

تعیین سمیت حاد (LC₅₀96h) قارچ کش کاپتان و تأثیر آن بر روی فاکتورهای خونی بچه ماهیان کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*)

* مهدی محمد علیخانی^۱، مسعود فرخ روز^۲، عباسعلی زمینی^۳، سهیل لامعی حسن کیاده^۴
و صفورا پشت پناه^۵

^{۱،۴} دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، ^{۲،۳} گروه شیلات دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان

تاریخ دریافت: ۹۱/۶/۱؛ تاریخ پذیرش: ۹۲/۹/۴

چکیده

در طی این تحقیق، اثرات سم کاپتان که به مقدار زیادی در مزارع کشاورزی خصوصاً شمال کشور استفاده می‌گردد، بر روی ۱۸۰ قطعه بچه ماهیان ۵-۳ گرمی کپور علفخوار به منظور تعیین غلظت کشنده ۵۰ درصد از جمعیت ماهیان در ۹۶ ساعت مطالعه گردید. آزمایشات بصورت ساکن و بر اساس روش استاندارد (O.E.C.D، ۲۰۰۱) به مدت ۴ شبانه روز (۹۶ ساعت) انجام و پارامترهای موثر فیزیوشیمیایی آب از جمله، pH، سختی کل، اکسیژن محلول و درجه حرارت کنترل گردید. در طول مدت آزمایش نیز رفتار و حرکات بچه ماهیان در مقابل سم به دقت مورد بررسی قرار گرفت. سمیت حاد (LC₅₀ 96h) سم کاپتان برای بچه ماهیان کپور علفخوار برابر ۰/۹ میلی گرم در لیتر محاسبه گردید و حداکثر غلظت مجاز این سم (M.A.C value) در مدت ۹۶ ساعت نیز برابر ۰/۰۹ میلی گرم در لیتر بدست آمد. سپس جهت تعیین تأثیر سم کاپتان بر خون بچه ماهیان آمو، با حفظ رعایت شرایط استاندارد نگهداری ماهیان در آزمایشگاه آنها را به مدت ۷ روز در معرض غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد از LC₅₀ 96h سم کاپتان (که به ترتیب برابر با ۰/۲۲۵ mg/l، ۰/۴۵ mg/l، ۰/۶۷۵ mg/l است) قرار داده و بعد از این مدت اقدام به خون‌گیری و آزمایشات خون‌شناختی شد. نتایج کاهش مقادیر لنفوسیت، هموگلوبین، گلبول قرمز، گلبول سفید، هماتوکریت، اتوزوفیل (به غیر از تیمار ۵۰ درصد)، MCHC و افزایش مقادیر MCV (به غیر از تیمار ۲۵ درصد)، MCH (به غیر از تیمار ۲۵ درصد)، مونوسیت و نوتروفیل را نشان داد.

واژه‌های کلیدی: قارچ کش کاپتان، کپور علفخوار، شاخص‌های خونی، LC₅₀96h

مقدمه

اراضی کشاورزی این مناطق به کشت انواع محصولات زراعی و دیم اختصاص دارد. مصرف انواع کودهای شیمیایی و مواد دفع آفات نباتی در این استان‌ها از میزان بسیار بالایی برخوردار است. از مجموع حدود ۳۵۰۰۰ تن ماده دفع آفات نباتی توزیع شده در سطح کشور حدود ۲۵۰۰۰ تن آن در اراضی کشاورزی استان‌های شمالی کشور مورد مصرف کشاورزان قرار می‌گیرد (محمدنژاد شמושکی و همکاران، ۱۳۸۸). اکوسیستم‌های آبی که از مناطق

استفاده از آفت‌کش‌های سمی در بین کشاورزان ایرانی نیز رواج یافته است. سه استان اصلی تولیدات کشاورزی ایران استان‌های مازندران، گیلان و گلستان هستند که در امتداد سواحل دریای خزر قرار دارند. محصولات اصلی این نواحی برنج، مرکبات، پنبه و توتون است. سطحی بالغ بر ۱/۵ میلیون هکتار از

* مسئول مکاتبه: m.bloga1982@yahoo.com

می‌گردد. این قارچ‌کش در بازار با نام تجاری ارتوساید (Orthocide) (WP₅₀%) وجود دارد (بامدادیان، ۱۳۷۶). کاپتان، قارچ‌کش حفاظتی (به عبارت دیگر، باید قبل از فعالیت بیمارگر در سطح گیاه موجود باشد تا موثر واقع شوند و از آلودگی جلوگیری کنند) از گروه فتالیمیدها و جزء آفت‌کش‌ها و ترکیبات آلی ارگانوکلره بوده که به صورت پودر قابل اختلاط با آب (WP₅₀%) برای کنترل طیف وسیعی از قارچ‌ها استفاده می‌شود. کاپتان در شرایط معمولی تبخیر نمی‌شود و در آب غیرمحلول است. به حالت پودر در حرارت کمتر از ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت طولانی پایدار می‌ماند ولی محلول آن در محیط‌های قلیایی زود تجزیه می‌شود. با توجه به اینکه این ترکیب در محیط‌های قلیایی و حرارت بالا زود تجزیه می‌شود لذا نباید آنرا با آهک و ترکیبات آهک‌دار (مثل ترکیب بردو) مخلوط کرد و در موقع مصرف نیز نباید از آب‌های آهکی استفاده نمود. کاپتان یک قارچ‌کش حفاظتی - معالجه‌ای و از ترکیبات فتالیمیدهاست. این ترکیبات دارای گروه - SCCL₃ در ساختمان خود هستند که برای قارچ‌ها سمی است. قارچ‌کش‌های این دسته دارای نقاط اثر مختلفی هستند و سمیت آنها مربوط به جلوگیری از سنتز ترکیبات آمینو و آنزیم‌های دارای گروه تیول (SH) می‌باشد. اثر قارچ‌کشی این ترکیبات را به قسمت تری کلرو متیل تیو نسبت می‌دهند که پس از ورود سم به سلول قارچ از فعالیت آنزیم‌هایی که در متابولیسم فسفر دخالت دارند؛ مانند برخی اکسیدازها، هیدروژنازها و همچنین کوآنزیم A جلوگیری می‌کند. کاپتان یکی از بهترین مؤثرترین قارچ‌کش‌هایی است که تاکنون ساخته شده است و چون برای مبارزه با بیماری‌های گیاهی متعددی بکار می‌رود، آنرا قارچ‌کش معجزه آسا نیز می‌گویند. کاپتان در کلیه مواردی که مخلوط بردو و ترکیبات مس بکار می‌روند، مؤثر است و در بسیاری موارد بهتر از ترکیبات مس نتیجه می‌دهد. کاپتان در

کشاورزی عبور می‌کنند، به احتمال خیلی زیاد توسط ضایعات و آب‌های زیرزمینی شسته شده بوسیله انواع مواد شیمیایی آلوده می‌شوند. آفت‌کش‌های بسیار مفید به‌طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرند که به‌هنگام ورود به محیط زیست آبی تغییرات متعددی از طریق تغییر میزان رشد، مقدار مواد غذایی مشخصه رفتاری و غیره در جاندار ایجاد می‌کنند. بخش مهمی از مواد غذایی جهان از منبع ماهی تأمین می‌گردد، بنابراین حفظ سلامتی ماهیان ضروری است (Ramesh و همکاران، ۲۰۰۸).

ویژگی‌های خون‌شناسی یکی از مهم‌ترین شواهد مراحل فیزیولوژیک آنها و منعکس کننده ارتباط خصوصیات اکوسیستم آبی و سلامتی آنها می‌باشد. به‌همین دلیل داشتن دامنه طبیعی پارامترهای خونی یک ماهی می‌تواند به‌عنوان شاخص زیستی (Biomarker) مورد استفاده قرار گیرد (Luskova, ۱۹۹۵).

ماهی‌آمور از خانواده کپور ماهیان با نام فارسی آمور (کپور علفخوار) و نام محلی سفید پرورشی می‌باشد و امروزه این ماهی برای جلوگیری از رویش شدید گیاهی در کانال‌ها یا آب‌بندان‌های طبیعی استفاده می‌شود و به‌علاوه تکثیر و پرورش مصنوعی ماهی‌آمور جهت تامین پروتئین با رهاسازی در آب‌بندان‌های طبیعی در اروپا و آسیا مرسوم شده است.

قارچ‌کش کاپتان با اسامی دیگر شامل؛ Orthocide, Phytocape, Marten, Strike, Merpan است. مبدأ پیدایش این ترکیب برای اولین بار در سال ۱۹۴۹ توسط کمپانی شورون Chevron Chemical و استافر Stuffer Chemical ساخته شده ولی در حال حاضر توسط کمپانی زنکا Zeneca نیز تولید و به بازار عرضه می‌گردد و در کشور ما نیز توسط کارخانجات تولید سموم شیمیایی تولید

آلی نبایستی صورت گیرد. در صورت اختلاط کاپتان با گوگرد نباید روی محصولات حساس به گوگرد استفاده شود. استفاده از کاپتان در دوز بالا یا خیساندن کامل درخت ممکن است روی برگ های ظریف و نابالغ برخی واریته های سیب، گیلاس، هلو و آلو ایجاد گیاه سوزی نماید (لکه های نکروز).

مواد و روش کار

برای بررسی تأثیرات سم کاپتان بر پارامترهای خونی بچه ماهیان ابتدا میزان سمیت کاپتان بر روی بچه ماهیان مورد مطالعه قرار گرفت، سپس آزمایشات مربوط به خون شناسی انجام شده و فاکتورهای خونی مورد سنجش قرار گرفت که در زیر به آن می پردازیم: آزمایش تعیین سمیت بر اساس روش استاندارد (O.E.C.D, ۲۰۰۱) (Organization Economic Cooperation Development) انجام می شود و آزمایشات بصورت ساکن (Static) صورت می گیرد. یعنی؛ محلول آزمایش در طی آزمایش تغییر نکرده و کاملاً ثابت است. تعیین مرگ و میر ماهی ها در طی ۴ روز صورت می گیرد، بطوری که هر ۲۴ ساعت یکبار میزان مرگ و میر ثبت می شود، بنابراین در زمان های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت رکوردگیری انجام می شود و آزمایش به پایان می رسد. پس از انجام آزمایش های ابتدایی به منظور یافتن محدوده کشندگی سم کاپتان بر روی بچه ماهیان مورد مطالعه محدوده غلظت های ۰/۵-۲/۵ میلی گرم در لیتر به عنوان محدوده کشندگی سم کاپتان بر روی بچه ماهیان ۳ تا ۵ گرمی مورد تعیین گردید و سپس تیمارهای نهایی با استفاده از روش لگاریتمی محاسبه شد که در ۵ تیمار با غلظت های ۰/۵، ۰/۷۴، ۱/۰۹، ۱/۶۲ و ۲/۵ میلی گرم در لیتر با ۳ تکرار و ۳ شاهد در ۱۸ عدد آکواریوم که هر کدام حاوی ۱۰ قطعه بچه ماهی بودند، انجام شد و سپس از محلول مورد نظر بوسیله پمپ مدرج به اندازه غلظت های بدست آمده برداشته و به آب

رنگ و زیبایی میوه ها اثر مطلوب دارد و درختانی که با کاپتان سمپاشی می شوند میوه های خوش رنگ تری می دهند. این موضوع مخصوصاً در سیب، گلابی، هلو و زردآلو قابل توجه می باشد. کاپتان روی سفیدک های پودری و زنگ ها کم اثر بوده و از این رو می توان آن را با کاراتان یا زینب مخلوط نمود. میوه های سمپاشی شده در انبار مقاومت بیشتری در مقابل عوامل پوسیدگی از خود نشان می دهند. کاپتان برای کنترل طیف وسیعی از بیماری های قارچی مثل؛ لکه سیاه سیب (اسکب) و آنتراکنوز درختان میوه دانه دار، غربالی شدن، پیچیدگی برگ هلو (لب شتری)، پوسیدگی قهوه ای درختان میوه هسته دار و پوسیدگی قهوه ای میوه مرکبات، سفیدک درونی و پوسیدگی سیاه درختان انگور، بلایت دیررس سیب زمینی و گوجه فرنگی، بلایت آلترناریایی و لکه برگی هویج، سفیدک درونی و آنتراکنوز کدوئیان، بیماری های لکه برگی گیاهان زینتی، آنتراکنوز و لکه برگی گوجه فرنگی، بیماری های برگی چمن و بیماری های ناشی از بوتریتیس بکار می رود. این قارچ کش همچنین جهت ضد عفونی بذور و ریشه گیاهان علیه قارچ های پیتوم، فوما، ریزوکتینیا و... روی گیاهان زینتی، صیفی، سبزی، گیاهان دانه روغن و سایر گیاهان زراعی استفاده می شود (بامدادیان، ۱۳۷۶). کاپتان با مواد قلیایی، روغن ها و فرمولاسیون های امولسیون پاراتیون، گیاهکتن غیرقابل اختلاط است. چون کاپتان یک قارچ کش تماسی است و ورود آن به داخل بافت گیاه ایجاد گیاه سوزی شدید می کند بنابراین بدنال اختلاط با روغن ها و کودهای مایع این نفوذ تسهیل شده و ایجاد شوک و گیاه سوزی شدید می نماید. کاپتان در اختلاط با مواد قلیایی مثل بردو ولایم سولفور تجزیه می شود و اثر قارچ کشی آن نیز کاهش می یابد. استفاده از مواد پخش کننده هایی که میزان بالایی از مواد خیس کننده را دارند، در مورد کاپتان توصیه نمی شود. اختلاط با فرمولاسیون های حل شونده و فسفات های

کوچک بودن نمونه‌ها نمودیم. در حقیقت خون‌گیری از سرخرگ یا سیاهرگ دمی صورت پذیرفت. حجمی از خون را داخل لوله‌های استریل درب‌دار و هپارینه قرار داده و در محفظه‌های حاوی یخ جهت مطالعات هماتولوژی به آزمایشگاه منتقل نموده و از روش‌های زیر جهت سنجش WBC, RBC, PVC و HB استفاده شد (کاظمی و همکاران، ۱۳۸۹).

۱- هموگلوبین (HB) به کمک دستگاه کولتر کانتور 1000 SYSMEX اندازه‌گیری شد.

۲- هماتوکریت (PVC) با روش لوله‌های میکروهماتوکریت توسط سانتریفیوژ HETTICH با دور ۱۲۰۰۰ در مدت ۵ دقیقه و با خط‌کش مخصوص اندازه‌گیری شد (کاظمی و همکاران، ۱۳۸۹).

۳- شمارش گلبول‌های قرمز (RBC) با محلول Lewis (۱ سی‌سی سیترات سدیم ۳ درصد، ۹۹ سی‌سی آب مقطر و ۱ سی‌سی فرمالین خنثی) و به‌کمک لام نئوبار با رقت ۱/۲۰۰ انجام شد (کاظمی و همکاران، ۱۳۸۹).

۴- شمارش گلبول‌های سفید توسط محلول رقیق شده ریس brilliant cresyl blue (۱ سی‌سی سیترات سدیم ۳ درصد، ۱ سی‌سی فرمالین، ۲ سی‌سی ویوله دوژانسین و ۱۰۰ سی‌سی آب مقطر تارسیون) و به‌کمک لام نئوبار انجام شد.

۵- شمارش افتراقی گلبول‌های سفید: پس از تهیه گسترش خونی و تثبیت سلول‌های خونی، رنگ‌آمیزی توسط رنگ گیمسا صورت گرفت و در هر گسترش تعداد ۱۰۰ عدد گلبول سفید به‌صورت تصادفی شمارش و درصد فراوانی آنها محاسبه شد (عامری مهابادی، ۱۳۷۸).

۶- اندکس گلبول قرمز Indices and constants

اندکس‌های مربوط به گلبول قرمز از شمارش گلبولی، هموگلوبین و هماتوکریت به‌دست می‌آیند و معیارهایی برای شمارش و طبقه‌بندی گلبول‌های قرمز

آکواریوم‌های حاوی ماهی اضافه شد. در طی انجام آزمایش (به‌مدت ۹۶ ساعت) هیچ تغذیه‌ای برای ماهیان نبایستی انجام شود و حتی بهتر است ۲۴ ساعت قبل از شروع آزمایشات نیز غذادهی قطع گردد. در طول مدت آزمایش نیز رفتار و حرکات بچه‌ماهیان در مقابل سم به‌دقت مورد بررسی قرار گرفت.

بعد از کسب نتایج نهایی اطلاعات حاصله با استفاده از نرم‌افزار آماری (USEPA، ۱۹۸۵) Probit program که به‌وسیله EPA آمریکا برای تجزیه و تحلیل داده‌های مرگ و میر ناشی از مسمومیت مزمن و حاد ماهیان و سایر آبزیان در آب‌های جاری و ساکن طراحی شده است با سطح اطمینان ۵ درصد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و میزان حداکثر غلظت مجاز در مدت ۹۶ ساعت (M.A.C value) Maximum Concentration value) (Allowable) (M.A.C value = Lc₅₀ 96h / 10) و درجه سمیت (Lc₅₀ 96h) مشخص شدند (سمیت حاد (Lc₅₀ 96h) سم کاپتان برای بچه‌ماهیان کپور علفخوار برابر ۰/۹ میلی‌گرم در لیتر محاسبه گردید و حداکثر غلظت مجاز این سم (کاپتان) در مدت ۹۶ ساعت نیز برابر ۰/۰۹ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد). سپس جهت تعیین تأثیر سم کاپتان بر خون بچه‌ماهیان آموز، با حفظ رعایت شرایط استاندارد نگهداری ماهیان در آزمایشگاه آنها را به‌مدت ۷ روز در معرض غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد از Lc₅₀ 96h سم کاپتان (که به‌ترتیب برابر با ۰/۲۲۵g mg/l، ۰/۴۵ mg/l، ۰/۶۷۵ mg/l است) قرار داده و سه تکرار و سه گروه شاهد نیز داشتیم (۱۲ عدد آکواریوم که هر کدام حاوی ۱۰ قطعه بچه ماهی بودند) و بعد از این مدت اقدام به خون‌گیری و آزمایشات خون‌شناختی نمودیم. ماهیانی که در معرض مقادیر مختلف سم به‌مدت ۷ روز قرار گرفتند را با استفاده از پارچه نظیف، خشک کرده و اقدام به قطع ساقه‌دمی به‌علت

Shapiro-Wilk و بررسی وجود یا عدم وجود اختلاف معنی دار آماری هر یک از فاکتورها بر اساس تیمارهای مختلف به دلیل نرمال بودن داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و برای مقایسه میانگین‌ها با یکدیگر از آزمون دانکن و به صورت دو به دو از آزمون توکی و در صورت نرمال نبودن داده‌ها جهت مقایسه تیمارها از آزمون Kruskal Wallis و به منظور مقایسه بین گروه‌ها از آزمون Mann-Whitney استفاده شده است.

نتایج

پس از انجام آزمایش‌های ابتدایی به منظور یافتن محدوده کشندگی سم کاپتان بر روی بچه ماهیان آمور، محدوده غلظت‌های ۰/۵ - ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر به عنوان محدوده کشندگی سم کاپتان بر روی بچه ماهیان ۳ تا ۵ گرمی آمور تعیین گردید و سپس تیمارهای نهایی با استفاده از روش لگاریتمی محاسبه شد که در ۵ تیمار با غلظت‌های ۰/۵، ۰/۷۴، ۱/۰۹، ۱/۶۲، ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر با ۳ تکرار و ۳ شاهد در ۱۸ عدد آکواریوم انجام شد. در نهایت براساس آزمایش‌های انجام گرفته و با استفاده از نرم‌افزار Probit program مقادیر LC₁₀، LC₅₀، LC₉₀ سم کاپتان در ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بر روی بچه ماهیان آمور اندازه‌گیری شدند (جدول ۱). بر طبق این نتایج LC₅₀ 96h سم کاپتان برای آمور ۰/۹۰ میلی‌گرم در لیتر و حداکثر غلظت مجاز این سم نیز ۰/۰۹ میلی‌گرم در لیتر محاسبه گردید.

و کم‌خونی به‌شمار می‌آیند که از فرمول‌های زیر استفاده گردید:

$$\text{الف) (Mean Corpuscular Hemoglobin) = MCH}$$

این اندکس وزن متوسط هموگلوبین را در یک گلبول قرمز متوسط مشخص می‌کند و فرمول محاسبه آن به قرار زیر است (Klinger و همکاران، ۱۹۹۶).
 $10 \times \text{هموگلوبین (گرم در دسی‌لیتر) / تعداد یاخته‌های قرمز (بر حسب میلیون در میلی‌متر مکعب) = MCH}$
 واحد گزارش آن پیکوگرم است.

$$\text{ب) (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration) = MCHC}$$

این اندکس رابطه بین اندازه اریتروسیت‌ها و میزان هموگلوبین آن را مشخص می‌کند و عبارت است از غلظت هموگلوبین در حجم معینی از گلبول‌های قرمز و به عبارتی دیگر، درصد هموگلوبین را نسبت به هماتوکریت می‌سنجد و فرمول محاسبه آن به قرار زیر است (Klinger و همکاران، ۱۹۹۶).

$$100 \times \text{هماتوکریت / هموگلوبین (بر حسب گرم در دسی‌لیتر) = MCHC}$$

$$\text{ج) (Mean Corpuscular Volume) = MCV}$$

این اندکس حجم متوسط گلبول‌های قرمز را در خون مورد آزمایش مشخص می‌کند و فرمول محاسبه آن به قرار زیر است (Klinger و همکاران، ۱۹۹۶).

$$10 \times \text{تعداد یاخته‌های قرمز (بر حسب میلیون در میلی‌متر مکعب) / هماتوکریت = MCV}$$

واحد گزارش آن فمتولیت (Femtoliter) و یا میکرون مکعب می‌باشد. در نهایت جهت بررسی نرمال بودن توزیع داده در تیمارهای مختلف از آزمون

جدول ۱- غلظت‌های کشنده سم کاپتان در طی ۴ روز روی بچه ماهی آمور

غلظت (mg/l)	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
LC ₁₀	۰/۸۶	۰/۷۲	۰/۷۱	۰/۷۰
LC ₅₀	۱/۴۲	۱/۱۰	۰/۹۱	۰/۹۰
LC ₉₀	۲/۴۸	۲/۳۸	۱/۴۴	۱/۴۱

ساعت مقادیر بیشتری از سم لازم است تا تأثیرات کشنده خود را نمایان سازد و نیز مقدار LC₅₀ در ۲۴ ساعت اولیه آزمایش همواره بیشتر از مقدار آن در پایان ۹۶ ساعت می‌باشد.

با مشاهده جدول فوق این نکته آشکار می‌گردد که با افزایش زمان از ۲۴ ساعت به ۹۶ ساعت در LC₁₀، LC₅₀ و LC₉₀ از غلظت آلاینده کاسته می‌شود؛ یعنی در ۲۴ ساعت نسبت به ۴۸، ۷۲ و ۹۶

جدول ۲- معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگی با لگاریتم غلظت در بچه ماهیان کپور علفخوار

اطلاعات آماری	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
معادله خط رگرسیون	$y = 3/2917x + 4/4987$	$y = 3/8369x + 3/8338$	$y = 6/5135x + 5/2431$	$y = 6/5049x + 5/2942$
ضریب همبستگی	$R^2 = 0/9453$	$R^2 = 0/9647$	$R^2 = 0/8448$	$R^2 = 0/8568$

میزان تعداد گلبول‌های سفید در غلظت ۷۵ درصد مشاهده شده است. میانگین میزان RBC در غلظت ۷۵ درصد کمتر از سایر غلظت‌ها بوده و با شاهد و غلظت ۲۵ درصد اختلاف معنی‌دار آماری داشته است ($P < 0/05$). همچنین میزان گلبول‌های قرمز در تیمارها روند کاهشی برخوردار بوده به طوری که کمترین میزان تعداد گلبول‌های قرمز در غلظت ۷۵ درصد مشاهده شده است. میانگین میزان هماتوکریت در غلظت ۷۵ درصد کمتر از سایر غلظت‌ها بوده و با شاهد و سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار داشته است ($P < 0/05$).

میزان هماتوکریت در تیمارها روند کاهشی داشته به طوری که کمترین میزان تعداد هماتوکریت در غلظت ۷۵ درصد بوده است. میزان هموگلوبین در غلظت ۷۵ درصد کمتر از سایر غلظت‌ها بوده و با شاهد و سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار داشته است ($P < 0/05$). میزان هموگلوبین در تیمارها روند کاهشی داشته به طوری که کمترین میزان هموگلوبین در غلظت ۷۵ درصد مشاهده شده است. میانگین حجم متوسط گلبولی (MCV) غلظت ۷۵ درصد بیش از سایر تیمارها و شاهد بوده و اختلاف معنی‌دار داشته است ($P < 0/05$). میانگین میزان غلظت متوسط هموگلوبین در گلبول قرمز (MCH) در تیمار ۲۵ کمتر از سایر غلظت‌ها و شاهد بوده و اختلاف بین شاهد، غلظت ۷۵ درصد و غلظت ۵۰ درصد با غلظت ۲۵ درصد مشاهده شده است ($P < 0/05$).

نتایج این جدول حاکی از آن است که ضریب همبستگی در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت از دقت بالایی برخوردار است و دلیل این امر نزدیک بودن ضریب همبستگی به عدد یک می‌باشد که نشان‌دهنده ارتباط مستقیم و قوی بین لگاریتم غلظت سم با درصد تلفات می‌باشد. مطالعه شاخص‌های خونی بچه‌ماهیان آمور در معرض غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد از LC₅₀96h سم کاپتان، (که بترتیب برابر با ۰/۲۲۵ mg/l، ۰/۴۵ mg/l، ۰/۶۷۵ mg/l است)، کاهش مقادیر لنفوسیت، هموگلوبین، گلبول قرمز، گلبول سفید، هماتوکریت، ائوزوفیل (به غیر از تیمار ۵۰ درصد)، MCHC و افزایش مقادیر MCV (به غیر از تیمار ۲۵ درصد)، MCH (به غیر از تیمار ۲۵ درصد)، مونوسیت و نوتروفیل را نشان داد که نتایج کامل این آزمایشات به شرح زیر می‌باشد:

براساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه به منظور مقایسه تعداد گلبول‌های سفید، تعداد کل گلبول‌های قرمز، هماتوکریت، هموگلوبین، حجم متوسط گلبولی، غلظت متوسط هموگلوبین، MCHC، نوتروفیل، لنفوسیت و مونوسیت در خون ماهیان مورد بررسی بین شاهد و تیمارها اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده شد ($P < 0/05$). بیشترین تعداد گلبول‌های سفید در شاهد مشاهده گردید و به لحاظ آماری بین همه تیمارها با شاهد اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده گردید ($P < 0/05$) و میزان گلبول‌های سفید در تیمارها از روند کاهشی برخوردار بوده‌اند، به طوری که کمترین

جدول ۳- مقادیر پارامترهای خونی در غلظت‌های مختلف سم کاپتان

فاکتور	تیمار	خطای استاندارد \pm میانگین	فاکتور	خطای استاندارد \pm میانگین
	شاهد	$8433/33 \pm 158/46^d$		$314/35 \pm 1/08^b$
گلبول‌های سفید	LC ۲۵٪	$7216/67 \pm 135/19^c$	حجم متوسط گلبولی (MCV)	$297/34 \pm 6/61^a$
	LC ۵۰٪	$3783/33 \pm 60/39^b$		$325/27 \pm 2/08^{bc}$
	LC ۷۵٪	$2866/67 \pm 170/61^a$		$329/55 \pm 3/76^c$
گلبول‌های قرمز	شاهد	$1177167 \pm 28190/33^b$	غلظت متوسط هموگلوبین در گلبول قرمز (MCH)	$66/11 \pm 0/27^b$
	LC ۲۵٪	$1124500 \pm 35687/3^b$		$61/54 \pm 1/45^a$
	LC ۵۰٪	$876500 \pm 15920/11^a$		$66/17 \pm 0/03^b$
	LC ۷۵٪	$698200 \pm 35848/01^a$		$66/89 \pm 0/47^b$
هماتوکریت	شاهد	$37 \pm 0/85^d$	MCHC	$21/03 \pm 0/12^b$
	LC ۲۵٪	$33/33 \pm 0/55^c$		$20/70 \pm 0/28^{ab}$
	LC ۵۰٪	$28/5 \pm 0/42^b$		$20/34 \pm 0/12^a$
	LC ۷۵٪	$23 \pm 1/18^a$		$20/30 \pm 0/17^a$
هموگلوبین	شاهد	$7/78 \pm 0/19^d$	نوتروفیل	$39/83 \pm 1/16^a$
	LC ۲۵٪	$6/9 \pm 0/12^c$		$48 \pm 1/29^b$
	LC ۵۰٪	$5/8 \pm 0/10^b$		$63 \pm 1/09^c$
	LC ۷۵٪	$4/66 \pm 0/22^a$		$70/66 \pm 1/60^d$
لنفوسیت	شاهد	$58/33 \pm 1/05^d$	مونوسیت	$1/33 \pm 0/21^a$
	LC ۲۵٪	$48/83 \pm 1/13^c$		$2/66 \pm 0/21^b$
	LC ۵۰٪	$32 \pm 0/89^b$		$3/66 \pm 0/21^c$
	LC ۷۵٪	$26/83 \pm 2/58^a$		$4/33 \pm 0/21^d$
ائوزوفیل	شاهد	$0/5 \pm 0/22^a$		
	LC ۲۵٪	$0/5 \pm 0/22^a$		
	LC ۵۰٪	$1/33 \pm 0/33^b$		
	LC ۷۵٪	$0/66 \pm 0/21^{ab}$		

است ($P < 0/05$) و میزان مونوسیت در تیمارها افزایش داشته است و در غلظت ۷۵ درصد از بیشترین میزان برخوردار بوده است. در مقایسه ائوزوفیل خون بچه‌ماهیان بین شاهد و تیمارها اختلاف معنی‌دار مشاهده شد ($P < 0/05$). در این ارتباط بین میزان ائوزوفیل در غلظت ۵۰ درصد با غلظت ۲۵ درصد و شاهد اختلاف معنی‌دار مشاهده شد و میزان این فاکتور در غلظت ۵۰ درصد بیش از سایر تیمارها و شاهد بوده است.

بحث و نتیجه‌گیری

آزمایش‌ها نشان داد که با افزایش زمان آزمایش به ۹۶ ساعت از غلظت LC₁₀ کاهش یافته که این

میانگین میزان MCHC در شاهد بیش از سایر غلظت‌ها بوده است ($P < 0/05$). بر این اساس، میزان هموگلوبین در تیمارها روند کاهشی داشته به طوری که کمترین میزان MCHC در غلظت‌ها ۷۵ درصد بوده است. میانگین میزان نوتروفیل در شاهد کمتر از سایر غلظت‌ها بوده است ($P < 0/05$). در این ارتباط، میزان نوتروفیل در تیمارها روند افزایشی داشته به طوری که بیشترین میزان نوتروفیل در غلظت ۷۵ درصد مشاهده شده است. میانگین میزان لنفوسیت در شاهد کمتر از سایر غلظت‌ها بوده و اختلاف معنی‌دار داشته است ($P < 0/05$). و میزان لنفوسیت در تیمارهای ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد نسبت به شاهد کاهش داشته‌اند. میانگین میزان مونوسیت در شاهد کمتر از سایر غلظت‌ها بوده

باشد، به مرور زمان هم مقاومت ماهی تحلیل می‌رود و هم سم فرصت بیشتری برای تأثیرگذاری روی ماهی دارد. علاوه بر این، در مواردی تجمع سم در بافت‌های ماهی نیز باعث ایجاد غلظت‌های فزاینده‌ای می‌شود که خود به مرور زمان موجب پائین آمدن LC₅₀ می‌شود. میزان LC₅₀ 96h بدست آمده برای سم کاپتان در این تحقیق ۰/۹ میلی‌گرم در لیتر تعیین شده است (جدول ۵). سطوح سمیت آفت‌کش‌ها را در Pesticide dictionary (۱۹۹۳) نشان می‌دهد (پیری زیرکوهی و همکاران، ۱۳۷۶).

موضوع برای مقادیر LC₅₀ و LC₉₀ نیز صادق است. به بیانی دیگر، در ۲۴ ساعت نسبت به ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت، مقادیر بیشتری از سم لازم است تا تأثیرات کشنده خود را نمایان سازد. به عبارت دیگر، هر چقدر ساعات آزمایش افزایش می‌یابد میزان غلظت کمتری از سم لازم است تا ۵۰ درصد از جمعیت ماهیان تلف شوند و مقدار LC₅₀ در ۲۴ ساعت اولیه آزمایش همواره بیشتر از LC₅₀ در پایان ۹۶ ساعت می‌باشد. علت این امر را چنین می‌توان ذکر کرد که یکی از عوامل تأثیرگذار در مسمومیت آبزیان عامل زمان است. هنگامی که ماهی در معرض غلظت ثابتی از سم

جدول ۵- سطوح سمیت آفت‌کش‌ها

درجه سمیت	LC ₅₀ 96h (میلی‌گرم در لیتر)
تقریباً غیرسمی	>۱۰۰
سمیت کم	۱۰-۱۰۰
سمیت متوسط	۱-۱۰
سمیت زیاد	۰/۱-۱
سمیت خیلی زیاد	<۰/۱

بر اساس جدول (۵) و با توجه به این که LC₅₀ 96h سم کاپتان برای بچه ماهیان کپور علفخوار (آمور) (*Ctenopharyngodon idella*) در این تحقیق بین ۰/۱-۱ میلی‌گرم در لیتر (LC₅₀96h) سم کاپتان برابر با ۰/۹ میلی‌گرم در لیتر محاسبه شد) بدست آمد، لذا می‌توان گفت که سم کاپتان برای بچه‌ماهیان کپور علفخوار از نظر درجه سمیت در درجه "سموم با "سمیت زیاد" (High toxic) قرار دارد. همچنین در سایر تحقیقات دیگری که بر روی سمیت حاد (LC₅₀ 96h) انجام پذیرفت، نتایج زیر حاصل گردید؛ مقدار LC₅₀ 96h سم کاپتان در جهان برای مارماهی ژاپنی (*Anguilla japonica*) برابر ۴۴۰ میلی‌گرم در لیتر، ماهی حوض نقره‌ای (*Carassius auratus*) برابر ۳۶۲/۸ میلی‌گرم در لیتر

برای *Clarias batrachus*) برابر ۲۳۲/۵ میلی‌گرم در لیتر، ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) برابر ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر، ماهی *Brachydanio rerio* برابر ۶۸۵ میلی‌گرم در لیتر، ماهی *Ictalurus punctatus* برابر ۷۸/۷ میلی‌گرم در لیتر، ماهی *Lepomis macrochirus* برابر ۱۲۱/۸ میلی‌گرم در لیتر، ماهی *Misgurnus anguillicaudatus* برابر ۳۴۰ میلی‌گرم در لیتر، ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) برابر ۱۶۶ میلی‌گرم در لیتر، ماهی *Oncorhynchus kisutch* برابر ۹۲/۳ میلی‌گرم در لیتر، ماهی *Oncorhynchus clarki* برابر ۶۵/۲ میلی‌گرم در لیتر بیان شده است (شیخی، ۱۳۸۸). مقدار LC₅₀ 96h سم کاپتان برای کپور علفخوار (آمور) (*Ctenopharyngodon idella*)

صورتی که میزان MCV، مونوسیت و نوتروفیل در جنس نر و ماده افزایش یافت (Kumar, ۲۰۰۳). در مارماهی آسیایی (*Monopetrus albus*) که در معرض سم ارگانوکلره Endosulfan قرار گرفت، نتایج مشابهی بدست آمد؛ بطوری که میزان RBC، لکوسیت و هموگلوبین و هماتوکریت کاهش یافت (Hii و همکاران، ۲۰۰۷). در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus caprio*) که توسط Jenkins (۲۰۰۳) در معرض سم ارگانوکلره آندوسولفان قرار گرفته بود، نتایج مشابهی بدست آمد؛ بطوری که میزان RBC، هموگلوبین و هماتوکریت کاهش یافت. همان طوری که مشاهده می شود یکی از اثرات آفت کش ها، اثرگذاری بر روی موازنه خونی است که سبب آنمی می گردد که این آنمی یا کم خونی به علت کمبود آهن و متعاقب آن، کاهش سنتز هموگلوبین است که Pandy و همکاران (۱۹۸۲) در ماهی (*Clarias batrachus*) قرار گرفته در معرض Metacid، Verma و همکاران (۱۹۸۲) در ماهی (*Mystus vittatus*) قرار گرفته در معرض Dichlorvos و Carbofuran و Thiotox این کم خونی را مشاهده نمودند. می توان نتیجه گیری کرد که میزان عکس العمل و ضایعات ناشی از این سم در آبزیان به عواملی مانند سن، گونه، وضعیت فیزیولوژی بدن آبزی، شرایط کیفی آب مانند درجه حرارت، pH و سختی کل بستگی دارد (خانجانی و پورمیرزا، ۱۳۸۴). به عنوان مثال؛ هر چقدر درجه سختی آب بالا باشد از میزان سمیت این سم (کاپتان) کاسته می شود.

تقدیر و تشکر

از زحمات جناب آقای دکتر عباسعلی زمینی و دکتر مسعود فرخ روز اساتید گروه شیلات دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان و آقای مهندس کاظمی و حلاجیان کارشناسان انستیتوی تحقیقات دکتر دادمان رشت تشکر و قدردانی می نمایم.

پس از انجام آزمایشات، ۰/۹ میلی گرم در لیتر تعیین شد و حداکثر غلظت مجاز این سم در مدت ۹۶ ساعت برابر با ۰/۰۹ میلی گرم در لیتر محاسبه گردید. مقایسه حساسیت این ماهیان با آمور در برابر تأثیر سم کاپتان بصورت زیر می باشد:

Oncorhynchus < *Ctenopharyngodon idella*
Oncorhynchus < *Ictalurus punctatus* < *clarki mykiss* < *Lepomis macrochirus* < *kisutch*
Cyprinus < *Clarias batrachus* < *Oncorhynchus*
 < *Misgurnus anguillicaudatus* < *carpio*
 < *Carassius auratus* < *Anguilla japonica*
Brachydanio rerio

این مقایسه نشان می دهد که کپور علفخوار (آمور) در برابر سم کاپتان نسبت به ماهیان ذکر شده در بالا برخوردار است و *Brachydanio rerio* دارای مقاومت بیشتری می باشد. پاسخ عمده هماتولوژیکی بچه ماهیان آمور به سم کاپتان اختلاف معنی دار است که بین میزان هموگلوبین، گلبول سفید، گلبول قرمز، هماتوکریت، ائوزوفیل، مونوسیت، لنفوسیت، نوتروفیل، MCV، MCHC در خون بچه ماهیان آمور بین شاهد و تیمار وجود دارد ($P < 0/05$) و همچنین کاهش معنی دار گلبول های سفید، گلبول های قرمز، هماتوکریت، هموگلوبین، MCHC، لنفوسیت، و کاهش ائوزوفیل (به غیر از تیمار ۵۰ درصد)، افزایش حجم متوسط گلبولی (MCV) (به غیر از تیمار ۲۵ درصد)، افزایش نوتروفیل، افزایش مونوسیت و افزایش MCH (به غیر از تیمار ۲۵ درصد) مشاهده شده است و نتایج مشابهی توسط میرزایی (۱۳۸۳)، علی نژاد (۱۳۸۳)، زمینی (۱۳۷۵)، Barak (۱۹۹۰) و Mance (۱۹۹۰) بر روی دیگر ماهیان انجام گرفته که این تغییرات را تأیید می کند. طبق نتایج بدست آمده بر روی ماهی استخوانی آب شیرین *Clarias batrachus* که تحت تأثیر سم بوتاکلر قرار گرفته بود، میزان هموگلوبین آن در جنس نر و ماده کاهش و میزان RBC در جنس نر و ماده، مقدار PVC در جنس نر و ماده کاهش یافت؛ در

منابع

- ۱-بامدادیان، ع. ۱۳۷۶. قارچ کش ها و کاربرد آن در کشاورزی، انتشارات برهمند، نوبت اول، ۲۲۷ ص.
- ۲-پیری زیرکوهی، م.، نظامی، ش.ع.، امینی رنجبر، غ.ر. و اردگ، و. ۱۳۷۶. مطالعات اکوتوکسیکولوژی بر روی *Daphnia magna* و تعیین اثر سموم Machete, Saturn, Diazinon, Malathion بر این ارگانیزم. مجله علمی شیلات ایران، شماره ۳، سال ششم، صفحات ۲۳ تا ۳۴.
- ۳-خانجانی، م. و پورمیرزا، ع.ا. ۱۳۸۴. سم شناسی. انتشارات دانشگاه بوعلی سینا. چاپ سوم. ۴۴۰ ص.
- ۴-زمینی، ع.ع. ۱۳۷۵. تعیین غلظت کشنده LC₅₀ 96h فلزات سرب و کادمیم بر روی دو گونه از کپور ماهیان چینی (آمور و فیتوفاگ). پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات دانشگاه آزاداسلامی واحد لاهیجان، ۵۶ ص.
- ۵-شیخی، ع. ۱۳۸۸. راهنمای آفت کش های ایران، موسسه تحقیقات گیاه پزشکی.
- ۶-عامری مهابادی، م. روش های آزمایشگاهی هماتولوژی دامپزشکی. ۱۳۷۸. موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، شماره ۱۲۶. ۲۴۴۷ صفحه و مصور.
- ۷-علی نژاد، ر. ۱۳۸۳. تعیین LC₅₀ 96h سموم حشره کش ریجنت، قارچ کش هینوزان و علف کش رانداپ روی دو گونه ماهی خاویاری ازون برون و قره برون، ۴۰-۵۵ ص.
- ۸-کاظمی، ر.، پوردهقانی، م.، یوسفی جوردی، ا.، یارمحمدی، م. و نصری تجن، م. ۱۳۸۹. فیزیولوژی دستگاه گردش خون آبزیان و فنون کاربردی خون شناسی ماهیان. انتشارات بازرگان رشت. ۱۹۴ ص.
- ۹-میرزایی، ج. ۱۳۸۳. تعیین LC₅₀ 96h عناصر سنگین مس، روی، سرب و کادمیم بر روی بچه ماهیان قره برون (*Acipenser persicus*) و ازون برون (*Acipenser stellatus*). پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات دانشگاه آزاداسلامی واحد لاهیجان ۴-۱ ص.
- ۱۰-محمدنژاد شמושکی، م.، محمدشریفی، ل.، صالحی، و. و ملکی، ش. ۱۳۸۸. تعیین غلظت کشنده (LC₅₀ 96h) سم آندوسولفان بروی بچه ماهیان سفید ۱ تا ۳ گرمی (*Rutilus frisii kutum*). کلمه (*Rutilus rutilus caspicus*) و کپور دریایی (*Cyprinus carpio*). فصلنامه علمی-پژوهشی زیست شناسی جانوری، سال اول، شماره چهارم، صفحات ۵۱ تا ۵۸.
11. Barak, N.A.E., and Mason, C.E. 1990. Mercury, cadmium and lead concentration in five Species of freshwater fish from eastern England. *Sci. Total, Environ.* 92, 257-264.
12. Hii, Y.S., Lee, M., and Chuah, T.S. 2007. Acute toxicity of organochlorine insecticide endosulfan and it's effect on behavior and some hematological parameters of Asian Swampell (*Monopterus albus*). *Pesticide Biochemistry and physiology*, 89, 46-53.
13. Jenkins, F., Smith, J., Hajannab, Sh., and Umadevik, S. 2003. Effect of sub lethal concentration of endosulfan on hematological and serum biochemical parameters in the carp (*Cyprinus carpio*) *Bull Environ Contam Toxicol.* 70: 993-997.
14. Kumar, A. 1962. Aquatic Environment and toxicology, Environment Biology Research unit. P.S.K. University, Dumaka-814101-Lagaret, K.F., Bardach, J.E.R.R. Miller, *Ichthyology*, 4, 135-139.
15. Klinger, R.C., Blaer, V.S., and Echvarria, C., 1996. Effect of dietary lipid on the hematology of Channel catfish, *Ictalurus punctatus*, *Aquaculture*, 147, 225-233.
16. Luskova, V. 1996. Annual cycles and normal values of hematological parameters in fishes. *Acta Sci. Nat. Brono.*, 31:1-70.
17. Mance, G., 1990. Pollution threat of heavy metals in aquatic environmental, Elsevier Science publisher LTD. pp.32-123.
18. O.E.C.D. (Organization Economic Cooperation Development)., 2001. Guideline for testing of chemicals: No.210.section 2. Effect on biotic system direction. 1-39.
19. Pandey, B.N., Prasad, S.S., Chanchal, A.K., and Singh, S.B. 1982. Effect of some pesticides on the oxidative metabolism and hematology of *Clarias batrachus* (Linn) *proc. Sem. Eff. Pest. Aq. Face*, 13-18.
20. Ramesh, M., and Saravanan, M. 2008. Hematological and biochemical responses in a freshwater fish *Cyprinus carpio* exposed to chlorpyrifos. *International Journal of Integrative Biology.* 3, 1, 80-83.
21. USEPA, 1985. Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms. 3rd Ed. Environmental Protection Agency, Environmental Monitoring and Support Laboratory, Cincinnati, OH. EPA-600/4-85/013.
22. Verma. S., Rani, R., and Dalela, S. 1982. Indicator of stress induced by pesticides in *Mystus vittatus* hematological parameters. *India J. Environ. Hlth.*, 24 (1): 58-64.