

تعیین LC_{50} سم دیازینون و غلظت تحت کشنده آن

بر عوامل خونی بچه فیل ماهی (*Huso huso*)

مهشید شاملوفر^(۱)؛ ابوالقاسم کمالی^(۲)؛ محمد پیری^(۳)؛ فرهاد یغمایی^(۴)

و نورمحمد مختومی^(۵)

shamloofar@yahoo.com

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد آزاد شهر صندوق پستی: ۳۰

۲ و ۴- دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان صندوق پستی: ۲۸۶-۴۹۱۶۵

۳- مرکز تحقیقات ذخایر آبزیان آبهای داخلی، گرگان صندوق پستی: ۱۳۹

۵- مرکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید مرجانی، رشت کد پستی: ۴۹۳۱۵۱۱۵

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۸۴ تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۸۵

چکیده

مسمومیت حاد و اثرات سم دیازینون بر برخی عوامل خونی بچه فیل ماهیان بر اساس دستورالعمل O.E.C.D، به صورت استاتیک (ساکن)، در شرایط کیفی ثابت آب و دمای $20/27 \pm 2/05$ درجه سانتیگراد در سال ۱۳۸۳ در مرکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید مرجانی مورد مطالعه قرار گرفت. در آزمایشات سمیت حاد، میانگین وزنی بچه فیل ماهی $4/03 \pm 0/12$ گرم بود. میزان LC_{50} ۹۶ ساعته این سم برای گونه فیل ماهی $5/8210$ میلیگرم در لیتر بدست آمد. همچنین حداکثر غلظت مجاز سم دیازینون در محیطهای طبیعی برای گونه فیل ماهی $0/5821$ میلیگرم در لیتر محاسبه شد. بر اساس طبقه بندی جدول سطوح سمیت حشره کشها، سم دیازینون برای گونه فیل ماهی جزء مواد "سمی" طبقه بندی شد. مطالعه عوامل خونی بچه فیل ماهیان با میانگین وزنی $16/08$ گرم تحت تأثیر سم دیازینون در غلظتهای کمتر از LC_{50} ۹۶ ساعته (۳) ۴، و ۵ میلیگرم در لیتر) انجام شد. نتایج حاصله نشان داد که تعداد کل گلبولهای سفید و قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت، MCH، MCV و درصد گلبولهای سفید لنفوسیت و ائوزینوفیل بچه فیل ماهیان در معرض سم دیازینون کاهش معنی داری در مقایسه با تیمار شاهد داشته است ($P < 0/05$). همچنین افزایش معنی دار درصد هتروفیلهای تیمارهای آزمایشی نسبت به تیمار شاهد مشاهده شد ($P < 0/05$). اما تغییر معنی داری در MCHC (میانگین غلظت هموگلوبین گلبولهای قرمز) و درصد گلبولهای سفید مونوسیت و بازوفیل مشاهده نشد.

لغات کلیدی: فیل ماهی، *Huso huso*، دیازینون، عوامل خونی

مقدمه

سموم و آفت‌کشاها در حال حاضر از عمده‌ترین عوامل ایجاد مسمومیت در ماهیان می‌باشند که ممکن است در غلظت کم، تاثیر مستقیمی روی ماهی نداشته باشند ولی در بلند مدت روی مراحل اولیه تکامل ماهی مؤثر می‌باشند. تحقیقات اکولوژیک و بیولوژیک برای تعیین اثرات مواد شیمیایی بر حیات در محیط زیست در سالهای اخیر افزایش یافته است (Piri Zirkoohi & Ordog, 1997).

داده‌های مربوط به سمیت ناشی از استفاده آفت‌کشاها و تأثیر آن بر روی موجودات غیر هدف مثل ماهی بعنوان مبنای پایه‌ای برای سنجش و تعیین خطرات محیطی آفت‌کشاها بر روی سیستم‌های آبی می‌باشد (Gangolli, 1999). حساسیت گونه‌های مختلف ماهی به مواد سمی، متفاوت است، از اینرو آزمایش‌های سم‌شناسی بر روی ماهیان مختلف صورت می‌گیرد (Finney, 1971). همچنین بررسی کمی عوامل خونی در مراحل اولیه رشد و نمو ماهیان بعنوان یک شاخص مهم وضعیت فیزیولوژیک محسوب می‌گردد که در تکثیر و پرورش تاسماهیان حائز اهمیت است (Alyakrinskay & Dolgora, 1984).

در این تحقیق با توجه به اینکه اغلب رودخانه‌های محل مهاجرت، تخم‌ریزی و پرورش اولیه لارو ماهیان مهاجر بویژه بچه ماهیان خاویاری (فیل ماهی) در مجاورت اراضی کشاورزی مصرف‌کننده سم دیازینون قرار داشتند، آثار این سم روی عوامل خونی بچه فیل ماهیان مورد مطالعه قرار گرفت. فرمول مولکولی سم حشره‌کش ارگانوفسفره دیازینون "C₁₂H₂₁N₂O₃PS" می‌باشد. این سم جزء سموم تماسی و نفوذی بوده و در مواردی سیستمیک کم دوام است (خانجانی و پورمیرزا، ۱۳۸۰). سم دیازینون برای ۲۶ نوع آفت استفاده می‌شود. با توجه به اینکه تعیین میانه غلظت کشنده یا LC₅₀ برای مطالعات سم‌شناسی ضروری است، ابتدا میزان LC₅₀ در مورد سم دیازینون در این گونه طی ۹۶ ساعت تعیین شد و به موازات این اقدام آثار رفتاری و خون‌شناسی نیز مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش کار

تعداد ۱۹۸ عدد بچه فیل ماهی با میانگین وزنی ۴/۰۳±۰/۱۲ گرم برای این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. این آزمایش در ۱۸ عدد وان گرد فایبرگلاس با حجم ۵۰ لیتر با قطر و ارتفاع بترتیب ۵۳ و ۲۵ سانتیمتر به صورت ساکن (نوعی از آزمایشات

سمیت است که محلول آزمایش طی آزمایش تغییر نکرده و جایگزین نمی‌شود) براساس دستورالعمل OECD, 2001¹ انجام شد.

وانها در هر آزمایش به میزان ۴۰ لیتر با آب دکلرینه شده آبیگری شدند و به ازای هر لیتر آب یک گرم بچه ماهی به هر وان اضافه شد. پس از قرار گرفتن بچه ماهیان در وانها غذادهی کلاً قطع گردید. برای تعیین محدوده کشندگی سم دیازینون در گونه فیل ماهی، ۱۰ عدد بچه ماهی با میانگین وزنی ۲/۲ گرم در وانهایی که به میزان ۳۰ لیتر آبیگری شده بود، قرار گرفتند. در این آزمایش غلظت بین ۱ تا ۱۰ میلیگرم در لیتر به روش لگاریتمی به ۵ تیمار (۱، ۱/۷۷، ۳/۱۶، ۵/۶۲ و ۱۰ میلیگرم در لیتر) تقسیم شد. این آزمایشات در سه تکرار انجام شد و یک تیمار شاهد نیز در نظر گرفته شد. در ماهیان مورد آزمون تا غلظت ۵/۶ میلیگرم در لیتر هیچگونه تلفاتی مشاهده نشد. اما در غلظت ۱۰ میلیگرم در لیتر همه ماهیان در مدت ۹۶ ساعت تلف شدند. لذا برای انجام آزمایشات اصلی، غلظت بین ۵ تا ۱۰ میلیگرم در لیتر به ۵ تیمار (۵، ۵/۹۶۵، ۷/۱۲۲، ۸/۵ و ۱۰ میلیگرم در لیتر) تقسیم شد.

میزان LC₅₀ بعد از ۹۶ ساعت در معرض قرارگیری با استفاده از نرم افزار Mini tab و روش پروبیت آنالیز محاسبه شد. میانگین عوامل فیزیکی و شیمیایی آب محیط آزمایش بشرح زیر بود:

درجه حرارت ۲۰/۲۷±۲/۰۵، اکسیژن محلول ۷/۹۶±۰/۴۰۱ میلیگرم در لیتر، نیتريت ۰/۰۲۷±۰/۰۱۱ میلیگرم در لیتر، سختی کل ۱۹۸ میلیگرم در لیتر، pH ۸/۸±۰/۱۱، هدایت الکتریکی ۲۹۹۲/۴۳±۳۶۰/۱۴ میکروموس در لیتر. در زمان انجام آزمایشات سمیت حاد رفتارهای بالینی بچه ماهیان مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام مطالعات خونشناسی تعداد ۴۸ عدد بچه ماهی با میانگین وزنی ۱۶/۰۸ گرم مورد استفاده قرار گرفت. این آزمایشات در یک تیمار شاهد و سه تیمار آزمایشی از سم دیازینون با غلظتهای ۳، ۴ و ۵ میلیگرم در لیتر انجام شد. خونگیری پس از ۹۶ ساعت قرار گرفتن ماهیان در معرض این سم به روش قطع ساقه دمی انجام شد. میزان یک میلی‌لیتر خون داخل وباله‌های پنسیلین حاوی IU ۲۰۰ تا ۲۵۰ هپارین

که مشاهده می‌شود مقادیر همبستگی بالایی بین میزان مرگ و میر بچه ماهیان (Y) و افزایش غلظت سم (X) وجود دارد. همچنین از مقادیر LC₁₀ و LC₅₀ مقدار حداقل غلظت موثر (LOEC) سم دیازینون بر گونه فیل ماهی ۴/۳۷۰۹ میلی‌گرم در لیتر و حداکثر غلظت مجاز (MAC) این سم بر گونه یاد شده ۰/۵۸۲۱ میلی‌گرم در لیتر محاسبه شد.

معمولترین عارضه برای ماهیان مسموم شده با این سم، انحناء ستون فقرات و فلج عصبی بود. ماهیانی که در معرض این سم قرار گرفته بودند دچار اختلالات تنفسی شده به طوری که سرپوشهای آبششی را تندتر باز و بسته کرده و اطراف سنگ هوا و حبابهای هوا شنا می‌کردند. اضطراب ماهیان به صورت افزایش عکس‌العمل در مقابل محرکهای بیرونی، گرفتگی عضلات دور دهانی و باله‌ای و تنفس ناموزون و غیرعادی دیده می‌شد. بیرون زدگی چشم، وجود مخاط فراوان روی سطح بدن، ایجاد لکه‌های خونی در اطراف چشم و پرخونی آبششها از عوارض ظاهری قرار گرفتن ماهیان در معرض این سم بود.

نتایج مقایسه بین عوامل خونی فیل ماهیانی که در معرض سم دیازینون قرار داشتند با فیل ماهیان شاهد در جداول ۳ و ۴ آمده است.

ریخته شد و در دمای حدود صفر درجه به آزمایشگاه منتقل گردید (شاهسونی و همکاران، ۱۳۸۰). در آزمایشگاه تعداد گلبولهای قرمز (RBC)، همتوکریت (PCV)، هوگلوبین (Hb)، حجم متوسط گلبولی (MCV)، هموگلوبین متوسط گلبولی (MCH)، غلظت متوسط هموگلوبین گلبولهای قرمز (MCHC) و تعداد گلبولهای سفید تعیین گردید. همچنین شمارش افتراقی گلبولهای سفید شامل هتروفیل، لنفوسیت، ائوزینوفیل، مونوسیت و بازوفیل نیز انجام شد (شیشه‌ایان و سعیدی، ۱۳۷۰ و Stoskopf, 1993).

نتایج

میزان LC₅₀ ۹۶ ساعته سم دیازینون در فیل ماهی ۵/۸۲۱۰ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد. جدول ۱ مقادیر غلظت کشنده (LC₅₀) سم دیازینون بر روی بچه فیل ماهیان را در زمانهای ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت نشان می‌دهد.

جدول ۲ معادلات رگرسیون و ضریب همبستگی بین ستون لگاریتم غلظت سم دیازینون با میزان مرگ و میر بچه فیل ماهیان در ستون مقادیر آماری (PV)، را نشان می‌دهد. همانطور

جدول ۱: مقادیر غلظت کشنده (LC) سم دیازینون بر روی بچه فیل ماهیان (میلی‌گرم در لیتر)

LC	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
۱۰	۸/۱۶۹۵	۴/۹۲۷۲	۴/۴۸۵۳	۴/۳۷۰۹
۵۰	۹/۸۴۶۹	۸/۳۱۹۵	۷/۴۴۷۳	۵/۸۲۱۰
۹۰	۱۴/۸۱۲۶	۱۴/۰۵۰۸	۱۲/۳۶۵۲	۹/۰۶۱۵

جدول ۲: معادلات رگرسیون و ضریب همبستگی بین لگاریتم غلظت سم دیازینون با میزان مرگ و میر بچه فیل ماهیان

زمان	معادله خط رگرسیون	ضریب تبیین (R ²)
۲۴ ساعت	$Y = 11/79.01 X^2 - 6/6482 X - 0.028$	۰/۷۳۹
۴۸ ساعت	$Y = 5/6322 X - 0.1823$	۰/۹۴۰۹
۷۲ ساعت	$Y = 5/82 X - 0.0752$	۰/۹۶۲۳
۹۶ ساعت	$Y = -67/18.08 X^3 + 118/26576 X^2 - 49/0.478 X + 3/2.04$	۰/۹۳۳۹

جدول ۳: شاخصهای خونی فیل ماهی در معرض غلظتهای مختلف سم دیازینون در مقایسه با گروه شاهد (a: با شاهد اختلاف معنی دار ندارد؛ b: با شاهد اختلاف معنی دار دارد)

شاخصها	واحدها	تیمار	تعداد	میانگین	خطای معیار	P
WBC	میلی متر مکعب/عدد	شاهد	۱۱	۵۹۳۶/۴ ^a	۱۱۱/۹۰۲	۰/۰۰۰
		۲ppm	۹	۴۱۶۱/۱ ^b	۹۹/۳	
		۴ppm	۸	۴۰۵۸/۳ ^b	۱۲۰/۶۵	
		۵ppm	۸	۴۱۶۶/۷ ^b	۱۳۲/۹۴	
Hb	دسی لیتر/گرم	شاهد	۱۱	۵/۰۱۸۲ ^a	۰/۲۰۹	۰/۰۰۰
		۲ppm	۹	۴/۱۳۳۳ ^b	۰/۱۳۲	
		۴ppm	۸	۳/۰۳۳۳ ^c	۰/۱۹۴	
		۵ppm	۸	۲/۹۰۰۰ ^{cd}	۰/۲۸۳	
PCV	درصد	شاهد	۱۱	۲۲/۷۲۷ ^a	۱/۷۱۵	۰/۰۰۰
		۲ppm	۹	۱۷/۴۴۴ ^b	۱/۰۲۶	
		۴ppm	۸	۱۴/۱۶۷ ^{bc}	۱/۶۰۰۶	
		۵ppm	۸	۱۰/۵ ^c	۱/۴۹۸	
RBC	میکرو لیتر/۱۰ ^۶ ×عدد	شاهد	۱۱	۰/۹۲۵۵ ^a	۰/۰۰۸	۰/۰۴۳
		۲ppm	۹	۰/۹۰۵۳ ^a	۰/۰۱۳	
		۴ppm	۸	۰/۸۷۰۰ ^b	۰/۰۴۲	
		۵ppm	۸	۰/۸۶۹۷ ^b	۰/۰۱۸	
MCV	fl	شاهد	۱۱	۲۴۵/۵۶۴ ^a	۱۸/۴۸	۰/۰۰۰
		۲ppm	۹	۱۹۲/۶۸۷ ^b	۱۰/۱۷۳	
		۴ppm	۸	۱۶۲/۸۳ ^{cb}	۱۱/۹۷۶	
		۵ppm	۸	۱۲۰/۷۳۱ ^c	۱۴/۸۱۸	
MCH	pg	شاهد	۱۱	۵۴/۲۲۱ ^a	۲/۴۰۲	۰/۰۰۰
		۲ppm	۹	۴۵/۶۵۶ ^b	۱/۵۲۸	
		۴ppm	۸	۳۴/۸۶۵ ^c	۱/۹۱۹	
		۵ppm	۸	۳۳/۳۴۴ ^{dc}	۲/۹۲۴	
MCHC	دسی لیتر/گرم	شاهد	۱۱	۲۲/۰۸۰ ^a	۱/۲۳۲	۰/۲۱۹
		۲ppm	۹	۲۶/۷۱۸ ^a	۱/۰۴۰	
		۴ppm	۸	۲۱/۴۱۱ ^a	۱/۵۲۹	
		۵ppm	۸	۲۷/۶۱۹ ^a	۱/۳۸۸	

جدول ۴: مقادیر میانگین و خطای معیار درصد گلبولهای سفید هتروفیل، لنفوسیت، مونوسیت، انوزینوفیل و بازوفیل بچه فیل ماهیان در معرض سم دیازینون

P	خطای معیار	میانگین	تعداد	تیمار	
	۲/۸۸۵۱	۲۴ ^a	۱۱	شاهد	
	۲/۳۴۸	۳۳/۱۱۱ ^b	۹	۳ppm	
۰/۰۱۶	۲/۲۶	۳۳/۶۶۷ ^b	۸	۴ppm	هتروفیل
	۳/۲۳۵	۳۸/۱۸۲ ^b	۸	۵ppm	
	۲/۹۳	۶۵/۸۳ ^a	۱۱	شاهد	
	۲/۳۱۶	۵۱/۱۱ ^b	۹	۳ppm	
۰/۰۰۵	۸/۷۶	۴۴/۶۷ ^b	۸	۴ppm	لنفوسیت
	۲/۷۵۱	۴۳ ^b	۸	۵ppm	
	۰/۲۷۳	۰/۷۲۷۳ ^a	۱۱	شاهد	
	۰/۲۸۸	۱ ^a	۹	۳ppm	
۰/۲۹۰	۰/۳۳۳	۰/۳۳۳ ^a	۸	۴ppm	مونوسیت
	۰/۲۱۰	۰/۳۳۳ ^a	۸	۵ppm	
	۱/۲۰۸	۱۷/۳۶۴ ^a	۱۱	شاهد	
	۱/۲۵۹	۱۴/۴۴۴ ^a	۹	۳ppm	
۰/۰۰۲	۱/۹۰۴	۱۰/۸۳ ^b	۸	۴ppm	انوزینوفیل
	۱/۲۲۲	۹/۸۳۳ ^b	۸	۵ppm	
	۰/۱۴	۰/۲۷۲۷ ^a	۱۱	شاهد	
	۰/۲۳۵	۰/۳۳۳ ^a	۹	۳ppm	
۰/۹۹۴	۰/۴۹۹	۰/۵ ^a	۸	۴ppm	بازوفیل
	۰/۲۱۰	۰/۳۳۳ ^a	۸	۵ppm	

۱- هایپوکرومی (Hypochromia): کاهش رنگ‌پذیری گلبولها در ماهیان مسموم در مقایسه با گروه شاهد که این امر نشان دهنده کاهش میزان هموگلوبین خون است.

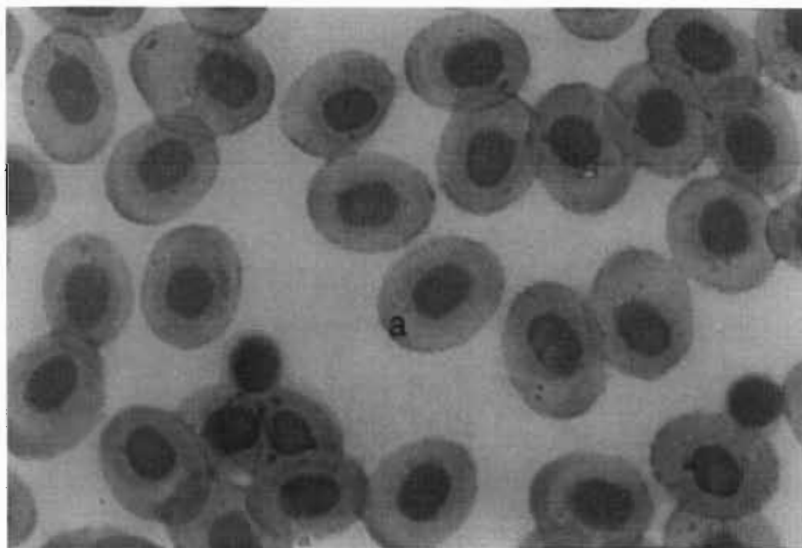
۲- پیکیلوسیتوز (Poikilocytosis): شکل گلبولها در ماهیان مسموم یکنواخت و یکدست نیست در حالی که گلبولهای گروه شاهد همگی تقریباً یک شکل و یکدست بودند. در گروه شاهد تعداد گلبولهای قرمز هسته‌دار خیلی بیشتر از تعدادی است که در مرحله پایانی عمر (در حال تجزیه شدن) قرار دارند. اما در گسترش خونی ماهیان مسموم تعداد گلبولهای قرمز هسته‌دار خیلی کاهش یافته و بیشتر گلبولهای قرمز در حال از بین رفتن

پس از تهیه گسترش خونی ماهیان گروه شاهد و گروههای آزمایشی، اشکال گلبولهای خونی این ماهیان با میکروسکوپ نوری و در بزرگنمایی ۱۰×۱۰۰ بررسی شد و تغییرات گلبولهای خونی گروههای آزمایشی نسبت به گروه شاهد بررسی گردید.

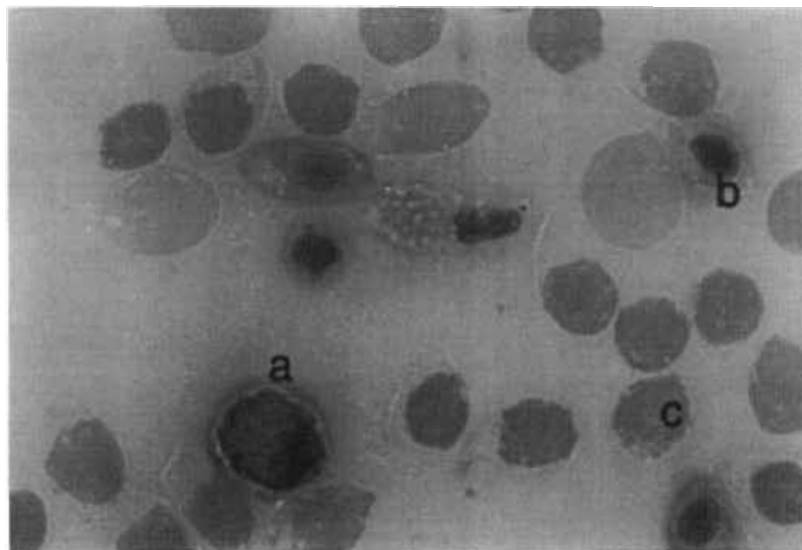
شکل ۱ گلبولهای خونی بچه فیل ماهیان گروه شاهد را نشان می دهد و شکل‌های ۲ و ۳ مربوط به خون بچه فیل ماهیانی است که در معرض سم دیازینون قرار داشتند. عوارض مشاهده شده در گسترش خونی ماهیان مسموم عبارت بود از:

شاهد نسبت هسته به سیتوپلاسم $\frac{1}{3}$ تا $\frac{1}{4}$ است. اما در گروه ماهیان در معرض سم به $\frac{1}{4}$ کاهش یافته است. در کل نتایج حاصل نشاندهنده ایجاد کم خونی در بچه ماهیان در معرض سم از نوع "میکروسیتر هیپوکروم" (Microcyterhypochrome) می باشد (شیشه ایان و سعیدی، ۱۳۷۰).

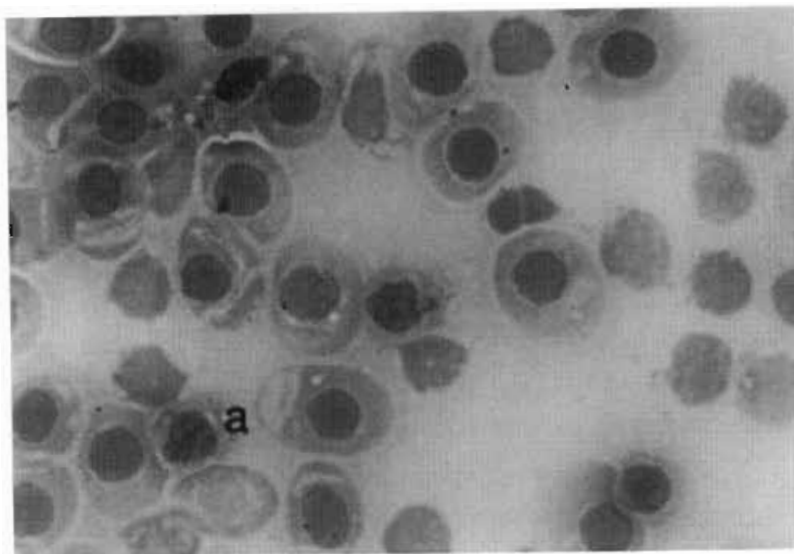
هستند.
 ۳- آنیزوسیتوز (Anisocytosis): اندازه سلولها در گروه ماهیان مسموم متغیر است ولی در گروه شاهد تقریباً همگی یکدست هستند.
 ۴- میکروسیتی (Microcyty): در گروه ماهیان مسموم اندازه هسته و کل گلبولهای قرمز کاهش یافته به طوری که در گروه



شکل ۱: گسترش خونی بچه فیل ماهیان گروه شاهد a: گلبول قرمز



شکل ۲: گسترش خونی بچه فیل ماهیان در معرض سم دیازینون
 a: گلبول سفید انوزینوفیل، b: گلبول قرمز در مرحله پیش تجزیه c: گلبول قرمز تجزیه شده



شکل ۳: گسترش خونی بچه فیل ماهیان در معرض سم دیازینون a: هسته گلبول قرمز در حال تجزیه

بحث

(Sovobodova *et al.*, 2003 و Sovboda *et al.*, 2001). نتایج بدست آمده برای LC_{50} در مدت ۹۶ ساعت آزمایشات نشان می‌دهد که میزان LC_{50} با افزایش ساعات آزمایش کاهش یافته است. بعبارت 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 می‌باشد. در نتیجه برخی از محققین معتقدند که یکی از عوامل تأثیرگذار در مسمومیت آبیان عامل زمان است. هنگامی که 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 دارد (شریف‌پور و همکاران، ۱۳۸۲). بهمنی و کاظمی، ۱۳۸۲ مقادیر برخی شاخص‌های خونی ماهیان انگشت قد فیل ماهی و قره برون و شاهسونی و همکاران، ۱۳۸۰ نیز مقادیر این شاخص‌ها را برای بچه ماهیان انگشت قد قره‌برون و ازون‌برون بررسی کردند که نتایج آنها با مقادیر بدست آمده در ارتباط با عوامل خونی بچه ماهیان شاهد قابل مقایسه و تأییدی بر درستی انجام این کار می‌باشد.

تغییرات عمده عوامل خونی فیل ماهیان در مقابل سمیت دیازینون در غلظت‌های ۳، ۴ و ۵ میلی‌گرم در لیتر را می‌توان به صورت کاهش معنی‌دار ($P < 0.05$) تعداد گلبولهای سفید و

مسمومیت‌زایی سم دیازینون در گونه فیل ماهی همراه با تأثیر آن بر رفتارها و نیز برخی عوامل خونی بچه فیل ماهیان در دمای ۲۰/۲۷ درجه سانتیگراد و سایر شرایط کیفی آب مورد مطالعه قرار گرفت. طی ۹۶ ساعت آزمایش مسمومیت‌زایی با دیازینون هیچگونه تلفاتی در ماهیان گروه شاهد مشاهده نشد. همچنین میزان اکسیژن در هر دو گروه شاهد و آزمون کاهش پیدا نکرد. براساس میزان LC_{50} ۹۶ ساعته محاسبه شده (۵/۸۲۱۰ میلی‌گرم در لیتر دیازینون) می‌توان این آفت‌کش را در گروه مواد سمی برای فیل ماهی طبقه‌بندی کرد.

این مقدار (LC_{50} ۹۶ ساعته دیازینون) برای گونه شیپ (A. *nudiventris*) ۴/۱۶ میلی‌گرم در لیتر (خوشبایور رستمی و سلطانی، ۱۳۸۱) و برای گونه چالباش (*A. guldenstadti*) ۶/۰۹ میلی‌گرم در لیتر گزارش شده است (سلطانی و خوشبایور رستمی، ۱۳۸۱). با توجه به مقادیر LC_{50} فیل ماهی، شیپ و چالباش می‌توان این طور نتیجه‌گیری نمود که مقاومت گونه چالباش < فیل ماهی < شیپ است.

رفتارها و نشانه‌های ظاهری غیرطبیعی مشاهده شده در ماهیان در معرض سمیت حاد دیازینون، مانند بی‌تابی شدید، انحنای ستون فقرات، شنای نیم دایره‌ای و تیرگی سطح بدن در ناحیه پشتی با علائم اشاره شده در سایر گزارشهای منتشر شده مشابه است (پژند و همکاران، ۱۳۸۲؛ Hoque *et al.*, 1993).

عمده در سیستم ایمنی همورال (غیر اختصاصی) موثر می‌باشد و در نتیجه می‌توان گفت که دیازینون عمدتاً موجب تضعیف سیستم ایمنی غیراختصاصی چالباش می‌شود (سلطانی و خوشباور رستمی، ۱۳۸۱).

کاهش ایمنی غیراختصاصی در ماهیان پس از مواجهه حاد با سموم ارگانوفسفره به علت کاهش تعداد گلبولهای سفید، لیمفونیا و گرانولوسیتوز در نوتروفیلها و ائوزینوفیلها می‌باشد.

تعداد زیادی از محققین لیمفوپنی و گرانولوسیتوز را از عوارض قرار گرفتن در معرض بسیاری از مواد آلاینده دانسته‌اند (Schwaiger et al., 1993؛ Wlasow et al., 1985؛ Svobodova et al., 2003).

با توجه به نظر سایر محققین (سلطانی و خوشباور رستمی، ۱۳۸۱؛ Svobodova et al., 2001) افزایش هتروفیل‌ها را در این تحقیق می‌توان بعنوان یک واکنش دفاعی از جانب بدن ماهی دانست و با توجه به کاهش تعداد کل گلبولهای سفید و همچنین کاهش درصد لنفوسیتها که در ایمنی غیراختصاصی ماهی مؤثرند می‌توان گفت که مقاومت بدنی ماهیان در معرض این سم حشره‌کش کاهش یافته است. این گونه ماهیان به آسانی به عوامل ثانویه پاتوزن مستعد و بیمار می‌شوند. این موضوع بویژه در مورد ماهیان خاویاری، به علت رهاسازی سالانه میلیونها بچه ماهی به دریا، از اهمیت خاصی برخوردار است زیرا در صورت آلودگی محلهای رهاسازی بچه ماهیان خاویاری و ایجاد مسمومیت مزمن یا تحت حاد زمینه تلفات بالای ناشی از تهاجم عوامل ثانویه فراهم می‌شود.

بنابراین با توجه به استفاده قابل توجه سم دیازینون در مزارع کشاورزی شمال کشور بخصوص استان گلستان و مجاورت این زمینها با محلهای رهاسازی بچه ماهیان خاویاری، حداقل احتمال بروز استرسهای شدید پس از در معرض قرارگیری بچه ماهیان رها شده و در نتیجه بروز تلفات ناشی از عوامل ثانویه پاتوزن وجود دارد.

تشکر و قدردانی

از زحمات و همکاریهای ریاست محترم و پرسنل کارگاه شهید مرجانی در زمان انجام تحقیق تشکر می‌گردد. همچنین از جناب آقای دکتر بهارلویی مسوول محترم آزمایشگاه لاند و کلیه کارکنان این آزمایشگاه تشکر و قدردانی می‌نمائیم.

منابع

بهمنی، م. و کاظمی، ا.، ۱۳۸۲. مطالعه برخی عوامل بیوشیمیایی و خونی در تاسماهیان پرورشی قره برون و فیصل

قرمز، میزان هموگلوبین و هماتوکریت و مقدار MCV (حجم متوسط گلبول قرمز)، MCH (وزن متوسط هموگلوبین در یک گلبول قرمز) و درصد گلبول سفید لنفوسیت و ائوزینوفیل خون این بچه ماهیان در مقایسه با شاهد ذکر کرد. همچنین افزایش معنی‌دار درصد هتروفیل‌های تیمارهای آزمایشی نسبت به تیمار شاهد مشاهده شد ($P < 0.05$). در بیشتر موارد در این آزمایش با افزایش غلظت سم، میزان کاهش عوامل خون نسبت به شاهد بیشتر بود و این موضوع تأییدکننده نتایج بدست آمده در تأثیر سوء این سم بر عوامل خونی بچه فیل ماهیان است. اما تغییر معنی‌داری در MCHC (متوسط هموگلوبین گلبولهای قرمز) و در صد گلبولهای سفید مونوسیت و بازوفیل مشاهده نشد ($P > 0.05$).

نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر همگی مؤید نتایج سایر محققین در بررسی تأثیر سموم ارگانوفسفره بر عوامل خونی ماهیان می‌باشد اما مکانیسم یا مکانیسمهای دقیق کاهش عوامل خونی فوق‌الذکر نامشخص است. تغییرات عمده همتولوژی ماهی چالباش در مقابل سم دیازینون در غلظت ۶/۰۹ میلیگرم در لیتر به صورت کاهش معنی‌دار ($P < 0.05$) تعداد گلبول قرمز، میزان هماتوکریت، هموگلوبین، مقدار MCV و MCH در مقایسه با گروه شاهد گزارش شد و دلیل احتمالی این نوع تغییرات را ناشی از تأثیر مستقیم سم بر بافتهای خون‌ساز کلیه و طحال دانسته‌اند (سلطانی و خوشباور رستمی، ۱۳۸۱).

همچنین اثر اصلی سم دلتامترین در غلظت ۰/۱۳ میلیگرم در لیتر بر عوامل خونی بچه ماهی کپور کاهش تعداد گلبولهای قرمز، هماتوکریت، هموگلوبین و پروتئین پلاسما و علت این تغییرات در عوامل خونی تخریب احتمالی بافتهای خون‌ساز گزارش شده است (Svoboda et al., 2001).

شمارش تفریقی لکوسیت ماهیان چالباش در معرض سمیت حاد دیازینون کاهش معنی‌داری در تعداد لنفوسیتها ($P < 0.05$) و افزایش معنی‌داری در تعداد نوتروفیلها ($P < 0.05$) را نشان داد. همچنین تغییراتی مشابه در گروهی از ماهیان شیب که در معرض سمیت حاد دیازینون قرار گرفته‌اند، گزارش شده است (سلطانی و خوشباور رستمی، ۱۳۸۱).

در تحقیقی دیگر کاهش میزان گلبولهای سفید، لنفوسیتها و افزایش هتروفیلها در سمیت حاد دیازینون بر کپور معمولی گزارش شد (Svoboda et al., 2001).

هتروفیلی (افزایش هتروفیلها)، می‌تواند ناشی از عمل بیگانه‌خواری سلولهای دفاعی میزبان باشد که در زمان قرار گرفتن ماهی در معرض سم تعداد هتروفیلها (بعنوان یک واکنش دفاعی) افزایش می‌یابد در حالیکه لنفوسیتهای ماهی بطور

- Opuntius gonionotus. Bangladesh Journal. Tran. Dev. Vol. 6, pp.19-26.
- OECD (Organization Economic Cooperation Development) , 2001.** Guideline for testing of chemicals. No.210. Section 2. Effect on biotic system direction. pp.1-39.
- Piri Zirkoohi, M. and Ordog, V. , 1997.** Effect of some pesticides commonly used in agriculture on aquatic food chain. Thesis for Ph.D. degree submitted to the Academy of Agricultural Sciences Godollo- Hungary. pp. 1-31.
- Schwaiger, J. ; Hoffman, R. and Negeler, R.D. , 1993.** Haematology in evaluation of experimental intoxication of fish. Ichthyohaematology, Research Institute of Fish Culture a Hydrobiology VodAany, Czech Republic. pp.155-160.
- Stoskopf, M.K. , 1993.** Fish medicine. Chapter 9: Clinical pathology. W.B. Saunders Co. pp.113-131.
- Svoboda, M. ; Lusova, V. ; Drastichova, J. and Ilabek, V. , 2001.** The effect of diazinon on hematological indices of common carp (*Cyprinus carpio*). Acta vet Brno. Vol. 10, pp.457-465.
- Svobodova, Z. ; Lusova, V. ; Drastichova, J. ; Svoboda, M. and Zlabek, V. , 2003.** Effect of deltamethrin on haematological indices of common carp (*Cyprinus carpio*). Acta vet. Brno.Vol. 72, pp.79-85.
- Wlasow, T. , 1985.** The leukocyte system in rainbow trout, *Salmo gaidneri*, affected by prolonged subacute phenol intoxication . Acta Ichthyol. Piscator. Vol. 15, pp.83-94.
- ماهی. مجله علمی شیلات ایران، سال دوازدهم، شماره ۳، پاییز، صفحات ۲۹ تا ۳۵.
- بزند، ذ.؛ سکری، م.؛ اسماعیلی ساری، ع.؛ پیروی زیر کوهی، م.، ۱۳۸۲. تعیین غلظت کشنده LC₅₀ ۹۶ ساعت سموم علفکش بوتاکلر، رستار، ریلوف - اچ و حشره کش دیازینون روی دو گونه بچه ماهی خاویاری (قره برون و ازون برون). مجله علمی شیلات ایران، سال دوازدهم، شماره ۳، پاییز، صفحات ۱۹۷.
- خاتجانی، ع. و پورمیرزا، م. ۱۳۸۰. سم شناسی. چاپ اول، دانشگاه بوعلی سینا، صفحات ۱۵۲ تا ۱۵۳ و ۱۶۲ تا ۱۶۴.
- خوشباور رستمی، ح. و سلطانی، م.، ۱۳۸۱. تاثیر سم دیازینون بر شاخص های هماتولوژیکی ماهی شیب (*A. nudiventris*) و تعیین LC₅₀ آن. خلاصه مقالات دومین همایش ملی ماهیان خاویاری. صفحات ۴۷ تا ۴۵.
- سلطانی، م. و خوشباور رستمی، ح.، ۱۳۸۱. مطالعه اثر سم دیازینون بر شاخص های خونی و بیوشیمیایی تاسماهی روسی (چلباش). مجله علوم دریایی ایران، شماره چهارم، صفحات ۶۵ تا ۷۵.
- شاهسونی، د.؛ وثوقی، غ. و خضرائی نیا، پ.، ۱۳۸۰. تعیین برخی شاخص های خونی ماهیان خاویاری انگشت قد (قره برون و ازون برون) در استان گیلان. مجله پژوهش و سازندگی، شماره ۵۰، صفحات ۱۴ تا ۱۸.
- شریف پور، ع.؛ سلطانی، م. و جوادی، م.، ۱۳۸۲. تعیین LC₅₀ و ضایعات بافتی ناشی از سم آندوسولفان در بچه فیل ماهی (*Huso huso*). مجله علمی شیلات ایران، سال دوازدهم، شماره ۴، زمستان، صفحات ۶۹ تا ۸۴.
- شیشه ایان، ب و سعیدی، ف.، ۱۳۷۰. خون شناسی پزشکی. صفحات ۸۹ تا ۱۱۵.
- Alyakrinskyay, I.O. and Dolgora, S.N.U. , 1984.** Haematological features of young sturgeons. Journal of Ichthyolog. Vol. 24, No. 3, pp.135-139.
- Finney, D. , 1971.** Probite analysis. Cambridge University. pp.1-33, Chem, pp.465-489.
- Gangolli, E.D. , 1999.** The dictionary of toxic substances and their effects. Second Edition. Royal Society of Chemistry, Cambridge, Vol. 3, pp.351-354.
- Hoque, M.M. ; Mirja, M.J.A. and Miah, M. , 1993.** Toxicity of Diazinon and Sumithion on

The determination of LC₅₀ of diazinon and it's sub-letal effect on haematological indices of beluga (*Huso huso*)

Shamloofar M.^{(1)*} ; Kamali A.⁽²⁾ ; Piri M.⁽³⁾ ; Yaghmaie F.⁽⁴⁾ and Makhtoomi N.⁽⁵⁾

shamloofar@yahoo.com

1- Department of Fisheries, Islamic Azad University of Azadshahr, P.O.Box: 30 Azarshahr, Iran

2,4- University of Agricultural and Natural Resources, P.O.Box: 49165-386 Gorgan, Iran

3- Inland Water Aquatic Stocks Research Center, P.O.Box: 139 Gorgan, Iran

5- Shahid Marjani Sturgeon Fish Breeding and Cultivation, ZipCod: 49315115 Rash, Iran

Received: November 2005

Accepted: September 2006

Keywords: Beluga, *Huso huso*, Diazinon, Hematological indices

Abstract

The acute toxicity and effects of diazinon on some hematological indices of Beluga (*Huso huso*) juveniles weighting 4.3 ± 0.12 grams was assessed following the O.E.C.D. direction in a static temperature in the range $20.27 \pm 2.05^\circ\text{C}$. The 96h LC₅₀ value of diazinon for beluga juveniles was 5.821. Also, the maximum allowable concentration of diazinon in natural waters for beluga was determined to be 0.5821mg.l^{-1} . Based on the toxicity table of insecticides, diazinon was listed as toxic for beluga. The clinical symptoms that were observed in this study consisted of lordosis and neural paralytic syndrome in fish exposed to the pesticide. Some abnormal reactions such as losing the balance when swimming and swimming in a half circle; expressive pigmentation mainly on the dorsal part were seen in the juveniles.

Examination of hematological indices was performed on control and experimental specimens of beluga weighting 16.08 grams on average that were treated with 96h exposure to diazinon in a concentration lower than LC₅₀ 96h. The experimental group of beluga showed significantly lower value ($P < 0.05$) of erythrocyte (RBC) and leukocyte count, hemoglobin content (Hb), and haematocrite (PCV), MCV, MCH and relative lymphocyte and eosinophil counts compared to the control group. In comparison, the relative heterophil count in the juveniles of the experimental group was significantly higher than the control group. By observing a decrease in the amount of leukocyte profile specially lymphocytes which are important in non-specific immunity of the fish, it can be said that diazinon may cause a decrease in the non-specific immunity of beluga.

* Corresponding author