فصلنامه علمی ـ پژوهشی دورهٔ ۵، شمارهٔ ۳، پاییز ۱۳۹۵، صفحه ۵۱- ٦٤

پاسخ رشد و آسیب‌های بافت آبشش بچه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در معرض سم زیستی نییم آزال (*Azadirachtin indica*)

امین اوجی فرد[1*]، محمد جواد پاپری مقدم[2]، رضا داودی[1] و عالی حسینی[1]

۱- * استادیار گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه خلیج فارس بوشهر
۲- فارغ التحصیل کارشناسی ارشد شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه خلیج فارس بوشهر

دریافت: ۹٤/۰۸/۱۷ پذیرش: ۹۵/۰۱/۱٤

* نویسنده مسئول مقاله: Oujifard.amin@gmail.com

چکیده

اثرات مزمن سم نییم آزال بر شاخص‌های رشد، بقا و مورفولوژی آبشش بچه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) با میانگین وزن ۰/۱۲±۱۰/۵٦ گرم بررسی شد. تعداد ۱۲۰ عدد ماهی بطور مساوی در ۳ گروه تیمار و یک گروه شاهد و هرکدام سه تکرار تقسیم گردیدند. جهت تعیین اثرات مزمن، دوزهای زیر غلظت کشنده این سم، ۰/۱۲ (LC_{50} ٪۱۰)، ۰/۲٤ (LC_{50} ٪۲۰) و ۰/۳٦ (LC_{50} ٪۳۰) انتخاب شد و ماهیان به مدت ۲۸ روز در معرض این دوزها قرار گرفتند. افزایش دوز نییم آزال تأثیر معنی‌داری بر پارامترهای رشد داشت، بطوری که با افزایش میزان دز سم، رشد بطور معنی داری کاهش یافت ($p<۰/۰۵$). با اینحال در بقا تغییر معنی‌داری مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$). الگوی رفتاری ماهیان، شامل شنای نامنظم، بروز رفتارهای غیر طبیعی، واکنشهای عصبی به محرکهای خارجی، افزایش ضربات سرپوش آبششی و بی اشتهایی در طول آزمایش مشاهده شد. همچنین با افزایش میزان دوز سم، تخریب بافتی آبشش بیشتر شد ($p<۰/۰۵$). بطور کلی با افزایش میزان سم زیستی، اثرات منفی آن بر رشد و بافت آبشش بچه ماهی کپور معمولی مشاهده شد.

کلید واژگان: آبشش، سم زیستی، ماهی، رشد

1 Oujifard.amin@gmail.com

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.3.9.8]

مقدمه

سموم و آفت‌کش‌ها امروزه از مهم‌ترین عوامل ایجاد مسمومیت در ماهیان هستند که از بین هزاران ماده شیمیایی رهاسازی شده، آفت‌کش‌ها حتی در غلظت‌های بسیار کم باعث مرگ‌ومیر بالایی می‌شوند. تولید بچه ماهیان با کیفیت بالا در محیط‌های طبیعی به عوامل محیطی بسیاری بستگی دارد که یکی از این آنها سموم است (Sanchez-fortun et al., 2005). استفاده از سموم آفت‌کش تا زمانی‌که شیوه مبارزه بیولوژیک با آفات گیاهی مرسوم نشود، امری اجتناب‌ناپذیر است. بنابراین توصیه می‌شود که دست‌کم از آفت‌کش‌هایی با درجه سمیت و نیمه عمر کمتر، استفاده شود (Vandergeest et al., 1997). داده‌های مربوط به سمیت ناشی از استعمال آفت‌کش‌ها، و تأثیر آنها روی موجودات غیرهدف مثل ماهی، به‌عنوان مبنا و پایه‌ای برای سنجش و تعیین خطرهای اکوتوکسیکولوژی آفت‌کش‌ها بر روی اکوسیستم آبی می‌باشد (Gangolli, 1999).

در طی سال‌های اخیر به‌منظور افزایش بهره‌برداری بیشتر از محصولات کشاورزی، از علف‌کش‌ها به‌طور گسترده‌ای استفاده شده است که در نتیجه آن، مقدار قابل توجهی از این گونه ترکیبات سمی در نتیجه فرایند شسته شدن از سطح خاک، گیاه و زهاب به اکوسیستم آبی وارد شده‌اند که در نهایت منجر به ایجاد آثار زیانباری بر جمعیت گونه‌های آبزی موجود در این اکوسیستم می‌شوند. ارزیابی‌ها نشان می‌دهد که حداکثر یک درصد آفت‌کش‌های مصرفی، صرف از بین بردن آفات شده و در نتیجه مقادیر قابل توجهی از آنها وارد محیط‌زیست می‌شوند و منابع آبی و خاکی را آلوده می‌کنند (Young, 1987). امروزه با افزایش کاربرد بسیاری از ترکیبات شیمیایی در بخش‌های کشاورزی و صنعتی در دنیا، ضروری است که روش‌های محاسبه و تعیین مقادیر سمیت این‌گونه ترکیبات نیز توسعه یابد. در مرحله نخست سمیت حاد این مواد بر روی جلبک‌ها، ماهیان و دیگر موجودات زنده باید ارزیابی گردد تا خطرهای ناشی از مواجهه با آنها مشخص شود.

حساسیت گونه‌های مختلف ماهی به مواد سمی متفاوت، متغیر است، از این‌رو آزمایش‌های سم‌شناسی بر روی ماهیان مختلف صورت می‌گیرد (Finney, 1971). کپور معمولی از گونه‌های مهم پرورشی است که در بیشتر نقاط دنیا پرورش داده می‌شود (Tokur et al., 2006). ماهی کپور معمولی به‌عنوان یکی از مهم‌ترین گونه‌های پرورشی در نقاط مختلف ایران، اغلب در نزدیکی زمین‌های کشاورزی پرورش داده می‌شود. از نظر زیست‌شناسی نیز شباهت بسیاری بین این ماهی و ماهیان بومی رودخانه‌های ایران وجود دارد و به‌خوبی با شرایط آزمایشگاهی سازگار می‌شود (Mirvaghefi et al., 2010). امروزه در تمام کشورها با توجه به آگاهی افراد نسبت به اثرهای جانبی مرتبط با استفاده از آفت‌کش‌های سنتزی، تلاش می‌شود تا با جایگزینی آفت‌کش‌های بیولوژیک و طبیعی به‌جای انواع سنتزی، گامی برای حفظ محیط‌زیست و سلامت انسان برداشته شود. از جمله این موارد استفاده از فراورده های گیاهی است. یکی از خانواده‌های گیاهی که اثرهای متنوع بر آفات و حشرات دارد، خانواده *Meliaceae* است. یکی از گونه‌های این خانواده به‌نام نییم[1]، گیاه بومی شبه قاره هند، با ویژگی‌های دارویی بسیار زیاد می‌باشد (Randhawa et al., 1993). از ترکیبات مختلف گیاه نیم می‌توان به خواص ضدویروسی، ضدباکتریایی، ضد ارچی، ضدالتهاب و ضدتب اشاره کرد (Singh et al., 1981, Gogati et al., 1989, Kher et al., 1997). نیم آزال یک حشره‌کش گیاهی مشتق شده از درخت نییم و یکی از امید

1. Neem

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.3.9.8]

بخش‌ترین ترکیبات طبیعی (Winkaler et al., 2007) است، زیرا نسبت به حشره‌کش‌های مصنوعی زیان کمتری به محیط‌زیست می‌رساند (Sundaram, 1996). با این حال، نیم برای موجودات غیرهدف که باعث ایجاد تغییرات قابل توجهی در حیوانات آزمایشگاهی می‌شود، سمی یافت شده است (Mahboob et al., 1998, Panda et al., 2000, Rahman et al., 2002, Hassanein et al., 2007).

در این تحقیق با توجه به تأثیرهای منفی حشره‌کش‌های سنتزی و لزوم جایگزینی با حشره‌کش‌های زیستی، و به دلیل وجود اثرهای منفی احتمالی حشره‌کش‌های زیستی بر اکوسیستم، اثر سم نییم آزال بر رشد، بقا و بافت آبشش بچه ماهی کپور معمولی مطالعه شد.

مواد و روش‌ها

تهیه ماهی و محل پرورش

این پژوهش در کارگاه تکثیر و پرورش آبزیان واقع در ۷ کیلومتری شهر برازجان در دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی انجام گرفت. برای سازش ماهی با شرایط آزمایش، تعداد ۵۰۰ قطعه ماهی با وزن اولیه ۰/۱۲± ۱۰/۵٦ گرم، به‌صورت انفرادی توزین و به‌طور تصادفی در تانک‌های فایبرگلاس منتقل شدند. ماهیان از مزرعه پرورش ماهی در شوشتر تهیه و با تانکر مجهز به کپسول اکسیژن به کارگاه مورد نظر منتقل گردیدند. آزمایش در یک سالن سر پوشیده با دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی به‌مدت ۲۸ روز انجام شد. ضدعفونی ماهیان نیز ابتدا با غوطه‌وری در محلول نمک ٤ درصد به‌مدت ۱ دقیقه انجام شد. در ابتدا اثرهای سمیت مزمن نییم آزال بر روی بچه ماهیان تعیین گردید که به همین منظور تعداد ۱۲۰ عدد از این بچه ماهیان جدا شده و برای انجام آزمایش تشخیص سمیت مزمن در ٤ تیمار و ۳ تکرار با ۱۰ عدد ماهی در هر تکرار و در داخل ۱۲ آکواریوم (۳ عدد آکواریوم برای هر تیمار و ۳۰ عدد ماهی در هر تیمار) قرار داده شدند. ماهیان در غلظت‌های مختلف نییم آزال (۰، ۱، ۱/٤۱ و ppm ۲) به‌مدت ۹٦ ساعت قرار گرفتند و مرگ‌ومیر آنها ثبت شد. LC_{50} ۹٦h با روش Finney's probit آنالیز شد و ppm ۱/۱۹ به‌دست آمد (داده‌های در حال انتشار). از آنجایی که مقدار LC_{50} 96h این سم ۱/۱۹ میلی‌گرم در لیتر تعیین شد، بنابراین برای بررسی تأثیر مزمن سم زیستی، آزمایش براساس دستورالعمل OECD و به‌صورت نیمه استاتیک و در قالب طرحی کاملاً تصادفی در چهار تیمار با سه تکرار (سه تیمار سم به غلظت ۰/۱۲ (۱۰٪ از LC_{50})، ۰/۲٤ (۲۰٪ از LC_{50})، ۰/۳٦ (۳۰٪ از LC_{50}) میلی‌گرم در لیتر و یک گروه شاهد) انجام گرفت. در هر ۲٤ ساعت آب به‌همراه سم تعویض شد تا هم کیفیت آب شرایط بهتری داشته باشد و هم این‌که غلظت نییم آزال در تمام طول دوره ثابت باشد و در طول دوره تغییراتی در ترکیب سم ایجاد نشود. پس از ۲۸ روز، ماهیان هر گروه به‌وسیله پودر گل میخک با دوز ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بیهوش شده (Velisek et al., 2005) و سپس با دقت ۰/۰۱ گرم بیومتری شدند و از آبشش این ماهیان نمونه‌برداری شد و در فرمالین ۱۰ درصد تثبیت گردید.

اندازه‌گیری شاخص‌های فیزیکوشیمیایی آب

برای بررسی کیفیت آب، دمای آب به‌صورت روزانه و pH و مقدار شوری دو هفته یک‌بار سنجش و ثبت شد. درجه حرارت (با دماسنج جیوه‌ای)، اکسیژن محلول با اکسیژن متر، ساخت آلمان و مدل wtw و pH با pH متر، مدل winlab و شوری با شوری‌سنج، ساخت آلمان و مدل wtw سنجش شد.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.3.9.8]

زیست‌سنجی و بررسی شاخص‌های رشد و درصد بازماندگی بچه ماهیان

برای بررسی اثر نییم آزال بر شاخص‌های رشد، اندازه‌گیری وزن ماهیان با کمک ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم انجام گردید و سپس توسط غذای کنسانتره ماهیان گرمابی سه بار در روز در ساعت‌های ۸، ۱٦ و ۲٤ تغذیه شدند. درصد میزان پروتئین و چربی جیره به‌ترتیب ۳۳/۷۸ و ٦/۹۱ درصد بود. غذادهی در طول مدت آزمایش به‌صورت دستی انجام گرفت.

تجزیه و تحلیل شاخص‌های رشد: پس از اتمام دوره پرورش افزایش وزن بدن (WG)، ضریب تبدیل غذایی (FCR) و ضریب رشد ویژه (SGR) از طریق فرمول‌های زیر محاسبه شدند (Misra et al., 2006).

میانگین وزن اولیه (گرم) – میانگین وزن ثانویه (گرم) = (WG) افزایش وزن بدن

افزایش وزن بدن (گرم)/ مقدار غذای خورده شده (گرم) = [1](FCR) ضریب تبدیل غذایی

۱۰۰ × {تعداد روزهای پرورش / (لگاریتم طبیعی وزن اولیه – لگاریتم طبیعی وزن نهایی)} = [2](SGR) ضریب رشد ویژه

علایم و ویژگی‌های ظاهری

بچه ماهیان در گروه شاهد و حاوی سم، اغلب برای جلوگیری از شرایط کم اکسیژن هوادهی شدند. ماهیان قرار گرفته در معرض سم و گروه شاهد در طول دوره آزمایش به‌صورت مداوم تحت نظر بوده و الگوی رفتاری و هرگونه حرکت غیرعادی در آنها ثبت شد.

بافت‌شناسی آبشش

در پایان آزمایش برای انجام مطالعات بافت‌شناسی از آبشش‌های بچه ماهیان نمونه‌برداری شد. برای این منظور بافت آبشش، از هر تکرار سه عدد ماهی به‌طور تصادفی انتخاب گردید. پس از جدا کردن بافت آبشش، نمونه‌ها درون فرمالین ٤ درصد تثبیت و به آزمایشگاه بافت‌شناسی منتقل شدند. سپس نمونه‌های تثبیت شده در الکل ۷۰ درصد نگهداری شدند. نمونه‌های نگهداری شده در الکل ۷۰ درصد با سری افزایشی اتانول (۸۰، ۹۰، ۱۰۰ درصد) قرار گرفتند و در ادامه در زایلل (برای شفاف‌سازی) و در نهایت به‌منظور استحکام بافت و حفظ شکل واقعی سلول‌ها در پارافین قرار داده شدند. تمامی این مراحل با دستگاه آماده‌سازی بافت[3] تحت برنامه تعریف شده برای این کار انجام شد. نمونه هر آبشش متعلق به هر تیمار همراه با کد مشخص، داخل محفظه‌های پلاستیکی قرار داده شد و درون دستگاه Tissue processor برای انجام فرایندهای آبگیری تا نفوذ پارافین چیده شد. بافت‌ها سپس با پارافین (دمای ذوب ۵۸-۵٦ درجه سانتی‌گراد) بر روی قالب‌های مخصوص tissue tech قالب‌گیری شد. از قالب‌های پارافینه با استفاده از دستگاه میکروتوم[4] برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرون تهیه و پس از قرارگیری بر روی لام، به‌مدت ٤۰ دقیقه در آون (٦۲ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شد تا پارافین اضافه از روی بافت حذف شود. نمونه‌ها پس از پارافین‌زدایی و جایگزینی آن با زایلل (۳بار، هر بار ۵ دقیقه)، به‌وسیله سری‌های کاهشی اتانول (۱۰۰، ۹۰ و ۷۰ درصد) آب‌دهی مجدد شد و با استفاده از محلول‌های هماتوکسیلین[5] (به‌مدت ۵ دقیقه) و ائوزین[6] (به‌مدت ۳۰ ثانیه تا ۱ دقیقه) رنگ‌آمیزی شدند. پس از آبگیری در سری افزایشی اتانول (تا الکل ۱۰۰

1. Feed Conversion Rate (FCR)
2. Specific Growth Rate (SGR)

3. Tissue processor
4. Microtome
5. Hematoxylin
6. Eosin

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.3.9.8]

درصد)، شفاف‌سازی با زایلل خالص (۲ مرتبه و هر بار به‌مدت ۱۰ دقیقه)، انجام پذیرفت. در نهایت لامل با استفاده از چسب انتالین[1] روی لام‌ها چسبانده شد (Kumar et al., 2010). نمونه‌های بافت زیر میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی‌های ٤٠ و ١٠٠ بررسی شدند. عملیات بافت‌شناسی در آزمایشگاه بافت‌شناسی پژوهشکده خلیج‌فارس بوشهر انجام گرفت.

تجزیه و تحلیل نتایج

طرح کلی این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی (Completely Randomized Design) برنامه‌ریزی و اجرا شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها و مقایسه میانگین‌ها با آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه (One – Way ANOVA) و روش دانکن در سطح اعتماد ۹۵ درصد و با استفاده از نرم‌افزار spss 16 انجام شد.

نتایج

شاخص‌های کیفیت آب پرورش

جدول ۱ شاخص‌های کیفیت آب را نشان می‌دهد که در طول مدت پرورش برای کپور معمولی سنجش شد. داده‌ها نشان داد که کیفیت آب برای پرورش این گونه مناسب بوده است.

جدول ۱ شاخص‌های کیفیت آب در طول مدت ۲۸ روز پرورش

شاخص	انحراف معیار± میانگین
شوری (ppt)	۲/۳±۰/۱
اکسیژن (میلی‌گرم در لیتر)	٦/١٢±٠/٤
دما (درجه سانتی‌گراد)	١٨/٦١±١/٣٧
pH	٧/٨٧±٠/١

2. Antaline

رشد

جدول ۲ نتایج شاخص‌های رشد بچه ماهیان کپور معمولی شاهد و بچه ماهیانی که تحت تأثیر غلظت‌های مزمن ۰/۱۲، ۰/۲٤ و ۰/۳٦ میلی‌گرم در لیتر (به‌ترتیب ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد LC_{50}) نییم آزال قرار داشتند، را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که پس از ۲۸ روز پرورش، با افزایش میزان سم، وزن نهایی، اختلاف وزن و ضریب رشد ویژه کاهش معناداری یافت. در این میان با افزایش دوز سم میزان ضریب تبدیل غذایی افزایش یافت (جدول ۳). در این میان ضریب تبدیل غذایی و ضریب رشد ویژه شاهد و تیمار ۰/۱۲ سم، تفاوت معناداری از خود نشان نداد. همچنین با وجود کاهش میزان وزن بدن، درصد بقا تغییری نکرد و تلفاتی در طول آزمایش مشاهده نشد.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]

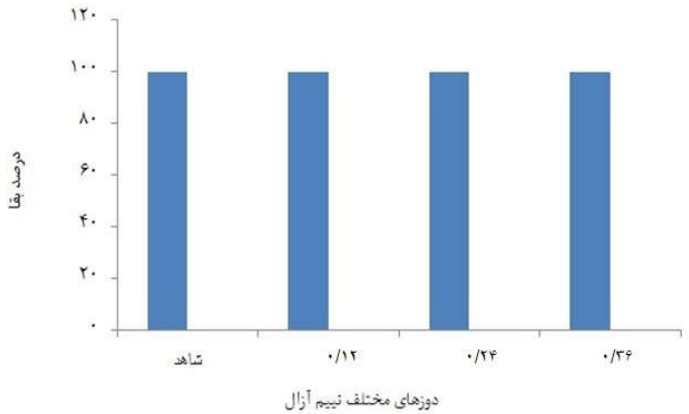
[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.3.9.8]

جدول ۲ نتایج شاخص‌های رشد بچه ماهیان قرار گرفته در معرض نییم آزال

شاخص رشد/ دوز سم	شاهد	۰/۱۲(ppm)	۰/۲٤(ppm)	۰/۳٦(ppm)
وزن اولیه (گرم)	۱۰/٦۳±۰/۱۹^{a}	۱۰/٤۰±۰/۲۲^{a}	۱۰/۵۳±۰/۲۸^{a}	۱۰/٦۷±۰/۱۷^{a}
وزن نهایی (گرم)	۱۸/۷۱±۰/٤۲^{a}	۱۸/۰٤±۰/۱۸^{b}	۱۷/۰٦±۰/۱٤^{c}	۱٦/٤۹±۰/۱۵^{d}
اختلاف وزن (گرم)	۸/۲۵±۰/۲۲^{a}	۷/٦٤±۰/۲۱^{b}	٦/٤٦±۰/۱٦^{c}	۵/۸۱±۰/۱۱^{d}
ضریب تبدیل غذایی	۲/۰۷±۰/۰۵^{c}	۲/۱۳±۰/۰۳^{c}	۲/۳۹±۰/۱۵^{b}	۲/۸٦±۰/۱۳^{a}
میزان غذای مصرفی	۱۷/۱۰±۰/۱۰^{a}	۱٦/۲۷±۰/۳۲^{ab}	۱۵/٤۳±۰/٦۰^{bc}	۱۵/۰۷±۰/۷۰^{c}
ضریب رشد ویژه	۲/۰٦±۰/۱٤^{a}	۱/۹۷±۰/۰۷^{a}	۱/۷۰±۰/۱۵^{b}	۱/۵۵±۰/۰۳^{c}

جدول ۳ درصد کاهش شاخص‌های رشد کپور معمولی با افزایش میزان سم نسبت به تیمار شاهد

پارامتر/تیمار	۰/۱۲(ppm)	۰/۲٤ (ppm)	۰/۳٦ (ppm)
کاهش وزن (درصد)	۷/۳۹	۲۱/٦۹	۲۹/۵۷
کاهش ضریب رشد ویژه **(درصد)**	۴/۳۶	۱۷/٤۷	۲٤/۷۵
افزایش ضریب تبدیل غذایی (درصد)	۲/۸۹	۱۵/٤۵	۳۸/۱٦



شکل ۱ نمودار میزان بقا ماهیان کپور معمولی درمعرض دوزهای مختلف سم نییم آزال (اختلاف معناداری مشاهده نشد)

علائم و ویژگی‌های ظاهری

الگوی رفتاری که در ماهیان در طول آزمایش مشاهده شد شامل شنای غیرعادی، چرخش، اضطراب به‌صورت افزایش عکس‌العمل در برابر محرک‌های بیرونی (به‌ویژه هنگام غذادهی و یا تردد) و کاهش حرکات گروهی بود.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.3.9.8]

همچنین برخی از ماهیان از پهلو در محیط پرورش قرار می‌گرفتند و توانایی حفظ تعادل خود را نداشتند.

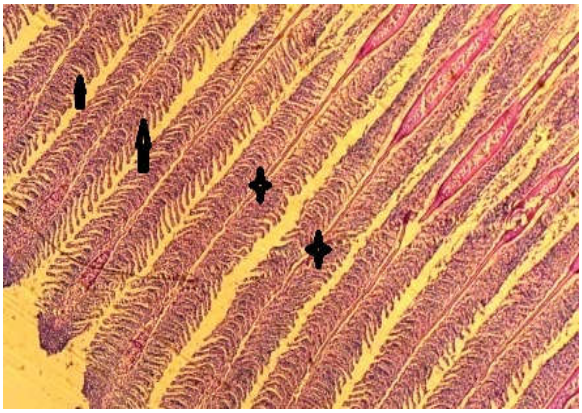
جدول ٤ علائم و ویژگی‌های ظاهری ماهیان در معرض دوزهای مختلف سم

شاخص‌ها	دوز سم (ppm)			
	کنترل	۰/۱۲	۰/۲٤	۰/۳٦
شنای غیرعادی	–	+	++	++
چرخش	–	+	++	++
واکنش عصبی به محرک خارجی	–	+	++	+++
عدم تعادل	–	+	++	++
بی‌اشتهایی	–	+	++	++

– ندارد (۰ درصد)، + ضعیف (۱۰ درصد)، ++ ملایم (۱۰–٤۰ درصد)، +++ شدید (٤۰–٦۰ درصد)

بافت‌شناسی آبشش

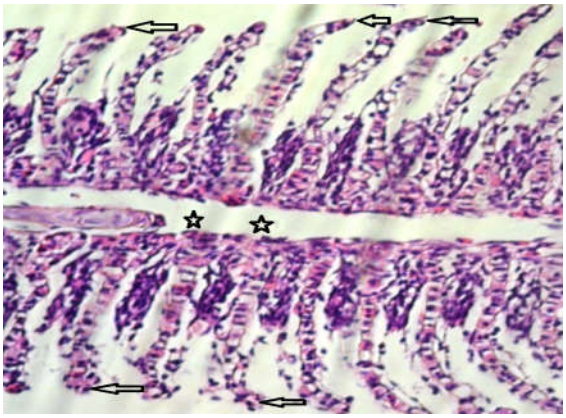
به‌منظور بررسی تأثیر سم بر ماهی، در این تحقیق بافت آبشش بررسی شد. نتایج نشان داد که با افزایش میزان سم، تخریب بافت آبشش نیز بیشتر می‌شود که با داده‌های مربوط به شاخص‌های رشد منطبق بود. بررسی‌های بافت‌شناسی در شکل‌های ۲ تا ۵ (که مربوط به تیمارهای مختلف است)، آورده شده است.



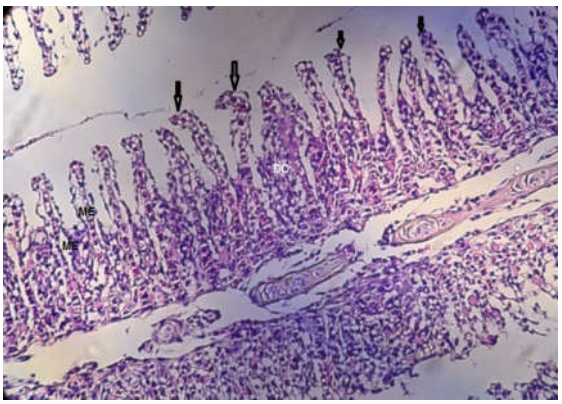
شکل ۲ بافت آبشش نرمال در گروه شاهد (با بزرگ‌نمایی ۱۰)، ستاره: تیغه‌های اولیه آبششی؛ پیکان‌ها: تیغه‌های آبششی ثانویه

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]

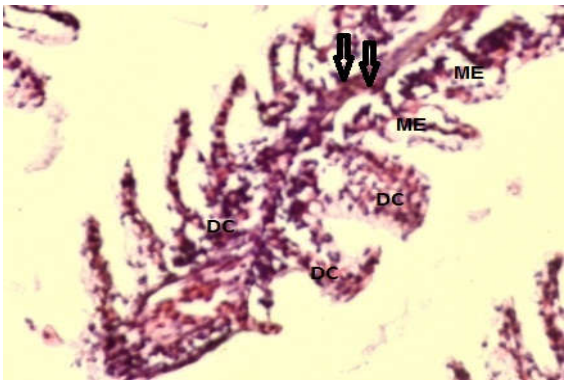
[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.3.9.8]



شکل۳ بافت آبشش تیمار ۰/۱۲ppm (با بزرگ‌نمایی ٤۰)، ستاره‌ها: نکروز سلول‌های تیغه‌های اولیه آبششی، پیکان‌ها: شروع چماقی شدن تیغه‌های ثانویه



شکل٤ بافت آبشش تیمار ۰/۲٤ppm (با بزرگ‌نمایی ٤۰)، پیکان‌ها : چماقی شدن تیغه‌های ثانویه DC (Damage Cell): تخریب و شروع لجنی شدن سلول‌ها در تیغه‌های ثانویه ME (Marked Edema): خیز یا ادم مشخص در تیغه‌های ثانویه



شکل ۵ بافت آبشش تیمار ۰/۳٦ppm (با بزرگ‌نمایی ٤۰)، پیکان: پرخونی و تورم شدید تیغه اولیه DC (Damage Cell): تخریب شدید و به‌هم ریختگی سلول‌ها در تیغه‌های ثانویه ME (Marked Edema): خیز شدید در تیغه‌های ثانویه

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.3.9.8]

بحث و نتیجه‌گیری

امروزه آفت‌کش‌ها بـه روش‌هـای مختلـف در زمـین‌هـای زراعی به‌کار گرفته می‌شوند، با این‌حال اثرهای سـوئی بـر اکوسیستم اطراف باقی می‌گذارند. از جمله محیط‌هایی کـه در معرض خطرهای استفاده از سموم می‌باشند، محیط‌های آبی است، زیرا آبزیان بـه‌دلیـل غوطـه‌وری دائمـی در ایـن محیط‌ها پیوسته در معرض تماس با این آلاینده‌ها می‌باشند. در نتیجه استفاده از سموم زیستی به‌دلیل پایداری و آسـیب کمتر به محیط‌زیست، بیشتر مورد توجه است.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که سم نییم آزال بـه‌طـور معناداری سبب کاهش شاخص‌های رشـد در مـاهی کپـور معمولی می‌شود (جـداول ۲ و ۳). یکـی از دلایـل کـاهش رشد می‌تواند ناشی از کاهش اشتها در ماهیان تحـت تـأثیر سم باشد، زیرا بـا افـزایش میـزان دوز سـم، میـزان غـذای مصـرفی کـاهش یافـت. Paul و همکـاران (۱۹۹۰) بیـان داشتند که افزایش سم در محیط می‌تواند موجب طعـم بـد غذا و در نتیجه کم‌اشتهایی شود که با داده‌های این تحقیـق منطبـــق اســـت. Omoregie و Okpanachi **(۱۹۹۲)** شاخص‌های رشد تیلاپیا (*Tilapia zilli*) کـه بـه‌مـدت ۱۲ هفته در معرض غلظت زیر کشنده عصاره نیـم آزال قـرار گرفته بود را بررسی و مشاهده کردند که با افـزایش میـزان سم، رشد کاهش می‌یابـد. کـاهش رشـد مشـابه از سـوی Oladimeji **و** Ologunmeta (۱۹۸۷)، در زمانی‌که تیلاپیای نیل را در معرض غلظـت زیـر کشـنده lead، Chinabut و همکاران (۱۹۸۷) کپور معمولی را در معرض حشـره‌کـش دیتریکس، و Ufodike و Omoregie (۱۹۹۰) تیلاپیای نیـل را در معرض حشره‌کـش گامـالین و اکتلیـک قـرار دادنـد، مشاهده شد. همچنین در تحقیق حاضر و تحقیقات مذکور، کاهش رشد وابسته به افزایش دوز سم بود. کارهـای اولیـه روی فیزیولوژی ماهی نشان داد زمانی‌که ماهی در معـرض سم قرار می‌گیرد، دچار استرس می‌شود (Grizzle, 1977; De Silva and Ranasinghe, 1989; Omoregie et al., 1990). کاهش رشد مشاهده شده در این تحقیق همچنـین می‌تواند ناشی از اختلال در متابولیسم طبیعی موجود تحت تأثیر سم نییم آزال باشد. با این‌حـال در تحقیـق غلامـی و همکاران (در حال چاپ)، اختلاف معناداری در رشد ماهی آمور تحت تأثیر سم نییم آزال مشاهده نشد.

از حساس‌ترین نشانه بالقوه سـموم، تغییـرات رفتـاری است. در این تحقیق علائم غیرطبیعی در ماهیان در معرض نییم آزال، نظیر شنای غیرعادی، چرخش، اضطراب در زمان غذادهی و یا مراجعه به تانک و عدم تعادل مشـاهده شـد. بررسی حالت‌ها و رفتار بچه ماهیان در برابـر غلظـت‌هـای مختلف سم متفاوت بـود بـه گونـه‌ای کـه در آزمـایش بـا غلظت‌های بالای سم نیـم، بچـه ماهیـان کپـور معمـولی، به‌سرعت عکس‌العمل نشان داده و با حرکات تند و سـریع دائم در جنبش بوده تا جایی‌که خسته شـده و بـی‌حـال در کف تانک می‌افتادند. درحالی‌که در غلظت‌های پایین، بچـه ماهیان در ساعت‌های اولیه عکس‌العمل محسوسی نداشتند، اما به‌تدریج دچار سستی می‌شدند؛ اختلال در سیستم مغـز و اعصاب که اساسی‌ترین اثر سموم است با عدم تعـادل و شنای مارپیچی بچه ماهیان مشهود بود. در مطالعـه (Eliaa et al., 2011) مشـخص شـد کـه مـاهی نیـل تیلاپیـا *O. niloticus* (L.) تحت تیمار با لورسبان تغییرات رفتـاری از جمله: کم کردن سرعت، شنا و به‌طور کلی فعالیت کمتر از گروه شاهد، همچنین حرکت نزدیک سطح آب، تـأخیر در حرکت opercular، از دسـت دادن اشـتها و ترشـح مخـاط پوست را نشان می‌دهـد. برخـی از ایـن علائـم بـا علائـم مشاهده شده در آزمایش انجام شـده مطابقـت دارد. علـت این رفتار غیرعادی می‌توانـد ناشـی از اخـتلال در سیسـتم عصبی مغز و اعصاب ماهیان در معرض سم باشد (Rao et

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.3.9.8]

al., 2005). تحقیق (Ahmadbhat et al., 2012) شنای نامنظم و بی‌هدف، کاهش حرکت و ناتوانی در حفظ تعادل در اثر قرارگیری طولانی مدت ماهی آب شیرین *Labeo rohita* در معرض حشره‌کش زیستی نیم را نشان داد.

در مطالعه (Edwards et al., 1986)، علائم سمیت حاد cypermethrin را در قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌صورت تند زدن حرکت آبشش، بیش فعالی، از دست دادن قدرت شناوری و ناتوانی در حفظ تعادل مشاهده کردند. شاملوفر و همکاران (۱۳۸۷)، تأثیر سم سوین را در بچه ماهیان کپور معمولی مطالعه و بررسی کردند. در این تحقیق اختلالات تنفسی به‌صورت باز و بسته شدن سریع سرپوش‌های آبششی و شنا کردن در اطراف سنگ هوا و حباب‌های هوا، افزایش عکس‌العمل در برابر محرک‌های بیرونی، گرفتگی عضلات دور دهانی و باله‌ای و تنفس ناموزون و غیرعادی آشکار شد.

آزمایش‌های بافت‌شناسی و بررسی‌های آسیب‌شناسی سلولی می‌تواند اطلاعات زیادی را در زمینه تأثیر سموم فراهم آورد. تغییرات بافتی که معمولاً در ماهی و برای برگشت به حالت طبیعی رخ می‌دهد شامل تخلیه گلیکوژن کبدی، کاهش وزن طحال و تحلیل مخاط معده و تغییر ویژگی‌های طبیعی بافت آبشش و سلول‌های کلرید می‌باشد. نتایج حاصل از بررسی‌های آسیب‌شناسی این مطالعه نشان داد که سم نییم‌آزال باعث ایجاد تغییرات عمده‌ای در بافت آبشش می‌شود که با افزایش میزان دوز سم، تخریب بافتی نیز بیشتر شد. در تحقیقی (Kumar et al., 2010)، اثر نییم آزال بر روی گربه ماهی *Heteropneustes fossilis* بررسی شد. در چند روز اول با گذشت زمان، تورم در نوک تیغه‌های ثانویه، ادغام تیغه‌های ثانویه، نکروز سلولی و جدا شدن تیغه‌های آبشش ثانویه از سلول پایه مشاهده شد. با گذشت ۱ ماه از قرار گیری در معرض سم، نکروز شدید سلولی اتفاق افتاد و در نقاطی تیغه‌های آبشش به‌طور کامل دژنره و محو شدند. نکروزی شدن بافت آبشش ماهیان تحت تأثیر سموم در تحقیق محققان بسیاری مشاهده شد (Erkmen et al., 2000, Cengiz et al., 2002, Cengiz et al., 2003, Cengiz, 2006) که با داده‌های این تحقیق مطابقت می‌کند. شاملوفر و همکاران (۱۳۸۷) در پژوهشی، اثر سم سوین در بچه ماهیان کپور معمولی را بررسی کردند که در آبشش‌ها پرخونی، تورم و جدا شدن لایه پایه رشته‌های آبششی قابل مشاهده بود. آسیب‌های آبشش نیز در گربه ماهی *(Clarias batrachus)* و در ماهی گورخری (*Branchydanio rerio*) پس از استفاده آزمایشی از سم آندوسولفان گزارش شد (Bhatnager Toledo et al., 1992; et al., 1982). ناجی و همکاران (۱۳۸٦) اثر سولفات روی را بر بچه ماهی کپور معمولی بررسی کردند. نتایج نشان داد که قرارگیری آبشش در مجاورت فلز روی منجر به بروز پدیده‌هایی مانند هایپرتروفی و هایپرپلازی سلول‌های پوششی آبشش، فیوژن یا چسبندگی تیغه‌های ثانویه به یکدیگر، افزایش و تکثیر سلول‌های مخاطی می‌شود. Cengiz و همکاران (2006) به بررسی اثر آسیب‌شناسی بافتی سم دلتامترین در آبشش ماهی کپور معمولی، پس از قرارگیری در معرض حاد غلظت ۰/۰۲۹ و ۰/۰٤۱ میلی‌گرم در لیتر این سم پرداختند. نتایج به‌صورت پوسته‌ریزی، نکروز، آنوریسم در تیغه‌های ثانویه، تورم، هیپرپلازی اپی‌تلیال و ادغام تیغه‌های ثانویه مشاهده شد. به‌طور کلی ضایعات بافتی آبشش مشاهده شده در تحقیق حاضر با تحقیقات فوق مطابقت دارد. میزان عکس‌العمل و ضایعات ناشی از سم در آبزیان به عواملی مانند سن، گونه و وضعیت فیزیولوژیکی بدن آبزی و نیز شرایط کیفی آب مانند درجه حرارت، سختی کل، pH بستگی دارد (Rijijohan et al., 1993).

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.3.9.8]

نتیجه‌گیری

نتایج کلی این تحقیق نشان داد که حتی سم زیستی نیم آزال هم می‌تواند در دوز بالا، باعث تأثیرهای منفی بر رشد و ایجاد ضایعات بافتی آبشش شود. با این‌حال این سم تأثیرهای منفی بر بقا نداشت، اگرچه بر رفتار ماهی تأثیرات سوئی گذاشت. در پایان با توجه به داده‌های این تحقیق بررسی این سم بر تکثیر و هماوری ماهی پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

بخش میدانی (پرورش) این تحقیق با کمک دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه خلیج‌فارس انجام شده است که بدین سبب از مسئولان آن تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

Abdel-Tawwab, M., Adel M.E, Shalaby., Ahmad, M.H. and Khattab, Y.A.E. 2001. effsupplemental dietary L-ascorbic acid (vitamin C) on mercuty detoxication, physiological aspect and growth performance of nile tilapia (*Oreochromis niloticus L.*). Sharqia, Egypt. 159-171.

Ahmadbhat, I.M, Varma, A. and Saxena, G. 2012. Acute toxicity of matrine containing biopesticide kethrin on a freshwater fish, *Labeo rohita* (Hamilton). *Indian journal of Science*. 2(1): 113-116.

Bhatnager, M.C., Bana, A.K. and Tyagi, M. 1982. Respiratory distress to *Clarias batrach* exposed to endosulfat- ahistological approach. *Journal of Environmental Biology*, 13: 227-231.

Cengiz, E.I. and Unlu, E. 2002. Histopathological changes in the gills of mosquitofish *Gambusia affinis* exposured to endosulfan. Bull. Environ. *Contaminant. Toxicology*, 68: 290-296.

Cengiz, E.I. and Unlu, E. 2003. Histopathology of gills in mosquitofish *Gambusia affinis* after long-term exposure to sublethal concentration of malathion. *Journal of Environmental Science and Health*. *Biology.*, 38: 581-589.

Cengiz, E. I. 2006. Gill and Kidney Histppathology in the freshwater fish *Cyprinus carpio* after acute exposure to deltamethrin. *Environmental Toxicology*. Phar., 22: 200-204.

Chinabut, S., Limsuwan, C. and Kanchanakhan, S. 1987. Toxic and sublethal effects of dipterex on freshwater fishes. Bangkok, Thailand, Network of Agricult. Centres in Asia, NACAlWP/87/56, 21 pp.

CIA, S. and summerfelt, R.C. 1992. Effects of temperature and size on oxygen consumption and ammonia excretion by walleye. *Aquaculture,*104: 127-138.

Edwards, R., Millburn, P. and Hutson, D.H. 1986. Comparative toxicity of cypermethrin in rainbow trout, frog, mouse and quail. Toxicology and Applied Pharmacology, Vol. 84, No. 3, (December 1986), pp. 512-522, ISSN 0041-008X

Eliaa, M. I., Azza, M. G. and Gehad, M. E. 2011. "Histological Hazards of Chlorpyrifos Usage on Gills and Kidneys of *Tilapia nilotica* and the Role of Vitamin E Supplement in Egypt". *Life Science Journal*;8(4): 113-123.

Erkmen, M.C., Caliskan, M. and Yerli, S.V. 2000. Histopathological Effects of cyphenothrin on the gills of *Lebistes reticulatus*. *Veterinary and Human Toxicology*., 42: 5-7.

Fanta, E., Rios, F.S., Romão, S., Vianna, A.C. and Freiberger, S. 2003. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. *Jornal of Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54: 119-130

Finney, D., 1971. Probite analysis. Cambridge University: 465-489.

Gogati, S.S. and Marathe, A.D. 1989. Anti –viral effect of neem leaf (*Azadirachta indica*) extracts on chinkungunya and measles viruses. *Journal* of *Research* and *Education* in *Indian Medicine*. 8: 1-5.

Hassanein, H.M.A., okail, H.A. and Mohamed, N.K. 2007. Biochemical changes in proteins and DNA in *Ctenopharyngodon idella* due to environmental pollution with the biopesticide (Trilogy). 10

ICCA ,Garyounis university , Benghazi , Libya . 18-21 . Nov . 2007

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.3.9.8]

Omoregie, E. and Okpanachi, M.A. 1992. Growth of *Tilapia zilli* exposed to sublethal concentrations of crude extracts of *Azadirachta indica*. *Acta Hydrobiology*., 34: 281–286.

Omoregie, K.E. Ufodike, B.C. and Keke, I.R. 1990. Tissue chemistry of *Oreochromis niloticus* exposed to sublethal concentrations of Gammalin 20 and Actellic 25 EC. *Journal of Aquatic Science*., 5, 33-36.

Panda, S. and kar, A. 2000. How safe is neem extract to thyroid function in male mice. *Pharmacological Research*., 41(4): 419-422.

Paul, A.M and Smith, R.L. 1990. Rate of oxygen consumption of yellow fin sole relative to body size, food intake and temperature. *Comparative Biochemistry* and *Physiology.,* 85: 313-331.

Piri Zirkoohi, M. and Ordog, V. 1997. Effect of some pesticides commonly used in Agriculture on Aquatic food chain. Tesis for Ph.D. degree submitted to the academy of agricultural sciences Budapest- Hungary, Pp.1-31.

Rahman, M.F., Siddiqui, M.K.J. and Jamil, K. 2002. LDH profiles of male and female rats treated with Vepacide. *Journal of Phytotherapy Research*., 16 (2):122-126.

Randhawa, N.S., Parmar, B.S. 1993. Neem. Researchand Development, Society of Pesticide Science, India. New Dehli Agricultural Research Institue. pp 283.

Rao, J.V. Begum, G., Pallela, G., Usman, P.K. and Rao, R.N. 2005. Changes in behavior and brain acetylcholinesterase activity in mosquito fish *Gambusia affinis* in relation to sublethal exposure of chlorpyrifos. Int. *Journal of Environmental Research* and *Public Health*, 2(3-4): 478-483.

Rijijohan, K. and Jayabalan, N. 1993. Sublethal effect of endosulfan on histology and protein pattern of *Cyorinus carpio* gill. *Journal of Applied Ichthyology*. 9:49-56.

Sakari, M. 2008. Determine the Lc50 96h Rnstar and Rylof-h chemical herbicides on baby *Acipenser persicus* and *Acipenser stellatus*. Master's thesis. Islamic Azad university of Lahijan.

Sanchez-Fortun, S. and Barahona, M.V. 2005. Comparative study on the environmental risk induced by several pyrethroids in estuarine and freshwater invertebrate organisms. *Chemosphere,* 59, 553-559.

Kher, A. and Chaurasia, S.C. 1997. Anti-fungal activity of essential oils of three medicinals plants. *Indian Drug*. 15:41- 2.

Kumar, A., Prasad, M.R., Srivastava, K., Tripathi, S. and Srivastav,A.K. 2010. Branchial Histopathological Study of Catfish *Heteropneustes Fossilis* Following Exposure to purified Neem Extract, Azadirachtin. *World Journal of Zoology*, 5(4): 239-243.

Leslie, W.C., Christopher, J.P. and Barbara, L. 2005. The pesticide malathion reduces survival and growth in developing zebrafish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 24, No. 7, pp. 1745–1750, 2005.

Mahboob, M., Siddiqui, M.K.J. and Jamil, K. 1998. The effect of subacute administration of a neem pesticide on rat metabolic enzymes. *Journal of Environmental Science and Health, Biology,* 33.,(4): 425-438.

Mirvaghefi, A.R., Banaee, M., Mojazi Amiri, B., Rafiee G.R. and Nematdost B. 2010. Hematological and Histopathological effects of Diazinon Poisoning in common carp (*Cyprinus carpio*) Journal of Fisheries, *Iranian Journal of Natural Research*., Vol. 64, No. 1, 2011. pp. 1-13

Misra, C.K., Kumar, D.B., Mukherjee, S.C., Pattnaik, P. 2006. Effect of long term administration of dietary â-glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings. *Aquaculture*. 255: 82–94.

Mohammadnejad shamoshaki, M., Soltani, M., Sharifpour, A. and Imanpour, M. 2012. Effects of sublethal concentrations of diazinon on activity of serum enzyme of males whitefish. *Iranian journal of veterinaria*n. Number 8. 94-101.

Naz, S. and Javed, M. 2013. Growth responses of fish during chronic exposure of metal mixture under laboratory conditions. *Pakestan veterinary Journal*, 33(3): 354-357.

Naji, T., Khara, H., Rostami, M., and Nasiri Parman., E. 2009. The effect of toxic ammonia on liver tissue of common carp (cyprinus carpio). Journal of *Environmental Science* and *Technology*., Spring 2009, No 40.

Oladimeji, A.k. and Ologunmeta, R.T. 1987. Toxicity of water bourne lead to *Tillapia niloticus. Nigerian Journal* of *Applied Fisheries Hydrobiology*., 2, 19-24.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.3.9.8]

zebra fish (*Brachydanyo rerio*). *Pesticide Science*, 36: 207-211.

Vandergeest, H.G., Studijfzand, S.C., Kraak, M.H.S. and Admiraal, W. 1997. Impact of diazinon calamity in 1996 on the aquatic macroinvertebrates in the river mesue. The Netherlands. *Journal of Aquatic Ecolology*, 30:327-330.

Velisek, J., Svobodoza, Z. and Piaakova, V. 2005. Effects of clove oil anesthesia on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Acta Veterinaria (Brno)*., 74, 139-146.

Winkaler, E.U., Santos, T. R. M., Joaquim, G. Machado-Neto, J.G. and Martinez, C.B.R. 2007. Acute lethal and sublethal effects of neem leaf extract on the neotropical freshwater fish Prochilodus lineatus. Comparative *Biochemistry* and *Physiology*. C 145: 236–244.

Sharifpour, A., Soltani, M. and Javadi, M. 2003. Determine the Lc50 and histological change of *Husso husso* endosulfan. *Iranian Journal of fishery*. 12 (4): 69-84.

Singh, N. and Sastry, M.S. 1981. Anti-microbial activity of neem oil. *Indian Journal of Pharmacology*. 13:102.

Sundaram, K.M.S. 1996. Azadirachtin, biopesticide: a review of studies conducted on its analytic chemistry, environmental behaviour and biological effects. *Journal of Environmental Science and Health Biology*, 3: 913-948.

Tokur, B., Ozkutuk, S., Atici, E., Ozyurt, G. and Ozyurt, C.E. 2006. Chemical and sensory quality hanges of fish fingers,made from mirror carp (*Cyprinus carpio* L.,1758), during frozen storage (-18C), *Food Chemistry*, 99: 335-341.

Toledo, M.C.F. and Jonsson, C.M. 1992. Bioaccumulation and elimination of endosulfat in

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.3.9.8]

Fisheries Science & Technology
TMU
Scientific - Research Journal Vol. 5, No. 3, Autumn 2016

Growth response and gill tissue damages of common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles exposed to Neem Azal biopestiside (*Azadirachtin indica*)

Amin Oujifard[*1], Mohammad Javad Papari Moghaddam [2], Reza Davoodi [1] and Aali Hosseini [1]

1- Assistant Prof., Fisheries Dept., Faculty of Agriculture and Natural Resources, Persian Gulf University, Bushehr, Iran.

2- M.Sc Graduate student, Fisheries Dept., Faculty of Agriculture and Natural Resources, Persian Gulf University, Bushehr, Iran.

Received:08.11.2015 Accepted: 02.04.2016

[*]**Corresponding author**: Oujifard.amin@gmail.com

Abstract

The chronic effects of Neem Azal on growth parameters, survival and gill morphology of common carp (*Cyprinus carpio*) with average weight of 10.56 ± 0.12 g were determined. A total of 120 fish were distributed equally between three treatments and a control group, with three replicates each. To determine the chronic effect, sublethal concentration of poison, 0.12 (10% LC_{50}), 0.24 (20% LC_{50}), 0.36 ppm (30% LC_{50}), was selected and fish were exposed to these doses for 28 days. Increasing doses of Neem Azal had a significant effect on growth parameters, as the growth declined significantly when poison dose increased ($P<0.05$). There were no significant differences in survival ($P>0.05$. Reactions such as irregular swimming, abnormal behavior, nervous reaction to external stimulator, increased opercular beating and anorexia were observed during the test. Damage to the gill tissue also increased as the poison levels increased. Generally, the negative effects of Neem Azal on growth parameters and gill morphology of common carp were observed as biopestiside levels increased.

Keyword: Gill, Biopestiside, Fish, Growth

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.3.9.8]