Archive of SID

اثر سمیت کلرپیریفوس بر شاخص‌های خونی ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) تغذیه شده با سطوح مختلف پربیوتیک قارچ صدفی (*Pleurotus ostreatus*)

عاطفه ایری، فرحناز کاکاوند، مریم رضایی شادگان، علی اکبر هدایتی*

گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

*نویسنده مسئول: hedayati@gau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۹/۷/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۲/۲۷

چکیده

هدف این مطالعه بررسی تأثیر سطوح مختلف پربیوتیک قارچ صدفی (*Pleurotus ostreatus*) بر شاخص‌های خون‌شناسی ماهی تیلاپیا نیل (*Oreochromis niloticus*) مواجهه شده با سم کلرپیریفوس بود. برای این منظور تعداد ۱۲۰ بچه ماهی تیلاپیا به مدت ۴۲ روز در ۴ تیمار (هر یک با سه تکرار) شامل (۱) شاهد، فاقد پربیوتیک قارچ صدفی، (۲) غذای حاوی ۰/۰۵، (۳) غذای حاوی ۰/۱ و (۴) غذای حاوی ۰/۲ درصد پربیوتیک قارچ صدفی تقسیم شدند. سپس به هر گروه غلظت ppm۰/۵ سم کلرپیریفوس به مدت ۱۶ روز اضافه شده و شاخص‌های خونی ماهیان در سطوح مختلف ارزیابی شد. براساس نتایج پربیوتیک به‌تنهایی اثر معنی‌داری بر تعداد گلبول‌های قرمز (RBC)، حجم متوسط گلبولی (MCV)، هماتوکریت، هموگلوبین و گلبول سفید نداشت ($P<0/05$) ولی تیمار در معرض کلرپیریفوس و پربیوتیک به‌صورت ترکیبی سبب افزایش فاکتورهای فوق در مقایسه با گروه شاهد و تیمارهای پربیوتیک به‌تنهایی شدند. با این وجود مقادیر گلبول سفید و گلبول قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت، MCHC در تیمار ترکیبی ۰/۲ و ۰/۱ درصد پربیوتیک و سم کلرپیریفوس بیشتر از سایر تیمارها بود. چنین نتیجه‌گیری می‌شود که سطح ۰/۲ و ۰/۱ درصد پربیوتیک قارچ صدفی در جیره می‌تواند بهترین تأثیر را بر فاکتورهای خونی ماهی تیلاپیا داشته باشد.

واژگان کلیدی: پربیوتیک، سم کلرپیرفیوس، ماهی تیلاپیا، شاخص‌های خونی.

مقدمه

استفاده از سموم آفت‌کش تا زمانی که شیوه‌های مبارزه زیستی با آفات گیاهی مرسوم نشود، امری اجتناب‌ناپذیر است. اکوسیستم‌های آبی گرچه به عنوان محیط هدف و اثر برای سموم آفت‌کش مدنظر نمی‌باشند (Mansingh *et al*.,1995)، ولی آن‌ها از طریق کاربرد مستقیم در اکوسیستم‌های آبی و یا به صورت غیرمستقیم مانند فرسایش به‌دست‌آمده از زمین‌های کشاورزی و هم‌چنین نفوذ فاضلاب‌های صنعتی و کشاورزی که به منابع آبی راه می‌یابند (Piri Zirkoohi *et al*., 1997). حشره‌کش‌های ارگانوفسفره گروهی از حشره‌کش‌های شیمیایی هستند که امروزه در جهان به‌طور گسترده استفاده می‌شوند. سموم ارگانوفسفره به‌طور عمومی سمیت بالایی دارند و مهم‌ترین عامل بیماری و مرگ‌ومیر ناشی از مسمومیت‌ها در کشورهای جهان سوم هستند (Hoffman *et al*., 2006; Nilla *et al*., 2008).

کلرپیریفوس (O,O-diethyl-O-(3,5,6-trichloro -2-pyridyl) (phosphorothioate) با نام تجاری دورسبان Dursban EC40.8%، حشره‌کش و کنه‌کش تماسی، گوارشی و تنفسی است که از طریق ریشه و برگ گیاهان جذب می‌شود. توانایی این سم در مهار آنزیم کولین‌استراز در سیستم عصبی جانوران بوده و سبب توقف فعالیت بیولوژیک آنزیم کولین-استراز شده و در نتیجه اختلال در سیستم عصبی مرکزی و مرگ آن‌ها را به دنبال دارد (Farrell and Brauner, 2014). ترکیبات ارگانوفسفره تأثیرات غیرکولینرژی مانند آسیب به غشاهای سلول، تولید رادیکال آزاد و اختلال در سیستم آنتی‌اکسیدانی را نیز سبب می‌شوند (Zhang and Sultatos, 2005).

تولید رادیکال‌های آزاد توسط این ترکیبات و به

www.SID.ir

Archive of SID

دنبال آن تغییر در سیستم آنتی‌اکسیدانی سلول و پر اکسیداسیون لیپیدهای غشاء از دیگر اثرات این سموم می‌باشد (Saulsbury *et al*., 2009). شدت سمیت کلرپیریفوس در بین گونه‌های مختلف از تغییرات زیادی برخوردار می‌باشد و میزان این تغییرات به‌طور عمده تابع سن، جنسیت، اندازه بدن ماهی، شرایط اقلیمی، ترکیب شیمیایی، شیمی محیط‌زیست و سایر فاکتورها است (Montz, 1983). علائم ظاهری مسمومیت ماهیان به سم کلرپیریفوس شامل تیرگی بدن، اضطراب بیش‌ازحد، گرفتگی شدید عضلانی و شنای سریع ناگهانی دورانی و علائم فیزیولوژیک داخلی از جمله مهار شدن کولین، انباشتگی استیل کولین، استراز، اختلال در کارکرد عصبی و اختلال در حرکات تنفسی می‌باشد (Sastry *et al*., 1980). اثرات غلظت تحت کشندگی سموم کشاورزی بر ماهی ها شامل انحنای ستون فقرات، تغییر ترکیبات خونی (هدایتی و همکاران، ۱۳۹۲)، اختلالات تولید مثلی و مهار فعالیت استیل کولین استراز، کاهش رشد مرحله لاروی و بالغ ماهیان، شنای نامتعادل و تغییر میزان رنگدانه‌ها و ساختمان آبشش گزارش شده است (Dutta *et al*., 1993).

اغلب پربیوتیک‌ها در دسته‌ی الیگوساکاریدهای غیرقابل هضم تقسیم‌بندی می‌شوند. الیگوساکاریدهای غیرقابل هضم از عواملی هستند که قابلیت تحریک رشد باکتری‌های مفید روده یا همان باکتری‌های پروبیوتیکی را دارا هستند. از خواص پربیوتیک‌ها می‌توان به تحریک و ارتقاء سیستم ایمنی بدن، افزایش کارایی غذایی که این امر از طریق تولید ویتامین‌ها، افزایش قابلیت جذب مواد معدنی و عناصر کمیاب اشاره کرد (Mahious *et al*., 2005). افزایش تحریک پاسخ‌های ایمنی به‌وسیله مکمل‌های غذایی مانند باکتری، قارچ خوراکی و تیمار ترکیبی می‌تواند از اهمیت بالایی در منابع آبی برخوردار باشد. این مکمل‌های غذایی می‌توانند به‌طور مستقیم سازوکارهای دفاعی اولیه را از طریق اثر برگیرنده‌ها و ژن‌های مسئول فعال سازند. بتاگلوکان موجود در قارچ می‌تواند بااتصال به گیرنده‌های پروتئینی موجود در سطح ماکروفاژها منجر به فعال شدن آن‌ها و درنتیجه حفظ و تقویت سیستم ایمنی گردد (Wasser, 2002).

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 استفاده می‌شوند (Dutta and Meijer, 2003). گونه‌های تیلاپیا از خانواده Cichlidae به علت رشد سریع و پرورش ساده و ارزان مورد توجه بوده و یکی از مهم‌ترین گونه‌های پرورشی آن تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) است. ارزیابی پارامترهای خون یکی از شاخص‌های مهم و قابل اطمینان در بررسی وضعیت سلامتی و کنترل زیستی آبزیان است (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 تأثیرگذار است (حیدری و همکاران، ۱۳۹۲؛ Verma *et al*., 1982). بنابراین پروفایل خون می‌تواند اطلاعات مهمی را در مورد وضعیت فیزیولوژیکی ماهی ارائه داده و به‌منظور ارزیابی اثرات سوء آفت‌کش‌ها استفاده شود (Dogan and Can, 2011). با توجه موارد فوق و وجود آلاینده‌هایی همچون سم کلرپیریفیوس در اکوسیستم‌های آبی به عنوان یکی از سموم رایج مصرفی، تحقیق حاضر به بررسی جنبه‌های هماتولوژی اثرات کلرپیریفوس بر ماهی تیلاپیا به اجرا درآمد و با این فرضیه که احتمالاً اثرات سم کلرپیریفوس با مصرف پربیوتیک قارچ صدفی قارچ صدفی (*Pleurotus ostreatus*) وجود دارد کاهش می‌یابد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق به مدت ۴۲ روز در محل مرکز تحقیقات آبزی‌پروری شهید ناصر فضلی برآبادی گروه شیلات

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱ – درصد ترکیبات شیمیایی جیره تجاری (شرکت فرادانه) مورد استفاده در تغذیه ماهیان کپور معمولی پرورشی (درصد ماده خشک).

ترکیب جیره	پروتئین خام	چربی خام	فیبر خام	خاکستر	رطوبت	فسفر کل
درصد	۳۸-۳۵	۸-۴	۷-۴	۱۱-۷	۱۱-۵	۱-۱/۵

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. بچه ماهی‌های تیلاپیا نیل در محدوده وزنی ۲۰ گرم از مراکز تکثیر و پرورش بخش خصوصی تهیه شد و پس از انتقال به مدت یک هفته سازگاری اولیه صورت پذیرفت. پس از عادت دهی بچه ماهی‌ها با تراکم ۱۰ عدد در ۱۲ وان فایبرگلاس ۱۰۰ لیتری ذخیره‌سازی شدند. ماهیان با غذای تجاری ماهی کپور (شرکت فرادانه با نام تجاری GFC1) به میزان ۳ درصد وزن بدن در ۲ نوبت (صبح و عصر) تغذیه شدند (جدول ۱) (جافرنوده، ۲۰۱۶). در طی دوره آزمایش فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب شامل اکسیژن محلول ۹-۷ میلی‌گرم، دمای ۲۵-۲۸ درجه سانتی‌گراد ثابت نگه‌داری شد. غذای مورد استفاده در این پژوهش حاوی پربیوتیک به‌عنوان مکمل غذایی بود که به این منظور ۵۰۰ گرم قارچ صدفی (بخش خصوصی بازار محلی گرگان) استفاده شد، جهت کاهش رطوبت قارچ‌های خریداری شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق در سینی نگهداری شد. سپس در آون (مدل Binder، آلمان) با دمای ۴۵ درجه سلسیوس به مدت ۲ روز خشک گردید سپس قارچ‌ها را با آسیاب (Parses، ایران) پودر کرده و به همراه ژلاتین به جیره تجاری کپوراضافه شد (Şevik *et al.*, 2013).

مطالعه فوق در ۴ تیمار با هر یک با سه تکرار شامل تیمار (۱) شاهد، فاقد پربیوتیک قارچ صدفی، تیمار (۲) حاوی ۰/۰۵ درصد پربیوتیک قارچ صدفی، تیمار (۳) حاوی ۰/۱ درصد پربیوتیک قارچ صدفی و تیمار (۴) حاوی ۰/۲ درصد پربیوتیک قارچ صدفی به مدت ۴۵ روز تغذیه شدند. سپس ماهیان ۱۶ روز در مجاورت سم کلرپیریفوس با غلظت ppm۰/۵ قرار گرفتند. همچنین در این مدت روزانه ۵۰ درصد حجم تانک‌ها تعویض آب صورت گرفت به‌طوری‌که غلظت سم در هر یک از تیمارها حفظ شد.

نمونه‌گیری و خون‌گیری: نمونه‌گیری از ماهیان جهت آزمایش‌های خونی در انتهای دوره پرورش صورت گرفت. ۲۴ ساعت قبل از خون‌گیری تغذیه ماهیان قطع و سپس ۳ عدد ماهی (۳ ماهی به ازای هر تکرار) به‌ظاهر سالم به‌طور تصادفی انتخاب شدند و از ورید ساقه دمی آن‌ها با سرنگ ۲/۵ سی‌سی حاوی هپارین خون‌گیری به عمل آمد و به ویال‌های ۲ سی‌سی منتقل شدند و سپس در سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد.

روش اندازه‌گیری: شمارش تعداد گلبول‌های قرمز و سفید پس از رقیق‌سازی با استفاده از هموسیتومتر انجام شد. شمارش افتراقی گلبول‌های سفید شامل هتروفیل (نوتروفیل)، لنفوسیت، ائوزینوفیل، منوسیت و بازوفیل نیز پس از تهیه گسترش و رنگ‌آمیزی صورت پذیرفت. هماتوکریت (PVC) بر اساس روش میکروهماتوکریت و هموگلوبین (Hb) بر اساس روش Sahli تعیین شد. مقادیر حجم متوسط گلبولی (MCV)، هموگلوبین متوسط سلولی (MCH) و غلظت متوسط هموگلوبین گلبول‌های قرمز (MCHC) بر اساس فرمول‌های استاندارد مشخص گردید. نوع رنگ‌آمیزی در شمارش گلبول‌های سفید از نوع گیمسا بود و از محلول ریس برای رقیق کردن خون استفاده شد (Brown, 1988).

$$MCV\ (fL) = [PCV(\%) / RBC(10^{-6}.mm^{-3})] \times 10$$

$$MCH\ (pg) = [Hb(g/dL) / RBC(10^{-6}.mm^{-3})] \times 10$$

$$MCHC\ (g/dL) = [Hb(g/dL) / PCV(\%)] \times 100$$

تجزیه‌وتحلیل آماری: این آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی برنامه‌ریزی و اجرا گردید. پس از ثبت داده‌ها همگنی آن‌ها با استفاده از Kolmogornove-Smirnove بررسی شد. برای مقایسه بین تیمارها و بررسی وجود اختلاف معنی‌دار

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲ – اثر تیمارهای مختلف پربیوتیک و سم کلرپیریفوس بر فاکتورهای خونی بچه ماهی تیلاپیا نیل.

تیمارها	گلبول قرمز (×۱۰^۶)	هموگلوبین (گرم در دسی لیتر)	هماتوکریت (درصد)	MCV (فمتولیتر)	MCH (پیکوگرم)	MCHC (گرم در دسی لیتر)
شاهد	۲/۰۷±۰/۱۹^{cd}	۷/۱۷±۰/۵۷^{a}	۶۶۹±۱/۱۵^{d}	۱۴۲/۰۳±۵/۸۷^{c}	۳۴/۳±۱/۷^{a}	۲۴/۱۷±۱/۳۸^{a}
پربیوتیک ppt۰/۰۵	۲/۴۶±۰/۱۸^{d}	۶/۵۵±۰/۹۹^{a}	۳۰±۱/۵۲^{bcd}/۶۶	۱۵۷/۹۵±۱۱/۷۳^{c}	۳۳/۴۵±۰/۹۷^{a}	۲۱/۲۸±۲/۲۱^{ab}
پربیوتیک ppt۰/۱	۲/۶۸±۰/۰۷^{cd}	۶/۸۳±۱/۰۱^{a}	۳۰±۲/۶۴^{cd}	۱۴۴/۶۴±۹/۰۲^{c}	۳۲/۸۱±۲/۹۷^{a}	۲۲/۷۴±۲/۴۴^{ab}
پربیوتیک ppt۰/۲	۲/۸۵±۰/۱۷^{d}	۶/۵۳±۱/۰۸^{a}	۲۹/۳۳±۲/۳^{d}	۱۴۳/۳۷±۶/۲۵^{c}	۳۱/۷۶±۲/۱۴^{ab}	۲۲/۲±۲/۰۹^{ab}
شاهد+سم	۲/۰۹±۰/۱۷^{cd}	۶/۰۴±۰/۵۱^{a}	۲۹/۸۳±۴/۰۴^{cd}	۲۹۸/۳۳±۴۰/۴۱^{b}	۲۹/۱۴±۰/۵^{bc}	۲۰/۳۹±۱/۸۹^{b}
پربیوتیک ppt۰/۰۵ + کلرپیریفوس ppm۰/۵	۱/۹۵±۰/۲۴^{bc}	۷/۱۶±۰/۷۹^{a}	۳۴/۶۶±۱/۰۴^{a}	۳۴۶/۶۶±۱۰/۴^{a}	۲۹/۰۲±۱/۱^{bc}	۲۰/۶۷±۲/۲۶^{ab}
پربیوتیک ppt۰/۱ + کلرپیریفوس ppm۰/۵	۲/۰۸±۰/۳۱^{ab}	۷/۳۹±۰/۲۵^{a}	۳۳/۶۶±۰/۲۸^{abc}	۳۳۶/۶۶±۲/۸۸^{a}	۲۷/۵۶±۰/۷۳^{cd}	۲۱/۹۷±۰/۹۳^{ab}
پربیوتیک ppt۰/۲ + کلرپیریفوس ppm۰/۵	۲/۰۵±۰/۲۵^{a}	۷±۰/۲۲^{a}	۳۴/۱۶±۱/۲۵^{ab}	۳۴۱/۶۶±۱۲/۵۸^{a}	۲۵/۵۶±۰/۹۷^{d}	۲۱/۲۹±۰/۲۴^{ab}

حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشد (P<۰/۰۵). عدم وجود حروف انگلیسی به‌منزله عدم معنی‌داری می‌باشد (P>۰/۰۵).

بین تیمارها در سطح احتمال (P<۰/۰۵)، از آنالیز واریانس یک‌طرفه ANOVA و آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncans multiple-range test) استفاده گردید. کلیه آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS (ویرایش ۲۰) و ترسیم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel ۲۰۰۷ انجام شد.

نتایج

جدول‌های ۲ و ۳ نشان دهنده نتایج آزمایش‌های هماتولوژی ماهی تیلاپیا در معرض سم کلرپیریفوس و پربیوتیک قارچ صدفی است. نتایج هموگلوبین (HB) نشان داد که در مجموع تیمارهای آزمایشی بر شاخص هموگلوبین خون تأثیر معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). براساس نتایج پربیوتیک به‌تنهایی اثر معنی‌داری بر شاخص هموگلوبین خون نداشت؛ اما ترکیب پربیوتیک و سم (کلرپیریفوس) مقدار این شاخص را افزایش داد. داده‌های هماتوکریت (HT)، تعداد گلبول‌های قرمز (RBC) و هموگلوبین گلبول‌های قرمز (MCV) نیز الگویی مشابه نتایج هموگلوبین داشتند. در مورد شاخص WBC نیز نتایج مشابه حاصل شد و دوز ۰/۲ پربیوتیک سبب افزایش معنی‌دار این شاخص شد.

بررسی نتایج مقادیر حجم متوسط گلبولی (MCH) و حجم متوسط گلبولی (MCHC) خون ماهی تیلاپیا نشان داد که در مجموع تیمارهای آزمایشی بر این شاخص‌ها تأثیر معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵) و پربیوتیک به‌تنهایی مقدار این شاخص را افزایش داد؛ اما ترکیب پربیوتیک و سم (کلرپیریفوس) مقدار این شاخص را کاهش داد. همچنین براساس نتایج پربیوتیک به‌تنهایی اثری بر شاخص‌های خونی هموگلوبین (HB)، هماتوکریت (HT)، تعداد گلبول‌های قرمز (RBC)، مقادیر حجم متوسط گلبولی (MCV)، تعداد گلبول‌های سفید (WBC) نداشت (P>۰/۰۵). با این‌حال مقادیر گلبول سفید در تیمارهای پربیوتیک بیشتر از تیمار شاهد بود (P<۰/۰۵)، اما در تیمار ۰/۲ ترکیب پربیوتیک و سم (کلرپیریفوس) مقدار این شاخص به طور معنی-داری بیشتر از تیمار شاهد بود.

جدول ۳ تأثیر جیره غذایی حاوی سطوح مختلف پربیوتیک قارچ خوراکی به‌تنهایی و پربیوتیک به همراه سم کلرپیریفوس را بر برخی پیراسنجه‌های هماتولوژی در ماهی تیلاپیا نشان می‌دهد. تغییرات عمده خونی در ماهی تیلاپیا در مقابل افزایش سطوح مختلف پربیوتیک و همچنین افزایش سطوح ترکیبی پربیوتیک و سم (کلرپیریفوس) در جیره را می‌توان به‌صورت افزایش در درصد لنفوسیت و منوسیت و

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳ – اثر تیمارهای مختلف پربیوتیک و سم کلرپیریفوس بر شمارش افتراقی گلبول‌های سفید بچه ماهی تیلاپیای نیل.

تیمارها	گلبول سفید (×۱۰^{۳})	لنفوسیت (درصد)	نوتروفیل (درصد)	منوسیت (درصد)	ائوزینوفیل (درصد)
شاهد	۶۰۵۰±۳۷۷/۴۹^{c}	۸۸±۷	۱۱±۳	۱±۰/۲	۰
پربیوتیک ppt۰/۰۵	۶۴۰۰±۱۱۶۲/۹۷^{c}	۹۱±۶	۷±۳	۲±۰/۲	۰
پربیوتیک ppt۰/۱	۶۶۳۳/۳۳±۱۰۰۱/۶۶^{c}	۹۳±۹	۷±۲	۰	۰
پربیوتیک ppt۰/۲	۸۴۶۶/۶۶±۵۳۴/۶۳^{bc}	۹۳±۵	۶±۱	۱±۰/۲	۰
شاهد+سم	۷۹۶۶/۶۶±۳۱۴۸/۹۴^{bc}	۸۷±۱۱	۱۰±۱	۳±۰/۱	۰
پربیوتیک ppt۰/۰۵ + کلرپیریفوس ppm۰/۵	۹۹۶۶/۶۶±۱۹۳۲/۸۳^{ab}	۹۱±۳	۷	۲±۰/۲	۰
پربیوتیک ppt۰/۱ + کلرپیریفوس ppm۰/۵	۸۸۰۰±۱۴۷۳/۰۹^{bc}	۹۴±۴	۵±۳	۱±۰/۴	۰
پربیوتیک ppt۰/۲ + کلرپیریفوس ppm۰/۵	۱۱۶۵۰±۹۰۰^{a}	۹۲±۵	۶±۳	۲±۰/۲	۰

حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشد (P<۰/۰۵). عدم وجود حروف انگلیسی به‌منزله عدم معنی‌داری می‌باشد (P>۰/۰۵).

کاهش در درصد نوتروفیل در مقایسه با گروه شاهد بیان داشت.

بحث

استفاده از آفت‌کش‌ها به‌صورت مداوم و گسترده در اکوسیستم‌های آبی ذخایر ژنی ماهیان را در معرض تهدید قرار داده و موجب کاهش تنوع زیستی فون و فلور این اکوسیستم می‌گردد (Rahman *et al*., 2002). تغییرات شاخص‌های خونی در ماهیان وابسته به شرایط محیط زیست آنهاست. بیماری، نوع تغذیه، مکمل‌های غذایی، آلودگی، تغییرات دما، استرس و سایر موارد می‌توانند در تغییر شاخص‌های خونی مؤثر باشند (Keiffer *et al*., 2000). پربیوتیک‌ها عمدتاً به خاطر دارا بودن بتاگلوکان و مانان اولیگوساکارید باعث افزایش کارایی تغذیه، کاهش تلفات، بهبود ضریب تبدیل غذایی و افزایش مصرف غذا در موجودات می‌شوند (Pryor *et al*., 2003). در مطالعه‌ی حاضر، ماهیان تحت تیمار ترکیبی پربیوتیک قارچ صدفی و کلرپیریفوس افزایشی را در شاخص‌های هماتوکریت، هموگلوبین و تعداد گلبول‌های سفید، MCV نسبت به تیمارهای پربیوتیک به تنهایی و گروه شاهد نشان دادند. بیشترین شاخص هموگلوبین، هماتوکریت، MCHC، گلبول قرمز، گلبول سفید در تیمار ترکیبی ۰/۲ و ۰/۱ پربیوتیک قارچ خوراکی+ ۰/۵ سم کلرپیریفوس مشاهده شد.

گلبول‌های سفید یکی از مهم‌ترین سلول‌هایی هستند که می‌توانند واکنش‌های ایمنی غیراختصاصی و اختصاصی را در ماهیان تحریک کنند (سلطانی، ۱۳۸۷). در تحقیق حاضر، تعداد گلبول‌های سفید در تیمارهای ترکیبی پربیوتیک قارچ صدفی و سم افزایشی را داشت. تیمار حاوی ۰/۱ پربیوتیک قارچ خوراکی + ۰/۰۵ سم کلرپیریفوس دارای تعداد لنفوسیت بیشتری نسبت به سایر تیمارها بود که نشان‌دهنده تقویت سیستم ایمنی در ماهیان تغذیه‌شده با این استراتژی تغذیه‌ای می‌باشد. افزایش تعداد لنفوسیت شاخص خوبی است و نشان‌دهنده افزایش توان ایمنی در برابر عوامل بیماری‌زای مهاجم می‌باشد. چون در اثر استرس و طولانی شدن کمبود اکسیژن آب، تعداد لنفوسیت‌ها کاهش می‌یابد (کاظمی و همکاران، ۱۳۸۹). در تحقیق حاضر بیشترین درصد گلبول‌های سفید خون را لنفوسیت‌ها و نوتروفیل ها تشکیل می‌دادند و این مسئله در سایر ماهیان نیز به اثبات رسیده است (Houston, 1990) که نشان‌دهنده تقویت سیستم ایمنی در ماهیان تغذیه‌شده با این استراتژی می‌باشد. افزایش تعداد

www.SID.ir

Archive of SID

گلبول سفید ش نشان‌دهنده افزایش توان ایمنی در برابر عوامل بیماری‌زای مهاجم می‌باشد (کاظمی و همکاران،۱۳۸۹). استرس نیز موجب افزایش تعداد گلبول سفید و قند خون شده و در عوض موجب کاهش تعداد گلبول قرمز می‌گردد.

تعداد گلبول‌های قرمز و غلظت هموگلوبین تغییرات وابسته به گونه را از خود نشان می‌دهند. این نوسانات حتی می‌توانند فصلی باشند، به‌ویژه تغییرات دما و غلظت اکسیژن محلول نیز روی این فاکتورها اثر می‌گذارند. با توجه به ثابت بودن شرایط محیطی در این آزمایش، می‌توان از تأثیر این عوامل بر تغییرات این شاخص در تیمارهای مختلف چشم‌پوشی کرد. گلبول‌های قرمز نقش مهمی در انتقال اکسیژن در بدن ایفا می‌کنند و مقادیر ناکافی گلبول‌های قرمز اثر منفی روی متابولیسم داشته و باعث کاهش پروتئین کل پلاسمای خون می‌شود (Stoskopf, 1993). علاوه بر این میزان هموگلوبین و هماتوکریت نیز تابعی از تغییرات گلبول‌های قرمز بوده و رابطه مستقیم با آن دارد. استفاده از سطوح مختلف پربیوتیک مانان الیگوساکارید (MOS) در ماهی تیلاپیای نیل جوان منجر به افزایش سطح لکوسیت و تفاوت معنی‌دار در پارامترهای هماتولوژی در مقایسه با گروه شاهد نگردید (Sado *et al*., 2008). Aly و همکاران (۲۰۰۸) افزایش میزان هماتوکریت را در تیلاپیای تغذیه‌شده با پربیوتیک گزارش نمودند. در بررسی پارامترهای هماتولوژیک خون ماهی کپور نقره‌ای در مسمومیت با تریکلروفن که توسط نظیفی و همکاران (۱۳۸۰) انجام شد، نتایج نشان داد که بین گروه شاهد و تیمارهای دیگر در همه‌ی پارامترهای هماتولوژی تفاوت معنی‌دار وجود دارد که این امر با افزایش دوز مصرفی اتفاق افتاد. با افزایش سم در تعداد پارامترهای اریتروسیتی و لوکوسیتی ماهی کاهش معنی‌داری مشاهده شد. در بررسی پارامترهای خون‌شناسی فیل‌ماهی پرورشی در معرض سطوح مختلف پربیوتیک الیگوفروکتوز که توسط حسینی فر و همکاران (۱۳۸۹) انجام شد نتایج نشان داد که افزودن سطوح مختلف پربیوتیک به جیره غذایی بچه فیل‌ماهی پرورشی اثری بر تعداد گلبول‌های قرمز و سفید ندارند. Sado و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که افزودن سطوح ۰/۲ تا ۱ درصد پربیوتیک مانان اثری بر فاکتورهای خونی ازجمله تعداد گلبول‌های سفید، گلبول‌های قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین، مقادیر حجم متوسط گلبولی (MCV)، هموگلوبین متوسط سلولی (MCH)، غلظت متوسط هموگلوبین گلبول قرمز (MCHC) نشان نداد.

همچنین در تحقیقات متعدد اثرات سموم و آلاینده-های مختلف بر تغییرات فاکتورهای خونی و ضعیف شدن سیستم ایمنی بدن ماهیان مختلف به اثبات رسیده است. به‌عنوان‌مثال می‌توان به اثر سم دیازینون بر روی کپور ماهیان به‌صورت کاهش میزان هموگلوبین، هماتوکریت و لنفوسیت در ماهی کپور علفخوار ۸۵۰ گرمی، ماهی کپور علفخوار ۵ گرم (شریعتی فیض‌آبادی و همکاران، ۱۳۸۰) و در ماهی کپور معمولی اشاره کرد (Sastry and Sharma, 1980) که نتایج آن‌ها با تحقیق حاضر همسو نبود. همچنین در سایر تحقیقات نیز نتایج در مورد اثر سم دیازینون در ماهی شیپ (Khoshbavar-Rostami and Soltani, 2005)، ازون برون جوان (Khoshbavar-Rostami *et al*., 2005)، ماهی انگشت قد گربه‌ماهی اروپایی (Sibel *et a*l., 2006)، گربه‌ماهی آفریقایی (Adedeji *et al*., 2009) به صورت کاهش میزان گلبول‌های قرمز، گلبول‌های سفید، MCHC، MCH، MCV، هموگلوبین، هماتوکریت و لنفوسیت گزارش شده است. با بررسی نتایج سایر محققین و مقایسه آن با نتایج تحقیق حاضر مشخص گردید که اگرچه غلظت سمیت حاد در گونه‌های مختلف آبزیان بسیار متغیر می‌باشد و بستگی به نوع گونه، خصوصیات فیزیولوژیک گونه، سن، جنسیت و غیره دارد، سمیت حاد یک گونه مشابه در دو محیط مختلف اکولوژی نیز بسیار تفاوت دارد، بنابراین استفاده از نتایج سمیت گونه‌های مشابه در محیط‌های مختلف جغرافیایی جایز نمی‌باشد و

www.SID.ir

Archive of SID

اجرا نمودن تست سمیت حاد قبل از هرگونه مطالعه توکسیکولوژی پیشنهاد می‌گردد (Louis *et al.*, 1996).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که افزایش سطح پربیوتیک در تیمارهای مجزا و در تیمارهای ترکیبی در جیره منجر به افزایش شاخص‌های هماتولوژی در مقایسه با گروه شاهد گردید. بنابراین پربیوتیک قارچ صدفی در سطوح بالا می‌تواند مکمل مناسبی برای جیره‌های غذایی ماهی تیلاپیا باشد. همچنین نتیجه‌گیری می‌شود که سطح ۰/۲ و ۰/۱ پربیوتیک قارچ صدفی در جیره می‌تواند دارای اثرات مثبتی بر فاکتورهای خونی ماهی تیلاپیا باشد. به عبارتی پربیوتیک در روش خوراکی، ایمنی غیراختصاصی را در ماهی تیلاپیا تحریک نموده و قادر است باعث بهبود شاخص‌های هماتولوژی گردد و اثرات تخریبی ناشی از کلرپیریفوس بر شاخص‌های خونی را کاهش دهد.

منابع

حسینی‌فر س.ح.، میرواقفی ع.، مجازی امیری ب.، خوش‌باور رستمی ح.، درویش بسطامی ک. ۱۳۹۰. بررسی تأثیر پربیوتیک الیگوفروکتوز بر پاره‌ای از شاخص‌های خونی، بیوشیمیایی سرمی و آنزیم‌های کبدی بچه فیل‌ماهی. مجله علمی شیلات ایران، ۲۰(۲): ۳۶-۲۷.

حیدری ب.، گلچین‌راد ع.، حقی ن، یاوری ل. ۱۳۹۲. مطالعه پاسخ فیزیولوژیکی ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*) در پاسخ به شوینده‌های آنیونی. نشریه علمی - پژوهشی اقیانوس‌شناسی، (۱۴):۷۶-۶۹.

سلطانی م. ۱۳۸۷. ایمنی‌شناسی ماهیان و سخت‌پوستان. انتشارات دانشگاه تهران. ۶۴ صفحه.

شریعتی فیض‌آبادی ف. ۱۳۸۰. تعیین فنل، نفتول و قارچ‌کش هینوزان بر روی ماهیان سیم، سفید و کپور نقره‌ای، پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، دانشکده علوم و فنون دریایی، ۱۶۰ صفحه.

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

کاظمی ر.، پور دهقانی م.، یوسفی جوردهی ا.، یارمحمدی م.، نصری تجن م. ۱۳۸۹. فیزیولوژی دستگاه گردش خون آبزیان و فنون کاربردی خون‌شناسی ماهیان. انتشارات بازرگان. ۱۹۴صفحه.

نظیفی س.، فیروزبخش ف.، قاضی‌زاده م. ۱۳۸۰. بررسی پارامترهای هماتولوژیک خون ماهی کپور نقره‌ای در مسمومیت باتری کلروفن. مجله تحقیقات دامپزشکی، ۵۶(۲): ۲۷-۲۳.

هدایتی ع.، جهانبخشی ع.، قادری ف. ۱۳۹۲. سم‌شناسی آبزیان. انتشارات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان .۲۱۲ صفحه.

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.

Aly S.M., Abdel-Galil A.Y., Ghareeb A. Mohamed M.F. 2008. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia niloticus* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish and Shellfish Immunology* 25, 128-136.

Bonill E., Hernandez F., Corte SL., Mendoza M., Mejla J., Carrillo E. 2008. Effects of the insecticides malathi and diazinon on the early oogenesis in mice *in vitro*. *Environmental Toxicology* 23, 240-245.

Brown B.A. 1988. Routine hematology procedures. Leo and Febiger, Philadelphia, PA, USA.

Civen M., Brown C.B., Morin R.J. 1977. Effects of organophosphate insecticides on adrenal cholesterol ester and steroid metabolism. *Biochemical Pharmacology* 26, 1901-1907.

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

www.SID.ir

Archive of SID

Louis A.H., Diana L.W., Patricia H., Elizabeth R.S. 1996. Pesticides and aquatic animals, Virginia Cooperative Extension, Virginia State University, Virginia. 24 p.

Mahious A.S., Gatesoupe F.J., Hervi M., Metailler R., Ollevier F. 2005. Effect of dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning Turbot (*Psetta maxima). Aquaculture* 14, 219-229.

Mansingh A., Wilson A. 1995. Baseline studies on the status of insectidical pollution of Kingston harbour insecticide contamination of Jamaican environment. *Marine Pollution Bulletin* 30, 640-643.

Mellanby K. 1967. Pesticide and pollution. The Fontana new naturalist.1td ed. Collins clear type press, London and Glasgow. UK, pp: 132-134.

Mohan M. 2003. A composite approach for evaluation of the effect of Malathion on Gobiid fish *Glossogobius giuris* (Ham.). *Aquatic Environment and Toxicolog* 18(4), 399-410.

Montz E. 1983. Effects of organophosphate insecticides on aspects of reproduction and survival in small mammal. Ph.D. thesis. Virginia polytech. State Univ., lacsuburg.179 p.

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

Piri Zirkoohi M., Vince O. 1997. Effect of some pesticides commonly used in Iranian agriculture on aquatic food chain. Thesis submitted to the Hungarian Academy of Sciences for Ph.D. Degree. 131 p.

Pryor G.S., Royes J.B., Chapman F.A., Miles R.D. 2003. Mannan oligosaccharides in fish nutrition: effects of dietary supplementation on growth and gastrointestinal villi structure in Gulf of Mexico sturgeon. *Aquaculture* 12(5), 12-19.

Rahman M.Z., Hossain Z., Mollah M.F.A., Ahmad G. U. 2002. Effect of diazinon 60EC on *Anabas testudineus*, *Channa punctatus* and *Barbodes gonionotus*. *Aquatic Environment and Toxicolog* 25(2), 8-12.

Rauen U., Polzar B., Stephan H., Mannherz GH., De Groot H. 1999. Cold induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species. *Federation of American*

Dutta H., Richmond C.R., Zento T. 1993. Effects of diazinon on the gills of bluegill sunfish (*Lepomise macrochirus). Environmental Ecology* 11, 979-981.

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.

FAO. UNEP, 1991. Operation of the prior informed consent procedure for banned or severely restricted chemicals in international trade. Joint FAO. UNEP program, Rome, Geneva, Arnended 1996.

Farrell A., Branner C. 2014. Organic chemical Toxicology of fishes. Academic Press, Santiago, USA. 543 p.

Feldman B., Zinkl J., Jain N. 2000. Schalm's Veterinary Hematology. Lippincott Williams and Wilkins, USA. 1344 p.

Greer J.P., Foerster J., Rodgers G.M., Paraskevas F., Glader B., Arber D.A., Means R.T. 2008. Wintrobe's clinical hematology. Lippincott Williams and Wilkins. 3232 p.

Hoffman U., Papendrof T. 2006. Organophosphate poisonings with parathion and dimethoate. *Intensive Care Medicine* 32, 464-468.

Houston A.H. 1990. Blood and circulation. In: Methods for fish biology. Schreck, C.B., Moyle, P.B. (Eds.). *American fisheries Society*, Bethesda, Maryland.USA. pp: 273-334.

Keiffer J.D. 2000. Limits to exhaustive exercise in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology* 126, 161-179.

Khoshbavar-Rostami H.A., Soltani M. 2005. Effect of acute toxicity of diazinon on hematological parameters in ship *(Acipenser nudiventris)* and determine LC50. *Iranian Journal of Fisheries* 14(3), 49-60.

Khoshbavar-Rostami H.A., Soltani M., Yelghi S. 2005. Effect of diazinon on the hematological profiles of *Acipencer stellatus* and determination of LC50. *Journal of AgriculturaL Sciensec and Natural Resourses* 12(5),100-108

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.

www.SID.ir

Archive of SID

Societies for Experimental Biology 13, 155-168.

Sado R.J., Bicudo A.J.D.A., Cyrno J.E.P. 2008. Feeding dietary mannano-ligosaccharid to juvenile Nile Tilapia *(Oreochromis niloticus),* has no effect on hematological parameters and showed decreased feed consumption. *World Aquaculture* 39(7), 821-826.

Sastry K. V, Sharma K. 1980. Diazinon effect on the activities of brain enzymes from *Opiocephalus punctatus* (Channa). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 50(12), 578-585.

Saulsbury M.D., Heyliger S.O., Wang K., Johnson D.J. 2009. Chlorpyrifos induces oxidative stress in oligodendrocyte progenitor cells. *Toxicology* 259(2), 1- 9.

Şevik S., Aktaş M., Dogan H., Koçak S. 2013. Mushroom drying with solar assisted heat pump system. *Energy Conversion and Management* 72, 171-178.

Sibel O.K., Kenan K., Mevlüt S., Ener U.I. Murat P. 2006. Acute toxicity of organophosphorous pesticide diazinon and its effects on behavior and some hematological parameters of fingerling European catfish (*Silurus glanis*). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 86, 99-105.

Stoskopf M. K. 1993. Fish medicine. WB Saunders Company.Philadelphia.USA.

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

Wasser S.P. 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immuneomo-dulating polysaccharides. *Microbiology and Biotechnology* 60(3), 258-274.

Zhang H.X., Sultatos L.G. 2005. Biotransformation of the organophosphorus insecticides parathion and methyl effects of black tea extract. *Clinica Chimica Acta* 358, 131-138.

www.SID.ir

Archive of SID

The effect of chlorpyrifos toxicity on hematological indices of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* fed with different levels of prebiotic *Pleurotus Ostreatus*

Atefeh Iri, Farahnaz Kakavand, Maryam Rezaei Shadegan, Aliakbar Hedayati*

Fisheries Department, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

*Corresponding author: hedayati@gau.ac.ir
Received: 2020/11/10 Accepted: 2021/3/17

Abstract

This study aimed to investigate the effect of different levels of prebiotic *Pleurotus ostreatus* on hematological indices of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* exposed to chlorpyrifos toxin. A total of 120 fish were distributed for 42 days in 4 treatments (each with 3 replicates), including control (1), no prebiotic fungi, (2) food containing 0.05, (3) food containing 0.1 and (4) food contained 0.2% prebiotic. Then, 0.5 ppm of Chlorpyrifos was added to each group for 16 days and their blood parameters were examined. Based on the results, prebiotic alone had no significant effect on erythrocyte count, mean cell volume (MCV), hematocrit, hemoglobin, white blood cell (P<0.05) but exposure to Chlorpyrifos and prebiotic in combination increased the mentioned factors compared to the control and prebiotic treatments alone. However, the levels of white blood cells and erythrocytes, hemoglobin, hematocrit, and MCHC were higher than the other treatments in the combination of 0.2 and 0.1% prebiotic and Chlorpyrifos. It is concluded that the 0.1 and 0.2% prebiotic level could have the best effect on the blood indices of Nile tilapia.

Keywords: Prebiotic, Chlorpyrifos, Tilapia, Blood indices.

www.SID.ir