



Available online: <http://ijhe.tums.ac.ir>

مقاله پژوهشی

مطالعه تاثیر سم کشاورزی گلایفوزیت بر برخی فاکتورهای خونی و تغییرات رفتاری ماهی کپور معمولی

*^۱ نبات نقشبندی^۲، مجید عسکری حصنی

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، ایران

۲- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

اطلاعات مقاله:

زمینه و هدف:	سم گلایفوزیت از سوموم علف کش سیستمیک و غیرانتخابی است که برای کنترل گیاهان استفاده می‌شود اما اثرات مضری بر جانوران دارد. مطالعه حاضر با هدف تعیین غلظت کشنده گلایفوزیت و تاثیر آن بر فاکتورهای خون شناسی و تغییرات رفتاری ماهی کپور معمولی انجام شد.	چکیده
تاریخ دریافت:	۹۶/۰۲/۲۰	
تاریخ ویرایش:	۹۶/۰۵/۱۰	
تاریخ پذیرش:	۹۶/۰۴/۲۷	
تاریخ انتشار:	۹۶/۰۶/۲۹	

روش بررسی: ماهیان در معرض غلظت‌های مختلف سم گلایفوزیت (۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و mg/L ۴۰) و یک گروه شاهد در طی ۹۶ h قرار گرفتند. از نمونه‌ها خون‌گیری و فاکتورهای خونی سنجیده شد. در طول دوره آزمایش، میزان تلفات و رفتارهای ماهیان ثبت گردید. براساس میزان تلفات، میزان LC_{50} ، NOEC، LOEC و LC محسوبه شد.

یافته‌ها: در شروع آزمایش رفتارهایی مانند جوش در سطح آب، تحرک بالا و سپس تجمع در بستر و در نهایت تنفس در سطح، عدم تعادل، سستی و مرگ در تیمارهای مختلف مشاهده شد. میزان LC_{50} گلایفوزیت برای این ماهی برای زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ h به ترتیب ۹۶ گردید. میزان LC_{50} گلایفوزیت برای این ماهی شامل گلیوبولهای قرمز و سفید، هماتوکریت، هموگلوبین، پروتئین کل، گلوکز، کورتیزول و غیره مشاهده شد ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: سم گلایفوزیت با درجه "نسبتاً سمی" است و در غلظت بالا تاثیرات شدیدی بر فیزیولوژی و سیستم ایمنی ماهیان دارد. فاکتورهای خونی و تغییرات رفتاری می‌توانند به عنوان آزمایش تشخیصی سلامت محیط و همچنین شاخص استرس سوموم در اکوسیستم‌های آبی استفاده شوند.

واژگان کلیدی: سموم کشاورزی، گلایفوزیت، ماهی کپور معمولی، فاکتورهای خونی، سلامت محیط

پست الکترونیکی نویسنده مسئول:
mahesni@gmail.com

مقدمه

صرف کنندگان آنها از جمله انسان‌ها تهدید محسوب می‌شود. مطالعاتی در مورد تاثیر سم گلایفوزیت بر روی ماهیان مختلف انجام شده است که براساس آن مطالعات میزان غلظت کشنده (LC₅₀) در بازه زمانی h ۹۶ از ۲ تا ۵۵ mg/L بدست آمده است (۷). همکاران (۸) میزان LC₅₀ این سم را در ماهی *Felix* در میزان ۴/۲ ppm به میزان *Catla catla* ۴ بدست آورده‌اند. میزان LC₅₀ برای قزل آلای رنگین کمان و خورشیدماهی میزان ۱۲۰ mg/L به ترتیب ۸۶ و ۱۲۰ mg/L محسابه شده است (۹).

تحقیقات نشان داده سموم علف کش می‌توانند بر ساختار کبد (۱۰)، آبشش و کلیه (۷) اثر تخریبی داشته و همچنین اختلالات آنزیمی و اندوکرینی شدیدی در ماهیان (۱۱) ایجاد کنند. تغییر فاکتورهای بیوشیمیایی و آنزیمی خون ماهی (۱۲) کاهش نرخ رشد، تضعیف سیستم ایمنی، تخریب غدد بزاوی و پاراتیروئید، تغییرات و جهش‌های ژنتیکی در جانوران مختلف (۱۳)، تخریب سلول‌های پوستی، اختلالات روانی و افزایش فعالیت سلول‌های سرطانی در کشاورزان و خانواده‌های آنها (۱۴) از دیگر اثرات سم گلایفوزیت هستند. براساس مطالعات مختلف ماهیان به دلیل طول عمر کوتاه، رشد زیاد و سازگاری با شرایط آزمایشگاهی به عنوان یکی از مدل‌های جانوری برای پایش آلدگی‌های زیست محیطی و بررسی اثرات بیولوژیکی سموم بر جانوران استفاده می‌شوند. هدف از مطالعه حاضر تعیین غلظت کشنده سم گلایفوزیت و اثر آن بر فاکتورهای خونی و تغییرات رفتاری ماهی کپور معمولی در شرایط آزمایشگاهی است.

مواد و روش‌ها

قطعه ماهی کپور معمولی با وزن ۱۰ g و طول ۶/۹ cm الی ۱۰/۱ cm از استخراه‌های پرورش ماهی بخش خصوصی تهیه و به آزمایشگاه تحقیقاتی منتقل شدند. قبل از انجام آزمایش، جهت سازگاری با شرایط آزمایشگاه نمونه‌ها به مدت دو هفته در وان‌های پلی اتیلنی L ۳۰۰ نگهداری شدند. سپس نمونه‌های هم اندازه در ۱۸ وان با حجم آب L ۱۵۰ جهت تعیین غلظت

امروزه افزایش فعالیت‌های کشاورزی و استفاده از کودهای شیمیایی و حشره کش‌ها سبب ورود گروه بزرگی از آلاینده‌ها به اکوسیستم‌ها شده است. یک دسته از این آلاینده‌ها سmom کشاورزی هستند که معمولاً از طریق فعالیت‌های انسانی وارد اکوسیستم‌های آبی می‌شوند و باعث بروز آسیب‌های شدید در جوامع آبزیان می‌گردند (۲، ۱). سم گلایفوزیت یکی از پرمصرفت‌رین علف‌کش‌های رایج در دنیا طی سال‌های اخیر بوده که می‌تواند گیاهان یک ساله و چند ساله مختلف را کنترل کند. این سم از سموم علف کش غیرانتخابی و سیستمیک است که برای کنترل علف‌های هرز و غیرکاربردی در مزارع کشاورزی، فضاهای سبز و حاشیه‌های استخرها و اکوسیستم‌های آبی استفاده می‌شود و حلالیت آن در آب بسیار بالاست (۳) و با مهار سنتز اسیدهای آمینه ضروری در گیاه مانع از تشکیل پروتئین‌های لازم در گیاه می‌گردد (۴).

در ایران، از این سم به عنوان علف کش در مزارع پنبه، نیشکر، ذرت و غیره در استان‌های شمالی مانند گیلان، مازندران، گلستان و استان‌های جنوبی کشور بهویژه خوزستان استفاده می‌شود. با توجه به اینکه این استان‌ها قطب اصلی پرورش ماهیان گرمابی در ایران محسوب می‌شوند لذا این سموم می‌توانند اثرات شدیدی بر ماهیان پرورشی و وحشی این مناطق داشته باشند. از طرفی مطالعات نشان داده میزان نفوذ و ماندگاری سموم کشاورزی در آب نسبتاً بالاست بنابراین می‌توانند اثرات محربی بر سلامت آبزیان و انسان داشته باشند (۵).

ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) از خانواده کپورماهیان (Cyprinidae) یکی از آبزیان ارزشمند و اقتصادی است که در اکثریت کشورهای جهان پرورش می‌یابد و میزان تولید آن در سال ۲۰۱۰ در کل جهان در حدود ۴ میلیون و ۱۰۰ هزار تن بوده است بنابراین به عنوان یکی از آبزیان پرمصرف جهان محسوب می‌شود (۶). از آنجایی که سموم کشاورزی به محیط‌های تکثیر این ماهی وارد می‌شوند، حیات این آبزیان به خطر می‌افتد و این امر برای حیات

ناحیه ساقه دمی صورت گرفت. بخشی از خون برای سنجش فاکتورهای خونی به ویال‌های حاوی ماده ضدانعقاد و نمونه دوم برای سنجش فاکتورهای سرمی داخل لوله آزمایش بدون هر گونه ماده ضد انعقاد متقل و پس از حدود ۲ الی ۳ min حرکت آرام به داخل یخچال انتقال یافت. سپس بالافصله پس از اتمام خون گیری، میزان سلول‌های خونی قرمز (RBC)، درصد هموگلوبین (Hb)، هماتوکریت (Ht)، حجم متوسط گلوبول‌های قرمز (MCV)، مقدار متوسط هموگلوبین در گلوبول‌های قرمز (MCH)، غلظت متوسط هموگلوبین (MCHC)، سلول‌های سفید و سلول‌های افتراقی گلوبول‌های سفید در نمونه اول خون سنجش شد. نمونه دوم خون، سانتریفوج (۱۰ min با دور ۳۰۰۰) و سرم (فاز رویی) به آرامی توسط سرنگ کشیده و به لوله‌های اپندورف mL ۱/۵ متنقل شد و سپس فاکتورهای سرمی شامل گلوکز و کورتیزول، پروتئین کل، کلسیترول و تری گلیسرید سنجش شدند (۲۰). (۲۱)

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS 21 و آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA – one side) انجام شد. در صورت وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها، پس آزمون دانکن (Duncan) برای گروه‌بندی میانگین‌های دارای اختلاف معنی‌دار استفاده شد ($P < 0.05$). رسم نمودارها در محیط نرم افزارهای Excel 21 و SPSS 21 صورت گرفت.

یافته‌ها

میزان تلفات و غلظت کشنده

براساس مشاهدات هیچ گونه تلفاتی در طول دوره آزمایش در گروه شاهد مشاهده نشد. همچنین در غلظت ۵ mg/L در ۴۸ ساعت اولیه شروع آزمایش نیز تلفاتی مشاهده نگردید (نمودار ۱). بیشترین تلفات در زمان ۹۶ h و در غلظت ۴۰ mg/L بود که حدود ۸۰ درصد نمونه‌ها تلف شدند. براساس نتایج بدست آمده میزان غلظت کشنده (LC_{50}) سم گلایفوزیت برای ماهی کپور معمولی برای زمان‌های ۴۸، ۷۲، ۴۸، ۲۴، ۲۴، ۳۶، ۳۶/۰۹، ۳۰/۴۶، ۳۰/۷۸ و ۲۱/۷۸ mg/L بود. براساس

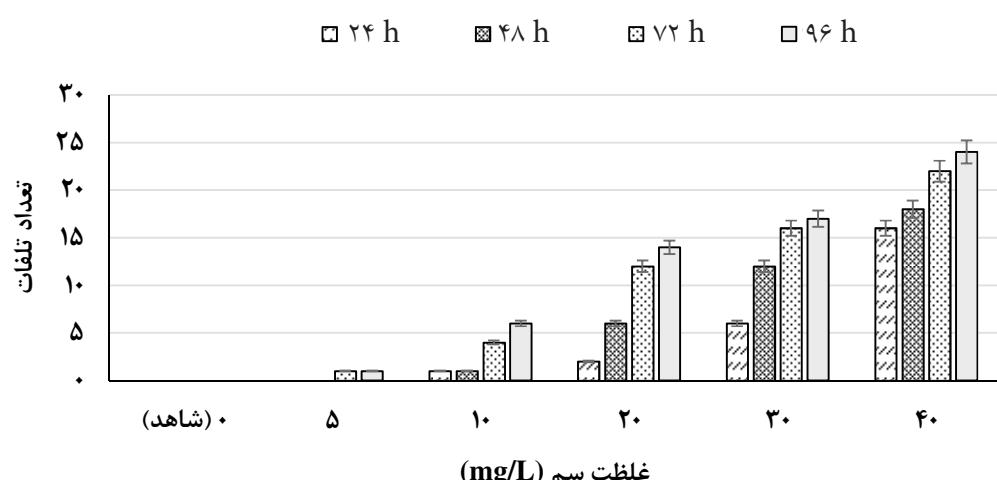
کشنده (LC_{50}) سم گلایفوزیت قرار گرفتند مدت آزمایش ۹۶ h در نظر گرفته شد. ماهیان مورد آزمایش به دقت توزین شده و پس از اطمینان از سلامتی و عدم ابتلا به بیماری به تعداد ۱۰ قطعه در هر وان (۳۰ قطعه در هر تیمار) ریخته شد. برای رسیدن به غلظت‌های مورد نظر، شروع آزمایش بین غلظت‌های ۰/۵ mg/L تا ۴ mg/L بود اما با توجه به اینکه تلفاتی مشاهده نشد بنابراین مرحله دوم آزمایش از غلظت ۵ mg/L به بالا و به صورت رشد لگاریتمی شروع شد. برای مرحله نهایی آزمایش ۵ تیمار و یک گروه شاهد در نظر گرفته شد. تیمارها شامل غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ mg/L بود. سپس در هر وان ۱۰ قطعه ماهی قرار داده شد (۱۷–۱۵). در طول انجام آزمایش فاکتورهای محیطی از جمله شوری، دما، pH و میزان اکسیژن محلول در آب اندازه‌گیری گردید و در طول آزمایش هیچ تغذیه‌ای برای ماهیان صورت نگرفت.

ثبت مرگ و میر ماهیان هر ۲۴ h یک بار و ماهیان مرده به دقت بررسی شده و علائم ظاهری ایجاد شده به دلیل تاثیرات سم ثبت گردید. تمامی حرکات و رفتارهای ماهیان در طول آزمایش با دوربین Webcam فیلمبرداری و سپس تمام فیلم‌ها بازبینی، بررسی و پایش گردید و به تمام تغییرات رفتاری مشاهده شده کد داده شد و در نهایت تمام تغییرات رفتاری با دقت ارزیابی گردید (۱۶، ۱۷). پس از ۹۶ h، میزان ۹۶ h غلظت کشنده (LC_{50}) برای زمان‌های ۴۸، ۲۴، ۷۲ و ۱۵ (۲۱) تعداد تلفات در هر تیمار و تکرار، با استفاده از نرم افزار Probit تحت برنامه SPSS 21 محاسبه شد (۱۷–۱۵). همچنین میزان حداقل غلظت مجاز (Maximum Acceptable Toxicant Concentration (MATC)) (میزان LC_{50} تقسیم به ۱۰) و همچنین حداقل غلظت موثر (Lowest Observed Effect Concentration (LOEC)) و غلظت بی اثریا فاقد مرگ و میر (No Observed Effect Concentration (NOEC)) تعیین گردید (۱۸، ۱۹).

پس از ۹۶ h از ماهیان باقیمانده در هر تیمار خون‌گیری شدند. برای خون‌گیری بین ۶ تا ۹ قطعه ماهی در آب حاوی پودر میخک قرار گرفتند. پس از بیهوشی ماهیان، خون‌گیری از

غلظت موثر (LOEC) $1/43$ تا $10/19 \text{ mg/L}$ و با میانگین $(NOEC) 6/66 \pm 2/24 \text{ mg/L}$ و میزان غلظت فاقد تلفات (MATC) به ترتیب $4/8$ و mg/L و حداقل غلظت مجاز (MATC) به ترتیب $2/005$ و $2/005 \text{ mg/L}$ محاسبه شد.

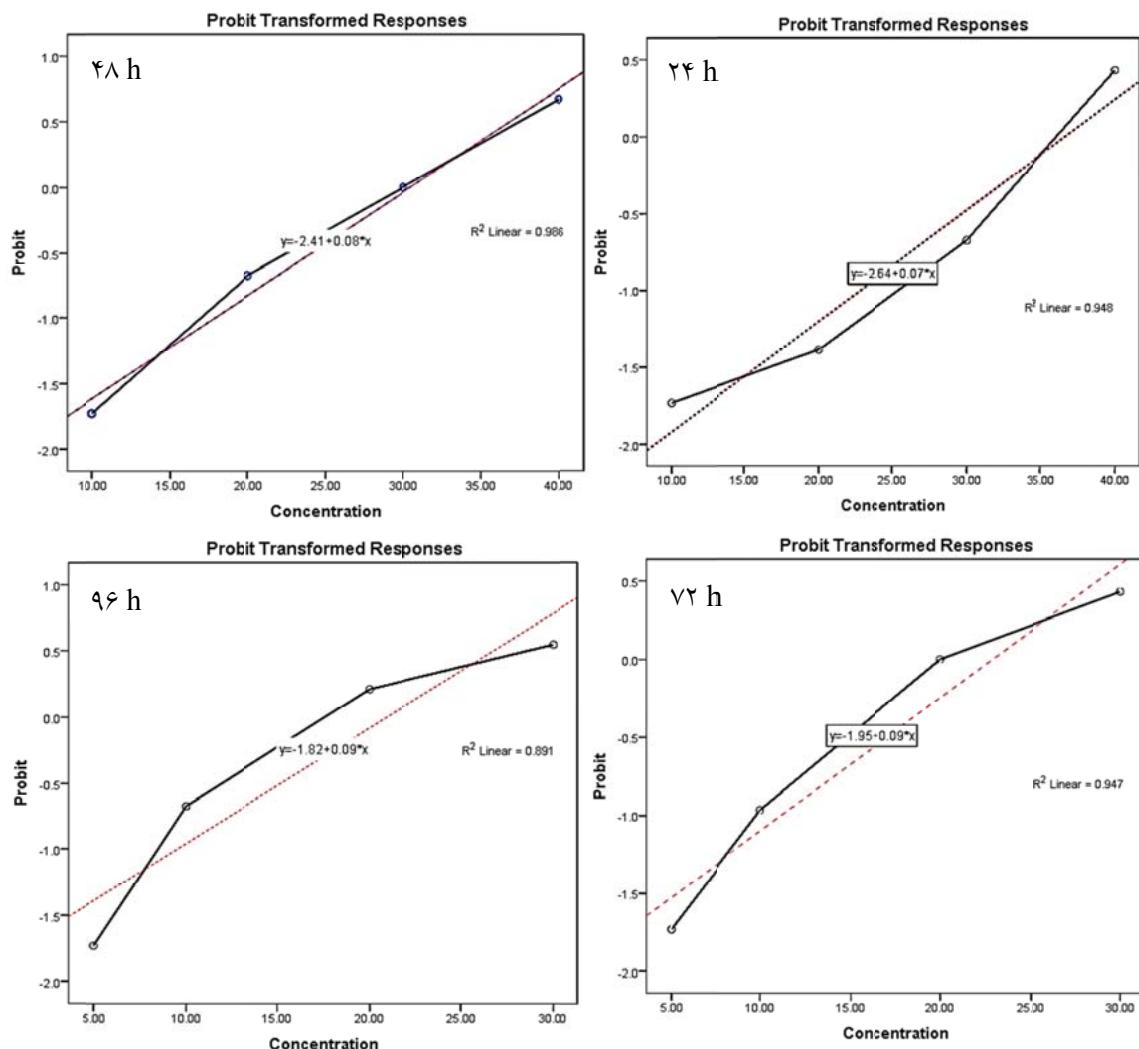
نتایج بدست آمده با گذشت زمان میزان غلظت کشنده از 10 تا 99 درصد در طی دوره آزمایش کاهش داشت (جدول ۱). میزان حداقل غلظت مجاز بین $1/719$ و $2/317 \text{ mg/L}$ و با میانگین $2/005 \pm 0/31 \text{ mg/L}$ بدست آمد و همچنین حداقل



نمودار ۱- میزان تلفات ماهی کپور معمولی در مواجهه با غلظت‌های مختلف سیم علف‌کش گلایفوزیت در طی 96 h

جدول ۱- غلظت کشنده سیم گلایفوزیت (mg/L) از 10 تا 99 درصد برای ماهی کپور معمولی در بازه زمانی 24 تا 96 h

بازه زمانی	غلظت‌های کشنده (mg/L) با محدوده اطمینان ۹۵ درصد			
	۹۶ h	۷۸ h	۴۸ h	۲۴ h
LC_{10}	$7/66$	$8/62$	$15/08$	$20/57$
LC_{20}	$20/36$	$13/14$	$20/36$	$25/90$
LC_{30}	$14/07$	$16/40$	$24/17$	$29/74$
LC_{40}	$17/40$	$19/18$	$27/42$	$33/02$
LC_{50}	$20/05$	$21/78$	$30/46$	$37/09$
LC_{60}	$22/70$	$24/38$	$33/50$	$39/15$
LC_{70}	$25/53$	$27/17$	$36/76$	$42/44$
LC_{80}	$28/84$	$30/42$	$40/06$	$46/28$
LC_{90}	$33/44$	$34/94$	$45/85$	$51/60$
LC_{99}	$44/36$	$40/67$	$58/39$	$64/25$



نمودار ۲- آنالیز Probit و رگرسیون خطی بین غلظت سم گلایفوزیت و روند مرگ و میر ماهی کپور معمولی در بازه‌های زمانی ۴۸ تا ۹۶ h

براساس نتایج ریخت‌شناسی و رفتاری نمونه‌های ماهی در تیمارهای مختلف، در شروع آزمایش رفتارهایی از جمله جهش در سطح آب، تحرک بالا مشاهده گردید. از روز اول به بعد و با توجه به غلظت سم، رفتارهایی از جمله بلعیدن هوا در سطح آب، سستی و بی‌حالی، عدم تعادل، بی‌حسی، تجمع در اطراف سنگ هوا و تحرک بسیار کم مشاهده گردید. با افزایش غلظت در ساعات اولیه، تحرک بیشتر و در پایان آزمایش ماهیان دچار عدم تعادل، بی‌حالی و در نهایت تلف می‌شدند. با افزایش زمان رفتارهای ماهیان مشهودتر بود.

آنالیز Probit همبستگی بالایی بین افزایش غلظت سم و مرگ و میر نشان داد و یک رابطه مستقیم بین دو مؤلفه بدست آمد. میزان رگرسیون خطی در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ h براساس غلظت‌های مختلف سم علف‌کش گلایفوزیت به ترتیب $0/94$ ، $0/98$ ، $0/89$ و $0/94$ بدست آمد (نمودار ۲).

تغییرات رفتاری

در تحقیق حاضر تحت تاثیر سم گلایفوزیت تغییرات رفتاری مختلفی در ماهی کپور معمولی مشاهده شد که با تغییر غلظت سم و همچنین گذشت زمان تغییرات رفتاری متفاوت بود.

جدول ۲- خلاصه‌ای از تغییرات رفتاری مشاهده شده در طی آزمایش تعیین کشنندگی حاد در بین غلظت‌های مختلف سیم گلایفوزیت (mg/L). عدم وجود (-)، کم (+) متوسط (++)، زیاد (+++)، خیلی زیاد (++++)

گلایفوزیت (mg/L)					پارامتر
۴۰	۳۰	۲۰	۱۰	۵	
+++	+++	+++	+++	++	شنا و فعالیت زیاد
+++	++	+	+	-	ترشح موکوس
+++	++	++	-	-	تجمع در اطراف سنگ و لوله هوارسانی
++++	+++	++	++	+	شنا در سطح آب
++++	+++	+++	++	+	بلعیدن هوا در سطح آب
+++	++	+	+	-	سختی در تنفس و افزایش حرکات سرپوش آبششی
+++	++	+	-	-	تجمع گروهی در بستر
-	-	+++	++	+	جهش ناگهانی
+++	++	+	-	-	شنا غیرعادی (شنا بر روی یک سمت بدن یا باله پشتی)
++++	++	+	-	-	سسیتی و بی حالی
++++	+++	++	+	-	عدم تعادل و جهت‌یابی

در غلظت‌های بالا این حرکات به سختی انجام می‌شد که این عمل هم نشان از سختی در تنفس است. ترشح موکوس در سطح بدن و در سطح آب وان‌ها، تقریباً در تمامی تیمارها به جزء تیمار شماره ۱ مشاهده شد. اولین تغییرات در تعادل و سستی در غلظت‌های ۳۰ و ۴۰ mg/L حدود ۶ h پس از شروع آزمایش مشاهده گردید. خلاصه‌ای از تغییرات مشاهده شده در طی آزمایش تعیین کشنندگی حاد در بین تیمارها در جدول ۲ بیان شده است.

تغییرات فاکتورهای خون و سرم با افزایش غلظت سیم کاهش معنی‌دار در میزان گلوبول‌های قرمز، هماتوکریت، هموگلوبین و شاخص‌های MCH، MCV، MCHC، در پایان دوره آزمایش مشاهده می‌شود ($P < 0.05$)

در ساعت‌های اولیه (۱ تا ۱۲ h شروع آزمایش) نمونه‌ها بسیار فعال و حرکات جهشی فراوانی انجام می‌دادند. حرکات جهشی در غلظت‌های ۲۰ تا ۴۰ mg/L به خصوص در طی ۳۶ h اولیه نسبت به دو غلظت دیگر بسیار شدیدتر بود و پس از آن کاهش یافت. اما میزان شناخت مداوم و فعال آنها نسبت به غلظت‌های ۵ و ۱۰ mg/L کمتر بود و در روز سوم و چهارم سستی و بی حالی و عدم تعادل در تیمارهای ۳۰ و ۴۰ mg/L سیم گلایفوزیت به وضوح دیده می‌شد. در غلظت‌های ۵ تا ۲۰ mg/L سستی و بی حالی کمتر مشاهده شد. ماهیان در روز دوم به صورت متناوب و در روزهای سوم و چهارم بصورت متوالی و دائم و به صورت عمودی در سطح آب بودند و شروع به بلعیدن هوا می‌کردند که نشان از سختی تنفس در این ماهیان بود. در روز چهارم به خصوص

(جدول ۳). میزان گلوكز، کورتیزول، کلسترول و تری گلیسرید با افزایش غلظت سم به مرور افزایش معنی دار ($P < 0.05$) و پروتئین کل کاهش معنی دار نشان داد ($P < 0.05$). (جدول ۴).

(جدول ۳). گلبول های سفید، لنفوسيت با افزایش غلظت سم به مرور افزایش معنی دار داشتند ($P < 0.05$). اما میزان مونوسيت، اوزينوفيل، نوتروفيل و بازو فيل با وجود نوسان در غلظت های مختلف اما در غلظت 40 mg/L کاهش معنی دار نشان دادند.

جدول ۳- روند تغيير ميزان فاكتورهای خونی در ماهی کپور معمولی پس از 96 h قرار گرفتن در معرض غلظت های مختلف سم گلايفوزيت (حروف انگلیسي غير مشابه (a,b,c,d) نشان دهنده اختلاف معنی دار در بين تیمارهای مختلف هستند).

غلظت سم گلايفوزيت (mg/L)							پارامتر خونی
۴۰	۳۰	۲۰	۱۰	۵	کترل (۰)		
^c $1/22 \pm 0/31$	^c $1/32 \pm 0/42$	^b $1/57 \pm 0/20$	^{ab} $1/62 \pm 0/18$	^a $1/75 \pm 0/23$	^a $1/82 \pm 0/21$	RBC (N/mm ³)	
^c $17/50 \pm 2/45$	^{bc} $19/20 \pm 3/19$	^b $21/45 \pm 4/07$	^{ab} $24/60 \pm 4/07$	^a $25/13 \pm 3/72$	^a $27/20 \pm 3/17$	Ht (%)	
^c $6/20 \pm 2/07$	^c $6/10 \pm 1/10$	^b $6/95 \pm 1/23$	^{ab} $7/21 \pm 1/09$	^a $8/01 \pm 1/17$	^a $8/91 \pm 0/87$	Hb (g/dl)	
^c $131/10 \pm 5/03$	^{bc} $137/10 \pm 6/10$	^b $140/10 \pm 4/39$	^a $149/10 \pm 6/22$	^a $146/85 \pm 3/74$	^a $147/10 \pm 4/19$	MCV (fl)	
^b $39/53 \pm 5/11$	^b $41/01 \pm 4/21$	^b $40/93 \pm 3/72$	^a $46/01 \pm 2/44$	^a $45/86 \pm 3/01$	^a $45/23 \pm 2/31$	MCH (pg)	
^b $38/53 \pm 3/09$	^{ab} $36/23 \pm 2/31$	^a $35/23 \pm 1/92$	^a $34/23 \pm 1/71$	^a $33/93 \pm 1/31$	^a $35/01 \pm 1/65$	MCHC (g/dl)	
^c $57/22 \pm 3/46$	^c $59/62 \pm 4/92$	^{bc} $56/57 \pm 4/30$	^b $54/22 \pm 2/71$	^a $50/75 \pm 4/22$	^a $49/82 \pm 3/35$	گلوبول سفید (N*10 ⁹ /mm ³)	
^b $84/50 \pm 4/29$	^b $85/04 \pm 3/46$	^b $84/45 \pm 5/97$	^a $81/60 \pm 5/37$	^a $81/13 \pm 4/81$	^a $81/20 \pm 3/37$	لنفوسيت (درصد)	
^c $1/20 \pm 0/37$	^c $1/02 \pm 0/40$	^c $1/25 \pm 0/17$	^b $2/21 \pm 0/99$	^b $2/11 \pm 0/85$	^a $2/91 \pm 0/47$	مونوسيت (درصد)	
^b $2/10 \pm 0/53$	^b $2/10 \pm 0/19$	^b $2/10 \pm 0/89$	^a $3/06 \pm 0/82$	^a $3/36 \pm 1/03$	^a $3/09 \pm 0/86$	نوتروفيل (درصد)	
^{ac} $1/10 \pm 0/11$	^c $1/01 \pm 0/23$	^a $1/22 \pm 0/42$	^b $2/01 \pm 0/49$	^b $2/16 \pm 0/81$	^a $1/22 \pm 0/27$	أوزينوفيل (درصد)	
^{bc} $1/05 \pm 0/19$	^c $0/83 \pm 0/11$	^{bc} $1/07 \pm 0/21$	^b $1/12 \pm 0/26$	^b $1/24 \pm 0/34$	^a $1/57 \pm 0/22$	بازوفييل (درصد)	

جدول ۴- روند تغيير ميزان فاكتورهای پلاسمایي در ماهی کپور معمولی پس از 96 h قرار گرفتن در معرض غلظت های مختلف سم گلايفوزيت (حروف انگلیسي غير مشابه (a,b,c,d) نشان دهنده اختلاف معنی دار در بين تیمارهای مختلف هستند).

غلظت سم گلايفوزيت (mg/L)							پارامتر پلاسمایي
۴۰	۳۰	۲۰	۱۰	۵	کترل (۰)		
^d $193/84 \pm 7/99$	^d $198/54 \pm 9/46$	^d $186/45 \pm 7/97$	^c $156/60 \pm 8/12$	^b $121/03 \pm 5/41$	^a $91/28 \pm 4/81$	گلوكز (mg/dl)	
^d $171/20 \pm 9/37$	^d $164/32 \pm 8/93$	^c $121/85 \pm 9/47$	^b $80/48 \pm 6/89$	^{ab} $52/76 \pm 4/71$	^a $31/98 \pm 2/91$	كورتیزول (nmol/l)	
^c $1/86 \pm 0/37$	^c $1/62 \pm 0/40$	^{bc} $2/85 \pm 0/47$	^b $3/21 \pm 0/99$	^{ab} $3/76 \pm 0/85$	^a $4/98 \pm 0/67$	پروتئين کل (g/dl)	
^d $245/45 \pm 10/4$	^d $231/77 \pm 9/23$	^c $20/22 \pm 6/42$	^{ab} $178/61 \pm 8/49$	^b $182/56 \pm 6/79$	^a $163/63 \pm 7/27$	كلسترول (mg/dl)	
^d $251/05 \pm 8/97$	^d $245/89 \pm 9/11$	^c $195/48 \pm 10/01$	^{bc} $188/46 \pm 10/19$	^b $185/75 \pm 7/04$	^a $142/83 \pm 9/22$	تري گلیسرید (mg/dl)	

بحث

در ماهی قزل آلای رنگین کمان در اثر ترکیبات مسی (۲۶، ۲۷) و در ماهی گورخری گونه *Danio rerio* در غلظت‌های بالای نیکل (۲۸) تغییرات رفتاری همچون افزایش شنا و فعالیت، سختی تنفس، سستی، عدم تعادل و افزایش موکوس گزارش شده است که این تغییرات می‌توانند در اثر تغییرات محیطی و فیزیولوژیکی در ماهی ایجاد شوند (۲۴، ۲۶-۲۸). مطالعات متواتی زیادی در مانیتورینگ و بررسی پاسخ‌های رفتاری ماهیان انجام شده که نشان داده برسی این تغییرات رفتاری روش مناسبی جهت ارزیابی سلامت محیط، حضور آلاینده‌ها و مواد سمی در محیط زیست جانور است (۲۶، ۲۷، ۲۹). از جمله تغییرات رفتاری، افزایش میزان تنفس است که علت آن کاهش اکسیژن و هیپوکسی است. زمانی که ماهی در شرایط آلودگی شدید قرار می‌گیرد اولین اندامی که در معرض آلاینده قرار می‌گیرد آبشنش است که آلاینده‌ها بر روی آبشنش قرار گرفته و باعث هیپوکسی و اختلالات تنفسی می‌شوند (۲۷، ۲۹، ۳۰). از جمله تغییرات مشاهده شده در ماهیان در معرض آلاینده‌های شیمیایی، افزایش موکوس و تغییر ساختار و مورفو‌لوژی پوست بدن در ماهیان بوده است که به عنوان یک پاسخ رفتاری سازگاری است و علت آن ایجاد یک لایه حفاظتی در مقابل اثرات تحریبی سموم گزارش شده است (۳۱، ۳۲).

در پژوهش حاضر پس از ۹۶ h میزان گلbul قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت و سایر فاکتورهای اریتروسیتی با افزایش غلظت سم کاهش یافتند و سلول‌های خونی سفید و لنفوцит‌ها افزایش و مونوکیت، نوتروفیل، بازوفیل و ائوزینوفیل‌ها کاهش معنی دار نشان دادند (جدول‌های ۳ و ۴). نتایج تحقیق حاضر با نتایج سایر مطالعات روی ماهیان از جمله ماهی کپور معمولی *lindane* (*Cyprinus carpio*) در معرض ماده شیمیایی *Clarias gariepinus* (۳۳)، در گربه ماهی آفریقایی در معرض سموم کشاورزی (۱۵، ۱۷، ۳۴)، در ماهی استخوانی *Prochilodus lineatus* تحت اثر سموم کشاورزی (۳) همخوانی دارد. کاهش فاکتورهای اریتروسیتی ناشی از آلودگی‌ها و افزایش غلظت‌های سموم تا حد کشنده، حاصل

سموم کشاورزی از آلاینده‌های مهم شیمیایی هستند که تاثیرات به سزایی بر روی موجودات زنده بخصوص آبزیان از جمله ماهیان دارند. در تحقیق حاضر میزان غلظت کشنده (LC50 96h) سم علف کش گلایفوزیت $20/05\text{ mg/L}$ و همچنین حداقل غلظت موثر (LOEC) $6/66\text{ mg/L}$ (Sadeghi و همکار (۲۰۱۴) بدست آمد. براساس مطالعات (۱۹) میزان غلظت کشنده سم گلایفوزیت برای ماهی گویی $12/01\text{ mg/L}$ (*Poecilia reticulate*) موثر $7/05\text{ mg/L}$ بدست آمده است (۱۹). میزان غلظت (Oreochromis niloticus) کشنده برای ماهی تیلاپیا $1/05\text{ mg/L}$ (۱۸)، ماهی گونه *Prochilodus lineatus* $13/6\text{ mg/L}$ (۳)، ماهی تیلاپیای زیلی $211/80\text{ mg/L}$ (۲۲)، ماهی *Catla catla* به میزان $4/2\text{ mg/L}$ (۸) و برای قزل آلای *Lepomis macrochirus* ترتیب $8/6$ و 120 mg/L (۹) محاسبه شده است. تغییر میزان غلظت کشنده در گونه‌های مختلف با تغییر شرایط محیطی، اندازه و سن ماهیان، ساختار تجاری سم (امولسیون یا پودر) و وجود سورفاکтан‌ها در سم مورد نظر تغییر می‌کند و اثرات آن بر موجودات هدف و غیرهدف متفاوت خواهد بود اما بطور کلی سم گلایفوزیت جزء سموم با سمیت متوسط تا زیاد تقسیم‌بندی می‌شود (۲۲).

همان گونه که در جدول ۲ مشاهده می‌گردد براساس نتایج بدست آمده در پژوهش حاضر، با افزایش غلظت سم، نوع و شدت تغییرات رفتاری و ریخت شناسی در ماهی کپور معمولی تغییر می‌کند. مشابه تحقیق حاضر، در گونه‌های مختلف ماهی در معرض آلاینده‌های مختلف تغییرات رفتاری مشاهده شده است. Gormley و همکاران (۲۰۰۳) در ماهی *Oryzias latipes* کاهش حرکت را تحت استرس سم آندوسولفان (۲۳) و Jaansson و همکاران (۲۰۰۷) در ماهی قزل آلای قهوه‌ای اثر پاراتیروییدها را در اختلال در فعالیت تولیدمثلی گزارش کردند (۲۴). در مطالعات دیگر نتایجی مشابه تحقیق حاضر بر روی ماهیان کپور معمولی تحت تاثیر سم کلروپیرفوس (۲۵)

استفاده قرار گیرند (۴۱، ۴۲).

نتیجه‌گیری

به طور کلی، نتایج نشان داد که سم گلایفوزیت سمتی نسبتاً بالایی بر ماهی کپور معمولی دارد به طوری که در غلطات‌های بالا باعث تغییرات رفتاری شدید گردید که نشان از ایجاد استرس بالا و تغییرات فیزیولوژیکی در ماهی است. از طرفی پس از ۹۶ h میزان گلبول قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت و سایر فاکتورهای اریتروسیتی با افزایش غلظت سم در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافتند و همچنین سلول‌های خونی سفید دچار تغییرات شدند که نشان از تغییرات شدید در سیستم ایمنی و تنفسی ماهی است. براساس نتایج بدست آمده می‌توان نتیجه گرفت که سم گلایفوزیت جزء سموم با سمتی متوسط تا زیاد برای ماهی کپور معمولی معرفی می‌گردد که تاثیرات آشکاری بر رفتار و واکنش این ماهیان در محیط آلوده به سم و همچنین فرایندهای فیزیولوژیک و بیوشیمیایی خونی ماهی کپور معمولی دارد و از این رفتارها و تغییرات فیزیولوژیک می‌توان بعنوان شاخص ارزیابی سلامت محیط ماهیان و سایر موجودات زنده استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

نویسنده‌گان مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از کارشناس محترم آزمایشگاه زیست‌شناسی دانشگاه پیام نور و نیروی‌های خدمات دانشگاه پیام نور جهت تامین نمونه‌های ماهی و همچنین کمک‌های مادی و معنوی دانشگاه پیام نور در حمایت از این تحقیق اعلام می‌دارند.

منابع

1. Sabra FS, Mehana E. Pesticides toxicity in fish with particular reference to insecticides. *Asian Journal of Agriculture and Food Sciences*. 2015;3(01):40-60.
2. Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NP. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2003;13(2):57-149.
3. do Carmo Langiano V, Martinez CB. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish Prochilodus lineatus. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2008;147(2):222-31.
4. Carlisle S, Trevors J. Glyphosate in the environment. *Water, Air, & Soil Pollution*. 1988;39(3):409-20.

آسیب دیدگی بافت‌های مختلف بدن از جمله بافت‌های خون‌ساز و کاهش توانایی تولید حامل‌های اکسیژنی هست از این رو مقدار این حامل‌ها در خون کاهش می‌یابند و این اثرات نشانه تخربی گلبول‌های قرمز و در نتیجه کم خونی شدید در ماهیان است (۳۳، ۳۵). افزایش گلبول‌های سفید و لنفوسيت‌ها و کاهش برخی لوکوسیت‌ها یک پاسخ فیزیولوژیک و سازگاری با شرایط در جانوران است که تحت اثر آلاینده‌های مختلف بعضی سلول‌های ایمنی بدن فعال‌تر می‌شوند و این افزایش لنفوسيت نشان از افزایش فعالیت ایمنی بدن ماهی برای مقابله با عوامل استرس زا است (۳۴).

براساس نتایج بدست آمده فاکتورهای بیوشیمیایی خون مانند گلوکز، کورتیزول، کلسترول و تری گلیسرید افزایش و پروتئین کل کاهش نشان داد که با گزارشات سایر محققان همخوانی دارد (۲۱، ۳۳، ۳۶، ۳۷). یکی از دلایل افزایش گلوکز، کلسترول و تری گلیسرید در مطالعات سم شناسی و ورود استرس محیطی، احتمالاً کاهش انسولین و افزایش گلوکوکورتیکوئیدها هست که به دنبال افزایش کاتکولامین‌ها و کورتیزول تحت تاثیر استرس اتفاق می‌افتد (۲۱، ۳۸). این هورمون‌ها باعث تحريك و افزایش تولید گلوکز از طریق فرایند گلیکوژنریز و افزایش مصرف پروتئین و فرایند لیپولیز برای تامین انرژی می‌شوند بنابراین در اثر ورود استرس میزان گلوکز، کلسترول و تری گلیسرید افزایش و میزان پروتئین کاهش می‌یابد (۲۱، ۳۳، ۳۹، ۴۰). بطور کلی تغییرات شدید در فاکتورهای خونی و سیستم ایمنی در ماهیان نشان‌دهنده این است که ماهیان از نظر سلامت در وضعیت وخیمی قرار دارند. بنابراین این فاکتورها می‌توانند بعنوان شاخص زیستی مهمی در ارزیابی سلامت بدن و محیط زیست ماهیان مورد

5. Khodadadi M, Samadi M, Rahmani A, Maleki R, Allahresani A, Shahidi R. Determination of organophosphorous and carbamat pesticides residue in drinking water resources of Hamadan in 2007. *Iranian Journal of Health and Environment*. 2010;2(4):250-57 (in Persian).
6. FAO. Cultured aquatic species information programme. Rome: FAO Fisheries and Aquaculture Department; 2004 [cited 2016 Jul 4]. Available from: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Cyprinus_carpio/en.
7. Jiraungkoorskul W, Upatham ES, Kruatrachue M, Sahaphong S, Vichasri-Grams S, Pokethitiyook P. Histopathological effects of Roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Science Asia*. 2002;28:121-27.
8. Felix JF, Saradhamani N, ManishKumar B, Charles Maria Prabhu F. Toxic effects of herbicide Glyphosate Hijac (41%) on serum biochemical parameters of freshwater fish, Catla catla. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2016;5(7):1928-37.
9. Tu M, Hurd C, Randall JM. *Weed Control Methods Handbook*. Utah: All U.S. Government Documents; 2001.
10. Szarek J, Siwicki A, Andrzejewska A, Terech-Majewska E, Banaszkiewicz T. Effects of the herbicide Roundup™ on the ultrastructural pattern of hepatocytes in carp (*Cyprinus carpio*). *Marine Environmental Research*. 2000;50(1):263-66.
11. Gluszak L, dos Santos Miron D, Moraes BS, Simões RR, Schetinger MRC, Morsch VM, et al. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2007;146(4):519-24.
12. Jofré DM, Germanó García MJ, Salcedo RE, Morales M, Alvarez M, Enriz RD, et al. Fish toxicity of commercial herbicides formulated with glyphosate. *Environmental and Analytical Toxicology*. 2013;4(1):199-201.
13. Williams GM, Kroes R, Munro IC. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2000;31(2):117-65.
14. Mesnage R, Defarge N, De Vendomois JS, Seralini G. Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. *Food and Chemical Toxicology*. 2015;84:133-53.
15. Aderolu A, Ayoola S, Otitoloju A. Effects of Acute and sub-lethal concentrations of Actellic on Weight changes and Haematology parameters of *Clarias gariepinus*. *World Journal of Biological Research*. 2010;3:30-39.
16. Hesni MA, Dadolahi-Sohrab A, Savari A, Mortazavi M. Study the acute toxicity of lead nitrate metal salt on behavioral changes of the milkfish (*Chanos chanos*). *World Journal of Fish & Marine Sciences*. 2011;3(6):496-501.
17. Adeyemo O. Haematological and histopathological effects of cassava mill effluent in *Clarias gariepinus*. *African Journal of Biomedical Research*. 2005;8(3):179-83.
18. Ayoola S. Toxicity of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juvenile. *African Journal of Agricultural Research*. 2008;3(12):825-34.
19. Sadeghi A, Hedayati A. Investigation of LC50, NOEC and LOEC of Glyphosate, Deltamethrin and Pretilachlor in Guppies (*Poecilia Reticulata*). *Iranian Journal of Toxicology*. 2014;8(26):1124-29.
20. Lal Shah S. Hematological changes in *Tinca tinca* after exposure to lethal and sublethal doses of Mercury, Cadmium and Lead. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. 2010;9(3):434-43.
21. Remyla SR, Ramesh M, Sajwan KS, Kumar KS. Influence of zinc on cadmium induced haematological and biochemical responses in a freshwater teleost fish Catla catla. *Fish Physiology and Biochemistry*. 2008;34(2):169-74.
22. Nwani C, Ibiam U, Ibiam O, Nworie O, Onyishi G, Atama C. Investigation on Acute toxicity and behavioral changes in *Tilapia zillii* due to glyphosate-based herbicide, forceup. *The Journal of Animal and Plant Sciences*. 2013;23(3):888-92.
23. Gormley KL, Teather KL. Developmental, behavioral, and reproductive effects experienced by Japanese medaka (*Oryzias latipes*) in response to short-

- term exposure to endosulfan. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2003;54(3):330-38.
24. Jaansson A, Scott AP, Moore A, Kylin H, Olsén KH. Effects of a pyrethroid pesticide on endocrine responses to female odours and reproductive behaviour in male parr of brown trout (*Salmo trutta* L.). *Aquatic Toxicology*. 2007;81(1):1-9.
25. Halappa R, David M. Behavioral responses of the freshwater fish, *Cyprinus carpio*(Linnaeus) following sublethal exposure to Chlorpyrifos. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 2009;9(2):233-38.
26. Petruskiene L. Changes in aggressive behaviour of rainbow trout after starvation and exposure to heavy metal mixture. *Ekologija*. 2002;1:14-21.
27. Sloman KA, Scott GR, Diao Z, Rouleau C, Wood CM, McDonald DG. Cadmium affects the social behaviour of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquatic Toxicology*. 2003;65(2):171-85.
28. Kienle C, Köhler H-R, Filser J, Gerhardt A. Effects of nickel chloride and oxygen depletion on behaviour and vitality of zebrafish (*Danio rerio*, Hamilton, 1822) (Pisces, Cypriniformes) embryos and larvae. *Environmental Pollution*. 2008;152(3):612-20.
29. Xu J, Liu Y, Cui S, Miao X. Behavioral responses of tilapia (*Oreochromis niloticus*) to acute fluctuations in dissolved oxygen levels as monitored by computer vision. *Aquacultural Engineering*. 2006;35(3):207-17.
30. Shah SL. Behavioural abnormalities of *Cyprinodon watsoni* on exposure to copper and zinc. *Turkish Journal of Zoology*. 2001;26(1):137-40.
31. Siddiqui AA, Arifa N. Toxicity of heavy metal copper and its effect on the behaviour of fresh water Indian cat fish, *Clarias batrachus* (Linn.). *Current Biotica*. 2011;4(4):405-11.
32. Yorulmazlar E, Güllü A. Investigation of acute toxicity of cadmium sulfate ($\text{CdSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) and behavioral changes of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus* Val., 1844). *Chemosphere*. 2003;53(8):1005-10.
33. Saravanan M, Kumar KP, Ramesh M. Haematological and biochemical responses of freshwater teleost fish *Cyprinus carpio* (Actinopterygii: Cypriniformes) during acute and chronic sublethal exposure to lindane. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2011;100(3):206-11.
34. Modesto KA, Martinez CB. Effects of Roundup Transorb on fish: hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere*. 2010;81(6):781-87.
35. Okomoda V, Ataguba G, Ayuba V. Hematological response of *Clarias gariepinus* fingerlings exposed to acute concentrations of sunsate®. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*. 2013;9(2):271-78.
36. Abalaka SE. Evaluation of the haematology and biochemistry of *Clarias gariepinus* as biomarkers of environmental pollution in Tiga dam, Nigeria. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2013;56(3):371-76.
37. Al-Akel A, Al-Balawi HA, Al-Misned F, Mahboob S, Ahmad Z, Suliman E. Effects of dietary copper exposure on accumulation, growth, and hematological parameters in *Cyprinus carpio*. *Toxicological and Environmental Chemistry*. 2010;92(10):1865-78.
38. Ahmad Z. Acute toxicity and haematological changes in common carp (*Cyprinus carpio*) caused by diazinon exposure. *African Journal of Biotechnology*. 2011;10(63):13852-59.
39. Singh AP, Singh S, Bhartiya P, Yadav K. Toxic effect of Phorate on the serum biochemical parameters of snake headed fish *Channa punctatus* (Bloch). *Advances Bioresearch*. 2010;1(1):177-81.
40. Stalin IS, Das SMS. Biochemical changes in certain tissues of *Cirrhina mrigala* (Hamilton) (Cyprinidae: Cypriniformes) exposed to fenthion. *International Journal of Environmental Sciences*. 2012;2(3):1268-72.
41. Tort L. Stress and immune modulation in fish. *Developmental & Comparative Immunology*. 2011;35(12):1366-75.
42. Wester P, Vethaak A, Van Muiswinkel W. Fish as biomarkers in immunotoxicology. *Toxicology*. 1994;86(3):213-32.



Available online: <http://ijhe.tums.ac.ir>

Original Article



Study of agricultural pesticide glyphosate effects on hematological factors and behavioral changes in *Cyprinus carpio*

N Naqshband¹, M Askari Hesni^{2*}

1- Department of Biology, Faculty of Sciences, Payame Noor University, Iran

2- Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

ARTICLE INFORMATION:

Received: 10 May 2017

Revised: 1 August 2017

Accepted: 7 August 2017

Published: 20 September 2017

ABSTRACT

Background and Objective: Glyphosate is a non-selective, systemic herbicide that can control most plants, but it has harmful effects on organisms, especially aquatic animals. Static bioassays were made to determine acute toxicity of glyphosate and its effects on haematological parameters and behavior changes of common carp (*Cyprinus carpio*).

Materials and Methods: Common carp were exposed to different concentrations of glyphosate (5, 10, 20, 30 and 40 mg/L) and a control group for 96 h. After that, blood and plasma factors were measured in blood samples. Mortality rate and fish behavioral were recorded during the experiments. LC₅₀, LOEC, NOEC and MATC were calculated by Probit software according to mortality rate in any treatment.

Results: In the early period of the experiment, fish in toxic media were jumping in water and showed high movements. Then after, the behavior such as breathing in surface, loss of balance, weakness and finally death were observed in the different treatments. LC₅₀ value and 95% confidence limit of glyphosate in 24, 48, 72 and 96 h were 36.09, 30.46, 21.78 and 20.05 mg/L for common carp, respectively. The LOEC, NOEC and MATC were calculated as 6.66, 4.73 and 2.005 mg/L. The Significant changes that were observed in blood factors included RBC, WBC, Hct, Hb and plasma factors such as total protein, glucose, cortisol and other factors when the pesticide concentration was increased (P<0.05).

Conclusion: Results showed that glyphosate had a high effect on common carp and its physiology and immune system. Haematological parameters may be used as an environmental health diagnostic test and stress indicator for agriculture pesticides in aquatic ecosystems.

*Corresponding Author:

mahesni@gmail.com