بررسی اثرات پاتولوژی سم ارگانو فسفره مالاتیون بر روی بافت کبد و کلیه در ماهی حوض (Carassius auratus)

علی باقرپور*[۱]، حسینعلی ابراهیم‌زاده‌موسوی[۲] و مینا رستمی[۳]

(تاریخ دریافت ۹۲/۶/۵؛ تاریخ پذیرش ۹۲/۸/۸)

چکیده

با توجه به استفاده روزافزون از آفت‌کش‌ها در کشاورزی، ورود این آلاینده‌ها به منابع آبی باعث ایجاد مشکلات حادی در آبزیان از جمله ماهی می‌گردد.

در این مطالعه اثرات سم ارگانوفسفره مالاتیون بر روی بافت کبد و کلیه ماهی حوض در محیط آزمایشگاهی بررسی گردید. این سم در کشاورزی نیز کاربرد داشته و به راحتی از طریق آب‌های جاری به استخرهای پرورشی یا حوضچه‌ها وارد می‌شود و مشکلاتی را ایجاد می‌کند.

مطالعه به صورت آزمایشگاهی انجام گرفت و از سم در غلظت‌های مختلف در چهار تیمار استفاده شد. و برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد. تیمارها عبارت بودند از، غلظت۱ /۰، ۰/۰۱، ۰/۰۰۱ میلی‌گرم در لیتر و گروه کنترل یا شاهد. در هر آکواریم ۲۰ عدد ماهی و ۳۰ لیتر آب وجود داشت. شرایط برای تمام آکواریم‌ها یکسان بود. پس از گذشت زمان‌های ۲،۴،۶ روز از بافت کبد و کلیه نمونه‌برداری شده و لام پاتولوژی تهیه شد که علائم آسیب‌شناسی در کبد شامل نکروز، خون‌ریزی و هیپرتروفی بود. در کلیه هم تخریب لوله‌ها و خونریزی، دژنراسیون واکئولی مشاهده شد. بنابراین از این مطالعه نتیجه حاصل می‌شود که در غلظت‌های کم و تحت کشنده هم سم روی ماهی اثرات تخریبی خود را می‌گذارد.

کلمات کلیدی: مالاتیون، غلظت تحت کشنده، کلیه، کبد.

[۱] گروه دامپزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر Alibagherpour20@gmail.com

[۲] گروه دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران

[۳] گروه دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران

مقدمه

استفاده وسیع و در مواردی بدون کنترل آفت‌کش‌ها و حشره‌کش‌ها در کشاورزی سال‌ها به عنوان یک مشکل زیست محیطی شناخته شده است و محققین مختلف به دنبال دستیابی و جایگزینی مناسب برای آن می‌باشند با توجه به اینکه این آفت‌کش‌ها در سطح وسیعی به کار برده می‌شوند و نیز روش‌های مختلفی در استفاده آنها به کار می‌رود از جمله استفاده از هواپیما و تانک‌های سم‌پاش که از این طریق بخشی از این سموم به راحتی از طریق آبیاری و هوا وارد منابع آبی شده و در نتیجه آبزیان مختلف در معرض آن قرار می‌گیرند. مطالعات وسیعی در زمینه آلودگی سموم مختلف در محیط زیست و به خصوص اکوسیستم‌های آبی انجام گرفته مطالعات رحمان و همکاران (۲۰۰۲) و یا هایدر و همکاران (۱۹۸۶) مثال‌هایی از این کار در خارج از کشور است. یکی از این سموم مالاتیون بوده که همان‌طور که در بالا ذکر شد از این سم به عنوان آفت‌کش در مزارع و زمین‌های کشاورزی به طور وسیعی استفاده می‌شود این سم پس از مصرف چنانچه از طریق آب جویبارها و یا آب باران به استخرهای پرورش ماهی که معمولاً هم در مجاورت زمین‌های کشاورزی واقع هستند وارد شده ایجاد مسمومیت در ماهیان منطقه می‌کنند. در این مطالعه آثار تحت کشنده سم مورد نظر در غلظت‌های مختلف بر روی ماهی طلایی مورد بررسی قرار گرفت با توجه به اینکه این ماهی از نظر طبقه‌بندی در خانواده کپور ماهیان قرار می‌گیرد که عمده ماهیان آب‌های داخلی ما نیز جزو خانواده کپور ماهیان هستند و همچنین به علت در دسترس بودن در بسیاری از مطالعات بر روی آبزیان به عنوان نمونه آزمایشگاهی استفاده می‌شود.

مواد و روش‌ها

درطی این مطالعه چهار عدد آکواریوم در ابعاد ۳۰×۳۰×۳۵ سانتی‌متر انتخاب گردید. تمامی آکواریوم‌ها با آب نمک شستشو و ضدعفونی شد و از آب لوله‌کشی برای آبگیری استفاده شد و حجم آکواریوم به ۳۰ لیتر رسید. درجه حرارت آب ۲۰درجه سانتیگراد و PH آب نیز برابر ۷ بود که این نکته در ۴ آکواریوم ثابت بود. آب به مدت ۲۴ ساعت داخل آکواریوم بدون ماهی نگه داشته شد تا کلر احتمالی از بین برود. تمامی ماهی‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در آب نمک ۲٪ ضدعفونی شدند.

سپس ماهی‌ها در چهار تیمار مختلف به آکواریوم‌ها اضافه شدند. در هر آکواریوم ۲۰ عدد ماهی طلایی با ظاهر سالم و متوسط اندازه ۸ سانتی‌متر قرار گرفت. از طریق پمپ هوا و۴ خروجی به تمام آکواریوم‌ها به مدت ۸ ساعت در روز، اکسیژن رسانی انجام گرفت. این شرایط نیز به مدت ۱۲ ساعت برای عادت کردن ماهی‌ها به آب ثابت نگه داشته شد. در این شرایط آب کاملاً شفاف و رفتار ماهیان طبیعی بود. پس از این مدت سم مالاتیون، با سه غلظت به آکواریوم‌ها افزوده شد. این کار با سرنگ و به طور منتشر در تمام آکواریوم انجام گرفت تا آب کاملاً با سم مخلوط گردد و آزمایش به مدت ۷ روز به طول انجامید.

تیمارها عبارت بودند از:

آکواریوم شماره (۱) حاوی ۳۰ لیتر آب و ۲۰ عدد ماهی و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر سم مالاتیون.

آکواریوم شماره (۲) حاوی ۳۰ لیتر آب و ۲۰ عدد ماهی و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر سم

مالاتیون.

آکواریوم شماره (۳) حاوی ۳۰ لیتر آب و ۲۰ عدد ماهی و ۰/۰۰۱ میلی‌گرم در لیتر سم مالاتیون.

آکواریوم شماره (۴) حاوی ۳۰ لیتر آب و ۲۰ عدد ماهی و بدون سم مالاتیون (گروه کنترل).

نمونه‌ها در فرمالین ۱۰٪ فیکس شد و به میزان ۱۰ برابر اندازه بافت فرمالین در شیشه‌ها ریخته شد و برای مدت ۱۰ روز نگهداری شد، تا فرآیند فیکس شدن کاملاً انجام گیرد. پس از این زمان نمونه‌ها برای مرحله مقطع گیری و تهیه لام پاتولوژی آماده شد.

نتایج

در بررسی علائم ظاهری در هر گروه در مدت زمان خاصی علائم ظاهری بروز می‌نمود.

در گروه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر پس از دو روز علائم رفتارشناسی رخ داد بی‌حالی، شنا یک طرفی و در برخی از آنها باله‌های شکمی و سینه‌ای یک سمت فعالیت نداشت، شنا سریع و گاهی ثابت باقی ماندن به مدت طولانی نیز دیده شد.

در گروه ۰/۰۱ میلی گرم در لیتر پس از ۴ روز علائم بی حالی و حتی تلف شدن برخی ماهی‌ها رخ داد که نمونه‌های تلف شده حذف شدند.

در گروه ۰/۰۰۱ میلی گرم در لیتر پس از ۶ روز علائم سستی و بی‌حالی و در سطح آب شنا کردن و عدم پاسخ به محرک‌ها رخ داد که در این گروه هم تلفات داشتیم.

در گروه کنترل ماهی‌ها کاملا نرمال شنا می‌کردند و علائم غیر طبیعی خاصی مشاهده نشد و فقط پس از گذشت ۷ روز یک تلفات داشتیم که می‌تواند به موارد دیگری ارتباط داشته باشد.

باید ذکر کرد که علائم رفتارشناسی در گروه ۰/۱ میلی‌گرم بسیار واضح‌تر بود. در تمام این موارد ماهی‌ها با علائم ذکر شده از آکواریوم خارج می‌شدند و بیوپسی انجام می‌گرفت.

وجود لکه‌های خون در آبشش نیز مشهود بود که نمونه‌ها به‌علت تلف شدن حذف شدند. همچنین باید ذکر کرد که مقاومت ماهیان ماده در مقابل سم نسبت به ماهیان نر، در اکثر گروه‌ها دیده شد که ماهیان ماده دیر علائم رفتاری و حتی تلفات را نشان دادند؛که این مورد پس از کالبد گشایی مشخص شد.

تغییرات بافت‌شناسی کبد

در گروه یک ماهیان با غلظت ۰/۱ میلی-گرم در لیتر به مدت دو روز در آکواریوم قرار داشتند، اثرات زیر مشاهده شد:

نکروز شدید هپاتوسیت‌ها و هموراژی در تمام نمونه‌ها مشهود بود. همچنین اتساع سینوزوئیدها و در بعضی نواحی، وجود نکروزهای کانونی قابل روئیت می‌باشد.

در این غلظت رنگدانه هموسیدرین به صورت مراکز ملانوماکروفاژ به صورت متراکم و تیره از ویژگی‌های خاص بود (تصویر ۱).

در تیمار دو ماهیان با غلظت ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر به مدت چهار روز در آکواریوم قرار داشت. نکروز هپاتوسیت‌ها و اتساع سینوزوئیدها به طور مشهود و همچنین نفوذ سلول‌های آماسی و پرخونی به همراه خونریزی نیز دیده می‌شد. نکته مهم ایجاد pre haepatitis و حضور سلول‌های آماسی به میزان بالایی در کپسول همبندی کبدی است (تصویر ۲).

در مواردی نیز نفوذ رنگدانه هموسیدرین در سیتوپلاسم هپاتوسیت‌ها به صورت منتشر که از ویژگی‌های این غلظت است هم دیده شده است. همچنین رسوب صفرا نیز دیده می‌شود. در گروه سوم که ماهیان با غلظت ۰/۰۰۱میلی‌گرم در لیتر به مدت ۶ روز در آکواریوم قرار داشت. نکروز هپاتوسیت‌ها به همراه رنگدانه هموسیدرین که با رنگ قهوه‌ای روشن داخل سیتوپلاسم دیده شد. مطابق سایر ضایعات پر خونی و خون‌ریزی هم بود رسوب صفرا نیز دیده شد. در این غلظت بیشترین ضایعات در کبد مشهود بود. حضور لنفوسیت‌ها (سلول‌های آماسی) در اطراف ورید باب کبدی نیز دیده شد که نشانه حالت Pre vasculitis بود (تصویر ۳).

در این تصویر سلول‌های پانکراس که با ویژگی دارا بودن رنگدانه زیموژن قرمز آشکار است، به صورت پراکنده در بافت کبدی دیده شده است. در گروه کنترل هم هپاتوسیت‌ها و سایر سلول‌ها به صورت نرمال و منظم قرار داشتند.

تغییرات بافت شناسی کلیه

در گروه یک که ماهیان با غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر به مدت دو روز در آکواریوم قرار داشتند، اثرات دیر مشاهده شد. نکروز سلول‌های پوششی مجاری ادراری و افزایش بافت خونساز کلیه و از بین رفتن مجاری ادراری و افزایش حضور سلول‌های ملانوماکروفاژ (MMCS) به همراه رسوب هموسیدرین که در کلیه قدامی و خلفی دیده می‌شود (تصویر ۴). در گروه دو که ماهیان با غلظت ۰/۰۱ میلی گرم در لیتر به مدت چهار روز در آکواریوم قرار داشتند، نکروز سلول‌های پوششی مجاری ادراری، مجاری پروکسیمال I و پروکسیمال II و اتساع سایر مجاری دیده می‌شود. داخل فضای لومن ادراری سلول‌های نکروتیک کنده شده، به همراه ترشحات ائوزینوفیلیک و سلول‌های آماسی دیده می‌شود. کست هیالین هم در این غلظت قابل مشاهده است (تصویر ۵). افزایش بافت هماتوپوئتیک و از بین رفتن براش بر در لوله‌های پروکسیمال I وII هم داریم و دژنراسیون و اکوئوله در تمام لوله‌های ادراری حتی مزونفریک و جمع کننده مشهود است. در گروه سه که ماهیان با غلظت ۰/۰۰۱ میلی گرم در لیتر سم به مدت ۶ روز در آکواریوم قرار داشتند. حضور کست هیالین که باز جذب مواد پروتئینی از دیواره مجاری ادراری است، دیده می‌شود که این ذرات ریزتر بود از قبلی. افزایش بافت خونساز در کلیه خلفی و افزایش فضای ادراری که فاصله بین لایه داخلی و خارجی کپسول بومن است، با وجود گلومرول سالم دیده شد. همچنان حضور نکروز در سلول‌ها و سلول‌های آماسی در داخل لومن مجاری ادراری بود (تصویر ۶). تورم ابری هیپرتروفی مجاری ادراری و جایگزینی بافت خونساز به جای بافت ادراری در کلیه خلفی دیده می‌شود. در گروه کنترل سلول‌های خونساز و لوله‌ها کاملا نرمال و منظم بودند.

بحث

در این مطالعه اثرات غلظت‌های تحت کشنده سم مالاتیون بر روی اندام‌های کبد و کلیه ماهی مورد بررسی قرار گرفت. ضایعات مشاهده شده در این بررسی با موارد گزارش شده توسط محققین دیگر در ماهیان مختلف تا حدود زیادی مطابقت دارد.

در دوز ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر بررسی اثرات رفتاری حرکات سریع و ناگهانی و ناگهان

آرام شدن و به ته آکواریوم رفتن ماهی مشاهده شد که این مشاهدات مشابه مطالعه رحمان و همکاران (۲۰۰۲) بود که این علائم را بررسی کرده بودند. اما علائمی مثل حرکات چرخشی، شنا به پشت که در غلظتهای بالا برو کرده بود به علت دوز غیرکشنده مطالعه حاضر مشاهده نشد.

همچنین وجود بی‌رنگی در غلظت‌های بالا در مطالعه رحمان مشاهده شده بود. در این مطالعه دیده نشد. رفتارهای غیر نرمال مانند افزایش فعالیت سر پوش آبششی حرکت در سطح آب یا ته آب مشابه مشاهدات [۶] و [۸] بود. هر چند تورم شکم و وجود گاز در معده مشاهده نشد که برخلاف مطالعه [۷] و [۸] این نشانه‌ها در گونه‌های خاص بود. ثابت بودن پارامترهای دما و ph در غلظت‌های مختلف مشابه سایر مطالعات بود.

در بررسی کبد هیپرتروفی و نکروز فوکال از خفیف تا شدید و واکئوله شدن، کاملاً مشاهده شد که مشابه مطالعه رحمان و همکاران (۲۰۰۲) بود. این موارد در مطالعه حاضر در تمام غلظت‌ها دیده شد.

کبیر و همکاران (۱۹۷۸) گزارشی از دژنراسیون سیتوپلاسم، پیکنوز هسته در بافت کبد و واکئوله شدن سلول‌های کبدی و گسیختگی عروق خونی را در ماهی هترونتوس فوسیلیس که به مدت ۲۵ روز با غلظت ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر آلوده شده بود مشاهده کرد [۷]. این مشاهدات در این مطالعه با وجود غلظت کم سم و تفاوت نوع ماهی به طور ملایم‌تری تماماً بروز کرده بود.

در مطالعه حاضر، حضور سلول‌های آماسی در داخل کپسول کبدی که علامت پرهیاتایتیس و شروع آماس کبدی را نشان می‌دهد، همچنین حضور سلول‌های خون‌ساز به میزان زیاد در کبد، حالتی غیر نرمال است؛ زیرا کبد در حالت نرمال هیچگونه سلول لنفوئیدی ندارد؛ که در تصاویر غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر سلول‌های خون‌ساز در کبد دیده می‌شود. همچنین وجود نکروز به صورت فوکال یا تکه‌ای در کبد ماهی به علت لوبوله نبودن کبد دیده می‌شود.

در بررسی کلیه نکروز سلول‌های پوششی مجاری ادراری و تخریب مجاری ادراری مشابه مطالعه رحمان و همکاران (۲۰۰۲) بود. دژنراسیون ملایم لوله‌ها و پیکنوز و خونریزی در سلول‌های کلیه نیز که در مطالعه رحمان به علت دوز بالاتر شدیدتر بود، به طور ملایم‌تری دیده شد.

البته این مشاهدات در مطالعه رند و همکاران (۱۹۸۵) که اثر سم آمیترول را روی ماهی سوهوسالمون که با غلظت بالای ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر بررسی کرده بودند، شامل تخریب سلول‌های خون‌ساز و پیکنوز و کاریورکسی هسته‌های سلول‌های کلیوی بود [۹] که در مطالعه حاضر به جز تخریب سلول‌های خون‌ساز موارد بعدی فقط در چند مورد مشاهده شد.

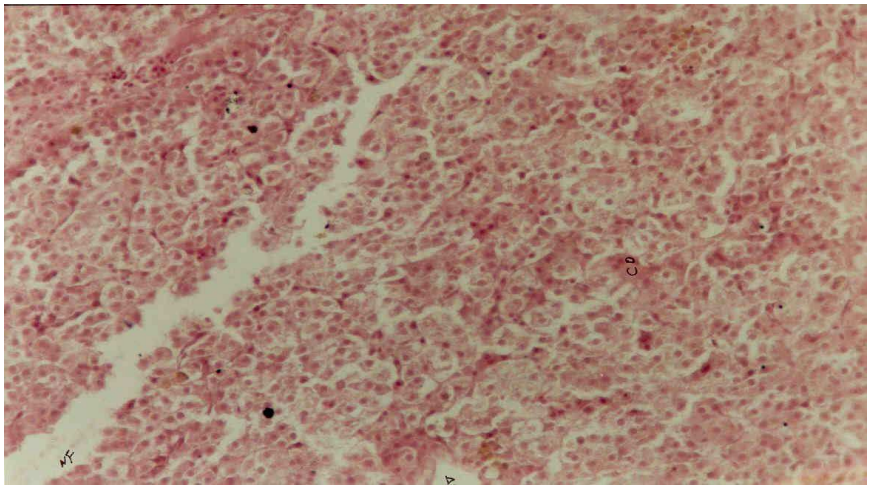
حضور رنگدانه هموسیدرین در سیتوپلاسم در کلیه به علت تخریب اریتروسیت‌ها و کاتابولیسم هموگلوبین می‌باشد و باید توجه داشت که کلیه در ماهی در بخش خلفی میزان بافت خون‌ساز بسیار محدودی دارد که در غلظت ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر بافت خون‌ساز در کلیه خلفی افزایش یافته که این حالت به دلیل نیازمندی ماهی به خون بیشتر، علاوه بر ساخت بوسیله کلیه قدامی، رخ داده است.

با بررسی تحقیقات مختلف و نیز با توجه به تحقیق حاضر چنین به نظر می‌رسد که عوامل

زیادی می‌توانند در تأثیر سم بر روی ماهیان و نیز دوز سمی کشنده و غیرکشنده آن تأثیر داشته باشند. از این عوامل می‌توان به درجه حرارت آب، سختی آب، PH، قلیائیت، جنس و سن و وضعیت فیزیولوژیکی ماهی اشاره نمود [۴]. به نحوی که در یکی از موارد مورد توجه در این مطالعه عدم بروز تلفات در یک گروه از ماهیان مشاهده شد که پس از کالبدگشایی مشخص گردید همگی ماده هستند و در گونه‌های مختلف ماهی نیز غلظت‌های کشنده و یا تحت کشنده متغیر بوده است که حکایت از اثرات اختصاصی گونه‌ای و یا به عبارتی حساسیت گونه‌ای ماهی دارد.

به نظر می‌رسد که حساسیت کپور ماهیان تا حدود زیادی نزدیک به هم می‌باشد و از طرفی دوز مالاتیون که در کشاورزی به کار می‌رود، حدود ۱/۱۳ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد که تقریباً در حد کشنده برای آبزیان می‌باشد. لذا به نظر می‌رسد که ورود ناگهانی سم به میزان فوق در منابع آبی به عنوان یکی از علل تلفات ناگهانی در رودخانه‌ها قابل تأمل باشد.

از طرفی غلظت‌های کمتر این سم نیز می‌تواند اندام‌های حیاتی ماهی از جمله کبد و کلیه را تحت تأثیر ساخته و در نتیجه ماهی در محیط‌های طبیعی به عوامل مختلف استرس‌زا از جمله تغییرات جوی و آلودگی‌های ثانویه حساس شود و ایجاد بیماری‌های ناگهانی و یا جراحات مختلف بنماید.

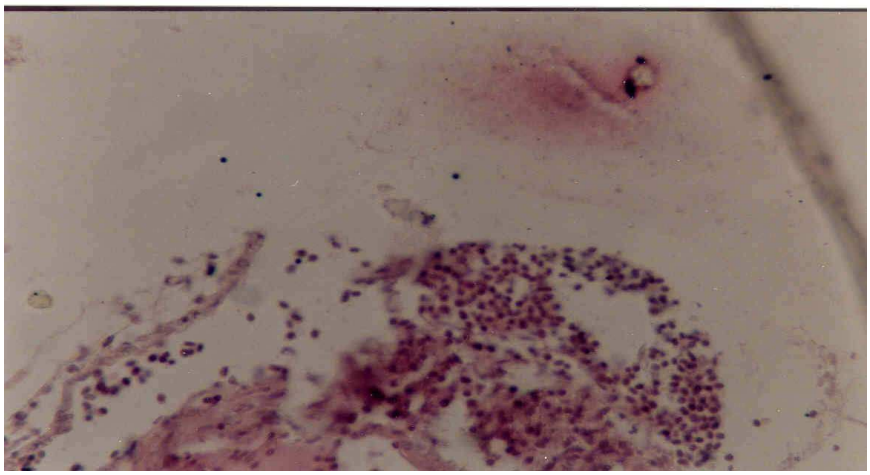


تصویر ۱. حضور نکروز در بافت کبد ماهی قرمز

X 40 درشتنمایی — H & E رنگ‌آمیزی

محلول ثبوت فرمالین ۱۰٪ — کبد ماهی قرمز متاثر از ۰/۱

سم مالاتیون ppm — N F : نکروز منطقه‌ای

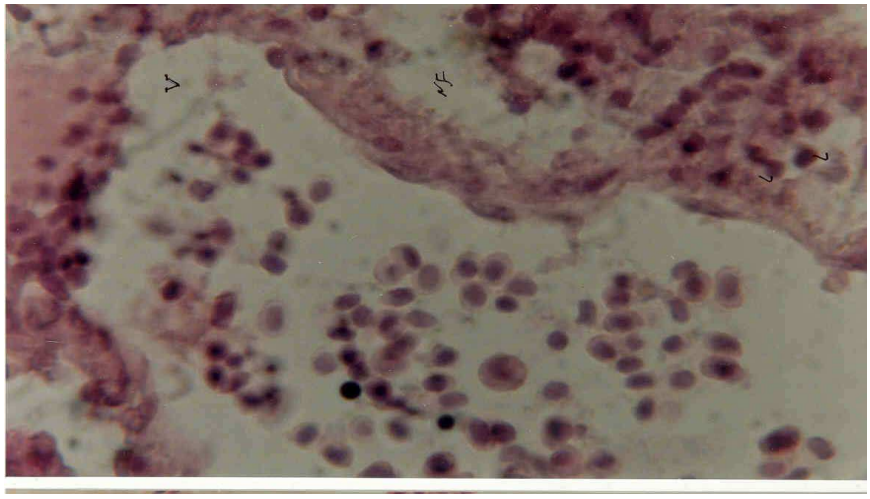


تصویر ۲. حضور سلول‌های آماسی در کبد ماهی قرمز

X 40 درشتنمایی — H & E رنگ آمیزی

محلول ثبوت فرمالین ۱۰٪ — کبد ماهی قرمز متاثر از ۰/۰۱

سم مالاتیون ppm

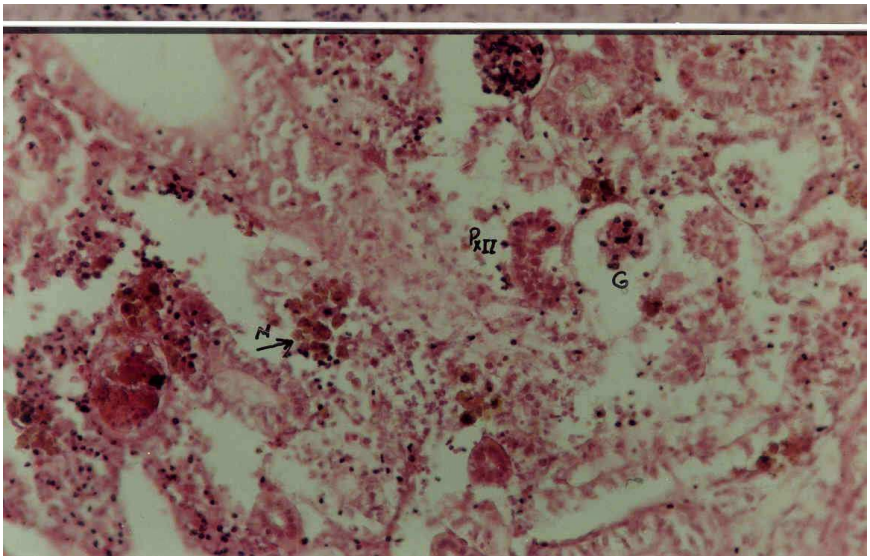


تصویر ۳. حضور لنفوسیت‌ها در اطراف ورید باب کبدی در ماهی قرمز

X 40 درشتنمایی — H & E رنگ آمیزی

محلول ثبوت فرمالین ۱۰٪ — کبد ماهی قرمز متاثر از ۰/۰۰۱

سم مالاتیون ppm — V : پرتال وین



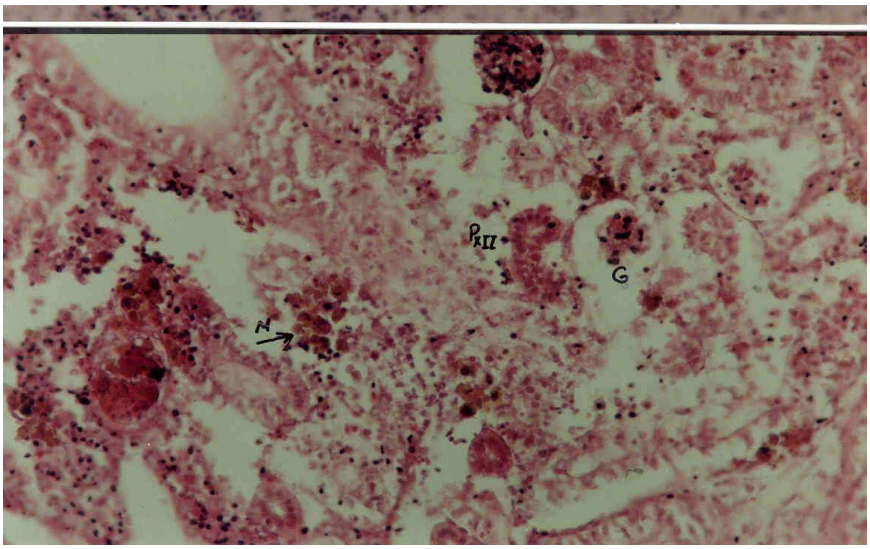
تصویر ۴. حضور سلول‌های ملانوماکروفاژ در کلیه ماهی قرمز

X 40درشتنمایی — H & E رنگ آمیزی

محلول ثبوت فرمالین ۱۰٪ — کلیه ماهی قرمز متاثر از ۰/۱

سم مالاتیون ppm — M : ملانوماکروفاژ

G: گلومرول — PXII: پروکسیمال ۲

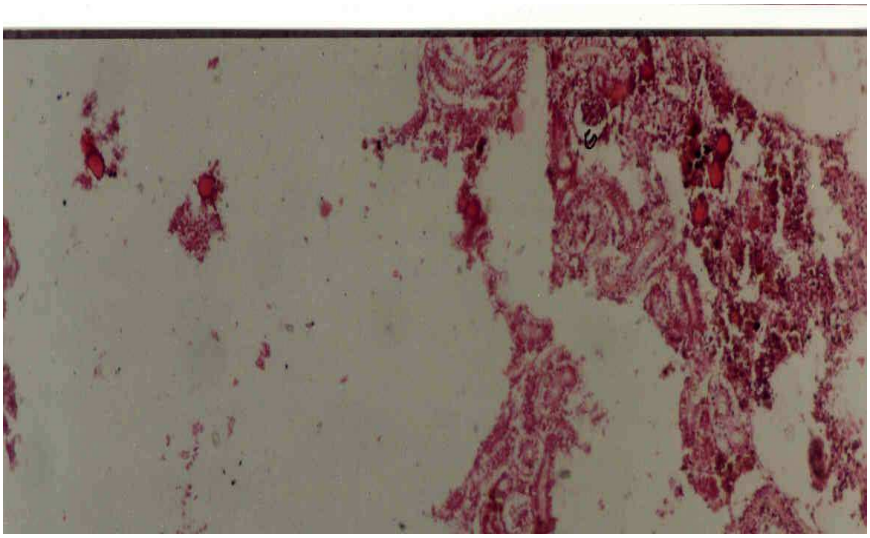


تصویر ۵. کست هیالن در کلیه ماهی قرمز

X 40 درشتنمایی — H & E رنگ آمیزی

محلول ثبوت فرمالین ۱۰٪ — کلیه ماهی قرمز متاثر از ۰/۰۱

سم مالاتیون ppm — H : هیالن



تصویر ۶. نکروز سلول‌های مجاری اداری در ماهی قرمز
X 40درشتنمایی H & Eرنگ آمیزی
محلول ثبوت فرمالین ۱۰٪ کلیه ماهی قرمز متاثر از ۰/۰۰۱
سم مالاتیون ppm

منابع

۱. اسماعیلی ،ع. (۱۳۸۲). بررسی اثر سموم علف‌کش (ساترن و ماچتی) و حشره‌کش (مالاتیون و دیازینون) بر مرگ و میر مینیاتورهای شاه میگوی آب شیرین، مؤسسه تحقیقات شیلات ایران، شماره ۱۸۳۲,

۲. پوستی، الف. (۱۳۷۸). اطلس بافت‌شناسی ماهی، انتشارات دانشگاه تهران، چاپ اول.

۳. حسینی، م. (۱۳۸۲). بررسی عوامل احتمالی درگیر در جراحات جلدی ماهی طلایی، پایان‌نامه دکتری دانشکده دامپزشکی دانشگاه گرمسار، شماره ۴۱۷ص: (۱۲-۸)

4. Boyd. C. E. (1979). Water quality in warm water fish ponds. Alabama Agricultural Research Station, Alabama. 32P.

5. Haider, S. and R. M. Inbaraj (1986). Relativ toxicity of technical material and commercial formulation of Malathion and Endsulfan to a fresh water fish. Channa punctatus (Bloch). Ecotixicol, Environ. saf; 11 (3): 347-351.

6. Hoque, M. M, M. J. A. Mirja and M. S. Miah (1993). Toxicity of Diazinon ...and sumithion to puntius gonionotus, Bangladesh J. Tran; Dev; 6 (1): 19-26

7.Kabir, S. M. H. and R.Begum (1978). Toxicity of three organophosphorus insecticides to singhi fish heteropneustes fossilis (Bloch); Dhaka univ. stud. B 26: 115- 122.

8. Lovely, F. (1998). Toxicology of three comonly used organophosphorus incecticides to Thai sharputi (Barbodes gonionotus) and african catfish. (daviasgariepinus) fry.Depaertment of fisheries Biology and jenetics, bandladesh agricultural university. Mymensingh, bangladesh. 83 P. M. S. thesis.

9. Rand, G. M. and S. R. petrocelli (1965). Fundamentals of aquatic Toxicology Hemisphere publishing corporation washington. 666p.

10. Rahman M. Z., Z. Hossain, M. F. A. Mollah and G. V. Ahmed (2002). Effects of diazinon 60 Ec on Anabas testudineus, chana punctatus and Barbodes gonionotus, Naga, the ICLARM quarterly; 25(2): 8-12.