

تجویز خوراکی لاکتوباسیلوس رامنوسوس (*Lactobacillus rhamnosus*) جهت کاهش اثرات مخرب مالاتیون بر سلامت عمومی و مقاومت در برابر بیماری در قزل آلاهی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

- سعید مرادی: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
- علیرضا میروافقی*: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
- کامران رضایی توابع: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۸

چکیده

تحقیق حاضر با هدف نشان دادن تأثیر تجویز خوراکی پروبیوتیک *Lactobacillus rhamnosus* بر عملکرد ایمنی قزل آلاهی رنگین کمان در مواجهه با سمیت تحت کشنده مالاتیون انجام شد. بدین منظور، ۱۸۰ قطعه ماهی قزل آلاهی رنگین کمان با میانگین وزن $43 \pm 2/6$ گرم به چهار گروه آزمایشی شاهد، تجویز خوراکی پروبیوتیک، در معرض مالاتیون توأم با تجویز خوراکی پروبیوتیک و در معرض مالاتیون توأم با جیره عاری از پروبیوتیک تقسیم شدند و به مدت ۲۸ روز تحت تأثیر تیمارهای مذکور قرار گرفتند. نتایج به دست آمده بیانگر کاهش معنی دار تعداد گلبول های قرمز، گلبول های سفید و درصد لنفوسیت های خون در ماهیان تحت تیمار با مالاتیون نسبت به گروه شاهد بود. تجویز خوراکی *L. rhamnosus* در مقایسه با جیره شاهد به طور معنی داری تعداد گلبول های قرمز و سفید خون در ماهیان تحت تیمار با مالاتیون را افزایش داد ($P < 0/05$). برآورد درصد تلفات تجمعی ماهیان در روز ۱۴ پس از چالش با باکتری بیماری زای *Aeromonas hydrophila* نشان دهنده کاهش معنی دار درصد بازماندگی در ماهیان تحت تیمار با مالاتیون بود و تجویز خوراکی *L. rhamnosus* در این گروه میزان مرگ و میر را به طور معنی داری کاهش داد. به طور کلی با توجه به نتایج حاصل از سنجش پارامترهای خون شناسی و هم چنین میزان بازماندگی ماهیان پس از چالش با *A. hydrophila*، تجویز خوراکی *L. rhamnosus* باعث بهبود عملکرد سیستم دفاعی ماهی قزل آلاهی رنگین کمان می شود و می تواند اثرات مخرب مالاتیون را بر عملکرد ایمنی قزل آلاهی رنگین کمان کاهش دهد.

کلمات کلیدی: آفت کش ارگانوفسفره، *Lactobacillus rhamnosus*، قزل آلاهی رنگین کمان، *Aeromonas hydrophila*



مقدمه

صنعت آبزی پروری در کنار رشد و توسعه قابل توجهی که داشته، همواره با مشکلاتی نیز روبرو بوده است که از آن جمله می توان به تغییرات کیفیت آب، شیوع بیماری ها و مشکلات تغذیه ای اشاره کرد. آب محیط پرورش ماهیان می تواند حاوی مقادیر بسیار بالایی از عوامل بیماریزا فرصت طلب باشد که همواره به دنبال فراهم آمدن شرایط مناسب جهت ایجاد بیماری می باشند. ماهیان تحت شرایط معمول، به واسطه سیستم ایمنی ذاتی در مقابل این عوامل مهاجم از خود محافظت می کنند، اما در هنگام قرارگیری در معرض استرس های زیست محیطی از جمله آلاینده های منابع آب، مستعد ابتلا به بیماری های عفونی می شوند، زیرا سیستم ایمنی یک هدف حساس برای آلاینده های محیطی است (Sinyakov و همکاران، ۲۰۰۲؛ Benejam و همکاران، ۲۰۱۰). در میان عوامل مسبب بیماری های عفونی، *Aeromonas hydrophila* یک باکتری همیشه حاضر و فرصت طلب است که تحت شرایط استرسزا، از قبیل تغییرات دمایی، دستکاری و یا کاهش کیفیت آب تبدیل به یک پاتوژن می شود و ایجاد بیماری می کند (آهنگرزاده و همکاران، ۱۳۹۴). این باکتری با مصرف خوراکی آنتی بیوتیک ها قابل کنترل است اما به دلیل وجود سویه های مقاوم و هم چنین کاهش اشتها در هنگام بیماری، لذا باید به درمان های غیر خوراکی و پیشگیری از جمله اصلاح و بهبود شرایط محیطی و از بین بردن عوامل استرسزا به ویژه کاهش دادن آلودگی های آب توجه ویژه کرد (مخیر، ۱۳۸۹). آشکارا مشخص است که آب های آلوده به آفت کش های کشاورزی ارتباط مستقیمی با افزایش استرس و متعاقباً افزایش شیوع عفونت های ناشی از باکتری های بیماریزا و فرصت طلب دارند (Khalil و همکاران، ۲۰۱۷). از جمله پرکاربردترین آفت کش ها در بخش کشاورزی، آفت کش های ارگانوفسفره می باشند که برای موجودات غیر هدف از جمله آبزیانی که در محیط طبیعی نزدیک به مزارع کشاورزی پرورش می یابند بسیار مضر هستند (Banaee و همکاران، ۲۰۱۱؛ Yonar و همکاران، ۲۰۱۴). مالاتیون یکی از خطرناک ترین آن ها است که جهت مبارزه با آفات نباتی مورد استفاده قرار گرفته و مشکلاتی برای محیط زیست در سرتاسر دنیا به وجود آورده است (فرخی و همکاران، ۱۳۹۴). به نقل از غفاری فارسانی و همکاران (۱۳۹۵) مالاتیون در ایران نیز یکی از آفت کش های پر مصرف می باشد. مکانیسم اصلی تاثیر گذاری مالاتیون بر آزاد ماهیان سمیت عصبی می باشد، اما گزارشاتی مبنی بر توانایی تغییر مستقیم و غیر مستقیم مولفه های سیستم ایمنی ماهی نیز برای این آفت کش موجود می باشد (Dietrich و همکاران، ۲۰۱۴). به عنوان مثال آسیب اکسیداتیو به اندام های مربوط به سیستم ایمنی و تغییر در مسیرهای انتقال سیگنال جهت فعال سازی، تکثیر و تمایز سلول های وابسته به

سیستم ایمنی توسط این آفت کش گزارش شده است (Galloway و Handy، ۲۰۰۳؛ Kawashima و Fujii، ۲۰۰۴). هم چنین تغییر در پارامترهای خونی، پاسخ ایمنی و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی نیز در آزمایش Yonar و همکاران (۲۰۱۴) مشاهده گردید. بنابراین ارائه راهکاری موثر جهت مقابله با اثرات زیان آور مالاتیون بر سلامت و عملکرد سیستم ایمنی ماهیان الزامی به نظر می رسد. یکی از شاخص های مهم و قابل اطمینان در بررسی وضعیت سلامت و فیزیولوژی ماهیان سنجش پارامترهای خون آنان می باشد که تحت تاثیر تغذیه، عوامل محیطی و سن آنان است (Farzanfar، ۲۰۰۶). در عمل، خون ماهی به طور گسترده ای در تحقیقات سم شناسی و نظارت بر محیط زیست به عنوان یک نشانگر از تغییرات فیزیولوژیکی و آسیب شناسی استفاده می شود و قادر به ارائه یک بینش کلی از سلامت سیستم ایمنی موجود نیز می باشد (Li و همکاران، ۲۰۱۱؛ Saravanan و همکاران، ۲۰۱۱). به همین دلیل جهت ارزیابی وضعیت سلامت سیستم ایمنی و آسیب شناسی ماهیان در مواجهه با آفت کش مالاتیون، شاخص های خون شناسی به عنوان ابزاری کارآمد، می توانند مورد استفاده قرار گیرند. نتایج مطالعات متعدد اثرات سودمند باکتری های پروبیوتیک در برطرف کردن انواع استرس از جمله استرس مربوط به آلودگی های محیطی را نشان می دهد (Castex و همکاران، ۲۰۰۹). استفاده از پروبیوتیک ها، به واسطه بهبود اجتماع فلور میکروبی محیط پیرامون و دستگاه گوارش موجود، موجب کارایی بهتر دستگاه گوارش، تحریک سیستم ایمنی بدن، رشد و مقاومت نسبت به عوامل بیماریزا در جانور میزبان می شود (Verschuere و همکاران، ۲۰۰۰). در زمان مواجهه با آلاینده های محیطی، به نظر می رسد که لاکتوباسیل ها از جمله *L. rhamnosus* باعث کاهش طیف گسترده ای از اثرات مخرب استرس اکسیداتیو بر موجود آبزی می شوند و هم چنین شواهد به صورت غیر مستقیم نشان می دهد که لاکتوباسیل ها قادر به متابولیسم یا تجزیه سموم دفع آفات از طریق آنزیم های فسفاتاز خود هستند (Trinder و همکاران، ۲۰۱۵). بنابراین بهره وری از باکتری های پروبیوتیک به منظور تخریب طیف وسیعی از آفت کش ها در داخل بدن و هم چنین محیط پرورش دور از انتظار نیست. لازم به ذکر است که استرس از هر نوعی که باشد می تواند باعث کاهش توان سیستم ایمنی آبزی گردد و در نتیجه منجر به افزایش احتمال ابتلا به بیماری ها و تلفات شود. بنابراین هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات محافظتی تجویز خوراکی *Lactobacillus rhamnosus* بر سلامت عمومی و میزان مقاومت قزل آلا ی رنگین کمان در چالش با *Aeromonas hydrophila* تحت شرایط استرس ناشی از قرارگیری در معرض مالاتیون می باشد.



مواد و روش‌ها

تهیه ماهی و شرایط نگهداری: کلیه مراحل پرورش و تغذیه

ماهیان در کارگاه بهداشت و بیماری آریان واقع در دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران (کرج) انجام شد. بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان با میانگین وزن ۴۲ گرم از روستای برغان واقع در استان البرز تهیه گردید و پس از انتقال به محل انجام آزمایش، به منظور سازگاری با شرایط محیطی جدید به مدت یک هفته در مخازن ۱۰۰۰ لیتری فایبرگلاس در محیط کارگاه با دوره نورانی ۱۲:۱۲ نگهداری شدند که در طی این مدت با غذای تجاری قزل‌آلای رنگین کمان مرحله پیش پروراری FFT۲ (ساخت شرکت غذای آریان، فردانه، شهرکرد، ایران، حدود ۴۳٪ پروتئین خام، ۱۴٪ چربی خام، فیبر خام حداکثر ۴٪، خاکستر حداکثر ۱۱٪، رطوبت حداکثر ۱۱٪، فسفر حداقل ۱ درصد) طی دو نوبت در روز راس ساعت ۷:۰۰ و ۱۹:۰۰ به میزان ۲٪ وزن بدن تغذیه شدند. پس از پایان دوره سازگاری، جهت شروع آزمایش ماهی‌ها به طور تصادفی در ۱۲ مخزن فایبرگلاسی توزیع شدند (هر مخزن ۱۵ قطعه ماهی) و تحت تاثیر تیمارهای گوناگون قرار گرفتند.

مواد: پروبیوتیک مورد استفاده در این آزمایش سویه *Lactobacillus rhamnosus* جدا شده از روده ماهی قزل‌آلای رنگین کمان و به صورت فریزدرای شده با واحد تشکیل کلنی 10^{10} سلول در هر گرم، از شرکت (زیست‌یار وارنا، رشت، ایران) تهیه و مورد استفاده قرار گرفت. مالاتیون مورد استفاده در این آزمایش نیز به صورت مایع امولسیون شونده با خلوص ۵۷٪ مورد استفاده قرار گرفت.

طرح آزمایش: تعداد ۱۸۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان با میانگین وزنی $43 \pm 2/6$ گرم بین ۱۲ مخزن آزمایشی (تراکم ذخیره سازی، ۱۵ ماهی برای هر مخزن یا ۳۰۰ لیتر آب پرورش) در قالب چهار تیمار با سه تکرار تقسیم شدند. طول دوره آزمایش ۲۸ روز بود و غلظت تحت‌کشنده انتخابی جهت انجام این آزمایش براساس میزان LC_{50} «ساعته مالاتیون برای ماهی قزل‌آلای رنگین کمان بود. بر طبق گزارش Purghart و Gries (۲۰۱۱) میزان LC_{50} ساعته مالاتیون برای قزل‌آلای رنگین کمان $0/18$ میلی گرم بر لیتر عنوان گردیده است. قبل از شروع آزمایش ماهی‌های موجود در تیمارهای پروبیوتیک به مدت یک هفته جهت انجام پیش تیمار با جیره حاوی پروبیوتیک تغذیه شدند. در طی مدت آزمایش مخازن دائماً هوادهی می‌شدند و آزمایشات براساس راهنمای استاندارد O.E.C.D (۱۹۸۴) به صورت نیمه ساکن (تعویض روزانه ۲۰٪ آب) روی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان صورت گرفت. جهت تعویض آب از محلول ذخیره‌ای که قبلاً ساخته شده بود و غلظت مالاتیون در آن با آب مخازن تحت تیمار با مالاتیون

برابر بود استفاده می‌شد. اندازه‌گیری عوامل کیفی آب، هم‌چون دمای آب (با دماسنج جیوه‌ای) به صورت روزانه، اکسیژن محلول (توسط اکسیژن متر) و pH (از طریق دستگاه pH متر) به صورت هفتگی انجام گرفت. میزان دمای آب، اکسیژن محلول و pH به ترتیب ۱۳ تا ۱۶ درجه سانتی‌گراد، ۸ تا ۹ میلی گرم در لیتر و $7/4$ تا ۸ اندازه‌گیری گردید.

تیمار بندی: به منظور تیمار بندی آزمایش، ماهیان به طور تصادفی بین ۴ گروه آزمایشی شاهد، فقط پروبیوتیک، پروبیوتیک توام با مالاتیون و فقط مالاتیون، با سه تکرار تقسیم شدند (۱۵ ماهی درون هر مخزن). غلظت انتخاب شده از مالاتیون جهت انجام این آزمایش معادل با $0/2$ میزان LC_{50} ۹۶ ساعته آن برای ماهی قزل‌آلای رنگین کمان برابر با $0/36$ میلی گرم بر لیتر مورد استفاده قرار گرفت. مکمل پروبیوتیک *L. rhamnosus* به میزان ۱ گرم بر کیلوگرم غذا به روش اسپری کردن به جیره غذایی افزوده گردید. جیره تجاری بدون مکمل پروبیوتیک *L. rhamnosus* به عنوان جیره شاهد در نظر گرفته شد.

سنجش پارامترهای خون شناسی: پس از اتمام دوره ۲۸ روزه آزمایش، جهت اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمیایی خون، ماهیان در محلول ۲۰۰ ppm پودر گل‌میخک قرار گرفتند و پس از بی‌هوشی کامل خونگیری از ساقه دمی آن‌ها توسط سرنگ‌های استریل ۲ میلی لیتری انجام شد. شمارش گلبول‌های قرمز و سفید خون با استفاده از رقیق سازی خون در محلول دایسیس (۱۰ میلی لیتر فرمالدهید، ۳/۳۱ گرم تری سدیم سیترات، ۱ گرم کریستال یوله در ۱ لیتر آب مقطر) و با استفاده از لام هموسیستمتر انجام شد (Dorafshan و همکاران، ۲۰۰۸؛ Rehulka، ۲۰۰۰). جهت تعیین میزان هماتوکریت، نمونه‌های خون گرفته شده از ماهیان به وسیله لوله موبینه آغشته به هیپارین جمع‌آوری و سپس در شیارهای مخصوص به مدت ۵ دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ میکروهیاتوکریت با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه قرار گرفتند تا جداسازی سرم و هماتوکریت انجام گیرد. هماتوکریت به صورت درصدی با خط‌کش هماتوکریت محاسبه گردید (جلالی و خواجه، ۱۳۸۳). اندازه‌گیری هموگلوبین به روش استاندارد سیانومت هموگلوبین انجام گرفت (Feldman و همکاران، ۲۰۰۰). اندیس‌های گلبولی یعنی حجم متوسط گلبولی (MCV)، میزان متوسط هموگلوبین گلبولی (MCH) و غلظت متوسط هموگلوبین گلبول‌های قرمز (MCHC) با استفاده از فرمول‌های استاندارد موجود محاسبه گردید (Feldman و همکاران، ۲۰۰۰). جهت شمارش افتراقی گلبول‌های سفید خون ابتدا گسترش خونی روی لام تهیه گردید. پس از خشک شدن لام و فیکس کردن با متانول، لام با رنگ گیمسا رنگ آمیزی گردید و نهایتاً شمارش افتراقی گلبول‌های سفید خون در زیر میکروسکوپ انجام گرفت و تعداد سلول‌های به دست آمده بر حسب درصد بیان شد (Houston و همکاران، ۱۹۹۶).



نتایج

جدول ۱ بیانگر نتایج به دست آمده از سنجش پارامترهای خون ماهی قزل آلاي رنگین کمان در تیمارهای مختلف می باشد. طبق نتایج به دست آمده قرارگیری ماهی قزل آلاي رنگین کمان در معرض آفت کش مالاتیون سبب کاهش معنی دار تعداد گلبول های قرمز خون در مقایسه با گروه شاهد می شود و در گروه های در معرض مالاتیون تجویز خوراکی پروبیوتیک *L. rhamnosus* در مقایسه با جیره شاهد سبب افزایش معنی دار تعداد گلبول های قرمز خون شد ($P < 0.05$). نتایج حاصل از سنجش تعداد گلبول های سفید خون نیز الگوی مشابهی با آن چه در مورد گلبول های قرمز مشاهده شد نشان داد و کمترین تعداد گلبول سفید خون در گروه آزمایشی در معرض مالاتیون و تغذیه شده با جیره شاهد با میزان $35/63 \pm 1/27$ هزار عدد در هر میلی متر مکعب خون مشاهده شد. تجویز خوراکی پروبیوتیک *L. rhamnosus* در گروه های تحت تیمار با مالاتیون سبب افزایش معنی دار این پارامتر در مقایسه با جیره شاهد شد ($P < 0.05$). اندازه گیری هماتوکریت خون نشان دهنده کاهش این پارامتر در گروه های در معرض مالاتیون بود اما این کاهش به لحاظ آماری با گروه شاهد اختلاف معنی اداری نشان نداد ($P > 0.05$). آنالیز آماری نتایج به دست آمده از سنجش هموگلوبین خون هیچ گونه اختلاف معنی داری در بین تیمارهای آزمایشی نشان نداد ($P > 0.05$). اندازه گیری اندیس های گلبولی یعنی حجم متوسط گلبولی (MCV)، میزان متوسط هموگلوبین گلبولی (MCH) و غلظت متوسط هموگلوبین گلبول های قرمز (MCHC) نشان داد که به جز MCV هیچ اختلاف معنی داری در سایر پارامترها بین تیمارهای مختلف وجود ندارد ($P > 0.05$). طبق نتایج به دست آمده، شاهد افزایش معنی دار MCV در گروه های در معرض مالاتیون نسبت به گروه شاهد بودیم و تجویز خوراکی پروبیوتیک *L. rhamnosus* در مقایسه با جیره شاهد تاثیر معنی داری در کاهش آن نداشت ($P > 0.05$).

شمارش افتراقی گلبول های سفید خون: تغییرات در درصد انواع سلول های سفید خون ماهی قزل آلاي رنگین کمان در نتیجه قرارگیری در معرض تیمارهای مختلف آزمایشی در شکل ۱ نشان داده شده است. شمارش افتراقی گلبول های سفید خون نشان دهنده افزایش معنی دار درصد نوتروفیل خون در گروه های در معرض مالاتیون بود و تجویز خوراکی پروبیوتیک *L. rhamnosus* تاثیر معنی داری در کاهش آن نداشت ($P > 0.05$). سنجش درصد لنفوسیت های خون الگویی عکس آن چه که در مورد نوتروفیل های خون مشاهده شد را نشان داد. قرارگیری ماهی در معرض مالاتیون سبب کاهش معنی دار درصد لنفوسیت خون شد و تجویز خوراکی پروبیوتیک *L. rhamnosus* در مقایسه با جیره شاهد تاثیر معنی داری در افزایش آن نداشت ($P > 0.05$). هیچ

چالش بیماری: به منظور ارزیابی عملکرد سیستم ایمنی ماهی قزل آلاي رنگین کمان پیرو قرارگیری در معرض آفت کش ارگانوفسفره مالاتیون، *Aeromonas hydrophila* به عنوان پاتوژن باکتریایی معمول در ماهیان آب شیرین مورد استفاده قرار گرفت. پس از پایان دوره ۲۸ روزه آزمایش و انجام خونگیری تعداد ۲۱ ماهی از هر گروه آزمایشی به وسیله تزریق درون صفاقی دوز کشنده *Aeromonas hydrophila* (10^7 واحد تشکیل کلنی بر میلی لیتر) که قبلاً توسط LaPatra و همکاران (۲۰۱۰) تعیین شد تحت چالش باکتریایی قرار گرفتند و میزان مرگ و میر ماهیان در هر گروه آزمایشی تا ۱۴ روز پس از چالش شمارش شد و درصد بقا با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد: $\text{نرخ بقا } (\%) = \frac{(\text{تعداد نهایی ماهیان زنده مانده})}{(\text{تعداد اولیه ماهیان تزریق شده})} \times 100$

کشت باکتری و آماده سازی آن جهت تزریق درون صفاقی:

منبع اولیه باکتری *Aeromonas hydrophila* از ماهی قزل آلاي رنگین کمان بیمار شده توسط این باکتری برداشت گردید. ابتدا باکتری مذکور توسط تست های بیوشیمیایی تأیید شده و سپس در شرایط استریل به منظور تولید انبوه در محیط کشت مایع (مدل TSB شرکت مرک آلمان) کشت داده شد. محیط کشت مذکور طبق دستورالعمل مصرف (۳۰ گرم از پودر برای یک لیتر آب مقطر) درون ارلن تهیه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در فشار ۱/۵ اتمسفر در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد اتوکلاو گردید. پس از خروج ارلن حاوی محیط کشت از اتوکلاو و همدم شدن آن با محیط، باکتری *Aeromonas hydrophila* به محیط کشت تلقیح شد و سپس درون انکوباتور شیکر در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون و مشاهده کدورت، محتویات ارلن به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰g سانتریفیوژ گردید، فاز مایع خارج شد و رسوب جامد باکتری توسط محلول بافر فسفات استریل طی سه مرحله شستشو و برداشت گردید (Firuzbakhsh و Amirkhani، ۲۰۱۵). غلظت باکتری در محلول نهایی توسط روش طیف سنجی اندازه گیری شد. تراکم باکتری تا رسیدن به غلظت 10^7 واحد کلنی بر میلی لیتر رقیق سازی شد و میزان ۰/۱ میلی لیتر از این سوسپانسیون باکتریایی به صورت داخل صفاقی به ماهیان تزریق گردید.

تجزیه و تحلیل آماری: تمام داده ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار برای هر گروه بیان شده است. تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA انجام شد. برای مقایسه میانگین داده ها از آزمون آماری توکی در سطح ۹۵ درصد اطمینان استفاده شد. هم چنین جهت انجام تمام تجزیه و تحلیل های آماری، از نرم افزار تحت ویندوز SPSS نسخه ۲۴ استفاده گردید.

گونه تفاوت معنی داری در درصد تشکیل دهنده مونوسیت خون در بین گروه‌های آزمایشی مختلف مشاهده نشد ($P > 0.05$).

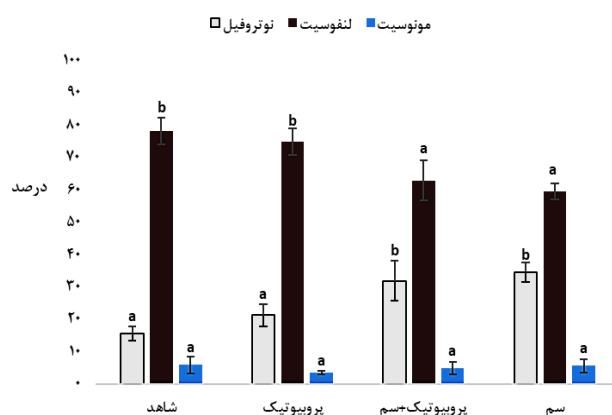
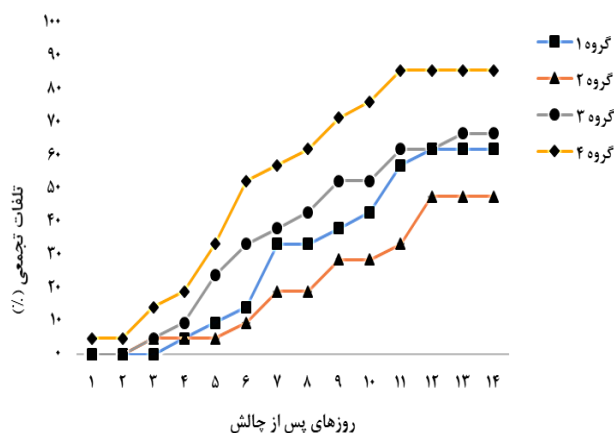
چالش بیماری: شکل ۲ نشان دهنده میانگین درصد تلفات تجمعی ماهیان مربوط به تیمارهای آزمایشی مختلف در طی روزهای مختلف پس از چالش باکتریایی با *Aeromonas hydrophila* می‌باشد. تلفات تجمعی و درصد نسبی بقا به مدت ۱۴ روز پس از چالش ثبت شد. کم‌ترین نرخ مرگ و میر تجمعی در تیمار آزمایشی تغذیه شده با جیره حاوی پروبیوتیک *L. rhamnosus* در عدم حضور مالاتیون با

میزان ۴۷/۶۱ درصد و بیش‌ترین نرخ مرگ و میر تجمعی در تیمار آزمایشی تغذیه شده با جیره شاهد و در معرض مالاتیون با میزان ۸۵/۷۱۱ درصد در روز ۱۴ پس از چالش ثبت گردید. در گروه‌های آزمایشی که در معرض مالاتیون قرار داشتند، تجویز خوراکی پروبیوتیک *L. rhamnosus* نسبت به جیره شاهد باعث کاهش معنی‌دار درصد تلفات تجمعی ماهیان در روز ۱۴ پس از چالش با *A. hydrophila* شد ($P < 0.05$).

جدول ۱: اثرات تجویز خوراکی پروبیوتیک *L. rhamnosus* بر پارامترهای خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تحت سمیت زیر کشنده مالاتیون

شاخص	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴
گلبول قرمز ($\times 10^6$)	$1/36 \pm 0/04^c$	$1/41 \pm 0/034^c$	$1/21 \pm 0/041^b$	$1/1 \pm 0/055^a$
گلبول سفید ($\times 10^3$)	$39/79 \pm 1/75^b$	$44/71 \pm 1/82^c$	$41/20 \pm 1/32^{bc}$	$35/63 \pm 1/27^a$
هماتوکریت (%)	$42/29 \pm 1/17^{ab}$	$45/06 \pm 1/13^b$	$39/62 \pm 3/69^{ab}$	$38/69 \pm 2/09^a$
هموگلوبین (گرم بر دسی لیتر)	$11/22 \pm 2/09^a$	$13/02 \pm 1/09^a$	$9/77 \pm 0/95^a$	$10/35 \pm 1/30^a$
MCV	$310 \pm 1/95^a$	$319 \pm 9/6^a$	$325 \pm 19/63^{ab}$	$351 \pm 9/54^b$
MCH	82 ± 14^a	92 ± 8^a	$80 \pm 5/45^a$	$94 \pm 10/5^a$
MCHC	$26/4 \pm 4/4^a$	$28/8 \pm 1/75^a$	$24/65 \pm 0/58^a$	$26/82 \pm 3/67^a$

مقادیر به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ارائه شده است. حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد ($P < 0.05$).



شکل ۲: نمودار میزان مرگ و میر تجمعی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان طی ۱۴ روز پس از چالش با باکتری *Aeromonas hydrophila* گروه ۱ شاهد، گروه ۲ تجویز خوراکی *L. rhamnosus*، گروه ۳ تجویز خوراکی *L. rhamnosus* در معرض مالاتیون، گروه ۴ تجویز جیره شاهد در معرض مالاتیون

شکل ۱: نمودار اثرات تجویز خوراکی پروبیوتیک *L. rhamnosus* بر میزان انواع گلبول‌های سفید خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تحت سمیت زیر کشنده مالاتیون پس از طی مدت ۴ هفته آزمایش. مقادیر به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ارائه شده است. حروف متفاوت روی هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد ($P < 0.05$).

بحث

از آنجایی که پارامترهای خونی به وسیله عوامل استرس‌زا و آلاینده‌های آب تحت تاثیر قرار می‌گیرند، بنابراین ارزیابی این پارامترها،

می‌تواند در شناخت اثرات سموم کشاورزی بر وضعیت سلامت ماهی ما را یاری نماید (Galal و همکاران، ۲۰۱۸). نتایج به دست آمده از آزمایش حاضر نشان داد که قرارگیری ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در معرض مالاتیون موجب کاهش تعداد گلبول‌های قرمز خون، هماتوکریت



و هموگلوبین خون می‌شود (جدول ۱). کاهش تعداد گلبول‌های قرمز خون و هموگلوبین ممکن است به دلیل اختلال در فرایند تولید گلبول‌های قرمز، خون‌سازی، تنظیم اسمزی و یا به دلیل افزایش تخریب سلول‌های قرمز خون در بافت‌های خون‌ساز باشد (Jenkins و همکاران، ۲۰۰۳). کم خونی ایجاد شده می‌تواند نشان‌دهنده اثرات مستقیم مالاتیون بر بافت‌های خون‌ساز کلیه و طحال و یا تخریب سلول‌های خونی توسط این آفت‌کش باشد. نتایج مطالعات متعددی نیز گواه از کاهش معنی‌دار پارامترهای مذکور در نتیجه قرارگیری در معرض آفت‌کش‌های کشاورزی در ماهیان می‌باشد (Narra و همکاران، ۲۰۱۵؛ Yonar و همکاران، ۲۰۱۴). تجویز خوراکی پروبیوتیک *L. rhamnosus* در ماهیان تحت تیمار با مالاتیون، در مقایسه با جیره شاهد به میزان قابل توجهی تعداد گلبول‌های قرمز خون را افزایش داد که مبین اثرات سودمند تجویز خوراکی مکمل *L. rhamnosus* در کاهش اثرات سوء مالاتیون بر بافت‌های خون‌ساز و گلبول‌های قرمز خون ماهی می‌باشد. در آزمایشی مشابه که توسط Mohapatra و همکاران (۲۰۱۲) صورت پذیرفت. استفاده از مخلوط چند سویه پروبیوتیک در غذای ماهی کپور روهو (*Labeo rohita*) منجر به افزایش تعداد گلبول‌های قرمز ماهیان، تحت سمیت زیرکشنده آفت‌کش فنوالرات شد که با نتایج حاصل از تحقیق حاضر هم‌خوانی داشت. در آزمایشی دیگر استفاده از پروبیوتیک *Micrococcus luteus* باعث افزایش تعداد گلبول‌های قرمز خون در تیلپای نیل (*Oreochromis niloticus*) شد (Abdel-Rhman و همکاران، ۲۰۰۹). پارامتر تعداد گلبول‌های سفید خون نقش مهمی در ایمنی ماهیان ایفا می‌کند، جزء سلولی ایمنی ذاتی را تشکیل می‌دهد و ترکیبات خونی از جمله پپتیدهای ضد میکروبی کاتیونی، لکترین‌ها، ترکیبات کمپلمان و سیتوکین‌ها را تولید می‌کنند (Galal و همکاران، ۲۰۱۸). با توجه به نتایج ارائه شده در جدول ۱ تعداد گلبول‌های سفید خون در ماهیان قرار گرفته در معرض مالاتیون نسبت به گروه شاهد به میزان قابل توجهی کاهش یافت. به نقل از غفاری‌فارسانی و همکاران (۱۳۹۵) تنش موجب افزایش تعداد گلبول‌های سفید و پاسخ ایمنی بدن می‌شود که با نتایج آزمایش حاضر در تناقض است. دلیلی که می‌توان برای این تناقض ذکر نمود اختلاف در مدت زمان قرارگیری در معرض آلودگی می‌باشد و احتمالاً قرارگیری طولانی مدت در معرض آفت‌کش فرصت جبران اثرات سوء آن بر سیستم ایمنی را از موجود صلب نموده است. آزمایش‌های دیگری (Yonar و همکاران، ۲۰۱۴؛ Ahmadi و همکاران، ۲۰۱۴) نیز گواه از کاهش میزان گلبول‌های سفید خون ماهی در مواجهه با آفت‌کش‌ها می‌باشد که با نتایج آزمایش حاضر هم‌خوانی دارد. تجویز خوراکی پروبیوتیک *L. rhamnosus* در مقایسه با جیره شاهد، کاهش تعداد گلبول‌های سفید خون ناشی از قرارگیری در معرض

مالاتیون را به میزان چشمگیری جبران نمود و شاهد افزایش معنی‌دار تعداد گلبول‌های سفید خون در گروه آزمایشی تغذیه شده با جیره حاوی پروبیوتیک در مقایسه با جیره شاهد بودیم. بیش‌ترین تعداد گلبول‌های سفید خون در گروه آزمایشی تغذیه شده با پروبیوتیک در عدم حضور مالاتیون مشاهده شد که حاکی تاثیر سودمند تجویز خوراکی پروبیوتیک *L. rhamnosus* جهت بهبود عملکرد سیستم ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌باشد. نتایج مطالعات متعدد دیگری (Yarahmadi و همکاران، ۲۰۱۴؛ Munir و همکاران، ۲۰۱۸) نیز تاثیرگذاری سودمند پروبیوتیک‌ها بر افزایش کارایی سیستم دفاعی ماهی‌ها را تأیید می‌نماید. مقادیر MCV، MCH و MCHC به مقادیر پارامترهای هموگلوبین، هماتوکریت و تعداد گلبول‌های قرمز خون وابسته است و تغییر در پارامترهای مذکور سبب تغییر در این سه فاکتور می‌گردد. در مطالعه حاضر قرارگیری ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در معرض مالاتیون باعث افزایش معنی‌دار MCV شد و دو فاکتور دیگر تغییر معنی‌داری نشان ندادند. تجویز خوراکی پروبیوتیک *L. rhamnosus* در مقایسه با جیره شاهد تاثیر معنی‌داری بر پارامتر مذکور نداشت. شمارش افتراقی فراوانی سلول‌های سفید خونی لنفوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها یک شاخص مؤثر بر استرس حاد است و یک بینش کلی از سلامت سیستم ایمنی ارائه می‌دهد (Li و همکاران، ۲۰۱۱). نوتروفیل‌ها و لنفوسیت‌ها از اصلی‌ترین سلول‌های سفید خونی در مطالعات سم‌شناسی می‌باشند و تاثیر آلاینده‌ها بیش‌تر در این سلول‌ها نمایان می‌شود. لنفوسیت غالب‌ترین لکوسیت افتراقی ماهیان و مسئول بسیاری از عملکردهای سیستم ایمنی است (غفاری‌فارسانی و همکاران، ۱۳۹۵). طبق نتایج به‌دست آمده از محاسبه درصد افتراقی گلبول‌های سفید خون در آزمایش حاضر (شکل ۲) کاهش معنی‌دار درصد لنفوسیت‌های خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پس از قرارگیری در معرض آفت‌کش مالاتیون مشاهده شد، درحالی‌که تعداد کل گلبول‌های سفید خون افزایش یافت. این کاهش تعداد لنفوسیت‌ها می‌تواند نشان‌دهنده این باشد که مالاتیون موجب القاء فرایند لکوسیتوزیس شده است (Harabawy و Ibrahim، ۲۰۱۴). البته Kori-Siakpere و Ikomi (۲۰۱۱) اظهار داشتند که قرارگیری در معرض مواد سمی می‌تواند باعث افزایش تولید لنفوسیت‌ها شود. نتایج حاصل از برآورد درصد نوتروفیل‌های خون افزایش معنی‌دار این شاخص را در گروه‌های در معرض مالاتیون نشان داد. نوتروفیل‌ها وظایفی هم‌چون فاگوسیتوز ذرات کوچک، پاسخ به التهاب، تجزیه آلاینده‌ها و پروسه‌های متابولیکی مثل نابود کردن سلول‌ها بر عهده دارند. بنابراین افزایش آن‌ها در شرایط سمیت آلاینده‌ها دور از انتظار نیست (غفاری‌فارسانی و همکاران، ۱۳۹۵). آزمایش چالش مقاومت میزبان در برابر پاتوژن‌ها به‌عنوان گویاترین ارزیابی عملکرد سیستم ایمنی در نظر گرفته

منابع

۱. آهنگرزاده، م.؛ قربانپورنصف آبادی، م.؛ پیغان، ر.؛ شریف روحانی، م. و سلطانی، م.، ۱۳۹۴. نقش آئروموناس هیدروفیلا در سیتیسمی‌های باکتریایی کپور ماهیان پرورشی استان خوزستان. مجله دامپزشکی ایران. دوره ۱۱، شماره ۳، صفحات ۵ تا ۱۶.
۲. راضی‌جلالی، م. و خواجه، غ.، ۱۳۸۳. روش‌ها و مفاهیم خون‌شناسی برای تکنسین‌های دامپزشکی. انتشارات دانشگاه شهید چمران. اهواز. ۱۹۰ صفحه.
۳. غفاری‌فارسانی، ح.؛ پورباقر، ه. و فرحمند، ح.، ۱۳۹۵. اثر سم مالاتیون بر شکستگی DNA در بافت کبد و آبشش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با استفاده از روش میانگین وزنی. مجله شیلات (منابع طبیعی ایران). دوره ۶۹، شماره ۱، صفحات ۸۹ تا ۹۹.
۴. غفاری‌فارسانی، ح.؛ هدایتی، س.ع.؛ زارع‌ندیمی‌بین، ن.؛ عزیزپور، س. و شهبازی‌ناصرآباد، س.، ۱۳۹۵. بررسی تاثیر غلظت‌های تحت کشنده سم مالاتیون بر پارامترهای خون‌شناسی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). نشریه اقیانوس‌شناسی. دوره ۷، شماره ۲۷، صفحات ۱ تا ۹.
۵. فرخی، ف.؛ جمیلی، ش.؛ شهیدی، م.؛ ماشینچیان، ع. و وثوقی، غ.، ۱۳۹۴. بررسی تاثیر حشره‌کش مالاتیون بر بافت و آنزیم‌های کبدی ماهی کلمه دریای خزر (*Rutilus rutilus* *casspicus*). مجله علمی شیلات ایران. دوره ۲۴، شماره ۴، صفحات ۱۱۷ تا ۱۲۶.
۶. مخیر، ب.، ۱۳۸۹. بیماری‌های ماهیان پرورشی. انتشارات دانشگاه تهران. چاپ ششم. ۶۳۸ صفحه.
۷. Ahmadi, K.; Mirvaghefi, A.R.; Banaee, M. and Vosoghe, A.R., 2014. Effects of long-term diazinon exposure on some immunological and haematological parameters in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). *Toxicology and Environmental Health Sciences*. Vol. 6, pp: 1-7.
۸. Amirkhani, N. and Firouzbakhsh, F., 2015. Protective effects of basil (*Ocimum basilicum*) ethanolic extract supplementation diets against experimental *Aeromonas hydrophila* infection in common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture Research*. Vol. 46, pp: 716-724.
۹. Banaee, M.; Sureda, A.; Mirvaghefi, A.R. and Ahmadi, K., 2011. Effects of diazinon on biochemical parameters of blood in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Pesticide biochemistry and physiology*. Vol. 99, pp: 1-6.
۱۰. Benejam, L.; Benito, J. and García-Berthou, E., 2010. Decreases in condition and fecundity of freshwater fishes in a highly polluted reservoir. *Water, Air and Soil Pollution*. Vol. 210, pp: 231-242.
۱۱. Castex, M.; Lemaire, P.; Wabete, N. and Chim, L., 2009. Effect of dietary probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress status of shrimp *Litopenaeus stylirostris*. *Aquaculture*. Vol. 294, pp: 306-313.
۱۲. Dietrich, J.P.; Van Gaest, A.L.; Strickland, S.A. and Arkoosh, M.R., 2014. The impact of temperature stress and pesticide exposure on mortality and disease susceptibility of endangered Pacific salmon. *Chemosphere*. Vol. 108, pp: 353-359.
۱۳. Dorafshan, S.; Kalbassi, M.R.; Pourkazemi, M.; Amiri, B.M.; Karimi, S.S., 2008. Effects of triploidy on the Caspian

می‌شود، چرا که پاسخ ایمنی کل را در سطح تمامیت موجود مورد سنجش قرار می‌دهد (Kollner و همکاران، ۲۰۰۲). در تعدادی مطالعات (Banuelos و همکاران، ۲۰۱۰؛ Dietrich و همکاران، ۲۰۱۴). به‌خوبی مشخص شده است که بسیاری از مواد شیمیایی از جمله آفت‌کش‌ها باعث اختلال در عملکرد سیستم ایمنی ماهی و سرکوب مقاومت آن نسبت به پاتوژن‌ها می‌شوند. در نقطه مقابل آن، اثرات سودمند پروبیوتیک‌ها به‌ویژه باکتری‌های لاکتوباسیل، به‌عنوان یک افزودنی غذایی که موجب بهبود پاسخ ایمنی میزبان علیه پاتوژن‌های مضر می‌شوند در دهه‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است (Pirarat و همکاران، ۲۰۰۶). با این دیدگاه آزمون چالش باکتریایی به‌وسیله تزریق درون صفاقی *Aeromonas hydrophila* با هدف بررسی اثر محافظتی پروبیوتیک *L. rhamnosus* بر عملکرد کلی سیستم ایمنی موجود متعاقب قرارگیری در معرض مالاتیون انجام شد. در پایان ۱۴ روز آزمون چالش باکتریایی بیش‌ترین درصد تلفات تجمعی در ماهیان گروه آزمایشی ۴ "تغذیه با جیره تجاری بدون مکمل پروبیوتیک و آب آلوده به مالاتیون" مشاهده گردید که نشان می‌دهد قرارگیری طولانی مدت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در معرض آفت‌کش مالاتیون مکانیسم‌های عملکردی سیستم ایمنی ماهی را با اختلال مواجه می‌سازد و متعاقباً مقاومت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان را نسبت به باکتری بیماری‌زای *A. hydrophila* کاهش می‌دهد. طبق نتایج به‌دست آمده نرخ بقا بالاتری برای ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی پروبیوتیک *L. rhamnosus* در مقایسه با ماهیان تغذیه شده با جیره شاهد در گروه‌های آزمایشی در معرض مالاتیون مشاهده گردید که ایجاد مقاومت طبیعی و نرخ بقا بالاتر ماهیان در پی چالش با باکتری *Aeromonas hydrophila* در این گروه‌های آزمایشی می‌تواند به افزایش ایمنی ماهیان در نتیجه تجویز خوراکی پروبیوتیک *L. rhamnosus* نسبت داده شود. نتایج مطالعات متعدد دیگری نیز بهبود کارایی سیستم ایمنی و افزایش مقاومت به بیماری در نتیجه تجویز پروبیوتیک‌ها را نشان داده است (Lin و همکاران، ۲۰۱۷؛ Zhang و همکاران، ۲۰۱۷). در آزمایش حاضر افزایش ظرفیت سیستم ایمنی در پاسخ به چالش با *A. hydrophila* می‌تواند با افزایش تعداد گلبول‌های قرمز و سفید خون در ارتباط باشد و با این پارامترها همبستگی مثبت نشان داد. در مجموع با توجه به نتایج حاصل از سنجش پارامترهای خون‌شناسی و هم‌چنین میزان بقاء ماهیان پس از چالش با *A. hydrophila* این‌طور استنباط می‌شود که تجویز خوراکی *L. rhamnosus* باعث بهبود عملکرد سیستم دفاعی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌شود و می‌تواند اثرات مخرب مالاتیون را بر سیستم ایمنی کاهش دهد.



۳۱. Munir, M.B.; Hashim, R.; Nor, S.A.M. and Marsh, T.L., 2018. Effect of dietary prebiotics and probiotics on snakehead (*Channa striata*) health: Haematology and disease resistance parameters against *Aeromonas hydrophila*. Fish & shellfish immunology. Vol. 75, pp: 99-108.
۳۲. Narra, M.R.; Rajender, K.; Reddy, R.R.; Rao, J.V. and Begum, G., 2015. The role of vitamin C as antioxidant in protection of biochemical and haematological stress induced by chlorpyrifos in freshwater fish *Clarias batrachus*. Chemosphere. Vol. 132, pp: 172-178.
۳۳. OECD. 1984. Guideline for Testing of Chemical Section 2, Effects on biotic systems; pp: 1-39.
۳۴. Ovie, K.S. and Ikomi, U., 2011. Alterations in some haematological parameters of the African Snakehead: *Parachanna africana* exposed to cadmium. Notulae Scientia Biologicae. Vol. 3, pp:29-34.
۳۵. Pirarat, N.; Kobayashi, T.; Katagiri, T.; Maita, M. and Endo, M., 2006. Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against experimental *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). Veterinary immunology and immunopathology. Vol. 113, pp: 339-347.
۳۶. Rehulka, J., 2000. Influence of astaxanthin on growth rate, condition, and some blood indices of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture. Vol. 190, pp: 27-47.
۳۷. Saravanan, M.; Kumar, K.P. and Ramesh, M., 2011. Haematological and biochemical responses of freshwater teleost fish *Cyprinus carpio* (Actinopterygii: Cypriniformes) during acute and chronic sublethal exposure to lindane. Pesticide Biochemistry & Physiology. Vol. 100, pp: 206-211.
۳۸. Sinyakov, M.S.; Dror, M.; Zhevelev, H.M.; Margel, S. and Avtalion, R.R., 2002. Natural antibodies and their significance in active immunization and protection against a defined pathogen in fish. Vaccine. Vol. 20, pp: 3668-3674.
۳۹. Tellez-Bañuelos, M.C.; Santerre, A.; Casas-Solis, J. and Zaitseva, G., 2010. Endosulfan increases seric interleukin-2 like (IL-2L) factor and immunoglobulin M (IgM) of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) challenged with *Aeromonas hydrophila*. Fish & shellfish immunol. Vol. 28, pp: 401-405.
۴۰. Trinder, M.; Bisanz, J.E.; Burton, J.P. and Reid, G., 2015. Probiotic lactobacilli: a potential prophylactic treatment for reducing pesticide absorption in humans and wildlife. Beneficial microbes. Vol. 6, pp: 841-847.
۴۱. Verschuere, L.; Rombaut, G.; Sorgeloos, P. and Verstraete, W., 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiology and molecular biology reviews. Vol. 64, pp: 655-671.
۴۲. Yarahmadi, P.; Farsani, H.G.; Khazaei, A.; Khodadadi, M.; Rashidiyan, G. and Jalali, M.A., 2016. Protective effects of the prebiotic on the immunological indicators of rainbow trout infected with *Aeromonas hydrophila*. Fish & shellfish immunology. Vol. 54, pp: 589-597.
۴۳. Yonar, S.M.; Ural, M.S.; Silici, S. and Yonar, M.E., 2014. Malathion-induced changes in the haematological profile, the immune response, and the oxidative/antioxidant status of *Cyprinus carpio carpio*: Protective role of propolis. Ecotoxicology & environmental safety. Vol. 102, pp:202-209.
۴۴. Zhang, C.N.; Zhang, J.L.; Guan, W.C.; Zhang, X.F.; Guan, S.H.; Zeng, Q.H. and Cui, W., 2017. Effects of *Lactobacillus delbrueckii* on immune response, disease resistance against *Aeromonas hydrophila*, antioxidant capability and growth performance of *Cyprinus carpio* Huanghe var. Fish & shellfish immunolo. Vol. 68, pp: 84-91.
۱۴. El-Rhman, A.M.A.; Khattab, Y.A. and Shalaby, A.M., 2009. *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Fish & Shellfish Immunology. Vol. 27, pp: 175-180.
۱۵. Farzanfar, A., 2006. The use of probiotics in shrimp aquaculture. FEMS Immunology & Medical Microbiology. Vol. 48, pp: 149-158.
۱۶. Feldman, B.F.; Zinkl, J.G. and Jain, N.C., 2000. Schalm's Veterinary Hematology 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins. pp: 1120-1124.
۱۷. Galal, A.A.; Reda, R.M. and Mohamed, A.A.R., 2018. Influences of *Chlorella vulgaris* dietary supplementation on growth performance, hematology, immune response and disease resistance in *Oreochromis niloticus* exposed to sub lethal concentrations of penoxsulam herbicide. Fish & shellfish immunology. Vol. 77, pp: 445-456.
۱۸. Galloway, T. and Handy, R., 2003. Immunotoxicity of organophosphorous pesticides. Ecotoxicology. Vol. 12, pp: 345-363.
۱۹. Gries, T. and Purghart, V., 2001. Malathion technical: acute immobilisation test with daphnids (*Daphnia magna*) under flow-through conditions. AG. Study. Vol. 1005, 115 p.
۲۰. Houston, A.H.; Dobric, N. and Kahurananga, R., 1996. The nature of hematological response in fish. Fish Physiol Biochem. Vol. 15, pp: 339-347.
۲۱. Ibrahim, A.T.A. and Harabawy, A.S., 2014. Sublethal toxicity of carbofuran on the African catfish *Clarias gariepinus*: Hormonal, enzymatic and antioxidant responses. Ecotoxicology & environmental safety. Vol. 106, pp: 33-39.
۲۲. Jenkins, F.; Smith, J.; Rajanna, B.; Shameem, U.; Umadevi, K.; Sandhya, V. and Madhavi, R., 2003. Effect of sub-lethal concentrations of endosulfan on hematological and serum biochemical parameters in the carp *Cyprinus carpio*. Bulletin of environmental contamination and toxicology. Vol. 70, pp: 0993-0997.
۲۳. Kawashima, K. and Fujii, T., 2004. Expression of non neuronal acetylcholine in lymphocytes and its contribution to the regulation of immune function. Front Biosci. Vol. 9, pp: 2063-2085.
۲۴. Kaya, H.; Çelik, E.Ş.; Yılmaz, S.; Tulgar, A.; Akbulut, M. and Demir, N., 2015. Hematological, serum biochemical, and immunological responses in common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to phosalone. Comparative Clinical Pathology. Vol. 24, pp: 497-507.
۲۵. Khalil, S.R.; Reda, R.M. and Awad, A., 2017. Efficacy of *Spirulina platensis* diet supplements on disease resistance and immune-related gene expression in *Cyprinus carpio* L. exposed to herbicide atrazine. Fish & shellfish immunology. Vol. 67, pp: 119-128.
۲۶. Köllner, B.; Wasserrab, B.; Kotterba, G. and Fischer, U., 2002. Evaluation of immune functions of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) how can environmental influences be detected? Toxicology letters. Vol. 131, pp: 83-95.
۲۷. LaPatra, S.E.; Plant, K.P.; Alcorn, S.; Ostland, V. and Winton, J., 2010. An experimental vaccine against *Aeromonas hydrophila* can induce protection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of fish diseases. Vol. 33, pp: 143-151.
۲۸. Li, Z.H.; Zlabek, V.; Velisek, J.; Grabic, R.; Machova, J.; Kolarova, J. and Randak, T., 2011. Acute toxicity of carbamazepine to juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effects on antioxidant responses, hematological parameters and hepatic EROD. Ecotoxicology and environmental safety. Vol. 74, pp: 319-327.
۲۹. Lin, H.L.; Shiu, Y.L.; Chiu, C.S.; Huang, S.L. and Liu, C.H., 2017. Screening probiotic candidates for a mixture of probiotics to enhance the growth performance, immunity, and disease resistance of Asian seabass, against *Aeromonas hydrophila*. Fish & shellfish immunol. Vol. 60, pp: 474-482.
۳۰. Mohapatra, S.; Chakraborty, T.; Prusty, A.K.; Kumar, K.; Prasad, K.P. and Mohanta, K.N., 2012. Fenvalerate induced stress mitigation by dietary supplementation of multispecies probiotic mixture in a tropical freshwater fish, *Labeo rohita*. Pesticide biochemistry and physiology. Vol. 104, pp: 28-37.

