آسیب‌شناسی اثرات فاز محلول نفت خام بر بافت آبشش بچه ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii kutum*) در شرایط آزمایشگاهی

عیسی شریف پور[۱]*؛ بهروز ابطحی[۲]؛ فاطمه حیدری جامع بزرگی[۳]؛
جعفر سیف‌آبادی[٤] و زهرا تقی‌زاده رحمت‌آبادی[٥]
isharifpour @yahoo.com
۱- موسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران صندوق پستی: ٦١١٦-١٤١٥٥
۲- دانشکدهٔ علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران
۳، ٤ و ٥- دانشکدهٔ منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس، نور صندوق پستی: ٣٥٦-٤٦٤١٤
تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۸۸ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۸۹

چکیده

هدف از این تحقیق، بررسی تأثیر سمیت فاز محلول نفت خام بر بافت آبشش بچه ماهی سفید دریای خزر و بررسی ضایعات بافتی ناشی از غلظت LC_{50} این محلول در مدت ۹۶ ساعت می‌باشد. بدین منظور بچه ماهیان به وزن ۱ تا ۲ گرم در تابستان ۱۳۸۷ از کارگاه تکثیر و پرورش ماهی کلمه گرگان صید و بمنظور سازگاری با شرایط آزمایشگاهی به مدت ۸ روز در تانکهای ۳۰۰ لیتری حاوی آب کلرزدایی شده شهری نگهداری شدند. سپس برای بدست آوردن LC_{50} ۹۶ ساعت، ۶ غلظت از فاز محلول نفت خام (۲۷، ۲۹/۲۵، ۳۱/۵، ۳۳/۷۵، ۳۶ و ۳۸/۲۵ قسمت در میلیون) غلظت‌سازی شده و به هر آکواریوم ۱۰ عدد بچه ماهی به مدت ۹۶ ساعت معرفی گردید. با توجه به میزان مرگ و میر بچه ماهیان در ۹۶ ساعت و با استفاده از آنالیز آماری Probit value، LC_{50} ۹۶ ساعت، ۳۳/۹۵ قسمت در میلیون محاسبه گردید. ۲ غلظت LC_{50} و LC_{50} ۰/۱ آماده‌سازی شدند. بعد از ۲۴ و ۹۶ ساعت از هر آکواریوم ۳ عدد ماهی برای انجام آزمایشات بافت‌شناسی در محلول بوئن تثبیت شدند. از بافت آبشش برش‌های ۳ میکرونی تهیه، با هماتوکسیلین-ائوزین رنگ‌آمیزی و بوسیله میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند. آسیب‌های عمومی مشاهده شده شامل جدا شدن اپیتلیال از غشاء پایه تیغه‌های آبششی، پرخونی در رشته و تیغه‌های آبششی، آنیوریسم، چماقی شدن انتهای تیغه‌ها، هایپرتروفی سلولهای اپیتلیال تیغه‌ها، هایپرپلازی بین تیغه‌ها و چسبندگی تیغه‌های آبششی بود. مطالعات آسیب‌شناسی نشان می‌دهد که فاز محلول در آب نفت خام سبب آسیب‌های جدی به بافت آبشش در بچه ماهی سفید می‌شود و با اختلال در عملکرد این اندام سبب بر هم خوردن هموستازی بدن ماهی می‌شود.

لغات کلیدی: بافت‌شناسی، فاز محلول نفت خام، آبشش، ماهی سفید، دریای خزر

* نویسندهٔ مسئول

[Downloaded from isfj.ir on 2026-10-30]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1390.20.1.9.4]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.109978]

مقدمه

آلاینده‌ها کیفیت آب را تغییر می‌دهند و سبب بروز مشکلات بسیاری مانند انواع بیماریها و تغییرات ساختاری در ماهیان می‌شوند (Chang *et al*., 1998). از میان انواع مختلف آلودگی-ها، مشتقات نفتی (هیدروکربن‌ها) از مهمترین آلاینده‌های محیط‌های آبی محسوب می‌شوند (Pacheco & Santos, 2001) که می‌توانند بدلیل سمیت و تجمع در بافتهای بدن آبزیان، مشکلات عمده‌ای ایجاد کنند. اثر هیدروکربنهای نفتی بر ماهیان در شرایط آزمایشگاهی، معمولاً با تعیین LC_{50} و میزان بقای موجود زنده در معرض آلاینده و نیز با بررسی تغییرات و ناهنجاری‌های پدید آمده در یک یا چند بافت از بافتهای حیاتی ماهیان مانند آبشش، کبد، طحال یا کلیه انجام گرفته که هر کدام از جنبه‌ای ضایعات حاصله را مورد بررسی قرار می‌دهند (Dede & Kaglo, 2001 ;Altinok & Capkin, 2006 ;Nero *et al*., 2007). مطالعات آسیب‌شناسی بافتی (histopathology) ماهیان قرار گرفته در معرض آلودگی، یکی از روش‌های کاربردی و معمول تعیین اثرات آلاینده بر موجود زنده می‌باشد که به درک واکنش‌های بیولوژیک رخ داده کمک می‌کند (Martinez, Silva & ;Schwaiger *et al*., 1997 2007) و یکی از مزایای استفاده از شاخص‌های آن، مطالعه و بررسی اختصاصی اثرات آلاینده بر اندامهای هدف خاص مثل آبشش، کلیه و کبد می‌باشد که مسئول اعمال حیاتی مثل تنفس، دفع، تجمع و نقل و انتقال ترکیبات ضد حیات (Xenobiotic) در ماهی می‌باشند (Gernhofer *et al*., 2001) و در اثر مواجه با آلاینده‌های محیطی دچار آسیب‌های حاد و اغلب جبران‌ناپذیر می‌شوند. از بین اندامهای حیاتی ماهیان، آبشش‌ها اهمیت زیادی در تنفس، تنظیم اسمزی، تعادل اسید-باز و دفع نیتروژن زائد در ماهیان دارند (Simonato *et al*., 2008). از آنجا که آبشش‌ها مهمترین جایگاه تبادلات یونی بین بدن و محیط بشمار می‌روند (Evans, 1993)، نقش مهمی در ثابت نگهداشتن ترکیب یونی درون بدن بخصوص در مواجه با محیط‌های آلوده دارند (Evans *et al*., 2005). از آنجا که سطح وسیعی از این بافت در ارتباط مستقیم با محیط خارجی است، بنابراین مورفولوژی آن مفیدترین ابزار در بررسی تأثیر آلاینده‌های محیطی بر جانور بوده (Schwaiger *et al*., 1997) و تغییر در ساختار این اندام بعنوان اصلی‌ترین پاسخ در مقابل استرس‌های شیمیایی مطرح می‌باشد. ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*)، از خانواده کپور ماهیان، از جمله مهمترین ماهیان استخوانی اقتصادی سواحل و رودخانه‌های حاشیه جنوبی دریای خزر می‌باشد که ذخایر آن بدلیل صید بیش از حد مجاز در معرض خطر قرار گرفته است. به منظور بازسازی ذخایر این ماهی سالانه بیش از ۲۰۰ میلیون عدد بچه ماهی ۱ تا ۲ گرمی توسط سازمان شیلات ایران در مراکز تکثیر و پرورش تولید و به رودخانه‌ها رهاسازی می‌شوند (Heyrati *et al*., 2007). با وجود انجام تحقیقاتی درخصوص تأثیر آلودگی فاز محلول نفت خام بر ماهیان (Dede & Kaglo, 2001 ;Rudolph *et al*., 2001; Simonato *et al*., 2008 ;Akaishi *et al*., 2004)، تحقیقی درباره اثر این آلودگی بر ماهی سفید دریای خزر انجام نگرفته است. با توجه به ارزش اقتصادی این ماهی و کاهش ذخایر آن از سویی و وجود صدها چاه نفت در کشورهای حاشیه دریای خزر و استحصال نفت با سیستم‌های قدیمی و بدون بهره‌گیری از تکنولوژی جدید از سوی دیگر، انجام این تحقیق گامی در جهت مشخص کردن میزان تأثیر هیدروکربن‌های نفتی بر بقاء این آبزی با ارزش خواهد بود. در این تحقیق، علاوه بر تعیین محدودهٔ کشندگی فاز محلول نفت خام بر بچه ماهی سفید دریای خزر با وزن تقریبی ۱ تا ۲ گرم و میزان بقاء آنها در شرایط آزمایشگاهی، آسیب‌های احتمالی ناشی از مواجه شدن این بچه ماهیان با آب شیرین آلوده به درجات مشخصی از فاز محلول نفت خام، در دوره زمانی ۹۶ ساعته، در اندام آبشش، با استفاده از تکنیک بافت شناسی مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش کار

تعداد ۸۰۰ بچه ماهی سفید به وزن ۱ تا ۲ گرم در تیر ماه ۱۳۸۷ از مرکز تکثیر و پرورش ماهی کلمه گرگان صید و بلافاصله به آزمایشگاه آبزیان دانشکدهٔ علوم زیستی دانشگاه شهید بهشتی منتقل گردیدند و به مدت ۸ روز با شرایط آزمایشگاه در آب هوادهی شده شهری سازش داده شدند. فاز محلول نفت خام نیز طبق روش Anderson و همکاران (۱۹۷۴) بدست آمد. یک بخش از نفت خام با ۹ بخش از آب فیلتر شده در ظرف مخصوصی، به مدت ۲۳ ساعت بوسیله دستگاه شیکر مخلوط شدند و به مدت ۱ ساعت صورت ساکن قرار داده شدند تا فاز محلول آن جدا شود. بخش زیرین که همان فاز محلول نفت خام (water-soluble fraction (WSF، استخراج و جداسازی گردید و بعنوان محلول مادر در آزمایش‌ها مورد

[Downloaded from isfj.ir on 2026-10-30]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1390.20.1.9.4]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.109978]

استفاده قرار گرفت. به منظور اندازه‌گیری محدوده کشندگی فاز محلول نفت خام بر بچه ماهی سفید، برای یافتن ۲ غلظت از سم (یکی بیشترین غلظتی که هیچ مرگ و میری در بین نمونه‌ها ایجاد نکند و دیگری کمترین غلظتی که باعث مرگ و میر ۱۰۰ درصد نمونه‌ها شود) ۱۱ غلظت به همراه ۳ شاهد استفاده شد (OECD Council, 1992). غلظتهای مورد استفاده فاز محلول نفت خام برحسب تصاعد حسابی: ۰/۴۵، ۴/۵، ۹، ۱۳/۵، ۱۸، ۲۲/۵، ۲۷، ۳۱/۵، ۳۶، ۴۰/۵ و ۴۵ قسمت در میلیون (ppm) بود. برای اطمینان بیشتر و نتیجه‌گیری دقیق‌تر، بین غلظت‌های ۳۶ و ۴۰/۵ هم غلظت‌سازی انجام و مورد آزمایش قرار گرفت که میزان مرگ و میر در غلظت ppm ۳۸/۲۵ صد در صد بود لذا بطور کلی می توان گفت که در غلظت ppm ۲۷ هیچ مرگ و میری مشاهده نشد و در غلظت ۳۸/۲۵ میزان مرگ و میر ۱۰۰ درصد بود. سپس برای تعیین میزان سمیت حاد نفت خام بر ماهی سفید از آزمایش LC_{50}، به روش نیمه پایدار (Semi-static) استفاده شد. شش آکواریوم با ابعاد ۳۰×۴۰×۲۰، انتخاب و در هر یک ۲۰ لیتر محلول WSF با غلظت‌های ۳۸/۲۵، ۳۶، ۳۳/۷۵، ۳۱/۵، ۲۹/۲۵ و ۲۷ میلی‌گرم در لیتر و در آخرین آکواریوم آب معمولی شهری کلرزدایی شده بعنوان گروه شاهد ریخته شد، این مرحله از آزمایش با ۳ تکرار انجام گرفت. در طول آزمایش همه آکواریوم‌ها هوادهی شده و دما در بازه ۱۷ تا ۱۸ درجه سانتیگراد نگه داشته شد. به هر آکواریوم ۱۰ عدد ماهی اضافه شد. محلول WSF آکواریوم‌ها هر ۲۴ ساعت با محلول هم غلظت تازه جایگزین شد. در هر بار جایگزین کردن محلول آکواریوم‌ها، ماهی‌های مرده نیز از داخل آکواریوم برداشته و شمرده شدند. بعد از ۹۶ ساعت تعداد کل ماهی‌های مرده هر آکواریوم مشخص گردید. در انتها با استفاده از اعداد بدست آمده و به کارگیری نرم افزار SPSS (نسخه ۱۶)، مقدار LC_{50} به روش Probit value محاسبه گردید (Finney, 1987). تعداد ۹ آکواریوم با ابعاد ۳۰×۴۰×۲۰، انتخاب و در هر یک بترتیب ۲۰ لیتر محلول WSF با غلظت‌های معادل LC_{50} ۰/۱ و LC_{50} محاسبه شده به روش نیمه پایدار و آب معمولی به عنوان گروه شاهد ریخته شد. آب موجود در آکواریوم ها, قبل از وارد نمودن بچه ماهی‌ها به آنها به مدت ۲۴ ساعت هوادهی شد تا کلرزدایی گردد. این مرحله نیز با ۳ تکرار انجام گرفت چنانچه سه آکواریوم به عنوان شاهد، در سه آکواریوم LC_{50} ۹۶ ساعت و در سه آکواریوم دیگر LC_{50} ۰/۱ (Walker *et al.*, 1996) غلظت‌سازی شدند. در هر یک از آکواریوم‌ها ۱۰ بچه ماهی قرار داده و هر ۲۴ ساعت یکبار محلول آکواریوم‌ها با محلول هم غلظت جایگزین شد. بعد از گذشت ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت از هر تیمار در هر سه تکرار نمونه‌برداری شد. سپس نمونه‌های جداسازی شده، در محلول تثبیت کننده بوئن برای انجام آزمایشات بافت‌شناسی تثبیت شدند. ویژگی‌های آب شامل هدایت الکتریکی، pH، اکسیژن محلول و کلر در اول و میانه دوره و دما روزانه دو بار اندازه‌گیری شدند. آزمایشات بافت‌شناسی در آزمایشگاه دانشکده علوم دریایی و منابع طبیعی دانشگاه تربیت مدرس انجام شد، بدین ترتیب که تعداد ۳۰ عدد بچه ماهی سفید با طولی معادل ۴ تا ۶ سانتیمتر و وزنی در حدود ۱تا ۲ گرم از گروههای شاهد و تیمارهای LC_{50} ۰/۱ و LC_{50}، بطور کامل در بوئن تثبیت شده و سپس برای آبگیری در اتانول ۷۰ درصد قرار داده شدند. مراحل آبگیری با استفاده از الکل‌های ۹۰ و۱۰۰ درصد و نهایتاً با الکل بوتیلیک (۱۲ ساعت) انجام گرفت. سپس نمونه‌ها با استفاده از گزیلین شفاف‌سازی شده و به مدت ۱۲ ساعت در پارافین مایع (آون با دمای حدود ۶۰ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند. نمونه‌های آماده شده قالب‌گیری شده و با استفاده از میکروتوم دوار برشهای ۳ میکرومتری تهیه گردید. برشها بر روی لام چسبانده شده، در آون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. لام‌ها بعد از پارافین‌زدایی و آبگیری، با استفاده از هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شده و با میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند (Khodabandeh *et al.*, 2006 ;Roberts, 2001). برای مقایسه داده‌های بدست آمده از اندازه‌گیری قطر رشته و تیغه‌های آبششی، در تیمارهای مختلف و تعیین معنی‌دار بودن تفاوت میان تیمارها، ابتدا به منظور تعیین نرمال بودن داده‌ها از آزمون Shapiro-Wilk استفاده گردید، سپس از آزمون Independent-samples t-test استفاده شد بدین ترتیب که هریک از تیمارها با نمونه شاهد سنجیده و مورد آزمون قرار گرفتند سپس به منظور مقایسه کلیه تیمارها و معنی دار بودن تفاوت میان آنها از آزمون one-way ANOVA و تست Tukey استفاده شد. کلیه این آزمونها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام گرفت.

نتایج

میانگین تعداد مرگ و میر در غلظت‌های مختلف آزمایش تعیین به روش نیمه استاتیک در زمانهای ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت در جدول ۱ آورده شده است. با استفاده از روش آماری پروبیت ولیو (Probit value) در نرم‌افزار SPSS، نسخه ۱۶، اعداد بدست آمده از آزمایش، تحلیل و میزان LC_{50} نفت خام مورد استفاده روی افراد انگشت قد ماهی سفید در روش نیمه

[Downloaded from isfj.ir on 2026-10-30]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1390.20.1.9.4]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.109978]

پایدار در زمانهای ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت و حدود اطمینان بالا و پایین آن در جدول ۲ آمده است.

جدول ۱: میانگین (± انحراف استاندارد) تعداد مرگ و میر حاصل از WSF در روش نیمه پایدار

غلظت (ppm)	مرگ ومیر در ۲٤ ساعت	مرگ ومیر در ٤٨ ساعت	مرگ ومیر در ۷۲ ساعت	مرگ ومیر در ۹٦ ساعت
۲۷	----	----	----	----
۲۹/۲۵	----	----	۰/٦۷±۰/۵۷	۰/٦۷±۰/۵۷
۳۱/۵	----	۰/۳۳±۰/۵۷	۱/٦۷±۰/۵۷	۲±۰
۳۳/۷۵	۱/۳۳±۰/۵۷	۳/۳۳±۰/۵۷	۳/۳۳±۰/۵۷	٤/۳۳±۰/۵۷
۳٦	۲±۰	٤/٦٦±۰/۵۷	٦±۰	۷±۰
۳۸/۲۵	٤/۳۳±۰/۵۷	۷/۳۳±۰/۵۷	۹±۰	۱۰±۰

جدول۲: میزان LC_{50} و حدود بالا و پایین اطمینان (ppm)

زمان (ساعت)	حد پایین اطمینان	حد بالا اطمینان	LC_{50}
۲٤	۳٦/۸۷	٤۷/۱۷	۳۸/۷۲
٤۸	۳٤/۷۵	۳۸/۰٦	۳٦/۰۸
۷۲	۳۳/٤٦	۳٦/٤۸	۳٤/۷۹
۹٦	۳۲/۷۲	۳۵/۲۹	۳۳/۹۵

در تیمار شاهد و تیمار با غلظت LC_{50} ۰/۱ در طول ۹۶ ساعت دوره آزمایش، مرگ و میری مشاهده نگردید اما در تیمار LC_{50} پس از ۲۴ ساعت از ۱۰ ماهی درون هر آکواریوم بطور میانگین ۲ ماهی و پس از گذشت ۹۶ ساعت بطور میانگین ۵ ماهی تلف شدند (جدول ۳).

جدول ۳: میزان میانگین (± انحراف استاندارد) مرگ و میر در آزمایشات LC_{50}

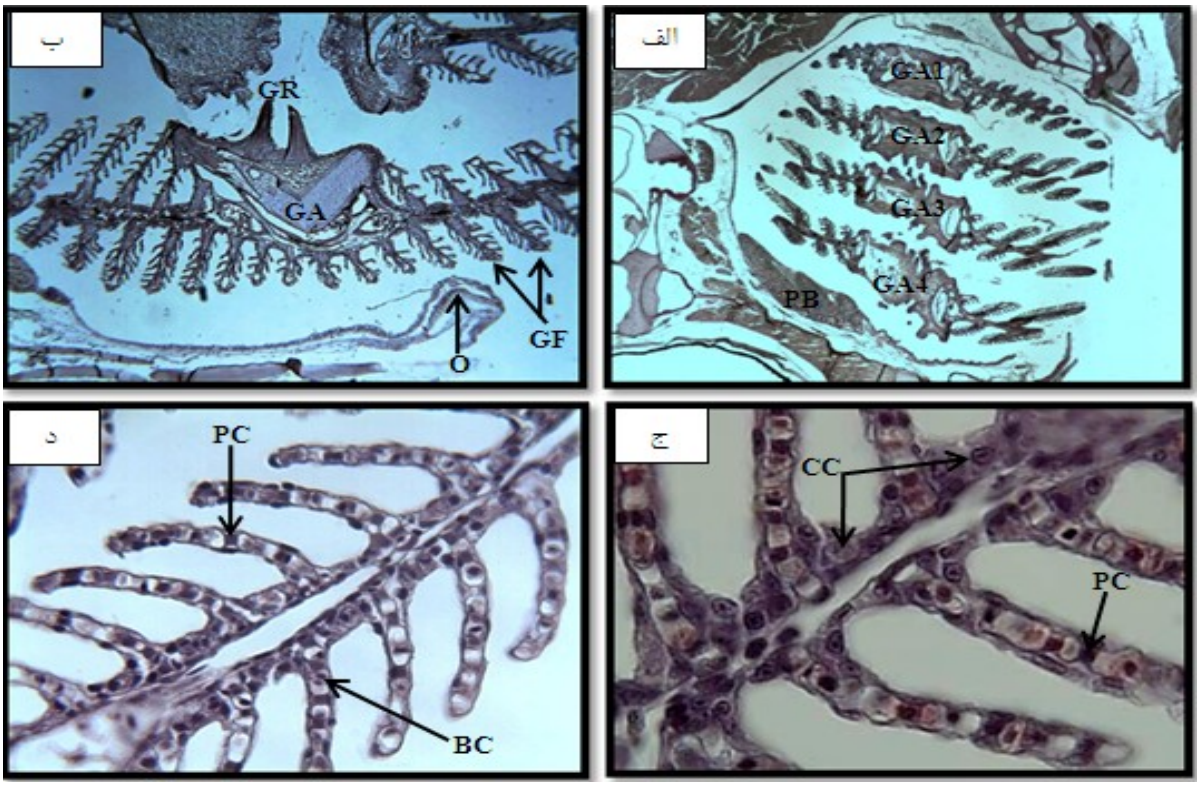
غلظت WSF (ppm)	تعداد	مرگ ومیر در ۲٤ساعت	مرگ ومیر در ۹٦ساعت
۰	۱۰	----	----
۳/۳۹	۱۰	----	----
۳۳/۹٤۵	۱۰	۱/٦٦±۰/۵۷	٤/٦٦±۰/۵۷

در بچه ماهیان گروه شاهد، آبشش ساختار طبیعی خود را داشته و تیغه‌های آبششی بطور منظم در اطراف رشته‌های آبششی پراکنده بودند. در محوطهٔ آبششی در بچه ماهیان سفید علاوه بر ۴ کمان آبششی، یک آبشش کاذب در راستای کمانهای آبششی گسترده می‌باشد (شکل۱-الف). در هر طرف کمان آبششی، رشته‌های آبششی (Filaments) گسترده هستند، خارهای آبششی (Gill Raker) توسعه یافته و روی کمانها به سمت حفره دهانی قرار گرفته‌اند (شکل ۱-ب). بررسی آبشش بچه ماهیان شاهد نشان داد که ضایعات بافتی در آنها دیده نمی‌شود. بافت‌شناسی نمونه‌های قرار گرفته در تیمار LC_{50} ۰/۱ پس از ۲۴ ساعت نشان داد که ساختار کلی بافت آبشش همانند گروه شاهد است، اما درصد کمی از تیغه‌های آبششی آسیب دیده‌اند که از آسیبهای مشاهده شده می‌توان به تورم و جداشدن اپیتلیال از غشاء پایه (شکل ۲-الف)، برهم خوردن ساختار سلولهای پیلار و پرخونی جزئی درون تیغه‌های آبششی (شکل ۲- ب) اشاره کرد. بافت‌شناسی نمونه‌های قرار گرفته در تیمار LC_{50} ۰/۱ پس از ۹۶ ساعت نشان داد که در این تیمار آسیبها تا حدی افزایش یافته بود. جدا شدن اپیتلیال از غشاء پایه در تعداد بیشتری از تیغه‌های آبششی مشاهده گردید (شکل ۲- ج). پرخونی نیز در تعداد بیشتری از تیغه‌های آبششی به خوبی قابل رؤیت بود. هایپرپلازی در رشته‌ها و تیغه‌های آبششی از دیگر ضایعات مشاهده شده در افراد این گروه بود (شکل ۲- د). بافت‌شناسی نمونه‌های قرار گرفته در تیمار LC_{50} پس از ۲۴ ساعت نشان داد که آسیبها در این تیمار شدت یافته است. آنیوریسم به وضوح در تیغه‌های آبششی قابل مشاهده می‌باشد (شکل۳- الف). تورم و جداشدن اپیتلیال از غشاء پایه در سطح وسیعی از تیغه‌های آبششی مشاهده شد، همچنین هیپرپلازی سلولهای اپی‌تلیال در پایه تیغه‌های آبششی نیز مشاهده شد (شکل ۳- ب). بافت‌شناسی نمونه‌های قرار گرفته در تیمار LC_{50} پس از ۹۶ ساعت نشان داد در این تیمار تیغه‌های آبششی در بیشتر قسمتها تغییر شکل داده بودند، به گونه‌ای که ساختار سلولهای پیلار از بین رفته و جمع شدن خون در رگهای خونی تیغه‌های آبششی (آنیوریسم) در سطح وسیعی از تیغه‌های آبششی مشاهده شد (شکل ۳- ج و ۳- د)، خیز و جداشدن اپیتلیال از غشا پایه سلولهای اپیتلیال آبشش براحتی قابل مشاهده بود (شکل ۳- ه). سلولهای اپیتلیومی دچار هیپرتروفی شده بودند. فاصله بین تیغه‌های آبششی در اکثر قسمتها از بین رفته و تیغه‌ها روی هم قرار گرفته بودند (شکل ۳- و).

با انجام آزمون Indepdent t-test غیرجفتی و مقایسه داده‌های حاصل از اندازه‌گیری قطر رشته آبششی با استفاده از نرم‌افزار Image tool، معنی‌داری اختلاف بین تیمارها با گروه شاهد مشخص شد. در آزمون t قطر رشته آبششی بین گروه شاهد و تیمار LC_{50} ۲۴ ساعت ۰/۱ و $p=۰/۴۶$ محاسبه شد. در نتیجه اختلاف معنی‌داری بین دو تیمار وجود نداشت ($P>۰/۰۵$).

[Downloaded from isfj.ir on 2026-10-30]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1390.20.1.9.4]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.109978]

در آزمون t قطر رشته آبششی بین گروه شاهد و تیمار LC_{50} ۰/۱ ۹۶ ساعت و $P_{=}$۰/۰۲ محاسبه شد ($P<$۰/۰۵) در نتیجه اختلاف معنی‌داری بین دو تیمار وجود دارد. در آزمون t قطر رشته آبششی بین گروه شاهد و تیمار LC_{50} ۲۴ ساعت و $P_{=}$۰/۰۱ محاسبه شد در نتیجه اختلاف معنی‌داری بین دو تیمار وجود دارد ($P<$۰/۰۵).



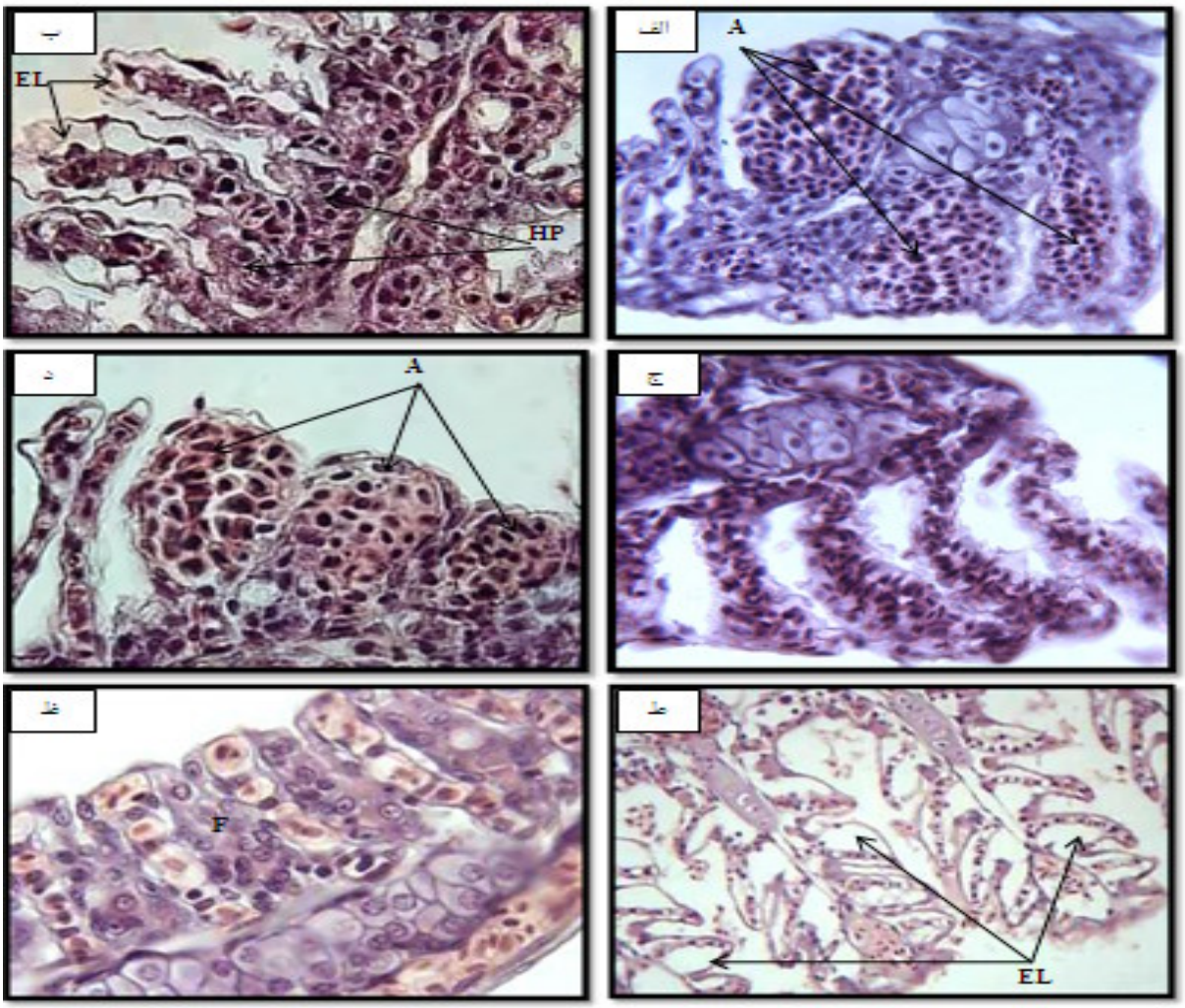
شکل ۱: بافت‌شناسی آبشش گروه شاهد بچه ماهیان سفید دریای خزر

الف: برش طولی از کمانهای آبششی (GA): موقعیت آبشش کاذب (PB) نسبت به کمانها به خوبی قابل مشاهده می باشد (H & E, ob. ٤٠)

ب: بخشی از کمان آبششی: موقعیت خارها (GR)، رشته‌های آبششی (GF) و سرپوش آبششی (O) بر روی کمانها به خوبی مشخص است (H & E, ob. ١٠)

ج و د: ساختار کلی رشته آبششی در یک ماهی شاهد: تیغه‌های آبششی بصورت منظم در دو سمت رشته آبششی قرار گرفته‌اند و اپی‌تلیوم روی آنها را پوشانده است. سلولهای کلراید (CC)، پیلار (PC) و خونی (BC) دیده می‌شوند (H & E, ob. ١٠٠)

[Downloaded from isfj.ir on 2026-10-30]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1390.20.1.9.4]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.109978]



شکل ۳: بافت‌شناسی آبشش بچه ماهیان سفید تیمار LC_{50}

الف: بافت آبشش نمونه تیمار با غلظت LC_{50} به مدت ۲٤ ساعت: در این تصویر آنیوریسم یا اتساع عروق (A) درون تیغه‌های آبششی که در نتیجه پرخونی شدید می‌باشد، قابل مشاهده است (H & E, ob. ۱۰۰).

ب: بافت آبشش نمونه تیمار با غلظت LC_{50} به مدت ۲٤ ساعت: برش طولی از رشته و تیغه‌های آبششی که در آن تورم و جداشدن اپیتلیال از غشاء پایه (EL) و هیپرپلازی سلولهای اپیتلیومی (HP) در پایه تیغه‌های آبششی بخوبی قابل مشاهده می‌باشد (H & E, ob. ۱۰۰).

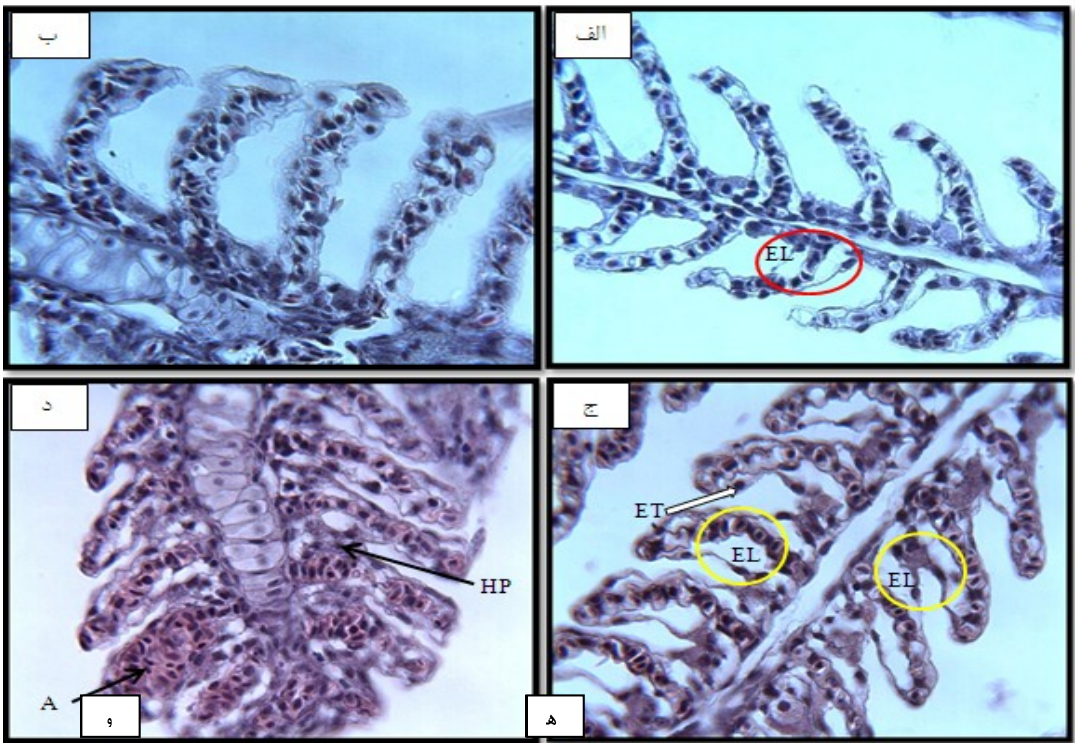
ج: بافت آبشش نمونه تیمار با غلظت LC_{50} به مدت ۹٦ ساعت: پرخونی شدید در تیغه‌های آبششی بخوبی قابل رؤیت می‌باشد (H & E, ob. ۱۰۰).

د: بافت آبشش نمونه تیمار با غلظت LC_{50} به مدت ۹٦ ساعت: پرخون و متورم شدن تیغه‌های آبششی (A) و اتصال آنها بهم بخوبی دیده می‌شود (H & E, ob. ۱۰۰).

هـ: بافت آبشش نمونه تیمار با غلظت LC_{50} به مدت ۹٦ ساعت: تورم و جدا شدن اپیتلیال از غشاء پایه (EL) در سطح وسیعی قابل رویت است (H & E, ob. ٤۰).

و: بافت آبشش نمونه تیمار با غلظت LC_{50} به مدت ۹٦ ساعت: هیپرتروفی سلولها و چسبیدن تیغه‌های آبششی بهم مشاهده می‌شود (F) (H & E, ob. ۱۰۰).

[Downloaded from isfj.ir on 2026-10-30]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1390.20.1.9.4]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.109978]



شکل ۲: بافت‌شناسی آبشش بچه ماهیان سفید تیمار LC_{50} ۰/۱

الف: بافت آبشش نمونه تیمار با غلظت LC_{50}۰/۱ به مدت ۲٤ ساعت: تورم و جداشدن اپیتلیال از غشاء پایه (**EL**) در بعضی سطوح تیغه‌های آبششی قابل مشاهده می‌باشد (**H & E, ob.** ۱۰۰).

ب: بافت آبشش نمونه تیمار با غلظت LC_{50}۰/۱ به مدت ۲٤ ساعت: پرخونی و برهم خوردن ساختار تیغه‌های آبششی دیده می‌شود (**H & E, ob.** ۱۰۰).

ج: بافت آبشش نمونه تیمار با غلظت LC_{50}۰/۱ به مدت ۹٦ ساعت: تورم و جداشدن اپیتلیال از غشاء پایه در سطح وسیع (دایره)، هایپرتروفی سلولهای اپیتلیومی تیغه‌های آبششی (پیکان) را نشان می‌دهد (**H & E, ob.** ۱۰۰).

د: بافت آبشش نمونه تیمار با غلظت LC_{50}۰/۱ به مدت ۹٦ ساعت: آنیوریسم (**A**) در تیغه‌های آبششی و همچنین هایپرپلازی (**HP**) بین تیغه‌ها را نشان می‌دهد (**H & E, ob.** ۱۰۰).

[Downloaded from isfj.ir on 2026-10-30]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1390.20.1.9.4]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.109978]

در آزمون t قطر رشته آبششی بین گروه شاهد و تیمار LC_{50} ۹۶ ساعت , P =۰/۰۰۰ محاسبه شد در نتیجه اختلاف معنی‌داری بین دو تیمار وجود دارد (P<۰/۰۵).

با انجام آزمون Independent t-test غیرجفتی و مقایسه داده‌های حاصل از اندازه‌گیری قطر تیغه آبششی با استفاده از نرم‌افزار Image tool، معنی‌داری اختلاف بین تیمارها با گروه شاهد مشخص شد. بین گروه شاهد و تیمار LC_{50} ۲۴ ساعت ۰/۱, P=۰/۸۶۷ محاسبه شد در نتیجه اختلاف معنی‌داری بین دو تیمار وجود نداشت (P>۰/۰۵). بین گروه شاهد و تیمار LC_{50} ۹۶ ساعت ۰/۱ , P=۰/۰۱ محاسبه شد در نتیجه اختلاف معنی‌داری بین دو تیمار وجود دارد (P<۰/۰۵).

بین گروه شاهد و تیمار LC_{50} ۲۴ ساعت, P =۰/۰۰۱ محاسبه شد و در نتیجه اختلاف معنی‌داری بین دو تیمار وجود دارد (P<۰/۰۵).

بین گروه شاهد و تیمار LC_{50} ۹۶ ساعت , P =۰/۰۰۰ محاسبه شد در نتیجه اختلاف معنی‌داری بین دو تیمار وجود دارد (P<۰/۰۵).

آنالیز one-way ANOVA و تست Tukey نشان داد که بین تیمار LC_{50} ۹۶ ساعت در اندازه قطر رشته و تیغه‌های آبششی با تیمار شاهد، تیمار LC_{50} ۲۴ ساعت ۰/۱ و تیمار LC_{50} ۹۶ ساعت ۰/۱ اختلاف معنی‌داری وجود دارد اما بین تیمار LC_{50} ۹۶ ساعت و LC_{50} ۲۴ ساعت در قطر رشته و تیغه آبششی اختلاف معنی‌داری وجود ندارد (P>۰/۰۵).

بحث

غلظت‌های متفاوت فاز محلول در آب نفت خام (WSF) در ساعات اولیهٔ آزمایش، عوارض شدیدی بر اندام‌های بچه ماهی سفید دریای خزر با طولی در حدود ۴ تا ۶ سانتیمتر و وزنی حدود ۱ تا ۲ گرم، در محیط آب شیرین نشان داد. در این تحقیق LC_{50} ۹۶ ساعت فاز محلول در آب نفت خام به روش نیمه پایدار، ۳۳/۹۵ppm محاسبه شد. در سال ۱۳۸۲ شریعتی و همکاران، با آزمایش تعیین سمیت و LC_{50} فنول و ۱-نفتول روی ماهیان انگشت قد سیم و سفید، LC_{50} ۹۶ ساعت فنول را برای ماهی سفید ۲۱/۵۹ و برای سیم ۲۵/۱۹ و LC_{50} ۹۶ ساعت ۱- نفتول برای ماهی سفید را ۲/۱۵ و برای سیم ۲/۸۵ قسمت در میلیون محاسبه کردند و بیانگر آن است که ماهی سفید در برابر فنول و ۱-نفتول حساس‌تر از ماهی سیم می‌باشد.

همچنین براساس داده‌های فوق شاید بتوان نتیجه گرفت که فنول و نفتول کشندگی بیشتری نسبت به WSF بر ماهی سفید دریای خزر دارند. شریف‌پور و همکاران (۱۳۸۷) با بررسی آسیب‌شناسی برخی اندام‌های مهم ماهی آزاد (*Salmo trutta caspius*) در حوزه جنوبی دریای خزر با تأکید بر آلاینده‌ها، هیچگونه ضایعه میکروسکوپی بافتی در گناد و عضله این ماهیها مشاهده نکردند و بیان داشتند که این امر ممکن است به این دلیل باشد که ارگان‌های هدف برای سموم و سایر آلاینده‌ها در وهله اول اندام‌های مهم و حیاتی از جمله آبشش، کلیه و کبد می‌باشند که نقش اصلی را در تصفیه سم از بدن بعهده دارند.

در مطالعه حاضر تغییرات بافتی در آبشش بچه ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*) قرار گرفته در معرض فاز محلول نفت خام مشاهده شد. همانطور که در بخش نتایج نشان داده شد از جملهٔ علائم و آسیب‌های مشاهده شده می‌توان به تورم، هیپرتروفی و هیپرپلازی، چسبیدن رشته‌های ثانویه به یکدیگر، پرخونی، خونریزی و جدا شدن اپیتلیال از غشاء پایه اشاره نمود. تغییرات و ناهنجاری‌های بافتی رخ داده در آبشش این بچه ماهیان با مشاهدات محققین دیگر در بررسی اثر سایر آلاینده‌ها مطابقت داشت. در بافت آبشش ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhyncus mykiss*) قرار گرفته در معرض فاز محلول هیدروکربنهای نفتی به مدت ۷، ۱۸ و ۳۰ روز، جدا شدن اپیتلیال از غشاء پایه تیغه‌های آبششی و هایپرتروفی سلولهای اپیتلیال آبشش در رشته‌ها و تیغه‌های آبششی مشاهده شده است (Rudolph *et al*., 2001). در بافت آبشش *Prochilodus lineatus* ساکن رودخانه‌های مناطق شهری، آسیب‌هایی مانند جدا شدن اپیتلیال از غشاء پایه، هایپرپلازی و هایپرتروفی اپیتلیوم تیغه‌های آبششی، چسبندگی و یکی شدن تیغه‌های آبششی و آنیوریسم (اتساع عروق) نشان داده شده است (Camargo & Martinez, 2007). Khan (۱۹۹۸) در آبشش کفشک ماهی *Pleuronectes americanus* ساکن آبهای نزدیک پالایشگاه نفت، هایپرپلازی در تیغه‌ها و فضای بین تیغه‌های آبششی و جداشدن کامل اپیتلیال را مشاهده کرد. در قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onchorrynchis mykiss*) قرار گرفته در معرض ترکیبات نفتی، ناهنجاری‌هایی در اپیتلیوم تیغه‌های آبششی و نشست نفت روی آبشش مشاهده شد (Engelhardt *et al*., 1981). هیپرپلازی سلولهای پوششی و بهم چسبیدن تیغه‌های آبششی بعنوان پاسخ‌های مزمن علیه عفونت‌های

[Downloaded from isfj.ir on 2026-10-30]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1390.20.1.9.4]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.109978]

میکروبی و انگلی یا تحریکات شیمیایی می‌باشند (ابطحی و همکاران، ۱۳۸۶). در مطالعه حاضر نمونه‌های در معرض غلظت LC_{50} ۰/۱ پس از ۲۴ ساعت تغییرات اندکی را در بافت آبشش نشان دادند که از جمله تغییرات مشاهده شده در این تیمار می‌توان به جدا شدن اپیتلیال از غشاء پایه و همچنین تورم و پرخونی در تعداد محدودی از تیغه‌های آبششی اشاره نمود. با گذشت ۹۶ ساعت و افزایش زمان قرار گرفتن ماهی در معرض فاز محلول در آب نفت خام، آسیب‌ها شدیدتر شده و تعداد بیشتری از تیغه‌های آبششی آسیب دیده و جدا شدن اپیتلیال از غشاء پایه و پرخونی در سطح وسیعتری از تیغه‌های آبششی، رخ داد که نشان می‌دهد با افزایش زمان قرار گرفتن در معرض آلاینده، آسیب‌های وارده آنچنان که قابل انتظار است شدیدتر می‌شود. در آبشش بچه ماهیان در معرض غلظت LC_{50} بدلیل بالا بودن آلاینده در ۲۴ ساعت اول عوارض شدید مشاهده می‌شود و با گذشت زمان تا ۹۶ ساعت این آسیب‌ها افزایش می‌یابد اما از لحاظ آماری (آزمون one-way ANOVA) این اختلاف معنی‌دار نمی‌باشد که نشان‌دهندهٔ آن است که غلظت بالای آلاینده بر بچه ماهی سفید دریای خزر در ساعات اولیه در معرض قرارگیری به شدت مخرب خواهد بود. در مجموع نتایج آزمونهای آماری بیانگر این امر است که با افزایش زمان قرار گرفتن ماهی در معرض آلاینده و همچنین افزایش غلظت فاز محلول در آب نفت خام، قطر تیغه‌ها و قطر رشته‌های آبششی افزایش می‌یابد. این افزایش قطر ممکن است به چند دلیل عمده از جمله، هیپرتروفی سلولهای اپیتلیال آبششی؛ هایپرپلازی سلولها در سطح رشته و تیغه‌های آبششی؛ پر خون شدن رشته‌ها و تیغه‌های آبششی و رخداد آنیوریسم و جدا شدن اپیتلیال از غشاء پایه باشد. تحقیق حاضر مانند سایر تحقیقات انجام شده، اهمیت آسیب‌شناسی را بعنوان یکی از شاخص‌های زیستی مهم در ارزیابی سمیت آلاینده‌ها، مخصوصاً در دوره حاد قرار گرفتن در معرض آلاینده‌ها مانند نشت نفت در محیطهای طبیعی، تأیید می‌کند. بررسی نتایج مطالعه حاضر و مقایسه آن با نتایجی که سایر محققین بدست آورده‌اند نشان می‌دهد که بچه ماهی سفید دریای خزر نسبت به آلودگی فاز محلول در آب نفت خام حساس بوده و با قرار گرفتن در معرض آن به شدت آسیب می‌پذیرد. با در نظر گرفتن احتمال فراوان وقوع آلودگی نفتی در بسیاری از سواحل خزر از جمله مناطق نوزادگاهی، این آلاینده‌ها قابلیت اعمال اثر بر عملکرد زیستی و اندامهای مهم و حیاتی بچه ماهیان سفید دارند، که این امر می‌بایست در برنامه‌ریزی‌های زیست محیطی مورد توجه قرار گیرد.

منابع

ابطحی، ب.؛ بهمنی، م.؛ شریف‌پور، ع.؛ اسماعیلی ساری، ع.؛ کاظمی، ر. و حلاجیان، ع.، ۱۳۸۶. بررسی آثار هیستوپاتولوژیک ناشی از عوامل زیست محیطی دریای خزر بر ماهیان خاویاری. مؤسسه تحقیقات شیلات ایران. ۵۵ صفحه.

شریعتی، ف.؛ اسماعیلی ساری، ع. و پیری، م.، ۱۳۸۲. تعیین سمیت و LC_{50} فنل و ۱-نفتول روی ماهیان سیم و سفید. مجله علمی شیلات ایران، سال دوازدهم، شماره ۴، زمستان ۱۳۸۲، صفحات ۵۷ تا ۶۸.

شریف‌پور، ع.، رضوانی گیل‌کلایی، س. و کاظمی، ر.، ۱۳۸۹. آسیب‌شناسی برخی اندامهای مهم ماهیان سوف (*Sander lucioperca*) و آزاد (*Salmo trutta caspius*) در حوضه جنوبی دریای خزر با تاکید بر آلاینده‌ها. مجله علمی شیلات ایران، سال نوزدهم، شماره ۴، زمستان ۱۳۸۹، صفحات ۷۷ تا ۸۶.

Akaishi F.M., Silva de Assis H.C., Jakobi S.C.G., Eiras-Stofella D.R., St-Jean S.D., Courtenay S.C., Lima E.F., Wagener A.L.R., Scofield A.L. and Oliveira Ribeiro C.A., 2004. Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 46:244–253.

Altinok I. and Capkin E., 2007. Istopathology of rainbow trout exposed to sublethal concentrations of methiocarb or endosulfan. Toxicologic Pathology, 35:405–410.

Anderson J.W., Neff J.M., Cox B.A, Tatem H.E. and Hightower G.M., 1974. Characteristics of dispersions and water-soluble extracts of crude and refined oils and their toxicity to estuarine crustaceans and fish. Marine Biology, 27:75-88.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-10-30]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1390.20.1.9.4]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.109978]

Camargo M.M.P. and Martinez C.B.R., 2007. Histopathology of gill, kidney and liver of a neotropical fish caged in an urban stream neotropical. Ichthyology, 5(3):327-336.

Chang S., Zdanowicz V.S. and Murchelano R.A., 1998. Associations between liver lesions in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) and sediment chemical contaminants from north-east United States estuaries. ICES Journal of Marine Science, 55:954–969.

Dede E.B. and Kaglo H.D., 2001. Aqua-toxicological effects of water soluble fractions (WSF) of diesel fuel on *O. Niloticus* fingerlings. Journal of Applied Science and Environmental Manegment, 5(1):93-96.

Engelhardt F.R., Wong M.P. and Duey M.E., 1981. Hydro mineral balance and gill morphology in rainbow trout (*Salmo gairdneri*), acclimated to fresh and sea water as affected by petroleum exposure. Aquatic Toxicology, 1:175-186.

Evans D.H., 1993. (Ed.). The physiology of fishes. CRC Press, Boca Raton, FL, pp.157-176.

Evans D.H., Piermarini P. M. and Choe K. P., 2005. The multifunctional fish gill: Dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. Physiological Reviews, 85:97–177.

Finney D.J., 1978. Statistical method in biological assay. Griffin, London, UK. 508P.

Gerenhofer M., Pawet M., Schramm M., Muller E. and Triebskorn R., 2001. Ultrastructural biomarkers as tools to characterize the health status of fish in contaminated streams. Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery, 8: 241-260.

Heyrati F.P., Mostafavi H., Toloee H. and Dorafshan S., 2007. Induced spawning of kutum, *Rutilus frisii kutum* using (D-Ala6, Pro9-NEt) GnRHa combined with domperidone. Aquaculture, 265:288–293.

Khan R.A., 1998. Influence of petroleum at a refinery terminal on winter flounder, (*Pleuronectes americanus).* Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 61:770-777.

Khodabandeh S. and Golzari A., 2006. Immun-olocalization of Na^+, K^+-ATPase in the branchia cavity of *palaemon elegans* (Decapoda, Crustacea) and effects of mercury on Na+,K+-ATPase immunoreactivity. Integr. Comparative Biochemistry and Physiology, 45B:1153-1161.

Nero V., Farwell A., Lister A., Kraak G.V.D., Lee L.E.J., Meer, T.V., Mackinnon, M.D. and Dixon D.G., 2006. Gill and liver histopathological change in yellow perch (*Perca flavescens*) and gold fish (*Caraccius auratus*) exposed to oil sands process-affected water. Ecotoxicology and Environmental Safety, 63:366-377.

OECD Council, 1992. OECD guideline for testing of chemicals (fish, Acute toxicity tests). 90P.

Pacheco M. and Santos M.A., **2001.** Biotrans-formation, endocrine, and genetic responses of *(Anguilla anguilla)* to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. Ecotoxicology and Environmental Safety, 49:64-75.

Roberts R.J., 2001. Fish Pathology, 3rd ed. W.B. Saunders Co. Philadelphia, PA., USA. 472P.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-10-30]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1390.20.1.9.4]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.109978]

Rudolph A., Yanez R. and Troncoso L., 2001. Effects of exposure of *Oncorhynchus mykiss* to the water accommodated fraction of petroleum hydro-carbons. Bulletin and Toxicology, 66:400–406.

Schwaiger J., Wanke R., Adam S., Pawert M., Honnen W. and Triebskorn R., 1997. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery, 6:75-86.

Silva A.G. and Martinez G.B.R., 2007. Morphological changes in the kidney of a fish living in an urban stream. Environmental Toxicology and Pharmacology, 23:185–192

Simonto J.D., Guedes C.L.B. and Martinez C.B.R., 2008. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish, *Prochilodus lineatus*, exposed to diesel oil. Ecotoxicology and Environmental Safety, 69:112–120

Walker C.H., Hopkin S.P., Sibly R.M. and Peakali S.M., 1996. Principles of Ecotoxicology, 321P.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-10-30]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1390.20.1.9.4]

[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.109978]

Experimental assessment of the histopathological effects of water-soluble fraction of crude oil on gill tissue of juvenile *Rutilus frisii kutum*

Sharifpour I.[(1)]*; Abtahi B.[(2)]; Heidary Jamebozorgi F.[(3)]; Seyfabadi S.J.[(4)] and Taghizadeh, R.Z.[(5)]

isharifpour@yahoo.com

1- Iranian Fisheries Research Organization, P.O.Box: 14155-6116 Tehran, Iran

2- Faculty of Biological Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

3,4,5- Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, P.O.Box: 46414-356 Noor, Iran

Received: February 2010 Accepted: February 2011

Keywords: Histopathology, Water-soluble fraction, Gill, *Rutilus frisii kutum*, Caspian Sea

Abstract

The toxic effects of water soluble fraction (WSF) of crude oil on the gills of juvenile kutum roach, *Rutilus frisii kutum*, were investigated. The juvenile (1-2g) kutum roach were collected in summer 2008 from the Kolmeh Hatchery Center, Golestan province, and acclimatized to laboratory conditions through keeping them in a 300 liter tank with de-chlorinated water for a minimum of 8 days. Six different types of WSF concentrations were made to obtain LC_{50}96h including 27, 29.25, 31.5, 33.75, 36 and 38.25ppm. Then, 10 fingerlings of *R. frisii kutum* were exposed to the WSF concentrations, for 96 hours. Considering mortality rate of the juveniles in 96 hours and using Probit value statistical analysis, LC_{50}96h was obtained at 33.95ppm. Two different concentrations (0.1 LC_{50} and LC_{50}) of WSF were prepared for further assessments and after 24 and 96h of exposure, 3 individual fish were collected from each aquarium for histopathological studies. The gill sections with 3 micron thickness were prepared, stained using H & E, and examined by light microscope. General damages after observation included: Epithelial lifting, congestion in filament and lamellae, clubbing, fusion, hypertrophy of epithelial cells of lamellae, different levels of hyperplasia between lamella and aneurysms. Pathological studies showed that the WSF of crude oil causes serious damage in gills of juvenile *R. frisii kutum*, leads to malfunction of this organ which will harm homeostasis of the fish.

* Corresponding author

[Downloaded from isfj.ir on 2026-10-30]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1390.20.1.9.4]

[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.109978]