



## تأثیر سطوح مختلف لاکتوباسیلوس برویس بر توان آنتی اکسیدانی، فعالیت آنزیم‌های کبدی و فراسنجه‌های خونی در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان

آزاده نیازی<sup>۱</sup>، مهدی شمسایی مهرجان\*<sup>۱</sup>، هومن رجبی اسلامی<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup>گروه شیلات، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۰۸

### چکیده

افزودن مکمل‌های غذایی به جیره آبزیان یک از راهکارهای مهم برای کاهش استرس‌های ناشی از عملیات پرورشی است. در این مطالعه اثر سطوح مختلف پروبیوتیک لاکتوباسیلوس برویس بر پارامترهای مرتبط با استرس شامل آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، آنزیم‌های کبدی، و فراسنجه‌های خونی و بیوشیمیایی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان ارزیابی شد. در این مطالعه، بچه ماهیان قزل‌آلا با میانگین وزنی  $9/5 \pm 0/3$  g به مدت ۸ هفته با پنج جیره آزمایشی شامل کنترل، LB1 ( $1 \times 10^6$ )، LB2 ( $1 \times 10^7$ )، LB3 ( $1 \times 10^8$ ) و LB4 ( $1 \times 10^9$ ) تغذیه شدند. طبق نتایج، بیشترین میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در ماهیان تغذیه شده با جیره LB3 ثبت شد که اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل دارد ( $p < 0.05$ ). همچنین، کمترین مقدار مالون دی‌آلدئید در گروه‌های دریافت‌کننده جیره LB2 و LB3 ثبت شد که اختلاف معنی‌داری را با گروه کنترل و LB1 نشان داد ( $p < 0.05$ ). جیره‌های مکمل شده با LB2، LB3، و LB4 منجر به کاهش قابل توجه سطح فعالیت آنزیم‌های آسپارات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز در مقایسه با گروه کنترل و LB1 شد ( $p < 0.05$ ). همچنین، سطح فعالیت آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز و لاکتات دهیدروژناز در تمام تیمارهای آزمایشی نسبت به گروه کنترل کاهش یافت ( $p < 0.05$ ). در این مطالعه تعداد گلبول‌های قرمز، مقدار هموگلوبولین و درصد هماتوکریت در گروه‌های دریافت‌کننده جیره LB2، LB3، و LB4 نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ( $p < 0.05$ ) و بالاترین مقادیر این سه پارامتر در گروه LB3 ثبت شد. براساس نتایج به‌دست آمده افزودن پروبیوتیک لاکتوباسیلوس برویس به ویژه در غلظت  $1 \times 10^9$  CFU/g به جیره ماهی قزل‌آلای رنگین کمان تاثیر مفیدی بر دفاع آنتی‌اکسیدانی، آنزیم‌های کبدی و فراسنجه‌های خونی دارد.

**واژگان کلیدی:** آنزیم‌های سرم، پروبیوتیک، دفاع آنتی‌اکسیدانی، فراسنجه‌های خونی

\* m.shamsaie@srbiau.ac.ir

## مقدمه

در چند دهه اخیر افزایش نیاز جهانی به پروتئین‌های با منشا دریایی، و کاهش ذخایر طبیعی آبزیان منجر به توسعه صنعت آبرزی پروری در سرتاسر جهان شده است (۲۰۱). یکی از شناخته‌ترین گونه‌های تجاری آبزیان ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان است که به دلیل بازارپسندی بالا، رشد مناسب و سازگارپذیری ایده‌آل در نقاط مختلف جهان با آب و هوای سرد و معتدله پرورش داده می‌شود. علیرغم رشد چشمگیر در فناوری‌های تولید ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، این گونه به طور دائم در طول دوره پرورش، به‌ویژه در سیستم‌های متراکم و فوق متراکم، در معرض عوامل استرس‌زا قرار دارد (۳). این عوامل استرس‌زا به همراه فرآیندهای فیزیولوژیک در بدن جاندار موجب افزایش سطح رادیکال‌های آزاد درون سلولی می‌شوند که اثرات مخربی را بر اجزا سلولی شامل لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA بر جای می‌گذارند (۴). در حقیقت، عدم توازن میان میزان رادیکال‌های آزاد تولید شده و دفاع آنتی‌اکسیدانی که استرس‌های اکسیداتیو نامیده می‌شود می‌تواند منجر به هیدروکسیلاسیون DNA، دناتور شدن پروتئین‌ها، پراکسیداسیون لیپیدها، آپوپتوز و آسیب‌های سلولی شدید شود (۵).

در سال‌های گذشته برای مهار اثرات منفی رادیکال‌های آزاد که به‌طور طبیعی در شرایط پرورش تولید می‌شوند مطالعات گسترده‌ای انجام شده است و معرفی آنتی‌اکسیدان‌های جدید، ایمن و طبیعی به جای آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک یا شیمیایی در حال توسعه است (۶). مطالعات پیشین در آبرزی پروری اثرات مکمل‌های مفید همانند پروبیوتیک‌ها، پری‌بیوتیک‌ها و سین‌بیوتیک‌ها در گونه‌های مختلف ماهی را گزارش کرده‌اند (۴). با توجه به اهمیت استرس‌های اکسیداتیو در عملیات پرورش آبزیان، به‌ویژه در سیستم‌های آبرزی پروری مدرن (به دلیل تراکم بالا)، محققان به دنبال بهبود دفاع آنتی‌اکسیدانی میزبان با تنظیم جمعیت میکروبی

روده ماهیان هستند. پروبیوتیک‌ها می‌توانند از طریق تنظیم میکروفلور روده و مهار رشد باکتری‌های پاتوژن به کاهش اثر استرس‌های اکسیداتیو کمک کنند (۷ و ۸). با توجه به اهمیت استرس‌های اکسیداتیو، به علاوه کارایی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، چندین مطالعه اثرات مثبت جیره‌های حاوی پروبیوتیک را بر افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گزارش کرده‌اند. برای مثال وانگ و همکاران (۲۰۱۹) اثرات مثبت جیره مکمل شده با دو نوع پروبیوتیک *باسیلوس ولکنسیس*<sup>۱</sup> و *ردوتورلا موسیلاژینوسا*<sup>۲</sup> بر بهبود دفاع آنتی‌اکسیدانی ماهی آزاد اقیانوس اطلس<sup>۳</sup> را گزارش کردند (۹). علاوه بر این، گویی و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کردند که ماهی *تیلایپای موزامبیک*<sup>۴</sup> تغذیه شده در سطوح مختلف *باسیلوس لیچنوفرمیس*<sup>۵</sup> (۱۰۷-۱۰۵) منجر به افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شامل گلوکاتیون پراکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز شد (۱۰). نتایج مشابهی نیز توسط لیو و همکاران (۲۰۱۷) به دنبال تجویز پروبیوتیک *باسیلوس سابتیلیس*<sup>۶</sup> در ماهی *تیلایپای* گزارش شد (۱۱). از سوی دیگر پروبیوتیک‌ها از طریق حذف اثرات سمی عوامل استرس‌زا نقش مفیدی را بر کارایی کبد اعمال می‌کنند، کاهش سطح آنزیم‌های کبدی در برخی گونه‌های تجاری همانند ماهی کپور و ماهی سی‌باس تغذیه شده با پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*<sup>۷</sup> (۱۲) و *باسیلوس سابتیلیس* (۱۳) تایید کننده این موضوع است. یافته‌های دیگر نشان داد که جیره‌های حاوی پروبیوتیک می‌توانند سطح گلوکز و کورتیزول سرم را در گونه‌های مختلف تعدیل کنند و از هدر رفت انرژی جلوگیری کنند (۱۴).

باکتری‌های اسیدلاکتیک مهم‌ترین گونه‌های پروبیوتیک هستند که قادرند pH در روده را از طریق تولید لاکتیک اسید، استیک اسید، پروپیونیک اسید و کنترل رشد باکتری‌های پاتوژن به بالانس میکروبی روده و کاهش اثرات استرس‌های اکسیداتیو کمک کنند (۸). یافته‌های پیشین

<sup>5</sup> *Bacillus licheniformis*

<sup>6</sup> *B. subtilis*

<sup>7</sup> *L. fermentum*

<sup>1</sup> *Bacillus velezensis*

<sup>2</sup> *Rhodotorula mucilaginosa*

<sup>3</sup> *Salmo salar*

<sup>4</sup> *Mozambique tilapia*

در این پژوهش، باکتری لاکتوباسیلوس برویس بصورت لیوفلیزه تهیه شد. خصوصیات پروبیوتیکی این باکتری، پیشتر توسط پوربافرانی و همکاران (۲۰۲۱) اثبات شده است (۱۶). این باکتری در محیط کشت Man Rogson Sharp در دمای °C ۳۰ به مدت ۴۸ h رشد کرد. محیط‌های کشت برای ۱۵ min در ۱۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند و پس از حذف قسمت فوقانی، پلت‌ها سه مرتبه با استفاده از بافر فسفات شستشو شدند. در نهایت، غلظت‌های باکتریایی مورد نظر شامل کنترل (۰)، LB1 (۱×۱۰<sup>۶</sup>)، LB2 (۱×۱۰<sup>۷</sup>)، LB3 (۱×۱۰<sup>۸</sup>) و LB4 (۱×۱۰<sup>۹</sup>) با استفاده از اسپکتوفتومتر در طول موج ۶۰۰ nm آماده شدند. پیش از شروع آزمایشات، تعداد باکتری‌های لاکتوباسیلوس برویس در جیره‌های آزمایشی با استفاده از کشت روی محیط تریپتیک سوی آگار (TSA) شمارش و تایید شدند (۱۷).

برای آماده‌سازی جیره پایه، نهاده‌های غذایی به مدت ۲۰ min با یکدیگر مخلوط شدند و با افزودن آب به آنها (۲۵۰-۳۰۰ ml/kg)، خمیر تهیه شد. خمیر به دست آماده در مرحله قبل از طریق یک چرخ گوشت صنعتی به پلت تبدیل شد و به مدت ۲۴ h در دمای °C ۳۷ خشک شد. این خمیر پلت‌شده در کیسه‌های پلاستیکی زیپ‌دار ذخیره شد. جیره‌های آزمایشی نیز از طریق افزودن دوزهای مختلف پروبیوتیک به خمیر، آماده شدند. جیره‌های آزمایشی از نظر ترکیبات تقریبی مشابه بوده و شامل ۴۲/۵٪ پروتئین خام، ۱۶/۴٪ چربی، ۹/۶٪ خاکستر و رطوبت زیر ۱۰٪ بودند.

### نمونه‌برداری جهت آنالیز پارامترها

ماهیان برای ارزیابی پارامترهای بیوشیمیایی سرم، در انتهای روز ۶۰ ام، به مدت ۲۴ h قطع غذا دهی شدند و سه ماهی از هر تکرار با استفاده از پودر گل میخک (۱۵۰ mg/l) بیهوش شد. نمونه‌های خونی با استفاده از سرنگ ۲ ml از ساقه دمی تهیه شد. برای شمارش سلول‌های خونی، نیمی از خون به میکروتیوب‌های حاوی هیارین منتقل شد. بخش دیگر خون به مدت ۳ h در دمای یخچال نگهداری شد و نمونه‌های سرم با استفاده از سانتریفیوژ (۳۰۰۰ rpm به مدت

گزارش کردند که پروبیوتیک‌ها قادرند متابولیت‌هایی با خواص آنتی‌اکسیدانی همانند گلوکاتینون، بوتیرات، فلات و آگزوپلی‌ساکاریدها تولید کنند (۱۵). لاکتوباسیلوس برویس یک باکتری اسیدلاکتیک، گرم مثبت، بدون اسپور، کاتالاز منفی و بدون تحرک است که به عنوان یک گونه ایمن با خواص پروبیوتیکی در نظر گرفته می‌شود (۱۶). این گونه به دلیل اثرات مثبت بر میزبان همانند تولید باکتریوسین، سنتز اسیدهای چرب زنجیره کوتاه، مقاومت آنتی‌بیوتیکی و کاهش pH روده می‌تواند اثرات مثبتی را بر میزبان اعمال کند (۱۷). علاوه بر این، بر اساس مطالعه آمراستی و همکاران (۲۰۱۳) لاکتوباسیلوس برویس<sup>۱</sup> جزء گونه‌هایی است که اثرات آنتی‌اکسیدانی قوی را نشان می‌دهد (۱۵). با توجه به پتانسیل‌های ذکر شده لاکتوباسیلوس برویس در زمینه‌های مختلف تاکنون اثرات مثبت این پروبیوتیک به‌طور جدی در آبی‌پروری مطالعه نشده است. بنابراین، در این مطالعه تاثیر این لاکتوباسیلوس بر فراسنجه‌های خونی، آنزیم‌های کبدی و دفاع آنتی‌اکسیدانی بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به عنوان مهم‌ترین گونه تجاری کشور ارزیابی شد.

## مواد و روش‌ها

### محیط پرورشی

این مطالعه در یک مزرعه خصوصی پرورش ماهی قزل‌آلا با منبع آب چشمه به مدت ۸ هفته انجام شد. در این مطالعه برای طراحی ۵ تیمار آزمایشی شامل کنترل، LB1 (۱×۱۰<sup>۶</sup>)، LB2 (۱×۱۰<sup>۷</sup>)، LB3 (۱×۱۰<sup>۸</sup>) و LB4 (۱×۱۰<sup>۹</sup>) با سه تکرار، ۳۰۰ قطعه بچه ماهی با میانگین وزنی  $g \pm 0.3/9.5$  در ۱۵ استخر تقسیم شدند. خصوصیات کیفی آب به صورت هفتگی اندازه‌گیری شده و در محدوده °C ۱۴-۱۵، mg/l ۷/۵-۷/۸ اکسیژن محلول و pH برابر ۷/۳-۷/۶ بود. در طول دوره آزمایشی ماهیان سه بار در روز (ساعات: ۹، ۱۳ و ۱۶) بر اساس وزن بدن ۳-۲/۵٪ تغذیه شدند (۴) و تلفات در صورت وجود به صورت روزانه ثبت شد.

### آماده‌سازی پروبیوتیک و تهیه جیره‌های آزمایشی

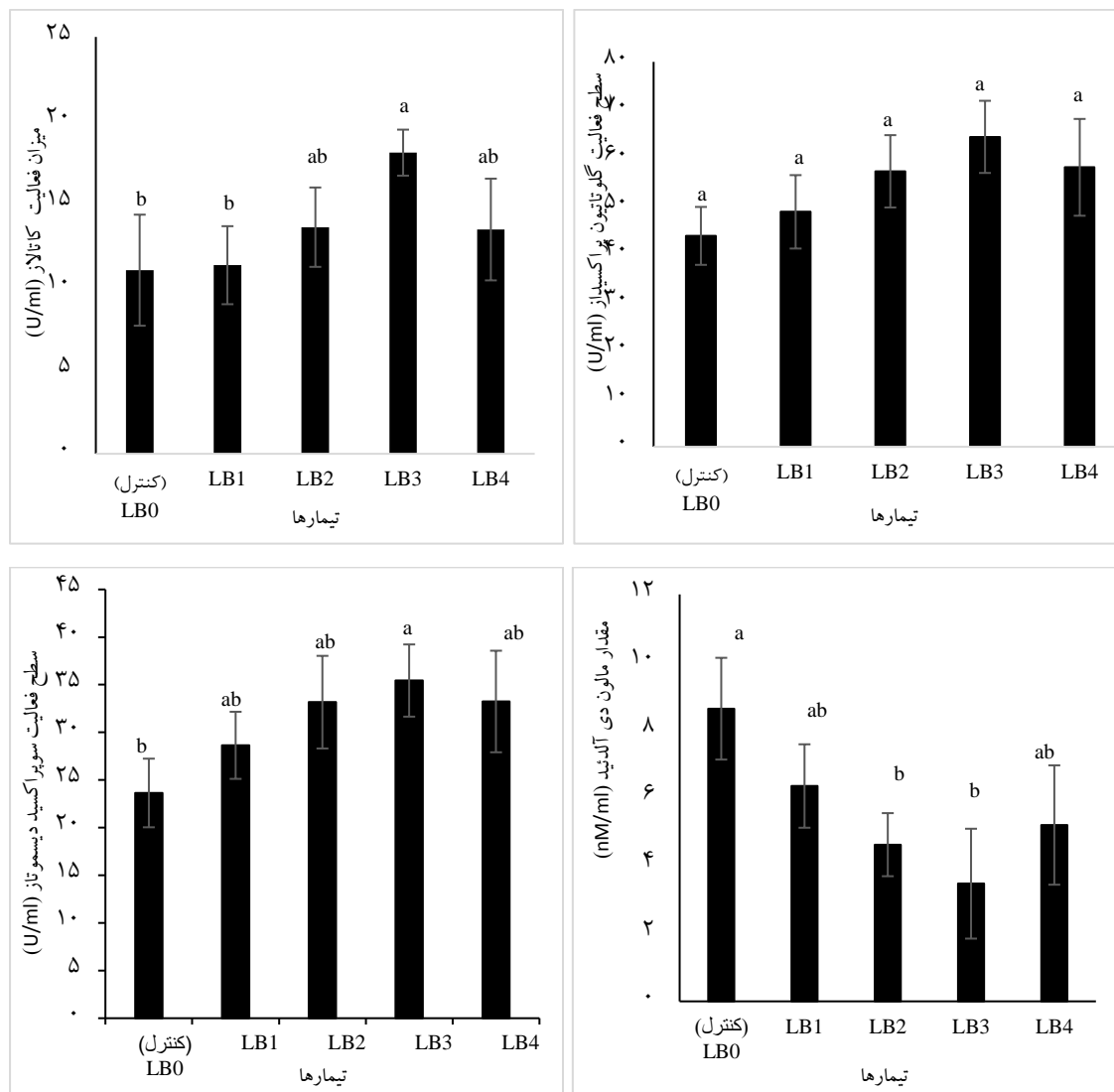
<sup>1</sup> *L. brevis*

آمینوترانسفراز تغییر رنگ ایجاد شده در اثر فعالیت آنزیم با طول موج ۵۰۵ nm قرائت شد و فعالیت آنزیم از طریق مقایسه با منحنی استاندارد محاسبه شد. برای اندازه‌گیری آلکالین فسفاتاز نیز از کیت پارس آزمون و در طول موج ۴۰۵ nm استفاده شد و پس از مقایسه با منحنی استاندارد، مقدار این آنزیم یادداشت و در نهایت آنزیم‌ها بر حسب U/L گزارش شدند (۱۹).

۱۰ min در دمای ۴ °C جدا شدند. سرم به دست آمده تا زمان سنجش پارامترهای ایمنی در دمای ۷۰ °C - ذخیره شد (۱۸).

### سنجش فعالیت آنزیم‌های کبدی

برای اندازه‌گیری آنزیم‌های کبدی در هر نوبت تعدادی از سرم‌ها از حالت انجماد خارج شده و با استفاده از کیت‌های اختصاصی پارس آزمون، فعالیت آنزیم‌های آلانین ترانسفراز، آلکالین فسفاتاز و آسپاراتات آمینوترانسفراز اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری آلانین ترانسفراز و آسپاراتات



شکل ۱. پاسخ‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی در ماهیان قزل‌آلای تغذیه شده با سطوح مختلف پروبیوتیک لاکتوباسیلوس برویس حروف غیرهمسان در هر نمودار بیانگر اختلاف معنی‌دار است ( $p > 0.05$ ).

### سنجش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

0.05). هر چند میزان گلوکاتایون پراکسیداز اختلاف معنی داری را بین گروه‌های آزمایشی مختلف نشان نداد ( $p > 0.05$ ). از سوی دیگر بالاترین میزان مالون دی‌آلدئید در گروه کنترل ثبت شد که اختلاف معنی‌داری را با گروه‌های LB2 و LB3 ارائه کرد ( $p < 0.05$ ).

### بررسی آنزیم‌های کبدی

واکنش آنزیم‌های کبدی نسبت به جیره‌های مکمل شده با پروبیوتیک در شکل ۲ ارائه شده است. بر اساس نتایج به‌دست آمده میزان فعالیت آلانین آمینو ترانسفرار و آسپاراتات آمینو ترانسفرار در گروه‌های تیمار شده با LB2، LB3 و LB4 در مقایسه با گروه LB1 و کنترل کاهش معنی داری را نشان داد. همچنین، فعالیت لاکتات دهیدروژناز و آلکالین فسفاتاز در واکنش به تمام تیمارها کاهش معنی‌داری را نشان داد و کمترین مقدار نیز در ماهیان دریافت‌کننده جیره LB3 ثبت شد.

### فراسنجه‌های خونی

پارامترهای هماتولوژی در پایان دوره پرورش در گروه‌های تغذیه شده با پروبیوتیک در انتهای این مطالعه بررسی شد (جدول ۱). بر این اساس تعداد گلبول‌های قرمز، درصد هماتوکریت و سطح هموگلوبین در تمام گروه‌های آزمایشی تغذیه شده با پروبیوتیک به جزء گروه LB1، در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری را نشان دادند ( $p < 0.05$ ).

همبستگی بین سطوح مختلف لاکتوباسیلوس و آنزیم‌های کبدی، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، محتوای مالون دی‌آلدئید و فراسنجه‌های خونی در جدول ۲ نشان شده است. بر طبق این نتایج، بین سطح فعالیت آنزیم‌های کبدی و غلظت لاکتوباسیلوس ارتباط وجود داشت ( $p < 0.05$ ) و با افزایش غلظت لاکتوباسیلوس سطح فعالیت آنزیم‌های کبدی کاهش یافت ( $r < 0.5$ ). در مورد آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بین میزان فعالیت گلوکاتایون پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، و غلظت لاکتوباسیلوس ارتباط مثبت وجود داشت و با افزایش غلظت سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی افزایش یافت ( $p < 0.05$  و  $r < 0.5$ ). گرچه بین میزان کاتالاز و سطوح مختلف

میزان گلوکاتایون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز توسط کیت‌های آزمایشگاهی ZellBio GmbH, Veltinerweg و طبق دستورالعمل شرکت سازنده تعیین شد (۲۰). فعالیت کاتالاز از طریق کاهش در میزان  $H_2O_2$  و بر اساس روش توصیف‌شده گوته (۱۹۹۱) محاسبه شد (۲۱). میزان مالون دی‌آلدئید نیز توسط روش تیوباریتوریک اسید و کیت تجاری ZellBio GmbH, Veltinerweg محاسبه شد (۲۰).

### تعیین فراسنجه‌های خونی

شمارش گلبول‌های قرمز با استفاده از لام هموسیئومتر و بر اساس روش بلسکل و همکاران (۱۹۷۳) انجام شد (۲۲). میزان هماتوکریت با استفاده از میکروهماتوکریت سنجش شد (۲۳).

### روش‌ها و ابزار تجزیه و تحلیل داده‌ها

آزمایش حاضر در قالب یک طرح کاملاً تصادفی انجام شد. ابتدا نرمال بودن داده‌های به‌دست آمده با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنف بررسی شد. بررسی آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS20 و به کمک آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و آزمون مقایسه میانگین توکی (Tukey' HSD test) انجام شد. تمام مفروضات آنالیز واریانس پیش از انجام تحلیل‌های آماری، بررسی شد و در صورت لزوم از تبدیل‌های مناسب استفاده شد. لازم به ذکر است که تمامی آزمون‌ها در سطح معنی داری کمتر از ۰.۵٪ تفسیر شد و نتایج نهایی به صورت Mean  $\pm$  SD گزارش شد. برای ترسیم نمودارها نیز از نرم‌افزار اکسل نسخه ۲۰۱۳ استفاده شد.

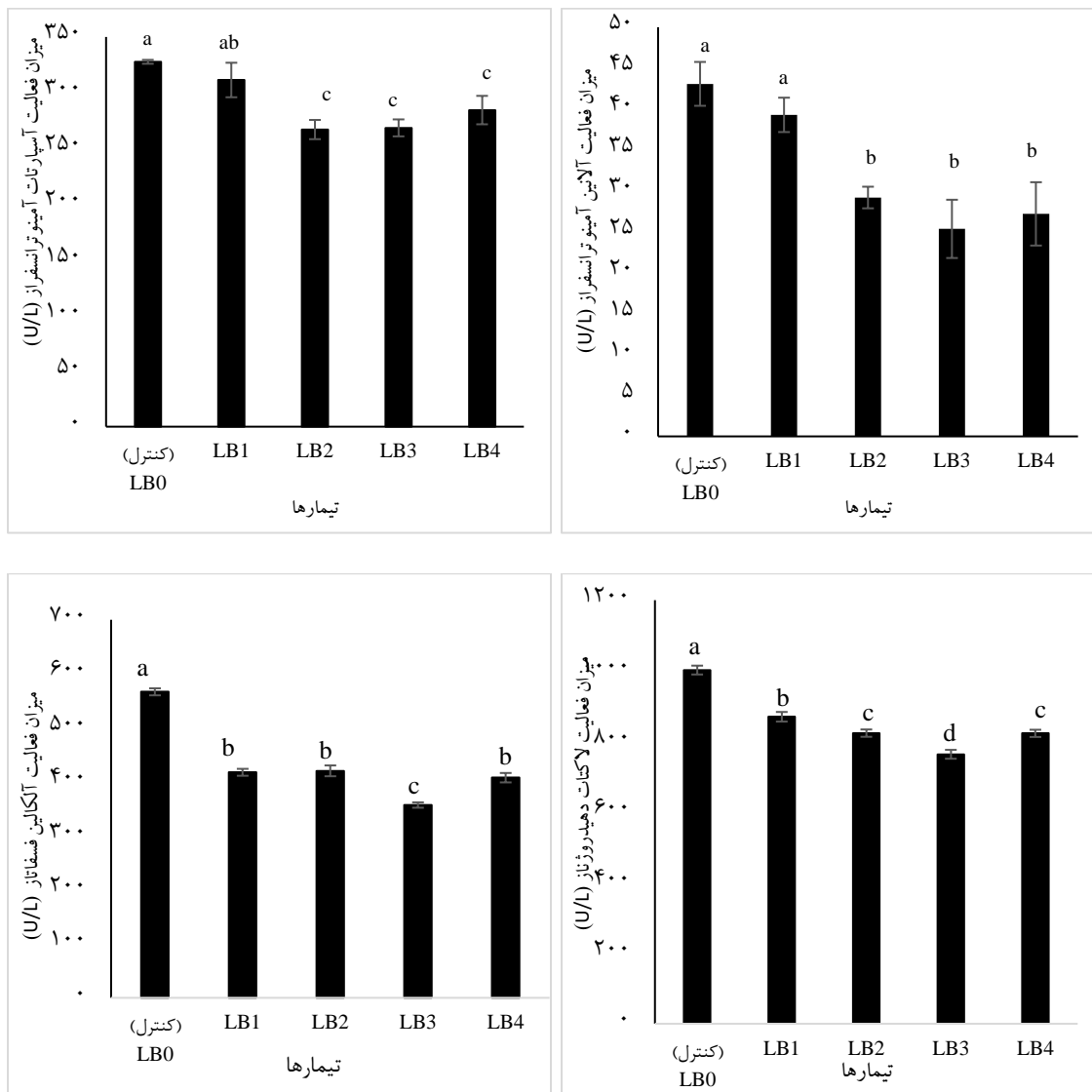
### نتایج

#### بررسی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

وضعیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در ماهیان تغذیه شده با سطوح مختلف پروبیوتیک، در گروه‌های آزمایشی مختلف در شکل ۱ ارائه شده است. بر این اساس سطح آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در ماهیان تغذیه شده با جیره LB3 اختلاف معنی‌داری را با گروه کنترل نشان داد ( $p <$

هماتوکریت و هموگلوبین ارتباط از نوع مثبت وجود داشت  
( $p < 0.05$  و  $r > 0.5$ ).

پروبیوتیک ارتباطی وجود نداشت ( $p > 0.05$ ). در مورد  
فراسنجه‌های خونی نیز بین تعداد گلبول‌های قرمز، میزان



شکل ۲. فعالیت آنزیم‌های کبدی در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با سطوح مختلف پروبیوتیک لاکتوباسیلوس برویس. حروف غیرهمسان در هر نمودار بیانگر اختلاف معنی‌دار است ( $p > 0.05$ ).

جدول ۱. وضعیت فراسنجه‌های خونی و پارامترهای بیوشیمیایی سرم ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با جیره پایه و جیره‌های مکمل شده با سطوح مختلف لاکتوباسیلوس برویس.

پارامترها	سطوح مختلف پروبیوتیک (CFU/g)				
	$1 \times 10^9$	$1 \times 10^8$	$1 \times 10^7$	$1 \times 10^6$	۰ (شاهد)
تعداد گلبول قرمز ( $10^6 \times \text{cell/mm}^3$ )	$1/30 \pm 0.02^a$	$1/35 \pm 0.01^a$	$1/32 \pm 0.02^{ab}$	$1/26 \pm 0.03^{bc}$	$1/21 \pm 0.02^c$
هماتوکریت (%)	$31.00 \pm 2.00^a$	$32.96 \pm 1.20^a$	$30.32 \pm 1.45^{ab}$	$26.33 \pm 1.20^{bc}$	$24.33 \pm 1.76^c$
هموگلوبین (mg/dl)	$5.03 \pm 0.02^{ab}$	$5.07 \pm 0.06^a$	$5.06 \pm 0.03^a$	$4.94 \pm 0.05^{bc}$	$4.85 \pm 0.04^c$

حروف غیرهمسان در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشد ( $p < 0.05$ ).

جدول ۲. بررسی ارتباط بین فراسنجه‌های خونی و پارامترهای بیوشیمیایی سرم ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با سطوح مختلف لاکتوباسیلوس برویس.

P value	R value	پارامترهای مورد مطالعه
۰/۰۰۳	-۰/۷۱۰*	آسپاراتات آمینو ترانسفراز (U/L)
۰/۰۰۰	-۰/۸۷۱*	آلانین آمینو ترانسفراز (U/L)
۰/۰۰۱	-۰/۷۵۹*	آلکالین فسفاتاز (U/L)
۰/۰۰۰	-۰/۸۱۳*	لاکتات دهیدروژناز (U/L)
۰/۰۰۹	-۰/۶۵۰*	مالون دی آلدئید (nM/ml)
۰/۰۰۶	۰/۶۷۱*	سوپراکسید دیسموتاز (U/ml)
۰/۰۵۸	۰/۴۹۹	کاتالاز (U/ml)
۰/۰۱۰	۰/۶۴۳*	گلوکاتایون پراکسیداز (U/ml)
۰/۰۰۲	۰/۷۳۹*	تعداد گلبول قرمز ( $10^6 \times \text{cell/mm}^3$ )
۰/۰۰۰	۰/۸۲۸*	میزان هماتوکریت (%)
۰/۰۰۱	۰/۷۶۰*	میزان هموگلوبین (mg/dl)

\* بین غلظت‌های مختلف پروبیوتیک و پارامترهای اندازه‌گیری شده اختلاف معنی‌دار وجود دارد ( $P < 0.05$ ;  $n=3$ )

## بحث و نتیجه‌گیری

استرس‌های ناشی از شرایط پرورش می‌توانند وضعیت فیزیولوژیکی ماهی را به‌طور گسترده تحت تاثیر قرار دهند و بر کارایی رشد، نرخ بقا و بازده اقتصادی مزرعه اثر منفی برجای بگذارند (۴). هنگام مواجهه ماهی با تنش، رادیکال‌های آزاد از طریق پراکسیداسیون لیپیدها یا پروتئین‌ها موجب تخریب سلولی می‌شوند (۵). بنابراین، حضور ترکیبات با خواص بالقوه آنتی‌اکسیدانی در جیره ضروری به نظر می‌رسد. پروبیوتیک‌ها از عوامل شناخته شده در کاهش استرس‌های اکسیداتیو در ماهی و میگو در شرایط پرورشی هستند (۸). پروبیوتیک‌ها از طریق تولید برخی متابولیت‌ها همانند اگرزوپلی‌ساکاریدها نقش مهمی را در پاکسازی رادیکال‌های آزاد ایفا می‌کنند (۱۵). از سوی دیگر این میکرواورگانیسم‌ها از طریق افزایش ترشح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی همانند کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گلوکاتایون پراکسیداز با رادیکال‌های آزاد مقابله می‌کنند. این آنزیم‌ها نقش حیاتی را در کنترل استرس‌های اکسیداتیو کنترل نشده در شرایط پرورشی و حفظ یکپارچگی اجزای سلولی دارند (۲۴). در مطالعه حاضر بالاترین میزان سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در ماهیان تغذیه شده با LB3 ثبت شد که اختلاف

معنی‌داری را با گروه کنترل ثبت کردند هرچند میزان گلوکاتایون سوپراکسید دیسموتاز در میان گروه‌های آزمایشی مختلف از نظر آماری مشابه بود. از سوی دیگر، میزان مالون دی آلدئید در ماهیان دریافت‌کننده جیره LB3 کمترین مقدار را دار بود و کاهش معنی‌داری را در مقایسه با گروه کنترل ثبت کرد. علاوه بر این در این مطالعه بین سطوح مختلف لاکتوباسیلوس و فعالیت گلوکاتایون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز ارتباط مثبت وجود داشت و با افزایش غلظت میزان فعالیت این آنزیم‌ها افزایش یافت. از سوی دیگر میزان مالون دی آلدئید و غلظت لاکتوباسیلوس نیز یک همبستگی وجود داشت و محتوای مالون دی آلدئید سرم با افزایش غلظت لاکتوباسیلوس کاهش یافت. گرچه، بین میزان فعالیت کاتالاز و سطح لاکتوباسیلوس همبستگی مشاهده نشد و به نظر می‌رسد فعالیت این آنزیم تحت حالت وابسته به دوز است. مالون دی آلدئید محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدی است که یک شاخص معتبر از میزان آسیب‌های سلولی است (۴). مطالعات پیشین نقش پروبیوتیک‌ها به ویژه باکتری‌های اسید لاکتیک را در افزایش آنزیم‌های درون سلولی تایید کردند (۸ و ۱۰). سطح سوپراکسید دیسموتاز و گلوکاتایون پراکسیداز در سرم ماهی کپور هندی و تیلاپیا موزابیک تغذیه

شده با *باسیلوس لیچنوفرמיس* (۲۵) و *لاکتوباسیلوس پلانٹاروم*<sup>۱</sup> (۱۰) در غلظت‌های  $1 \times 10^7$  CFU/g و  $1 \times 10^8$  CFU/g به ترتیب افزایش یافت. همچنین، نادری فارسانی و همکاران (۲۰۲۱) گزارش دادند که *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*<sup>۲</sup> و *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم*<sup>۳</sup> از طریق افزایش سطح فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی همانند کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، گلوکاتایون پراکسیداز مقدار مالون دی‌آلدئید در سرم ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان را کاهش داد (۲۶). خواص آنتی‌اکسیدانی پروبیوتیک‌ها احتمالاً به دلیل شلاته کردن یون‌ها، کاهش متابولیت اکسیژن فعال، جلوگیری از تولید ترکیبات اکسیدانت، کاهش اتواکسیداسیون آسکوربات و پاکسازی رادیکال‌های آزاد می‌باشد (۱۵ و ۲۷).

آنزیم‌های کبدی یکی دیگر از شاخص‌های برجسته برای ارزیابی وضعیت ماهی از لحاظ میزان پایداری سلول‌ها در برابر عوامل استرس‌زا هستند که می‌توانند اطلاعات مهمی را در رابطه با جیره غذایی، دمای آب و بیماری‌ها ارائه کنند (۲۸). برای مثال افزایش فعالیت آسپارات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز در پلاسما می‌تواند ناشی از آسیب به غشای سلولی میتوکندریایی و نشت آنزیمی به خون، در اثر بروز استرس اکسیداتیو باشد. از سوی دیگر افزایش آلکالین فسفاتاز نشان‌دهنده مرگ برنامه ریزی شده سلولی یا آپوپتوز باشد. علاوه بر این، بالا رفتن سطح لاکتات دهیدروژناز در سرم بیانگر شرایط هیپوکسی و اکسیداسیون در میتوکندری است (۲۹). سطح استاندارد آنزیم‌های کبدی در پلاسما ماهیان می‌تواند حاکی از سلامتی بافت‌های ماهی و دلیلی بر عملکرد مناسب کبد و شرایط تغذیه‌ای مناسب باشد (۳۰). به نظر می‌رسد که پروبیوتیک‌ها از طریق افزایش باکتری‌های مفید روده، بهبود وضعیت ساختاری روده، مهار رشد باکتری‌های پاتوژن، تقویت پاسخ‌های ایمنی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و تولید متابولیت‌های مفید همانند اسیدهای چرب زنجیره کوتاه ویتامین‌ها و مواد معدنی نقش مهمی را در

سلامت کبد و سایر بافت‌های تولیدکننده این آنزیم‌ها ایفا می‌کنند (۱۵). در مطالعه جاری ماهیان تغذیه شده با سطوح مختلف پروبیوتیک به جز LB1 اختلاف معنی‌داری را با گروه کنترل ثبت کردند. براساس جدول ۲ بین فعالیت آنزیم‌های کبدی و سطوح مختلف *لاکتوباسیلوس* ارتباط منفی وجود داشت و با افزایش غلظت فعالیت آنزیم‌های کبدی کاهش یافت. عدم افزایش سطح آنزیم‌های کبدی در گروه‌های دریافت‌کننده *لاکتوباسیلوس* بیانگر بی‌خطر بودن این *لاکتوباسیلوس* و عدم تولید متابولیت‌های ناسازگار با سیستم فیزیولوژی میزبان است. کاهش سطح آنزیم‌های کبدی در گروه‌های تغذیه شده با *لاکتوباسیلوس* در این مطالعه احتمالاً مرتبط با تقویت توان آنتی‌اکسیدانی آنها است. در حقیقت، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به حفظ یکپارچگی سلولی و حمایت از ساختارهای سلولی این تیمارها کمک می‌کند و با کاهش تولید ترکیبات سمی همانند مالون دی‌آلدئید ریسک آسیب سلولی و نشت آنزیم‌های کبدی به پلاسما کاهش می‌یابد. به‌طور مشابه نادری فارسانی و همکاران (۲۰۲۰) گزارش دادند که افزودن پروبیوتیک تجاری پری مالاک<sup>۴</sup> به جیره ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان منجر به کاهش معنی‌دار در سطح آنزیم‌های کبدی سرم شد که مطابق با نتایج این مطالعه است (۳۱). همچنین، براساس نتایج یداللهی و همکاران (۲۰۲۱)، سطح آنزیم‌های کبدی شامل آلانین آمینوترانسفراز و آسپارات آمینوترانسفراز در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با *باسیلوس سابتلیس* و *باسیلوس لیچنوفرמיس* در غلظت  $1 \times 10^8$  CFU/g به‌طور قابل توجهی کاهش یافت (۳۲).

پارامترهای هماتولوژی می‌توانند اطلاعات با ارزشی را از وضعیت فیزیولوژی جانوران آبرزی تحت شرایط مختلف فراهم کنند (۳۳). در مطالعه حاضر تعداد گلبول‌های قرمز، هماتوکریت و هموگلوبولین در ماهیان دریافت‌کننده جیره LB3 اختلاف معنی‌داری را با گروه کنترل ثبت کردند. علاوه بر این، افزایش فراسنجه‌های خونی با افزایش غلظت

<sup>3</sup> *Bifidobacterium bifidum*

<sup>4</sup> Primalac

<sup>1</sup> *L. plantarum*

<sup>2</sup> *L. acidophilus*

با توجه به نتایج به‌دست آمده از این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از لاکتوباسیلوس برویس می‌تواند یک مکمل پروبیوتیکی کارا، بدون اثرات جانبی و تقویت‌کننده سلامت ماهی باشد. سطوح مختلف پروبیوتیک در این مطالعه نشان داد که استفاده از  $1 \times 10^9$  CFU/g غلظت  $1 \times 10^9$  اثرات بالاتری بر تقویت دفاع آنتی‌اکسیدانی و فراسنجه‌های خونی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان داشت. علاوه بر این، این غلظت به‌عنوان محافظ کبد نیز می‌تواند عمل کند. بنابراین، استفاده از دوز  $1 \times 10^9$  CFU/g لاکتوباسیلوس برویس به‌عنوان یک مکمل میکروبی با پتانسیل پروبیوتیکی در تقویت دفاع آنتی‌اکسیدان و سلامت کبد در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در شرایط اسارت توصیه می‌شود.

### منابع

1. Taghavizadeh M, Shekarabi SPH, Mehrgan, MS, Islami, H. Efficacy of dietary lysophospholipids (Lipidol™) on growth performance, serum immuno-biochemical parameters, and the expression of immune and antioxidant-related genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 2020; 525: 735315.
2. Park Y, Lee S, Hong J, Kim D, Moniruzzaman M, Bai SC. Use of probiotics to enhance growth, stimulate immunity and confer disease resistance to *Aeromonas salmonicida* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Research*. 2017; 48: 2672-2682.
3. Adel M, Caipang CMA, Dawood MA. Immunological responses and disease resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles following dietary administration of stinging nettle (*Urtica dioica*). *Fish & shellfish immunology*. 2017; 71: 230-238.
4. Hoseinifar SH, Yousefi S, Van Doan H, Ashouri G, Gioacchini G, Maradonna F, Carnevali O. Oxidative stress and antioxidant defense in fish: the implications of probiotic, prebiotic, and synbiotics. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*. 2020; 29(2):198-217.
5. Tang Y, Han L, Chen X, Xie M, Kong W, Wu Z. Dietary supplementation of probiotic *Bacillus subtilis* affects antioxidant defenses and immune response in grass carp under *Aeromonas hydrophila* challenge. *Probiotics and antimicrobial proteins*. 2019; 11(2): 545-58.
6. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current biology*. 2014; 24(10): 453-462.

لاکتوباسیلوس همراه بود. افزایش سطح پارامترهای هماتولوژی در گونه‌های مختلف ماهیان به دنبال تجویز خوراکی باکتری‌های سودمند در چندین مطالعه گزارش شده است (۳۴). تغییر در سطح سلول‌های خونی ممکن است به اثرات پروبیوتیکی بر بافت‌های لنفاوی مرتبط باشد. یافته‌های مشابهی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با لاکتوباسیلوس بولگاریکوس<sup>۱</sup> (۳۵)، پروبیوتیک تجاری بایوآکوا (۳۶) لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (۳۷) گزارش شده است. افزایش تعداد گلبول‌های قرمز در ماهیان دریافت‌کننده پروبیوتیک می‌تواند نرخ متابولیسم را در بافت‌های مختلف افزایش دهد (۳۸).

پارامترهای خونی به‌عنوان یک نشانگر زیستی حساس می‌تواند تغییرات محیطی و فیزیولوژیک مختلفی شامل استرس و تغذیه را در آبزیان آشکار کنند (۲۸). در این مطالعه به نظر می‌رسد که ارتباط قوی بین بهبود فراسنجه‌های خونی و بهبود عملکرد سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و آنزیم‌های کبدی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با سطوح پروبیوتیک LB دیده شد. که این ارتباط نشان دهنده بهبود اجزاء خون در خون‌رسانی و تامین انرژی و اکسیژن مورد نیاز بافت‌ها به‌ویژه کبد است (۳۹). در حقیقت بهبود سیستم آنتی‌اکسیدانی ماهی همراه با تامین اکسیژن مورد نیاز بدن در خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد نقش داشته که این خود سبب کاهش معنی‌دار آسیب کبدی ناشی از استرس اکسیداسیو و در نهایت کاهش رهاسازی آنزیم‌های کبدی در خون می‌شود (۴۰). در مطالعه حاضر کاهش آنزیم‌های کبدی همراه با بهبود سیستم آنتی‌اکسیداتی ماهیان تغذیه شده با LB3 ثبت شد که اختلاف معنی‌داری را با گروه کنترل و LB1 ثبت کرد. براساس مطالعات قبلی یک ارتباط مثبت بین فراسنجه‌های خونی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و آنزیم‌های کبدی سرم وجود دارد و استفاده از پروبیوتیک‌ها قادر است اثرات مضر استرس در شرایط پرورش را کاهش دهد (۴۱).

### نتیجه‌گیری

<sup>1</sup> *Lactobacillus bulgaricus*

- probiotic strain, *Lactobacillus brevis* MK05, and the toxicity effects of its secretory proteins against MCF-7 breast cancer cells. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2021; 13(4): 982-92.
17. Liu W, Ren P, He S, Xu L, Yang Y, Gu Z, Zhou Z. Comparison of adhesive gut bacteria composition, immunity, and disease resistance in juvenile hybrid tilapia fed two different *Lactobacillus* strains. *Fish & shellfish immunology*. 2013; 35(1): 54-62.
18. Yousefi M, Ghafarifarsani H, Hoseini SM, Hoseinifar SH, Abtahi B, Vatnikov YA, Kulikov EV, Van Doan H. Effects of dietary thyme essential oil and prebiotic administration on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) welfare and performance. *Fish & Shellfish Immunology*. 2022; 120: 737-44.
19. Adineh H, Naderi M, Yousefi M, Khademi Hamidi M, Ahmadifar E, Hoseini SM. Dietary licorice (*Glycyrrhiza glabra*) improves growth, lipid metabolism, antioxidant and immune responses, and resistance to crowding stress in common carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture Nutrition*. 2021; 27(2): 417-26.
20. Hoseini SM, Hoseinifar SH, Van Doan H. Growth performance and hematological and antioxidant characteristics of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, fed diets supplemented with Roselle, *Hibiscus sabdariffa*. *Aquaculture*. 2021; 530: 735827.
21. Goth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica chimica acta*. 1991; 196 (2-3):143-51.
22. Blaxhall PC, Daisley KW. Routine haematological methods for use with fish blood. *Journal of fish biology*. 1973; 5(6):771-81.
23. Adel M, Dawood MA, Shafiei S, Sakhaie F, Shekarabi SP. Dietary *Polygonum minus* extract ameliorated the growth performance, humoral immune parameters, immune-related gene expression and resistance against *Yersinia ruckeri* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 2020; 519: 734738.
24. Aliko V, Qirjo M, Sula E, Morina V, Faggio C. Antioxidant defense system, immune response and erythron profile modulation in gold fish, *Carassius auratus*, after acute manganese treatment. *Fish & shellfish immunology*. 2018; 76:101-9.
25. Abarike ED, Cai J, Lu Y, Yu H, Chen L, Jian J, Tang J, Jun L, Kuebutornye FK. Effects of a commercial probiotic BS containing *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on growth, immune response and disease resistance in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology*. 2018; 82: 229-38.
26. Naderi Farsani M, Meshkini S, Manaffar R. Growth performance, immune response, antioxidant capacity and disease resistance against *Yersinia ruckeri* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as influenced through singular or combined consumption of resveratrol and two- strain
7. Van Doan H, Hoseinifar SH, Ringø E, Ángeles Esteban M, Dadar M, Dawood MA, Faggio C. Host-associated probiotics: a key factor in sustainable aquaculture. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*. 2020; 28(1):16-42.
8. Dawood MA, Koshio S, Esteban MÁ. Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture*. 2018; 10(4): 950-74.
9. Wang C, Liu Y, Sun G, Li X, Liu Z. Growth, immune response, antioxidant capability, and disease resistance of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed *Bacillus velezensis* V4 and *Rhodotorula mucilaginosa* compound. *Aquaculture*. 2019; 500: 65-74.
10. Gobi N, Vaseeharan B, Chen JC, Rekha R, Vijayakumar S, Anjugam M, Iswarya A. 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 & shellfish immunology*. 2018; 74: 501-8.
11. Liu H, Wang S, Cai Y, Guo X, Cao Z, Zhang Y, Liu S, Yuan W, Zhu W, Zheng YU, Xie Z. Dietary administration of *Bacillus subtilis* HAINUP40 enhances growth, digestive enzyme activities, innate immune responses and disease resistance of tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & shellfish immunology*. 2017; 60: 326-33.
12. Krishnaveni G, Vignesh S, Vidhyalakshmi N, Vijay V, Ramesh U. Effects of dietary supplementation of *Lactobacillus fermentum* URLP18 on growth, innate immunity and survival against *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 challenge in freshwater fish *Cyprinus carpio* (common carp). *Aquaculture Research*. 2021; 52(3):1160-76.
13. Adorian TJ, Jamali H, Farsani HG, Darvishi P, Hasanpour S, Bagheri T, Roozbehfar R. Effects of probiotic bacteria *Bacillus* on growth performance, digestive enzyme activity, and hematological parameters of Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch). *Probiotics and antimicrobial proteins*. 2019; 11(1): 248-55.
14. Telli GS, Ranzani-Paiva MJ, de Carla Dias D, Sussel FR, Ishikawa CM, Tachibana L. Dietary administration of *Bacillus subtilis* on hematology and non-specific immunity of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* raised at different stocking densities. *Fish & shellfish immunology*. 2014; 39(2): 305-11.
15. Amaretti A, Di Nunzio M, Pompei A, Raimondi S, Rossi M, Bordoni A. Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: in vitro and in vivo activities. *Applied microbiology and biotechnology*. 2013; 97(2): 809-17.
16. Pourbaferani M, Modiri S, Norouzy A, Maleki H, Heidari M, Alidoust L, Derakhshan V, Zahiri HS, Noghahi KA. A Newly characterized potentially

- intestinal microflora. *Aquaculture Nutrition*. 2012; 18(1): 1-11.
34. Nayak SK. Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish & shellfish immunology*. 2010; 29(1): 2-14.
35. Mohammadian T, Dezfuly ZT, Motlagh RG, Jangaran-Nejad A, Hosseini SS, Khaj H, Alijani N. Effect of encapsulated *Lactobacillus bulgaricus* on innate immune system and hematological parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), post-administration of Pb. *Probiotics and antimicrobial proteins*. 2020; 12(2): 375-88.
36. Akbari Nargesi E, Falahatkar B, Sajjadi MM. Dietary supplementation of probiotics and influence on feed efficiency, growth parameters and reproductive performance in female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) broodstock. *Aquaculture Nutrition*. 2020; 26(1): 98-108.
37. Mohammadian T, Nasirpour M, Tabandeh MR, Heidary AA, Ghanei-Motlagh R, Hosseini SS. Administrations of autochthonous probiotics altered juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* health status, growth performance and resistance to *Lactococcus garvieae*, an experimental infection. *Fish & shellfish immunology*. 2019; 86: 269-79.
38. Opiyo MA, Jumbe J, Ngugi CC, Charo-Karisa H. Different levels of probiotics affect growth, survival and body composition of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in low input ponds. *Scientific African*. 2019; 4: e00103.
39. Arillo A, Gaino E, Margiocco C, Mensi P, Schenone G. Biochemical and ultrastructural effects of nitrite in rainbow trout: liver hypoxia as the root of the acute toxicity mechanism. *Environmental Research*. 1984; 34(1): 135-154.
40. Wilhelm Filho D. Reactive oxygen species, antioxidants and fish mitochondria. *Frontiers in Bioscience-Landmark*. 2007; 12(4): 1229-1237.
41. Alak G, Kotan R, Uçar A, Parlak V, Atamanalp M. Pre-probiotic effects of different bacterial species in aquaculture: behavioral, hematological and oxidative stress responses. *Oceanological and Hydrobiological Studies*. 2022; 51(2): 133-142.
- probiotics. *Aquaculture Nutrition*. 2021; 27(6): 2587-99.
27. Martarelli D, Verdenelli MC, Scuri S, Cocchioni M, Silvi S, Cecchini C, Pompei P. Effect of a probiotic intake on oxidant and antioxidant parameters in plasma of athletes during intense exercise training. *Current microbiology*. 2011; 62(6):1689-96.
28. Banaee M, Akhlaghi M, Soltanian S, Sureda A, Gholamhosseini A, Rakhshaninejad M. Combined effects of exposure to sub-lethal concentration of the insecticide chlorpyrifos and the herbicide glyphosate on the biochemical changes in the freshwater crayfish *Pontastacus leptodactylus*. *Ecotoxicology*. 2020; 29(9):1500-15.
29. Hamed M, Soliman HA, Osman AG, Sayed AE. Assessment the effect of exposure to microplastics in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) early juvenile: I. blood biomarkers. *Chemosphere*. 2019; 228:345-50.
30. Akrami R, Ghelichi A, Ahmadifar E. Effect of dietary prebiotic inulin on hematological and biochemical parameters of cultured juvenile beluga (*Huso huso*). *Journal of Veterinary Research*. 2011; 66 (2):131-6.
31. Naderi Farsani M, Bahrami Gorji S, Hoseinifar SH, Rashidian G, Van Doan H. Combined and singular effects of dietary primalac® and potassium diformate (KDF) on growth performance and some physiological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2020; 12(1): 236-45.
32. Yadollahi F, Soltani M, Modarresi MH, Akhondzadeh Basti A. Efficacy of vitamin E with or without probiotic, astaxanthin or rosemary extract on growth performance, survival, haematological parameters, antioxidant activity and liver enzymes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Research*. 2021; 52(11): 5606-16.
33. Mohapatra S, Chakraborty T, Prusty AK, Das P, Paniprasad K, Mohanta KN. Use of different microbial probiotics in the diet of rohu, *Labeo rohita* fingerlings: effects on growth, nutrient digestibility and retention, digestive enzyme activities and

## Effect of different levels of *Lactobacillus brevis* on antioxidant capacity, hepatic enzymes activity, and hematological indices in rainbow trout

Azadeh Niazi<sup>1</sup>, Mehdi Shamsaie Mehrgan<sup>1</sup>, Houman Rajabi Islami<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Fisheries, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

### Abstract

The use of dietary supplements in aquatic diets is one of the most important ways to reduce the stress of rearing operations. In this study, the effect of different levels of *Lactobacillus brevis* on stress-related indicators including antioxidant and liver enzymes, and hematological indices in rainbow trout were evaluated. In this study, 300 rainbow trout fry ( $9.5 \pm 0.3$  g) with five experimental diets including control, LB1 ( $1 \times 10^6$ ), LB2 ( $1 \times 10^7$ ), LB3 ( $1 \times 10^8$ ), and LB4 ( $1 \times 10^9$ ) were fed for 8 weeks. The results showed that the highest levels of superoxide dismutase and catalase were recorded in fish fed LB3 diet. Also, the lowest malondialdehyde value was recorded in the groups receiving LB2 and LB3 diets, which showed a significant difference compared to the control and LB1 groups ( $p < 0.05$ ). Besides, diets supplemented with LB2, LB3, and LB4 significantly reduced the activity of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase enzymes compared to controls and LB1 ( $p < 0.05$ ). Also, the level of alkaline phosphatase and lactate dehydrogenase enzymes decreased in all experimental treatments compared to the control group ( $p < 0.05$ ). In this study, red blood cells count, the hemoglobin value and the hematocrit percentage in the groups receiving LB2, LB3, and LB4 diet significantly increased compared to the control group ( $p < 0.05$ ) and the highest value was recorded in the LB3 group. Based on the obtained results, the addition of *L. brevis*, especially in concentrations of  $1 \times 10^9$  to the diet of rainbow trout has a beneficial effect on the antioxidant defense, liver enzymes, and hematological indices.

**Keywords:** Antioxidant defense, Hematological indices, Probiotic, Serum enzymes

---

<sup>1</sup> m.shamsaie@srbiau.ac.ir