مقاله علمی – پژوهشی:

تاثیر باکتری پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* در کاهش سمیت دیازینون بر ناپلی *Artemia franciscana*

فرشید مرادی[۱]، نصرالله احمدی‌فرد*[۱]، امیر توکمه‌چی[۲]

*n.ahmadifard@urmia.ac.ir

۱- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
۲- گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۹ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۴۰۰

چکیده

در مطالعه حاضر، اثر باکتری پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* بر کاهش سمیت آفت‌کش دیازینون بر *Artemia franciscana* مورد بررسی قرار گرفت. بعد از تعیین دوز کشندگی سم دیازینون بر ناپلی آرتمیا، تعداد ۵ تیمار از غلظت‌های مختلف (صفر، $۳/۷۵\times۱۰^{۶}$، $۷/۵\times۱۰^{۶}$، $۱۱/۲۵\times۱۰^{۶}$ و ۱۵×۱۰^{۶} کلونی بر میلی‌لیتر) باکتری *P. acidilactici* برای بررسی نقش آن در کاهش تاثیر سم در محیط‌های کشت ناپلی آرتمیا استفاده شد. برای تعیین غلظت کشندگی LC_{50} ۲۴ ساعته سم در *A. franciscana* ابتدا در آزمایش اول از ۵ غلظت ۶۰-۲۰ میلی‌گرم بر لیتر استفاده گردید که در پایین‌ترین غلظت میزان تلفات بیشتر از ۵۰ درصد در مدت زمان ۲۴ ساعت به‌دست آمد. در آزمایش دوم از غلظت‌های پایین‌تر ۱۸-۱۲ میلی‌گرم بر لیتر سم دیازینون استفاده گردید. براساس نتایج میزان LC_{50} ۲۴ ساعته به میزان ۱۲ میلی‌گرم بر لیتر محاسبه شد. با استفاده از دستگاه HPLC میزان کاهش مقدار سم در حضور غلظت‌های مختلف باکتری پروبیوتیک محاسبه شد. میزان حذف سم در پایین‌ترین غلظت باکتری ($۷/۵\times۱۰^{۶}$ کلنی بر میلی‌لیتر) ۸۲ درصد و در بالاترین تراکم ($۲۲/۵\times۱۰^{۶}$ کلنی بر میلی لیتر) ۹۵ درصد مشاهده شد. افزودن همزمان باکتری و سم به طور معنی‌داری باعث کاهش تلفات آرتمیا نسبت به تیمار شاهد شد ($p<۰/۰۵$) اگرچه در تیمارهای باکتری غلظت‌های مختلف باکتری تفاوت معنی‌داری در کاهش تلفات آرتمیا نشان ندادند ($p>۰/۰۵$). براساس نتایج تحقیق حاضر مشخص شد که باکتری *P. acidilactici* تاثیر معنی‌داری بر کاهش سمیت سم دیازینون به عنوان سم ارگانوفسفره دارد. همچنین نتایج تاثیر حضور همزمان سم و باکتری بر میزان تلفات آرتمیا، نشان‌دهنده حذف و بی‌اثر شدن سم به‌وسیله باکتری است.

لغات کلیدی: آرتمیا، باکتری، پروبیوتیک، دیازینون، آفت‌کش ارگانوفسفره

*نویسنده مسئول

مقدمه

امروزه آلودگی محیط‌زیست و به‌ویژه محیط آبی، جوامع انسانی و موجودات زنده را درگیر مشکلات جدی و غیرقابل جبران نموده است (Chu *et al.*, 2018). گروه بزرگی از آلاینده‌های زیست‌محیطی، سموم کشاورزی می‌باشند که آفت‌کش‌ها گروهی از این سموم هستند (El-Bakouri *et al.*, 2008). امروزه بیش از ۱۰۰۰ نوع از آنها در کشورهای مختلف جهان مورد استفاده قرار می‌گیرند و طی دهه‌های گذشته، مقادیر قابل توجهی از این ترکیبات وارد منابع آبی شده‌اند (Sucahyo *et al.*, 2008؛ سیف زاده و همکاران، ۱۳۹۷). سموم ارگانوفسفره‌ها بزرگ‌ترین و متنوع‌ترین گروه آفت‌کش‌های موجود هستند و در حدود ۷۰ درصد آفت‌کش‌های ثبت‌شده در جهان را تشکیل می‌دهند (Chu *et al.*, 2018).

دیازینون یکی از مهم‌ترین آفت‌کش‌های ارگانوفسفره می‌باشد که دارای فرمول شیمیایی $C_{12}H_{21}N_2O_3PS$ می‌باشد (Koprucu *et al.*, 2006) و به عنوان یک آفت‌کش پایدار (با نیمه‌عمر ۱۷۱ روز در دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد) به‌شدت برای ماهی‌ها، بی‌مهرگان آبزی، حشرات شکارچی و یا پارازیت‌ها سمی است (Coupe *et al.*, 2000؛ صمدی و همکاران، ۱۳۹۹). دیازینون به‌راحتی وارد بدن آبزیان می‌شود و در داخل بدن دیازینون به دیازوکسون متابولیزه می‌شود که دیازوکسون شکل سمی دیازینون می‌باشد (Dutta and Arends, 2003). غلظت‌های مختلف دیازینون سبب کاهش درصد تفریخ، کاهش رشد، تغییر شکل ستون فقرات، کاهش وزن در اندام‌های جنسی، کاهش حرکت، افزایش ناهنجاری و مرگ اسپرم (Larkin and Tjeerdema, 2000)، کاهش تولیدمثل و عملکرد سیستم ایمنی و مرگ (Hamm and Hinton, 2000) می‌شود.

بسیاری از گونه‌های باکتری اسیدلاکتیک میکروارگانیسم‌های غیربیماری‌زا هستند و ظرفیت زیادی برای حذف یا جذب انواع مختلف آلودگی‌های شیمیایی موجود در محلول‌های آبی دارند (Dogi *et al.*, 2011). مطالعاتی در کاربرد آنها، در زمینه‌های محیط‌زیست، سلامت و ایمنی مواد غذایی به عنوان استراتژی‌هایی برای کاهش آلودگی مواد شیمیایی و تعداد دیگری از کاربردهای آنها صورت گرفته است (Harishankar *et al.*, 2013). مکانیزم‌های تعامل باکتری اسیدلاکتیک با آلودگی‌های شیمیایی متنوع هستند و بستگی به ماهیت آلودگی، سویه میکروبی و شرایط فیزیکی و شیمیایی دارند (Dogi *et al.*, 2011). نقش باکتری‌های اسیدلاکتیک در از بین بردن سموم ارگانوفسفره عمدتاً با یک فرآیند تجزیه باکتریایی همراه است. Harishankar و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که فرآیندهای تخریب آفت‌کش‌ها به‌وسیله باکتری‌های اسیدلاکتیک مختلف در شرایط مشابه متفاوت هستند که نشان می‌دهد که مسیرهای مختلفی ممکن است در این سویه‌ها وجود داشته باشند. سه کلاسه از آنزیم‌های باکتریایی برای تخریب آفت‌کش‌های ارگانوفسفره شامل phosphotriesterases، methyl parathion hydrolases و organophosphorus acid anhydrolases شناخته شده‌اند و همه از طریق هیدرولیز کردن پیوند فسفواستر R_3 عمل می‌کنند (Russell *et al.* 2011) که بعضی از آنها در باکتری‌های اسیدلاکتیک گزارش شده‌اند، مانند Islam و همکاران (۲۰۱۰) که آنزیم phosphorus hydrolase enzyme را در باکتری *Lactobacillus brevis* استخراج کردند. همچنین مطالعات متعدد نشان داده است که باکتری‌هایی برای تجزیه آفت‌کش‌های organochlorates، pyrethroids و carbamates وجود دارند (Cycon and Piotrowska-Seget, 2016). Trinder و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند که لاکتوباسیلوس‌ها می‌توانند به عنوان یک سیستم بالقوه برای جذب و کاهش آفت‌کش‌ها در انسان و سایر موجودات زنده عمل کنند.

محیط‌های زندگی آرتمیا مناطق ساحلی و آبهای کم‌عمق با شوری بالا هستند که اغلب نزدیک به مناطق کشاورزی قرار دارند. آفت‌کش‌های ارگانوفسفره به دلیل سمیت و قابلیت ذخیره‌سازی می‌توانند تهدیدی برای جمعیت آرتمیاها باشند. همچنین آفت‌کش‌هایی که در بافت‌های آرتمیا انباشته می‌شوند، می‌توانند از طریق زنجیره غذایی به محصولات آبزی‌پروری برسند. آرتمیا به دلیل پرورش آسان، زمان تولیدمثل کوتاه، توزیع جهانی و دسترسی تجاری به تخم‌های آن، به عنوان محبوب‌ترین موجودات آزمایشی

برای آزمایش سمیت کوتاه‌مدت محسوب می‌شود (Chiocchetti *et al.*, 2018). با آگاهی از دامنه تحمل آرتمیا به آلودگی‌های مختلف می‌توان نتایج به‌دست آمده را در آبزیان پرورشی به طور مؤثرتر استفاده کرد (Ali *et al.*, 2018). هیچ‌گونه اطلاعاتی در مورد اثر محافظتی این باکتری‌ها در موجودات زنده از جمله آرتمیا گزارش نشده است. با توجه به اثرات مخرب آفت‌کش‌ها و پس‌مانده‌های آنها بر اکوسیستم‌های آبی لازم است که اثرات این مواد شیمیایی در حضور پروبیوتیک‌ها مورد ارزیابی قرار گیرند. لذا، تحقیق حاضر به بررسی اثر پروبیوتیک‌ها بر کاهش سمیت سموم کشاورزی بر بقاء *آرتمیا فرانسیسکانا* انجام شده است تا میزان بقاء ناپلی آرتمیا در معرض سم دیازینون و حضور پروبیوتیک *P. acidilactici* مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش کار

تهیه آرتمیا و باکتری

سیست‌های *A. franciscana* مورد استفاده در این تحقیق از مراکز تجاری تهیه شد. سیست‌های آرتمیا براساس روش‌های استاندارد ضد عفونی و پوسته‌زدایی و در دمای ۳۰-۲۸ درجه سانتی‌گراد و شوری ۳۳ در هزار تخم گشایی شدند (Sorgeloos *et al.*, 2001). سویه باکتری *P. acidilactici* از محصول تجاری شرکت لامند فرانسه تهیه شد. سم دیازینون (به شکل امولسیون ۶۰ درصد محلول در زایلون ۴۰ درصد) ساخت شرکت پرتونار (ساخت ایران) تهیه شد.

تعیین حساسیت ضد باکتریایی دیازینون

برای این منظور، سویه باکتری *P. acidilactici* در محیط MRS broth کشت داده شد. پس از رشد با دور ۳۰۰۰ دور دقیقه سانتریفوژ و پس از دو مرتبه شستشو با سرم فیزیولوژیک استریل، تراکم آن به طور جداگانه با روش نفلومتری با لوله شماره ۱ مک فارلند (تراکم $CFU\ mL^{-1}$ ۱/۵ × $۱۰^{۹}$) تنظیم شد. سپس رقت‌های سریالی از سم دیازینون در مبنای ۲ با استفاده از محلول ۵۰ درصد DMSO تهیه شد. غلظت‌های مورد استفاده به صورت رقت‌های آزمایشی به میزان ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵، ۱۵/۶۳ و ۷/۸۲، ۳/۹۱ میلی‌گرم از سم دیازینون تهیه گردیدند. از محیط کشت MRS برای مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد برای جداسازی و شمارش باکتری‌ها استفاده شد. بعد از شمارش باکتری‌ها بر اساس شکل و رنگ کلنی‌های باکتری‌های لاکتوباسیل میزان تغییرات پروبیوتیک‌ها توسط سم مشخص شد (Ahmadifard *et al.*, 2018). براساس استاندارد بین‌المللی حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت باکتری کشی دیازینون (MBC) تعیین شد (CLSI, 2009).

تعیین غلظت کشندگی برای ناپلی آرتمیا (LC_{50})

به دلیل احتمال تجزیه و تضعیف سم دیازینون، رقت‌سازی از سم قبل از شروع آزمایش و به اندازه مورد نیاز صورت گرفت. برای تهیه رقت‌های آزمایشی در مرحله اول میزان ۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ میلی‌گرم و در مرحله بعد ۱۲، ۱۴، ۱۶ و ۱۸ میلی‌گرم از سم دیازینون (۶۰ درصد) به یک لیتر آب با شوری ۳۵ گرم در لیتر اضافه شد و سپس به لوله‌های فالکون ۵۰ میلی‌لیتری منتقل شدند. با توجه به جرم مولکولی و درصد خلوص سم دیازینون (۶۰ درصد) برای تهیه غلظت محلول خالص میزان سم در هر رقت در عدد ۱/۶۶۷ ضرب شد.

پس از تهیه رقت‌های دیازینون ۲۰ عدد ناپلی آرتمیای تازه تفریخ شده به هر یک از لوله‌های فالکون حاوی آب شور و سموم دیازینون با رقت‌های مذکور توزیع شدند. لوله‌های فالکون در داخل آکواریوم شیشه‌ای مجهز به بخاری آکواریومی در دمای ۰/۵±۲۶ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. تمامی ناپلی‌ها به مدت ۲۴ ساعت بدون غذادهی در غلظت‌های موردنظر نگهداری شدند و میزان تلفات بعد از ۲۴ ساعت محاسبه شد (هدایتی و همکاران، ۱۳۹۵). مقادیر LC_{50} و محدوده اطمینان ۹۵ درصد مطابق دستورالعمل فینی (Finney) با روش آنالیز Probit محاسبه شد (Guzzella *et al.*, 1997).

روش تعیین میزان دوز سم باقی‌مانده با استفاده از دستگاه HPLC

بعد از مشخص شدن غلظت کشندگی ۵۰ درصد (LC_{50}) سم دیازینون، باکتری پدیوکوس با غلظت‌های مختلف (CFU/mL ۱۰^۶×۳/۷۵، ۷/۵، ۱۱/۲۵ و ۱۵) به محیط حاوی سم اضافه گردید و بعد از سپری شدن ۲۴ ساعت با استفاده از سانتریفوژ باکتری‌ها جداسازی شدند و محیط فوقانی جهت آنالیز میزان باقی مانده سم به آزمایشگاه HPLC ارسال شد. هنگام نمونه‌برداری جهت جلوگیری از تجزیه دیازینون، در هر بطری بعد از برداشت نمونه ۱۰ میلی لیتر دی کلرومتان اضافه شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده در بطری ۲۵۰ میلی‌لیتری با فویل پوشیده و در کنار یخ تحت دمای ۴-۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. عملیات استخراج دیازینون از نمونه‌ها بدین صورت است که ۲۵۰ میلی‌لیتر نمونه داخل قیف دکانتور ریخته و ۲ میلی‌لیتر کلرور سدیم اشباع به آن افزوده شد. عمل جداسازی دیازینون از محلول حاصل در سه مرتبه متوالی با افزودن ۱۵/۵، ۱۲ و ۱۲/۵ میلی‌لیتر دی کلرومتان ادامه یافت. فاز آلی نمونه‌ها در هر مرحله جدا، سپس ۷ گرم سولفات سدیم انیدرید به آن اضافه گردید تا عاری از آب شود. حجم محلول آلی جدا شده در دمای آزمایشگاه تبخیر شد و مواد باقیمانده در استن حل شدند. بدین طریق نمونه‌ها برای تزریق به دستگاه HPLC آماده شدند. شرایط کروماتوگرافی برای آنالیز دیازینون به صورت ایزوکراتیک با فاز معکوس در ستون C-۱۸ با فاز متحرک حاوی متانول/آب (۷۰/۳۰) در دمای اتاق با HPLC و نرم افزار EZ-chrome با دتکتور UV در طول موج ۲۲۰ نانومتر انجام شد (Dean, 2009).

تعیین دوزهای پروبیوتیک و بقای آرتمیا

بعد از مشخص شدن نتایج دوز کشندگی سم دیازینون بر ناپلی آرتمیا و حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت باکتری کشی دیازینون (MBC) ۵ تیمار از غلظت‌های مختلف پروبیوتیک شامل ۱- تیمار فاقد پروبیوتیک و حاوی سم، ۲- تیمار حاوی CFU/mL ۱۰^۶×۳/۷۵ از پروبیوتیک و حاوی سم، ۳- تیمار حاوی CFU/mL ۱۰^۶×۷/۵ از پروبیوتیک و حاوی سم، ۴- تیمار حاوی CFU/mL ۱۰^۶×۱۱/۲۵ از پروبیوتیک و حاوی سم و ۵- تیمار حاوی CFU/mL ۱۰^۶×۱۵ از پروبیوتیک و حاوی سم برای بررسی نقش آن در کاهش تاثیر سم در محیط‌های کشت آرتمیا استفاده شد. غلظت‌های مذکور در لوله‌های فالکون ۵۰ میلی‌لیتری تنظیم شدند و به هر یک از فالکون‌ها ابتدا پروبیوتیک به همراه سم دیازینون اضافه شد و پس از ۲۴ ساعت تعداد ۵۰ عدد ناپلی تازه تفریخ شده در هر یک از فالکون‌ها توزیع شدند و در نهایت میزان تلفات ناپلی آرتمیا بعد از گذشت ۲۴ ساعت محاسبه شد (Planas *et al.*, 2004).

روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

آزمایش‌ها در قالب یک طرح کاملاً تصادفی انجام گردید. ابتدا نرمال بودن داده با استفاده از آزمون کولموگراف-اسمیرنوف بررسی شد و سپس برای مقایسه بین تیمارها از آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA و جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه توکی در سطح احتمال $p<0/05$ استفاده گردید. مقادیر LC_{50} در محدوده اطمینان ۹۵ درصد مطابق دستورالعمل فینی (Finney) با روش آنالیز Probit محاسبه شد. آنالیز آماری با استفاده از نسخه ۲۱ نرم افزار SPSS صورت گرفت. جداول و نمودارهای موردنیاز نیز با نرم‌افزار Excel (نسخه ۲۰۱۳) ترسیم شدند.

نتایج

شمارش باکتری و تعیین MIC و MBC

میزان شمارش باکتری در دوزهای مختلف سم در جدول ۱ ارائه داده شده است. براساس نتایج میزان دوزهای بیشتر از ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر سم دیازینون باعث توقف کامل رشد باکتری (MIC) و مرگ کامل باکتری‌ها (MBC) شد. با کاهش غلظت سم تعداد باکتری‌ها افزایش یافت به‌طوری‌که در غلظت‌های کمتر از ۳/۹۱ میلی‌گرم بر لیتر سم دیازینون تعداد باکتری‌ها غیرقابل شمارش بود.

جدول ۱: تعداد باکتری *P. acidilactici* بعد از قرار دادن در غلظت‌های مختلف سم دیازینون

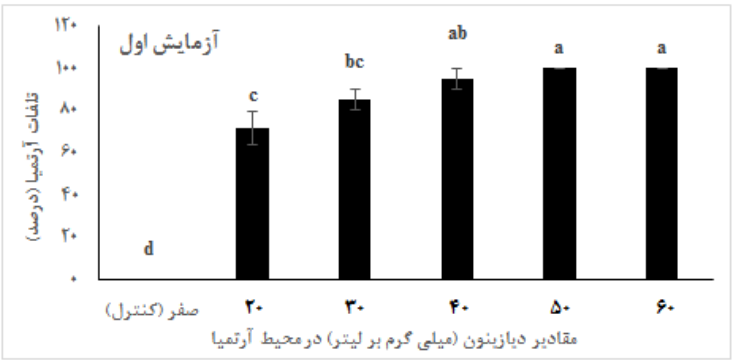
Table 1: Number of *P. acidilactici* bacteria after exposure to different concentrations of diazinon toxin

غلظت های سم دیازینون (میلی‌گرم بر لیتر)	تعداد باکتری (CFU/mL)
۱۰۰۰	۰
۵۰۰	۰
۲۵۰	۰
۱۲۵	۱۱×۱۰^۶
۶۲/۵	۱۵۷×۱۰^۷
۳۱/۲۵	۳۱۴×۱۰^۷
۱۵/۶۳	۴۹×۱۰^۸
۷/۸۲	۶۶/۷×۱۰^۸
۳/۹۱	غیرقابل شمارش

میزان مرگ و میر آرتمیا در غلظت‌های مختلف سم دیازینون و محاسبه LC_{50}

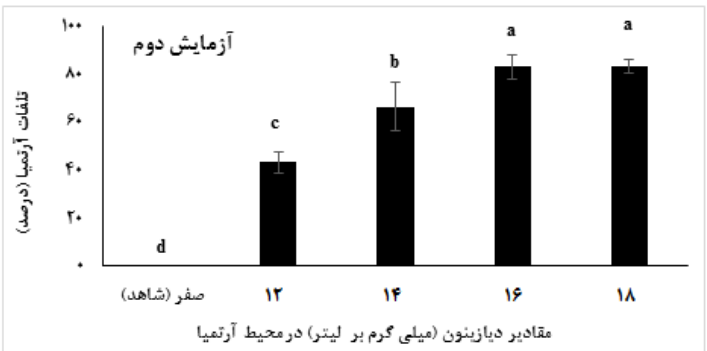
برای تعیین غلظت کشندگی ۵۰ درصد (LC_{50}) سم در *آرتمیا فرانسیکانا* ابتدا در آزمایش اول از ۵ غلظت ۶۰-۲۰ میلی‌گرم بر لیتر استفاده گردید که نتایج نشان‌دهنده تلفات ۱۰۰ درصدی در غلظت‌های بالای ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر می‌باشد (شکل ۱). در غلظت‌های پایین‌تر میزان تلفات از ۱۰۰ درصد کمتر بود. اما در پایین‌ترین غلظت نیز میزان تلفات بیشتر از ۵۰ درصد در مدت زمان ۲۴ ساعت به‌دست آمد.

در آزمایش دوم از غلظت‌های پایین‌تر ۱۸-۱۲ میلی‌گرم بر لیتر سم دیازینون استفاده گردید که نتایج آن در شکل ۲ نشان داده شده است. براساس نتایج حداکثر تلفات به طور معنی‌داری در تیمار ۱۸ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد. اگر چه از نظر آماری بین تیمارهای ۱۸-۱۴ میلی‌گرم بر لیتر تفاوت معنی‌داری یافت نشد. براساس این نتایج میزان غلظت کشندگی ۵۰ درصد (LC_{50}) با استفاده از نرم افزار SPSS و به میزان ۱۲/۲۲ میلی‌گرم بر لیتر محاسبه شد.



شکل ۱: میزان مرگ و میر آرتمیا (درصد) در غلظت‌های ۲۰ تا ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر سم دیازینون (آزمایش اول)

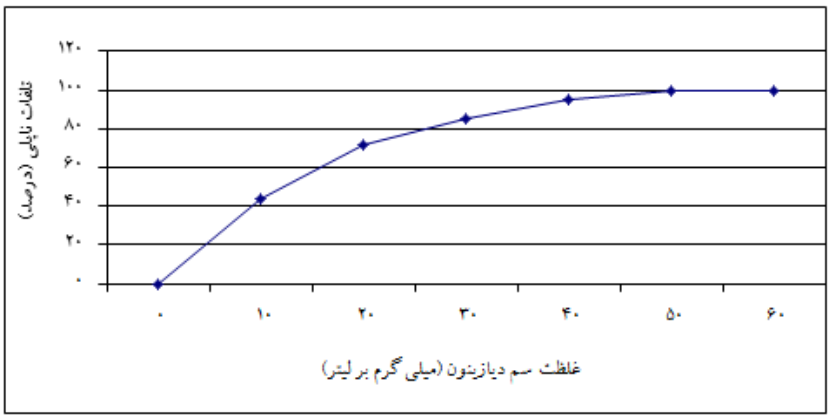
Figure 1: Mortality of Artemia (%) in concentrations of 20 to 60 mg L^{-1} diazinon toxin (first experiment)



شکل ۲: میزان مرگ و میر آرتمیا (درصد) در غلظت‌های ۱۲ تا ۱۸ میلی‌گرم بر لیتر سم دیازینون (آزمایش دوم)

Figure 2: Mortality of Artemia (%) in concentrations of 12 to 18 mgL^{-1} diazinon toxin (secound experiment)

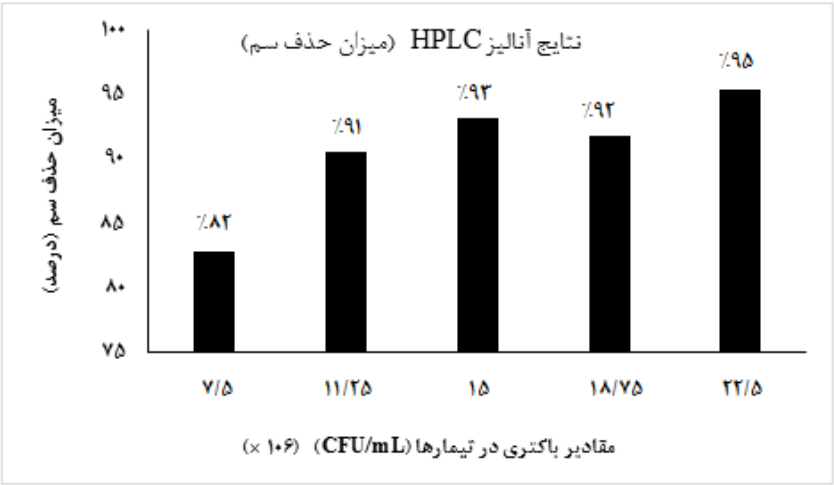
در شکل ۳ الگـوی تلفـات ناپلی آرتمیا را در غلظت‌های مختلف سم دیازینون نشان داده شده است. بر اساس این نتایج الگوی تلفات ناپلی آرتمیا تا غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر سم دیازینون یک شیب تند را نشان داد. این در حالی است که الگوی تلفات بعد از افزایش غلظت از ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر سم دیازینون شیب ملایمی نشان داد.



شکل ۳: مقایسه میزان مرگ و میر ناپلی آرتمیا در ارتباط با غلظت‌های مختلف سم دیازینون
Figure 3: Comparison of Artemia nauplii mortality in relation to different concentrations of diazinon

ردیابی میزان کاهش سم با استفاده از دستگاه HPLC

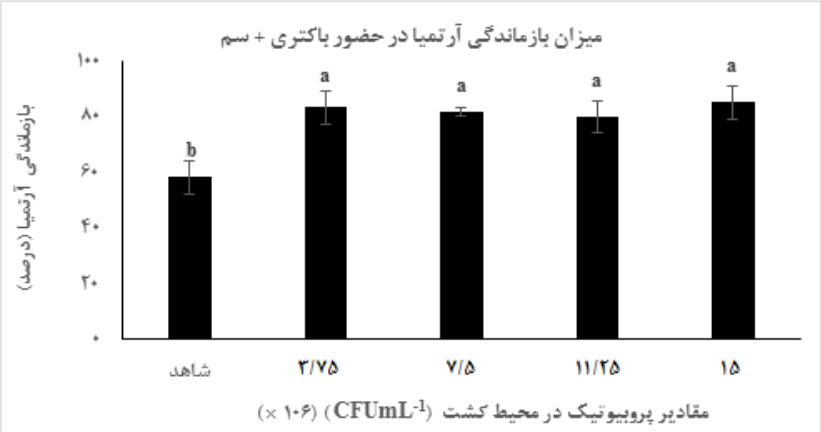
با استفاده از دستگاه HPLC میزان کاهش مقدار سم در غلظت‌های مختلف باکتری محاسبه شد که نتایج آن در شکل ۴ نشان داده شده است. همان‌طوری‌که مشاهده می‌شود، در پایین‌ترین غلظت باکتری ۸۲ درصد سم را حذف نمود. با افزایش تراکم باکتری میزان حذف سم افزایش یافته و بالاترین میزان حذف سم در تراکم CFU ۱۰^{۶} × ۲۲/۵ از باکتری مشاهده شده است.



شکل ۴: درصد میزان کاهش سم در حضور مقادیر مختلف باکتری (۷/۲۲-۵/۵ ×۱۰^{۶} CFUmL^{-1})
Figure 4: Percentage of toxin reduction in the presence of different amounts of bacteria (7.5-22.5×10^{6} CFUmL^{-1})

میزان بازماندگی آرتمیا در حضور سم و باکتری

در شکل ۵ نتایج بازماندگی آرتمیا در حضور هم‌زمان سم و غلظت‌های مختلف باکتری نشان داده شده است. همان‌طوری‌که مشاهده می‌شود، افزودن هم‌زمان باکتری و سم به طور معنی‌داری باعث کاهش تلفات آرتمیا نسبت به تیمار شاهد شد ($p<0/05$). اگرچه در تیمارهای باکتری غلظت‌های مختلف باکتری تفاوت معنی‌داری در کاهش تلفات نشان ندادند ($p>0/05$).



شکل ۵: درصد بازماندگی ناپلی آرتمیا در حضور سم و مقادیر مختلف باکتری ($۳/۱۵-۷۵ \times ۱۰^{۶}$ CFUmL^{-1}) در محیط

Figure 5: Survival percentage of Artemia nauplii in the presence of diazinon and different concentarion of bacteria ($3.75\text{-}15 \times 10^{6}$ CFUmL^{-1}) in the environment

بحث

حساسیت باکتری‌ها به سموم آفت کش

گونه‌های مختلف باکتری در مقابل سموم کشاورزی حساسیت‌های مختلفی از خود نشان می‌دهند. در مطالعه حاضر باکتری *P. acidilactici* در غلظت‌های کمتر از ۱۲۵ میلی‌گرم بر لیتر از سم دیازینون توانایی رشد را از خود نشان داد. Thabit و El-Naggar (۲۰۱۳) نشان دادند که دیازینون هیچ تاثیری بر برخی باکتری‌ها از جمله *Pseudomonas aeruginosa* و *Bacillus amyloliquefaciens* ندارد و این باکتری‌ها قادر به جذب سم دیازینون و شکستن ساختار مولکولی آن می‌باشد. Hassanshahian (۲۰۱۶) گزارش کرد که باکتری‌های *Achromobacter piechaudii*، *P. fluorescens* و *P. putida* در غلظت‌های کمتر از ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر قادر به استفاده از سم دیازینون به عنوان منبع کربن و انرژی هستند و این سم را تخریب می‌کنند، اما غلظت‌های بالای ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر برای این باکتری‌ها سمی است و باعث کاهش جمعیت این باکتری‌ها می‌شود. در مطالعه Gao و همکاران (۲۰۱۷) سم دیازینون نتوانست جمعیت باکتری‌های Bacteroidaceae_*Bacteroides*، *Burkholderiales*، Clostridiaceae و Erysipelotrichaceae_ *Coprobacillus* را تحت تاثیر قرار دهد درحالی‌که جمعیت‌های باکتریایی Lachnospiraceae_*Shtletle*، Lachnospiraceae_*Butyrivibrio* و Staphylococcaceae_ *Staphylococcus* پس از قرار گرفتن در معرض سم دیازینون به طور کامل مهار شدند. El-Hussein و همکاران (۲۰۱۴) نیز نشان دادند که برخی گروه‌های باکتریایی از جمله *Pseudomonas* ها دارای توانایی تجزیه بعضی آفت‌کش‌ها از جمله بنومیل هستند و این سم نه تنها هیچ تاثیر منفی بر رشد این باکتری‌ها ندارد بلکه به عنوان منبع کربن می‌تواند مورد تغذیه این باکتری‌ها قرار گیرد. Harishankar و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آفت‌کش chlorpyrifos باعث مهار رشد باکتری *L. plantarum* شد درحالی‌که برای باکتری‌های *Lactococcus lactis* و

L. fermentum مهار رشد در غلظت ۱۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد.

اثر سم دیازینون بر بقاء آرتمیا فرانسیسکانا

در مطالعه حاضر، غلظت‌های ۵۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر سم دیازینون باعث تلفات ۱۰۰ درصدی ناپلیوس‌های تازه تفریخ شده شد. همچنین میزان LC_{50} ۲۴ ساعته سم دیازینون ۱۲ میلی‌گرم بر لیتر به‌دست آمد. در مطالعه شهابی‌نیا (۱۳۹۳) با بررسی آفت‌کش مالاتیون، LC_{50} ۲۴ ساعته برای گروه سنی تازه تفریخ و ۴۸ ساعته *A. franciscana* به‌ترتیب ۱۱/۴۶ و ۷/۲۳ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمد. همچنین میزان ۲۰ میلی‌گرم در لیتر باعث تلفات ۹۵ درصدی در ناپلیوس ۴۸ ساعته شد. در مطالعه محیسنی و همکاران (۱۳۸۸) میزان LC_{50} ۲۴ ساعته برای ناپلیوس تازه تفریخ شده *A. urmiana*، ناپلیوس ۲۴ و ۴۸ ساعته به‌ترتیب ۹/۶۸، ۹/۶۳ و ۱/۸۴ میلی‌گرم بر لیتر به‌دست آمد. در مطالعه حاضر، میزان تلفات نسبی بالا در غلظت‌های پایین مشاهده شد. به بیان دیگر، با افزایش غلظت دیازینون تلفات شدیدی دیده می‌شود و در شکل ۵ در حالت نمایی دارای شیب زیادی است و برعکس در غلظت‌های بالاتر، تا حدودی شیب منحنی تلفات کاهش پیدا کرده و منحنی به سمت خط مستقیم میل می‌کند. احتمالاً با توجه به متابولیسم بالای ناپلیوس آرتمیا در مراحل اولیه لاروی، شدت پالیده خواری بالاست. در طول زمان میزان سم در بدن موجود به دلیل انباشت مداوم و عدم توانایی موجود در متابولیزه کردن آن، افزایش می‌یابد و زمانی که غلظت سم از حد قابل تحمل برای موجود بالاتر رفت، تلفات رخ می‌دهد. اما در غلظت‌های بالاتر این آفت‌کش، به دلیل تأثیر آنی و لحظه‌ای این آلاینده بر موجود، شدت پالیده‌خواری به‌شدت کاهش یافته است و در نتیجه با وجود غلظت بالای آلاینده در محیط، میزان نسبی ورود آن به بدن کاهش می‌یابد. این نکته در ارتباط با دافنی اثبات شده است (Taylor *et al.*, 1998). در مطالعه‌ای محیسنی و همکاران (۱۳۸۸) تلفات نسبی ناپلی آرتمیا در غلظت‌های پایین‌تر آفت‌کش دیازینون دارای یک شیب تند و در غلظت‌های بالاتر میزان تلفات شیب ملایمی را نشان داد و این نکته به لحاظ جمعیتی و زیست محیطی، مسئله نگران کننده‌ای به‌نظر می‌رسد. در مطالعه Varó و همکاران (۱۹۹۸)، میزان LC_{50} برای ۱۶ سویه از ناپلی *A. franciscana* و *A. parthenogenetica* برای سم ارگانوفسفره Chlorpyrifos کمتر از ۱۸ میلی‌گرم بر لیتر بود. Ali و همکاران (۲۰۱۸) گزارش دادند که LC_{50} ۲۴ و ۴۸ ساعته برای آفت‌کش مالاتیون به‌ترتیب ۵۳/۳ و ۱۷/۳ میلی‌گرم بر لیتر و برای آفت‌کش گلیفوسیت به‌ترتیب ۰/۰۲۸ و ۰/۰۱۹ میلی‌گرم بر لیتر برای ناپلی آرتمیا به‌دست آمد. گزارش شده است که آرتمیا حساسیت بیشتری به سم متیل پاراتیون در مقایسه با *Brachionus calyciflorus* و *Gambusia affinis* دارد (Fernandez-Casalderrey *et al.*, 1992) و برعکس حساسیت کمتری به این سموم نسبت به بعضی بی‌مهرگان آبزی شامل *Gammarus fasciatus*، *Daphnia magna*، *G. pulex*، *G. fossarum* و *Simocephalus spp* دارد (Fernandez-Casalderrey *et al.*, 1995). Stephenson (۱۹۹۱) اعلام کرد که گونه‌های یوری‌هالین از جمله *Artemia sp* و *B. plicatilis*، ظرفیت تنظیم اسمزی بیشتری دارد و در برابر اثرات سمی آفت‌کش‌های ارگانوفسفره مقاومت بیشتری دارد. علاوه بر ترکیبات یک آفت‌کش، شوری، سختی و pH محیط می‌توانند نتایج آزمایش‌های اکوتوکسیولوژیک را به‌شدت تحت تأثیر قرار دهند. به طور کلی، سموم در محیط با شوری بالا اثرات کمتری دارند. تفاوت در میزان حساسیت آرتمیا به سموم ارگانوفسفره مختلف نسبت به سایر موجودات آبزی به میزان اختلاف در قدرت مهار فعالیت آنزیم استیل کولین استراز دارد (Sánchez-Fortún *et al.*, 1996).

تاثیر پروبیوتیک بر آرتمیا در حضور سم

مطالعات نشان داده که باکتری‌ها قادرند با استفاده از مکانیسم‌های مختلف اثرات سموم مختلف را خنثی کنند. در مطالعه حاضر، باکتری *P. acidilactici* به همراه سم دیازینون به محیط کشت آرتمیا اضافه شد و نقش باکتری در خنثی‌سازی سم دیازینون مشاهده شد. بالاترین میزان

بقاء ناپلی آرتمیا در محیط حاوی سم در حضور باکتری با غلظت ۱۵×۱۰^{۶} باکتری در میلی‌لیتر مشاهده شد. همچنین حذف سم به‌وسیله باکتری به میزان ۹۲٪ مشاهده شد. Li و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کردند که بعد از آنالیز GC-MS عصاره سلولی سویه های *L. plantarum* هیچ‌گونه باقیمانده سمی در سویه P9 مشاهده نشد. بنابراین، این سویه قادر به تخریب آفت‌کش‌های ارگانوفسفره می‌باشد. چندین گروه از آنزیم‌های میکروبی، از جمله کربوکسیل استرازها، فسفاتازها (Bhalerao and Puranik, 2009)، فسفو تری استرازها (Weston and Amweg, 2007)، ارگانوفسفر هیدرولاز (Islam *et al.*, 2010)، می‌توانند تخریب سموم ارگانوفسفرها را از طریق هیدرولیز استرهای اسید فسفریک تسهیل نمایند. Upadhyay و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند باکتری‌های *B. subtilis*، *L. lactis*، *L. sanfrancisco*، *L. mesenteroides* بر اساس پدیده اتصال به دیواره سلولی، تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده و با عمل بیوترانسفورماسیون قادر به تبدیل سموم به مواد کمتر سمی می‌باشند.

محققین گزارش کردند که بعد از استفاده از پروبیوتیک *L. rhamnosus* در محیط کشت *Drosophila melanogaster* که در معرض سموم آفت‌کش ارگانوفسفره قرارگرفته بودند، میزان بقاء در این تیمارها نسبت به تیمارهایی که از پروبیوتیک استفاده نشده بود، بالاتر بود که می‌تواند به علت حذف سموم ارگانوفسفره به‌وسیله باکتری *L. rhamnosus* باشد (Trinder *et al.*, 2016). Daisley و همکاران (۲۰۱۸) گزارش دادند که حشره‌کش ارگانوفسفات کلروپیریفوس از طریق بیوترنسفورماسیون با یک انتقال مولکولی به مولکول سمی‌تر ۳، ۵، ۶-تری کلرو-۲-پیریدینول تبدیل می‌شود و در نتیجه پیامدهای بیولوژیک مرتبط و سمی بر سلامتی میزبان ایجاد می‌کند درحالی‌که گونه‌های باکتریایی خاصی، برای مثال، *Pseudomonas spp.* (ATCC700113)، *L. lactis*، *E. coli* و *L. fermentum* قادر به استفاده از ۳، ۵، ۶-تری کلرو-۲-پیریدینول به عنوان منبع کربن و انرژی خود هستند و می‌توانند این حشره‌کش ارگانوفسفره را از محیط حذف کنند.

پروبیوتیک‌ها یکپارچگی سد روده را افزایش می دهند و از این طریق جذب آفت‌کش‌ها را کاهش می‌دهند (Cho *et al.*, 2012). ساز و کار اصلی اثرات سمی دیازینون بر موجودات هدف و غیر هدف مهار استیل کولین استراز است (Jameson *et al.*, 2006)، اما محققان نشان داده‌اند که اثر دیازینون تنها اثرات سمی نیست و مطالعات متعددی نشان می‌دهد که دیازینون استرس اکسیداتیو را تحریک می‌کند و رادیکال‌های آزاد را در سیستم‌های بیولوژیک تولید می‌کند که مکانیسم اصلی سمیت ارگانو فسفات مزمن است (Jafari *et al.*, 2012). سموم ارگانوفسفره میزان ROS[1] (یک محرک اصلی آپوپتوز در اندام‌های مختلف است) را بالا می‌برد (Aluigi *et al.*, 2010). در واقع، آپوپتوز نتیجه متداول برای قرار گرفتن در معرض سمی است که باعث تحریک استرس اکسیداتیو می‌شود (Abdel-Daim, 2016). دیازینون باعث افزایش پراکسیداسیون لیپیدها و کاهش نشانگرهای آنتی‌اکسیدانی از جمله کاهش گلوتاتیون، گلوتاتیون پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام می‌شود (Abdel-Daim, 2016). در یک مطالعه دیازینون، در دوزهای بالا باعث افزایش سطح مالون دی آلدئید، سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون S ترانسفراز و کاهش سطح گلوتاتیون، لاکتات دهیدروژناز و فعالیت‌های کولین استراز در موش شد (Jafari *et al.*, 2012). محققان گزارش کردند، لاکتوباسیلوس‌ها طی دو پروسه جذب و حذف آنزیمی، آفت‌کش‌ها را حذف می‌کنند که با استفاده از آنزیم‌های فسفوتری استراز، متیل پاراتیون هیدرولاز و ارگانوفسفروس اسید هیدرولاز صورت می‌گیرد (Harishankar *et al.*, 2013).

تلفات ناپلی آرتمیا در غلظت‌های مختلف سم دیازینون الگوی متفاوتی نشان داد به‌طوری‌که میزان تلفات در غلظت‌های بالاتر از ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر ۱۰۰ درصد بود. از سوی دیگر، میزان تلفات در غلظت‌های بالای ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر بالای ۷۰ درصد بود. میزان شیب تلفات در غلظت‌های پایین‌تر (۲۰-۰ میلی‌گرم)، تند و در غلظت‌های

[1] Reactive oxygen species

بالاتر شیب ملایمی را نشان داد که نشان‌دهنده حساسیت بالای ناپلی آرتمیا نسبت به سم دیازینون و کاهش شدت پالیده‌خواری در غلظت‌های بالا بود. از نتایج حاصله از این بررسی، مشخص می‌شود که باکتری پروبیوتیک *P. acidilactici* تاثیر معنی‌داری بر کاهش سمیت سم دیازینون به عنوان سم ارگانوفسفره دارد. نتایج کاهش میزان سم در محیط نیز در نتایج حاصل از دستگاه HPLC به‌خوبی مشاهده شد که بیانگر این است که باکتری، سم دیازینون را از محیط حذف نموده است. همچنین نتایج تاثیر حضور هم‌زمان سم و باکتری بر میزان تلفات آرتمیا نیز نشان‌دهنده این مطلب است که باکتری، سم را حذف و بی‌اثر می‌کند.

منابع

سیف زاده، م، ولی پور، ع.ر.، زارع گشتی، ق. و خانی پور، ع .ا.، ۱۳۹۷. بررسی میزان تجمع سموم آلدرین، دیازینون و اندرین در بافت عضله خوراکی ماهیان اقتصادی تالاب انزلی. مجله علمی شیلات ایران، ۲۷(۳): ۳۰-۲۳. DOI: 10.22092/ISFJ.2018.116858

شهابی نیا، ح. ۱۳۹۳. تعیین غلظت تحت کشنده (LC50) ۲۴ ساعته حشره‌کش مالاتیون بر ناپلیوس آرتمیا فرانسیسکانای (*Artemia franciscana*) تازه تفریخ شده و ۴۸ ساعته در شرایط آزمایشگاهی. پایان نامه، دانشگاه زابل، ۴۵ ص.

صمدی، ح.، جوادیان، س. ر.، ایمان پور، م. ر. ۱۳۹۹. اثر زیر حد کشندگی سک دیازینون بر استروئید زایی و وضعیت جنسی مولدین نر ماهی قرمز *Carassius auratus* مجله علمی شیلات ایران، ۲۹(۶): ۱۴۲-۱۳۳. DOI: 10.22092/ISFJ.2021.123734

محیسنی، م.، فرهنگی، م.، محیسنی، ع.، میرواقفی، ع.، شکوه سلجوقی، ظ. ۱۳۸۸. بررسی تاثیر سن بر میزان حساسیت ناپلیوس *Artemia urmiana* نسبت به غلظت‌های مختلف حشره‌کش دیازینون. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی، ۳: ۲۵-۱۶.

Abdel-Daim, M.M., 2016. Synergistic protective role of ceftriaxone and ascorbic acid against subacute diazinon-induced nephrotoxicity in rats. Cytotechnology, 68(2): 279-289. DOI: 10.1007/s10616-014-9779-z

Ahmadifard, N., Aminlooi, V.R., Tukmechi, A. and Agh, N., 2018. Evaluation of the impacts of long-term enriched *Artemia* with *Bacillus subtilis* on growth performance, reproduction, intestinal microflora, and resistance to *Aeromonas hydrophila* of ornamental fish *Poecilia latipinna*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11(3): 957-965. DOI.org/10.1007/s12602-018-9453-4

Ali, A., Mohamed, A.J., Kumar, M.A. and John, B.A., 2018. Organophosphorus pesticides toxicity on brine shrimp, *Artemia*. *Journal Clean WAS*, 2(1): 23-26. DOI: 10.26480/jcleanwas.01.2018.23.26

Aluigi, M.G., Guida, C. and Falugi, C., 2010. Apoptosis as a specific biomarker of diazinon toxicity in NTera2-D1 cells. *Chemico-biological Interactions*, 187(1-3): 299-303. DOI: 10.1016/j.cbi.2010.03.031

Bhalerao, T.S., and Puranik, P.R., 2009. Microbial degradation of monocrotophos by *Aspergillus oryzae*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 63: 503–508. DOI.org/10.1016/j.ibiod.2008.11.011.

Chiocchetti, G.M., Jadán-Piedra, C., Monedero, V., Zúñiga, M., Vélez, D. and Devesa, V., 2018. Use of lactic acid bacteria and yeasts to reduce exposure to chemical food contaminants and toxicity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-12. DOI: 10.1080/10408398.2017.1421521

Cho, I., Yamanishi, S., Cox, L., Methé, B.A., Zavadil, J., Li, K., Gao, Z., Mahana, D., Raju, K., Teitler, I. and Li, H., 2012. Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity. *Nature*, 488(7413):621. DOI.org/10.1038/nature11400

Chu, Y., Li, Y., Wang, Y., Li, B. and Zhang, Y., 2018. Investigation of interaction modes involved in alkaline phosphatase and organophosphorus pesticides via molecular simulations. *Food Chemistry*, 254: 80–86. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.01.187

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), 2009. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically. 17th. ed. Approved Standard. Wayne, PA.

Coupe, R.H., Manning, M.A., Foreman, W.T., Goolsby, D.A. and Majewski, M.S., 2000. Occurrence of pesticides in rain and air in urban and agricultural areas of Mississippi, April–September 1995. *Science of the Total Environment*, 248(2): 227-240. DOI: 10.1016/s0048-9697(99)00545-8

Cycon, M. and Piotrowska-Seget, Z., 2016. Pyrethroid-Degrading Microorganisms and Their Potential for the Bioremediation of Contaminated Soils: A Review. *Frontiers in Microbiology*, 7: 1463. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01463

Daisley, B.A., Trinder, M., McDowell, T.W., Collins, S.L., Sumarah, M.W. and Reid, G., 2018. Microbiota-mediated modulation of organophosphate insecticide toxicity by species-dependent lactobacilli interactions in a *Drosophila melanogaster* insect model. *Applied and Environmental Microbiology*, 84: e02820-17. DOI: 10.1128/AEM.02820-17

Dean, J.R., 2009. Extraction techniques in Analytical Sciences. John Wiley and Sons ltd, 38-42

Dogi, C.A., Armando, R., Luduena, R., de Moreno de LeBlanc, A., Rosa, C.A., Dalcero, A. and Cavaglieri, L., 2011. *Saccharomyces cerevisiae* strains retain their viability and aflatoxin B1 binding ability under gastrointestinal conditions and improve ruminal fermentation. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 28: 1705–1711. DOI: 10.1128/AEM.02820-17

Dutta, H.M. and Arends, D.A., 2003. Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish. *Environmental Research*, 91(3): 157-162. DOI:10.1016/S0013-9351(02)00062-2

El-Bakouri, H., Morillo, J., Usero, J. and Ouassini, A., 2008. Potential use of organic waste substances as an ecological technique to reduce pesticide ground water contamination. *Journal of Hydrology*, 353(3-4): 335-342. DOI: 10.1016/j.jhydrol.2008.02.019

El-Hussein, A.A., Elsalahi, R.H., Osman, A.G., Sherif, A.M. and El-Siddig, M.A., 2014. Isolation and 16S rRNA-Based Identification of Benomyl-Degrading Bacteria. *British Biotechnology Journal*, 4: 670-683. DOI: 10.9734/BBJ/2014/10633

Fernandez-Casalderrey, A., Ferrando, M.D. and Andreu-Moliner, E., 1992. Acute toxicity of several pesticides to rotifer (*Brachionus calyciflorus*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 48: 14-17. DOI: 10.1007/BF00197477

Fernandez-Casaiderrey, A., Ferrando, M.D. and Andreu-Moliner, E., 1995. Chronic toxicity of methylparathion to *Daphnia magna*: Effects on survival, reproduction and growth. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 54: 43-49. DOI: 10.1007/BF00196268

Gao, B., Bian, X., Mahbub, R. and Lu, K., 2017. Sex-Specific Effects of Organophosphate Diazinon on the Gut Microbiome and Its Metabolic Functions. *Environmental Health Perspectives*, 125: 198–206. DOI: 10.1289/EHP202

Guzzella, L., Gronda, A. and Colombo, L., 1997. Acute toxicity of organophosphorus insecticides to marine invertebrates. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 59(2): 313-320. DOI: 10.1007/s001289900481

Hamm, J.T. and Hinton, D.E., 2000. The role of development and duration of exposure to the embryotoxicity of diazinon. *Aquatic Toxicology*, 48(4): 403-418. DOI: 10.1016/S0166-445X(99)00065-X

Harishankar, M.K., Sasikala, C. and Ramya, M., 2013. Efficiency of the intestinal bacteria in the degradation of the toxic pesticide, chlorpyrifos. *Biotechnology*, 3: 137–142. DOI:10.1007/s13205-012-0078-0

Hassanshahian, M., 2016. Isolation and Characterization of Diazinon Degrading Bacteria from Contaminated Agriculture Soils. *Iranian Journal of Toxicology*, 10(4): 13-20.

Islam, S.M., Math, R.K., Cho, K.M., Lim, W.J., Hong, S.Y., Kim, J.M., Yun, M.G., Cho, J.J. and Yun, H.D., 2010. Organophosphorus hydrolase (OpdB) of *Lactobacillus brevis* WCP902 from kimchi is able to degrade organophosphorus pesticides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 5380–5386. DOI: 10.1021/jf903878e

Jafari, M., Salehi, M., Ahmadi, S., Asgari, A., Abasnezhad, M. and Hajigholamali, M., 2012. The role of oxidative stress in diazinon-induced tissues toxicity in Wistar and Norway rats. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 22(8): 638-647. DOI: 10.3109/15376516.2012.716090

Jameson, R.R., Seidler, F.J. and Slotkin, T.A., 2006. Nonenzymatic functions of acetylcholinesterase splice variants in the developmental neurotoxicity of organophosphates: chlorpyrifos, chlorpyrifos oxon, and diazinon. *Environmental Health Perspectives*, 115(1): 65-70. DOI: 10.1289/ehp.9487

Koprucu, S.S., Koprucu, K., Ural, M.S.,

Ispir, U. and Pala, M., 2006. Acute toxicity of organophosphorous pesticide diazinon and its effects on behavior and some hematological parameters of fingerling European catfish (*Silurus glanis* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 86(2): 99-105. DOI: 10.1016/j.pestbp.2006.02.001

Larkin, D.J. and Tjeerdema, R.S., 2000. Fate and effects of diazinon. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 166: 49-82.

Li, C., Ma, Y., Mi, Z., Huo, R., Zhou, T., Hai, H., Kwok, L.Y., Chen, Y., Sun, Z. and Zhang, H., 2018. Screening for *Lactobacillus plantarum* Strains that Possess Organophosphorus Pesticide-Degrading Activity and Metabolomic Analysis of Phorate Degradation. *Frontiers in Microbiology*, 9: 2048. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02048

Planas, M., Vazquez, J.A., Marques, J., Peres-Lomba, R., Gonzalez, M.P. and Murado, M., 2004. Enhancement of rotifer (*Brachionus plicatilis*) growth by using terrestrial lactic acid bacteria. *Aquaculture*, 240: 313-329. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2004.07.016

Russell, R.J., Scott, C., Jackson, C.J., Pandey, G., Taylor, M.C., Choppin, C.W., Liu, J.W. and Oakeshott, J.G., 2011. The evolution of new enzyme function: lessons from xenobiotic metabolizing bacteria versus insecticide-resistant insects. *Evolutionary Applications*, 4: 225–248. DOI: 10.1111/j.1752-4571.2010.00175.x

Sánchez-Fortún, S., Sanz, F. and Barahona, M.V., 1996. Acute toxicity of several organophosphorous insecticides and protection by cholinergic antagonists and 2-PAM on *Artemia salina* larvae. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 31(3): 391-398. DOI: 10.1007/BF00212678

Sorgeloos, P., Dhert, P. and Candreva, P., 2001. Use of the brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. *Aquaculture*, 200(1): 147-159. DOI: 10.1016/S0044-8486(01)00698-6

Stephenson, G.L., Kaushik, N.K. and Solomon, K.R., 1991. Acute toxicity of pure pentachlorophenol and a technical formulation to three species of Daphnia. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 20: 73-80. DOI: 10.1007/BF01065331

Sucahyo, D., van Straalen, N.M., Krave, A. and van Gestel, C.A., 2008. Acute toxicity of pesticides to the tropical freshwater shrimp Caridina laevis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 69(3): 421-427. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2007.06.003

Taylor, G., Baird, D.J. and Soares, A.M., 1998. Surface binding of contaminants by algae: consequences for lethal toxicity and feeding to *D. magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17: 412– 419. DOI:10.1002/etc.5620170310

Thabit, T.M.A. and El-Naggar, M.A.H., 2013. Diazinon decomposition by soil bacteria and identification of degradation products by GC-MS. *Soil and Environment*,

32: 96-99.

Trinder, M., Bisanz, J.E., Burton, J.P. and Reid, G., 2015. Probiotic lactobacilli: a potential prophylactic treatment for reducing pesticide absorption in humans and wildlife. *Beneficial Microbes*, 6: 841–847. DOI: 10.3920/BM2015.0022

Trinder, M., McDowell, T.W., Daisley, B.A., Ali, S.N., Leong, H.S., Sumarah, M.W. and Reid, G., 2016. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* reduces organophosphate pesticide absorption and toxicity to Drosophila melanogaster. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(20): 6204-6213. DOI:10.1128/aem.01510-16

Upadhyay, L.S. and Dutt, A., 2017. Microbial detoxification of residual organophosphate pesticides in agricultural practices. In Microbial Biotechnology, Springer, Singapore, 225-242 DOI: 10.1007/978-981-10-6847-8_10

Varó, I., Serrano, R., Navarro, J.C., López, F.J. and Amat, F., 1998. Acute lethal toxicity of the organophosphorus pesticide chlorpyrifos to different species and strains of *Artemia*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 61(6): 778-785. DOI: 10.1007/s001289900828

Weston, D.P. and Amweg, E.L., 2007. Whole-sediment toxicity identification evaluation tools for pyrethroid insecticides: II. Esterase addition. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26: 2397–2404. DOI: 10.1897/07-018R.1

The effect of probiotic *Pediococcus acidilactici* on reduction of toxicity of diazinon to *Artemia franciscana* nauplii

Moradi, F.[1]; Ahmadifard, N.[1*]; Tukmechi, A.[2]

*n.ahmadifard@urmia.ac.ir

1-Department of fisheries, Faculty of Natural Resources, Urmia University, P.O. Box: 46414-356, Urmia, Iran.

2-Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, P.O. Box: 46414-356, Urmia, Iran, Email

Abstract

In recent years, the use of bacteria is growing to research into the reduction of chemical pollutants. However, no information has been reported on the protective effect of these bacteria on living organisms, including *Artemia*. Thus, the effect of probiotic *Pediococcus acidilactici* on reduction of diazinon pesticide toxicity in *Artemia franciscana* was investigated. In the first, the lethal dose of diazinon toxin was determined on *Artemia* nauplii. Then five treatments of different probiotic concentrations (3.75×10^6, 7.5×10^6, 11.25×10^6 and 15×10^6 $CFUmL^{-1}$) were used to evaluate the reducing effect of the diazinon in the culture media of *Artemia* nauplii. For to this, five concentrations of 20 to 60 mgL^{-1} were used to determine the 24h-LC_{50} toxicant concentration in *A. francicana*, which at the lowest concentration, the mortality rate was more than 50% over a 24-hour period. In the second experiment, the concentrations of 12 to 18 mgL^{-1} diazinon were used. Based on the results, the 24h-LC_{50} lethal concentration was calculated as 12 mgL^{-1}. The amount of diazinon in different concentrations of probiotic bacteria was calculated by gas chromatography. Toxin removal was observed at 82% at the lowest bacterial concentration (7.5×10^6 $CFUmL^{-1}$) and 95% at the highest density (22.5×10^6 $CFUmL^{-1}$). Simultaneous addition of bacteria and diazinon significantly reduced *Artemia* mortality compared to the control treatment ($p<0.05$). However, in different probiotic treatments, bacterial concentrations showed no significant difference in *Atremia* mortality ($p>0.05$). The results of this study indicated that the probiotic *P. acidilactici* has a significant effect on reducing the toxicity of diazinon as an organophosphorus toxin. The results also showed that the simultaneous presence of diazinon and bacteria on the rate of *Artemia* mortality indicates the elimination and inactivation of the toxin by the bacteria.

Keywords: *Artemia*, Bacteria, Probiotic, Diazinon, Organophosphorus pesticides

*Corresponding author