تاثیر باکتری *Lactobacillus rhamnosus* بر شاخص‌های بیوشیمیایی خون و فعالیت آنزیم‌های هضمی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تغذیه شده با جیره آلوده به آفلاتوکسین B1

- **نازنین صادقی**: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان، ایران
- **رعنا بهادری***: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
- **سیدمهدی اجاق**: گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران
- **عرفان سلمرودی**: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۸

چکیده

در فرایند تولید و نگه‌داری خوراک آبزیان، همواره ممکن است برخی آلودگی‌ها به غذا سرایت کند که آفلاتوکسین B1 یکی از شایع‌ترین و خطرناک‌ترین این سموم است. هدف از انجام این تحقیق بررسی تاثیر پروبیوتیک *Lactobacillus rhamnosus* بر بهبود شرایط زیستی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تغذیه شده با جیره آلوده به آفلاتوکسین B1 بود. در این آزمایش، ۱۲۰ قطعه ماهی ٤٢±٤ گرمی در ۱۲ مخزن فایبرگلاس با ٤ جیره غذایی مختلف (جیره پایه، جیره حاوی پروبیوتیک، جیره حاوی سم آفلاتوکسین و جیره ترکیب سم و پروبیوتیک) تغذیه شدند و پس از اتمام دوره ۳۰ روزه آزمایش، میزان گلوکز خون در گروه تغذیه شده با جیره حاوی سم آفلاتوکسین B1، به شکل معنی‌داری از سایر تیمارها بیش‌تر بود (P<۰/۰۵). کورتیزول و آنزیم آلکالین فسفاتاز در هردو تیمار جیره پایه و جیره حاوی پروبیوتیک، کم‌ترین مقدار را نشان دادند. فعالیت آنزیم تریپسین در روده تیمارهای پروبیوتیکی، به شکل معنی‌دار نسبت به سایر تیمارها بیش‌تر بود. درحالی‌که جیره حاوی سم فعالیت آنزیم کیموتریپسین را در روده ماهی کاهش داد و افزودن پروبیوتیک به جیره غذایی باعث افزایش معنی‌دار فعالیت این آنزیم شد. میزان تلفات نیز در تیمار جیره حاوی سم به شکل معنی‌داری از سایر تیمارها بیش‌تر بود اما با افزودن پروبیوتیک به جیره، در تیمار جیره حاوی پروبیوتیک و سم به شکل معنی‌دار کاهش یافت. در پایان نتایج به‌دست آمده از این مطالعه نشان می‌دهد که پروبیوتیک *Lactobacillus rhamnosus* می‌تواند به‌عنوان یک افزودنی خوراکی برای کاهش اثرات سمی آفلاتوکسین B1 و بهبود میزان بقا در ماهی استفاده شود و پرورش دهندگان قزل‌آلا می‌توانند به‌منظور کاهش اثر سمیت آفلاتوکسین از این پروبیوتیک در جیره خود استفاده نمایند.

کلمات کلیدی: پروبیوتیک، پروتئین کل، تریپسین، سرم خون، سم، گلوکز

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: Rana.bahadori@ut.ac.ir

مقدمه

یکی از جدی‌ترین مشکلاتی که صنعت آبزی‌پروری در برخی نقاط جهان با آن مواجه می‌باشد آلودگی خوراک آبزیان به سموم قارچی ازجمله آفلاتوکسین‌ها می‌باشد (Hussain و همکاران، ۲۰۱۷). آفلاتوکسین، یک هیدروکربن آروماتیک چندحلقه‌ای می‌باشد که عمدتاً توسط گونه‌های قارچی *Aspergillus flavus* و *Aspergillus parasiticus* تولید می‌شود و بسیاری از اقلام خوراکی با محتوای نشاسته و چربی بالا مانند پنبه دانه، ذرت، بادام زمینی، گندم و سویا را آلوده می‌کند (Huang و همکاران، ۲۰۱۱). استفاده روزافزون از ترکیبات غذایی با منشأ گیاهی به‌منظور کاهش هزینه تولید خوراک آبزیان، موجب افزایش بالقوه احتمال بروز آفلاتوکسیکوزیس در سیستم‌های آبزی‌پروری شده است (Dirican، ۲۰۱۵؛ Pia و همکاران، ۲۰۰۸). به‌طوری‌که Chen و Rawling (۲۰۰۸) گزارش نمودند که آفلاتوکسین‌ها در ۹۶/۱٪ از مواد خام و خوراک تجاری آماده مصرف جمع‌آوری شده از قاره آسیا یافت می‌شوند (Deng و همکاران، ۲۰۱۰). در میان انواع آفلاتوکسین‌ها، آفلاتوکسین B1 توسط سازمان غذا و داروی ایالات متحده به‌عنوان سمی‌ترین ترکیب سرطان‌زای طبیعی در نظر گرفته شده است و اثرات سمیت کبدی، جهش‌زایی، سرطان‌زایی، تراتوژنیک و سرکوب سیستم ایمنی به‌وسیله این سم قارچی، در طیف وسیعی از حیوانات ازجمله مهره‌داران آبزی اثبات گردیده است (Matejova و همکارن، ۲۰۱۷؛ Imani و همکاران، ۲۰۱۷). تغییر در فاکتورهای خون‌شناسی ازجمله تعداد گلبول‌های قرمز، گلبول‌های سفید، مقدار هماتوکریت، محتوای هموگلوبین و بیوشیمی سرم خون ماهیان به‌واسطه قرارگیری در معرض آفلاتوکسین B1 مشاهده گردیده است (Selim و همکاران، ۲۰۱۴؛ خانی و همکاران، ۱۳۹۵). علاوه بر این کاهش ایمنی غیراختصاصی ماهیان به‌واسطه قرارگیری طولانی مدت در معرض آفلاتوکسین B1 از طریق کاهش فعالیت ضد باکتریایی، فعالیت لیزوزیم، سطح پروتئین کل و نسبت آلبومین به گلوبولین خون گربه ماهی (*Pelteobagrus fulvidraco*) توسط Wang و همکاران (۲۰۱۶)، کاهش سطح گلوبولین، فعالیت‌های نوتروفیل خون و مقاومت به پاتوژن‌های باکتریایی *Aeromonas hydrophila* و *Edwardsiella tarda* در ماهی کپور روهو (*Labeo rohita*) توسط Sahoo و Mukherjee (۲۰۰۲) گزارش شده است. اثرات مسمومیت با آفلاتوکسین‌ها به‌طور گسترده بر گونه‌های مختلف ماهی ازجمله تیلاپیای نیل (Cagauan و همکاران، ۲۰۰۴)، قزل‌آلای رنگین‌کمان (Nomura و همکاران، ۲۰۱۱)، کپور روهو (Sahoo و Mukherjee، ۲۰۰۱)، گربه‌ماهی کانال (Jantrarotal و Lovel، ۱۹۹۰) و غیره مورد بررسی قرار گرفته است. هم‌چنین نتایج حاصل از مطالعات پیشین نشان می‌دهد که در بین گونه‌های مذکور قزل‌آلای رنگین‌کمان نسبت به آفلاتوکسین B1 به‌شدت حساس است و بسته به غلظت سم در غذا و مدت زمان رویارویی با آن اثراتی هم‌چون آسیب یا نارسایی کبد، کم خونی، خون‌ریزی، کاهش وزن، سرکوب سیستم ایمنی، افزایش حساسیت به بیماری‌های عفونی و مرگ و میر را بروز می‌دهد (Greco و همکاران، ۲۰۱۵). بنابراین، علاوه بر لزوم فهم هرچه بیش‌تر اثرات سمیت آفلاتوکسین B1 بر قزل‌آلای رنگین کمان، به‌کارگیری روش‌های کارآمد جهت سرکوب یا غیرفعال‌سازی آفلاتوکسین B1 به‌منظور تضمین سلامت ماهی و هم‌چنین فراهم آوردن تولیدی سالم و ایمن برای مصرف کننده نهایی که انسان باشد نیز امری ضروری می‌باشد. هر کدام از روش‌های فیزیکی و شیمیایی مورد استفاده جهت سم‌زدایی آفلاتوکسین B1 دارای معایب خاص خود می‌باشند و می‌توانند اثرات ناخواسته‌ای ازجمله نابودسازی مواد مغذی موجود در جیره یا از بین بردن خوش خوراکی غذا در پی داشته باشند، هم‌چنین این تکنیک‌ها نیازمند تجهیزات گران‌قیمت می‌باشند. اما روش بیولوژیکی با استفاده از به‌کارگیری میکروارگانیسم‌ها برای از بین بردن AFB1، می‌تواند به‌صورت مفید و با صرفه‌تر کارایی لازم را برآورده سازد، هم‌چنین ایمن‌تر می‌باشد و هزینه کم‌تری نیز لازم دارد (Fan و همکاران، ۲۰۱۸). در تعدادی از مطالعات مشخص شده است که برخی از میکروب‌ها هم‌چون *Debaryomyces hansenii* (Martinez و همکاران، ۲۰۱۸)، *Mycobacterium fluoranthenivorans* (Hormisch و همکاران، ۲۰۱۴)، *Lactobacillus johnsonii* (Poltonen و همکاران، ۲۰۰۰) و *Rhodococcus erythropolis* (Teniola و همکاران، ۲۰۰۵) در شرایط آزمایشگاهی قابلیت کاهش آفلاتوکسین B1 را در طی انکوباسیون هم‌زمان دارند اما این قابلیت آن‌ها بر روی حیوانات به‌ندرت مورد آزمایش قرار گرفته است. در آزمایش Lillehoj و همکاران (۱۹۶۷) مشخص شد که *Flavobacterium aurantiacum* در هنگام انکوباسیون هم‌زمان با ۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر آفلاتوکسین B1، قادر به حذف کامل سم از محیط آزمایش بود و در آزمایشی که توسط Tejada-Castañeda و همکاران (۲۰۰۸) بر روی سم‌زدایی غذای آلوده به آفلاتوکسین جوجه‌های گوشتی در حال رشد موثر بود. تا به حال چندین عضو از جنس لاکتوباسیلوس به‌عنوان پروبیوتیک برای ماهی استفاده شده است و مجموعه‌ای از اثرات سودمند ازجمله تحریک سیستم ایمنی، بهبود میزان بقا و افزایش توانایی مقابله با استرس در اثر استفاده از *Lactobacillus rhamnosus* گزارش شده است (Popovic و همکاران، ۲۰۱۷). هم‌چنین بررسی توانایی *L. rhamnosus* جهت حذف آفلاتوکسین B1 از محلول ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر Toxin trapped توسط El-Nezami و همکاران (۱۹۹۸) نشان داد که این سویه بالغ بر ۸۰٪ از غلظت سم را کاهش داد، اما کاربرد آن جهت استفاده مستقیم در خوراک آلوده با

آفلاتوکسین B1 باید ارزیابی شود. با توجه به گزارشات موجود مبنی بر قابلیت حذف آفلاتوکسین توسط *L. rhamnosus* و هم‌چنین آگاهی از اثرات سودمند مصرف خوراکی آن به‌عنوان پروبیوتیک بر ایمنی غیراختصاصی قزل‌آلای رنگین‌کمان (Panigarhi و همکاران، ۲۰۰۵) در تقابل با اثرات زیان‌بار آفلاتوکسین بر ایمنی غیراختصاصی، نهایتاً این ماهی برای این آزمایش انتخاب شد و در مجموع هدف از مطالعه حاضر، ارزیابی اثربخشی باکتری *L. rhamnosus* بر ثبات عملکرد بیولوژی و فعالیت آنزیم‌های هضمی قزل‌آلای رنگین‌کمان در پی مصرف غذای آلوده با آفلاتوکسین B1 می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه ماهی و شرایط نگه‌داری: تعداد ۱۲۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین‌وزن ۴±۴۲ گرم‌از یکی از مراکز تکثیر و پرورش آبزیان واقع در استان فارس تهیه گردید. ماهی‌ها به کارگاه سلامت آبزیان واقع در موسسه دامپزشکی افران سلامت (شیراز) انتقال داده شد و به‌منظور سازگاری با شرایط محیطی جدید به‌مدت یک هفته در مخازن ۱۰۰۰ لیتری فایبرگلاس نگه‌داری شدند. پس از پایان دوره سازگاری، جهت شروع آزمایش ماهی‌ها به‌طور تصادفی میان ۱۲ مخزن فایبرگلاس ۴۰۰ لیتری توزیع شدند(هرمخزن ۱۰ قطعه ماهی) و تحت اثر تیمارهای گوناگون قرار گرفتند. اندازه‌گیری عوامل کیفی آب، هم‌چون دمای آب (با دماسنج جیوه‌ای) به‌صورت روزانه، اکسیژن محلول (توسط اکسیژن‌متر) و pH (از طریق دستگاه pH متر) به‌صورت هفتگی انجام گرفت. میزان دمای آب، اکسیژن محلول و pH به‌ترتیب ۱۲تا ۱۵ درجه سانتی‌گراد، ۷ تا ۸ میلی‌گرم در لیتر و ۷/۲ تا ۷/۹ اندازه‌گیری گردید.

تهیه جیره‌های آزمایش: در این آزمایش از غذای تجاری قزل‌آلای رنگین‌کمان مرحله پیش‌پرواری 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٪) به‌عنوان جیره پایه استفاده شد و به‌منظور تهیه جیره‌های آزمایشی مقادیر مورد نیاز از پروبیوتیک و آفلاتوکسین B1 به جیره تجاری پایه افزوده گردید. سویه باکتریایی مورد استفاده به عنوان پروبیوتیک *Lactobacillus rhamnosus* بود و به شکل پودر خشک شده توسط انجماد (واحد تشکیل کلنی ۱۰۱۰ سلول در هر گرم) به‌میزان ۱ گرم برای هر کیلوگرم غذا مورد استفاده قرار گرفت. برای افزودن پروبیوتیک به جیره تجاری پایه از روش روغن پوشی شرح داده شده توسط Wache و همکاران (۲۰۰۶) استفاده شد. افزودن آفلاتوکسین B1 (سیگما آلدریچ) به جیره تجاری پایه نیز با روش Yonar و همکاران (۲۰۱۱) انجام شد. به این صورت که جیره تجاری مورد استفاده ابتدا کاملاً خرد شد، سپس میزان ۵ میلی‌گرم آفلاتوکسین B1 به‌ازای هر کیلوگرم غذا به آن افزوده شد و پس از مخلوط شدن اولیه به آن آب اضافه گردید و مجدداً به‌مدت ۱۵ دقیقه دیگر مخلوط شدند. بعد از آن جیره‌ها از چرخ گوشت گذرانده شد و دوباره به‌صورت پلت درآمد و در دمای اتاق به‌مدت ۴۸ ساعت خشک گردید. غلظت آفلاتوکسین مورد استفاده در خوراک براساس نصف غلظت کشنده این سم برای قزل‌آلای رنگین‌کمان محاسبه شد (فریدی کلورزی و همکاران، ۱۳۹۵). در طول دوره آزمایش ماهیان طی سه نوبت‌در روز تا حد سیری با جیره‌های آزمایشی تهیه شده تغذیه شدند.

طرح آزمایش: پس از طی دوره آداپتاسیون تمامی ماهیان بین ۴ گروه آزمایشی شاهد (تغذیه با جیره پایه)، پروبیوتیک (تغذیه با جیره حاوی پروبیوتیک *Lactobacillus rhamnosus*)، آفلاتوکسین (تغذیه با جیره حاوی آفلاتوکسین B1)، آفلاتوکسین توام با پروبیوتیک (تغذیه با جیره حاوی آفلاتوکسین B1 و پروبیوتیک) تقسیم شدند که هر تیمار دارای ۳ تکرار بود و به‌مدت ۳۰ روز با جیره‌های مذکور مورد تغذیه قرار گرفتند. قبل از شروع آزمایش ماهی‌های موجود در تیمارهای پروبیوتیک به‌مدت یک‌هفته جهت انجام پیش تیمار با جیره حاوی پروبیوتیک تغذیه شدند. در طی مدت آزمایش مخازن دائماً هوادهی می‌شدند و روزانه ۲۵٪ از حجم آب مخازن نگه‌داری ماهیان تعویض گردید.

روش‌های سنجش

شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون: پس‌از پایان دوره آزمایش، جهت اندازه‌گیری پروتئین کل، گلوکز، کورتیزول، آلکالین فسفاتاز و آسپارتات آمینوترنسفراز موجود در سرم خون ماهی، ۵ قطعه ماهی از هر مخزن برداشت گردید و به‌مدت ۱۰ دقیقه ماهی‌ها در محلول ۲۰ گرم بر لیتر پودر گل میخک قرار گرفتند و پس از بی‌هوشی کامل خونگیری از ساقه دمی توسط سرنگ‌های استریل ۲ میلی‌لیتری انجام شد. نمونه‌ها پس از ۶ ساعت نگه‌داری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و لخته شدن کامل، با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۷ دقیقه در دمای ۴ درجه‌سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سپس سرم‌خون توسط سمپلر از روی نمونه‌ها برداشته شد. نمونه‌های سرم توسط دستگاه سنجشگر خودکار شاخص‌های بیوشیمیایی (شرکت هیتاچی، ساخت کشور ژاپن) و کیت‌های ضمیمه‌ای (شرکت پارس آزمون، ساخت ایران) مورد ارزیابی قرار گرفت. کورتیزول نیز به‌روش الیزا توسط کیت‌های تجاری (شرکت آی بی ال، ساخت کشور آلمان) اندازه‌گیری شد.

میزان فعالیت آنزیم‌های هضمی روده: جهت سنجش میزان فعالیت آنزیم‌های هضمی روده، در انتهای دوره آزمایش ۴ قطعه ماهی

از هر مخزن برداشت گردید و مطابق با قوانین حمایت از حیوانات آزمایشگاهی با قرارگیری در محلول ۷۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پودر گل میخک سریعاً کشته شد. سپس سریعاً عمل تشریح آغاز شد و قسمتی از اواسط روده هر ماهی جداسازی گردید. نمونه‌ها با مقدار کافی محلول نمکی ۰/۸ درصد جهت به‌دست آوردن ترکیب ۱۰ درصد وزنی همگن شدند. ترکیب حاصله با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سپس میزان فعالیت آنزیم‌های تریپسین و کیموتریپسین به‌روش Hummel (۱۹۵۹) با افزودن محلول حاصله به بستری از کازئین و بررسی میزان هضم کازئین صورت گرفت. لیپاز به‌روش Shihabi و Bishop (۱۹۷۱) با استفاده از روغن زیتون خالص به‌عنوان بستر و سنجش میزان هضم روغن زیتون توسط محلول حاصل از بافت روده انجام شد. آمیلاز نیز به‌روش Bernfeld (۱۹۵۱) با استفاده از بستر نشاسته‌ای محاسبه گردید.

تحلیل‌های آماری: نرمال بودن تمام داده‌ها توسط آزمون کلموگروف اسمیرنوف بررسی شد و سپس با آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه ANOVA مورد بررسی قرار گرفت. هم‌چنین از آزمون چند دامنه‌ای دانکن با سطح معنی‌داری ($P<0/05$) برای مقایسه میانگین بین تیمارها استفاده شد. تمام داده‌های موجود در این مقاله به‌صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه گردید و جهت انجام تمام تجزیه و تحلیل‌های آماری، از نرم‌افزار تحت ویندوز SPSS نسخه ۲۴ استفاده گردید.

نتایج

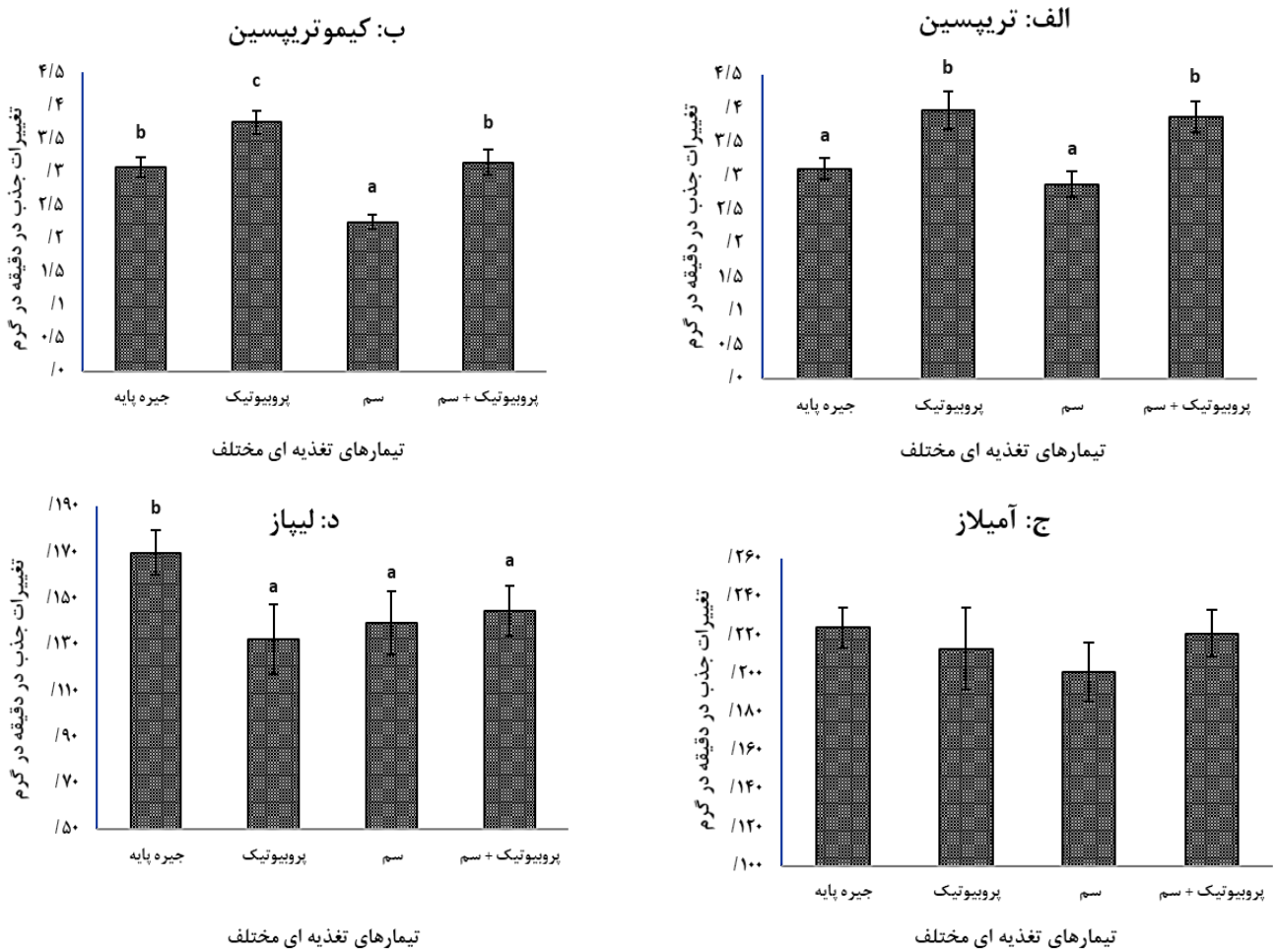
شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون: ماهیانی که به‌مدت ۳۰ روز با جیره‌های حاوی سم آفلاتوکسین B1 تغذیه شده بودند، زمانی که پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس به جیره سمی آن‌ها افزوده شد، پاسخ‌های خونی متفاوتی را نشان دادند (جدول ۱). محتوای پروتئین کل موجود در سرم خون ماهی و هم‌چنین فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترنسفراز در هیچ‌یک از تیمارهای آزمایش تغییر معنی‌داری نشان نداد ($P>0/05$). درحالی‌که میزان گلوکز خون در گروه تغذیه شده با جیره حاوی سم آفلاتوکسین B1 ، به شکل معنی‌داری از سایر تیمارها بیش‌تر بود ($P<0/05$). تغییرات میزان کورتیزول و آنزیم آلکالین فسفاتاز روند مشابهی را داشت و هردو در تیمار جیره پایه و جیره حاوی پروبیوتیک، کم‌ترین مقدار را نشان دادند، اما در تیمار جیره حاوی پروبیوتیک+سم و جیره حاوی سم به‌ترتیب به شکل معنی‌داری افزایش یافتند. میزان تلفات نیز در تیمار جیره حاوی سم به شکل معنی‌داری از سایر تیمارها بیش‌تر بود اما با افزودن پروبیوتیک به جیره، در تیمار پروبیوتیک+سم به شکل معنی‌دار کاهش یافت.

میزان فعالیت آنزیم‌های هضمی روده: افزودن پروبیوتیک و سم به جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، باعث تغییر میزان فعالیت آنزیم‌های هضمی در روده این ماهی گردید (شکل ۱). فعالیت آنزیم تریپسین در تیمارهای غذایی حاوی پروبیوتیک، به شکل معنی‌دار نسبت به سایر تیمارها بیش‌تر بود. درحالی‌که جیره حاوی سم به‌شدت فعالیت آنزیم کیموتریپسین را در روده ماهی کاهش داد و افزودن پروبیوتیک به جیره غذایی نیز باعث افزایش معنی‌دار فعالیت این آنزیم شد. فعالیت آنزیم لیپاز در گروه تغذیه شده با جیره پایه (شاهد) به شکل معنی‌داری از سایر تیمارها بیش‌تر بود، اما آنزیم آمیلاز تحت تاثیر هیچ‌یک از تیمارهای تغذیه‌ای، تغییرات معنی‌دار نشان نداد و از نظر آماری در تمام تیمارها ثابت بود.

جدول ۱: تاثیر پروبیوتیک *Lactobacillus rhamnosus* بر شاخص‌های بیوشیمیایی خون و درصد بقاء ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با جیره آلوده به آفلاتوکسین B_1

تیمارها	پروتئین کل (گرم بر دسی‌لیتر)	گلوکز (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)	کورتیزول (میکروگرم بر دسی‌لیتر)	آلکالین فسفاتاز (واحد بر لیتر)	آسپارتات آمینوترنسفراز (واحد بر لیتر)	درصد بقاء
جیره پایه	۴/۹۱ ± ۰/۳۳	۸۳/۱۳ ± ۶/۷^{a}	۱۹۹/۰۳ ± ۱۱/۷۸^{a}	۱۲/۴ ± ۰/۴^{a}	۳۲/۷۷ ± ۲/۷	۹۳/۳۳ ± ۳/۹^{c}
جیره حاوی پروبیوتیک	۴/۳۷ ± ۰/۱	۸۰/۹۲ ± ۳/۱^{a}	۱۹۴/۳۷ ± ۹/۲^{a}	۱۲/۶۲ ± ۰/۹^{a}	۳۱/۵ ± ۶/۱	۹۳/۳۳ ± ۳/۹^{c}
جیره حاوی سم	۴/۶۹ ± ۰/۱۶	۱۰۱/۳۸ ± ۱۱^{b}	۲۸۷/۶۹ ± ۱۹/۳۵^{c}	۱۷/۶۵ ± ۱/۶^{c}	۳۴/۳۹ ± ۳/۳	۷۰ ± ۶/۶ ^{a}
جیره حاوی پروبیوتیک و سم	۴/۷۳ ± ۰/۱۶	۸۷/۶۲ ± ۴/۱^{a}	۲۲۱/۷۴ ± ۱۶/۳^{b}	۱۳/۹۸ ± ۰/۹^{b}	۳۳/۰۵ ± ۴/۷	۸۳/۳۳ ± ۵/۷ ^{b}

میانگین (± انحراف معیار)، حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهاست ($P<0/05$).



شکل ۱: نمودار میزان فعالیت آنزیم‌های هضمی روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با پروبیوتیک *Lactobacillus rhamnosus* و سم آفلاتوکسین B1

حروف متفاوت روی هر ستون، نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها (P<۰/۰۵) می‌باشد.

بحث

آلودگی خوراک آبزیان در مراحل ساخت و ذخیره‌سازی و انبارداری ممکن است رخ دهد اما بیش‌ترین آلودگی سمی نظیر آلودگی به آفلاتوکسین معمولاً از مواد اولیه وارد غذا می‌گردد (Hussain و همکاران، ۲۰۱۷).آفلاتوکسین،یک هیدروکربن آروماتیک‌چندحلقه‌ای می‌باشد که عمدتاً توسط گونه‌های قارچی *Aspergillus flavus* و *Aspergillus parasiticus* تولید می‌شود و بسیاری از اقلام خوراکی با محتوای نشاسته و چربی بالا مانند پنبه دانه، ذرت، بادام زمینی، گندم و سویا را آلوده می‌کند(Huang و همکاران، ۲۰۱۱).این تحقیق با هدف ارزیابی تاثیر باکتری *Lactobacillus rhamnosus* در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تغذیه شده با جیره آلوده به آفلاتوکسین B_1 با تجزیه و تحلیل شاخص‌های بیوشیمیایی خون و فعالیت‌آنزیم‌های هضمی صورت گرفت. پارامترهای خونی در ماهیان تحت تأثیر عوامل فیزیولوژیکی (Rosenmann و Nespolo، ۲۰۰۲) و یا عوامل خارجی مختلفی نظیر جیره غذایی قرار دارد (Rios و همکاران، ۲۰۰۲). خون به‌عنوان یک بافت سیال یکی از مهم‌ترین مایعات بیولوژیک بدن بوده که تحت تأثیر حالات مختلف فیزیولوژیک و پاتولوژیک، ترکیبات آن دستخوش تغییر و نوسان می‌گردد (Khageh و Peyghan، ۱۳۸۵).خون‌شناسی اهمیت فراوانی در تشخیص اختلالات و بیماری‌ها دارد. به طوری‌که اگر میزان طبیعی پارامترهای سلولی و بیوشیمیایی خون و دامنه تغییرات آن در انواع ماهیان در شرایط طبیعی در دسترس باشد، بررسی این پارامترها می‌تواند نقش مهمی در تشخیص بیماری‌های عفونی و خونی آبزیان ایفا نماید (Shahidi Yasagh و همکاران، ۱۳۸۷). تغییر در میزان پروتئین کل پلاسما نسبت به محدوده پایه، به‌عنوان یک شاخص در سنجش میزان سلامت، استرس و وضعیت بدنی آبزی به‌کار برده می‌شود (Jadi و

همکاران، ۲۰۱۵). در این تحقیق محتوای پروتئین کل موجود در سرم خون ماهی در هیچ‌یک از تیمارهای آزمایش تغییر معنی‌داری نشان نداد. در آزمایشی که توسط Pradeepkiran و همکاران (۲۰۱۵) صورت گرفت مقدار پروتئین کل به‌طور معنی‌داری در گروه T2 (تحت درمان با AFB1 ۲۰۰ ppb) کاهش یافت اما در سایر گروه‌های تحت درمان با پروبیوتیک (رژیم غذایی آلوده به AFB1 ۲۰۰ ppb+۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن پنیر) T3، (رژیم غذایی آلوده به AFB1 ۲۰۰ ppb +۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن سیر) T4 و (رژیم غذایی آلوده به AFB1 ۲۰۰ppb+۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن پنیر + سیر) T5، سطح کل پروتئین مشابه گروه شاهد بود. هم‌چنین در تحقیق Pradeepkiran و همکاران (۲۰۱۵) شمارش WBC افزایش یافته که بیانگر این می‌باشد که آفلاتوکسین B_1 یک پاسخ التهابی ایجاد کرده و سبب تغییر در مغز استخوان و افزایش تولید WBC توسط سیستم ایمنی بدن می‌شود. تجزیه و تحلیل سرم از ماهی‌های تحت تیمار با آفلاتوکسین B_1 کاهش قابل توجهی در کل پروتئین، گلوبولین و آلبومین را با افزایش آسیب‌نشان داد. یافته‌های تحقیق Saber (۱۹۹۵) بر روی ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) تیمار شده با آفلاتوکسین B_1 نشان‌دهنده کاهش قابل توجهی در کل پروتئین، گلوبولین و آلبومین بود. نتایج مطالعه جوانمردی و همکاران (۱۳۹۶) نشان داد که افزودن ویتامین C به جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تحت سمیت کشنده مالاتیون سبب تغییر معنی‌داری در میزان پروتئین کل پلاسما نمی‌شود که با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد.

آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) یک آنزیم حیاتی برای ماهی محسوب می‌شود و سنجش این آنزیم به تشخیص آسیب‌های بافتی ایجاد شده از طریق مواد سمی کمک می‌کند. این آنزیم به‌صورت وسیع در بسیاری از بافت‌ها و اندام‌ها مثل کبد، ماهیچه، قلب، سیستم اسکلتی، عضلات و کلیه وجود دارد (Chimela و همکاران، ۲۰۱۴). این آنزیم هم‌چنین به‌طور گسترده در مطالعات سم‌شناسی برای تشخیص آسیب‌های سلولی و بافتی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Diamantino و همکاران، ۲۰۰۱). در تحقیق Pradeepkiran و همکاران (۲۰۱۵) سطوح آسپارتات آمینو ترنسفراز (AST) به‌میزان قابل توجهی با تغییر ۵۲/۰۷ درصد در گروه T2 (تحت تیمار باAFB1) کاهش یافت. در تمام گروه‌های درمان شده با پروبیوتیک (پنیر و سیر) T3، T4 و T5، سطوح AST مشابه گروه شاهد بود اما در تحقیق حاضر فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترنسفراز در هیچ‌یک از تیمارهای آزمایش تغییر معنی‌داری نشان نداد. در تحقیق دهقان‌نواز و همکاران (۱۳۹۴) تحت عنوان تغییرات آسپارتات آمینوترانسفراز و لاکتات دهیدروژناز تحت تأثیر سمیت جلبک *Nodularia spumigena* در ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*)، آنزیم AST در تیمار سنگین (10^8 سلول در هر میلی‌لیتر نمونه) اختلاف معنی‌داری در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری نشان داد اما نسبت به گروه شاهد معنی‌دار نبود که با مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد.

در مطالعه حاضر میزان گلوکز خون در گروه تغذیه شده با جیره حاوی سم آفلاتوکسین B_1، به شکل معنی‌داری از سایر تیمارها بیش‌تر بود. یکی از دلایل افزایش گلوکز در مطالعات سم‌شناسی و ورود استرس محیطی، احتمالاً کاهش انسولین و افزایش گلوکوکورتیکوئیدها می‌باشد که به‌دنبال افزایش کورتیزول تحت تاثیر استرس اتفاق می‌افتد (Ahmad، ۲۰۱۱). این هورمون‌ها به‌همراه کورتیزول باعث تحریک و افزایش تولید گلوکز از طریق فرآیند گلیکوژنزیز می‌شود تا انرژی مورد نیاز سلول‌های تحت استرس فراهم شود (Al-Ghanim، ۲۰۱۲). افزایش گلوکز خون در زمان استرس به موجود کمک می‌کند تا با رساندن انرژی به اندام‌های حیاتی جوابگوی این افزایش تقاضای انرژی باشد. بنابراین سم آفلاتوکسین سبب ایجاد استرس و در نتیجه افزایش گلوکز در خون ماهی در جیره حاوی سم شده است اما در سایر جیره‌ها پروبیوتیک به‌عنوان یک عامل ضداسترس عمل کرده و از این طریق مانع از افزایش گلوکز در خون شده است که با نتایج جوانمردی و همکاران (۱۳۹۶) مبنی بر این‌که ویتامین C به‌عنوان یک عامل ضد استرس مانع از افزایش گلوکز در خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تحت سمیت تحت کشنده سم مالاتیون می‌شود.

آلکالین فسفاتاز آنزیمی است که به‌طور معمول در بسیاری از مطالعات سیستم گوارشی در لارو ماهیان مورد مطالعه قرار می‌گیرد. این آنزیم تکامل غشای نوار مسواکی روده را نشان می‌دهد. این آنزیم‌ها در هیدرولیز و سنتز استرها یا اسیدفسفریک و انتقال گروه‌های فسفات از اسیدفسفریک به سایر ترکیبات در pH قلیایی نقش دارد و آن را تسریع می‌نماید و نقش مهمی را در فرآیند معدنی‌سازی اسکلت حیوانات آبزی و رشد و نمو موجودات زنده ایفا می‌کنند (Farrell و همکاران، ۲۰۱۱). هورمون کورتیزول یک هورمون چندکاره است و در پاسخ به استرس، تنظیم اسمزی، متابولیسم، رشد و سیستم ایمنی بدن ماهیان نقش دارد (Martinez-Porchas و همکاران، ۲۰۰۹). بنابراین، مطالعه و بررسی میزان این هورمون در بدن ماهیان در شرایط مختلف محیطی حائز اهمیت است.

در این مطالعه تغییرات میزان کورتیزول و آنزیم آلکالین فسفاتاز روند مشابهی را داشت و هردو در تیمار جیره پایه و جیره+ پروبیوتیک، کم‌ترین مقدار را نشان دادند، اما در تیمار جیره+ پروبیوتیک+ سم و جیره+ سم به‌ترتیب به شکل معنی‌داری افزایش یافتند. این نتایج با نتایج تحقیق Hamed (۲۰۱۵) هم‌خوانی داشت که در آن

سطح کورتیزل پلاسمای تیلاپیای نیل تحت سمیت مالاتیون افزایش نشان داد. در تحقیقی که توسط El-Gawad و Hamid (۲۰۱۴) بر روی ماهی تیلاپیا صورت گرفت نیز ویتامین C میزان کورتیزول پلاسما را تحت سمیت فنیتروتیون به‌میزان قابل توجهی کاهش داد (Segner و همکاران، ۱۹۹۵). میزان تلفات نیز در تیمار جیره + سم به‌طور معنی‌داری از سایر تیمارها بیش‌تر بود اما با افزودن پروبیوتیک به جیره، در تیمار جیره حاوی پروبیوتیک و سم به شکل معنی‌دار کاهش یافت. بنابراین چنین به‌نظر می‌رسد که پروبیوتیک سبب افزایش درصد بقا در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان شده است.

آنزیم تریپسین یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های گروه پروتئاز سرین بوده که به‌صورت یک پیش آنزیم توسط سلول‌های پانکراس تولید می‌شود و فعالیت آندوپپتیدازی که زنجیره پروتئینی را از سمت گروه کربوکسیل جایی‌که اسید آمینه آرژنین و لایزین قرار دارد را شکسته و نقش مهمی در فرآیندهای زیستی مانند هضم مواد غذایی و فعال کردن زیموژن‌های تریپسین و هم‌چنین سایر زیموژن‌های آنزیم‌های پانکراتیک دارد (Silva و همکاران، ۲۰۱۱). آنزیم تریپسین یک فاکتور افزایش دهنده هیدرولیز پروتئین است. بنابراین مشاهده می‌شود که آنزیم تریپسین نقش بسیار مهمی در شکست و هیدرولیز پروتئین‌ها ایفا می‌کند (Ktari و همکاران، ۲۰۱۲). در تحقیق حاضر نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم‌های هضمی روده شامل تریپسین، کیموتریپسین، لیپاز و آمیلاز پس از یک‌دوره ۳۰ روزه تغذیه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با جیره حاوی پروبیوتیک *Lactobacillus rhamnosus* و سم آفلاتوکسین B_1 نشان داد که فعالیت آنزیم تریپسین در تیمارهای غذایی حاوی پروبیوتیک، به شکل معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها بیش‌تر بود. درحالی‌که جیره حاوی سم به شدت فعالیت آنزیم کیموتریپسین را در روده ماهی کاهش داد و افزودن پروبیوتیک به جیره غذایی نیز باعث افزایش معنی‌دار فعالیت این آنزیم شد. فعالیت آنزیم لیپاز در گروه تغذیه شده با جیره پایه (شاهد) به شکل معنی‌داری از سایر تیمارها بیش‌تر بود، اما آنزیم آمیلاز تحت تاثیر هیچ‌یک از تیمارهای تغذیه‌ای، تغییرات معنی‌دار نشان نداد و از نظر آماری در تمام تیمارها ثابت بود. مطالعه Yanbo و Zirong (۲۰۰۶) بر روی استفاده از باکتری‌های خانواده باسیلوس به‌عنوان پروبیوتیک در جیره غذایی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) نیز افزایش فعالیت آنزیم آمیلاز در روده را نشان داد، درحالی‌که میزان فعالیت آنزیم لیپاز نیز با افزایش روبرو بود که با نتایج حاصل از مطالعه حاضر هم‌خوانی ندارد و احتمالاً دلیل این عدم تطابق تفاوت در رژیم‌غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و کپورمعمولی و گرایش بیش‌تر ماهی کپور معمولی به جیره‌های گیاهی می‌باشد. باکتری باسیلوس در جیره میگوی سفید هندی (*Fenneropenaeus indicus*) نیز تاثیری مشابه با کپور معمولی داشت و باعث افزایش هم‌زمان فعالیت آنزیم‌های هضمی لیپاز و آمیلاز در روده شد (Ziaei-Nejad و همکاران، ۲۰۰۶). در سنین لاروی نیز افزودن سطوح مختلف پروبیوتیک لاکتوباسیلوسی به جیره غذایی لارو ماهی شانک اروپایی (*Sparus aurata*) باعث افزایش فعالیت آنزیم هضمی آمیلاز و تریپسین در هفته دوم و سوم بعد از تفریخ شد (Suzer و همکاران، ۲۰۰۸) که این نتایج با توجه به لاکتوباسیلوسی بودن پروبیوتیک مصرفی، با نتایج حاصل از تحقیق حاضر تطابق دارد.

در پایان نتایج به‌دست آمده از این مطالعه به‌وضوح نشان می‌دهد که پروبیوتیک *Lactobacillus rhamnosus* می‌تواند به‌عنوان یک افزودنی خوراکی برای کاهش اثرات سمی آفلاتوکسین B_1 و بهبود میزان بقا در ماهی استفاده شود و پرورش‌دهندگان به‌خصوص پرورش دهندگانی که از ترکیبات غذایی با منشأ گیاهی به‌منظور کاهش هزینه تولید خوراک آبزیان استفاده می‌کنند می‌توانند از این پروبیوتیک در جیره خود استفاده نمایند.

تشکر و قدردانی

نگارندگان این مقاله علمی- پژوهشی وظیفه خود می‌دانند که از تمامی کارکنان و مسئولین موسسه دامپزشکی افران‌سلامت هم‌چنین آقای ماهان معتمدیان جهت نقطه نظرات علمی ایشان، صمیمانه مراتب تقدیر و تشکر ویژه خود را به‌عمل آورند.

منابع

۱. **جوانمردی، س.؛ رضایی‌توابع، ک.؛ مرادی، س. و بیات‌غیاثی، ل.، ۱۳۹۶.** اثرات سطوح مختلف ویتامین C در جیره غذایی بر عملکرد رشد، فعالیت آنزیم‌های هضمی و برخی فاکتورهای استرسی خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تحت سمیت تحت کشندهٔ سم مالاتیون. فصلنامه علوم آبزی پروری. دوره ۵، شماره ۲، صفحات ۴۰ تا ۴۹.

۲. **دهقان‌نواز، م.؛ ستاری، م. و رمضان‌پور، ز.، ۱۳۹۴.** تغییرات آسپارتات آمینوترانسفراز و لاکتات دهیدروژناز تحت تاثیر سمیت جلبک *Nodularia spumigena* در ماهی آزاد دریای خزر *Salmo trutta caspius*.. مجله توسعه آبزی پروری. دوره ۹، شماره ۴، صفحات ۲۱ تا ۳۰.

۳. **Ahmad, Z., 2011.** Toxicity bioassay and haematological changes induced by diazinon in common carp, Cyprinus carpio. African Journal of Biotechnology. Vol. 10, pp: 13852-13859.

۴. **Al-Ghanim, K.A., 2012.** Acute toxicity and effects of sub lethal malathion exposure on biochemical and haematological parameters of Oreochromis niloticus Scientific Research & Essays. Vol. 7, No. 16, pp: 1674-1680.

۵. **Bernfeld, P., 2014.** Enzymes of starch degradation and synthesis. Advances in enzymology and related areas of molecular biology. Vol. 12, No. 3, pp: 379-428.

۶. **Cagauan, A.G.; Tayaban, R.H.; Somga, J.R. and Bartolome, R.M., 2004.** Effect of aflatoxin-contaminated feeds in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). In Abstract of the 6th international symposium on tilapia in aquaculture (ISTA 6) section: health management and diseases Manila, Philippines. Vol. 12, 16 p.

۷. **Chen, H.Y. and Rawlings, R., 2008.** The truth of mycotoxin contamination of feed in Asia region. China Poult. Vol. 30, No. 16, pp: 33-35.

۸. **Diamantino, T.C., 2001.** Lactate dehydrogenase activity as an effect criterion in toxicity tests with Daphnia magna straus. Chemosphere. Vol. 45, No. 4-5, pp: 553-560.

۹. **Dirican, S., 2015.** A review of effects of aflatoxins in aquaculture. Appl Res J. Vol. 1, pp: 192-196.

۱۰. **El-Gawad E.A.A. and Hamid, O.M.A., 2014.** Effect of vitamin C dietary supplementation in reducing the alterations induced by fenitrothion in Oreochromis niloticus. Fish physiology and biochemistry. Vol. 40, No. 3, pp: 787-796.

۱۱. **El-Nezami, H.; Kankaanpaa, P.; Salminen, S. and Ahokas, J., 1998.** Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B1. Food and chemical toxicology. Vol. 36, No. 4, pp: 321-326.

۱۲. **Fan, Y.; Liu, L.; Zhao, L.; Wang, X.; Wang, D.; Huang, C.; Zhang, J.; Ji, C. and Ma, Q., 2018.** Influence of Bacillus subtilis ANSB060 on growth, digestive enzyme and aflatoxin residue in Yellow River carp fed diets contaminated with aflatoxin B1. Food and chemical toxicology. Vol. 113, pp: 108-114.

۱۳. **Farrell, A.P.; Stevens, E.D.; Cech, J.J. and Richards, J.G., 2011.** Encyclopedia of fish physiology: From genome to environment. Academic Press, Elsevier, London. 2163 p.

۱۴. **Greco, M.; Pardo, A. and Pose, G., 2015.** Mycotoxigenic fungi and natural co-occurrence of mycotoxins in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) feeds. Toxins. Vol. 7, No. 11, pp: 4595-4609.

۱۵. **Hamed, H.S., 2015.** Impact of a short-term malathion exposure of Nile tilapia, (*Oreochromis niloticus*): the protective role of selenium. International Journal of Environmental Monitoring and Analysis. Vol. 3, pp: 30-37.

۱۶. **Hormisch, D.; Brost, I.; Kohring, G.W.; Giffhorn, F.; Kroppenstedt, R.M.; Stackebradt, E.; Färber, P. and Holzapfel, W.H., 2004.** *Mycobacterium fluoranthenivorans* sp. nov., a fluoranthene and aflatoxin B1 degrading bacterium from contaminated soil of a former coal gas plant. Systematic and applied microbiology. Vol. 27, No. 6, pp: 653-660.

۱۷. **Huang, Y.; Han, D.; Zhu, X.; Yang, Y.; Jin, J.; Chen, Y. and Xie, S., 2011.** Response and recovery of gibel carp from subchronic oral administration of aflatoxin B1. Aquaculture. Vol. 319, No. 1-2, pp: 89-97.

۱۸. **Hummel, B.C., 1959.** A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin, and thrombin. Canadian journal of biochemistry and physiology. Vol. 37, No. 12, pp: 1393-1399.

۱۹. **Hussain, D.; Mateen, A. and Gatlin III, D.M., 2017.** Alleviation of aflatoxin B1 (AFB1) toxicity by calcium bentonite clay: Effects on growth performance, condition indices and bioaccumulation of AFB1 residues in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture. Vol. 475, pp: 8-15.

۲۰. **Imani, A.; Bani, M.S.; Noori, F.; Farzaneh, M. and Moghanlou, K.S., 2017.** The effect of bentonite and yeast cell wall along with cinnamon oil on aflatoxicosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Digestive enzymes, growth indices, nutritional performance and proximate body composition. Aquaculture. Vol. 476, pp: 160-167.

۲۱. **Jadi, E.; Movahedinia, A.; Safahie, A.; Dezhandian, S. and Halajian, A., 2015.** Study of the effects of diazinon pesticides on some of the biochemical parameters of serum of Caspian Sea fish. Journal of Animal Scienc. Vol. 28, No. 9, pp: 274-281.

۲۲. **Jantrarotai, W. and Lovell, R.T., 1990.** Subchronic toxicity of dietary aflatoxin B1 to channel catfish. Journal of Aquatic Animal Health. Vol. 2, No. 4, pp: 248-254.

۲۳. **Khageh, GH.H. and Peyghan, R., 1386.** Evaluation of some blood serum biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cultured in earthen ponds. Journal of Veterinary Research. Vol. 62, pp: 203-197.

۲۴. **Knox, D.; Cowey, C.B. and Adron, J.W., 1981.** The effect of low dietary manganese intake on rainbow trout (*Salmo gairdneri*). British Journal of Nutrition. Vol. 46, pp: 495-501.

۲۵. **Ktari, N.; Khaled, H.B.; Nasri, R.; Jellouli, K.; Ghorbel, S. and Nasri, M., 2012.** Trypsin from zebra blenny (*Salaria basilisca*) viscera: Purification, characterisation and potential

۲۶. **Lillehoj, E.B.; Ciegler, A. and Hall, H.H., 1967.** Aflatoxin B1 uptake by *Flavobacterium aurantiacum* and resulting toxic effects. Journal of Bacteriology. Vol. 93, No. 1, pp: 464-471.

۲۷. **Martínez, M.P.; González Pereyra, M.L.; Fernandez Juri, M.G.; Poloni, V. and Cavaglieri, L., 2018.** Probiotic characteristics and aflatoxin B1 binding ability of *Debaryomyces hansenii* and Kazaschtania exigua from rainbow trout environment. Aquaculture research. Vol. 49, No. 4, pp: 1588-1597.

۲۸. **Martinez-Porchas M.; Martinez-Cordova, L.F. and Ramos-Eneiquez, R., 2009.** Cortisol and Glucose: Reliable indicators of fish stress? Pan-American Journal of Aquatic Sciences. Vol. 4, No. 2, pp: 158-178.

۲۹. **Matejova, I.; Svobodova, Z.; Vakula, J.; Mares, J. and Modra, H., 2017.** Impact of mycotoxins on aquaculture fish species: a review. Journal of the world aquaculture society. Vol. 48, No. 2, pp: 186-200.

۳۰. **Matejova, I.; Vicenova, M.; Vojtek, L.; Kudlackova, H.; Nedbalcova, K.; Faldyna, M.; Sisperova, E.; Modra, H. and Svobodova, Z., 2015.** Effect of the mycotoxin deoxynivalenol on the immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Veterinarni Medicina. Vol. 60, No. 9, pp: 57-68.

۳۱. **Nespolo, R.F. and Rosenmann, M., 2002.** Intraspecific allometry of haematological parameters in *Basilichthys australis*. Journal of Fish Biology. Vol. 60, No. 5, pp: 1358-1362.

۳۲. **Nomura, H.; Ogiso, M.; Yamashita, M.; Takaku, H.; Kimura, A.; Chikasou, M.; Nakamura, Y.; Fujii, S.; Watai, M. and Yamada, H., 2011.** Uptake by dietary exposure and elimination of aflatoxins in muscle and liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of agricultural and food chemistry. Vol. 59, No. 9, pp: 5150-5158.

۳۳. **Panigrahi, A.; Kiron, V.; Puangkaew, J.; Kobayashi, T.; Satoh, S. and Sugita, H., 2005.** The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture. Vol. 243, No. 1-4, pp: 241-254.

۳۴. **Peltonen, K.D.; El-Nezami, H.S.; Salminen, S.J. and Ahokas, J.T., 2000.** Binding of aflatoxin B1 by probiotic bacteria. Journal of the Science of Food and Agriculture. Vol. 80, No. 13, pp: 1942-1945.

۳۵. **Rios, F.S.; Kalinin, A.L. and Rantin, F.T., 2002.** The effects of long-term food deprivation on respiration and haematology of the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. Journal of Fish Biology. Vol. 61, No. 1, pp: 85-95.

۳۶. **Saber, N.A., 1995.** Depression of protein synthesis in tilapia by aflatoxin. Bull. Nat. Inst. Of Oceanogr. Egypt. Vol. 21, pp: 631-638.

۳۷. **Sahoo, P.K. and Mukherjee, S.C., 2001.** Effect of dietary β-1, 3 glucan on immune responses and disease resistance of healthy and aflatoxin B1-induced immunocompromised rohu (*Labeo rohita* Hamilton). Fish & Shellfish Immunology. Vol. 11, No. 8, pp: 683-695.

۳۸. **Santacroce, M.P.; Conversano, M.C.; Casalino, E.; Lai, O.; Zizzadoro, C.; Centoducati, G. and Crescenzo, G., 2008.** Aflatoxins in aquatic species: metabolism, toxicity and perspectives. Reviews in Fish Biology and Fisheries. Vol. 18, No. 1, pp: 99-130.

۳۹. **Selim, K.M.; El-hofy, H. and Khalil, R.H., 2014.** The efficacy of three mycotoxin adsorbents to alleviate aflatoxin B 1-induced toxicity in Oreochromis niloticus. Aquaculture International. Vol. 22, No. 2, pp: 523-540.

۴۰. **Shahidi Yasaghi, S.A.; Mazandarani, M.; Ghorbani, A.; Saraei, H.: Ghorbani, R. and Soleimani, N., 1387.** Determination of normal values of some blood serum factors (Electrolyte and nonelectrolyte) of *Acipenser persicus*. Journal of Fisheries. Vol. 2, No. 1, pp: 25-32.

۴۱. **Shihabi, Z.K. and Bishop, C., 1971.** Simplified turbidimetric assay for lipase activity. Clinical chemistry. Vol. 17, No. 12, pp: 1150-1153.

۴۲. **Silva, J.F.; Espósito, T.S.; Marcuschi, M.; Ribeiro, K.; Cavalli, R.O.; Oliveira, V. and Bezerra, R.S., 2011.** Purification and partial characterisation of a trypsin from the processing waste of the silver mojarra (*Diapterus rhombeus*). Food chemistry. Vol. 129, No. 3, pp: 777-782.

۴۳. **Suzer, C.; Çoban, D.; Kamaci, H.O.; Saka, Ş.; Firat, K.; Otgucuoğlu, Ö. and Küçüksari, H., 2008.** Lactobacillus spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae: effects on growth performance and digestive enzyme activities. Aquaculture. Vol. 280, pp: 140-145.

۴۴. **Tejada-Castaneda, Z.I.; Avila-Gonzalez, E.; Casaubon Huguenin, M.T.; Cervantes-Olivares, R.A.; Vásquez Peláez, C.; Hernandez-Baumgarten, E.M. and Moreno Martínez, E., 2008.** Biodetoxification of aflatoxin application as a detergent additive. Food Chemistry. Vol. 130, No. 3, pp: 467-474.

contaminated chick feed. Poultry science. Vol. 87, No. 8, pp: 1569-1576.

۴۵. **Teniola, O.D.; Addo, P.A.; Brost, I.M.; Färber, P.; Jany, K.D.; Alberts, J.F.; Van Zyl, W.H.; Steyn, P.S. and Holzapfel, W.H., 2005.** Degradation of aflatoxin B1 by cell free extracts of Rhodococcus erythropolis and *Mycobacterium fluoranthenivorans* sp. nov. DSM44556T. International journal of food microbiology. Vol. 105, No. 2, pp: 111-117.

۴۶. **Topic Popovic, N.; Strunjak-Perovic, I.; Sauerborn Klobucar, R.; Barisic, J.; Jadan, M.; Kazazic, S.; Kesner Koren, I.; Prevendar Crnic, A.; Suran, J.; Beer Ljubic, B. and Matijatko, V., 2017.** The effects of diet supplemented with Lactobacillus rhamnosus on tissue parameters of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Aquaculture research. Vol. 48, No. 5, pp: 2388-2401.

۴۷. **Wang, X.; Wang, Y.; Li, Y.; Huang, M.; Gao, Y.; Xue, X.; Zhang, H.; Encarnação, P.; Santos, G.A. and Gonçalves, R.A., 2016.** Response of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) to different dietary concentrations of aflatoxin B1 and evaluation of an aflatoxin binder in offsetting its negative effects. Ciencias Marinas. Vol. 42, No. 1, pp: 15-29.

۴۸. **Yanbo, W. and Zirong, X., 2006.** Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. Animal feed science and technology. Vol. 127, pp: 283-292.

۴۹. **Ziaei-Nejad, S.; Rezaei, M.H.; Takami, G.A.; Lovett, D.L.; Mirvaghefi, A.R. and Shakouri, M., 2006.** The effect of Bacillus spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp (*Fenneropenaeus indicus*). Aquaculture. Vol. 252, pp: 516-524.