳۹.

۲-سلطانی، مهدی. ۱۳۸۷. ایمنی شناسی ماهیان و سخت پوستان. انتشارات دانشگاه تهران. صفحه ۲۶۴.

۳-کاظمی، ر.، پوردهقانی، م.، یوسفی جوردی، ا.، یارمحمدی، م.، نصری تجن، م. ۱۳۸۹. فیزیولوژی دستگاه گردش خون آبیان و فنون کاربردی خون شناسی ماهیان. انتشارات بازرگان. صفحه ۱۹۴.

4.Aly, S.M., Abdel-Galil, A.Y., Ghareeb, A. 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 Shellfish Immunology*, 25; 128-136.

5.Andrews, S .R .,N .P., Sahu, A .K .Pal., 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; 61-69.

6.Brown, B.A. (1988). Routine hematology procedures. Leo and Febiger, Philadelphia, PA, USA.

7.Burr, G., Gatlin, D., Ricke, S. (2009). Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of probiotics and prebiotics in finfish aquaculture. *Int Aquat Res*, 1; 1-29.

8. Edsall, C.C. (1999). A blood chemistry profile for lake trout. *Journal of Aquatic Animal Health*, 11(1); 81-86.

9.Fadaei, M. (2013). Effect of dietary oligosaccharide-mannan on growth performance, survival, body composition and some hematological parameters in giant sturgeon juvenile(*Huso huso* Linnaeus , 1754).

in giant sturgeon juvenile (*Huso huso* Linnaeus, 1754). *Fish Physiology and Biochemistry*, 38; 829-835.

20. Sado, R.J., Bicudo, A.J.D.A., Cyrno, J.E.P. (2008). Feeding dietary mannanoligosaccharid to juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), has no effect on hematological parameters and showed decreased feed consumption. *World Aquac. Soc.*, 39; 821-826.

21. Şevik, S., Aktaş, M., Doğan, H., Koçak, S. (2013). Mushroom drying with solar assisted heat pump system. *Energy Conversion and Management*, 72; 171-178.

22. Stoskopf, M. K. (1993). *Fish medicine*. WB Saunders Company. Philadelphia. USA.

23. Vesterhoff, P., Benn, T., Cavanagh, B., Hristovski, K., Posner, J. D. (2010). The release of nanosilver from consumer products used in the home. *Journal of Environmental Quality*, 39(6); 1875-1882.

24. Verdegem, M. C. J., Hilbrands, A.D., Boon, J.H. (1997). Influence of salinity and dietary composition on blood parameter values of hybrid red tilapia (*Oreochromis niloticus* & *Oreochromis mossambicus*) *Aquacult. Res.*, 28; 453-459.

25. Verschuere, L., Rombout, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W. (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64; 655-671.

26. Wasser, S.P. (2002). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immune modulating polysaccharides. *Applied microbiology and biotechnology*, 60(3); 258-274.

27. Welker, T.L., Lim, C., Yildirim-Aksoy, M., Shelby, R., Klesius, P.H. (2007). Immune response and resistance to stress and Edwardsiella ictaluri, fed diets containing commercial whole-cell yeast or yeast subcomponents. *Journal of World Aquaculture Society*, 38; 24-35.

28. Ya, Chang., Xia, L., Zhang, M., Zhang, J., Xing, G. (2012). The toxic effects and mechanisms of CuO and ZnO nanoparticles. *Materials*, 5(12); 2850-2871, 2012.

29. Ye, J.D., K. Wang, F. D. Li, Sun, Y. Z. (2011). Single or combined effect of fructo and mannan oligosaccharide supplements and *Bacillus clausii* on the growth, feed utilization, body composition, digestive enzyme activity, innate immune response and lipid metabolism of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture Nutrition*, 17; 902-911.



Dietary Effect of Prebiotic Pretreatment on Hematological Indices of Tilapia Exposed to Silver Nanoparticles

F. Kakavand¹, **A. Hedayati**¹, A. Jafar Nodeh¹, S. Maddah², M. Rezaei Shadegan¹

1. Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. Hedayati@gau.ac.ir

2. Faculty of Environmental Sciences, Tehran University, Tehran, Iran.

Received: 2020.10.1

Accepted: 2020.10.5

Abstract

Introduction & Objective: Emerging contaminants of nanoparticles in aquatic ecosystems cause stress response in aquatic animals and decrease their immune function. Therefore, use of immune stimuli such as prebiotics is very necessary. The aim of this study was to investigate the effect of different levels of prebiotic *Pleurotus ostreatus* on hematological indices of tilapia exposed to silver nanoparticles.

Materials and Methods: 120 fish were distributed for 42 days in 4 treatments (3 replicates): control (1), no prebiotic fungi, treatment (2) food containing 0.05, treatment (3) food containing 0.1 and treatment (4) food contained 0.2% prebiotic. Then, 0.5 ppm of silver nanoparticles was exposed to each group for 16 days and blood parameters were examined.

Results: Prebiotic alone had no significant effect on erythrocyte count, mean cell volume (MCV), mean cell hemoglobin (MCH), mean erythrocyte hemoglobin concentration (MCHC), hematocrit, hemoglobin, white blood cell (P < 0.05) but exposure to silver nanoparticles and prebiotic in combination increased the mentioned factors compared to the control and prebiotic treatments alone. However, the levels of white blood cells and erythrocytes, hemoglobin, hematocrit, and MCH were higher than the other treatments in the combination of 0.2 prebiotic and silver nanoparticles.

Conclusion: Oral prebiotics stimulate non-specific immunity in tilapia, the combined use of nano-silver and prebiotic mushrooms increase the amount of blood indices and reduce the destructive effects of nano-silver on blood indices. It is concluded that the 0.2% prebiotic level could have the best effect on the blood indices of tilapia.

Key word: Prebiotic, *Pleurotus ostreatus*, Tilapia, Blood Indices .