بررسی اثر غلظت تحت کشنده فلزات سنگین مس و کادمیوم بر شاخص‌های استرسی تاسماهی ایرانی یکساله (*Acipenser persicus*)

سعید زاهدی[۱]*؛ علیرضا میرواقفی[۲]؛ غلامرضا رفیعی[۳]؛ باقر مجازی امیری[٤]؛ مهدی هدایتی[٥]؛ چنگیز مخدومی[٦]؛ موسی زارعی دنگسرکی[۷]

szahedit@gmail.com

۱، ۲، ۳ و ٤ – گروه شیلات و محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج صندوق پستی: ٤۳۱٤-۳۱٥۸٥

٥- پژوهشکده علوم غدد دورن ریز، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران صندوق پستی: ٤۷٦۳-۱۹۳۹٥

٦ و ۷- مرکز بازسازی ذخایر و تکثیر و پرورش ماهی شهید رجایی، ساری صندوق پستی: ۸۳۳

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۸۹ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۰

چکیده

در این مطالعه، علاوه بر تعیین مقادیر متوسط غلظت کشنده (LC_{50}) ۹۶ ساعته فلزات سنگین مس و کادمیوم در تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) یکساله، به بررسی اثرات غلظت تحت کشنده این فلزات بر شاخص‌های استرسی در گونه مذکور پرداخته شد. نتایج حاصل از آزمون آنالیز پروبیت، مقادیر LC_{50} ۹۶ ساعته مس و کادمیوم را در گونه مذکور بترتیب به میزان ۰/۵۰۲ و ۱۴/۷۸ میلی‌گرم بر لیتر نشان داد. همچنین در آزمایش مواجهه با غلظت انفرادی و تحت‌کشنده این فلزات، ۷۲ عدد بچه تاسماهی (وزن متوسط ۱۹±۱۳۰ گرم) بترتیب در معرض غلظت ۰/۰۲۶ و ۰/۶۸ میلی‌گرم بر لیتر مس و کادمیوم در سیستم آزمایشی نیمه ثابت قرار گرفتند و برخی از شاخص‌های بیوشیمیایی مرتبط با استرس، در ۱، ۷ و ۱۴ روز پس از شروع آزمایش اندازه‌گیری گردید. براساس نتایج بدست آمده، سطوح گلوکز و کورتیزول پلاسما در ماهیان تحت تیمارهای آزمایشی در مقایسه با ماهیان گروه شاهد فقط در اولین مرحلهٔ نمونه‌برداری بطور معنی‌داری افزایش یافته بود ($P<0.05$). همچنین، در این ماهیان، کاهش معنی‌داری در مقادیر گلوکز و کورتیزول پلاسما در روزهای ۷ و ۱۴ در مقایسه با روز اول مشاهده گردید ($P<0.05$). پروتئین کل پلاسما و کبد در بچه ماهیان تیمارهای آزمایشی و کنترل، به استثنای ماهیان تحت تیمار مس در اولین نمونه‌برداری، فاقد هرگونه اختلاف معنی‌داری بود. در اولین نمونه برداری، پروتئین پلاسما بطور معنی‌داری در تیمار مس افزایش یافت ($P<0.05$) و در این تیمار، کاهش معنی‌داری در دومین و سومین نمونه‌برداری نسبت به روز اول مشاهده شد ($P<0.05$). همچنین، در تیمارهای فلزی، کاهش معنی‌داری در میزان تری‌گلیسیرید پلاسما طی زمان و در دومین و سومین روز نمونه‌برداری در مقایسه با روز اول مشاهده گردید ($P<0.05$). نتایج حاصله از این آزمایش بخوبی نشان داد که فلز مس در مقایسه با کادمیوم از سمیت بالاتری برای تاسماهی ایرانی برخوردار می‌باشد و همچنین، غلظت تحت کشنده مس و کادمیوم برای تاسماهی ایرانی استرس‌زا بوده‌اند.

لغات کلیدی: آلاینده‌ها، آلودگی، کورتیزول، تاسماهی ایرانی

* نویسندهٔ مسئول

مقدمه

فلزات سنگین مس و کادمیوم، جزء مهم‌ترین فلزات از منظر سم‌شناسی محیطی هستند و محدوده وسیعی از اثرات آسیب‌شناسی را در ماهیان و سایر آبزیان ایجاد می‌کنند. در ماهیان، فلز مس در غلظتهای تحت کشنده باعث اختلال محور هیپوتالاموس– هیپوفیز – غده بین کلیوی در سوف زرد (Gravel *et al*., 2005)، تغییر پارامترهای خونی و بیوشیمیایی در قزل‌آلای رنگین کمان (Dethloff *et al*., 1999) و کپور معمولی (Witeska, 2005) و نیز تغییر سطوح آنزیمهای آنتی اکسیدان در ماهی سه خاره (Sanchez *et al*., 2005) و باس دریایی (Romeo *et al*., 2000) می‌شود.

کادمیوم نیز در ماهیان موجب تغییر رشد در بسیاری از گونه‌ها مانند ماهی گوپی (Miliou *et al*., 1998)، تجمع یافتن در اندامهای حیاتی (Cinier *et al*., 1997; Kim *et al*., 2004; Asagba *et al*., 2008)، تغییر شاخصهای خونی (Brucka-Jastrzebska & Protawicki, 2005)، آسیب غده بین کلیوی (Lizardo-dault *et al*., 2007)، تغییرات مقادیر هورمونهای درون‌ریزی مانند کورتیزول و تیروکسین (Pratap & Wendelaar Bonga, 1990; Hontela *et al*., 1996) و اختلال در تنظیم اسمزی (Reid & McDonald, 1988) می‌شود.

در سال‌های اخیر، نگرانی‌ها پیرامون ورود حجم قابل توجهی از آلاینده‌ها به دریای خزر افزایش یافته است (Agusa *et al*., 2004) و گزارشهای متعددی حاکی از افزایش بیش از حد غلظت آلاینده‌ها بویژه فلزات سنگین در رودخانه‌های حوزه جنوبی (سعیدی و همکاران، ۱۳۸۵)، مصبها و رسوبات ساحلی جنوبی (De Mora *et al*., 2004; Saeedi & Karbassi, 2006; Parizanganeh *et al*., 2008)، موجودات کفزی (Karpinskey, 1992) و فوک (Ikemoto *et al*., 2004) این دریا بوده است.

تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) یکی از گونه‌های مهم ماهیان خاویاری دریای خزر است (Khodorevskaya *et al*., 1997) که دارای خاویار و گوشت با کیفیت بوده و ایران، در رأس برنامهٔ بازسازی ذخایر ماهیان خاویاری قرار دارد. امروزه، به‌رغم تلاشهای گسترده سازمان شیلات ایران، جمعیت این ماهی در خزر رو به کاهش نهاده است. از میان دلایل مختلفی که توسط متخصصین امر برای این کاهش جمعیت پیشنهاد شده است، آلودگیهای محیطی از عوامل مهم اثرگذار قلمداد می شود. لذا با توجه به اهمیت تاسماهی ایرانی و همچنین، گزارشهای متعدد پیرامون وجود غلظتهای پایین فلزات سنگین در آب و رسوبات حوزه جنوبی خزر، در این مطالعه به بررسی اثرات غلظت تحت کشنده و انفرادی موجود در آب مس و کادمیوم در این گونه پرداخته شد. با توجه به اهمیت تعیین سمیت انفرادی فلزات در هر گونه، در ابتدا و به عنوان یک بررسی مقدماتی، میزان سمیت مس و کادمیوم، تعیین و سپس، به بررسی اثرات غلظت تحت کشنده فلزات مذکور در این گونه پرداخته شد تا اثر دوز تحت کشنده بر شاخصهای مرتبط با استرس یعنی گلوکز، پروتئین کل پلاسما و کبد، تری‌گلیسیرید و کورتیزول پلاسما طی دوره آزمایش مشخص شود.

مواد و روش کار

تعداد ۷۲ بچه تاسماهی (با وزن متوسط (±SD) ۱۹±۱۳۰ گرم و سن ۱۴ ماه) در اواخر خرداد ماه ۱۳۸۷، از پژوهشکده اکولوژی دریای خزر به سالن ونیروی مجتمع تکثیر و پرورش ماهی شهید رجایی ساری منتقل و در داخل ونیروهایی با جریان آب کافی و تراکم مناسب نگهداری شدند. آب ورودی به ونیروها، آب مورد استفاده برای استخرهای مجتمع بود. پس از گذشت ۲۴ ساعت، غذادهی به میزان ۵ درصد وزن بدن و دو مرتبه در ساعت ۹ صبح و ۴ بعدازظهر با غذای دستی مرطوب تهیه شده در مجتمع انجام گرفت که متشکل از پودر تغذیه آغازین ماهی سفید Starter food of Kutum (SFK)، ماهی کاراس چرخ شده و تخم مرغ، با نسبت ۸۰ درصد SFK، ۲۰ درصد ماهی کاراس و ۱ عدد تخم مرغ به ازای هر کیلوگرم از مخلوط SFK و چرخ کرده کاراس بود. ماهیان برای آداپتاسیون، به مدت ۲ هفته تا قبل از شروع آزمایش سمیت مس و کادمیوم و همچنین آزمایش بررسی اثرات تحت کشنده در همان شرایط باقی ماندند.

محلولهای استوک مس و کادمیوم با انحلال نمکهای سولفات مس ($CuSO_4.5(H_2O)$) و کلریدکادمیوم ($CdCl_2.2.5H_2O$) در آب یون‌زدایی شده نیروگاه برق نکاء، بترتیب به غلظت‌های ۱۰۰۰ppm و ۲۰۰۰ فلز خالص تهیه شدند که برای رسیدن به غلظت‌های دلخواه، این محلولهای استوک به مقدار لازم رقیق می‌شد.

پس از اتمام دوره آداپتاسیون، آزمایش سمیت حاد برای تعیین دوز کشنده متوسط (LC_{50})، تحت شرایط آزمایشی ساکن و براساس پروتکل شماره ۲۰۳ OECD (1992) انجام گرفت. تعداد ۷ عدد ماهی به ازای هر غلظت و در سه تکرار در نظر گرفته شد. اندازه‌گیری درجه حرارت، pH، اکسیژن و سختی آب بصورت روزانه انجام گرفت. ۲۴ ساعت قبل از شروع آزمایش و همچنین طی مدت انجام آزمایش سمیت حاد، غذادهی بچه ماهیان صورت نپذیرفت. پس از شروع مواجهه، ماهیان مرده خارج و میزان مرگ و میر تجمعی بچه ماهیان برای هر غلظت طی هر ۲۴ ساعت یادداشت شد. پس از پایان ۹۶ ساعت دوره آزمایش، داده‌های حاصله برای تعیین میزان LC_{50} مس و کادمیوم با انجام آنالیز پروبیت توسط نرم‌افزار SAS استفاده شد.

برای آزمایش اثرات غلظت تحت‌کشنده، تعداد ۷۲ بچه تاسماهی بطور تصادفی از گله پرورشی انتخاب و به ونیروهای آزمایشی (دارای ۱۰۰۰ لیتر آب، هر تیمار با سه تکرار و ۸ عدد ماهی به ازای هر تکرار) منتقل و تحت سیستم آزمایشی نیمه ساکن (با نصب سیستم هوادهی و تعویض آب در هر ۴۸ ساعت یکبار) به مدت ۲ هفته، تحت رژیم نوری طبیعی آداپته شد. غذادهی در کل این دوره و در هنگام مواجهه با غلظت تحت‌کشنده بصورت روزانه و به میزان ۳ درصد وزن بدن طی یک نوبت و در ساعت ۹ تا ۹:۳۰ صبح انجام گرفت. طی انجام آزمایش، خصوصیات کیفی آب هر روزه سنجش شد. در شروع مواجهه با غلظت تحت‌کشنده، در حدود ۵ درصد LC_{50} ۹۶ ساعته محاسبه شده برای مس و کادمیوم که بترتیب معادل ۰/۰۲۶ و ۰/۶۸ میلی‌گرم بر لیتر بود، با رقیق نمودن محلول استوک در ونیروی نگهداری ماهیان ایجاد و برای حفظ شرایط کیفی آب، هر ۲۴ ساعت یکبار عمل سیفون نمودن و هر ۴۸ ساعت یکبار تعویض ۹۰ درصد آب صورت گرفت. لازم به ذکر است که در هنگام تعویض آب، از مخازن ذخیره تعبیه شده آب به ونیروهای آزمایش منتقل می‌گردید. تیمار شاهد طی این مدت در آب آزمایشگاه، بدون افزودن مس و کادمیوم نگهداری شدند. پس از آغاز مواجه با مس و کادمیوم، نمونه‌برداری از ماهیان در ۱، ۷ و ۱۴ روز پس از آغاز مواجهه، در ساعت ۹ صبح با برداشت تصادفی ۲ عدد ماهی از هر ونیرو انجام شد. پس از بیهوش نمودن ماهیان توسط پودر گل میخک، ماهیان توزین و خونگیری از رگ دمی به میزانی نزدیک به یک سی‌سی انجام گرفت که فوراً به یخچال معمولی با دمای ۴- درجه سانتیگراد منتقل گردید. پس از باز نمودن شکم بچه ماهیان، کبد استحصال پس از توزین، با سرم فیزیولوژیک انسانی شستشو گردید. نمونه‌های حاصله به پژوهشکده اکولوژی دریای خزر منتقل شدند.

نمونه‌های خون انتقال یافته سریعاً در دستگاه سانتریفیوژ در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ و پلاسمای حاصله در فریزر، ذخیره شد. نمونه‌های بافت کبد نیز در فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد ذخیره شدند. سپس، نمونه‌ها توسط مخزن نیتروژن مایع به پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز دانشگاه شهید بهشتی منتقل شد تا سنجش‌های لازم در آنجا صورت پذیرد. برای سنجش گلوکز و تری‌گلیسیرید پلاسما از کیت‌های رنگ‌سنجی آنزیمی (پارس آزمون) و برای سنجش پروتئین کل پلاسما و همگن بافت کبد از کیت‌های رنگ‌سنجی شیمیایی (پارس آزمون) استفاده شد. سنجش هورمون کورتیزول نیز با استفاده از کیت الایزا Diagnostics Biochem Canada Inc, (Canada) (Ontario,، انجام گرفت.

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. در ابتدا نرمال و همگن بودن داده‌های حاصله توسط آزمون Shapiro-Wilk و همگن بودن داده‌های حاصله توسط آزمون Levene مورد بررسی قرار گرفت. برای مقایسه میانگین متغیرهای آزمایش از تجزیه واریانس یکطرفه ANOVA و برای مقایسه میانگین‌ها، از آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد. برای پردازش داده‌ها از نرم‌افزار Excel و جهت انجام آنالیز واریانس و مقایسه میانگین‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۱ استفاده شد (Sokal & Rohlf, 1995).

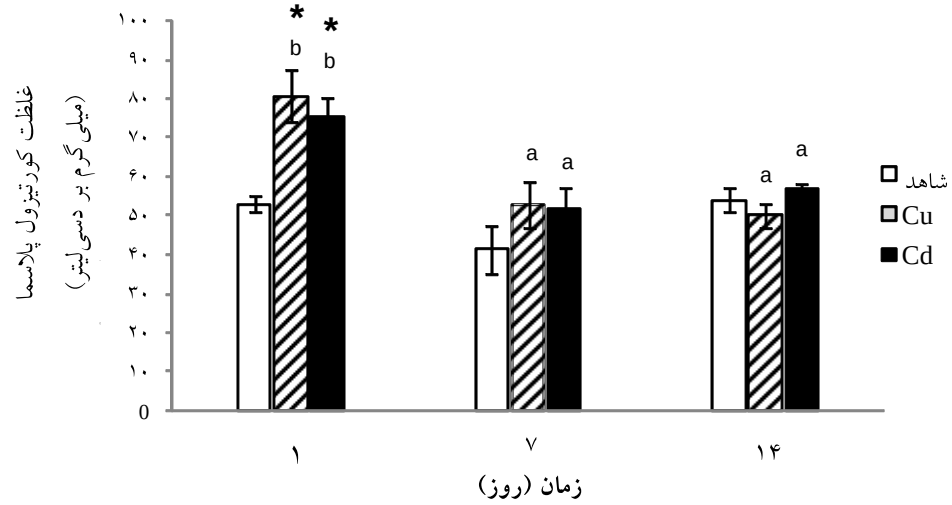
نتایج

وزن متوسط ماهیان با توزین کل ماهیان وارد شده به هر ونیرو، سنجش شد که از این لحاظ، اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی وجود نداشت ($P>0.05$). طی مدت انجام آزمایش، اکسیژن ۷/۹ میلی‌گرم بر لیتر، دما ۲۲/۸ درجه سانتیگراد، سختی کل ۲۷۵ میلی‌گرم بر لیتر کربنات کلسیم و pH در محدوده ۸/۲– ۷/۹ بود. طی آزمایش سمیت حاد، تلفاتی در تیمار شاهد مشاهده نشد. نتایج حاصله از آنالیز پروبیت، مقادیر LC_{50} ۹۶ ساعته فلزات مس و کادمیوم را برای تاسماهی ایرانی یکساله بترتیب ۰/۵۰۲ و ۱۴/۷۸ میلی‌گرم بر لیتر نشان داد.

غلظت تحت کشنده مس و کادمیوم، مرگ و میری را در بچه ماهیان هیچیک از تیمارهای آزمایشی موجب نشد که نشان‌دهنده این است که غلظت‌های انتخابی مس و کادمیوم برای بچه تاسماهی کاملاً تحت‌کشنده بوده است. لازم بذکر است که میانگین (± خطای استاندارد) غلظت مس در آب ۰/۰۳۳±۰/۰۲۳۹ و کادمیوم ۰/۰۴±۰/۶۵۰۱ میلی‌گرم بر لیتر بود.

نمودار ۱ تغییرات مقادیر گلوکز پلاسما بچه ماهیانی که طی ۱۴ روز در معرض غلظت تحت کشنده انفرادی مس و کادمیوم قرار گرفتند، نتایج حاصله از آزمایش، افزایش معنی‌دار مقادیر گلوکز پلاسما در تیمارهای فلزی مس و کادمیوم نسبت به تیمار شاهد در روز اول نمونه‌برداری را نشان می‌دهد ($P<0.05$). هر چند تغییرات گلوکز پلاسما در سایر روزهای نمونه‌برداری فاقد هرگونه اختلاف معنی‌دار با تیمار شاهد می‌باشد ($P>0.05$). همچنین، کاهش معنی‌دار گلوکز در تیمارهای فلزی طی دومین و سومین مرحله نمونه‌برداری در مقایسه با مرحله اول مشاهده می‌شود ($P<0.05$). تغییرات مقادیر پروتئین پلاسما و کبد و تری‌گلیسرید پلاسما در جدول ۱ آمده است. نتایج حاصله از آزمایش، اختلاف معنی‌داری را در مقادیر پروتئین پلاسما در تیمار آزمایشی مس نسبت به تیمار شاهد در روز اول نمونه‌برداری نشان می‌دهد ($P<0.05$) ولی چنین اختلاف معنی‌داری برای تیمار آزمایشی کادمیوم قابل مشاهده نیست ($P>0.05$). همچنین، کاهش معنی‌دار پروتئین پلاسما در تیمار مس طی روزهای ۷ و ۱۴ نسبت به روز اول مشهود است ($P<0.05$). در مقابل، نتایج حاصله نشان‌دهنده فقدان هرگونه اختلاف آماری معنی‌دار در مقادیر پروتئین کبد بین تیمارهای آزمایشی و طی دوره آزمایش است ($P<0.05$). از طرفی، مواجهه با مس و کادمیوم تغییر معنی‌داری را در مقادیر تری‌گلیسرید پلاسما بین تیمارهای آزمایشی موجب نشد. اما در این تیمارها، کاهش معنی‌داری در میزان تری‌گلیسرید پلاسما طی زمان یعنی در دومین و سومین روز نمونه‌برداری در مقایسه با روز اول مشاهده گردید ($P<0.05$).

نتایج حاصله از آزمایش، اختلاف معنی‌داری را در مقدار هورمون کورتیزول پلاسما در روز اول نمونه‌برداری بین تیمارهای آزمایشی و تیمار شاهد نشان می‌دهد بنحویکه مواجهه با غلظت تحت‌کشنده فلزات مذکور، منجر به افزایش معنی‌دار غلظت‌های هورمون کورتیزول پلاسما شده است ($P<0.05$، نمودار ۲). اما اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای فلزی با تیمار شاهد در سایر روزهای نمونه‌برداری مشاهده نگردید ($P>0.05$). با گذشت زمان و در روزهای ۷ و ۱۴، در هر دو تیمار فلزی مس و کادمیوم کاهش معنی‌داری در مقادیر کورتیزول پلاسما در مقایسه با روز اول مشاهده گردید ($P<0.05$).



نمودار ۱: تغییرات مقادیر گلوکز پلاسما در تاسماهی ایرانی (*A. persicus*) یکساله طی دوره چهارده روزه مواجهه با غلظت تحت‌کشنده انفرادی ۰/۰۲۶ میلی‌گرم بر لیتر مس و ۰/۶۸ میلی‌گرم بر لیتر کادمیوم

* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در هر روز نمونه‌برداری

حروف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین روزهای مختلف نمونه‌برداری ($P<0.05$)

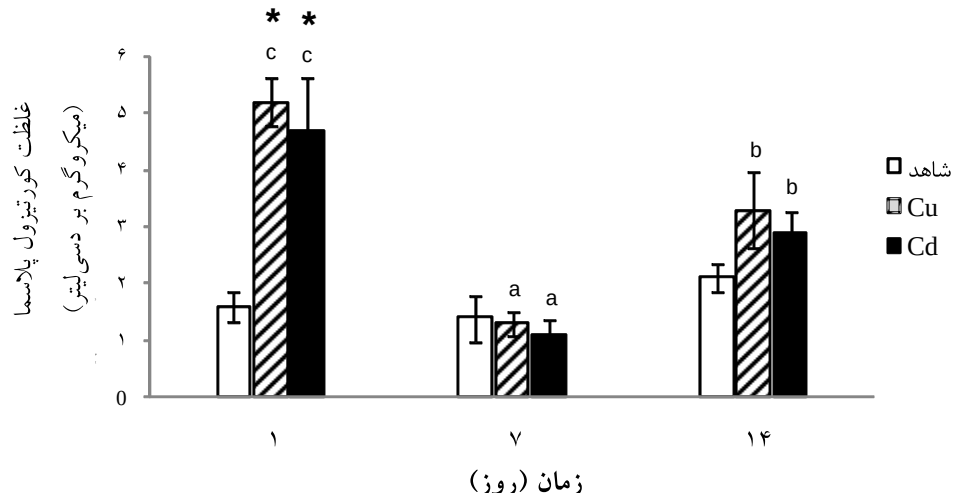
جدول ۱: تغییرات مقادیر پروتئین کل پلاسما و کبد و تری‌گلیسیرید در بچه تاسماهی (*A. persicus*) طی مواجهه ۱۴ روزه با غلظت تحت‌کشنده انفرادی مس و کادمیوم

فاکتور	شاهد			مس			کادمیوم		
	روز ۱	روز ۷	روز ۱۴	روز ۱	روز ۷	روز ۱۴	روز ۱	روز ۷	روز ۱۴
پروتئین پلاسما (میلی‌گرم دردسی‌لیتر)	۲.۹±۰.۰۵۸	۲.۲±۰.۴	۲.۴۷±۰.۵۴	۴.۰۸±۰.۱۴^{*b}	۲.۸±۰.۲۶^{a}	۲.۷۵±۰.۲^{a}	۲.۷۸±۰.۱۹	۲.۶۸±۰.۲۲	۲.۶۶±۰.۱۷
پروتئین کبد (میلی‌گرم در گرم)	۰.۱۲۶±۰.۰۰۱	۰.۱۳±۰.۰۰۳	۰.۱۳۷±۰.۰۰۹	۰.۱۳۵±۰.۰۰۴	۰.۱۲۶±۰.۰۰۵	۰.۱۲۶±۰.۰۰۴	۰.۱۳±۰.۰۰۲	۰.۱۴±۰.۰۰۷	۰.۱۴۱±۰.۰۱۲
تری‌گلیسیرید پلاسما (میلی‌گرم دردسی‌لیتر)	۳۲۹.۳۲±۴۴.۷	۱۹۶±۲۵.۱۵	۳۱۹.۶۷±۴۰.۸۹	۵۵۲.۷۵±۷۳.۲۴^{b}	۲۳۱.۱±۳۴.۰۵^{a}	۲۶۶.۸۸±۴۰.۷۷^{a}	۴۱۹.۶±۵۹.۳^{b}	۲۷۱.۸۵±۲۵.۴۴^{a}	۳۰۶±۴۵.۱۸^{ab}

داده‌های ارائه شده میانگین±خطای استاندارد ۵-۶ داده می‌باشد. داده‌ها با **ANOVA** یکطرفه آنالیز شده و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شده است.

* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در هر روز نمونه‌برداری

حروف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین روزهای مختلف نمونه برداری می باشد (**P<0.05**).



نمودار ۲: تغییرات مقادیر کورتیزول پلاسما در تاسماهی ایرانی (*A. persicus*) یکساله طی دوره ۱۴ روزه مواجهه با غلظت تحت کشنده انفرادی ۰/۰۲۶ میلی‌گرم بر لیتر مس و ۰/۶۸ میلی‌گرم بر لیتر کادمیوم

* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در هر روز نمونه‌برداری

حروف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین روزهای مختلف نمونه‌برداری می‌باشد (**P<0.05**).

بحث

در این مطالعه، برای بررسی اثرات تحت‌کشنده فلزات سنگین بر تاسماهی ایرانی، از میان تمامی فلزات سنگین موجود در آب و رسوبات حوزه جنوبی خزر و رودخانه‌های منتهی به آن، فلزات سنگین مس و کادمیوم انتخاب شدند چرا که مطالعه‌ای که قبلاً روی گونه مذکور انجام شده بود، نشان داد که فلزات مس و کادمیوم در بین تمامی فلزات مورد آزمایش، دارای کوچکترین مقدار LC_{50} و در نتیجه بالاترین سمیت بودند (Mirzaei *et al.*, 2004). البته مقدار LC_{50} بدست آمده در این تحقیق، با مطالعه مذکور متفاوت بود که شاید تفاوت سنی بچه ماهیان مورد آزمایش و ویژگی‌های متفاوت فیزیکی و شیمیایی آب از دلایل اصلی این اختلاف باشد چرا که این عوامل بر مقدار LC_{50} محاسباتی اثر گذارند (Karan *et al.*, 1998; Hansen *et al.*, 2000). تفاوت مقدار LC_{50} 96 ساعته مس و کادمیوم نیز حاکی از اختلاف سمیت این فلزات برای تاسماهی ایرانی است. در ضمن، غلظتهای عددی تحت‌کشنده انتخاب شده برای مس و کادمیوم در این مطالعه، بترتیب در حدود ۰/۵ و ۱۳ برابر حد بالایی گزارش اخیر از غلظت‌های آبهای ساحلی ایران در خزر می‌باشد (واردی و همکاران، ۱۳۸۹). همچنین لازم بذکر است که دلیل انتخاب تاسماهیان یکساله برای این مطالعه، فراوانی مناسب آنها در حوزه جنوبی خزر در این سن است چرا که این منطقه منطبق بر بسترهای تغذیه‌ای آنها می‌باشد (Haddadi Moghadam *et al.*, 2009).

تغییرات مقادیر گلوکز پلاسما، افزایش معنی‌داری را طی این مطالعه در اولین مرحله نمونه‌برداری نشان داد. مطالعه‌ای که روی ماهی کپور معمولی با غلظت‌های مختلف تحت‌کشنده کادمیوم (۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر) انجام شد، تغییرات معنی‌دار مقادیر گلوکز سرم خون ماهیان طی مواجهه با کادمیوم را نشان می‌دهد که این افزایش با افزایش غلظتهای کادمیوم در آب همبستگی داشت (Cicik & Engin, 2005). همچنین در تیلاپیای موزامبیک (*Oreochromis mosambicus*) نیز طی مواجهه با غلظت ۱۰ میکروگرم بر لیتر کادمیوم، افزایش موقتی در غلظت گلوکز پلاسما ایجاد شد بطوریکه افزایش معنی‌دار آن در روزهای ۲ و ۴ آزمایش، در ماهیان مواجه با کادمیوم مشهود بود و در روز چهاردهم مواجهه، به حدود آغازین آزمایش و مشابه تیمار شاهد رسید (Pratap & Wendlaar Bonga, 1990). مقادیر گلوکز سرم در ماهیان تحت تاثیر عوامل استرس‌زا نیز می‌باشد که از جمله این عوامل می‌توان به استرس ایجاد شده در اثر فلزات سنگین اشاره نمود (Canli, 1995). تغییرات مشاهده شده در مقادیر گلوکز خون و هیپرگلیسمی حاصله طی مواجهه ماهیان با مس و کادمیوم را می‌توان اینطور توجیه نمود که مواجهه بچه ماهیان با فلز، استرس شدید و موقتی را در آنها ایجاد می‌کند که منجر به افزایش شدید و معنی‌دار هورمون کورتیزول در خون می‌شود که این مورد با توجه به سمیت بالای مس و کادمیوم برای تاسماهی قابل توجیه است. در حقیقت، با توجه به تغییرات هورمون کورتیزول، افزایش آن منجر به افزایش مقادیر گلوکز پلاسما می‌شود که احتمالاً از طریق القاء فرآیند گلوکونئوژنزیس و گلیکوژنولیزیس می‌باشد تا انرژی لازم برای مواجهه با استرس حاصله تامین گردد چرا که ماهیان به تامین مقادیر بالایی از انرژی برای مقابله با استرس نیاز دارند و گلوکز بعنوان ماده انرژی‌زا نقش بسزایی را در این زمینه بر عهده دارد.

مواجهه با فلز یا افزایش زمان هیچ اثر معنی‌داری بر مقادیر پروتئین کل پلاسما در تیمار کادمیوم ندارد ولی در تیمار مس در روز اول نمونه‌برداری، اختلاف معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد مشاهده می‌شود. از طرفی، مواجهه با مس و کادمیوم و همچنین زمان، اثر معنی‌داری بر مقادیر پروتئین کل کبد نداشت (جدول ۱). بطور کلی، محتوای پروتئین بافتی بعنوان شاخص استرسی ایجاد شده توسط ترکیبات خارجی (گزنوبیوتیکها) در آبزیان می‌باشد (Singh & Sharma, 1998). Almeida و همکاران (۲۰۰۱) در مطالعه‌ای که روی تیلاپیای نیل مواجهه با غلظتهای مختلف تحت‌کشنده فلز کادمیوم انجام دادند، تغییراتی را در مقادیر پروتئین کبدی در هیچکدام از غلظت‌های آزمایشی مشاهده نکردند که این نتیجه، مطابق با نتایج بدست آمده در این آزمایش می‌باشد. در مقابل، کاهش معنی‌دار پروتئین کبدی در کپور معمولی در تیماری با غلظت ۱/۶ میلی‌گرم بر لیتر کادمیوم طی بازه زمانی ۱۴ روزه، مشاهده گردید (De la Torre *et al.*, 2000) که در تناقض با نتایج بدست آمده در این مطالعه می‌باشد. عنوان شده است که قندها پیش‌سازهای اصلی و فوری انرژی در ماهیان طی پاسخ استرسی می‌باشند در حالیکه پروتئین‌ها طی دوره مزمن استرس آلاینده‌ها موثر بوده و بکارگیری می‌شوند (Umminger, 1970). غلظت مس مورد استفاده در این مطالعه، روی گلوکز و پروتئین پلاسما در اولین نمونه‌برداری اثرگذار بوده که حاکی از استرس شدید تحمیل شده به بچه تاسماهیان طی ساعات اولیه مواجهه است و می‌توان

آنرا به نقش مس در بر هم زدن تنظیم اسمزی و ایجاد استرس و در نتیجه، صرف انرژی توسط ماهی برای مقابله با شرایط تحمیلی جدید نسبت داد.

در این مطالعه، مقادیر هورمون کورتیزول پلاسما در تیمارهای فلزی، بعنوان یک پاسخ استرسی غیراختصاصی، در روز اول نمونه‌برداری افزایش، با گذشت زمان، کاهش و در روز پایانی آزمایش به مقدار اندکی افزایش یافت. افزایش کورتیزول پلاسما، شاخص پاسخ اولیه به استرس وارده در ماهیان است (Wu *et al.*, 2007). در بسیاری از ماهیان، مقادیر کورتیزول پلاسما طی مواجهه با فلزات سنگینی همچون مس و کادمیوم افزایش می‌یابد که پس از گذشت چند روز از آغاز آزمایش، به سطح معمول خود باز می‌گردد و این موضوع در تیلاپیای موزامبیک *Oreochromis mossambicus* (Pratap & Wendelaar Bonga, 1990) و قزل‌آلای رنگین کمان (Tort *et al.*, 1996) مشاهده شده است. برخی محققین این افزایش در مقادیر هورمون کورتیزول پلاسما را مرتبط با نقش این هورمون در تنظیم تعادل یونی در ماهی می‌دانند و کورتیزول تمایز سلولهای کلرید برای تقویت فعالیت پمپ سدیم پتاسیم آت‌پ‌آزه را تحریک می‌نماید. با این وجود، برخی این افزایش را مرتبط با سرکوب ایمنی در ماهی می‌دانند (Veillette & Yong, 2004). Robert و همکاران (۲۰۰۰) پیشنهاد نمودند که عملکرد فیزیولوژیک استرس حاصله از فلز کادمیوم مثل افزایش معنی‌دار مقادیر کورتیزول، برای مقابله با کادمیوم نیست بلکه در مقابل واکنش‌های دفاعی معمولی است که توسط کادمیوم فقط فعال می‌شود و کورتیزول از بهم خوردن هموستاز بدن جلوگیری می‌کند. بنابراین ممکن است که تغییرات در مقادیر کورتیزول پلاسما در ارتباط با اعمال عوامل پاسخی بالاتر از استرس فلز باشد. Ricard و همکاران (۱۹۹۸)، در قزل‌آلای رنگین کمان، افزایش مقادیر کورتیزول پلاسما را طی مواجهه با کادمیوم مشاهده نمودند و کادمیوم در دوزهای بالا ممکن است افزایش القاء ساخت سیتوزلی متالوتیونین را سبب شود. عنوان شده است که کورتیزول علاوه بر دخالت در تنظیم یونی و متابولیسم انرژی، نقش مهمی را در رفع سمیت فلزات از طریق القاء متالوتیونین در ماهیان بازی می‌کند و حذف موثرتر کادمیوم توسط متالوتیونین رخ می‌دهد که باعث کاهش اثر سمی فلز می‌شود (Wu *et al.*, 2007). نتایج بدست آمده در این آزمایش در تاسماهی ایرانی، با توجه به روند تغییرات فاکتورهای استرسی، نشان می‌دهد که تاسماهی ایرانی، به غلظتهای تحت کشنده مس و کادمیوم طی مواجهه ۱۴ روزه تا حدی مقاومت پیدا می‌کند که عامل این مقاومت یا سازش نسبی، ممکن است هورمونها یا تولید پروتئین‌هایی مانند متالوتیونین باشد که اثرات حاصله را طی زمان تقلیل داده است.

بطور خلاصه، غلظت‌های تحت‌کشنده مورد استفاده مس و کادمیوم در این مطالعه، برای بچه تاسماهیان ایرانی استرس‌زا بودند. شاخص‌های مورد مطالعه، افزایش سریع و گذرایی را در پاسخ به استرس ایجاد شده نشان دادند که با گذشت زمان به سطح مقدار اولیه خود بازگشت. تغییرات شاخص‌های استرسی مورد اندازه‌گیری بخوبی نشان داد که فلز مس از سمیت بالاتری برای تاسماهی ایرانی برخوردار می‌باشد. همچنین، تغییرات شاخص‌ها نشان داد که غلظت‌های کوچک مس و کادمیوم حتی در سختی (۲۷۵ میلی‌گرم بر لیتر کربنات کلسیم) و pH (۸/۲–۷/۹) بالا برای این گونه استرس‌زا می‌باشد که ضرورت توجه بیشتر به غلظت‌های محیطی آلاینده‌ها را در محیط‌زیست ماهیان بویژه در سنین نوجوانی نشان می‌دهد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از جناب آقای دکتر رضا پورغلام، ریاست محترم پژوهشکده اکولوژی دریای خزر بدلیل مساعدت‌هایی که جهت انجام این تحقیق نمودند، ابراز می‌دارند. همچنین از آقایان دکتر رجب محمد نظری، دکتر احسان شهریاری، دکتر مهدی بنایی و دکتر محسن نواری جهت راهنمایی‌های ارزشمندشان در خلال انجام این تحقیق و از آقایان مهندس سعید مهدوی و مهندس حسین واعظزاده و خانم قاسمی (موسسه تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران) برای کمکهای بی‌دریغشان صمیمانه تشکر می‌نماییم.

منابع

سعیدی، م.؛ کرباسی، ع.؛ نبی بیدهندی، غ. و مهردادی، ن.، ۱۳۸۵. اثر فعالیت‌های انسانی بر تجمع فلزات سنگین در آب رودخانه تجن در استان مازندران. محیط‌شناسی. شماره ۴۰، صفحات ۴۱ تا ۵۰.

واردی، س.ا.؛ غلامی‌پور، س. و رضایی، م.، ۱۳۸۹. غلظت‌های فلزات سنگین در ستون آبی ۵، ۱۰ و ۵۰ متری در سواحل جنوبی دریای خزر. اولین همایش ملی- منطقه‌ای اکولوژی دریای خزر. ساری. ایران.

Agusa T., Kunito T., Tanabe S., Pourkazemi M. and Aubrey D.G., 2004. Concentrations of trace elements in muscle of sturgeons in the Caspian Sea. Marine Pollution Bulletin, 49:789–800.

Almeida J.A., Novelli E.L.B., Silva M.D. and Alves Junior R., 2001. Environmental cadmium exposure and metabolic responses of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Environmental Pollution, 21:169-175.

Asagba S.O., Eriyamremu G.E. and Igberaese M.E., 2008. Bioaccumulation of cadmium and its biochemical effects on selected tissues of the catfish (*Clarias gariepinus*). Fish Physiology and Biochemistry, 34:61-69.

Brucka-Jastrzebska E. and Protawicki M., 2005. Effects of cadmium and nickel exposure on haematologocal parameters of common carp, *Cyprinus carpio*. Acta Ichthyology et Piscatoria, 35(1):29-38.

Canli M., 1995. Effects of mercury, chromium and nickel on some blood parameters in the carp, *Cyprinus carpio*. Turkish Journal of Zoology, 19:305-311.

Canli M., Ay O. and Kalay M., 1998. Levels of heavy metals (Cd^{2+}, Pb^{2+}, Cu^{2+}, Cr^{2+} and Ni^{2+}) in tissue of *Cyprinus carpio*, *Barbus Capito* and *Chondrostoma regium* from the Seyhan River. Turkish Journal of Zoology, 22:149-157.

Charkhabi A.H., Sakizadeh M. and Rafiee G., 2005. Seasonal fluctuation of heavy metals pollution in Iran's Siahrood River. Environmental Science and Pollution Research, 12:264–270.

Cicik B. and Engin K., 2005. The effects of cadmium on levels of glucose in serum and glycogen reserves in the liver and muscle tissues of *Cyprinus carpio*. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 29:113-117.

Cinier C., Petit-Ramel M., Faure R., Garin D. and Bouvet Y., 1999. Kinetics of cadmium accumulation and elimination in carp, *Cyprinus carpio* tissue. Comparative Biochemistry and Physiology, 122C:345-352.

De la Torre F.R., Salibian A. and Ferrari L., 2000. Biomarkrs assessment in juvenile *Cyprinus carpio* exposed to waterborne cadmium. Environmental Pollution, 109:277-282.

De Mora S., Sheikholeslami M.R., Wyse E., Azemard S. and Cassi R., 2004. An assessment of metal contamination in coastal sediments of the Caspian Sea. Marine Pollution Bulletin, 48:61–77.

Dethloff G.M., Schlenk D., Khan S. and Bailey H.C., 1999. The effects of copper on blood and biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Archive of Environmental Contamination and Toxicology, 36:415-423.

Dumont H.J., 1998. The Caspian Lake: History, biota, structure and function. Limnology and Oceanography, 43:44-52.

Gopal V., Parvathy S. and Balasubramanian P.B., 1997. Effects of heavy metals on the blood protein biochemistry on the fish *Cyprinus carpio* and its use as a bio-andicator of pollution stress. Environmental Monitoring and Assessment, 48:117-124.

Gravel A., Campell P.G.C. and Hontela A., 2005. Distruption the hypothalamo-pituitary-inter-

renal axis in 1^{+} yellow perch (*Perca flavescens*) chronically exposed to metals in the environment. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 62:982-990.

Haddadi Moghadam K., Pajand Z., Parandavar H., Chubian F. and Pahlavan Yali M., 2009. Diet composition of the Persian sturgeon *Acipenser persicus* at the coast of the Guilan province, Caspian Sea. Russian Journal of Marine Biology, 35(4):331–334.

Hansen J.A., Lipton J. and Welsh P.G., 2000. Acute responses of Bull trout (*Salvelinus confluentus*) to cadmium, copper and zinc. *In*: Third Society of Environmental Toxicology and Chemistry Congress, 10^{th} Annual Meeting of SETACEurope, Brighton, UK, May 21–25.

Hontela A., Daniel C. and Ricard A.C., 1996. Effects of acute and subacute exposures to cadmium on the interrenal and thyroid function in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquatic Toxicology. 35:171-182.

Humtsoe N., Davoodi R., Kulkarni B.G. and Chavan B., 2007. Effect of arsenic on the enzymes of the Rohu carp, *Labio rohita*. The Raffles Bulletin of Zoology, 14:17-19.

Ikemoto T., Kunito T., Watanabe I., Yasunaga G., Baba N., Miyazaki N., Petrov, E.A. and Tanabe S., 2004. Comparison of trace element accumulation in Baikal seals (*Pusa sibirica*), Caspian seals (*Pusa caspica*) and northern fur seals (*Callorhinus ursinus*). Environmental Pollution,127:83–97.

Karan V., Vitoric V., Tutanclyc V. and Poleksic V., 1998. Functional enzymes activity and gill histology of carp after copper sulfate exposure and recovery. Ecotoxicology and Environmental Safety, 40:49-55.

Karpinskey M.G., 1992. Aspects of the Caspian Sea benthic ecosystem. Marine Pollution Bulletin, 24:389-394.

Khodorevskaya R.P., Dovgopol G.F., Zhuravleva O.L. and Vlasenko A.D., 1997. Present status of commercial stocks of sturgeons in the Caspian Sea basin. Environmental Biology of Fishes, 48:209–219.

Kim S., Jee J. and Kang J., 2004. Cadmium accumulation and elimination in tissues of juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus* after sub-chronic cadmium exposure. Environmental Pollution,127:117-123.

Lizardo-Dault H.M., Bains O.S., Singh C.R. and Kennedy C.J., 2007. Biosynthetic capacity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) interrenal tissue after cadmium exposure. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 52:66-90.

Miliou H., Zaboukas N. and Moraitou-Apostolopoulou M., 1998. Biochemical composition, growth and survival of the guppy, *Poecilia reticulate*, during chronic sub-lethal exposure to calcium. Archives Environmental Contamination and Toxicology,35:58-63.

Mirzaei J., Nezami S., Mehdinejad K., Pajand Z.O. and Alinejad R., 2004. Acute toxicity (96-h LC_{50}) of heavy metals (Pb, Zn, Cu and Cd) in two species of sturgeon (*Acipenser persicus* and *Acipenser stellatus*). *In*: 5^{th} Symposium of Sturgeon Fish. Ramsar, Iran. GB12.

OECD, 1992. OECD guideline for testing of chemicals. Section 2, No. 203. Fish acute toxicity test, adopted July 17.

Parizangane A., Lakhan V.C., Jalalian H. and Ahmad S.R., 2008. Contamination of near shore surficial sediments from the Iranian coast of Caspian Sea. Soil and Sediment Contamination, 17:19-28.

Pratap H.B. and Wendlaar Bonga S.E.W., 1990. Effects of water-borne cadmium on plasma cortosol and glucose in the cichlid fish, *Oreochromis mossambicus*. Comparative Biochemistry and Physiology, 95C:313-317.

Reid S.D. and McDonald D.G., 1988. Effects of Cd, Cu, and low pH on ion fluxes in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Canadian Journal of Fishieries and Aquatic Sciences, 45:244-253.

Ricard A.C., Daniel C. and Holenta A., 1998. Effects of subchronic exposure to cadmium chloride on endocrine and metabolic functions in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 34:377-381.

Robert M., Sapolsky M., Romeo M.L. and Munck A.U., 2000. How do glucocorticoids influence stress responses integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. Endocrin Reviews, 21: 55-80.

Romeo M., Bennani N., Gnassia-Barelli M., Lafaurie M. and Girard J.P., 2000. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass, *Dicentrarchus labrax*. Aquatic Toxicology, 48:185-194.

Saeedi M. and Karbassi A., 2006. Heavy metal pollution and speciation in sediments of southern part of Caspian Sea. Pakistani Journal of Biology Sciences, 9(4):733-740.

Sanchez W., Palluel O., Meunier L., Coquery M., Porcher J. and Ait- Aisa S., 2005. Copper-induced oxidative stress in the three-spined stickleback: Relationship with hepatic metal levels. Environmental Toxicology and Pharmacology, 19:177-183.

Singh R.K. and Sharma B., 1998. Carbofuran induced biochemical changes in *Claria batrachus*. Pesticide Science, 53:285-290.

Sokal R.R. and Rohlf F.J., 1995. Biometry: The principles and practice of statistics in biological research. 3rd ed. W.H. Freeman and Company, New York, USA. 887P.

Tort L., Kargacin B., Torres P., Giralt M. and Hidalgo J., 1996. The effect of cadmium exposure and stress on plasma cortisol, metallothionein levels and oxidative status in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver. Comparative Biochemistry and Physiology, 114:29-34.

Umminger B.L., 1970. Physiological studies on super cooled fish *Fundulus heteroclitus*. Carbohydrate metabolism and survival at sub zero temperature, Journal of Experimental Zoology, 17:159–174.

Veillette P.A. and Young G., 2004. Temporal changes in intestinal Na^+, K^+-ATPase activity and *in vitro* responsiveness to cortisol in juvenile Chinook salmon. Comparative Biochemistry and Physiology, 138A:297–303.

Watanabe I., Kunito T., Tanabe S., Amano M., Koyama Y., Miyazaki N., Petrov E.A. and Tatsukawa R., 2002. Accumulation of heavy metals in Caspian seals (*Phoca caspica*). Archive of Environmental Contamination and Toxicology, 43:109–120.

Witeska M., 2005. Stress in fish-hematological and immunological effects of heavy metals. Electronic Journal of Ichthyology, 1:34-41.

Wu S.M., Shih M.J. and Ho Y.C., 2007. Toxicological stress responses and cadmium distribution in hybrid tilapia (*Oreochromis* spp) upon cadmium exposure. Comparative Biochemistry and Physiology, 145C:218-226.

The effects of exposure to sub-lethal copper and cadmium concentrations on biochemical factors of one year old Persian sturgeon, *Acipenser persicus*

Zahedi S.[(1)]*; Mirvaghefi A.R.[(2)]; Rafiee Gh.R.[(3)]; Mojazi Amiri B.[(4)]; Hedayati M.[(5)]; Makhdoomi Ch.[(6)] and Zarei Dengasraki M.[(7)]

szahedit@gmail.com

1,2,3,4 – Faculty of Natural Resources, Tehran University, P.O.Box: 4111 Karaj, Iran

5- Research Institute for endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences

6,7- Shahid Rajaee Fishes Rearing Center, P.O.BoX: 833 Sari, Iran

Received: August 2010 Accepted: June 2011

Keywords: Pollutants, Pollution, Cortisol, *Acipenser persicus*

Abstract

The aim of this study was to determine the 96h LC_{50} of copper and cadmium, and also, to evaluate the effects of their sub-lethal dose on stress factors in Persian sturgeon, *Acipenser persicus*. Obtained results from Probit analysis showed 96h LC_{50} values of 0.502 and 14.78mg/l for copper and cadmium, respectively. Also, in single sub-lethal exposures, 72 juveniles (130±19g) were exposed to 0.026 and 0.68mg/l of copper and cadmium in semi-static conditions, and some stress-related biochemical factors were assessed in 1, 7 and 14 days. According to the obtained results, plasma glucose and cortisol were increased ($P<0.05$) in experimental fishes compared to the controls only in the first day of sampling. There were no significant ($P>0.05$) differences in plasma and liver protein contents between experimental groups and controls with the exception of copper treatment at the first day of sampling when plasma protein contents showed significant increases, but decreased significantly ($P<0.05$) in the subsequent sampling stages. In addition, with copper treatment, significant decreases were observed in plasma triglyceride concentrations as time passed by compared to day 1 ($P<0.05$). Results showed that copper is more toxic than cadmium for this species and also, 96h LC_{50} of copper and cadmium are stressful for Persian sturgeon.

*Corresponding author