Veterinary Clinical Pathology, Vol.15, No. 58, Summer 2021

"Research article" **DOI: 10.30495/JVCP.2021.1902449.1270**

The effect of prebiotic pretreatment on histological lesions of Nile tilapia fry (*Oreochromis niloticus*) exposed to silver nanoparticles

Kakavand, F.[1], Hedayati, S.A.A. [2*], Rezaei Shadegan, M.[3], Jafar Nodeh, A.[4], Maddah, S.[5]

1- Graduate of MSc in Aquatic Ecology, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
2- Associate Professor of Fisheries and Aquatic Ecology, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
3- Ph.D. Student in Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
4- PhD of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
5- Ph.D. Student in Environment, Faculty of Environmental Sciences, Tehran University, Tehran, Iran.
[*]Corresponding author's email: hedayati@gau.ac.ir
(Received: 2020/12/18 Accepted: 2021/5/6)

Abstract

The presence of emerging nanoparticle contaminants in aquatic environments reduces the safety performance of aquatic animals, so the use of safety stimuli is essential. The aim of the present study was to investigate the effect of different prebiotic levels of oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus*) on tissue damage in the liver and gills of tilapia exposed to silver nanoparticles. For this purpose, 120 juveniles of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) were divided into 4 experimental groups with 3 replicates and bred for 42 days including treatment 1 as control (fed with diet without probiotic) and treatments 2-4, fed with diet containing 0.05%, 0.1% and 0.2% prebiotics, then 5 ppm of silver nanoparticles were added to the culture medium of each treatment for 16 days. At the end of the experimental period, fish were anesthetized with clove anesthetic solution (220 mg/L) and their liver and gill tissues were isolated for histological studies. Treatments exposed to silver nanoparticles showed extensive complications in gill tissue as well as severe injuries and bile stasis in liver tissue. However, the use of mushroom prebiotics was able to reduce the destructive effects of silver nanoparticles on these tissues. Overall, the results indicated that treatment with 0.2% of prebiotics in the diet could have the best protective effect on tissue damage in the liver and gills of tilapia exposed to silver nanoparticles.

Conflict of interest: None declared.
Keywords: *Pleurotus ostreatus*, Prebiotic Silver nanoparticles, Tilapia.

"مقاله پژوهشی" DOI: 10.30495/JVCP.2021.1902449.1270

تأثیر پیش‌تیمار پره‌بیوتیکی بر آسیب‌های بافتی در بچه‌ماهیان تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*)، مواجهه‌یافته با نانوذرات نقره

فرحناز کاکاوند[۱]، سیدعلی‌اکبر هدایتی[۲*]، مریم رضایی‌شادگان[۳]، علی جافر نوده[٤]، سعید مداح[٥]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد بوم‌شناسی آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم‌کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

۲- دانشیار گروه تولید و بهره‌برداری آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

۳- دانشجوی دکتری تخصصی تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

٤- دانشجوی دکترای تخصصی تکثیر و پرورش، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

۵- دانشجوی دکترای تخصصی محیط زیست، دانشکده محیط زیست، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: Hedayati@gau.ac.ir

(دریافت مقاله: ۹۹/۹/۲۸ پذیرش نهایی: ۱٤۰۰/۲/۱٦)

چکیده

وجود آلاینده‌های نوظهور نانوذرات در محیط‌های آبی باعث کاهش عملکرد ایمنی آبزیان می‌شود، از این‌رو استفاده از محرک‌های ایمنی بسیار ضروری به نظر می‌رسد. هدف از انجام مطالعه حاضر، بررسی تأثیر سطوح مختلف پره‌بیوتیکی قارچ صدفی (*Pleurotus ostreatus*) بر آسیب‌های بافتی در کبد و آبشش ماهیان تیلاپیای مواجهه‌یافته با نانوذرات نقره بود. به این منظور تعداد ۱۲۰ قطعه بچه‌ماهی تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*) در ٤ گروه آزمایشی با ۳ تکرار شامل تیمار ۱ به‌عنوان شاهد (تغذیه‌شده با غذای فاقد پره‌بیوتیک)، تیمار ۲ تا ٤، تغذیه‌شده با غذای حاوی ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ درصد پره‌بیوتیک تقسیم شدند و به مدت ٤۲ روز پرورش داده شدند، سپس به مدت ۱٦ روز نانوذرات نقره با غلظت ۰/۵ ppm به محیط پرورش هرکدام از تیمارها افزوده شد. در پایان دوره، ماهیان توسط محلول بیهوش‌کننده گل‌میخک (۲۲۰ میلی‌گرم بر لیتر) بیهوش شده و بافت کبد و آبشش آن‌ها برای مطالعات بافت‌شناسی جدا گردید. تیمارهایی که در معرض نانو ذرات نقره بودند عوارض وسیع در بافت آبشش و نیز جراحات شدید و رکود صفرا در بافت کبد را نشان دادند. ولی استفاده از پره‌بیوتیک قارچ صدفی توانست اثرات تخریبی ناشی از نانوذرات نقره بر عوارض بافتی مذکور را کاهش دهد. نتیجه کلی مطالعه حاضر نشان داد که تیمار ۰/۲ درصد با پره‌بیوتیک قارچ صدفی در جیره می‌تواند بهترین تأثیر محافظتی را بر آسیب‌های بافتی در کبد و آبشش ماهی تیلاپیای مواجهه‌یافته با نانوذرات نقره را داشته باشد.

کلیدواژه‌ها: پره‌بیوتیک، قارچ صدفی، ماهی تیلاپیا، آسیب بافتی، نانوذرات نقره.

مقدمه

امروزه نانوذرات نقره به دلیل خواص ضد میکروبی، نوری، الکتریکی و مغناطیسی در جهان کاربرد وسیعی دارد و ٥٦ درصد از تولید نانو را به خود اختصاص می دهد (Kalbassi *at al*., 2011). امروزه به علت ویژگی‌های ضد میکروبی نانو ذرات نقره، از آن به‌طور گسترده در موارد مختلفی مانند صنایع پوشاک، ظروف، مواد غذایی، اسباب‌بازی و ماشین‌های لباس‌شویی استفاده می‌شود. استفاده از محصولات حاوی نانو ذرات نقره می‌توانند موجب رهایش و ورود غلظت‌های بالای آن به منابع آبی شود. برای مثال، یک پیراهن ورزشی شسته‌شده در ml ٥٠٠ آب لوله کشی، موجب رهایش mg ٢٧ نانو ذرات‌نقره می‌گردد (Benn *et al*., 2010). لذا استفاده وسیع از این مواد، سبب آلودگی فاضلاب‌های شهری و صنعتی شده و رهایی این فاضلاب‌ها به اکوسیستم‌های آبی باعث صدماتی جبران‌ناپذیر به آبزیان می‌گردد (Shaluei *et al*., 2012). در حال حاضر مشکل است که بتوان میزان تولید، آزادشدن و ضرایب جریان ورود نانوذرات‌نقره را به دلیل عدم وجود آمار کاملی از محصولات حاوی نانو مواد و اطلاعات کم در زمینهٔ حمل‌ونقل، به محیط‌زیست را محاسبه کرد. پژوهش‌ها نشان داده‌است که اگر استفاده از نانو فناوری‌های نقره گسترش یابد، غلظت نقره در طبیعت به‌صورت منطقه‌ای و ناحیه‌ای به حدی افزایش می‌یابد که حتی این غلظت‌ها از پیک میزان نقره محلول در آب‌های آلوده نیز خواهد گذشت (Ziaei., 2013).

توسعه روزافزون آبزی‌پروری در بسیاری از مناطق دنیا منجر به افزایش تقاضا در به‌کارگیری از مواد شیمیایی جدید شده‌است به‌گونه‌ای که در سال‌های اخیر استفاده از مواد شیمیایی و ترکیبات صنعتی تحت مطالعات دقیق قرارگرفته تا از نظر جنبه‌های اقتصادی و دامنه سلامتی طبقه‌بندی و در آبزی‌پروری مورد استفاده قرار گیرند. ازجمله این ترکیبات شیمیایی پره‌بیوتیک‌ها هستند. پره‌بیوتیک ماده غذایی غیرقابل هضمی است که در اثر تخمیر به اسیدهای چرب با زنجیرهٔ کوتاه تبدیل می‌شود 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 (Mahious *et al*., 2010). در واقع استفاده از پره‌بیوتیک‌ها موجب بهبود عملکرد ایمنی، فیزیولوژی روده و کاهش پاسخ‌های آلرژیک می‌شود (Douglas and Sander, 2008; Khodadadi *et al*., 2019). مکمل‌های غذایی نظیر باکتری‌های مفید، قارچ‌های خوراکی و تیمارهای ترکیبی می‌توانند به‌طور مستقیم، سازوکارهای دفاع اولیه بدن را از طریق اثر برگیرنده‌ها و ژن‌های مسئول فعال سازند. تمام پژوهش‌هایی که روی قارچ‌های خوراکی صورت گرفته، آن‌ها را به علت دارا بودن شمار زیادی از ترکیبات فعال زیستی به‌عنوان یک مکمل غذایی طبیعی مورد تأیید قرار داده‌اند. مخصوصاً بتاگلوکان موجود در قارچ می‌تواند با اتصال به گیرنده‌های پروتئینی موجود در سطح ماکروفاژها، منجر به فعال شدن آن‌ها و درنتیجه حفظ و تقویت سیستم ایمنی گردد (Wasser *et al*., 2010).

برای ارزیابی میزان سمیت آلاینده‌های محیطی شاخص‌های فیزیولوژیکی متفاوتی در ماهی‌ها وجود دارد که ازجمله آن‌ها آسیب‌شناسی بافتی است. آسیب‌شناسی بافتی ارزیابی کاملی از سلامتی موجود زنده فراهم می‌کند و به‌طور مؤثری اثرات مواجهه با آلاینده‌های

محیطی را انعکاس می‌دهد. با توجه به ماهیت اغلب سموم و آلاینده‌های زیست‌محیطی، این ترکیبات به‌راحتی از سد دفاعی بدن آبزیان گذشته و وارد خون می‌شوند و از طریق خون به بافت‌های مختلف بدن انتقال می‌یابند. بافت‌شناسی در حال حاضر به‌عنوان یکی از رشته‌های علمی، به مطالعه ساختمان‌های کوچک جانوران و گیاهان با استفاده از روش‌های ریزبینی (microtechniqus) می‌پردازد. در هیستوپاتولوژی یا آسیب‌شناسی بافتی (histopathology) هدف اصلی شناخت و تشخیص بیماری‌ها از طریق تغییرات مرضی در بافت‌ها است (Shamoshaki *et al*., 1992).

آبشش‌ها به‌عنوان ارگانی که در معرض مداوم محیط خارجی قرار دارند، اولین هدف آلاینده‌ها می‌باشند. بنابراین، آبشش بافت مناسبی جهت بررسی اثر کوتاه‌مدت آلاینده‌ها است. از طرفی این عناصر سمی در اندام‌ها ذخیره می‌شود و تجمع زیستی رخ می‌دهد. زمانی که ماهی در معرض نانوذرات نقره قرار می‌گیرد، یون نقره به آبشش متصل شده و از طریق مهار آنزیم ATPase موجب اختلال در جذب یون‌های سدیم و کلر می‌شود. از نتایج آن می‌توان به عدم توانایی در کنترل سطح مایع، افزایش غلظت آمونیاک، تغییر ساختار آبشش ماهی، کاهش عملکرد سیستم ایمنی و ناتوانی قلبی و عروقی اشاره نمود (Pelgrom *et al*., 1995). در این راستا گریفیت و همکاران در سال ۲۰۰۸ در بررسی اثر نانوذرات نیکل، کروم، نقره، مس و آلومینیوم بر ماهی گورخری نشان دادند که مقادیر بیش از ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر از نانوذرات یادشده در محیط آبی، می‌تواند بر ماهیان گورخری اثر کشنده داشته باشد. درصورتی‌که نانوذرات طلا فاقد سمیت برای این ماهیان بودند (Griffitt *et al*., 2008).

وجود آلاینده‌هایی همچون نانوذرات نقره در اکوسیستم‌های آبی موجب تنش در ماهیان شده و می‌تواند سیستم ایمنی ماهیان را تضعیف نماید. در واقع کیفیت نامناسب آب و وجود آلاینده‌هایی همچون نانوذرات مذکور در آن می‌تواند باعث ایجاد استرس در ماهیان شده و با کاهش عملکرد ایمنی ماهیان سبب به خطر افتادن سلامتی آن‌ها شود (Kakavand *et al*., 2020).

تیلاپیا از راسته سوف ماهیان و خانواده Cichlidae می‌باشد که به علت رشد سریع و پرورش ساده و ارزان موردتوجه بسیاری از کشورهای جهان قرارگرفته و یکی از مهم‌ترین گونه‌های پرورشی، تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) می‌باشد (Kakavand *et al*., 2020).

با توجه به جنبه‌های روزافزون کاربرد نانوذرات و ورود آن به اکوسیستم‌های آبی به‌عنوان آلاینده نوظهور و هم‌چنین با توجه به اثرات مثبت پره‌بیوتیک قارچ صدفی (*Pleurotus ostreatus*) بر بهبود ایمنی ناشی از اثرات سمیت نانو ذرات نقره بر عملکرد بافتی، افزایش رشد و شاخص‌های رشد و برخی از شاخص‌های زیستی آبزیان نظیر شاخص‌های خون‌شناسی (Kakavand *et al*., 2020)، در مطالعه حاضر به بررسی بهبود عملکرد دفاع بدن و تاثیر پره‌بیوتیک قارچ صدفی بر بافت کبد وآبشش ماهی تیلاپیا، متعاقب مواجهه با غلظت‌های کشنده نانوذرات نقره (افزایش مقاومت ماهی تیلاپیای تغذیه‌شده با پره‌بیوتیک قارچ صدفی به‌منظور کاهش آسیب بافتی ناشی از نانوذرات نقره) پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر در پاییز ۱۳۹۷ در سالن آبزی پروری شهید ناصر فضلی‌برآبادی دانشکده شیلات دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان به مدت ۵۸ روز انجام شد. ۱۲۰ عدد بچه ماهی تیلاپیا نیل با محدوده وزنی حدود ۲۰ گرم از مرکز خصوصی تکثیر و پرورش بجنورد پاک‌نژاد تهیه شد و پس از انتقال به مدت یک هفته سازگاری اولیه صورت پذیرفت. پس از عادت دهی، بچه ماهی‌ها با تراکم ۱۰ عدد، در وان‌های فایبرگلاس ۱۰۰ لیتری ذخیره‌سازی شدند. ماهیان با غذای تجاری کپور به میزان ۳ درصد وزن بدن در ۲ نوبت (صبح و عصر) تغذیه شدند (جدول۱) (Kakavand *et al.*, 2020). در طی دوره آزمایش فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب شامل اکسیژن محلول به میزان ۹-۷ میلی‌گرم و دمای ثابت ۲۸-۲۵ درجه سلسیوس، نگه‌داری شدند. غذای مورد استفاده در این پژوهش هم حاوی پره‌بیوتیک به‌عنوان مکمل غذایی بود که به این منظور از قارچ صدفی (پارسی قارچ، تهران) استفاده شد. قارچ‌های خریداری شده، به علت میزان بالای آب موجود در آن به مدت ۲٤ ساعت در دمای اتاق نگه‌داری شد، سپس در آون (Binder، آلمان) با دمای ٤٥ درجه سلسیوس به مدت ۲ روز خشک گردیده و در ادامه آسیاب شده (Parses، ایران) و در نهایت برای تهیه جیره غذایی استفاده گردید (Sevik *et al.*, 2013). مطالعه در قالب ٤ تیمار با سه تکرار شامل: تیمار ۱ به‌عنوان شاهد (تغذیه‌شده با غذای فاقد پره‌بیوتیک)، تیمار ۲، تغذیه‌شده با غذای حاوی ۰/۰۵ درصد پره‌بیوتیک، تیمار ۳، تغذیه‌شده با غذای حاوی ۰/۱ درصد پره‌بیوتیک و تیمار ٤، تغذیه‌شده با غذای حاوی ۰/۲ درصد پره‌بیوتیک تقسیم شدند (Akrami *et al.*, 2014) و به مدت ٤۲ روز پرورش داده شدند، سپس ۱٦ روز هم در مجاورت نانوذرات نقره (شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان، مشهد) با غلظت ppm ۰/۵ قرار گرفتند (Hedayati *et al.*, 2013). همچنین لازم به یادآوری است روزانه به میزان ۵۰ درصد حجم تانک‌ها تعویض آب صورت گرفت به‌طوری‌که غلظت نانوذرات نقره در هر یک از تیمارها حفظ شد.

جدول ۱- درصد ترکیبات تشکیل‌دهنده جیره تجاری (شرکت فرادانه) مورد استفاده در تغذیه ماهیان تیلاپیا

اجزای جیره	پروتئین خام	چربی خام	فیبر خام	خاکستر	رطوبت	فسفر کل
مقدار (درصد)	۳۵-۳۸	٤-۸	٤-۷	۷-۱۱	۵-۱۱	۱/۵-۱

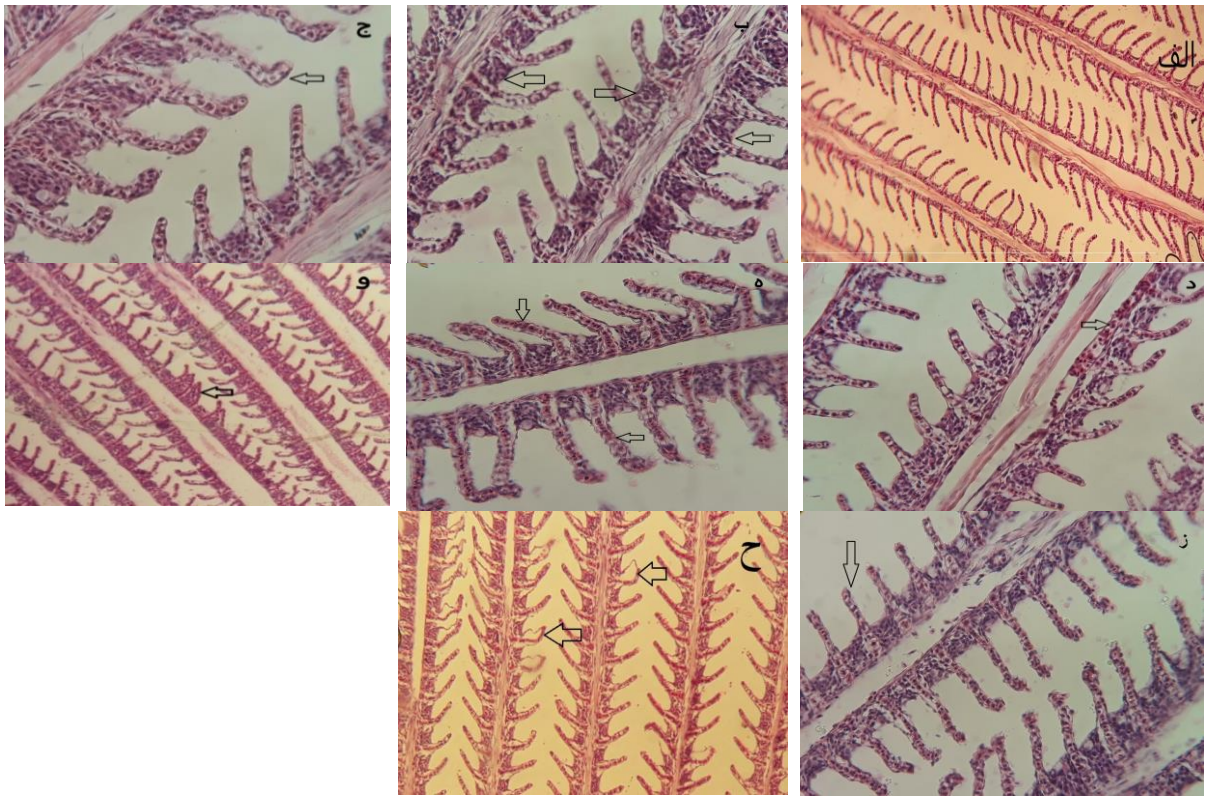
- **نمونه‌برداری آسیب‌شناختی:** نمونه‌گیری به‌منظور بررسی اثرات هیستوپاتولوژی در انتهای دوره پرورش (انتهای دوره تغذیه با پره‌بیوتیک روز ٤۲ و انتهای دوره قرارگرفتن در معرض سم نانوذرات نقره روز ۵۸) صورت گرفت. بدین منظور ۲٤ ساعت قبل از نمونه‌گیری تغذیه ماهیان قطع می‌شد و سپس ۳ قطعه ماهی به‌ظاهر سالم (۳ قطعه ماهی به ازای هر تکرار) به‌طور تصادفی انتخاب می‌گردید. در ادامه ماهیان مذکور، توسط محلول بیهوش‌کننده گل میخک (۲۲۰ میلی‌گرم برلیتر) به‌سرعت بیهوش شده و بافت کبد و آبشش آن‌ها برای مطالعات بافت‌شناسی جدا می‌شد. نمونه‌ها به مدت ۲٤ ساعت در محلول بوئن (شرکت

صنایع شیمیایی آریا، ساخت ایران) تثبیت شده و پس از گذشت این مدت، چندین مرتبه با اتانول ۷۰ درصد (مرک، آلمان) مورد شستشو قرار می‌گرفتند. در ادامه توسط اتانول ۹۵ درصد و سپس اتانول خالص (هر دو مرک، آلمان) و نهایتاً توسط بوتانول (مرک، آلمان) آبگیری می‌شدند. همچنین پس از قراردادن نمونه‌های مذکور در گزیلول به مدت ۳ ساعت به‌منظور شفاف‌سازی، برای آغشته‌سازی در پارافین مایع (مرک، آلمان) و در داخل آون قرار داده، سپس با پارافین قالب‌گیری شده و از بافت‌ها برش‌هایی به ضخامت ٦-۵ میکرومتر تهیه می‌گردید. در ادامه و پس از نگه‌داری به مدت ٤٨ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در آون، (K.M100، شرکت طیف آزما طب، ساخت ایران) به‌روش استاندارد هماتوکسیلین-ائوزین(شرکت صنایع شیمیایی آروین، ساخت ایران) (Iri *et al.*, 2020) رنگ‌آمیزی صورت گرفت. در نهایت به‌منظور بررسی عوارض بافتی ناشی از اثر نانو ذرات نقره و مقایسه بافت‌های موردنظر با نمونه‌های شاهد از میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین عکس‌برداری(CX21، المپیوس، ژاپن) استفاده گردید (Iri *et al.*, 2020). تغییرات ساختارهای بافتی آبشش و کبد بر اساس روش نیمه کمی و برمبنای تعداد عارضه مشاهده‌شده با استفاده از امتیازات، شامل: عدم مشاهده عارضه (-)، ۱ تا ۳ عارضه مشاهده‌شده (+)، ۳ تا ۵ عارضه مشاهده‌شده (++)، ۵ تا ۱۱ عارضه مشاهده‌شده (+++)، و بیشتر از ۱۱ عارضه مشاهده‌شده (++++) مورد ارزیابی قرار گرفت (Ariaei *et al.*, 2014).

-**تحلیل آماری داده‌ها**: جهت آنالیز بافتی از نرم افزار تخصصی Image J (نسخه ۱/٤٦، ساخت کشور آمریکا) استفاده گردید. تغییرات بافتی ساختارهای آبشش و کبد براساس روش نیمه کمی با استفاده از امتیازات، عدم مشاهده عارضه (-)، ۱ تا ۳ عارضه مشاهده‌شده (+)، ۳ تا ۵ عارضه مشاهده‌شده (++)، ۵ تا ۱۱ عارضه مشاهده‌شده (+++) و بیشتر از ۱۱ (++++) براساس تعداد عارضه مورد ارزیابی قرار گرفت (Ariaei *et al.*, 2014).

یافته‌ها

شکل ۱ و جدول ۲ نشان‌دهنده بروز ناهنجاری‌های ساختاری در بافت آبشش در طی بررسی عملکرد پره-بیوتیک قارچ صدفی بر عارضه‌های بافتی در آبشش ماهی تیلاپیا نیل، پس از مواجهه با نانوذرات نقره می‌باشد. نتایج بافت‌شناسی نشان داد که ماهیان تیمار شاهد (بدون پره‌بیوتیک و سم) دارای آبشش سالم و طبیعی بودند. عارضه‌های مشاهده‌شده در بافت آبشش ماهیان تیلاپیای قرار گرفته در معرض سم نیترات نقره شامل هایپرپلازی پایه‌ای، هایپرپلازی رأسی، نفوذ گلبول‌های خونی، کوتاه شدن تیغه‌های ثانویه، برآمدگی اپی‌تلیوم، تورم سلول پوششی سنگفرشی و همجوشی تیغه‌های ثانویه بود که بیشترین اثر تخریب در گروه ماهیان تیمارشده با غلظت ppm ۰/۵ نانوذرات نقره (شاهد مسموم و بدون پره‌بیوتیک) با عارضه‌هایی نظیر برآمدگی اپی‌تلیوم و هایپرپلازی پایه‌ای بود که این جراحات در تیمارهای ترکیبی نانوذرات نقره و پره‌بیوتیک قارچ صدفی با شدت کمتر و در مواردی بدون وجود آسیب مشاهده شد و در میان آن‌ها تیمار ترکیبی ۰/۲ درصد پره‌بیوتیک + ppm ۰/۵ نانوذرات نقره، بهترین اثر را بر جراحات بافتی آبشش داشت.



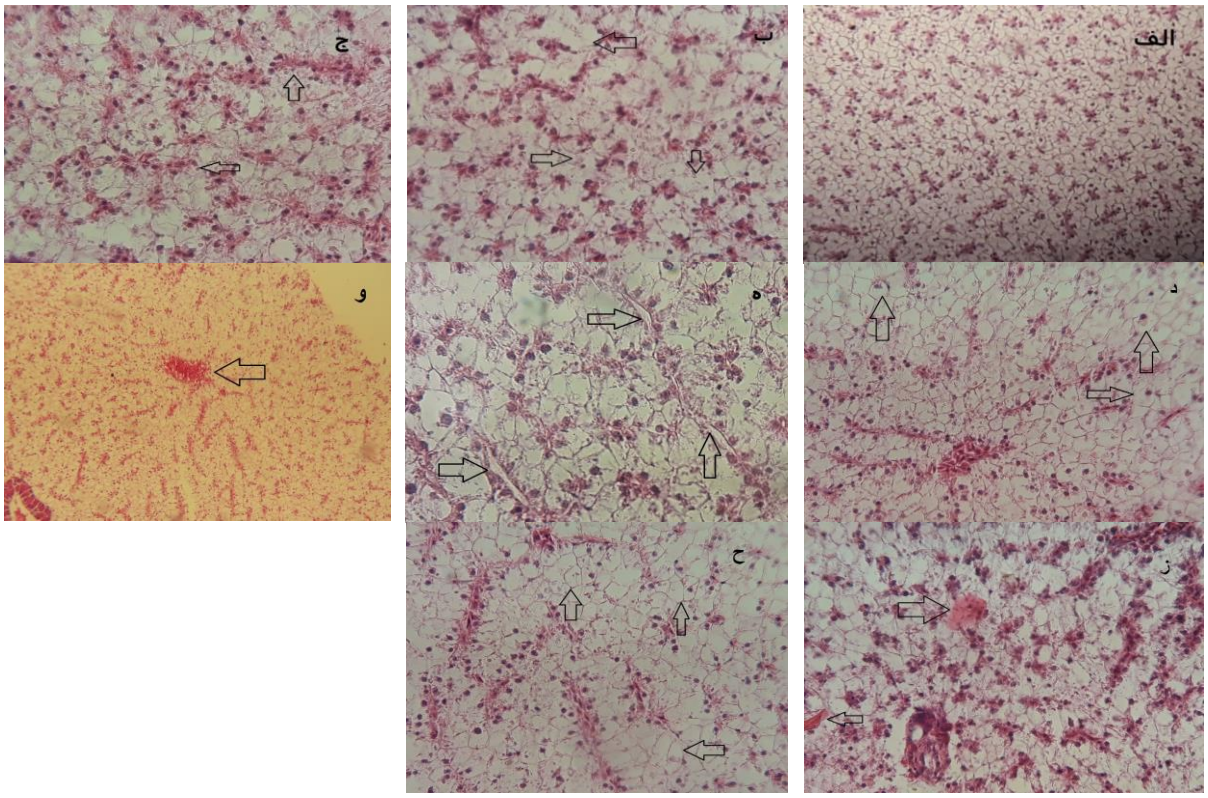
شکل ۱- بررسی تاثیر پره‌بیوتیک قارچ صدفی بر جراحات بافتی مشاهده‌شده در آبشش ماهی تیلاپیا نیل، پس از مواجهه با نانوذرات نقره (هماتوکسیلین- ائوزین، بزرگنمایی ٤٠٠×). الف: (نمونه شاهد)، ب: (هایپرپلازی پایه‌ای)، ج: (هایپرپلازی رأسی)، د: (نفوذ گلبول‌های خونی)، ه: (تورم سلول سنگفرشی)، و: (همجوشی تیغه‌های ثانویه)، ز: (کوتاه شدن تیغه ثانویه)، ح: (برآمدگی اپی‌تلیوم)

جدول ۲- بررسی اثر محافظتی تیمار پره‌بیوتیک قارچ صدفی بر آسیب‌های بافت آبشش ماهی تیلاپیا نیل در تیمارهای آزمایشی مختلف

نوع تیمار / نوع جراحات در آبشش	تیمار شاهد (بدون پره‌بیوتیک و سم)	شاهد مسموم و بدون تیمار با پره‌بیوتیک	تیمار با ۰/۰۵ درصد پره‌بیوتیک+۰/۵ ppm نانوذرات نقره	تیمار با ۰/۱درصد پره‌بیوتیک+۰/۵ ppm نانوذرات نقره	تیمار با ۰/۲ درصد پره‌بیوتیک+۰/۵ ppm نانوذرات نقره
هایپرپلازی رأسی	–	++	+++	++	–
هایپرپلازی پایه‌ای	–	+++	+	+	–
برآمدگی اپی‌تلیوم	–	+++	+++	++	+
نفوذ گلبول‌های خونی	–	++	++	+	+
تورم بافت پوششی سنگفرشی	–	+	+	+	+
اتصال تیغه های ثانویه	–	++	+	+	–
کوتاه شدن تیغه های ثانویه	–	++	++	–	–

* عدم مشاهده عارضه (–)، ۱ تا ۳ عارضه مشاهده‌شده (+)، ۳ تا ۵ عارضه مشاهده‌شده (++)، بیشتر از ۵ عارضه مشاهده‌شده (+++).

همچنین شکل ۲ و جدول ۳ بروز آسیب‌های ساختاری در بافت کبد ماهی تیلاپیا نیل در طی بررسی تاثیر محافظتی پره‌بیوتیک قارچ صدفی بر عارضه‌های بافتی پس از مواجهه با نیترات نقره را نشان می‌دهد. نتایج بافت‌شناسی نشان داد که ماهیان تیمار شاهد (بدون پره‌بیوتیک و سم) دارای کبدی سالم و طبیعی بودند اما بیشترین عارضه‌های مشاهده‌شده در بافت کبد ماهیان تیلاپیا قرارگرفته در معرض نیترات نقره شامل آتروفی هپاتوسیت‌ها، نکروز، رقیق شدن سینوزوئیدها، تورم سلولی، انسداد خونی (پرخونی)، خون‌ریزش و رکود صفرا بود که بیشترین اثر تخریب در گروه ماهیان تیمار شده با غلظت ppm ۰/۵ نانوذرات نقره (شاهد مسموم و بدون تیمار با پره‌بیوتیک) با تغییراتی نظیر آتروفی هپاتوسیت‌ها، نکروز، رقیق‌شدن سینوزوئیدها، انسداد خونی (پرخونی) و خون‌ریزی بود که این عارضه‌ها در تیمارهای ترکیبی نانوذرات نقره و پره‌بیوتیک قارچ صدفی با اثر تخریبی کمتر و در مواردی بدون اثر تخریبی مشاهده شد که در میان آن‌ها تیمار در معرض ۰/۲ درصد پره‌بیوتیک + ۰/۵ppm نانوذرات نقره، بهترین اثر را بر بهبود آسیب‌های کبد داشت.



شکل ۲- بررسی تاثیر پره‌بیوتیک قارچ صدفی بر جراحات بافتی مشاهده‌شده در کبد ماهی تیلاپیا نیل، پس از مواجهه با نانوذرات نقره (هماتوکسیلین- ائوزین، بزرگنمایی ٤٠٠x). الف: (شاهد)، ب: (نکروز)، ج: (آتروفی هپاتوسیت‌ها)، د: (تورم)، ه: (رقیق‌شدن سینوزوئیدها) و: (انسداد خونی یا پرخونی)، ز: (خون‌ریزش)، ح: (تجمع چربی در هپاتوسیت‌ها)

جدول ۳- مقایسه تاثیر محافظتی پره‌بیوتیک قارچ صدفی بر آسیب‌های بافت کبد ماهی تیلاپیا نیل در تیمارهای آزمایشی مختلف

نوع جراحات در کبد	تیمار شاهد بدون پره‌بیوتیک و سم	تیمار شاهد مسموم و با پره‌بیوتیک	تیمار با ۰/۰۵درصد پره‌بیوتیک+۰/۵ppm نانوذرات نقره	تیمار با ۰/۱درصد پره‌بیوتیک+ ۰/۵ppm نانوذرات نقره	تیمار با ۰/۲درصد پره‌بیوتیک+۰/۵ppm نانوذرات نقره
آتروفی هپاتوسیت‌ها	–	+++	+++	++	++
تجمع چربی	–	+++	++	+	+
نکروز	–	+++	++	+	+
رقیق شدن سینوزوئیدها	–	+++	++	++	–
تورم هپاتوسیت‌ها	–	++	++	++	+
پرخونی	–	+++	++	+	+
خون‌ریزی	–	+++	++	–	
رکود صفرا	–	–	–	–	–

* عدم مشاهده عارضه (–)، ۱ تا ۳ عارضه مشاهده‌شده (+)، ۳ تا ۵ عارضه مشاهده‌شده (++)، بیشتر از ۵ عارضه مشاهده‌شده (+++).

بحث و نتیجه‌گیری

امروزه در صنعت آبزی‌پروری استفاده از انواع ترکیبات پروبیوتیکی، پره‌بیوتیکی 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 آنتی‌بیوتیکی‌ها و واکسیناسیون مورد استفاده قرار می‌گیرند. اکثر مطالعات در مورد تاثیر پره‌بیوتیک‌ها در آبزیان، با شاخص‌های رشد از قبیل ضریب رشد ویژه، ضریب تبدیل غذایی و فاکتورهای ایمنی سنجیده شده‌است و مطالعات بافت-شناسی و آسیب شناختی بسیار کمی در ارتباط با تاثیرات پره‌بیوتیک بر بافت‌های آبزیان صورت پذیرفته-است و نیز مطالعه‌ای با زمینه بافت‌شناسی نسبت به تاثیرات پره‌بیوتیک قارچ صورت نپذیرفته است (Iri *et al*., 2020).

با توجه به جنبه‌های روزافزون کاربرد نانوذرات و ورود آن به اکوسیستم‌های آبی به‌عنوان آلاینده نوظهور و هم‌چنین با توجه به اثرات مثبت پره‌بیوتیک قارچ صدفی بر بهبود ایمنی ناشی از اثرات سمیت نانوذرات نقره بر عملکرد بافتی (Iri *et al*., 2020; Kakavand *et al*., 2020). در مطالعه حاضر به اثرات افزایش مقاومت ماهیان تیلاپیای تغذیه‌شده با پره‌بیوتیک قارچ صدفی به‌منظور کاهش آسیب بافتی ناشی از نانوذرات نقره پرداخته شد. یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که تیمارهای تحت نانوذرات نقره باعث آسیب‌های شدید در بافت کبد و آبشش می‌شود ،ولی استفاده از پره-بیوتیک قارچ صدفی در غذای روزانه، توانست اثرات تخریبی ناشی از نانوذرات نقره بر عارضه‌های بافتی را کاهش دهد (جداول ۲ و ۳). گزارش شده است که در ماهیان تحت تیمار با نانو ذرات نقره، مطالعات آسیب‌شناسی بافتی به‌عنوان ابزاری حساس برای

تشخیص اثرات مستقیم مواد شیمیایی بر اندام‌های هدف ماهیان در شرایط آزمایشگاهی محسوب می‌شود. در این راستا آبشش ماهیان به‌عنوان شاخص کارآمدی از کیفیت آب در نظر گرفته می‌شود، چراکه علاوه بر وسیع بودن سطح تماس، آبشش‌ها عملکردهای مختلفی دارند که شامل تنفس، تنظیم اسمزی، دفع مواد زائد نیتروژن‌دار و تعادل اسید و باز می‌باشد، بنابراین اختلال در عملکرد آبشش ناشی از آلاینده‌ها، به‌طور قابل‌توجهی به بهداشت و سلامت ماهی مرتبط بوده و عدم سلامت آبشش ماهی به‌عنوان مهم‌ترین نشانه وجود آلودگی در آب در نظر گرفته می‌شود (Alazemi *et al*., 1996; Hedayati *et al*., 2017).

در بررسی حاضر عمده‌ترین تغییرات بافتی که در بافت آبشش در مواجهه با نانو ذرات نقره در ماهی تیلاپیا مشاهده شد شامل هایپرپلازی رأسی، هایپرپلازی پایه‌ای، نفوذ گلبول‌های خونی، کوتاه شدن تیغه‌های ثانویه، برآمدگی اپی‌تلیوم، تورم سلول‌های سنگفرشی و اتصال تیغه‌های ثانویه بود . همچنین مطابق یافته‌های به‌دست آمده، بیشترین اثرات تخریب بافتی، در مورد ماهیان تیمارشده با غلظت ۰/۵ ppm نانوذرات نقره بود که در آبشش ماهیان مذکور، عارضه‌هایی نظیر برآمدگی اپی‌تلیوم و هایپرپلازی پایه‌ای مشاهده گردید . این جراحات در تیمارهای ترکیبی نانوذرات نقره و پره‌بیوتیک قارچ صدفی با شدت کمتر و در مواردی بدون بروز هر گونه آسیب تخریبی مشاهده شد (جدول ۲). هدایتی و همکاران در سال ۲۰۱۷ در مطالعه اثر نانو ذرات فلزی (دی اکسید تیتانیوم، مس و روی) در بافت آبشش ماهی کپور معمولی و ماهی طلایی، آنوریسم لاملای ثانویه و هیپرپلازی در مواجهه با نانو ذرات روی را گزارش کردند (Hedayati *et al*.,2017) که این عوارض در تحقیق حاضر نیز مشهود بود. شهزاد و همکاران در سال ۲۰۱۹ تأثیر سمیت نانو ذرات اکسید روی بر تجمع بافت‌ها، استرس اکسیداتیو، هیستوپاتولوژی و سمیت جنسی در تیلاپیا را بررسی نمودند و در آبشش، هایپرپلازی، هم‌جوشی آبشش، ضخیم شدن لاملا اولیه و ثانویه و همچنین در بافت کبد، نکروز و آپوپتوز با هسته متراکم و هسته پیلونتیک مشاهده شد (Shahzad *et al*.,2019) که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی داشت. درمطالعه پاشایی و همکاران در سال۲۰۱٤ اثر دیازینون و بوتاکلر در بافت کبد و آبشش بچه ماهی سیاه کولی بررسی شد، و از نظر آسیب شناسی بافتی نکروز و پرخونی در بافت کبد و نکروز و هیپرپلازی در بافت آبشش تیمارهای دیازیتون مشاهده شد همچنین در تیمارهایی که در معرض سم بوتاکلر قرار گرفته بودند نیز پرخونی و اتروفی در بافت کبد و هیپرپلازی ،چسبندگی و عریض شدن لاملاهای ثانویه در بافت آبشش تیمارهای بوتاکلر مشاهده گردید (Pashaie *et al*.,2014) که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی داشت. چن و همکاران در سال۲۰۱۱ عوارض هیستوپاتولوژیک در بافت آبشش ماهی دانیو گورخری در مواجهه با نانوذرات تیتانیوم را، هایپرپلازی رأسی و پایه‌ای گزارش کردند (Chen *et al*., 2011) که این عوارض در تحقیق حاضر نیز مشهود بود (جدول ۲). در این ارتباط محققان ضایعات آبششی را در دو گروه تقسیم بندی کرده‌اند که شامل اثرات آسیب مستقیم مواد محرک و پاسخ دفاعی ماهی می‌باشد. نکروز آبششی و ریزش اپیتلیوم آبشش، پاسخ‌های مستقیم ناشی از عمل سموم است و پاسخ دفاعی شامل هیپرپلازی اپی‌تلیوم و

اتصال تیغه‌های مجاور می‌باشد. هیپرپلازی، افزایشی غیرطبیعی در تعداد سلول‌های اپیتلیوم آبشش بوده و بر تبادل گاز و تنفس تاثیر گذاشته و در حالات شدیدتر می‌تواند به اتصال تیغه‌های مجاور با یکدیگر و جلوگیری از تبادل گاز منجر شود. در واقع هیپرپلازی به عنوان یک مکانیسم دفاعی، منجر به کاهش سطح تنفسی و افزایش فاصله سطح انتشار آلاینده در خون می‌شود. در واقع انفصال اپی‌تلیال در تیغه‌های آبششی به دلیل عدم فیلتراسیون مایع میان بافتی ایجاد می‌شود که باعث کاهش مبادله گاز از طریق افزایش فاصله انتشار و کاهش فاصله بین لاملایی می‌شود. همچنین، این عارضه می‌تواند موجب کاهش جذب مواد سمی گردد. به عبارت دیگر انفصال و برآمدگی اپیتلیوم، فاصله رسیدن ماده سمی به جریان خون را افزایش می‌دهد (Cengiz and Unlu, 2006).

از طرف دیگر در تحقیق حاضر، در بافت کبد ماهیان تیلاپیای مواجهه یافته با نانوذرات نقره، عوارض مهم پاتولوژیکی شامل آتروفی هپاتوسیت‌ها، نکروز، رقیق‌شدن سینوزوئیدها، تورم سلولی، انسداد خونی (پرخونی) و خون‌ریزش مشاهده شد، به‌طوری‌که بیشترین اثرات تخریب بافتی، در مورد ماهیان تیمار شده با غلظت ppm ۰/۵ نانوذرات نقره بود (شاهد مسموم و بدون پره‌بیوتیک) که در کبد ماهیان مذکور، عارضه‌هایی نظیر آتروفی هپاتوسیت، نکروز و خون‌ریزش قابل مشاهده بود که این عوارض در تیمارهای ترکیبی نانوذرات نقره و پره‌بیوتیک قارچ صدفی با اثر تخریبی کمتر و در مواردی بدون اثر تخریبی مشاهده‌شد (جدول ۳). در تحقیقات انجام‌شده توسط سایر محققین نیز، علائمی مشابه در کبد ماهیان قرارگرفته در معرض سموم و حشره‌کش‌ها، مشاهده شده‌است. فانتا و همکاران در سال ۲۰۰۳ تورم ابری، نکروز، آتروفی هپاتوسیت و واکوئله شدن را در کبد ماهی *Corydoras paleatus* قرارگرفته در معرض متیل پاراشین، گزارش نموده‌اند (Fanta *et al*., 2003) که مطابق با نتایج تحقیق حاضر بود. همچنین سارکار و همکاران در سال ۲۰۰۵ هایپرپلازی، واکوئله شدن، خون ریزش، هپاتوسیتِ تخریب‌شده و نکروز را در بافت کبد ماهی کپور هندی (*Labeo rohita*) قرارگرفته در معرض سم سایپرمترین گزارش کردند (Sarkar *et al*., 2005) که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی داشت. در مطالعه فرخی و همکاران نیز در سال ۲۰۱۶ در بافت کبد ماهی کولمهٔ آلوده‌شده با حشره‌کش مالاتیون، دژنراسیون هپاتوسیت‌ها، پیکنوزه شدن هسته‌ها، نکروز، خون‌ریزش، انسداد خونی و واکولاسیون سیتوپلاسم سلول‌های کبدی مشاهده شد (Farokhi *et al*., 2016) که با نتایج بررسی حاضر همراستا بود. دکا و ماهانتا در سال ۲۰۱۲ نیز علائمی مانند تخریب ساختار پارانشیمی کبد، تجزیه و تفکیک هپاتوسیتها، تورم هپاتوسیتها، نکروز مرکزی و پیکنوتیک شدن هسته هپاتوسیتها را در کبد گربه ماهی *Heteropneustes fossilis*، آلوده شده با مالاتیون، مشاهده نمودند (Deka and Mahanta *et al*., 2012) که با نتایج بررسی حاضر همسو بود. داس و همکاران در سال ۲۰۱۳ در مطالعه‌ای تأثیرات سم مالاتیون را روی کبد ماهی *Esomus danricus* موردبررسی قراردادند و آسیب‌هایی مانند تورم و واکوئله شدن هپاتوسیتها و نکروزه شدن را گزارش کردند (Das *et al*., 2013) که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت. کلارک و

همکاران در سال ۲۰۱۹ با قراردادن نیترات‌نقره در رژیم غذایی و مقایسه آن با حضور نانوذرات نقره در غذای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، به این نتیجه رسیدند که بالاترین تجمع نقره در بافت‌های روده، کلیه، کبد و کیسه صفرا بوده‌است (Clark *et al*., 2019) که تجمع صفرا آسیب احتمالی به متابولیسم کبدی را نشان می‌دهد.

در این ارتباط لازم به ذکر است که کبد برعکس آبشش مستقیماً با آلودگی‌های محیطی در تماس نیست اما آلودگی‌ها از طریق خون به کبد می‌رسند و اثر غیرمستقیم بر روی آن می‌گذارند. لذا احتمالاً تغییرات کبدی نیز نشانگر سودمندی برای نشان دادن استرس‌های اولیه زیست‌محیطی باشد. با وجود این‌که کبد اندام اصلی دفع ترکیبات سمی است، اما درصورتی‌که غلظت مواد سمی زیاد باشد و یا این‌که کبد در مدت‌زمانی طولانی در معرض مواد سمی باشد، این مکانیسم کبد دچار مشکل شده و نهایتاً سبب آسیب بافت کبدی می‌گردد (Brusle *et al*., 1996). در واقع کبد که بزرگ‌ترین غده بدن ماهی است و انجام فعالیت‌های مختلفی را برعهده داشته و مخصوصاً اندام اصلی دفع‌کننده مواد سمی است، در ماهیان قرارگرفته در معرض سموم، دچار تغییرات ریخت‌شناسی جدی می‌گردد (Safahieh *et al*., 2011). همچنین کبد به دلیل جایگاه خاصی که در متابولیسم دارد، محل دفع سمیت داروها، زنوبیوتیک‌ها و استرس‌های اکسیداتیو می‌باشد، به‌نحوی‌که در عارضه‌های کبدی که هپاتوسیت‌ها دچار آپوپتوزیس می‌شوند، به علت فعالیت سلول‌های کوپفر و تجمع و انتشار نوتروفیل‌ها، آسیب‌های ناشی از سمیت در آن توسعه می‌یابد (Ariaei *et al*., 2014).

از طرف دیگر اعلام شده است که فعالیت ایمنولوژیک پره‌بیوتیک‌ها از طریق ارتباط مستقیم با گیرنده‌های شناسایی الگو یا PRRs (pattern recognition receptors)، از قبیل گیرنده‌های بتاگلوکان (beta-glucan) و گیرنده‌های دکتین-۱ (dectin-1) ماکروفاژها صورت می‌پذیرد که این تعادل مولکولی، انتقال سیگنال‌های دفاعی از قبیل NF-kappa-B را فعال می‌کند (Yadav and Schorey, 2006) و احتمالاً می‌تواند علت کاهش ضایعات بافتی مخصوصاً در کبد در زمان آزمون مواجهه با نانوذرات نقره باشد. البته با وجود اثرات مفیدی که برای پره‌بیوتیک‌ها ارائه شده‌است، تحقیقات محدودی در زمینه تاثیر پره‌بیوتیک‌ها در آبزیان پرورشی انجام شده‌است. در مطالعه خدادادی و همکاران در سال ۲۰۱۹، دوزهای ۰/۰۱، ۰/۵ و ۱ درصد پره‌بیوتیک سلماناکس را در جیره ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد استفاده قراردادند که نتایج این مطالعه در طول ٦٠ روز پرورش تأثیرات معنی‌داری در بافت آبشش و کبد ماهی نشان داد. به‌طوری‌که در تحقیق نامبردگان، افزودن پره‌بیوتیک مذکور به رژیم غذایی با غلظت ۱ درصد، باعث بهبود پارامترهای بافتی در طی دوره تولیدمثل و کاهش ضایعات بافتی هنگام مواجهه با پرسینیوز و در نهایت سبب کاهش میزان تلفات ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان شد (Khodadadi *et al*., 2019). پورنوری و همکاران در سال ۲۰۱۷ تأثیر نانو ذرات نقره و نیترات نقره را در گربه ماهی راه‌راه تغذیه‌شده با تیمار نوکلئوتیدهای غذایی را مورد بررسی قرارداده و مشاهده کردند که با افزایش غلظت نقره در آب، تجمع نقره در بافت‌ها به میزان قابل توجهی افزایش و در ماهی تغذیه شده با

نوکلئوتیدهای غذایی میزان تجمع نقره کمتر شده، در نتیجه با افزودن نوکلئوتیدهای غذایی به رژیم غذایی گربه ماهی راه‌راه سیستم ایمنی ماهی در برابر تجمع نقره تقویت می‌شود (Pournori *et al*., 2017). در یک بررسی لی و همکاران در سال ۲۰۰۳ تاثیر پروبیوتیک و پره‌بیوتیک بر کاهش میزان جراحات بافتی و افزایش سرعت میزان بهبود آسیب‌های کبدی غیرالکلی در موش‌های صحرایی را نشان دادند. براساس نتایج این تحقیق، میزان رشد باکتری‌های پاتوژن در کبد و همچنین میزان TNF-α (Tumor Necrosis Factor-α) در سرم به صورت معنی‌داری کاهش یافته بود که نتایج بررسی سرم‌شناسی میزان ALT تأییدکننده تاثیر پره‌بیوتیک در جهت کاهش جراحات بافتی بود (Li *et al*., 2003). که با نتایج بررسی حاضر که همراه با کاهش شدت جراحات کبدی و آبششی در تیمار با ۰/۲ درصد پره‌بیوتیک قارچ صدفی در آزمون مواجهه با نانوذرات نقره بود، همخوانی دارد. پره‌بیوتیک با بهبود عملکرد شاخص‌های ایمنی می‌تواند باعث افزایش مقاومت ماهی در برابر آلاینده شود به گونه‌ای که باعث بهبود عملکرد دستگاه گوارش و کبد می‌شود. بنابراین در ماهیانی که پره‌بیوتیک مصرف کرده‌اند عوارض مخرب بافت ناشی از نانوذرات نقره کمتر است به عبارتی پره‌بیوتیک بافت را در برابر تغییرات مقاوم کرده‌است (Kakavand *et al*., 2020; Iri *et al*., 2020).

با توجه به مجموعه فوق‌الذکر، به نظر می‌رسد که تغییرات هیستوپاتولوژیک ایجادشده در کبد و آبشش ماهی تیلاپیا پس از مواجهه با نانوذرات نقره در تحقیق حاضر، نوعی پاسخ فیزیولوژیک باشد که جاندار برای ممانعت از ورود این مواد به بدن خود و جلوگیری از آسیب‌های احتمالی ایجاد می‌کند. لذا احتمالاً مکانیسم اثر مثبت قارچ صدفی بر مقاومت در برابر نانوذرات نقره به دلایلی از قبیل بهبود پارامترهای ایمنی، پاسخ‌های آنزیمی و در نهایت مهار استرس بوده‌باشد. در واقع یافته‌های مطالعه حاضر، تأییدی بود بر اثر مثبت پره‌بیوتیک قارچ صدفی بر آسیب‌های بافتی ماهی تیلاپیا در مواجهه با نانوذرات نقره که توانست اثر مخرب نانوذرات مذکور را بر بافت آبشش و کبد بهبود ببخشد. لیکن به نظر می‌رسد، ضروری است که به منظور حصول اطمینان از اثرات مثبت این پره‌بیوتیک مطالعه‌ای در خصوص تاثیر آن بر سطوح ایمنی در شرایط آزمایشگاهی و پرورشی انجام پذیرد. همچنین با توجه به نتایج بافتی و آزمون مواجهه، مصرف پره‌بیوتیک قارچ صدفی با غلظت بیشتر برای بررسی افزایش مقاومت در آبزیان مواجهه‌یافته با انواع آلاینده‌ها پیشنهاد می‌شود، تا بتوان با قطعیت بیشتری در مورد پتانسیل این پره‌بیوتیک در ماهی تیلاپیای نیل و سایر آبزیان اظهار نظر کرد.

سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان به خاطر تامین هزینه اجرای این تحقیق قدردانی می نمایند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی ندارند.

منابع

- Akrami, R., Qelichi, A. and Ahmadi, A. (2014). Prebiotic effect of dietary inulin on hematological parameters and biochemistry of fish serum Hus (Huso huso) Young . Journal of Veterinary Research, University of Tehran, 66(2): 131-136.
- Alazemi, B.M., Lewis, J.W. and Andrews, E.B. (1996). Gill damage in the freshwater fish Gnathonemus petersii (family: Mormyridae) exposed to selected pollutants: an ultrastructural study. Environmental Technology, 17(3): 225-238.
- Ariaei, M., Hamidian, A.H., Igdari, S., Pourbagher, H. and Ashrafi, S. (2014). Histopathological changes of zebrafish liver (Aphanius sophiae) due to arsenic and cadmium. Journal of Aquatic Ecology, Hormozgan University, 3(4): 40-31. [In Persian]
- Benn, T., Cavanagh, B., Hristovski, K., Posner, J.D. and Westerhoff, P. (2010). The release of nanosilver from consumer products used in the home. Journal of Environmental Quality, 39(6): 1875-1882.
- Brusle, J., Gonzalez, I. and Anadon, G. (1996). Fish Morphology, the structure and function of fish Liver, eds Munshi JSD, Dutta HM, Science Publishers INC: New York, pp: 189.
- Cengiz, E.I. and Unlu, E. (2006). Sublethal effects of commercial deltamethrin on the structure of the gill, liver and gut tissues of mosquitofish Gambusia affinis, a microscopic study. Environmental Toxicology and Pharmacology, 21(3): 246-253.
- Chen, J., Dong, X., Xin, Y. and Zhao, M. (2011). Effects of titanium dioxide nano particles on growth and some histological parameters of zebrafish (Danio rerio) after a long maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. Biology of Reproduction, 49(1): 89-94.
- Clark, N.J., David, B., Benjamin, P.E. and Richard, D.H. (2019). Dietary exposure to silver nitrate compared to two forms of silver nanoparticles in rainbow trout: bioaccumulation potential with minimal physiological effects. Environmental Science, 6(5): 1393-1405.
- Das, S., Das,A. and Gupta,A. (2013) Histopathological changes in liver of Indian flying barb, Esomus danricus, exposed to Malathion. International Journal of Latest Research in Science and Technology, 2(2):62-64.
- Deka, S. and Mahanta, R. (2012) A Study on the Effect of Organophosphorus Pesticide Malathion on Hepato-Renal and Reproductive Organs of Heteropneustes fossilis (Bloch). The Science Probe, 1(1): 1- 13.
- Douglas, L.C. and Sanders, M.E. (2008). Probiotics and prebiotics in dietetics practice. Journal of the American Dietetic Association, 108(3): 510-521.
- Fanta, E., Rios, F.S., Romao, S., Vianna, A.C.C. and Freiberger, S. (2003). Histopathology of the fish Corydoras paleatus contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. Journal of Ecotoxicology and Environmental Safety, 54(4): 119-130.
- Farokhi, F., Jamili, S.H., Shahidi, M., Mashinchian, A. and Vosoghi, G.H. (2016). Investigation of the effect of Malathion insecticide on liver tissue and liver enzymes of Caspian Sea fish (Rutilus rutilus caspicus). Journal of Animal Environment, Fisheries Science Research Institute, 8(3): 259-264.
- Griffitt, R.J., Luo, J., Gao, J., Bonzongo, J.C. and Barber, D.S. (2008). Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. Environmental Toxicology and Chemistry, 27(9): 1972-1978.
- Hedayati, S.A., Darabitabar, F. and Rezaie, H. (2017). Examination of tissue pathology of carp carp and ordinary goldfish (Carassius auratus) in the face of lethal concentrations of zinc nanofibers, copper

nanocoxes (CuONPs) and titanium oxide nanoparticles (TiO2NPs) . Journal of Veterinary Clinical Pathology, 11(2): 135-144. [In Persian]

- Hedayati, S.A., Jahanbakhshi, A. and Qaderi, F. Aquatic toxicology. (2013). Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources Publications. 212 pages. [In Persian]
- Iri, A., Kakavand, F., Rezaie shadegan, M. and Hedayati, S.A. (2020). The effect of oyster mushroom extract on histopathological changes in the liver and gills of Nile tilapia in the presence of silver nitrate. Journal of Marine Biology, 12(3):53-64. [In Persian]
- 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, Islamic Azad University, Zanjan Branch, 13(3): 1-13. [In Persian]
- Kalbassi, M.R., Salari, J.H. and Johari, A. (2011). Toxicity of silver nanoparticles in aquatic ecosystems: salinity as the main cause in reducing toxicity. Iranian Journal of Toxicology, 5(12): 436-443.
- Khodadadi, A., Haghighi, A., Malekinezhad, H., Tokmechi, A. and Afsharnasab, M. (2019).The effect of Salmanax probiotic supplement on gill tissue and liver of rainbow trout in the breeding period and experimental exposure to Yersiniosis disease . Journal of Veterinary Clinical Pathology, 12(4): 337-355. [In Persian]
- Li, Z., Yang, S., Lin, H., Huang, J., Watkins, P.A., Moser, A.B., et al. (2003). Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology, 11(4): 720-726.
- Mahious, A.S., Gatesoupe, F.J., Hervi, M., Metailler, R. and Ollevier, F. (2005). Effect of dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning Turbot (Psetta maxima). International Journal of Environmental Science and Technology, 14(7): 219-229.
- Martoja, R. and Martoja–Pierson, M. (1967). Initiation aux techniques de l'histologie animale. Paris, Masson, pp: 345.
- Ostaszewska, T., Chojnacki, M., Kamaszewski, M. and Sawosz-Chwalibóg, E. (2016). Histopathological effects of silver and copper nanoparticles on the epidermis, gills, and liver of Siberian sturgeon. Environmental Science and Pollution Research, 23(2): 1621-1633.
- Pashaei, H., Farokhroz, M., Zamini, A.A., Vahabzadeh, H., Ebrahimian, Y.(2013) .The Affection of Diazinon Insecticide and Butachlor Herbicide on the Vimba vimba persa free larva liver tissue and gill, 27(3):38-42.
- Pelgrom, S., Lamers, L., Lock, R., Balm, P. and Wendelaar Bonga, S.E. (1995). Integrated physiological response of tilapia (Orechromis mossambicus) to sublethal copper. Aquatic Toxicology, 32(4), 303-320.
- Pournori, B., Dorafshan, S. and Heyrati, F. P., (2017). Bioaccumulation of water-borne silver nanoparticles and silver nitrate in striped catfish, Pangasianodon hypophthalmus, fed dietary nucleotides. Iranian Journal of Ichthyology, 4(1): 31-40.
- Rayes, N., Seehofer, D., Theruvuth, T., Schiller, R.A., Langrehr, J.M. and Jonus, S. (2004). Supply of pre- and probiotics reduces bacterial infection rates after liver transplantation-a randomized, double-blind trial. American Journal of Transplantation, 5(4): 125-130.
- Rishi, P., Kaur Mari, S., Bharrhan, S., Shukla, G. and Rupinder, T. (2009). Protective efficacy of probiotic alone or in conjunction with a prebiotic in Salmonella-induced liver damage. FEMS Microbiology Ecology, 69(9): 222-230.
- Safahieh, A., Hedayati, A., Savari, A. and Movahedinia, A. (2011). Effect of sublethal dose of mercury toxicity on liver cells and tissue of yellowfin seabream (Acanthopagrus latus). Toxicology and Industrial Health, 28(7) : 583-592.
- Sarkar, B., Chatterjee, A., Adhikari, S. and Ayyappan, S. (2005). Carbofuran and cypermethrin induced histopathological alterations in the liver of Labeo rohita (Hamilton) and its recovery. Journal of Ecotoxicology and Environmental Safety, 21(1): 131-135.

- Şevik, S., Aktaş, M., Doğan, H. and Koçak, S. (2013). Mushroom drying with solar assisted heat pump system. Energy Conversion and Management, 7 (2): 171-178.
- Shahzad, K., Khan, M. N., Jabeen, F., Kosour, N., Chaudhry, A. S., Sohail, M. and Ahmad, N.(2019). Toxicity of zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) in tilapia (Oreochromis mossambicus): tissue accumulation, oxidative stress, histopathology and genotoxicity. International journal of environmental science and technology, 16(4)： 1973-1984.
- Shahzad, K., Khan, M.N., Jabeen, F., Kosour, N., Chaudhry, A.S., Sohail, M., et al. (2019). Toxicity of zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) in tilapia (Oreochromis mossambicus): tissue accumulation, oxidative stress, histopathology and genotoxicity. International Journal of Environmental Science and Technology, 16(4)： 1973-1984.
- Shaluei, F., Hedayati, A., Jahanbakhshi, A. and Baghfalaki, M. (2012). Effects of nanometer-sized silver materials on survival response of Caspian roach (Rutilus rutilus caspicus). Toxicology and Industrial Health, 24(3): 207-211.
- Shamoshaki, M., Soltani, M., Shrifpour, I., Imanpour, M., Baharloi, A. and Naimi, M. (1992). Investigation of the effect of diazinon toxin-killing concentrations on gonad, brain and heart tissue of Rutilus frisii kutum Kamensky, 1901. Journal of Veterinary Clinical Pathology, 5(3): 1287-1294. [In Persian]
- Van der Oost, R., Beyer, J. and Vermeulen, N.P.E. (2003). Fish Bioaccumulation and Biomarkers, 13(2): 57-149.
- Wasser, S.P. (2002). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. Applied Microbiology and Biotechnology, 60(3): 258-274.
- Yadav, M. and Schorey, J.S. (2006). The β-glucan receptor dectin-1 functions together with TLR2 to mediate macrophage activation by mycobacteria. Blood, 10(8): 3168-3175.
- Ziaei, N. (2013). Investigation of the toxic effect of silver nanoparticles on biological and ecological systems. Journal of Agricultural Biotechnology, 6(3): 148-121. [In Persian]