شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۷۷، شماره ۱، بهار ۱۴۰۳
صفحات ۱۰۵-۹۳

ارزیابی اثرات فیزیولوژیک اسپور قارچ *Trichoderma* sp. بر برخی فاکتورهای رشد، خون‌شناسی و آنالیز تقریبی ترکیب لاشه در بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

فرشته زراعت‌پیشه[۱]، حمید فرحمند[۲*]، علیرضا میرواقفی[۲]، مرضیه حیدریه[۳]، سمیرا شهبازی[۴]

۱. دانشجوی دکتری، گروه شیلات، دانشکدهٔ منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
۲. استاد گروه شیلات، دانشکدهٔ منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
۳. دانشیار پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، تهران، ایران
۴. دانشیار پژوهشکدهٔ کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، کرج ، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۲۲

چکیده

طی سال‌های متمادی با افزایش جمعیت، تقاضای روزافزون بشر برای مصرف مواد غذایی و اهمیت حفظ امنیت محیط‌زیست باعث گردیده تا محققین به استفاده از ریزجانداران برای افزایش میزان محصول در واحد سطح بیش از گذشته توجه نمایند. برخی سویه های قارچ تریکودرما (*Trichoderma* sp.) به‌عنوان محرک رشد در گیاهان شناخته شده‌اند. حساسیت سویه های مختلف ماهی به مواد سمی متفاوت است، از این‌رو آزمایش‌های سم‌شناسی بر روی ماهیان مختلف صورت می‌گیرند. در این آزمایش ۱۲۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با ۳ گونه قارچ تریکودرما (*Trichoderma afroharzianum*، *Trichoderma ghanens* و *Trichoderma lixii*)، تیمار ۱ (TC-1)، تیمار ۲ (TC-3)، تیمار ۳ (TC-4) و تیمار شاهد (CL) به‌صورت کاملاً تصادفی تغذیه شدند. فاکتورهای رشد (میزان رشد روزانه، درصد افزایش وزن، ضریب رشد ویژه و ضریب تبدیل غذایی)، آنالیز تقریبی لاشه (پروتئین، چربی، خاکستر و رطوبت) و خون‌شناسی (هموگلوبین، هماتوکریت، گلبول سفید و قرمز، نوتروفیل، مونوسیت، لنفوسیت، میانگین هموگلوبین گلبول‌های قرمز (MCHC)، اندازهٔ گلبول‌های قرمز (MCV)، متوسط هموگلوبین در گلبول‌های قرمز (MCH)) بررسی شدند. بهبود فاکتورهای رشد در تیمار (TC-3) اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها و گروه شاهد داشت. ارزیابی پارامترهای خونی در این تحقیق بیانگر آن بود که به‌صورت معنی‌داری قارچ تریکودرما منجر به کاهش سطح این فاکتورها در بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌گردد. آنالیز لاشه بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمارهای تغذیه شده توسط سویه‌های مختلف تریکودرما نشان داد که میزان پروتئین، چربی و میزان رطوبت در گروه‌های شاهد و تیمارهای تغذیه شده با قارچ تریکودرما تفاوت معنی‌داری نداشتند، اما کمترین میزان کلسترول و تری‌گلیسیرید در شاهد مشاهده شد. با توجه به تغییر فاکتورهای هماتولوژی ماهی‌های تحت تیمار تغذیه شده با قارچ تریکودرما، سنجش این فاکتورها می‌تواند به‌عنوان یک شاخص زیستی، ابزار پایش و ارزیابی سلامت اکوسیستم‌های آبی بهره گرفت. با توجه به ضرورت استفاده از سموم شیمیایی کنترل آفات و سمیت آن‌ها حتی در غلظت‌های بسیار اندک بر ماهی، بررسی پیامدهای نامطلوب سموم شیمیایی بر سلامت آبزیان، از دیدگاه شیلاتی و محیط‌زیستی حائز اهمیت است.

واژگان کلیدی: اسپور قارچ تریکودرما، فاکتورهای رشد، فاکتورهای خونی، بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

* نویسنده مسئول: حمید فرحمند
Email: hfarahmand@ut.ac.ir

Journal of Fisheries
Vol. 77, No. 1, Spring 2024
pp. 93-105

Evaluation of the physiological effects of *Trichoderma* sp. on growth factors, hematology and approximate analysis of carcass composition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Fereshteh Zeraat Pisheh[1], Hamid Farahmand[2*], Alireza Mirvaghefi[2], Marzieh Heidarieh[3], Samira Shahbazi[4],

1. Ph. D student of Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
2. Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
3. Associate Professor, Nuclear Science and Technology Research Institute, Tehran, Iran
4. Associate Professor, Nuclear Agricultural School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Karaj, Iran

Received: 29-Jan-2024 **Accepted: 12-Mar-2024**

Abstract

Over many years, with the increase in population, the increasing human demand for food consumption and the importance of maintaining environmental security, researchers have paid attention to the use of microorganisms to increase the amount of product per unit area more than in the past. Some species of Trichoderma fungus are known as growth promoters in plants. The sensitivity of different species of fish to toxic substances is different, so toxicology tests are done on different fish. In this experiment, 120 pieces of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with 3 types of Trichoderma fungi (*Trichoderma afroharzianum, Trichoderma ghanens, Trichoderma lixii*), treatment 1 (TC-1), treatment 2 (TC-3), treatment 3 (TC-4) and control treatment (CL) were fed completely randomly. Finally, growth factors (daily growth rate, weight gain percentage, specific growth factor, food conversion factor), approximate carcass analysis (protein, fat, ash, and moisture), and hematology (hemoglobin, hematocrit, white and red blood cells, neutrophils, Monocyte, lymphocyte, mean hemoglobin red blood cells (MCHC), size red blood cells (MCV), mean hemoglobin red blood cells (MCH)) were evaluated. The investigation growth factors showed that the treatment (TC-3) had significant difference with other treatments and the control group. Also, the evaluation of blood parameters in this research showed that *Trichoderma* significantly reduces the level of these factors in rainbow trout. The analysis of the rainbow trout carcasses in the treatments fed by different strains of *Trichoderma* showed that the amount of protein, fat and moisture in the control groups and the treatments were not significantly different; but the lowest amount of cholesterol and triglyceride was observed in the control. Considering the changes in the hematological factors of fish treated with Trichodema, the measurement of these factors can be used as biological index, a tool for monitoring and evaluating the health of aquatic ecosystems. Since it is necessary to use chemical pesticides and their toxicity even in very small concentrations on fish, it is important to investigate the adverse effects of chemical pesticides on aquatic health from the perspective of fisheries and environment.

Keyword: Fungus, Toxicity, Blood count, Hypothermia, Carcass composition

∗ Corresponding author: Hamid Farahmand Email: hfarahmand@ut.ac.ir

۱. مقدمه

افزایش مناطق کشاورزی و افزایش تولید محصولات کشاورزی موجب نیاز به استفادهٔ بیشتر از سموم دفع آفات را الزامی کرده و تا حجم بسیار زیادی پساب‌های کشاورزی که حاوی ترکیبات شمیایی زیادی هستند وارد اکوسیستم‌های آبی می‌شوند. با این آگاهی، ماهی بخش مهمی از یک رژیم غذایی متعادل است. استفاده از محصولات کشاورزی که به منظور آفت‌زدایی از سموم دفع آفات استفاده کرده‌اند و وارد سبد غذایی شده‌اند؛ باعث گردیده این سموم در جوامع انسانی به‌صورت نامحسوس گسترش یابد. این آلودگی‌ها پس از وارد شدن به اکوسیستم، در اندام‌ها و بافت‌های آبزیان تجمع یافته و در نهایت وارد زنجیرهٔ غذایی انسانی می‌شوند. میزان جذب و تجمع سموم در آبزیان خصوصاً ماهیان تابع شرایط اکولوژیک، فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیک محیط آبی، نوع عنصر آلاینده و موجود آبزی و فیزیولوژی بدن آن است. در دهه‌های اخیر با افزایش جمعیت، تقاضای روزافزون مصرف مواد غذایی و اهمیت حفظ امنیت محیط‌زیست باعث گردیده تا محققین به استفاده از ریز جانداران برای افزایش میزان محصول در واحد سطح بیش از گذشته توجه نمایند. برخی سویه‌های تریکودرما به‌عنوان محرک رشد گیاهان شناخته شده‌اند (Kleifeld & Chert, 1992).

ماهی یکی از مهمترین موجودات آبزی است که به علت ارزش اقتصادی و حساسیت در مقابل آلاینده‌ها از اهمیت خاصی برخوردار هستند، به‌همین دلیل جهت انجام آزمایش‌های زیست‌سنجی در بعد وسیعی از آن‌ها استفاده می‌گردد. حساسیت گونه‌های مختلف ماهی به مواد سمی متفاوت است (Hedayati & Jahanbakhshi, 2017)؛ از این‌رو ضروری است تا آزمایش‌های سم‌شناسی برای ماهیان مختلف صورت گیرد.

به‌طور کلی سمیت یک آلاینده از طریق آزمایش سنجش زیستی ارزیابی می‌گردد که به‌وسیلهٔ آن غلظت لازم جهت ایجاد تلفات نیمی از موجودات مورد آزمایش در یک دورهٔ زمانی مشخص (کوتاه و بلند مدت) معلوم می‌شود. این آزمایش‌ها شاخه‌ای از علم سم‌شناسی محیطی بوده و وظایف آن قضاوت درباره توان بالقوهٔ مواد آلاینده و بررسی اثرات زیان‌بخش این مواد بر اکوسیستم‌ها و موجودات زنده در آن می‌باشد. آلاینده‌های شیمیایی اندام‌های مختلف از جمله آبشش‌ها، کلیه و کبد را تحریک می‌کنند و این بافت‌ها ارائه‌دهندهٔ یک ابزار مفید جهت سنجش اثرات آلاینده‌های خارجی هستند (Yancheva *et al*., 2016). گونه‌های *Trichoderma* spp. از قارچ‌های خاک‌زی هستند که در اغلب خاک‌ها یافت می‌شوند و مرحلهٔ غیرجنسی *Hypocrea* spp. از راستهٔ آسکومیست‌ها هستند. گونه‌های این قارچ جزء متداول‌ترین میکروارگانیسم‌های مفید در کشاورزی هستند زیرا به آسانی تکثیر می‌شوند و به‌عنوان عامل کنترل زیستی علیه دامنهٔ وسیعی از سایر ارگانیسم‌های بیمارگر مانند باکتری‌ها، پروتوزوآها و نماتودها شناخته می‌شود (Sun *et al*., 2016). از دلایل موفقیت این عامل کنترل زیستی، علاوه بر دامنهٔ تأثیر وسیع بر عوامل بیماری‌زا، قدرت زنده‌مانی مناسب در شرایط محیطی مختلف و قدرت رقابت بالا با سایر میکروارگانیسم‌ها و آسانی کاربرد تریکودرما در خاک است. همچنین مطالعات مختلف نشان داده است که سویه‌های تریکودرما اثرات سوئی بر گیاهان میزبان و حشرات مفید موجود در اکوسیستم ندارد. همین ویژگی‌ها باعث شده تریکودرما در بین عوامل کنترل زیستی از جایگاه ویژه‌ای برخوردار شود (Abdullah *et al*., 2021).

ماهی یکی از مهمترین موجودات آبزی است که به‌علت ارزش اقتصادی و حساسیت در مقابل آلاینده‌ها از اهمیت خاصی در بررسی سمیت ترکیبات کنترل آفات کشاورزی برخوردار است و باید بر روی قوطی کلیهٔ ترکیبات شیمایی کنترل کنندهٔ آفات گیاهی میزان سمیت آنها بر ماهی درج گردد زیرا بخشی از سموم استفاده شده در کشاورزی ممکن است وارد آب شده و آبزیان را تحت تأثیر قرار دهند. حساسیت گونه‌های مختلف ماهی به مواد شیمیایی سمی متفاوت است اما برای بسیاری از ترکیبات زیستی این مطالعات به‌صورت محدود انجام شده است (Hedayati and Jahanbakhshi, 2017)؛ به‌همین دلیل انجام آزمایش‌های زیست‌سنجی بر روی ماهی برای ترکیبات کنترل‌کنندهٔ آفات (شیمیای و زیستی) توصیه می‌شود. البته در این ارزیابی‌ها تنها میزان سمیت و کشندگی این ترکیبات گزارش می‌شود در حالی‌که مطالعهٔ تأثیرات فیزیولوژیک می‌تواند دانش ما را از نحوهٔ تأثیر این ترکیبات بر ماهی به‌عنوان بخشی از اکوسیستم افزایش دهد. هدف از این تحقیق بررسی ارزیابی تأثیرات فیزیولوژیک برخی از گونه‌های تریکودرمای پرکاربرد در کنترل زیستی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) جوان می‌باشد.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. طرح آزمایش

۱۲۰ قطعه بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با میانگین وزن ۰/۵±۶۱ گرم از مرکز پرورش ماهی در شهرستان یاسوج خریداری و با ماشین مخصوص حمل آبزیان به پژوهشکدهٔ خلیج‌فارس، بوشهر منتقل شد. ابتدا جهت سازگاری بچه ماهی‌ها در تانک‌های فایبرگلاس ۳۰۰ لیتری به‌مدت دو هفته نگه‌داری شدند و با خوراک تجاری کیمیاگران، تغذیهٔ مخصوص قزل‌آلا رنگین‌کمان تغذیه شدند.

از کلکسیون میکروبی پژوهشکدهٔ کشاورزی هسته‌ای-پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، ۳ سویه فعال قارچ تریکودرمای بومی ایران متعلق به گونه‌های *Trichoderma afroharzianum*، *Trichoderma ghanens* و *Trichoderma lixii* دارای شماره دسترسی در بانک اطلاعات جهانی ژنوم (جدول ۱) دریافت شد. از کشت فعال هر یک از سویه‌ها بر روی محیط کشت PDA[1] سوسپانسیون اسپور با غلظت ۲×۱۰^{۸} اسپور در میلی‌لیتر با استفاده از هموسایتومتر تهیه و هر میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپور با ۴ میلی‌لیتر روغن مایع (به‌عنوان تعلیق‌کنندهٔ خوراکی) مخلوط گردید. یک لیتر از سوسپانسیون مذکور بر هر کیلوگرم جیرهٔ غذایی اسپری و تا زمان خشک شدن خوراک در معرض هوای آزاد قرار گرفت تا غلظت نهایی اسپور در خوراک در حدود $۱۰^{۸}$ اسپور در کیلوگرم باشد. فعال بودن اسپور تریکودرما در خوراک ماهی تیمار شده با نمونه‌برداری تصادفی و کشت مجدد در بر روی محیط کشت PDA بررسی و تأیید گردید. خوراک هر تیمار به‌صورت جداگانه در محفظهٔ پلاستیکی در یخچال (۴ درجهٔ سانتی‌گراد) نگهداری شد. تمام مراحل ساخت غذا در مورد جیرهٔ گروه شاهد نیز انجام شد و فقط اسپور تریکودرما به غذای گروه شاهد اضافه نگردید. تانک‌ها روزانه به میزان ۹۰ درصد تعویض آب انجام شد و اکسیژن و دما با دستگاه قابل حمل مدل oxyguard ساخت کشور دانمارک و pH نیز با دستگاه مدل هانا ساخت کشور چین به‌صورت روزانه در ۲ مرحله اندازه‌گیری شد. آزمایش در ۳ تکرار به‌صورت کاملاً تصادفی به همراه شاهد (cl) بر روی ماهی‌هایی که در ۱۲ تانک ۳۰۰ لیتری تقسیم شده بودند انجام و ماهیان در تمامی تیمارها با خوراک تجاری شرکت کیمیاگران که آنالیز تقریبی آن در جدول ۲ ارائه شده است به‌صورت روزانه در دو نوبت به میزان ۲ درصد وزن بدن ماهیان به‌مدت ۶ هفته تغذیه شدند.

جدول ۱. اسامی علمی سویه قارچ‌های استفاده شده در آزمایش به‌همراه علامت اختصاری و کد دسترسی آنها

نام علمی سویه قارچ	کد سویه	
	والد	والد
Trichoderma afroharzianum	MW714049	TC-1
Trichoderma ghanens	MW719590	TC-3
Trichoderma lixii	MW719563	TC-4

جدول ۲. آنالیز تقریبی خوراک تجاری مخصوص قزل آلای رنگین کمان

ترکیبات	درصد مواد خام
پروتئین	۴۸-۵۲
چربی	۹-۱۳
رطوبت	۱۲
خاکستر	۱۱-۱۵
فسفر	۱-۱/۴

[1] Potatoe Dextrose Agar

۲.۲. تعیین شاخص‌های عملکرد رشد و بازماندگی

شاخص‌های عملکرد رشد و بازماندگی همهٔ ماهیان در آخر دوره، اندازه‌گیری که جهت بررسی میزان رشد ابتدا توزین شدند و وزن متوسط، میزان رشد روزانه، درصد افزایش وزن (WG)، ضریب رشد ویژه (SGR) و ضریب تبدیل غذایی (FCR) محاسبه شد.

= درصد بقاء
{(تعداد ماهی‌ها انتهای دوره–تعداد ماهی‌های ابتدای دوره)} ×۱۰۰

= ضریب تبدیل غذایی (FCR)
{میزان غذای خشک خورده شده/میزان افزایش وزن بدن}

افزایش وزن بدن (بر حسب میلی‌گرم)= (وزن ثانویه–وزن اولیه)

= درصد افزایش وزن بدن
{(وزن نهایی–وزن ابتدایی)/(وزن ابتدایی)}× ۱۰۰

= سرعت رشد (میلی‌گرم/ روز)
{(وزن نهایی–وزن ابتدایی)/(دورهٔ پرورش به روز)}

= ضریب رشد ویژه (SGR) (درصد در روز)
{(لگاریتم طبیعی وزن نهایی–لگاریتم طبیعی وزن ابتدایی)/(دورهٔ پرورش (روز)} ×۱۰۰

۳.۲. شاخص‌های هماتولوژی

در پایان به‌منظور ارزیابی فاکتورهای خونی ۲۴ ساعت قبل از نمونه‌برداری غذادهی ماهیان متوقف شد و ۱۸ ماهی از هر تیمار (از هر تکرار ۶ ماهی) به‌طور تصادفی نمونه‌برداری شدند و پس از بیهوشی کامل ماهیان در محلول پودر گل میخک (۲۰۰ppm) ماهی را خارج کرده و سپس قسمت دمی آن را با حوله کاملاً خشک کرده و خون‌گیری با سرنگ دو سی‌سی از ساقهٔ دمی انجام شد. شمارش گلبول‌های سفید (WBC) و گلبول‌های قرمز (RBC) خون به روش هموسیتومتری انجام گرفت. به‌منظور کاهش خطای آزمایش، شمارش گلبول‌های سفید و قرمز در ۳ مرحله انجام شد (Schalm *et al.*, 1975). هماتوکریت به روش میکروهماتوکریت محاسبه شد، بدین‌صورت که لوله‌های میکروهماتوکریت به‌مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند (Feldman, 2000). سپس میزان هماتوکریت برحسب درصد با خط‌کش مخصوص میکروهماتوکریت تعیین شد. برای اندازه‌گیری هموگلوبین، دستگاه اسپکتروفتومتر با محلول درآبکین شاهد صفر شده و سپس برای سنجش جذب نوری محتویات لوله‌ها، دستگاه با طول موج ۵۴۶ نانومترتنظیم شد. مقدار قرائت شده از روی دستگاه برای محاسبهٔ میزان هموگلوبین با منحنی استاندارد مقایسه شد و بر حسب گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر به‌دست آمد (Drobkin, 1945).

RBC (میانگین حجم گویچه‌ها بر حسب فمتولیتر) که Hct درصد هماتوکریت و RBC تعداد کل گلبول‌های قرمز است.

MCH= Hb×10/RBC (میانگین هموگلوبین گویچه‌ها برحسب پیکوگرم) که HB غلظت هموگلوبین بر حسب گرم در دسی‌لیتر است.

MCHC=HB×100/HCT (میانگین غلظت هموگلوبین گویچه‌ها بر حسب گرم در دسی لیتر)

۴.۲. آنالیز تقریبی لاشه بچه ماهی‌ها

بعد از ۶ هفته پرورش، ۳ عدد ماهی از هر تکرار، از تانک خارج شده و پس از فیله کردن بافت، عضلات شستشو و با چرخ گوشت همگن گردیدند و در ظروف جداگانه قرار گرفتند. سپس فاکتورهای چربی، رطوبت و خاکستر آن‌ها مورد سنجش قرار گرفت (AOAC, 2000). میزان رطوبت با استفاده از آون (مدل F.A. G) در دمای ۱۰۵ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت سنجش گردید. خاکستر نیز با سوزاندن نمونه‌ها در دمای ۵۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۵ ساعت در داخل کوره مدل (BATEC PC21A) اندازه‌گیری شد. پروتئین کل با استفاده از دستگاه کجلدال (Kjeltec Analyzer Unit Foss 2300) محاسبه شد. چربی کل نیز با استفاده از دستگاه FOSS (Soxtec 2050) و کلروفرم اندازه‌گیری شد.

$$\text{Moisture (\%)} = [(W_1-W_2)/W] \times 100$$

W_1=وزن نمونه قبل از رطوبت‌گیری+وزن پتری‌دیش خالی (گرم)
W_2= وزن نمونه بعد از رطوبت‌گیری+وزن پتری‌دیش خالی (گرم)
W=وزن نمونه (گرم)

میزان خاکستر نیز با قرار دادن نمونهٔ خام در کورهٔ الکتریکی در دمای ۵۵۰ درجهٔ سلسیوس و با جای‌گذاری در فرمول ۲ تعیین شد (AOAC, 2005).

فرمول ۲:

= درصد خاکستر
وزن بوته چینی ثانویه (بعد از کوره)–وزن بوتهٔ چینی اولیه/وزن نمونهٔ اولیه گوشت ماهی× ۱۰۰

۵.۲. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کلموگروف-اسمیرنوف مورد سنجش قرار گرفت. از آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه برای مقایسهٔ میانگین‌ها بین تیمارها استفاده شد. سطح معنی‌دار بودن از طریق آزمون دانکن مشخص شد (در سطح احتمال ۵ درصد) از نرم‌افزار آماری SPSS نسخهٔ ۲۲ برای آنالیز داده‌ها و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel نسخهٔ ۲۰۱۹ استفاده شد.

۳. نتایج

۱.۳. رشد

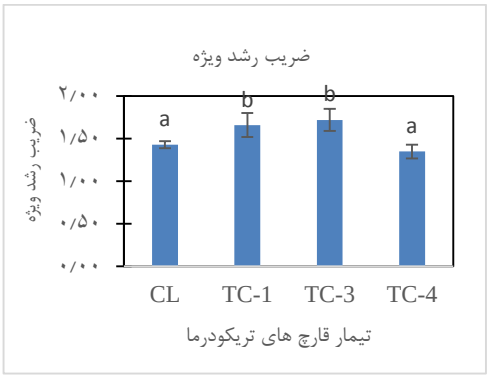
در این آزمایش مقادیر مربوط به میانگین دما (۰/۳۰±۱۸ درجهٔ سانتی‌گراد)، pH (۰/۰۲۵ ±۸/۵) و اکسیژن محلول (۰/۰۴۶±۷/۳۲ میلی‌گرم در لیتر) در همهٔ تیمارها در طول دوره‌ی آزمایش اندازه‌گیری شد.

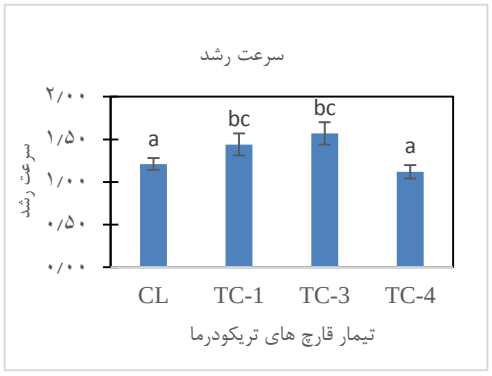
نتایج حاصل از بررسی تغییرات وزن بدن بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان بر حسب گرم در تیمارهای تغذیه شده توسط سویه های مختلف از قارچ تریکودرما، در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج به‌دست آمده از میانگین وزن بدن ماهی در هر تیمار نشان می‌دهد که بیشترین وزن در گروه TC-2 و کمترین وزن در گروه شاهد و TC-1 مشاهده شد. میانگین وزن در بین گروه شاهد و TC-3 تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($P>0/05$). نتایج حاصل نشان داد که ضریب تبدیل غذایی در بین گروه‌ها با تفاوت معنی‌داری مشاهده شد. به‌طوری که بیشترین میزان در بین گروه‌های شاهد مشاهده شد ($P<0/05$). همچنین کمترین میزان در گروه TC-2 مشاهده شد ($P<0/05$). همان‌طور که در نمودار مشاهده می‌شود تفاوت قابل توجهی بین گروه شاهد و TC-3 مشاهده نشد ($P>0/05$). همچنین اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای TC-1 و TC-2 مشاهده نشد ($P>0/05$).

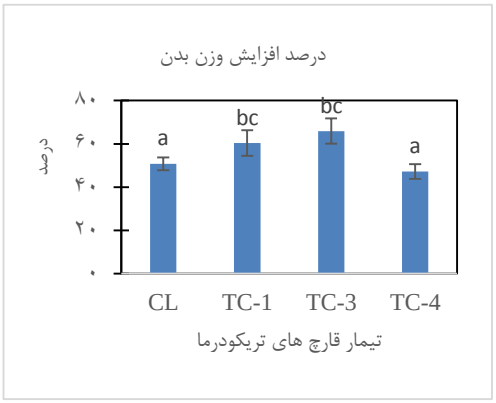
براساس نتایج شکل ۱، نرخ رشد محاسبه شده در تیمار TC-1 و TC-2 اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد داشت ($P<0/05$). تیمار TC-3 اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد مشاهده نشد ($P> 0/05$).

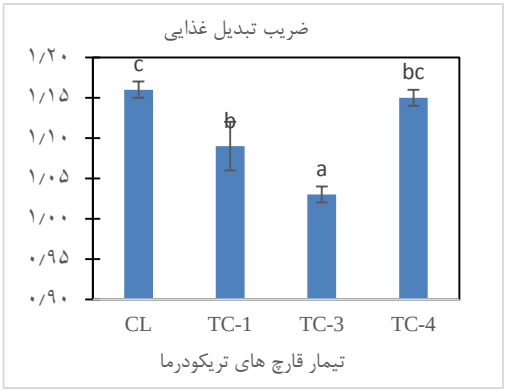
نتایج حاصل از بررسی فاکتورهای خونی بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمارهای تغذیه شده توسط سویه‌های مختلف از قارچ تریکودرما، در جدول ۳ نشان‌دهندهٔ آن است بیشترین تعداد گلبول قرمز در گروه کنترل مشاهده شد که در مقایسه با سایر گروه‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده شده است ($P<0/05$). لازم به ذکر است کمترین میزان در گروه TC-1 مشاهده شد. تعداد گلبول قرمز در بین تیمارهای TC-2 و TC-3 تفاوتی وجود نداشت ($P>0/05$). گروه‌های تغذیه شده با قارچ تریکودرما باعث افزایش تعداد گلبول‌های سفید شده است؛ به‌طوری‌که گروه‌های تغذیه شده با قارچ تریکودرما افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد داشتند ($P<0/05$). لازم به ذکر است که در مقایسهٔ تعداد گلبول‌های سفید بین گروه‌های دیگر اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($P>0/05$). نتایج به‌دست آمده از میزان درصد هماتوکریت نشان داد که بیشترین درصد هماتوکریت در گروه شاهد مشاهده شد که با سایر گروه‌ها اختلاف معنی‌داری نشان داده است درحالی‌که در بین سایر تیمارها، کمترین میزان در TC-1 مشاهده شد. همچنین بین گروه‌های TC-2 و TC-3 تفاوت معنی‌داری وجود نداشت.

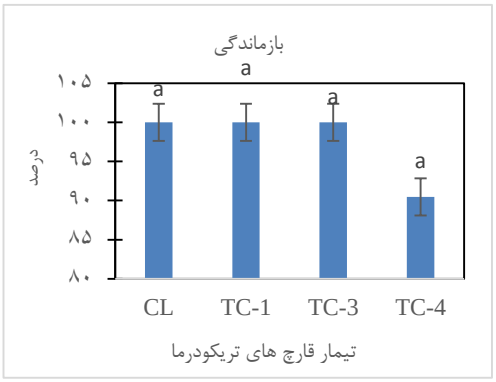
نتایج به‌دست آمده از غلظت هموگلوبین نشان داد که بیشترین میزان هموگلوبین در گروه شاهد مشاهده شد که با سایر گروه‌ها اختلاف معنی‌داری نشان داده است. کمترین میزان هموگلوبین در گروه TC-1 مشاهده شد، در حالی که در بین گروه‌های TC-3 و TC-2 اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد ($P>0/05$). با توجه به نتایج جدول ۳، بیشترین میزان MCV در گروه شاهد و TC-2 و کمترین میزان در تیمارهای TC-3 و TC-1مشاهده شد، اما اختلاف معنی‌داری در بین گروه شاهد و دیگر گروه‌ها نشان نداند ($P> 0/05$). همان‌طور که در جدول ۲ نشان داده شده است میزان MCHC گروه شاهد با سایرگروه-های آزمایش دارای اختلاف معنی‌دار هستند و کمترین میزان را به‌خود اختصاص داد ($P< 0/05$). بیشترین میزان MCHC در TC-1 و TC-3 مشاهده شد ($P<0/05$). تعداد گلبول‌های سفید نوتروفیل در گروه TC-2 نسبت به گروه‌های دیگر افزایش یافته است. کمترین میزان نوتروفیل در گروه شاهد مشاهده شد. به‌طوری‌که در بین گروه‌های دیگر تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. میزان لنفوسیت در گروه شاهد و گروه‌های تغذیه شده با سویه های والد نشان داده شده است. به‌عبارتی بیشترین میزان در گروه شاهد و کمترین میزان در گروه TC-2 مشاهده شد. همچنین میزان لنفوسیت در گروه TC-3 و TC-2 تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. با توجه به نتایج جدول ۳، بیشترین میزان مونوسیت در گروه تغذیه شده TC- 3 و کمترین میزان در گروه شاهد مشاهده شد. بین گروه‌های TC-1 و TC-2 تفاوت معنی‌داری وجود نداشت.

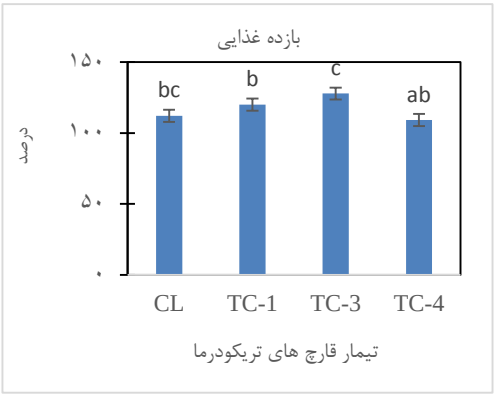












شکل ۱- میزان وزن نهایی، ضریب تبدیل غذایی، سرعت رشد، ضریب رشد ویژه، افزایش بیومس، درصد افزایش بیومس و بازدهٔ غذایی، بازماندگی در ماهی‌قزل‌آلا رنگین‌کمان (*O. mykiss*) در تیمارهای واجد قارچ تریکودرما (تیمار TC-1 (*Trichoderma afroharzianum*)، تیمار TC-2 (*Trichoderma ghanens*)، تیمار TC-3 (*Trichoderma lixii*) و تیمار شاهد (CL).

جدول ۳- پارامترهای مربوط به شاخص‌های هماتولوژی تیمارهای مختلف در پایان دورهٔ آزمایش (میانگین±انحراف معیار). حروف انگلیسی یکسان به معنی عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین تیمارها در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.

تیمار/ پارامترها	شاهد	TC-1	TC-2	TC-3
هموگلوبین (g/L)	۷/۶۳±۰/۱۵ e	۶/۵۳±۰/۱۵ a	۷/۰±۰/۳۰ bc	۷/۲۳±۰/۰۵cd
هماتوکریت(٪)	۴۶±۱/۵۲ d	۳۹±۱ a	۴۲±۱ bc	۴۳±۱bc
گلبول سفید(mm3)	۶۸۵۰±۴۵۰ a	۹۰۰۰±۱۰۰ b	۹۷۵۰±۳۵۰ b	۹۱۵۰±۵۰ b
گلبول‌قرمز104×(mm3)	۱۴۸±۵f	۱۲۷±۳ab	۱۳۵±۳ cd	۱۳۹/۵±۳/۵ cd
(pg)MCV	۳۱۳/۳۳±۰/۵۷ ab	۳۰۷±۱a	۳۱۰/۳۳±۰/۵۷ ab	۳۰۸/۳۳±۰/۵۷a
MCH(٪)	۵۲±۴ ab	۵۱/۵۳±۰/۰۵ a	۵۱/۷۳±۱/۰۵ ab	۵۱/۹۳±۰/۹۵ ab
(fl) MCHC	۱۶/۵±۱ a	۱۶/۷۳±۰/۰۵ abc	۱۶/۶۰±۰/۳ ab	۱۶/۸۳±۰/۲۵ abc
نوتروفیل (٪)	۱۲/۳۳±۰/۵۷ a	۱۵±۱ b	۱۶/۳۳±۰/۵۷b	۱۶/۳۳±۰/۵۷b
لنفوسیت (٪)	۸۵±۱ e	۸۱±۰ cd	۷۸/۳۳±۰/۵۷ b	۷۹/۳۳±۰/۵۷ bc
مونوسیت (٪)	۲/۳۳±۰/۵۷ ab	۳/۳۳±۰/۵۷ bc	۳/۳۳±۰/۵۷ bc	۴±۱ c

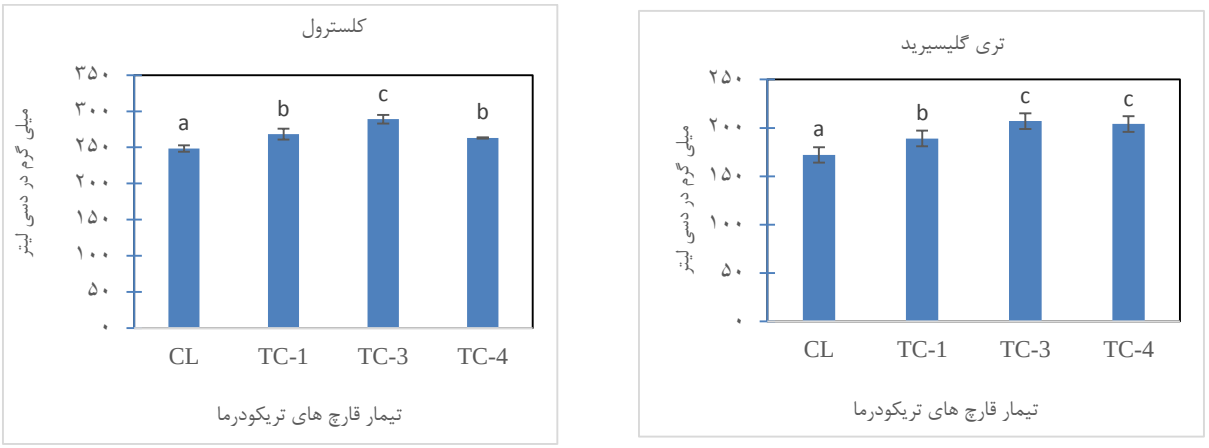
نتایج حاصل از سنجش آنالیز لاشه بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمارهای تغذیه شده توسط سویه‌های مختلف تریکودرما، در جدول ۴ ارائه شده است. نتایج نشان داد که میزان پروتئین در تمام گروه‌های تغذیه شده با قارچ تریکودرما و گروه شاهد یکسان است و تفاوت معنی‌داری در بین گروه‌ها مشاهده نشد. همچنین سنجش میزان چربی نشان داد که بیشترین میزان چربی در گروه شاهد و کمترین میزان چربی در گروه TC-1 به ثبت رسید. بین تیمارهای TC-2 و TC-3 اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. همچنین بیشترین میزان سنجش خاکستر درگروه شاهد مشاهده شد که با گروه TC-3 اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. لازم به ذکر است بین گروه‌های TC-1 و TC-3 تفاوت قابل توجهی مشاهده نشد.

میزان رطوبت در گروه‌های شاهد و دیگر گروه‌های تغذیه شده با قارچ تریکودرما مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین میزان رطوبت را در گروه TC-1 و کمترین TC-2 میزان رطوبت در گروه مشاهده شد. اما به‌طور کلی اختلاف قابل توجهی در بین گروه‌ها مشاهده نشد.

جدول ۴- پارامترهای مربوط به آنالیز لاشه تیمارهای مختلف در پایان دورهٔ آزمایش (میانگین±انحراف معیار). حروف انگلیسی یکسان به معنی عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین تیمارها در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.

تیمار/ پارامتر	cl	TC-1	TC-2	TC-3
پروتئین (٪)	۵۱/۲۳±۰/۱۷a	۵۱/۲۱±۰/۱۷a	۳۸/۱۸±۰/۱۸a	۳۸/۲۵±۰/۱۷a
چربی (٪)	۳۲/۶۲±۰/۲۲cd	۷۱/۰۷±۰/۱۱abc	۹۷/۱۵±۰/۱۱bcd	۱۹/۰۲±۰/۲۲cd
خاکستر (٪)	۶۲/۵۱±۱/۵b	۷۶/۰۸±۱/۴ab	۷۲/۴۵±۰/۴۱ab	۶۶/۱۵±۰/۵۳b
رطوبت (٪)	۵۳/۲۲±۱/۷۴ab	۷۶/۳۳±۱b	۹۲/۴۲±۰/۷۵a	۴۴/۳۶±۰/۷۵ab

نتایج حاصل از بررسی فاکتورهای بیوشیمیایی سرم در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با جیرهٔ غذایی حاوی قارچ تریکودرما در شکل ۲ ارائه شده است. نتایج نشان داد که کمترین میزان تری‌گلیسرید در گروه شاهد مشاهده شد. در میزان تری‌گلیسیرید گروه‌های TC-1 و TC-2 تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. نتایج حاصل از میزان سنجش کلسترول نشان داد که کمترین میزان کلسترول در گروه شاهد ثبت شد که با گروه‌های تغذیه شده با قارچ تریکودرما اختلاف معنی‌داری داشت. بیشترین میزان کلسترول در گروه TC-2 مشاهده شد. بین گروه TC-1 و TC-3 اختلاف معنی‌داری از لحاظ کلسترول مشاهده نشد.



شکل ۲- میزان کلسترول و تری‌گلیسیرید در ماهی قزل‌آلا (*O .mykiss*) در تیمارهای واجد قارچ تریکودرما (تیمار TC-1 (*Trichoderma afroharzianum*)، تیمار TC-2 (*Trichoderma ghanens*) و تیمار TC-3 (*Trichoderma lixii*) و تیمار شاهد (CL)).

۴. بحث و نتیجه‌گیری

در سال‌های اخیر به‌دلیل افزایش استفاده از سموم شیمیایی کنترل آفات در کشاورزی، کنجکاوی‌های زیادی دربارهٔ اثرات حاد کشنده و اثرات مزمن غیرکشندهٔ آفت‌کش‌ها بر ارگانسیم‌های مفید و غیر هدف به‌وجود آمده است. با توجه به عدم سمیت حاد ترکیبات زیستی بر موجودات مفید و غیر هدف در اکوسیستم، هدف از اجرای این تحقیق علاوه بر بررسی میزان سمیت اسپورهای قارچ تریکودرما به‌عنوان عامل کنترل کنندهٔ زیستی پرکاربرد در سراسر جهان بر روی بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، بررسی تأثیرات فیزیولوژیک این مادهٔ زیستی بر بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، در صورت انتقال اسپور فعال آن به حوضچه‌های تولید ماهی بوده است. آفت‌کش‌های شیمیایی در غلظت‌های پایین و غلظت‌های توصیه شده برای مزارع و باغات برای ماهی سمی هستند اما کاربرد این سموم شیمیایی با در نظر گرفتن اثرات نامطلوب آن‌ها بر اکوسیستم با توجه به ضرورت تأمین غذا و کنترل خسارت آفات ادامه دارد. یکی از اثرات جانبی زمانی است که آفت‌کش شیمیایی وارد بدن ماهی شده و با گذشت زمان، در بافت‌های مختلف بدن ماهی انباشت می‌شوند و زمانی که به سطح کشنده برای ماهی برسد نهایتاً وارد زنجیرهٔ غذایی انسان خواهند شد (Sabzghabaei and Raisi, 2021). یکی از راه‌کارهای کاهش این اثرات نامطلوب جانبی، استفاده از ترکیبات زیستی به جای ترکیبات شیمیایی در کشاورزی است. ترکیبات زیستی از سمیت پایین‌تری نسبت به سموم شیمیایی بر موجودات غیرهدف برخوردار هستند. از سوی دیگر مادهٔ مؤثره ترکیبات زیستی، بر خلاف مادهٔ مؤثره ترکیبات شیمیایی تنها در شرایط ویژه (دما و رطوبت) فعال می‌ماند (Sabzghabaei and Raisi, 2021). به‌عنوان مثال اسپورهای قارچ تریکودرما به‌عنوان عامل کنترل زیستی (Hang *et al.*, 2022)، نهایتاً تا دو ساعت پس از ورود به آب ممکن است فعال بمانند زیرا این اسپورها با جذب رطوبت بلافاصله جوانه زده یا به‌دلیل فشار اسمزی در محیط مایع (آب) غیرفعال می‌شوند بنابراین احتمال انتقال مادهٔ مؤثرهٔ فعال ترکیبات زیستی به زنجیرهٔ غذایی ماهی بسیار کمتر از ترکیبات شیمیایی است. در این تحقیق حادترین سناریوی ممکن استفاده نادرست از ترکیبات زیستی در نظرگرفته شده است، تا اثرات تغذیهٔ مستقیم بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با غلظت (۲×۱۰^{۸} اسپور در میلی‌لیتر) تریکودرما، ده برابر بیش از غلظت واقعی مادهٔ مؤثرهٔ تریکودرما در قارچ‌کش زیستی (۲×۱۰^{۷} اسپور در میلی‌لیتر) بررسی شود.

براساس نتایج به‌دست آمده در این مطالعه افزودن اسپور قارچ تریکودرما به جیرهٔ غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان جوان، منجر به اختلاف معنی‌داری در شاخص‌های تغذیه‌ای و رشد آنها شد. یکی از عوامل اقتصادی بودن پرورش آبزیان مقدار ضریب تبدیل غذایی است چرا که علاوه بر کاهش هزینه‌های غذا و غذادهی به سبب مقدار کمتر غذادهی، از آلودگی ثانویه آب محیط پرورش و به تبع آن کاهش پارامترهای کیفی آب جلوگیری خواهد کرد. ضریب تبدیل غذایی به‌عنوان یکی از مهمترین شاخص‌های ارزیابی کیفیت تغذیه به‌شمار می‌آید. کاهش ضریب تبدیل غذایی در گروه‌های تغذیه شده با اسپور

قارچ تریکودرما اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد داشت که بیانگر تأثیر غیرکشندهٔ استفاده از اسپور قارچ تریکودرما در جیرهٔ غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌باشد. بهبود ضریب تبدیل غذایی در تیمارهای آزمایشی می‌تواند بدین معنی باشد که رژیم غذایی حاوی اسپور تریکودرما نه تنها اثر سویی در واحد زمان نداشته است بلکه به مانند محرک اشتها عمل کرده است و سبب افزایش قابلیت هضم و به نوبهٔ خود باعث افزایش رشد شده است.

اما از سوی دیگر بررسی پارامترهای خونی در این تحقیق بیانگر آن بود که به‌طور کلی اسپور فعال قارچ تریکودرما منجر به کاهش مقادیر فاکتورهای خونی در بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌گردد. کاهش تعداد گلبول‌های قرمز، غلظت هموگلوبین و میزان هماتوکریت، همگی می‌توانند از نشانه‌های کم خونی در اثر مسمومیت باشد. این کم‌خونی بیشتر به‌دلیل اثر سموم بر روی کبد و تا حدودی کلیه است. در مطالعه‌ای مشابه کاهش معنی‌دار تعداد سلول‌های قرمز خونی (RBC) و مقدار هماتوکریت (Hct) در ماهیانی که در معرض سم دیازینون (آفت‌کش شیمیایی پرکاربرد) با غلظت ۶/۱۹ و۶/۱۰ میلی‌گرم قرار گرفته بودند در مقایسه با ماهی‌های گروه شاهد از مهمترین پاسخ خونی مشاهده شده است. به‌عبارت دیگر، کاهش تعداد سلول‌های قرمز خونی و مقدار هماتوکریت یکی از شاخص‌های بارز کم خونی در این جانوران می‌باشد. این کم‌خونی ناشی از اثر رادیکال‌های آزاد اکسیژنی تولید شده توسط سم بر بافت طحال و کلیه که مراکز خونساز در ماهیان هستند، می‌باشد که همین امر باعث کاهش تولید گلبول‌های قرمز خواهد شد. همچنین سم با اثر بر گلبول‌های قرمز باعث از بین رفتن آن‌ها می‌شود. از این‌رو حذف گلبول‌های قرمز آسیب‌دیده ناشی از اثر سم سبب آزاد شدن آهن هموگلوبین و تجمع ترکیبات پروتئینی حاوی آهن نظیر هموسیدرین و فریتین در طحال این ماهی‌ها می‌گردد.

همچنین در شرایط استرس‌زایی که ماهی‌ها در معرض اسپور قارچ تریکودرما قرار گرفته‌اند، افزایش گلوکز خون و اختلال در عملکرد پانکراس، می‌تواند موجب افزایش اکسیداسیون گلوکز در بافت‌ها و به‌دنبال آن افزایش سطح کلسترول گردد. آسیب‌های بافت‌شناسی به بافت کبد و انسداد مجاری صفراوی ناشی از نکروز بافتی در پی مسمومیت با دیازینون(آفت‌کش شیمیایی پرکاربرد) نیز نشان داد که در فرایند تشکیل اسیدهای صفراوی و دفع آن اختلال ایجاد می‌شود و به این ترتیب از دفع کلسترول اضافی پلاسما از طریق اسیدهای صفراوی ممانعت به‌عمل می‌آورد، که این امر موجب افزایش سطح کلسترول پلاسما می‌گردد (Banaei *et al*., 2012). سطح کلسترول در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، ماهی کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*) و ماهی کپور معمولی به‌ترتیب در تماس با سم دیازینون، مسمومیت حاد با آمونیاک و سم دیازینون روندهای افزایشی، کاهشی و بی‌تفاوت از خود نشان دادند (Banaei *et al*., 2012 Pourgholam *et al*., 2006;).

بنابراین با توجه به تغییر فاکتورهای هماتولوژی و بیوشیمیایی ماهی‌های تحت تیمار تغذیه شده با اسپور قارچ تریکودرما، اندازه‌گیری این فاکتورها می‌تواند به‌عنوان یک شاخص زیستی، ابزار پایش و ارزیابی سلامت اکوسیستم‌های آبی بهره گرفت. در حقیقت استفاده از سموم و علی‌الخصوص سموم شیمیایی حتی در غلظت‌های بسیار اندک می‌تواند در طولانی مدت پیامدهای نامطلوبی بر سلامت و بقای آبزیان، به‌ویژه ماهی‌ها در پی داشته باشد که این امر از دیدگاه شیلاتی و محیط‌زیستی بسیار حائز اهمیت است. بررسی میزان آلودگی منابع آب به مادهٔ مؤثره ترکیبات زیستی، میزان فعال ماندن انواع مواد موثره زیستی در استخرها و اکوسیستم‌های آبزی-پروری و مقایسه تأثیرات ترکیبات زیستی در دزهای کاربردی با سموم شیمیایی در ادامه انجام خواهد شد.

۵. تشکر و قدردانی

نویسندگان این مطالعه از حمایت مالی دانشکدهٔ کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران و پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای در قالب پروژه با کد (پژوهانهٔ سال ۱۴۰۲-۱۴۰۱) تشکر و قدردانی می‌کنند.

۶. منابع

References

Abdullah, N.S., Doni, F., Mispan, M.S., Saiman, M.Z., Yusuf, Y.M., Oke, M. A., Suhaimi, N.S.M., 2021. Harnessing Trichoderma in agriculture for productivity and sustainability. *Agronomy* 11(12), 2559. DOI:10.3390/agronomy11122559

Association of Official Agricultural Chemists (AOAC). 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association (APHA), *American Water Works Association* (AWWA) & *Water Environment Federation* (WEF). Washington, D.C.

Banaei, M., Mirvaghefi, A., Sureda, A., Rafiee, G., Ahmadi, K., 2012. Blood Biochemical and Liver Histopathological Changes in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Following Exposure to Sub-Lethal Concentrations of Diazinon. *Journal of Natural Environment* 65(3), 297-313. (In Persian) DOI: 10.22059/jne.2012.29785

Feldman, B.F., Zinkl, J.G., Jain, N.C., 2000. Schalm Veterinary Hematology. 5th ed. *Lippincott Williams & Wilkins, New York* 1120-1124. DOI: 10.1002/9781119500537

Hang, X., Meng, L., Ou, Y., 2022. Trichoderma-amended biofertilizer stimulates soil resident Aspergillus population for joint plant growth promotion. *Npj Biofilms Microbiomes* 8, 1-57. DOI: 10.1038/s41522-022-00321-z

Hedayati, S.A., Jahanbakhshi, A.R., 2017. Sub-lethal effects of nano zinc oxide (ZnO NPs) on some hematological indices of goldfish (*Carassius auratus*). International Journal of Environmental Science and Technology 19(1), 211-219. DOI: 10.22034/jest.2017.10346

Kleifeld, O., Chet, I., 1992. *Trichoderma harzianum*—interaction with plants and effect on growth response. *Plant and Soil* 144, 267-272. DOI:10.1007/BF00012884

Pourgholam, R., Soltani, M., Hassan, M.D., Ghoroghi, A., Nahavandi, R., Pourgholam, H., 2006. Determination of diazinon LC_{50} in grass carp (*Cetenopharyngodon idella*) and the effect of sublethal concentration of toxin on some hematological and biochemical indices. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 5(2), 67-82. (In Persian). DOI: 10.17582/journal.pjz/20190713140754

Rezaei, M H., Sourinejad, I., Soltanian, S., Yousefzadi, M., 2013. The effects of dietary Zhumeria majdae extract on growth indices, hematology and immunology of catfish Pangasianodon hypophthalmus. *Journal of Aquatic Ecology* 3(1), 8-19. (In Parsian)

Schalm, O.W., Jain, N.C., Carroll, E.J., 1975. Veterinary hematology (No. 3rd edition). Lea & Febiger. DOI: 10.1016/C2009-0-39565-3

Sabzghabaei, Gh., Raisi, M., 2021. The Effects of Important Groups of Chemical Pesticides (Organochlorine, Organophosphate and Carbamate) on Environment and Humans. *Human and Environment* 19(3), 69-78.

Sun, R., Dsouza, M., Gilbert, J.A., Guo, X., Wang, D., Guo, Z., Ni, Y., Chu, H., 2016. Fungal community composition in soils subjected to long- term chemical fertilization is most influenced by the type of organic matter. *Environmental Microbiology* 18(12), 5137-5150. DOI: 10.1111/1462-2920.13512

Yancheva, V., Velcheva, I., Stoyanova, S., Georgieva, E., 2016. Histological biomarkers in fish as a tool in ecological risk assessment and monitoring programs: a review. *Applied ecology and Environmental Research* 14(1), 47-75. DOI:10.15666/aeer/1401_047075