بررسی تاثیر فلز مس بر تغییرات هیستوپاتولوژیک بافتهای عضله، کبد و گناد ماهی کپور معمولی

مریم شاپوری[1*]، شهربانو عریان[2]، عباس اسماعیلی ساری[3]

چکیده

در این تحقیق به بررسی تأثیر فلز مس بر ماهی کپور معمولی (*Cyprinus Carpio*) در شرایط آزمایشگاهی پرداخته شد. ابتدا میزان Lc50-96h مس بر روی ماهیان انگشت قد و بالغ محاسبه گردید که به ترتیب معادل ۰/۲۷ و ۲/۳ میلی‌گرم در لیتر تعیین گردیدند، سپس به بررسی بروز ضایعات احتمالی ریزبینی، بافتهای عضله، گناد و کبد ماهی کپور معمولی که در مجاورت با فلز مس در دامنهٔ غلظت‌های ۲ الی ۶/۵ میلی‌گرم در لیتر قرار داشتند، پرداخته شد. مقاطع میکروسکوپی تهیه شده از نقطه نظر هیستوپاتولوژی مورد مطالعه میکروسکوپیک قرار گرفتند. نتایج حاصله نشان داد که در کبد پس از قرارگیری در مجاورت فلز مس، پدیده‌هایی نظیر دژنرسانس چربی، پرخونی، خونریزی و در غلظت‌های بالاتر نکروز و هجوم لنفوسیت‌ها و التهاب کپسول کبدی مشاهده گردید. در تخمدان دژنره شدن تخمک‌ها و در بیضه نفوذ سلولهای آماسی و رسوب هموسیدرین در داخل بافت بیضه و افزایش بافت همبندی قابل مشاهده بود . در عضلات ضایعه‌ای مشاهده نگردید. همچنین میزان تجمع زیستی فلز مس در سه بافت عضله، گناد و کبد در سه غلظت زیر کشنده مس (۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) به کمک روش جذب اتمی تعیین گردید. نتایج تحلیل شده بیانگر حداقل میزان تجمع مس در عضلات و حداکثر میزان تجمع مس در کبد ماهی کپور معمولی می‌باشد.

واژگان کلیدی: کپور معمولی، مس ، کبد، گناد، عضله، Lc50

مقدمه

امروزه صنایع گوناگون و شیوه‌های نوین کشاورزی موجب وارد شدن مقادیر زیادی از ترکیبات شیمیایی مختلف و فلزات سنگین به محیط زیست شده است. آبزیان نیز به طور طبیعی در معرض تماس با تعداد زیادی از این ترکیبات و فلزات می‌باشند. در این راستا پژوهشگران توجه خود را به انجام تحقیقاتی در خصوص مشخص نمودن میزان آلودگی منابع مختلف آبی، چگونگی تقلیل آلودگی، نحوه جذب فلزات توسط آبزیان، تجمع زیستی فلزات سنگین در بافت‌های مختلف آبزیان، امکان استفاده از برخی آبزیان به عنوان شاخص‌های زیستی، تغییرات و آسیب‌های ایجاد شده

۱ـ استادیاردانشگاه آزاد اسلامی واحد سواد کوه و عضو باشگاه پژوهشگران جوان
۲ـ استاد گروه زیست‌شناسی دانشگاه تربیت معلم
۳ـ دانشیار گروه محیط زیست دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس.
*–نویسنده مسئول marybito@yahoo.com

در بافت‌ها و بسیاری از زمینه‌های تحقیقی دیگر معطوف ساخته‌اند. (۵) به علاوه استفاده از سولفات مس به عنوان یک ماده جلبک کش تاریخچه طولانی داشته است. این ماده دارای تأثیر وسیعی بر روی انگلها و جلبک‌های سبز و آبی می‌باشد. عملکرد سمی مس بر روی موجودات زنده به خواص شیمیایی و عملکردهای بیوشیمیایی آن در تغییرات متابولیکی بستگی دارد. سولفات مس به خوبی در آب حل می‌شود و می‌تواند همراه با آب به صورت یون توسط موجودات زنده جذب گردد. در نتیجه سولفات مس دستخوش تجمع زیادی می‌شود. از آنجاییکه مس می‌تواند در بافتهای ماهیان جمع شود و باعث تغییرات و آسیب در بافت‌های مختلف ماهیان گردد لذا انگیزه اصلی این تحقیق در مورد تعیین Lc50 فلز مس و تغییرات ایجاد شده بر روی بعضی از اندامهای ماهی کپور معمولی است.

مواد و روش کار

آزمایش های تعیین Lc50 بر اساس روش سازمان توسعه و همکاری اقتصادی و با نام متداول O.E.C.D[1] *Guide Line on testing of chemical* (۱۹۸۹) انجام گرفت (۴).

سمیت حاد فلز مس بر روی کپور معمولی (Cyprinus Carpio) مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق برای تعیین Lc50 فلز مس در کپور ماهی انگشت قد (۵ ـ ۳ گرمی) از ۹ آکواریم با گنجایش هر یک ۵۰ لیتر آب استفاده شد. برای شروع کار ماهیان به گروه‌های ده‌تایی در آکواریم‌ها حاوی غلظت‌های ۰/۱ تا ۰/۸ میلی‌گرم سولفات مس قرار گرفتند. همچنین یک آکواریم به عنوان شاهد در نظرگرفته شد. دمای آب آکواریم‌ها یکسان در حدود ۲۳ ـ ۲۱ درجه سانتی‌گراد و pH تقریباً خنثی در حدود ۷/۲، سختی آب ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر و میزان اکسیژن ورودی از طریق پمپ هوا دقیقاً کنترل گردید.در طی دوره آزمایش ماهیان، تغذیه نمی‌شدند. ماهیان مورد مطالعه در صورت مرگ از آب خارج می‌شدند. پس از ٤ روز آب آکواریم‌ها تخلیه شده به خوبی شستشو و برای تکرارهای بعدی آماده شدند. همچنین جهت تعیین Lc50 برای کپور ماهیان (۱۲۰ ـ ۱۰۰ گرمی) و بررسی اثرات هیستوپاتولوژی فلز مس، ٦ آکواریم تهیه و ماهیان را به گروه‌های ده‌تایی در هر کدام از آکواریم‌ها با غلظت‌های (۰/۵، ۲، ۳/۵، ۵، ٦/۵ میلی‌گرم در لیتر) قرار داده، شرایط فیزیکی و شیمیایی ایجاد شده برای تمامی آکواریم‌ها یکسان بوده به این ترتیب که دمای آب آکواریم ۲۳ ـ ۲۱ درجه سانتی‌گراد و pH تقریباً خنثی در حدود ۷/٤ بوده و سختی آب ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر بود. یک آکواریم نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شد.

از تمامی ماهیانی که مدت زمان بیشتری تحت سولفات مس قرارگرفته بودند (۷۲ و ۹٦ ساعت) و ماهیهای شاهد جهت انجام آزمایش‌های آسیب‌شناسی نمونه‌گیری به عمل آمد به نحوی که نمونه‌های بافتی پس از برداشت از بدن ماهیان در داخل محلول فرمالین بافر ۱۰ درصد قرار داده شد. سپس مقاطع بافتی با ضخامت ۵ میکرون بریده و به روش معمولی هماتوکسلین و ائوزین رنگ‌آمیزی انجام گردید (۷). در نهایت برای بررسی میزان تجمع زیستی فلز مس از ۳ غلظت زیر کشنده ۰/۱، ۰/۵ و ۱، از نمونه‌های ٤۸، ۷۲ و ۹٦ ساعت، ۵ نمونه به طور تصادفی انتخاب شدند سپس بافتهای گنادها، عضله و کبد جداسازی شده به وسیله اسید نیتریک و آب اکسیژنه عمل هضم آن‌ها در اتوکلاو صورت گرفته و برای تعیین میزان فلز مس از دستگاه جذب اتمی با مشخص GBC932 استفاده شد. (۲ و ۵)

نتایج

بر اساس نتایج حاصل مقادیر ۰/٦، ۰/۵ و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر از سولفات مس به ترتیب برای ٤۸، ۷۲

1 . Organization Economic co-operation development

و ۹۶ ساعت، ۵۰ درصد ازماهیان با وزن تقریبی ۵ـ۳ گرمی را نسبت به شاهد از بین برد. حداکثر غلظت مجاز این ترکیب با توجه به سختی ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر آب، ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد (نمودار شماره ۱) .

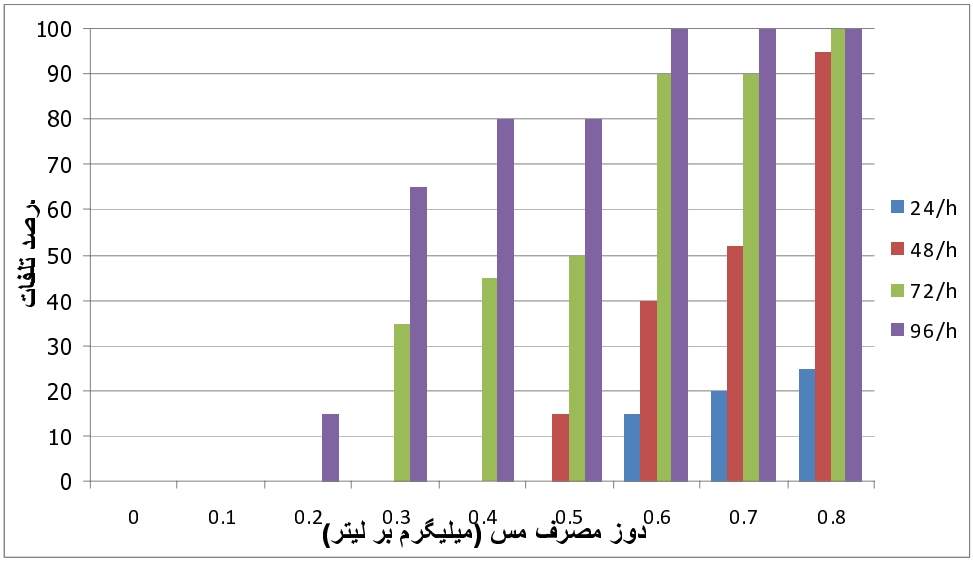
مقادیر ٦/٥، ٥، ٣/٥ و ٢/٣ میلی‌گرم در لیتر از سولفات مس به ترتیب برای ٢٤، ٤٨، ٧٢ و ٩٦ ساعت، ۵۰ درصد از ماهیان با وزن تقریبی ۱۲۰ ـ ۱۰۰ گرمی در شرایط سختی ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر، نسبت به شاهد از بین رفتند. (ماهیهای شاهد همگی سالم بودند) (نمودار شماره ۲). در بررسی مقاطع بافتی تهیه شده از کبد، تخمدان، بیضه و عضله ماهی کپور معمولی که در مجاورت با غلظت‌های۰/۵ ، ۲، ۳/۵ ، ۵، ٦/٥ میلی‌گرم در لیتر از سولفات مس قرارگرفته بودند از نظر هیستوپاتولوژیکی مورد مطالعه قرار گرفتند، نتایج بررسی میکروسکوپی از نمونه‌هایی که در مجاورت غلظت‌های ذکر شده بودند، به شرح ذیل می‌باشند:

در بررسی مقاطع بافتی در غلظت های ۰/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر هیچگونه ضایعه‌ای مشاهده نشد. در غلظت ۳/۵ میلی‌گرم در لیتر، نمونه‌هایی که تحت مجاورت بیشتر سولفات مس قرارگرفته بودند (۷۲ و ۹٦ ساعت) و در غلظت های ۵ و ٦/٥ در تمامی گروهها اکثر ضایعات هیستوپاتولوژیکی ذکر شده مشاهده شد.

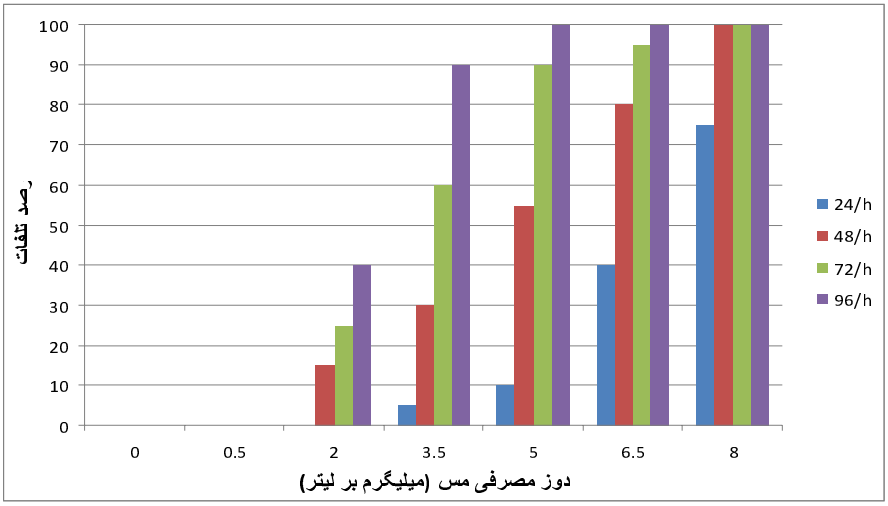
در کبد حضور بافت لمفاتیک و خونساز در اطراف مجاری صفراوی کبد به خصوص در نمونه‌هایی که در مجاورت غلظت‌های بالاتر قرار داشتند، بارزتر بودند. حضور نکروز کانونی در نواحی مختلف کبد و رسوب هموسیدرین در اطراف عروق خونی کبدی و مجاری صفراوی کبد و در داخل ملانوماکروفاژهای منتشر شده در کبد دیده می‌شد. در تمامی غلظت‌ها اکثراً ادم، پرخونی خونریزی، نفوذ چربی و گلیکوژن وجود داشت. (شکل شماره ۱)

در تخمدان تغییرات نکروتیک و دژنرسانس تخمک‌ها مشاهده گردید (شکل شماره ۲). در بیضه‌ها حضور و نفوذ سلولهای آماسی در بافت همبندی، افزایش بافت همبندی به همراه رسوب هموسیدرین مشاهده گردید. (شکل شماره ۳) در عضلات هیچگونه ضایعه‌ای مشاهده نشد.

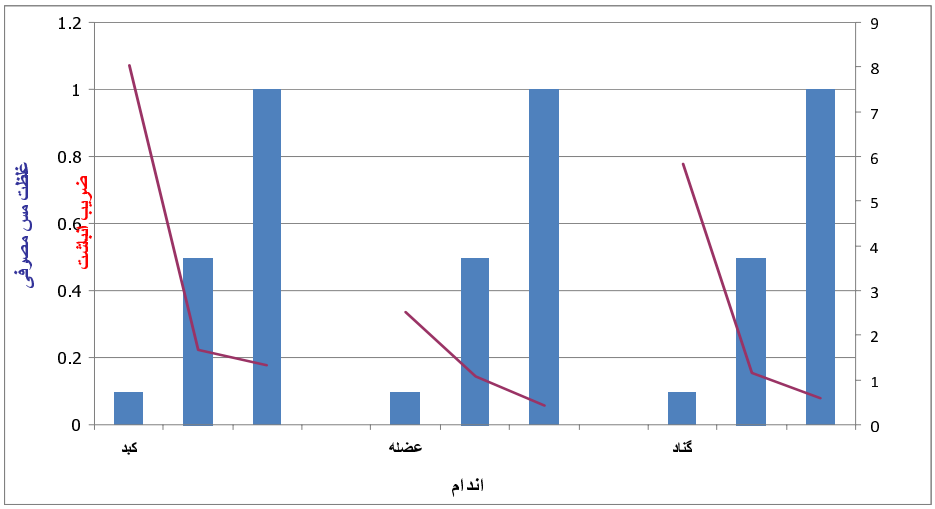
بر اساس نتایج حاصل از انباشت مس در بافت‌های مورد بررسی در غلظت‌های زیرکشنده در کبد به بیشترین مقدار خود و در عضلات به کمترین مقدار می‌رسید (نمودار شماره ۳).



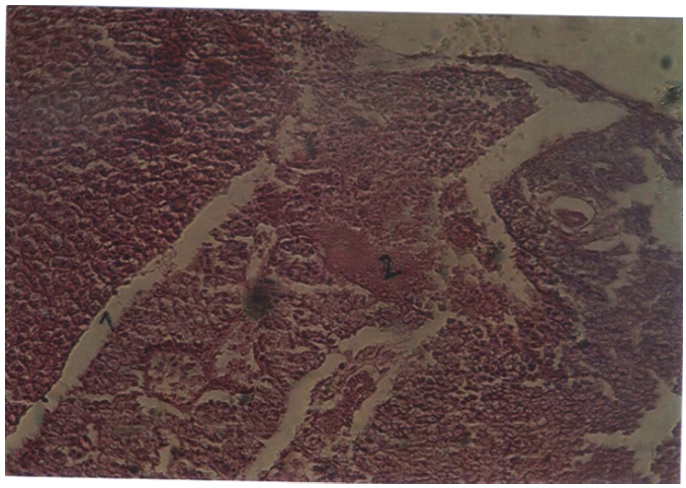
نمودار شماره ۱ ـ Lc_{50} کپورماهیان با وزن تقریبی ۵ـ۳ گرم



نمودار شماره ۲ ـ Lc_{50} کپورماهیان با وزن تقریبی ۱۲۰ـ۱۰۰ گرم

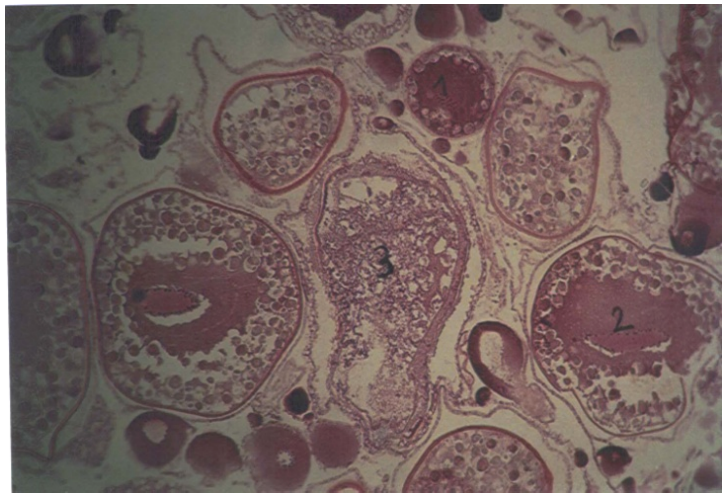


نمودار شماره ۳- ضریب انباشت غلظت مس مصرفی در اندامهای مورد نمونه برداری

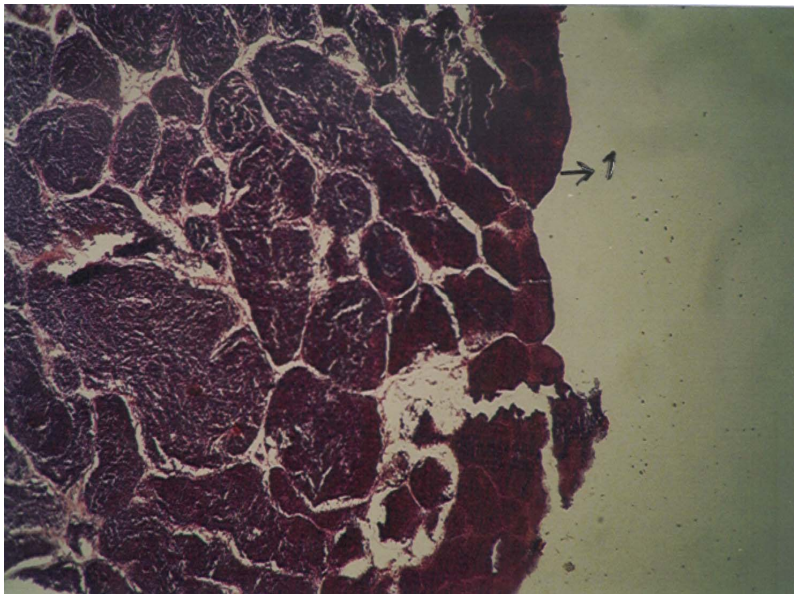


شکل شماره ۱ـ تصویر میکروسکوپی از کبد ماهی کپور معمولی (در مجاورت با سولفات مس) (درشتنمایی X=10)

۱ـ فضاهای سینوزوئیدی ۲ـ نکروز کانونی (Focal Necrosis)



شکل شماره ۲ـ تصویر میکروسکوپی از تخمدان ماهی کپور معمولی (در مجاورت با سولفات) (درشتنمایی X=40)
۱ ـ Primary Oocyte (Po) ۲ـ Secondary Oocyte (So)
۳ ـ دژنره شدن تخمک‌ها (Oocyte Degeneration)



شکل شماره ۳ـ تصویر میکروسکوپی از بیضه ماهی کپور معمولی (در مجاورت با سولفات مس) (درشتنمایی X=40)
۱ـ التهاب و ادم در قسمت سطحی

بحث

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد $Lc_{50}-96h$ برای ماهیان انگشت قد (۵ـ۳ گرمی) ۰/۲۷ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد. این مسئله بیانگر حساسیت ماهیان کپور معمولی جوان و مقاومت بسیار کم آنها به مس می‌باشد. بر اساس تحقیق انجام شده در سال ۱۹۹۵ بر روی ماهیان کپور معمولی جوان با اندازه طولی ٤ cm میزان Lc_{50} بدست آمد. در مدت زمان ۹٦ ساعت ۰/۳ ppm و در اندازه ٦ cm میزان Lc_{50} ، ۱ ppm می‌باشد (۳). همچنین در تحقیقی که توسط Powoiko وLam در سال ۱۹۹۸ بر روی تیلاپیا وماهی کپورمعمولی صورت گرفت میزان Lc_{50} در ماهی کپور معمولی برای زمان ۹٦ ساعت ۰/۲ ppm و برای ماهی تیلاپیا ۱/۵ ppm تعیین شد. این مسئله نیز بیانگر

مقاومت بالای تیلاپیا و حساسیت کپور معمولی جوان به مس می‌باشد (۸) از آنجا که سولفات مس غالباً برای کنترل انگلهای خارجی و گاهی اوقات برای کنترل گیاهان آبزی بکار می‌رود دامنه مصرف آن بسته به شرایط شیمیایی آب می‌باشد. سولفات مس در آبهای سبک نسبت به آبهای سنگین سمیت بیشتری داشته و بنابراین باید در آبهای سبک کمتر مصرف شود. افزایش دما و کاهش pH نیز برسمیت مس اثر می‌گذارد و آن را افزایش می‌دهد (۱). در بررسی مقاطع بافتی تهیه شده از کبد، بیضه و تخمدان ضایعاتی مشاهده گردید. در کبد پرخونی، خونریزی، واکوئلهای چربی و تجمع گلیکوژن و در غلظت‌های بالاتر تغییرات سیتوپلاسم، نکروز کانونی و هجوم لنفوسیت‌ها و التهاب کپسول کبدی دیده شد که در نهایت می‌توان بیان نمود که آسیب کبدی به صورت نکروتیک و خونریزی یا هموراژیک می‌باشد. کبد ماهیان نسبت به محرکهای شیمیایی بسیار حساس می‌باشد زیرا جریان خون در کبد در مقایسه با بازده قلبی کنداست و دفع سموم شیمیایی و متابولیک‌های حاصله از کبد تدریجی است. در تخمدان ماهی کپور معمولی ضایعات دژنرسانس شدن تخمک‌ها و در بیضه حضور و نفوذ سلولهای آماسی در بافت همبندی به همراه رسوب هموسیدرین در داخل بافت بیضه قابل مشاهده بود. ضایعات موجود در تخمدان و بیضه ماهیان در سال ۱۹٤۱ توسط Robert مورد بررسی قرار گرفته بود. در عضلات هیچگونه ضایعه‌ای مشاهده نشد و سالم بودند اما در بررسی‌های انجام شده به وسیله میکروسکوپ الکترونی، در سال ۱۹۹۱ توسط Jan Mark در قسمت‌هایی از فیبر ماهیچه‌ای ماهی کپور معمولی که به مدت ۹ روز در مجاورت غلظت ppm ۱ مس قرار داشتند، بین سارکومرها کاهش فاصله دیده می‌شد که این امر موجب انقباض فیبرهای ماهیچه‌ای می‌شود (٦) نتایج حاصله از جدول انباشت مس، نشان می‌دهد که مراحل انباشت زیستی باعث تجمع مس در کبد، گنادها و عضله می‌شوند و این مقدار تجمع مس از آنچه که در آب است فراتر و بیشتر خواهد بود. بنابراین حتی کمترین غلظت مس موجود در آب که پایین‌تر از شرایط طبیعی به نظر می‌رسد نیز تأثیری معکوس بر افراد Cyprinus Carpio دارد. اگرچه در غلظت ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر مس هیچگونه عملکرد حاد سمی که باعث مرگ و میر شود دیده نمی‌شود. با این حال ضرایب انباشت را برای این غلظت‌ها اندازه‌گیری و محاسبه می‌کنند تا ثابت شود مقادیر بدست آمده چندین برابر آنچیزی است که برای غلظت‌های بالاتر وجود دارد. همچنین بافت‌های مختلف الگوهای مختلفی از تجمع مس را بروز می‌دهند. همانطور که نمودار ۳ نشان می‌دهد، غلظت‌های مس در ماهیچه کمتر از ۲ بافت دیگر است، این موضوع با آنچه که Chan در سال ۱۹۹۵ نشان داد یکسان است، وی بیان نمود که غلظت‌های مس در ماهیچه‌ها کمتراز نقاط دیگر بدن در Rabbit Fish می‌باشد. همچنین Chu و Wonk در سال ۱۹۹۸ مطالعه مسمومیت و تجمع زیستی مس را بر روی ماهیان Bream نقره‌ای دریایی مورد بررسی قرار داده است که تجمع قابل ملاحظه‌ای از مس را پس از تماس با مس در غلظت‌های زیرکشنده در Bream مشاهده نموده است (۱۰). در بررسی به عمل آمده، انباشت مس در بافت‌های ماهی کپور معمولی در غلظت‌های زیرکشنده در کبد به بیشترین مقدار خود و در عضلات به کمترین مقدار می‌رسید. در ماهیچه‌ها، مقدار متوسط میزان جذب مس در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر برابر با ۰/۲۵۳ می‌باشد، در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر برابر با ۰/۵۳٤ و در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر میزان متوسط مس کاهش یافته که برابر ۰/٤۲ میلی‌گرم در لیتر است. این امر بر توقف انباشته زیستی مس در ماهیچه‌ها دلالت می‌کند. در کبد ماهیانی که در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر قرار گرفته‌اند با افزایش مقدار غلظت. مقدار متوسط انباشت مس $(\overline{x})$ نیز افزایش می‌یابد. در عین حال ضریب انباشت، با افزایش غلظت، کاهش می‌یابد. همچنین میزان متوسط مس در بافت گناد با

افزایش غلظت مصرفی مس تغییرات چندانی نداشته و از طرفی ضرایب انباشت نیز کاهش می‌یابد.

از این رو محلولهایی که غلظت‌های کم مس را در خود دارند به خصوص از نظر انتقال فلز در زنجیره غذایی می‌توانند برای اکوسیستم خطرناک باشند. در این تحقیق میزان متوسط تجمع مس بیشتر در کبد، سپس در گنادها و در نهایت در ماهیچه‌ها اتفاق افتاده است.

منابع

۱- اسماعیلی ساری، ع. (۱۳۷۹): مبانی مدیریت کیفی آب در آبزی پروری، مؤسسه تحقیقات شیلات ایران، ۲٦۰ ص.

۲- علیزاده، م. (۱۳۷٦): تعیین مقادیر فلزات سنگین در سه گونه از کپور ماهیان پرورشی به روش اسپکتروسکوپی. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد. دانشکده علوم و فنون دریایی.

3- Alam, M.K.; Maughan, (1995): Acute toxicity of heavy metals to common carp, J. ENVIRON-SCI.-Health.Vol.A30, no 8, PP. 1807-1816.

4- ASTM (1988): Standard Guide for Conducting early lifes - stage Toxicity tests with fishes. American Society for testing and material. E 1241-88. 26pp.

5- Finpederson, R; (1994) Ecotoxicological Evaluation of indutrial wast water, Ministry of the Envoronment, Denmark; 1994; pp. 360-380.

6- JAN Mark, E. (1991). The Effect of copper (Cu2+) On Carp Juveniles in a laboratory Experiment Pol. Arch. Hydrobiol, Vol. 38, No 3-4, PP. 485-494.

7- Kumar, V, Cotran, R., and Robbins, (1992): S.L. Basic pathology, 5th edition W.B. Saunders, PP: 592

8- Lam, K., Powaiko. (1998): Metal Toxicity and Metallothionein Gene expression studies in common carp and Tilapia; Marine Environmental Research, Vol, 46, No 1-5. PP: 563-566.

9- Roberts, J. Ronald. (1941): Fish pathology. British library cataloguing in publication Data, pp 44-45.

10- Wong, P. M. Chu. (1998): Study of Toxicity and Bioaccumulation of copper in the silver sea Bream sparus sarbai; Environment International, Vol. 25, No-4, PP: 417-422.