

Prebiotic Effects of *Pleurotus Ostreaus* on Biochemical Parameters of Serum of Tilapia (*Oreochromis Niloticus*) Exposed to Silver nitrate (AgNO_3)

Farahnaz Kakavand¹, Maryam Rezaei Shadegan^{2*}, Atefeh Iri¹, Aliakbar Hedayati³

¹ Graduate of MSc in Aquatic Ecology, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

² Ph.D. student in Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

³ Associate Professor of Fisheries and Aquatic Ecology, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Received: 3 May 2021 Accepted: 2 July 2021

Abstract

Background and Aim: Inadequate quality of water and the presence of contaminants such as silver nitrate in water can cause stress in fish and endanger their life by reducing the immune system function. The aim of this study was to determine the effect of different prebiotic levels of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on some immune parameters of tilapia serum exposed to silver nitrate toxin.

Methods: 120 tilapia were treated for 42 days in 4 groups with 3 replications (n=10). These groups were 1) control, no oyster mushroom prebiotics, 2) food containing 0.05%, 3) food containing 0.1% and 4) food containing 0.2% prebiotic oyster mushrooms. Silver nitrate toxin with a concentration of 0.5 ppm was added to each group for 16 days. Finally, the biochemical parameters of fish in serum were measured.

Results: Serum biochemical parameters in the control group were significantly different from the groups fed with oyster mushrooms (0.05, 0.1 and 0.2% oyster mushroom prebiotics) that were exposed to silver nitrate toxin ($P < 0.05$). The use of oyster mushrooms prebiotics had a positive effect on serum biochemical parameters; more effects were observed on AST, albumin, glucose and total protein levels.

Conclusion: This study showed that the level of 0.2% prebiotic oyster mushroom can partially neutralize the effect of silver nitrate toxin in tilapia.

Keywords: Prebiotic, Silver nitrate, Tilapia, *Pleurotus ostreatus*.

*Corresponding author: Maryam Rezaei Shadegan, Email: rezaie.m26@gmail.com
Address: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

اثرات پریبوتیک قارچ صدفی (*Pleurotus ostreatus*) بر پارامترهای بیوشیمیایی سرم خون بچه ماهی تیلایا (*Oreochromis niloticus*) در مواجهه با نیترات نقره

فرحناز کاکاوند^۱، مریم رضایی شادگان^{۲*}، عاطفه ایری^۱، سیدعلی اکبر هدایتی^۳

^۱ دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بوم‌شناسی آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
^۲ دانشجوی دکتری تخصصی تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
^۳ دانشیار گروه تولید و بهره‌برداری آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۰۲/۱۳ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۰۴/۱۱

چکیده

زمینه و هدف: کیفیت نامناسب آب و وجود آلاینده‌هایی همچون نیترات نقره در آب می‌تواند باعث ایجاد استرس در ماهیان شده و با کاهش عملکرد ایمنی ماهیان سبب به خطر افتادن سلامتی آنها گردد. هدف از انجام مطالعه حاضر تعیین تأثیر سطوح مختلف پریبوتیک قارچ صدفی (*Pleurotus ostreatus*) بر شاخص‌های ایمنی سرم ماهی تیلایا مواجه شده با سم نیترات نقره بود.

روش‌ها: تعداد ۱۲۰ بچه ماهی تیلایا به مدت ۴۲ روز در ۴ گروه آزمایشی (هر گروه: ۱۰ عدد ماهی) با ۳ تکرار شامل تیمار ۱) شاهد، فاقد پریبوتیک قارچ صدفی، تیمار ۲) غذای حاوی ۰/۰۵، تیمار ۳) غذای حاوی ۰/۱ و تیمار ۴) غذای حاوی ۰/۲ درصد پریبوتیک قارچ صدفی تقسیم شدند. به هر کدام از گروه‌ها غلظت ۰/۵ ppm سم نیترات نقره به مدت ۱۶ روز اضافه گردید. در پایان شاخص‌های بیوشیمیایی ماهیان در سرم سنجش شد.

یافته‌ها: شاخص‌های بیوشیمیایی سرم در گروه‌های تغذیه شده با قارچ صدفی (۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ درصد پریبوتیک قارچ صدفی) که در معرض سم نیترات نقره بودند، با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند ($P < 0.05$). استفاده از قارچ صدفی اثر مثبتی بر شاخص‌های بیوشیمیایی سرم داشت و در میان این شاخص‌ها؛ بر سطح آنزیم AST، آلومین، گلوکز و پروتئین کل اثرات بهتری را نشان داد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که سطح ۰/۲ درصد پریبوتیک قارچ صدفی، می‌تواند تا حدی اثر سم نیترات نقره را در ماهی تیلایا خنثی کند.

کلیدواژه‌ها: پریبوتیک، نیترات نقره، ماهی تیلایا، قارچ صدفی.

*نویسنده مسئول: مریم رضایی شادگان. پست الکترونیک: rezaie.m26@gmail.com

آدرس: دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

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. آلاینده‌ها در نهایت می‌توانند وارد زنجیره غذایی و بدن انسان شده و آسیب‌های ایمنی زیادی را در پی داشته باشند (۱). لذا شناخت اثرات متقابل عوامل استرس‌زا 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 محیط زیست یاری می‌کند. نیترات نقره به‌عنوان عامل ایجادکننده گروه‌های فعال اکسیژنی (ROS)، شناخته شده و به وسیله مکانیسم‌های متنوع به سلول آسیب می‌رساند (۲). این یون به‌صورت طبیعی در آب‌های سطحی وجود دارد و فعالیت‌های بشری سبب افزایش سطوح نیترات نقره در اکوسیستم‌های آبی می‌شوند (۳).

توسعه روزافزون آبی‌پروری منجر به افزایش تقاضا در به‌کارگیری 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 پریبیوتیک‌ها هستند (۴). استفاده از پریبیوتیک‌ها موجب بهبود عملکرد ایمنی، فیزیولوژی روده و کاهش پاسخ‌های آلرژیک می‌شود (۵،۶). از متداول‌ترین قارچ‌های پرورشی در جهان قارچ صدفی *Pleurotus spp* است. در طول سال‌های گذشته استفاده از پریبیوتیک و سایر افزودنی‌ها (که در بالا بردن ایمنی مصرف‌کنندگان نقش اساسی داشته‌اند) افزایش یافته است، به‌طوری‌که اثرات مثبت و فراوان این مواد در انواع جانداران ثابت شده است. افزایش تحریک پاسخ‌های ایمنی با مکمل‌های غذایی مانند قارچ خوراکی می‌تواند از اهمیت بالایی در منابع آبی برخوردار باشد (۷-۸). Kaya و همکاران تحقیقی به‌منظور ارزیابی اثر قارچ صدفی (*Pleurotus ostreatus*) به‌عنوان یک افزودنی در جیره غذایی گربه‌ماهی (*Silurus asotus*) انجام دادند، بررسی‌ها نشان داد که دوزهای متفاوتی از جیره غذایی فوق می‌تواند تأثیر مثبتی بر رشد و ایمنی گربه‌ماهی داشته باشد (۹). خدادادیان زو و همکاران در مطالعه‌ای اثرات استفاده از پودر قارچ *Agaricus bisporus* به‌عنوان مکمل غذایی در جیره را بر ایمنی موکوس پوست و بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی موکوسی و سرمی در بچه ماهی کپور معمولی بررسی کردند. نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از پودر قارچ در جیره تأثیر مثبتی بر افزایش بیان ژن‌های درگیر در ایمنی دارد که قارچ را به‌عنوان یک منبع پریبیوتیکی مهم مورد تأیید قرار می‌دهد (۱۰). سپهرفر و همکاران تأثیر استفاده مجزا و توأم پریبیوتیک *Pediococcus acidilactici* و پودر *Agaricus*

bisporus بر شاخص‌های ایمنی موکوس و هیستومورفولوژی روده در بچه ماهی کپور معمولی را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد جیره غذایی دارای مکمل‌های غذایی فوق، موجب بهبود شاخص‌های ایمنی موکوس شدند (۱۱).

با توجه به ماهیت اغلب سموم و آلاینده‌های زیست-محیطی، این ترکیبات به راحتی از سد دفاعی بدن آبیان گذشته و وارد خون می‌شوند و از طریق خون به بخش‌های مختلف بدن انتقال می‌یابند. مطالعه پارامترهای بیوشیمیایی خون به‌عنوان بیومارکرها (نشانه‌گر زیستی) عموماً به یک شاخص قابل سنجش از برخی شرایط بیولوژیک یا زیستی اشاره دارد. زیست‌نشانه‌ها اغلب با بررسی فرآیندهای طبیعی زیستی، فرآیندهای پاتوژن یا پاسخ دارویی به یک درمان ویژه ارزیابی می‌شوند، از جمله مهم‌ترین شاخص‌های زیستی شاخص‌های خون‌شناسی، بیوشیمیایی، هورمونی و بافتی است (۱۲). تحقیقات محققین نشان داده از جمله فاکتورهای موجود در سرم خون که میزان آنها در اثر سموم مختلف دچار تغییر می‌گردد آنزیم‌هایی از قبیل لاکتات دهیدروژناز، کولین استراز، آلکالین فسفاتاز و آسپاراتات آمینوترانسفراز است (۱۳-۱۶).

مطالعات انجام شده نشان داده که 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 گردد. با توجه به ورود فلزات سنگین به اکوسیستم‌های آبی به‌عنوان آلاینده و در نظر گرفتن اثرات مثبت پریبیوتیک قارچ صدفی بر ارتقای ایمنی و افزایش شاخص‌های رشد و برخی از شاخص‌های خون‌شناسی و بافتی آبیان، در مطالعه حاضر، به بررسی جنبه‌های بیوشیمیایی ایمنی اثرات نیترات نقره بر ماهی تیلاپیا پرداخته شد و امکان مقاوم سازی ماهی تیلاپیا در مقابل اثرات نیترات نقره با استفاده از پودر قارچ صدفی (*pleurotus ostreatus*) مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها

مطالعه حاضر در پاییز ۱۳۹۷ در مرکز تحقیقات آبی‌پروری شهید ناصر فضلی برآبادی دانشکده شیلات دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان به مدت ۴۲ روز انجام شد. ابتدا ۱۲۰ عدد بچه ماهی تیلاپیا نیل (*Oreochromis niloticus*) با میانگین وزنی حدود ۲۰ گرم از مرکز خصوصی تکثیر و پرورش تهیه شد و پس از انتقال به سالن پرورش به مدت یک هفته سازگاری اولیه با تنظیم کیفیت مطلوب و بهینه برای بچه ماهی تیلاپیای نیل صورت پذیرفت. پس از عادت دهی بچه ماهی‌ها، با تراکم ۱۰ عدد در وان‌های فایبرگلاس ۱۰۰ لیتری ذخیره‌سازی شدند. بچه ماهیان با غذای تجاری کپور به میزان ۳ درصد وزن بدن در ۲ نوبت (صبح و عصر) تغذیه شدند (جدول ۱-۱۷). در طی دوره آزمایش،

فاکتورهای فیزیوشیمیایی آب شامل اکسیژن محلول ۷-۹ میلی گرم، و دمای ۲۸-۲۵ درجه سانتی گراد، بصورت ثابت حفظ شد. غذای مورد استفاده در این پژوهش حاوی پریوتیک به عنوان مکمل غذایی بود که به این منظور از ۵۰۰ گرم قارچ صدفی (*Pleurotus ostreatus*) (بخش خصوصی بازار محلی گرگان) استفاده شد. جهت کاهش رطوبت قارچ‌های خریداری شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق در سینی نگهداری شد. پس از آن، در آن (مدل Binder، آلمان) با دمای ۴۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲ روز خشک گردید سپس قارچ‌ها با آسیاب (Parses، ایران) پودر شده و به همراه ژلاتین به جیره تجاری کپور اضافه گردید (۱۸). در این

مطالعه ۴ گروه آزمایشی (هر گروه حاوی ۱۰ عدد ماهی) با ۳ تکرار (شامل: تیمار ۱) شاهد، غذای 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 تعیین شد (۱۸) و بچه ماهیان به مدت ۴۵ روز تغذیه شدند. سپس بچه ماهیان، به مدت ۱۶ روز در مجاورت سم نیترات نقره (شرکت سیگما) با غلظت ۰/۵ قسمت در میلیون قرار گرفتند (۱۹). روزانه ۵۰ درصد حجم آب تانک‌ها به دلیل حفظ کیفیت آب تعویض شد و غلظت سم در تمام تیمارها ثابت بود.

جدول-۱. درصد ترکیبات شیمیایی جیره تجاری مورد استفاده در تغذیه ماهیان کپور معمولی پرورشی (درصد ماده خشک)

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

نتایج

آسپاراتات آمینو ترانسفراز (AST): میزان AST خون

در اثر تیمارهای تغذیه شده با قارچ صدفی *P. ostreatus* در تیمار ۰/۰۵ درصد قارچ صدفی در مقایسه با گروه کنترل افزایش و در تیمارهای ۰/۱ درصد و ۰/۲ درصد در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت که معنی‌دار نبود. همچنین سطح این شاخص در تیمار در معرض سم نیترات نقره در مقایسه با گروه شاهد افزایش داشت که معنی‌دار نبود و در تیمارهای ترکیبی سم نیترات نقره و قارچ صدفی در مقایسه با گروه شاهد (سم زده) به صورت معنی‌دار کاهش یافت (شکل-۱).

آلانین آمینوترانسفراز (ALT): میزان ALT سرم خون در

اثر تیمارهای تغذیه شده با قارچ صدفی *P. ostreatus* در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت که معنی‌دار نبود. سطح این شاخص در تیمار در معرض سم نیترات نقره در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت که معنی‌دار بود. همچنین در تیمار ترکیبی ۰/۱ درصد سم نیترات نقره و قارچ صدفی در مقایسه با گروه شاهد (سم زده) به صورت معنی‌داری افزایش یافت (شکل-۲).

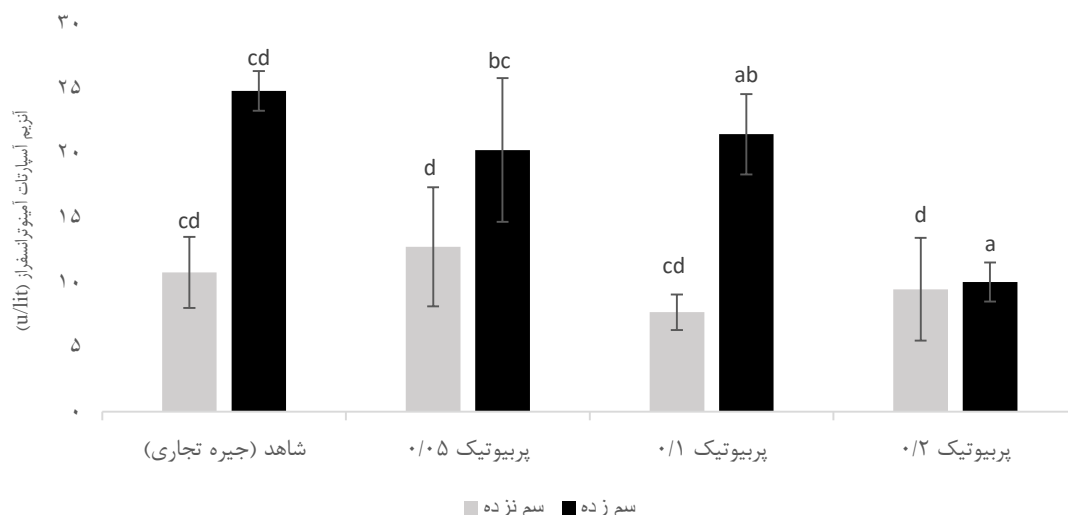
آلکالین فسفاتاز قلیایی (ALP): میزان ALP سرم خون

در اثر تیمارهای تغذیه شده با قارچ صدفی *P. ostreatus* در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت که معنی‌دار نبود. در تیمار در معرض سم نیترات نقره در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافت که معنی‌دار نبود و در تیمارهای ترکیبی سم نیترات نقره و قارچ صدفی در مقایسه با گروه شاهد (سم زده) افزایش یافت که معنی‌دار نبود. همچنین سطح این شاخص در تیمارهای ترکیبی قارچ صدفی و سم نیترات نقره در مقایسه با تیمارهای مجزای قارچ صدفی پایین‌تر بود (شکل-۳).

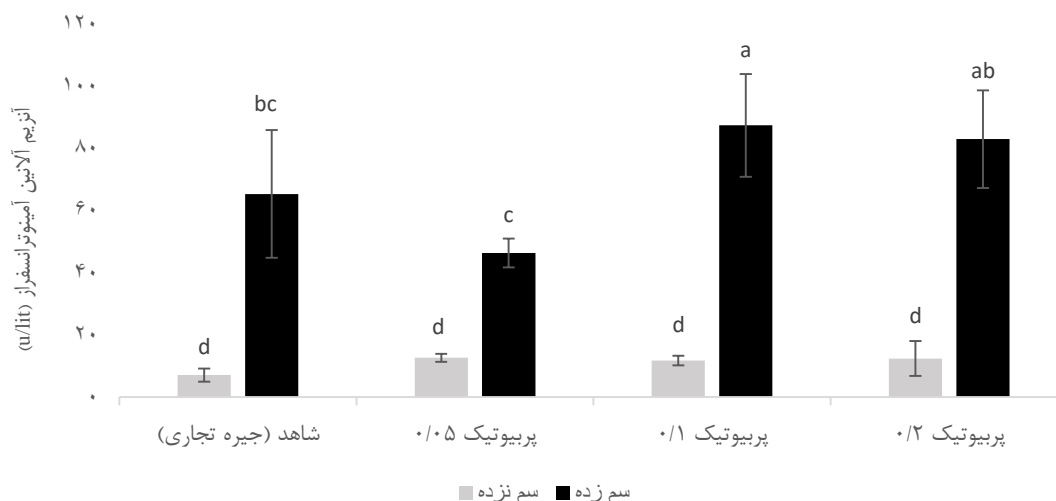
پس از اتمام دوره تغذیه و مواجهه، نمونه برداری از ماهی‌ها با تراکم ۳ قطعه از هر تکرار از تیمارها به صورت تصادفی انتخاب شد. بچه ماهیان قبل از خون‌گیری با استفاده از پودر گل میخک (۲۲۰ میلی گرم بر لیتر) بیهوش شدند، نمونه‌گیری از ماهیان جهت آزمایش‌های خونی در انتهای دوره پرورش صورت گرفت. ۲۴ ساعت قبل از خون‌گیری، تغذیه ماهیان قطع شد و سپس ۳ عدد ماهی (۳ ماهی به ازای هر تکرار) به ظاهر سالم به‌طور تصادفی انتخاب شد و از ورید ساقه دمی آنها با سرنگ ۲/۵ سی‌سی حاوی هپارین خون‌گیری به عمل آمد سپس به داخل تیوب‌های استریل ریخته شده تا توسط سانتیفریوژ (آلمان، HettichT Tuttlingen D-7200) با دور ۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سرم آن جدا شود و در آزمایشگاه تا زمان اندازه‌گیری در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردد (۷).

برای اندازه‌گیری شاخص‌های بیوشیمیایی سرم و آنزیم‌های کبدی آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST)، آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) به روش رنگ سنجی کینتیک و از کیت‌های تجاری پارس آزمون توسط دستگاه‌های اتوآنالیزور مخصوص استفاده گردید (۲۱). به منظور اندازه‌گیری شاخص ایمنوگلوبولین از روش الیزا با دستگاه (statfax2100 USA, Awareness، استفاده شد، آلبومین به روش بروموکرزول کرین، توتال پروتئین به روش بیوره (Biuret)، و گلوکز به روش آنزیماتیک (glucose oxidase) اندازه‌گیری شد (۲۲).

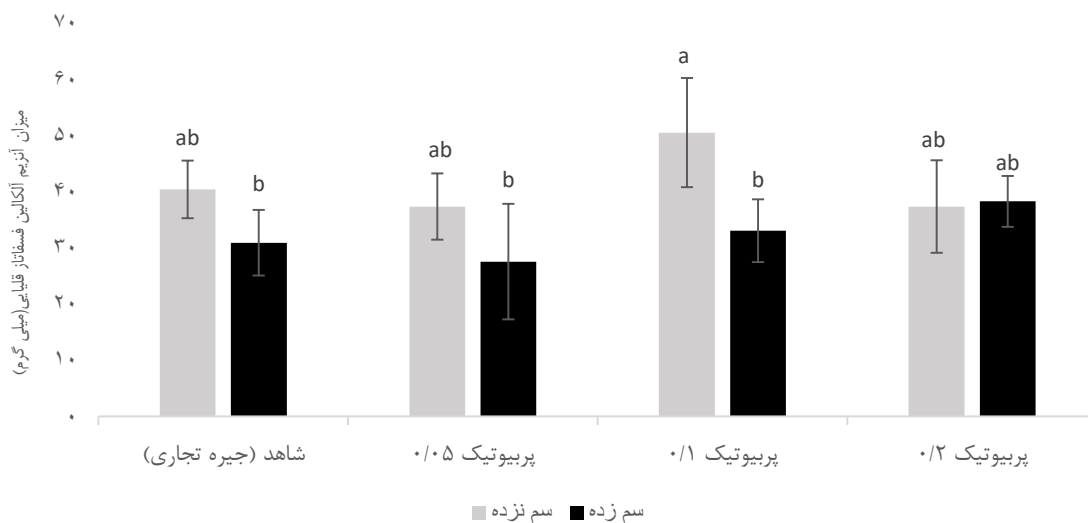
تجزیه و تحلیل آماری: داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (one-way ANOVA) و آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncan's Multiple Range Test) در سطح احتمال (P<۰/۰۵) انجام شد. تمامی آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS (ویرایش ۲۲) انجام شد.



شکل-۱. میزان آسپاراتات آمینو ترانسفراز (AST) سرم خون ماهی تیلاپیا در تیمارهای مختلف آزمایشی. حروف لاتین متفاوت، نشانگر اختلاف معنی دار بین تیمارهای آزمایشی است ($P < 0.05$).



شکل-۲. میزان آلانین آمینوترانسفراز (ALT) سرم خون ماهی تیلاپیا در تیمارهای مختلف آزمایشی. حروف لاتین متفاوت، نشانگر اختلاف معنی دار بین تیمارهای آزمایشی است ($P < 0.05$).



شکل-۳. میزان آلکالین فسفاتاز قلبایی (ALP) سرم خون ماهی تیلاپیا در تیمارهای مختلف آزمایشی. حروف لاتین متفاوت، نشانگر اختلاف معنی دار بین تیمارهای آزمایشی است ($P < 0.05$).

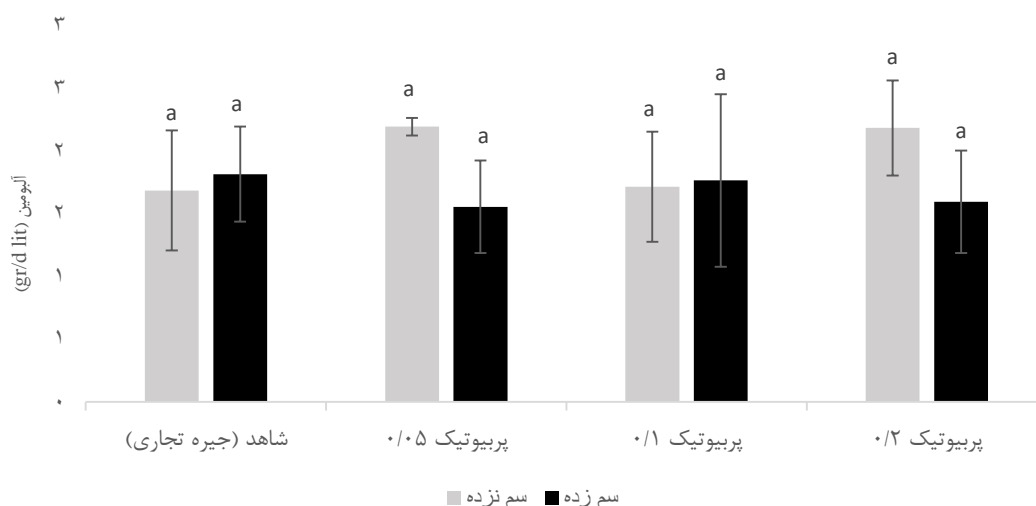
درصد قارچ صدفی به طور معنی‌داری افزایش یافت. میزان این شاخص در تیمار در معرض سم نیترات نقره نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشت. در تیمارهای ترکیبی سم نیترات نقره و قارچ صدفی با افزایش غلظت میزان این شاخص نسبت به تیمار شاهد سم خورده افزایش یافت که معنی‌دار نبود (شکل-۶).

گلوکز: میزان گلوکز سرم خون در اثر تیمارهای تغذیه شده با قارچ صدفی *P. ostreatas* با افزایش غلظت قارچ کاهش یافت که معنی‌دار نبود. میزان این شاخص در تیمار در معرض سم نیترات نقره نسبت به گروه شاهد کاهش یافت که معنی‌دار نبود. در تیمارهای ترکیبی سم نیترات نقره و قارچ صدفی، میزان این شاخص نسبت به تیمار شاهد سم خورده بطور معنی‌دار کاهش یافت. همچنین سطح این شاخص در تیمارهای ترکیبی قارچ صدفی و سم نیترات نقره در مقایسه با تیمارهای مجزای قارچ صدفی پایین‌تر بود (شکل-۷).

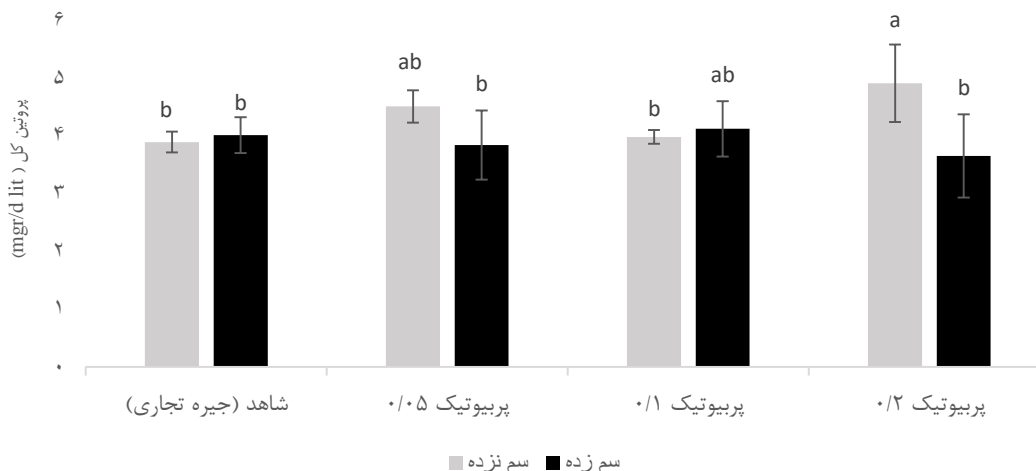
آلبومین: سطح آلبومین سرم خون در تیمارهای تغذیه شده با قارچ صدفی *P. ostreatas* با افزایش غلظت قارچ در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت که معنی‌دار نبود. همچنین در تیمار در معرض سم نیترات نقره در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت که معنی‌دار نبود و در تیمارهای ترکیبی سم نیترات نقره و قارچ صدفی در مقایسه با گروه شاهد (سم زده) کاهش یافت و این کاهش معنی‌دار نبود (شکل-۴).

پروتئین کل: میزان پروتئین کل سرم خون در اثر تیمارهای تغذیه شده با قارچ صدفی *P. ostreatas* با افزایش غلظت قارچ به طور معنی‌داری افزایش یافت. میزان این شاخص در تیمار در معرض سم نیترات نقره نسبت به گروه شاهد افزایش یافت که معنی‌دار نبود و همچنین در تیمارهای ترکیبی سم نیترات نقره و قارچ صدفی، سطح این شاخص افزایش یافت اما معنی‌دار نبود (شکل-۵).

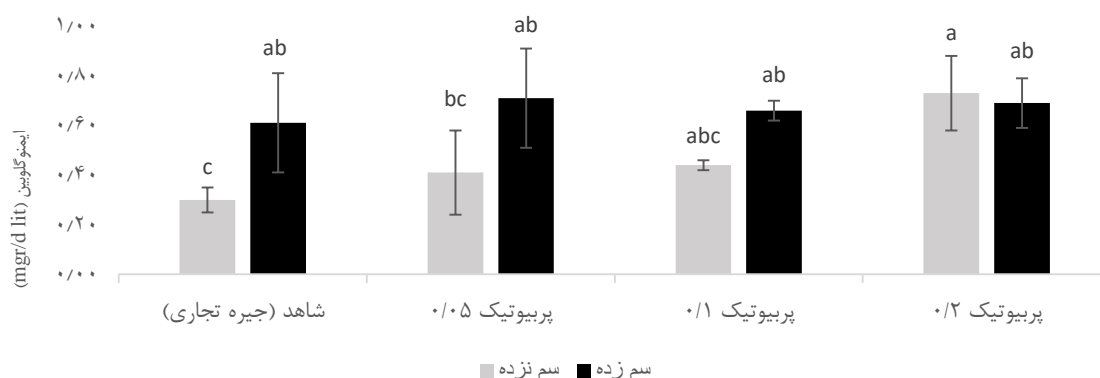
ایمونوگلوبولین: میزان ایمونوگلوبولین سرم خون در اثر تیمارهای تغذیه شده با قارچ صدفی *P. ostreatas* در سطح ۰/۲



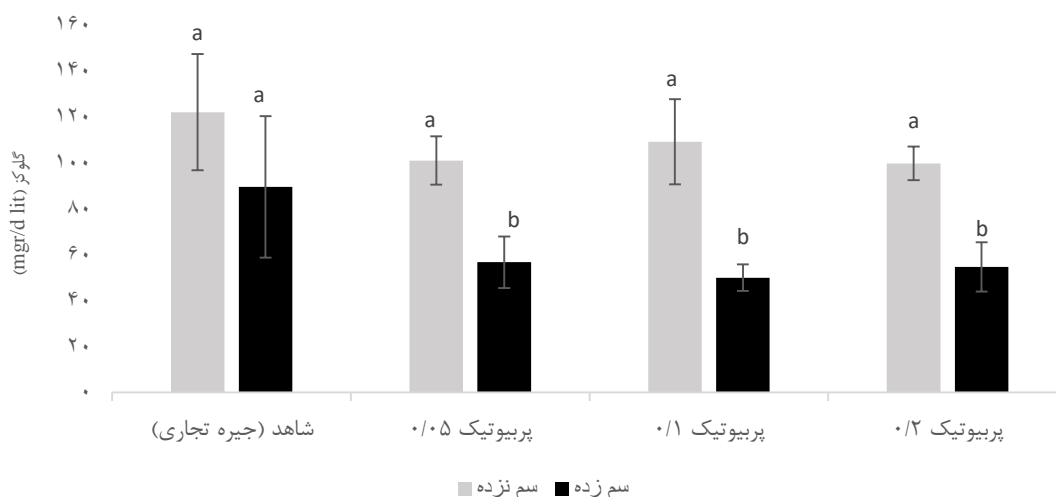
شکل-۴. میزان آلبومین سرم خون ماهی تیلپایا در تیمارهای مختلف آزمایشی. حروف لاتین متفاوت، نشانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای آزمایشی است ($P < 0.05$).



شکل-۵. میزان پروتئین کل سرم خون ماهی تیلپایا در تیمارهای مختلف آزمایشی. حروف لاتین متفاوت، نشانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای آزمایشی است ($P < 0.05$).



شکل-۶. میزان ایمونوگلوبولین سرم خون ماهی تیلاپیا در تیمارهای مختلف آزمایشی. حروف لاتین متفاوت، نشانگر اختلاف معنی دار بین تیمارهای آزمایشی است ($P < 0.05$).



شکل-۷. میزان گلوکز سرم خون ماهی تیلاپیا در تیمارهای مختلف آزمایشی. حروف لاتین متفاوت، نشانگر اختلاف معنی دار بین تیمارهای آزمایشی است ($P < 0.05$).

پلاسما شامل پروتئین‌های آلبومین و گلوبولین است. تصور می‌شود که افزایش میزان آلبومین، گلوبولین و پروتئین سرم بیشتر در ارتباط با تحریک سیستم ایمنی غیراختصاصی می‌باشد. پروتئین خون از اساسی‌ترین اجزای متابولیسم در آبزیان است و غلظت کل پروتئین موجود در پلاسما خون به عنوان یک شاخص بالینی در سنجش میزان سلامتی، استرس و وضعیت بدنی ارگان‌های آبی بکار برده می‌شود و سنجش مقدار پروتئین خون می‌تواند آسیب‌های سلولی را پیش‌بینی کند (۲۵). مطابق نتایج تحقیق حاضر، فروردین و همکاران در بررسی اثرات گالاکتولایگوساکارید بر روی ماهی قرمز به این نتیجه رسیدند که جیره حاوی گالاکتولایگوساکارید باعث افزایش معنی‌دار پروتئین کل می‌شود (۲۶) که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد. غنی و همکاران در بررسی اثرات جلبک پادینا بر مقاوم سازی ماهی کپور معمولی در مواجهه با نانوآکسیدروری به این نتیجه رسیدند که جلبک پادینا می‌تواند باعث افزایش معنی‌دار پروتئین کل شود و اثر کاهشی نانوآکسید روی را بهبود بخشد که

بحث

وجود آلاینده‌ها در اکوسیستم‌های آبی سبب آسیب‌های بافتی در ماهیان می‌شود که این آسیب‌ها و عوارض را با روش‌های هیستوپاتولوژی و شاخص‌های بیوشیمیایی می‌توان بررسی کرد (۲۳). شاخص‌های بیوشیمیایی در ماهی نشانگر خوبی از استرس شدید است و اطلاعاتی از اختلال عملکرد اندام‌ها ارائه می‌دهد. پروتئین، شاخص مهمی از وضعیت سلامت ماهیان استخوانی است و به عنوان شاخصی از وضعیت تغذیه‌ای در نظر گرفته می‌شود (۲۴). در مطالعه حاضر، میزان پروتئین کل سرم خون در تیمارهای مجزای تغذیه شده با قارچ صدفی *P. ostreatus* و سم به طور معنی‌داری افزایش یافت. همچنین سطح آن در تیمارهای ترکیبی قارچ صدفی و سم نیترا نقره افزایش داشت که معنی‌دار نبود. به نظر می‌رسد پریبیوتیک قارچ صدفی توانسته اثر کاهشی سم نیترا نقره را بهبود بخشد و به حد شاهد و بیشتر از گروه شاهد برساند که تیمار ۰/۲ درصد قارچ صدفی بهترین اثر را داشت. پروتئین کل

گلوکز خون نشان دهنده اختلال در متابولیسم گلوکز و لیپید و تخریب گلیکوژن در کبد است (۳۴).

آنزیم‌های کبدی به عنوان شاخص فعالیت کبدی محسوب می‌شوند و تغییر در میزان فعالیت و ترشح آنها می‌تواند متأثر از فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب، تراکم، شرایط پرورشی، نوع جیره مصرفی، سن، جنس و وضعیت سلامت ماهیان باشد (۳۵). نتایج این تحقیق نشان داد که در مجموع تیمارهای آزمایشی بر میزان اسپاراتات آمینوترانسفراز (AST)، آلکالین فسفاتاز (ALP)، آلانین ترانس آمیناز (ALT) سرم خون ماهی تأثیر معنی‌داری دارد (P < ۰/۰۵). از آنجایی که کبد اندامی است که متابولیسم اولیه مواد غیرزیستی را انجام می‌دهد و با تغییر در ساختار مورفولوژیک این مواد، در برخی موارد، سم زدایی می‌نماید، تأثیر آلاینده‌گی فلزات به صورت افزایش یا کاهش فعالیت آنزیم‌های کبدی و ایجاد تغییرات هیستوپاتولوژیک کبدی بروز می‌کند. به همین دلیل در ارزیابی آسیب کبد، سنجش سطوح آنزیم‌های نظیر ALT، ALP، AST به طور وسیع مورد استفاده قرار می‌گیرد (۷). وقوع نکروز یا آسیب غشای سلول باعث رها شدن این آنزیم‌ها به گردش خون می‌شود (۳۶). ALT به طور عمده در کبد وجود دارد و برای کبد اختصاصی‌تر از AST است. در جریان آسیب حاد، آنزیم‌های ALT و AST حساس‌ترین نشانگرهای سرمی هستند. هرگاه غشای سلول صدمه ببیند هر دو آنزیم به مقادیر فزاینده‌ای در خون آزاد می‌شوند (۳۷). افزایش سطح AST در سرم می‌تواند به علت آسیب کبد نظیر هیپاتیت‌های ویروسی، انفارکتوس قلبی و صدمات عضلانی باشد. ALT که تبدیل آلانین به پیرووات و گلوکاتامات را کاتالیز می‌کند، برای کبد اختصاصی‌تر بوده و پارامتر مناسب‌تری برای تشخیص آسیب کبد است. سطوح افزایش یافته آنزیم‌های سرمی حاکی از نشت سلولی بوده و نشانگر آسیب ساختار و اختلال عملکرد غشاهای سلولی در کبد می‌باشد (۳۸). یکی از دلایل افزایش سطح سرمی این آنزیم‌ها ممکن است تغییر در نفوذپذیری غشای پلاسمایی سلول‌های کبدی یا صدمات سلولی حاصل از قرار گرفتن در معرض سموم باشد (۳۹).

حاتمی و همکاران با بررسی اثرات سمیت سلولی کلرپیریفوس و پلی اتیلن گلیکول (PEG) بر استرس اکسیداتیو و پارامترهای بیوشیمیایی در کپور معمولی افزایش سطح ALT و AST را گزارش کردند (۳۱) که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد. نعمت‌دوست و بنایی افزایش فعالیت ALT و AST در پلاسمای ماهی کپور معمولی در معرض ذرات ریز پلاستیک و پاراکوات را گزارش نمودند (۴۰) که با نتایج تحقیق حاضر همخوان است. رنگسامی و همکاران به این نتیجه رسیدند که فعالیت ALT و AST در گورخرماهی پس از قرار گرفتن در معرض داروی ضد التهاب کتوپروفن به طور قابل توجهی افزایش یافته است (۴۱). همچنین بنایی و همکاران نتایج مشابهی در ماهی کپور نقره‌ای در معرض دلتامترین، گزارش کردند (۴۲) که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد. Jaroli و

مطابق نتایج حاضر است (۲۷). در تحقیق حاضر میزان ایمونوگلوبین سرم خون در تیمارهای تغذیه شده با قارچ صدفی *P. ostreatas* و سم نیترات نقره به طور معنی‌داری افزایش یافت. در تیمارهای ترکیبی سم نیترات نقره و قارچ صدفی (سطح ۰/۰۲ درصد و ۰/۰۵ درصد)، میزان این شاخص نسبت به تیمار شاهد سم خورده افزایش یافت که با توجه به نتایج، به نظر می‌رسد قارچ صدفی توانسته اثر سم نیترات نقره را بهبود بخشد. ایمونوگلوبین‌ها جزو آنتی بادی‌های طبیعی بوده و به صورت کاملاً تنظیم شده در غیاب محرک آنتی‌ژنیک خارجی تولید و در برابر عوامل بیماری‌زا ایجاد می‌شود. به همین دلیل به عنوان یکی از بخش‌های مهم سیستم ایمنی غیراختصاصی ماهی مدنظر قرار می‌گیرد (۲۸). طی تحقیقی حسینی‌فر و همکاران به این نتیجه رسیدند که استفاده از گالاتکوالیگوساکارید و زابلوالیگوساکارید در جیره ماهی سفید باعث بهبود ایمونوگلوبین کل و شاخص‌های ایمنی می‌شود (۲۸) که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد. یوسفی و همکاران در بررسی اثرات گالاتکوالیگوساکارید و آفت کش کلرپیریفوس بر روی ماهی زبرا به این نتیجه رسیدند که جیره ترکیبی حاوی ۱٪ گالاتکوالیگوساکارید و آفت کش باعث افزایش پروتئین کل و ایمونوگلوبولین می‌شوند (۲۹) که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد. میزان آلبومین سرم خون در تحقیق حاضر در تیمارهای تغذیه شده با قارچ صدفی *P. ostreatas* و تیمار در معرض سم با افزایش غلظت قارچ در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت و در تیمارهای ترکیبی سم نیترات نقره و قارچ صدفی، کاهش یافت ولی معنی‌دار نبود. آلبومین نقش مهمی در ثبات فشار اسمزی به منظور توزیع مناسب مایعات بدن داشته و به عنوان حامل پلاسما و لیگاندهای غیراختصاصی عمل می‌نماید (۳۰). کاهش آلبومین ممکن است در اثر نارسایی کبدی، سندرم نفروتیک و اختلال در بیوسنتز آلبومین، سوء تغذیه، پاسخ‌های التهابی حاد و مزمن ایجاد شود (۳۱). بنایی و همکاران نشان دادند که سطح آلبومین و گلوبولین در ماهی‌های در معرض دیازینون کاهش می‌یابد (۳۰) که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد. میزان گلوکز سرم خون در تیمارهای تغذیه شده با قارچ صدفی *P. ostreatas* و تیمارهای در معرض سم و همچنین تیمارهای ترکیبی قارچ و سم با افزایش غلظت قارچ کاهش یافت که معنی‌دار نبود. بنابراین سطح این شاخص در تیمارهای ترکیبی قارچ صدفی و سم نیترات نقره در مقایسه با تیمارهای مجزای قارچ صدفی پایین‌تر بود این بدان معناست که قارچ صدفی در ترکیب با سم نیترات نقره توانسته است اثر سم را خنثی نماید یا بهبود بخشد. گلوکز یکی از نشانگرهای زیستی حساس در شرایط استرس است. به عبارت دیگر، در پاسخ به شرایط استرس‌زا، گلوکز خون افزایش می‌یابد. علاوه بر این، آسیب به کبد، اختلال عملکرد شدید کلیه و تجزیه ذخایر گلیکوژن در کبد و عضلات اسکلتی سطح گلوکز خون را افزایش می‌دهد (۳۲، ۳۳). افزایش قند خون یا افزایش سطح

تا بتوان با قطعیت بیشتری در مورد پتانسیل این پریبیوتیک در ماهی تیلاپیای نیل و سایر آبزیان اظهار نظر کرد.

نتیجه گیری

به نظر می‌رسد که تغییرات بیوشیمیایی ایجاد شده در سرم خون ماهی تیلاپیا پس از مواجهه با نیترات نقره در تحقیق حاضر، نوعی پاسخ فیزیولوژیک باشد که جاندار برای ممانعت از ورود این مواد به بدن خود و جلوگیری از آسیب‌های احتمالی از خود نشان می‌دهد. لذا احتمالاً مکانیسم اثر مثبت قارچ صدفی بر مقاومت در برابر نیترات نقره به دلایلی از قبیل بهبود پارامترهای ایمنی، پاسخ‌های آنزیمی و در نهایت مهار استرس اکسیداتیو می‌باشد.

تشکر و قدردانی: نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان به خاطر تأمین هزینه اجرای این تحقیق که بر گرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد است، قدردانی می‌نمایند.

نقش نویسندگان: همه نویسندگان در نگارش اولیه مقاله یا بازنگری آن سهیم بودند و همه با تأیید نهایی مقاله حاضر، مسئولیت دقت و صحت مطالب مندرج در آن را می‌پذیرند.

تضاد منافع: نویسندگان تصریح می‌کنند که هیچ گونه تضاد منافی در مطالعه حاضر وجود ندارد.

منابع

- Hedayati SA, Jahanbakhshi A, Qaderi F. Aquatic toxicology. Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources Publications. 2013; 70-76.
- Tarballi N, Bahavar M, Ainollahi N, Nabatchian F. The Effect of Silver Nitrate on Horseradish Peroxidase Activity. Feyz Scientific Research Journal, Kashan University of Medical Sciences. 2012; 16(7): 714-713.
- Abarqawi P, Hedayati SA, Ghorbani R, Kalangi Miandreh H, Bagheri I. Determination and Comparison of Lethal Toxicity of Silver Nanoparticles and Silver Nitrate-Silver Salt in Goldfish. Journal of Environmental Science and Technology, Islamic Azad University. 2016; 3(2): 429-438.
- Mahious AS, Gatesoupe FJ, Hervi M, Metailler R, Ollevier F. Effect of Dietary Inulin and Oligosaccharides as Prebiotics for Weaning Turbot (*Psetta maxima*). Journal of Aquaculture. 2005; 14 (3): 219-229. doi:10.1007/s10499-005-9003-4
- Khodadadi A, Haghghi A, Malekinezhad H, Tokmechi A, Afsharnasab M. The Effect of Salmanax Probiotic Supplement on Gill Tissue and Liver of Rainbow Trout in the Breeding Period and Experimental Exposure to Yersiniosis Disease.

Sharma اعلام کردند که کلریپریفوس در غلظت‌های ۲۰، ۱۰ و ۳۰ درصد LC₅₀ طی ۱۵ روز سبب افزایش فعالیت آلکالین فسفاتاز در *Channa punctatus* می‌شود که یافته‌های حاضر همسو با آن تحقیق است (۴۳). بر اساس گزارش Kaya و همکاران، فعالیت آلکالین فسفاتاز ماهی کپور معمولی (*C. carpio*) توسط فوزانول افزایش یافته که نتایج حاضر با یافته‌های آنها همخوانی دارد (۹). همچنین افزایش فعالیت این آنزیم ناشی از سم دیازینون در مولدین نر ماهی سفید (*R. frisii kutum*) (۴۴) و ماهی کپور معمولی (*C. carpio*) (۴۵) به اثبات رسیده که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد. اختلاف نتایج تغییرات آنزیمی در مطالعات مختلف احتمالاً ناشی از اختلاف نژاد و گونه ماهی، وزن ماهی، مقدار و زمان مواجهه با ماده سمی، و شرایط فیزیکی و شیمیایی آب است. بعلاوه، میزان تأثیر سم در یک گونه از ماهی می‌تواند تحت تأثیر فاکتورهای مختلف فردی و محیطی قرار گیرد (۴۲). در واقع یافته‌های مطالعه حاضر، تأییدی بر اثر مثبت پریبیوتیک قارچ صدفی بر شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون ماهی تیلاپیا در مواجهه با نیترات نقره است که توانست اثر مخرب نیترات نقره را بر این شاخص‌ها بهبود ببخشد. لیکن به نظر می‌رسد، ضروری است که به منظور حصول اطمینان از اثرات مثبت این پریبیوتیک مطالعه‌ای در خصوص تأثیر آن بر سطوح ایمنی در شرایط آزمایشگاهی و پرورشی انجام پذیرد. همچنین با توجه به نتایج و آزمون مواجهه، مصرف پریبیوتیک قارچ صدفی با غلظت بیشتر برای بررسی افزایش مقاومت در آبزیان مواجهه‌یافته با انواع آلاینده‌ها پیشنهاد می‌شود.

- Journal of Veterinary Clinical Pathology. 2019; 12(4): 337-355.
- Douglas LC, Sanders ME. Probiotics and Prebiotics in Dietetics Practice. Journal of the American Dietetic Association. 2008; 108(3): 510-521. doi:10.1016/j.jada.2007.12.009
- Kakavand F, Hedayati SA, Jafar A, Madah S, Rezaie Shadegan M. The Effect of Prebiotic Pretreatment on Hematological Characteristics of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to silver nanoparticles. Journal of Animal Physiology and Development. 2020;13(3):1-13.
- Wasser, S.P. Medicinal Mushrooms as a Source of Antitumor and Immunomodulating Polysaccharides. Journal of Microbiology and Biotechnology. 2002; 60(3): 258-274. doi:10.1007/s00253-002-1076-7
- Kaya H, ŞanverÇelik E, Yılmaz S, Tulgar A, Akbulut M, Demir N. Hematological, Serum Biochemical, and Immunological Responses in Common Carp (*Cyprinus carpio*) Exposed to Phosalone. Journal of Comparative Clinical Pathology. 2014; 89(4): 46-53.
- Khodadadian Zou H, Hoseinifar SH, Miandare HK, Hajimoradloo A. 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*. 2016; 58(5): 380-386. doi:10.1016/j.fsi.2016.09.050
11. Sepehrfar D, Hossieni far SH, Jafar Nodeh A. The Effect of Separate and Combined Use of Probiotics *Pediococcus acidilactici* and Prebiotics Raffinos on Mucosal Safety Indicators and Intestinal Histomorphology in Goldfish (*Carassius auratus*). *Journal of Animal Physiology and Development*, Islamic Azad University, Zanjan. 2018;12(1): 25-34
12. Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE. Fish Bioaccumulation and Biomarkers. *Journal of Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2003; 13 (2):57-149. doi:10.1016/S1382-6689(02)00126-6
13. Khoshbavar rostami H, Soltani M. Study of Some Hematological and Serum Biochemical Factors Beluga (*Huso huso*) After Long-term Exposure to the Pesticide Diazinon. *Journal of Fisheries of Iran*. 2006; 5(3): 53-66.
14. Banaee M, Mirvagefei AR, Rafei GR, MajaziAmiri B. Effect of Sublethal Diazinon Concentration on Blood Plasma Biochemistry. *Journal of Environmental Research* 2008;2(3): 189-198.
15. Banaee M, Nematdoust Haghi B, Ibrahim A. Sublethal Toxicity of Chlorpyrifos on Common carp, *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758): Biochemical Response. *Journal of Aquatic Biology*. 2013;1(6): 281-288.
16. Purgholam R, Esmaeili F, Farhumand L, Soltani, M, Yousefi P, Mehdad H. Evaluation of Blood Characteristics of Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*) after Exposure to Organophosphate Diazinon. *Journal of Fisheries of Iran* .2001;1(2): 1-18.
17. Jafar Nodeh A. Investigation of Specific Cinematic Properties of some Organic Acids with *Lactobacillus casei* in the Breeding of Finger Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Thesis, Faculty of Fisheries, Urmia University.2016; 120-124.
18. Akrami R, Qelichi A, Ahmadi A. Prebiotic Effect of Dietary Inulin on Hematological Parameters and Biochemistry of Fish Serum Hus (*Huso huso*) Young . *Journal of Veterinary Research*, University of Tehran. 2011;66(2):131-136.
19. Sevik S, Aktaş M, Dogan H, Koçak S. Mushroom Drying with Solar Assisted Heat Pump System. *J Energy Conversion Management*. 2013; 72(4): 171-178. doi:10.1016/j.enconman.2012.09.035
20. Hedayati SA, Darabitarbar F, Rezaie H. Examination of tissue Pathology of carp and ordinary goldfish (*Carassius auratus*) in the face of lethal Concentrations of Zinc Nanofibers, copper nanocoxes (CuONPs) and titanium oxide nanoparticles (TiO₂NPs). *Journal of Veterinary Clinical Pathology*, 2017; 11 (2): 135-144.
21. Shahsavani D, Mohri M, Gholipour Kanani H. Determination of normal values of some blood serum enzymes in *Acipenser stellatus* Pallas. *Fish Physiology Biochem*. 2010; 36(3):39-43. doi:10.1007/s10695-008-9277-3
22. Asadi F, Hallajian A, Asadian P, Shahriari A, Pourkabir M . Serum lipid, free fatty acid, and proteins in juvenile sturgeons: *Acipenser persicus* and *Acipenser stellatus*. *Journal of Comparative Clinical Pathology*. 2009; 18(3):287-289. doi:10.1007/s00580-008-0797-0
23. Mazandarani M, Sodagar M, Namrodi S. Histopathology of kidney, liver and gills of common carp (*Cyprinus carpio*) in acute exposure to copper sulfate. *Scientific Journal of Aquatic Ecology*, Hormozgan University. 2015;5(1):9-16.
24. Yousefian M, Sheikholeslami M, Amiri M, Hedayadifard AA, Dehpour H, Fazli M, et al. Serum biochemical parameters of male and female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cultured in Haraz River, Iran. *World Journal of Fish and Marine Sciences*. 2010; 2 (4): 512-518.
25. Riche M. Analysis of Refractometry for Determining Total Plasma Protein in Hybrid Striped Bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*) at Various Salinities. *Journal of Aquaculture*. 2006; 26(4): 279-284. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.12.018
26. Farvardin Sh, Kalangi Miandareh H, Shabani A, Hosseinifar H, Ramazanpour P. Effects of Galactvaligosaccharide Diets on Gene Expression Involved in Appetite (Ghrelin) and Some Parameters of Serum Safety and Growth of Goldfish (*Carassius Auratus* Gibelio). *Journal of New Technologies in Aquaculture Development*. 2016; 17 (4): 123-132.
27. Ghani S, Madah S, Hedayati A, Kakavand F, Eri A, Sancholi H, et al. The Effect of Diet Enrichment with Padina Alga (*Padina Astraulis* Haunk) on Blood Serum Safety Indicators of Common Carp (*Cyprinus Carpio*) in the Face of Zinc Nanoxide, *Iranian Journal of Fisheries*. 2018;28 (5): 121-129.
28. Hoseinifar SH, Sharifian M, Vaseghi MJ, Khalili M, Esteban MA. The Effects of Dietary Xylooligosaccharide on Mucosal Parameters, Intestinal Microbiota and Morphology and Growth Performance of Caspian White Fish (*Rutilus Ffrisii* Kutum) fry. *Journal of Fish and Shellfish Immunology*. 2014; 39(2): 231-236. doi:10.1016/j.fsi.2014.05.009
29. Yousefi S, Hoseinifar SH. Protective Effects of Prebiotic in Zebrafish, *Danio Rerio*, Under Experimental Exposure to Chlorpyrifos. *Journal of Aquaculture*. 2018;6(2): 49-54.
30. Rezaei Shadegan M, Banaee M. Effects of Dimethoate alone and in Combination with Bacilar Fertilizer on Oxidative Stress in Common Carp, *Cyprinus Carpio*. *Journal of Chemosphere*. 2018; 208 (2):101-107. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.05.177
31. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. *Harper's Illustrated Biochemistry*, 26 edition, Lange Medical Books/McGraw-Hill, Medical Publishing Division, 2003; 702 pp.
32. Banaee M, Sureda A, Mirvagefei AR, Ahmadi K. Effects of Diazinon on Biochemical Parameters of Blood in Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*). *Journal of Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2011; 99(1): 1-6. doi:10.1016/j.pestbp.2010.09.001
33. Hatami M, Banaee M, Nematdoust Haghi B. Sublethal Toxicity of Chlorpyrifos Alone and in Combination with Polyethylene Glycol to Common

- Carp (*Cyprinus Carpio*). *J Chemosphere*. 2019; 219 (6): 981-988. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.12.077
34. Mahmoudi N, Abedian Kanari A, Soltani M. Dietary Effects of Different Levels of Nucleotide on Growth, Survival and Liver Enzymes of Caspian Sea *Salmo Trutta Caspicus*. *Journal of Fisheries*. 2008;17 (4): 123-132.
35. Park EJ, Bae E, Yi J, Kim Y, Choi K, Lee SH. Repeated-dose Toxicity and Inflammatory Responses in Mice by Oral Administration of Silver Nanoparticles. *Journal of Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2010;30(2): 162-168. doi:10.1016/j.etap.2010.05.004
36. Radghar N. *Clinical Biochemical Interpretation*. Arman Publications. First Edition. 2011; 740pp.
37. Drotman R, Lawhan G. Serum Enzymes are Indications of Chemical Induced Liver Damage. *Journal of Drug and Chemical Toxicology*, 1987; 1(4): 163-171. doi:10.3109/01480547809034433
38. Christ-Crain M, Meier Cpuder J, Staub J, Huber P, Keller U. Changes in Liver Function Correlate with the Improvement of Lipid Profile after Restoration of Euthyroidism Inpatients with Subclinical Hypothyroidism. *Experimental and Clinical Sciences: International Online Journal for Advances in Science*. 2004; 3(5):1-9.
39. Nematdoost Haghi B, Banaee M. Effects of Micro-plastic Particles on Paraquat Toxicity to Common Carp (*Cyprinus carpio*): Biochemical Changes. *Journal of Environmental Science Technology*. 2017; 14 (3), 521-530. doi:10.1007/s13762-016-1171-4
40. Rangasamy B, Hemalatha D, Shobana C, Nataraj B, Ramesh M. Developmental Toxicity and Biological Responses of Zebrafish (*Danio Rerio*) Exposed to Anti-inflammatory Drug Ketoprofen. *Journal of Chemosphere*. 2018; 213(4): 423-433. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.09.013
41. Ullah S, Li Z, Ul Arifeen MZ, Khan SU, Fahad S. Multiple Biomarkers Based Appraisal of Deltamethrin Induced Toxicity in Silver Carp (*Hypophthalmichthys Molitrix*). *Journal of Chemosphere*.2019; 214(4): 519-533. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.09.145
42. Banaee M, Sureda A, Zohiery F, Hagi BN, Garanzini DS. Alterations in Biochemical Parameters of the Freshwater Fish, *Alburnus Mossulensis*, Exposed to Sub-lethal Concentrations of Fenpropathrin. *International Journal of Aquatic Biology*. 2014; 2(2): 58-68.
43. Jaroli DP, Sharma BL. Effect of Organophosphate Insecticide on the Organic Constituents in Liver of *Channa Punctatus*. *Journal of Experimental Sciences*. 2005;21(5):121-129.
44. Mohammadnezhad Shamoshaky M, Sultani M, Sharif pour A, Emanpour M. The Effect of Acute Organophosphate of Diazinon on Activity of Some Enzymes in the Blood Serum of Adult Males (*Rutilus Frisii Kutum*). *Veterinary Journal*. 2012; 8(3): 96-97.
45. Banaee M, Myrvaqefy A, Anthont sorda G, Rafeie Q. Change in Blood Biochemical Parameters and Histopathology of the Liver Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Contact with the Sub-lethal Concentrations of Diazinon. *Journal of Natural Resources*. 2012;(4)65: 297-313.