فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۴۰، جلد ۱۱، شماره ۱، زمستان ۹۶، صفحه ۴۳ تا ۵۲

بررسی تاثیر سم گلایفوزیت بر مرگ و میر و برخی شاخص های خونی بچه ماهیان کپور نقره ای(*Hypophthalmichthys molitrix*)

حمید جافر نوده[۱]، **مهشید شاملوفر**[۱]، رضا اکرمی[۱]
۱- گروه شیلات، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران. **shamloofar@yahoo.com**
تاریخ دریافت: ۹۶/۶/۶ تاریخ پذیرش:۹۶/۸/۲۰

چکیده

زمینه و هدف: هدف از این تحقیق، تعیین میزان غلظت کشندگی (LC_{50}) سم گلایفوزیت و بررسی تاثیرات آن بر برخی فاکتورهای خونی بچه ماهیان کپور نقره ای بود.

روش کار: در این پژوهش آزمایش‌های تعیین غلظت کشندگی سم گلایفوزیت در ٦ تیمار و ۳ تکرار با ۱۰ عدد ماهی(میانگین وزنی ۱/۵ ± ۱۰ گرم) در هر تکرار و در ۱۸ آکواریوم ۱۰۰ لیتری بر اساس دستورالعمل O.E.C.D، به صورت استاتیک(ساکن)، در شرایط کیفی ثابت آب و دمای ۱/۷۸ ±۲۲/۱٦ درجه سانتی گراد انجام و فاکتورهای خونی بچه ماهیان کپور نقره ای در غلظت های کمتر از LC_{50} ۹٦ ساعته(۰، ۰/۳٤۱ و ۰/٦۸۲ میلی گرم در لیتر) مورد سنجش قرار گرفت.

یافته ها: براساس نتایج بدست آمده، مقادیر LC_{50} سم گلایفوزیت طی زمان‌های ۲٤، ٤۸، ۷۲ و ۹٦ ساعت پس از در معرض قرار گیری بچه ماهیان به ترتیب ٤/۸٤، ٤/۲۸، ۳/۸۹ و ۳/٤۱ میلی گرم بر لیتر بود. هم چنین حداکثر غلظت مجاز سم گلایفوزیت در محیط-های طبیعی برای گونه کپور نقره ای ۰/۳٤۱ میلی گرم در لیتر محاسبه شد. نتایج بررسی فاکتورهای خونی مشخص نمود که تعداد کل گلبول های سفید و قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت، MCV، MCH و درصد گلبول های سفید لنفوسیت و ائوزینوفیل بچه ماهیان کپور نقره ای در معرض سم گلایفوزیت کاهش معنی داری در مقایسه با تیمار شاهد داشته است(P<۰/۰۵).

نتیجه گیری: بر اساس طبقه بندی جدول سطوح سمیت حشره کش ها، سم گلایفوزیت برای گونه کپور نقره ای، جزو سموم سمی طبقه بندی می شود. فاکتورهای خونی و تغییرات رفتاری می توانند به عنوان آزمایش تشخیص سلامت محیط و شاخص استرس سموم در اکوسیستم های آبی استفاده شوند.

واژه های کلیدی: کپور نقره ای، گلایفوزیت، سمیت حاد ، فاکتورهای خونی.

مقدمه

در طی پنجاه سال گذشته، علف کش‌ها جزء ضروری دنیای کشاورزی بوده‌اند. استفاده از علف کش-ها تا زمانی که شیوه های مبارزه بیولوژیک با آفات گیاهی مرسوم نشود امری اجتناب ناپذیر است، بنابراین توصیه بر این است که حداقل از علف کش‌ها با درجه سمیت و نیمه عمر کم تر استفاده شود(۳۷). سموم و علف کش ها در حال حاضر از عمده ترین موارد مسمومیت ماهی هستند که ممکن است در غلظت کم، تاثیر مستقیمی روی ماهی نداشته باشند ولی در طولانی مدت روی مراحل اولیه تکامل ماهی مؤثر می باشند. به هر حال علف کش ها در بیشتر موارد منجر به آسیب ماهیان می شوند(۷). از این رو تحقیقات اکولوژیکی و بیولوژیکی برای تعیین اثرات مواد غیرطبیعی بر حیات محیط زیست درسال های اخیر افزایش یافته است(۳۴). داده های مربوط به سمیت ناشی از استعمال علف کش ها و تأثیر آن بر روی موجودات غیر هدف مثل ماهی به عنوان مبنا و پایه ای برای سنجش و تعیین خطرات علفکش ها بر روی سیستم های آبی می باشد(۲۱). اکوسیستم های آبی به عنوان بزرگ ترین بخش محیط طبیعی همواره با تهدیدهایی نظیر محدودیت ژنتیکی و

تنوع زیستی مواجه هستند(۳۱). چنین محیط هایی گرچه به عنوان محیط هدف و اثر برای سموم علف کش‌ها مد نظر نیستند، اما نتایج تعدادی از مطالعات پایشی حضور برخی علف کش‌ها را در آب های سطحی نمایان ساخته است(۳۴). گلایفوزیت از بین علفکش‌ها یکی از پر مصرف ترین علف کش ها است. گلایفوزیت علف کشی سیستمیک و غیر انتخابی از گروه اسید فسفوتیک با نام تجاری رانداپ است و باعث اختلال در سنتز اسید آمینه می‌گردد(۱۷). علف کش گلایفوزیت از پرمصرف ترین علف کش های رایج در دنیا طی سال های اخیر بوده و می تواند آفات گیاهان یک ساله و چند ساله مختلف را کنترل کند. این سم برای کنترل علف های هرز و غیرکاربردی در مزارع کشاورزی، فضاهای سبز و حاشیه های استخرها و اکوسیستم های آبی استفاده شده و حلالیت آن در آب بسیار بالا است(do Carmo . Langiano). ساده ترین تاثیر علف کش ها بر آبزیان ایجاد استرس است. استرس مجموعه واکنش‌های فیزیولوژیکی است و زمانی رخ می‌دهد که موجود سعی دارد تا هموستازی بدن خویش را حفظ کند. در آزمایشات سمیت سموم در آبزیان، LC50 یک مفهوم آماری است که بیان گر غلظتی از آلاینده است که موجب مرگ و میر ۵۰ درصد از جمعیت یک گونه می-گردد. هم چنین بررسی کمی فاکتورهای خونی در مراحل اولیه رشد و نمو ماهیان به عنوان یک شاخص مهم وضعیت فیزیولوژیک محسوب می گردد که در تکثیر و پرورش ماهیان حائز اهمیت می باشد(۱۵). ماهی کپور نقره ای با نام علمی *Hypophthalmichthys molitrix* یکی از گونه‌های پرورشی و اقتصادی کپور ماهیان می-باشد. میزان تولید ماهیان گرمابی در کشور در سال ۱۳۹۳ معادل ۱۷۰۱۴۱ تن بوده که از این میزان سهم تولید ماهی فیتوفاگ معادل ۹۴ هزار و ۸۰۰ تن می باشد. در استان گلستان در سال ۱۳۹۳، ۱۸ هزار و ۴۰۰ تن ماهی گرمابی در سطح ۷۶۰۰ هکتار از مزارع پرورش ماهی تولید شده است که از این میزان سهم تولید ماهی فیتوفاگ در استان گلستان معادل ۱۱ هزار و ۴۰ تن می باشد(۳). سم علف کش گلافوزیت در مزارع پنبه، نیشکر، ذرت و غیره در استان های شمالی مانند گیلان، مازندران، گلستان و در استان های جنوبی به ویژه خوزستان استفاده می شود. با توجه به این که این استان ها قطب اصلی پرورش ماهیان گرمابی در ایران محسوب می شوند لذا این سموم می توانند اثرات شدیدی بر ماهیان پرورشی و وحشی این مناطق داشته باشند(۹). مطالعاتی در مورد تاثیر سم گلایفوزیت بر روی ماهیان مختلف انجام شده است که بر اساس آن، میزان غلظت کشنده($LC_{50\text{-}96h}$) از ۲ تا ۵۵ mg/l بدست آمده است(۲۴). میزان LC50 این سم در ماهی *Catla catla* به میزان ۴/۲ میلی گرم در لیتر(۱۹)، برای ماهی کپور معمولی ۲۰/۰۵ میلی گرم در لیتر بدست آمد(۹). تحقیقات نشان داده سموم علف کش از جمله سم گلایفوزیت می توانند بر ساختار کبد(۳۵)آبشش و کلیه(۲۴) اثر تخریبی داشته باشد و اختلالات آنزیمی و آندوکرینی شدیدی در ماهیان ایجاد نمایند(۲۲). تغییر فاکتورهای بیوشیمیایی و آنزیمی خون ماهی(۲۵) کاهش نرخ رشد، تضعیف سیستم ایمنی، تخریب غدد بزاقی و پاراتیروئید، تغییرات و جهش های ژنتیکی در جانوران مختلف از اثرات حضور این سم در محیط های طبیعی گزارش شده است. از آن جا که مطالعات کافی در مورد اثر علف کش گلایفوزیت بر بچه ماهی کپور نقره ای انجام نشده است، این مطالعه با هدف تعیین $LC_{50\text{-}96h}$ سم گلایفوزیت و تاثیر آن بر برخی فاکتورهای خونی بچه ماهی کپور نقره‌ای به انجام رسید.

مواد و روش ها

برای انجام این آزمایش تعداد ۱۸۰ قطعه بچه ماهی کپور نقره ای به وزن ۱/۵ ± ۱۰ گرم در ۱۸ عدد آکواریوم ۱۰۰ لیتری مورد آزمایش قرار گرفتند. جهت انجام

آزمایش ۱۰ قطعه بچه ماهی کپور نقره ای(به ازای هر لیتر آب یک گرم بچه ماهی) به هر آکواریوم اضافه و غذادهی کلاً قطع گردید. آزمایشات بر اساس دستورالعمل(سازمان همکاری اقتصادی اروپا(OECD)) (۲۸) به صورت ساکن(نوعی از آزمایشات سمیت است که محلول آزمایش در طی آزمایش تغییر نکرده و جایگزین نمی شود) انجام شد. برای تعیین محدوده کشندگی سم گلایفوزیت ۶ تیمار مورد استفاده قرار گرفت. در پایان میزان LC_{50} به دست آمده برای سم گلایفوزیت نسبت به جدول ۱ مقایسه و سم مورد نظر نسبت به آن گونه از لحاظ سمیت طبقه بندی گردید. ماهیان برای سازگار شدن با محیط آزمایش به مدت یک هفته در داخل آکواریوم‌ها نگهداری شدند. پیش از انجام آزمایشات اصلی آزمایشات تعیین محدوده سمیت گلایفوزیت بر روی ماهی کپور نقره ای انجام گرفت و بر اساس نتایج تحقیقات پیشین(۹، ۷)، سمیت این سم در گونه های مختلف بین ۲ تا ۵۵ میلی گرم در لیتر بدست آمده بود، آزمایشات تعیین محدوده کشندگی در غلظت های(۱، ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۵ و ۵۰) میلی گرم در لیتر انجام و بر اساس نتایج این آزمایشات اولیه جهت انجام آزمایشات اصلی ۶ تیمار(در ۳ تکرار) با غلظت‌های ۰، ۱، ۲، ۴، ۶ و ۸ میلی گرم در لیتر برای سم گلایفوزیت مورد استفاده قرار گرفت. تمامی ماهیان به مدت ۹۶ ساعت در غلظت های مورد نظر نگهداری شده و میزان مرگ و میر در زمان های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ محاسبه شد. ماهیان مرده به دقت بررسی شده و علائم ظاهری ایجاد شده به دلیل تاثیرات سم ثبت گردید. در پایان میزان LC_{50} بدست آمده برای سم گلایفوزیت نسبت به جدول ۱ مقایسه و سم مورد نظر نسبت به آن گونه از لحاظ سمیت طبقه بندی شد(۵). میانگین فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب محیط آزمایش به شرح زیر بود. درجه حرارت ۱/۹۵ ± ۲۱/۴۳ درجه سانتی گراد، اکسیژن محلول ۰/ ۳۷۴mg/l ± ۷/۷۹، نیتریت ۰/۰۲۶ mg/l، سختی کل ۲۰۴ mg/l، pH ۰/۰۴ ± ۸/۲، هدایت الکتریکی ۳۴۱/۱۴ ± ۲۸۸۳/۱۳ میکروموس در لیتر. در زمان انجام آزمایشات سمیت حاد رفتارهای بالینی شامل نحوه شنا و محل تجمع، میزان موکوس، حرکات سرپوش آبششی هم چنین رنگ و فرم بدن بچه ماهیان مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام مطالعات خونشناسی تعداد ۹۰ عدد بچه ماهی کپور نقره ای به صورت تصادفی در ۹ آکواریوم ۱۰۰ لیتری توزیع و در معرض ۳ غلظت مختلف از سم گلایفوزیت(شامل ۰ mg/l شاهد، یک پنجم و یک دهم از غلظت $LC_{50\text{-}96h}$ گلایفوزیت) قرار گرفتند. برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد. بچه ماهیان به مدت ۱۰ روز در معرض ۳ غلظت سم گلایفوزیت قرار گرفتند و پس از گذشت ۱۰ روز، بچه ماهیان صید و بلافاصله(جهت کاهش اثرات عوامل استرس‌زا)، به داخل تشت‌های پلاستیکی محتوی آب همسان با آکواریوم حاوی ماده بیهوش‌کننده گل‌میخک منتقل شدند. جهت اندازه‌گیری فاکتورهای خونی، با استفاده از سرنگ هپارینه از بچه ماهیان(از رگ ساقه‌دمی) خون گیری صورت گرفت(۲۳) و لوله‌های آزمایش بر روی پودر یخ جهت اندازه گیری فاکتورهای خونی به آزمایشگاه انتقال یافتند. در آزمایشگاه تعداد گلبول های قرمز(RBC)، هماتوکریت، هموگلوبین (Hb)، حجم متوسط گلبولی(MCV)، هموگلوبین متوسط گلبولی(MCH)، غلظت متوسط هموگلوبین گلبول های قرمز(MCHC) و تعداد گلبول های سفید تعیین گردید. شمارش افتراقی گلبول های سفید شامل هتروفیل، لنفوسیت، ائوزینوفیل، مونوسیت و بازوفیل نیز انجام شد(۱۴).

تجزیه و تحلیل داده ها

میزان LC_{50} سم گلایفوزیت با استفاده از نرم افزار SPSS 21 و روش Probit Analysis محاسبه شد. برای رسم نمودار LC_{50} ، غلظتی از سم که مرگ و میر در آن

مشاهده نشد(NOEC) و غلظتی از سم که کم ترین تعداد مرگ و میر را داشت(LOEC) از نرم افزار Excel استفاده گردید(۱۱).

نتایج

نتایج آزمایشات تعیین سمیت

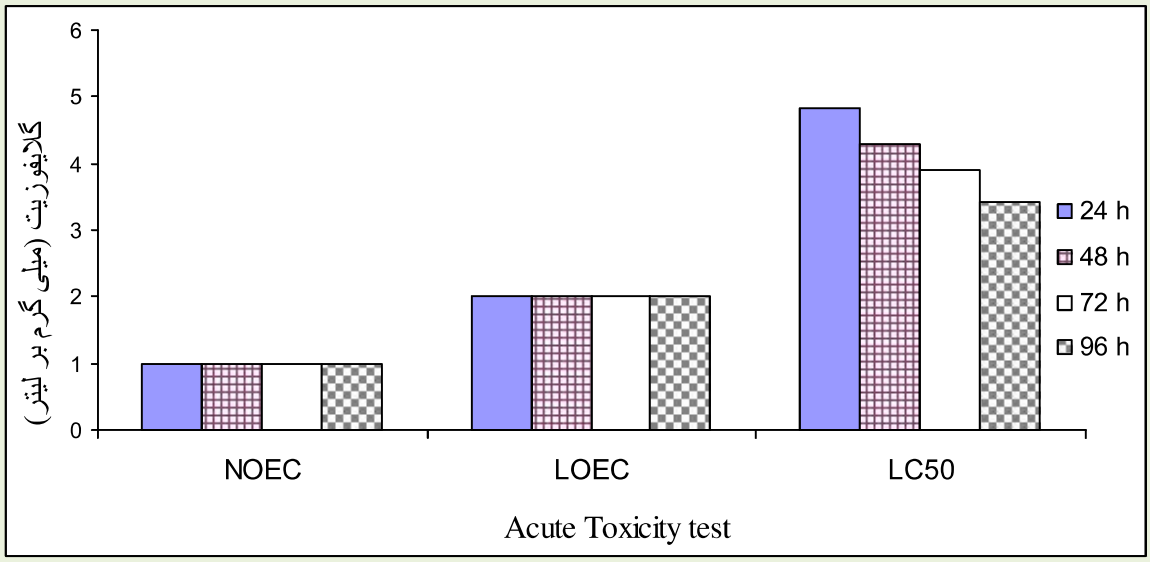
جدول ۲ نشان می‌دهد که میزان سمیت حاد(LC_{50}) گلایفوزیت برای بچه ماهیان کپور نقره ای در طی زمان-های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از در معرض قرار گرفتن به ترتیب ۴/۸۴، ۴/۲۸، ۳/۸۹ و ۳/۴۱ میلی گرم بر لیتر بود. نمودار ۱ نشان می‌دهد که NOEC برای سم گلایفوزیت طی زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از در معرض قرار گرفتن بچه ماهیان کپور نقره ای، ۱ میلی گرم بر میلی لیتر و میزان LOEC برای سم گلایفوزیت طی زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از در معرض قرار گرفتن بچه ماهیان کپور نقره ای، ۲ میلی گرم بر میلی لیتر است. از عوارض اولیه مشاهده شده در ماهیان در معرض سم گلایفوزیت اختلالات تنفسی به شکل باز و بسته کردن سریع سرپوش های آبششی و تجمع اطراف سنگ هوا بود. ماهیانی که در معرض این سم قرار گرفته بودند دچاراضطراب به صورت افزایش عکس العمل در مقابل محرک های بیرونی و تنفس ناموزون و غیر عادی شدند. هم چنین مخاط فراوان در سطح بدن، بیرون زدگی چشم و پرخونی آبشش ها نیز در برخی از ماهیان مشاهده گردید.

جدول ۱-درجه بندی سمیت سموم آفت کش برای موجودات زنده(Piri, 1997)

درجه سمیت	میزان LC_{50}(میلی گرم در لیتر)
نسبتاً غیر سمی	> ۵۰۰
کمی سمی	۱۰۰ – ۵۰۰
سمیت متوسط	۱۰ – ۱۰۰
سمی	۱ – ۱۰
خیلی سمی	۰/۱ – ۱
شدیداً سمی	< ۰/۱

جدول ۲- غلظت‌های کشنده سم گلایفوزیت در طی ۹۶-۲۴ ساعت بر روی بچه ماهیان کپور نقره ای

	غلظت کشندگی (میلی گرم بر لیتر)			
	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
LC_{10}	۲/۱۴±۰/۲۰	۱/۶۵±۰/۱۸	۱/۳۹±۰/۱۷	۱/۲۸±۰/۱۹
LC_{20}	۳/۰۶±۰/۲۰	۲/۵۵±۰/۱۸	۲/۲۵±۰/۱۷	۲/۰۱±۰/۱۹
LC_{30}	۳/۷۳±۰/۲۰	۳/۲۰±۰/۱۸	۲/۸۶±۰/۱۷	۲/۵۴±۰/۱۹
LC_{40}	۴/۳۱±۰/۲۰	۳/۷۶±۰/۱۸	۳/۳۹±۰/۱۷	۲/۹۹±۰/۱۹
LC_{50}	۴/۸۴±۰/۲۰	۴/۲۸±۰/۱۸	۳/۸۹±۰/۱۷	۳/۴۱±۰/۱۹
LC_{60}	۵/۳۷±۰/۲۰	۴/۷۹±۰/۱۸	۴/۳۸±۰/۱۷	۳/۸۴±۰/۱۹
LC_{70}	۵/۹۵±۰/۲۰	۵/۳۵±۰/۱۸	۴/۹۱±۰/۱۷	۴/۲۹±۰/۱۹
LC_{80}	۶/۶۲±۰/۲۰	۶/۰۰±۰/۱۸	۵/۵۳±۰/۱۷	۴/۸۲±۰/۱۹
LC_{90}	۷/۵۵±۰/۲۰	۶/۹۰±۰/۱۸	۶/۳۸±۰/۱۷	۵/۵۵±۰/۱۹



نمودار ۱- مقادیر LC50، NOEC و LOEC سم گلایفوزیت در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت

نتایج آزمایشات خون شناسی

مقایسه نتایج بین فاکتورهای خونی ماهیان گروه شاهد و ماهیانی که در معرض سم گلایفوزیت قرار داشتند در جدول ۳ آورده شده است. نتایج نشان داد که تعداد کل گلبول های سفید و قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت، MCV، MCH و درصد گلبول های سفید لنفوسیت و ائوزینوفیل بچه ماهیان کپور نقره ای در معرض سم گلایفوزیت کاهش معنی داری در مقایسه با تیمار شاهد دارند($P<0/05$).

جدول ۳- مقادیر متوسط فاکتورهای خونی بچه ماهیان کپور نقره ای قرار گرفته در معرض سم گلایفوزیت

فاکتورهای خونی	شاهد	یک دهم ($LC_{50(96h)}$ (۰/۳۴۱)	یک پنجم ($LC_{50(96h)}$ (۰/۶۸۲)
گلبول قرمز($10^6/mm^3$)	۰/۸۳± ۰/۰۲^a	۰/۷۴± ۰/۰۴^b	۰/۶۷± ۰/۰۲^c
هموگلوبین(گرم در دسی لیتر)	۷/۴۰± ۰/۴۰^a	۷/۰۰± ۰/۲۴^{ab}	۶/۷۳± ۰/۱۳^b
هماتوکریت (درصد)	۳۵/۷۶± ۰/۴۶^a	۳۱/۶۰± ۱/۱۰^b	۳۰/۳۴± ۰/۶۲^b
MCV(فمتولیتر)	۳۱۸/۰۰± ۱۰/۴۲^a	۳۰۲/۶۵± ۸/۸۵^{ab}	۲۹۱/۳۰± ۷/۸۵^b
MCH(پیکوگرم)	۹۳/۲۴± ۲/۷۴^a	۸۸/۳۶± ۱/۹۰^b	۸۵/۴۰± ۱/۲۰^b
MCHC(درصد)	۴۰/۶۲± ۱/۸۰^a	۳۷/۸۴± ۱/۸۳^{ab}	۳۶/۲۰± ۱/۴۱^b
گلبول سفید عدد/(mm^3)	۱۰۴۸۰/۰۰± ۲۴۰/۶۳^a	۹۲۳۸/۰۰± ۱۶۸/۴۰^b	۷۹۰۰/۰۰± ۱۹۵/۲۱^c
لنفوسیت(درصد)	۹۰/۲۴± ۲/۱۰^a	۸۷/۴۳± ۱/۳۷^{ab}	۸۴/۹۰± ۱/۲۳^b
نوتروفیل(درصد)	۸/۳۵± ۰/۴۸^c	۱۰/۲۱± ۰/۲۴^b	۱۲/۹۱± ۰/۶۱^a
ائوزوفیل(درصد)	۰/۲۸± ۰/۰۴^a	۰/۲۰± ۰/۰۲^b	۰/۱۹± ۰/۰۵^b
مونوسیت(درصد)	۱/۱۰± ۰/۲۰^b	۱/۸۴± ۰/۳۰^a	۱/۹۷± ۰/۲۴^a

حروف لاتین غیر مشترک در هر ردیف نشان دهنده معنی دار بودن می‌باشد($P<0/05$).

بحث ونتیجه گیری

نتایج به دست آمده برای LC_{50} در مدت ۴ روز متوالی(۹۶ ساعت) نشان داد که با افزوده شدن سم، میزان مرگ و میر بچه ماهیان افزایش می یابد. میزان LC_{50} ۹۶ ساعته سم گلایفوزیت برای بچه ماهیان کپور نقره ای در این تحقیق(۳/۴۱ mg/l) در مقایسه با سایر گزارش ها بر روی میزان LC_{50} ۹۶ ساعته سم گلایفوزیت برای کپور معمولی(۶/۷۵ mg/l) به مراتب کمتر می باشد(۸). هم چنین در سایر تحقیقات انجام شده بر روی گونه های مختلف ماهیان مشخص شد که میزان LC_{50} ۹۶ ساعته

علف کش گلایفوزیت برای ماهی تیلاپیا ۱۳/۲۵ میلی گرم بر لیتر(۱۸) و بر روی *Cichlasoma dimerus* برابر ۲۴/۳۰ میلی گرم بر لیتر است(۱۷). با توجه به میزان LC_{50} ۹۶ ساعته بدست آمده در این آزمایش و مقایسه آن با جدول طبقه بندی سمیت سموم بر روی موجودات زنده(جدول ۱)، سم گلایفوزیت برای بچه ماهیان کپور نقره ای، جزو سموم" سمی " طبقه بندی شده است. در گزارشی دیگر سم گلایفوزیت برای تیلاپیای نیل جوان جزو سموم "سمیت زیاد" طبقه بندیگردید(۱۲)، در تحقیق دیگری بیان شد که حساسیت های اختصاصی گونه‌های مختلف ماهیان به سموم مختلف ممکن است به علت قابلیت های مختلف ماهیان در جذب، عمل سم-زدایی از بدن و ممانعت از عملکرد آنزیم استیل کولین استراز باشد(۲۹). نتایج بدست آمده برای LC_{50} درمدت ۹۶ ساعت آزمایشات نشان می دهد که میزان LC_{50} با افزایش ساعات آزمایش کاهش یابد. به عبارت دیگر با افزایش ساعات آزمایش میزان غلظت کمتری از سم لازم است تا ۵۰ درصد از جمعیت ماهیان تلف شوند و مقدار LC_{50} در ۲۴ ساعت اولیه آزمایش همواره بیشتر از LC_{50} در پایان ۹۶ ساعت می باشد(۳۴). بنا به نظر شریف پور و همکاران یکی از عوامل تأثیر گذار در مسمومیت آبزیان عامل زمان است(۶). هنگامی که ماهی در معرض غلظت ثابتی از سم باشد، به مرور زمان هم مقاومت ماهی تحلیل می رود و هم سم فرصت بیشتری برای تأثیر گذاری روی ماهی دارد. علاوه بر این در مواردی تجمع سم در بافت-های ماهی نیز باعث افزایش تأثیر سوء آن بر بدن ماهی و در مدت ۹۶ ساعت انجام آزمایشات موجب پایین آمدن LC_{50} می شود. نتایج بدست آمده از آزمایشات سمیت حاد سم گلایفوزیت بر گونه کپور معمولی(۸) و ترکیب فنل و ۱- نفتول بر گونه سیم و سفید(۵) نیز این امر را تصدیق می نماید که مقدار LC_{50} در طول ۹۶ ساعت آزمایش همواره روند کاهشی داشته است. نتایج حاصل از این آزمایش نشان می دهد که سم گلایفوزیت در غلظت های غیر کشنده، تغییراتی بر روی فاکتورهای ایمونوفیزیولوژیک بچه ماهیان کپور نقره ای می گذارد، به طوری که براساس نتایج هماتولوژی به دست آمده مشخص گردید که افزایش غلظت سم گلایفوزیت باعث کاهش معنی دار تعداد گلبول های سفید و قرمز، میزان هموگلوبین و هماتوکریت و مقدار MCV، MCH، MCHC و درصد گلبول سفید لنفوسیت و ائوزینوفیل خون این بچه ماهیان در مقایسه با تیمار شاهد می شود. هم چنین افزایش معنی دار درصد نوتروفیل و مونوسیت تیمارهای آزمایشی نسبت به تیمار شاهد مشاهده شد. کاهش فاکتورهای مربوط به گلبول های قرمز ناشی از آلودگی ها و افزایش غلظت های سموم تا حد کشنده، حاصل آسیب دیدگی بافت های مختلف بدن از جمله بافت های خون ساز و کاهش توانایی تولید حامل های اکسیژنی هست از این رو مقدار این حامل ها در خون کاهش می یابند و این اثرات نشانه تخریب گلبول های قرمز و در نتیجه کم خونی شدید در ماهیان است(۳۵، ۳۳) احتمالاً این نوع تغییرات ناشی از تاثیر مستقیم سم بر بافت های خون ساز کلیه و طحال و به دنبال آن کاهش یا تضعیف سیستم ایمنی غیر اختصاصی ماهی می‌باشد. آزمایش های مشابهی که قبلاً با استفاده از آفت کش-های ارگانوفسفره بر روی دیگر ماهیان انجام گرفته این تغییرات را تأیید می نماید، در واقع این کاهش تعداد گلبول های سفید موجب ضعف ماهی در برابر عوامل بیماری زا و افزایش حساسیت آن نسبت به بیماری های واگیر می شود(۱۴). همان طور که در جدول ۳ مشاهده گردید هر چه غلظت سم گلایفوزیت افزایش می‌یابد، اثرات سم بر فاکتورهای خونی بچه ماهیان تشدید می شود به طوری که با افزایش میزان غلظت سم کاهش تعداد گلبول های سفید و قرمز، میزان هموگلوبین و هماتوکریت و مقدار MCV، MCH،MCHC و درصد

لنفوسیت و ائوزینوفیل خون بچه ماهیان در غلظت یک پنجم LC_{50} ۹ ساعته سم گلایفوزیت بیشتر از غلظت یک دهم LC_{50} ۹۶ ساعته سم گلایفوزیت بود. هم چنین افزایش درصد نوتروفیل و مونوسیت خون با افزایش غلظت سم نیز افزایش یافت. در تحقیقاتی که بر روی اثر سم دیازینونبر ماهی چالباش(۴)، ماهی شیپ(۱) و ازون برون(۲) انجام شد، کاهش تعداد گلبول های قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت و لنفوسیت گزارش گردید که با نتایج این آزمایش مشابه بود. هم چنین در ماهی چالباش افزایش مونوسیت گزارش شد که با تحقیق حاضر همسویی داشت(۴). کاهش گلبول های قرمز و هموگلوبین نشان دهنده کم خونی یا خونریزی شدید است. کاهش گلبول های سفید می‌تواند به دلیل کاهش عملکرد بافت های خون ساز از قبیل کلیه، طحال و یا بیماری های عفونی خاص باشد(۱۴). اصلی ترین عملکرد مونوسیت ها فاگوسیتوز و هضم ذرات بزرگی نظیر سلول‌های پیر، باقی مانده سلول های نکروزه و میکروارگانیزم های بزرگ است. افزایش مونوسیت، پاسخ ثانویه به عوارضی نظیر تخریب گسترده بافتی، نکروز و کم خونی همولیتیک می باشد. افزایش مونوسیت در التهاب های بدخیم و محیطی رخ می دهد و اغلب با افزایش نوتروفیل نیز همراه است و می تواند منجر به آسیب های شدیدی شود(۱۸). علت احتمالی نوتروفیلی(افزایش تعداد نوتروفیل ها) می تواند ناشی از عمل بیگانه خواری سلول های دفاعی میزبان باشد، در حالی که لنفوسیت های ماهی به طور عمده در سیستم ایمنی مایعی موثر است(۲۶). بنابراین با توجه به این آزمایش می توان چنین نتیجه گیری کرد که گلایفوزیت به طور عمده موجب تضعیف سیستم ایمنی غیر اختصاصی بچه ماهیان کپور نقره ای می شود. در شمارش تفریقی لوکوسیت بچه ماهیان در معرض سمیت گلایفوزیت، کاهش معنی داری در تعداد لنفوسیت ها و افزایش معنی داری در تعداد نوتروفیل ها با افزایش غلظت سم مشاهده شد که این امر می تواند به دلیل تخریب بافت های خون ساز و از دست رفتن توانایی دفاعی آن ها به دلیل افزایش غلظت سم و مدت زمان قرار گرفتن در معرض سم باشد. کاهش قابل توجه در غلظت هموگلوبین خون ماهیان می تواند به عنوان یک نقطه بحرانی تلقی گردد زیرا تغییرات آسیب شناسی خون ماهیان غیر قابل برگشت است(۲۶). نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر همگی مؤید نتایج سایر محققین در بررسی تأثیر سموم ارگانوفسفره بر فاکتورهای خونی ماهیان می-باشد، اما مکانیسم یا مکانیسم های دقیق کاهش فاکتورهای خونی فوق الذکر نامشخص است(۱۵). با توجه به میزان LC50 به دست آمده در آزمایش، از سمی بودن گلایفوزیت برای بچه ماهیان کپور نقره ای حکایت می نماید. هم چنین افزایش نوتروفیل ها را در این تحقیق می توان به عنوان یک واکنش دفاعی از جانب بدن ماهی دانست و با توجه به کاهش تعداد کل گلبول های سفید و کاهش درصد لنفوسیت ها که در ایمنی غیر اختصاصی ماهی مؤثرند می توان گفت که مقاومت بدنی ماهیان در معرض این سم علف کش کاهش یافته است. این گونه ماهیان به آسانی به عوامل ثانویه پاتوژن مستعد و بیمار می‌شوند، بنابراین با توجه به استفاده قابل توجه گلایفوزیت در مزارع کشاورزی شمال کشور و مجاورت آن ها با استخرهای پرورش این ماهیان، احتمال بروز استرس های شدید پس از در معرض قرارگیری بچه ماهیان و در نتیجه بروز تلفات ناشی از عوامل ثانویه پاتوژن وجود دارد.

منابع

۱–خوش باوررستمی، ح.، سلطانی، م. ۱۳۸۴. بررسی تاثیر سمیت حاد دیازینون بر روی شاخص های خونی ماهی شیپ *(Acipenser nudiven)* و تعیین میزان LC50. مجله علمی شیلات ایران، سال چهاردهم، شماره ۳، صفحات ۶۰–۴۹ .

۲– خوش باوررستمی، ح.، سلطانی، م.، یلقی، س. ۱۳۸۴. اثر سم دیازینون روی شاخص های خونی ماهی خاویاری ازون برون(*Acipenser stellatus*) و تعیین LC50. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی ، سال دوازدهم، شماره پنجم، آذر و دی. صفحات ۱۰۰–۱۰۸.

۳– سالنامه آماری شیلات ایران. ۱۳۹۴. صفحات ۲۸ و ۳۸.

٤–سلطانی، م.، خوشباور رستمی، ح.ع. ۱۳۸۱. مطالعه اثر دیازینون بر برخی شاخص های خونی و بیوشیمیایی تاس ماهی روسی(چالباش)(*Acipenser guldenstadti*). مجله علوم دریایی ایران .شماره چهارم. صفحات ۶۶–۷۷.

۵–شریعتی، ف . ع.، اسماعیلی ساری، م.، پیری، م. ۱۳۸۲. تعیین سمیت و LC_{50} فنل و ۱– نفتول روی ماهیان انگشت قد سیم و سفید. مجله علمی شیلات ایران. شماره ۴. سال دوازدهم. صفحات ۵۷ –۶۷.

٦–شریف پور، ع .، سلطانی، م.، جوادی، م. ۱۳۸۲. تعیین LC_{50} و ضایعات بافتی ناشی از سم آندوسولفان در بچه فیل ماهی(*Huso huso*). مجله علمی شیلات ایران. شماره ۴. سال دوازدهم. صفحات ۶۹ تا ۸۴ .

۷–شریف روحانی، م. ۱۳۷۵. تشخیص، پیشگیری و درمان بیماری ها و مسمومیت های ماهی. معاونت تکثیر و پرورش شیلات ایران. صفحه ۲۵۶.

۸–کلایی، ب.، پورکاظمی، م.، سلطانی، م. ۱۳۹۲. اکوسیستم‌های تالابی و رودخانه ای استان گلستان .چاپ اول . صفحات ۶۹–۶۸.

۹–نقشبندی، ن .، عسگری حسنی، م. ۱۳۹۶. مطالعه تاثیر سم کشاورزی گلایفوزیت بر برخی فاکتورهای خونی و تغییرات رفتاری ماهی کپور معمولی. مجله سلامت و محیط زیست. فصلنامه علمی پژوهشی انجمن علمی بهداشت محیط ایران. دوره دهم، شماره دوم، صفحات ۱۷۵– ۱۸۶.

10. Alyakrinskyay, I. o., Dolgora, S. N. (1984). Haematological features of sturgeons. Ichthyology, 24(3); 135-139.

11. Atamanalp, M., Yanik, T. (2003). Alterations in hematological parameters of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* exposed to mancozeb. Turk J Vet Animal Sci, 27(3); 1213-1217.

12. Ayula, D.T. (2008). Use of exposure units for estimating aquatic toxicity of organophosphate pesticides. U. S. Environ. Protection Agen. Rep. 600; 25-31.

13. Banaee, M., Mirvaghefei, A. R., Ahmadi, K., Banaee, S. (2008). Acute toxic effects of diazinon on hematology and biochemical parameters in common carp(*Cyprinus carpio*). Journal of Marine Science and Technology, Azad University, Tehran North Unit, 8; 1-10.

14. Banaee, M., Sureda, A., Mirvagefei, R., Ahmadi, K. (2011). Effect of diazinon on biochemical parameters of blood in rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*). Pestic Biochem Physiol, 99; 1-6.

15. Blahova, J., Modra, H., Sevcikova, M., Marsalek, P., Svobodova, Z. (2014). Evaluation of biochemical, haematological and histopathological responses and recovery ability of common carp(*Cyprinus carpio*) after acute exposure to atrazine herbicide. BioMed Research International. Published online, 27.

16.do Carmo Langiano, V., Martinez, CB. (2008). Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 147(2); 222-31.

17. Domitrovic, H.A. (2006). Acute toxic effects of ethidium bromide on hematology and biochemical parameters in common carp(*Cyprinus carpio*). Australian Veterinary Journal, 79; 70-574.

18. Evans, N.D. (2009). Investigation of acute toxicity of two pesticides glyphosate and deltamethrin on Tilapias. Aquaculture,290; 111 -118.

19. Felix, JF., Saradhamani, N., ManishKumar, B., Charles Maria Prabhu, F. (2016). Toxic effects of herbicide Glyphosate Hijac (41%) on serum biochemical parameters of freshwater fish, *Catla catla*. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 5(7); 192-217.

20. Finney , D. (1971). Probite analysis. Cambridge University, 1-33.

21. Gangolli, E. D. (1999). The dictionary of toxic substances and their effects. Edition Royal Society of Chemistry. Cambidge, 3; 351-354.
22. Glusczak, L., dos Santos Miron, D., Moraes, BS., Simões, RR., Schetinger, MRC., Morsch, VM. (2007). Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish(*Rhamdia quelen*). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 146(4);519-24.
23. Groff, J.M., Zinkl, J.G. (1999). Hematology and clinical chemistry of cyprinid fish *Common carp* and goldfish. Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice, 2; 741-776.
24. Jiraungkoorskul, W., Upatham, ES., Kruatrachue, M., Sahaphong, S., Vichasri-Grams, S., Pokethitiyook, P. (2002) .Histopathological effects of Roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia(*Oreochromis niloticus*). Science Asia, 28; 121-27.
25. Jofré, DM., Germanó García, MJ., Salcedo, RE., Morales, M., Alvarez, M., Enriz, RD. (2013). Fish toxicity of commercial herbicides formulated with glyphosate. Environmental and Analytical Toxicology, 4(1);199-201.
26. Mela, M., Guiloski, I.C., Doria H.B. (2013). Effects of herbicide atrazine in neotropical catfish(*Rhamdia quelen*). Ecotoxicology and Environmental Safety, 93;13–21.
27. Neff, J.M. (2002). Bio accumulation in marine organisms: effect of contaminants from oil well produced water. Elsevier Science Publication, Amsterdam. 203-214.
28.OECD. (2001). Guideline for testing of chemicals, No.210, section 2. Effect on biotic system direction ; 1-39.
29. Oh, H. S., Lee, S. K., Kim Y. (1991). Mechanism of selective toxicity of diazinon to killifish(*Orizias latipes*) and loach . Aquatic Toxicology and Risk assessment, 14; 343-353.
30. Okomoda, V., Ataguba, G., Ayuba, V. (2013). Hematological response of *Clarias gariepinus* fingerlings exposed to acute concentrations of sunsate. Journal of Stress Physiology & Biochemistry, 9(2);271-78.
31. Parrish, P.R. (2006). Acute toxicity tests. In Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment, 2nd, ed. G. M. Rand. pp.Taylor & Francis, Washington DC, 210–228.
32. Piri, M. (1997). Effect of some pesticides commonl iranian agriculture on aquatic food chain. Tesis for PH.D degree submitted to the academy of agricultural sciences Godollo-Hungary, 1-31.
33. Saravanan, M., Kumar, KP., Ramesh, M. (2011). Haematological and biochemical responses of freshwater teleost fish *Cyprinus carpio*(Actinopterygii: Cypriniformes) during acute and chronic sublethal exposure to lindane. Pesticide Biochemistry and Physiology, 100(3); 6-11.
34. Stalin, S.I., Kiruba, S., Manohar, S. (2008). Comparative study on the toxicity of a synthetic pyrethroid, deltamethrin and a neem based pesticide, Azadirachtin to *Poecilia reticulata* Peters 1859(Cyprinodontiformes: Poeciliidae). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 11; 1-5.
35. Szarek, J., Siwicki, A., Andrzejewska, A., Terech-Majewska, E., Banaszkiewicz, T. (2000). Effects of the herbicide Roundup™ on the ultrastructural pattern of hepatocytes in carp(*Cyprinus carpio*). Marine Environmental Research, 50(1); 263-66.
36.Tu, M., Hurd, C., Randall, JM. (2001). Weed control methods handbook. Utah: All U.S. Government Documents, 48-56.
37. Willios, G.H., Dowell, L., (2008). Review: pesticides in agricultural run off and their effects on down stream water quality. Environ. Toxicol. Chem, 28; 267–279.

.

Survey the Effect of Glyphosate on Mortality and some Haematological Indices of Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix)* Juveniles

H. Jafar Nodeh[1], **M. Shamloofar[1]**, R. Akrami[1]

1. Department of Fisheries, Azadshahr Branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Iran.

shamloofar@yahoo.com

Received:2017.26. 8 **Accepted: 2017. 11. 11**

Abstract

Inroduction & Objective: The object of this survey was to determine the acute toxicity and effects of pesticides, glyphosate on some haematological indices of Silver carp.

Material and Methods: For this reason the acute toxicity tests was performed in 6 treatments and 3 replacements with 10 fish with 10 ± 1.50 g mean body weight was assessed following the O.E.C.D. direction and performed statically in 22.45 ± 3.12 ˚C. Examination of haematological indices was performed on control and experimental specimens of Silver carp with 10 ± 1.50 g mean body weight after 96h exposure to glyphosate in concentration lower than LC_{50} 96h (0, 0.341 and 0.682 mg/l).

Results: The 96h LC_{50} value of glyphosate for Silver carp juveniles was 3.41 $mg.l^{-1}$. According to the table of sorting the toxicity of insecticides, glyphosate was Toxic for Silver carp. The experimental group of Silver carp exposed to glyphosate showed significantly lower value ($p<0.05$) of erytherocyte (RBC) and leukocyte(Leuko) count, haemoglobin content (Hb), and haematocrit (PCV) , MCV, MCH, MCHC and relative lymphocyte and eosinophil count compared to the control group. Also showed significantly increase value ($p<0.05$) of relative notrophil and monocyte count compared to the control group.

Conclusion: By reduction of white blood cells particularly lymphocites which are mainly in the humoral immune system(non-proprietary) of fish. Haematological parameters may be used as an environmental health diagnostic test and stress indicator for agriculture pesticides in aquatic ecosystems.

Keywords: *Silver carp,* Glyphosate, Acute Toxicity, Haematological Indices.