# تاثیر نانوذرات نقره بر بافت آبشش ماهی کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*) تغذیه شده با پیش تیمار پروبیوتیک لاکتوباسیلوس


- **روح ا.. شیخ‌ویسی** *: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران، صندوق‌پستی: ۴۸۷-۴۹۱۷۵
- **سیدعلی‌اکبر هدایتی:** گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران، صندوق‌پستی: ۴۸۷-۴۹۱۷۵


تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۶

## چکیده

**در این تحقیق تاثیر مقاوم‌سازی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس بر بافت آبشش ماهی کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*) در مواجهه با نانوذرات نقره صورت گرفت. سه گروه ماهیان بدون پروبیوتیک و ماهیان تیمار شده شش هفته‌ای با پروبیوتیک سطح A (۱۰۶ کلی‌فرم/میلی‌لیتر) و پروبیوتیک سطح B (۱۰۷ کلی‌فرم/میلی‌لیتر) به‌مدت ده روز با غلظت تحت کشنده نانو نقره مواجهه شدند. برای بررسی آسیب‌های بافتی، از مقایسه بافت‌های مورد نظر با نمونه‌های شاهد، آسیب‌های ایجاد شده تشخیص و به‌وسیله میکروسکوپ مجهز به دوربین عکس‌برداری صورت گرفت. نتایج نشان داد که عارضه‌هایی مانند نفوذ گلبول‌های خونی، ادم سلولی و هایپرتروفی در همه تیمارها، آنوریسم لاملایی و برآمدگی اپی تلیوم تیغه ثانویه تنها در تیمارهای تحت تاثیر نانوذرات نقره، عارضه اتصال تیغه‌های مجاور تنها در تیمارهای تحت تاثیر پروبیوتیک و عارضه تورم سلول‌های سنگفرشی که تحت تاثیر پروبیوتیک و نانوذرات نقره بودند، مشاهده گردید. نتیجه‌گیری کلی این تحقیق نشان داد که عارضه‌های مربوط به تیمار نانونقره (تیمار٤) بیش‌تر از سایر تیمارهای آزمایشی بود و تغییرات بافتی مانند نفوذ گلبول‌های خونی، ادم سلولی و هایپرتروفی در تمام تیمارهای آزمایشی وجود داشت و این عوارض بیش‌ترین عوارض مشاهده شده در بافت آبشش بودند و سطوح مختلف پروبیوتیک نتوانست اثر مخرب نانونقره را بر بافت آبشش بهبود ببخشد بلکه خود نیز باعث عوارضی در بافت آبشش گردید ولی عوارض آن در مقایسه با نانو ذره نقره کم‌تر بود.**

**کلمات کلیدی:** ماهی، هیستوپاتولوژی، نانو ذرات فلزی، پروبیوتیک



* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: Hedayati@gau.ac.ir

## مقدمه

تأثیرات مثبت پروبیوتیک‌ها بر آبزیان پرورشی بر جنبه‌های مختلفی نظیر بهینه‌سازی پارامترهای فیزیکی و شیمیایی محیط پرورش، پیشگیری و مبارزه با عوامل بیماری‌زا و نیز ارتقا عملکرد رشد آبزیان پرورشی، در تحقیقات بی‌شماری توسط محققان شیلاتی تأیید شده است. در رابطه با تأثیر پروبیوتیک‌ها بر جنبه‌های مختلف آبزی پروری می‌توان به عملکرد این باکتری‌های مفید در دفع رقابتی و جلوگیری از کلنی شدن باکتری‌های بیماری‌زا در لوله گوارشی میزبان از طریق ترشح ترکیبات بازدارنده رشد یا رقابت برای غذا و مکان اشاره نمود. هم‌چنین تحریک سیستم ایمنی میزبان در جهت تحمل بهتر محرک‌های محیطی و رشد را می‌توان از دیگر کارکردهای مفید پروبیوتیک‌ها برشمرد (Irianto و Austin، ۲۰۰۲). پروبیوتیک‌ها می‌توانند به‌صورت مستقیم یا غیرمستقیم بر آبزیان تأثیر بگذارند. در حالت اول با تغییر بر تعادل میکروبی روده جاندار و تغییر فلور میکروبی موکوس روده، پوست و آبششِ آبزی باعث ایجاد مقاومت در برابر بیماری می‌شوند (Ziaei-Nejad و همکاران، ۲۰۰۶) و با ترشح ویتامین و مواد مغذی و کمک به جذب مواد غذایی سبب افزایش رشد می‌گردند (Tovar-Ramirez و همکاران، ۲۰۰۲). در حالت دوم با بهبود کیفیت آب و محیط زیست آبزی باعث کاهش استرس می‌شوند که خود باعث کاهش احتمال بروز بیماری می‌شود، چرا که بین مقاومت میزبان، عوامل بیماری‌زا و محیط پرورش رابطه‌ای سه گانه برقرار است که هریک دیگری را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Verschuere و همکاران، ۲۰۰۰).

کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) از رده ماهیان استخوانی و متعلق به خانواده کپورماهیان (Cyprinidae) است و در تمام حوضه‌های آبریز ایران پراکنش دارد. ماهی کپورمعمولی یکی از گونه‌های مهم تجاری در سراسر جهان می‌باشد و در اکثر کشورهای جهان سیستم پرورش آن گسترده و نیمه متراکم است فراوانی بسیار زیادی در آب‌های شیرین دارند. این ماهیان به‌صورت گسترده در سرتاسر نقاط دنیا، مورد تکثیر و پرورش قرار می‌گیرند. احتمالاً ماهی کپور معمولی اولین گونه‌ای از ماهیان است که از زادگاهش به سایر نقاط دنیا معرفی شده است (ستاری، ۱۳۸۲).

توسعه سریع نانو و نانو تکنولوژی در سال‌های اخیر افق جدیدی به روی بسیاری از صنایع و بخش‌های مختلف گشوده که سرچشمه انقلاب صنعتی جدید گردیده است. اندازه کوچک این ذرات می‌تواند به تغییرات اساسی در ساختار و خواص این عناصر منجر شود به‌طوری که تا امروز صدها تولیدات جدید برای اهداف مختلف در زمینه فناوری نانو ساخته‌شده است. ورود این فناوری به عرصه آبزی‌پروری و استفاده کاربری از آن در بسیاری از کشورها گسترش یافته است. نانو ذرات می‌توانند از جداره رگ‌های خونی و هم‌چنین جفت عبور کنند در نتیجه، به‌راحتی می‌توانند با ملکول‌های مستقر بر روی سطح یا داخل سلول‌ها تعامل داشته باشند. این مسئله باعث می‌شود سلامتی موجودات زنده زیادی تحت تاثیر قرار گیرد (Cheraghi و همکاران، ۲۰۰۴). فناوری نانو به معنای ساده، استفاده از مواد و ساختارهایی در مقیاس نانو (حداقل در یک بعد ۱۰۰-۱ نانومتر) است. نانو مواد دارای ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی منحصر به فرد در مقایسه با سایر مواد با ترکیبات مشابه می‌باشند نقره در ابعاد بزرگ، فلزی با خاصیت واکنش دهی کم می‌باشد، ولی زمانی‌که به ابعاد کوچک در حد نانومتر تبدیل می‌شود، خاصیت میکروب‌کشی آن بیش از ۹۹ درصد افزایش می‌یابد، به حدی که می‌توان از آن جهت بهبود جراحات و عفونت‌ها استفاده کرد. نقره در ابعاد نانو بر متابولیسم، تنفس و تولید مثل میکروارگانیسم اثر می‌گذارد (Hedayati و همکاران، ۲۰۱۳).

قرار گرفتن در معرض آلاینده‌های شیمیایی می‌تواند ضایعات و آسیب‌های متعددی را به بافت‌ها و سلول‌های مختلف ماهی وارد کند، آزمایشات آسیب شناسی بافتی، ابزاری مفید به‌منظور ارزیابی میزان آلودگی و بررسی اثرات آلاینده، به ویژه اثرات حاد و مزمن بر موجودات زنده می‌باشد. در واقع تغییرات بافتی که در اثر قرار گرفتن موجود زنده در معرض غلظت تحت حاد از یک سم بروز می دهد، واکنشی از موجود زنده است که اطلاعاتی در مورد ماهیت مواد سمی را فراهم می‌کند. حساسیت گونه‌های مختلف ماهیان به مواد سمی، متغیر است، از این‌رو ضروری است آزمایش‌های سم‌شناسی برای ماهیان مختلف صورت گیرد (Finney، ۱۹۷۱).

هدایتی و همکاران (۱۳۹۲) به بررسی اثرات سمیت کشنده نانواکسید روی، نانو اکسید مس (CuO NPs) و نانو دی‌اکسید تیتانیوم و بررسی اثرات سمیت تحت کشنده آن‌ها بر فاکتورهای خون و بافت آبشش ماهی قرمز، کپور معمولی و کلمه (*Rutilus rutilus*) پرداختند. Handy و همکاران (۲۰۰۸) با مطالعه بر ساختار و نحوه عملکرد ذرات نانو بر بدن ماهی بیان نمودند که جذب نانوذرات (در این مقاله از نانوذرات تیتانیوم و کبالت استفاده شد) در بافت آبشش و موکوس موجود، بر روی آن به یک صورت انجام می‌گردد ولی جذب این مواد در بافت اپی‌تلیال آبشش ماهی به‌صورت فرایندهای ذره‌خواری نظیر اگزوسیتوز انجام می‌پذیرد. لذا با توجه به نوظهور بودن فلزات سنگین آن هم در مقیاس نانو و اثر سمیت آن‌ها و از طرف دیگر تاثیرات مثبت پروبیوتیک به‌عنوان محرک‌های ایمنی آبزیان در برابر آلاینده‌ها این تحقیق به‌منظور بررسی بافت آبشش کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*) در مواجهه با نانوذرات نقره و پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس* صورت گرفته است.

## مواد و روش‌ها

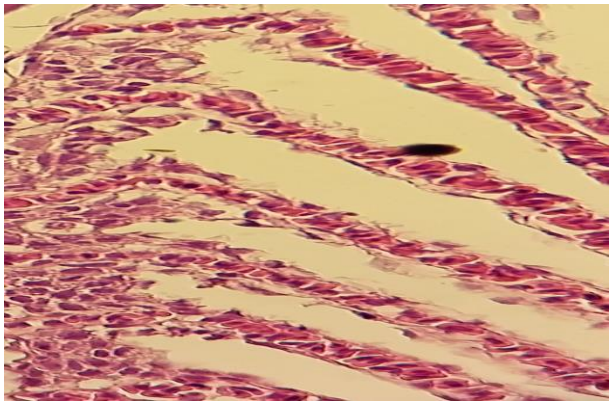
این تحقیق به‌مدت ۶۰ روز (یک هفته برای آداپته شدن،۴۲ روز تغذیه با پروبیوتیک،۱۰روز در معرض نانو ذرات نقره) در محل مرکز تحقیقات آبزی‌پروری شهید ناصر فضلی برآبادی گروه شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. ابتدا تعداد ۲۵۰ بچه ماهی کپورمعمولی با محدوده وزنی حدود ۲۰ گرم از مراکز تکثیر و پرورش بخش خصوصی تهیه گردید. بعد از ضدعفونی و آماده‌سازی آکواریوم‌ها، آبگیری آن‌ها صورت گرفت. سپس به آکواریوم‌های آزمایشگاه منتقل شدند. برای سازگار شدن با محیط آزمایش به‌مدت یک هفته در داخل مخازن پرورشی نگه‌داری شدند.

در طول دوره آزمایش فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب اندازه‌گیری شد که شامل دمای آب ۱±۲۱ درجه سانتی‌گراد، پی‌اچ(pH) ۷/۹ – ۶/۷، غلظت اکسیژن محلول: ۹-۷ میلی‌گرم در لیتر و سختی آب: ۲۱۰ میلی‌گرم کربنات کلسیم در لیتر بود. بعد از گذشت یک هفته از دوره سازگاری، ماهیان در سه دسته ماهیان بدون پروبیوتیک و ماهیان دارای پروبیوتیک سطح A (۱۰۶) و ماهیان دارای پروبیوتیک سطح B (۱۰۷) تقسیم شدند (Cerezuela و Meseguer، ۲۰۰۸). اضافه کردن پروبیوتیک لاکتو باسیلوس به غذا با روش اسپری کردن صورت گرفت، به این صورت که ابتدا میزان ۲ گرم پودر ژلاتین را به آب اضافه کرده و پس از حل شدن پودر در آب مقادیر مورد نیاز پروبیوتیک را که از قبل توزین و آماده شده بود، به محلول آب و پودر ژله اضافه شد. در نهایت پس از حل شدن پروبیوتیک، محلول آماده شده بر غذای تجاری اسپری شد. بعد از گذشت ۴۲ روز به هرکدام از گروه‌ها ۵۰ درصد غلظت کشنده نانونقره که با پیش تست اولیه مشخص شده بود به‌مدت ده روز اضافه شد که در مجموع ۶ تیمار با ۳ تکرار (۱۸ تیمار×تکرار) طراحی شد. هم‌چنین لازم به یادآوری است تعویض آب روزانه ۷۰ درصد حجم تانک‌ها صورت گرفت و غلظت سم در هر یک از تیمارها حفظ شد. غذادهی روزانه ۲/۵ درصد وزن بدن صورت گرفت (Di Giulio و Hinton، ۲۰۰۸).

جهت‌نمونه‌برداری،ماهیان درداخل تشت‌های‌پلاستیکی محتوی آب همسان با آکواریوم هر ماهی‌که دارای ماده بی‌هوش‌کننده یوژینول بود، بی‌هوش شدند. پس از زیست‌سنجی از طریق اندازه‌گیری طول، وزن و تخصیص کد به هر ماهی، برای بررسی بافت آبشش از کمان دوم آبششی، نمونه آبشش تهیه و در تثبیت کننده مناسب فیکس شد و پس از قالب‌گیری در پارافین با ضخامت ۵ میکرون برش خورد و به روش ائوزین- هماتوکسیلین رنگ‌آمیزی گردید و پس از آن تغییرات بافت شناسی بررسی شد. برای بررسی آسیب‌های بافتی، از مقایسه بافت‌های مورد نظر با نمونه‌های شاهد و نیز منابع موجود، آسیب‌های ایجاد شده تشخیص و به‌وسیله میکروسکوپ مجهز به دوربین عکس‌برداری صورت گرفت (هدایتی و همکاران،. ۱۳۹۲).

## نتایج

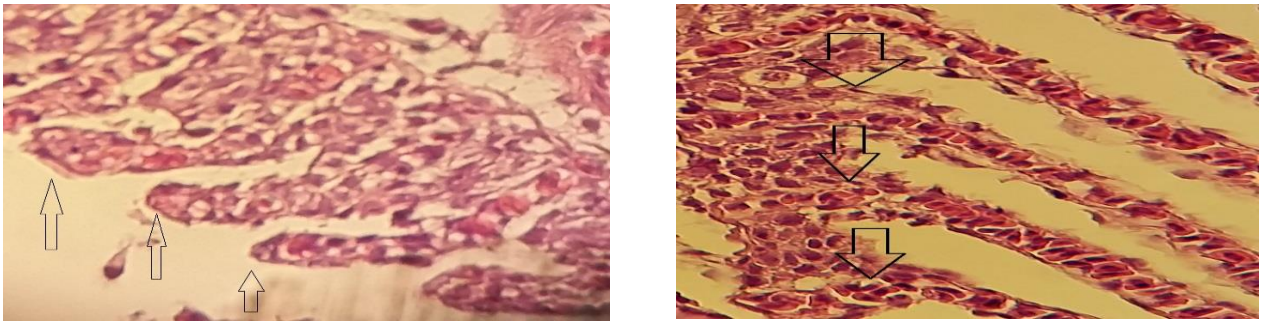
در طول دوره آزمایش در هیچ یک از تیمارهای آزمایشی و گروه کنترل مرگ و میر مشاهده نشد. بررسی‌های بافت‌شناسی ماهیان که در معرض پروبیوتیک لاکتوباسیلوس و نانو ذرات نقره قرار داشتند، نشان دهنده بروز ناهنجاری‌های ساختاری در بافت آبشش بود. به طوری‌که این تغییرات در مقایسه با بافت‌های گروه شاهد اختلاف بسیاری داشت.



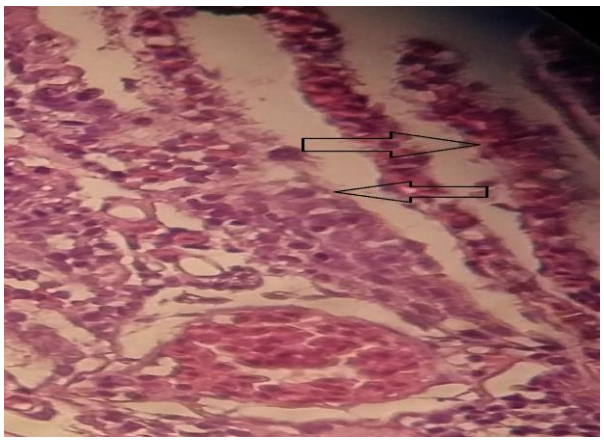
**شکل ۱: تصویر میکروسکوپ نوری نمونه‌ی شاهد بافت آبشش ماهی کپور معمولی(X ۴۰۰)**

در تحقیق حاضر بررسی نتایج بافت شناسی نشان داد که در تیمار دو (پروبیوتیک $10^6$) و چهار (نانو نقره) هیپرپلازی راسی (چماقی شدن راس تیغه آبشش)(شکل۲) و در تیمار یک (شاهد) هیپرپلازی پایه‌ای (چماقی شدن پایه تیغه آبشش) وجود داشت (شکل۲).

آئوریسم لاملایی در تحقیق حاضر تنها در تیمار۴ (نانو نقره) ولی تورم سلول‌های سنگفرشی در تیمارهای سه (پروبیوتیک $10^7$)، چهار (نانو نقره )، شش (پروبیوتیک $10^7$+ نانو نقره ) وجود داشت (شکل۳) که عارضه مذکور در تیمارهای سه و شش با شدت متوسط و در تیمار چهار با شدت خفیف مشاهده شد (جدول۱).



**شکل۲: تصویر میکروسکوپ نوری هیپرپلازی راسی (تصویر سمت چپ) و هیپرپلازی پایه‌ای (تصویر سمت راست) بافت آبشش ماهی کپور معمولی پیش تیمار شده با پروبیوتیک لاکتوباسیلوس در مواجهه با نانو ذرات نقره (X ۴۰۰)**



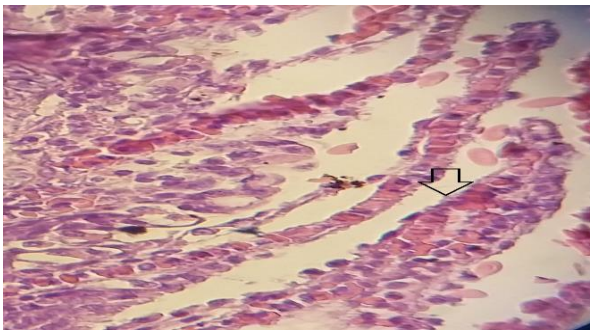
**شکل۳: تصویر میکروسکوپ نوری آئوریسم لاملایی (جهت سمت چپ) و تورم سلول‌های سنگفرشی (جهت سمت راست) بافت آبشش ماهی کپورمعمولی پیش تیمار شده با پروبیوتیک لاکتوباسیلوس در مواجهه با نانو ذرات نقره (X ۴۰۰)**

**جدول ۱: عوارض بافت آبشش ماهی کپورمعمولی در مواجهه با نانوذرات نقره و پروبیوتیک لاکتوباسیلوس (عدم مشاهده عارضه(– )، خفیف (+)، متوسط ( ++ )، شدید (+++))**

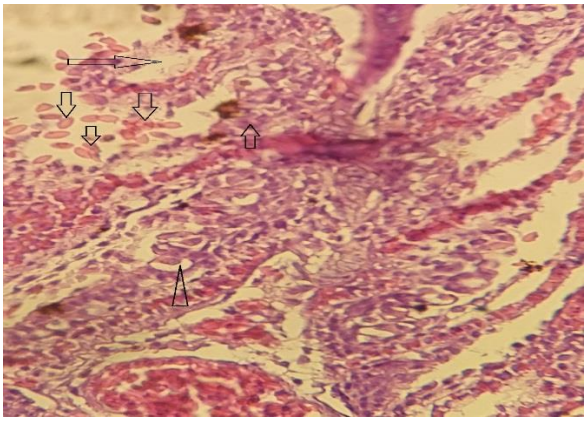
| تیمار / عارضه | تیمار۱ شاهد | تیمار۲ پروبیوتیک ۱۰۶ | تیمار۳ پروبیوتیک ۱۰۷ | تیمار ۴ نانو نقره | تیمار ۵ پروبیوتیک ۱۰۶ + نانو نقره | تیمار۶ پروبیوتیک ۱۰۷+ نانو نقره |
|---|---|---|---|---|---|---|
| هیپرپلازی راسی | – | ++ | – | ++ | – | – |
| هیپرپلازی پایه‌ای | ++ | – | – | – | – | – |
| برآمدگی اپی‌تلیوم تیغه ثانویه | – | – | – | – | + | – |
| آئوریسم لاملایی | – | – | – | + | – | – |
| اتصال تیغه‌های مجاور | – | +++ | – | – | +++ | + |
| تورم سلول‌های سنگفرشی | – | – | ++ | + | – | ++ |
| نفوذ گلبول‌های خونی | ++ | + | + | ++ | +++ | +++ |
| ادم سلولی (افزایش حجم سلول) | ++ | ++ | ++ | +++ | ++ | + |
| هایپرتروفی | + | ++ | +++ | + | + | ++ |

اتصال تیغه‌های مجاور در تحقیق حاضر در تیمارهای دو (پروبیوتیک $۱۰^{۶}$)، تیمار پنج (پروبیوتیک $۱۰^{۶}$ + نانو نقره) و تیمار شش (پروبیوتیک $۱۰^{۷}$+ نانو نقره) وجود داشت (شکل۴) که در تیمار دو و پنج این عارضه با شدت زیاد ولی در تیمار شش با شدت خفیف مشاهده شد (جدول۱).

برآمدگی اپی تلیوم تیغه ثانویه در تحقیق حاضر تنها در تیمار ۵ (پروبیوتیک ۱۰۶ + نانو نقره) وجود داشت ولی عارضه‌هایی مانند نفوذ گلبول‌های خونی، هایپرتروفی و ادم سلولی در همه تیمارها وجود داشت (شکل۵). نفوذ گلبول‌های خونی در تیمارهای پنج و شش با شدت زیاد، در تیمارهای یک و چهار با شدت متوسط و در تیمارهای دو و سه با شدت خفیف مشاهده شد (جدول ۱). عارضه ادم سلولی در تیمار چهار با شدت زیاد، در تیمارهای یک و دو و سه و پنج با شدت متوسط و در تیمار شش این عارضه با شدت خفیف مشاهده شد (جدول ۱). عارضه هایپرتروفی در تیمار سه با شدت زیاد، در تیمار دو و شش با شدت متوسط و در تیمار یک و چهار و پنج این عارضه با شدت خفیف مشاهده شد (جدول ۱).



**شکل۴: تصویر میکروسکوپ نوری اتصال تیغه‌های مجاور بافت آبشش ماهی کپور معمولی پیش تیمار شده با پروبیوتیک لاکتوباسیلوس در مواجهه با نانو ذرات نقره (X ۴۰۰)**



**شکل۵: تصویر میکروسکوپ نوری برآمدگی اپی‌تلیوم تیغه ثانویه (فلش جهت راست)، نفوذ گلبول‌های خونی (فلش جهت پایین)، هایپرتروفی (فلش جهت بالا)، ادم سلولی(پیکان) بافت آبشش ماهی کپور معمولی پیش تیمار شده با پروبیوتیک لاکتوباسیلوس در مواجهه با نانو ذرات نقره (X ۴۰۰)**

## بحث

مطالعات آسیب‌شناسی بافتی به‌عنوان ابزاری حساس برای تشخیص اثرات مستقیم مواد شیمیایی بر اندام‌های هدف ماهیان در شرایط آزمایشگاهی محسوب می‌شود به‌طورکلی آبشش ماهیان به عنوان شاخص کارآمدی از کیفیت آب درنظر گرفته می‌شود، چرا که علاوه بر وسیع بودن سطح، آبشش‌ها عملکردهای مختلفی دارند که شامل تنفس، تنظیم اسمزی، دفع مواد زائد نیتروژن‌دار و تعادل اسید و باز می‌باشد. بنابراین اختلال عملکرد آبششی ناشی از آلاینده‌ها به‌طور قابل توجهی به بهداشت و سلامت ماهی مرتبط می‌شود و آبشش ماهی به‌عنوان مهم‌ترین شاخص سطوح آلودگی آب در نظر گرفته می‌شود (Alazemi، ۱۹۹۶). آبشش‌ها، سازش‌های تنفسی اغلب جانوران آبزی و محل اصلی تبادل گازها هستند. این اندام سطوح چین‌خورده‌ای از سطح بدن می‌باشد که در آب معلق است. کل مساحت سطح آبشش‌ها اغلب بسیار بیش‌تر از بقیه سطح بدن است. آبشش ماهی یک اندام چند وظیفه‌ای است و بیش از ۵۰ درصد کل سطح بدن ماهی را تشکیل می‌دهد که آن را در برابر مواد شیمیایی آب حساس می‌کند. هم‌چنین، آبشش ماهی محل تبادلات گازی و تنظیم اسمزی است و نقش مهمی در حفظ همئوستازی یونی موجود ایفا می‌کند (هدایتی و همکاران، ۱۳۹۲). به‌طورکلی عمده‌ترین تغییرات بافتی که در بافت آبشش در مواجهه با نانوذرات نقره مشاهده شد شامل هیپرپلازی راسی، آئوریسم لاملایی، تورم سلول‌های سنگفرشی، نفوذ گلبول‌های خونی، ادم سلولی و هایپرتروفی بود که مطابق نتایج حاضر در مطالعه‌ای آسیب شناسی بافتی تحت سم دیازینون در بچه ماهی قزل‌الای رنگین‌کمان انجام شد که مهم‌ترین تغییرات بافتی در بافت آبشش پرخونی، هیپرپلازی آبششی و چماقی شدن لاملا از مهم‌ترین تغییرات هیستوپاتولوژیکی مشاهده شده بود

(Saeedi Far، ۲۰۱۲). Chen و همکاران (۲۰۱۱) تنها عوارض هیستوپاتولوژیک ایجاد شده در بافت آبشش ماهی دانیو گورخری را در مواجهه طولانی‌مدت با نانو ذرات تیتانیوم را، ادم و هایپرپلازی رأسی لاملاهای ثانویه گزارش کردند که این عوارض در تحقیق حاضر نیز مشهود بود. محققین زیادی اثرات هیستوپاتولوژی نانو ذرات فلزی را بررسی کردند که مهم‌ترین عوارض مشاهده شده شامل: هایپرپلازی و آئوریسم لاملایی بود که با نتایج تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد. ازجمله مهم‌ترین عوارض مشاهده شده شامل آنوریسم لاملای ثانویه و هیپرپلازی در مواجهه با نانو ذرات نقره گزارش شده است (هدایتی و همکاران، ۱۳۹۲).

تغییرات بافتی مانند نفوذ گلبول‌های خونی، ادم سلولی و هایپرتروفی در تیمار شاهد و تمام تیمارهای آزمایشی وجود داشت علاوه بر عوارض مذکور در تیمار یک (شاهد) هیپرپلازی پایه‌ای، در تیمار دو (پروبیوتیک ۱۰۶) اتصال تیغه‌های مجاور و هیپرپلازی راسی، درتیمار سه (پروبیوتیک۱۰۷) تورم سلول‌های سنگفرشی نیز مشاهده شد. با وجود اثرات مفیدی که برای پروبیوتیک‌ها در نظر گرفته شده است، تحقیقات محدودی در زمینه تاثیر پروبیوتیک در آبزیان پرورشی انجام شده است. اکرمی و همکاران (۱۳۸۷) اثر استفاده از اینولین در سطوح ۱، ۲ و ۳ درصد را در جیره ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بررسی کردند. یافته‌های آن‌ها نشان داد که این نوع پربیوتیک نمی‌تواند مکمل مناسبی برای جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در نظر گرفته شود و در تیمارهای تحت بررسی تفاوت آماری معنی‌داری در نرخ بازماندگی مشاهده نگردید. در مطالعه‌ای دیگر، با افزودن اینولین به‌میزان ۵ یا ۱۰ گرم در کیلوگرم جیره ماهی سیم دریایی (*Spaus aurata*) طی مدت ۱ تا ۲ هفته در شرایط پرورشی دریافتند که اینولین بازدارندگی معنی‌داری در پارامترهای سیستم ایمنی به‌دنبال دارد و پیشنهاد کردند که اینولین نمی‌تواند محرک ایمنی مناسبی برای این گونه باشد (Cerezuela و همکاران، ۲۰۱۳).

تجویز خوراکی عملی‌ترین روش برای استفاده و معرفی محرک‌های ایمنی است، اما با این حال تاثیرات و عواقب استفاده طولانی مدت محرک‌های ایمنی به‌صورت خوراکی هنوز چندان واضح و مشخص نیست (Yoshida و همکاران، ۱۹۹۳). استفاده از پپتیدوگلیکان به‌مدت ۵۶ روز به‌صورت خوراکی در قزل‌آلای رنگین‌کمان باعث حمایت در برابر آلودگی به *Vibrio anguillarum* نمی‌شود، درحالی‌که در صورت استفاده از این محرک به‌مدت ۲۸ روز باعث حمایت از این ماهی در برابر آلودگی به باکتری یاد شده می‌گردد. هرچند هنوز دلیل کاهش پاسخ‌های ایمنی در ماهیان هنگام استفاده طولانی مدت از محرک های ایمنی به‌صورت خوراکی، مشخص نشده است. اما با این حال احتمالاً یک سیستم فیدبک منفی در ماهیان بر علیه تحریک ایمنی بدن ایجاد شده و باعث برگشت پاسخ‌های ایمنی به جایگاه اول آن می‌گردد (Yoshida و همکاران، ۱۹۹۳).

استفاده از محرک‌های ایمنی برای تحریک و ارتقای سیستم ایمنی آبزیان باید دقت زیادی در مورد مقدار ماده مورد استفاده به‌عمل بیاید. گونه‌های مختلف آبزیان و نوع ماده محرک ایمنی به‌کار برده شده در تعیین مقدار آن بسیار حائز اهمیت هستند، به‌گونه‌ای که یک محرک ایمنی خاص ممکن است در گونه‌های مختلف آبزیان با مقادیر متفاوتی قادر به تاثیر مثبت بر سیستم ایمنی گردد و یا ممکن است که یک محرک ایمنی در گونه‌ای از آبزیان تاثیر مطلوب و در گونه دیگر بی‌تاثیر یا همراه با تاثیرات منفی باشد (Kim و Austin، ۲۰۰۶). با توجه به نتایج سایر محققان و نتایج تحقیق حاضر پروبیوتیک به تنهایی باعث ایجاد عارضه در بافت آبشش شد.

همان‌طورکه گفته شد تغییرات بافتی مانند نفوذ گلبول‌های خونی، ادم سلولی و هایپرتروفی در تمام تیمارهای آزمایشی وجود داشت، در ترکیب پروبیوتیک و نانونقره علاوه بر عوارض مذکور، در تیمار پنج (پروبیوتیک۱۰۶+نانونقره) عوارضی مانند برآمدگی اپی‌تلیوم تیغه‌های ثانویه و اتصال تیغه‌های مجاور، در تیمار شش (پروبیوتیک ۱۰۷ + نانونقره) تورم سلول‌های سنگفرشی و اتصال تیغه‌های مجاور نیز وجود داشتند که 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 آبزی پرورشی مرتبط دانست که نیاز به تحقیقات بیش‌تری داد.

نتیجه‌گیری کلی این تحقیق نشان داد که عارضه‌های مربوط به تیمار نانونقره (تیمار۴) بیش‌تر از سایر تیمارهای آزمایشی بود و تغییرات بافتی مانند نفوذ گلبول‌های خونی، ادم سلولی و هایپرتروفی در تمام تیمارهای آزمایشی وجود داشت و این عوارض بیش‌ترین عوارض مشاهده شده در بافت آبشش بودند. تحقیق حاضر فرضیه‌ای بود بر اثر مثبت پروبیوتیک‌ها بر ایمنی ماهی کپورمعمولی در مواجهه با نانوذرات نقره که نتایج تحقیق حاضر این فرضیه را رد و نه تنها نتوانست اثر مخرب نانو نقره را بر بافت آبشش بهبود ببخشد بلکه خود نیز باعث عوارضی در بافت آبشش گردید ولی عوارض آن در مقایسه با نانو ذره نقره کم‌تر بود و نانو نقره به تنهایی اثرات مخرب‌تری نسبت به سایر تیمارها داشت.

## تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت‌های مادی و معنوی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان صورت گرفت. از همه بزرگوارانی که به نحوی در این پژوهش مساعدت نمودند، سپاس‌گزاری می‌گردد.

## منابع

۱. **اکرمی، ر.؛ کریم‌آبادی، ع.؛ محمدزاده، ح. و احمدی‌فر، ا.، ۱۳۸۸.** تاثیر پربیوتیک مانان الیگوساکارید بر رشد، بازماندگی، ترکیب بدن و مقاومت به تنش شوری در بچه ماهی سفید ( *Rutilus frisii kutum*). مجله علوم و فنون دریایی. دوره ۸، شمار ۳ تا ۴، صفحات ۴۷ تا ۵۷.

۲. **ستاری، م.؛ شاهسونی، د. و شفیعی، ش.، ۱۳۸۲.** ماهی شناسی۲. انتشارات حق‌شناس. ۵۰۲ صفحه.

۳. **هدایتی، س.ع.؛ قربانی، ر.؛ باقری، ط.؛ احمدوند، ش. و جهانبخشی، ع.، ۱۳۹۲.** بررسی اثرات سمیت کشنده نانواکسید روی (ZnO NPs)، نانو اکسید مس، (CuONPs) و نانو دی اکسید تیتانیوم (TiO2 NPs) و بررسی اثرات سمیت تحت کشنده آن‌ها بر فاکتورهای خون و بافت آبشش ماهی قرمز، کپورمعمولی و کلمه. طرح پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ۲۹ صفحه.

۴. **هدایتی، س.ع؛ قادرمزی، ع. و قادری، ف.، ۱۳۹۲.** سم شناسی آبزیان. انتشارات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ۲۱۰ صفحه.

۵. **Alazemi, B.M.; Lewis, J.W. and Andrews, E.B., 1996.** Gill damage in the freshwater fish *Gnathonemus petersii* (family: Mormyridae) exposed to selected pollutants: an ultrastructural study. Environmental Technology. Vol. 17, No. 3, pp: 225-238.

۶. **Cerezuela, R.; Cuesta, A. and Meseguer, J., 2008.** Effect of inulin on gilthead Seabream (*Sparus aurata*) innate immune parameters. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 24, No. 5, pp: 663-668.

۷. **Chen, J.; Dong, X.; Xin, Y. and Zhao, M., 2011.** Effects of titanium dioxide nano particles on growth and some histological parameters of zebrafish *(Danio rerio)* after a long term exposure. Aquatic Toxicology. Vol. 101, No. 3, pp: 493-499.

۸. **Cheraghi, A.; Bohrani, N. and Malekfar, R., 2004.** Technology office of the presidential committee on nanotechnology policy. Applications of Nanotechnology in the Diagnosis and Treatment of Diseases. Vol. 5, pp: 85-94.

۹. **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. Vol. 14, pp: 219-229.

۱۰. **Finney, D., 1971.** Probit analysis, a statistical treatment of the sigmoid response curve. Cambridge. 256 p.

۱۱. **Handy, R.D., 2008.** Manufactured nanoparticles: their uptake and effects on fish a mechanistic analysis. Ecotoxicology. Vol. 17, No. 5, pp: 396-409.

۱۲. **Hedayati, A.; Jahanbakhshi, A.and Qaderi Rmazy, F., 2013.** Aquatic Toxicology, Vol. I, First edition. pp: 70-76.

۱۳. **Irianto, A. and Austin, B., 2002.** Probiotic in aquaculture, Journal of Fish Diseases. Vol. 25, pp: 1-10.

۱۴. **Kim, D.H. and Austin, B., 2006.** Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 21, No. 5, pp: 24-513.

۱۵. **Saeedi Far, M.; Roodsari, H.V.; Zamini, A.; Mirrasooli, E. and Kazemi, R., 2012.** The effects of diazinon on behavior and some hematological parameters of fry rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Jurnal of World Journal of Fish and Marine Sciences. Vol. 4, pp: 369-375.

۱۶. **Tovar Ramirez, D.; Zambonino, J.; Cahu, C.; Gatesoupe, F.J.; Vazquez Juarez, R. and Lésel, R., 2002.** Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Aquaculture. Vol. 204, pp: 113-123.

۱۷. **Verschuere, L.; Dhont, J.; Sorgeloos, P. and Verstraete, W., 2000.** Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiology and Molecular Biology Reviews. Vol. 64, pp: 655-671.

۱۸. **Yoshida, M.; Ishigaki, K.; Nagai, T.; Chikyu, M. and Pursel, V.G., 1993.** Glutathione concentration during

maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. Biology of Reproduction. Vol. 49, No. 1, pp: 89-94.

۱۹. **Ziaei Nejad, S.; Habibi Rezaei, M.; Azari Takami, G.; Lovett, D.L.; Mirvaghefi, A.R. and Shakouri, M., 2006.** The effect of Bacillus spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp Fenneropenaeus indicus. Aquaculture. Vol. 252, No. 2-4, pp: 516-524.