



بررسی اثر ریزپوشانی باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم (*Lactobacillus plantarum*) با ریزذرات کیتوزان/آلژینات بر شاخص‌های استرس اکسیداتیو در ماهی تیلاپیا نیل (*Oreochromis niloticus*)

زهرا بهرامی^۱، لاله رومیانی^۲، نرگس جوادزاده^۲، ابوالفضل عسکری ساری^۲، مهران جواهری بابلی^۲

^۱ دانش آموخته واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

^۲ گروه شیلات، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۴ مرداد ماه ۱۴۰۱، تاریخ پذیرش: ۲۵ مهر ماه ۱۴۰۱

doi 10.22059/jvr.2022.346007.3285



20.1001.1.20082525.1401.77.3.3.2

چکیده

زمینه مطالعه: ریزپوشانی باکتری‌های پروبیوتیک حوزه‌ای است که در سال‌های اخیر به سرعت گسترش یافته است. ریزپوشانی یکی از روش‌های نوین پایداری پروبیوتیک‌ها است که در آن عوامل زیستی به وسیله پوششی محصور محافظت می‌گردند تا در زمان و تحت شرایط ویژه عوامل فعال درون پوشش خود را با سرعت کنترل‌شده‌ای آزاد کنند.

هدف: مطالعه حاضر با هدف ارزیابی اثر ریزپوشانی باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم (*Lactobacillus plantarum*) با ریزذرات کیتوزان/آلژینات بر روی پاسخ اکسیداتیو، فاکتورهای بیوشیمیایی و آنزیم‌های کبدی ماهی تیلاپیا نیل (*Oreochromis niloticus*) انجام شده است.

روش کار: جهت انجام مطالعه حاضر ۲۴۰ قطعه ماهی تیلاپیا نیل با میانگین وزن $15/56 \pm 0/02$ گرم به شکل تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند. گروه ۱ یا شاهد با جیره بدون پروبیوتیک، گروه ۲، ۳ و ۴ به ترتیب با جیره حاوی 10^8 (واحد تشکیل کلنی بر گرم) لاکتوباسیلوس پلانتاروم ریزپوشانی نشده، جیره حاوی لاکتوباسیلوس پلانتاروم ریزپوشانی شده و تغذیه شده با خوراک حاوی آلژینات و کیتوزان به مدت ۶۰ روز تغذیه و به میزان ۲ درصد وزن بدن و ۲ بار در روز تغذیه شدند. در انتهای مدت مطالعه میزان فعالیت آنزیم‌های اکسیداتیو، فاکتورهای بیوشیمیایی و آنزیم‌های کبدی ماهی مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج: آنزیم‌های اکسیداتیو، فاکتورهای بیوشیمیایی و آنزیم‌های کبدی تحت تأثیر تغذیه با لاکتوباسیلوس پلانتاروم ریزپوشانی شده با تغییر مثبت قرار گرفتند ($P < 0/05$). سه آنزیم آلانین ترانس آمیناز، اسپاراتات ترانس آمیناز و الکالین فسفاتاز در تیمار سوم از دو تیمار دوم و چهارم بالاتر بودند و هر ۳ گروه در مقایسه با شاهد عملکرد بهتری داشتند ($P < 0/05$).

نتیجه‌گیری نهایی: ریزپوشانی پروبیوتیک بالاترین کارایی پروبیوتیک در کاهش استرس اکسیداتیو ماهی تیلاپیا را نشان داد.

کلمات کلیدی: آنزیم‌های اکسیداتیو، آنزیم‌های کبدی، ریزپوشانی، فاکتورهای بیوشیمیایی، ماهی تیلاپیا نیل

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

نویسنده مسئول: لاله رومیانی، گروه شیلات، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

مقدمه

رساندن عملکرد در واحد سطح، در راستای افزایش تولید ماهی و در جهت تقاضای جهانی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲). با این حال، چالش گرانی خوراک ماهی و شیوع مکرر بیماری، مشکلات عمده‌ای را برای گسترش آبی‌پروری ایجاد کرده است (۳).

آبی‌پروری در دهه‌های گذشته به شدت رشد کرده و به یک صنعت مهم اقتصادی تبدیل شده است. بخش آبی‌پروری سریع‌ترین رشد را در بین بخش‌های تولیدکننده مواد غذایی در سطح جهان دارد (۱). پرورش متراکم ماهی، برای به حداکثر

در مطالعه حاضر پروبیوتیک مورد استفاده گونه لاکتوباسیلوس پلانتاروم (*Lactobacillus plantarum*) از خانواده باکتری‌های پروبیوتیک گرم مثبت بوده که علاوه بر ارزش تغذیه‌ای (۱۹)، بر ایمنی اختصاصی ماهی تأثیرگذار می‌باشد (۲۰). ارزیابی تأثیر پروبیوتیک‌ها و سایر محرک‌های ایمنی و رشد، از طریق فاکتورهای شناخته شده مختلفی انجام می‌گیرد از جمله شاخص‌های اکسیداتیو، فاکتورهای بیوشیمیایی و آنزیم‌های کبدی و خونی ماهی که از مهم‌ترین عوامل ارزیابی سلامت ماهی می‌باشند که باعث افزایش مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا شده و نهایتاً سبب سلامت و رشد بهتر ماهی می‌شوند (۲۱). تأثیر فرآیند ریزپوشانی پروبیوتیک بر ماهی تیلاپیا، به عنوان یکی از مهم‌ترین گونه‌های پرورشی در سراسر جهان، تاکنون در ایران انجام نشده است. از این رو مطالعه حاضر با هدف ارزیابی اثر ریزپوشانی باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم (*L. plantarum*) با ریزذرات کیتوزان/آلژینات بر روی پاسخ اکسیداتیو، فاکتورهای بیوشیمیایی و آنزیم‌های کبدی ماهی تیلاپیا نیل (*Oreochromis niloticus*) انجام شد تا بتوان شاخص‌های ایمنی را تقویت نمود.

مواد و روش کار

انتخاب باکتری: لاکتوباسیلوس پلانتاروم (*L. plantarum*) مورد استفاده در مطالعه حاضر بر اساس شکل کلنی و مورفولوژی سلولی، رنگ آمیزی گرم، ویژگی‌های بیوشیمیایی و تعیین توالی ژن SrRNA ۱۶ (شماره دسترسی در GenBank، EU520326) شناسایی شد. این سویه به مدت ۳۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در محیط MRS برات (BD Difco, Sparks, MD, USA) کشت داده شد.

ریزپوشانی کردن باکتری با آلژینات/کیتوزان: ۲ درصد آلژینات سدیم (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) پس از مخلوط شدن در آب مقطر و استریل شدن، ۱ درصد سوسپانسیون پروبیوتیک ($10^8 \text{ Log CFUg}^{-1}$) به آن اضافه شد. برای تشکیل امولسیون مخلوط حاصل در ۱۵۰ میلی‌لیتر روغن کانولا حاوی ۱/۵ درصد توئین ۸۰ (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) ریخته و با استفاده از همزن مغناطیسی به مدت ۵ دقیقه امولسیون یکنواختی تشکیل شد. به منظور تشکیل کپسول به محلول، ۱۵۰ میلی‌لیتر کلرید کلسیم ۰/۱ مولار اضافه شد. به منظور جداسازی کپسول‌ها، از سانتریفیوژ با ۲۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه استفاده شد. کپسول‌ها با سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد شسته و در

آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد شیمیایی برای درمان بیماری‌های موجود در آبزیان مورد استفاده قرار می‌گیرند (۴)، اما استفاده مکرر از مواد شیمیایی، مشکلات زیادی برای سلامت انسان، ماهی و محیط‌زیست دارد. از این رو، بسیاری از کشورها مصرف آنتی‌بیوتیک در بخش دام و آبی‌پروری را ممنوع کرده‌اند (۵). امروزه، پروبیوتیک‌ها، گروهی از میکروارگانیسم‌های مفید در آبی‌پروری، برای بهبود عملکرد رشد، پاسخ ایمنی، مقاومت در برابر بیماری‌ها و همچنین جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌ها هستند (۶).

از نظر تحریک رشد، پروبیوتیک‌ها با تعدیل آنزیم‌های گوارشی مانند پروتئازها، آمیلازها و لیپازهای روده ماهی (۷)، کارایی استفاده از مواد مغذی را بهبود داده (۸) و کارایی سیستم ایمنی در برابر باکتری‌های بیماری‌زا را ارتقا می‌دهند (۹). پروبیوتیک‌ها با تجمع در داخل روده با پاتوژن‌ها رقابت کرده و از چسبیدن آن‌ها به دیواره روده جلوگیری کرده و دسترسی آن‌ها به مواد مغذی را محدود می‌کنند. باکتری‌های مفید، مواد آنتی‌باکتریایی نظیر باکتریوسین و اسیدهای آلی که بر روی ساختار مورفولوژی روده مؤثر هستند را افزایش می‌دهند (۱۰، ۱۱). در استفاده از گونه‌های مختلف پروبیوتیک توجه به ویژگی زنده‌مانی سلول‌های پروبیوتیک از اهمیت بالایی برخوردار است، چرا که باید قابلیت حیات در روده بزرگ را داشته باشند تا به تعداد مناسبی تکثیر و اثرات مفید روی سلامتی آبی‌پروری را القا نمایند (۱۲). از روش‌های نوین پایداری پروبیوتیک‌ها استفاده از فن‌آوری ریزپوشانی (استفاده از نانو و میکروانکپسولاسیون) است. ریزپوشانی در واقع فرآیندی است که عوامل زیستی و یا غیرزیستی عمل‌کننده (به صورت ذرات ریز در حد نانومتر یا میکرومتر) به وسیله پوششی محصور و نسبت به عوامل مختلف محیط قرار گرفته در آن، محافظت می‌گردند تا در زمان و تحت شرایط ویژه عوامل فعال درون پوشش خود را با سرعت کنترل شده‌ای آزاد کنند (۱۳). ترکیب کیتوزان و آلژینات یکی از مؤثرترین روش‌ها جهت بهبود ریزپوشانی گونه‌های مختلف لاکتوباسیلوس است (۱۴). آلژینات سدیم از جلبک قهوه‌ای به دست می‌آید (۱۵) و ترکیب نمکی اسید آلژینیک است (۱۶). کیتوزان به عنوان یک فیلم نیمه‌نفوذپذیر یک لایه نازک روی محصول ایجاد کرده و به صورت یک مکانیسم حفاظتی اتمسفر درونی را تغییر داده و باعث تنظیم انتقال اکسیژن، دی‌اکسید کربن و بخار آب می‌شود (۱۷) و همچنین این ماده بر روی طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها، خاصیت ضد میکروبی نشان داده است (۱۸).

به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، سانتریفیوژ و سرم در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمیایی خون: فاکتورهای

بیوشیمیایی خون با استفاده از کیت‌های شرکت پارس آزمون و با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر UV/VIS (مدل ۲۱۰۰) یونیکو ساخت آمریکا اندازه‌گیری شدند. گلوکز به روش اکسیداز، کلسترول به روش کلسترول اکسیداز، تری‌گلیسرید به روش آنزیمی لیپاز، کلسیم، منیزیم و اوریک‌اسید با استفاده از کیت‌های تجاری شرکت پارس آزمون اندازه‌گیری شدند (۲۷). سدیم به روش شعله‌سنجی با فلیم فتومتر Jenway و با استفاده از محلول‌ها و استانداردهای مربوطه (۲۸) و کلر به صورت دستی با استفاده از کیت آزمایشگاهی زیست‌شیمی اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری هورمون کورتیزول خون با روش رادیوایمونواسی با استفاده از دستگاه Gamma counter مدل L.K.B ساخت کشور فنلاند و با بکارگیری کیت‌های هورمونی ایمونوتک ساخت کشور فرانسه (1251 RIA Kit) انجام شد. به این منظور ابتدا ۱۰ میکرولیتر از پلاسما و ۵۰۰ میکرولیتر از هورمون کورتیزول نشاندار به میکروتیوپ‌ها اضافه و سپس میکروتیوپ‌ها پس از ورتکس شدن، به مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. پس از آن محتوای میکروتیوپ‌ها خالی شده و پس از خشک‌شدن، مقدار تشعشعات گامای آن‌ها اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری کراتین به روش اصلاح شده ژافه انجام شد.

اندازه‌گیری آنزیم‌های کبدی: سنجش آنزیم‌های کبدی با

استفاده از کیت‌های شرکت پارس آزمون و با دستگاه اتوآنالایزر انجام شد. سطح فعالیت آنزیم‌های آسپارات آمینوترانسفراز (AST)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT) سرم براساس مقدار مصرف NADPH در طول موج ۳۴۰ نانومتر و آلکالین فسفاتاز (ALP) براساس تبدیل نیتروفنیل فسفات به نیتروفنول و فسفات در طول موج ۴۰۵ نانومتر تعیین و بر اساس میزان جذب نوری OD محاسبه گردید (۲۹). سنجش آنزیم کاتالاز در سرم بر اساس تشکیل کمپلکس زرد رنگ در اثر واکنش آمونیوم مولیبدات با پراکسید هیدروژن انجام شد. این تغییر رنگ در طول موج ۴۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدئید با استفاده از کیت آزمایشگاهی شرکت آنزان‌شیمی و بر اساس تشکیل MDA-TBA adduct بین یک مولکول MDA و دو مولکول تیوباربیتوریک‌اسید بود که جذب نوری کمپلکس حاصله در طول موج ۵۳۲ نانومتر قرائت و غلظت TBARS بافت در مقایسه با منحنی استاندارد MDA تعیین شد. بلافاصله جذب نوری نمونه

دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. ۴ گرم کیتوزان (با وزن ملکولی پایین - Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) در ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل و با اسیداستیک گلاسیال به غلظت نهایی ۰/۴ درصد (W/V) رسید. کپسول‌های آلژینات‌سدیم در این محلول پراکنده شدند (۱۰۰ دور در دقیقه تا ۴۰ دقیقه) تا علمیات پوشش‌دهی به طور کامل انجام شود. دانه‌های پوشش داده شده با کیتوزان با آب مقطر شسته و استفاده شدند (۲۲).

معرفی تیمارهای مورد بررسی: تعداد ۴۸۰ قطعه ماهی با

میانگین وزنی $15/56 \pm 0/02$ گرم از یکی از کارگاه‌های تکثیر تیلاپیا در شهر یزد تهیه و پس از انتقال به محل نگهداری به شکل تصادفی در مخازن پلاستیکی ۱۵۰ لیتری و دمای 27 ± 2 درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند. طول مدت پرورش ۶۰ روز بود (جدول ۱). نحوه چیدن مخازن به صورت بلوک‌های تصادفی و تغذیه ۲ بار در روز (۷ صبح و ۶ عصر) و به صورت دستی انجام شد. ۳۰ درصد آب به شکل روزانه و ۱۰۰ درصد آب هفته‌ای ۱ بار تعویض شد. به منظور آماده سازی باکتری لاکتوباسیلوس پلانتروم و افزودن آن‌ها به غذای ماهیان از روش توصیه شده توسط Jiang و همکاران در سال ۲۰۱۳ (۲۳)، Planas و همکاران در سال ۲۰۰۴ (۲۴) و Vine و همکاران در سال ۲۰۰۶ (۲۵) استفاده شد. باکتری لاکتوباسیلوس پلانتروم در محیط مایع MRS در شرایط بی‌هوایی کشت داده شد. پس از رشد، باکتری‌ها با سانتریفیوژ جداسازی و شستشو شدند و تعداد آن‌ها به کمک لوله‌های استاندارد مک فارلند (غلظت 10^8 باکتری در گرم خوراک ماهی‌ها) تنظیم گردید. جیره‌های آزمایشی (جدول ۲) به صورت پودر آسیاب شد و کاملاً با روغن سویا مخلوط و آب برای تولید خمیر به آن اضافه شد. سپس خمیر آسیاب و به شکل گلوله درآمدند. پالت‌ها در فر با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد جهت رسیدن رطوبت به حدود ۱۰ درصد خشک و تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

خون‌گیری: در انتهای دوره تغذیه جهت بررسی پارامترهای

بیوشیمیایی و آنزیم‌های کبدی سرم ماهی، از هر تیمار ۱۲ عدد ماهی انتخاب و پس از بیپوشی با استفاده از پودر میخک (۲۰۰ ppm، ۲۰ دقیقه)، خون‌گیری از ساقه دمی انجام گرفت (۲۶). نمونه‌های خون به لوله‌های اپندروف حاوی هیپارین منتقل و در دمای اتاق به مدت ۱ ساعت و ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. پس از انعقاد، خون با دور ۲۰۰۰ دور در دقیقه

گلووتاتیون (GSH) به روش اسپکتروفوتومتری و با استفاده از دی-تیو- بیس نیتروبنزوئیک اسید (DTNB) شرکت سیگما (امریکا) و بر اساس روش Ellman در سال ۱۹۵۹ (۳۱) و گلووتاتیون پراکسیداز بر اساس روش Peglia و Valentine در سال ۱۹۷۶ (۳۲) اندازه‌گیری شد. سوپراکسیددسموتاز (SOD) با استفاده از کیت شرکت رندوکس (انگستان) و بدین صورت که اضافه کردن گزانتین و گزانتین اکسیداز به عصاره بافت ماهی، تولید رادیکال‌های سوپراکسید می‌کند که این رادیکال‌های آزاد تشکیل رنگ قرمز فورماران را می‌دهند و بنابراین میزان فعالیت این آنزیم از طریق مهار این واکنش و جلوگیری از تشکیل رنگ اندازه‌گیری شد که این مهار با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر و در طول موج ۵۰۵ نانومتر قرائت شد.

بافتی، بلانک نمونه عصاره بافتی و استانداردها در برابر آب مقطر در طول موج ۵۳۲ نانومتر با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر خوانده شد (۳۰).

میزان سوپراکسیددسموتاز (SOD) با استفاده از روش تست تقلیل رنگ NBT (Nitro Blue Tetrazolium) سنجش شد. در این روش ۰/۱ میلی‌لیتر سرم ماهی به ۲ میلی‌لیتر محلول واکنش پذیر (۰/۲ میلی‌مول گزانتین، ۰/۱۲ میلی‌مول NBT، ۰/۴۹ واحد گزانتین اکسیداز و ۰/۱ مول بافر فسفات) اضافه و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شد. میزان تقلیل رنگ با استفاده از اسپکتوفتومتر در طول موج ۵۶۰ نانومتر سنجیده و به صورت درصد کاهش مهار قرائت گردید (۳۰). میزان

جدول ۱. گروه‌های مورد مطالعه.

نام گروه	نوع غذا	تعداد ماهی
تیمار اول (شاهد)	تغذیه شده با خوراک پایه (بدون باکتری)	۴۰ قطعه (در سه تکرار)
تیمار دوم	خوراک همراه با لاکتوباسیلوس پلانتروم ریزپوشانی نشده	۴۰ قطعه (در سه تکرار)
تیمار سوم	خوراک همراه با لاکتوباسیلوس پلانتروم ریزپوشانی شده	۴۰ قطعه (در سه تکرار)
تیمار چهارم	تغذیه شده با خوراک حاوی آلژینات / کیتوزان	۴۰ قطعه (در سه تکرار)

جدول ۲. فرمول جیره غذایی آزمایشی و ترکیب تقریبی.

ترکیب	جیره ۱ (گرم بر کیلوگرم)	جیره ۲ (گرم بر کیلوگرم)	جیره ۳ (گرم بر کیلوگرم)	جیره ۴ (گرم بر کیلوگرم)
آرد ماهی	۳۰۰	۳۰۰	۳۰۰	۳۰۰
سیوس برنج	۲۴۰	۲۴۰	۲۴۰	۲۴۰
کنجاله سویا	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰
آرد ذرت	۱۲۵	۱۲۵	۱۲۵	۱۲۵
آرد گندم	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰
روغن سویا	۳۰	۳۰	۳۰	۳۰
سلولز	۳۰	۲۰	۲۰	۲۰
پریمیکس	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰
ترکیب ویتامینی و مواد معدنی	۵	۵	۵	۵
<i>L.plantarum</i> (واحد تشکیل کلنی بر گرم)	۰	۰	۱۰ ^۸	۰
<i>L.plantarum</i> (واحد تشکیل کلنی بر گرم) ریزپوشانی شده	۰	۰	۰	۱۰
میکروکپسوله	۰	۱۰	۰	۰
ترکیب تقریبی جیره آزمایشی				
انرژی ناخالص (کالری بر گرم)	۴۳۸۷	۴۴۱۹	۴۳۸۷	۴۴۱۹
ماده خشک	۹۳۱	۹۳۱۳	۹۳۱	۹۳۱/۳
پروتئین خام	۳۵۳/۱	۳۵۳/۶	۳۵۳/۱	۳۵۳/۶
خاکستر	۱۱۴/۴	۱۱۵/۲	۱۱۴/۴	۱۱۵/۲
چربی خام	۱۰۰/۵	۹۹	۱۰۰/۵	۹۹
فیبر	۶۳/۸	۶۰/۶	۶۳/۸	۶۰/۶

۱: شاهد، ۲: لاکتوباسیلوس پلانتروم ریزپوشانی نشده، ۳: لاکتوباسیلوس پلانتروم ریزپوشانی، ۴: آلژینات همراه با کیتوزان.

با اتر نفتی، نقطه جوش ۶۰-۴۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۲-۱۰ ساعت) اندازه‌گیری شد (۳۳).

تجزیه و تحلیل داده‌ها: از نرم‌افزار SPSS19 استفاده شد. جهت بررسی اختلاف معنی‌دار بین تیمارها از آنالیز واریانس یک طرفه و بررسی معنی‌دار بودن تفاوت میانگین‌ها از آزمون تکمیلی دانکن و در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ درصد استفاده شد.

اندازه‌گیری ترکیبات لاشه: میزان رطوبت به وسیله خشک‌کردن نمونه‌ها در آون در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت تا رسیدن به وزن ثابت تعیین شد. خاکستر به وسیله سوزاندن نمونه‌ها در کوره در دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت محاسبه گردید. میزان پروتئین خام با ضریب محتوای نیتروژن نمونه‌ها در ضریب ۶/۲۵ و به روش کجدال اندازه‌گیری شد. میزان چربی خام به روش سوکسله (تقطیر حلال

جدول ۳. میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در (*O. niloticus*) تحت تغذیه با جیره‌های آزمایشی.

شاخص	تیمار	۱	۲	۳	۴
واحد/ گرم پروتئین	سوپراکسید دیسموتاز	۱±۱۰۰/۲۵ ^a	۳±۳۷۴/۹۶ ^c	۱±۳۸۲/۷۴ ^d	۲±۳۲۵/۶۹ ^b
	مالون‌دی‌آلدئید	۴±۷۲۰/۰۳ ^d	۷±۲۲۵/۶۳ ^c	۰±۵۶/۵۸ ^a	۱±۶۲/۷۵ ^b
	گلوکاتیون	۲±۵۲/۷۳ ^a	۱±۷۰/۲۹ ^b	۱±۸۸/۶۶ ^d	۲±۷۵/۵۶ ^c
	گلوکاتیون پراکسیداز	۰±۴۹/۷۲ ^a	۰±۸۱/۶۴ ^b	۰±۹۲/۹۶ ^d	۰±۸۸/۸۲ ^c
	کاتالاز	۶±۱۸۶/۶۲ ^a	۳±۲۸۵/۲۵ ^b	۵±۴۵۲/۴۹ ^d	۴±۴۳۷/۸۰ ^c

حروف غیرمشابه به معنی اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشد ($P < 0.05$). ۱: شاهد، ۲: لاکتوباسیلوس پلانتاروم ریزپوشانی نشده، ۳: لاکتوباسیلوس پلانتاروم ریزپوشانی، ۴: آلزینات همراه با کیتوزان.

جدول ۴. شاخص‌های بیوشیمیایی و یون‌های سرم خون (*O. niloticus*) تحت تغذیه با جیره‌های آزمایشی.

شاخص	تیمار	۱	۲	۳	۴
میلی‌گرم بر دسی‌لیتر	کراتین	۰/۰±۴۱/۰۵ ^b	۰/۰±۳۰/۰۳ ^a	۰/۰±۲۷/۰۲ ^a	۰/۰±۳۱/۰۳ ^a
	اوریک اسید	۱۳/۰±۱۰/۹۴ ^b	۱۲/۰±۱۱/۹۵ ^a	۱۱/۰±۱۰/۴۶ ^a	۱۲/۰±۳۶/۷۰ ^{ab}
	گلوکز	۲±۱۸۱/۹۳ ^c	۳±۱۲۳/۱۴ ^b	۱±۹۷/۶۲ ^a	۴±۱۰۱/۹۱ ^a
نانوگرم بر میلی‌لیتر	کورتیزول	۵/۰±۵۰/۳۲ ^b	۵/۰±۲/۶۵ ^b	۴/۰±۱/۱۳ ^a	۴/۰±۵۲/۲۷ ^a
میلی‌مول بر لیتر	کلسترول	۱۰±۲۰۱/۳۳ ^d	۴±۱۹۰/۷۰ ^c	۶±۱۴۱/۹۰ ^a	۵±۱۶۷/۲۶ ^b
	تری‌گلیسرید	۶±۶۱۲/۵۸ ^c	۳±۶۰۰/۸۶ ^{bc}	۳±۵۷۸/۷۵ ^a	۷±۵۸۹/۱۵ ^{ab}
میلی‌گرم بر دسی‌لیتر	منگنز	۱/۰±۵۱/۲۹ ^a	۲/۰±۲۰/۵۲ ^b	۲/۰±۷۱/۹۱ ^b	۲/۰±۵۴/۳۰ ^b
میلی‌کی‌والان بر لیتر	سدیم	۰±۱۴۱/۶۱ ^a	۰±۱۷۴/۴۹ ^b	۰±۱۶۰/۸۷ ^d	۰±۱۵۸/۴۷ ^c
	کلسیم	۹/۰±۲۵/۱۵ ^a	۱۱/۰±۸۷/۶۴ ^b	۱۸/۰±۱۰/۵۷ ^d	۱۷/۰±۱۰/۶۶ ^c
	کلراید	۸/۰±۱۰/۳۷ ^a	۱۱/۰±۱۲/۲۷ ^b	۱۳/۰±۵۶/۱۸ ^d	۰±۱۲/۵۵ ^c

حروف غیرمشابه به معنی اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشد ($P < 0.05$). ۱: شاهد، ۲: لاکتوباسیلوس پلانتاروم ریزپوشانی نشده، ۳: لاکتوباسیلوس پلانتاروم ریزپوشانی، ۴: آلزینات همراه با کیتوزان.

جدول ۵. ترکیب لاشه (*O. niloticus*) تحت تغذیه با جیره‌های آزمایشی.

شاخص	تیمار	۱	۲	۳	۴
درصد (وزن خشک)	پروتئین	۱±۵۰/۲۶ ^a	۰±۵۲/۹۲ ^{ab}	۰±۵۵/۸۲ ^c	۱±۵۴/۴۴ ^{bc}
	لیپید	۰±۳۱/۲۴ ^{ab}	۱±۳۲/۰۴ ^b	۱±۲۹/۲۳ ^a	۰±۲۸/۹۴ ^a
	خاکستر	۰±۱۵/۶۴ ^b	۰±۱۴/۴۷ ^{ab}	۰±۱۲/۱۷ ^a	۰±۱۲/۰۹ ^a
	رطوبت	۱±۷۰/۸۱ ^a	۰±۷۱/۵۶ ^a	۰±۷۱/۷۳ ^a	۰±۷۲/۹۵ ^a

حروف غیر مشابه به معنی اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشد ($P < 0.05$). ۱: شاهد، ۲: لاکتوباسیلوس پلانتاروم ریزپوشانی نشده، ۳: لاکتوباسیلوس پلانتاروم ریزپوشانی، ۴: آلزینات همراه با کیتوزان.

نتایج

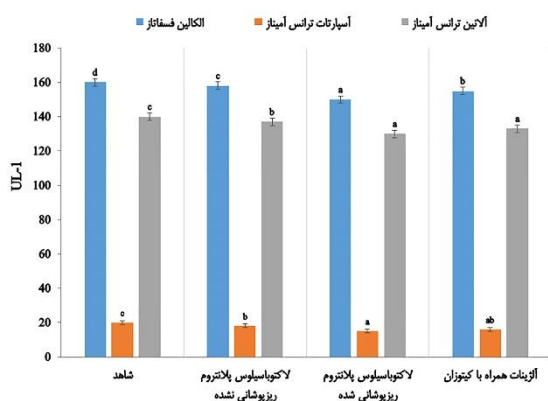
خشک) و ۲ (52 ± 0.92) درصد وزن خشک) بدون اختلاف معنی‌داری با یکدیگر کمترین میزان پروتئین را داشتند ($P < 0.05$). بالاترین میزان لیپید لاشه در تیمار ۲ و ۳ بدون اختلاف معنی‌دار با شاهد اندازه‌گیری شد. دو گروه دیگر با شاهد اختلاف معنی‌دار نداشتند ($P > 0.05$). خاکستر، در گروه شاهد بالاترین مقدار را بدون اختلاف معنی‌دار با تیمار ۲ داشت و دو تیمار ۳ (12 ± 0.17) درصد وزن خشک) و ۴ (12 ± 0.09) درصد وزن خشک) بدون اختلاف معنی‌دار با یکدیگر کمترین میزان را داشتند ($P < 0.05$). رطوبت بین گروه‌های مورد بررسی اختلاف معنی‌داری نداشت ($P < 0.05$).

بحث

استرس اکسیداتیو باعث آسیب به ساختار پروتئین‌ها، لیپیدها (۳۴) و نوکلئوتیدها (۳۵) می‌شود. در مطالعه حاضر تمام گروه‌های مورد بررسی در مقایسه با شاهد، سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بالاتری داشتند که نشان می‌دهد پروبیوتیک و آلزینات-کیتوزان وضعیت استرس اکسیداتیو را در ماهی بهبود می‌بخشند، اما عملکرد پروبیوتیک ریزپوشانی شده بالاتر از سایر گروه‌ها بود. در مطالعه Zhang و همکاران در سال ۲۰۱۳ (۳۶) پروبیوتیک به عنوان یک آنتی‌ژن برای آنتی‌اکسیدان‌ها عمل کرده و در نتیجه باعث افزایش ترشح آنتی‌اکسیدان‌ها و حذف رادیکال‌های آزاد اضافی می‌شوند که به نظر می‌رسد ریزپوشانی سطح عملکرد پروبیوتیک را افزایش داده است.

طبق نتایج جدول ۳، فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، گلوکاتایون، گلوکاتایون پراکسیداز و کاتالاز در تیمار ۳ به شکل معنی‌داری بیشتر از تیمارهای ۱، ۲ و ۴ بود ($P < 0.05$). همچنین فعالیت آنزیم مالون‌دی‌آلدئید در تیمار ۳ در مقایسه با سایر گروه‌ها به شکل معنی‌داری پایین‌تر بود ($P < 0.05$). مقادیر آنزیم‌های کبدی در سرم ماهی نیل تیلپیا در گروه‌های مختلف در تصویر ۱، مقایسه شده است. آنزیم آلکالین فسفاتاز بین ۴ تیمار اختلاف معنی‌دار داشت و بالاترین مقدار (UL^{-1}) $4 \pm 162/15$ در گروه شاهد و کمترین میزان (UL^{-1}) $2 \pm 140/92$ در تیمار ۳ بود ($P < 0.05$). میزان دو آنزیم آسپارات ترانس‌آمیناز و آلانین ترانس‌آمیناز بین تیمار ۳ و ۴ اختلاف معنی‌دار نداشت ($P > 0.05$).

با توجه به نتایج جدول ۴، میزان کراتین و اوریک‌اسید، در گروه‌های پروبیوتیک (گروه ۲ و ۳) و آلزینات همراه با کیتوزان (گروه ۴) اختلاف معنی‌داری نداشت ($P > 0.05$). کراتین در هر سه گروه در مقایسه با شاهد پایین‌تر بود ($P < 0.05$) اما مقادیر اوریک‌اسید بین تیمار ۱ و ۴ اختلاف معنی‌داری نداشت ($P > 0.05$). شاخص گلوگز بالاترین مقدار خود را با میزان $181 \pm 2/93$ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر در تیمار ۱ و کمترین مقدار خود را با اختلاف معنی‌دار در مقایسه با سایر گروه‌ها در تیمار ۳ و ۴ داشت ($P < 0.05$). کراتین بین دو تیمار ۱ (0.41 ± 0.05) نانوگرم بر میلی‌لیتر) و ۲ (0.30 ± 0.03) نانوگرم بر میلی‌لیتر) و نیز بین دو تیمار ۳ (0.27 ± 0.02) نانوگرم بر میلی‌لیتر) و ۴ (0.31 ± 0.03) نانوگرم بر میلی‌لیتر) اختلاف معنی‌داری نداشت ($P > 0.05$). کلسترول بین ۴ تیمار اختلاف معنی‌دار داشت ($P < 0.05$) و تیمار ۱ با مقدار $201 \pm 10/23$ میلی‌مول بر لیتر بالاترین میزان و تیمار ۳ با میزان $141 \pm 6/90$ میلی‌مول بر لیتر کمترین مقدار این پارامتر را داشت. کمترین میزان شاخص تری‌گلیسرید و بیشترین میزان سدیم، کلسیم و کلراید در تیمار ۳ اندازه‌گیری شد ($P < 0.05$). منگنز در تیمار ۱ در مقایسه با سایر گروه‌ها کمترین مقدار را داشت ($P < 0.05$) و مقدار آن بین سایر گروه‌ها اختلاف معنی‌داری نداشت ($P > 0.05$). ترکیب لاشه ماهی تیلپیا نیل در گروه‌های مختلف در جدول ۵، مقایسه شده است. پروتئین با مقدار ۵۵ درصد وزن خشک بالاترین میزان را در تیمار ۳ و بدون اختلاف معنی‌دار با تیمار ۴ داشت ($P > 0.05$). دو تیمار ۱ ($1/26$) و ۵۰ درصد وزن



تصویر ۱. تغییرات سطح آنزیم‌ها (میانگین \pm انحراف معیار) در سرم ماهی نیل تیلپیا بعد از تغذیه با جیره‌های آزمایشی حروف غیرمشابه به معنی اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشد ($P < 0.05$).

می‌شود (۴۳). همان‌طور که نتایج مطالعه حاضر نشان داد محتوای مالون‌دی‌آلدئید در ماهی‌های گروه شاهد و دریافت‌کننده پروبیوتیک به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای در مقایسه با پروبیوتیک ریزپوشانی شده و آلژینات-کیتوزان بالاتر بود که با توجه به سطح بالاتر آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسیددیسموتاز به عنوان آنزیم‌های کلیدی سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی و گلوکاتینون به عنوان فراوان‌ترین آنتی‌اکسیدان غیر آنزیمی داخل سلولی که در پاکسازی رادیکال‌های آزاد نقش مهمی دارد (۴۴)، نتیجه به‌دست آمده قابل توجیه است. همچنین سطح بالاتر آنزیم گلوکاتینون نشان‌دهنده کمتر بودن سطح استرس در سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی ماهی است (۴۵).

در خصوص گلوکز نتایج نشان داد که استفاده از پروبیوتیک ریزپوشانی شده با بهبود متابولیسم کربوهیدرات و عملکرد کبد (۴۶) و افزایش سطح انسولین، کاهش گلوکز خون را به دنبال داشت. یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که استفاده از پروبیوتیک به شکل ریزپوشانی شده در مقایسه با مصرف پروبیوتیک به شکل معمول و نیز در مقایسه با آلژینات-کیتوزان، سطح کوفاکتورهای سدیم، کلسیم، منگنز و کلراید را به شکل معنی‌داری بهبود بخشید. پروبیوتیک‌ها عمق کریپت در روده را افزایش داده و بافت پوششی روده را مستحکم‌تر می‌سازند که این موضوع جذب ریزمغذی‌ها را افزایش می‌دهد (۴۷). همچنین پروبیوتیک‌ها تولید ویتامین‌های B₆، B₁₂ و K₂ را افزایش داده و به جذب املاح معدنی مانند آهن و کلسیم کمک می‌کنند (۴۸) که این موضوع توجیه‌کننده بهبود کارایی گروه پروبیوتیک در مقایسه با شاهد است. کلسترول به عنوان یک لیپید استروئیدی در غشاء سلولی همه بافت‌های بدن و نیز در پلاسمای خون وجود دارد. این ماده در سلول‌های کبدی تولید می‌شود. یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که پروبیوتیک‌ها چه به شکل معمول و چه به شکل ریزپوشانی شده و نیز گروه دریافت‌کننده آلژینات-کیتوزان موجب کاهش معنی‌دار کلسترول در مقایسه با شاهد شدند. در خصوص پروبیوتیک‌ها مطالعات نشان می‌دهد که تخمیر پروبیوتیک‌ها، متابولیت‌هایی مانند اسیدهای چرب زنجیره کوتاه در دستگاه گوارش ماهی تولید می‌کنند که از طریق خون به کبد منتقل شده و سنتز کلسترول را کاهش می‌دهند که با یافته‌های مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد. در خصوص تری‌گلیسرید نیز چنین عملکرد کاهشی مشاهده شده است که بالاتر بودن تولید اسیدهای چرب زنجیره کوتاه (۴۹) را در تیمار پروبیوتیک ریزپوشانی شده در مقایسه با گروه‌های دیگر داشت.

در واقع پروبیوتیک‌ها بعد از مصرف و ورود به سیستم گوارش، باید در برابر شرایط اسیدی معده، اسیدهای صفراوی، ترکیبات ضد میکروبی و سایر شرایط حاد محافظت شوند (۳۷) و این موضوع یکی از دلایل کاهش توانایی آنتی‌اکسیدانی پروبیوتیک‌های بدون محافظ در مقایسه با پروبیوتیک ریزپوشانی شده است. ریزپوشانی را می‌توان فرآیندی قلمداد کرد که در آن یک ترکیب مهم و حساس غذایی، به عنوان هسته توسط مواد دیواره، غشاء و کپسول محافظت شود (۳۸) و این محافظت زمانی که بیش از یک ترکیب در یک پوشش باشد نظیر آلژینات و کیتوزان (ریزپوشانی توام)، باعث افزایش فعالیت زیستی تمام ترکیبات نسبت به حالت جز به جز می‌شود (۳۹، ۴۰، ۴۱). با توجه به نتایج، در گروه پروبیوتیک، به دلیل تخریب باکتری توسط اسید معده و نیز حضور نمک‌های صفراوی در روده، قابلیت زیست باکتری کاهش یافته است (۳۸) که این موضوع توجیه‌کننده عملکرد پایین‌تر این گروه در مقایسه با گروه پروبیوتیک ریزپوشانی شده و نیز گروه آلژینات-کیتوزان است. در مطالعه Hosseini و همکاران در سال ۲۰۱۸ (۶)، مقایسه میزان زنده‌مانی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس بولگاریکوس تحت تأثیر ریزپوشانی نانو آلژینات/کیتوزان در فیل ماهی نشان داد که بین باکتری‌های ریزپوشانی شده و آزاد، زنده‌مانی و تحمل شرایط شبیه‌سازی شده در باکتری‌های ریزپوشانی شده به مراتب بالاتر بوده است و ریزپوشانی توانست تأثیر چشمگیری در قابلیت زنده‌مانی باکتری در شرایط شبیه‌سازی شده شیره معده و روده داشته باشد. به عبارت دیگر ریزپوشانی باکتری به عنوان حایلی در برابر شرایط نامساعد محیطی عمل کرده و ماندگاری آن‌ها را افزایش می‌دهد.

Zou و همکاران در سال ۲۰۱۲ (۴۲) ماندگاری بیفیدوباکتریوم بیفیدایوم در ریزپوشینه‌های آلژینات، ریزپوشینه‌های ترکیب شده با نشاسته، پکتین، کیتوزان و پلی-آل-لیزین را مورد مطالعه قرار دادند. ریزپوشینه‌های پوشیده شده با کیتوزان حمایت بهتری را برای باکتری‌ها نسبت به ریزپوشینه‌های دیگر در طول دوره نگهداری از خود نشان دادند که این موضوع احتمالاً ناشی از تراکم بالاتر غشاء تشکیل شده در ریزپوشینه‌های پوشیده شده با کیتوزان بوده است که با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد. یکی از محصولات نهایی استرس‌های اکسیداتیو، آلدئیدهای فعالی مانند مالون‌دی‌آلدئید می‌باشد. این ماده به عنوان یک شناساگر مطمئن و قابل‌اعتماد برای ردیابی میزان تخریب لیپیدها در اثر استرس اکسیداتیو به کار گرفته

فعالیت آنزیم‌ها در پلاسمای ماهی‌ها ممکن است ناشی از تأثیر پروبیوتیک‌ها (۵۵) و ترکیبات ریزپوشانی‌کننده بر عملکرد فیزیولوژیکی غشای سلول‌ها در بافت‌های مختلف به ویژه بافت کبد باشد (۵۶،۵۷) که با توجه به پایین‌تر بودن سطح لیپید در لاشه با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد. افزایش فعالیت این آنزیم می‌تواند نشان‌دهنده افزایش شکست ذخایر انرژی باشد که ممکن است به منظور افزایش رشد یا ارتقای ایمنی به کار رود (۵۴،۵۸).

نتیجه‌گیری نهایی: بررسی نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نشان‌دهنده تأثیر مثبت ریزپوشانی پروبیوتیک در شاخص‌های مورد بررسی بود. به این ترتیب لاکتوباسیلوس پلانتروم ریزپوشانی شده بهترین نتیجه را داشت. همچنین یافته‌ها نشان داد گروه آلزینات سدیم / کیتوزان در مقایسه با گروه لاکتوباسیلوس پلانتروم عملکرد بهتری داشت. این نتایج حاکی از اثر مثبت ریزپوشانی بر روی بهبود عملکرد پروبیوتیک‌ها در بهبود مقاومت آنتی‌اکسیدانی در ماهی تیلپیا داشت.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله تشکر و قدردانی خود را از معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز اعلام می‌دارند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

آنزیم‌های ALT، AST، ALP از آنزیم‌های مهم در تعیین وضعیت سلامت ماهیان به شمار می‌آیند (۵۰). یافته‌ها نشان‌دهنده برتری گروه پروبیوتیک ریزپوشانی شده و آلزینات سدیم-کیتوزان و در رتبه سوم گروه پروبیوتیک در مقایسه با شاهد بود. اندازه‌گیری فعالیت این سه آنزیم، شاخص مهمی برای بررسی اثرات سمی ترکیبات مورد استفاده بر کبد محسوب می‌شود و افزایش آن‌ها می‌تواند بیانگر تخریب غشاء سلولی باشد که موجب نشت این آنزیم‌ها از سیتوزول سلول‌های کبد به جریان خون می‌شود (۵۱). لذا می‌توان عنوان نمود که استفاده از پروبیوتیک و نیز آلزینات-کیتوزان علاوه بر این که سمیتی در کبد تولید نمی‌کند، بلکه کارایی و عملکرد کبد را بهبود می‌بخشد.

Shapoori و Alizadeh Nozari در سال ۲۰۱۷ (۵۲) با افزودن باکتری *نتروکوکوس فکالیس* در جیره تاس‌ماهی ایرانی افزایش سطح AST را در مقایسه با شاهد گزارش کردند. Seyedi و همکاران در سال ۲۰۱۳ (۵۳) در بررسی تأثیر افزودن پروبیوتیک‌های *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* به موش، افزایش سطح ALT و AST را در مقایسه با شاهد گزارش نمودند که با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد. Sharangi و همکاران در سال ۲۰۰۹ (۵۴) گزارش کردند که استفاده از باکتری *لاکتوباسیلوس پلانترایوم* در قزل‌آلای رنگین‌کمان موجب افزایش فعالیت ALP سرم شده و این افزایش با کاهش سطح گلوگز و چربی همبستگی دارد. از طرفی کاهش یا عدم افزایش سطح

References

- Herrera M, Mancera JM, Costas B. The use of dietary additives in fish stress mitigation: comparative endocrine and physiological responses. *Front. Endocrinol.* 2019; 10: 447-151. doi: [10.3389/fendo.2019.00447](https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00447) PMID: [31354625](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31354625/)
- Dawood MA, Koshio S. Recent advances in the role of probiotics and prebiotics in carp aquaculture: a review. *Aquac Int.* 2016; 454: 243-251. doi: [10.1016/j.aquaculture.2015.12.033](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.12.033)
- Naylor L, Hardy RW, Buschmann AH, Bush SR, Cao L, Klinger DH, Troell M. A 20-year retrospective review of global aquaculture. *Nature.* 2021; 591: 551-563. doi: [10.1038/s41586-021-03308-6](https://doi.org/10.1038/s41586-021-03308-6) PMID: [29786478](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29786478/)
- El-Kady AA, Magouz F, Mahmoud SA, Abdel-Rahim MM. The effects of some commercial probiotics as water additive on water quality, fish performance, blood biochemical parameters, expression of growth and immune-related genes, and histology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). 2022; 546. doi: [10.1016/j.aquaculture.2021.737249](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737249)
- Santos L, Ramos F. Antimicrobial resistance in aquaculture: current knowledge and alternatives to tackle the problem. *Int J Antimicrob Agents.* 2018; 52(2): 135-143. doi: [10.1016/j.ijantimicag.2018.03.010](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.03.010) PMID: [29567094](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29567094/)
- Hoseini SS, Alishahi M, Amini K, Abbaspour M, Ghorbanpour M, Mohammadian T. Comparison effect of *Lactobacillus bulgaricus* microencapsulated by nano alginate/ chitosan on growth performance and feed efficiency great sturgeon Juvenile. *J Vet Res.* 2018; 73: 181-190. doi: [10.22059/jvr.2018.209113.2485](https://doi.org/10.22059/jvr.2018.209113.2485)
- Pérez Sánchez T, Ruiz Zarzuela I, de Blas I, Balcázar JL. Probiotics in aquaculture: a current assessment. *Rev Aquac.* 2014; 6 (3): 133-146. doi: [10.1111/raq.12033](https://doi.org/10.1111/raq.12033)
- Mohammadyan T, Bitá S, Naseri Pouttaklo R. Effect of *Lactobacillus plantarum* encapsulated with alginate/chitosan on biochemical factors in the beluga (*Huso huso*). *J Vet Res.* 2019; 9: 103-93. doi: [10.22059/jvr.2018.233209.2627](https://doi.org/10.22059/jvr.2018.233209.2627)
- Bajelan B, Zakeri M, Mousavi SM, Yavari V, Rajab Zadeh E. Combinatory effects of dietary Inulin and *Enterococcus faecium* in Benni, Mesopotamichthys sharpeyi on some hematological parameters, serum biochemical and resistance to environmental stress. *Iran Vet J.* 2017; 14(2): 25-38. doi: [10.22055/ijv.2017.65672.1825](https://doi.org/10.22055/ijv.2017.65672.1825)
- Elsabagh M, Mohamed R, Moustafa EM, Hamza A, Farrag F, Decamp O, Eltholth M. Assessing the impact of *Bacillus* strains mixture probiotic on water quality, growth

- performance, blood profile and intestinal morphology of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Aqua Nutri. 2018; 24: 1613-1622. doi: [10.1111/anu.12797](https://doi.org/10.1111/anu.12797)
11. Michael S, Abarike E, Cai J. A review on the probiotic effects on hematological parameters in fish. J Fish Com. 2019; 13(3): 25-31. doi: [10.36648/1307-234X.13.3.166](https://doi.org/10.36648/1307-234X.13.3.166)
 12. Choi W, Moniruzzaman M, Bae J, Hamidoghli A, Lee S, Choi Y, Min T, Bai SC. Evaluation of dietary probiotic bacteria and processed yeast (GroPro-Aqua) as the alternative of antibiotics in juvenile olive flounder *paralichthys olivaceus*. Antibiotics. 2022; 11: 129. doi: [10.3390/antibiotics11020129](https://doi.org/10.3390/antibiotics11020129) PMID: [35203732](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35203732/)
 13. Iorizzo M, Albanese G, Letizia F, Testa B, Tremonte P, Vergalito F, Lombardi SJ, Succi M, Coppola R, Sorrentino E. Probiotic potentiality from versatile *Lactiplantibacillus plantarum* strains as resource to enhance freshwater fish health. Microorganism. 2022; 10. doi: [10.3390/microorganisms10020463](https://doi.org/10.3390/microorganisms10020463)
 14. Huiyi S, Yu W, Gao M, Liu X, Ma X. Microencapsulated probiotics using emulsification technique coupled with internal or external gelation process. Carbo Polym. 2009; 96(1): 181-189. doi: [10.1016/j.carbpol.2013.03.068](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.068) PMID: [23688468](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23688468/)
 15. Tooryan F, Azizkhani M. Effect of orange (*Citrus aurantium*) juice concentrate and chitosan coating enriched with fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) essential oil on the quality and shelf life of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillet during storage in a refrigerator. J Vet Res. 2020; 75(2): 173-184. doi: [10.22059/jvr.2018.259911.2809](https://doi.org/10.22059/jvr.2018.259911.2809)
 16. Rokka S, Rantamäki P. Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. Europ Food Res Technol. 2010; 231(1): 1-12. doi: [10.1007/s00217-010-1246-2](https://doi.org/10.1007/s00217-010-1246-2)
 17. Aprilliza M. Characterization and properties of sodium alginate from brown algae used as an ecofriendly superabsorbent. IOP conference series: materials science and engineering. IOP Publishing. 2017. p. 012019.
 18. Aranaz I, Alcántara AR, Civera MC, Arias C, Elorza B, Heras Caballero A, Acosta N. Chitosan: An Overview of Its Properties and Applications. Polymers. 2021; 13, 3256-3276. doi: [10.3390/polym1319325](https://doi.org/10.3390/polym1319325)
 19. Gao X, Gong J, Cai Y, Wang J, Wen J, Peng L, Ji H, Jiang S, Guo D. Chitosan modified squalene nanostructured lipid carriers as a promising adjuvant for freeze-dried ovalbumin vaccine. Int J Biol Macromol. 2021; 188: 855-862. doi: [10.1016/j.ijbiomac.2021.08.074](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.08.074) PMID: [34411614](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34411614/)
 20. Shoaie F, Heshati A, Mahjub R, Garmakhany AD, Taheri M. The assessment of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* survivability in rose petal jam and the changes in physicochemical, textural and sensorial characteristics of the product during storage. Sci Rep. 2022; 12: 6200-6213. doi: [10.1038/s41598-022-10224-w](https://doi.org/10.1038/s41598-022-10224-w) PMID: [35418196](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35418196/)
 21. Nikoskelainen S, Ouwehand AC, Bylund G, Salminen S, Lilius EM. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). Fish Shellfish Immunol. 2003; 15: 443-452. doi: [10.1016/s1050-4648\(03\)00023-8](https://doi.org/10.1016/s1050-4648(03)00023-8) PMID: [14550670](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14550670/)
 22. Mohammadian T, Alishahi M, Tabandeh MR, Ghorbanpoor M, Gharibi D, Tollabi M, Rohanizade S. Probiotic effects of *Lactobacillus plantarum* and *L. delbrueckii* ssp. bulgaricus on some immune-related parameters in *Barbus grypus*. Aqua Inter. 2016; 24(1): 225-242. doi: [10.1007/s10499-015-9921-8](https://doi.org/10.1007/s10499-015-9921-8)
 23. Jiang T, Kim YK, Singh B, Kang SK, Choi YJ, Cho CS. Effect of microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* 25 into alginate/chitosan/alginate microcapsules on viability and cytokine induction. J Nano Sci Nanotechnol. 2013; 13(8): 5291-5295. doi: [10.1166/jnn.2013.7042](https://doi.org/10.1166/jnn.2013.7042) PMID: [23882756](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23882756/)
 24. Planas M, Vazquez JA, Marques J, Peres-Lomba R, Gonzalez M, Murado M. Enhancement of rotifer (*Brachionus plicatilis*) growth by using terrestrial lactic acid bacteria. Aquaculture. 2004; 240: 313-329. doi: [10.1016/j.aquaculture.2004.07.016](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.07.016)
 25. Vine NG, Leukes WD, Kaiser H. Probiotics in marine larviculture. FEMS Microbiol Rev. 2006; 30: 404-427. doi: [10.1111/j.1574-6976.2006.00017.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00017.x) PMID: [16594964](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16594964/)
 26. Houde ED, Schekter RC. Growth rates, rations and cohort consumption of marine fish larvae in relation to prey concentrations. Rapports Procès-verbaux des Réunions Conseil international pour l'Exploration de la Mer. 1981; 178: 441-453. doi: [10.1016/0272-7714\(85\)90119-2](https://doi.org/10.1016/0272-7714(85)90119-2)
 27. Rahmati-Holasoo H, Hadadi A, Ebrahimzadeh Mousavi H, Taheri Mirghaed A, Sadeghinezhad J. Effect of monoammonium phosphate on some blood factors, bone analysis and growth rate of ornamental koi fish (*Cyprinus carpio Koi*). J Vet Res. 2020; 75: 442-451. doi: [10.22059/JVR.2019.287435.2964](https://doi.org/10.22059/JVR.2019.287435.2964)
 28. Khadjeh GH, Peighan R. The investigation of some blood serum biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) culture in earthen pond. J Vet Res. 2007; 3: 197-203. (In Persian).
 29. Moss DW, Henderson AR. Clinical enzymology. In: Burtis CA, Ashwood ER. editors. 3rd ed. Tietz's Textbook of Clinical Chemistry. WB. Saunders Company. Philadelphia, USA. 1999. p. 617-721.
 30. Mann T, Keilin D. Mann T, Keilin D. Haemocuprein, Copperprotein compounds of blood and liver in mammals. Proc Roy Soc London. 1938; 126: 303-315. doi: [10.1098/rspb.1938.0058](https://doi.org/10.1098/rspb.1938.0058)
 31. Ellman GL. Tissue sulfhydryl group. Archive Biochem Biophys. 1959; 82: 70-77. doi: [10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6) PMID: [13650640](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13650640/)
 32. Peglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J Laborat Clin Med. 1976; 70: 158-169. PMID: [6066618](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6066618/)
 33. A.O.A.C. Official Methods of Analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemist, Washington DC. 1990.
 34. Zabidi A, Yusoff FM., Amin N, Yaminudin NJM, Puvanendram, P, Karim MMA. Effects of Probiotics on Growth, Survival, Water Quality and Disease Resistance of Red Hybrid Tilapia (*Oreochromis spp.*) Fingerlings in a BioflocSystem. Animals. 2021; 11: 3514. doi: [10.3390/ani11123514](https://doi.org/10.3390/ani11123514) PMID: [34944289](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34944289/)
 35. Weifen L, Xiaoping Z, Wenhui S, Bin D, Quan L, Luoqin F, Jiajia Z, Yue W, Dongyou Y. Effects of Bacillus preparations on immunity and antioxidant activities in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Fish Physiol Biochem. 2012; 38: 1585-1592. doi: [10.1007/s10695-012-9652-y](https://doi.org/10.1007/s10695-012-9652-y) PMID: [22585415](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22585415/)
 36. Zhang CN, Li XF, Xu WN, Jiang GZ, Lu KL, Wang LN, Liu WB. Combined effects of dietary fructooligosaccharide and *Bacillus licheniformis* on innate immunity, antioxidant capability and disease resistance of triangular bream (*Megalobrama terminalis*). Fish Shellfish Immunol. 2013; 35(5): 1380-1386. doi: [10.1016/j.fsi.2013.07.047](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.07.047) PMID: [23932988](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23932988/)
 37. Siuta-Cruce PJ, Goulet B. Improving probiotic survival rates. Food Technol. 2001; 55: 36-42.

38. Halwanil M, Yebiol B, Suntres ZE, Alipour M, Azghani AO, Omril A. Coencapsulation of gallium with gentamicin in liposomes enhances antimicrobial activity of gentamicin against *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemoth. 2008; 62: 1291-1297. doi: [10.1093/jac/dkn422](https://doi.org/10.1093/jac/dkn422) PMID: [18931388](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18931388/)
39. Ariful IM, Yun CH, Choi Y, Cho CS. Microencapsulation of live probiotic bacteria. Microbiol Biotechnol. 2010; 20(10): 1367-1377. doi: [10.4014/mb.1003.03020](https://doi.org/10.4014/mb.1003.03020)
40. Mortazavian A, Razavi SH, Ehsani MR, Sohrabvandi S. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. Iran J Biotechnol. 2007; 5(1): 1-18. (In Persian)
41. Lu ES, Zhen HL, Dan TL, Min X, Huai YC, Zhi LZ, Zhen X. Encapsulation of probiotic *Lactobacillus bulgaricus* in alginate-milk microspheres and evaluation of the survival in simulated gastrointestinal conditions. J Food Engin. 2013; 117: 99-104. doi: [10.1016/j.foodeng.2013.02.012](https://doi.org/10.1016/j.foodeng.2013.02.012)
42. Zou Q, Liu X, Zhao D, Tian F, Zhang HP, Zhang H, Chen W. Microencapsulation of bifidobacterium bifidum F- 35 in Whey Protein- Based Microcapsules by Transglutaminase Induced Gelation. J Food Sci. 2012; 77(5): M270-M2. doi: [10.1111/1750-3841.2012.02673.x](https://doi.org/10.1111/1750-3841.2012.02673.x) PMID: [23163944](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23163944/)
43. Bitá S, Mesbah M, Ghorbanpour Najafabadi M. Study of antioxidant enzymes and lipid peroxidation changes in common carp exposed to silver nanoparticles synthesized using Sargassum seaweed. Veter Res Biol Produc. 2017; 119: 150-160. doi: [VJ.2018.109111.1255](https://doi.org/10.1016/j.vetres.2017.11.015)
44. Limon-Pacheco J, Gonshebbat ME. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. Mut Res. 2009; 674(2): 137-147. doi: [10.1016/j.mrgentox.2008.09.015](https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.09.015) PMID: [18955158](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18955158/)
45. Oberdorster E. Manufactured nano materials (fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile Largemouth Bass. Environ Health Perspec. 2004; 112: 1058-1062. doi: [10.1289/ehp.7021](https://doi.org/10.1289/ehp.7021) PMID: [15238277](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15238277/)
46. Martinez C, Nagae M, Zaia C, Zaia D. Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. Braz J Biol. 2004; 64(4): 797-807. doi: [10.1590/s1519-69842004000500009](https://doi.org/10.1590/s1519-69842004000500009) PMID: [15744420](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15744420/)
47. Toutou MM, Soliman AAA, Farrag MMS, Abouelwafa AE. Effect of probiotic and symbiotic food supplementation on growth performance and healthy status of grass carp, *Ctenopharyngodon Idella* (Valenciennes, 1844). Int J Ecotoxicol Ecobiol. 2016; 1(3): 111-117. doi: [10.11648/j.ijee.20160103.18](https://doi.org/10.11648/j.ijee.20160103.18)
48. Ahire JJ, Mokashe NU, Chaudhari BL. Effect of dietary probiotic *Lactobacillus helveticus* on growth performance, antioxidant levels, and absorption of essential trace elements in goldfish (*Carassius auratus*). Probi Antimi Oteins. 2018; 11(2): 559-568. doi: [10.1007/s12602-018-9428-5](https://doi.org/10.1007/s12602-018-9428-5) PMID: [29748780](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29748780/)
49. Bajelan B, Zakeri M, Mousavi SM, Yavari V, Rajab Zadeh E. Combinatory effects of dietary Inulin and *Enterococcus faecium* in Benni, *Mesopotamichthys sharpeyi* on some hematological parameters, serum biochemical and resistance to environmental stress. Iran Vet J. 2017; 14(2): 25-38. doi: [10.22055/ivj.2017.65672.1825](https://doi.org/10.22055/ivj.2017.65672.1825) (In Persian)
50. Akrami R, Ghelichi A, Ahmadifar E. Effect of dietary prebiotic inulin on hematological and biochemical parameters of cultured juvenile beluga (*Huso huso*). J Vet Res. 2011; 66(2): 131-136. doi: [10.1111/j.1749-7345.2009.00297.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2009.00297.x) PMID: [22726](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22726/)
51. Al-Ngada RS, Abdelwahab AM, El-Bahr SM. Effect of Dietary Supplementation of Green Tea (*Camellia Sinensis*) on Growth, Body Composition and Serum Biochemistry of the Asian Seabass, *Lates calcarifer* Fingerlings. J Aqua Res Develop. 2017; 8(11): 518-522. doi: [10.4172/2155-9546.1000518](https://doi.org/10.4172/2155-9546.1000518)
52. Alizadeh Nozari M, Shapoori M. Effects of dietary alphamion probiotic on growth, hematological indices and proximate composition of *Huso huso*. Iran Sci Fish. 2016; 4: 151-159. (In Persian). doi: [10.22092/ISFJ.2017.113935](https://doi.org/10.22092/ISFJ.2017.113935)
53. Seyedi B, Heidary R, Tukmechi A. Dietary effect of *L. casei* and *L. paracasei* as probiotic bacteria with Raftilose as prebiotic on the growth and liver enzymes in rat. Razi J Med Sci. 2013; 20(107): 1-9.
54. Sharangi AB. Medicinal and therapeutic potentialities of tea (*Camellia sinensis*) – A review. Food Res Inter. 2009; 42: 529-535. doi: [10.1016/j.foodres.2009.01.007](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.01.007)
55. Kalantarian SH, Mirzargar SS, Rahmati-Holasoo H, Sadeghinezhad J. Effects of oral administration of acidifier and probiotic on growth performance, digestive enzymes activities and intestinal histomorphology in *Salmo trutta caspius* (Kessler, 1877). J Vet Res. 2020; 19: 1532-1555. (In Persian)
56. AnvariFar H, Keramat A, Ouraji H, Paknejad H. Influence of dietary nucleotides on growth performance, HSP70 expression, and stress resistance in kutum (*Rutilus kutum*) Fry. J Vet Res. 2022; 77(1): 37-45. doi: [10.22059/jvr.2019.245746.2724](https://doi.org/10.22059/jvr.2019.245746.2724) (In Persian)
57. Mohammadian T, Jangaran Nejad A, Badieli E, Momeni H, Tabandeh M, Mousavi Khorasani S. Effect of autochthonous probiotics, isolated from fish intestine on biochemical parameters and hepatic enzymes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J Vet Res. 2021; 76(1): 22-30. doi: [10.22059/JVR.2020.296608.3018](https://doi.org/10.22059/JVR.2020.296608.3018) (In Persian)
58. Hoseinpour M, Meshkini S, Hosein Najdegerami E. Comparison of the effect of L-carnitine and betaine on fish and corn oils in diet, and their effect on fatty acid profile and blood indices of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J Vet Res. 2020; 75(3): 288-299. doi: [10.22059/jvr.2019.279041.2922](https://doi.org/10.22059/jvr.2019.279041.2922) (In Persian)



Investigating the Effect of Microencapsulation of *Lactobacillus Plantarum* Bacteria with Chitosan/Alginate Microparticles on Oxidative Stress Indices in Nile Tilapia Fish (*Oreochromis niloticus*)

Zahra Bahrami^{1✉}, Laleh Roomiani^{2✉}, Narges Javadzadeh^{2✉}, Abolfazl Askary Sary^{2✉}, Mehran Javaheri Baboli^{2✉}

¹ Graduated from the Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran

² Department of Fisheries, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran

doi [10.22059/jvr.2022.346007.3285](https://doi.org/10.22059/jvr.2022.346007.3285)

Received: 26 July 2022, Accepted: 17 October 2022

Abstract

BACKGROUND: Microencapsulation of probiotic bacteria is an area that has rapidly expanded over the recent years. It is one of the new methods of improving probiotics stability, through which the biological agents are protected with an enclosed coating to release the active agents within the coating at a controlled rate in time and under special conditions.

OBJECTIVES: The present study aims to evaluate the effect of *Lactobacillus plantarum* microencapsulation with chitosan/alginate microparticles on the oxidative response of Nile tilapia fish (*Oreochromis niloticus*).

METHODS: Herein, 240 pieces of Nile tilapia, with an average weight of 15.56 ± 0.02 g, were randomly divided into four groups as follows: group 1 or control with a diet without probiotics, groups 2, 3, and 4 respectively with a diet containing 10^8 Log CFU/g of unencapsulated *Lactobacillus plantarum*, a diet containing microencapsulated *Lactobacillus plantarum*, and with feed containing alginate with chitosan without the presence of bacteria. They were fed for 60 days at the rate of 2% of body weight twice a day.

RESULTS: The activity level of oxidative enzymes, biochemical factors, and liver enzymes of the Nile tilapia fish were investigated. The findings revealed that oxidative enzymes, biochemical factors, and liver enzymes were positively affected in the groups with microencapsulated *Lactobacillus plantarum* ($P < 0.05$). The three enzymes of alanine transaminase, aspartate transaminase, and alkaline phosphatase were higher in the micro-encapsulated probiotic group compared to the two groups of probiotics and alginate with chitosan without the presence of bacteria, and all the three groups performed better compared to the control ($P < 0.05$).

CONCLUSIONS: Microencapsulation of probiotics maximizes the efficiency of probiotics in reducing oxidative stress.

Keywords: Biochemical factors, Liver enzymes, Microencapsulation, *Oreochromis niloticus*, Oxidative enzymes

Copyright © 2022. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Corresponding author's email: Laleh Roomiani, Tel/Fax: 061-3348421 / 061-33329200

How to cite this article:

Bahrami Z, Roomiani L, Javadzadeh N, Askary Sary A, Javaheri Baboli M. Investigating the Effect of Microencapsulation of *Lactobacillus Plantarum* Bacteria with Chitosan/Alginate Microparticles on Oxidative Stress Indices in Nile Tilapia Fish (*Oreochromis niloticus*). J Vet Res, 2022; 77(3): 155-165. doi: 10.22059/jvr.2022.346007.3285

Figure Legends and Table Captions

Table 1. The researched groups.

Table 2. Experimental food ration formula and approximate composition.

1: control; 2: non-encapsulated *L. plantarum*; 3: microencapsulated *L. plantarum*; 4: alginate with chitosan.

Table 3. The activity level of the antioxidant enzymes in (*O. niloticus*) fed with experimental diets. Different letters mean a significant difference at the level of 0.05 ($P < 0.05$).

1: control; 2: non-encapsulated *L. plantarum*; 3: microencapsulated *L. plantarum*; 4: alginate with chitosan.

Table 4. Biochemical indices and blood serum ions (*O. niloticus*) under the effect of experimental diets. Different letters mean a significant difference at the level of 0.05 ($P < 0.05$).

Table 5. Carcass composition (*O. niloticus*) fed with experimental diets. Different letters mean a significant difference at the level of 0.05 ($P < 0.05$).

Figure 1. Changes in the level of enzymes (mean \pm standard deviation) in the serum of the Nile tilapia fish after being fed with experimental diets. Different letters mean a significant difference at the level of 0.05 ($P < 0.05$).