

## تعیین $LC_{50}$ کلرید کبالت در ماهی کپور معمولی (Carpio Cyprinus)

طاهره ناجی

دانشکده دارو سازی دانشگاه آزاد اسلامی (عهده دار مکاتبات)

شهر بانو عریان

دانشکده علوم دانشگاه تربیت معلم

سارا کرمی

دانشکده محیط زیست و انرژی واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی

تاریخ پذیرش: ۸۵/۴/۳

تاریخ دریافت: ۸۴/۱۰/۱۵

### چکیده

در این تحقیق، سمیت حاد فلز سنگین کبالت روی ماهی کپور معمولی (Cyprinus Carpio) در شرایط آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات در سال ۱۳۸۴ مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش ها، به روش استاندارد O. E. C. D طی ۹۶ ساعت انجام شد. ماهی ها، به طور تصادفی به ۸ گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند. میانگین طولی و وزنی ماهی ها به ترتیب  $1/5 \pm 9$  سانتی متر و  $10/125 \pm 2/19$  گرم بود. یک گروه به عنوان شاهد و ۷ گروه تحت تیمار در معرض غلظتهای ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم در لیتر کلرید کبالت قرار گرفتند. کلیه پارامترهای مهم فیزیکی، شیمیایی و فیزیوشیمیایی آب نظیر pH، اکسیژن محلول، سختی، درجه حرارت، EC، قلیائیت، فسفات، نیترات و نیتريت اندازه گیری شد. آزمایش ها با هفت تیمار و دو تکرار در هر تیمار انجام شد. داده ها با استفاده از برنامه نرم افزاری SPSS و روش تحلیل آماری Probit Analysis مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقدار  $LC_{50}$  ۹۶ ساعته کلرید کبالت برای ماهی کپور معمولی، در دو تکرار اول و دوم به ترتیب ۳۲۸ و ۳۲۷ میلی گرم در لیتر بدست آمد. بطور کلی، افزون مواد شیمیایی به نفت خام و آب های تزریقی، سبب افزایش خاصیت ژنوتوکسیک و سمی می شود. نظر به اینکه، ۸۰۰ تا ۱۲۰۰ بشکه در روز، آب حاوی مواد شیمیایی مذکور و مواد شیمیایی دیگر که جهت اهداف ویژه به آب تزریقی افزوده می گردد، به محیط زیست دریای خلیج فارس تخلیه می شوند، امید است که با تولید و جایگزین کردن ترکیبات دیگر با اثرات ژنوتوکسیک و خاصیت سمی کمتر و متناسب با ترکیب نفت منطقه سیری، گام بزرگی در حفظ سلامت محیط زیست خلیج فارس و حفظ تنوع زیستی این اکوسیستم پهناور برداشته شود.

واژه های کلیدی: کلرید کبالت، ماهی کپور معمولی،  $LC_{50}$ ، Cyprinus carpio

### مقدمه

از فلزات قرار دارند که ترکیبات شیمیایی و غلظت آنها می تواند از تغییرات شیمیایی پوسته زمین و همچنین، چگونگی برخورد انسان با طبیعت، متأثر شود. (۱) با افزایش بی رویه جمعیت و نیاز جوامع انسانی به پروتئین حیوانی، مانند ماهی، اهمیت روزمره مطالعات و تحقیقات بر روی ماهی ها، مشخص می شود. با شناخت فاکتورهای محیط زیستی و فراهم کردن محیط زیست مناسب، برای ماهی ها می توان، ظرفیت تولید ماهی را در کشور افزایش داد. شایان ذکر است که، کپور معمولی یکی از

توسعه، پیشرفت صنایع و افزایش بی رویه جمعیت سبب می شود تا مقدار زیادی فاضلاب های صنعتی و شهری، همچنین پسابهای کشاورزی که دارای ترکیبات شیمیایی مختلفی، مخصوصاً عناصر سنگین<sup>۱</sup> است وارد وارد اکوسیستم آبی شده و به این ترتیب، فلزات سنگین، به عنوان یک مسأله مهم و حتی خطرناک مطرح شدند زیرا، آنها در اکوسیستم تجزیه و حذف نمی شوند.

آبزیان به طور طبیعی، در معرض تماس با تعداد زیادی

1-Heavy metal

قرار گرفته است.

### روش بررسی

این تحقیق در بهار ۱۳۸۴ در آزمایشگاه واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی صورت گرفت. بعد از نصب و راه اندازی آکواریومها، جهت سازگاری با محیط، ماهی ها در آکواریومهایی که محتوی ۴۰ لیتر آب بود، به مدت یک هفته نگهداری شدند. آزمایش ها انجام شده طبق روش استاندارد O.E.C.D (سازمان توسعه و همکاری اقتصادی اروپا) صورت گرفت و سعی بودن حاد کلرید کبالت، بر روی ماهی ها در کوتاه مدت (۴ روز) به طور ثابت (استاتیک) انجام شد. میزان مرگ و میر ماهیها، طی ۴ روز به صورت هر ۲۴ ساعت یکبار به ثبت رسید. (۵) ماهیها، به گروههای ۱۰ تایی در ۴۰ لیتر آب تقسیم و در معرض اندازه های مختلف کبالت قرار گرفتند. میانگین طولی و وزنی ماهی ها، به ترتیب،  $1/5 \pm 9$  سانتی متر و  $2/195 \pm 10/125$  گرم بود. یک آکواریوم که غلظت کبالت در آن برابر صفر بود، به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. در بقیه آکواریومها به ترتیب غلظتهای ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم کبالت به ازای هر لیتر آب اضافه شد.

تعداد تیمارها، ۷ غلظت مختلف بود که دوبار تکرار شد. در هر ۲۴ ساعت، آکواریومها مورد بررسی قرار گرفته و مقدار مرگ و میر ثبت شد، این کار به مدت ۹۶ ساعت و هر روز رأس ساعت مشخص انجام گرفت. جدول شماره (۱) و (۲)

در تمام مدت آزمایش، فاکتورهای فیزیکی، شیمیایی و فیزیکی شیمیایی از جمله درجه حرارت، EC، pH و میزان اکسیژن بررسی شده است جدول شماره (۳)

دمای محیط آزمایشگاه ۲۲ درجه سانتی گراد و ۹ ساعت در محیط روشنایی و ۱۵ ساعت تاریکی بود. ماهی های مرده، در طی این بررسی، سریع از آب خارج می شدند. حالتها و رفتار آنها در طی آزمایش ثبت می گردید. بعد از ۴ روز آب آکواریومها تخلیه شده و پس از شستن کامل آنها با آب نمک، برای استفاده دوباره،

گونه های مهم پرورشی محسوب می شود و پرداختن به شرایط بهینه مورد نیاز برای پرورش این ماهی و هشدار، نسبت به عوارض شدید آلاینده های محیط زیست از جمله فلزات سنگین همچون کبالت، می تواند کمک مؤثری به بهبود این محصول شیلاتی ارزشمند نماید.

هدف از انجام این تحقیق، تعیین میزان  $LC_{50}$  کلرید کبالت، در ماهی کپور معمولی است.

اثر سمومیت کبالت در مقادیر مجاز، زیر حد کشنده در ماهی توسط Nishth Kumar و Kedar Nath در سال ۲۰۰۳ صورت گرفت.

Lison و همکاران، در سال ۲۰۰۳، اطلاعات مربوط به ژنو توکسی سیتی و خاصیت سرطانزایی کبالت و سرب را دسته بندی نمودند.

اثر سمیت Hg,Cu,Ni,Pb,Co بر روی جنین ولارو ماهی گورخری *Brachydani rerio* در سال ۱۹۹۱ توسط Xiu, Dave صورت گرفت.

استفاده از ماهی، به عنوان یک بیواندیکاتور بیولوژیک، در برنامه های پایش آلودگی در اکوسیستمهای آبی به در سطح گسترده، سفارش می شود. هدف اصلی از پایش آلودگی، جمع آوری اطلاعات پیوسته و قابل اعتماد، در رابطه با کیفیت مواد غذایی دریایی دخیل با سلامت انسان و همچنین، کنترل، رویدادهایی است که، در مناطق آلوده از دیدگاه محیط زیستی رخ می دهد. (۲) کبالت، یک ریز مغذی است که، دارای ویژگیهای سمی بالفعلی برای ماهیها است که جدیداً مورد بررسی قرار گرفته، زیرا این ماده در کودهای ویژه و فاضلابهای مربوط به تخلیه معادن کبالت و رآکتورهای هسته ای وجود دارد (۳).

حداکثر میزان تراکم مجاز کبالت در هوا  $1-5 \text{ mg/m}^3$ ، در آب ۱ و در خاک  $1 \text{ mg/m}^2$  است.

غلظت کبالت در آب رودخانه ها بسیار ناچیز بوده و میزان آن حدود  $0/2$  میکروگرم در لیتر می باشد. (۴) در این تحقیق، مقدار  $LC_{50}$  MATC, NOEC, LOEC, کلرید کبالت بر روی ماهی کپور معمولی مورد بررسی

گرفتن آنتی لگاریتم از  $LC_{50}$ ،  $X$  برحسب میلی گرم بدست می آید. نمودار شماره (۱) و (۲) رفتار ماهی ها در طی ۹۶ ساعت به شکل، هیجان زده، جنب و جوش غیرعادی، ترشحات غیر طبیعی در سطح پوست و بدن (موکوس) و کندی حرکات و توقف نسبتاً کامل (در صورت ادامه مرگ) مشاهده شد.

### بحث و تفسیر نتایج

آلودگی محیط زیست، یکی از مسائل متداول در دنیا است که، فلزات سنگین از موارد بسیار مهم این آلودگی به شمار می رود. پیشرفت های صنعتی منجر به افزایش نشر آلاینده ها در اکوسیستم ها می شوند. (۶) برای بدست آوردن سریع اطلاعات، آزمایش ها کوتاه مدت بیش از طولانی مدت استفاده می شود. از این آزمایش ها جهت تعیین سمیت کلی محلولهای مورد آزمایش، که اطلاعاتی در باره میزان سمی بودن آنها وجود ندارد، استفاده می شود. به علاوه، برای ارزیابی ارگانسیم های مختلف، به شرایط متفاوتی مانند دما و pH، نیز به کار برده می شود.

جدول (۱) - نتایج مربوط به تعیین  $LC_{50}$  «نوبت اول»، اعداد درون جدول تعداد آزمایش ها مرده را نشان می دهد

$\frac{mg}{L}$ غلظت کبالت	شاهد	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	۳۰۰	۴۰۰	۵۰۰	۶۰۰
		زمان بر حسب ساعت						
۲۴	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱
۴۸	۰	۰	۰	۰	۲	۱	۲	۲
۷۲	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۸	۷
۹۶	۰	۰	۰	۳	۲	۴	-	-

جدول (۲) - نتایج مربوط به تعیین  $LC_{50}$  «نوبت دوم»، اعداد درون جدول تعداد آزمایش ها مرده را نشان می دهد

$\frac{mg}{L}$ غلظت کبالت	شاهد	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	۳۰۰	۴۰۰	۵۰۰	۶۰۰
		زمان بر حسب ساعت						
۲۴	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۵	۴
۴۸	۰	۰	۰	۱	۱	۲	۰	۲
۷۲	۰	۰	۰	۱	۱	۱	۴	۴
۹۶	۰	۰	۰	۱	۱	۱	۱	-

آماده می شد. بعد از تکرار آزمایش و ثبت نتایج مرحله دوم، باتوجه به غلظت کبالت مصرفی و درصد مرگ و میر، نمودار تعیین  $LC_{50}$  رسم شد.

### نتایج

براساس روش گفته شده، آزمایش  $LC_{50}$  انجام و پس از آن، تعداد ماهی ها، تلف شده در هر غلظت و زمان شمارش به صورت جدول نوشته شد.

لازم به ذکر است برای توجه بیشتر و درصد اشتباه کمتر، آزمایش بالا در دو تکرار صورت گرفت که نتایج بدست آمده، یکسان هستند. در تکرار اول، مقدار  $LC_{50}$  ۳۲۸ میلی گرم در لیتر و در تکرار دوم ۳۲۷ میلی گرم در لیتر محاسبه شد.

لازم به ذکر است، با استفاده از برنامه نرم افزاری SPSS و روش تحلیل آماری Probit Analysis نمودارها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. عدد پروبیت مربوط به ۵۰ از جدول پروبیت استخراج شده و به عنوان  $Y$  در نظر گرفته می شود از آنجا مقدار  $X$  بدست می آید که با

است که کبالت به صورت محلول در آب و در دسترس موجودات زنده قرار دارد .

مقادیر  $LC_{50}$  به سبب حساسیت کم گونه P. promelas نسبت به غلظت‌های بالای کبالت ( $5 \text{ mg/L} \geq$ ) در مدت زمانی بیش از ۴۸ ساعت، قابل اندازه گیری نبود که، نشان دهنده ارتباط مستقیم موجود بین سختی آب و سمی بودن حاد کبالت، برای این گونه است (۹) .

آزمایش‌ها حاکی بر روی گونه C. dubia نشان داد که سختی آب، بعد از ۴۸ ساعت تماس موجود با کبالت تأثیر گذار بوده و در آبهای سخت ( $200 \text{ mg/L} \leq$ ) با افزایش غلظت کبالت واکنش گونه مورد نظر روال خطی نخواهد داشت .

برای هر دو مورد، استفاده از یک رابطه نمائی ساده بهترین حالت جهت تفسیر موضوع است. گونه C. dubia در سختی‌های بیش از ۲۰۰ میلی گرم / لیتر بسیار حساس تر از گونه P. promelas است، اما، عکس این حالت در آبهای سبک ( سختی کمتر از  $50 \text{ mg/Lit}$ ) صادق است. در این تحقیق، تأثیر کبالت بر روی آزمایش‌ها به لحاظ تعیین غلظت مؤثر در مرگ و میر مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز رگرسیون در رابطه با زنده ماندن ماهی، در آبهایی با سختی متوسط، ضریب همبستگی معادل  $R^2 = 0/97$  را بدست داد .

بر مبنای داده‌های موجود به نظر می رسد که در سختی بین  $50 - 200 \text{ mg/Lit}$ ، سمی بودن کبالت به صورت حاد به طور معکوس با سختی آب ارتباط دارد. می توان حدس زد که سمی بودن کبالت به صورت حاد بر مبنای رابطه نمائی،  $288 \text{ } \mu\text{g/Lit}$  برای آب سبک و  $\mu\text{g/Lit}$  ۸۷۳ برای آب سخت است (۹).

مقدار  $LC_{50}$  معیار مفیدی برای سمیت حاد بوده، لیکن بیانگر مقادیری که در زیستگاههای آبی، بی خطر یا کم خطر وجود دارد، نیست. مقدار مواد زائدی که تا ۹۶ ساعت سمی نیستند، ممکن است در دوره های زمانی بیشتر که در داخل آب بمانند، سمی شوند. بنابراین  $LC_{50}$ ، ۹۶ ساعته ممکن است فقط دربخشی از سمی بودن طولانی مدت دیده شود (۷)

اخیراً، آژانس حفاظت محیط زیست آمریکا (E.P.A)، اقدام به جلوگیری ورود مواد خطرناک به محیط نموده تا از این روش، ازآلوده شدن آنها جلوگیری کند. اطلاعات حاصل، از بررسی جانوران آبی به عنوان مبنا و استانداردی جهت دسته بندی مواد خطرناک مورد استفاده قرار می گیرد، هرچند که در رابطه با بعضی مواد شیمیایی صنعتی، چنین اطلاعاتی در دست نبوده، آزمایش‌ها سم شناسی برای ۴۰ ماده شیمیایی انجام شد تا از این طریق داده های ابتدایی جهت انجام تصمیم گیریها فراهم شود.

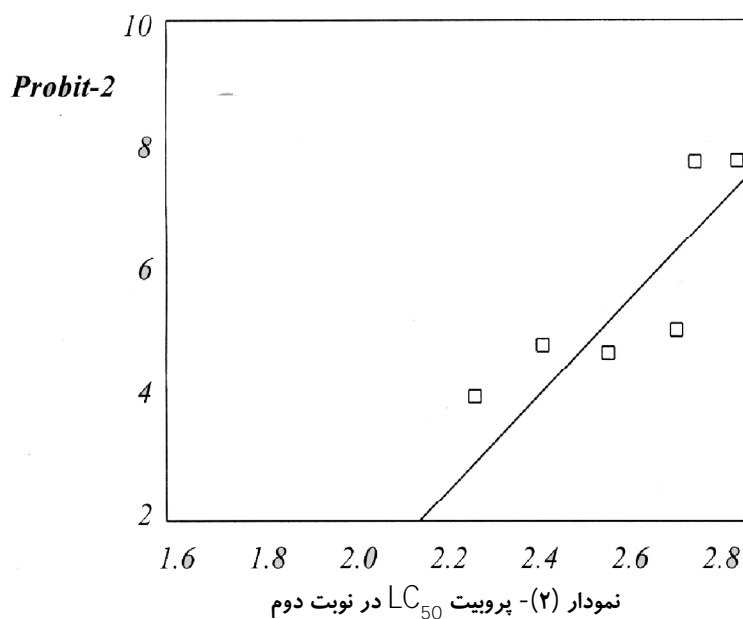
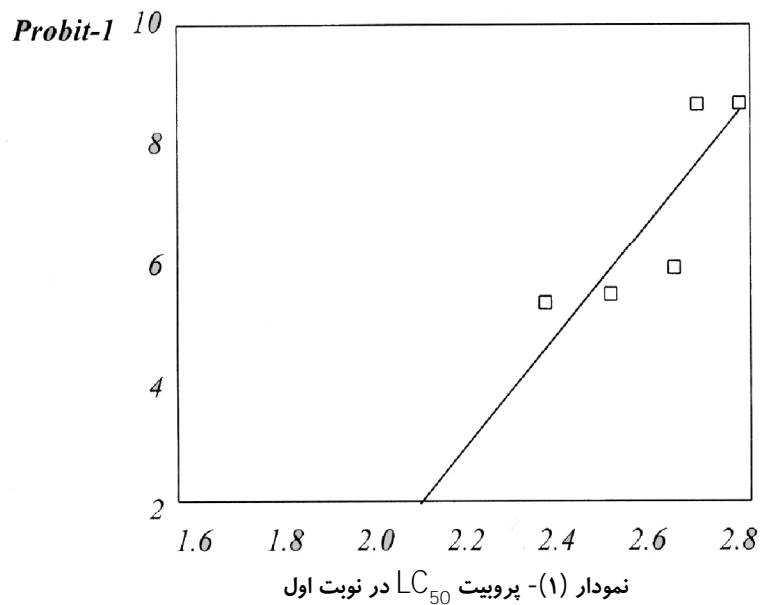
۳۲ ماده از بین ۴۰ ماده مورد بررسی، برای زندگی موجودات آبی با انجام آزمایش‌ها ۹۶ ساعته، خطرناک شناخته شد  $LC_{50}$  این مواد کمتر و یا معادل  $\text{Lit} / \text{mg}$  ۵۰۰ بود .

۴۰ ماده مورد نظر بر روی ماهی (Fathead minnow) Pimephales promelas تعیین شد و همچنین ۱۰ مورد علاوه بر ماهی مذکور بر روی میگوی علفی آب شور Palaemonetes pugio مورد آزمایش قرار گرفت . (۸)

در انجام کارهای تحقیقی، بررسی مقدار سمی بودن کبالت به دو صورت حاد و مزمن با استفاده از دو گونه eriodaphnia dubia و Pimephales Promelas و چهارنوع آب با سختی ۵۰، ۴۰۰، ۲۰۰، ۸۰۰ میلی گرم درلیتر به صورت  $\text{CaCO}_3$  بر حسب گرفت. سختی کم آب تأثیری بر روی غلظت اندازه گیری شده کبالت نداشت. مقدار کبالت محلول در آب، در نمونه های مورد بررسی معادل مقدار کبالت به کار رفته در ابتدای آزمایش بود که در حقیقت بیانگر این مطلب

جدول (۳) - فاکتور های فیزیکی ، شیمیایی و فیزیکی شیمیایی آب

مقدار	پارامتر
۲۱ ± ۱/۵ درجه سانتی گراد	درجه حرارت
همواره بیش از ۵ میلی گرم / لیتر	اکسیژن محلول
۸/۳۱۵ ± ۰/۱۳۵	pH
۰/۳۵۷۵ ± ۰/۰۲۰۵ میکروموس / سانتی متر	EC
۵۶ میلی گرم / لیتر کربنات کلسیم	سختی کل
۱۲۵/۳۳ میلی گرم / لیتر	قلیائیت کل
۰/۸۵ میلی گرم / لیتر	فسفات
۸/۴۳ میلی گرم / لیتر	نیترات
۰/۰۱۶ میلی گرم / لیتر	نیتریت



2. Hellawell, M., 2003 Toxic Substances in rivers and Streams. Environmental Pollution. No. 50, PP.61-85.
3. Anadu, D. I, Anozie, O. C. and Anthony, A. D.1990. Growth responses of Tilapia zillii Fed diets Containing various Levels of ascorbic acid and Cobalt of ascoride.,Aquaculture. No. 14, PP. 329-336.
4. Rand, G. M., 1995. Fundamental of aquatic toxicology effects, environmental fate and risk assessment. Second Edition. Tylor & Francis, Washington D.C., USA. PP. 79-85, 1125
5. TCR, S 1984. O.E.C.D guideline for testing of Chemicals, Section 2 on biotic Systems. PP.1-39.
6. Diagomanolin, V;Farhang, M; Ghazi-Khansari, M. and Jafarzadeh, N., 2004. Heavy metals (Ni, Cr, Cu) in the Karoon Waterway river, Iran. Aquatic Toxicology. No, 50. PP.63-68.
7. Standard Methods for Examination of Water and Waste Water, 19th ed. 1995, American Public Health Assoc., American Water Pollution Control Federation, American Water Work Assoc.
8. Curtis, M. W. and Ward, C. H., 1981. Aquatic Toxicity of Forty industrial Chemical: Testing in Support of Hazardous Substance Spill

در صورتی که در ماهی کپور معمولی، براساس این تحقیق  $LC_{50}$  - کبالت در دو تکرار اول و دوم به ترتیب ۳۲۷ و ۳۲۸ محاسبه شد .

همچنین حداکثر غلظت مجاز<sup>۱</sup> (MATC) با توجه به مقدار  $LC_{50}$  بدست آمده ۱۰۰ تعیین شد . حداکثر غلظت مجاز سم، غلظتی است که، در طول مدت آزمایش، هیچ اثر سوئی بر ماهی مورد آزمایش نگذارد و سلامتی آنرا به خطر نیندازد. مقدار  $NOEC_2$  و  $LOEC_3$  در این تحقیق با توجه به مقدار  $LC_{50}$  بدست آمده به ترتیب  $50 \text{ Lit /mg}$  و  $200 \text{ Lit /mg}$  است. بالاترین غلظت از یک ماده که در یک آزمایش سمی بودن استفاده شده، غلظتی است که هیچ اثر قابل توجه آماری در مقایسه با نمونه های شاهد روی جمعیت نمونه های مورد آزمایش که در معرض آن ماده سمی قرار گرفته اند نداشته که آنرا<sup>۲</sup> (NOEC) می نامند . کمترین غلظت از یک ماده در آزمایش سمیت نیز، غلظتی است که از نظر آماری در مقایسه با نمونه های شاهد، اثر قابل توجهی روی جمعیت نمونه های مورد آزمایش که در معرض آن ماده سمی قرار گرفته اند، داشته است که آن را<sup>۳</sup> (LOEC) می گویند. حداکثر غلظت مجاز سم، بیشتر از غلظتی است که هیچ اثری ندارد و کمتر از غلظتی است که کمترین اثر را دارد

(۴)  $(NOEC < MATC < LOEC)$

از پرسنل محترم مجتمع آزمایشگاهی واحد علوم و تحقیقات و سایر دوستان که در اجرای این پژوهش ما را همراهی کردند ، نهایت سپاس را داریم .

#### References

1. Jhingron, V.G. 1979, some aspect of capture and culture Fisheries of inland waters of India relation to environmental pollution and toxicology., No.2, pp.183-190.

1-Maximum Allowable Toxicant Concentration  
2-No Observed Effect Concentration  
3-Lowest Observed Effect Concentration

Species as a Function of Water Hardness.  
Aquatic Toxicology. No.22. PP.163-179.

Prevention regulation Science of the Total  
Environment No, 77.PP.359-367.

9. Diamond, J; Winchester, E; Macler, D; Rasnake, W; Fanelli, j. And Gruber, D., 1992.  
Toxicity of Cobalt to Fresh Water indicat or