بررسی تاثیر غلظت‌های تحت کشنده سم مالاتیون بر پارامترهای خون‌شناسی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

حامد غفاری فارسانی[1*]، سیدعلی‌اکبر هدایتی[2]، نسترن زارع ندیمی‌بین[3]، سیروان عزیزپور[4]، سعید شهبازی ناصرآباد[5]

۱- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران، پست الکترونیکی: hamed_ghafari@alumni.ut.ac.ir

۲- دانشیار، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، پست الکترونیکی: marinebiology1@gmail.com

۳- دانشکده محیط زیست و انرژی، دانشگاه آزاد اسلامی، علوم و تحقیقات تهران، پست الکترونیکی: n.zarenadimi@yahoo.com

۴- کارشناسی ارشد، دانشکده محیط زیست، دانشگاه محیط زیست کرج، کرج، پست الکترونیکی: sirwanazizpour@yahoo.com

۵- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد یاسوج، دانشگاه آزاد اسلامی، یاسوج، ایران، پست الکترونیکی: saeid.shahbazi@alumni.ut.ac.ir

** نویسنده مسوول*

تاریخ دریافت: ۹۴/۳/۱۷ *تاریخ پذیرش: ۹۴/۹/۲۸*

چکیده

هدف از این مقاله بررسی تاثیر غلظت‌های تحت کشنده سم مالاتیون بر پارامترهای خون‌شناسی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) است. در این راستا سه غلظت تحت کشنده (۰/۰۲۵، ۰/۰۵، ۰/۰۷۵ میلی‌گرم بر لیتر) و یک تیمار شاهد (هر کدام با سه تکرار) انتخاب شد و از ماهیان در روزهای پنجم و نهم آزمایش خونگیری انجام گرفت. قرارگیری این ماهی در معرض غلظت‌های تحت کشنده سم مالاتیون منجر به کاهش معنی‌داری در تعداد گلبول‌های قرمز (RBC)، مقدار هموگلوبین (HB) و هماتوکریت در مقایسه با گروه کنترل گردید (P<۰/۰۵). در مقابل، افزایش معنی‌داری در تعداد گلبول‌های سفید (WBC) در تیمارهای آزمایشی مشاهده شد (P<۰/۰۵). میانگین حجم سلولی (MCV) و میانگین هموگلوبین سلول (MCH) در پاسخ به این آفت‌کش نیز در طول آزمایش افزایش یافت. پس از شمارش افتراقی، گلبول‌های سفید خون نیز مشخص شد که میزان لنفوسیت‌ها برخلاف آئوزینوفیل و نوتروفیل در تیمارهای آزمایشی کاهش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که پارامترهای خون‌شناسی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌تواند نشانگر حساس و مفیدی برای بررسی اثر این آفت‌کش بر آبزیان باشد.

کلمات کلیدی: *آلودگی، آبزی، خون‌شناسی، سم کشاورزی، ارگانوفسفره.*

۱. مقدمه

در سال‌های اخیر استفاده از آفت‌کش‌ها به منظور از بین بردن حشرات ناخواسته و ناقل‌های بیماری برای افزایش تولید محصولات کشاورزی و بهبود سلامت انسان افزایش یافته است (Prakasam et al., 2001). حشره‌کش‌ها یکی از آلاینده‌های مضر محیط زیست هستند که نقش مهمی را در کنترل انواع مختلف حشرات آسیب‌رسان به گیاهان زراعی بر عهده دارند (Magar and Dube, 2012). ورود آفت‌کش‌ها به سیستم‌های آبی، تا حد زیادی موجودات غیر هدف، مانند ماهی و پرندگان را تحت تاثیر

قرار می‌دهند (Thenmozhi et al., 2011). گزارش‌های متعددی مبنی بر سمیت حشره‌کش‌ها بر گونه‌های مختلف ماهی وجود دارد (Kumar et al., 1999; Mohan, 2003). مالاتیون یکی از سموم متداول از خانواده ارگانوفسفره است که به طور گسترده‌ای در باغ ها و مزارع کشاورزی استفاده می‌شود. این سم برای حشرات و ماهیان نسبت به پستانداران سمیت بیش‌تری دارد (Murphy et al., 1968). بیش‌ترین کاربرد مالاتیون، به عنوان یک حشره‌کش و کنه‌کش فسفره آلی در ایران، مربوط به سم‌پاشی باغ-های مرکبات و شالیزارها است (طالبی جهرمی، ۱۳۹۰).

پایش زیستی روشی است که در آن عکس‌العمل‌های موجودات آبزی را برای آشکارسازی تأثیر یک یا چند ماده سمی مورد بررسی قرار می‌دهد. ارزیابی اثرات سمیت آلاینده‌ها با در معرض قرار دادن موجودات در مقدارهای مختلف ماده آلوده کننده انجام می‌گیرد (Martins et al., 2007).

ارزیابی پارامترهای خون یکی از شاخص‌های مهم و قابل اطمینان در بررسی وضعیت سلامتی و کنترل زیستی آبزیان است (کیخسروی و همکاران، ۱۳۸۹;Orum et al., 2003). تغییرات پارامترهای خونی دلالت بر تغییرات نامطلوب کیفیت آب محیط دارد و این تغییر پارامترها با افزایش یا کاهش برخی از پارامترهای خونی در ایجاد بیماری تاثیرگذار است (حیدری و همکاران، ۱۳۹۲; Verma et al., 1982). پارامترهای خونی ماهیان به منظور توصیف سلامت ماهیان در پاسخ به عوامل تنش‌زا به کار برده می‌شوند و در واقع رابطه سیستماتیک و سازگاری فیزیولوژیک موجودات را در برابر این عوامل پیش‌بینی می‌کند (Soivio and Oikari, 1976). بنابراین پروفایل خون می‌تواند اطلاعات مهمی را در مورد وضعیت فیزیولوژیکی ماهی ارائه داده و به منظور ارزیابی اثرات سوء آفت‌کش‌ها استفاده شود (Dogan and Can, 2011).

ماهیان به دلیل ارزش اقتصادی بالا، یکی از مهم‌ترین موجودات آبزی به شمار می‌روند که در مقابل انواع آلاینده‌ها نیز حساسیت بالایی از خود نشان می‌دهند. بنابراین جهت انجام آزمایش‌های زیست‌سنجی در بعد وسیعی از آن‌ها استفاده می‌شود (Dutta and Meijer, 2003). ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با نام علمی (*Oncorhynchus mykiss*) یکی از مهم‌ترین ماهیان پرورشی در تمام دنیا، به ویژه در ایران است که پرورش این ماهی عموماً در مجاورت رودخانه‌های پرآب صورت می‌پذیرد. از آنجایی که آب‌های سطحی و زیرزمینی یکی از مهم‌ترین منابع تامین کننده آب مورد نیاز سیستم‌های پرورشی ماهی قزل‌آلا است، بنابراین آلودگی این منابع می‌تواند اثرات جبران ناپذیری بر این گونه مهم پرورشی داشته باشد (بنایی و همکاران، ۱۳۹۱).

از آنجایی‌که قزل‌آلای رنگین‌کمان مهم‌ترین گونه پرورشی ماهیان سردآبی در مناطق مختلف ایران است و به دلیل کاربرد مداوم و بی‌رویه سم مالاتیون در مزارع و باغ‌های کشاورزی در مجاورت رودخانه‌ها و ورود بالقوه آن به مزارع پرورش قزل‌آلای رنگین‌کمان، سبب شد تا در تحقیق حاضر از شاخص‌های خون-شناسی این ماهی به عنوان پرکاربردترین شاخص پایش زیستی سنجش آلاینده‌ها در غلظت‌های تحت کشنده سم مالاتیون برای ارزیابی اثرات مخرب این سم استفاده گردد.

۲. مواد و روش‌ها

در این پژوهش تعداد ۷۰ قطعه قزل‌آلای رنگین‌کمان با وزن متوسط (±SD) ۱±۶۵ گرم و میانگین طولی (±SD) ۱±۱۸ سانتی‌متر از یکی از مراکز تکثیر و پرورش معتبر شهر گرگان خریداری و به کارگاهی خصوصی در شهر گرگان انتقال یافت. سپس ماهیان، به مدت یک هفته در آکواریوم‌هایی با ابعاد ۸۰×۹۰×۱۱۰ سانتی‌متر که از نظر پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب در شرایط مطلوبی بودند قرار گرفتند، تا تنش‌های ناشی از حمل و نقل بر طرف گردد و ماهیان با شرایط آزمایش سازگار شوند. بدین منظور هر ۶ ساعت یکبار، درجه حرارت، O_2، pH و سختی کل به ترتیب برابر۱±۱۸ درجه سانتی‌گراد، ppm ۷/۵–۷، ۸–۷/۵ و ۲۱۰ میلی‌گرم بر لیتر $CaCO_3$، اندازه‌گیری و تقریباً ثابت نگه داشته شد. برای اندازه‌گیری فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب مورد استفاده در کارگاه، دما توسط دماسنج، pH با دستگاه قابل حمل سنجش pH (مدل TS) و اکسیژن محلول با دستگاه دیجیتال اندازه‌گیری اکسیژن، اندازه‌گیری شدند. در این مدت نیز غذادهی ماهیان روزی دو بار با غذای فرموله شده تجاری که از شرکت بهپرور تهیه شده بود و دارای گواهینامه سلامت بود انجام گرفت.

در پژوهش حاضر، پس از مرور منابع و بررسی محدوده غلظت نیمه کشنده سم مالاتیون برای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (غفاری فارسانی و همکاران، ۱۳۹۵; Newhart, WHO, 2003; 2006; USEPA, 2007)، آزمایش با چهار تیمار و سه تکرار با غلظت‌های مختلف این سم (شاهد، ۰/۰۲۵ ، ۰/۰۵ ، ۰/۰۷۵

میلی‌گرم بر لیتر) طراحی گردید و به آکواریوم هر تیمار ۱۵ عدد ماهی اضافه شد. سم مالاتیون مورد استفاده در این پژوهش با امولسیون ۵۷٪ و درصد خلوص تکنیکال ۹۵٪ متعلق به شرکت کاوش کیمیای کرمان بود. لازم به ذکر است در این مرحله، از ۴ عدد آکواریوم ذخیره هر ۲ روز یکبار به منظور جابجایی ماهیان در تیمارهای مختلف استفاده گردید تا هم کیفیت آب شرایط بهتری داشته باشد و هم اینکه غلظت سم مالاتیون در تمام طول دوره ثابت بماند و در طی دوره تغییراتی در ترکیب سم ایجاد نشود. پس از تحت تاثیر قرار دادن ماهیان در معرض سم مالاتیون در روزهای پنجم و نهم آزمایش، برای نمونه‌گیری از خون ماهیان اقدام گردید. سپس cc ۱ خون نمونه برداری شده با استفاده از سرنگ و سرسوزن شماره ۲۱ از ورید ساقه دمی (Ruane et al., 2001)، در لوله‌های استریل دربدار و هپارینه و در محفظه‌های حاوی یخ قرار داده شد و جهت مطالعات هماتولوژیکی به آزمایشگاه منتقل شدند.

شاخص‌های مدنظر برای ارزیابی مشخصات خونی در این آزمایش شامل: تعداد گلبول‌های قرمز (RBC)، تعداد گلبول‌های سفید (Leuko)، هماتوکریت (PCV)، هموگلوبین (Hb)، میانگین حجم گلبول قرمز (MCV)، میانگین غلظت رنگ گویچه (MCHC) و میانگین هموگلوبین گویچه‌ها (MCH) و همچنین شمارش افتراقی گلبول‌های سفید بودند.

به منظور اندازه‌گیری میزان هماتوکریت طبق روش Goldenfarb و همکاران (۱۹۷۱) خون وارد لوله‌های میکرو هماتوکریت آغشته به هپارین شد؛ سپس این لوله‌ها در شیارهای مخصوص در سانتریفیوژ میکرو هماتوکریت مدل Hettich ساخت آلمان قرار گرفتند. پس از قرار دادن سرپوش محفظه، برای تعیین هماتوکریت لوله‌های موئینه به مدت ۵ دقیقه و با ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ شدند. در پایان عمل سانتریفیوژ، میزان هماتوکریت بر حسب درصد با خط‌کش میکروهماتوکریت تعیین گردید.

برای شمارش اریتروسیت‌ها (RBC) و لوکوسیت‌ها (WBC) نمونه‌های خون با محلول هایم رقیق‌سازی شدند و پس از رنگ-آمیزی با محلول گیسما، سلول‌ها با استفاده از لام هموسیتومتر شمارش شدند (Stevens, 1997). برای بدست آوردن میزان هموگلوبین از روش Drabkin (1946) استفاده شد. همچنین، به منظور محاسبه شاخص‌های اریتروسیت شامل میانگین حجم گویچه‌ها (MCV) و میانگین غلظت هموگلوبین گویچه‌ها (MCHC) و میانگین هموگلوبین گویچه‌ها (MCH) نیز از فرمول‌های استاندارد استفاده شد (Seiverd, 1964; Ramesh et al., 2014). به منظور شمارش تفریقی گلبول‌های سفید خون، یک قطره خون روی لام قرار داده شد و یک گسترش تهیه گردید. سپس لام تهیه شده به مدت ۱ دقیقه در معرض هوا، خشک شد و به مدت ۳۰ دقیقه در اتانول ۹۰ درصد ثابت گردید و پس از آن رنگ‌آمیزی صورت گرفت. به منظور رنگ‌آمیزی از گیمسا استفاده شد که این فرآیند ۳۰ دقیقه به طول انجامید؛ سپس شمارش گلبول‌های سفید در زیر میکروسکوپ انجام شد (Khoshbavar-Rostami et al., 2006).

تجزیه و تحلیل آماری به منظور بررسی اثر سم بر ماهی قزل آلای رنگین‌کمان بر اساس آزمون تجزیه واریانس یک طرفه ANOVA و با مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن با دقت P<۰/۰۵، با استفاده از SPSS، نسخه ۲۰ انجام گردید.

۳. نتایج و بحث

بر اساس نتایج بدست آمده، در طول دوره آزمایش هیچ‌گونه مرگ و میری در گروه‌های آزمایشی مشاهده نشد، که حاکی از انتخاب صحیح محدوده تحت کشندگی سم مالاتیون برای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان است. جدول ۱ نشان‌دهنده نتایج حاصل از آزمایش‌های هماتولوژی ماهی قزل‌آلا در معرض سم مالاتیون است. تاثیر غلظت‌های مختلف سم مالاتیون بر پارامترهای خونی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نظیر گلبول‌های قرمز تفاوت معنی داری را در هر دو زمان نمونه‌برداری بین تیمارهای مختلف نشان داد (P<۰/۰۵)، به طوری که کم‌ترین میزان گلبول‌های قرمز در تیماری که بالاترین غلظت سم (۰/۰۷۵ میلی‌گرم بر لیتر) را داشت مشاهده گردید و بیشترین میزان آن نیز در تیمار شاهد مشاهده شد. همچنین نتایج این آزمایش در روز پنجم نمونه‌برداری نشان داد که میزان هماتوکریت از ۳۵/۸۳ درصد در تیمار شاهد به ۲۸/۱ درصد با بیشترین غلظت سم کاهش یافته است و اختلاف معنی داری را نشان می‌دهد (P<۰/۰۵). در پژوهش حاضر میزان هموگلوبین خون نیز کاهش یافت که این کاهش بین گروه شاهد با سایر تیمارها معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). به طور کلی میزان هموگلوبین با افزایش غلظت سم کاهش بیشتری را نشان داد و بیشترین مقدار آن در هر دو زمان نمونه‌برداری، در تیمار شاهد مشاهده شد.

سطوح مختلف سم مالاتیون سبب کاهش گلبول‌های سفید خون شد (P<۰/۰۵)، به گونه‌ای که با گذشت زمان گلبول‌های سفید خون افزایش داشتند. همچنین بالا رفتن غلظت سم نیز سبب افزایش معنی‌دار این شاخص خونی گردید (P<۰/۰۵).

نتایج حاصل از اندازه‌گیری میانگین MCHC در ماهیان شاهد و تیمارهای μgL^{-1} ۰/۰۲۵، ۰/۰۵، و ۰/۰۷۵ از سم مالاتیون، نشان داد که در هر دو زمان نمونه‌برداری براساس آزمون آنالیز واریانس یک طرفه بین تیمار شاهد و سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده شد (P<۰/۰۵). همچنین نتایج اندازه گیری MCV در ماهیان مورد مطالعه نیز نشان داد که براساس آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه بین تیمارهای شاهد و سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده شده است (P<۰/۰۵) و MCV خون ماهیان مورد مطالعه پس از قرار گرفتن در معرض سم مالاتیون روند افزایشی داشته است. تغییرات شاخص MCH نیز به گونه‌ای بود که کمترین میزان آن در تیمار شاهد مشاهده گردید، و بین تیمار شاهد و سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (P<۰/۰۵)، و با بالا رفتن غلظت سم در هر دو زمان نمونه‌برداری میزان این شاخص افزایش یافت (جداول ۱ و ۲).

بر اساس نتایج بدست آمده از آنالیز واریانس، ماهیان قرار گرفته در معرض غلظت تحت کشنده سم مالاتیون بسته به زمان و مقدار، علی‌رغم افزایش تعداد کل گلبول‌های سفید خون، کاهش معنی‌داری را در میزان لنفوسیت‌ها نشان دادند (P<۰/۰۵)، بدین صورت که با افزایش مقدار سم، تعداد لنفوسیت‌ها کاهش یافت. در مقابل، درصد میزان آئوزینوفیل و نوتروفیل به طور معنی‌داری افزایش یافت و بیشترین میزان این سلول‌ها در تیمارهای با بالاترین غلظت سم مشاهده شد. پارامترهای خونی ماهیان در پاسخ به تنش‌های شیمیایی به طور قابل توجهی تغییر می‌یابد، اگرچه این تغییرات برای دامنه وسیعی از مواد آلاینده غیر اختصاصی است (Modesto and Martinez, 2010)، با این وجود این پارامترها به عنوان نشانگرهای زیستی برای نشان دادن وضعیت فیزیولوژی و سلامت عمومی موجود زنده، در شرایط مختلف مفید هستند (Vander Oost et al., 2003).

جدول ۱: مقدار متوسط فاکتورهای خونی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمارهای مختلف سم مالاتیون (میانگین±انحراف معیار)

فاکتور	زمان	گروه شاهد	غلظت ۰/۰۲۵ (ppm)	غلظت ۰/۰۵ (ppm)	غلظت ۰/۰۷۵ (ppm)
گلبول قرمز ($\times 10^6/\mu l$)	روز پنجم	^{a}۰/۰۱±۰/۷۳	^{b}۰/۰۱±۰/۶۲	^{c}۰/۰۱±۰/۵۶	^{d}۰/۰۱±۰/۵۳
	روز نهم	^{a}۰/۰۰۵±۰/۷۲	^{b}۰/۰۲±۰/۵۵	^{c}۰/۰۲±۰/۴۸	^{d}۰/۰۱±۰/۴۳
هماتوکریت٪	روز پنجم	^{a}۰/۱۵±۳۵/۸۳	^{b}۰/۹۴±۳۱/۶۷	^{b}۰/۸۸±۳۰/۵۹	^{c}۰/۱±۲۸/۱
	روز نهم	^{a}۰/۲۱±۳۵/۹۹	^{b}۰/۷۰±۳۱/۲۳	^{c}۰/۵±۲۹/۷۴	^{d}۰/۴۳±۲۵/۹۶
هموگلوبین (g/dl)	روز پنجم	^{a}۰/۰۱±۷/۰۱	^{b}۰/۰۷±۶/۳۴	^{c}۰/۰۶±۵/۹۸	^{d}۰/۰۲±۵/۷۹
	روز نهم	^{a}۰/۰۱±۷/۰۲	^{b}۰/۰۵±۶/۲۴	^{c}۰/۰۱±۵/۶۷	^{d}۰/۰۲±۴/۹۷
M.C.H.C (g/dl)	روز پنجم	^{a}۰/۱۱±۱۹/۵۷	^{ab}۰/۷۹±۲۰/۰۴	^{a}۰/۳۲±۱۹/۰۶	^{b}۰/۱۶±۲۰/۶۱
	روز نهم	^{ab}۰/۰۴±۱۹/۵۱	^{b}۰/۵۶±۱۹/۹۸	^{a}۰/۳۲±۱۹/۰۶	^{a}۰/۲۹±۱۹/۱۶
M.C.V (fl)	روز پنجم	^{a}۶/۳۲±۴۹۰/۹۲	^{ab}۲۳/۸۳±۵۰۵/۷۱	^{b}۲۶/۲±۵۴۰/۳۵	^{b}۸/۱۲±۵۳۰/۴۱
	روز نهم	^{a}۳/۷۱±۴۹۵/۲۹	^{b}۲۶/۰۰±۵۶۱/۸۲	^{c}۳۵/۶۲±۶۱۲/۲۴	^{bc}۲۳/۴۱±۶۰۴/۴۴
M.C.H (pg)	روز پنجم	^{a}۱/۵۲±۹۶/۰۸	^{b}۰/۸۹±۱۰۱/۲۳	^{bc}۳/۹۷±۱۰۵/۶۵	^{c}۲/۵۳±۱۰۹/۳۴
	روز نهم	^{a}۰/۷۵±۹۶/۶۵	^{b}۶/۰۹±۱۱۲/۲۷	^{b}۴/۸۵±۱۱۶/۶۴	^{b}۴/۹±۱۱۵/۸۶
گلبول سفید ($\times 10^4/\mu l$)	روز پنجم	^{a}۰/۰۳±۵/۳۳	^{b}۰/۰۵±۵/۹۹	^{c}۰/۰۸±۶/۲	^{d}۰/۰۲±۶/۳۱
	روز نهم	^{a}۰/۰۳±۵/۳۷	^{b}۰/۱۱±۶/۲۶	^{b}۰/۰۴±۶/۳۹	^{c}۰/۰۷±۷/۰۳

حروف غیر مشابه در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت آماری معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی است (P<۰/۰۵).

جدول ۲: مقدار متوسط افتراقی گلبول‌های سفید ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمارهای مختلف سم مالاتیون (میانگین±انحراف معیار)

فاکتور	زمان	گروه شاهد	غلظت ۰/۰۲۵ (ppm)	غلظت ۰/۰۵ (ppm)	غلظت ۰/۰۷۵ (ppm)
نوتروفیل %	روز پنجم	^{a}۰/۸±۱۶/۱۳	^{b}۰/۲۶±۲۰/۲	^{c}۰/۵۷±۲۱/۸۶	^{d}۰/۴۸±۲۳/۴۸
	روز نهم	^{a}۰/۴۵±۱۷/۰۳	^{b}۰/۶۴±۲۲/۴۶	^{c}۰/۵۹±۲۴/۵۱	^{d}۰/۴۳±۲۷/۳
لنفوسیت %	روز پنجم	^{a}۰/۷۹±۸۲/۹	^{b}۰/۲۵±۷۸/۲۳	^{c}۰/۵۸±۷۶/۶۳	^{d}۰/۴۸±۷۴/۹۲
	روز نهم	^{a}۰/۵۵±۸۲/۰۳	^{b}۰/۷±۷۵/۸	^{c}۰/۶۴±۷۳/۷۳	^{d}۰/۶۵±۷۰/۹
آئوزینوفیل %	روز پنجم	^{a}۰/۱۵±۰/۹۶	^{b}۰/۰۵±۱/۵۶	^{b}۰/۱±۱/۵	^{c}۰/±۱/۶
	روز نهم	^{a}۰/۲±۰/۹۳	^{b}۰/۰۵±۱/۷۳	^{c}۰/۱۸±۱/۷۵	^{d}۰/۲۶±۱/۸

حروف غیرمشابه در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت آماری معنی‌دار در بین گروه‌های آزمایشی است (P<۰/۰۵).

در پژوهش حاضر، ماهیان قرارگرفته در معرض غلظت‌های تحت کشنده سم مالاتیون بسته به زمان و مقدار سم، کاهش معنی‌داری را در تعداد کل گلبول‌های قرمز، محتوای هموگلوبین، مقادیر هماتوکریت و نیز افزایش معنی‌داری را در مجموع گلبول های سفید خون نشان دادند (P<۰/۰۵). بر اساس مطالعه Al-Ghanim (2012)، زمانی‌که ماهی *Oreochromis niloticus* در معرض سم مالاتیون قرار می‌گیرد به طور معنی-داری پارامترهای RBC، مقدار Hb و Hct در مقایسه با گروه کنترل کاهش می‌یابد. همین نتایج در مطالعه Shahbazi و همکاران (۲۰۱۵) برای سیاه‌ماهی در معرض سم مالاتیون گزارش شد. همچنین بررسی پارامترهای خونی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در معرض حشره‌کش فسفره دیمیتوات[1] کاهش معنی‌داری را در پارامترهای هماتوکریت، هموگلوبین، تعداد گلبول‌های سفید و نیز تعداد گلبول‌های قرمز نشان داد (Dogan and Can, 2011). در این بررسی با افزایش مدت زمان آزمایش، کاهش بیشتری در پارامترهای خونی گزارش شد. این کاهش وابسته به زمان نیز در پژوهش حاضر مشاهده شد. هم چنین Mişe Yonar و همکاران (۲۰۱۴) با بررسی تاثیر سم مالاتیون روی پارامترهای خونی ماهی کپور معمولی نشان دادند که مالاتیون سبب کاهش پارامترهای RBC، Hb، Hct، MCV ماهیان در معرض سم می‌شود. به طور کلی، اختلال در اریتروسیت‌ها ممکن است باعث کم خونی شود (Javed and Usmani, 2015). در طی کم خونی، کاهش در تعداد گلبول‌های قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت مشاهده می‌شود که ممکن است به دلیل خونریزی، همولیز یا کاهش تولید گلبول‌های قرمز صورت پذیرد (Dogan and Can, 2011) که با نتایج مطالعه حاضر نیز مطابقت دارد. همچنین ممکن است این کاهش به علت یک واکنش جبرانی باشد که باعث بهبود ظرفیت حمل اکسیژن برای حفظ تبادل گاز در تیغه‌های آبششی صورت می-گیرد (Jee et al., 2005). از عوامل دیگری که برای کاهش گلبول‌های قرمز ذکر شده است می‌توان به تجمع گلبول‌های قرمز در آبشش ماهی‌های در معرض تنش ناشی از آلاینده اشاره کرد (Narain and Srivastava, 1989). از سوی دیگر کاهش تعداد گلبول‌های قرمز می‌تواند ناشی از مرگ آن‌ها در برابر آلاینده باشد (Kudirat-Adeyemo, 2007).

در مطالعه حاضر هموگلوبین و هماتوکریت ماهیان در معرض سم دارای کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل بودند (P<۰/۰۵). Luskova و همکاران (۲۰۰۲) بیان کردند که تغییرات میزان هماتوکریت ماهیان احتمالاً ناشی از تاثیر مستقیم آفت‌کش‌ها بر بافت‌های خون‌ساز کلیه و طحال است. بنایی و همکاران (۱۳۸۷) عوامل کاهش هماتوکریت را عوامل کاهش اندازه یا تعداد گلبول‌های قرمز می‌دانند و بیان می‌کنند که اگر آلاینده‌ای توانایی ایجاد این تاثیرات را در گلبول‌های قرمز داشته باشد، هماتوکریت خون آن نیز کاهش می‌یابد و سنجش آن می‌تواند در تشخیص بیماری موثر باشد. مطالعات متعددی نشان داده است که سم موجب کاهش معنی‌دار سطوح هموگلوبین و هماتوکریت از طریق اختلال در فرآیندهای خون‌سازی و تسریع فروپاشی گلبول‌های قرمز خون می‌شود (Köprücü et al., 2006; Dogan and Can, 2011; Singh and Srivastava, 2010).

در پژوهش حاضر میزان گلبول‌های سفید خون در تیمار شاهد کمتر از سایر تیمارها بود و با افزایش غلظت سم مالاتیون میزان این سلول‌های خونی افزایش یافت. در حالت کلی تنش موجب افزایش تعداد گلبول‌های سفید شده و در عوض موجب کاهش هموگلوبین، تعداد اریتروسیت (گلبول قرمز) می‌گردد (Das et al., 2006). از پاسخ‌های ایمنی بدن ماهی در طی دوره تنش، می-توان به افزایش تعداد کل گلبول‌های سفید یعنی افزایش رهاسازی گلبول‌های سفید به جریان خون اشاره نمود (Harikrishnan et al., 2003). به عبارت دیگر افزایش میزان گلبول‌های سفید قرار گرفته در معرض تنش ممکن است به این دلیل باشد که موجود توانسته است سیستم ایمنی خود را در مواجهه با آلاینده تقویت کند و با شرایط سازگار شود (Remyla et al., 2008).

افزایش معنی‌دار شاخص MCH و MCV در پژوهش حاضر می‌تواند ناشی از افزایش گلبول‌های قرمز نابالغ باشد که هموگلوبین کمتری را در خود جای داده‌اند، به طور کلی این فرآیند ناشی از هایپرپلازی مکان‌های تولیدکننده گلبول‌های قرمز است (Ferrando and Moliner, 1991).

شاخص‌های لوکوسیتی خون از جمله لنفوسیت‌ها، نوتروفیل-ها، مونوسیت‌ها و آئوزینوفیل‌ها یکی از عوامل بخش‌های سیستم ایمنی سلولی هستند که نوسان در تعداد آن‌ها می‌تواند به عنوان یک شاخص مناسب در ارتباط با پاسخ ماهیان به عوامل تنش مطرح باشد (Stoskopf, 1993). با این حال نوتروفیل و لنفوسیت اصلی‌ترین سلول‌های خونی در مطالعات سم‌شناسی هستند و

[1] dimethoate

تأثیر آلاینده‌ها بیشتر در این سلول‌ها نمایان می‌شود (Lermen et al., 2004). لنفوسیت غالب‌ترین لوکوسیت افتراقی ماهیان و مسوول بسیاری از عملکردهای سیستم ایمنی است (Campbell et al., 1998; Roberts, 2001). در پژوهش حاضر میزان لنفوسیت گروه‌های در معرض سم، نسبت به گروه شاهد دارای کاهش معنی‌داری بود. این در حالی است که میزان کلی گلبول-های سفید خون افزایش یافت. کاهش تعداد لنفوسیت‌ها می‌تواند ناشی از نقص در سیستم ایمنی بدن باشد (Witeska, 2005; Balabanova et al., 2009). بررسی تاثیر سم سایپرمترین بر گربه ماهی آفریقایی (*Clarias gariepinus*) کاهش لنفوسیت و افزایش نوتروفیل خون ماهیان در معرض سم را نشان داد (Akinrotimi et al., 2012). همچنین قرارگیری بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین-کمان در معرض سم دیازینون سبب کاهش لنفوسیت و افزایش نوتروفیل خون گردید (Saeedi Far et al., 2012).

در پژوهش حاضر افزایش معنی‌داری در میزان نوتروفیل و آئوزینوفیل گروه‌های در معرض سم مالاتیون رخ داد. نوتروفیل وظایف زیادی از جمله فاگوسیتوز ذرات کوچک، پاسخ به التهاب، تجزیه آلاینده و پروسه‌های متابولیکی نظیر نابود کردن سلول‌ها را به عهده دارد. بنابراین افزایش نوتروفیل در مواجهه با آلاینده‌ها دور از انتظار نیست (Evans, 2008). همچنین در سطح سلولی، التهاب کبدی و تنش می‌تواند باعث افزایش نوتروفیل شود (Gad, 2007). Evans (2009) بیان نمود، نوتروفیل فعالیت فاگوسیتی داشته و در برابر ورود عامل ناخواسته خارجی افزایش پیدا می‌کند. آئوزینوفیل نیز همانند نوتروفیل فعالیت فاگوسیتی داشته و در برابر پاتوژن‌ها این نقش را بر عهده دارد (Evans, 2009).

۴. نتیجه‌گیری

از آنجاییکه بررسی موجودات زنده از جمله ماهی، هزینه کمتری نسبت به سایر سنجش‌های آب دارد و از طرفی ماهی‌ها دارای گروه‌های سنی مختلفی هستند و در اکثر مناطق رودخانه‌ها حضور دارند، اندازه‌گیری پارامترهای خون‌شناسی در ماهیان ساده‌تر است. بنابراین با مشاهده این پارامترها و بررسی‌های دقیق محیطی و آنالیزهای آب، می‌توان نوع آلاینده را به طور دقیق پیش‌بینی کرد و راهکارهایی برای جلوگیری از آن اتخاذ نمود و در کشاورزی و سایر بخش‌ها اعمال کرد.

بررسی شاخص‌های خون‌شناسی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در معرض سم مالاتیون نشان داد که آلودگی با این سم تأثیرات زیادی بر عملکرد و میزان سلول‌های خونی دارد و این شاخص‌ها تفاوت معنی‌داری در غلظت‌های مختلف خود نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهند. بنابراین می‌توانند به عنوان نشانگرهای زیستی و ردیابی اثرات آلاینده‌ها استفاده شوند. در نهایت می‌توان بیان نمود که آلودگی آب به مواد سمی باعث بروز مشکلات مختلف در آبزیان می‌شود و در صورت تداوم آلودگی، این مشکلات به جامعه آبزیان منتقل شده و در نهایت این تغییرات، قادر خواهند بود که شانس بقاء موجود را کاهش دهند.

منابع

بنایی، م.؛ میرواقفی، آ.؛ رفیعی، ج.؛ مجازی امیری، ب.، ۱۳۸۷. اثر غلظت تحت کشنده سم دیازینون در بیوشیمی پلاسمای خون. مجله محیط‌زیست. شماره ۲: دوره ۷، صفحات ۱۹۸-۱۸۹.

بنایی، م.؛ میرواقفی، ع.؛ سوردا گومیل، آ.؛ رفیعی، غ.؛ احمدی، ک.، ۱۳۹۱. مطالعه تغییرات فاکتورهای بیوشیمیایی خون و آسیب‌شناسی بافتی کبد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در تماس با غلظت‌های زیرکشنده دیازینون. نشریه محیط‌زیست. مجله منابع طبیعی ایران. دوره ۶۵، شماره ۳، صفحات ۳۱۳-۲۷۹.

حیدری، ب.؛ گلچین‌راد، ع.؛ حقی، ن.؛ یاوری، ل.، ۱۳۹۲. مطالعه پاسخ فیزیولوژیکی ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*) در پاسخ به شوینده‌های آنیونی. نشریه علمی - پژوهشی اقیانوس-شناسی. سال ۴، شماره ۱۴، صفحات ۷۶-۶۹.

طالبی جهرمی، خ.، ۱۳۹۰. سم‌شناسی آفت‌کش‌ها. انتشارات دانشگاه تهران. ۴۹۲ صفحه.

غفاری فارسانی، ح.؛ پورباقر، ه.؛ فرحمند ح.، ۱۳۹۵. نشریه شیلات. مجله منابع طبیعی ایران. دوره ۶۹، شماره ۱، صفحات ۹۹-۸۹

کیخسروی، ع.؛ عتباتی؛ آ.؛ وطن دوست، ج.؛ شمس، ه.؛ جلیلی، م.؛ روکی، ح.، ۱۳۸۹. تاثیر غلظت‌های نزدیک به کشنده کادمیوم بر روی برخی پارامترهای بیوشیمیایی در خون ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*). نشریه علمی- پژوهشی اقیانوس‌شناسی. سال ۱، شماره ۲، صفحات ۱۶-۱۱.

Akinrotimi, O.A.; Gabriel, U.U.; Ariweriokuma, S.V., 2012. Hematotoxicity of cypermethrin to african catfish *Clarias gariepinus* under laboratory conditions.

465-470.

Gad, S.C., 2007. Animal models in toxicology. CRC Press, 950P.

Goldenfarb, P.B.; Bowyer, F.P.; Hall, T.; Brosious, E., 1971. Reproductibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. American Journal of Clinical Pathology, 56(1): 35-39.

Harikrishnan, R.; Nisha Rani, M.; Balasundaram, C., 2003. Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. Aquaculture, 221(1-4): 41-50.

Javed, M.; Usmani, N., 2015. Impact of heavy metal toxicity on hematology and glycogen status of fish: a review. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences, 85(4): 889-900.

Jee, J.H.; Masroor, F.; Kang, J.C., 2005. Responses of cypermethrin□induced stress in haematological parameters of Korean rockfish, *Sebastes schlegeli* (Hilgendorf). Aquaculture Research, 36(9): 898-905.

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.

Kudirat-Adeyemo, O., 2007. Haematological profile of *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) exposed to lead. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 7(2): 163-169.

Kumar, S.; Lata, S.; Gopal, K., 1999. Deltamethrin induced physiological changes in freshwater cat fish (*Heteropneustes fossilis*). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 62(3): 254-258.

Lermen, C.L.; Lappe, R.; Crestani, M.; Vieira, V.P.; Gioda, C.R.; Schetinger, M.R.C.; Baldisseretto, B.; Environmental Engineering and Technology, 2: 20-25.

Al-Ghanim, K.A., 2012. Acute toxicity and effects of sub-lethal malathion exposure on biochemical and haematological parameters of *Oreochromis niloticus*. Scientific Research and Essays, 7(16): 1674-1680.

Balabanova, L.V.; Mikryakov, D.V.; Mikryakov, V.R., 2009. Response of common carp (*Cyprinus carpio* L.) leucocytes to hormone-induced stress. Inland Water Biology, 2(1): 86-88.

Campbell, W.B.; Emlen J.M.; Hershberger, W., 1998. Thermally induced chronic development stress in coho salmon: integrating measures of mortality, early growth and developmental instability. Oikos, 81(2): 398-410.

Das, P.C.; Ayyappan, S.; Jena, J.K., 2006. Haematological changes in the three Indian major carps, *Catla catla*, *Labeo rohita* and *Cirrhinus mrigalaexposed* to acidic and alkaline water pH. Aquaculture, 256(1-4): 80-87.

Dogan, D.; Can, C., 2011. Hematological, biochemical, and behavioral responses of *Oncorhynchus mykiss* to dimethoate. Fish Physiology and Biochemistry, 37(4): 951-958.

Drabkin, D.L., 1946. Spectrophotometric studies XIV. The crystallographic and optical properties of the hemoglobin of man in comparison with those of other species. Biological Chemistry, 164: 703-723.

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.

Evans, G.O., 2008. Animal hematotoxicology: a practical guide for toxicologists and biomedical researchers. CRC Press, 224P.

Evans, G.O., 2009. Animal Hematotoxicology. CRC Press, 204P.

Ferrando, H.D.; Moliner, E.A., 1991. Effect of lindane on the blood of a freshwater fish. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 47:

Newhart, K., 2006. Environmental fate of malathion. California environmental protection, Agency department of pesticide regulation, Sacramento, 20P.

Orum, I.; Dorucu, M.; Yazlak, H., 2003. Haematological parameters of three cyprinid fish species from karakaya Darn Lake, Turkey. Online Journal of Biological Sciences, 3(3): 320-328.

Prakasam, A.; Sethupathy, S.; Lalitha, S., 2001. Plasma and RBCs antioxidant status in occupational male pesticide sprayers. Clinica Chimica Acta, 310(2): 107-112.

Ramesh, M.; Sankaran, M.; Veera-Gowtham, V.; Poopal, R.K., 2014. Hematological, biochemical and enzymological responses in an Indian major carp *Labeo rohita* induced by sublethal concentration of waterborne selenite exposure. Chemico-Biological Interactions, 207: 67-73.

Remyla, S.R.; Ramesh, M.; Sajwan, K.S.; Senthil Kumar, K., 2008. Influence of zinc and cadmium induced haematological and biochemical responses in a freshwater teleost fish *Catla catla*. Fish Physiology and Biochemistry, 34(2): 169-174.

Roberts, R.J., 2001. The immunology of teleosts. Fish Pathology, (Ed. 3), 133-150PP.

Ruane, N.M.; Huisman, E.A.; Komen, J., 2001. Plasma cortisol and metabolite level profiles in two isogenic strains of common carp during confinement. Fish Biology, 59(1): 1-12.

Saeedi Far, M.; Roodsari, H.V.; Zamini, A.; Mirrasooli, E.; Kazemi, R., 2012. The effects of diazinon on behavior and some hematological parameters of fry rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). World Journal of Fish and Marine Sciences, 4(4): 369-375.

Seiverd, C.E., 1964. Haematology for medical technologists. Lea and Febiger, Philadelphia, 946P.

Shahbazi, S.; Moëzzi, F.; Poorbagher, H.; Rostamian, N., Moraes, G.; Morsch, V.M., 2004. Effect of different temperature regimes on metabolic and blood parameters of silver cat fish (*Rhamdia quelen*). Aquaculture, 239(1-4): 497-507.

Luskova, V.; Svoboda, M.; Kolarova, J., 2002. The effect of Diazinon on blood plasma biochemistry in carp (*Cyprinus carpio*). Acta Veterinaria Brno, 71: 117-123.

Magar, R.S.; Dube, K.V., 2012. Impact of malathion on some haematological parameters of *Channa punctatus* (Bloch). International Journal of Biomedical and Advance Research, 3(9): 683-685.

Martins, J.; Oliva, T.L.; Vasconcelos, V., 2007. Assays with *Daphnia magna* and *Danio rerio* as alert systems in aquatic toxicology. Environment International, 33(3): 414-425.

Mişe Yonar, S.; 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.

Modesto, K.A.; Martinez, C.B., 2010. Effects of Roundup Transorb on fish: hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. Chemosphere, 81(6): 781-787.

Mohan, M., 2003. A composite approach for evaluation of the effect of Malathion on Gobiid fish *Glossogobius giuris* (Ham.). Aquatic Environment and Toxicology, 399-410.

Murphy, S.D.; Lauwerys, R.R.; Cheever, K.L., 1968. Comparative anticholinesterase action of organophosphorus insecticides in vertebrates. Toxicology and Applied Pharmacology, 12(1): 22-35.

Narain, A.S.; Srivastava, P.N., 1989. Anemia in the freshwater teleost. *Heteropneustes fossilis* under the stress of environmental pollution. Environmental Contamination and Toxicology, 627-634PP.

rohita. Iranian Journal of Environmental Health Science and Engineering, 8(4): 393-400.

Vander Oost, R.; Beyer, J.; Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environmental Toxicology and Pharmacology, 13(2): 57-149.

Verma, S.R.; Rani, S.; Dalela, R.C., 1982. Indicator of stress induced by pesticides in *Mystus vittatus* Haematological paramenters. Indian Journal of Environmental Health, 24(1): 58-64.

WHO., 2003. Specifications and evaluations for public health pesticides, malathion, World Health Organization, Geneva.

USEPA. U.S., Environmental Protection Agency. 2007. Ecotox user guide: Ecotoxicology database, version 3.0. www.epa.gov/ecotox.

Witeska, M., 2005. Stress in fish-hematological and immunological effects of heavy metals. Electronic Journal of Ichthyology, 1: 35-41.

2015. Effects of malathion acute toxicity on behavioral and haematological parameters in *Capoeta damascina* (Cypriniformes: Cyprinidae). Chemical Health Risks, 5(3): 209-220.

Singh, N.N.; Srivastava, A.K., 2010. Haematological parameters as bioindicators of insecticide exposure in teleosts. Ecotoxicology, 19(5): 838-854.

Soivio, A.; Oikari, A., 1976. Haematological effects of stress on a teleost, *Esox lucius* L. Fish Biology, 8(5): 397-411.

Stevens, M.L., 1997. Fundamentals of clinical hematology. WB Saunders, Philadelphia, PA. 393P.

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, 450-453PP.

Thenmozhi, C.; Vignesh, V.; Thirumurugan, R.; Arun, S., 2011. Impacts of malathion on mortality and biochemical changes of freshwater fish *Labeo*