

مقاله پژوهشی

ارزیابی درون تنی اثر حفاظتی باکتری *Lactobacillus curvatus* سویه af₁ جدا شده از استخرهای پرورش ماهی علیه سمیت سرب و کادمیوم در بافت روده و کبد بچه ماهیان سفید دریای کاسپین (*Rutilus frisii*)

افشین فهیم^۱، معصومه انوری^۲، علیرضا ولی پور^{۳*}، محمدرضا صفابخش^۴

DOI: 10.22124/japb.2025.31993.1579

تاریخ پذیرش: دی ۱۴۰۴

تاریخ دریافت: مهر ۱۴۰۴

چکیده

در این پژوهش اثرات پروبیوتیکی باکتری *Lactobacillus curvatus* جدا شده از استخر پرورش ماهی برای مطالعات آسیب شناسی بافتی مورد بررسی قرار گرفت. بچه ماهیان سفید با وزن تقریبی $8/05 \pm 1/58$ گرم به طور تصادفی به شش گروه شامل گروه شاهد، گروه تیمار با *L. curvatus* (10^8 واحد تشکیل دهنده کلونی در گرم)، گروه تیمار با سرب (۱۲ میلی گرم در کیلوگرم)، گروه تیمار با کادمیوم (۴ میلی گرم در کیلوگرم)، گروه تیمار با سرب (۱۲ میلی گرم در کیلوگرم) + *L. curvatus* (10^8 واحد تشکیل دهنده کلونی در گرم) و گروه تیمار با کادمیوم (۴ میلی گرم در کیلوگرم) + *L. curvatus* (10^8 واحد تشکیل دهنده کلونی در گرم) تقسیم شدند و ترکیبات آزمایشی به جیره غذایی آنها اضافه شد. هر تیمار در سه تکرار انجام شد. ماهیان به مدت ۵۶ روز در این تیمارها نگهداری شدند. سپس از روده و کبد ماهیان برای بررسی آسیب شناسی بافتی نمونه برداری شدند. نتایج نشان داد که در تیمار حاوی سرب و کادمیوم در روده بچه ماهیان، پرخونی (کم)، وجود سلول های خونی در لامینا پروپریا، نکروز سلول های انتروسیت و میکروویلی ها و واکوئل سلولی مشاهده شد. بررسی آسیب شناسی بافتی کبد، پرخونی و خونریزی (زیاد)، نکروز سلولی (زیاد) و واکوئل شدن سلولی (کم) را نشان داد. پس از بررسی بافت های کبد و روده ماهیان در معرض فلزات سنگین سرب و کادمیوم در مقایسه با تیمارهای حاوی پروبیوتیک، ترمیم بافت ها در تیمارهای حاوی پروبیوتیک مشاهده شد. بنابراین با توجه به نتایج، در این مرحله تاثیر مطلوبی بر بافت کبد مشاهده شد.

واژگان کلیدی: درون تنی، اثر حفاظتی، لاکتوباسیل، پروبیوتیک، *Rutilus frisii*

- ۱- دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.
- ۲- دانشیار گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.
- ۳- دانشیار پژوهشکده آبی پروری آب های داخلی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندر انزلی، ایران.
- ۴- مربی گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.

* نویسنده مسئول: valipour40@gmail.com

مقدمه

منجر به قرار گرفتن مداوم در معرض فلزات سنگین در آب‌های اطراف می‌شود.

فلزات سنگین دارای خواص مهاری هستند که از رشد تعدادی از باکتری‌ها در دستگاه گوارش جلوگیری می‌کنند. جمعیت طبیعی میکروارگانیسم‌ها در روده از طریق ساز و کار مختلف در عملکردهای فیزیولوژیکی روده نقش اساسی ایفا می‌کنند، در این میان، باکتری‌های اسید لاکتیک فیزیولوژی روده و عملکردهای تعدیل‌کننده سیستم ایمنی را کنترل می‌کنند و می‌توانند خواص مفیدی داشته باشند. استفاده از پروبیوتیک‌ها شرایط سلامت روده را بهبود می‌بخشند و منجر به کاهش تکثیر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا روده‌ای و اعمال خواص مفید بر روده می‌شوند (Jama et al., 2012).

بخش بزرگی از باکتری‌های روده می‌توانند به فلزات سنگین متصل شده و آنها را جدا کنند. در ماهی، میکروبیوتای روده با تقویت پاسخ‌های ایمنی، تغییر شرایط فیزیولوژیکی و افزایش فعالیت متابولیک، سمیت ناشی از فلزات سنگین را سم‌زدایی می‌کند (Arun et al., 2021).

لاکتوباسیل‌ها، گروهی از باکتری‌های گرم مثبت، کاتالاز منفی، بدون اسپور و میله‌ای شکل

توسعه روزافزون کشاورزی و صنعت، موجبات آلودگی آب، ماهیان و به دنبال آن غذای انسان به فلزات سنگین را فراهم کرده است (Noel et al., 2013). آبیان به‌ویژه ماهی‌ها منبع مهمی از پروتئین جانوری هستند، بنابراین یکی از منابع اصلی آلودگی فلزات سنگین در بدن انسان خواهند بود (Gupta and Gupta, 1998).

آلودگی فلزات سنگین به دلیل پتانسیل‌های خطرناک و سمی، از نظر سلامت انسان و از دیدگاه کلی زیست‌محیطی یک چالش جدی است. فلزات سنگین خطرناک، مانند کادمیوم (Cd) و سرب (Pb) در میان ده فلز سمی برتر در فهرست اولویت‌دار مواد خطرناک قرار دارند که به عنوان مواد سرطان‌زای انسانی طبقه‌بندی می‌شوند (Kumar et al., 2017). ناکافی بودن ایمنی مواد غذایی آلوده به کادمیوم و سرب در زنجیره غذایی، خطرات تجمعی را در انسان افزایش داده است (Ojekunle et al., 2017).

مطالعات مختلف وجود فلزات سنگین را در غذاهای دریایی جنوب دریای کاسپین گزارش کرده‌اند. ماهی‌ها از طریق آبشش‌های خود در تماس مداوم با محیط اطراف خود هستند که

Lactobacillus می‌تواند بیان ژن‌های دخیل در اتصالات محکم مانند E-cadherin و β -catenin را افزایش دهد (Orlando et al., 2018).

سد روده‌ای، لومن روده را از محیط داخلی جاندار جدا می‌کند و عمدتاً از سلول‌های اپیتلیال روده، کمپلکس‌های اتصال بین سلولی، سلول‌های ایمنی و لایه مخاطی تشکیل شده است (Feng et al., 2018). لایه مخاطی از سلول‌های زیرین در برابر عوامل نامطلوب زیستی، شیمیایی و فیزیکی محافظت می‌کند و همچنین زیستگاهی برای میکروارگانیسم‌های همزیست است (Paone and Cani, 2020). سلول‌های اپیتلیال نفوذپذیری انتخابی دارند، به این معنی که آنها مواد مغذی را تحت شرایط فیزیولوژیکی جذب می‌کنند و مانعی در برابر ترکیبات نامطلوب ایجاد می‌کنند (Peterson and Artis, 2014).

پروبیوتیک‌ها التهاب ناشی از فلز سنگین و آسیب سد روده‌ای را در میزبان کاهش می‌دهند. آنها ساختار را بهبود می‌بخشند و حفظ هومئوستاز روده را تسهیل می‌کنند (Yang et al., 2022).

تعداد قابل توجهی از مطالعات آزمایشگاهی با رده‌های سلولی مختلف روده نشان داده‌اند که

هستند که به دلیل تولید اسید لاکتیک، به عنوان محصول نهایی تخمیر شناخته می‌شوند. این باکتری‌ها، به‌ویژه آنهایی که به عنوان باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB، *Lactobacillus*) طبقه‌بندی می‌شوند، توانایی‌های امیدوارکننده‌ای در حذف فلزات سنگین از محیط‌های مختلف نشان داده‌اند (Afraz et al., 2020).

باکتری‌های اسید لاکتیک می‌توانند فلزات سنگین را از طریق دو مکانیسم اصلی دفع کنند: جذب زیستی و تجمع زیستی. جذب زیستی شامل اتصال یون‌های فلزات سنگین به دیواره سلولی باکتری است، در حالی که تجمع زیستی زمانی رخ می‌دهد که فلزات سنگین از غشای سلولی عبور کنند و در داخل سلول‌های باکتری تجمع یابند. این توانایی به باکتری‌های گرم مثبت، مانند لاکتوباسیل‌ها، اجازه می‌دهد تا در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی، به فلزات سنگین بیشتری متصل شده و آنها را جذب کنند (Jiang et al., 2021).

با توجه به قابلیت‌های جذب فلزات سنگین و خواص مفید باکتری‌های اسید لاکتیک، *Lactobacillus curvatus* می‌تواند نقشی در کاهش سمیت کادمیوم و سرب در ماهی سفید دریای کاسپین (*Rutilus frisii*) داشته باشد.

سنگین را مصرف می‌کنند که انتقال و تجمع فلزات سنگین در ماهی‌ها را در سطوح مختلف تغذیه‌ای توسط شبکه غذایی افزایش می‌دهد (Yozukmaz et al., 2018).

این پژوهش بر روی ماهی سفید دریای کاسپین انجام شد که از خانواده Leuciscidae بوده و به عنوان یک گونه منحصر به فرد و یکی از اقتصادی‌ترین ماهیان بومی حوضه جنوبی دریای کاسپین است و سالیانه بیش از ۴ هزار تن از آن در قالب تعاونی‌های صیادی، صید می‌شود. این گونه تقریباً ۶۰ درصد از صید ماهیان استخوانی در این منطقه را تشکیل می‌دهد (Valipour and Khanipour, 2009). با توجه به ارزش غذایی، محبوبیت و جایگاه اقتصادی آن به ویژه در استان‌های شمالی کشور موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور و سازمان شیلات ایران به دنبال معرفی آن به صنعت آبزی‌پروری کشور بوده و یکی از انتخاب‌های مهم گونه‌های بومی برای پرورش در قفس در دریای خزر است (Valipour et al., 2025) و با توجه به رژیم غذایی آن در دریای کاسپین که از نرم‌تنان تغذیه می‌کند (Valipour and Khanipour, 2009)، می‌تواند مستعد تجمع فلزات سنگین در بافت عضله و اندام‌های داخلی دیگر باشد. بنابراین مطالعه حاضر با هدف

پروبیوتیک‌ها می‌توانند نقش محافظتی در برابر افزایش نفوذپذیری روده ناشی از مواد بیگانه‌زیست (Xenobiotic) داشته باشند (Wang et al., 2022).

جمع‌آوری سلول‌های سالم *L. curvatus* نشان می‌دهد این سویه فعالیت خوبی در مهار پراکسیداسیون لیپید دارد که از سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها در برابر سمیت کادمیوم و سرب در کبد ماهی محافظت می‌کند (Chen et al., 2010). علاوه بر این، پروتئین‌های *Lactobacillus* می‌توانند با ایجاد چسبندگی سطحی، چسبندگی مخاط را افزایش دهند و با مخلوط گلیکوپروتئین (موسین) ترشح شده توسط سلول اپیتلیال روده ادغام شوند تا از حذف رقابتی عوامل بیماری‌زا از مخاط اطمینان حاصل شود (Clarke et al., 2019).

تجمع فلزات سنگین در بافت‌های ماهی بسته به اندازه، گونه و زیستگاه ماهی و همچنین میزان آلودگی در آب متفاوت است. علاوه بر این، ممکن است تحت تاثیر عواملی مانند طول عمر ماهی و تبادلات فیزیولوژیکی باشند (Luczynska et al., 2020). یک توضیح احتمالی برای غلظت بالاتر فلزات سنگین در ماهی‌های کفزی این است که این ماهی‌ها بسیاری از بسترهای (پیش‌ماده) غنی از فلزات

ویروم (رشت) منتقل شد. سنجش مقدار باکتری (N) بر اساس رابطه کوکران (رابطه ۱) انجام گرفت (Cochran et al., 2006).

رابطه ۱:

$$N(CFU/g) = Z^2 \times p \times q / d^2$$

Z: برابر ۱/۹۶؛ p: برابر ۰/۵؛ q: برابر ۰/۵؛ d: درصد خطا.

رقیق سازی در محیط کشت

برای کشت باکتری، توسط محلول سرم فیزیولوژی (۰/۹ درصد نمک NaCl) استریل رقت های ۰/۱، ۰/۰۱، ۰/۰۰۱ میلی لیتر از نمونه ها تهیه شد. نمونه برداری به روش کاملاً تصادفی با استفاده از لوپ استریل انجام پذیرفت. به این صورت که برای تهیه رقت ۰/۱، از نمونه آب استخر پرورشی ۱ میلی لیتر تهیه و به ۹ میلی لیتر سرم فیزیولوژی اضافه و توسط دستگاه همزن (Samsung، کره جنوبی) به صورت یکنواخت حل شد (کشت به طریقه پورپلیت، Pour Plate). برای رقت های بعدی نیز به طور مشابه عمل شد. یک سری رقت سازی تحت استریلیزاسیون شدید برای تمام نمونه های جمع آوری شده انجام شد. سپس ۰/۱ میلی لیتر از هر رقت روی سطح محیط کشت آگار دمان روگوسا شارپ (MRS، محیط کشت Hi) کشت

بررسی درون تنی (In vivo) اثر حفاظتی باکتری *L. curvatus* سویه af₁ بر روی بافت کبد و روده بچه ماهیان سفید دریای کاسپین در معرض سمیت ناشی از کادمیوم و سرب در مدت زمان ۵۶ روز نگهداری در دوره پرورش انجام شده است.

مواد و روش ها

این پژوهش در دو مرحله مجزا شامل تعیین سویه باکتریایی به منظور تامین کننده پروبیوتیک و استفاده از سویه باکتریایی به دست آمده در جیره غذایی ماهی سفید برای بررسی اثربخشی آن بر کاهش سمیت فلزات سنگین به انجام رسید.

مرحله اول: تهیه سویه باکتریایی به عنوان

پروبیوتیک

جداسازی سویه باکتریایی

به منظور جداسازی و تهیه مقدار مناسب باکتریایی از آب استخرهای پرورش ماهی در منطقه قلم گوده بندر انزلی نمونه برداری شد. برای این منظور ۵۰ نمونه آب به میزان هر یک ۱۰ میلی لیتر در لوله های آزمایش ۲۰ میلی لیتری جمع آوری شد. نمونه ها یخ پوشی شده در داخل یونولیت به آزمایشگاه تخصصی

داده شد و به مدت ۴۸ ساعت به صورت هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. کلونی‌های باکتریایی شفاف از محیط کشت گیاهی گرفته شدند تا کشت خالص تولید شود (DeMan et al., 1960).

آزمون‌های شناسایی پروبیوتیک

آزمون حرکت

برای بررسی تحرک باکتری از محیط کشت آگار نیمه جامد استفاده شد. در این محیط باکتری‌های متحرک به گونه‌ای ازدحام و رشد می‌کنند و منتشر می‌شوند که به راحتی با چشم غیرمسلح قابل تشخیص است. برای این منظور از محیط کشت SIM (Sulphide Indole Motility) استفاده شد که یک محیط کشت افتراقی ترکیبی است و سه پارامتر مختلف کاهش گوگرد، تولید ایندول و تحرک را آزمایش می‌کند. این محیط دارای غلظت بسیار کمی است که به باکتری‌های متحرک اجازه می‌دهد به آسانی از میان آن حرکت کنند و باعث کدر شدن محیط شوند. تلقیح با ضربه به وسط عمق محیط کشت آگار نیمه جامد انجام شد. تحرک باکتری با پخش و گسترش ناحیه رشد در راستای مسیر ورود سوزن تلقیح، بررسی شد. برخی از ارگانیسم‌ها در کل محیط رشد

می‌کنند، در حالی که برخی دیگر در نواحی کوچک یا به صورت توده‌هایی در محدوده مسیر ورود سوزن تلقیح، رشد می‌کنند. باکتری‌های غیرمتحرک تنها در لوله آگار نرم (Soft Agar Tube) و فقط در ناحیه‌ای که تلقیح شده‌اند، رشد می‌کنند (Hutahaean et al., 2019).

رنگ‌آمیزی گرم

نخست یک گسترش از محیط کشت خالص باکتری بر روی لام تهیه شد. در ادامه مراحل رنگ‌آمیزی گرم به این شرح انجام شد. نخست لام با رنگ کریستال ویوله به مدت ۳۰ تا ۴۵ ثانیه رنگ‌آمیزی شد و در نتیجه آن همه باکتری‌ها به رنگ بنفش درآمدند. پس از شستشو با آب، برای تثبیت رنگ کریستال ویوله به آن لوگول افزوده شد و بعد از ۳۰ تا ۴۵ ثانیه لام با آب شستشو شد. در مرحله رنگ‌زدایی، لام به مدت ۱۵ تا ۲۰ ثانیه در معرض مواد رنگ‌زدا مانند الکل - استون قرار گرفت و سپس با آب شستشو شد. به این ترتیب در باکتری‌های گرم منفی که دارای لایه‌های پپتیدوگلیکان محدود و غشای خارجی غنی از چربی هستند، این حلال باعث حذف این لایه‌ها و غشا می‌شود و باکتری رنگ مرحله قبل را از دست می‌دهد، ولی در باکتری‌های گرم مثبت به علت ضخامت زیاد لایه

باکتری‌های اسید لاکتیک، این آزمون یک آزمون تاییدی است (Hutahaeen et al., 2019).

آزمون VP

برای انجام آزمایش VP (Voges Proskauer Test)، از محیط MR-VP مطابق پروتکل استاندارد استفاده شد. این آزمایش گونه‌هایی را شناسایی می‌کند که اسید پیروویک حاصل از تخمیر گلوکز را از طریق مسیر متابولیکی به استوئین (استیل متیل کربونیل) هیدرولیز می‌کنند. در حضور آلفانفتول (به عنوان کاتالیزور) و اکسیژن، استوئین به دی‌استیل اکسید شده و ایجاد رنگ قرمز نشان‌دهنده نتیجه مثبت (VP مثبت) است. عدم تغییر رنگ (باقی ماندن رنگ اولیه یا زرد) نشان‌دهنده نتیجه منفی (VP منفی) است (Hutahaeen et al., 2019).

آزمون متیل‌رد

آزمون متیل‌رد برای تعیین pH محصولات نهایی به دست آمده از تخمیر گلوکز به کار می‌رود. بعضی از انتروباکتریاسه‌ها هنگام تبدیل گلوکز به اسید پیروویک، محصولات نهایی اسیدی تولید می‌کنند (pH به پایین‌تر ۴/۴

پتیدوگلیکانی و عدم وجود غشای خارجی رنگ مرحله قبل خارج نمی‌شود. در نتیجه پس از این مرحله باکتری‌های گرم منفی بی‌رنگ، ولی باکتری‌های گرم مثبت همچنان بنفش باقی خواهند ماند. در انتها لام با سافرانین یا فوشین قرمز رنگ به مدت ۳۰ تا ۴۵ ثانیه رنگ‌آمیزی شد. سپس با آب شستشو داده شد. در این مرحله باکتری‌های بی‌رنگ (باکتری‌های گرم منفی) به رنگ قرمز درمی‌آیند و باکتری‌های بنفش (باکتری‌های گرم مثبت) بدون تغییر رنگ باقی می‌مانند (Hutahaeen et al., 2019). لام‌ها پس از خشک شدن با میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت.

آزمون‌های بیوشیمیایی

آزمون کاتالاز

این آزمایش با چکاندن ۲ قطره پراکسید هیدروژن (H_2O_2) روی یک اسلاید شیشه‌ای حاوی جدایه‌های LAB انجام شد. آزمایش مثبت بر روی باکتری (*Staphylococcus aureus*) انجام شد (شاهد مثبت). این واکنش با تشکیل حباب‌های گاز مشخص می‌شود که نشان می‌دهد جدایه آنزیم کاتالاز تولید می‌کند و می‌تواند پراکسید هیدروژن را به آب و اکسیژن تبدیل کند. به دلیل کاتالاز منفی بودن

می‌رسد) که رنگ معرف متیل‌رِد را به قرمز تغییر می‌دهد (Hutahaeen et al., 2019).

آزمون هیدرولیز آرژنین

فرایند تعیین وجود آنزیم آرژنین دی‌هیدرولاز شامل انتقال تلقیح کشت خالص به صورت استریل به یک لوله استریل پر از مایع آرژنین دی‌هیدرولاز بود. سپس لوله تلقیح شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد تا نتایج اولیه جمع‌آوری شود. در این فاصله، ابتدا باکتری با مصرف گلوکز باعث کاهش pH می‌شود (Soccol et al., 2010) که با تغییر رنگ از بنفش به زرد همراه است. با اسیدی‌تر شدن محیط، آنزیم آرژنین دی‌هیدرولاز فعال می‌شود. کشت به مدت ۲۴ ساعت دیگر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا باکتری‌ها زمان کافی را برای استفاده از آرژنین داشته باشند (Hutahaeen et al., 2019).

آزمون سیترات

در این آزمون از محیط کشت سیترات آگار (Citrate Agar) برای آزمایش توانایی باکتری در استفاده از سیترات به عنوان منبع انرژی استفاده شد. در این محیط کشت، سیترات به

عنوان تنها منبع کربن و نمک‌های آمونیوم غیرآلی ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) به عنوان تنها منبع نیتروژن است (Soccol et al., 2010).

آزمون تخمیر کربوهیدرات

تمام جدایه‌های خالص‌سازی شده تحت آزمایش توسط محیط کشت کلیگر آیرون آگار (KIA) قرار گرفتند تا مکانیسم مصرف لاکتوز و گلوکز آنها مشخص شود (Sefcova et al., 2021). یک کشت تازه تهیه شده با کشت خطی از سطح شیب‌دار تلقیح شد. انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انجام گرفت. نتایج آزمایش، تغییرات رنگ سطح شیب‌دار و انتهای آن و همچنین تولید گاز H_2S یا گازهای دیگر را نشان می‌دهد (Hatami et al., 2022). اگر فقط گلوکز تخمیر شود، سطح شیب‌دار اسیدی و انتهای آن قلیایی می‌شود. اگر هم لاکتوز و هم گلوکز تخمیر شوند، انتهای آن اسیدی می‌شود و اگر لاکتوز و گلوکز هیچ کدام تخمیر نشوند، انتهای آن قلیایی می‌شود. به دلیل تشکیل سولفید هیدروژن و تولید گاز، محیط می‌تواند سیاه شود که منجر به تشکیل حباب در لوله می‌شود (Bazireh et al., 2020).

بررسی ویژگی‌های پروبیوتیکی جدایه‌ها

آزمون تحمل اسید

آزمایش تحمل اسید با استفاده از محیط کشت MRS با pHهای مختلف ۳، ۵، ۷ و ۹ انجام شد که با استفاده از HCl ۱ درصد (J.T. Baker) و NaOH ۱ نرمال (محیط کشت Hi) تهیه شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شد (برای هر آزمایش سه تکرار در نظر گرفته شد). ۰/۱ میلی‌لیتر از باکتری کشت شده در محیط کشت MRS استفاده شد و سپس در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. چگالی نوری (OD) به عنوان سرعت رشد باکتری‌ها توسط اسپکتروفتومتر (UV-1800، Shimadzu، ژاپن) در طول موج ۶۰۰ نانومتر پس از ۳ و ۲۴ ساعت انکوباسیون اندازه‌گیری شد (Allameh et al., 2012).

آزمون تحمل صفرا

برای این آزمایش، محیط کشت MRS با غلظت‌های مختلف نمک‌های صفراوی اکسگال (HiMedia، Difco، هند) با غلظت‌های ۰/۳ درصد (وزنی/ حجمی) تهیه شد. هر غلظت با ۰/۱ میلی‌لیتر از باکتری‌های کشت شده در طول شب تلقیح و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد

انکوبه شد. رشد باکتری‌ها در هر غلظت پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ و ۲۴ ساعت با اندازه‌گیری چگالی نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر ارزیابی شد (Balcazar et al., 2008).

آزمایش حساسیت آنتی‌بیوتیکی

حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌های منتخب (استرپتومایسین، آمپی‌سیلین، سفتریاکسون، سیپروفلوکساسین، کلیندامایسین، اریترومایسین، وانکومایسین و تتراسایکلین) با استفاده از روش انتشار دیسک آنتی‌بیوتیکی روی پلیت‌های آگار MRS همان‌طور که توسط Vijayakumar و همکاران (۲۰۱۷) شرح داده شده بود، آزمایش شد. سطح آگار به طور کامل با کشت سویه مورد نظر پوشانده شد (Lawn Inoculation). دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی روی آگار MRS جامد قرار داده شدند و ۳۰ دقیقه برای انتشار آنتی‌بیوتیک به آنها زمان داده شد و پس از آن در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. قطر هاله عدم رشد برای هر دیسک آنتی‌بیوتیکی پس از اتمام انکوباسیون اندازه‌گیری شد. حساسیت آنتی‌بیوتیکی با

آگار مغذی حاوی باکتری‌های بیماری‌زای مورد آزمایش پر شد. قطر هاله عدم رشد پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون ثبت شد. آزمایش در سه تکرار انجام شد (Prabhurajeshwar and Chandrakanth, 2019).

اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد، یعنی به صورت مقاوم کمتر از ۸ میلی‌متر، حساسیت متوسط ۸ تا ۱۰ میلی‌متر و حساسیت بیشتر از ۱۰ میلی‌متر، تفکیک شد (Vijayakumar et al., 2017).

آزمون فعالیت ضد میکروبی

فعالیت ضد میکروبی تمام جدایه‌های *Lactobacillus* جمع‌آوری شده علیه باکتری‌های بیماری‌زای مورد آزمایش با روش انتشار در چاهک آگار تعیین شد. *Staphylococcus aureus* (PTCC96)، *Enterococcus faecalis* (PTCC439)، *Klebsiella pneumoniae* (PTCC432)، *Pseudomonas aeruginosa* (PTCC7925)، *Escherichia coli* (PTCC443)، *Salmonella typhi* (PTCC734) و *Shigella dysentery* (PTCC13313) از آزمایشگاه پزشکی و فاز درمانی، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه کالابوراگی (مالزی) تهیه و به عنوان باکتری‌های بیماری‌زا مورد آزمایش استفاده شدند. ۵۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی بدون سلول هر جدایه *Lactobacillus* پس از سانتریفوژ در چاهک‌هایی به قطر ۷ میلی‌متر در محیط کشت

تعیین آستانه تحمل جدایه نسبت به فلزات سنگین سرب و کادمیوم

این آزمایش برای تشخیص توانایی جدایه‌ها در تحمل فلزات سنگین (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) استفاده شد. میزان یک لوپ از جدایه که به مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت MRS در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد رشد کرده بود تحت شرایط آسپتیک بر روی پلیت آگار MRS حاوی غلظت‌های مختلف کادمیوم و سرب (۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) کشت داده شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. کمترین غلظت فلزات سنگین که منجر به مهار رشد شد به عنوان MIC تعیین شد. این روش در سه تکرار انجام و یکی از پلیت‌ها به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. در نهایت بازده باکتری در حذف کادمیوم و سرب به عنوان درصد حذف (R) با استفاده از

طول دوره عادت پذیری بچه ماهیان سه بار در روز و به میزان ۵ درصد وزن بدن با جیره پایه (Manaqua، ایران) با ترکیب غذایی ۴۰ درصد پروتئین، ۹/۵ درصد چربی و ۸/۳ درصد خاکستر تغذیه شدند. پس از طی دوره عادت پذیری بچه ماهیان به ۵ تیمار آزمایشی در مخازن پلی اتیلن ۴۰ لیتری (۶ قطعه بچه ماهی در هر مخزن) تقسیم شده و به مدت ۸ هفته نگهداری شدند (Alves and Wood, 2006).

افزودن پروبیوتیکها به غذای تجاری طبق دستور العمل استاندارد انجام گرفت (Planas et al., 2004). نمونه برداری از ماهی در روز ۵۶ انجام شد. لازم به ذکر است که منبع آب مصرفی در دوره پرورش از چاه بوده و کیفیت آن ثابت بود. مخازن روزانه شسته می شدند.

جیره های آزمایشی

در این مطالعه ۶ جیره شامل جیره شاهد (بدون فلز سنگین و بدون پروبیوتیک)، جیره حاوی پروبیوتیک *Lactobacillus curvatus* به غلظت 10^8 واحد تشکیل دهنده کلونی در هر گرم، جیره حاوی سرب در غلظت ۱۲ میلی گرم در هر کیلوگرم جیره، جیره حاوی کادمیم در غلظت ۴ میلی گرم در هر کیلوگرم جیره، جیره حاوی پروبیوتیک (10^8) واحد تشکیل دهنده

رابطه ۲ محاسبه شد (Huet and Puchooa, 2017).

رابطه ۲:

$$R(\%) = (C_D / C_i) \times 100$$

C_i : غلظت اولیه فلز سنگین؛ C_D : کاهش غلظت فلز سنگین.

شناسایی ملکولی جدایه ها

برای شناسایی ملکولی باکتری های اسید لاکتیک با تمرکز بر تکثیر و توالی یابی ژن 16SrRNA از روش PCR و بررسی نتایج با روش الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد (Kostinek et al., 2005).

مرحله دوم: استفاده از سویه باکتریایی در

جیره غذایی ماهی سفید

ماهیان پرورشی و شرایط آزمایش

تعداد ۷۲ عدد بچه ماهی سفید (*Rutilus frisii*) با وزن متوسط $8/05 \pm 1/58$ گرم از مرکز تکثیر و پرورش ماهی شهید انصاری واقع در شهر صنعتی رشت تهیه و توسط کیسه های پلی اتیلنی به آزمایشگاه بخش تغذیه و غذای زنده پژوهشکده آبی پروری آب های داخلی انزلی منتقل شد و به مدت دو هفته در شرایط مناسب برای سازگاری با شرایط آزمایشگاهی در مخازن پلی اتیلنی ۴۰ لیتری نگهداری شدند. در

ریخت‌سنجی بافتی روده و کبد

آسیب‌شناسی بافتی، روشی سریع برای تشخیص اثرات مواد تنش‌زا (مثلاً فلزات سنگین) در اندام‌های مختلف ماهی ارائه می‌دهد و می‌تواند به عنوان شاخصی برای بسیاری از شرایط غیرطبیعی برای اکوسیستم ماهی (محیط زیست) در نظر گرفته شود. با این حال، آسیب‌شناسی فلزات سنگین بسته به مدت زمان مواجهه، غلظت فلزات و حساسیت ژنتیکی متفاوت است (Naiel et al., 2019).

نمونه‌های بافت کبد و روده (۹ ماهی در هر گروه) جمع‌آوری شدند که در آنها از اتانول ۴۰ درصد برای بیهوشی استفاده شد (Dawood et al., 2018). از بافر فرمالین ۱۰ درصد برای تثبیت نمونه‌های بافتی استفاده شد. نمونه‌های تثبیت شده با غلظت‌های افزایشی اتانول و زایلن پردازش شدند. برش‌های بافت با ضخامت ۵ میکرومتر با استفاده از میکروتوم چرخشی (Leica, 2025، آلمان) تهیه و با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) رنگ‌آمیزی شدند. برای بررسی از میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین دیجیتال (Nikon، ژاپن) استفاده شد (Bancroft and Gamble., 2008).

کلونی در گرم) همراه با سرب (۱۲ میلی گرم در کیلوگرم) و جیره حاوی پروبیوتیک (10^8 واحد تشکیل‌دهنده کلونی در گرم) همراه با کادمیم (۴ میلی گرم در کیلوگرم) با سه تکرار، مورد ارزیابی بیوشیمیایی و بافتی قرار گرفتند. تعداد ماهی در هر مخزن آزمایشی ۶ عدد بود.

تنظیم خوراک پروبیوتیکی

برای تهیه جدایه پروبیوتیک و افزودن آنها به غذای ماهی، از روشی که توسط Planas و همکاران (۲۰۰۴) و Vine و همکاران (۲۰۰۴) توصیه شده است، استفاده شد. به طور خلاصه هر یک از باکتری‌ها به طور جداگانه در محیط براث MRS در شرایط بی‌هوازی کشت شدند پس از رشد، باکتری‌ها جدا و سانتریفوژ شده و با کمک لوله‌های استاندارد مک‌فارلند غلظت آنها 10^8 واحد تشکیل‌دهنده کلونی در هر گرم تنظیم شد. غذاها توزین و در سینی‌های استریل در شرایط کاملاً استریل قرار داده و خشک شده، سپس در دمای آزمایشگاه به مدت ۲۴ ساعت در شرایط استریل بسته‌بندی شدند. پس از آن با تهیه رقت‌های متوالی غلظت نهایی باکتری در غذا برابر 10^8 واحد تشکیل‌دهنده کلونی در هر گرم پروبیوتیک به غذا اسپری شد. سرب و کادمیم نیز مستقیماً به تیمارها اضافه شد.

تجزیه و تحلیل آماری

سایت NCBI با کد دسترسی OR574371 ثبت شد.

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS (نسخه ۲۰) انجام شد. به منظور بررسی توزیع نرمال داده ها برای تشکیل تیمارهای آزمایش، از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف استفاده شد. مقایسه آماری تیمارها به روش تحلیل واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P < 0.05$) انجام شد و در صورت معنی دار بودن با آزمون دانکن مقایسه شدند. داده ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ارائه می شوند.

نتایج

جداسازی و شناسایی باکتری ها

بر اساس غربالگری اولیه تعداد ۱۰ جدایه که قابلیت تحمل غلظت فلز را داشتند از استخر پرورش ماهی جداسازی و نمونه هایی که در بررسی ویژگی های ریخت شناختی و بیوشیمیایی به باکتری های اسید لاکتیک نزدیک بودند، انتخاب شدند. علاوه بر این، بهترین جدایه (af_1) با تعیین توالی ژن 16SrRNA مورد شناسایی مولکولی قرار گرفت، همچنین بهترین جدایه در

نتایج آزمون های ریخت شناسی، بیوشیمیایی و تخمیر کربوهیدرات

این جدایه ها از نظر ویژگی های ظاهری بررسی شدند و ویژگی های بیوشیمیایی قابل توجهی را نشان دادند (جدول ۱). پتانسیل تشکیل بیوفیلم نیز مشاهده شد (جدول ۲) و از نظر خواص کربوهیدراتی نیز جدایه ها بررسی و نتایج آن به صورت مقایسه ای در جدول ۳ آورده شد.

شناسایی گونه های *Lactobacillus*

آزمون تحمل اسید

نتایج جدول ۴ نشان داد که رشد جدایه ها در محدوده pH ۹-۳ و در طول مدت زمان ۳ ساعت ظاهر شد. این نتایج نشان داد که جدایه ها مهم ترین ویژگی باکتری های پروبیوتیک را دارند که توانایی آنها برای زنده ماندن در معده با اسیدیته بالا است. مطابق جدول ۴، جدایه های PO_2 و PO_5 به عنوان جدایه های منتخب به شمار می روند.

[illegible]

جدول ۳: نتایج آزمون تخمیر کربوهیدرات جدایه‌های استخرپرورش ماهی

جدایه	گلوکز	گالاکتوز	لاکتوز	آرابینوز	رافینوز	ترهالوز	ملیبیوز	مالتوز	مانیتول	سوربیتول	گزیلوز	ساکارز
P0 ₁	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-
P0 ₂	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-
P0 ₃	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P0 ₄	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
P0 ₅	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
P0 ₆	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-
P0 ₇	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
P0 ₈	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-
P0 ₉	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P0 ₁₀	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-

جدول ۴: مقاومت جدایه‌ها به اسید

جدایه	P0 ₁	P0 ₂	P0 ₃	P0 ₄	P0 ₅	P0 ₆	P0 ₇	P0 ₈	P0 ₉	P0 ₁₀
تعداد کلونی در زمان صفر	<۱۰ ^۶	<۱۰ ^۶	<۱۰ ^۶	<۱۰ ^۶	<۱۰ ^۶	<۱۰ ^۶	<۱۰ ^۶	<۱۰ ^۶	<۱۰ ^۶	<۱۰ ^۶
تعداد کلونی بعد از ۳ ساعت	۱۲۰	<۱۰ ^۶	۲۰۰	۱۴۰	<۱۰ ^۶	۲۰۰	۲۲۰	۳۰۰	۲۴۰	۲۲۰

آزمون تحمل صفرا

شده با استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های رایج مختلف در جدول ۶ ارائه شده است که نشان می‌دهد همه جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه به استثنای سیپروفلوکساسین و وانکومایسین، حساس بودند. جدایه‌های P0₂ و P0₅ علاوه بر وانکومایسین و سیپروفلوکساسین به کلیندامایسین نیز مقاومت نشان دادند و جزء جدایه‌های منتخب هستند.

بر اساس جدول ۵، پس از بررسی جدایه‌ها و میزان تحمل آنها به نمک‌های صفراوی بعد از ۳ ساعت، جدایه‌های P0₂ و P0₅ به عنوان جدایه‌های منتخب تعیین شدند.

آزمون حساسیت به آنتی‌بیوتیک

حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های آزمایش

جدول ۵: مقاومت جدایه‌ها به نمک‌های صغراوی

جدایه	P01	P02	P03	P04	P05	P06	P07	P08	P09	P010
تعداد کلونی در زمان صفر	<10 ⁶	<10 ⁶	<10 ⁶	<10 ⁶	<10 ⁶	<10 ⁶	<10 ⁶	<10 ⁶	<10 ⁶	<10 ⁶
تعداد کلونی بعد از ۳ ساعت	۱۹۰	<10 ⁶	۱۴۰	۱۶۰	<10 ⁶	۲۵۰	۱۲۰	۳۵۰	۱۱۰	۱۱۵

جدول ۶: حساسیت جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها

جدایه	P01	P02	P03	P04	P05	P06	P07	P08	P09	P010
استرپتومایسین	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس
آمپی‌سیلین	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس
سفت‌ریاکسون	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس
سیپروفلوکساسین	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم
کلیندامایسین	حساس	مقاوم	حساس	حساس	مقاوم	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس
اریترومایسین	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس
وانکومایسین	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم
تتراسایکلین	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس

آزمون اثر مهار بر باکتری‌های بیماری‌زا

af₁) در برابر باکتری‌های بیماری‌زای مورد آزمایش نشان دادند (جدول ۷).

سویه‌های *Lactobacillus* جدا شده، مهار متوسط (۱۵ تا ۲۵ میلی‌متر قطر هاله عدم رشد) را بر رشد باکتری‌های بیماری‌زای مورد آزمایش نشان دادند، اما جدایه‌های P06 و P09 موثرترین جدایه‌ها در مهار باکتری‌های بیماری‌زای مورد آزمایش بودند (۱۹ تا ۳۳ میلی‌متر). به طور کلی، بسیاری از سویه‌های *Lactobacillus* جدا شده، فعالیت آنتاگونیستی بهتری نسبت به سویه مرجع *Lactobacillus* (*L. curvatus*) سویه

تعیین آستانه تحمل جدایه نسبت به فلزات سنگین سرب و کادمیوم به منظور ارزیابی توانایی زیست‌پالایی جدایه‌ها، تحمل باکتری‌ها به غلظت‌های مختلف سرب و کادمیوم با تعیین حداقل غلظت بازدارنده (MIC) آنها بررسی شد. نتایج مقادیر MIC در جدول ۸ نشان داده شده است.

جدول ۷: فعالیت آنتاگونیستی جدایه های *Lactobacillus* علیه باکتری های بیماری زای مورد آزمایش

جدایه	Po ₁ (mm)	Po ₂ (mm)	Po ₃ (mm)	Po ₄ (mm)	Po ₅ (mm)	Po ₆ (mm)	Po ₇ (mm)	Po ₈ (mm)	Po ₉ (mm)	Po ₁₀ (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i>	۱۲	۱۸	۱۶	۸	۱۵	۱۴	۱۷	۱۰	۱۲	۱۳
<i>Salmonella enterica</i>	۱۱	۱۷	۱۴	۱۵	۱۲	۱۱	۱۳	۱۲	۱۷	۱۵
<i>Escherichia coli</i>	۱۰	۱۳	۱۸	۱۴	۱۹	۹	۱۴	۱۱	۱۵	۱۶
<i>Enterococcus faecalis</i>	۱۰	۱۶	۱۲	۱۴	۱۲	۱۴	۱۰	۱۰	۱۵	۱۰
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	۱۳	۲۰	۱۰	۱۵	۱۲	۱۴	۱۲	۱۸	۱۷	۱۰
<i>Bacillus cereus</i>	۱۳	۱۵	۱۴	۱۰	۱۰	۱۲	۱۰	۹	۱۳	۱۶

جدول ۸: حداقل غلظت بازدارنده و حذف فلزات سنگین

فلزات سنگین	حداقل غلظت بازدارنده (میلی گرم در لیتر)		حذف فلزات سنگین در ۲۴ ساعت (%)	
			۲۵(mg/L)	۵۰(mg/L)
سرب	۱۸۰۰		۶۲/۱۰	۶۸/۳۹
کادمیوم	۱۵۰۰		۵۲/۷۱	۱۱/۲۵

همان طور که از نتایج مشاهده می شود، مقدار MIC برای سرب (۱۸۰۰ میلی گرم در لیتر) بیشتر از کادمیوم (۱۵۰ میلی گرم در لیتر) بوده است. در این زمینه، می توان استنباط کرد که اگرچه *Lactobacillus* در برابر سرب و کادمیوم مقاوم بوده، اما مقاومت آن در برابر سرب بیشتر از کادمیوم بوده است. در مطالعه زیست پالایی، از دو غلظت ۲۵ و ۵۰ میلی گرم در لیتر از سرب و کادمیوم استفاده شده است و نتایج (جدول ۸) نشان داد که درصد حذف سرب برای غلظت های ۲۵ و ۵۰ میلی گرم در لیتر به ترتیب ۶۲/۱۰ و ۶۸/۳۹ درصد و برای کادمیوم ۵۲/۷۱ و ۱۱/۲۵ درصد بود. نتایج همچنین نشان داد که باکتری های مورد مطالعه قادر به حذف سرب بیشتر از توانایی خود در حذف کادمیوم بودند. به علاوه، توانایی باکتری ها در

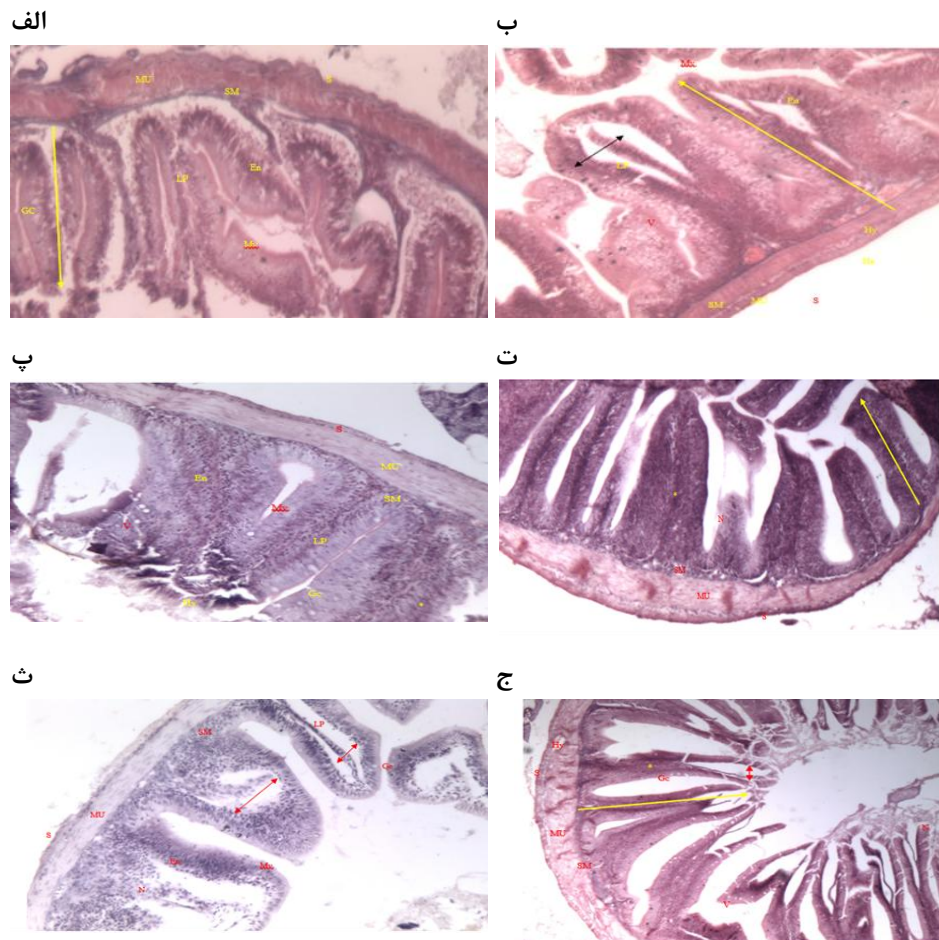
حذف سرب با افزایش غلظت افزایش یافت، در حالی که حذف کادمیوم با افزایش غلظت کاهش یافت. به این معنی که توانایی حذف کادمیوم وابسته به غلظت است، از بالاترین غلظت کادمیوم (۵۰ میلی گرم در لیتر) بخش کمتری نسبت به ۲۵ میلی گرم در لیتر حذف شد.

نتایج ارزیابی آسیب شناسی بافتی

در شکل ۱-الف (تیمار شاهد)، پرزهای روده طبیعی دارای انتروسیت های طبیعی مشاهده می شود. پارگی مشاهده در برخی نقاط احتمالا ناشی از فرایند آماده سازی بافتی است. در شکل ۱-ب، (تیمار دارای پروبیوتیک) اتساع فضای لامینا پروپریا، نکروز و تخریب سلولی انتروسیت ها مشاهده می شود. در شکل ۱-پ (تیمار حاوی سرب) نکروز کلی در برخی از نقاط پرزهای روده وجود دارد. در شکل ۱-ت (تیمار حاوی کادمیوم) چسبندگی شدید پرزهای روده و هایپرپلازی (تکثیر شدید سلولی) در پرزهای روده دیده می شود. تخریب انتهای هر پرز روده

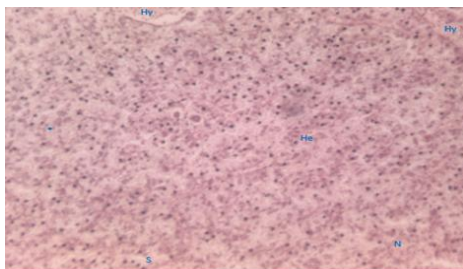
نیز وجود دارد. در ۱-ث (تیمار حاوی سرب و پروبیوتیک) نکروز سلولی از بین رفته است و گسستگی بین این لایه و سلول های پرز روده وجود دارد. شکل ۱-ج نیز سلول های پرز روده را در تیمار حاوی کادمیوم و پروبیوتیک نشان می دهد. در مجموع افزودن پروبیوتیک بر روی بافت آبری پس از تاثیر فلزات سنگین سرب و کادمیوم تاثیر زیادی بر رفع التهاب بافت و جلوگیری از نکروز بافتی داشته است.

در شکل ۲-الف (شاهد) علائم تخریب و آسیب بافتی ملاحظه نمی شود. در شکل ۲-ب (پروبیوتیک) پیکنوز همراه با پرخونی مشاهده می شود. در شکل ۲-پ (تیمار حاوی سرب) نکروز شدید مشاهده می شود. در شکل ۲-ت (تیمار حاوی کادمیوم) پیکنوز شدید دیده می شود. در شکل ۲-ث (تیمار حاوی سرب و پروبیوتیک) سلول های کبد طبیعی هستند. در شکل ۲-ج (تیمار حاوی کادمیوم و پروبیوتیک) پیکنوز کاهش یافته است ولی هنوز پیکنوز و نکروز سلولی وجود دارد.

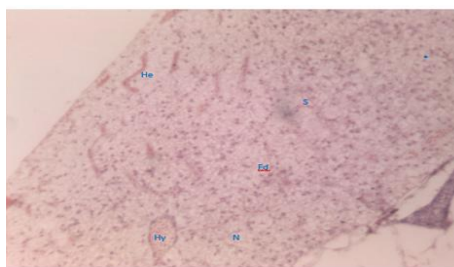


شکل ۱: اثرات *Lactobacillus curvatus* سویه af_1 بر تغییرات آسیب‌شناختی بافتی روده ناشی از سرب و کادمیوم در بچه ماهیان سفید (*Rutilus frisii*). الف) گروه شاهد. ب) گروه پروبیوتیک. پ) گروه سرب (۱۲ میلی گرم در کیلوگرم). ت) گروه کادمیوم (۴ میلی گرم در کیلوگرم). ث) گروه سرب (۱۲ میلی گرم در کیلوگرم) + پروبیوتیک. ج) گروه کادمیوم (۴ میلی گرم در کیلوگرم) + پروبیوتیک.

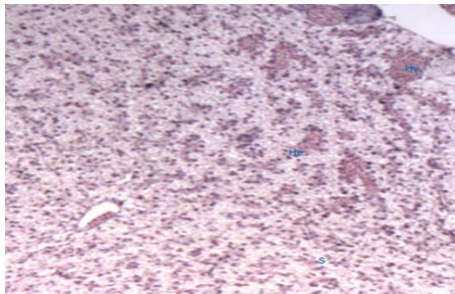
الف



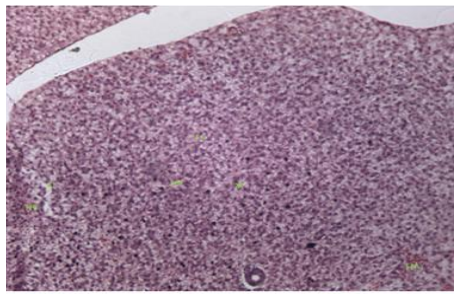
ب



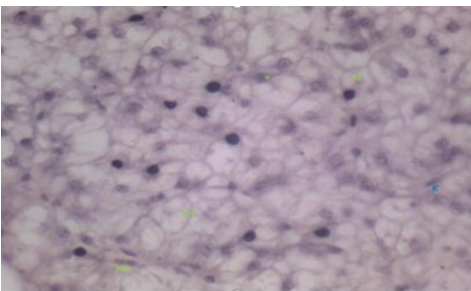
پ



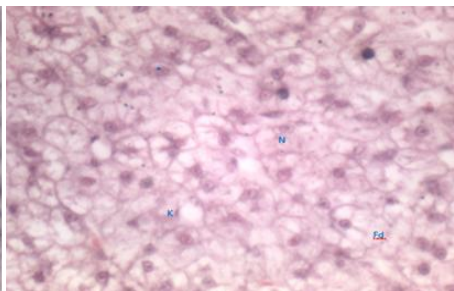
ت



ث



ج



شکل ۲: اثرات لاکتوباسیلوس کورواتوس سویه af_1 بر تغییرات آسیب‌شناختی بافتی کبد ناشی از سرب و کادمیوم در بچه‌ماهیان سفید (*Rutilus frisii*). (الف) گروه شاهد. (ب) گروه پروبیوتیک. (پ) گروه سرب (۱۲ میلی‌گرم در کیلوگرم). (ت) گروه کادمیوم (۴ میلی‌گرم در کیلوگرم). (ث) گروه سرب (۱۲ میلی‌گرم در کیلوگرم) + پروبیوتیک. (ج) گروه کادمیوم (۴ میلی‌گرم در کیلوگرم) + پروبیوتیک.

بحث

در این مطالعه استفاده از باکتری پروبیوتیک *Lactobacillus* باعث جلوگیری از چین‌های روده‌ای (Lamina Propria)، مقدار خیلی کم خونریزی و نکروز سلولی اینتروسیت (طول سلول‌های جذب روده) و پرزهای میکروویلی شد که به نسبت تیمار شاهد و تیمارهای حاوی فلزات سنگین وضعیت مطلوب‌تری داشت. علاوه بر این استفاده از پروبیوتیک، نکروز سلولی و واکوئلی شدن کمتری را نسبت به تیمار شاهد و تیمارهای حاوی سرب و کادمیوم ایجاد کرد که نمایانگر تاثیر مطلوب پروبیوتیک بر بافت روده و کبد در بچه‌ماهیان طی ۵۶ روز نگهداری بود.

روده یک سیستم گوارشی و جذبی است، اما مطالعات کمی در رابطه با تغذیه با پروبیوتیک‌ها و ریخت‌شناسی روده ماهی انجام شده است (Mohammadian et al., 2021).

Nakandakare و همکاران (۲۰۱۳) گزارش دادند که میانگین طول قسمت ابتدایی، میانی و انتهایی روده و همچنین کل سطح روده در ماهی‌هایی که غذای پروبیوتیک دریافت کرده بودند، بیشتر از ماهی‌هایی بود که غذای شاهد دریافت کرده بودند. افزایش ضخامت لایه اپیتلیال روده میانی بچه‌ماهیان تیلاپیا و بهبود شکل ظاهری میکروویلی‌های روده پس از تغذیه

از جیره‌های دارای پروبیوتیک نیز مشاهده شد. نتایج نشان داد که پرزهای روده در تیمارهای پروبیوتیکی، چین‌خوردگی بیشتر و ضخامت بیشتری نسبت به گروه شاهد داشتند و بنابراین در تعامل با میکروفلور روده، شکل ظاهری روده، سیستم ایمنی و جذب مواد مغذی، ممکن است در سلامت ماهی‌ها بهتر عمل کنند (Nakandakare et al., 2013) که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت داشت.

در پژوهشی مشاهده شد که استفاده از پروبیوتیک‌های چندگونه‌ای با مقادیر افزایشی، شکل ظاهری و سطح جذب روده را از طریق افزایش طول، عرض، عمق و مساحت پرزها و همچنین وزن خشک روده ماهی روهو (*Labeo rohita*) به طور قابل توجهی تغییر داد. همچنین گونه‌های *Bacillus* و یا *Lactobacillus* به صورت تکی یا ترکیبی، هضم و جذب مواد مغذی و سطح جذب روده را در بسیاری از ماهی‌ها از جمله گونه‌های کپور افزایش دادند (Islam et al., 2021). علاوه بر این، برخی پروبیوتیک‌ها اسیدهای چرب زنجیره کوتاه (Short-chain Fatty Acids) تولید می‌کنند که عملکرد ضدالتهابی دارند و برای حمایت از محیط اسیدی روده کلیدی هستند. بنابراین پروبیوتیک‌ها می‌توانند

کلونیزاسیون میکروب‌های مفید را افزایش دهند و التهاب ناشی از فلز سنگین را در روده ماهی مهار کنند. علاوه بر این، تحمل فلز سنگین باکتری‌ها اغلب با پمپ‌های خروجی، ترکیب دیواره سلولی و اتصال و جداسازی مرتبط است (Daisley et al., 2019). جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک که می‌توانند غلظت بالای کادمیوم و سرب را تحمل کنند، نشان می‌دهد که این میکروارگانیسم‌ها دارای مقاومت اکتسابی در برابر فلزات سنگین هستند. همچنین افزایش تحمل باکتری‌های اسید لاکتیک به کادمیوم و سرب در غلظت‌های مختلف گزارش شد (Irawati et al., 2025). این داده‌ها با نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر مطابقت داشت.

بیشترین بقادر ماهیانی که *Lactobacillus brevis* به صورت خوراکی در غلظت‌های 10^8 و 10^{10} واحد تشکیل کلونی در گرم دریافت کرده بودند (۸۶/۶ درصد) مشاهده شد. نتایج نشان داد که مکمل *L. brevis* با تحریک هم‌زمان سیستم دفاعی غیراختصاصی در ماهی سوف معمولی (*Sander lucioperca*) مقاومت در برابر توسعه بیماری *Aeromonas hydrophila* را فراهم می‌کند. بنابراین با نتایج مطالعه حاضر مبنی بر افزایش غلظت خوراکی پروبیوتیک به میزان

10^8 که باعث افزایش بقا در بچه‌ماهیان سفید دریای کاسپین شد، مطابقت داشت. مقاومت لاکتوباسیل‌ها در برابر کادمیوم و سرب به مکانیسم‌هایی مانند تشکیل کمپلکس، جذب، کیلیت شدن و ریزرسوب‌گذاری مربوط می‌شود (Zhai et al., 2015) این مکانیسم‌های جذب زیستی به متابولیسمی وابسته هستند که شامل رسوب خارج سلولی، جذب سطحی سلول و تجمع درون سلولی می‌شود (Ojekunle et al., 2017). سطح سلولی باکتری‌های اسید لاکتیک از یک لایه ضخیم از پپتیدوگلیکان، اسید تیکوئیک، پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها تشکیل شده است که این اجزا حاوی گروه‌های کربوکسیل، هیدروکسیل و فسفات هستند. بنابراین، باکتری‌های اسید لاکتیک تعداد زیادی لیگاند بالقوه دارند که قادر به اتصال به کنش‌هایی مانند کادمیوم و سرب هستند (Jama et al., 2012). گزارش شده است که باکتری‌های اسید لاکتیک مانند *Lactobacillus plantarum* CCFM 8610 و *L. plantarum* CaD1 می‌توانند غلظت‌های بالاتر از ۱۰۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر فلزات سنگین را تحمل کنند که در آن ظرفیت اتصال زیست‌توده به کادمیوم و سرب بالاتر از ۳۱/۳۴ درصد بود (Ojekunle et al., 2017). همچنین

- زیست‌توده مرطوب برخی از سویه‌های لاکتوباسیل مانند *Lactobacillus amylovorus*، *Lactobacillus reuteri* و *Pediococcus acidilactici* و *Enterococcus faecium* نیز می‌توانند حتی در غلظت‌های بالاتر از ۲۰۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر کادمیوم و سرب متصل و آن را تحمل کنند (Bhakta et al., 2023).
- برای این که میکروارگانیسم‌ها به عنوان پروبیوتیک در نظر گرفته شوند، باید توانایی زنده ماندن در شرایط روده و نمک‌های صفراوی وارد شده به دوازدهه را داشته باشند. صفرا برای غشای سلولی میکروارگانیسم‌ها که از لیپیدها و اسیدهای چرب تشکیل شده‌اند، مهم است و کارایی آن عمدتاً توسط غلظت نمک‌های صفراوی تعیین می‌شود (Ojekunle et al., 2017). تحمل نشان داده شده توسط این جدایه‌ها در پژوهش حاضر به غلظت‌های مختلف نمک‌های صفراوی، مسیرهای شبیه‌سازی شده معده و روده و توانایی بقای آنها در محیط روده مربوط است که در آن تعاملاتی با پایداری میکروارگانیسم‌های مختلف به صورت هم‌افزایی وجود دارد.
- سمیت فلزات سنگین باعث استرس اکسیداتیو می‌شود که منجر به تغییراتی در فعالیت‌های فیزیولوژیکی سلول‌ها و آسیب بافتی در اندام‌ها و بافت‌های انسان و جانوران می‌شود. بنابراین، توانایی‌های ضد اکسیداتیو جدایه‌های آزمایشگاهی انتخاب شده برای استفاده در مطالعات درون‌تنی باید به عنوان یک ویژگی مهم برای محافظت در برابر سمیت فلزات سنگین در نظر گرفته شود (Zhai et al., 2015).
- ضریب خطر (HQ) برای کادمیوم برای مصرف انسانی کمتر از ۱ است که حد مجاز مصرف ماهی در تالاب انزلی (ایران) بوده و برای مصرف انسان قابل قبول است (Mansouri et al., 2013).
- پروبیوتیک‌ها سلول‌های اپیتلیال روده را در برابر آسیب ناشی از القای استرس اکسیداتیو توسط فلزات سنگین محافظت می‌کنند (Ojekunle et al., 2017). جدایه‌های لاکتوباسیل می‌تواند فعالیت آنتی‌اکسیدانی ایجاد کنند که با شرایط استرس اکسیداتیو ناشی از فلزات سنگین مقابله می‌کند. مطالعات درون‌تنی از سلول‌های جانوری گزارش شده است که در آن باکتری‌های اسید لاکتیک اثرات محافظتی، ظرفیت اتصال بالا و پتانسیل پروبیوتیکی بالقوه‌ای را از خود نشان داده‌اند (Zhai et al., 2015). گزارش شده است که

پروبیوتیک *L. curvatus* به جذب کادمیوم و سرب کمک می‌کند که نشان می‌دهد لاکتوباسیل‌ها جاذب‌های زیستی بالقوه‌ای برای فلزات سنگین بوده و دارای پروتئین‌های اتصال‌دهنده هستند (Irawati et al., 2025).

در مجموع، این مطالعه نشان داد که *L. curvatus* سویه af₁ با ظرفیت اتصال و توانایی‌های آنتی‌اکسیدانی در برابر سمیت‌های کادمیوم و سرب دارای ظرفیت پروبیوتیکی است. این میکروارگانیسم به طور مثبت تجمع فلزات سنگین را در بافت‌های روده و کبد کاهش داد و در مجموع باعث سلامت بافت روده و کبد شد. بنابراین *L. curvatus* سویه af₁ می‌تواند

به عنوان درمان‌های غذایی در برابر سمیت‌های کادمیوم و سرب در نظر گرفته شده و برای ساخت جیره‌های غذایی ماهی سفید به کارخانجات ساخت غذا معرفی شود.

تشکر و قدردانی

نگارندگان بر خود لازم می‌دانند از حمایت‌ها و پشتیبانی مدیریت محترم و کارکنان پژوهشکده آبی‌پروری آب‌های داخلی و ایستگاه تحقیقاتی تغذیه و غذای زنده آبزیان بندر انزلی و انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری تقدیر و تشکر نمایند.

منابع

- Afraz V., Younesi H., Bolandi M. and Hadiani M.R. 2020. Optimization of lead and cadmium biosorption by *Lactobacillus acidophilus* using response surface methodology. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 29: 1–7 (101828). doi: 10.1016/j.bcab.2020.101828
- Allameh S.K., Daud H., Yusoff F.M., Saad C.R. and Ideris A. 2012. Isolation, identification and characterization of *Leuconostoc mesenteroides* as a new probiotic from intestine of snake head fish (*Channa striatus*). *African Journal of Biotechnology*, 11(16): 3810–3816. doi: 10.5897/AJB11.1871
- Alves L.C. and Wood C.M. 2006. The chronic effects of dietary lead in freshwater juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed elevated calcium diets. *Aquatic Toxicology*, 78(3): 217–232. doi: 10.1016/j.aquatox.2006.03.005
- Arun K.B., Madhavan A., Sindhu R., Emmanuel S., Binod P., Pugazhendhi A., Sirohi R., Reshmy R., Awasthi M.K., Gnansounou E. and Pandey A. 2021. Probiotics and gut microbiome- Prospects and challenges in remediating heavy metal toxicity. *Journal of Hazardous Materials*, 420: 126676. doi: 10.1016/j.jhazmat.2021.126676
- Asadi A., Lohrasbi V., Abdi M., Mirkalantari S., Esghaei M., Kashanian M., Oshaghi M. and Talebi M. 2022. The probiotic properties and potential of vaginal *Lactobacillus* spp. isolated from healthy women against some vaginal pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 74(5): 752–764. doi: 10.1111/lam.13660
- Balcazar J.L., Vendrell D., De Blas I., Ruiz-Zarzuela I., Muzquiz J.L. and Girones O. 2008. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. *Aquaculture*, 278(1-4): 188–191. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.03.014
- Bancroft J.D. and Gamble M. 2008. *Theory and Practice of Histological Techniques*. Elsevier, USA. 725P.
- Bazireh H., Shariati P., Azimzadeh Jamalkandi S., Ahmadi A. and Boroumand M.A. 2020. Isolation of novel probiotic *Lactobacillus* and *Enterococcus* strains from human salivary and fecal sources. *Frontiers in Microbiology*, 11: 597946. doi: 10.3389/fmicb.2020.597946
- Bhakta J.N., Bhattacharya S., Lahiri S. and Panigrahi A.K. 2023. Probiotic characterization of arsenic-resistant lactic acid bacteria for possible application as arsenic bioremediation tool in fish

- for safe fish food production. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 15(4): 889–902. doi: 10.1007/s12602-022-09921-9
- Chen L.S., Ma Y., Chen L.J., Zhao C.H., Maubois J.L., Jiang T.M., Li H.M. and He S.H. 2010.** Antioxidant activity of two yeasts and their attenuation effect on 4-nitroquinoline 1-oxide induced in vitro lipid peroxidation. International Journal of Food Science and Technology, 45(3): 555–561. doi: 10.1111/j.13652621.2009.02165.x
- Clarke G., Sandhu K.V., Griffin B.T., Dinan T.G., Cryan J.F. and Hyland N.P. 2019.** Gut reactions: Breaking down xenobiotic-microbiome interactions. Pharmacological Reviews, 71(2): 198–224. doi: 10.1124/pr.118.015768
- Cochran E.W., Garcia-Cervera C.J. and Fredrickson G.H. 2006.** Stability of the gyroid phase in diblock copolymers at strong segregation. Macromolecules, 39(7): 2449–2451. doi: 10.1021/ma060970s
- Daisley B.A., Monachese M., Trinder M., Bisanz J.E., Chmiel J.A., Burton J.P. and Reid G. 2019.** Immobilization of cadmium and lead by *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 mitigates apical-to-basolateral heavy metal translocation in a Caco-2 model of the intestinal epithelium. Gut Microbes, 10(3): 321–333. doi: 10.1080/19490976.2018.1526581
- Dawood M.A., Koshio S. and Esteban M.A. 2018.** Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: A review. Reviews in Aquaculture, 10(4): 950–974. doi: 10.1111/raq.12209
- DeMan J.D., Rogosa D. and Sharpe M.E. 1960.** A medium for the cultivation of lactobacilli. Journal of Applied Microbiology, 23(1): 130–135. doi: 10.1111/j.13652672.1960.tb00188.x
- Feng P., Ye Z., Kakade A., Virk A.K., Li X. and Liu P. 2018.** A review on gut remediation of selected environmental contaminants: Possible roles of probiotics and gut microbiota. Nutrients, 11(1): 1–19 (22). doi: 10.3390/nu11010022
- Gupta U.C. and Gupta S.C. 1998.** Trace element toxicity relationships to crop production and livestock and human health: Implications for management. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 29(11-14): 1491–1522. doi: 10.1080/00103629809370045
- Hatami S., Yavarmanesh M., Sankian M. and Issazadeh S.A. 2022.** Comparison of probiotic *Lactobacillus* strains isolated from dairy and Iranian traditional food products with those from human source on intestinal microbiota

- using BALB/C mice model. Brazilian Journal of Microbiology, 53(3): 1577–1591. doi: 10.1007/s42770-022-00790-6
- Huet M.A.L. and Puchooa D. 2017.** Bioremediation of heavy metals from aquatic environment through microbial processes: A potential role for probiotics. Journal of Applied Biology and Biotechnology, 5(6): 14–23. doi: 10.1111/raq.12209
- Hutahaean A.J.N., Silalahi J., Suryanto D. and Satria D. 2019.** Characterization of lactic acid bacteria from Dengke Naniura of common carp (*Cyprinus carpio*) with α -glucosidase inhibitory activity. Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences, 7(22): 3794–3798. doi: 10.3889/oamjms.2019.506
- Irawati E., Epina E., Febriyanti R. and Saleh E. 2025.** Addition of salam leaf flour (*Syzygium polyanthum* Walp) in rating on broiler chicken blood profile. Prosiding Seminar Nasional Integrasi Pertanian dan Peternakan, 3(1): 238–242. [Indonesian].
- Islam S.M., Rohani M.F. and Shahjahan M. 2021.** Probiotic yeast enhances growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) through morphological modifications of intestine. Aquaculture Reports, 21: 1–7 (100800). doi: 10.1016/j.aqrep.2021.100800
- Jama A.M., Mitc-Culafic D., Kolarevic S., Durasevic S.F. and Knezevic-Vukcevic J. 2012.** Protective effect of probiotic bacteria against cadmium-induced genotoxicity in rat hepatocytes in vivo and in vitro. Archives of Biological Sciences, 64(3): 1197–1206. doi: 10.1089/jmf.2016.0090
- Jiang C., Zhao Q., Zheng L., Chen X., Li C. and Ren M. 2021.** Distribution, source and health risk assessment based on the Monte Carlo method of heavy metals in shallow groundwater in an area affected by mining activities, China. Ecotoxicology and Environmental Safety, 224: 1–10 (112679). doi: 10.1016/j.ecoenv.2021.112679
- Kostinek M., Specht I., Edward V.A., Schillinger U., Hertel C., Holzapfel W.H. and Franz C.M. 2005.** Diversity and technological properties of predominant lactic acid bacteria from fermented cassava used for the preparation of Gari, a traditional African food. Systematic and Applied Microbiology, 28(6): 527–540. doi: 10.1016/j.syapm.2005.03.001
- Kumar N., Kumar V., Panwar R. and Ram C. 2017.** Efficacy of indigenous probiotic *Lactobacillus* strains to reduce cadmium bio accessibility- An in vitro digestion model. Environmental Science and Pollution Research, 24(2): 1241–

1250. doi: 10.1007/s11356-016-7779-6
- Luczynska J., Pietrzak-Fiecko R., Purkiewicz A. and Luczynski M.J. 2020.** Assessment of fish quality based on the content of heavy metals. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(4): 1–13 (2307). doi: 10.3390/ijerph19042307
- Mansouri N., Khorasani N., Karbassi A.R., Riazi B. and Panahandeh M. 2013.** Assessing human risk of contaminants in Anzali Wetland Fishes. *International Journal of Application or Innovation in Engineering and Management*, 2(11): 119–126. doi: 10.22093/wwj.2025.525270.3495
- Mohammadian S., Krok B., Fritzsche A., Bianco C., Tosco T., Cagigal E., Mata B., Gonzalez V., Diez-Ortiz M., Ramos V., Montalvo D., Smolders E., Sethi R. and Meckenstock R.U. 2021.** Field-scale demonstration of in situ immobilization of heavy metals by injecting iron oxide nanoparticle adsorption barriers in groundwater. *Journal of Contaminant Hydrology*, 237: 1–11 (103741). doi: 10.1016/j.jconhyd.2020.103741
- Naiel M.A., Ismael N.E. and Shehata S.A. 2019.** Ameliorative effect of diets supplemented with rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on aflatoxin B1 toxicity in terms of the performance, liver histopathology, immunity and antioxidant activity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 511: 1–8 (734264). doi: 10.1016/j.aquaculture.2019.734264
- Nakandakare I.B., Iwashita M.K.P., Dias D.D.C., Tachibana L., Ranzani-Paiva M.J.T. and Romagosa E. 2013.** Growth performance and intestinal histomorphology of Nile tilapia juveniles fed probiotics. *Acta Scientiarum Animal Sciences*, 35(4): 365–370. doi: 10.4025/actasci animsci.v35i4.18610
- Noel L., Chekria R., Millour S., Merlo M., Leblanc J.C. and Guerin T. 2013.** Distribution and relationships of As, Cd, Pb and Hg in freshwater fish from five French fishing areas. *Chemosphere*, 90(6): 1900–1910. doi: 10.1016/j.chemosphere.2012.10.015
- Ojekunle O., Banwo K. and Sanni A.I. 2017.** In vitro and in vivo evaluation of *Weissella cibaria* and *Lactobacillus plantarum* for their protective effect against cadmium and lead toxicities. *Letters in Applied Microbiology*, 64(5): 379–385. doi: 10.1111/lam.12731
- Orlando A., Linsalata M., Bianco G., Notarnicola M., D'Attoma B., Scavo M.P., Tafaro A. and Russo F. 2018.** *Lactobacillus rhamnosus* GG protects the epithelial barrier of Wistar rats from the pepsin-trypsin-digested gliadin (PTG)-

- induced enteropathy. *Nutrients*, 10(11): 1–16 (1698). doi: 10.3390/nu10111698
- Paone P. and Cani P.D. 2020.** Mucus barrier, mucins and gut microbiota: The expected slimy partners? *Gut*, 69(12): 2232–2243. doi: 10.1136/gut.jnl-2020-322260
- Peterson L.W. and Artis D. 2014.** Intestinal epithelial cells: Regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nature Reviews Immunology*, 14(3): 141–153. doi: 10.1038/nri3608
- Planas M., Vazquez J.A., Marques J., Perez-Lomba R., Gonzalez M.P. and Murado M. 2004.** Enhancement of rotifer (*Brachionus plicatilis*) growth by using terrestrial lactic acid bacteria. *Aquaculture*, 240(1-4): 313–329. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.01.011
- Prabhurajeshwar C. and Chandrakanth K. 2019.** Evaluation of antimicrobial properties and their substances against pathogenic bacteria in-vitro by probiotic *Lactobacilli* strains isolated from commercial yoghurt. *Clinical Nutrition Experimental*, 23: 97–115. doi: 10.1016/j.yclnex.2018.10.001
- Sefcova M.A., Larrea-Alvarez M., Larrea-Alvarez C.M., Karaffova V., Ortega-Paredes D., Vinueza-Burgos C., Sevcikova Z., Levkut M., Herich R. and Revajova V. 2021.** The probiotic *Lactobacillus fermentum* Biocenol CCM 7514 moderates *Campylobacter jejuni*-induced body weight impairment by improving gut morphometry and regulating cecal cytokine abundance in broiler chickens. *Animals*, 11(1): 235. doi: 10.3390/ani11010235
- Soccol C.R., De Souza Vandenberghe L.P., Medeiros A.B.P., Karp S.G., Buckeridge M., Ramos L.P., Pitarelo A.P., Ferreira-Leitao V., Gottschalk L.M.F., Ferrara M.A., Da Silva Bon E.P., De Moraes L.M.P., De Amorim Araujo J. and Torres F.A.G. 2010.** Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. *Bioresource Technology*, 101(13): 4820–4825. doi: 10.1016/j.biortech.2009.11.067
- Valipour A.R. and Khanipour A.A. 2009.** Kutum: Jewel of the Caspian Sea. Iranian Fisheries Research Organization, Iran. 84P.
- Valipour A.R., Goroochi D., Sayyad Bourani M., Hafezieh M., Hosseinzadeh Sahafi H. and Sharifian M. 2025.** Effects of density on the survival rate and growth performance of grow-out kutum, *Rutilus frisii* (Nordmann, 1840) in earthen pond. *Aquatic Animals Nutrition*, 11(1): 89–104. doi: 10.22124/janb.2025.29664.1274
- Vijayakumar S., Vaseeharan B., Malaikozhundan B., Gopi N., Ekambaram P., Pachaiappan R., Velusamy P., Murugan K.,**

- Benelli G., Suresh Kumar R. and Suriyanarayanamoorthy M. 2017.** Therapeutic effects of gold nanoparticles synthesized using *Musa paradisiaca* peel extract against multiple antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis* biofilms and human lung cancer cells (A549). *Microbial Pathogenesis*, 102: 173–183. doi: 10.1016/j.micpath.2016.11.029
- Vine N.G., Leukes W.D., Kaiser H., Daya S., Baxter J. and Hecht T. 2004.** Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. *Journal of Fish Diseases*, 27(6): 319–326. doi: 10.1111/j.1365-2761.2004.00542.x
- Wang N., Yin Y., Xia C., Li Y., Liu J. and Li Y. 2022.** Zn-enriched *Bacillus cereus* alleviates Cd toxicity in mirror carp (*Cyprinus carpio*): Intestinal microbiota, bioaccumulation, and oxidative stress. *Biological Trace Element Research*, 200(2): 812–821. doi: 10.1007/s12011-021-02657-7
- Wei C., Luo K., Wang M., Li Y., Pan M., Xie Y., Qin G., Liu Y., Li L., Liu Q. and Tian X. 2022.** Evaluation of potential probiotic properties of a strain of *Lactobacillus plantarum* for shrimp farming: From beneficial functions to safety assessment. *Frontiers in Microbiology*, 13: 1–14 (854131). doi: 10.3389/fmicb.2022.854131
- Yang S., Xiong Z., Xu T., Peng C., Hu A., Jiang W., Xiong Z., Wu Y., Yang F. and Cao H. 2022.** Compound probiotics alleviate cadmium-induced intestinal dysfunction and microbiota disorders in broilers. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 234: 1–10 (113374). doi: 10.1016/j.ecoenv.2022.113374
- Yozukmaz A., Yabanli M. and Sel F. 2018.** Heavy metal bioaccumulation in *Enteromorpha intestinalis*, (L.) Nees, a macrophytic alga: The example of Kadin Creek (Western Anatolia). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 61: 1–12 (e18160777). doi: 10.1590/1678-4324-2018160777
- Zhai Q., Yin R., Yu L., Wang G., Tian F., Yu R., Zhao J., Liu X., Chen Y.Q., Zhang H. and Chen W. 2015.** Screening of lactic acid bacteria with potential protective effects against cadmium toxicity. *Food Control*, 54: 23–30. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.01.037



Research Paper

In vivo evaluation of the protective effect of *Lactobacillus curvatus* strain af₁ isolated from fish farming ponds against lead and cadmium toxicity in the intestinal and liver tissues of Caspian Sea kutum (*Rutilus frisii*)

Afshin Fahim¹, Masoumeh Anvari², Ali Reza Valipour^{3*},
Mohammad Reza Safabakhsh⁴

DOI: 10.22124/japb.2025.31993.1579

Received: October 2025

Accepted: January 2026

Abstract

In this research, the probiotic effects of *Lactobacillus curvatus* bacteria isolated from fish ponds were investigated for histopathological studies. Kutum fingerling with an approximate weight of 8.05 ± 1.58 g were randomly divided into six groups including the control group, the group treated with *L. curvatus* (10^8 CFU/g), the group treated with lead (12mg/kg), the group treated with cadmium (4mg/kg), the group treated with lead (12mg/kg) + *L. curvatus* (10^8 CFU/g) and the group treated with cadmium + *L. curvatus* (10^8 CFU/g); and experimental materials were added to their diets. Each treatment was done in three replicates. Fish were maintained under these treatments for 56 days. Then, fish intestine and liver were sampled for histopathological examination. The results showed that in the treatment containing lead and cadmium, hyperemia (low), the presence of blood cells in the lamina propria, necrosis of enterocyte cells and microvilli and cell vacuoles were observed in the intestines of juvenile fish. Histopathological examination of liver tissue showed hyperemia and bleeding (high), cell necrosis (high) and cell vacuolation (low). After examining the liver and intestine tissues of fishes exposed to heavy metals lead and cadmium compared to the treatments containing probiotics, the tissue regeneration was observed in the treatments containing probiotic. Therefore, according to the results, a favorable effect on the liver tissue was observed at this stage.

Key words: *In vivo*, *Protective Effect*, *Lactobacillus*, *Probiotic*, *Rutilus frisii*.

1- Ph.D. Student in Microbiology, Department of Biology, Ra. C., Islamic Azad University, Rasht, Iran.

2- Associate Professor in Department of Biology, Ra. C., Islamic Azad University, Rasht, Iran.

3- Associate Professor in Inland Waters Aquaculture Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Anzali, Guilan, Iran.

4- Scientific Member in Department of Biology, Ra. C., Islamic Azad University, Rasht, Iran.

*Corresponding Author: valipour40@gmail.com

