

بررسی حفاظتی تجویز *Lactobacillus fermentum* لاکتولوز و سین بیوتیک بر شاخص‌های هماتولوژیکی و بیوشیمیایی خرچنگ دراز آب شیرین (*Astacus leptodactylus*) در مواجهه با استرس ناشی از سرب

سید حسین سجادی^۱، سید محمد موسوی^{۱*}، امین غلامحسینی^۲، مهدی بنایی^۳ و بابک دوست‌شناس^۴

۱ گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، ایران

۲ گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، ایران

۳ گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی خاتم الانبیا بهبهان، ایران

۴ گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، ایران

تاریخ پذیرش:

تاریخ دریافت:

چکیده

این مطالعه اثرات محافظتی پروبیوتیک (*Lactobacillus fermentum*) با غلظت 10^7 سلول/کیلوگرم غذا، پری بیوتیک (لاکتولوز 10 میلی‌لیتر/کیلوگرم غذا) و سین بیوتیک بر شاخص‌های هماتولوژیکی و بیوشیمیایی خرچنگ دراز آب شیرین (*Astacus leptodactylus*) در مواجهه با سرب استات (0.1 میلی‌گرم بر لیتر) بررسی شد. بدین منظور، 240 قطعه خرچنگ (با توزیع برابر جنسیتی) در هشت گروه آزمایشی با سه تکرار (مجموعاً 24 آکواریوم) به صورت زیر تقسیم شدند: گروه کنترل (بدون مکمل)، سه گروه دریافت‌کننده پروبیوتیک، پری بیوتیک و سین بیوتیک (بدون سرب)، گروه مواجهه با سرب (بدون مکمل)، و سه گروه تیمار ترکیبی (پروبیوتیک، پری بیوتیک یا سین بیوتیک همراه با سرب). مدت زمان آزمایش 28 روز بود. سپس از همولف نمونه برداری و تغییرات بیوشیمیایی و هماتولوژی ارزیابی گردید. نتایج نشان داد که قرار گرفتن در معرض سرب سبب کاهش معنی‌دار تعداد هموسیت‌ها (هموسیت‌های کل، هیالونوسیت، گرانولار و نیمه‌گرانولار) گردید. در حالی که تجویز پروبیوتیک، پری بیوتیک و سین بیوتیک منجر به افزایش معنی‌دار تعداد هموسیت‌ها شد. مصرف پروبیوتیک، پری بیوتیک و سین بیوتیک در شرایط مواجهه با سرب، اثرات محافظتی قابل توجهی بر تعداد هموسیت‌ها، هیالونوسیت، گرانولار و نیمه‌گرانولار داشت و آن را نسبت به گروهی که در معرض سرب قرار داشت را افزایش داد. اگرچه قرار گرفتن در معرض سرب منوج افزایش معنی‌دار پروتئین کل، آلبومین، گلوکز، کلسترول و تری‌گلیسیرید گردید، تغذیه با هر سه مکمل پس از مواجهه با سرب، سطوح پروتئین کل، آلبومین، گلوکز و تری‌گلیسیرید را به محدوده نرمال بازگرداند؛ همچنین لاکتولوز و سین بیوتیک اثر سمی سرب بر کلسترول را کاهش دادند، اما پروبیوتیک نتوانست کلسترول را به حد نرمال بازگرداند. این مطالعه نشان می‌دهد که تغذیه با سین بیوتیک می‌تواند به عنوان یک راهکار مؤثر برای تعدیل اثرات سمی فلزات سنگین و حفظ سلامت ایمنی در خرچنگ‌های پرورشی مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: خرچنگ دراز آب شیرین، *Lactobacillus fermentum*، لاکتولوز، سین بیوتیک، سرب استات، هموسیت، ایمنی بی‌مهرگان

مقدمه

خرچنگ دراز آب شیرین (*Astacus leptodactylus*) یکی از گونه‌های مهم اقتصادی و اکولوژیکی در آبی‌پروری اروپا و غرب آسیا محسوب می‌شود. این گونه یکی شناخته‌شده‌ترین گونه‌های سخت‌پوستان آب شیرین است که در رودخانه‌ها،

* نویسنده مسئول: سید محمد موسوی، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، ایران

E-mail: seied1356@yahoo.com



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

دریاچه‌ها و حوضچه‌های مناطق مختلف اروپا و آسیا، از جمله ایران، یافت می‌شود. این گونه از نظر اقتصادی برای ماهی‌گیران محلی اهمیت زیادی دارد و پتانسیل بالایی برای پرورش در محیط‌های طبیعی و مصنوعی نشان می‌دهد (Banaee et al, 2019). از نظر اکولوژیکی، خرچنگ‌ها نقش حیاتی در شبکه غذایی آبی ایفا می‌کنند. با این حال، عواملی مانند تغییرات اقلیمی، خشکسالی، تخریب زیستگاه، آلودگی آب، ماهی‌گیری بی‌رویه و رقابت با گونه‌های مهاجم، خطرات جدی برای جمعیت *A. leptodactylus* ایجاد کرده و می‌تواند منجر به انقراض آن شوند. مانند سایر جانوران آبی، خرچنگ دراز آب شیرین (*A. leptodactylus*) نسبت به آلاینده‌های محیطی از جمله فلزات سنگین، آفت‌کش‌ها و داروها حساس است. به دلیل اهمیت اقتصادی و اکولوژیکی و سازگاری با شرایط آزمایشگاهی، *A. leptodactylus* به طور مکرر به عنوان گونه مدل در مطالعات سم‌شناسی محیطی استفاده می‌شود (Zeydi et al, 2023; Gholamhosseini et al, 2023; Banaee et al, 2025; Banaee et al, 2020).

نشت فاضلاب‌های صنعتی، کشاورزی و شهری به آب‌های سطحی از جمله دریاچه‌ها و آب‌بند‌های طبیعی سبب شده که سطح آلودگی این زیستگاه‌ها به انواع آلاینده‌های محیطی از جمله فلزات سنگین شده است. لذا در سال‌های اخیر، آلودگی اکوسیستم‌های آبی به سرب (Pb) به یکی از مهم‌ترین دغدغه‌های زیست‌محیطی بدل شده که می‌تواند سلامت اکوسیستم‌های آبی، جانوران آبی، سایر گونه‌های جانوری و حتی انسان‌ها را تهدید کند (Duan et al, 2012; Dai et al, 2024; Capparelli et al, 2021).

سرب برای سخت‌پوستان بسیار سمی است. مطالعات نشان داده‌اند که قرارگیری در معرض سرب می‌تواند میزان مرگ و میر این جانوران را به طور معنی‌داری افزایش دهد. سمیت سرب بسته به گونه، مرحله رشد و مدت زمان قرارگیری در معرض آن متفاوت است (Li et al, 2023). سرب می‌تواند با اختلال در فرآیندهای متابولیکی، باعث کاهش نرخ رشد و ایجاد ناهنجاری‌های رشدی در خرچنگ دراز آب شیرین (*A. leptodactylus*) شود. همچنین، قرارگیری در معرض سرب می‌تواند عملکرد تولیدمثلی سخت‌پوستان را تحت تأثیر قرار داده و منجر به کاهش نرخ باروری و بقای لاروها شود. بنابراین، سرب می‌تواند در بلندمدت بر پویایی جمعیت این جانوران تأثیر بگذارد (Zarnescu et al, 2017).

تغییرات رفتاری در سخت‌پوستان پس از قرارگیری در معرض سرب می‌تواند منجر به کاهش فعالیت تغذیه، تغییر در رفتار شنا و اختلال در پاسخ‌های فرار و اجتناب از شکارچیان شود. این تغییرات می‌تواند توانایی آن‌ها برای بقا و رشد در زیستگاه‌های طبیعی را تحت تأثیر قرار دهد. سرکوب سیستم ایمنی، تغییر در پارامترهای بیوشیمیایی همولنف، آسیب ناشی از استرس اکسیداتیو، اختلال در عملکردهای فیزیولوژیک و افزایش حساسیت به بیماری‌ها در سخت‌پوستان قرارگرفته در معرض سرب گزارش شده است. مهار آنزیم‌های مختلف دخیل در فرآیندهای متابولیک ضروری توسط سرب می‌تواند عملکردهای فیزیولوژیک طبیعی مانند تنفس، هضم و تولید انرژی در سخت‌پوستان را تحت تأثیر قرار دهد (Li et al, 2023).

علاوه بر این، سرب می‌تواند جایگزین کلسیم در سیستم‌های بیولوژیکی شده و فرآیندهای وابسته به سیگنالینگ و هومئوستازی کلسیم را مختل کند (Zhang et al, 2025). بنابراین، قرارگیری سخت‌پوستان در معرض سرب می‌تواند منجر به اختلالات پوست‌اندازی شود. کاهش جمعیت گونه‌های حساس در معرض سرب می‌تواند به برهم خوردن تعادل و توازن در اکوسیستم آبی منجر شده و در نتیجه بر شبکه غذایی و تنوع زیستی کلی تأثیر بگذارد. تجمع زیستی سرب در بافت‌های مختلف سخت‌پوستان می‌تواند به انتقال این آلاینده از طریق شبکه غذایی و افزایش بزرگنمایی زیستی در شکارچیان، از جمله انسان‌هایی که از جانوران آلوده تغذیه می‌کنند، کمک کند (Zhang et al, 2023).

یکی از رویکردهای مقابله با سمیت آلاینده‌های محیطی در جانوران آبی شامل بهبود کیفیت آب، تقویت سیستم‌های سم‌زدایی، افزایش دفاع‌های آنتی‌اکسیدانی و کاهش زیست‌دسترسی آلاینده‌ها در سیستم گوارش است (Banaee et al, 2023).

بنابراین، تجویز مکمل‌های غذایی از جمله پروبیوتیک‌ها، پری‌بیوتیک‌ها و سین‌بیوتیک‌ها (ترکیبی از پروبیوتیک و پری‌بیوتیک) می‌تواند به عنوان یک راهبرد امیدوارکننده مطرح شود (Banaee et al, 2022). پروبیوتیک‌ها می‌توانند با حفظ میکروبیوتای سالم روده، زیست‌دسترسی سرب را کاهش داده و جذب مواد مغذی و سلامت کلی را بهبود بخشند و به این ترتیب به جانداران کمک کنند تا در برابر استرس سمی مقاومت بهتری داشته باشند. بهبود کارایی سیستم ایمنی، تقویت سیستم‌های سم‌زدایی، تقویت دفاع‌های آنتی‌اکسیدانی سلولی و افزایش تحمل به سمیت سرب از جمله مزایای بالقوه مکمل‌سازی با پروبیوتیک است. پری‌بیوتیک‌ها مانند اینولین، فروکتو-الیگوساکاریدها (FOS) و لاکتولوز به صورت انتخابی رشد باکتری‌های مفید روده را تحریک می‌کنند که می‌توانند جذب سرب در سیستم گوارش را کاهش دهند. علاوه بر این، پری‌بیوتیک‌ها می‌توانند یکپارچگی سد روده‌ای را تقویت کرده و از انتقال سرب از روده به همولنف پیش‌گیری کنند (Bhowmik et al, 2025; Dai et al, 2023). بنابراین، ترکیب پروبیوتیک و پری‌بیوتیک (سین‌بیوتیک) می‌تواند به صورت هم‌افزایی اثربخشی آن‌ها را در کاهش زیست‌دسترسی سرب، افزایش ظرفیت سم‌زدایی و کاهش آسیب‌های ناشی از سمیت سرب بهبود بخشد.

لذا پیش‌فرض این مطالعه این است که تجویز پروبیوتیک، پری‌بیوتیک و همچنین سین‌بیوتیک به خرچنگ‌های در معرض سرب می‌تواند از تأثیر سمیت سرب بر هموسیت‌ها بکاهد. سیستم ایمنی این جانوران کاملاً ذاتی است و هموسیت‌ها نقش محوری در دفاع علیه پاتوژن‌ها و عوامل استرس‌زا دارند. لذا حفظ پایداری و ثبات هموسیت‌ها در این جانوران نقش مهمی در حفظ بقای این جانوران در شرایط نامساعد محیطی دارد. از این رو، هدف این مطالعه ارزیابی اثربخشی تجویز *L. fermentum* و لاکتولوز به صورت جداگانه و ترکیبی به عنوان سین‌بیوتیک در کاهش اثرات سمی سرب در خرچنگ دراز آب شیرین بود. یافته‌های این مطالعه از اهمیت بالایی برخوردارند، زیرا بینشی در مورد پتانسیل مکمل‌های پروبیوتیک، پری‌بیوتیک و سین‌بیوتیک در کاهش زیست‌دسترسی و سمیت سرب در خرچنگ دراز آب شیرین (*A. leptodactylus*) ارائه می‌دهند.

مواد و روش‌ها

خرچنگ‌ها

خرچنگ‌های دراز آب شیرین (*Astacus leptodactylus*) با استفاده از تور فایک نت از دریاچه هفت‌برم استان فارس صید و با جعبه پلی‌استایرن به آزمایشگاه منتقل شدند. خرچنگ‌های جمع‌آوری شده در مخازن ۲۰ لیتری تحت شرایط هوادهی (هواده شارژی) منتقل گردید. نمونه‌ها به مدت ۲ هفته آداپته گردید، سپس از بین ۲۴۰ نمونه جمع‌آوری شده و پس از حذف نمونه‌های خیلی ریز یا درشت ۲۸۸ قطعه خرچنگ با وزن 37 ± 10.2 گرم و طول کل 2.1 ± 14.6 سانتی‌متر به ۸ گروه در سه تکرار تقسیم شدند. نمونه‌ها در ۲۴ آکواریوم شیشه‌ای (هر کدام شامل ۱۲ قطعه) توزیع شدند. آزمایشگاه در شرایط کنترل‌شده (pH 7.4 ± 0.2 ، دمای ۱۸-۲۲ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول بیش از ۶ میلی‌گرم بر لیتر) تنظیم شد. پارامترهای آب با دستگاه‌های قابل حمل کالیبره‌شده اندازه‌گیری و پس از تثبیت خوانش‌ها ثبت شدند (Banaee et al., 2019; Banaee et al., 2020; Gholamhosseini et al., 2023; Zeidi et al., 2023). کلیه مراحل اجرایی پژوهش بر اساس اصول اخلاقی و مطابق با مجوز کمیته اخلاق دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، ایران (IR.KMSU.REC.1402.009) انجام شد.

پروبیوتیک و پری‌بیوتیک

باکتری *Lactobacillus fermentum* (PTCC:1744) به عنوان پروبیوتیک از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران به صورت لیوفیلیزه خریداری شد. باکتری در محیط کشت MRS در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در شرایط هوازی کشت داده شد. لاکتولوز از شرکت شرکت بهستان دارو تهیه شد.

آماده‌سازی جیره غذایی

جیره‌ای حاوی پروتئین خام (۳۵٪)، چربی خام (۱۲٪)، فیبر خام (۷٪) و خاکستر (۱۴٪) فرموله شد تا نیازهای تغذیه‌ای خرچنگ را تأمین کند. برای افزودن *L. fermentum* به عنوان پروبیوتیک در جیره خرچنگ، باکتری‌های فریزدرای شده در محیط MRS هیدراته و به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شرایط هوایی کشت داده شدند تا به غلظت 10^8 CFU/mL برسند. پس از کشت با سانتریفیوژ باکتری‌ها رسوب و سپس شسته و در PBS (pH 7.2) سوسپانسیون شد و با غلظت 10^8 CFU/g به جیره اضافه گردید. سوسپانسیون پروبیوتیک به صورت یکنواخت روی جیره نیمه‌مرطوب اسپری یا هم زده شد و به صورت هفتگی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در ظرف دربسته نگهداری شد. شمارش کلنی‌ها طی دوره نگهداری، زنده‌مانی باکتری را در سطح 10^7 CFU/g تأیید کرد. برای افزودن لاکتولوز به عنوان پری‌بیوتیک در جیره ماهی، محلولی با حل کردن ۱۰ سی سی لاکتولوز در هر کیلوگرم خوراک استفاده شد و به منظور راحت و یکنواخت پخش شدن در سطح خوراک ابتدا در آب مقطر رقیق شد و سپس مقدار مورد نظر به تدریج به جیره ماهی اضافه و با هم زدن یا اسپری کردن محلول روی پلت‌ها، توزیع یکنواخت آن تضمین شد. برای افزودن ترکیب سین‌بیوتیکی لاکتولوز و *Lactobacillus fermentum* فریزدرای شده به جیره خرچنگ، هر دو ماده (محلول لاکتولوز و *L. fermentum* هیدراته شده) به جیره اضافه و با هم زدن یا اسپری کردن به صورت یکنواخت توزیع شدند. در صورت مرطوب شدن بیش از حد جیره، آن را در زیر هود استریل یا در دمای کمتر از ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک کردند. جیره سین‌بیوتیک به صورت هفتگی آماده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در ظرف دربسته نگهداری شد (Valipour et al., 2019).

طرح آزمایش

در این مطالعه، ۲۸۸ عدد خرچنگ دراز آب شیرین از هر دو جنس به تعداد برابر در هشت گروه آزمایشی با سه تکرار در ۲۴ آکواریوم توزیع شدند. گروه‌های آزمایشی شامل، گروه کنترل (I) با جیره استاندارد بدون مکمل تغذیه شد. گروه پروبیوتیک (II) با غذای حاوی *Lactobacillus fermentum* 10^7 سلول در هر کیلوگرم غذا تغذیه شد. گروه پری‌بیوتیک (III) با غذای حاوی ۱۰ سی سی لاکتولوز در هر کیلوگرم غذا تغذیه شد. گروه سین‌بیوتیک (IV) با غذای حاوی هر دو مکمل (*L. fermentum* 10^7 سلول و ۱۰ سی سی لاکتولوز) تغذیه شد. گروه مواجهه (V) با جیره استاندارد و بدون مکمل و در معرض ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر استات سرب $Pb(C_2H_3O_2)_2$ قرار گرفت. گروه VI با غذای حاوی *L. fermentum* و در معرض سرب، گروه VII با غذای حاوی لاکتولوز و در معرض سرب و گروه VIII با غذای سین‌بیوتیک و در معرض سرب قرار گرفتند. روزانه حدود ۸۰ درصد آب آکواریوم‌ها تعویض می‌شد. پس از گذشت ۲۸ روز از شروع آزمایش، خرچنگ‌ها از هر تیمار صید و بر روی یخ قرار داده شدند تا از طریق هیپوترمی بی‌حس و بی‌تحرک شوند. نمونه‌برداری از همولف با استفاده از سرنگ استریل (۲/۵ میلی‌لیتر) معمولاً از سینوس همولفی بین پای سوم و چهارم یا سینوس پری کاردیال در زیر سفالوتوراکس انجام شد. پس از نمونه‌برداری، همولف در میکروتیوب برچسب‌دار (حاوی و فاقد ماده ضد انعقاد) انتقال یافته و روی یخ یا در یخچال نگهداری شد. بخشی از همولف برای مطالعات هماتولوژی مورد استفاده قرار گرفت و بخش عمده‌ای آن، با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴°C سانتریفیوژ شد تا ذرات و سلول‌های جامد از آن جدا شوند. پس از این مرحله، خرچنگ‌ها به مخزن بازیابی منتقل شدند تا به طور کامل به هوش آیند (Gholamhosseini et al., 2023).

تهیه اسلاید هماتولوژی و شمارش هموسیت‌ها

در روش تهیه اسلاید از هموسیت‌های خرچنگ دراز آب شیرین، ابتدا قطره‌ای کوچک (حدود ۵ تا ۱۰ میکرولیتر) از همولف ضد انعقاد شده (محلول ضد انعقاد استاندارد آلزور (Alsevers Solution) برای همولف ده‌پاها مانند *A. leptodactylus* حاوی گلوکز (۱۲۰ میلی‌مولار)، تریس‌هیدروکلراید (۳۰ میلی‌مولار)، سدیم کلرید (۲۶ میلی‌مولار)، سدیم سیترات (۱۰ میلی‌مولار) و اُدا (۲ میلی‌مولار) با pH نهایی ۷/۴-۷/۵ بوده و به نسبت ۱:۱ با همولف مخلوط می‌شود) بر روی یک سر لام قرار داده

می‌شود. سپس با استفاده از یک لام دیگر به‌عنوان گسترش شعله شمعی تهیه گردید. برای این منظور، لام اسپردر با زاویه‌ای بین ۳۰ تا ۴۵ درجه بر روی قطره همولنف قرار داده شد و به‌آرامی و به‌صورت یکنواخت به جلو کشیده شد تا لایه‌ای نازک از سلول‌ها ایجاد شود. پس از آن، اسلاید در هوای آزاد و در محیطی عاری از گرد و غبار خشک گردید.

اسلاید خشک‌شده سپس با متانول خالص به مدت ۵ دقیقه فیکس گردید. در ادامه، رنگ گیمسا بر روی اسلاید ریخته شده و نمونه به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شد. پس از پایان زمان رنگ‌آمیزی، اسلاید خشک شده و جهت بررسی زیر میکروسکوپ نوری با عدسی ۴۰x یا ۱۰۰x روغنی قرار داده شد.

براساس شکل و اندازه، شناسایی و شمارش (درصد) تفریقی انواع هموسیت‌ها انجام شد. هموسیت‌های خرچنگ‌های آب شیرین به سه دسته اصلی شامل هیالینوسیت‌ها، نیمه گرانولوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها تقسیم‌بندی می‌شوند. برای شمارش هموسیت‌های تام، از لام هموسایتومتر یا نئوبار جهت تعیین تعداد کل هموسیت‌ها در واحد حجم (سلول بر میکرولیتر) استفاده شد (Giulianini et al., 2007; Li et al., 2018).

با ضرب درصد هموسیت‌های محاسبه شده از شمارش تفریقی در تعداد کل حاصله از لام نئوبار، تعداد هر هموسیت بدست آمد.

سنجش پارامترهای بیوشیمیایی در همولنف غلظت پارامترهای بیوشیمیایی شامل پروتئین کل (با روش بیوره در ۵۴۶ نانومتر)، آلبومین (با روش بروم کروزل گرین در ۶۳۰ نانومتر)، گلوکز (با روش گلوکز اکسیداز-پراکسیداز در ۵۰۵ نانومتر)، کلسترول (با روش کلسترول اکسیداز-پراکسیداز در ۵۰۵ نانومتر) و تری‌گلیسیرید (با روش گلیسرول-فسفات اکسیداز در ۵۰۵ نانومتر) با استفاده از کیت‌های بیوشیمیایی شرکت Biorex-Fars (شیراز، ایران) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده و با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتری UV/Visible اندازه‌گیری شد. مقادیر جذب خوانده‌شده با منحنی‌های کالیبراسیون مقایسه شد و غلظت هر یک از آنالیت‌ها محاسبه گردید. به‌طور خاص، غلظت‌های پروتئین کل و آلبومین بر حسب گرم در دسی لیتر (g/dL) و غلظت‌های کلسترول، تری‌گلیسیرید و گلوکز بر حسب میلی‌گرم در دسی لیتر (mg/dL) بیان شدند (Banace et al., 2020).

تجزیه و تحلیل آماری

پس از بررسی نرمال بودن داده‌ها، داده‌ها با نرم‌افزار گراف‌پد پریسم (نسخه ۸) تجزیه و تحلیل و نمودارها رسم گردید. از آزمون ANOVA یکطرفه و آزمون تعقیبی توکی برای مقایسه میانگین‌ها استفاده شد (سطح معنی‌داری ۵ درصد).

نتایج

کمترین تعداد کل هموسیت‌ها، هیالونوسیت‌ها، سلول‌های گرانولار و نیمه گرانولار در گروه خرچنگ‌های در معرض سرب مشاهده شد، در حالی که بیشترین مقدار در خرچنگ‌های تغذیه سین‌بیوتیک گزارش شد. نتایج نشان داد که در شرایطی که خرچنگ‌ها در معرض سرب قرار داشتند، مصرف پروبیوتیک، پری‌بیوتیک و سین‌بیوتیک (گروه‌های VI, VII, VIII) نسبت به گروهی که تنها در معرض سرب قرار گرفت، اثرات محافظتی داشته و تعداد هموسیت را افزایش داده است (شکل ۱).

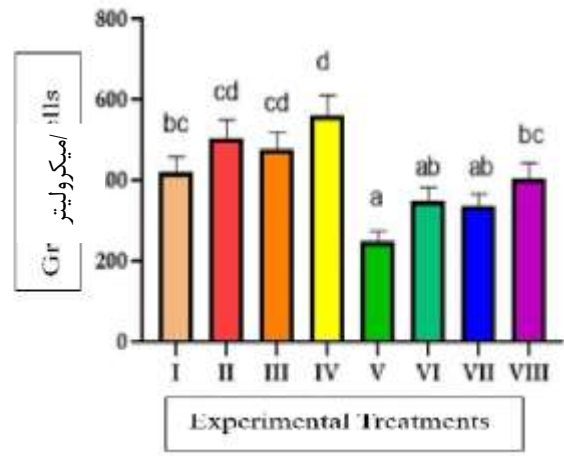
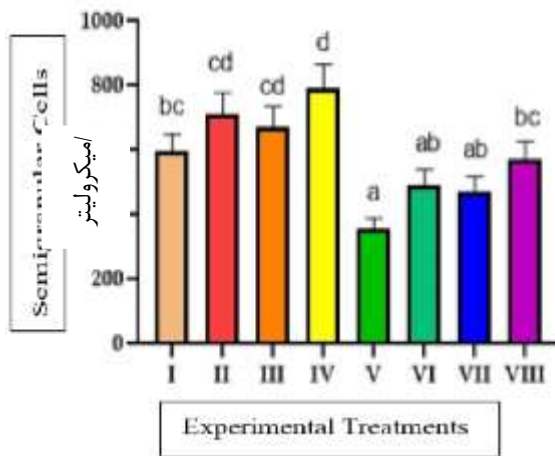
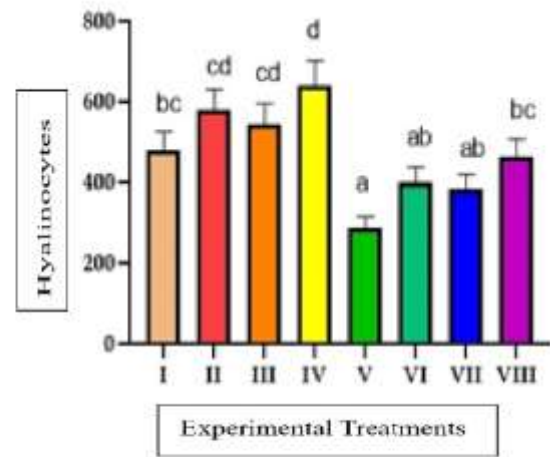
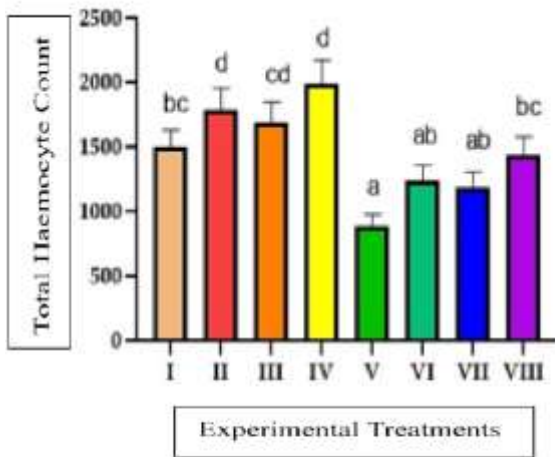


Figure 1: Shows the changes in blood cells, including total hemocyte count, hyalinocytes, semi-granulocytes, and granulocytes, in the hemolymph of the freshwater crayfish. Different letters indicate statistically significant differences between groups ($p < 0.05$).

(Group I (control, standard diet); **Group II** (probiotic, 10^7 CFU/kg *L. fermentum*); **Group III** (prebiotic, 10 cc/kg lactulose); **Group IV** (synbiotic); **Groups V–VIII** (exposed to 0.1 mg/L lead (Pb), and fed with standard, probiotic, prebiotic, and synbiotic diets, respectively).

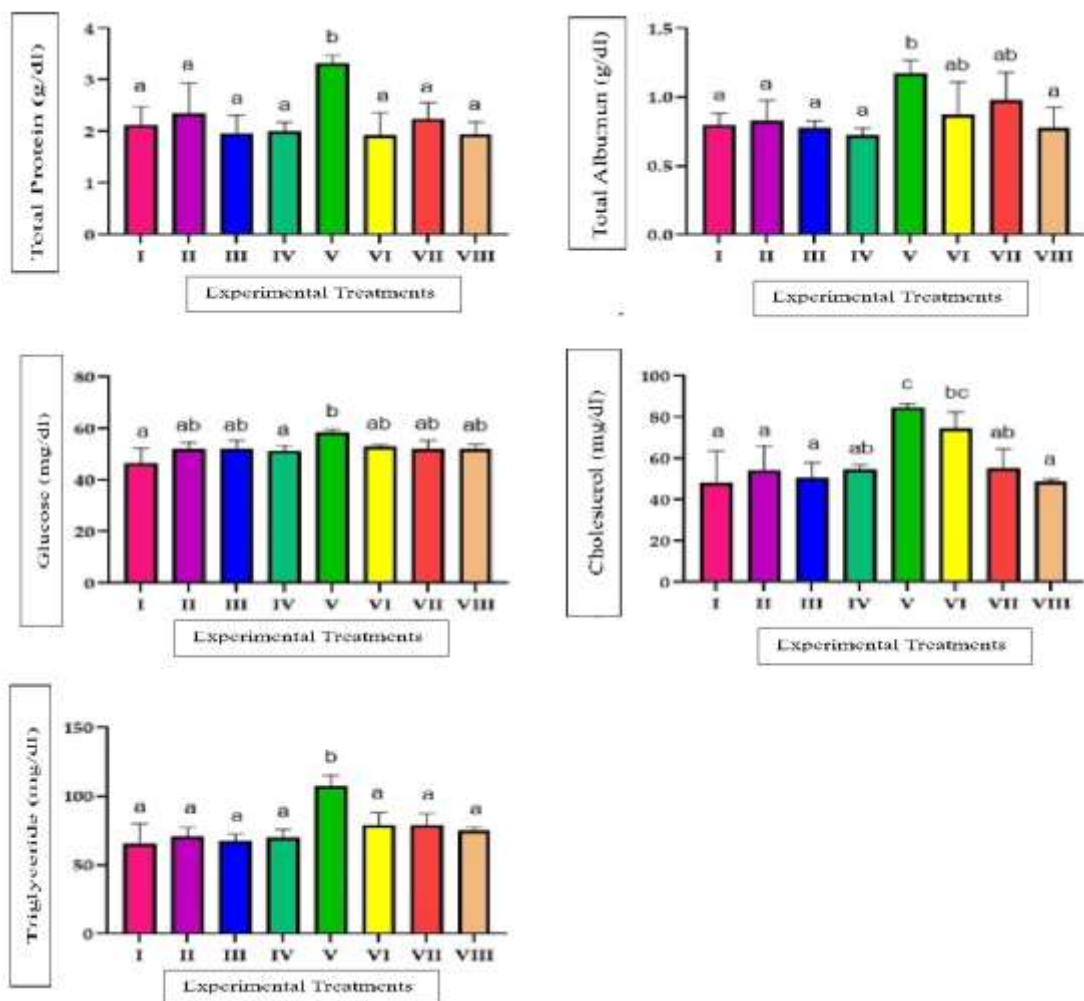


Figure 2: Shows the changes in biochemical parameters, including total protein, albumin, glucose, cholesterol, and triglyceride levels in the hemolymph of the freshwater crayfish. Different letters indicate statistically significant differences between groups ($p < 0.05$).

(Group I (control, standard diet); **Group II** (probiotic, 10^7 CFU/kg *L. fermentum*); **Group III** (prebiotic, 10 cc/kg lactulose); **Group IV** (synbiotic); **Groups V–VIII** (exposed to 0.1 mg/L lead (Pb), and fed with standard, probiotic, prebiotic, and synbiotic diets, respectively).

تغییرات پارامترهای بیوشیمیایی شامل سطوح پروتئین کل، آلبومین، گلوکز، کلسترول و تری گلیسیرید در شکل ۲ نشان داده شده است. یافته‌ها نشان داد که مصرف مکمل‌های *L. fermentum*، لاکتولوز و سین‌بیوتیک تأثیر معنی‌داری بر سطوح پروتئین کل، آلبومین، گلوکز، کلسترول و تری گلیسیرید در همولف خرچنگ‌های آب شیرین نداشت ($p > 0.05$). با این حال، قرارگیری در معرض سرب (Pb) منجر به افزایش معنی‌دار تمامی پارامترهای بیوشیمیایی ذکرشده در خرچنگ‌های آب شیرین شد ($p < 0.05$). علاوه بر این، نتایج نشان داد که سطوح پروتئین کل، آلبومین، گلوکز و تری گلیسیرید در همولف خرچنگ در معرض سرب پس از تغذیه با مکمل‌های *L. fermentum*، لاکتولوز و سین‌بیوتیک به محدوده نرمال بازگشت. همچنین، مصرف مکمل‌های لاکتولوز و سین‌بیوتیک توانست اثرات سمی سرب را بر سطح کلسترول در همولف خرچنگ‌های آب شیرین کاهش دهد. با

این حال، سطح کلسترول در همولنف خرچنگ‌های که با مکمل پروبیوتیک تغذیه شده و در معرض سرب قرار گرفته بودند، به محدوده نرمال بازنگشت (شکل ۲).

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که مواجهه با غلظت زیرکشنده سرب به‌طور معنی‌داری سبب سرکوب سیستم ایمنی خرچنگ‌ها گردید. کاهش معنی‌دار هموسیت‌های کل و به‌ویژه هیالینوسیت‌ها که نسبت به استرس‌های محیطی به شدت حساس می‌باشند ممکن است ناشی از آسیب به بافت‌های خون‌ساز و هپاتوپانکراس خرچنگ‌ها است.

نتایج نشان داد که مصرف جداگانه *L. fermentum* (پروبیوتیک) و لاکتولوز (پری‌بیوتیک) توانست اثرات منفی سرب را تا حدی تعدیل کند. مکانیسم‌های مؤثر در این حفاظت ممکن است به دلیل کاهش جذب سرب در روده از طریق اتصال یون‌های سرب به دیواره سلولی باکتری‌های پروبیوتیک، تقویت میکروبیوتای روده و کاهش پاسخ التهابی توسط پری‌بیوتیک، و افزایش احتمالی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی باشد که مجموعاً منجر به تنظیم و بهبود پارامترهای هماتولوژیک در خرچنگ‌های در معرض سرب گردید (Madreseh et al, 2019). نتایج نشان می‌دهد که تجویز سین‌بیوتیک به خرچنگ‌ها توانست شاخص‌های هماتولوژیک را حتی در حضور سرب به سطح نرمال نزدیک کند. این امر نشان‌دهنده اثر هم‌افزایی بین پروبیوتیک و پری‌بیوتیک است؛ لاکتولوز به‌عنوان منبع کربن، بقای و فعالیت *L. fermentum* را افزایش می‌دهد و این باکتری نیز با تولید اسیدهای آلی و باکتریوسین‌ها، محیط را برای رشد سایر میکروب‌های مفید بهینه می‌کند (Hernández-Hernández et al, 2011). همچنین، حفظ نسبت طبیعی زیرگروه‌های هموسیتی در گروه VIII نشان‌دهنده حفظ تعادل ایمنی و جلوگیری از اختلال عملکردی سلول‌هاست. این یافته برای صنعت آبی‌پروری بسیار حائز اهمیت است، زیرا نشان می‌دهد که حتی در مناطق آلوده، با تغذیه هوشمند می‌توان سلامت جمعیت‌های پرورشی را حفظ کرد.

تغییرات سطوح پروتئین کل، آلبومین، گلوکز، کلسترول و تری‌گلیسیرید در همولنف خرچنگ دراز آب شیرین، نشان‌دهنده تنش سیستمیک و اختلال متابولیک ناشی از سمیت سرب (Pb) بود. سرب از طریق القای استرس اکسیداتیو، مهار آنزیم‌های کلیدی متابولیسم، آسیب به هپاتوپانکراس و اختلال در ترشح هورمون‌های تنظیم‌کننده متابولیسم باعث کاهش سنتز پروتئین و آلبومین، هایپرگلیسمی تنش‌زده و اختلال در متابولیسم لیپید می‌شود. این مطالعه نشان داد که اگرچه تجویز مکمل‌های *L. fermentum* لاکتولوز و سین‌بیوتیک در شرایط عادی تأثیری بر این پارامترهای بیوشیمیایی نداشت. اما، تغذیه خرچنگ در معرض سرب، با این مکمل‌ها به‌طور مؤثری سطوح پروتئین کل، آلبومین، گلوکز و تری‌گلیسیرید را در همولنف به مقادیر نرمال بازگرداند.

نتایج نشان داد که سطح کلسترول در همولنف خرچنگ دراز آب شیرین پس از قرارگیری در معرض سرب افزایش یافت که احتمالاً ناشی از اختلال در متابولیسم چربی به دلیل استرس اکسیداتیو و اختلال متابولیک ناشی از سرب است. مطالعه حاضر نشان داد که تجویز مکمل‌های لاکتولوز و سین‌بیوتیک به‌طور مؤثری افزایش کلسترول ناشی از مواجهه با سرب را کاهش داد. این مکمل‌ها به احتمال زیاد سلامت روده را بهبود بخشیده، جذب مواد مغذی را افزایش داده و در مسیرهای سم‌زدایی کمک کرده و در نتیجه به تنظیم متابولیسم کلسترول کمک می‌کنند. در مقابل، مکمل‌های پروبیوتیکی توانایی نرمال‌سازی سطح کلسترول در خرچنگ در معرض سرب را نداشتند. این یافته نشان می‌دهد که هرچند *L. fermentum* ممکن است سلامت عمومی روده و عملکرد متابولیک را پشتیبانی کند، اما ممکن است فاقد مکانیسم‌های خاصی برای مقابله با اثر مستقیم سرب بر تنظیم کلسترول باشد.

یافته‌ها همچنین نشان داد که *L. fermentum* می‌تواند در روده خرچنگ دراز آب شیرین کلونی‌زده شده، جمعیت باکتری‌های مفید را افزایش داده و میکروب‌های مضر را کاهش دهد. علاوه بر این، لاکتولوز می‌تواند به عنوان یک زیرلایه برای باکتری‌های

مفید عمل کرده و رشد آن‌ها را تحریک کند و در نتیجه ثبات میکروبیوتای روده را در شرایط استرسی بهبود بخشد (Alvanou et al., 2023; Dai et al., 2023; Duan et al., 2023; Liu et al., 2020; Valipour et al., 2019; Wang et al., 2024). رو، بهبود یکپارچگی سد روده‌ای می‌تواند از جذب سرب به داخل همولنف جلوگیری کند. دیواره سلولی باکتری‌های پروبیوتیک حاوی پلی‌ساکاریدها و پپتیدوگلیکان‌هایی با گروه‌های عاملی (-NH_2 ، -OH ، -COOH) است که یون‌های Pb^{2+} را از طریق جذب سطحی و تشکیل کمپلکس‌های نامحلول در روده به دام انداخته و جذب روده‌ای آن را تا ۴۰-۶۰٪ کاهش می‌دهد. علاوه بر این، برخی سویه‌های *L. fermentum* آنزیم‌هایی مانند سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و گلوکاتایون ردوکتاز را ترشح کرده و گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) را خنثی می‌کنند که این امر از آسیب اکسیداتیو به پروتئین‌ها (کاهش کربونیل‌اسیون پروتئین) و لیپیدها (کاهش پراکسیداسیون لیپید) جلوگیری می‌کند. از این رو، کاهش بار سمی سرب، سنتز پروتئین‌های حیاتی (از جمله آلبومین مانند پروتئین‌های انتقال) در هیپاتوپانکراس بهبود یافته و سطح پروتئین کل همولنف افزایش می‌یابد. همچنین، پروبیوتیک‌ها می‌توانند فلزات سنگینی مانند سرب را در روده به دام انداخته، زیست‌فراهمی آن‌ها را کاهش داده و دفع آن‌ها را تسهیل کنند (Abdel-Megeed, 2021). علاوه بر این، لاکتولوز به‌عنوان منبع کربن انتخابی برای باکتری‌های مفید روده، متابولیزه شده و بوتیرات، پروپیونات و استات تولید می‌کند. بوتیرات نه تنها به‌عنوان منبع کربن انتخابی برای باکتری‌های مفید روده، متابولیزه شده و بوتیرات، پروپیونات و استات تولید می‌کند، بلکه می‌تواند التهاب را کاهش دهد. همچنین، رویونات تولیدشده در روده وارد گردش خون شده و در هیپاتوپانکراس مانع از گلوکونئوز بی‌رویه تحت تنش شده و هایپرگلیسمی را تعدیل می‌کند. همچنین، استات به‌عنوان پیش‌ساز آستیل CoA در سنتز اسیدهای چرب نقش دارد و تعادل متابولیسم لیپید را بازیابی می‌کند که منجر به نرمال‌سازی سطوح تری‌گلیسیرید و کلسترول می‌گردد. بنابراین، ترکیب همزمان پروبیوتیک و پری‌بیوتیک به‌صورت هم‌افزایی سلامت روده را تقویت کرده و این امر در کاهش زیست‌فراهمی سرب و سمیت سیستمیک آن بسیار حیاتی است (Kakade et al., 2022; Kakade, 2021). به عبارتی دیگر، نتایج نشان داد که اثر محافظتی سین‌بیوتیک معمولاً برتر از هر کدام به‌تنهایی است، زیرا همزمان هم بر علت اولیه (جذب سرب) و هم بر پیامدهای ثانویه (استرس اکسیداتیو و التهاب) تأثیر می‌گذارد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که قرارگیری خرچنگ‌ها در معرض غلظت زیرکشنده سرب (Pb) منجر به سرکوب سیستم ایمنی و اختلالات متابولیک سیستمیک شد، که از آن جمله کاهش معنی‌دار هموسیت‌های کل، به‌ویژه هیالینوسیت‌ها و تغییرات نامطلوب در پارامترهای بیوشیمیایی همولنف (مانند پروتئین کل، آلبومین، گلوکز، کلسترول و تری‌گلیسیرید) قابل مشاهده بود. در مقابل، تجویز مکمل‌های پروبیوتیک (*Lactobacillus fermentum*)، پری‌بیوتیک (لاکتولوز) و به‌ویژه سین‌بیوتیک (ترکیب هر دو) توانست این اثرات منفی را تعدیل کند. در حالی که پروبیوتیک و پری‌بیوتیک به‌تنهایی تا حدی مؤثر بودند، سین‌بیوتیک با ایجاد اثر هم‌افزایی، از طریق بهبود سلامت روده، تقویت میکروبیوتای گوارشی، کاهش جذب سرب، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و تسهیل دفع فلزات سنگین، توانست شاخص‌های هماتولوژیکی و بیوشیمیایی را در خرچنگ‌های در معرض سرب به سطح نزدیک به نرمال بازگرداند. هرچند *L. fermentum* به‌تنهایی در بازگرداندن سطح کلسترول مؤثر نبود، استفاده هم‌زمان آن با لاکتولوز این کمبود را جبران کرد. این یافته‌ها اهمیت بالقوه سین‌بیوتیک‌ها را در مدیریت سلامت آبزیان در محیط‌های آلوده به فلزات سنگین برجسته می‌سازد و راهکاری عملی برای حفظ سلامت جمعیت‌های پرورشی از طریق تغذیه هوشمند ارائه می‌دهد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر به منظور حمایت مالی و معنوی اعلام می‌نمایند. همچنین از همه افرادی که در این پژوهش همکاری نمودند به ویژه آقای حسن حیدریه و محمد سعید فریدونی قدردانی می‌گردد.

منابع

- Abdel-Megeed, R.M. 2021. Probiotics: a promising generation of heavy metal detoxification. *Biological trace element research* 199(6), 2406-2413.
- Alvanou, M.V., Feidantsis, K., Staikou, A., Apostolidis, A.P., Michaelidis, B. and Giantsis, I.A. 2023. Probiotics, prebiotics, and synbiotics utilization in crayfish aquaculture and factors affecting gut microbiota. *Microorganisms* 11(5), 1232.
- Banaee, M., Akhlaghi, M., Soltanian, S., Gholamhosseini, A., Heidarieh, H. and Fereidouni, M.S. 2019. Acute exposure to chlorpyrifos and glyphosate induces changes in hemolymph biochemical parameters in the crayfish, *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 222, 145-155.
- Banaee, M., Akhlaghi, M., Soltanian, S., Sureda, A., Gholamhosseini, A. and Rakhshaninejad, M. 2020. Combined effects of exposure to sub-lethal concentration of the insecticide chlorpyrifos and the herbicide glyphosate on the biochemical changes in the freshwater crayfish *Pontastacus leptodactylus*. *Ecotoxicology* 29(9), 1500-1515.
- Banaee, M., Impellitteri, F., Multisanti, C.R., Sureda, A., Arfuso, F., Piccione, G. and Faggio, C. 2023. Evaluating silymarin extract as a potent antioxidant supplement in diazinon-exposed rainbow trout: oxidative stress and biochemical parameter analysis. *Toxics* 11(9), 737.
- Banaee, M., Sureda, A. and Faggio, C. 2022. Protective effect of protexin concentrate in reducing the toxicity of chlorpyrifos in common carp (*Cyprinus carpio*). *Environmental Toxicology and Pharmacology* 94, 103918.
- Banaee, M., Zeidi, A., Gholamhosseini, A., Shakeri, R., Faggio, C. and Multisanti, C.R. 2025. Potential synergistic effects of microplastics and zinc oxide nanoparticles: biochemical and physiological analysis on *Astacus leptodactylus*. *Ecotoxicology*, 1-10.
- Bhowmik, B., Hossain, M.N., Afrin, S., Jui, A.H. and Naumovski, N. 2025. Heavy metal detoxification of gut environment: potential application of probiotic supplementation and challenges. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.
- Capparelli, M.V., Dzul-Caamal, R., Rodríguez-Cab, E.M., Borges-Ramírez, M.M., Rendón-von Osten, J., Beltran, K., Pichardo-Casales, B., Ramírez-Olivares, A.I., Vargas-Abúndez, J.A. and Thurman, C.L. 2024. Synergistic effects of microplastic and lead trigger physiological and biochemical impairment in a mangrove crab. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 276, 109809.
- Dai, C., Xiao, L., Mo, A., Yuan, Y., Yuan, J., Gu, Z. and Wang, J. 2023. Effect of dietary *Bacillus subtilis* supplement on Cd toxicokinetics and Cd-induced immune and antioxidant impairment of *Procambarus clarkii*. *Environmental Science and Pollution Research* 30(15), 43914-43926.
- Dai, W., Liu, S., Fu, L., Du, H. and Xu, Z. 2014. Lead (Pb) accumulation, oxidative stress and DNA damage induced by dietary Pb in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Research* 43(2), 208-214.
- Duan, H., Zuo, J., Pan, N., Cui, X., Guo, J. and Sui, L. 2023. 3-Hydroxybutyrate helps crayfish resistant to *Vibrio parahaemolyticus* infection in versatile ways. *Fish & Shellfish Immunology* 132, 108444.
- Duan, Y., Wang, Y., Huang, J., Li, H., Dong, H. and Zhang, J. 2021. Toxic effects of cadmium and lead exposure on intestinal histology, oxidative stress response, and microbial community of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Marine Pollution Bulletin* 167, 112220.
- Gholamhosseini, A., Banaee, M., Sureda, A., Timar, N., Zeidi, A. and Faggio, C. 2023. Physiological response of freshwater crayfish, *Astacus leptodactylus* exposed to polyethylene microplastics at different temperature. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 267, 109581.

- Giulianini, P.G., Bierti, M., Lorenzon, S., Battistella, S. and Ferrero, E.A. 2007. Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from the freshwater crayfish *Astacus leptodactylus*: cell types and their role after in vivo artificial non-self challenge. *Micron* 38(1), 49-57.
- Hernández-Hernández, O., Muthaiyan, A., Moreno, F. J., Montilla, A., Sanz, M. L., & Ricke, S. C. (2012). Effect of prebiotic carbohydrates on the growth and tolerance of *Lactobacillus*. *Food microbiology*, 30(2), 355-361.
- Kakade, A., Salama, E.-S., Usman, M., Arif, M., Feng, P. and Li, X. 2022. Dietary application of *Lactococcus lactis* alleviates toxicity and regulates gut microbiota in *Cyprinus carpio* on exposure to heavy metals mixture. *Fish & shellfish immunology* 120, 190-201.
- Kakade, S. 2021. Probiotics and Oral Health: A Review.
- Li, F., Chang, X., Xu, L. and Yang, F. 2018. Different roles of crayfish hemocytes in the uptake of foreign particles. *Fish & shellfish immunology* 77, 112-119.
- Li, Y., Zhou, X., Guo, W., Fu, Y., Ruan, G., Fang, L. and Wang, Q. 2023. Effects of lead contamination on histology, antioxidant and intestinal microbiota responses in freshwater crayfish, *Procambarus clarkii*. *Aquatic Toxicology* 265, 106768.
- Liu, Q., Long, Y.n., Li, B., Zhao, L., Luo, J., Xu, L., Luo, W., Du, Z., Zhou, J. and Yang, S. 2020. Rice-shrimp culture: a better intestinal microbiota, immune enzymatic activities, and muscle relish of crayfish (*Procambarus clarkii*) in Sichuan Province. *Applied Microbiology and Biotechnology* 104(21), 9413-9420.
- Madreseh, S., Ghaisari, H. R., & Hosseinzadeh, S. (2019). Effect of lyophilized, encapsulated *Lactobacillus fermentum* and lactulose feeding on growth performance, heavy metals, and trace element residues in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) tissues. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 11(4), 1257-1263.
- Valipour, A., Nedaei, S., Noori, A., Khanipour, A.A. and Hoseinifar, S.H. 2019. Dietary *Lactobacillus plantarum* affected on some immune parameters, air-exposure stress response, intestinal microbiota, digestive enzyme activity and performance of narrow clawed crayfish (*Astacus leptodactylus*, Eschscholtz). *Aquaculture* 504, 121-130.
- Wang, Q., Lin, Y., Zhang, H., Fan, W., Li, S., Ruan, G. and Fang, L. 2024. Positive impacts of dietary prebiotic inulin on growth performance, antioxidant capacity, immunity, and intestinal microbiota of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). *Aquaculture International* 32(1), 775-794.
- Zarnescu, O., Petrescu, A.-M., Gaspar, A. and Craciunescu, O. 2017. Effect of sublethal nickel chloride exposure on crayfish, *Astacus leptodactylus* ovary: an ultrastructural, autometallographic, and electrophoretic analyses. *Microscopy and Microanalysis* 23(3), 668-678.
- Zeidi, A., Sayadi, M.H., Rezaei, M.R., Banaee, M., Gholamhosseini, A., Pastorino, P., Multisanti, C.R. and Faggio, C. 2023. Single and combined effects of CuSO₄ and polyethylene microplastics on biochemical endpoints and physiological impacts on the narrow-clawed crayfish *Pontastacus leptodactylus*. *Chemosphere* 345, 140478.
- Zhang, L., Song, Z., Qin, Q., He, L., Tian, J., Yu, Y., Mu, Y., Zhong, L., Cui, Z. and Gan, J. 2025. Multi-system toxicity of lead (Pb) in *Procambarus clarkii*: Integrated analysis of tissue damage, immune dysfunction, oxidative stress, and microbial dysbiosis via multi-omics approaches. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 110331.
- Zhang, L., Song, Z., Zhou, Y., Zhong, S., Yu, Y., Liu, T., Gao, X., Li, L., Kong, C. and Wang, X. 2023. The accumulation of toxic elements (Pb, Hg, Cd, As, and Cu) in red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) in Qianjiang and the associated risks to human health. *Toxics* 11(7), 635.

Evaluation of the Protective Effects of *Lactobacillus fermentum*, Lactulose, and Synbiotic on Hematological and Biochemical Parameters of the Freshwater Crayfish (*Astacus leptodactylus*) Under Lead-Induced Stress

Seyed Hossein Sajadi¹, Seyed Mohammad Mousavi^{1*}, Amin Gholamhosseini², Mahdi Banaee³ and Babak Doustshenas⁴

¹ Department of Fisheries, Faculty of Marine Natural Resources, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran

² Department of Clinical Sciences, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran

³ Department of Aquaculture, Faculty of Natural Resources, Behbahan Khatam Alanbia University of Technology, Behbahan, Iran

⁴ Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Oceanography, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran.

Received:

Accepted:

Abstract

This study investigated the protective effects of probiotic (*Lactobacillus fermentum* at a concentration of 10⁷ cells/kg feed), prebiotic (lactulose at 10 mL/kg feed), and synbiotic on the hematological and biochemical parameters of freshwater crayfish (*Astacus leptodactylus*) exposed to lead acetate (0.1 mg/L). For this purpose, 240 crayfish (with equal sex distribution) were divided into eight experimental groups with three replicates each (totaling 24 aquaria) as follows: control group (basal diet without supplement), three groups receiving probiotic, prebiotic, or synbiotic alone (without lead exposure), a lead-exposed group (basal diet without supplement), and three combined treatment groups (probiotic, prebiotic, or synbiotic together with lead exposure). The experiment lasted 28 days, after which hemolymph was sampled and hematological and biochemical changes were assessed. Results showed that lead exposure caused a significant decrease in total hemocyte count (including hyaline, granular, and semi-granular hemocytes). In contrast, administration of probiotic, prebiotic, and synbiotic led to a significant increase in hemocyte counts. Furthermore, supplementation with probiotic, prebiotic, and synbiotic under lead exposure conditions exerted considerable protective effects on total hemocyte count as well as hyaline, granular, and semi-granular hemocyte populations, significantly elevating these parameters compared to the lead-exposed group without supplementation. Feeding with all three supplements following lead exposure restored total protein, albumin, glucose, and triglycerides to normal levels. Moreover, lactulose and the synbiotic reduced the toxic effect of lead on cholesterol, whereas the probiotic was unable to return cholesterol to the normal range. This study indicates that synbiotic supplementation can serve as an effective strategy to mitigate the toxic effects of heavy metals and maintain immune health in cultured crayfish.

Key words: Freshwater crayfish, *Lactobacillus fermentum*, Lactulose, Synbiotic, Lead acetate, Hemocyte, Invertebrate immunity

* **Corresponding Author:** Seyed Mohammad Mousavi, Department of Fisheries, Faculty of Marine Natural Resources, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran
E-mail: seied1356@yahoo.com



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).