



Determination of Median Lethal Concentration (LC50) Values of Di-n- Butyl Phthalate on Rainbow Trout Fingerlings (*Oncorhynchus mykiss*)

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Kamali M.^{*1} PhD,
Shabani A.¹ PhD,
Kalbasi M.R.² PhD,
Paknejad H.¹ PhD

How to cite this article

Kamali M, Shabani A, Kalbasi M.R, Paknejad H. Determination of Median Lethal Concentration (LC50) Values of Di-n- Butyl Phthalate on Rainbow Trout Fingerlings (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Fisheries Science and Technology. 2018 ;7(4):249-254.

¹Fisheries Department, Fisheries & Environment Faculty, Gorgan University of Agriculture & Natural Resources, Gorgan, Iran

²Fisheries Department, Natural Resources & Marine Science Faculty, Tarbiat Modares University, Noor, Iran

*Correspondence

Address: Fisheries Department, Gorgan University of Agriculture & Natural Resources, Basij Square, Gorgan, Iran. Postal Code: 4918943464
Phone: +98 (11) 44999160
Fax: +98 (11) 44553499
kamalilase@gmail.com

Article History

Received: September 11, 2018

Accepted: November 2, 2018

ePublished: December 20, 2018

ABSTRACT

Aims The purpose of this study was to determine the lethal concentration (LC50 96h) Di-n- Butyl phthalate and Calculate of Low Observable Effect Concentration (LOEC) and Non Observable Effect Concentration (NOEC) on rainbow trout fingerlings.

Materials and Method Acute static toxicity test was performed based on the standard O.E.C.D. using rainbow trout fingerlings (7.3 ± 1.25 g) in 96 hours. Statistical calculation was done with SPSS 21 and probit regression and ANOVA method.

Findings Mortality was increased with increasing concentrations of Di-n- Butyl phthalate Within 24 to 96 hours. Lethal concentrations of 24, 48, 72 and 96 hours were 15.46, 12.96, 11.21 and 9.93mg.L⁻¹, respectively. Low Observable Effect Concentration (LOEC) of 24, 48, 72 and 96 hours were 3.4, 3.8, 7.2 and 9.95mg.L⁻¹, too. Non Observable Effect Concentration (NOEC) of 24, 48, 72 and 96 hours were 0.78, 0.95, 1.45 and 1.68mg.L⁻¹, respectively.

Conclusion Toxicological studies are necessary for rainbow trout because of their importance (economic and sensitivity of this species to pollutants). The results of this research can be applied to assess the ecological risks and nutritional risks of this group of pollutants. So, an effective management and control strategy must be executed in order to reduce the problems caused by DnBP in the environment.

Keywords Median Lethal Concentration (LC50); Di-n-Butyl phthalate; Rainbow Trout

CITATION LINKS

[1] Marine pollution [2] Comparison of the waterborne and dietary routes of exposure on the effects of Benzo(a)pyrene on biotransformation pathways in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [3] The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research [4] The oestrogenic potential of the phthalate esters [5] Phthalates: Toxicology and exposure [6] Methods for the determination of phthalates in food [Internet] [7] The environmental fate of phthalate esters: A literature zebrafish [8] Development and validation of a colorimetric sensor array for fish spoilage review [9] Di 2-ethylhexylphthalate in the aquatic and terrestrial environment: A critical review [10] Aquatic toxicity of phthalate esters [11] The physiology of fishes [12] The effect of hydrocortisone treatment by bathing and daphnia enrichment on the salinity stress in Persian sturgeon *Acipenser persicus* juvenile [13] Evaluation of the toxic effects of phthalate, Di-n-Butyl Phthalate (DBP) on health of *Oreochromis niloticus* [14] Acute toxicity of carbaryl, methiocarb, and carbosulfan to the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and guppy (*Poecilia reticulata*) [15] Ministry of Agriculture-Jahad [Internet] [16] Acute toxicity of copper, cadmium, and mercury to the freshwater fish *Varicorhinus barbatulus* and *Zacco barbata* [17] The toxicology of fishes [18] Effect of sub-lethal diazinon concentrations on blood plasma biochemistry [19] Changes in electrolyte activities of *Clarias gariepinus* exposed to diazinon [20] Organization for Economic Co-Operation and Development [21] Effects of short-term pulsed ammonia exposure on fish [22] Standard methods for the examination of water and wastewater, 23rd edition [23] Pesticides and aquatic animals: A Guide to Reducing Impacts on Aquatic Systems [Internet] [24] A biodynamic model predicting waterborne lead bioaccumulation in *Gammarus pulex*: Influence of water chemistry and in situ validation [25] Toxicological characterization of phthalic acid [26] In utero exposure to di(n-butyl) phthalate and testicular dysgenesis: Comparison of fetal and adult end points and their dose sensitivity [27] Ecotoxicology and the marine environment [28] Toxicological consequences of Di-n-Butyl-Phthalate (DBP) on health of Nile tilapia fingerlings [29] Determination of lethal concentration (LC50) Endosulfan and its damage in *Huso huso*

تعیین میزان غلظت کشندگی میانی (LC₅₀) دی-ان- بوتیل فتالات (DnBP) در بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

مرتضی کمالی* PhD

گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

علی شعبانی PhD

گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

محمدرضا کلباسی PhD

گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

حامد پاک‌نژاد PhD

گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

چکیده

اهداف: هدف از این مطالعه تعیین غلظت کشنده میانی (LC₅₀) در مدت ۹۶ ساعت و برآورد میزان حداقل غلظت موثر (LOEC) و بالاترین غلظت بدون تاثیر (NOEC) آلاینده دی-ان- بوتیل فتالات (DnBP) روی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) بود.

مواد و روش‌ها: آزمایش روش سمیت حاد به روش ساکن و براساس رهنمود استاندارد O.E.C.D به مدت ۹۶ ساعت روی بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (با میانگین وزن ۳۱/۲۵± گرم) انجام شد. محاسبات آماری با نرم‌افزار SPSS 21 و روش رگرسیون پروبیت و ANOVA صورت گرفت.

یافته‌ها: طی زمان ۲۴ الی ۹۶ ساعت با افزایش غلظت دی-ان- بوتیل فتالات مرگ بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان افزایش یافت. میزان غلظت کشنده میانی در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت به ترتیب ۱۵/۴۶، ۱۲/۹۶، ۱۱/۲۱ و ۹/۹۳ میلی‌گرم در لیتر بود. همچنین میزان حداقل غلظت موثر در مدت زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت به ترتیب ۳/۴، ۳/۸، ۷/۲ و ۹/۹۵ میلی‌گرم در لیتر بود. بالاترین غلظت بدون تاثیر این آلاینده در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت به ترتیب ۱/۷۸، ۱/۴۵، ۱/۶۸ و ۱/۶۸ میلی‌گرم در لیتر بود.

نتیجه‌گیری: مطالعات سم‌شناسی روی قزل‌آلای رنگین‌کمان به علت اهمیت آنها ضروری است و نتایج این پژوهش می‌تواند در ارزیابی خطرات بوم‌شناختی و غذایی این گروه از آلاینده‌ها کاربردی باشد. با توجه به غلظت کشندگی میانی DnBP (۹/۹۳ میلی‌گرم در لیتر) که جزو آلاینده‌های با سمیت متوسط قرار دارد، توصیه می‌شود راهکار مناسب برای کنترل ورود DnBP به بوم‌سازگان‌های آبی ضروری است.

کلیدواژه‌ها: غلظت کشندگی میانی (LC₅₀)، دی-ان- بوتیل فتالات، قزل‌آلای رنگین‌کمان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۶/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۸/۱۱

* نویسنده مسئول: kamalilasem@gmail.com

مقدمه

ماهیان، موجودات آبی هستند که به علت ارزش بوم‌شناختی، اقتصادی و حساسیت در مقابل مواد سمی و آلاینده‌های زیست‌محیطی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند و از سوی دیگر حساسیت گونه‌های مختلف ماهیان، نسبت به مواد سمی و آلاینده‌های محیطی، متفاوت است، از این رو آزمایشات مختلف سم‌شناسی روی ماهیان ضروری به نظر می‌رسد. به منظور انتخاب یک گونه برای آزمایشات سم‌شناسی، شاخص‌های متعددی مانند دردسترس بودن، سهولت پرورش، سهولت حمل‌ونقل و ارزش اقتصادی، بوم‌شناختی و خوراکی نقش دارند^[1]. آلاینده‌های

زیست‌محیطی وارد شده به محیط‌های آبی برحسب میزان غلظت و سمیت آنها، رفتار و زیست‌شناسی موجودات آبی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. جذب آلاینده‌های زیست‌محیطی و انباشت مواد سمی در دوکفه‌ای‌ها، سخت‌پوستان، نرم‌تنان و ماهیان به واسطه مصرف انسانی آنها نگرانی قابل توجهی را به وجود آورده است^[2]. از این رو امروزه با توجه به پذیرش، انباشت و ذخیره آلاینده‌های مختلف در بوم‌سازگان‌های آبی مطالعات سم‌شناسی آبزیان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است^[3].

از جمله آلاینده‌هایی که امروزه بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند، فتالات‌ها هستند. استرهای فتالات‌ها (استرهای اسیدفتالیک) به عنوان یک پلاستیسایزرها (روان‌کننده) از سال ۱۹۳۰ برای انعطاف‌پذیری، شفافیت و شکل‌دهندگی برای ساخت پلیمرهای پی‌وی‌سی، پلی‌وینیل استات، پلاستیک، صنایع سلولزی و پلی‌اتیلن استفاده شده است. به دلیل ماهیت منومری این ترکیبات، رهاسازی این ترکیبات در محیط زیست به راحتی در مراحل مختلف تولید، توزیع، حمل‌ونقل و استفاده، انجام می‌شود^[4-7]. سازمان جهانی بهداشت در سال ۲۰۰۸ تولید جهانی فتالات را ۸ میلیون تن در سال برآورد کرده است. فتالات‌ها به دلیل حجم بالای تولید، استفاده گسترده از آنها در محصولات مختلف به خصوص مواد پلاستیکی، واکس، عطر و اسباب‌بازی کودکان، رهاسازی، انتقال آسان و پراکنش وسیع در بخش‌های مختلف محیط زیست به عنوان یک آلاینده مختل‌کننده سیستم هورمونی درون‌ریز از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند^[8,9].

دی-ان-بوتیل‌فتالات (DnBP) حدود ۲۵٪ کل تولیدات جهانی فتالات‌ها را به تنهایی به خود اختصاص داده است. این ترکیب کاربرد وسیعی در تولید پلیمرها و انعطاف‌پذیری پی‌وی‌سی دارد و در ساخت مصالح ساختمانی، اسباب‌بازی‌ها، کفش و لوازم پزشکی و غیره به کار می‌رود. دی-ان-بوتیل‌فتالات با وزن مولکولی ۲۷۸/۳۴ گرم بر مول و حلالیت ۱۳ میلی‌گرم بر لیتر تمایل زیادی به جذب شدن در مواد معلق آبی و کلونیدی دارد که این موجب جذب توسط آبزیان و به تبع آن موجب سمیت در آنها می‌شود^[10].

به طور معمول می‌توان هر عامل تغییردهنده محیط طبیعی را به عنوان منبعی از استرس در نظر گرفت که باعث ایجاد واکنش سریع در جانوران، تحت تغییرات عوامل فیزیولوژیک شود. در واقع، این پاسخ‌ها را می‌توان در ماهیان به شکل تغییر در غلظت هورمون‌های موجود در پلاسما یا تغییر در سنجه‌های سلول‌های خونی از جمله حجم سلول، فعالیت آنزیم‌ها و غیره شناسایی کرد^[11,12].

زیست‌سنجی روشی برای توسعه اطلاعات سم‌شناسی روی موجوداتی است که فیزیولوژی آنها شبیه به موجوداتی فرض می‌شود که مورد توجه مستقیم قرار دارند. زیست‌سنجی‌ها می‌توانند کمی یا کیفی باشند. زیست‌سنجی‌های کمی شامل برآورد منحنی غلظت-پاسخ می‌شوند، که چگونه با افزایش غلظت پاسخ تغییر می‌کند. این رابطه غلظت پاسخ، اجازه برآورد غلظتی که ماده در ارتباط با یک پاسخ خاص زیست‌شناختی را می‌دهد (مانند LC₅₀: غلظت کشتن ۵۰٪ از موجودات زنده در معرض یک ماده خاص). زیست‌سنجی‌های کمی معمولاً با استفاده از روش‌های آمار زیستی تجزیه و تحلیل می‌شوند. غلظت کشندگی میانی بنا به تعریف غلظت کشنده سم برای ۵۰٪ ارگانیزم‌های مورد آزمایش و برحسب گرم در لیتر است. در واقع مقدار سمی که قادر است ۵۰٪ ماهی مورد آزمایش را بکشد. تجزیه و تحلیل پروبیت معمولاً در سم‌شناسی برای تعیین سمیت نسبی مواد شیمیایی به موجودات

پس از انجام آزمایشان در دوره ۹۶ ساعت، داده‌های به‌دست‌آمده از آزمایش سمیت حاد با استفاده از نرم‌افزار SPSS 21 روش آنالیز پروبیت با سطح اطمینان ۹۵٪ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. میزان LC₁₋₉₉ به‌دست‌آمده برای میزان همبستگی پیرسون بین زمان‌های رویارویی دی-ان- بوتیل فتالات و میزان LC₅₀ طی زمان‌های مذکور محاسبه شد. میزان بالاترین غلظت بدون تاثیر (NOEC)، غلظتی که هیچ اثر قابل توجهی در مقایسه با نمونه شاهد روی جمعیت نمونه‌های در رویارویی با آلاینده، ندارد و میزان حداقل غلظت موثر (LOEC) یعنی کمترین غلظتی از یک ماده که از نظر آماری اثر قابل توجهی بر جمعیت‌های مورد آزمایش ندارد که به روش آنالیز واریانس یک‌طرفه تعیین شدند [21, 22].

جدول ۱) شرایط فیزیکی‌وشیمیایی آب در طول دوره نگهداری و سازگاری	
پارامتر	مقدار
pH	۷/۳-۸/۱
دما	۱۴-۱۵/۲°C
شوری	۰/۴ قسمت در هزار
اکسیژن محلول	۷/۲۳±۰/۸۱ میلی‌گرم در لیتر
دوره نوری	۱۲ ساعت روشنایی: ۱۲ ساعت تاریکی
EC	۳۹۴±۱۳ میکرو زیمنس بر سانتی‌متر
TDS	۲۵۳±۱۲ میلی‌گرم در لیتر
تغذیه	روزی دوبار به میزان ۳٪ وزن بدن

یافته‌ها

سنجه‌های اندازه‌گیری‌شده در طول دوره آزمایش شامل pH، دما، شوری، اکسیژن محلول، EC و TDS در زمان پیش و هنگام رویارویی دی-ان- بوتیل فتالات در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

پس از قراردادن ماهیان در حوضچه‌ها در شرایط کیفی یکسان به‌مدت ۴ روز (۹۶ ساعت) قبل از رویارویی آلاینده هیچ‌گونه مرگ‌ومیری مشاهده نشد (جدول ۲) اما مرگ‌ومیر و تلفات مشاهده‌شده پس از آن به‌مدت ۴ روز (۹۶ ساعت) که در رویارویی با دی-ان- بوتیل فتالات بوده ناشی از رویارویی ماهیان با آلاینده دی-ان- بوتیل فتالات بود. البته در زمان آزمایش نیز تیماری به‌عنوان شاهد استفاده شد که غلظت آلاینده صفر لحاظ شده بود. در آزمایش اولیه، با توجه به این که در غلظت‌های زیر ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر DnBP هیچ تلفات و مرگ‌ومیری مشاهده نشد، دامنه کشندگی که غلظت ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر تعیین شد و مرگ‌ومیر ماهیان در رویارویی با آلاینده DnBP در جدول ۳ مشاهده می‌شود.

تعداد مرگ‌ومیر بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در مدت ۲۴ ساعت در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۱۰ و به‌ترتیب صفر، صفر، صفر، ۳ و ۲۰ عدد بود. تعداد مرگ‌ومیر بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در غلظت‌های ذکرشده در مدت ۴۸ ساعت به‌ترتیب صفر، صفر، ۲، ۵، ۱۴ و ۲۰ عدد بود. میزان مرگ‌ومیر بچه‌ماهیان در زمان ۷۲ ساعت در غلظت‌های مذکور به‌ترتیب صفر، ۱، ۴، ۶، ۱۶ و ۲۰ عدد بود و در نهایت تعداد تلفات و مرگ‌ومیر بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان پس از مدت‌زمان ۹۶ ساعت در غلظت‌های آزمایشی صفر، ۲، ۶، ۷، ۱۹ و ۲۰ عدد بود.

براساس نتایج حاصل از جدول‌های ۳ و ۴ مقادیر LC₁₋₉₉ آلاینده DnBP طی زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت محاسبه شد که در جدول ۴ مشاهده می‌شود. با توجه به نتایج جدول پروبیت مقدار مجاز غلظت کشنده میانی LC₅₀ در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در

زنده استفاده می‌شود [13]. تجزیه و تحلیل پروبیت فرض می‌کند که رابطه بین تعداد واکنش (۹٪ پاسخ) و غلظت به‌طور معمول توزیع می‌شود. اگر داده‌ها به‌طور معمول توزیع نشده باشند، رگرسیون لجیت ترجیح داده می‌شود. در این مطالعه اثرات سمی حاد DnBP در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با استفاده از تجزیه و تحلیل پروبیت، LC₅₀ تعیین می‌شود (این منحنی درجه سوم غلظت واکنش را به یک خط مستقیم تبدیل می‌کند که می‌تواند با رگرسیون از طریق حداقل مربعات یا حداکثر احتمال). در نهایت مقادیر غلظتی که باعث مرگ‌ومیر ۵۰٪ ماهیان در مدت ۹۶ ساعت مشخص می‌شود [14].

ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با توجه به گسترش جهانی و پرورش آن در آب‌های کوهستانی و جلگه‌ای و تولید سالانه آن نزدیک به ۱۷۶ هزار تن، از اهمیت خاصی در تامین پروتئین مورد نیاز جامعه برخوردار است [15]. ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌عنوان یکی از ماهیان خیلی حساس در برابر آلاینده‌ها مورد مطالعه قرار گرفت. بنابراین در ارزیابی خطرات آلاینده‌های محیط زیست به‌منظور حفاظت از موجودات آبی از مقادیر ۰/۱ تا ۰/۱۰ مقدار LC₅₀ استفاده می‌شود [16]. هدف از این پژوهش با توجه به تعیین غلظت کشندگی در مطالعات سم‌شناسی ضروری است، میزان LC₅₀ در مورد آلاینده دی-ان-بوتیل فتالات طی ۹۶ ساعت تعیین شد.

مواد و روش‌ها

تعداد ۱۲۰ عدد بچه‌ماهیان انگشت قد با وزن ۷/۳±۱/۲۵ قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌منظور بررسی غلظت کشندگی میانی دی-ان-بوتیل فتالات از مرکز تکثیر و پرورش قزل‌دشت (بخش خصوصی) در شهرستان آمل تهیه شد و با رعایت شرایط انتقال اعم از در نظر گرفتن مسافت، تامین اکسیژن و تراکم مناسب به سالن تحقیقات آبیان دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس منتقل شدند. به‌منظور سازگاری و شرایط سازگاری ماهیان به‌مدت یک هفته به حوضچه ۱۰۰۰ لیتری با آب کلرزدايي‌شده و هواده‌ی‌شده منتقل شدند. دیگر شرایط فیزیکی‌وشیمیایی آب در طول دوره نگهداری و سازگاری در جدول ۱ ذکر شده است.

طی این مدت و تا ۴۸ ساعت قبل از تیمار بندی و شروع آزمایشات رویارویی با دی-ان- بوتیل فتالات با غذای تولید کارخانه غذای آبیان‌ساری انجام شد. دوره روشنایی و تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت بود [17]. تغذیه ماهیان تا ۲۴ ساعت قبل از شروع رویارویی با دی-ان- بوتیل فتالات قطع شد [18].

با توجه به عدم مشخص بودن غلظت کشندگی میانی LC₅₀ (96h) دی-ان- بوتیل فتالات در بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان، برای یافتن دامنه کشندگی آزمایش اولیه تعیین دامنه انجام شد [19]. آزمایش سمیت حاد براساس روش استاندارد سازمان توسعه و همکاری اقتصادی (OECD) به‌صورت ساکن (استاتیک) انجام شد [20] که در آن غلظت آلاینده در طول دوره ۹۶ ساعت آزمایش در حوضچه‌های ۱۰۰ لیتری ثابت نگهداشته شد.

بعد از انجام آزمایش اولیه تعیین دامنه کشندگی، آزمایش نهایی سمیت حاد دی-ان- بوتیل فتالات روی بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در ۵ تیمار ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر با یک تیمار شاهد صورت گرفت. به‌ازای هر تیمار ۲۰ عدد ماهی در هر حوضچه قرار داده شد. ماهیان تلف‌شده پس از رویارویی با دی-ان-بوتیل فتالات، به محض مشاهده از حوضچه جمع‌آوری و تعداد تلفات ماهی در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ شمارش و ثبت شدند.

مدت زمان ۹۶ ساعت ۹/۹۳ میلی گرم در لیتر به دست آمد. براساس میزان غلظت محاسباتی LC₅₀ 96h می توان آلاینده DnBP را در گروه ماده سمی متوسط طبقه بندی نمود (جدول ۵).

جدول ۲) میزان مرگ و میر بچه ماهیان قزل آلائی رنگین کمان در ۹۶ ساعت قبل رویارویی با DnBP

مدت زمان آزمایش (ساعت)	۲۴	۴۸	۷۲	قبل از رویارویی	۹۶
تکرار					
۱	۰	۰	۰	۰	۰
۲	۰	۰	۰	۰	۰
۳	۰	۰	۰	۰	۰

جدول ۳) میزان مرگ و میر بچه ماهیان قزل آلائی رنگین کمان در ۹۶ ساعت حین رویارویی با DnBP

مدت زمان آزمایش (ساعت)	۲۴	۴۸	۷۲	۹۶
غلظت DnBP (میلی گرم در لیتر)				
صفر (شاهد)	۰	۰	۰	۰
۰/۱	۰	۰	۱	۲
۰/۵	۰	۲	۴	۶
۱	۳	۵	۶	۷
۱۰	۱۱	۱۴	۱۶	۱۹
۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰

جدول ۴) غلظت کشنده LC₅₀₋₉₅ DnBP بر بچه ماهی قزل آلائی رنگین کمان طی زمان ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت

LC (پروبیوت)	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
LC	۱/۹۱	۱/۰۱	-۱/۰۶	-۳/۴۶
LC ₅	۲/۱۶	۱/۲۹	۰/۹۳	-۲/۲۱
LC ₁₀	۲/۸۴	۲/۴۱	۱/۱۳	۰/۱
LC ₁₅	۷/۱۷	۵/۹۶	۳/۱۲	۱/۰۶
LC ₄₀	۱۴/۳۶	۱۱/۷۳	۹/۲۶	۴/۳۱
LC ₅₀	۱۵/۴۶	۱۲/۹۶	۱۱/۲۱	۹/۹۳
LC ₆₀	۱۶/۱۷	۱۳/۰۹	۱۱/۵۸	۱۰/۰۶
LC ₈₅	۱۷/۹۵	۱۳/۳۷	۱۲/۱۱	۱۰/۷۳
LC ₉₀	۱۸/۱۸	۱۴/۰۱	۱۲/۶۱	۱۱/۰۱
LC ₉₅	۱۸/۹۹	۱۵/۸۹	۱۳/۳۳	۱۲/۲۳
LC ₉₉	۱۹/۲۳	۱۷/۲۵	۱۵/۳۸	۱۳/۶۴

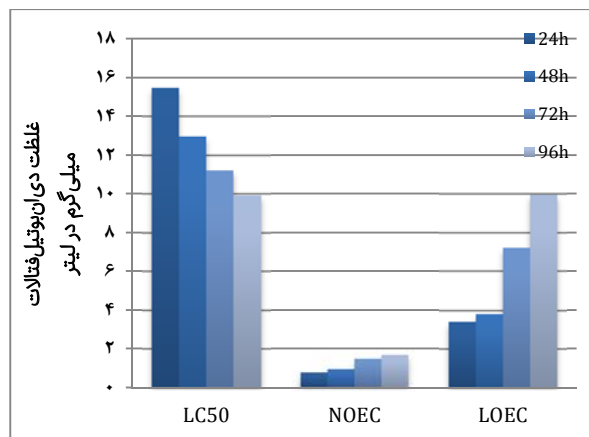
جدول ۵) طبقه بندی سطوح سمیت آلاینده ها [23]

درجه سمیت	LC ₅₀ (میلی گرم بر لیتر)
بیشتر از ۱۰۰	نسبتاً سمی
۱۰-۱۰۰	کمی سمی
۱-۱۰	سمی متوسط
۰/۱-۱	خیلی سمی
کمتر از ۰/۱	شدیداً سمی

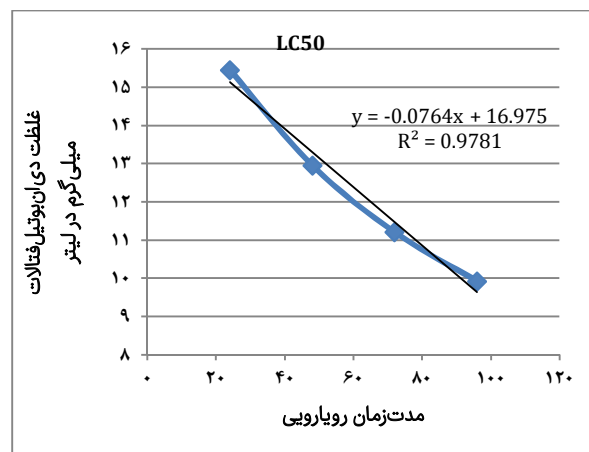
میزان حداقل غلظت موثر (LOEC) آلاینده DnBP در مدت زمان ۹۶ ساعت ۹/۹۵ میلی گرم در لیتر و میزان بالاترین غلظت بدون تاثیر (NOEC) آلاینده DnBP در مدت ۹۶ ساعت ۱/۶۸ میلی گرم در لیتر در بچه ماهیان قزل آلائی رنگین کمان برآورد شد (نمودار ۱). با توجه به نتایج به دست آمده در این آزمایشات میزان NOEC در زمان ۲۴ ساعت پس از رویارویی ۰/۷۸ میلی گرم در لیتر تعیین شد و در سایر زمان ها ۴۸، ۷۲ و ۹۶ به ترتیب ۰/۹۵، ۱/۴۵ و ۱/۶۸ محاسبه شد که بیانگر تاثیر اولین غلظت موثر تنها در مدت زمان های مذکور از رویارویی آلاینده است. از سوی دیگر LOEC نیز تقریباً با همین روند تکرار شد و در مدت زمان ۲۴ ساعت پس از رویارویی

بچه ماهیان قزل آلائی رنگین کمان با غلظت ۳/۴ میلی گرم در لیتر DnBP به دست آمد و در بقیه زمان های ۴۸، ۷۲ و ۹۶ به ترتیب ۳/۸، ۷/۲ و ۹/۹۵ میلی گرم در لیتر محاسبه شد که نشان دهنده تاثیر DnBP بر غلظت های آزمایش در زمان های مختلف رویارویی است (نمودار ۱).

پس از به دست آوردن ضریب همبستگی بین غلظت و مدت زمان رویارویی بچه ماهیان قزل آلائی رنگین کمان و رسم نمودار آن (نمودار ۲) معادله میزان LC₅₀ به صورت $Y = 0.0764X + 16.975$ به دست آمد که میزان R^2 آن برابر ۰/۹۷۸۱ بود.



نمودار ۱) مقایسه شاخص های مختلف سمیت در بچه ماهیان قزل آلائی رنگین کمان



نمودار ۲) نمودار همبستگی بین زمان رویارویی بچه ماهیان قزل آلائی رنگین کمان با غلظت های مختلف DnBP

رفتار عمومی بچه ماهیان قزل آلائی رنگین کمان پس از رویارویی با آلاینده DnBP با غلظت های متفاوت آن کمی اختلاف داشت. اما رفتارهای طبیعی پس از تاثیر رویارویی به صورت غیرعادی شد، به طوری که در ابتدا دچار شای سربالا شده و پس از مدتی به صورت تجمعی در کف حوضچه ها بدون حرکت می ماندند و سپس به پهلو شنا می کردند. ماهیانی که در رویارویی با این آلاینده بودند، دچار اختلالات تنفسی شدند و سرپوش آبششی با سرعت بیشتری نسبت به بچه ماهیان حوضچه های شاهد باز و بسته می شدند و در اطراف سنگ هوا و حبابچه های هوا به پهلو شنا می کردند. رنگ بدن ماهیان به تدریج از روشن به تیرگی و رنگ پریدگی تغییر پیدا می کرد. حالت لرز و تشنج در غلظت های کم به صورت دوره ای دیده شد که در نهایت باعث مرگ و میر آنها شد. اما در غلظت های بالا این

موثر در تاثیرگذاری سمیت آلاینده‌ها است [29]. هنگام رویارویی بچه‌ماهیان با غلظت ثابت آلاینده DnBP به مرور مقاومت بچه‌ماهیان کمتر می‌شود و همچنین آلاینده فرصت بیشتری برای تاثیرگذاری (افزایش تماس) روی ماهی می‌گذارد. علاوه بر این احتمال انباشت زیستی این آلاینده در بافت‌های ماهی (به‌خصوص کبد و تخمدان) به مرور موجب پایین آمدن LC50 می‌شود.

آلاینده DnBP گرچه در غلظت‌های پایین (زیر کشنده) به‌طور سریع موجب مرگ می‌شود اما باعث بروز تغییرات فیزیولوژیک و رفتاری در ماهی می‌شود که این تغییرات به تدریج روی توانایی ماهی نسبت به تحمل استرس‌های زیست‌محیطی اثر گذاشته و در نهایت باعث مرگ ماهی می‌شود [28]. میزان حداقل غلظت موثر در مدت زمان ۹۶ ساعت ۹/۹۵ میلی‌گرم در لیتر و میزان بالاترین غلظت بدون تاثیر در مدت ۹۶ ساعت ۱/۶۸ میلی‌گرم در لیتر تعیین شد که معمولاً مقدار عددی حداقل غلظت موثر بیشتر از میزان عددی بالاترین غلظت بدون تاثیر همان آلاینده است [29] (نمودار ۱).

با انجام آزمون همبستگی بین زمان‌های مختلف رویارویی بچه‌ماهیان با آلاینده DnBP (۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت) و میزان LC50 رابطه $Y = 0.0764X + 16/975$ به دست آمد و از آنجایی که R2 آن برابر ۰/۹۷۸۱ است می‌توان با این رابطه میزان LC50 طی زمان‌های مختلف برآورد نمود و با توجه به ضریب همبستگی بالای ۰/۹ ارتباط مستقیم و قوی بین غلظت‌های مورد نظر با تلفات بچه‌ماهیان وجود دارد و با افزایش غلظت میزان تلفات افزایش می‌یابد.

با توجه به حساسیت گونه قزل‌آلای رنگین‌کمان به نسبت به آلاینده‌ها و تولید بالای این گونه (۱۷۶ هزار تن در سال) [15]، مطالعات سم‌شناسی ضروری است بنابراین نتایج به‌دست‌آمده می‌تواند در ارزیابی خطرات بوم‌شناختی این گروه از آلاینده‌ها به‌ویژه DnBP کاربردی باشد.

با توجه به افزایش مصرف مواد پلیمری و پلاستیکی و رهاسازی ساده آن در آب‌ها قبل از رویارویی ماهیان با فتالات‌استر، مقدار این مواد در آب‌ها مشخص نبوده و توصیه می‌شود که میزان فتالات‌استر آب مورد احتیاج ماهیان در معرض اندازه‌گیری شود. همچنین با توجه به حساسیت موضوع میزان غلظت کشندگی فتالات‌استر به‌ویژه DnBP را در ماهیان مولد در مطالعات بعدی تعیین شود.

نتیجه‌گیری

در یک نتیجه‌گیری کلی براساس نتایج این تحقیق و سایر تحقیقات مشابه صورت‌گرفته در خصوص تاثیر آلاینده‌های فتالات‌استر به‌ویژه DnBP بر ماهی و سایر آبزیان می‌توان گفت که این آلاینده در غلظت‌های بالاتر از ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر بر ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان حالت کشندگی ایجاد می‌کند و اثرات زیانبار آن بر آبزیان و اکوسیستم‌های آبی مشخص شده که کاهش اثر منفی آن مستلزم مدیریت اصولی در جهت استفاده از فتالات‌استرها است.

تشکر و قدردانی: نویسندگان بر خود لازم می‌دانند تا از مدیریت و پرسنل شرکت قزل‌دشت آمل به‌منظور تامین بچه‌ماهیان برای انجام این تحقیق تشکر و قدردانی نمایند.

تاییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

رفتار با شدت بیشتری دیده شد و حالت دوره‌ای وجود نداشت و در همان ساعات اولیه تلف شدند. علاوه بر موارد ذکرشده، پرخونی آبشش‌ها و افزایش موکوس پوست نیز در بچه‌ماهیان دیده شد.

بحث

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در این آزمایش و همچنین به استناد به مطالعات قبلی در زمینه آزمایشات سمیت حاد می‌تواند در موارد سمیت آلاینده‌ها، تاثیر عوامل بیرونی بر آلاینده‌ها و تاثیر آلاینده‌ها بر گونه به نتیجه‌گیری کلی در مورد این آلاینده دست یافت. مطالعات زیادی در مورد سمیت فتالات استرها روی آبزیان صورت گرفته است. مطالعات سم‌شناسی حاد فتالات‌استرها بیشتر بر گاماروس، دافنی‌ها، جلبک‌ها و بی‌مهرگان آبی صورت گرفته است [24]. ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی فتالات‌استرها در ایجاد سمیت آنها در مواجهات کوتاه‌مدت و حاد تاثیر فراوان دارد. با توجه به حلالیت بیشتر فتالات‌استرها سبک با زنجیره آلکیلی کوتاه و وزن مولکولی کمتر، حتی در مقادیر بسیار کم موجب واکنش‌های سمی در بدن موجودات زنده به‌ویژه آبزیان می‌شود. به همین دلیل ایجاد سمیت حاد این ترکیبات زیاد است [9]. به‌منظور فهم و درک دقیق سازوکار اثر فتالات‌استرها نیاز به مطالعه متابولیتهای زیست‌فعال آنها دارد. فتالات‌استرها پس از جذب توسط آبزیان در کبد تبدیل به منواستر شده و منواسترها با توجه به ماهیت ساختاری در کبد در فاز انتقال زیستی با اسیدگلوکرونیک و اکشن داده و محصولات نهایی با حلالیت بیشتری در آب نسبت به فتالات‌استرها اولیه ایجاد می‌شود که این متابولیتهای موجب سمیت فتالات‌استرها هستند [25]. به‌علت متابولیتهای زیستی فتالات‌استرها در غلظت‌های خیلی کم و دفع سریع از بدن موجب عوارض خاصی در بدن موجودات آبی نمی‌شود اما رویارویی‌های پشت سر هم با غلظت‌های بیشتر موجب عوارض بافتی و فیزیولوژیک می‌شود [26].

کنترل شرایط آزمایش شرایط حاد در هنگام آزمایشات رویارویی از اهمیت زیادی برخوردار است. سنج‌های متعددی در نتایج این آزمایشات می‌تواند تاثیرگذار باشد، عواملی نظیر شرایط فیزیکوشیمیایی آب و ویژگی‌های زیستی گونه آزمایشی نام برد. برای به‌دست‌آوردن نتایج مورد اطمینان باید هنگام انجام رویارویی آلاینده‌ها، باید شرایط آزمایش را کنترل نمود و با به حداقل‌رساندن متغیرهای بیرونی و تصادفی با استاندارد کردن روش‌های آزمایش به این هدف دست یافت [27].

در این پژوهش میزان LC50 به‌دست‌آمده برای آلاینده DnBP برای بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان، ۹/۹۳ میلی‌گرم در لیتر (جدول ۴) تعیین شد که براساس میزان غلظت محاسباتی LC50 در مدت ۹۶ ساعت می‌توان آلاینده DnBP را در گروه ماده سمی متوسط (جدول ۵) طبقه‌بندی نمود. احسان و همکاران LC50 در مدت ۹۶ ساعت در بچه‌ماهیان انگشت‌قد تیلایپای نیل (*Oreochromis niloticus*) حدود ۱۱/۸ میلی‌گرم در لیتر به دست آوردند [28] که علت این اختلاف به نوع گونه ماهی و شرایط آزمایش بستگی دارد. مقادیر به‌دست‌آمده LC50 (جدول ۴) در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت نشان می‌دهد که با افزایش زمان رویارویی، میزان غلظت کمتری از آلاینده لازم است تا نصف جمعیت بچه‌ماهیان از بین برود و مقدار LC50 در ۲۴ ساعت اولیه آزمایش رویارویی همواره بیشتر از LC50 در پایان ۹۶ ساعت است. علت این امر را می‌توان به عامل زمان رویارویی ربط داد. زمان رویارویی به‌عنوان یک عامل

- 14- Boran M, Altinok L, Çapkin E, Karaçam H, Bıçer V. Acute toxicity of carbaryl, methiocarb, and carbosulfan to the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and guppy (*Poecilia reticulata*). *Turk J Vet Anim Sci*. 2007;31(1):39-45.
- 15- Fisheries Statistical Yearbook. Ministry of Agriculture-Jahad [Internet]. Tehran: Iran Fisheries Organization; 2016 [cited 2018 Aug 12]. Available from: <https://bit.ly/2XWMgNq> [Persian]
- 16- Shyong WJ, Chen HC. Acute toxicity of copper, cadmium, and mercury to the freshwater fish *Varicorhinus barbatulus* and *Zacco barbata*. *Acta Zoologica Taiwanica*. 2000;11(1):33-45.
- 17- Di Giulio RT, Hinton DE, editors. The toxicology of fishes. Boca Raton: CRC Press; 2008. pp. 319-884.
- 18- Banaee M, Mirvagefi AR, Rafei GR, Majazi Amiri B. Effect of sub-lethal diazinon concentrations on blood plasma biochemistry. *Int J Environ Res*. 2008;2(2):189-98.
- 19- Inyang I, Daka E, Ogamba E. Changes in electrolyte activities of *Clarias gariepinus* exposed to diazinon. *Biol Environ Sci J Trop*. 2010;198-200.
- 20- Organization for Economic Co-Operation and Development. Section 2-Effects on biotic systems, OECD guidelines for the testing of chemicals. Paris: OECD; 1984.
- 21- Milne I, Seager J, Mallett M, Sims I. Effects of short-term pulsed ammonia exposure on fish. *Environ Toxicol Chem*. 2000;19(12):2929-36.
- 22- Rice EW, Baird RB, Eaton AD. Standard methods for the examination of water and wastewater, 23rd edition. Unknown city: American Public Health Association, American Water Works Association; 2017.
- 23- Louis AH, Diana LW, Patricia H, Elizabeth RS. Pesticides and aquatic animals: A Guide to Reducing Impacts on Aquatic Systems [Internet]. Virginia: Virginia Cooperation Extension, Virginia State University; 1996 [cited 2018 Aug 25]. Available from: <https://www.pubs.ext.vt.edu/420/420-013/420-013.html>.
- 24- Urien N, Uher E, Billoir E, Geffard O, Fechner LC, Lebrun JD. A biodynamic model predicting waterborne lead bioaccumulation in *Gammarus pulex*: Influence of water chemistry and in situ validation. *Environ Pollut*. 2015;203:22-30.
- 25- Bang DY, Lee IK, Lee BM. Toxicological characterization of phthalic acid. *Toxicol Res*. 2011;27(4):191-203.
- 26- Mahood IK, Scott HM, Brown R, Hallmark N, Walker M, Sharpe RM. In utero exposure to di(n-butyl) phthalate and testicular dysgenesis: Comparison of fetal and adult end points and their dose sensitivity. *Environ Health Perspect*. 2007;115 Suppl 1:55-61.
- 27- Abel PD, Axiak V. Ecotoxicology and the marine environment. Cambridge: Cambridge University Press; 1991.
- 28- Abu Zeid EH, Khalil ASA. Toxicological consequences of Di-n-Butyl-Phthalate (DBP) on health of Nile tilapia fingerlings. *Am J Anim Vet Sci*. 2014;9(4):269-76.
- 29- Sharifpour I, Soltani M, Javadi M. Determination of lethal concentration (LC50) Endosulfan and its damage in *Huso huso*. *J Sci Fish Iran*. 2003;12(4):69-84. [Persian]

سهم نویسندگان: مرتضی کمالی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/روش شناس/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۲۵٪)؛ علی شعبانی (نویسنده دوم)، روش شناس/پژوهشگر کمکی (۲۵٪)؛ محمدرضا کلباسی (نویسنده سوم)، روش شناس/پژوهشگر کمکی/تحلیلگر آماری (۲۵٪)؛ حامد پاک نژاد (نویسنده چهارم)، پژوهشگر کمکی/تحلیلگر آماری (۲۵٪)

منابع مالی: مطالعه حاضر تحت حمایت مالی گزنت دانشجویی و اساتید بوده است.

منابع

- 1- Clark RB, Frid C, Attrill M. Marine pollution. Oxford UK: Oxford University Press; 2001.
- 2- Costa J, Ferreira M, Rey-Salguero L, Reis-Henriques MA. Comparison of the waterborne and dietary routes of exposure on the effects of Benzo(a)pyrene on biotransformation pathways in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Chemosphere*. 2011;84(10):1452-60.
- 3- Embry MR, Belanger SE, Braunbeck TA, Galay-Burgos M, Halder M, Hinton DE, et al. The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. *Aquat Toxicol*. 2010;97(2):79-87.
- 4- Moore NP. The oestrogenic potential of the phthalate esters. *Reprod Toxicol*. 2000;14(3):183-92.
- 5- Heudorf U, Mersch-Sundermann V, Angerer J. Phthalates: Toxicology and exposure. *Int J Hyg Environ Health*. 2007;210(5):623-34.
- 6- Wenzl T. Methods for the determination of phthalates in food [Internet]. Belgium: JRC European Commission; 2009 [cited 2018 Aug 12]. Available from: <https://www.bezpecnostpotravin.cz/UserFiles/File/Publikace/ftalaty.pdf>
- 7- Uren-Webster TM, Lewis C, Filby AL, Paull GC, Santos EM. Mechanisms of toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate on the reproductive health of male zebrafish. *Aquat Toxicol*. 2010;99(3):360-9.
- 8- Staples CA, Peterson DR, Parkerton TF, Adams WJ. The environmental fate of phthalate esters: A literature review. *Chemosphere*. 1997;35(4):667-749.
- 9- Magdoui S, Daghrir R, Brar SK, Drogui P, Tyagi RD. Di 2-ethylhexylphthalate in the aquatic and terrestrial environment: A critical review. *J Environ Manage*. 2013;127:36-49.
- 10- Bradlee CA, Thomas P. Aquatic toxicity of phthalate esters. In: Staples CA, editor. Series anthropogenic compounds, the handbook of environmental chemistry. 3Q Volume. Berlin/Heidelberg: Springer; 2003. pp. 263-98.
- 11- Evans DH, Claiborne JB, editors. The physiology of fishes. Boca Raton: CRC Press; 2005. p. 601.
- 12- Fakharzadeh SME, Farhangi M, Mojazi Amiri B, Ahmadi M, Mazloumi N. The effect of hydrocortisone treatment by bathing and daphnia enrichment on the salinity stress in Persian sturgeon *Acipenser persicus* juvenile. *Int Aquat Res*. 2011;3:125-33.
- 13- Hakim Y, Ali HA. Evaluation of the toxic effects of phthalate, Di-n-Butyl Phthalate (DBP) on health of *Oreochromis niloticus*. *World J Fish Marine Sci*. 2014.