بهره‌برداری و پرورش آبزیان
جلد هفتم، شماره سوم، پاییز ۱۳۹۷
http://japu.gau.ac.ir
DOI: 10.22069/japu.2019.12260.1330

کارایی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس (*Lactobacillus*) در بهبود پارامترهای بیوشیمیایی کبد ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در معرض سطوح تحت کشنده نانو نقره

مهرداد مرادی سقلمه‌چی[۱]، *سید علی‌اکبر هدایتی[۲]، سید حسین حسینی‌فر[۳] و دارا باقری[۴]

[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۲]دانشیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،
[۳]استادیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۴]استادیار، دانشگاه خلیج‌فارس بوشهر

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۹/۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۱/۹

چکیده

وجود آلاینده‌های نوظهور نانوذرات در آب باعث پاسخ استرس در ماهی می‌شود که نهایتا بر وضعیت فیزیولوژیک ماهیان اثرگذار بوده و باعث کاهش عملکرد ایمنی ماهیان می‌شود، از این‌رو استفاده از محرک‌های ایمنی نظیر پروبیوتیک‌ها بسیار ضروری به‌نظر می‌رسد. تعداد ۲۵۰ بچه ماهی کپور معمولی به‌مدت ٤۲ روز در سه دسته ماهیان بدون پروبیوتیک و ماهیان دارای پروبیوتیک سطح A (10^6) و ماهیان دارای پروبیوتیک سطح B (10^7) تقسیم شدند. سپس هر کدام از گروه‌ها ۵۰ درصد غلظت کشنده نانو نقره به‌مدت ده روز اضافه شد. پروبیوتیک به تنهایی اثر معنی‌داری بر گلوکز، بیلی روبین دایرکت، بیلی روبین کل و پروتئین نداشت ($P\geq0/05$)، اما نانونقره باعث افزایش پروتئین و کاهش دیگر شاخص‌ها گردید ($P<0/05$)، استفاده ترکیبی پروبیوتیک و نانونقره باعث افزایش مقدار گلوکز، بیلی روبین دایرکت، بیلی روبین کل و کاهش پروتئین گردید ($P<0/05$). غلظت نانو نقره باعث سرکوب وکاهش شاخص‌های بیوشیمیایی سرم شده که مقدار این شاخص‌ها در مواجهه با نانو نقره کاهش یافته است، همچنین در تیمار استفاده توام پروبیوتیک لاکتو باسیلوس و نانو نقره از سرکوب در تیمار قبل کم کرده و روندی افزایشی در مقدار شاخص‌ها رخ داده است. در مجموع نتایج نشان داد که نانونقره با ایجاد شرایط استرس مقدار این شاخص را کاهش داده و استفاده ترکیبی نانونقره وپروبیوتیک لاکتو باسیلوس با جلوگیری از اثر مخرب نانو نقره، مقدار شاخص‌های بیوشیمایی کبد را افزایش داده است.

واژه‌های کلیدی: بهبود مقاومت، نانو ذرات فلزی، پروبیوتیک، شاخص بیوشیمیایی، کپور معمولی

*مسئول مکاتبه: hedayati@gau.ac.ir

مقدمه

نانوذرات نقره عمدتاً، به‌دلیل خواص فیزیکی و شیمیایی ویژه‌ای که از خود نشان می‌دهند در مصارف الکترونیکی، نوری، دارویی و بهداشتی و کاتالیتیکی کاربرد فراوان دارند. اثر ضد باکتریایی نانو نقره به اثبات رسیده و امروزه در صنایع مختلف کاربرد فراون دارد (گنگ و همکاران، ۲۰۰۷). نقره در ابعاد بزرگ، فلزی با خاصیت واکنش‌دهی کم می‌باشد، ولی زمانی‌که به ابعاد کوچک در حد نانومتر تبدیل می‌شود خاصیت میکروب کشی آن بیش از ۹۹ درصد افزایش می‌یابد، به حدی که می‌توان از آن جهت بهبود جراحات و عفونت‌ها استفاده کرد. نقره در ابعاد نانو بر متابولیسم، تنفس و تولید مثل میکروارگانیسم اثر می‌گذارد (بلایس و همکاران، ۲۰۰۸). تاکنون بیش از ٦٥٠ نوع باکتری شناخته شده را از بین برده است (بلایس و همکاران، ۲۰۰۸). نقره در ابعاد نانو بر متابولیسم، تنفس و تولید مثل میکروارگانیسم اثر می‌گذارد. نقره در ابعاد نانو بر متابولیسم، تنفس و تولید مثل میکروارگانیسم اثر می‌گذارد. نانوذرات نقره عمدتاً، به‌دلیل خواص فیزیکی و شیمیایی ویژه‌ای که از خودنشان می‌دهند در مصارف الکترونیکی، نوری، دارویی و بهداشتی و کاتالیتیکی کاربرد فراوان دارند. اثر ضد باکتریایی نانو نقره به اثبات رسیده و امروزه در صنایع مختلف کاربرد فراون دارد (گنگ و همکاران، ۲۰۰۷).

در سال‌های اخیر تحقیقات فراوانی روی ترکیبات و مکمل‌های غذایی که در بالا بردن ایمنی موجود و کارایی تغذیه نقش دارند صورت گرفته است. افزودن پروبیوتیک‌ها به غذای ماهی باعث افزایش فعالیت گوارشی، شاخصی و در نهایت سبب بهبود وضعیت ایمنی می‌گردد. ایجاد تعادل میکروبی در روده میزبان، ساختن ترکیبات مفید از جمله ویتامین‌ها و برخی شاخص‌ها، تحریک و افزایش کارایی سیستم ایمنی، در آخر افزایش بقای موجود می‌شوند. عوامل مختلفی می‌توانند بر کارایی تکثیر و پرورش ماهیان تأثیرگذار باشند. از جمله ترکیباتی که به‌عنوان مکمل غذایی و جایگزین برای ترکیبات ضدمیکروبی مطرح می‌باشند می‌توان به پروبیوتیک‌ها، نوکلئوتیدها، پری‌بیوتیک‌ها اشاره کرد. در طول سال‌های گذشته استفاده از مکمل‌های غذایی (پروبیوتیک و سایر افزودنی‌ها) که در بالا بردن ایمنی مصرف‌کنندگان نقش اساسی داشته‌اند افزایش یافته است، به‌طوری که اثرات مثبت و فراوان این مواد در انواع جانداران ثابت شده است. از خواص پروبیوتیک‌ها می‌توان به تحریک و ارتقاء سیستم ایمنی بدن (خان و انصاری، ۲۰۰۷)، افزایش کارائی غذایی که این امر از طریق تولید ویتامین‌ها، افزایش قابلیت جذب مواد معدنی و عناصر کمیاب و نیز تولید شاخص‌های گوارشی انجام می‌گیرد اشاره کرد (خان و انصاری، ۲۰۰۷). با توجه به پیشرفت صنعت آبزی پروری استفاده از پروبیوتیک‌ها به منظور تحریک فعالیت سیستم ایمنی و کاهش ضریب تبدیل غذایی گسترش یافته است. کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) از رده ماهیان استخوانی و متعلق به خانواده کپورماهیان (*Cyprinidae*) است و در بوم‌سازگان‌های آب شیرین ازجمله ماهیان مهم از لحاظ اقتصادی بوده و به جهت خوراک مردم مورد پرورش قرار می‌گیرد. این ماهی پر تولید ترین گونه پرورش کشور می‌باشد و بسیاری از مزارع پرورش شمال کشور به تکثیر و پرورش آن اختصاص دارد.

اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی به‌طور عمده در تشخیص وضعیت فیزیولوژی ماهی و تعیین حالت عمومی سلامتی ماهی استفاده می‌شود. تغییرات بیوشیمیایی بافت‌های مختلف بدن، بازگوکننده

تغییرات در متابولیسم و فرآیندهای بیوشیمیایی موجودات زنده است که در بروز آن‌ها، عوامل بسیار مختلفی از جمله تماس ماهی با ترکیبات سمی می‌تواند مؤثر باشد. از آنجایی که ویژگی‌های بیوشیمیایی خون به‌عنوان یکی از مهم‌ترین شاخص‌های وضعیت فیزیولوژیکی ماهی قلمداد می‌شود، ورود آلاینده‌ها در پیکره موجود زنده می‌تواند موجب تغییر قابل توجه و معنی‌داری در پروفایل بیوشیمیایی خون شود که در واقع بازتابی از ایجاد تغییرات در پروسه متابولیسم طبیعی بدن ماهی است که در نتیجه متابولیسم آلاینده طی فرایند سم‌زدایی حاصل می‌شود (ادسل، ۱۹۹۹). از جمله فاکتورهای بیوشیمیایی مهم، گلوکز، بیلی روبین و پروتئین هستند که از سنجش آن‌ها به‌عنوان یک شاخص آزمایشگاهی استاندارد جهت بررسی اختلالات کبدی در موجودات استفاده می‌شود. این شاخص‌ها، اساسا داخل سلولی هستند و در بسیاری از اندام‌های مختلف دیگر ماهی نیز یافت می‌شوند. با توجه به این‌که، در حالت طبیعی مقادیر این شاخص‌ها در داخل سلول بیشتر از خارج سلول است، بنابراین افزایش مقادیر جزئی آن‌ها در محیط خارج سلول اعم از مایع بین سلولی و پلاسما به‌عنوان یک اندیکاتور حساس، بیانگر وقوع آسیب سلولی در مواجهه با انواع آلاینده‌های وارد شده به بدن در ارزیابی نحوه عملکرد سلول‌های کبدی به‌عنوان تست‌های موجود زنده خواهد بود. بنابراین این آنزیم‌ها اهمیت بالینی دارند و استاندارد از آن‌ها استفاده می‌شود (پارما و همکاران، ۲۰۰۷). لذا با توجه به جنبه‌های روز افزون کاربرد نانوذرات نقره در صنایع مختلف ورود آن به اکوسیستم‌های آبی به‌عنوان آلاینده نوظهور، در تحقیق حاضر به بررسی جنبه‌های بیوشیمیایی اثرات نانونقره بر ماهی کپور معمولی پرداخته شد و این فرضیه که احتمال کاهش اثرات نانوذرات با مکمل پروبیوتیک وجود دارد نیز مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تعداد ۲۵۰ قطعه ماهی با میانگین وزنی ۲۰ گرم از مرکز از مراکز تکثیر و پرورش بخش خصوصی خریداری شد. ماهی‌ها در تانک‌های فایبر گلاس که قبل از شروع آزمایش به‌وسیله پرمنگنات پتاسیم و آب‌نمک غلیظ ۷۰ درصد کاملاً شسته شد تا محیط عاری از هر گونه آلودگی و بیماری و برای ماهیان مناسب باشد، توزیع شدند. ظروف حاوی آب کلر زدایی شده با دمای ۱۹– ۱۷ درجه سانتی‌گراد بود که به‌صورت ۲٤ ساعته هوادهی می‌شدند. ماهیان در دوره نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی به مدت یک هفته نگهداری شدند تا به شرایط آزمایشگاه سازگار شوند. در دوره سازگاری در دو نوبت صبح و بعدازظهر به میزان ۱/۵ درصد وزن بدن در روز تغذیه غذادهی انجام شد آب تانک‌های نگهداری ماهی‌ها هر ۲٤ ساعت یکبار تعویض شد (چاپمن و همکاران، ۱۹۹۸). پس از گذراندن دوره سازگاری با شرایط آزمایشگاهی، ماهیان به ٦ تیمار (شاهد، پروبویتیک 10^{6}، پروبیوتیک 10^{7}، نانونقره، پروبیوتیک 10^{6}+ نانونقره، پروبیوتیک 10^{7}+ نانونقره) هرکدام با ۳ تکرار تقسیم‌بندی شدند. ماهیان به‌مدت ٤۲ روز تیمارهای مشخص شده غذادهی شدند. بعد از گذشت ٤۲ روز تیمارهای مشخص شده به‌مدت ۱۰ روز در معرض غلظت تحت حاد (۵۰ درصد غلظت حاد= ۱ میلی‌گرم در لیتر) نانونقره قرار گرفتند. در طول دوره آزمایش، میزان هوادهی، غذادهی، شرایط فیزیکوشیمیایی آب نظیر دما، پی اچ و اکسیژن محلول کنترل شد.

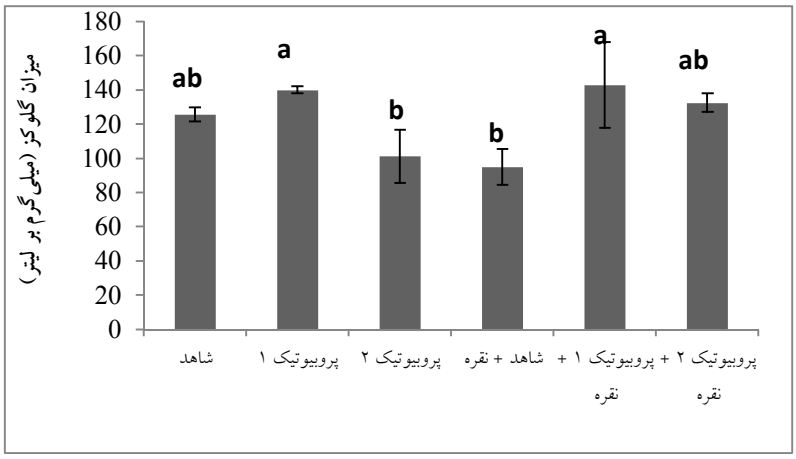
جهت اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی و نیز تهیه بافت کبد، ابتدا ماهیان به‌صورت تصادفی با ساچوک برداشته و در داخل تشت پلاستیکی ۵ لیتری

دارای ۲۲۰ ppm محلول یوژینول قرار گرفته (بنایی و همکاران، ۲۰۱٤) و سپس از ماهیان نمونه خون برای به‌دست آوردن پارامترهای بیوشیمیایی گرفته شد. پس از بیهوشی، آب اضافی از سطح بدن ماهی‌ها به‌وسیله حوله نرم خشک شد. سپس از قسمت پایین باله مخرجی خون‌گیری صورت گرفت. برای تهیه سرم به منظور اندازه‌گیری شاخص‌های کبدی، ۲ تا ۳ سی سی خون را به داخل ویال‌های بدون انعقاد ریخته و در داخل سانتریفیوژ، ٤۰۰۰ دور به‌مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد تا سرم خون تهیه شود. سپس سرم خون در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد در یخچال برای انتقال به آزمایشگاه قرار داده شد (گودارد و همکاران، ۲۰۰۳).

پارامترهای بیوشیمیایی با استفاده از دستگاه الایزا و دستگاه سیسمکس ساخت کشور ژاپن و کیت‌های مخصوص خریداری شده از شرکت من اندازه‌گیری شد. سطوح شاخص‌های بیلی روبین و گلوکز سرم خون با استفاده از کیت تجاری (پارس آزمون) مورد سنجش قرار گرفت. همچنین میزان پروتئین کل با استفاده روش Biuret، و با استفاده از کیت تجاری ELITech ساخت کشور فرانسه انجام گردید. برای انجام محاسبات، آنالیزهای آماری (آزمون تحلیل واریانس تک متغیره در سطح معنی‌داری ۵ درصد P<۰/۰۵) و ترسیم نمودارها از نرم‌افزارهای Excel 2003 و SPSS 20 استفاده شد.

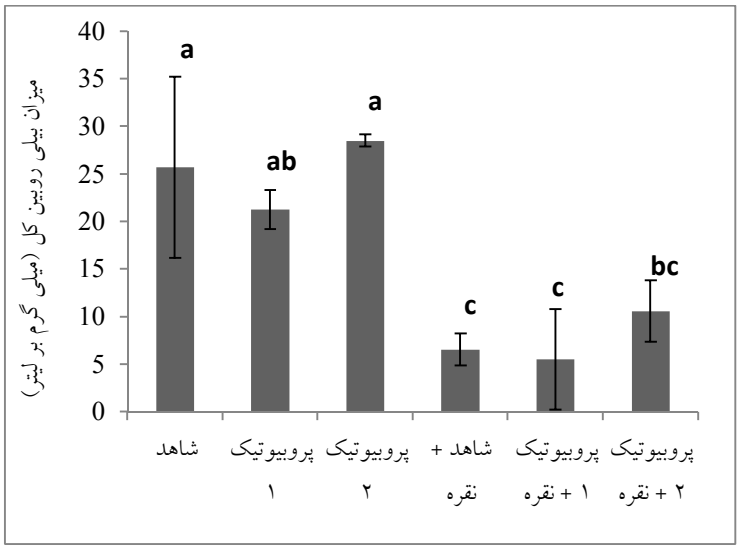
نتایج

آنالیز حاصل از داده‌های تحقیق نشان داد که در مجموع تیمارهای آزمایشی بر شاخص گلوکز خون تأثیر معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). نتایج نشان داد که پروبیوتیک به تنهایی اثر معنی‌داری بر شاخص گلوکز نداشت، اما نانونقره باعث کاهش مقدار شاخص گلوکز گردید. همچنین استفاده ترکیبی پروبیوتیک و نانونقره باعث افزایش مقدار شاخص گلوکز گردید (P<۰/۰۵) (شکل ۱).



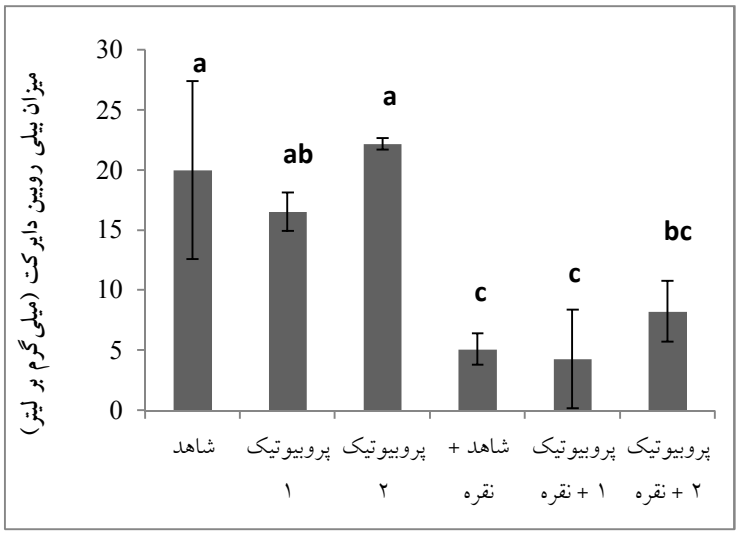
شکل ۱- میزان گلوکز سرم خون ماهی کپور معمولی در تیمارهای مختلف آزمایشی

بررسی تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نشان داد که در مجموع تیمارهای آزمایشی بر شاخص بیلی روبین خون تأثیر معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). پروبیوتیک به تنهایی اثر معنی‌داری بر مقدار شاخص بیلی روبین نداشت اما نانو نقره مقدار این شاخص را به شدت کاهش داد (P<۰/۰۵). همچنین استفاده ترکیبی پروبیوتیک و نانو نقره باعث افزایش ناچیز اثر کاهشی نانو نقره گردید (شکل ۲).



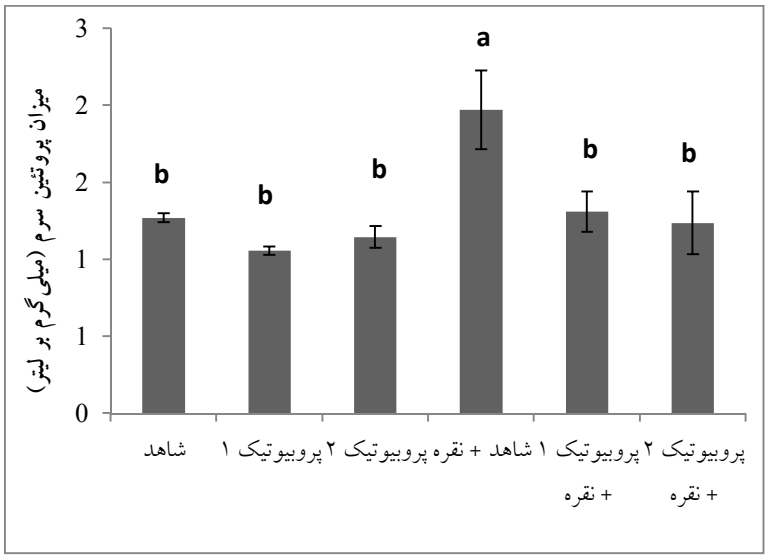
شکل ۲- میزان بیلی روبین سرم خون ماهی کپور معمولی در تیمارهای مختلف آزمایشی

تیمارهای آزمایشی اثر معنی‌داری بر شاخص بیلی روبین دایرکت خون داشت (P<۰/۰۵). پروبیوتیک به تنهایی اثر معنی‌داری بر مقدار شاخص بیلی روبین دایرکت نداشت، اما نانونقره مقدار این شاخص را به‌شدت کاهش داد (P<۰/۰۵). همچنین استفاده ترکیبی پروبیوتیک و نانونقره باعث افزایش ناچیز اثر کاهشی نانونقره گردید (شکل ۳).



شکل ۳- میزان بیلی روبین دایرکت کلسترول سرم خون ماهی کپور معمولی در تیمارهای مختلف آزمایشی

تیمارهای مختلف تحقیق بر شاخص بیلی روبین خون تأثیر معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). پروبیوتیک به مقدار اندک مقدار پروتئین را کاهش داده است، اما نانونقره مقدار این شاخص را به شدت افزایش داد. در حالی‌که استفاده ترکیبی پروبیوتیک و نانونقره کاهش و تعدیل شدن مقدار شاخص پروتئین شد (P<۰/۰۵) (شکل ٤).



شکل ٤- میزان پروتئین سرم خون ماهی کپور معمولی در تیمارهای مختلف آزمایشی

بحث

ویژگی‌های نانو ذرات مانند انحلال‌پذیری، تحرک بسیار زیاد در بدن انسان و توانایی نفوذ به غشا سلولی سبب شده مقیاس نانو بیش از مقیاس‌های دیگر مورد توجه قرار گیرد با توجه به خصوصیات منحصر به فرد فیزیکوشیمیایی نانوذرات ممکن است نوع سمیت آن‌ها با موادی که از نظر ساختمان شیمیایی با آن‌ها یکسان اما اندازه متفاوت دارند، فرق داشته باشد. حتی امکان دارد که نانو ذره‌ها سمیت بیشتری در مقایسه با ذرات بزرگتر ایجاد کنند نانوذرات اکسید فلزی می‌توانند وارد رگ‌ها و بافت‌های مغز شوند و از این طریق می‌توانند قابلیت دسترسی زیستی را افزایش دهند. این مسئله ممکن است منجر به تأثیرات سمی و پاسخ‌های التهابی در مغز و تخریب سیستم عصبی مرکزی شود (چانگ و همکاران، ۲۰۱۲).

سطح شاخص‌های بیوشیمیایی در ماهی شاخص خوبی از استرس شدید است و اطلاعاتی از اختلال عملکرد اندام‌ها را ارائه می‌دهد. سموم باعث اختلال در حالت فیزیولوژیکی ماهیان می‌شوند و روی سطح شاخص‌ها تأثیر می‌گذارند و موجب تخریب اندامک‌های سلولی میشوند، که ممکن است افزایش یا مهار در تولید شاخص‌ها را باعث شوند. سطح شاخص‌های بافت، به میزان آزاد شدن این شاخص‌ها از سلول‌های آسیب دیده، که به نوبه خود به میزان آسیبی که در حد آسیب‌های سلولی اتفاق افتاده است، وابسته می‌باشد (بنایی و همکاران، ۱۳۹۱). پارامترهای بیوشیمیایی می‌توانند اطلاعات قابل دسترسی را برای بررسی سلامتی و شرایط ماهی فراهم کنند.

امروزه با پیشرفت آنالیز فاکتورهای بیوشیمیایی سرم خون، درک بهتری از وضعیت فیزیولوژیک و سلامتی آبزیان به‌دست آمده است ولی برخلاف حیوانات خشکیزی، به‌دلیل متغیر بودن این پارامترها و تنوع بالای گونه‌های آبزیان، اثرات فیزیولوژیک فاکتورهای بیوشیمیایی خون در آبزیان چندان شناخته شده نمی‌باشد (کامپل، ۲۰۱٤). میزان پروتئین، شاخص‌های مهمی از وضعیت سلامت ماهیان استخوانی و نیز به‌عنوان شاخصی از وضعیت تغذیه‌ای در نظر گرفته می‌شود. همچنین گلوکز یکی از منابع انرژی مهم استفاده شده توسط ماهی است که برای مقابله با استرس فیزیولوژیکی استفاده می‌شنود و

بنابراین میزان گلوکز خون به‌عنوان شاخص پاسخ به استرس استفاده می‌شود (یوسفیان و همکاران، ۲۰۱۰).

نتایج حاضر نشان داد که پروبیوتیک به تنهایی اثر معنی‌داری بر شاخص گلوکز وبیلی روبین تام و دایرکت نداشت اما نانونقره باعث کاهش مقدار این شاخص‌ها گردید. همچنین استفاده ترکیبی پروبیوتیک و نانونقره باعث افزایش مقدار شاخص‌های ذکر شده گردید. که نشان‌دهنده کاهش اثرات استرسی ایجاد شده توسط نانو نقره می‌باشد. مطالعات محققین نشان داده است که گلوکز و بیلی روبین خون ماهیان دارای تفاوت‌های زیادی بین گونه‌های مختلف و حتی بین افراد یک گونه است (ناوارو و گوتیرز، ۱۹۹۵). مرشدی همکاران (۲۰۱۵) در بررسی پروبیوتیک بر ماهی سی باس آسیایی (*Lates calcarifer*) نشان داد که سطوح مختلف پروبیوتیک بر میزان گلوکز بی‌تأثیر بوده است. در مطالعه‌ای دیگر ولی‌پور و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که میزان کلسترول و گلوکز در بچه ماهیان سفید تغذیه شده باپروبیوتیک افزایش داشت. که با تحقیق حاضرمطابقت دارد چرا که در حالت استفاده ترکیبی از پروبیوتیک و نانونقره، پروبیوتیک از روند کاهشی شاخص گلوکز در معرض نانونقره جلوگیری کرده و حتی مقدار این شاخص را هم افزایش داده است. در بررسی مقدار شاخص پروتئین نتایج حاضر نشان داد که پروبیوتیک به مقدار اندک مقدار پروتئین را کاهش داده است. اما نانونقره مقدار این شاخص را به‌شدت افزایش داد. در حالی‌که استفاده ترکیبی از پروبیوتیک و نانونقره موجب کاهش و تعدیل مقدار پروتئین شد. برخی مطالعات پیشین نشان دادند که میزان پروتئین در ماهیان تغذیه شده باسطوح مختلف محرک‌های ایمنی از جمله پروبیوتیک در مقایسه با گروه شاهد بالاتر است (نایاک، ۲۰۱۰، میرسا، ۲۰۰۶، چودهاری، ۲۰۰۵). سینیواسام و همکاران (۲۰۱۲) و ولی‌پور و همکاران (۲۰۱۳) مشاهده کردند که میزان پروتیئن خون در تیمارهای تغذیه شده با پروبیوتیک افزایش یافت.

همچنین نتایج دیگر محققین از جمله برونت و همکاران (۲۰۰۷)، نواج و همکاران (۲۰۰۷)، پارتا و همکاران (۲۰۰۹) و فرزانفر و همکاران (۱۳۸۸) به‌دست آوردند که با تحقیق حاضر مطابقت ندارد. دلیل تفاوت در این نتایج می‌تواند به‌علت تفاوت در نوع گونه پرورشی، نوع پروبیوتیک مصرفی و میزان مورد استفاده آن در جیره باشد. بر اساس مطالعات محققین عوامل محیطی (فصل، شوری، درجه حرارت، تراکم)، عوامل فیزیولوژیکی (گونه ماهی، سن، جنس، وضعیت تغذیه‌ای)، زمان نمونه‌برداری، چگونگی تهیه نمونه، دقت و حساسیت روش‌های اندازه‌گیری می‌توانند برفعالیت پارامترهای بیوشیمیایی خون تأثیرگذار باشند و تفاوت در نتایج تحقیقات صورت گرفته را سبب شود (وردگرم، ۱۹۹۷).

نتایج به‌دست آمده از این مطالعه نشان داد که پروبیوتیک در روش خوراکی، ایمنی غیراختصاصی را در ماهی کپور معمولی تحریک نموده و قادر است باعث بهبود شاخص‌های بیوشیمیایی سرم گردد و اثرات تخریبی ناشی از نانو نقره بر بیوشیمیایی خون را نیز کاهش دهد.

منابع

1. Banaee, M., Sureda, A., Zohiery, F., Hagi, B.N., and Garanzini, D.S. 2014. Alterations in biochemical parameters of the freshwater fish, *Alburnus mossulensis*, exposed to sub-lethal concentrations of Fenpropathrin. International Journal of Aquatic Biology. 2(2): 58-68.
2. Blaise, C., Gagne, F., Ferard, J.F., and Eullaffroy, P. 2008. Ecotoxicity of selected nano-materials to aquatic organisms. *Environmental toxicology*, 23(5): 591-598
3. Brunt, B., and Austin, B. 2005. Use of a probiotic to control lactococcosis and streptococcosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Fish Diseases, 28: 693-701.
4. Campbell, T.W. 2004. Clinical chemistry of fish and amphibians. In: Thrall, M.A., Baker, D.C., Campbell T.W., DeNicola, D., Fettman, M.J., Lassen, E.D., Rebar, A., Weiser, G. (eds.). Veterinary Hematology and Clinical Chemistry. Lippincott Williams & Wilkins, Pennsylvania. Pp: 499-517.
5. Chang, Ya., Xia, L., Zhang, M., Zhang, J., Xing, G. 2012. The Toxic Effects and Mechanisms of CuO and ZnO Nanoparticles. Materials. 5(12): 2850-2871.
6. Chapman, P.M., Dexter, R.N., and Long, E.R. 1998. Synoptic measures of sediments contamination, toxicity and infaunal -community composition (the Sediment Quality Triad) in San Francisco Bay. Marine Ecological Progress Series, 37: 75-93.
7. Choudhury, D., Pal, A.K., Sahu, N.P., Kumar, S., Das, S.S., and Mukherjee, S.C. 2005. Dietary yeast RNA supplementation reduces mortality by *Aeromonas hydrophila* in rohu (*Labeo rohita* L.) juveniles. Fish and Shellfish Immunology, 19: 281–291.
8. Edsall, C.C. 1999. A blood chemistry profile for lake trout. Journal of Aquatic Animal Health. 11(1): 81-86.
9. Goddard, W.A., Brenner, D.W., Lyshevski, S.E., Iafrate, G.J. 2003. Handbook of nanoscience, engineering, and technology. Boca Raton: CRC.
10. Gong, P., Li, H., He, X., Wang, K., Hu, J., Tan, W., and Yang, X. 2007. Preparation and antibacterial activity of Fe_3O_4@ Ag nanoparticles. *Nanotechnology*, 18(28): 285604.
11. Khan, S.H., and Ansari, F.A. 2007. Probiotics the friendly bacteria with market potential in global market. Pakistan Journal of Pharmaceutical Scinces. 20 (1): 71-76.
12. Misra, C.K., Das, B.K., Mukherjee, S.C., and Pattnaik, P. 2006. Effect of multiple injections of b-glucan on non-specific immune response and disease resistance in *Labeo rohita* fingerlings. Fish and Shellfish Immunology 2: 305-319.
13. Morshedi, V., Nafisi Bahabadi, M., Azodi, M., Modaresi, M., and Cheraghi, S. 2015. Effects of dietary probiotic (*Lacrobacillus plantarum*) on body composition, serum biochemical parameters and liver enzymes of Asian sea bass (*Lates calcarifer*).
14. Navarro, I., Gutiérrez, J. 1995. Fasting and starvation. In: Hochachka P.W., Mommsen T. (Eds.) Biochemistry and Molecular Biology of Fishes. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, Pp: 393–434.
15. Nayak, S.K. 2010. Probiotics and immunity: a fish perspective. Fish and Shellfish Immunology, 29: 2-14.
16. 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). Applied Microbiology, 103: 1699- 1706.
17. Parma, M.J., Loteste, A., Campana, M., and Bacchetta, C. 2007. Changes of hematological parameters in Prochilodus lineatus (Pisces, Prochilodontidae) exposed to sublethal concentration of cypermethrin. Journal of Environmental Biology. 28(1): 49-147.
18. Partha, B., and Pradeep, B. 2009. Effect of a probiotic bacterium Bacillus

circulans PB7 in the formulated diets: on growth, nutritional quality and immunity of Catla catla (Ham.). Fish Physiol Biochem, 35: 467-478.

19. Seenivasam, C., Saravana, P., Radhakrishnan, S., and Muralisankar, T. 2012. Effects of probiotics on survival, growth and biochemical constituents of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* post larvae. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 12: 331-338.
20. Valipour, A.R., Hamedi, N., and Abdollahpour, H., 2013. The effect of probiotic (*Pedicococcus acidilactici*) supplementation on blood parameters of fingerlings kutum (*Rutilus kutum*). Aquaculture Europe. Journal of Marine Science and Technology, 14(2): 1-14. (Abstract in English)
21. Verdegem, M.C.J., Hilbrands, A.D., and Boon, J.H. 1997. Influence of salinity and dietary composition on blood parameter values of hybrid red tilapia (*Oreochromis niloticus* & *Oreochromis mossambicus*). Aquaculture Research 28: 453-459.
22. Yousefian, M., Sheikholeslami, M., Amiri, M., Hedayadifard, A.A., Dehpour, H., Fazli, M., Ghiaci, S.V., and Najafpour, S.H. 2010. Serum biochemical parameters of male and female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cultured in Haraz River, Iran. World Journal of Fish and Marine Sciences, 2: 512-518.