



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

محمد فرهنگي*، حجت‌اله جعفریان، ضیاء کردجزی، 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، آزر، اورال و دریای سیاه شده‌اند (Pourkazemi, 2006) و هم‌اکنون در فهرست گونه‌های به‌شدت 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) به‌عنوان ریزمغذی در تغذیه ماهیان نقش به‌سزایی دارند، با این حال افزایش بیش از حد نیاز زیستی برای آبزیان سمی است. سطح طبیعی عنصر روی و مس در ماهیان آب‌شیرین و آب‌شور به‌منظور پاسخگویی به نیاز رشد آبی ناکافی گزارش شده است، لذا این عناصر به‌عنوان 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، با توجه به اهمیت دریای خزر به‌عنوان مأمّن اصلی زیست تاس‌ماهیان و همچنین در بین گونه‌های با ارزش تاس‌ماهیان، فیل‌ماهی به‌عنوان یک گونه ارزشمند اقتصادی و در معرض خطر انقراض و به‌عنوان یک گونه معرفی شده جهت تولید و پرورش در مزارع، و از طرف دیگر نقش تعیین‌کننده 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 $3/1 \pm 3/2$ 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 میلی‌گرم در لیتر بود. ماهیان ۲۴ ساعت قبل از آزمایش قطع غذایی 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 میلی‌گرم در لیتر) و سولفات مس (۳، ۱، ۰/۵، ۰/۰۵، ۰ میلی‌گرم 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 میلی‌گرم در لیتر به ترتیب برای روی و مس در مدت ۲۴ ساعت غلظت‌های مختلف ۸۵، ۸۰، ۷۵، ۵۰، ۲۵، ۵ میلی‌گرم در لیتر برای فلز روی و غلظت‌های مختلف ۰/۸، ۰/۷، ۰/۶، ۰/۴، ۰/۲، ۰/۱ میلی‌گرم 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 (Lowest Observed Effect Concentration) و حداکثر غلظت مجاز MATC (Maximum Allowable Toxicant) تعیین شد (Sadeghi and Imanpour, 2015).

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 - اتوزین 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 میلی‌گرم در لیتر برای روی و ۰/۷ میلی‌گرم 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 میلی‌گرم در لیتر و برای فلز مس ۰/۲ میلی‌گرم 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 میلی‌گرم 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 میلی‌گرم 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 پروبیت، غلظت نیمه‌کشنده (LC₅₀, 96h) روی و مس به-ترتیب برابر با ۵۴/۲۱ و ۵۲/۵۲ 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 این‌حال در تمامی تیمارها میزان تلفات ماهی در ۲۴ ساعت

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

تیمار	ماده سمی	غلظت (میلی‌گرم در لیتر)	تعداد تلفات				درصد تلفات تجمعی
			۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت	
۱	مس	۰	۰	۰	۰	۰	
	روی	۰	۰	۰	۰	۰	
۲	مس	۰/۱	۰	۰	۰	۰	
	روی	۵	۰	۰	۰	۰	
۳	مس	۰/۲	۰	۰	۱	۷/۶۹	
	روی	۲۵	۰	۱	۲	۱۵/۳۸	
۴	مس	۰/۴	۱	۰	۱	۱۵/۳۸	
	روی	۵۰	۲	۲	۵	۴۶/۳۸	
۵	مس	۰/۶	۳	۱	۰	۵۳/۸۵	
	روی	۷۵	۵	۳	۹	۶۹/۲۳	
۶	مس	۰/۷	۷	۰	۲	۹۲/۳۱	
	روی	۸۰	۷	۳	۱۲	۹۲/۳۱	
۷	مس	۰/۸	۹	۲	۰	۱۰۰	
	روی	۸۵	۸	۳	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
LC ₁₀	روی ۲۶/۷۱	۸/۵۵	۳۷/۱۸
	مس ۰/۳۲	۰/۱۸	۰/۴۲
LC ₂₀	روی ۳۶/۱۵	۲۱/۸۱	۴۵/۱۲
	مس ۰/۳۹	۰/۲۸	۰/۴۶
LC ₄₀	روی ۴۸/۷۷	۳۸/۵۹	۵۶/۶۷
	مس ۰/۴۸	۰/۴۱	۰/۵۵
LC ₅₀	روی ۵۴/۲۱	۴۵/۲۶	۶۲/۲۱
	مس ۰/۵۲	۰/۴۶	۰/۵۹
LC ₆₀	روی ۵۹/۶۵	۵۱/۴۶	۶۸/۲۰
	مس ۰/۵۶	۰/۵۰	۰/۶۴
LC ₈₀	روی ۷۲/۲۸	۶۴/۱۴	۸۳/۸۶
	مس ۰/۶۶	۰/۵۹	۰/۷۶
LC ₉₀	روی ۸۱/۷۱	۷۲/۵۲	۹۶/۶۸
	مس ۰/۷۲	۰/۶۵	۰/۸۵
LC ₉₅	روی ۸۹/۵۲	۷۹/۰۴	۱۰۷/۶۵
	مس ۰/۷۹	۰/۷۰	۰/۹۴
LC ₉₉	روی ۱۰۴/۱۴	۹۰/۷۹	۱۲۸/۷۲
	مس ۰/۸۹	۰/۷۸	۱/۱۰

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 گل‌مرول‌ها بود (شکل‌های ۴ و ۵). تجمع سلول‌های آماسی با افزایش سمیت افزایش یافت. در بافت کبد نیز نکروز سلول‌های کبدی، خون‌ریزی و پرخونی، رکود صفرا و نفوذ سلول‌های آماسی بوضوح دیده شد. علاوه بر آن مرزنشینی هسته‌ها یا به‌عبارت 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 سولفات‌روی و مس دیده نشد. در ماهیان گروه شاهد هیچ عارضه‌ای مشاهده نشد.

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 پهلو افتاد. دهان و سرپوش آبششی در بعضی از ماهیان به‌دلیل 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 اکسیژن‌محلول 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

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	پرخونی	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	+++	+++	+++	+++	+++	+++

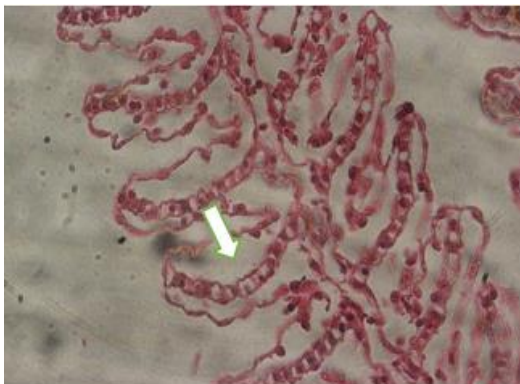
ب- ضایعات مشاهده شده در کلیه

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

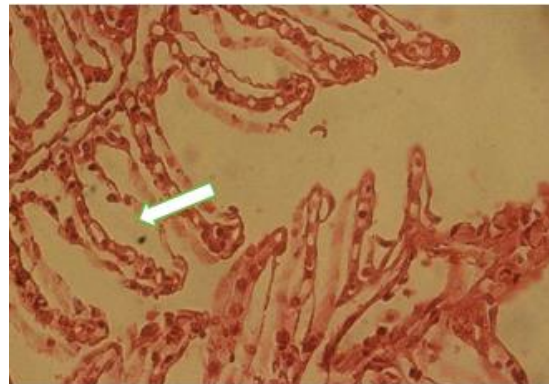
ج- ضایعات مشاهده شده در کبد

غلظت فلز (میلی‌گرم در لیتر)	نکروز	خون‌ریزی	رکود صفرا	مزرانشینی 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 < ۲۰٪؛ (++) : آسیب های ۲۰-۶۰٪؛ (+++) : آسیب های > ۶۰٪

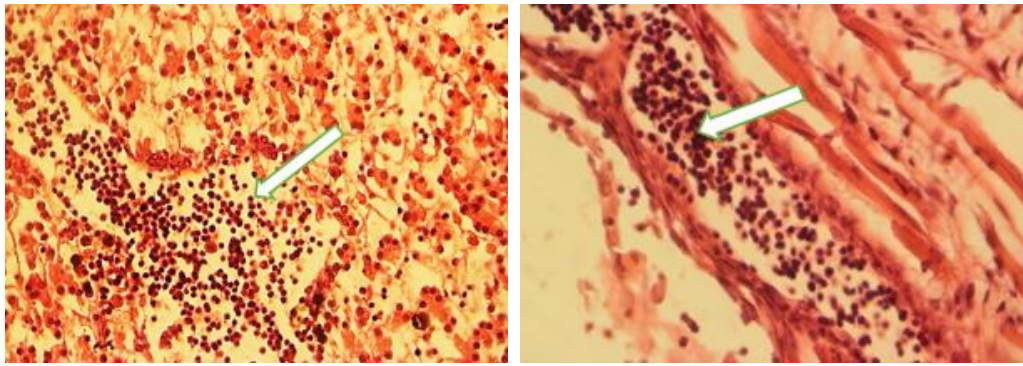


ب

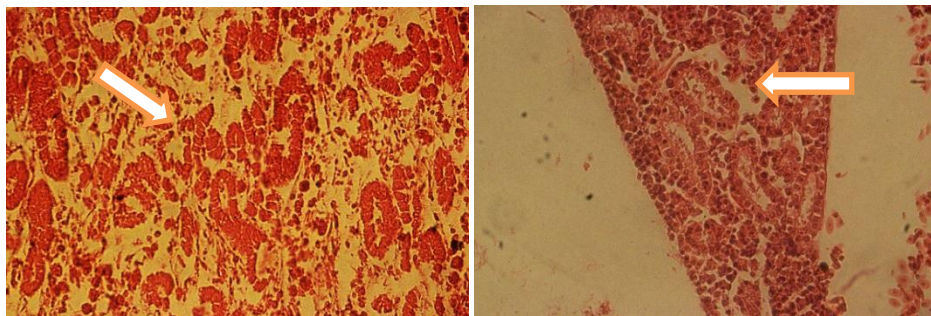


الف

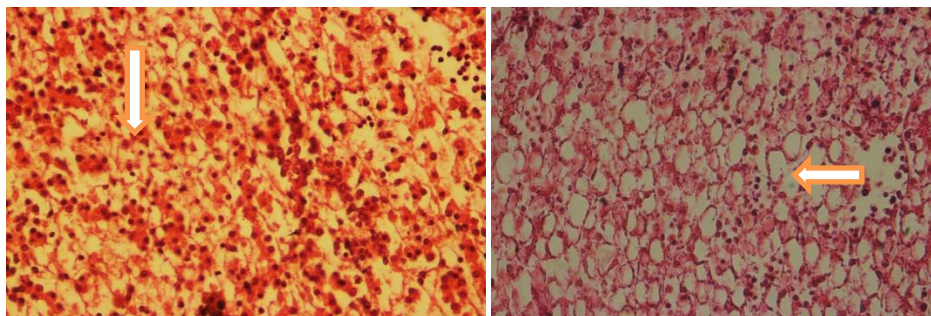
شکل ۱- مقطع تهیه شده از آبشش ماهیانی که در معرض غلظت کشنده فلز روی (الف) و مس (ب) قرار داشتند. نوک پیکان ادم را نشان می‌دهد (رنگ‌آمیزی H&E 40، بزرگنمایی ۴۰۰).



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).



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).



شکل ۴- مقطع تهیه شده از کبد ماهیانی که در معرض غلظت کشنده روی (الف) و مس (ب) قرار داشتند. نوک پیکان تخریب هیاتوسیت‌ها 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 سولفات‌روی و مس پس از گذشت ۹۶ ساعت برای فیل‌ماهیان دریای‌خزر به‌ترتیب برابر با ۸۵، ۵۴/۲۱ (سولفات‌روی) و ۰/۸، ۰/۵۲ (سولفات‌مس) میلی‌گرم در لیتر است. با مقایسه سمیت نفت خام (۴۶/۶۸ میلی‌گرم) (Khodabksh *et al.*,

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

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

کردند. در این تحقیق میزان LC50, 96h برابر ۷۴۶/۵۵ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمد. این امر حاکی از سمیت بسیار زیاد سولفات‌روی در مقایسه با نیترات‌روی است. مشتاقی و همکاران (Moshtaghi et al., 2014) با مطالعه اثرات سمیت‌حاد سولفات‌مس و پرمنگنات‌پتاسیم در بچه‌تاس‌ماهیان ایرانی غلظت‌کشنده فلز مس و پرمنگنات‌پتاسیم را در مدت ۹۶ ساعت به‌ترتیب برابر ۰/۱۵ و ۰/۴۱ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آوردند. در مقایسه با نتایج حاضر، تاس‌ماهی ایرانی در مقایسه با گونه فیل‌ماهی حساسیت بیشتری نسبت به مس نشان داده است، هرچند شرایط آزمایش متفاوت باشد. به محض مواجهه ماهی با سولفات‌روی 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 غلظت‌های نزدیک به غلظت‌کشنده یکسان بود. به‌طوری‌که ماهی در همان ساعت اولیه دچار خون‌ریزی، تشنجات عصبی به‌صورت پریدن به بیرون و شنای وحشت‌آمیز گردید. در غلظت‌های پایین رنگ پریدگی، شنای ناموزون، تجمع در اطراف سنگ‌های هوا، بلعیدن هوا از سطح آب بروز کرد. در ادامه ماهیانی که زنده بودند به‌شکل بی‌حال در کف تشت قرار گرفتند. رزاقی قاضیانی (Razaghi ghaziani et al., 2017) با مطالعه غلظت‌کشدگی 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 آبشش‌ها و خوابیدن به پشت بود که با نتایج حاضر مطابقت دارد. با مقایسه نتایج فوق و نتایج به‌دست آمده توسط سایر محققین بر روی انواع گونه‌های ماهی ژنگ و همکاران (Zeng et al., 2018) می‌توان اظهار داشت که واکنش رفتاری ماهی در مواجهه سموم به یک شکل بروز می‌کند. آلاینده‌های شیمیایی اندام‌های مختلفی از جمله آبشش‌ها، کلیه و کبد را تحریک می‌کنند و این بافت‌ها ارائه دهنده یک ابزار مفید جهت سنجش تاثیرات آلاینده‌های خارجی هستند. بافت آبشش دارای محافظت کمتری نسبت به سایر بافت‌هاست و به‌طور مستقیم در مجاورت با آب قرار دارد، بنابراین از حساسیت بیشتری نیز برخوردار است. شاید اولین سد دفاعی بدن در مواجهه با آلاینده‌های شیمیایی باشد. با بررسی صورت گرفته در تخریب بافت آبشش بچه‌فیل‌ماهیان مورد مطالعه در مواجهه با فلز روی و مس ضایعاتی همچون پرخونی، خون‌ریزی، هیپرپلازی راس رشته‌های آبشش، ادم، اتساع لاملاهای ثانویه دیده شد. گرچه میزان آنها در سمیت با روی و مس متفاوت بود. در مطالعه حاضر، در غلظت‌های پایین آسیب‌های وارده بر بافت آبشش در مواجهه با روی کمتر از مس بود. با این حال شدت آسیب‌های وارده در غلظت‌کشنده برای هر دو یکسان بود.

در آب می‌پذیرد (Tophan and Prescott, 2001, Roberts, 2012). اندام کبد مسئول اعمال حیاتی همچون تجمع‌زیستی، تغییر شکل زیستی و عوامل بیگانه از جمله آلاینده‌ها می‌باشند، از این‌رو مطالعه بر روی اندام کبد از دیرباز مورد توجه بوده است. شناسایی تغییرات یافت شده در این اندام آسان‌تر از انواع تغییرات عملکردی بوده و به‌عنوان یک علامت هشدار دهنده به سلامت جانور عمل می‌کند (Altinok et al., 2013, Khodabakhsh and Capkin, 2007). خدابخش و همکاران (Khodabakhsh et al., 2013) اثرات سمیت نفت‌خام را بر کبد فیل‌ماهی دریای خزر به‌شکل پرخونی عروق، اتساع و پرخونی سینوزوئیدهای کبدی، هیپرتروفی، رکود صفرا و همین‌طور نکروز، سیروز و فیبروز بافت کبدی بیان کردند. خوش‌باور رستمی و همکاران (Khoshbavar-Rostami et al., 2015) با بررسی سمیت دیازینون بر فیل‌ماهی بیان کردند، گرفتگی رگ‌های خونی، افزایش هیپاتوسیت‌های کبدی و کلفت‌شدن سلول‌های پایه‌ای 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 به‌شکل خون‌ریزی، تخریب مجاری کلیوی و گلوبومرول‌ها و نفوذ سلول‌های آماسی بود. در کبد ماهیان نیز ضایعات عموماً به‌شکل خون‌ریزی، رکود صفرا، نفوذ سلول‌های آماسی، نکروز هیپاتوسیت‌ها و گوشه‌نشینی هسته‌ها (حرکت هسته‌ها به کناره‌ها) بود. آنچه از بررسی ضایعات رخ داده شده بر می‌آید، در غلظت‌کشنده با سولفات‌مس و روی اثرات تخریبی یکسانی اتفاق افتاد و لکن در غلظت‌های پایین‌تر اثرات سمیت‌مس بیشتر مشهود بود.

آنچه براساس مطالعه فوق مشهود است، اثرات تخریبی سموم مختلف بر بافت‌های ماهی با افزایش غلظت و زمان، متفاوت و متنوع می‌باشد. جمشیدی و همکاران (Jamshidi et al., 2013) اثرات نیترات‌روی را بر بافت‌های تاس‌ماهی ایرانی به‌شکل 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 غلظت‌کشدگی سم دیازینون بر بافت کبد و آبشش ماهیان استرلیاد (*A. ruthenus*) بیان کردند، در بافت آبشش بچه‌ماهیان، ادم رشته‌های اولیه، الحاق تیغه‌های ثانویه، بالونینگ و پهن شدن، واکوئل‌دار شدن، پوسته پوسته شدن تیغه‌های ثانویه و جداشدن سلول‌ها، نکروز، پرخونی عمومی مشاهده شد که شدت آن در غلظت‌های ۴/۴ و ۵ میلی‌گرم در لیتر بیشتر مشهود بود. در بافت کبد نیز واکوئل‌دار شدن سلول‌ها، از بین رفتن غشای سیتوپلاسمی، از بین رفتن ظاهر دانه‌دار سیتوپلاسم، پیکنوزه شدن هسته سلول‌ها، کاریورکسیس، کاریولیز، نکروز و تجزیه کامل غشای سلول‌های کبدی مشاهده گردید. کشتکار لنگرودی و تهرانی‌فرد (Keshtkar Langroudi and

کبد اندامی است که بیشترین ارتباط را با سم‌زدائی و فرآیندهای تغییرشکل زیستی دارد که به‌دلیل این عملکرد و وجود خون فراوان در آن، یکی از اندام‌هایی است که بیشترین تأثیر را از آلاینده‌های موجود

Biology, conservation and sustainable development of sturgeons. Springer, New York, 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 nudiventris* Lovetsky, 1828 juveniles. *Journal Applied Ichthyology Reacerch*, 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.

and kidney *Acipenser persicus*. Journal of Animal Physiology and Development, 6(3): 23-32.

Mazandarani M., Sodagar M., Namroodi S. 2015. Histopathological effects of acute copper sulphate

۷۳ |

in fish. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology, 229: Abstract.

Jamshidi A., Khara H., Pazhand Z. 2013. Effects of LC50, 96h and histopathological Zn (NO₃)₂ on the gill, liver

بررسی اثرات آسیب‌شناسی بافتی سمیت‌حاد سولفات روی و ...

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., Nazarhaghghi 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.

Morenoa D.H., Valdehitaa A., Conde E., Rucandiob 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 فیله ماهی 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