فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال هشتم، شماره اول، بهار ۱۳۹۹

مقاله پژوهشی

بررسی تاثیر سطوح مختلف باکتری *Lactobacillus casei* بر وضعیت دفاع آنتی‌اکسیدانی و برخی فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پس از مصرف سرب در جیره غذایی

تکاور محمدیان[۱]*، رضا قانعی مطلق[۲]، حسین خاج[۳]، صادق رباط‌کریمی[۴]، علی ضیاغم[۴]، امین حیدری[۴]

تاریخ دریافت: اسفند ۹۷ تاریخ پذیرش: تیر ۹۸

چکیده

هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات مصرف باکتری *Lactobacillus casei* روی برخی از فراسنجه‌های بیوشیمیایی و آنتی‌اکسیدانی سرم خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پس از مواجهه با فلز سرب در جیره است. برای این منظور، ۳۷۵ قطعه ماهی (۴/۶±۱۵ گرم) به طور تصادفی به پنج گروه تقسیم شدند (با سه تکرار). گروه یک، دو و سه به ترتیب با جیره‌های حاوی $۵×۱۰^{۶}$، $۵×۱۰^{۷}$ و $۵×۱۰^{۸}$ CFU/g پروبیوتیک تغذیه شدند. گروه چهارم (شاهد منفی) با جیره پایه تغذیه شد. گروه پنجم (شاهد مثبت) ابتدا به مدت ۴۵ روز با جیره پایه و سپس به مدت ۲۱ روز همراه با گروه‌های پروبیوتیکی با غذای حاوی نیترات سرب تغذیه شد. خون‌گیری در روزهای صفر، ۴۵، ۵۲، ۵۹ و ۶۶ صورت گرفت. طبق نتایج مقادیر LDH، کلسترول و تری‌گلیسرید در اغلب تیمارهای پروبیوتیکی پس از ۴۵ روز نسبت به گروه شاهد منفی کاهش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). پس از مواجهه با سرب مقادیر ALP و LDH سرم در گروه دو نسبت به پنج از کاهش معنی‌داری برخوردار بود (P<۰/۰۵). در گروه دو سطح آنزیم گلوتاتیون در روز ۵۲ افزایش معنی‌داری نسبت به گروه پنج داشته است (P<۰/۰۵). بر اساس نتایج، استفاده از پروبیوتیک مذکور در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌تواند با بهبود شاخص‌های بیوشیمیایی و آنتی‌اکسیدانی ماهی در پیشگیری از مسمومیت با سرب موثر باشد. همچنین به نظر می‌رسد که سطح $۵×۱۰^{۷}$CFU/g باکتری تاثیر بهتری در بهبود فراسنجه‌های مورد مطالعه داشت.

واژگان کلیدی: *پروبیوتیک، سرب، سرم خون، قزل‌آلا*، Lactobacillus casei.

۱- دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
۲- دکتری بهداشت آبزیان، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
۳- استادیار موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
۴- دانشجوی دکتری عمومی دامپزشکی، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
* نویسنده مسئول: t.mohammadian@scu.ac.ir

مقدمه

باکتری‌های اسید لاکتیک از دسته باکتری‌های سودمند و بی‌خطر (Generally Regarded as Safe: GRAS) به شمار می‌آیند که امروزه به طور گسترده‌ای به عنوان پروبیوتیک در صنعت آبزی‌پروری به کار برده می‌شوند. اثرات افزودن مکمل پروبیوتیکی به جیره غذایی در بهبود عملکرد رشد، افزایش نرخ بازماندگی و وضعیت سلامت ماهی به خوبی اثبات شده است. از جمله دیگر خصوصیات باکتری‌های اسید لاکتیک توانایی این دسته از باکتری‌ها در حذف و اتصال به فلزات سنگین هم در شرایط برون‌تنی (in vitro) و هم در شرایط درون‌تنی (in vivo) است (Yu et al., 2017).

آلودگی محیط آبی به وسیله فلزات سنگین یک تهدید جدی برای سلامت عمومی است، زیرا این فلزات در بافت‌های موجودات آبزی تجمع می‌یابند و نهایتا توسط انسان مصرف می‌شوند. به طور کلی تجمع فلزات سنگین در بدن ماهی بستگی به غلظت فلز، راه مواجهه با فلز، عوامل محیطی (دما، سختی و شوری آب) و عوامل درونی (سن و عادات غذایی ماهی) دارد (Jezierska and Witeska, 2006). از بین فلزات سنگین، فلز سرب یکی از فلزاتی است که انتشار گسترده‌ای در محیط دارد. عمده منبع ورودی سرب به محیط زیست ناشی از فعالیت‌های انسانی است. سرب در اندام‌های مختلف از جمله کبد، کلیه، طحال، دستگاه گوارش و آبشش‌ها تمایل به تجمع دارد و گاهی سطوح بالایی از آن در استخوان‌ها یافت می‌شود. تجمع موکوس در کل بدن به ویژه آبشش، سیاه شدن ناحیه دم، دژنره شدن باله دمی، انحراف ستون مهره‌ها از نوع لوردواسکولیوزیز و آتروفی عضلانی از جمله علایم بالینی ناشی از مسمومیت با سرب در ماهی هستند (Eisler, 1988). تاثیر عوامل چلاته کننده سرب در درمان مسمومیت رژیمی با سرب به خاطر عوارض جانبی به ویژه در مصرف طولانی مدت مورد بحث است و از طرفی هیچ یک از این ترکیبات برای استفاده در جانوران مورد مصرف انسان تایید نشده است. همچنین در حال حاضر هنوز یک روش کاربردی و ارزان قیمت برای حذف فلزات سنگین از محصولات غذایی وجود ندارد (Meldrum and Ko, 2003; Kalia and Flora, 2005; Mrvcic et al., 2012).

در انسان و جانوران یافته‌های آنزیم‌شناختی در بررسی آسیب سلولی و بافتی، مهار آنزیم‌ها توسط گزنوبیوتیک‌ها، القای فعالیت آنزیمی توسط داروها (یا سایر ترکیبات) و بیماری‌های

متابولیک کاربرد دارد. خیلی از سموم متابولیک اثرات سمی خود را از طریق مهار آنزیم‌ها و در نتیجه کندسازی و توقف واکنش‌های آنزیمی ضروری اعمال می‌کنند. سرب نیز به عنوان یک مهارگر آنزیمی قوی شناخته شده است (Farkas et al., 1978). علاوه بر این، سنجش میزان فعالیت آنزیم‌ها به عنوان یک نشانگر بیوشیمیایی حساس قبل از ایجاد اثرات مخاطره‌آمیز در ماهیان مطرح شده است و تغییرات آن‌ها نیز به عنوان یک شاخص در ارزیابی کیفیت آب و حضور ترکیبات سمی در آب مورد استفاده قرار می‌گیرد (Casillas et al., 1983; Velmurugan et al., 2008).

یکی از روش‌های جدید و ارزان که اخیرا در حذف فلزات سنگین به کار برده شده است، استفاده از زیست‌توده‌های باکتریایی، جلبکی و قارچی است. در این باره، در مطالعه Das و همکاران (۲۰۱۶) توانایی دفع فلز سنگین سرب و کادمیوم توسط برخی از جدایه‌های *Lactobacillus casei* در شرایط برون‌تنی بیش از ۷۰ درصد تخمین زده شد. این توانایی به پلی‌ساکاریدهای خارجی (EPS) جداسازی شده از این باکتری نسبت داده شد و عنوان شد که استفاده از پروبیوتیک‌ها در غذاهای آلوده به فلزات سنگین در انسان و جانوران می‌تواند منجر به حذف این فلزات در مدفوع شود (Das et al., 2016). در مطالعه Zhai و همکاران (۲۰۱۶) مشخص شد که توانایی برخی از سویه‌های باکتری *Lactobacillus plantarum* تنها به خصوصیت اتصالی آن‌ها به کادمیوم بر نمی‌گردد، بلکه برخی از این سویه‌ها قادر هستند با افزایش بیان ژن اتصالات محکم (Tight Junctions)، کاهش کموکین‌ها و سیتوکین‌های التهابی، کاهش نفوذپذیری روده و فعالیت آنتی‌اکسیدانی مطلوب باعث حفظ یکپارچگی سد روده شوند. در این مطالعه مشخص شد که این سویه‌های پروبیوتیکی توانستند باعث دفع کادمیوم در مدفوع و کاهش تجمع آن در بافت‌ها شوند (Zhai et al., 2016). با توجه به پتانسیل باکتری‌های اسید لاکتیک در اتصال و برداشت فلزات سنگین و اثرات مفید آن‌ها بر فراسنجه‌های فیزیولوژیکی میزبان، هدف از مطالعه حاضر تاثیر سطوح مختلف باکتری *Lactobacillus casei* در جیره غذایی بر برخی از فراسنجه‌های بیوشیمیایی و سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و اثر محافظتی آن در مسمومیت تجربی با فلز سنگین سرب در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بوده است.

مواد و روش‌ها

تعداد ۳۷۵ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با میانگین وزنی ۴/۶±۱۵ گرم از یک مرکز تکثیر ماهی قزل‌آلا در شهرکرد تهیه و به آزمایشگاه دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز منتقل شد. ماهی‌ها به مدت دو هفته نسبت به شرایط آزمایشگاهی سازگاری یافتند. در طی دوره سازگاری، ماهی‌ها با جیره تجاری ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (بیومار، فرانسه) با ترکیب غذایی ۴۰ درصد پروتئین، ۹/۵ درصد چربی و ۸/۳ درصد خاکستر، روزانه دو بار و به میزان ۱/۵ درصد وزن بدن تغذیه شدند.

پس از طی دوره سازگاری، ماهیان به پنج گروه (در سه تکرار با ۲۰ قطعه ماهی در هر تکرار) در مخازن فایبرگلاس ۳۰۰ لیتری تقسیم شدند. گروه اول با جیره غذایی حاوی 5×10^{6}CFU/g باکتری *Lactobacillus casei* (جدا شده از ماهی شیربت (Mohammadian et al., 2016))، گروه دوم با جیره غذایی حاوی 5×10^{7}CFU/g باکتری *L. casei*، گروه سوم با جیره غذایی حاوی 5×10^{8}CFU/g باکتری *L. casei* به مدت ۴۵ روز تغذیه و نگهداری شدند. پس از اتمام این دوره به غذای هر سه گروه علاوه بر پروبیوتیک، ۵۰۰ میکروگرم نیترات سرب به ازای هر کیلوگرم جیره به مدت ۲۱ روز اضافه شد (Alves et al., 2006). گروه چهارم (شاهد منفی یا شاهد بدون سرب) در تمام طول آزمایش با غذای فاقد افزودنی، تغذیه و نگهداری شدند. گروه پنجم (گروه شاهد سرب‌دار یا شاهد مثبت) ابتدا بدون افزودن باکتری به جیره غذایی به مدت ۴۵ روز تغذیه شدند و پس از این مدت تا انتهای دوره آزمایش مورد مواجهه با فلز سرب (۵۰۰ میکروگرم نیترات سرب در هر کیلوگرم جیره) قرار گرفتند.

اضافه کردن پروبیوتیک به غذای تجاری مطابق با دستورالعمل استاندارد انجام شد (Planas et al., 2004; Vine et al., 2004). نحوه تیماربندی آزمایش به طور خلاصه در جدول ۱ آورده شده است. نمونه‌برداری از ماهی‌ها در روزهای صفر، ۴۵، ۵۲، ۵۹ و ۶۶ انجام شد.

لازم به ذکر است که کیفیت آب در طول دوره پرورش ثابت و در حد قابل قبول بود. شستشوی مخازن به طور روزانه صورت گرفت. شاخص‌های کیفی و فیزیکوشیمیایی آب مانند اکسیژن، درجه حرارت، pH، شوری، هدایت الکتریکی، آمونیاک، نیتریت و نیترات به صورت روزانه سنجش و ثبت شد. دمای آب حوضچه‌ها

در طول دوره پرورش در محدوده ۱۸-۱۲ درجه سانتی‌گراد و pH معادل ۸/۳-۷/۵ بود.

جدول ۱: نحوه تیماربندی گروه‌های آزمایشی

تیمارها	سطوح پروبیوتیک *Lactobacillus casei*			فلز سنگین سرب (۵۰۰µg/kg)
	سطح اول (5×10^{6}CFU/g)	سطح دوم (5×10^{7}CFU/g)	سطح سوم (5×10^{8}CFU/g)	
گروه اول	*	–	–	*
گروه دوم	–	*	–	*
گروه سوم	–	–	*	*
گروه چهارم (شاهد منفی)	–	–	–	–
گروه پنجم (شاهد مثبت)	–	–	–	*

*: علامت ستاره نشان دهنده وجود ماده مورد نظر در ترکیب جیره آزمایشی است.

در روز ۴۵ آزمایش با استفاده از ماده بیهوشی ۲- فنوکسی اتانول (۰/۳ میلی‌لیتر در لیتر) ماهیان بیهوش شدند. سپس از هر تیمار خون‌گیری از ۹ قطعه ماهی (۳ قطعه از هر تکرار) با استفاده از سرنگ ۵ میلی‌لیتری از محل ساقه دمی انجام شد. نمونه‌های خون به میکروتیوب‌های فاقد ماده ضدانعقاد منتقل و برای جداسازی سرم، درون دستگاه سانتریفیوژ (5415 R، Eppendorf، آلمان) با سرعت ۳۶۰۰ دور در ثانیه به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. سپس نمونه‌های سرم بلافاصله به فریزر (در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد) منتقل و تا زمان انجام آزمایش‌های بعدی در آنجا نگهداری شدند. عمل خون‌گیری از ماهیان در روزهای ۵۲، ۵۹ و ۶۶ آزمایش نیز انجام شد.

برای آماده‌سازی باکتری‌های *L. casei* و افزودن آن‌ها به غذای ماهیان از روش توصیه شده توسط Planas و همکاران (۲۰۰۴) و Vine و همکاران (۲۰۰۴) استفاده شد. به طور خلاصه باکتری‌ها در محیط آبگوشت MRS در شرایط بی‌هوازی کشت داده شدند. پس از رشد، باکتری‌ها با عمل سانتریفوژ جداسازی و شستشو شدند و به کمک لوله‌های استاندارد مک‌فارلند غلظت آن‌ها بر روی 3×10^{9}CFU/mL تنظیم شد. سپس به طریق تهیه رقت‌های متوالی، غلظت مورد نظر به هر گرم غذا اسپری شد.

غذاها در شرایط کاملا استریل به میزان لازم توزین و در سینی‌های استریل قرار داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت با رعایت شرایط استریل در دمای آزمایشگاه خشک و بسته‌بندی شدند. برای اطمینان از تعداد باکتری‌های زنده موجود در غذا، نمونه‌برداری و شمارش باکتریایی غذای به دست آمده انجام شد. بر روی غذای گروه‌های شاهد مثبت و منفی فقط سرم فیزیولوژی استریل اسپری شد (Planas et al., 2004; Vine et al., 2004).

سنجش فراسنجه‌های بیوشیمیایی و اکسیدان-آنتی‌اکسیدانی

سنجش میزان آلبومین سرم بر اساس روش برموکرزول‌گرین (BCG) صورت گرفت (Johnson et al., 1999). اندازه‌گیری سطح فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز سرمی بر اساس تبدیل نیتروفنیل‌فسفات به نیتروفنول و فسفات صورت گرفت. در این واکنش آلکالین فسفاتاز در واکنش پی- نیتروفنیل فسفات با آب دخالت کرده، فسفات و پی- نیتروفنیل تولید می‌شود. شدت جذب نور توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Eppendorf، آلمان) در طول موج ۴۰۵ نانومتر و در طی ۳ دقیقه اندازه‌گیری شد و برحسب میزان جذب نوری و بر اساس فرمول اختصاصی کاتالوگ محاسبه شد (Moss and Henderson, 1999). اندازه‌گیری سطح فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترنسفراز (AST) سرم بر اساس مقدار مصرف NADH و تبدیل آن به NAD^+ صورت گرفت. اندازه‌گیری سطح فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز سرم با استفاده از کیت (پارس آزمون، ایران) و بر اساس تبدیل پیرووات به لاکتات صورت گرفت. میزان فعالیت این دو آنزیم بر اساس شدت جذب نور در طول موج ۳۴۰ نانومتر و در طی ۳ دقیقه اندازه‌گیری شد و بر حسب میزان جذب نوری و بر اساس فرمول اختصاصی کاتالوگ محاسبه شد (Moss and Henderson, 1999).

اندازه‌گیری گلوکز سرم بر اساس روش آنزیمی گلوکز اکسیداز صورت گرفت. در این روش، آب اکسیژنه با یک فنل و آمینوآنتی‌پیرن (AAP) و در حضور آنزیم پراکسیداز تشکیل محصول قرمز رنگی به نام کینونیمین می‌دهد که در طول موج ۵۱۰nm رنگ‌سنجی شده، بر حسب میزان جذب نوری و سطح گلوکز استاندارد و بر اساس فرمول ارائه شده در کاتالوگ محاسبه شد (Sacks, 1999). اندازه‌گیری کلسترول بر اساس روش آنزیمی CHO-PAP صورت گرفت (Rifai et al., 1999). اندازه‌گیری تری‌گلیسرید بر اساس

روش آنزیمی GPO-PAP صورت گرفت. در این روش، تری‌گلیسرید توسط آنزیم لیپاز به گلیسرول و اسید چرب هیدرولیز می‌شود. سپس گلیسرول در طی چند واکنش متوالی به تولید محصول آب اکسیژنه می‌انجامد. آب اکسیژنه تولید شده نیز توسط واکنش تریندر اندازه‌گیری می‌شود (Rifai et al., 1999).

سنجش آنزیم کاتالاز (CAT) در سرم بر اساس روش Koroluk و همکاران (۱۹۸۸) صورت گرفت. برای سنجش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD) از روش تقلیل رنگ نیتروبلوتترازولیوم (NBT) استفاده شد که اساس کار به این شرح است: ۰/۱ میلی‌لیتر سرم به ۲ میلی‌لیتر محلول واکنش‌پذیر که شامل ۰/۲ میلی‌مول گزانتین، ۰/۱۲ میلی‌مول NBT، ۰/۴۹ واحد گزانتین اکسیداز و ۰/۱ مول بافر فسفات (pH ۷) بود اضافه و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شد. میزان سوپراکسید دیسموتاز از طریق سنجش تقلیل رنگ آبی با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۵۶۰ نانومتر سنجیده و نتایج به صورت درصد کاهش مهار آن خوانده شد (Peixoto et al., 2013). برای سنجش آنزیم گلوتاتیون (GSH) از روش توصیف شده توسط Ellman (۱۹۵۹) استفاده شد.

مالون‌دی‌آلدهید (MDA) به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی بر مبنای واکنش آن با تیوباربیتوریک اسید و بر اساس روش گزارش شده توسط Latha و Pari (۲۰۰۳) با کمی تغییر اندازه‌گیری شد.

سنجش الکترولیت‌ها

سنجش مقادیر یون‌های کلسیم، منیزیم، کلرید و فسفر در سرم خون به روش رنگ‌سنجی و با استفاده از کیت (پارس آزمون، ایران) صورت گرفت.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای بررسی نرمال بودن داده‌ها از آزمون آماری Kolmogorov-Smirnov استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط آزمون آماری تحلیل واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و پس‌آزمون دانکن با ضریب اطمینان ۹۵ درصد ($P<0/05$) در نرم‌افزار SPSS 22 انجام شد.

نتایج

نتایج مربوط به سنجش مقادیر آلبومین، آلکالین فسفاتاز، آسپارتات آمینوترانسفراز، لاکتات دهیدروژناز، فسفر، کلرید، کلسیم، منیزیوم، گلوکز، کلسترول و تری‌گلیسرید سرم

خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تیمار شده با سطوح مختلف پروبیوتیک *Lactobacillus casei* و سرب، در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۲: تاثیر سطوح مختلف *Lactobacillus casei* بر شاخص‌های بیوشیمیایی سرم در مراحل مختلف نمونه‌گیری (میانگین ± خطای استاندارد)

شاخص	گروه‌ها	روز صفر	روز ۴۵	روز ۵۲	روز ۵۹	روز ۶۶
آلبومین (gr/dL)	گروه ۱	۱/۰±۹۴/۱۸ Aa	۱/۰±۶۳/۴۶ Ba	۲/۰±۲۵/۴۹ Aa	۲/۰±۰۳/۱۷ Aa	۲/۰±۱۶/۶۵ Aa
	گروه ۲	۱/۰±۹۶/۱۶ Aab	۱/۰±۹۳/۲۲ ABab	۱/۰±۹۷/۲۲ Aab	۱/۰±۸۴/۳۷ Ab	۲/۰±۲۳/۱۸ Aa
	گروه ۳	۱/۰±۹۳/۱۶ Aab	۱/۰±۹۴/۱۹ ABab	۲/۰±۴۵/۵۷ Aab	۱/۰±۸۹/۳۷ Ab	۲/۰±۵۱/۴۵ Aa
	گروه ۴	۱/۰±۹۶/۱۱ Aa	۱/۰±۹۶/۱۴ Aba	۱/۰±۹۸/۱۳ Aa	۱/۰±۹۳/۱۱ Aa	۲/۰±۰۲/۰۷ Aba
	گروه ۵	تعیین نشده	تعیین نشده	۲/۰±۰۲/۱۳ Aa	۱/۰±۷۴/۲۶ Aab	۱/۰±۵۸/۳۸ Bb
آلکالین‌فسفاتاز (U/L)	گروه ۱	۲۷۵/۴±۳۴/۹۱ Ab	۲۶۷/۳۰±۸۶/۶۹ Bb	۳۲۳/۲۴±۲۱/۱۹ Aa	۸۶/۱۹±۶۶/۳۸ Dd	۱۸۵/۲۰±۴۸/۸۹ Cc
	گروه ۲	۲۷۶/۵±۰۱/۵۴ Ab	۳۲۸/۳۹±۲۱/۰۲ Aa	۲۴۲/۴۸±۳۱/۱۹ Bb	۷۴/۱۶±۰۴/۹۹ Dd	۱۳۶/۲۹±۲۷/۲۴ Dc
	گروه ۳	۲۷۶/۴±۷۵/۷۶ Aa	۳۰۲/۴۳±۳۵/۱۵ Aba	۱۹۷/۲۹±۱۴/۱۸ Cb	۱۳۶/۳۳±۱۱/۸۷ Cc	۲۱۳/۴۴±۴۷/۴۲ Cb
	گروه ۴	۲۷۹/۲±۲۸/۳۸ Aa	۲۷۷/۴±۰۰/۲۸ Ba	۲۷۵/۴±۶۷/۵۳ Ba	۲۷۵/۴±۶۴/۵۸ Aa	۲۷۵/۵±۶۷/۰۳ Ba
	گروه ۵	تعیین نشده	تعیین نشده	۲۳۷/۳۷±۴۰/۴۲ Bb	۲۲۳/۷۲±۴۳/۴۱ Bb	۳۸۹/۳۸±۳۳/۶۴ Aa
آسپارتات آمینوترنسفراز (U/L)	گروه ۱	۱/۰±۲۰/۲۷ A,b	۱/۰±۸۴/۴۸ B,a	۰/۰±۸/۱ B,b	۰/۰±۹۳/۲۵ A,b	۱/۰±۶۶/۴۱ A,a
	گروه ۲	۱/۰±۰۷/۳۱ A,b	۱/۰±۷۶/۲۴ B,a	۱/۰±۰۲/۲۸ B,b	۰/۷ ± ۰/۱۵ A,b	۱/۹۷ ± ۰/۴۷ A,a
	گروه ۳	۱/۰±۱۶/۲۹ A,b	۲/۰±۷۸/۳۴ A,a	۰/۰±۸۸/۲۴ B,b	۰/۰±۸۸/۲۴ A,b	۰/۰±۸۲/۲۳ B,a
	گروه ۴	۱/۰±۰۳/۳ A,a	۰/۰±۸۶/۲۱ C,a	۰/۰±۸۸/۲۴ B,a	۰/۰±۸۸/۱۹ A,a	۰/۰±۸۵/۲۲ B,a
	گروه ۵	تعیین نشده	تعیین نشده	۲/۰±۵۲/۴۹ A,a	۰/۰±۸۳/۲ A,b	۱/۰±۱۳/۳۹ B,b
لاکتات دهیدروژناز (U/L)	گروه ۱	۱۷/۲±۷۳/۰۸ A,a	۷/۲±۱۳/۱۸ C,c	۱۲/۲±۰۲/۶۷ BC,b	۱۸/۵±۸/۰۴ AB,a	۱۲/۲±۴۷/۷۶ BC,b
	گروه ۲	۱۸/۲±۰۶/۰۹ A,a	۱۱/۳±۷۱/۹۹ B,b	۱۰/۲±۴۸/۸۷ CD,b	۶/۱±۶۴/۷۴ C,c	۹/۳±۷۶/۱۸ C,b
	گروه ۳	۱۷/۲±۴۱/۶ A,b	۹/۲±۴۲/۳۱ BC,c	۱۴/۱±۲۲/۹۵ B,b	۲۳/۵±۰۶/۲۰ A,a	۱۳/۲±۸۹/۹۳ B,b
	گروه ۴	۱۷/۲±۸۳/۹۵ A,a	۱۹/۳±۲۹/۸۷ A,a	۱۹/۲±۰۷/۵۸ A,a	۱۹/۳±۴۶/۷۳ AB,a	۱۸/۲±۲۹/۳۸ A,a
	گروه ۵	تعیین نشده	تعیین نشده	۸/۲±۰۰/۱۸ D,b	۱۵/۳±۵۱/۸۵ B,a	۹/۱۳±۶۱/۱۶ C,b
	گروه ۱	۵/۰±۲۹/۸۵ A,c	۷/۱±۶۲/۶۵ B,c	۱۲/۲±۰۱/۱۸ B,b	۸/۲±۱۱/۰۱ AB,c	۱۵/۴±۴۳/۳ A,a

فسفر (mg/dL)	گروه ۲	۵/۰±۷۳/۵۴ A,c	۱۰/۲±۷۵/۶۶ A,ab	۱۲/۳±۲۴/۰۷ B,a	۸/۲±۰۵/۳۳ AB,bc	۱۳/۳±۱۵/۳۶ AB,a
	گروه ۳	۵/۰±۵۹/۵۱ A,d	۱۰/۱±۶۳/۵۹ A,b	۱۶/۲±۱۶/۷۲ A,a	۷/۲±۷۴/۰۷ B,c	۱۱/۰±۳۵/۷۸ B,b
	گروه ۴	۵/۰±۸۷/۴۴ A,a	۶/۰±۰۹/۳۵ B,a	۶/۰±۰۹/۳۵ C,a	۵/۰±۸۹/۷۳ B,a	۶/۰±۰۹/۳۵ C,a
	گروه ۵	تعیین نشده	تعیین نشده	۱۱/۱±۳۹/۴۸ B,a	۱۰/۲±۳/۹ A,a	۱۰/۲±۴۴/۸۵ B,a
کلرید (mg/dL)	گروه ۱	۱۱۴/۷±۱۱/۵ A,b	۹۸/۲۰±۹۶/۲۰ B,b	۱۵۵/۱۶±۷۲/۰۳ A,a	۱۰۳/۲۱±۶۳/۹۳ A,b	۱۳۹/۱۲±۰۴/۳۰ A,a
	گروه ۲	۱۱۰/۴±۳۳/۳۷ A,a	۱۰۴/۲۲±۳۸/۵۱ B,a	۱۲۱/۸±۰۳/۸۷ B,a	۱۰۵/۲۲±۵۱/۹۵ A,a	۱۱۱/۱۲±۹۲/۰۹ B,a
	گروه ۳	۱۱۰/۴±۶۵/۵۱ A,a	۱۲۵/۲۰±۲۷/۷۷ A,a	۱۲۶/۷±۹۹/۳۰ B,a	۱۰۵/۲۱±۴۸/۱۲ A,a	۱۰۸/۱۶±۳/۷۲ B,a
	گروه ۴	۱۱۳/۱۳±۹۴/۱۱ A,a	۱۰۹/۵±۴۶/۶۹ AB,a	±۲۱/۱۱۰ ۶/۶۸ B,a	۱۱۶/۱۰±۱۶/۹۵ A,a	۱۰۹/۷±۹۷/۱۸ B,a
	گروه ۵	تعیین نشده	تعیین نشده	۱۲۰/۲۰±۱۱/۰۶ B,a	۱۲۴/۲۰±۱۴/۷۰ A,a	۱۲۱/۱۸±۵۱/۸۷ B,a
کلسترول (mg/dL)	گروه ۱	۲۰۷/۱۲±۲۴/۸۹ A,b	۱۷۶/۳۵±۶۶/۴۴ B,b	۱۲۴/۵±۱۷/۶۴ CD,c	۱۷۹/۳۰±۵۲/۰۹ B,b	۲۶۰/۴۵±۱۸/۲۴ A,a
	گروه ۲	۲۱۲/۱۳±۰۷/۶۶ A,b	۱۸۶/۲۷±۵۲/۳۶ AB,b	۱۳۳/۱۸±۶۱/۶۵ BC,c	۱۸۰/۳۴±۳۲/۶۵ B,b	۲۷۵/۵۱±۵۹/۸۶ A,a
	گروه ۳	۲۱۰/۱۳±۸۷/۱۰ A,b	۱۲۲/۱۷±۰۵/۰۷ C,c	۱۰۹/۹±۲/۰۵ D,c	۱۹۹/۱۶±۰۰/۰۰ AB,b	۲۵۱/۲۹±۶۲/۷۱ AB,a
	گروه ۴	۲۰۹/۳۰±۹۵/۹۲ A,a	۲۱۰/۱۵±۴۷/۵ A,a	۲۱۳/۱۰±۸/۱۳ A,a	۲۰۷/۱۴±۱۳/۲۸ A,a	۲۱۲/۱۳±۱۵/۸۶ B,a
	گروه ۵	تعیین نشده	تعیین نشده	۱۴۱/۸±۰۴/۸۵ B,a	۱۴۴/۲۱±۳۱/۹۹ C,a	۱۳۹/۳۰±۶۷/۹۱ C,a
کلسیم (mg/dL)	گروه ۱	۱۰/۲±۴۷/۶۶ A,a	۹/۲±۱۸/۲۲ A,a	۱۰/۱±۵۷/۶۵ A,a	۱۱/۲±۶۳/۲۴ A,a	۱۲/۲±۴/۶۳ A,a
	گروه ۲	۹/۱±۰۷/۶۷ A,a	۸/۱±۹۸/۴۶ A,a	۱۰/۲±۲۵/۸۷ A,a	۱۰/۲±۹۵/۷۳ A,a	۱۱/۱±۲۷/۳ AB,a
	گروه ۳	۹/۱±۲۲/۶۰ A,b	۹/۱±۳/۲۴ A,b	۹/۱±۹۵/۷۲ A,b	۹/۲±۷۶/۳۴ A,b	۱۲/۱±۶۲/۷۵ A,a
	گروه ۴	۹/۲±۳۸/۴۱ A,a	۹/۲±۳۳/۰۱ A,a	۹/۲±۰۹/۱۲ A,a	۹/۲±۵۴/۲۱ A,a	۹/۲±۳۹/۳۱ B,a
	گروه ۵	تعیین نشده	تعیین نشده	۱۰/۲±۹۶/۰۴ A,a	۱۰/۲±۶/۱۶ A,a	۱۰/۱±۶۸/۸۸ AB,a
گلوکز (mg/dL)	گروه ۱	۵۱/۴±۹۳/۲۱ A,b	۵۰/۵±۹۲/۷۴ B,b	۳۸/۹±۴۵/۹۰ B,c	۸۴/۱۳±۰۶/۲۸ A,a	۵۹/۴±۶۱/۵۷ B,b
	گروه ۲	۴۹/۲±۷۶/۶۵ A,b	۴۲/۱۰±۲۶/۸۵ B,b	۵۰/۹±۲۴/۵۵ A,b	۸۲/۱۳±۴۲/۹۲ A,a	۷۷/۱۱±۴۲/۹۸ A,a
	گروه ۳	۴۹/۲±۹۹/۵۴ A,c	۶۵/۱۷±۲۷/۶۵ A,ab	۵۵/۸±۲۸/۲۷ A,bc	۷۸/۹±۰۹/۴۴ A,a	۶۹/۹±۰۵/۹۰ AB,ab
	گروه ۴	۵۱/۸±۷۶/۹۴ A,a	۴۷/۲±۲۳/۲۲ B,a	۴۷/۲±۰۲/۰۵ AB,a	۵۰/۴±۷۶/۶۵ B,a	۴۶/۱±۳۶/۲۶ C,a
	گروه ۵	تعیین نشده	تعیین نشده	۴۵/۱۰±۰۵/۷۲ AB,a	۴۲/۱۰±۷/۶۳ B,a	۴۰/۹±۴۷/۱۷ C,a
منیزیم (mg/dL)	گروه ۱	۱/۰±۷۶/۳۵ A,a	۲/۰±۰۲/۲۶ A,a	۲/۰±۰۱/۲۷ A,a	۱/۰±۸۸/۴۳ A,a	۲/۰±۰۷/۲۷ A,a
	گروه ۲	۱/۰±۹۴/۲۲ A,a	۱/۰±۸۶/۳۳ A,a	۲/۰±۰۶/۴۳ A,a	۱/۰±۸۵/۴۵ A,a	۲/۰±۱۹/۴۶ A,a
	گروه ۳	۱/۰±۹۲/۲۱ A,a	۲/۰±۰۶/۴۹ A,a	۱/۰±۸۹/۳۴ A,a	۱/۰±۷۷/۲۸ A,a	۲/۰±۰۶/۴۴ A,a
	گروه ۴	۱/۰±۷۷/۴۴ A,a	۱/۰±۸۳/۳۰ A,a	۱/۰±۹۰/۳۶ A,a	۱/۰±۹۱/۴۱ A,a	۲/۰±۰۷/۱۸ A,a
	گروه ۵	تعیین نشده	تعیین نشده	۱/۰±۹۱/۴۹ A,a	۱/۰±۹۶/۳۹ A,a	۱/۰±۸۹/۳۹ A,a

تری‌گلیسرید (mg/dL)	گروه ۱	۲۱۷/۴۳±۱۶/۹۴ A,bc	۱۶۳/۲۸±۸۷/۶۴ B,d	۳۹۸/۳۴±۰۴/۸۳ A,a	۱۷۰/۳۸±۳۸/۶۰ B,cd	۲۳۸/۴۵±۸۱/۵ B,b
	گروه ۲	۲۱۶/۲۶±۸۵/۹۵ A,b	۱۸۶/۱۲±۱۶/۱۱ B,c	۱۹۱/۱۳±۵۸/۹۴ B,bc	۱۵۲/۲۳±۰۴/۰۵ B,d	۲۹۲/۳۷±۹۱/۴۸ A,a
	گروه ۳	۲۱۷/۴۲±۷۳/۲۶ A,a	۲۴۲/۳۲±۷/۳۳ A,a	۲۳۲/۳۴±۸۱/۲ B,a	۱۵۰/۲۴±۱۴/۸۲ B,b	۲۵۶/۳۹±۱۶/۲۶ AB,a
	گروه ۴	۴۷±۲۱۸/۴۴ A,a	۲۵۳/۲۲±۵/۰۴ A,a	۲۱۹/۳۴±۴۶/۸۴ B,a	۲۱۷/۴۴±۷۲/۷۸ A,a	۲۱۹/۲۲±۱۶/۷۸ B,a
	گروه ۵	تعیین نشده	تعیین نشده	۲۱۷/۳۶±۷۷/۶۷ B,a	۱۷۸/۱۳±۳۹/۲۶ AB,b	۱۷۲/۱۵±۷۹/۵۷ C,b

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

نتایج مربوط به سنجش آلبومین سرم نشان داد به دنبال مصرف باکتری پروبیوتیک به مدت ۴۵ روز تغییر معنی‌داری در میزان آلبومین مشاهده نشد. پس از مواجهه با سرب در روز ۶۶، میزان آلبومین در گروه پنج (شاهد مثبت) نسبت به گروه شاهد منفی (گروه چهارم) و گروه‌های پروبیوتیکی کاهش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). در این زمان مقادیر آلبومین در تیمارهای پروبیوتیکی از گروه شاهد منفی بیشتر بود، هر چند این مقادیر معنی‌دار نبود.

نتایج مربوط به آنزیم آلکالین فسفاتاز نشانگر آن است که به دنبال مصرف پروبیوتیک در ۴۵ روز ابتدایی آزمایش، مقدار این آنزیم در گروه دوم نسبت به گروه شاهد منفی و گروه یک افزایش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). به دنبال مواجهه با سرب مقادیر آنزیم فوق در اغلب تیمارهای پروبیوتیکی نسبت به گروه‌های شاهد منفی و مثبت کاهش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). در روزهای ۵۲ و ۵۹ مقدار آن در گروه پنج نسبت به چهار کاهش و در روز ۶۶ آزمایش از افزایش معنی‌داری برخوردار بود (P<۰/۰۵).

نتایج سنجش آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز حاکی از آن است که در تمامی تیمارهای پروبیوتیکی مقدار آنزیم ۴۵ روز پس از مصرف پروبیوتیک به طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد منفی افزایش داشت (P<۰/۰۵). پس از مواجهه با سرب مقدار این آنزیم در روز ۶۶ در گروه یک و دو نسبت به گروه‌های چهار و پنج از افزایش معنی‌داری برخوردار بود (P<۰/۰۵). در روز ۵۲ افزایش معنی‌داری در مقدار این آنزیم در گروه پنج نسبت به سایر گروه‌ها (P<۰/۰۵) و در روز ۶۶ افزایش غیرمعنی‌داری در مقدار این آنزیم در گروه پنج نسبت به گروه چهار مشاهده شد.

نتایج بررسی آنزیم لاکتات دهیدروژناز بیانگر آن است که به دنبال مصرف پروبیوتیک در جیره به مدت ۴۵ روز، مقدار این آنزیم در تمامی تیمارهای پروبیوتیکی نسبت به گروه شاهد منفی و در گروه یک نسبت به گروه دو و سه از کاهش معنی‌داری برخوردار بود (P<۰/۰۵). پس از مواجهه با سرب در روز ۵۲ و ۶۶ آزمایش، تمامی گروه‌های پروبیوتیکی نسبت به گروه شاهد منفی به طور معنی‌داری دارای فعالیت آنزیمی کمتری بودند (P<۰/۰۵). همچنین در گروه پنج مقدار این آنزیم در روزهای ۵۲ و ۶۶ نسبت به گروه چهار از کاهش معنی‌داری برخوردار بود (P<۰/۰۵).

نتایج مربوط مقدار فسفر سرم نشان داد که در تیمارهای پروبیوتیکی در ۴۵ روز ابتدایی آزمایش افزایش معنی‌دار فسفر نسبت به گروه شاهد منفی در گروه دو و سه وجود داشت (P<۰/۰۵). به دنبال مواجهه با سرب در تمامی روزهای بعد از مواجهه، مقدار فسفر در گروه دو و سه و گروه پنج نسبت به گروه چهار افزایش داشت (P>۰/۰۵).

نتایج مربوط به مقادیر کلرید سرم نشان داد که پس از ۴۵ روز مصرف پروبیوتیک تاثیر معنی‌داری در مقدار آن در تیمارهای پروبیوتیکی نسبت به گروه شاهد منفی مشاهده نشد. پس از مواجهه با سرب نیز تغییر معنی‌دار قابل توجهی بین گروه‌ها مشاهده نشد.

سنجش مقدار کلسیم سرم نشان از عدم اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های پروبیوتیکی نسبت به گروه شاهد منفی پس از ۴۵ روز داشت. به دنبال مواجهه با سرب نیز اختلاف معنی‌دار قابل توجهی بین گروه‌ها مشاهده نشد.

سنجش مقدار منیزیم بیانگر آن بود که تغییر معنی‌داری در هیچ یک از روزهای آزمایش بین تیمارها وجود نداشت.

مقدار کلسترول سرم خون در روز ۴۵ در تمامی گروه‌های پروبیوتیکی نسبت به گروه شاهد منفی کاهش داشت که این کاهش در گروه یک و سه معنی‌دار بوده است (P<۰/۰۵). میزان کلسترول بعد از مواجهه با سرب در گروه پنج نسبت به گروه چهار در تمامی روزها کاهش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). در گروه‌های پروبیوتیکی مقدار کلسترول در روز ۵۹ نسبت به گروه پنج بیشتر بود. در روز ۶۶ مقدار کلسترول سرم در گروه‌های پروبیوتیکی نسبت به گروه چهار و پنج بیشتر بود که این افزایش در گروه یک و دو معنی‌دار بود (P<۰/۰۵).

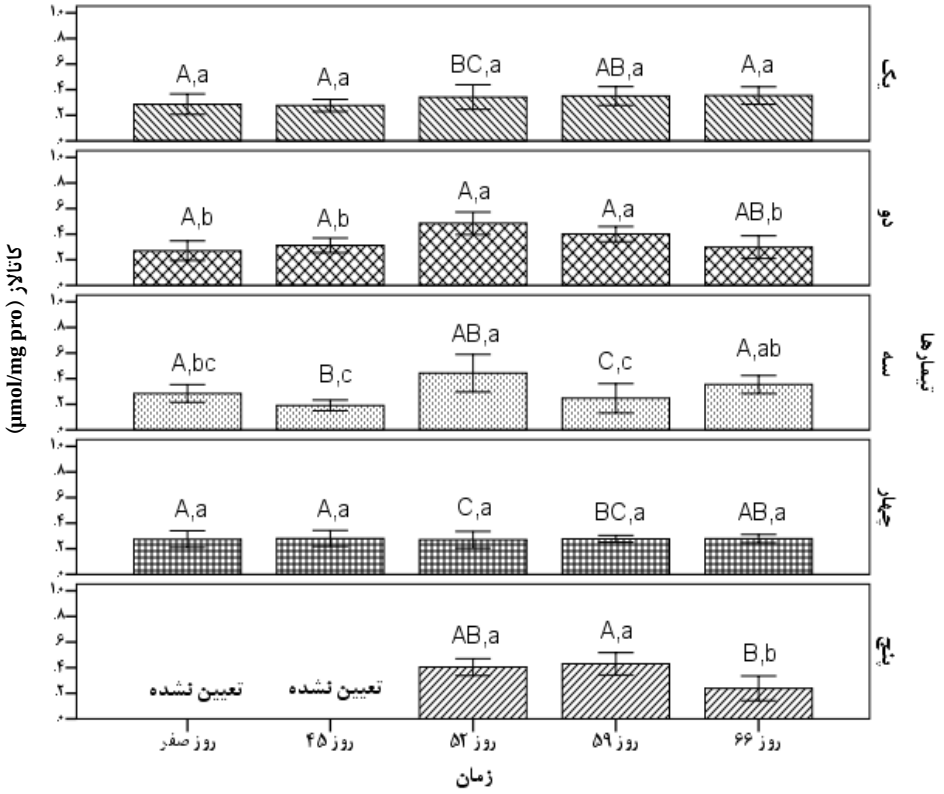
مقدار گلوکز ۴۵ روز بعد از مصرف پروبیوتیک در گروه سه نسبت به گروه شاهد منفی و دیگر تیمارهای پروبیوتیکی افزایش

معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). میزان گلوکز خون بعد از مواجهه با سرب در گروه چهار نسبت به گروه پنج تفاوت معنی‌داری نداشت. مقدار گلوکز سرم تمامی تیمارهای پروبیوتیکی در روز ۵۹ و ۶۶ آزمایش دارای افزایش معنی‌داری نسبت به گروه چهار و پنج بود (P<۰/۰۵).

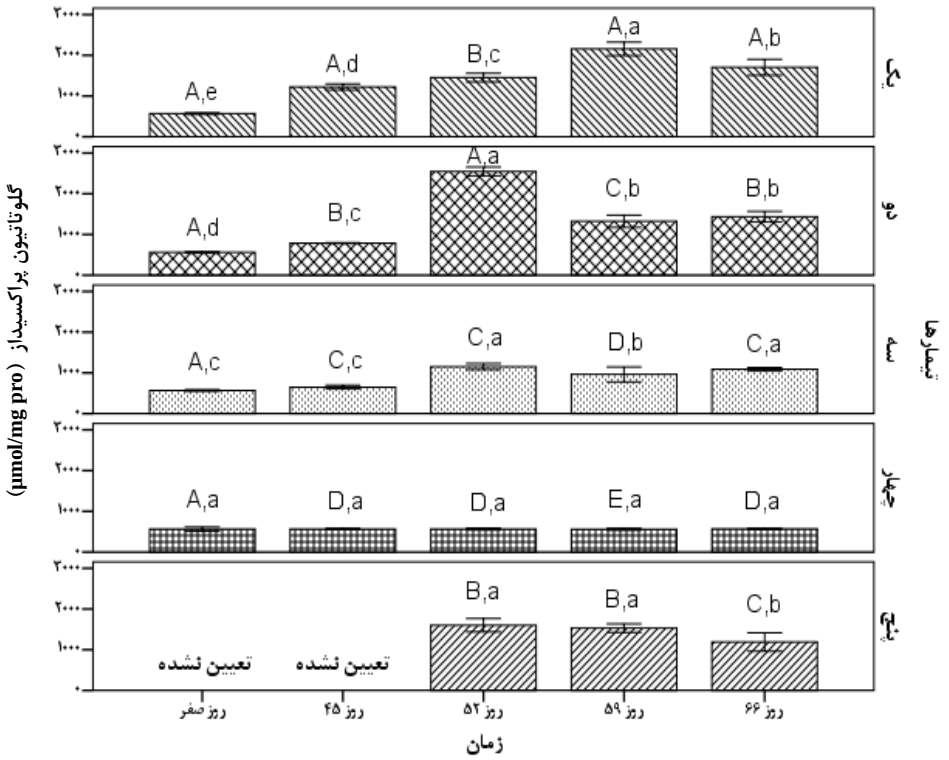
مقدار تری‌گلیسرید در گروه یک و دو بعد از مصرف پروبیوتیک به مدت ۴۵ روز کاهش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد داشت (P<۰/۰۵). پس از مصرف سرب میزان تری‌گلیسرید در گروه پنج در تمام روزهای پس از مواجهه نسبت به گروه چهار کاهش داشت که این کاهش در روز ۶۶ معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). در روز ۶۶ مقدار تری‌گلیسرید در تمامی تیمارهای پروبیوتیکی نسبت به گروه پنج افزایش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵).

نتایج مربوط به سنجش میزان کاتالاز سرم در شکل ۱ آورده شده است. نتایج حاکی از آن است که پس از مصرف پروبیوتیک در جیره به مدت ۴۵ روز تغییر معنی‌داری در میزان فعالیت این آنزیم مشاهده نشد. بعد از مصرف سرب مقدار کاتالاز در روز ۵۲ و ۵۹ در گروه پنج نسبت به گروه چهار افزایش معنی‌دار (P<۰/۰۵) و در روز ۶۶ کاهش غیرمعنی‌داری داشت. به دنبال مصرف سرب در روز ۶۶ میزان کاتالاز در گروه‌های یک و سه نسبت به گروه پنج از افزایش معنی‌داری برخوردار بود (P<۰/۰۵).

نتایج مربوط به میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در شکل ۲ آورده شده است. نتایج نشانگر آن است در گروه یک و دو بعد از مصرف باکتری پروبیوتیکی به مدت ۴۵ روز میزان فعالیت این آنزیم افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد داشت (P<۰/۰۵). میزان فعالیت این آنزیم در گروه پنج نسبت به گروه شاهد منفی در تمامی روزهای بعد از مواجهه با سرب افزایش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). میزان فعالیت آنزیم مذکور در روز ۵۲ در گروه دو، در روز ۵۹ در گروه یک و در روز ۶۶ در گروه یک و دو نسبت به گروه پنج افزایش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵).



شکل ۱: نتایج مربوط به سطح سرمی کاتالاز در تیمارهای مختلف طی مراحل مختلف نمونه‌برداری (میانگین ± انحراف معیار). حروف بزرگ لاتین ناهمنام نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر روز و حروف کوچک ناهمنام نشانگر تفاوت معنی‌دار در هر تیمار است (P<۰/۰۵).

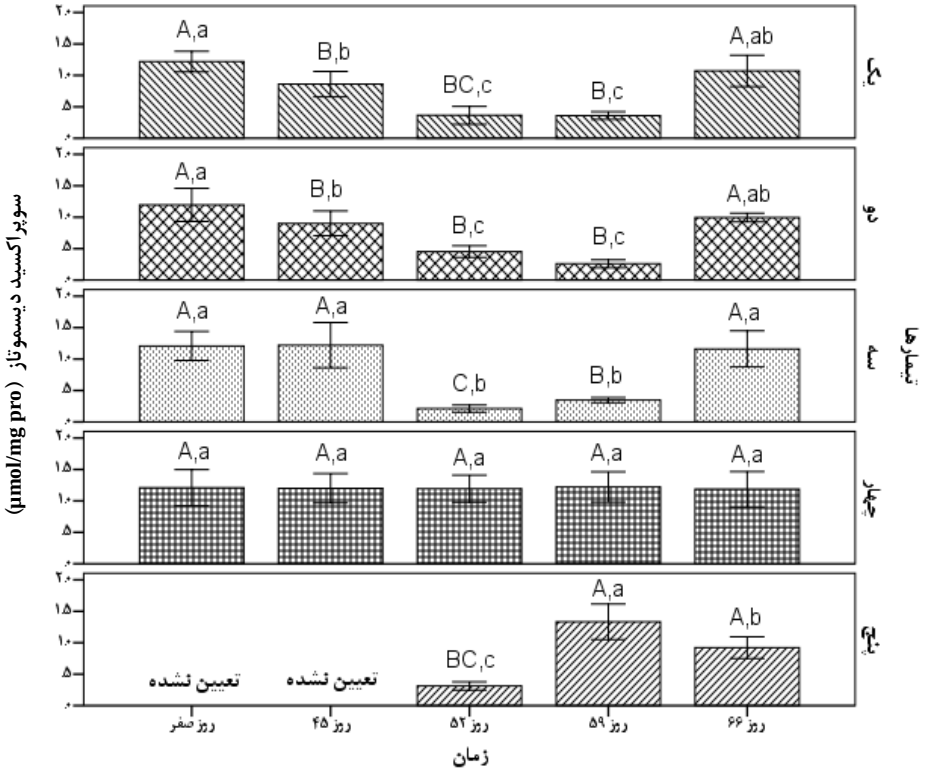


شکل ۲: نتایج مربوط به سطح سرمی گلوتاتیون پراکسیداز در تیمارهای مختلف طی مراحل مختلف نمونه‌برداری (میانگین ± انحراف معیار). حروف بزرگ لاتین ناهمنام نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر روز و حروف کوچک ناهمنام نشانگر تفاوت معنی‌دار در هر تیمار است (P<۰/۰۵).

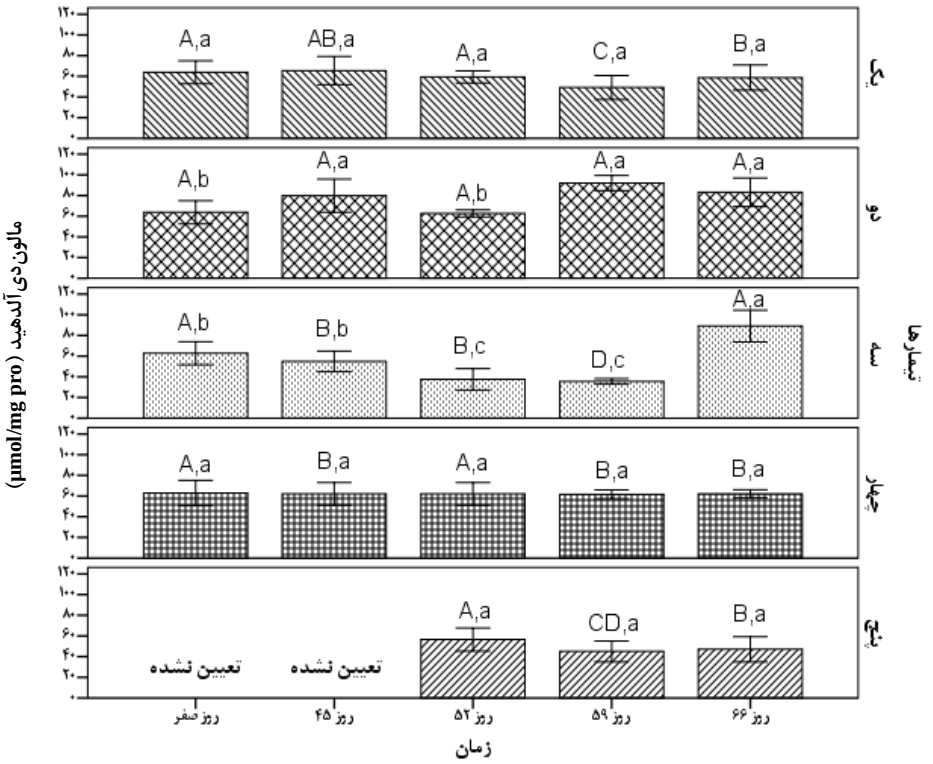
نتایج مربوط به سنجش آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در شکل ۳ آورده شده است. نتایج حاکی از آن است که در ۴۵ روز اول بعد از مصرف پروبیوتیک میزان این آنزیم در گروه‌های یک و دو نسبت به گروه شاهد از کاهش معنی‌داری برخوردار بود (P<۰/۰۵). به دنبال مصرف سرب میزان آن در تمامی گروه‌ها نسبت به گروه چهار در روز ۵۲ کاهش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). در روز ۶۶ مقدار این آنزیم در گروه‌های پروبیوتیکی نسبت به روز ۵۲ و ۵۹ افزایش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). هر چند اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای پروبیوتیکی و گروه پنج در روز ۶۶ مشاهده نشد.

نتایج مربوط به مقادیر مالون‌دی‌آلدهید در شکل ۴ نشان داده شده است. میزان آن در گروه‌های پروبیوتیکی در ۴۵ روز اول تغییر

جالب توجهی نداشته است. بعد از مواجهه با سرب میزان آن در گروه سوم نسبت به گروه پنج و دیگر گروه‌های پروبیوتیکی کاهش داشت (P<۰/۰۵).



شکل ۳: نتایج مربوط به سطح سرمی آنزیم سوپراکسید دیسموتاز سرم در تیمارهای مختلف طی مراحل مختلف نمونه‌برداری (میانگین ± انحراف معیار). حروف بزرگ لاتین ناهمنام نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر روز و حروف کوچک ناهمنام نشانگر تفاوت معنی‌دار در هر تیمار است (P<۰/۰۵).



شکل ۴: نتایج مربوط به سطح سرمی مالون‌دی‌آلدهید در تیمارهای مختلف طی مراحل مختلف نمونه‌برداری(میانگین ± انحراف معیار). حروف بزرگ لاتین ناهمنام نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر روز و حروف کوچک ناهمنام نشانگر تفاوت معنی‌دار در هر تیمار است (P<۰/۰۵).

بحث

اعتقاد بر این است که *Lactobacillus*ها جمعیت مهمی از میکروفلور روده هستند که به تعادل رساندن و مهار رشد عوامل بیماری‌زا کمک می‌کنند. در این باره، مطالعات متعددی کاربرد این باکتری‌های سودمند را به عنوان پروبیوتیک تایید کرده‌اند. با توجه به اثرات نامطلوب فلزات سنگین در موجودات مواجه شونده، فرآیندها و عواملی که بتوانند موجب حذف و کاهش این فلزات در بدن شوند، مطلوب به نظر می‌رسند. توانایی جنس‌های مختلف باکتری‌های اسید لاکتیک در جذب فلزات سنگین از سطح دیواره سلولی (Biosorption) یا تجمع این فلزات در درون سلول آن‌ها

(Bioaccumulation) توجه زیادی را در سال‌های اخیر به خود معطوف کرده است (Monachese, 2012; Gerbino et al., 2014).

مواجهه با فلزات سنگین می‌تواند موجب اختلال در تعادل یون‌ها و جذب فعال یون‌ها از آب شود. سرب می‌تواند با مهار آنزیم Na^+/K^+-ATPase در آبشش و احتمالا در روده باعث اختلالات تنظیمی- اسمزی شود. تحریک فعالیت بافت بین‌کلیوی و افزایش سطوح کورتیکواستروئید و گلوکز در ماهی به دنبال مواجهه با فلزات سنگین گزارش شده است. افزایش ترشح آدرنالین و کورتیزول به عنوان پاسخ اولیه به استرس شناخته می‌شوند. این اثرات مسبب مجموعه‌ای از تغییرات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی تحت عنوان پاسخ‌های استرس ثانویه می‌شوند. این اثرات شامل هیپرگلیسمی، تخلیه ذخایر گلیکوژن، کاتابولیزه شدن پروتئین عضلات و تغییر سطوح پروتئین، کلسترول و اسیدهای چرب آزاد خون هستند. پاسخ به سطوح اندک فلز سرب می‌تواند نشان دهنده تطابق باشد در حالی که سطوح بالای آن به نظر می‌رسد ویژگی ورود به مرحله تحلیل باشد. تطابق یا سازش‌پذیری بیانگر تغییر در برخی فرآیندهای فیزیولوژیکی مرتبط است که امکان بازگشت به هومئوستازی را می‌دهد. در هر صورت اگر استرس ادامه یابد، فاز تحلیل رخ می‌دهد که مشخصه آن تخلیه گلیکوژن کبدی، کاهش سطوح کورتیزول و تغییراتی است که بقای موجود را کم خواهد کرد (Martinez et al., 2004).

فراسنجه‌های خونی ابزار مهمی در پاسخ به شرایط استرس فیزیولوژیکی و وضعیت سلامت عمومی ماهی نسبت به تغییرات تغذیه‌ای و محیطی هستند (Alak et al., 2013).

در مطالعه حاضر، میزان آلبومین سرم خون ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در روز ۴۵ آزمایش در گروه‌های تیمار شده با پروبیوتیک *Lactobacillus casei* تغییر معنی‌داری با گروه شاهد نداشت. در توافق با این نتایج عدم تغییر مقادیر آلبومین سرم پس از مصرف باکتری *Bacillus cereus* در ماهی کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*) نیز مشاهده شد (Toutou et al., 2016). همچنین میزان آلبومین سرم به دنبال مصرف سرب در روز ۶۶ در گروه پنج کاهش معنی‌داری نسبت به گروه‌های دیگر داشت. در توافق با این نتایج، نتایج مطالعه Javed و همکاران (۲۰۱۷) نشان داد که در ماهی *Channa punctatus* ساکن در آب‌های آلوده به فلزات سنگین در هند نسبت

به آب منطقه غیرآلوده، میزان پروتئین تام نسبتا بالاتر و میزان آلبومین کمتر بود. کمتر بودن آلبومین در این مطالعه به آسیب کبدی که در آزمایش‌های آسیب‌شناسی بافتی مشاهده شد، نسبت داده شد. علاوه بر این میزان گلوبولین سرمی بالاتر و نسبت آلبومین به گلوبولین کمتری مشاهده شد. افزایش در مقادیر گلوبولین می‌تواند به دلیل افزایش تولید پروتئین‌های حیاتی علیه مسمومیت با فلزات سنگین باشد. ساخت پروتئین همچنین می‌تواند به خاطر جبران نیاز برای ترمیم بافت‌های آسیب دیده و افزایش پاسخ‌های ایمنی باشد (Javed et al., 2017).

نتایج مربوط به آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) نشان داد که بعد از مصرف پروبیوتیک میزان این آنزیم در گروه دو از افزایش معنی‌داری برخوردار بود (P<۰/۰۵). در مطالعه Tang و همکاران (۲۰۱۷) مشخص شد که مصرف باکتری *Bacillus subtilis* موجب افزایش فعالیت آلکالین فسفاتاز سرمی در ماهی *Yoshitomi tilapia* می‌شود. ALP یک آنزیم هیدرولاز مهم در بدن محسوب می‌شود و در انتقال و متابولیسم گروه‌های فسفر نقش دارد. همچنین مشخص شده که این آنزیم موجب دفسفریله شدن مولکول‌های مضر بالقوه از جمله نوکلئوتیدفسفاتازها، لیپوپلی‌ساکارید عوامل بیماری‌زا و فسفاتازهای فعال‌گر مسیر تماسی (داخلی) انعقاد شده، بنابراین باعث کاهش التهاب و اختلال انعقادی می‌شود (Tang et al., 2017). در مطالعه حاضر بعد از مواجهه با سرب میزان این آنزیم در گروه پنج نسبت به گروه چهار ابتدا کاهش و سپس افزایش داشت و در تیمارهای پروبیوتیکی نسبت به گروه پنج کاهش معنی‌داری را نشان داد. در مطالعه Mirmazloomi و همکاران (۲۰۱۵) میزان آنزیم‌های ALP و AST به دنبال مواجهه با استات سرب به مقدار ۵ میلی‌گرم در لیتر به مدت ۱۵ روز، افزایش معنی‌داری در بافت کبدی داشت. از طرفی مطالعه Dai و همکاران (۲۰۰۹) نشان داد که مواجهه ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) با فلز سرب در رژیم غذایی موجب کاهش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز کبدی و کلیوی می‌شود.

نتایج مربوط به آنزیم AST نشان داد که در گروه‌های پروبیوتیکی مقدار آن نسبت به روز صفر افزایش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). در بررسی Alizadeh Rudposhti و همکاران (۲۰۱۷) با افزودن باکتری *Enterococcus faecalis* در جیره تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) افزایش معنی‌دار

مقادیر ALP و AST سرمی نسبت به گروه شاهد مشاهده شد. نتایج مطالعه Seyedi و همکاران (۲۰۱۳) نیز نشان داد که با مصرف پروبیوتیک‌های *Lactobacillus casei* و *Lactobacillus paracasei* در مدل جانوری موش مقادیر ALT (Alanine Aminotransferase) سرم به طور معنی‌دار و مقادیر AST سرم به طور غیرمعنی‌داری نسبت به گروه شاهد افزایش یافت. در مطالعه حاضر، بعد از مواجهه با سرب مقادیر آنزیم در روز ۵۲ و ۶۶ در گروه پنج نسبت به گروه چهار به طور معنی‌داری بالاتر بود (P<۰/۰۵). در روز ۵۲ در تمامی تیمارهای پروبیوتیکی و در روز ۶۶ در گروه سه مقدار آن از گروه پنج کمتر بود. در توافق با نتایج مطالعه حاضر، افزایش فعالیت آنزیم‌های AST و ALT در ماهی تیلاپیای نیل بعد از مواجهه با روی و کادمیوم به مدت ۷ و ۱۴ روز مشاهده شد (Firat and Kargin, 2010). در مطالعات مشابه افزایش این دو آنزیم در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پس از مواجهه با مس و در ماهی شانک سرطلایی (*Sparus aurata*) پس از مواجهه با کادمیوم مشاهده شد (Nemcsok and Hughes, 1988; Vaglio and Landriscina, 1999). آنزیم‌های AST و ALT به طور عمده در تشخیص آسیب حاصل از آلاینده‌ها در بافت‌های مختلف از جمله کبد، عضلات و آبشش‌ها نقش دارند. همچنین افزایش فعالیت این آنزیم‌ها در مایع خارج سلولی یا پلاسما یک شاخص حساس حتی در آسیب‌های سلولی مختصر است. افزایش این آنزیم‌ها در سرم می‌تواند ناشی از آسیب کبدی و نشت آن‌ها از سیتوپلاسم سلول‌های کبدی به جریان خون باشد (Firat and Kargin, 2010). در مطالعه حاضر، با وجود افزایش معنی‌دار مقدار آنزیم‌های ALT و AST در تیمارهای پروبیوتیکی در ۴۵ روز ابتدایی، افزایش بیشتر سطح آن‌ها به دنبال مواجهه با فلز سرب در تیمارهای پروبیوتیکی مشاهده نشد و اثر محافظتی آن‌ها به ویژه در روز ۵۲ آزمایش به خوبی مشهود بود.

نتایج مربوط به فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH) نشان داد که مقدار آن در تیمارهای پروبیوتیکی بعد از ۴۵ روز نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافت (P<۰/۰۵). بعد از مواجهه با سرب، مقدار آن در گروه پنج نسبت به گروه چهار در روز ۵۲ و ۶۶ کاهش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). همچنین بعد از مواجهه با سرب در روز ۵۹ مقدار LDH در گروه دو نسبت به گروه پنج کاهش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). در راستای مطالعه حاضر مطالعه، Dai و همکاران (۲۰۰۹) نشان

دادند که مواجهه ماهی تیلاپیا نیل با فلز سرب در رژیم غذایی موجب کاهش فعالیت آنزیم LDH کلیوی، به طور وابسته به غلظت، شد.

نتایج مربوط به مقدار فسفر سرم نشان داد که در گروه دو و سه افزایش معنی‌دار فسفر نسبت به گروه شاهد بعد از ۴۵ روز مصرف پروبیوتیک وجود دارد (P<۰/۰۵). بعد از مواجهه با سرب میزان آن در تمامی گروه‌ها نسبت به گروه شاهد منفی بیشتر بود.

نتایج مربوط به مقادیر کلرید، کلسیم و منیزیم سرم حاکی از عدم اختلاف معنی‌دار قبل و بعد از مواجهه با سرب بود. در این باره، در مطالعه Chelladurai و همکاران (۲۰۱۳) در ماهی *Mystus montanus* به دنبال مصرف پروبیوتیک *Lactobacillus acidophilus* به مدت ۶۰ روز و پس از مواجهه با باکتری *Aeromonas hydrophila* میزان منیزیوم و کلر سرم تیمارهای پروبیوتیکی نسبت به گروه شاهد کاهش داشت، ولی تغییری در مقادیر کلسیم مشاهده نشد. در مطالعه Al-Dohail و همکاران (۲۰۱۱) پس از مصرف پروبیوتیک *Lactobacillus acidophilus* مقادیر کلسیم، منیزیم و کلرید سرم افزایش یافت.

در این مطالعه مقدار کلسترول سرم خون در روز ۴۵ در تمامی گروه‌های پروبیوتیکی کاهش داشت. میزان کلسترول بعد از مواجهه با سرب در گروه پنج نسبت به گروه چهار در تمامی روزها کاهش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). در گروه‌های پروبیوتیکی مقدار کلسترول در روز ۵۹ نسبت به گروه پنج و در روز ۶۶ نسبت به گروه چهار و پنج بیشتر بود.

مقدار تری‌گلیسرید در گروه یک و دو بعد از ۴۵ روز کاهش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد داشت (P<۰/۰۵). پس از مصرف سرب میزان تری‌گلیسرید در گروه پنج نسبت به گروه چهار کاهش داشت. در روز ۶۶ مقدار تری‌گلیسرید در تمامی تیمارهای پروبیوتیکی نسبت به گروه پنج افزایش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵).

در توافق با نتایج مطالعه حاضر، Dawood و همکاران (۲۰۱۶) عنوان کردند که به دنبال مصرف پروبیوتیک‌های *Lactobacillus lactis* و *Lactobacillus rhamnosus* به شکل مجزا یا ترکیبی در ماهی سیم دریایی قرمز (*Pagrus major*)، مقادیر کلسترول تام و تری‌گلیسرید پلاسما به طور معنی‌داری کاهش یافت. کاهش مقادیر کلسترول تام و تری‌گلیسرید در سایر مطالعات مشابه نیز با مصرف پروبیوتیک در ماهی سیم دریایی قرمز مشاهده شد. از جمله دلایل این کاهش، می‌توان ذکر کرد که پروبیوتیک‌ها با تخمیر کربوهیدرات‌های غیرقابل

هضم غذا باعث تولید اسیدهای چرب زنجیره کوتاه در روده شده که متعاقبا می‌تواند موجب کاهش مقادیر سیستمیک لیپیدهای خونی از طریق مهار ساخت کلسترول کبدی و یا انتشار مجدد کلسترول از پلاسما به کبد شود. کاهش محتوای لیپیدی پلاسما پس از مصرف مکمل پروبیوتیکی می‌تواند به تحریک احتمالی بیان ژن‌های دخیل در متابولیسم لیپیدی نیز نسبت داده شود (Dawood et al., 2016).

در توافق با نتایج مطالعه حاضر، در مطالعه Tewari و همکاران (۱۹۸۷) کاهش سطوح کلسترول بافتی و خونی به دنبال مواجهه با فلز سنگین سرب مشاهده شد. با توجه به این که کلسترول جزء مهمی از غشای سلول و پیش‌ساز هورمون‌های استروئیدی است، تغییرات القا شده توسط این فلز ممکن است ناشی از تخریب غشای پلاسمایی و تغییر در فرآیند استروئیدوژنز باشد (Tewari et al., 1987). از سوی دیگر در ماهی *Lepomis macrochirus* مواجهه با کلرید جیوه منجر به کاهش کلسترول سرم شد و این کاهش به افزایش سنتز پروتئین در کبد و افزایش سطح لیپوپروتئین‌های با چگالی بالا در سرم نسبت داده شد (Dutta and Haghighi, 1986).

در باره مقادیر گلوکز سرم، ۴۵ روز بعد از مصرف پروبیوتیک در گروه سه افزایش معنی‌داری وجود داشت (P<۰/۰۵). میزان گلوکز خون بعد از مواجهه با سرب در گروه پنج نسبت به گروه چهار کاهش داشت، هر چند این کاهش معنی‌داری نبود. مقدار گلوکز سرم در تیمارهای پروبیوتیکی در روز ۵۹ و ۶۶ از افزایش معنی‌داری نسبت به گروه پنج برخوردار بود (P<۰/۰۵). در این باره، در مطالعه Al-Dohail و همکاران (۲۰۱۱) مقادیر گلوکز و کلسترول سرم به دنبال مصرف پروبیوتیک *Lactobacillus acidophilus* کاهش و مقادیر کلسیم، منیزیم و کلرید سرم افزایش یافت. در ماهی *Mystus montanus* مقادیر گلوکز، کلسترول و آنزیم‌های AST، ALT و LDH سرم پس از مصرف پروبیوتیک *Lactobacillus acidophilus* به مدت ۶۰ روز و پس از مواجهه با باکتری *Aeromonas hydrophila* نسبت به گروه شاهد افزایش داشت (Chelladurai et al., 2013).

در مورد اثر فلز سرب بر سطح گلوکز خون، مواجهه ماهی *Barbus conchonius* با فلز سرب موجب پاسخ هیپرگلیسمیک و افزایش سطح گلوکز خون پس از ۳۰ و ۶۰ روز مواجهه شد که احتمالا ناشی از فراخوانی ذخایر انرژی

به دنبال پاسخ به استرس بوده است. از سوی دیگر در مطالعات دیگر ذکر شد که در مواجهه طولانی مدت با فلزات سنگین ابتدا سطح گلوکز افزایش می‌یابد و سپس کاهش می‌یابد تا حدی که به پایین‌ترین سطح برسد. این امر احتمالا ناشی از تخلیه ذخایر انرژی برای غلبه بر شرایط استرس ناشی از تجمع فلزات سنگین است. همچنین علت مقادیر پایین گلوکز در مواردی که ماهیان به شکل مزمن با فلزات سنگین در آب آلوده مواجهه می‌شوند، احتمالا ناشی از گلوکونئوژنز نابجا نیز باشد (Javed et al., 2017). از طرفی در مطالعه Firat و Kargin (۲۰۱۰) افزایش مقادیر گلوکز و کورتیزول به دنبال مواجهه ماهی تیلاپیای نیل با روی و کادمیوم مشاهده شد. افزایش گلوکز خون در جانورانی که در شرایط استرس قرار بگیرند، معمول است و یکی از اثرات اصلی ترشح کاتکولامین‌ها و هورمون‌های کورتیکواستروئیدی است. پاسخ هیپرگلایسمیک حاکی از یک اختلال در متابولیسم کربوهیدرات است که دلیل آن احتمالا افزایش فعالیت آنزیم گلوکز ۶- فسفاتاز در کبد، افزایش شکست گلیکوژن کبدی و ساخت گلوکز از پروتئین‌ها و اسیدهای آمینه خارج کبدی است. افزایش گلوکز خون ممکن است نشان دهنده اختلال متابولیسم کربوهیدرات به واسطه افزایش تجزیه گلیکوژن کبدی باشد که احتمالا توسط هورمون‌های آدرنوکوتیکوتروپیک و گلوکاگون و کاهش فعالیت انسولین صورت می‌گیرد. افزایش ارتباط کورتیزول و گلوکز در شرایط مواجهه با فلزات سنگین سرب و مس به ترتیب در ماهی *Prochilodus lineatus* و تیلاپیای نیل دیده شد (Martinez et al., 2004; Monteiro et al., 2005).

نتایج مربوط به سنجش میزان کاتالاز سرم نشان داد که با مصرف پروبیوتیک به مدت ۴۵ روز مقدار آن در گروه دو افزایش داشت، هر چند معنی‌دار نبود. با سنجش فعالیت آنزیم گلوتاتیون مشخص شد که در گروه یک و دو پس از تجویز پروبیوتیک به مدت ۴۵ روز میزان آن افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد داشت ($P<۰/۰۵$). نتایج مربوط به ارزیابی آنزیم سوپراکسید دیسموتاز حاکی از آن است که با مصرف سرب میزان آن در تیمارهای پروبیوتیکی ابتدا کاهش و سپس افزایش داشت. همچنین نتایج مربوط به مقادیر مالون‌دی‌آلدهید (MDA) نشان داد که بعد از مواجهه با سرب میزان آن در گروه سوم نسبت به گروه پنج و دیگر گروه‌های پروبیوتیکی کاهش داشت.

در رابطه با سنجش شاخص‌های اکسیدان-آنتی‌اکسیدانی، Dawood و همکاران (۲۰۱۶) عنوان کردند که به دنبال مصرف پروبیوتیک‌های *Lactobacillus lactis* و *Lactobacillus rhamnosus* به شکل مجزا یا ترکیبی در ماهی سیم دریایی قرمز، میزان پراکسیداز تام سرم و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز سرم افزایش یافت. در مطالعه Dawood و همکاران (۲۰۱۵) افزودن مکمل رژیمی *Lactobacillus plantarum* (به شکل کشته شده توسط گرما) به طور معنی‌داری موجب افزایش فعالیت پراکسیداز سرمی شد. آنزیم پراکسیداز آنزیمی است که از رادیکال‌های اکسیداتیو به منظور تولید هیپوکلرو اسید برای کشتن عوامل بیماری‌زا استفاده می‌کند (Dawood et al., 2015). افزایش فعالیت پراکسیداز سرم با مصرف پروبیوتیک‌های جنس *Bacillus* و *Lactobacillus* در ماهی شانک سرطلایی نیز مشاهده شد (Salinas et al., 2008). فعالیت آنزیم گلوتاتیون همچنین در هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) به دنبال مصرف پروبیوتیک افزایش داشت (Son et al., 2009).

آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در دیسموتاسیون آنیون سوپراکسید به هیدروژن پراکسید در شرایط استرس‌زا نقش دارد. در توافق با نتیجه مطالعه حاضر، نتایج بررسی Thy و همکاران (۲۰۱۷) نشان داد که با مصرف پروبیوتیک‌های جنس *Bacillus* به مدت ۹۰ روز در جیره گربه‌ماهی رنگین‌کمان (*Pangasianodon hypophthalmus*) تغییر معنی‌داری در مقادیر این آنزیم رخ نداد. در مطالعه Son و همکاران (۲۰۰۹)، کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم SOD در لوکوسیت‌های کلیه قدامی ماهی هامور معمولی به دنبال مصرف پروبیوتیک *Lactobacillus plantarum* به مدت ۴ هفته دیده شد. کاهش در فعالیت آنزیم یاد شده می‌تواند به دلیل حفظ سطح آنیون سوپراکسید یا تبدیل آن به اکسیژن یگانه ($^1O_2$) و رادیکال هیدروکسیل به واسطه برهم‌کنش کاتالیز شده با فلزات به منظور افزایش فعالیت باکتری‌کشی فاگوسیت‌ها باشد. علاوه بر این هیدروژن پراکسید نیز می‌تواند موجب مهار فعالیت آنزیم SOD و القای فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز شود (Son et al., 2009).

در مطالعه Shen و همکاران (۲۰۱۰)، افزودن باکتری *Bacillus subtilis* به عنوان مکمل غذایی در جیره میگوی *Litopenaeus vannamei* موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز و SOD و کاهش سطح MDA و عدم تغییر در مقادیر کاتالاز و آلکالین

فسفاتاز شد. در این مطالعه مشخص شد که افزایش مقادیر آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی در ارتباط با خنثی‌سازی گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن و پیشگیری از آسیب خودی و پراکسیداسیون لیپیدی است (Shen et al., 2010).

در مطالعات صورت گرفته در مورد اثر فلزات سنگین بر سیستم اکسیدان و دفاع آنتی‌اکسیدانی، مطالعه Yu و همکاران (۲۰۱۷) نشان داد که مواجه ماهی تیلاپیا با فلز سنگین آلومینیوم موجب کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز و افزایش سطح مالون‌دی‌آلدهید در کبد می‌شود که عکس این حالت حین مصرف پروبیوتیک رخ داد. همچنین در تیمار پروبیوتیکی مواجه نشده با فلز نسبت به گروه شاهد فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز و مقدار مالون‌دی‌آلدهید بهبود یافت (Yu et al., 2017). در مطالعه Alak و همکاران (۲۰۱۳) سطوح تحت کشنده کلرید سرب در آب موجب افزایش پراکسیداسیون لیپیدی، فعالیت کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز شد. افزایش فعالیت کاتالاز به دنبال مواجهه با سایر فلزات سنگین از جمله جیوه، کادمیوم، روی، مس و ارسنیک نیز مشاهده شد. افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در سایر گونه‌های ماهی نیز به دنبال مواجهه با سرب مشاهده شد (Alak et al., 2013). در مطالعه صورت گرفته توسط Paul و Sengupta (۲۰۱۳) مواجهه ماهی *Channa punctatus* با مقدار ۹/۴۳ میلی‌گرم در لیتر استات سرب به مدت ۴ روز موجب افزایش معنی‌دار میزان پراکسیداسیون لیپیدی و سوپراکسید دیسموتاز و کاهش مقادیر کاتالاز، گلوتاتیون اس-ترانسفراز، گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز در ماکروفاژهای روده شد.

افزایش پراکسیداسیون لیپیدی در بافت‌ها به طور عمده ناشی از آسیب غشایی است. سطح پراکسیداسیون لیپیدی به موجودیت اسیدهای چرب غیراشباع و سیستم آنتی‌اکسیدانی وابسته است. ماهیان به عنوان منبع غنی از اسیدهای چرب غیراشباع محسوب می‌شوند و با توجه به نقش فلزات سنگین در القای تولید گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن نهایتا آسیب لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA می‌تواند صورت پذیرد (Son et al., 2009). تجمع فلزات سمی در اندام‌های بدن می‌تواند موجب تشکیل گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن و آسیب سلولی و بافتی شود. همچنین فلزات سنگین می‌توانند موجب اختلال در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان شوند که در

حفظ سلول‌های بدن از گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن نقش دارند. یکی دیگر از مکانیسم‌هایی که فلزات سنگین باعث تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌شوند، برهم‌کنش این فلزات با فلزات کمیاب ضروری (مثل آهن، روی و کلسیم) است که می‌تواند فعالیت این دسته از آنزیم‌ها را مختل کند. برخی از سویه‌های Lactobacillus دارای یک سیستم گلوتاتیون توسعه یافته هستند و این سیستم دارای اثر مستقیم در کاهش استرس اکسیداتیو است (Yu et al., 2017). برخی مکانیسم‌های دخیل در جذب زیستی فلزات سنگین توسط باکتری‌های اسید لاکتیک شامل تشکیل کمپلکس، تبادل یونی، جذب، دفع (چلاته‌سازی) و ریزترسیب می‌باشد. گروه‌های هیدروکسیل لایه پپتیدوگلیکان و گروه‌های کربوکسیلات پروتئین‌های دیواره باکتری‌های اسید لاکتیک نقش مهمی در اتصال یون‌های فلزی به این باکتری‌ها دارند (Mrvcic et al., 2012).

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که در مجموع استفاده از باکتری *Lactobacillus casei* در جیره ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌تواند در بهبود شاخص‌های سرمی و کاهش سمیت ناشی از فلز سنگین سرب در جیره این ماهی نقش داشته باشد. لازم به ذکر است که انجام مطالعات مرتبط در این زمینه مانند استفاده از گونه‌های دیگر *Lactobacillus* و همچنین استفاده از غلظت‌های مختلف به درک بهتر از تاثیر عوامل زیستی در پیشگیری از مسمومیت رژیمی با فلزات سنگین و رسیدن به روش‌های زیستی موثر و ارزان در حذف فلزات سنگین کمک شایانی خواهد کرد.

منابع

Alak G., Atamanalp M., Topal A., Arslan H., Kocaman E.M. and Oruc E. 2013. Effect of sub-lethal lead toxicity on the histopathological and antioxidant enzyme activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fresenius Environmental Bulletin, 22: 733–738.

Al-Dohail M.A., Hashim R. and Aliyu-Paiko M. 2011. Evaluating the use of *Lactobacillus acidophilus* as a biocontrol agent against common pathogenic bacteria and the effects on the haematology parameters and histopathology in African catfish *Clarias gariepinus* juveniles. Aquaculture Research, 42(2): 196 –209.

Alizadeh Rudposhti M., Shenavar Masouleh A., Masoumzadeh M., Jalilpoor J., Bazari Moghaddam S., Yeganeh H. and Azizzadeh L. 2017. Effect of lactic Acid bacteria Enterococcus faecalis as a probiotic on blood biochemical and serum factors in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) fingerlings. Journal of Aquaculture Development, 11(1): 89–103.

Alves L., Glover C. and Wood C. 2006. Dietary Pb accumulation in juvenile freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 51(4): 615.

Casillas E., Myers M. and Ames W.E. 1983. Relationship of serum chemistry values to liver and kidney histopathology in English sole (*Parophrys vetulus*) after acute exposure to carbon tetrachloride. Aquatic Toxicology, 3(1): 61–78.

Chelladurai G., Felicitta J. and Nagarajan R. 2013. Protective effect of probiotic diets on haematobiochemical and histopathology changes of *Mystus montanus* (Jerdon 1849) against *Aeromonas hydrophila*. Journal of Coastal Life Medicine. 1(4): 259–264.

Dai W., Fu L., Du H., Jin C. and Xu Z. 2009. Changes in growth performance, metabolic enzyme activities, and content of Fe, Cu, and Zn in liver and kidney of tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to dietary Pb. Biological Trace Element Research, 128(2): 176–183.

Das P., Khowala S. and Biswas S. 2016. In vitro probiotic characterization of *Lactobacillus casei* isolated from marine samples. LWT-Food Science and Technology, 73: 383–390.

Dawood M.A., Koshio S., Ishikawa M. and Yokoyama S. 2015. Interaction effects of dietary supplementation of heat-killed *Lactobacillus plantarum* and β-glucan on growth performance,

digestibility and immune response of juvenile red sea bream, *Pagrus major*. Fish and Shellfish Immunology, 45(1): 33 –42.

Dawood M.A., Koshio S., Ishikawa M., Yokoyama S., El Basuini M.F., Hossain M.S., Nhu T.H., Dossou S. and Moss A.S. 2016. Effects of dietary supplementation of *Lactobacillus rhamnosus* or/and *Lactococcus lactis* on the growth, gut microbiota and immune responses of red sea bream, *Pagrus major*. Fish and Shellfish Immunology, 49: 275–285.

Dutta H.M. and Haghighi A.Z. 1986. Methylmercuric chloride and serum cholesterol level in the bluegill (*Lepomis macrochirus*). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 36(1): 181–185.

Eisler R. 1988. Lead hazards to fish, wildlife, and invertebrates: A synoptic review, Patuxent Wildlife Research Center, Laurel, MD (USA).

Ellman G.L. 1959. Tissue sulfhydryl groups. Archives of Biochemistry and Biophysics, 82(1): 70–77.

Farkas W.R., Stanawitz T. and Schneider M. 1978. Saturnine gout: Lead-induced formation of guanine crystals. Science. 199(4330): 786–787.

Firat O. and Kargin F. 2010. Individual and combined effects of heavy metals on serum biochemistry of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 58(1): 151–157.

Gerbino E., Carasi P., Tymczyszyn E.E. and Gomez-Zavaglia A. 2014. Removal of cadmium by *Lactobacillus kefir* as a protective tool against toxicity. Journal of Dairy Research, 81(3): 280–287.

Javed M., Ahmad M.I., Usmani N. and Ahmad M. 2017. Multiple biomarker responses (serum biochemistry, oxidative stress, genotoxicity and histopathology) in *Channa punctatus* exposed to heavy metal loaded waste water. Scientific Reports, 7(1): 1–11 (1675).

Jezierska B. and Witeska M. 2006. The metal uptake and accumulation in fish living in polluted waters. P: 107–114. In: Twardowska I., Allen H.E., Haggblom M.M. and Stefaniak S. (Eds.). Soil and water Pollution Monitoring, Protection and Remediation. Springer, Netherlands.

Johnson A.M., Rohlfs E.M. Silverman L.M. 1999. Protein. P: 477–540. In: Burtis C.A. and Ashwood E.R. (Eds.). Tietz Textbook of Clinical Chemistry. WB Saunders, Philadelphia.

Kalia K. and Flora S.J. 2005. Strategies for safe and effective therapeutic measures for chronic arsenic and lead poisoning. Journal

of Occupational Health, 47(1): 1–21.

Koroluk M., Ivanova L. and Maiorova I. 1988. The method of definition of the activeness of catalase. Laboratorial Work (1): 16–19.

Latha M. and Pari L. 2003. Preventive effects of *Cassia auriculata* L. flowers on brain lipid peroxidation in rats treated with streptozotocin. Molecular and Cellular Biochemistry, 243(1-2): 23–28.

Martinez C., Nagae M., Zaia C. and Zaia D. 2004. Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. Brazilian Journal of Biology, 64(4): 797–807.

Meldrum J.B. and Ko K.W. 2003. Effects of calcium disodium EDTA and meso-2, 3-dimercaptosuccinic acid on tissue concentrations of lead for use in treatment of calves with experimentally induced lead toxicosis. American Journal of Veterinary Research, 64(6): 672–676.

Mirmazloomi S., Shahsavani D. and Baghshani H. 2015. Studies on the protective effects of ascorbic acid and thiamine on lead-induced lipid and protein oxidation as well as enzymatic alterations in some tissues of *Cyprinus carpio*. Comparative Clinical Pathology, 24(5): 1231–1236.

Monachese M.A. 2012. Sequesteration of lead, cadmium and arsenic by *Lactobacillus* species and detoxication potential. The School of Graduate and Postdoctoral Studies, The University of Western Ontario London, Ontario, Cana, 154P.

Monteiro S.M., Mancera J.M., Fontainhas-Fernandes A. and Sousa M. 2005. Copper induced alterations of biochemical parameters in the gill and plasma of *Oreochromis niloticus*. Comparative Biochemistry and Physiology C, 141(4): 375–383.

Moss D. and Henderson A. 1999. Clinical enzymology. P: 617–677. In: Burtis C.A. and Ashwood F.R. (Eds.). Tietz Textbook of Clinical Chemistry. WB Saunders Company, Philadelphia.

Mrvcic J., Stanzer D., Solic E. and Stehlik-Tomas V. 2012. Interaction of lactic acid bacteria with metal ions: Opportunities for improving food safety and quality. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28(9): 2771–2782.

Nemcsok J. and Hughes G. 1988. The effect of copper sulphate on some biochemical parameters of rainbow trout. Environmental Pollution, 49(1): 77–85.

Paul N. and Sengupta M. 2013. Lead induced overactivation of

phagocytes and variation in enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses in intestinal macrophages of *Channa punctatus*. Modern Research in Inflammation, 2: 28–35.

Peixoto F.P., Carrola J., Coimbra A., Fernandes C., Teixeira P., Coelho L., Conceicao I., Oliveira M.M. and Fontainhas-Fernandes A. 2013. Oxidative stress responses and histological hepatic alterations in barbel, *Barbus bocagei*, from Vizela River, Portugal. Revista Internacional de Contaminacion Ambiental, 29: 29–38.

Planas M., Vazquez J., Marques J., Perez-L Gonzalez M.P. and Murado M. 2004. Enhancement of rotifer (*Brachionus plicatilis*) growth by using terrestrial lactic acid bacteria. Aquaculture, 240(1-4): 313–329.

Rifai N., Bachorik P.S. and Albers J.J. 1999. Lipids, Lipoproteins and Apolipoproteins. Tietz Textbook of Clinical Chemistry: WB Saunders Company, Philadelphia. 927P.

Sacks D.B. 1999. BFACP carbohydrates. P: 787–790. In: Burtis C.A. and Ashwood E.R. (Eds). Tietz Book of Clinical Chemistry. Saunders Company, Philadelphia. 1022P.

Salinas I., Abelli L., Bertoni F., Picchietti S., Roque A., Furones D., Cuesta A., Meseguer J. and Esteban M.A. 2008. Monospecies and multispecies probiotic formulations produce different systemic and local immunostimulatory effects in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Fish and Shellfish Immunology, 25(1-2): 114–123.

Seyedi B., Heidary R. and Tukmechi A. 2013. Dietary effect of *L. casei* and *L. paracasei* as probiotic bacteria with Raftilose as peribiotic on the growth and liver enzymes in rat. Razi Journal of Medical Sciences, 20(107): 1–9.

Shen W.Y., Fu L.L., Li W.F. and Zhu Y.R. 2010. Effect of dietary supplementation with *Bacillus subtilis* on the growth, performance, immune response and antioxidant activities of the shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Aquaculture Research, 41(11): 1691–1698.

Son V.M., Chang C.C., Wu M.C., Guu Y.K., Chiu C.H. and Cheng W. 2009. Dietary administration of the probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper *Epinephelus coioides*. Fish and Shellfish Immunology, 26(5): 691–698.

Tang L., Huang K., Xie J., Yu D., Sun L., Huang Q. and Bi Y. 2017. 1- Deoxynojirimycin from *Bacillus subtilis* improves antioxidant and antibacterial activities of juvenile *Yoshitomi tilapia*. Electronic

Journal of Biotechnology, 30: 39–47.

Tewari H., Gill T.S. and Pant J. 1987. Impact of chronic lead poisoning on the hematological and biochemical profiles of a fish, *Barbus conchonius* (Ham). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 38(5): 748–752.

Thy H.T.T., Tri N.N., Quy O.M., Fotedar R., Kannika K., Unajak S. and Areechon N. 2017. Effects of the dietary supplementation of mixed probiotic spores of *Bacillus amyloliquefaciens* 54A, and *Bacillus pumilus* 47B on growth, innate immunity and stress responses of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). Fish and Shellfish Immunology, 60: 391–399.

Toutou M.M., Soliman A.A.A., Farrag M.M.S. and Abouelwafa A.E. 2016. Effect of probiotic and synbiotic food supplementation on growth performance and healthy status of grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes, 1844). International Journal of Ecotoxicology and Ecobiology, 1(3): 111–117.

Vaglio A. and Landriscina C. 1999. Changes in liver enzyme activity in the teleost *Sparus aurata* in response to cadmium intoxication. Ecotoxicology and Environmental Safety, 43(1): 111–116.

Velmurugan B., Selvanayagam M., Cengiz E.I. and Uysal E. 2008. Levels of transaminases, alkaline phosphatase, and protein in tissues of *Clarias gariepienus* fingerlings exposed to sublethal concentrations of cadmium chloride. Environmental Toxicology, 23(6): 672–678.

Vine N., Leukes W., Kaiser H., Daya S., Baxter J. and Hecht T. 2004. Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. Journal of Fish Diseases, 27(6): 319–326.

Yu L., Zhai Q., Zhu J., Zhang C., Li T., Liu X., Zhao J., Zhang H., Tian F. and Chen W. 2017. Dietary *Lactobacillus plantarum* supplementation enhances growth performance and alleviates aluminum toxicity in tilapia. Ecotoxicology and Environmental Safety, 143: 307–314.

Zhai Q., Tian F., Zhao J., Zhang H., Narbad A. and Chen W. 2016. Oral administration of probiotics inhibits absorption of the heavy metal cadmium by protecting the intestinal barrier. Applied and Environmental Microbiology, 82(14): 4429–4440.

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 8, No. 1, Spring 2020

Research Paper

The survey on effect of different *Lactobacillus casei* concentrations on serum antioxidative defense status and biochemical parameters of rainbow trout exposed to foodborne lead toxicity

Takavar Mohammadian[1]*, Reza Ghanei-Motlagh[2], Hossein Khaj[3], Sadegh Robatkarimi[4], Ali Ziagham[4], Amin Heidari[4]

Received: March 2019 Accepted: July 2019

Abstract

This study was aimed to investigate the effects of different concentrations of *Lactobacillus casei* on some serum biochemicals and antioxidant factors in rainbow trout exposed to foodborne lead toxicity. For this purpose, 375 juvenile fish (15±4.6g) were randomly divided into five groups in three replications. Group 1, 2 and 3 were respectively fed with a diet containing 5×10^6, 5×10^7 and 5×10^8 CFU/g *Lactobacillus casei* throughout the experiment. Group 4 (negative control) was fed with a basal diet (no probiotic and lead) during all experiment period. Group 5 (positive control) was fed with the basal diet for 45 days and was subsequently fed with diets containing 500 µg/kg lead nitrate similar to the probiotic groups for 21 days. Blood sampling was performed to measure the parameters on days of 0, 45, 52, 59 and 66. The results showed that LDH, cholesterol and triglyceride levels were significantly reduced in most probiotic treatments after probiotic consumption for 45 days compared to a negative control group ($P<0.05$). After exposure to lead, serum ALP and LDH values in group 2 were significantly lower than group 5 ($P<0.05$). In group 2, GSH enzyme levels significantly increased compared to group 5 on day 52 ($P<0.05$). The findings of this study showed that supplementing diet with *Lactobacillus casei* in rainbow trout can be effective in preventing the chronic effects of lead poisoning by improving the biochemical and antioxidant indices. It seems that level of 5×10^7 CFU/g of probiotic bacteria had an ameliorative effect on improving the biomarkers.

Key words: *Probiotic, Lead, Blood Serum, Trout,* Lactobacillus casei.

1- Associate Professor in Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
2- Ph.D. in Aquatic Health, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
3- Assistant Professor in Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
4- Ph.D. Student in Veterinary Medicine, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

*Corresponding Author: t.mohammadian@scu.ac.ir