

فیزیولوژی آبزیان**بررسی میزان تغییرات لیزوزیم و تعداد گلبولهای سفید خون ماهی بنی (Barbus sharpeyi) بر اثر مسمومیت حاد با سم ارگانو فسفره تری کلروفن**بهرام گندمی*^۱ - مجتبی علیشاهی^۲

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اهواز، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانش آموخته کارشناسی ارشد تکثیر و پرورش

آبزیان، اهواز، ایران

۲- دانشگاه شهید چمران، دانشکده دامپزشکی، دانشیار گروه علوم درمانگاهی، اهواز، ایران

نویسنده مسئول: bhgandomi@gmail.com

چکیده:

تری کلروفن یک آفت کش ارگانو فسفره می باشد که با اهداف مختلفی در آبی پروری کاربرد دارد. بیشترین اثر زیست محیطی این سم اثرات آن بر موجودات غیر هدف بویژه ماهی ها می باشد. در این تحقیق اثر مسمومیت با تری کلروفن بر برخی فاکتورهای ایمنی (WBC و فعالیت لایزوزیم سرم) در ماهی بنی (ماهی بومی رودهای استان خوزستان) مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور ابتدا بر اساس روش استاندارد OECD غلظت $96LC_{50}$ ساعتی این سم در ماهی بنی محاسبه گردید. سپس از ۴ غلظت ۰، $1/5$ ($3/3 \text{ mg/l}$)، $1/10$ ($1/8 \text{ mg/l}$)، و $1/20$ ($0/9 \text{ mg/l}$) $96LC_{50}$ ساعتی این سم در آکواریوم های جداگانه تهیه و ۴۵ قطعه ماهی به هر آکواریوم اضافه گردید. از ماهی های هر تیمار در زمان های صفر، ۷، ۱۴ و ۲۱ نمونه خون تهیه شده و آزمایشات ایمنی شناسی روی نمونه ها انجام گرفت. نتایج نشان داد که فاکتورهای ایمنی مورد مطالعه تحت تاثیر مسمومیت با تری کلروفن قرار گرفت، بطوریکه تعداد گلبولهای سفید خونی، فعالیت لایزوزیم تقریباً در تمام مراحل نمونه گیری در ماهیان مجاور شده با $3/3$ و $1/8$ میلی گرم در لیتر تری کلروفن کاهش نشان داد ($P < 0.05$). بطور کلی می توان نتیجه گرفت که مسمومیت با سم تری کلروفن باعث سرکوب ایمنی در ماهی بنی می گردد.

کلمات کلیدی: لیزوزیم، گلبول سفید، سم تری کلروفن، مسمومیت، *Barbus sharpeyi*، LC_{50} .

مقدمه: تری کلروفن یک آفت کش ارگانو فسفره با اهداف مختلف در آبی پروری می باشد. بیشترین اثر زیست محیطی این سم اثرات آن بر موجودات غیر هدف بویژه ماهیها می باشد. در این تحقیق اثرات این سم بر برخی فاکتورهای ایمنی ماهی بنی که هم بصورت وحشی و هم بصورت پرورشی زیست می کند، ارزیابی می گردد

اهمیت موضوع: مصرف بالای سموم آفت کش به ویژه تری کلروفن در آبی پروری، جایگاه ویژه آبی پروری در استان خوزستان و حضور منابع آبی سطحی فراوان، بنی نماینده ای از ماهی ها هم در محیط طبیعی (رودخانه ها) و هم پرورشی، نقش احتمالی افزایشی مصرف سم تری کلروفن و اثر آنها بر سلامت ماهی

روش کار: در این تحقیق بر اساس روش استاندارد OECD غلظت $5096LC$ ساعتی این سم در ماهی بنی محاسبه گردید. سپس از ۴ غلظت ۰، $1/5$ ($3/3 \text{ mg/l}$)، $1/10$ ($1/8 \text{ mg/l}$)، و $1/20$ ($0/9 \text{ mg/l}$) $96 LC_{50}$ ساعتی این سم در آکواریوم های جداگانه تهیه و ۴۵ قطعه ماهی به هر آکواریوم اضافه گردید. از ماهی های هر تیمار در زمان های صفر، ۷، ۱۴ و ۲۱ نمونه خون تهیه شده و آزمایشات ایمنی شناسی (شمارش کلی گلبولهای سفید (TWBC) و لایزوزیم سرم روی نمونه ها انجام گرفت. برای تعیین میزان سمیت تری کلروفن از نرم افزار Probit و برای آنالیز اطلاعات مربوط به فاکتورهای ایمنی و آنزیمی از نرم افزار SPSS و پیرایش ۱۱۶ استفاده گردید.

آزمایشات انجام شده روی نمونه ها:

فاکتورهای ایمنی مورد بررسی: شمارش کلی گلبول های سفید (TWBC) ۲۵

شمارش کلی گلبول های سفید به روش مستقیم (هماسیتومتر) و همانند شمارش کلی گلبول های سفید پرندگان با رقیق کردن خون به نسبت ۱ به ۲۰۰ با محلول رقیق کننده نات - هر یک صورت گرفت. برای این کار و پس از انتقال نمونه رقیق شده به لام هماسیتومتر تعداد گلبول های سفید در ۹ مربع بزرگ اولیه شمارش می گردید و سپس تعداد کل گلبول های سفید در میلی متر مکعب خون با استفاده از فرمول زیر محاسبه می گردید (Feldman *et al.*, 2000; Thrall, 2004)

$200 \times (10\% \text{ درصد} + \text{تعداد کل گلبول های سفید شمارش شده در } 9 \text{ مربع بزرگ}) = \text{تعداد کل گلبول های سفید}$

در میکرولیتر خون

اندازه گیری لایوزیم سرم: برای اندازه گیری میزان فعالیت لایوزیم سرم از روش آگارز لیزوپلیت Agarose lysoplate Method توصیه شده توسط Osserman and Lawlor (1966) و Roed *et al.* (1993) با مقدراری تغییرات استفاده گردید.

نتایج فاکتورهای ایمنی شناسی

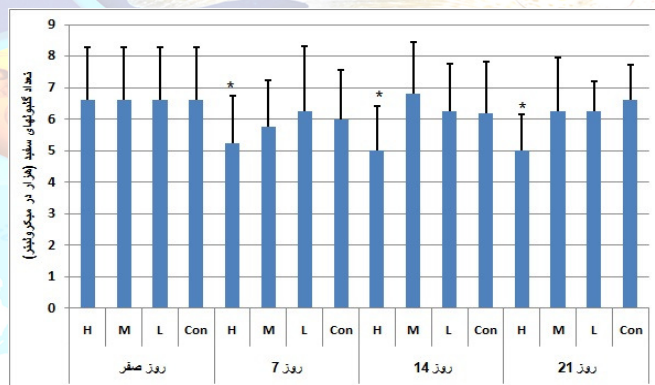
نتایج شمارش کلی گلبول های سفید

نتایج مربوط به شمارش کلی گلبول های سفید خونی در نمودار آورده شده است.

اطلاعات بصورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شده است.

H: غلظت ۳/۳ میلی گرم در لیتر تری کلروفن

M: غلظت ۱/۸ میلی گرم در لیتر تری کلروفن



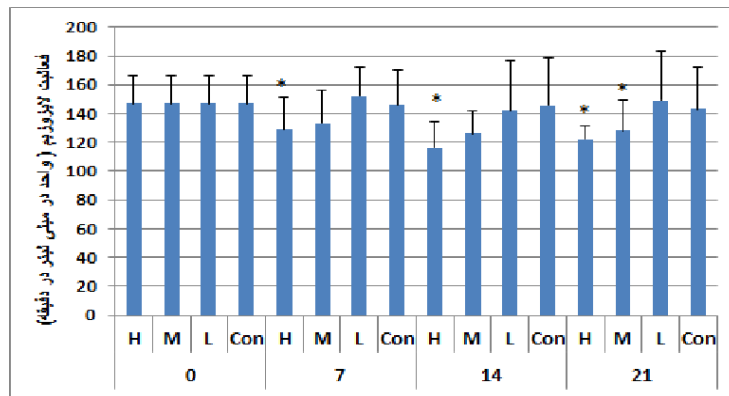
L: غلظت ۰/۹ میلی گرم در لیتر تری کلروفن: کنترل

نمودار شماره ۱- شمارش تعداد گلبول های سفید ماهی ها در تیمارهای مورد بررسی در مراحل مختلف نمونه گیری.

همانطور که در نمودار فوق مشاهده می شود، میزان گلبولهای سفید خون در روز ۷، ۱۴ و ۲۱ فقط در تیمار ۳/۳ میلی گرم تری کلروفن کاهش معنی داری نسبت به گروه کنترل نشان داد ($P < 0.05$). بقیه تیمارها فاقد تفاوت معنی دار نسبت به تیمار کنترل بودند ($P > 0.05$)

نتایج فعالیت لایوزیم سرم:

نتایج مربوط به فعالیت لایوزیم سرم در تیمارهای مورد بررسی در مراحل مختلف نمونه گیری در نمودار ۲ آورده شده است.



نمودار شماره ۲- میزان فعالیت لایزوزیم سرم ماهی‌ها در تیمارهای مورد بررسی در مراحل مختلف نمونه گیری. همانطور که در نمودار فوق مشاهده می شود، هر چند فعالیت لایزوزیم تقریباً در تمام مراحل نمونه گیری در تیمارهای مجاور شده با سم تری کلروفن کاهش نسبی نشان داد ولی فعالیت لایزوزیم سرم در روز ۷، ۱۴ و ۲۱ در تیمار H و در روز ۲۱ در تیمار M کاهش معنی داری نسبت به کنترل نشان داد.

بحث:

تعداد کلی گلبول های سفیدخونی:

در این تحقیق در تیمار مجاور شده با ۳/۳ میلی گرم در لیتر سم تریکلروفن در هر سه مرحله نمونه گیری کاهش معنی دار تعداد گلبولهای سفید خونی مشاهده گردید ($P < 0.05$). در بقیه تیمارها نیز کاهش نسبی نسبت به کنترل مشاهده شد. تعداد و نسبت گلبولهای سفید خونی گویای وضعیت سلامت و ایمنی ماهی می باشد (ایوامات ۱۹۹۹). بنابراین این کاهش تعداد گلبولهای سفید خونی نیز می تواند بدلیل کاهش خون سازی یا کاهش عمر گلبولهای سفید خونی ایجاد شده باشد، و یکی از دلایل کاهش کارایی سیستم ایمنی ماهی مسموم شده با تری کلروفن را می توان به این دلیل دانست. کاهش فعالیت لایزوزیم سرم و کاهش گلوبولین سرم نیز می توانند بدنبال کاهش تعداد گلبولهای سفید خون حاصل شده باشند. کاهش تعداد گلبولهای سفید خونی در تیمار مجاور شده با غلظت ۳/۳ میلی گرم در لیتر تری کلروفن نشان دهنده کاهش توانایی ماهی در مبارزه با عوامل استرس زا بویژه عوامل بیماریزا می باشد. کاهش تعداد گلبولهای سفید خونی بدنبال مسمومیت حاد یا مزمن با سموم ارگانوفسفره در فیل ماهی و ماهی کپور معمولی نیز گزارش گردیده است (خوشباور رستمی ۱۳۸۴ و Svoboda, 2001). همچنین راخدایی (۱۳۹۰) و محمدی (۱۳۹۰) نیز استفاده از دیازینون را به ترتیب در ماهی شیربت و بنی باعث کاهش معنی دار تعداد کلبولهای سفید خونی دانستند.

فعالیت لایزوزیم سرم: نتایج این تحقیق نشان دهنده اثرات سرکوب ایمنی مسمومیت مزمن تری کلروفن در ماهی بنی است. این

افت قدرت ایمنی با کاهش فعالیت لایزوزیم و میزان پروتئین تام و گلوبولین سرم همراه بوده است.

لایزوزیم پروتئینی با ارزش در ماهی است که یکی از اجزای مهم ایمنی غیر اختصاصی ماهی بوده و باعث تخریب جدار باکتری ها، فعال سازی کمپلمان و افزایش فعالیت بیگانه خواری، به عنوان اپسونین، در ماهی می گردد، (Sakai, 1999). افزایش فعالیت لایزوزیم بعد از تجویز محرک های ایمنی، واکسن ها و برخی پروبیوتیک ها در ماهی گزارش گردیده است (Swain et al. 2006; Yuan et al. 2007). افزایش میزان فعالیت لایزوزیم به عنوان یکی از فاکتورهای نشان دهنده افزایش سطح ایمنی غیر اختصاصی قلمداد شده و برعکس کاهش فعالیت آن باعث کاهش کارایی سیستم ایمنی، بویژه ایمنی غیر اختصاصی می گردد (علیشاهی ۱۳۸۸). در این تحقیق کاهش فعالیت سرم در دو تیمار ۳/۳ میلی گرم در لیتر تری کلروفن در تمام مراحل نمونه گیری و ۱/۸ میلی گرم در لیتر در روز هفتم نشان دهنده اثر سرکوب ایمنی این سم در ماهی بنی است. در مطالعات مشابه در ماهی تیلپایا (Giron_perez et al

2009) و فیل ماهی (Khoshbavar rostami et al, 2006) نیز اثرات سمیت ایمنی (ایمونوتوکسیک) تری کلروفن گزارش شده است. بطوریکه در هر دو گزارش کاهش فعالیت لایزوزیم سرم و فاکتورهای ایمنی غیر اختصاصی به دنبال مسمومیت حاد و مزمن با تری کلروفن مشاهده گردیده است. آسیب بافتهای تولید کننده سلول های ایمنی، بویژه کبد از اصلی ترین دلایل این سرکوب ایمنی است (Giron_perez et al 2009، بنایی ۲۰۱۱).

نتیجه گیری: بطور کلی می توان نتیجه گرفت که سم تری کلروفن که به میزان زیادی در آبی پروری استفاده می گردد، دارای سمیت متوسطی برای ماهی بنی می باشد. و این سمیت با افزایش غلظت سم و همچنین مدت مجاورت افزایش می یابد. همچنین مسمومیت با این سم باعث سرکوب ایمنی در ماهی شده و افت کارایی ایمنی ماهی را باعث می گردد. لذا در کاربرد این سم در آبی پروری، بویژه در پرورش ماهیان بومی باید دقت کافی به کار برد و از غلظت های استاندارد آن استفاده کرد.

فهرست منابع فارسی

۱. احمدی ممقانی، ی؛ خراسانی، نعمت اله؛ طالبی جهرمی، خ. ۱۳۸۹. بررسی و اندازه گیری باقی مانده آفت کش دیازینون در رودخانه تجن. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده علوم دریایی. دانشگاه تربیت مدرس.
۲. بنایی، مهدی؛ میرواقفی، علیرضا؛ مجازی امیری، باقر؛ رفیعی، غلامرضا؛ نعمت دوست، بهزاد (۱۳۹۰) بررسی خون شناسی و آسیب شناسی بافتیدر مسمومیت تجربی با دیازینون در ماهی کپور معمولی (Cyprinus carpio). نشریه شیلات. دوره ۶۴. شماره ۱. صفحات ۱-۳.
۳. پزند، ذ؛ اسماعیلی ساری، ع؛ پیری زیرکوهی، م. ۱۳۸۲. نقش و تاثیر حشره کش دیازینون در مطالعات اکوتوکسیکولوژی بر روی بچه ماهیان خاویاری، مجله پژوهش و سازندگی، ۱۶ (۵۸) صفحات ۶۷-۶۴.
۴. پیغان، رحیم، (۱۳۷۸): بررسی مسمومیت تجربی حاد با آمونیاک در ماهی کپور معمولی، بر اساس تغییرات هیستوپاتولوژیک و آنزیم های سرمی، و امکان پیشگیری با زئولیت، پایان نامه دکترای تخصصی دامپزشکی دانشگاه تهران، پایان نامه شماره ۸۹، صفحه (۳۶، ۳۲، ۷۵، ۹۳).
۵. خانی، آریتا (تیرماه ۱۳۷۷): بررسی تغییرات آنزیم های LDH و ALP و ALT و AST و آمیلاز در سرم خون جوجه های گوشتی آلوده به ویروس گامبورو، پایان نامه دکترای دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، پایان نامه شماره ۲۶۴.
۶. خوشباور رستمی، ح، سلطانی، م. ۱۳۸۴. بررسی تاثیر سمیت حاد دیازینون بر روی شاخص های خونی ماهی شیب و تعیین LC50 آن. مجله علمی شیلات ایران، ۱۴، ۳، صفحه ۶۰-۴۹.
۷. خوشباور رستمی، حسینعلی، سلطانی، مهدی و سعید یلقی (۱۳۸۴) بررسی تاثیر سمیت حاد دیازینون بر روی شاخص های خونی ماهی ازون برون و تعیین LC50 آن. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی، ۱۲، ۵، صفحه ۱۰-۳.
۸. علیشاهی، م. ۱۳۸۳. نقش محرک های ایمنی در آبی پروری، مجله سازمان نظام دامپزشکی کشور، سال چهارم، شماره سوم ص ۳۸-۳۳.
۹. علیشاهی، م. ۱۳۸۹. مروری بر ایمنی شناسی آبزیان، انتشارات دانشگاه شهید چمران، ۶۲۵ صفحه.
۱۰. محمدی، ا. ۱۳۹۰. بررسی سمیت دیازینون در ماهی بنی و تاثیر آن بر سیستم ایمنی این ماهی. پایان نامه دکترای تخصصی دامپزشکی. دانشکده دامپزشکی. دانشگاه شهید چمران.

۱۱. نیک پی، م (۱۳۷۲). بررسی بیولوژیکی ماهی شیربت (*Barbusgrypus*) و بنی (*Barbussharpeyi*). طرح تحقیقاتی مرکز تحقیقات شیلات جنوب کشور خوزستان.

فهرست منابع غیر فارسی

1. Agrahari S, K.C. Pandey, K. Gopal, Biochemical alteration induced by monocrotophos in the blood plasma of fish, *Channa punctatus* (Bloch), Pesticide Biochemistry and Physiology 88 (2007) 268–272.
2. Ahmad, FE. (2001). Analyses of pesticides and their metabolites in foods and drinks. *Trend and Analytica Chemistry*. 20(11): 649-661.
3. Alkahea, h.f. 1994. The toxicity of nickel and the effects of sublethal levels on hematological parameters and behavior of the fish, *Oreochromis niloticus*. J. Univ.
4. Alkahem, H.F., Z. Ahmed., A.S. Alkel & M.J.K. Shamsi. 1998. Toxicity bioassay and changes in hematological parameters of *Oreochromis niloticus* by trichlorfon. *Arab-Gulf-Journal-of-scientific research*. 16: pp:581-593.
5. Amin, A.B. 1992. Histology Atlas, Normal Structure of Salmonids, A.P.L pp: 18-19.
6. Anees, M. 1978. Hematological abnormalities in a freshwater teleost, *Channa punctatus*, (Bloch), exposed to sublethal and chronic levels of three organophosphorus insecticides. *Int. J. E.C.L. Environ. Sci.*, 4: 53-60
7. Ansari, B.A.M. and Aslam Kumar, K., 1987. Diazinon toxicity: Activities of acetylcholinesterase and Phosphatase in the nervous tissue of zebra fish, *B. rerio* (*Cyprinidae*).
8. Banaee M, A.R. Mirvaghefi, G.R. Rafei, B. Majazi Amiri, Effect of sub-lethal diazinon concentrations on blood plasma biochemistry, *International Journal Environmental Research* 2 (2008) 189–198.
9. Banaee. M., Sureda. A. Mirvaghefi. A. R., Ahmadi. K. (2010) Effects of diazinon on biochemical parameters of blood in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Pesticide Biochemistry and Physiology* xxx, xxx-xxx.
10. Banuelos. T. M. C, Santerre. A., Casas. S. J. (2009) Oxidative stress in macrophages from spleen of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to sublethal concentration of endosulfan. *Fish & Shellfish Immunology* 27 (2009) 105–111
11. Benz, G.W., Otting, R.L., Case, A., 1995. Redescription of *Argulus melanosticus* (Brachiura: Argulidae), a parasite of California grunion (*Leuresthes tenuis*: Atherinidae), With notes regarding chemical control of *A. melanosticus* in a captive host population. *J. Parasitol.* 81, 154-161.
12. Bhattacharya H, Q. Xiao, L. Lun, Toxicity studies of nonylphenol on rosy barb (*Puntius conchionius*): a biochemical and histopathological evaluation, *Tissue and Cell* 40 (2008) 243–249
13. Blaxhall, P. C. and Daisley, K. W. (1973). Routine. haematological methods for use with fish blood. *J. fish. Biol.*, 5: 771-781.
14. Bond, C.E. 1979. *Biology of Fish*, W.B. Saunders Company, Philadelphia London. pp 11- 50.
15. Chandrasekara, H.U., Pathiratne, A., 2005. Influence of low concentrations of trichlorfon on hematological parameters and brain acetylcholinesterase activity in common carp, *Cyprinus carpio* L. *Aquaculture res.* 36(2), 144-149.

Coad, B.W. (1991). *Fishes of the Tigris-Euphrates Basin: a critical*