تغــذیه آبزیــان
سال پنجم، شماره دوم،
پاییز و زمستان ۱۳۹۸

تاثیر سطوح مختلف پری بیوتیک همزاد قارچ صدفی بر شاخص‌های ایمنی موکوس ماهی تیلاپیا نیل (*Oreochromis niloticus*) در مواجهه با سم کلرپیریفوس در شرایط آزمایشگاهی

عاطفه ایری[۱]، سید علی اکبر هدایتی[۱*]، حامد پاک‌نژاد[۱]، طاهره باقری[۲]، سید رضا خالقی[۱]
۱- دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، گلستان
۲- مرکز تحقیقات شیلاتی آبهای دور، موسسه تحقیقات شیلات ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، چابهار، سیستان و بلوچستان

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۱/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۵/۱۶

چکیده
این تحقیق با هدف بررسی اثر پری‌بیوتیک قارچ صدفی بر شاخص‌های ایمنی موکوس ۱۲۰ قطعه بچه ماهی تیلاپیا با میانگین وزنی ۲۰ گرم در مواجهه با سم کلرپیریفوس انجام شد. بدین منظور به تیمار ۱ (شاهد) غذای بدون پری‌بیوتیک، به تیمار ۲ غذای حاوی ۰/۰۵٪، تیمار ۳ غذای حاوی ۰/۱٪ و تیمار ۴ غذای حاوی ۰/۲٪ پری‌بیوتیک اضافه شد. پس از پایان دوره تغذیه، ماهیان به مدت ۱۴ روز در مواجهه با سم کلرپیریفوس با غلظت ۰/۰۵ ppm قرار گرفته و نمونه‌برداری از موکوس پوست ماهی انجام شد. تیمارهای آزمایشی بر فسفاتاز قلیایی، آنزیم لـیزوزیم، پروتئین محلول و ایمـونوگلوبولین مـوکوس تأثیر معنی‌داری داشت ($p<0/05$)، به طوری‌که میزان فسفاتاز قلیایی، آنزیم لیزوزیم و پروتئین محلول موکوس در اثر تیمارهای تغذیه شده با پری‌بیوتیک و با افزایش غلظت پری‌بیوتیک، به طور معنی‌داری افزایش یافت (به ترتیب ۴۰/۱۲ IU/L، ۳۶ U/mg Pro و ۹۹/۵۴ µg/100 µL)، ولی میزان ایمونوگلوبولین موکوس در اثر تیمارهای تغذیه شده با پری‌بیوتیک و با افزایش غلظت آن روند کاهشی داشت (۶۹ µg/100 µL). در مجموع افزودن پری‌بیوتیک (پودر قارچ) به جیره غذایی سبب تقویت شاخص‌های ایمنی (آنزیم فسفاتاز قلیایی، لیزوزیم، ایمونوگلوبولین و پروتئین محلول) موکوس پوست ماهی تیلاپیای نیل در مواجهه با سم کلرپیریفوس شد و مشخص شد که افزودن پری‌بیوتیک به جیره غذایی تأثیر معنی‌داری دارد و سبب تقویت دستگاه ایمنی در مواجهه با آلاینده ها و مواد تنش‌زا می‌شود.

کلمات کلیدی: ایمنی زیستی، پری‌بیوتیک، سم کلریپریفوس، ماهی تیلاپیا

* نویسنده مسئول: Hedayati@gau.ac.ir

مقدمه

با رونق کشاورزی و افزایش تولید محصولات، استفاده از آفت‌کش‌های کشاورزی افزایش یافته است. ورود میزان زیادی از انواع این آفت‌کش‌ها از طریق رواناب و ریزش‌های جوی به بوم سازگان آبی می‌شود که این مـواد آسیب‌های جبران‌ناپذیری را به محیط زیست و این نوع بوم سازگان و حفظ گونـه‌هـای آبزی وارد می‌کنند. کلرپیریفوس از حشره‌کش‌های ارگانوفسفره پر مصرف است که در مزارع و باغـات برای محـــدود کردن حشـــرات و کنه به‌کار برده می‌شوند. استفاده از این سموم به علت توزیع گسترده در محیط آبی، اثرگذاری وسیعی در جانداران غیر هدف از قبیل بی‌مهرگان، پرندگان، پستانداران، ماهی‌ها (Castano at el. 1986) و محیط زیست دارد. کلرپیریفوس حشره‌کشی است که برای کنترل آفات زراعی، آفات خانگی، لارو آبزیان و درمان خاک، برگ و بذر استفاده می‌شود. نفوذ پساب‌هـای کشـاورزی و جـاری شدن رواناب‌های سطحی سبب ورود سموم ارگانوفسفره مثل کلرپیریفوس به بوم‌سازگان آبی و صدماتی به این منابع و موجودات غیر هدف می‌شود (Burkepile et al. 2000). کلرپیریفوس چربی‌دوست است و از غشای سلول عبور کرده و سبب واکنش‌های درون‌سلولی و تغییرات در هورمون‌ها و آنزیم‌ها و بافت موجود می‌شود (Uzun et al. 2010).

عوامل استرس‌زای محیطی از جمله سموم کشاورزی باعث ایجاد اختلال در دستگاه ایمنی ماهیان و حساسیت زیاد به انواع بیمـاری‌ها می‌شـود که کاهش توسعه اقتصـادی آبزی‌پروری را به همراه دارد (اکرمی و همکاران، ۱۳۸۷). به همین علت در سال‌های اخیر از مکمل‌های غذایی که باعث تقویت دستگاه ایمنی و بهبود رشد آبزیان می‌شوند و از نظر اقتصـادی و دامنه سـلامتی مناسب هستـــند، استفـــاده می‌کـنند. از جـمله این مکـمـل غـــذایی مـی‌تـوان به پری‌بیوتیک‌ها اشاره کرد. پری‌بیوتیـک‌ها مـواد غذایی هضم‌ناپذیری هستند که سبب می‌شوند تا تعداد کمی از باکتری‌های روده، فعال یا تحریک به رشد شوند و تأثیرات مثبـــتی در میزبان داشتـه و سلامتی میزبان را بهبـــود می‌بخشند (Gibson and Rober Foroid, 1995).

استفاده از پری‌بیوتیک‌ها به صورت مکمل در جیره غذایی سبب افزایش اشتها و فعال شدن آنزیم‌های گوارشی، ایجاد تعادل میکروب‌های موجود در دستگاه گوارشی میزبان و تولید مواد مفید از جمله ویتامین‌ها می شوند و ایمنی ذاتی را در مقابل فرآیندهای تنش‌زا و عوامل بیماری‌زا افزایش می‌دهند. از جمله پری‌بیوتیک‌ها می‌تـوان به قارچ‌ها اشاره کرد که دارای ترکیبات فعال زیستی هستند. بتاگلوکان با اتصال به گیرنده‌های پروتئینی موجود در سطح ماکروفاژها، سبب فعال شدن آنها و افزایش لنفوسیت‌ها، فاگوسیت‌ها و ظرفیت دستگاه ایمنی ماهی در برابر آلاینده‌های محیطی می‌شود (Wasser, 2002).

ماهی تیلاپیا از راسته سوف ماهی‌شکلان (Perciformes) و خانواده Cichlidae است. معمولاً این ماهی در آب‌های داخلی شیرین و لب شور پرورش می‌یابد، ولی به علت تحمل محدوده گسترده‌ای از شوری، در محیط آب شور دریا در قفس هم قابل پرورش است. Zahran و همکاران (۲۰۱۸) تأثیر سم کلرپیریفوس را بر شاخص‌های خونی، ایمنی، ضداکسایشی و تغییرات بافتی (کبد، کلیه و آبشش) در ماهی تیلاپیا بررسی کردند که این یافته‌ها می‌تواند به طور بالقوه به عنوان نشانگرهای زیستی در مطالعات ارزیـابی سم‌شناسی آبزیان به‌کار روند. Jiao و همکاران (۲۰۱۹) تأثیر سم کلرپیریفوس را روی بافت آبشش کپور بررسی کردند که باعث تخریب بافت آبشش شده، بر عملکرد دستگاه ایمنی تأثیر داشته و سبب ایجاد استرس اکسیداتیو و آپوپتوزیس در کپور شده است.

با توجه به افزایش روز افزون استفاده از سموم کشاورزی و اثرات مخرب این سم بر آبزیان و همچنین، اهمیت ارزش اقتصادی ماهی تیلاپیا، هدف از این تحقیق، بررسی اثر پری‌بیوتیک همزاد قارچ صدفی بر شاخص‌های ایمنی موکوس ماهی تیلاپیا در مواجهه با سم کلرپیریفوس بود.

مواد و روش ها

این تحقیق به مدت ۵۶ روز (۴۲ روز تغذیه با مکمل غذایی و ۱۴روز مواجهه با سم کلرپیریفوس) در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. در این آزمایش ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) در قالب طرح تصادفی به عنوان مدل جانوری در نظر گرفته شد. به این منظور، تعداد ۱۲۰ قطعه بچه ماهی تیلاپیا با میانگین وزنی ۲۰ گرم انتخاب شد. این ماهیان به مدت ۲ هفته برای سازگاری با شرایط بالا نگهداری شدند. سپس به مدت ۶ هفته با غذای تجاری کپور حاوی پری‌بیوتیک (قارچ صدفی) به میزان ۳٪ وزن بدن ماهی تغذیه شدند.

آماده‌سازی جیره غذایی

پری‌بیوتیک قارچی مورد استفاده در این تحقیق به عنوان مکمل غذایی قارچ صدفی (*Pleurotus ostreatas*) بود که پس از خرد کردن در دستگاه آون با دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد تا کاملاً خشک شود و نهایتاً آسیاب شد. سپس در جیره غذایی برای انجام آزمایش استفاده شد. این آزمایش به صورت ۴ تیمار با ۳ تکرار با استفاده از جیره غذایی تجاری ماهی کپور معمولی شرکت فرادانه انجام شد. به این منظور به تیمار ۱ (شاهد) غذای بدون پری‌بیوتیک، به تیمار ۲ غذای حاوی ۰/۰۵٪، تیمار ۳ غذای حاوی ۰/۱٪ و تیمار ۴ غذای حاوی ۰/۲٪ پری‌بیوتیک به جیره غذایی اضافه شد. به این ترتیب که ابتدا مکمل‌ها را با محلول ژلاتین ۴٪ حل کرده و سپس با غذای تجاری که با آسیاب پودر شده، مخلوط می‌شود و با دستگاه همزن به صورت خمیر و بعد توسط چرخ گوشت به صورت رشته‌ای در می‌آورند. پس از خشک شدن، آن را به پلت‌های کوچک تبدیل کرده تا بچه ماهی‌ها استفاده کنند.

مواجهه با غلظت تحت کشنده سم کلرپیریفوس

پس از پایان ۶ هفته دوره تغذیه و بر اساس تحقیقات قبلی محققان، ماهیان به مدت ۱۴ روز در مواجهه با سم کلرپیریفوس با غلظت ۰/۰۵ ppm قرار گرفتند (Zahran et al. 2018; Jiao et al. 2019). در دوره پرورش ماهیان در مخازن فایبرگلاس ۴۰۰ لیتری نگهداری شده و در طی دوره آزمایش متغیرهای فیزیکوشیمیایی آب شامل اکسیژن محلول در ۹-۷ میلی‌گرم در لیتر و دما در ۲۸-۲۵ درجه سانتی‌گراد ثابت نگهداری شدند. در این مدت روزانه ۵۰٪ حجم آب تعویض و با افزودن مقادیر جدید، میزان سم ثابت نگهداشته شد.

جمع آوری موکوس

برای اندازه‌گیری برخی از شاخص‌های ایمنی موکوس، از جمله آنزیم آلکالین فسفاتاز قلیایی، لیزوزیم و پروتئین کل، نمونه‌برداری از موکوس پوست ماهی انجام شد. برای انجام این کار از هر تیمار سه قطعه ماهی به‌طور تصادفی انتخاب، و با پودر گل میخک بیهوش شدند و به‌طور جداگانه درون کیسه‌های پلاستیکی زیپ‌دار که حاوی ۱۰ میلی‌لیتر نمک بودند، قرار داده شدند. به مدت ۲ دقیقه نمونه‌ها را به آرامی تکان داده تا باعث تحریک ترشح موکوس در پوست ماهی شود. موکوس‌های جمع‌آوری شده به لوله‌های سانتریفیوژ استریل منتقل شده و با دور ۱۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ و سپس مایع رویی (سوپرناتانت) به میکروتیوب‌ها منتقل شدند. نمونه‌ها درون فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمایش نگهداری شدند.

سنجش شاخص لیزوزیم

لیزوزیم موکوس بر اساس روش کدورت‌سنجی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Biochrom Libra S12) و بر مبنای تجزیه باکتری گرم مثبت (*Micrococcus lysodeikticus*) حساس به آنزیم لیزوزیم سنجش شد. برای سنجش این آنزیم از باکتری *Micrococcus luteus* به عنوان سوبسترا استفاده شد. برای تهیه این سوسپانسیون، باکتری لیوفیلیزه شده میکروکوکوس لوتئوس را در بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۴ مولار حل کرده و جذب این محلول در مقابل شاهد (کووت حاوی فسفات سدیم)، در طول موج ۴۵۰ نانومتر، برابر ۰/۷-۰/۶ تنظیم شد. سپس، کاهش در جذب سلول‌های *Micrococcus luteus* در مدت ۱۰ دقیقه ثبت شد که در واقع، یک واحد فعالیت آنزیم، به صورت مقدار آنزیمی که در طول موج ۴۵۰ نانومتر و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد کاهشی معادل ۰/۰۰۱ در دقیقه در جذب سلول‌های میکروکوکوس لوتئوس ایجاد می‌کند، بیان می‌شود (Subramanian et al. 2007).

سنجش شاخص پروتئین کل

برای این منظور از منحنی استاندارد آلبومین سرم گاوی استفاده شد. اندازه‌گیری با اضافه کردن معرف رنگی فولین فنول سیوکالتیو (Folin-Ciocalteu's phenol reagent) به ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های رقیق‌شده موکوس و استاندارد و قرائت نوری با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد. با انتقال جذب نوری به دست آمده به منحنی استاندارد، میزان پروتئین محلول بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد (Lowry et al. 1951).

سنجش ایمونوگلوبولین کل

ابتدا میزان پروتئین موکوس تعیین و سپس به نمونه موکوس، پلی‌اتیلن گلیکول ۱۲٪ اضافه شد. پس از ۲ ساعت

گرمخانه گذاری در دمای اتاق و تاریکی، نمونه‌ها سانتریفیوژ شده (۵۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه) و غلظت پروتئین در قسمت بالایی محلول بار دیگر اندازه‌گیری شد. در واقع، پلی‌اتیلن گلیکول باعث رسوب ایمونوگلوبولین موجود در پروتئین شد و میزان ایمونوگلوبولین کل از محاسبه اختلاف غلظت پروتئین در نمونه اولیه (پروتئین محلول) و غلظت پروتئین پس از افزودن پلی‌اتیلن گلیکول محاسبه شد (Lowry et al. 1951).

سنجش شاخص آنزیم فسفاتاز

فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی موکوس با استفاده از کیت تجاری شرکت پارس آزمون بر اساس پروتکل ارائه شده توسط شرکت سنجش شد. میزان جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Biochrom Libra S12) و با طول موج ۴۰۵ نانومتر خوانده و سپس با استفاده از ضریب مشخص، عدد نهایی محاسبه شد (Smith et al. 2000).

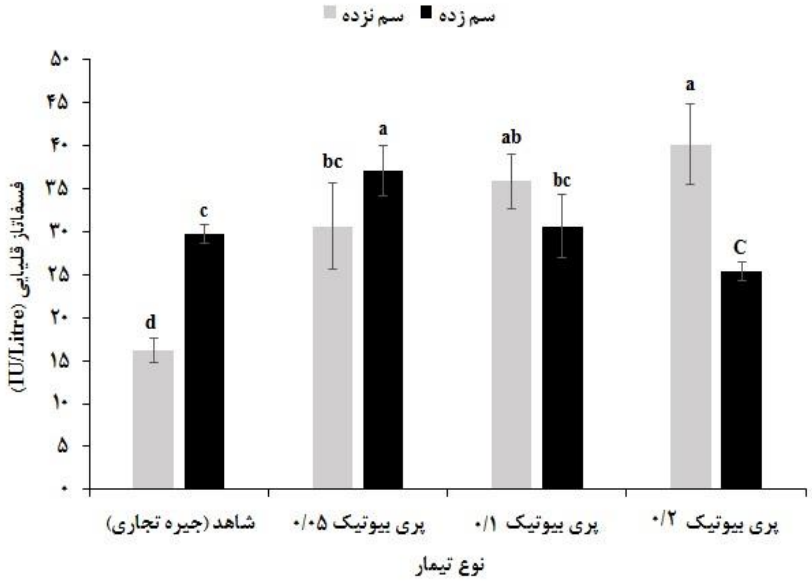
تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با نرم‌افزار SPSS 22 و آزمون واریانس یکطرفه و پس آزمون دانکن در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ انجام شد. ترسیم نمودارها با نرم‌افزار Excel 2016 به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شد.

نتایج

میزان فسفاتاز قلیایی در بچه ماهی تیلاپیا

بررسی تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نشان داد که در مجموع تیمارهای آزمایشی بر فسفاتاز قلیایی موکوس تأثیر معنی‌داری داشت (p<۰/۰۵). به این صورت که میزان فسفاتاز قلیایی موکوس در اثر تیمارهـای تغذیه شده با پری‌بیوتیک و با افزایـش غلظـت پری‌بیوتیک به طور معنی‌داری افزایش یافت، در تیمار در معرض سم کلرپیریفوس و در تیمارهای ترکیب سم و پری‌بیوتیک نیز کاهش معنی‌داری مشاهده شد، ولی در تیمارهای شاهد و ۰/۰۵ افزایش معنی‌داری وجود داشت (p<۰/۰۵).

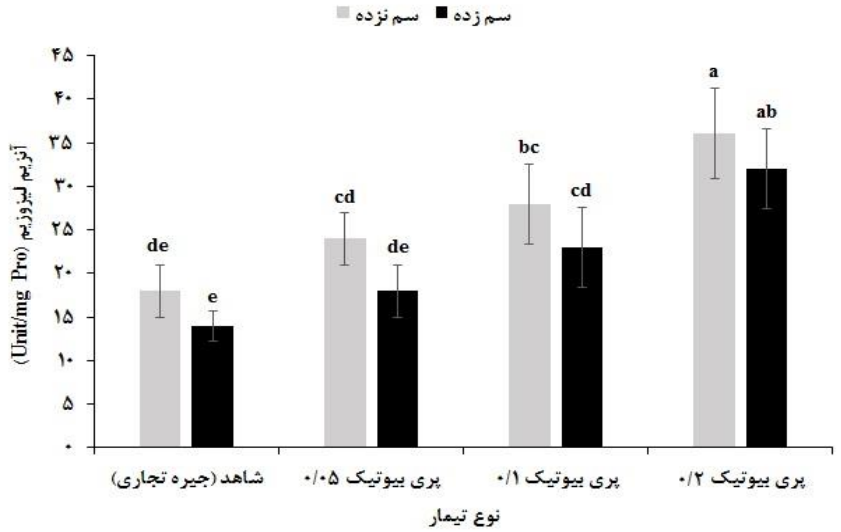


شکل ۱ میزان فسفاتاز قلیایی موکوس بچه ماهی تیلاپیای نیل در تیمارهای تغذیه شده با سطوح مختلف پری‌بیوتیک با تیمارهای سم‌زده (کلرپیریفوس). حروف متفاوت نشانگر اختلاف معنی‌دار در سطوح بین تیمارهای آزمایشی می‌باشد (p<۰/۰۵).

میزان آنزیم لیزوزیم در بچه ماهی تیلاپیا

بررسی تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نشان داد که در مجموع تیمارهای آزمایشی بر آنزیم لیزوزیم موکوس تأثیر معنی‌داری داشت (p<۰/۰۵). به این صورت که میزان این آنزیم در تیمارهای تغذیه شده با پری‌بیوتیک و با افزایش غلظت آن، به طور معنی‌داری افزایش یافت. میزان این آنزیم در تیماری که در معرض سم کلرپیریفوس قرار داشت و

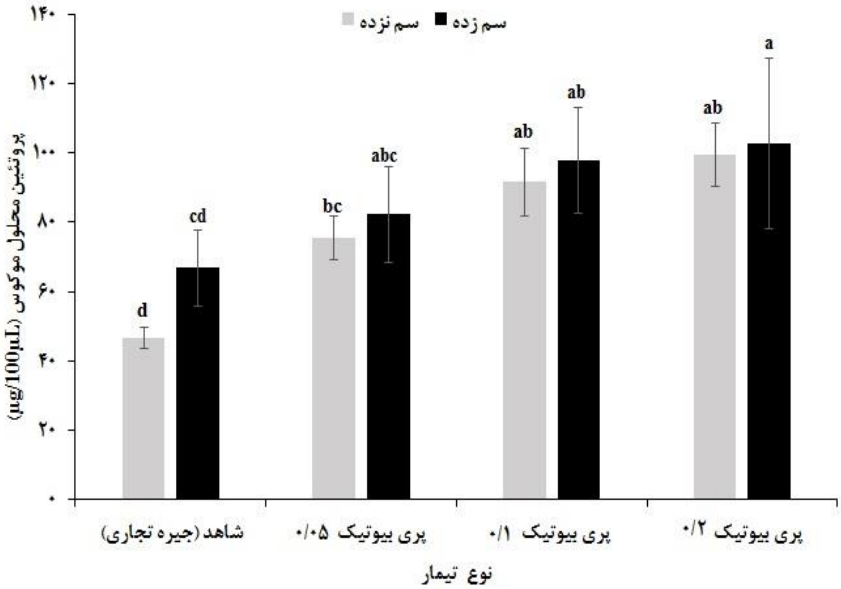
همچنین، در تیمارهای ترکیب سم و پری‌بیوتیک کاهش معنی‌داری داشت (p<۰/۰۵).



شکل ۲ میزان آنزیم لیزوزیم موکوس بچه ماهی تیلاپیای نیل در تیمارهای تغذیه شده با سطوح مختلف پری‌بیوتیک با تیمارهای سم زده (کلرپیریفوس). حروف متفاوت نشانگر اختلاف معنی‌دار در سطوح بین تیمارهای آزمایشی است (p<۰/۰۵).

میزان پروتئین محلول در بچه ماهی تیلاپیا

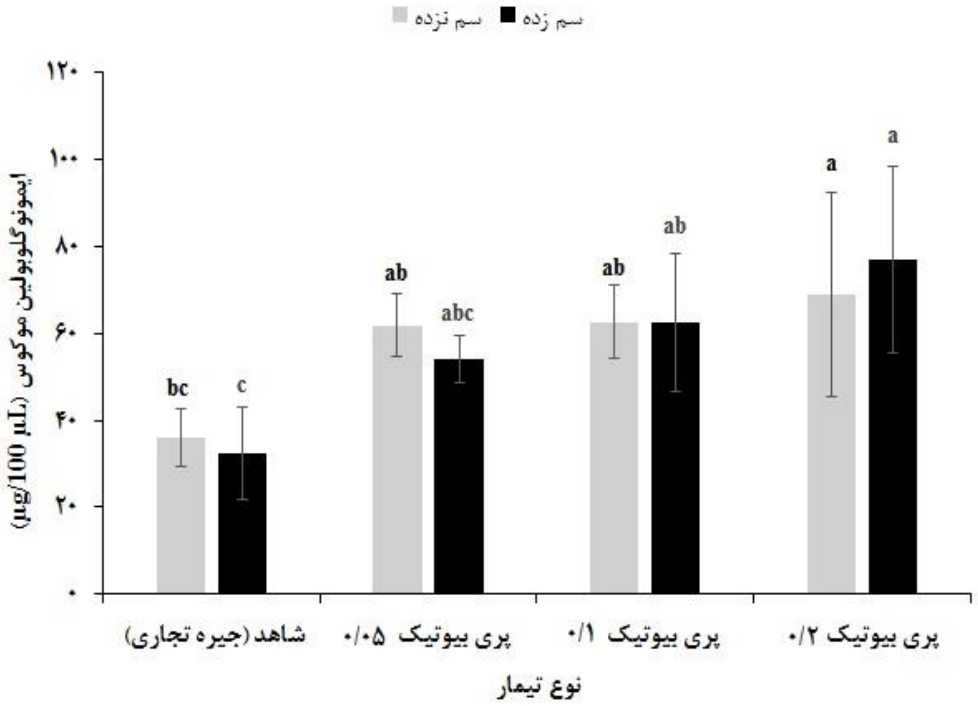
تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نشان داد که در مجموع، تیمارهای آزمایشی بر پروتئین محلول موکوس تأثیر معنی‌داری داشت (p<۰/۰۵). به این صورت که میزان آن در تیمارهای تغذیه شده با پری‌بیوتیک و با افزایش غلظت آن، به‌طور معنی‌دار افزایش یافت. همچنین، در تیمارهای در معرض سم کلرپیریفوس و در تیمارهای ترکیب سم و پری‌بیوتیک افزایش معنی‌داری نشان داد (p<۰/۰۵).



شکل ۳ میزان پروتئین محلول بچه ماهی تیلاپیای نیل در تیمارهای تغذیه شده با سطوح مختلف پری‌بیوتیک با تیمارهای سم زده (کلرپیریفوس). حروف متفاوت نشانگر اختلاف معنی‌دار در سطوح بین تیمارهای آزمایشی است (p<۰/۰۵).

میزان ایمونوگلوبولین در بچه ماهی تیلاپیا

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نشان داد که در مجموع، تیمارهای آزمایشی بر ایمـونوگلوبولین موکـوس تأثیر معنی‌دار داشت (p<۰/۰۵). به این صورت که میزان آن در تیمارهای تغذیه شده با پری‌بیوتیک و با افزایش غلظت آن، به‌طور کلی روند افزایشی نداشت، ولی نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌داری داشت. همچنین، در تیمارهای در معرض سم کلرپیریفوس و در تیمارهـای ترکیب سم و پری‌بیوتیک افزایش معنی‌داری نشان داد (p<۰/۰۵).



شکل ۴: میزان ایمونوگلوبولین موکوس بچه‌ماهی تیلاپیای نیل در تیمارهای تغذیه شده با سطوح مختلف پری‌بیوتیک با تیمارهای سم‌زده (کلرپیریفوس). حروف متفاوت نشانگر اختلاف معنی‌دار در سطوح بین تیمارهای آزمایشی است (p<۰/۰۵).

بحث

آنزیم فسفاتاز قلیایی یکی از اجزای مهم موکوس پوست ماهی است که به دلیل فعالیت تجزیه کنندگی (هیدرولیتیک)، عاملی ضد باکتریایی به شمار می‌آید. این آنزیم نقش حفاظتی در برابر عفونت‌های انگلی و بهبود زخم دارد و همچنین، باعث مقاومت ماهی در برابر عوامل بیماری‌زا مختلف می‌شود (Iger and Abraham, 1990). میزان آنزیم فسفاتاز قلیایی موکوس در تیمارهای تغذیه شده با پری‌بیوتیک افزایش یافته و با افزایش غلظت پری‌بیوتیک، نسبت به گروه شاهد میزان این آنزیم به طور معنی‌دار افزایش داشت، ولی در تیمارهای تغذیه شده با پری‌بیوتیک که در معرض سم کلرپیریفوس قرار داشتند، میزان آنزیم این آنزیم روند کاهشی داشته است.

لیزوزیم آنزیمی ضد باکتریایی در دستگاه ایمنی غیر اختصاصی است که به‌صورت مستقیم دیواره باکتری‌ها را تخریب می‌کند. این آنزیم اهمیت زیادی در ایمنی ذاتی موکوس پوست دارد و میزان آن در شرایط مختلف محیطی مثل دما، شوری، غذا، استرس و غیره تفاوت می‌کند (Sabramanian et al. 2007). اندازه‌گیری آنزیم لیزوزیم در تیمارهای تغذیه شده با پری‌بیوتیک و تیمارهای مواجه شده با سم کلرپیریفوس نشان می‌دهد که این آنزیم روند افزایشی داشته و سبب افزایش ایمنی ماهی می‌شود. افزایش لیزوزیم در پژوهش‌های دیگر از جمله استفاده از قارچ *Phellinus linteus* در جیره غذایی ماهی *Epinephelus bruneus* (Harikishnin et al. 2011)، گالاکتوالیگوساکارید در جیره غذایی ماهی قرمز (Kolangi Miandare et al. 2016) و افزایش لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در ماهی تایگر باب (روستا و همکاران، ۱۳۹۲) مشاهده شده است.

پروتئین محلول کل یکی از شاخص‌های ایمنی با باندهای کربوهیدراتی است که به همراه فاکتورهای مختلف موکوس، در هنگام حمله عوامل آسیب‌زا نقش آگلوتینه کردن آنها را برعهده دارند و باعث محافظت در برابر عفونت‌های ناشی از انگل‌ها می‌شوند (Suzuki et al. 2003). سطوح پروتئین محلول موکوس در تیمارهای تغذیه شده با پری‌بیوتیک و توأمان تغذیه با پری‌بیوتیک و مواجهه با سم کلرپیریفوس روند افزایشی داشت. بر اساس گزارش ارائه شده توسط Roosta و همکاران (۲۰۱۴)، استفاده از ویتامین C در جیره غذایی بچه‌ماهی کولمه باعث افزایش سطح پروتئین کل و فسفاتاز قلیایی موکوس شده است. همچنین، این افزایش در بچه ماهی سفید که با پری‌بیوتیک گزیلوالیگوساکارید تغذیه شده، مشاهده شده است (Hoseinifar et al. 2014).

ایمونوگلوبولین پروتئینی است که در ایمنی اختصاصی نقش دارد. این پروتئین توسط لنفوسیت‌های B که بیشترین توانایی تولید ایمونوگلوبولین را دارند ترشح، و سبب افزایش ظرفیت دستگاه ایمنی می‌شوند. میزان این آنزیم در تیمارهای تغذیه شده با پری‌بیوتیک (پودر قارچ) و همچنین، تیمارهایی که با پری‌بیوتیک (پودر قارچ) تغذیه شده و با سم کلرپیریفوس مواجه شدند، نشان داد که این پروتئین روند افزایشی داشت. در گزارش مشابه، عصاره قارچ صدفی (*Pleurotuso streatus*) در جیره ماهی قزل‌آلا باعث افزایش میزان ایمونوگلوبولین در موکوس ماهی شده است (Ulukoy et al. 2016). Rufchaei و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کرده‌اند که استفاده از عصاره گاماروس و کرم خاکی به عنوان جاذب، باعث افزایش ایمونوگلوبولین کل سرم ماهی کولمه شده است. همچنین، Jiao و همکاران (۲۰۱۹) گزارش کرده‌اند که سم کلرپیریفوس تأثیر معنی‌داری روی ایمنی ماهی کپور داشته و میزان ایمونوگلوبولین در برابر این سم کاهش یافته است.

نتیجه نهایی این مطالعه نشان می‌دهد که افزودن پری-بیوتیک (پودر قارچ) به جیره غذایی سبب تقویت شاخص-های ایمنی (آنزیم فسفاتاز قلیایی، لیزوزیم، ایمونوگلوبولین و پروتئین محلول) موکوس پوست ماهی تیلاپیای نیل در مواجهه با سم کلرپیریفوس می‌شود. پژوهش حاضر نشان می‌دهد که افزودن پری‌بیوتیک به جیره غذایی تأثیر معنی-داری دارد و سبب تقویت دستگاه ایمنی در مواجهه با آلاینده‌ها و مواد تنش‌زا می‌شود.

منابع

اکرمی، ا.، قلیچی، ا.، ابراهیمی، ع. ۱۳۸۷. تاثیر سطوح مختلف پری بیوتیک بازدارنده بر رشد و بقای قزل آلای رنگین کمان. اولین کنفرانس ملی علوم شیلات و آبزیان ایران، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ۱۲-۱۰.

روستا، ز.، حاجی مرادلو، ع.، حسینی فر، س.ح.، وکیلی، ف. ۱۳۹۲. اثرات سطوح مختلف پروبیوتیک *Lactobacillus acidophilus* بر فعالیت ضدباکتریایی و برخی شاخص‌های ایمنی موکوسی ماهی تایگر بارب (*Puntius tetrazona*). بوم شناسی آبزیان ۳: ۲۰-۱۳.

Burkepile, D.E., Moore, M.T., Holland, M.M. 2000. The susceptibility of five nontarget organisms to aqueous diazinon exposure. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 64: 114-121.

Castano, A., Bols, N.C., Braunbeck, T., Dierick, P., Halder, M., Isomaa, B., Kawahara, K., Lee, L.E.J., Mthersill, C., Part, P., Repetto, G., Sintes, J.R., Rufli, H., Smith, R., Eisler, R. 1986. Diazinon hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. U.S. Fish and Wildlife Service, U.S., 85: 1-38.

Farrell, A., Branner, C. 2014. Organic chemical Toxicology of Fishes Academic Press. Santiago, USA, 543 p.

Gibson, G.R., Roberfroid, M.B. 1995. Modulation of the colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. Journal of Nutrition 125: 1401-1412.

Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Heo, M.S. 2011. Diet enriched with mushroom *Phellinus linteus* extract enhances the growth, innate immune response, and disease resistance of kelp grouper, *Epinephelus bruneus* against vibriosis. Fish and Shellfish Immunology 30: 128-134.

Hoffman, U., Papendrof, T. 2006. Organophosphate poisonings with

parathion and diamethoate. Intensive Care Medicine 32: 464-468.

Hoseinifar, S.H., Sharifian, M., Vesaghi, M.J., Khalili Esteban, M.A. 2014. The effects of dietary xylooligosaccharide on mucosal parameters, intestinal microbiota and morphology and growth performance of Caspian white fish (*Rutilus frisii kutum*) fry. Fish and Shellfish Immunology 39: 231-236.

Jiao, W., Han, Q., Xu, Y., Jiang, H., Xing, H., Teng, X. 2019. Impaired immune function and structural integrity in the gills of common carp (*Cyprinus carpio* L.) caused by chlorpyrifos exposure: through oxidative stress and apoptosis. Fish and Shellfish Immunology 86: 239-245.

Iger, Y., Abraham, M. 1990. The process of skin healing in experimentally wounded carp. Journal of Fish Biology 36: 421-437.

Kolangi Miandare, H., Farvardin, Sh., Shabani, A., Hoseinifar, S.H., Ramezanpour, S. 2016. The effects of galacto-oligosacharide on systemic and mucosal immune response, growth performance and appetite related gene transcript in goldfish (*Carassius auratus gibelio*). Fish and Shellfish Immunology 55: 479-483.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry 193: 265-275.

Palaksha K., Shin G.W., Kim Y.R., Jung T.S., 2008. Evaluation of non-specific immune components from the skin mucus of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Fish and Shellfish Immunology 24: 479-488.

Roosta, Z., Hajimoradloo, A., Ghorbani, R., Hoseinifar, S.H. 2014. The effects of dietary vitamin C on mucosal immune responses and growth performance in Caspian roach (*Rutilus rutilus caspicus*) fry. Fish Physiology and Biochemistry 40: 1601-1607.

Rufchaei, R., Hoseinifar, S.H., Mirzajani, A., Van Doan, H. 2017. Dietary administration of *Pontogammarus maeoticus* extract affects immune responses, stress resistance, feed intake and growth performance of Caspian roach (*Rutilus caspicus*) fingerlings. Fish and Shellfish Immunology 63: 196-200.

Saurabh S., Sahoo P. 2008. Lysozyme: An important defense molecule of fish innate immune system. Aquaculture Research 39: 223-239.

Scott, P., Conrad, J., Edsjö, J., Bergström, L., Farnier, C., Akrami, Y. 2010. Direct constraints on minimal supersymmetry from Fermi-LAT observations of the dwarf galaxy Segue 1. Journal of Cosmology and Astroparticle Physics 1: 31-47.

Smith, D.R., Padilla, W.J., Vier, D., Nemat-Nasser, S.C., Schultz, S. 2000. Composite medium with simultaneously negative permeability and permittivity. Physical Review Letters 84: 41-84.

Subramanian, S., MacKinnon, S.L., Ross, N.W. 2007. A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. Comparative Biochemistry and Physiology 148B: 256-263.

Suzuki, Y., Tasumi, S., Tsutsui, S., Okamoto, M., Suetake, H. 2003. Molecular diversity of skin mucus lectins in fish. Comparative Biochemistry and Physiology 136B: 723-730

Ulukoy, G., Baba, E., Ontas, C. 2016. Effect of oyster mushroom, *Pleurotuso streatus*, Extract on hemato-immunological parameters of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Journal of the World Aquaculture Society 47: 676-684.

Uzun, F.G., Demir, F., Kalender, S., Bas, H., Kalender, Y. 2010. Protective effect of catechin and quercetin on chlorpyrifos-induced lung toxicity in male rats. Food and Chemical Toxicology 48: 1714-1720.

Wasser, S.P. 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immuno-

modulating polysaccharides. Applied Microbiology and Biotechnology 60: 258-274.

Zahran, E., Risha, E., Awadin, W., Palić, D. 2018. Acute exposure to chlorpyrifos induces reversible changes in health parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquatic Toxicology 197: 47-59.

Effects of different mushroom levels on immunity indices of tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to chlorpyrifos in experimental condition

Atefeh Iri[1], Aliakbar Hedayati[1*], Hamed Paknejad[1], Tahere Bagheri[2], Seyed Reza Khaleghi[1]

1- Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Golestan, Iran

2- Offshore Water Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Chabahar, Sistan and Baluchistan, Iran

Received 14 April 2019; accepted 07 August 2019

Abstract

The aim of this study was to investigate the prebiotic effect of mushroom on the immune indices of tilapia mucus exposed to chlorpyrifos on 120 juveniles tilapia with an average weight of 20 g. So, 4 treatments were considered as (1) control without prebiotics, (2) treatments containing 0.05%, (3) 0.1% and (4) 0.2% of dietary prebiotics. At the end of the feeding period, fish were exposed to chlorpyrifos toxin at a concentration of 0.05 ppm for 14 days and mucus sampling was taken from the fish skin. Experimental treatments exhibited significant effects on alkaline phosphatase, lysozyme, soluble protein, and mucus immunoglobulin ($p<0.05$). So that, the amounts of alkaline phosphatase, lysozyme and mucus soluble protein were significantly increased in treatments fed with prebiotic-supplemented diets by increasing in prebiotic concentration (40.40 IU/L, 36 Unit/mg Pro and 99.54 µg/100 µL, respectively). However, the amount of mucosal immunoglobulin decreased in these treatments (69 µg/100 µL). Overall, supplementing diets with prebiotic (mushroom powder), leads to enhanced immune system (elevating alkaline phosphatase, lysozyme, immunoglobulin, and soluble protein) when exposed pollutants and stressors.

Keywords: Biosafety, Prebiotics, Chlorpyrifos poison, Tilapia

*Corresponding author: Hedayati@gau.ac.ir