



## 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<sup>1</sup>, Mojdeh Chelemaal Dezfoulnejad<sup>1,2\*</sup>, Mehran Javaheri baboli<sup>1,2</sup>, Abolfazl Askary Sary<sup>1,2</sup>, Hadideh Mabudi<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Fisheries, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran

<sup>2</sup> Aquaculture Research Center, Department of 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  $171.29 \pm 8.79$  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.

## مقاله پژوهشی

## تأثیر 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<sup>۱</sup>، مژده چله مال دزفول نژاد<sup>۱،۲\*</sup>، مهران جواهری بابلی<sup>۱،۲</sup>، ابوالفضل عسکری ساری<sup>۱،۲</sup>، حدیده معبودی<sup>۲،۱</sup>

<sup>۱</sup> گروه شیلات، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

<sup>۲</sup> مرکز تحقیقات تکثیر و پرورش آبزیان، گروه شیلات، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

## چکیده

## کلمات کلیدی

**مقدمه:** پروبیوتیک‌ها باکتری‌هایی هستند که در مقادیر کافی دارای اثرات سودمند برای میزبان می‌باشند. امروزه استفاده از پروبیوتیک‌ها به‌عنوان مکمل غذایی در صنعت آبی‌پروری 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  $171/29 \pm 8/79$  گرم، به مدت ۶۰ 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 ۶۰ آزمایش انجام شد.

**نتایج:** نتایج نشان داد که بعد از ۶۰ روز مصرف پروبیوتیک مقادیر سوپراکسید دیسموتاز کبد در تمام گروه‌ها کاهش و مقادیر گلوکاتایون در گروه‌های دوم و سوم افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد داشته است ( $p < 0/05$ ). هم‌چنین مقادیر سوپراکسید دیسموتاز سرم خون در تمام گروه‌ها و مقادیر گلوکاتایون در گروه اول افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد داشته است ( $p < 0/05$ ).

**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.

پروبیوتیک جیره  
سوپراکسید دیسموتاز  
کاتالاز  
گلوکاتایون  
مالون دی‌آلدهید  
ماهی سی‌باس آسیایی

## مقدمه

باشد، باعث ایجاد استرس اکسیداتیو و آسیب اکسیداتیو خواهد شد (۱۶). از طرفی ماهی‌ها نیز دارای مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌باشند که از جمله آن‌ها می‌توان به آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی شامل سوپر اکساید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی از قبیل گلوتاتیون (GSH) اشاره کرد که به‌همراه تعداد دیگری از آنزیم‌ها مجموعه‌ای از دفاع آنتی‌اکسیدانی سلولی را تشکیل می‌دهند و نقش حذف رادیکال‌های آزاد را برعهده دارند (۱۷). به‌نظر می‌رسد که نسبت به تست‌های مرسوم ایمنی، سنجش شاخص‌های اکسیدانی/آنتی‌اکسیدانی به‌عنوان شاخص‌های حساس‌تری در نظر گرفته می‌شوند و می‌توانند اثرات بهبود عملکرد بدن میزبان توسط باکتری‌های پروبیوتیکی بر فاکتورهای استرس اکسیداتیو و مکانیسم‌های بیوشیمیایی که به‌وسیله این باکتری‌ها تحت تاثیر قرار می‌گیرند، را به‌خوبی نمایان سازند. ماهی باس دریایی آسیایی (*Lates calcalifer*) که باراموندی نیز نامیده می‌شود، ماهی دریایی ارزشمندی است. این گونه مهم و تجاری صنعت آبزی‌پروری جنوب‌شرقی آسیا است که به‌طور گسترده در استرالیا، تایلند و اندونزی کشت می‌شود. باس دریایی به‌دلایل مختلف مانند کشت در طیف وسیعی از شوری‌ها، تولیدمثل در اسارت، سرعت رشد 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 آنتی‌اکسیدانی در این گونه 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 ۱۰:۱ 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 در شرایط بی‌هوازی گرم‌خانه‌گذاری شد و سپس از کلنی‌های مشکوک زیرنمونه (Subculture) تهیه و مراحل خالص‌سازی و شناسایی اولیه (رنگ‌آمیزی گرم، آزمایش‌های اکسیداز و کاتالاز) انجام شد (۲۱).

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). نقش اساسی 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 می‌کند (۳، ۴). آنتی‌بیوتیک‌ها، واکسن‌ها و برخی مواد شیمیایی به‌عنوان محرک ایمنی در برابر ویروس‌ها، باکتری‌ها، انگل‌ها و بیماری‌های قارچی در بسیاری از مزارع پرورش ماهی استفاده می‌شوند (۵). با این حال، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و داروهای شیمیایی در برابر بیماری‌های آبزیان عوارضی مانند مقاومت دارویی، تجمع زیستی در آبزیان، آلودگی محیط زیست و مقاومت باکتریایی در انسان دارد (۱). بنابراین، در سال‌های اخیر، توجه بیش‌تری به افزودن مکمل‌های غذایی طبیعی برای جلوگیری، کنترل بیماری یا افزایش ایمنی شده است (۶). استفاده از پروبیوتیک به‌عنوان مکمل غذایی برای حیوانات پرورشی به دهه ۱۹۷۰ بر می‌گردد (۷). 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 تک‌یاخته‌ای به‌عنوان پروبیوتیک در آبزی‌پروری بررسی شده و اثرات بسیار سودمند آن‌ها در افزایش ایمنی، بهبود رشد، مقاومت در برابر بیماری‌های گونه‌های مختلف ماهی و میگو به‌اثبات رسیده است (۸، ۹، ۱۰). استرس اکسیداتیو تعادل میان اکسیدان‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها را به نفع اکسیدان‌ها به هم 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 دارای توانایی برای زندگی در محل‌های آلوده هستند که 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 رادیکال‌های آزاد، به‌ویژه رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شوند، هم‌چنین دیگر گونه‌های 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 این حال، زمانی که تولید ROS بیش از ظرفیت آنتی‌اکسیدان سلولی

(شرکت فرادانه)، انجام شد. ماهیان در طول دوره آزمایش به مدت ۶۰ روز با جیره غذایی حاوی باکتری‌های پروبیوتیک انتخابی مورد تغذیه قرار گرفتند.

جدول ۲: نحوه تیمار بندی 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 $1 \times 10^8$ CFU/gr	۵۰۰۰ قطعه در هکتار
۲	همراه با سویه انتخابی جدا شده از ماهیان استان بوشهر با تراکم $1 \times 10^8$ CFU/gr	۵۰۰۰ قطعه در هکتار
۳	همراه با سویه انتخابی جدا شده از ماهیان استان هرمزگان با تراکم $1 \times 10^8$ CFU/gr	۵۰۰۰ قطعه در هکتار

**نمونه برداری بافتی:** به منظور بررسی سطوح استرس اکسیداتیو در ماهیان تیمار شده با پروبیوتیک، در روزهای صفر، میان دوره و انتهای دوره به طور 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 نمونه برداری انجام شد. سپس نمونه‌ها با سرم فیزیولوژی (NaCl ۰/۹٪) شسته شدند و سریعاً درون میکروبیوت‌های برچسب گذاری شده کنار یخ به آزمایشگاه بخش آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران منتقل و تا زمان سنجش در فریزر ۸۰- نگه‌داری شد.

**عصاره گیری 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 EDTA مخلوط شد. بشر حاوی نمونه بر روی یخ قرار گرفت و با استفاده از دستگاه همگن‌ساز (هموژنایزر) با سرعت ۱۴۰۰۰ rpm به مدت ۲ دقیقه هموژن شد. سپس محلول هموژن شیری به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ rpm 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  $O_2$  و  $H_2O_2$  می‌باشد. فعالیت این آنزیم در تحقیق حاضر براساس روش

### تهیه جیره غذایی حاوی باکتری‌های پروبیوتیک انتخابی:

به منظور ارزیابی اثر پروبیوتیک‌های انتخاب شده بر پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی ماهی باس دریایی آسیایی، باکتری‌های باسیلوس و لاکتوباسیلوس منتخب به غذای ماهیان افزوده شد. به طور خلاصه هر یک از باکتری‌های باسیلوس *Bacillus cereus* و *B. thuringiensis*، با تلقیح سویه مورد نظر به محیط مایع لوریا-برتانی به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده و سپس به مدت 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. به طور خلاصه هر باکتری به طور جداگانه در محیط آگوش MRS در شرایط بی‌هوای کشت داده شد. پس از رشد، باکتری‌ها با سانتریفیوژ جداسازی و شستشو و به کمک لوله‌های استاندارد مک‌فارلند غلظت‌های مناسب آن‌ها ( $3/33 \times 10^7$  CFU/ml) از هر کدام از سه باکتری تنظیم شد. سپس غلظت تعیین شده هر کدام از باکتری‌ها به هر گرم غذای تیمارها (شرکت فرادانه) اسپری شد. جهت اطمینان از تعداد باکتری‌های زنده موجود در غذا، نمونه برداری و شمارش باکتریایی غذایی حاصل انجام شد (۲۳).

### تهیه و نگهداری ماهی: با توجه به این که این تحقیق در مزارع

پرورش ماهی باس دریایی آسیایی (*Lates calcarifer*) واقع در منطقه چوئیده 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  $171/29 \pm 8/79$  گرم، به مدت 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 فیزیکی شیمیایی آب استخرها

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

جهت اندازه‌گیری فاکتورهای فیزیکی شیمیایی آب از دستگاه کالری متر هک (مدل ۸۹، شرکت Hach، کشور آمریکا) و pH متر مدل متروهم (مدل ۷۸۱، Metrohm، کشور سوئیس) استفاده شد. غذایی ماهی‌ها در طول مدت سازگاری در دو نوبت با غذای کنسانتره تجاری

**اندازه گیری فعالیت پراکسیداسیون لیپیدی (LPO/MDA):**

در پژوهش حاضر سطح پراکسیداسیون لیپیدی (LPO) تحت القاء استرس نانومگنتیت در عصاره های بافتی برحسب محتوی مالون دی آلدئید (MDA) سنجش شد. زیرا تجمع بیش از حد مالون دی آلدئید می تواند به سلول ها آسیب رسانده و به مرگ برنامه ریزی شده سلولی، منتهی گردد. مالون دی آلدئید به عنوان یکی از تولیدات فرعی حاصل از فرایند پراکسیداسیون لیپیدی غشاء معرفی شده که به واسطه واکنش با اسید تیوباریتوریک، می تواند کمپلکس سرخ آبی صورتی رنگ TBA-MDA را تشکیل دهد. از این رو غلظت مالون دی آلدئید به روش رنگ سنجی و با بهره گیری از یک طیف سنج نوری قابل اندازه گیری است. برای این منظور، براساس روش Plaser و همکاران، یک محلول واکنش گر (معرف) (TCA/TBA/HCl) آماده سازی شد (۲۷). این محلول محتوی TBA ۰/۳۷۵٪ w/v، تری کلرواستیک اسید (TCA) ۰/۱۵٪ w/v، و اسید کلریدریک ۰/۲۵ نرمال بود. در ادامه، هر نمونه از عصاره بافتی به نسبت ۲:۱ با محلول معرف در میکروتیوب ۱/۵ ml مخلوط شده و به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب جوش (دمای ۱۰۰°C) گرمادهی شد و پس از سرد شدن نمونه ها، به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. پس از آن، مایع رویی نمونه ها به میکروپلیت منتقل شد و بدین وسیله تغییرات طیف جذبی نمونه ها در محیط واکنش با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر در طول موج ۵۳۵ نانومتر قرائت شد. سپس غلظت TBA/MDA در نمونه ها براساس منحنی استاندارد (مبتنی بر هیدرولیز اسیدی ۰/۳، ۱، ۳- ترا اتوکسی پروپان) (TEP) محاسبه شده و بر حسب واحد نهایی میکرومول (MDA/μmol) به ازاء هر میلی گرم از پروتئین بافتی (μmolMDA/mg) گزارش شد (۲۸).

**اندازه گیری میزان گلو تاتیون (GSH):** در مطالعه حاضر سنجش

میزان گلو تاتیون احیاء (گاما گلو تاملیل سیستئینیل گلایسین) (GSH) یا گلو تاتیون تام، به عنوان ترکیب آنتی اکسیدان غیر آنزیمی به روش Ellman انجام پذیرفت (۲۹). به منظور اجرای این آزمایش، حجم نهایی محلول واکنش ۲۸۰ میکرولیتر بوده و مشتمل بر عصاره بافتی، بافر فسفات سدیم (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) ۰/۱ مول (محتوی EDTA ۱ میلی مول) با pH = ۸ و معرف DTNB ۰/۱ مول بود. واکنش شاهد (بلانک) نیز محتوی تمامی ترکیبات واکنش گر به جز عصاره بافتی بود. در ادامه میکروپلیت حاوی اجزاء واکنش، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد و تغییرات طیف جذبی نمونه ها در محیط واکنش، توسط دستگاه میکروپلیت ریدر در طول موج ۴۱۲ نانومتر نسبت به نمونه بلانک قرائت شد. سپس سطح گلو تاتیون احیاء شده در نمونه ها، پس از کالیبراسیون با منحنی استاندارد (سیستئین هیدروکلرید مونو هیدرات

رنگ سنجی پیشنهادی (۲۵)، مبتنی بر مهار رادیکال های سوپراکسید تولیدی طی فرایند اتواکسیداسیون هیدروکسیل آمین هیدروکلراید و احیاء نیتروبلوتترازولیموم (NBT) و نیز تشکیل کمپلکس آبی- بنفش رنگ فورمازان اندازه گیری شد. در این واکنش آنزیم SOD در رقابت با NBT از تشکیل رنگ آبی- بنفش فورمازان ممانعت به عمل می آورد. حجم نهایی محلول در این واکنش ۲۵۰ میکرولیتر خواهد بود و مشتمل بر عصاره بافتی، کربنات سدیم (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) ۵۰ Mm با pH = ۱۰/۲، EDTA ۰/۱، NBT ۲۴ μM، تریتون ۱۰۰ x<sup>3</sup> ۰/۰۶٪ و هیدروکسیل آمین هیدروکلراید ۱ میلی مول با pH = ۶ است. در ادامه، نرخ مهار الکترون در انتقال به NBT و تشکیل کمپلکس فورمازان، به واسطه قرائت تغییرات طیف جذبی نمونه A (s) و شاهد A (c) در طول موج ۵۶۰ نانومتر، در سه تکرار با استفاده از دستگاه قرائت گر میکروپلیت انجام پذیرفت. در پایان، درصد مهار احیاء NBT، با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد مهار} = \frac{(A(c) - A(s))}{A(c)} \times 100$$

در این جا یک واحد بین المللی (U) از SOD به صورت مقدار آنزیمی تعریف می شود که بتواند در شرایط آزمایش نرخ احیاء NBT و واکنش تولید رنگ را تا ۵۰٪ مهار نماید. لذا فعالیت ویژه آنزیم SOD بر حسب واحد بین المللی از آنزیم به ازای هر میلی گرم از وزن پروتئین بافت تر در زمان واکنش بر حسب دقیقه (U/mg/min) گزارش شد.

**اندازه گیری آنزیم کاتالاز (CAT):** سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز

براساس روش Korolyuk و همکاران انجام شد (۲۶). به منظور 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ۰/۰۳٪ ۱۰ میلی مول بود. این واکنش پس از قرار گیری به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی با افزودن آمونیوم مولیبدات ۰/۰۴٪ متوقف شد. سپس غلظت آنزیم بر مبنای 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 واکنش گر به جز 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، به عنوان 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 این رو، غلظت آنزیم کاتالاز بر پایه فرمول زیر و با احتساب غلظت آنزیم در گروه شاهد (c)، بر حسب میلی مول در لیتر یا میکرومول در میلی لیتر محاسبه شد.

$$\text{فعالیت کاتالاز} = \frac{(A(c) - A(s))}{Ac} \times c \times 10 \text{ (}\mu\text{M/min)}$$

با گروه شاهد نشان داد ( $P < 0.05$ ). نتایج مربوط به سنجش کاتالاز و مالون دی آلدیید کبد نشان داد به دنبال مصرف باکتری پروبیوتیک به مدت ۳۰ و ۶۰ روز تغییر معنی‌داری در میزان این شاخص، مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ). مقدار گلوکاتایون در روز ۳۰ آزمایش افزایش معنی‌داری را در گروه دوم در مقایسه با گروه شاهد نشان داد ( $P < 0.05$ ). همچنین مقدار این شاخص در روز ۶۰ آزمایش افزایش معنی‌داری را در گروه دوم و سوم در مقایسه با گروه شاهد نشان داد ( $P < 0.05$ ). نتایج مربوط به سنجش سوپراکسید دیسموتاز سرم نشان داد به دنبال مصرف باکتری پروبیوتیک به مدت ۳۰ روز کاهش معنی‌داری و در روز ۶۰ آزمایش افزایش معنی‌داری را در تمام گروه‌ها در مقایسه با گروه شاهد نشان داد ( $P < 0.05$ ). نتایج مربوط به سنجش کاتالاز سرم نشان داد به دنبال مصرف باکتری پروبیوتیک به مدت ۳۰ روز افزایش معنی‌داری در میزان این شاخص در گروه‌های اول و سوم آزمایش مشاهده شد ( $P < 0.05$ ) در حالی که در روز ۶۰ تغییر معنی‌داری در میزان این شاخص، مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ). نتایج مربوط به گلوکاتایون سرم نشان داد به دنبال مصرف باکتری پروبیوتیک به مدت ۳۰ روز تغییر معنی‌داری در میزان این شاخص، مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ) اما مقدار این شاخص در روز ۶۰ آزمایش افزایش معنی‌داری را در گروه اول آزمایش در مقایسه با گروه شاهد نشان داد ( $P < 0.05$ ). نتایج مربوط به سنجش مالون دی آلدیید سرم نشان داد به دنبال مصرف باکتری پروبیوتیک به مدت ۳۰ و ۶۰ روز تغییر معنی‌داری در میزان این شاخص، مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ).

۱/۵ میلی‌مول) محاسبه شده و بر حسب واحد نهایی میکرومول GSH به‌ازاء هر میلی‌گرم از پروتئین بافت تر ( $\mu\text{M-SH/mg}$ ) گزارش شد. **آنالیز و بررسی آماری:** تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 21 انجام شد. بدین ترتیب که ابتدا نرمال بودن پراکنش داده‌ها با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov سنجیده شد. سپس داده‌ها به وسیله آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) بررسی شدند. با مشاهده اختلاف بین داده‌ها از پس آزمون توکی برای تعیین معنی‌دار بودن یا نبودن اختلاف موجود بین تیمارهای مورد مطالعه در سطح ۹۵ درصد استفاده شد ( $P < 0.05$ ).

## نتایج

نتایج سنجش شاخص‌های استرس اکسیداتیو (سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوکاتایون و مالون دی آلدیید) بافت کبد و سرم خون ماهی باس دریایی 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 ( $P > 0.05$ ). نتایج مربوط به سنجش سوپراکسید دیسموتاز کبد نشان داد به دنبال مصرف باکتری پروبیوتیک به مدت ۳۰ روز تغییر معنی‌داری در میزان این شاخص، مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ) اما مقدار این شاخص در روز ۶۰ آزمایش کاهش معنی‌داری را در تمام گروه‌ها در مقایسه

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	گروه‌ها	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
گلوکاتایون (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±۱/۰۰ Aa	۰/۰±۴۸/۱ Bb
مالون دی آلدیید (میکرومول بر میلی‌گرم)	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 ( $P < 0.05$ ).

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±۷/۴۱ Aa	۳/۰±۲۷/۸۲ Aa	۲/۰±۸۷/۸۱ Aa
	گروه اول	۳/۰±۵/۱۸ 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±۵۴/۷۷ 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±۴/۳۳ 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

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) به ترتیب گزارش دادند که تغذیه ماهی تیلاپای 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. سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون 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

استرس اکسیداتیو به دلیل 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 هوایی می‌توانند تشکیل ROS را کاهش داده یا واکنش‌پذیری بالای چنین ترکیباتی را از طریق ترکیبات آنتی‌اکسیدانی تولیدشده توسط سلول (منبع درون‌زا) یا از طریق 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 آگرو 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).

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., Mohtashampour, 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 biology/veterinarian and critical thinking. *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 of fibrin 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., Haapasaaari, K.M., Moza, M., Ristimäki, A., Soini, Y., Koivunen, J. and

از ۳ درصد فروکتوالیگوساکارید همراه با باکتری پروبیوتیکی *Bacillus licheniformis* در جیره غذایی ماهی سیم (*Megalobrama terminalis*)، منجر به افزایش فعالیت سوپراکسیداز دیسموتاز و گلوکاتایون پراکسیداز در کبد شد (۴۳). هم‌چنین Lee و همکاران، در مارماهی ژاپنی (*Anguilla japonica*) تغذیه شده با مخلوط پروبیوتیک *Bacillus subtilis* و *plantarum Lactobacillus* گزارش دادند که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی افزایش یافت (۴۴). مالون‌دی‌آلدئید محصول ثانویه پراکسیداسیون لیپیدها بوده که به صورت مستقیم می‌تواند درجه پراکسیداسیون لیپید و به صورت 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 مالون‌دی‌آلدئید 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 آنتی‌اکسیدانی ماهی تیلایپای نیل (*Oreochromis niloticus*) انجام دادند. آن‌ها دریافتند که تغذیه این ماهی با این گونه پروبیوتیک تاثیر معنی‌داری روی مقادیر کاتالاز و مقدار مالون دی‌آلدئید 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 گلوکاتایون در گروه‌های دوم و سوم افزایش معنی‌داری داشته‌است. مقادیر سوپراکسید دیسموتاز سرم خون در تمام گروه‌ها و مقادیر گلوکاتایون در گروه اول افزایش معنی‌داری نشان داد. هم‌چنین به نظر 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

- 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* Dabhl1 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., Katva, 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.
- 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 deltamethrin in 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-term monitoring. *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 Diseases*. 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- $\alpha$ -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 Martinez-Alvarez, R.M., Morales, A.E. and Sanz, A., 2005. Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. *Rev Fish Biol Fisheries*. 15(1/2): 75-88.