View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Aquatic Commons

[DOI: 10.22092/ISFJ.2018.117049]
Downloaded from isfj.ir at 14:12 +0330 on Friday October 5th 2018

ارزیابی مکمل های غذایی باکتری *Pediococcus acidilactici* و قارچ خوراکی *Agaricus bisporus* بر شاخص‌های ایمنی موکوس پوست ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در مواجهه با نانو ذرات نقره

سیدرضا خالقی[۱]، سید علی اکبر هدایتی*[۱]، حدیثه کشیری[۱]، حامد پاک‌نژاد[۲]، سید حسین حسینی‌فر[۲]

*hedayati@gau.ac.ir

۱- گروه تولید و بهره برداری آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
۲- گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۷

چکیده

هدف از پژوهش حاضر بررسی تأثیر مکمل‌های غذایی باکتری *Pediococcus acidilactici* و پودر قارچ خوراکی *Agaricus bisporus* به‌صورت مجزا و ترکیبی (مکمل ترکیبی) بر شاخص‌های ایمنی موکوس پوست ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در مواجهه با نانو ذرات نقره بود. در این بررسی از ۱۸۰ عدد ماهی با میانگین وزن ۰/۴± ۲۹/۶ گرم به چهار تیمار باکتری (۱ گرم باکتری در کیلوگرم غذا)، پودر قارچ (۱۰ گرم در کیلوگرم غذا)، مکمل ترکیبی حاوی باکتری و پودر قارچ خوراکی (۱ گرم باکتری و ۱۰ گرم قارچ در کیلوگرم غذا) و شاهد (تغذیه بدون مکمل غذایی) و هر تیمار با ۳ تکرار (۱۵ عدد ماهی در هر تکرار) تقسیم و به مدت ۶۰ روز تغذیه گردیدند. پس از پایان دوره تغذیه، ماهیان به مدت ۱۴ روز در معرض غلظت تحت کشنده نانو ذرات نقره (۱ میلی‌گرم در لیتر) قرار گرفتند. نمونه‌برداری از موکوس پوست جهت سنجش پارامترهای مرتبط با ایمنی در روزهای ۱، ۷ و ۱۴ رویارویی با نانو ذرات نقره، هر بار با ۵ عدد ماهی از هر تیمار صورت پذیرفت. نتایج نشان داد فعالیت آنزیم‌های لیزوزیم و فسفاتاز قلیایی و میزان پروتئین محلول و ایمنوگلوبولین کل در تیمارهای حاوی مکمل‌های غذایی نسبت به تیمار شاهد در روزهای مختلف در مواجهه با نانو ذرات نقره قرار داشتند، افزایش معنادار داشتند ($p<۰/۰۵$) و در روز ۱۴ بیشترین مقدار را داشتند. همچنین با وجود آنکه پارامترهای سنجیده شده طی ۱۴ روز در تیمار شاهد روند افزایشی داشت، ولی نسبت به تیمارهای آزمایشی کمتر بود. تیمارهای آزمایشی ترکیبی، باکتری و پودر قارچ خوراکی به ترتیب بیشترین تأثیر را بر شاخص‌های ایمنی موکوس پوست ماهیان کپور معمولی که در معرض نانو ذرات نقره قرار گرفته بودند، نشان دادند.

لغات کلیدی: سیستم ایمنی، مکمل‌های غذایی، لیزوزیم، فسفاتاز قلیایی، پروتئین محلول، ایمونوگلوبولین

*نویسنده مسئول

[DOI: 10.22092/ISFJ.2018.117049]
Downloaded from isfj.ir at 14:12 +0330 on Friday October 5th 2018

مقدمه

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 شسته شده در ۵۰۰ mL آب لوله‌کشی، موجب رهایش ۲۷ µg نانو ذرات نقره می‌گردد (Benn *et al*., 2010). در حال حاضر بسیار مشکل است که بتوان میزان تولید، آزاد شدن و ضرایب جریان ورود نانو ذرات نقره را به دلیل عدم وجود آمار کاملی از محصولات حاوی نانو مواد و عدم کنترل و اطلاعات اندک در زمینه حمل و نقل، به محیط زیست را تخمین زد. پژوهش‌ها نشان داده است که اگر استفاده از نانوفناوری‌های 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 (ضیائی، ۱۳۹۲).

پوست ماهی به عنوان نخستین سد دفاعی بدن در برابر انواع تنش‌های شیمیایی، فیزیکی و زیستی مطرح است. موکوس اپیدرم در ماهیان شامل عوامل فعال زیستی متنوعی مثل لیزوزیم، آنزیم‌های پروتئولیتیک، فلاووآنزیم‌ها، ایمونوگلوبین‌ها و پپتیدهای ضد میکروبی می‌باشد. ترشحات موکوسی نه‌تنها با به دام انداختن غلظت بالای ترکیبات سمی مانع ورود آن‌ها به بدن ماهی می‌گردند، بلکه پروتئین‌های ایمنی ذاتی مانند لیزوزیم و ایمونوگلوبین M از طریق موکوس با عوامل بیماری‌زا مقابله می‌نمایند. همچنین تجمع فلزات در موکوس ماهیان گزارش شده است و قرارگیری در معرض فلزات، تولید موکوس در پوست و آبشش را افزایش می‌دهد (Magnadottir, 2006).

افزایش تحریک پاسخ‌های ایمنی به‌وسیله مکمل‌های غذایی مانند باکتری، قارچ خوراکی و تیمار ترکیبی می‌تواند از اهمیت بالایی در منابع آبی برخوردار باشد. این مکمل‌های غذایی می‌توانند به‌طور مستقیم سازوکارهای دفاعی اولیه را از طریق اثر بر گیرنده‌ها و ژن‌های مسئول فعال سازند. باکتری *Pediococcus acidilactici* به عنوان یک میکروارگانیسم زنده می‌تواند سبب بهبود وضعیت سلامت میزبان شود و با تحریک سیستم ایمنی میزبان مانع از تکثیر باکتری‌های بیماری‌زا در لوله گوارش شود (Bricknell and Dalmo, 2005). Perera (۲۰۰۷) اثرات باکتری *P. acidilactici* را بر مقاومت ماهی قرمز در برابر تنش و نیز انگل بیماری‌زای *Ichthyophthirius multifiliis* بررسی نمودند. نتایج این پژوهش نشان داد که به‌طور معنی‌داری مقاومت ماهیان افزایش یافته و تلفات کاهش یافته است. جعفری و همکاران (۱۳۹۷) تأثیر پیش‌تیمار الیگوساکارید رافینوز و باکتری *Pediococcus acidilactici* را بر برخی از شاخص‌های خونی ماهی کاراس (*Carassius auratus*) در مواجهه با نانونقره بررسی کردند. نتایج به دست آمده نشان داد مکمل غذایی باکتری بیشترین تأثیر را روی شاخص هموگلوبین داشته و به میزان مساوی با سایر مکمل‌های غذایی در شاخص مونوسیت خون مؤثر بوده است.

تمام پژوهش‌هایی که روی قارچ‌ها صورت گرفته است آنها را به علت دارا بودن شمار زیادی از ترکیبات فعال زیستی به عنوان 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, 2002). Chang و همکاران (۲۰۱۳) مخلوط بتاگلوکان دو قارچ *Ganoderma lucidum* و *Coriolus versicolor* را در جیره ماهی هامور (*Epinephelus coioides*) استفاده کردند و تأثیرات آن را بر سیستم ایمنی ذاتی مورد بررسی قرار دادند. در پایان دوره تیمارهای تغذیه شده با بتاگلوکان نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری در فعالیت لیزوزیم، فعالیت سیستم کمپلمان و فعالیت فاگوسیتوز را نشان دادند.

تیمارهای ترکیبی مخلوطی از باکتری‌ها و قارچ‌های خوراکی هستند که اثرات مفیدی بر میزبان از طریق بهبود قدرت حیات و تحریک رشد و متابولیسم یک یا چند باکتری می‌گذارند. این ترکیب دارای یک اثر هم‌افزایی در

[DOI: 10.22092/ISFJ.2018.117049]
Downloaded from isfj.ir at 14:12 +0330 on Friday October 5th 2018

بالا بردن کارایی دستگاه گوارش می‌باشد (حسینی‌فر، ۱۳۹۱). Soleimani و همکاران (۲۰۱۲) مطالعه‌ای در زمینه‌ی اثر پربیوتیک فروکتوالیگوساکارید بر عملکرد رشد، ایمنی غیراختصاصی، مقاومت در برابر استرس و فعالیت آنزیم‌های گوارشی در بچه ماهی کلمه (*Rutilus rutilus*) انجام دادند. نتایج نشان داد پاسخ ایمنی (Lys, Ig, ACH50) در سطح ۱٪ نسبت به دو سطح دیگر بالاتر بود. کلیه سطوح پربیوتیک استفاده شده سبب افزایش مقاومت در برابر استرس شوری گردید.

زمانی که ماهی در معرض نانو ذرات نقره قرار می‌گیرد، یون نقره به آبشش متصل شده و از طریق مهار آنزیم ATPase موجب اختلال در جذب یون سدیم و یون 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. همچنین تحقیقات نشان داده است که نانو ذرات نقره پتانسیل تأثیر بر فلور میکروبی دستگاه گوارش را داشته و اندازه جمعیت نوعی از باکتری‌های این دستگاه را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Garcia-Reyero *et al*., 2015).

در این راستا Griffitt و همکاران (۲۰۰۸) در بررسی اثر نانو ذرات نیکل، کروم، نقره، مس و آلومینیوم بر ماهی گورخری نشان دادند که مقادیر بیش از ۶۰ µg/L از نانو ذرات یاد شده می‌تواند بر ماهیان گورخری اثر کشنده داشته باشد. درصورتی‌که نانو ذرات طلا فاقد سمیت برای این ماهیان بودند. بنابراین وجود آلاینده‌هایی همچون نانو ذرات نقره در اکوسیستم‌های آبی موجب تنش در ماهیان شده و می‌تواند سیستم ایمنی ماهیان را تضعیف نماید.

کیفیت نامناسب آب و وجود آلاینده‌هایی همچون نانو ذرات نقره در آن می‌تواند باعث ایجاد استرس در ماهیان شده و با کاهش عملکرد ایمنی ماهیان سبب به خطر افتادن سلامتی آنها شود. با توجه به اینکه تاکنون پژوهشی در زمینه ایجاد مقاومت در برابر سمیت نانو ذرات نقره بر سیستم ایمنی ماهی کپور معمولی با استفاده از مکمل‌های غذایی صورت نگرفته است، این پژوهش با هدف بررسی تأثیر استفاده از باکتری *Pediococcus acidilactici* و پودر قارچ خوراکی*Agaricus bisporus* به صورت مجزا و مکمل ترکیبی بر روی شاخص‌های سیستم ایمنی موکوس پوست ماهی کپور معمولی و در نهایت امکان کاهش سمیت نانو ذرات نقره در بچه ماهیان کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) صورت پذیرفت.

مواد و روش کار

تهیه و نگهداری ماهیان

در این پژوهش ۱۸۰ عدد ماهی کپور معمولی با میانگین وزن (±SD) ۰/۴ ±۲۹/۶ گرم از یک کارگاه خصوصی واقع در استان گیلان تأمین گردید. ماهیان پس از یک هفته دوره سازگاری به تعداد ۱۵ عدد در ۱۲ حوضچه فیبرگلاس با حجم ۱۰۰ لیتر آب نگهداری شدند. ماهیان روزانه سه بار به میزان ۳ درصد وزن بدن با غذاهای تجاری (جدول ۱) حاوی مکمل‌های غذایی تغذیه گردیدند (جافرنوده، ۱۳۹۵). در طی دوره آزمایش نگهداری ماهیان در حوضچه‌های حاوی آب با میانگین دمای (±SD) ۲۳±۲ درجه سانتی‌گراد و اکسیژن محلول ۶/۸±۰/۴ و pH ۷/۸±۰/۳ صورت گرفت.

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

Table 1: Percentage of ingredients in the commercial diet (Faradaneh Company) used for common carp feed

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

غذادهی ماهیان با مکمل‌های غذایی

پروبیوتیک مورد استفاده در این پژوهش *Pediococous acidilactici*، از خانواده لاکتوباسیلوس‌ها بود که تحت نام تجاری باکتوسل ساخت کشور فرانسه و به‌صورت لیوفیلیزه تأمین گردید. غلظت باکتری $۰/۹\times۱۰^{۷}$ CFU/g بود (Castex *et al*., 2010). همچنین از قارچ دکمه‌ای (*Agaricus bisporus*) به عنوان پربیوتیک استفاده شد.

[DOI: 10.22092/ISFJ.2018.117049]
Downloaded from isfj.ir at 14:12 +0330 on Friday October 5th 2018

قارچ‌های خریداری شده پس از خرد شدن، به علت میزان بالای آب موجود در آن به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. سپس ۴۸ ساعت در آون ۴۵ درجه سانتی‌گراد خشک گردید. نهایتاً قارچ‌های خشک آسیاب شده و پودر قارچ برای تهیه جیره آماده گردید (Şevik *et al.*, 2013).

آزمایش در قالب ۴ تیمار شامل تیمار شاهد تغذیه شده فقط با غذای تجاری و دیگر تیمارها با غذای تجاری مکمل شده به باکتری *P. acidilactici* (۱ گرم باکتری در کیلوگرم غذا) و پودر قارچ خوراکی *A. bisporus* (۱۰ گرم قارچ در کیلوگرم غذا) و تیمار چهارم *A. bisporus+P. acidilactici* (۱ گرم باکتری در کیلوگرم غذا و ۱۰ گرم قارچ در کیلوگرم غذا) انجام گرفت. بدین منظور ابتدا مکمل‌ها وزن و سپس در محلول ژلاتین ۴ درصد حل گردید و به غذای تجاری اسپری شد (جافرنوده، ۱۳۹۵).

رویارویی با نانو ذرات نقره: بعد از پایان دوره ۸ هفته‌ای غذادهی با غذای مکمل شده با باکتری *P. acidilactici* و پودر قارچ خوراکی *A. bisporus*، رویارویی ماهیان با غلظت تحت کشنده (۱ میلی‌گرم در لیتر) نانو ذرات نقره آغاز شد. طی این دوره ۱۴ روزه از کلوئید نانو ذرات نقره (شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان، مشهد) استفاده گردید. نانو ذرات نقره به شکل محلول کلوئیدی ۴۰۰۰ppm و دارای میانگین اندازه ۲۰ نانومتر بودند. آزمایش LC_{50} طی ۹۶ ساعت برگرفته از هدایتی و همکاران (۱۳۹۲) محاسبه شد. پس از محاسبه LC_{50}، آزمایش سمیت تحت کشنده انجام گردید. مجموعاً ۱۲ حوضچه شامل ۴ تیمار و ۳ تکرار به مدت ۱۴ روز در رویارویی با غلظت نیمه‌کشنده (LC_{50}) نانو ذرات نقره قرار گرفتند.

تعیین LC_{50} ۹۶ ساعته نانو ذرات نقره: با بررسی غلظت‌های گسترده، مقادیر نزدیک به LC_{50} انتخاب گردید. برای انجام آزمایش LC_{50} نانو ذرات نقره، ماهیان کپور در ۶ تیمار با سه تکرار (یک گروه به عنوان شاهد و در هر تیمار ۶ ماهی) به‌صورت تصادفی در تانک‌های ۱۰۰ لیتری در غلظت‌های ۰، ۰/۰۱، ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم بر لیتر قرار گرفتند. با شروع آزمایش کشندگی حاد، هیچ‌گونه تعویض آبی در مخازن آزمایش صورت نگرفت و غلظت آلاینده‌ها هم تجدید نشد (هدایتی و همکاران،۱۳۹۲). زمان انجام آزمایش غلظت کشندگی، ۹۶ ساعت بود و میزان مرگ‌ومیر در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲، و ۹۶ ساعت محاسبه شد. پس از محاسبه LC_{50} که ۲ میلی‌گرم بر لیتر بود، آزمایش سمیت تحت کشنده انجام شد. با توجه به این‌که، آزمایش تحت حاد در دوره ۲۸-۷ روزه صورت می‌گیرد (Di Giulio and Hinton, 2008)، این آزمایش در ۱۴ روز و با انتخاب ۵۰ درصد از غلظت سمیت کشنده (۱ میلی‌گرم بر لیتر) استفاده شد و تمام تیمارهای آزمایشی طی این ۱۴ روز، در رویارویی با نانو ذرات نقره قرار گرفتند.

جمع‌آوری موکوس پوست

موکوس پوست ماهیان بر اساس Subramanian و همکاران (۲۰۰۷) جمع‌آوری شد. بعد از بیهوشی با پودر گل میخک (۵ میلی‌گرم در لیتر) از هر تانک ۵ قطعه ماهی به‌صورت جداگانه درون کیسه‌های پلی‌اتیلنی حاوی ۱۰ میلی‌لیتر کلرید سدیم ۵۰ میلی مولار قرار گرفته و پس از ۲ دقیقه ماهیان از کیسه خارج و به تشتی با اکسیژن‌دهی مناسب منتقل شدند. مخلوط موکوس و کلرید سدیم جمع‌آوری شده را درون لوله‌های فالکون ۱۵ میلی‌لیتر ریخته و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰×g سانتریفیوژ شد و سوپرناتانت جدا شده (موکوس) در میکروتیوپ‌های ۱/۵ mL ریخته و جهت بررسی‌های بیشتر در فریزر منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

سنجش فعالیت آنزیم لیزوزیم

اندازه‌گیری لیزوزیم موکوس پوست به روش کدورت‌سنجی و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Biochrom Libra S12 انجام شد. برای سنجش این آنزیم از باکتری *Micrococcus luteus* به عنوان سوبسترا استفاده گردید. برای تهیه این سوسپانسیون، باکتری لیوفلیزه شده میکروکوکوس لوتئوس را در بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۴ مولار حل نموده و جذب این محلول در مقابل شاهد

[DOI: 10.22092/ISFJ.2018.117049]
Downloaded from isfj.ir at 14:12 +0330 on Friday October 5th 2018

(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 گردید. که درواقع یک واحد فعالیت آنزیم، به‌صورت مقدار آنزیمی که در طول موج ۴۵۰ نانومتر و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد کاهشی معادل ۰/۰۰۱ در دقیقه در جذب سلول‌های میکروکوکوس لوتئوس ایجاد می‌کند، بیان می‌شود (Subramanian *et al*., 2007).

سنجش فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی

برای تعیین سطح فعالیت این آنزیم از کیت مخصوص سنجش فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی (شرکت پارس آزمون) و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۰۵ نانومتر استفاده شد.

سنجش پروتئین محلول

برای این منظور از روش Lowry و همکاران (۱۹۵۱) و منحنی استاندارد آلبومین سرم گاوی استفاده گردید. اندازه‌گیری با اضافه نمودن معرف رنگی فولین فنول سیوکالتیو[1] به ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های رقیق‌شده موکوس و استاندارد و قرائت نوری با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر انجام گرفت. با انتقال جذب نوری بدست آمده به منحنی استاندارد، میزان پروتئین محلول بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محاسبه گردید.

سنجش ایمونوگلوبولین کل

جهت اندازه‌گیری این پارامتر، از روش Siwicki و Anderson(۱۹۹۳) استفاده شد. ابتدا میزان پروتئین موکوس تعیین شده و سپس به نمونه موکوس پلی‌اتیلن گلیکول ۱۲ درصد اضافه می‌شود. پس از ۲ ساعت انکوباسیون در دمای اتاق و تاریکی، نمونه‌ها سانتریفیوژ شده (۵۰۰۰rpm به‌مدت ۵ دقیقه) و غلظت پروتئین در قسمت بالایی محلول بار دیگر توسط روش Lowry و همکاران (۱۹۵۱) اندازه‌گیری شد. درواقع پلی‌اتیلن گلیکول باعث رسوب ایمونوگلوبولین موجود در پروتئین می‌شود و میزان ایمونوگلوبولین کل از محاسبه اختلاف غلظت پروتئین در نمونه اولیه (پروتئین محلول) و غلظت پروتئین پس از افزودن پلی‌اتیلن گلیکول محاسبه شد (Siwicki and Anderson, 1993).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

این آزمایش بر مبنای طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار (شاهد و تغذیه شده با باکتری، قارچ خوراکی و مکمل ترکیبی) در ۳ تکرار صورت پذیرفت. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه نرم‌افزار SPSS 22 استفاده شد و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان ۵ درصد انجام گرفت. نمودارها در اکسل ۲۰۱۳ رسم شدند.

نتایج

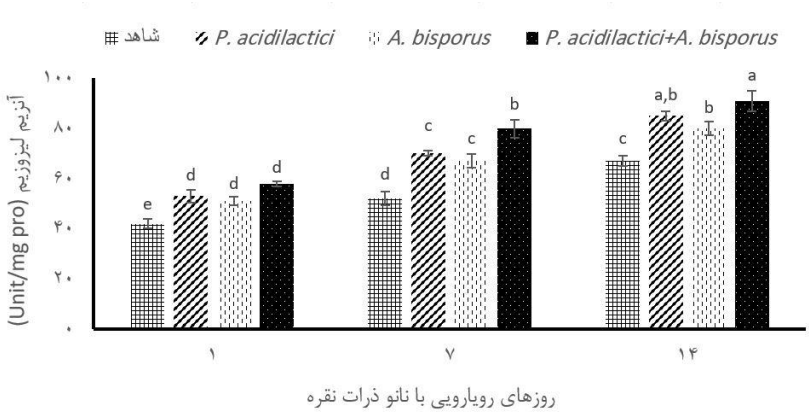
در این بخش نتایج بدست آمده از سنجش فعالیت آنزیم‌های لیزوزیم و فسفاتاز قلیایی، پروتئین محلول و ایمنوگلوبولین کل تیمارهای تغذیه شده با مکمل‌های غذایی باکتری (*P. acidilactici*)، قارچ خوراکی (*A. bisporus*) و مکمل ترکیبی (*P. acidilactici*+*A. bisporus*)، طی روزهای ۱، ۷ و ۱۴ رویارویی با غلظت تحت کشنده نانو ذرات نقره آورده شده است.

فعالیت آنزیم لیزوزیم

نتایج سنجش فعالیت آنزیم لیزوزیم موکوس پوست، افزایش معنادار این آنزیم را در تیمارهای تغذیه شده با مکمل‌های غذایی در مقایسه با تیمار شاهد پس از رویارویی با نانو ذرات نقره طی روزهای ۱، ۷ و ۱۴ نشان داد (شکل ۱). در روز ۱ رویارویی با نانو ذرات نقره سطح آنزیم لیزوزیم در تیمارهای حاوی مکمل‌های غذایی افزایش معناداری در مقایسه با تیمار شاهد داشت ($p<۰/۰۵$). در روز ۷ رویارویی با نانو ذرات نقره تیمار ترکیبی افزایش معناداری را با تیمارهای باکتری، قارچ و نیز شاهد داشت ($p<۰/۰۵$).

[1] Folin-Ciocalteu's phenol reagent

[DOI: 10.22092/ISFJ.2018.117049]
Downloaded from isfj.ir at 14:12 +0330 on Friday October 5th 2018



شکل ۱: مقایسه میانگین فعالیت لیزوزیم موکوس در تیمارهای تغذیه شده با مکمل‌های غذایی طی روزهای ۱، ۷ و ۱۴ رویارویی با نانو ذرات نقره. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌داری بین تیمارها می‌باشند (p<۰/۰۵).

Figure 1: Comparison of the average activity of mucosal lysozyme in treatments fed with dietary supplements during 1, 7 and 14 days of exposure to silver nanoparticles. The Different letters correspond to the significant difference between treatments (p<0/05).

در روز ۱۴ نیز افزایش معنادار فعالیت لیزوزیم موکوس نسبت به تیمار شاهد ادامه داشت (p<۰/۰۵). همچنین تیمارهای حاوی مکمل ترکیبی (باکتری و پودر قارچ) و باکتری در روز ۱۴ تفاوت معناداری در سطح ۵ درصد نداشتند.

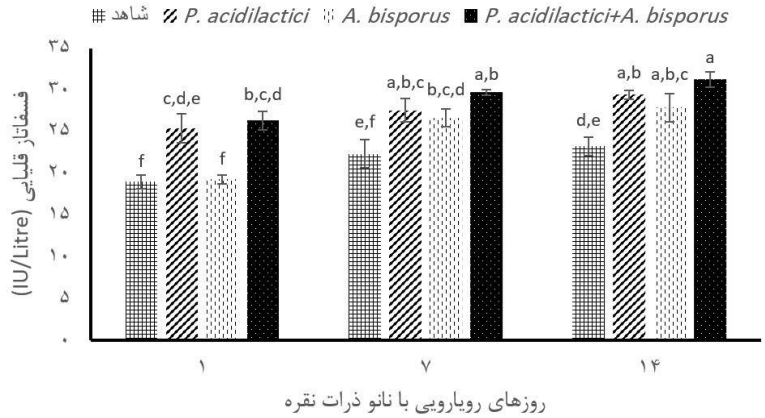
فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی

نتایج سنجش آنزیم فسفاتاز قلیایی موکوس پوست در شکل ۲ نشان داده شده است. روند افزایشی این آنزیم طی روزهای ۱، ۷ و ۱۴ رویارویی با نانو ذرات نقره در تمامی تیمارها قابل مشاهده بود. نتایج حاصل از آنالیزهای آماری سنجش آنزیم فسفاتاز قلیایی نشان داد که در روز ۱ بین تیمار ترکیبی و تیمار باکتری تفاوت معناداری با تیمارهای قارچ و شاهد داشتند (p<۰/۰۵)، اما بین تیمارهای قارچ و شاهد تفاوت معناداری وجود نداشت (p>۰/۰۵). در روز ۷ تفاوت فعالیت این آنزیم در تیمارهای حاوی مکمل‌های غذایی در مقایسه با تیمار شاهد افزایش معنادار داشت (p<۰/۰۵). در روز ۱۴ رویارویی ماهیان با نانو ذرات نقره نیز افزایش فعالیت معنادار آنزیم فسفاتاز قلیایی در تیمارهای حاوی مکمل‌های غذایی نسبت به تیمار شاهد قابل مشاهده بود. علاوه بر این، در این روز تفاوت معناداری بین تیمارهای تغذیه شده با مکمل‌های غذایی مشاهده نشد (p>۰/۰۵).

سنجش پروتئین محلول

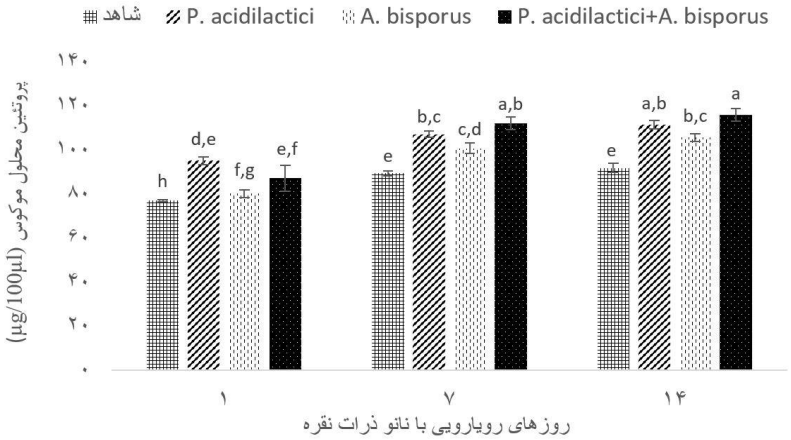
سطوح پروتئین محلول موکوس در تمامی تیمارها (تغذیه شده با مکمل‌های غذایی و شاهد) در رویارویی با غلظت تحت کشنده نانو ذرات نقره در روزهای ۱، ۷ و ۱۴ افزایش یافت (شکل ۳). این افزایش بین روز ۱ و ۷ معنادار بود (p<۰/۰۵) و بین روزهای ۷ و ۱۴ معنادار نبود (p>۰/۰۵). نتایج حاصل از آنالیزهای آماری پروتئین محلول موکوس نشان داد که در تمام روزها تیمار شاهد دارای کمترین میزان این شاخص نسبت به سایر تیمارها بوده است. سطوح پروتئین محلول موکوس در روز ۱، بین تیمارهای ترکیبی و باکتری نسبت به تیمار شاهد در سطح ۵ درصد افزایش معنادار داشت. در روز ۷ سطوح پروتئین محلول تیمارهای تغذیه شده با مکمل‌های غذایی، افزایش معناداری نسبت به تیمار شاهد نشان دادند (p<۰/۰۵).

[DOI: 10.22092/ISFJ.2018.117049]
Downloaded from isfj.ir at 14:12 +0330 on Friday October 5th 2018



شکل ۲: مقایسه میانگین فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی موکوس در تیمارهای تغذیه شده با مکمل‌های غذایی طی روزهای ۱، ۷ و ۱۴ رویارویی با نانو ذرات نقره. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌داری بین تیمارها می‌باشند (p<۰/۰۵).

Figure 2: Comparison of the average activity of mucosal alkaline phosphatase in treatments fed with dietary supplements during 1, 7 and 14 days of exposure to silver nanoparticles. The Different letters correspond to the significant difference between treatments (p<0/05).



شکل ۳: مقایسه میانگین پروتئین محلول موکوس در تیمارهای تغذیه شده با مکمل‌های غذایی طی روزهای ۱، ۷ و ۱۴ رویارویی با نانو ذرات نقره. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌داری بین تیمارها می‌باشند (p<۰/۰۵).

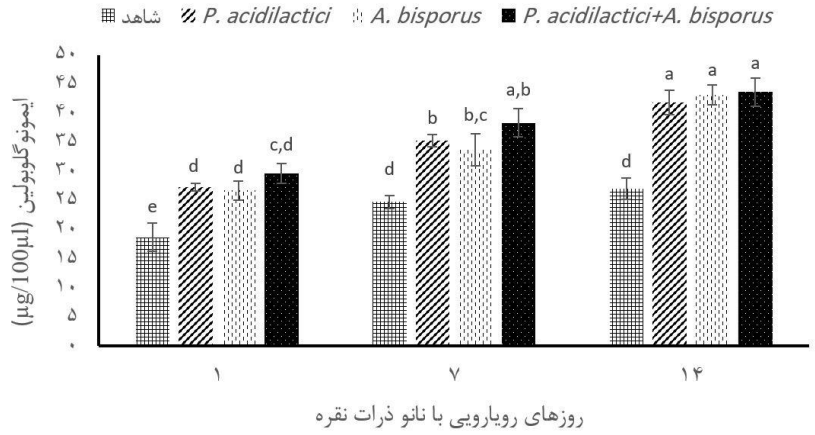
Figure 3: Comparison of the average activity of mucosal soluble protein in treatments fed with dietary supplements during 1, 7 and 14 days of exposure to silver nanoparticles. The Different letters correspond to the significant difference between treatments (p<0/05).

در روز ۱۴، سطح پروتئین محلول موکوس در تیمار باکتری و قارچ اختلاف معنادار نداشتند (p>۰/۰۵)، اما تیمار ترکیبی با قارچ اختلاف معنادار داشت (p<۰/۰۵).

سنجش ایمونوگلوبولین کل

در شکل ۴ نتایج بدست آمده از سنجش ایمونوگلوبولین کل موکوس پوست گزارش شده است. میزان ایمونوگلوبولین کل موکوس پوست در طی ۱۴ روز دوره رویارویی با غلظت تحت کشنده نانو ذرات نقره افزایش معناداری را نشان داد (p<۰/۰۵).

[DOI: 10.22092/ISFJ.2018.117049
Downloaded from isfj.ir at 14:12 +0330 on Friday October 5th 2018



شکل ۴: مقایسه میانگین ایمونوگلوبولین موکوس در تیمارهای تغذیه شده با مکمل‌های غذایی طی روزهای ۱، ۷ و ۱۴ رویارویی با نانو ذرات نقره. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌داری بین تیمارها می‌باشند (p<۰/۰۵).

Figure 4: Comparison of the average activity of mucosal immunoglobulin in treatments fed with dietary supplements during 1, 7 and 14 days of exposure to silver nanoparticles. The Different letters correspond to the significant difference between treatments (p<0/05).

در روز ۱ تیمارهای حاوی مکمل‌های غذایی افزایش معناداری را نسبت به تیمار شاهد نشان دادند (p<۰/۰۵). در روز ۷ نیز تیمارهای تغذیه شده با مکمل‌های غذایی در سطح ۵ درصد تفاوت معناداری با یکدیگر نداشتند، اما افزایش آنها در مقایسه با تیمار شاهد معنادار بود. در روز ۱۴ افزایش معنادار این شاخص بین تیمارهای تغذیه شده با مکمل‌های غذایی و تیمار شاهد مشاهده شد. (p<۰/۰۵) البته اختلاف بین تیمارهای تغذیه شده با مکمل‌های غذایی در روز ۱۴ معنادار نبود (p>۰/۰۵).

بحث

جوهری و حسینی (۱۳۹۳)، در نتایج حاصل از بررسی سمیت تغذیه ای کلوئید نانو ذرات در ماهی قزل آلا رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) مشاهده کردند بلع نانو ذرات ممکن است بر سلامت ماهیان اثر منفی بگذارد. در این بین سیستم ایمنی موکوس پوست نقش مهمی در مکانیسم دفاعی بدن بر عهده دارد و به عنوان اولین مانع در مقابل هرگونه تنش، عامل بیماری و عفونت عمل می‌کند (Subramanian *et al*., 2007). استفاده از محرک‌های ایمنی، به‌صورت مکمل‌های غذایی، می‌تواند ایمنی ذاتی ماهی را به‌منظور مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا در فرآیندهای پر تنش بهبود بخشد. کیفیت و کمیت ترکیبات موکوس گونه‌های مختلف ماهی متفاوت بوده و متأثر از فاکتورهای تنش‌زا در قبل یا در زمان نمونه‌برداری موکوس است (Bricknell and Dalmo, 2005).

فعالیت آنزیم لیزوزیم

در این مطالعه فعالیت آنزیم لیزوزیم تیمارهای تغذیه شده با مکمل‌های غذایی با افزایش روزهای رویارویی با نانو ذرات نقره افزایش معناداری یافت (p<۰/۰۵). تیمار ترکیبی روز ۱۴ و تیمار شاهد روز ۱ به ترتیب با ۹۱ و ۴۲ واحد بر میلی‌گرم پروتئین، بیشترین و کمترین مقدار این آنزیم را دارا بودند. بیشترین فعالیت این آنزیم در روز ۱۴ رویارویی مربوط به تیمار باکتری و تیمار ترکیبی مشاهده شد که این دو مکمل غذایی بیشترین تأثیر را در رویارویی با نانو ذرات نقره نشان دادند. نتایج تحقیق حاضر مشابه با نتایج به دست آمده از فعالیت آنزیم لیزوزیم موجود در موکوس بسیاری از گونه‌های ماهی می‌باشد (Guardiola *et al*., 2015). Miandare و همکاران (۲۰۱۶) تأثیر محرک ایمنی گالاکتوالیگوساکارید را در جیره‌ی غذایی ماهی قرمز بررسی و بیان کردند که میزان آنزیم لیزوزیم

[DOI: 10.22092/ISFJ.2018.117049]
Downloaded from isfj.ir at 14:12 +0330 on Friday October 5th 2018

در ماهیان تغذیه شده با گالاکتوالیگوساکارید افزایش یافته است. همچنین در مطالعات دیگر که توسط Harikrishnan و همکاران (۲۰۱۲) انجام شده است قارچ خوراکی را به عنوان محرکی جهت بالا بردن فعالیت آنزیم لیزوریم بیان کردند. افزایش سطوح لیزوزیم موکوس مؤید افزایش سطح ایمنی در ماهیان تغذیه شده با مکمل‌های غذایی می‌باشد.

فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی

آنزیم فسفاتاز قلیایی به دلیل دارا بودن فعالیت هیدرولیتیک در موکوس به عنوان یک عامل ضدباکتریایی عمل می‌کند و مقدار آن در شرایطی مانند مراحل اولیه بهبود زخم‌ها، شرایط تنش‌زا به دلیل نقش حفاظتی در برابر عوامل بیماری‌زا (Palaksha *et al*., 2008) و استفاده از محرک‌های ایمنی در جیره (Roosta *et al*., 2014) افزایش می‌یابد. در این پژوهش با افزایش روزهای رویارویی با نانو ذرات نقره میزان آنزیم فسفاتاز قلیایی نیز افزایش معناداری یافت و بیشترین افزایش و سطوح را تیمارهای تغذیه شده با مکمل‌های غذایی داشتند. کمترین و بیشترین مقدار این آنزیم به ترتیب ۲۸/۹ و ۴۱ واحد بین‌المللی در لیتر مربوط به تیمار شاهد در روز ۱ و تیمار ترکیبی در روز ۱۴ رویارویی با نانو ذرات نقره بود. فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی شاخص بالقوه استرس است که در موکوس پوست سالمون اتلانتیک به اثبات رسیده است. موکوس کپور معمولی بیشترین سطوح فسفاتاز قلیایی را دارد که بعلت زیستگاه این ماهی در آب‌های کم عمق و نزدیک بستر و تحت شرایط گل آلود است و حضور این آنزیم در جهت افزایش مقاومت سیستم ایمنی ذاتی این ماهی می‌باشد (Subramanian *et al*., 2007). Hoseinifar و همکاران (۲۰۱۵a) اثر باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس را روی موکوس پوست در جیره غذایی *Xiphophorus* بررسی و بیان کردند که سبب افزایش معنی دار در میزان فسفاتاز قلیایی می‌شود. نتایج مطالعه حاضر با نتایج این پژوهش مطابقت دارد.

سنجش پروتئین محلول

افزایش پروتئین محلول موکوس تحت تأثیر محرک‌های ایمنی از جمله محرک ایمنی ارگوسان‌پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی در موکوس ماهی *Puntigrus tetrazona* و *Periophthalmus gracilis* گزارش شده است (Hernandez *et al*., 2010) که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. آنالیز مقدار پروتئین محلول موکوس ماهی کپور معمولی بین تیمارهای مختلف نشان داد که مقدار آن بین تیمارهای تغذیه شده با مکمل‌های غذایی و گروه شاهد افزایش معناداری داشت و با افزایش روزهای رویارویی با نانو ذرات نقره مقدار این شاخص در تمامی تیمارها افزایش یافت. بیشترین و کمترین مقدار این فاکتور به ترتیب با ۱۱۶ و ۷۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در تیمارهای ترکیبی در روز ۱۴ رویارویی و شاهد در روز ۱ بود. Hoseinifar و همکاران (۲۰۱۵b) طی بررسی های خود بیان کردند که افزودن باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و ترکیب باکتری پدیوکوکوس اسیدلاکتیکی و گالاکتوالیگوساکارید به عنوان مکمل ترکیبی به ترتیب در جیره غذایی ماهی تایگر بارب و قزل‌آلای رنگین کمان سبب افزایش معنی دار میزان پروتئین محلول موکوس پوست می‌شود ($p<۰/۰۵$). Miandare و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که افزودن محرک ایمنی گالاکتوالیگوساکارید در جیره‌ی غذایی ماهی قرمز منجر به افزایش معنی دار پروتئین محلول موکوس نسبت به گروه شاهد شده است ($p<۰/۰۵$) که این دو پژوهش با نتایج حاصل از مطالعه‌ی کنونی هم‌سو می‌باشد.

سنجش ایمنوگلوبولین کل

ایمنوگلوبولین در ماهیان از سلول‌های B ترشح می‌شوند که یکی از مؤلفه‌های ایمنی اختصاصی می‌باشد (Esteban, 2012). در تحقیق حاضر سطح ایمنوگلوبولین موکوس تیمارهای تغذیه شده با مکمل های غذایی در مقایسه با تیمار شاهد در روز ۱ افزایش معنادار داشت و با بالا رفتن روزهای رویارویی با نانو ذرات نقره میزان این شاخص افزایش معنادار داشت ($p<۰/۰۵$). در روز ۱۴ هر سه تیمار تغذیه شده با باکتری، قارچ و مکمل ترکیبی

[DOI: 10.22092/ISFJ.2018.117049]
Downloaded from isfj.ir at 14:12 +0330 on Friday October 5th 2018

بیشترین میزان سطوح ایمنوگلوبولین را داشتند و بین آنها اختلاف معناداری مشاهده نشد ($p>0/05$). تیمار ترکیبی در روز ۱۴ با ۴۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و تیمار شاهد در روز ۱ با ۱۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بیشترین و کمترین مقدار این فاکتور را دارا بودند. این افزایش ایمنوگلوبولین توسط محققین دیگر که در جیره ماهی از محرک‌های ایمنی مانند قارچ و باکتری‌ها استفاده کرده‌اند مورد تأیید واقع شده است که عبارتند از استفاده عصاره قارچ *Lentinula edodes* در جیره قزل‌آلا (Baba *et al.*, 2015) و بتاگلوکان مستخرج از مخمر ساکارومایسس سرویزیه در جیره ماهی *Sparus aurata* (Guzmán-Villanueva *et al.*, 2014) که موجب افزایش این پارامتر شده‌اند.

جمع‌بندی نهایی مؤید آن است که افزودن مکمل‌های غذایی به ترکیب غذایی سبب بهبود نسبی شاخص‌های ایمنی موکوس پوست در ماهی کپور معمولی می‌شود. نتایج بدست آمده از آنالیز آماری نشان داد افزودن مکمل ترکیبی، باکتری *Pediococous acidilactici* و پودر قارچ *Agaricus bisporus* به ترتیب می‌تواند بر شاخص‌های ایمنی موکوس پوست شامل فعالیت آنزیم‌های لیزوزیم و فسفاتاز قلیایی، پروتئین محلول و ایمنوگلوبولین کل به طور معناداری تأثیرگذار باشد و در نهایت موجب بهبود عملکرد سیستم ایمنی موکوس پوست ماهی کپور معمولی در رویارویی ۱۴ روزه با نانو ذرات نقره گردد.

منابع

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*). پایان نامه، دانشکده شیلات دانشگاه ارومیه. ۱۵۰ صفحه.

جعفری، ف.ز.، هدایتی، ع.ا.، حسینی‌فر، س.ح.، جافرنوده، ع.، باقری، ط.، ۱۳۹۷. تأثیر پیش‌تیمار الیگوساکارید رافینوز و باکتری *Pediococcus acidilactici* بر برخی از شاخص‌های خونی ماهی کاراس (*Carassius auratus*) در مواجهه با نانو ذره نقره. مجله علمی شیلات ایران، ۲۷(۲):۱۶۰-۱۵۳. DOI: 10.22092/ISFJ.2018.116795

جوهری، ع. و حسینی، س.، ۱۳۹۳. بررسی سمیت تغذیه‌ای کلوئیدی نانو ذرات در ماهی قزل‌آلا رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله علمی شیلات ایران، ۲۳(۱):۳۰-۲۳. DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110159

حسینی‌فر، س.ح.، ۱۳۹۱. بررسی خواص سین‌بیوتیکی برخی قارچ‌های الیگوساکاریدی با باکتری*Pediococcus acidilactici* بر میکروبیوتای روده‌ای، شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی، هیستومورفولوژی روده و مقاومت در برابر *Streptococcus iniae* بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Onchorhynchus mykiss*). پایان نامه، دانشکده شیلات دانشگاه تهران. ۱۱۴ صفحه.

ضیائی، ن.، ۱۳۹۲. بررسی اثر مسمومیت زایی نانو ذره نقره بر سیستم‌های زیستی و اکولوژیکی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی. ۶(۳)، ۱۴۸-۱۲۱. DOI: 10.22103/JAB.2014.1331

هدایتی، ع.، قربانی، ر.، باقری، ط.، احمدوند، ش.، و جهانبخشی، ع.، ۱۳۹۲. بررسی اثرات سمیت کشنده نانو اکسید روی، نانو اکسید مس (CuO NPs) و نانو دی‌اکسید تیتانیوم (TiO2 NPs) و بررسی اثرات سمیت تحت کشنده آنها بر فاکتورهای خون و بافت آبشش ماهی قرمز (*Carassius auratus*)، کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) و کلمه (*Rutilus rutilus*). دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، معاونت پژوهشی و فناوری دانشکده شیلات و محیط زیست- گروه شیلات تاریخ تصویب ۱۳۹۱. ۲۹ صفحه.

Baba, E., Uluköy, G. and Öntaş, C., 2015. Effects of feed supplemented with Lentinula edodes mushroom extract on the immune response of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, and disease

[DOI: 10.22092/ISFJ.2018.117049]
Downloaded from isfj.ir at 14:12 +0330 on Friday October 5th 2018

resistance against *Lactococcus garvieae*. Aquaculture, 448: 476-4. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2015.04.031

Benn, T., Ca vanagh, 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. DOI: 10.2134/jeq2009.0363

Bricknell, I. and Dalmo, R.A., 2005. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. Fish and Shellfish immunology, 19: 457-472. DOI: 10.1016/j.fsi.2005.03.008

Castex, M., Lemaire, P., Wabete, N. and Chim, L., 2010. Effect of probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress of Litopenaeus stylirostris under Vibrio nigripulchritudo challenge. Fish and shellfish immunology, 28(4): 622-631. DOI: 10.1016/j.fsi.2009.12.024

Chang, C.S., Huang, S.L., Chen, S. and Chen, S.N., 2013. Innate immune responses and efficacy of using mushroom beta-glucan mixture (MBG) on orange-spotted grouper, Epinephelus coioides, aquaculture. Fish and shellfish immunology, 35(1): 115-125. DOI: 10.1016/j.fsi.2013.04.004

Di Giulio, R.T. and Hinton, D.E., 2008. The Toxicology of Fishes. Taylor Francis. 319-884.dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning Turbot (Psetta maxima).Aquaculture International, 14: 219-229.

Esteban, M.A, 2012. An overview of the immunological defenses in fish skin. ISRN Immunology. International Scholarly Research Network. Article ID 853470, 29. DOI: 10.5402/2012/853470

Garcia-Reyero, N., Thornton, C., Hawkins, A.D., Escalon, L., Kennedy, A.J., Steevens, J.A. and Willett, K.L., 2015. Assessing the exposure to nanosilver and silver nitrate on fathead minnow gill gene expression and mucus production. Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management, 4: 58-66. DOI: 10.1016/j.enmm.2015.06.001

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. DOI: 10.1897/08-002.1

Guardiola, F.A., Dioguardi, M., Parisi, M.G., Trapani, M.R., Meseguer, J., Cuesta, A. and Esteban, M.A., 2015. Evaluation of waterborne exposure to heavy metals in innate immune defences present on skin mucus of gilthead seabream *(Sparus aurata*). Fish and shellfish immunology, 45: 112-123. DOI: 10.1016/j.fsi.2015.02.010

Guzmán-Villanueva, L.T., Tovar-Ramírez, D., Gisbert, E., Cordero, H., Guardiola, F.A., Cuesta, A., Meseguer, J., Ascencio-Valle, F. and Esteban, M.A., 2014. Dietary administration of β-1, 3/1, 6-glucan and probiotic strain Shewanella

[DOI: 10.22092/ISFJ.2018.117049]
Downloaded from isfj.ir at 14:12 +0330 on Friday October 5th 2018

putrefaciens, single or combined, on gilthead seabream growth, immune responses and gene expression. Fish and shellfish immunology, 39(1): 34-41. DOI: 10.1016/j.fsi.2014.04.024

Harikrishnan, R., Balasundaram, C. and Heo, M.S., 2012. Inonotus obliquus containing diet enhances the innate immune mechanism and disease resistance in olive flounder Paralichythys olivaceus against Uronema marinum. Fish and shellfish immunology, 32(6): 1148-1154. DOI: 10.1016/j.fsi.2012.03.021

Hernandez, L.H.H., Barrera, T.C., Mejia, J.C., Mejia, G.C., Del Carmen, M., Dosta, M., De Lara Andrade, R. and Sotres, J.A.M., 2010. Effects of the commercial probiotic Lactobacillus casei on the growth, protein content of skin mucus and stress resistance of juveniles of the Porthole livebearer Poecilopsis gracilis (*Poecilidae*). Aquaculture nutrition, 16(4): 407-411. DOI: 10.1111/j.1365-2095.2009.00679.x

Hoseinifar, S.H., Roosta, Z., Hajimoradloo, A. and Vakili, F., 2015a. The effects of Lactobacillus acidophilus as feed supplement on skin mucosal immune parameters, intestinal microbiota, stress resistance and growth performance of black swordtail (*Xiphophorus helleri*). Fish and shellfish immunology, 42: 533-538. DOI: 10.1016/j.fsi.2014.12.003

Hoseinifar, S.H., Mirvaghefi, A., Amoozegar, M.A., Sharifian, M. and Esteban, M.Á., 2015b. Modulation of innate immune response, mucosal parameters and disease resistance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) upon synbiotic feeding. Fish and shellfish immunology, 45(1): 27-32. DOI: 10.1016/j.fsi.2015.03.029

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of biological chemistry, 193(1): 265-75.

Magnadottir, B., 2006. Innate immunity of fish (overview). Fish and shellfish immunology, 20: 137-151.

Miandare, H.K., Yarahmadi, P. and Abbasian, M., 2016. Immune related transcriptional responses and performance of Litopenaeus vannamei post-larvae fed on dietary probiotic PrimaLac®. Fish and shellfish immunology, 55: 671-678. DOI: 10.1016/j.fsi.2016.06.053

Palaksha, K.J., Shin, G.W., Kim, Y.R. and Jung, T.S., 2008. Evaluation of non-specific immune components from the skin mucus of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Fish and shellfish immunology, 24(4): 479-488. DOI: 10.1016/j.fsi.2008.01.005

Perera, S., 2007. The Probiotic Pediococcus Acidilactici Protects Goldfish (Carassius Auratus) Undergoing Induced Stress. Doctoral dissertation, Hood College, New York.

Roosta, Z., Hajimoradloo, A., Ghorbani, R. and Hoseinifar, S.H., 2014. The effects of dietary vitamin C on mucosal immune

[DOI: 10.22092/ISFJ.2018.117049]
Downloaded from isfj.ir at 14:12 +0330 on Friday October 5th 2018

Dietary supplementation of fructooligosaccharide (FOS) improves the innate immune response, stress resistance, digestive enzyme activities and growth performance of Caspian roach (Rutilus rutilus) fry. Fish and shellfish immunology, 32(2): 316-321. DOI: 10.1016/j.fsi.2011.11.023

Subramanian, S., MacKinnon, Sh.L. and Ross, N.W., 2007. A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. Comprative Biochemistry and Physiology, 148: 256-263. DOI: 10.1016/j.cbpb.2007.06.003

Wasser, S.P., 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. Applied microbiology and biotechnology, 60(3): 258-274.

responses and growth performance in Caspian roach (*Rutilus rutilus caspicus*) fry. Fish physiology and biochemistry, 40(5): 1601-1607.

Şevik, S., Aktaş, M., Doğan, H. and Koçak, S., 2013. Mushroom drying with solar assisted heat pump system. Energy Conversion and Management, 72: 171-178. DOI: 10.1016/j.enconman.2012.09.035

Siwicki A.K. and Anderson D.P., 1993. Nonspecific defense mechanisms assay in fish: II. Potential killing activity of neutrophils and macrophages, lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin level in serum. Fish Disease Diagnosis and Prevention Methods Olsztyn, Poland, 1993, 105-12.

Soleimani, N., Hoseinifar, S.H., Merrifield, D.L., Barati, M. and Abadi, Z.H., 2012.

[DOI: 10.22092/ISFJ.2018.117049]
Downloaded from isfj.ir at 14:12 +0330 on Friday October 5th 2018

Evaluation of dietary supplements of *Pediococcus acidilactici* bacteria and *Agaricus bisporus* mushroom powder on skin mucus immune indices of common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to Silver nano-particles

Khaleghi S.R.[1], Hedayati S.A.A.*[1], Kashiri H.[1], Paknejad H.[2], Hosseinifar S.H.[2]

hedayati@gau.ac.ir

1- Department of Aquatic Production and Exploitation, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
2- Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

Abstract

The purpose of this study was to investigate the effects of dietary supplements of *Pediococcus acidilactici* bacteria and *Agaricus bisporus* mushroom powder separate and combined (combined supplement) on the skin mucosal immune indices of common carp (*Cyprinus carpio*) in exposure to silver nano-particles. For this purpose, 180 fish with mean weight 29.6±0.4 g were fed in four treatments: bacteria (1 g/kg of diet), mushroom powder (10 g/kg of diet), combined bacteria and mushroom powder (1 and 10 g/kg of bacteria and mushroom) supplements and control (nutritionally non-supplemented) treatments and each treatment with 3 replicate (15 fish per replicate) for 60 days. After the end of the feeding period, the fish were exposed to sub-acute concentration of nano-silver (1 mg/l) for 14 days. Sampling of skin mucosa was performed to evaluate the immune-related parameters on days 1, 7 and 14 (5 sampling per replicate). Results showed that activity of lysozyme, alkaline phosphatase enzymes, soluble protein and total immunoglobulin in diets containing dietary supplements had a significant difference in nano exposed groups with control treatments ($p<0.05$) and had the highest amount on day 14. Also, although the control treatment had a 14-days incremental trend, it had the lowest levels than dietary supplement treatments. Combined food supplements, bacteria and mushroom powder showed the highest effects on mucosal immune parameters in exposure to nano-silver respectively.

Keywords: Immune system, Dietary supplements, Lysozyme, Alkaline phosphatase, Soluble protein, Immunoglobulin

*Corresponding author