Archive of SID



Downloaded from jweb.iauahvaz.ac.ir at 17:54 +0330 on Saturday November 25th 2017

# مقایسه غلظت‌های مختلف باکتری *Lactobacillus casei* بر برخی پاسخ‌های ایمنی غیراختصاصی و شاخص‌های خونی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در مواجه با سمیت فلز سنگین سرب در جیره غذایی

تکاور محمدیان[1*]
سمیرا غلفری[2]
محمد محیسنی[3]
بهزاد نعمت دوست[4]

۱. استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
۲. دانشجوی کارشناسی ارشد شیلات، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه خاتم انبیا بهبهان، بهبهان، ایران
۳. استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه خاتم انبیا بهبهان، بهبهان، ایران
۴. مربی گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه خاتم انبیا بهبهان، بهبهان، ایران

*مسئول مکاتبات:
takavar_m2002@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۲/۲۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۱/۳۷
کد مقاله: ۱۳۹۶۰۱۰۵۱۴
مقاله برگرفته از طرح پژوهشی است.

## چکیده

مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر سطوح مختلف پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی (جداشده از ماهی شیربت) بر فاکتورهای خونی و ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به دنبال مسمومیت با سرب انجام شد. تعداد ۳۷۵ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با وزن ۴/۶ ±۱۵ گرم انتخاب و پس از اطمینان از سلامت آن‌ها، به‌طور تصادفی به ۵ گروه تقسیم شدند که به ترتیب با جیره غذایی حاوی $5\times10^{6}$، $5\times10^{7}$ و $5\times10^{8}$ CFU/g باکتری لاکتوباسیلوس کازئی به مدت ۴۵ روز تغذیه شدند و نیز گروه چهارم (کنترل منفی یا کنترل بدون سرب) در تمام طول آزمایش با غذای بدون هیچ‌گونه افزودنی تغذیه و نگه‌داری شدند و گروه پنجم (گروه کنترل سرب‌دار یا کنترل مثبت) که اینتا بدون افزودن باکتری به جیره غذایی به مدت ۴۵ روز تغذیه شدند و پس‌ازاین مدت تا انتهای دوره آزمایش به همراه سه گروه پروبیوتیکی به مدت ۳۱ روز با جیره حاوی ۵۰۰ میکروگرم در کیلوگرم نیترات سرب تغذیه شدند. در روزهای صفر، ۴۵، ۵۲، ۵۹ و ۶۶ بعد از بیهوشی ماهی‌ها خون‌گیری از ساقه دمی به عمل آمد. سپس فاکتورهای خونی مانند تعداد گلبول‌های قرمز و سفید، میزان هموگلوبین و هماتوکریت و نیز فاکتورهای ایمنی شامل فعالیت لایزوزیم و باکتری‌کشی سرم، کمپلمان، انفجار تنفسی، میزان پروتئین و گلوبولین سرم بین تیمارها مقایسه و مورد تجزیه‌وتحلیل آنالیز واریانس (ANOVA) یک و دوطرفه قرار گرفت. نتایج نشان داد که هموگلوبین، تعداد گلبول‌های قرمز و سفید در سه گروه پروبیوتیکی در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشته است ($P<0/05$). در مورد فعالیت لایزوزیم و باکتری‌کشی سرم و همچنین کمپلمان، افزایش قابل‌توجهی در گروه‌های پروبیوتیکی در مقایسه با گروه کنترل مشاهده گردید ($P<0/05$). میزان انفجار تنفسی در روز ۵۲ در گروه ۲ مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشت ($P<0/05$). پروتئین تام و گلوبولین در مقایسه با گروه کنترل کاهش پیدا کرد ($P>0/05$). بر اساس نتایج به‌دست‌آمده می‌توان نتیجه گرفت که پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی، در کاهش آسیب‌های ناشی از مسمومیت با سرب بر فاکتورهای خونی و سیستم ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نقش مؤثری دارد. همچنین به نظر می‌رسد که غلظت $5\times10^{7}$CFU/g تأثیر بهتری بر سیستم ایمنی ماهی قزل‌آلا داشته است.

واژگان کلیدی: قزل‌آلای رنگین‌کمان، پروبیوتیک، لاکتوباسیلوس کازئی، سرب.

## مقدمه

امروزه اهمیت آبزیان به‌عنوان یک منبع غذایی ارزشمند و باکیفیت کاملاً اثبات‌شده است. از بعد کمی نیز آبزیان نقش قابل‌توجهی در تأمین نیازهای پروتئینی جوامع مختلف ایفا می‌کنند. در سال‌های اخیر آبزی‌پروری یکی از سریع الرشدترین بخش‌های تولید غذا بوده است. بر اساس آمار فائو تولید آبزیان از دو منبع آبزی‌پروری و صید در پنج دهه اخیر به‌صورت مستمر افزایش‌یافته و در سال ۲۰۱۲ به رقم ۱۵۸ میلیون تن رسید.



www.SID.ir

Archive of SID



Downloaded from jweb.iauahvaz.ac.ir at 17:54 +0330 on Saturday November 25th 2017

نرخ افزایش تولید آبزیان برای مصرف انسانی در پنج دهه گذشته به‌طور متوسط معادل ۳/۲ درصد بوده که نسبت به نرخ افزایش جمعیت جهانی در همین زمان ۱/۶ درصد بوده و این حاکی از میانگین افزایش مصرف سرانه آبزیان در جهان بوده است. مصرف سرانه آبزیان در جهان از مقدار ۹/۹ کیلوگرم در دهه ۱۹۶۰ به بیش از ۱۹/۲ کیلوگرم در سال ۲۰۱۲ رسیده است که بیانگر استقبال عمومی جهان از افزایش مصرف آبزیان است (FAO, 2014). در سطح جهانی، این صنعت ازنظر تنوع گونه‌ای و افزایش تراکم و پرورش در حال گسترش است و در حال حاضر هدف از آبزی‌پروری به حداکثر رساندن راندمان تولید، برای بهینه‌سازی سودآوری می‌باشد (Denev *et al.*, 2009). از بزرگ‌ترین مسائل پیش رو در صنعت آبزی‌پروری، یافتن راه‌حل‌هایی جهت بالا بردن تولید در واحد هکتار است. تغذیه رکن اصلی در صنعت آبزی‌پروری است و بیشترین هزینه را در مزارع آبزیان پرورشی به خود اختصاص می‌دهد. همگام با توسعه صنعت آبزی‌پروری، مطالعات جدیدی درزمینهÓ تغذیه گونه‌های مختلف آبزیان پرورشی صورت گرفته است. بررسی فناوری‌های جدید بر روی گونه‌های پرورشی مرسوم، جهت بالا بردن توان تولید و بازماندگی، رسیدن به این هدف را نزدیک‌تر و متمرکزتر می‌کند. استفاده از پروبیوتیک‌ها یکی از دست آوردهای مثبت در این زمینه است که امروزه در آبزی‌پروری نیز متداول گردیده است (Makridis *et al.*, 2001). پروبیوتیک‌ها به‌واسطه سازوکارهای متعدد در کنترل بیماری‌های آبزیان، سبب افزایش تولید در واحد سطح و کاهش هزینه‌های جانبی می‌شوند. در این راستا و با توجه به موفقیت‌های اخیر در استفاده از این فناوری، سازمان خواروبار جهانی (FAO) استفاده از پروبیوتیک‌ها و اصلاح زیستی برای بهبود کیفیت محیط‌زیست آبزیان را به‌عنوان موارد عمده تحقیقات آینده در آبزی-پروری تعیین نموده است (FAO, 2002).

سرب یکی از فلزات سنگین سمی است که انتشار محیطی گسترده‌ای دارد و موجب ایجاد طیف وسیعی از اختلالات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی می‌گردد. مسمومیت با سرب یکی از رایج‌ترین مسمومیت‌ها در بین حیوانات و نیز انسان است. منشأ آلودگی دریا به سرب می‌تواند ناشی از گیاهان دریایی، رسوبات دریایی کف دریا، گازوییل نشتی از لنج و قایق‌های ماهیگیری، کارخانجات تولیدی باتری‌های ماشین، چراغ‌قوه، فیلم عکاسی و فیلم‌برداری و سرب آزادشده ناشی از سوخت ماشین‌های بنزینی باشد (Roberts, 2001; Jill *et al.*, 2001).

در ماهی علاوه بر عوارض مختلفی که مسمومیت با سرب در اندام‌های مختلف ایجاد می‌کند، تجمع این فلز در بافت‌های خوراکی ماهی می‌تواند مسئله امنیت و سلامت غذایی انسان را نیز تحت تأثیر قرار دهد. از طرفی میزان تأثیر برخی ترکیبات چلاته‌کننده که در درمان مسمومیت با سرب استفاده می‌شوند هنوز مورد سؤال و بحث است و ممکن است عوارض جانبی متعددی به‌خصوص در موارد مصرف طولانی‌مدت داشته باشند (Kalia, 2005; Meldrum and Ko, 2003). علاوه بر این هیچ‌یک از این ترکیبات برای استفاده در حیوانات مورد مصرف غذای انسان تأیید نشده‌اند (Meldrum and Ko, 2003). لذا تحقیق به‌منظور بررسی ترکیبات مفید با منشأ طبیعی در درمان مسمومیت با سرب و کاهش میزان تجمع این فلز سمی در بافت‌های خوراکی ماهیان می‌تواند از جنبه بهداشت و سلامت آبزیان و همچنین از جنبه تأثیر آن در کیفیت و امنیت غذایی انسان حائز اهمیت باشد. اخیراً حذف فلزات سنگین با استفاده از توده زیستی جلبکی، قارچی و باکتریایی به‌عنوان یک روش ارزان و جدید معرفی‌شده است و در رأس روش‌های معمول قرار دارد (Mrvčić *et al.*, 2012). سازوکارهای دخیل در جذب زیستی فلزات سنگین شامل تشکیل کمپلکس، تبادل یونی، جذب، دفع (چلاته سازی) و ریزترسیب می‌باشد. با توجه به پتانسیل باکتری‌های اسیدلاکتیک در اتصال و برداشت فلزات سنگین در شرایط in vivo و in vitro و طبیعت غیر بیماری‌زای این باکتری‌ها و اثرات مثبت اثبات‌شده این ترکیبات بر عملکرد رشد و همچنین داشتن اثراتی همچون اثرات ضد میکروبی، ضدویروسی، تنظیم‌کننده ایمنی، ضد سرطانی، آنتی‌اکسیدانی و غیره (Mrvčić *et al.*, 2009; Kinoshita *et al.*, 2013). تحقیق حاضر به‌منظور بررسی مقایسه اثرات سطوح مختلف پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* در جیره بر کاهش سمیت فلز سنگین سرب و بهبود سیستم ایمنی و شاخص‌های خونی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) طراحی‌شده است.



www.SID.ir

Archive of SID



Downloaded from jweb.iauahvaz.ac.ir at 17:54 +0330 on Saturday November 25th 2017

## مواد و روش‌ها

تعداد ۳۷۵ قطعه قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی ۴/۶ ±۱۵ گرم به آزمایشگاه دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز منتقل و مدت دو هفته در شرایط استاندارد به‌منظور تطبیق‌پذیری با شرایط آزمایشگاهی نگه‌داری شدند. طی دوره عادت‌پذیری ماهی‌ها با جیره تجاری قزل‌آلای رنگین‌کمان روزانه دو بار و به میزان ۱/۵ درصد وزن بدن تغذیه شدند. بچه ماهی‌ها در طول دوره تحقیق با خوراک ماهی (ساخت شرکت بیومار) با ترکیب غذایی ۴۰ درصد پروتئین، ۹/۵ درصد چربی، ۸/۳ درصد خاکستر تغذیه شدند. پس از طی دوره عادت‌پذیری ماهی‌ها به پنج گروه (در سه تکرار و تعداد ۲۰ قطعه ماهی در هر تکرار) مخازن فایبرگلاس ۳۰۰ لیتری تقسیم‌بندی شدند. گروه اول با جیره غذایی حاوی CFU/g ۵×۱۰^۶ باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* (جداشده از ماهی شیربت در مطالعات قبلی محققین)، گروه دوم با جیره غذایی حاوی CFU/g ۵×۱۰^۷ باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* و گروه سوم با جیره غذایی حاوی CFU/g ۵×۱۰^۸ باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* به مدت ۴۵ روز تغذیه و نگه‌داری شدند. پس از اتمام این دوره به غذای هر سه گروه علاوه بر پروبیوتیک مقدار ۵۰۰ میکروگرم در کیلوگرم خوراک نیترات سرب به مدت ۲۱ روز اضافه شد (Alves *et al.*, 2006). گروه چهارم (کنترل منفی یا کنترل بدون سرب) در تمام طول آزمایش با غذای بدون هیچ‌گونه افزودنی تغذیه و نگه‌داری شدند. گروه پنجم (گروه کنترل سرب‌دار یا کنترل مثبت) ابتدا بدون افزودن باکتری به جیره غذایی به مدت ۴۵ روز تغذیه شدند و پس‌ازاین مدت تا انتهای دوره آزمایش در معرض فلز سرب (۵۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم خوراک نیترات سرب) قرار گرفتند. اضافه کردن پروبیوتیک به غذای تجاری مطابق با دستورالعمل استاندارد انجام شد (Planas *et al.*, 2004; Vine *et al.*, 2004). نمونه‌برداری از ماهی‌ها در روزهای صفر، ۴۵، ۵۲، ۵۹ و ۶۶ انجام شد. نحوه تیمار بندی آزمایش به‌طور خلاصه در جدول زیر آورده شده است. لازم به ذکر است که کیفیت آب در طول دوره پرورش در حدی قابل‌قبول و تقریباً ثابت بود. شستشوی مخازن نیز به‌طور روزانه صورت گرفت. پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب از قبیل اکسیژن، دما، pH، شوری و هدایت الکتریکی به‌صورت روزانه اندازه‌گیری و ثبت شد. پارامترهای کیفی آب از قبیل آمونیاک، نیترات نیز به‌صورت هفتگی مورد ارزیابی قرار گرفت. دمای آب حوضچه‌ها در طول دوره پرورش در دامنه ۱۸-۱۲ درجه سانتی‌گراد و pH معادل ۷/۵-۸/۳ قرار داشت. در جدول ۱ تیمار بندی گروه‌های آزمایشی ارائه‌شده است.

**جدول ۱: تیمار بندی گروه‌های آزمایشی.**

| | فلز سنگین | پروبیوتیک | | |
|---|---|---|---|---|
| | | سطح سوم | سطح دوم | سطح اول |
| گروه اول | * | - | - | * |
| گروه دوم | * | - | * | - |
| گروه سوم | * | * | - | - |
| گروه چهارم | - | - | - | - |
| گروه پنجم | * | - | - | - |

در روز ۴۵ آزمایش با استفاده از ماده بیهوشی ۲-فنوکسی اتانول (۰/۳ میلی‌لیتر در لیتر) ماهیان بیهوش شدند. پس از وزن کشی و بیومتری ماهیان با ترازوی دیجیتال (با دقت ۰/۰۱)، تعداد نه ماهی (سه عدد از هر تکرار) به‌منظور بررسی شاخص‌های ایمنی و خونی با استفاده از سرنگ ۵ سی‌سی از ناحیه ساقه دمی خون‌گیری شدند. نمونه خون اخذشده به دو میکروتیوب حاوی و فاقد ماده ضد انعقاد هپارین منتقل شدند. نمونه‌های خون فاقد ماده ضد انعقاد جهت جداسازی سرم، درون دستگاه سانتریفیوژ با سرعت ۳۶۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. سرم ها بلافاصله به فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل و تا زمان انجام آزمایشات نگهداری گردیدند. عمل خون‌گیری از ماهیان در روزهای ۵۲، ۵۹ و ۶۶ آزمایش نیز ادامه یافت.



www.SID.ir

Archive of SID



جهت آماده‌سازی باکتری‌های لاکتوباسیلوس و افزودن آن‌ها به غذای ماهیان از روش توصیه‌شده توسط Planas و همکاران (۲۰۰۴) و Vine و همکاران (۲۰۰۴) استفاده گردید. به‌طور خلاصه هرکدام از باکتری‌ها به‌طور جداگانه در محیط آبگوشت MRS در شرایط بی‌هوازی کشت داده شدند. پس از رشد، باکتری‌ها با عمل سانتریفیوژ جداسازی و شستشو گردیده و به کمک لوله‌های استاندارد مک فارلند غلظت آن‌ها بر روی $2\times10^{9}$ CFU/ml تنظیم شد و سپس به طریق تهیه رقت‌های متوالی، غلظت موردنظر به هر گرم غذا اسپری گردید. غذاها در شرایط کاملاً استریل به میزان لازم وزن شده و در سینی‌های استریل قرار داده‌شده و به مدت ۲۴ ساعت با رعایت شرایط استریل در دمای آزمایشگاه خشک‌شده و بسته‌بندی گردیدند. جهت اطمینان از تعداد باکتری‌های زنده موجود در غذا، نمونه‌برداری و شمارش باکتریایی غذای حاصل انجام گردید. بر روی غذای گروه شاهد فقط سرم فیزیولوژی استریل اسپری شد.

به‌منظور بررسی فاکتورهای خونی، از روش‌های معمول و متداول برای اندازه‌گیری پارامترهای خون‌شناسی استفاده گردید (Feldman *et al.* 2000). نمونه‌های خون حاوی ماده ضد انعقاد به لوله‌های شیشه‌ای منتقل‌شده و فاکتورهای خونی بلافاصله اندازه‌گیری شدند. شمارش تام گلبول‌های سفید و گلبول‌های قرمز با استفاده از نام نئوبار صورت پذیرفت (Schaperclaus *et al.*, 1991). برای اندازه‌گیری هماتوکریت یا حجم فشرده سلولی (PCV) از روش میکروهماتوکریت و برای اندازه‌گیری هموگلوبین (Hb) از روش استاندارد سیانومت هموگلوبین استفاده شد. در این روش از محلول درابکین استفاده‌شده و میزان جذب نوری OD در طول‌موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد و با استفاده از فرمول ارائه‌شده درکیت، غلظت هموگلوبین محاسبه گردید.

جهت اندازه‌گیری فعالیت کمپلمان از آزمایش همولیز در ژل آگارز استفاده شد (Brata, 1993). برای این‌کار ابتدا آگارز ۱/۵ درصد در بافر فسفات (pH=۷/۲ حاوی ۰/۵ میلی‌مول کلرید منیزیم و ۱/۵ میلی‌مول کلرید کلسیم) تهیه شد. مقدار $1\times10^{-8}$ گلبول قرمز خرگوش شسته شده با بافر فسفات در دمای ۵۵–۵۰ درجه سانتی‌گراد به آگارز اضافه شد. مخلوط آگارز حاوی گلبول‌های قرمز خرگوش داخل پلیت‌ها توزیع گردید. پلیت‌ها به مدت یک‌شب در یخچال قرار داده شدند و سپس حفرات به قطر ۳ میلی‌متر و بافاصله ۲ سانتی‌متر از هم در آگار ایجاد شد و در هر گوده میزان ۲۰ میکرولیتر از سرم نمونه ریخته شد. پلیت‌ها در محیط مرطوب و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شده و پس‌ازآن قطر هاله لیز گلبولی با خط‌کش مخصوص اندازه‌گیری گردید.

برای اندازه‌گیری میزان فعالیت لایزوزیم سرم از روش کدورت سنجی که توسط Ellis (۱۹۹۰) و Mohammadian و همکاران (۲۰۱۶) توصیه‌شده است، استفاده گردید. برای این کار در ابتدا ۱۵ میکرو لیتر سرم با ۱۳۵ میکرو لیتر از سوسپانسیون ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر باکتری میکروکوکوس *لیزودئیکتیکوس* (سیگما) در بافر ۰/۰۲ مولار سدیم سیترات (pH= ۵/۸) در گودهای میکروپلیت تخت مخلوط گردید و جذب نوری آن در دمای اتاق در زمان‌های صفر و ۶ دقیقه بعد از مخلوط‌سازی در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

غلظت ایمنوگلوبولین کل بر اساس روش شرح داده‌شده توسط Mohammadian و همکاران (۲۰۱۶) اندازه‌گیری شد. به‌طور خلاصه ابتدا پروتئین تام و آلبومین پلاسما با استفاده از کیت شرکت پارس آزمون و دستگاه اتوآنالایزر مدل Eurolyser ساخت کشور اتریش بر اساس واحد گرم بر دسی لیتر اندازه‌گیری شد. میزان ایمونوگلوبولین تام سرم از تفریق میزان آلبومین از پروتئین تام پلاسما محاسبه گردید.

برای اندازه‌گیری قدرت باکتری‌کشی سرم از روش توصیه‌شده توسط Kajita و همکاران (۱۹۹۰) باکمی تغییرات استفاده گردید. برای این کار ابتدا باکتری *آئرومونا‌س هیدروفیلا* به مدت ۶ ساعت در محیط TSB کشت داده شد و سپس از آن رقت $2\times10^{-5}$ تهیه گردید. نمونه‌های سرمی نیز به نسبت ۱:۳ با بافر فسفات رقیق گردیدند. سوسپانسیون باکتریایی حاصل در میکروتیوب‌های استریل به نسبت ۱:۱ با سرم رقیق‌شده مخلوط شد و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با حرکت ملایم انکوبه گردید. علاوه بر نمونه‌های فعال، آزمایش با سرم غیرفعال شده (سرم قرارگرفته حرارت دیده در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت نیم ساعت) نیز انجام شد، سپس ۱۰ میکرولیتر از مخلوط سرم و باکتری در محیط کشت TSA کشت شد. تمامی مراحل در زیر هود و کنار شعله انجام گرفت. محیط‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه



Downloaded from jweb.iauahvaz.ac.ir at 17:54 +0330 on Saturday November 25th 2017

www.SID.ir

Archive of SID



گردید و سپس به کمک دستگاه کلونی‌کانتر تعداد پرگنه باکتریایی رشد یافته در روی محیط کشت شمارش گردید. نتایج به‌صورت متوسط تعداد باکتری شمارش‌شده برای هر نمونه مشخص شد و تعداد باکتری شمارش‌شده در هر تیمار نسبت به تیمار شاهد مقایسه گردید.

برای ارزیابی فعالیت انفجار تنفسی مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از خون هپارینه در داخل گودهای میکروپلیت تخت قرار داده شد و ۰/۱ میلی‌لیتر نیز محلول ۰/۲ درصد NBT به آن اضافه شد. پلیت به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شد و سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از مخلوط حاصل برداشت و به یک لوله‌آزمایش حاوی ۲ میلی‌لیتر دی متیل فرمامید اضافه گردید. پس از نمونه سانتریفوژ، جذب نوری مایع رویی در طول‌موج ۶۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Mohammadian *et al.*, 2016).

برای آنالیز اطلاعات از نرم‌افزار آماری SPSS ویرایش ۱۶ استفاده شد و تأثیر پروبیوتیک بر عملکرد رشد و فعالیت آنزیم‌های گوارشی موردبررسی بین ۴ تیمار توسط آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) یک و دوطرفه با ضریب اطمینان ۹۵ درصد موردبررسی قرار گرفت. برای بررسی معنی‌دار بودن تفاوت میانگین‌ها از آزمون تکمیلی Duncan در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ درصد استفاده شد. همچنین ترسیم نمودار در فضای نرم‌افزار Excel (نسخه ۲۰۱۰) انجام گرفت.

## نتایج

نتایج مربوط به آنالیز شاخص‌های خونی در جدول ۲ آورده شده است. نتایج مربوط به هماتوکریت نشان داد که میزان هماتوکریت در گروه یک، دو، سه و چهار به‌طور معنی‌داری پس از روز صفر افزایش‌یافته است ($P<0/05$). در گروه پنج میزان هماتوکریت به دنبال مصرف سرب کاهش یافت و در روز ۶۶ نسبت به‌روز ۵۲ و ۵۹ از اختلاف معنی‌داری برخوردار بود ($P<0/05$).

نتایج مربوط به هموگلوبین نشان داد که در گروه یک، دو و سه در روزهای ۴۵، ۵۹ و ۶۶ میزان هموگلوبین پس از روز صفر افزایش معنی‌داری داشته است ($P<0/05$). در روز ۴۵ گروه یک از افزایش معنی‌دار هموگلوبین نسبت به گروه کنترل برخوردار بود ($P<0/05$)؛ اما بین سایر گروه‌ها اختلاف معنی‌داری دیده نشد. در روز ۵۹ میزان هموگلوبین در گروه یک و دو نسبت به سایر گروه‌ها به‌طور معنی‌داری افزایش یافت و در گروه یک نسبت به گروه دو به‌طور معنی‌داری بیشتر بود ($P<0/05$). در روز ۶۶ گروه‌های دریافت‌کننده پروبیوتیک از افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل برخوردار بودند ($P<0/05$). میزان هموگلوبین در گروه یک نسبت به گروه دو به‌طور معنی‌داری بیشتر بود ($P<0/05$).

نتایج بیانگر آن است که در گروه یک تعداد گلبول‌های قرمز خون پس از روز صفر در روزهای ۴۵، ۵۲ و ۶۶ به‌طور معنی‌داری افزایش‌یافته است ($P<0/05$). در گروه دو پس از روز صفر تعداد گلبول‌های قرمز در روز ۵۲ افزایش معنی‌داری داشته است ($P<0/05$). در گروه پنج پس از روز ۵۲ تعداد گلبول‌های قرمز در روزهای ۵۹ و ۶۶ کاهش یافت که در روز ۵۹ این کاهش معنی‌دار بوده است ($P<0/05$).

نتایج حاصل گویای این هستند که در گروه یک تعداد گلبول‌های سفید خون پس از روز صفر در روزهای ۴۵ و ۵۲ از افزایش معنی‌داری برخوردار بوده است ($P<0/05$). در گروه دو و سه پس از روز صفر این تعداد در روز ۵۲ افزایش معنی‌داری داشته است ($P<0/05$). در گروه پنج پس از روز ۵۲ تعداد گلبول‌های سفید با روند کاهشی مواجه بوده که این کاهش در روز ۶۶ نسبت به‌روز ۵۲ معنی‌دار بوده است ($P<0/05$). در روز ۴۵ تعداد گلبول‌های سفید در گروه یک نسبت به گروه کنترل از افزایش معنی‌داری برخوردار بوده است ($P<0/05$). در روز ۵۲ تعداد گلبول‌ها در گروه یک و دو نسبت به گروه کنترل منفی و کنترل مثبت افزایش معنی‌داری داشته است ($P<0/05$). در روز ۶۶ تعداد گلبول‌ها در گروه یک و دو نسبت به گروه کنترل سرب‌دار از افزایش قابل‌توجهی را نشان داد ($P<0/05$).



Downloaded from jweb.iauahvaz.ac.ir at 17:54 +0330 on Saturday November 25th 2017

www.SID.ir

Archive of SID



**جدول ۲: نتایج مربوط به تأثیر تیمارهای مختلف آزمایشی برشاخص‌های مختلف خونی در مراحل مختلف نمونه‌گیری.**

| شاخص | گروه‌ها | روز صفر | روز ۴۵ | روز ۵۲ | روز ۵۹ | روز ٦٦ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| هماتوکریت | گروه یک | ۲۳/۹۷±۱/۹۰$^{cA}$ | ۴۰/۱۷±۶/۱۸$^{abA}$ | ۳۵/۸۳±۲/۰۳$^{bAB}$ | ۴۳/۸۰±۹/۲۳$^{aA}$ | ۳۶/۸۳±۳/۹۹$^{abA}$ |
| | گروه دو | ۲۶/۱۶±۲/۸۱$^{bA}$ | ۳۳/۰۰±۳/۰۶$^{aB}$ | ۳۶/۶۷±۳/۶۷$^{aA}$ | ۳۲/۳۳±۳/۹۳$^{aB}$ | ۳۲/۳۳±۳/۷۸$^{aAB}$ |
| | گروه سه | ۲۳/۰۵±۱/۷۹$^{cA}$ | ۳۶/۶۰±۳/۶۵$^{aAB}$ | ۳۶/۰۰±۳/۷۳$^{aAB}$ | ۳۱/۱۷±۳/۷۵$^{bB}$ | ۳۷/۰۰±۳/۵۶$^{aA}$ |
| | گروه چهار | ۲۳/۰۵±۱/۷۹$^{bA}$ | ۳۲/۰۰±۳/۶۳$^{aB}$ | ۳۱/۶۰±۳/۹۱$^{aB}$ | ۳۱/۶۰±۳/۹۱$^{aB}$ | ۳۱/۲۰±۳/۷۰$^{aAB}$ |
| | گروه پنج | تعیین نشده | تعیین نشده | ۳۷/۷۵±۳/۵۰$^{aA}$ | ۳۳/۲۵±۱/۷۱$^{aB}$ | ۲۷/۶۰±۳/۳۳$^{bB}$ |
| هموگلوبین (گرم در دسی لیتر) | گروه یک | ۳/۱۱±۰/۶۰$^{cA}$ | ۵/۲۵±۱/۲۸$^{bA}$ | ۳/۸۷±۰/۷۵$^{cA}$ | ۷/۷۰±۱/۵۹$^{aA}$ | ۵/۵۳±۰/۵۱$^{bA}$ |
| | گروه دو | ۳/۱۷±۰/۷۷$^{cA}$ | ۴/۳۳±۰/۶۶$^{bAB}$ | ۳/۹۳±۰/۶۱$^{bcA}$ | ۶/۰۸±۱/۲۳$^{aB}$ | ۳/۶۰±۱/۰۸$^{bB}$ |
| | گروه سه | ۳/۰۵±۰/۵۹$^{cA}$ | ۴/۴۸±۰/۲۷$^{abAB}$ | ۳/۹۲±۱/۱۵$^{bcA}$ | ۳/۲۲±۱/۱۳$^{abC}$ | ۵/۰۶±۰/۸۵$^{aAB}$ |
| | گروه چهار | ۳/۰۵±۰/۵۸$^{bA}$ | ۳/۹۵±۰/۵۰$^{aB}$ | ۴/۰۸±۰/۲۳$^{aA}$ | ۳/۹۶±۰/۲۸$^{aC}$ | ۳/۸۰±۰/۲۸$^{aC}$ |
| | گروه پنج | تعیین نشده | تعیین نشده | ۳/۷۹±۰/۷۴$^{bA}$ | ۳/۹۱±۰/۵۳$^{bC}$ | ۴/۸۳±۰/۵۷$^{aAB}$ |
| گلبول قرمز (×۱۰$^{۶}$ فمتولیتر) | گروه یک | ۰/۸۱±۰/۲۶$^{bA}$ | ۱/۳۹±۰/۲۳$^{aA}$ | ۱/۴۶±۰/۳۹$^{aAB}$ | ۰/۷۹±۰/۲۲$^{bB}$ | ۱/۲۷±۰/۲۵$^{aA}$ |
| | گروه دو | ۰/۷۸±۰/۲۱$^{bA}$ | ۱/۰۶±۰/۲۳$^{bBC}$ | ۱/۷۸±۰/۳۳$^{aA}$ | ۰/۶۹±۰/۰۹$^{bB}$ | ۱/۰۸±۰/۲۶$^{bA}$ |
| | گروه سه | ۰/۸۱±۰/۲۳$^{abA}$ | ۰/۷۲±۰/۱۸$^{bC}$ | ۱/۱۷±۰/۲۵$^{aBC}$ | ۰/۹۲±۰/۲۳$^{abAB}$ | ۱/۲۱±۰/۲۳$^{aA}$ |
| | گروه چهار | ۰/۸۲±۰/۲۳$^{bA}$ | ۱/۲۲±۰/۳۶$^{abAB}$ | ۱/۳۹±۰/۲۷$^{aABC}$ | ۱/۲۲±۰/۳۹$^{abA}$ | ۱/۲۴±۰/۲۳$^{abA}$ |
| | گروه پنج | تعیین نشده | تعیین نشده | ۰/۹۶±۰/۰۸$^{aC}$ | ۰/۷۴±۰/۱۳$^{bB}$ | ۰/۸۹±۰/۲۰$^{abA}$ |
| گلبول سفید (×۱۰$^{۳}$ فمتولیتر) | گروه یک | ۲۴/۵۰±۵/۱۵$^{bA}$ | ۷۲/۲۰±۲۶/۰۶$^{aA}$ | ۵۶/۰۰±۱۷/۲۶$^{aA}$ | ۲۶/۴۰±۱۱/۲۶$^{bAB}$ | ۳۱/۲۸±۱۱/۵۸$^{abA}$ |
| | گروه دو | ۲۶/۵±۸/۰۰$^{bcA}$ | ۳۸/۰۰±۱۵/۷۳$^{abB}$ | ۵۳/۸۰±۲۲/۵۶$^{aA}$ | ۱۳/۸۰±۶/۳۱$^{cB}$ | ۳۹/۶۰±۱۶/۵۱$^{abA}$ |
| | گروه سه | ۲۵/۲۵±۳/۹۶$^{bA}$ | ۲۸/۰۰±۷/۲۳$^{bB}$ | ۳۸/۴۰±۵/۵۳$^{aAB}$ | ۲۵/۳۳±۹/۰۰$^{bAB}$ | ۲۸/۵۰±۷/۰۰$^{bAB}$ |
| | گروه چهار | ۲۶/۴±۵/۲۳$^{aA}$ | ۲۷/۷۶±۳/۸۷$^{aB}$ | ۲۹/۱۵±۶/۲۷$^{aB}$ | ۲۹/۹±۱/۵۱$^{aA}$ | ۲۹/۲۳±۵/۲۳$^{aAB}$ |
| | گروه پنج | تعیین نشده | تعیین نشده | ۴۰/۸۰±۱۷/۰۶$^{aAB}$ | ۲۸/۸۰±۱۰/۵۲$^{abA}$ | ۲۲/۶۶±۳/۱۶$^{bB}$ |

*حروف کوچک لاتین غیر همنام روی انحراف معیار نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر سطر و حروف بزرگ لاتین غیر همنام نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر ستون می‌باشد

نتایج به‌دست‌آمده بر اساس شکل ۱ نشان می‌دهد که در گروه‌های یک، دو و سه میزان پروتئین تام پلاسما پس از روز صفر در روز ۶۶ کاهش معنی‌داری یافته است ($P<0/05$). در گروه پنج این میزان در روز ۶۶ نسبت به‌روز ۵۲ کاهش معنی‌داری داشت ($P<0/05$). همچنین در روز ۶۶ میزان پروتئین تام در گروه کنترل مثبت نسبت به گروه کنترل منفی کاهش معنی‌داری پیدا کرد ($P<0/05$).

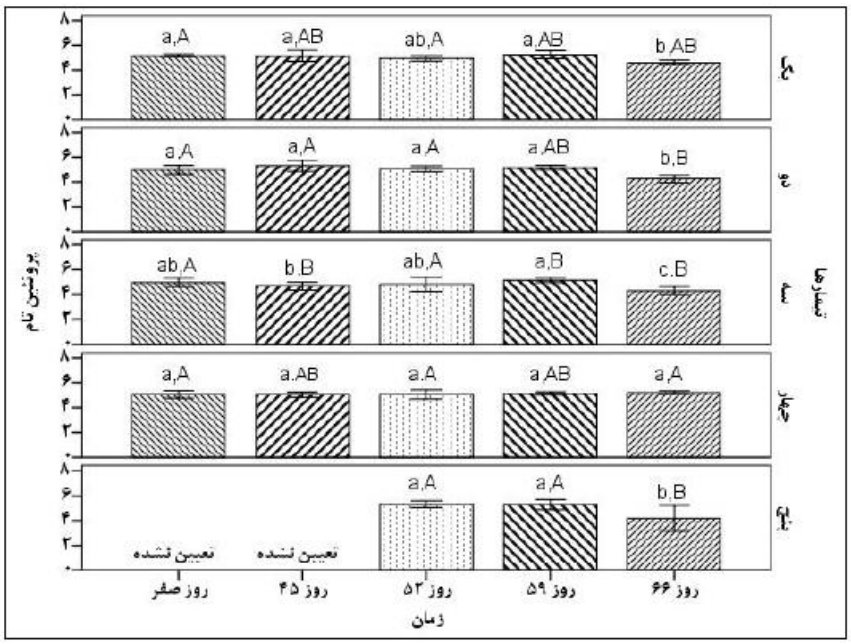


Downloaded from jweb.iauahvaz.ac.ir at 17:54 +0330 on Saturday November 25th 2017

www.SID.ir

Archive of SID






**شکل ۱: نتایج مربوط به میزان پروتئین تام سرم در تیمارهای مختلف طی مراحل مختلف نمونه‌برداری. بیان داده‌ها به شکل Means ± SD می‌باشد.**

***حروف کوچک لاتین غیر همنام روی انحراف معیار نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر سطر و حروف بزرگ لاتین غیر همنام نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر ستون می‌باشد.**

**نتایج به‌دست‌آمده بر اساس شکل ۲ نشان می‌دهد که در گروه‌های یک، دو و سه پس از روز صفر میزان گلوبولین پلاسما در روز ۶۶ کاهش معنی‌داری داشته است ($P<0/05$). در روز ۶۶ میزان گلوبولین پلاسما در گروه کنترل مثبت نسبت به گروه کنترل منفی کاهش معنی‌داری داشت ($P<0/05$).**

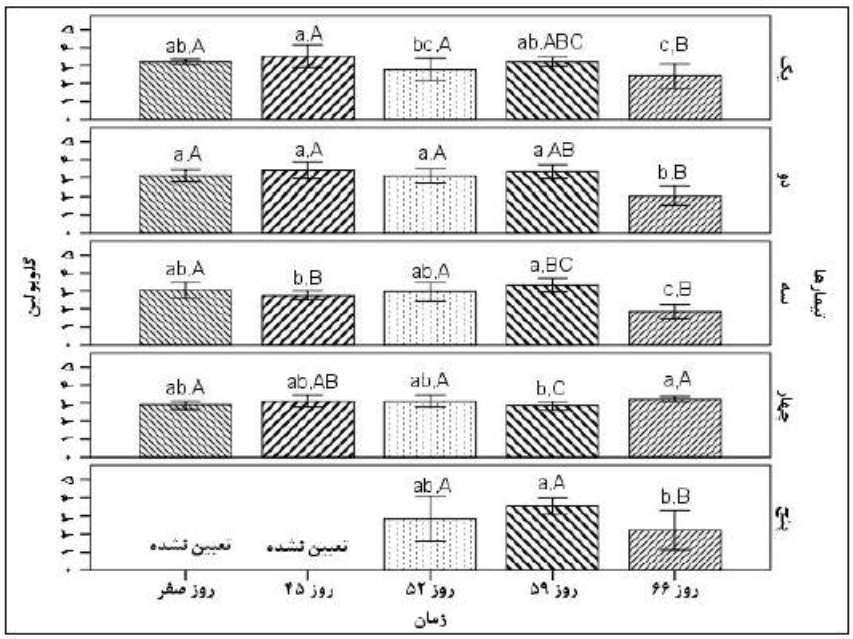


Downloaded from jweb.iauahvaz.ac.ir at 17:54 +0330 on Saturday November 25th 2017

www.SID.ir

Archive of SID






**شکل ۲: نتایج مربوط به میزان گلوبولین سرم در تیمارهای مختلف طی مراحل مختلف نمونه‌برداری. بیان داده‌ها به شکل Means ± SD هست.**

***حروف کوچک لاتین غیر همنام روی انحراف معیار نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر سطر و حروف بزرگ لاتین غیر همنام نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر ستون هست.**

با توجه به شکل ۳ نتایج مربوط به فعالیت لایزوزیم نشان‌گر آن است که در گروه یک‌میزان فعالیت لایزوزیم در تمامی روزهای پس از روز صفر افزایش معنی‌داری یافته است ($P<0/05$). همچنین در گروه دو و سه در روزهای ۴۵ و ۵۲ فعالیت لایزوزیم به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد ($P<0/05$). همچنین بیشترین فعالیت لایزوزیم در گروه‌های یک، دو و سه در روزهای ۴۵ و ۵۲ دیده شد. در گروه کنترل مثبت میزان فعالیت لایزوزیم در روزهای ۵۹ و ۶۶ نسبت به‌روز ۵۲ کاهش معنی‌داری یافت ($P<0/05$). در روز ۴۵ و ۵۹ گروه‌های مصرف‌کننده پروبیوتیک نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری فعالیت لایزوزیم بیشتری داشتند ($P<0/05$). در روز ۵۲ گروه‌های دو و سه نسبت به گروه کنترل فعالیت لایزوزیم بیشتری نشان دادند ($P<0/05$). در روز ۶۶ گروه یک و دو فعالیت لایزوزیم نسبت به گروه کنترل افزایش یافت ($P<0/05$).

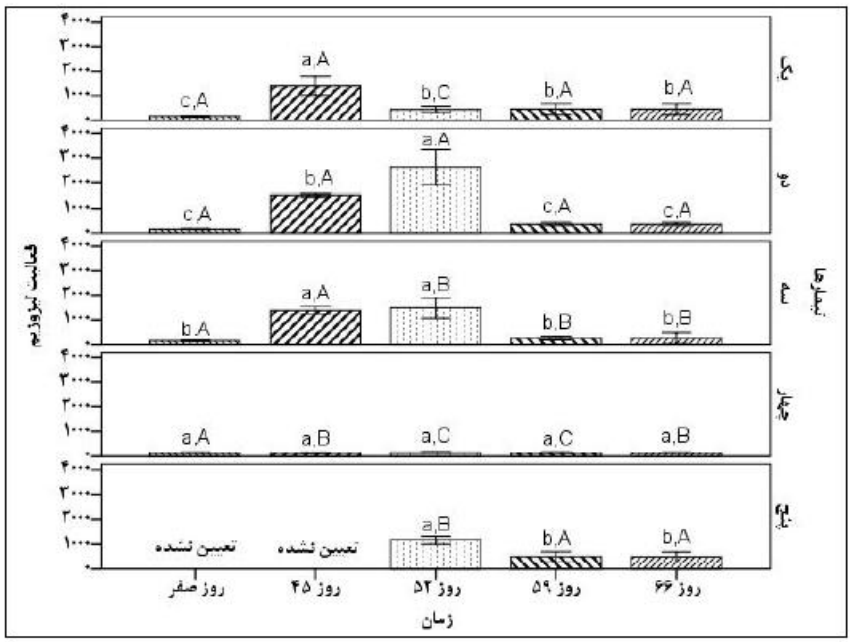


Downloaded from jweb.iauahvaz.ac.ir at 17:54 +0330 on Saturday November 25th 2017

www.SID.ir

Archive of SID






**شکل ۴: نتایج مربوط به فعالیت لایزوزیم سرم در تیمارهای مختلف طی مراحل مختلف نمونه‌برداری. بیان داده‌ها به شکل Means ± SD می‌باشد.**

***حروف کوچک لاتین غیر همنام روی انحراف میار نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر سطر و حروف بزرگ لاتین غیر همنام نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر ستون می‌باشد.**

**بر اساس نتایج حاصل از شکل ۴ فعالیت کمپلمان در گروه‌های یک، دو و سه و همچنین کنترل پس از روز صفر در تمامی روزها افزایش معنی‌داری یافت (P<۰/۰۵). در گروه پنج به دلیل مصرف سرب میزان فعالیت کمپلمان باگذشت زمان کاهش معنی‌داری پیدا کرد (P<۰/۰۵). در روز ۶۶ نیز میزان فعالیت کمپلمان در گروه دو و سه نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۵).**

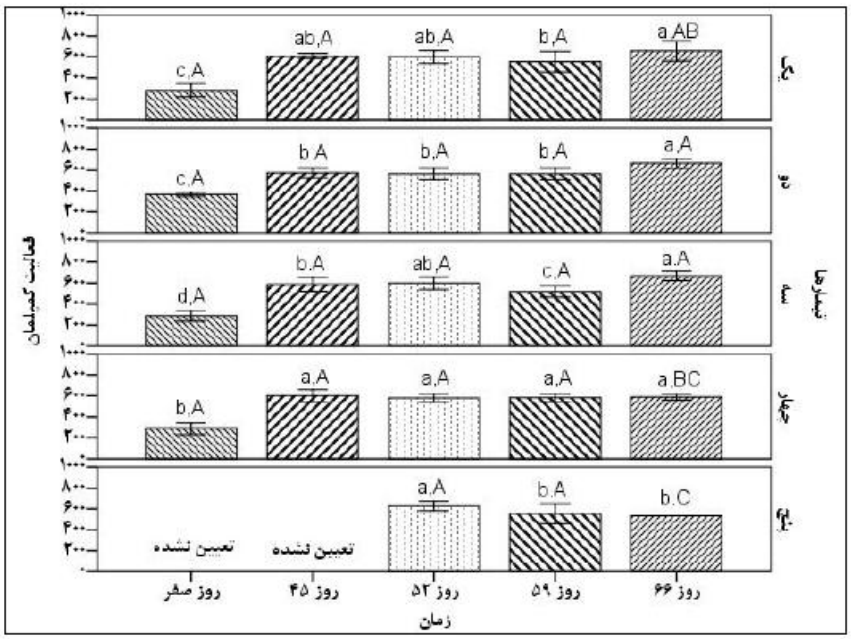


Downloaded from jweb.iauahvaz.ac.ir at 17:54 +0330 on Saturday November 25th 2017

www.SID.ir

Archive of SID






**شکل ٤: نتایج مربوط به فعالیت کمپلمان سرم در تیمارهای مختلف طی مراحل مختلف نمونه‌برداری. بیان داده‌ها به شکل Means ± SD می‌باشد.**

***حروف کوچک لاتین غیر همنام روی انحراف معیار نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر سطر و حروف بزرگ لاتین غیر همنام نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر ستون می‌باشد**

**بر اساس شکل ۵ میزان فعالیت انفجار تنفسی در گروه دو در روز ۵۲ نسبت به‌روز صفر افزایش معنی‌داری داشت. در گروه کنترل مثبت میزان فعالیت انفجار تنفسی در روز ۶۶ نسبت به روز ۵۲ کاهش معنی‌داری یافت ($p<0/05$). در روز ۵۲ میزان فعالیت انفجار تنفسی در گروه دو نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری پیدا کرد ($p<0/05$). در روز ۵۹ در تمامی گروه‌های مصرف‌کننده پروبیوتیک میزان فعالیت انفجار تنفسی نسبت به گروه کنترل با افزایش معنی‌داری همراه بود ($p<0/05$).**

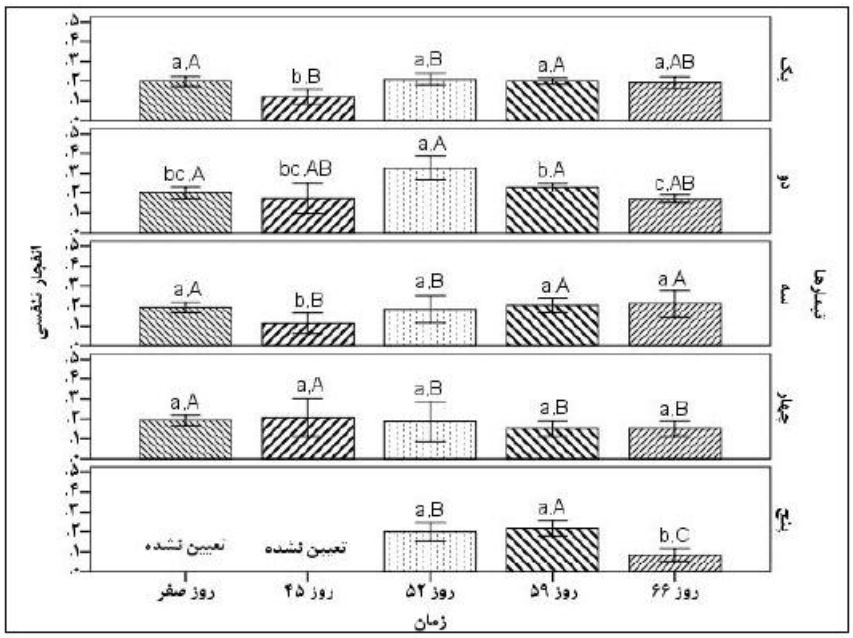


Downloaded from jweb.iauahvaz.ac.ir at 17:54 +0330 on Saturday November 25th 2017

www.SID.ir

Archive of SID






**شکل ۵: نتایج مربوط به فعالیت انفجار تنفسی (احیاء NBT) در تیمارهای مختلف طی مراحل مختلف نمونه‌برداری. بیان داده‌ها به شکل Means ± SD می‌باشد.**

***حروف کوچک لاتین غیر همنام روی انحراف معیار نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر سطر و حروف بزرگ لاتین غیر همنام نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر ستون می‌باشد.**

طبق شکل ۶ نتایج مربوط به فعالیت باکتری‌کشی نشان می‌دهد که قدرت باکتری‌کشی در گروه‌های مصرف‌کننده پروبیوتیک پس از ۴۵ روز نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش‌یافته است ($P<0/05$). در روز ۵۲ گروه‌های دو و سه قدرت باکتری‌کشی بیشتری از گروه چهار و پنج داشتند ($P<0/05$). در روز ۵۹ و ۶۶ گروه‌های پروبیوتیکی دارای اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه چهارم و پنجم بودند ($P<0/05$). لازم به توضیح است که ستون‌های ترسیم‌شده در نمودار ۶ تعداد کلنی باکتری‌های موجود در محیط کشت را پس از اضافه نمودن سرم خون ماهی قزل‌آلا نشان می‌دهد، لذا هرچه تعداد کلنی‌های شمارش‌شده کمتر باشد قدرت باکتری‌کشی سرم بیشتر بوده است.

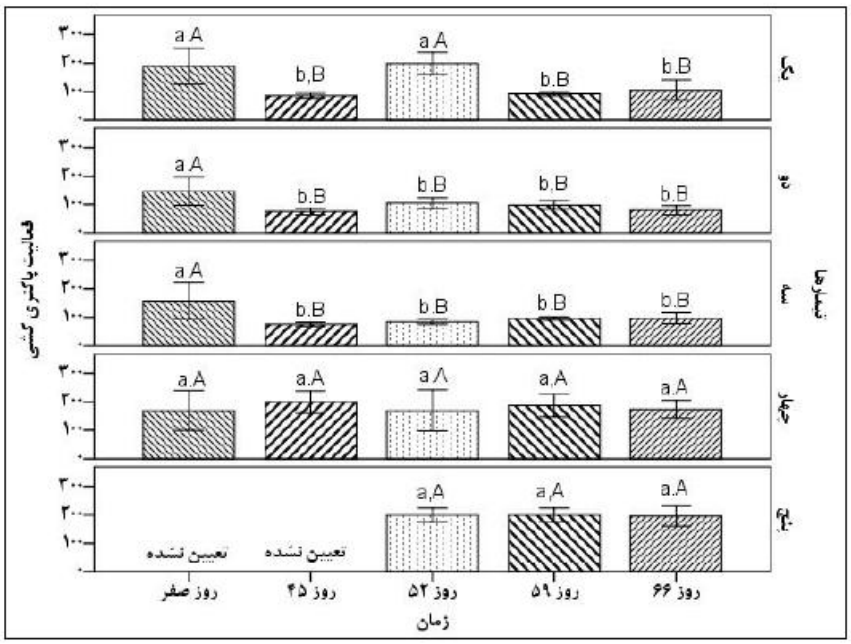


Downloaded from jweb.iauahvaz.ac.ir at 17:54 +0330 on Saturday November 25th 2017

www.SID.ir

Archive of SID






**شکل ٦: نتایج مربوط به فعالیت باکتری‌کشی سرم در تیمارهای مختلف طی مراحل مختلف نمونه‌برداری. بیان داده‌ها به شکل Means ± SD می‌باشد.**

**حروف کوچک لاتین غیر همنام روی انحراف معیار نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر سطر و حروف بزرگ لاتین غیر همنام نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر ستون می‌باشد.**

## بحث و نتیجه‌گیری

کمبود منابع آبی موجب شده است که در اکثر کشورها، پرورش متراکم آبزیان جایگزین روش‌های نیمه متراکم و گسترده گردد. در تولید متراکم، موجودات آبزی همواره در معرض شرایط تنش‌زا و بیماری قرارگرفته و این استرس موجب ایجاد بیماری و ضرر اقتصادی می‌گردد (Mohammadian *et al.*, 2016). فلزات سنگینی که وارد آب می‌شوند می‌توانند در زنجیره غذایی دست‌خوش تجمع زیستی و بزرگ‌نمایی زیستی شوند که منجر به ایجاد اثرات تحت‌کشنده یا مرگ در جمعیت‌های ماهی می‌شود. فلزات سنگین موجود در آب نه‌تنها بقا و فیزیولوژی موجودات آبزی را به مخاطره می‌اندازند بلکه باعث تغییرات ژنتیکی نیز می‌شوند که می‌تواند منجر به جهش و سرطان‌زایی گردد (Rayes, 2012). پروبیوتیک‌ها میکروارگانیزم‌های زنده‌ای هستند که وقتی در مقادیر کافی تجویز شوند با بهبود میکروفلور درونزاد دارای اثرات مفید برای میزبان هستند (Hauville *et al.*, 2016). چنین اثراتی از پروبیوتیک‌ها به اثرات مثبت بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و ضدمیکروبی آن‌ها، مقابله با پاتوژن‌ها، تحریک و تعدیل ایمنی، حفظ یکپارچگی دفاع مخاطی و همچنین حذف رقابتی در دستگاه گوارش نسبت داده می‌شود (Aly *et al.*, 2008; Safari *et al.*, 2016).

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که در ۴۵ روز ابتدایی آزمایش، درمجموع شاخص‌های خونی گروه یک نسبت به گروه کنترل و سایر گروه‌های پروبیوتیکی به میزان بیشتری افزایش داشته است. همچنین پس از چالش ماهیان با سرب درمجموع، گروه یک توانست شاخص‌های خونی را نسبت به گروه کنترل سرب‌دار به میزان بیشتری افزایش دهد. همچنین مشاهده شد که پس از مصرف سرب، شاخص‌های خونی در گروه کنترل سرب‌دار نسبت به گروه کنترل منفی کاهش داشته است که احتمالاً به دلیل اثرات سمی سرب در تداخل با سنتز هم موجودات زنده است (Hart and Graziano, 1978). این فلز نه‌تنها سنتز هموگلوبین (رنگدانه تنفسی حاوی هم در خون) را مهار می‌کند، بلکه بسیاری از



Downloaded from jweb.iauahvaz.ac.ir at 17:54 +0330 on Saturday November 25th 2017

www.SID.ir

Archive of SID



Downloaded from jweb.iauahvaz.ac.ir at 17:54 +0330 on Saturday November 25th 2017

فعالیت‌هایی که توسط ترکیبات دارای هم در سلول‌ها انجام می‌شود را نیز مختل می‌کند. مطالعه Al-Dohail و همکاران (۲۰۰۹) نشان داد که استفاده از باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به میزان $3\times10^{7}$ CFU/g غذا در گربه ماهی آفریقایی (*Clarias gariepinus*) به مدت ۱۲ هفته موجب بهبود شاخص‌های خون‌شناسی می‌شود که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت داشت. بهبود برخی از شاخص‌های خونی به دنبال استفاده از پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم جداسازی شده از قزل‌آلای رنگین‌کمان نیز مشاهده‌شده است (قلجایی فرد و همکاران، ۱۳۹۴).

نتایج مربوط به پارامترهای ایمنی نشان داد که میزان پروتئین تام و میزان گلوبولین سرم در ۴۵ روز اول آزمایش در تیمارهای پروبیوتیکی نسبت به گروه کنترل تغییر معنی‌داری نداشته است. همچنین پس از چالش ماهیان با سرب، گروه‌های پروبیوتیکی درمجموع اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه کنترل سرب‌دار ازنظر مقادیر پروتئین تام و گلوبولین سرم نداشتند. بااین‌حال مشاهده شد که در گروه کنترل مثبت میزان پروتئین تام و میزان گلوبولین سرم نسبت به گروه کنترل منفی در روز ۶۶ کاهش معنی‌داری داشته است. در راستای نتایج مطالعه حاضر Balcazar و همکاران (۲۰۰۷b) نشان داد که استفاده از برخی گونه‌های اسیدلاکتیک سبب تغییر معنی‌دار میزان ایمونوگلوبین سرم در قزل‌آلای قهوه‌ای نشده است، اما Nikoskelainen و همکاران (۲۰۰۳) مشاهده کردند، اگر لاکتوباسیلوس رامنوسوس با دوز $2/8\times10^{8}$ CUF/g همراه غذا به ماهی قزل‌آلا تجویز شود، میزان ایمنوگلبولین پلاسما یک هفته پس از تغذیه با پروبیوتیک افزایش معنی‌داری نسبت به ماهیان شاهد نشان می‌دهد.

نتایج مربوط به فعالیت لایزوزیم نشان داد که در تمامی گروه‌های پروبیوتیکی پس از ۴۵ روز از مصرف پروبیوتیک، میزان فعالیت لایزوزیم به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش داشته است. بین تیمارهای پروبیوتیکی این میزان از اختلاف معنی‌داری برخوردار نبود. پروبیوتیک‌ها به شکل انفرادی یا ترکیبی می‌توانند سطح لایزوزیم را در ماهیان تلئوستی افزایش دهند. افزایش فعالیت لایزوزیم توسط پروبیوتیک‌هایی مثل لاکتوباسیلوس رامنوسوس، کارنوباکتریوم مالتاروماتیکوم، کارنوباکتریوم دایورجنس در قزل آلای رنگین کمان گزارش‌شده است (Kim and Austin, 2006; Panigrahi *et al.*, 2004). از سوی مقابل افزودن پروبیوتیک‌های *لاکتوباسیلوس ساکائی*، در قزل‌آلای خال قهوه‌ای (Balcazar, 2007) و لاکتوباسیلوس ساکائی، لاکتوباسیلوس لاکتیس، لاکتوباسیلوس مزنتروئیدس و لاکتوباسیلوس رامنوسوس در قزل آلای رنگین‌کمان (Balcazar *et al.*, 2007b; Panigrahi *et al.*, 2005) نتوانسته است میزان لایزوزیم را افزایش دهد.

نتایج مربوط به فعالیت کمپلمان سرم نشان داد که در ۴۵ روز اول آزمایش میزان فعالیت کمپلمان در تیمارهای پروبیوتیکی افزایش‌یافته است اما این افزایش نسبت به گروه کنترل معنی‌دار نبود. افزایش فعالیت کمپلمان در ماهیانی مثل قزل‌آلای رنگین‌کمان توسط باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* و تیلاپیا توسط *انتروکوکوس فسیوم* مشاهده شده است (Panigrahi *et al.*, 2007; Salinas *et al.*, 2008).

نتایج مربوط به فعالیت انفجار تنفسی نشان داد که در گروه یک و گروه سه پس از ۴۵ روز میزان این فعالیت کاهش‌یافته است. نتایج مربوط به فعالیت انفجار تنفسی در ماهی ضدونقیض است. برخی مطالعات افزایش و برخی کاهش فعالیت انفجار تنفسی را گزارش کردند (Diaz-Rosales *et al.*, 2009; Nayak, 2010; Sharifuzzaman and Austin, 2009). پروبیوتیک‌هایی مثل *باسیلوس سابتیلیس* و برخی از *لاکتوباسیلوس‌ها* می‌توانند فعالیت انفجار تنفسی را تحریک کنند (Nikoskelainen *et al.*, 2003; Salinas *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2009)؛ حتی باکتری غیرفعال شده لاکتوباسیلوس دلبروکی تحت گونه لاکتیس و باکتری باسیلوس سابتیلیس در شرایط in vitro توانستند فعالیت انفجار تنفسی کلیه قدامی را در ماهی سیم دریایی (*Sparus aurata*) افزایش دهند (Salinas *et al.*, 2008).

نتایج مربوط به فعالیت باکتری‌کشی نشان داد که در ۴۵ روز اول آزمایش گروه‌های پروبیوتیکی نسبت به گروه کنترل فعالیت باکتری‌کشی بیشتری داشته‌اند. این نتایج با نتایج مربوط به فعالیت باکتری‌کشی در ماهیانی مثل تیلاپیای نیل، روهو و قزل‌آلای رنگین‌کمان مطابقت داشت (Aly *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2008; Newaj-Fyzul *et al.*, 2007).

در مطالعه حاضر پس از چالش با سرب در روز ۵۲ میزان فعالیت لایزوزیم در گروه دو نسبت به گروه کنترل سرب‌دار از افزایش معنی‌داری برخوردار بود. پس از چالش با سرب میزان فعالیت لایزوزیم در گروه کنترل سرب‌دار در روزهای ۵۹ و ۶۶ نسبت به روز ۵۲ کاهش داشت. بااین‌حال پس از چالش با سرب میزان فعالیت لایزوزیم در گروه کنترل مثبت نسبت به کنترل منفی در تمامی روزها افزایش معنی‌داری را نشان داد.



www.SID.ir

Archive of SID



همچنین پس از چالش با سرب در روز ۶۶ میزان فعالیت کمپلمان در تمامی گروه‌های پروبیوتیکی نسبت به گروه کنترل سرب‌دار بالاتر بود. در گروه کنترل سرب‌دار میزان فعالیت کمپلمان در روز ۵۹ و ۶۶ نسبت به‌روز ۵۲ کاهش داشت هرچند که با گروه کنترل معنی‌دار نبود. پس از چالش با سرب میزان فعالیت انفجار تنفسی در روز ۵۲ در گروه دو نسبت به گروه کنترل سرب‌دار بیشتر بود. در روز ۶۶ نیز میزان این فعالیت در تمامی گروه‌های پروبیوتیکی نسبت به گروه کنترل مثبت افزایش یافت. پس از چالش با سرب گروه‌های پروبیوتیکی درمجموع میزان فعالیت باکتری‌کشی بیشتری از گروه کنترل مثبت داشتند. در گروه کنترل مثبت نسبت به گروه کنترل منفی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

اطلاعات در خصوص اثرات سمی سرب (in vivo) در سیستم ایمنی ماهی اندک است. در مطالعه Witeska (۲۰۰۵) پس از مواجهه ماهی کپور با سرب ابتدا افزایش تعداد گلبول‌های سفید و لنفوسیتوز و سپس کاهش هر دو پارامتر ایجاد شد. مطالعه Dunier *in vitro* و Siwicki (۱۹۹۳) نشان داد که سرب (با غلظت ۱۰۰–۵ میلی‌گرم در لیتر) فعالیت فاگوسیت‌های کپور معمولی را مهار می‌کند، اما چنین اثری در غلظت ۱–۰/۰۰۱ میلی‌گرم در لیتر مشاهده نشد. همچنین تکثیر لنفوسیت‌ها در ۱۰۰–۶/۲ میلی‌گرم در لیتر افزایش یافت، در ۳ میلی‌گرم در لیتر اثری مشاهده نشد اما در ۱ میلی‌گرم در لیتر تکثیر به طور کامل مهار شد. در مطالعه Aboud (۲۰۱۰) تأثیر سرب، جیوه و کادمیوم (هرکدام به میزان ۲۰ درصد غلظت کشنده = LC50/96h) بر روی پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی ماهی تیلاپیای نیل بررسی شد. در این مطالعه مشخص شد که تمامی این فلزات بعد از یک، سه و شش هفته باعث کاهش فعالیت فاگوسیتوز نسبت به گروه کنترل می‌شوند. این ماهیان بعد از مواجهه با فلزات، با باکتری *سودوموناس فلوئورسنس* به شکل تزریقی مورد چالش قرار گرفتند که پس از چالش میزان تلفات در این ماهیان نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری یافت و بیشترین میزان مرگ‌ومیر در گروه چالش یافته با سرب (۶۶ درصد) مشاهده شد. در مطالعه Kaya و همکاران (۲۰۱۳) اثر مواجهه با سطوح تحت کشنده سرب بر روی پارامترهای خونی–ایمنی ماهی تیلاپیای موزامبیک سنجیده شد. در این مطالعه از سه سطح تحت کشنده فلز سرب به میزان ۰/۵ (دوز کم)، ۲/۵ (دوز متوسط) و ۵ میلی‌گرم در لیتر (دوز بالا) به مدت ۱۴ روز استفاده شد و نمونه‌برداری از خون در روزهای ۷ و ۱۴ انجام شد. نتایج نشان داد که ۱۴ روز پس از مواجهه با سرب میزان هماتوکریت، هموگلوبین و تعداد گلبول‌های قرمز در گروه‌های مواجه شده با دوز متوسط و بالا افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشته است. ۱۴ روز پس از مواجهه تعداد گلبول‌های قرمز در گروه با دوز کم افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشت. فعالیت لایزوزیم ۷ روز بعد از مواجهه در هیچ‌یک از گروه‌ها تفاوت معنی‌داری نسبت به یکدیگر نداشت، اما بعد ۱۴ روز مواجهه، میزان فعالیت لایزوزیم در تمامی گروه‌ها نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری یافت. فعالیت انفجار تنفسی در گروه با دوز بالا بعد از ۱۴ روز مواجهه کاهش معنی‌داری داشت اما در سایر گروه‌ها و در روز هفت تفاوت معنی‌داری دیده نشد (Kaya *et al.*, 2013). اثر منفی سرب در کاهش فعالیت لایزوزیم در موش و کاهش فاگوسیتوز در قورباغه نیز مشاهده‌شده است (Teijon *et al.*, 2003; Rosenberg *et al.*, 2003). نتایج مشابهی در مورد سایر فلزات نیز به‌دست‌آمده است.

اعتقاد بر این است که لاکتوباسیلوس‌ها جمعیت مهمی از میکروفلور روده هستند که به هومئوستاز و مهار رشد پاتوژن‌ها کمک می‌کنند. بر اساس مطالعات in vitro یکی از عمده‌ترین مکانیسم‌های باکتری در کاهش فلزات سنگین توانایی آن‌ها در اتصال به فلزات سنگین است. سه مکانیسم در مورد اتصال فلزات سنگین به دیواره سلول‌های باکتریایی شناخته‌شده است. ۱) واکنش‌های تبادل یون با لایه پپتیدوگلیکان و لیپوتیکوئیک اسید، ۲) ترسیب از طریق واکنش‌های نوکلئاسیون و ۳) کمپلکس‌سازی با لیگاندهای نیتروژن و اکسیژن. باکتری‌های گرم مثبت به‌خصوص گونه‌های باسیلوس دارای توانایی جذب بیشتر هستند، زیرا مقادیر بالایی پپتیدوگلیکان و لیپوتیکوئیک اسید در دیواره سلولی خوددارند. همچنین لاکتوباسیلوس‌ها در کل دارای بار سطحی منفی هستند که این امر به دلیل گروه‌های عاملی موجود ازجمله گروه‌های هیدروکسیل، فسفوریل و کربوکسیل در سطح سلول آن‌ها است. Monachese در سال ۲۰۱۲ بیان کرد که در شرایط *in vitro* اتصال فلزات به سطح برخی از سویه‌های پروبیوتیکی زنده یا مرده به‌واسطه یک فرآیند غیرفعال و احتمالاً از طریق انتقال‌دهنده‌های کاتیونی غیراختصاصی صورت می‌گیرد. این موضوع ازاین‌جهت اهمیت دارد که با توجه به این‌که ممکن است پروبیوتیک در مسیر روده مستقر نشود و یا توان بقا نیابد، افزودن پروبیوتیک در جیره جهت کاهش مسمومیت فلزات سنگین الزاماً به زنده‌مانی آن‌ها وابسته نیست. بر اساس مطالعه Zhai و همکاران (۲۰۱۳) در مورد توانایی



Downloaded from jweb.iauahvaz.ac.ir at 17:54 +0330 on Saturday November 25th 2017

www.SID.ir

Archive of SID



یکی از سویه‌های باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (*L. plantarum* CCFM8610) در کاهش جذب فلز سنگین کادمیوم مؤثر است. نتایج این مطالعات با نتایج مطالعه حاضر که حاکی از بی‌اثر کردن سمیت سرب است، مطابقت دارد که می‌تواند به دلیل مقدار بالای حذف یون سرب در اثر خصوصیت اتصالی سریع و کارآمد *لاکتوباسیلوس کازئی* و همچنین بهبود روند حرکات دودی در دستگاه گوارش، پس از یک دوره زمانی کوتاه همراه با مدفوع باشد. لازم به ذکر است جذب فلزات سنگین مانند سرب و کادمیوم از روده وابسته به‌نوعی انتقال‌دهنده فلزات دو ظرفیتی بنام Divalent metal transporter 1 می‌باشد که این پروتئین اختصاصیت بالایی به فلزات دو ظرفیتی مثل کلسیم، آهن و روی دارد. به‌عبارت‌دیگر یک ارتباط رقابتی بین جذب سرب و عوامل اصلی دو ظرفیتی در دستگاه گوارش ماهی وجود دارد. جالب این‌که برخی از لاکتوباسیلوس‌ها (مانند *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*) و بیفیدوباکترها (*بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* و *بیفیدوباکتریوم لانگوم*) می‌توانند جذب و دسترسی-زیستی برخی از عناصر ضروری مثل کلسیم، منیزیوم و آهن را هم در انسان و هم در حیوانات بهبود بخشند؛ بنابراین باوجود این‌که این مسئله در حال حاضر هنوز اثبات نشده است، اما می‌توان متصور شد که سویه موردمطالعه قرارگرفته توانایی افزایش جذب یون‌های ضروری دو ظرفیتی را داشته و بنابراین جذب روده‌ای سرب کاهش‌یافته است.

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که درمجموع استفاده از باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* جداشده از روده ماهی شیربت به‌عنوان یک مکمل پروبیوتیکی می‌تواند دارای اثرات مثبت در بهبود شاخص‌های هماتولوژی و ایمنی باشد و علاوه بر این از مسمومیت با فلز سنگین سرب ممانعت کند. در مطالعه حاضر باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* در غلظت پایین احتمالاً توانسته باتصال به فلز سنگین سرب در کاهش اثرات مضر آن مؤثر باشد. فلزات سنگین دارای بارهای مختلفی هستند به‌طوری‌که فلز سرب دارای بار مثبت (کاتیون) است. ازاین‌رو به دلیل منفی بودن بار سطحی *لاکتوباسیلوس کازئی*، اتصال این دو صورت می‌گیرد (Monachese, 2012). درمجموع با توجه به طبیعت غیر بیماری‌زای *لاکتوباسیلوس کازئی* می‌توان از آن به‌عنوان یک روش زیستی بی‌خطر و کاربردی در حذف فلزات سنگین کاتیونی وارد شونده به روده از طریق غذا استفاده کرد.

## منابع


**قلجایی فرد، ا.، خاوار، ح.، و شناور ماسوله، ح.، ۱۳۹٤.** تأثیر باکتری (*Lactobacillus plantarum*) جداسازی شده از روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان استان گیلان بر شاخص‌های خونی و ایمنی بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان. فصلنامه فیزیولوژی و تکوین جانوری، جلد ۸، شماره ۱: صفحات ۶۸-۶۱

**Aboud, O. A. S. A., 2010.** Impact of Pollution with Lead, Mercury and Cadmium on the Immune Response of *Oreochromis Niloticus*. New York Science Journal, 3(9): 9–16.

**Al-Dohail, M. A., Hashim, R. and Aliyu-Paiko, M., 2009.** Effects of the probiotic, ***Lactobacillus acidophilus***, on the growth performance, haematology parameters and immunoglobulin concentration in African catfish (***Clarias gariepinus***, Burchell 1822) fingerlings. Aquaculture Research, *40:* 1642–1652.

**Alves, L. C., Glover, C. N. and Wood, C. M., 2006.** Dietary Pb Accumulation in Juvenile Freshwater Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Environmental Contamination and Toxicology, 51: 615–625.

**Aly, S. M., Abdel-Galil A. Y., Abdel-Aziz Gh. A. and Mohamed, M. F., 2008.** Studies on ***Bacillus subtilis*** and ***Lactobacillus acidophilus***, as potential probiotics, on the immune response and resistance of Tilapia nilotica (***Oreochromis niloticus***) to challenge infections. Fish and Shellfish Immunology, 25: 128–136.

**Balcazar J. L., de Blas, I., Ruiz-Zazuela, I., Vandrell, D., Girones, O. and Muzquiz, J. L., 2007a.** Enhancement of the immune response and protection induced by probiotic lactic acid bacteria against furunculosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). FEMS Immunology and Medical Microbiology, 51: 185-93.

**Balcazar, J. S., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Vendrell, D., Calvo, A. C., Marquez, I., Girones, O. and Muzquiz, J. L., 2007b.** Changes in intestinal microbiota and humoral immune response following probiotic administration in brown trout (*Salmo trutta*). British Journal of Nutrition, 97: 522–527.

**Brata, O., 1993.** Veterinary Clinical Immunology laboratory. Vol 2, Bar- Lab Inc, pp.24-25.




Downloaded from jweb.iauahvaz.ac.ir at 17:54 +0330 on Saturday November 25th 2017

www.SID.ir

Archive of SID



Downloaded from jweb.iauahvaz.ac.ir at 17:54 +0330 on Saturday November 25th 2017

**Denev, S., Staykov, Y., Moutafchieva, R. and Beev, G., 2009.** Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of probiotics and prebiotics in finfish aquaculture. International aquatic Research, 1:1-29.

**Diaz-Rosales, P., Arijo, S., Chabrillon, M., Alarcon, F. J., Tapia-Paniagua, S. T., Martinez-Manzanares, E., Balebona, M. C. and Morinigo, M. A., 2009.** Effects of two closely related probiotics on respiratory burst activity of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) phagocytes, and protection against Photobacterium damselae subsp. piscicida. Aquaculture, 293:16-21.

**Dunier, M. and Siwicki, A. K., 1994.** Study of the effects of pollutants on fish defence mechanisms. I. In vitro influence of heave metals on the spleen and kidney lymphocytes and macrophages activity in carp (*Cyprinus carpio*). Archives of Polish Fisheries, 2: 55.

**Ellis, A. E., 1990.** Lysozyme Assay In: Techniques in Fish Immunology ed. Stolen J. S., Fletcher D. P., Anderson B. S. and Robertson B. S., SOS Publication, Fair Haven, New Jersey, USA, pp.101-103.

**FAO, 2014. The State of World Fisheries and Aquaculture.**

**FAO, 2002.** Who working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food London, Ontario, Canada.

**Feldman, B. F., Zinkl, J. G. and Jain, N. C., 2000.** Schalm's Veterinary Hematology, 5th edition, Lippincott Williams & Wilkins, Maryland, USA.

**Hart, D. P. S. and Graziano, J. H., 1978**. Time sequence of RBC protoporphyrin (pp) accumulation in lead poisoning. Pediatric Research, 12:465.

**Hauville, M. R., Zambonino, J. L., Gordon, B. J., Migaud, H. and Main, K. L., 2016.** Effects of a mix of ***Bacillus*** sp. as a potential probiotic for Florida pompano, common snook and red drum larvae performances and digestive enzyme activities. Aquaculture Nutrition, 22(1): 51-60.

**Jill, C.M., Hoseph, J.P.M. and Stephan, D.S., 2001**. Metals in: Principles and Methods of Toxicology. 4th ed. Philadelphia: Taylor and Francis, Philadelphia, USA.

**Kajita, Y., Sakai, M., Atsuta, S. and Kobayash, M., 1990.** The immunonodulatory effects of levamisole on rainbow trout, ***Oncorhynchus mykiss***. Fish Pathology, 25: 93-98.

**Kalia, K. S., 2005.** Strategies for safe and effective therapeutic measures for chronic arsenic and lead poisoning. Journal of Occupational Health, 47: 1-21.

**Kaya, H., Akbulut, M., Şanver Çelik, E. and Yilmaz, S., 2013.** Impacts of sublethal lead exposure on the hemato-immunological parameters in tilapia (*Oreochromis mossambicus*). Toxicological and Environmental Chemistry, 95(9): 1554-1564.

**Kim, D. H. and Austin, B., 2006.** Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. Fish and Shellfish Immunology, 21: 513-524.

**Kinoshita, H., Sohma, Y., Ohtake, F., Ishida, M., Kawai, Y., Kitazawa, H., Saito, T. and Kimura, K., 2013.** Biosorption of heavy metals by lactic acid bacteria and identification of mercury binding protein. Research in Microbiology, 164(7): 701-709.

**Kumar, R., Mukherjee, S. C., Ranjan, R. and Nayak, S. K., 2008.** Enhanced innate immune parameters in *Labeo rohita* (Ham.) following oral administration of *Bacillus subtilis*. Fish and Shellfish Immunology, 24: 168-172.

**Makridis, P., Bergh, Q. and Skjermoj, J. O.**, 2001. **Addition of bacteria bioencapsulated in** Artemia metanauplii **to a rearing system for halibut larvae. Aquaculture International, 9: 225-235.**

**Meldrum, J. B. and Ko, K. W., 2003.** Effect of calcium disodium EDTA and meso-2, 3-dimercaptosuccinic acid of tissue concentrations of lead for use in treatment of calves with experimentally induced lead toxicosis. American Journal of Veterinary Research, 64(6): 672-676.

**Mohammadian, T., Alishahi, M., Tabandeh, M. R., Ghorbanpoor, M., Gharibi, D., Tollabi, M. and Rohanizade, S., 2016.** Probiotic effects of *Lactobacillus plantarum* and *L. delbrueckii* ssp. *bulguricus* on some immune-related parameters in *Barbus grypus*. Aquaculture International, 24(1): 225–242.

**Monachese, M. A., 2012.** Sequesteration of lead, cadmium and arsenic by Lactobacillus species and detoxication potential. Electronic Tesis and Dissertation Repository, 729p.



www.SID.ir

Archive of SID



Downloaded from jweb.iauahvaz.ac.ir at 17:54 +0330 on Saturday November 25th 2017

**Mrvčić, J., Stanzer, D., Bucun-druzina, V. and Stehlik-Tomas, V., 2009.** Copper Binding by Lactic Acid Bacteria (LAB). Bioscience Microflora, 28(1): 1–6.

**Mrvčić, J., Stanzer, D., Šolić, E. and Stehlik-Tomas, V., 2012.** Interaction of lactic acid bacteria with metal ions: opportunities for improving food safety and quality. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28(9): 2771–2782.

**Nayak, S. K., 2010.** Role of gastrointestinal microbiota in fish. Aquaculture Research, 41: 1553-1573.

**Newaj-Fyzul, A., Adesiyun, A. A., Mutani, A., Ramsubhag, A., Brunt, J. and Austin, B., 2007.** *Bacillus subtilis* AB1 controls Aeromonas infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Journal of Applied Microbiology, 103:1699-706.

**Nikoskelainen, S., Ouwehand, A. C., Bylund, G., Salminen, S. and Lilius, E. M., 2003.** Immune enhancement in rainbow trout (***Oncorhynchus mykiss***) by potential bacteria (***Lactobacilus rhamnosus***). Fish and Shellfish Immunology, 15: 443-452.

**Panigrahi, A., Kiron, V., Kobayashi, T., Puangkaew, J., Satoh, S. and Sugita, H., 2004.** Immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. Veterinary Immunology and Immunopathology, 102: 379-388.

**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, 243: 241-254.

**Planas, M., Vazquez, J. A., Marques, J., Peres-Lomba, R., Gonzalez M. P. and Murado, M., 2004.** Enhancement of rotifer (***Brachionus plicatilis***) growth by using terrestrial lactic acid bacteria. Aquaculture, 240: 313-329.

**Rayes, A. A. H., 2012.** Field studies on the removal of lead, cadmium and copper by the use of probiotic lactic acid bacteria from the water for culturing marine tilapia *T. spilurus*. New York Science, 5(11): 74-82.

**Roberts, R. J., 2001**. The immunology of teleost. In: Roberts, R.J.(Ed.). Fish Pathology, Vol. 1:W.B. Saunders, London, England, pp. 133-150.

**Rosenberg, C. E., Fink, N. E., Arrieta, M. A. and Salibian, A., 2003.** Effect of Lead Acetate on the In Vitro Engulfment and Killing Capability of Toad (*Bufo arenarum*) Neutrophils. Comparative Biochemistry and Pysiology, 136: 225–233.

**Safari, R., Adel, M., Lazado, C. C., Caipang, C. A. M. and Dadar, M., 2016.** Host-derived probiotics ***Enterococcus casseliflavus*** improves resistance against ***Streptococcus iniae*** infection in rainbow trout (***Oncorhynchus mykiss***) via immunomodulation. Fish and Shellfish Immunology, 52: 198-205.

**Salinas, I., Abelli, L., Bertoni, F., Picchietti, S., Roque, A., Furones, D., ... & Esteban, M. Á., 2008.** Monospecies and multispecies probiotic formulations produce different systemic and local immunostimulatory effects in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Fish and shellfish immunology, *25*(1): 114-123.

**Schaperclaus, W., Kulow, H. and Schreckenbach, K., 1991.** Hematological and Serological Technique ed. V. S. First edition, Gulab primlani, Oxonian press, New Delhi, India, pp.71-108.

**Secombes, C. J., Zou, J., Laing, K., Daniels, G. D. and Cunningham, C., 1998.** Cytokine genes in fish. Aquaculture, 171: 93-102.

**Sharifuzzaman, S. M. and Austin, B., 2009.** Influence of probiotic feeding duration on disease resistance and immune parameters in rainbow trout. Fish and Shellfish Immunology, 27:440-445.

**Teijon, C., Olmo, R., Blanco, M. D., Romero, A. and Teijon, J. M., 2003.** Effects of lead administration at low doses by different routes on rat spleens, study of response of splenic lymphocytes and tissue lysozyme. Toxicology, 191(2–3): 245–258.

**Vine, N. G., Leukes, W. D., Kaiser, H., Daya, S., Baxter, J. and Hecht, T., 2004.** Competition for attachment of aquaculrue candidate probiotic and pathogenic bacaetia on fish interstinal mucus. Journal of Fish Disease, 27: 319-326.

**Witeska, M., 2005.** Stress in fish-hematological and immunological effects of heavy metals. Electronic Journal of Ichthyology, 1: 35.



www.SID.ir

Archive of SID



**Zhai, Q., Wang, G., Zhao, J., Liu, X., Tian, F., Zhang, H. and Chen, W., 2013.** Protective effects of *Lactobacillus plantarum* CCFM8610 against acute cadmium 2 toxicity in mice. Applied and Environmental Microbiology, 79(5): 1508-1515.

**Zhou, X., Tian, Z., Wang, Y. and Li, W., 2009.** Effect of treatment with probiotics as water additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. Fish Physiology and Biochemistry, 1742:1573-5168.

Downloaded from jweb.iauahvaz.ac.ir at 17:54 +0330 on Saturday November 25th 2017



www.SID.ir