

کاربرد انگشت نگاری عنصری در تفکیک جمعیتی و پایش زیستی ماهی سفید (*Rutilus kutum*) در جنوب دریای خزر

نیما پورنگ^{۱*}، فرخ پرافکنده حقیقی^۱، حمیدرضا معظمی^۲، داوود آقا علی گل^۲، پرگل قوام مصطفوی^۳،
مینو محمودیان^۳

*n_pourang@yahoo.com

- ۱- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
- ۲- آزمایشگاه واندوگراف، پژوهشگاه علوم هسته ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، سازمان انرژی اتمی ایران، تهران، ایران
- ۳- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم و فنون دریایی

تاریخ دریافت: مهر ۱۳۹۶

تاریخ پذیرش: دی ۱۳۹۶

چکیده

در این تحقیق به منظور بررسی قابلیت استفاده از پنج بافت سخت (اتولیت، فلس، شعاع سخت باله، عدسی چشم و مهره های پشتی) ماهی سفید (*Rutilus kutum*) برای تفکیک جمعیت های مختلف این گونه و ارزیابی قابلیت پایش زیستی در حوزه جنوبی دریای خزر از طریق سنجش تغییرات میزان تجمع زیستی عناصر تعداد ۶۰ نمونه ماهی سفید از سه ایستگاه نمونه برداری در حوزه جنوبی دریای خزر (ایستگاههای ۱، ۲ و ۳ به ترتیب در مجاورت مصب رودخانه های سفید رود، تجن و گرگانرود) گردآوری شد. همچنین در این پژوهش امکان استفاده از هر یک از پنج بافت مزبور به منظور استفاده به عنوان آرشیو زیستی عناصر و از سوی دیگر، تجمع عناصر در بافت های ماکول و مخاطرات احتمالی ناشی از مصرف آنها بررسی گردید. نمونه برداری ها در طی خرداد ۱۳۹۵ توسط تورهای پره ساحلی انجام شد. در مجموع میزان تجمع ۱۳ عنصر اصلی و فرعی در نمونه ها (پنج بافت سخت مذکور و دو بافت عضله و کبد) توسط روش های پیکسی و میکرو پیکسی بررسی شد. کمترین میزان تشابه بین بافت ها در مورد عدسی چشم (از نظر تجمع عناصر S، P و Zn) و کبد (از دیدگاه تجمع عناصر Fe، Cl و K) قابل تشخیص بود. هیچگونه همبستگی معنی داری بین عناصر و خصوصیات بیومتریک مشاهده نگردید. به نظر می رسد که تمام بافت های سخت، بجز عدسی چشم، ممکن است جایگزین های بالقوه ای برای پایش زیستی عناصر S، K، Fe، Cl، Ca باشند. با توجه به نتایج مربوط به تجمع Sr در اتولیت، می توان استنتاج نمود که نمونه هایی که از ایستگاه های ۲ و ۳ گردآوری شده اند، احتمالاً متعلق به یک جمعیت می باشند. استنتاج مشابهی نیز بر مبنای نتایج حاصل از تجمع K در فلس حاصل گردید. فلس ها ممکن است قابلیت استفاده به عنوان ساختار جایگزین اتولیت برای تفکیک جمعیت های *R. kutum* را داشته باشند. از میان ده عنصری که با بکارگیری روش پیکسی در بافت ماکول (عضله) قابل اندازه گیری بودند، تنها در مورد چهار عنصر Zn، Cu، Fe و Mn آستانه های مجاز در برخی استانداردهای بین المللی تعریف شده است که میانگین مقادیر اندازه گیری شده در این تحقیق در تمامی موارد در مقایسه با استانداردهای مزبور بسیار کمتر بود.

کلمات کلیدی: دریای خزر، ماهی سفید، تفکیک جمعیتی، پایش زیستی، پیکسی

*نویسنده مسئول

مقدمه

انگشت‌نگاری عنصری^۱ روشی بر مبنای بررسی میزان تجمع عناصر در بخشهای مختلف برخی بافت‌های سخت بدن آبزیان می‌باشد و بر این اصل استوار است که منشأ برخی عناصر تجمع یافته در بافت‌های مزبور محیط پیرامون آنها می‌باشد و از این طریق می‌توان اطلاعاتی در مورد تاریخچه زندگی آنها (زادگاه (زادگاه و تغییرات وضعیت محیط زندگی در طول عمر) کسب نمود (Sorte et al., 2013). عناصر به طور طبیعی از طریق مسیرهای تنفسی و غذایی به بدن آبزیان وارد شده و در ساختارهای آهکی آنها مانند فلس‌ها، اتولیت و صدف جذب می‌شوند (Campana, 1999). ترکیب عنصری این ساختارها انعکاس دهنده شرایط فیزیکی و شیمیایی محیط پیرامون آنها می‌باشد. چنانچه عناصر موجود در ساختارهای آهکی مزبور در یک الگوی زمانی پیوسته جذب شده باشند (در معرض بازجذب قرار نگرفته باشند)، ترکیب عناصر در بخش‌های مختلف این ساختارها می‌تواند نشانگر مناسبی برای انعکاس دائمی تغییرات شرایط محیطی در طول عمر آبی مورد نظر محسوب گردد. به تعبیر دیگر در این شرایط ساختارهای سخت مورد نظر در آبزیان به عنوان پایشگر و کرومومتر زیستی قابل استفاده می‌باشند (Peterson et al., 1983; Elsdon and Gillanders, 2004). از این قابلیت می‌توان برای شناخت بهتر محیط زیست پیرامون آبزیان در مقاطع زمانی مختلف استفاده نمود. در طی سال‌های اخیر، مطالعات مربوط به نحوه پراکنش جمعیت‌های ماهی‌ها و ارتباط بین آنها، به صورت فزاینده‌ای در ساماندهی پشتیبانی از مدیریت پایدار شیلاتی مورد توجه قرار گرفته است (Brickle et al., 2016). اصولاً روش‌های مختلفی برای شناسایی جمعیت‌های ماهی‌ها و ردیابی مهاجرت آنها وجود دارد. اما تنها روش‌های محدودی می‌توانند معیارهای قابل اعتمادی را برای تشخیص جمعیت‌ها ارائه نمایند. اخیراً بسیاری از پژوهشگران بر استفاده از انگشت‌نگاری عنصری ساختارهای کلسیمی (مانند اتولیت‌ها) به عنوان معیاری برای تشخیص جمعیت‌ها متمرکز شده‌اند (Gillanders, 2001; Seeley et al., 2015). وقوع تغییرات طبیعی در غلظت عناصر موجود در ساختارهای زیستی (مانند مهره‌ها، اتولیت، فلس‌ها و شعاع باله‌ها) موجب فراهم شدن برچسب‌های بیوژئوشیمیایی^۲ برای ماهی‌های مناطق مختلف جغرافیایی مختلف می‌گردد (Ramsay et al., 2011). در مطالعات متعدد از ترکیب شیمیایی عناصر کمیاب موجود در

اتولیت برای شناسایی جمعیت‌های ماهی استفاده شده است (Javor and Dorval, 2016). برخی از پژوهشگران بر این باورند که عناصر یا ترکیباتی که بر روی سطوح رشد اتولیت‌ها جذب می‌شوند، بطور دائمی حفظ می‌شوند و به عنوان برچسب‌های طبیعی دائمی محسوب می‌شوند (Javor and Dorval, 2016). یکی از مهمترین معایب استفاده از اتولیت برای آنالیز شیمیایی این نکته است که ماهیان نمونه برداری شده باید پس از مرگ بررسی شوند (Clarke et al., 2004) که این امر بویژه در شرایطی که بررسی گونه‌های کمیاب مد نظر می‌باشد، مطلوب نخواهد بود و علاوه بر این موجب کاهش ارزش بازاری گونه‌های با ارزش تجاری می‌گردد (Ramsay et al., 2011). از سوی دیگر برخی محققین معتقدند که عدسی چشم ماهی‌ها نیز ممکن است برای تمایز جمعیتی مناسب باشد، زیرا عدسی چشم فاقد مکانیزم کارآمد برای حذف یون‌ها می‌باشد. استخوان‌ها، فلس‌ها و برخی از بافت‌های نرم، عوامل مختلفی از جمله ترکیب عناصر در محیط را در طی رشد منعکس می‌کنند، اما در بعضی گونه‌ها امکان بازجذب عناصر و وقوع فرآیند معدنی شدن مجدد^۳ در این بافت‌ها وجود دارد (Veubitt and Evans, 1999; Gillanders, 2001). پژوهش‌های متعددی محتوای عنصری اتولیت‌ها برای تشخیص مهاجرت ماهی‌ها و تفکیک جمعیت‌های آنها استفاده شده است، اما تنها در تعداد نسبتاً محدودی از این پژوهش‌ها قابلیت استفاده از اتولیت به منظور بررسی در معرض قرار گرفتن ماهی‌ها در قبال آلاینده‌ها مد نظر قرار گرفته شده است. امکان استفاده از اندام‌های سخت بدن ماهیان (بویژه اتولیت) به عنوان ابزاری برای پایش زیستی^۴ آلاینده‌های حاصل از فعالیت‌های انسانی در اکوسیستم‌های آبی توسط Millon و Chenery (2001) و Elsdon و Gillanders (2004)، Gannon و Ranaldi (2008)، Sarmin و Mohamed (2012)، Herrera-Reveles (2013) بررسی شده است. در چند دهه گذشته، شرایط زیست‌محیطی دریای خزر بواسطه تأثیرات عوامل مختلف مانند فشارهای ناشی از عوامل انسانی، نوسانات سطح دریا و معرفی گونه‌های غیربومی به طور قابل توجهی تغییر کرده است (Pourang et al., 2005; Fazli et al., 2013). با توجه به پراکنش گسترده R. kutum در حوزه جنوبی دریای خزر (Afraei Bandane et al., 2010)، میزان نسبتاً بالایی از صید سالانه آن در منطقه (Kohestan-Eskandari et al., 2014) و با عنایت به قابلیت این گونه در

³ Remineralization⁴ Biomonitoring¹ Elemental fingerprinting² Biogeochemical tags

نمونه ها طی خرداد ۱۳۹۵ توسط تورهای پره ساحلی (از طریق تعاونی های پره استانی در استانهای گلستان، مازندران و گیلان) گردآوری گردیدند. از هر ایستگاه تعداد ۲۰ نمونه ماهی سفید (با سن تقریبی سه سال) گردآوری گردید. نمونه های مزبور بلافاصله در داخل ظروف حاوی یخ به آزمایشگاه منتقل شدند.

آماده سازی و آنالیز نمونه ها

در آزمایشگاه پس از بیومتری نمونه ها (اندازه گیری وزن و طول کل به ترتیب با استفاده از ترازو و تخته بیومتری واجد دقت ± 1 گرم و ± 0.5 سانتیمتر)، پنج بافت سخت (اتولیت، فلس، عدسی چشم، شعاع سخت باله پشتی، مهره پشتی) و دو بافت نرم (عضله و کبد) از هر نمونه به طریق ذیل تفکیک و نگهداری شد. کلیه وسایل مورد استفاده برای تشریح و تفکیک بافت های نمونه ها، قبل از استفاده به دقت با شوینده و آب لوله کشی شهری و سپس با آب مقطر شسته شدند و ظروف پلی اتیلنی مورد استفاده برای نگهداری بافت های تفکیک شده نیز قبل از انتقال بافت ها به درون آنها، ابتدا با شوینده، سپس با اسید نیتریک ۱۰ درصد و نهایتاً با آب مقطر شسته شدند. نمونه برداری و خشک کردن بافت ها بر اساس منابع علمی معتبر مرتبط (Gillanders, 2001; Wells et al., 2003; Davies et al., 2011; Al-Najjar et al., 2012; Herrera-Reveles et al., 2013) انجام شد. کلیه بافت های تفکیک شده پس از طی مراحل مذکور به ظروف پلی اتیلنی واجد برچسب مشخصات (کد محل نمونه برداری، بافت و شماره نمونه) انتقال یافتند و تا قبل از سنجش های آزمایشگاهی درون فریزر (۱۸- درجه سانتیگراد) قرار داده شدند (Davies et al., 2011). علاوه بر این به منظور مشخص نمودن ضریب تبدیل وزن خشک به وزن تر، حدود یک گرم از ۱۰ نمونه عضله ماهی از هر ایستگاه به طور تصادفی انتخاب و مانند آنچه در بالا ذکر گردید درون آون خشک شد و سپس ضریب تبدیل وزن خشک به تر معادل ۳/۱۹ محاسبه گردید. به منظور آنالیزهای دستگاهی با پیکسی^۲، نمونه ها به آزمایشگاه واندوگراف (مستقر در سازمان انرژی اتمی) منتقل شدند. در آنجا در ابتدا لایه ای یکنواخت و صاف از بافت های مورد نظر تهیه گردید. این لایه ها بر روی نگهدارنده که با کپتون پوشیده شده چسبانده و خشک شدند و برای گرفتن در شتاب دهنده آماده شدند. شایان ذکر است که در این روش باریکه پروتون با انرژی ۲ MeV حاصل از شتاب دهنده واندوگراف به نمونه مورد آنالیز که در خلا قرار دارد، برخورد می کند. سپس پرتو ایکس در یک آشکار ساز Si

تجمع زیستی عناصر اصلی و کمیاب (Naghipour et al., 2016)، بنظر می رسد که دارای برخی مشخصات اصلی یک پایشگر زیستی مناسب برای اکوسیستم های آبی می باشد (قابلیت دسترسی زیستی)، ظرفیت تجمع زیستی، محدوده قابل اندازه گیری مواد شیمیایی، رفتار مهاجرتی، پراکنش مناسب، اندازه مناسب (Zhou et al., 2008; Ranaldi, 2011) اهداف اصلی این تحقیق شامل: بررسی قابلیت استفاده از پنج بافت سخت (اتولیت، فلس، شعاع سخت باله، عدسی چشم و مهره های پشتی) گونه مورد نظر به منظور تفکیک جمعیت های مختلف ماهی سفید، بررسی قابلیت بکارگیری هر یک از پنج بافت سخت مزبور به عنوان آرشیو زیستی^۱ عناصر، بررسی قابلیت استفاده از هر یک از پنج بافت مزبور به منظور پایش زیستی تغییرات میزان تجمع عناصر، بررسی تجمع عناصر در بافت های ماکرل و مخاطرات احتمالی ناشی از مصرف آنها می باشد.

مواد و روش ها

نمونه برداری

ماهی سفید با نام علمی *Rutilus rutilus* (Kamenesky, 1901) از جنس *Rutilus*، خانواده کپورماهیان (Cyprinidae) و راسته کپور ماهی شکلات (Cypriniformes) است (فضلی و همکاران، ۱۳۹۱). نمونه برداری از سه ایستگاه نمونه برداری در حوزه جنوبی دریای خزر (ایستگاههای ۱، ۲ و ۳ به ترتیب در نزدیک مصب رودخانه های سفید رود، تجن و گرگانرود) (شکل ۱) انجام شد.



شکل ۱: موقعیت تقریبی سه ایستگاه نمونه برداری در تحقیق کنونی.

Figure1: Locations of the three sampling sites in the present study.

² PIXE: Proton Induced X-ray Emission

¹ Bioarchive

طبیعی نبود از روش های مناسب تغییر شکل داده ها^{۱۲} استفاده شد. به منظور مقایسه ایستگاههای نمونه برداری از نظر میزان تجمع هر یک از عناصر بافت های نرم و سخت از تعداد ۶۷ آنالیز واریانس یک طرفه^{۱۳} استفاده شد و در صورت مشاهده اختلاف معنی دار، آزمون دانکن^{۱۴} استفاده شد. علاوه بر این از ۷ آنالیز واریانس یک طرفه به منظور بررسی وجود یا عدم وجود اختلاف معنی دار بین تجمع عناصر در هر بافت اجرا گردید. از دو آزمون غیرپارامتریک کروسکال-والیس^{۱۵} و متعاقبا آزمون post hoc مربوطه (من-وینتی^{۱۶}) به منظور تشخیص اختلاف احتمالی بین ایستگاههای نمونه برداری از دیدگاه مشخصات بیومتریک استفاده شد. به منظور گروه بندی بافت ها از نقطه نظر تجمع هر عنصر در رسوبات از آنالیزهای خوشه ای^{۱۷} بر مبنای مقیاس اقلیدسی^{۱۸} استفاده شد (Everitt et al., 2011). کلیه آنالیزهای مزبور با استفاده از نسخه جدید بسته نرم افزاری SPSS (Version 23) انجام شد.

نتایج

مقایسه بین ایستگاهها

نتایج بکارگیری چند آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون های دانکن برای مقایسه ایستگاههای مختلف از نظر مقادیر هر عنصر در هر بافت در جدول ۱ ارائه شده است. بر اساس آزمون های آنالیزهای واریانس نتایج ذیل به تفکیک بافت قابل ذکر می باشد:

عضله: ایستگاههای نمونه برداری از نظر تجمع عناصر Zn, K و Na اختلاف معنی داری را نشان دادند. کبد: از نظر مقادیر عناصر P, Cl و K اختلاف معنی داری بین ایستگاهها مشاهده گردید. اتولیت: از دیدگاه میزان Ca, Br و Sr اختلاف معنی دار بین ایستگاهها قابل تشخیص بود. شعاع سخت باله پشتی: از نظر تجمع هیچیک از عناصر اختلاف معنی داری بین ایستگاهها مشاهده نشد. فلس: در مورد عناصر K و Zn اختلاف معنی داری بین ایستگاهها مشاهده شد.

(Li) آشکار می شود. انرژی این پرتوها نوع عنصر و تعداد آنها (تعداد شمارش ها در یک قله) و فراوانی نسبی عنصر متناظر با آن قله در نمونه را نشان می دهد. به منظور بررسی صحت^۱ و دقت^۲ نتایج از یک نمونه استاندارد^۳ با شش تکرار مربوط به بافت ماهی با کد MA-B-3/TM در شرایطی مشابه استفاده گردید. درصد بازیابی^۴ عناصر بین ۹۵ تا ۱۰۶ درصد و دقت اندازه گیری ها بین ۲/۳ تا ۴/۱ درصد انحراف استاندارد نسبی اندازه گیری گردید. آنالیز کمی عناصر توسط نرم افزار Gupix انجام شد (پورنگ و همکاران ۱۳۹۴؛ Moosavi et al., 2010). علاوه بر این از هر ایستگاه نمونه برداری دو نمونه ماهی انتخاب و پس از تفکیک بافت های سخت فوق الذکر، به منظور امکان آنالیز بافت ها توسط میکرو پیکسی^۵، با توجه به ابعاد نسبتا کم محفظه مربوطه (حدود 1×1 cm²) لازم بود که برخی نمونه ها به نحوی برش داده شوند که بر روی محفظه مزبور قابل نصب باشند. لذا بافت های عدسی چشم، مهره پشتی و شعاع سخت باله پشتی ابتدا با بهره گیری از اره واجد تیغه دوار ویژه^۶ و در امتداد محور رشد برش داده شدند. سپس قطعه های برش داده شده بر اساس خطوط عرضی رشد، درون ظرف ویژه حاوی نوعی رزین^۷ قرار داده شدند. در مرحله بعد قطعه سخت شده درون رزین توسط اره با دقت برش زیاد^۸ در لایه هایی به عرض حدود دو الی سه میلیمتر برش داده شد و به منظور اطمینان از مناسب بودن برش ها، خطوط رشد مربوط به هر یک از نمونه ها در زیر استریومیکروسکوپ بررسی گردید. نمونه های آماده شده جهت آنالیز با میکرو پیکسی به آزمایشگاه ذیربط در سازمان انرژی اتمی منتقل گردیدند (آقاعلی گل و همکاران، ۱۳۸۶؛ نیکبخت و همکاران، ۱۳۹۴).

تجزیه و تحلیل داده ها

به منظور بررسی طبیعی بودن^۹ توزیع داده ها از آزمون شاپیرو-ویلک^{۱۰} و جهت بررسی همگن بودن داده ها از آزمون لون^{۱۱} استفاده شد. در مواردی که توزیع داده ها

¹ Accuracy

² Precision

³ CRM: Certified Reference Material

⁴ Recovery

⁵ μ -PIXE

⁶ Rotating diamond cutting blade

⁷ Polyester Casting Resin

⁸ low speed diamond saw

⁹ Normality

¹⁰ Shapiro-Wilk

¹¹ Levene

¹² Transformation

¹³ One-way analyses of variance (ANOVA)

¹⁴ Duncan's new multiple range test

¹⁵ Kruskal-Wallis

¹⁶ Mann-Whitney U

¹⁷ Cluster analysis

¹⁸ Euclidean distance

جدول ۱: نتایج ۶۷ آنالیز واریانس یک طرفه به منظور بررسی این فرضیه صفر که هیچ اختلاف معنی داری میان ایستگاههای نمونه برداری از دیدگاه تجمع هر یک از عناصر در بافت ها وجود ندارد. درجه آزادی (df) در تمامی موارد برابر ۲ بود. در مواردی که اختلاف معنی داری مشاهده گردید، مقادیر p به صورت پررنگ (**bold**) مشخص شده است (بر مبنای آزمون دانکن، $p \leq 0.05$). ایستگاههای نمونه برداری (S1, S2, S3) که در زیر آنها خط کشیده شده است فاقد اختلاف معنی دار می باشند.

Table 1: Results of 67 one-way ANOVAs testing the null hypothesis that there were no significant differences among the sampling sites from level of each element in the selected tissues point of view. The degree of freedom (df) in all cases was 2. In cases where the significant differences were detected, p values are shown in bold (based on Duncan's new multiple range test, $p \leq 0.05$). The sampling sites, which are underlined with a common line indicate mean values are not significantly different.

بافت	عناصر										
		Br	Na	Sr	Zn	Fe	Cu	Mn	Ca	K	Mg
کبد	F-ratio	۲/۶۹۰	۱/۱۵۹	۱/۱۵۹	۰/۰۰۰	۰/۳۹۸	۰/۳۴۷	۰/۳۰۳	۲/۹۷۸	۴/۳۳۱	۰/۰۵۳
	p-value	۰/۰۰۱	۰/۳۳۳	۰/۳۳۳	۰/۳۳۳	۰/۶۷۷	۰/۶۶۶	۰/۵۴۱	۰/۰۷۳	۰/۰۲۰	۰/۴۰۲
	Duncan									<u>S1, S2, S3</u>	<u>S1, S2, S3</u>
عضله	F-ratio	۰/۳۳۱	۲۰		۳/۱۳۶	۳/۱۳۱	۳/۳۷۸	۳/۵۳۴	۰/۱۴۳	۴/۳۵۳	۰/۰۳۸
	p-value	< ۰/۰۰۱			۰/۰۰۴	۰/۰۰۶	۰/۰۰۷	۰/۰۰۴	۰/۰۶۷	۰/۰۰۳	۰/۰۱۳
	Duncan	<u>S1, S2, S3</u>			<u>S1, S2, S3</u>					<u>S1, S2, S3</u>	
فلس	F	۱/۵۳۱	۵/۰۷۳	۱/۵۳۱	۵/۰۷۳	۱/۳۳۸		۱/۵۳۳	۳/۳۴۶	۷/۳۳۴	۰/۰۱۹
	p-value	۰/۳۳۱	۰/۰۰۱	۰/۳۳۱	۰/۰۰۱	۰/۳۸۵		۰/۰۰۲	۰/۰۱۲	۰/۰۰۴	۰/۰۱۵
	Duncan				<u>S1, S2, S3</u>					<u>S3, S2, S1</u>	
مهره پشتی	F-ratio	۱/۱۳۱	۱/۱۳۱	۱/۱۳۱	۰/۰۰۰	۱/۰۵۶	۱/۰۵۶	۱/۰۵۶	۱/۰۰۰	۱/۰۰۰	۱/۰۰۰
	p-value	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
	Duncan				<u>S3, S1, S2</u>					<u>S1, S2, S3</u>	
شعاع سخت پاله	F-ratio	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
	p-value	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
	Duncan				<u>S3, S1, S2</u>					<u>S1, S2, S3</u>	
اتولیت	F-ratio	۱/۵۳۱	۱/۵۳۱	۱/۵۳۱	۱/۵۳۱	۱/۵۳۱	۱/۵۳۱	۱/۵۳۱	۱/۵۳۱	۱/۵۳۱	۱/۵۳۱
	p-value	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱
	Duncan	<u>S3, S1, S2</u>			<u>S1, S2, S3</u>					<u>S2, S1, S3</u>	
عدسی چشم	F-ratio	۱/۵۳۱	۱/۵۳۱	۱/۵۳۱	۱/۵۳۱	۱/۵۳۱	۱/۵۳۱	۱/۵۳۱	۱/۵۳۱	۱/۵۳۱	۱/۵۳۱
	p-value	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱
	Duncan	<u>S2, S1, S3</u>			<u>S1, S2, S3</u>					<u>S1, S2, S3</u>	

اختلاف معنی داری از دیدگاه تجمع عناصر مشاهده گردید. با عنایت به نتایج آزمون های دانکن، ترتیب تجمع عناصر در هر بافت به قرار ذیل است:

کبد: $K > S > Cl > P > Ca > Fe$, $Na > Sr$, Mn , Cu , Zn , Mg ؛
عضله: $K > S > Cl$, Ca , $P > Na > Mn$, Cu , Zn , Fe ؛
 $Ca > P > S$ ؛ شعاع باله پشتی: $Ca > Sr > S$, $Cl > Br$, K , Fe ؛
 $S > Cl > K$ ؛ عدسی چشم: K , Cl , Mg , Sr , Zn , Na , Fe ؛
 $Ca > S$, $P > Cl$, Mg , K , Na , Sr ؛ فلس: Ca , P , Na , Fe ؛
 $Ca > Mg > P$, S , $K > Cl$, $Sr > Zn$, Fe , Mn ؛ مهره پشتی: Zn , Fe , Mn ؛
 Zn , Fe , Mn با توجه به نتایج مندرج در جدول مزبور، در تمامی بافت های سخت، بجز عدسی چشم، Ca نسبت به سایر عناصر به بیشترین میزان تجمع را داشته است در صورتی که Fe در زمره عنصری بوده است که کمترین میزان تجمع را آشکار ساخته است. بطور کلی الگوی تجمع عناصر در عدسی چشم نسبت به سایر بافت ها تا حدود زیادی متمایز بود. ترتیب تجمع عناصر در دو بافت نرم مورد بررسی، تا حدود زیادی مشابه بود، اما Sr در بافت عضله قابل تشخیص نبود. عناصر Ca ، Fe ، S ، Cl و K در تمامی بافت های بررسی شده، قابل تشخیص بودند اما عنصر Br تنها در اتولیت قابل اندازه گیری بود.

تفاوت میان بافت ها

در شکل ۲ نتایج مربوط به دندروگرام های آنالیز های خوشه ای ۷ بافت مورد بررسی در این تحقیق ارائه شده است. کمترین میزان تشابه در مورد عدسی چشم (دندروگرام های مربوط به P ، S و Zn) و کبد (دندروگرام های مربوط به Cl ، Fe و K) قابل تشخیص است. در حالی که در مورد Sr و Ca ، اتولیت حداکثر فاصله را آشکار ساخت. با در نظر گرفتن این شکل مشخص می گردد که چنانچه خطوط عمود فرضی در فواصل کمتر از ۵، خطوط افقی را قطع نمایند، تمامی بافت های سخت، بجز عدسی چشم، در یک گروه قرار می گیرند. از سوی دیگر در مورد دندروگرام مربوط به عنصر K ، بافت های نرم و سخت در قالب دو گروه کاملاً مجزا قابل طبقه بندی می باشند.

تجمع عناصر در لایه های رشد بافت های سخت

توزیع عنصری عناصر مختلف در نمونه ای از یک بافت سخت بررسی شده در این تحقیق (نتایج آنالیز با روش میکرو پیکسی) در شکل ۳ نشان داده شده است. متعاقب آنالیز با روش مزبور در هیچیک از بافت های سخت بررسی شده، تغییرات تجمع عناصر در راستای الگوهای خطوط رشد سالانه، قابل تشخیص نمی باشد.

مهره پشتی: بین ایستگاههای نمونه برداری از نظر Mg ، P و S اختلاف معنی داری مشاهده شد. عدسی چشم: ایستگاههای نمونه برداری از نظر تجمع عناصر S ، Cl و Na اختلاف معنی داری را آشکار ساختند.

بر اساس آزمون های مقایسه میانگین ها (دانکن) نتایج زیر قابل تبیین است:

- بین ایستگاههای ۱ و ۲ از نظر مقادیر Zn در بافت های عضله، فلس و مهره پشتی؛ از نقطه نظر مقادیر K در بافت های عضله، کبد و مهره پشتی و از منظر مقادیر Na در عضله و عدسی چشم و مقادیر S و Cl در عدسی چشم اختلاف معنی داری مشاهده نشد.
- بین ایستگاههای ۲ و ۳ از نظر مقادیر K در فلس؛ از نقطه نظر مقادیر Ca و Sr در اتولیت و از دیدگاه مقادیر P در کبد اختلاف معنی داری قابل تشخیص نبود.
- بین ایستگاههای ۱ و ۳ از نظر مقادیر S در مهره پشتی و همچنین از منظر مقادیر Br در اتولیت اختلاف معنی داری تشخیص داده نشد.

از سوی دیگر بین ایستگاههای ۲ و ۳ از نظر مشخصات بیومتریک نمونه ها اختلاف معنی داری مشاهده نگردید (جدول ۲).

جدول ۲: نتایج ۲ آزمون کروسکال والیس به منظور آزمون این فرضیه صفر که هیچ اختلاف معنی داری میان ایستگاههای نمونه برداری از نظر مشخصات بیومتریک وجود ندارد. مقادیر میانگین و انحراف معیار (درون پرانتزها) نیز ارائه گردیده است. ایستگاههایی که باحروف لاتین مشابه مشخص گردیده اند، فاقد اختلاف معنی دار می باشند (بر مبنای آزمون من ویتنی، $p \leq 0.05$). درجه آزادی = df .

Table 2: Results of 2 Kruskal-Wallis tests to evaluate the null hypothesis that there exist no significant differences among the sampling sites from the biological characteristics of the fish point of view. Mean and standard deviation (in parentheses) of the biological characteristics are also presented. The sampling sites which have a common letter are not significantly different from one another (based on Mann-Whitney U tests, $p \leq 0.05$). df : Degrees of Freedom.

پارامتر	χ^2	df	p -value	ایستگاههای نمونه برداری		
				۱	۲	۳
وزن (گرم)	۱۳/۳۱۷	۲	۰/۰۰۱	a	b	b
				۶۵۰/۰ (۹۵/۷)	۴۳۴ (۱۱۷/۵)	۴۵۱/۰ (۱۰۶/۰۸)
طول کل (سانتیمتر)	۱۵/۷۵۴	۲	<۰/۰۰۱	a	b	b
				۳۷/۹۲ (۰/۹)	۳۲/۵۶ (۲/۵)	۳۱/۲۱ (۱/۸)

ترتیب تجمع عناصر در بافت ها

با توجه به نتایج آزمون های آنالیز واریانس یک طرفه (جدول ۳)، در مورد تمامی بافت های بررسی شده در این تحقیق

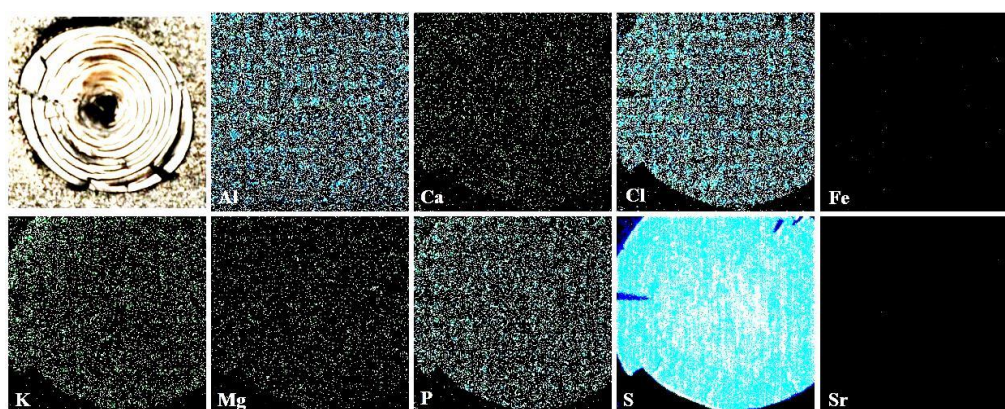
جدول ۳: نتایج ۷ آنالیز واریانس یک طرفه به منظور بررسی این فرضیه صفر که هیچ اختلاف معنی داری میان عناصر از دیدگاه میزان تجمع هر یک از عناصر در بافت ها وجود ندارد. عناصری که باحروف لاتین مشابه مشخص گردیده اند، فاقد اختلاف معنی دار می باشند (بر مبنای آزمون دانکن، $p \leq 0.05$). مقادیر میانگین و انحراف معیار (درون پرانتزها) نیز ارائه گردیده است (بر حسب درصد وزن خشک).
Table 3: Results of 7 one-way ANOVAs testing the null hypothesis that there were no significant differences among concentrations of each of the selected elements in the tissues. Elements which have a common letter are not significantly different from one another (Duncan's new multiple range test, $p < 0.05$). Mean and standard deviation (in parentheses) of the elements concentrations (percent, dry weight) are also presented.

بافت	F-ratio	df	p-value	عناصر												
				Br	Na	Sr	Zn	Fe	Mn	Cu	Ca	K	Mg	Cl	S	P
کبد	۹۵۹۱/۴	۱۱	<۰/۰۰۱		b ۲/۹۸±۱/۶۰	a ۰/۰۳±۰/۰۲	a ۰/۳۳±۰/۰۸	b ۲/۶۹±۱/۴۹	a ۰/۰۴±۰/۰۲	a ۰/۳۵±۰/۱۱	c ۴/۲۸±۱/۱۳	b ۳۵/۳۷±۲/۴۰	a ۰/۶۵±۰/۷۲	e ۱/۸۳۸±۲/۸۰	f ۲۲/۳۷±۳/۳۴	d ۱۲/۶۰±۱/۲۳
عضله	۱۱۵۱/۲۳	۹	<۰/۰۰۱	a ۰/۳۳±۰/۳۱	b ۱/۵۴±۰/۸۹	c ۴/۶۳±۳/۰۳	a ۰/۰۸±۰/۰۴	a ۰/۱/۶±۰/۱۱	a ۰/۰۳±۰/۰۲	a ۰/۰۵±۰/۰۴	c ۹/۱۴±۱/۵۴	a ۵۰/۱۱±۲/۰۴		c ۸/۸۵±۱/۳۶	d ۱۹/۹۶±۲/۷۳	c ۱۰/۰۱±۱/۸۱
اتولیت	۱۰۰۶۶/۸	۶	<۰/۰۰۱		a ۰/۱۳±۰/۳۱	a ۰/۷۴±۰/۲۶	a ۰/۳۹±۰/۱۱	a ۰/۰۹±۰/۰۸	a ۰/۰۷±۰/۰۴		d ۹۱/۶۵±۳/۱۴	a ۰/۱۲±۰/۰۸	a ۰/۸۸±۰/۵۳	a ۱/۱/۴±۰/۲۶	b ۱/۸۱±۰/۵۸	
شعاع سخت باله	۱۸۱۶۱/۱۲	۹	<۰/۰۰۱	a ۱/۰/۴±۰/۰۱	a ۰/۱۳±۰/۳۱	a ۰/۷۴±۰/۲۶	a ۰/۳۹±۰/۱۱	a ۰/۰۹±۰/۰۸	a ۰/۰۷±۰/۰۴	a ۰/۰۵±۰/۰۴	a ۷۱/۸۵±۵/۰۱	b ۷/۲۰±۱/۷۴	a ۰/۸۸±۰/۵۳	a ۱/۵۱±۱/۰۷	b ۴/۴۴±۳/۱۷	c ۱۶/۷۹±۴/۲۰
عدسی چشم	۳۹۱۲/۱۱	۷	<۰/۰۰۱		a ۱/۰/۴±۰/۰۱		a ۰/۱/۴±۰/۲۷	a ۰/۱/۱±۰/۱۶	a ۰/۱/۱±۰/۱۶		a ۲/۰/۶±۱/۳۳	b ۱۲/۰/۵±۳/۱۳	a ۱/۲/۰/۵±۳/۱۳	c ۲۲/۹۰±۸/۰۴	b ۶۰/۳۹±۱۱/۷۱	a ۱/۰/۸±۰/۷۳
فلس	۸۶۱۵۳/۸	۹	<۰/۰۰۱		a ۰/۷۴±۰/۳۳	a ۰/۷۴±۰/۲۶	a ۰/۳۳±۰/۱۵	a ۰/۱/۲±۰/۲۴	a ۰/۰/۳±۰/۰۲	a ۰/۰/۳±۰/۰۲	c ۷۰/۸۰±۱/۸۰	a ۱/۳/۵±۱/۰۷	a ۱/۳/۱±۰/۵۰	a ۲/۰/۰±۲/۰۷	b ۱۱/۵۵±۱/۱۵	b ۱۰/۰/۶±۱/۳۰
مهره پشتی	۶۴۵/۸	۹	<۰/۰۰۱		ab ۱/۰/۸±۰/۵۴		a ۰/۱/۴±۰/۱۱	a ۰/۱/۲±۰/۱۰	a ۰/۰/۸±۰/۰۱	a ۰/۰/۸±۰/۰۱	d ۶۸/۳۵±۱/۲۹	b ۳/۵۹±۳/۳۵	c ۱/۶/۳±۵/۱۷	ab ۱/۱/۲±۱/۰۶	b ۳/۶۰±۳/۳۰	b ۵/۱/۵±۱/۲۳



شکل ۲: دندروگرام های آنالیز خوشه ای سلسله مراتبی (بر مبنای فاصله اقلیدسی) برای گروه بندی بافت های مختلف (M: عضله، L: کبد، O: اتولیت، V: مهره پشتی، D: شعاع سخت باله پشتی، S: فلس، E: عدسی چشم) ماهی سفید از دیدگاه میزان تجمع عناصر.

Figure 2: The dendrograms for hierarchical cluster analysis (Euclidean distance) of the selected tissues (M: Muscle, L: Liver, O: Otolith, V: Vertebral bone, D: Dorsal fin, S: Scale, E: Eye lens) of kutum based on concentration of the elements.



شکل ۳: توزیع عناصر مختلف در یک نمونه عدسی چشم آنالیز شده ماهی سفید با میکروپیکسی.

Figure 3: Micro-PIXE elemental distributionmaps of a cross section sample of the kutum eye lens.

بحث

تفاوت‌های میان ایستگاهها

در تفسیر تفاوت های مشاهده شده بین ایستگاههای نمونه برداری (جدول ۱)، باید موارد زیر را مد نظر قرار داد:

الف) به طور کلی، تجمع عناصر در اتولیت و سایر ساختارهای سخت بدن ماهی ها، ناشی از فرآیندهایی پیچیده است که هنوز به طور کامل شناسایی نشده اند. اما می دانیم که عوامل متعدد زیستی (مانند منابع غذایی، سرعت متابولیسم، جنسیت، فعالیت تولید مثلی، استرس، تفاوت های ژنتیکی میان جمعیت ها) و غیرزیستی (مانند pH، پتانسیل ردکس^۱، قلیائیت، شوری، درجه حرارت، دوره هیدرولوژیکی^۲) ممکن است قادر به کنترل میزان تجمع و پراکنش عناصر در این بافت ها باشند. علاوه بر این، برخی از محققان در مورد هم افزایی^۳ و یا هم کاستی^۴ این عوامل گزارش هایی را منتشر کرده اند (Swan et al., 2003; Swan et al., 2006; Cuveliers et al., 2010; Ren et al., 2012; Tanner, 2012; Kerr and Campana, 2014; Aschenbrenner et al., 2016). از سوی دیگر، نتایج منتشر شده مربوط به تحقیقات مشابه در رابطه با بافت های نرم بسیار بیشتر از بافت های سخت است. با این وجود، بر مبنای پیشینه مطالعاتی (Wagner and Boman, 2003; Witeska and Jezierska, 2003; Cogun and Kargin, 2004; Jezierska and Witeska, 2006) در میان عوامل متعددی که بر تجمع عناصر اصلی و کمیاب در بافت نرم ماهی ها تاثیر می گذارند، بیشتر آنها مشابه موارد فوق الذکر می باشند. علاوه بر این، این نکته نیز باید مورد توجه قرار گیرد که تفکیک و توزیع عناصر در فازهای مختلف از جمله ستون آب، رسوب و آب موجود در خلل و فرج ذرات رسوبی^۵ بر قابلیت دسترسی زیستی^۶ فلزات در یک اکوسیستم آبی تاثیر می گذارد. در هر فاز، قابلیت دسترسی زیستی به وسیله چندین ویژگی فیزیکی، شیمیایی و زیستی تعیین می شود (Pourang et al., 2005).

ب) ایستگاههای نمونه برداری در مجاورت مصب سه رودخانه که به عنوان مکان های تخم ریزی طبیعی ماهی سفید شناخته شده اند، انتخاب شده اند. اصولا مصب ها دارای قابلیت دریافت انواع مواد شیمیایی از آبهای ساحلی و دریایی و همچنین آب شیرین رودخانه می باشند و غالبا در معرض طیف گسترده ای

از فشارهای ناشی از فعالیت های انسانی (مانند لایروبی، ورود فاضلاب و پساب های خانگی، کشاورزی و صنعتی) می باشند و همچنین تحت تاثیر رژیم های حرارتی، هیدرودینامیکی، زمین شناختی، نرخ هوازدهی و جریان رودخانه متفاوت می باشند (Chang et al., 2008; Cuveliers et al., 2010). در عین حال، باید این نکته را مد نظر قرار داد که غلظت یک عنصر در محیط الزاما نشاندهنده قابلیت دسترسی عنصر مزبور برای جذب در اتولیت یا سایر بافت های سخت نیست. به طور کلی، یون های محلولی که فاقد لیگاندها می باشند، تنها گونه شیمیایی هستند که قابلیت جذب توسط برانشی ها را دارند (Campana, 1999, 2005). تاکنون طرح پایشی جامعی در رابطه با اندازه گیری غلظت و تغییرات عناصر بررسی شده در این تحقیق در آب و رسوبات سه رودخانه مذکور اجرا نشده است. از اینرو در حال حاضر نمی توان در مورد مقایسه میزان تجمع عناصر مزبور در بافت های سخت با مقادیر آنها در آب و رسوبات منطقه مطالعاتی اظهار نظر نمود. در میان محدود مطالعات مرتبط انجام شده در منطقه، می توان به تحقیق انجام شده توسط Agah و همکاران (۲۰۱۱) اشاره نمود که بر اساس نتایج حاصله میزان تجمع عنصر Mg در رسوبات نزدیک مصب رودخانه تجن بطور معنی داری بیشتر از میزان این عنصر در رسوبات مجاور مصب گرگانرود بود (به ترتیب ۱۴۳۳۲ و ۱۲۷۵۰ میکروگرم بر گرم وزن خشک) که با نتایج تحقیق کنونی در مورد مهره پشته تطابق دارد (جدول ۱). از سوی دیگر، تجمع بیشتر S در عدسی چشم نمونه های گردآوری شده از ایستگاه ۲ در مقایسه با ایستگاه ۳، نیز با نتایج Agah و همکاران (۲۰۱۱) مطابقت دارد زیرا در تحقیق آنها نیز مقادیر بالاتری از این عنصر در رسوبات مجاورت ایستگاه ۲ نسبت به ایستگاه ۳ اندازه گیری گردید (به ترتیب ۵۱۰۰ و ۳۶۲۵ میکروگرم بر گرم وزن خشک). علاوه بر این، با توجه به نتایج تحقیق انجام شده توسط Saeedi و Karbassi (۲۰۰۶)، میزان Zn در رسوبات مجاورت مصب رودخانه گرگانرود بیشتر از رسوبات نزدیکی مصب رودخانه تجن بود (به ترتیب ۱۱۷ و ۸۳ میکروگرم بر گرم وزن خشک). به همین ترتیب، میانگین مقادیر تجمع Zn در فلس و عضله نمونه های گردآوری شده از ایستگاه ۳ به طور معنی داری بیشتر از ایستگاه ۲ بود.

ج) به طور کلی، اندازه بدن در زمره عواملی است که تاثیر آن بر میزان تجمع عناصر در بدن موجودات زنده به خوبی شناخته شده است (Pourang et al., 2014). همانطوریکه ذکر شد، طول و وزن نمونه های گردآوری شده از ایستگاه ۱ به طور معنی داری بیشتر از ایستگاههای ۲ و ۳ بود (گرچه تمام نمونه ها به گروه سنی مشابهی تعلق داشتند) (جدول ۲). به همین

¹ Redox potential

² Hydrological period

³ Synergism

⁴ Antagonism

⁵ Pour water

⁶ Bioavailability

صورت میانگین مقادیر Sr در اتولیت نمونه های ایستگاه ۱ بطور معنی داری بیشتر از دو ایستگاه دیگر بود. بر اساس نتایج تحقیق انجام شده توسط Geffen و همکاران (۲۰۰۳) مقادیر بالاتر عناصر در اتولیت نمونه های ماهی بزرگتر ممکن است در نتیجه سوخت و ساز سریعتر و نرخ رشد بالاتر و لذا افزایش میزان در معرض قرارگیری عناصر باشد که در نهایت در اتولیت تجمع می یابند. بالعکس، میانگین مقادیر P در کبد نمونه های گردآوری شده از ایستگاه ۱ به طور معنی داری کمتر از دو ایستگاه دیگر بود. وجود روابط منفی بین میزان تجمع عناصر (بوژه فلزات سنگین)، در بافت ها (از جمله کبد) و اندازه بدن ماهی ها توسط سایر پژوهشگران نیز گزارش شده است (Nussey et al., 2000; Cai, 2012). یک توضیح برای روابط منفی مشاهده شده بین غلظت این عنصر و اندازه بدن ماهی در این مطالعه ممکن است تفاوت در فعالیت های متابولیک بین ماهی های کوچکتر و بزرگتر باشد. بطور کلی تجمع یک عنصر در بدن یک موجود زنده نتیجه تفاوت بین عملکرد کلیه فرآیندهای مربوط به بین جذب و دفع عنصر مورد نظر در بدن است (Canli and Atli, 2003).

تشابه میان بافت ها

هفت بافت انتخاب شده در تحقیق کنونی از دیدگاه ترکیب و عملکرد آنها تا حدود زیادی متفاوت می باشند. اتولیت ها عمدتاً از کربنات کلسیم تشکیل شده اند، در حالی که فلس ها، مهره ها و شعاع بال ها عمدتاً متشکل از فسفات کلسیم هستند و عدسی چشم تا حدود زیادی از آب و ساختارهای پروتئینی تشکیل شده است (Tzadik et al., 2017). ترکیب بافت های نرم مورد بررسی تا حدودی متفاوت است. عضله ماهی، متشکل از آب (عمدتاً)، پروتئین و چربی و مقادیر بسیار اندکی (حدود ۱ الی ۲ درصد) کربوهیدرات، اسیدهای نوکلئیک و نمک های معدنی می باشند (Martínez Musoles et al., 2016). کبد ماهی ها حاوی پروتئین، آب و چربی است (NIIR, 2004). بنابراین، ممکن است در بافت های مختلف میل ترکیبی یون ها متفاوت باشد و از اینرو ترکیب عنصری متفاوت در بافت های مختلف قابل توجیه است. از سوی دیگر، در تفسیر تفاوت های مشاهده شده بین بافت ها، باید مسیرهای متابولیک، مسیرهای جذب یون ها و احتمال وقوع باز جذب و فرآیند معدنی شدن مجدد در نظر گرفته شود (Campana, 1999; Gillanders, 2001). بر اساس نتایج ارائه شده در شکل ۳، به نظر می رسد که تمام بافت های سخت، به جز عدسی چشم، ممکن است جایگزین های بالقوه ای برای پایش زیستی عناصر Fe, Cl, Ca, K و S در حوزه جنوبی دریای خزر باشند. شایان توجه است

که بر اساس نتایج مطالعه کنونی، فلس ها و شعاع باله ها را می توان به عنوان جایگزین های بالقوه غیر کشنده برای سایر ساختارهای سخت مطرح نمود. با این وجود، با عنایت به اینکه جذب برخی عناصر از طریق فیزیولوژی بدن ماهی ها قابل تنظیم است (Campana et al., 2000; Geffen et al., 2003)، لذا مشخص نیست که میزان تجمع همه عناصر مذکور فوق در این بافت ها منعکس کننده تغییرات آنها در محیط باشد. از سوی دیگر بر اساس نتایج ارائه شده در شکل مزبور به نظر می رسد در مورد عناصر Fe, Cl و Ca فلس ها و شعاع باله ها را می توان به عنوان جایگزین های بالقوه غیر کشنده برای اتولیت به منظور تفکیک جمعیت های ماهی سفید مطرح نمود. برخی محققین دیگر (Gillanders, 2001; Wells et al., 2003; Phelps et al., 2012; Kerr and Campana, 2014) نیز به نتایج مشابهی در مورد گونه های دیگر ماهی دست یافته اند.

توجیه ترتیب تجمع عناصر در بافت ها

به طور کلی در تفسیر نتایج ارائه شده در بخش مربوط به ترتیب تجمع عناصر در بافت ها، باید به این نکته توجه داشت که بر اساس نظرات برخی از محققین (Beone et al., 2011)، سه عامل بر ویژگی های عناصر در بدن موجودات زنده تأثیر می گذارد: الف) تفاوت در میل ترکیبی عناصر، ب) تفاوت در غلظت های درون سلولی عناصر (مثلاً وجود سیستم های خاص جذب یا جریان) و پ) ترجیحات هندسه کوئوردیناسیون^۱ عناصر مختلف. الگوی تجمع عناصر در اتولیت در این تحقیق بطور کلی با نتایج گزارش شده توسط محققان دیگر (Houston, 2015; Lai et al., 2015; Cuveliers et al., 2006; Gao et al., 2010; Swan et al., 2010) تطابق دارد. نتایج تحقیقات مشابه مربوط به سایر بافت های سخت بسیار محدود است. مکانیسم های جایگزینی و ترکیب عناصر در ماتریس های اتولیت تحت تأثیر شرایط زیستی و غیر زیستی (مانند شوری و سرعت رشد ماهی) است (Bickford et al., 2003). مکانیسم هایی که ورود عناصر به اتولیت ماهی ها را تنظیم می کنند، هنوز به طور کامل شناسایی نشده اند (Aschenbrenner et al., 2016). عدسی چشم ماهی ها، بر خلاف دیگر بافت های سخت بدن آنها، دارای ساختاری غیر آهکی است (Chittaro et al., 2006; Tzadik et al., 2017). از اینرو ترتیب متفاوت تجمع عناصر (بوژه Ca) در این بافت قابل پیش بینی بود. عناصر از طریق آب پیرامون و غذا به فلسها

¹ Coordination geometry

اکثر تحقیقات انجام شده در این خصوص از روش LA-ICP-MS استفاده شده است. لذا، لازم است در تحقیقات آتی حتی الامکان بکارگیری روش هایی با قابلیت تفکیک بالاتر مد نظر قرار گیرد.

مقایسه با استانداردها

از میان عناصری که با بکارگیری روش پیکسی در بافت ماکول (عضله) قابل اندازه گیری بودند (شامل Fe, Cu, Zn, Mn, Na, S, P, K, Ca و Cl) تنها در مورد چهار عنصر Fe, Cu, Zn و Mn آستانه های مجاز در برخی استانداردهای بین المللی تعریف شده است که در جدول ۴ مندرج می باشند. با عنایت به اینکه استانداردهای مندرج در جدول مزبور بر اساس وزن تر ارائه شده است، اما محاسبات انجام شده در این تحقیق بر اساس وزن خشک می باشد، لذا لازم است قبل از مقایسه مقادیر محاسبه شده با استانداردها، از ضریب تبدیل وزن خشک به تر که در بخش مواد و روش ها ارائه شده است (۳/۱۹) استفاده نمود. با در نظر گرفتن ضریب تبدیل فوق الذکر میزان تجمع عناصر Fe, Cu, Zn و Mn در بافت عضله نمونه های بررسی شده در این تحقیق به ترتیب برابر ۰/۲۶، ۰/۱۷، ۰/۵۰ و ۰/۰۹ خواهد بود که در تمامی موارد در مقایسه با استانداردهای درج شده در جدول ۴ بسیار کمتر می باشد. از اینرو بنظر می رسد مصرف کنندگان این ماهی از نظر تجمع چهار عنصر مزبور در بدن در معرض تهدید سلامتی نیستند.

وارد می شوند. مسیر ورود عناصر به فلس به نوع عنصر بستگی دارد. فلس ها فاقد ثبات متابولیک می باشند و ممکن است در شرایط استرس و همچنین مطالبات غذایی بالای ماهی، برخی از عناصر را بازجذب نمایند (Gillanders, 2001; Ramsay et al., 2011; Kerr and Campana, 2014). به نظر می رسد که نحوه ورود عناصر به شعاع باله ماهی ها تقریباً مشابه با مهره ها باشد. با این وجود، عدم امکان ارائه استدلال مناسب در مورد تفاوت ترکیب عنصری اتولیت ها و شعاع باله ها، حاکی از فقدان شناخت کافی ما از مسیرهای متابولیک، مسیرهای جذب یون ها و توانایی های متفاوت بافت ها در جذب عناصر می باشد (Davies et al., 2011; Tzadik et al., 2017). الگوی تجمع عناصر در عضله *R. kutum* تا حد زیادی مشابه با موارد گزارش شده توسط Pirestani و همکاران (۲۰۰۹) بود. Goutte و همکاران (۲۰۱۵) روندهای نسبتاً مشابهی را در مورد کبد شش گونه ماهی قطب جنوب گزارش نمودند.

تجمع عناصر در لایه های رشد بافت های سخت

همانگونه که قبلاً ذکر گردید، به منظور بررسی قابلیت استفاده از هر یک از پنج بافت های سخت انتخاب شده در این تحقیق به عنوان آرشیو زیستی عناصر از روش میکرو پیکسی استفاده گردید. همانگونه که از شکل ۳ قابل استنتاج است، قابلیت تشخیص روش مزبور برای تفکیک عناصر بر مبنای خطوط رشد کافی نیست. برخی محققین با استفاده از روش های مختلف تغییرات میزان تجمع برخی عناصر را در ارتباط با الگوهای رشد برخی گونه های ماهی گزارش نموده اند (Davies et al., 2011; Campbell et al., 2015; Luque et al., 2016).

جدول ۴: حداکثر غلظت های مجاز عناصر (برحسب میکروگرم بر گرم وزن تر) در آبزیان برای استفاده انسان بر اساس استانداردهای بین المللی مختلف.

Table 4: The maximum allowable concentrations of elements (in microgram per gram wet weight) in aquatic organisms for human consumption based on different international standards.

منبع	Fe	Mn	Zn	Cu	استاندارد
FAO/WHO, 1989; Yin et al., 2012	۱۰۰	۱	۱۰۰	۳۰	FAO ^۱ /WHO ^۲
Maher, 1986; Darmono & Denton, 1990			۱۵۰	۱۰	NHMRC ^۳
Collings et al., 1996; Anan et al., 2005			۵۰	۲۰	MAFF ^۴
Sarmani et al., 1993			۱۰۰	۳۰	Malaysian Food Regulations

^۱ Food and Agriculture Organization, ^۲ World Health Organization, ^۳ Ministry of Agriculture Fisheries and Food (UK), ^۴ Australian National Health and Medical Research Council

منابع

- waters of the Caspian Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 51: 882-888. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2005.06.038.
- Aschenbrenner, A., Ferreira, B. P. and Rooker, J. R., 2016.** Spatial and temporal variability in the otolith chemistry of the Brazilian snapper *Lutjanus alexandrei* from estuarine and coastal environments. *Journal of Fish Biology*, 89(1), 753-769. DOI: 10.1111/jfb.13003.
- Bickford, N.A., Hannigan, R.E. and Bogdevich, O.P., 2003.** Environmental life histories of freshwater fish using otolith microchemistry. The Sixth International Symposium on Environmental Contamination in Central and Eastern Europe and the Commonwealth of Independent States, , Prague, Czech Republic, 1-4 September 2003.
- Brickle, P., Schuchert, P.C., Arkhipkin, A.I., Reid, M.R. and Randhawa, H.S., 2016.** Otolith trace elemental analyses of South American Austral Hake, *Merluccius australis* (Hutton, 1872) indicates complex salinity structuring on their spawning/larval grounds. *PLoS One*, 11 (1), e0145479. DOI: 10.1371/journal.pone.0145479.
- Cai, S., Ni, Z., Li, Y., Shen, Z., Xiong, Z., Zhang, Y. and Zhou, Y., 2012.** Metals in the tissues of two fish species from the rare and endemic fish nature reserve in the upper reaches of the Yangtze River, China. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 88, 922-927. DOI: 10.1007/s00128-012-0564
- Campana, S.E., 1999.** Chemistry and composition of fish otoliths: pathways, mechanisms and applications. *Marine Ecology Progress Series*, 188, 263-297. DOI: 10.3354/meps188263.
- Campana, S.E., Chouinard, G.A., Hanson, J.M., Frechet and A., Brattey, J., 2000.** Otolith elemental fingerprints as biological tracers of fish stocks. *Fisheries Research*, 46, 343-357.
- آقاعلی گل، د.، اولیائی، پ.، باقی زاده، ع.، شکوهی، ف.، کاکویی، ا.ر.، موحد، ب.، فرمehینی فراهانی، م.، مرادی، م. و لامعی رشتی. م.، ۱۳۸۶. آنالیز عنصری نمونه های مختلف با استفاده از میکروسکوپ روبشی پروتون و بررسی توزیع عناصر در آنها. *مجله علوم و فنون هسته ای*، ۴۰: ۱-۱۰
- پورنگ، ن.، قنبری باغستانی، ف.، لامعی رشتی، م.، مرتضوی، م. ص.، کمالی، ع. و وارسته، ط. ۱۳۹۴. بررسی قابلیت استفاده از یک گونه دو کفه ای به منظور پایش زیستی عناصر در خلیج فارس با بکارگیری یک روش آنالیز غیرتخریبی. *مجله علمی شیلات ایران*، ۲۴ (۴): ۸۵-۶۵
- فضلی، ح. ، دریانبرد، غ.ر. ، پورغلام، ر.، عبدالملکی، ش.، بندان، ع. ، پورغلامی، ا. و صفوی، س. ا.، ۱۳۹۱. بررسی کیفی وضعیت ذخایر ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum* Kamensky, 1901) در دریای خزر طی سالهای ۱۳۹۰-۱۳۷۰. *مجله علمی شیلات ایران*، ۲۱ (۲): ۵۳-۶۴
- نیکبخت، ط.، کاکویی، ا.ر.، لامعی رشتی، م. و صداقتی بورخانی، م.، ۱۳۹۴. مشخصه یابی سنگ لاجورد با استفاده از روشهای مکمل آبییل و میکروپیکسی. *مجله پژوهش فیزیک ایران*، ۱۵ (۱): ۹-۱۷.
- Afraei Bandpei, M.A., Mashhor, M., Abdolmaleki, S. and El-Sayed, A.M., 2010.** Population dynamics of Caspian Kutum, *Rutilus frisii kutum* (Cyprinidae) in southern Caspian Sea, Iran. *Cybiuim*, 34(3): 285-292.
- Agah, H., Hashtroodi, M. and Baeyens, W., 2011.** Trace metals analysis in the sediments of the southern Caspian Sea. *Journal of the Persian Gulf*, 2 (6): 1-12.
- Al-Najjar, T., Khalaf, N., Alawi, M. and Disi, A., 2012.** Levels of trace metals in two fish species (*Caesio varilineata* and *Caesio lunaris*) of the family Caesionidae from the Gulf of Aqaba, Red Sea. *Fresenius Environmental Bulletin*, 21(5): 1152-1157.
- Anan, Y., Kunito, T., Tanabe, S., Mitrofanov, I. and Aubrey, D., 2005.** Trace element accumulation in fishes collected from coastal

- Campana, S.E., 2005.** Otolith elemental composition as a natural marker of fish stocks. In: Cardin, S.X., Friedland, K.D. and Waldman, J.R. Stock identification methods. Academic Press, New York. pp. 227-245.
- Campbell, L.A., Bottom, D.L., Volk, E.C. and Fleming, I.A., 2015.** Correspondence between scale morphometrics and scale and otolith chemistry for interpreting juvenile salmon life histories. Transactions of the American Fisheries Society, 144, 55–67. DOI: 10.1080/00028487.2014.963253 .
- Canli, M. and Atli, G., 2003.** The relationships between heavy metal (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) levels and the size of six Mediterranean fish species. Environmental Pollution, 121, 129–136. DOI: 10.1016/S0269-7491(02)00194-X.
- Chang, M.Y., Tzeng, W.N., Wang, C.H., You, C.F., 2008.** Differences in otolith elemental composition of the larval *Rhinogobius giurinus* (Perciformes, Gobiidae) among estuaries of Taiwan: implications for larval dispersal and connectance among metapopulation. Zoological Studies, 47(6), 676-684.
- Chittaro, P.M., Usseglio, P., Fryer, B.J. and Sale, P.F., 2006.** Spatial variation in otolith chemistry of *Lutjanus apodus* at Turneffe Atoll, Belize. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 67, 673-680. DOI: 10.1016/j.ecss.2005.12.014.
- Clarke, A.D., Telmer, K. and Shrimpton, J.M., 2004.** Population structure and habitat use by Arctic grayling (*Thymallus arcticus*) in tributaries of the Williston Reservoir using natural elemental signatures. Peace/Williston Fish and Wildlife Compensation Program Report No. 300, 61P.
- Cogun, H.Y. and Kargin, F., 2004.** Effects of pH on the mortality and accumulation of copper in tissues of *Oreochromis niloticus*. Chemosphere, 55, 277–282. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2003.10.007.
- Collings, S.E., Johnson, M.S. and Leah, R.T., 1996.** Metal contamination of angler – caught fish from the Mersey Estuary. Marine Environmental Research, 41(3), 281-297. DOI: 10.1016/0141-1136(95)00020-8.
- Cuveliers, E.L., Geffen, A.J., Guelinckx, J., Raeymaekers, J.A.M., Skadal, J., Volckaert, F.A.M. and Maes, G.E., 2010.** Microchemical variation in juvenile *Solea solea* otoliths as a powerful tool for studying connectivity in the North Sea. Marine Ecology Progress Series, 401, 211–220. DOI: 10.3354/meps08439.
- Darmono, D. and Denton, G.R.W., 1990.** Heavy metal concentrations in the banana prawn, *Penaeus merguensis*, and leader prawn, *P. monodon*, in the Townsville Region of Australia. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 44, 479-486. DOI: 10.1007/BF01701233.
- Davies, C.A., Brophy, D., Jeffries, T. and Gosling, E., 2011.** Trace elements in the otoliths and dorsal spines of albacore tuna (*Thunnus alalunga*, Bonnaterre, 1788): An assessment of the effectiveness of cleaning procedures at removing postmortem contamination. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 396, 162-170. DOI: 10.1016/j.jembe.2010.10.016.
- Elsdon, T.S. and Gillanders, B.M., 2004.** Fish otolith chemistry influenced by exposure to multiple environmental variables. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 313 (2), 269-284.
- Everitt, B.S., Landau, S., Leese, M. and Stahl, D., 2011.** Cluster analysis. (5th ed). Chichester, UK, Wiley, 330P.
- FAO/WHO, 1989.** National Research Council Recommended Dietary Allowances (10th ed). National Academy Press. Washington, DC. USA, 302P.

- Fazli, H., Daryanabard, G.R., Abdolmaleki, S. and Bandani, G.A., 2013.** Stock management implication of Caspian kutum (*Rutilus frisii kutum* Kamensky, 1901) in Iranian waters of the Caspian Sea. *Ecopersia*, 1 (2), 179-190.
- Gao, Y., Feng, Q., Ren, D., Qiao, L. and Li, L., 2010.** The relationship between trace elements in fish otoliths of wild carp and hydrochemical conditions. *Fish Physiology and Biochemistry*, 36, 91-100. DOI: 10.1007/s10695-008-9294-2.
- Geffen, A.J., Jarvis, K., Thorpe, J.P., Leah, R.T. and Nash, R.D.M., 2003.** Spatial differences in the trace element concentrations of Irish Sea plaice *Pleuronectes platessa* and whiting *Merlangius merlangus* otoliths. *Journal of Sea Research*, 50, 245-254. DOI: 10.1016/j.seares.2003.06.001
- Gillanders, B.M., 2001.** Trace metals in four structures of fish and their use for estimates of stock structure. *Fishery Bulletin*, 99(3), 410-419.
- Goutte, A., Cherel, Y., Churlaud, C., Ponthus, J.P., Massé, G. and Bustamante, P., 2015.** Trace elements in Antarctic fish species and the influence of foraging habitats and dietary habits on mercury levels. *Science of the Total Environment*, 538, 743-749. DOI: 10.1016/j.scitotenv.
- Herrera-Reveles, A.T., Lemus, M., Marín, B. and Prin, J. L. 2013.** Trace metal incorporation in otoliths of a territorial coral reef fish (*Abudefduf saxatilis*) as an environmental monitoring tool. *E3S Web of Conferences*, 1, 34007.
- Houston, B.C., 2015.** Comparison of otolith-based growth rates and microchemistry in red drum before, during, and after the Deepwater Horizon oil spill. M.Sc. Thesis, College of Marine Science, University of South Florida, USA.
- Javor, B.J. and Dorval, E., 2016.** Stability of trace elements in otoliths of juvenile Pacific sardine *Sardinops sagax*. *CalCOFI Reports*, 57, 109-123.
- Jezierska, B. and Witeska, M., 2006.** The metal uptake and accumulation in fish living in polluted waters, In: Twardowska, I.; Allen, H.E.; Hagblom, M.M. and Stefaniak, S. (eds.). *Soil and Water Pollution Monitoring, Protection and Remediation*. Springer, pp. 3-23. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-4728-2_6.
- Kerr, L.A. and Campana, S.E., 2014.** Chemical composition of fish hard parts as a natural marker of fish stocks. In: Cadrin, S. X., Kerr, L. A. and Mariani, S. (ed). *Stock identification methods*. 2nd ed. Academic Press, San Diego, CA. pp 205-234.
- Kohestan-Eskandari, S., Anvarifar, H., Mousavi-Sabet, H., Yousefi, M. and Khanzade, M., 2014.** A morphology-based hypothesis for homeward migration success and population differentiation in the anadromous kutum *Rutilus kutum* (Pisces: Cyprinidae) along the southern Caspian Sea, Iran. *Folia Zoologica*, 63 (3), 151-160. DOI: [doi.org/10.25225/fozo.v63.i3.a2.2014](http://dx.doi.org/10.25225/fozo.v63.i3.a2.2014).
- Lai, J., Zhao, L., Fan, Y., Qu, X., Liu, D., Guo, Z., Wang, Y., Liu, Q. and Chen, Y., 2015.** Using whole body elemental fingerprint analysis to distinguish different populations of *Coilia nasus* in a large river basin. *Biochemical Systematics and Ecology*, 60, 249-257.
- Luque, P.L., Zhang, S., Rooker, J.R., Bidegain, G. and Rodríguez-Marí, E., 2016.** Dorsal fin spines as a non-invasive alternative calcified structure for microelemental studies in Atlantic bluefin tuna. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 486, 127-133. DOI: 10.1016/j.jembe.2016.09.016.
- Maher, W. A., 1986.** Trace metal concentrations in marine organisms from St. Vincent Gulf, south

- Australia. Water, Air and Soil Pollution, 29, 77-84. DOI:10.1007/BF00149330.
- Martínez Musoles, M., Alvarez Perez, J., Pessatti, M., Loyola Twardowsky Bova, M., 2016.** Why are Brazilian deep-demersal fish resources valuable? An analysis of the size of edible flesh and its chemical composition. Latin American Journal of Aquatic Research, 44(5), 947-956. DOI:10.3856/vol44-issue5-fulltext-7.
- Milton, D. A. and Chenery, S.R. , 2001.** Sources and uptake of trace metals in otoliths of juvenile bramundi (*Lates calcarifer*). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 264 (1), 47-65. DOI: 0.1111/j.1095-8649.2004.00393.x.
- Moosavi, K., Vatankhah, S., Salimi, J. and Moradi, M., 2010.** A proton induced X-ray emission (PIXE) analysis of concentration of trace elements in varicose veins. Iranian Journal of Radiation Research, 8(2), 117 – 121.
- Naghipour, D., Shaabaninezhad, Z. and Amouei, A., 2016.** Evaluation of heavy metal concentrations in *Rutilus frisii kutum* on the southern coast of the Caspian Sea (northern Iran). Environmental Health Engineering and Management Journal, 3(2), 55–59. DOI: 10.15171/ehemj.2016.01.
- NIIR, 2004.** Handbook of fisheries and aquaculture technology. National Institute of Industrial Research (NIIR), Asia Pacific Business Press Inc. 750P.
- Nussey, G., Van Vuren, J.H.J. and du Preez, H.H., 2000.** Bioaccumulation of chromium, manganese, nickel and lead in the tissues of themoggel, *Labeo umbratus* (Cyprinidae), from Witbank Dam, Mpumalanga. Water SA, 26(2), 269–284.
- Peterson, C.H., Duncan, P.B., Summerson, H.C. and Safrit, G.W., 1983.** A mark-recapture test of annual periodicity of internal growth band deposition in shells of hard clams, *Mercenaria mercenaria*, from a population along the Southeastern United States. Fishery Bulletin, 81, 765–779.
- Phelps, Q.E., Whitedge, G.W., Tripp, S.J., Smith, K.T., Garvey, J.E., Herzog, D.P., Ostendorf, D.E., Ridings, J.W., Crites, J.W., Hrabik, R.A., Doyle, W.J., Hill, T.D., Trudel, M., 2012.** Identifying river of origin for age-0 *Scaphirhynchus* sturgeons in the Missouri and Mississippi rivers using fin ray microchemistry. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 69 (5), 930-941. DOI: 10.1139/f2012-038.
- Pirestani, S., Ali Sahari, M., Barzegar, M. and Seyfabadi, S.J., 2009.** Chemical compositions and minerals of some commercially important fish species from the South Caspian Sea. International Food Research Journal, 16, 39-44.
- Pourang, N., Tanabe, S., Rezvani, S. and Dennis, J.H., 2005.** Trace elements accumulation in edible tissues of five sturgeon species from the Caspian Sea. Environmental Monitoring and Assessment, 100, 89–108. DOI: 10.1007/s10661-005-7054-7.
- Pourang, N., Richardson, C.A., Chenery, S.R.N. and Nasrollahzede, H., 2014.** Assessment of trace elements in the shell layers and soft tissues of the pearl oyster *Pinctada radiata* using multivariate analyses: a potential proxy for temporal and spatial variations of trace elements. Environmental Monitoring and Assessment. 186(4), 2465-2485. DOI: 10.1007/s10661-013-3553-0.
- Ramsay, A.L., Milner, N.J., Hughes, R.N. and McCarthy, I.D., 2011.** Comparison of the performance of scale and otolith microchemistry as fisheries research tools in a small upland catchment. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 68, 823-833. DOI: 10.1139/f2011-027.

- Ranaldi, M. and Gagnon, M. M., 2008.** Trace metal incorporation in otoliths of black bream (*Acanthopagrus butcheri* Munro), an indicator of exposure to metal contamination. *Water, Air and Soil Pollution*, 194 (1-4), 31-43. DOI: 10.1007/s11270-008-9696-x.
- Ranaldi, M.M., 2011.** Trace metal analysis of fish otoliths used as a biomonitoring tool. Curtin University. Department of Environment and Agriculture, 114P.
- Ren, D., Gao, Y. and Feng, Q., 2012.** Enrichment of Pb, Hg and Cr in cultured carp otolith. *African Journal of Biotechnology*, 11(8), 1939-1947. DOI: 10.5897/AJB11.3108.
- Saeedi, M. and Karbassi, A.R., 2006.** Heavy metal pollution and speciation in sediments of southern part of the Caspian Sea. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 9, 735-740. DOI: 10.3923/pjbs.2006.735.740.
- Sarimin, A. and Mohamed, C.A.R., 2012.** Elements content in otolith as pollution indicator for cultured sea bass (*Lates calcarifer*) of Malaysia. *Journal of Environmental Protection*, 3, 1689-1703. DOI: 10.4236/jep.2012.312184.
- Sarmani, S., Wood, A. K., Hamzah, Z. and Majid, A. A., 1993.** Analysis of toxic trace elements in sea food samples by neutron activation. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 169(1), 255-258. DOI: 10.1007/BF02046800.
- Seeley, M., Miller, N. and Walther, B., 2015.** High resolution profiles of elements in Atlantic tarpon (*Megalops atlanticus*) scales obtained via cross-sectioning and laser ablation ICP-MS: a literature survey and novel approach for scale analyses. *Environmental Biology of Fishes*, 98, 2223-2238. DOI: 10.1007/s10641-015-0443-z.
- Sorte, C.J.B., Etter, R.J., Spackman, R., Boyle, E.E. and Hannigan, R.E., 2013.** Elemental fingerprinting of mussel shells to predict population sources and redistribution potential in the Gulf of Maine. *PLoS ONE*, 8(11), e8086. DOI: 10.1371/journal.pone.0080868.
- Swan, S.C., Gordon, J.D.M., Morales-Nin, B., Shimmield, T., Sawyer, T., Geffen, A.G., 2003.** Otolith microchemistry of *Nezumia aequalis* (Pisces: Macrouridae) from widely different habitats in the Atlantic and Mediterranean. *Marine Biological Association of the United Kingdom*, 83, 883-886.
- Swan, S. C., Geffen, A. J., Morales-Nin, B., Gordon, J. D. M., Shimmield, T., Sawyer, T. and Massuti', E., 2006.** Otolith chemistry: an aid to stock separation of *Helicolenus dactylopterus* (bluemouth) and *Merluccius merluccius* (European hake) in the Northeast Atlantic and Mediterranean. *ICES Journal of Marine Science*, 63, 504-513. DOI: 10.1016/j.icesjms.2005.08.012.
- Tanner, S.E., 2012.** Connectivity among estuarine and coastal fish populations using otolith geochemistry. Ph.D. Thesis. Departamento de Biologia Animal, University of Lisboa, Portugal, 179P.
- Tzadik, O.E., Curtis, J.S., Granneman, J.E., Kurth, B.N., Pusack, T.J., Wallace, A.A., Hollander, D.J., Peebles, E.B. and Stallings, C.D., 2017.** Chemical archives in fishes beyond otoliths: A review on the use of other body parts as chronological recorders of microchemical constituents for expanding interpretations of environmental, ecological, and life-history changes. *Limnology and Oceanography: Methods*, 15, 238-263. DOI: 10.1002/lom3.10153.
- Veinott, G.I. and Evans, R.D., 1999.** An examination of elemental stability in the fin ray of the white sturgeon with laser ablation sampling-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (LAS-ICP-MS). *Transactions of*

- the American Fisheries Society, 128, 352-361. DOI: 10.1577/1548-8659(1999)128.
- Wagner, W. and Boman, J., 2003.** Biomonitoring of trace elements in muscle and liver tissue of freshwater fish. *Spectrochimica Acta Part B*, 58, 2215–2226. DOI: 10.1016/j.sab.2003.05.003.
- Wells, B.K., Rieman, B.E., Clayton, J.L., Horan, D.L. and Jones, C.M., 2003.** Relationships between water, otolith, and scale chemistries of westslope cutthroat trout from the Coeur d'Alene River, Idaho: The potential application of hard-part chemistry to describe movements in freshwater. *Transactions of the American Fisheries Society*, 132, 409–424. DOI: 10.1577/1548-8659(2003)132<0409:RBWOAS>2.0.CO;2.
- Witeska, M. and Jezierska, B., 2003.** The effects of environmental factors on metal toxicity to fish (Review), *Fresenius Environmental Bulletin*, 12, 824-9.
- Yin, S.A., Ismail, A. and Zulkifli, S.Z., 2012.** Heavy metals uptake by Asian swamp eel, *Monopterus albus* from paddy fields of Kelantan, Peninsular Malaysia: Preliminary study. *Tropical Life Sciences Research*, 23(2), 27–38.
- Zhou, Q., Zhang, J., Fu, J., Shi, J. and Jiang, G., 2008.** Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Analytica Chimica Acta*, 606: 135–150. DOI: 10.1016/j.aca.2007.11.018.

Applications of elemental fingerprinting for population discrimination and biomonitoring potential assessment of *Rutilus kutum* from the Southern Caspian Sea

Pourang N.^{1*}; Parafkandeh Haghighi F.¹; Moazami H.R.²; Agha Aligol D.²; Ghavam Mostafavi P.³; Mahmoudian M.³

*n_pourang@yahoo.com

1-Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.

2-Van de Graaff Laboratory, Nuclear Science Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute (NSTRI), Tehran, Iran.

3-Department of Marine Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Abstract

In this research, the potential use of five hard parts (otolith, scale, eye lens, dorsal spine, vertebral bone) of *Rutilus kutum* for populations discrimination and biomonitoring as well as their usability as biological archive in the southern Caspian Sea was investigated. Two soft tissues (muscle and liver) were also analyzed for assessment of the possible risk of consumption and use as biomonitoring tool, respectively. A total of 60 specimens were collected using beach seine from three sampling sites (adjacent to the estuaries of the rivers Sefidrud, Tajan and Gorganrud, respectively) in the Southern Caspian Sea in May 2016. In total, the levels of 13 major and trace elements in the samples (the seven soft and hard tissues) was measured using PIXE (Proton Induced X-ray Emission) and μ -PIXE methods. Minor similarities among the tissues were observed in the case of eye lens (for P, S and Zn) and liver (for Cl, Fe and K). There were no significant relationships between the elements and biological characteristics (weight, total length and standard length). Based on the results, it seems that all the studied hard parts, except for eye lens, may offer alternatives for biomonitoring of Ca, Cl, Fe, K and S in the southern Caspian Sea. Considering Sr level in otolith, no significant differences could be found between the sampling sites 2 and 3. So it can be concluded that the specimens collected from the two sites are probably from the same population. Similar results were also obtained based on the results concerning K accumulation in scale. It can be concluded that scales may provide an alternative structure to otolith for stock discrimination of *R. kutum* in the southern Caspian Sea. Among the 10 elements that were detectable in the muscle using the PIXE method, only in the case of four of them (i.e. Zn, Cu, Fe and Mn) maximum allowable concentrations for human consumption have been defined, which in all the cases the mean concentrations in the present study were far below the recommended limits.

Keywords: Caspian Sea, Kutum, Population discrimination, Biomonitoring, PIXE

*Corresponding author