اثر سمیت سولفات نقره بر شاخص‌های خونشناسی ماهی تیلاپیا نیل (*Oreochromis niloticus*) تغذیه شده با پربیوتیک قارچ صدفی (*Pleurotus ostreatus*)

محمدرضا غلامی[1]، حامد منوچهری*[1]، رضا چنگیزی*[1]، شایان قبادی[1]، سیدمهدی حسینی فرد[2]

[1]گروه شیلات، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران.

[2]گروه دامپزشکی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران.

*نویسنده مسئول hdmanuchehri@gmail.com; changizi@baboliau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۴/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۶/۲۲

چکیده

افزایش فلزات سنگین سبب برهم زدن اکوسیستم‌های آبی با تأثیرگذاری بر پارامترهای فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و سلول‌های ارگانیسم‌های آبزیان شده و سبب کاهش عملکرد ایمنی ماهیان می‌گردد. این مطالعه، با هدف تعیین تأثیر سمیت سولفات نقره بر شاخص‌های خونی ماهی تیلاپیا نیل (*Oreochromis niloticus*) تغذیه شده با سطوح مختلف پربیوتیک قارچ صدفی (*Pleurotus ostreatus*) صورت گرفت. به‌همین منظور، تعداد ۱۲۰ قطعه بچه ماهی تیلاپیا نیل به مدت ۶ هفته در ۴ تیمار با جیره‌های ۰، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ درصد پربیوتیک قارچ صدفی تغذیه شدند. در پایان دوره تغذیه، نمونه‌های آزمایشی به مدت ۱۴ روز در معرض سولفات نقره قرار گرفتند و نمونه‌برداری در دو زمان (در پایان دوره تغذیه، در پایان دوره مواجهه با سم) انجام و پارامترهای خون‌شناسی ارزیابی شد. نتایج نشان داد که پربیوتیک به تنهایی اثر معنی‌داری بر RBC، MCV، هماتوکریت و هموگلوبین نداشت ($P>0/05$). اما میزان گلبول سفید، MCH و MCHC در تیمارهای تغذیه شده با پربیوتیک ۰/۲ قارچ صدفی و مواجهه با سم، افزایش معنی‌داری داشت($P<0/05$). در مجموع، پربیوتیک پودر قارچ صدفی ایمنی غیراختصاصی ماهی تیلاپیا را تحریک کرد و اثرات تخریبی ناشی از سولفات نقره را بر شاخص‌های خونی کاهش داد. در مجموع میزان ۰/۱ و ۰/۲ درصد پربیوتیک قارچ صدفی در تیمارهایی که در معرض سولفات نقره بودند، توانست وضعیت شاخص‌های خونی ماهی تیلاپیا نیل را بهبود بخشد.

واژگان کلیدی: فلزات سنگین، پربیوتیک، ماهی تیلاپیا نیل، شاخص خونی.

مقدمه

اکوسیستم‌های آبی بزرگ‌ترین محیط‌های طبیعی هستند که دائماً با تهدیدات کاهش تنوع ژنتیکی و زیستی مواجه هستند (Shahbazi Naserabad *et al*., 2015). فلزات سنگین سبب تغییر در اکوسیستم می‌شوند و در نتیجه اثرات فیزیولوژیکی مختلف، فرآیندهای بیوشیمیایی و سلولی ارگانیسم‌های آبزی را تغییر می‌دهند. بررسی اثرات سمی فلزات سنگین روی ماهیان حائز اهمیت است؛ زیرا حلقه مهمی در زنجیره غذایی هستند و آلودگی آن‌ها به فلزات سنگین باعث عدم تعادل در سیستم آبی می‌شود (Khabbazi *et al*., 2014). نقره (Ag^{+}) یکی از سمی‌ترین فلزاتی است که برای موجودات آبزی شناخته شده است (Yalsuyi and Vajargah, 2017). نقره به عنوان هالید در ساخت مواد تصویربرداری عکاسی، جواهرات، سکه‌ها، جوهرهای پاک‌نشدنی، ظروف غذاخوری استفاده می‌شود و به عنوان نمک نقره در تولید مواد سوزاننده، میکروب کش‌ها، ضدعفونی‌کننده‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (Yalsuyi and Vajargah, 2017). همچنین یک محصول زائد حاصل از استخراج فلزات سنگین و فرآیندهای آسیاب به شمار می‌رود (Yi and Zhang, 2012). بسیاری از محققین سمیت نقره را در موجودات آبزی مختلف گزارش کرده‌اند (Lee *et al*., 2005; Zhang *et al*., 2013; Johari *et al*., 2016; Vali *et al*., 2020)، اما داده‌های مربوط به سمیت حاد و اثرات سولفات نقره ($AgSO_4$) بر پارامترهای خونی ماهی تیلاپیانیل کمیاب است.

سولفات نقره همراه با سایر نمک‌های نقره در آماده سازی‌هایی با اثر ضد باکتریایی و ترمیم‌کننده زخم استفاده می‌شود. در پانسمان‌ها و محصولات نساجی پزشکی، روپوش‌های جراحی، ملحفه‌های تخت و تشک برای بیماران مبتلا به سوختگی و زخم و برای ضدعفونی‌کردن استفاده می‌شود. این ماده در حالت طبیعی سمیت کمی دارد (LD_{50} برای موش‌ها= ۵۰۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم)، اما میزان زیاد آن جهش‌زا بوده و در آزمایش‌های in vivo به سختی مطالعه شده است (Lee *et al*., 2005).

ماهی‌ها یکی از مهم‌ترین موجودات آبزی هستند که به‌علت حساسیت در مقابل آلاینده‌ها از اهمیت خاصی برخوردارند و به‌عنوان مهم‌ترین زیست‌سنج‌ها در سیستم‌های آبی برای برآورد سطح آلودگی فلزات در نظر گرفته می‌شوند (Ali *et al*., 2014). ماهی تیلاپیا نیل یکی از مهم‌ترین منابع ماهی از نظر اقتصادی در سراسر جهان می‌باشد، اما پرورش آن‌ها عمدتاً محدود به نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری و به میزان کمتر در نواحی معتدل دنیا است. ماهیان تیلاپیا متعلق به راسته سوف ماهیان و خانواده سیکلیده (*Cichlidae*)، بومی قاره آفریقا هستند، فعالیت این ماهیان در دمای کمتر از ۲۰ درجه سانتی‌گراد کاهش و در دمای کمتر از۱۶ درجه تغذیه کاملاً متوقف می‌شود (Javad and Usmani, 2015).

فاکتورهای خونی در گونه‌های مختلف متفاوت و تحت تأثیر شرایط محیطی، تغذیه‌ای، سن، گونه، جنسیت، دمای آب، ترکیبات شیمیایی، سختی و pH آب، روش‌های نمونه‌گیری، شمارش سلولی و رنگ‌آمیزی و عوامل استرس زایی مانند صید و دستکاری می‌باشد (جمیلی و همکاران، ۱۳۸۷). سنجش پارامترهای خونی برای تعیین احتیاجات و اجزاء غذایی جدید و سایر افزودنی‌ها می‌توانند مفید باشند؛ به‌طورکلی، درباره اثر پربیوتیک‌ها در پیراسنجه‌های خونی ماهیان، در مقایسه با پیراسنجه‌های رشد و تغذیه، تحقیقات گستردهای انجام نشده است. در این خصوص مطالعاتی بر گونه‌های Andrews و همکاران (۲۰۰۹)، کپور معمولی(*Cyprinus carpio*) Razeghi و همکاران (۲۰۱۲)، فیل ماهی (*Huso huso*)، Fadaei (۲۰۱۳) تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*)، Hisano و همکاران (۲۰۱۸) راهو (*Labeo rohita*) انجام شده است. به‌طورکلی یکی از تأثیرات احتمالی پربیوتیک‌ها افزایش عملکرد ایمنی است. استفاده از پروبیوتیک‌ها و پری‌بیوتیک‌ها در سال‌های اخیر به‌عنوان یک درمان مناسب در پرورش ماهی مورد توجه قرار گرفته است، و از آن به‌عنوان یک استراتژی کنترل زیستی امیدوارکننده یاد می‌شود (Rombout *et al*., 2010). پربیوتیک‌ها مواد غذایی غیر قابل هضمی هستند، که مکانیسم بالقوه آن شامل افزایش تولید اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه روده، تعامل با گیرنده‌های کربوهیدرات روی سلول‌های اپیتلیال روده و سلول‌های ایمنی و جذب جزئی که منجر به تماس موضعی و سیستمیک با سیستم ایمنی می‌شود (Seifert and Watzl, 2007).

در بررسی رزم‌آرا و همکاران (۱۳۹۳)، اثر نانوذرات نقره بر برخی شاخص‌های خون‌شناسی گربه‌ماهی رنگین‌کمان (*Pangasius hypophthalmus*) انجام شد و نتایج نشان داد که میزان هموگلوبین، هماتوکریت و تعداد گلبول قرمز در دوز ۲۰ میکروگرم بر لیتر نانوذرات نقره در روز اول افزایش یافت. همچنین غلظت بالای نانوذرات نقره و نیترات‌نقره منجر به تغییر معنی‌دار فراوانی انواع گلبول‌های سفید شد. در مطالعه جهانبخشی و همکاران (۱۳۹۶)، نتایج حاصل از تحلیل پارامترهای خون‌شناسی ماهی قرمز (*Carassius auratus*) تغذیه شده با جیره‌های حاوی سطوح مختلف سولفات روی نشان داد که میزان گلبول‌های سفید خون، میانگین حجم گلبول، میانگین هموگلوبین گلبول و میانگین غلظت هموگلوبین گلبول در تیمارهای مختلف آزمایشی تفاوت معنی‌داری را با یک‌دیگر نشان

ندادند. اما در تعداد گلبول‌های قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی وجود داشت. در بررسی دیگر توسط کاکاوند و همکاران (۱۳۹۸)، تأثیر سطوح مختلف پربیوتیک قارچ صدفی(*Pleurotus ostreatus*) بر ماهی تیلاپیا مواجهه شده با نانوذرات نقره انجام شد و نتایج نشان داد پارامترهای خون‌شناسی از جمله: گلبول قرمز، گلبول سفید،MCV، MCH، MCHC، هملتوکریت و هموگلوبین معنی‌دار نبود ولی تیمارهای در معرض سم و پربیوتیک سبب افزایش این پارامتر در مقایسه با شاهد داشته است.

آزمایشی توسط Loghmani Jahromi و همکاران (۲۰۱۴)، به‌منظور بررسی تأثیر پربیوتیک ایمونوژن بر شاخص‌های خونی بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام شد. تفاوت معنی‌داری در پارامترهای خونی شامل هماتوکریت، RBC، WBC، HB، تعداد لنفوسیت و نوتروفیل در ماهیان تغذیه شده با جیره پربیوتیک وجود داشت ($P<۰/۰۵$). و مشخص شد میزان ۰/۱۵-۰/۲ درصد از این پربیوتیک اثرات مثبتی بر شاخص‌های خونی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان دارد.

در پژوهشی توسط Abarghoei و همکاران (۲۰۱۵)، به بررسی کارایی سولفات نقره به‌عنوان یک ماده سمی در ماهی قرمز (*Carassius auratus*) پرداخته شد. مصرف سولفات نقره باعث کاهش معنی‌دار در پارامترهای MCHE پس از ۴۸ ساعت، MCV و MCH پس از ۹۶ ساعت و لنفوسیت پس از ۹۶ ساعت در مقایسه با گروه کنترل می‌شود. همچنین افزایش لنفوسیت پس از ۲۴ ساعت مواجهه معنی‌دار بود. در مطالعه Abdel-Warith و همکاران (۲۰۲۰) تأثیر غلظت‌های مختلف سولفات‌مس بر تیلاپیا نیل (*Oreochromis niloticus*) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج ماهیانی که در معرض $CuSO_4$ قرار گرفتند، کاهش سطوح RBC، Hb، Hct را نشان داد. و میزان WBC و سطوح MCHC، MCH و MCV تیمارهای مواجهه با $CuSO_4$ به‌طور قابل توجهی افزایش یافت.

Soliman و همکاران (۲۰۲۱)، در بررسی نقش پیشگیرانه اسپیرولینا پلاتنسیس بر اثرات سولفات مس در ماهی تیلاپیا نیل (*Oreochromis niloticus*) گزارش کردند که به‌طور قابل توجهی پارامترهای پروتئین کل سرم، گلوکز، آسپارتات آمینوترانسفراز، آلانین آمینوترانسفراز افزایش یافتند، در مقابل، بیشتر شاخص‌های خونی پس از مواجهه با $CuSO_4$ به‌طور قابل توجهی کاهش یافت. مطالعات خون‌شناسی روش ارزشمندی برای ارزیابی آثار محیطی آلاینده‌ها بر ماهیان می‌باشد. بنابراین با توجه به موارد فوق و اهمیت بررسی اثرات فلزات سنگین به‌ویژه سولفات نقره در آبزیان و افزایش کاربرد سولفات نقره در صنعت، و به‌خصوص اهمیت وجود ماهی تیلاپیای نیل به‌علت رشد سریع و پرورش ساده و ارزان در اکثر کشورهای جهان، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات سولفات نقره بر شاخص‌های خون‌شناسی ماهی تیلاپیا نیل انتخاب و این فرضیه که احتمال کاهش اثرات سولفات نقره با پربیوتیک قارچ صدفی وجود دارد، نیز مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در مرکز تحقیقات آبزی‌پروری شهید ناصر فضلی برآبادی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام گرفت. در مجموع ۱۲۰ قطعه بچه ماهی تیلاپیا (میانگین وزنی در حدود ۲۰ گرم) از مرکز خصوصی تکثیر و پرورش بجنورد پاکنژاد تهیه و با تراکم ۱۰ قطعه بچه ماهی در مخازنی با هوادهی و جریان مناسب آب رهاسازی شدند، به مدت ۲ هفته با شرایط آزمایشی عادت دهی شده و در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل ۴ تیمار و هرکدام در ۳ تکرار به صورت زیر تیماربندی شد (ایری و همکاران، ۱۴۰۱) (جدول ۱). در طول دوره آزمایش با سطوح مختلف پودر قارچ به مدت ۶ هفته تغذیه انجام گرفت.

(شاهد): تعداد ۳۰ عدد ماهی (۳ تکرار و هر تکرار شامل ۱۰عدد ماهی) که با غذای پایه تغذیه شدند.

جدول ۱- تیمار بندی نمونه‌های آزمایشی.

شاهد	تیمار۱	تیمار۲	تیمار۳
فاقد پربیوتیک+ فاقد سولفات‌نقره	غذای ۵g/kg پربیوتیک پودرقارچ صدفی در هر کیلوگرم غذا	غذای ۱۰ g/kg پربیوتیک پودرقارچ صدفی در هر کیلوگرم غذا	غذای ۲۰g/kg پربیوتیک پودرقارچ صدفی در هر کیلوگرم غذا

(تیمار۱): تعداد ۳۰ عدد ماهی (۳ تکرار و هر تکرار شامل ۱۰عدد ماهی) که با غذای ۵ گرم بر کیلوگرم پربیوتیک پودرقارچ صدفی در هر کیلوگرم غذا مورد تغذیه قرار گرفتند.

(تیمار۲): تعداد ۳۰ عدد ماهی (۳ تکرار و هر تکرار شامل ۱۰عدد ماهی) که با غذای ۱۰ گرم بر کیلوگرم پربیوتیک پودرقارچ صدفی در هر کیلوگرم غذا مورد تغذیه قرار گرفتند.

(تیمار۳) تعداد ۳۰ عدد ماهی (۳ تکرار و هر تکرار شامل ۱۰عدد ماهی) که با غذای ۲۰ گرم بر کیلوگرم پربیوتیک پودرقارچ صدفی در هر کیلوگرم غذا مورد تغذیه قرار گرفتند.

در پایان دوره تغذیه تمامی نمونه ماهیان تیمارها به مدت دو هفته در مواجهه سم سولفات‌نقره قرار گرفتند.

برای تهیه جیره حاوی مکمل غذایی پربیوتیک ابتدا قارچ صدفی از یک بخش خصوصی پرورش‌دهنده قارچ (بازار محلی شهرگرگان) خریداری و در یک مکان استریل پس از خشک‌کردن و پودرکردن توسط آسیاب (Parses، ایران) به جیره غذایی پایه اضافه شد. پس از تبدیل به پلت‌های مناسب در دوره آزمایش به صورت دستی و بر اساس حداکثر ۳ ٪ وزن توده زنده در ۲ نوبت به مدت ۶ هفته مورد استفاده قرار گرفتند و در پایان این ۶ هفته نمونه‌برداری اول انجام شد. بعد از گذشت ۶ هفته به هرکدام از تانک‌ها ۵۰ درصد غلظت کشنده تحت سولفات‌نقره (merck، آلمان)، که با استفاده از نتایج Zhurkov و همکاران (۲۰۱۷)، به‌دست آمده است، به‌مدت ۱۴ روز اضافه شده و روزانه، ۵۰ درصد حجم آب تانک‌ها تعویض گردید تا غلظت سم در هر تیمار حفظ شود. نمونه‌برداری از خون در پایان دوره آزمایش انجام شد (Aida *et al.*, 2009). در روز نمونه‌برداری، ابتدا ماهیان با پودر گل میخک بیهوش شدند. سپس نمونه‌های خون با استفاده از سرنگ از ساقه دمی گرفته شد. میزان پارامترهای گلبول‌های قرمز، گلبول-های سفید و هماتوکریت خون تعیین شد. برای شمارش افتراقی گلبول‌های سفید و گلبول‌های قرمز پس از تهیه گسترش مناسب از خون، گسترش‌ها با روش گیمسا رنگ‌آمیزی نمودیم. درصد هماتوکریت نمونه‌های خون، پس از سانتریفوژ کردن تعیین گردید، در این روش لوله‌های هماتوکریت در شیارهای مخصوص در سانتریفیوژ (eppendorf، آلمان) گذاشته، سپس درپوش را قرار داده و به مدت ۵ دقیقه با سرعت۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. مقادیر حجم متوسط گلبولی(MCV)، هموگلوبین متوسط سلولی(MCH) و غلظت متوسط هموگلوبین گلبول‌های قرمز(MCHC) بر اساس فرمول‌های استاندار زیر تعیین شدند (Fadaei, 2013).

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

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

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

تجزیه وتحلیل آماری: این آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی برنامه‌ریزی و اجرا گردید. پس از ثبت داده‌ها همگنی آن‌ها با استفاده از کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شد. برای مقایسه و نیز وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح احتمال ($P<۰/۰۵$) از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncan's test range-multiple) استفاده گردید. کلیه آنالیزهای آماری با

جدول ۲- تأثیر تیمارهای مختلف پربیوتیک و سولفات نقره بر فاکتورهای خونی بچه ماهی تیلاپیا نیل.

تیمارها	گلبول قرمز(۱۰)	هموگلوبین (گرم در دسی لیتر)	هماتوکریت (درصد)	MCV (فمتولیتر)	MCH (پیکوگرم)	MCHC (گرم در دسی لیتر)
شاهد	۲/۴۵±۰/۵^{a}	۷/۱۷±۰/۵۷^{a}	۲۹/۶۶±۱/۱۵^{ab}	۱۵۰±۵/۸۷^{a}	۳۴/۳±۱/۷^{ab}	۲۴/۱۷±۵^{ab}
ppt۰/۰۵پربیوتیک	۱/۹۵±۰/۲۴^{a}	۷/۹۲±۰/۹۹^{a}	۳۰/۶۶±۱/۵^{a}	۱۶۱±۱۱/۷۴^{a}	۳۳/۴۵±۰/۹۷^{ab}	۲۱/۲۸±۲/۲^{b}
ppt۰/۱پربیوتیک	۲/۰۸±۰/۳۱^{a}	۶/۸۲±۱/۰۲^{a}	۳۱±۲/۶۴^{ab}	۱۵۹±۹/۰۲^{a}	۳۲/۸±۲/۹۸^{ab}	۲۲/۷۴±۲/۴۴^{ab}
ppt۰/۲پربیوتیک	۲/۰۵±۰/۲۵^{a}	۶/۱۳±۱/۰۸^{a}	۳۳±۲/۳^{abc}	۱۵۵±۶/۲۵^{a}	۲۹±۲/۱۵^{ab}	۱۹±۲/۱^{b}
شاهد+سم	۲/۰۵±۰/۲۶^{a}	۵/۹۱±۰/۲۲^{a}	۲۵/۳۳±۱/۴۴^{bcd}	۱۲۵/۰۷±۲۵^{a}	۲۹/۱۶±۵^{b}	۲۳/۴۱±۰/۹۶^{ab}
پربیوتیک ppt۰/۰۵ + ppm۰/۵ سولفات نقره	۲/۰۴±۰/۳۵^{a}	۵/۶±۱/۱^{a}	۲۵/۵±۵/۱۹^{abcd}	۱۲۹/۵۲±۹/۵۹^{a}	۲۹/۹±۲/۱۱^{b}	۲۱/۲±۰/۹۶^{b}
پربیوتیک ppt۰/۱ + ppm۰/۵ سولفات نقره	۱/۸۳±۰/۳^{a}	۶/۹۹±۰/۵۹^{a}	۲۵۲۲±۳/۳^{dc}	۱۳۲/۷۵±۵/۷۸^{a}	۳۳/۱۱±۳^{ab}	۲۲±۲^{ab}
پربیوتیک ppt۰/۲ + ppm۰/۵ سولفات نقره	۱/۵۵±۰/۳۳^{a}	۶/۳۹±۰/۲^{a}	۲۹±۲/۰۲^{d}	۱۲۶/۳۲±۱۲/۲۹^{a}	۳۷/۴۳±۷^{a}	۲۹±۲/۰۱^{a}

حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($P<۰/۰۵$).

استفاده از نرم‌افزارSPSS نسخه ۲۲ و ترسیم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel نسخه ۲۰۰۷ انجام شد.

نتایج

جدول‌های ۲ و ۳ نشان‌دهنده نتایج پارامترهای هماتولوژی ماهی تیلاپیا نیل در معرض سولفات نقره و پربیوتیک قارچ صدفی است. بر اساس نتایج، تعداد گلبول‌های قرمز(RBC) و هموگلوبین (HB) در مجموع تیمارهای آزمایشی تأثیر معنی‌داری نداشت ($P>۰/۰۵$). اما مقادیر گلبول قرمز در تیمار تغذیه شده با پربیوتیک ۰/۲ کاهش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد داشت ($P<۰/۰۵$). نتایج تعداد گلبول‌های سفید (WBC) و هماتوکریت (HT) نشان داد که در مجموع تیمارهای آزمایشی پربیوتیک براین شاخص تأثیر معنی‌داری داشت ($P<۰/۰۵$). و در بررسی تعداد گلبول سفید تیمارهای ترکیب سولفات نقره و پربیوتیک قارچ صدفی نسبت به تیمارهای تغذیه شده با پربیوتیک و گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشت ($P<۰/۰۵$). همچنین در بررسی هماتوکریت تیمارهای ترکیب سولفات نقره و پربیوتیک قارچ صدفی نسبت به تیمارهای تغذیه شده با پربیوتیک و گروه شاهد کاهش معنی‌داری داشت ($P>۰/۰۵$). در بررسی تغییرات پارامترهای MCH و MCHC در کل تیمارهای آزمایشی نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌دار وجود نداشت ($P>۰/۰۵$). اما در تیمار ترکیب سولفات نقره و ۰/۲ پربیوتیک قارچ صدفی نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌دار مشاهده شد($P<۰/۰۵$). هچنین در بررسی MCV تیمارهای آزمایشی کاهش معنی‌داری در تیمارهای ترکیب سولفات نقره و پربیوتیک نسبت به گروه شاهد مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). جدول ۳ تأثیر سطوح مختلف مکمل غذایی پربیوتیک قارچ صدفی به تنهایی و پربیوتیک به همراه سولفات نقره را بر برخی پیراسنجه های هماتولوژی در ماهی تیلاپیا نیل نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که در مقابل افزایش سطوح مختلف پربیوتیک و همچنین افزایش سطوح ترکیبی پربیوتیک و سولفات نقره در جیره ماهیان افزایش معنی‌داری در درصد لنفوسیت و منوسیت نسبت به گروه شاهد مشاهده شد ($P<۰/۰۵$).

بحث و نتیجه‌گیری

جدول ۳- تأثیر تیمارهای مختلف پربیوتیک و سولفات‌نقره بر شمارش افتراقی گلبول‌های سفید بچه ماهی تیلاپیای نیل.

تیمارها	گلبول سفید (10^3)	لنفوسیت (درصد)	نوتروفیل (درصد)	مونوسیت (درصد)	ائوزینوفیل (درصد)
شاهد	۵۰۵۰±۳۳۷/۴۹^{c}	۸۶±۶	۱۱±۳	۳±۰/۷	۰
پربیوتیک ۰/۰۵ ppt	۵۴۰۰±۱۱۶۲/۹۷^{c}	۹۰±۵	۷±۲	۳±۰/۴	۰
پربیوتیک ۰/۱ ppt	۶۶۳۳/۳۳±۱۰۰۱/۶۶^{bc}	۹۳±۳	۶±۳	۱±۱	۰
پربیوتیک ۰/۲ ppt	۹۹۹۹±۵۳۴/۶۳^{a}	۹۲±۵	۷±۱	۲±۱	۰
شاهد+سم	۶۶۰۰±۳۱۲/۲۴^{bc}	۸۸±۸	۹±۱	۳±۱	۰
سولفات نقره ppm+ ۰/۵ ppt پربیوتیک ۰/۰۵	۸۱۰۰±۱۰۰۳/۷۴^{ab}	۹۱±۳	۶±۱	۳±۰/۵	۰
سولفات نقره ppm+ ۰/۵ ppt پربیوتیک ۰/۱	۹۱۵۰±۱۱۶۹/۴^{a}	۹۳±۲	۵±۳	۲±۱	۰
سولفات نقره ppm+ ۰/۵ ppt پربیوتیک ۰/۲	۱۰۵۰۰±۶۶۵/۸۳^{a}	۹۴±۴	۵±۱	۱±۰/۲	۰

حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشد($P<۰/۰۵$).

افزایش میزان فلزات سنگین در یک محیط سبب اثرات زیانباری بر جاندارانی ساکن آن محیط زندگی می‌گذارد و ممکن است از طریق بیماری، نوع تغذیه، مکمل‌های غذایی، آلودگی، تغییرات دما و استرس به‌صورت غیر مستقیم در تغییر شاخص‌های خونی تأثیر به‌سزایی داشته باشد. خون، بافت سیال و یکی از مهم‌ترین مایعات بدن است که ترکیبات آن تحت تأثیر حالات مختلف فیزیولوژیک و پاتولوژیک دستخوش نوسان و تغییر می‌گردد. گلبول‌های سفید مهم‌ترین سلول‌های هستند که واکنش‌های ایمنی اختصاصی و غیر اختصاصی را در ماهیان تحریک می‌کنند. افزایش شاخص‌های گلبول قرمز (گلبول‌های قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت) اغلب به دلیل کم آبی و هیپوکسی رخ می‌دهد و متعاقباً حرکت گلبول‌های قرمز را در جریان خون افزایش می‌دهد. مکانیسم ساده دیگری نیز با قلیایی بودن و افزایش نیاز به اکسیژن رخ می‌دهد زیرا این مکانیسم حسگرهای کلیه را وادار به تشخیص هیپوکسی و افزایش حرکت گلبول های قرمز خون می‌کند (Di Giulio and Hinton, 2008).

در تیمارهای آزمایشی پربیوتیک مواجهه شده با سولفات نقره تعداد گلبول‌های قرمز نسبت به تیمار شاهد و تیمارهای پربیوتیک قبل از مواجهه با نانونقره تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. گزارش شده است که تعداد گلبول‌های قرمز و غلظت هموگلوبین وابسته به نوع گونه می‌باشد. 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. مطالعات بسیاری مثل تأثیر غلظت‌های مختلف سولفات مس بر تیلاپیا نیل (*Oreochromis niloticus*) توسط Abdel-Warith و همکاران (۲۰۲۰) مغایرت و با مطالعه Soliman و همکاران (۲۰۲۱) در بررسی نقش اسپیرولینا پلاتنسیس بر اثرات سولفات مس در ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) هم‌سو بوده است. در بررسی میزان هموگلوبین خون تیمارهای آزمایشی تفاوت معنی‌داری وجود نداشت و با افزایش درصد پربیوتیک میزان این پارامترها کاهش یافته است که ممکن است سولفات نقره به‌عنوان یک فلزسنگین سبب تغییر در شکل و اندازه سلول‌های خونی شده و خواص هموگلوبین را برای نگه داشتن اکسیژن تغییر و کاهش دهد. که این کاهش در بررسی Abdel-Warithو همکاران(۲۰۲۰) در پارامتر هموگلوبین مشاهده شده است که با پژوهش حاضر هم‌سو می‌باشد. همچنین در بررسی میزان MCV خون تیمارهای آزمایشی تفاوت معنی‌داری وجود نداشت و

با افزایش درصد پربیوتیک میزان این پارامترها کاهش یافته است که در بررسی رزم آرا (۱۳۹۳) کاهش پارامتر (MCV) مشاهده شده است که با پژوهش فوق هم‌سو می‌باشد.

در تأثیر درصدهای مختلف پربیوتیک بر سمیت سولفات نقره در ماهی مورد مطالعه میزان گلبول‌های سفید خون افزایش معنی‌داری داشته است. این افزایش شاخص مناسبی برای ایمنی است و نشان‌دهنده افزایش توان ایمنی در برابر عوامل بیماری‌زای مهاجم می‌باشد. استرس می‌تواند موجب افزایش تعداد گلبول سفید و قند خون و موجب کاهش تعداد گلبول قرمز شود. که این مسئله در ماهیان دیگر هم به اثبات رسیده است. به‌عنوان مثال در مطالعه اثر نانوذرات نقره بر گربه ماهی رنگین‌کمان توسط رزم آرا و همکاران (۱۳۹۳) تعداد گلبول سفید با مطالعه فوق هم‌سو بود. همچنین در بررسی تأثیر سطوح مختلف پربیوتیک قارچ صدفی (*Pleurotus ostreatus*) بر شاخص‌های هماتولوژی خون ماهی تیلاپیا مواجهه شده با نانوذرات نقره توسط کاکاوند و همکاران (۱۳۹۹)، مقادیر گلبول سفید در تیمار ترکیبی ۰/۲ پربیوتیک و نانوذرات نقره بیشتر از سایر تیمارها بود و در مطالعه Abdel-Warith و همکاران (۲۰۲۰) تأثیر غلظت‌های مختلف سولفات‌مس بر تیلاپیا نیل (*Oreochromis niloticus*) میزان WBC در تیمارهای مواجهه با $CuSO_4$ به‌طور قابل توجهی افزایش یافت که با نتایج این مطالعه هم‌سو می‌باشد. میزان هماتوکریت، MCH، MCHC در درصدهای مختلف پربیوتیک بر سمیت سولفات نقره در ماهی تیلاپیانیل افزایش معنی‌داری داشته است که این افزایش در مطالعه دیگر از جمله در بررسی اثرات سطوح مختلف پربیوتیک قارچ صدفی(*Pleurotus ostreatus*) بر شاخص‌های خونی ماهی تیلاپیا مواجهه شده با نانوذرات نقره توسط کاکاوند و همکاران (۱۳۹۹) مقادیر هماتوکریت، MCHدر تیمار ترکیبی ۰/۲ پربیوتیک و نانوذرات نقره بیشتر از سایر تیمارها بود. و در مطالعه اثر نانوذرات نقره بر گربه ماهی رنگین‌کمان نتایج تغییرات هماتوکریت (رزم آرا و همکاران، ۱۳۹۳) با مطالعه فوق هم‌سو بود.

در بررسی شمارش گلبول‌های سفید مشخص شد میزان لنفوسیت در تیمارهای تغذیه شده با ۰/۲ درصد پربیوتیک و مواجهه با سولفات نقره نسبت به شاهد افزایش یافته است، در بررسی پارامترهای خون‌شناسی فیل‌ماهی پرورشی در معرض سطوح مختلف پربیوتیک اولیگوفروکتوز که توسط Hoseinifar و همکاران (۲۰۱۱) انجام شد نتایج نشان داد که افزودن سطوح مختلف پربیوتیک به چیره غذایی بچه فیل‌ماهی پرورشی اثری بر تعداد گلبول‌های قرمز و سفید ندارند. هرچند شمارش تفریقی گلبول‌های سفید افزایش معنی‌داری در تعداد لنفوسیت‌های بچه ماهیان تغذیه شده با سطح ۱ و ۲درصد پربیوتیک نشان داد و نتایجی مشابه نیز در بررسی اثرات پربیوتیک ایمونوژن بر ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان توسط Loghmani Jahromi و همکاران (۲۰۱۴)گزارش شد. در پژوهشی توسط Abarghoei و همکاران (۲۰۱۵) بررسی اثرات سولفات نقره ($AgSO_4$) در ماهی قرمز (*Carassiusauratus*) مشخص شد که مصرف $AgSO_4$ باعث کاهش معنی‌دار لنفوسیت پس از ۹۶ ساعت در مقایسه با گروه کنترل می‌شود که با مطالعه فوق مغایرت داشت.

براساس نتایج حاصل از مطالعه حاضر و مطالعات گذشته نشان داد که سمیت تحت حاد سولفات نقره بر شاخص‌های خونی تأثیرگذار بود به گونه‌ای که بعد از ۱۴ روز از طریق کاهش گلبول قرمز و هموگلوبین و به دنبال آن کاهش اکسیژن خون میزان ایمنی ماهی تیلاپیانیل تأثیر به‌سزایی داشته است و افزایش درصد پربیوتیک سبب افزایش شاخص‌های خون‌شناسی از جمله گلبول سفید، MCH و MCHC در مقایسه با گروه شاهد در ماهی می‌شود. از این رو می‌توان بیان کرد که سطوح بالا از پربیوتیک می‌تواند مکمل مناسبی برای ماهی تیلاپیا نیل باشد و به‌عبارتی پربیوتیک، ایمنی غیراختصاصی را در ماهی تیلاپیا تحریک نموده و باعث بهبود شاخص‌های هماتولوژی

گردد و اثرات ناشی از سولفات نقره را بهبود بخشد. پس نتیجه‌گیری می‌شود که سطح ۰/۲ و ۰/۱ پربیوتیک قارچ صدفی در جیره می‌تواند دارای اثرات مثبتی بر فاکتورهای خونی ماهی تیلاپیا باشد. استفاده از پروبیوتیک خوراکی سبب تحریک سیستم ایمنی غیر اختصاصی در ماهی تیلاپیا می‌گردد و اثرات نامطلوب آلاینده بر پارامترهای هماتولوژی را کاهش دهد وسطح ایمنی را افزایش دهد.

منابع

ایری ع.، هدایتی س.ع.ا.، پاکنژاد ح.، باقری، ط. ، خالقی س.ر. ۱۴۰۱. بررسی تاثیر مکمل غذایی پربیوتیک پودر قارچ صدفی (*Pleurotus ostreatus*) بر بیان ژن‌های P450 و Hsp70 بافت کبد ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) در مواجهه با سم کلرپیریفوس. فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان. ۱۰(۱): ۲۰-۱.

جهان‌بخشی ع.، شعبانی ع.، قاضی ش.، کلنگی میان دره ح. ۱۳۹۶. تأثیر سطوح مختلف سولفات روی ($ZnSO_4$) در جیره غذایی بر هماتوکریت و فراسنجه های خونی ماهی قرمز (*Carassius auratus*). فیزیولوژی و تکوین جانوری. ۱۰(۴):۱۱-۱.

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

رزم‌آرا پ.، پیکان حیرتی ف.، درافشان س. ۱۳۹۳. اثر نانوذرات‌نقره بر برخی پارامترهای خون‌شناسی گربه ماهی رنگین کمان (*Pangasius hypophthalmus*). سلول و بافت. ۵(۳): ۲۷۲-۲۶۳.

کاکاوند ف.، هدایتی س. ع. ا.، جافر ع.، مداح ع.، رضایی م. ۱۳۹۹. تأثیر پیش تیمار پربیوتیکی بر شاخص‌های خون شناسی ماهی تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*) مواجهه یافته با نانو ذرات نقره .فیزیولوژی و تکوین جانوری. ۱۳(۱): ۱۳-۱.

Abdel-Warith A.W.A., Younis E.S.M., Al-Asgah N.A., Abd-Elkader M.O., Elsayed E.A. 2020. Effects of sub-lethal lead nitrate and copper sulfate concentrations on haematological parameters during long-term exposure in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Scientific & Industrial Research* 79, 437-441

Abarghoei S., Hedayati S.A., Ghafari Farsani H., Gerami M.H. 2015. Hematological responses of Goldfish (Carassiusauratus) to different acute concentrations of Silver Sulfate as a toxicant. *Pollution* 1(3), 247-256.

Aida F.M.N.A., Shuhaimi M., Yazid M., Maaruf A.G. 2009. Mushroom as a potential source of prebiotics: a review. *Trends in Food Science and Technology* 20, 567-575.

Ali A.S., US S.A., Ahmad R. 2014. Effect of different heavy metal pollution on fish. *Res. Journal of Chemical and Environmental Sciences* 2(1), 74-79.

Andrews S.R., Sahu N.P., Pal A.K., 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(1), 61-69.

Di Giulio R.T., Hinton D.E. 2008. The Toxicology of Fishes. CRC Press. 1096 p.

Fadaei M. 2013. Effect of dietary oligosaccharide-mannan on growth performance, survival, body compositin and some hematological parameters in giant sturgeon juvenile (*Huso huso* Linnaeus, 1754). *Fish Physiol Biochem* 38(3), 829-35.

Hisano H., Barros M.M., Pezzato L.E. 2018. Levedura e zinco como pró-nutrientes em rações para tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*): aspectos hematológicos. *Boletim do Instituto de Pesca* 33(1), 35-42.

Hoseinifar S.H., Mirvaghefi A., Mojazi Amiri B., Rostami H K., Merrifield D.L. 2011. The effects of oligofructose on growth performance, survival and autochthonous intestinal microbiota of beluga (Huso huso) juveniles. *Aquaculture Nutrition* 17(5), 498-504.

Javed M., Usmani N. 2015. Impact of heavy metal toxicity on hematology and glycogen status of fish: a review. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B:*

Soliman H.A., Hamed M., Sayed A.E.D.H. 2021. Investigating the effects of copper sulfate and copper oxide nanoparticles in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using multiple biomarkers: the prophylactic role of Spirulina. *Environmental Science and Pollution Research* 28(23), 30046-30057.

Vali S., Mohammadi G., Tavab, K.R., Moghadas F., Naserabad S.S. 2020. The effects of silver nanoparticles (Ag-NPs) sublethal concentrations on common carp (Cyprinus carpio): Bioaccumulation, hematology, serum biochemistry and immunology, antioxidant enzymes, and skin mucosal responses. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 194, 110353.

Yalsuyi A.M., Vajargah M.F. 2017. Acute toxicity of silver nanoparticles in Roach (Rutilus rutilus) and Goldfish (*Carassius auratus*). *Journal of Environmental Treatment Techniques* 5(1), 1-4.

Yi Y.J., Zhang S.H. 2012. The relationships between fish heavy metal concentrations and fish size in the upper and middle reach of Yangtze River. *Procedia Environmental Sciences* 13, 1699-1707.

Zhurkov V.S., Savostikova O.N., Yurchenko, V.V., Krivtsova E.K., Kovalenko M.A., Murav'eva L.V., Sycheva L.P. 2017. Features of the mutagenic and cytotoxic effects of nanosilver and silver sulfate in mice. *Nanotechnologies in Russia* 12(11), 667-672.

Zhang T., Zhang Y., Li D., Xiao T., Li J. 2013. Exposure of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) to environmentally relevant levels of cadmium: hematology, muscle physiology, and implications for stock enhancement in the Xiangjiang River (Hunan, China). *Science China Life Sciences* 56(1), 66-72.

Biological Sciences 85(4), 889-900.

Johari S.A., Kalbassi M.R. 2016. Chronic effect of waterborne colloidal silver nanoparticles on plasma biochemistry and hematology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Coastal Life Medicine* 4(5), 337-340.

Khabbazi M., Harsij M., Hedayati S.A., Gholipoor H., Gerami M.H., Ghafari Farsani H. 2015. Effect of CuO nanoparticles on some hematological indices of rainbow trout*Oncorhynchusmykiss* and their potential toxicity. *Nanomedicine Journal* 2(1), 67-73.

Lee D.Y., Fortin C., Campbell P.G. 2005. Contrasting effects of chloride on the toxicity of silver to two green algae, *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Chlamydomona sreinhardtii*. *Aquatic Toxicology* 75(2), 127-135.

Loghmani Jahromi V., Keyvanshokooh S., Salati A.P., Pashazanoosi H. 2014. Effects of Dietary Immunogen Prebiotic on Growth, Hematological Indices and Proximate Composition of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Oceanography* 5(18), 11-19.

Luskova V. 1995. Determination of normal values in fish. *Acta Universitatis Carolinae Biologica*. 39, 191-200.

Razeghi Mansour M., Akrami R., Ghobadi S.H., Amani Denji K., Ezatrahimi N., Gharaei A. 2012. Effect of dietary mannan oligosaccharide (MOS) on growth performance, survival, body composition, and some hematological parameters in giant sturgeon juvenile (*Huso huso* Linnaeus, 1754). *Fish Physiology and Biochemistry* 38(3), 829-835.

Rombout J.H., Abelli L., Picchietti S., Scapigliati G., Kiron V. 2010. Teleost intestinal immunology. *Fish Shellfish Immunology* 31, 616-626.

Shahbazi Naserabad S., Mirvaghefi A., Gerami M.H., Ghafari Farsani H. 2015. Acute Toxicity and Behavioral -Changes of the Gold Fish (*Carassiusauratus*) Exposed to Malathion and Hinosan. *Iranian Journal of Toxicology* 8(27), 1203-1208.

Seifert, S., Watzl B. 2007. Inulin and oligofructose: Review of Experimental data on immune modulation. *The Journal of Nutrition* 137, 2563-2567.

Toxic effect of silver sulfate on heamtological indices of Nile tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) fed with oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) prebiotic

Mohammad Reza Gholami[1], Hamed Manouchehri[*1], Reza Changizi[*1], Shayan Ghobadi[1], Seyed Mehdi Hoseinifard[2]

[1]Department of Fisheries, Babol branch, Islamic Azad University, Babol, Iran.
[2]Department of Veterinary, Babol branch, Islamic Azad University, Babol, Iran.
*Corresponding authors: hdmanuchehri@gmail.com; changizi@baboliau.ac.ir
Received: 2022/7/21 Accepted: 2022/9/13

Abstract

The increase of heavy metals disturbs the aquatic ecosystems by affecting the physiological, biochemical parameters and cells of the aquatic organism and causes a decrease in the immune function of fishes. The aim of this study was to determine toxic effects of silver sulfate toxicity on some blood indices of Nile tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) fed with different levels of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) prebiotic. 120 Nile tilapia fry were fed for 6 weeks in 4 treatments with 0, 0.05, 0.1 and 0.2% of prebiotics Oyster mushrooms. At the end of feeding period, the experimental samples were exposed to silver sulfate for 14 days, and sampling was done at two times (at the end of the feeding period, at the end of the toxicity exposure) and hematological indices were measured. The results showed prebiotic alone had no significant effect on RBC, MCV, hematocrit and hemoglobin ($P<0.05$). However, the amount of white blood cells, MCH and MCHC significantly increased in the treatments fed with prebiotic 0.2 and exposure. In general, Oyster mushroom powder stimulated the non-specific immunity of tilapia and also reduced the destructive effects caused by silver sulfate on blood indices. In general, the amount of 0.1 and 0.2% oyster mushroom in the exposed treatments was able to improve the normal blood indices of Nile tilapia.

Keywords: Heavy metals, Prebiotic, Nile tilapia, Hematology.