فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۴۳، جلد ۱۱، شماره ۴، پائیز۹۷، صفحه۸۷ تا ۹۹
Qjaphd.sinaweb.net ISSN: ۱۷۳۵-۹۸۸۰

بررسی اثر افزودن خوراکی ایزومالتو الیگوساکارید در آسیب بافتی ماهی کپور معمولی(*Cyprinus carpio*) در مواجهه با حشره‌کش ورتیمک

سید علی اکبر هدایتی [۱]، **فاطمه دارابی تبار** [۲]
۱- دانشیار گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
۲- دانشجوی دکتری، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران.**darabitabar@gmail.com**

تاریخ دریافت:۹۶/۹/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/۲۵

چکیده

زمینه و هدف: پریبیوتیک ها ترکیب غذایی غیر قابل هضمی هستند که از طریق تحریک انتخابی، رشد و فعال کردن یک یا تعداد محددی از باکتری‌های موجود در روده اثرات سودمندی بر روی میزبان داشته و می‌تواند سلامتی میزبان را بهبود بخشد. برای ارزیابی میزان سمیت آلاینده‌های محیطی شاخص‌های فیزیولوژیکی متفاوتی در ماهی‌ها وجود دارد که از جمله آن‌ها بافت شناسی است.

روش کار: در این تحقیق ۱۴۷ قطعه ماهی کپور معمولی به مدت دو هفته جهت سازگاری با شرایط محیطی آکواریوم، نگهداری شدند. LC50/96h برای سم ورتیمک(ورتمیک) ۱/۲۴۳ محاسبه گردید که براساس آن سه غلظت کشنده ۲ppm، ۳ppm، ۶ppm برای این بررسی در نظر گرفته شد. اضافه کردن پریبیوتیک ایزومالتو الیگوساکارید به غذا با روش اسپری کردن به میزان ۱g/kg صورت گرفت. طی دوره تحت تأثیر قرار دادن ماهیان در معرض پریبیوتیک ایزومالتو الیگوساکارید و سم ورتیمک، ماهیان توسط ۲۲۰ میلی-گرم بر لیتر محلول بیهوش کننده گل میخک به سرعت بیهوش شده و بافت کبد، آبشش آن‌ها برای مطالعات بافت‌شناسی جدا گردید.

یافته ها: نتایج نشان داد تیمارهایی که بعد از القای پریبیوتیک در معرض سم ورتیمک قرار گرفتند عارضه‌های بافتی شامل از بین رفتن سلول‌های کبدی، پرخونی، نکروز و کاریولیز هسته در بافت کبد و عارضه های هایپرپلازی تیغه اولیه، پرخونی، نکروز، چسبندگی تیغه‌های ثانویه، در بافت آبشش مشاهده شد که عارضه‌ها به ترتیب در غلظت ۶ppm، ۳ ppm و ۲ppm بیشترین اثر تخریب را در بافت کبد و آبشش نشان دادند.

نتیجه گیری: پریبیوتیک ایزومالتو الیگوساکارید نتوانست از میزان عارضه‌های ناشی از آسیب بافتی سم ورتیمک در بافت کبد و آبشش ماهی کپور بکاهد.

واژه های کلیدی: ایزومالتو الیگوساکارید، آسیب‌های بافتی، سم ورتیمک، کپور معمولی.

مقدمه

استفاده از سموم آفت کش تا زمانی که شیوه های مبارزه بیولوژیک با آفات گیاهی مرسوم نشود امری اجتناب ناپذیر است بنابراین توصیه بر این است که حداقل از آفت کش هایی با درجه سمیت و نیمه عمر کم‌تر استفاده شود. اکوسیستم های آبی به عنوان بزرگ-ترین بخش محیط طبیعی همواره با تهدیدهایی مانند محدودیت ژنتیکی و تنوع زیستی مواجه می باشد. چنین محیط هایی گرچه به عنوان محیط هدف و اثر برای سموم آفت کش مد نظر نمی‌باشند(۱۶). آفت کش ها از دو طریق وارد منابع آبی می شوند که یکی از طریق کاربرد مستقیم آفت کش ها در اکوسیستم های آبی و دیگری در اثر استفاده غیرمستقیم مانند ریزش اتمسفری و فرسایش به دست آمده از زمین های کشاورزی و هم چنین نفوذ فاضلاب های صنعتی و کشاورزی است که به منابع آبی راه می یابند(۱۹). یکی از عوامل تأثیرگذار در مسمومیت آبزیان عامل زمان است. هنگامی که ماهی در معرض غلظت ثابتی از سم باشد، به مرور زمان هم مقاومت ماهی تحلیل می رود و هم سم فرصت بیشتری

برای تأثیر گذاری روی ماهی دارد. علاوه بر این در مواردی تجمع سم در بافت های ماهی نیز باعث افزایش تأثیر سوء آن بر بدن ماهی و در مدت ۹۶ ساعت انجام آزمایشات موجب پایین آمدن سیستم ایمنی بدن ماهی می‌شود. آبشش ها به عنوان ارگانی که در معرض مداوم محیط خارجی قرار دارند، اولین هدف آلاینده ها می-باشند، بنابراین آبشش بافت مناسبی جهت بررسی اثر کوتاه مدت آلاینده ها است. از طرفی این عناصر سمی در اندام ها ذخیره م و تجمع زیستی رخ می دهد(۱۸). اغلب پربیوتیک‌ها در دسته‌ی الیگوساکاریدهای غیرقابل هضم تقسیم‌بندی می‌شوند. الیگوساکاریدهای غیرقابل هضم از جمله عواملی هستند که قابلیت تحریک رشد باکتری‌های مفید روده یا همان باکتری‌های پروبیوتیکی را دارا هستند. ایزومالتو الیگوساکارید یکی از انواع الیگوساکاریدها است که اخیراً به‌عنوان پربیوتیک در آبزی‌پروری مطرح می گردد. در یک نگاه کلی، اغلب پربیوتیک‌ها در دسته‌ی الیگوساکاریدهای غیرقابل هضم تقسیم‌بندی می‌شوند و همان طور که گفته شد، الیگوساکاریدهای غیرقابل هضم از جمله عواملی هستند که قابلیت تحریک رشد باکتری‌های مفید روده یا همان باکتری‌های پروبیوتیکی را دارا هستند. الیگوساکاریدهای غیرقابل هضم به دلیل ساختار شیمیایی خاص، در قسمت‌های بالایی دستگاه گوارش در برابر فرآیند گوارش مقاومت کرده و پس از رسیدن به بخش‌های انتهایی دستگاه گوارش برخی از آن ها طی فرآیند تخمیر به مونومرها هیدرولیز شده و توسط برخی باکتری‌ها متابولیزه و مورد استفاده واقع می‌شوند. هر ساله ترکیبات فعال دارویی تولید می‌شوند که استفاده از آن‌ها در مقیاس و تنوع بسیار بالا در حال افزایش است(۱۲). داروها به طور مداوم در نتیجه فعالیت‌های دامپزشکی در محیط زیست و در محیط آبی پراکنده می‌شوند. که این مسئله باعث نگرانی‌های زیست محیطی شده است.

آفتکش ورتیمک یا آبامکتین در بازار با نام تجاری (Vertimec EC1.8%) وجود دارد. ورتیمک(آبامکتین) از گروه شیمیایی آورمکتین(Avermectin) و با منشا میکروبی بوده که از تخمیر یک اکتینومیست به‌نام *Strepromyces avermitilis* به دست آمده است. این سم دارای اثر تماسی و گوارش است که فعالیت سیستمیکی محدودی داشته و قادر است در حشره‌ها نفوذ کند. این ترکیب از لحاظ آفت‌کشی تاثیر آهسته ای داشته، اما اثر فلج کنندگی آن ها به سرعت بروز می-نماید. برای ارزیابی میزان سمیت آلاینده‌های محیطی شاخص‌های فیزیولوژیکی متفاوتی در ماهی‌ها وجود دارد که از جمله آن‌ها بافت شناسی است. بافت شناسی ارزیابی کاملی از سلامتی موجود زنده فراهم می‌کند و به طور مؤثری اثرات مواجهه با آلاینده های محیطی را انعکاس می‌دهد. با توجه به ماهیت اغلب سموم و آلاینده‌های زیست محیطی، این ترکیبات به راحتی از سد دفاعی بدن آبزیان گذشته و وارد خون می‌شوند و از طریق خون به بافت‌های مختلف بدن انتقال می‌یابند(۲۷). پربیوتیک‌ها به عنوان منبع غذایی برای پروبیوتیک‌ها (بیفیدوباکترها، لاکتوباسیلوس‌ها و باکتروئیدها) محسوب می‌شوند. در نتیجه‌ی استفاده‌ی باکتری‌های پروبیوتیکی از پربیوتیک‌ها و تولید محصولات تخمیری از آن ها، اسیدهای چرب آزاد کوتاه زنجیره مانند استات، بوتیرات و پروپیونات و لاکتات تولید می‌گردند(۱۵). مهم‌ترین فرآورده‌ی حاصل از متابولیسم پربیوتیک‌ها، اسیدهای چرب آزاد کوتاه زنجیره هستند(۱۴) که از طریق اپیتلیوم روده جذب و به عنوان یک منبع انرژی مهم برای میزبان تلقی شده و سبب تقویت انتروسیت‌ها و بهبود جذب مواد مغذی می‌شوند(۱). به علاوه، اسیدهای چرب کوتاه زنجیره و اسید لاکتیک در روده با ایجاد محیط اسیدی باعث محدود کردن جمعیت پاتوژن‌ها خواهند شد(۱۵) و شرایط مناسبی برای رشد باکتری‌های اسید

لاکتیک(ازجمله بیفیدوباکترها) را فراهم می‌کند(اشلی و فیلد، ۲۰۰۲). هم‌چنین باکتری‌های اسید لاکتیک ترکیباتی مانند باکتریوسین‌ها را تولید می‌کنند و بدین طریق باعث جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در روده می‌شوند(۱) و با تحریک سیستم ایمنی سبب افزایش مقاومت میزبان در برابر عوامل بیماری‌زا می‌گردند(۱۱). مطالعه پارامترهای هیستوپاتولوژیک به عنوان بیومارکرهای(نشانگر زیستی یا بیومارکرها عموماً به یک شاخص قابل سنجش از برخی حالت‌ها و شرایط بیولوژیک یا زیستی اشاره دارد، زیست‌نشان گرها اغلب در بررسی فرآیندهای طبیعی زیستی، فرایندهای پاتوژن و یا پاسخ دارویی به یک درمان ویژه ارزیابی می‌شوند(۲۶)، از جمله مهم ترین شاخص های زیستی شاخص‌های خون شناسی، بیوشیمیایی، هورمونی و بافتی است. هرچند ماهی معمولاً جزو ارگانیسم‌های هدف برای آفتکش‌ها نیست و دانش درباره تاثیرات آفتکش‌ها در محیط طبیعی هنوز اندک است. تنها مطالعات اندکی نشان می‌دهد که ماهیانی که در محیط‌های طبیعی آب شیرین زندگی می‌کنند ممکن است تحت تاثیر سمپاشی-های غیرعمدی قرار بگیرند(۹). کپور معمولی(*Cyprinus carpio*) از رده‌ی ماهیان استخوانی و متعلق به خانواده‌ی کپورماهیان(*Cyprinidae*) است؛ در حوضه‌های دریای خزر، رودخانه‌ی تجن و تمام حوضه‌های آبریز ایران پراکنش دارد(۴). هم چنین با توجه به اثرات مثبت پروبیوتیک ایزومالتو الیگوساکارید بر بهبود ایمنی ناشی از اثرات سمیت ورتیمک بر عملکرد بافتی، افزایش رشد و شاخص‌های رشد و برخی از شاخص‌های زیستی آبزیان نظیر شاخص‌های خون شناسی و بافتی، در این مطالعه به منظور بررسی اثرات افزایش سیستم ایمنی(بهبود عملکرد دفاع هیستوپاتولوژیک) و مواجهه بافتی پروبیوتیک ایزومالتو الیگوساکارید بر بافت کبد، آبشش و روده ماهی کپور معمولی در غلظت‌های کشنده سم، اثر افزایش مقاومت ماهی کپور معمولی تغذیه شده با پربیوتیک به منظور کاهش آسیب بافتی ناشی از سم ورتیمک پرداخته می‌شود.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق ۱۴۷ قطعه ماهی کپور به مدت دو هفته جهت سازگاری با شرایط محیطی آکواریوم، نگهداری شدند. ۱۲ آکواریوم ۱۰۰ لیتری که در هر کدام ۷ عدد ماهی قرار داده شده در سالن آبزی پروری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان برای انجام طرح در نظر گرفته شد. به منظور اطمینان از زنده ماندن تعداد ماهیان مورد نیاز تا پایان مواجهه باسم، ماهیان اضافی تا پایان آزمایش نگهداری شدند. بعد از ضدعفونی و آماده‌سازی آکواریوم‌ها، آبگیری آن‌ها صورت گرفت. در طول دوره‌ی آزمایش فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب در تمام تیمارها ثابت در نظر گرفته شد. در این مطالعه از غذای تجاری(انرژی ۳۰۰۱، ماهیران، ایران) به عنوان جیره‌ی پایه برای گروه شاهد استفاده شد. ترکیبات تقریبی جیره استفاده شده شامل ۴۱ درصد پروتئین، ۶ درصد چربی، ۵ درصد فیبر خام و ۱۲ درصد رطوبت بود. پربیوتیک مورد استفاده در این تحقیق ایزومالتو الیگوساکارید بود که از کارخانه اورافتی بلژیک تامین شد. این پربیوتیک عمدتاً شامل، ایزومالتوز، پانوز، ایزومالتوتریوز، ایزومالتوتترائوز است. و طی فرآیندهای آنزیمی از نشاسته به دست آمده است(تیتارام و همکاران، ۲۰۰۵). رنگ این ماده سفید مات و به شکل بلورهای ریز و فاقد بو می باشد. اضافه کردن پربیوتیک ایزومالتو الیگوساکارید به غذا با روش اسپری کردن به میزان ۱g/kg صورت گرفت، به این صورت که ابتدا میزان ۲ گرم پودر ژلاتین را به آب اضافه کرده و پس از حل شدن پودر در آب مقادیر مورد نیاز پربیوتیک را که از قبل توزین و آماده شده بود، به محلول آب و پودر ژله اضافه شد. در نهایت پس از حل شدن پربیوتیک، محلول آماده شده بر غذای تجاری

اسپری شد. غذادهی به بچه ماهی‌ها به صورت دستی به میزان ۳ درصد وزن بدن و ۳ وعده در روز صورت پذیرفت. ثبت تلفات به صورت روزانه طی مدت ۹۶ ساعت انجام شد و بعد از ثبت تلفات، اقدام به تعیین LC_{10}, LC_{20}, LC_{30}, LC_{40}, LC_{50}, LC_{60}, LC_{70}, LC_{80}, LC_{90}, LC_{95} در ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت با استفاده از نرم افزار پروبیت گردید که در نهایت میزان $LC_{50/96h}$، ۱/۲۴ میلی‌گرم بر لیتر محاسبه شد که براساس آن سه غلظت کشنده ۲ppm، ۳ppm، ۶ppm برای این بررسی در مدت ۹۶ ساعت در نظر گرفته شد. هر یک از غلظت‌های ورتیمک در سه تکرار ایجاد گردید.طی دوره تحت تأثیر قرار دادن ماهیان در معرض پربیوتیک ایزومالتو الیگوساکارید در دوره ۸ هفته ای و سم ورتیمک در دوره ۴ روزه (۴ غلظت۰، ۲، ۳ و ۶ میلی گرم بر لیتر)، ماهیان توسط ۲۲۰ میلی‌گرم بر لیتر محلول بیهوش کننده گل میخک به سرعت بیهوش شده و بافت کبد، آبشش آن‌ها برای مطالعات بافت‌شناسی جدا گردید. نمونه ها ابتدا به مدت ۲۴ ساعت در محلول بوئن تثبیت شدند. سپس چندین مرتبه با الکل اتانول ۷۰ درصد مورد شستشو قرار گرفتند. پس از آن توسط الکل ۹۵ و ۱۰۰ و نهایتاً توسط الکل بوتانول آبگیری و پس از قرار دادن نمونه ها در گزیلول به مدت سه ساعت به منظور شفاف سازی، برای پارافینه کردن در پارافین مایع در داخل آون قرار داده ، سپس با پارافین قالب گیری شدند. از بافت ها برش هایی به ضخامت ۵-۶ میکرومتر تهیه شد. پس از نگهداری به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه آون به روش استاندارد هماتوکسیلین ائوزین رنگ آمیزی صورت گرفت. در نهایت به منظور بررسی عوارض بافتی ناشی از اثر سم و مقایسه بافت های مورد نظر با نمونه های شاهد از میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین عکس برداری استفاده گردید(۱۷).

نتایج

ثبت تلفات به صورت روزانه طی مدت ۹۶ ساعت انجام شد(جدول ۱) و بعد از ثبت تلفات، اقدام به تعیین LC_{10}, LC_{20}, LC_{30}, LC_{40}, LC_{50}, LC_{60}, LC_{70}, LC_{80}, LC_{90}, LC_{95} در ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت با استفاده از نرم افزار پروبیت گردید. که در نهایت میزان LC50/96h، ۱/۲۴ میلی‌گرم بر لیتر محاسبه شد(جدول ۲تا۵). در طول دوره آزمایش در هیچ یک از تیمارهای آزمایشی و گروه کنترل مرگ و میر مشاهده نگردید. بررسی‌های بافت‌شناسی ماهیان که در معرض پربیوتیک و ورتیمک قرار داشتند، نشان دهنده بروز ناهنجاری‌های ساختاری در بافت آبشش بود(شکل ۱). بیشترین عارضه-های مشاهده شده در بافت آبشش ماهی کپور معمولی شامل هایپرپلازی تیغه اولیه، پرخونی، نکروز، چسبندگی تیغه‌های ثانویه، چماقی شدن تیغه‌های ثانویه، از بین رفتن لاملاهای ثانویه، کوتاه شدن و خمیدگی لاملاهای ثانویه بود. که بیشترین اثر تخریب در غلظت ۶ ppm با عارضه-هایی نظیر از بین رفتن و خمیدگی تیغه‌های ثانویه و نکروز بود. که این عارضه‌ها در غلظت ۲ppm با اثر تخریب کمتری مشاهده شد. بیشترین عارضه‌های مشاهده شده در بافت آبشش ماهی کپور معمولی شامل هایپرپلازی تیغه اولیه، پرخونی، نکروز، چسبندگی تیغه‌های ثانویه، چماقی شدن تیغه‌های ثانویه، از بین رفتن لاملاهای ثانویه، کوتاه شدن و خمیدگی لاملاهای ثانویه بود. که بیشترین اثر تخریب در غلظت ۶ ppm با عارضه‌هایی نظیر از بین رفتن و خمیدگی تیغه‌های ثانویه و نکروز بود. که این عارضه‌ها در غلظت ۲ppm با اثر تخریب کمتری مشاهده شد(جدول ۶). بیشترین عارضه‌های مشاهده شده در بافت کبد شامل از بین رفتن سلول‌های کبدی، پرخونی، نکروز و کاریولیز هسته بود. که شدت این عارضه‌ها در هر دو غلظت ۳ ppm و ۶ ppm مشاهده شد. رکود صفراوی تنها در غلظت ۳ ppm مشاهده شد(شکل ۲).

جدول۱- میزان مرگ و میر در تست سمیت حاد(LC_{50} 96h)(تعداد در هر تیمار=۲۱ عدد)

غلظت (mg/l)	۲٤ ساعت	٤۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹٦ ساعت
شاهد	۰	۰	۰	۰
۱	۰	۰	۸	۱۲
۲	۲	۹	۱۵	۱۶
۳	۷	۱۱	۱۷	۲۰
٦	۹	۱۳	۱۵	۲۱
۱۲	۱۵	۱۷	۲۱	۲۱
۱۵	۱۷	۱۸	۲۱	۲۱

جدول۲- غلظت کشنده (LC_{10-95}) با حدود اطمینان ۹۵ ٪ در طی زمان ۲٤ ساعت

LC	غلظت کشنده	حدود اطمینان ۹۵٪	
		حد پایین	حد بالا
LC10	۱/۳۰۳	–	۴/۱۷۸
LC20	۳/۸۲۵	–	۶/۴۴۹
LC30	۵/۶۴۵	۲/۲۴۷	۸/۴۴۷
LC40	۷/۱۹۹	۴/۳۶۰	۱۰/۵۲۳
LC50	۸/۶۵۲	۶/۰۱۷	۱۲/۷۷۹
LC60	۱۰/۱۰۵	۷/۴۳۹	۱۵/۲۷۱
LC70	۱۱/۶۵۹	۸/۷۹۰	۱۸/۱۰۷
LC80	۱۳/۴۷۸	۱۰/۲۴۱	۲۱/۵۵۸
LC90	۱۶/۰۰۱	۱۲/۱۲۵	۲۶/۴۷۰
LC95	۱۸/۰۸۴	۱۳/۶۲۰	۳۰/۵۸۸

جدول۳- غلظت کشنده (LC_{10-95}) با حدود اطمینان ۹۵ ٪ در طی زمان ٤۸ ساعت

LC	غلظت کشنده	حدود اطمینان ۹۵٪	
		حد پایین	حد بالا
LC10	–	–	۲/۳۸۸
LC20	۰/۷۹۵	–	۴/۵۸۹
LC30	۲/۷۸۰	–	۶/۷۴۵
LC40	۴/۴۷۶	–	۹/۵۸۸
LC50	۶/۰۶۱	۱/۱۷۴	۱۳/۷۵۳
LC60	۷/۶۴۷	۳/۷۱۳	۱۹/۳۲۹
LC70	۹/۳۴۳	۵/۵۶۲	۲۶/۱۶۱
LC80	۱۱/۳۲۸	۷/۲۲۹	۳۴/۶۵۴
LC90	۱۴/۰۸۱	۹/۱۷۹	۴۶/۷۹۵
LC95	۱۶/۳۵۴	۱۰/۶۵۰	۵۶/۹۶۰

جدول٤- غلظت کشنده(LC_{10-95}) با حدود اطمینان ۹۵ ٪ در طی زمان ۷۲ ساعت

LC	غلظت کشنده	حدود اطمینان ۹۵٪	
		حد پایین	حد بالا
LC10	–	–	۰/۸۰۱
LC20	۰/۱۲۳	–	۱/۴۵۰
LC30	۰/۷۶۸	–	۲/۰۳۶
LC40	۱/۳۱۹	–	۲/۷۴۹
LC50	۱/۸۳۴	–	۳/۸۴۹
LC60	۲/۳۴۹	۰/۷۵۳	۵/۶۳۷
LC70	۲/۹۰۰	۱/۶۰۵	۸/۱۵۷
LC80	۳/۵۴۵	۲/۲۵۳	۱۱/۴۵۴
LC90	۴/۴۴۰	۲/۹۳۳	۱۶/۲۴۶
LC95	۵/۱۷۹	۳/۴۲۲	۲۰/۲۷۷

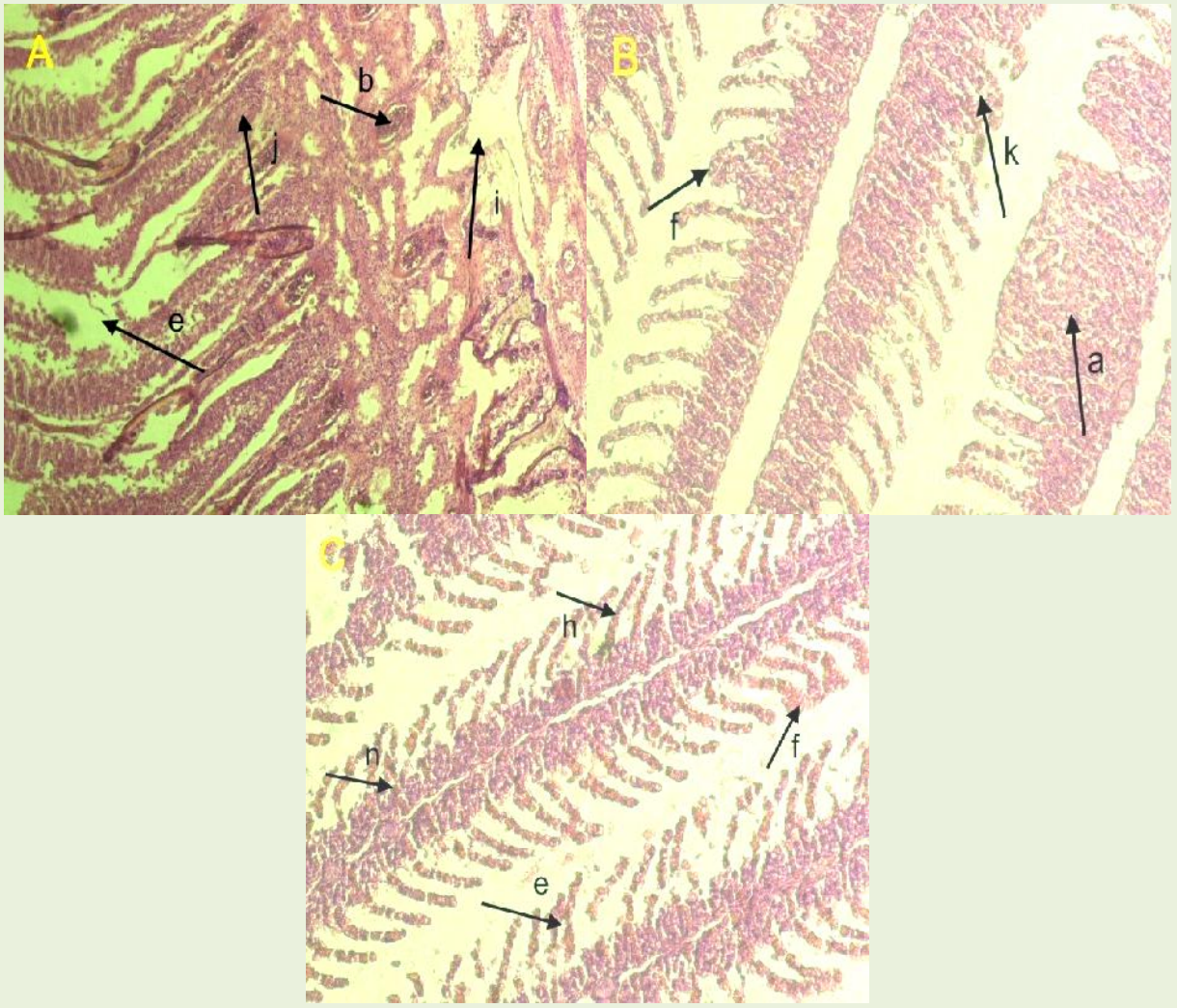
جدول٥- غلظت کشنده (LC_{10-95}) با حدود اطمینان ۹۵ ٪ در طی زمان ۹٦ ساعت

LC	غلظت کشنده	حدود اطمینان ۹۵٪	
		حد پایین	حد بالا
LC10	۰/۰۸۶	–	۰/۵۱۴
LC20	۰/۴۸۳	–	۰/۸۴۱
LC30	۰/۷۶۹	۰/۲۸۰	۱/۰۹۲
LC40	۱/۰۱۴	۰/۶۰۷	۱/۳۲۳
LC50	۱/۲۴۳	۰/۸۹۳	۱/۵۵۹
LC60	۱/۴۷۲	۱/۱۵۵	۱/۸۲۰
LC70	۱/۷۱۶	۱/۴۰۷	۲/۱۲۷
LC80	۲/۰۰۳	۱/۶۷۵	۲/۵۱۳
LC90	۲/۴۰۰	۲/۰۱۵	۳/۰۸۰
LC95	۲/۷۲۸	۲/۲۸۱	۳/۵۶۴

جدول ٦- اثر پروبیوتیک بر تخریب بافت آبشش ناشی از غلظت‌های کشنده آبامکتین

عارضه‌های آبشش	۰	۲ppm	۳ppm	٦ppm
هایپرپلازی تیغه اولیه	–	++	++	+++
پرخونی	–	++	++	++
نکروز	–	+++	+++	++++
چسبندگی تیغه‌های ثانویه	–	++	+++	++
چماقی شدن تیغه ثانویه	–	++	++	++
از بین رفتن لاملاهای ثانویه	–	+++	+++	++++
کوتاه شدن لاملاهای ثانویه	–	++	+++	++
خمیدگی تیغه ثانویه	–	+++	++++	++++

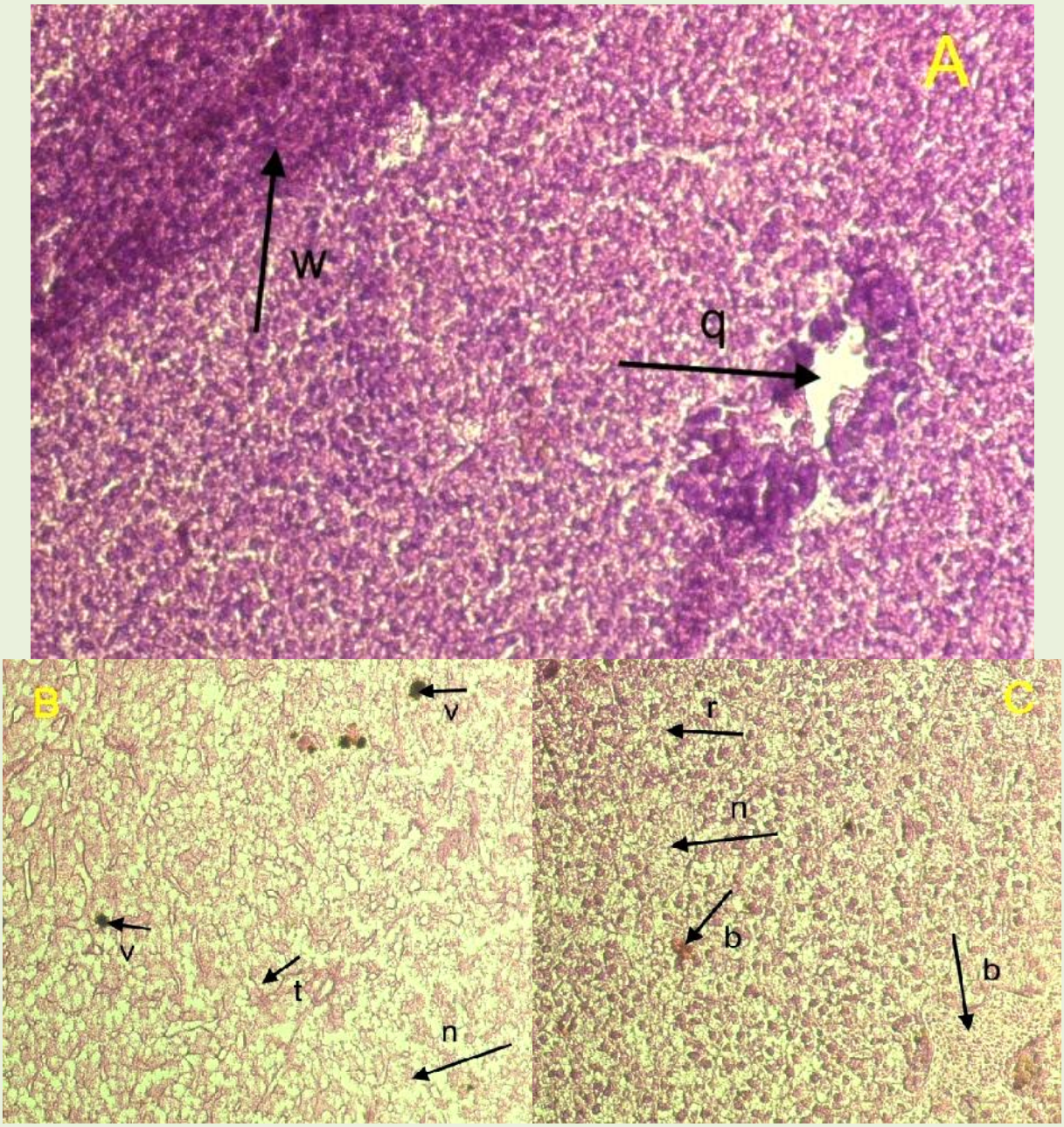
عدم مشاهده عارضه(–)، ۱ تا ۳ عارضه مشاهده شده (+)، ۳ تا ۵ عارضه مشاهده شده (++)، ۵ تا ۱۱ عارضه مشاهده شده (+++)، و بیشتر از ۱۱ (++++).



شکل ۱- بررسی اثر پروبیوتیک ایزومالتو الیگوساکارید بر تخریب بافت آبشش ماهی کپور معمولی ناشی از غلظت‌های کشنده آبامکتین با بزرگنمایی ۲۰۰ برابر

A= غلظت ppm۲ سم آبامکتین، B= غلظت ۳ ppm سم آبامکتین، C= غلظت ۶ ppm سم آبامکتین

چسبندگی لاملای ثانویه (a)، پرخونی (b)، از بین رفتن لاملاهای ثانویه (e)، چماقی شدن تیغه‌های ثانویه (f)، خمیدگی تیغه ثانویه (h)، از بین رفتن لاملای اولیه (i)، هایپرپلازی لاملاهای اولیه (j)، نکروز (n)، کوتاه شدن لاملای ثانویه (k)



شکل ۲- بررسی اثر پریبیوتیک ایزومالتوالیگوساکارید بر تخریب بافت کبد ماهی کپور معمولی ناشی از غلظت‌های کشنده ورتیمک با بزرگنمایی ۲۰۰ برابر

A= غلظت ۲ppm سم ورتمیک، B= غلظت ۳ ppm سم ورتمیک، C= غلظت ۶ ppm سم ورتیمک، D= تیمار شاهد

پرخونی (b)، نکروز (n)، سیاهرگ باب کبدی (q)، از بین رفتن سلول‌های کبدی (r)، کاریولیز هسته (تخریب هسته سلول) (t)، رکود صفرا (v)، تورم صفراوی

بحث و نتیجه گیری

در ماهیان تحت تیمار سم ورتیمک، هایپرپلازی تیغه ثانویه، چسبندگی لاملاهای ثانویه، ادم و جداشدگی اپی-تلیوم(ادم منتشر در لاملای ثانویه) مشاهده شد، که شدت این عوارض در تیمار ۶ ppm افزایش یافت. افزایش عوارض بافتی مشاهده شده در برابر سموم مختلف در مطالعات پیشین به اثبات رسیده است(۱۲، ۱۰، ۹). هیپرپلازی افزایشی غیرطبیعی در تعداد سلول‌های اپی‌تلیوم آبشش است. این عارضه بر تبادل گاز و تنفس تاثیر گذاشته و در حالات شدیدتر می‌تواند منجر به

اتصال تیغه‌های مجاور به یکدیگر و جلوگیری از تبادل گاز شود. سلول‌های هیپرتروفی و برآمدگی‌های بسیار ریز سلول‌های پوشش سطحی، اولین علائم اثرات فیزیکی و شیمیایی بر تیغه‌های ثانویه هستند. گرزی‌شکل بودن تیغه‌ها خود دلیلی بر تغییرات مزمن در آبشش‌ها است(۵). تغییرات آبشش ماهیان قرار گرفته در معرض غلظت کشنده ppm۶ ورتیمک پس از گذشت ۹۶ ساعت شامل ادم، پرخونی، نکروز، چسبندگی تیغه‌های ثانویه، چماقی شدن تیغه ثانویه، از بین رفتن لاملاهای ثانویه، بود. که نتایج نشان داد با افزایش زمان غلظت میزان آسیب بافتی نیز بیشتر خواهد بود. Caliskan و همکاران در سال ۲۰۰۳ بلند شدن لایه اپیتلیال لاملای آبشش، هایپرپلازی، کوتاه شدن تیغه های ثانویه و نکروز در آبشش ماهی *Lebistes reticulates* قرار گرفته در معرض سایپرمترین را گزارش کردند. اتصال تیغه‌های ثانویه‌ی مجاور پس از هیپرپلازی، بیش‌ترین عارضه‌ی مشاهده شده بود. در این عارضه اپی‌تلیوم دو تیغه‌ی ثانویه مجاور به‌واسطه هیپرپلازی و یا برآمدگی و در برخی موارد هیپرتروفی اپی‌تلیوم به‌هم اتصال می‌یابد و موجب توقف تبادل گاز از طریق سطوح مربوطه می‌شود.

ادم: ادم در آبشش ماهیان به حالتی اطلاق می‌شود که لایه اپیتلوم از سطح لاملاهای ثانویه جدا می‌شود. در این حالت بین اپی‌تلیوم و عروق خونی فاصله می‌افتد در حقیقت این واکنش یک عمل دفاعی بوده و به این طریق ماهی سعی می‌کند تا از مسمومیت بیش‌تر در امان بماند که در تیمارهای ۲، ۳ و ۶ ppm این عارضه مشاهده شد ولی با افزایش غلظت سم این عارضه نیز بیش‌تر مشاهده شد(۵).

تورم سلولی: در این حالت سلول‌ها متورم شده و سیتوپلاسم آن بسته به نوع تورم آبکی یا ابری شکل، شفاف و صاف یا ابری شکل و دانه‌دار می‌گردد. دانه‌ها ممکن است ریز یا درشت و تقریباً به شکل قطرات هیالینی و ائوزینوفیلی در سیتوپلاسم ظاهر گردند. تورم سلولی ممکن است به علت ناتوانی سلول در حفظ تعادل یون سدیم باشد.

تورم کبد: در این عارضه تعداد زیادی لنفوسیت و لکوسیت در اطراف رگ‌های خونی کبد دیده می‌شود. تغییرات دژنراتیو مانند هیدروپسی، تورم ابری و نکروز در اطراف سلول‌های کبدی متورم قابل تشخیص است. با پیشرفت تورم کبدی بافت هم‌بند نواحی آسیب دیده، شروع به رشد می‌کند.

خون‌ریزی: عبارت است از خروج خون از رگ‌های خونی(۵). در طول دوره آزمایش در هیچ یک از تیمارهای آزمایشی و گروه کنترل مرگ و میر مشاهده نشد. بررسی‌های بافت‌شناسی ماهیان که در معرض ورتیمک قرار داشتند، نشان‌دهنده بروز ناهنجاری‌های ساختاری در بافت کبد بود. به‌طوری‌که این تغییرات در مقایسه با بافت‌های گروه شاهد اختلاف بسیاری داشته و این تغییرات با افزایش غلظت سم ورتیمک افزایش یافت. در مطالعه‌ای که توسط بنایی و همکاران بر روی آسیب-شناسی بافتی کبد ماهی قزل‌آلای رنگین کمان تحت دو غلظت تحت‌کشنده دیازینون انجام شد که مهم‌ترین عوارضی هم چون هیپرتروفی سلول‌های کبدی، واکوئله شدن سیتوپلاسم سلولی و تورم ابری مشاهده شد. این نتایج به دست آمده نشان می دهد که تغییرات آسیب شناختی القا شده توسط سم ورتیمک وابسته به روش مواجهه، اندازه و مقدار می‌باشند. مطالعه تغییرات هیستوپاتولوژی انجام شده نشان داد، در هر سه غلظت ۲ و ۳ و ۶ ppm سم ورتیمک بافت کبد دچار آسیب شده است. به‌طوری‌که تجمعات و تقسیمات سلولی در بافت کبد به خصوص در اطراف مجاری سینوزوئیدی افزایش یافته است و با افزایش غلظت، میزان این تجمعات و تقسیمات بیش‌تر شده است. کبد ماهی شاخص حساس آلودگی محیط بوده و به دلیل تجمع زیستی فوق العاده

نسبت به سایر بافت‌های بدن، اکثر مطالعات اخیر برای تعیین آلودگی، بر این اندام متمرکز شده است(۲۱). بیشترین و وسیع ترین عارضه‌های مشاهده شده در بافت کبد شامل: تخریب سلول‌های کبدی، آب‌آوردگی، خونریزی و نکروز بود. که این عارضه‌ها در غلظت ppm۲ سم ورتمیک، با شدت کمتری بروز نمود. ولی با افزایش غلظت و مدت زمان قرارگیری در برابر سم (ppm۶)، میزان آسیب وارد شده نیز بیشتر بود. این تجمع صفرا آسیب احتمالی به متابولیسم کبدی را نشان می‌دهد(۱۰). بنابراین به نظر می‌رسد تغییرات هیستوپاتولوژیک ایجاد شده در کبد و آبشش ماهی کپور معمولی پس از مواجهه با سم ورتیمک نوعی پاسخ فیزیولوزیک باشد که جاندار برای ممانعت از ورود این مواد به بدن خود و جلوگیری از آسیب‌های بیشتر ایجاد کرده است. هم‌چنین پارگی در هپاتوسیت موجب شد تا مواد سلولی از آن خارج شود و وجود خون در سینوزوئیدهای کبدی، وجود صفرا در سلول‌های هپاتوسیت و سیتوپلاسم، وجود خون در مجاری صفراوی و یا خون‌ریزی، رگ‌زایی، پرخونی در وریدهای مرکزی لوبولی و سینوزوئیدها، تجمعات سلولی و یا ارتشاح شدید سلول‌های دفاعی در پارانشیم کبدی و حذف در بافت کبد مشاهده شد. از آن جائی که نقش کبد در تجزیه و خروج سم است تأثیر سم ورتیمک بر کبد نشان می‌دهد که وقتی سم وارد بدن ماهی شده وارد کبد شده و بر روی آن تأثیر زیادی گذاشته و به بافت آسیب رسانده است(۲۰). اکرمی و همکاران در سال ۱۳۸۷ اثر استفاده از اینولین در سطوح ۱، ۲ و ۳ درصد را در جیره‌ی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان بررسی کردند. یافته‌های آن ها نشان داد که این نوع پربیوتیک نمی‌تواند مکمل مناسبی برای جیره‌ی غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در نظر گرفته شود و در تیمارهای تحت بررسی تفاوت آماری معنی داری در نرخ بازماندگی مشاهده نگردید.

در مطالعه‌ای دیگر، با افزودن اینولین به میزان ۵ یا ۱۰ g/kg جیره ماهی سیم دریایی(*Spaus aurata*) طی مدت ۱ تا ۲ هفته در شرایط پرورشی دریافتند که اینولین بازدارندگی معنی‌داری در پارامترهای سیستم ایمنی به دنبال دارد و پیشنهاد کردند که اینولین نمی‌تواند محرک ایمنی مناسبی برای این گونه باشد(۸). که نتایج این مطالعه نشان داد که افزودن پروبیوتیک ایزومالتو الیگوساکارید به تنهایی در جیره غذایی ماهی کپور معمولی باعث ایجاد آسیب و ایجاد عارضه در بافت کبد، آبشش شده است. اکرمی و همکاران در سال ۱۳۸۷ تاثیر پربیوتیک اینولین را در سه سطح ۱، ۲ و ۳٪ بر روی شاخص‌های تغذیه‌ای فیل ماهیان جوان پرورشی بررسی کردند. نتایج حاصل، حاکی از ارتباط منفی پربیوتیک اینولین و برخی شاخص‌های تغذیه‌ای شامل کارایی بقاء انرژی، نسبت کارایی پروتئین و کارایی غذا در فیل ماهیان بود. به طوری که در سطح ۳٪ مقادیر فاکتورهای فوق، در مقایسه با سایر تیمارها کاهش یافت. پروبیوتیک استفاده شده به میزان یک گرم بر کیلوگرم واحد غذا در این مطالعه نتوانست بر آسیب‌های بافتی ناشی از غلظت‌کشنده سم ورتمیک بکاهد و تیمارهایی که بعد از دادن پروبیوتیک در معرض سم ورتمیک قرار گرفتند عارضه‌های بافتی نظیر تخریب سلول‌های کبدی، آب‌آوردگی، خونریزی، نکروز و کاریولیز هسته در بافت کبد و عارضه های هایپرپلازی تیغه اولیه، خونریزی، نکروز، چسبندگی تیغه‌های ثانویه، چماقی شدن تیغه‌های ثانویه، تخریب لاملاهای ثانویه، کوتاه شدن و خمیدگی لاملاهای ثانویه در بافت آبشش مشاهده شد که عارضه‌ها به ترتیب در غلظت ppm۶، ppm۳ و ppm۲ بیشترین اثر تخریب را در بافت کبد، آبشش نشان دادند. اوجی فرد و همکاران در سال ۱۳۸۷ در مطالعه‌ای که روی میگوی وانامی(*Litopenaeus vannamei*)، یک دوز(۲ درصد) پربیوتیک اینولین در جیره مورد استفاده قرار دادند که

نتایج این مطالعه نشان داد پربیوتیک اینولین اثری بر فاکتورهای رشد، کارایی مصرف جیره و بازماندگی بچه میگوها ندارد(۳). Staykov و همکاران در سال ۲۰۰۷، در مطالعه‌ای روی قزل‌آلای رنگین کمان در دو سیستم پرورش در قفس و کانال‌های دراز، اثر افزودن پربیوتیک مانان‌الیگوساکارید را روی فاکتورهای رشد، بازماندگی و ایمنی این ماهی بررسی کردند و دریافتند که در هردو سیستم ذکر شده افزودن این پربیوتیک به طور معنی‌داری وزن، بازماندگی ایمنی را فزایش و ضریب تبدیل غذایی را کاهش داد(۲۴). این مطالعه نشان داد که غلظت‌های کشنده سم ورتمیک باعث آسیب‌های شدید در بافت کبد و آبشش و روده می‌شود. که شدت این آسیب‌ها با افزایش غلظت در ppm۶ سم ورتمیک و افزایش مدت زمان قرار گیری در معرض سم 96h افزایش پیدا می‌کند.

و هم چنین استفاده از پربیوتیک ایزومالتو الیگوساکارید به میزان یک گرم در کیلوگرم به تنهایی باعث بروز عارضه در بافت کبد، آبشش و روده گردید و تیمارهایی که به آن‌ها پربیوتیک داده شده بود زمانی که در معرض غلظت‌های کشنده سم ورتمیک قرار گرفتند. پربیوتیک ایزومالتو الیگوساکارید نتوانست از میزان عارضه‌های ناشی از آسیب بافتی سم ورتمیک در بافت کبد، آبشش بکاهد. بنابر این با توجه به اثر منفی پربیوتیک ایزومالتو الیگوساکارید بر بافت کبد و آبشش این پربیوتیک نمی-تواند اثری بر بهبود ایمنی ناشی از تخریب سم ورتیمک داشته باشد، هرچند این امر می تواند به دلیل غلظت های مورد استفاده پروبیوتیک و دوره مواجهه باشد که نیاز به بررسی بیشتر در مطالعات آتی دارد.

منابع

۱–اکرمی، ر.، قلیچی، ا.، ابراهیمی، ا. ۱۳۸۷. تأثیر سطوح مختلف پربیوتیک اینولین بر رشد و زنده مانی ماهی قزل آلای رنگین کمان(*Oncorhynchus mykiss*). خلاصه مقالات اولین کنفرانس ملی علوم شیلات و آبزیان ایران، صفحه ۱۲–۱۰.

۲–اکرمی، ر.، کریم آبادی، ع.، محمدزاده، ح.، احمدی فر، ا. ۱۳۸۸. تاثیر پربیوتیک مانان الیگوساکارید بر رشد، بازماندگی، ترکیب بدن و مقاومت به تنش شوری در بچه ماهی سفید(Rutilus *frisii kutum*). مجله علوم وفنون دریایی، ۴۷–۵۷.

۳–اوجی فرد، ا.، عابدیان کناری، ع.، نفیسی بهابادی، م.، عباس زاده،ا. ۱۳۸۷. تأثیر پربیوتیک اینولین بر ترکیب اسیدهای چرب عضله میگوی پاسفید غربی(*Litopenaeus vannamei*). خلاصه مقالات اولین کنفرانس ملی علوم شیلات و آبزیان ایران، صفحه ۱۵–۱۳.

٤–ستاری، م.، شاهسونی، د.، شفیعی،ش. ۱۳۸۲. ماهی-شناسی۲. نشر حق‌شناس.۵۹۷ ص.

۵–هدایتی، ع.، جهانبخشی، ع.، قادری‌رمازی، ف. ۱۳۹۲. سم‌شناسی آبزیان. چاپ اول، انتشارات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران، صفحه: ۲۱۰.

6.Braunbeck, T., Appelbaum, S. (1999). Ultrastructural alterations in the liver and intestine of carp *Cyprinus carpio* induced orally by ultra-low doses of endosulfan. Diseases of Aquatic Organisms, 36(3);183-200.

7.Çaliskan, M., Erkmen, B., Yerli, S.V. (2003). The effects of zeta cypermethrin on the gills of common guppy *Lebistes reticulatus*. Environmental Toxicology and Pharmacology, 14(3); 117-120.

8.Cerezuela, R., Cuesta, A., Meseguer, J., (2008). Effect of inulin on gilthead Seabream (*Sparus aurata*) innate immune parameters. Fish & Shellfish Immunology, 24(5); 663-668.

9.Csillik, B., Fazakas, J., Nemcsok, J., Knyihar-Csillik, E. (2000). Effect of the pesticide deltamethrin on the mauthner cells of lake balaton fish. Journal of Neurotoxicology, 21; 343-352.

10. Fanta, E., Rios, F. S., Romao, S., Vianna, A. C. C., and Freiberger, S. (2003). Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. Journal of Ecotoxicology and Environmental Safety, 54; 119-130.

11. Flickinger, EA., Van Loo, J., Fahey, G.C. (2003). Nutritional responses to the presence of inulin and oligofructose in the diets of domesticated animals: A Review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 43(1); 19-60.

12. Hedayati, A., Tarkhani, R. (2014). Hematological and gill histopathological changes in iridescent shark, *Pangasius hypophthalmus*(Sauvage, 1878) exposed to sublethal diazinon and deltamethrin concentrations. Fish Physiology and Biochemistry, 40; 715-720.

13. Liu, K., Chiu, C., Shiu, Y., Cheng, W., Liu, C. (2010). Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. Fish and Shellfish Immunology, 28; 837-844.

14. Mahious, A.S. (2005). Prebiotics in aquaculture: new strategy for larviculture improvement. LARVI 05. Fish & Shellfish Larviculture Symposium Belgium, 311-313.

15. Mahious, A.S., Ollevier, F. (2005). Probiotics and prebiotics in aquaculture: a review. 1st regional workshop on techniques for enrichment of live food for use in larviculture. Artemia and aquatic Animals Research Institute, 17-26.

16. Mansingh, A., Wilson, A. (1995). Baseline studies on the status of insectidical pollution of Kingston Harbour Insecticide contamination of Jamaican environment. 3. Marine Pollution Bulletin, 30; 640-643.

17. Martoja, R., Martoja–Pierson, M. (1967). Initiation aux techniques de l histology animale. Masson et Cie, Paris. 345 p.

18. Pelgrom, S., Lamers, L., Lock, R., Balm, P., Wendelaar Bonga, S.E. (1995). Integrated physiological response of tilapia (*Orechromis mossambicus*) to sublethal copper exposure. Aquatic Toxicology, 32(4); 303-320.

19. Piri Zirkoohi, M., Vince, O. (1997). Effect of some pesticides commonly used in iranian agriculture on aquatic food chain. Thesis submitted to the Hungarian Academy of Sciences for Ph.D. degree, 131p.

20. Rastogi, I.D. (2012). Nanotechnology:safety paradigms. Journal of Toxicology and Environmental Health, 4(1);1-12.

21. Safahieh, A., Hedayati, A., Savari, A., Movahedinia, A., (2011). Effect of sublethal dose of mercury toxicity on liver cells and tissue of yellowfin seabream(*Acanthopagrus latus*). Toxicology and industrial health, 28(7); 583-92.

22. Satyanarayan, S. Satyanarayan, J.P.K.A., Verma, S. (2012). Histopathological changes due to some chlorinated hydrocarbon pesticides in the tissues to *Cyprinus carpio*. IOSR Journal of Pharmacy, 2; 60-66.

23. Schley, P.D., Field, C.J. (2002). The immune-enhancing effects of dietary fibres and prebiotics. British Journal Nutrition, 87; 221-23.

24. Staykov, Y., Spring, P., Denev, S., Sweetman, J. (2007). Effect of a mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*) . Aquaculter International, 17; 153-161.

25. Thitaram, S., Chung, C. H., Day, D. F., Hinton, A., Bailey, J. S., Sirausa, G.R. (2005). Isomaltooligosaccharide increases cecal *Bifido bacterium* population in young broiler chickens. Poultry Science, 84(7); 998-1003.

26. Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N. P. E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. Journal of Environmental Toxicology Pharmacology, 13(2); 57–149.

27. Vutukuru, S.S., Prabhath, N.A., Raghavender, M., Yerramilli, A. (2007). Effect of arsenic and chromium on the serum amino-transferases activity in indian major carp, *Labeo rohita*. International Journal Of Environmental Research And Public Health, 4; 224-227.

.

The effect of Isomaltooligosaccharide Feed Additives in Damage Tissue in Common Carp (*Cyprinus carpio*) in the Face of Vertimec

Seyyed A. Hedayati [1], F. Darabitabar[2]

1.Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. Gorgan.Iran.

2.PhD Student of Aquatic Ecology, Khoramshahr Marine Science and Technology University. Khoramshahr.Iran.

darabitabar@gmail.com

Received:2017.9.12 **Accepted: 2018.14.10**

Abstract

Inroduction & Objective: Prebiotic and non-digestible food components which selectively stimulate the growth and enable one or a number of bacteria in the gut, beneficial effects on the host and can improve the health of the host. To assess the toxicity of environmental pollutants in fish are different physiological parameters, including histologic.

Material and Method: In this study, 147 pieces of common carp were stormed at aquarium for about two weeks to adapt to environmental conditions. LC50 / 96h was calculated as 1.234 mg/l and on the basis of that, three lethal concentration 2ppm, 3ppm, 6ppm were considered for this review. Added prebiotic isomalto-oligosaccharides in food took placed with spray method as 1 g/kg. During the period under prebiotics affect fish and poison fish by 220 mg/l of solution anesthetic clove quickly lost consciousness and liver and gills was removed for histological studies.

Results: The results showed that the probiotic treatments were exposed to poison abamectin led some lesions such as destruction of liver cells, Ascites, hemorrhage, necrosis and nuclear Karyolysis in the liver and symptoms of early blade hyperplasia, hemorrhage, necrosis, secondary blade attachment, the gill tissue was observed that the effect of the concentration 6ppm, 3ppm and 2ppm most severe effects on the liver, gills and intestines showed.

Conclussion: Isomalto-oligosaccharides probiotics could result in conditions of tissue damage in the liver of toxins Abamectin, reduce the gills and intestines carp fish.

Keywords: Isomalto-oligosaccharides, tissue damage, Vertimec poison, common carp