



دانشگاه گنبد کاووس

نشریه "پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی"

دوره ششم، شماره سوم، پاییز ۹۷

<http://jair.gonbad.ac.ir>

## اثرات سطوح کشنده و تحت کشنده مالاتیون در ماهی قرمز (*Carassius auratus*) (Linnaeus, 1758): مطالعات خون‌شناسی، بافت‌شناسی کبد و آنزیم‌های کبدی

زینب حنایی کاشانی<sup>\*</sup>، محمدرضا ایمانیپور<sup>۲</sup>، وحید زادمجید<sup>۳</sup>، محمد مازندرانی<sup>۴</sup>

دانش‌آموخته دکتری تکثیر و پرورش آبزیان، گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران  
 ۱ استاد، گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران  
 ۲ استادیار، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران  
 ۴ دانشیار، گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ ارسال: ۹۵/۸/۱۲؛ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۱/۱۸

### چکیده

در بررسی حاضر اثرات مواجهه کشنده و تحت کشنده سم مالاتیون در ماهی قرمز در مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور در ابتدا ماهیان با سطوح مختلف غلظت کشنده مالاتیون (۱۵ تا ۲۵ میلی‌گرم/لیتر) مورد مواجهه قرار گرفتند و مقدار LC<sub>50</sub> مالاتیون برابر با ۲۳/۵ میلی‌گرم برای این ماهی محاسبه گردید. سپس ماهیان با غلظت‌های تحت کشنده LC<sub>50</sub> ۰/۱ (۲۳/۰ میلی‌گرم در لیتر) و LC<sub>50</sub> ۰/۰۱ (۲۳/۰ میلی‌گرم در لیتر) به مدت ۷ ماه مورد مواجهه قرار گرفتند. بعد از اتمام آزمایش تأثیر این سم بر میزان هماتوکریت، هموگلوبین، تعداد گلبول‌های سفید و قرمز، متوسط هموگلوبین گلبولی (MCH)، متوسط حجم گلبولی (MCV)، غلظت متوسط هموگلوبین گلبولی (MCHC)، آلانین ترانسفراز (ALT)، آلکالین فسفاتاز (ALP)، آسپارات آمینو ترانسفراز (AST)، تستسترون، پروتئین کل و گلوکز خون بررسی شد. درصد هماتوکریت، هموگلوبین، تعداد گلبول‌های سفید و قرمز، متوسط هموگلوبین گلبولی (MCH)، متوسط حجم گلبولی (MCV) و غلظت متوسط هموگلوبین گلبولی (MCHC) در بین گروه‌های آزمایشی معنی‌دار بود به طوری که ماهیانی که تحت غلظت LC<sub>50</sub> ۰/۱ از سم مالاتیون بودند کمترین میزان هماتوکریت، هموگلوبین، تعداد گلبول‌های سفید و قرمز، MCH و MCHC نسبت به تیمار شاهد داشتند. کمترین میزان آلانین آمینو ترانسفراز، پروتئین کل، تستسترون و گلوکز در تیمار LC<sub>50</sub> ۰/۱ مالاتیون مشاهده شد و حداقل میزان آلکالین فسفاتاز و آسپارات آمینو ترانسفراز در گروه شاهد به دست آمد. در بررسی‌های بافت‌شناسی عوارضی از قبیل دژنره شدن سلول‌های هیپاتوسیت، واکوئلیزاسیون گسترده سلول‌های هیپاتوسیت کبد، تجمع ملانوماکروفاژها و نکروز موضعی کبد در ماهیانی که با غلظت LC<sub>50</sub> ۰/۱ مواجهه داده شده بودند مشاهده گردید در عین حال در ماهیانی که با غلظت LC<sub>50</sub> ۰/۰۱ مواجهه شده بودند عوارض کبدی ملایم‌تری ثبت گردید.

واژه‌های کلیدی: *C. auratus*، مالاتیون، پارامترهای خون‌شناسی، بافت‌شناسی

\*نویسنده مسئول: [z.h.kashani@gmail.com](mailto:z.h.kashani@gmail.com)

## مقدمه

آفت‌کش‌ها در فصل خشک که ظرفیت رقیق‌سازی آبی پایین است یا خطر غلظت‌های بالای مواد شیمیایی در حال افزایش است سبب مشکلات زیست محیطی جدی می‌شوند. علاوه بر این، فصول خشک، دوره حیاتی مهمی برای بعضی از حیوانات به‌خصوص ماهیان و پرندگان است (Adedej *et al.*, 2009). استفاده از سموم آفت‌کش تا زمانی که شیوه‌های مبارزه بیولوژیک با آفات گیاهی مرسوم نشود امری اجتناب‌ناپذیر است، بنابراین توصیه بر این است که حداقل از آفت‌کش‌هایی با درجه سمیت و نیمه عمر کمتر استفاده شود. اکوسیستم‌های آبی به‌عنوان بزرگ‌ترین بخش محیط طبیعی همواره با تهدیدهایی نظیر محدودیت ژنتیکی و تنوع زیستی مواجه است. اکوسیستم‌های آبی به‌عنوان محیط هدف برای سموم آفت‌کش مد نظر نمی‌باشد (Venkateswara Rao, 2006). داده‌های مربوط به سمیت ناشی از استعمال آفت‌کش‌ها و تأثیر آن بر موجودات غیر هدف مثل ماهی به‌عنوان مبنا و پایه‌ای برای سنجش و تعیین خطرات سم‌شناسی اکولوژیکی (Ecotoxicology) آفت‌کش‌ها بر سیستم‌های آبی است (Gangolli, 1999).

مالاتیون یکی از خطرناک‌ترین سموم ارگانوفسفره‌ای است که به‌عنوان حشره‌کش، جهت مبارزه با آفات نباتی، مورد استفاده قرار گرفته و مشکلاتی برای محیط زیست در سرتاسر دنیا بوجود آورده است (Elbadawi and Ramadan, 2006). مالاتیون در آب ۲۵ درجه سانتی‌گراد به میزان ۱۴۵ میلی‌گرم در لیتر حل شده و در حلال‌هایی همچون الکل، استر، کتون‌ها و اتر نیز به سهولت حل می‌گردد. مالاتیون عمدتاً دارای اثرات سمی است (Edwards, 2006) و تأثیرات مخربی بر گونه‌های مختلف ماهیان بر جای می‌گذارد. ویژگی‌های خونی و تغییرات پروفیل شیمیایی خون، یکی از مهم‌ترین شاخص‌های زیستی عمومی و نشانگر تغییر در متابولیسم و هموستتازی بدن ماهی است که به‌طور عمده ناشی از تأثیر آلاینده‌هاست که در پژوهش‌های سم‌شناسی آزمایشگاهی از آن‌ها استفاده می‌شود (Amini and Oryan, 2002).

خون به‌عنوان یک بافت سیال، یکی از مهم‌ترین مایعات زیستی بدن است که تحت تأثیر حالت‌های مختلف، ترکیبات آن دستخوش تغییر و نوسان می‌شود (Amini and Oryan, 2002). آفت‌کش در آب نوعی استرس شیمیایی محسوب می‌شود و بر شاخص‌های خون شناسی نظیر میزان هماتوکریت اثرگذار است. ماهی قرمز از لحاظ شرایط زیستی و تغذیه‌ای شبیه کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) است (Vosoughi and Mostajir, 1993). باتوجه به اهمیت این ماهی که به‌طور گسترده در مطالعات تولید مثلی و بررسی‌های هورمونی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Bjerselius *et al.*, 2001). با توجه به ورود گسترده این سموم به محیط‌های آبی محل زیست این ماهیان، امروزه پژوهش‌های گسترده‌ای در مورد این سموم و افزایش تداخل آن‌ها با آبزیان به ویژه ماهیان صورت گرفته است. باتوجه به شباهت، خصوصیات و عملکرد این گونه با کپور معمولی به‌عنوان گونه‌ای با اهمیت اقتصادی زیاد، این پژوهش انجام گرفت تا مشخص شود

که چه میزان و چه غلظتی از این سم برای این ماهیان خطرناک است تا بتوان یک الگوی کلی برای ارزیابی سمیت این مواد بر تغییرات خونی و بافت شناسی در کپورماهیان در نظر گرفت.

### مواد و روش‌ها

**تهیه بچه ماهی و سازگاری ماهیان با شرایط آزمایش:** تعداد ۲۰۰ عدد ماهی قرمز جهت انجام مراحل آزمایش از مزرعه پرورش ماهی واقع در رشت تهیه و در اردیبهشت ماه ۱۳۹۴ به مرکز تحقیقات آبی پروری شهید ناصر فضلی گروه شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل شد. این تحقیق به مدت ۷ ماه از اردیبهشت تا آذر انجام شد. مولدین نر ماهی قرمز پس از صید برای سازگاری با محیط آزمایش به مدت ۱ هفته در مخازن فایبر گلاس نگهداری شدند. هر یک از ونیروها به صورت جداگانه به سیستم هوادهی مجهز شدند تا سطح اکسیژن آب در سطح استاندارد قرار گیرد. پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب از جمله دما، میزان اکسیژن و pH به ترتیب در محدوده  $21.7 \pm 0.14$  درجه سانتی‌گراد،  $6 \pm 0.5$  میلی‌گرم بر لیتر و  $8 \pm 0.08$  قرار داشتند. طی این مدت ماهیان با جیره غذایی بیومار (Biomar Co., France) روزانه ۲ بار تغذیه شدند.

**تعیین غلظت میانه و طرح آزمایش:** به منظور یافتن محدوده غلظت کشندگی سم مالاتیون روی مولدین نر ماهی قرمز محدوده غلظت‌های ۱۵، ۱۷، ۲۰، ۲۳، ۲۴ و ۲۵ میلی‌گرم در لیتر در نظر گرفته شد. در هر تیمار ۱۰ ماهی قرار گرفت. در دوره آزمایش غذایی قطع شد (Di Giulio and Hinton, 2008). در طی آزمایش، شرایط فیزیکی و شیمیایی آب کنترل و تمام شرایط در طی دوره آزمایش یکسان نگهداری شد تا تنها عامل متغیر، غلظت‌های مختلف سمیت باشد (Di Giulio and Hinton, 2008). تمامی آکواریوم‌ها به گونه‌ای که حداقل آشفستگی در آن‌ها ایجاد شود هوادهی می‌شدند. تمامی ماهیان به مدت ۹۶ ساعت در غلظت‌های مورد نظر نگهداری و میزان تلفات در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت محاسبه شد (Hotos and Vlahos, 1998). مقادیر  $LC_{50}$  به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار Probit برابر  $23/5$  میلی‌گرم در لیتر سم مالاتیون بود. پس از تعیین میزان  $LC_{50}$ ، تیمار بندی نهایی بر اساس غلظت‌های  $LC_{50} \times 0.1$  ( $2/35$ ) و  $LC_{50} \times 0.01$  ( $0/235$ ) مالاتیون و تیمار شاهد (بدون سم) انجام شد و ماهیان به مدت ۷ ماه در معرض این غلظت از سم مالاتیون قرار گرفتند.

**بررسی‌های خون شناسی:** بعد از طی دوره قرارگرفتن ماهیان در معرض سم مالاتیون، مولدین با عصاره گل میخک بیهوش شدند و خون‌گیری از ماهیان با استفاده از سرنگ‌های هیپارینه ۲ سی‌سی انجام گرفت. برای اندازه‌گیری هماتوکریت، لوله‌های مویینه حاوی خون، به مدت ۱۰ دقیقه و در  $4000$  دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس با استفاده از میکروهماتوکریت خون، میزان هماتوکریت نمونه‌ها اندازه‌گیری شد

(Amini and Oryan, 2002). همچنین جهت اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی خون، پلاسما خون با دستگاه سانتریفیوژ در دور ۸۰۰۰ به مدت ۸ دقیقه سانتریفیوژ گردید. غلظت گلوکز، پروتئین کل با استفاده از کیت‌های کمی مخصوص اندازه‌گیری گلوکز و پروتئین (شرکت پیشتاز طب) و بر اساس روش‌های فتومتریک و برای تعیین پروتئین کل از دستگاه الکتروفوتومتر استفاده شد. هورمون تستسترون در این مطالعه به روش رادیو ایمنسی (RIA) با استفاده از کیت اسپکترا (شرکت Immunotech، ساخت چک) اندازه‌گیری شد (Simmons, 1997). سنجش آنزیم آلانین آمینوترانسفراز و آسپارات آمینوترانسفراز به روش رنگ‌سنجی سینتیک و آلکالین فسفاتاز به روش آنزیماتیک سینتیک صورت گرفت (Simmons, 1997).

**بررسی‌های بافت شناسی:** به منظور بررسی‌های بافت شناسی، اندام کبد ماهیان مورد آزمایش بلافاصله پس از مرگ جدا شد و در محلول فیکساتور بوئن تثبیت گردید. نمونه‌ها پس از ۲۴ ساعت، از محلول بوئن خارج و برای نگهداری در الکل قرار گرفت. برای تهیه اسلایدهای بافتی، نمونه‌ها پس از مراحل معمول بافت‌شناسی که عبارتند از آب‌گیری، شفاف‌سازی پارافینه شدن، قالب‌گیری، برش‌های بافتی ۳/۰ میکرونی با دستگاه میکروتوم آماده شد و روی لام، مونته گردیدند. اسلایدها با رنگ آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین و نصب لامل روی لام حاوی بافت آماده شد. اسلایدهای بافتی با کمک میکروسکوپ نوری متصل به مانیتور و مجهز به دوربین عکاسی مورد بررسی قرار گرفتند (Afzali et al., 2010).

## نتایج

**میزان تلفات در مواجهه با غلظت‌های مختلف سم:** پس از انجام آزمایش‌های ابتدایی به منظور یافتن محدوده کشندگی سم مالاتیون روی ماهی قرمز، محدوده غلظت‌های ۱۷، ۲۰، ۲۳ و ۲۵ میلی‌گرم در لیتر (ppm) به عنوان محدوده کشندگی مالاتیون در زمان‌های ۹۶، ۷۲، ۴۸، ۲۴ ساعت روی ماهیان قرمز تعیین شد. بر اساس نتایج حاصل از این بررسی، میزان تلفات در ۹۶ ساعت در تیمارهای ۲۰، ۲۳ و ۲۵ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب برابر ۲۰، ۴۰ و ۹۰ درصد ماهی در هر تیمار بودند.

**نتایج خون‌شناسی:** مطابق نتایج در جدول ۱، با افزایش غلظت سم مالاتیون، میزان هماتوکریت، هموگلوبین، تعداد گلبول‌های قرمز و سفید خون، MCH و MCHC نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافت. به طوری که ماهیانی که تحت تأثیر غلظت  $LC_{50}$  ۰/۱ مالاتیون قرار داشتند کمترین میزان هماتوکریت، هموگلوبین، تعداد گلبول‌های قرمز و سفید خون، MCH و MCHC را داشتند.

جدول ۱- نتایج حاصل از آنالیز خون ماهی مولد قرمز نر (*C. auratus*) در تیمارهای مختلف سم مالاتیون در پایان آزمایش (انحراف معیار  $\pm$  میانگین).

پارامتر	تیمار	مالاتیون ( $LC_{50}/0.1$ )	مالاتیون ( $LC_{50}/0.1$ )	شاهد (بدون سم)
هماتوکریت (%)	۳۱/۰۰ <sup>c</sup> $\pm$ ۱/۰۰	۳۵/۳۴ <sup>b</sup> $\pm$ ۰/۶۰	۴۶/۰۰ <sup>a</sup> $\pm$ ۱/۰۰	
هموگلوبین (%)	۳/۱۶ <sup>c</sup> $\pm$ ۰/۷۶	۸/۳۳ <sup>b</sup> $\pm$ ۰/۵۷	۱۴/۵ <sup>a</sup> $\pm$ ۰/۸۶	
گلبول قرمز (تعداد $10^5$ /میلی متر مکعب)	۸ <sup>c</sup> $\pm$ ۰/۵۷	۱۰ <sup>b</sup> $\pm$ ۱/۱۵	۱۲/۳ <sup>a</sup> $\pm$ ۰/۵۹	
گلبول سفید (تعداد $10^4$ /میلی متر مکعب)	۱/۹۳ <sup>c</sup> $\pm$ ۱/۵۳	۱/۹۸ <sup>b</sup> $\pm$ ۰/۵۸	۳/۱۵ <sup>a</sup> $\pm$ ۱/۱۵	
MCV ( $10^2$ فمتولیت)	۳۸۷ <sup>a</sup> $\pm$ ۷/۲	۳۵۳ <sup>b</sup> $\pm$ ۳/۳	۳۷۳ <sup>a,b</sup> $\pm$ ۸/۱	
MCH (پیکوگرم)	۳۹/۵۸ <sup>c</sup> $\pm$ ۹/۵	۸۳/۳۳ <sup>b</sup> $\pm$ ۵/۷	۱۱۷/۸۹ <sup>a</sup> $\pm$ ۴/۰۶	
MCHC (%)	۱۰/۱۷ <sup>c</sup> $\pm$ ۲/۱۲	۲۳/۰۷ <sup>b</sup> $\pm$ ۸/۵۳	۳۱/۵۵ <sup>a</sup> $\pm$ ۲/۵۲	

حروف انگلیسی غیر مشترک در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار ( $P < 0.05$ ) می باشد.

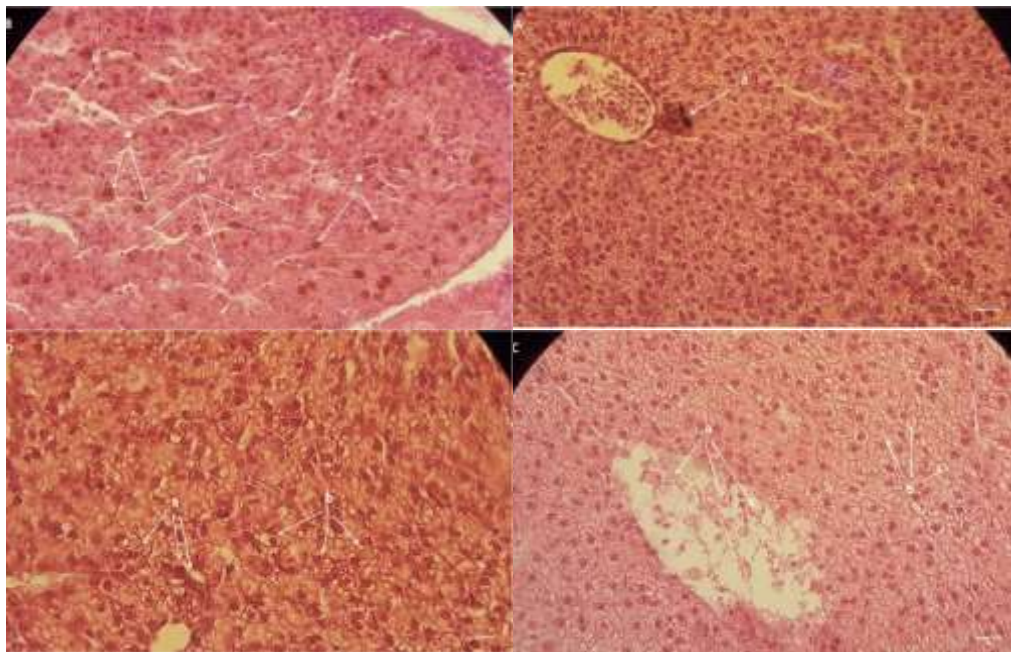
پس از در معرض قرار گرفتن مولدین در برابر سم، به منظور مطالعات بیوشیمیایی، سرم خون را جدا نموده و مقدار آنزیم‌های متابولیکی شامل آلکالین فسفاتاز (ALP)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپارات آمینوترانسفراز (AST)، تستسترون، پروتئین کل و گلوکز خون اندازه‌گیری شد که در جدول ۲ بیان شده است. بر اساس نتایج جدول ۲، پارامترهای بیوشیمیایی خون در میان تیمارهای آزمایشی تفاوت معنی‌داری داشتند ( $P < 0.05$ ). نتایج نشان می‌دهد که با افزایش غلظت سم مالاتیون، میزان آلانین آمینوترانسفراز، آلکالین فسفاتاز (ALP) و آسپارات آمینوترانسفراز به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. به طوری که ماهیانی که در مواجهه با غلظت  $LC_{50} 0.1$  از مالاتیون بودند بالاترین میزان را نسبت به گروه شاهد داشتند. میزان گلوکز، پروتئین کل و تستسترون میان تیمارها معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ ) و این پارامترها در گروه شاهد نسبت به سایر تیمارها افزایش یافت.

جدول ۲- نتایج حاصل از آنالیز بیوشیمیایی خون ماهی مولد قرمز نر (*C. auratus*) در تیمارهای مختلف سم مالاتیون در پایان آزمایش (انحراف معیار  $\pm$  میانگین)

پارامتر	تیمار	مالاتیون ( $LC_{50}/0.1$ )	مالاتیون ( $LC_{50}/0.1$ )	شاهد
آلکالین فسفاتاز (ALP)	۳۸۸/۳۳ <sup>a</sup> $\pm$ ۰/۵۸	۱۵۶/۳۳ <sup>b</sup> $\pm$ ۰/۵۸	۱۱۲/۳۳ <sup>c</sup> $\pm$ ۰/۵۸	
آسپارات آمینوترانسفراز (AST)	۱۱۳۶/۳ <sup>a</sup> $\pm$ ۰/۵۰	۱۱۲۸/۵ <sup>b</sup> $\pm$ ۰/۵۰	۹۰۸/۳۳ <sup>c</sup> $\pm$ ۰/۵۱	
آلانین آمینو ترانسفراز (ALT)	۱۲/۳۴ <sup>a</sup> $\pm$ ۰/۵۰	۷/۱۴ <sup>b</sup> $\pm$ ۰/۵۰	۲/۶۴ <sup>c</sup> $\pm$ ۰/۵۰	
تستسترون	۰/۱۰ <sup>c</sup> $\pm$ ۰/۰۱	۰/۸۱ <sup>b</sup> $\pm$ ۰/۰۲	۳/۴۶ <sup>a</sup> $\pm$ ۰/۰۵	
توتال پروتئین (TP)	۲/۸۸ <sup>c</sup> $\pm$ ۰/۰۰۵	۲/۹۱ <sup>b</sup> $\pm$ ۰/۰۰۵	۳/۱۸ <sup>a</sup> $\pm$ ۰/۰۰۵	
گلوکز	۲۳/۶ <sup>c</sup> $\pm$ ۰/۵۷	۲۸/۳۴ <sup>b</sup> $\pm$ ۰/۵۷	۴۰/۳۴ <sup>a</sup> $\pm$ ۰/۵۷	

حروف انگلیسی غیر مشترک در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار ( $P < 0.05$ ) می باشد.

**بررسی‌های بافت‌شناسی:** در بررسی‌های بافت‌شناسی کبد ماهیان مولد نر قرمز که در معرض غلظت ۰/۱ LC<sub>50</sub> از سم مالاتیون قرار داشتند عوارضی از قبیل دژنره شدن سلول‌های هیپاتوسیت، واکتولیزاسیون گسترده سلول‌های هیپاتوسیت کبد، تجمع ملانوماکروفاژها و نکروز موضعی در کبد ماهیانی که از سم مالاتیون با غلظت ۰/۱ LC<sub>50</sub> استفاده کردند، مشاهده شد. همچنین ماهیانی که تحت تأثیر غلظت ۰/۰۱ LC<sub>50</sub> از مالاتیون قرار داشتند این تغییرات بیشتر به صورت موضعی بود و مهم‌ترین عارضه در این ماهیان تجمع ملانوماکروفاژها بود (شکل ۱).



شکل ۱- بررسی بافت‌شناسی کبد ماهی نر (*C. auratus*) مواجهه شده با غلظت تحت کشنده مالاتیون - (A) ماهیان مواجهه شده با غلظت ۰/۱ LC<sub>50</sub> (۰/۲۳ میلی‌گرم در لیتر) a: تجمع موضعی و ملایم ملانوماکروفاژ - (B) ماهیان مواجهه شده با غلظت ۰/۱ LC<sub>50</sub> (۲/۳ میلی‌گرم در لیتر) a: تجمع گسترده ملانوماکروفاژ b: دژنره شدن هیپاتوسیت‌ها - (C) ماهیان مواجهه شده با غلظت ۰/۱ LC<sub>50</sub> (۲/۳ میلی‌گرم در لیتر) a: نکروز موضعی هیپاتوسیت‌های کبدی b: دژنره شدن هیپاتوسیت‌ها - (D) ماهیان مواجهه شده با غلظت ۰/۱ LC<sub>50</sub> (۲/۳ میلی‌گرم در لیتر) a: واکتولیزاسیون گسترده هیپاتوسیت‌های کبدی b: دژنره شدن هیپاتوسیت‌ها

## بحث و نتیجه گیری

در تحقیق حاضر علاوه بر تعیین درجه سمیت مالاتیون، اثرهای غلظت‌های کشنده این حشره کش بر برخی شاخص‌های خونی ماهیان مولد قرمز نیز بررسی شد. نتایج به دست آمده از آزمایش سمیت مالاتیون نشان داد که میزان غلظت کشنده در طی ۹۶ ساعت برای مولدین کپور برابر با ۲۳/۵۰ میلی گرم در لیتر است. تغییرات پارامترهای بیوشیمیایی سرم خون می‌تواند به عنوان یک فاکتور مناسب برای تشخیص اثرات سمیت تحت کشنده در اندام‌های هدف و تعیین وضعیت فیزیولوژیکی ماهی در معرض آفت کش مالاتیون در نظر گرفته شود (Bagheri, 2007).

تعداد گلبول‌های قرمز خون، گلبول‌های سفید، هموگلوبین و هماتوکریت در ماهیان در معرض آفت کش نسبت به گروه شاهد دارای کاهش معنی‌داری بودند که این با نتایج تحقیقات محققینی مانند کاویتا (Kavitha et al., 2010) که اثر ارسنات را بر کپور هندی (*Catla catla*) و کوپروجو و همکاران (Köprüci et al., 2006) تأثیر دیازینون را بر گربه ماهی اروپایی (*silurus glanis*) بررسی کردند، مطابقت دارد. مشاهده کاهش تعداد گلبول‌های قرمز می‌تواند ناشی از مرگ آن‌ها در معرض آلاینده باشد (Kudirat Adeyemo, 2007).

در تحقیق حاضر تعداد گلبول‌های سفید در ماهیانی که در معرض سم مالاتیون بودند نسبت به گروه شاهد دارای کاهش معنی‌داری بود که مشابه نتایج تحقیقات (Banaee et al., 2008) بود. باتوجه به اینکه محل ساخت گلبول‌های سفید کلیه است، تأثیر یا تجمع آلاینده در کلیه می‌تواند سبب اختلال در فرآیند ساخت آن‌ها شود. بنابراین، یکی از دلایل کاهش گلبول‌های سفید در این تحقیق را احتمالاً می‌توان به تخریب بافت کلیه نسبت داد (Ololade and Ogini, 2010).

میزان هموگلوبین در تحقیق حاضر در تیمار شاهد نسبت به گروه‌های دیگر که در معرض سم قرار داشتند به طور معنی‌داری بالاتر بود که این امر با نتیجه تحقیقات اسوبودا و همکاران (Svoboda et al., 2001) درباره *Cyprinus carpio*، به منظور تعیین شاخص‌های هماتولوژیک در معرض دیازینون انجام دادند مطابقت دارد. سینگ و سریواستاوا (Singh and Srivastava, 2010) بیان کردند که کاهش هموگلوبین و هماتوکریت می‌تواند به سبب کاهش تعداد گلبول‌های قرمز باشد. از آنجا که هموگلوبین در گلبول‌های قرمز است، پس اختلالات گلبول‌های قرمز می‌تواند در آن تأثیر بگذارد. برای مثال پاره شدن گلبول قرمز می‌تواند سبب کاهش هموگلوبین شود (Ololade and Ogini, 2010). بنابراین، آسیب گلبول‌های قرمز می‌تواند علت کاهش گلبول‌های قرمز در این تحقیق باشد، چرا که آلاینده می‌تواند از طریق خون خود را به اندام‌های مختلف برساند و ممکن است در آن‌ها تجمع نماید (Adeyemo et al., 2011).

غلظت کل پروتئین پلاسما نسبت به محدوده پایه‌ای به عنوان یک شاخص بالینی در سنجش میزان سلامتی، استرس و وضعیت بدنی ارگان‌های آبی به کار برده می‌شود (Atamanalp and Yanik, 2011).

2003). تغییر در سنتز پروتئین یکی از متداول‌ترین پاسخ‌ها به آسیب سلولی است، لذا با سنجش میزان پروتئین می‌توان به میزان آسیب سلولی پی برد (Canli, 1996). با توجه به اینکه اکثر پروتئین‌ها در کبد سنتز می‌شوند کاهش پروتئین در پلاسما خون ممکن است به نقص کبد ماهیانی که در مجاورت آفت‌کش‌ها قرار می‌گیرند ارتباط داد. در این بررسی میزان پروتئین کل نسبت به تیمار شاهد کاهش معنی‌داری داشت که احتمالاً ناشی از آسیب‌های کبدی است.

در این تحقیق کاهش معنی‌داری در میانگین میزان گلوکز خون ماهیان مشاهده شد ( $P < 0.05$ ). یافته‌های سلطانی و رستمی (Soltani and Rostami, 2002) نشان می‌دهد که میزان گلوکز با افزایش غلظت سم، به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است که با نتایج حاضر در این تحقیق مغایرت دارد. غلظت گلوکز در سرم در اثر فعل و انفعال‌های پیچیده هورمون‌هایی مانند گلوکاگون و کورتیزول تنظیم می‌گردد، هرچند استرس‌های محیطی می‌تواند سبب افزایش مقادیر گلوکز در پلاسما شود (Martin and Black, 1998).

آنزیم آلانین آمینوترانسفراز و آسپاراتات آمینوترانسفراز که در ماهیان وجود دارند، عضوی از خانواده ترانس آمینازها هستند. این آنزیم‌ها در بافت کبد تغلیظ می‌شوند. مقادیر این آنزیم‌ها در بیماری‌های حاد کبد در اثر تماس با سموم کبدی افزایش می‌یابد. در بیماری‌های حاد کبدی که منجر به ایجاد صدمات غشایی یا نکروز سلولی می‌شوند، فعالیت آلانین آمینوترانسفراز در سرم خون به‌طور قابل توجهی افزایش می‌یابد (Mojabi et al., 2000). در تحقیق حاضر میزان آلانین آمینوترانسفراز نسبت به تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافت که احتمالاً ناشی از تماس طولانی مدت با این سم می‌باشد. آلکالین فسفاتاز در بیماری‌های حاد کبدی افزایش می‌یابد و زمانی که از مرحله حاد می‌گذرد ناگهان کاهش می‌یابد (Shisheian and Saeedi, 2007). در این تحقیق میزان آلکالین فسفاتاز با افزایش میزان این سم افزایش یافت. به‌نظر می‌رسد که آسیب‌های کبدی ناشی از تأثیر منفی سم مالاتیون روی این اندام، بر عملکرد ساخت آنزیم‌های کبدی تأثیر گذاشته و سبب تغییر میزان این آنزیم‌ها شده است. در این تحقیق، میزان آلکالین فسفاتاز در ماهیانی که در معرض سم مالاتیون بودند، نسبت به تیمار شاهد افزایش داشت، اما با افزایش غلظت سم مالاتیون، مقدار این آنزیم کاهش یافت. نتایج این تحقیق با بررسی فرخی و همکاران (Farrokhy et al., 2015) در زمینه تأثیر مالاتیون بر آنزیم‌های کبدی همخوانی دارد.

جهت انجام اسپرمتوزن چندین هورمون نقش اساسی دارند که تستوسترون از مهم‌ترین این هورمون‌ها می‌باشد و توسط سلول‌های لایدیگ واقع در فضای بین سلول‌های بیضه ترشح می‌شود و برای رشد و تقسیم سلول‌های ژرمینال و تشکیل اسپرمتوزوئید ضروری می‌باشد. مطالعات بسیاری روی ماهیان انجام گردیده که مشخص کرده است که تولید مثل ماهیان نسبت به آلودگی‌های محیط بسیار



حساس می‌باشد و در نهایت باعث تغییرات اندوکرینی در ماهی‌ها می‌شود (Jobling *et al.*, 1998). میزان هورمون تستوسترون در ماهیانی که تحت تأثیر این سم بودند، کاهش یافت که احتمالاً به دلیل تخریب سلول‌های ترشح کننده این هورمون و تخریب بافتی می‌باشد. در تحقیقی که فایرچیلد و همکاران (Fairchild *et al.*, 2009) انجام دادند، ارزیابی اثرات حاد و مزمن اثرات خطرات زیست محیطی علف‌کش کلوپیرالید بر بالغین و نوزادان نر قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام شد که بر اساس نتایج، این سم باعث کاهش وزن و تحرک کمتر اسپرم و همچنین کاهش تستوسترون شد که موافق با نتایج تحقیق حاضر می‌باشد.

مشاهدات بافت‌شناسی کبد ماهیان قرمز نر که در معرض دوزهای مختلف مالاتیون قرار گرفته بودند، نشان می‌دهد که مالاتیون سبب ایجاد اثرات مخرب بر بافت کبد این ماهی می‌گردد و علائمی که در کبد آسیب دیده مشاهده شد، سبب ایجاد مشکلات فیزیولوژیکی و در نهایت مرگ ماهی می‌شود. ماهیانی که در معرض سم مالاتیون با غلظت  $LC_{50} 0/1$  بودند نسبت به تیمار  $LC_{50} 0/0.1$  دچار تغییرات شدیدتری بودند. در تیمار  $LC_{50} 0/0.1$  تغییرات بیشتر به صورت موضعی مشاهده شد و این تغییرات احتمالاً به دلیل دوره طولانی استفاده از سم بوده است. در نهایت، یافته‌های تحقیق حاضر نشان می‌دهد که رابطه مستقیمی بین قرار گرفتن در معرض حشره‌کش مالاتیون و اختلالات بافت‌شناسی در بافت کبد ماهی قرمز وجود دارد و آسیب‌شناسی بافت کبد می‌تواند، نشانگری مفید برای آلودگی‌های زیست‌محیطی باشد. دیکا و ماهانتا (Mahanta, 2012 Deka and) نیز علائمی همچون تخریب ساختار پارانشیمی کبد، تجزیه و تفکیک هیپاتوسیت‌ها، تورم هیپاتوسیت‌ها، نکروز مرکزی و پیکنوتیک شدن هسته هیپاتوسیت‌ها را در کبد نوعی گربه‌ماهی (*Heteropneustes fossilis*)، قرار گرفته در معرض مالاتیون، مشاهده نمودند. در بافت کبد ماهی *Esomus danricus* که در معرض مالاتیون قرار گرفت، آسیب‌هایی همچون تورم و واکنش شدن هیپاتوسیت‌ها و نکروزه شدن مشاهده شد (Das and Mukherjee, 2003).

در بررسی حاضر هرچند هیچ تلفاتی در غلظت تحت کشنده سم مالاتیون در ماهیان قرمز ثبت نگردید اما آسیب‌های بافتی و خون‌شناسی این سم در ماهیان مذکور مشاهده شد. در عین حال ماهی قرمز می‌تواند به‌عنوان یک گونه مدل مورد استفاده قرار گیرد و در برخی موارد نتایج حاصل از بررسی‌های آن در گونه‌های مشابه از جمله کپور معمولی بکار گرفته شود. آنچه در این تحقیق مشاهده گردید بیانگر این موضوع است که سم مالاتیون حتی در غلظت‌های برابر با  $0/0.1$  غلظت کشنده آن نیز در این ماهیان قادر به ایجاد عوارض بافتی خواهد بود.

منابع

- Adedeji O.B., Adeyemo O.K., Agbede, S.A. 2009. Effects of diazinon on blood parameters in the African catfish (*Clarias gariepinus*), African Journal of Biotechnology, 8(16): 3940-3946.
- Adeyemo O.K., Adedeji O.B., Offor C.C. 2011. Blood lead level as biomarker of environmental lead pollution in feral and cultured African catfish (*Clarias gariepinus*). Nigerian Veterinary Journal, 31: 139-147.
- Afzali F., Sharifpoor A., Soltani B., Abtahi B. 2010. Study of liver, kidney and gill tissue changes of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Due to Aquagerm bathing. Renewable Natural Resources Research, 1: 63-70. (In Persian).
- Amini P.H., Oryan S. 2002. Effects of NaCl stress on hematocrit and hemoglobin levels in common carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Fisheries Science, 3(11): 13-22. (In Persian).
- Atamanalp M., Yanik T. 2003. Alterations in hematological parameters of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* exposed to mancozeb. Turkish Journal of Veterinary Animal Science, 27(5): 1213-1217.
- Bagheri F. 2007. Study of pesticide residues (Diazinon, Azinphosmethyl) in the rivers of Golestan province (GorganRoud and Gharehsou). M.Sc. Thesis, Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran. (In Persian).
- Banaee M., Mirvagefei A.R., Rafei G.R., Majazi Amiri B. 2008. Effect of sub-lethal diazinon concentration on blood plasma biochemistry. International Journal of Environmental Research, 2 (2): 189-198.
- Bjerselius R., Lundstedt-Enkel K., Olsen H., Mayer I., Dimberg K. 2001. male gold fish reproductive behavior and physiology are severely affected by exogenous exposure to 17- betasteradiol. Aquatic Toxicology, 53: 139-152.
- Canli M. 1996. Effects of mercury, chromium, and nickel on glycogen reserves and protein levels in tissues of (*Cyprinus carpio*). Journal of Zoology, 20: 161-168.
- Das B.K., Mukherjee S.C. 2003. Toxicity of cypermethrin in *Labeo rohita* fingerlings: biochemical, enzymatic and haematological consequences. Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Toxicology and Pharmacology, 134: 109-121.
- Deka S., Mahanta R. 2012. A Study on the Effect of Organophosphorus Pesticide Malathion on Hepato-Renal and Reproductive Organs of *Heteropneustes fossilis*. Science Probe, 1(1): 1-13.
- Di Giulio R.T., Hinton D.E. 2008. The Toxicology of Fishes. Taylor and Francis, London. UK. 1096 P.
- Edwards D. 2006. Reregistration Eligibility Decision for Malathion. US Environmental Protection Agency - Prevention, Pesticides and Toxic Substances EPA. USA. 915 P.
- Elbadawi A.A., Ramadan O.A. 2006. Some toxicological studies of the insecticide "pymetrozine" on (*Oreochromis niloticus*). Egyptian Academic Society for Environmental Development, 7(3): 125-138.

- Fairchild J.F., Feltz K.P., Allert A., Sappington L.S., Nelson K.J., Valle J. 2009. An ecological risk assessment of the exposure and effects of 2, 4-D acid to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environment Contaminate and Toxicology*, 56: 754-760.
- Farrokhy F., Jamili Sh., Mashinchian A., Vosughi Gh. 2015. Effects of malathion on tissue and liver enzyme in (*Rutilus rutilus caspicus*). *Iranian Fishery Journal*, 24(4): 117-127. (In Persian).
- Gangolli S.D. 1999. The dictionary of substances and their effects (DOSE). 2<sup>nd</sup> Edition, Vol. 1(A-B). Royal Society of Chemistry publications. 976 P.
- Hotos G.N., Vlahos N. 1998. Salinity tolerance of *Mugil cephalus* and *Chelon labrosus*, Pisces: Mugilidae/fry in experimental conditions. *Aquaculture*, 167: 329-338.
- Jobling S., Nolan Tylor, C.R., Brighty G., Sumpter J.P. 1998. Widespread sexual disruption in wild fish (Roach). *Environmental Technology*, 32: 2496-2506.
- Kavitha C., Malarvizhi A., Senthil Kumaran S., Ramesh M. 2010. Toxicological effects of arsenate exposure on hematological, biochemical and liver transaminases activity in an Indian major carp, *Catla catla*. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 2848-2854.
- Köprücü S., Köprücü K., Ural M.Ş., Ispir 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: 99-105.
- Kudirat Adeyemo O. 2007. Haematological profile of *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) exposed to lead. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 7: 163-169.
- Martin J.R.L.K., Black, M.C. 1998. Biomarker assessment of the effects of coal-strip mine contamination on channel catfish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 41: 307-320.
- Mojabi A., Nazifi S., Safi Sh. 2000. Veterinary clinical biochemistry. Noorbakhsh publication. 512 P. (In Persian).
- Ololade I.A., Oginni O. 2010. Toxic stress and hematological effects of nickel on African catfish, *Clarias gariepinus*, fingerlings. *Journal of Environmental and Chemical Ecotoxicology*, 22: 14-19.
- Shisheian B., Saeedi F. 2007. Medical Hematology. Daneshjoo publication. 344 P. (In Persian).
- Simmons A. 1997. Hematology: A combined theoretical and technical approach. Boston: Butterworth-Heinemann, USA. 507 P.
- Singh N.N., Srivastava A.K. 2010. Haematological parameters as bioindicators of insecticide exposure in teleosts. *Ecotoxicology*, 19: 838-854.

- Soltani M., Rostami H.K. 2002. Effects of diazinon on the hematological and biochemical profiles of (*Acipenser gueldenstaedtii*). Journal of Marine Science, 4: 65-75. (In Persian).
- Svoboda M., Luskova V., Drastichova J., Ilabek V. 2001. The effect of Diazinon on haematological indices of Common carp (*Cyprinus carpio* L.). Acta Veterinaria Brunensis, 70: 457-465.
- Venkateswara Rao J. 2006. Toxic effects of novel organophosphorus insecticide (RPR-V) on certain biochemical parameters of euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 86: 78-84.
- Vosoughi Gh.H., Mostajir B. 1993. Fresh Water Fishes. Tehran University. 317 P. (In Persian).