14(2) 177-184, Summer 2022

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

Determination of MATC and LOEC of ZnSO4 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Emphasis by tissue lesion

Mohamad Farhangi* *, Hojatollah Jafaryan, Ziae Kordjazi

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

Key Words

Zinc sulphate
Acute toxicity
Mortality percentage
Oncorhynchus mykiss

Abstract

Introduction: The aim of this study conducted in Gonbad Kavous aquaculture laboratory was to determine MATC and LOEC of ZnSO4 in fish using tissue lesion examinations.

Materials & Methods: To do this, rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles (6.18±1.33 g) were exposed zinc sulphate over 96 hours (in December 2021). Zinc sulphate salt was used to examine toxicity of zinc.

Results: The lethal dose of zinc for *Oncorhynchus mykiss* was 21 mgL-1 over 96 hours. According to the linear regression and relationship between the percentage of mortality and different concentrations of zinc, the LC50 (median lethal dose) was obtained 11.54 mgL-1 for *Oncorhynchus mykiss*. However, acute toxicity of zinc sulphate showed that mortality was directly proportional to the concentration of the zinc sulphate, whilst there was no mortality in the control treatment. No behavioral changes were observed in control treatment over the experiment. Microscopic studies showed that the common lesions of gill in fish exposed to zinc lethal concentration were hyperplasia, edema, hyperemia, hemorrhage and expansion of secondary lamellae.

Conclusion: Therefore, the results and information obtained in this study can be applicable in ecological risk assessment studies.

* Corresponding Author's email: s.farhangi@yahoo.com
Received: 22 May 2021; Reviewed: 25 June 2021; Revised: 29 August 2021; Accepted: 1 October 2021
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.304059.2633

مقاله پژوهشی

تعیین حداکثر و حداقل غلظت مجاز سولفات‌روی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با تاکید بر آسیب‌شناسی بافتی

محمد فرهنگی*، حجت‌اله جعفریان، ضیاء کردجزی

گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه دانشگاه گنبدکاووس، گنبدکاووس، ایران

کلمات کلیدی

سولفات روی
سمیت حاد
درصد مرگ و میر
قزل‌آلای رنگین‌کمان

چکیده

مقدمه: هدف از مطالعه حاضر تعیین حداکثر و حداقل غلظت مجاز سولفات‌روی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با تاکید بر آسیب‌شناسی بافتی در مدت ۹٦ ساعت (زمستان ۱۳۹۹) در آزمایشگاه آبزی‌پروری دانشگاه گنبدکاووس اجرا شد.

مواد و روش‌ها: از نمک سولفات‌روی جهت سمیت روی در آزمایشات استفاده شد. ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با سایز ۱/۳۱±٦/۱۸ گرم انتخاب شدند.

نتایج: غلظت کشنده سولفات‌روی برای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در مدت ۹٦ ساعت برابر ۲۱ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمد. براساس شیب خط رگرسیون و منحنی درصد تلفات ماهی در غلظت‌های مختلف مورد استفاده برای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان غلظت نیمه‌کشنده برابر ۱۱/٥٤میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمد. به هرحال نتایج حاصل از سمیت‌حاد سولفات‌روی نشان داد، نرخ مرگ و میر به‌طور مستقیم وابسته به غلظت‌های استفاده شده از سولفات‌روی، درحالی‌که در گروه شاهد مرگ و میری مشاهده نشد. در گروه شاهد تغییرات رفتاری خاصی در طول آزمایشات دیده نشد. نتایج حاضر نشان داد، عمومی‌ترین ضایعات رخ داده شده در آبشش ماهیانی که در معرض غلظت کشنده روی قرار داشتند شامل هایپرپلازی، خون ریزی، پرخونی ، ادم و اتساع لاملاهای ثانویه بود.

بحث و نتیجه‌گیری: به‌طورکلی نتایج چنین آزمایشاتی جهت ارزیابی ریسک اکولوژیک بسیار مفید است.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: s.farhangi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱ خرداد ۱٤۰۰؛ تاریخ داوری: ٤ تیر ۱٤۰۰؛ تاریخ اصلاح: ۷ شهریور ۱٤۰۰؛ تاریخ پذیرش: ۹ مهر ۱٤۰۰
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.304059.2633

مقدمه

یکی از مهم‌ترین گونه پرورشی آزاد ماهیان، قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) است که بومی ایران نیست و تخم چشم‌زده آن از کشورهای مختلف وارد کشور شده و پرورش می‌یابد. امروزه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌صورت ماهی شماره یک اکثر کارگاه‌های تکثیر و پرورش ماهیان سردآبی در بیش‌تر نقاط جهان درآمده است. روی (Zinc) به‌عنوان یک عنصر ضروری برای رشد و نمو گیاهان نقش ساختاری و عملکردی فراوانی را در بسیاری از فرآیندهای متابولیکی دارد. هم‌چنین عنصر روی به‌عنوان یک فلز نادر در فرآیندهای متابولیسمی ماهی نقش دارد و می‌تواند به‌عنوان یک کوفاکتور آنزیم‌های مختلف از جمله آلکالین فسفاتاز، الکل دهیدروژناز، سوپراکسید دیسموتاز و کربونیک انیدراز عمل کند (۱). سطح طبیعی عنصر روی در ماهیان آب شیرین و آب شور به‌منظور پاسخگویی به نیاز رشد آبزی ناکافی گزارش شده است. از این‌رو این عنصر به‌عنوان ریزمغذی ضروری در تغذیه ماهیان مورد توجه قرار گرفته است و می‌تواند جهت تامین نیازهای غذایی ماهیان به جیره اضافه گردد (۱). عنصر روی در مقادیر بالاتر از نیاز زیستی برای آبزیان سمی است. افزایش سطوح روی در اکوسیستم‌های آبی می‌تواند بر اثر تخلیه پساب‌های صنعتی و رسوب روی از طریق اتمسفر، شستشوی فاضلاب‌های محلی و مواد زائد فعالیت‌های معدنی، آفت‌کش‌ها و فرآیندهای گالوانیزاسیون باشد (۲). اصولاً کبد، آبشش و کلیه محل مناسبی برای تجمع سموم و فلزات سنگین است و البته همه فلزات سنگین سمی نیستند و برخی از آن‌ها مانند آهن و روی ضروری نیز هستند. این تعریف ممکن است در مواردی شامل عناصر کمیاب باشد که در دوزهای غیرطبیعی زیاد ممکن است سمی باشند. فلزات سمی می‌توانند در اندام‌ها و ساختارهای بدن موجود قرار بگیرند و آن‌ها را دچار اختلال کنند. به‌عنوان مثال، فلز رادیواکتیو رادیوم می‌تواند در ساختار استخوان، در کنار کلسیم قرار بگیرد (۳). آزمون‌های زیست‌سنجی روش موثری در ارزیابی میزان سمیت فلزات در آبزیان است که در علم سم‌شناسی مورد توجه قرار می‌گیرد. به‌طورکلی سمیت یک آلاینده از طریق سنجش زیستی ارزیابی می‌گردد که به‌وسیله آن غلظت لازم جهت ایجاد تلفات نیمی از موجودات مورد آزمایش در یک دوره زمانی مشخص (کوتاه مدت و بلندمدت) معلوم می‌شود (۴). در این رابطه ماهی یکی از مهم‌ترین موجودات آبزی است که به‌علت ارزش اقتصادی و حساسیت در مقابل آلاینده‌ها از اهمیت خاصی برخوردار هستند، به‌همین دلیل جهت انجام آزمایش‌های زیست‌سنجی در بعد وسیعی از آن‌ها استفاده می‌گردد. مطالعات محدودی بر روی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان با فلز روی صورت گرفته است که هرکدام از جنبه خاصی مورد توجه بوده است (۵، ۶، ۷). Besser و همکاران، حساسیت دو گونه ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Onchorhynchus* mykiss) و ماهی کوتوس (*Cottus bairdi*) را نسبت به مس، روی و کادمیوم مورد ارزیابی قرار دادند. براساس نتایج حساسیت گروه‌های تازه هچ شده در سمیت‌حاد و نیمه‌حاد بیش‌تر بود تا مراحل بالاتر. ضمن این‌که ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان حساسیت بیش‌تری نسبت به گونه کوتوس نشان داد (۸). Calfee و همکاران، به بررسی سمیت حاد مس، روی و کادمیوم در مراحل مختلف رشدی دو گونه قزل‌الای رنگین کمان (*Onchorhynchus mykiss*) و استروژن سفید (*Acipenser transmontanus*) پرداختند. آن‌ها بیان کردند که قزل‌آلای رنگین‌کمان نسبت به کادمیوم در تمامی مراحل زندگی حساس‌تر از ماهی خاویاری سفید بود (۹). با توجه به حساسیت گونه‌های مختلف ماهی به مواد سمی، ضروری است تا آزمایش‌های سم‌شناسی برای ماهیان مختلف صورت گیرد. از طرفی بررسی دقیق ضایعات ناشی از مسمومیت با فلز روی بر بافت‌های ماهی، دلیل اصلی آزمایش حاضر بود که ضمن تعیین حداقل و حداکثر سمیت سولفات‌روی بر ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در مدت ۹۶ ساعت به آسیب‌شناسی بافت ماهی در مواجهه با مسمومیت روی می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

انتخاب ماهی: جهت انجام آزمایش از ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان پرورش یافته از کارگاه‌های پرورش ماهی استان گلستان (شهرستان رامیان) با میانگین وزنی ۱/۳۱ ±۶/۱۸ گرم استفاده شد. ۳۰۰ قطعه بچه‌ماهی بعد از انتقال به آزمایشگاه تکثیر و پرورش دانشگاه گنبد کاووس به‌منظور سازگاری با محیط، به‌مدت ۴۸ ساعت در ونیروهای پرورشی با گنجایش ۲۰۰ لیتر آب نگه‌داری شدند. ماهیان به‌مدت یک هفته به‌منظور صحت سلامت کامل تغذیه شدند.

آزمایش سمیت‌حاد: مدت زمان آزمایش برای هر گروه ۹۶ ساعت بود. در این مدت درصد تلفات و علائم مسمومیت ثبت گردید. آزمایش‌ها با استفاده از روش آب‌ساکن (Water Static Method) و براساس دستورالعمل استاندارد O.E.C.D صورت گرفت (۱۰). در پایان آزمایش غلظت‌های بی‌اثر NOEC (No Observed Effect Concentration)، کم‌اثر LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) و حداکثر غلظت مجاز MATC (Maximum Allowable Toxicant) تعیین شد (۱۱).

شرایط آزمایش: برای انجام آزمایش‌ها از تشت‌های پلاستیکی با گنجایش ۳۰ لیتر آب استفاده شد. در هر تشت آزمایشی تعداد ۱۳ قطعه بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان توزیع شدند. به‌منظور تامین اکسیژن لازم از سنگ‌هوا به‌عنوان هواده استفاده شد. میزان تولید

اکسیژن‌محلول هر سنگ هوا در ۲۴ ساعت معادل ۱/۹ میلی‌گرم در لیتر اندازه‌گیری شد. میزان اکسیژن‌محلول، پی‌اچ و دما در طول آزمایش ثابت بود. ماهیان ۲۴ ساعت قبل از آزمایش قطع غذادهی شدند و در طول مدت آزمایش تغذیه صورت نگرفت.

شرایط آزمایش: برای پیدا کردن محدوده کشندگی سولفات روی (Range Finding Test)، پس از یک‌سری مطالعات مقدماتی (۶، ۱۲). ابتدا غلظت‌های فرضی (۳۰، ۲۵، ۲۰، ۱۵، ۵، ۰ میلی‌گرم در لیتر) جهت برآورد میزان تلفات ماهی و شدت اثرپذیری ماهی در غلظت‌های نزدیک به آزمایش تعیین شد. سپس جهت انجام آزمایش، پس از تعیین حجم آب و به ازای واحد حجمی، سولفات‌روی توزین و به آب اضافه گردید. برای حل کردن سولفات‌روی در آب تشت، ابتدا آن‌را در بشر حل و سپس محلول حاصله به تشت آزمایش اضافه گردید، تا محلول یکنواختی به‌دست آید. پس از انجام آزمایش‌های مقدماتی و با احتساب صددرصدی تلفات ماهی در غلظت ۲۵ میلی‌گرم در لیتر در مدت ۲۴ ساعت، از نمک سولفات‌روی ($ZnSO_4, 5H_2O$) با غلظت‌های مختلف ۲۳، ۲۱، ۱۸، ۱۵، ۱۰، ۵، ۰ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد، به‌طوری که در این غلظت‌ها از صفر تا ۱۰۰ درصد تلفات ماهی مشاهده شد. غلظت صفر که بدون حضور سولفات‌روی بود به‌عنوان شاهد درنظر گرفته شد. حجم آب در طول آزمایش ثابت بود.

مطالعات بافت‌شناسی و رفتاری: تظاهرات رفتاری ماهی در برابر سمیت روی و آسیب‌های قابل مشاهده با چشم در طول آزمایش ثبت گردید. به‌منظور بررسی آسیب‌های ناشی از فلز روی بر بافت‌های ماهی، هر ۱۲ ساعت یک‌بار ماهیان مرده جمع‌آوری و در ظروف حاوی فرمالین ۱۰ درصد تا پایان آزمایش نگه‌داری شدند. در پایان ۹۶ ساعت، تمام ماهیان مورد آزمایش (زنده- مرده) که در معرض غلظت‌های مختلف سولفات-روی قرار داشتند، جمع‌آوری و در محلول فرمالین تثبت شدند. از نمونه‌های بافتی آبشش، کلیه و کبد فیکس شده در محلول فرمالین ۱۰درصد، پس از طی مراحل آب‌گیری، شفاف‌کردن و پارافینه کردن، با استفاده از میکروتوم دوار مقاطع ۵ میکرونی تهیه و به‌روش هماتوکسیلین ائوزین رنگ‌آمیزی شدند. نهایتاً با استفاده از میکروسکوپ نوری و کلیدهای موجود مورد مطالعه قرار گرفتند (۱۳).

روش آماری: آزمایش موردنظر در طرح کاملاً تصادفی متعادل (۶×۳) صورت گرفت. ابتدا نرمال بودن داده‌ها به‌کمک آزمون Shapiro wailk بررسی و سپس به‌منظور تعیین غلظت نیمه‌کشنده از نرم‌افزار پروبیت (Probite) و جهت رسم منحنی شیب خط رگرسیون از نرم‌افزار Spss نسخه ۱۵ استفاده شد.

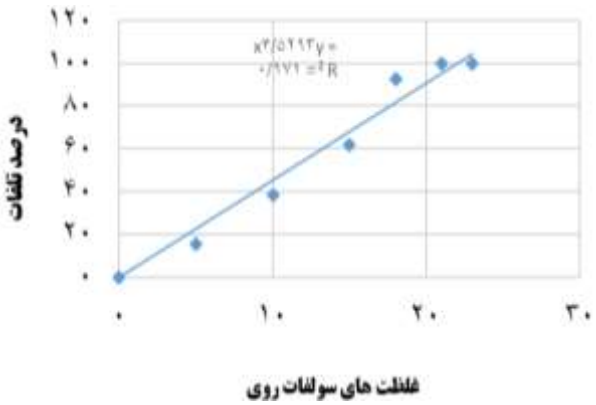
نتایج

نتایج حاصل از در معرض قرارگیری ماهی با سولفات‌روی: درصد بقاء و تلفات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در مواجهه با غلظت‌های مختلف سولفات‌روی در جدول ۱ آمده است. براساس جدول فوق، افزایش مقادیر روی به تشت‌های آزمایشی میزان تلفات ماهی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($p<0/05$). با این حال صددرصد تلفات ماهی در تیمارهای ۵ و ۶ رخ داد. نتایج حاصل از آزمایش نشان داد که کم‌ترین غلظتی که سبب تلفات در ماهی شد برابر ۵ میلی‌گرم در لیتر برای مدت ۹۶ ساعت به‌دست آمد (LOEC)(جدول ۱). همان‌طوری‌که در جدول مشخص است با افزایش غلظت روی میزان درصد تجمعی تلفات ماهی نیز افزایش معنی‌داری داشت، به‌طوری‌که در غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر میزان تلفات ماهی بعد از گذشت ۹۶ ساعت برابر با ۲ قطعه (۱۵/۳۸ درصد) و با افزایش دو برابری غلظت سولفات روی به‌میزان ۱۰ میلی‌گرم لیتر بعد از گذشت ۹ ۶ ساعت به ۵ قطعه (۳۸/۴۶ درصد) رسید. هم‌چنین تلفات کامل ماهی در غلظت‌های ۲۳ و ۲۱ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمد. با این‌حال غلظت ۲۳ میلی‌گرم در لیتر سبب تلفات صددرصدی در همان ۲۴ ساعت اول شد (جدول ۱).

جدول ۱: نتایج حاصل از قرارگرفتن ماهی در معرض غلظت‌های مختلف سولفات‌روی (تعداد ماهی ۱۳ عدد، اکسیژن محلول ۱/۲±۶/۹، دمای آب ۱±۱۵ و پی‌اچ ۰/۱۵±۷/۸)

تیمار مورد آزمایش	غلظت سولفات‌روی (میلی‌گرم درلیتر)	تعداد تلفات				درصد تلفات تجمعی بعد از ۹۶ ساعت
		بعداز ۲۴ ساعت	بعداز ۴۸ساعت	بعداز ۷۲ساعت	بعداز ۹۶ ساعت	
شاهد	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۱	۵	۰	۰	۱	۱	۱۵/۳۸
۲	۱۰	۲	۱	۱	۱	۳۸/۴۶
۳	۱۵	۴	۲	۲	۰	۶۱/۵۴
۴	۱۸	۷	۴	۰	۱	۹۲/۳۱
۵	۲۱	۱۰	۰	۲	۱	۱۰۰
۶	۲۳	۱۳	۰	۰	۰	۱۰۰

نتایج حاصل از آزمایش ثابت کرد میزان تلفات ماهی در غلظت‌های بالاتر بیش‌تر است. با این‌حال در تمامی تیمارها میزان تلفات ماهی در ۲۴ ساعت اولیه بیش‌ترین میزان را داشته است، گرچه در نهایت درغلظت ۲۱ میلی‌گرم درلیتر در تمامی گروه‌ها تلفات تجمعی ۱۰۰ درصد بوده است (جدول ۱). با توجه به منحنی شیب خط رگرسیون و درصد تلفات ماهی در غلظت‌های مختلف سولفات‌مس، معادله خط به‌صورت Y= x۵۲۹۳/۴ به‌دست آمد. از آن‌جاکه میزان R2 بالا و برابر ۹۷ درصد است، می‌توان با این معادله میزان غلظت نیمه‌کشنده را به‌دست آورد (شکل ۱). بااین‌حال براساس نتایج حاصل از جدول پروبیت، غلظت نیمه‌کشنده (LC50,96h) روی برابر با ۱۱/۵۴میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمد (جدول ۲).



شکل ۱: منحنی رگرسیون درصد تلفات ماهی درمعرض غلظت‌های مخلتف روی بعد از گذشت ۹۶ ساعت تحت شرایط آزمایشی

جدول ۲: غلظت‌کشنده (LC 10-95) با حدود اطمینان ۹۵٪ در طی زمان ۹۶ ساعت

LC	غلظت‌کشنده	حدود اطمینان	
		حدپایین	حدبالا
LC10	۵/۱۳۵	۰/۷۷۹	۷/۶۱۲
LC20	۷/۳۳۶	۳/۹۰۱	۹/۴۵۴
LC30	۸/۹۲۳	۶/۰۷۶	۱۰/۸۵۷
LC40	۱۰/۲۷۹	۷/۸۵۵	۱۲/۱۳۷
LC50	۱۱/۵۴۷	۹/۴۲۴	۱۳/۴۲۶
LC60	۱۲/۸۱۴	۱۰/۸۸۳	۱۴/۸۲۶
LC70	۱۴/۱۷۱	۱۲/۳۱۶	۱۴/۶۵۰
LC80	۱۵/۷۵۸	۱۳/۸۵۰	۱۸/۴۹۶
LC90	۱۷/۹۵۹	۱۵/۷۹۹	۲۱/۵۱۰
LC95	۱۹/۷۹۹	۱۷/۳۱۶	۲۴/۰۹۲
LC99	۲۳/۱۸۷	۲۰/۰۴۵	۲۹/۰۵۱

نتایج حاصل از مطالعات آسیب‌شناسی و تظاهرات رفتاری:

علائم مسمومیت با رفتار غیرطبیعی ماهی شامل افزایش فعالیت، افزایش تحریک‌پذیری، شنای با شتاب و بی‌هدف در جهات مختلف و در مسیرهای کوتاه، عدم تعادل و قرارگرفتن ماهی به پشت و فرو رفتن ماهی در عمق آب، انقباض شدید عضلات و به‌دنبال آن ایجاد انحنای ستون‌فقرات و بالاخره مرگ همراه بود. این رفتارهای غیرطبیعی در ماهی با هوادهی و اکسیژن‌رسانی آب به تأخیر افتاد. در بررسی ضایعات بافتی ناشی از سمیت فلز روی ضایعات بافتی در آبشش‌ها به‌صورت پرخونی، خون‌ریزی و چماغی شدن رشته‌های آبششی بروز کرد. در گروه‌هایی که در معرض غلظت‌های بالایی از فلز روی قرار گرفته بودند ضایعات با شدت بیش‌تری دیده شد. در آبشش ماهیان شاهد موارد خفیفی از هایپرپلازی دیده شد (شکل‌های ۲، ۳ و۴). علایم مشاهده شده در بافت کلیه ماهیانی که در معرض غلظت کشنده روی قرار داشتند به‌صورت خونریزی، نفوذ فراوان سول‌های آماسی، تخریب مجاری کلیوی و گلرمرول‌ها بود (شکل‌های ۵ و ۶). در بافت کبد نیز نکروز سلول‌های کبدی، خون‌ریزی و پرخونی به وضوح دیده شد. علاوه بر آن مرزنشینی هسته‌ها یا به‌عبارت دیگر حرکت هسته از مرکز به مجاورت دیواره‌سلولی به‌وضوح خصوصاً در غلظت‌های بالا مشهود بود (شکل ۷و ۸). براساس جدول ۳ میزان تخریب و ضایعات ناشی از مسمومیت حاد با فلز روی در غلظت‌های مختلف مشخص شده است.

جدول ۳: ضایعات مشاهده شده در بافت‌های آبشش، کلیه و کبد ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان پس از ۹۶ ساعت قرارگیری در معرض فلز روی

الف- ضایعات مشاهده شده در آبشش

غلظت روی (میلی‌گرم در لیتر)	ادم	پرخونی	خون‌ریزی	چماغی‌شدن	فیوژن	هایپرپلازی
شاهد	-	-	-	-	-	+
۵	-	+	-	-	-	+
۱۰	+	+	+	++	++	++
۱۵	+++	+++	+++	+++	+++	+++
۱۸	+++	+++	+++	+++	+++	+++
۲۱	+++	+++	+++	+++	+++	+++

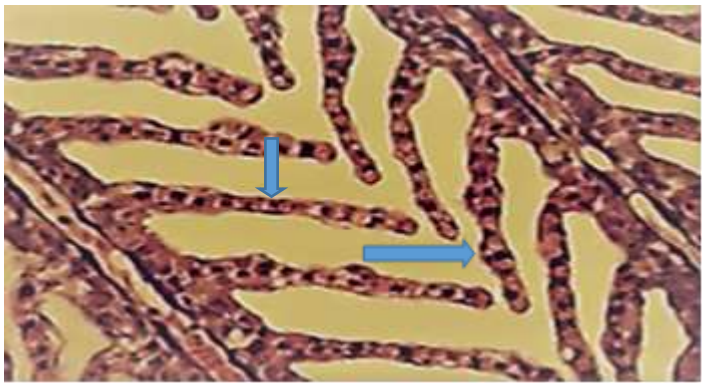
ب- ضایعات مشاهده شده در کلیه

غلظت روی (میلی‌گرم در لیتر)	تخریب مجاری	تخریب گلومرل	خون‌ریزی	نفوذ سلول‌های آماسی
شاهد	-	-	-	-
۵	-	-	+	+
۱۰	+	+	++	++
۱۵	+++	+++	+++	+++
۱۸	+++	+++	+++	+++
۲۱	+++	+++	+++	+++

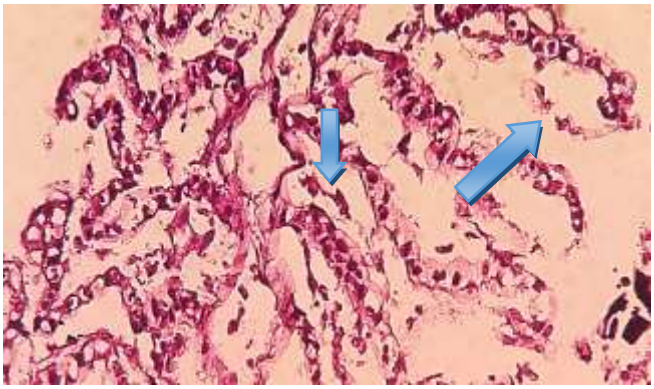
ج- ضایعات مشاهده شده در کبد

غلظت روی (میلی‌گرم در لیتر)	نکروز	خون ریزی	رکود صفرا	مزرنشینی هسته
شاهد	-	-	-	-
۵	-	+	-	-
۱۰	+	++	+	+
۱۵	+++	+++	++	++
۱۸	++	+++	+++	+++
۲۱	+++	+++	+++	+++

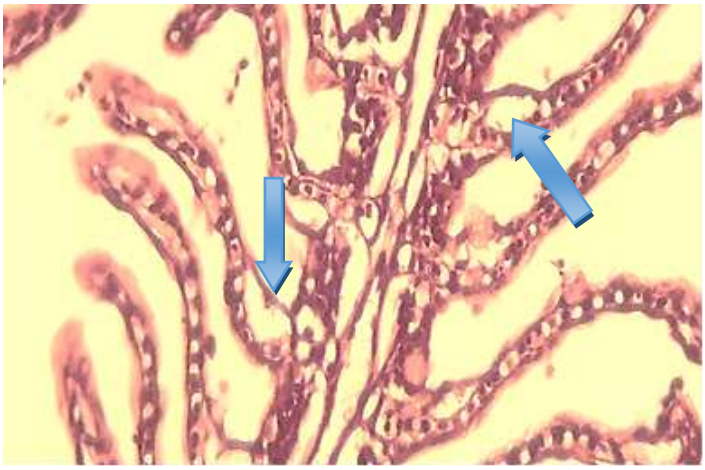
(-): بدون آسیب در بافت؛ (+): آسیب ۲۰٪> ؛ (++): آسیب‌های ۶۰-٪۲۰؛ (+++): آسیب‌های ۶۰٪<



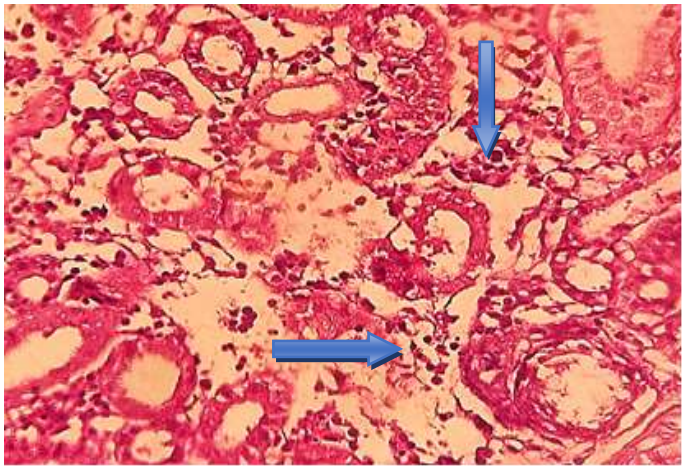
شکل ۲: مقطع تهیه شده از آبشش ماهیانی گروه شاهد. نوک پیکان لاملای اولیه و ثانویه سالم را نشان می‌دهد (رنگ‌آمیزی H&E، بزرگ‌نمایی ۴۰۰)



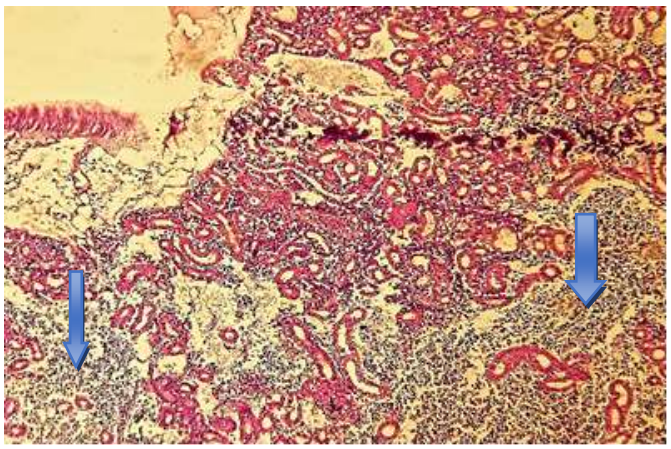
شکل ۳: مقطع تهیه شده از آبشش ماهیانی که درمعرض غلظت‌کشنده روی قرار داشتند. نوک پیکان نکروز کامل رشته‌های آبشش را نشان می‌دهد (رنگ‌آمیزی H&E، بزرگ‌نمایی ۴۰۰)



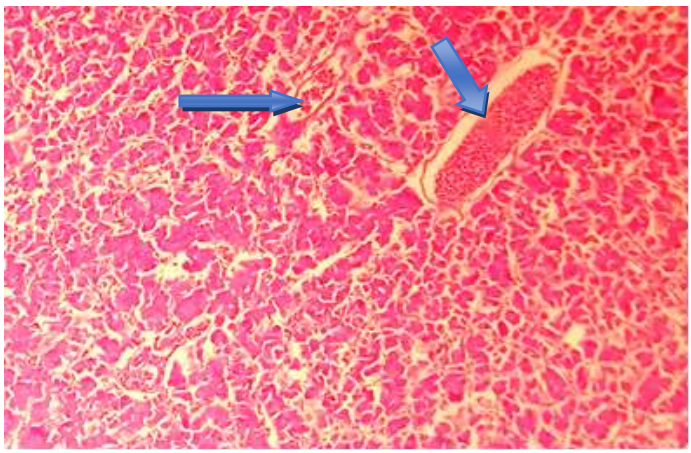
شکل ۴: مقطع تهیه شده از آبشش ماهیانی که در معرض غلظت‌کشنده روی قرار داشتند. نوک پیکان ادم و جداشدگی اپیتلیالی را نشان می‌دهد (رنگ‌آمیزی H&E، بزرگ‌نمایی ۴۰۰)



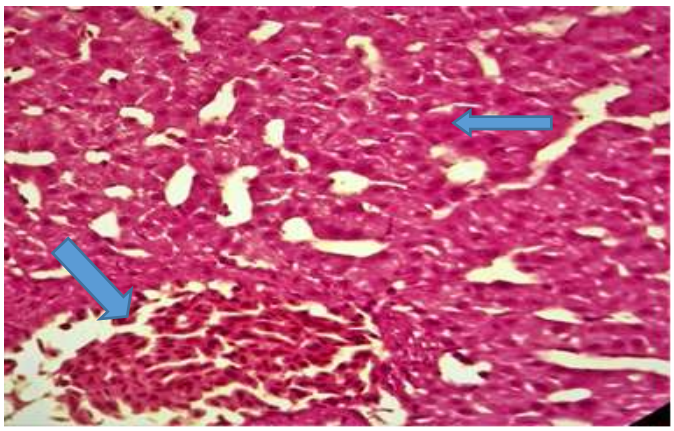
شکل ۵: مقطع تهیه شده از کلیه ماهیانی که در معرض غلظت‌کشنده روی قرار داشتند. نوک پیکان منطقه تخریب مجاری کلیوی و حضور سلول‌های آماسی را نشان می‌دهد (رنگ‌آمیزی H&E، بزرگ‌نمایی ۴۰۰)



شکل ۶: مقطع تهیه شده از کلیه ماهیانی که در معرض غلظت تحت‌کشنده روی قرار داشتند. نوک پیکان تجمع ملانوماکروفاژها را نشان می‌دهد (رنگ‌آمیزی H&E، بزرگ‌نمایی ۲۰۰)



شکل ۷: مقطع تهیه شده از کبد ماهیانی که درم عرض غلظت‌کشنده روی قرار داشتند. نوک پیکان رکودصفرا و خون‌ریزی را نشان می‌دهد (رنگ‌آمیزی H&E، بزرگ‌نمایی ۲۰۰)



شکل ۸: مقطع تهیه شده از کبد ماهیانی که در معرض غلظت‌کشنده روی قرار داشتند. نوک پیکان گوشه‌نشینی هسته‌ها و پرخونی را نشان می‌دهد (رنگ‌آمیزی H&E، بزرگ‌نمایی ۴۰۰)

بحث

تعیین دامنه کشندگی و تحت‌کشندگی‌روی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان هدف مورد مطالعه حاضر بود. مطالعه حاضر نشان داد که به محض مواجهه ماهی با سولفات‌روی ماهی دچار رفتارهای غیرارادی گردید که این رفتارها با افزایش غلظت و زمان در معرض قرارگیری بیش‌تر شد. نتایج حاضر با نتایج Barzegar و همکاران، مطابقت داشت. آن‌ها بیان کردند با افزایش غلظت‌های مس و حنا در تیمارهای آزمایشی، میزان آسیب‌های وارد شده بر بافت آبشش و کبد تاس‌ماهی سیبری بیش‌تر خواهد شد (۱۴). علائم ظاهری مسمومیت بافلزروی در آزمایش حاضر به‌شکل رنگ پریدگی، تیرگی سفیدشدگی کره چشم، حرکات سریع و دایره‌ای، تجمع در اطراف سنگ‌های هوا،

پرخونی در رشته‌های آبششی، سعی در بیرون پریدن ماهی از تشت‌های آزمایش و بلعیدن هوا از سطح بروز کرد. در ادامه ماهیانی که زنده بودند به‌شکل بی‌حال در کف تشت قرار گرفتند. مطالعات مختلفی این امر را تایید می‌کنند (۱۵، ۱۶). میزان تلفات ماهی در ساعات اولیه پس از در معرض قرارگیری با فلز روی رخ داد. هم‌چنین بررسی‌ها نشان می‌دهد، ماهیانی که به یک ماده حساسیت بیش‌تری نشان می‌دهند، نسبت به مواد دیگر حساسیت کم‌تری را در غلظت‌های یکسان نشان خواهند داد. Besser و همکاران، حساسیت دو گونه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onchorhynchus mykiss*) و ماهی کوتوس (*Cottus bairdi*) را نسبت به مس، روی و کادمیوم مورد ارزیابی قرار دادند (۸). براساس نتایج حساسیت گروه‌های تازه هچ شده در سمیت حاد و نیمه‌حاد بیش‌تر بود تا مراحل بالاتر. ضمن این‌که ماهی قزل آلای رنگین‌کمان حساسیت بیش‌تری نسبت به گونه کوتوس نشان داد. Calfee و همکاران، به بررسی سمیت حاد مس، روی و کادمیوم در مراحل مختلف رشدی دو گونه قزل‌الای رنگین‌کمان (*Onchorhynchus mykiss*) و استروژن سفید (*Acipenser transmontanus*) پرداختند (۹). آن‌ها بیان کردند که قزل‌آلای رنگین‌کمان نسبت به کادمیوم در تمامی مراحل زندگی حساس‌تر از ماهی خاویاری سفید بود. ماهی خاویاری در مراحل ۵ و ۷ رشدی از حساسیت بیش‌تری دربرابر فلز مس در مقایسه با قزل‌آلا داشت، با این‌حال در ادامه مراحل رشدی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان مسن‌تر حساسیت بیش‌تری را نسبت به مس نشان دادند. در آزمایش فوق، غلظت‌های کشنده و نیمه‌کشنده در طی ۹۶ ساعت برای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌ترتیب برابر با ۲۱ و ۱۱/۵۴ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمد. در مقایسه با مطالعه حاضر، Farhangi و همکاران، سمیت روی را برای ماهی کپور در مدت ۹۶ ساعت برابر ۲۷۰ میلی‌گرم در لیتر و غلظت نیمه‌کشنده آن برابر با ۱۲۹/۰۷ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آورند (۱۷). با مطالعه تحقیقات مختلف، تفاوت‌هایی در غلظت کشنده فلز روی بر روی گونه‌های ماهی به‌دست آمده است که هر کدام تحت شرایط متفاوتی بوده است. حتی برطبق مطالعات مختلف، حساسیت گونه قزل‌آلای رنگین‌کمان نسبت به سموم مختلف متفاوت است. این امر در درجه اول به‌میزان اثرگذاری سم مورد نظر و در مرحله بعد، به زمان در معرض قرارگیری، شرایط آزمایشی و سن ماهی بستگی دارد. به‌عنوان مثال، غلظت نیمه‌کشنده سموم مختلف در مدت ۹۶ ساعت برای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در آزمایش‌های مختلف به‌ترتیب برای اسانس آویشن‌شیرازی ۱۳/۶ میلی‌گرم (۱۶)، برای EDTA حدود برابر ۲۲۳۱ میلی‌گرم در لیتر (۱۸)، اسانس مرزن‌جوش ۲/۷ میلی‌گرم در لیتر (۱۹)، روی و مس به‌ترتیب برابر ۱۲/۸۸ و ۰/۰۹۴ میلی‌گرم بر لیتر (۶) به‌دست آمده است. مطالعات نشان داده است با افزایش فلزات سمی در آب ضمن اثرات مستقیم سمیت مواد بر روی اندام‌های ماهی، گاهی حضور متعدد عناصر با غلظت‌های پایین که توانایی کشندگی ماهی را ندارند، می‌توانند با تاثیر غیرمستقیم (سینرژتیک) باعث شدت اثر آن ماده شود، به‌طوری که قادر به تلفات در ماهی شود. هرچند عوامل محیطی هم‌چون کمبود اکسیژن، درجه حرارت و افزایش اسیدیته معمولاً حساسیت ماهی را به مواد سمی افزایش داده، درحالی‌که مواد معدنی هم‌چون سختی و شوری سبب کاهش سمیت مواد می‌شود (۱۷). Naddy و همکاران، اثرات سمیت چند فلز کادمیوم، مس و روی را بر روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و دافنی مورد مطالعه قرار دادند. آن‌ها بیان کردند محیط‌های آبی تحت تاثیر غلظت‌های مخلوطی از سموم هستند که اثرات سینرژیکی آن‌ها به‌شکل سمیت بالا بروز می‌کند (۲۰). Kumara و همکاران، اثر سینرژیتیک درجه حرارت و نانوذره روی را در ماهی *Pangasianodon hypophthalmus* بررسی کردند. آن‌ها ثابت کردند که اثرات درجه‌حرارت بر سمیت فلز نانوذره روی به‌شکل افزایشی است، به‌طوری‌که غلظت نیمه‌کشنده نانوذره روی در مدت ۹۶ ساعت به تنهایی برابر ۲۱/۸۹ میلی‌گرم در لیتر است ولی در دمای بالاتر (۳۰ درجه) برابر ۱۹/۷۴ میلی‌گرم درلیتر است (۲۱). این امر سبب استرس اکسیداتیو بیش‌تر در ماهیان مورد آزمایش شد. در شرایط آزمایشگاهی به کمک آلاینده‌های مختلف که سبب آسیب‌های بافتی مشخصی در اندام‌های ماهی می‌شوند، می‌توان از آن‌ها به‌عنوان نشانگر زیستی به‌منظور بررسی وجود آلاینده‌ها در اکوسیستم‌های طبیعی استفاده کرد. آلاینده‌های شیمیایی اندام‌های مختلفی ازجمله آبشش‌ها، کلیه و کبد را تحریک می‌کنند و این بافت‌ها ارائه دهنده یک ابزار مفید جهت سنجش تاثیرات آلاینده‌های خارجی هستند. بنابراین مطالعات آسیب‌شناسی منعکس‌کننده شرایط زیستی، محیطی و سلامت ماهی می‌باشد. در مطالعه حاضر نیز اثرات سیمت‌حاد سولفات روی بر اندام‌های داخلی ماهی به‌شکل پرخونی، خون‌ریزی، تخریب مجاری کلیوی و نکروز سلول‌های کبدی و آبشش رخ داد. گرچه ضایعاتی که در مطالعه حاضر رخ داده است، در غلظت‌های مختلف اثرات متفاوتی را نشان داد. دلایل متعددی از مرگ و میر ماهی بر اثر آلاینده‌هایی چون سموم و فلزات بیان شده است. ازجمله آن‌که بافت آبشش دارای محافظت کم‌تری نسبت به سایر بافت‌هاست و به‌طور مستقیم در مجاورت با آب قرار دارد. این امر سبب می‌شود تا از حساسیت بیش‌تری نیز برخوردار باشد و تخریب بافت آبشش سبب مشکلات تنفسی و نهایتاً مرگ و میر شود. Zargar، اثرات سمیت مرزن‌جوش را بر بافت آبشش در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌صورت جراحات در بافت آبشش، چماقی‌شدن لاملاهای ثانویه، هیپرپلازی سلول‌های اپیتلیوم لاملای ثانویه و آنوریسم عروقی بیان کرد. در گروه شاهد درجات خفیفی از هایپرپلازی دیده شد که ناشی از اثر یک

عامل خارجی به‌عنوان یک فاکتور استرس‌زا می‌باشد. اصولاً هایپرپلازی نوعی واکنش دفاعی بدن در پاسخ به مسمومیت‌هاست که به معنای افزایشی غیرطبیعی در تعداد سلول‌های اپیتلیوم آبشش است و به دو صورت چماقی‌شدن سر لاملاهای ثانویه و ضخیم‌شدن بافت اپی‌تلیوم نزدیک پایه لاملا، خود را نشان می‌دهد. این عارضه بر تبادل گاز و تنفس تأثیر گذاشته و در حالات شدیدتر می‌تواند منجر به اتصال تیغه‌های مجاور به یکدیگر و جلوگیری از تبادل گاز شود (۲۲). در واقع این تغییرات می‌تواند خود به‌عنوان یک شاخص زیستی در بررسی اثرات آلاینده‌ها باشد. 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 در آب می‌پذیرد (۱۳). تخریب مجاری کلیوی و گلومرول‌ها و هم‌چنین نکروز در سلول‌های کبدی سبب کاهش عملکرد کلیه و کبد می‌گردد. همان‌طوری‌که مشخص است رفتارهای ظاهری مسمومیت با عناصر سمی به‌ویژه روی می‌تواند نتیجه تغییر ساختاری اندام‌های داخلی ماهی باشد.

تشکر و قدردانی

این طرح با حمایت مالی دانشگاه گنبدکاووس و با مصوبه شورای پژوهشی دانشگاه به شماره پرونده ۶/۱۸۳ اجرا شده است. بدین‌وسیله از حمایت‌های ریاست محترم دانشگاه و مدیریت محترم پژوهشی دانشگاه و هم‌چنین از سرکارخانم دکتر قلیپور کنعانی که صمیمانه در اجرای طرح و شناسایی ضایعات بافتی راهنمایی فرمودند، نهایت تشکر و قدردانی را دارد.

منابع

1. **Dokani, L. and Johari, S.A., 2016.** The role of zinc element in aquatic nutrition. The fourth national conference of natural resources researches of Iran with a focus on fisheries and aquatic ecosystems, Kurdistan, Iran. Abstract. (In Persian)
2. **Yim, J.H. and Kim, S.D., 2006.** Effects of hardness on acute toxicity of metal mixtures using *Daphnia magna*. Journal of Hazardous Materials. 138(1): 16-21.
3. **Kosnett, M.J., 2010.** Chelation for Heavy Metals (Arsenic, Lead, and Mercury): Protective or Perilous? Clinical Pharmacology and Therapeutics. 88(3): 412-415.
4. **Hedayati, S.A., Rezaei, H., Darabitabar, F., Bagheri, T., Zahiri, F., Mohammadi Yalsuei, A. and sahraei, H., 2016.** Evaluation of histopathology changes of common carp (*Cyprinus carpio*) in the face of the deadly toxin concentrations Abamectin. Zanko Journal of Medical Sciences. 17(54): 1-15. (In Persian)
5. **Bagdonas, E. and Vosylienė, M.Z., 2006.** A study of toxicity and genotoxicity of copper zinc and their mixture to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Biologyja. 1: 8-13.
6. **Gündoğdu, A., 2008.** Acute toxicity of zinc and copper for rainbow trout (*Onchorhyncus mykiss*). Journal of FisheriesSciences. 2(5): 711-720.
7. **Butrimavičienė, L., Nalivaikienė, R., Kalcienė, V. and 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.
8. **Besser, J.M., Mebane, CH. A., Mount, D.R., Ivey, CH.D. Kunz, J.L., Greer, I.E., May, T.W. and Ingersoll, CH.G., 2009.** Sensitivity of mottled sculpinus (*Cottus bairdi*) and Rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) to acute and chronic toxicity of cadmium and zinc. Environmental Toxicology and Chemistry. 26(80): 1657-1665.
9. **Calfee, R.D.; Little, E.L., Puglis, H.J., Scott, E., Brumbaugh, W.G. and 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.
10. **TRC. 1984.** OECD Guideline for testing of chemical. Section 2, Effects on biotic systems. OECD. 39 p.
11. **Sadeghi, A. and 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.
12. **Brown, V.M., 1968.** The calculation of the acute toxicity of mixtures of poisons to rainbow trout. Water Reaserch. 10: 723-733.
13. **Roberts, R.J., 2012.** Fish pathology. 4th edition. Wiley Blackwell, UK. 590 p.
14. **Barzegar, R., Farokhrouz, M., Khara, H., Shenavar Masouleh, A. and Ahmadnezhad, M., 2021.** Evaluating disinfecting effect of Henna Extract (*Lawsonia inermi*) compared with copper sulfate (CuSo4.5H2o) and its effect on gill and liver tissues and bacterial and fungal loads on skin and gills of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). Journal of Animal Environment. 13(2): 217-230. (In Persian)
15. **Nafisi Bahabadi, M., Dadgar, Sh., Lakzaei, F., Mohajeri, Zh. and Abdolahi, R., 2016**. The effect of subacute concentrations of Butachlor herbicide on some blood parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Iranian Fisheries Science Research Institute. 25(2): 151-160.
16. **Sharif Rohani, M., Haghighi, M. and Assaeian, H., 2011.** The lethal concentration (LC50) of Zataria multi flora essential oil in fries of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Iranian Scientific Fisheries Journal. 20(2): 89-96. (In Persian)
17. **Farhangi, M. and Jafarian, H., 2019.** Evaluation of tissue changes in carp *Cyprinus carpio* and *Rutilus caspicus* under acute toxicity with copper sulfate. Aquaculture Development Journal. 4(14): 73-84. (In Persian)
18. **Ghoreshi, Sh., Shajiei, H., Vaezi, Gh. and Mohammadnezhad Shamoushaki, M., 2013.** The Effect of EDTA on Histophatological Changes in Liver of Rainbow Trout. Journal of Animal Biology. 6(1): 41-50. (In Persian)
19. **Zargar, A., 2019.** Investigation of semi-lethal concentration and histopathology of lesions caused by chronic toxicity of *Origanum* spp essential oil in rainbow trout, 7th Scientific Research Conference on Development and Promotion of Agricultural Sciences and Natural Resources of Iran, Tehran. (In Persian)
20. **Naddy, R.B., Cohen, A.S. and Stubblefield, W.A., 2014.** The interactive toxicity of cadmium, copper, and zinc to *Ceriodaphnia dubia* and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Environmental Toxicology and Chemistry. 34(4): 809-815.
21. **Kumara, N., Kumar Chandan, N., Wakchaure, G.C. and Singha, N.P., 2020.** Synergistic effect of zinc nanoparticles and temperature on acute toxicity with response to biochemical markers and histopathological attributes in fish. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology. 229: Abstract.
22. **Van, H., Vosloo, A. and Nikinmaa, M., 2004.** Effects of short-term copper exposure on gill structure, methallothionein and hypoxia-inducible factor-1á (HIF-1á) levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquatic Toxicology. 69: 271-280.