

بررسی تأثیر مصرف عصاره‌ی قارچ صدفی (*Pleurotus ostreatus*) بر تغییرات هیستوپاتولوژیک کبد و آبشش ماهی تیلاپای نیل (*Oreochromis niloticus*) در مواجهه با نیترات نقره

چکیده

وجود آلاینده‌ها در بدنه‌های آبی باعث پاسخ استرس در آبزیان و بخصوص ماهی‌ها می‌شود که نهایتاً بر وضعیت فیزیولوژیک ماهیان اثرگذار بوده و باعث کاهش عملکرد ایمنی در آن‌ها می‌شود، از این‌رو استفاده از محرک‌های ایمنی نظیر پریبیوتیک‌ها بسیار ضروری به نظر می‌رسد. هدف این مطالعه بررسی تأثیر سطوح مختلف پریبیوتیک قارچ صدفی (*Pleurotus ostreatus*) بر شاخص‌های بافت‌شناسی ماهی تیلاپای (*Oreochromis niloticus*) مواجهه شده با نیترات نقره بود. این تحقیق در پاییز ۱۳۹۷ در سالن آبی‌پروری شهید ناصر فضلی برآبادی دانشکده شیلات دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. به همین منظور تعداد ۱۲۰ بچه ماهی تیلاپای (محدوده وزنی حدود ۲۰ گرم) به مدت ۴۲ روز در ۴ تیمار: تیمار (۱) شاهد، فاقد پریبیوتیک قارچ صدفی، تیمار (۲) غذای حاوی ۰/۰۵ درصد، تیمار (۳) غذای حاوی ۰/۱ درصد و تیمار (۴) غذای حاوی ۰/۲ درصد پریبیوتیک قارچ صدفی تقسیم شدند. سپس به هر کدام از گروه‌ها غلظت ۰/۵ ppm نیترات نقره به مدت ۱۶ روز اضافه شد. در پایان دوره ماهیان توسط محلول بیهوش‌کننده گل میخک (۲۲۰ میلی‌گرم بر لیتر) بیهوش شده و بافت کبد و آبشش آن‌ها برای مطالعات بافت‌شناسی جدا گردید. نتایج نشان داد تیمارهایی که در معرض نیترات نقره بودند عارضه‌های بافتی شامل هایپرپلازی پایه‌ای، هایپرپلازی رأسی، نفوذ گلبول‌های خونی، کوتاه شدن تیغه ثانویه، برآمدگی اپی‌تلیوم، تورم سلول سنگفرشی، اتصال تیغه ثانویه در بافت آبشش و عارضه‌های بافتی شامل آتروفی، چربی نکروز، رقیق شدن، گرانول تیره، تورم، انسداد خونی، ریزش خون، رکود صفرا در بافت کبد را نشان دادند و بیشترین اثر تخریب را داشتند. تیمارهای تحت نیترات نقره باعث آسیب‌های شدید در بافت کبد و آبشش می‌شود ولی استفاده ترکیبی نیترات نقره و پریبیوتیک قارچ صدفی توانست اثرات تخریبی ناشی از نیترات نقره بر عارضه‌های بافتی را کاهش دهد. سطح ۰/۲ درصد پریبیوتیک قارچ صدفی و ۰/۵ درصد نیترات نقره در جیره می‌تواند بهترین تأثیر را بر عارضه‌های بافت کبد و آبشش ماهی تیلاپای داشته باشد.

واژگان کلیدی: پریبیوتیک، ماهی تیلاپای، آسیب بافتی، نیترات نقره.

عاطفه ایری^۱

فرحناز کاکاوند^۲

مریم رضایی شادگان^۳

سید علی اکبر هدایتی^{۴*}

۱، ۲، ۳ و ۴. دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

*مسئول مکاتبات:

Hedayati@gau.ac.ir

کد مقاله: ۱۳۹۹۰۳۰۸۳۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۷/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۸/۱۵

این مقاله پژوهشی و برگرفته از طرح

پژوهشی است.

مقدمه

پرورش در اکوسیستم‌های آبی همواره با مشکلاتی مواجه است که یکی از آن‌ها وجود آلاینده‌ها می‌باشد ورود پساب‌های صنعتی و کشاورزی و شهری بدون هیچ تصفیه‌ای به محیط آبی سبب آلودگی این اکوسیستم می‌گردد. ورود آلاینده‌ها از منابع مختلف صنعتی و بهداشتی به اکوسیستم‌های آبی می‌تواند تعادل آن‌ها را بر هم زده و اکوسیستم‌ها را در معرض خطر نابودی قرار دهد. این آلاینده‌ها در نهایت می‌توانند وارد زنجیره غذایی و بدن انسان شده و آسیب‌های ایمنی زیادی را در پی داشته باشند (هدایتی و همکاران، ۱۳۹۲). لذا شناخت اثرات متقابل عوامل استرس‌زا و اثرات سوء آن‌ها بر جوامع زیستی، متخصصین امر را در تعیین استانداردهای محدودکننده و اثرات فلزات و سایر آلاینده‌ها بر

مکانیسم‌های بیولوژیکی و فیزیولوژیکی موجودات و در نهایت حفاظت از محیط‌زیست یاری می‌کند. سمیت یک ماده، به قابلیت ذاتی آن ماده در صدمه زدن به موجود زنده اطلاق می‌شود. نیترات نقره به‌عنوان عامل ایجادکننده گروه‌های فعال اکسیژنی (ROS)، شناخته‌شده و به‌وسیله مکانیسم‌های متنوع شامل برهم‌کنش با گروه‌های سولفیدریل، پروتئین‌ها و آنزیم‌ها به سلول آسیب می‌رساند (تربالی و همکاران، ۱۳۹۱). نقره دارای خواص فیزیکوشیمیایی خاصی می‌باشد و به همین دلیل در مصارف بهداشتی، دارویی، نوری و الکترونیکی کاربرد دارد. یون نقره دارای اثر باکتریایی می‌باشد و برای طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها بالاترین درجه سمیت را دارا می‌باشد. این یون به‌صورت طبیعی در آب‌های سطحی وجود دارد و فعالیت‌های بشری سبب افزایش سطوح نقره در اکوسیستم‌های آبی می‌شوند. مقصد نهایی تمام آلاینده‌ها محیط آبی می‌باشد، ماهی در بالاترین سطح زنجیره غذایی در محیط آبی قرار گرفته و یکی از شاخص‌های آلودگی می‌باشد (ابرقویی و همکاران، ۱۳۹۴).

توسعه روزافزون آبی‌پروری در بسیاری از مناطق دنیا منجر به افزایش تقاضا در به‌کارگیری از مواد شیمیایی جدید شده است، به‌گونه‌ای که 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 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., ۲۰۰۵). استفاده از پریبوتیک‌ها موجب بهبود عملکرد ایمنی، فیزیولوژی روده و کاهش پاسخ‌های آلرژیک می‌شود (خدادادی و همکاران، ۱۳۹۷؛ Douglas and Sander, ۲۰۰۸).

مکمل‌های غذایی مانند باکتری، قارچ خوراکی و تیمار ترکیبی می‌توانند به‌طور مستقیم‌ساز و کارهای 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 (Wasser, ۲۰۰۲).

برای ارزیابی میزان سمیت آلاینده‌های محیطی شاخص‌های فیزیولوژیکی متفاوتی در ماهی‌ها وجود دارد که از جمله آن‌ها بافت‌شناسی است. بافت‌شناسی 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 آبیان 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 ریزی (Microtechnique) می‌پردازد. 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 نیترات نقره قرار می‌گیرد، یون نقره به آبشش متصل شده و از طریق مهار آنزیم موجب اختلال در جذب یون سدیم و یون کلر ATPase 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., ۱۹۹۵). کبد (به‌عنوان غده اصلی در دستگاه گوارش ماهیان) نقش مهمی در سم‌زدایی و نگهداری هموستاز متابولیک بدن و نیز نقش کلیدی در سنتز پروتئین‌های پلاسما دارد. Clark و همکاران (۲۰۱۹) با قرار دادن نیترات نقره در رژیم غذایی و مقایسه با نیترات نقره در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به این نتیجه رسیدند که بالاترین تجمع نقره در بافت‌های روده، کلیه، کبد و کیسه صفرا بوده است. Ostaszewska و همکاران در سال ۲۰۱۶ اثرات سمیت نیترات نقره و مس را در اپیدرم، آبشش و کبد ماهی خاویاری سبزی بررسی و آسیب بافتی در آبشش و کبد را گزارش کردند. Khosravi-Katuli و همکاران (۲۰۱۸) اثرات مزمن نانو پلاستیک نقره و نیترات نقره را بر کبد و آبشش کپور معمولی بررسی کرد.

نتایج نشان داد که جذب نانو نقره با تغییرات بافت‌شناسی در اندام‌های هدف همراه شده و ضایعات بافتی در تیمارهای در معرض نانو نقره و نیترات نقره مشاهده شد. Katya و همکاران در سال ۲۰۱۶ تحقیقی به‌منظور ارزیابی اثربخشی غذای تخمیر شده توسط قارچ صدفی (Pleurotus ostreatus) به‌عنوان یک افزودنی در جیره غذایی گربه‌ماهی (Juvenile Amur cat fish, Silurus asotus) انجام دادند، نتایج نشان داد که دوزهای مختلفی از این جیره غذایی فوق می‌تواند تأثیر مثبتی بر رشد و ایمنی گربه‌ماهی داشته باشد (Katya et al., ۲۰۱۶). خدادادیان‌زو و همکاران در سال ۲۰۱۶ در پژوهشی اثرات استفاده از پودر قارچ *Agaricus bisporus* به‌عنوان مکمل غذایی در جیره بر ایمنی موکوس پوست و بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی موکوسی و سرمی در بچه ماهی کپور معمولی را بررسی کردند. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که استفاده از پودر قارچ در جیره تأثیر مثبتی بر افزایش بیان ژن‌های درگیر در ایمنی داشت که قارچ را به‌عنوان یک منبع پریبیوتیکی مهم مورد تأیید قرار می‌دهد (Khodadadian zou et al., ۲۰۱۶). سپهر فر و همکاران در سال ۱۳۹۷ تأثیر استفاده مجزا و تلفیقی پریبیوتیک (*Pediococcus acidilactici*) و پودر (*Agaricus bisporus*) بر شاخص‌های ایمنی موکوس و هیستومورفولوژی روده در بچه ماهی کپور معمولی را بررسی کردند. بر این اساس نشان داده شد جیره غذایی که دارای مکمل‌های غذایی فوق هستند موجب بهبود شاخص‌های ایمنی موکوس شده ولی به هیستومورفولوژی روده در این ماهی تأثیری ندارد (سپهر فر و همکاران، ۱۳۹۷). خالقی و همکاران در سال ۱۳۹۶ با بررسی ارزیابی مکمل‌های غذایی باکتری (*pediococcus*) و قارچ خوراکی *Agaricus* بر شاخص‌های ایمنی موکوس ماهی کپور معمولی که با نانو ذرات نقره قرار گرفته است، بیان کردند که در تیمارهایی که مورد آزمایش قرار گرفته‌اند میزان فعالیت آنزیم‌های لیپوزیم و فسفاتاز قلیایی و ایمونگلوبولین و توتال پروتئین افزایش معنی‌داری داشتند ($P < 0.05$) و تیمار ترکیبی باکتری و پودر قارچ خوراکی به ترتیب بیشترین اثر را بر پارامترهای ایمنی موکوس ماهی کپور در معرض نانو نقره داشته است (خالقی و همکاران، ۱۳۹۶).

ماهی تیلاپیا یکی از مهم‌ترین ماهیان استخوانی در صنعت آبزی‌پروری در قرن ۲۱ می‌باشد. تیلاپیای نیل بیشترین تولید را در دنیا دارد. این گونه همه‌چیزخوار و چرنده است و در محیط آبی باکیفیت پایین نیز به‌راحتی تکثیر و پرورش می‌یابد.

وجود آلاینده‌هایی همچون نیترات نقره در اکوسیستم‌های آبی موجب تنش در ماهیان شده و می‌تواند سیستم ایمنی ماهیان را تضعیف نماید. کیفیت نامناسب آب و وجود آلاینده‌هایی همچون نیترات نقره در آن می‌تواند باعث ایجاد استرس در ماهیان شده و با کاهش عملکرد ایمنی ماهیان سبب به خطر افتادن سلامتی آن‌ها شود. لذا با توجه به ورود فلزات سنگین به اکوسیستم‌های آبی به‌عنوان آلاینده و همچنین با توجه به اثرات مثبت پریبیوتیک قارچ صدفی بر بهبود ایمنی ناشی از اثرات سمیت مواد آلاینده بر عملکرد بافتی، افزایش رشد و شاخص‌های رشد و برخی از شاخص‌های زیستی آبزیان نظیر شاخص‌های خون‌شناسی و بافتی، در این مطالعه به‌منظور بررسی اثرات افزایش سیستم ایمنی (بهبود عملکرد دفاع هیستوپاتولوژیک) و مواجهه بافتی پریبیوتیک قارچ صدفی بر بافت کبد، آب‌شش ماهی تیلاپیا در غلظت‌های کشنده نیترات نقره، اثر افزایش مقاومت ماهی تیلاپیا تغذیه‌شده با پریبیوتیک قارچ صدفی به‌منظور کاهش آسیب بافتی ناشی از نیترات نقره پرداخته می‌شود.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در پاییز ۱۳۹۷ در سالن آبزی‌پروری شهید ناصر فضلی برآبادی دانشکده شیلات دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان به مدت ۴۲ روز انجام شد. بچه ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) 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 (جدول ۱) (جافر نوده، ۱۳۹۵). در طی دوره آزمایش فاکتورهای فیزیوشیمیایی آب شامل اکسیژن محلول ۷-۹ میلی گرم، دمای ۲۵-۲۸ درجه سلسیوس

ثابت نگهداری شد. غذای مورد استفاده در این پژوهش حاوی پریوتیک به عنوان مکمل غذایی بود که به این منظور از قارچ صدفی استفاده شد. قارچ‌های خریداری شده، به علت میزان بالای آب موجود در آن به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. سپس در آون (Binder، آلمان) با دمای ۴۵ درجه سلسیوس به مدت ۲ روز خشک گردید و در آخر قارچ‌ها را آسیاب (Parses، ایران) کرده و در نهایت برای تهیه جیره غذایی استفاده شد (بخش خصوصی تولیدکننده قارچ) (Şevik et al., ۲۰۱۳). مطالعه فوق در ۴ تیمار با سه تکرار شامل: تیمار (۱) شاهد، فاقد پریوتیک قارچ صدفی، تیمار (۲) غذای حاوی ۰/۰۵ درصد پریوتیک قارچ صدفی، تیمار (۳) غذای حاوی ۰/۱ درصد پریوتیک قارچ صدفی، تیمار (۴) غذای حاوی ۰/۲ درصد پریوتیک قارچ صدفی به مدت ۴۵ روز تغذیه شدند. سپس ۱۶ روز در مجاورت سم نیترات‌نقره (شرکت سیگما) با غلظت ۰/۵ قسمت در میلیون قرار گرفتند. همچنین لازم به یادآوری است روزانه به میزان ۵۰ درصد حجم تانک‌ها تعویض آب صورت گرفت، به طوری که غلظت سم در هر یک از تیمارها حفظ شد. در جدول ۱ درصد ترکیبات تشکیل دهنده جیره مصرفی کپور ماهیان ارائه شده است.

جدول ۱: درصد ترکیبات تشکیل دهنده جیره تجاری (شرکت فرادانه) مورد استفاده در تغذیه ماهیان کپور معمولی پرورشی (سال ۱۳۹۷).

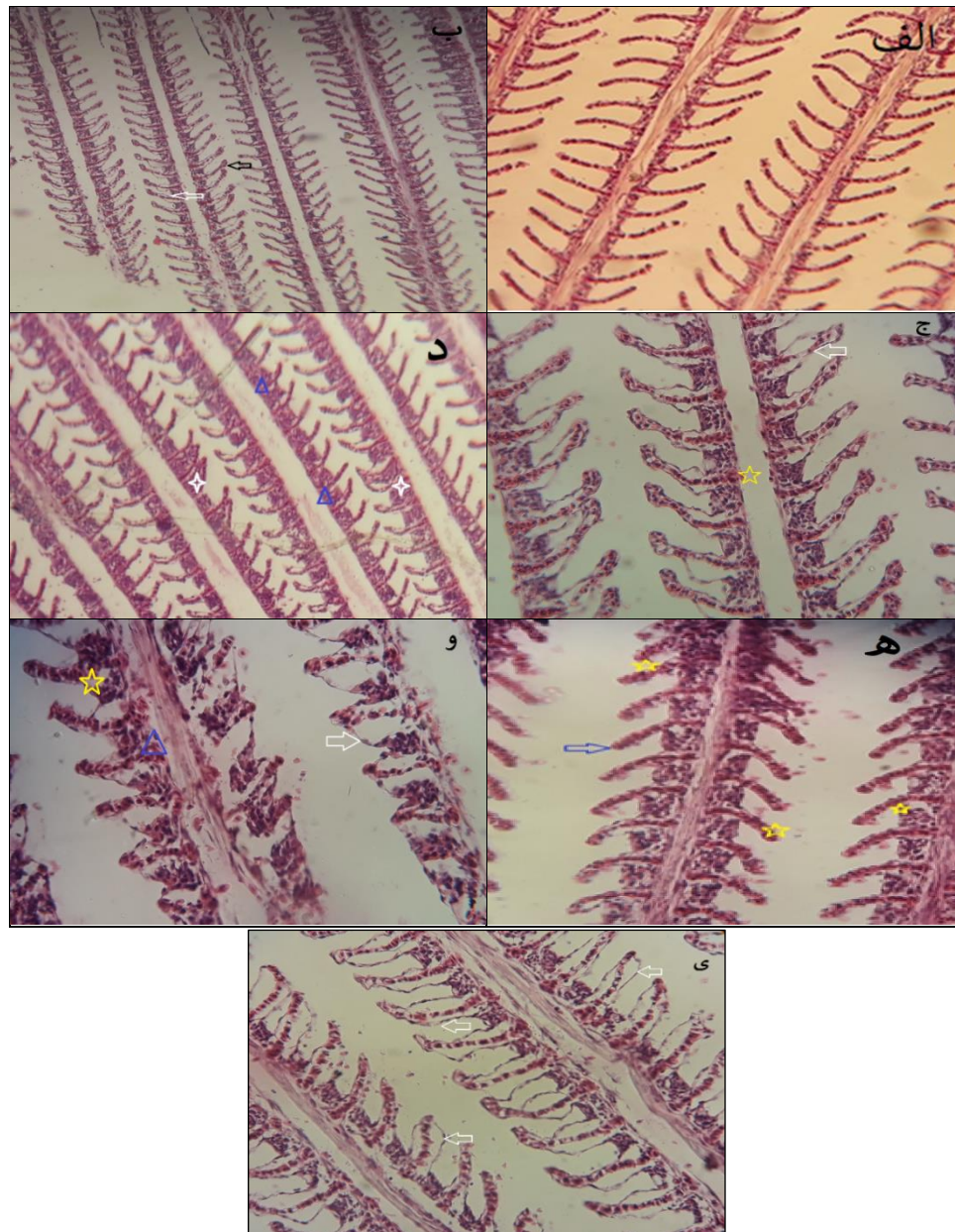
اجزای جیره	پروتئین خام	چربی خام	فیبر خام	خاکستر	رطوبت	فسفر کل
درصد اجزا جیره (درصد)	۳۸-۳۵	۸-۴	۷-۴	۱۱-۷	۱۱-۵	۱-۱/۵

نمونه‌گیری به منظور بررسی اثرات هیستوپاتولوژیکی در انتهای دوره پرورش صورت گرفت. ۲۴ ساعت قبل از نمونه‌گیری تغذیه ماهیان قطع شد و سپس ۳ قطعه ماهی (۳ قطعه ماهی به ازای هر تکرار) به ظاهر سالم به طور تصادفی انتخاب شدند. ماهیان توسط محلول بیهوش کننده گل میخک (۲۲۰ میلی گرم بر لیتر) به سرعت بیهوش شده و بافت کبد و آبشش آن‌ها برای مطالعات بافت‌شناسی جدا گردید. نمونه‌ها ابتدا به مدت ۲۴ ساعت در محلول بوئن تثبیت شده و پس از گذشت ۲۴ ساعت چندین مرتبه با الکل اتانول ۷۰ (مرک، آلمان) درصد مورد شستشو قرار گرفتند. پس از آن توسط الکل ۹۵ و ۱۰۰ (مرک، آلمان) و نهایتاً توسط الکل بوتانول (مرک، آلمان) آبگیری و پس از قرار دادن نمونه‌ها در گزیلول به مدت سه ساعت به منظور شفاف‌سازی، برای پارافینه کردن در پارافین مایع (مرک، آلمان) در داخل آون قرار داده، سپس با پارافین قالب‌گیری شدند. از بافت‌ها برش‌هایی به ضخامت ۵-۶ میکرومتر تهیه شد. پس از نگهداری به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس آون، به روش استاندارد هماتوکسیلین اتوزین رنگ‌آمیزی صورت گرفت. در نهایت به منظور بررسی عوارض بافتی ناشی از اثر نیترات‌نقره و مقایسه بافت‌های مورد نظر با نمونه‌های شاهد از میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین عکس‌برداری (CX۲۱، المپیوس، ژاپن) استفاده گردید (Martoja et al., ۱۹۶۷). برای مقایسه درجات آسیب‌های بافتی نیز از آزمون ناپارامتری کروسکال والیس (Kruskal-Wallis test)، سپس آزمون یو-من وایتنی (Mann-Whitney test) استفاده شد. در تمام بررسی‌ها سطح معنی‌داری آزمون‌ها $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

شکل ۱ و جدول ۲ نشان‌دهنده اثر پریوتیک قارچ صدفی بر عارضه‌های بافتی در آبشش ماهی تیلاپای نیل، پس از مواجهه با نیترات نقره بود. بیشترین عارضه‌های مشاهده شده در بافت آبشش ماهی تیلاپا شامل هایپرپلازی پایه‌ای، هایپرپلازی رأسی، نفوذ گلبول‌های خونی، کوتاه شدن تیغه ثانویه، برآمدگی اپی‌تلیوم، تورم سلول سنگفرشی، اتصال تیغه ثانویه و آنوريسم بود که بیشترین اثر تخریب در تیمار شاهد که فقط در معرض نیترات نقره بودند مشاهده شد که این عارضه‌ها در تیمارهای ترکیبی نیترات نقره و پریوتیک قارچ صدفی با اثر تخریبی کمتر و در مواردی بدون

اثر تخریبی مشاهده شد و در میان آن‌ها تیمار ترکیبی ۰/۲ قسمت در هزار پریوتیک و ۰/۵ قسمت در میلیون نیترات نقره، بهترین اثر را بر عارضه‌های آب‌شش داشت.



شکل ۱: بررسی اثر پریوتیک قارچ صدفی بر تغییرات بافتی آب‌شش بچه ماهی تیلاپای نیل (*Oreochromis niloticus*) پس از مواجهه با نیترات نقره (بزرگنمایی ۴۰۰x) (سال ۱۳۹۷).

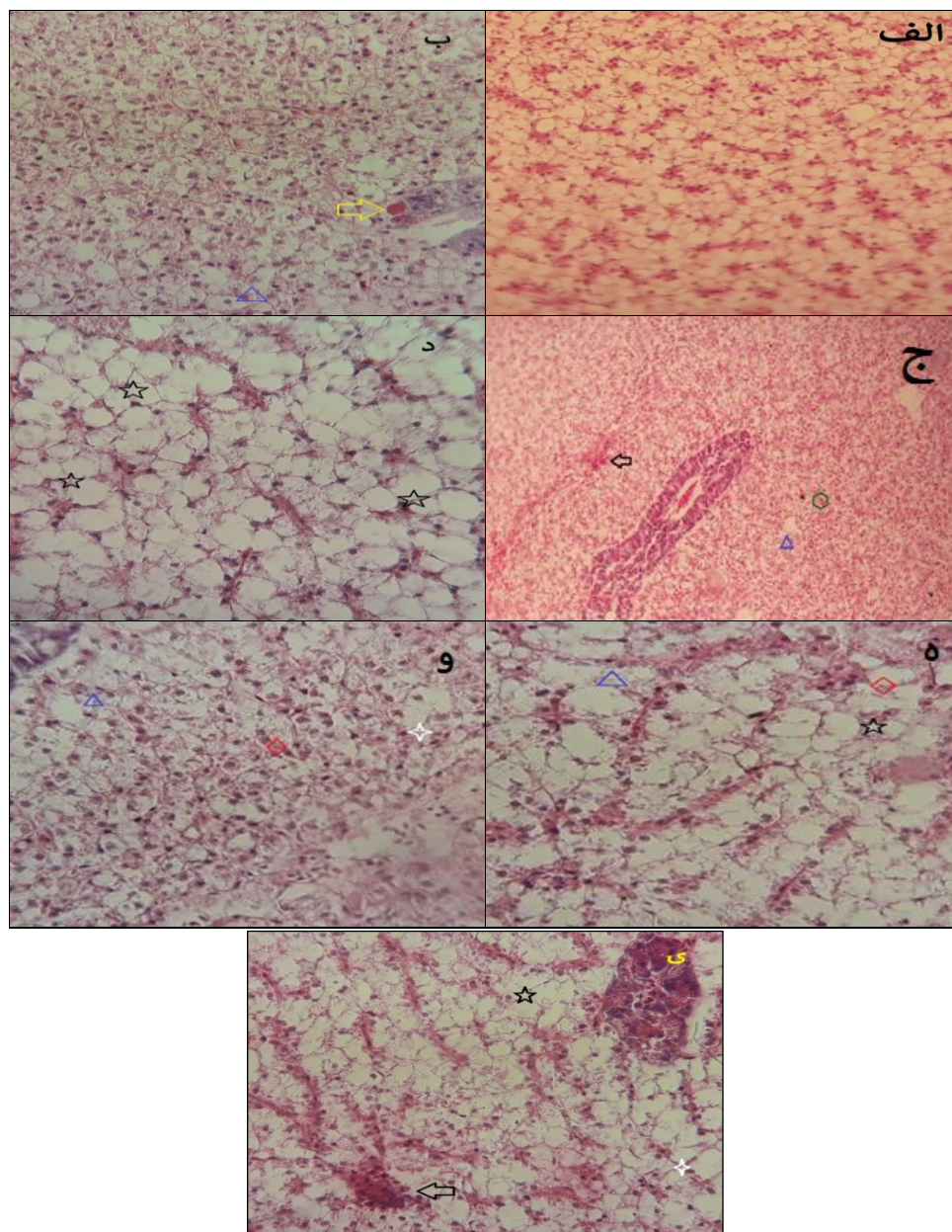
شکل الف: تیمار شاهد (کنترل صفر)، شکل ب: (فلش سیاه) هایپرپلازی رأسی، (فلش سفید) ادم (برآمدگی اپی‌تلیوم)، شکل ج: (فلش سفید) ادم، (ستاره زرد) نفوذ گلبول‌های خونی، شکل د: (مثلث آبی) هایپرپلازی پایه‌ای، (ستاره سفید) اتصال تیغه ثانویه، شکل ه: (ستاره زرد) نفوذ گلبول‌های خونی، (فلش آبی) تورم سنگفرشی، شکل و: (فلش سفید) ادم (برآمدگی اپی‌تلیوم)، (ستاره زرد) نفوذ گلبول‌های خونی، (مثلث آبی) هایپرپلازی پایه‌ای، شکلی: (فلش سفید) ادم (برآمدگی اپی‌تلیوم).

جدول ۲: اثر پریبیوتیک قارچ صدفی بر عارضه‌های بافتی در آبشش ماهی تیلاپپای نیل (*Oreochromis niloticus*) پس از مواجهه با نیترات نقره در تیمارهای آزمایشی مختلف (سال ۱۳۹۷).

عارضه‌های آبشش	شاهد بدون پریبیوتیک و سم	شاهد سم زده و بدون پریبیوتیک	تیمار ۰/۰۵ درصد پریبیوتیک	تیمار ۰/۱ درصد پریبیوتیک	تیمار ۰/۲ درصد پریبیوتیک
هایپرپلازی رأسی	-	+++	++	+	+
هایپرپلازی پایه‌ای	-	++	+	+	+
برآمدگی اپی‌تلیوم	-	+++	+	-	-
نفوذ گلبول‌های خونی	-	+++	+++	+++	++
تورم سلول سنگفرشی	-	++	-	-	-
اتصال تیغه ثانویه	-	++	+	-	-
آنورسم	-	-	-	-	-
کوتاه شدن تیغه ثانویه	-	+	+	-	-

عدم مشاهده عارضه (-)، ۱ تا ۳ عارضه مشاهده شده (+)، ۳ تا ۵ عارضه مشاهده شده (++)، ۵ تا ۱۱ عارضه مشاهده شده (+++) و بیشتر از ۱۱ (++++).

شکل ۲ و جدول ۳ نشان‌دهنده اثر پریبیوتیک قارچ صدفی بر عارضه‌های بافتی در کبد ماهی تیلاپپای نیل، پس از مواجهه با نیترات نقره است. بیشترین عارضه‌های مشاهده شده در بافت کبد ماهی تیلاپپا شامل آتروفی، چربی نکروز، رقیق شدن، گرانول تیره، تورم، انسداد خونی، ریزش خون و رکود صفرا بود که بیشترین اثر تخریب در تیمار شاهد که فقط در معرض نیترات نقره بودند، با عارضه‌هایی نظیر آتروفی، چربی، نکروز، رقیق شدن، انسداد خونی و ریزش خون مشاهده شد که این عارضه‌ها در تیمارهای ترکیبی نیترات نقره و پریبیوتیک قارچ صدفی با اثر تخریبی کمتر و در مواردی بدون اثر تخریبی مشاهده شد؛ و در میان آن‌ها تیمار ترکیبی ۰/۲ قسمت در هزار پریبیوتیک + ۰/۵ قسمت در میلیون نیترات نقره، بهترین اثر را بر عارضه‌های کبد داشت.



شکل ۲: بررسی اثر پریبیوتیک قارچ صدفی بر تغییرات بافتی کبد بچه ماهی تیلاپای نیل (*Oreochromis niloticus*) پس از مواجهه با نیترات نقره (با بزرگنمایی $\times 400$). (سال ۱۳۹۷).

شکل الف: تیمار شاهد (کنترل صفر)، شکل ب: (فلش زرد) خون‌ریزش، (مثلث آبی) نکروز، (مثلث آبی) نکروز، (فلش مشکی) انسداد خونی، (شش ضلعی سبز) گرانول تیره، شکل د: (ستاره سیاه) چرب شدن، شکل ه: (مثلث آبی) نکروز، (ستاره سیاه) چرب شدن، (لوزی قرمز) آتروفی، شکل و: (لوزی قرمز) آتروفی، (مثلث آبی) نکروز، (ستاره سفید) تورم، شکلی: (فلش مشکی) انسداد خونی، (ستاره سیاه) چرب شدن، (ستاره سفید) تورم.

جدول ۳: اثر پریبوتیک قارچ صدفی بر عارضه‌های بافتی در کبد ماهی تیلاپای نیل (*Oreochromis niloticus*) پس از مواجهه با نیترات نقره در تیمارهای آزمایشی مختلف (سال ۱۳۹۷).

عارضه‌های کبد	شاهد بدون پریبوتیک و سم	شاهد سم زده و بدون پریبوتیک	تیمار ۰/۰۵ درصد پریبوتیک	تیمار ۰/۱ درصد پریبوتیک	تیمار ۰/۲ درصد پریبوتیک
آتروفی	-	+++	+++	++	+
چربی	-	+++	+++	+++	++
نکروز	-	+++	+++	+	+
رقیق شدن	-	-	-	-	-
گرانول تیره	-	-	+	-	-
تورم	-	+++	++	++	+
انسداد خونی	-	+++	++	+	-
خون‌ریزش	-	++	++	+	-
رکود صفرا	-	-	-	-	-

عدم مشاهده عارضه (-)، ۱ تا ۳ عارضه مشاهده شده (+)، ۳ تا ۵ عارضه مشاهده شده (++)، ۵ تا ۱۱ عارضه مشاهده شده (+++). و بیشتر از ۱۱ (++++).

بحث و نتیجه‌گیری

وجود آلاینده‌ها در اکوسیستم‌های آبی سبب آسیب‌های بافتی در ماهیان می‌شود که این آسیب‌ها و عوارض را با روش‌های هیستوپاتولوژی می‌توان مورد بررسی قرار داد (مازندرانی و همکاران، ۱۳۹۴). مطالعه پارامترهای هیستوپاتولوژیک به‌عنوان بیومارکرهای نشانگر زیستی یا بیومارکرها عموماً به یک شاخص قابل‌سنجش از برخی حالت‌ها و شرایط بیولوژیک یا زیستی اشاره دارد. زیست‌نشانگرها اغلب در بررسی فرآیندهای طبیعی زیستی، فرایندهای پاتوژن و یا پاسخ دارویی به یک درمان ویژه ارزیابی می‌شوند، از جمله مهم‌ترین شاخص‌های زیستی شاخص‌های خون‌شناسی، بیوشیمیایی، هورمونی و بافتی است (Van der Oost *et al.*, ۲۰۰۳). با توجه به آلودگی محیط‌زیست آبریان و افزایش روزافزون آلاینده‌ها در اکوسیستم‌های آبی و ایجاد عوارض و آسیب بر آبریان، مطالعه این اکوسیستم‌ها امری ضروری می‌باشد (اکرمی و همکاران، ۱۳۹۰). وجود فلزات سنگین سبب آسیب‌های بافتی می‌شود. آبشش‌ها به‌عنوان ارگانی که در معرض مداوم محیط خارجی قرار دارند، اولین هدف آلاینده‌ها می‌باشند و دارای سلول‌های اپی‌تلیوم بوده و سبب تبادلات گازی با محیط آبی می‌شود؛ بنابراین آبشش بافت مناسبی جهت بررسی اثر کوتاه‌مدت آلاینده‌ها است. در صورتی که وجود آلاینده در محیط به‌صورت طولانی‌مدت می‌باشد، باعث ایجاد عوارض و آسیب‌هایی قابل‌مشاهده در بافت آبشش می‌شود. آسیب به این بافت سبب از بین رفتن سلول‌های اپی‌تلیوم و کاهش اکسیژن‌رسانی می‌شود (مشتاقی و همکاران، ۱۳۹۱). به‌طور کلی آبشش ماهیان به‌عنوان شاخص کارآمدی از کیفیت آب در نظر گرفته می‌شود، چراکه علاوه بر وسیع بودن سطح، آبشش‌ها عملکردهای مختلفی دارند که شامل تنفس، تنظیم اسمزی، دفع مواد زائد نیتروژن دار و تعادل اسید و باز می‌باشد؛ بنابراین اختلال عملکرد آبششی ناشی از آلاینده‌ها به‌طور قابل‌توجهی به بهداشت و سلامت ماهی مرتبط می‌شود (هدایتی و همکاران، ۱۳۹۶؛ Alazemi *et al.*, ۱۹۹۶). عمده‌ترین تغییرات بافتی که در بافت آبشش در مواجهه با نیترات نقره در ماهی تیلاپا مشاهده شد شامل هایپرپلازی پایه‌ای، هایپرپلازی رأسی، نفوذ گلبول‌های خونی، کوتاه شدن تیغه ثانویه، برآمدگی اپی‌تلیوم، تورم سلول سنگفرشی، اتصال تیغه ثانویه و آنورسم بود که مطابق نتایج، بیشترین اثر تخریب در تیمار شاهد که فقط در معرض نیترات نقره بودند مشاهده شد که این عارضه‌ها در تیمارهای ترکیبی نیترات نقره و پریبوتیک قارچ صدفی با اثر تخریبی کمتر و در مواردی بدون اثر تخریبی مشاهده شد.

Chen و همکاران در سال ۲۰۱۱ عوارض هیستوپاتولوژیک در بافت آبشش ماهی دانیو گورخری در مواجهه با نانو ذرات تیتانیوم را، هایپرپلازی رآسی و پایه‌ای گزارش کردند که این عوارض در تحقیق حاضر نیز مشهود بود. همچنین هدایتی و همکاران در سال ۱۳۹۶ در مطالعه اثر نانو ذرات فلزی (دی‌اکسید تیتانیوم، مس و روی) در بافت آبشش ماهی کپور معمولی و ماهی طلایی، آنوریسم لاملای ثانویه و هایپرپلازی در مواجهه با نانو ذرات روی را گزارش کردند. Shahzad 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. در مطالعه فوق در آبشش هایپرپلازی، همجوشی آبشش، ضخیم شدن لاملا اولیه و ثانویه و همچنین در بافت کبد، نکروز و آپوپتوز با هسته متراکم و هسته پیلوتیک مشاهده شد.

کبد ماهی شاخص حساس آلودگی محیط بوده و به دلیل تجمع زیستی فوق‌العاده نسبت به سایر بافت‌های بدن، اکثر مطالعات اخیر برای تعیین آلودگی، بر این اندام متمرکز شده است (Safahieh et al., ۲۰۱۱). در مواجهه با سموم و فلزات سنگین هیپاتوسیت‌های کبدی به دلیل ارتباطی که با صفرا دارند، در غیر فعال‌سازی آلاینده‌ها نقش بسزایی دارند. خون‌رسانی در کبد نسبت به بقیه بافت‌ها بیشتر می‌باشد به این دلیل وجود سموم در طولانی‌مدت در محیط زندگی ماهی سبب آسیب به سلول‌های بافت کبد نسبت به بقیه بافت‌های داخلی ماهی می‌شود (بنایی و همکاران، ۱۳۹۱). بیشترین عارضه‌های مشاهده‌شده در بافت کبد ماهی تیلاپیا شامل آتروفی، چربی، نکروز، رقیق شدن، گرانول تیره، تورم، انسداد خونی، ریزش خون و رکود صفرا بود که بیشترین اثر تخریب در تیمار شاهد که فقط در معرض نیترات نقره بودند مشاهده شد که این عارضه‌ها در تیمارهای ترکیبی نیترات نقره و پریبیوتیک قارچ صدفی با اثر تخریبی کمتر و در مواردی بدون اثر تخریبی مشاهده شد. Ostaszewska و همکاران (۲۰۱۶) اثرات سمیت نانو ذرات نقره و مس را در ایپدرم، آبشش و کبد ماهی خاویاری سیبری بررسی کردند و ساختار نامنظم و هسته‌های پیکنوتیک ایپدرم، آپلازی و یا همجوشی لاملاها، اپیتلیال و نکروز در آبشش و همچنین در بافت کبد اتساع فضای سینوسی، رگ‌های خونی بیش‌ازحد و هسته‌های پیکنوتیک را گزارش کردند. Batham و Jain در سال ۲۰۱۶ اثرات نیترات سرب را بر کبد ماهیان استخوانی آب شیرین بررسی کردند. نتایج عارضه‌های سلول‌های کبدی نامنظم، تخلیه سیتوپلاسمی، دژنراسیون کبدی، احتقان خون و ... در کبد را نشان داد. Pournori و همکاران در سال ۲۰۱۷ تأثیر نانو ذرات نقره و نیترات نقره را در گربه‌ماهی راه‌راه تغذیه‌شده با تیمار نوکلئوتیدهای غذایی موردبررسی قرارداند و مشاهده کردند که با افزایش غلظت نقره در آب، تجمع نقره در بافت‌ها به میزان قابل‌توجهی افزایش و در ماهی تغذیه‌شده با نوکلئوتیدهای غذایی میزان تجمع نقره کمتر شده، در نتیجه با افزودن نوکلئوتیدهای غذایی به رژیم غذایی گربه‌ماهی راه‌راه سیستم ایمنی ماهی در برابر تجمع نقره تقویت می‌شود. همچنین Khodadadi و همکاران در سال ۲۰۱۹ در مطالعه‌ای دوزهای (۰/۱، ۰/۵، ۱ درصد) پریبیوتیک سلماناکس را در جیره ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد استفاده قراردادند که نتایج این مطالعه در طول ۶۰ روز پرورش تأثیرات معنی‌داری در بافت آبشش و کبد ماهی نشان داد. افزودن پریبیوتیک سلماناکس به رژیم غذایی در غلظت ۱ درصد باعث بهبود پارامترهای بافتی در طی دوره تولیدمثل و کاهش ضایعات بافتی هنگام مواجهه با یرسینیوز و در نهایت سبب کاهش میزان تلفات ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان شد.

بر اساس مطالعه Rayes و همکاران در سال ۲۰۰۴ که اقدام به انتقال مستقیم عفونت‌های باکتریال به کبد موش صحرایی نمودند، مشخص گردید که مصرف پروبیوتیک، پریبیوتیک و سین‌بیوتیک در کاهش عفونت‌های مذکور در کبد به میزان ۴۸ درصد مؤثر می‌باشد و این پیشگیری در موش‌های صحرایی توسط فعال کردن ماکروفاژها، تحریک ترشح ایمنوگلوبولین A و افزایش نوتروفیل‌ها بوده است. می‌توان علت اصلی کاهش آسیب‌های کبدی ماهی‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان را در موارد فوق توجیه نمود.

تحقیق حاضر نیز مانند نتایج سایر محققان عوارض بسیار شدیدتر ناشی از فلزات نسبت به عوارض مواد آلی و پروبیوتیک‌ها بر بافت آبشش را بیان می‌کند. تفاوت‌های موجود در نتایجی را که محققان مختلف گزارش کرده‌اند، احتمالاً بایستی به گونه پرورشی، اندازه و سن گونه، طول دوره پرورش، شرایط محیطی، رفتارهای تغذیه‌ای، خصوصیات فیزیولوژیک آبی پرورشی مرتبط دانست که نیاز به تحقیقات بیشتری دارد.

بنابراین به نظر می‌رسد تغییرات هیستوپاتولوژیک ایجادشده در کبد و آبشش ماهی تیلاپا پس از مواجهه با نیترات نقره نوعی پاسخ فیزیولوژیک باشد که جاندار برای ممانعت از ورود این مواد به بدن خود و جلوگیری از آسیب‌های احتمالی ایجاد کرده است. بر اساس نتایج مطالعه حاضر مشخص گردید که غلظت‌های مختلف پریبوتیک قارچ صدفی بر بافت‌های آبشش و کبد در طی دوره مواجهه با نیترات نقره تأثیر به سزایی داشت. البته بهترین تأثیر را غلظت ۰/۲ قسمت در هزار پریبوتیک نشان داد که سبب بهبود مقاومت بافتی در برابر آسیب‌های بافتی کبد و آبشش شد. به نظر می‌رسد مقاومت مذکور به دلایل احتمالی از قبیل بهبود پارامترهای ایمنی، پاسخ‌های آنزیمی و در نهایت مهار استرس بوده باشد. همچنین با توجه به نتایج بافتی و آزمون مواجهه، مصرف بلندمدت و با غلظت بیشتر پریبوتیک قارچ صدفی سبب تأثیر بهتر در میزان هدف (ماهی تیلاپا) می‌گردد. تحقیق حاضر فرضیه‌ای بود بر اثر مثبت پریبوتیک قارچ صدفی بر ایمنی ماهی تیلاپا در مواجهه با نیترات نقره که نتایج تحقیق حاضر این فرضیه را تأیید کرد و توانست اثر مخرب نیترات نقره را بر بافت آبشش و کبد بهبود ببخشد.

منابع

- ابرقویی، ص.، هدایتی، س. ع. ا.، قربانی، ر.، کلنگی میاندره، ح. و باقری، ط.، ۱۳۹۵. تعیین و مقایسه سمیت کشنده نانو ذرات نقره و نمک نیترات نقره در ماهی کاراس طلایی. فصلنامه علوم و تکنولوژی محیط‌زیست، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات. دوره ۳، شماره ۲، زمستان ۱۳۹۴. صفحات ۴۳۸-۴۲۹.
- اکرمی، ر.، قلیچی، ا. و احمدی، ا.، ۱۳۹۰-. تأثیر پریبوتیک اینولین جیره غذایی بر پارامترهای هماتولوژی و بیوشیمی سرم خون فیل‌ماهیان (*Huso huso*) جوان پرورشی. مجله تحقیقات دامپزشکی، دانشگاه تهران. دوره ۶۶، شماره ۲، بهار ۱۳۹۰، صفحات ۱۳۶-۱۳۱.
- بنایی، م.، میرواقفی، ع. ر.، سورد گومیل، آ.، رفیعی، غ. ر. و احمدی، ک.، ۱۳۹۱. مطالعه تغییرات فاکتورهای بیوشیمیایی خون و آسیب‌شناسی بافتی کبد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در تماس با غلظت‌های زیرکشنده دیازینون. نشریه محیط‌زیست طبیعی، دانشگاه تهران. دوره ۶۵، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۱، صفحات ۳۱۳-۳۹۷.
- تربالی، ن.، بهاور، م.، عین‌اللهی، ن. و نباتچیان، ف.، ۱۳۹۱. بررسی اثر نیترات نقره بر فعالیت آنزیم پراکسیداز ترب کوهی. مجله علمی پژوهشی فیض، دانشگاه علوم پزشکی کاشان. دوره ۱۶، شماره ۷، زمستان ۱۳۹۱، صفحات ۷۱۴-۷۱۳.
- جافرنوده، ع.، ۱۳۹۵. بررسی خواص سینرژیستی برخی اسیدهای آلی با باکتری لاکتوباسیلوس کازئی (*Lactobacillus casei*) در پرورش بچه ماهیان انگشت قد قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) پایان‌نامه، دانشکده شیلات دانشگاه ارومیه. ۱۵۰ ص.
- خدادادی، ا.، حقیقی، ع.، ملکی نژاد، ح.، توکمه چی، ا. و افشار نسب، م.، ۱۳۹۷. تأثیر مکمل پریبوتیک سل ماناکس بر بافت آبشش و کبد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در دوره پرورشی و مواجهه تجربی با بیماری یرسینیوزیس. مجله آسیب‌شناسی درمانگاهی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی تبریز. دوره ۱۲، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۷، صفحات ۳۵۵-۳۳۷.
- سپهرفر، د.، حسینی فر، س. ح. و جافر نوده، ع.، ۱۳۹۷. تأثیر استفاده مجزا و تلفیقی پریبوتیک *Pediococcus acidilactici* و پریبوتیک *Raffinos* بر شاخص‌های ایمنی موکوس و هیستو مورفولوژی روده در ماهیان طلایی (*Carassius auratus*). فیزیولوژی و تکوین جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان. دوره ۱۲، شماره ۱، زمستان ۱۳۹۷، صفحات ۲۵-۳۴.
- خالقی، س. ر.، هدایتی، س. ع. ا.، کشیری، ح.، پاکنژاد، ح. و حسینی فر، س. ح.، ۱۳۹۷. ارزیابی مکمل‌های غذایی باکتری *Pediococcus acidilactici* و قارچ *Agaricus bisporus* بر شاخص‌های ایمنی موکوس پوست ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در مواجهه با نانو ذرات نقره. مجله علمی شیلات ایران، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور. دوره ۲۷، شماره ۳، تابستان ۱۳۹۷، صفحات ۹۷-۱۰۹.
- سرسنگی‌علی‌آباد، ح.، محمدی، م.، مشایی، ن. و رجبی‌پور، ف.، ۱۳۹۵. بررسی اثر شوری بر رشد و بازماندگی لارو تیلاپای نیل (*Oreochromis niloticus*). مجله علوم تکثیر و آبی‌پروری، دانشگاه آزاد اسلامی بابل. دوره ۳، شماره ۹، تابستان ۱۳۹۵، صفحات ۶۲-۵۳.
- مازندرانی، م.، سوداگر، م. و نمرودی، س.، ۱۳۹۴. هیستوپاتولوژی کلیه، کبد و آبشش بچه ماهیان کپور (*Cyprinus carpio*) در مواجهه حاد با سولفات مس. نشریه علمی بوم‌شناسی آبزیان، دانشگاه هرمزگان. دوره ۵، شماره ۱، تابستان ۱۳۹۴، صفحات ۱۶-۹.

مشتاقی، ب.، نظامی، ش.ع.، خارا، ح.، پژند، ذ.، شناور، ع.ر.، حلاجیان، ع.، فتح‌الهی، ر. و منافی حویق، ز.، ۱۳۹۱. تأثیر سمیت حاد سولفات مس ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) و پرمنگنات پتاسیم (KMnO_4) بر آبشش و کبد بچه تاس ماهیان ایرانی (۱۸۹۷). *Acipenser persicus* Borodin. مجله علمی پژوهشی زیست‌شناسی دریا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز. دوره ۴، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۱، صفحات ۴۴-۳۵.

هدایتی، س.ع.ا.، دارابی تبار، ف. و رضایی، ح.، ۱۳۹۶. بررسی آسیب‌شناسی بافتی آبشش ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) و ماهی طلایی (*Carassius auratus*) در مواجهه با غلظت کشنده نانو اکسید روی (ZnONPs)، نانو اکسید مس (CuONPs) و نانودی اکسیدتیتانیوم (TiO_2NPs). مجله آسیب‌شناسی درمانگاهی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی تبریز. دوره ۱۱، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۶، صفحات ۱۴۴-۱۳۵.

هدایتی، س.ع.ا.، جهانبخشی، ع. و قادری‌رمازی، ف.، ۱۳۹۳. سم‌شناسی آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. جلد اول، چاپ اول، صفحات ۷۶-۷۰.

Alazemi, B. M., Lewis, J. W. and Andrews, E. B., ۱۹۹۶. Gill damage in the freshwater fish *Gnathonemus petersii* (family: Mormyridae) exposed to selected pollutants: an ultrastructural study. *Journal of Environmental Technology*, ۱۷(۳): ۲۲۵-۲۳۸.

Chen, J., Dong, X., Xin, Y. and Zhao, M., ۲۰۱۱. Effects of titanium dioxide Nano particles on growth and some histological parameters of zebra fish (*Danio rerio*) after a long maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. *Journal of Biology of Reproduction*, ۴۹(۱): ۸۹-۹۴.

Chen, J., Dong, X., Xin, Y. and Zhao, M., ۲۰۱۱. 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. *Journal of Biology of Reproduction*, ۴۹(۱): ۸۹-۹۴.

Clark, N. J., David, B., Benjamin, P. E. and Richard, D. H., ۲۰۱۹. Dietary exposure to silver nitrate compared to two forms of silver nanoparticles in rainbow trout: bioaccumulation potential with minimal physiological effects. *Journal of Environmental Science*, ۶ (۵): ۱۳۹۳-۱۴۰۵.

Davies, P. H., Goettl Jr, J. P. and Sinley, J. R., ۱۹۷۸. Toxicity of silver to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of Water Research*, ۱۲(۲): ۱۱۳-۱۱۷.

Douglas, L. C. and Sanders, M. E., ۲۰۰۸. Probiotics and prebiotics in dietetics practice. *Journal of the American dietetic association*, ۱۰۸(۳): ۵۱۰-۵۲۱.

Jain, S. and Batham, D., ۲۰۱۶. Acute toxicity and biochemical studies of lead nitrate on the liver and kidney of fresh water fish *Mystus cavasius*. *Journal of Global Biosciences*, ۵(۹): ۴۵۹۰-۴۵۹۷.

Katya, K., Yun, Y. H., Yun, H., Lee, J. Y. and Bai, S. C., ۲۰۱۶. Effects of dietary fermented by-product of mushroom, *Pleurotus ostreatus*, as an additive on growth, serological characteristics and nonspecific immune responses in juvenile Amur catfish, *Silurus asotus*. *Journal of Aquaculture research*, ۴۷(۵), ۱۶۲۲-۱۶۳۰.

Khodadadian Zou, H., Hoseinifar, S. H., Miandare, H. K. and Hajimoradloo, A., ۲۰۱۶. *Agaricus bisporus* powder improved cutaneous mucosal and serum immune parameters and up-regulated intestinal cytokines gene expression in common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings. *Journal of Fish & shellfish immunology*, ۵۸: ۳۸۰-۳۸۶.

Khodadadi, A., Haghighi, A., Malekinezhad, H., Tokmechi, A. and Afsharnasab, M., ۲۰۱۹. 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*, ۱۲(۴): ۳۳۷-۳۵۵. [In Persian]

Khosravi-Katuli, K., Shabani, A., Paknejad, H. and Imanpoor, M. R., ۲۰۱۸. Comparative toxicity of silver nanoparticle and ionic silver in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*): Accumulation, physiology and histopathology. *Journal of hazardous materials*, ۵(۳۵۹): ۳۷۳-۳۸۱.

Mahious, A. S., Gatesoupe, F. J., Hervi, M., Metailler, R. and Ollevier, F., ۲۰۰۵. Effect of dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning Turbot (*Psetta maxima*). *Journal of Aquaculture International*, ۱۴: ۲۱۹-۲۲۹.

Martoja, R. and Martoja-Pierson, M., ۱۹۶۷. Initiation aux techniques de l histology animale. Masson et Cie, Paris. ۳۴۵ p.

- Ostaszewska, T., Chojnacki, M., Kamaszewski, M. and Sawosz-Chwalibóg, E., ۲۰۱۶. Histopathological effects of silver and copper nanoparticles on the epidermis, gills, and liver of Siberian sturgeon. Journal of Environmental science and pollution research, ۲۳(۲): ۱۶۲۱-۱۶۳۳.
- Pelgrom, S., Lamers, L., Lock, R., Balm, P. and Wendelaar Bonga, S. E., ۱۹۹۵. Integrated physiological response of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to sublethal copper. Journal of Aquatic Toxicology. ۳۲(۴):۳۰۳-۳۲۰.
- Pournori, B., Dorafshan, S. and Heyrati, F. P., ۲۰۱۷. Bioaccumulation of water-borne silver nanoparticles and silver nitrate in striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus*, fed dietary nucleotides. Journal of Iranian Journal of Ichthyology, ۴(۱): ۳۱-۴۰.
- Rayes, N., Seehofer, D., Theruvuth, T., Schiller, R. A., Langrehr, J. M. and Jonus, S., ۲۰۰۴. Supply of pre- and probiotics reduces bacterial infection rates after liver transplantation a randomized, double-blind trial. Journal of American Journal of Transplantation, ۵: ۱۲۵-۱۳۰.
- Safahieh, A., Hedayati, A., Savari, A. and Movahedinia, A., ۲۰۱۱. Effect of sublethal dose of mercury toxicity on liver cells and tissue of yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*). Journal of Toxicology and industrial health, ۲۸(۷): ۵۸۳-۹۲.
- Şevik, S., Aktaş, M., Dogan, H. and Koçak, S., ۲۰۱۳. Mushroom drying with solar assisted heat pump system. Journal of Energy Conversion and Management, ۷۲: ۱۷۱-۱۷۸.
- Shahzad, K., Khan, M. N., Jabeen, F., Kosour, N., Chaudhry, A. S., Sohail, M. and Ahmad, N., ۲۰۱۹. 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, ۱۶(۴): ۱۹۷۳-۱۹۸۴.
- Van der Oost, R., Beyer, J. and Vermeulen, N. P. E., ۲۰۰۳. Fish bioaccumulation and biomarkers. Journal of Environmental toxicology and pharmacology, ۱۳(۲):۵۷-۱۴۹.
- Wasser, S. P., ۲۰۰۲. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. Journal of microbiology and biotechnology, ۶۰(۳): ۲۵۸-۲۷۴.