ارزیابی توان آنتی‌اکسیدانی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (*Lactobacillus plantarum*) ریزپوشانی شده با آلژینات/کیتوزان در فیل‌ماهی جوان *Huso huso*

- **سراج بیتا***: دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران
- **تکاور محمدیان**: گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
- **رسول ناصری پورتکلو**: گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۶

چکیده

استفاده از پروبیوتیک‌ها در آبزی‌پروری به‌دلیل اثرات مفید در سلامت ماهی رشد فزاینده‌ای داشته است. یکی از مشکلات اصلی استفاده از پروبیوتیک‌ها غیرفعال شدن آن‌ها در شرایط معدی - روده‌ای ماهی است، محافظت پروبیوتیک‌ها با پوشش‌های فیزیکی توان پروبیوتیکی آن‌ها را بهبود می‌بخشد، لذا در این تحقیق اثر ریزپوشانی باکتری پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس پلانتاروم (*Lactobacillus plantarum*) با نانوذرات آلژینات/کیتوزان بر ویژگی‌های پروبیوتیکی آن در شرایط برون‌تنی (Invitro) و نیز اثرات پروبیوتیکی آن در فیل‌ماهی جوان (*Huso huso*) ارزیابی شد. ابتدا اثر ریزپوشانی باکتری بر ویژگی‌های پروبیوتیکی باکتری در شرایط برون‌تنی شامل: تحمل pH، تحمل صفرا، زنده‌مانی در شرایط مشابه معدی- روده‌ای بررسی شد، سپس اثر پروبیوتیک در فیل‌ماهی جوان مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور تعداد ٤٨٠ قطعه فیل‌ماهی با میانگین وزنی ۲۷/۲±۲/۸ گرم به چهار تیمار در سه تکرار به‌صورت زیر تقسیم شدند: تیمار T1 با خوراک حاوی آلژینات/کیتوزان بدون پروبیوتیک، T۲ با خوراک حاوی پروبیوتیک ریزپوشانی شده با آلژینات/کیتوزان، T۳ با خوراک حاوی پروبیوتیک بدون پوشش و گروه شاهد با خوراک پایه تغذیه شدند. ماهیان به‌مدت ٦٠ روز با جیره‌های آزمایشی تغذیه شدند. پس از اتمام دوره آزمایش، تیمارها به‌مدت ۱۵ روز با غذای فاقد پروبیوتیک غذادهی شدند. نمونه‌گیری از ماهیان در روزهای ۳۰، ٦٠ و ۷۵ تحقیق انجام گرفت و آنزیم‌های اکسیداتیو و آنزیم‌های کبدی در روزهای ۳۰، ٦٠، ۷۵ مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج مرحله اول تحقیق نشان داد بیش‌ترین میزان پراکسید دیسموتازو گلوتاتیون پراکسیداز در تیمار تغذیه شده با آلژینات/کیتوزان و پلانتاروم ریزپوشانی شده در روزهای ۳۰ و ٦٠، بیش‌ترین میزان فعالیت مالون دی‌آلدئید در تیمار تغذیه شده با پلانتاروم ریزپوشانی شده در روز ۳۰ مشاهده شد و بیش‌ترین میزان فعالیت کاتلاز در تیمار تغذیه شده با پلانتاروم در روز ۳۰ مشاهده شد. به‌نظر می‌رسد ریزپوشانی باکتری با نانوذرات کیتوزان/آلژینات کارایی پروبیوتیکی باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم را بهبود بخشید (P<۰/۰۵) و توانسته است عملکرد مثبت پروبیوتیک را بهبود بخشد.

کلمات کلیدی: *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، نانوذرات کیتوزان/آلژینات، آنتی اکسیدان، فیل ماهی

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: bitaf79@gmail.com

مقدمه

آبزی‌پروری یکی از مهم‌ترین منابع تأمین پروتئین بشری است که به‌دلیل پتانسیل بالقوه تولید و امنیت غذایی، امروزه بیش‌تر از قبل مورد توجه قرار می‌گیرد. به‌همین دلیل در سال‌های اخیر آبزی‌پروری یکی از سریع‌الرشدترین بخش‌های تولید غذا بوده و بیش‌ترین میزان رشد را در میان صنایع دیگر داشته است. کاهش هزینه‌های پرورش از طریق بهبود جیره‌های غذایی و نیز افزایش مقاومت آبزیان پرورشی در برابر شرایط استرس‌زای پرورش و نیز بیماری‌ها، یکی از موارد مهم در بالابردن کارایی تولید ماهی است. در چند دهه گذشته دریای خزر به تنهایی ۹۰٪ خاویار جهان را تأمین می‌نمود ولی در دهه گذشته میزان تولید گوشت تاس‌ماهیان از ۶۴۳ تن در سال ۱۳۸۱ به ۶۸ تن در سال ۱۳۹۱ و میزان تولید خاویار از ۵۸/۸ تن به ۰/۴ تن کاهش یافته است (سالنامه آماری سازمان شیلات، ۱۳۹۲). یکی از مشکلاتی که صنعت آبزی‌پروری همواره در کنار رشد قابل توجه خود با آن مواجه بوده، شیوع بیماری‌ها است که گسترش اقتصادی این بخش را در بسیاری از کشورهای جهان تحت تأثیر قرار داده است (FAO، ۲۰۱۰). همواره راه‌حل‌هایی برای حل این مشکلات ارائه گردیده که موفقیت چندانی را در پی نداشته‌اند. استفاده از پروبیوتیک به‌عنوان مکمل غذایی برای حیوانات پرورشی به دهه ۱۹۷۰ برمی‌گردد (Fuller، ۱۹۸۹). تاکنون مطالعات بسیاری در زمینه کاربرد پروبیوتیک‌ها در آبزی‌پروری انجام شده است و موجودات زنده مختلفی از جمله باکتری‌های گرم مثبت و منفی، مخمرها، جلبک‌های تک یاخته‌ای به عنوان پروبیوتیک در آبزی‌پروری بررسی شده و اثرات بسیار سودمند آن‌ها در افزایش ایمنی، بهبود رشد، مقاومت در برابر بیماری‌های گونه‌های مختلف ماهی و میگو به اثبات رسیده است (Irianto و Austin، ۲۰۰۲). در حال حاضر بسیاری از بخش‌های صنعت آبزیان شروع به کاهش استفاده و وابستگی خود به داروهای ضدمیکروبی کرده‌اند. پیشرفت در تولید واکسن، محرک‌های ایمنی و پروبیوتیک (ساختار این مواد استفاده از باکتری‌های مفید و آنزیم آن‌ها است) در آینده‌ای نزدیک جای درمان دارویی را خواهد گرفت، به‌طور مثال در کشور نروژ استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در پرورش آبزیان از حدود ۵۰ تن در سال ۱۹۸۷ به ۷۴۶ کیلو در سال ۲۰۱۲ کاهش یافته است و در طی همین مدت تولید آبزیان از ۵۰۰۰۰ تن به حدود ۱ میلیون تن افزایش یافته است، به‌طوری‌که هم اکنون در این زمینه به‌عنوان یک کشور الگو شناخته می‌شود. اثر مثبت استفاده از پروبیوتیک‌ها در روند پرورش ماهیان خاویاری به اثبات رسیده است (Merrifield و Ringo، ۲۰۱۴). توسعه غذاهایی که سبب بهبود وضعیت اکسیدان/ آنتی‌اکسیدان و در نتیجه تأمین سلامتی ماهی می‌شوند، یکی از فاکتورهای مهم اولویت تحقیقاتی در بحث آبزی‌پروری است، به‌طوری که امروزه غذاهای غنی شده با ترکیبات فعال فیزیولوژیکی مانند پروبیوتیک، پری‌بیوتیک و سین‌بیوتیک‌ها برتری مصرف دارند. استفاده از پروبیوتیک‌ها برای بهبود وضعیت متابولیکی، فاکتورهای التهابی و وضعیت اکسیدان/ آنتی‌اکسیدان بدن موجودات بسیار قابل‌توجه است (Kullisaar و همکاران، ۲۰۰۳). کاهش التهاب و بهبود مکانیسم دفاعی آنتی‌اکسیدانی به‌وسیله این مکمل‌ها ممکن است به‌دلیل اثرات آن‌ها بر افزایش سطح فاکتورهای آنتی‌اکسیدانی باشد (Peran و همکاران، ۲۰۰۹). امروزه عوامل داخلی و خارجی بسیاری شناخته شده‌اند که از طریق فعال کردن واکنش‌های آنزیمی، رادیکال‌های آزاد تولید می‌کنند و به‌طور طبیعی سیستم‌های دفاعی بدن تلاش می‌کنند تا اثرات تخریبی این رادیکال‌های ایجاد شده را به‌حداقل برسانند و از سلول‌های بدن در برابر آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد محافظت کنند (Hasting و Gascoyne، ۱۹۹۲). فعالیت آنزیم‌های کبدی سرم از جمله آلکالین فسفاتاز (ALP)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپارات آمینوترانسفراز (AST) برای ارزیابی عملکرد کبد مورداستفاده قرار می‌گیرد. Scoll و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند که GGT, LDH, AST, ALT معمولاً زمانی در سرم ظاهر می‌شوند که آسیب کبد و بافت ماهیچه به‌علت استرس فراوان ایجاد شود. اگرچه دلایل مختلفی برای تغییر غلظت و فعالیت آنزیم‌های خون وجود دارد، بسیاری از آنزیم‌ها تغییرات فیزیولوژیک مهم ناشی از سن، جنس، دوره‌های جنسی، تغذیه‌ای، فعالیت بدنی و غیره را نشان می‌دهند (Rahman و همکاران،۲۰۰۴). Ziaei و همکاران (۲۰۰۹) نیز گزارش کردند که پروبیوتیک‌ها غلظت آنزیم‌های کبد را تغییر می‌دهند. لذا با توجه به اهمیت فیل‌ماهی در ایران و جهان و این مهم که تاکنون تأثیر پروبیوتیک‌هایی که ریزپوشانی شده را روی افزایش دفاع آنتی‌اکسیدانی و آنزیم‌های کبدی در فیل‌ماهی تحقیقی صورت نگرفته است، این مطالعه پایه‌ریزی شد.

مواد و روش‌ها

تهیه باکتری پروبیوتیک: در این تحقیق از پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جداسازی شده از روده ماهی شیربت (*Tor grypus*) استفاده شد. این باکتری با استفاده از ژن ۱۶s rRNA توسط محمدیان و همکاران (۱۳۹۲) جداسازی و شناسایی شد. باکتری مورد نظر در سرم فیزیولوژیک استریل به‌صورت سوسپانسیون درآمد و بر اساس استاندارد مک فارلند با غلظت $۲/۴ \times ۱۰^{۹}$ باکتری زنده در هر میلی‌لیتر تنظیم شدند و جهت ریزپوشانی کردن مورداستفاده قرار گرفت.

فرآیند ریزپوشانی (Micro encapsulation): در این تحقیق براساس روش Huiyi و همکاران (۲۰۱۳) از تکنیک ریزپوشانی امولسیون

بهره‌گیری شد. امولسیون کردن یک تکنیک شیمیایی مناسب برای ریزپوشانی سلول‌های زنده پروبیوتیکی است. برای امولسیون کردن یک امولسیفایر و سورفاکتانت و ترکیب قوام‌دهنده (تثبیت‌کننده) مانند کلرید کلسیم استفاده می‌گردد. مشخصات شمارش تعداد باکتری‌ها در محصول ریزپوشانی شده و ویژگی‌های محصول ریزپوشانی شده و بررسی برون‌تنی توان پروبیوتیکی باکتری‌های ریزپوشانی شده مورد ارزیابی قرار گرفت.

آماده‌سازی ماهیان مورد آزمایش: این تحقیق در استان گلستان و در ایستگاه تحقیقات شیلاتی قره‌سو واقع درناحیه جنوب‌شرق خلیج گرگان و فاصله ۵ کیلو متری شهرستان بندرترکمن انجام شد. منبع آب ورودی از چاه، تحت فشار وارد مخزن اصلی و از آن‌جا همراه هوادهی وارد هر یک از وان‌ها می‌شد. تعداد ۳۰۰ قطعه فیل‌ماهی با میانگین‌وزنی ۴/۸±۲۳/۳۶ گرم از مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان خاویاری شهیدمرجانی گرگان توسط ماشین حمل بچه‌ماهی مجهز به کپسول‌اکسیژن به ایستگاه قره‌سو و به وان‌های مورد نظر منتقل شدند.

جدول ۱ : ترکیب جیره مورد استفاده شرکت فرادانه مخصوص ماهیان خاویاری

نوع جیره	پروتیین خام (حداقل)	چربی خام (حداقل)	فیبر خام (حداکثر)	خاکستر (حداکثر)	رطوبت (حداکثر)	فسفر (حداقل)	اندازه خوراک میلی‌متر
FFS2	٪۴۵	٪۱۶	٪۳,۵	٪۱۰	٪۱۰	۱/۱	۲/۵-۳
GFS1	٪۴۰	٪۲۰	٪۴,۵	٪۱۰	٪۱۰	۱	۵-۶

ماهیان پس از طی دو هفته سازش با غذای دستی (شرکت فرادانه)، در ۱۲ مخزن فایبر گلاس (۴ تیمار هرکدام با ۳ تکرار) با حجم آب‌گیری ۱۰۰۰ لیتر و با تراکم ۲۵ قطعه در هر مخزن ذخیره سازی شدند. به‌منظور بررسی تأثیر پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بر فاکتورهای بیوشیمیایی ماهیان، ۴ تیمار غذایی تهیه شد. در این تحقیق غذای کنسانتره شرکت فرادانه مخصوص ماهیان خاویاری از روز صفر تا ۳۰ با سایز پیش پرواری (FFS2) و از روز ۳۰ تا روز ۶۰ با سایز پرواری (GFS1) بود. بدین منظور، غذای مورد نیاز برای هر هفته محاسبه و به‌میزان ۲×۱۰^{۹} باکتری ریزپوشانی به هر گرم غذا اضافه شد و سپس در شرایط سایه و در مجاورت جریان هوا خشک و در طول مدت مصرف در یخچال نگه‌داری شد.

جدول ۲: تیماربندی ماهیان در آزمایش مورد نظر

نام گروه	نوع غذا	تعداد ماهی
تیمار یک T۱	غذای حاوی آلژینات و کیتوزان بدون باکتری	**۱۲۰** قطعه (در سه تکرار)
تیمار دو T۲	غذای حاوی باکتری ریزپوشانی شده به روش امولسیون	**۱۲۰** قطعه (در سه تکرار)
تیمار سه T۳	غذای حاوی باکتری بدون پوشش	**۱۲۰** قطعه (در سه تکرار)
تیمار چهار T۴	غذای بدون باکتری	**۱۲۰** قطعه (در سه تکرار)

ارزیابی تجویز پروبیوتیک‌ها بر آنزیم‌های اکسیداتیو: به منظور ارزیابی اثر پروبیوتیک‌ها بر آنزیم‌های اکسیداتیو، ۳ عدد ماهی از هر تکرار در روزهای صفر، ۳۰ و ۶۰ روز پس از تغذیه با پروبیوتیک و روز ۷۵ (یعنی ۱۵ روز پس از قطع مصرف پروبیوتیک) خونگیری و جداسازی سرم صورت‌گرفت و جهت آزمایشات مذکور در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردیدند.

روش اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی سرم خون ماهی

۱- اندازه‌گیری کاتالاز (CAT): براساس روش Koroluk و همکاران، (۱۹۸۸)، آمونیوم مولیبدات با پراکسید هیدروژن موجود در محیط تشکیل کمپلکس زرد رنگی می‌دهد که در طول موج ۴۱۰ نانومتر با روش اسپکتروفتومتری قابل اندازه‌گیری می‌باشد. آنزیم کاتالاز موجود در نمونه با تجزیه پراکسید هیدروژن، این واکنش را مهار می‌کند.

۲- اندازه‌گیری میزان تیول پروتئین (G-SH): معرف المن (Ellman reagent)(دی‌تیو-نیتروبنزوئیک‌اسید(DTNB)) با گروه‌های سولفیدریل احیا (G-SH) واکنش داده و تولید کمپلکس‌رنگی می‌کند که در طول موج ۴۱۲ نانومتر با اسپکتروفتومتری (Unico,۲۱۵) قابل اندازه‌گیری است (Elman، ۱۹۵۹).

۳- اندازه‌گیری مالون دی‌آلدئید (MDA): اندازه‌گیری مالون دی آلدئید با استفاده از کیت آزمایشگاهی شرکت آنزان شیمی انجام شد. در این روش اساس واکنش تشکیل MDA-TBA adduct بین یک مولکول MDA و دو مولکول تیوباربیتوریک اسید (TBARS) بوده، که جذب نوری کمپلکس حاصله در طول موج ۵۳۲ نانومتر قرائت و غلظت TBARS عصاره بافتی در مقایسه با منحنی استاندارد MDA

تعیین شد. بلافاصله جذب نوری نمونه عصاره بافتی، بلانک نمونه عصاره بافتی و استانداردها در برابر آب مقطر در طول موج ۵۳۲ نانومتر، با استفاده از دستگاه میکروپلیت‌ریدر قرائت شد.

۴- سنجش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD): در این روش از تست تقلیل رنگ NBT (Nitro Blue Tetrazolium) استفاده می‌شود و اساس کار به‌شرح زیر است: ۰/۱ میلی‌لیتر سرم فیل‌ماهی به ۲ میلی‌لیتر محلول واکنش‌پذیر که شامل ۰/۲ میلی‌مول گزانتین، ۰/۱۲ میلی‌مول NBT، ۰/۴۹ واحد گزانتین اکسیداز و ۰/۱ مول بافر فسفات (pH=۷) اضافه و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه انکوبه می‌شود. میزان سوپراکسید دیسموتاز به‌وجود آمده از طریق سنجش تقلیل رنگ آبی با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۵۶۰ نانومتر سنجیده و نتایج به‌صورت درصد کاهش مهار آن قرائت می شود (Keilin و Mann، ۱۹۳۸).

روش اندازه‌گیری آنزیم‌های کبدی خون ماهی

۱- آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز: اندازه‌گیری سطح فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز پلاسما براساس مقدار مصرف NADH و تبدیل آن به +NAD صورت گرفت. در این واکنش بیوشیمیایی ال-آسپارتات و اکسی‌گلوتارات در حضور آنزیم AST با یکدیگر واکنش داده و ال-گلوتامات و اکسال‌استات تولید می‌شود، این واکنش برگشت‌پذیر است. سپس اکسال‌استات با NADH و هیدروژن واکنش داده و به ال-مالات و +NAD تبدیل می‌شود. شدت جذب نور در طول موج ۳۴۰ نانومتر و در طی ۳ دقیقه اندازه‌گیری و برحسب میزان جذب نوری OD و براساس فرمول اختصاصی کاتالوگ محاسبه گردید (Moss و Henderson، ۱۹۹۰).

۲- آنزیم آلانین آمینوترانسفراز: اندازه‌گیری سطح فعالیت آنزیم آلانین آمینوترانسفراز پلاسما براساس مقدار مصرف NADH و تبدیل آن به +NAD صورت گرفت. در این واکنش بیوشیمیایی ال-آلانین و اکسی‌گلوتارات در حضور آنزیم ALT با یکدیگر واکنش داده و ال-گلوتامات و پیروات تولید می‌شود، این واکنش برگشت‌پذیر است. سپس پیروات با NADH و هیدروژن واکنش داده و به ال-لاکتات و +NAD تبدیل می‌شود. شدت جذب نور در طول موج ۳۴۰ نانومتر و در طی ۳ دقیقه اندازه‌گیری و برحسب میزان جذب نوری OD و براساس فرمول اختصاصی کاتالوگ محاسبه گردید (Moss و Henderson، ۱۹۹۰).

۳- آنزیم لاکتات دهیدروژناز: اندازه‌گیری سطح فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز پلاسما با استفاده از کیت شرکت پارس‌آزمون براساس تبدیل پیروات به لاکتات صورت گرفت. در این واکنش پیروات با NADH و هیدروژن در حضور LDH واکنش داده و لاکتات و +NAD تولید می‌شود. شدت جذب نور در طول موج ۳۴۰ نانومتر و در طی ۳ دقیقه اندازه‌گیری و برحسب میزان جذب نوری OD و براساس فرمول اختصاصی کاتالوگ محاسبه گردید (Moss و Henderson، ۱۹۹۰).

۴- آنزیم آلکالین فسفاتاز: اندازه‌گیری سطح فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز پلاسما براساس تبدیل نیتروفنیل‌فسفات به نیتروفنول و فسفات صورت گرفت. در این واکنش آلکالین فسفاتاز یا فسفاتاز قلیائی در واکنش پی-نیتروفنیل فسفات با آب دخالت کرده و فسفات و پی-نیتروفنیل تولید می‌شود. شدت جذب نور در طول موج ۴۰۵ نانومتر و در طی ۳ دقیقه اندازه‌گیری و برحسب میزان جذب نوری OD و براساس فرمول اختصاصی کاتالوگ محاسبه گردید (Moss و Henderson، ۱۹۹۰).

تجزیه و تحلیل آماری: جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه و دوطرفه نرم‌افزار SPPS نسخه ۲۲ استفاده شد. برای بررسی معنی‌دار بودن تفاوت میانگین‌ها از پس آزمون دانکن استفاده شد. در تمام بررسی‌ها سطح معنی‌دار آزمون‌ها $p<0/05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

تعداد اولیه باکتری‌های زنده قبل از ریزپوشانی ۲/۴×۱۰۹ cfu /ml محاسبه شد. برحسب داده‌های به‌دست آمده تعداد باکتری‌های به‌دام افتاده در ریزپوشینه‌های این مطالعه ۱۰۹cfu/ml×۰/۰۶±۲/۰۲ اندازه‌گیری شدند.

تعیین شاخص وضعیت آنتی‌اکسیدانی

۱- کاتالاز: تغییرات میانگین کاتالاز سرم فیل‌ماهی در تیمار *پلانتاروم* در پایان روز ۳۰ که در (جدول ۱) نشان داده شده است، داری اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارهای آزمایشی بود ($P<0/05$). در روز ۶۰ آزمایش بین تیمارهای آزمایشی و گروه شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید ($P>0/05$). هم‌چنین میزان کاتالاز سرم در تیمارهای پروبیوتیکی در روز ۷۵ پس از قطع غذای حاوی مکمل تنها در تیمار *پلانتاروم* افزایش معنی‌داری را نشان داد.

۲- GSH: جدول ۱ تغییرات میزان گلوتاتیون سرم را در تیمارهای مورد آزمایش را می‌دهد. در روز ۰ و روز ۳۰ میزان گلوتاتیون در تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد نداشتند ($p>0/05$)، اما نتایج در روز ۶۰ نشان داد که تیمار آزمایشی دارای اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد می‌باشند ($p<0/05$) که بیش‌ترین میزان گلوتاتیون احیا در تیمار *پلانتاروم* (۸۰/۵۸±۶۰۶/۳۰۷ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) مشاهده شد. با ادامه روند تغذیه و قطع مکمل در جیره غذایی در روز ۷۵ نشان داد که به‌جز تیمار آلژینات /کیتوزان بقیه تیمارهای آزمایشی با کاهش روند میزان گلوتاتیون مواجه شدند.

۳- مالون دی‌آلدئید: میزان مالون دی آلدئید در تیمارهای آزمایشی بسته به گذشت زمان (روز ۳۰) تغذیه با پروبیوتیک، افزایش یافت. در روز ۳۰ پس از تغذیه، میزان مالون دی آلدئید تیمارهای

پلانتاروم و *پلانتاروم* ریزپوشانی شده نسبت به تیمار شاهد و تیمار آلژینات /کیتوزان به‌طور معنی‌داری (p<۰/۰۵) بیش‌تر بود. در روز ۶۰ و ۷۵ میزان مالون‌دی آلدئید در تیمارهای پروبیوتیکی کاهش یافت به‌طوری که اختلاف معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد و تیمار آلژینات/کیتوزان نداشتند (P>۰/۰۵).

۴- سوپراکسیددسموتاز: میزان سوپر اکسید دسموتاز در تیمارهای آزمایشی در روزهای ۳۰، ۶۰ و ۷۵ تیمارهای آلژینات /کیتوزان، *پلانتاروم* و *پلانتاروم* ریزپوشانی، افزایش معنی‌داری (p<۰/۰۵) را با روز صفر نشان دادند. بیش‌ترین میزان سوپر اکسید دسموتاز در روز ۳۰ در تیمارهای آلژینات/کیتوزان و *پلانتاروم* ریزپوشانی به‌ترتیب مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری را با تیمار شاهد نشان دادند (P<۰/۰۵) درحالی‌که روز ۶۰ در تیمارهای *پلانتاروم* ریزپوشانی و آلژینات/کیتوزان به‌ترتیب بیش‌ترین میزان سوپر اکسید دسموتاز را داشتند که اختلاف معنی‌داری را با تیمار شاهد نشان دادند (P<۰/۰۵).

جدول۳: مقایسه نتایج آزمایشات آنتی‌اکسیدان در تیمارهای آزمایشی در روزهای صفر،۳۰، ۶۰ و ۷۵ تحقیق

فاکتور	تیمارها	روز صفر	روز۳۰	روز ۶۰	روز ۷۵
CAT (u/mgProtein)	آلژینات کیتوزان	Aa ۰/۳۱±۰/۰۳	Ab ۰/۱۱±۰/۰۳	Aa ۰/۱۵±۰/۰۴	Ab ۰/۱۰±۰/۰۸
	پلانتاروم امولسیون	Aa ۰/۱۰±۰/۰۲	Aab ۰/۱۶±۰/۰۵	Aa ۰/۱۳±۰/۰۵	Ab ۰/۱۳±۰/۰۵
	پلانتاروم	Ba ۰/۱۰±۰/۰۲	ABa ۰/۲۷±۰/۱۴	Ba ۰/۱۳±۰/۰۷	Aa ۰/۳۳±۰/۱۵
	شاهد	ABa ۰/۱۰±۰/۰۱	Bb ۰/۰۷±۰/۰۶	ABa ۰/۱۱±۰/۰۲	Ab ۰/۱۸±۰/۰۷
GSH (u/mgProtein)	آلژینات کیتوزان	Ba ۱۲۱/۹۱±۲۷/۰۶	Aa ۳۰۷/۸۵±۷۸/۶۴	ABa ۴۳۲/۳۱±۱۰۴/۰۶	Ca ۵۲۳/۲۷±۱۶۲/۴۴
	پلانتاروم امولسیون	Ba ۱۴۷/۳۴±۳۸/۶۹	ABa ۲۷۷/۱۴±۷۰/۶۶	Ca ۵۶۰/۳۴±۱۹۸/۸۵	ACa ۳۹۸/۲۷±۱۴۵/۹۱
	پلانتاروم	Ba ۱۲۸/۵۱±۱۰/۶۰	Ba ۲۳۰/۹۷±۷۳/۵۳	Aa ۶۰۶/۸۰±۳۰۷/۵۸	ABa ۳۷۲/۷۱±۱۱۶/۳۹
	شاهد	Aa ۱۴۴/۹۴±۳۳/۲۷	Aa ۱۹۰/۲۱±۸۲/۱۴	Ab ۱۶۲/۷۹±۴۸/۹۰	Ab ۱۸۹/۲۵±۷۷/۱۱
MDA (u/mgProtein)	آلژینات کیتوزان	Ba ۲۶/۴۰±۲/۴۴	Ab ۳۸/۰۳±۴/۱۱	Aab ۳۴/۶۸±۵/۶۳	ABa ۳۰/۷۸±۸/۵۰
	پلانتاروم امولسیون	Ba ۳۰/۸۸±۶/۲۸	Aa ۶۹/۱۶±۵/۶۴	Bab ۳۳/۸۳±۵/۶۶	Ba ۳۲/۹۲±۶/۸۵
	پلانتاروم	Ba ۳۰/۷۷±۶/۶۸	Aa ۶۲/۴۰±۲۲/۰۰	Ba ۴۱/۷۱±۷/۹۱	Ba ۳۴/۵۷±۳/۶۷
	شاهد	Aa ۳۰/۷۷±۶/۶۸	Ab ۳۴/۲۸±۳/۸۱	Ab ۳۱/۱۹±۴/۲۲	Aa ۲۸/۸۵±۷/۷۸
SOD (Inhibition%)	آلژینات کیتوزان	Ba ۱/۰۷±۰/۰۹	Aa ۲/۹۷±۰/۴۰	Aa ۲/۵۲±۰/۵۶	Aa ۲/۰۸±۰/۷۴
	پلانتاروم امولسیون	Ba ۱/۲۶±۰/۲۱	Aa ۲/۷۱±۰/۴۲	Aa ۲/۹۲±۰/۶۹	ABa ۲/۰۹±۰/۷۰
	پلانتاروم	Ba ۱/۰۹±۰/۲۰	Aab ۲/۲۸±۰/۲۰	Aab ۱/۹۷±۰/۶۷	Aa ۲/۲۰±۰/۷۵
	شاهد	Aa ۱/۱۲±۰/۱۷	Ab ۱/۸۸±۰/۳۸	Ab ۱/۳۹±۰/۲۵	Aa ۱/۳۳±۰/۱۸

(اطلاعات براساس میانگین ± انحراف معیار آورده شده است). حروف کوچک لاتین غیرهمنام نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر ستون و حروف بزرگ لاتین غیرهمنام نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر سطر می‌باشد).

تعیین شاخص وضعیت آنزیم‌های کبدی

۱- آنزیم آلکالین فسفاتاز: هرچند فعالیت **ALP** در پلاسمای ماهی‌های تغذیه شده با تیمارهای آزمایشی در روزهای ۳۰، ۶۰ و ۷۵ به‌طور معنی‌داری درمقایسه با روز ۰ افزایش یافت، اما تغییر معنی‌داری در سطح فعالیت این آنزیم در روزهای نمونه‌برداری و بین تیمارها مشاهده نشد. بیش‌ترین میزان فعالیت **ALP** در روز ۶۰ در تیمارهای *پلانتاروم* (۲۴۳/۷۱±۳۰/۲۷) مشاهده شد.

۲- آنزیم لاکتات دهیدروژناز: هرچند فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز در پلاسمای ماهی‌های تغذیه شده با تیمارهای آزمایشی در روزهای ۳۰، ۶۰ و ۷۵ در مقایسه با روز صفر افزایش یافت اما این افزایش معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵)، هم‌چنین تغییر معنی‌داری در سطح فعالیت این آنزیم در روزهای نمونه‌برداری و بین تیمارها مشاهده نشد (جدول ۲).

۳- آنزیم آلانین آمینوترانسفراز: علی‌رغم اختلافات جزئی در سطح آنزیم ALT در پلاسمای ماهی‌های تغذیه شده با تیمارهای آزمایشی در روزهای ۳۰، ۶۰ و ۷۵ در مقایسه با روز صفر اما این اختلاف معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵)، هم‌چنین تغییر معنی‌داری در سطح فعالیت این آنزیم در روزهای نمونه‌برداری و بین تیمارها مشاهده نشد (جدول ۴).

۴- آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز: سطح فعالیت آنزیم AST علی‌رغم اختلافات جزئی در بین گروه‌ها، از نظر آماری اختلاف معنی‌داری در سطح این آنزیم در روز ۰ وجود نداشت. هرچند فعالیت AST در پلاسمای ماهی‌های تغذیه شده با تیمارهای آزمایشی در روزهای ۳۰، ۶۰ و ۷۵ به‌طور معنی‌داری در مقایسه با روز صفر افزایش یافت (p<۰/۰۵)، اما تغییر معنی‌داری در سطح فعالیت این آنزیم در روزهای نمونه‌برداری و بین تیمارها مشاهده نشد (P>۰/۰۵). بیش‌ترین میزان فعالیت AST در روز ۶۰ در تیمارهای آلژینات/کیتوزان (۱۱/۴۷±۲/۰) مشاهده شد.

جدول۴ : مقایسه نتایج آزمایشات آنزیم های کبدی در تیمارهای آزمایشی در روزهای صفر،۳۰، ۶۰ و ۷۵ تحقیق

فاکتور	تیمارها	روز صفر	روز۳۰	روز ۶۰	روز ۷۵
ALP (U/ml)	آلژینات کیتوزان	Ba ۹۵/۹۲±۱۱/۹۶	ABa ۱۳۶/۶۶±۳۰/۴۹	ABa ۱۶۳/۵۸±۵۰/۲۴	Aa ۱۸۵/۷۹±۸۷/۰۱
	پلانتاروم امولسیون	Ba ۱۰۸/۷۹±۹/۷۳	ABa ۱۵۶/۵۴±۴۰/۵۱	Aa ۲۰۸/۷۷±۵۸/۳۸	Aa ۱۸۷/۳۲±۶۰/۷۷
	پلانتاروم	Ba ۱۱۹/۲۵±۳۷/۰۳	ABa ۱۳۹/۱۵±۲۹/۱۳	Aa ۲۴۳/۳۰±۷۱/۲۷	Aa ۲۴۰/۲۷±۱۰۹/۴۴
	شاهد	Aa ۱۰۳/۶۲±۵۰/۸۶	Aa ۱۰۸/۱۳±۳۸/۸۴	Aa ۱۶۱/۷۴±۳۶/۸۷	Aa ۱۵۸/۲۲±۴۲/۰۸
LDH (U/ml)	آلژینات کیتوزان	Aa ۲/۶۷±۰/۵۸	Aa ۳/۱۹±۱/۵۶	Aa ۲/۹۳±۱/۶۳	Aa ۳/۰۷±۱/۵۶
	پلانتاروم امولسیون	Aa ۲/۹۲±۱/۴۰	Aa ۳/۰۲±۱/۷۹	Aa ۳/۳۳±۱/۶۳	Aa ۳/۸۰±۱/۵۵
	پلانتاروم	Aa ۳/۶۹±۱/۹۱	Aa ۳/۰۰±۲/۰۴	Aa ۳/۵۱±۱/۶۷	Aa ۳/۰۳±۱/۴۰
	شاهد	Aa ۲/۷۶±۱/۰۹	Aa ۳/۲۵±۱/۶۲	Aa ۳/۹۵±۱/۷۹	Aa ۳/۲۲±۱/۷۴
ALT (U/ml)	آلژینات کیتوزان	Ba ۱/۰۳±۰/۳۵	Aa ۱/۹۵±۰/۲۳	Aa ۲/۱۱±۰/۴۷	Aa ۱/۴۶±۰/۲۸
	پلانتاروم امولسیون	Ba ۱/۰۵±۰/۳۸	Aa ۱/۹۶±۰/۷۳	Aa ۱/۹۱±۰/۶۴	Aa ۱/۸۴±۰/۵۰
	پلانتاروم	Ba ۰/۹۸۱±۰/۱۹	Aa ۲/۰۶±۰/۴۰	Aa ۱/۹۹±۰/۷۲	Aa ۲/۰۲±۱/۰۰
	شاهد	Aa ۱/۱۳±۰/۴۲	Aa ۱/۶۱±۰/۹۲	Aa ۲/۰۵±۱/۰۴	Aa ۱/۷۱±۰/۹۷
AST(U/ml)	آلژینات کیتوزان	Aa ۱/۲۸±۰/۵۳	Aa ۱/۲۷±۰/۵۹	Aa ۱/۳۴±۰/۷۵	Aa ۱/۰۵±۰/۴۶
	پلانتاروم امولسیون	Aa ۱/۱۸±۰/۶۸	Aa ۱/۵۳±۰/۸۶	Aa ۱/۲۴±۰/۴۲	Aa ۱/۲۲±۰/۵۸
	پلانتاروم	Aa ۱/۵۵±۰/۷۰	Aa ۱/۰۴±۰/۳۱	Aa ۱/۲۹±۴۲/۱۶	Aa ۱/۴۱±۰/۶۷
	شاهد	Aa ۱/۳۳±۰/۶۵	Aa ۱/۱۷±۰/۵۹	Aa ۱/۲۲±۰/۱۹	Aa ۱/۷۲±۰/۷۲

(اطلاعات براساس میانگین ± انحراف معیار آورده شده است). حروف کوچک لاتین غیرهمنام نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر ستون و حروف بزرگ لاتین غیرهمنام نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر سطر می‌باشد).

بحث

به‌منظور افزایش زنده‌مانی باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در شرایط معده و روده فیل‌ماهی این باکتری به‌وسیله آلژینات سدیم ریزپوشانی و با کیتوزان پوشش داده شد. مشاهده با روش SEM نشان داد که ریزپوشینه‌ها از نظر شکل ظاهری تا حدود زیادی به شکل کروی و بیضوی هستند. چندین مطالعه بر روی بررسی استرس اکسیداتیو و تأثیرات مکمل‌های غذای بر بافت‌های مختلف ماهی انجام شده‌است. در این خصوص، سنجش بیومارکرهای رایج استرس اکسیداتیو به‌عنوان روشی معتبر برای ارزیابی عوامل تأیید شده است. پروبیوتیک‌ها وضعیت استرس اکسیداتیو را در موجودات بهبود می‌بخشند و با افزایش فعالیت ضداکسیدانی و ضدمیکروبی خطر عفونی شدن را در موجودات کاهش می‌دهند (Mikelsaar و Zilmer، ۲۰۰۹). با افزایش احتمال پروبیوتیک‌ها در دستگاه گوارش، شاخص‌های استرس در خون کاهش می‌یابد، این ممکن است به‌علت اثرات ضداسترسی پروبیوتیک موجود در جیره غذایی باشد که با بهبود مکانیسم دفاع آنتی‌اکسیدانی سبب کاهش شاخص‌های استرس در خون می‌شود (Rahayu و همکاران، ۲۰۱۳). درشرایط فیزیولوژیکی طبیعی، سلول‌های حیوانی تولید انواع اکسیژن فعال می‌نماید. که هم‌زمان با آن چندین مکانیسم دفاع آنتی اکسیدان در بدن صورت می‌گیرد (Wifan و همکاران، ۲۰۱۲). عدم تعادل بین تولید و حذف اکسیژن فعال منجربه ایجاد استرس اکسیداتیو می‌شود. آنتی‌اکسیدان‌های ماهی شامل آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز، سوپراکسیداز دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و مالون دی‌آلدئید است (Martinz Alvarez و همکاران، ۲۰۰۵). سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی ابزار مفیدی برای تعیین وضعیت آنتی‌اکسیدانی و تشخیص استرس اکسیداتیو در مایعات و بافت بدن ماهی می‌باشد (Wifan و همکاران، ۲۰۱۱). نتایج حاصل از این تحقیق نشان دادکه استفاده از پروبیوتیک *پلانتاروم* در جیره غذایی فیل ماهی منجر به افزایش معنی‌دار فعالیت کاتالاز، گلوتاتیون احیا و کاهش معنی‌دار فعالیت مالون دی الدیید در پلاسما شد که با تحقیق صورت گرفته توسط Zahang و همکاران (۲۰۱۳) هم‌خوانی دارد. آن‌ها گزارش کردند که استفاده از ۳ درصد فروکتوالیگوساکارید ۱×۱۰^{۷} واحد تشکیل کلونی بر گرم پروبیوتیک *Bacillus licheniformis* در جیره غذایی ماهی سیم *Megalobrama terminalis* منجربه افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدان کل، کاتالاز، سوپر اکسیداز دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاهش فعالیت مالون دی الدیید در کبد شد. تحقیق مشابه دیگر بر روی ماهی کپور علف‌خوار *Ctenopharyngidon idella* نشان‌داد که استفاده ازجیره غذایی حاوی باسیلوس به‌عنوان پروبیوتیک منجربه افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدان در کبد شد (Weifan و همکاران، ۲۰۱۲). این موضوع نشان می‌دهدکه پروبیوتیک با افزایش ترشح آنتی‌اکسیدان منجر به حذف رادیکال‌های آزاد اضافی تولید شده توسط سوخت و ساز بالای بدن و استرس نامطلوب زیست محیطی گردید و با تنظیم تعادل رادیکال‌های بدن، بافت و اندام‌های آسیب‌دیده بدن ترمیم شدند (Zahang و همکاران، ۲۰۱۳؛ Weifan و همکاران، ۲۰۱۲). Reyes-Becerril و همکاران (۲۰۰۸) و Ai و همکاران (۲۰۱۱) به‌ترتیب استفاده از مخمر (*Debaryomvces hansenii*) و *Bacillus subtilis* در جیره غذایی ماهی را به‌عنوان منبع بالقوه تولید آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان پیشنهاد نمود. Ai و همکاران (۲۰۱۱) گزارش نمودند که استفاده از $۱/۳\times۱۰^{۷}$ واحد تشکیل برگرم در جیره غذایی ماهی (*Larimichthys Crocea*) منجر به‌افزایش فعالیت سوپراکسیداز دیسموتاز گردید. هم‌چنین آن‌ها گزارش کردند که غلظت مالون‌دی‌الدئید نشان‌دهنده فرایندهای سمی نشأت گرفته از رادیکال‌های آزاد می‌باشد و سطح مالون دی الدئید شاخص مناسبی از میزان پراکسیداسیون لیپیدی می‌باشد (Ai و همکاران، ۲۰۱۱) . در تحقیقی دیگر Nabas و همکاران (۲۰۱۴) با بررسی ترکیب شیمیایی ژل رویال و اثر سین بیوتیک با دو سویه پروبیوتیک جداسازی شده *L. acidophilus* و *Bifidobacterium bifidum* در شیر بدون چربی گزارش کردند که عملکرد آنتی‌اکسیدانی به‌طور قابل توجهی افزایش می‌یابد. مصرف باکتری‌های پروبیوتیک می‌تواند سنتز آنزیم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی SOD، کاتالاز و گلوتاتیون احیایی را در موجوداتی که در معرض استرس اکسیداتیو قرار می‌گیرند افزایش دهد. این پاسخ، به حفاظت در برابر استرس‌های اکسیداتیو قوی‌تر و حملات رادیکال‌های آزاد کمک می‌کند تا در زمان‌های طولانی‌تر استرس، سلول‌ها در برابر تکرار حملات رادیکال‌های آزاد مقاومت کنند. این مکانیسم سازگاری عمومی با تغییرات بیان ژن آنزیم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی همراه است (Halliwell و Gutteridge، ۱۹۹۹). علاوه بر این پروبیوتیک‌ها می‌توانند سیستم ایمنی را تحریک کرده و عملکرد فاگوسیتوز و مونوسیت‌ها را افزایش دهند (Hartanti، ۲۰۱۰). در پژوهشی دیگر اثر پروبیوتیک Biogen در دوزهای ۱٪، ۲٪، ۳٪ و پری‌بیوتیک سدیم آلجینات (Sodium alginate) به‌میزان ۳ گرم در لیتر و محرک‌های ایمنی (Immuno-stimulant) شامل سیر و گونه گیاهی *Cynodon dactylon* به نسبت ۱٪، ۲٪ و ۳٪ بر روی گونه خرچنگ آب شیرین *Procambarus clarkia* نشان داد جیره دارای ۲٪ پروبیوتیک Biogen به‌طور معنی‌داری موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی پروفنیل اکسیداز (Prophenol oxidase) و آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (SOD) می‌شود (Mona و همکاران، ۲۰۱۵). در بررسی دیگر فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز و اسید پروتئاز با افزودن پروبیوتیک *B. subtilis, B. licheniformis, B. cereus* به غذای روتیفر و تغذیه لارو ماهی *Sparus aurata* از آن به‌طور معنی‌داری افزایش

یافت (Arig و همکاران، ۲۰۱۳). کاهش یا عدم افزایش سطح فعالیت آنزیم‌ها در پلاسمای ماهی‌ها ممکن است ناشی از تأثیر پروبیوتیک‌ها و ترکیبات ریزپوشانی کننده بر عملکرد فیزیولوژیکی غشای سلول‌ها در بافت‌های مختلف به‌ویژه بافت کبد باشد. ثابت و در حد نرمال ماندن سطح آنزیم‌های پلاسمایی کبدی در این مطالعه ممکن است بیانگر عملکرد پایدار کبد و سیستم صفراوی در طی آزمایش باشد. هرچند با شروع تغذیه و تیماربندی ماهیان با یک افزایش محسوسی در همه گروه‌ها مشاهده شد که این افزایش احتمالاً ناشی از شرایط استرسی مخازن پرورشی در این تحقیق می‌باشد.

درکل نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که استفاده از پروبیوتیک ریزپوشانی شده علاوه بر حفاظت از باکتری‌های با توان پروبیوتیکی در برابر شرایط دستگاه گوارش، با داشتن ترکیباتی مانند آلژینات و کیتوزان نیز منجر به افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل در فیل‌ماهیان آزمایشی‌شده است. از این‌رو به‌نظر می‌رسد مکمل خوراکی پروبیوتیکی می‌تواند برای افزایش سلامت و عملکرد ماهیان خاویاری توصیه شود.

منابع

۱. **سال‌نامه آماری سازمان شیلات ایران. ۱۳۹۲.** سازمان شیلات ایران، معاونت برنامه‌ریزی و توسعه مدیریت، دفتر برنامه و بودجه.

۲. **محمدیان، ت.، ۱۳۹۲.** ارزیابی توان پروبیوتیکی و تحریک کنندگی ایمنی برخی لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از روده ماهی شیربت *Barbus grypus* . پایان‌نامه دوره دکترای تخصصی، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده دامپزشکی. ۱۸۴صفحه.

۳. **Ai, Q.; Xu, H.; Mai, K.; Xu, W.; Wang, J. and Zhang, W., 2011.** Effects of dietary supplementation of Bacillus subtilis and fructooligosccharide on growth performance, survival, non-specific immune response and disease resistance of juvenile Large Yellow Croaker, Larimichthys crocea. Aquaculture. Vol. 317. pp: 155-161

۴. **Arıg, N.; Suzer, C.; Gokyardar, A.; Basaran, F.; Coban, D.; Yildirim, S.H.; FIrat, K. and Saka, S., 2013.** Effects of probiotic (Bacillus sp.) supplementation during larval development of Gilthead Sea bream (*Sparus aurata*, L.). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. Vol. 13, No. 3, pp: 19-25.

۵. **Ellman, G.l., 1959.** Tissue sulfhydryl groups. Archive of Biochemistry and Biophysics. Vol. 82, pp: 70-77.

۶. **FAO. 2010.** The State of World Fisheries and Aquaculture. Rome. 180 p.

۷. **Fuller, R., 1989.** Probiotics in man and animals. J. Appl. Bacteriol. Vol. 66, pp: 365-378.

۸. **Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., 1999.** Free radicals in biology and medicine. 3 rd edn. New York: Oxford University Press, Inc

۹. **Hartanti, A.W., 2010.** Evaluation of antidiarrheal activity of *Lactobacillus* isolates from breast milk. Bogor: Bogor Agricultural University, MSc thesis.

۱۰. **Hasting, B.E. and Gascoyne, S.C., 1992.** Trace mineral levels in guanaco. Research *in* Veterinary Science. Vol. 131, pp: 14-15.

۱۱. **Huiyi, S.; Weiting, Y.; Meng, G; Xiudong, L. and Xiaojun, M., 2013.** Microencapsulated probiotics using emulsification technique coupled with internal or external gelation process. Carbohydrate Polymers. Vol. 96, pp: 181-189.

۱۲. **Irianto, A. and Austin, B., 2002.** Probiotics in aquaculture. Journal of Fish Diseases. Vol. 25, pp: 633-642.

۱۳. **Koroluk, M.; Ivanova, L.; Majorova, I. and Tokarev, V., 1988.** Method for determination ofcatalase activity Laboratory Work Laboratornoe Delo, in, in Russian. Vol. 11, pp: 16-19.

۱۴. **Kullisaar, T.; Songisepp, E.; Aunapuu, M.; Kilk, K.; Arend, A. and Mikelsaar, M., 2003.** Antioxidative probiotic fermented goats' milk decreases oxidative stress- mediated atherogenicity in human subjects. Br J Nutr. Vol. 90, No. 2, pp: 449-456.

۱۵. **Mann, T. and Keilin, D., 1938**. Haemocuprein, copper-protein compounds of blood and liver in mammals. Proceedings of the Royal Society of London B, 126: 303-315.

۱۶. **McCord, J.M. and Fridovich, I., 1969**. Superoxide dismutase, an enzymatic function for erythrocuprein. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 244, pp: 6049-6055.

۱۷. **Martı´nez-Alvarez, R.M.; Morales, A.E. and Sanz, A., 2005.** Antioxidantdefenses in fish: biotic and abiotic factors. Review Fish Biology &Fisheries. Vol. 15, pp: 75-88.

۱۸. **Merrifield, D. and Ringo, E., 2014.** Aquaculture nutrition: Gut health, probiotics and prebiotics. Oxford, UK: Wiley Blackwell. pp: 401-418.

۱۹. **Mikelsaar, M. and Zilmer, M., 2009.** *Lactobacillus fermentum* ME 3 an antimicrobial & antioxidative probiotic. Microbial Ecology in Health and Disease. Vol. 21. pp: 1-27.

۲۰. **Mona, M.H.; Rizk, E.S.T.; Salama, W.M. and Younis, M.L., 2015.** Efficacy of probiotics, prebiotics, and immunostimulant on growth performance & immunological parameters of *Procambarus clarkii* juveniles. The Journal of Basic & Applied Zoology. Vol. 69, pp: 17-25.

۲۱. **Moss, D.W. and Henderson, A.R., 1999.** Clinical enzymology. In: Burtis, C.A. and Ashwood, E.R., Editors. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3rd edition. Philadelphia: W.B Saunders Company. pp: 617-721.

۲۲. **Nabas, Z.; Haddadin, M.; Haddain, J. and Nazer, I.K., 2014.** Chemical Composition of Royal Jelly and Effects of Synbiotic with Two Different Locally Isolated Probiotic Strains on Antioxidant Activities. Pol. J. Food Nutr. Sci. Vol. 64, No. 3, pp: 171-180.

۲۳. **Peran, L.; Camuesco, D.; Comalada, M.; Nieto, A.; Concha, A. and Adrio, J.L., 2009.** Lactobacillus fermentum, a probiotic capable to release glutathione, prevents colonic inflammation in the meta-analysis. East Mediterr Health J. Vol. 15, No. 3, pp: 591-599.

۲۴. **Rahayu, W.P.; Astawan, M.; Wresdiyati, T. and Mariska, S., 2013.** Antidiarrheal and antioxidative capability of synbiotic yogurt to the rats. International Food Research Journal. Vol. 20, No. 2, pp: 703-709.

۲۵. **Rahman, M.M.; Islam, M.N.; Islam, M.W. and Kabir, S.M.L., 2004.** Kamruzzaman SM. Effects of probiotics supplementation on growth performance and certain haemato- biochemical parameters in broiler chickens. Bangladesh J Vet Med. Vol. 2, No. 1, pp: 39-43.

۲۶. **Reyes-Becerril, M.; Salinas, I.; Cuesta, A.; Meseguer, J.; Tovar-Ramirez, D.; Ascencio-Valle, F. and Esteban, M.A., 2008.** Oral delivery of live yeast Debaryomyces hansenii modulates the main innate immune parameters and the expression of immune-relevant genes in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Fish & Shellfish Immunology. Vol. 25, pp: 731-739.

۲۷. **Scoll, P.F.; McCoy, L. and Kensler, T.W., 2009.** Groopman JD. Quantitative analysis and chronic dosimetry of the aflatoxin B1 plasma albumin adduct Lys-AFB1 in rats by isotope dilution mass spectrometry. Chem Res Toxicol. Vol. 19, No. 1, pp: 44-49.

۲۸. **Weifen, L.; Xiaoping, Z.; Wenhui, S.; Bin, D.; Quan, L.; Luoqin, F.; Jiajia, Z.; Yue, W. and Dongyou, Y., 2012.** Effects of Bacillus preparations on immunity and antioxidant activities in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Fish Physiology and Biochemistry. Vol. 38, pp: 1585-1592.

۲۹. **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. Vol. 35, pp: 1380-1386.

۳۰. **Ziaei, H.; Karimi Torshizi, M.A.; Bashtani, M.; naeemipour, H. and Zeinali, A., 2009.** Efficiency evaluation of antibiotic growth promoter's alternatives on immune response and some blood metabolites in broiler chickens. J Agri Sci Nat Resour. Vol. 16, No. 2, pp: 1-13.