بررسی پارامترهای هماتولوژی ماهی کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) در معرض غلظت‌های تحت کشنده علف‌کش رانداپ

حامد غفاری فارسانی[۱]، قاسم رشیدیان*[۲]، سعید شهبازی ناصرآباد[۳]، مهدی نادری فارسانی[۴]، سید علی اکبر هدایتی[۵]

[۱]باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

[۲]باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد خرم آباد، خرم آباد، ایران.

[۳]باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد یاسوج، یاسوج، ایران.

[۴]باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ارومیه، ارومیه، ایران.

[۵]گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

*نویسنده مسئول: ghasemrashidiyan@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۶/۳/۱ تاریخ پذیرش: ۹۶/۶/۲۳

چکیده

ماهیان به طیف گسترده‌ای از مواد شیمیایی از جمله علف‌کش‌ها بسیار حساس می‌باشند، این آلاینده‌ها ممکن است نه تنها از طریق تخلیه عمدی به آبراهه‌ها، باعث آلودگی منابع آبی شده، بلکه از طریق سم پاشی مزارع در شیوه‌های کشاورزی مرسوم نیز اکوسیستم‌های آبی و موجودات زنده آن را به مخاطره بیندازد. رانداپ از سموم علف‌کش بسیار پرکاربرد در مزارع زراعی و به خصوص در شمال کشور می‌باشد. در تحقیق حاضر تأثیر سمیت تحت کشنده رانداپ بر شاخص‌های خونی ماهی فیتوفاگ مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور ابتدا با تعیین دامنه‌ای از غلظت‌های سم رانداپ به‌منظور تعیین LC_{50} تلفات ماهیان کپور نقره‌ای در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ بررسی و سمیت نیمه کشنده آن با روش پروبیت آنالیز ۹/۹ میلی‌گرم بر لیتر به‌دست آمد. سپس با توجه به میزان LC_{50} آزمایش جداگانه‌ای طراحی شد که در آن ماهیان کپور نقره‌ای را در ۴ تیمار با ۳ تکرار گروه شاهد و ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ درصد (LC_{50} 96h) در دو دوره ۴ و ۸ روزه در معرض این علف‌کش قرار داده و پس از خونگیری پارامترهای هماتولوژی نظیر هماتوکریت، هموگلوبین، شاخص‌های گلبول قرمز، تعداد کل گلبول‌های سفید و قرمز و شمارش افتراقی گلبول‌های سفید مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از بررسی هماتولوژی ماهیان در معرض سم رانداپ، کاهش معنی‌دار گلبول قرمز، گلبول‌های سفید، درصد هماتوکریت و هموگلوبین و همچنین افزایش میزان نوتروفیل را با افزایش میزان غلظت سم نشان داد. بنابراین می‌توان گفت که استفاده از خون و بررسی هماتولوژیکی ماهی فیتوفاگ در برابر سم رانداپ، ابزار مناسبی جهت بررسی مسمومیت در ماهی می‌باشد.

واژگان کلیدی: آلودگی، بیومارکر، علف‌کش، گلایفوزیت، کپور نقره‌ای، هماتولوژی.

مقدمه

استفاده از علف‌کش‌ها در بخش کشاورزی می‌تواند منجر به‌حضور آن‌ها در ماتریس‌های محیطی مختلف از جمله محیط‌های آبی گردد، غالباً پس از مصرف این ترکیبات در مزارع و شالیزارها، از طریق شستشوی خاک در اثر بارش باران و نیز نشت زهاب کشاورزی، به منابع آب شیرین به ویژه رودخانه‌ها، راه پیدا می‌نمایند (Konstantinou *et al*., 2006; Borggaard and Gimsing, 2008). به‌طور کلی می‌توان گفت آفت‌کش‌ها مدت زیادی است که بقای اکوسیستم‌های مهم را از طریق اختلال در روابط اکولوژیکی بین ارگانیسم‌ها و کاهش تنوع زیستی مورد تهدید قرار می‌دهند (Frank, 1990; Kolpin *et al*., 2006). هر چند استفاده از آفت‌کش‌ها در صنعت کشاورزی ضروری و دارای اهمیت اقتصادی می‌باشند (Saeed *et al*., 2005)، با این وجود این ترکیبات شیمیایی برای فون و فلور آبی و نهایتاً انسان خطرناک است چرا که این سموم می‌توانند از طریق تغذیه انسان از تولیدات آبی، برای انسان مشکل‌ساز شوند (Mellanby, 1967).

گلایفوزیت، علف‌کشی غیرانتخابی، سیستمیک با فرمول شیمیایی *N-(Phosphonomethyl)glycine*

از گروه اسید فسفونیک (نمک ایزوپروپیل آمین) است که به‌صورت پس‌رویشی برای کنترل کلیه گیاهان هرز (نازک برگ و پهن برگ) یکساله و چندساله در باغات و زمین‌های زراعی و غیر زراعی (اکوسیستم‌های آبی برای مبارزه با علف‌های هرز آبزی) به‌صورت مایع قابل حل در آب (۴۱ درصد ماده موثره) فرموله می‌شود (Giesy *et al*., 2000; Kreutz *et al*., 2011; Moreno *et al*., 2014). امروز، انواع متنوعی از علف‌کش گلایفوزیت فرموله شده مانند رانداپ (Roundup) در بیش از ۱۰۰ کشور دنیا ثبت شده و تحت نام‌های تجاری مختلف در دسترس هستند (Moreno *et al*., 2014). در ایران نیز گلایفوزیت با نام تجاری رانداپ از پر مصرف‌ترین سموم علف‌کش می‌باشد. گلایفوزیت توسط آژانس حفاظت محیط زیست ایالت متحده آمریکا (USEPA) از لحاظ سمیت در کلاس II (سمیت متوسط) علف‌کش‌ها دسته‌بندی گردیده است (Veeraiah *et al*., 2015)، همچنین نوع فرموله شده تجاری گلایفوزیت، سمیت بیشتری نسبت به نوع فنی آن دارد (Peixoto, 2005).

ماهیان از مهمترین موجودات آبزی می‌باشند که به علت ارزش اقتصادی و حساسیت در برابر آلاینده-ها، از اهمیت خاصی برخوردار بوده و به‌همین دلیل جهت انجام آزمایشات زیست‌سنجی در بُعد وسیعی از آن‌ها استفاده می‌گردد (Smith and Stratton, 1986; Dutta and Meijer, 2003). محیط زیست ماهیان و نیز شرایط حاکم بر آن (نظیر آلودگی) بر مقادیر سلول‌های خونی تاثیر می‌گذارد. با توجه به این‌که پارامترهای خونی شرایط نامطلوب محیطی را برای ماهیان سریع‌تر از پارامترهای دیگر نشان می-دهند و می‌توانند اطلاعات ارزشمندی را در رابطه با حد تحمل جانوران در برابر فاکتورهای استرس‌زا ارائه دهند تا حد زیادی برای تعیین وضعیت سلامت و نظارت بر پاسخ‌های استرسی ماهیان برای پیش‌بینی سازگاری‌های فیزیولوژیکی آن‌ها استفاده می‌شود (Cataldi *et al*., 1998; Atamanalp and Yanik, 2003; Lasheidani *et al*., 2008). خون یک بازتابنده پاتوفیزیولوژیک از کل بدن بوده و در نتیجه پارامترهای خونی در تشخیص وضعیت ساختاری و عملکردی ماهیان قرار گرفته در معرض سموم مهم هستند (Adams, 2002).

مطالعات و متون مرتبط با بررسی‌های سم‌شناسی و اکوتوکسیکولوژی سم گلایفوزیت، بسیار پراکنده بوده (Neskovic *et al*., 1996) و همچنین اطلاعات محدودی از خصوصیات سمی علف‌کش تجاری گلایفوزیت، برای ماهیان در دسترس می‌باشد (Salbego *et al*., 2010). گلایفوزیت اثرات بسیار مهم و غیرقابل جبرانی بر اکوسیستم‌های آبی و ارگانیزم‌های آن دارد (USDA, 1984) و از طرف دیگر، این آفت‌کش‌ها، قادرند از طریق انباشتگی زیستی و زنجیره‌های غذایی به انسان منتقل گردند بنابراین بررسی اثرات کشنده و تحت کشنده این سموم بر گونه‌های مهم و اقتصادی ضروری به نظر می‌رسد. با توجه به این نکته که علف‌کش رانداپ یکی از سموم بسیار پرکاربرد در ایران و به‌خصوص در مناطقی شمالی بوده (Montazeri *et al*., 2012) و نیز این سم در فصول مختلف برای مبارزه با علف‌های هرز (شالیزارها، باغات، مزارع) استفاده شده و در نتیجه رودخانه‌ها در تمام طول این مدت این آلاینده را دریافت کرده و نسبت به آن آلوده می‌شوند و همچنین با توجه به اهمیت بسیار زیاد ماهی فیتوفاگ به‌عنوان یک گونه با ارزش اقتصادی و خوراکی، از این‌رو این پژوهش به بررسی تعیین بیومارکر مناسب برای سمیت گلایفوزیت و ماهی فیتوفاگ در برابر این آلاینده می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

به منظور انجام این پژوهش، سم گلایفوزیت (رانداپ ۴۱ درصد ماده موثره) از شرکت اکسیر کشاورزی و نیز تعداد ۳۵۰ عدد ماهی کپور نقره‌ای (با احتساب

تلفات احتمالی و نیز همچنین انجام پیش آزمایشات به‌منظور دستیابی به غلظت‌های کشنده و انجام آزمایش اصلی) با وزن متوسط ۸/۷±۹۰ گرم از یکی از مزارع خصوصی پرورش ماهیان گرمابی در شهرستان گرگان خریداری شد. سپس ماهیان توسط تانک‌های مجهز به هواده به کارگاهی خصوصی در شهر گرگان منتقل و به‌منظور گذراندن دوره سازگاری به‌مدت ۱۰ روز در مخزن‌های ۲۰۰ لیتری نگهداری شدند. در تمام طول این مدت و همچنین در زمان انجام آزمایش اصلی شرایط فیزیکوشیمیایی آب (O_2، pH، دما و سختی کل به ترتیب برابر ppm ۷/۵-۷، ۷/۹-۷، ۱±۲۴ و۲۱۰ میلی‌گرم بر لیتر ($CaCO_3$) در فواصل زمانی مشخص هر ۸ ساعت یکبار کنترل و ثابت نگه داشته شد. آب تانک‌ها به‌طور مداوم هوادهی و روزانه ۷۰ درصد تعویض آب صورت می‌گرفت.

جهت تعیین LC_{50}، ماهیان ابتدا در معرض غلظت‌های ۱، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰ و ۳۵ میلی‌گرم بر لیتر سم رانداپ و نیز یک گروه شاهد (بدون تزریق سم) قرار گرفتند و سپس تلفات آن‌ها تا ۹۶ (در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶) ساعت ثبت گردید. برای هر غلظت سه آکواریوم ۱۲۰ لیتری به‌عنوان تکرار در نظر گرفته شد و در هر آکواریوم ۷ ماهی قرار داده شد. در واقع آزمایش تعیین سمیت حاد به منظور تعیین LC_{50} 96-h به‌طور ساکن و بر اساس روش استاندارد شماره ۲۰۳ O.E.C.D (۱۹۸۹) صورت گرفت. در نهایت براساس روش آنالیز آماری پروبیت، مقادیر LC_1، LC_{10} LC_{30}، LC_{50}، LC_{70}، LC_{90} و LC_{90} در ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت به‌طور جداگانه محاسبه شد.

پس از تعیین LC_{50} 96-h و با استناد به آن، برای انجام آزمایش اصلی (بررسی پارامترهای خونی)، ماهیان در ۳ گروه تیماری براساس غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ درصد از LC_{50} 96-h سم رانداپ (Lasheidani *et al*., 2008) و نیز یک گروه شاهد (هر کدام با سه تکرار) قرار گرفتند. سپس در دو دوره زمانی و پس از گذشت ۴ و ۸ روز از زمان در معرض قرارگیری سم رانداپ، ماهیان به آرامی به‌وسیله یک تور دستی صید شده و به‌منظور خون‌گیری، بلافاصله در داخل تشت‌های پلاستیکی محتوی آب همسان با آکواریوم حاوی هر ماهی دارای ماده بیهوش‌کننده گل‌میخک (۲۰۰ ppm)، بیهوش شدند (Hedayati *et al*., 2013).

پس از بیهوشی، خون‌گیری با استفاده از سرنگ و سرسوزن شماره ۲۱ هپارینه شده از ورید ساقه دمی صورت گرفت و نمونه خون جهت بررسی و شمارش پارامترهای هماتولوژیک به‌میزان ۱/۵ سی‌سی در شیشه‌های حاوی هپارین ریخته شده (Ruane *et al*., 2001) و به‌مدت ۵ دقیقه جهت جلوگیری از لخته شدن تکان داده شده و سپس در مجاورت یخ نگهداری شدند. شمارش گلبول‌های سفید و قرمز به روش هماسیتومتری، اندازه‌گیری هموگلوبین به روش سیان مت هموگلوبین، سنجش هماتوکریت بر حسب درصد به روش میکرو هماتوکریت، تشخیص تفریقی گلبول‌های سفید بر اساس تهیه گسترش خون و رنگ‌آمیزی با گیسما و سنجش شاخص‌های گلبولی (MCV, MCHC, MCH) بر اساس دستورالعمل و فرمول‌های استاندارد صورت گرفت (Jain, 1986; Ruane *et al*., 2001).

در نهایت جهت مقایسه اثر سموم مورد آزمایش بر میانگین شاخص‌های خونی ماهی کپور نقره‌ای، ابتدا داده‌ها از نظر توزیع نرمال بررسی و سپس داده-ها توسط تحلیل یک‌طرفه واریانس و آزمون دانکن در نرم افزارSPSS v.21 تجزیه و تحلیل شدند. P=۰/۰۵ به‌عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد. داده‌ها به صورت میانگین تیمار ± انحراف معیار ارائه شدند.

نتایج

بررسی نتایج حاصل از تعیین غلظت کشنده سم رانداپ با استفاده از آنالیز پروبیت، بر روی کپور نقره-

جدول ۱- میزان تلفات ماهی کپور نقره‌ای تحت تأثیر سم رانداپ.

غلظت (پی پی ام)	تعداد مرگ و میر			
	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
شاهد	۰	۰	۰	۰
۱	۰	۰	۰	۰
۵	۰	۰	۰	۰
۱۰	۰	۱	۳	۵
۱۵	۰	۳	۵	۶
۲۰	۴	۶	۶	۷
۳۰	۷	۷	۷	۷
۳۵	۷	۷	۷	۷

جدول ۲- غلظت ۱ ،۱۰، ۳۰، ۵۰، ۷۰، ۹۰ و ۹۹ درصد تلفات بعد از ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از مجاورت با رانداپ در کپور نقره‌ای.

مقدار	غلظت (قسمت در میلیون)			
	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
LC_1	۱۴/۱۷-±۰/۲	۵/۲۴±۰/۰۷	۱/۱۵±۰/۰۵	۲/۲۷±۰/۰۸
LC_{10}	۱۶/۸۰±۰/۲	۹/۸۱±۰/۰۷	۶/۳۷±۰/۰۵	۵/۷۰±۰/۰۸
LC_{30}	۱۸/۷۰±۰/۲	۱۳/۱۲±۰/۰۷	۱۰/۱۶±۰/۰۵	۸/۱۸±۰/۰۸
LC_{50}	۲۰/۰۲±۰/۲	۱۵/۴۲±۰/۰۷	۱۲/۷۹±۰/۰۵	۹/۹۰±۰/۰۸
LC_{70}	۲۱/۳۴±۰/۲	۱۷/۷۱±۰/۰۷	۱۵/۴۱±۰/۰۵	۱۱/۶۳±۰/۰۸
LC_{90}	۲۳/۲۴±۰/۲	۲۱/۰۳±۰/۰۷	۱۹/۲۰±۰/۰۵	۱۴/۱۱±۰/۰۸
LC_{99}	۲۵/۸۷±۰/۲	۲۵/۶۰±۰/۰۷	۲۴/۴۳±۰/۰۵	۱۷/۵۴±۰/۰۸

ای نشان داد که با افزایش غلظت سم، درصد مرگ و میر جمعیت ماهیان در معرض افزایش نشان می‌دهد. با این حال در گروه شاهد در طول ۹۶ ساعت هیچ‌گونه مرگ و میری مشاهده نشد. همچنین با گذشت زمان در یک غلظت یکسان مرگ و میر تعداد بیشتری از ماهیان کپور نقره‌ای مشاهده شد. به‌طور مثال در غلظت ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر در ۴۸ ساعت ۳ ماهی از بین رفت و در همین غلظت در ۷۲ ساعت مرگ ۵ ماهی کپور نقره‌ای نیز مشاهده شد (جدول ۱). همچنین مقدار LC_{50} سم رانداپ در ۲۴ ساعت ۲۰/۰۲، در ۴۸ ساعت ۱۵/۴۲، در ۷۲ ساعت ۱۲/۷۹ و در ۹۶ ساعت نیز ۹/۹ میلی‌گرم بر لیتر بود (جدول ۲).

نتایج LC_{50} در مدت ۹۶ ساعت برای سم رانداپ نشان داد که میزان LC_{50} با افزایش غلظت و مدت زمان قرارگیری در برابر سم کاهش یافته (جدول ۲)، و 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 (جدول ۲).

مقایسه اندیس‌های خونی ماهیانی که در معرض غلظت‌های مختلف تحت کشنده سم رانداپ قرار گرفتند نسبت ماهیانی که در معرض این سم قرار نگرفتند (گروه شاهد)، در اغلب شاخص‌های خونی اختلاف معنی‌داری را نشان داد (جدول ۳). همچنین در پارامترهای ایمنی‌شناختی ماهی کپور نقره‌ای، بین ماهیان در معرض سم با ماهیان گروه شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (جدول ۴).

بررسی تغییرات گلبول‌های قرمز خون بین تیمارهای مختلف و در هر دو دوره آزمایشی نشان داد که بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری وجود دارد. کمترین میزان تعداد گلبول‌های قرمز ($۱/۵۴±۰/۱×۱۰^{۶}$) در روز هشتم نمونه‌برداری و در

جدول ۳- مقدار متوسط شاخص‌های خونی ماهی کپور نقره‌ای در تیمارهای مختلف سم رانداپ (میانگین±انحراف معیار).

فاکتور	زمان	گروه شاهد	غلظت ۱/۲۵ (میلی‌گرم بر لیتر)	غلظت ۲/۵ (میلی‌گرم بر لیتر)	غلظت ۵ (میلی‌گرم بر لیتر)
گلبول‌قرمز (×۱۰^۶/µl)	روز چهارم	۱/۸۹±۰/۰۱[a]	۱/۸۷±۰/۰۱[ab]	۱/۸۴±۰/۰۲[bc]	۱/۸۰±۰/۰۳[c]
	روز هشتم	۱/۹۰±۰/۰۱[a]	۱/۸۴±۰/۰۰۵[a]	۱/۸۳±۰/۰۲[a]	۱/۵۴±۰/۱[b]
هماتوکریت ٪	روز چهارم	۲۹/۶۱±۰/۰۸[a]	۲۸/۲۴±۰/۲۹[b]	۲۶/۹۳±۰/۲۲[c]	۲۵/۵±۰/۱۱[d]
	روز هشتم	۲۹/۵۹±۰/۲۶[a]	۲۷/۳۱±۰/۷۷[b]	۲۵/۳۰±۰/۲۶[c]	۲۳/۲۶±۰/۴۵[d]
هموگلوبین (g/dl)	روز چهارم	۶/۰۸±۰/۰۲[a]	۶/۰۰±۰/۱[ab]	۵/۹۷±۰/۰۵[bc]	۵/۷۸±۰/۰۷[c]
	روز هشتم	۶/۱۱±۰/۰۷[a]	۵/۸۹±۰/۱[b]	۵/۶۳±۰/۰۶[c]	۵/۰۵±۰/۱[d]
گلبول‌سفید (×۱۰^۴/µl)	روز چهارم	۷/۲۱±۰/۰۷[a]	۷/۱۹±۰/۰۶[a]	۷/۰۳±۰/۰۷[b]	۶/۶۲±۰/۰۷[c]
	روز هشتم	۷/۲۳±۰/۰۸[a]	۶/۵۳±۰/۱۴[b]	۶/۱۰±۰/۱۱[c]	۵/۴۶±۰/۳۰[d]
M.C.H.C (g/dl)	روز چهارم	۲۰/۵۴±۰/۱[a]	۲۱/۲۴±۰/۳۹[b]	۲۲/۱۶±۰/۳۶[c]	۲۲/۶۲±۰/۳۲[d]
	روز هشتم	۲۰/۶۶±۰/۱[a]	۲۱/۵۹±۰/۷۴[ab]	۲۲/۲۷±۰/۲۲[b]	۲۱/۷۴±۲/۸۱[ab]
M.C.V (fl)	روز چهارم	۱۵۶/۱۳±۱/۰۸[a]	۱۵۰/۲۸±۲/۶۰[b]	۱۴۵/۸۸±۲/۴۹[bc]	۱۴۱/۴۸±۱۳/۱۷[c]
	روز هشتم	۱۵۵/۵۱±۲/۴۷[a]	۱۴۸/۱۶±۴/۴۱[ab]	۱۳۸/۲۷±۲/۷۸[b]	۱۵۱/۹۹±۲۳/۴۱[ab]
M.C.H (pg)	روز چهارم	۳۲/۰۷±۰/۳[a]	۳۱/۹۲±۰/۷[a]	۳۲/۳۳±۰/۳[a]	۳۲/۰۲±۰/۹[a]
	روز هشتم	۳۲/۱۳±۰/۵[a]	۳۱/۹۷±۲/۶[a]	۳۰/۸۰±۰/۴[a]	۳۳/۱۲±۴/۱۲[a]

جدول ۴- مقدار متوسط شاخص‌های ایمنی‌شناسی ماهی کپور نقره‌ای در تیمارهای مختلف سم رانداپ (میانگین±انحراف معیار).

فاکتور	زمان	گروه شاهد	غلظت ۱/۲۵ (میلی‌گرم بر لیتر)	غلظت ۲/۵ (میلی‌گرم بر لیتر)	غلظت ۵ (میلی‌گرم بر لیتر)
لنفوسیت %	روز چهارم	[a]۰/۱۵±۸۴/۱۶	[b]۰/۵۵±۸۲/۵۰	[c]۰/۱۱±۷۴/۰۶	[d]۰/۶۶±۶۳/۳۳
	روز هشتم	[a]۰/۳۸±۸۴/۱۶	[b]۰/۳۷±۷۸/۳۳	[c]۰/۶۶±۶۸/۵۶	[d]۰/۱۵±۵۹/۸۶
نوتروفیل %	روز چهارم	[a]۰/۱۵±۱۵/۳۳	[b]۰/۶±۱۶/۸۶	[c]۰/۱۷±۲۲/۹۰	[d]۰/۵۵±۳۲/۶۳
	روز هشتم	[a]۰/۳۲±۱۵/۲۶	[b]۰/۱۵±۱۹/۰۳	[c]۰/۶۸±۲۷/۷۶	[d]۰/۲±۳۵/۸۰
آئوزینوفیل %	روز چهارم	[a]۰/۱±۰/۵۰	[b]۰/۰۵±۰/۶۳	[c]۰/۵±۱/۹۶	[d]۰/۰۵±۲/۸۰
	روز هشتم	[a]۰/۰۶±۰/۵۷	[b]۰/۱۱±۱/۵۶	[c]۰/۱±۲/۶۰	[d]۰/۱±۳/۱
مونوسیت %	روز چهارم	[a]۰/۰±۰/۰	[a]۰/۰±۰/۰	[b]۰/۰۵±۱/۰۶	[b]۰/۱۵±۱/۱۶
	روز هشتم	[a]۰/۰±۰/۰	[b]۰/۱۱±۱/۰۶	[b]۰/۱۱±۱/۰۶	[b]۰/۲±۱/۲۳

تیمار با بیشترین غلظت سم (۵ میلی‌گرم بر لیتر) مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد (۱/۹۰±۰/۰۱×۱۰^۶) و سایر تیمارها داشت (P<۰/۰۵) (جدول ۳). بیشترین میزان هموگلوبین در روز چهارم و هشتم نمونه‌برداری در تیمار شاهد مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها نشان داده است، به‌طوری‌که با افزایش غلظت سم و گذشت زمان از میزان این پارامتر خونی کاسته می‌شد.

نتایج همچنین نشان داد که با افزایش غلظت سم میزان هماتوکریت به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. این نتایج نشان داد که در تیمار ۵۰٪ غلظت LC_{50} (بیشترین غلظت سم) در روز هشتم، میزان هماتوکریت خون به کمترین مقدار خود یعنی ۲۳/۲۶ درصد در خون رسیده است، این در حالی است که بیشترین مقدار این شاخص خونی در تیمار شاهد قابل مشاهده بود.

میزان گلبول‌های سفید خون (WBC) ماهی کپور نقره‌ای در معرض سم رانداپ نیز با افزایش غلظت سم کاهش معنی‌داری پیدا کرده است. بیشترین میزان WBC در خون ماهی کپور نقره‌ای در هر دو دوره نمونه‌برداری در گروه شاهد و کمترین مقدار آن نیز در تیمار با بیشترین مقدار سم مشاهده شد (جدول ۳).

تغییرات در شاخص‌های اریتروسیتی خون ماهیان نامنظم بود، با این حال تیمارهای آزمایشی اختلاف

معنی‌داری را نشان دادند. با این حال به طور مثال در میان شاخص‌های اریتروسیتی تغییرات MCV در روز چهارم معنی‌دار بود (P<۰/۰۵)، به طوری‌که با افزایش غلظت سم، میزان این شاخص کاهش یافت (جدول ۳).

نتایج شمارش تفریقی گلبول‌های سفید در معرض غلظت‌های مختلف سم رانداپ نشان داد که میزان تغییرات لنفوسیت، نوتروفیل، آئوزینوفیل و مونوسیت کاملاً معنی‌دار می‌باشد (P<۰/۰۵)، برای لنفوسیت با افزایش میزان سم در هر دو دوره نمونه-برداری، شاهد کاهش پیدا کرد و برای نوتروفیل با افزایش میزان غلظت‌های سم رانداپ، افزایش در مقدار آن مشاهده شد (جدول ۴).

بحث

در پژوهش حاضر میزان LC_{50} 96h سم رانداپ برای ماهی کپور نقره‌ای برابر ۹/۹ میلی‌گرم بر لیتر به دست آمد. Cox (۱۹۹۵) گزارش کرد که غلظت نیمه‌کشنده سم رانداپ در ۹۶ ساعت (LC_{50} 96h) برای ماهیان در محدوده ۳/۲ تا ۵۲ میلی‌گرم بر لیتر می‌باشد. پژوهش Etien و همکاران (۱۹۹۱) میزان LC_{50} 96h سم رانداپ برای ماهی تیلاپیا را ۱۳/۲۵ میلی‌گرم در لیتر گزارش کرد. همچنین این میزان برای ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) نیز ۱۰ میلی‌گرم در لیتر گزارش شده است (Liong *et al*., 1988). با این حال گزارش دیگری میزان LC_{50} 96h سم رانداپ را برای ماهی کپور معمولی ۴/۹ میلی‌گرم در لیتر و مابین ۳/۱ تا ۸/۱ در نوسان دانسته است (Neskovic *et al*., 1996). همچنین میزان غلظت نیمه‌کشنده سم رانداپ برای ماهی گامبوزیا (*Gambusia affinis*) ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر (Sun, 1987) و نیز برای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) همین میزان گزارش شده است (Mitchell *et al*., 1987). مطالعات دیگری میزان LC_{50} 96h سم رانداپ برای ماهی *Catla Catla* را ۴/۶ میلی‌گرم بر لیتر (Felix and Saradhamani, 2015)، برای ماهی *Prochilodus lineatus* ۱۳/۶۹ میلی گرم بر لیتر (Langiano and Martinez, 2008)، برای گربه‌ماهی آفریقایی (*Clarias gariepinus*) ۱/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر (Ayanda and Egbamuno, 2012) و نیز برای گربه‌ماهی نقره‌ای (*Rhamdia quelen*) ۷/۳ میلی-گرم بر لیتر (Kreutz *et al*., 2008) گزارش کرده‌اند. این تفاوت‌ها در میزان سمیت کشنده برای ماهیان مختلف و یک گونه ماهی به‌عوامل متعددی مانند وزن و سایز ماهی و همچنین فاکتورهای محیطی نظیر دما، pH، سختی کل و اکسیژن محلول بستگی دارد (Pandey *et al*., 2005).

در پژوهش حاضر تمامی پارامترهای خونی نظیر گلبول‌های سفید، گلبول‌های قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین با افزایش غلظت سم کاهش یافته و با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان دادند. مشابه چنین نتایجی در مطالعات سایر محققان (Al-Ghanim, 2012; Yonar *et al*., 2014; Shahbazi *et al*., 2015) نیز گزارش شده است.

هماتوکریت خون به عنوان یک شاخص مهم و رایج در تعیین سلامت و بیماری ماهیان مورد استفاده قرار می‌گیرد (Houston and Rupert, 1976). در پژوهش حاضر میزان هماتوکریت و هموگلوبین خون به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد کاهش یافت که علت آن متلاشی شدن گلبول‌های قرمز در اثر تأثیر سم بر آن‌ها بود که در نهایت باعث کم‌خونی ماهی شد (Köprücü *et al*., 2006). در واقع کاهش تعداد گلبول‌های قرمز، میزان هماتوکریت و غلظت هموگلوبین همگی از نشانه‌های کم‌خونی در برابر اثرات سم و مسمومیت ناشی از آن می‌باشد. این کم‌خونی به‌دلیل اثرات سم بر روی بافت کبد و نیز تا حدودی بافت کلیه می‌باشد (Coles, 1986; Duncan *et al*., 1994).

در پژوهش حاضر کاهش تعداد گلبول‌های سفید

گروه‌های در معرض سم نسبت به گروه شاهد مشاهده شد. نتایج یافته‌های دیگر محققان نظیر Yonar و همکاران (۲۰۱۴) نیز کاهش گلبول‌های سفید ماهی کپور معمولی در برابر سم مالاتیون را گزارش داد. با توجه به این‌که گلبول‌های سفید در کلیه ماهی ساخته می‌شوند بنابراین حضور و تجمع آلاینده در کلیه می‌تواند به این فرآیند آسیب وارد کرده و منجر به اختلال در ساخت گلبول‌های سفید شود (Ololade and Oginni, 2010).

بررسی پارامترهای خونی در دو دوره زمانی نشان داد که این پارامترها با گذشت زمان کاهش بیشتری را نشان می‌دهند، زمانی که جانور در معرض غلظت ثابتی از سم باشد، با گذشت زمان از مقاومت آن کاسته شده و سم فرصت بیشتری برای اثرگذاری دارد، در مطالعات پیشین نیز به اثر زمان بر مسمومیت ماهیان در معرض سم رانداپ (Salbego *et al*., 2010) و نیز اهمیت این عامل در دیگر مطالعات اشاره و تاکید شده است (Nahla *et al*., 2003; Modesto and Martinez, 2010; Shahbazi *et al*., 2015).

شاخص‌های لوکوسیتی خون از جمله لنفوسیت-ها، نوتروفیل‌ها، مونوسیت‌ها و ائوزینوفیل‌ها یکی از عوامل بخش‌های سیستم ایمنی سلولی هستند که نوسان در تعداد آن‌ها می‌تواند به‌عنوان یک شاخص مناسب در ارتباط با پاسخ ماهیان به عوامل استرس‌زا مطرح باشد (Stoskopf, 1993). با این حال نوتروفیل و لنفوسیت اصلی‌ترین سلول‌های خونی در مطالعات توکسیکولوژی هستند و تأثیر آلاینده‌ها بیشتر در این سلول نمایان می‌شود (Lermen *et al*., 2004). در پژوهش حاضر میزان لنفوسیت گروه-های در معرض سم، نسبت به گروه شاهد دارای کاهش معنی‌داری بود. کاهش تعداد لنفوسیت‌ها می-تواند ناشی از نقص در سیستم ایمنی بدن باشد (Bannaee *et al*., 2008). بررسی تاثیر سم رانداپ بر گربه‌ماهی نقره‌ای (*Rhamdia quelen*) کاهش لنفوسیت خون ماهیان در معرض سم را نسبت به گروه شاهد نشان داد (Kreutz *et al*., 2011).

همچنین بررسی شاخص‌های هماتولوژیک و ایمنولوژیک نشان داد که آلودگی ناشی از سم علف-کش رانداپ، تأثیرات زیادی بر عملکرد و مقدار سلول‌های خونی ماهی فیتوفاگ داشته و اکثر این شاخص‌ها، تفاوت معنی‌داری در مقادیر خود نسبت به گروه کنترل نشان دادند. بنابراین تغییرات شاخص-های هماتولوژی و ایمنی ماهی کپور نقره‌ای به خصوص هماتوکریت، هموگلوبین، گلبول‌های سفید و لنفوسیت‌ها می‌تواند به‌عنوان بیومارکرهای سنجش و ردیابی اثرات این آلاینده مورد استفاده قرار گیرد و تغییرات وسیع در فاکتورهای خونی باعث کاهش توان سیستم ایمنی و در نهایت موجب کاهش بقای ماهیان می‌گردد.

منابع

Adams S.M. 2002. Biological indicators of aquatic ecosystem stress. *American Fisheries Society* 644 p.

Al-Ghanim K.A. 2012. Acute toxicity and effects of sub-lethal Malathion exposure on biochemical and haematological parameters of *Oreochromis niloticus*. Sci Res Essays; 7(16), 1674-1680.

Atamanalp M.Y., Anik, T. 2003. Alterations in hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to mancozeb. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 27(5), 1213-1217.

Ayanda O.I. 2012. Histopathological Examination of the liver and gills of *Clarias gariepinus* treated with glyphosate. *Environmental Research Journal* 6(3), 228-34.

Bannaee M., Mirvagefei A.R., Rafei G.R., Amiri B.M. 2008. Effect of sub-lethal diazinon concentrations on blood plasma biochemistry. *International Journal of Environmental Research* 2, 189-198.

Borggaard O.K., Gimsing A.L. 2008. Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review. *Pest Management Science* 64(4), 441-56.

Cataldi E., Di Marco P., Mandich A., Cataudella S. 1998. Serum parameters of

Urban contributions of glyphosate and its degradate AMPA to streams in the United States. *Science of the Total Environment* 354(2), 191-7.

Konstantinou I.K., Hela D.G., Albanis T.A. 2006. The status of pesticide pollution in surface waters (rivers and lakes) of Greece. Part I. Review on occurrence and levels. *Environmental Pollution* 141(3), 555-70.

Köprücü S.Ş., Köprücü K., Ural M.Ş., İspir Ü., 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.

Kreutz L.C., Barcellos L.J., de Faria Valle S., de Oliveira Silva T., Anziliero D., dos Santos E.D. 2011. Altered hematological and immunological parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) following short term exposure to sublethal concentration of glyphosate. *Fish and Shellfish Immunology* 30(1), 51-7.

Kreutz L.C., Barcellos L.J., Silva T.O., Anziliero D., Martins D., Lorenson M. 2008. Acute toxicity test of agricultural pesticides on silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings. *Ciência Rural* 38(4), 1050-1055.

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

Lasheidani M.F., Balouchi S.N., Keyvan A., Jamili S., Falakrou K. 2008. Effects of butachlor on density, volume and number of abnormal sperms in caspian kutum (*Rutilus frisii kutum*, Kamenskii 1901). *Research Journal of Environmental Sciences* 2(6), 474-82.

Lermen C.L., Lappe R., Crestani M., Vieira V.P., Gioda C.R., Schetinger M.R. 2004. Effect of different temperature regimes on metabolic and blood parameters of silver catfish *Rhamdia quelen*. *Aquaculture* 239(1), 497-507.

Liong P.C., Hamzah W.P., Murugan V. 1988. Toxicity of some pesticides towards freshwater fishes. *Malaysia Agriculture* 54(3), 147-156.

Mellanby K. 1967. Pesticide and Pollution. The Fontana New Naturalist. Collins Clear-type Press, London and Glasgow. pp: 132-134.

Mitchell D.G., Chapman P.M., Long T.J. 1987. Acute toxicity of Roundup® and Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* (Pisces: Acipenseriformes): effects of temperature and stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 121(4), 351-4.

Coles E.H. 1986. Veterinary clinical pathology, 4rd ed. WB Saunders Co, Philadelphia. pp: 43-79.

Cox C. 1995. Glyphosate, part 1: toxicology. *Journal of Pesticide Reform* 15(3), 14-20.

Duncan J.R., Prasse K.W., Mahaffey E.A. 1994. Veterinary laboratory medicine: clinical pathology. Iowa State University Press. pp: 37-52.

Dutta H.M., Meijer H.J. 2003. Sublethal effects of diazinon on the structure of the testis of bluegill, *Lepomis macrochirus*: a microscopic analysis. *Environmental Pollution* 125(3), 355-60.

Etien N.D., Kaba N., Amon Kothias J.B. 1991. Glyphosate and 2, 4-D efficacious doses for the chemical control of water lettuce (*Pistia stratiotes*, Linn.) and toxicity of glyphosate against tilapias (*Sarotherodon melanotheron*). *Journal Ivoirien d'Oceanologie et de Limnologie* 1(2), 111-8.

Felix F.J., Saradhamani N. 2015. Impact of the herbicide glyphosate roundup (41%) on the haematology of the freshwater fish, *Catla Catla* (Hamilton). *Journal of Environmental Science* 9(4), 56-60.

Frank R., Braun H.E., Ripley B.D., Clegg B.S. 1990. Contamination of rural ponds with pesticide, 1971–85, Ontario, Canada. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 44(3), 401-9.

Giesy J.P., Dobson S., Solomon K.R. 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. Springer New York. 167, 35-120.

Hedayati A., Jahanbakhshi A., Ghaderi F. 2013. Aquatic Toxicology. GAU Publication. 210 p. (In Persian)

Hedayati A., Niazie E.H. 2015. Hematological changes of silver carp (*hypophthalmichthys molitrix*) in response to Diazinon pesticide. *Journal of Environmental Health Science and Engineering* 13(1), 1-5.

Houston A.H., Rupert R. 1976. Immediate response of the hemoglobin system of the goldfish, *Carassius auratus*, to temperature change. *Canadian Journal of Zoology* 54(10), 1737-41.

Jain N.C. 1986. Schalm's veterinary hematology, 4rd ed. Lea & Febiger. Philadelphia. pp: 20-80.

Kolpin D.W., Thurman E.M., Lee E.A., Meyer M.T. Furlong E.T., Glassmeyer S.T. 2006.

C.C., Lazzari R., Neto J.R. 2010. Herbicide formulation with glyphosate affects growth, acetylcholinesterase activity, and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 58(3), 740-5.

Shahbazi Naserabad S., Mirvaghefi A., Gerami M.H., Ghafari Farsani H. 2015. Acute toxicity and behavioral changes of the gold fish (*Carassius auratus*) exposed to malathion and hinosan. *Iranian Journal of Toxicology* 8(27), 1203-1208.

Shahbazi S., Moëzzi F., Poorbagher H., Rostamian N. 2015. Effects of Malathion Acute Toxicity on Behavioral and Haematological Parameters in *Capoeta damascina* (Cypriniformes: Cyprinidae). *Journal of Chemical Health Risks* 5(3), 209-220

Smith T.M. Stratton G.W. 1986. Effects of synthetic pyrethroid insecticides on nontarget organisms. InResidue reviews, Springer New York. pp: 450-453.

Stoskopf M.K. 1993. Clinical pathology of Carp, Gold fish and Koi in Fish Medicine. In: M.K. Stoskopf. Eds. W.B. Sounders Company. Philadelphia, USA. pp: 450-453.

Sun F. 1987. Evaluating acute toxicity of pesticides to aquatic organisms carp, mosquitofish and daphnids. *Plant Protection Bulletin* 29(4), 385-396.

USDA. 1984. Herbicide Background Statement: Glyphosate. In: Pesticide Background Statements. Vol 1: Herbicides USDA Forest Service, Agricultural Handbook. 633, G-1-72.

Veeraiah K., Padmaja B., Sai Ram V., Vivek C. 2015. Impact of glyphosate on biochemical constituents of the freshwater fish, *Catla catla*. *International Journal of Bioassays* 4(07), 4139-44.

Yonar S.M., Ural M.Ş., Silici S., Yonar M.E. 2014. Malathion-induced changes in the haematological profile, the immune response, and the oxidative/antioxidant status of *Cyprinus carpio*: Protective role of propolis. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 102, 202-209.

Rodeo® herbicides to rainbow trout, chinook, and coho salmon. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 39(6), 1028-35.

Modesto K.A., Martinez C.B. 2010. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* 78(3), 294-9.

Montazeri M.A., Lashidani M., Zamini A., Yousefi A., Tehranifard A. 2012. Effects of Roundup herbicide on gonad histopathological changes and GSI index of raibow trout (*Onchorhynchus mykiss*) males in two time periods in the Caspian Sea basin. *Fisheries Journal of Islamic Azad University, Azadshahr* 6(4), 51-58. (In Persian)

Moreno N.C., Sofia S.H., Martinez C.B. 2014. Genotoxic effects of the herbicide Roundup Transorb® and its active ingredient glyphosate on the fish *Prochilodus lineatus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 37(1), 448-54.

Nahla S., Abdel-Nabi I.M., Moawad T.I., Taha I.A. 2003. Physiological and behavioural responses of *Ruditapes decussatus* to roundup and reldan. *Egyptian Journal of Biology* 5, 108-19.

Neskovic N.K., Poleksić V., Elezović I., Karan V., Budimir M. 1996. Biochemical and histopathological effects of glyphosate on carp, *Cyprinus carpio* L. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 56(2), 295-302.

O.E.C.D. 1989. Guideline for testing on chemicals.O. E. C. D, Paris, 1987.

Ololade I.A., Oginni O. 2010. Toxic stress and hematological effects of nickel on African catfish, *Clarias gariepinus*, fingerlings. *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology* 2(2), 014-9.

Peixoto F. 2005. Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. Chemosphere; 61(8), 1115-1122.

Ruane N.M., Huisman E.A., Komen J. 2001. Plasma cortisol and metabolite level profiles in two isogenic strains of common carp during confinement. *Journal of Fish Biology* 59(1), 1-2.

Saeed T., Sawaya W.N., Ahmad N., Rajagopal S., Al-Omair A. 2005. Organophosphorus pesticide residues in the total diet of Kuwait. *Arabian Journal for Science and Engineering* 30(1), 17-28.

Salbego J., Pretto A., Gioda C.R., de Menezes

Study of hematological parameters of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) exposed to sublethal concentrations of Roundup herbicide

Hamed Ghafari Farsani[1], Ghasem Rashidian[*2], Saeid Shahbazi Naserabad[3], Mehdi Naderi Farsani[4], Aliakbar Hedayati[5]

[1]Young Researchers and Elite Club, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
[2]Young Researchers and Elite Club, Khorramabad Branch, Islamic Azad University, Khorramabad, Iran.
[3]Young Researchers and Elite Club, Islamic Azad University, Yasooj Branch, Yasooj, Iran.
[4]Young Researchers and Elite Club, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran.
[5]Fisheries Department, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
*Corresponding author: Ghasemrashidiyan@gmail.com
Received: 2017/5/22 Accepted: 2017/9/14

Abstract

Fish are very sensitive to a wide range of chemicals, including herbicides, which can pollute water sources not only through deliberate drainage into the waterways, but also through spraying farms in conventional farming practices which also jeopardizes aquatic ecosystems and living organisms. Roundup is a very useful herbicide in present case study was aimed to investigate the effect of its sub-lethal toxicity on blood indices of silver carp. For this purpose, first with determination of some poison concentration for LC_{50} calculation, mortality was monitored at 24, 48, 72 and 96 hours and lethal concentarion was measured 9.9 mg/l with probit analysis. Then, a separate experiment was designed according to the LC_{50} data where fish were put in 4 treatments with triplicate (control group and 12.5, 25 and 50% of LC_{50} 96h) in two periods of 4 and 8 days and after exposure to the herbicide some blood hematological parameters such as hematocrit, hemoglobin, RBC indices, RBC, WBC and differential count of white cells were studied. Results of hematological indices found a significant decrease in RBC, WBC, hematocrit and hemoglobin and also an increase in the number of neutrophils showed by increasing the concentration of the herbicide. The results of this study showed that hematological indices are a sensitive indicator and can be useful to evaluate the effect of herbicides on aquatic organisms.

Keywords: Pollution, Biomarker, Herbicide, Glyphosate, Silver Carp, Hematology.