



بررسی اثرات آسیب‌شناسی بافتی سمیت‌حاد سولفات روی و مس در گونه فیل‌ماهی دریای خزر

محمد فرهنگي*, حجت‌اله جعفریان، ضیاء کردجری، بهروز محمدزاده، حسنی قلی‌پورکنعانی

گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران

چکیده

در تحقیق حاضر اثرات بافت‌شناسی مواجهه حاد با سولفات مس و روی در ۲۵۰ بچه فیل‌ماهی دریای خزر مورد مطالعه قرار گرفت. براساس آزمون محدوده کشندگی، ماهیان در تیمارهایی با غلظت ۰/۸، ۰/۷، ۰/۶، ۰/۴، ۰/۲ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر در معرض سولفات مس و غلظت‌های ۰/۸۵، ۰/۸۰، ۰/۷۵، ۰/۵۰ و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر در معرض سولفات روی به مدت ۴ روز قرار گرفتند. در طول آزمایش، علایم رفتاری و کلینیکی ماهیان ثبت گردید. به منظور بررسی‌های آسیب‌شناسی، از بافت‌های کلیه، کبد و آبشش ماهیان در حال مرگ و تازه تلف شده نمونه برداری صورت گرفت. براساس نتایج حاضر، میزان غلظت نیمه‌کشنده برای سولفات مس و روی به ترتیب بعد از گذشت ۹۶ ساعت برابر ۰/۵۲ و ۵۴/۲۱ میلی‌گرم در لیتر به دست آمد. در این بررسی، در بافت‌های کلیه، کبد و آبشش تمام ماهیان علایم آسیب‌بافتی خفیف همچون پرخونی و نفوذ سلول‌های آماسی (غلظت تحت کشنده) تا شدید شامل خون‌ریزی و نکروز (غلظت کشنده) مشاهده گردید. شدت آسیب‌های بافتی مشاهده شده در تمام بافت‌ها با افزایش غلظت و زمان در معرض قرارگیری سولفات مس و روی افزایش یافت. براساس نتایج حاضر، میزان سمیت مس نسبت به روی بالاتر و ضایعات بوجود آمده شدیدتر بود.

واژه‌های کلیدی:

آسیب‌شناسی، سمیت‌حاد، سولفات مس، سولفات روی، فیل‌ماهی دریای خزر

نوع مقاله:

پژوهشی اصیل

<https://doi.org/10.22034/jair.10.3.2>

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۰۰/۰۸/۲۸

پذیرش: ۰۰/۱۲/۰۱

نویسنده مسئول مکاتبه:

محمد فرهنگي، گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران.

ایمیل: s.fathangi@yahoo.com

۱ | مقدمه

فیل‌ماهی یا بلوگا (*Huso huso*) از راسته تاس‌ماهیان، از بزرگ‌ترین ماهیان استخوانی و بزرگ‌ترین ماهی دریای خزر است که به علت از بین رفتن زیستگاه و تغییرات اکولوژیک محیط‌زیست و همچنین صید بی‌رویه و آلودگی‌های شیمیایی تنها محدود به دریای خزر، آذوف، اورال و دریای سیاه شده‌اند (Pourkazemi, 2006) و هم‌اکنون در فهرست گونه‌های به شدت در معرض خطر انقراض قرار دارد (Carmona et al., 2009). سمیت فلزی یا مسمومیت فلزی، به اثر سمی برخی فلزات بر موجودات زنده گفته می‌شود. بعضی از فلزات وقتی ترکیب محلول تشکیل می‌دهند، سمی می‌شوند. برخی فلزات دیگر هیچ نقش بیولوژیکی ندارند و جزء مواد معدنی ضروری نیستند، یا در شکل خاصی سمی هستند (Kosnett, 2010).

عناصر روی (Zinc) و مس (Copper) به عنوان ریزمغذی در تغذیه ماهیان نقش به سزایی دارند، با این حال افزایش بیش از حد نیاز زیستی برای آبزیان سمی است. سطح طبیعی عنصر روی و مس در ماهیان آب شیرین و آب شور به منظور پاسخگویی به نیاز رشد آبی ناکافی گزارش شده است، لذا این عناصر به عنوان ریزمغذی ضروری در تغذیه ماهیان بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. آنچه مسلم است دریای خزر تحت تأثیر استفاده روزافزون صنایع موجود در استان‌های حاشیه خزر و ورود فاضلاب‌های حامل این مواد قرار گرفته و متأسفانه آلودگی ناشی از آنها باعث نگرانی‌های روزافزون شده است. لذا امروزه بیومارکرها به-

عنوان جدیدترین روش‌های بررسی آلاینده‌ها، با بررسی اثرات ثانویه آلودگی بر محیط به پایش وضعیت سلامت آبزیان منطقه و کل اکوسیستم می‌پردازند. تاکنون مطالعات گوناگونی در خصوص سمیت‌های مس و روی در گونه‌های مختلف صورت گرفته است (Moreno et al., 2019; Farhangi and Jafaryan, 2020; Calfee et al., 2014)، لکن مطالعه بر روی گونه فیل‌ماهی بسیار محدود می‌باشد، ضمن آنکه تاکنون گزارشی بر سمیت این دو فلز و اثرات آسیب‌شناسی آنها در فیل‌ماهی دریای خزر دیده نشده است (Bagherzadeh Lakani et al., 2016; Moeinnejad et al., 2019; Farhangi et al., 2013; Khodabakhsh et al., 2013; Khoshbavar-Rostami, 2015; Mohammadnezhad et al., 2016; Khoshbavar-Rostami and Yelghi, 2020).

آنچه مسلم است، باتوجه به اهمیت دریای خزر به عنوان مأمن اصلی زیست تاس‌ماهیان و همچنین در بین گونه‌های با ارزش تاس‌ماهیان، فیل‌ماهی به عنوان یک گونه ارزشمند اقتصادی و در معرض خطر انقراض و به عنوان یک گونه معرفی شده جهت تولید و پرورش در مزارع، و از طرف دیگر نقش تعیین کننده بافت‌های آبشش، کلیه و کبد در بررسی‌های اکوتوکسیکولوژی، سبب شد تا مطالعه فوق به بررسی میزان سمیت‌حاد سولفات مس و روی و ضایعات ناشی از آنها به بافت‌های آبشش، کبد و کلیه فیل‌ماهی دریای خزر بپردازد.

۲ | مواد و روش‌ها

جهت انجام آزمایش از فیل ماهیان پرورش یافته در یکی از کارگاه‌های پرورش ماهیان خاویاری استان مازندران (شهرستان ساری، شرکت آبی‌گستران ساعی) با میانگین وزنی $38/2 \pm 3/1$ گرم استفاده شد. ۳۰۰ قطعه بچه فیل ماهی بعد از انتقال به آزمایشگاه تکثیر و پرورش دانشگاه گنبد کاووس به منظور سازگاری با محیط، به مدت یک هفته در ونیروهای پرورشی با گنجایش ۲۰۰ لیتر آب نگهداری شدند. ماهیان به مدت یک هفته به منظور صحت سلامت کامل تغذیه شدند.

برای انجام آزمایش، ماهیان در گروه‌های ۱۳ عددی در مخازن ونیرو با گنجایش ۵۰ لیتر آب جایابی شدند (حداقل ۱ گرم بر لیتر بر اساس (TRC, 1984)). پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب در طول دوره آزمایش ثابت بود. فاکتورهایی چون اکسیژن محلول، پی‌اچ و دمای آب توسط دستگاه مولتی پارامتر مدل هک ساخت کشور آلمان (Hack, 2000) اندازه‌گیری شد. به منظور تأمین اکسیژن لازم از سنگ- هوا به عنوان هواده در تشت‌های آزمایشی استفاده شد. میزان اکسیژن- محلول در هر اشباع نگه داشته شد. اکسیژن تولیدی توسط هر سنگ هوا در ۲۴ ساعت معادل ۲/۴ میلی گرم در لیتر بود. ماهیان ۲۴ ساعت قبل از آزمایش قطع غذاهای شدند و در طول مدت آزمایش تغذیه صورت نگرفت.

آزمایش‌ها با استفاده از روش آب‌ساکن و بر اساس دستورالعمل استاندارد O.E.C.D صورت گرفت (TRC, 1984). مدت زمان آزمایش برای هر گروه ۹۶ ساعت بود. در این مدت درصد تلفات و علائم مسمومیت ثبت گردید. برای پیدا کردن محدوده کشندگی سولفات روی و مس (Range Finding Test)، پس از یکسری مطالعات مقدماتی در خصوص اثرات سمیت‌حاد مس و روی بر روی ماهیان خاویاری (Farhangi et al., 2013; Moeinnejad et al., 2020; Gündoğdu, 2008) ابتدا غلظت‌های فرضی برای سولفات روی (۱۵۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۰ میلی گرم در لیتر) و سولفات مس (۳، ۱، ۰/۵، ۰/۰۵، ۰ میلی گرم در لیتر) جهت برآورد میزان تلفات ماهی و شدت اثرپذیری ماهی در غلظت‌های نزدیک به آزمایش تعیین شد. در نهایت با احتساب صددرصدی تلفات ماهی در غلظت ۱۰۰ و ۱ میلی گرم در لیتر به ترتیب برای روی و مس در مدت ۲۴ ساعت غلظت‌های مختلف ۸۵، ۸۰، ۷۵، ۵۰، ۲۵، ۵ میلی گرم در لیتر فلز روی و غلظت‌های مختلف ۰/۸، ۰/۷، ۰/۶، ۰/۴، ۰/۲، ۰/۱ میلی گرم برای فلز مس استفاده شد. آزمایش موردنظر به صورت جداگانه برای فلزات روی و مس هر کدام با ۶ تیمار به شکل سمیت‌حاد انجام گرفت. یک تیمار با غلظت صفر که بدون حضور مس و روی بود به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. به منظور تأمین سمیت فلزات مس و روی در آب، از نمک سولفات روی‌آبدار ($ZnSO_4 \cdot 5H_2O$) و سولفات مس‌آبدار ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) ساخت آلمان (Merc) استفاده شد. حجم آب در طول آزمایش ثابت بود. در ادامه، پس از تعیین حجم آب و به‌ازای واحد حجمی، سولفات روی و مس توزین و به آب به شکل محول اضافه گردید. برای حل کردن سولفات روی و مس در آب تشت، ابتدا آن‌را در بشر حل و سپس محلول حاصله به تشت آزمایش اضافه گردید، تا محلول یکنواختی به دست آید. قبل از آب‌گیری، ظروف

آزمایشی به وسیله آب نمک غلیظ ۷۰٪ کاملاً شسته شدند تا محیط عاری از هر گونه آلودگی و بیماری برای ماهیان فراهم گردد (Jamshidi et al., 2013). در پایان آزمایش غلظت‌های بی‌اثر NOEC (Lowest Observed Effect Concentration)، کم‌اثر LOEC (Maximum Allowable Toxicant) و حداکثر غلظت مجاز MATC (Sadeghi and Imanpour, 2015) تعیین شد.

پس از افزودن فلزات روی و مس به تشت‌های آزمایشی، نشانه‌های رفتاری ماهی در برابر سمیت و آسیب‌های قابل مشاهده با چشم در طول آزمایش ثبت گردید. به منظور بررسی آسیب‌های ناشی از سمیت فلزات روی و مس بر بافت‌های ماهی، هر ۱۲ ساعت یک بار ماهیان مرده بلافاصله جمع‌آوری و در ظروف حاوی فرمالین ۱۰ درصد تا پایان آزمایش نگهداری شدند (Ettah et al., 2017; Mazandarani et al., 2015). در پایان ۹۶ ساعت، تمام ماهیان مورد آزمایش (زنده - مرده) که در معرض غلظت‌های مختلف سولفات روی و مس قرار داشتند، جمع‌آوری و در محلول فرمالین تثبیت شدند (Ettah et al., 2017). از نمونه‌های بافت آبشش، کلیه و کبد فیکس شده در محلول فرمالین ۱۰ درصد، پس از طی مراحل آب‌گیری، شفاف کردن و پارافینه کردن، با استفاده از میکروتوم دوار مقاطع ۵ میکرونی تهیه و به روش هماتوکسیلین - ائوزین رنگ‌آمیزی شدند. نهایتاً با استفاده از میکروسکوپ نوری و کلیدهای موجود مورد مطالعه قرار گرفتند (Roberts, 2012).

آزمایش موردنظر در طرح کاملاً تصادفی صورت گرفت. به منظور تعیین غلظت نیمه‌کشنده از نرم‌افزار پروبیت (Probit) و شیب خط رگرسیون تحت نرم‌افزار Spss-15 استفاده شد.

۳ | نتایج

درصد بقاء و تلفات بچه فیل ماهیان در مواجهه با غلظت‌های مختلف سولفات روی و مس در جدول ۱ آمده است. براساس جدول فوق، افزایش مقادیر روی و مس به تیمارهای آزمایشی میزان تلفات ماهی به طور معنی‌داری افزایش یافت. با این حال صددرصد تلفات ماهی به ترتیب در غلظت ۸۵ میلی گرم در لیتر برای روی و ۰/۷ میلی گرم در لیتر برای مس اتفاق افتاد. نتایج حاصل از آزمایش نشان داد که کمترین غلظتی که سبب تلفات در ماهی شد برای فلز روی برابر ۲۵ میلی گرم در لیتر و برای فلز مس ۰/۲ میلی گرم در لیتر پس از مدت ۹۶ ساعت بود (LOEC) (جدول ۱).

نتایج حاصل از آزمایش ثابت کرد، با افزایش غلظت هر دو فلز مس و روی میزان درصد تجمعی تلفات ماهی نیز افزایش معنی‌داری داشت، به طوری که تلفات ماهی پس از ۹۶ ساعت در معرض قرارگیری روی، در غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۸۰ میلی گرم در لیتر به ترتیب برابر ۲ قطعه (۱۵/۳۸ درصد)، ۵ قطعه (۳۸/۴۶ درصد) و ۱۲ (۹۲/۳۱ درصد) بود. همچنین تلفات کامل ماهی در غلظت ۸۵ میلی گرم در لیتر به دست آمد (جدول ۱). این در حالی است که نتایج به دست آمده برای فلز مس

اولیه بیشترین میزان را داشته است (جدول ۱). بر اساس نتایج حاصل از جدول پروفیت، غلظت نیمه‌کشنده (LC50, 96h) روی و مس به-ترتیب برابر با ۵۴/۲۱ و ۵۲/۵ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمد (جدول ۲). میزان LC10, 96h و LC90, 96h و LC95, 96h برای فلز روی به-ترتیب برابر ۲۶/۷۱، ۸۱/۷۱ و ۱۰۴/۱۴ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمد.

باتوجه به سمیت آن، با مقادیر کمتری رخ داده است، به‌طوری‌که کمترین و بیشترین غلظتی از مس که سبب تلفات در ماهی شد به-ترتیب برابر ۰/۲ و ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمد. در هر دو آزمایش مشخص گردید، گرچه میزان تلفات ماهی در غلظت‌های بالاتر بیشتر است، با این حال در تمامی تیمارها میزان تلفات ماهی در ۲۴ ساعت

جدول ۱- نتایج قرارگرفتن ماهی در معرض غلظت‌های مختلف سولفات روی (تعداد ماهی ۱۳ قطعه، اکسیژن محلول ۷/۹±۱/۱ دمای ۲۵±۱ °C و پی‌اچ ۷/۸±۰/۲ pH)

تیمار	ماده سمی	غلظت (میلی‌گرم در لیتر)	تعداد تلفات				تعداد تلفات تجمعی	درصد تلفات
			۲۴	۴۸	۷۲	۹۶		
۱	مس	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	روی	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۲	مس	۰/۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	روی	۵	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۳	مس	۰/۲	۰	۰	۰	۱	۱	۷/۶۹
	روی	۲۵	۰	۰	۱	۱	۲	۱۵/۳۸
۴	مس	۰/۴	۱	۰	۱	۰	۲	۱۵/۳۸
	روی	۵۰	۲	۲	۱	۱	۵	۴۶/۳۸
۵	مس	۰/۶	۳	۱	۳	۰	۷	۵۳/۸۵
	روی	۷۵	۵	۳	۰	۱	۹	۶۹/۲۳
۶	مس	۰/۷	۷	۰	۲	۳	۱۲	۹۲/۳۱
	روی	۸۰	۷	۳	۱	۱	۱۲	۹۲/۳۱
۷	مس	۰/۸	۹	۲	۲	۰	۱۳	۱۰۰
	روی	۸۵	۸	۳	۲	۰	۱۳	۱۰۰

جدول ۲- غلظت‌کشنده (LC₁₀₋₉₅) با حدود اطمینان ۹۵٪ در طی زمان ۹۶ ساعت

LC	غلظت- کشنده	حدود اطمینان	
		حد پایین	حد بالا
LC10	روی	۲۶/۷۱	۸/۵۵
	مس	۰/۳۲	۰/۱۸
LC20	روی	۳۶/۱۵	۲۱/۸۱
	مس	۰/۳۹	۰/۲۸
LC40	روی	۴۸/۷۷	۳۸/۵۹
	مس	۰/۴۸	۰/۴۱
LC50	روی	۵۴/۲۱	۴۵/۲۶
	مس	۰/۵۲	۰/۴۶
LC60	روی	۵۹/۶۵	۵۱/۴۶
	مس	۰/۵۶	۰/۵۰
LC80	روی	۷۲/۲۸	۶۴/۱۴
	مس	۰/۶۶	۰/۵۹
LC90	روی	۸۱/۷۱	۷۲/۵۲
	مس	۰/۷۲	۰/۶۵
LC95	روی	۸۹/۵۲	۷۹/۰۴
	مس	۰/۷۹	۰/۷۰
LC99	روی	۱۰۴/۱۴	۹۰/۷۹
	مس	۰/۸۹	۰/۷۸

وجود مقادیر بالای روی و مس در تشت‌های آزمایشی سبب ایجاد استرس در ماهیان همراه با شنای نامنظم و کاهش ایمنی شد. در غلظت‌های تحت‌کشندگی مس (۰/۳ و ۰/۳۵ میلی‌گرم در لیتر) خون‌ریزی‌هایی در ناحیه آبششی دیده شد. این درحالی است که در مسمومیت با فلز روی قرمز شدن آبشش قابل مشاهده بود. افزایش میزان ترشح موکوس در هردو حالت (مس و روی) دیده شد. انقباضات و اسپاسم‌های عضلانی اتفاق افتاده و نهایتاً ماهی به پهلوی افتاد. دهان و سرپوش آبششی در بعضی از ماهیان به دلیل اسپاسم شدید باز ماند. آنچه مشخص بود، علائم مسمومیت با مس و روی، با رفتار غیرطبیعی ماهی همراه بود. شنای با شتاب و بی‌هدف در جهات مختلف و در مسیرهای کوتاه، بلعیدن اکسیژن محلول از سطح آب، عدم تعادل و قرارگرفتن ماهی به پشت و فرو رفتن ماهی در عمق آب و ایجاد انحنای ستون فقرات از دیگر تغییر رفتار ماهی در مواجهه با فلزات روی و مس بود.

مشاهده مقاطع بافتی تهیه شده از ماهیانی که در معرض غلظت-کشنده مس و روی قرار داشتند، ضایعات مشابهی را نشان داد (جدول

۳). از جمله خون‌ریزی، هیپرپلازی، ادم و چماغی شدن رشته‌های آبششی. در گروه‌هایی که در معرض غلظت‌های بالایی از فلز مس قرار گرفته بودند ضایعات با شدت بیشتری دیده شد. در آبشش ماهیان شاهد ضایعه‌ای دیده نشد (شکل‌های ۱، ۲ و ۳). میزان ضایعه وارد شده در آبشش ماهیانی که در معرض غلظت‌های پایین مس و روی قرار داشتند، حاکی از آسیب‌پذیری بیشتر فلز مس در مقابل با فلز روی بود. علائم مشاهده شده در بافت کلیه ماهیانی که در معرض غلظت کشنده مس و روی قرار داشتند به‌صورت خون‌ریزی، تخریب مجاری کلیوی و گلرمول‌ها بود (شکل‌های ۴ و ۵). تجمع سلول‌های آماسی با افزایش سمیت افزایش یافت. در بافت کبد نیز نکروز سلول‌های کبدی، خون-ریزی و پرخونی، رکود صفرا و نفوذ سلول‌های آماسی بوضوح دیده شد. علاوه بر آن مرز نشینی هسته‌ها یا به عبارت دیگر حرکت هسته از مرکز به مجاورت دیواره سلولی به‌وضوح و خصوصاً در غلظت‌های بالا مشهود بود (شکل‌های ۶ الی ۷). تفاوت آشکاری در ضایعه وارد شده بر کبد و کلیه ماهیان در مواجهه با سولفات روی و مس دیده نشد. در ماهیان گروه شاهد هیچ عارضه‌ای مشاهده نشد.

جدول ۳- ضایعات مشاهده شده در بافت‌های آبشش، کلیه و کبد پس از ۹۶ ساعت قرارگیری در معرض فلز الف- ضایعات مشاهده شده در آبشش

غلظت فلز (میلی‌گرم در لیتر)	ادم	پر خونی	خون‌ریزی	چماغی شدن	فیوژن	هایپرپلازی
۰	-	-	-	-	-	-
۰	-	-	-	-	-	-
۱۰	-	-	-	-	+	+
۰/۱	-	+	-	-	+	++
۳۰	+	+	+	+	++	++
۰/۲	+	++	+	++	+	+++
۵۰	+	+++	+	+	+++	+++
۰/۴	++	+++	+++	++	+++	+++
۷۰	++	+++	+++	++	+++	+++
۰/۶	++	+++	+++	+++	+++	+++
۸۰	+++	+++	+++	+++	+++	+++
۰/۷	+++	+++	+++	+++	+++	+++
۹۰	+++	+++	+++	+++	+++	+++
۰/۸	+++	+++	+++	+++	+++	+++

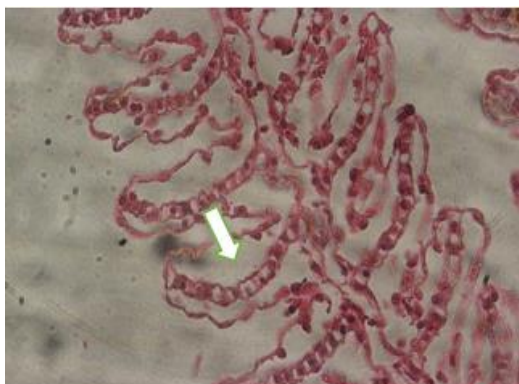
ب- ضایعات مشاهده شده در کلیه

غلظت فلز (میلی گرم در لیتر)	تخریب مجاری	تخریب گلومرل ها	خون‌ریزی	نفوذ سلولهای آماسی
۰	-	-	-	-
۰	-	-	-	-
۱۰	-	-	-	+
۰/۱	-	-	+	+
۳۰	+	+	++	++
۰/۲	+	-	++	+++
۵۰	++	++	++	+++
۰/۴	+++	++	+++	+++
۷۰	+++	+++	+++	+++
۰/۶	+++	+++	+++	+++
۸۰	+++	+++	+++	+++
۰/۷	+++	+++	+++	+++
۹۰	+++	+++	+++	+++
۰/۸	+++	+++	+++	+++

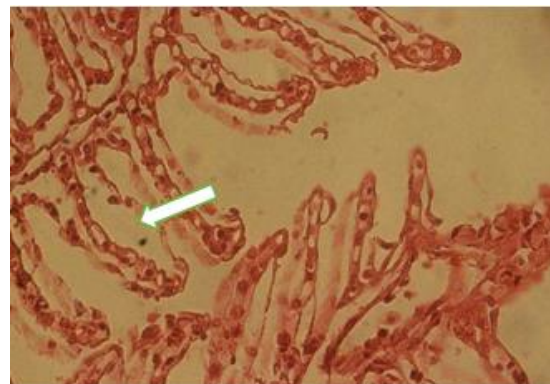
ج- ضایعات مشاهده شده در کبد

غلظت فلز (میلی گرم در لیتر)	نکروز	خون‌ریزی	رکود صفرا	مزر نشینی هسته
۰	-	-	-	-
۰	-	-	-	-
۱۰	-	+	-	-
۰/۱	-	+	-	+
۳۰	+	+	+	++
۰/۲	+	++	+	++
۵۰	++	++	+	++
۰/۴	++	+++	++	++
۷۰	++	+++	++	+++
۰/۶	+++	+++	++	+++
۸۰	+++	+++	+++	+++
۰/۷	+++	+++	+++	+++
۹۰	+++	+++	+++	+++
۰/۸	+++	+++	+++	+++

(-): بدون آسیب در بافت؛ (+): آسیب $< 20\%$ ؛ (++) : آسیب های $20-60\%$ ؛ (+++) : آسیب های $> 60\%$

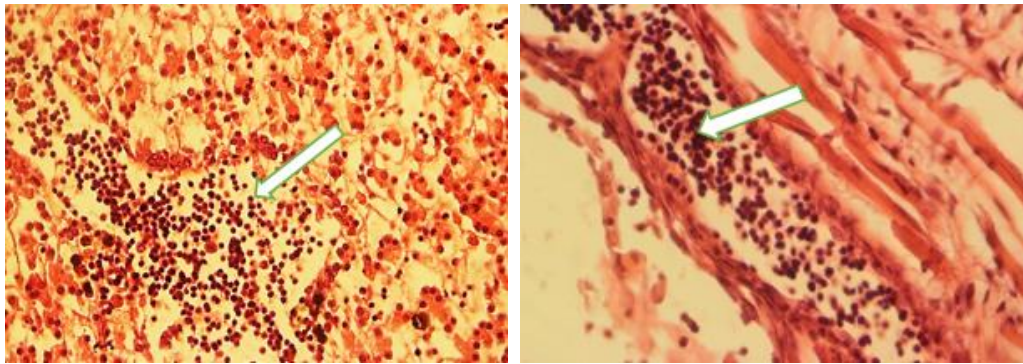


ب



الف

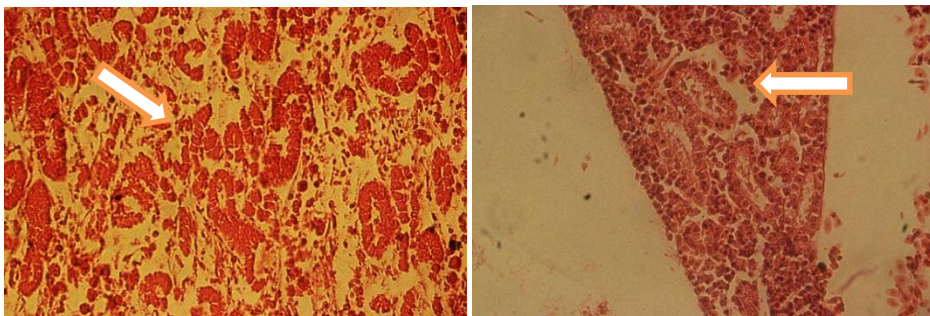
شکل ۱- مقطع تهیه شده از آبشش ماهیانی که در معرض غلظت کشنده فلز روی (الف) و مس (ب) قرار داشتند. نوک پیکان ادم را نشان می‌دهد (رنگ آمیزی H&E 40، بزرگنمایی ۴۰۰).



ب

الف

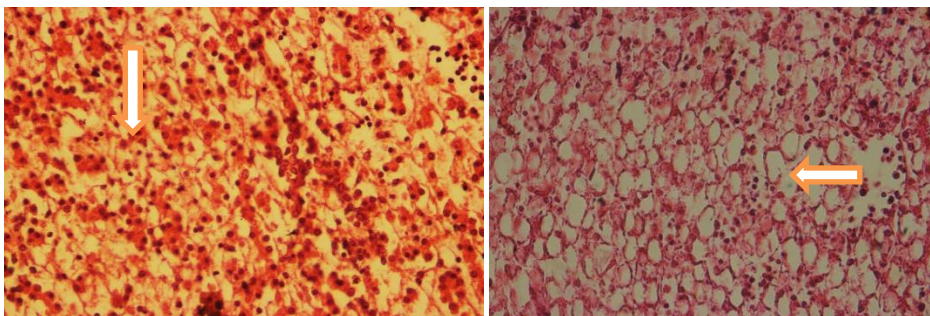
شکل ۲- مقطع تهیه شده از آبشش ماهیانی که در معرض غلظت کشنده روی (الف) و کبد ماهیان در غلظت کشنده مس (ب) قرار داشتند. نوک پیکان وجود سلول‌های آماسی را نشان می‌دهد (رنگ آمیزی H&E، بزرگنمایی ۴۰۰).



ب

الف

شکل ۳- مقطع تهیه شده از کلیه ماهیانی که در معرض غلظت تحت کشنده روی (الف) و مس (ب) قرار داشتند. نوک پیکان‌ها نواحی تخریب مجاری کلیوی را نشان می‌دهد (رنگ آمیزی H&E، بزرگنمایی ۴۰۰).



ب

الف

شکل ۴- مقطع تهیه شده از کبد ماهیانی که در معرض غلظت کشنده روی (الف) و مس (ب) قرار داشتند. نوک پیکان تخریب هیپاتوسیت‌ها را نشان می‌دهد (رنگ آمیزی H&E، بزرگنمایی ۴۰۰).

۴ | بحث و نتیجه‌گیری

به‌طور کلی از آزمون‌های سمیت‌حاد به‌عنوان یک شاخص مناسب جهت بررسی اثرات کوتاه مدت آلاینده‌ها و همچنین یک مقایسه ساده بین مقدار اثرات مختلف آلاینده‌ها بر ماهی و همچنین میزان حساسیت ماهی استفاده می‌شود (Moeinnejad *et al.*, 2019). در تحقیق حاضر نیز غلظت‌های کشنده و نیمه‌کشنده سولفات روی و مس پس از گذشت ۹۶ ساعت برای فیل‌ماهیان دریای خزر به‌ترتیب برابر با ۸۵، ۵۴/۲۱ (سولفات روی) و ۰/۸، ۰/۵۲ (سولفات مس) میلی‌گرم در لیتر است. با مقایسه سمیت نفت خام (۴۶/۶۸ میلی‌گرم) (Khodabakhsh *et al.*,

2013) و آمونیاک (۵۰ میلی‌گرم در لیتر) (Farhangi *et al.*, 2013) در بچه فیل‌ماهی دریای خزر با نتایج حاضر می‌توان بیان کرد، حساسیت بچه فیل‌ماهی دریای خزر نسبت به فلزات روی < آمونیاک < نفت خام < مس است.

محمدنژاد شמושکی (Mohammadnejad Shamoushaki, 2004) غلظت‌کشنده سولفات روی را برای بچه‌ماهی شیپ (*Acipenser nudivenrtis*) در مدت ۹۶ ساعت به روش آب‌ساکن برابر با ۷۳/۸۲۵ میلی‌گرم در لیتر به دست آوردند. باتوجه به نتایج حاضر

در آب می پذیرد (Tophan and Prescott, 2001, Roberts, 2012). اندام کبد مسئول اعمال حیاتی همچون تجمع زیستی، تغییر شکل زیستی و عوامل بیگانه از جمله آلاینده ها می باشند، از این رو مطالعه بر روی اندام کبد از دیرباز مورد توجه بوده است. شناسایی تغییرات یافت شده در این اندام آسان تر از انواع تغییرات عملکردی بوده و به عنوان یک علامت هشدار دهنده به سلامت جانور عمل می کند (Altinok et al., 2013, Khodabakhsh and Capkin). خدابخش و همکاران (Khodabakhsh et al., 2013) اثرات سمیت نفت خام را بر کبد فیل ماهی دریای خزر به شکل پرخونی عروق، اتساع و پرخونی سینوزوئیدهای کبدی، هیپرتروفی، رکود صفرا و همین طور نکروز، سیروز و فیروز بافت کبدی بیان کردند. خوش باور رستمی و همکاران (Khoshbavar-Rostami et al., 2015) با بررسی سمیت دیازینون بر فیل ماهی بیان کردند، گرفتگی رگ های خونی، افزایش هپاتوسیت های کبدی و کلفت شدن سلول های پایه ای کپسول بومن در کلیه، بهم جوش خوردگی و هیپرپلازی لاملاهای ثانویه در آبشش از جمله اثرات تخریبی سم دیازینون بود. در مطالعه حاضر نیز بیشترین اثرات بر بافت کلیه به شکل خونریزی، تخریب مجاری کلیوی و گلودرول ها و نفوذ سلول های آماسی بود. در کبد ماهیان نیز ضایعات عموماً به شکل خونریزی، رکود صفرا، نفوذ سلول های آماسی، نکروز هپاتوسیت ها و گوشه نشینی هسته ها (حرکت هسته ها به کناره ها) بود. آنچه از بررسی ضایعات رخ داده شده بر می آید، در غلظت کشنده با سولفات مس و روی اثرات تخریبی یکسانی اتفاق افتاد و لکن در غلظت های پایین تر اثرات سمیت مس بیشتر مشهود بود.

آنچه براساس مطالعه فوق مشهود است، اثرات تخریبی سموم مختلف بر بافت های ماهی با افزایش غلظت و زمان، متفاوت و متنوع می باشد. جمشیدی و همکاران (Jamshidi et al., 2013) اثرات نیترات روی را بر بافت های تاس ماهی ایرانی به شکل هیپرپلازی، چسبندگی لاملاهای ثانویه، خونریزی و نکروز سلولی (در آبشش) و پرخونی، نکروز سلولی، رکود صفراوی و آتروفی در کبد بیان کردند. آنها بیان کردند شدت تغییرات بافتی در هر تیمار متنوع بود و بیشترین عارضه در تیمارهای ۴ و ۵ (بالترین غلظت) مورد آزمایش بود، که با نتایج حاضر مطابقت داشت. رزاقی قاضیانی (Razaghi ghaziani et al., 2017) با مطالعه غلظت کشندگی سم دیازینون بر بافت کبد و آبشش ماهیان استرلیاد (*A. ruthenus*) بیان کردند، در بافت آبشش بچه ماهیان، ادم رشته های اولیه، الحاق تیغه های ثانویه، بالونینگ و پهن شدن، واکوئل دار شدن، پوسته پوسته شدن تیغه های ثانویه و جدا شدن سلول ها، نکروز، پرخونی عمومی مشاهده شد که شدت آن در غلظت های ۴/۴ و ۵ میلی گرم در لیتر بیشتر مشهود بود. در بافت کبد نیز واکوئل دار شدن سلول ها، از بین رفتن غشای سیتوپلاسمی، از بین رفتن ظاهر دانه دار سیتوپلاسم، پیکنوزه شدن هسته سلول ها، کاربوریسیس، کاربولیز، نکروز و تجزیه کامل غشای سلول های کبدی مشاهده گردید. کشتکار لنگرودی و تهرانی فرد (Keshtkar Langroudi and

کردند. در این تحقیق میزان LC50, 96h برابر ۷۴۶/۵۵ میلی گرم در لیتر به دست آمد. این امر حاکی از سمیت بسیار زیاد سولفات روی در مقایسه با نیترات روی است. مشتاقی و همکاران (Moshtaghi et al., 2014) با مطالعه اثرات سمیت حاد سولفات مس و پرمنگنات پتاسیم در بچه تاس ماهیان ایرانی غلظت کشنده فلز مس و پرمنگنات پتاسیم را در مدت ۹۶ ساعت به ترتیب برابر ۰/۱۵ و ۰/۴۱ میلی گرم در لیتر به دست آوردند. در مقایسه با نتایج حاضر، تاس ماهی ایرانی در مقایسه با گونه فیل ماهی حساسیت بیشتری نسبت به مس نشان داده است، هرچند شرایط آزمایش متفاوت باشد. به محض مواجهه ماهی با سولفات روی و مس، ماهی دچار رفتارهای غیرطبیعی گردید. براساس نتایج فوق، با افزایش غلظت و زمان در معرض قرارگیری ماهی با فلزات روی و مس شدت رفتارها افزایش یافت. علائم ظاهری مسمومیت با فلز روی و مس در غلظت های نزدیک به غلظت کشنده یکسان بود. به طوری که ماهی در همان ساعت اولیه دچار خونریزی، تشنجات عصبی به صورت پریدن به بیرون و شنای وحشت آمیز گردید. در غلظت های پایین رنگ پریدگی، شنای ناموزون، تجمع در اطراف سنگ های هوا، بلعیدن هوا از سطح آب بروز کرد. در ادامه ماهیانی که زنده بودند به شکل بی حال در کف تشت قرار گرفتند. رزاقی قاضیانی (Razaghi ghaziani et al., 2017) با مطالعه غلظت کشندگی سم دیازینون بر بافت کبد و آبشش ماهیان استرلیاد (*A. ruthenus*) بیان کردند که علائم رفتاری ناشی از مواجهه شدن در برابر سم شامل انحنای ستون فقرات (فلج عصبی)، قرمزی روی سطح زیرین بدن و آبشش، شنای چرخشی، باز و بست سریع آبشش ها و خوابیدن به پشت بود که با نتایج حاضر مطابقت دارد. با مقایسه نتایج فوق و نتایج به دست آمده توسط سایر محققین بر روی انواع گونه های ماهی ژنگ و همکاران (Zeng et al., 2018) می توان اظهار داشت که واکنش رفتاری ماهی در مواجهه سموم به یک شکل بروز می کند. آلاینده های شیمیایی اندام های مختلفی از جمله آبشش ها، کلیه و کبد را تحریک می کنند و این بافت ها ارائه دهنده یک ابزار مفید جهت سنجش تاثیرات آلاینده های خارجی هستند. بافت آبشش دارای محافظت کمتری نسبت به سایر بافت ها است و به طور مستقیم در مجاورت با آب قرار دارد، بنابراین از حساسیت بیشتری نیز برخوردار است. شاید اولین سد دفاعی بدن در مواجهه با آلاینده های شیمیایی باشد. با بررسی صورت گرفته در تخریب بافت آبشش بچه فیل ماهیان مورد مطالعه در مواجهه با فلز روی و مس ضایعاتی همچون پرخونی، خونریزی، هیپرپلازی راس رشته های آبشش، ادم، اتساع لاملاهای ثانویه دیده شد. گرچه میزان آنها در سمیت با روی و مس متفاوت بود. در مطالعه حاضر، در غلظت های پایین آسیب های وارده بر بافت آبشش در مواجهه با روی کمتر از مس بود. با این حال شدت آسیب های وارده در غلظت کشنده برای هر دو یکسان بود.

کبد اندامی است که بیشترین ارتباط را با سم زدائی و فرآیندهای تغییر شکل زیستی دارد که به دلیل این عملکرد و وجود خون فراوان در آن، یکی از اندام هایی است که بیشترین تأثیر را از آلاینده های موجود

- Biology, conservation and sustainable development of sturgeons. Springer, NewYork, USA. 467p.
- Ettah I., Ibor O., Bassey A., Akaninyene J., Christopher N. 2017. Toxicity and histological effects of two liquid soaps on African Mud Catfish (*Clarias gariepinus*, Buchell, 1822) fingerlings. Asian Journal of Environment and Ecology, 3(4): 1-9.
- Farhangi M., Jafaryan H. 2021. The Assessment of Histopathological Change Induced in the Tissues of the Cyprinus Carpio and Rutilus Caspicus Fry after Acute Exposure of Copper (Cuso4). Journal of Aquaculture Development, 4 (1): 69-81.
- Farhangi M., Gholipour-Kanani H., Rostami-Charati F. 2013. Prevention of acute ammonia toxicity in bluga (*Huso huso*), using natural zeolite. Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences, 5(3): 2400-2407.
- Gündoğdu, A. 2008. Acute toxicity of zinc and copper for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Fisheries Sciences, 2(5):711-720.
- Hakimi B., Khara H., Pazhand Z. 2015. Determining the Lethal Concentration of Formalin to Persian Sturgeon (*Acipenser persicus* Borodin, 1897) and Stellate (*Acipenser stellatus* Pallas, 1811) Fingerlings. Journal of Fisheires, 9 (2): 1-7.
- Hosseini SH., Kamali A., Yazadani M.A., Khara H. 2017. The effect of different iron levels on some of growth indices and carcass composition in Ship Sturgeon *Acipenser nudi ventris* Lovetsky, 1828 juveniles. Journal Applied Ichthyology Reacerc, 5(1): 101-116.
- Keshtkar Langroudi E., Tehranifard A. 2018. Sublethal effects of diazinon on hematological parameters and gills and muscle tissue of sturgeon fish (*Acipenser persicus* Borodin, 1897), Iran. Journal of Aquaculture Development, 3 (12): 119-129.
- Khodabakhsh E., Jamili SH., Motalebi A., Mashinchian A., Nasrolahzadeh Saravi H., Hoseini M. 2013. The acute effects of water soluble-fraction crude oil on liver tissue of beluga (*Husohuso Linnaeus*, 1754) fingerlings in the Caspian Sea. Journal of Marian Biology, 5(3): 1-14.
- Khoshbavar-Rostami H.A., Sharifpour I., Mokarami-Rostami, A. 2015. Sublethal toxicity of organophosphate, diazinon on some organs of great sturgeon (*Huso huso*). Iranian Journal of Aquatic Animal Health, 1(1): 27-35.
- Khoshbavar-Rostami, H.A., Yelghi S. 2020. Acute toxicity and hematological indices and biochemical parameters of giant sturgeon, *Huso huso* after acute exposure to crude oil. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 19(3): 1292-1303.
- Kosnett M.J. 2010. Chelation for Heavy Metals (Arsenic, Lead, and Mercury): Protective or Perilous?" Clinical Pharmacology and Therapeutics, 88(3): 412-415.
- Kumara N., Kumar Chandan N., Wakchaure G.C., Singha N.P. 2020. Synergistic effect of zinc nanoparticles and temperature on acute toxicity with response to biochemical markers and histopathological attributes

آنچه مشخص است سمیت مس به مراتب بیشتر از روی بوده و اثرات تخریبی آنها در غلظت های کشنده مشابه می باشد، با این تفاوت که شدت تخریب بافت ها خصوصا ضایعات وارده بر آبشش که در مواجهه مستقیم با سم بوده اند، در مسمومیت با فلز مس شدیدتر بود.

۵ | تشکر و قدردانی

این طرح با حمایت مالی دانشگاه گنبد کاووس و با مصوبه شورای پژوهشی دانشگاه به شماره پرونده ۶/۰۰/۱۷ اجرا شده است. بدینوسیله از حمایت های ریاست محترم دانشگاه و مدیریت محترم پژوهشی دانشگاه و همکاران گروه شیلات تقدیر و تشکر می نمایم. همچنین بر خود واجب می دانیم از راهنمایی جناب آقای دکتر مازندرانی عضو هیات علمی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی که در راستای آسیب شناسی بافتی نهایت همکاری را داشتند، تشکر نمایم.

پست الکترونیک نویسندگان

محمد فرهنگی: s.farhangi@yahoo.com
حجت اله جعفریان: hojat.jafaryan@gmail.com
ضیاء کردجری: z.kordjazi@gmail.com
بهروز محمدزاده: behrooz9@gmail.com
حسنی قلی پور کنعانی: gholipourk@gmail.com

REFERENCES

- Altas L. 2009. Inhibitory effect of heavy metals on methane producing anaerobic granular sludge. Journal of Hazard Mater, 162: 1551-6.
- Altinok I., Capkin E. 2007. Histopathology of rainbow trout exposed to sublethal concentrations of methiocarb or Endosulfan. Toxicology Pathology, 35: 405-410.
- Bagheri T., Hedayati S.A.K. 2019. Effect of oil pollutions on strogen fish. The First National Conference on the Opportunites and Challenges of the Caspian Sea, Gorgan Iran. <https://civilica.com/doc/973867>.
- Bagherzadeh Lakani F., Sattari M., Sharifpour I., Kazemi R., Hallajian A. 2016. Effects of different oxygen levels on the spleen in two weight groups of beluga (*Huso huso*). Journal of Aquaculture Development, 10(2): 30-21.
- Butrimavičienė L., Nalivaikienė R., Kalcienė V., Rybakovas A. 2021. Impact of copper and zinc mixture on haematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): acute exposure and recovery. Ecotoxicology, <https://doi.org/10.1007/s10646-021-02404-7>.
- Calfee R.D., Little E.L., Puglis H.J., Scott E., Brumbaugh W.G., Mebane CH.A. 2014. Acute sensitivity of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to copper, cadmium, or zinc water-only laboratory exposures. Environmental Toxicology and Chemistry, 33(10): 2259-2272.
- Carmona R., Domezain, A., Garcia-Gallego, M., Antonio Hernando, J., Rodriguez, F., and Ruiz-Rejon, M. 2009.

- exposure on kidney, liver and gill of common carp, *Cyprinus carpio*, fingerlings. Journal of Aquatic Ecology, 5(1): 9-16.
- Mohammadnejad Shamoushaki SH., Nezami Balouchi SH., Esmaeili Sari A., Khara H., Pazhand Z. 2004. Determination of lethal concentration (LC50/96h) of Pb, Zn and Cd on *Acipenser nudiventris*. Journal of Marian Sciences and Technology, 4(3): 45-53.
- Mohammadnezhad Sh., Shariati F., Keshavarz A., Vahabzadeh H. 2016. The toxicity of zinc oxide nanoparticles on blood factors of *Huso huso* and *Cyprinus carpio*. Journal of Pharmaceutical and Health Sciences, 4(2): 123-133.
- Moeinnejad S., Naeemi A.S., Nazarhaghighi F., Nasr E. 2019. Sub-acute effects of copper oxide nanoparticles on enzymes and hematological parameters of the juvenile beluga (*Huso huso*). Veterinary Researches and Biological Products, 1 (1): 84-96.
- Moreno D.H., Valdehita A., Conde E., Rucandio I., Navas J.M., Cruza M.L.F. 2019. Acute toxic effects caused by the co-exposure of nano particles of ZnO and Cu in rainbow trout. Science of the Total Environment, 687(15): 24-33.
- Moshtaghi B., Nezami SH., Khara H., Pazhand Z., Shenavar Masouleh A., Hallajan A., Fathollahi R., Manafi Havigh Z. 2012. Effect of acute toxicity of copper sulfate and potassium permanganate on gill and liver tissues of Persian sturgeon, *Acipenser persicus* Borodin, 1897. Journal of Marian Biology, 4(15): 1-11.
- Pourkazemi M. 2006. Caspian Sea sturgeon conservation and fisheries: past, present and future. Journal of Applied Ichthyology, 22(1):12-16.
- Razaghi ghaziani M., Imanpour J., Pazhand Z. 2017. Determination of Lethal Concentration (LC50 96 H) of Diazinon and Effects on Histological and Hematological Parameters on Sterlet (*Acipenser Ruthenus*). Journal of Aquaculture Development, 2 (11): 49-60.
- Roberts R.J. 2012. Fish pathology. 4th edition. Wiley-Blackwell, UK. 590 p.
- Sadeghi A., Imanpour M.R. 2015. Investigation of LC50, NOEC, and LOEC of Oxadiazon, Deltamethrin and Malathion on Platy Fish (*Xiphophorus Maculatus*). Iranian Journal of Toxicology, 9(28): 1271-1276.
- Soltani Z., Ghorbani R., Hedayati S.A.K., Adeli A., Mazandarani M. 2015. The comparison of sub lethal concentration effects of zinc sulfate and zinc nano-oxide on gill histopathological lesions of *Capoeta*

capoeta gracilis (Keyserling, 1861). Journal Applied Ichthyology Research, 4(2): 13-22.

TRC. 1984. OECD Guideline for testing of chemical, Section 2, Effects on biotic systems. OECD. 39p.

Zeng L., Huang L., Zhao M., Liu SH., He ZH., Feng J., Qin CH., Yuan D. 2018. Acute toxicity of zinc sulfate heptahydrate (ZnSO₄.7H₂O) and copper (II) sulfate pentahydrate (CuSO₄.5H₂O) on freshwater fish, *Percocypris pingi*. Fisheries and Aquaculture Journal, 9(1): 1-5.

نحوه استناد به این مقاله:

فرهنگی م., جعفریان ح., کردجزی ض., محمدزاده ب., قلی‌پور کنعانی ح. ۱۴۰۱. بررسی اثرات آسیب‌شناسی بافتی سمیت‌حاد سولفات روی و مس در گونه فیل‌ماهی دریای خزر. نشریه پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی, ۱۰(۲): ۶۵-۷۴.

<https://doi.org/10.22034/jair.10.3.2>

Farhangi M., Jafaryan H., Kordjazi Z., Mohammadzadeh B., Gholipour Kanani H. 2022. The study of histopathology of acute toxicity rate of Zinc and Copper sulfate on Caspian beluga -Species (*Huso huso*). Journal of Applied Ichthyological Research, 10(2): 65-74. <https://doi.org/10.22034/jair.10.3.2>

The study of histopathology of acute toxicity rate of Zinc and Copper sulfate on Caspian beluga - Species (*Huso huso*)

Farhangi M^{*}, Jafaryan H., Kordjazi Z., Mohammadzadeh B., Gholipour Kanani H.

Dept of Fisheries, Faculty of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran.

Type:

Original Research Paper

<https://doi.org/10.22034/jair.10.3.2>

Paper History:

Received: 19-11-2021

Accepted: 20-02- 2022

Corresponding author:

Farhangi M. Dept of Fisheries, Faculty of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran.

Email: s.farhangi@yahoo.com

Abstract

Toxicity tests will reveal the organism's sensitivity to a particular toxicant and help us determine the permissible limit of a toxicant in an ecosystem. Hence, in the present study histological effects of copper and Zinc sulphate on, 250 Caspian beluga (*Huso huso*) fingerlings were studied. On the based of RFT (Range Finding Test), fish of treatment groups were exposed to 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.7 and 0.8 mg/l of copper and 5, 25, 50, 75, 80 and 85 mg/l of Zinc sulphate during 4 days respectively. Behaviours and clinical signs of fish were recorded during the experiment. Samples were cut from kidney, liver and gill of moribund and fresh dead fish for histopathological signs. On the present study, LC50 value for 96 hours exposure were calculated as 0.52 and 54.21 mg/l, respectively for Copper and Zinc. Mild (Sublethal dose) to severe (lethal dose) histopathological signs were observed in kidney, liver and gill of all treatment fish specimens such as hyperemia, inflammatory cell infiltration (sublethal dose), hemorrhage and necrosis (lethal does). Pathologic severity signs in sampled tissues were increased by increasing in concentration and exposure times of copper and Zinc sulphate. On the based of present study, toxicity of copper was more than zinc and lesions were more severity.

Keywords: Histopathology, Acute Toxicity, Copper sulphate, Zinc sulphate Caspian beluga