فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۳۳، جلد ۹، شماره ۲، بهار۹۵، صفحه ۳۹تا ۴۸

بررسی میزان سمیّت و اثرات آسیب شناسی فنل بر بافت های آبشش، کبد و کلیه جنین تاس ماهی ایرانی(*Acipenser persicus*)

علیرضا سلیمانی[۱]، عسگر کریم آبادی[۲]
۱- گروه زیست شناسی، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان. ایران. asoleimani56@yahoo.com
۲-بخش تکثیر مرکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید مرجانی، اداره کل شیلات گلستان، گرگان. ایران.

تاریخ دریافت: ۹٤/۱۱/۱۵ تاریخ پذیرش:۹۵/۲/۱۰

چکیده

زمینه و هدف: با توجه به اهمیت بوم شناختی و اقتصادی گونه تاس ماهی ایرانی به عنوان یک گونه بومی در خطر انقراض ساکن دریای خزر، گستردگی مناطق پراکنش آن و افزایش آلودگی روز افزون آب‌های داخلی به مشتقات نفتی مانند ترکیباتی فنلی، بررسی سمیّت حاد فنل در مرحله جنینی لاروهای ۳ روزه تاس ماهی ایرانی ضروری می باشد.

روش کار: ۷تیمار با غلظت های ۱٤۰، ۱۱۵، ۹۰، ٦۵، ٤۰، ۲۵، ۱۰میلی گرم بر لیتر فنل و یک شاهد(هریک ۳ تکرار) در نظر گرفته و آزمایشات مربوط به تعیین سمیّت حاد براساس استاندارد O.E.C.D. به صورت ساکن انجام گرفت. در مرحله بعد از سه غلظت زیر کشنده فنل(۱۰،۲۵،٤۰ میلی گرم برلیتر) و شاهد در سه تکرار و در شرایط نیمه پایدار برای بررسی اثرات سمی فنل روی آبشش، کبد و کلیه به عنوان نشان گرهای سیتولوژیک در مدت تکامل لارو نورس تا شروع تغذیه فعال استفاده شد. لاروهای ناهنجار و تلف شده به صورت روزانه جمع آوری و در محلول بوئن فیکس و مراحل آماده سازی بافتی و رنگ آمیزی نمونه ها انجام گردید.

یافته ها: مقدار LC۵۰ طی ۹٦ ساعت فنل ۹۰ میلی گرم بر لیتر و حداکثر غلظت مجاز فنل برای لاروهای نورس تاس ماهی ایران ۹۵/۱ میلی گرم برلیتر تعیین گردید. تغییرات بافتی در آبشش پرخونی و هیپرپلازیا در کبد دژنراسیون سلول ها و تجمع ملانین و در کلیه اتساع کپسول بومن، شبکه گلومرولی و تخریب توبول ها بودند.

نتیجه گیری: تحقیق حاضر نشان داد که آلاینده هایی مانند ترکیبات فنلی در اکوسیستم های آبی بر رشد و نمو لاروهای نورس تاس ماهی ایرانی موثر هستند.

واژه های کلیدی: تاس ماهی ایرانی، فنل، سمیّت حاد، هیپرپلازیا.

مقدمه

دریای خزر به عنوان یک اکوسیستم آبی و بسته می-باشد که به علت وضعیت جغرافیایی، سیاسی، فرهنگی، اقتصادی و صنعتی کشورهای حاشیه این دریا، دچار آلودگی های مختلف شده است. یکی از این آلاینده ها ترکیبات فنلی است که به صورت مشتقات بروموایندول و بروموفنل اخیراً به صورت طبیعی در پستانداران دریایی و دیگر ارگانیسم ها نیز شناسایی شده اند(۱۶). تا سال ۱۹۹۶ ذخایر نفتی بخش شمالی دریای خزر در منطقه روسیه در حدود ۱ میلیارد تن تخمین زده شده بود و در منطقه آذربایجان ۴ تا ۵ میلیارد تن برآورد گردید از این رو شرکت‌های نفتی در این مناطق فعالیت زیادی داشته اند و استفاده از گل های حفاری سبب شده که این مناطق به شدت آلوده شوند. لذا آلاینده های خطرناک دریای خزر در وهله اول، نفت و محصولات نفتی و سپس مشتقات فنلی است(۱۱). از سوی دیگر، در بخش شمالی دریای خزر تنوع گونه ها از ۷۸ به ۴۶ گونه کاهش داشته و در بخش های جنوبی و مرکزی آن تعداد گونه ها تا یک سوم کاهش پیدا نمودند، در بین گونه‌های تجاری طی دهه های اخیر، جمعیت ماهیان خاویاری به شدت سیر نزولی داشته است و در بیست ساله گذشته

صید خاویار تا۹۰ درصد کاهش پیدا کرده است؛ یکی از دلایل این روند نزولی، آلودگی آب ها می باشد(۱۵). در حوزه‌ی جنوبی دریای خزر که شامل استان‌های گیلان، مازندران و گلستان از کشور جمهوری اسلامی ایران هستند، علاوه بر فاضلاب های خانگی، صنایع چوب، نساجی، مواد شیمیایی، تولیدات غذایی و الکترونیکی از عوامل عمده ی آلوده کننده دریای خزر هستند(۱۵). در منطقه باکو با انجام طرح بزرگ هدایت فاضلاب ها از غلظت این آلاینده ها تا حد زیادی کاسته شده و به حدود ۸۰۰ میلیون مترمکعب در سال رسیده است با بررسی رسوباتی که از این فاضلاب ها برجا مانده، مشخص شده که مقادیر زیادی هیدرات‌های کربن، انواع فنل، فلزات سنگین، اسیدها، بازها و دیگر ترکیبات با سمیت بالا وجود دارد. در ارزیابی های مقدماتی مشخص گردید که غلظت این ترکیبات بیش از حد مجاز است، به طوری که این مواد صد بار بیشتر در آب دریاها و رودخانه‌ها تجمع پیدا کرده اند(۱۵). در تحقیق دیگری که طی سال های ۲۰۰۲ تا ۲۰۰۷ در منطقه آبشوران در حاشیه دریای خزر به عمل آمد، ثابت شده که مقادیر نیترات آمونیوم و فنل به ترتیب ۱۸۰ تا ۲۲۰ بار نسبت به محدوده آسیب رسان آن‌ها بیشتر می باشد. بر طبق گزارش سالانه ی بانک جهانی بیش از یک میلیون متر مکعب از فاضلاب های صنعتی تنها از رودخانه ی ولگا به دریای خزر می ریزد، ضمناً آب های آلوده به عوامل عفونت زا از مکان هایی که ۳۵۰۰ کیلومتر از دریای خزر فاصله دارند به این دریا وارد می شوند(۱۸). بنابر این صنعتی شدن و گسترش شهرنشینی می توانند دو عامل عمده در ارتباط با گسترش آلودگی در محیط زیست باشند(۱۳). وجود فنل در اکوسیستم های آبی می تواند سبب کاهش وزن و درصد لقاح در ماهی ها شود(۷). گاهی دیده شده است که ترکیبات فنلی که از پسماندهای شیمیایی مختلف نظیر پالایشگاه ها، صنایع نساجی، چرم، رزین و پتروشیمی می باشند، می توانند پس از نفوذ به بدن ماهی ها بر روی متابولیسم، رشد و نمو و بقای آن ها تاثیر بگذارند. علیرغم فعالیت متابولیکی و سم زدایی ترکیبات فنلی در ماهی ها، غلظت‌های زیر کشنده فنل می تواند با فعالیت های آنزیمی آن ها تداخل عمل داشته باشد و تغییرات ناخواسته و غیر قابل پیش بینی را در ماهی ها ایجاد کند(۲۰). در مطالعه‌ای که توسط Kammannn و همکاران(۲۰۰۹) روی جنین گورخر ماهی انجام گردید، مشاهده شد که پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت که تخم ها در معرض غلظت های کشنده فنل قرار داشتند، از کار افتادن قلب، از دست رفتن سومیت ها و عدم تشکیل دم دیده و در غلظت های زیر کشنده ادم کیسه زرده، ناهنجاری ستون مهره، از بین رفتن رنگدانه ها و تکامل ناقص چشم رویت شد. یک گروه پست از ماهیان استخوانی، خانواده تاس ماهیان هستند که اخیراً به علت اهمیت اقتصادی زیاد و آسیب پذیر بودنشان بیشتر مورد توجه قرار گرفته-اند(۱۷). رشد و نمو و تمایز اندام ها، در طی دوره لاروی نورس در ماهیان خاویاری انجام می‌شود، از این رو در این دوره نه تنها الگوهای ساختاری جنین شکل می گیرد بلکه ناهنجاری های جنینی در اثر وجود شرایط نامطلوب بروز می نماید. فاکتورهای محیطی می‌توانند طی این دوره اثرات تراتوژنیک روی جنین بگذارند و یا سبب مرگ آن ها شوند. در برخی از تحقیقات ثابت شده است که ترکیباتی مانند فنل و ۱- نفتول علاوه بر این که در غلظت های معینی باعث مرگ آبزیان می شوند، در غلظت های پایین تر نیز اثرات سوء بر جا می گذارند. چنان چه جذب فنل از طریق سطح بدن یا پوست و آبشش و یا تغذیه صورت گیرد، باعث بروز طعم فنلی در گوشت ماهیان می شود و همین طور قرار گرفتن در معرض ۰/۲ میلی گرم در لیتر از انواع فنل‌ها موجب مهاجرت ماهی به خارج از آب های آلوده می گردد(۶).

در ماهی خاویار ایرانی سن تولید مثل برای نرها بین ۸ تا ۱۵ سال و برای ماده ها ۱۲ تا ۱۸ سال است، دوران بلوغ در ماهی های بالغ ۶ تا ۴۰ سال طول می کشد و ۸۵ درصد آن ها در سن ۱۴تا ۱۸ سالگی بالغ می شوند(۱۰)، بنابر این بررسی تاثیرات آلاینده ها روی مولدین ماهی-های خاویاری کاری دشوار بوده و از نظر اقتصادی نیز چندان مقرون به صرفه نمی باشد لذا در این تحقیق از لارو های نورس تاس ماهی ایرانی که هنوز در مرحله تکامل جنینی هستند، در محیط دارای غلظت های زیر کشنده فنل استفاده گردید. لاروهای نورس نسبتاً به اثرات سمی فنل مقاوم تر هستند اما با رشد و نمو آن ها، سمیت فنل به سرعت افزایش می یابد. غلظت ۴۰ میلی گرم بر لیتر فنل که برای لاروها کشنده است و آن ها را ظرف چند دقیقه می کشد، برای لاروهای نورس غلظت زیر کشنده محسوب می شود. این مطلب نشان می دهد که فنل روی لاروها با شیوه ای متفاوت با لاروهای نورس عمل می کند و به خصوص به عنوان یک ترکیب سمی بر سیستم عصبی مرکزی اثر می گذارد(۳). در اکثر مطالعات انجام شده در ارتباط با تاثیرات آلاینده ها بر روی ماهی ها غالباً از بافت های آبشش و کبد به عنوان نشان گر هیستولوژیک مناسب استفاده شده است(عتباتی و همکاران، ۱۳۸۸؛ camargo و Martinez، ۲۰۰۷). البته بافت های دیگری نیز مانندکلیه، عضله و اپی تلیوم معده–روده ای نیز از بافت هایی هستند که تحت تاثیر آلاینده ها دژنره می شوند(Chronic toxicity summery phenol:Registry number 108-95-20:cas,1999). سمیت یک آلاینده از طریق آزمایش سنجش زیستی ارزیابی می شود و به کمک آن غلظت لازم جهت بروز تلفات در نیمی از موجودات زنده در یک دوره زمانی کوتاه مدت یا بلند مدت معلوم می شود(۴). از این رو در این تحقیق تعیین غلظت نیمه کشنده ی فنل برای لارو نورس تاس ماهی ایرانی، مشخص نمودن محدوده ی کشندگی و هم چنین بررسی ضایعات بافتی ایجاد شده در بافت های آبشش، کبد و کلیه در غلظت های زیر کشنده در لاروهای نورس تاس ماهی ایرانی انجام شد.

مواد و روش ها

برای مشخص نمودن میزان LC ۵۰ طی ۹۶ ساعت ترکیب فنل روی لاروهای نورس تاس ماهی ایرانی(*Acipenser persicus*)، تعداد ۲۱۰ عدد لارو نورس سالم ۳ روزه پس از تفریخ به صورت تصادفی از وان های فایبرگلاس مرکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید مرجانی استان گلستان در سال ۱۳۹۰ جمع آوری، سپس برای آزمایشات تشخیص سمیّت، لاروهای نورس۳ روزه درون بشرهایی به حجم ۱ لیتر به تعداد ۱۰ عدد در هر ظرف رهاسازی شده ودر شرایط ساکن و هواد دهی مستمر و براساس استاندارد (Organization Economic Cooperation Development) O.E.C.D.(سازمان توسعه و همکاری اقتصادی اروپا) در ۷ تیمار و ۳ تکرار، به همراه ۳۰ عدد شاهد به منظور اندازه‌گیری توان زیستی و تعیین وضعیت بقا، استفاده شدند و میزان تلفات طبیعی در نمونه های شاهد هم زمان با سایر تیمارها بررسی گردید(۱). هوادهی شدید صورت گرفت و دوره نوری به صورت طبیعی ۱۲ تا ۱۶ ساعت در روز استفاده شد. مرگ و میر لاروها هر ۲۴ ساعت ثبت می گردید. اگر مرگ و میر موجودات پس از ۸ روز کمتر از ۱۰ عدد باشد، شرایط آزمایش مورد قبول تلقی می شود اما اگر بیش از ۱۰ درصد باشد، بهتر است که شرایط آزمایش را تا حدی که به آزمایش اصلی لطمه ای وارد نشود تغییر داد(۵، ۴). برای تعیین محدوده کشندگی، دو غلظت از فنل در نظر گرفته شد. یکی بیشترین غلظتی که تقریباً هیچ گونه مرگ و میری وجود ندارد و دیگری کمترین غلظتی است که بیشترین تلفات را داشته باشد. در محدوده دمایی ۱۳–۱۴ درجه سانتی گراد ۷ غلظت همراه با ۳ شاهد مورد آزمایش قرار گرفتند. بیشترین غلظت فنل که در آزمایشات مشابه به

عنوان غلظت کشنده محسوب می شد، بین ۱۳۰ تا ۱۴۰ میلی گرم در لیتر بوده است(۶، ۱). براساس مطالعه ی امینی راد(۱۳۷۶)؛ ابطحی و برازنده(۱۳۸۲) غلظت ۱۴۰میلی گرم تا هفت مرحله براساس تصاعد هندسی کاهش یافت، یعنی غلظت های ۱۴۰، ۱۱۵، ۹۰، ۶۵، ۴۰، ۲۵، ۱۰ میلی گرم بر لیتر فنل استفاده شدند(۲، ۱). در ظرف شاهد نیز هیچ غلظتی از فنل اضافه نگردید. پس از افزودن لاروها به غلظت های تهیه شده ی فنل، تلفات آن ها هر ۲۴ ساعت به مدت ۹۶ ساعت بررسی و مطابق جدول ۲ ثبت شد. سپس برای تعیین LC ۵۰ در محدوده اطمینان ۹۵ (confidence limits) از مدل رگرسیون خطی و روش Probit Analysis استفاده (۱۵) و در مرحله بعدی آزمایش، چهار غلظت زیر کشنده برای لاروهای نورس در نظر گرفته شد. تعداد ۳۶۰ عدد لارو نورس ۳ روزه در ۱۲ وان پلاستیکی با حجم ۳ لیتر در ۴ تیمار و ۳ تکرار(هر ظرف ۳۰ عدد) رهاسازی گردیدند. آزمایش در شرایط نیمه پایدار تا زمان تغذیه فعال ادامه پیدا کرد. ۹۰ درصد آب ظروف حاوی نمونه ها هر ۴۸ ساعت یک بار تعویض و مجدداً همان غلظت های قبلی از فنل به آن‌ها اضافه می گردید. با توجه به تحقیقات دتلاف و همکاران(۱۹۹۳) چون غلظت۴۰ میلی گرم بر لیتر فنل برای لاروهای نورس در گونه های مشابه زیر کشنده است، لذا غلظت های ۰،۱۰،۲۵و۴۰ میلی گرم برلیتر فنل به عنوان غلظت های زیر کشنده در این مطالعه انتخاب شدند(۳). فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب شامل pH، اکسیژن محلول، سختی کل و دمای آب در طی این تحقیق به صورت روزانه اندازه گیری شدند. دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی بود. نمونه های تلف شده و ناهنجار تا آغاز تغذیه فعال روزانه جمع آوری شده و در محلول فیکساتور بوئن به مدت ۲۴ساعت تثبیت گردید و سپس به الکل ۷۰ درجه انتقال پیدا کردند تا مراحل آب گیری و قالب گیری از نمونه ها انجام شود. سپس به کمک دستگاه میکروتوم(مدل DS 40SS ساخت ایران) برش هایی با ضخامت ۵ µm از قالب ها تهیه و با تکنیک رنگ آمیزی هماتوکسیلین – ائوزین رنگ آمیزی گردیدند، سپس تغییرات بافتی آبشش، کبد و کلیه در لاروهای نورس بین تیمارهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت و عکس برداری از نمونه ها انجام شد.

نتایج

طی انجام آزمایش های مختلف، عوامل فیزیکی و شیمیایی آب ظروف به طور روزانه کنترل و ثبت گردید که نتایج آن در جدول ۱ آمده است. تلفات طی ۹۶ ساعت نیز در جدول ۲ بر اساس درصد ثبت گردیده است. نتایج به دست آمده برای LC ۵۰ در مدت ۹۶ ساعت مطابق جدول ۲، ۹۰ میلی گرم برلیتر بوده و بر اساس آنالیز پروبیت بیشترین غلظت قابل قبول فنل برای لاروهای نورس تاس ماهی ایرانی ۱/۹۵ میلی گرم برلیتر محاسبه شد. لاروهای نورسی که در معرض غلظت های زیر کشنده فنل قرار داشتند تغییرات بافتی قابل توجهی را در بافت های آبشش، کبد و کلیه نشان دادند. در آبشش، تجمع گلبول های قرمز و هیپرپلازی(Hyperplasia) اپی تلیوم رویت شد(شکل۱). تغییرات عمده درکبد، دژنراسیون بافتی و تجمع ملانین بوده است(شکل ۲). در بافت کلیه، تخریب توبول ها وفضاهای بینابینی و انبساط شبکه گلومرولی و کپسول بومن دیده شد(شکل ۳).

بحث و نتیجه گیری

بر اساس نتایج به دست آمده از این تحقیق، طی مدت ۹۶ ساعت آزمایش سمیّت حاد هیچ گونه تلفاتی در ماهیان گروه شاهد مشاهده نشد و کلیه فاکتورها در شرایط مناسب و دلخواه بودند و نتایج به دست آمده برای فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب با تحقیقات مشابه تفاوت زیادی نداشت. با توجه به مقدار به دست آمده در ارتباط با سمیّت حاد برای لاروهای نورس(mg/l) ۱/۹۵، چون حداکثر غلظت مجاز(Maximum Allowable Toxicant Concentration) فنل ۸-۲ میلی گرم در لیتر در آب های

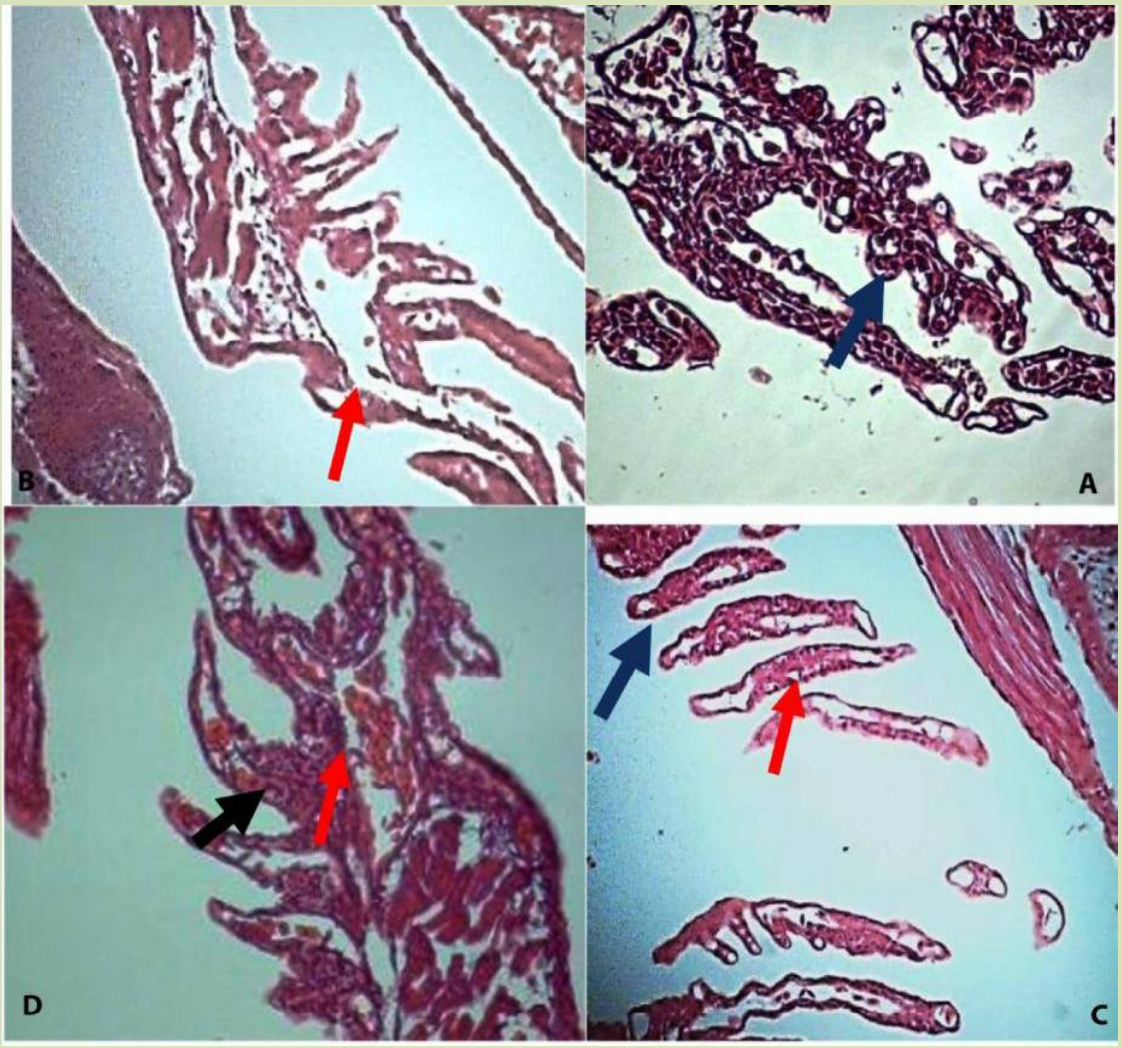
شمال دریای خزر معرفی شده است(۱۱) و با توجه به این که سمیّت فنل به دمای آب نیز بستگی دارد؛ یعنی هر چه دمای آب افزایش یابد میزان سمیّت آن افزایش خواهد یافت(۱۷)؛ بنابراین چون دمای آب در مدت این تحقیق در محدوده ۱۳ الی ۱۵ درجه سانتی گراد بوده است، این محدوده از غلظت فنل محدوده ی خطرناکی برای لاروها ی نورس تاس ماهی ایرانی محسوب نمی شود. بنابراین در دماهای بیشتر از این محدوده امکان افزایش سمیّت فنل و کشندگی آن بیشتر خواهد شد(۱۲). در مطالعات مشابه که توسط نظامی و همکاران(۱۳۸۳) بر روی بچه ماهیان تاس ماهی ایرانی انجام شد، حداکثر غلظت مجاز فنل ۳/۶۶mg/l گزارش گردید(۶). در مطالعه دیگری که توسط Dwyer و همکاران برروی گونه‌های تاس ماهی پارو پوزه(*Scaphirhyncus platorhyncus*) و تاس ماهی آتلانتیک(*Acipenser oxyrhyncus*) صورت گرفته است، برای دو نوع از ترکیبات فنلی در دمای ۱۷ درجه سانتی گراد، محدوده ی فنلی ۰/۰۴ تا ۰/۱۳ میلی گرم بر لیتر محاسبه شده بود(۱۲). البته به غیر از فاکتور دما مدت زمانی که جنین ها در معرض فنل قرار دارند نیز دارای اهمیت زیادی است و از این رو الگوهای اثرات ترکیبات فنلی به نوع و غلظت آن ماده ی فنلی نیز بستگی دارد(۱۶). افزایش فزآینده غلظت فنل اثرات آشکاری را روی آبشش ها می گذارد؛ این اثرات شامل پرخونی و هیپرپلازی سلول های اپی تلیالی است. آبشش ها در رابطه با عملکردهای مهمی مانند: تنفس، تنظیم اسمزی و دفع ادرار در ماهی ها سهم زیادی دارند. چون آبشش ها مستقیماً در معرض تماس با محیط خارجی هستند لذا اولین عضوی می باشند که در معرض آلاینده ها قرار می گیرند و از طرفی نسبت به تغییرات کیفی آب بسیار حساس هستند، ازاین رو تغییراتی مانند هیپرپلازی اپی تلیال و هیپرتروفی آن ها، چسبیدن تیغه های ثانویه آبششی به یک دیگر به عنوان نوعی مکانیسم دفاعی در برابر آلاینده ها در آن ها رویت می شود(۸). این تغییرات سبب می شود که فاصله بین محیط و جریان خون افزایش پیدا کند و بنابر این به عنوان سدی در برابر نفوذ آلاینده ها عمل کند(۹). در این تحقیق تغییرات شدیدی در ساختار بافتی آبشش ها بین غلظت های شاهد،۱۰، ۲۵ و ۴۰ میلی گرم بر لیتر دیده نشد که این احتمالاً می تواند به علت مدت زمان دوره ی این تحقیق(۱۰ روز) یا مقاومت لاروهای نورس تاس ماهی ایرانی به غلظت های به کار رفته باشد. تغییری که در بافت آبشش به خوبی رویت می شود هیپرپلازی لاملاهای آبششی در غلظت ۴۰ میلی گرم برلیتر می باشد(شکل ۱-د). یکی دیگر از اثرات فنل، تاثیرات آن روی بافت کبد می باشد(۱۹) که در این تحقیق شامل : نکروز و دژنراسیون سلول های هپاتوسیتی و تجمع ملانین می باشد (شکل ۲-د).

جدول۱- مقادیر برخی از فاکتور های فیزیکی و شیمیایی آب مورد استفاده در مدت آزمایش

نام فاکتور	مقادیر
درجه حرارت	۱۳ تا ۱۵ درجه سانتی گراد
اکسیژن محلول	۰/۱ ± ۶/۵ میلی گرم بر لیتر
pH	۵/۸±۰/۹
سختی کل	۳۵۸ میلی گرم بر لیتر

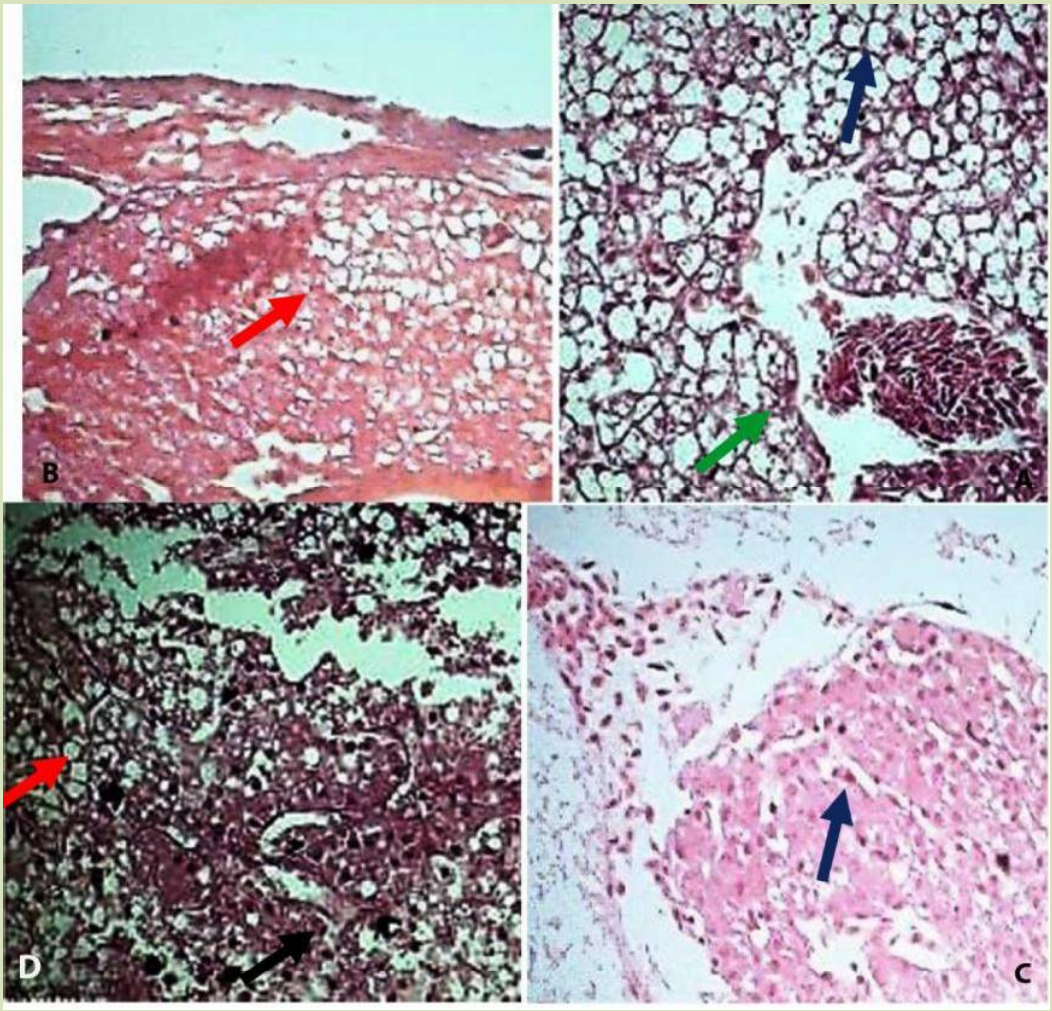
جدول ۲- تعداد تلفات لاروها بعد از ۹۶ ساعت در غلظت های مختلف فنل

غلظت فنل (mg/l)	۱۴۰	۱۱۵	۹۰	۶۵	۴۰	۲۵	۱۰	۰
درصد تلفات(پس از ۹۶ ساعت)	۷۰	۶۰	۵۰	۴۰	۳۰	۲۰	۳۰	۲



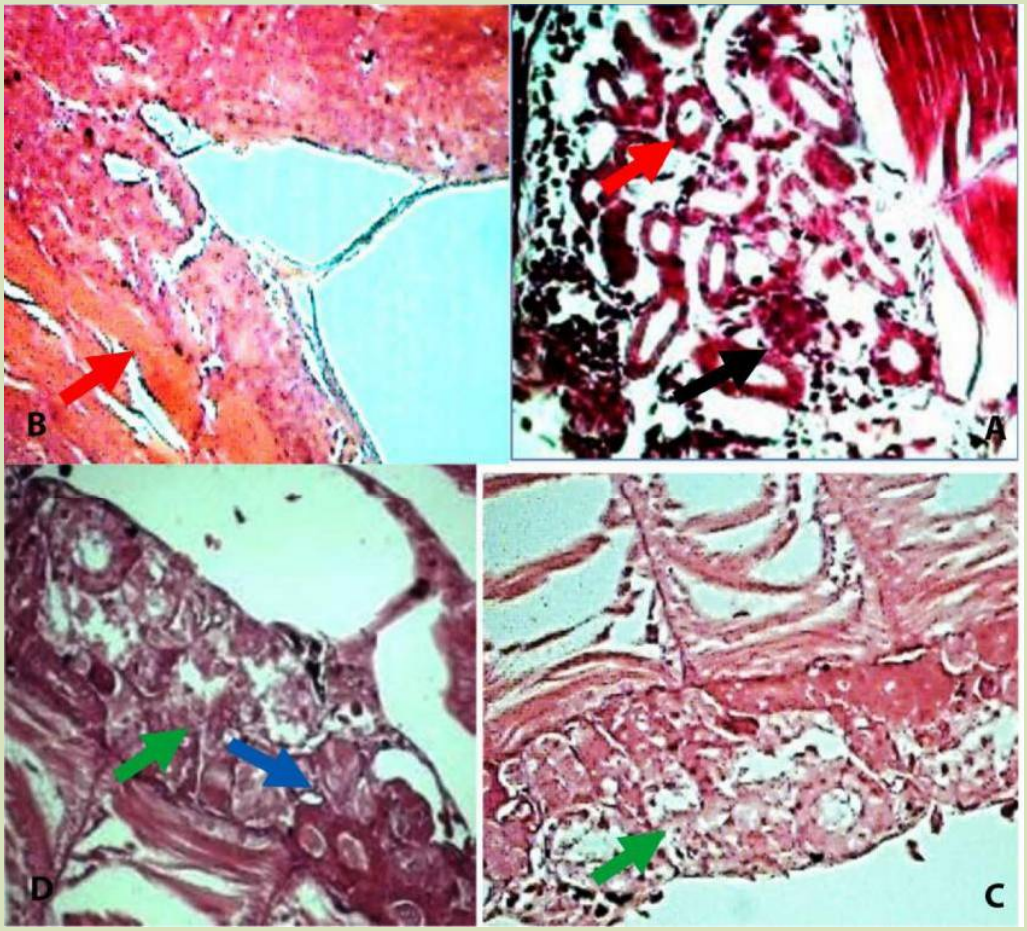
شکل ۱- اثرات آسیب شناسی فنل برش بافت آبشش

نمونه ی شاهد(A): نمونه در معرض فنل با غلظت ۱۰ mg/l ، (B): نمونه در معرض فنل با غلظت(mg/l)۲۵،(C): نمونه در معرض فنل با غلظت(mg/l)۴۰ ، (D): پیکان آبی سلول های اپی تلیالی لاملاهای آبششی را نشان می دهد. پیکان قرمز حالت پرخونی در فضای بین لاملاهای آبششی و پیکان مشکی هیپرپلازی تیغه‌های آبششی را نشان می دهد(رنگ آمیزی H&E، 100X) .



شکل۲- اثرات آسیب شناسی فنل برش بافت کبد

نمونه ی شاهد(A): نمونه در معرض فنل با غلظت ۱۰ mg/l ، (B): نمونه در معرض فنل با غلظت(mg/l)۲۵،(C): نمونه در معرض فنل با غلظت(mg/l)۴۰ ، (D): پیکان آبی هپاتوسیت های نرمال را نشان می دهد .پیکان سبز مقطع یک ورید کبدی می باشد. پیکان قرمز نشان دهنده ی واکوئولیزه شدن و تخریب هپاتوسیت



شکل۳- اثرات آسیب شناسی فنل برش بافت کلیه.

نمونه ی شاهد(A): نمونه در معرض فنل با غلظت ۱۰ mg/l ، (B): نمونه در معرض فنل با غلظت(mg/l)۲۵،(C): نمونه در معرض فنل با غلظت(mg/l)۴۰ ، (D):.پیکان مشکی کپسول بومن نرمال و پیکان قرمز توبول های نرمال را نشان می دهد. پیکان آبی نشان دهنده ی اتساع کپسول بومن و شبکه گلومرولی بوده و پیکان سبز نشان دهنده‌ی تخریب توبول ها و بافت بینابینی است. (رنگ آمیزی H&E ، 100X).

مشابه این تغییرات که تحت تاثیر فنل در بافت کبد بروز می-کند، کاهش ذخایر گلیکوژن است، زیرا به خصوص در شرایط استرس‌زا کربوهیدرات ها به عنوان اولین ذخایر انرژی به شدت مصرف می شوند، ضمناً تجمع ملانین به صورت پراکنده در بافت کبد نشان از حضور ملانوماکروفاژها دارد. این سلول ها عموماً به صورت دسته جاتی از ملانین به نظر می‌رسند که در واقع سلول های فاگوسیته محسوب می شوند(۸،۱۹). در تحقیق حاضر تفاوت چندانی بین بافت های کبدی در نمونه شاهد و غلظت های ۱۰ و ۲۵ میلی گرم برلیتر دیده نشد اما بیشترین آسیب های بافتی کبد در غلظت ۴۰ میلی گرم بر لیتر اتفاق افتاد. کلیه در ماهیان استخوانی یکی دیگر از اندام‌هایی است که از همان ابتدا در معرض آلاینده ها قرار می‌گیرد و غالباً دژنراسیون بافت های بینابینی، توبول ها و اتساع کپسول بومن وشبکه گلومرولی مشاهده می شود. این تغییرات در اکثر ماهی هایی که در معرض آلاینده های مختلف قرار می گیرند نیز دیده می شود(۲۱). در بافت کلیه تفاوت زیادی بین غلظت های شاهد و ۱۰ میلی گرم بر لیتر مشاهده نشد ولی در غلظت های ۲۵ و به خصوص ۴۰ میلی گرم برلیتر از فنل آسیب های شدیدی مانند تخریب توبول ها و اتساع شبکه گلومرولی و کپسول بومن مشهود است(شکل

۳- ج و د). امروزه تغییرات هیستوپاتولوژیک به عنوان نشان-گرهای بافتی و سلولی جهت ارزیابی سلامت ماهی ها کاربرد گسترده پیدا کرده است(۲۳، ۲۲). یکی از بزرگ‌ترین مزایای استفاده از نشان گرهای هیستوپاتولوژیک جهت ارزیابی شرایط زیست محیطی این است که این نشانگرها اجازه آزمایش روی اندام‌های خاص مانند: آبشش، کلیه و کبد را که مسئول عملکردهای حیاتی نظیر تنفس، دفع ادرار، تجمع و تغییر حالت زنوبیوتیک ها(آلاینده های زیست محیطی) در ماهی‌ها هستند را به ما می دهند. به علاوه شناسایی تغییرات ایجاد شده در این اندام ها آسان تر از شناسایی عملکرد آن ها می باشد(۱۴). تشخیص محدوده ی غلظتی که در آن، آلاینده بر روی یک گونه ماهی و یا زیستگاه آن خطری نداشته باشد، به مدت زمان ماندگاری آن ماده سمی در محیط بستگی دارد. به طوری که بایستی حداقل ۹۰ روز از غلظت های زیر کشنده آن ماده سمی در شرایط آزمایشگاهی بگذرد تا تاثیرات آن بر روی رشد و نمو جنین ماهی ثابت گردد(۲۰). بنابراین با توجه به محدودیت زمانی برای تکامل لاروهای نورس تاس ماهی ایرانی و مشاهده تغییرات اندک بافتی در آبشش، کبد و کلیه نمی توان با قاطعیت در این بازه زمانی(۱۰ الی ۱۵ روز) در خصوص اثرات سمی فنل بر جنین تاس ماهی ایرانی نظر داد. بر اساس مطالعه دتلاف و همکاران دمای ایده آل برای رشد و نمو جنین ماهی های خاویاری ۱۵-۱۱ درجه سانتی گراد است، چون در مدت این تحقیق دمای آب بین ۱۵-۱۳ درجه سانتی گراد بوده است(۱۲). بنابراین بروز تلفات و ناهنجاری های جنینی نمی تواند در اثر تغییرات دمای آب باشد. از این تحقیق نتیجه می گیریم که ترکیبات فنلی به عنوان یکی از آلاینده های اکوسیستم های آبی می توانند اثرات منفی زیادی به محیط وارد کنند. بنابراین مطالعه آسیب شناسی بافتی آبشش، کلیه و کبد به عنوان نشان‌گرهای زیستی در جنین تاس ماهی ایرانی نشان می دهد که جنین این گونه به اثرات مستقیم آلاینده های فنلی به شدت پاسخ می دهد. بنابر این گرچه ممکن است که فاکتورهای دیگری نیز در بروز ناهنجاری ها و تلفات تاس ماهی ایرانی در طبیعت دخیل باشند، اما نقش ترکیبات فنلی نیز باید مورد توجه بیشتری قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

از آقای مهندس قمصری مدیریت محترم مرکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید مرجانی و همکاران ایشان، که از هیچ گونه کمکی طی انجام این تحقیق دریغ نکردند و قدردانی از معاونت محترم حوزه پژوهش و فن آوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان که در تامین اعتبار لازم برای انجام هرچه بهتر این طرح و تهیه امکانات آزمایشگاهی لازم همواره ما را حمایت نمودند.

منابع

۱-ابطحی، ب.، برازنده م. ۱۳۸۲. اثر دما بر حساسیت گاماروس(*Pontogamarus maeotics*) نسبت به سولفات کادمیوم با محاسبه *LC50* ۹۶ ساعته. مجله علوم دریایی ایران، دوره دوم، شماره۴، ص ۹ تا۱۷.

۲-امینی راد، ا. ۱۳۷۶. تعیین غلظت کشندگی(*LC50*) سم دیازنون در ماهی آزاد دریای خزر(*Salmotrutta caspicus*). پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، صفحه ۴۵.

۳-دتلاف، ت. آ.، گینس برگ، آ. اس .، اشمال هوزن، او. ال. ۱۹۹۳. تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری. مترجمان: محمد

٤-جوادی، م. ۱۳۸۷. تعیین غلظت کشندگی50 LC و ضایعات ناشی از سم آندوسولفان درفیل ماهی(Husohuso) . پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس. صفحه۶۷.

۵-زمینی، ع. ۱۳۷۵. تعیین غلظت کشنده50 LC فلزات سرب و کادمیوم بر روی دو گونه از کپور ماهیان چینی(آمور و فیتوفاگ)، پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات، دانشگاه آزاد لاهیجان. صفحه ۵۷.

٦-نظامی، ش.، پژند، ز.، خارا، ه.، افسرده،آ. ۱۳۸۴. تعیین LC 50 طی ۹۶ ساعت دو ترکیب نفتی فنل و ۱- نفتول بر

بچه ماهی تاسماهی ایرانی(*Acipenserpersicus*). مجله علمی شیلات ایران، سال چهاردهم، شماره۱، صفحات ۱۴۸ تا ۱۵۹.

7.Abdel-Hameid, N.A.H. (2007). Physiological and histopathological alterations induced by phenol exposure in *Oreochromis aureus* juveniles. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 7; 131-138.

8.Camargo marina, M.P., Martinez Claudia, B.R. (2007). Histopathology of gills , kidney and liver of neotropical fish caged in an urban stream. Neotropical. Ichth, 5(3); 327-336.

9.Carmono, R., Garcia –Gallego, M., Sanza, A., Domezain, A., Ostos- Garrido, M.V. (2004). Chloride cells and pavement cells in gill epithelia of *Acipenserna ccarii*: ultrastructural modifications in *Acipenserna ccarii*: ultrastructural modifications in seawater-acclimated specimens. Journal of Fish Biology, 64; 553-566.

10. Chebanov, M. (2011). Sturgeon hatchery practices and management for release guidelines , FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) Fisheries and Aquaculture Technical Paper Ankara, p ; 124.

11. Chicherina, O.V., Leonov, D., Fashchuk, D.A. (2004). Geographical and ecological characteristics of the Caspian sea and modern tendencies in the evolution of its ecosystem. Water Resources, 31; 299-317.

12. Dwyer, V., Mayer, F.L., Sappington, L.C., Buckler, D.R., Bridages, C.M., Greer, I.E. (2005). Assessing contaminant sensitivity of endangered and threatened aquatic species: part 1. acute toxicity of five chemical , arch. Environ .contam. Toxical, 143 -154.

13. Fanta, E., Rios, F.S. S., Vianna Romao , A.C.C., Freiberger, S. (2003). Histopathology of the fish *Corydora spaleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. Ecotoxicology and Environmental Safety, 54; 119-130.

14. Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. Cambrige University Press, London, U.K . p 333 .

15. Jafari, N. (2010). Review of pollution sources and controls in Caspian sea region .Journal Of Ecology And The Natural Environment, 2(2); 025 – 029 .

16. Kammann, U., Vobach, M., Wosniok, W. (2005). Toxic effects of Brominated and Phenols on zebra fish embryo. Journal of Springer, Bull . Environ. Contam .Toxical, 97 – 102.

17. Kammann, U., Vobach, M., Wosniok, W., Schäffer, A., Telscher, A. (2009). Acute toxicity of 353-nonylphenol and its metabolites for zebra fish embryos. Journal of Springer .Environ Sci. Pollut. Res., 16; 227–231.

18. Nasrollahzadeh, A. (2010). Caspian sea and its ecological challenges [report and opinion], Caspian Jou. Env. Sci., 8(1); 97-104.

19. Rodrigues, E.L., Fanta, F. (1998). Liver histopathology of the fish *Brachy daniorerio* after acute exposure to sublethal levels of the organophosphate Dimetoato 500. Revista. Brasileira. de Zoologia, 15; 441-450.

20. Saha, N.C., Bhunia, F., Kaviraj, A. (1999). Toxicity of phenol to fish and aquatic ecosystems. Journal of Springer. Bull. Environ. Contam. Toxical, 63; 195 – 202.

21. Takashima, F., Hibya, T. (1995). An atlas of fish histology: Normal and Pathological Features. 2nd ed. Tokyo:Kodansha.

22. Thophon, S., Kruatrachue, M., Upatha, E.S., Pokethitiyook, P., Sahaphong, S., Jarikhuan, S. (2003). Histopathological alterations of white seabass, *Latescal carifer* in acute and subchronic cadmium exposure. Environmental Pollution, 121; 307-320.

23. Wester, P.W., Canton, J.H. (1991). The use fulness of histopathology in aquatic toxicity studies. Comparative Biochemistry and Physiology(C), 100; 115-117.