

غلظت کشندگی (LC50 96 h) حشره کش دیازینون و اثرات آن روی پارامترهای خونی، بافت کبد و آبشش بچه‌ماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*)

مهدی رزاقی قاضیانی^{*}، جاوید ایمانپور نمین^۱، ذبیح^۱... پزند^۲

۱- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، ایران، صندوق پستی: ۱۱۴۴

۲- سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای خزر، گروه اکولوژی، رشت، ایران،

صندوق پستی: ۴۱۶۳۵-۳۴۶۴

تاریخ دریافت: ۲۸ مرداد ۱۳۹۵

تاریخ پذیرش: ۲ بهمن ۱۳۹۵

چکیده

اثر غلظت‌های مختلف سم دیازینون به منظور تعیین LC50 96h بر روی بچه‌ماهیان استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) در مرکز تکثیر و پرورش و بازسازی ذخایر ماهیان خاویاری شهید دکتر بهشتی رشت مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایش تعداد ۱۸۰ قطعه بچه‌ماهی استرلیاد با وزن $1/28 \pm 6/48$ گرم در شش تیمار و سه تکرار (پنج گروه آزمایشی و یک گروه شاهد) در مخازن فایبرگلاس به ابعاد (۷۵*۵۰*۱۵cm) رهاسازی شدند. آزمایش بصورت ساکن و به روش O.E.C.D (Organization of Economic Cooperation and Development) به مدت ۹۶ ساعت انجام گرفت. فاکتورهای فیزیوشیمیایی آب از قبیل دما، اکسیژن، pH و سختی کل در طول دوره اندازه‌گیری و ثبت شد. بچه‌ماهیان در غلظت‌های ۳، ۳/۴۱، ۳/۸۷، ۴/۴ و ۵ میلی‌گرم در لیتر قرار گرفتند و نتایج حاصل از LC₅₀، LC₁₀، LC₉₆ به روش آماری Probit Analysis به ترتیب ۲/۴۸، ۳/۵۸ و ۵/۱۷ میلی‌گرم در لیتر تعیین گردید. در بررسی هماتولوژی نیز شاخص‌های PCV، RBC و WBC در دو گروه آزمایشی و شاهد تفاوت معنی‌داری نشان دادند ($P < 0/05$). در بافت آبشش بچه‌ماهیان، ادم رشته‌های اولیه، الحاق تیغه‌های ثانویه، بالونینگ و پهن شدن و الحاق تیغه‌های ثانویه، واکوئل‌دار شدن، پوسته پوسته شدن تیغه‌های ثانویه و جدا شدن سلول‌ها، نکروز، پرخونی عمومی مشاهده شد که شدت آن در غلظت‌های ۴/۴ و ۵ میلی‌گرم در لیتر نسبت به سایرین بیش‌تر مشاهده شد. در بافت کبد نیز واکوئل‌دار شدن سلول‌های ادم، از بین رفتن غشای سیتوپلاسمی، از بین رفتن ظاهر دانه‌دار سیتوپلاسم، پیکنوزه شدن هسته سلول‌ها، کاریورکسیس، کاریولیز، نکروز و تجزیه کامل غشای سلول‌های کبدی مشاهده گردید که عارضه در غلظت ۴/۴ و ۵ میلی‌گرم در لیتر نسبت به سایرین بیش‌تر بود.

کلمات کلیدی: دیازینون، LC50، سمیت حاد، ماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*).

مقدمه

دیزاینون از گروه آفت کش ارگانوفسفره با پایداری متوسط است که به طور گسترده در کشاورزی استفاده می گردد و مانند دیگر آفت کش ها می تواند منجر به بروز اختلال در وضعیت فیزیولوژیکی گردد (Banaee *et al.*, 2011). با توجه به تاثیر آفت کش ها در ماهی ها، نخستین هدف مطالعات اکوتوکسیکولوژی بدست آوردن نشانگر زیستی مناسب برای بررسی این تاثیرات است. مطالعات نشان می دهند که حداکثر ۱۰٪ از آفت کش های استفاده شده صرف از بین بردن آفات شده و مقادیر قابل توجهی از آن ها وارد محیط زیست گردیده و منابع آبی و خاکی را آلوده می کنند (Yaung and Baumann, 2006). براساس گزارشات آژانس حفاظت زیستی (Environmental Protection Agency) عوامل متعددی می توانند سمیت دیزاینون را تشدید کنند که از جمله آن ها می توان به دما و رطوبت پایین همراه با قلیائیت بالا و فقدان شرایط میکروبیولوژیکی مناسب اشاره کرد، از نظر بیولوژیکی این سم می تواند به مدت ۱۴ روز یا بیش تر در آب باقی بماند (Eisler, 1986). ماهیان بعلت ارزش اقتصادی و حساسیت در برابر آلاینده ها از اهمیت خاصی برخوردار بوده و به همین دلیل در آزمایشات زیست سنجی در بعد وسیعی از آن ها استفاده می گردد. تحمل غلظت سم دیزاینون برای گونه های مختلف ماهی، متفاوت می باشد. مقادیر LC50 96h از چند دهم میلی گرم بر لیتر تا چندین میلی گرم بر لیتر در نوسان می باشد (Tsuda *et al.*, 1996; Keizer *et al.*, 1991).

استرلیاد یکی از گونه های با ارزش تاسماهیان و بومی آب های شیرین می باشد که در سراسر بخش های شمالی دریای خزر، اروپا و سیریری پراکنده شده است.

این ماهی در رودخانه های حوزه دریای خزر، دریای سیاه، بالتیک، آزوف، سفید، بارتس و کارا زندگی می کند. استرلیاد کوچک ترین گونه از این تاسماهیان بوده و دوره زندگی کوتاهی دارد. کوچک بودن اندازه نسبت به سایر گونه های خاویاری و دوره باروری کوتاه و تولید دوره های استرلیاد و بلوگاه (بستر) و همچنین سهولت پرورش، از مزیت های این گونه برای پرورش و تولید خاویار در مقایسه با سایر تاسماهیان می باشد. نظر به اهمیت اقتصادی ماهیان خاویاری و از جمله استرلیاد و احتمال انقراض نسل این گونه ماهیان در حوزه دریای خزر، و از جمله تکثیر و پرورش این گونه در مرکز تکثیر و پرورش و بازسازی ذخایر ماهیان خاویاری شهید دکتر بهشتی با استفاده از آب رودخانه سفیدرود انجام می گیرد و به دلیل ورود پساب کشاورزی که حاوی سم دیزاینون نیز است (گزارش شرکت آب منطقه ای ۱۳۸۸)، سبب شد تا این تحقیق با هدف تعیین غلظت کشندگی (LC50) سم دیزاینون بر روی بچه ماهی استرلیاد و نیز بررسی پارامترهای بافت شناسی پس از مقابله با سم و مقایسه مقاومت استرلیاد با سایر گونه های تاسماهیان انجام گیرد.

مواد و روش ها

تعداد ۱۸۰ قطعه بچه ماهی استرلیاد با میانگین وزنی $1/28 \pm 6/48$ گرم در مرکز تکثیر و پرورش و بازسازی ذخایر ماهیان خاویاری شهید دکتر بهشتی رشت مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایش از ۱۸ عدد مخزن فایبرگلاس با ابعاد (۷۵×۵۰×۱۵ cm) استفاده شد. به منظور انجام بررسی، هر مخزن با ۴۰ لیتر آب چاه آبگیری شده و تعداد ۱۰ قطعه بچه ماهی در آن قرار داده شد. آزمایش با ۵ تیمار و یک شاهد و هر کدام با

خون، سرم خون جداسازی و مقادیر گلوکز و پروتئین کل اندازه گیری شد. آنالیز آماری با آنالیز واریانس یک طرفه Anova و آزمون دانکن با استفاده از نرم افزار SPSS ۱۸ انجام شد و برای رسم نمودار از نرم افزار Excel ۲۰۱۳ استفاده گردید.

به منظور بررسی هیستوپاتولوژیک اثرات سم دیازینون در پایان دوره ۹۶ ساعت تعداد دو قطعه بچه ماهی از هر تکرار مورد آزمایش به طور تصادفی انتخاب شدند. بافت کبد و آبشش بچه ماهیان استرلیاد جهت این بررسی جدا سازی شده و در ظرف حاوی فرمالین ۱۰٪ قرار داده شد. نمونه های بافتی در آزمایشگاه طی فرآیند عمل آوری، بوسیله دستگاه میکروتوم برش و سپس با همتوکسین و ائوزین رنگ آمیزی شدند و سپس به وسیله میکروسکوپ نوری مجهز به مانیتور و دوربین عکاسی و فیلمبرداری مورد بررسی قرار گرفتند. در طول دوره آزمایش دما، اکسیژن، pH و سختی کل اندازه گیری شدند.

نتایج

محدوده کشندگی حشره کش دیازینون بر روی بچه ماهیان ۸-۵ گرمی پس از آزمایش اولیه ۳-۵ میلی گرم در لیتر تعیین گردید. بر اساس روش آماری Probit Analysis مقادیر LC_{10} ، LC_{50} ، LC_{90} سم فوق در ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ اندازه گیری شد و مقدار غلظت مجاز (LC_{50} 96h) برای بچه ماهیان استرلیاد ۳/۵۸ میلی گرم در لیتر تعیین گردید (جدول های ۱ و ۲).

۳ تکرار انجام شد. سم دیازینون مورد استفاده از نوع امولسیون ۶۰٪ و با فرمول $isopropyl-6-o,o-methylprimidin-4-yl\ phosphorothioate$ -2-diethyl o بوده و آزمایش سمیت حاد بر اساس O.E.C.D انجام گردید (O.E.C.D, 1989). برای تعیین (LC_{50} 96h) تعداد ۱۲ مخزن آبیگری و به مدت ۴۸ ساعت هوادهی شدند. سپس بچه ماهیان به مخازن انتقال داده شدند تا به محیط جدید سازگار شوند. ابتدا چهار آزمایش اولیه (پایلوت) با غلظت های مختلف بر روی بچه ماهیان استرلیاد انجام گردید و غلظت کشندگی در محدوده ۵-۳ میلی گرم در لیتر بدست آمد. مخازن ها پس از شستشوی کامل مجدداً آبیگری شده و پس از هوادهی به مدت ۲۴ ساعت، به استثنای مخازن شاهد که هیچگونه سمی اضافه نگردید، در سایر مخازن آزمایشی غلظت های ۳، ۳/۴۱، ۳/۸۷، ۴/۴ و ۵ میلی گرم در لیتر سم دیازینون اضافه شد. میزان LC_{50} بر اساس روش آماری Probit Analysis انجام گردید. رفتار بچه ماهیان در طول دوره، مورد بررسی قرار گرفت و بچه ماهیان تلف شده نیز جمع آوری گردیدند. به منظور بررسی های خون شناسی و بیوشیمیایی خون، در پایان دوره ۹۶ ساعته از هر تیمار بصورت تصادفی تعداد ۳ قطعه بچه ماهی گرفته شده و از ناحیه ساقه دمی آن ها خون گیری بعمل آمد. نمونه های خون درون لوله های اپندروف هپارینه ریخته شده و همزمان گسترش خونی نیز داده شد. میزان اریتروسیت، لکوسیت، همتوکریت، هموگلوبین و تعداد لکوسیت افتراقی (لنفوسیت، نوتروفیل، منوسیت) تعیین گردید. در مطالعه بیوشیمیایی

جدول ۱: مقایسه اثر تیمارهای مختلف دیازینون روی مرگ و میر بچه‌ماهیان ۵-۳ گرمی استرلیاد (میانگین سه تکرار) در طی ۹۶ ساعت

تیمار	دیازینون (ppm)	غلظت																لگاریتم	Probit value																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
		۲۴ساعت				۴۸ساعت				۷۲ساعت				۹۶ساعت						تغییرات نسبت به شاهد(ساعت) غلظت ذرات معلق																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
		مرده	زنده	مرده	زنده	مرده	زنده	مرده	زنده	مرده	زنده	مرده	زنده	۲۴	۴۸	۷۲	۹۶																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
شاهد	۰	۰	۱۰	۱۰	۰	۱۰	۰	۱۰	۰	۱۰	۰	۱۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	

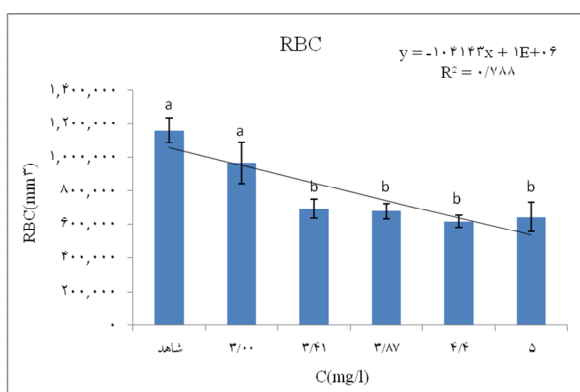
جدول ۲: تعیین غلظت‌های کشنده دیازینون در طی ۹۶ ساعت بر روی بچه‌ماهی استرلیاد

LC	زمان			
	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
۱۰	۴/۳۰	۳/۲۰	۲/۵۸	۲/۴۸
۵۰	۵/۲۱	۴/۴۳	۳/۹۵	۳/۵۸
۹۰	۶/۳۱	۶/۱۴	۶/۱۲	۵/۱۷

شکل ۱: میزان لکوسیت ماهی *Acipenser ruthenus*

قرار گرفته در معرض دیازینون نمودار براساس $\text{mean} \pm \text{SE}$

است



شکل ۲: میزان اریتروسیت ماهی *Acipenser ruthenus*

قرار گرفته در معرض دیازینون نمودار براساس $\text{mean} \pm \text{SE}$

است

نتایج پروفیل خونی در هر دو گروه شاهد و آزمون

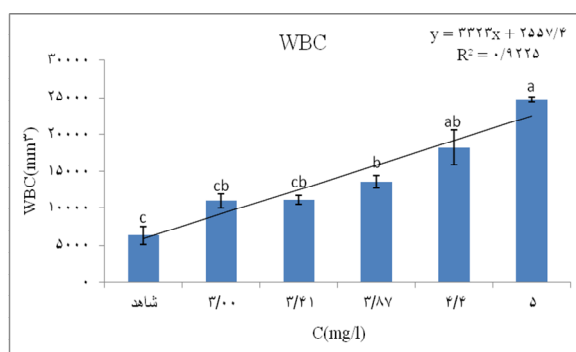
بچه‌ماهیان استرلیاد در شکل‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ آورده شده

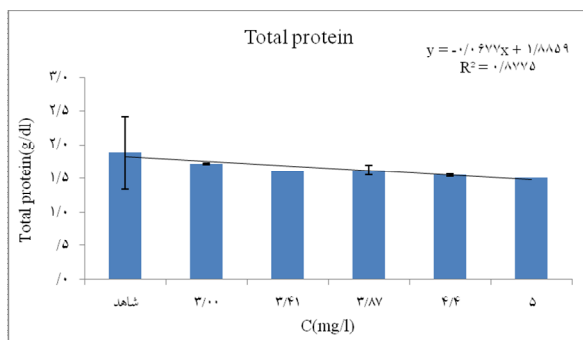
است. میزان لکوسیت، اریتروسیت، و هماتوکریت

کاهش معنی‌داری نشان دادند ($P < 0.05$). مقادیر

هموگلوبین در دو گروه آزمون و شاهد دارای اختلاف

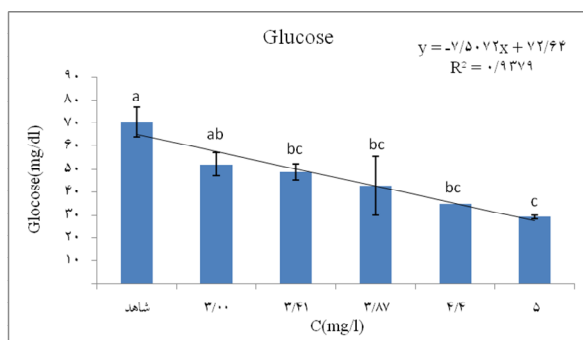
معنی‌دار نمی‌باشد.





شکل ۵: میزان پروتئین کل *Acipenser ruthenus*

قرار گرفته در معرض دیازینون نمودار براساس $\text{mean} \pm \text{SE}$ است



شکل ۶: میزان گلوکز ماهی *Acipenser ruthenus*

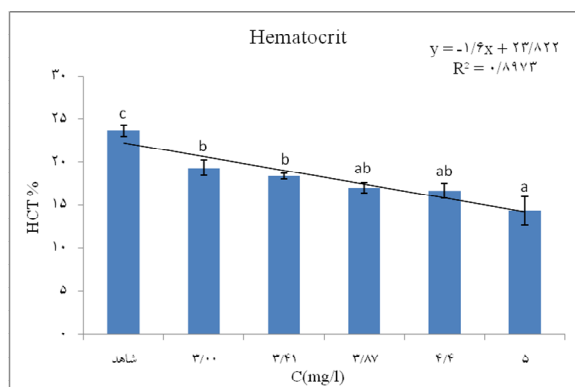
قرار گرفته در معرض دیازینون. نمودار براساس $\text{mean} \pm \text{SE}$ است

مطالعه آسیب شناسی کبد استرلیاد

بطور کلی در تیمارهای مورد آزمون عوارضی همچون واکوئل دار شدن سلولهای ادم، از بین رفتن غشای سیتوپلاسمی، از دست دادن ظاهر دانه دار سیتوپلاسم، پیکنوزه شدن هسته سلولها، کاریورکسیس، کاریولیز و تجزیه کامل غشای سلولهای کبدی مشاهده گردید که شدت عارضه در غلظت های ۴/۴ و ۵ میلی گرم در لیتر نسبت به سایرین بیش تر می باشد (شکل های ۸-۱۳).

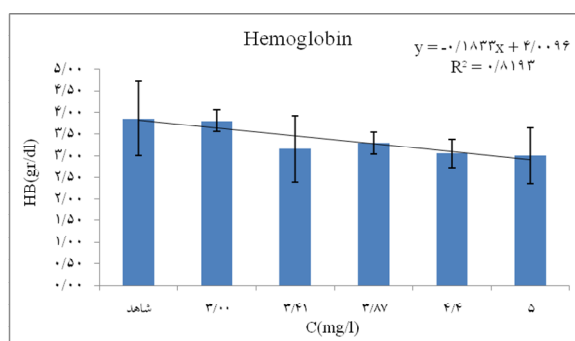
بررسی علائم بالینی

در بررسی علائم بالینی پس از ۹۶ ساعت، انحنای ستون فقرات (فلج عصبی)، قرمزی روی سطح زیرین بدن و آبشش، شای چرخشی، باز و بست سریع آبشش ها و وجود مخاط روی سطح بدن و خوابیدن به پشت و در نهایت تلف شدن مشاهده گردید.



شکل ۷: درصد هماتوکریت ماهی *Acipenser ruthenus*

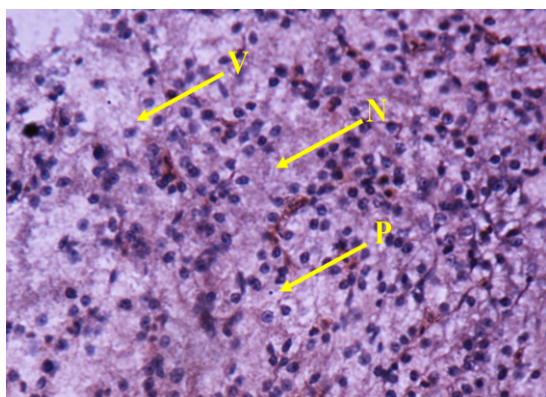
قرار گرفته در معرض دیازینون نمودار براساس $\text{mean} \pm \text{SE}$ است



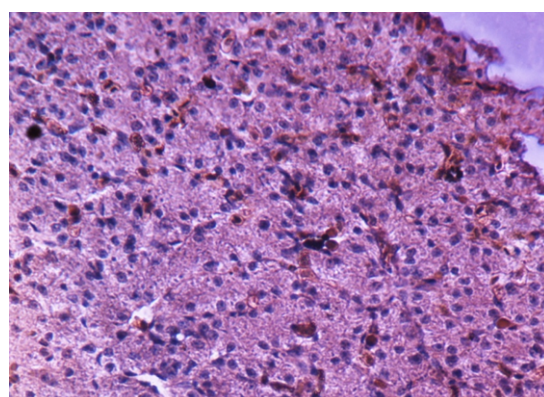
شکل ۸: میزان هموگلوبین ماهی *Acipenser ruthenus*

قرار گرفته در معرض دیازینون نمودار براساس $\text{mean} \pm \text{SE}$ است

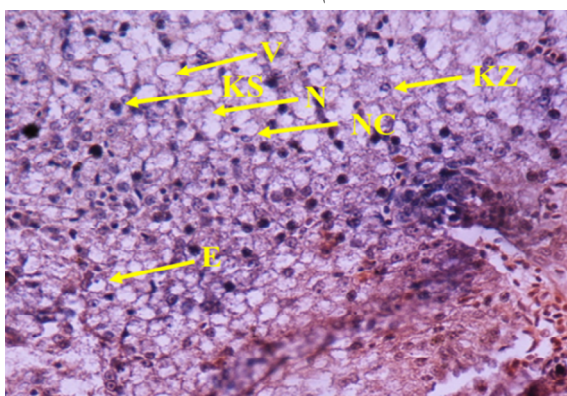
نتایج حاصل از بیوشیمی خون در شکل ۶ و ۷ بیان کننده کاهش غیر معنی دار پروتئین کل و کاهش معنی دار گلوکز می باشد ($P < 0.05$).



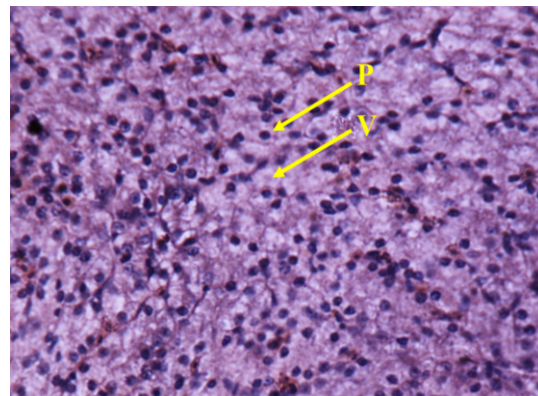
شکل ۸: واکوئل دار شدن سلول‌های کبدی به همراه نکروز موضعی (N, V) و پیکنوز شدن هسته سلول‌ها (P) (غلظت ۳ میلی گرم در لیتر)



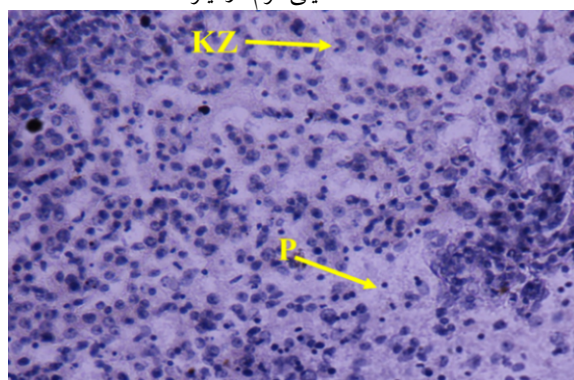
شکل ۷: بافت کبد (شاهد)



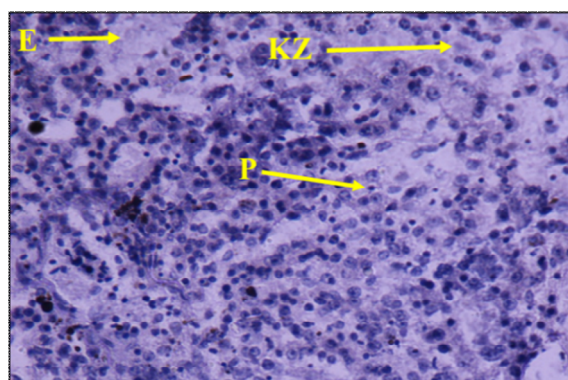
شکل ۱۰: بیشتر سلول‌ها متورم و واکوئل شده (V)، سیتوپلاسم ظاهر دانه دار خود را از دست داده است (NC)، نکروز (N)، کارپورکسیس (KS) کارپولیز (KZ) و ادم (E) (غلظت ۳/۸۷ میلی گرم در لیتر)



شکل ۹: واکوئل دار شدن بیشتر سلول‌ها (V)، از بین رفتن غشای سیتوپلاسمی و پیکنوز (P) (غلظت ۳/۴۱ میلی گرم در لیتر)



شکل ۱۲: پیکنوز (P)، کارپولیز (KZ)، تجزیه کامل غشای سلول‌های کبدی و مراحل مختلف نکروز سلول‌های کبدی (غلظت ۵ میلی گرم در لیتر)

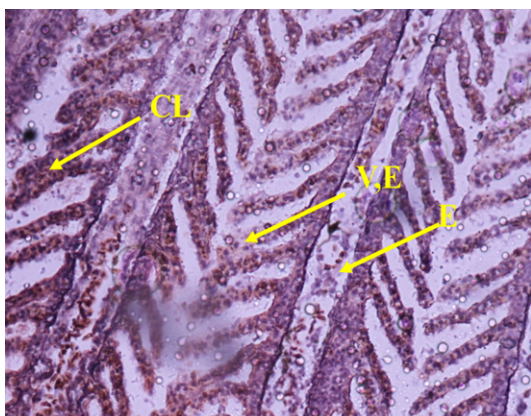


شکل ۱۱: پیکنوز (P)، کارپولیز (KZ)، تجزیه کامل غشای سلول‌های کبدی و مراحل مختلف نکروز سلول‌های کبدی (غلظت ۴/۴ میلی گرم در لیتر)

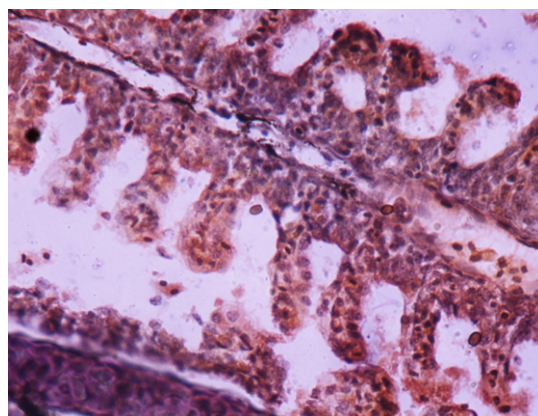
جدا شدن سلول‌ها، نکروز، پرخونی عمومی مشاهده گردید که عارضه در غلظت ۴/۴ و ۵ میلی گرم در لیتر نسبت به سایرین بیش تر می باشد (شکل های ۱۴-۱۹).

مطالعه آسیب شناسی آبشش استرلیاد

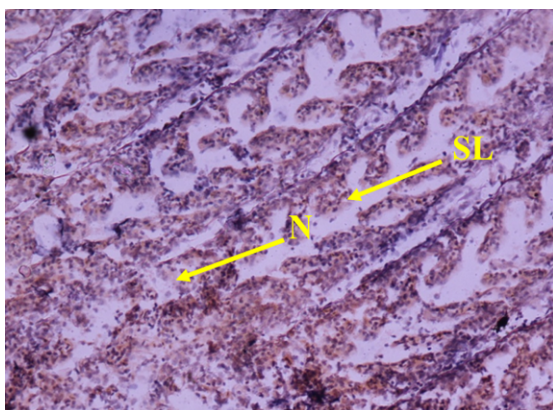
بطور کلی در تیمارهای مورد آزمون عوارضی همچون ادم رشته های اولیه، الحاق تیغه های ثانویه، بالونینگ و پهن شدن و الحاق تیغه های ثانویه، واکوئل دار شدن، پوسته پوسته شدن تیغه های ثانویه و



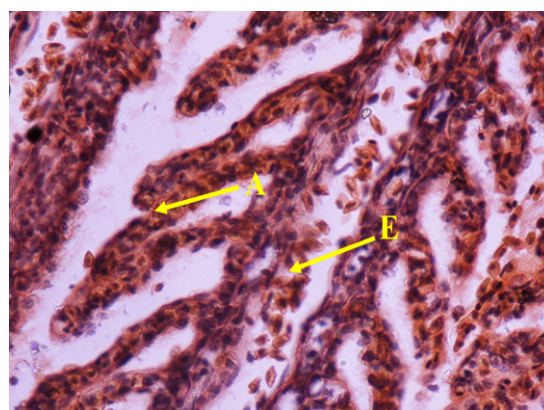
شکل ۱۴: الحاق تیغه های ثانویه (CL)، ادم رشته های اولیه (E)، واکوئل دار شدن (V) (غلظت ۳ میلی گرم در لیتر)



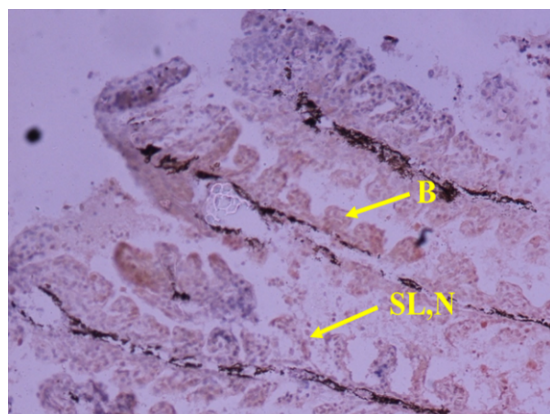
شکل ۱۳: (بافت آبشش شاهد)



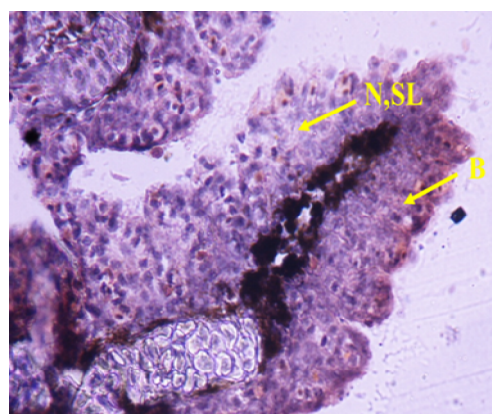
شکل ۱۶: پوسته پوسته شدن تیغه های ثانویه و جدا شدن سلول ها (SL)، نکروز (N) (غلظت ۳/۸۷ میلی گرم در لیتر)



شکل ۱۵: الحاق تیغه های ثانویه (A)، ادم (E)، پرخونی عمومی (غلظت ۳/۴۱ میلی گرم در لیتر)



شکل ۱۸: بالونینگ و پهن شدن تیغه‌های ثانویه (B)، پوسته شدن و وسیع تیغه‌های ثانویه (SL)، نکروز (N) (غلظت ۵ میلی گرم در لیتر)



شکل ۱۷: بالونینگ و پهن شدن و الحاق تیغه‌های ثانویه (B) نکروز و پوسته پوسته شدن سلول‌های ثانویه (N, SL) (غلظت ۴/۴ میلی گرم در لیتر)

آوردند. براساس گزارش‌های مرکز تحقیقات شیلات ایران (۱۳۷۵) میزان (LC₅₀ 96h) سم دیازینون بر روی ماهی سفید ۰/۳۶ و بر روی فیتوفاک ۱/۹ میلی گرم در لیتر بوده است. جاذب نیکو (۱۳۷۵) این غلظت را بر روی ماهی سیم ۱/۲ میلی گرم بر لیتر بیان نمود. پورغلام و همکاران (۱۳۸۰) اثر سم دیازینون را بر روی بچه ماهی ۵ گرمی، برابر با ۱۵/۱۳ میلی گرم در لیتر تعیین نمودند. Svobodova و همکاران (۲۰۰۱) غلظت سمیت حاد سم دیازینون را بر روی کپور ماهی ۳۲ میلی گرم در لیتر بیان نمودند.

نتایج حاصل از اثر دیازینون بر روی بچه ماهی استرلیاد نشان داد که میزان اریتروسیت و هماتوکریت از کاهش معنی داری برخوردار بوده است ($P < 0/05$). سلطانی و خوش باور رستمی (۱۳۸۴) نتایج مشابه در پاسخ خونی ماهی شپ در غلظت ۷/۶۷ میلی گرم بر لیتر Maccidal-600EC با کاهش معنی دار ($P < 0/05$) گلبول‌های قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین در مقایسه با گروه شاهد مشاهده نمودند. Svoboda و همکاران (۲۰۰۱) دریافتند که در کپور معمولی، سمیت حاد با سم دیازینون با غلظت ۳۲ میلی گرم در لیتر از ماده

در طول دوره آزمایش دما، اکسیژن، pH و سختی کل به ترتیب $21/8 \pm 1/12^{\circ}\text{C}$ ، $8 \pm 0/25\text{ppm}$ و $7/19 \pm 0/11$ و $275 \pm 15\text{ppm}$ اندازه گیری شد.

بحث

نتایج حاصل از تحقیق فوق نشان داد که سمیت حاد (LC₅₀ 96h) سم دیازینون بر روی بچه ماهیان استرلیاد $6/48 \pm 1/28$ گرمی $3/58$ میلی گرم در لیتر می باشد. شاملوفر و همکاران در سال ۱۳۸۵ غلظت کشندگی (LC₅₀ 96h) سم دیازینون بر روی فیل ماهی *Huso huso* را $5/82$ میلی گرم در لیتر تعیین نمودند. میزان سمیت حاد LC₅₀ ۹۶ ساعت سم دیازینون برای قره برون برابر $4/38$ میلی گرم در لیتر و برای ازون برون معادل $2/54$ میلی گرم در لیتر تعیین گردید (پژند، ۱۳۷۸). سلطانی و خوش باور رستمی (۱۳۸۱) LC₅₀ 96h ساعت سم دیازینون را برای ماهیان شپ *Acipenser nudiventries* $4/6$ میلی گرم در لیتر گزارش کردند. Sancho و همکاران (۱۹۹۲) با تحقیقی با سم دیازینون (LC₅₀ 96h) بر روی مارماهی مهاجر اروپایی *Anguilla anguilla* را معادل $0/08$ بدست

ارگانوفسفره Basudin 600EW کاهش معنی داری در تعداد اریتروسیت، میزان هماتوکریت و هموگلوبین در گروه آزمایشی در مقایسه با گروه شاهد ایجاد کرده است ($P < 0/01$). در شمارش افتراقی خون ماهی کپور معمولی در مسمومیت حاد با دیازینون مشاهده گردید که میزان لنفوسیت کاهش معنی دار ($P < 0/01$) و مقدار نوتروفیل افزایش معنی داری ($P < 0/05$) را نشان دادند. در شمارش افتراقی لکوسیت ماهیان ازون برون در معرض سمیت حاد دیازینون کاهش معنی دار لنفوسیت ($P < 0/01$) و افزایش معنی دار نوتروفیل مشاهده گردید ($P < 0/01$). سلطانی و خوش باور رستمی (۱۳۸۱) تغییرات مشابهی در ماهیان شپ که در معرض سم دیازینون با غلظت ۴/۶ قرار گرفته اند گزارش کردند. کاهش معنی دار لنفوسیت و افزایش معنی دار نوتروفیل در این آزمایش با نتایج Svoboda و همکاران او مطابقت دارد. سلطانی و خوش باور رستمی (۱۳۸۱) در بررسی وضعیت بیوشیمیایی خون در ماهی ازون برون دریافتند، میزان پروتئین کل و گلوکز تحت تاثیر سم دیازینون از کاهش معنی داری برخوردار می باشد. نتایج حاصل از اثر سم دیازینون بر روی بچه ماهی استرلیاد نشان داد که کاهش گلوکز معنی دار بوده ولی میزان کاهش پروتئین معنی دار نمی باشد.

بررسی علائم بالینی

تولید بچه ماهی با کیفیت بالا به عوامل محیطی بستگی دارد. سموم از جمله عواملی هستند که بر رشد و تولید مثل ماهیان اثرات منفی می گذارند. امروزه سموم و آفت کش ها از عمده ترین عوامل ایجاد مسمومیت در ماهیان هستند که می توانند حتی در غلظت های کم موجب مرگ و میر زیاد شوند Sanchez-Fortun and

(Barahona, 2005). سلطانی و خوش باور رستمی (۱۳۸۱) اثر سمیت حاد دیازینون را بر ماهی شپ ۴/۶ میلی گرم در لیتر و معمولترین علائم بالینی را سندروم عصبی پارالتیک، بی تابی شدید، گرفتگی عضلات باله-ها و دور دهان، کاهش حرکات گروهی، از دست دادن جهت یابی، به پهلو خوابیدن و شنای نیم دایره ای، عکس العمل هیجانی با حرکات ناگهانی، تیرگی سطح بدن در ناحیه پشتی، قطع حرکات تنفسی و در نهایت مرگ ماهیان مشاهده گردید. شاملوفر و همکاران (۱۳۸۵) در مطالعه ای اثرات غلظت تحت کشندگی دیازینون ۳ تا ۵ میلی گرم در لیتر در مدت ۹۶ ساعت را بر فیل ماهی *Huso huso* بررسی نمودند که انحنای ستون فقرات و فلج عصبی، تنفس ناموزون و غیر عادی، افزایش عکس العمل در مقابل محرک های بیرونی، وجود مخاط فراوان روی سطح بدن، ایجاد لکه های خونی در اطراف چشم و پر خونی آبشش ها از عوارض ظاهری قرار گرفتن ماهیان در معرض این سم بوده است. این رفتارها و عوارض ظاهری غیرطبیعی مشاهده شده در ماهیان در معرض سمیت حاد دیازینون، بی تابی شدید، انحنای ستون فقرات، شنای نیم دایره ای و تیره-گی سطح بدن با علائم اشاره شده در سایر گزارش های منتشر شده مشابه است.

بافت کبد

بهمنی و همکاران (۱۳۸۴) اندام اصلی دخیل در سم زدایی آلاینده ها، کبد می باشد. سلول های کبد علاوه بر تولید صفرا، نقش مهمی در متابولیسم پروتئین، چربی و کربوهیدرات را داشته و به عنوان واحدهای سمیت زدا و تولید آنتی بادی نیز عمل می نمایند. اندازه این سلول ها

بستگی به وضعیت فیزیولوژیک ماهی داشته و در هنگام افزایش و کاهش متابولیت بدن، متغیر می‌باشد.

تعداد زیادی از حشره کش‌ها و سایر مواد ساخت بشری به مقدار زیاد در کبد تجمع یافته و موجب ضایعات زیادی در آن می‌شود (Meteeleeve et al, 1971). تغییرات بافتی با آسیب‌های بافتی کلیه و آبشش مرتبط است، هر ماده سمی که وارد بدن ماهیان می‌شود، برای ذخیره‌سازی یا به وسیله سیستم گردش خون وارد کبد می‌شود و در صورتی که در کبد تجمع نیابد وارد صفرها شده و برای دفع به آبشش و کلیه منتقل می‌شود (Lindstoma-Seppa et al, 1981). نتایج تحقیق یآوری و همکاران (۱۳۹۲) با بررسی ضایعات بافتی ناشی از تاثیر سم دیازینون بر روی بچه ماهیان سفیدک (*Schizothorax zardnyi*) با غلظت ۱۴/۷ میلی گرم در لیتر عوارضی نظیر، پرخونی در عروق و سینوزوئیدها و دژنراسیون واکوئلی هپاتوسیت‌ها را در بافت کبد و پرخونی، چروکیدگی و دژنراسانس بعضی لوله‌های ادراری، اتساع فضای بومن، پیکنوتیک شدن هسته بعضی سلول‌ها و افزایش سلول‌ها در بافت بینابینی را در کلیه و عوارضی نظیر پرخونی، تلاثرکتازی، تورم، چروکیدگی، چماقی شدن و به هم چسبیدگی در رشته‌های ثانوی آبشش را مشاهده نمودند. مشاهدات به عمل آمده از آزمایش اثر سم دیازینون بر بچه ماهیان استرلیاد نشان داد که در تیمارهای مورد آزمون عوارضی همچون واکوئل دار شدن سلول‌های ادم. از بین رفتن غشای سیتوپلاسمی، از دست دادن ظاهر دانه دار سیتوپلاسم، پیکنوزه شدن هسته سلول‌ها، کاربوریکیس، کاربولیز و تجزیه کامل غشای سلول‌های کبدی مشاهده گردید. شدت عارضه در غلظت ۴/۴ و ۵ میلی گرم در لیتر نسبت به سایرین

بیش تر بوده است. این عوارض با مشاهدات سایر محققین مطابقت دارد.

آبشش در ماهیان یکی از مهمترین اندام‌هایی است که به طور مستقیم در تماس با آلاینده‌ها قرار دارد. تغییرات وسیع آسیب‌شناسی بافت کلیه، طحال و آبشش موجب برهم خوردن هموستازی جانور و بروز تغییراتی در عوامل خونی و به تبعیت آن کاهش توان سیستم ایمنی و بقای آبزیان می‌شود (Banaee et al, 2011). Dutta و همکاران (۲۰۰۳) تاثیر دیازینون را بر آبشش *Lepomis macrochiras* بررسی کردند. این سم اثرات تخریبی زیادی را بر آبشش این ماهی داشته است. ماهیان بزرگ در معرض ۵ غلظت متفاوت از این ماده قرار گرفت و آبشش آنها را توسط میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار دادند. همه ماهیانی که در معرض سم دیازینون قرار گرفته بودند در مقایسه با گروه شاهد دارای عوارضی مانند کشیدگی لایه اپی تلیال، هیپرپلازی و نکروز، کوتاه شدن و جدا شدن اپی تلیال، به هم پیوستگی لاملا، هیپرپلازی شدید و هیپرتروفی موکوس سلول‌ها و چماقی شدن لاملا بودند. دیازینون از طریق آبشش‌ها، پوست و سیستم گوارشی به راحتی وارد بدن می‌شود. قابلیت انحلال این سم در چربی سبب شده تا این سم از ساختار فسفولپیدی غشای زیستی عبور کند و طی کم‌تر از ۲۴ ساعت از قرار گرفتن ماهیان در معرض سم دیازینون غلظت این سم در بافت‌های مختلف بدن به ویژه خون به سطح مشابه غلظت این سم در محیط می‌رسد و در بافت‌های مختلف بدن تجمع می‌یابد (Vale, 1998). مطالعه آبشش ماهی کپور علفخوار پس از مجاورت با غلظت‌های تحت کشنده سم دیازینون نشان داد که این سم صدمات شدید به ساختمان سلول‌های آبشش وارد

تحقیقاتی، انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان
خاویاری، انتشارات مؤسسه تحقیقات شیلات ایران،
۶۴-۶۷.

۲. پژند، ذ.، ۱۳۷۸. تعیین غلظت کشندگی سموم علف
کش بوتاکلر و حشره کش دیازینون بر ماهیان
خاویاری تاسماهی و ازون برون، دانشگاه آزاد اسلامی.
واحد لاهیجان، پایان نامه کارشناسی ارشد، ۱۱۰
صفحه.
۳. پورغلام، ر.، اسماعیلی، ف.، فرهمند، ه.، سلطانی، م.،
یوسفی، پ.، مهرداد، ح.، ۱۳۸۰. بررسی مشخصه‌های
خونی ماهی کپور علفخوار بعد از تماس با سم
ارگانوفسفره دیازینون. مجله علمی شیلات ایران ۳(۲)،
۱-۱۸.
۴. سلطانی، م.، خوشباور رستمی، ح.، ۱۳۸۱. مطالعه اثر
سم دیازینون بر شاخص‌های خونی و بیوشیمیایی
تاسماهی روسی *Acipenser gueldenstaedti* مجله
علوم دریای ایران، ۴، ۶۵-۷۵.
۵. جاذب نیکو، ا.ک.، ۱۳۷۵. بررسی اثر سموم بوتاکلر
۶۰٪ و مالاتیون ۵۷٪ تعیین LC₅₀ بر روی مرگ و میر
ماهی سیم. پایان نامه کارشناسی شیلات، ۷-۳۴.
۶. شاملوفر، م.، کمالی، ا.، پیری، م.، یغمایی، ف.، ۱۳۸۵.
تعیین (LC₅₀ 96h) سم دیازینون و غلظت تحت
کشنده آن بر عوامل خونی بچه‌فیل ماهی *Huso huso*،
مجله علمی شیلات ایران، ۴، ۶۹-۷۸.
۷. یآوری، ا.، قرایی، ا.، غفاری، م.، شریف پور، ع.،
۱۳۹۲. تعیین LC₅₀ و بررسی ضایعات بافتی ناشی از سم
دیازینون در بچه ماهیان سفیدک سیستان
(*Schizothorax zarudnyi*)، مجله علوم و فنون
شیلات، ۲(۲)، ۶۳-۷۴.

8. Banaee, M., Mirvaghefi, A.R., Mojazi, A.B.,
Rafiee, G. R., Nematdost, B., 2011.
Hematological and Histopathological effects of
Diazinon Poisoning in common carp (*Cyprinus
carpio*), 64(1), 1-12.

می‌نماید که از جمله می‌توان هیپرپلازی و چسبندگی
تیغه‌های ثانویه به هم، جدا شدن و افتادن بافت پوششی
از لایه پایه دیده شد (Sharifpour et al, 2006).
بطور کلی در تیمارهای مورد آزمون اثر سم دیازینون
بر روی بچه‌ماهیان استرلیاد، بافت‌های آبشش دارای
عوارضی همچون ادم رشته‌های اولیه، الحاق تیغه‌های
ثانویه، بالونینگ و پهن شدن و الحاق تیغه‌های ثانویه،
واکوئل‌دار شدن، پوسته پوسته شدن تیغه‌های ثانویه و
جدا شدن سلول‌ها، نکروز، پر خونی عمومی مشاهده
گردید که عارضه در غلظت‌های ۴/۴ و ۵ میلی گرم در
لیتر نسبت به سایرین بیش تر بوده است. این نتایج، با
اثرات سم دیازینون بر روی سایر ماهیان نیز مطابقت
دارد.

نتایج این تحقیق نشان داد، اثر سم دیازینون بر
روی فاکتورهای خون‌شناسی و بیوشیمیایی خون
بچه‌ماهی استرلیاد باعث اثرات مخرب در سیستم ایمنی
می‌گردد، لذا کنترل روند استفاده از سموم ارگانوفسفره
به عنوان آفت‌کش در مزارع شالیزار و باغات می‌تواند
موجب کاهش اثرات زیانبار بر روی تکثیر و پرورش
این گونه با ارزش از ماهیان خاویاری گردد.

سپاسگزاری

در اینجا بر خود لازم می‌دانیم از زحمات کلیه
کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند
سپاسگزاری نمایم.

منابع

۱. بهمنی، م.، کاظمی، ر.، حلاجیان، ع.، شریف پور، ع.،
مجازی امیری، ب.، ۱۳۸۴. بررسی بافت شناسی
آبشش‌ها، گناد، کلیه، کبد و دستگاه گوارش تاسماهی
ایرانی *Acipenser persicus* گزارش نهایی طرح های

16. Sancho, E., Ferrando, M. D., Andreu, E., Gamon, M. 1992. Acute toxicity, uptake and clearance of diazinon by the European EEL, *Anguilla anguilla* (L.). Journal of Environmental Science and Health, Part B. 27(2), 209-221.
17. Svobodova, Z., Luskova, V., Drastichova, J., Svoboda, M., Žlábek, V., 2003. Effect of deltamethrin on haematological indices of common carp (*Cyprinus carpio* L.). Acta Veterinaria Brno, 72(1), 79-85.
18. Sharifpour, I., Pourgholam, R., Soltani, M., Hassan, M., Akbari, S., Nouri, A., 2006. Light and electron microscope studies of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) organs following exposure to various sublethal concentrations of diazinon.
19. Tsuda, T., Inoue, T., Kojima, M., Aoki, S., 1996. Pesticides in water and fish from rivers flowing into Lake Biwa. Bulletin of environmental contamination and toxicology, 57(3), 442-449.
20. Vale, J.A., 1998. Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning. Toxicology Letters, 102, 649-652.
21. Yang, X., Baumann, P.C., 2006. Biliary PAH metabolites and the hepatosomatic index of brown bullheads from Lake Erie tributaries. Ecological Indicators, 6(3), 567-574.
9. 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(3), 355-360.
10. Eisler, R., 1986. Diazinon hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. U.S. fish and wildlife service biological report, 85(1.9), 25p.
11. Lindström-Seppä, P., Koivusaari, U., Hänninen, O., 1981. Extrahepatic xenobiotic metabolism in North-European freshwater fish. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology, 69(2), 259-263.
12. Meteleve, V.V., Kanaev, A.L., Diasokhva, N. G., 1971. Water toxicity. Amerind Publishing Co. Pvt. Ltd. New Delhi.
13. O.E.C.D., 1989. Guideline for testing on chemicals.
14. Keizer, J., D'Agostino, G., Vitozzi, L., 1991. The importance of biotransformation in the toxicity of xenobiotics to fish. I. Toxicity and bioaccumulation of diazinon in guppy (*Poecilia reticulata*) and zebra fish (*Brachydanio rerio*). Aquatic toxicology, 21(3-4), 239-254.
15. Sánchez-Fortún, S., Barahona, M.V., 2005. Comparative study on the environmental risk induced by several pyrethroids in estuarine and freshwater invertebrate organisms. Chemosphere, 59(4), 553-559.