



Available online: <http://ijhe.tums.ac.ir>

مقاله پژوهشی

مطالعه تاثیر سم کشاورزی گلايفوزيت بر برخی فاکتورهای خونی و تغييرات رفتاری ماهی کپور معمولی

نبات نقشبندی^۱، مجید عسکری حسینی^{۲*}

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، اشنویه، ایران

۲- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

اطلاعات مقاله:	چکیده
تاریخ دریافت: ۹۶/۰۲/۲۰	زمینه و هدف: سم گلايفوزيت از سموم علف کش سیستمیک و غیرانتخابی است که برای کنترل گیاهان استفاده می‌شود اما اثرات مضر بر جانوران دارد. مطالعه حاضر با هدف تعیین غلظت کشنده گلايفوزيت و تاثیر آن بر فاکتورهای خون شناسی و تغييرات رفتاری ماهی کپور معمولی انجام شد.
تاریخ ویرایش: ۹۶/۰۵/۱۰	روش بررسی: ماهیان در معرض غلظت‌های مختلف سم گلايفوزيت (۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ mg/L) و یک گروه شاهد در طی ۹۶ h قرار گرفتند. از نمونه‌ها خونگیری و فاکتورهای خونی سنجیده شد. در طول دوره آزمایش، میزان تلفات و رفتارهای ماهیان ثبت گردید. براساس میزان تلفات، میزان LC_{50} ، $LOEC$ ، $NOEC$ و $MATC$ محاسبه شد.
تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۵/۱۶	یافته‌ها: در شروع آزمایش رفتارهایی مانند جهش در سطح آب، تحرک بالا و سپس تجمع در بستر و در نهایت تنفس در سطح، عدم تعادل، سستی و مرگ در تیمارهای مختلف مشاهده گردید. میزان LC_{50} گلايفوزيت برای این ماهی برای زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ h به ترتیب ۳۶/۰۹، ۳۰/۴۶، ۲۱/۷۸، ۲۰/۰۵ mg/L و میزان $NOEC$ ، $LOEC$ و $MATC$ به ترتیب ۶/۶۶، ۴/۷۳ و ۲/۰۰۵ mg/L محاسبه شد. با افزایش غلظت سم تغییرات معنی داری در میزان فاکتورهای خونی شامل گلبول‌های قرمز و سفید، هماتوکریت، هموگلوبین، پروتئین کل، گلوکز، کورتیزول و غیره مشاهده شد ($p < 0.05$).
تاریخ انتشار: ۹۶/۰۶/۲۹	نتیجه‌گیری: سم گلايفوزيت با درجه "نسبتاً سمی" است و در غلظت بالا تاثیرات شدیدی بر فیزیولوژی و سیستم ایمنی ماهیان دارد. فاکتورهای خونی و تغییرات رفتاری می‌توانند به عنوان آزمایش تشخیصی سلامت محیط و همچنین شاخص استرس سموم در اکوسیستم‌های آبی استفاده شوند.
واژگان کلیدی: سموم کشاورزی، گلايفوزيت، ماهی کپور معمولی، فاکتورهای خونی، سلامت محیط	
پست الکترونیکی نویسنده مسئول: mahesni@gmail.com	

مقدمه

امروزه افزایش فعالیت‌های کشاورزی و استفاده از کودهای شیمیایی و حشره کش‌ها سبب ورود گروه بزرگی از آلاینده‌ها به اکوسیستم‌ها شده است. یک دسته از این آلاینده‌ها سموم کشاورزی هستند که معمولاً از طریق فعالیت‌های انسانی وارد اکوسیستم‌های آبی می‌شوند و باعث بروز آسیب‌های شدید در جوامع آبزیان می‌گردند (۲، ۱). سم گلايفوزيت یکی از پرمصرف‌ترین علف‌کش‌های رایج در دنیا طی سال‌های اخیر بوده که می‌تواند گیاهان یک ساله و چند ساله مختلف را کنترل کند. این سم از سموم علف‌کش غیرانتخابی و سیستمیک است که برای کنترل علف‌های هرز و غیرکاربردی در مزارع کشاورزی، فضاهای سبز و حاشیه‌های استخرها و اکوسیستم‌های آبی استفاده می‌شود و حلالیت آن در آب بسیار بالاست (۳) و با مهار سنتز اسیدهای آمینه ضروری در گیاه مانع از تشکیل پروتئین‌های لازم در گیاه می‌گردد (۴).

در ایران، از این سم به عنوان علف‌کش در مزارع پنبه، نیشکر، ذرت و غیره در استان‌های شمالی مانند گیلان، مازندران، گلستان و استان‌های جنوبی کشور به‌ویژه خوزستان استفاده می‌شود. با توجه به اینکه این استان‌ها قطب اصلی پرورش ماهیان گرمابی در ایران محسوب می‌شوند لذا این سموم می‌توانند اثرات شدیدی بر ماهیان پرورشی و وحشی این مناطق داشته باشند. از طرفی مطالعات نشان داده میزان نفوذ و ماندگاری سموم کشاورزی در آب نسبتاً بالاست بنابراین می‌تواند اثرات مخربی بر سلامت آبزیان و انسان داشته باشند (۵).

ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) از خانواده کپورماهیان (Cyprinidae) یکی از آبزیان ارزشمند و اقتصادی است که در اکثریت کشورهای جهان پرورش می‌یابد و میزان تولید آن در سال ۲۰۱۰ در کل جهان در حدود ۴ میلیون و ۱۰۰ هزار تن بوده است بنابراین به عنوان یکی از آبزیان پرمصرف جهان محسوب می‌شود (۶). از آنجایی که سموم کشاورزی به محیط‌های تکثیر این ماهی وارد می‌شوند، حیات این آبزیان به خطر می‌افتد و این امر برای حیات

مصرف‌کنندگان آنها از جمله انسان‌ها تهدید محسوب می‌شود. مطالعاتی در مورد تاثیر سم گلايفوزيت بر روی ماهیان مختلف انجام شده است که براساس آن مطالعات میزان غلظت کشنده (LC_{50}) در بازه زمانی ۹۶ h از ۲ تا ۵۵ mg/L بدست آمده است (۷). Felix و همکاران (۸) میزان LC_{50} این سم را در ماهی *Catla catla* به میزان ۴/۲ ppm بدست آورده‌اند. میزان LC_{50} برای قزل‌آلای رنگین کمان و خورشیدماهی *Lepomis macrochirus* به ترتیب ۸۶ و ۱۲۰ mg/L محاسبه شده است (۹).

تحقیقات نشان داده سموم علف‌کش می‌توانند بر ساختار کبد (۱۰)، آبشش و کلیه (۷) اثر تخریبی داشته و همچنین اختلالات آنزیمی و اندوکرینی شدیدی در ماهیان (۱۱) ایجاد کنند. تغییر فاکتورهای بیوشیمیایی و آنزیمی خون ماهی (۱۲) کاهش نرخ رشد، تضعیف سیستم ایمنی، تخریب غدد بزاقی و پاراتیروئید، تغییرات و جهش‌های ژنتیکی در جانوران مختلف (۱۳)، تخریب سلول‌های پوستی، اختلالات روانی و افزایش فعالیت سلول‌های سرطانی در کشاورزان و خانواده‌های آنها (۱۴) از دیگر اثرات سم گلايفوزيت هستند. براساس مطالعات مختلف ماهیان به دلیل طول عمر کوتاه، رشد زیاد و سازگاری با شرایط آزمایشگاهی به‌عنوان یکی از مدل‌های جانوری برای پایش آلودگی‌های زیست محیطی و بررسی اثرات بیولوژیکی سموم بر جانوران استفاده می‌شوند. هدف از مطالعه حاضر تعیین غلظت کشنده سم گلايفوزيت و اثر آن بر فاکتورهای خونی و تغییرات رفتاری ماهی کپور معمولی در شرایط آزمایشگاهی است.

مواد و روش‌ها

۴۰۰ قطعه ماهی کپور معمولی با وزن ۱۰ g تا ۱۶ g و طول ۶/۹ الی ۱۰/۱ cm از استخرهای پرورش ماهی بخش خصوصی تهیه و به آزمایشگاه تحقیقاتی منتقل شدند. قبل از انجام آزمایش، جهت سازگاری با شرایط آزمایشگاه نمونه‌ها به مدت دو هفته در وان‌های پلی اتیلنی ۳۰۰ L نگهداری شدند. سپس نمونه‌های هم اندازه در ۱۸ وان با حجم آب ۱۵۰ L جهت تعیین غلظت

ناحیه ساقه دمی صورت گرفت. بخشی از خون برای سنجش فاکتورهای خونی به ویال‌های حاوی ماده ضد انعقاد و نمونه دوم برای سنجش فاکتورهای سرمی داخل لوله آزمایش بدون هر گونه ماده ضد انعقاد منتقل و پس از حدود ۲ الی ۳ min حرکت آرام به داخل یخچال انتقال یافت. سپس بلافاصله پس از اتمام خون‌گیری، میزان سلول‌های خونی قرمز (RBC)، درصد هموگلوبین (Hb)، هماتوکریت (Ht)، حجم متوسط گلبول‌های قرمز (MCV)، مقدار متوسط هموگلوبین در گلبول‌های قرمز (MCH)، غلظت متوسط هموگلوبین (MCHC)، سلول‌های سفید و سلول‌های افتراقی گلبول‌های سفید در نمونه اول خون سنجش شد. نمونه دوم خون، سانتیفریوژ (۱۰ min با دور ۳۰۰۰) و سرم (فاز رویی) به آرامی توسط سرنگ کشیده و به لوله‌های اپندورف ۱/۵ mL منتقل شد و سپس فاکتورهای سرمی شامل گلوکز و کورتیزول، پروتئین کل، کلسترول و تری گلیسرید سنجش شدند (۲۰، ۲۱). تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS 21 و آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA – one side) انجام شد. در صورت وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها، پس آزمون دانکن (Duncan) برای گروه‌بندی میانگین‌های دارای اختلاف معنی‌دار استفاده شد ($p < 0.05$). رسم نمودارها در محیط نرم افزارهای SPSS, 21 و Excel صورت گرفت.

یافته‌ها

میزان تلفات و غلظت کشندگی

براساس مشاهدات هیچ گونه تلفاتی در طول دوره آزمایش در گروه شاهد مشاهده نشد. همچنین در غلظت ۵ mg/L در ۴۸ ساعت اولیه شروع آزمایش نیز تلفاتی مشاهده نگردید (نمودار ۱). بیشترین تلفات در زمان ۹۶ h و در غلظت ۴۰ mg/L بود که حدود ۸۰ درصد نمونه‌ها تلف شدند. براساس نتایج بدست آمده میزان غلظت کشنده (LC_{50}) سم گلایفوزیت برای ماهی کپور معمولی برای زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ h به ترتیب ۳۶/۰۹، ۳۰/۴۶، ۲۱/۷۸ و ۲۰/۰۵ mg/L بدست آمد. براساس نتایج بدست آمده با گذشت زمان میزان غلظت کشنده از ۱۰

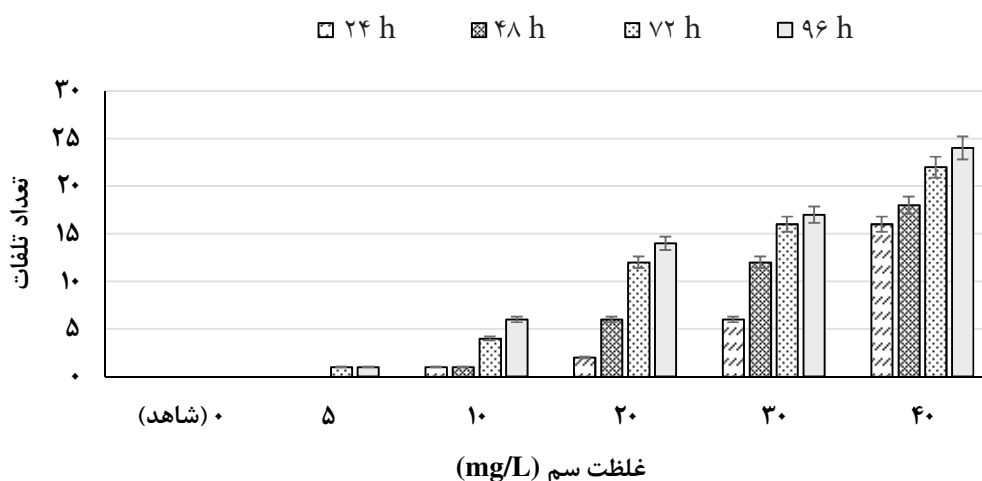
کشنده (LC_{50}) سم گلایفوزیت قرار گرفتند مدت آزمایش ۹۶ h در نظر گرفته شد. ماهیان مورد آزمایش به دقت توزین شده و پس از اطمینان از سلامتی و عدم ابتلا به بیماری به تعداد ۱۰ قطعه در هر وان (۳۰ قطعه در هر تیمار) ریخته شد. برای رسیدن به غلظت‌های مورد نظر، شروع آزمایش بین غلظت‌های ۰/۵ تا ۴ mg/L بود اما با توجه به اینکه تلفاتی مشاهده نشد بنابراین مرحله دوم آزمایش از غلظت ۵ mg/L به بالا و به صورت رشد لگاریتمی شروع شد. برای مرحله نهایی آزمایش ۵ تیمار و یک گروه شاهد در نظر گرفته شد. تیمارها شامل غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ mg/L بود. سپس در هر وان ۱۰ قطعه ماهی قرار داده شد (۱۷-۱۵). در طول انجام آزمایش فاکتورهای محیطی از جمله شوری، دما، pH و میزان اکسیژن محلول در آب اندازه‌گیری گردید و در طول آزمایش هیچ تغذیه‌ای برای ماهیان صورت نگرفت.

ثبت مرگ و میر ماهیان هر ۲۴ h یک بار و ماهیان مرده به دقت بررسی شده و علائم ظاهری ایجاد شده به دلیل تاثیرات سم ثبت گردید. تمامی حرکات و رفتارهای ماهیان در طول آزمایش با دوربین Webcam فیلمبرداری و سپس تمام فیلم‌ها بازبینی، بررسی و پایش گردید و به تمام تغییرات رفتاری مشاهده شده کد داده شد و در نهایت تمام تغییرات رفتاری با دقت ارزیابی گردید (۱۶، ۱۷). پس از ۹۶ h و ۷۲، ۴۸، ۲۴ و ۹۶ h براساس تعداد تلفات در هر تیمار و تکرار، با استفاده از نرم افزار Probit تحت برنامه SPSS, 21 محاسبه شد (۱۷-۱۵). همچنین میزان حداکثر غلظت مجاز (Maximum Acceptable Toxicant Concentration (MATC)) (میزان LC_{50} تقسیم به ۱۰) و همچنین حداقل غلظت موثر (Lowest Observed Effect Concentration (LOEC)) و غلظت بی اثر یا فاقد مرگ و میر (No Observed Effect Concentration (NOEC)) تعیین گردید (۱۸، ۱۹).

پس از ۹۶ h از ماهیان باقیمانده در هر تیمار خونگیری شدند. برای خونگیری بین ۶ تا ۹ قطعه ماهی در آب حاوی پودر میخک قرار گرفتند. پس از بیهوشی ماهیان، خونگیری از

تا ۹۹ درصد در طی دوره آزمایش کاهش داشت (جدول ۱).
میزان حداکثر غلظت مجاز بین ۱/۷۱۹ و ۲/۳۱۷ mg/L و با
میانگین $2/05 \pm 0/31$ mg/L بدست آمد و همچنین حداقل
غلظت موثر (LOEC) ۱/۴۳ تا ۱۰/۱۹ mg/L و با میانگین

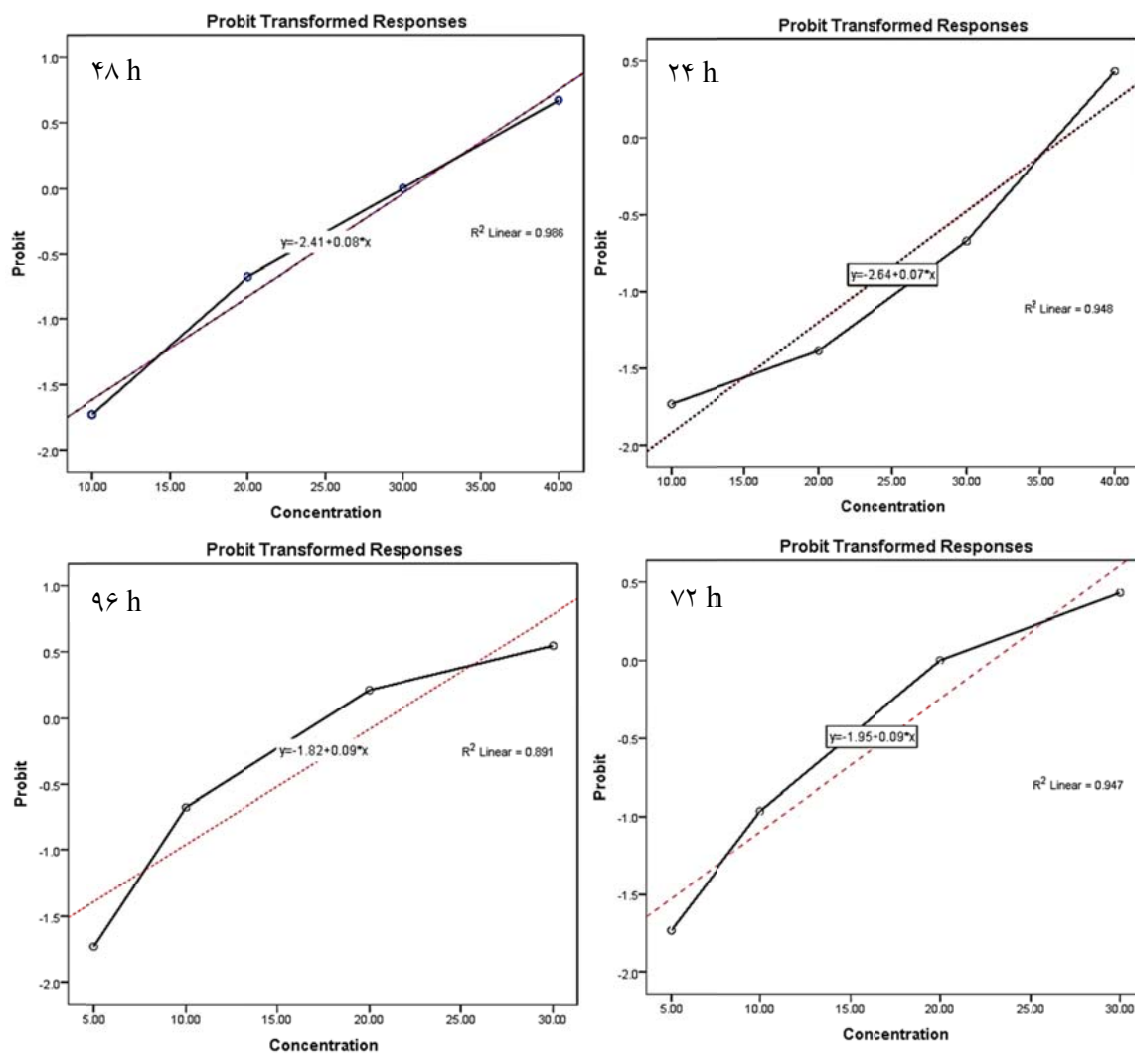
۶/۶۶±۲/۲۴mg/L و میزان غلظت فاقد تلفات (NOEC)
و حداکثر غلظت مجاز (MATC) به ترتیب ۴/۸ و ۲/۰۰۵
محاسبه شد.



نمودار ۱- میزان تلفات ماهی کپور معمولی در مواجهه با غلظت‌های مختلف سم علف‌کش گلايفوزيت در طی ۹۶ h

جدول ۱- غلظت کشنده سم گلايفوزيت (mg/L) از ۱۰ تا ۹۹ درصد برای ماهی کپور معمولی در بازه زمانی ۲۴ تا ۹۶ h

بازه زمانی				
۹۶ h	۷۸ h	۴۸ h	۲۴ h	
غلظت‌های کشنده (mg/L) با محدوده اطمینان ۹۵ درصد				
۶/۶۶	۸/۶۲	۱۵/۰۸	۲۰/۵۷	LC ₁₀
۲۰/۳۶	۱۳/۱۴	۲۰/۳۶	۲۵/۹۰	LC ₂₀
۱۴/۵۷	۱۶/۴۰	۲۴/۱۷	۲۹/۷۴	LC ₃₀
۱۷/۴۰	۱۹/۱۸	۲۷/۴۲	۳۳/۰۲	LC ₄₀
۲۰/۰۵	۲۱/۷۸	۳۰/۴۶	۳۶/۰۹	LC ₅₀
۲۲/۷۰	۲۴/۳۸	۳۳/۵۰	۳۹/۱۵	LC ₆₀
۲۵/۵۳	۲۷/۱۷	۳۶/۷۶	۴۲/۴۴	LC ₇₀
۲۸/۸۴	۳۰/۴۲	۴۰/۵۶	۴۶/۲۸	LC ₈₀
۳۳/۴۴	۳۴/۹۴	۴۵/۸۵	۵۱/۶۰	LC ₉₀
۴۴/۳۶	۴۵/۶۷	۵۸/۳۹	۶۴/۲۵	LC ₉₉



نمودار ۲- آنالیز Probit و رگرسیون خطی بین غلظت سم گلایفوزیت و روند مرگ و میر ماهی کپور معمولی در بازه‌های زمانی ۲۴ تا ۹۶ h

براساس نتایج ریخت‌شناسی و رفتاری نمونه‌های ماهی در تیمارهای مختلف، در شروع آزمایش رفتارهایی از جمله جهش در سطح آب، تحرک بالا مشاهده گردید. از روز اول به بعد و با توجه به غلظت سم، رفتارهایی از جمله بلعیدن هوا در سطح آب، سستی و بی‌حالی، عدم تعادل، بی‌حسی، تجمع در اطراف سنگ هوا و تحرک بسیار کم مشاهده گردید. با افزایش غلظت در ساعات اولیه، تحرک بیشتر و در پایان آزمایش ماهیان دچار عدم تعادل، بی‌حالی و در نهایت تلف می‌شدند. با افزایش زمان رفتارهای ماهیان مشهودتر بود.

آنالیز Probit همبستگی بالایی بین افزایش غلظت سم و مرگ و میر نشان داد و یک رابطه مستقیم بین دو مولفه بدست آمد. میزان رگرسیون خطی در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ h براساس غلظت‌های مختلف سم علف‌کش گلایفوزیت به ترتیب ۰/۹۴، ۰/۹۸، ۰/۹۴ و ۰/۸۹ بدست آمد (نمودار ۲).

تغییرات رفتاری

در تحقیق حاضر تحت تاثیر سم گلایفوزیت تغییرات رفتاری مختلفی در ماهی کپور معمولی مشاهده شد که با تغییر غلظت سم و همچنین گذشت زمان تغییرات رفتاری متفاوت بود.

جدول ۲- خلاصه‌ای از تغییرات رفتاری مشاهده شده در طی آزمایش تعیین کشندگی حاد در بین غلظت‌های مختلف سم گلايفوزيت (mg/L). عدم وجود (-)، کم (+) متوسط (++)، زیاد (+++)، خیلی زیاد (++++)

گلايفوزيت (mg/L)					پارامتر
۴۰	۳۰	۲۰	۱۰	۵	
+++	+++	+++	+++	++	شنا و فعالیت زیاد
+++	++	+	+	-	ترشح موکوس
+++	++	++	-	-	تجمع در اطراف سنگ و لوله هوارسانی
++++	+++	++	++	+	شنا در سطح آب
++++	+++	+++	++	+	بلعیدن هوا در سطح آب
+++	++	+	+	-	سختی در تنفس و افزایش حرکات سرپوش آبششی
+++	++	+	-	-	تجمع گروهی در بستر
-	-	+++	++	+	جهش ناگهانی
+++	++	+	-	-	شنای غیرعادی (شنا بر روی یک سمت بدن یا باله پشتی)
++++	++	+	-	-	سستی و بی‌حالی
++++	+++	++	+	-	عدم تعادل و جهت‌یابی

در غلظت‌های بالا این حرکات به سختی انجام میشد که این عمل هم نشان از سختی در تنفس است. ترشح موکوس در سطح بدن و در سطح آب وان‌ها، تقریباً در تمامی تیمارها به جزء تیمار شماره ۱ مشاهده شد. اولین تغییرات در تعادل و سستی در غلظت‌های ۳۰ و ۴۰ mg/L حدود ۶ h پس از شروع آزمایش مشاهده گردید. خلاصه‌ای از تغییرات مشاهده شده در طی آزمایش تعیین کشندگی حاد در بین تیمارها در جدول ۲ بیان شده است.

تغییرات فاکتورهای خون و سرم

با افزایش غلظت سم کاهش معنی‌دار در میزان گلبول‌های قرمز، هماتوکریت، هموگلوبین و شاخص‌های MCV، MCH، MCHC، در پایان دوره آزمایش مشاهده می‌شود

در ساعات اولیه (۱ تا ۱۲ h شروع آزمایش) نمونه‌ها بسیار فعال و حرکات جهشی فراوانی انجام می‌دادند. حرکات جهشی در غلظت‌های ۲۰ تا ۴۰ mg/L به خصوص در طی ۳۶ h اولیه نسبت به دو غلظت دیگر بسیار شدیدتر بود و پس از آن کاهش یافت. اما میزان شنای مداوم و فعال آنها نسبت به غلظت‌های ۵ و ۱۰ mg/L کمتر بود و در روز سوم و چهارم سستی و بی‌حالی و عدم تعادل در تیمارهای ۳۰ و ۴۰ mg/L سم گلايفوزيت به وضوح دیده می‌شد. در غلظت‌های ۵ تا ۲۰ mg/L سستی و بی‌حالی کمتر مشاهده شد. ماهیان در روز دوم به صورت متناوب و در روزهای سوم و چهارم بصورت متوالی و دائم و به‌صورت عمودی در سطح آب بودند و شروع به بلعیدن هوا می‌کردند که نشان از سختی تنفس در این ماهیان بود. در روز چهارم به‌خصوص

نشان دادند ($p < 0.05$) (جدول ۳). میزان گلوکز، کورتیزول، کلسترول و تری گلیسرید با افزایش غلظت سم به مرور افزایش معنی دار ($p < 0.05$) و پروتئین کل کاهش معنی دار نشان داد ($p < 0.05$) (جدول ۴).

($p < 0.05$) (جدول ۳). گلبول‌های سفید، لنفوسیت با افزایش غلظت سم به مرور افزایش معنی دار داشتند ($p < 0.05$). اما میزان مونوسیت، ائوزینوفیل، نوتروفیل و بازوفیل با وجود نوسان در غلظت‌های مختلف اما در غلظت 40 mg/L کاهش معنی دار

جدول ۳- روند تغییر میزان فاکتورهای خونی در ماهی کپور معمولی پس از 96 h قرار گرفتن در معرض غلظت‌های مختلف سم گلایفوزیت (حروف انگلیسی غیرمشابه (a,b,c,d) نشان‌دهنده اختلاف معنی دار در بین تیمارهای مختلف هستند).

غلظت سم گلایفوزیت (mg/L)						پارامتر خونی
۴۰	۳۰	۲۰	۱۰	۵	کنترل (۰)	
$1/22 \pm 0.31$	$1/32 \pm 0.42$	$1/57 \pm 0.20$	$1/62 \pm 0.18$	$1/75 \pm 0.23$	$1/82 \pm 0.21$	RBC (N/mm^3)
$17/50 \pm 2/45$	$19/20 \pm 3/19$	$21/45 \pm 4/07$	$24/60 \pm 4/57$	$25/13 \pm 3/72$	$27/20 \pm 3/17$	Ht (%)
$6/20 \pm 2/07$	$6/10 \pm 1/10$	$6/95 \pm 1/23$	$7/21 \pm 1/09$	$8/01 \pm 1/17$	$8/91 \pm 0/87$	Hb (g/dl)
$131/10 \pm 5/03$	$137/10 \pm 6/10$	$140/10 \pm 4/39$	$149/10 \pm 6/22$	$146/85 \pm 3/74$	$147/10 \pm 4/19$	MCV (fl)
$39/53 \pm 5/11$	$41/01 \pm 4/21$	$40/93 \pm 3/72$	$46/01 \pm 2/44$	$45/86 \pm 3/01$	$45/23 \pm 2/31$	MCH (pg)
$38/53 \pm 3/09$	$36/23 \pm 2/31$	$35/23 \pm 1/92$	$34/23 \pm 1/71$	$33/93 \pm 1/31$	$35/01 \pm 1/65$	MCHC (g/dl)
$57/22 \pm 3/46$	$59/62 \pm 4/92$	$56/57 \pm 4/30$	$54/22 \pm 3/71$	$50/75 \pm 4/23$	$49/82 \pm 3/35$	گلبول سفید ($\text{N} \times 10^3/\text{mm}^3$)
$84/50 \pm 4/29$	$85/04 \pm 3/46$	$84/45 \pm 5/97$	$81/60 \pm 5/37$	$81/13 \pm 4/81$	$81/20 \pm 3/37$	لنفوسیت (درصد)
$1/20 \pm 0/37$	$1/02 \pm 0/40$	$1/25 \pm 0/17$	$2/21 \pm 0/99$	$2/11 \pm 0/85$	$2/91 \pm 0/47$	مونوسیت (درصد)
$2/10 \pm 0/53$	$2/10 \pm 0/19$	$2/10 \pm 0/89$	$3/06 \pm 0/82$	$3/36 \pm 1/03$	$3/09 \pm 0/86$	نوتروفیل (درصد)
$1/15 \pm 0/11$	$1/01 \pm 0/23$	$1/23 \pm 0/42$	$2/01 \pm 0/49$	$2/16 \pm 0/81$	$1/23 \pm 0/27$	ائوزینوفیل (درصد)
$1/05 \pm 0/19$	$0/83 \pm 0/11$	$1/07 \pm 0/21$	$1/12 \pm 0/26$	$1/24 \pm 0/34$	$1/57 \pm 0/22$	بازوفیل (درصد)

جدول ۴- روند تغییر میزان فاکتورهای پلاسمایی در ماهی کپور معمولی پس از 96 h قرار گرفتن در معرض غلظت‌های مختلف سم گلایفوزیت (حروف انگلیسی غیرمشابه (a,b,c,d) نشان‌دهنده اختلاف معنی دار در بین تیمارهای مختلف هستند).

غلظت سم گلایفوزیت (mg/L)						پارامتر پلاسمایی
۴۰	۳۰	۲۰	۱۰	۵	کنترل (۰)	
$193/84 \pm 7/99$	$198/54 \pm 9/46$	$186/45 \pm 7/97$	$156/60 \pm 8/12$	$121/03 \pm 5/41$	$91/28 \pm 4/81$	گلوکز (mg/dl)
$171/20 \pm 9/37$	$164/32 \pm 8/93$	$121/85 \pm 9/47$	$80/48 \pm 6/89$	$52/76 \pm 4/71$	$31/98 \pm 2/91$	کورتیزول (nmol/l)
$1/86 \pm 0/37$	$1/62 \pm 0/40$	$2/85 \pm 0/47$	$3/21 \pm 0/99$	$3/76 \pm 0/85$	$4/98 \pm 0/67$	پروتئین کل (g/dl)
$245/45 \pm 10/04$	$231/72 \pm 9/23$	$202/23 \pm 6/42$	$178/61 \pm 8/49$	$182/56 \pm 6/79$	$163/63 \pm 7/27$	کلسترول (mg/dl)
$251/05 \pm 8/97$	$245/89 \pm 9/11$	$195/48 \pm 10/01$	$188/46 \pm 10/19$	$185/75 \pm 7/04$	$144/83 \pm 9/22$	تری گلیسرید (mg/dl)

بحث

سموم کشاورزی از آلاینده‌های مهم شیمیایی هستند که تاثیرات به سزایی بر روی موجودات زنده بخصوص آبزیان از جمله ماهیان دارند. در تحقیق حاضر میزان غلظت کشنده $LC_{50} 96h$ سم علف کش گلايفوزيت $20/05 \text{ mg/L}$ و همچنین حداقل غلظت موثر $LOEC$ $6/66 \text{ mg/L}$ بدست آمد. براساس مطالعات Sadeghi و همکار (۲۰۱۴) (۱۹) میزان غلظت کشنده سم گلايفوزيت برای ماهی گوپی $12/01 \text{ mg/L}$ (*Poecilia reticulata*) و حداقل غلظت موثر $7/05 \text{ mg/L}$ بدست آمده است (۱۹). میزان غلظت کشنده برای ماهی تیلایپا (*Oreochromis niloticus*) $1/05 \text{ mg/L}$ (۱۸)، ماهی گونه *Prochilodus lineatus* $13/6 \text{ mg/L}$ (۳)، ماهی تیلایپای زیلی $211/80 \text{ mg/L}$ (۲۲)، ماهی *Catla catla* به میزان $4/2 \text{ mg/L}$ (۸) و برای قزل آلاي رنگين کمان و خورشيدماهی *Lepomis macrochirus* به ترتیب ۸۶ و 120 mg/L (۹) محاسبه شده است. تغییر میزان غلظت کشنده در گونه‌های مختلف با تغییر شرایط محیطی، اندازه و سن ماهیان، ساختار تجاری سم (امولسیون یا پودر) و وجود سورفاکتانت‌ها در سم مورد نظر تغییر می‌کند و اثرات آن بر موجودات هدف و غیرهدف متفاوت خواهد بود اما بطور کلی سم گلايفوزيت جزء سموم با سمیت متوسط تا زیاد تقسیم‌بندی می‌شود (۲۲).

همان گونه که در جدول ۲ مشاهده می‌گردد براساس نتایج بدست آمده در پژوهش حاضر، با افزایش غلظت سم، نوع و شدت تغییرات رفتاری و ریخت شناسی در ماهی کپور معمولی تغییر می‌کند. مشابه تحقیق حاضر، در گونه‌های مختلف ماهی در معرض آلاینده‌های مختلف تغییرات رفتاری مشاهده شده است. Gormley و همکاران (۲۰۰۳) در ماهی *Oryzias latipes* کاهش حرکت را تحت استرس سم آندوسولفان (۲۳) و Jaensson و همکاران (۲۰۰۷) در ماهی قزل آلاي قهوه‌ای اثر پاراتیرویدها را در اختلال در فعالیت تولیدمثلی گزارش کردند (۲۴). در مطالعات دیگر نتایجی مشابه تحقیق حاضر بر روی ماهیان کپور معمولی تحت تاثیر سم کلروپیرفوس (۲۵)

در ماهی قزل آلاي رنگين کمان در اثر ترکیبات مسی (۲۶)، (۲۷) و در ماهی گورخری گونه *Danio rerio* در غلظت‌های بالای نیکل (۲۸) تغییرات رفتاری همچون افزایش شنا و فعالیت، سختی تنفس، سستی، عدم تعادل و افزایش موکوس گزارش شده است که این تغییرات می‌توانند در اثر تغییرات محیطی و فیزیولوژیکی در ماهی ایجاد شوند (۲۴، ۲۶-۲۸). مطالعات متوالی زیادی در مانیتورینگ و بررسی پاسخ‌های رفتاری ماهیان انجام شده که نشان داده بررسی این تغییرات رفتاری روش مناسبی جهت ارزیابی سلامت محیط، حضور آلاینده‌ها و مواد سمی در محیط زیست جانور است (۲۶، ۲۷، ۲۹). از جمله تغییرات رفتاری، افزایش میزان تنفس است که علت آن کاهش اکسیژن و هیپوکسی است. زمانی که ماهی در شرایط آلودگی شدید قرار می‌گیرد اولین اندامی که در معرض آلاینده قرار می‌گیرد آبشش است که آلاینده‌ها بر روی آبشش قرار گرفته و باعث هیپوکسی و اختلالات تنفسی می‌شوند (۲۷، ۲۹، ۳۰). از جمله تغییرات مشاهده شده در ماهیان در معرض آلاینده‌های شیمیایی، افزایش موکوس و تغییر ساختار و مورفولوژی پوست بدن در ماهیان بوده است که به عنوان یک پاسخ رفتاری سازگاری است و علت آن ایجاد یک لایه حفاظتی در مقابل اثرات تخریبی سموم گزارش شده است (۳۱، ۳۲).

در پژوهش حاضر پس از ۹۶ h میزان گلبول قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت و سایر فاکتورهای اریتروسیتی با افزایش غلظت سم کاهش یافتند و سلول‌های خونی سفید و لنفوسیت‌ها افزایش و مونوسیت، نوتروفیل، بازوفیل و ائوزینوفیل‌ها کاهش معنی‌دار نشان دادند (جدول‌های ۳ و ۴). نتایج تحقیق حاضر با نتایج سایر مطالعات روی ماهیان از جمله ماهی کپور معمولی *Cyprinus carpio* در معرض ماده شیمیایی lindane (۳۳)، در گربه ماهی آفریقایی *Clarias gariepinus* در معرض سموم کشاورزی (۱۵، ۱۷، ۳۴)، در ماهی استخوانی *Prochilodus lineatus* تحت اثر سموم کشاورزی (۳) همخوانی دارد. کاهش فاکتورهای اریتروسیتی ناشی از آلودگی‌ها و افزایش غلظت‌های سموم تا حد کشنده، حاصل

استفاده قرار گیرند (۴۱، ۴۲).

نتیجه گیری

به طور کلی، نتایج نشان داد که سم گلايفوزیت سمیت نسبتاً بالایی بر ماهی کپور معمولی دارد به طوری که در غلظت‌های بالا باعث تغییرات رفتاری شدید گردید که نشان از ایجاد استرس بالا و تغییرات فیزیولوژیکی در ماهی است. از طرفی پس از ۹۶ h میزان گلبول قرمز، هموگلوبین، همتوکریت و سایر فاکتورهای اریتروسیته با افزایش غلظت سم در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافتند و همچنین سلول‌های خونی سفید دچار تغییرات شدند که نشان از تغییرات شدید در سیستم ایمنی و تنفسی ماهی است. براساس نتایج بدست آمده می‌توان نتیجه گرفت که سم گلايفوزیت جزء سموم با سمیت متوسط تا زیاد برای ماهی کپور معمولی معرفی می‌گردد که تأثیرات آشکاری بر رفتار و واکنش این ماهیان در محیط آلوده به سم و همچنین فرایندهای فیزیولوژیک و بیوشیمیایی خونی ماهی کپور معمولی دارد و از این رفتارها و تغییرات فیزیولوژیک می‌توان بعنوان شاخص ارزیابی سلامت محیط ماهیان و سایر موجودات زنده استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از کارشناس محترم آزمایشگاه زیست شناسی دانشگاه پیام نور و نیروی‌های خدمات دانشگاه پیام نور جهت تأمین نمونه‌های ماهی و همچنین کمک‌های مادی و معنوی دانشگاه پیام نور در حمایت از این تحقیق اعلام می‌دارند.

منابع

1. Sabra FS, Mehana E. Pesticides toxicity in fish with particular reference to insecticides. *Asian Journal of Agriculture and Food Sciences*. 2015;3(01):40-60.
2. Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NP. Fish bio-accumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2003;13(2):57-149.

آسیب دیدگی بافت‌های مختلف بدن از جمله بافت‌های خون ساز و کاهش توانایی تولید حامل‌های اکسیژنی هست از این رو مقدار این حامل‌ها در خون کاهش می‌یابد و این اثرات نشانه تخریب گلبول‌های قرمز و در نتیجه کم خونی شدید در ماهیان است (۳۳، ۳۵). افزایش گلبول‌های سفید و لنفوسیت‌ها و کاهش برخی لوکوسیت‌ها یک پاسخ فیزیولوژیک و سازگاری با شرایط در جانوران است که تحت اثر آلاینده‌های مختلف بعضی سلول‌های ایمنی بدن فعال‌تر می‌شوند و این افزایش لنفوسیت نشان از افزایش فعالیت ایمنی بدن ماهی برای مقابله با عوامل استرس‌زا است (۳۴).

براساس نتایج بدست آمده فاکتورهای بیوشیمیایی خون مانند گلوکز، کورتیزول، کلسترول و تری گلیسرید افزایش و پروتئین کل کاهش نشان داد که با گزارشات سایر محققان همخوانی دارد (۲۱، ۳۳، ۳۶، ۳۷). یکی از دلایل افزایش گلوکز، کلسترول و تری گلیسرید در مطالعات سم شناسی و ورود استرس محیطی، احتمالاً کاهش انسولین و افزایش گلوکوکورتیکوئیدها هست که به دنبال افزایش کاتکولامین‌ها و کورتیزول تحت تأثیر استرس اتفاق می‌افتد (۲۱، ۳۸). این هورمون‌ها باعث تحریک و افزایش تولید گلوکز از طریق فرایند گلیکوزنریز و افزایش مصرف پروتئین و فرایند لیپولیز برای تأمین انرژی می‌شوند بنابراین در اثر ورود استرس میزان گلوکز، کلسترول و تری گلیسرید افزایش و میزان پروتئین کاهش می‌یابد (۲۱، ۳۳، ۳۹، ۴۰). بطور کلی تغییرات شدید در فاکتورهای خونی و سیستم ایمنی در ماهیان نشان‌دهنده این است که ماهیان از نظر سلامت در وضعیت وخیمی قرار دارند. بنابراین این فاکتورها می‌توانند بعنوان شاخص زیستی مهمی در ارزیابی سلامت بدن و محیط زیست ماهیان مورد

3. do Carmo Langiano V, Martinez CB. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2008;147(2):222-31.
4. Carlisle S, Trevors J. Glyphosate in the environment. *Water, Air, & Soil Pollution*. 1988;39(3):409-20.

5. Khodadadi M, Samadi M, Rahmani A, Maleki R, Allahresani A, Shahidi R. Determination of organophosphorous and carbamat pesticides residue in drinking water resources of Hamadan in 2007. *Iranian Journal of Health and Environment*. 2010;2(4):250-57 (in Persian).
6. FAO. Cultured aquatic species information programme. Rome: FAO Fisheries and Aquaculture Department; 2004 [cited 2016 Jul 4]. Available from: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Cyprinus_carpio/en.
7. Jiraungkoorskul W, Upatham ES, Kruatrachue M, Sahaphong S, Vichasri-Grans S, Pokethitiyook P. Histopathological effects of Roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Science Asia*. 2002;28:121-27.
8. Felix JF, Saradhamani N, ManishKumar B, Charles Maria Prabhu F. Toxic effects of herbicide Glyphosate Hijac (41%) on serum biochemical parameters of freshwater fish, *Catla catla*. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2016;5(7):1928-37.
9. Tu M, Hurd C, Randall JM. *Weed Control Methods Handbook*. Utah: All U.S. Government Documents; 2001.
10. Szarek J, Siwicki A, Andrzejewska A, Terech-Majewska E, Banaszkiewicz T. Effects of the herbicide Roundup™ on the ultrastructural pattern of hepatocytes in carp (*Cyprinus carpio*). *Marine Environmental Research*. 2000;50(1):263-66.
11. Gluszczak L, dos Santos Miron D, Moraes BS, Simões RR, Schetinger MRC, Morsch VM, et al. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2007;146(4):519-24.
12. Jofré DM, Germanó García MJ, Salcedo RE, Morales M, Alvarez M, Enriz RD, et al. Fish toxicity of commercial herbicides formulated with glyphosate. *Environmental and Analytical Toxicology*. 2013;4(1):199-201.
13. Williams GM, Kroes R, Munro IC. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2000;31(2):117-65.
14. Mesnage R, Defarge N, De Vendomois JS, Seralini G. Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. *Food and Chemical Toxicology*. 2015;84:133-53.
15. Aderolu A, Ayoola S, Otitolaju A. Effects of Acute and sub-lethal concentrations of Actellic on Weight changes and Haematology parameters of *Clarias gariepinus*. *World Journal of Biological Research*. 2010;3:30-39.
16. Hesni MA, Dadolahi-Sohrab A, Savari A, Mortazavi M. Study the acute toxicity of lead nitrate metal salt on behavioral changes of the milkfish (*Chanos chanos*). *World Journal of Fish & Marine Sciences*. 2011;3(6):496-501.
17. Adeyemo O. Haematological and histopathological effects of cassava mill effluent in *Clarias gariepinus*. *African Journal of Biomedical Research*. 2005;8(3):179-83.
18. Ayoola S. Toxicity of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juvenile. *African Journal of Agricultural Research*. 2008;3(12):825-34.
19. Sadeghi A, Hedayati A. Investigation of LC50, NOEC and LOEC of Glyphosate, Deltamethrin and Pretilachlor in Guppies (*Poecilia Reticulata*). *Iranian Journal of Toxicology*. 2014;8(26):1124-29.
20. Lal Shah S. Hematological changes in *Tinca tinca* after exposure to lethal and sublethal doses of Mercury, Cadmium and Lead. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. 2010;9(3):434-43.
21. Remya SR, Ramesh M, Sajwan KS, Kumar KS. Influence of zinc on cadmium induced haematological and biochemical responses in a freshwater teleost fish *Catla catla*. *Fish Physiology and Biochemistry*. 2008;34(2):169-74.
22. Nwani C, Ibiam U, Ibiam O, Nworie O, Onyishi G, Atama C. Investigation on Acute toxicity and behavioral changes in *Tilapia zillii* due to glyphosate-based herbicide, forceup. *The Journal of Animal and Plant Sciences*. 2013;23(3):888-92.
23. Gormley KL, Teather KL. Developmental, behavioral, and reproductive effects experienced by Japanese medaka (*Oryzias latipes*) in response to short-

- term exposure to endosulfan. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2003;54(3):330-38.
24. Jaensson A, Scott AP, Moore A, Kylin H, Olsén KH. Effects of a pyrethroid pesticide on endocrine responses to female odours and reproductive behaviour in male parr of brown trout (*Salmo trutta* L.). *Aquatic Toxicology*. 2007;81(1):1-9.
 25. Halappa R, David M. Behavioral responses of the freshwater fish, *Cyprinus carpio* (Linnaeus) following sublethal exposure to Chlorpyrifos. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 2009;9(2):233-38.
 26. Petrauskienė L. Changes in aggressive behaviour of rainbow trout after starvation and exposure to heavy metal mixture. *Ekologija*. 2002;1:14-21.
 27. Sloman KA, Scott GR, Diao Z, Rouleau C, Wood CM, McDonald DG. Cadmium affects the social behaviour of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquatic Toxicology*. 2003;65(2):171-85.
 28. Kienle C, Köhler H-R, Filser J, Gerhardt A. Effects of nickel chloride and oxygen depletion on behaviour and vitality of zebrafish (*Danio rerio*, Hamilton, 1822) (Pisces, Cypriniformes) embryos and larvae. *Environmental Pollution*. 2008;152(3):612-20.
 29. Xu J, Liu Y, Cui S, Miao X. Behavioral responses of tilapia (*Oreochromis niloticus*) to acute fluctuations in dissolved oxygen levels as monitored by computer vision. *Aquacultural Engineering*. 2006;35(3):207-17.
 30. Shah SL. Behavioural abnormalities of *Cyprinus watsoni* on exposure to copper and zinc. *Turkish Journal of Zoology*. 2001;26(1):137-40.
 31. Siddiqui AA, Arifa N. Toxicity of heavy metal copper and its effect on the behaviour of fresh water Indian cat fish, *Clarias batrachus* (Linn.). *Current Biologica*. 2011;4(4):405-11.
 32. Yorulmazlar E, Gül A. Investigation of acute toxicity of cadmium sulfate ($\text{CdSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) and behavioral changes of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus* Val., 1844). *Chemosphere*. 2003;53(8):1005-10.
 33. Saravanan M, Kumar KP, Ramesh M. Haematological and biochemical responses of freshwater teleost fish *Cyprinus carpio* (Actinopterygii: Cypriniformes) during acute and chronic sublethal exposure to lindane. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2011;100(3):206-11.
 34. Modesto KA, Martinez CB. Effects of Roundup Transorb on fish: hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere*. 2010;81(6):781-87.
 35. Okomoda V, Ataguba G, Ayuba V. Hematological response of *Clarias gariepinus* fingerlings exposed to acute concentrations of sunsate®. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*. 2013;9(2):271-78.
 36. Abalaka SE. Evaluation of the haematology and biochemistry of *Clarias gariepinus* as biomarkers of environmental pollution in Tiga dam, Nigeria. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2013;56(3):371-76.
 37. Al-Akel A, Al-Balawi HA, Al-Misned F, Mahboob S, Ahmad Z, Suliman E. Effects of dietary copper exposure on accumulation, growth, and hematological parameters in *Cyprinus carpio*. *Toxicological and Environmental Chemistry*. 2010;92(10):1865-78.
 38. Ahmad Z. Acute toxicity and haematological changes in common carp (*Cyprinus carpio*) caused by diazinon exposure. *African Journal of Biotechnology*. 2011;10(63):13852-59.
 39. Singh AP, Singh S, Bhartiya P, Yadav K. Toxic effect of Phorate on the serum biochemical parameters of snake headed fish *Channa punctatus* (Bloch). *Advances BioResearch*. 2010;1(1):177-81.
 40. Stalin IS, Das SMS. Biochemical changes in certain tissues of *Cirrhina mrigala* (Hamilton) (Cyprinidae: Cypriniformes) exposed to fenthion. *International Journal of Environmental Sciences*. 2012;2(3):1268-72.
 41. Tort L. Stress and immune modulation in fish. *Developmental & Comparative Immunology*. 2011;35(12):1366-75.
 42. Wester P, Vethaak A, Van Muiswinkel W. Fish as biomarkers in immunotoxicology. *Toxicology*. 1994;86(3):213-32.



Available online: <http://ijhe.tums.ac.ir>

Original Article



Study of agricultural pesticide glyphosate effects on hematological factors and behavioral changes in *Cyprinus carpio*

N Naqshband¹, M Askari Hesni^{2,*}

1- Department of Biology, Faculty of Sciences, Payame Noor University, Oshnaviye, Iran

2- Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

ARTICLE INFORMATION:

Received: 10 May 2017
Revised: 1 August 2017
Accepted: 7 August 2017
Published: 20 September 2017

Key words: Pesticides, Glyphosate, *Cyprinus carpio*, Blood factors, Environmental health

***Corresponding Author:**
mahesni@gmail.com

ABSTRACT

Background and Objective: Glyphosate is a non-selective, systemic herbicide that can control most plants, but it has harmful effects on organisms, especially aquatic animals. Static bioassays were made to determine acute toxicity of glyphosate and its effects on haematological parameters and behavior changes of common carp (*Cyprinus carpio*).

Materials and Methods: Common carp were exposed to different concentrations of glyphosate (5, 10, 20, 30 and 40 mg/L) and a control group for 96 h. After that, blood and plasma factors were measured in blood samples. Mortality rate and fish behavioral were recorded during the experiments. LC₅₀, LOEC, NOEC and MATC were calculated by Probit software according to mortality rate in any treatment.

Results: In the early period of the experiment, fish in toxic media were jumping in water and showed high movements. Then after, the behavior such as breathing in surface, loss of balance, weakness and finally death were observed in the different treatments. LC₅₀ value and 95% confidence limit of glyphosate in 24, 48, 72 and 96 h were 36.09, 30.46, 21.78 and 20.05 mg/L for common carp, respectively. The LOEC, NOEC and MATC were calculated as 6.66, 4.73 and 2.005 mg/L. The Significant changes that were observed in blood factors included RBC, WBC, Hct, Hb and plasma factors such as total protein, glucose, cortisol and other factors when the pesticide concentration was increased ($p < 0.05$).

Conclusion: Results showed that glyphosate had a high effect on common carp and its physiology and immune system. Haematological parameters may be used as an environmental health diagnostic test and stress indicator for agriculture pesticides in aquatic ecosystems.