بررسی اثرات سمی سولفات مس بر بافت آبشش و کبد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان *(Oncorhynchus mykiss)*

- **ذوالفقار لطفی***: گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم‌پایه، دانشگاه پیام‌نور، واحد قم، صندوق‌پستی:۳۷۱۸۵-۳۱۱
- **صدیقه برهانی**: گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم‌پایه، دانشگاه پیام‌نور، واحد قم، صندوق‌پستی:۳۷۱۸۵-۳۱۱
- **شهلا جمیلی**: گروه زیست‌شناسی دریا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، صندوق‌پستی:۱۴۵۱۵- ۷۷۵
- **آزاده کدخدایی**: گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم‌پایه، دانشگاه پیام‌نور، واحد قم، صندوق‌پستی:۳۷۱۸۵-۳۱۱

تاریخ دریافت: مهر ۱۳۹۱ تاریخ پذیرش: دی ۱۳۹۱

چکیده

مس یکی از عناصرکمیابی است که در بسیاری از واکنش‌های آنزیمی دخیل است و برای ماهی سمی می‌باشد ولی ترکیب آن در پرورش ماهی، برای از بین بردن جلبک‌ها و هم‌چنین در پیشگیری و درمان برخی از بیماری‌های ماهی به‌کار می‌رود. در این پژوهش اثر سمیت فلز مس (سولفات مس) بر روی بافت آبشش و کبد قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در شرایط آزمایشگاهی بررسی شده است.

برای بررسی بافت آبشش وکبد ٤ آکواریوم هر کدام حاوی۱۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان استفاده شد. یکی از این آکواریوم‌ها به‌عنوان شاهد انتخاب شد و به ۳ آکواریوم دیگر غلظت‌های ۰/۲ و ٠/٤ و ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر سولفات مس اضافه شد. سپس در زمان‌های ٢٤ ،٤٨ ،٧٢ و ٩٦ ساعت پس از آن، ماهی‌ها برای مطالعات هیستوپاتولوژیک آماده شدند. بررسی‌ها نشان داد که سولفات مس می‌تواند باعث ضایعات هیستوپاتولوژیکی مانند اتساع شریان‌های لاملائی (آنوریسم) در آبشش و هم‌چنین بروز خون‌ریزی به خصوص در ورید مرکزی شود. در نهایت می‌توان نتیجه گرفت که فلز مس به‌عنوان یک فلز سنگین دارای اثرات مخربی بر روی اندام‌های حیاتی ماهیان می‌باشد که میزان این اثرات مخرب در مقایسه گونه‌های مختلف ماهیان،متفاوت است.

کلمات کلیدی: ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، سولفات مس، آبشش، کبد، هیستوپاتولوژی

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: lotfi_zp@yahoo.com

مقدمه

آلودگی اکوسیستم‌های آبی روز به روز در حال افزایش است.از جمله این آلودگی‌ها، فلزات سنگین هستندکه از منابع طبیعی و غیرطبیعی به‌طور پیوسته وارد اکوسیستم آبی می‌شوند (شاپوری، ۱۳۸۲) و به‌دلیل مسمومیت در زنجیره غذائی موجودات زنده، تهدیدی جدی برای اکوسیستم به‌شمار می‌روند (Eisler، ۱۹۸۸).

فاضلاب‌های صنعتی، شهری و پساب‌های کشاورزی هر کدام حاوی مقادیری فلزات سنگین هستند که این مواد پس از ورود به اکوسیستم‌های آبی موجب آلودگی و تجمع در بدن موجودات آبزی می‌شوند. آبزیان به‌طور طبیعی در معرض تماس با تعداد زیادی از فلزات قرار دارند که ترکیب شیمیای و غلظت آن‌ها می‌تواند از تغییرات شیمیائی پوسته زمین و هم‌چنین چگونگی برخورد بشر با طبیعت متأثر شود. یکی از مهم‌ترین آلاینده‌ها عنصر مس است که قادر به تجمع در بافت‌های آبزیان می‌باشد (Boudou و Ribayer، ۱۹۸۹). عنصر سنگین مس قادر است تغییراتی در بیوشیمی، آناتومی، فیزیولوژی و رفتار موجود زنده ایجاد نماید و در سطح سلولی مانع از فعالیت پمپ‌های سدیم- پتاسیم گردد (Lauren و Mcdonald، ۱۹۸۷) و باعث پراکسیداسیون لیپیدها و تغییر در فعالیت آنزیم‌های متأثر از مس گردد (Baker، ۱۹۹۸).

مس یکی از عناصری است که برای ماهی سمی می‌باشد ولی ترکیب آن در پرورش ماهی، برای از بین بردن جلبک‌ها و هم‌چنین در پیشگیری و درمان برخی از بیماری‌های ماهی به‌کار می‌رود (اسبودا و همکاران۱۳۷۴). یکی از ترکیبات مس، به‌صورت سولفات مس می‌باشد که برای ماهیان بسیار سمی است و سمیت آن برای ماهی، بستگی به گونه ماهی و خصوصیات فیزیکی و شیمیائی آب دارد (Pimentel، ۱۹۷۱). حتی مقادیر بسیار کم این ماده اثرات تخریبی بر روی ماهی‌ها دارد (U.S. Environmental Protection Agency، ۱۹۸۶). استفاده مستقیم سولفات مس در آب، می‌تواند جمعیت گونه‌های گیاهی، بی‌مهرگان و ماهی‌ها را کاهش دهد (U.S. Environmental Protection Agency، ۱۹۸۶). تحقیقات دیگر نیز ثابت کرده است که میزان سمیت سولفات مس برای ماهیان، با افزایش سختی آب کاهش می‌یابد (Gangstad، ۱۹۸۶).

در این پژوهش با توجه به استفاده مداوم از سولفات مس در استخرهای پرورش ماهی و تأثیرات آن بر روی بافت‌های گوناگون ماهیان،تأثیر آن بر روی بافت‌های حساس و حیاتی آبشش و کبد بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد بررسی و سنجش قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در زمستان سال ۱۳۸۸ در آزمایشگاه دانشگاه پیام نور استان قم انجام گرفت و هدف از آن مشاهده اثرات سمیت حاد سولفات مس طی ۹۶ ساعت در آب شهری استان قم بر بافت آبشش وکبد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) می‌باشد. ابتدا آکواریوم‌هایی با گنجایش ۱۵۰ لیتر تهیه، شستشو و آماده گردید. تعداد ۱۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با وزن ۲۰۰-۱۸۰ گرمی در هر آکواریوم قرار داده شد. سختی آب آکواریوم‌ها ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر کربنات‌کلسیم اندازه‌گیری شد و دمای آب ۱±۱۹ درجه سانتی‌گراد و pH حدود ۷ محاسبه گردید. به‌مدت ۴۸ ساعت ماهیان در این آب سازگار شدند. در این مدت هوادهی از طریق پمپ‌های هواده انجام شد.

۲۴ ساعت قبل از اضافه نمودن سولفات مس به آب، غذادهی قطع گردید. برای بررسی بافت آبشش و کبد از ۴ آکواریوم که هر کدام حاوی۱۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بود، استفاده شد. یکی از این آکواریوم‌ها به‌عنوان شاهد و بدون حضور سولفات مس در نظر گرفته شد و به ۴ آکواریوم دیگر غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۴ و ۰/۸ میلی‌گرم در لیترسولفات مس اضافه شد. پس از اضافه نمودن سولفات مس در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از آن، ماهی‌ها به‌ترتیب خارج شده، تشریح شدند.

کبد و آبشش ماهیان خارج شد و در ظرف حاوی فرمالین ۱۰ درصد بافر شده قرار داده شد. نمونه‌ها به‌منظور آب‌گیری به‌ترتیب در الکل‌های ۵۰٪،۷۰٪،۹۰٪ و الکل مطلق به‌مدت ۱ ساعت قرار گرفتند. پس از آن به‌مدت ۱ ساعت در زایلین شفاف‌سازی شدند. در مرحله نفوذ و آغشتگی، نمونه‌ها به‌مدت ۲ ساعت در حمام پارافین مرک مذاب با دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و قالب‌گیری شده و توسط میکروتوم دوار مدلKEDEE 1508 برش‌هایی به ضخامت‌های ۵ میکرون تهیه شد. مراحل رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین انجام شد. به این صورت که لام‌ها به‌ترتیب در مواد زیر قرار گرفتند: دو ظرف زایلین هر کدام ۴-۳ دقیقه، درجات پائین آورنده الکل (الکل مطلق،۹۰٪ و ۷۰٪) برای ۳۰ تا۶۰ ثانیه برای هر

کدام، شستشو در آب مقطر، رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین به مدت ۵-۳ دقیقه، شستشو در آب جاری ،اسلایدها به‌سرعت در اسید کلریدریک ۵٪ وارد و خارج شدند، الکل ۷۰٪ به مدت ۵ دقیقه، رنگ‌آمیزی در ائوزین به مدت ۴ -۳ دقیقه، الکل‌های ۹۰٪ و مطلق هر کدام به‌مدت ۳۰ ثانیه تا ۱ دقیقه، دو ظرف زایلین هر کدام به مدت ۵ دقیقه، قبل از خشک شدن مقاطع، زایلین اضافی خارج شد و سپس لام‌ها با استفاده از چسب انتلان مرک آلمان، روی لام چسبانده شد. سپس از لام‌های‌تهیه شده توسط میکروسکوپ مجهز به دوربین عکس‌برداری شد.

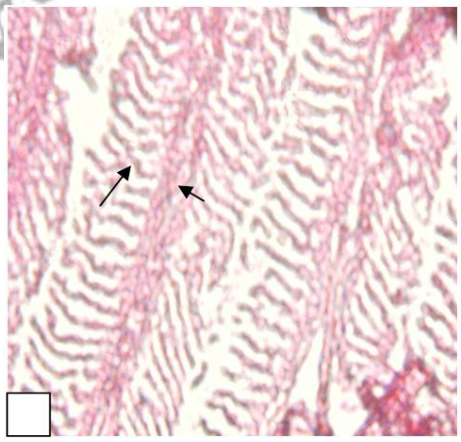
نتایج

بررسی بافت‌شناسی آبشش

بررسی بافت‌شناسی آبشش ماهیان شاهد و مقایسه آن با آبشش ماهیانی که تحت تأثیر غلظت‌های ۰/۲، ۰/۴، ۰/۸ میلی‌گرم سولفات مس قرار داشتند نشان‌دهنده این بود که در غلظت ۰/۲ و۰/۴ تفاوت چندانی با ماهیان شاهد در بافت مذکور دیده نشد (شکل ۱).

شکل۱: مقطعی از بافت آبشش گروه شاهد- a:لاملای اولیه - b: لاملای ثانویه

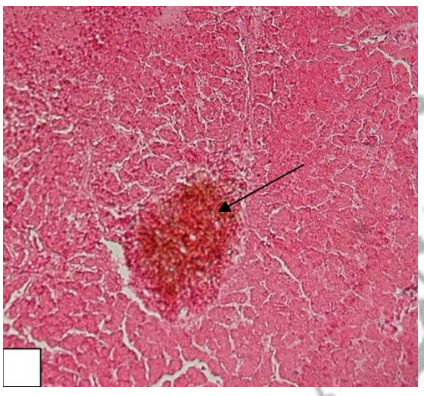
مورفولوژی و بافت‌شناسی آبشش در نمونه شاهد شبیه به سایر ماهیان استخوانی بود. تعداد زیادی تیغه آبششی ثانویه در طرفین تیغه‌های آبششی اولیه قرار گرفته بود. تیغه‌های آبششی اولیه ازغضروف، رگ‌های خونی و بافت پوششی چند لایه تشکیل شده بود .سلول‌های پهن سنگفرشی خارجی‌ترین لایه تیغه آبششی اولیه را تشکیل داد. در میان لاملاها، تیغه اولیه از چند لایه سلولی با انواع مختلف تشکیل شده بود که شامل سلول‌های کلراید، موکوسی و سنگفرشی بود. در غلظت ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر سولفات مس در پایان ۹۶ ساعت ضایعات هیستوپاتولوژیکی در آبشش به‌صورت اتساع شریان‌های لاملائی (lamellar aneurisms) مشاهده گردید (شکل۲).



شکل۲: مقطعی از بافت آبشش گروه با تیمار ۰/۸ میلی‌گرم در لیترسولفات مس (۹۶ساعت)- فلش‌ها: اتساع شریان لاملایی

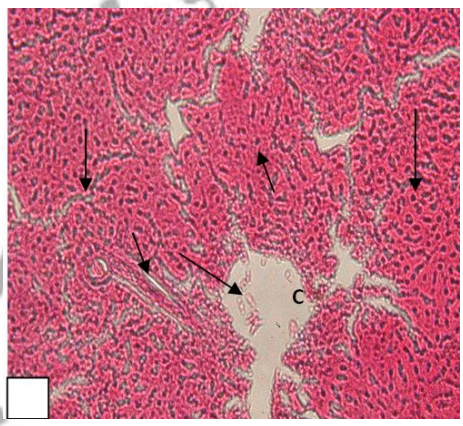
بررسی بافت شناسی کبد

بررسی بافت شناسی کبد ماهیان شاهد و مقایسه آن با کبد ماهیانی که تحت تأ ثیر غلظت‌های ۰/۲، ۰/۴، ۰/۸ میلی‌گرم سولفات مس قرار داشتند نشان‌دهنده این بودکه در غلظت ۰/۲ و۰/۴ تفاوت چندانی با ماهیان شاهد در بافت مذکور دیده نشد. (شکل ۳)



شکل۳: مقطعی از بافت کبد گروه شاهد- H: هپاتوسیت، S: سینوزوئید،CV : ورید مرکزی

در نمونه شاهد بیش‌تر بافت کبد توسط هپاتوسیت یا سلول‌های کبدی اشغال شده بود. هپاتوسیت‌ها دارای ساختارپلی گنال بودند، به‌صورت طبیعی بازوفیل بوده و سیتوپلاسم یکنواخت دارند. غشاء سلولی هپاتوسیت‌ها به‌خوبی قابل تشخیص است. در کبد ماهیان تحت تاثیر غلظت ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر سولفات مس در پایان ۹۶ ساعت ضایعاتی مانند خون‌ریزی به‌خصوص در ورید مرکزی دیده شد. (شکل۴)



شکل ۴: مقطعی از بافت کبد گروه با تیمار ۰/۸ میلی‌گرم در لیترسولفات مس (۹۶ساعت)- فلش: خونری‌زی در ورید مرکزی (بزرگنمائی‌ها ۴۰ می‌باشد)

بحث

با توجه به این‌که تغییرات فلزات سنگین در محیط آبی اثرات سوء زیستی قابل‌توجهی را بر روی موجودات آبزی به‌ویژه انواع ماهی‌ها پدیده آورده و با عنایت به تسلسل زنجیرهای غذائی ثبات و پایداری فلزات سنگین در بدن موجودات زنده و انتقال آن به حلقه‌های بعدی زنجیره غذائی، تأثیر فلزات سنگین در حیات موجودات آبزی حائز اهمیت است.

تغییرات بافت‌شناسی در اثر محرک‌های داخلی و خارجی ایجاد می‌شود که در هر صورت در نتیجه آشفتگی در سطح مولکولی سازمان‌دهی زیستی رخ می‌دهد. بنابراین بررسی بافت‌شناسی یک پارامتر جامع است که به‌صورت کامل وضعیت سلامت ماهی را مشخص می‌کند و می‌تواند تجمع ماده آلاینده را بیش از حد نرمال در محیط‌زیست دریایی مشخص نماید (Vander Oost و همکاران، ۲۰۰۳). بنابراین پارامترهای

بیولوژیکی قادرند اثرات سمی آلاینده‌ها را مشخص کنند.

اثر مس که به‌صورت سولفات مس که به‌عنوان جلبک‌کش به‌کار برده می‌شود بر روی آبشش‌ها تا سه برابر بیش‌تر از سایر فلزات سنگین گزار ش شده است (Carbonell و Tarazona، ۱۹۹۳). ماهیان جوان نسبت به ماهیان بالغ حساسیت بیش‌تری به فلزات سنگین دارند، به‌همین دلیل ماهیان جوان برای بررسی تاثیرات فلزات سنگین مناسب‌تر می‌باشند (Akaheri، ۱۹۹۹).

آبشش‌ها نه‌تنها اندام‌های اصلی تبادلات گازی در ماهیان هستند و در تنظیم اسمزی و اعمال دفعی ماهیان نقش دارند، بلکه نقش قابل ملاحظه‌ای در جذب مواد (حتی فلزات) ضروری و غیرضروری از آب را برعهده دارند. پس از جذب فلزات سنگین توسط آبشش‌ها این فلزات در تمامی بدن پراکنده شده و در اندام‌های به‌خصوصی نظیر کبد و کلیه تجمع می‌یابند.

در پژوهش حاضردر آبشش‌های گروه با غلظت ۰/۸میلی‌گرم در لیتر سولفات مس، پرخونی (فراوانی و احتباس اریتروسیت‌ها در رگ)، خون‌ریزی (در اثر پارگی رگ)، آماس و آنوریسم (ایجاد حوضچه‌های خونی در اثر از بین رفتن سلول‌های پیلار) به‌طور خفیف دیده شد. این تغییرات در ۲۴ ساعت اول ضعیف بوده و با گذشت زمان تا ۹۶ ساعت شدت یافتند.

افزایش ترشحات مخاطی به‌عنوان حفاظی در محدود کردن دسترسی سموم به سطح آبششی می‌باشند ولی افزایش آن ممکن است با مسدود کردن تبادل گازهای تنفسی منجر به خفگی گردد (پوستی، ۱۳۷۸) که این مورد به‌صورت خفیف دیده شد.

کبد اندام حیاتی است که نقش مهمی در متابولیسم و دفع مواد زائد شیمیایی و فلزات سنگین ایفاء می‌کند و غلظت این مواد سمی در کبد بیش‌تر از سایر اندام‌های بدن است. بنابراین سلول‌های کبدی اولین هدف مواد سمی هستند و بیو مارکر عالی جهت بررسی آلودگی‌های محیط آبی می‌باشند (Braun beck و همکاران، ۱۹۹۰). در بسیاری از پژوهش‌های انجام شده، اثر سولفات مس روی کبد ماهی به‌صورت نکروز، واکوئله شدن هپاتوسیت‌ها و تغییرات هسته (کوچک شدن، تکه‌تکه شدن و از بین رفتن)، احتقان یا پرخونی عروق، هجوم لنفوسیت‌ها به بافت کبدی و بافت همبند خارج کبدی بوده است. در پژوهش حاضر، در کبد ماهیان تحت تاثیر غلظت ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر سولفات مس در پایان ۹۶ ساعت ضایعاتی مانند خونریزی به‌خصوص در ورید مرکزی به‌وضوح دیده شد که نشان‌دهنده شدت اثرپذیری کبد از سولفات مس است.

هم‌چنین در مطالعه‌ای روی بچه‌ماهیان کپور در غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر سولفات مس طی ۹۶ ساعت نمونه‌ها تلف شدند، در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر سولفات مس، این تلفات در ۴۸ ساعت پس از شروع آزمایش رخ داده است (عتباتی و همکاران، ۱۳۸۸) که با توجه به نتایج آزمایش کنونی به‌نظر می‌رسد حساسیت قزل‌آلا نسبت به سولفات مس بسیار بیش‌تر از گونه کپور می‌باشد.

منابع:

۱. **اسبودا، ف.؛ ویکسوا، ب. و شریف‌روحانی، م.، ۱۳۷۴.** تشخیص و درمان بیماری‌ها و مسمومیت‌های ماهی. معاونت تکثیر و پرورش آبزیان شیلات ایران، تهران. ۱۳۵ صفحه.

۲. **پوستی، ا. و صدیق‌مروستی، ع.، ۱۳۷۸.** اطلس بافت‌شناسی ماهی. انتشارات دانشگاه تهران. ۳۲۸۱ صفحه.

۳. **شاپوری، م.، ۱۳۸۲.** بررسی اثرات حاد فلز مس و تعیین LC50 و تغییرات ایجاد شده در بافت گناد، عضله و کبد ماهی کپورمعمولی. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال. ۱۷۷ صفحه.

4. **Akaheri, A. and Jozwiak, z., 1999.** Effect of Zinc on Common Carp (*Cyprinus carpio*) erythrocytes, Elsevier Science. Inc.16-17
5. **Baker, R.T.M., 1998.** Chronic dietary exposure to copper effects growth, tissue lipid peroxidation, and metal composition of the grey mullet, *Chelon labrosus*. Mar. Environ. Res. 45:357-365.
6. **Boudou, A. and Ribayreb, F., 1989.** Fish as biological model for experimental studies in ecotoxicology. Aquatic Ecotoxicology, fundamental concepts and methodology, vell. CRC press Boca Raton.USA. pp: 127-162.
7. **Braun beck, T.; Starch, V. and Brash, H., 1990**. Species-specific reaction of liver ultra-structure in zebra fish (*Brachydanio* rerio) and trout (*Salmo gairdneri*) after people exposure to 4-chloroaniline. Arch. Environ. Contam. Toxicol.19:405-418.
8. **Carbonell, G. and Tarazona, J.V., 1993.** A proposed method to diagnose. Sci. Acute copper poisoning in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Total Environ. Suool. 1993:1329-1334.
9. **Eisler, R., 1998.** Zinc hazard to fish. Wildlife and invertebrates: asynoptic reviw. US fish wildlife serve. Rep. 1: 85.

10. **Gangstad, E.O., 1986.** Freshwater vegetation management. Fresno, CA: Thomson Publications.
11. **Lauren, D.J. and Mcdonald, D.G., 1987.** Acclimation to copper by rainbow Trout, Salmo gairdneri: biochemistr. Can. J. fish. Aqut. Sci. 44:105-111
12. **Pimentel, D., 1971**. Ecological effects of pesticides on nontarget species. Executive Office of the President's Office of Science and Technology. Washington, DC: U. S. Government Printing Office.
13. **U.S. Environmental Protection Agency. 1986** Guidance for reregistration of pesticide products containing copper sulfate. Fact sheets no 100. Office of Pesticide Programs. Washington, DC.
14. **-Vander Oost, R.; Beber, J. and Vermeulen, N.P.E., 2003.** Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review Environmental Toxicology and Pharmacology. 13:57-149.

Toxic effect of copper sulfate on gill and liver tissue of *Oncorhynchus mykiss*

- **Zolphaghar Lotfi*:** Department of Biology, Faculty of Basic Science, Payam Noor University, Qom branch, P.O. Box: 311-37185, Qom, Iran
- **Sadigheh Borhani:** Department of Biology, Faculty of Basic Science, Payam Noor University, Qom branch, P.O. Box: 311-37185, Qom, Iran
- **Shahla Jamili:** Iranian Fisheries Research Organization, P.O. Box: 14155-6116, Tehran, Iran
- **Azadeh Kadkhodaei:** Department of Biology, Faculty of Basic Science, Payam Noor University, Qom branch, P.O. Box: 311-37185, Qom, Iran

Received: October 2012 Accepted: January 2013

Key words: histopathological changes, *Oncorhynchus mykiss*, copper sulfate

Abstract

Copper is one of trace elements which is essential for enzymatic reactions and is toxic to fish. But its compounds use for algae control and for prevention and treatment of fish disease. In this study, the effects of copper toxicity (copper sulfate) on gill and liver tissues of *Oncorhynchus mykiss*, were evaluated. 4 aquariums containing ten fish were used. One aquarium as control group and 3 others exposed to 0.2, 0.4 and 0.8 mg/l copper sulfate. Tissue samples were obtained 24, 48, 72, 96 hours after copper sulfate exposure and processed by Hematoxyline- Eosin staining method. The main histopathological changes observed were lamellar aneurisms in gill tissue and bleeding in central vein of liver tissue. These results suggest that exposure to copper as a heavy metal, has toxic effect on vital organs of fish. These toxic effects are various in different species.

* Corresponding author's email: lotfi_zp@yahoo.com