

## بررسی تاثیر ماده نفتی کرئوزوت بر روی مرگ و میر و برخی از عوامل خونی و بیوشیمیایی بچه ماهیان ازون برون (*Acipenser stellatus*)

علی مکرمی رستمی<sup>(۱)\*</sup>؛ شهلا جمیلی<sup>(۲)</sup>؛ حسینعلی خوشباور رستمی<sup>(۳)</sup>؛

غلامحسین وثوقی<sup>(۴)</sup> و حبیب اسپوئی<sup>(۵)</sup>

ali\_m.rostami@yahoo.com

۱- مرکز تحقیقات اکولوژی دریای خزر، ساری صندوق پستی: ۹۶۱

۲- موسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران صندوق پستی: ۶۱۱۶-۱۴۱۵۵

۳- مرکز تحقیقات ذخایر آبزیان آبهای داخلی، گرگان صندوق پستی: ۱۲۹

۴- دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران صندوق پستی: ۶۴۵۳-۱۴۱۵۵

۵- اداره کل شیلات استان گلستان، گرگان کدپستی: ۸۷۱۶۵-۴۹۱۶۶

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۸۵ تاریخ پذیرش: دی ۱۳۸۵

### چکیده

به منظور ارزیابی اثرات کشندگی ماده نفتی کرئوزوت (Creosote) در بچه ماهیان ازون برون (*Acipenser stellatus*)، آزمایش تعیین سمیت حاد به صورت ساکن و براساس روش استاندارد (OECD) در مرکز تحقیقات اکولوژی دریای خزر در سال ۱۳۸۴ انجام گرفت. ۱۸۰ عدد ماهی ازون برون جوان با میانگین وزنی  $1 \pm 0.3$  گرم در ۶ گروه (۵ گروه آزمایشی و یک گروه شاهد) پس از تعیین محدوده کشندگی (۱ و ۲/۵ میلی گرم بر لیتر)، در معرض غلظت‌های ۱، ۱/۴، ۱/۸، ۲/۲ و ۲/۶ میلی گرم بر لیتر کرئوزوت قرار گرفتند. میزان متوسط غلظت کشنده (LC50) کرئوزوت بر روی بچه ماهیان موردآزمون طی ۹۶ ساعت، ۱/۵ میلی گرم بر لیتر تعیین گردید. جهت مطالعات هماتولوژیک و بیوشیمیایی از ماهیانی که بمدت ۹۶ ساعت در معرض غلظت LC50 (۱/۵ میلی گرم بر لیتر) کرئوزوت قرار گرفته بودند، خونگیری بعمل آمد. مقادیر شاخصهای خونی Hb, MCH, WBC, RBC, و MCHC در گروه آزمون نسبت به شاهد از کاهش معنی‌داری برخوردار بودند ( $P < 0.05$ )، در حالیکه میزان PCV و MCV در گروه آزمون نسبت به شاهد دارای افزایش معنی‌دار بوده است ( $P < 0.05$ ). مقادیر پروتئین کل، ALP, ALT, AST و LDH در گروه آزمون نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) داشته است، برعکس مقدار گلوکز خون در گروه آزمون افزایش معنی‌دار داشت ( $P < 0.05$ ). در مدت اجرای آزمایش اکسیژن محلول، اسیدبته، سختی کل، هدایت الکتریکی، نیتريت، نیترات، فسفات و دمای آب همه روزه اندازه گیری و ثبت گردید و هیچ تغییری در این عوامل مشاهده نشد.

لغات کلیدی: ازون برون، *Acipenser stellatus*، کرئوزوت، LC50، آلودگی

\* نویسنده مسئول

## مقدمه

افزایش هیدروکربنهای حلقوی در محیط ناشی از آلودگی‌های نفت، زغال سنگ، قطران، دوده و مواد آلوده کننده هوا می‌باشد (Hardin ;Cooke & Dennis, 1988; et al., 1992; Mudzinski, 1993).

بغیر از انتشار فراگیر این مواد در محیطهای خشکی، غلظت Poly Aromatic Hydrocarbons (PAHs) در محیطهای آبی نیز بطور گسترده‌ای افزایش یافته است (Couch & Harshbarger, 1985; Weeks et al., 1990). در حقیقت غلظت PAHs اخیراً در رسوبات آبهای بشدت آلوده تا هزاران قسمت در میلیون افزایش داشته است (Bieri ;Seeley & Weeks-Perkins, 1991; et al., 1986).

Eisler (1987) مشخص نمود که ترکیبات PAHs دارای وزن مولکولی پایین شامل دو یا سه حلقه مثل نفتالن، فلورین، فنانترون و آنتراسن ایجاد سمیت حاد در بعضی از موجودات می‌نمایند، در حالیکه در ترکیبات با وزن مولکولی بالا شامل ۴ تا ۷ حلقه آروماتیکی اینطور نیست. هر چند مولکولهای سنگین نیز در موارد بیشماری باعث سرطانزایی و جهش شده اند. مقادیر LC50 ۹۶ ساعت ترکیبات PAHs که در مورد اکثر موجودات گزارش گردیده بین ۵۰۰ ppb تا ۵۰۰۰ ppb می‌باشد (Brooks, 1997).

کروزوت مخلوطی از ۱۶۰ نوع ترکیب هیدروکربن است که ۱۸ نوع آن از ترکیبات اصلی آروماتیک و حلقوی می‌باشد. طبق برآورد محیط زیست کانادا بیشتر از ۸۰ درصد کروزوت را هیدروکربنهای حلقوی تشکیل می‌دهد (Brooks, 1997).

آزمون مسمومیت حاد یکی از معمولترین روشها برای ارزیابی امنیت محیطی مواد شیمیایی است. مطابق نظر لوید، جهت کسب هرگونه اطلاعات اولیه در مورد ارزیابی فرآیند خطر آفرینی هر ماده شیمیایی جدید از آزمون مسمومیت حاد استفاده می‌گردد (Murty, 1986).

تغییرات پروفیل بیوشیمیایی خون در واقع بازتاب تغییر در فرآیند متابولیسم و بیوشیمی ماهی بوده که بطور عمده ناشی از تأثیر آلاینده‌ها می‌باشد بطوریکه در چنین وضعیتی میزان گلیکوژن کبد و بافت عضلانی بطور معنی‌داری کاهش یافته و غلظت گلوکز و لاکتات خون بطور معنی‌داری افزایش می‌یابد (Luskova et al., 2002). تجزیه و تحلیل بیوشیمیایی سرم و پلاسما اطلاعاتی را در مورد اندامهای داخلی (کبد و کلیه)،

الکترولیتها (سدیم، پتاسیم، کلسیم، فسفر)، پروتئین‌ها (گلوبین و آلبومین) و عوامل تغذیه‌ای و متابولیک (کلسترول، تری‌گلیسرید و گلوکز) ارائه می‌دهد (Jain, 1986; Franson et al., 1985; Allen, 1988; Duncan et al., 1994).

تجزیه و تحلیل هماتولوژیک که شامل شمارش گلبول قرمز، گلبول سفید و شمارش افتراقی گلبول سفید می‌باشد، اطلاعاتی را در مورد سیستم خونسازی و پاسخهای ایمنی شناسی ارائه می‌نماید. آزمایش خون می‌تواند بعنوان تشخیص ثلثی بکار رود (Duncan et al., 1994; Campbell, 1995). بنزوپیرین (Benzo[a]pyrene) یکی از آروماتیکیهای بسیار شایع و سرطانزایی است که باعث سرکوب هر دو بخش ایمنی خونی و سلولی می‌گردد و ممکن است باعث تهدید حیات جانوری شود که در معرض این ماده قرار می‌گیرد (Urso & Genyozian, 1982, 1984).

براساس آمار، همه ساله بین ۲ تا ۵ تن فلزات سنگین، ۶۰۰۰۰ تا ۲۰۰۰۰۰ تن مواد نفتی و بیشتر از ۵ میلیون تن مواد آلوده‌کننده میکروبی وارد دلتای رودخانه‌های دریای خزر می‌شوند (کاپلین، ۱۳۷۴) و مطابق منابع رسمی آماری شیلات ایران میزان استحصال خاویار از گونه ازون برون از سواحل جنوبی دریای خزر از ۱۶۱/۶۵۴ تن در سال ۱۳۶۴ به ۲/۹۲۸ تن در سال ۱۳۸۳ کاهش یافته است. با توجه به در معرض خطر بودن این ماهیان با ارزش و حفاظت از اکوسیستم دریای خزر، در این مطالعه میزان LC50 کروزوت (Creosote) در گونه ازون برون (*Acipenser stellatus*) طی ۹۶ ساعت تعیین گردید و به موازات این اقدام شاخصهای هماتولوژیک و بیوشیمیایی ماهی نیز مورد مطالعه قرار گرفت.

## مواد و روش کار

جهت انجام این مطالعه ۳۰۰ عدد ازون برون (*Acipenser stellatus*) با میانگین وزنی  $1 \pm 3/6$  گرم در نظر گرفته شد. در این آزمایش ۱۸ عدد آکواریوم به ابعاد  $100 \times 40 \times 40$  سانتیمتر با حجم ۱۶۰ لیتر پر شده از آب شیرین مورد استفاده قرار گرفت. ماده نفتی مورد استفاده در این آزمایش کروزوت (Creosote) بود که از پژوهشگاه نفت اصفهان تهیه گردید. آزمایش تعیین LC50 کروزوت مطابق روش (OECD) Organization Economic Cooperation and Development (1992) انجام گرفت. جهت تعیین غلظت محدوده کشندگی کروزوت در ماهی ازون برون، تعداد ۱۲۰ عدد از ماهیان

هموگلوبین گویچه‌ها (MCH) و میانگین غلظت هموگلوبین گویچه (MCHC)، مطابق روش Klont (۱۹۹۴) مورد مطالعه قرار گرفت. بمنظور مطالعات بیوشیمیایی سرم خون، نمونه‌های خون فاقد هپارین بمدت ۱۵ دقیقه با ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند و با استفاده از دستگاه اتوآنالایزر (TECHNICON-RA 1000) و کیت‌های شرکت پارس آزمون مقادیر فاکتورهای اسپارئات آمینو ترانسفراز (AST)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آلکالین فسفاتاز (ALP)، لاکتات‌دی‌هیدروژناز (LDH)، گلوکز و پروتئین کل اندازه‌گیری شد. میزان LC50 ازون برون طی ۹۶ ساعت در معرض قرار گرفتن با استفاده از روش Probit Analysis و نرم افزار SPSS محاسبه گردید. همچنین نتایج بدست آمده از مطالعات هماتولوژیک با استفاده از نرم افزار SPSS و از طریق جدول آنالیز واریانس مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

## نتایج

تلفات تجمعی ماهیان ازون برون در مدت ۹۶ ساعت پس از در معرض قرارگرفتن با کرنوزوت در غلظتهای مختلف در جدول ۱ نشان داده شده است و مقادیر مختلف LC50 کرنوزوت در بچه ماهیان ازون‌برون در زمانهای ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بترتیب ۰/۳۱، ۱/۹، ۱/۷ و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر محاسبه گردید (نمودار ۱).

در معرض غلظتهای متفاوت از این ماده (۰/۵، ۰/۶، ۱، ۱/۲۵، ۲، ۲/۵، ۴، ۵، ۸، ۱۰، ۱۶ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر) قرار داده شدند. پس از تعیین محدوده کشندگی (۱ تا ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر)، ماهیان بمدت ۹۶ ساعت در معرض ۵ غلظت (۱، ۱/۴، ۱/۸، ۲/۲ و ۲/۶ میلی‌گرم بر لیتر) کرنوزوت قرار گرفتند و همچنین یک گروه شاهد، هر کدام در سه تکرار (۱۸ عدد آکواریوم) در نظر گرفته شد. حجم آب آکواریومها یک لیتر به ازای یک گرم ماهی بوده است (۳۶ لیتر).

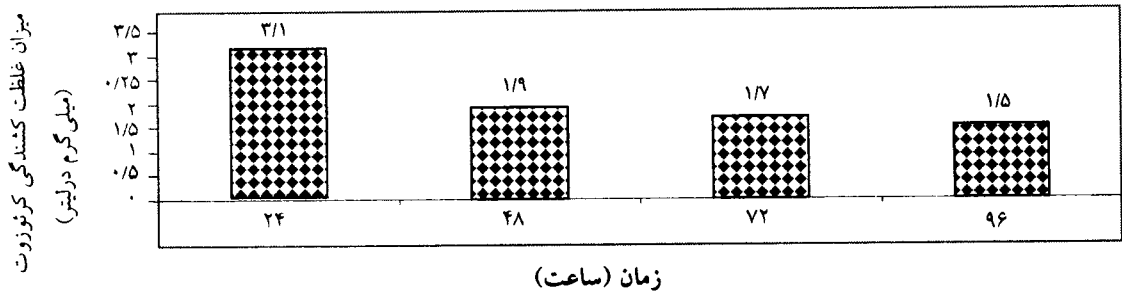
در هر آکواریوم ۱۰ عدد ازون‌برون معرفی گردید، ماهیان تلف شده از محیط آکواریوم جمع‌آوری و تعداد تلفات در هر ۲۴ ساعت تا پایان ۹۶ ساعت ثبت گردید. دما، اکسیژن محلول و pH آب بطور روزانه اندازه‌گیری شد.

طی مدت ۹۶ ساعت تعیین LC50، میانگین مقادیر عوامل فیزیکی و شیمیایی آب محیط آزمایش بصورت زیر بود: درجه حرارت آب  $22 \pm 1$ ، هدایت الکتریکی ۲/۱۱ میکرو زیمنس، نیتريت ۰/۰۲۵ میلی‌گرم بر لیتر، نیترات ۰/۵۰۳ میلی‌گرم بر لیتر، سختی کل ۱۴۵ میلی‌گرم بر لیتر، اکسیژن محلول  $8 \pm 1$  میلی‌گرم بر لیتر، فسفات ۰/۲۸۵ میلی‌گرم بر لیتر و  $pH = 7/9$ .

برای انجام مطالعات هماتولوژیک از ناحیه دمی تعداد ۵ عدد ماهی که ۹۶ ساعت در معرض کرنوزوت در غلظت (LC50) قرار گرفته بودند و همچنین ۵ عدد ماهی گروه شاهد، خونگیری بعمل آمد و در لوله‌های حاوی و فاقد هپارین ذخیره شد. سپس تعداد گلبول قرمز (RBC)، گلبول سفید (WBC) و مقادیر هماتوکریت (PCV)، هموگلوبین (Hb)، میانگین حجم گویچه‌ها (MCV)، میانگین

جدول ۱: درصد تلفات تجمعی ماهیان ازون برون جوان در معرض کرنوزوت طی ۹۶ ساعت آزمایش

تیمار	غلظت (میلی‌گرم بر لیتر)	درصد تلفات تجمعی			
		۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
شاهد	۰	۰	۰	۰	۰
آزمون	۱	۳	۱۰	۱۷	۲۰
	۱/۴	۷	۱۷	۲۷	۳۰
	۱/۸	۱۳	۲۰	۳۷	۴۰
	۲/۲	۲۰	۴۰	۶۷	۸۷
	۲/۶	۵۰	۷۰	۹۷	۱۰۰



نمودار ۱: مقادیر مختلف LC50 کروزوت در ماهی ازون برون در زمانهای ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت

اندازه گیری شاخصهای بیوشیمیایی خون ماهیان ازون برون در دو گروه شاهد و آزمون در جدول ۳ ارائه شده است. مقادیر کل، AST, ALP, ALP و LDH در گروه آزمون نسبت به شاهد کاهش معنی داری داشته است ( $P < 0.05$ ). برعکس مقدار گلوکز خون در گروه آزمون افزایش معنی دار یافته است ( $P < 0.05$ ).

سمیت حاد کروزوت بر روی شاخصهای خونی ماهی ازون برون در دو تیمار شاهد و آزمون در جدول ۲ ارائه شده است. مقادیر MCV و هماتوکریت خون در گروه آزمون نسبت به شاهد افزایش معنی داری داشته است ( $P < 0.05$ ). در مقابل تعداد RBC و WBC و مقادیر Hb, MCH و MCHC در گروه آزمون نسبت به شاهد کاهش معنی داری داشته است ( $P < 0.05$ ).

جدول ۲: شاخصهای خونی ازون برون در دو گروه آزمون و شاهد در معرض کروزوت در ۹۶ ساعت آزمایش

احتمالات	واریانس	انحراف معیار	میانگین	تعداد	گروه	واحد	شاخص
۰/۰۰/۰	۵۹/۳	۷/۷	۱۴۸/۰	۵	شاهد	فمتولیت	میانگین حجم گویچه ها (MCV)
	۱۷۶/۳	۱۳/۳	۲۲۵/۳	۵	آزمون		
۰/۰۰/۲	۴/۳	۲/۱	۳۵/۹	۵	شاهد	پیکوگرم	میانگین هموگلوبین گویچه ها (MCH)
	۱/۹	۱/۴	۳۰/۵	۵	آزمون		
۰/۰۰/۰	۲/۳	۱/۵	۲۴/۳	۵	شاهد	درصد	میانگین غلظت هموگلوبین گویچه (MCHC)
	۰/۹	۱/۰	۱۳/۶	۵	آزمون		
۰/۰۰/۰	۳۰/۷	۵/۵	۱۴۳/۸	۵	شاهد	$\times 10^4$ میلی متر مکعب	گلبول قرمز (RBC)
	۳۷/۵	۶/۱	۱۰۹/۰	۵	آزمون		
۰/۰۰/۰	۰/۸	۰/۹	۲۱/۳	۵	شاهد	درصد	هماتوکریت (PCV)
	۰/۳	۰/۵	۲۴/۵	۵	آزمون		
۰/۰۰/۰	۰/۲	۰/۴	۵/۲	۵	شاهد	گرم بر دسی لیتر	هموگلوبین (Hb)
	۰/۱	۰/۲	۳/۳	۵	آزمون		
۰/۰۰/۴	۴۱۴۸۰۰۰/۰	۲۰۳۶/۷	۱۵۳۶۰/۰	۵	شاهد	در میلی متر مکعب	لکوسیت (WBC)
	۲۱۳۲۰۰۰/۰	۱۴۶۰/۱	۱۰۹۲۰/۰	۵	آزمون		

جدول ۳: شاخصهای بیوشیمیایی خون ماهیان ازون برون جوان در دو گروه آزمون و شاهد در معرض کرونوزوت طی ۹۶ ساعت

شاخص	واحد	تیمار	تعداد	میانگین	انحراف معیار	واریانس	احتمال
پروتئین کل	گرم بر دسی لیتر	شاهد	۵	۱/۳	۰/۲	۰/۰	۰/۰۰۲
		آزمون	۵	۰/۸	۰/۱	۰/۰	
گلوکز	گرم بر دسی لیتر	شاهد	۵	۱۳/۴	۱/۱	۱/۳	۰/۰۰۰
		آزمون	۵	۱۹/۴	۲/۱	۴/۳	
ALP	IU/L	شاهد	۵	۳۹۷/۲	۸۳/۵	۶۹۷۲/۷	۰/۰۱۲
		آزمون	۵	۲۷۴/۴	۱۱/۳	۱۲۷/۳	
ALT	IU/L	شاهد	۵	۳/۴	۰/۹	۰/۸	۰/۰۲۸
		آزمون	۵	۲/۲	۰/۴	۰/۲	
AST	IU/L	شاهد	۵	۴۸/۲	۸/۶	۷۴/۷	۰/۰۰۰
		آزمون	۵	۱۷/۲	۳/۷	۱۳/۷	
LDH	IU/L	شاهد	۵	۲۴۹/۴	۲۸/۷	۸۲۱/۳	۰/۰۰۳
		آزمون	۵	۱۸۲/۲	۲۲/۴	۵۰۰/۷	

## بحث

در این مطالعه طی ۹۶ ساعت آزمایش هیچگونه تلفاتی در ماهیان گروه شاهد مشاهده نگردید و درصد اشباع اکسیژن در هر دو گروه شاهد و آزمون تنزل پیدا نکرد.

در این تحقیق LC50 ۹۶ ساعت کرونوزوت بر روی بچه ماهی ازون برون ۱/۵ میلی گرم بر لیتر تعیین گردید. در آزمایشی که توسط Barron و همکاران (1999) بر روی یک گونه از میگو (*Mysidopsis bahia*) انجام گرفت ۵۰ درصد غلظت کشندگی (LC50 96h) سه نوع نفت خام در این آبی را بین ۰/۹ تا ۱/۶ میلی گرم بر لیتر تعیین کرده اند. همچنین در آزمایشی که توسط Long و Holdway در سال ۲۰۰۲ انجام گرفت میزان LC50 ۴۸ ساعته سه نوع نفت خام در یک گونه اختاپوس (*Octopus pallidus*) را بین ۰/۳۹ تا ۰/۸۹ میلی گرم بر لیتر برآورد کرده اند.

در تحقیقی که توسط نظامی و همکاران (۱۳۸۴) انجام گرفت میزان LC50 ۹۶ ساعت دو ترکیب نفتی فنل و ۱- نفتول را در تاسماهی ایرانی بترتیب ۳۶/۶۵ و ۱/۳۲ میلی گرم بر لیتر اندازه گیری نمودند.

همچنین در مطالعه ای دیگر اثرات کشندگی PAHs بر روی برخی از موجودات کفزی بررسی گردید (Swartz et al., 1995). در این مطالعه میزان LC50 ۱۰ روزه فلورانتن در دو

گونه *Corophium spinicorne* و *Rhepoxynius abronius* بترتیب ۲۳/۸ و ۳۷/۹ میکروگرم بر لیتر محاسبه گردید. همچنین در این تحقیق میزان LC50 ۱۰ روزه آسنافتن (*Acenaphthen*) و فنانترن (*Phenanthrene*) در دو گونه کفزی *Leptocheirus plumulosus* و *Eohaustorius estuarinus* بترتیب شامل ۰/۷۰۸ و ۰/۱۵۸ میلی گرم بر لیتر و ۱/۴۹۶ و ۰/۳۰۹ میلی گرم بر لیتر محاسبه گردید.

در مطالعه دیگری که توسط Mitchell و Holdway (۲۰۰۰) انجام گرفت میزان LC50 ۹۶ ساعت Total petroleum TPH (hydrocarbon) را بر روی گرین هیدرا (*Hydra viridissima*) ۰/۷ میلی گرم بر لیتر تعیین کرده اند.

نتایج بدست آمده از تحقیقات اکثر دانشمندان حاکی از دامنه زیاد سمیت هیدروکربنهای نفتی بر روی اکثر آبزیان می باشد و همانطور که ذکر گردید از چند دهم میلی گرم بر لیتر تا چندین میلی گرم بر لیتر متغیر می باشد. از نتایج فوق چنین برمی آید که سمیت هیدروکربنهای نفتی بستگی به نوع موجود زنده، شرایط در معرض قرارگیری و نوع هیدروکربن حلقوی دارد و براساس نتایج بدست آمده، می توان این ترکیبات را جزء مواد سمی برای این موجودات بشمار آورد.

معنی دار ( $P < 0.05$ ) غلظت گلوکز خون ماهیانی که در معرض سمیت حاد کرفوزوت قرار گرفتند، مشاهده گردید.

Sastry و Sharma (۱۹۸۰) و Luskova و همکاران (۲۰۰۲) نیز در مطالعات خود کاهش مقادیر برخی از آنزیمها مانند ALP, AST و LDH در *Channa punctata* و کپور معمولی را گزارش نمودند.

کاهش پروتئین کل خون و نیز آنزیمهای مذکور حکایت از تأثیر سوء کرفوزوت بر برخی اندامهای حیاتی از جمله بافت کبد ماهی دارد، بطوریکه با کاهش این نوع آنزیمها بسیاری از فعالیتهای فیزیولوژی ماهی دچار اختلال شده و ماهی در شرایط استرس قرار گرفته که منجر به تضعیف سیستم ایمنی و نهایتاً مستعد ابتلا به عفونتهای ثانویه می‌گردد.

افزایش میزان گلوکز متعاقب قرار گرفتن در معرض غلظت کشنده سم می‌تواند ناشی از افزایش شدت استرس باشد. در تائید نتایج این تحقیق، Ceron و همکارانش (1997) افزایش گلوکز را در مارماهی متعاقب ۹۶ ساعت در معرض غلظت تحت کشنده سم دیازینون گزارش نمودند. افزایش معنی‌دار گلوکز بعنوان یک پاسخ عمومی ماهیان علیه اثرات حاد آلاینده‌ها بشمار می‌رود (Singh & Srivastava, 1981; Svobodova, 1971; Mishra & Srivastava, 1983; Srivastava, 1982; Balint et al., 1995; Natarajan, 1989; Gill et al., 1990; Sancho et al., 1997).

کاهش غلظت یون فسفر و لاکتات پلاسمای خون و همچنین کاهش فعالیت لاکتات دهیدروژناز بعنوان محصول عامل فعال کننده متابولیسم گلوکز، نشان داد که شدت این فرآیند در گروه آزمون تحت اثر سمی کرفوزوت کاهش می‌یابد. این فرضیه با افزایش غلظت گلوکز در ماهیان گروه سمی تائید می‌گردد (Luskova et al., 2002).

در مجموع آزمایشات روی پارامترهای هماتولوژی و بیوشیمیایی ازون برون نشان داد که ماده نفتی کرفوزوت، ایجاد تغییرات معنی‌دار روی این پارامترها می‌کند. این نتایج نشان دهنده اثر سرکوب‌کنندگی کرفوزوت روی سیستم ایمنی ماهی می‌باشد. بنابراین از آنجایی که سیستم ایمنی بعنوان محافظ آزیان در مقابل بیماریهای عفونی محسوب می‌شود، لذا در معرض قرارگیری این موجودات با مواد سمی و شیمیایی باعث به خطر افتادن و کاهش مقاومت در مقابل عوامل بیماریزا شده و در نهایت باعث مرگ آنها می‌شود.

پاسخهای اصلی خون ازون برون به کرفوزوت در غلظت LC50 ۹۶ ساعت شامل کاهش معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) تعداد گلبول قرمز، گلبول سفید و هموگلوبین و افزایش معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) هماتوکریت در مقایسه با گروه شاهد می‌باشد.

دیگر تغییرات عوامل خونی ازون برون در برابر سمیت حاد کرفوزوت شامل افزایش معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) میانگین حجم گویچه‌ها (MCV) و کاهش معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) میانگین هموگلوبین گویچه‌ها (MCH) و میانگین غلظت هموگلوبین گویچه‌ها (MCHC) بوده است.

Natarajan (۱۹۸۹) تغییرات خونی را بطور کلی به شرایط کم اکسیژن ناشی از آسیب دیدگی آبشش نسبت داد، اگر چه شواهد مستقیمی جهت تائید این فرضیه وجود ندارد.

در مطالعه‌ای که Newman و همکاران (۲۰۰۰) انجام دادند، کاهش معنی‌داری در مقادیر گلبول سفید MCH و MCHC و افزایش معنی‌دار در میزان هماتوکریت پرنده‌گانی که در معرض نفت قرار گرفته بودند، در مقایسه با پرندهگان شاهد مشاهده کردند. همچنین در مطالعه دیگری نشان داده شد که نفت خام می‌تواند باعث ایجاد صدمه در هموگلوبین و گلبول قرمز گردد که نتیجه آن کم خونی می‌باشد (Leighton et al., 1983; Leighton, 1985).

همچنین در مطالعه دیگری اثر طولانی مدت فنانترون روی شاخص‌های خونی کفشک ماهی (*Paralichthys olivaceus*) مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی مشاهده گردید که تعداد گلبول قرمز و مقادیر هموگلوبین و هماتوکریت با افزایش زمان در معرض قرارگیری کاهش یافته است (Ju-Chan Kang & Jung, 2004). (Hoon Jee, 2004). افزایش میزان MCV مربوط به افزایش حجم اریتروسیت بوده که این پدیده نیز ناشی از شرایط کم اکسیژنی حاکم بر محیط سلولی است. در واقع آلاینده‌ای که موجب آسیب دیدگی آبشش گردد باعث بروز شرایط کم اکسیژنی داخل سلولی (Hypoxcia) می‌گردد که این پدیده منجر به افزایش حجم سلولی می‌شود (Heath, 1990).

تغییرات برخی از عوامل هماتولوژی و بیوشیمیایی خون نشان می‌دهد که بافت خونساز ماهی در معرض استرس بوده و این تغییرات عکس‌العملی است تا اثرات ماده سمی به حداقل برسد (Anees, 1978).

در این تحقیق، سمیت حاد کرفوزوت موجب کاهش معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) مقادیر آنزیمهای ALT, AST, ALP و LDH و پروتئین کل در پلاسمای خون ماهیان گردید. همچنین افزایش

## تشکر و قدردانی

از مدیریت وقت مرکز تحقیقات اکولوژی دریای خزر جناب آقای دکتر رستمی خوشباور و همکاران و دوستانی که در اجرای این طرح ما را یاری نمودند، تشکر می‌نمائیم.

## منابع

- Polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments from the Elizabeth river subestuary. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* Vol. 26, pp.97-113.
- Brooks, K.M.** , 1997. Literature review, computer model and assessment of the potential environmental risks associated with Creosote treated wood products used in aquatic environments. *Aquatic Environmental Sciences.* 139P.
- Campbell, T.W.** , 1995. *Avian Hematology. Avian hematology and cytology.* 2nd Edition. Iowa State University Press, Ames, IA. pp.1-19.
- Ceron, J.J.; Sancho, E.; Ferrando, M.D.; Gutierrez, C. and Andreu, E.** , 1997. Changes in carbohydrate metabolism in the eel *Anguilla anguilla*, during short-term exposure to diazinon. *Toxicol. Environ. Chem.* Vol. 60, pp.201-210.
- Cooke, M. and Dennis, A.J. (Eds.)** , 1988. *Polynuclear aromatic hydrocarbons: a decade of progress.* Battelle, Columbus, OH. 93P.
- Couch, J.A. and Harshbarger, J.C.** , 1985. Effects of carcinogenic agents on aquatic animals: an environmental and experimental review. *Environ. Carcinogenesis.* Vol. 3, pp.63-105.
- Duncan, R.J.; Prasse, K.W. and Mahaffey, E.A.** , 1994. *Veterinary Laboratory Medicine Clinical Pathology*, 3rd Edition. Iowa State Press, Ames, IA. 237P.
- Eisler, R.** , 1987. Polycyclic aromatic hydrocarbon hazards to fish, wildlife, and invertebrates: A synoptic review. Final ed. Patuxent Wildlife Research Center, Laurel, MD 20708: U.S. Department of the Interior; Contaminant Hazard Reviews, Report No. 11, 81P.
- Franson, C.J.; Murray, H.C. and Bunck, C.** , 1985. Enzyme activities in plasma. Liver, kidney of five Avian species. *Journal of*
- کاپلین، پ. ، ۱۳۷۴. وضعیت زیست محیطی دریای خزر در شرایط افزایش سطح آب دریا. فصلنامه آب و توسعه، بهار ۱۳۷۴، صفحات ۱۹ تا ۳۴.
- نظامی، ش. ؛ پژند، ذ. ؛ خارا، ح. و افسرده، ع. ، ۱۳۸۴. تعیین LC50 طی ۹۶ ساعت دو ترکیب نفتی فنل و -۱ نفتول بر بچه ماهیان تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*). مجله علمی شیلات، سال چهاردهم، شماره ۱، بهار ۱۳۸۴، صفحات ۱۴۷ تا ۱۵۹.
- Allen, J.L.** , 1988. An overview of avian serum chemical profiles. *In: Jacobson, E.R., Kollias. G.V. (Eds.), Exotic Animals.* Churchill Livingstone. New York, USA. pp.143-159.
- Anees, M.A.** , 1978. Hematological abnormalities in a freshwater teleost, *Channa punctatus* (Bloch), exposed to sub-lethal and chronic levels of three organophosphorus insecticides. *Int. J. Ecol. Environ. Sci.* Vol. 4, pp.53-60.
- Balint, T.; Szegetes, T.; Szegetes, Z.; Halasy, K. and Nemcsok, J.** , 1995. Biochemical and subcellular changes in carp exposed to the organophosphorous methidathion and the pyrethroid deltamethrin. *Aquat. Toxicol.* Vol. 33, pp.279-295.
- Barron, M.G.; Podrabsky, T.; Ogle, S. and Ricker, R.W.** , 1999. Are aromatic hydrocarbons the primary determinant of petroleum toxicity to aquatic organisms? *Aquatic Toxicology.* Vol. 46, pp.253-268.
- Bieri, R.H.; Hein, C.; Huggett, R.J.; Shou, P.; Slone, H.; Smith, C.L. and Su, C.W.** , 1986.

- Wildlife Disease. Vol. 21, pp.33-39.
- Gill, T.S.; Pande, J. and Tewari, H. , 1990.** Sublethal effects of an organophosphorus insecticide on certain metabolite levels in a freshwater fish, *Puntius conchoni* Hamilton. Peptic. Biochem. Physiol. Vol. 36, pp.290-299.
- Hardin, J.A.; Hinoshita, E. and Sherr, D.H. , 1992.** Mechanisms by which benzo[a]pyrene, and environmental carcinogen, suppresses B cell lymphopoiesis. Toxicol. Appl. Pharm-acol. Vol. 117, pp.155-164.
- Heath, A.G. , 1990.** Water pollution and fish physiology. CRC Press. pp.51-58.
- Jain, N.C. , 1986.** Schalm's Veterinary Hematology. 4<sup>th</sup> Edition. Lea and Febiger, Philadelphia, PA. USA. pp.20-87.
- Jung-Hoon Jee, and Ju-Chan Kang , 2004.** Effect of Phenanthrene on haematological parameters in Olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminch et Schlegel). Aquaculture Research. Vol. 35, Issue 14, 1310P.
- Klont, G.W. , 1994.** Fish hematology. In: J.S. Stelon; T.C. Fletcher; A.F. Rowley; T.C. Kelikoff; S.L. Kaattari and S.A. Smith (eds). Techniques in Fish Immunology, SOS Pub. Vol. 3, pp.121-132.
- Leighton, F.A.; Peakall, D.B. and Butler, R.G., 1983.** Heinz body hemolytic anemia from ingestion of crude oil: A primary toxic effect in marine birds. Science. Vol. 220, pp.871-873.
- Leighton. F.A. , 1985.** Morphological lesions in red blood cells from herring gulls and Atlantic puffins ingesting Prudhoe Bay crude oil. Veterinary Pathology. Vol. 22, pp.393-402.
- Long. S.M. and Holdway, D.A. , 2002.** Acute toxicity of crude oil and dispersed to *Octopus pallidus* (Hoyle, 1885) hatchlings, Water Research. Vol. 36, pp.2769-2776.
- Luskova, V.; Svoboda, M. and Kolarova, J. , 2002.** The effects of diazinon on blood plasma biochemistry in carp (*Cyprinus carpio*). Acta vet. BRNO, Vol. 71, pp.117-123.
- Mishra, J. and Srivastava, A.K. , 1983.** Malathion induced hematological and biochemical changes in the Indian catfish *Heteropneutes fossilis*. Environ. Res. Vol. 30, pp.393-398.
- Mitchell, F.M. and Holdway, D.A. , 2000.** The acute and chronic toxicity of the dispersants corexit 9527, water accommodated fraction (WAF) of crude oil, and dispersant enhanced WAF (DEWAF) to *Hydra viridissima* (Green hydra). Wat. Res. Vol. 34, No.1, pp.343-348.
- Mudzinski, S.P. , 1993.** Effects of benzo[a]pyrene on concanavalin A-stimulated human peripheral blood mononuclear cells *invitro*: Inhibition of proliferation but no effect on parameters related to the G<sub>1</sub> phase of the cell cycle. Toxicol. Appl. Pharmacol. Vol. 119, pp.166-174.
- Murty, A.S. , 1986.** Toxicity of pesticides to fish. CRC Press. Vol. 1, 140P.
- Natarajan, G.M. , 1989.** Changes in the carbohydrate metabolites during acute and chronic exposure of air-breathing fish *Channa striatus* to oxydemeton methyl (metasystox). Comp. Physiol. Ecol. Vol. 14, pp.181-184
- Newman, S.H.; Anderson, D.W.; Ziccardi, M.H.; Trupkiewicz, J.G.; Tseng, F.S.; Christopher, M.M. and Zinkl, J.G. , 2000.** An experimental soft-release of oil-spill rehabilitated American coots (*Fulica americana*): II. Effects on health and blood parameters. Environmental pollution. Vol. 107, pp.295-304.



- OECD , 1992. Guidelines for testing chemicals. No. 203 and 204. OECD, Paris. 11P.
- Sancho, E.; Ferrando, M.D. and Andreu, E. , 1997. Sublethal effects of an organophosphate insecticide on the European eel, *Anguilla anguilla*. Ecotoxicol. Environ. Sci. Health. Vol. B 27, No. 2, pp.209 - 221.
- Sastry, K.V. and Sharma, K. , 1980. Diazinon effect on the activities of brain enzymes from *Opiocephalus punctatus* (Channa). Bull. Environ. Contam. Toxicol. Vol. 24, pp.326-332.
- Seeley, K.R. and Weeks-Perkins, B.A. , 1991. Altered phagocytic activity of macrophages in oyster toadfish from a highly polluted estuary. Journal of Aquatic Animal Health. Vol. 3, pp.224-227.
- Singh, H.H. and Srivastava, A.K. , 1982. Effect of formation on carbohydrate metabolism in Indian catfish (*Heteropneustes fossilis*). Environ. Res. Vol. 28, pp.335-339.
- Srivastava, A.K. , 1981. Effects of acute exposure of methyl parathion on carbohydrate metabolism of Indian catfish (*Heteropneustes fossilis*). Acta Pharmacol. Toxicol. Vol. 48, pp.26-34.
- Svobodova, Z. , 1971. Some haematological and metabolic changes in fish occurring after pesticide intoxication. Bull. VUR Vodnany. Vol. 7, pp.29-36.
- Swartz, R.C.; Schults, D.W.; Ozretich, R.J.; Lamberson, J.O.; Cole, F.A.; DeWitt, T.H.; Redmond, M.S. and Ferraro, S.P. , 1995.  $\Sigma$ PAH: A model to predict the toxicity of polynuclear aromatic hydro-carbon mixtures in field-collected sediments. Environmental Toxicology and Chemistry. Vol. 14, No. 11, pp.1977-1987.
- Urso, P. and Gengozian, N. , 1982. Alterations in the hormonal immune response and tumor frequencies in mice exposed to benzo[a]pyrene and X-rays before or after birth. Journal of Toxicol. Environ. Health. Vol. 10, pp.817-835.
- Urso, P. and Gengozian, N. , 1984. Subnormal expression of cell-mediated and humoral immune responses in progeny disposed towards a high incidence of tumors after in utero exposure to benzo[a]pyrene. Journal of Toxicol. Environ. Health. Vol. 14, pp.569-584.
- Weeks, B.A.; Warinner, I.E.; Mathews, E.S. and Wishkovsky, A. , 1990. Effects of toxicant on certain functions of the lymphoreticular system of fish. Pathol.Mar. Sci. Vol. 32, pp.369-374.

## The effects of Creosote on mortality rate and blood biochemical factors of Stellate sturgeon (*Acipenser stellatus*)

Mokaremi Rostami A.<sup>(1)\*</sup> ; Jamili Sh.<sup>(2)</sup> ; Khoshbavar Rostami H.A.<sup>(3)</sup> ; Vosoughi Gh.<sup>(4)</sup> and Ospooei H.<sup>(5)</sup>

ali\_m.rostami@yahoo.com

- 1- Caspian Sea Ecology Research Center, P.O.Box: 916 Sari, Iran
- 2- Iranian Fisheries Research Organization, P.O.Box: 14155-6116 Tehran, Iran
- 3- Inland Water Aquatic Stocks Research Center, P.O.Box: 139 Gorgan, Iran
- 4- Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, P.O.Box: 14155-6453
- 5- Golestan Fisheries Main Office, Zip Code: 49166-87165 Gorgan, Iran

Received: May 2006

Accepted: January 2007

**Keywords:** *Acipenser stellatus*, Creosote, LC<sub>50</sub>, Acute Toxicity

The effects of Creosote on Stellate sturgeon (*Acipenser stellatus*) juveniles each weighing 3.6±1 grams was evaluated. Acute toxicity test was undertaken in static water quality at 22°C±1 according to the OECD method at the Caspian Sea Ecology Institute in 2005. The effect was assessed based on the results of the acute toxicity test. For the test, the hematological and biochemical properties of one control and five experimental groups of the fish juveniles what were exposed to Creosote were compared. The acute toxicity test lasting 96h was performed in fully static water condition with aeration. The 96h LC<sub>50</sub> values of Creosote for Stellate sturgeon juveniles was 1.5 mg/l. The experimental groups of Stellate sturgeon juveniles showed significantly different values (P< 0.05) of erythrocyte count (RBC), hemoglobin count (Hb), hematocrit (PCV), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) , leukocyte count, total protein (TP), glucose, ALP, AST, ALT and LDH of blood serum compared to the control group. Changes in values of erythrocyte and leukocyte profile after exposure to Creosote may be referred to disruption of hematopoiesis as well as to decrease in non-specific immunity of the fish.

\* Corresponding author