مطالعه تجربی تغییرات ناشی از مسمومیت حاد سرب در یک دوره ٤٨ ساعته در آبشش ماهی زبرا (Danio rerio) تغذیه شده با لاکتوباسیلوس فرمنتوم (*Lactobacillus fermentum*)

فرانک تهرانی[۱]، نجمه هادی زاده شیرازی[۱*]، رضا کاظم پور[۱]

چکیده

وجود زیست یارها در رژیم غذایی جانوران منجر به افزایش سطح ایمنی در آنها می شود. هدف از این مطالعه بررسی اثر مکمل غذایی باکتری لاکتوباسیلوس فرمنتوم به عنوان زیست یار بر کاهش آسیبهای بافتی ناشی از دوز کشنده سرب در آبشش ماهی زبرا بوده است. برای این منظور ۳٦۰ قطعه ماهی زبرا به دو گروه تقسیم و برای مدت ٦۰ روز با غذای تجاری (گروه کنترل) یا غذای تجاری بهبود یافته با زیست یار (گروه آزمون) تغذیه شده اند. پس از این زمان هر دو گروه در مجاورت ۰/۳ میلی گرم بر لیتر سرب قرار گرفته و زنده مانی، جذب فلز در بافتهای کبد و آبشش و تغییرات بافتی آبشش آنها در مدت ٤٨ ساعت مورد مطالعه قرار گرفته است. بر اساس نتایج، ماهی های های گروه آزمون نسبت به گروه کنترل بیش از ٢٤ ساعت قادرند دوز کشنده سرب را تحمل کنند. طی ٤٨ ساعت مسمومیت، میزان جذب فلز در هر دو بافت کبد و آبشش برای گروه آزمون به صورت قابل توجهی کمتر از گروه کنترل بوده و بعلاوه آسیبهای بافتی شامل دیلاتاسیون وریدی، فیوژن لاملا و تلانژکتازی نیز در گروه آزمون به صورت معنی داری کمتر از گروه کنترل بوده و هایپرپلازی سلولهای پوششی نیز در آنها مشاهده نشده است. به این ترتیب می توان گفت که تغذیه با زیست یار می تواند اثرات سمی ناشی از دوز کشنده سرب را در ماهی به مقدار قابل توجهی کاهش دهد.

واژگان کلیدی: *سرب، دوز کشنده، زیست یار، لاکتوباسیلوس فرمنتوم، ماهی زبرا.*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۳/۲

مقدمه

امروزه بدلیل صنعتی شدن بسیاری از جوامع از جمله ایـران، آلودگیهای زیست محیطی از جمله الودگی به فلزات سـنگین مانند سرب، جیـوه، کـادمیوم و روی بـه یکـی از مهمتـرین معضلات جوامع صـنعتی تبـدیل شـده اسـت. افـزایش ایـن فلزات می توانند اثرات جبران ناپذیری بر محیط زیست و و سلامت جانوران و نیز انسان داشته باشد و به صورت مستقیم و غیر مستقیم موجب افزایش مرگ و میر در میان انسانها شود. یکی از مهمترین فلزات آلاینده، فلز سرب است (۱). فلز سرب، از عناصر شیمیایی واسطه در جدول تناوبی با نماد Pb و عدد اتمی ۸۲ است. این فلز عنصری سمی و سنگین با رنگ خاکستری است و کاربردهای فراوانی در صنعت ساختمان سازی، خازنهای اسیدی، اسلحه سازی، لعاب سرامیک و لوله های انتقال اب و ... دارد(۲). تا کنون نقش زیستی و متابولیکی مشخصی برای این فلز شناخته نشده است و از این رو پس از ورود به بدن در بافتهای حیاتی مانند کبد تجمع پیدا می کند. تجمع این فلز در بدن انسان می تواند در عملکرد ریه، کبد، لوله گوارش و سیستمهای قلبی عروقی و عصبی اختلال ایجاد کند. مطالعات Sanders و همکارانش در سال ۲۰۰۹ نشان داد که غلظتهای کم سرب نه تنها بهره هوشی را در کودکان کاهش می دهد، بلکه با اثر بر پوشش میلین اعصاب محیطی، منجر به کاهش توان ماهیچه ها و توان حرکتی می شود (۳). همچنین دریافت کمتر از ٦۰ µg/dL فلز سرب بروز نارسایی های کلیوی و آسیب های برگشت ناپذیر در گلومرول و یا لوله های پروگزیمال و دیستال نفرونها می شود (٤). در آبشش ماهی های تیمار شده با دوزهای غیر کشنده سرب آثاری از دژنره شده لاملاهای ثانویه و هایپرتوفی سلولهای اپیتلیالی مشاهده شده است (۵).

۱-گروه زیست شناسی، واحد رودهن، دانشگاه ازاد اسلامی، رودهن، ایران(nhadizade@riau.ac.ir)

باکتریهای مختلفی قادر به حذف زیستی فلزات سنگین هستند که از ان جمله می توان به لاکتو باسیلوسها اشاره کرد که از انها به عنوان زیست یارها نیز یاد می شود.

زیست یارها، میکروارگانیسم هایی هستند که درصورت مصرف توسط انسان یا حیوان، با اثر بر روی فلورمیکروبی بدن باعث اعمال اثرات مفید بر سلامتی میزبان می شوند. اکثر زیست یارها متعلق به گروه بزرگی از باکتری ها به نام *لاکتوباسیلوس* هستند. این باکتریها جزء باکتری های گرم مثبت و جزءاصلی فلور میکروبی روده انسان بوده و در آنجا زندگی همسفرگی بی ضرری دارند (٦). باور موجود در مورد اثرات مفید زیست یار ها ، بر پایه این واقعیت قرار دارد که این باکتری ها می توانند میزان جذب بسیاری از مواد مغذی را افزایش داده و به دنبال ان سیستم ایمنی را تقویت کنند (۷). مشاهده شده است که مصرف دائم زیست یار ها در کاهش میزان بروز بیماریهای مختلف موثر است که این تاثیر در جمعیت های دارای خطر بالا (مانند کودکان بستری در بیمارستان، کودکانی که شیر مادر مصرف نمی کنند یا در شرایط محروم به سر می برند) بارزتر است. فراورده های زیست یاری در بازار تجاری به اشکال قرص، کپسول، پودر، ماست های غنی شده، شیر و پنیر به فروش می رسند. اغلب زیست یارهایی که تاکنون مورد مطالعه قرار گرفته اند یا در بازار موجودند، ایمن هستند و در هزاران نفر از افرادی که تاکنون مصرف این فراورده ها را گزارش کرده اند، هیچ گونه عارضه جانبی آشکاری از خود نشان نداده اند (۸).

مطالعات گسترده ای در زمینه اثرات زیست یارها برای افزایش مقاومت و کاهش اثرات سمیت به فلز سرب در موجودات زنده صورت گرفته است. از انجا که ازمایش روی جوندگان، دوزیستان، پرندگان و پستانداران رده پایین مانند قورباغه، موش، خرگوش و جوجه پرهزینه، وقت گیر و دارای موانع قانونی و اخلاقی است. بسیاری از مطالعات روی نماتودها و یا کرم میوه صورت می گیرد. ماهیها نیز در این زمینه به فراوانی مورد استفاده قرار گرفته اند. یکی از ماهی هایی که برای این منظور استفاده می شود ماهی Zebrafish است. ماهی زبرا یک مدل مهره دار مناسب برای ارزیابی سمیت است. اندازه کوچک، پرورش اسان از مزایای استفاده از ماهی زبرا به عنوان یک مدل سم شناسی است (۹).

Zebrafish (Danio rerio) یکی از ماهیهای مدلی است که به گستردگی در مطالعات تکاملی، جنین شناسی و واکنش نسبت یه انواع سموم مورد استفاده قرار می گیرد (۱۰). از دیدگاه ماهی شناسی، ارزیابی موتاسیونهای ژنتیکی ایجاد شده در این نوع از ماهی بدلیل لقاح خارجی، باروری زیاد و رشد و نمو سریع و نقشه ژنومی شناخته شده بسیار ساده تر از ارزیابی ژنتیکی موتاسیونها در جانورانی مانند موشها می باشد، چراکه فرایند لقاح در ماهیها خارج از بدن رخ داده و دستکاری ژنتیکی و ایجاد موتاسیونهای تصادفی و نقطه ای آن باکمک اتیل نیتروز اوره نسبت به جنین موش ساده تر است. بعلاوه بسیاری از فنوتیپهای موتاسیونی بیماری زا شناخته شده در ماهی زبرا در انسان نیز دیده می شود (۱۱). از این رو ماهی زبرا به خوبی می تواند مدلی مناسب برای مطالعه بیماریهای خونی یا اختلالات هماتوپوئیتیک باشد (۱۲). همچنین قلب جنین این ماهی تشابه بسیاری از نظر ساختار دهلیز و بطن، زمان اغاز طپش، تعداد طپش با قلب جنین انسان در سه هفتگی دارد و به همین دلیل مطالعه قلب این ماهی به عنوان مدلی شبیه سازی شده از قلب جنین انسان اهمیت فراوانی دارد(۱۳). بعلاوه برخلاف قلب موش، بقاء قلب و جنین به گردش خون در دوران جنینی این ماهی وابسته نیست و به همین دلیل مطالعه ان ساده تر است. علاوه بر دو مورد فوق از این ماهی به عنوان مدل برای مطالعه اختلالات کلیوی، اختلال در غدد جنسی و سیستم عصبی نیز استفاده می شود (١٤).

با توجه به اهمیت افزایش غلظت فلز سرب در بدن انسان و محیط زیست و ابهای سطحی و نیز افزایش نیاز به حذف این الاینده سرطانزا و کشنده از محیط و نیز یافتن روشی جهت افزایش مقاومت بدن موجودات مختلف از جمله انسان در برابر این فلز، در این تحقیق هدف ان است تا با بررسی میزان مقاومت ماهی زبرا تغذیه شده با لاکتوباسیلوس فرمنتوم به عنوان زیست یار در برابر دوز کشنده سرب پتانسیل این باکتری برای افزایش زندمانی این ماهی و کاهش آسیبهای بافتی در آبشش ماهی زبرا مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش‌کار

مواد

محلول ۱۰ mg/L استات سرب ($Pb(C_2H_3O_2)_2$)، شرکت سیگما) در اب دیونیزه تهیه شده و برای تهیه غلظتهای کمتر، رقیق شده است.

تهیه محلول زیست یار: سویه باکتریایی *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* (ATCC 14931) به عنوان مکمل زیست یار از مرکز تحقیقات علمی و صنعتی ایران به صورت پودر لیوفیلیزه خریداری شده و سپس روی پلیت حاوی محیط کشت MRS- آگار به مدت ٤٨ ساعت در دمای ٣٧ درجه سانتیگراد کشت داده شد. برای تهیه مکمل غذایی زیست یار، یک کلنی از باکتری به ۱۰۰ سی سی محیط کشت MRS منتقل شده و برای ٢٤ ساعت در ٣٧ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شده است. سوسپانسیون باکتریایی به مدت ۱۵ دقیقه در g ۸۰۰۰ سانتیفیوژ شده و رسوب حاصل با بافر سالین رقیق و برای ادامه مطالعه مورد استفاده قرار گرفته است. تعداد باکتری های موجود در محلول با استفاده از روش تهیه رقتهای سریال میکروبی و به منظور تهیه مکمل زیست یار، مقدار ۷×۱۰^{٤} cfu/g از باکتری به غذای تجاری ماهی ها اضافه و اجازه داده شده تا در دمای ازمایشگاه به مدت ۲۰ ساعت کاملا خشک شوند.

تیمارها: در این مطالعه ٣٦٠ قطعه ماهی زبرا (Danio rerio) با میانگین وزن۰/۲۳± ۱/۰٦ گرم از مرکز فروش ماهی زبرا (تهران) خریداری شده و جهت سازگاری با شرایط آزمایشگاه (دمای ۲۰ درجه سانتیگراد و pH = ۷) و رفع استرس به مدت دو هفته قبل از انجام تیمارها نگهداری شدند. در طی دوره آزمایش، ماهیان دو بار در روز با غذای تجاری (حاوی ۳۰٪ پروتئین) غذادهی شدند و سیفون کردن باقیمانده های غذا و سایر مواد زائد روزانه انجام شد. سیکل نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت خاموشی و دمای محیط ازمایشگاه ۰/۲± ۲۰ درجه سانتیگراد در طول مدت تحقیق حفظ شده است. پس از پایان دوره سازگاری، ماهیان به طور تصادفی در دو گروه آزمون و کنترل (هرگروه دارای سه تکرار و ٦٠ ماهی در هر تکرار) به صورت زیر تقسیم شدند: گروه کنترل که تا پایان دوره تحقیق فقط با غذای تجاری تغذیه شدند و گروه آزمون که به مدت ٦٠ روز قبل از مسمومیت با سرب، با غذای تجاری حاوی $۱۰^{٤}$ cfu/g× ۷ باکتری *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* به عنوان مکمل غذایی تغذیه شدند.

پس از ٦٠ روز تغذیه و نگهداری ماهی ها، هر دو تیمار کنترل وآزمون به مدت ٤٨ ساعت با دوز کشنده ۰/۳ mg/l استات سرب مسوم شدند. در طی این مدت ماهی ها با کمک تغذیه تجاری غذا دهی شده بودند و بررسی و نمونه گیری هر ۱۲ ساعت انجام و نمونه های مرده از آکواریوم ها خارج شده اند.

مطالعه هیستوپاتولوژی: برای انجام مطالعات هیستوپاتولوژی آبشش، در بازه زمانی ٢٤ تا ٤٨ ساعت پس از مسمومیت با سرب، ماهی های زنده روی یخ کشته شده و آبشش آنها جداسازی و پس از توزین در فرمالین ۱۰درصدتثبیت شدند. نمونه‌های تثبیت شده با روش معمول آبگیری و آماده سازی شده و پس از قالب گیری با پارافین، توسط میکروتوم برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرومتر تهیه

گردید و رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین انجام گرفت. در نهایت اسلایدهای تهیه شده توسط میکروسکوپ نوری مورد مطالعه و تصویر برداری قرار گرفت. مقایسه طول لاملا با استفاده از عدسی چشمی مدرج و اسلاید کالیبره شده صورت گرفته است

اندازه گیری مقدار سرب در بافت آبشش:به منظور بررسی میزان تجمع زیستی فلز سرب، ٤٨ ساعت بعد از مسمومیت، از هر دو گروه شاهد و ازمون، تصادفا سه نمونه انتخاب شدند. سپس بافت آبشش و کبد جداسازی شده به وسیله اسید نیتریک و آب اکسیژنه عمل هضم آنها در دستگاه تمام خودکار هضم با سیستم مایکروویو صورت گرفته و برای تعیین میزان سرب از دستگاه طیف سنجی جذب اتمی (Perkin Elmer) مجهز به کوره استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

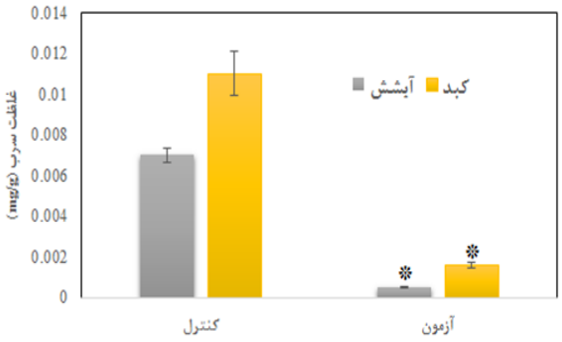
روش Two-way NPMANOVA یک روش غیر پارامتریک برای بررسی تفاوت معنی داری بین دو یا چند گروه می باشد که مقادیر F را مشابه آنالیز ANOVA ولی برای دادههای چند متغیره محاسبه ی کند و ارزش P در این روش نیز براساس آزمون Permutation با ده هزار تکرار بیان میگردد. این آنالیز در نرم افزار Past برای بررسی اثرات متقابل بین تیمارهای مختلف انجام شد.

نتایج

نتایج حاصل از تیمار ماهی ها با تغذیه زیست یار نشان داد که در طی ٦٠ روز تغذیه ماهی ها، هیچگونه مرگ و میری مشاهده نشده ماهی ها به خوبی با غلظت انتخاب شده زیست یار سازش پیدا کرده اند. این مساله نشان می دهد که افزودن فلز سرب به اکواریوم ها تنها دلیل ایجاد مرگ و میر در آنها بوده است. همچنین وزن ماهی های دو گروه کنترل و آزمون، تفاوت معنی داری با یکدیگر نداشتند که به این معنی است که تغذیه با زیست یار در این غلظت بر رشد و افزایش وزن ماهی زبرا تاثیر معنا داری ندارد.

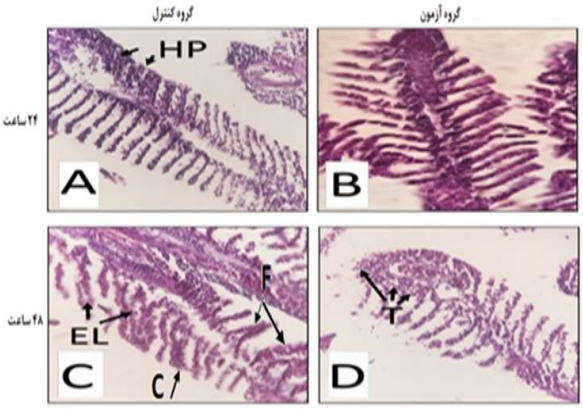
پس از آغاز مسمومیت با سرب، پاسخهای رفتاری ماهی های هر دو گروه به صورت روزانه و در طول تست سمیت حاد مشاهده و بررسی شد. نتایج این مشاهدات نشان داد که ٢٤ ساعت پس از دریافت سرب، از توانایی حرکت ماهی ها در گروه کنترل بطور قابل توجهی کاسته شده و الگوی حرکت و رفتار آنها به شدت تحت تأثیر سرب قرار گرفتند. بطوریکه ماهیها روی سطح آب بیشتر شنا کرده و مشخصا در مشاهده چشمی علائم ظاهری، تجمع مخاط برروی بافت آبشش و نیز پرخونی آبششها مشاهده شد که گواهی بر اثرگذاری فلزات سنگین بر بافت مورد نظر بود. سرانجام بیشتر نمونه ها پس از ٤٨ ساعت تعادل و آگاهی خود را از دست دادند و به صورت خوابیده کف آکواریوم قرار گرفته و در نهایت مرگ ومیر در آنها به فراوانی دیده شد. این درحالی است که ماهی های گروه آزمون به مدت ٢٤ ساعت پس از قرار گرفتن در معرض سرب، بدون عارضه قابل توجه شنا کردند و عوارض جانبی جدی مسمومیت، پس از این دوره مشاهده شد.

نتایج حاصل از اندازه گیری تجمع فلز سرب در بافت کبد و آبشش ماهی زبرا در تصویر١ آورده شده است. بر اساس یافته های حاصل از این مطالعه غلظت فلز سرب در هر دو تیمار کنترل و آزمون، در بافت کبد به مراتب بالاتر از بافت آبشش بوده است. مقایسه میزان انباشت فلز سرب در بافتهای مورد بررسی نشان داد که اختلاف در توزیع بین بافتهای مختلف ارزیابی شده بین دو گروه از نظر آنالیز آماری معنی دار بودند ($p < ٠/٠٥$).



نگاره۱. غلظت سرب در بافت آبشش و کبد در دو گروه آزمون و کنترل بر حسب میلی گرم بر گرم ماده خشک. علامت * نشاندهنده معنی دار بودن ($p < ۰/۰۵$) اختلاف غلظت سرب در دو گروه آزمون و کنترل است.

برای مطالعه تغییرات بافت آبشش در هر دو گروه، نمونه ها در فواصل مختلف (۲٤ و ٤۸ ساعت پس از مواجهه) از اکواریوم جداسازی شده و بافت آبشش آنها به طور ویژه مورد بررسی قرار گرفت (نگاره ۲). هایپرپلازی سلول اپیتلیال ، تلانژکتازی و چسبندگی لاملا و کنده شدن سلولهای اپیتلیالی طی ۲٤ تا ٤۸ ساعت پس از مسمومیت در گروه کنترل مشاهده شد. در این گروه، طی ۲٤ ساعت اول لاملاهای اولیه و ثانویه آبشش حالت طبیعی داشتند و هیچگونه آثار آسیب شناختی قابل توجه و معنی دار بافتی قابل مشاهده نبود. جدا شدن سلولهای اپیتلیال، هایپرپلازی، چسبندگی لاملای ثانویـه و افزایش اندازه لاملا و چماقی شدن پس از ۲٤ ساعت در نمونه کنترل قابل تشخیص بود و در نهایت پس از ٤۸ ساعت، در ۲± ۷۸٪ نمونه ها هایپرپلازی، ۳± ۷۳٪ دیلاتاسیون وریدی و ۲± ۵۹٪ کنده شدن سلولهای اپیتلیالی و ۵ ± ٤۰ ٪ اتصال لاملا قابل تشخیص بود. این درحالی بود که در ۲٤ ساعت اول پس از دریافت سرب در گروه آزمون، تغییرات معنی داری مشاهده نشده و پس از ۲٤ساعت مسمومیت، دیلاتاسیون وریدی (٤ ± ۲۱ ٪) اتصال لاملا (کمتر از ۵٪) و تلانژکتازی (۳± ۱۷٪)در آبشش ماهی ها دیده شد. در این گروه هایپرپلازی مشاهده نشده است (نگاره۳). نتایج مقایسه آماری تفاوت معنی داری را از نظر آسیبهای بافتی تلانژکتازی و فیوژن لاملا بین دو گروه کنترل و آزمون پس از ۲٤ ساعت مسمومیت نشان نداد (F =۰/۱٤۳ و P =۰/۱۹۲). درحالی که با افزایش زمان مسمومیت تا ٤۸ ساعت، بین دو گروه کنترل و آزمون از نظر میزان آسیبهای بافتی مختلف ناشی از مسمومیت تفاوتهای معنا داری وجود داشت (F =٤/۳۵ و P =۰/۰۰۰۷).

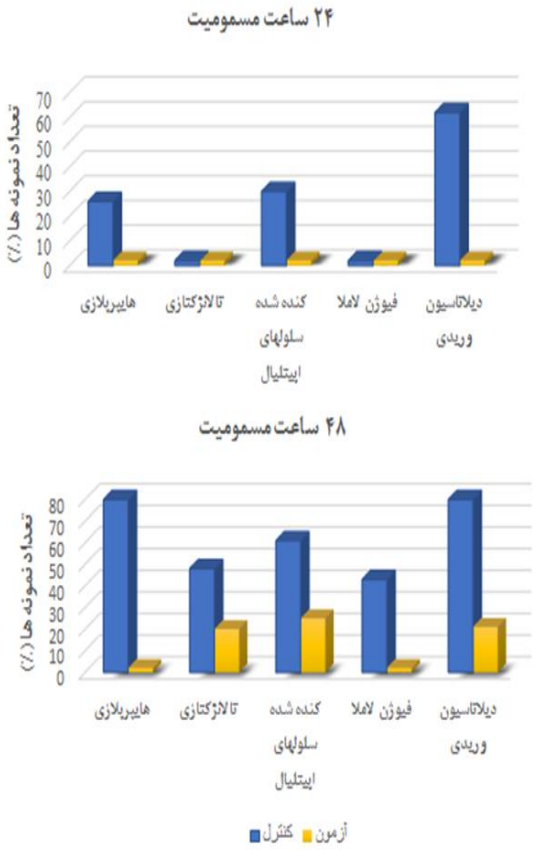


نگاره ۲. بررسی هیستوپاتولوژی آبشش در گروه کنترل (A)(10X) و (C (40X)) و آزمون (Bو D (10X)) طی ۲٤ تا ٤۸ ساعت مسمومیت با ۰/۳ میلی گرم بر لیتر سرب. HP: هیپرپلازی سلول های پوششی،T: تلانژکتازی، EL: کنده شدن سلول های اپیتلیال، F: اتصال لاملا و C: چماقی شدن.(رنگ آمیزی H&E).

بحث

آلاینده های فلزی بویژه فلزات سنگینی مانند سرب همواره نگرانی های فراوانی را برای محققان عرصه سلامت و محیط زیست ایجاد کرده است. افزایش بی رویه غلظت این فلزات در ابهای سطحی مناطق صنعتی موجب شده است تا جمعیت بزرگی از جانوران ساکن آبهای مناطق آلوده درگیر بسیاری از بیماریهای متابولیک و یا ژنتیکی شوند چرا که این فلزات در بدن متابولیزه نشده و از آنجا که نقش زیستی شناخته شده ای ندارند، در اندامهای حیاتی مانند کبد و یا

کلیه تجمع یافته و با اختلال در عملکرد این اندامها جانوران مصرف کننده را به نابودی می کشانند (۱۵ و۱٦).



نگاره۳. درصد فراوانی آسیبهای مختلف بافتی پس از ۲٤ و ٤۸ ساعت مسمومیت با سرب در ماهی زبرا.

مطالعات نشان داده اند که استفاده از باکتریهای خانواده لاکتوباسیلوس که به عنوان زیست یارها نیزمعروفند می تواند تاثیرات مفید و قابل توجهی را در افزایش مقاومت آبزیان به مسمومیت های مزمن و طولانی مدت فلزی ایجاد کند. نتیجه تحقیقات گیری و همکارانش نشان داده است که استفاده از *L. reuteri* به عنوان یک مکمل غذایی می تواند زندمانی و پاسخهای ایمنی ماهی کپور در برابر دوزهای مزمن سرب را افزایش دهد (۱۷). همچنین باکتری *Lactobacillus acidophilus* می تواند پاسخهای ایمنی را در ماهی تیلاپیای رشد کرده در آبهای الوده به کادمیوم، بهبود ببخشد (۱۸). تغذیه با زیست یارها علاوه بر اینکه در افزایش مقاومت آبزیان در برابر آلاینده های محیطی و یا عوامل پاتوژن موثر است، در بهبود کیفیت و کمیت رشد آنها مانند افزایش وزن، قد و سرعت رشد ماهی ها نیز اثرات مثبتی دارد (۱۹و ۱٦). نتایج تحقیقات نجفی و همکارانش (۲۰۲۰) نشان داد که رژیم غذایی غنی شده با زیست یار ها موجب افزایش معنی دار رشد در ماهی قزل آلای رنگین کمان شده است (۲۰). این نتیجه برای ماهی ازاد دریای خزر نیز دیده شده است (۲۱). همچنین بچه ماهی کپورخزری نیز با دریافت ۰/۱۵-۰/۱ درصد مکمل پروبیوبیوتیک تجاری رشد بهتری داشته و شاخص های سلامتی بالاتری نیز از خود نشان داده اند (۲۲).

نتایج حاصل از بررسی اثرات باکتری *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* به عنوان مکمل غذایی بر ویژگیهای مورفولوژیکی ماهی زبرا در تحقیق حاضر نشان داد که علی رغم تغذیه طولانی مدت ماهی زبرا درگروه آزمون، با این باکتری، نمونه ها تغییرات موفولوژیکی معنی داری نسبت به گروه کنترل از خود نشان ندادند. به نظر می رسد این امر بدلیل استفاده از غلظت باکتری کمتر نسبت به سایر مطالعات مرتبط است. غلظت باکتری مورد استفاده در اغلب تحقیقاتی که از زیست یار برای بهبود رشد ابزیان استفاده کرده اند در حدودهcfu/g ۱۰۸-۱۰٦ باکتری بوده است (۲۳).

ماهی های گروه کنترل در ساعات اولیه پس از مسمومیت، انواع علائم مسمومیت حاد مانند تغییر الگوی شناکردن ، شـنای نـامنظم و به پهلو و اختلالات عصبی را از خود نشان دادند که با افزایش زمان مسمومیت این عوارض شدت بیشتری پیدا کرد.این مشاهدات با نتایج حاصل از سایر مطالعات مسمومیت فلزی در ابزیان همخوانی دارد. بر اساس استانداردهای جهانی، حداکثر غلظت مجاز سرب در آبهای سطحی، ۰/۰۲ میکروگرم بر لیتر است و غلظتهای بالاتر ۰/۱ میلیگرم بر لیتر می تواند موجب مرگ ماهی زبرا در بازه

زمانی ٢٤ تا ٩٦ شود. غلظتهای زیر کشنده و کشنده سرب معمولا عوارضی همچون از دست رفتن توانایی تولید مثل، تغییر شکل اسکلت، تغییرات در فاکتورهای خونی، افزایش حساسیت به عوامل عفونی و بالاخره مرگ را احتمالا به دلیل آسیب به سیستم ایمنی در ماهی ایجاد می کند (٢٤). وجود حداکثر ۱۰ میلی گرم بر لیتر سرب موجب افزایش سطح کلسترول و توتال پروتئین سرمی ماهی فیتوفاگ می شود (۲۵). مطالعات بافت شناسی نیز نشان می دهد که وجود سرب در آب ماهی کلمه (Rutilus rutilus caspius) منجر به بروز ادم، فیلامنت ولاملای ثانویه، نکروز سلولی، هایپرتروفی وهایپرپلازی، پرخونی وخونریزی، هجوم سلولهای آماسی، چسبندگی در لاملای ثانویه،تجمع موکوس، تلانژیکتازی در آبشش می شود (٢٦). با وجود سمیت اثبات شده سرب، در ماهی های گروه آزمون، تا ٢٤ ساعت اولیه پس از دریافت سرب تغییر معنی داری در رفتار نمونه ها مشاهده نشد و اولین نشانه های رفتاری مسمومیت پس از ٢٤ ساعت بروز کرد.

جهت بررسی دلائل مقاومت ماهی های گروه آزمون، میزان جذب سرب در آبشش و کبد ماهی های هر دو گروه اندازه گیری شد. غلظت فلز سرب جذب شده در بافت کبدگروه کنترل مشخصا بالاتر از بافت آبشش بوده است. چنین الگویی در بسیاری از مطالعات دیگر که طیف وسیعی از گونه های ماهی را پوشش می دهد مشاهده شده است بطوریکه بافتهای کبد، کلیه، ماهیچه و آبشش به ترتیب بیشترین پتانسیل را برای جذب فلزات سنگین دارند (۲۷). مقدار سرب جذب شده در هر دو بافت کبد و آبشش گروه آزمون به مراتب کمتر از گروه شاهد بوده است. توانایی بالای کبد در جذب فلزات سنگین، نتیجه فعالیت متالوتیونینها است . این پروتئینها می توانند به برخی فلزات مانند مس ، کادمیوم، سرب و روی متصل شوند و به این ترتیب سمیت آنها را کاهش می دهند. زیست یارهایی مانند لاکتوباسیلوس پلانتاروم قادر است سنتز و بیان پروتئین متالوتیونین را در سلولهای کبدی القا کرده و این امر نه تنها جذب کبدی فلزات را کاهش می دهد بلکه در افزایش قدرت بافری خون نیز موثر است (۲۸). بعلاوه مطالعات نشان داده اند که زیست یارها باسلولهای ایمنی مانند مونوسیت ها و ماکروفاژها به منظور افزایش پاسخ ایمنی ذاتی ارتباط برقرار می کنند(۲۹). این میکروارگانیزمها می توانند به صورت فعالی باعث شروع تولید سلول های فاگوسیتوزی در میزبان و افزایش فرآیند بیگانه خواری خصوصاً توسط گروه لاکتوباسیلوس ها شوند (۲۰). زیست یارها همچنین به طور منفرد یا ترکیبی باعث آزاد شدن سطوح بالای لیزوزیم در ماهیان استخوانی می شوند (۳۰). همچنین به نظر می رسد تغذیه طولانی مدت با زیست یارها، فلور روده را در ماهی ها تغییر داده و این امر موجب می شود تا مقدار کمتری فلز سنگین از روده آنها جذب شود بعلاوه این نوع رژیم غذایی کمک می کند تا سطح پروتئینهایی مانند سیتوکین IL-1β و TNF-α که در نتیجه مسمومیت از سلولهای مونوسیت و ماکروفاژها ترشح می شود افزایش یافته و در نتیجه پاسخهای چندگانه ایمنی را در کبد و دستگاه گردش خون ایجاد کند (۳۱).

در چنین شرایطی انتظار می رود تا بافتی مانند آبشش که جزء اولین بافتهایی است که در معرض مسمومیت قرار میگرد، آسیب کمتری را نسبت به حالت عادی متحمل شود (۳۲). مطالعات نشان داده اند که تغذیه با انواع زیست یارها حتی برای دوره های دو هفته ای، سطح ماکروفاژها و لنفوسیتها و بطورکلی ایمنی هومورال را افزایش داده و بروز التهاب در بافتهایی مانند آبشش و کبد را کاهش میدهد و همین امر ماهی ها را در برابر استرسهای محیطی مقاوم می کند(۳۳). همچنین استفاده از مکمل پروبیوتیک *P.acidilactici* در تیلاپیای قرمز در حال رشد به مدت ۳۲ روز و برررسی وضعیت فلور میکروبی و ایمنی سیستمیک

نشان داد سطوح لوکوسیت روده بعد از اعمال پروبیوتیک بدون تغییر باقی میماند، اما تاثیرات قابل توجهی در ایمنی سیستمیک مشاهده شد(۳٤). بررسی لامهای بافت شناسی گروه کنترل و آزمون در طول مدت مسمومیت نتایج فوق را تایید می کند. بطوریکه بررسی لامهای آبشش گروه کنترل، نشان داد که با افزایش زمان مسمومیت شدت آسیبهای بافتی نیز به صورت معنی داری افزایش پیدا می کند. آسیبهایی مانند هایپرپلازی و جدا شدن سلوهای اپیتلیال در ساعات اولیه مسمومیت ناشی از تلاش بافت آبشش برای کاهش دریافت مسمومیت از محیط آبی خارجی است (۳۵). مطالعات نشان داده اند که در نتیجه مسمومیت با فلز سنگین، اپیتلیوم آبشش به شدت تحت تاثیر محیط قرار می گیرد و در نتیجه رسوب مواد در سرپوش آبششی و خونریزی مویرگهای آبششی در روزهای بعدی مسمومیت در آبشش دیده می شود (۳٦). علاوه بر فلزات سنگین سایر استرسهای محیطی نیز می توانند تغییراتی در دیلاتاسیون رگهای خونی و کانالهای حاشیه ای و در نهایت خونریزی و انوریسم ایجاد کنند و بنابراین این تغییرات برای الودگی با فلز اختصاصی نیستند (۳۷). این درحالی است که نمونه های گروه آزمون در بازه زمانی طولانی تری آسیب های بافتی ناشی از مسمومیت را نشان داده و مقاومت بیشتری نسبت به دوز کشنده سرب داشتند. این مقاومت در برابر الودگی های فلزی در مطالعه خالقی و همکارانش (۲۰۱۹) در ماهی کپور تغذیه شده یا پروبیوتیک و مسموم شده با نانوذرات نقره نیز مشاهده شده است. نتایج بررسی بیان ژنهای افتراقی این مطالعه نشان داد که ژن TNF-1α در نتیجه این تغذیه افزایش پیدا می کندو همین امر مقاومت ماهی را در برابر الاینده فلزی افزایش می دهد (۳۸).

براساس انالیزهای آماری دو گروه آزمون و کنترل درطی ۲٤ ساعت اول مسمومیت میتوان نتیجه گرفت که آسیبهایی از قبیل گشاد شدن رگ ها و جداشدگی پوشش تیغه های ثانویه آسیبهایی هستند که در مراحل اولیه شدت آنها با زمان تغییر معنی داری را نشان نمیدهد. از این رو این آسیب ها را می توانند بعنوان آسیب های قابل برگشتی در نظر گرفت که در شرایط مساعد بهبود خواهند داشت (۳۹). درحالی که آسیبها شامل گرزی شدن سرتیغه های آبششی ثانویه و بهم چسبیدن تیغه های آبششی میتوانند به عنوان آسیبهای غیرقابل برگشت در نظر گرفته شوند (٤۰) چرا که در آنالیز آماری این آسیبها تفاوت بین آسیبهای موجود در دوگروه طی گذشت ٤۸ ساعت مسمومیت معنی دار بود. به این ترتیب می توان نتیجه گرفت که تغذیه با *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* به صورت قابل توجهی مقاومت و سیستم حفاظتی ماهی را در برابر مسمومیت حاد با سرب افزایش داده است

علیرغم اینکه اثرات زیانبار مصرف دوزهای زیر کشنده فلز سرب و روشهای مقاومت در برابر آن به فراوانی مورد مطالعه قرار گرفته است، راهکارهای مقاومتی در برابر الودگیهای ناگهانی آبها به دوزهای کشنده این فلز چندان بررسی نشده است. این درحالی است که بدلیل وجود انواع کارخانجات صنعتی، رهایش پسماندهای الوده به محیط به فراوانی در آبهای سطحی دیده می شود. از آنجاییکه ماهی زبرا نمونه ای قابل قبول جهت مطالعه روشهای افزایش مقاومت ابزیان در برابر آلاینده های فلزی است، در این تحقیق اثرات مکمل غذایی زیست یار در افزایش مقاومت در برابر دوز کشنده سرب در این ماهی مطالعه شده است. نتایج حاصل از این تحقیق گویای آن است که علی رغم اینکه از باکتری لاکتوباسیلوس فرمنتوم به عنوان زیست یار در دوز و غلظت کم استفاده شده است، با اینحال موجب افزایش مقاومت و زندمانی در ماهی ها شده و میزان جذب فلز سنگین را در انها به شدت کاهش می دهد. همچنین مطالعه هیستوپاتولوژی نمونه های گروه کنترل و آزمون نیز گویای این حقیقت بود که تغذیه طولانی مدت با زیست یار ، اثرات آسیب سلولی و بافتی ناشی از مسمومیت را به

شدت و به صورت معنی داری کاهش می دهد. بنابر نتایج این تحقیق، تغذیه طولانی مدت ماهی زبرا با مکمل لاکتوباسیلوس فرمنتوم می‌تواند روشی مناسب برای حفاظت از ابزیان در برابر دریافت تصادفی دوزهای کشنده فلز سرب باشد.

فهرست منابع

1. Kurniawan,T.A . Comparison of low-cost adsorbent for treating wastewater ladenwith heavy metals. Science of the Total Environment.2006, 366: 409-426.
2. Al-yaqout,A. F. Assessment and analysis of industrial liquid waste and sludge disposal at unlined landfill sites in arid climate. Waste management. 2003, 23. pp: 817-824.
3. Sanders T, Liu Y, Buchner V, Tchounwou PB. (2009). Neurotoxic eff ects and biomarkers of lead exposure: A Review. Res Environ Health 24: 15–45.
4. Flora G, Gupta D, Tiwari A. Toxicity of lead:A review with recent updates. Interdiscip. Toxicol. 2012;5(2):47–58.
5. Al-Balawi, H.F. Al-Akel, A.S. Al-Misned, F. Suliman, A.M. Effects of sub-lethal exposure of lead acetate on histopathology of gills, liver, kidney and muscle and its accumulation in these organs of Clarias gariepinus. Brazilian Archives of Biological Technology. 2013, 56(2): 27-31.
6. Savard P, Lamarche B, Paradis M, Thiboutot H, Laurin E, Roy D. Impact of Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-and, Lactobacillus acidophilus LA-5-containing yoghurt, on fecal bacterial counts of healthy adults. International Journal of Food Mcrobiology2011. 149(1):50-57.
7. Stanton C, Gardiner G, Meehan H, et al. Market potential for probiotics. American Journal of Clinical Nutrition. 2001,73(2): 476S- 483S.
8. Guo H, Luo S, Chen L, Xiao X, Xi Q, Wei W, et al. Bioremediation of heavy metals by growing hyperaccumulaor endophytic bacterium Bacillus sp. L14. Bioresource Technology .2010, 101(22):8599-605
9. Saaveda JM. Clinical applications of probiotic agents. American Journal of Clinical Nutrition. 2001, 73(6): 1147S-51S
10. Haffter GM, Brand M, Mullins MC, Hammerschmidt M, Kane DA, Odenthal J, van Eeden FJM, Jiang Y, Heisensberg C, Kelsh RN . The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, Danio rerio. Development.1996, 123:1-36.
11. Driever W, Solnica-Krezel L, Schier AF, Neuhauss SCF, Malicki J, Stemple DL, Stainier DYR, Zwartkruis F, Adbelilah S, Rangini Z . A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. Development 1996, 123:37-46.
12. Bahary N, Zon LI. Use of the zebrafish (Danio rerio) to define hematopoiesis. Stem Cells.1998, 16:89-98.
13. Chen JN, Haffter P, Odenthal J, Vogelsang E, Brand M, van Eeden FJ, Furutani-Seiki M, Granato M, Hammerschmidt M, Heisenberg CP . Mutations affecting the cardiovascular system and other internal organs in zebrafish. Development. 1996,123:293-302.
14. Dressler G. Kidney development branches out. Developmental Genetics.1999, 24:163-189.
15. Mohammadian, T., Alishahi, M., Tabandeh, M. R., Ghorbanpoor, M., Gharibi, D., Tollabi, M. and Rohanizade, S.Probiotic effects of Lactobacillus plantarum and L. delbrueckii ssp. bulguricus on some immune-related parameters in Barbus grypus. Aquaculture International.2016, 24(1): 225–242
16. Rayes, A. A. H. Field studies on the removal of lead, cadmium and copper by the use of probiotic lactic acid bacteria from the water for culturing marine tilapia T. spilurus. New York Science.2012, 5(11): 74-82

17. Giri SS, Yun S, Jun JW, Kim HJ, Kim SG, Kang JW. Therapeutic Effect of Intestinal Autochthonous Lactobacillus reuteri P16 Against Waterborne Lead Toxicity in Cyprinus carpio. Front. Immonology.2018, 9:1824.
18. Abu-Braka1 A , Saad Zaki M, Hassan Abbas H , Ahmed Ismail N, Khalil R, Tanekhy M. Filed studies on some probiotics to minimize hazard effects of prevailing heavy metals contamination for improving immunity and growth performance of Oreochromis niloticus Electronic Physician.2017, 9(4):4134-4144.
19. Musawi A, Johari W, Ikhsan N.The Growth Potential and Bioaccumulation Ability of Probiotics under the Exposure of Different Heavy Metals. Pertanika Journal of Tropical Agriculture Sciences. 2019, 42 (1): 305 - 314
20. Najafi Enferadi, M.H. Mohammadizadeh, F. Soltani, M. Bahri, A.H. Sheikhzadeh, N. Effects of Lactobacillus plantarum and Mannan Oligosaccharide on growth performance and some digestive factors in Oncorhynchus mykiss. Animal physiology and development. 2020; 13(48): 69-83
21. Hosseini, A. Oraji, H. Yegane, S. Shahabi, H. The effect of probiotic Pediococcus acidilactici on growth performance, blood and some serum parameters in Caspian salmon (Salmo trutta caspius). Iranian Scientific Fisheries Journal, 2014 2:35-45.
22. Panahi Sahebi, H., Esmaeili Fereidouni, A., Imanpour, M., Taheri Mirghaed, A., Barari, A., Kavianpour, M. Effects of Dietary Inclusion of Prebiotic Immunowall and Probiotic Primalac on Growth Indices, Survival, Body Composition, and Blood Biochemical Parameters in the Caspian Sea Carp, Cyprinus carpio, Fingerlings. Journal of Veterinary Research, 2019; 74(1): 45-53.
23. Abdullah al mamun, M, Nasreni SH, Bari S. 2018. Role of probiotics in aquaculture: importance and future guidelines. Journal of Bangladesh Academic Sciences 42 (1):105-109
24. Rahimibashar M.R., Alipoor V., Danesh M., Alinia M.R. Survival of biometrical characteristics, diet, gonad and liver index of (Sander lucioperca) in the lake of Arass Dam. Pajouhesh and Sazandegi. 2008, 79: 58-65
25. Shakoori, M. Abdali, S. Effect of Lead on Some Biochemical Indices of Farmed Silver Carp (Hypophthalmichthys molitrix).2016.Journal of Marine Science and Technology Research. 1:1-12
26. Mohamadzadeh, P., Gamili, S. Effect of PbNO3 on Gill and Liver tissues in Rutilus rutilus. Applied Biology, 2014; 27(1): 79-96.
27. Mahboob Sh, Kausar Sh, Jabeen F, Sultana, S. Effect of Heavy Metals on Liver, Kidney, Gills and Muscles of Cyprinus carpio and Wallago attu inhabited in the Indus. Brazilian Archives of Biology and Technology.2016, 59, e16150275
28. Zhai Q, Yang L, Zhao J, Zhang H, Tian F and Chen W .Protective Effects of Dietary Supplements Containing Probiotics, Micronutrients, and Plant Extracts Against Lead Toxicity in Mice. Front. Microbiology. 2018, 9:2134.
29. Abu-Braka AZ, Zaki MS, Abbas HH, et al. Filed studies on some probiotics to minimize hazard effects of prevailing heavy metals contamination for improving immunity and growth performance of Oreochromis niloticus. Electron Physician. 2017;9(4):4138-4144.
30. Mahious, A.S., Ollevier, F. (2005). Probiotics and prebiotics in aquaculture: review. 1st regional workshop on techniquesfor enrichment of live food for use inlarviculture. AAARC, pp. 17-26 (Urmia, Iran).
31. Denis F, Archambault D. Molecular cloning and characterization of beluga whale (Delphinapterus leucas) interleukin-1b and tumor necrosis factor-a. Canadian Journal of Veternity Reseaarch.2001, 65:233–40
32. Clark R.B.Marine Pollution. Oxford University Press, 248 P. Dobaradaran S.,

Naddafi K., Nazmara S.H., Ghaedi H. 2010. Heavy metals (Cd, Cu, Ni and Pb) content in two fish species of Persian Gulf in Bushehr Port, Iran. African Journal of Biotechnology.2001, 9(37): 6191 - 6193

33. Irianto, A., Austin, B., 2002, Probiotics in aquaculture. Journal of Fish Diseases. 25, pp: 633 – 642.
34. Ferguson R., Merrifield D.L., Harper G.M., Rawling M.D., Mustafa S., Picchietti S., Balcazar J.L. and Davies S.J. 2010. The effect of Pediococcus acidilactici on the gut microbiota and immune status of on-growing red tilapia (Oreochromis niloticus). Journal of Applied Microbiology, 109(3): 851–862.
35. Abalaka S E .Heavy metals bioaccumulation and histopathological changes in Auchenoglanis occidentalis fish from Tiga dam, Nigeria, Journal of Environmental Health Science & Engineering.2015, 13:67-71.
36. Jahanbakhshi A., Hedayati A. Gill histopathological changes in Great sturgeon after exposure to crude and water soluble fraction of diesel oil. Comparative Clinical Pathology.2012, 22 (6): 1083-1086
37. Rosety-Rodríguez M., Ordoñez F.J., Rosety M., Rosety J.M., Ribelles A., Carrasco C. Morpho-histochemical changes in the gills of turbot, Scophthalmus maximus L., induced by sodium dodecyl ulfate. Ecotoxicology and Environmental Safety.2002, 51: 223-228
38. Khaleghi, R. Hedayati, A.K. Kashiri, H. Paknejad, H. Hosseinifar, H. Effect of Pediococcus acidilactici probiotic and Agaricus bisporus prebiotic supplements on the expression of immune-related genes in common carp (Cyprinus carpio) exposed to silver nanoparticles,2019. Aquatic Physiology and Biotechnology, 6(4): 155-174.
39. Sayes C, Leyton Y, Riquelme C.Probiotic Bacteria as Healthy Alternative for Fish Aquaculture, Antibiotic Use in Animals, Sara Savic, IntechOpen,2017 DOI: 10.5772/intechopen.71206.
40. Wani, A.A. Sikdar-Bar, M. Borana, K. Khan, H.A .Histopatological Alterations Induced in Gill Epithelium of African Catfish, Clarias gariepinus, Exposed to Copper Sulphate. Asian Journal of Experimantal Biology Sciences.2011, 2(2): 278-282