تاثیر سمیت تحت‌کشنده علف‌کش (2،4- D +MCPA) بر برخی شاخص‌های خونی و آنزیم‌های کبدی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

- **پریا اکبری**: گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران
- **فرزاد غیاثی***: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران
- **محسن علی**: گروه بهداشت و بیماری آبزیان، دانشکده دامپزشکی شیراز، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۷

چکیده

این تحقیق به‌منظور بررسی اثر سمیت تحت حاد علف‌کش توفوردی- ام‌پی‌سی‌آ طی مدت زمان ۲ و ۳ هفته، بر برخی شاخص‌های خونی و آنزیم‌های کبدی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) انجام شد. پس از تعیین LC۵۰ سم با استفاده از مدل پروبیت، القای غلظت تحت‌کشنده (یک نهم LC۵۰) علف‌کش ترکیبی توفوردی- ام‌سی‌پی‌آ به‌میزان ۰/۱۱ میلی‌لیتر بر لیتر (معادل ٤٠ میلی‌گرم بر لیتر توفوردی+ ۳۵ میلی‌گرم بر لیتر ام‌سی‌پی‌آ) صورت پذیرفت. نمونه‌های خون از قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی ۹۷ گرم که به‌مدت دو هفته و سه هفته در معرض غلظت تحت‌کشنده علف‌کش توفوردی- ام‌سی‌پی‌آ قرار داشتند و ماهیانی که در معرض علف‌کش نبودند، گرفته شد. نتایج نشان داد که علف‌کش توفوردی- ام‌سی‌پی‌آ موجب تغییرات در پارامترهای خونی و آنزیم‌های کبدی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بعد از دوهفته و سه هفته می‌گردد که این تغییرات در شاخص‌های خونی با کاهش گلبول‌های قرمز، گلیول‌های سفید، نوتروفیل و لنفوسیت در تیمارهایی که ماهیان در معرض غلظت تحت‌کشنده علف‌کش قرار داشت، همراه بود (P<۰/۰۵) کم‌ترین میزان گلبول‌های قرمز خون و بیش‌ترین مونوسیت‌ها، آنزیم‌های کبدی آلانین آمینوترانسفراز و آسپارتات آمینوترانسفراز در تیماری که ماهیان در معرض غلظت تحت‌کشنده علف‌کش به‌مدت سه هفته بودند مشاهده شد (P<۰/۰۵). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که سمیت تحت‌کشنده علف‌کش توفوردی- ام‌سی‌پی‌آ به‌مدت دوهفته و سه هفته، با کاهش گلبول‌های سفید، نوتروفیل و لنفوسیت‌ها می‌تواند منجر به تضعیف فعالیت سیستم ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان گردد و افزایش سطح آنزیم‌های کبدی در سرم خون نیز آسیب‌های ناشی از مواجهه با این سم را نشان می‌دهد.

کلمات کلیدی: توفوردی- ام سی‌پی‌آ، شاخص‌های خونی، علف‌کش، سیستم ایمنی، آنزیم‌های کبدی، قزل‌آلای رنگین‌کمان

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: f.ghiasi@uok.ac.ir

مقدمه

همزمان با رشد روزافزون جمعیت جهان، نیاز به مواد غذایی، به‌ویژه محصولات کشاورزی افزایش یافته است. برای پاسخ‌گویی به این نیاز جهانی، افزایش بازده تولید از طریق بهینه‌سازی روش‌های کاشت و برداشت و مبارزه با آفات محصولات کشاورزی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار شده است (Ashton و Crafts، ۱۹۸۱). آفات محصولات کشاورزی در چهار دسته: علف‌های هرز، قارچ‌ها، حشرات و جوندگان طبقه‌بندی شده‌اند و مواد شیمیایی مورد استفاده برای مقابله با این آفات را آفت‌کش نامیده‌اند. در میان آفت‌های نام برده، کنترل رشد علف‌های هرز، سهم قابل توجهی در افزایش بازده محصولات کشاورزی دارد که درنتیجه آن، مقادیر قابل‌توجهی از این گونه ترکیبات سمی درنتیجه فرآیند شسته‌شدن از سطح خاک و گیاه و زه‌آب به اکوسیستم‌های آبی وارد شده‌اند، که در نهایت منجر به ایجاد آثار زیانباری بر جمعیت گونه‌های آبزی موجود در این اکوسیستم‌ها می‌شوند (حاجی‌شریفی و شکوه‌فر، ۱۳۸۸). یکی از پرمصرف‌ترین سموم علف‌کش در ایران و دنیا توفوردی- امسی‌پی‌آ است (حاجی‌شریفی و شکوه‌فر، ۱۳۸۸؛ Aylward و همکاران، ۲۰۱۰). این سم نوعی علف‌کش هورمونی (اکسین سنتتیک) است که به دو فرم نمک و استر فرموله می‌شود و نیمه عمر آن در محیط فاقد اکسیژن ۳۳۳ روز تخمین زده شده است (Grabinska- Sota و همکاران ۲۰۰۳). در ساختار این علف‌کش ترکیب فنوکسی(Phenoxy) دارای پتانسیل سمیت بالایی برای موجودات زنده مشاهده می‌شود. این ترکیبات، در سال ۱۹۴۰ به‌دنیا معرفی شدند و جزو علف‌کش‌های انتخابی هستند که برای از بین بردن علف‌های هرز پهن برگ به‌کار گرفته می‌شوند (Ware، ۲۰۰۰). براساس آیوپاک بخش توفوردی سم مذکور، دی کلرو فنوکسی استیک اسید است (۲،۴-dicholorophenoxy acetic acid in ammonium salt) و بخش امسی‌پی‌آ (MCPA : 4-chloro -2-methylphenoxy acetic acid) نام‌گذاری می‌شود (Alexander و همکاران ۱۹۸۵). از اثرات مخرب این سم در حیوانات می‌توان به مهار آنزیم‌های تولیدکننده پلی‌آمین جهت سنتز پروتئین، مهار آنزیم‌های میتوکندری به‌منظور تامین انرژی مورد نیاز متابولیسم و مهار سنتز DNA اشاره نمود (Salvo و همکاران ۲۰۱۵). رادیکال‌های آزاد شده از فرآیند متابولیسم این علف‌کش، موجب تخریب غشاء فسفولیپیدی سلول طی فرآیند پراکسیداسیون لیپید شده که در نهایت مرگ سلول را به‌دنبال خواهد داشت هم‌چنین این سم منجر به افزایش ناهنجاری‌های کروموزومی، شکست زنجیره DNA، افزایش ریزهسته‌ک‌های درون‌سلولی و اختلال در چرخه تقسیم سلولی می‌شود(Bukowska، ۲۰۰۶). به‌طورکلی سمیت یک آلاینده از طریق سنجش زیستی ارزیابی می‌گردد که به‌وسیله آن غلظت لازم جهت ایجاد تلفات نیمی از موجودات مورد آزمایش در یک دوره زمانی مشخص (کوتاه مدت و بلندمدت) معلوم می‌شود و وظیفه آن قضاوت درباره توان بالقوه مواد آلاینده و بررسی تاثیرات زیان‌آور این مواد بر اکوسیستم و موجودات زنده در آن می‌باشد (Bahmani و همکاران ۲۰۰۱) مقادیر LC۵۰ گزارش شده سم توفوردی امسی‌پی‌آ طی ۹۶ ساعت با توجه به شرایط محیطی و به‌خصوص دما متغیر است که این مقدار در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ۳۷۷ ppm گزارش شده است (Carpenter و Eaton، ۱۹۸۳). یکی از مهم‌ترین شاخص‌های وضعیت فیزیولوژیک ماهی اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی خون ماهی می‌باشد. ورود آلاینده‌ها در پیکره موجود زنده منجر به تغییر قابل توجه و معنی‌داری از پروفایل بیوشیمیایی خون می‌گردد که بازتابی از ایجاد تغییرات در فرآیند متابولیسم طبیعی بدن موجود است که درنتیجه تشکیل رادیکال‌های آزاد ناشی از فرآیند سم‌زدایی حاصل می‌شود (Edsall، ۱۹۹۹). آنزیم‌های کبدی آلانین آمینوترانسفراز و آسپارتات‌آمینوترانسفراز از شاخص‌های مهم آزمایشگاهی جهت بررسی اختلالات کبدی در موجودات می‌باشند. آنزیم‌های آلانین‌آمینوترانسفراز و آسپارتات آمینوترانسفراز که در ماهیان وجود دارند عضوی از خانواده ترانس آمیناز هستند. این آنزیم‌ها در بافت کبد تغلیظ می‌شوند. مقادیر این آنزیم‌ها در بیماری نکروتیک حاد کبد در اثر تماس با سموم کبدی افزایش می‌یابد (Venkateswara Rao، ۲۰۰۶). از آن‌جایی‌که مقادیر این آنزیم‌ها در حالت طبیعی در داخل سلول بیش‌تر از خارج سلول است، بنابراین افزایش مقادیر جزئی آن‌ها در مایع بین سلولی و پلاسما به‌عنوان شاخص حساس، بیان‌گر وقوع آسیب سلولی در مواجهه با انواع آلاینده‌های وارد شده به بدن موجود زنده می‌باشد (Parma و همکاران ۲۰۰۷). در یک ارزیابی سمی بودن علف‌کش توفوردی امسی پی‌آ در کشت‌اولیه سلول‌های کبدی ماهی *Metynnis roosevelti* نشان داد که حتی غلظت‌های پایین این سم موجب کاهش اکسیژن‌رسانی و ATP پایه مورد نیاز هموستاز سولی شده و استرس اکسیداتیو را نیز به‌دنبال دارد (Salvo و همکاران ۲۰۱۵). هم‌چنین در مطالعه‌ای تاثیر سم توفوردی بر پارامترهای هماتولوژیک ماهی *Channa punctatus* موجب کاهش چشم‌گیر در مقدار گلبول قرمز کل و هموگلوبین شد که به‌صورت کاهش وابسته به دوز سم مذکور نشان داده شد. ازطرفی از نتایج دیگر این مطالعه افزایش شمار کل گلبول‌های سفید متناسب با افزایش غلظت سم مذکور بود(kumar و همکاران ۲۰۱۶). باتوجه به مصرف بالای سم توفوردی- امسی‌پی‌آ و اهمیت قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌عنوان یکی از گونه‌های ماهیان پرورشی و حساس به آلاینده‌ها در ایران، این تحقیق، به بررسی تاثیر سمیت حاد علف‌کش توفوردی امسی‌پی‌آ بر شاخص‌های خونی و آنزیم‌های کبدی در قزل‌آلای رنگین کمان در طی مدت ۲ و ۳ هفته پرداخته است.

مواد و روش‌ها

تعیین غلظت تحت‌کشنده: تعداد ۱۸۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی ۹۷ گرم از یکی از مزارع پرورش ماهی در استان کردستان تهیه شدو به آکواریوم‌های آزمایشگاه گروه شیلات در دانشکده منابع طبیعی دانشگاه کردستان انتقال داده شدند جهت تعیین LC۵۰ علف‌کش توفوردی- ام‌سی‌پی‌آ به شیوه آزمون و خطا تعداد ۷۲ قطعه ماهی در شش گروه و شرایط کاملاً یکسان در آکواریوم‌های ۱۴۰ لیترکه هر کدام دارای ۱۲ قطعه ماهی بودند در طی مدت ۹۶ ساعت تحت تاثیر مقادیر مختلف علف‌کش توفوردی ام‌سی‌پی‌آ ۶۷/۵ درصد(۰، ۲۲/۵، ۴۵، ۹۰، ۱۸۰، ۳۶۰و ۷۲۰ میلی‌گرم بر لیتر) قرار گرفتند و سپس با استفاده از مدل پروبیت، میزان LC۵۰ سم پس از ۹۶ ساعت به‌دست آمد (Finney و Stevens، ۱۹۸۴).

طراحی آزمایش و شرایط نگه‌داری: پس‌از تعیین LC۵۰ سم، جهت بررسی اثرات تحت‌کشنده سم بر فاکتورهای خونی و آنزیم‌های کبدی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، تعداد ۱۰۸ قطعه ماهی باقی‌مانده به‌طور تصادفی در سه گروه مساوی شاهد و تیمار با سه تکرار تقسیم شدند، به‌طوری‌که هر ۱۲ قطعه ماهی به‌طور تصادفی در ۹ آکواریوم ۱۴۰ لیتر تیماربندی شدند. آکواریوم‌ها با آب چاه حاوی ۸ میلی‌گرم بر لیتراکسیژن محلول، pH ۸/۳، سختی کل ۲۰۵ برحسب CaCO3، قلیائیت ۱۹۵ میلی‌گرم بر لیتر و درجه حرارت ۱۲ درجه سانتی‌گراد آبگیری شدند. ماهیان گروه اول (گروه شاهد) در آب عاری از سم نگه‌داری شدند. درحالی‌که دو گروه دیگر (تیمار اول به‌مدت دو هفته و تیمار دوم به‌مدت سه هفته) در معرض ۰/۱۱ میلی‌لیتر برلیتر از سم توفوردی ام‌سی‌پی‌آ ۶۷/۵ درصد (مقدار تحت‌کشنده معادل یک نهم LC۵۰ درنظر گرفته شد): شامل ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر سم توفوردی و ۳۵ میلی‌گرم بر لیتر ام‌سی‌پی‌آ قرار گرفتند. لازم به‌ذکر است که هر میلی‌گرم از سم مذکور معادل ۳۶۰ میلی‌گرم بر لیتر توفوردی و ۳۱۵ میلی‌گرم بر لیتر ام‌سی‌پی‌آ می‌باشد. به‌منظور هوادهی و نیاز اکسیژن ماهی‌ها به هر یک از مخزن‌ها یک سنگ هوا که به منبع هواده متصل بود نصب گردید. گروه‌های مورد استفاده در تحقیق حاضر با غذای تجاری مخصوص قزل‌آلای رنگین‌کمان (کارخانه بیضاء شیراز) تغذیه شدندمقدار غذای‌روزانه باتوجه به درصدوزن بدن (توده زنده) محاسبه شد و در نوبت صبح و عصر در حد سیری در اختیار ماهیان قرار گرفت. عمل سیفون کردن به‌صورت یک روز در میان انجام و باقی‌مانده غذایی و مدفوع ماهی‌ها از مخازن خارج گردید. هم‌چنین روزانه به‌میزان ۱۰درصد تعویض آب صورت می‌گرفت.

خونگیری: خونگیری ازگروه شاهد و تیمارها در پایان هفته سوم از ورید ساقه دمی (۶ قطعه ماهی از هر تیمار) با سرنگ و سر سوزن نمره ۲۰ انجام شد. بخشی از نمونه در لوله‌های ۱/۵ میلی‌لیترحاوی ماده ضدانعقاد هپارین برای مطالعات خون‌شناسی وبقیه‌خون‌فاقدهپارین برای تهیه سرم و مطالعات آنزیمی‌مورد استفاده گرفت. سرم‌های جدا شده با استفاده از سانتریفوژ دور g ۱۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه‌تا زمان‌اندازه‌گیری‌آنزیم‌در دمای ۲۰- درجه‌سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

روش‌های‌خون‌شناسی‌و اندازه‌گیری آنزیم‌های‌سرمی: جهت شمارش گلبول‌های سفید و شمارش تفریقی گلبول‌های سفید از روش Svobodova و همکاران (۲۰۰۸) و جهت شمارش تعداد گلبول قرمز و هماتوکریت از روش Schaperclaus و همکاران (۱۹۹۱) استفاده شد. آنزیم‌های سرمی آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آسپارتات آمینو ترانسفراز (AST) با دستگاه اتوآنالایزر BT ۱۵۰۰ ساخت کشور ایتالیا براساس دستورالعمل کشور سازنده دستگاه اندازه‌گیری شدند.

تجزیه و تحلیل آماری: پس از حصول اطمینان از نرمال بودن داده‌هااز آزمون کالموگراف‌اسمیرنف،تجزیه داده‌ها با استفاده از آزمون One Way Anova در سطح معنی‌دار ۵ درصد، مقایسه بین میانگین داده‌ها از تست دانکن و به‌کمک نرم‌افزار آماری SPSS ۱۶ انجام شد. برای تعیین LC۵۰ از نرم‌افزار Probit analysis استفاده شد. داده‌های مربوط به آنالیزهای‌مختلف به‌صورت میانگین ±انحراف معیار بیان شده است.ابتدا سمیت حاد براساس میزان LC۵۰سم توفوردی ام‌سی‌پی‌آ با استفاده از برنامه آماری تجزیه پروبیت در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت ثبت و محاسبه شد. به‌عبارتی دیگر ابتدا درصد مرگ و میر ماهیان نسبت به شاهد محاسبه شد و از جدول پروبیت عدد مربوطه استخراج شد (Finney و Stevens، ۱۹۴۸).

نتایج

درطی دو و سه هفته مجاورت ماهیان در معرض ۰/۱۱ میلی‌لیتر بر لیتر سم توفوردی- ام‌سی‌پی‌آ، هیچ‌گونه تلفاتی در گروه‌های تیمار شده با سم و شاهد مشاهده نشد.ولی تغییرات رفتاری ازجمله بی‌قراری و شنا در سطح آب، شنای غیرعادی، حرکات تند و به‌هم‌خوردن تعادل و بی‌اشتهایی در ماهی‌های در معرض سم مشاهده شد. نتایج حاصل ازاندازه‌گیری‌شاخص‌های‌خونی‌وآنزیم‌های‌کبدی‌ماهی‌قزل‌آلای‌رنگین کمان‌نشان‌داد‌که مقادیر شاخص‌های‌خونی گلبول قرمز، گلبول‌های سفید، نوتروفیل و لنفوسیت در تیمارهای هفته دوم و سوم نسبت به گروه‌شاهدبه‌طور معنی‌داری کم‌تر بودند ($P<0/05$). درحالی‌که مقادیر مونوسیت و آنزیم‌های کبدی آلانین آمینو ترانسفراز و آسپارتات آمینو ترانسفراز در گروه ماهیان در معرض غلظت تحت‌کشنده علف‌کش توفوردی ام‌سی‌پی‌آ به‌مدت دو و سه هفته نسبت به گروه شاهد به‌طور

معنی‌داری بالاتر بودند (P<۰/۰۵). تغییر در تعداد بازوفیل در بین گروه‌های تیمار با شاهد معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). بیش‌ترین میزان آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفرازو آسپارتات آمینوترانسفراز در گروهی مشاهده شد که به‌مدت سه هفته در معرض تحت‌کشنده سم توفوردی ام‌سی‌پی‌آ قرار داشتند به‌طوری‌که این میزان دارای اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد و تیمار دو هفته مواجه‌سازی با سم بود (P<۰/۰۵). کم‌ترین میزان گلبول قرمز و هماتوکریت متعلق به تیمار سه هفته مواجه‌سازی با سم بودکه اختلاف معنی‌داری را با تیمار دو هفته مواجه سازی با سم و گروه شاهد نشان داد (P<۰/۰۵) (جدول ۱). به‌طورکلی نتایج مطالعه حاضر جهت بررسی تاثیر مدت زمان آزمایش بر سمیت علف‌کش توفوردی ام‌سی‌پی‌آ نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار پارامترهای مورد سنجش با گذشت دو و سه هفته پس از شروع آزمایش است. به عبارتی دیگر ارتباط مستقیمی بین افزایش طول دوره مواجهه با کاهش مقادیر برخی شاخص‌های خونی و افزایش سطح هر دو آنزیم کبدی در نتایج به‌دست آمده مشاهده شد.

جدول ۱: شاخص‌های خونی و آنزیم‌های کبدی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان گروه شاهد و در معرض غلظت تحت‌کشنده ۰/۱۱ میلی‌لیتر بر لیتر علف‌کش توفوردی- ام‌سی‌پی‌آ پس از طی مدت دو و سه هفته

شاخص‌ها	تیمار	شاهد	دو هفته مواجهه سازی با سم	سه هفته مواجهه سازی با سم
گلبول قرمز		۱/۴۴×۱۰^۶ a	۹/۶۰×۱۰^۵ b	۶/۲۴×۱۰^۵ c
هماتوکریت		۳۶/۰۸ a	۳۰/۸۱ a	۲۰/۳۸ b
گلبول سفید		۶۲۲۰۰±۸۵۹۹ a	۲۶۸۶۰±۵۰۶۷ b	۲۱۷۶۹±۹۶۲۶ b
لنفوسیت		۸۰±۱/۵۸ a	۳۹/۲۰±۵/۳۵ c	۴۹±۴/۰۶ b
مونوسیت		۸/۸۰±۱/۴۸ c	۴۱±۶/۲۶ a	۳۶±۳/۳۹ b
نوتروفیل		۱۸/۲±۱/۹۲ a	۱۲/۴۰±۱/۳۴ b	۱۲/۲۰±۱/۴۸ b
بازوفیل		۳/۲۰±۰/۸۳ a	۳±۱/۲۲ a	۳/۴±۱/۱۴ a
آلانین آمینوترانسفراز (واحد بر لیتر)		۲۳/۲۲± ۰/۱۳ c	۵۱/ ۶۶ ±۰/۶۵ b	۱۸۰/۲۰±۰/۸۴ a
آسپارتات آمینوترانسفراز (واحد بر لیتر)		۱۰۸/۲۰± ۰/۷ c	۱۷۶/۸۵ ±۰/۵۵ b	۲۲۴/۸۰±۰/۵۲ a

حروف نامشابه در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد (P<۰/۰۵).

بحث

با این‌که در هر دو تیمار ۲ و ۳ هفته نسبت به شاهد به‌طور معنی‌داری کم‌تر بودند ولی نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که با افزایش مدت مجاورت ماهی با مقدار تحت‌کشنده سم توفوردی ام‌سی‌پی‌آ (۳هفته)، تعداد گلبول‌های قرمز، گلبول‌های سفید، نوتروفیل و هماتوکریت نسبت به‌گروه شاهد کاهش یافتند. این امرنشان می‌دهد که ماهیان در معرض قرار گرفته، دچار آنمی (Anemia) شده و مسلماً بیانگر تاثیر مخرب سم توفوردی ام‌پی‌سی‌آ بر ظرفیت حمل اکسیژن خون است که‌باعث می‌شود ماهی نتواند انتقال اکسیژن را به‌خوبی انجام دهد. هم‌چنین ثابت شده است که مواد حشره‌کش و علف‌کش‌های مورد استفاده در کشاورزی باعث آسیب به هموگلوبین و کاهش موثر درمقادیر اریتروسیت‌ها می‌گردندکه‌با افزایش‌طول‌زمان مواجهه باعث آنمی می‌شود (Federal Insecticide USA، ۲۰۰۳). طی یک مطالعه اثر مقدار حاد علف‌کش ۲و۴-دی کلروفنوکسی استیک اسید (۲،۴-D) به‌میزان ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر بر گونه ماهی *Tinca tinca* موجب کاهش معنی‌دار درصد هماتوکریت و سطح هموگلوبین بعد از گذشت ۱۲ روز مواجهه نسبت به گروه شاهد شد(Gomez و همکاران، ۱۹۹۸). نتایج‌این مطالعه با تحقیق انجام شده توسط نفیسی‌بهابادی و همکاران (۱۳۹۵) مطابقت داشت آن‌ها گزارش کردند که غلظت تحت‌کشنده سم بوتاکلرو که از پر مصرف‌ترین علف‌کش‌ها بوده و هم‌چون توفوردی ام‌سی‌پی‌آ و برای از بین بردن علف‌های هرز پهن برگ به‌کار می‌رود طی‌مدت۶ روز مقادیر گلبول‌های سفید، گلبول‌های قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین درماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان کاهش‌یافتند.ازطرف دیگر (Hymavathi و Rao، ۲۰۰۰) گزارش کردند که تعداد گلبول‌های سفید درمواجهه با آلاینده‌های محیطی به‌دلیل تحریک‌سیستم دفاعی ایمنی بدن افزایش می‌یابد و افزایش تعداد گلبول‌های قرمز به‌دلیل ایجاد مسمومیت به‌منظور رفع نقصان اکسیژن‌رسانی در اثر آسیب به آبشش و آزاد شدن آن‌ها از محل ذخیره خود در خون می‌باشد (Faree و همکاران، ۲۰۰۹). علت تناقض نتایج این تحقیق با موارد گزارش شده فوق را می‌توان به تخریب گلبول‌های خونی تولید شده و یا آسیب‌های اندام‌های تولیدکننده‌آن‌ها مانند کبد و طحال در اثر مجاورت

با غلظت تحت‌کشنده سم توفوردی ام‌سی‌پی‌آ در مدت ۲ هفته و سه هفته نسبت داد (Shah و Altindag، ۲۰۰۴). نتایج مطالعه حاضر با یافته‌های به‌دست‌آمده از سم کشاورزی دیازینون بر پاسخ‌های بیوشیمیایی خون ماهی کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*) (Banaee و همکاران، ۲۰۰۸) و سم تری کلروفون بر پاسخ‌های ایمنی ماهی کپورمعمولی (Siwicki و همکاران، ۱۹۹۰) مطابقت دارد. طی مطالعه دیگری گزارش کردند که اثر مستقیم سم بر اندام‌های داخلی منجر به تخریب فرآیندهای خون‌سازی همانند تجزیه گلبول‌ها می‌شود (Ololade و Oginni، ۲۰۱۰). هم‌چنین تجمع گلبول‌های قرمز در آبشش ماهیان در هنگام بروز استرس ناشی از حضور آلاینده‌ها منجر به کاهش تعداد گلبول‌های قرمز در خون می‌گردد. در مطالعه دیگری تاثیر مالاتیون بر گونه *Cyprininon wabosoni* بررسی شد و نتایج نشان داد که سموم ارگانوفسفره موجب تغییراتی در بدن ماهی می‌شوند که باعث کاهش فعالیت بافت خون‌ساز اولیه و درنتیجه سبب کم‌خونی در ماهی می‌شود (Khattak و Hafeezn، ۱۹۹۶). هم‌چنین، در طی شمارش افتراقی گلبول‌های سفید، مقادیر میانگین لنفوسیت‌ها از ۸۰ در گروه شاهد به ۳۹/۲۰ در تیمارهفته دوم و ۴۹ در تیمار هفته سوم و تعداد نوتروفیل‌ها از ۱۸/۲ در گروه شاهد به ۱۲/۲۰ در تیمار هفته سوم تنزل کرده است . این کاهش در شمار تعداد لکوسیت ها و نوتروفیل بترتیب می‌تواند نشان دهنده ایجاد عوارض لکوپنی (Leukopenia) و نوتروپنی(Neutropenia) طی مواجهه با سم مذکور بوده و منجر به تضعیف سیستم ایمنی ماهی گردد. علی و همکاران(۱۳۹۳) نشان دادند که میانگین تعداد نوتروفیل در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در گروه شاهد و گروه تیمار شده با این سم در غلظت حاد به‌ترتیب برابر با ۷/۶۶ و ۸/۴۳ بود، که نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین این دو گروه بود و می‌توان گفت که غلظت حاد این سم در این مطالعه، تاثیری بر تعداد نوتروفیل‌ها نداشته است. حال‌که Verschuuren و همکاران(۱۹۷۵) نشان دادند که در مدت زمان کوتاهی پس از قرار گرفتن موش Wistar در مجاورت علف‌کش Mecoprop(MCPP) که همانند توفوردی دارای ساختار کلروفنوکسی است تعداد نوتروفیل کاهش یافت که با نتایج حاصل از این تحقیق هم‌خوانی داشت مقادیر مونوسیت در این تحقیق از میزان ۸/۸۰ در گروه شاهد به ۴۱ در تیمار هفته دوم و ۳۶ در تیمار هفته سوم افزایش معنی‌داری داشته است. هم‌چنین علی و همکاران (۱۳۹۳) با بررسی مقادیر حاد علف‌کش ترکیبی (۲و۴ دی کلروفنوکسی استیک اسید و ۲ متیل ۴ کلرو فنوکسی استیک اسید) بر فاکتورهای خونی نشان دادند که مقادیر شاخص خونی شامل لوکوسیت، مونوسیت و ائوزینوفیل در گروه تحت تیمار به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد افزایش یافت درحالی‌که مقادیر لنفوسیت در مقایسه با گروه شاهد کاهش قابل ملاحظه‌ای داشت. با توجه به نتایج مطالعه حاضر، میانگین تعداد بازوفیل‌ها در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در گروه شاهد و تیمارهای هفته دوم و سوم اختلاف معنی‌داری را نشان ندادند که با نتایج حاصل از تحقیق مدرسی و سیف (۱۳۹۰) هم‌خوانی داشت. آن‌ها نشان دادند که سم آندوسولفان منجر به کاهش معنی‌دار لنفوسیت‌ها در مقایسه با گروه شاهد گردید درحالی‌که تغییری در تعداد بازوفیل در مقایسه با گروه شاهد ایجاد نکرد. دلایل کاهش لنفوسیت‌ها در این تحقیق را می‌توان به اثرات زیان‌آور سم توفوردی ام‌پی‌سی‌آ بر گره‌های لنفاوی و غده تیموس نسبت داد. هم‌چنین این سم منجر به سرکوب سیستم ایمنی بدن ماهی‌های تحت تیمار شده و اثرات ناشی از کاهش لنفوسیت‌ها که به نوعی لنفوپنی یا لنفوسیتوپنی (Lymphocytopenia)نیز از آن یاد می‌شود را به همراه دارد. در مطالعه حاضر، مقادیر میانگین مونوسیت‌ها و آنزیم کبدی آلانین آمینوترانسفراز و آسپارتات آمینو ترانسفراز در تیمارهای مجاورت داده شده با سم توفوردی ام‌پی‌سی‌آ در هفته دو و سوم افزایش معنی‌داری را در مقایسه با گروه شاهد نشان دادند، شموشکی و همکاران (۱۳۹۱) گزارش کردند که تاثیر مقادیر تحت‌کشنده سم دیازینون بر روی ماهی سفید (*Rutilus frisii*) تحت تیمار، می‌تواند موجب افزایش آنزیم‌های کبدی آسپارتات آمینو ترانسفراز و آلکالین فسفاتاز گردد درحالی‌که مقادیر این آنزیم‌ها در ماهی کپور (*Cyprinus carpio*) و فیل‌ماهی (*Huso huso*) در مجاورت با غلظت تحت‌کشنده سم دیازینون کاهش یافتند که با نتایج حاصل از این تحقیق هم‌خوانی نداشت. می‌توان گفت که آسپارتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز مهم‌ترین آنزیم‌های گروه ترانس آمینازها هستند که با انتقال واحدهای آمین، آلفاکتواسید را به آمینو اسیدها کاتالیز می‌کنند. این آنزیم‌ها به‌طور عمده در سلول‌های کبد یافت می‌شوند و به‌مقدار کم‌تری در قلب، کلیه‌ها و عضلات اسکلتی حضور دارند. هر گونه آسیب یا نکروز سلول‌های کبد موجب افزایش ترشح این آنزیم‌ها و وارد شدن آن‌ها به پلاسما می‌گردد. از این‌رو افزایش سطح فعالیت این آنزیم‌ها در پلاسما حاکی از آسیب‌های بافتی به‌ویژه کبد باشد (Venkateswara Rao، ۲۰۰۶). هم‌چنین ازجمله پارامترهای موثر در مسمومیت آبزیان می‌توان به فاکتور زمان اشاره کرد. در مطالعه حاضر نیز تاثیر مدت زمان آزمایش بر سمیت توفوردی ام‌سی‌پی‌آ برای تمامی پارامترهای مورد بررسی به‌جز بازوفیل اختلاف معنی‌داری با شاهد را نشان داد. به‌طوری‌که در یک غلظت ثابت از سم مذکور با افزایش مدت مواجهه، کاهش گلبول قرمز، هماتوکریت، گلبول‌های سفید، نوتروفیل و لنفوسیت مشاهده شد. از طرفی میزان دو آنزیم کبدی آلانین آمینوترانسفراز و آسپارتات آمینوترانسفراز با افزایش طول دوره مواجهه نسبت به گروه شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. پژوهش‌ها نشان می‌دهند با افزایش طول دوره مواجهه ماهیان با سموم در یک غلظت ثابت، سم فرصت بیش‌تری برای تاثیر

گذاری بر مکانیسم‌های حیاتی و اندام هدف ماهی را خواهد داشت و از سوی دیگر مقاومت ماهیان تحت تیمار برای حفظ هموستاز بدن تحلیل رفته و دستخوش تغییرات نامطلوب برای ادامه حیات خواهد شد (شریف‌پور و همکاران، ۱۳۸۲). در مطالعه حاضر، تغییرات رفتاری ماهیان در معرض غلظت تحت‌کشنده سم توفوردی ام‌سی‌پی‌آ مشابه تغییرات رفتاری مشاهده شده در لابستر (*Astacus leptodactylus*) در مجاورت با غلظت تحت‌کشنده سم مذکور و تغییرات رفتاری مشاهده شده بر رفتار کپورمعمولی ناشی از مواجهه با سمیت حاد علف‌کش ۲و۴- دی‌کلروفنوکسی‌استیک‌اسید بود که می‌توان به شنای چرخشی، حرکات جهشی، پرش به بیرون آب و حرکاتی مشابه به علائم کمبود اکسیژن در آب اشاره نمود (Sarikaya و Yılmaz، ۲۰۰۳). هم‌چنین می‌توان گفت که عواملی نظیر سن، گونه ماهی، کیفیت آب، ساختار شیمیایی سم و ویژگی‌های محیطی (دما و فصل) بر اثرات ناشی از مواجهه با این سم تاثیرگذار است (Neskovid و همکاران ۱۹۹۴). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که سمیت تحت‌کشنده علف‌کش توفوردی- ام‌سی‌پی‌آ در هفته دوم و سوم می‌تواند بر وضعیت سلامت و ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تاثیرگذار باشد چرا که با کاهش گلبول‌های قرمز، هماتوکریت، گلبول‌های سفید، توتروفیل و لنفوسیت‌ها می‌تواند منجر به تضعیف سیستم ایمنی ماهی شود و از طرف دیگر افزایش میزان آنزیم‌های کبدی نظیر آلانین آمیتوترانسفراز و آسپارتات آمینوترانسفراز احتمالاً به‌دلیل اثرات مخرب سم بر بافت کبد و تخریب آن است. از سوی دیگر افزایش طول دوره مواجهه با سم مذکور کاهش شمار کل گلبول‌های قرمز، سفید، درصد هماتوکریت و لنفوسیت‌ها را به‌دنبال داشت که به‌نظر می‌رسد ناشی از آسیب به اندام‌های خون‌ساز است که به‌تدریج دچار اختلال عملکرد شده‌اند. از طرف دیگر با ورود تدریجی علف‌کش مذکور به سیستم گردش خون و فعال شدن مکانیسم سم‌زدایی کبد، سطح دو آنزیم ALT و AST شاخص کبدی به‌ترتیب در هفته‌ای دوم و سوم افزایش می‌یابد که احتمالاً به‌دلیل آزاد شدن این آنزیم‌ها از میتوکندری هپاتوسیت‌های کبدی است. به‌عبارتی دیگر هرگونه آسیب خفیف، التهاب یا نکروز سلول‌های کبد موجب آزاد شدن این آنزیم‌ها و افزایش سطح آن در پلاسما خواهد شد.

به‌طورکلی یافته‌های به‌دست آمده از پژوهش حاضر اهمیت جلوگیری از ورود این گونه علف‌کش را به اکوسیستم آبی را نشان می‌دهد. از آن‌جایی که میزان سمیت این دسته از علف‌کش‌ها بستگی به گونه ماهی، دمای آب و وزن ماهی دارد، این موضوع نیاز به مطالعات بیش‌تر و بررسی اثرات پاتولوژیک سم بر روی اندام‌های حیاتی ماهی دارد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از همکاری وحمایت گروه شیلات، مدیریت محترم گروه و کارشناس آزمایشگاه دانشکده منابع طبیعی دانشگاه کردستان تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

۱. **حاجی‌شریفی، غ.م. و شکوه‌فر، ع.، ۱۳۸۸.** جایگزینی علف‌کش‌های نیشکری به‌منظور کاهش مصرف سموم شیمیایی و استفاده بهینه از نهادهای کشاورزی در مزارع نیشکر استان خوزستان. فصلنامه علمی تخصصی فیزیولوژی گیاهان زراعی. دوره ۱، شماره ۱، صفحات ۴۹ تا ۵۷.

۲. **شریف‌پور، ع.؛ سلطانی، م. و جوادی، م.، ۱۳۸۲.** تعیین LC۵۰ و ضایعات بافتی ناشی از سم آندوسولفان در بچه فیل‌ماهی (*Huso huso*). مجله علمی شیلات ایران. دوره ۱۲، شماره ۴، صفحات ۶۹ تا ۸۴.

۳. **شموشکی، م.م.ن.؛ سلطانی، م.؛ شریف‌پور، ع. و ایمانپور، م.، ۱۳۹۱.** بررسی اثر غلظت‌های تحت‌کشنده سم دیازینون بر فعالیت برخی آنزیم‌های سرمی مولدین نر ماهی سفید. مجله دامپزشکی ایران. دوره ۸، شماره ۴، صفحات ۹۴ تا ۱۰۱.

۴. **علی، م.؛ غیاثی، ف. و بدخشان، ه.، ۱۳۹۳.** بررسی اثر مقدار حاد علف‌کش ترکیبی (dichlorophenoxyacetic acid -۴و۲) و (۲-Methyl -۴- chlorophenoxyacetic acid) بر فاکتورهای خونی و آنزیم-های کبدی ALT و AST قزل‌آلای رنگین‌کمان Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). مجله سلامت و محیط. دوره ۷ ، شماره ۱، صفحات ۹۵ تا ۱۰۴.

۵. **مدرسی، م. و سیف، م.ر.، ۱۳۹۰** . بررسی تاثیر سم ارگانوکلره آندوسولفان بر پارامترهای خونی در موش صحرایی. مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد. دوره ۱۳، شماره ۲، صفحات ۲۶ تا ۳۱.

۶. **نفیسی‌بهابادی، م.؛ دادگر، ش.؛ لکزایی، ف.؛ مهاجری برازجانی، ژ. و عبدالهی، ر. ۱۳۹۵.** تأثیر غلظت‌های تحت حاد علفکش بوتاکلر بر برخی پارامترهای خونی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان(*Oncorhynchus mykiss*) . مجله علمی شیلات ایران. دوره ۲۵، شماره ۲، صفحات ۱۵۱ تا ۱۶۲.

۷. **Alexander, H.; Gersich, F. and Mayes, M., 1985.** Acute toxicity of four phenoxy herbicides to aquatic organisms**.** Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. Vol. 35, No. 1, pp: 314-321.

۸. **Ashton, F.M. and Craft, A.S., 1981.** The mechanism of action of herbicides, Mode of action of herbicides. 2nd ed. John Wiley & Sons, New York. 525 P.

۹. **Aylward, L.L.; Morgan, M.K.; Arbuckle, T.E.; Barr, D.B.; Burns, C.J. and Alexander, B.H., 2010.** Biomonitoring data for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in the United States and Canada: interpretation in a public health risk assessment context using Biomonitoring Equivalents. Environmental Health Perspectives. Vol. 118, No. 2, pp: 177-1781.

۱۰. **Bahmani, M.; Kazemi, R. and Donskaya, P., 2001.** A comparative study of some hematological features in young reared sturgeons (*Acipenser persicus* and *Huso huso*). Fish Physiology and Biochemistry. Vol. 24, pp: 135-140.

۱۱. **Banaee, M.; Mirvagefei, A.R.; Rafei, G.R. and Majazi Amiri, B. 2008.** Effect of sub-lethal diazinon concentration on blood plasma biochemistry. International Journal of Environmental Research. Vol. 2, No. 2, pp:189-198.

۱۲. **Bukowska, B., 2006.** Toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid molecular mechanisms. Polish Journal of Environmental Studie. Vol. 115, No. 3, pp: 365-374.

۱۳. **Çaglan, A.; Benli, K.; Sarıkaya, R.; Sepici-Dincel, A.; Selvi, M.; Şahin, D. and Erkoç, F., 2007.** Investigation of acute toxicity of (2,4-dichlorophenoxy) acetic acid (2,4-D) herbicide on crayfish (***Astacus leptodactylus*** Esch. 1823) Pesticide Biochemistry and Physiology. Vol. 88, No. 3, pp: 296-299.

۱۴. **Carpenter, L.A. and Eaton, D.L., 1983.** The Disposition of 2,٤-Dichlorophenoxyacetic Acid in Rainbow Trout. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. Vol. 12, No. 2, pp: 169-173.

۱۵. **Edsall, C.C., 1999.** A blood chemistry profile for lake trout . Journal of Aquatic Animal Health. Vol. 11, No. 1, pp: 81-86.

۱۶. **Farre, M.; Gajda-Schrantz, K.; Kantiani, L. and Barceló, D., 2009.** Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment. Analytical and Bioanalytical Chemistry. Vol. 393, No. 1, pp: 81-95.

۱۷. **Federal Insecticide (USA). 2003.** Fungicide and rodenticide act. Environ Protect. Vol. 23, pp: 59-61.

۱۸. **Finney, D.J. and Stevens, W.L., 1948.** A table for the calculation of working probits and weights in probit analysis. Biometrika. Vol. 35, No. 1-2, pp: 191-201.

۱۹. **Gomez, L.; Masot, J.; Martinez, S.; Duran, E.; Soler, F. and Roncero, V., 1998.** Acute 2,4-D poisoning in tench (*Tinca tinca* L.) lesions in the hematopoietic porton of kidney. Arch. Environ. Comtam. Toxicol. Vol. 35, pp: 479-483.

۲۰. **Grabinska-Sota, E.; Wiśniowska, E. and Kalka, J., 2003.** Toxicity of selected synthetic auxins-2, 4-D and MCPA derivatives to broad-leaved and cereal plants. Crop Protection. Vol. 22, No. 2, pp: 355-60.

۲۱. **Hymavathi, V. and Rao, L.M., 2000.** Effect of sublethal concentration of lead on the Haematology and Biochemical Constituents of Channa *punctatus*. Bulletin of Pure and Applied Sciences. Vol. 19, pp: 1-5.

۲۲. **khattak, I.U.D. and Hafeez, M.A., 1996.** Effect of malathionon blood parameters of fish Cyprinion watsoni pak. Journal of Zoology. Vol. 28, pp: 45-49.

۲۳. **Kumar, P.; Kumar Gupta, Y. and Pandey D., 2016.** Effect of pesticides 2, 4-on hematological parameters of *channa punctatus*. International Journal of Biological Research. Vol. 4, No. 2, pp: 245-248.

۲۴. **Neskovid, N.K.; Karan, V.; Elezovic, I.; Poleksić, V. and Budimir, M., 1994.** Toxic effects of 2, 4-D herbicide on fish. Journal of Environmental Science & Health Part B. Vol. 29, No. 2, pp: 265-79.

۲۵. **Ololade, I.A. and Oginni, O., 2010.** Toxic stress and hematological effects of nickel on African catfish, *Clarias gariepinus*, Fingerlings. Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology. Vol. 2, No. 2, pp: 14-19.

۲۶. **Parma, M.J.; Loteste, A.; Campana, M. and Bacchetta, C., 2007.** Changes of hematological parameters in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae) exposed to sublethal concentration of cypermethrin. Journal of Environmental Biology. Vol. 28, No. 1, pp: 147-149.

۲۷. **Salvo, L.M.; Malucelli, M.I.C.; Dasiliva, J.R.C.; Alberton, G.C. and Silva DeAssis, H.C., 2015.** Toxicity assessment of 2,4-D and MCPA herbiurnal of Envicides in primary culture of fish hepatic cells. Journal of Environmental Science and Health, Part B. Vol. 50, pp: 449-455.

۲۸. **Sarikaya, R. and Yılmaz, M., 2003.** Investigation of acute toxicity and the effect of 2, 4-D (2, 4-dichlorophenoxyacetic acid) herbicide on the behavior of the common carp (*Cyprinus carpio*) L., 1758; Pisces, Cyprinidae. Chemosphere. Vol. 52, No. 1, pp: 195-201.

۲۹. **Schaperclaus, W.; Kulow, H. and Schreckenbach, K., 1991.** Hematological and serological technique. In: Fish Disease. Kothekar, V.S. (ed.) (2 nd ed.). Connaught circus, Gulab primlani, Oxonian press. New Delhi, India. pp: 71-108.

۳۰. **Shah, S.L. and Altindag, A., 2004.** Hematological parameters of tench (*Tinca tinca* L.) after acute and chronic exposure to lethal and sublethal mercury treatments. Bulletin

of Environmental Contamination and Toxicology. Vol. 73, No. 5, pp: 911-918.

۳۱. **Siwicki, A.K.; Cossarini-Dunier, M.; Studnicka, M. and Demael, A., 1990.** In vivo effect of the organophosphorus insecticide trichlorphon on immune response of carp (*Cyprinus carpio*). II. Effect of high doses of trichlorphon on nonspecific immune response. Ecotoxicology and Environmental Safety. Vol. 19, No. 1, pp: 99-105.

۳۲. **Svobodova, Z.; Kroupova, H.; Modra, M.; Flajshans, T.; Randak, T. and Savina, LV., 2008.** Haematological profile of common carp spawners of various breeds. Journal of Applied Ichthyology. Vol. 24, No. 1, pp: 55-59.

۳۳. **Venkateswara Rao, J., 2006.** Toxic effects of novel organophosphorus insecticide (RPR-V) on certain biochemical parameters of euryhaline fish ,*Oreochromis mossambicus*. Pesticide Biochemistryand Physiology. Vol, 86, pp: 78-84.

۳۴. **Verschuuren, H.G.; Kroes, R. and Den Tonkelaar, E.M., 1975**. Short-term oral and dermal toxicity of MCPA and MCPP. Toxicology. Vol, 3, No. 3, pp: 349-59.

۳۵. **Ware, G.W., 2000.** An introduction to herbicides (No. D-1601). Agricultural Research and Advisory Bureau.