



تأثیر آفت‌کش سایپرمتترین بر برخی از پارامترهای مورفولوژیکی و بافت‌های آب‌شش و کبد جنین ماهی اوزون برون (*Acipenser stellatus* Pallas, 1771)

علیرضا سلیمانی^{۱*}، حامد پاکنژاد^۲، حسینعلی خوشباور رستمی^۳، سید علی اکبر هدایتی^۴

^۱ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران.

^۲ گروه تکثیر و پرورش آبزبان، دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

^۳ اداره کل شیلات استان مازندران.

^۴ گروه تولید و بهره‌برداری آبزبان، دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

نوع مقاله:	چکیده
پژوهشی	در تحقیق حاضر تأثیر سم سایپرمتترین بر ساختارهای مورفولوژیکی و بافت‌های آب‌شش و کبد جنین اوزون برون به عنوان نشانگر زیستی، بررسی شد. تعداد ۲۷۰ قطعه لارو نوس یک روزه پس از تفریح در ۳ تیمار شاهد، ۰/۵ $\mu\text{g/l}$ و ۰/۹ $\mu\text{g/l}$ سایپرمتترین در ۳ تکرار، در شرایط نیمه پایدار و طی مدت ۲۰ روز در نظر گرفته شد. در پایان دوره تحقیق میانگین تلفات لاروهای نوس در سه تیمار به ترتیب برحسب تعداد ۱۷/۳±۰/۵۷، ۱۹±۰/۱، ۲۳±۰/۱ محاسبه شد. بررسی‌های مورفولوژیکی نیز هم‌زمان به کمک دستگاه استریومیکروسکپ انجام گردید. در آب‌شش هیپرپلازی و تورم سلولی حاد و در بافت کبد نکروز تدریجی هسته‌ها و ایجاد واکوئول به خصوص در غلظت‌های بالاتر سایپرمتترین دیده شد. میانگین تلفات جنین اوزون برون نسبت به گروه شاهد در غلظت ۰/۹ $\mu\text{g/l}$ افزایش داشت ($p < 0/05$). تغییرات مورفولوژیکی آشکاری در تمامی تیمارها مشاهده نشد. میانگین داده‌های طول کلی، ابعاد سر و قطر چشم‌ها بین گروه‌ها تفاوتی با یکدیگر نشان نداد ($p > 0/05$). بنابراین استفاده گسترده و غیراصولی از این سموم می‌تواند سبب آلودگی محیط‌زیست و نابودی تدریجی گونه‌های ارزشمند آبی از جمله ماهیان خاویاری گردد.
تاریخچه مقاله: دریافت: ۹۷/۱۲/۰۹ اصلاح: ۹۸/۰۸/۱۲ پذیرش: ۹۸/۰۹/۱۶	
کلمات کلیدی: حشره‌کش سایپرمتترین ماهی خاویاری هیستوپاتولوژی	

مقدمه

سم سایپرمتترین یک حشره‌کش پایرتروئیدی است و در برنامه‌های کنترل آفات نباتی، صنعتی و خانگی به شکل گسترده استفاده می‌شود. پایرتروئیدها آنالوگ‌های سنتزی از پایرتترین‌های طبیعی می‌باشند که از عصاره گیاه گل داودی (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) استخراج می‌شوند (National Pesticide Information Center, 2010). آن‌ها سمومی انتخابی کم‌خطر و با نیمه‌عمر کوتاه هستند (Richterova and Svobodova, 2012). تأثیرات سمی ناچیز این سموم بر روی پرندگان و پستانداران از یک‌سو و ماندگاری محدود آن‌ها در خاک از سوی دیگر سبب شده که استفاده از آن‌ها برای مقابله با آفات کشاورزی در طیف وسیعی رایج شود (Koprucu and Aydin, 2004). متأسفانه استفاده از سموم پایرتروئیدی سبب شده که برخی از موجودات زنده غیر هدف مانند زنبورها، ماهی‌های آب‌های شیرین و سایر جانوران آبی حتی در غلظت‌های بسیار کم در معرض خطر قرار گیرند (Velisk et al., 2011). استفاده غیراصولی از سموم پایرتروئیدی سبب حضور

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: asoleimani56@yahoo.com

آن‌ها در زهکشی آب‌های مزارع کشاورزی و فعالیتهای آبی‌پروری می‌شود، که خود می‌تواند آسیب جدی به جانورانی مانند ماهی‌ها و میگوها که برای بشر از نظر اقتصادی دارای اهمیت هستند، وارد کند (Adhikari et al., 2004). بقایای سایپرترین به میزان گسترده‌ای در رسوبات کف رودخانه‌ها و جویبارهای نزدیک به مزارع شناسایی شده است (Marino and Ronco, 2011; Vryzas et al., 2005)، از این رو امکان اینکه این سم بتواند به همراه جریان آب رودخانه‌ها به دریا راه یابد وجود دارد. ایران از جمله کشورهایی است که مصرف سرانه آفت‌کش‌های مختلف در آن بالا می‌باشد (Dadras et al., 2017). وجود چندین رودخانه که در نهایت به دریای خزر می‌ریزند و استفاده بی‌رویه و بدون نظارت دقیق از انواع سموم و آفت‌کش‌های مختلف، به عنوان یکی از معضلات اصلی در منابع آبی استان‌های شمالی ایران محسوب می‌شوند (The Caspian Environment Program, CEP), 2004). اما متأسفانه هنوز در رابطه با تعیین میزان تقریبی سایپرترین در دریای خزر مطالعات دقیقی انجام نشده است. حساسیت ماهی‌ها به سموم پایروترئید گاهی ناشی از اختلافات خاص گونه‌ای در متابولیسم این دسته از سموم می‌باشد؛ اما فاکتور مهم‌تر حساسیت زیاد سیستم عصبی آن‌ها به سموم پایروترئید است، از این رو مغز ماهی‌ها نسبت به مغز پرندگان و پستانداران حساسیت فوق‌العاده بیشتری به این دسته از سموم دارد (Koprucu and Aydin, 2001; Moore and Waring, 2004). عامل بعدی، تماس مستقیم است؛ سموم پایروترئیدی از طریق تماس با آب‌شش‌ها می‌توانند مستقیماً جذب جریان خون شوند (Aydin et al., 2005). پایروترئیدها بازدارنده‌های آنزیم‌های کربنیک آنهیدراز در ماهی‌ها هستند و ممکن است که سبب بروز عوارض نامطلوبی مانند به هم خوردن تعادل اسیدی-بازی شوند (Ekinci and Beydemir, 2010). ثابت شده است که سایپرترین در دراز مدت می‌تواند تأثیرات کاملاً آشکاری روی جمعیت ماهی‌های سالمون بگذارد. این سم به واسطه حس بویایی روی عملکرد هورمون‌های جنسی تأثیر می‌گذارد، در نتیجه سطوح استروئیدهای تولیدمثلی افزایش پیدا می‌کند (Moore and Waring, 2001). غلظت‌های زیر کشنده سایپرترین (یک دهم و یک پنجاهم غلظت LC50-96h در محلول ۰/۱۳۹ ppm) فاکتورهای هماتولوژیک و بیوشیمیایی خون و آنزیم‌های درون بافتی را تغییر داده و استرس را در ماهی کپور هندی (*Labeo rohita*) القا می‌کند (Das and Mukherjee, 2003). بر اساس تحقیقی که روی جنین ماهی زبرا (*Danio rerio*) انجام شده است، در غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر لیتر علائم قابل توجهی از آپوپتوزیس در مغز و طناب عصبی ایجاد می‌شود؛ در ضمن بدشکلی‌هایی مانند انحناء ستون مهره‌ها، ادم حفره دور قلبی و بزرگ شدن کیسه زرده نیز دیده شده است (Shi et al., 2011). ثابت شده که غلظت‌هایی از پایروترئیدها که برای جنین ماهی زبرا کشنده است، ممکن است برای مراحل لاروی یا بالغ آن مؤثر نباشند (Glaberman et al., 2017).

ماهی اوزون برون (*Acipenser stellatus*) یکی از گونه‌های ماهیان خاویاری بوده که در دریای خزر، دریای آزوف و دریای اژه زندگی کرده و برای تخم‌ریزی به رودخانه‌ها مهاجرت می‌کند (Shubina et al., 1989). اوزون برون در دریای خزر در عمق ۱۰۰ تا ۳۰۰ متری آب، روی رسوبات رسی یا شنی و یا در مناطق پست رودخانه‌ها مشاهده می‌شود. بلوغ جنسی در نرها از سن ۵ یا ۶ سالگی اتفاق می‌افتد و در ماده‌ها از میانگین سنی ۷/۹ سالگی می‌باشد. در طول حیاتشان به ندرت بیشتر از ۳ بار تخم‌ریزی می‌کنند. از فروردین ماه تا اوایل خرداد ماه که دمای آب بین ۱۰ تا ۱۵ درجه سانتی‌گراد است تخم‌ها در بستر شنی یا سنگی و یا بین تکه‌های سنگ‌های کف رودخانه‌ها گذاشته می‌شوند. تاس ماهی‌های جوان‌تر در دهانه رودخانه‌ها باقی می‌مانند. گرچه تکنیک‌های تکثیر و پرورش مصنوعی تا حدی از انقراض نسل این گونه جلوگیری به عمل آورده است (FAO)^۱، اما استفاده بی‌رویه از شوینده‌ها و تداوم ریزش فاضلاب‌های خانگی و صنعتی در برخی از شهرها و روستاهای ساحلی به رودخانه‌ها و دریاها، استفاده بی‌رویه برخی سموم دفع آفات نباتی و نفوذ آن‌ها به آب‌های زیرزمینی سبب شده است تا تعیین اثرات سمی این آلاینده‌ها بر گونه‌های جانوری آبی به خصوص گونه‌های در خطر انقراض مانند ماهی اوزون برون (*Acipenser stellatus*) حائز اهمیت باشد. بر اساس آمار CEP^۲ صید ماهیان خاویاری از ۳۰۰۰۰ تن در سال ۱۹۸۵ به ۵۶۷۲ تن در سال ۱۹۹۵ رسیده است (Abbasian et al., 2004). عوامل زیادی می‌تواند در کاهش جمعیت تاس ماهیان مؤثر باشند که بایستی جداگانه مورد بررسی قرار گیرند. در تحقیق حاضر به تأثیر یک نوع سم پایروترئیدی به نام سایپرترین بر سیر تکامل جنین ماهی اوزون برون که حساس‌ترین مرحله در تکامل یک موجود زنده است، پرداخته شده است و اثرات

^۱ Food and Agriculture Organization of the united nations for a world without hunger, Fish and Aquaculture Department .

^۲ The Caspian Environment Program, 2004.

غلظت‌های زیر کشنده روی تغییرات ریخت‌شناسی و آسیب‌شناسی بافت های آب‌شش و کبد به عنوان نشانگرهای سلولی جنین بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

در تحقیق حاضر که در شرایط آزمایشگاهی نیمه پایدار انجام گرفت، تأثیر غلظت‌های زیر کشنده‌ی سایپر مترین بر سیر تکامل جنین تاس ماهی اوزون برون بررسی شد و سعی گردید که به این سؤال که آیا میانگین تلفات جنین اوزون برون بین غلظت‌های زیر کشنده‌ی سایپر مترین در طی دوره تکامل لارو نوری با یکدیگر تفاوت دارند یا نه؟ پاسخ داده شود. نوزادها بعد از بازگشایی تخم‌ها به مدت ۱۵ روز در معرض غلظت‌های زیر کشنده سایپر مترین قرار گرفتند و تأثیرات این سم روی ساختارهای مورفولوژیکی نظیر طول، شکل و اندازه سر و چشم‌ها، تغییرات بافت‌های آب‌شش و کبد لاروهای نوری مورد بررسی قرار گرفتند. این تحقیق در فروردین ماه ۱۳۹۵ در مرکز تکثیر، پرورش و بازسازی ذخایر آبزیان شهید رجایی ساری انجام شد. بر اساس تحقیق Jahanbakhshi و همکاران (۲۰۱۲)، روی فیلم ماهی (*Huso huso*)، میزان Lc 50 - 48h ، Lc 50 - 96h , 72h برای سم سایپر مترین به ترتیب ۴/۷۵۱، ۲/۶۷۷ و ۰/۹۵۲ میکروگرم بر لیتر محاسبه شده است. در این مطالعه بر اساس استاندارد OECD^۳ و در شرایط پایدار میزان غلظت نیمه کشنده سایپر مترین ۰/۸۱ میکروگرم بر لیتر محاسبه گردید. سپس ۳ تیمار سایپر مترین با غلظت‌های ۰، ۰/۵ و ۰/۹ میکروگرم بر لیتر در ۳ تکرار تهیه شدند. به هر تیمار ۳۰ جنین اوزون برون اضافه گردید، بنابراین به طور کلی تعداد ۲۷۰ قطعه جنین یک روزه پس از تفریح در شرایط محیطی نیمه پایدار قرار گرفتند، از این رو هفته‌ای ۳ بار مجدداً حدود ۹۵ درصد محلول‌های درون هر تیمار تعویض شد و دقیقاً بعد از تعویض، همان غلظت‌های قبلی سایپر مترین به ظروف مورد نظر اضافه گردید. در طول آزمایش برخی پارامترهای فیزیکی-شیمیایی آب نظیر دما، pH، سختی کل، غلظت اکسیژن محلول به طور روزانه اندازه‌گیری شده و به مدت ۱۵ روز این عمل ادامه پیدا کرد. برای تهیه محلول مادر^۴ با توجه به مقاله مشابهی که توسط Sarikoya (2009) ارائه شده است، مقدار ۲۲۰۰ میلی‌گرم از سم تکنیکال گرید سایپر مترین ۹۸ درصد (Technical Grade - Daga Global Chemical, India) به کمک ترازوی دیجیتال وزن شد و در نتیجه مقدار استون مورد نیازی که باید به عنوان حلال استفاده شود، ۲۲ میلی‌لیتر به دست آمد. به این ترتیب محلول مادر در مرحله اول با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول مرحله قبل برداشته شد و به آکواریوم حاوی ۱۰ لیتر آب اضافه گردید تا غلظت ۱۰ میکروگرم بر لیتر تهیه شود و در نهایت غلظت‌های زیر کشنده‌ی ۰/۵ و ۰/۹ میکروگرم بر لیتر از روی این محلول ساخته شد. برای گروه کنترل نیز تنها بیشترین میزان استون که برای رقیق‌سازی استفاده شده بود، به کار رفت. دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی بود. هوادهی توسط پمپ هوا تا پایان آزمایش بی‌وقفه ادامه یافت. روزانه از هر کدام از نمونه‌های شاهد و در معرض سایپر مترین تلفات خارج و در محلول بوئن قرار داده شدند و پس از ۲۴ ساعت به الکل ۷۰ درجه انتقال یافتند؛ سپس به آزمایشگاه بافت‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان برای تهیه مقاطع، قالب‌گیری و رنگ‌آمیزی منتقل شدند (Pearse, 1985). برش‌ها با دستگاه میکروتوم (مدل DS 40SS ساخت ایران) و با ضخامت ۷ میکرون به صورت سائیتال انجام گرفت. رنگ‌آمیزی با تکنیک هماتوکسیلین-ئوزین صورت پذیرفت و از مقاطع به دست آمده به کمک میکروسکوپ دوربین‌دار عکس‌هایی با درشت‌نمایی ۴۰۰ مرتبه تهیه شد. ضمناً تعداد تلفات در هر غلظت و میانگین وزن و طول آن‌ها در پایان آزمایش به ترتیب برحسب میلی‌گرم و میلی‌متر اندازه‌گیری و ثبت گردید. بر روی هر ظرف مشخصات نمونه (تاریخ نمونه‌برداری، طول و وزن لارو نوری) نوشته شد. در پایان آزمایش (مرحله ۲۰ روز پس از لقاح) جنین‌های هر یک از تیمارهای شاهد، ۰/۵ و ۰/۹ میکروگرم بر لیتر سایپر مترین در بشرهای ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی آب نمک ppt ۰/۱ به مدت ۲۴ ساعت نگاه‌داشته شدند، چون در این فاصله غشاء اطراف جنین پاره شده و تصاویر شفاف‌تری برای مشاهدات مورفولوژیک می‌توان تهیه کرد. در این مرحله نمونه‌ها برای عکس‌برداری به آزمایشگاه انستیتوی تحقیقات آبزیان دریای خزر - ساری منتقل شدند و عکس‌برداری مورفولوژیک توسط

³ Organization for Economic Co-operation and Development , 2014

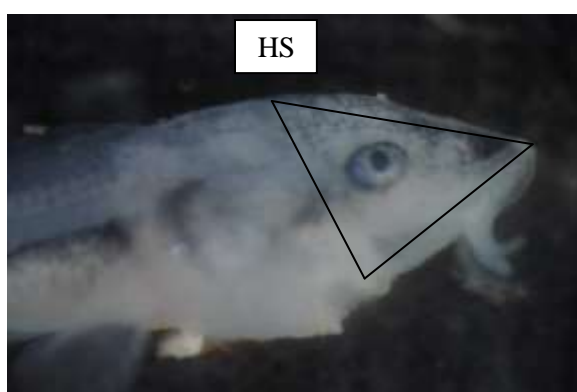
⁴ stock

دستگاه استریومیکروسکوپ دوربین‌دار با درشت‌نمایی ۶ انجام گرفت. متغیرهای مورفولوژیکی که در این تحقیق با توجه به مقاله Chambers و همکاران (۲۰۱۲) اندازه‌گیری شدند، شامل طول کلی، قطر چشم‌ها برحسب میلی‌متر و ابعاد سر بر حسب میلی‌متر مربع بوده است.

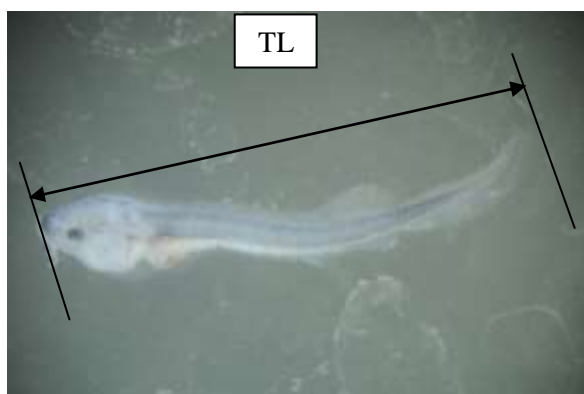
تحلیل داده‌ها با آنالیز واریانس یک طرفه و متعاقب آن آزمون توکی HSD با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۳ انجام گرفت. معنی‌داری تیمارها در سطح ۰/۰۵ بین گروه‌های آزمایشی در نظر گرفته شده است.

نتایج

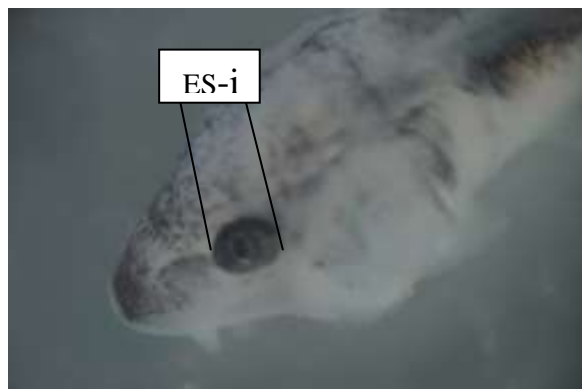
طی انجام تحقیق حاضر درجه حرارت آب 13 ± 2 درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول $5/6 \pm 0/1$ میلی‌گرم بر لیتر، pH $0/9 \pm$ و سختی کل 354 ± 4 میلی‌گرم بر لیتر بوده است. میانگین نتایج تحقیق بین سه تیمار شاهد، $0/5$ و $0/9$ میکروگرم بر لیتر سم سایپرمتترین به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شده است (جدول ۱ و ۲). برای هر سه تیمار مذکور اندازه‌ی طول کلی، قطر چشم‌ها و ابعاد سر اندازه‌گیری شد (شکل ۱). در پایان ۲۰ روز پس از لقاح، بررسی آزمون‌های آماری انجام شد. بررسی آماری نتایج نشان داد که سایپرمتترین بر میانگین تلفات جنین اوزون برون تأثیر داشته است ($P < 0.05$). در مقایسه میانگین‌های داده‌های طول کلی، ابعاد سر و قطر چشم‌ها، $p > 0/05$ به دست آمده است که نشان‌دهنده آن است که سایپرمتترین روی تکامل مورفولوژیک جنین اوزون برون طی این فاصله زمانی تأثیری نداشته است. اختلافی بین شاهد و غلظت $0/5$ میکروگرم بر لیتر سایپرمتترین از نظر میانگین تلفات مشاهده نشد ($P > 0/05$)، در حالی که برای سایر تیمارها معنی‌دار می‌باشد ($p < 0/05$)، بنابراین بین میانگین تلفات در تیمارهای شاهد و $0/9$ میکروگرم بر لیتر و همین‌طور $0/5$ و $0/9$ میکروگرم بر لیتر تفاوت معنی‌داری وجود داشت (جدول ۱).



(ب)



(الف)



(ج)

شکل ۱. فاکتورهای مورفولوژیک. (الف) طول کل (TL= total length)، (ب) اندازه سر (HS= head area) و (ج) قطر چشم (ES-i= diameter of eye) (iris) لاروهای نوری اوزون برون در پایان مواجهه با سایپرمتترین. (بزرگ‌نمایی $\times 6$).

جدول ۱. مقایسه میانگین تعداد تلفات در پایان دوره تحقیق بین غلظت‌های شاهد، $0/5$ و $0/9$ میکروگرم بر لیتر

۰/۹	۰/۵	شاهد	میانگین تعداد تلفات
۰/۱±۰/۲۳*	۰/۱±۰/۱۹	۱۷/۳±۰/۵*	

مقادیر درون جدول بر اساس میانگین± انحراف معیار و در سطح معنی داری $P < 0.05$ ارائه شده است.

علامت * مقایسه میانگین تلفات بین غلظت شاهد و ۰/۹ میکروگرم بر لیتر است و علامت • مقایسه میانگین تلفات بین غلظت ۰/۵ و ۰/۹ میکروگرم بر لیتر می باشد.

آسیب های بافتی آبشش شامل هایپرپلازی و تورم سلولی حاد و تحلیل سلول های پوششی، در بافت کبد شامل نکروز تدریجی هسته ها و واکوئولیزه شدن فضاهای بین هپاتوسیت ها بود که در جدول ۳ مقادیر آن به صورت نیمه کمی آورده شده است. همان گونه که در شکل ۲-الف، ب و ج مشاهده می شود، در بافت آبشش تیغه های ثانویه آبششی نسبت به گروه شاهد، در هر دو غلظت ۰/۵ و ۰/۹ میکروگرم بر لیتر دچار هایپرپلازی و تورم سلولی حاد و تحلیل سلول های پوششی شده است.

در بافت کبد نکروز تدریجی هسته ها و واکوئولیزه شدن فضاهای بین هپاتوسیتها در غلظت های ۰/۵ و ۰/۹ میکروگرم بر لیتر نسبت به گروه شاهد مشاهده می شود (شکل ۳-الف، ب و ج).

جدول ۲. مقایسه میانگین برخی شاخص های مورفولوژیکی جنین اوزون برون در تیمارهای شاهد، ۰/۵ و ۰/۹ میکروگرم بر لیتر سایپر مترین

شخص مورفولوژیک مورد بررسی	شاهد	۰/۵	۰/۹
طول کلی (میلی متر)	۱۹±۰/۲	۱۹±۰/۲	۲۰±۰/۳
قطر چشم (میلی متر)	۰/۰۰۱±۰/۰۱	۰/۰۰۱±۰/۰۱	۰/۰۰۱±۰/۰۲
اندازه سر (میلی متر مربع)	۰/۰۰۰۰۵±۰/۰۰۱	۰/۰۰۰۰۵±۰/۰۰۱	۰/۰۰۰۰۵±۰/۰۰۱

مقادیر درون جدول بر اساس میانگین± انحراف معیار و در سطح معنی داری $P < 0.05$ ارائه شده است.

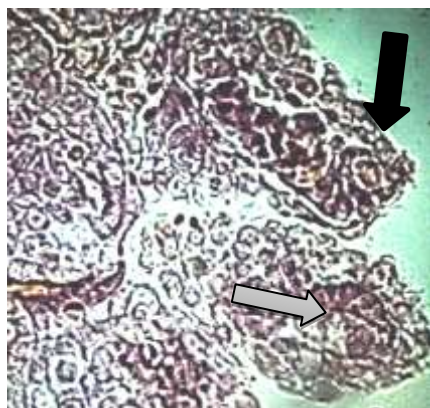
جدول ۳. بررسی نیمه کمی تغییرات بافتی آبشش و کبد در جنین اوزون برون در تیمارهای شاهد، ۰/۵ و ۰/۹ میکروگرم بر لیتر سایپر مترین

شاهد	آبشش		کبد	
	هایپرپلازی و تورم سلولی حاد	تحلیل سلول های پوششی	نکروز تدریجی هسته سلول های کبدی	واکوئولیزه شدن
۰/۵	++	++	++	-
۰/۹	+++	+++	+++	+++

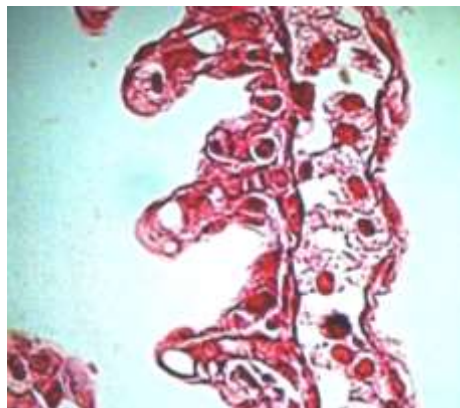
* - بدون آسیب بافتی ؛ ++ : آسیب بافتی < ۲۰ درصد ؛ +++ : آسیب بافتی < ۶۰ درصد.

بحث

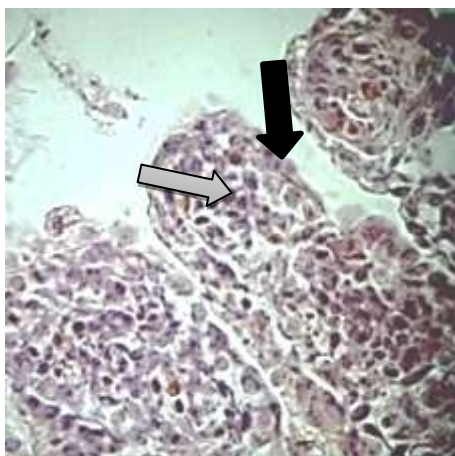
دریای خزر از سال ۱۹۷۰ تأمین کننده بیش از ۸۰ تا ۹۰ درصد خاویار جهان بود، که در سال های اخیر روند نزولی داشته است. از سال ۲۰۰۰ ماهیان خاویاری در لیست گونه های در خطر انقراض قرار گرفتند و اعمال محدودیت تجارت این ماهیان از سال ۲۰۰۱ وضع گردید (Moghim *et al.*, 2013; Rubin and Khodorevskaya, 2011). هشت گونه از ماهیان خاویاری در امریکای شمالی شناسایی شده اند که بر اساس چرخه زندگی و زیستگاهشان گمان می رود در معرض خطر وجود آلاینده های شیمیایی قرار داشته باشند (Chambers *et al.*, 2012). این تحقیق نیز بر روی یک گونه از این ماهیان خاویاری به نام اوزون برون متمرکز بوده است. در مطالعه حاضر که در مرحله جنینی ماهی اوزون برون صورت گرفته است، تعداد تلفات ناچیز بود (جدول ۱).



(ب)



(الف)

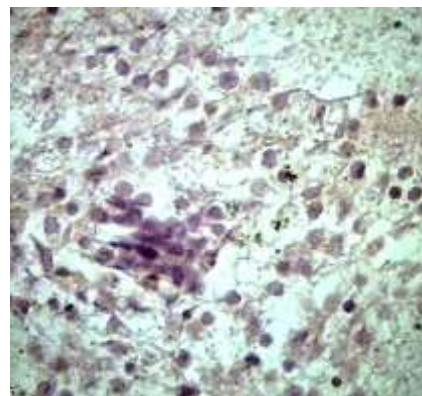


(ج)

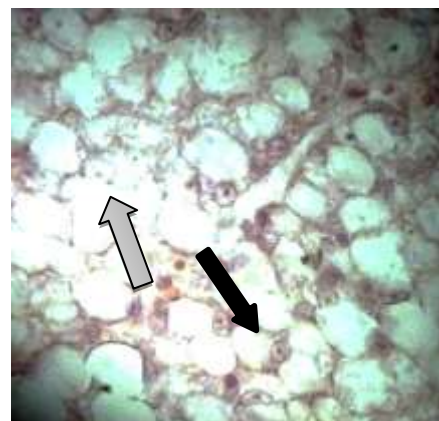
شکل ۲. برش سائیتال ازبافت لاملا های آبششی لارو نوس اوزون برون در (الف) تیمار شاهد . (ب) غلظت ۰/۵ میکرومتر . (ج) غلظت ۰/۹ میکرومتر . حالت هایپر پلازیای شدید (پیکان سفید) و تحلیل سلول‌های پوششی (پیکان سیاه) را در هر دو غلظت ۰/۵ و ۰/۹ میکروگرم بر لیتر نشان می‌دهد. (رنگ‌آمیزی H&E- بزرگ‌نمایی ۴۰۰×).



(ب)



(الف)



(ج)

شکل ۳. برش عرضی از بافت کبد لارو نوس اوزون برون در (الف) تیمار شاهد . (ب) غلظت ۰/۵ میکرومتر . (ج) غلظت ۰/۹ میکرومتر . نکروز تدریجی هسته‌ها (پیکان سیاه) و واکنش شدن (پیکان سفید) مشاهده می‌شود. (رنگ‌آمیزی H&E- بزرگ‌نمایی ۴۰۰×)

بر اساس تحقیقی که توسط Mendes و همکاران (۲۰۱۸) روی جنین ماهی زبرا انجام شد، ثابت گردید که غلظت‌هایی که برای جنین ماهی زبرا کشنده‌اند، ممکن است به طور دقیق سمیت پائرتروئیدها را نشان ندهند و حتی مراحل لاروی یا بالغ آن‌ها حساسیت بیشتری به این سموم داشته باشند؛ البته افزایش تلفات به غلظت و مدت زمان در معرض سم قرار داشتن ماهی نیز بستگی دارد (Richterova et al., 2015). در یک تحقیق مروری که توسط Bradbury and Coats (1989b) صورت گرفت تأثیرات سموم پائرتروئیدی بر روی انواع پستانداران، پرندگان و بی‌مهرگان آبی و خشکی مقایسه شده است. در این تحقیق مقادیر Lc 50 – 96h برای سم سایپر مترین در گونه‌های مختلف ماهی‌ها آمده است. به عنوان مثال برای ماهی کپور (*Cyprinus carpio*) ۰/۹ تا ۱/۱ میکروگرم بر لیتر، ماهی قزل‌آلا (*Salmo trutta*) ۱/۲ میکروگرم بر لیتر ماهی سالمون (*Salmo gairdneri*) ۰/۵ میکروگرم بر لیتر، ماهی ساردین (*Sardinus erythrophthalmus*) ۰/۴ میکروگرم بر لیتر و ماهی تیلاپیا (*Tilapia nilotica*) ۰/۴ میکروگرم بر لیتر گزارش شده است.

بر اساس گزارش Polat و همکاران (2002)، Davis و همکاران (1993)، Bradbury و Coats (1989a) برای تمام گونه‌های ماهی، میانگین غلظت کشنده سم سایپر مترین کمتر از ۱۰ میکروگرم بر لیتر می‌باشد. این مقدار برای سم سایپر مترین در لاروهای انگشت قد فیل ماهی ۰/۹۵۲ میکروگرم بر لیتر تعیین شده است (Jahanbakhshi et al., 2012). اثرات سمی پائرتروئیدها عموماً در ماهیان کوچک‌تر نسبت به ماهیان بزرگ‌تر بیشتر است (Bradbury and Coats, 1989b; Solomon et al., 2003; Baser et al., 2003). برخی از موارد ناهنجاری‌های مورفولوژیک که در اثر وجود مواد سمی شبه دی اکسین در محیط‌زیست ماهی‌ها گزارش شده عبارت‌اند از بدشکلی‌های اسکلت جمجمه-صورت، انحنای غیرطبیعی نخاع، تورم حفره دور قلبی و کیسه زرده، تجمع خون، ایسکمی، تغییرات سرعت بازگشایی تخم‌ها و کاهش درصد بقای لاروهای نارس است (Hornug et al., 1999). در مطالعه حاضر با توجه به نتایج اندازه‌گیری‌های مورفولوژیک هیچگونه تغییری در طی مراحل رشد و نمو جنین ماهی اوزون برون در معرض سم سایپر مترین مشاهده نشد. درجه نفوذ پائرتروئیدها به نحو چشم‌گیری تحت تأثیر ذرات ریز محلول در آب قرار دارد و این مسئله احتمالاً ناشی از خاصیت چربی دوستی مولکول‌های سم برای اتصال به مواد آلی محلول و رسوبات معلق در آب می‌باشد، بنابراین جذب سموم پائرتروئید (به بافت‌های جانوری) در برخی از آب‌ها مانند آب تالاب‌ها و مزارع دارای مواد آلی نسبت به جویبارها کمتر اتفاق می‌افتد (Werner and Moran, 2008). میزان سمیت حاد سموم پائرتروئید با دما همبستگی منفی نشان می‌دهد، بنابراین در محیط‌های آبی که این سموم حضور دارند در صورت کاهش دما، اثرات مخرب آن‌ها بر ماهی‌ها افزایش پیدا خواهد کرد (Jahanbakhshi et al., 2012). بر اساس گزارش Nasuti و همکاران (۲۰۰۳) سمیت پائرتروئیدهای نوع I با درجه حرارت آب رابطه معکوس دارد، در حالی که پائرتروئیدهای نوع II رابطه مستقیم با درجه حرارت داشته، از آن جا که سایپر مترین جزء سموم درجه II از گروه پائرتروئیدها محسوب می‌شود، سمیت آن با افزایش درجه حرارت آب افزایش پیدا می‌کند (Shahbazi et al., 2015). در طول انجام این آزمایش دمای آب در محدوده ۱۵-۱۳ درجه سانتی‌گراد ثابت بود و افزایش دما اتفاق نیافتد. آسیب‌های سلولی و بافتی اغلب تغییراتی در ساختار سلول‌ها القاء می‌کنند که کشنده نبوده و حتی گاهی برگشت‌پذیر هستند؛ مانند تورم سلولی حاد، تغییرات هیدروفوبیک و چربی. این موارد گاهی هم‌زمان با هم بروز می‌کنند و اغلب قابل تشخیص هستند. آسیب‌های برگشت‌پذیر ممکن است تغییرات ساختاری و عملکردی در سلول‌ها و بافت‌ها ایجاد کنند. گاهی نیز سلول‌ها خود را با شرایط جدید سازگار می‌کنند و این مسئله به بقای آن‌ها کمک می‌کند؛ اگر امکان سازگاری وجود نداشته باشد این آسیب‌ها گسترش پیدا کرده و سبب مرگ سلولی می‌شوند (Mumford et al., 2007). یکی از اثرات زیر کشنده سموم پائرتروئید شامل آسیب به آب‌شش‌ها و تغییرات رفتاری وابسته به آن می‌باشد. چون سلول‌های آب‌شش به شدت چربی دوست هستند بنابراین سموم پائرتروئیدی حتی با وجود غلظت بسیار ناچیز در آب، قویاً تمایل دارند که جذب سلول‌های آب‌ششی گردند (Smith and Stratton, 1986). در تحقیق حاضر تورم حاد سلولی در بافت پوششی رشته‌های آب‌ششی را می‌توان در غلظت‌های ۰/۵ و ۰/۹ میکروگرم بر لیتر به خوبی مشاهده کرد (شکل ۲- ب و ج). شاید این وضعیت را نیز بتوان نوعی از سازگاری بافتی در شرایط دشوار محسوب کرد. نوع دیگر از تغییرات سلولی، تغییر چربی^۵ می‌باشد که آن به معنی تجمع غیرطبیعی و بیش از حد چربی درون سلول است.

⁵ lipidosis

این آسیب نیز غالباً برگشت‌پذیر محسوب می‌گردد، ولی به هر حال می‌تواند سبب آشفتگی شدید عملکرد سلول‌ها شود. این وضعیت بیشتر در کبد به چشم می‌خورد. چندین مکانسیم در ایجاد آن نقش دارند، یکی از آن‌ها کاهش کارایی گیرنده‌های چربی رژیم غذایی و یا کاهش فشار اکسیژن و نرسیدن اکسیژن به بافت‌ها^۶ می‌باشد (Mumford *et al.*, 2007). در این تحقیق نیز تغییر چربی را می‌توان در غلظت ۰/۹ میکروگرم بر لیتر به خوبی مشاهده کرد (شکل ۳، ب و ج). اطلاعاتی که بر اساس مدل‌سازی اکوسیستم‌ها جهت بررسی خطرات سموم پایرتروئیدی به دست آمده است، معمولاً غیرقابل اطمینان و محدود می‌باشد. برای کاهش اختلافات احتمالی بهتر است که آزمون‌های تعیین میزان سمیت این دسته از سموم، اجزاء تشکیل‌دهنده آن‌ها را نیز در برگیرد و تنها به یک جزء از این سموم اکتفا نکرده. به علاوه بایستی پتانسیل سمی متابولیت‌های سموم پایرتروئیدی را نیز در این گونه از تحقیقات مدنظر داشت (Sarikoya, 2009). تعداد ناچیز تلفات در این تحقیق و نبود بدشکلی‌های مورفولوژیکی و احتمال برگشت‌پذیری ضایعات بافتی، مؤید این مطلب است که سایپرمتترین نمی‌تواند به عنوان یک عامل در تلفات جنینی ماهی اوزون برون مطرح باشد. البته شاید این احتمال وجود داشته باشد که با تأثیر در ساختار ژنومی آن بتواند تأثیرات نامطلوبی را در ادامه نسل این گونه بر جا بگذارد، لذا این مسئله نیاز به کارهای دقیق‌تری در ادامه روند تکاملی جنین ماهی اوزون برون دارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این تحقیق بر خود لازم می‌دانند از همکاری مسئول محترم مرکز تکثیر، پرورش و بازسازی ذخایر آبریان شهید رجایی ساری، جناب آقای معصومی و خانم جمال که خالصانه در انجام این پروژه ما را یاری نمودند تشکر و قدردانی نمایند. همچنین از معاونت محترم حوزه پژوهش و فن‌آوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان که در تأمین اعتبار و امکانات آزمایشگاهی لازم برای انجام این طرح ما را یاری نمودند، سپاسگزاریم.

منابع

- Abbasian, H., Ashayeri, A., Hasanzadeh, H. 2004. Agricultural drainage water in the Caspian sea and their ecological impacts. The Caspian Environment Program (CEP).
- Adhikari, S., Sarker, B., Chatterjee, A., Mahapatra, C.T., Ayyappan, S. 2004. Effects of cypermethrin and carbofuran on certain hematological parameters and prediction of their recovery in a fresh water teleost, *Labeo rohita* (Hamilton). *Ecotoxicology Environment Safety*. 58(2): 220-226.
- Aydin, R., Koprucu, K., Dorucu, M., Koprucu, S.S., Pala, M. 2005. Acute toxicity of synthetic pyrethroid cypermethrin on the common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryos and larvae. *Aquaculture International Journal*. 13: 451-458.
- Baser, S., Erkoç, F., Sevi, M., Kocak, O. 2003. Investigation of acute toxicity of permethrin on on guppies (*Poecilia reticulata*). *Cemosphere Journal*. 51(6): 469-74.
- Bradbury, S.P., Coats, J.R. 1989a. Toxicokinetics and toxicodynamics of pyrethroid insecticides in fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 8(5): 373-380.
- Bradbury, S.P., Coats, J.R. 1989b. Comparative toxicology of the pyrethroid insecticides. *Review Environment Contaminant Toxicology*. 108: 133-77.
- Chambers, R.C., Davis, D.D., Habeck, E.A., Roy, N.K., Wirgin, I. 2012. Toxic effects of PCB126 and TCDD on Shortnose sturgeon and Atlantic sturgeon. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 31(10): 2347-2337.
- Dadras, S., Mirfakhraei, S.H., Safaralizadeh, M.H., Vardast, M. 2017. M.S. Thesis: Evaluation of the residual insecticides deltamethrin, cypermethrin and chlorpyrifos and their effects on the *Hyper postica* Gyllenhal (col. Curlionidae) in the desert. Uremia University. 80 p. (in Persian)
- Das, B.K., Mukherjee, S.C. 2003. Toxicity of cypermethrin in *Labeo rohita* fingerlings: biochemical, enzymatic and hematological consequences. *Comparative Biochemistry Physiology*. 134(C): 109-121.

⁶ hypoxia

- Davis, B.N.K., Lakhani, K.H., Yates, T.J., Frost, A.J., Plant, R.A. 1993. Insecticide drift from ground-base, hydraulic sparging of peas and brussels sprouts-bioassays for determining buffer zone. *Agriculture, Ecosystem and Environment*. 43: 93-108.
- Ekinci, D., Beydemir, S. 2010. Risk assessment of pesticides and fungicides for acid-base regulation and salt transport in rainbow trout tissues. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 97(1): 66-70.
- Glaberman, S., Padilla, S., Barron, M.G. 2017. "Evaluating the zebrafish embryo toxicity test for pesticide hazard screening," *Environmental Toxicology and Chemistry*. 36(5). 1221-1226.
- Jahanbakhshi, A.R., Shalvei, F., Baghfalaki, M. 2012. Acute toxicity of Cypermethrin on the great sturgeon (*Huso huso*) juvenile. *World Journal of Fish and Marine Sciences*. WJFMS. 4(2): 170-174.
- Marino, D., Ronco, A. 2005. Cypermethrin and chlorpyrifos concentration levels in surface water bodies of the Pampa Ondulada, Argentina. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 75(4): 820-826.
- Mendes, J., Tennakoon, T.K., Jayasinghe, C.D. 2018. Zebrafish embryo toxicity of a binary mixture of pyrethroid insecticides: D-tetramethrin and cypermethrin. *Journal of Toxicology*. <https://doi.org/10.1155/2018/4182694>.
- Moore, A., Waring, C.P. 2001. The effects of a synthetic pyrethroid pesticide on some aspects of reproduction in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). *Aquatic Toxicology*. 52(1): 1-12.
- Moghim, M., Tan, S.G., Pourkazemi, M., Kor, D., Laloei, F. 2013. Application of microsatellite markers for genetic conservation and management of Persian Sturgeon resources in the Caspian Sea. *Journal Applied Ichthyology*. 29: 697-703.
- Mumford, S., Heidel, J., Smith, C., Morrison, J., MacConnell, B., Blazer, V. 2007. *Fish Histology and Histopathology*. Chapter 5. USFWS- NCTC. pp. 118-126.
- Nasuti, C., Cantalamessa, F., Falcioni, G., Gabbianelli, R. 2003. Different effects of Type I and Type II pyrethroids on erythrocyte plasma membrane properties and enzymatic activity in rats. *Toxicology*. 191(2-3): 233-44.
- National Pesticide Information Center. 2010. Technical Fact Sheet. National Pesticide Information Center. <http://npic.orst.edu/factsheets/Deltatech.html>
- Hornug, M.W., Spitsbergen, J.M., Peterson, R.E. 1999. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin alters cardiovascular and craniofacial development and function in sac fry of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicology Science*. Oxford Academic. 47: 40-451. [PubMed: 10048152].
- Koprucu, K., Aydin, R. 2004. The toxic effects of pyrethroid deltamethrin on the common carp *Cyprinus carpio* embryos and larvae. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 80: 47-53.
- Pearse, A.G.E. 1985. *Histochemistry, Theoretical and Applied*, Vol. 2, Analytical Technology. Churchill Livingstone. New York.
- Polat, H., Erkoc, F., Viran, R., Kocak, O. 2002. Investigation of acute toxicity of beta-cypermethrin on guppies (*Poecilia reticulata*). *Cemisphere Journal*. 49(1): 39-44.
- Richterova, Z., Svobodova, Z. 2012. Pyrethroids influence on fish. *Slov. Veterinary Research*. 49(2): 63-72.
- Richterova, Z., Machova, J., Stara, A., Tumova, J., Velisek, J., Sevcikova, M., Svobodova, Z. 2015. Effects of a cypermethrin-based pesticide on early life stages of Common carp (*Cyprinus carpio L.*). *Veterinarni Medicina*. Sicmago. 60(8): 423-431.
- Rubin, G.I., Khodorevskaya, R.P. 2011. Caspian Sea Sturgeon Fishery : A historic overview . *Journal Applied Ichthyology*. 27: 199-208.
- Sarikoya, R. 2009. Investigation of acute toxicity of alpha-cypermethrin on adult Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus L.*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 9: 85-89.
- Solomon, K.R., Giddings, R.M., Maund, S.J. 2001. Probabilistic risk assessment of cotton pyrethroids: 1. Distributional analysis of laboratory aquatic toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 20: 652-659.
- Shahbazi, S., Mirvaghefi, A., Abedi, M., Taherian, M. 2015. Effect of temperature lethal concentration (Lc 50 96-h) of cypermethrin on the caspian kutum fish *Rutilus frisii kutum* (Kamensky, 1901). *Journal of Fisheries*. 68: 421-435.

- Shi, X., Gu, A., Ji, G., Li, Y., Di, J., Jin, J., Hu, F., Long, Y., Xia, Y., Lu, C., Song, L., Wang, S., Wang, X. 2011. Development toxicity of cypermethrin in embryo-larval stages of zebrafish. *Chemosphere Journal*. 85(6): 1010-1016.
- Shubina, T.M., Popova, A.A., Vasilev, V.P. 1989. *Acipenser stellatus Pallas, 1771*. In the fresh water fishes of Europe. Vol. 1, part II: General introduction to fishes. Acipenseriformes. (ed. Holcik) AULA-Verlag Wiesbaden. pp. 394-442.
- Smith, T.M., Stratton, G.W. 1986. Effects of synthetic pyrethroid insecticides on non-target organism. *PubMed.gov. NCBI*. 97: 93-120.
- Velisk, J., Stara, A., Svobodova, Z. 2011. The effects of pyrethroid and triazine pesticides on fish physiology. In: stoytcheva, M. (ed.). *Pesticides in the modern world: pest control and pesticides exposure and toxicity assessment*. Rijeka. In: tech. pp: 377-402.
- Vryzas, Z., Alexoudis, C., Vassiliou, G., Galanis, K., Papadopoulou-Mourkidou, E. 2011. Determination and aquatic risk assessment of pesticide residues in riparian drainage canals in northeastern Greece. *Ecotoxicology Environment Safety*. 74(2): 174-18.
- Werner, I., Moran, K. 2008. Effects of pyrethroid insecticides on aquatic organisms. In: Gan, J., Spurlock, F., Hendley, P., Weston, D.P. (eds). *Synthetic pyrethroids: occurrence and behavior in aquatic environments*. Washington: American Chemical Society. pp: 310-35.