تعیین محدوده کشندگی و بررسی اثرات ناشی از عصاره تنباکو بر بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

- **صبا حسینی**: گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی، خرمشهر، صندوق‌پستی: ٦٦٩
- **عبدالعلی موحدی‌نیا**: گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی، خرمشهر، صندوق‌پستی: ٦٦٩
- **محسن حیدری**: گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، صندوق‌پستی:۱۳۱۸-۱۳۱٤٥
- **معصومه قدمی**: گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی، قزوین
- **جواد مهدوی**: مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، یاسوج
- **زینب صالحپور***: مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹٤ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹٤

چکیده

هدف از این تحقیق بررسی دامنه سمیت ناشی از عصاره تنباکو بر ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌باشد. با توجه به مطالعات انجام شده، بیش‌تر به آثار سوء و زیان‌بار تنباکو و دیگر ترکیبات آن بر انسان اشاره شده و کم‌تر به استفاده های مفید آن در صنایع توجه شده است. این مطالعه را می‌توان اولین گام در شناخت و توسعه استفاده مفید تنباکو در صنایع دیگر دانست. آزمایش سمیت حاد به‌صورت ساکن و براساس روش استاندارد OECD به‌مدت ٤ روز انجام و پارامترهای موثر فیزیکوشیمیایی آب شامل pH، اکسیژن محلول و درجه حرارت کنترل گردید. در هر تیمار از ۳۰ عدد ماهی قزل‌آلا با میانگین وزنی ۰/۰۲±٥ گرم استفاده شد. بعد از به‌دست آوردن دامنه غلظت کشندگی، تیمارهای نهایی با ٥ تیمار برای تعیین غلظت کشنده (LC_{50} ۹٦ h) انجام پذیرفت. نتایج کمی به‌دست آمده توسط نرم‌افزار SPSS version.۱٦ و روش آماری Probit با سطح اطمینان ۹٥ درصد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. غلظت کشنده (LC_{50} ۹٦ h) عصاره تنباکو برای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ۳/٥٥ میلی‌گرم بر لیتر و غلظت غیرموثر مربوطه (NOEC)، معادل ۰/۳٥ میلی‌گرم بر لیتر به‌دست آمد. غلظت ۰۱ /۰ LC_{50} ۹٦h را سطح ایمن و مطمئن برای پرورش آبزیان توصیه می‌کنند درصورتی‌که در مطالعه فعلی غلظت ۰/۰۳ میلی‌گرم بر لیتر جهت پرورش لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پیشنهاد می‌گردد. ضمن توصیه به‌کارگیری عصاره آبی تنباکو در غلظت‌های پایین در استخرهای پرورشی جهت ماهی قزل‌آلا براساس یافته‌های این تحقیق غلظت غیرسمی و موثر و مجاز حداکثر ۰/۰۳ میلی‌گرم بر لیتر جهت استفاده سالم در استخرهای پرورشی پیشنهاد می‌گردد.

کلمات کلیدی: عصاره آبی تنباکو، ماهی قزل‌آلا رنگین‌کمان (*Onchorhynchus mykiss*)، سمیت

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: zeynab.salehpour@gmail.com

مقدمه

ماهی به‌خاطر اهمیت اکولوژیکی و اقتصادی به‌عنوان یک گونه مناسب در ارزیابی سمیت آبزیان مورد توجه است. گونه‌های بسیار زیادی از ماهی‌ها برای مطالعه سمیت استفاده می‌شوند. انتخاب یک گونه برای انجام آزمایش، به در دسترس بودن گونه، سهولت پرورش و سهولت حمل و نقل آن بستگی دارد (Clark، ۲۰۰۱؛ OECD، ۱۹۹۲). ماهیان یکی از مهم‌ترین موجودات آبزی می‌باشند که به‌علت ارزش اقتصادی و حساسیت در مقابل آلاینده‌هااز اهمیت خاصی برخوردار هستند و به‌همین دلیل جهت انجام آزمایشات زیست‌سنجی، در بعد وسیعی از آن‌ها استفاده می‌گردد (Nemmar و همکاران، ۲۰۱۳). حساسیت گونه‌های مختلف ماهی به مواد سمی متفاوت، متغیر است، از این‌رو آزمایش‌های سم‌شناسی روی ماهیان مختلف صورت می‌گیرد (Neuspiel، ۱۹۹۴). برای محاسبه سمیت روی ماهی قزل‌آلا از مدل زمان-غلظت (زف) و مدل زمان غلظت کامل (زهف) استفاده می‌شود (Canivet و Chambon، ۲۰۰۱).

در هنگام انجام تست سمیت حاد، کنترل کردن شرایط آزمایش از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است. عوامل متعددی در نتایج آزمایش‌های سمیت روی آبزیان تأثیر دارند که می‌توان به ویژگی‌های آب و خصوصیات زیستی گونه‌های مورد آزمایش اشاره کرد. به هنگام اجرای آزمایش‌های سمیت، از روش‌های آزمایش استاندارد شده برای به حداقل رساندن متغیرهای خارجی و تصادفی استفاده نمود و شرایط آزمایش را باید تحت کنترل قرار داد (Axiak و Abel، ۱۹۹۰). اطمینان از این‌که همه موجودات مورد آزمایش از یک گروه سالم بوده و توزیع آن‌ها به‌صورت تصادفی در هنگام انجام آزمایش می‌باشد، نکته‌ای مهم است. یکی از عوامل تأثیرگذار در مسمومیت آبزیان عامل زمان است. هنگامی‌که ماهی در معرض غلظت ثابتی از سم باشد، به مرور زمان هم مقاومت ماهی تحلیل می‌رود و هم سم فرصت بیش‌تری برای تأثیرگذاری روی ماهی دارد. علاوه بر این در مواردی تجمع سم در بافت‌های ماهی نیز باعث افزایش تأثیر سو آن بر بدن ماهی و در مدت ۹۶ ساعت انجام آزمایش‌ها موجب پایین آمدن LC_{50} می‌شود (David و همکاران، ۲۰۰۳).

به‌طورکلی سمیت یک آلاینده از طریق آزمایش سنجش زیستی ارزیابی می‌گردد که به‌وسیله آن غلظت لازم جهت ایجاد تلفات نیمی از موجودات مورد آزمایش در یک دوره زمانی مشخص (کوتاه و بلندمدت) معلوم می‌شود. این آزمایش‌ها شاخه‌ای از علم اکوتوکسیکولوژی بوده و وظیفه آن قضاوت درباره توان بالقوه مواد آلاینده و بررسی تأثیرات زیان بخش این مواد بر اکوسیستم‌ها و موجودات زنده در آن می‌باشد (Narahashi و همکاران، ۲۰۰۰). برای ارزیابی آلودگی زیست آزمونی لازم است، زیرا آزمایش‌های فیزیکی و شیمیایی برای ارزیابی اثرات بالقوه بر حیات آبزیان کافی نیست (Clesceria و همکاران، ۱۹۹۸). زیست آزمونی می‌تواند در ارزیابی تأثیر فرآیندهای تصفیه آب در کاهش سمیت آب نقش بسیار ارزنده‌ای داشته باشد (ندافی، ۱۳۷۹؛ Clesceria و همکاران، ۱۹۹۸).

تنباکو یا توتون گیاهی با برگ‌های پهن است که در اصل در آمریکای شمالی و جنوبی رشد کرده و امروزه در سراسر جهان کشت می‌شود. به برگ‌های خشک و بریده شده آن گیاه هم تنباکو می‌گویند. استفاده از تنباکو در آبزی‌پروری دارای سابقه طولانی می‌باشد. استفاده از پودر برگ این گیاه به‌منظور از بین بردن موجودات شکارگر و نیز علف‌ها در استخرهای ماهی قبل از ماهی‌دار کردن استخر استفاده شده است (Kori-Siakpere و Oviroh، ۲۰۱۱). ماهی‌گیران بومی در نیجریه از تنباکو برای صید ماهی استفاده می‌کنند (Reed و همکاران، ۱۹۶۹). ماده مؤثر موجود در تنباکو نیکوتین است که به‌میزان ۲ تا ۵ درصد در برگ خشک آن یافت می‌شود (Hassal، ۱۹۸۲). مهره‌داران و بی‌مهرگان هر دو گروه دارای گیرنده‌های نیکوتینی با ساختار و فعالیت مشابهی هستند اما می‌تواند ویژگی‌های فیزیولوژیکی و فارماکولوژیکی متفاوتی داشته باشد و نیکوتین احتمالاً می‌تواند موجب صدمه و آسیب سمی در مهره‌داران شود (Ballivet و همکاران، ۱۹۹۶). در طب سنتی دنیا از گیاه تنباکو به‌عنوان یک داروی ضداسپاسم، مدر، قی‌آور، خلط‌آور، مسکن و بزاق‌آور استفاده می‌شود (Narahashi و همکاران، ۲۰۰۰). نیکوتین با اثر بر گیرنده استیل-کولین باعث شلی عضلانی می‌گردد(Narahashi و همکاران، ۲۰۰۰).

انواع دخانیات و برندهای آن حاوی فلزات سنگین آهن، مس، روی، کروم، نیکل، سرب و کادمیوم با بیش‌ترین مقدار و دیگر فلزات سنگین می‌باشد (Verma و همکاران، ۲۰۱۰). به‌ترتیب حداکثر مقدار فلزات سنگین در نمونه‌های سیگار و توتون معطر موجود در بازار ایران به‌صورتFe>Zn>Ni>Cu>Cd>Pb>Cr می‌باشد (عبداله‌نژاد و همکاران، ۱۳۹۲). ضرغام و همکاران (۱۳۹۱) با بررسی اثر بی‌هوش‌کنندگی عصاره‌های آبی و الکلی تنباکو (*Nicotiana tabacum*) بر ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بیان داشتند که ارتباط معنی‌داری بین غلظت و شدت بی‌هوشی و مدت بازگشت وجود دارد و در این مطالعه کاربرد ۳/۵ میلی‌لیتر

بر لیتر عصاره الکلی تنباکو برای ماهی‌های ۲۰۰ گرمی (پرواری) سبب تلف شدن ۴۰ درصد بچه ماهی‌ها شد.

هدف از انجام این مطالعه، مشخص نمودن محدوده کشندگی، تعیین غلظت کشنده (LC_{50} .۹۶ h)، تعیین حداکثر غلظت مجاز (MATC یا Maximum acceptable toxicant concentration) و تعیین حداقل غلظت موثر (LOEC یا Lowest Observed Effect Concentration) عصاره هیدرو الکلی تنباکو بر بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

عصاره‌گیری از گیاه مورد مطالعه: گیاه تنباکو پس از تهیه از بازار شهر یاسوج به‌وسیله آسیاب برقی به پودر تبدیل شد. پودر حاصله به نسبت (W/V) ۱/۲۰ در آب مقطر ریخته شده و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای آزمایشگاه نگه‌داری و هر چند مدت یک‌بار به‌هم‌زده می‌شوند. بعد از رد کردن از صافی عصاره‌های حاصل به‌منظور خروج حلال در تبخیرکننده گردان (روتاری) در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار می‌گیرد (Salehi و همکاران، ۲۰۰۵). پس از خروج حلال عصاره‌های حاصله توسط دستگاه لیوفیلیزه می‌شود و تا زمان شروع مراحل آزمایش درون یخچال قرار می‌گیرد.

بررسی خواص سمیت عصاره گیاه مورد مطالعه: عملیات شروع طرح در شهریورماه سال ۱۳۹۳ روی بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری یاسوج بود. برای این منظور ۱۵۰ قطعه بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان جهت سازگار شدن با شرایط محیط به‌مدت یک هفته در وان‌های سالن ونیرو این مرکز نگه‌داری شدند. در این مدت ضمن هوادهی مناسب، غذادهی توسط پلت (روزانه به‌ازای ۰/۰۲ وزن بدن) صورت گرفت. از آن‌جایی‌که غلظت کشنده (LC_{50} .۹۶ h) عصاره تنباکو بر روی این ماهی معلوم نبود، برای یافتن محدوده‌کشندگی عصاره تنباکو بر روی بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، ابتدا یک آزمایش اولیه (Range finding test) انجام شد (Inyang و همکاران، ۲۰۱۰). تست سمیت حاد به روش ساکن (Static) و براساس دستورالعمل استاندارد O.E.C.D (Organization of Economic Cooperation and Development) (TRC و همکاران، ۱۹۸۴) به‌مدت ۴روز بر روی بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام شد. تغذیه بچه‌ماهیان ۲۴ ساعت قبل از انجام آزمایش سمیت حاد متوقف شد (Banaee و همکاران، ۲۰۱۱). پارامترهای موثر فیزیکوشیمیایی آب شامل pH، اکسیژن محلول و دما به‌طور روزانه ثبت گردید. بعد از تعیین محدوده‌کشندگی آزمایش نهایی سمیت حاد عصاره تنباکو بر بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان برای بررسی سمیت این گیاه از چهار تیمار (غلظت‌های ۰/۱، ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در هر لیتر) آب مخازن حاول ماهی زنده و یک گروه شاهد استفاده شد. در هر تیمار ۳۰ عدد ماهی (با میانگین وزنی ۰/۰۲±۵ گرم) درون آکواریم‌های ۶۰ لیتری محتوی ۴۰ لیتر آب که از قبل هوادهی شده بود قرار داده شد. ماهیان تلف شده از محیط آکواریوم به محض مشاهده جمع‌آوری و تعداد تلفات ماهی‌ها در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت و ۹۶ ساعت محاسبه و ثبت گردیدند.

آنالیز آماری: پس از اتمام آزمایش داده‌های حاصل از انجام آزمایش تست سمیت حاد با روش آماری Probit Analysis با سطح اطمینان ۹۵ درصد و نرم‌افزار SPSS version.۱۶ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برحسب غلظت‌های کشنده (Sub Lethal Concentration) تنباکو و با استفاده از شیب خط رگرسیون غلظت نیمه‌کشنده (Lethal Concentratoin) در مدت ۹۶ ساعت محاسبه شد.

نتایج

در طی انجام آزمایش فاکتورهای فیزیکوشیمیایی (pH ، دما و اکسیژن محلول) آکواریوم‌ها به‌طور روزانه سنجیده و ثبت گردید (جدول ۱).

جدول ۱: مقادیر پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب مورد استفاده طی انجام آزمایش‌ها

پارامتر	مقدار
دما (درجه سیلیسیوس)	۱۲/۷۵ ±۰/۹۵
pH	۷/۳۳ ±۰/۱۴
اکسیژن محلول (میلی‌گرم بر لیتر)	۸/۸۷ ±۰/۲۹

در هنگام انجام تست سمیت حاد، کنترل کردن شرایط آزمایش از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است. عوامل متعددی در نتایج آزمایش‌های سمیت روی آبزیان تاثیر دارند که می‌توان به ویژگی‌های آب و خصوصیات زیستی گونه‌های مورد آزمایش اشاره کرد. به هنگام اجرای آزمایش‌های سمیت، از روش‌های آزمایش استاندارد شده برای به حداقل رساندن متغیرهای خارجی

و تصادفی استفاده نمود و شرایط آزمایش را باید تحت کنترل قرار داد (Axiak و Abel، ۱۹۹۰). پس از تعیین محدوده‌کشندگی تنباکو بر بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، تست سمیت حاد ($LC_{۵۰}$) در ۵ غلظت مختلف (۰/۱، ۱، ۱۰ و ۱۰۰میلی گرم بر لیتر) به همراه شاهد انجام گردید و نتایج مرگ و میر در طی زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت اندازه‌گیری شدند (جدول ۳). در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر ۷۳ درصد تلفات مشاهده شد. میزان مرگ و میر در غلظت‌های ۰، ۰/۱، ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پس از ۲۴ ساعت به‌ترتیب ۷، ۱۳، ۱۸ و ۲۲ عدد به‌دست آمد. براساس این نتایج میزان غلظت کشنده ($LC_{۵-۹۵}$) تنباکو بر ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در طی زمان ۲۴ساعت به‌دست آمد. غلظت کشنده ۲۴ ساعته ($LC_{۵۰}$ ۲۴ h) تنباکو بر روی ماهی قزل آلای رنگین‌کمان با حدود اطمینان ۹۵ درصد ۴۳/۱۱ میلی‌گرم بر لیتر می‌باشد. سایر مقادیر LC ($LC_{۵-۹۵}$) با حدود اطمینان ۹۵ درصد در جدول ۳ آمده است.

جدول ۲: میزان مرگ و میر بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در تست سمیت حاد تنباکو ((تعداد ماهی در هر تیمار = ۳۰عدد)

غلظت (میلی گرم بر لیتر)	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
شاهد	۰	۰	۱	۱
۰/۱	۷	۸	۱۰	۱۱
۱	۱۳	۱۵	۱۷	۱۸
۱۰	۱۸	۲۰	۲۲	۲۴
۱۰۰	۲۲	۲۴	۲۸	۳۰

جدول۳: غلظت کشنده ($LC_{۵-۹۵}$) تنباکو بر روی بچه‌ماهی قزل آلای رنگین‌کمان به‌ترتیب در طی زمان ۲۴، ۴۶، ۷۲ و ۹۶ ساعت

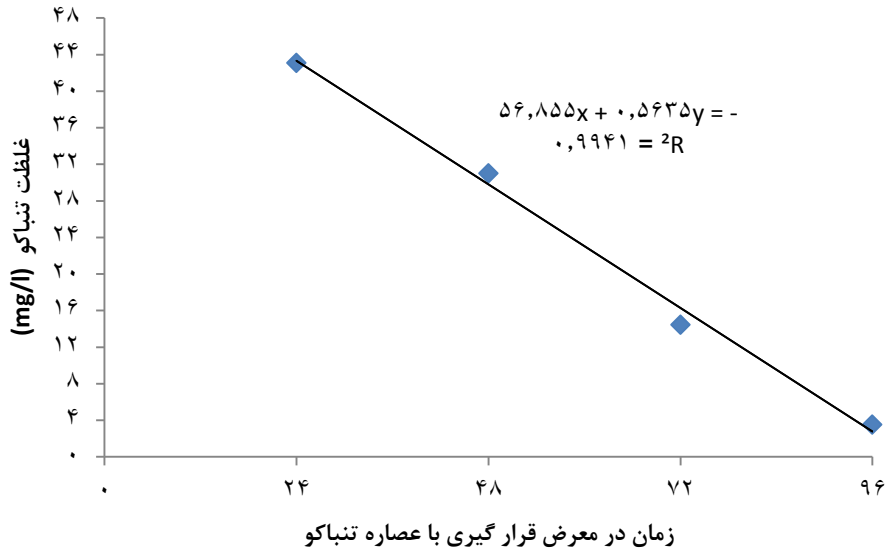
LC	غلظت کشنده			
	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ساعت	۹۶ ساعت
$LC_{۵}$	-۷۲/۸۹	-۸۹/۵۰	-۶۸/۹۳	-۷/۸۹
$LC_{۱۰}$	-۶۰/۳۷	-۶۲/۸۸	-۵۰/۵۰	-۵/۳۶
$LC_{۲۰}$	-۲۴/۸۵	-۳۰/۲۴	-۲۸/۱۹	-۲/۳۰
$LC_{۳۰}$	۰/۷۶	-۷/۳۹	-۱۲/۱۰	-۰/۰۹
$LC_{۴۰}$	۲۲/۶۵	۱۲/۴۷	۱/۶۴	۱/۷۹
$LC_{۵۰}$	۴۳/۱۱	۳۱/۰۴	۱۴/۴۹	۳/۵۵
$LC_{۶۰}$	۶۳/۵۷	۴۹/۶۰	۲۷/۳۴	۵/۳۱
$LC_{۷۰}$	۸۵/۴۶	۶۹/۴۷	۴۱/۰۹	۷/۲۰
$LC_{۸۰}$	۱۱۱/۰۸	۹۲/۷۲	۵۷/۱۸	۹/۴۱
$LC_{۹۰}$	۱۴۶/۶۱	۱۲۴/۹۶	۷۹/۵۰	۱۲/۴۷
$LC_{۹۵}$	۱۷۵/۹۵	۱۵۱/۵۹	۹۷/۹۳	۱۵

پس از گذشت ۴۸ ساعت در تیمار شاهد هیچ‌گونه تلفاتی مشاهده نشد ولی در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر ۸۰ درصد تلفات مشاهده شد. میزان مرگ و میر پس از ۴۸ ساعت در غلظت‌های ۰/۱، ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به‌ترتیب ۸، ۱۵، ۲۰و ۲۴ عدد به‌دست آمد. بر این اساس میزان غلظت کشنده ۴۸ ساعته ($LC_{۵۰}$ ۴۸ h) تنباکو با حدود اطمینان ۹۵ درصد ۳۱/۰۴ میلی‌گرم بر لیتر می‌باشد که میزان $LC_{۵۰}$ ۴۸ h نسبت به‌میزان $LC_{۵۰}$ ۲۴ h کاهش داشته است. سایر مقادیر LC ($LC_{۵-۹۵}$) با حدود اطمینان ۹۵ درصد در جدول ۳ آمده است.

در تیمار شاهد پس از مدت زمان ۷۲ ساعت ۳ درصد تلفات مشاهده شد درحالی‌که در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر ۹۳ درصد تلفات مشاهده شد. میزان مرگ و میر در غلظت‌های ۰/۱، ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به‌ترتیب ۱۰، ۱۷، ۲۲ و ۲۸ عدد به‌دست آمد. میزان غلظت کشنده ۷۲ ساعته ($LC_{۵۰}$ ۷۲ h) تنباکو با حدود اطمینان ۹۵ درصد، ۱۴/۴۲ میلی‌گرم بر لیتر می‌باشد. همان‌گونه که ملاحظه می‌گردد کلیه غلظت‌های کشنده در مدت زمان ۷۲ ساعت نسبت به ۲۴ و ۴۸ ساعت کاهش واضحی را نشان می‌دهد. سایر مقادیر LC ($LC_{۵-۹۵}$) با حدود اطمینان ۹۵ درصد در جدول ۳ آمده است.

در غلظت‌های ۰/۱، ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر میزان مرگ و میر پس از ۹۶ ساعت به‌ترتیب ۱۱، ۱۸، ۲۴ و ۳۰ عدد به دست آمد و در تیمار شاهد ۳ درصد تلفات مشاهده شد. میزان غلظت کشنده ۹۶ ساعته ($LC_{۵۰}$ ۹۶ h) عصاره تنباکو با حدود اطمینان ۹۵ درصد، ۳/۵۵ میلی‌گرم بر لیتر می‌باشد. سایر مقادیر LC ($LC_{۵-۹۵}$) با حدود اطمینان ۹۵ درصد در جدول ۳ آمده است.

با ایجاد همبستگی بین زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت از در معرض قرار گیری با عصاره تنباکو و میزان $LC_{۵۰}$ در طی زمان‌های ذکر شده معادله خط برابر با $y = -۰,۵۶۳x + ۵۶,۸۵$ می‌باشد. از آن‌جاکه میزان $R^۲$ در معادله بالا برابر با ۹۹ درصد است می‌توان با این معادله میزان $LC_{۵۰}$ را در طی زمان‌های مختلف به‌دست آورد (شکل ۱).



شکل۱: نمودار همبستگی بین زمان در معرض قرار گیری عصاره تنباکو با غلظت‌های مختلف

بحث

در مقایسه و تعیین ارجحیت داروها لازم است کیفیت اثر، اثرات سمی و جانبی، پایداری دارو در شرایط محیط نگه‌داری، سهولت تهیه و کاربرد خصوصاً در مصارف دام و آبزیان قیمت آن‌ها را مورد توجه قرار داد. در مطالعه سمیت دارو با استفاده از روش‌های محاسبه کمی داروشناسی می‌توان معیارهایی برای مقایسه به‌دست آورد. این معیارها بسته به هدف پژوهش، علائم و اثرات معینی از دارو را مد نظر قرار می‌دهند که می‌تواند شامل فعالیت قلب و دستگاه گردش خون، حرکات تنفسی، واکنش‌های عصبی و رفتاری، عملکرد دستگاه دفعی یا سایر اعمال فیزیولوژیک موجود زنده باشد. در مطالعات جانوری و خصوصاً آبزیان، میان اثرات متحمل دارو یا سم، اثر کشندگی به لحاظ قطعی بودن و دقت آن کاربرد وسیع‌تری دارد (Gray، ۱۹۹۵). $LC_{۵۰}$ ۹۶h ۰/۰۱ را سطح ایمن و مطمئن برای آبزیان توصیه می‌کنند (CWQC، ۱۹۷۲). که در این مطالعه برابر با ۰/۰۳ میلی‌گرم بر لیتر می‌باشد. براساس جدول ۳ میزان غلظت کشنده تنباکو در طی چهار روز متوالی (۹۶ساعت) برای ۵۰ درصد ($LC_{۵۰}$ ۹۶h) از بچه‌ماهی‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان، ۳/۵۵ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمد.

درجه‌بندی سمیت آفت‌کش‌ها با استفاده از میزان $LC_{۵۰}$ ۹۶h مشخص می‌شود، اگر از این تقسیم‌بندی برای سمیت تنباکو نیز استفاده شود، تنباکو برای بچه‌ماهی قزل‌آلا دارای سمیت متوسط محسوب می‌گردد (Loui و همکاران، ۱۹۹۶) (جدول ۴).

جدول ۴: دسته بندی سطوح سمیت آفت‌کش‌ها

$LC_{۵۰}$ (میلی‌گرم)	درجه سمیت
۱۰۰	نسبتاً سمی
۱۰-۱۰۰	کمی سمی
۱-۱۰	متوسط سمی
۰/۱-۱	خیلی سمی
۰/۱	شدیداً سمی

حداکثر غلظت سمی که وجود آن در آب برای آبزیان مجاز در نظر گرفته می‌شود غلظتی معادل ۰/۱ غلظت کشندگی حاد ۹۶ ساعته ($LC_{۵۰}$ ۹۶h) می‌باشد (Gray، ۱۹۹۵). این غلظت که غلظت غیر موثر (NOEC) نیز نامیده می‌شود برای بچه‌ماهی قزل آلا با کاربرد تنباکو، برابر با ۰/۳۵ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمد. ضرغام و همکاران (۱۳۹۱) با بررسی اثر بی‌هوش‌کنندگی عصاره‌های آبی و الکلی تنباکو (*Nicotiana tabacum*) بر ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorchynchus mykiss*) در سه گروه وزنی بچه‌ماهی (کوچک‌تر از ۸۰ گرم)، پرواری (حدود ۲۰۰ گرم)

و مولد (بزرگ‌تر از ۱۵۰۰ گرم) و غلظت تنباکو در عصاره آبی در تیمارهای ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میلی‌گرم در لیتر آب و عصاره الکلی تنباکو در تیمارهای ۰/۷، ۱، ۱/۷ و ۳/۵ میلی‌لیتر در یک لیتر آب بیان داشتند که ارتباط معنی‌داری بین غلظت و شدت بی‌هوشی و مدت بازگشت وجود دارد و در این مطالعه کاربرد ۳/۵ میلی‌لیتر بر لیتر عصاره الکلی تنباکو برای ماهی‌های ۲۰۰ گرمی (پرواری) سبب تلف شدن ۴۰ درصد بچه‌ماهی‌ها شد. Banaee و همکاران (۲۰۱۱) با مطالعه سمیت حاد دیازینون روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، LC_{50} آن را ۱/۱۷ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آوردند.

کم‌ترین غلظت موثر سم بر بچه‌ماهیان قزل‌آلا (LOEC) معادل LC_{10} ۹۶h (غلظتی از سم که در مدت زمان ۹۶ ساعت ۱۰٪ از ماهیان را می‌کشد) می‌باشد. این غلظت برای تنباکو بر بچه ماهی‌های قزل‌آلای مورد مطالعه معادل ۵/۳۶- میلی‌گرم در لیتر تعیین گردید. این سطح در واقع حداقل غلظتی است که در مقایسه با نمونه شاهد اثر قابل توجهی بر مرگ و میر ماهی مورد آزمایش اعمال نماید (CWQC، ۱۹۷۲).

عصاره تنباکو یک ترکیب گیاهی است که انتظار می‌رود به آسانی در محیط تجزیه شود و اثرات سوء زیست محیطی نیز نداشته است (شریف‌پور و همکاران، ۱۳۸۱). استفاده از پودر برگ این گیاه به‌منظور از بین بردن موجودات شکارگر و نیز علف‌ها در استخرهای ماهی قبل از ماهی‌دار کردن استخر استفاده شده است (Konar، ۱۹۷۰). از جمله تحقیقات صورت گرفته روی تنباکو در آبزی پروری بررسی سمیت حاد این گیاه روی گربه‌ماهی آفریقایی با نام علمی *Clarias gariepinus* (Kori-Siakpere و Oviroh، ۲۰۱۱) و هم‌چنین گونه *Oreochromis niloticus* می‌باشد (Agbon و همکاران، ۲۰۰۲). Kori-Siakpere و Oviroh (۲۰۱۱) با بررسی سمیت حاد تنباکو روی گربه ماهی آفریقایی با نام علمی *Clarias gariepinus* و با کاربرد غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ میلی‌گرم در لیتر و در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بر گربه ماهی آفریقایی نشان دادند که کشندگی در تمامی غلظت‌های مورد آزمایش تنباکو در مقایسه با تیمار شاهد اتفاق افتاد و سمیت تنباکو روی گربه ماهی با افزایش غلظت و زمان مواجهه افزایش می‌یابد که در توافق با مطالعه حاضر است، هم‌چنین در آن مطالعه LC_{50} ۹۶h، ۱۰/۹۰ میلی‌گرم در لیتر محاسبه شد. که به‌نظر می‌رسد گربه ماهی آفریقایی *Clarias gariepinus* نسبت به بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نسبت به سمیت حاد تنباکو مقاوم‌تر باشد.

Asadi و همکاران (۲۰۱۰) اثر گیاه *Nasturtium nasturtium* را روی فاکتورهای ایمنی از جمله لیزوزیم و عامل مکمل در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که این عصاره موجب افزایش فعالیت سیستم عامل مکمل و لیزوزیم می‌شود.

بهمنی و همکاران (۱۳۸۹) با بررسی اثر ضد زالو عصاره متانولی تنباکو (*Nicotina tabacum*) در مقایسه سوکسینیل و چند داروی ضد انگل با بررسی فلجی و مرگ زالو مشخص نشان دادند عصاره متانولی تنباکو با دوز ۶۰۰ میلی‌گرم با میانگین ۱۷ دقیقه باعث مرگ زالوها می‌شود.

با توجه به نتایج LC_{50} ۹۶h، سمیت عصاره تنباکو روی ماهی قزل‌آلا با افزایش غلظت و زمان مواجهه افزایش می‌یابد به‌عبارت دیگر با افزایش ساعات آزمایش میزان غلظت کم‌تری از سم لازم است تا ۵۰ درصد از جمعیت ماهیان تلف شوند و مقدار LC_{50} در ۲۴ ساعت اولیه آزمایش همواره بیش‌تر از LC_{50} در پایان ۹۶ ساعت می‌باشد. یکی از عوامل تأثیرگذار در مسمومیت آبزیان عامل زمان است. هنگامی‌که ماهی در معرض غلظت ثابتی از سم باشد، به مرور زمان هم مقاومت ماهی تحلیل می‌رود و هم سم فرصت بیش‌تری برای تأثیرگذاری روی ماهی دارد. علاوه بر این در مواردی تجمع سم در بافت‌های ماهی نیز باعث افزایش تأثیر سو آن بر بدن ماهی و در مدت ۹۶ ساعت انجام آزمایش ها موجب پایین آمدن LC_{50} می‌شود. نتایج مرگ و میر در غلظت‌های ۰/۱، ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پس از ۲۴ ساعت به‌ترتیب ۲۳/۳۳، ۴۳/۳۳، ۶۰ و ۷۳/۳۳ درصد، ۴۸ ساعت به‌ترتیب ۲۶/۶۷، ۵۰، ۶۶/۶۷ و ۸۰ درصد، ۷۲ ساعت به‌ترتیب ۳۳/۳۳، ۵۶/۶۷، ۷۳/۳۳ و ۹۳/۳۳ درصد و ۹۶ ساعت به‌ترتیب ۳۶/۶۷، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ درصد در مطالعه حاضر محاسبه شد.

غلظت LC_{50} ۹۶h ۰/۰۱ را سطح ایمن و مطمئن برای پرورش آبزیان توصیه می‌کنند که در مطالعه فعلی غلظت ۰/۰۳ میلی‌گرم بر لیتر جهت پرورش لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پیشنهاد می‌گردد. مقاومت ماهی قزل‌آلا در برابر عصاره تنباکو نسبت به سایر گونه‌ها متوسط می‌باشد. با توجه به نتایج آزمایش‌های سمیت عصاره تنباکو روی بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ضمن توصیه به‌کارگیری عصاره آبی تنباکو در غلظت‌های پایین در استخرهای پرورشی براساس یافته‌های این تحقیق غلظت غیرسمی و موثر و مجاز حداکثر ۰/۰۳ میلی‌گرم بر لیتر جهت استفاده استخرهای پرورشی پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از مدیریت مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری یاسوج به‌خاطر فراهم کردن شرایط مورد نیاز کمال تشکر و قدردانی را دارند.

منابع

۱. **بهمنی، م.؛ حسینی، س.ر.؛ آویژگان، م. و قربانی، م.، ۱۳۸۹.** بررسی اثر ضد زالو عصاره متانولی تنباکو(*Nicotina tabacum*) در مقایسه با سوکسینیل و چند داروی ضد انگل. مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد. دوره ۱۲، شماره ۳، صفحات ۵۳ تا ۵۹.

۲. **شریعتی‌فیض‌آبادی، ف.، ۱۳۸۰.** تعیین فنل،۱-نفتول و قارچ‌کش هینوزان بر روی ماهیان سیم، سفید و کپور نقره‌ای. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد. دانشکده علوم و فنون دریایی. دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال. ۱۶۰ صفحه.

۳. **شریف‌پور، ع.؛ سلطانی، م.؛ عبدالحی، ح. و قیومی، ر.، ۱۳۸۱.** اثر بی‌هوش‌کنندگی اسانس گل میخک در شرایط مختلف pH و درجه حرارت در بچه‌ماهی کپور معمولی. مجله علمی شیلات ایران. سال ۱۱، شماره ۴، صفحات ۵۹ تا ۷۴.

۴. **ضرغام، د.؛ شریف‌روحانی، م.؛ فلاحت‌ناصرآباد، ع. و باشتی، ط.، ۱۳۹۱.** بررسی اثر بی‌هوش‌کنندگی عصاره‌های آبی و الکلی تنباکو (*Nicotiana tabacum*) بر ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorchynchus mykiss*). مجله علمی شیلات ایران. سال ۲۱، شماره ۴، صفحات ۳۳ تا ۴۰.

۵. **عبداله‌نژاد، ع.؛ ابراهیمی، ا.؛ جعفری، ن.؛ وحیددستجردی، م. و نورمرادی، ح.، ۱۳۹۲.** تعیین مقدار فلزات سنگین در برخی نمونه‌های پر مصرف سیگار و توتون‌های معطر موجود در بازار ایران. فصلنامهٔ علمی پژوهشی دانشکده بهداشت یزد. سال ۱۲، شماره ۳، صفحات ۱۱۶ تا ۱۲۷.

۶. **ندافی، ک.؛ نبی‌زاده، ر.؛ یونسیان، م.؛ جاهد، غ. و بیکی، ا.، ۱۳۸۵.** استفاده از ماهی قزل‌آلا برای سنجش سمیت ناشی از آرسنیک در آب. مجله آب و فاضلاب. شماره ۵۸، صفحات ۶۲ تا ۶۸.

۷. **Abel, P. and Axiak, V., ۱۹۹۰**. Ecotoxicology and the marine environment.Old University Building Malta. pp: ۱۷-۲۶۹.

۸. **Agbon, A.O.; Omoniyi, I.T. and Teko, A.A., ۲۰۰۲.** Acute toxicity of tobacco (*Nicotiana tobaccum*) leaf dust on *Oreochromis niloticus* and haematological changes resulting from sublethal exposure. Journal of Aquatic Sciences. Vol. ۱۷, No: ۱, pp: ۵-۸.

۹. **Asadi, M.S.; Mirvaghefei, A.R.; Nematollahi, M.A.; Banaee, M. and Ahmadi, K., ۲۰۱۲.** Effects of Watercress (*Nasturtium nasturtium*) extract on selected immunological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Opan Veterinary Journal. Vol. ۲, pp: ۳۲-۳۹.

۱۰. **Ballivet, M.; Alloid, C.; Bertrand, S. and Bertrand, D., ۱۹۹۶.** Nicotine acetylcholine receptors in the nematode caenorhabditis elegans. J Mol Biol. Vol. ۲۵۸, No. ۲, pp: ۹-۲۱.

۱۱. **Banaee, M.; Mirvagefei, R.; Rafei, G. and Majazi Amiri, B., ۲۰۰۸**. Effect of sub-lethal Diazinon Concentrations on Blood Plasma Biochemistry. Int. J. Environ. Res. Vol. ۲, No. ۲, pp: ۱۸۹-۱۹۸.

۱۲. **Banaee, M.; Sureda, A.; Mirvagefei, R. and Ahmadi, A., ۲۰۱۱.** Effect of diazinon on biochemical parameters of blood in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Pesticide Biochemistry and Physiology. Vol. ۹۹, pp: ۱-۶.

۱۳. **Canivet, V. and Chambon, P., ۲۰۰۱.** Toxicity and bioaccumulation of arsenic and chromium in epigean and hypogean freshwater macro invertebrates. J. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. Vol. ۴۰, No. ۳, pp: ۳۴۵-۳۵۴.

۱۴. **Clark, R.B., ۲۰۰۱.** Marine pollution.Oxford University Press, London, ۱۵th (Ed). ۲۳۷ p.

۱۵. **Clesceria, L.S.; Greenberg, A.E. and Eaton, A.D., ۱۹۹۸.** Standard methods for the examination of water and wastewater, APHA, WEF, AWWA. ۲۰th(Ed), Washington, D. C. ۷۴۸ p

۱۶. **Committee on Water Quality Criteria (CWQC). ۱۹۷۲.** A Report of the committee on water Quality Criteria. Ecological Research Series, EPA-R۳-۷۳-۰۰۳, US Environmental Protection Agency Report; CWQC: Cincinnati, OH, USA. ۳۴۲ p.

۱۷. **David, M.; Mushigeri, S.B.; Shivakumar, R. and Philip, G.H., ۲۰۰۳.** Responseof Cyprinus carpio (Linn) to sublethal concentration of cypermethrin: alterationsin protein metabolism profiles Chemosphere. Vol. ۵۶, pp: ۳۴۷-۳۵۲.

۱۸. **Gray, M. Rand., ۱۹۹۵.** Fundamentals of aquatic toxicology. Taylor and Francis Pub. Washington, USA. pp: ۲۸-۲۹.

۱۹. **Hassal, K.A., ۱۹۸۲**. The chemistry of pesticides.Macmillan Press, London, UK. ۳۷۲ p.

۲۰. **Inyang, I.R.; Daka, E.R. and Ogamba, E.D., ۲۰۱۰a.** Changes in electrolyte activities of Clarias gariepinus exposed to diazinon. Biol Environ Sci. J. Trop. Vol. ۷, pp: ۱۹۸-۲۰۰.

۲۱. **Louis, A.H.; Diana, L.W.; Patricia, H. and Elizabeth, R.S., ۱۹۹۶.** Pesticides and Aquatic Animals, Virginia Cooperation Extension. Virginia State University, Virginia. ۲۴ p.

۲۲. **Kazi, T.G.; Jalbani, N.; Arain, M.B.; Jamali, M.K.; Afridi, H.I.; Sarfraz, R.A. and Shah, A.Q., ۲۰۰۹**. Toxic metals distribution in different components of Pakistani and imported cigarettes by electrothermal atomic absorption spectrometer. Journal of hazardous materials. Vol. ۱۶۳, No. ۱, pp: ۳۰۲-۳۰۷.

۲۳. **Konar, S.K., ۱۹۷۰.** Progressive Fish Culturist.Fish Culturist. Vol. ۳۲, pp: ۱۰۳-۱۰۴.

۲۴. **Kori-Siakpere, O. and Oviroh, E.O., ۲۰۱۱**. Acute toxicity of tobacco (*Nicotiana tobaccum*) leaf dust on the African catfish: *Clarias gariepinus* (Burchell, ۱۸۲۲). Archives of Applied Science Research. Vol. ۳, No. ۲, pp: ۱-۷.

۲۵. **Narahashi, T.; Fenester, C.; Quick, M.W.; Laster, R.A.; Marszalec, W.; Aistrup, G.L.; Sattelle, D.B.; Martin, B.R. and Levin, E.D., ۲۰۰۰.** Symposium overiview: mechanism of action of nicotine on neuronal acetylcholine receptors, from molecule to behavior. Toxicol Sci. Vol. ۵۷, No. ۲, pp: ۱۹۳-۲۰۲.

۲۶. **Nemmar, A.; Raza, H.; Subramaniyan, D.; Yasin, J.; John, A.; Ali, B.H. and Kazzam, E.E., ۲۰۱۳.** Short-term systemic effects of nose-only cigarette smoke exposure in mice: Role of oxidative stress. Cell Physiol Biochem. Vol. ۳۱, No. ۱, pp: ۱۵-۲۴.

۲۷. **Neuspiel, D.R.; Markowitz, M. and Drucker, E., ۱۹۹۴.** Intrauterine cocaine, lead, and nicotine exposure and fetal growth.American journal ofpublic health. Vol. ۸۴, No. ۹, pp: ۱۴۹۲-۱۴۹۵.

۲۸. **OECD, ۱۹۹۲.** Guidelines for testing of chemicals. Section ۲: Adopted by the Council on ۱۷th July ۱۹۹۲. Fish acute toxicity test. ۴۱۱ p.

۲۹. **Ovie, K.S.; Bemingho, I.R. and Gbemi, O.M., ۲۰۱۰.** Variations in alanineamino transferase and aspartate aminotransferase activities in African catfish: *Clarias gariepinus* (Burchell, ۱۸۲۲) at different sub lethalconcentrations of potassium permanganate. Scientific Research and Essays. Vol. ۵, No. ۱۲, pp: ۱۵۰۱-۱۵۰۳.

۳۰. **Reed, W.; Birchard, J.; Hopson, A.J.; Jenness, J. and Yaro, I., ۱۹۶۹.** Fish and fisheries of Northern Nigeria.Gaskiya Corporation, Zaria, Nigeria. ۲۲۶ p.

۳۱. **Salehi, P.; Sonboli, A.; Eftekhar, F.; Nejad Ebrahimi, S. and Yousefzadi, M., ۲۰۰۵.** Essential oil composition, antibacterial and antioxidant activity of the oil and various extracts of *Ziziphora clinopodioides* subsp. rigida (Boiss.) Rech. from Iran. Biol. & Pharm.Bull. Vol. ۲۸, No. ۱۰, pp: ۱۸۹۲-۱۸۹۶.

۳۲. **Verma, S.; Yadav, S. and Singh, I., ۲۰۱۰.** Trace metal concentration in different Indian tobacco products and related health implications. Food and Chemical Toxicology. Vol. ۴۸, No. ۸-۹, pp: ۲۲۹۱-۲۲۹۷.