



دانشگاه گنبد کاووس

نشریه "پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی"

دوره دوم، شماره دوم، تابستان ۹۳

<http://jair.gonbad.ac.ir>

بررسی آسیب‌شناسی بافت آبشش ماهی کاراس طلائی (*Carassius auratus* Linnaeus, 1758) قرار گرفته در معرض غلظت‌های تحت کشنده کلرید کادمیوم

سیدعلی اکبر هدایتی^{۱*}، محسن خلیلی^۲، حامد غفاری فارسانی^۳

^۱استادیار گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

^۲دانشجوی کارشناسی‌ارشد شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد، ایران

^۳باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

تاریخ ارسال: ۹۲/۱۰/۷؛ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱/۲۰

چکیده

کادمیوم یکی از فلزات سنگینی است که به طور طبیعی در نفت خام و مشتقات آن وجود دارد. برای انجام این تحقیق، از ۱۲۰ قطعه ماهی کاراس طلائی با میانگین وزنی ۱/۵ تا ۲/۵ گرم، در مرکز تکثیر و پرورش ماهی کاراس طلائی استان گلستان، مورد استفاده قرار گرفت. این آزمایش در ۵ تیمار و هر تیمار با ۳ تکرار در غلظت‌های مختلف کادمیوم (شاهد، ۲/۸ ppm، ۵/۶ ppm، ۸/۴ ppm و ۱۱/۲ ppm) که به صورت صفر (شاهد)، ۲۵٪، ۵۰٪، ۷۵٪ و ۱۰۰ درصد LC₅₀ کادمیوم انتخاب شده بود و مورد آزمایش قرار گرفت. در پایان روز هفتم از هر تکرار یک عدد ماهی نمونه‌برداری شده و لام برای بافت‌شناسی تهیه شد. نتایج بررسی بافت‌ها نشان‌دهنده وجود موکوس، چسبندگی لاملاهای ثانویه، تورم و جدا شدن لایه پوششی، گریزی شدن لاملاها، کوتاه شدن لاملاها، هایپرپلازی سلول کلرید، شکستگی لاملاها و نازک شدن لاملاها بود. نتیجه کلی این پژوهش نشان داد که بافت آبشش در معرض کادمیوم طی یک هفته با افزایش میزان سم و مدت در معرض قرارگیری، دچار ضایعه شده و بیشترین ضایعات در میزان بالای سم و در پایان یک هفته مشاهده شد. نتایج این تحقیق می‌تواند در ارزیابی اثرات هیستوپاتولوژیک محتمل حضور آلاینده‌های زیست محیطی از جمله فلزات سنگین در محیط زیست طبیعی با شرایط پرورشی ماهیان در آزمایشگاه مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: آلودگی، بافت‌شناسی، کادمیوم، کاراس طلائی، فلزات سنگین

*نویسنده مسئول: hedayati@gau.ac.ir

مقدمه

فلزات سنگین اجزای کمیاب طبیعی محیط‌های آبی هستند اما امروزه میزان آن‌ها به دلیل فعالیت‌های کشاورزی، صنعتی و استخراج معادن، افزایش یافته است. بعضی از فلزات سنگین مانند آرسنیک، کادمیوم و سرب، معمولاً برای فعالیت‌های زیستی مورد نیاز نیستند و در غلظت‌های پایین نیز سمی می‌باشند (Elsagh and Rabani, 2010). مطالعات نشان داده است که ماهی‌ها قادر به جمع‌آوری و ذخیره فلزات سنگین از محیط و انتقال آن‌ها به انسان، به دلیل قرار گرفتن در سطح بالای زنجیره غذایی، می‌باشند. فلزات می‌توانند توسط ماهی از آب، غذا، رسوب و مواد ذره‌ای معلق گرفته شود. پذیرش فلزات توسط ماهی‌ها در اکوسیستم‌های آبی آلوده متفاوت است و به احتیاجات اکولوژیکی، سوخت و ساز و عوامل دیگری از قبیل شوری، سطح آلودگی آب، غذا و رسوب بستگی دارد. میزان تأثیر فلزات سنگین بر انسان و آبریان بستگی به غلظت و نوع عنصر دارد (Ghaedi *et al.*, 2007). فلزات سنگین سرب و کادمیوم موجب کاهش رشد، تغییر رفتار، تغییرات ژنتیکی در آبریان می‌شود که این اثرات سبب زوال زیستی آنها می‌گردد.

در سال‌های اخیر منابع آبی مورد تهدید انواع آلودگی قرار گرفته‌اند که از آن جمله می‌توان به پساب‌های صنعتی، سموم کشاورزی و فلزات سنگین اشاره کرد. یکی از تهدیدات جدی اکوسیستم‌های آبی، آلودگی با مواد شیمیایی است. این در حالی است که توسعه صنعت کشاورزی برای پاسخگویی به نیازهای روز افزون غذا جهت تأمین نیازهای غذایی بشر باعث شده است که منابع آب‌های سطحی هر روزه با مواد شیمیایی جدیدی آلوده شوند (Kazemnejhad *et al.*, 2010).

کادمیوم به‌طور طبیعی در نفت خام و مشتقات آن نظیر مازوت، گازوییل و بنزین وجود دارد. کادمیوم که در آب‌های سطحی وجود دارد ممکن است به صورت محلول یا نامحلول باشد. اشکال محلول به صورت یون‌های ساده، ترکیبات آلی و غیر آلی با درجات مختلفی برای ماهی سمی هستند. وجود مقادیر کم فلزات سنگین برای مدت طولانی در آب باعث می‌شود که این فلزات وارد بدن جاندار شده و در بافت‌های مختلف موجود زنده تجمع پیدا کند (Ebrahimi, 2004).

در ارتباط با جانوران آبی، آبشش‌ها مهمترین راه نفوذ فلزات به داخل بدن بوده و به عنوان یک مخزن در تجمع فلزات سنگین عمل می‌کنند. علاوه بر این در شرایطی که غلظت فلزات سنگین در محیط آبی بالا باشد، آبشش‌ها اولین مکانی هستند که به‌طور مستقیم تحت تأثیر آلاینده‌ها آسیب می‌بینند. این مسئله در ماهی به خوبی نشان داده شده است. غلظت‌های تحت حد این عنصر در بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان منجر به کاهش رشد شده است. در بچه ماهی‌های قزل‌آلای سرگاو (Salvelinus confluentus) نیز کاهش رشد و مرگ و میر در غلظت‌های تحت حد گزارش شده است (Hansen *et al.*, 2002).

ماهی کاراس طلایی (*Carassius auratus auratus*) از خانواده کپور ماهیان (Cyprinidae) می‌باشد و به لحاظ شرایط زیستی و تغذیه‌ای شبیه کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) است. ماهی کاراس طلایی گونه‌ای می‌باشد که به‌صورت گسترده در مطالعات تولیدمثلی و کنترل هورمونی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Bjerselius et al., 1995). با توجه به سمیت بالای کادمیوم و و تأثیرات فلزات سنگین بر پیکره‌های آبی و ماهی‌ها، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات بافت آبشش در ماهی کاراس طلایی در غلظت‌های کشنده و تحت کشنده فلز کادمیوم صورت پذیرفت.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در زمستان ۱۳۹۱ در کارگاه ماهیان زینتی واقع در شهر گرگان، استان گلستان انجام گرفت. جهت انجام تحقیق تعداد ۱۲۰ عدد ماهی کاراس طلایی با میانگین وزنی 3 ± 0.5 گرم از مرکز تکثیر و پرورش ماهی کاراس طلایی واقع در استان گیلان تهیه گردید و برای انجام آزمایش به کارگاه ماهیان زینتی وارد شده و به مدت دو هفته برای سازگار شدن با شرایط محیط در درون مخازن فایبرگلاس قرار گرفته و با غذای انرژی ۳۰۰۱ مورد تغذیه قرار گرفتند.

ابتدا آکواریوم‌ها به مقدار ۲۰ لیتر آبگیری شدند که آب مخازن به مدت ۴۸ ساعت با اکسیژن اشباع هوادهی شدند تا کلر آب از بین برود. ۲۴ ساعت قبل از انتقال ماهی‌ها به درون آکواریوم‌ها به ماهی‌ها غذا داده نشد. آزمایش به مدت ۱ هفته در ۵ تیمار و با ۳ تکرار (شاهد، $2/8$ میلی‌گرم بر لیتر، $5/6$ میلی‌گرم بر لیتر، $8/4$ میلی‌گرم بر لیتر و $11/2$ میلی‌گرم بر لیتر) کادمیوم که به صورت صفر (شاهد)، ۲۵ درصد، ۵۰ درصد، ۷۵ درصد و ۱۰۰ درصد LC_{50} کادمیوم (که LC_{50} همین ماهیان به وسیله پژوهش‌های نویسندگان (منتشر نشده) بدست آمده بود) انتخاب شد و مورد آزمایش قرار گرفت. در طی دوره میزان دما، pH و اکسیژن اندازه‌گیری شد. میزان دما 22 ± 1 درجه سانتی‌گراد، مقدار $pH=7/5-8$ و مقدار اکسیژن محلول همواره بیش از ۵ میلی‌گرم بر لیتر بود.

برای بررسی آسیب‌شناسی بافت آبشش ماهی کاراس طلایی در پایان روز هفتم از هر تکرار یک عدد ماهی به طور تصادفی انتخاب شد. نمونه‌برداری از کمان دوم آبشش سمت چپ ماهی کاراس طلایی صورت گرفت و نمونه‌ها در فرمالین ۱۰ درصد تثبیت گردید. سپس به منظور رنگ‌آمیزی به روش هماتوکسیلین-ائوزین، بافت آبشش جهت آبگیری در الکل قرار گرفت. پس از آبگیری، نمونه‌ها جهت شفاف‌سازی و الکل‌گیری، در محلول گزلیل قرار داده شدند. نمونه‌ها در پارافین مذاب قرار گرفتند و پس از اتمام این مرحله، قالب‌گیری در پارافین صورت گرفت. تهیه اسلاید و برش به وسیله میکروتوم ۵ میکرون صورت گرفت و در نهایت لام‌های تهیه شده به روش هماتوکسیلین-ائوزین رنگ‌آمیزی گردید و با استفاده از چسب بالزام سطح نمونه‌ها پوشیده شد (Gaber, 2007). پس از ثبت مشاهدات لام‌های

آماده شده به وسیله میکروسکوپ نوری نیکون با بزرگنمایی $\times 40$ و $\times 100$ و $\times 400$ مورد بررسی قرار گرفتند، در نهایت داده‌ها به صورت توصیفی ارائه شدند.

نتایج

آسیب‌هایی در بافت میکروسکوپی آبشش ماهی کاراس طلائی مشاهده شد. از این آسیب‌ها می‌توان به وجود موکوس، چسبندگی لاملای ثانویه، برآمدن بافت پوششی، گریزی شدن و کوتاه شدن لاملاها، افزایش سلول‌های کلرایدی، شکستگی و نازک شدن لاملاها اشاره کرد.

در تیمار $2/8$ میلی‌گرم بر لیتر و $5/6$ میلی‌گرم بر لیتر بعد از تزریق سم به آب هیچ گونه رفتار قابل توجهی از ماهیان دیده نشد و به صورت نرمال شنا می‌کردند. اما در تیمار $8/4$ میلی‌گرم بر لیتر و $11/2$ میلی‌گرم بر لیتر رفتارهایی از قبیل سرعت بالا، شنای بی هدف مشاهده شد که بعد از چند ساعت این رفتارها به حالت نرمال خود بازگشت.

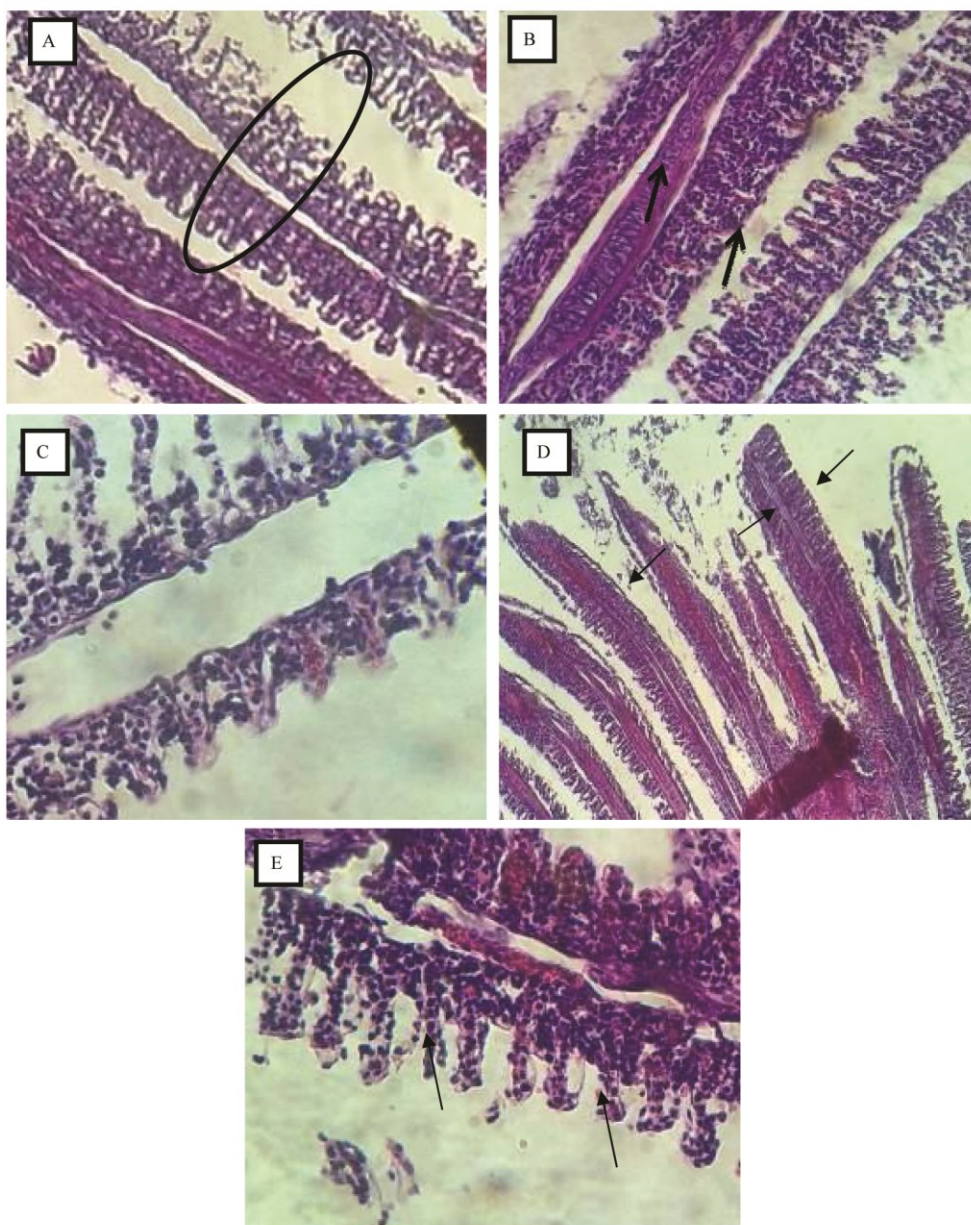
در بررسی‌های بافت شناسی انجام شده مشاهده شد که با افزایش میزان غلظت کادمیوم در آب میزان آسیب‌های وارده به آبشش ماهی کاراس طلائی نیز افزایش یافته است (جدول ۱). در تیمار $5/6$ میلی‌گرم بر لیتر و $8/4$ میلی‌گرم بر لیتر کادمیوم میزان آسیب‌ها با هم تقریباً برابر بودند.

آسیب کوتاه شدن لاملاها در تیمار $5/6$ میلی‌گرم بر لیتر بیشتر از تیمار $8/4$ میلی‌گرم بر لیتر و تیمار $11/2$ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد. عارضه شکستگی لاملاها در تیمار $5/6$ میلی‌گرم بر لیتر و $8/4$ میلی‌گرم بر لیتر بیشتر از کمترین غلظت کادمیوم ($2/8$ میلی‌گرم بر لیتر) و بیشترین غلظت کادمیوم ($11/2$ میلی‌گرم بر لیتر) دیده شد. وجود آسیب برآمدن بافت پوششی و هایپرپلازی سلول‌های کلراید در هر چهار تیماری که در معرض کادمیوم قرار داشتن در سطح بالایی دیده شد.

جدول ۱- عوارض دیده شده در آبشش ماهی کاراس طلائی قرار گرفته در معرض غلظت‌های مختلف فلز سنگین کادمیوم

آسیب	غلظت تحت کشنده کادمیوم (میلی‌گرم بر لیتر)			
	$11/2$	$8/4$	$5/6$	$2/8$
موکوس	+++	++	++	+
چسبندگی لاملای ثانویه	+++	++	++	+
گریزی شدن	++	+	+	-
برآمدن بافت پوششی	+++	++	++	++
هایپرپلازی سلول‌های کلراید	+++	+++	++	++
کوتاه شدن لاملاها	+	+	++	+
شکستگی لاملاها	+	++	++	+

عدم مشاهده عارضه (-)، خفیف ۱ تا ۳ عدد در تیمار (+)، متوسط ۳ تا ۶ عدد در تیمار (++)، شدید بالای ۶ عدد در تیمار (+++).



شکل ۱- (A) بهم چسبیدگی تیغه‌های ثانویه ($\times 100$)، (B) افزایش سلول‌های کلرایدی (\rightarrow) ($\times 400$) کوتاه شدگی تیغه‌ها ($\times 400$)، (D) بهم چسبیدگی تیغه‌های ثانویه شدید ($\times 400$)، (E) epithelial lifting ($\times 400$)

بحث و نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج به‌دست آمده نوع و میزان آسیب وارد شده در تیمارهای مختلف متفاوت است. افزایش چشمی ترشح موکوس نسبت به گروه شاهد در همه تیمارهای آزمایشی مشاهده شد و با افزایش غلظت کادمیوم شدت یافت. در غلظت ۲/۸ ppm مقدار افزایش ترشح موکوس کم، در غلظت‌های ۵/۶ ppm و ۸/۴ ppm متوسط و در غلظت ۱۱/۲ ppm شدید بود. ترشح موکوس یکی از راهکارهای دفاعی گونه‌های مختلف ماهیان در برابر آلودگی‌های محیطی و از جمله آلودگی‌های فلزات سنگین است.

آبشش‌ها حساس‌ترین اندام بدن در برابر فلزات سنگین هستند. در مواجهه کوتاه مدت بیشترین تجمع فلزات سنگین در بافت آبشش و کمترین تجمع این فلزات در بافت‌های عضلانی است ولی در مواجهه‌های طولانی مدت، عمدتاً کبد بیشترین تجمع فلزات سنگین را نشان می‌دهد. دلیل این امر را می‌توان به خاطر فعالیت متابولیکی بیشتر آبشش‌ها نسبت به بافت‌های عضلانی دانست (Beheshti *et al.*, 2010). این دستاورد با نتایج محمد زاده و همکاران (Mohamad Zadeh *et al.*, 2011)، که اثرات فلز سنگین سرب را بر بافت‌های کبدی و آبششی ماهی کلمه (*Rutilus rutilus caspius*) بررسی کرده بودند همخوانی داشت. افزایش ترشح موکوس به علت وجود فلزات سنگین در کپور معمولی و در تیمارهای حاوی روی و برخی سموم در آب، توسط شاهسونی و همکاران (Shahsavani *et al.*, 2007)، گزارش شده است. در تیمارهای حاوی فنی‌توئیدین سدیم در ماهی حوض (*Carassius auratus*) نیز گزارش شده که ترشح موکوس، یکی از اولین واکنش‌های ماهی به حضور فلزات سنگین یا سایر آلودگی‌ها در محیط آبی است (Shahsavani *et al.*, 2007).

بهم چسبیدگی تیغه‌های ثانویه در تمامی تیمارهای آزمایشی مشاهده شد و با افزایش غلظت کادمیوم شدت یافت. در تیمار ۲/۸ ppm تیغه‌های کمتری بهم چسبیده بودند. با توجه به سمیت کمتر کادمیوم نسبت به برخی فلزات سنگین مانند سرب، به هم چسبیدگی تیغه‌های ثانویه آبششی در غلظت‌های بالاتری از سایر فلزات رخ داد. این موضوع براساس مقایسه با نتایج گابر (Gaber, 2007)، برای فلزات سنگین مس، روی، سرب و کادمیوم در تیلاپپای نیل قابل توجه است. همچنین براساس همین مقایسه بنظر می‌رسد کادمیوم نسبت به برخی از فلزات سنگین مانند روی و مس (که در غلظت‌های پایین برای متابولیسم حیاتی‌اند) سمی‌تر است و در غلظت‌های پایین‌تر اثرات کشندگی دارد. همچنین به هم چسبیدگی تیغه‌های ثانویه در ماهی *Lates calcarifer* در تیمارهای حاوی نیکل؛ جیوه یا هر دو با هم، مشاهده شده است (Senthamilselvan *et al.*, 2011).

گرمی شدن آبشش‌ها در تیمار ۱۱/۲ ppm نسبت به تیمارهای ۲/۸ ppm، ۵/۶ ppm و ۸/۴ ppm شدیدتر بود. گرمی شدن آبشش‌ها با سرعت و شدت کمتری نسبت به افزایش موکوس و بهم چسبیدگی

تیغه‌های ثانویه گسترش می‌یابد و احتمالاً نسبت به دو تغییر فوق با تأخیر بیشتری ظاهر خواهد شد. به نظر می‌رسد که این عارضه نسبت به کوتاه شدن و شکستن تیغه‌ها مؤثرتر باشد (Filazi *et al.*, 2003). برآمدن بافت پوششی در تمام تیمارهای آزمایشی مشاهده شد. میزان این برآمدگی در سه تیمار ۲/۸ ppm، ۵/۶ ppm و ۸/۴ ppm متوسط اما در تیمار ۱۱/۲ ppm شدید بود. بنابراین می‌توان این عارضه را از تغییراتی دانست که در برخورد با غلظت‌های تحت کشندگی فلزات سنگین به سرعت در ماهی ایجاد می‌شود. شایان ذکر است که عارضه‌ی فوق در اثر وجود بعضی از سموم در آب (حشره‌کش‌هایی مانند گلی فسفات یا مواد شیمیایی مانند لامبدا- سیالوتترین و فنی توتیدین سدیم) نیز به وجود می‌آید (Olurin *et al.*, 2006).

افزایش سلول‌های کلریدی در تمام تیمارهای آزمایشی مشاهده شد و با افزایش غلظت کادمیوم شدت یافت. شدت این افزایش در تیمارهای ۲/۸ ppm و ۵/۶ ppm متوسط و در تیمارهای ۸/۴ ppm و ۱۱/۲ ppm زیاد بود. بنابراین افزایش سلول‌های کلریدی می‌تواند شاخص بیولوژی وجود فلزات سنگین در آب باشد. اما از آنجا که در برخی گونه‌ها این سلول‌ها در روند طبیعی چرخه زندگی (مثلاً در آزادماهیان هنگام مهاجرت از رودخانه به دریا) افزایش می‌یابند، بنابراین بهتر است که از شاخص افزایش سلول‌های کلریدی با احتیاط بیشتر و در کنار سایر شاخص‌ها استفاده کرد.

در پایان با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان بیان نمود که کادمیوم در دو سطح استرس حاد دارای اثرات متعدد بافتی بر آبشش ماهی کاراس طلایی بوده و در کوتاه مدت به شدت سمی می‌باشد و می‌توان از این شاخص‌ها به عنوان بیومارکرهای ردیابی اثرات کادمیوم بر سلامت ماهی و در نهایت اکوسیستم استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

در پایان از همه کسانی که در این پژوهش ما را یاری نموده‌اند به ویژه کارکنان محترم آزمایشگاه بیمارستان آموزشی درمانی کودکان طالقانی گرگان مخصوصاً جناب آقای میربازل، سرکار خانم عامریان و خانم هروی سپاسگزاری و قدردانی می‌شود.

منابع

Beheshti M., Askari Sari I., Khodadadi M., Velaiaat-Zadeh M. 2010. Measured concentrations of heavy metals (Cu, Fe, Zn, Mn) in different organs of *Liza abu* in the Dez River, Khuzestan Province. Journal of wetlands, Islamic Azad University, Ahvaz, 6: 79-71. (In Persian).

- Bjerselius R., Olsen K.H., Zheng W. 1995. Endocrine, gonadal and behavioral responses of male Crucian carp (*Carassius carassius*) to the hormonal pheromone 17, 20-dihydroxy-4-pregnen-3-one. *Chem. Senses*, 20: 221-230.
- Ebrahimi M. 2004. Some of the changes resulting from the toxic effects of copper on sperm morphology of carp and rainbow trout using scanning electron microscopy (SEM). *Journal of Fisheries*, 2:1-10.
- Elsagh A., Rabani M. 2010. Determination of heavy metals like Ni, Cr, Mn and Co in salt that getting from infiltration with water washing method and comparing with impure salt. The National Chemistry Conference, Islamic Azad University, Shahreza Branch, 373 PP.
- Filazi A., Baskaya R., Kum C., Hismiogullari S.A. 2003. Metal concentrations in tissues of the Black Sea fish *Mugil auratus* from Sinop-Icliman, Turkey. *Human and Experimental Toxicology*, 22: 85-7.
- Gaber H.S. 2007. Impact of certain heavy metals on the gill and liver of the Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Egypt Journal Aquaculture Biology*, 11: 79-100.
- Ghaedi M., Ahmadi F., Soylak., M. 2007. Simultaneous preconcentration of copper, nickel, cobalt and lead ions prior to their flame atomic absorption spectrometric determination. *Annali di Chimica*, 97: 277-285.
- Hansen J.A., Welsh P.G., Lipton J., Cacula D., Dailey A.D. 2002. Relative sensitivity of bull trout (*Salvelinus confluentus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to acute exposures of cadmium and zinc. *Environmental toxicology and chemistry*, 21(1): 67-75.
- Kazemnejhad F., Safaee H., Pasha M.B., Kazemnejhad A. 2010. Sources of river pollution Sardabrood. *Science and Technology, Natural Resources*, 2: 101-110.
- Mohamadzadeh P., Jamil Sh., Mashynchyan A., Matinfar A., Rostami M. 2011. Effects of metal lead on the liver and gill tissues Roach (*Rutilus rutilus caspius*). *Journal of Environmental Zoology*, 1: 7-14.
- Olurin K.B., Olojo E.A.A., Mbaka G.O., Akindele A.T. 2006. Histopathological responses of the gill and liver tissue of *Clarias gariepinus* fingerlings to the herbicide, glyphosate. *African Journal of Biotechnology*, 5: 2480-2487.
- Senthamilselvan D., Chezhan A., Kabilan N., Sureshkumar T. 2011. Synergistic impact of heavy metals (Ni and Hg) and histopathological alterations in the organ (gill) of the fish, *Lates calcarifer* (Bloch, 1790). *European Journal of Experimental Biology*, 1: 198-205.
- Shahsavani D., Farhodi M., Movassaghi A.R., Kiekha F. 2007. Clinical and pathological study of effects of phenytoin sodium in gill, liver and kidney of gold fish (*Carassius auratus*). *Pajouhesh and Sazandegi*, 74: 150-155. (In Persian).