



## تأثیر آزادیراختین (*Azadirachtin indica*) بر برخی پارامترهای رشد، بقا و بافت آبشش بچه ماهی آمور (*Ctenopharyngodon idella*)

راضیه غلامی<sup>۱</sup>، رضا داودی<sup>۱\*</sup>، امین اوجی فرد<sup>۱</sup>، حمیدرضا نوریزدان<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup>گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه خلیج فارس بوشهر

<sup>۲</sup>گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه خلیج فارس بوشهر

| نوع مقاله:       | چکیده   |
|------------------|---|
| پژوهشی           |   |
| تاریخچه مقاله:   |   |
| دریافت: ۹۴/۰۲/۳۱ |   |
| اصلاح: ۹۴/۰۷/۱۸  |   |
| پذیرش: ۹۴/۰۹/۰۵  |   |
| کلمات کلیدی:     |   |
| آبشش             | تحقیق حاضر جهت بررسی اثرات مزمن سم آزادیراختین بر شاخص‌های رشد، بقا و مورفولوژی آبشش بچه ماهی آمور ( <i>Ctenopharyngodon idella</i> ) با میانگین وزن $11/09 \pm 2/3$ گرم انجام گرفت. تعداد ۱۲۰ قطعه ماهی آمور به تعداد مساوی در ۳ گروه تیمار و یک گروه شاهد و هرکدام سه تکرار تقسیم شدند. دوزهای زیر غلظت کشنده این سم، $0/073 (LC_{50} 1/0)$ ، $0/115 (LC_{50} 2/0)$ و $0/22 (LC_{50} 3/0)$ میلی گرم بر لیتر، انتخاب شد و ماهیان به مدت ۲۸ روز در معرض این دوزها قرار گرفتند. افزایش آزادیراختین تأثیری بر پارامترهای رشد و بقا نداشت ( $P > 0.05$ ). در طول آزمایش، الگوی رفتاری ماهیان همچون شنای غیرعادی، چرخش و اضطراب به صورت افزایش عکس‌العمل در مقابل محرک‌های بیرونی، کاهش حرکات گروهی و عدم تعادل و در مورد بافت‌شناسی، تورم اپیتلیال، هایپرپلازی، امتزاج لاملا و نکروز آبشش مشاهده شد. نتایج نشان داد اگرچه آزادیراختین در غلظت غیرکشنده در کوتاه مدت تأثیری بر رشد و بقای ماهی آمور ندارد اما باعث ایجاد رفتار غیرعادی در این ماهیان می‌شود. همچنین با افزایش میزان دوز این سم، تخریب بافتی آبشش بیشتر شد که می‌تواند در دراز مدت اثرگذار باشد. |
| آزادیراختین      |   |
| ماهی آمور        |   |
| رشد              |   |

### مقدمه

امروزه سموم و آفت‌کش‌ها در کشاورزی و بسیاری از اهداف گوناگون همچون حفظ سلامت بشر و حیوانات به کار می‌روند. اما کاربرد روزافزون و بیش از حد آفت‌کش‌ها سلامت بشر را به مخاطره انداخته و اثرات معکوسی بر موجودات غیر هدف داشته و همچنین موجب آلودگی منابع آب، خاک و هوا می‌گردد. به طور کلی سمیت یک آلاینده از طریق آزمایش سنجش زیستی ارزیابی می‌گردد که به وسیله آن غلظتی که در آن غلظت نیمی از ارگانسیم‌های مورد آزمایش در یک دوره زمانی مشخص تلف می‌گردند، مشخص می‌شود. این آزمایش‌ها شاخه‌ای از علم اکوتاکسیکولوژی بوده و وظیفه آن قضاوت درباره توان بالقوه مواد آلاینده و بررسی تأثیرات زیان بخش این مواد بر اکوسیستم‌ها و موجودات زنده می‌باشد (Sharifpour et al., 2003). ماهیان یکی از مهمترین موجودات آبی

\* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: [da\\_afshin@yahoo.com](mailto:da_afshin@yahoo.com)

می باشند که به علت ارزش اقتصادی و حساسیت در مقابل آلاینده ها از اهمیت خاصی برخوردار بوده و به همین دلیل جهت انجام آزمایشات زیست سنجی، در بعد وسیعی از آنها استفاده می گردد (Piri et al., 1997). حساسیت گونه های مختلف ماهی به مواد سمی متفاوت، متغیر است، از این رو آزمایش های سم شناسی بر روی ماهیان مختلف صورت می گیرد (Finney, 1971).

امروزه در تمام کشورها آگاهی افراد نسبت به مسائل زیست محیطی و اثرات جانبی مرتبط با استفاده از آفت کش های سنتزی رو به افزایش است، لذا سعی بر این است تا با جایگزین کردن آفت کش های بیولوژیک و طبیعی به جای انواع سنتزی، گامی در جهت حفظ محیط زیست و سلامت انسان برداشته شود. از جمله این موارد، استفاده از فرآورده های گیاهی است که برای حفاظت گیاهان در مقابل آفات و بیماری ها مورد استفاده قرار می گیرند. خانواده *Meliaceae* یکی از خانواده های گیاهی است که دارای ویژگی های متعدد از جمله اثر بر آفات و حشرات می باشد. یکی از گونه های این خانواده بنام *Neem* گیاه بومی شبه قاره هند با ویژگی های دارویی بسیار زیاد بوده که از قرن ها پیش در طب سنتی مردم این سرزمین مورد استفاده بوده است. در حال حاضر به علت موارد کاربرد متعدد آن در تمام مناطق دنیا به عنوان یک درخت اعجاب انگیز مورد قبول واقع شده است (Randhawa and Parmar, 1993). ترکیبات مختلف گیاه *Neem* سالهاست که مورد شناسایی قرار گرفته است. این ترکیبات دارای خواص ضد ویروسی، ضدباکتریایی، ضد قارچی، ضد التهاب و ضد تب می باشند (Singh and Sastry, 1981; Gogati and Marathe, 1989; Kher and Chaurasia, 1997). آزادیراختین یک حشره کش گیاهی مشتق شده از درخت *Neem* می باشد. *Azadirachta indica* یکی از مناسب ترین ترکیبات طبیعی (Winkaler et al., 2007) است چرا که نسبت به حشره کش های مصنوعی زیان کمتری به محیط زیست می رساند (Sundaram, 1996). با این حال، آزادیراختین برای موجودات غیر هدف، سمی محسوب می شود و باعث ایجاد تغییرات قابل توجهی در موجودات آزمایشگاهی شده است (Mahboob et al., 1998; Panda and Kar, 2000; Rahman et al., 2002; Hassanein et al., 2007).

در این تحقیق با توجه به اینکه استفاده از آفت کش های سنتزی اغلب بدون دقت و بی رویه بوده و منجر به مسائل و مشکلات زیست محیطی زیادی از جمله: آلودگی مواد غذایی، خاک، آب های سطحی و زیرزمینی، آلودگی هوا و غیره می شود، تلاش بر این است که آفت کش های بیولوژیک و طبیعی جایگزین آفت کش های سنتزی گردد. لذا آثار این سم روی رشد، بقا و بافت آبشش بچه ماهی امور به عنوان با ارزش ترین و پرطرفدارترین گونه پرورشی ماهیان گرمابی نزد مصرف کنندگان، مورد مطالعه قرار گرفت. هم چنین با علم به اینکه تعیین میانه غلظت کشنده یا  $LC_{50}$  برای مطالعات تاکسیکولوژی ضروری است، ابتدا میزان مذکور آزادیراختین در این گونه طی ۹۶ ساعت تعیین شده بود و به موازات این اقدام آثار رشد و بافت شناسی نیز مورد مطالعه قرار گرفت.

## مواد و روش ها

این تحقیق در زمستان ۱۳۹۲ در کارگاه تکثیر و پرورش آبزیان دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه خلیج فارس بوشهر انجام گرفت. در این آزمایش ۵۰۰ عدد ماهی انگشت قد امور مورد نیاز از مزرعه پرورش ماهی در شوشتر تهیه و با تانکر مجهز به کپسول اکسیژن به کارگاه مورد نظر منتقل گردید. سپس ماهیان برای سازگار شدن با محیط آزمایش به مدت یک هفته در داخل تانک های پرورشی (فایبرگلاس) نگهداری شدند. به منظور هوادهی و تأمین اکسیژن، هر یک از مخازن به یک عدد سنگ هوا که به منبع هواده متصل بوده مجهز گردیدند. آزمایش در یک سالن سر پوشیده با دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی به مدت ۵ هفته انجام شد.

در ابتدا اثرات سمیت مزمن آزادیراختین بر روی بچه ماهیان امور تعیین گردید که به همین منظور تعداد ۱۲۰ قطعه از این بچه ماهیان با وزن متوسط  $11/09 \pm 2/3$  گرم و طول کل  $8/29 \pm 2/6$  سانتی متر جدا شده و برای انجام آزمایش تشخیص سمیت مزمن در ۴ تیمار و ۳ تکرار با ۱۰ عدد ماهی در هر تکرار و در داخل ۱۲ تانک (۳ عدد تانک برای هر تیمار و ۳۰ عدد ماهی در هر تیمار)

قرار داده شدند از آنجایی که مقدار  $LC_{50}$  طی ۹۶ ساعت برای این سم در آزمایشات قبلی  $0/73$  میلی‌گرم در لیتر تعیین شده بود، (Gholami *et al.*, 2015) لذا ۳ تیمار با مقدار  $0/073$  (۱۰٪ از  $LC_{50}$ )،  $0/15$  (۲۰٪ از  $LC_{50}$ )،  $0/22$  (۳۰٪ از  $LC_{50}$ ) میلی‌گرم در لیتر و یک گروه شاهد تشکیل گردید. هر ۲۴ ساعت آب به همراه سم تعویض شد تا هم کیفیت آب شرایط بهتری داشته باشد و هم اینکه غلظت آزادیراختین در تمام طول دوره ثابت باشد و در طول دوره تغییراتی در ترکیب سم ایجاد نشود. پس از ۲۸ روز، ماهیان هر گروه بیهوش شده و سپس بیومتری شدند و از آبشش این ماهیان نمونه‌برداری شد و در فرمالین ۱۰ درصد تثبیت گردید.

### اندازه‌گیری پارامترهای فیزیکی‌شیمیایی آب

در طول مدت آزمایش سنجش خصوصیات فیزیکی‌شیمیایی آب از قبیل درجه حرارت (با دماسنج جیوه‌ای)، اکسیژن محلول (با اکسیژن متر، ساخت آلمان و مدل wtw) به صورت روزانه و pH (با pH متر، مدل winlab) و شوری (با شوری‌سنج، ساخت آلمان و مدل wtw) به صورت ۲ هفته یکبار انجام گرفت.

### تغذیه و زیست‌سنجی

در ابتدا ماهیان به کمک ترازو توزین گردیدند و پس از انجام این عملیات، توسط غذای کنسانتره ماهیان گرمایی سه بار در روز در ساعات ۸، ۱۶ و ۲۴ تغذیه شدند. درصد میزان پروتئین و چربی جیره به ترتیب  $33/78$  و  $6/91$  درصد بود. غذادهی در طول مدت آزمایش به صورت دستی انجام گرفت.

تجزیه و تحلیل فاکتورهای رشد: پس از اتمام دوره پرورش درصد بقا (survival %)، ضریب تبدیل غذایی (FCR)، ضریب رشد ویژه (SGR) و فاکتور وضعیت (CF) از طریق فرمول‌های زیر محاسبه شدند (Misra *et al.*, 2006).

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

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

$100 \times \{ \text{تعداد روزهای پرورش} / (\text{لگاریتم طبیعی وزن اولیه} - \text{لگاریتم طبیعی وزن نهایی}) \} = SGR^2$  ضریب رشد ویژه

$100 \times \text{طول} / \text{وزن تر} = CF^3$  فاکتور وضعیت

### الگوی رفتاری ماهیان

در گروه شاهد و گروه حاوی سم، به منظور جلوگیری از شرایط کمبود اکسیژن هوادهی به صورت پیوسته انجام گرفت. ماهیان قرار گرفته در معرض سم و گروه شاهد در طول دوره آزمایش به صورت مداوم تحت نظر نگه داشته شدند و الگوی رفتاری و هرگونه حرکت غیرعادی در آنها ثبت شد.

### بافت‌شناسی کلاسیک

<sup>1</sup> Feed Conversion Rate (FCR)

<sup>2</sup> Specific Growth Rate (SGR)

<sup>3</sup> Condition Factor (CF)

در پایان دوره نمونه‌ها با وزن و طول یکسان انتخاب و به مدت ۲۴ ساعت در محلول دیویدسون فیکس شدند. پس از آن چندین مرتبه با الکل اتانول ۷۰٪ مورد شستشو قرار گرفتند، سپس نمونه‌های آبشش توسط الکل اتانول‌های ۹۵ و ۱۰۰ و نهایتاً توسط الکل بوتانول آبگیری شدند. نمونه‌ها پس از قرارگیری به مدت ۳ ساعت در گزین به منظور پارافینه کردن، در داخل آون در پارافین مایع قرار داده شدند و پس از آن توسط پارافین (Merck) قالب‌گیری شدند. از بافت‌ها برش‌هایی به ضخامت ۴ میکرومتر توسط میکروتوم تهیه شد. لامها پس از نگهداری در داخل آون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و پس از آن پارافین زدایی توسط گزین به روش هماتوکسیلین- فوشین رنگ آمیزی شده و توسط میکروسکوپ نوری Micros مورد مطالعه و عکس‌برداری قرار گرفتند (Khodabandeh *et al.*, 2006).

### تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

طرح کلی این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی<sup>۴</sup> برنامه‌ریزی و اجرا شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها و مقایسه میانگین‌ها با آزمون تجزیه واریانس یک طرفه (One – Way ANOVA) و آزمون دانکن در سطح اعتماد ۵ درصد و با استفاده از نرم‌افزار<sup>۵</sup> sas نسخه 9.1.3 انجام و برای رسم نمودارها از Excel استفاده شد.

### نتایج

#### پارامترهای فیزیکی شیمیایی

نتایج مربوط به شاخص‌های فیزیکی شیمیایی آب در جدول ۱ نشان داده شده است. در طول آزمایش میزان شاخص‌های مذکور در حد استاندارد نگه داشته شد.

جدول ۱. فاکتورهای کیفی اندازه‌گیری شده در طول مدت آزمایش

| شاخص                   | شوری (ppt) | اکسیژن (میلی‌گرم در لیتر) | دما (درجه سانتی‌گراد) | pH         |
|------------------------|------------|---------------------------|-----------------------|------------|
| انحراف معیار ± میانگین | ۲/۳ ± ۰/۱  | ۶/۱۲ ± ۰/۴                | ۱۸/۶۱ ± ۱/۳۷          | ۷/۸۷ ± ۰/۱ |

#### رشد

نرخ رشد بچه ماهیان آمو شد و بچه ماهیانی که تحت تأثیر غلظت‌های مزمن ۰/۰۷۳، ۰/۱۵ و ۰/۲۲ میلی‌گرم در لیتر (۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد LC<sub>50</sub>) آزادیراختین قرار داشتند در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج پارامترهای رشد نشان داد تفاوت معنی‌داری در بین تیمارها وجود ندارد (p>۰/۰۵). همچنین در هیچ یک از تیمارها در طول آزمایش ماهیان تلف نشدند و بقا ۱۰۰٪ بود. در این تحقیق از آنجا که ماهیان در آکواریوم پرورش یافتند و تحت تأثیر سم بودند از علوفه برای تغذیه ماهیان استفاده نشد در نتیجه رشد مطلوب به دست نیامد با این حال از غذای کپور ماهیان استفاده شد که انرژی این غذا (۳۹۸۳ کیلوکالری بر کیلوگرم) حتی از میزان انرژی مورد نیاز آمو، بیشتر بود.

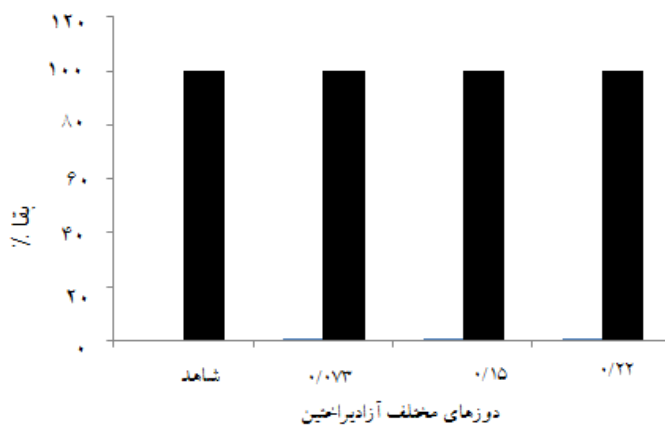
<sup>1</sup> Complete Random Design

<sup>5</sup> Statistical Analysis System (The SAS System for Windows V.6.1.7600, 2002-2004 by SAS Institute Inc.)

جدول ۲. نتایج پارامترهای رشد بچه ماهیان قرار گرفته در معرض آزادی‌راختین

| شاخص رشد/ دوز سم        | شاهد      | ۰/۰۷۳ (ppm) | ۰/۱۵ (ppm) | ۰/۲۲ (ppm) |
|-------------------------|-----------|-------------|------------|------------|
| وزن اولیه (گرم)         | ۱۰/۵±۲/۳  | ۱۱/۰±۱/۰۷   | ۱۱/۳۱±۱/۰۵ | ۱۱/۵۵±۱/۲۵ |
| وزن نهایی (گرم)         | ۱۲/۵±۱/۷۴ | ۱۲/۸۷±۰/۷۵  | ۱۳/۱±۰/۳۶  | ۱۳/۲۵±۱/۱  |
| اختلاف وزن (گرم)        | ۲/۰±۰/۵۷  | ۱/۸۷±۰/۵    | ۱/۷۹±۰/۸۹  | ۱/۷±۰/۱۵   |
| طول کل اولیه (سانتیمتر) | ۸/۱±۱/۱۷  | ۸/۴±۰/۸     | ۸/۴۳±۰/۴   | ۸/۲۶±۰/۶۱  |
| طول کل نهایی (سانتیمتر) | ۹/۷۳±۱    | ۹/۶±۰/۷۲    | ۹/۵۶±۰/۳   | ۹/۴±۰/۴۵   |
| افزایش طول              | ۱/۶۳±۰/۴  | ۱/۲±۰/۱۱    | ۱/۱۳±۰/۱۵  | ۱/۱۴±۰/۴۳  |
| ضریب تبدیل غذایی        | ۲/۵±۰/۱۳  | ۲/۶۷±۰/۳۴   | ۲/۷۹±۰/۵۲  | ۲/۹۴±۰/۱۶  |
| ضریب رشد ویژه           | ۰/۲±۰/۰۸  | ۰/۱۷±۰/۰۵   | ۰/۱۴±۰/۰۱  | ۰/۰۶±۰/۰۶  |
| فاکتور وضعیت            | ۱/۸۷±۰/۱۸ | ۱/۵۲±۰/۲    | ۱/۲۷±۰/۰۴  | ۱/۲۱±۰/۰۱  |

اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد ( $p > 0.05$ ).



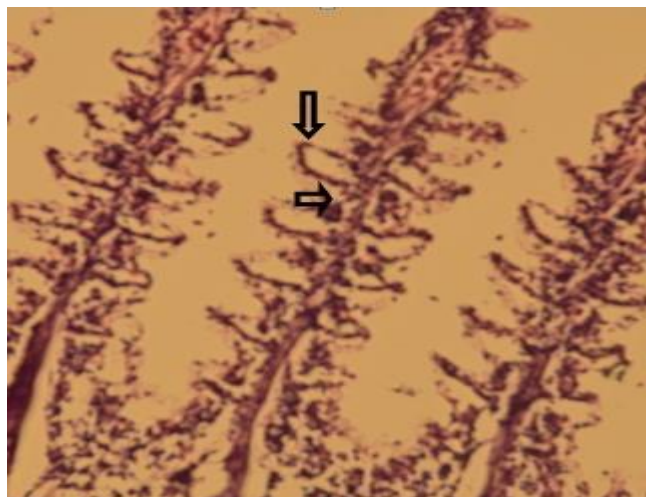
شکل ۱. میزان بقا ماهیان آمو در معرض دوزهای مختلف سم آزادی‌راختین (اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد)

### علایم و خصوصیات ظاهری

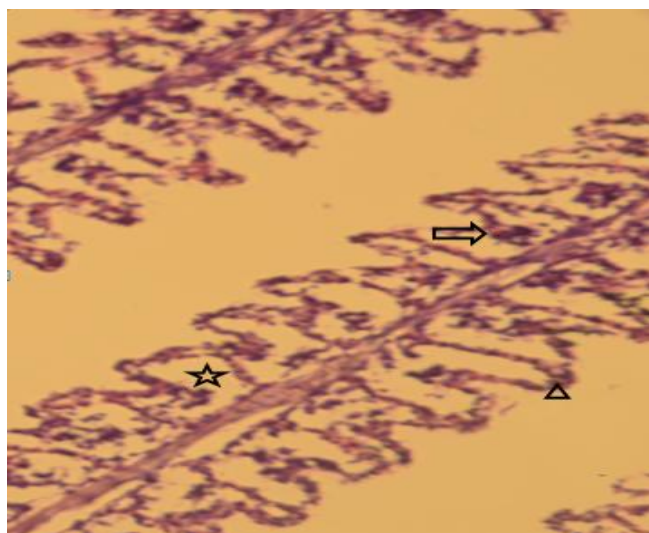
از نظر رفتاری، ماهیان در معرض سم دچار بی‌تابی شدید شدند. اضطراب ماهیان به صورت افزایش عکس‌العمل در مقابل محرک‌های بیرونی، شنای غیرعادی، چرخش، کاهش حرکات گروهی و به همان نسبت عدم توانایی در جهت‌یابی خود در آب، خوابیدن به پهلو و شنای نیم‌دایره‌ای بود.

### بافت‌شناسی آبشش

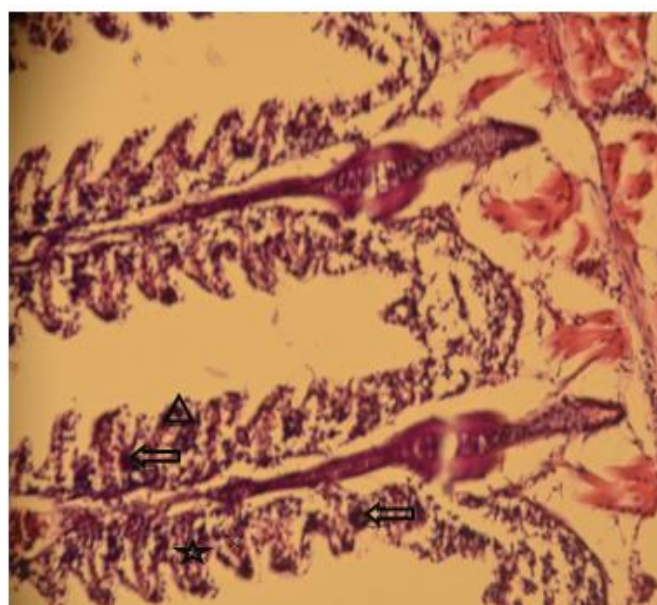
در این تحقیق به منظور بررسی اثر سم آزادی‌راختین، سلول‌های آبشش مورد بررسی قرار گرفتند و مشخص شد که سلول‌های آبششی به طور قابل توجهی آسیب دیده و حالت هایپرپلازی در آنها مشخص بود. با افزایش میزان دوز سم، هایپرپلازی لاملاها شدیدتر شده به طوری که در بیشترین دوز ساختار کلی لاملاهای ثانویه از بین رفت (شکل ۲ تا ۵).



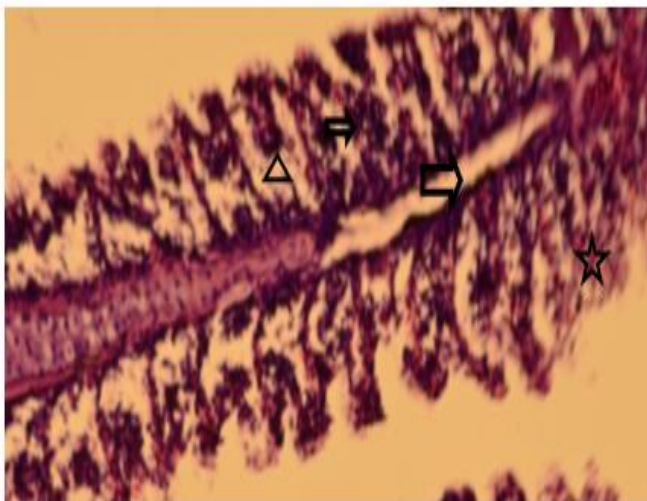
شکل ۲. برش طولی از آبشش ماهیان گروه شاهد. تیغه‌های آبششی ثانویه (پیکان بزرگ)، تیغه‌های آبششی اولیه (پیکان کوچک)، (رنگ آمیزی با هماتوکسیلین- فوشین).



شکل ۳. برش طولی از آبشش ماهیان قرار گرفته در معرض ppm ۰/۰۷۳ آزادیراختین. هایپرپلازی سلول‌های اپی‌تلیالی لاملاهای ثانویه (پیکان)، ادم یا خیز میان اپی‌تلیالی در لاملاهای ثانویه (ستاره) و به هم پیوستگی نوک لاملاهای ثانویه (مثلث). (رنگ آمیزی با هماتوکسیلین- فوشین).



شکل ۴. برش طولی از آبشش ماهیان قرار گرفته در معرض ppm ۰/۱۵ آزادیراختین. هایپرپلازی سلول‌های اپی‌تلیالی لاملاهای ثانویه بسیار گسترده‌تر از تیمار ppm ۰/۰۷۳ (پیکان)، فیوز شدن نوک لاملاهای ثانویه (مثلث) و شروع لجنی شدن سلول‌های اپی‌تلیالی (Sloughing cell) در لاملاهای ثانویه (ستاره). (رنگ آمیزی با هماتوکسیلین- فوشین).



شکل ۵. برش طولی آبشش ماهیان قرار گرفته در معرض ppm ۰/۲۲ آزادیراختین. هایپرپلازی شدید سلول‌های اپی تلیال لاملاها (پیکان کوچک)، نکروز سلول‌های اپی‌تلیال لاملاهای اولیه (پیکان بزرگ)، لجنی شدن و تخریب سلول‌های اپی‌تلیال لاملاهای ثانویه به طوری که ساختار کلی لاملاهای ثانویه از بین رفته است (ستاره)، ادم میان اپی‌تلیالی لاملاهای ثانویه در معدود تیغه‌هایی که هنوز به طور کامل لجنی نشده و ساختار خود را حفظ کرده‌اند (مثلث). (رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین-فوشین).

### بحث

بر اساس نتایج به‌دست آمده از این مطالعه مشخص گردید آزادیراختین تأثیر معنی‌داری در میانگین وزن، طول بدن ماهیان، نرخ رشد ویژه، ضریب تبدیل غذایی و ضریب چاقی بچه ماهیان آمور نمی‌گذارد ولی باعث کاهش جزئی این پارامترها می‌شود که این امر می‌تواند ناشی از کاهش مصرف مواد غذایی باشد که به دنبال طعم بد غذا ناشی از سم ایجاد می‌شود. در تحقیقی مشخص شد که جذب مواد غذایی با افزایش غلظت سم کاهش می‌یابد که ناشی از تجمع سموم در محیط و تأثیر آن بر اشتها بود (Cia et al., 1990; 1992). قرار گرفتن ماهی سیچلاید (Cichlid) به مدت طولانی در معرض عصاره خام *Azadirachtin indica* رشد این ماهی را به تعویق انداخت (Omeregic and Okpanachi, 1992).

Naz و Javed (۲۰۱۳)، بر روی ماهیان *Catla catla*, *Labeo rohita*, *Cirrhina mrigala* و *Ctenopharyngodon idella* و *Hypophthalmichthys molitrix* نشان داد که با قرار دادن این ماهیان در معرض مخلوط فلزات سنگین به مدت ۸۴ روز، کاهش وزن و ضریب چاقی را موجب شد. همچنین نتایج تحقیقات Abdel-Tawwab و همکاران (۲۰۰۱)، بر روی ماهی نیل تیلایپا در معرض جیوه نشان داد که حداقل وزن نهایی با بیشترین دوز جیوه (ماهی ۳۱/۹g/l) به دست آمد و افزایش وزن و نرخ رشد ویژه به طور معنی‌داری با افزایش دوز جیوه کاهش یافت. در تحقیقی دیگر (Mohammad nejhad et al., 2012) تأثیر سم ارگانوفسفره دیازینون بر مولدین نر ماهی سفید *Rutilus frisii kutum* بررسی شد. نتایج آن تحقیق نشان داد که هیچ تفاوت معنی‌داری در میانگین وزن و طول کل ماهیان در تیمارهای مورد بررسی وجود ندارد که با داده‌های این تحقیق مطابقت می‌کند.

تغییرات رفتاری حساسترین نشانه اثرات بالقوه سموم است. در این تحقیق علائم غیر طبیعی در ماهیان در معرض آزادیراختین، نظیر بی‌تابی شدید، اضطراب به صورت افزایش عکس‌العمل در مقابل محرک‌های بیرونی، از دست دادن توانایی جهت‌یابی در آب، شنای غیرعادی و کاهش تعادل مشاهده شد. در تحقیقی شنای نامنظم و بی‌هدف، کاهش حرکت و عدم توانایی در حفظ تعادل در اثر قرارگرفتن طولانی‌مدت ماهی آب شیرین *Labeo rohita* در معرض حشره‌کش زیستی Neem مشاهده شد (Ahmadbhat et al., 2012). مطالعه Elia و همکاران (۲۰۱۱)، نشان داد که ماهی نیل تیلایپا *Oreochromis niloticus* تحت تیمار سم ارگانوفسفره باعث تغییرات رفتاری از جمله: کم کردن سرعت شنا و به طور کلی فعالیت کمتر از گروه شاهد، همچنین حرکت نزدیک سطح آب، تأخیر در حرکت سرپوش آبشش، از دست دادن اشتها و ترشح مخاط پوست می‌شود. برخی از این علائم با علائم مشاهده شده در آزمایش انجام شده مطابقت دارد. علت این رفتار غیرعادی می‌تواند ناشی از اختلال در سیستم عصبی مغز و اعصاب ماهیان در معرض سم باشد (Rao et al., 2005).

آزمایشات بافت‌شناسی و بررسی‌های آسیب‌شناسی سلولی می‌تواند اطلاعات زیادی را در زمینه تأثیر سموم فراهم آورد. نتایج حاصل از بررسی‌های آسیب‌شناسی این مطالعه نشان داد که سم آزادیراختین باعث ایجاد عوارضی از قبیل هایپرپلازی، ادم (خیز)، به هم پیوستگی (فیوز شدن)، نکروزی شدن، لجنی شدن و تخریب سلول‌های اپیتلیال می‌گردد و به هر میزانی که غلظت آزادیراختین افزایش یافت اثرات فوق در آبشش بچه‌ماهیان امور شدیدتر شد. در تحقیقی اثر آزادیراختین بر روی آبشش گربه ماهی *Heteropneustes fossilis* مورد بررسی قرار گرفت (Kumar et al., 2010). سلول‌های موکوسی بعد از ۲۴ ساعت قرار گرفتن در معرض تیمار آزادیراختین فعال شدند. بعد از ۴۸ ساعت، تورم در نوک تعدادی از لاملاهای ثانویه مشاهده شد. ادغام لاملاهای ثانویه بعد از ۷۲ ساعت قرارگرفتن در معرض آزادیراختین و نکروز سلولی بعد از ۹۶ ساعت، اتفاق افتاد و جدا شدن اپیتلیال لاملاهای ثانویه از سلول‌های پایه نیز مشاهده شد.

نکروزی شدن (بافت مردگی) در آبشش ماهیان تحت تیمار آزادیراختین با یافته‌های سایر محققین که دژنره شدن مشابه را در مقابل سایر مواد سمی مشاهده کردند مطابقت دارد (Erkmen et al., 2000; Cengiz and Unlu, 2002; Cengiz and Unlu, 2003; Cengiz, 2006). در بررسی تغییرات بافتی ماهی *Corydoras paleatus* در معرض سم متیل پاراتیون (سم زیستی) بیان شد که لاملاهای آبششی در بخش اپیتلیال دچار هایپرپلازی (پریاختگی)، ادم و جدا شدن اپیتلیال از غشاء پایه است (Fanta et al., 2003). آسیب‌های آبشش بعد از استفاده آزمایشی از سم آندوسولفان در گربه‌ماهی، *Clarias batrachus* (Bhatnager et al., 1982) و در ماهی گوره‌خری، *Branchydanio rerio* (Toledo and Jonsson, 1992) نیز گزارش گردیده است. میزان عکس‌العمل و ضایعات ناشی از سم در آبزیان به عواملی مانند سن، گونه و وضعیت فیزیولوژیکی بدن آبی و نیز شرایط کیفی آب مانند درجه حرارت، سختی کل و pH بستگی دارد (Rijijohan and Jayabalan, 1993).

نتایج کلی این تحقیق نشان داد که آزادیراختین در دوز غیرکشنده تأثیری بر رشد و بقای ماهی امور ندارد اما باعث ایجاد رفتار غیرعادی در این ماهیان می‌گردد. همچنین با افزایش میزان دوز این سم تخریب بافتی آبشش بیشتر شد. این مطالعه می‌تواند به منظور ایجاد یک سطح قابل قبول و ایمن از سم آزادیراختین در طبیعت برای رشد و بقای ماهی در دراز مدت کمک کند.

## منابع

- Abdel-Tawwab, M., Shalaby, A.M.E., Ahmad, M.H., Khattab, Y.A.E. 2001. Effect of supplemental dietary L-ascorbic acid (vitamin C) on mercury detoxication, physiological aspect and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). Sharqia, Egypt. 159-171.
- Ahmad Bhat, I., Varma, A., Saxena, G. 2012. Acute toxicity of matrine containing biopesticide kethrin on a freshwater fish, *Labeo rohita* (Hamilton). Indian Journal of Life Science. 2(1): 113-116.
- Bhatnager, M.C., Bana, A.K., Tyagi, M. 1982. Respiratory distress to *Clarias batrach* exposed to endosulfat-histological approach. Journal of Environmental Biology. 13: 227-231.
- Cengiz, E.I., Unlu, E. 2002. Histopathological changes in the gills of mosquitofish *Gambusia affinis* exposed to endosulfan. Bulletin of Environmental Contaminantion Toxicology. 68: 290-296.
- Cengiz, E.I. 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. B. 38: 581-589.
- Cengiz, E.I. 2006. Gill and Kidney Histppathology in the freshwater fish *Cyprinus carpio* after acute exposure to deltamethrin. Environmental Toxicology and Pharmacology. 22: 200-204.
- Cia, S., Summerfelt, R.C. 1992. Effects of temperature and size on oxygen consumption and ammonia excretion by walleye. Aquaculture. 104: 127-138.
- Eliaa, M.I., Azza, M.G., 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., Yerli, S.V. 2000. Histopathological effects of cyphenothrin on the gills of *Lebistes reticulatus*. *Veterinary Human. Toxicology*. 42: 5-7.
- Fanta, E., Rios, F.S., Romão, S., Vianna, A.C., Freiburger, 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. Probit analysis. Cambridge University. pp. 465-489.
- Gogati, S.S., Marathe, A.D. 1989. Anti-viral effect of neem leaf (*Azadirachta indica*) extracts on chinkungunya and measles viruses. *Journal of Research Education in Indian Medicine*. 8:1-5.
- Gholami, R., Davoodi, R., Oujifard, A., Nooryazdan, H. 2015. Chronic effects of Neem Azal on biochemical parameters of grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. *Aquaculture Research*. doi:10.1111/are.12837.
- Hassanein, H.M.A., Okail, H.A., Mohamed, N.K. 2007. Biochemical changes in proteins and DNA in *Ctenopharyngodon idella* due to environmental pollution with the biopesticide (Trilogy). ICCA Garyounis University. Benghazi, Libya. 18-21.
- Kher, A., Chaurasia, S.C. 1997. Anti-fungal activity of essential oils of three medicinals plants. *Indian Drug*. 15: 41- 2.
- Khodabandeh, S., Charmantier, G., Charmantier-Daures, M. 2006. Immunolocalization of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in osmoregulatory organs during the embryonic and post-embryonic development of the lobster *Homarus gammarus*. *Journal of Crustacean Biology*. 26: 515-523.
- Kumar, A., Prasad, M.R., Srivastava, K., Tripathi, S., 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.
- Mahboob, M., Siddiqui, M.K.J., Jamil, K. 1998. The effect of subacute administration of a neem pesticide on rat metabolic enzymes. *Journal of Environmental Science and Health*. B. 33(4): 425-438.
- Misra, C.K., Kumar, D.B., Mukherjee, S.C., Pattnaik, P. 2006. Effect of long term administration of dietary  $\beta$ -glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings. *Aquaculture*. 255: 82-94.
- Mohammad nejhadi, M., Soltani, M., Sharifpour, A., Imanpour, M. 2012. To examine the sublethal effect of diazinon on enzymatic activity of blood serum of male brooders of *Caspian Kutum*. *Iranian Veterinary Journal*. 8(4): 94-101.
- Naz, S., Javed, M. 2013. Growth responses of fish during chronic exposure of metal mixture under laboratory conditions. *Pakistan Veterinary Journal*. 33(3): 354-357.
- Omeregic, E., Okpanachi, M.A. 1992. Growth of *Tilapia zilli* exposed to sublethal concentrations of crude extracts of *Azadirachta indica*. *Acta Hydrobiologia*. 34: 281-286.
- Panda, S., Kar, A. 2000. How safe is neem extract to thyroid function in male mice. *Pharmacological Research*. 41(4): 419-422.
- Paul, A.M., 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., Ordog, V. 1997. Effect of some pesticides commonly used in agriculture on aquatic food chain. Ph.D. thesis. Submitted to the academy of agricultural sciences Budapest- Hungary. pp. 1-31.
- Rahman, M.F., Siddiqui, M.K.J., 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, research and development, society of pesticide science. India, New Delhi Agricultural Research Institute. 283 p.
- Rao, J.V., Begum, G., Pallela, R., Usman, P.K., Rao, R.N. 2005. Changes in behavior and brain acetylcholinesterase activity in mosquito fish *Gambusia affinis* in relation to sublethal exposure of chlorpyrifos. *International Journal of Environmental Research. Public Health*. 2(3-4): 478-483.
- Rijijohan, K., Jayabalan, N. 1993. Sublethal effect of endosulfan on histology and protein pattern of *Cyprinus carpio* gill. *Journal of Applied Ichthyology*. 9: 49-56.
- Sharifpour, A., Soltani, M., Javadi, M. 2003. Determination of LC50 and tissue damages due to endosulfan poison in *Huso huso*. *Iranian Scientific Fisheries Journal*. 4: 69-84. (in Persian).
- Singh, N., 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. B. 3*: 913-948.
- Toledo, M.C.F., Jonsson, C.M. 1992. Bioaccumulation and elimination of endosulfat in zebra fish (*Brachydanyo rerio*). *Pesticide Science. 36*: 207-211.
- Winkaler, E.U., Santos, T.R.M., Joaquim, G., Machado-Neto, J.G., 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. C145*: 236-244.