14(3) 285-292, Autumn 2022

Journal of Animal Environment

(AEJ)

Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

The effect of probiotic bacteria isolated from fish intestines of Khuzestan, Bushehr and Hormozgan provinces on oxidative stress system in liver tissue and blood serum of Asian sea bass (*Lates calcarifer*)

***Razieh Sokooti* [1], *Mojdeh Chelemal Dezfoulnejad* [1,2*], *Mehran Javaheri baboli* [1,2], *Abolfazl Askary Sary* [1,2], *Hadideh Mabudi* [1,2]**

[1] *Department of Fisheries, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran*

[2] *Aquaculture Research Center, Department of Fisheries, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran*

Key Words

Dietary probiotic
Superoxide dismutase
Catalase
Glutathione
Malondialdehyde
Asian sea bass

Abstract

Introduction: Probiotics are bacteria that in sufficient quantities have beneficial effects on the host. Today, the use of probiotics as food supplements in the aquatic industry has grown exponentially.

Materials & Methods: The aim of this study was to investigate the effect of various probiotics on antioxidant factors in the liver and blood serum of Asian sea bass (*Lates calcarifer*). For this purpose, Asian bass fish with an initial weight of 171.29±8.79 g, for 60 days using four diets including control group (without bacteria), the first group (selected strain isolated from fish in Khuzestan province), the second group (selected strain isolated from fish of Bushehr province) and the third group (selected strain isolated from fish of Hormozgan province) were fed. Fish sampling was performed on days 0, 30, and 60 of the experiment.

Results: The results showed that after 60 days of probiotic use, liver superoxide dismutase levels decreased in all groups and glutathione levels in the second and third groups increased significantly compared to the control group ($p<0.05$). Also, serum superoxide dismutase levels in all groups and glutathione levels in the first group increased significantly compared to the control group ($p<0.05$).

Conclusion: The results of this study showed that the selected strain isolated from fish in Khuzestan, Bushehr, and Hormozgan provinces can improve the antioxidant indices of the liver and serum of Asian seabass.

* Corresponding Author's email: m_chelemal@yahoo.com, mojdeh-chelemaldezfoulnejad@iauahvaz.ac.ir
Received: 28 June 2021; Reviewed: 4 August 2021; Revised: 11 October 2021; Accepted: 14 November 2021
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.310091.2661

مقاله پژوهشی

تاثیر باکتری‌های پروبیوتیکی جدا شده از روده ماهیان استان‌های خوزستان، بوشهر و هرمزگان بر سیستم استرس اکسیداتیو در بافت کبد و سرم خون ماهیان باس دریایی آسیایی (*Lates calcarifer*) پرورش یافته در استخرهای خاکی

راضیه سکوتی[۱]، مژده چله‌مال‌دزفول‌نژاد[۱،۲*]، مهران جواهری‌بابلی[۱،۲]، ابوالفضل عسکری‌ساری[۱،۲]، حدیده معبودی[۲،۱]

[۱] گروه شیلات، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

[۲] مرکز تحقیقات تکثیر و پرورش آبزیان، گروه شیلات، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

کلمات کلیدی

پروبیوتیک جیره
سوپراکسید دیسموتاز
کاتالاز
گلوتاتیون
مالون دی آلدهید
ماهی سی‌باس آسیایی

چکیده

مقدمه: پروبیوتیک‌ها باکتری‌هایی هستند که در مقادیر کافی دارای اثرات سودمند برای میزبان می‌باشند. امروزه استفاده از پروبیوتیک‌ها به‌عنوان مکمل غذایی در صنعت آبزی‌پروی رشد فزاینده‌ای داشته است.

مواد و روش‌ها: هدف از این تحقیق بررسی اثر پروبیوتیک‌های مختلف بر روی فاکتورهای آنتی‌اکسیدانی کبد و سرم خون ماهی سی‌باس آسیایی (*Lates calcarifer*) بود. بدین‌منظور، ماهیان سی‌باس آسیایی با وزن اولیه ۸/۷۹±۱۷۱/۲۹ گرم، به‌مدت ٦۰ روز با به‌کارگیری چهار جیره شامل گروه شاهد (بدون باکتری)، گروه اول (سویه انتخابی جدا شده از ماهیان استان خوزستان)، گروه دوم (سویه انتخابی جدا شده از ماهیان استان بوشهر) و گروه سوم (سویه انتخابی جدا شده از ماهیان استان هرمزگان)، مورد تغذیه قرار گرفتند. نمونه‌برداری از ماهیان در روزهای صفر، ۳۰ و ٦۰ آزمایش انجام شد.

نتایج: نتایج نشان داد که بعد از ٦۰ روز مصرف پروبیوتیک مقادیر سوپراکسید دیسموتاز کبد در تمام گروه‌ها کاهش و مقادیر گلوتاتیون در گروه‌های دوم و سوم افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد داشته است ($p<۰/۰۵$). هم‌چنین مقادیر سوپراکسید دیسموتاز سرم خون در تمام گروه‌ها و مقادیر گلوتاتیون در گروه اول افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد داشته است ($p<۰/۰۵$).

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که سویه انتخابی جدا شده از ماهیان استان خوزستان، بوشهر و هرمزگان می‌تواند در بهبود شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی کبد و سرم ماهی سی‌باس آسیایی نقش داشته باشد.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: m_chelemal@yahoo.com, mojdeh-chelemaldezfoulnejad@iauahvaz.ac.ir

تاریخ دریافت: ۷ تیر ۱٤۰۰؛ تاریخ داوری: ۱۳ مرداد ۱٤۰۰؛ تاریخ اصلاح: ۱۹ مهر ۱٤۰۰؛ تاریخ پذیرش: ۲۳ آبان ۱٤۰۰
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.310091.2661

مقدمه

با توجه به افزایش جمعیت جهان و نیاز به تأمین غذا از منابع مختلف، صنعت آبزی‌پروری رشد چشمگیری داشته و به سمت سیستم‌های فشرده و فوق فشرده حرکت کرده است. در نتیجه، در صنعت آبزی‌پروری، نیاز به کنترل کیفیت آب، تغذیه و پیشگیری از بیماری‌ها بیش از پیش احساس می‌شود(۱، ۲).نقش‌اساسی سیستم ایمنی در حفظ سلامت، بقا و رشد مناسب حیوانات آبزی در طول دوره پرورش، محققان را بر آن داشته است تا از چندین ترکیب شیمیایی و طبیعی استفاده کنند که سیستم ایمنی بدن را تحریک و تقویت می کند (۳، ۴). آنتی‌بیوتیک‌ها، واکسن‌ها و برخی مواد شیمیایی به‌عنوان محرک‌ایمنی در برابر ویروس‌ها، باکتری‌ها، انگل‌ها و بیماری‌های قارچی در بسیاری‌از مزارع پرورش ماهی استفاده می‌شوند (۵). با این‌حال، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و داروهای شیمیایی در برابر بیماری‌های آبزیان عوارضی مانند مقاومت‌دارویی، تجمع زیستی در آبزیان، آلودگی محیط زیست و مقاومت باکتریایی در انسان دارد (۱). بنابراین، در سال‌های‌اخیر، توجه بیش‌تری به افزودن‌مکمل‌های غذایی طبیعی برای جلوگیری، کنترل بیماری یا افزایش ایمنی شده است (۶). استفاده از پروبیوتیک به‌عنوان مکمل غذایی برای‌حیوانات پرورشی به دهه ۱۹۷۰ بر می‌گردد (۷). تاکنون مطالعات بسیاری در زمینه کاربرد پروبیوتیک‌ها در‌آبزی‌پروری انجام شده است و موجودات زنده مختلفی از جمله باکتری‌های گرم مثبت و منفی، مخمرها، جلبک‌های تک یاخته‌ای به‌عنوان پروبیوتیک در آبزی‌پروری بررسی شده و اثرات بسیار سودمند‌آن‌ها در افزایش‌ایمنی، بهبود‌رشد، مقاومت در برابر بیماری‌های‌گونه‌های مختلف ماهی و میگو به‌اثبات رسیده‌است (۸، ۹، ۱۰). استرس‌اکسیداتیو‌تعادل‌میان‌اکسیدان‌ها‌و‌آنتی‌اکسیدان‌ها را به نفع اکسیدان‌ها به‌هم زده و این احتمالاً منجر به آسیب سلولی شده که باعث اکسیداسیون مولکول‌های زیستی مانند پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک، لیپیدها و کربوهیدرات می‌شود (۱۱، ۱۲، ۱۳). حیوانات دارای‌توانایی برای‌زندگی در محل‌های آلوده هستند‌که این توانایی عمدتاً به‌دلیل وجود مکانیسم‌های دفاعی است که باعث سم زدایی، دفع، حفاظت از آنتی‌اکسیدان و پاسخ به استرس می‌گردد (۱۴). تجمع مواد سمی باعث واکنش‌های اکسایش-کاهش و تولید رادیکال‌های‌آزاد، به‌ویژه رادیکال‌های‌آزاد‌اکسیژن می‌شوند، هم‌چنین دیگر‌گونه‌های اکسیژن‌فعال (ROS) که موجب تغییرات بیوشیمیایی در بافت ماهی شده، تولید می‌شوند (۱۵، ۱۶). به‌منظور مقابله با اثرات سمی ROS، ارگانیسم‌های هوازی از آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی جهت از بین بردن رادیکال‌های آزاد استفاده می‌کنند. با این‌حال،زمانی‌که‌تولید ROS بیش از ظرفیت آنتی‌اکسیدان سلولی باشد، باعث ایجاد استرس اکسیداتیو و آسیب اکسیداتیو خواهد شد (۱۶). از طرفی ماهی‌ها نیز دارای‌مکانیسم‌های‌آنتی‌اکسیدانی می‌باشند که ازجمله آن‌ها می‌توان به آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی شامل سوپر اکساید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی از‌قبیل گلوتاتیون (GSH) اشاره‌کرد‌که به‌همراه‌تعداد دیگری از‌آنزیم‌ها مجموعه‌ای از‌دفاع آنتی‌اکسیدانی سلولی‌را تشکیل می‌دهند و نقش حذف رادیکال‌های آزاد را برعهده دارند (۱۷). به‌نظر می‌رسد که نسبت به تست‌های مرسوم ایمنی، سنجش شاخص‌های اکسیدانی/ آنتی‌اکسیدانی به‌عنوان‌شاخص‌های‌حساس‌تری‌درنظر‌گرفته می‌شوند و می‌توانند اثرات بهبود عملکرد بدن میزبان توسط باکتری‌های پروبیوتیکی بر‌فاکتورهای‌استرس‌اکسیداتیو‌و‌مکانیسم‌های‌بیوشیمیایی که به‌وسیله‌این‌باکتری‌ها تحت‌تاثیر قرار‌می‌گیرند، را به‌خوبی نمایان سازند. ماهی باس دریایی آسیایی (*Lates calcalifer*) که بارامووندی نیز نامیده می‌شود، ماهی دریایی ارزشمندی است. این گونه مهم و تجاری‌صنعت آبزی‌پروری جنوب‌شرقی آسیا است‌که به‌طور گسترده در استرالیا، تایلند و اندونزی کشت می‌شود. باس دریایی به‌دلایل مختلف‌مانند کشت در‌طیف وسیعی از‌شوری‌ها، تولیدمثل در اسارت، سرعت‌رشد سریع و قیمت مناسب محصول در بازار، یک گونه ماهی مناسب برای پرورش یوری‌هالاین است (۱۸، ۱۹، ۲۰). بنابراین با توجه به اهمیت ماهی باس دریایی آسیایی در ایران و این مهم که تا کنون در رابطه با تأثیر تغذیه با باکتری‌های پروبیوتیکی جدا شده از روده ماهیان استان‌های خوزستان، بوشهر و هرمزگان روی افزایش دفاع آنتی اکسیدانی در این‌گونه تحقیقی صورت نگرفته است، این مطالعه پایه‌ریزی شد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌های پروبیوتیک: ماهی‌ها آسان‌کشی شده، وزن و طول آن‌ها، به‌طور دقیق اندازه‌گیری و ثبت شد. روده ماهی در شرایط استریل، در کنار شعله، خارج و در جهت طولی برش داده شد. محتویات روده دور ریخته و داخل روده با سرم فیزیولوژی شستشو شد. مقدار ۱ گرم از بافت هموژن شده روده به ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی اضافه شد تا سوسپانسیون ۱:۱۰ آن به‌دست آید. به‌همین ترتیب رقت‌هایی بر مبنای ۱۰ از نمونه اولیه تهیه شد. بعد از مشخص شدن بهترین رقت، نمونه در محیط MRS آگار، کشت داده شد. پلیت‌ها به‌مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در‌شرایط بی‌هوازی گرم‌خانه‌گذاری شد و سپس از کلنی‌های مشکوک زیرنمونه (Subculture) تهیه و مراحل خالص‌سازی و شناسایی اولیه (رنگ‌آمیزی گرم، آزمایش‌های اکسیداز و کاتالاز) انجام‌شد (۲۱).

تهیه جیره غذایی حاوی باکتری‌های پروبیوتیک انتخابی: به‌منظور ارزیابی اثر پروبیوتیک‌های انتخاب شده بر پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی ماهی باس دریایی آسیایی، باکتری‌های باسیلوس و لاکتوباسیلوس منتخب به غذای ماهیان افزوده شد. به‌طور خلاصه هر یک از باکتری‌های باسیلوس *Bacillus cereus* و *B. thuringiensis*، با تلقیح سویه مورد نظر به محیط مایع لوریا-برتانی به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده و سپس به‌مدت ۳۰ دقیقه در دور ۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ و جداسازی، باکتری‌ها دو بار با PBS استریل شستشو و با استفاده از لوله‌های مک‌فارلند غلظت مناسب آن‌ها تنظیم شد. جهت آماده‌سازی سویه‌های مختلف باکتری لاکتوباسیلوسی و افزودن آن‌ها به غذای ماهیان از روش توصیه شده توسط (۲۲) استفاده شد. به‌طور خلاصه هر باکتری به‌طور جداگانه در محیط آبگوشت MRS در شرایط بی‌هوازی کشت داده شد. پس از رشد، باکتری‌ها با سانتریفوژ جداسازی و شستشو و به کمک لوله‌های استاندارد مک فارلند غلظت‌های مناسب آن‌ها ($۳/۳۳\times۱۰^{۷}$ CFU/ml از هر کدام از سه باکتری) تنظیم شد. سپس غلظت تعیین شده هرکدام از باکتری‌ها به هر گرم غذای تیمارها (شرکت فرادانه) اسپری شد. جهت اطمینان از تعداد باکتری‌های زنده موجود در غذا، نمونه‌برداری و شمارش باکتریایی غذایی حاصل انجام شد (۲۳).

تهیه و نگه‌داری ماهی: با توجه به این‌که این تحقیق در مزارع پرورش ماهی باس دریایی آسیایی (*Lates calcarifer*) واقع در منطقه چوئبده آبادان انجام شد، گروه‌های آزمایشی (جدول ۲) در استخرهای خاکی پرورشی تعریف شدند. برای این منظور ده استخر ۰/۷ هکتاری انتخاب شد. سپس ماهیان هر استخر با میانگین وزنی ۸/۷۹±۱۷۱/۲۹ گرم، به‌مدت یک هفته قبل از شروع آزمایش به شرایط محیطی سازگاری یافتند. گروه شاهد در تمام طول دوره آزمایش با غذای تجاری موجود بدون افزودن سویه‌های انتخابی باکتری تغذیه شد. در تمامی طول دوره آزمایش، پرورش ماهیان در استخرهای خاکی و در آب شور دریا صورت گرفت. فاکتورهای شیمیایی آب برای همه گروه‌ها یکسان و به قرار زیر بوده است (جدول ۱):

جدول ۱: فاکتورهای فیزیکو شیمیایی آب استخرها

اکسیژن	pH	شوری کل	دما
۶/۷-۵ میلی‌گرم در لیتر	۷/۷-۲/۵	۳۴ ppt	۲۹-۲۴ درجه سانتی‌گراد

جهت اندازه‌گیری فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب از دستگاه کالری متر هک (مدل ۸۹، شرکت Hach، کشور آمریکا) و pH متر مدل متروهم (مدل ۷۸۱، Metrohm، کشور سویس) استفاده شد. غذادهی ماهی‌ها در طول مدت سازگاری در دو نوبت با غذای کنسانتره تجاری (شرکت فرادانه)، انجام شد. ماهیان در طول دوره آزمایش به‌مدت ۶۰ روز با جیره غذایی حاوی باکتری‌های پروبیوتیک انتخابی مورد تغذیه قرار گرفتند.

جدول ۲: نحوه تیماربندی آزمایش

نام گروه	نوع غذا	تعداد ماهی در هکتار
گروه شاهد	بدون باکتری	۵۰۰۰ قطعه در هکتار
۱	همراه با سویه انتخابی جدا شده از ماهیان استان خوزستان با تراکم ۱×۱۰^{۸}CFU/gr	۵۰۰۰ قطعه در هکتار
۲	همراه با سویه انتخابی جدا شده از ماهیان استان بوشهر با تراکم ۱×۱۰^{۸}CFU/gr	۵۰۰۰ قطعه در هکتار
۳	همراه با سویه انتخابی جدا شده از ماهیان استان هرمزگان با تراکم ۱×۱۰^{۸}CFU/gr	۵۰۰۰ قطعه در هکتار

نمونه‌برداری بافتی: به‌منظور بررسی سطوح استرس اکسیداتیو در ماهیان تیمار شده با پروبیوتیک، در روزهای صفر، میان دوره و انتهای دوره به‌طور تصادفی، تعداد ۱۵ قطعه ماهی از هر استخر انتخاب شد. ماهیان با حوله خشک و سپس توزین و آسان‌کشی شدند. در نهایت ماهیان تشریح شده و از اندام کبد نمونه‌برداری انجام شد. سپس نمونه‌ها با سرم فیزیولوژی (۰/۹ ٪ NaCl) شسته شدند و سریعاً درون میکروپیپت‌های برچسب‌گذاری شده کنار یخ به آزمایشگاه بخش آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران منتقل و تا زمان سنجش در فریزر ۸۰- نگه‌داری شد.

عصاره‌گیری از نمونه‌های بافتی: برای این منظور، ابتدا در یک بشر ۱۰۰ میلی‌لیتری، ۰/۵ گرم از هر بافت منجمد شده با ۵ برابر وزنی/حجمی آن (۱:۵ w/v) (معادل ۲/۵ ml) از بافر سدیم فسفات (PBS) ۱۰۰ Mm سرد با pH =۷/۴ محتوی (v/v) ۲۰ ٪ حجمی گلیسرول و ۱ mM EDTE مخلوط شد. بشر حاوی نمونه بر روی یخ قرار گرفت و با استفاده از دستگاه همگن‌ساز (هموژنایزر) با سرعت ۱۴۰۰۰rpm به‌مدت ۲ دقیقه هموژن شد. سپس محلول هموژن شیری به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰rpm در دمای ۴ °c سانتریفیوژ شده و محلول رویی (عصاره بافتی) در حجم‌های ۰/۵ ml در میکروپیپت‌های استریل تقسیم‌بندی و در دمای ۴°c در یخچال نگه‌داری شد. در نهایت شاخص‌های سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی در نمونه‌های مذکور ارزیابی خواهد شد (۲۴).

اندازه‌گیری آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD): سوپراکسید دیسموتاز نخستین آنزیمی است که نیاز است تا در سنجش اکسی رادیکال‌ها مورد توجه قرار گیرد. زیرا مسؤول کاتالیزه شدن سطوح بالایی از رادیکال‌های سوپراکسید O_2^{-} و تبدیل این رادیکال‌ها با O_2، H_2O_2 می‌باشد. فعالیت این آنزیم در تحقیق حاضر براساس روش

رنگ‌سنجی پیشنهادی (۲۵)، مبتنی بر مهار رادیکال‌های سوپراکسید تولیدی طی فرایند اتواکسیداسیون هیدروکسیل آمین هیدروکلراید و احیاء نیتروبلوتترازولیوم(NBT) و نیز تشکیل کمپلکس آبی- بنفش رنگ فورمازان اندازه‌گیری شد. در این واکنش آنزیم SOD در رقابت با NBT از تشکیل رنگ آبی-بنفش فومارزان ممانعت به‌عمل می‌آورد. حجم نهایی محلول در این واکنش ۲۵۰ میکرولیتر خواهد بود و مشتمل بر عصاره بافتی، کربنات سدیم (Na_2Co_3) ۵۰ Mm با pH =۱۰/۲، NBT۲۴µM، EDTA۰/۱mM، تریتون x^3 ۱۰۰ ۰/۶٪ و هیدروکسیل آمین هیدروکلراید ۱ میلی‌مول با pH =۶ است. در ادامه، نرخ مهار الکترون در انتقال به NBT و تشکیل کمپلکس فومارزان، به‌واسطه قرائت تغییرات طیف جذبی نمونه A (s) و شاهد A (c) در طول موج ۵۶۰ نانومتر، در سه تکرار با استفاده از دستگاه قرائت‌گر میکروپلیت انجام پذیرفت. در پایان، درصد مهار احیاء NBT، با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد: (A(c)-A(s)/A(c)×۱۰۰)= درصد مهار

در این‌جا یک واحد بین‌المللی (U) از SOD به‌صورت مقدار آنزیمی تعریف می‌شود که بتواند در شرایط آزمایش نرخ احیاء NBT و واکنش تولید رنگ را تا ۵۰٪ مهار نماید. لذا فعالیت ویژه آنزیم SOD برحسب واحد بین‌الملل از آنزیم به‌ازای هر میلی‌گرم از وزن پروتئین بافت تر در زمان واکنش برحسب دقیقه (U/mg/min) گزارش شد.

اندازه‌گیری آنزیم کاتالاز(CAT): سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز براساس روش Korolyuk و همکاران انجام شد (۲۶). به‌منظور ارزیابی فعالیت آنزیم کاتالاز، حجم نهایی واکنش در ۲۰۵ میکرولیتر تنظیم شد که مشتمل بر عصاره بافتی، بافر Tris-HCl ۰/۰۵ با pH =۷/۸، و H_2O_2 ۰٪۰/۰۳ ۱۰ میلی‌مول بود. این واکنش پس از قرار گیری به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی با افزودن آمونیوم مولیبدات ۴٪ متوقف شد. سپس غلظت آنزیم بر مبناء قرائت اختلاف جذب نوری بین نمونه A (s) و شاهد A (c) در طول موج ۴۱۰ نانومتر، توسط دستگاه میکروپلیت ریدر سنجش شد. واکنش شاهد (بلانک) نیز محتوی تمامی ترکیبات واکنش‌گر به‌جز عصاره بافتی بود. در این رویکرد، نرخ کاهش اولیه میزان جذب نوری کمپلکس زرد رنگ (حاصل از واکنش آب اکسیژنه و آمونیوم مولیبدات) در قیاس با کنترل تحت طول موج ۴۱۰ نانومتر، به‌عنوان یک برآمد از میزان مصرف پراکسید هیدروژن توسط آنزیم در طی مدت زمان ۱۰ دقیقه در واکنش معرفی شد. زیرا آنزیم کاتالاز موجود در نمونه، با تجزیه پراکسید هیدروژن، تشکیل کمپلکس زرد رنگ را مهار می کند. از این‌رو، غلظت آنزیم کاتالاز بر پایه فرمول زیر و با احتساب غلظت آنزیم در گروه شاهد (c)، برحسب میلی‌مول در لیتر یا میکرومول در میلی‌لیتر محاسبه شد.

فعالیت کاتالاز (µM/min) = ((A (c)- A (s)/ Ac)×c/10

اندازه‌گیری فعالیت پراکسیداسیون لیپیدی(LPO/MDA): در پژهش حاضر سطح پراکسیداسیون لیپیدی (LPO) تحت القاء استرس نانومگنتیت در عصاره‌های بافتی برحسب محتوی مالون دی آلدهید(MDA) سنجش شد. زیرا تجمع بیش‌از حد مالون دی آلدهید می‌تواند به سلول‌ها آسیب رسانده و به مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، منتهی گردد. مالون‌دی‌آلدهید به‌عنوان یکی از تولیدات فرعی حاصل از فرایند پراکسیداسیون لیپیدی غشاء معرفی شده که به‌واسطه واکنش با اسید تیوباربیتوریک، می‌تواند کمپلکس سرخ آبی صورتی رنگ TBA-MDA را تشکیل دهد. از این‌رو غلظت مالون‌دی آلدهید به‌روش رنگ‌سنجی و با بهره‌گیری از یک طیف‌سنج نوری قابل اندازه‌گیری است. برای این منظور، براساس روش Plaser و همکاران، یک محلول واکنش‌گر (معرف) (TCA/TBA/HCl) آماده‌سازی شد (۲۷). این محلول محتوی TBA ۰/۳۷۵٪ w/v، تری کلرواستیک اسید (TCA) ۱۵٪ w/v، و اسیدکلریدریک ۰/۲۵ نرمال بود. در ادامه، هر نمونه از عصاره بافتی به نسبت ۲:۱ با محلول معرف در میکروتیوب ۱/۵ ml مخلوط شد و به‌مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب جوش (دمای ۱۰۰°c) گرمادهی شد و پس از سردشدن نمونه‌ها، به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. پس از آن، مایع رویی نمونه‌ها به میکروپلیت منتقل شد و بدین‌وسیله تغییرات طیف جذبی نمونه‌ها در محیط واکنش با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر در طول موج ۵۳۵ نانومتر قرائت شد. سپس غلظت TBA/MDA در نمونه‌ها براساس منحنی استاندارد (مبتنی بر هیدرولیز اسیدی ۱،۱،۳،۳- تترا اتوکسی پروپان) (TEP) محاسبه شده و بر حسب واحد نهایی میکرومول MDA(µM/l) به‌ازاء هر میلی‌گرم از پروتئین بافتی (µ molMDA/ mg) گزارش شد (۲۸).

اندازه‌گیری میزان گلوتاتیون (GSH): در مطالعه حاضر سنجش میزان گلوتاتیون احیاء (گاما گلوتامیل سیستئینیل گلایسین) (GSH) یا گلوتاتیون تام، به‌عنوان ترکیب آنتی‌اکسیدان غیرآنزیمی به‌روش Ellman انجام پذیرفت (۲۹). به‌منظور اجرای این آزمایش، حجم نهایی محلول واکنش ۲۸۰ میکرولیتر بوده و مشتمل بر عصاره بافتی، بافر فسفات سدیم (Na_2HPO_4) ۰/۱ مول (محتوی EDTA ۱ میلی‌مول) با pH =۸ و معرف DTNB ۰/۰۱ مول بود. واکنش شاهد (بلانک) نیز محتوی تمامی ترکیبات واکنش‌گر به‌جز عصاره بافتی بود. در ادامه میکروپلیت حاوی اجزاء واکنش، به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد و تغییرات طیف جذبی نمونه‌ها در محیط واکنش، توسط دستگاه میکروپلیت ریدر در طول موج ۴۱۲ نانومتر نسبت به نمونه بلانک قرائت شد. سپس سطح گلوتاتیون احیاء شده در نمونه‌ها، پس از کالیبراسیون با منحنی استاندارد (سیستئین هیدروکلرید مونو هیدرات

۱/۵ میلی‌مول) محاسبه‌شده و برحسب واحد نهایی میکرومول GSH به‌ازاء هر میلی‌گرم از پروتئین بافت تر (µM-SH/mg) گزارش شد.

آنالیز و بررسی آماری: تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS21 انجام شد. بدین‌ترتیب که ابتدا نرمال‌بودن پراکنش داده‌ها با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov سنجیده شد. سپس داده‌ها به‌وسیله آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) بررسی شدند. با مشاهده اختلاف بین‌داده‌ها از پس آزمون توکی برای تعیین معنی‌دار بودن یا نبودن اختلاف موجود بین تیمارهای مورد مطالعه در سطح ۹۵ درصد استفاده شد (P<۰/۰۵).

نتایج

نتایج سنجش شاخص‌های استرس اکسیداتیو (سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون و مالون دی آلدهید) بافت کبد و سرم خون ماهی باس‌دریایی آسیایی تغذیه شده با غذای حاوی سویه‌های باکتریایی جدا شده از ماهیان مزارع خوزستان، بوشهر و هرمزگان به ترتیب در جدول ۳ و ۴ آورده شده است. در نتایج مربوط به سنجش تمام شاخص‌ها در روز صفر آزمایش تغییر معنی‌داری را مشاهده نشد (P>۰/۰۵). نتایج مربوط به سنجش سوپراکسید دیسموتاز کبد نشان داد به‌دنبال مصرف باکتری پروبیوتیک به‌مدت ۳۰ روز تغییر معنی‌داری در میزان این شاخص، مشاهده نشد (P>۰/۰۵) اما مقدار این شاخص در روز ۶۰ آزمایش کاهش معنی‌داری را در تمام گروه‌ها در مقایسه با گروه شاهد نشان داد (P<۰/۰۵). نتایج مربوط به سنجش کاتالاز و مالون دی آلدهید کبد نشان داد به‌دنبال مصرف باکتری پروبیوتیک به‌مدت ۳۰ و ۶۰ روز تغییر معنی‌داری در میزان این شاخص، مشاهده نشد (P>۰/۰۵). مقدار گلوتاتیون در روز ۳۰ آزمایش افزایش معنی‌داری را در گروه دوم در مقایسه با گروه شاهد نشان داد (P<۰/۰۵). هم‌چنین مقدار این شاخص در روز ۶۰ آزمایش افزایش معنی‌داری را در گروه دوم و سوم در مقایسه با گروه شاهد نشان داد (P<۰/۰۵). نتایج مربوط به سنجش سوپراکسید دیسموتاز سرم نشان داد به‌دنبال مصرف باکتری پروبیوتیک به‌مدت ۳۰ روز کاهش معنی‌دار و در روز ۶۰ آزمایش افزایش معنی‌داری را در تمام گروه‌ها در مقایسه با گروه شاهد نشان داد (P<۰/۰۵). نتایج مربوط به سنجش کاتالاز سرم نشان داد به‌دنبال مصرف باکتری پروبیوتیک به‌مدت ۳۰ روز افزایش معنی‌داری در میزان این شاخص در گروه‌های اول و سوم آزمایش مشاهده شد (P<۰/۰۵) درحالی‌که در روز ۶۰ تغییر معنی‌داری در میزان این شاخص، مشاهده نشد (P>۰/۰۵). نتایج مربوط به گلوتاتیون سرم نشان داد به دنبال مصرف باکتری پروبیوتیک به‌مدت ۳۰ روز تغییر معنی‌داری در میزان این شاخص، مشاهده نشد (P>۰/۰۵) اما مقدار این شاخص در روز ۶۰ آزمایش افزایش معنی‌داری را در گروه اول آزمایش در مقایسه با گروه شاهد نشان داد (P<۰/۰۵). نتایج مربوط به سنجش مالون دی آلدهید سرم نشان داد به‌دنبال مصرف باکتری پروبیوتیک به‌مدت ۳۰ و ۶۰ روز تغییر معنی‌داری در میزان این شاخص، مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

جدول ۳: تاثیر باکتری‌های پروبیوتیکی جدا شده از روده ماهیان استان‌های خوزستان، بوشهر و هرمزگان بر فاکتورهای استرس اکسیداتیو در کبد ماهی باس دریایی آسیایی

پارامتر	گروه ها	روز صفر	روز ۳۰	روز ۶۰
سوپراکسید دیسموتاز (واحد بین‌الملل بر میلی‌گرم بر دقیقه)	گروه شاهد	۸۶/۴±۴۹/۶۵ Aa	۸۴/۱±۶۱/۸۷ Aa	۸۴/۹±۳۳/۷۶ Ab
	گروه اول	۸۹/۳±۲۴/۰۰ Ba	۸۶/۵±۴۹/۳۷ Ba	۵۳/۸±۰۳/۳۶ Aa
	گروه دوم	۸۷/۷±۶۵/۹۳ Ba	۸۴/۱۰±۴۴/۷۲ Ba	۵۲/۴±۲۱/۲ Aa
	گروه سوم	۸۴/۹±۶۹/۲۴ Ba	۹۳/۹±۴۸/۳۳ Ba	۶۰/۹±۶۶/۷۸ Aa
کاتالاز (میلی‌مول در لیتر)	گروه شاهد	۰/۰±۰۲۴/۰۰ Aa	۰/۰±۰۱۷/۰۰ Aa	۰/۰±۰۱۹/۰۰ Aa
	گروه اول	۰/۰±۰۲۵/۰۰ Aa	۰/۰±۰۲۸/۰۱ Aa	۰/۰±۰۲۹/۰۰ Aa
	گروه دوم	۰/۰±۰۲۵/۰۰ Ba	۰/۰±۰۲۱/۰۰ Ba	۰/۰±۰۱۳/۰۰ Aa
	گروه سوم	۰/۰±۰۲۵/۰۰ Ba	۰/۰±۰۲۵/۰۰ Ba	۰/۰±۰۱۴/۰۰ Aa
گلوتاتیون (میکرومول بر میلی‌گرم)	گروه شاهد	۰/۰±۰۹/۰۱ Aa	۰/۰±۱/۰۰ Aa	۰/۰±۱/۰۱ Aa
	گروه اول	۰/۰±۰۹/۰۱ Aa	۰/۰±۲۲/۰۱ Bab	۰/۰±۱۲/۰۴ Aa
	گروه دوم	۰/۰±۱۱/۰۰ Aa	۰/۰±۳/۰۲ Bb	۰/۰±۴۲/۱ Cb
	گروه سوم	۰/۰±۰۹/۰۰ Aa	۰/۰±۱/۰ Aa	۰/۰±۴۸/۱ Bb
مالون دی‌آلدهید (میکرومول بر میلی گرم)	گروه شاهد	۱/۰±۷۳/۱۷ Aa	۲/۰±۳۷/۱۸ Ba	۲/۰±۳۲/۵۲ Ba
	گروه اول	۱/۰±۸۳/۴۸ Aa	۲/۰±۷۳/۸۹ Ba	۲/۰±۴۴/۵۹ Ba
	گروه دوم	۱/۰±۸۳/۴۸ Aa	۲/۰±۵۱/۶۸ Ba	۲/۰±۳۳/۲۴ Ba
	گروه سوم	۱/۰±۸۴/۵۳ Aa	۲/۰±۶۸/۴۳ Ba	۱/۰±۹۷/۷۵ Aa

حروف کوچک لاتین ناهمنام نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر ستون و حروف بزرگ ناهمنام نشانگر تفاوت معنی‌دار در هر سطر است (P<۰/۰۵).

جدول ۴: تاثیر باکتری‌های پروبیوتیکی جدا شده از روده ماهیان استان‌های خوزستان، بوشهر و هرمزگان بر فاکتورهای استرس اکسیداتیو در سرم خون ماهی باس دریایی آسیایی

پارامتر	گروه‌ها	روز صفر	روز ۳۰	روز ۶۰
سوپراکسید دیسموتاز (واحد بین‌الملل بر میلی‌گرم بر دقیقه)	گروه شاهد	۱۰۳/۴±۹۴/۴۲ Aa	۱۰۲/۸±۵/۱۹ Ab	۹۸/۶±۶۶/۳ Aa
	گروه اول	۹۹/۵±۲۷/۷۳ Aa	۸۸/۳±۳۳/۳۳ Aa	۱۵۵/۳±۵۵/۸۴ Bb
	گروه دوم	۱۰۰/۸±۸۱/۴۵ Aa	۸۶/۵±۱۱/۰۹ Aa	۱۵۱/۳±۶۶/۳۳ Bb
	گروه سوم	۹۹/۷±۵/۹۷ Aa	۸۷/۳±۷۷/۸۴ Aa	۱۵۹/۳±۴۴/۱۲ Bb
کاتالاز (میلی‌مول در لیتر)	گروه شاهد	۰/۰±۰۰۱/۰۰ Aa	۰/۰±۰۰۱/۰۰ Aa	۰/۰±۰۰۱/۰۰ Aa
	گروه اول	۰/۰±۰۰۱/۰۰ Aa	۰/۰±۰۰۳/۰۰ Bb	۰/۰±۰۰۰/۰۰ Aa
	گروه دوم	۰/۰±۰۰۱/۰۰ Aa	۰/۰±۰۰۱/۰۰ Aa	۰/۰±۰۰۰/۰۰ Aa
	گروه سوم	۰/۰±۰۰۱/۰۰ Aa	۰/۰±۰۰۴/۰۰ Bb	۰/۰±۰۰۰/۰۰ Aa
گلوتاتیون (میکرومول بر میلی‌گرم)	گروه شاهد	۲/۰±۷۱/۴۱ Aa	۳/۰±۲۷/۸۲ Aa	۲/۰±۸۷/۸۱ Aa
	گروه اول	۳/۰±۵۱/۸ Aa	۴/۰±۱۵/۸۹ Aa	۴/۰±۶۵/۸۳ Bb
	گروه دوم	۲/۰±۸/۳۱ Aa	۲/۰±۸۷/۹۵ Aa	۲/۰±۹۷/۹۸ Aa
	گروه سوم	۳/۰±۵۴/۷ Aa	۴/۰±۰۱/۸۲ Aa	۳/۰±۷۴/۷۱ Aab
مالون دی‌آلدهید (میکرومول بر میلی‌گرم)	گروه شاهد	۱/۰±۳۱/۱۳ Aa	۱/۰±۲۸/۲۶ Aa	۱/۰±۴۳/۲۵ Aa
	گروه اول	۱/۰±۲۴/۱۶ Aa	۱/۰±۳۸/۱۵ Aa	۱/۰±۷/۴۲ Aa
	گروه دوم	۱/۰±۱۶/۰۹ Aa	۱/۰±۴۳/۳۸ Aa	۱/۰±۴/۳ Aa
	گروه سوم	۱/۰±۲۸/۰۸ Aa	۱/۰±۴۴/۲۶ Aa	۱/۰±۳۴/۳۳ Aa

حروف کوچک لاتین ناهمنام نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر ستون و حروف بزرگ ناهمنام نشانگر تفاوت معنی‌دار در هر سطر است (P<۰/۰۵).

بحث

استرس اکسیداتیو به‌دلیل افزایش تولید ROS یا کاهش سطح پروتئین‌های حذف‌کننده ROS رخ می‌دهد (۳۰). گونه‌های اکسیژن فعال با چندین واکنش آنزیمی و فرایندهای شیمیایی تولید می‌شوند (۳۱) و منبع اصلی تولید ROS کمپلکس اکسیداز NADPH (NOX) است (۳۲). با توجه به اهمیت استرس اکسیداتیو در پرورش آبزیان، به‌ویژه در سیستم‌های پرورشی مدرن که بیش‌تر استرس‌زا هستند، محققان به بررسی امکان بهبود دفاع آنتی‌اکسیدانی موجودات زنده با استفاده از میکروب‌های مفید می‌پردازند. برای جلوگیری از عدم تعادل تولید ROS، ارگانیزم‌های هوازی می‌توانند تشکیل ROS را کاهش داده یا واکنش‌پذیری بالای چنین ترکیباتی را از طریق ترکیبات آنتی‌اکسیدانی تولیدشده توسط سلول (منبع درون‌زا) یا ازطریق رژیم غذایی (منبع برون‌زا) کاهش دهند (۸). بنابراین رژیم غذایی به‌عنوان یک عامل مهم غیرزنده، می‌تواند بر استرس اکسیداتیو موجودات زنده تأثیر بگذارد (۳۳). طی دهه‌های گذشته، چندین محقق جنبه‌های مختلف تجویز افزودنی‌های خوراکی را که از طریق تعدیل تعادل میکروبی در روده بر عملکرد و سلامت ماهی تأثیر می‌گذارد را مورد بررسی قرار دادند (۳۴). مواد افزودنی اصلی در این گروه پروبیوتیک‌ها هستند (۳۵). گزارش شده است که پروبیوتیک‌ها می‌توانند متابولیت‌هایی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی مانند گلوتاتیون (GSH)، بوتیرات، فولات و اگزو پلی ساکاریدها (EPS) تولید کنند (۳۰). گلوتاتیون ردوکتاز (GSH) یکی از آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی است که رادیکال‌هایی مانند هیدروژن پراکسیداز و رادیکال‌های هیدروکسیل را از بین می‌برد (۳۶).

در مطالعه حاضر تغذیه باس دریایی آسیایی با غذای مکمل شده با سویه‌های باکتریایی جدا شده باعث افزایش فعالیت گلوتاتیون در پایان دوره آزمایشی شد. سویه‌های پروبیوتیک قادر به تولید مستقیم یا القای انتشار گلوتاتیون از روده‌ها هستند. از این‌رو، آن‌ها می‌توانند پتانسیل آنتی‌اکسیدانی داشته باشند (۳۷). در راستای مطالعه حاضر، Yang و همکاران، مطالعه‌ای را بر روی اثر پروبیوتیک *Bacillus cereus* روی سیستم آنتی‌اکسیدانی ماهی *Carassius auratus* انجام دادند (۳۸). آن‌ها دریافتند که تغذیه این ماهی با این گونه پروبیوتیک باعث افزایش معنی‌دار مقادیر گلوتاتیون موجود در بافت روده و سرم می‌شود. هم‌چنین Gobi و همکاران (۳۹) و Wang و همکاران (۴۰) به‌ترتیب گزارش دادند که تغذیه ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) و *Salmo salar* با غذای حاوی *Bacillus* sp اثرات مثبتی بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی این گونه‌ها دارد. در مطالعه حاضر تغذیه باس دریایی آسیایی با غذای مکمل شده با سویه‌های باکتریایی جدا شده باعث افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز سرم و کاهش مقدار این شاخص در کبد در پایان دوره آزمایشی شد. سوپر اکسید دیسموتاز و گلوتیون اس-ترانسفراز و ردوکتاز به‌عنوان آنزیم‌های مهم در دستگاه دفاعی آنتی‌اکسیدانی هستند. افزایش فعالیت این آنزیم‌ها نشان‌دهنده مهار شدن فعالیت رادیکال‌های آزاد و بهبود وضعیت اکسیدان بدن ماهیان است (۴۱). محققان مختلف دریافتند که پروبیوتیک‌ها به‌طور معنی‌دار پراکسیداسیون لیپیدی و تشکیل نیتریک اکساید را در بافت‌ها مهار کرده و از این طریق آسیب اکسیداتیو ایجاد شده را کاهش، و مقادیر از قبیل گلوتاتیون پراکسیداز، گلوتاتیون ردوکتاز و سوپراکسید دیسموتاز را افزایش می‌دهند (۴۲). Zhang و همکاران، گزارش کردند استفاده

از ۳درصد فروکتوالیگوساکارید همراه با باکتری پروبیوتیکی *Bacillus licheniformis* در جیره غذایی ماهی سیم (*Megalobrama terminalis*)، منجر به افزایش فعالیت سوپراکسیداز دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز در کبد شد (۴۳). هم‌چنین Lee و همکاران، در مارماهی ژاپنی (*Anguilla japonica*) تغذیه شده با مخلوط پروبیوتیک *Bacillus subtilis* و *Lactobacillus plantarum* گزارش دادند که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی افزایش یافت (۴۴). مالون‌دی‌آلدهید محصول ثانویه پراکسیداسیون لیپیدها بوده که به‌صورت مستقیم می‌تواند درجه پراکسیداسیون لیپید و به‌صورت غیرمستقیم سطح آسیب به سلول را نشان دهد (۴۵). هم‌چنین کاتالاز آنزیمی است که تقریباً در همه موجودات زنده و اکثر اندام‌های بدن یافت می‌شود. این آنزیم رادیکال‌های آزاد پراکسید هیدروژن (H_2O_2) را به آب و اکسیژن تبدیل می‌کند (۴۶). در مطالعه حاضر تغذیه باس دریایی آسیایی با غذای مکمل شده با سویه‌های باکتریایی جدا شده تغییری در میزان فعالیت کاتالاز و مالون‌دی‌آلدهید در کبد و سرم در پایان دوره آزمایشی ایجاد نکرد. در راستای مطالعه حاضر، Dawood و همکاران، مطالعه‌ای را بر روی اثر پروبیوتیک *Aspergillus oryzae* روی سیستم آنتی اکسیدانی ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) انجام دادند. آن‌ها دریافتند که تغذیه این ماهی با این گونه پروبیوتیک تاثیر معنی‌داری روی مقادیر کاتالاز و مقدار مالون دی آلدهید موجود در سرم خون ندارد (۴۷). اختلاف در نتایج مطالعات انجام شده در زمینه پروبیوتیک‌ها ناشی از تفاوت در گونه پرورشی، اندازه، سن، مرحله به کارگیری پروبیوتیک، طول دوره پرورش، شرایط بهداشتی و سیستم پرورشی، رفتارهای تغذیه‌ای، خصوصیات فیزیولوژیک، فرمولاسیون جیره پایه، نوع پروبیوتیک مصرفی، درجه خلوص آن‌ها و میزان به کارگیری آن‌ها در جیره مصرفی، روش‌های افزودن آن‌ها به جیره و میکروبیوتای روده‌ای گونه پرورش دارد (۴۸، ۴۹). براساس یافته‌های به‌دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که افزودن سویه‌های جدا شده از خوزستان، بوشهر و هرمزگان در جیره غذایی ماهیان باس دریایی آسیایی می‌تواند سبب بهبود سیستم آنتی‌اکسیدانی این گونه گردد. نتایج نشان داد که بعد از ۶۰ روز مصرف پروبیوتیک مقادیر سوپر اکسید دیسموتاز کبد در تمام گروه‌ها کاهش و مقادیر گلوتاتیون در گروه‌های دوم و سوم افزایش معنی‌داری داشته‌است. مقادیر سوپراکسید دیسموتاز سرم‌خون در تمام گروه‌ها و مقادیر گلوتاتیون در گروه اول افزایش معنی‌داری نشان داد. هم‌چنین به‌نظر می‌رسد که افزودن سویه‌های جدا شده از هرمزگان (گروه سوم) روی شاخص‌های استرس اکسیداتیو تاثیر بهتری داشته است. علی‌رغم مطالعات گسترده و تلاش‌های تحقیقاتی در مورد تأثیر پروبیوتیک‌ها بر عملکرد رشد، پاسخ ایمنی و مقاومت در برابر بیماری‌ها، مطالعات محدودی روی تعدیل دفاع آنتی‌اکسیدانی در ماهی با استفاده از پروبیوتیک‌ها متمرکز شده است. تعیین اهمیت این افزودنی‌های خوراکی دوستدار محیط زیست در دفاع آنتی‌اکسیدانی، یکی از زمینه‌های آشکار تحقیقات آینده است.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب پایان‌نامه و با استفاده از امکانات دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز انجام گردید، در این خصوص از اعطای پژوهانه معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1 **Reverter, M., Bontemps, N., Lecchini, D., Banaigs, B. and Sasal, P., 2014.** Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. Aquaculture. 433: 50-61.

2 **Zhu, F., 2020.** A review on the application of herbal medicines in the disease control of aquatic animals. Aquaculture. 526: 735422.

3 **Nhu, T.Q., Hang, B.T.B., Bach, L.T., Hue, B.T.B., Quetin-Leclercq, J., Scippo, M.L., Phuong, N.T. and Kestemont, P., 2019.** Plant extract-based diets differently modulate immune responses and resistance to bacterial infection in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). Fish and Shellfish Immunology. 92: 913-924.

4 **Mohammadian, T., Ghanei-Motlagh, R., Molayemraftar, T., Mesbah, M., Zarea, M., Mohtashamipour, H. and Jangaran Nejad, A., 2021.** Modulation of growth performance, gut microflora, non-specific immunity and gene expression of proinflammatory cytokines in shabout (*Tor grypus*) upon dietary prebiotic supplementation. Fish and Shellfish Immunology. 112: 38-45.

5 **Awad, E. and Awaad, A., 2017.** Role of medicinal plants on growth performance and immune status in fish. Fish and Shellfish Immunology. 67: 40-54.

6 **Karami, E., Mesbah, M., Molayem raftar, T., Mohammadian, T., Hoseini, S.S. and Nazari, M., 2016.** Effects of aqueous extract of *Sargassum angustifolium* (Agardh, 1820) on some of the hematological parameters in Common carp *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758). Journal Aquatic Ecology. 6(2): 124-133.

7 **Fuller, R., 1989.** Probiotics in man and animals. Journal of Applied Bacteriology. 66: 365-378.

8 **Hoseinifar, S.H., Yousefi, S., Doan, H.V., Ashouri, G., Gioacchini, G., Maradonna, F. and Carnevali, O., 2020.** Oxidative Stress and Antioxidant Defense in Fish: The Implications of Probiotic, Prebiotic, and Synbiotics. Reviews in Fisheries Science & Aquaculture. 198-217 .

9 **Almasi Bardemiri, B., Alishahi, M. and Javadzadeh, N., 2018.** Investigating the effect of oral administration of different levels of probiotic *Lactobacillus casei* on growth and survival indicators of rainbow trout. Journal of Animal environment. 11(2): 266-259. (In Persian)

10 **Mohammadi Makvandi, Z., Mesbah, M., Gharibi, D., Alishahi, M. and Gurbanpour, M., 2018.** Evaluation of the antimicrobial activity of bacteria isolated from the intestine, water and sediments of the western white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) breeding environment in Choebde area of Abadan. Journal of Animal environment. 11(1): 293-302. (In Persian)

11 **Azzi, A., Davies, K. and Kelly, F., 2004.** Free radical biologyeterminology and criticalthinking. FEBS Letters. 558: 3-6.

12 **Anjana Vaman, V.S., Tinu, S.K., Geetha, C.S., Lissy, K.K. and Mohanan, P.V., 2013.** Effect offibrin glue on antioxidant defense mechanism, oxidative DNA damage and chromosomal aberrations. Toxicology Mechanisms and Methods. 23(7): 500-508.

13 **Hintsala, H.R., Jokinen, E., Haapasaari, K.M., Moza, M., Ristimєaki, A., Soini, Y., Koivunen, J. and**

Karihtala, P., 2016. Nrf2/Keap1 pathway and expression of oxidative stress lesions 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and nitrotyrosine in Melanoma. Anticancer Research. 36(4): 1497-1506.

14 **Bard, S.M., 2000.** Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. Aquatic Toxicology. 48: 357-389.

15 **Sayeed, I., Parvez, S., Pandey, S., Bin-Hafeez, B., Haque, R. and Raisuddin, S., 2003.** Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrinin freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. Ecotoxicology and Environmental Safety. 56: 295-301.

16 **Narra, M.R., 2016.** Single and cartel effect of pesticides on biochemical and haematological status of *Clarias batrachus*: a long-termmonitoring. Chemosphere. 144: 966-974.

17 **Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., 1990.** The antioxidants of human extracellular fluids. Archives of Biochemistry and Biophysics Journal. 280(1): 1-8.

18 **Glencross, B., 2006.** The nutritional management of barramundi, *Lates calcarifer*-a review. Aquac Nutr 12: 291-309.

19 **Jerry, D.R., 2013.** Biology and Culture of Asian Seabass *Lates Calcarifer*. CRC Press.

20 **Gholipour, M., Soltanian, S., Akhlaghi, M., Alishahi, M., Mirbakhsh, M. and Gheysari, H., 2019.** Investigating the effect of microencapsulation of Lactobacillus plantarum bacteria with alginate/chitosan on growth indicators and digestive enzyme activity of Asian sea bass (*Lates calcarifer*). Journal of Animal environment. 12(3): 197-206. (In Persian)

21 **Mohammadian, T., Gurbanpour, M., Alishahi, M., Tabandeh, M. and Gharibi, D., 2012**. Isolation and biochemical identification of *lactobacilli* with probiotic potential from the intestines of Large scaled barb. Iranian veterinary medicine. 10(2): 97-88. (In Persian)

22 **Chang, C.I.W. and Liu, W.Y., 2002.** An evaluation of two bacterial strains, *Enterococcus faecium* SF68 and *Bacillus toyoi*, for reducing edwardsiellosis in cultured European eel, *Anguilla anguilla* L. Journal of Fish Disseases. 25: 311-315.

23 **Chu, W., Lu, F., Zhu, W. and Kang, C., 2012.** Isolation and characterization of new potential probiotic bacteria based on quorum-sensing system. Journal of Applied Microbiology. 110: 202-208.

24 **Hao, L. and Chen, L., 2012.** Oxidative stress responses in different organs of carp (*Cyprinus carpio*) with exposure to ZnO nanoparticles. Ecotoxicology and Environmental Safety. 80: 103-110.

25 **Kono, Y., 1978**. Generation of superoxide radical during autoxidation of hydroxylamine and an assay for superoxide dismutase. Archives of Biochemistry and Biophysics. 186: 189-195.

26 **Korolyuk, M.A., Ivanova, L.I., Mayorova, I.G. and Tokarev, V.E., 1998**. Method for catalase activity determination. Laboratornoe Delo. 1: 16-18 .(In Russian)

27 **Placer, Z.A., Cushman, L.L. and Johnson, B.C., 1966.** Estimation of lipid peroxidation (*Malonyl dialdehyde*) in biochemical systems. Analytical Biochemistry. 16: 359-364.

28 **Konukoglu, D., Serin, O., Ercan, M. and Turhan, M.S., 2003.** Plasma homocysteine levels in obese and non-obese subjects with or without hypertension; its relationship with oxidative stress and copper. Clin Biochem. 36: 405-408.

29 **Ellman, G.L., 1959.** Tissue sulfhydryl groups. Archives of Biochemistry and Biophysics. 82: 70-77.

30 **Lin, M.Y. and Yen, C.L., 1999**. Antioxidative ability of lactic acid bacteria. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 47(4): 1460-1466.

31 **Lin, C.C., Yang, C.C., Wang, C.Y., Tseng, H.C., Pan, C.S., Hsiao, L.D. and Yang, C.M., 2015.** NADPH oxidase/ROS-dependent VCAM-1 induction on TNF-a-challenged human cardiac reviews in fisheries science & aquaculture 17 fibroblasts enhances monocyte adhesion. Frontiers in Pharmacology. 6: 310.

32 **Rahman, I., Biswas, S.K. and Kode, A., 2006.** Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. European Journal of Pharmacology. 533(1-3): 222-239.

33 **Martınez-Alvarez, R.M., Morales, A.E. and Sanz, A., 2005.** Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. Rev Fish Biol Fisheries. 15(½): 75-88.

34 **Van Doan, H., Hoseinifar, S.H., Ringø, E., Esteban, M.A., Dadar, M., Dawood, M.A.O. and Faggio, C., 2020.** Host-associated probiotics: a key factor in sustainable aquaculture. Reviews in Fisheries Science & Aquaculture. 28(1): 16-42.

35 **Dawood, M.A.O., Koshio, S. and Esteban, M.A., 2018.** Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture. Reviews in Aquaculture. 10(4): 950-974.

36 **Zilmer, M., Soomets, U., Rehema, A. and Langel, U., 2005**. The glutathione system as an attractive therapeutic target. Drug Design Reviews. 2(2): 121-127.

37 **Mishra, V., Shah, C., Mokashe, N., Chavan, R., Yadav, H. and Prajapati, J., 2015.** Probiotics as potential antioxidants: a systematic review. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 63(14): 3615-3626.

38 **Yang, G., Shen, K., Yu, R., Wu, Q., Yan, Q., Chen, W., Ding, L., Kumar, V., Wen, C. and Peng, M., 2020.** Probiotic (*Bacillus cereus*) enhanced growth of *Pengze crucian* carp by modulating the antioxidant defense response and exerting beneficial impacts on inflammatory response via Nrf2 activation. Aquaculture. 529: 735691.

39 **Gobi, N., Vaseeharan, B., Chen, J.C., Rekha, R., Vijayakumar, S., Anjugam, M. and Iswarya, A., 2018.** Dietary supplementation of probiotic *Bacillus licheniformis* Dahb1 improves growth performance, mucus and serum immune parameters, antioxidant enzyme activity as well as resistance against *Aeromonas hydrophila* in tilapia *Oreochromis mossambicus*. Fish and Shellfish Immunology. 74: 501-508.

40 **Wang, C., Liu, Y., Sun, G., Li, X. and Liu, Z., 2019. Growth**, immune response, antioxidant capability, and disease resistance of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed *Bacillus velezensis* V4 and *Rhodotorula mucilaginosa* compound. Aquaculture. 500: 65-74.

41 **Puangkaew, J., Kiron, V., Satoh, S. and Watanabe, T., 2005**. Antioxidant defense of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to dietary n-3 highly unsaturated fatty acids and vitamin E contents. Comparative Biochemistry and Physiology. 140: 187-196.

42 **Yadav, H., Jain, S. and Sinha, P.R., 2008.** Oral administration of dahi containing probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* delayed the progression of streptozotocin-induced diabetes in rats. Journal of Dairy Research. 75: 189-195.

43 **Zhang, C.N., Li, X.F., Xu, W.N., Jiang, G.Z., Lu, K.L., Wang, L.N. and Liu, W.B., 2013.** Combined effects of dietary fructooligosaccharide and *Bacillus licheniformis* on innate immunity, antioxidant capability and disease resistance of triangular bream (*Megalobrama terminalis*). Fish and Shellfish Immunology. 35(5): 1380-1386.

44 **Lee, S., Katya, K., Park, Y., Won, S., Seong, M. and Bai, S.C., 2017.** Comparative evaluation of dietary probiotics *Bacillus subtilis* WB60 & *Lactobacillus plantarum* KCTC3928 on the growth performance, immunological parameters, gut morphology and disease resistance in Japanese eel, *Anguilla japonica*. Fish Shellfish Immunol. 61: 201-210.

45 **Pang, Sh., Xing, Y., Riu, L. and Jian Ping, C., 2010.** Effects of nitrobenzene on liver antioxidant defense system of *Carassius auratus*. Chemical Research in Chinese Universities. 26(2): 204-209.

46 **Chelikani, P., Fita, I. and Loewen, P.C., 2004.** Diversity of structures and properties among catalases. Cellular and Molecular Life Sciences. 61: 192-208.

47 **Dawood, M.A.O., Eweedah, N.M., Moustafa, E.M. and Farahat, E.M., 2020.** Probiotic effects of Aspergillus oryzae on the oxidative status, heat shock protein, and immune related gene expression of Nile tilapia under hypoxia challenge. Aquaculture. 520: 734669.

48 **Gomez Gill, B., Roque, A. and Turnbull, J.F., 2000**. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. Aquaculture. 191: 259-270.

49 **Ringø, E., Olsen, R., Gifstad, T., Dalmo, R., Amlund, H., Hemre, G.I. and Bakke, A., 2010.** Prebiotics in aquaculture: A review. Aquaculture Nutrition. 16: 117-136.