



تعیین غلظت کشنده (LC₅₀ 96h) عصاره گیاه *Haplophyllum virgatum* روی ماهی گورخری معمولی (*Aphanius dispar*)

حمیدرضا رنجبر^۱، محمد اسدی^{۲*}، مرتضی یوسف‌زادی^۳، سعید نخل پیمای جهرمی^۴، ساجده مزارعی^۲، نسیمه درویشی^۲

^۱گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه‌سرا

^۲گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس

^۳گروه زیست دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس

^۴گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد، گنبد کاووس

چکیده

نوع مقاله:

پژوهشی

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۹۴/۱۱/۲۸

اصلاح: ۹۶/۰۳/۲۷

پذیرش: ۹۶/۰۴/۰۲

کلمات کلیدی:

آفانیوس گورخری

سمیت حاد

شیرابه گیاهی

گیاه سدابی

امروزه اهمیت استفاده از مواد طبیعی و جایگزینی آن‌ها با مواد شیمیایی پرخطر در آبی‌پروری به جهت تولید غذای سالم، کاملاً آشکار به نظر می‌رسد. این مطالعه با هدف، تعیین غلظت کشنده (LC₅₀) شیرابه گیاه سدابی (*Haplophyllum virgatum*) روی ماهی گورخری معمولی (*Aphanius dispar*) انجام شد. این آزمایش شامل ۵ تیمار و ۳ تکرار بر اساس روش استاندارد O.E.C.D و به صورت ساکن طی مدت زمان ۹۶ ساعت انجام شد. ۱۵۰ قطعه ماهی با میانگین وزنی ۰/۱۸±۰/۶۱ گرم پس از سازش‌پذیری در معرض غلظت‌های مختلف شیرابه گیاه سدابی (۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر) قرار گرفتند و تغییرات رفتاری در مدت آزمایش ثبت گردید. جهت تعیین غلظت کشندگی (LC₅₀) شیرابه گیاه سدابی از نرم‌افزار Minitab و روش آماری Probit analysis استفاده شد. نتایج نشان داد که غلظت کشنده گیاه سدابی طی مدت زمان ۹۶ ساعت برای ماهی گورخری معمولی، ۵۷/۹۹۶ میلی‌گرم در لیتر و حداکثر غلظت مجاز سمیت و حداقل غلظت مؤثر به ترتیب ۵/۷۹۹۶ و ۲۵/۲۶۹ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد.

مقدمه

یکی از مشکلات جامعه بشری امروز گسترش استفاده از سموم شیمیایی در کشاورزی و آبی‌پروری و اثرات جانبی بعدی آن بر اکوسیستم‌ها می‌باشد. به همین منظور در دهه اخیر، تمایل به استفاده از سموم طبیعی با منشأ گیاهی در صنعت آبی‌پروری ارگانیک، افزایش یافته است (Kumar et al., 2010). از دلایل این امر مزیت‌های متعدد مواد طبیعی از جمله آثار جانبی کمتر بر موجود زنده و محیط‌زیست، عدم ایجاد مقاومت دارویی، ارزان بودن، قابلیت تجزیه‌پذیری طبیعی و در دسترس بودن و از طرف دیگر معایب سموم شیمیایی از جمله وجود باقی‌مانده‌های مواد شیمیایی در بافت آبزیان و وجود اثرات سمی و سرطان‌زا بر روی اکوسیستم‌های زنده و انسان‌ها می‌باشد (Singh et al., 2004; Tiwari and Singh, 2004).

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: mohamad_asadi12@yahoo.com

گیاهان دارای ترکیبات مختلف آلکالوئیدها، ساپونین‌ها و سایر ترکیبات شیمیایی می‌باشند (Saad et al., 2006). آن‌ها توانایی منحصربه‌فردی در تولید متابولیت‌های متفاوت دارند. برخی از این متابولیت‌ها دارای خواص درمانی و بسیاری نیز سمی می‌باشند (Barthelson et al., 2006). در بسیاری از کشورها از سموم گیاهی در آبی‌پرووری به منظور ریشه‌کن کردن ماهیان هرز، کنترل کمیت جمعیت، کنترل بیماری‌ها و بهبود کیفیت آب برای گونه‌های در معرض خطر استفاده می‌شود (Tierney et al., 2013). ایران از تنوع بالایی در گونه‌های گیاهی برخوردار است که متأسفانه ارزیابی جامعی در این خصوص صورت نگرفته است. شناسایی گیاهان سمی اولین قدم در جایگزینی سموم شیمیایی با ترکیبات طبیعی قابل‌اعتماد می‌باشد.

جنس *Haplophyllum* دارای حدود ۷۰ گونه بوده که در سرتاسر مناطق گرم و معتدل اوراسیا و مناطق گرمسیری شرق آفریقا انتشار دارند (Townsend, 2000). در ایران از بین ۲۵ گونه این جنس، ۱۳ گونه آن بومی بوده، که این وضعیت موجب شده تا ایران به عنوان مرکز اصلی گونه‌زایی این جنس معرفی شود (Townsend, 2000). گونه‌های مختلف این جنس در مناطق بیابانی و کوهستانی انتشار یافته (Batooli and Bamoniri, 2013) و به طور معمول از گذشته‌های دور این گیاهان توسط جوامع موجود در این مناطق مورد استفاده دارویی قرار می‌گرفته است (Jansen et al., 2006). مطالعات صورت گرفته بر روی گونه‌های مختلف این جنس، وجود لیگنآن‌ها، کومارین‌ها، فلاونوئیدها و چند گروه از آلکالوئیدها شامل کوئینولین‌ها، فوروکوئینولین‌ها، دی‌هیدرو فوروکوئینولین‌ها، پیرانو کوئینولین‌ها و تترا هیدرو فوروکوئینولین‌ها را نشان داده است (Jansen et al., 2006). برخی از گزارش‌ها حاکی از وجود ترکیبات سمی نظیر γ -Fagarine، Haplopine، Skimmianine، Flindersine، Patavine، Haplamine و Justicidine در آلکالوئیدها و لیگنآن‌های این جنس می‌باشد (Jansen et al., 2006; Varamini et al., 2007). یکی از گونه‌های بومی ایران، گیاه سدابی با نام علمی *Haplophyllum virgatum* می‌باشد. این گونه متعلق به تیره سدابیان، علفی پایا، اسانس دار و دارای بویی نافذ می‌باشد (Karimi et al., 2013).

آزمایش‌های سم‌شناسی به منظور دستیابی به داده‌های آزمایشگاهی برای ارزیابی پتانسیل اثرات سموم در محیط به کار رفته و همچنین محدودسازی کاربرد مواد سمی ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین هدف از آزمایش‌های سنجش سمیت مواد، تهیه و تدوین استانداردهای لازم و قابل‌اعتماد برای حفاظت منابع آبریان می‌باشد (Pedersen, 1994).

با توجه به وجود ترکیبات سمی موجود در گونه‌های سدابی مطالعاتی برای تعیین دوز کشندگی این گیاهان در حشرات مختلف انجام شده است. از آن جمله Asadi و همکاران (۲۰۱۴) خاصیت حشره کشی اسانس گیاه سدابی جنوبی (*Haplophyllum tuberculatum*) روی حشرات کامل شپشه آرد (*Tribolium castaneum*) و شپشه برنج (*Sitophilus oryzae*) بررسی کرده و مناسب‌ترین دوز را برای این حشرات به ترتیب ۲۳/۱ و ۱۴/۹ میکرولیتر در لیتر به دست آوردند. همچنین Mohsen و همکاران (۱۹۸۹) اثر حشره کشی گیاه سدابی جنوبی روی حشره *Culex quinquefasciatus* مورد بررسی قرار دادند و بیان نمودند که خاصیت حشره کشی این گیاه در غلظت ۵۰ تا ۲۰۰۰ ppm روی لارو، شفیره و حشره بالغ مؤثر بوده است.

با این حال مطالعات محدودی در داخل کشور در زمینه سمیت حاد گیاهان در صنعت آبی‌پرووری انجام شده است که از آن جمله می‌توان به بررسی سمیت گیاه ماهور (*Verbascum Thapsus*) بر روی ماهی کفال (Khodadadi et al., 2012)، اثرات سمیت آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) در بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) (Rohani et al., 2011)، تعیین غلظت کشنده عصاره هیدرو الکلی سیر (*Allium sativum* L.) بر روی بچه تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) (Bazari Moghadam et al., 2015) و همچنین بررسی تأثیرات شیرابه فریبون ترکمنی (*Euphorbia turcomanica*) بر روی ماهی گورخری معمولی (*Aphanius dispar*) (Zare et al., 2014)، اشاره کرد.

ماهی گورخری معمولی (*Aphanius dispar*) (Rupell, 1828)، گونه‌ای یوری هالین از ماهیان خانواده کپور دندان ماهیان (Cyprinodontidae) می‌باشد که به طور وسیع در مناطق مختلف از آب شیرین تا آب شور زیست دارند (Esmaeili and Gholami, 2007). به طور کلی محدوده پراکنش این ماهیان از مناطق آمریکای شمالی و جنوبی، مدیترانه، آفریقا تا آسیای

غربی گزارش شده است. این ماهی یوری ترمال درجه معینی از آلودگی آلی، آلودگی غیر آلی و درجه نسبی پایین اکسیژن را تحمل می‌کند. پراکنش بالای این گونه در ایران سبب شده تا در بسیاری از مطالعات آزمایشگاهی به عنوان مدل آزمایشی مورد استفاده قرار گیرد.

از آنجا که تا کنون در مورد سمیت حاد گیاه سدابی بر روی ماهیان مطالعه‌ای صورت نگرفته، هدف مطالعه حاضر تعیین غلظت کشنده، تعیین حداکثر غلظت مجاز (MATC¹) و تعیین حداقل غلظت مؤثر (LOEC²) گیاه سدابی روی ماهی گورخری معمولی بود و به موازات این اقدام آثار رفتاری ماهی نیز مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

گیاه سدابی در فروردین ۱۳۹۰ از منطقه کوه گنو واقع در شمال غربی شهر بندرعباس با مختصات جغرافیایی (27°26'45 N , 56°18'12 E) و در ارتفاع ۳۲۹ متری تهیه گردید. گیاهان جمع‌آوری شده به صورت کامل در سایه و در دمای اتاق به مدت یک هفته خشک گردید. سپس گیاه خشک شده توسط آسیاب برقی به صورت پودر در آمد. به منظور تهیه شیرابه این گیاه، پودر تهیه شده از گیاه در آب ریخته شد و سپس این مخلوط به تیمارهای آزمایشی اضافه گردید.

جهت انجام مطالعات آزمایشگاهی از ۱۵۰ قطعه ماهی گورخری معمولی نر و ماده (میانگین وزنی ۰/۶۱±۰/۱۸ گرم و میانگین طولی ۳/۳±۰/۳۷ سانتی‌متر) صید شده از آبگیرهای دانشگاه هرمزگان، استفاده شد. ماهی‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه آبی‌پروری دانشگاه هرمزگان جهت رفع استرس و سازگاری با محیط جدید به مدت یک هفته در تانک‌های ۳۰۰ لیتری فایبرگلاس نگهداری شدند. در این مدت ضمن هوادهی مناسب، با غذای پلت تجاری (روزانه دو بار و به ازای ۰/۰۲ وزن بدن) مورد تغذیه قرار گرفتند. از آنجا که غلظت کشندگی گیاه سدابی بر روی ماهی گورخری معمولی معلوم نبود، آزمایش‌های اولیه به منظور تعیین محدوده کشندگی گیاه سدابی انجام شد. آزمایش نهایی سمیت حاد در ۵ تیمار (غلظت‌های ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و در ۳ تکرار در قالب طرح آزمایشی کاملاً تصادفی درون تانک‌های ۱۰ لیتری انجام گرفت. روش تحقیق براساس روش استاندارد سازمان همکاری و توسعه اقتصادی برنامه‌ریزی (O.E.C.D³) (OECD, 1992) و به صورت ساکن (Static) انجام شد. بر اساس استاندارد فوق، غذادهی به ماهیان ۲۴ ساعت قبل از شروع آزمایش و در طی انجام آن قطع گردید (ISO 7346-1:1996). تعداد ماهی‌ها در هر تانک ۱۰ عدد و در مجموع از ۱۵۰ قطعه ماهی استفاده شد. آب مورد استفاده در آزمایش ۲۴ ساعت قبل از شروع آزمایش هوادهی شده بود و عمل هوادهی در تمام مدت آزمایش به کمک پمپ و سنگ هوا ادامه داشت. در طول مدت آزمایش ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی آب به صورت روزانه اندازه‌گیری و ثبت می‌شد. بر این اساس میانگین دما ۲۵±۱ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول ۷/۲±۰/۳ میلی‌گرم در لیتر و میزان pH برابر با ۷/۹±۰/۰۴ بود. در طول مدت آزمایش حرکات و رفتار ماهی‌ها به طور مداوم مورد بررسی قرار گرفت و ماهیان تلف شده به محض مشاهده از محیط آکواریوم جمع‌آوری می‌شدند. بعد از کسب نتایج نهایی، داده‌ها در نرم‌افزار Excel ثبت و جهت آزمون‌های آماری از نرم‌افزارهای Minitab v. 17.1.0 و SPSS v. 16 استفاده شد. در نهایت، اطلاعات حاصله بر طبق روش آماری Probit analysis با سطح اطمینان ۹۵ درصد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

پس از انجام آزمایش‌های ابتدایی به منظور یافتن محدوده کشندگی، غلظت‌های ۵۰ تا ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر به عنوان محدوده کشندگی گیاه سدابی در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بر روی ماهی گورخری معمولی تعیین گردید. براساس نتایج حاصل، در تیمار کنترل هیچ‌گونه تلفاتی بعد از ۹۶ ساعت مشاهده نشد. تعداد مرگ و میر ماهی گورخری معمولی در

¹ Maximum Acceptable Toxicant Concentration

² Lowest Observable Effect Concentration

³ Organisation for Economic Co-operation and Development

غلظت‌های مختلف طی زمان‌های انتخاب شده در جدول ۱ نشان داده شده است. طبق نتایج به دست آمده، میزان مرگ و میر ماهی‌ها با افزایش غلظت شیرابه گیاه سدایی به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0.05$, $df=4$, $F=57/429$). بر اساس بررسی داده‌های مستخرج از آزمون آماری Probit analysis، غلظت کشنده (LC_{50}) گیاه سدایی طی ۹۶ ساعت برابر ۵۷/۹۹۶ میلی‌گرم در لیتر به دست آمد (جدول ۲). همچنین حداکثر غلظت مجاز یا غلظت غیر مؤثر و حداقل غلظت مؤثر این گیاه به ترتیب ۵/۷۹۹۶ و ۲۵/۲۶۹ میلی‌گرم بر لیتر تعیین گردید. در جدول ۳ مقادیر غلظت‌های کشنده مختلف تخمین زده شده و محدوده اطمینان آن‌ها مشخص گردیده است.

طبق مشاهدات، در ساعات ابتدایی ماهیانی که در معرض شیرابه گیاهی قرار داشتند، دارای حرکات غیرعادی نظیر شنای سریع، حرکات سریع سرپوش آبششی، تنفس از سطح آب و تجمع اطراف سنگ هوا بودند. کمی قبل از مرگ اختلال در سیستم مغز و اعصاب که از اساسی‌ترین اثر سموم است (Mohammadnezhad and Shahkar, 2010)، به صورت حرکات هیجانی شدید، پرش از آب و شنای چرخشی نمود یافت. در نهایت قبل از مرگ بی‌حال گشته و رو به پهلو بدون حرکت خاص قرار گرفته و فقط آبشش‌ها زنده داشتند. پرخونی و وجود موکوس در سطح بدن و آبشش و همچنین تغییر رنگ بدن از علائم ظاهری ماهیان در برابر سم شیرابه گیاهی بود.

جدول ۱. تعداد تلفات ماهی آفانیوس گورخری پس از معرض گذاری با شیرابه گیاه سدایی در طی ۹۶ ساعت

تعداد ماهیان تلف شده								غلظت (میلی‌گرم بر لیتر)
زمان (ساعت)								
۹۶	۷۲	۴۸	۲۴	۸	۴	۲	۱	
		۱	۲۲	۳	۴	۰	۰	۳۰۰
		۶	۱۴	۷	۳	۰	۰	۲۰۰
۲	۶	۵	۷	۳	۰	۰	۰	۱۰۰
۱	۵	۲	۱	۲	۳	۰	۰	۵۰
۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰ (شاهد)

جدول ۲. غلظت کشنده شیرابه گیاه سدایی در طی ۴ روز بر روی ماهی گورخری معمولی (میلی‌گرم بر لیتر)

مقدار LC	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
LC ₁₀	۴۶/۸۲۴	۴۱/۳۴۲	۲۷/۵۰۲	۲۵/۲۶۹
LC ₅₀	۱۱۳/۳۶۶	۸۳/۷۱۲	۶۲/۹۱۶	۵۷/۹۹۶
LC ₉₀	۲۷۴/۴۶۹	۱۶۹/۵۰۳	۱۴۳/۹۳۰	۱۳۳/۱۱۲

بحث

تا کنون آزمایش‌های متعددی در خصوص تعیین غلظت کشنده سموم و عناصر فلزی در انواع ماهیان صورت گرفته است، با این حال اطلاعات در خصوص سمیت شیرابه‌های گیاهی بر روی ماهی‌ها خصوصاً در ایران بسیار ناچیز است. مقادیر غلظت‌های کشنده هیچ‌گاه یک مقدار ثابت و مطلق نبوده‌اند؛ به این دلیل که فاکتورهای زیادی نظیر اختلافات فردی، جنسی، ژنتیکی،

⁴Lethal Concentration

جدول ۳. مقادیر LC برآورد شده و محدوده اطمینان شیرابه گیاه سدابی بر روی ماهی گورخری معمولی (میلی گرم بر لیتر)

محدوده اطمینان ۹۵٪		غلظت (mg/L)	غلظت‌های کشنده	زمان معرض‌گذاری
حد بالا	حد پایین			
۳۴/۵۰۹	۱۰/۸۹۵	۲۲/۷۷۲	LC ₁	۲۴ ساعت
۵۰/۱۹۱	۲۰/۹۹۷	۳۶/۴۴۳	LC ₅	
۶۱/۵۲۴	۲۹/۶۷۲	۴۶/۸۲۴	LC ₁₀	
۹۶/۱۲۳	۵۹/۶۸۵	۷۸/۹۴۹	LC ₃₀	
۱۳۶/۷۲۷	۹۲/۷۴۰	۱۱۳/۳۶۶	LC ₅₀	
۲۰۷/۵۰۳	۱۳۵/۰۵۹	۱۶۲/۷۸۶	LC ₇₀	
۴۱۱/۵۱۷	۲۱۴/۰۲۰	۲۷۴/۴۶۹	LC ₉₀	
۵۸۰/۰۶۳	۲۶۳/۰۱۶	۳۵۲/۶۵۹	LC ₉₅	
۳۳/۱۶۵	۱۲/۱۹۶	۲۳/۲۵۹	LC ₁	۴۸ ساعت
۴۴/۶۳۸	۲۰/۷۸۶	۳۳/۸۴۸	LC ₅	
۵۲/۴۷۶	۲۷/۵۲۵	۴۱/۳۴۲	LC ₁₀	
۷۴/۸۵۷	۴۸/۵۳۴	۶۲/۷۲۱	LC ₃₀	
۹۹/۰۳۰	۶۹/۴۹۷	۸۳/۷۱۱	LC ₅₀	
۱۳۷/۸۲۰	۹۴/۵۹۵	۱۱۱/۷۲۷	LC ₇₀	
۲۳۸/۵۲۹	۱۳۷/۴۷۷	۱۹۶/۵۰۳	LC ₉₀	
۳۱۴/۷۴۱	۱۶۲/۱۹۳	۲۰۷/۰۳۱	LC ₉₅	
۲۳/۳۲۷	۴/۷۵۷	۱۴/۰۰۷	LC ₁	۷۲ ساعت
۳۲/۴۳۶	۹/۵۰۰	۲۱/۷۵۱	LC ₅	
۳۸/۷۶۸	۱۳/۷۰۰	۲۷/۵۰۲	LC ₁₀	
۵۷/۰۰۱	۲۸/۹۷۸	۴۴/۸۴۳	LC ₃₀	
۷۶/۶۷۰	۴۷/۲۷۴	۶۲/۹۱۵	LC ₅₀	
۱۱۰/۲۹۸	۷۲/۱۰۵	۸۸/۲۷۱	LC ₇₀	
۲۱۶/۱۹۷	۱۱۴/۴۰۵	۱۴۳/۹۳۰	LC ₉₀	
۳۰۷/۹۳۴	۱۳۸/۴۴۵	۱۸۱/۹۸۴	LC ₉₅	
۲۲/۱۰۵	۳/۸۱۴	۱۲/۸۳۵	LC ₁	۹۶ ساعت
۳۰/۶۰۸	۷/۸۳۹	۱۹/۹۶۶	LC ₅	
۳۶/۴۹۵	۱۱/۴۷۹	۲۵/۲۶۸	LC ₁₀	
۵۳/۳۲۹	۲۵/۱۰۱	۴۱/۲۸۱	LC ₃₀	
۷۱/۲۶۵	۴۱/۹۹۶	۵۷/۹۹۶	LC ₅₀	
۱۰۱/۸۴۲	۶۵/۷۰۳	۸۱/۲۷۸	LC ₇₀	
۲۰۲/۱۴۴	۱۰۵/۷۷۱	۱۳۳/۱۱۲	LC ₉₀	
۲۹۱/۵۶۷	۱۲۸/۰۴۸	۱۶۸/۴۶۳	LC ₉₅	

عوامل محیطی، نحوه تجویز، فرمولاسیون سم، خصوصیات فیزیکوشیمیایی آب و سایر فاکتورهای دیگر در تعیین LC₅₀ مؤثر می‌باشند (Bazari Moghadam et al., 2015; Banaee et al., 2012). لذا به منظور جلوگیری از مسمومیت‌ها به هنگام استفاده از هر نوع ماده طبیعی، دارویی یا شیمیایی، ضروری است که آزمایش‌های زیست‌سنجی جهت تعیین سمیت، بررسی اثرات جانبی و دوز قابل استفاده آن در گونه مورد نظر صورت گیرد (Rohani et al., 2011). پژوهش حاضر به منظور

تعیین غلظت کشنده شیرابه گیاه سدابی در ماهی گورخری معمولی به مدت ۹۶ ساعت تحت شرایط آزمایشگاهی صورت گرفت.

همچنین حالات و رفتار ماهیان در برابر غلظت‌های مختلف در طول مدت آزمایش بررسی گردید. بعد از معرفی شیرابه گیاهی ترشح موکوس افزایش یافت که این امر یک واکنش دفاعی غیراختصاصی می‌باشد و یکی از راه‌هایی است که بدن ماهی را در برابر سموم محافظت می‌کند که نتایج مشابه قبلاً توسط Naji و همکاران (۲۰۱۲) بر روی تاس ماهی شیپ و Zare و همکاران (۲۰۱۴) بر روی ماهی گورخری معمولی نیز گزارش گردیده است. همچنین رفتارهای مشاهده شده در ماهیان گورخری معمولی طی انجام آزمایش‌های زیست‌سنجی، نظیر بی‌تابی شدید، شنای چرخشی، اختلال در سیستم تنفسی، وجود موکوس بر روی آبشش با علائم اشاره شده در تحقیق Zare و همکاران (۲۰۱۴) در مورد شیرابه فرفیون ترکمنی و mazarei و همکاران (۲۰۱۵) در مورد نانو ذرات نقره مشابهت دارد. در طول مدت آزمایش هیچ‌گونه تلفاتی در تیمار شاهد مشاهده نشد، بنابراین علت مرگ ماهیان را می‌توان عواملی نظیر تأثیر سم بر روی سیستم عصبی، کاهش نرخ تبادل گازی در آبشش‌ها توسط موکوس و تغییرات ساختاری اندام‌های داخلی ماهی نظیر آبشش، کبد و کلیه دانست که در این خصوص پیشنهاد می‌گردد فاکتورهای خونی و آسیب‌شناسی اندام‌های داخلی ماهی نیز مورد ارزیابی قرار گیرد.

بر اساس بررسی داده‌های مرگ و میر طبق روش آماری Probit analysis، غلظت کشنده گیاه سدابی بر روی ماهی گورخری معمولی طی ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت اندازه‌گیری شد (جدول ۲)، که بر این اساس LC_{50} 96h، ۵۷/۹۹۶ میلی‌گرم بر لیتر و حداکثر غلظت مجاز این گیاه یعنی حداکثر غلظت سمی که وجود آن در آب برای آبزیان مجاز در نظر گرفته می‌شود (معادل ۰/۱ غلظت کشندگی حاد ۹۶ ساعته) نیز ۵/۷۹۹۶ میلی‌گرم بر لیتر محاسبه شد (Di Giulio *et al.*, 2008). کمترین غلظت مؤثر گیاه سدابی روی ماهی گورخری معمولی معادل LC_{10} 96h (غلظتی از سم که در زمان ۹۶ ساعت ۱۰٪ از ماهیان را می‌کشد) می‌باشد. این سطح در واقع حداقل غلظتی از سم است که در مقایسه با نمونه شاهد اثر قابل توجهی بر مرگ و میر ماهی مورد آزمایش اعمال نماید (Di Giulio *et al.*, 2008). این غلظت برای گیاه سدابی بر ماهی گورخری معمولی معادل ۲۲/۱۰۵ میلی‌گرم بر لیتر تعیین گردید. همان‌طور که در جدول ۱ نشان داده شده است، تلفات ماهی‌ها با افزایش غلظت و افزایش زمان در معرض گذاری، بیشتر شد، به این صورت که با افزایش غلظت روند افزایشی در تلفات مشاهده گردید.

نتایج به دست آمده حاکی از آن است که مقدار غلظت کشنده (LC_{10} ، LC_{50} و LC_{90}) شیرابه گیاه سدابی در ۲۴ ساعت بیشتر از این میزان در ۹۶ ساعت است (جدول ۲). در مطالعات اخیر که توسط Zare و همکاران (۲۰۱۴) و Bazari Moghadam و همکاران (۲۰۱۵) انجام شد، روند نزولی LC_{10} ، LC_{50} و LC_{90} طی گذشت زمان مشاهده شد که با نتایج به دست آمده از این آزمایش کاملاً مطابقت دارد. این بدان معنی است که مقاومت ماهی‌ها در مدت زمان کوتاه بیشتر بوده و توانایی تحمل غلظت بالاتری از سم شیرابه گیاهی را دارا می‌باشند ولی با گذشت زمان مقاومت ماهی کاهش می‌یابد و سم فرصت بیشتری برای تأثیرگذاری روی ماهی دارد (Jadi *et al.*, 2014). علاوه بر این در مواردی تجمع سم در بافت‌های ماهی نیز باعث ایجاد غلظت‌های فزاینده‌ای می‌شود که خود به مرور زمان موجب پایین آمدن LC_{50} است (Sharifpour *et al.*, 2003). همچنین حدود اطمینان بالا و پایین موجود در جدول ۳ نشان‌دهنده این موضوع است که شیرابه گیاه سدابی در یک محدوده کم بر ماهی گورخری معمولی تأثیرگذار است.

در مجموع غلظت نیمه کشنده شیرابه گیاه سدابی برای ماهی گورخری معمولی برابر ۵۷/۹۹۶ میلی‌گرم بر لیتر تعیین گردید. با توجه به میزان LC_{50} 96h به دست آمده در این آزمایش و مقایسه آن با جدول طبقه‌بندی سمیت سموم بر روی ماهی، سم شیرابه گیاه سدابی برای ماهی آفانیوس گورخری جزء سموم با "سمیت متوسط" طبقه‌بندی شد (LC_{50} بین ۱۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر). نتایج حاصل از پژوهش حاضر بیان می‌کند که بین غلظت شیرابه گیاه سدابی و مرگ و میر ماهی‌ها رابطه مستقیم وجود دارد به گونه‌ای که با افزایش غلظت شیرابه، مرگ و میر نیز افزایش می‌یابد، در حالی که بین غلظت شیرابه گیاهی و زمان مرگ و میر ماهی‌ها رابطه عکس وجود دارد. با این حال با توجه به قدرت سازگاری و مقاومت

بالای این گونه در برابر عوامل محیطی توصیه می‌گردد سمیت شیرابه گیاه سدابی در دیگر گونه‌های ماهیان مورد مطالعه قرار گیرد.

منابع

- Asadi, R., Al-e-Hosseini, A. 2014. Fumigant toxicity of essential oil from *Haplophyllum tuberculatum* to *Tribolium castaneum* and *Sitophilus oryzae*. 3rd Integrated Pest Management Conference (IPMC). Shahid Bahonar University. Kerman. (in Persian)
- Banaee, m., Mirvaghefi, A. R., Sureda, A., Rafiee, G. R., Ahmadi, K. 2012. Blood Biochemical and Liver Histopathological Changes in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Following Exposure to Sub-Lethal Concentrations of Diazinon. Iranian Journal of Natural Resources. 65(3): 297-313. (in Persian)
- Barthelson, R.A., Sundareshan, P., Galbraith, D.W., Woosley, R.L. 2006. Development of a comprehensive detection method for medicinal and toxic plant species. American Journal of Botany. 93: 566-574.
- Batooli, H., Bamoniri, A. 2013. Comparison of the essential oil composition in leaves of three *Haplophyllum* A. Juss. Species from Kashan. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants. 28(4): 720-729. (in Persian)
- Bazari Moghadam, S., Sharif Rohani, M., Sharifpour, I., Pajand, Z., Jalilpour, J., Masoumzadeh, M. 2015. Determination of lethal concentration (LC96h) of hydroalcoholic extract of garlic (*Allium sativum* L.) and its effects on gill tissue of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) fingerlings. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants. 30(6): 915-922. (in Persian)
- Di Giulio, R.T., Hinton, D.E. 2008. The toxicology of fishes. Taylor and Francis Group. 1101 p.
- Esmaeili, H., Gholami, Z. 2007. Investigations on the surface ultrastructure of scale of Geno tooth-carp, *Aphanius ginaonis* (Holly, 1929) (Actinopterygii: Cyprinodontidae) using scanning electron microscope. Iranian Journal of Biology. 2: 307-314. (in Persian)
- Jadi, Y., Safahieh, A., Salighezadeh, R. 2014. Determination of toxicity and mean lethal concentration (96h LC50) of Paraquat on Binni (*Mesopotamichthys sharpeyi*). Aquatic Animals and Fisheries. 17(4): 21-31. (in Persian)
- Jansen, O., Akhmedjanova, V., Angenot, L., Balansard, G., Chariot, A., Ollivier, E., Tits, M., Frédéric, M. 2006. Screening of 14 alkaloids isolated from *Haplophyllum* A. Juss. for their cytotoxic properties. Journal of Ethnopharmacology. 105: 241-245.
- Karimi, F., Yousefzadi, M., Mirjalili, M., Rahmani, N., Zaeifi, M. 2013. Chemical composition of the essential oil of *Haplophyllum virgatum* var. *virgatum* from Iran. Chemistry of Natural Compounds. 49: 148-149.
- Khodadadi, M., Ghaedi, F., Rashidi, F. 2012. Determination of lethal concentration (LC50 96h) of Mahour plant (*Verbascum thapsus*) on Abu mullet (*Liza abu*) fingerling. Bachelor thesis. Fisheries department. Hormozgan University. 64 p. (in Persian)
- Kumar, A., Prasad, M., Mishra, D., Srivastav, S.K., Srivastav, A.K. 2010. Toxicity of aqueous extract of Euphorbia tirucalli latex on catfish, *Heteropneustes fossilis*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 73: 1671-1673.
- Mazarei, S., Sajjadi, M.M., Sourinejad, I., Johari, S.A., Asadi, M. 2015. Effect of lethal concentration of Nano Silver in *Aphanius dispar*. Journal of Aquatic Ecology. 4: 115-110. (in Persian)
- Mohammadnezhad, S. M., Shahkar, E. 2010. Determination the lethal concentration (LC50 96 H) of chloropyrifos and diazinon on (*Rutilus rutilus caspicus*). Journal of Fisheries. 3: 73-78. (in Persian)
- Mohsen, Z.H., Jaaffer, H.J., Al-Saadi, M., Ali, Z.S. 1989. Insecticidal effects of *H. Tuberculatum* against *Culex quinquefasciatus*. Pharmaceutical Biology. 27: 17-21.
- Naji, M., Abdali, S., Yazdani M. A., Yousefi Jourdehi, A. 2012. Determination of LC50 - 96h of Atrazine herbicide in farmed juvenile *Acipenser nudiventris*. The first national conference on environmental protection and planning. Islamic Azad University, Hamedan. (in Persian)

- OECD. 1992. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
- Pedersen, F. 1994. Ecotoxicological evaluation of industrial wastewater. Ministry of the Environment. 216 p.
- Rohani, M.S., Haghghi, M., Assaeian, H. 2011. The lethal concentration (LC50) of *Zataria multiflora* essential oil in fries of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Iranian Journal of Fisheries Sciences. 20: 89-96. (in Persian)
- Saad, B., Azaizeh, H., Abu-Hijleh G., Said, O. 2006. Safety of traditional Arab herbal medicine. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 3: 433-439.
- Sharifpour, I., Soltani, M., Javadi, M. 2003. Determination of LC50 and Histopathological Changes Due to endosulfan in Beluga (*Huso huso*) Juveniles. Scientific Fisheries Journal. 12(4): 69-84. (in Persian)
- Singh, S.K., Yadav, R.P., Singh, D., Singh, A. 2004. Toxic effect of two common *Euphorbiales latices* on the freshwater snail *Lymnaea acuminata*. Environmental Toxicology and Pharmacology. 15: 87-93.
- Tierney K.B., Farrell A.P., Brauner, C.J. 2013. Fish Physiology: Organic Chemical Toxicology of Fishes. Elsevier Science. 574 p.
- Tiwari, S., Singh, A. 2004. Piscicidal and anti-acetylcholinesterase activity of *Euphorbia royleana* stem bark extracts against freshwater common predatory fish *Channa punctatus*. Environmental Toxicology and Pharmacology. 18: 47-53.
- Townsend, C. 2000. Taxonomic revision of the genus *Haplophyllum* (Rutaceae). Kew Publishing. 336 p.
- Varamini, P., Doroudchi, M., Mohagheghzadeh, A., Soltani, M., Ghaderi, A. 2007. Cytotoxic Evaluation of Four *Haplophyllum*. Species with Various Tumor Cell Lines. Pharmaceutical Biology. 45: 299-302.
- Zare, H., Noori, A., Yousefzadi, M., Banaee, M. 2014. Effects of sub-lethal concentrations of *Euphorbia turcomanica* extract on some liver biochemical parameters of Zebra Aphanus (*Aphanius dispar*). Iranian Scientific Fisheries Journal. 23(4): 31-48. (in Persian)