Autumn (2024) 13(50): 1-9
DOI: 10.30473/eab.2025.72947.1973
Received: 1 Dec 2024 Accepted: 25 Feb 2025

Experimental Animal Biology Open Access

ORIGINAL ARTICLE

Molecular isolation of Lactobacillus acidophilus and investigation of blood parameters caused by diazenone poisoning in Hypophthalmichthys nobilis

Azam Ghorbannia Delavar[1(0000000279547038)], Saeed Alinejad Moalem[2]

[1]Department of Biology, Payam Noor University, Tehran, Iran.
[2]Department of Laboratory Sciences, Islamic Azad University, Babol Branch, Iran.

Correspondence
Azam Ghorbannia Delavar
Email: A.ghorbannia@pun.ac.ir

How to cite
Ghorbannia Delavar, A., & Alinejad Moalem, S. (2024). Molecular isolation of Lactobacillus acidophilus and investigation of blood parameters caused by diazenone poisoning in Hypophthalmichthys nobilis. *Experimental Animal Biology*, *13*(50), 1-9.

ABSTRACT

Diazenone is one of the most important organospheric pesticides that is widely used in agriculture and homes to control insects in the soil, plants and other crops. Diazenone is used to control plant pests in many agricultural fields that are located near fresh water sources, It is common.Therefore, in this research, the effect of agricultural poison diazenon was investigated by calculating LC50 on blood parameters and lactobacilli in the intestine of *Hypophthalmichthys nobilis*. In this experiment, fish were exposed to different concentrations of diazenon poison for 15 days. The amount of blood parameters of red and white blood cells and the presence of lactobacillus species were investigated in 6 treatments with 3 repetitions over a period of 15 days. Then, blood sampling and sampling from the intestines of *Hypophthalmichthys nobilis* were done. The results showed that the hematological indices of Red carp exposed to different doses of diazenon poison showed a significant decrease in RBC and WBC with increasing poison concentration ($p<0.05$). Also, the results showed that in all different doses of diazenon poison, the lack of growth of Lactobacillus bacteria compared to the control group on MRS agar culture medium had significant differences ($p<0.05$). Finally, it can be mentioned that the use of intestinal and blood Lactobacillus samples to investigate the microbial and hematological indicators of Sargandeh carp can be used as biomarkers for measuring and tracking the effects of diazenon poison in aquatic communities.

KEYWORDS

Diazenon, *Hypophthalmichthys nobilis*, blood parameters, lactobacillus.

© 2023, by the author(s). Published by Payame Noor University, Tehran, Iran.
This is an open access article under the CC BY 4.0 license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

سال سیزدهم، شماره دوم، پیاپی پنجاهم، پاییز ۱۴۰۳ (۱-۹)

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۹/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۰۷

DOI: 10.30473/eab.2025.72947.1973

نشریه علمی

زیست‌شناسی جانوری تجربی

«مقاله پژوهشی»

جداسازی مولکولی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بررسی فراسنجه خونی ناشی از آلودگی سم دیازینون در ماهی کپور سرگنده

اعظم قربان‌نیا دلاور [۱](۰۰۰۰۰۰۰۲۷۹۵۴۷۰۳۸)، سعید علی‌نژاد معلم [۲]

[۱]گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.
[۲]گروه علوم آزمایشگاهی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل، ایران.

نویسنده مسئول:
اعظم قربان‌نیا دلاور
رایانامه: A.ghorbannia@pun.ac.ir

چکیده

دیازینون یکی از مهم‌ترین آفت‌کش‌های ارگانوفسفری است که به‌طور وسیعی در کشاورزی و منازل به‌منظور کنترل حشرات در خاک، گیاهان و محصولات زراعی دیگر کاربرد دارد. استفاده از دیازینون برای کنترل آفات نباتی در بسیاری از مزارع کشاورزی که در مجاورت منابع آب شیرین واقع شده‌اند، بسیار رایج است. از این‌رو، در این پژوهش اثر سم کشاورزی دیازینون را با محاسبه LC50 بر روی فراسنجه خونی و جداسازی مولکولی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس موجود در روده در ماهی کپور سرگنده موردبررسی قرار گرفت. در این آزمایش ماهی‌ها به‌مدت ۱۵ روز در معرض غلظت‌های مختلف سم دیازینون قرار گرفتند سپس میزان پارامترهای خونی گلبول‌های قرمز و سفید خونی و وجود گونه‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در شش تیمار با سه تکراردر طی مدت ۱۵ روز موردبررسی قرار گرفت. سپس خون‌گیری و نمونه برداری از روده ماهی کپور سرگنده انجام شد. نتایج نشان داد که شاخص‌های هماتولوژیک ماهی کپور سرگنده در معرض دوزهای مختلف سم دیازینون، کاهش معنی‌دار گلبول‌های قرمز و سفیدرا با افزایش میزان غلظت سم نشان دادند ($p<0/05$). همچنین در تمامی دوزهای مختلف سم دیازینون، در جداسازی مولکولی (PCR) عدم شناسایی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس نسبت به گروه شاهد، مشاهده گردید ($p<0/05$). در نهایت می‌توان اذعان نمود که استفاده از آفت‌کش دیازینون، باعث آلودگی منابع آبزی و از بین‌رفتن فلور نرمال جمعیت باکتری در روده آبزیان و کاهش فراسنجه خونی و درنهایت مرگ آن‌ها می‌شود.

واژه‌های کلیدی

فراسنجه خونی، دیازینون، لاکتوباسیلوس اسیدو فیلوس، کپور سرگنده.

استناد به این مقاله:

قربان‌نیا دلاور، اعظم و علی‌نژاد معلم، سعید (۱۴۰۳). جداسازی مولکولی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بررسی فراسنجه خونی ناشی از آلودگی سم دیازینون در ماهی کپور سرگنده. *فصلنامه زیست‌شناسی جانوری تجربی*، ۱۳(۵۰)، ۱-۹.

مقدمه

در سال های اخیر توسعه فزاینده کشاورزی با رشد سریع صنعتی‌شدن، باعث افزایش چشم‌گیر تولید و استفاده از کودهای شیمیایی، سموم دفع آفات، محصولات پتروشیمی، مواد شوینده و سایر مواد شیمیایی مصنوعی گردیده است که همین امر باعث تهدید جدی برای اکوسیستم آبی و زندگی آبزیان شده است (Ma *et al*., 2019). عمده آلودگی آب به‌وسیله سموم و آفت‌کش‌های مورد استفاده در کشاورزی به‌همراه رواناب سطحی و زهکشی زیرسطحی است که معمولاً ظرف چند هفته پس از بکارگیری اتفاق می‌افتد (Banaee *et al*., 2019).

اکوسیستم‌های آبی اگرچه به‌عنوان محیط هدف و اثر سموم آفت‌کش مدنظر نمی‌باشند با این وجود نتایج برخی از مطالعات پایشی حضور دیازینون و متابولیت آن دیازوکسون و یا سایر سموم را در آب‌های سطحی نمایان ساخته است (Sereshti *et al*., 2010).

دیازینون[1] یکی از مهم‌ترین آفت‌کش‌های ارگانوفسفره با فعالیت آنتی‌کولین استراز بوده که دارای فرمول شیمیایی C12H21N2O3PS می‌باشد (Larkin & Tjeerdema, 2000).

این سم دارای مصارف زیادی در بخش‌های مختلف از جمله مبارزه با آفات کشاورزی و حتی مصارف خانگی نیز HSJ و به‌علت کاربرد ساده و قیمت پایین، در بسیاری از مناطق ایران به‌ویژه در استان‌های شمالی به میزان زیادی علیه آفات مختلف به‌کار می‌رود. مطالعات بسیاری در ایران بر روی دیازینون صورت گرفته و براساس آن گزارش شده است که برخی از آب‌های سطحی و محیط‌های اطراف آن‌ها به این سم و مشتقات آن آلوده هستند (Arjmandi *et al*., 2010).

دیازینون معمولاً از سم‌پاشی بر روی محصولات و گیاهان زراعی به سهولت شسته شده و وارد آب‌های سطحی و زیرزمینی می‌شود و در نهایت، مقادیر زیادی از این سم وارد محیط‌های آبی خواهد شد (Coppage & Matthews, 1974). اگرچه دیازینون به سرعت تجزیه می‌شود اما تحت شرایط خاص، پایین‌بودن دما، رطوبت پایین، قلیاییت بالا و فقدان فعالیت تجزیه‌ای میکروبی می‌تواند تا شش ماه از نظر زیستی در خاک فعال باقی بماند (Eisler, 1986). توزیع دیازینون در آب می‌تواند بر دامنه گسترده‌ای از موجودات غیرهدف مانند بی‌مهرگان، پستانداران، پرندگان و ماهی‌ها که در اکوسیستم‌های آبی زیست می‌کنند، تأثیر بگذارند (Burkepile *et al*., 2000).

دیازینون از طریق باندشدن با آنزیم‌های عصبی استیل کوین استراز و بلوکه‌نمودن آن سبب اسپاسم عضلانی در جانوران می‌گردد (Eisler, 1986).

مقدار LC50[2] دیازینون بسیار متغیر است و به سن، وزن، جنسیت جاندار و شرایط اقلیمی محیط بستگی دارد. دوزهای تحت کشنده دیازینون ممکن است منجر به کاهش مقدار رشد و توان تولید مثل و بقای بی‌مهرگان آبزی و همچنین کاهش توان زادآوری، اختلال در تغذیه و افت وزن و نیز ناهنجاری‌های عصبی و رفتاری در ماهی‌ها، دوزیستان، پرندگان و پستانداران می‌شود (Dutta & Arends, 2003). ورود دیازینون به آب‌های سطحی و قرارگرفتن ماهیان در معرض آن، حتی در دوزهای پایین نه تنها موجب بروز اختلالات عصبی در ماهیان می‌گردد بلکه سبب بروز ناهنجاری در آبشش (Dutta *et al*., 1997) سیستم ایمنی (Dutta *et al*., 1997) سیستم بویایی و اختلال در بروز رفتارهای تولید مثلی نیز می‌شود (Moore & Waring, 1996).

متأسفانه مصرف بیش از حد این سم در ایران و ورود آن از طریق زهکشی مزارع کشاورزی به‌ویژه پس از بارش باران به آب‌های سطحی خطری جدی و بالقوه برای آبزیان رودخانه‌ها، تالاب‌ها و آب بندها و استخرها به‌شمارمی‌آید (Shayeghi, 2007).

نفوذ زهکش مزارع کشاورزی، روان آب‌های سطحی و فاضلاب‌های شهری حاوی سم دیازینون به منابع مختلف آبی همچون رودخانه‌ها، تالاب‌ها، دریاچه‌ها، آب‌بندها و مزارع پرورش ماهی و دیگر آبزیان به‌ویژه پس از بارش باران‌های فصلی می‌تواند بر طیف گسترده ای از موجودات غیرهدف نظیر ماهی‌ها، که در این اکوسیستم‌های آبی زیست می‌کنند، تأثیر بگذارد و حتی موجب مرگ و میر بسیاری از آن‌ها و تجمع زیستی این سم در بدن آن‌ها گردد (Burkepile *et al*., 2000).

دیازینون از طریق آبشش ها، پوست و سیستم گوارشی به راحتی وارد بدن ماهی‌ها می‌شود. قابلیت انحلال این سم در چربی سبب شد تا این سم به‌راحتی از ساختار فسفولیپیدی غشاهای زیستی عبور نماید و در طی کم‌تر از ۲۴ ساعت از قرارگرفتن ماهی‌ها در معرض این سم، غلظت آن در بافت‌های مختلف بدن به‌ویژه خون به سطح مشابه غلظت این سم در محیط می‌رسد و در بافت های مختلف بدن تجمع می‌یابد. اگر چه سنجش عمده‌ای از سم وارد شده به بدن پس از سم‌زدایی در کبد از بدن دفع می‌گردد اما بخشی از آن نیز ممکن است در بافت‌های مختلف بدن از جمله غددجنسی تجمع یابد (Sahlab, 1994).

1. Diazinon

2. Lethal concentration

ماهی‌ها پس از قرارگرفتن در معرض یک آلاینده، بخش قابل توجهی از انرژی دریافتی از طریق غذا را صرف برقراری هموستازی و حفظ تعادل فیزیولوژیکی خود در جهت مقابله با پیامدهای ناخواسته ورود سم به بدن خود می‌نمایند. از سوی دیگر کاهش اشتهای این ماهی‌ها و همچنین ایجاد تغیر در توانایی دریافتن و گرفتن غذا ناشی از تأثیر سم دیازینون بر عوامل بویایی و چشایی و نیز بلوکه‌نمودن فعالیت استیل کولین استراز نیز موجب تشدید وخامت وضعیت فیزیولوژیکی این ماهی‌ها می‌گردد (Fulton & Key, 2001).

ماهیان استخوانی شاخص مناسبی از آلودگی به‌وسیله آلاینده‌ها می‌باشند، چرا که پاسخ‌های بیوشیمیایی آن‌ها مشابه پاسخ‌های موجود در پستانداران می‌باشد. دلیل اصلی انجام آزمایش‌های سمیت توسط ماهی و دیگر ارگانیسم‌های آبی تعیین غلظت موادی است که برای ارگانیسم‌ها مضر می‌باشد (Banaee *et al*., 2011). ماهی به‌عنوان مهم‌ترین و حیاتی‌ترین حلقه در زنجیره غذایی اکوسیستم در نظر گرفته می‌شود و صنعت ماهی‌گیری در داخل یک کشور، تامین کننده منابع مهم پروتئین در رژیم غذایی آن کشور است، لذا درک کاملی از اثرات سموم دفع آفات روی ماهیا برای حفظ ماهی و توسعه شیلاتی بسیار حیاتی است (Sabra & Mehana, 2015). بسیاری از سموم دفع آفات منجر به تغییرات بیوشیمیایی کشنده در ماهی‌ها می‌شوند، که شامل تغییرات غلظت یون، ترکیبات ارگانیک، فعالیت آنزیم، فعالیت غدد درون ریز و تنظیم اسمزی می‌باشند (Kondera *et al*., 2017).

ماهی کپور سرگنده (*Hypophthalmichthys nobilis*) از ماهیان آب شیرین متعلق به خانواده کپور ماهیان، گونه غیربومی که به‌صورت چند گونه‌ای در سیستم‌های گرمابی پرورش داده می‌شود (Heydari *et al*., 2014).

ماهی کپور سرگنده یکی از فراوان‌ترین ماهیان پرورشی در مزارع گرمابی بوده و برای کشت متراکم مورداستفاده قرار می‌گیرد و نیز درصد نسبت بالایی از سیستم پرورشی را به خود اختصاص می‌دهد، همچنین به‌دلیل این‌که تامین آب این مزارع پرورشی از رودخانه‌های مجاور بوده که به‌طور حتم از کنار باغات و مزارع زراعی می‌گذرند، لذا بررسی حاضر می‌تواند کمک شایانی به فهم میزان اثرات این سموم بر آبزیان موردنظر نماید، از سوی دیگر همواره از این گونه به‌عنوان مدل جهت بررسی کپورماهیان استفاده می‌شود (Lee & Gibbons, 1997).

پارامترهای خونی شرایط نامطلوب محیطی را برای ماهیان سریعتر از پارامترهای دیگر نشان می‌دهند و تا حد زیادی برای تعیین وضعیت سلامت و نظارت بر پاسخ‌های استرسی ماهیان برای پیش‌بینی سازگاری‌های فیزیولوژیکی آن‌ها استفاده می‌شود (Banaee *et al*., 2008).

باکتری‌های اسید لاکتیک مهم‌ترین میکرواورگانیسم‌های پروبیوتیک بوده، که شامل باکتری‌های متنوعی مانند لاکتوباسیل‌ها و *Bifidobacterium* می‌باشد. لاکتو باسیل‌ها، باسیل گرم مثبت، بدون حرکت، بدون اسپور وکاتالاز منفی هستند و قندهای مختلف را به لاکتات و استات تبدیل می‌کنند (De LeBlanc & LeBlanc, 2014).

لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس از دستگاه گوارش انسان و حیوانات گوناگون، محوطه دهانی و واژن انسان، خمیر ترش و شراب جدا شده است. دمای رشد مناسب برای این باکتری ۳۴ تا ۳۷ درجه است و رشد باکتری در ۱۵ درجه سانتی‌گراد منفی اما در ۴۵ درجه مثبت است. این باکتری توانایی تخمیر اکثر قندها را دارا می‌باشد و تنها قند مانیتول را نمی تواند تخمیر کند (De Vos *et al*., 2009).

مهم‌ترین فعالیت پروبیوتیک‌ها در لوله گوارش ماهی از طریق بهبود جذب غذا با تولید آنزیم‌های خارج سلولی و ویتامین‌ها است. نتایج آزمایشات مختلف نشان داده شده که رشد، درصد افزایش وزن، سرعت رشد ویژه، راندمان مصرف خوراک، نسبت راندمان پروتئین و افزایش پروتئین در ماهی‌های تغذیه شده با پروبیوتیک بیش‌تر بوده است. تأثیر مهم دیگر پروبیوتیک ها کاهش میزان بروز و شیوع بیماری‌ها، تقویت سیستم ایمنی و فعالیت های ضد ویروسی است (Behnsen *et al*., 2013).

از طرف دیگر ماهیان از جمله مهم‌ترین موجودات آبزی به‌شمار می‌آیند که علت ارزش اقتصادی و حساسیت در برابر آلاینده‌ها از اهمیت خاصی برخوردار بوده و به همین دلیل انجام آزمایش‌های زیست‌سنجی در بعد وسیعی از آن استفاده می‌گردد (Shariati *et al*., 2013).

لذا با توجه به پیامدهای نامطلوب دیازینون بر روی ماهی‌ها، اثرات این سم در تغییر پارامترهای خونی و باکتری لاکتوباسیلوس در ماهی کپور سرگنده بررسی شد. از آنجایی که ماهی کپور سرگنده به‌عنوان یکی از فراوان‌ترین و مهم‌ترین ماهیان پرورشی در مزارع گرمابی است و درصد نسبتاً بالایی از این سیستم پرورش را به خود اختصاص می‌دهد. همچنین یکی از گونه‌های ماهیان پرورشی در مناطق مختلف ایران به‌شمار می‌آید (Shahbazi *et al*., 2013). که محل پرورش آن‌ها اغلب در نزدیکی زمین‌های کشاورزی است و به‌خوبی با شرایط آزمایشگاهی نیز، سازگار است. بنابراین مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر سم دیازینون به‌عنوان یک عامل، برروی تغییرات پارامترهای خونی در ماهی کپور سرگنده معمولی انجام شد.

با توجه به وجود مقادیر قابل‌توجه سموم دیازینون در اکوسیستم‌های آبی کشور به‌ویژه رودخانه‌های مجاور با مزارع بسیار وسیع کشاورزی اعم از شالیزار، گندم زار، مرکبات و باغ‌های چای و نظر به اثرات بالقوه این سموم بر پارامترهای فیزیولوژیک ماهیان، در پژوهش حاضر به بررسی پاسخ‌های هماتولوژیکی وحضور لاکتوباسیلوس‌ها در ماهی کپور سرگنده و تعیین برخی از شاخص‌های خونی و روده‌ای به‌عنوان نشانگرهای آلودگی در مواجهه با آفت‌کش دیازینون در ماهی کپور سرگنده پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش، از ۳۶۰ عدد ماهی کپور سرگنده معمولی در ۱۸ تانک ۱۸۰ لیتری استفاده شد. در هر تانک تعداد ۲۰ عدد ماهی کپور سرگنده در وزن‌های ۴۵-۳۰ گرمی استفاده شد. آزمایش با شش تیمار در سه تکرار انجام گرفت. ماهیان کپور سرگنده به کارگاه پرورش ماهیان زینتی منتقل شدند. بچه ماهیان برای سازگاری با شرایط محیطی به‌مدت یک هفته نگهداری و با مکمل پروبیوتیکی مورد تغذیه قرار گرفتند و در طی این مدت پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب طبق جدول (۱) تحت کنترل بودند. فاکتورهای اندازه‌گیری‌شده آب مخازن به شرح زیر است.

جدول ۱. فاکتورهای اندازه‌گیری‌شده آب مخازن

پارامترها	مقدار
دمای آب (درجه سانتی‌گراد)	۳۰-۲۸
اکسیژن محلول (میلی‌گرم در لیتر)	۹/۵-۷
pH	۸-۷/۵
آمونیاک (میلیگرم در لیتر)	<۰/۲۵
کدورت (میلی‌گرم در لیتر)	۱۰/۲۷±۰/۱۹
سختی (میلی‌گرم در لیتر)	۳۵۰±۱/۲
شوری (میلی‌گرم در لیتر)	۲۴±۰/۰۴

آفت‌کش دیازینون با محاسبه LC50 در پنج دوز متفاوت به آکواریم‌ها اضافه شد (Al-Ghanim, 2012).

غلظت‌های آفت‌کش در آکواریوم‌های مختلف

آکواریوم ۱: آکواریوم شاهد← بدون سم و به‌عنوان شاخص سنجش برای سایر آکواریوم‌ها.

آکواریوم ۲: غلظت ۱۷ µl

آکواریوم ۳: غلظت ۳۴ µl

آکواریوم ۴: غلظت ۵۶ µl

آکواریوم ۵: غلظت ۸۵ µl

آکواریوم ۶: غلظت ۱۱۳ µl

در طول آزمایش، حرکات و رفتار ماهیان مورد ارزیابی قرار گرفتند. در آکواریوم ۵ و ۶ در روزهای آخر شاهد مرگ‌ومیر تعدادی از ماهیان بودیم. بعد از مدت زمان ۱۵ روز ماهی‌ها خون‌گیری شدند و برای بررسی پارامترهای خونی به آزمایشگاه منتقل گردیدند. برای بررسی لاکتوباسیلوس‌ها نمونه‌گیری از روده ماهی انجام گرفته و در محیط کشت MRS، کشت داده شد و سپس در جار بی‌هوازی با شرایط میکروائروفیلیک قرار داده شد. بعد از مدت زمان انکوبه، در صورت وجود کدورت به بررسی باکتری‌ها پرداخته شد و از محیط کشت رشد یافته دوباره نمونه‌برداری و در محیط MRS آگار کشت داده شد. بعد از زمان انکوبه، کلنی موردنظر را برداشته و رنگ‌آمیزی گرم انجام داده و در صورت مثبت‌بودن باسیل گرم مثبت؛ تست کاتالاز، اکسیداز، تست حرکت و تست اندول انجام گردید. برای بررسی گلبول‌های سفید و قرمز خون با قطع ساقه دمی، خون‌گیری انجام گردید و در ویال‌های محتوی ضد انعقاد به آزمایشگاه انتقال داده شد.

شناسایی نمونه با روش PCR

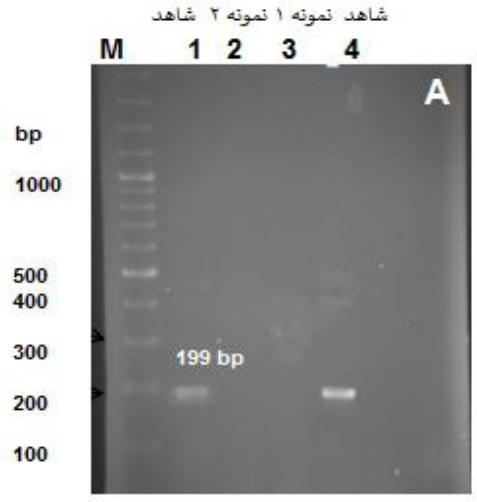
برای تشخیص نهایی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، پرایمرهای اختصاصی برای تکثیر قطعه 16s rRNA مورداستفاده قرار گرفت که اطلاعات مربوطه در جدول (۲) آورده شده است. پرایمر اختصاصی توسط Bioneer سنتز شدند (Massi *et al.*, 2013). حجم نهایی مخلوط اصلی واکنش PCR۲۰ میکرولیتردر نظر گرفته شد که حاوی ۲ میکرولیتر از DNA،۴/. میکرولیتر dNTPs، ۰/۶ میکرو لیتر $MgCl_2$، ۲ میکرو لیتر بافر ۱۰X، ۰/۲ میکرولیتر از آنزیم Taq پلیمرازآنزیم و ۰/۵ میکرولیتر از پرایمر (۲۰ pmol) و میکرولیتر آب مقطر بود. برای PCR از دستگاه Thermo Cyclic شرکت اپندورف استفاده شد. برنامه حرارتی مورد استفاده براساس ژن 16s rDNA برای شناسایی لاکتوباسیلوس‌ها به شرح زیر است. دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴ دقیقه، ۳۵ چرخه تکرار شامل دناتوراسیون در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه، دمای اتصال پرایمر ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای لاکتو باسیلوس‌اسیدوفیلوس طویل سازی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه. طویل‌سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۶ دقیقه بود محصولات PCR در ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شدند. باندهای DNA با استفاده از دستگاه Transilluminator UV مشاهده شدند (Massi *et al.*, 2013). محصول PCR از طریق ترادف‌سنجی و مقایسه ترادف آن با ترادف‌های موجود در بانک ژنی مورد تأیید قرار گرفتند. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

جدول ۲. ترادف‌های پرایمرهای مورداستفاده در این پژوهش

References	Amplicon (bp)	Sequence (5' →3')	Primer sets (target site)	Species
M. Massi	199	CCTTTCTAAGGAAGCGAAGGAT AATTCTCTTCTCGGTCGCTCTA	aci-ITS.F (16S-ITS)	Lactobacillus acidophilus

نتایج

لاکتوباسیلوس در روده ماهی کپور سرگنده در معرض آفت‌کش دیازینون با کشت میکروبی در محیط اختصاصی (MRS) آگار، رشد باکتری‌ها مشاهده شد و باسیل‌های گرم مثبت و کاتالاز، اکسیداز، حرکت و اندول منفی فقط در تیماریک (آکواریوم شاهد) جدا گردید و در سایر تیمارها کلنی لاکتوباسیلوس را جدا نگردید. بعد از جداسازی باکتری، تست مولکولی (PCR) انجام گردید. برای تشخیص گونه لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، پرایمرهای اختصاصی برای تکثیر ژن 16s rRNA مورداستفاده قرار گرفت. بعد از انجام مراحل، محصول PCR بر روی ژل الکتروفورز قرار گرفت و باند اختصاصی لاکتوباسیلوس‌اسیدوفیلوس توسط دستگاه ژل داک مشخص گردید (شکل ۱). در نتیجه حضور لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در تیمارهای مختلف؛ منفی گزارش گردید، ولی در نمونه شاهد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس جدا گردید و در بررسی آماری تفاوت معنی‌دار بین تیمار اول (شاهد) و سایر تیمارها با دوز مختلف آفت‌کش دیازینون مشاهده گردید ($p<۰/۰۵$).



شکل ۱. نتایج حاصل از الکتروفورز. A) ستون های شماره ۱ و ۴ حضور ژن هدف را در نمونه شاهد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (199bp) نشان می‌دهد، اما سایر نمونه‌ها که دوز دیازینون را دریافت کردند فاقد این باکتری می‌باشند.

میانگین میزان تغییرات گلبول سفید خونی تحت تأثیر حشره‌کش دیازینون بر روی ماهیان ماهی کپور سرگنده معمولی در جدول (۳) ارائه شده است.

میزان گلبول‌های سفید خون ماهی کپور سرگنده در معرض آفت‌کش دیازینون با افزایش غلظت سم میزان خون به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. این نتایج نشان داد که در تیمارشش (آکواریوم شماره ۶) بیش‌ترین غلظت سم میزان گلبول‌های سفید خون به کم‌ترین مقدار خود یعنی ۱۱۳۴۰ واحد در خون رسیده است، این در حالی است که بیش‌ترین مقدار این شاخص خونی در تیمار شاهد قابل مشاهده بود (جدول ۳).

میزان گلبول‌های قرمز خون ماهی کپور سرگنده در معرض آفت‌کش دیازینون کاهش معنی‌داری پیدا می‌کند. بیش‌ترین میزان RBC در خون ماهی کپور سرگنده در گروه شاهد و کم‌ترین مقدار RBC در تیمار ۶ با بیش‌ترین مقدار سم مشاهده شد (جدول ۴).

بحث

نتایج این پژوهش نشان داد که غلظت‌های مختلف سموم کشاورزی تأثیرات فیزیولوژیک زیادی بر ماهی کپور سرگنده می‌گذارد، به‌طوری که در مواجه‌شدن کپورسرگنده با آفت‌کش دیازینون، ابتدا باعث ازدست‌دادن تعادل ماهی برای شنا، تیره رنگ‌شدن سطح بدن و زخم که نشانه بیماری وتأثیر آفت‌کش دیازینون بر روی ماهی و سیستم گوارش آن می‌باشد، ایجاد می‌گردد.

نتایج حاصل از بررسی هماتولوژی ماهیان کپورسرگنده در معرض آفت‌کش دیازینون، کاهش معنی‌دار گلبول قرمز و گلبول‌های سفید را با افزایش میزان غلظت سم نشان داد، در پژوهش حاضر با افزایش غلظت آفت‌کش دیازینون، میزان گلبول‌های قرمز ماهی کپور سرگنده به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. همچنین در بررسی لاکتوباسیلوس، فقط در نمونه تیمار ۱ رشد باکتری انجام شد و در سایر دوزهای دیازینون رشدی مشاهده نشد.

Svesbodora *et al.* (1991) شاهد کاهش تعداد سلول‌های قرمز خون و هموگلوبین در ماهی آب شیرین کپور معمولی پس از قرارگیری در معرض دیازینون مطالعه نمودند و کاهش خون‌سازی و وجود کم‌خونی را گزارش نمودند (Svobodova *et al.*, 1991).

جدول ۳. میانگین میزان گلبول سفید سه تکرار در شش تیمار

آکواریم شماره ۱ (شاهد)	آکواریم شماره ۲	آکواریم شماره ۳	آکواریم شماره ٤	آکواریم شماره ٥	آکواریم شماره ٦
۴۸۹۰۰±۸۲۸a	۲۶۴۰۰±۶۲۲b	۲۵۲۰۰±۷۲۵ab	۲۲۵۰۰±۸۱۲b	۱۳۵۵۰±۹۶۱b	۱۱۳۴۰±۶۹۵ab

جدول ٤. میانگین میزان گلبول قرمز سه تکرار در شش تیمار (RBC×1000000)

آکواریم شماره ۱(شاهد)	آکواریم شماره ۲	آکواریم شماره ۳	آکواریم شماره ٤	آکواریم شماره ٥	آکواریم شماره ٦
۱/۷۵ (±۰/۲ab)	۱/۶۳ (±۰/۲b)	۱/۴۲ (±۰/۱ab)	۱/۳۸ (±۰/۳b)	۱/۳۵ (±۰/۳a)	۱/۲۸ (±۰/۲ab)

در مطالعه Benarji *et al.* (1990) به بررسی سایر آفت‌کش‌ها پرداختند که تغییر در پروفایل گلبول قرمز در نتیجه اثرات حاد دیکلرووس در ماهی *Clarias batrachus*، مشاهده نمودند (Benarji, 1990).

در مطالعه حاضر استرس آفت‌کش منجر به شرایط کم‌خونی ماکروکیستیک در کپور سرگنده شده که احتمالاً در اثر از بین رفتن گلبول‌های بالغ و کاهش تعداد سلول‌های قرمز خون بوده، در نتیجه باعث اختلال در مکانیسم ترکیب آهن می‌گردد.

همچنین در پژوهش Banaee *et al.* (2011) گزارش نمودند که کاهش تعداد گلبول‌های قرمز که اثرات مسمومیت با سم دیازینون بر خون‌شناسی و بافت‌شناسی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) مؤثر می‌باشد (Banaee *et al.*, 2019).

Mohammad nejad *et al.* (2011) گزارش کردند که اثرات ارگانوفسفات و دیازینون بر تغییرات خون‌شناسی و بیوشیمیایی ماهی سفید، کاهش تعداد گلبول‌های قرمز است که احتمالاً به‌علت اختلال در روند خون‌سازی ماهی می‌باشد (Mohammadnejad *et al.*, 2011).

Yonar *et al.* (2014) اعلام کردند که کاهش گلبول قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت با ظرفیت حمل اکسیژن خون در ارتباط است که ممکن است به‌علت مهار خون‌سازی و افزایش سرعت تخریب اریتروسیت در اندام‌های خون‌ساز باشد (Yonar *et al.*, 2014).

Khoshbavar *et al.* (2005) در بررسی اثر سم دیازینون بر روی شاخص‌های خونی ماهی ازون‌برون (*Acipenser stellatus*) مشخص گردید که این سم باعث کاهش پارامترهای خونی می‌شود.

Nazifi *et al.* (2001) در بررسی مؤلفه‌های خون‌شناسی ماهی کپور نقره‌ای مسموم شده با تریکلروفون کاهش میزان گلبول‌های قرمز خون ماهیان را در اثر قرارگرفتن در معرض سموم یاد شده گزارش کرده‌اند.

در بررسی Zhang *et al.* (2010) نشان داده است که افزایش درگیری سلول‌ها در فرایندهای ایمنی موجب کاهش تعداد سلول‌های خونی می‌گردد.

شهبازی ناصرآباد و همکاران (۱۴۰۰) در خصوص سموم مالاتیون و دیازینون بر روی ماهی کپور سرگنده تحقیق نمودند و گزارش کردند که با افزایش میزان دوز سم میزان گلبول‌های سفید و قرمز خون ماهی کاهش یافته است که با پژوهش حاضر هم‌خوانی دارد.

همچنین Masud & Singh (2013) گزارش نمودند که گلبول‌های سفید سلول‌های مهمی در سیستم ایمنی هستند، چرا که عملکرد دفاعی اصلی را انجام می‌دهند. گلبول‌های سفید بلافاصله به تغییرات محیطی به‌دلیل تغییرات خارجی پاسخ می‌دهند.

Shamloo *et al.* (2016) بیان نمودند که قرار گرفتن در معرض دیازینون می‌تواند مسمومیت حاد و مزمن را ایجاد کند و به‌طور قابل توجهی باعث آسیب DNA و اثرات آپوپتوز در سلول‌های مختلف انسان و جانوران شود. سم دیازینون باعث افزایش مرگ سلولی با تعدادی از ویژگی‌های خاص آپوپتوز از جمله تغییرات پتانسیل غشا و میتوکندری می‌شود.

باکتری‌های طبیعی و مفید موجود در روده همانند یک ارتش قوی هستند که با بیماری‌ها مبارزه می‌کنند و در صورتی‌که به تعداد زیاد در روده حضور داشته باشند نقش مهمی را در پیشگیری از بیماری‌ها و سلامت بازی خواهند کرد. در پژوهشی دیگر، Diaz *et al.* (2013)، گونه‌های لاکتوباسیل را از دستگاه گوارش دولفین جدا کردند.

Mathialagan *et al.* (2018)، گونه‌های لاکتوباسیلوس را از دستگاه گوارش ماهی‌های آب‌شیرین، (*Labeo calbasu*) برای ارزیابی پتانسیل پروبیوتیکی آن‌ها جدا نمودند.

Simón *et al.* (2021) در پژوهشی که انجام دادند دریافتند که رایج‌ترین گونه‌های پروبیوتیک مورداستفاده در آبزی‌پروری شامل جنس لاکتوباسیلوس‌ها می‌باشد.

در خصوص تأثیر آفت‌کش دیازینون بر روی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس پژوهش‌های زیادی در دسترس نمی‌باشد. نتایج حاضر نشان می‌دهد که سم دیازینون باعث ازبین‌رفتن لاکتوباسیلوس‌ها و احتمالاً سایر باکتری‌ها که به‌صورت فلور نرمال دستگاه گوارش ماهی بوده است که در نهایت منجر به مرگ ماهی می‌شود. در پژوهش حاضر، بررسی فراسنجه خونی و باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* نشان داد که آلودگی سموم کشاورزی تأثیرات زیادی بر عملکرد و مقدار سلول‌های خونی و فلور نرمال دستگاه گوارش داشته و تفاوت معنی‌داری در مقادیر خود نسبت به گروه کنترل (شاهد) نشان دادند.

نتیجه‌گیری

جمع‌بندی کلی نتایج این پژوهش نشان داد که غلظت‌های مختلف سموم کشاورزی تأثیرات فیزیولوژیک زیادی بر ماهی کپور سرگنده می‌گذارد، به‌صورتی‌که در مواجه‌شدن کپور سرگنده با سم دیازینون ابتدا باعث ازدست‌دادن تعادل ماهی برای شنا، سطح بدن تیره رنگ و زخم که نشانه بیماری و تأثیر سم دیازینون بر روی ماهی که این بیماری ناشی از کاهش گلبول‌های سفید خونی می‌باشد، با پایین‌آمدن گلبول‌های سفید خون سیستم دفاعی ماهی در مقابل پاتوژن‌ها پایین آمده و باعث درگیری ماهی با عوامل بیماری‌زای متعدد می‌گردد. در واقع با کاهش گلبول‌های سفید خون سیستم ایمنی بدن کاهش می‌یابد و با کاهش سیستم ایمنی بدن مستعد بیماری در برابر کوچک‌ترین عوامل بیماری‌زا و در نهایت منجر به مرگ می‌شود. لذا توصیه می‌شود از مصرف هرگونه سم دفع آفات نباتی به پیامدهای مخرب زیست‌محیطی و احتمال نابودی آبزیان ساکن در بوم‌سازگان‌های نزدیک به مزارع کشاورزی توجه شود. این آلاینده‌ها قادر خواهند بود ابتدا با ایجاد مشکلات در آبزیان و در نهایت در صورت تداوم، جامعه آبزیان در اکوسیستم مربوطه را تحت تأثیر قرار داده و از طریق کاهش شانس بقای، اکولوژی آن گونه را تغییر دهند.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

References

AkbarHedayati,S.A.& Mouludi-Saleh,A. (2022). Application of blood biomarker for determination of Diazinon and Malathion toxicity to Big-head Carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). *Fisheries Science and Technology*, 11(1), 78-90.

Al-Ghanim, K. A. (2012). Acute toxicity and effects of sub-lethal malathion exposure on biochemical and haematological parameters of Oreochromis niloticus. *Sci. Res. Essays*, 7(16), 1674-1680.

Arjmandi, R., Tavakol, M., & Shayeghi, M. (2010). Determination of organophosphorus insecticide residues in the rice paddies. *Int J Environ Sci Technol*, 7(1),175-182.

Banaee, M., Mirvaghefei, AR., MajaziAmiri, B., Rafei, GR., & Nematdost, B. (2011). Hematological and Histopathological Study of Experimental Diazinon Poisoning in common carp fish (*Cyprinus carpio*). *J Fis*h. (Iran J Natur Resou.), 64(1), 1-14.

Banaee, M., Tahery, S., Nematdoost, Haghi, B., Shahafve, Sh., & Vaziriyan, M. (2019). Blood biochemical changes in common carp (*Cyprinus carpio*) upon co-exposure to titanium dioxide nanoparticles and paraquat. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 18(2), 242-255.

Banaee, M., Mirvagefei, AR., Rafei, GR., & Amiri, B.M. (2008). Effect of sub -lethal diazinon concentrations on blood plasma biochemistry. *Int J Environ Res*, 2, 189-198.

Behnsen, J., Deriu, E., Sassone-Corsi, M., & Raffatellu, M. (2013). Probiotics: properties, examples, and specific applications. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 3(3), 010074.

Benarji, G.R.T. (1990). Hematological changes induced by an organophosphorus insecticide in a freshwater fish Clarias batrachus (Linnaeus). *Trop Freshwater Biol*, 2, 197-202.

Burkepile, D.E., Moore, M.T., & Hollemol, M.M. (2000). The susceptibility of five nauclarget organisms to aqueous diazinon exposure. *Bull environ contam toxicol*, 64 114- 121.

Coppage, D. L., & Matthews, E. (1974). Short-term effects of organophosphate pesticides on cholinesterases of estuarine fishes and pink shrimp. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 11, 483-488.

De LeBlanc, A. d. M., & LeBlanc, J. G. (2014). Effect of probiotic administration on the intestinal microbiota, current knowledge and potential applications. *World Journal of Gastroenterology*, 20(44), 16518.

DeVos, P., George, M., Dorothy, J.G., Krieg, N. R., Ludwig, W.A., Fred, K. S., Rainey, B., & Whitman W. (2009). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd. The Firmicutes. *New York. America*, 1422 Pages.

Diaz, M.A., Bik, E.M., Carlin, K.P., VennWatson, S.K., Jensen, E.D., Jones, S.E., Gaston, E.P., Relman, D.A., & Versalovic, J. (2013). Identification of Lactobacillusstrains with probiotic features fromthe bottlenose dolphin (Tursiopstruncatus). *Journal of AppliedMicrobiology*, 115(4).

Dutta, H.M., Qadir, N., Ojha, J., Singh, N.K.,, Achikar, S., Data Munsh, J.S., & Roy, P.K. (1997). Effect of diazinon on macrophages of bluegill sun fish, lepomis macrochirus: *a cytochemical evaluation bull. Environ. Contam. Toxical*, 58, 134-147.

Dutta, H. M., & Arends, D. A. (2003). Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish. *Environmental research*, 91(3), 157-162.

Eisler, R. (1986). Diazinon hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review, *Fish and Wildlife Service*, US Department of the Interior.

Fulton, M. H., & Key, P.B. (2001). Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. Environmental Toxicology and Chemistry: *An International Journal*, 20(1), 37-45.

Heydari, K. H., & Vahabzadeh. H. (2014).Effect of sex and hormone therapy on some blood cellular and biochemical factors in Bighead Carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). *Ren Natur Resou Res*,4(4), 15 -23 (In Persian).

Khoshbavar, R.H.A., Soltani, M., & Yrlghi, S. (2005). Effect of Diazinon on the Hematological profiles of Asipenser stellatus and determination of LC50. *J Agri Sci Nature Rsou*, 12(5), 100-108. (in Persian).

Kondera, E. Kościuszko, A. Dmowska, A. Witeska, M. (2017). Haematological and haematopoietic effects of feeding different diets and starvationin common carp *Cyprinuscarpio* L. *Journal of Applied Animal Research*, 45(1), 623-628.

Larkin, D. J., & Tjeerdema R.S. (2000). Fate and effects of diazinon. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 166, 49-82.

Lee LE, C. S. & Gibbons, J. (1997). Development of a cell line from skin of goldfish (*Carassius auratus*), and effects of ascorbic acid on collagen deposition. Histochem. *Cell Biol*, 29, 31-43.

Ma, X., Huizhen, Li., Jingjing, X. W., Tyler, M., & Jing, Y. (2019). Developmental toxicity of a neonicotinoid insecticide, acetamiprid to zebrafish embryos. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(9), 2429-2436.

Masud, S., & Singh, I. (2013). Effect of Cypermethrin on some hematological parameters and prediction of their recovery in a freshwater Teleost, Cyprinus carpio. *African Journal of Environmental Science and Technology*, 7(9), 852-856.

Mohammadnejad, S.M., Sharifpour, I., & Imanpoor, M. (2011). The Study of diazinon effects on Haematological factors of Rutilus kutum male brood stocks. *J. Large Anim. Clinic. Sci. Res. (Journal of Veterinary Medicine)*, 5(3), 23-32.

Moore, A., & Waring C. (1996). Sublethal effects of the pesticide diazinon on olfactory function in mature male Atlantic salmon parr. *Journal of Fish Biology*, 48(4), 758-775.

Nazifi, S., Firouzbakhsh, F., & Ghazizadeh, M. (2001). Evaluation of Hematological parameters in experimental intoxication with trichlorofen in the Silver Carp. *J Vet Res*, 56(2), 23 -27. (in Persian).

Sabra, F. S., & Mehana E. S. (2015). Pesticides toxicity in fish with particular reference to insecticides. *Asian Journal of Agriculture and Food Sciences*, 3(1).

Shahbazinaserabad, S., Akbarhedayati, S.A., & MouludiSaleh, A. (2022). Application of blood biomarker for determination of Diazinon and Malathion toxicity to Big-head Carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). JFST, 11(1), 78-90. https://j*fst.modares.ac.ir*/article-6-50720-fa.html.

Shayeghi, M., Darabi, H., Hossainiabtahi, M., Sadeghi, M., Pakbaz, F., & Golestane, S. R. (2007). Assessment of persistence and residue of diazinon and malathion in three rivers (Mond, Shahpour and Dalaky) of Bushehr Province 2004-2005. *Iran South Med J*, 10(1), 54-60 .URL: http://ismj.bpums.ac.ir/article-1-8-fa.htm.

Shariati, F., Ismaili, S. A., & Piri, M. (2003). Determination of toxicity and LC50 of phenol and 1-naphthol on silver and white fingerlings. *Scientific Journal of Iranian Fisheries*, 12(4), 57-68. (InPersian)SID. https://sid.ir/paper/4346/fa

Sahlab, A. (1994). Influence of diazinon and deltamethrin on reproductive organs and fertility of male rats. DTW. *Deutsche tierarztliche Wochenschrift*, 101(6), 230-232.

Shamloo, H., Bagherpour, G.S., Faghfoori, Z., Movassaghpou, A., Lotfi, H., Barzegari, A., & Yari Khosroushahi, A. (2016). Lactobacillus casei decreases organophosphorus pesticide diazinon cytotoxicity in human HUVEC cell line. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 6(2), 201.

Shegefti, S., Sereshti, H., & Samadi, S. (2010). Determination ofendosulfan in water samples using dispersive liquidliquid micro-extraction and experimental design for optimization. *Int J Env Res*, 4(2), 237-46.

Svobodova, Z., Fravda, D., & Palakova, J. (1991). Unified methods of haematological examination of Research institute of fish culture and hydrobiology. *Vodnany, Czechoslovekia*.

Yonar, S., ErpilMişe, A., Ural, M. Ş., Silici, S.C., & Yonar, M. E. (2014). Malathion-induced changes in the haematological profile, the immune response, and the oxidative/antioxidant status of Cyprinus carpio carpio: Protective role of propolis. *Ecotoxicology and environmental safety*, 102, 202-209.

Zhang, XD., Wu, HY., Wu, D., Wang, YY., Chang, JH., & Zhai, ZB. (2010). Toxicologic effects of gold nanoparticles in vivo by different administration routes. *Int J Nanomed*, 5, 771-81.