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

- **سعید مرادی**: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
- **علیرضا میرواقفی***: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
- **کامران رضایی‌توابع**: 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 قزل‌آلای رنگین‌کمان در مواجه با سمیت تحت‌کشنده مالاتیون انجام شد. بدین‌منظور، ۱۸۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزن ۲/۶±۴۳ گرم به چهار گروه آزمایشی شاهد، تجویز خوراکی پروبیوتیک، در معرض مالاتیون توأم با تجویز خوراکی پروبیوتیک و در معرض مالاتیون توأم با جیرهٔ عاری از پروبیوتیک تقسیم شدند و به‌مدت ۲۸ روز تحت تأثیر تیمارهای مذکور قرار گرفتند. نتایج به‌دست آمده بیانگر کاهش معنی‌دار تعداد گلبول‌های قرمز، گلبول‌های سفید و درصد لنفوسیت‌های خون در ماهیان تحت تیمار با مالاتیون نسبت به گروه شاهد بود. تجویز خوراکی *L. rhamnosus* در مقایسه با جیرهٔ شاهد به‌طور معنی‌داری تعداد گلبول‌های قرمز و سفید خون در ماهیان تحت تیمار با مالاتیون را افزایش داد (P<۰/۰۵). برآورد درصد تلفات تجمعی ماهیان در روز ۱۴ پس از چالش با باکتری بیماری‌زای *Aeromonas hydrophila* نشان‌دهندهٔ کاهش معنی‌دار درصد بازماندگی در ماهیان تحت تیمار با مالاتیون بود و تجویز خوراکی *L. rhamnosus* در این گروه میزان مرگ و میر را به‌طور معنی‌داری کاهش داد. به‌طورکلی با توجه به نتایج حاصل از سنجش پارامترهای خون‌شناسی و هم‌چنین میزان بازماندگی ماهیان پس از چالش با *A. hydrophila*، تجویز خوراکی *L. rhamnosus* باعث بهبود عملکرد سیستم دفاعی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌شود و می‌تواند اثرات مخرب مالاتیون را بر عملکرد ایمنی قزل آلای رنگین‌کمان کاهش دهد.

کلمات کلیدی: آفت‌کش ارگانوفسفره، *Lactobacillus rhamnosus*، قزل‌آلای رنگین‌کمان، *Aeromonas hydrophila*

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: avaghefi@ut.ac.ir

مقدمه

صنعت آبزی‌پروری درکنار رشد و توسعه قابل توجهی که داشته، همواره با مشکلاتی نیز روبرو بوده است که از آن جمله می‌توان به تغییرات کیفیت آب، شیوع بیماری‌ها و مشکلات تغذیه‌ای اشاره کرد. آب محیط پرورش ماهیان می‌تواند حاوی مقادیر بسیار بالایی از عوامل بیماریزا فرصت‌طلب باشد که همواره به‌دنبال فراهم‌آمدن شرایط مناسب جهت ایجاد بیماری می‌باشند. ماهیان تحت شرایط معمول، به‌واسطه سیستم ایمنی ذاتی در مقابل این عوامل مهاجم از خود محافظت می‌کنند، اما در هنگام قرارگیری در معرض استرس‌های زیست محیطی ازجمله آلاینده‌های منابع آب، مستعد ابتلا به بیماری‌های عفونی می‌شوند، زیرا سیستم ایمنی یک هدف حساس برای آلاینده‌های محیطی است (Sinyakov و همکاران، ۲۰۰۲؛ Benejam و همکاران، ۲۰۱۰). در میان عوامل مسبب بیماری‌های عفونی، *Aeromonas hydrophila* یک باکتری همیشه حاضر و فرصت‌طلب است که تحت شرایط استرس‌زا، از قبیل تغییرات دمایی، دستکاری و یا کاهش کیفیت آب تبدیل به یک پاتوژن می‌شود و ایجاد بیماری می‌کند (آهنگرزاده و همکاران، ۱۳۹۴). این باکتری با مصرف خوراکی آنتی بیوتیک‌ها قابل کنترل است اما به‌دلیل وجود سویه‌های مقاوم و هم‌چنین کاهش اشتها در هنگام بیماری، لذا باید به درمان‌های غیرخوراکی و پیشگیری ازجمله اصلاح و بهبود شرایط محیطی و از بین بردن عوامل استرس‌زا به‌ویژه کاهش دادن آلودگی‌های آب توجه ویژه کرد (مخیر، ۱۳۸۹). آشکارا مشخص است که آب‌های آلوده به آفت‌کش‌های کشاورزی ارتباط مستقیمی با افزایش استرس و متعاقباً افزایش شیوع عفونت‌های ناشی از باکتری‌های بیماریزا و فرصت‌طلب دارند (Khalil و همکاران، ۲۰۱۷). ازجمله پرکاربردترین آفت‌کش‌ها در بخش کشاورزی، آفت‌کش‌های ارگانوفسفره می‌باشند که برای موجودات غیرهدف از جمله آبزیانی که در محیط طبیعی نزدیک به مزارع کشاورزی پرورش می‌یابند بسیار مضر هستند (Banaee و همکاران، ۲۰۱۱؛ Yonar و همکاران، ۲۰۱۴). مالاتیون یکی از خطرناک‌ترین آن‌هاست که جهت مبارزه با آفات نباتی مورد استفاده قرار گرفته و مشکلاتی برای محیط‌زیست در سرتاسر دنیا به‌وجودآورده است (فرخی و همکاران، ۱۳۹۴). به‌نقل از غفاری‌فارسانی و همکاران (۱۳۹۵) مالاتیون در ایران نیز یکی از آفت‌کش‌های پرمصرف می باشد. مکانیسم اصلی تاثیرگذاری مالاتیون بر آزاد ماهیان سمیت عصبی می‌باشد، اما گزارشاتی مبنی بر توانایی تغییر مستقیم و غیرمستقیم مولفه‌های سیستم ایمنی ماهی نیز برای این آفت‌کش موجود می‌باشد (Dietrich و همکاران، ۲۰۱۴). به‌عنوان مثال آسیب اکسیداتیو به اندام‌های مربوط به سیستم ایمنی و تغییر در مسیرهای انتقال سیگنال جهت فعال‌سازی، تکثیر و تمایز سلول‌های وابسته به سیستم ایمنی توسط این آفت‌کش گزارش شده است (Galloway و Handy، ۲۰۰۳؛ Kawashima و Fujii، ۲۰۰۴). هم‌چنین تغییر در پارامترهای خونی، پاسخ ایمنی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نیز در آزمایش Yonar و همکاران (۲۰۱۴) مشاهده گردید. بنابراین ارائه راهکاری موثر جهت مقابله با اثرات زیان‌آور مالاتیون بر سلامت و عملکرد سیستم ایمنی ماهیان الزامی به‌نظر می‌رسد. یکی از شاخص‌های مهم و قابل اطمینان در بررسی وضعیت سلامت و فیزیولوژی ماهیان سنجش پارامترهای خون آنان می‌باشد که تحت تأثیر تغذیه، عوامل محیطی و سن آنان است (Farzanfar، ۲۰۰۶). در عمل، خون ماهی به‌طور گسترده‌ای در تحقیقات سم‌شناسی و نظارت بر محیط‌زیست به‌عنوان یک نشانگر از تغییرات فیزیولوژیکی و آسیب‌شناسی استفاده می‌شود و قادر به ارائه یک بینش کلی از سلامت سیستم ایمنی موجود نیز می‌باشد (Li و همکاران، ۲۰۱۱؛ Saravanan و همکاران، ۲۰۱۱). به‌همین دلیل جهت ارزیابی وضعیت سلامت سیستم ایمنی و آسیب شناسی ماهیان در مواجه با آفت‌کش مالاتیون، شاخص‌های خون‌شناسی به‌عنوان ابزاری کارآمد، می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند. نتایج مطالعات متعدد اثرات سودمند باکتری‌های پروبیوتیک در برطرف کردن انواع استرس ازجمله استرس مربوط به آلودگی‌های محیطی را نشان می‌دهد (Castex و همکاران، ۲۰۰۹). استفاده از پروبیوتیک‌ها، به‌واسطه 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 می‌شود (Verschuere و همکاران، ۲۰۰۰). در زمان مواجه با آلاینده‌های محیطی، به‌نظر می‌رسد که لاکتوباسیل‌ها ازجمله *L. rhamnosus* باعث کاهش طیف گسترده‌ای از اثرات مخرب استرس اکسیداتیو بر موجود آبزی می‌شوند و هم‌چنین شواهد به‌صورت غیرمستقیم نشان می‌دهد که لاکتوباسیل‌ها قادر به متابولیسم یا تجزیه سموم دفع آفات از طریق آنزیم‌های فسفاتاز خود هستند (Trinder و همکاران، ۲۰۱۵). بنابراین بهره‌وری از باکتری‌های پروبیوتیک به‌منظور تخریب طیف وسیعی از آفت‌کش‌ها در داخل بدن و هم‌چنین محیط پرورش دور از انتظار نیست. لازم به‌ذکر است که استرس از هرنوعی که باشد می‌تواند باعث کاهش توان سیستم ایمنی آبزی گردد و در نتیجه منجر به افزایش احتمال ابتلا به بیماری‌ها و تلفات شود. بنابراین هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات محافظتی تجویز خوراکی *Lactobacillus rhamnosus* بر سلامت عمومی و میزان مقاومت قزل‌آلای رنگین‌کمان در چالش با *Aeromonas hydrophila* تحت شرایط استرس ناشی از قرارگیری در معرض مالاتیون می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه ماهی و شرایط نگهداری: کلیه مراحل پرورش و تغذیه ماهیان در کارگاه بهداشت و بیماری آبزیان 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، به‌منظور سازگاری با شرایط محیطی جدید به‌مدت 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 رنگین‌کمان مرحله پیش پرواری FFT۲ (ساخت شرکت غذای آبزیان فرادانه، 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 به‌میزان ۲٪ وزن بدن تغذیه شدند. پس از پایان دوره سازگاری، جهت‌شروع آزمایش ماهی‌ها به‌طور 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 به‌صورت 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 به‌صورت مایع امولسیون شونده با خلوص ۵۷٪ مورد استفاده قرار گرفت.

طرح آزمایش: تعداد ۱۸۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی ۲/۶±۴۳ 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} ۹۶ساعته مالاتیون برای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بود. بر طبق گزارش Gries و Purghart (۲۰۰۱) میزان LC_{50} ۹۶ ساعته مالاتیون برای قزل‌آلای رنگین‌کمان ۰/۱۸ میلی‌گرم بر لیترعنوان 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 دائما هوادهی می‌شدند و آزمایشات براساس راهنمای استاندارد O.E.C.D (۱۹۸۴) به‌صورت نیمه ساکن (تعویض روزانه ۲۰٪ آب) روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان 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) به‌صورت روزانه، اکسیژن محلول (توسط اکسیژن متر) و pH (از طریق دستگاه pH متر) به‌صورت هفتگی انجام گرفت. میزان دمای آب، اکسیژن محلول و pH به‌ترتیب ۱۳تا ۱۶ درجه سانتی‌گراد، ۸ تا ۹ میلی‌گرم در لیتر و ۷/۴ تا ۸ اندازه‌گیری گردید.

تیماربندی: به‌منظور تیماربندی آزمایش، ماهیان به‌طور 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 ۰/۲ میزان LC_{50} ۹۶ ساعته آن برای ماهی قزل‌آلای رنگین کمان برابر با ۰/۰۳۶ میلی‌گرم بر لیتر مورد استفاده قرار گرفت. مکمل پروبیوتیک *L. rhamnosus* به‌میزان ۱ گرم بر کیلوگرم غذا به‌روش اسپری کردن به جیره غذایی افزوده گردید. جیره تجاری بدون مکمل پروبیوتیک *L. rhamnosus* به‌عنوان جیره شاهد درنظرگرفته شد.

سنجش پارامترهای خون‌شناسی: پس از اتمام دوره ۲۸ روزه آزمایش، جهت اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمیایی خون، ماهیان در محلول ۲۰۰ ppmپودر گل میخک قرار گرفتند و پس از بی‌هوشی کامل خونگیری از ساقه دمی آن‌ها توسط سرنگ‌های استریل ۲ میلی‌لیتری انجام شد. شمارش گلبول‌های قرمز و سفید خون با استفاده از رقیق سازی خون در محلول دایسیس (۱۰ میلی‌لیتر فرمالدهید، ۳/۳۱ گرم تری سدیم سیترات، ۱ گرم کریستال ویوله در ۱ لیتر آب مقطر) و با استفاده از لام هموسیتومتر انجام شد (Dorafshan و همکاران، ۲۰۰۸؛ Rehulka، ۲۰۰۰). جهت تعیین میزان هماتوکریت، نمونه‌های خون گرفته‌شده از ماهیان به‌وسیلهٔ لوله مویینه آغشته به هپارین جمع‌آوری و سپس در شیارهای مخصوص به‌مدت ۵ دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ میکروهماتوکریت با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه قرار گرفتند تا جداسازی‌سرم و هماتوکریت انجام‌گیرد.هماتوکریت به‌صورت درصدی با خط‌کش هماتوکریت محاسبه گردید (جلالی و خواجه، ۱۳۸۳). اندازه‌گیری هموگلوبین به‌روش 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 رنگ‌آمیزی گردیدو نهایتاً شمارش افتراقی گلبول‌های سفید خون در زیر میکروسکوپ انجام گرفت و تعداد سلول‌های به‌دست آمده برحسب درصد بیان شد(Houston و همکاران، ۱۹۹۶).

چالش بیماری: به‌منظور ارزیابی عملکرد سیستم ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پیرو قرارگیری در معرض آفت‌کش ارگانوفسفره مالاتیون، *Aeromonas hydrophila* به‌عنوان 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 به‌وسیله تزریق درون صفاقی دوز کشنده *Aeromonas hydrophila* (10^7 واحد تشکیل کلنی بر میلی‌لیتر) 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:

نرخ بقا (٪)=(تعداد نهایی ماهیان زنده مانده)÷ (تعداد اولیه ماهیان تزریق شده×۱۰۰

کشت باکتری و آماده‌سازی آن جهت تزریق درون صفاقی: منبع اولیه باکتری *Aeromonas hydrophila* از ماهی قزل‌آلای رنگین کمان بیمار شده توسط این باکتری برداشت گردید. ابتدا باکتری مذکور توسط تست‌های بیوشیمیایی تائید شده و سپس در شرایط استریل به‌منظور 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 به‌مدت 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 هم‌دما شدن آن با محیط، باکتری *Aeromonas hydrophila* به محیط کشت تلقیح شد و سپس درون انکوباتور شیکردار در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون و مشاهده کدورت، محتویات ارلن به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰g سانتریفیوژ گردید، فاز مایع خارج شد و رسوب جامد باکتری توسط محلول بافر فسفات استریل طی سه مرحله‌شستشووبرداشت‌گردید(Amirkhani و Firuzbakhsh، ۲۰۱۵). غلظت باکتری در محلول نهایی توسط روش طیف‌سنجی اندازه‌گیری شد. تراکم باکتری تا رسیدن به غلظت 10^7 واحد کلنی بر میلی‌لیتر رقیق‌سازی شد و میزان ۰/۱ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون باکتریایی به‌صورت داخل صفاقی به ماهیان تزریق گردید.

تجزیه و تحلیل آماری: تمام داده‌ها به‌صورت میانگین± انحراف معیار برای هر گروه بیان شده است. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه ANOVA انجام شد. برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون آماری توکی در سطح ۹۵ درصد اطمینان استفاده شد. هم‌چنین جهت انجام تمام تجزیه و تحلیل‌های آماری، از نرم‌افزار تحت ویندوز SPSS نسخه ۲۴ استفاده گردید.

نتایج

جدول ۱ بیانگر نتایج به‌دست آمده از سنجش پارامترهای خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمارهای مختلف می باشد. طبق نتایج به‌دست آمده قرارگیری ماهی‌قزل‌آلای رنگین‌کمان درمعرض‌آفت‌کش مالاتیون سبب کاهش معنی‌دار تعدادگلبول‌های قرمز خون در مقایسه با گروه شاهد می‌شودو درگروه‌های در معرض مالاتیون تجویز خوراکی پروبیوتیک *L. rhamnosus* در مقایسه با جیره شاهد سبب افزایش معنی‌دار تعداد گلبول‌های قرمز خون شد (P<۰/۰۵). نتایج حاصل از سنجش تعداد گلبول‌های سفید خون نیز الگوی مشابهی با آن‌چه در مورد گلبول‌های 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 ۱/۲۷±۳۵/۶۳ هزار عدد در هر میلی‌متر مکعب خون مشاهده شد. تجویز خوراکی پروبیوتیک *L. rhamnosus* در گروه‌های تحت‌تیمار با مالاتیون سبب افزایش معنی‌دار این پارامتر در مقایسه با جیره شاهد شد (P<۰/۰۵). اندازه‌گیری هماتوکریت خون نشان‌دهنده کاهش این پارامتر در گروه‌های در معرض مالاتیون بود اما این کاهش به لحاظ آماری با گروه شاهد اختلاف معنی‌اداری نشان نداد(P>۰/۰۵). آنالیز آماری نتایج به‌دست آمده از سنجش هموگلوبین خون هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری در بین تیمارهای آزمایشی نشان نداد (P>۰/۰۵). اندازه‌گیری اندیس‌های گلبولی یعنی حجم متوسط گلبولی (MCV)، میزان متوسط هموگلوبین گلبولی (MCH) و غلظت متوسط هموگلوبین گلبول‌های‌قرمز(MCHC)نشان‌داد‌که‌به‌جز MCV هیچ‌اختلاف معنی‌داری در سایر پارامترها بین تیمارهای مختلف وجود ندارد (P>۰/۰۵). طبق نتایج به‌دست آمده، شاهد افزایش معنی‌دار MCV در گروه‌های در معرض مالاتیون نسبت به گروه شاهد بودیم و تجویز خوراکی پروبیوتیک *L. rhamnosus* در مقایسه با جیره شاهد تاثیر معنی‌داری در کاهش آن نداشت (P>۰/۰۵).

شمارش افتراقی گلبول‌های سفید خون: تغییرات در درصد انواع سلول‌های سفید خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در نتیجه قرارگیری در معرض تیمارهای مختلف آزمایشی در شکل ۱ نشان داده شده است. شمارش افتراقی گلبول‌های سفید خون نشان‌دهنده افزایش‌معنی‌دار درصدنوتروفیل خون در گروه‌های در معرض مالاتیون بود و تجویز خوراکی پروبیوتیک *L. rhamnosus* تاثیر معنی‌داری در کاهش آن نداشت(P>۰/۰۵).سنجش‌درصدلنفوسیت‌های‌خون الگویی عکس آن‌چه که در مورد نوتروفیل‌های خون مشاهده شد را نشان داد. قرارگیری‌ماهی‌درمعرض‌مالاتیون‌سبب‌کاهش‌معنی‌دار‌درصدلنفوسیت خون شد و تجویز خوراکی پروبیوتیک *L. rhamnosus* در مقایسه با جیره شاهد تاثیر معنی‌داری در افزایش آن نداشت (P>۰/۰۵). هیچ

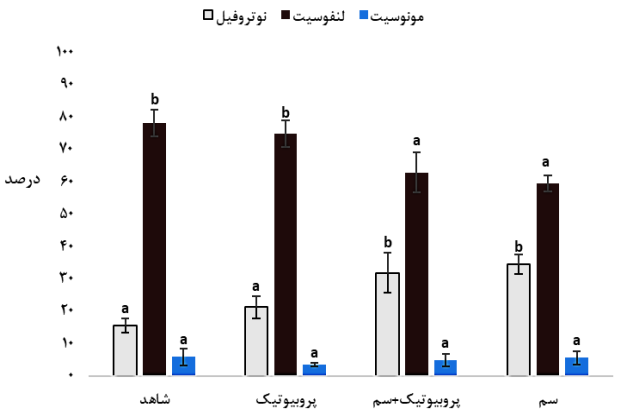
گونه تفاوت معنی‌داری در درصد تشکیل‌دهنده مونوسیت‌خون در بین گروه‌های آزمایشی مختلف مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

چالش بیماری: شکل ۲ نشان‌دهنده 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 به‌مدت 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<۰/۰۵).

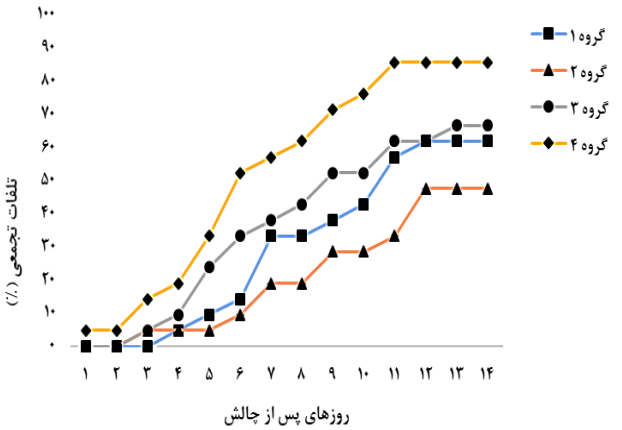
جدول۱: اثرات تجویز خوراکی پروبیوتیک *L. rhamnosus* بر پارامترهای خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تحت سمیت زیر کشنده مالاتیون

شاخص	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴
گلبول قرمز (×۱۰^۶)	۱/۳۶ ± ۰/۰۴^{c}	۱/۴۱ ± ۰/۰۳۴^{c}	۱/۲۱ ± ۰/۰۴۱^{b}	۱/۱ ± ۰/۰۵۵^{a}
گلبول سفید (×۱۰^۳)	۳۹/۷۹ ± ۱/۷۵^{b}	۴۴/۷۱ ± ۱/۸۲^{c}	۴۱/۲۰ ± ۱/۳۲^{bc}	۳۵/۶۳ ± ۱/۲۷^{a}
هماتوکریت (٪)	۴۲/۲۹ ± ۱/۱۷^{ab}	۴۵/۰۶ ± ۱/۱۳^{b}	۳۹/۶۲ ± ۳/۶۹^{ab}	۳۸/۶۹ ± ۲/۰۹^{a}
هموگلوبین (گرم بر دسی لیتر)	۱۱/۲۲ ± ۲/۰۹^{a}	۱۳/۰۲ ± ۱/۰۹^{a}	۹/۷۷ ± ۰/۹۵^{a}	۱۰/۳۵ ± ۱/۳۰^{a}
MCV	۳۱۰ ± ۱/۹۵^{a}	۳۱۹ ± ۹/۶^{a}	۳۲۵ ± ۱۹/۶۳^{ab}	۳۵۱ ± ۹/۵۴^{b}
MCH	۸۲ ± ۱۴^{a}	۹۲ ± ۸^{a}	۸۰ ± ۵/۴۵^{a}	۹۴ ± ۱۰/۵^{a}
MCHC	۲۶/۴ ± ۴/۴^{a}	۲۸/۸ ± ۱/۷۵^{a}	۲۴/۶۵ ± ۰/۵۸^{a}	۲۶/۸۲ ± ۳/۶۷^{a}

مقادیر به‌صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است. حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد (P<۰/۰۵).



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±انحراف معیار ارائه شده است. حروف متفاوت روی هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد (P<۰/۰۵)



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

بحث

از آن‌جایی‌که پارامترهای خونی به‌وسیله 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 به‌دست 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 به‌دلیل اختلال در فرایند تولید گلبول‌های قرمز، خون‌سازی، تنظیم اسمزی و یا به‌دلیل 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 به‌میزان 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 زیر کشنده 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 تیلاپیای 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 ضدمیکروبی کاتیونی، لکتین‌ها، 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 به‌میزان 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 مواجه 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 به‌میزان 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 تائید 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 رنگین کمان 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

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 ازجمله 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 اثرت 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.

منابع

۱. **آهنگرزاده، م.؛ قربانپورنجف‌آبادی، م.؛ پیغان، ر.؛ شریف روحانی، م. و سلطانی، م.، ۱۳۹۴.** نقش آئرومونواس هیدروفیلا در سپتی‌سمی‌های 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 قزل آلای 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 خون شناسی 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.; Mirvaghefei, A.R.; Banaee, M. and Vosoghei, 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

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, AH.; 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.

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 africans 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.Ş.; 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.