(DOI): 10.22092/ISFJ.2025.134217 34(3) 19-31 Iranian Scientific Fisheries Journal

Effect of white button mushroom meal on antioxidant capacity, immune systems, and expression of immune-related cytokine genes in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

Lotfi K.[1]; Shamsaie Mehrgan M.[1*]; Forodi F.[1]; Rajabi Islami H.[1]; Hosseini Shekarabi S.P.[2]

*m.shamsaie@iau.ac.ir

1-Department of Agriculture Science and Engineering, SR.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran
2-National Research Center off Saline-waters Aquatics, Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Bafgh Yazd, Iran

Received: December 2024 Accepted: May 2025 Published: September 2025

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Introduction

Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), a globally significant aquaculture species, plays a critical role in addressing food security due to its high nutritional value and adaptability to diverse farming environments (Shafiujjaman *et al.,* 2024). However, the intensification of aquaculture practices has introduced stressors that adversely affect fish health and increase vulnerability to diseases (Li *et al.,* 2022). Conventional solutions like antibiotics and chemical therapeutics, while effective, raise concerns about environmental degradation, drug resistance, and food safety. Functional feed additives, particularly those derived from natural sources, have emerged as promising alternatives for enhancing fish health and immune function. White button mushrooms (*Agaricus bisporus*), recognized for their rich bioactive compound profile—including polysaccharides, phenolics, and antioxidants—have shown potential in modulating immune responses and oxidative stress (Habib *et al.,* 2021). Despite the demonstrated benefits of mushrooms in aquaculture, the molecular mechanisms underlying their effects, particularly on cytokine-mediated immune responses, remain underexplored. This study evaluates the impact of dietary supplementation with A. bisporus powder on antioxidant activity, immune parameters, and cytokine gene expression in Nile tilapia, providing valuable insights into its potential as a sustainable aquafeed additive (Habib *et al.,* 2021; Harikrishnan *et al.,* 2018).

Methodology

White button mushrooms were sourced locally, cleaned, sliced, dried at 50°C for 24 hours, and ground into powder. Experimental diets were formulated to include 0%, 0.5%, 1%, and 2% mushroom powder (Amiri *et al.,* 2018; Hoseinifar *et al.,* 2019). Diets were adjusted to maintain iso-nitrogenous and iso-caloric properties and pelletized into uniform 2 mm pellets for feeding. A total of 240 juvenile Nile tilapia, weighing approximately 3.1±0.3 g, were distributed randomly into 12 aquaria (250 liters) in a completely

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-19]

randomized design. Each treatment was replicated thrice, with 20 fish per aquarium. The fish were fed their respective diets to apparent satiation four times daily over 56 days. Water quality parameters, including temperature (28.01±0.10°C), pH (7.13±0.20), and dissolved oxygen (5.23±0.18 mg/L), were maintained within optimal ranges. At the conclusion of the feeding trial, six fish per treatment group were anesthetized using 0.3 mL/L of 2-phenoxyethanol. Blood samples were collected via caudal vein puncture for serum isolation. Immune tissues, specifically the head kidney and spleen, were aseptically excised and stored in RNA later solution for subsequent molecular analysis. Antioxidant enzyme activities, including catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GPx), as well as total antioxidant capacity (T-AOC), were quantified using commercial kits. Lipid peroxidation was assessed by measuring serum malondialdehyde (MDA) levels. Immune parameters, including serum bactericidal activity, immunoglobulin M (IgM) concentrations, and lysozyme levels, were evaluated using standard methodologies. RNA was extracted from head kidney and spleen tissues and reverse-transcribed into cDNA. Quantitative PCR (qPCR) was used to measure the expression of immune-related cytokines, including interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor-alpha (TNF-α), and interleukin-1 beta (IL-1β). Relative expression levels were normalized to β-actin, and fold changes were calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Data were analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test for pairwise comparisons. Results were presented as mean ± standard deviation, with statistical significance set at $p<0.05$.

Results

Dietary supplementation with mushroom powder significantly enhanced antioxidant enzyme activities, with the 1% and 2% treatments showing the greatest increases in CAT, SOD, and GPX activities compared to the control group ($p<0.05$). Total antioxidant capacity (T-AOC) was similarly elevated in these groups, while serum MDA levels, indicative of lipid peroxidation, were markedly reduced. These results underscore the potent antioxidant properties of A. bisporus, attributed to its phenolic and flavonoid compounds, which act as radical scavengers and reduce oxidative stress. Comparable studies have demonstrated the role of mushroom-derived antioxidants in enhancing oxidative resilience in fish, including common carp and rainbow trout. Mushroom supplementation significantly increased serum bactericidal activity, IgM concentrations, and lysozyme levels. The 1% and 2% inclusion levels elicited the strongest responses ($p<0.05$), reflecting improved non-specific immune defenses. Polysaccharides such as beta-glucans, abundant in mushrooms, are known to activate macrophages and stimulate the release of immune mediators, enhancing humoral immunity. The observed immune improvements align with previous findings in aquaculture species, where mushroom-based diets augmented pathogen resistance and overall health. The expression of pro-inflammatory cytokines IL-6, TNF-α, and IL-1β in head kidney and spleen tissues was significantly upregulated in fish fed mushroom-enriched diets, particularly at the 1% and 2% inclusion levels ($p<0.05$). Cytokines play a pivotal role in coordinating immune responses, mediating inflammation, and facilitating pathogen clearance. The enhanced expression observed in this study likely results from mushroom-derived polysaccharides interacting with toll-like receptors on

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-19]

immune cells, triggering downstream signaling pathways. These findings corroborate previous studies that reported similar cytokine upregulation in fish fed functional diets containing prebiotics or plant-derived compounds. The dual antioxidant and immunomodulatory effects of A. bisporus are attributed to its diverse bioactive compounds, including phenolics, flavonoids, and beta-glucans. These molecules neutralize reactive oxygen species (ROS), enhance the activity of antioxidant enzymes, and stimulate immune responses. Additionally, mushrooms may influence gut microbiota composition, indirectly bolstering immune function. While this study provides compelling evidence of the benefits of A. bisporus, further research is warranted to isolate specific bioactive compounds and elucidate their precise mechanisms of action. The findings of this study highlight the potential of white button mushroom powder as a sustainable alternative to antibiotics and chemical treatments in aquaculture. By enhancing both antioxidant defenses and immune responses, mushroom supplementation can improve fish health, reduce disease incidence, and mitigate environmental risks associated with conventional therapeutics. Functional diets incorporating natural additives like A. bisporus align with the goals of sustainable aquaculture, promoting health and productivity without compromising ecological integrity.

Discussion and conclusion

This study demonstrates the efficacy of dietary supplementation with white button mushroom powder in enhancing the antioxidant and immune systems of Nile tilapia. The 1% and 2% inclusion levels yielded the most significant improvements in antioxidant enzyme activities (CAT, SOD, GPX), total antioxidant capacity (T-AOC), and reductions in serum MDA levels. Immune parameters, including bactericidal activity, IgM concentrations, and lysozyme levels, were also significantly enhanced. Furthermore, mushroom supplementation upregulated the expression of cytokines IL-6, TNF-α, and IL-1β, indicating robust immunomodulatory effects. These findings underscore the potential of *A. bisporu*s as a functional feed additive, offering a natural and sustainable approach to improving fish health and reducing reliance on chemical therapeutics in aquaculture. Future research should focus on identifying and characterizing the specific bioactive compounds responsible for these effects and optimizing their application in aquafeeds.

Conflict of interest

We wish to confirm that there are no known conflicts of interest associated with this study.

Acknowledgment

The authors are grateful to the Fisheries Lab at Science and Research Branch Institute and the Aquatics Production & Trade Union of Iran for their kind cooperation.

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-19]

مجله علمی شیلات ایران ۳۴ (۳) ۱۹-۳۱ (DOI): 10.22092/ISFJ.2025.134217

مقاله علمی – پژوهشی:

تأثیر پودر قارچ دکمه‌ای سفید بر ظرفیت آنتی اکسیدانی، سیستم ایمنی و بیان سایتوکاین‌های ایمنی در ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*)

کسری لطفی[۱]، مهدی شمسایی مهرجان[۱]*، فرهاد فرودی[۱]، هومن رجبی اسلامی[۱]، سید پژمان حسینی شکرابی[۲]

*m.shamsaie@iau.ac.ir; m.shamsaie@srbiau.ac.ir

۱-گروه دانشی علوم و مهندسی کشاورزی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲-مرکز تحقیقات ملی آبزیان آبهای شور، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بافق، ایران

تاریخ دریافت: آذر ۱۴۰۳ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۴۰۴ تاریخ چاپ: شهریور ۱۴۰۴

چکیده

این مطالعه برای بررسی اثرات مکمل غذایی با پودر قارچ دکمه‌ای سفید (*Agaricus bisporus*) بر سیستم ایمنی و آنتی اکسیدانی ماهی تیلاپیا نیل، انجام شد. در یک آزمایش کنترل شده، ماهی‌ها با جیره‌های ۰، ۰/۵، ۱ و ۲ درصد پودر قارچ طی ۵۶ روز تغذیه شدند. فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی شامل کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز، سطوح آنتی اکسیدان کل و پراکسیداسیون لیپیدی با استفاده از تعیین سطح مالون دی آلدهید (MDA) سرم به همراه با پاسخ‌های ایمنی از جمله فعالیت باکتری‌کش سرم، غلظت ایمونوگلوبولین M (IgM) و سطوح لیزوزیم مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین بیان ژن سایتوکاین‌های اینترلوکین-۶، شاخص نکروز توموری آلفا و اینترلوکین-۱ بتا در بافت سر کلیه و طحال نیز اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که ماهی‌های تغذیه شده با جیره‌های غنی‌شده با قارچ به‌ویژه در سطوح ۱ و ۲ درصد، افزایش قابل‌توجهی در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و کاهش MDA نشان دادند. شاخص‌های ایمنی (IgM)، فعالیت لیزوزیم و بیان سایتوکاین‌ها به طور قابل‌توجهی افزایش یافته که نشان‌دهنده بهبود سیستم ایمنی است. با توجه به نتایج مطالعه حاضر، پودر قارچ دکمه‌ای سفید یک مکمل غذایی امیدوارکننده برای تقویت سلامت ماهی و عملکرد ایمنی است و به طور بالقوه نیاز به آنتی‌بیوتیک را در آبزی‌پروری کاهش می‌دهد. همچنین یافته‌های تحقیق حاضر، نشان‌دهنده نقش افزودنی‌های غذایی در پرورش پایدار ماهی است، اگرچه تحقیقات بیشتری در مورد اجزاء زیست‌فعال موجود در قارچ دکمه‌ای سفید و اثرات آن بر آبزیان نیاز است.

لغات کلیدی: تیلاپیا نیل، قارچ دکمه‌ای سفید، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، تعدیل سیستم ایمنی، بیان ژن سایتوکاین

*نویسنده مسئول

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-19]

مقدمه

صنعت آبزی‌پروری نقشی محوری در امنیت غذایی جهانی ایفاء کرده و منبع قابل‌توجهی از پروتئین را برای تأمین نیازهای غذایی جمعیت در حال رشد فراهم می‌کند. در میان گونه‌های مختلف آبزی پروری، تیلاپیا (*Oreochromis* .spp) به دلیل رشد سریع، سازگاری با شرایط محیطی متنوع و ارزش غذایی بالا، به عنوان یکی از کلیدی‌ترین گونه‌های آبزی‌پروری شناخته شده است. تیلاپیا به عنوان یکی از پرکاربردترین گونه‌های ماهی در سرتاسر جهان، سهم قابل‌توجهی در تأمین پروتئین دارد به‌ویژه در کشورهای در حال توسعه که ماهی منبع اصلی پروتئین حیوانی است (Shafiujjaman *et al.,* 2024).

در عرصه افزایش تقاضای تولید ماهی، بزرگ‌ترین مانع برای کشاورزان دستیابی به حداکثر تولید با افزایش تراکم ماهی و در عین حال به حداقل رساندن ظهور بیماری‌هاست. اخیراً در سراسر جهان پرورش آبزی‌پروری افزایش یافته است که از آبزی‌پروری گسترده با بهره‌وری پایین به سمت آبزی‌پروری فشرده و فوق فشرده حرکت می‌کند (Li *et al.,* 2022). در نتیجه تشدید، ماهی‌ها مستعد محیط استرس‌زا هستند که به‌خودی‌خود خطر شیوع بیماری‌ها را افزایش می‌دهد. سلامت سیستم ایمنی در ماهی‌ها برای حفظ رفاه کلی و تضمین رشد و بهره‌وری مطلوب در محیط‌های آبزی‌پروری حیاتی است. یک پاسخ ایمنی قوی برای محافظت از ماهی در برابر عوامل بیماری‌زا ضروری است که در نتیجه، وابستگی به آنتی‌بیوتیک‌ها را کاهش می‌دهد و شیوع بیماری را به حداقل می‌رساند که می‌تواند اثرات مخرب اقتصادی داشته باشد. تقویت سیستم ایمنی ماهی تیلاپیا برای شیوه‌های آبزی‌پروری پایدار از اهمیت بالایی برخوردار است. روش رایج برای مقابله با شیوع بیماری، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و داروهای شیمی‌درمانی است. با وجود این، استفاده از این مواد منجر به ایجاد باکتری‌های مقاوم به دارو، سرکوب سیستم ایمنی و خطرات محیطی، شده است (Li *et al.,* 2023). بنابراین، توسعه راه‌های جایگزین برای بهبود مقاومت در برابر بیماری، پاسخ‌های ایمنی و رفاه ماهی در نظر گرفته شده است (Zhang *et al.,* 2021; Sherif and AbuLeila, 2022).

استفاده از افزودنی‌های خوراکی تعدیل‌کننده ایمنی (پروبیوتیک‌ها، پری بیوتیک‌ها و سایر مکمل‌ها)، از جمله روش‌های امیدوارکننده برای بهبود عملکرد سیستم ایمنی و مبارزه با عفونت‌هاست (Sîrbu *et al.,* 2022). در میان ترکیبات کاربردی، قارچ و محصولات مشتقات آن به عنوان ترکیبات پری‌بیوتیک، اخیراً مورد توجه تجاری و علمی در آبزی‌پروری قرار گرفته است. قارچ‌ها به دلیل ترکیبات زیست‌فعال خود که ممکن است بر عملکرد سیستم ایمنی تأثیر بگذارند، توجه را به‌خود جلب کرده‌اند (Mohan *et al.,* 2022). قارچ‌های دکمه‌ای سفید (*Agaricus bisporus*) غنی از ترکیبات فعال زیستی (پلی‌ساکاریدها و ترکیبات فنلی)، هستند که نشان داده شده است که عملکرد سیستم ایمنی را تعدیل می‌کنند (Habib *et al.,* 2021). این ترکیبات می‌توانند تولید سیتوکین‌ها را تحریک کنند و پاسخ ایمنی را در برابر پاتوژن‌ها افزایش دهند. علاوه‌براین، خواص آنتی‌اکسیدانی قارچ می‌تواند با کاهش استرس اکسیداتیو، به بهبود سلامت کلی ماهی کمک کند (Harikrishnan *et al.,* 2018; Habib *et al.,* 2021). اگر چه مطالعات پیشین نشان دادند که استفاده از قارچ‌ها به عنوان پری‌بیوتیک می‌تواند در تعدیل سیستم ایمنی ماهیان مؤثر باشد، اما مکانیسم این تأثیر بر اجزاء ایمنی به‌خصوص تأثیر بر تولید سیتوکین‌ها و پاسخ‌های ایمنی هنوز کاملاً شناخته نشده است و نیاز به تحقیقات بیشتر دارد. سیتوکین‌ها، مولکول‌های سیگنال‌دهنده مهمی هستند که پاسخ ایمنی را تنظیم می‌کنند و بیان آنها می‌تواند تحت تأثیر اجزاء رژیم غذایی قرار گیرد (Hoseinifar *et al.*, 2015; Amiri *et al*., 2018).

مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات پودر قارچ دکمه سفید بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و سیستم ایمنی ماهی تیلاپیا نیل (*Oreochromis niloticus*)، با تمرکز بر بیان ژن‌های سیتوکین ایمنی در بافت‌های ایمنی کلیدی انجام شد. این تحقیق با مطالعه رابطه بین مکمل‌های غذایی قارچ و عملکرد سیستم ایمنی بدن، به دنبال کمک به راهکارهای ارزشمند برای افزایش سلامت و انعطاف‌پذیری ماهی تیلاپیا در سیستم‌های آبزی‌پروری است.

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-19]

مواد و روش کار

تهیه پودر قارچ دکمه‌ای سفید

قارچ دکمه‌ای سفید تازه پس از خرید از یکی از بازارهای محلی در تهران به واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی منتقل شد. کارشناسان دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی این قارچ را *Agaricus bisporus* شناسایی کردند. قارچ دکمه‌ای سفید ابتدا شست‌وشو داده شده و سپس با برش‌های عرضی بریده شده و در آون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد، خشک شد. سپس قارچ‌ها به‌کمک آسیاب برقی به پودر تبدیل شده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شد.

تهیه رژیم غذایی ماهی

قارچ‌های دکمه‌ای به‌ترتیب در سطوح ۰ (شاهد)، ۰/۵، ۱ و ۲ درصد در جیره‌های آزمایش گنجانده شد. این سطوح بر اساس نتایج مطالعات پیشین انتخاب شدند (Amiri *et al.,* 2018; Hoseinifar *et al.,* 2019). همه مواد جیره ریز آسیاب شده و مخلوط شدند تا یک ترکیب همگن تشکیل شود. مواد مغذی و ترکیب شیمیایی جیره‌های آزمایشی به تفصیل در جدول ۱ ارائه شده است. سپس مواد غذایی با آب ترکیب شدند تا خمیری ایجاد شود که با استفاده از دستگاه پلت شد تا گلوله‌های ۲ میلی متری تولید شود. این گلوله‌ها در آون در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک شده و تا زمان استفاده در کیسه‌های پلاستیکی برچسب‌دار در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جیره‌های غذایی ماهی تیلاپیا همراه با پودر قارچ دکمه‌ای بنحوی در جیره فرموله شد تا تمام جیره‌ها مقدار کالری و پروتئین مساوی را بر اساس نیاز تغذیه‌ای ماهی برآورده سازد. ترکیب جیره‌های آزمایشی طبق رویه‌های AOAC تجزیه‌وتحلیل شد (AOAC, (2012.

جدول ۱: فرمول جیره غذایی مورداستفاده در مطالعه

Table 1: Diet formula used in the study

Ingredients (%)	Mushroom meal level			
	Control (0%)	0.5%	1%	2%
Fishmeal	15.10	15.10	15.10	15.10
Wheat bran	38.9	38.4	37.9	36.9
Soybean meal	22	22	22	22
Wheat flour	8.99	8.99	8.99	8.99
Corn meal	5	5	5	5
Fish oil	7	7	7	7
Vitamin mixture	1	1	1	1
Mineral mixture	2	2	2	2
Butylated hydroxytoluene	0.01	0.01	0.01	0.01
Button mushroom powder	0	0.5	1	2
Proximate analysis (%)				
Crude protein	35.60	35.65	35.70	35.80
Crude lipids	9.38	9.23	9.19	9.11
Ash	8.20	8.22	8.24	8.27
Gross energy (MJ/kg)	18.30	18.30	18.29	18.28

ماهی‌ها و شرایط آزمایش

در این آزمایش تعداد ۲۴۰ قطعه بچه ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) با وزن ۰/۳±۳/۱ گرم و طول ۰/۵±۳۷ میلی‌متر از یک مرکز تکثیر در استان سمنان تهیه و ماهیان به مدت ۵۶ روز در آن مرکز با جیره‌های آزمایشی پرورش داده شدند. ماهی‌ها به طور تصادفی به ۱۲ مخزن فایبرگلاس ۲۵۰ لیتری با سیستم جریان مداوم آب (۱/۵ لیتر در دقیقه) در قالب طرح کاملاً تصادفی، شامل چهار

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-19]

تیمار غذایی با سه تکرار (۲۰ ماهی در هر مخزن) تقسیم شدند. یک دوره نوری طبیعی ثابت ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در طول آزمایش حفظ شدند. ماهی‌ها در ساعت‌های ۰۸:۰۰، ۱۲:۰۰، ۱۵:۰۰ و ۱۸:۰۰ روزانه با دست تا سیری ظاهری تغذیه می‌شدند و هیچ خوراکی در مخزن باقی نمی‌ماند. مصرف خوراک روزانه ثبت شد. شاخص‌های کیفیت آب روزانه مورد بررسی قرار گرفت و نتایج ذیل حاصل شد (متوسط ± انحراف معیار): دمای آب در ۲۸/۰۱±۰/۱۰ درجه سانتی‌گراد، pH در ۷/۱۳±۰/۲۰ و اکسیژن محلول در ۵/۲۳±۰/۱۸ میلی‌گرم در لیتر . این آزمایش مطابق با دستورالعمل مراقبت و استفاده از حیوانات برای تحقیقات علمی از UNIOESTE و دانشگاه آزاد اسلامی بود.

نمونه‌گیری

پس از آزمایش تغذیه، شش ماهی از هر تیمار با استفاده از ۲-فنوکسی اتانول (۰/۳ میلی لیتر در لیتر) بیهوش شدند و با استفاده از سرنگ ۳ میلی لیتری از ورید دمی خون گرفته شد. خون جمع‌آوری‌شده به یک تیوپ ۱ میلی‌لیتری منتقل شد، به مدت ۱ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد لخته شد و سپس سانتریفیوژ شد (۳۰۰۰g در ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه؛ میکرولیتر سانتریفیوژ، Mikro 220R، Hettich، آلمان). نمونه‌های سرم در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد برای تجزیه‌وتحلیل بعدی نگهداری شدند. پس از ضدعفونی سطوح پهلو و شکمی ماهی با اتانول ۷۰ درصد، ماهی‌ها به‌صورت آسپتیکال تشریح شدند و تقریباً ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت‌های سر کلیه و طحال جمع‌آوری شد و بلافاصله طبق پروتکل در محلول RNAlater، (Qiagen آلمان) نگهداری شد.

سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی و پراکسیداسیون لیپیدی

کیت‌های سنجش تجاری از ZellBio GmbH ، (آلمان) برای ارزیابی سطوح سوپراکسید دیسموتاز(SOD) (، ZB - SOD-96A)، کاتالاز CAT (ZB-CAT-96A)، گلوتاتیون پراکسیداز GPx ، (ZB-GPx-96A) استفاده شد. مالون دی آلدئید MDA ، (ZB-MDA-96A)، و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل T-AOC ، (ZB-TAC-96A) در نمونه‌های سرم مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت SOD با تبدیل رنگ‌سنجی آنیون سوپراکسید به پراکسید هیدروژن و اکسیژن در طول موج ۴۲۰ نانومتر با دستگاه اسپکتوفتومتر (Varian Cary, USA) بررسی شد. فعالیت CAT با تجزیه ۱ میکرومول H2O2 به آب و O2 در یک دقیقه، با حساسیت U/ML ۰/۵ ارزیابی شد. فعالیت‌های GPx به صورت کالریمتری در طول موج ۴۱۲ نانومتر، با حساسیت ۵ واحد در میلی‌لیتر برای نمونه‌های سرم تعیین شد. سطوح MDA با اندازه‌گیری ترکیب اضافی MDA-TBA حاصل از واکنش بین MDA و تیوباربیتوریک اسید (TBA) در دماهای بالا، با کمی‌سازی در ۵۳۵ نانومتر در یک محیط اسیدی (حساسیت: ۰/۱ میکرومولار) تعیین شد. سطوح T-AOC از طریق روش رنگ‌سنجی کاهش اکسیداسیون در ۴۹۰ نانومتر، در مقایسه با اسید آسکوربیک به عنوان استاندارد، با حساسیت ۰/۱ میلی‌مولار (۱۰۰ میکرومول در لیتر) برای TAC انجام شد (Adineh *et al.,* 2021).

سنجش‌های مربوط به سیستم ایمنی

فعالیت ضد باکتریایی سرم

فعالیت باکتری‌کشی سرم علیه *Streptococcus iniae* در پلیت‌های میکروتیتر کف مسطح ارزیابی شد (Khosravi *et al.,* 2018) نمونه‌های سرم در VBS (۱:۲ نسبت حجمی/حجمی) رقیق شده و ۵۰ میکرولیتر سرم فعال یا غیرفعال شده با حرارت (از همان نمونه) به هر چاهک اضافه شد. سپس ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی از پیش تنظیم شده به 10^6CFU/mL در VBS به چاهک‌ها تلقیح شد و پلیت در دمای ۲۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰۰ دقیقه انکوبه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر TSB استریل حاوی ۲ درصد نمک طعام به چاهک‌ها اضافه شده و پلیت بیشتر در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد به مدت ۱۸ ساعت انکوبه شد. چگالی نوری پس از ۰ و ۱۸ ساعت انکوباسیون در ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شده و تفاوت بین فعالیت سرم فعال و غیرفعال شده با حرارت محاسبه و به عنوان فعالیت باکتری‌کشی هر نمونه گزارش شد. رشد بیشتر پاتوژن در

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-19]

چاهک‌ها OD بیشتر نشان‌دهنده فعالیت باکتری‌کشی کمتر در نمونه است.

غلظت کل ایمونوگلوبولین (IgM)

سطح IgM کل سرم با استفاده از یک روش ایمونوسوربنت مرتبط با آنزیم (ELISA) با یک کیت تجاری (Cusabio، Wuhan، Hubei، چین) بر طبق روش کار ارائه شده از شرکت سازنده اندازه‌گیری شد (Sun *et al.*, 2010). پلیت‌ها با استفاده از اتاآنالایزر در ۴۵۰ نانومتر خوانده شد. کنترل‌های منفی با استفاده از نمونه‌های فاقد آنتی بادی بیوتین تهیه شد. میانگین جذب کنترل منفی برای هر پلیت از چگالی نوری در ۴۵۰ نانومتر کم شد.

فعالیت لیزوزیم سرم

فعالیت لیزوزیم سرم با استفاده از روش توربیدیمتریک مورد بررسی قرار گرفت (Mohammadian *et al.*, 2020). باکتری *Micrococcus lysodeikticus* (۰/۲ میلی گرم در میلی لیتر، سیگما-آلدریچ، آلمان) در بافر فسفات سدیم (۲۰ میلی متر، pH۵/۸) ۱۵ به همراه میکرولیتر از نمونه‌های سرم به حالت تعلیق درآمد و ۱۳۵ میکرولیتر از محلول همگن در چاهک‌های ۹۶ خانه میکروتیتر پلیت پخش شد. خوانش‌های جذب در هر ۲ دقیقه در ۴۵۰ نانومتر در دمای اتاق طی یک دوره ۶ دقیقه‌ای انجام شد. نتایج به عنوان واحد در میلی لیتر گزارش شد.

بیان ژن‌های ایمنی

استخراج RNA و ساخت cDNA

RNA کل (۲۵ میلی گرم در هر بافت) با استفاده از کیت جداسازی RNA (EX6101، Sinaclon، ایران) از سر کلیه و طحال استخراج شد. برای ارزیابی کیفیت RNA خالص شده، جذب آن در طول موج‌های ۲۸۰/۲۶۰ نانومتر اندازه گیری و ارزیابی شد. سپس ۱ میکروگرم از RNA کل تحت تیمار DNase I برای از بین بردن DNA ژنومی باقیمانده قرار گرفت و ساخت cDNA و با استفاده از کیت سنتز cDNA (EX6101، Sinaclon، ایران) انجام شد. کنترل‌های منفی به طور همزمان اجرا شدند و RNA یا آنزیم حذف شدند. cDNA حاصل به ۱:۱۰ رقیق شده و در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد ذخیره شد.

کمی‌سازی بیان ژن‌ها

سطح بیان ژن‌های هدف (سایتوکاین‌های IL-6، TNF-α، IL1 β)، با استفاده از سیستم LightCycler 480(Roche Diagnostic، سوئیس)، مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۲). هر واکنش ۱۰ میکرولیتر بود که شامل ۲ میکرولیتر از آب درجه PCR، ۵ میکرولیتر از مسترمیکس حاوی رنگ سایبرگرین (سیناکولون، ایران)، ۲ میکرولیتر الگوی cDNA رقیق شده (۱:۱۰) و ۰/۵ میکرولیتر (غلظت نهایی ۵۰۰ نانومتر) از هر پرایمر بود. پروتکل qPCR شامل یک فرآیند سه مرحله‌ای: فعال سازی آنزیم اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و به دنبال آن ۴۰ چرخه دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه، آنیل شدن در دمای تعیین شده پرایمر به مدت ۱۰ ثانیه و سپس در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، می‌شد. چرخه کمیت (CQ) با استفاده از حداکثر روش مشتق دوم تعیین شد که حداکثر سرعت افزایش DNA تازه سنتز شده در هر چرخه را اندازه‌گیری می‌کند که در Light Cycler 480 نسخه ۱.۵.۰ (Roche Diagnostics) اجرا شد. برای تأیید ویژگی قطعات تکثیر شده محصولات PCR، برای هر جفت پرایمر منحنی ذوب مورد تحلیل قرار گرفت و از الکتروفورز ژل آگارز برای تأیید بصری استفاده شد. از ژن ACT β، برای نرمال‌سازی استفاده شد. تمام سنجش‌های RT-QPCR سه تکرار داشت. برای کمی‌سازی از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ استفاده شد (Muller *et al.*, 2002).

روش تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها

داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۴ (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) و با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و سپس آزمون‌های چند دامنه‌ای توکی مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت. نتایج به صورت میانگین± انحراف معیار گزارش شده و ضریب اطمینان ۹۵٪ در نظر گرفته شد.

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-19]

جدول ۲: توالی پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه

Table 2: Sequences of the primers used in the study

Gene name	Sequences (5'-3')	Tm (°C)	Product size (bp)	Reference
IL-6	GTTCTGCTACAAAAAGTCGCCC CAGAGCACACCAACAGCGAGA	58	132	(Krishnan *et al.,* 2019)
TNF-α	CGTCGTCGTGGCTCTTTGTT TGGGGCTCTGTTTTGTCGC	60	166	(Li *et al.,* 2021)
IL1 β	CGGAATCCACGAAACCACCTA CCAGACGGAGTATTTACGCTCA	59	123	(Li *et al.,* 2021)
β –Actin	CGGAATCCACGAAACCACCTA CCAGACGGAGTATTTACGCTCA	58	159	(Li *et al.,* 2021)

نتایج

فعالیت آنتی‌اکسیدانی و پراکسیداسیون لیپیدی

سطح آنزیم آنتی اکسیدانی (CAT، SOD و GPx) و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل (T-AOC) در گروه‌های تیمار با پودر قارچ به طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل بود که بالاترین سطوح در تیمار ۱ و ۲٪ پودر قارچ مشاهده شد ($p<0.05$). علاوه‌براین، سطوح سرمی MDA در گروه‌های تیمار به طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بود که کمترین میزان آن در گروه تیمار ۲٪ پودر قارچ مشاهده شد ($p<0.05$) (جدول ۳).

جدول ۳: شاخص‌های اکسیدانی در سرم خون ماهی تیلاپیا پس از ۵۶ روز تیمار با پودر قارچ

Table 3: Antioxidant indices in tilapia blood serum after 56 days of treatment with mushroom powder

Parameter	Mushroom meal levels				
	Control (0%)	0.5%	1%	2%	*p* value
CAT (U mL^{-1})	91.21 ± 5.2^{c}	110.15 ± 6.4^{b}	140.2 ± 2.2^{a}	138.3 ± 3.2^{a}	0.000
SOD (U mL^{-1})	81.19 ± 1.3^{c}	89.14 ± 1.3^{b}	95.4 ± 2.5^{a}	94.3 ± 2.3^{a}	0.001
GP_X(U mL^{-1})	301.11 ± 6.4^{b}	318.12 ± 8.1^{b}	331.21 ± 6.3^{a}	333.3 ± 7.1^{a}	0.002
T-AOC (µmol mL^{-1})	1022.12 ± 7.8^{c}	1045.21 ± 9.2^{b}	1122.01 ± 9.3^{a}	1125.03 ± 9.6^{a}	0.000
MDA (µmol mL^{-1})	5.15 ± 0.02^{a}	3.11 ± 0.01^{b}	2.22 ± 0.03^{c}	2.01 ± 0.01^{d}	0.012

حروف متفاوت در هر گروه نشان دهنده تفاوت معنی دار است.

Different letters in each group indicate significant differences.

فعالیت‌های ایمنی

فعالیت ضد باکتریایی سرم و سطوح IgM و لیزوزوم افزایش قابل‌توجهی را در گروه‌های تیمار شده با پودر قارچ در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند که بیشترین افزایش در گروه‌های ۱٪ و ۲٪ پودر قارچ مشاهده شد ($p<0.05$) (جدول ۴).

جدول ۴: شاخص‌های ایمنی در سرم خون ماهی تیلاپیا پس از ۵۶ روز تیمار با پودر قارچ

Table 4: Immune indices in tilapia blood serum after 56 days of treatment with mushroom powder

Parameter	Mushroom meal levels				*P* value
	Control (0%)	0.5	1%	2%	
Bactericidal activity (CFU ml^{-1})	132.3 ± 2.4^{c}	139.2 ± 6.4^{b}	145.6 ± 3.9^{a}	144.3 ± 3.3^{a}	0.001
IgM (mg dL^{-1})	25.05 ± 1.5^{c}	35.11 ± 3.3^{b}	41.31 ± 1.1^{a}	40.9 ± 2.3^{a}	0.021
Lysozyme (U ml^{-1} min^{-1})	25.21 ± 1.9^{b}	29.33 ± 0.9^{a}	29.20 ± 0.7^{a}	30.15 ± 0.5^{a}	0.000

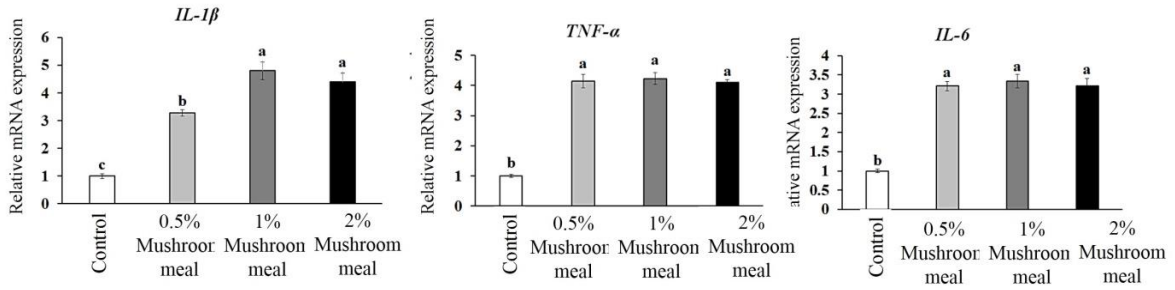
حروف متفاوت در هر گروه نشان دهنده تفاوت معنی دار است.

Different letters in each group indicate significant differences.

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-19]

بیان نسبی سایتوکاین‌ها در بافت‌های ایمنی

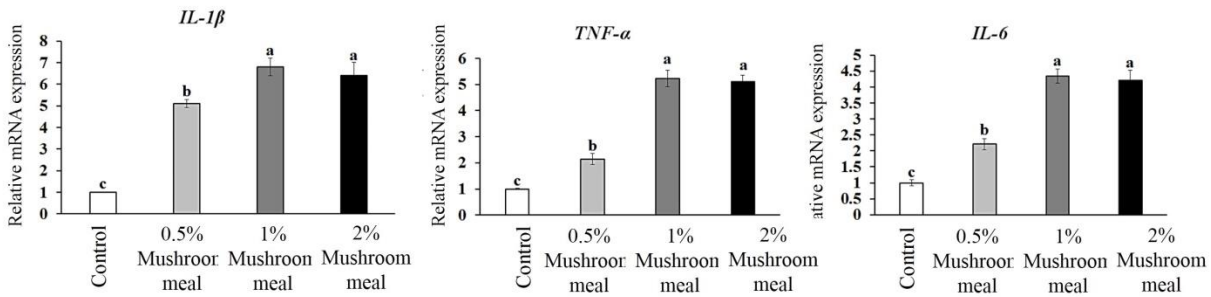
بر اساس نتایج، بیان نسبی سایتوکاین‌های *IL-6*، *TNF-α* و *IL1 β* در بافت سر کلیه به طور معنی‌داری در گروه‌های تیمار با پودر قارچ نسبت به گروه کنترل افزایش یافت ($p<0.05$). بیان سایتوکاین *IL1 β* در بافت سرکلیه در تیمارهای ۱٪ و ۲٪ پودر قارچ حداکثر بود (شکل ۱).



شکل ۱: بیان نسبی ژن سایتوکاین‌های ایمنی در بافت سرکلیه ماهی تیلاپیا پس از ۵۶ روز تیمار با پودر قارچ. حروف متفاوت در هر گروه نشان‌دهنده تفاوت معنی دار است.

Figure 1: Relative gene expression of immune cytokines in tilapia kidney tissue after 56 days of treatment with mushroom powder. Different letters in each group indicate significant differences.

بیان نسبی سایتوکاین‌های *IL-6*، *TNF-α*، *IL1 β* در بافت طحال به طور معنی‌داری در تیمار با پودر قارچ نسبت به گروه کنترل افزایش نشان داد ($p<0.05$). تیمار ۱٪ و ۲٪ پودر قارچ، نسبت به گروه ۰/۵ درصد پودر قارچ و گروه کنترل، افزایش بیان حداکثری را در سایتوکاین‌ها نشان داد ($p<0.05$) (شکل ۲).



شکل ۲: بیان نسبی ژن سایتوکاین‌های ایمنی در بافت طحال ماهی تیلاپیا پس از ۵۶ روز تیمار با پودر قارچ. حروف متفاوت در هر گروه نشان‌دهنده تفاوت معنی دار است.

Figure 2: Relative gene expression of immune cytokines in tilapia spleen tissue after 56 days of treatment with mushroom powder. Different letters in each group indicate significant differences.

بحث

در سال‌های اخیر، تحقیقات برای یافتن افزودنی‌های غذایی سالم و سازگار با محیط زیست به منظور کاهش و جایگزینی داروهای شیمیایی در پرورش آبزیان افزایش یافته است. در این زمینه، رژیم‌های غذایی عملکردی به عنوان یکی از مهم‌ترین استراتژی‌ها برای داروهای شیمیایی در صنعت آبزی‌پروری در نظر گرفته شده است (Dawood and Koshio, 2018). بسیاری از مطالعات نشان دادند که استفاده از رژیم‌های غذایی حاوی پری‌بیوتیک‌ها می‌تواند بر تقویت سیستم ایمنی و وضعیت سلامت ماهی مؤثر باشد (Hoseinifar *et al.,* 2015; Safari and Sarkheil, 2018). بسیاری از مواد طبیعی به عنوان پری‌بیوتیک‌های افزودنی به خوراک در آبزی‌پروری آزمایش شده‌اند. با

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-19]

این‌حال، قارچ به عنوان جذاب‌ترین گروه در نظر گرفته شده است (Yan *et al.,* 2017; Safari and Sarkheil, 2018). از این‌رو، تحقیق حاضر، به منظور بررسی اثرات پودر قارچ دکمه‌ای بر سیستم دفاع اکسیدانی و سیستم ایمنی انجام شد.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی CAT، SOD و GPx و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در سرم ماهی‌های تغذیه شده با پودر قارچ به‌خصوص در دوزهای ۱ و ۲ درصد پودر قارچ، به طور معنی‌داری افزایش یافت. همچنین کاهش معنی‌داری در میزان MDA در سرم ماهی‌های تیمار به‌خصوص در دوزهای ۱ و ۲ درصد پودر قارچ مشاهده شد. نظیر مشاهدات حاضر، در مطالعه دیگری استفاده از پودر قارچ دکمه‌ای در ماهی کپور (*Cyprinus carpio*) سبب افزایش بیان ژن‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر CAT و SOD شد (Hoseinifar *et al.,* 2019). در مطالعه دیگری بر تیلاپیای نیل مشخص شد که تغذیه با ضایعات قارچ سبب افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی گردید (Ahmed *et al.,* 2017). آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی اجزاء مهم سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی در ماهی هستند که می‌توانند رادیکال‌های آزاد را از بین ببرند (Hoseinifar *et al.,* 2020). گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) به طور مداوم در بدن از طریق فرآیندهای متابولیک به طور طبیعی ساخته می‌شوند و مقدار این محصولات در صورت قرار گرفتن موجود در شرایط استرس‌زا، افزایش می‌یابد و می‌تواند مشکلات متعددی را برای میزبان ایجاد کند (Aliko *et al.,* 2018; Subaramaniyam *et al.,* 2023). بنابراین، عملکرد آنتی‌اکسیدانی سلولی با حضور آنتی‌اکسیدان‌های رژیم غذایی تقویت می‌شود (Zhu *et al.,* 2023; Amenyogbe *et al.,* 2024). بنابراین، آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی اخیراً به عنوان ابزاری برای آسیب اکسیداتیو در محافظت در برابر اختلالات سلامت مورد توجه قرار گرفته‌اند (Amenyogbe *et al.,* 2024). فعالیت آنتی‌اکسیدانی ممکن است به وجود مواد فنولی و فلاونوئیدی در قارچ *A. bisporus* نسبت داده شود (Ramesh and Pattar, 2010). مواد فنولیک ممکن است به روش‌های متعددی به عنوان آنتی‌اکسیدان عمل کنند که از جمله آن می‌توان به عوامل کاهنده، اهداءکننده‌های هیدروژن، خاموش‌کننده‌های اکسیژن منفرد و عوامل کلات‌کننده فلز، اشاره کرد (Elmastas *et al.,* 2007). قارچ حاوی چندین نوع آنتی اکسیدان است. با این‌حال، تنها پاک‌کننده رادیکال‌های آزاد و آنتی‌اکسیدان‌های ثانویه یا پیشگیرانه در قارچ‌ها به طور کامل شناخته شده‌اند (Cheung *et al.,* 2003; Sharpe *et al.,* 2021). در قارچ‌ها، غیرفعال کردن فلزات، مهار یا تجزیه هیدروپراکسیدهای لیپیدی، بازسازی آنتی‌اکسیدان‌های اولیه و اکسیژن منفرد باعث تولید آنتی‌اکسیدان دوم می‌شود (Sharpe *et al.,* 2021). چندین ترکیب قارچی می‌توانند عملکرد آنتی‌اکسیدانی را به عنوان القاء کننده یا سیگنال‌های سلولی نشان دهند که منجر به تغییراتی در عملکرد سیستم آنتی‌اکسیدانی شود که منجر به فعال شدن آنزیم‌هایی می‌شود که ROS را از بین می‌برند (Herawati *et al.,* 2021). با این‌حال، مکانیسم‌های دقیقی که قارچ از طریق آن آنزیم آنتی‌اکسیدانی را تنظیم می‌کند، مستلزم بررسی بیشتر است.

در مطالعه حاضر، تغذیه ماهی تیلاپیا با پودر قارچ دکمه‌ای به‌خصوص در دوز ۱ و ۲ درصد پودر قارچ سبب افزایش IgM، لیزوزیم و افزایش فعالیت باکتری‌کشی سرم شد. همچنین تیمار پودر قارچ سبب افزایش بیان سایتوکاین‌های IL-6، TNF-α، IL1 β در بافت‌های ایمنی (سرکلیه و طحال) شد. مشابه این نتایج، در مطالعه تأثیر عصاره قارچ دارویی *Lentinula edodes* به عنوان مکمل خوراک قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌خصوص در دوز ۲٪ پودر قارچ، افزایش معنی‌داری در فعالیت لیزوزوم و مقدار IgM مشاهده شد (Baba *et al.,* 2015). در گورخرماهی، تجویز پودر قارچ *Agaricus bisporus*، به‌تنهایی یا در ترکیب با پروبیوتیک، بیان ژن‌های مربوط به ایمنی مخاطی سایتوکاین‌ها و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (SOD و CAT) را به میزان قابل‌توجهی افزایش داد (Safari and Sarkheil, 2018). علاوه‌براین، پودر قارچ ریشی که سرشار از بتا گلوکان است، پاسخ‌های ایمنی نظیر فعالیت آنزیم لیزوزیم و مقدار IgM را در ماهی کپور هندی تقویت کرد که

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-19]

نشان‌دهنده پتانسیل آن برای بهبود سلامت کلی ماهی است (Saha *et al.,* 2023).

مکانیسم‌های احتمالی اثر پودر قارچ تحریک بافت‌های ایمنی و تقویت ایمنی در ماهی تیلاپیا، می‌تواند به دلیل وجود بتا گلوکان و سایر پلی ساکاریدها در قارچ باشد که می‌تواند ماکروفاژها را برای آزادسازی اکسید نیتریک فعال کند (Harikrishnan *et al.,* 2012). همچنین سایر پلی‌ساکاریدهای موجود در قارچ (لنتینان و اسکیزوفیلان)، می‌توانند تکثیر لنفوسیت‌های T را تحریک کنند (Harikrishnan *et al.,* 2011) که در نتیجه فعالیت ایمنی و تولید سایتوکاین‌های ایمنی تقویت می‌شود. علاوه‌براین، پودر قارچ به عنوان یک پری‌بیوتیک طبیعی، می‌تواند با تغییر تعادل میکروبیوتای روده نسبت به باکتری‌های مفید (باکتری‌های اسید لاکتیک)، به طور غیرمستقیم بر پاسخ ایمنی تأثیر بگذارند (Van Doan *et al.,* 2016) که نیازمند بررسی‌های دقیق‌تری است.

به طور کلی، مطالعه حاضر تأثیر قابل‌توجه پودر قارچ دکمه‌ای سفید را بر تقویت آنتی‌اکسیدان و سیستم ایمنی در ماهی تیلاپیا نیل نشان داد. یافته‌ها نشان می‌دهد که مکمل‌های غذایی با پودر قارچ به‌ویژه در غلظت‌های ۱٪ و ۲٪، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی CAT، SOD و GPx را بهبود می‌بخشد و پراکسیداسیون لیپیدی (سطح MDA) را کاهش داد. علاوه‌براین، تیمار پودر قارچ نشانگرهای ایمونولوژیک (IgM)، فعالیت لیزوزیم و فعالیت باکتری‌کشی سرم را همراه با بیان سیتوکین‌های ایمنی IL-6، TNF-α و IL-1β در بافت‌های ایمنی کلیدی افزایش داد. این نتایج نشان می‌دهد که پودر قارچ دکمه‌ای سفید ممکن است به عنوان یک مکمل غذایی مؤثر برای ارتقاء سلامت و ایمنی ماهی عمل کند و به طور بالقوه باعث کاهش مصرف درمان‌های شیمیایی در آبزی‌پروری شود. تحقیقات آینده باید مکانیسم‌های دقیق زیربنای این اثرات تعدیل‌کننده ایمنی به‌ویژه نقش ترکیبات زیست فعال خاص را در قارچ‌ها برای پیشبرد شیوه‌های آبزی‌پروری پایدار بررسی کند.

منابع

Adineh, H., Naderi, M., Nazer, A., Yousefi, M. and Ahmadifar, E., 2021. Interactive effects of stocking density and dietary supplementation with Nano selenium and garlic extract on growth, feed utilization, digestive enzymes, stress responses, and antioxidant capacity of grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 52(4), 789-804. DOI:10.1111/jwas.12747

Ahmed, M., Abdullah, N., Yusof, H.M., Shuib, A.S. and Razak, S.A., 2017. Improvement of growth and antioxidant status in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, fed diets supplemented with mushroom stalk waste hot water extract. *Aquaculture Research*, 48(3), 1146-1157. DOI:10.1111/are.12956

Aliko, V., Qirjo, M., Sula, E., Morina, V. and Faggio, C., 2018. Antioxidant defense system, immune response and erythron profile modulation in gold fish, *Carassius auratus*, after acute manganese treatment. *Fish & Shellfish Immunology*, 76, 101-109. DOI:10.1016/j.fsi.2018.02.042

Amenyogbe, E., Droepenu, E.K., Ayisi, C.L., Boamah, G.A., Duker, R.Q., Abarike, E.D. and Huang, J.S., 2024. Impact of probiotics, prebiotics, and synbiotics on digestive enzymes, oxidative stress, and antioxidant defense in fish farming: current insights and future perspectives. *Frontiers in Marine Science*, 11, 1368436. DOI:10.3389/fmars.2024.1368436

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-19]

Amiri, O., Miandare, H.K., Hoseinifar, S.H., Shabni, A. and Safari, R., 2018. Skin mucus protein profile, immune parameters, immune-related gene expression, and growth performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed white button mushroom (*Agaricus bisporus*) powder. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 20(4): 337-347. DOI: 10.1615/IntJMedMushrooms.2018025825

AOAC, 2012. AOAC, 2012. Official methods of analysis, 13th ed. Association of Analytical Chemists, Washington, DC. 1018 P.

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 resistance against *Lactococcus garvieae*. *Aquaculture*, 448, 476-482. DOI:10.1016/j.aquaculture.2015.04.031

Cheung, L., Cheung, P.C. and Ooi, V.E., 2003. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chemistry*, 81(2), 249-255. DOI:10.1016/S0308-8146(02)00419-3

Dawood, M.A. and Koshio, S., 2018. Vitamin C supplementation to optimize growth, health and stress resistance in aquatic animals. *Reviews in Aquaculture*, 10(2), 334-350.

Elmastas, M., Isildak, O., Turkekul, I. and Temur, N., 2007. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. *Journal of Food Composition and Analysis,* 20(3-4), 337-345.

Habib, S.S., Naz, S., Khalid, S., Kanwal, R., Ameer, I., Khan, S.N.A., Rehman, A.U., Kousar, M., Khan, S.U. and Nazir, N., 2021. Effect of white button mushroom (*Agaricus bisporus*) on immunity and haematological parameters of *Oreochromis niloticus*. *Pakistan Journal of Zoology*, 7, 1-4.

Harikrishnan, R., Balasundaram, C. and Heo, M.S., 2011. Diet enriched with mushroom *Phellinus linteus* extract enhances the growth, innate immune response, and disease resistance of kelp grouper, *Epinephelus bruneus* against vibriosis. *Fish & Shellfish Immunology,* 30(1), 128-134.

Harikrishnan, R., Balasundaram, C. and Heo, M.S., 2012. Effect of *Inonotus obliquus* enriched diet on hematology, immune response, and disease protection in kelp grouper, *Epinephelus bruneus* against *Vibrio harveyi*. *Aquaculture*, 344, 48-53.

Harikrishnan, R., Naafar, A., Musthafa, M.S., Ahamed, A., Arif, I.A. and Balasundaram, C., 2018. Effect of *Agaricus bisporus* enriched diet on growth, hematology, and immune protection in *Clarias gariepinus* against *Flavobacterium columnare*. *Fish & Shellfish Immunology,* 73, 245-251. DOI:10.1016/j.fsi.2017.12.024

Herawati, E., Ramadhan, R., Ariyani, F., Marjenah, M., Kusuma, I.W., Suwinarti, W., Mardji, D., Amirta, R. and Arung, E.T., 2021. Phytochemical screening and antioxidant activity of wild mushrooms growing in tropical regions. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity,* 22(11).

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-19]

Hoseinifar, S.H., Esteban, M.Á., Cuesta, A. and Sun, Y.Z., 2015. Prebiotics and fish immune response: a review of current knowledge and future perspectives. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture,* 23(4), 315-328. DOI:10.1080/23308249.2015.1052365

Hoseinifar, S.H., Zou, H.K., Paknejad, H., Hajimoradloo, A. and Van Doan, H., 2019. Effects of dietary white-button mushroom powder on mucosal immunity, antioxidant defence, and growth of common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, 501, 448-454. DOI:10.1016/j.aquaculture.2018.12.007

Hoseinifar, S.H., Yousefi, S., Van Doan, H., Ashouri, G., Gioacchini, G., Maradonna, F. and Carnevali, O., 2020. Oxidative stress and antioxidant defense in fish: the implications of probiotic, prebiotic, and synbiotics. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture,* 29(2), 198-217.

Khosravi, M., Mohammadian, T., Tahmasebifard, M. and Boroujeni, M.P., 2018. Correlation between C-reactive protein level, immunology, and hematology of a *Oncorhynchus mykiss* infected with *Lactococcus garvieae*. *Aquaculture International,* 26, 1415-1425. DOI:10.1007/s10499-018-0295-6

Krishnan, R., Kurcheti, P.P., Mushtaq, Z. and Jeena, K., 2019. Interferon-regulatory factors, IRF3 and IRF7 in Asian seabass, *Lates calcarifer*: Characterization, ontogeny and transcriptional modulation upon challenge with nervous necrosis virus. *Fish & Shellfish Immunology,* 89, 468-476. DOI: 10.1016/j.fsi.2019.03.073

Li, K., Qiu, H., Yan, J., Shen, X., Wei, X., Duan, M. and Yang, J., 2021. The involvement of TNF-α and TNF-β as proinflammatory cytokines in lymphocyte-mediated adaptive immunity of Nile tilapia by initiating apoptosis. *Developmental & Comparative Immunology,* 115, 103884.

Li, Q., Jiang, B., Zhang, Z., Huang, Y., Xu, Z., Chen, X., Cai, J., Huang, Y. and Jian, J., 2022. CRP involved in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) against bacterial infection. *Biology,* 11(8), 1149. DOI: 10.3390/biology11081149

Li, X., Jiang, B., Zhang, Z., Huang, M., Feng, J., Huang, Y., Amoah, K., Huang, Y. and Jian, J., 2023. Interleukin-8 involved in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against bacterial infection. *Fish & Shellfish Immunology,* 141, 109004.

Mohammadian, T., Dezfuly, Z.T., Motlagh, R.G., Jangaran-Nejad, A., Hosseini, S.S., Khaj, H. and Alijani, N., 2020. Effect of encapsulated *Lactobacillus bulgaricus* on innate immune system and hematological parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), post-administration of Pb. *Probiotics and Antimicrobial Proteins,* 12, 375-388.

Mohan, K., Karthick Rajan, D., Muralisankar, T., Ramu Ganesan, A., Marimuthu, K. and Sathishkumar, P., 2022. The potential role of medicinal mushrooms as prebiotics in aquaculture: A review. *Reviews in Aquaculture,* 14(3), 1300-1332.

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-19]

Muller, P.Y., Janovjak, H., Miserez, A.R. and Dobbie, Z., 2002. Short technical report processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *Biotechniques,* 32(6), 1372-1379.

Ramesh, C. and Pattar, M.G., 2010. Antimicrobial properties, antioxidant activity and bioactive compounds from six wild edible mushrooms of western ghats of Karnataka, India. *Pharmacognosy Research,* 2(2), 107.

Safari, O. and Sarkheil, M., 2018. Dietary administration of eryngii mushroom (*Pleurotus eryngii*) powder on haemato-immunological responses, bactericidal activity of skin mucus and growth performance of koi carp fingerlings (*Cyprinus carpio* koi). *Fish & Shellfish Immunology,* 80, 505-513. DOI: 10.1016/j.fsi.2018.06.046

Saha, T.K., Mariom, Rahman, T., Moniruzzaman, M., Min, T. and Hossain, Z., 2023. Immuno-physiological effects of dietary reishi mushroom powder as a source of beta-glucan on Rohu, *Labeo rohita* challenged with *Aeromonas veronii*. *Scientific Reports*, 13(1), 14652. DOI:10.1038/s41598-023-41557-9

Shafiujjaman, M., Mandal, S.C., Moniruzzaman, M., Habibullah-Al-Mamun, M., Shaikh, M.A.A., Watanabe, K. and Hossain, A., 2024. Environmental and human health risk of potentially toxic metals in freshwater and brackish water Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) aquaculture. *Environmental Geochemistry and Health*, 46(11), 477.

Sharpe, E., Farragher-Gnadt, A.P., Igbanugo, M., Huber, T., Michelotti, J.C., Milenkowic, A., Ludlam, S., Walker, M., Hanes, D. and Bradley, R., 2021. Comparison of antioxidant activity and extraction techniques for commercially and laboratory prepared extracts from six mushroom species. *Journal of Agriculture and Food Research,* 4, 100130.

Sherif, A.H. and AbuLeila, R.H., 2022. Prevalence of some pathogenic bacteria in caged-Nile Tilapia (*Oreochromis Niloticus*) and their possible treatment. *Jordan Journal of Biological Sciences,* 15(2). DOI: 10.54319/jjbs/150211

Sîrbu, E., Dima, M.F., Tenciu, M., Cretu, M., Coadă, M.T., Țoțoiu, A., Cristea, V. and Patriche, N., 2022. Effects of dietary supplementation with probiotics and prebiotics on growth, physiological condition, and resistance to pathogens challenge in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fishes*, 7(5), 273.

Subaramaniyam, U., Allimuthu, R.S., Vappu, S., Ramalingam, D., Balan, R., Paital, B., Panda, N., Rath, P.K., Ramalingam, N. and Sahoo, D.K., 2023. Effects of microplastics, pesticides and nano-materials on fish health, oxidative stress and antioxidant defense mechanism. *Frontiers in Physiology*, 14, 1217666.

Sun, Y.Z., Yang, H.L., Ma, R.L. and Lin, W.Y., 2010. Probiotic applications of two dominant gut Bacillus strains with

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-19]

antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper *Epinephelus coioides*. *Fish & Shellfish Immunology*, 29(5), 803-809. DOI:10.1016/j.fsi.2010.07.018

Van Doan, H., Doolgindachbaporn, S. and Suksri, A., 2016. Effects of Eryngii mushroom (*Pleurotus eryngii*) and *Lactobacillus plantarum* on growth performance, immunity and disease resistance of Pangasius catfish (*Pangasius bocourti*, Sauvage 1880). *Fish Physiology and Biochemistry,* 42, 1427-1440. DOI:10.1007/s10695-016-0230-6

Yan, J., Li, Y., Liang, X., Zhang, Y., Dawood, M.A., Matuli'c, D. and Gao, J., 2017. Effects of dietary protein and lipid levels on growth performance, fatty acid composition and antioxidant-related gene expressions in juvenile loach *Misgurnus anguillicaudatus*. *Aquaculture Research*, 48(10), 5385-5393. DOI:10.1111/are.13352

Zhang, Z., Niu, J., Li, Q., Huang, Y., Jiang, B., Wu, Y., Huang, Y. and Jian, J., 2021. HMG20A from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) involved in the immune response to bacterial infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 119, 499-507. DOI:10.1016/j.fsi.2021.10.032

Zhu, L., Wang, S., Cai, Y., Shi, H., Zhou, Y., Zhang, D., Guo, W. and Wang, S., 2023. Effects of five prebiotics on growth, antioxidant capacity, non-specific immunity, stress resistance, and disease resistance of juvenile hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*♀× *Epinephelus lanceolatus*♂). *Animals*, 13(4), 754. DOI:10.3390/ani13040754

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-19]