تأثیر آفت‌کش دیازینون بر رفتار و برخی شاخص‌های خونی بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

رضوان‌اله کاظمی[1*]، مسعود سعیدی‌فر[2]، حبیب وهاب‌زاده‌رودسری[2]، عباسعلی زمینی[2]

[1] انیستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری، رشت، ایران.

[2] گروه شیلات، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱/۲۳ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۴/۲

چکیده

این تحقیق به‌منظور ارزیابی اثر آفت‌کش دیازینون بر برخی شاخص‌های خونی بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در مرکز علوم شیلاتی و فنون دریایی دکتر کیوان (دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، بندر چمخاله) انجام شد. در مدت یک هفته ۱۲۰ قطعه بچه‌ماهی قزل‌آلا در ۳ گروه آزمایشی و ۱ گروه شاهد با ۳ تکرار که در هر تکرار ۱۰ عدد ماهی با میانگین وزنی ۵-۳ گرم وجود داشت براساس روش O.E.C.D در معرض غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد از LC_{50} دیازینون (که برابر ۱/۶۵ میلی‌گرم بر لیتر است) به‌صورت ساکن قرار گرفتند. در ماهیانی که در معرض قرار گرفتند، علایمی مانند فلج عصبی و از دست دادن تعادل، شنای نیم‌دایره‌ای، بی‌تابی شدید و رنگ‌پریدگی مشاهده شد. نتایج نشان داد که تعداد کل گلبول‌های سفید و قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین با افزایش غلظت سم کاهش یافت. میزان MCH با افزایش غلظت سم افزایش یافت که این افزایش بین گروه ۷۵ درصد با بقیه گروه‌ها معنی‌دار بود. میزان MCV با افزایش غلظت سم افزایش یافت که بین گروه‌های ۲۵ و ۵۰ درصد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. ضمن این‌که میزان نوتروفیل تا گروه ۵۰ درصد افزایش و سپس کاهش یافت. اما میزان لنفوسیت تا گروه ۵۰ درصد کاهش و در گروه ۷۵ درصد افزایش یافت. تغییرات به‌دست آمده در مقادیر اریتروسیت و لکوسیت پس از قرارگیری در معرض سم دیازینون ناشی از بروز اختلال در روند خون‌سازی و کاهش ایمنی غیراختصاصی ماهی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: قزل‌آلای رنگین‌کمان، دیازینون، شاخص‌های خونی، رفتار

مقدمه

تولید بچه‌ماهیان با کیفیت بالا به عوامل محیطی زیادی بستگی دارد که یکی از این عوامل که بر مراحل رشد ابتدایی ماهیان تأثیر منفی می‌گذارد سموم هستند. با نیازی که امروزه برای کاهش هزینه‌های تولید به تولید بچه‌ماهیان با کیفیت بالا در طول سال وجود دارد باید بررسی بیش‌تری نسبت به پرورش بچه‌ماهیان داشت. سموم و آفت‌کش‌ها امروزه از عمده‌ترین عوامل ایجاد مسمومیت در ماهیان هستند که از بین هزاران ماده شیمیایی رهاسازی شده آفت‌کش‌ها حتی در غلظت‌های بسیار کم موجب مرگ و میر زیادی می‌شوند (Sanchez-fortun و Barahona، ۲۰۰۵). استفاده از سموم آفت‌کش تا زمانی که شیوه‌های مبارزه بیولوژیک با آفات گیاهی مرسوم نشود امری اجتناب‌ناپذیر است بنابراین توصیه بر این است که حداقل از آفت‌کش‌هایی با درجه سمیت و نیمه‌عمر کم‌تر استفاده شود. اکوسیستم‌های آبی به‌عنوان بزرگ‌ترین بخش محیط طبیعی همواره با

* مسئول مکاتبه: rezkazemi2000@yahoo.com

تهدیدهایی مانند محدودیت ژنتیکی و تنوع زیستی مواجه می‌باشد. چنین محیط‌هایی گرچه به‌عنوان محیط هدف و اثر برای سموم آفت‌کش مدنظر نمی‌باشند (Mansinghو Wilson، ۱۹۹۵).

آفت‌کش‌ها از دو طریق وارد منابع آبی می‌شوند که یکی از طریق کاربرد مستقیم آفت‌کش‌ها در اکوسیستم‌های آبی و دیگری در اثر استفاده غیرمستقیم مانند ریزش اتمسفری و فرسایش به‌دست آمده از زمین‌های کشاورزی و همچنین نفوذ فاضلاب‌های صنعتی و کشاورزی است که به منابع آبی راه می‌یابند (Pirizitkoohi و Ordog، ۱۹۹۷).

دیازینون آفت‌کشی ارگانوفسفره است که به‌طور وسیعی در کشاورزی و منازل برای کنترل حشرات مورد استفاده قرار می‌گیرد. اسپری‌های کشاورزی شامل ۹۰-۸۵ درصد دیازینون هستند. بعد از استفاده این سم به راحتی به آب‌های سطحی و از آنجا به آب‌های عمقی شسته شده و سرانجام وارد محیط‌های آبی در بعد وسیع‌تر می‌شود (Saglam، ۲۰۰۳؛ Dutta و Meijer، ۲۰۰۳).

دلیل تخریب محیط‌های آبی توسط دیازینون این است که این سم روی تعداد زیادی از موجودات زنده غیرهدف مانند مهره‌داران، پستانداران، پرندگان و ماهی‌ها تأثیر می‌گذارد (Ham و Hinton، ۲۰۰۰؛ Burkepile و همکاران، ۲۰۰۰).

قرار گرفتن ماهیان در معرض غلظت‌های کمتر از LC_{50} دیازینون روی سیستم عصبی از طریق توقف فعالیت استیل‌کولین استراز تأثیر می‌گذارد (Dutta و Arends، ۲۰۰۳). در ضمن افزایش زمان قرارگیری در معرض سم مقاومت ماهی را کاهش داده و به سم فرصت بیشتری برای گذاشتن تأثیرات مخرب روی ماهی قرار می‌دهد (Oh و همکاران، ۱۹۹۱).

نفوذ دیازینون به مایع میان بافتی بدن روی ظرفیت تولیدمثل ماهی تأثیر خواهد گذاشت و موجب سوق یافتن آن‌ها به‌سمت کاهش و کوچک شدن جمعیت‌شان می‌شود (Maxwell و Dutta، ۲۰۰۵).

بررسی شاخص‌های خونی در بسیاری از زمینه‌های تحقیقاتی آبزی‌پروری و پرورش ماهی و در عرصه سم‌شناسی و پایش زیستی به‌عنوان شاخص مناسب برای نشان دادن تغییرات پاتولوژیکی و فیزیولوژیکی و بیماری‌ها به‌شمار می‌رود (Adedeji و همکاران، ۲۰۰۹).

خون به‌عنوان یک بافت دارای ویژگی‌هایی است که آن را از سایر بافت‌ها متمایز می‌کند. اولین ویژگی خون به‌عنوان یک بافت، سهولت به‌دست آوردن آن است. دومین ویژگی توانایی برداشت‌های متعدد از این بافت و سومین ویژگی بارز بودن خون است، به‌طوری‌که بسیاری از بیماری‌هایی که سایر بافت‌ها را تحت‌تأثیر قرار داده‌اند، آثار خود را در خون نشان می‌دهند (عامری‌مهابادی، ۱۳۷۸). خون حساس‌ترین بافت بدن نسبت به تغییرات ایجاد شده در موجودات زنده است و در تحقیقات ماهی‌شناسی کاربرد وسیعی دارد. عموماً اعتقاد بر این است که کیفیت‌ها و خصوصیات سلول‌های خونی به همان نسبت که از تغییرات فیزیولوژیک تأثیر می‌پذیرند، نسبت به تغییرات آسیب‌شناسی نیز حساس هستند (Stoskopf، ۱۹۹۳).

Svoboda و همکاران (۲۰۰۱) تأثیر سم دیازینون بر شاخص‌های خونی ماهی کپور معمولی را بررسی کردند. تغییرات برخی عوامل هماتولوژی و بیوشیمیایی سرم خون فیل‌ماهیان (*Huso huso*) پس از مجاورت طولانی‌مدت با سم دیازینون توسط خوش‌باوررستمی و همکاران (۱۳۸۵) بررسی شد. مشخصه‌های خونی ماهی کپور علف‌خوار (*Ctenopharygondon idella*) بعد از تماس با سم ارگانوفسفره نیز مورد بررسی قرار گرفته است (پورغلام و همکاران، ۱۳۸۰). همچنین سلطانی و خوش‌باوررستمی (۱۳۸۱) اثر دیازینون بر برخی

شاخص‌های خونی و بیوشیمیایی تاس‌ماهی روس (چالباش) (*Acipeneser guldenstadti*) را مورد آزمایش قرار داده‌اند.

با توجه به افزایش روزافزون پرورش ماهیان قزل‌آلا و ارزش اقتصادی و حساسیت بالای این ماهی به‌خصوص در مراحل ابتدایی زندگی، این پژوهش برای بررسی اثر سم دیازینون بر پارامترهای خونی در بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگی‌کمان انجام شد.

مواد و روش‌ها

به‌منظور اجرای این پژوهش، تعداد ۱۲۰ عدد بچه‌ماهی قزل‌آلا با میانگین وزنی ۲-۱ گرم از مرکز تکثیر ماهیان سرد آبی در تنکابن در بهمن‌ماه ۱۳۸۸ به مرکز علوم شیلاتی و فنون دریایی دکتر کیوان (دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان واقع در بندر چمخاله) منتقل گردید و به‌مدت یک ماه در ۴ وان به‌منظور سازگاری ماهیان برای انجام آزمایش‌ها، نگهداری و تغذیه شدند. برای انجام آزمایش که براساس معیارهای O.E.C.D (۲۰۰۱) صورت پذیرفت، از تعداد ۱۲ عدد آکواریوم شیشه‌ای استفاده شد که هر یک با ۲۰ لیتر از آب ورودی به سالن مرکز تحقیقات چمخاله آب‌گیری شدند. میانگین فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب محیط آزمایش در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- میانگین فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب محیط آزمایش

دما (درجه سانتی‌گراد)	اکسیژن محلول (میلی‌گرم در لیتر)	سختی کل (میلی‌گرم در لیتر)	pH	هدایت الکتریکی (میلی‌موس در لیتر)
۱۲- ۹	۹-۷	۲۱۰	۷/۵	۲/۱۵

آزمایش‌ها به‌صورت ساکن (Static) انجام پذیرفت، به‌طوری که محلول آزمایش در طول انجام آزمایش تغییر نکرده و کاملاً ثابت می‌ماند.

هدف از نگهداری ماهیان به‌مدت حداقل یک هفته قبل از شروع آزمایش در مخزن، سازگار نمودن آن‌ها با کیفیت آبی بود که برای آزمایش مورد استفاده قرار می‌گرفت و در صورتی‌که در این مدت مرگ و میر بچه‌ماهیان بیش‌تر از ۱۰ درصد جمعیت ماهیان باشد از آن‌ها استفاده نمی‌شود، اگر بین ۱۰-۵ درصد باشد به زمان سازگاری افزوده می‌شود و اگر کم‌تر از ۵ درصد باشد جمعیت ماهیان مناسب بوده و از آن‌ها استفاده می‌شود. در این آزمایش در طول دوره سازگاری تلفاتی مشاهده نشد. ۲۴ ساعت قبل از شروع آزمایش غذادهی به ماهیان قطع شده و قبل از شروع آزمایش به‌مدت ۲۴ ساعت آب آکواریوم‌ها با پمپ هوا هوادهی شدند. پس از این مرحله و زمانی‌که ماهیان به وزن ایده‌آل (۵-۳ گرم) رسیدند، به آکواریوم منتقل شدند. به‌طوری‌که در هر آکواریوم ۱۰ عدد ماهی قرار گرفت.

پس از سازگار شدن ماهیان اقدام به اضافه کردن سم شد. برای این منظور یک محلول استاندارد با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر تهیه گردید (برای تهیه این محلول ۱/۶۷ میلی‌لیتر از سم در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد). سپس با توجه به این‌که غلظتی از سم دیازینون که باعث مرگ نیمی از جمعیت بچه‌ماهیان و قزل‌آلا می‌شود برابر ۱/۶۵ میلی‌گرم بر لیتر می‌باشد (Aydin و Köprücü، ۲۰۰۵)، براساس فرمول $C_1V_1=C_2V_2$ میزان ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد از غلظت کشنده دیازینون که به‌ترتیب برابر با ۱۳/۷ و ۲۷/۵ و ۴۱/۲۵ بود، از محلول پایه به آکواریوم‌ها اضافه شد.

آزمایش‌ها در ۳ تیمار و هر تیمار در ۳ تکرار به همراه یک شاهد برای هر تیمار انجام پذیرفت.

برای مطالعات هماتولوژی از ماهی‌ها پس از ۱ هفته که در معرض سم قرار گرفته بودند، با قطع ساقه دمی از ناحیه دمی آن‌ها خون‌گیری به‌عمل آمد. خون استحصال شده داخل ویال آغشته به هپارین ریخته و به آزمایشگاه منتقل شد. در آزمایشگاه بلافاصله گسترش‌های خونی تهیه شد.

شمارش گلبول‌های قرمز: تعداد گلبول‌های قرمز در یک میلی‌مترمکعب حجم خون با استفاده از لام هموسیتومتر و از طریق رابطه ۱ محاسبه شد (Simons، ۱۹۹۷).

رابطه ۱: $RBC = N \times 10000$

N= مجموع گلبول‌های قرمز در ۵ مربع کوچک لام هموسیتومتر با درشت‌نمایی ۴۰.

شمارش گلبول‌های سفید: تعداد گلبول‌های سفید در یک میلی‌مترمکعب حجم خون با استفاده از لام هموسیتومتر و از طریق رابطه ۲ محاسبه گردید (Simons، ۱۹۹۷).

رابطه ۲: $WBC = N \times 500$

N= مجموع گلبول‌های سفید در ۴ مربع کوچک لام هموسیتومتر با درشت‌نمایی ۴۰.

شمارش افتراقی گلبول‌های سفید: برای تشخیص افتراقی گلبول‌های سفید، گسترش‌های خونی تهیه و شمارش آن‌ها به روش دولامی انجام گرفت. (Simons، ۱۹۹۷).

هماتوکریت HCT یا PCV: هماتوکریت با استفاده از لوله‌های میکروهماتوکریت اندازه‌گیری شد، به این ترتیب که لوله‌های میکروهماتوکریت در شیارهای مخصوص در سانتریفیوژ میکروهماتوکریت مدل Hettich ساخت آلمان قرار گرفتند. پس از قرار دادن سرپوش محفظه، برای تعیین هماتوکریت لوله‌های مویینه به‌مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. در پایان عمل سانتریفیوژ، میزان هماتوکریت بر حسب درصد با خط‌کش میکروهماتوکریت تعیین گردید.

هموگلوبین (Hb): اندازه‌گیری هموگلوبین به روش سیان مت هموگلوبین به‌شرح زیر انجام شد.

دستگاه اسپکتروفتومتر با محلول درآبکین شاهد صفر شده و سپس برای اندازه‌گیری جذب نوری محتویات لوله‌ها، دستگاه با طول موج ۵۴۶–۵۴۰ نانومتر تنظیم شد. مقدار قرائت شده از روی دستگاه برای محاسبه میزان هموگلوبین با منحنی استاندارد مقایسه شد و بر حسب گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر به‌دست آمد.

میانگین حجم گویچه‌ها (MCV[1]) از طریق رابطه ۳ به‌دست آمد (Stoskopf، ۱۹۹۳).

رابطه ۳: $MCV = \frac{Hct \times 10}{RBC}$

MCV= (فمتولیتر) (fL)، Hct= هماتوکریت (درصد)، RBC= تعداد کل گلبول‌های قرمز (μl / ۱۰^{۶} × عدد).

میانگین هموگلوبین گویچه‌ها (MCH[2]) نیز از طریق رابطه ۴ به‌دست آمد (Stoskopf، ۱۹۹۳).

رابطه ۴: $MCH = \frac{Hb \times 10}{RBC}$

MCH= (پیکوگرم) (Pgr)، Hb= هموگلوبین (گرم در دسی‌لیتر) (gr/dl).

میانگین غلظت هموگلوبین گویچه‌ها (MCHC) از طریق رابطه ۵ به‌دست آمد (Stoskopf، ۱۹۹۳).

رابطه ۵: $MCHC = \frac{Hb \times 100}{Hct}$

MCHC= (گرم در دسی‌لیتر) (gr/dl).

به‌منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها برای بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها در تیمارهای مختلف از تست کلموگراف– اسمیرنوف و بررسی معنی‌دار بودن

۱– حجم متوسط گلبولی
۲– هموگلوبین متوسط گلبولی

اختلاف آماری هر یک از فاکتورها براساس تیمارهای مختلف از آزمون واریانس یک‌طرفه ANOVA و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون فیشر استفاده شد. تجزیه و تحلیل اطلاعات با استفاده از نرم‌افزار SPSS 13 انجام شد.

نتایج

در طی انجام تمام آزمایش‌های تأثیر سم بر فاکتورهای خونی بچه‌ماهیان، هیچ‌گونه تلفاتی در ماهیان گروه شاهد مشاهده نشد و همچنین میزان اکسیژن در همه آزمایش‌ها از ۶۰ درصد اشباع تنزل پیدا نکرد.

شایع‌ترین علایم رفتاری در ماهیان پس از قرار گرفتن در معرض دیازینون سندروم فلج عصبی بود و با افزایش غلظت سم ماهیان دچار شنای نیم‌دایره و انحنای ستون فقرات شدند.

نتایج آزمایش‌های تأثیر سم دیازینون بر شاخص‌های خونی در بچه‌ماهیان به‌شرح زیر بود:

نتایج آزمایش‌های RBC در ماهیان شاهد و تیمارهای ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد از میزان LC_{50} نشان می‌دهد بیش‌ترین میانگین مربوط به تیمار شاهد می‌باشد. براساس آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه بین تیمارهای مورد بررسی از نظر RBC ماهیان، اختلاف معنی‌دار آماری وجود دارد و میزان RBC خون ماهیان مورد مطالعه پس از قرار گرفتن در مقابل سم دیازینون در سطح احتمال ($P<۰/۰۵$) کاسته شده و دیازینون روی این پارامتر خونی تأثیر کاهشی داشته است (جدول ۲).

نتایج آزمایش‌های WBC در ماهیان شاهد و تیمارهای ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد از میزان LC_{50} نشان می‌دهد بیش‌ترین میانگین مربوط به تیمار شاهد می‌باشد. براساس آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه بین تیمارهای مورد بررسی از نظر WBC ماهیان، اختلاف معنی‌دار آماری وجود دارد و میزان WBC خون ماهیان مورد مطالعه پس از قرار گرفتن در مقابل سم دیازینون در سطح احتمال ($P<۰/۰۵$) کاسته شده و دیازینون روی این پارامتر خونی تأثیر کاهشی داشته است (جدول ۳).

نتایج آزمایش‌های هماتوکریت در ماهیان شاهد و تیمارهای ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد از میزان LC_{50} نشان می‌دهد بیش‌ترین میانگین مربوط به تیمار شاهد می‌باشد. براساس آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه بین تیمارهای مورد بررسی از نظر شاخص هماتوکریت، اختلاف معنی‌دار آماری وجود دارد و میزان هماتوکریت خون ماهیان مورد مطالعه پس از قرار گرفتن در مقابل سم دیازینون در سطح احتمال ($P<۰/۰۵$) کاسته شده و دیازینون روی این پارامتر خونی تأثیر کاهشی داشته است (جدول ۴).

نتایج اندازه‌گیری هموگلوبین در ماهیان شاهد و تیمارهای ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد از میزان LC_{50} نشان می‌دهد بیش‌ترین میانگین مربوط به تیمار شاهد می‌باشد. براساس آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه بین تیمارهای مورد بررسی از نظر شاخص هموگلوبین، اختلاف معنی‌دار آماری وجود دارد و میزان هموگلوبین خون ماهیان مورد مطالعه پس از قرار گرفتن در مقابل سم دیازینون در سطح احتمال ($P<۰/۰۵$) کاسته شده و دیازینون روی این پارامتر خونی تأثیر کاهشی داشته است (جدول ۵).

نتایج اندازه‌گیری MCH در ماهیان شاهد و تیمارهای ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد از میزان LC_{50} نشان می‌دهد بیش‌ترین میانگین مربوط به تیمار ۷۵ درصد می‌باشد. براساس آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه بین تیمارهای مورد بررسی از نظر شاخص MCH، اختلاف معنی‌دار آماری بین تیمار ۷۵ درصد با بقیه تیمارها وجود دارد و ماهیان مورد مطالعه پس از قرار گرفتن در مقابل سم دیازینون در سطح احتمال

(P<۰/۰۵) قرار دارند و این پارامتر جز در تیمار ۷۵ درصد غلظت سم در بقیه تیمارها تأثیر چشم‌گیری نداشته است (جدول ۶).

نتایج اندازه‌گیری MCHC در ماهیان شاهد و تیمارهای ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد از میزان LC_{50} نیز نشان می‌دهد که براساس آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه بین تیمارهای شاهد و بقیه تیمارها از نظر MCHC، اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نشده است و ماهیان مورد مطالعه پس از قرار گرفتن در مقابل سم دیازینون در سطح احتمال (P>۰/۰۵) بوده و دیازینون روی این پارامتر خونی تأثیر چشم‌گیری نداشته است (جدول ۷).

نتایج اندازه‌گیری MCV در ماهیان شاهد و تیمارهای ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد از میزان LC_{50} نشان می‌دهد بیش‌ترین میانگین مربوط به ۷۵ درصد می‌باشد. نتایج نشان دادند که براساس آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه بین MCV در تیمارهای شاهد و ۷۵ درصد اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده می‌گردد و دیازینون روی این پارامتر خونی تأثیر افزایشی داشته است. اما بین MCV در غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ درصد اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نمی‌گردد (P>۰/۰۵) (جدول ۸).

نتایج شمارش نوتروفیل‌ها در ماهیان شاهد و تیمارهای ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد از میزان LC_{50} نشان می‌دهد بیش‌ترین میانگین مربوط به ۵۰ درصد می‌باشد. نتایج نشان دادند که براساس آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه بین تیمارهای مورد بررسی از نظر نوتروفیل ماهیان، اختلاف معنی‌دار آماری وجود دارد و دیازینون روی این پارامتر خونی تأثیر چشم‌گیری داشته است که در تیمارهای ۲۵ و ۵۰ درصد یک روند افزایشی در میزان نوتروفیل مشاهده شد ولی با افزایش سم دیازینون در تیمار ۷۵ درصد یک کاهش چشم‌گیر دیده می‌شود (جدول ۹).

در نهایت اندازه‌گیری لنفوسیت در ماهیان شاهد و تیمارهای ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد از میزان LC_{50} نشان داد که بیش‌ترین میانگین مربوط به تیمار شاهد می‌باشد. با توجه به آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه، بین لنفوسیت و تیمارهای مورد بررسی اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده می‌گردد که در تیمارهای ۲۵ و ۵۰ درصد یک روند کاهشی در میزان لنفوسیت رخ می‌دهد. ولی با افزایش سم دیازینون در تیمار ۷۵ درصد یک افزایش چشم‌گیر دیده شد و دیازینون روی این پارامتر خونی تأثیر چشم‌گیری داشته است (جدول ۱۰).

جدول ۲- مقایسه میانگین تعداد گلبول‌های قرمز بچه‌ماهیان قزل‌آلای قرار گرفته در معرض سم دیازینون بر حسب میلی‌مترمکعب (R^2=۰/۸۱۳)

پارامترها / تیمارها	± SD میانگین تعداد گلبول‌های قرمز	حداکثر تعداد گلبول‌های قرمز	حداقل تعداد گلبول‌های قرمز
شاهد	۱۱۵۰۰۰۰±۱۶۵۰۰۰^a	۱۴۵۰۰۰۰	۹۶۳۰۰۰
۲۵ درصد	۸۹۷۰۰±۳۹۰۰۰۰^b	۹۵۰۰۰۰	۸۳۵۰۰۰
۵۰ درصد	۶۴۰۰۰۰±۴۲۰۰۰^c	۸۷۲۰۰۰	۶۲۵۰۰۰
۷۵ درصد	۶۴۰۰۰۰±۴۲۰۰۰^d	۷۴۰۰۰۰	۶۰۰۰۰۰

حروف کوچک انگلیسی نمایانگر وجود یا نبود اختلاف معنی‌دار آماری می‌باشد.

جدول ۳- مقایسه میانگین تعداد گلبول‌های سفید بچه‌ماهیان قزل‌آلای قرار گرفته در معرض سم دیازینون بر حسب میلی‌مترمکعب (R^2=۰/۸۷۹)

پارامترها / تیمارها	± SD میانگین تعداد گلبول‌های قرمز	حداکثر تعداد گلبول‌های قرمز	حداقل تعداد گلبول‌های قرمز
شاهد	۱۲۷۲۰±۱۰۶۰^a	۱۴۵۰۰	۱۰۸۰۰
۲۵ درصد	۹۸۴۰±۸۶۰^b	۱۱۲۰۰	۸۳۰۰
۵۰ درصد	۷۳۶۰۰±۱۲۰۰^c	۹۳۰۰	۵۳۰۰
۷۵ درصد	۶۱۰۰±۶۶۰^d	۷۰۰۰	۴۹۰۰

حروف کوچک انگلیسی نمایانگر وجود یا نبود اختلاف معنی‌دار آماری می‌باشد.

جدول ۴- مقایسه میانگین درصد هماتوکریت بچه‌ماهیان قزل‌آلای قرار گرفته در معرض سم دیازینون بر حسب درصد (R^2=۰/۸۱۲)

پارامترها / تیمارها	± SD میانگین درصد هماتوکریت	حداکثر درصد هماتوکریت	حداقل درصد هماتوکریت
شاهد	۴۰/۷±۳/۹^a	۴۸	۳۶
۲۵ درصد	۳۴/۱±۱/۳^b	۳۶	۳۱
۵۰ درصد	۲۹/۸±۲^c	۳۴	۲۷
۷۵ درصد	۲۶/۴±۲/۱^d	۳۰	۲۴

حروف کوچک انگلیسی نمایانگر وجود یا نبود اختلاف معنی‌دار آماری می‌باشد.

جدول ۵- مقایسه میانگین درصد هموگلوبین بچه‌ماهیان قزل‌آلای قرار گرفته در معرض سم دیازینون بر حسب درصد (R^2=۰/۸۵۴)

پارامترها / تیمارها	± SD میانگین درصد هموگلوبین	حداکثر درصد هموگلوبین	حداقل درصد هموگلوبین
شاهد	۷/۲±۰/۵۸^a	۸/۴	۶/۴
۲۵ درصد	۵/۸±۰/۲۹^b	۶/۲	۵
۵۰ درصد	۵/۱±۰/۳۷^c	۵/۵	۴/۳
۷۵ درصد	۴/۷±۰/۳۴^d	۵/۷	۴/۴

حروف کوچک انگلیسی نمایانگر وجود یا نبود اختلاف معنی‌دار آماری می‌باشد.

جدول ۶- مقایسه میانگین MCH بچه‌ماهیان قزل‌آلای قرار گرفته در معرض سم دیازینون بر حسب پیکوگرم (R^2=۰/۴۹۸)

پارامترها / تیمارها	± SD میانگین MCH	حداکثر MCH	حداقل MCH
شاهد	۶۳/۶±۵/۱^b	۶۸/۵	۵۵/۵
۲۵ درصد	۶۴/۵±۲/۷^b	۶۹/۴	۵۹/۸
۵۰ درصد	۶۶/۷±۴^b	۷۲	۵۹/۶
۷۵ درصد	۷۳±۳^a	۷۶/۶	۶۸/۱

حروف کوچک انگلیسی نمایانگر وجود یا نبود اختلاف معنی‌دار آماری می‌باشد.

جدول ۷- مقایسه میانگین MCHC بچه‌ماهیان قزل‌آلای قرار گرفته در معرض سم دیازینون بر حسب گرم بر دسی‌لیتر (R^2=۰/۲۱۸)

پارامترها / تیمارها	± SD میانگین MCHC	حداکثر MCHC	حداقل MCHC
شاهد	۶۳/۶±۵/۱[a]	۱۸/۸	۱۷
۲۵ درصد	۶۴/۵±۲/۷[a]	۱۸/۷	۱۵/۱
۵۰ درصد	۶۶/۷±۴[a]	۱۷/۶	۱۵/۸
۷۵ درصد	۷۳±۳[a]	۱۹/۵	۱۵/۵

حروف کوچک انگلیسی نمایانگر وجود یا نبود اختلاف معنی‌دار آماری می‌باشد.

جدول ۸- مقایسه میانگین MCV بچه‌ماهیان قزل‌آلای قرار گرفته در معرض سم دیازینون بر حسب فمتولیتر (R^2=۰/۳۹۲)

پارامترها / تیمارها	± SD میانگین MCV	حداکثر MCV	حداقل MCV
شاهد	۳۵۶/۹±۳۱[b]	۳۹۴/۷	۳۱۴/۹
۲۵ درصد	۳۸۰/۸±۱۹[ab]	۴۰۲/۳	۳۵۱
۵۰ درصد	۳۹۱±۲۴/۳[ab]	۴۳۲	۳۵۵/۵
۷۵ درصد	۴۱۱/۵±۲۴/۶[a]	۴۵۳/۸	۳۸۳/۳

حروف کوچک انگلیسی نمایانگر وجود یا نبود اختلاف معنی‌دار آماری می‌باشد.

جدول ۹- مقایسه میانگین نوتروفیل بچه‌ماهیان قزل‌آلای قرار گرفته در معرض سم دیازینون برحسب درصد (R^2=۰/۷۲)

پارامترها / تیمارها	± SD میانگین نوتروفیل	حداکثر نوتروفیل	حداقل نوتروفیل
شاهد	۱۶/۱±۴/۸[c]	۲۶	۱۰
۲۵ درصد	۳۲/۸±۴[b]	۴۰	۲۷
۵۰ درصد	۴۱/۴±۷/۹[a]	۵۵	۲۷
۷۵ درصد	۲۶/۵±۴/۳[d]	۳۵	۲۰

حروف کوچک انگلیسی نمایانگر وجود یا نبود اختلاف معنی‌دار آماری می‌باشد.

جدول ۱۰- مقایسه میانگین لنفوسیت بچه‌ماهیان قزل‌آلای قرار گرفته در معرض سم دیازینون برحسب درصد (R^2=۰/۷۴)

دامنه میانگین / تیمارها	± SD میانگین لنفوسیت	حداکثر لنفوسیت	حداقل لنفوسیت
شاهد	۸۲/۸±۴/۵[a]	۸۸	۷۳
۲۵ درصد	۶۴/۸±۴/۳[b]	۷۳	۵۸
۵۰ درصد	۵۸±۷/۷[c]	۷۲	۴۵
۷۵ درصد	۷۲/۳±۳/۷[d]	۷۷	۶۵

حروف کوچک انگلیسی نمایانگر وجود یا نبود اختلاف معنی‌دار آماری می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

مسمومیت‌زایی سم دیازینون در بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان همراه با تأثیر آن بر رفتار بالینی و نیز برخی فاکتورهای خونی مورد مطالعه قرار گرفت. طی یک هفته آزمایش مسمومیت‌زایی با دیازینون هیچ‌گونه تلفاتی در این پژوهش در ماهیان گروه شاهد مشاهده نشد. همچنین میزان اکسیژن در هر دو گروه شاهد و آزمون تنزل پیدا نکرد. شایع‌ترین علایم رفتاری غیرطبیعی در ماهیان سندروم فلج عصبی بود و ماهیان بلافاصله پس از قرار گرفتن در سم دچار بی‌تابی شدید شدند و با افزایش غلظت سم ماهیان دچار شنای نیم‌دایره و انحنای ستون فقرات شدند که این موارد در گزارش‌های دیگر محققان (سلطانی و خوشباوررستمی، ۱۳۸۱؛ Svoboda و همکاران، ۲۰۰۱) نیز ذکر شده است.

بر طبق نتایج Svoboda و همکاران (۲۰۰۳) اختلال در تنفس، کاهش حرکات بدن، حرکت و سکونت ماهیان در کف، حرکات تشنجی ناگهانی به‌صورت پرش از سطح آب و حرکت در مسیر دایره‌ای و سپس رسیدن دوباره به حالت سکون از عوارض مسمومیت حاد بچه‌ماهیان کپور با سم دلتامترین می‌باشد.

پژوهش‌های انجام شده توسط Alison و Hermantaz (۱۹۸۷) نشان داد بدترین شکل نابهنجاری در اثر سم دیازینون تغییر شکل ستون فقرات به شکل لردوسیس (انحناء عمودی ستون فقرات) اسکولیو سیز (انحناء افقی ستون فقرات) است.

تغییرات عمده هماتولوژیکی ماهیان قزل‌آلا در مقابل سمیت دیازینون به‌صورت کاهش معنی‌دار ($P<0/05$) تعداد گلبول‌های قرمز، سفید، هموگلوبین و هماتوکریت نسبت به گروه شاهد بود. ضمن این‌که میزان MCH و MCV افزایش داشتند. شایان ذکر این‌که مکانیسم یا مکانیسم‌های دقیق کاهش فاکتورهای خونی ذکر شده در بالا نامشخص است. احتمالاً این نوع تغییرات ناشی از تأثیر مستقیم سم بر بافت‌های خون‌ساز کلیه و طحال می‌باشد. علت احتمالی نوتروفیلی، می‌تواند ناشی از عمل بیگانه‌خواری سلول‌های دفاعی میزبان باشد در حالی‌که لنفوسیت‌های ماهی به‌طور عمده در سیستم ایمنی مایعی مؤثر می‌باشد (سلطانی و خوش‌باوررستمی، ۱۳۸۱؛ Luskova و همکاران، ۲۰۰۳). بنابراین با توجه به نتایج این مطالعه و سایر مطالعات قبلی مورد اشاره می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که دیازینون به‌طور عمده موجب تضعیف سیستم ایمنی غیراختصاصی قزل‌آلا می‌شود. در شمارش تفریقی لکوسیت ماهیان قزل‌آلا در معرض سمیت دیازینون کاهش معنی‌داری در تعداد لنفوسیت‌ها تا غلظت ۵۰ درصد و افزایش معنی‌داری در تعداد نوتروفیل‌ها تا غلظت ۵۰ درصد مشاهده شد که این امر می‌تواند به‌دلیل تخریب بافت‌های خون‌ساز و از دست رفتن توان دفاعی آن‌ها به‌دلیل افزایش غلظت به ۷۵ درصد و افزایش مدت زمان قرار گرفتن در معرض سم باشد. چنان‌که (Oh و همکاران، ۱۹۹۱) بیان کردند که یکی از عوامل تأثیرگذار در مسمومیت آبزیان، زمان است. هنگامی‌که ماهی در معرض غلظت ثابتی از سم باشد، به مرور زمان هم مقاومت ماهی تحلیل می‌رود و هم سم فرصت بیشتری برای تأثیرگذاری روی ماهی پیدا می‌کند. ضمن این‌که در مواردی تجمع سم در بافت‌های ماهی نیز باعث افزایش تأثیر سوء آن بر بدن ماهی می‌شود.

بنا به نظر Krylov (۱۹۹۸) فرآیندهای آسیب‌شناسی خون ماهیان در اثر مسمومیت را می‌توان این‌طور تقسیم‌بندی کرد که افزایش غلظت هموگلوبین در خون ماهیان به‌عنوان اولین پاسخ این موجودات به مسمومیت با مواد سمی است و متعاقب این افزایش، کاهش تدریجی هموگلوبین تا رسیدن به غلظت کمتر از نرمال

رخ می‌دهد.

Hafeez و Khattak (۱۹۹۶) در تأثیر مالاتیون بر گونه "*Cyprinion wabosoni*" به این نتایج دست یافتند که سموم ارگانوفسفره موجب تغییراتی در بدن ماهی می‌شوند که باعث کاهش فعالیت بافت خون‌ساز اولیه و در نتیجه آن موجب کم‌خونی در ماهی می‌شود.

Svoboda و همکاران (۲۰۰۱) کاهش معنی‌دار تعداد گلبول‌های سفید و لنفوپنی (کاهش درصد و تعداد کل لنفوسیت‌ها) و گرانوله شدن گلبول‌های سفید و افزایش نوتروفیل را از عوارض قرار گرفتن بچه‌ماهیان کپور در معرض سم دیازینون دانستند.

Svoboda و همکاران (۲۰۰۳) تأثیر سم دلتامترون را روی شاخص‌های خونی ماهی کپور بررسی کردند. در این پژوهش سم دلتامترون با عنوان (بسیار سمی) برای ماهیان طبقه‌بندی شد و علت تغییرات در گلبول‌های قرمز و پروتئین کل پلاسمای خون ماهیانی که در معرض غلظت غیرکشنده این سم قرار گرفتند را آسیب دیدن بافت خون‌ساز کلیه و بافت سنتزکننده پروتئین دانست.

خوش‌باوررستمی و همکاران (۱۳۸۴) اثر سم دیازینون روی شاخص‌های خونی ماهی خاویاری اوزون‌برون را بررسی کردند که براساس نتایج مقادیر شاخص‌های خونی MCHC، MCH، MCV، Hb، PCV و RBC در گروه شاهد و آزمایش تفاوت معنی‌داری داشتند. نتایج به‌دست آمده از شمارش تفریقی لکوسیت و لنفوسیت و نوتروفیل گروه آزمایشی و شاهد نشانگر اختلاف معنی‌دار در آن‌ها بود.

Köprücü و همکاران (۲۰۰۶) مطالعه‌ای روی اثرات سم دیازینون روی رفتار و بعضی از شاخص‌های خونی گربه‌ماهی اروپایی (*Silurus glanis*) انجام دادند. نتایج آزمایش آن‌ها نشان داد در مقایسه با گروه شاهد ماهی بعد از تأثیر حاد دیازینون به‌طور معنی‌داری کاهش در اریتروسیت، لوکوسیت، هموگلوبین، هماتوکریت، MCV، MCH و MCHC را نشان داد. در مجموع این مطالعه نشان داد یک ارتباط منفی بین پارامترهای خونی و زمان در معرض قرارگیری با دیازینون وجود دارد. نتایج این پژوهش‌ها به‌جز میزان MCV و MCH مشابه نتایج این پژوهش می‌باشد. کاهش در میزان لکوسیت دلیلی بر کاهش ایمنی غیراختصاصی در ماهیانی است که در معرض سمیت حاد قرار می‌گیرند.

در مجموع می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که کاهش ایمنی غیراختصاصی می‌تواند ناشی از کاهش تعداد لکوسیت، لنفوسیت و افزایش نوتروفیل ماهیانی باشد که در معرض سمیت حاد آفت‌کش‌ها قرار گرفته‌اند. این گونه ماهیان به آسانی به عوامل ثانویه پاتوژن مستعد و بیمار می‌شوند. این موضوع به‌ویژه در مورد ماهیان قزل‌آلا از اهمیت خاصی برخوردار است زیرا در صورت آلودگی مکان‌های پرورش بچه‌ماهیان و ایجاد مسمومیت‌های مزمن یا تحت حاد زمینه تلفات بالای ناشی از تهاجم عوامل ثانویه فراهم می‌شود.

منابع

Allison, D., Hermanutz, R. 2004. Toxicity of diazinon to brook trout and fathead minnows. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C., EPA/600/3-77/060 (NTIS PB269293).

Aydin, R., Köprücü, K. 2005. Acute toxicity of diazinon on the commoncarp (*Cyprinus carpio* L.) embryos and larvae, Pest. Journal of Physiology and Biochemistry 82 (3), 220-225.

Burkepile, D.E., Moore, M.T., Holland, M.M., 2000. The susceptibility of five nontarget organisms to aqueous diazinon exposure. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 64, 114-121.

Dutta, H.M., Arends, D. 2003. Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish. Environmental Research 91, 157-162.

Dutta, H.M., Meijer, H.J.M. 2003. Sublethal effects of diazinon on the structure of the testis of bluegill, *Lepomis macrochirus*: a microscopic analysis. Environmental Pollution 125, 355-360.

Hamm, J.T., Hinton, D.E. 2000. The role of development and duration of exposure to the embryotoxicity of diazinon. Aquatic Toxicology 48, 403-418.

Khattak, I.U.D., Hafeez, M.A. 1996. Effect of malathionon blood parameters of fish, *Cyprinion watsoni pak.* Journal of. Zoology 28, 45-49.

Khoshbavarrostami, H.A., Soltani, M., Haj-Mohi-Eldit, D.H. 2016. Investigating the changes of some hematological and biochemical factors in the blood serum of elephant fish (Huso huso) after long-term exposure to diazinon poison. Iranian Journal of Fisheries Sciences (English), 5, 53-66.

Khoshbavarrostami, H.A., Soltani, M., Yalqi, S. 2014. The effect of diazinon poison on the blood parameters of ozonated sturgeon and determination of LC50. Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources, 12(5), 23-28.

Köprücü, S.O., Köprücü, K., Mevlüt, S., Ural, E., Ispir, Ü., Pala, M. 2006. Acute toxicity of organophosphorous pesticide diazinon and its eVects on behavior and some hematological parameters of Wngerling European catWsh (*Silurus glanis* L.). Pesticide Biochemistry and Physiology 86, 99-105.

Krylov, O.N. 1998. Manual for the prevention and diagnostics of the poisoning of the fishes by harmful substance. Moscow: Tsniiterkh, 12, 51-53.

Luskova, V., Svoboda, M., Kolarova, J. 2003. The effect of Diazinon on blood plasma biochemistry in Carp (*Cyprinus carpio* L.). Acta Veterinaria Brno 71, 117-123.

Mansingh, A., Wilson, A. 1995. Baseline studies on the status of insectidical pollution of Kingston Harbour Insecticide contamination of Jamaican environment. 3. Mar. pollut. Bull. 30, 640-643.

Maxwell, L.B., Dutta, H.M. 2005. Diazinon-induced endocrine disruption in Bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 60, 21-27.

OECD (orgaziation Economic coopration Developmet), 2001. Guideline for testing of chemicals. No. 210. section 2. Effect on biotic system direction, pp. 1-39.

Oh, H.S., Lee, S.K., Kim, Y.H., Roh, J.K. 1991. Mechanism of selective toxicity of diazinon to killifish (*Oryzias latipes*) and loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). Aquatic Toxicology and Risk Assessment 14, 343-353.

Piri Zirkoohi, M., and Vince O. 1997. Effect of some pesticides commonly used in Iranian Agriculture on Aquatic food chain. Thesis submitted to the Hungarian Academy of Sciences for Ph.D. degree, 131p.

Pourgholam, R., Esmaili, F., Farhoumand, H., Soltani, M., Yousefi, P., Mehrdad, H. 2017. Investigating the blood characteristics of herbivorous carp after contact with diazinon organophosphate poison. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 3 (2), 1-18.

Saglam, N., 2003. Aquaculture Legislation (in Turkish). Nobel Publication, Ankara, 281p.

Sanchez-Fortun, S., Barahona, M.V. 2005. Comparative study on the environmental risk induced by several pyrethroids in estuarine and freshwater invertebrate organisms. Chemosphere 59, 553-559.

Simons, A. 1997. Hematology, Butterworth-Heinemann, pp. 259-269.

Soltani, M., Khushbavarrostami, H.A. 2012. Study of the effect of diazinon on some hematological and biochemical indicators of Russian (Chalbash) fish (Acipeneser guldenstadti). Iranian Journal of Marine Sciences and Techniques, 1, 65-75.Adedeji, O.B., Adeyemo, O.K., Agbede, S.A., 2009. Effects of diazinon on blood parameters in the African catfish (*Clarias gariepinus*). *African Journal of Biotechnology* 8 (16), 3940-3946.

Stoskopf, M.K. 1993. Clinial pathology. Saunders Company. Fish Medicine, pp. 113-131.

Svoboda, M., Luskova, V., Drastichova, J., Ilabek, V. 2001. The effect of Diazinon on haematological indices of Common carp (*Cyprinus carpio* L.). Acta Veterinaria Brno 70, 457-465.

Svobodova, Z., Luscova, V., Drastichova, J., Svoboda, M., Zlabek, V. 2003. The effect of deltamethrin on hematological indices of common carp (*Cyprinus carpio*). Acta Veterinaria Brno 72, 79-85.

Journal of New Technologies in Aquaculture Development, Azadshahr Branch, Islamic Azad University
Vol. 16, No. 3, Autumn 2022

The effects of organophosphorous pesticide diazinon on behavior and some hematological parameters of fry rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

***M. Saeidifar[1], H. Vahabzadeh Roudsari[2], A.A. Zamini[2], R. Kazemi[3]**

[1]M.Sc Graduated in Fisheries, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran,

[2]Dr. Keyvan's Research Center for Fisheries Sciences and Marine Technologies, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Chamkhale, Iran,

[3]Dr. Dadman International Sturgeon Research Institute, Rasht, Iran.

Abstract

This study was conducted to evaluate diazinon pesticide impact on some hematological indices in rainbow trout fry in Dr. Keyvan's Research Center for Fisheries Sciences & Marine Technology (Islamic Azad University, Lahijan branch, Chamkhale port). During one week 120 pieces rainbow trout fry were exposed to three different consentration of Diazinon including 25, 50 and 75 percent of its LC_{50} (LC_{50}=1.65 mg/lit) in 3 experimental groups and one blank group (by three times replicates) by O.E.C.D method. Exposed fry fishes showed some signs including neural paralysis, imbalance, abnormal swimming, severe impatience and paleness. The result showed that the number of leukocytes, erythrocytes, haematocrit and hemoglobin significantly decreased ($P<0.05$), but the amount of MCV and MCH increased significantly by 50% and decreased again, lymphocyte increased significantly by 50% and then increased by 75%. Resulted changes in erythrocyte & leukocytes after exposing with diazinon is due to malfunction in hemopoiesis and decrease in non-specific immune system.

Keywords: Rainbow trout, Diazinon, Haematological profile, Behavior

*- Corresponding Authors; rezkazemi2000@yahoo.com