

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

مریم شاپوری<sup>۱\*</sup>، شهربانو عریان<sup>۲</sup>، عباس اسماعیلی ساری<sup>۳</sup>

## 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 میلی گرم در لیتر تعیین گردیدند، سپس به بررسی بروز ضایعات احتمالی ریزینی، بافتهای عضله، گناد و کبد ماهی کپور معمولی که در مجاورت با فلز مس در دامنه غلظت‌های ۲ الی ۶/۵ میلی گرم در لیتر قرار داشتند، پرداخته شد. مقاطع میکروسکوپی تهیه شده از نقطه نظر هیستوپاتولوژی مورد مطالعه میکروسکوپی قرار گرفتند. نتایج حاصله نشان داد که در کبد پس از قرارگیری در مجاورت فلز مس، پدیده‌هایی نظیر دژنراسانس 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 کشته مس (۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی گرم 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

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

امروزه صنایع گوناگون و شیوه‌های نوین کشاورزی موجب وارد شدن مقادیر زیادی از ترکیبات شیمیایی مختلف و فلزات سنگین به محیط زیست شده است.

۱- استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد سواد کوه و عضو باشگاه پژوهشگران جوان  
۲- استاد گروه زیست‌شناسی دانشگاه تربیت معلم  
۳- دانشیار گروه محیط زیست دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس.

\*-نویسنده مسئول marybito@yahoo.com

هوا دقیقاً کنترل گردید. در طی دوره آزمایش ماهیان، تغذیه نمی شدند. ماهیان مورد مطالعه در صورت مرگ از آب خارج می شدند. پس از ۴ روز آب آکواریومها تخلیه شده به خوبی شستشو و برای تکرارهای بعدی آماده شدند. همچنین جهت تعیین  $Lc50$  برای کپور ماهیان (۱۲۰ - ۱۰۰ گرمی) و بررسی اثرات هیستوپاتولوژی فلز مس، ۶ آکواریوم تهیه و ماهیان را به گروههای ده تایی در هر کدام از آکواریومها با غلظت‌های (۰/۵، ۲، ۳/۵، ۵، ۶/۵ میلی‌گرم در لیتر) قرار داده، شرایط فیزیکی و شیمیایی ایجاد شده برای تمامی آکواریومها یکسان بوده به این ترتیب که دمای آب آکواریوم ۲۳ - ۲۱ درجه سانتی‌گراد و pH تقریباً خنثی در حدود ۷/۴ بوده و سختی آب ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر بود. یک آکواریوم نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شد.

از تمامی ماهیانی که مدت زمان بیشتری تحت سولفات مس قرار گرفته بودند (۷۲ و ۹۶ 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 انوزین 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 ۴۸، ۷۲ و ۹۶ 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 ۰/۶، ۰/۵ و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر از سولفات مس به ترتیب برای ۴۸، ۷۲

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

آزمایش‌های تعیین  $Lc50$  بر اساس روش سازمان توسعه و همکاری اقتصادی و با نام متداول *O.E.C.D<sup>1</sup> 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 - ۳ گرمی) از ۹ آکواریوم با گنجایش هر یک ۵۰ لیتر آب استفاده شد. برای شروع کار ماهیان به گروه‌های ده تایی در آکواریومها حاوی غلظت‌های ۰/۱ تا ۰/۸ میلی‌گرم سولفات مس قرار گرفتند. همچنین یک آکواریوم به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. دمای آب آکواریومها یکسان در حدود ۲۳ - ۲۱ درجه سانتی‌گراد و pH تقریباً خنثی در حدود ۷/۲، سختی آب ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر و میزان اکسیژن ورودی از طریق پمپ

1 . Organization Economic co-operation development

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 ملانوماکروفازهای منتشر شده در کبد دیده می‌شد. در تمامی غلظت‌ها اکثراً ادم، پرخونی خونریزی، نفوذ چربی و گلیکوژن وجود داشت. (شکل شماره ۱)

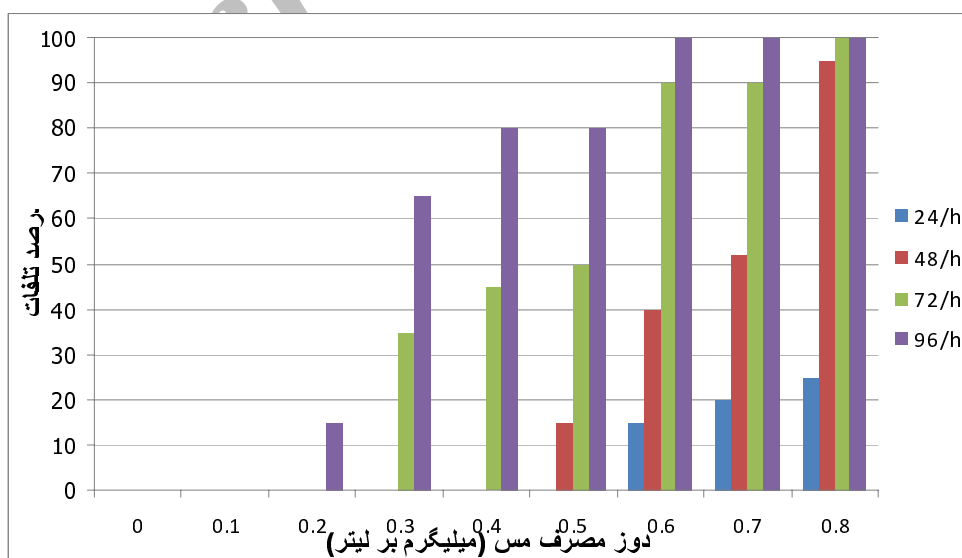
در تخمدان تغییرات نکروتیک و دژنراسانس تخمک‌ها مشاهده گردید (شکل شماره ۲). در بیضه‌ها حضور و نفوذ سلولهای آماسی در بافت همبندی، افزایش بافت همبندی به همراه رسوب هموسیدرین مشاهده گردید. (شکل شماره ۳) در عضلات هیچگونه ضایعه‌ای مشاهده نشد.

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).

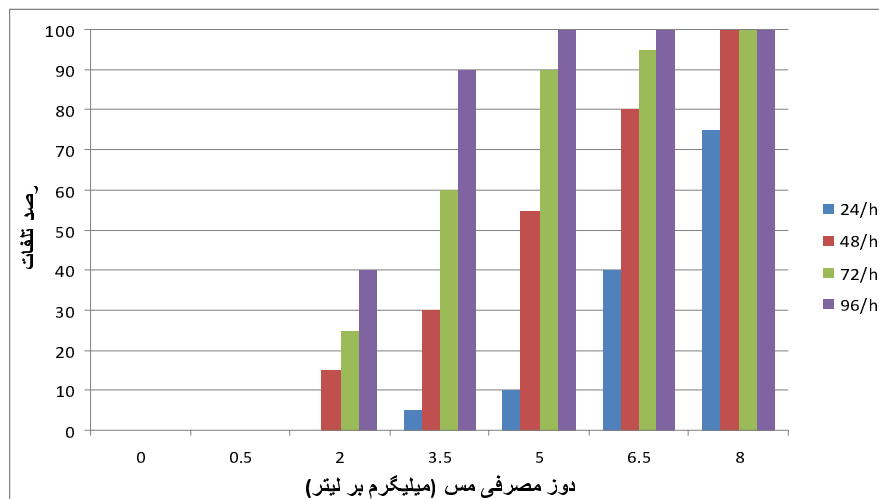
و ۹۶ ساعت، ۵۰ درصد از ماهیان با وزن تقریبی ۳-۵ گرمی را نسبت به شاهد از بین برد. حداکثر غلظت مجاز این ترکیب با توجه به سختی ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر آب، ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد (نمودار شماره ۱).

مقادیر ۶/۵، ۵، ۳/۵ و ۲/۳ میلی‌گرم در لیتر از سولفات مس به ترتیب برای ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت، ۵۰ درصد از ماهیان با وزن تقریبی ۱۲۰ - 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 غلظت‌های ۰/۵، ۲، ۳/۵، ۵، ۶/۵ میلی‌گرم در لیتر از سولفات مس قرار گرفته بودند از نظر هیستوپاتولوژیکی مورد مطالعه قرار گرفتند، نتایج بررسی میکروسکوپی از نمونه‌هایی که در مجاورت غلظت‌های ذکر شده بودند، به شرح ذیل می‌باشند:

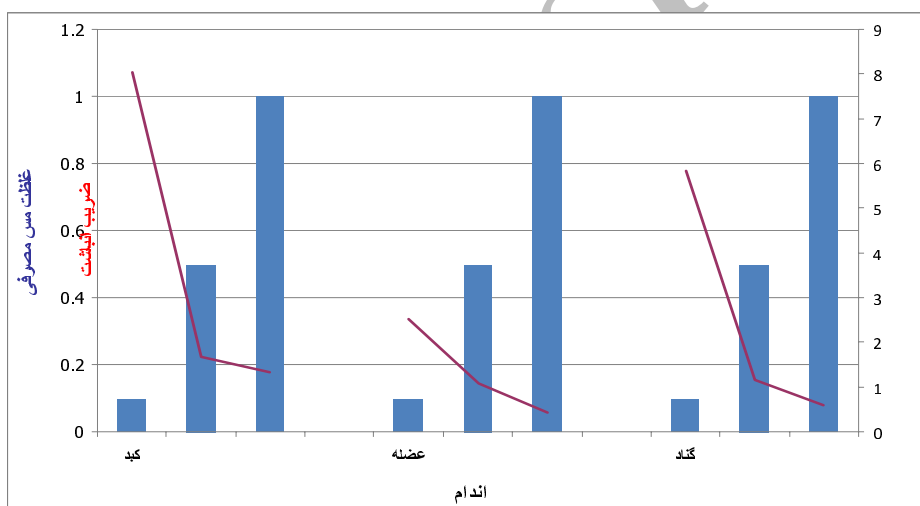
در بررسی مقاطع بافتی در غلظت‌های ۰/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر هیچگونه ضایعه‌ای مشاهده نشد. در غلظت ۳/۵ میلی‌گرم در لیتر، نمونه‌هایی که تحت مجاورت بیشتر سولفات مس قرار گرفته بودند (۷۲ و ۹۶ ساعت) و در غلظت‌های ۵ و ۶/۵ در تمامی گروهها



نمودار شماره ۱ - LC50 کپور ماهیان با وزن تقریبی ۳-۵ گرم



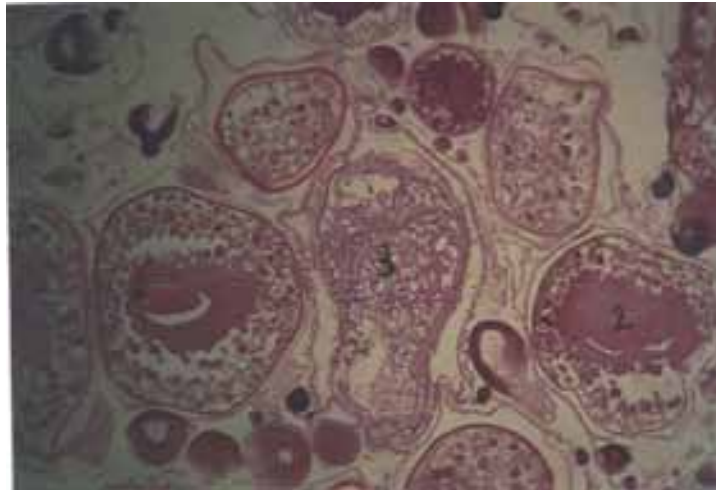
نمودار شماره ۲ -  $Lc50$  کپورماهیان با وزن تقریبی ۱۲۰-۱۰۰ گرم



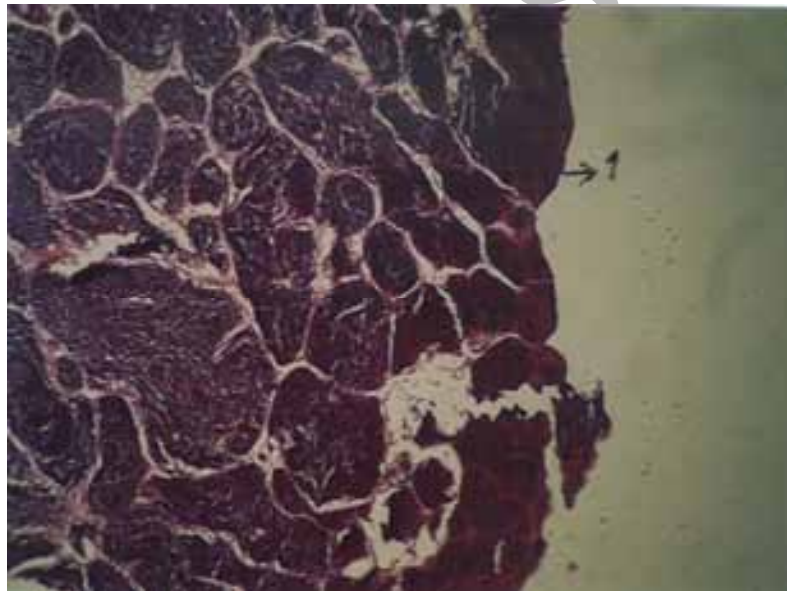
نمودار شماره ۳ - ضریب انباشت غلظت مس مصرفی در اندامهای مورد نمونه برداری



شکل شماره ۱- تصویر میکروسکوپی از کبد ماهی کپور معمولی (در مجاورت با سولفات مس) (درشتنمایی  $\times=10$ )  
 ۱- فضاهای سینوزوئیدی  
 ۲- نکروز کانونی (Focal Necrosis)



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



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

## بحث

طولی ۴ cm میزان  $Lc50$  بدست آمد. در مدت زمان ۹۶ ساعت  $0.3$  ppm و در اندازه ۶ cm میزان  $Lc50$ ،  $1$  ppm می‌باشد (۳). همچنین در تحقیقی که توسط Lam و Powoiko در سال ۱۹۹۸ بر روی تیلاپیا و ماهی کپور معمولی صورت گرفت میزان  $Lc50$  در ماهی کپور معمولی برای زمان ۹۶ ساعت  $0.2$  ppm و برای ماهی تیلاپیا  $1/5$  ppm تعیین شد. این مسئله نیز بیانگر

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد  $Lc50 - 96h$  برای ماهیان انگشت قد (۳-۵ گرمی)  $0.27$  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

انچه که در آب است فراتر و بیشتر خواهد بود. بنابراین حتی کمترین غلظت مس موجود در آب که پایین تر 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 کمتر از 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 ۰/۵۳۴ و در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر میزان متوسط مس کاهش یافته که برابر ۰/۴۲ 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 ( $\bar{X}$ ) نیز افزایش می‌یابد. در عین حال ضریب انباشت، با افزایش غلظت، کاهش می‌یابد. همچنین میزان متوسط مس در بافت گناد با

مقاومت بالای تیلایا 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 آبی 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 بر سمیت 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 دژنراتیو 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 ۱۹۴۱ 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 ۱ ppm مس قرار داشتند، بین سارکومرها کاهش فاصله دیده می‌شد که این امر موجب انقباض فیبرهای ماهیچه‌ای می‌شود (۶) 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

- 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 industrial wast water, Ministry of the Environment, Denmark; 1994; pp. 360-380.
- 6- JAN Mark, E. (1991). The Effect of copper (Cu<sup>2+</sup>) 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., Powaiako. (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.

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): مابانی مدیریت کیفی آب در آبی پروری، مؤسسه تحقیقات شیلات ایران، ۲۶۰ ص.
- ۲- علیزاده، م. (۱۳۷۶): تعیین مقادیر فلزات سنگین در سه گونه از کپور ماهیان پرورشی به روش اسپکتروسکوپی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشکده علوم و فنون دریایی.