بررسی اثر غلظت‌های گوناگون کلرید جیوه بر مراحل تکوین جنین ماهی سفید دریای خزر (Rutilus frisii kutum)

خدیجه محمدیان ساروی*[۱]، مهرانگیز صدوقی [۲]، همایون حسین زاده صحافی[۳]، سید هادی موسوی[۴]

۱ و۲- دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال ، دانشکده علوم زیستی، گروه زیست‌شناسی، تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۶۶۷۹۳۴۷۸۳

۳-موسسه تحقیقات شیلات، تهران، ایران، صندوق پستی: ۶۱۱۶-۱۴۱۵۵

۴- مرکز تکثیر و بازسازی آبزیان شهید رجایی، ساری، ایران، صندوق پستی: ۸۳۳

تاریخ دریافت: ۲۳ بهمن ۱۳۹۱ تاریخ پذیرش: ۲۱ اردیبهشت ۱۳۹۲

چکیده

امروزه اثر آلاینده ها بر روند تکوین جنینی به ویژه آبزیان به اثبات رسیده است. این پژوهش با هدف بررسی اثرات سمیت کلرید جیوه بر مراحل تکوین جنین ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*) صورت پذیرفت. این تحقیق در شرایط آزمایشگاهی مرکز تکثیر وپرورش ماهی سفید شهید رجایی ساری در سال ۱۳۹۰ طی دو مرحله انجام شد. مرحله اول به مدت۹۶ساعت،برای تعیین سمیت کلرید جیوه (LC_{50}) با ۵ تیمار با غلظت‌های ۲۰، ۵۰، ۱۰۰،۱۵۰و۲۰۰ میکروگرم در لیتر و تیمار شاهد (بدون کلرید جیوه). اثر غلظت‌های مختلف کلرید جیوه بر مراحل رشد و نمو جنینی در ۳ تکرار انجام شد. میزان (LC 96 h) بر جنین ماهی سفید ۱۰۲/۴۱میکروگرم در لیتر تعیین شده است. مرحله دوم در مدت ۷ روز: به منظور بررسی میزان تاثیرکلرید جیوه بر مراحل ارگانوژنز جنین درغلظتی کمتر از (غلظت‌های کشنده‌ی ۵۰٪جامعه LC_{50}) با ۳ تیمار(۲۰، ۵۰ و۱۰۰) میکرو گرم در لیترکلرید جیوه و تیمار شاهد, در ۳ تکرار انجام شد. با بررسی مراحل جنینی و روش تحلیل آماری در تیمار ۲۰ppb، کلرید جیوه محلول در آب سبب تاخیر در مراحل تکامل وکاهش رشد در جنین گردید و میزان مرگ ومیر ۶/۲۵٪ ثبت گردید و ایجاد (۷/۵-۳)٪ آنورمالی در اندام‌ها شامل، خمیدگی در ناحیه دمی و ستون فقرات مشاهده گردید. در تیمار ppb ۵۰ کلرید جیوه محلول در آب افزایش مرگ ومیر حدود ۳۰/۲۵٪ ودر تیمارppb ۱۰۰کلرید جیوه ۴۹/۵٪. میزان ناهنجاری در تیمار ppb ۵۰ کلرید جیوه ۳۸/۹٪ و در تیمار ppb ۱۰۰کلرید جیوه ۵۳/۹٪ بود. آنورمالی در اندام‌های جنین مانند خمیدگی در ناحیه دم و ستون فقرات و ادم در کیسه زرده مشاهده شد.

کلمات کلیدی: ماهی سفید، کلرید جیوه، جنین ماهی، ارگانوژنز.

* عهده‌دار مکاتبات (✉). khmohammadian52@yahoo.com

مقدمه

در تکثیر و پرورش ماهی، محیط‌های پرورش و کیفیت آب از عناصر تعیین‌کننده‌ای هستند که میزان بازماندگی لاروها و درصد بقای ماهی را تضمین می‌کند (Behra,1993).

پیشرفت صنایع و افزایش بی رویه جمعیت سبب شده است تا فاضلاب‌های صنعتی وشهری و پساب‌های کشاورزی که دارای ترکیبات شیمیایی مختلفی، از قبیل عناصر سنگین هستند، وارد اکوسیستم آبی شده و به عنوان یک مسأله مهم و حتی خطرناک مطرح شوند، زیرا که در اکوسیستم‌ها تجزیه و حذف نمی‌شود (Guliherm, *et al*., 2008).

در بین فلزات سنگین، جیوه فلزی منحصر به فرد است که در طبیعت دارای اشکال فیزیکی و شیمیایی مختلفی می‌باشد. باتوجه به ماهیت شیمیایی جیوه و زمان قرار گرفتن در معرض این فلز میزان تأثیرات جیوه بر موجود زنده متغیر است (Weis,1997). فاضلاب‌های صنعتی که وارد رودخانه‌ها و دریا می‌شوند حاوی ترکیبات مختلفی از جیوه می‌باشند. جیوه و ترکیبات آن منجر به آلودگی آب شده و اثرات مختلفی در ماهی ایجاد کرده که غلظت مشخصی از آن نهایتاً مرگ ماهی را موجب می‌شود.

شناسایی آلاینده‌ها و اثر آن بر مکانیسم‌های فیزیولوژیکی ازمسائل مهم علم توکسیکولوژی به شمار می‌رود.

اطلاعات حاصل از آزمایشات سم‌شناسی در علم اکوتوکسیکولوژی تأثیرات این سموم را در مراحل مختلف زندگی بر جمعیت ماهیان آب شیرین و دریا نشان داده است و به این ترتیب می‌توان تعیین نمود که پتانسیل کدامیک از موارد آلاینده بیشتر و در چه میزان از حد مجاز مصرف قراردارد (Devlin, Cavas, 2008; 2006; Diajomanolin, 2004; Dave, 1991; Westernhang, 1970; Weis,1977). مراحل اولیه زندگی از مهمترین مراحل برای جمعیت ماهی است که در این دوران (جنینی و لاروی) به شدت احتمال مرگ وجود دارد. در این مراحل جنین ماهی به تغییرات محیطی و فعالیت‌های انسانی از قبیل قرارگرفتن در محیط جیوه‌دار بسیار حساس است (Perry, 1988; Chow, 2003).

مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که ترکیباتی از جیوه که به دریا حمل می‌شوند به صورت‌های مختلف بر روی لارو و جنین‌ها تأثیر می‌گذارند مانند: ۱- گسستگی غشاء زرده‌ای (پوسته شدن) ۲- کم شدن مرحله تفریخ و یا تاخیر در آن ۳- کاهش بقاء و زنده ماندن ۴- آنورمالی در اندام‌های مختلف جنین و لارو ۵- مهار فعالیت آنزیم‌ها ۶- آنورمالی کروموزم‌ها و دیگر مشکلات فیزیولوژی و ژنتیکی (Cavas, 2008; Chow, 2003; Heath, 1995; Kapur, 1982; Perry, 1988; Werlecar, 2008; Westernhang, 1970).

دریای خزر و رودخانه‌های اطراف آن محل ورود پساب‌های کارخانجات می‌باشد (شهریاری مقدم، ۱۳۸۷) و از طرفی این منطقه محل تخم‌ریزی یا زمستان گذرانی برخی ماهیان از جمله ماهی سفید است. با توجه به اینکه مراحل جنینی ماهی از مراحل حساس به مواد آلاینده موجود در آب است می‌توان از آن به عنوان شاخص حساس برای ردیابی تأثیرات سمی جیوه در اکوسیستم‌ها استفاده شود. بنابراین بررسی تأثیر جیوه و ترکیبات آن بر مراحل رشد و نمو جنینی ماهی سفید به‌عنوان یک نمونه تجاری و اقتصادی حائز اهمیت است.

در این تحقیق با هدف بررسی، ۲ دسته تست سمیت کلرید جیوه بر روی جنین ماهی سفید به شرح زیر به اجرا درآمد.

۱- تست سمیت حاد (۹۶ h)که تعیین غلظت یا تعین مرگ ۵۰٪ از جنین‌ها

۲- تست سمیت برای شناسایی تأثیر جیوه روی آنورمالی اندام‌ها- بقاء و رشد جنین‌ها

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی و لوازم مورد نیاز

در این تحقیق از ترکیب شیمیایی کلرید جیوه، تخم ماهی سفید، آکواریوم (وسایل جانبی مانند سنگ هوا و پمپ‌هوا)، ترازوی حساس با دقت ۰/۰۰۰۱گرم، pH سنج شرکت Horiba ساخت آلمان، استریو فتومیکروسکوپ مدل Nicon-SMZ1000,japon، ارلن‌مایر استفاده شد.

تست اول: تعیین سمیت حادکلرید جیوه ۱(LC50) بر روی جنین ماهی سفید

تخم‌های لقاح یافته ماهی سفید از مرکز پرورش ماهی سفیدشهید رجایی ساری تهیه و آزمایش‌ها انجام شده طبق روش (۱۹۹۸) .O.E.C.D ۲ انجام شد .در این روش آزمایش‌ها به صورت ساکن(static) بوده و در آن محلول آزمایش در طول انجام آزمایش ثابت می‌باشد. در تمام مدت آزمایش، فاکتورهای فیزیکی، شیمیایی و pH، حرارت و میزان اکسیژن بررسی شده است (جدول ۱).

دمای محیط آزمایشگاه ۱+۱۵ درجه سانتی‌گراد و۱۳ ساعت در محیط روشنایی و ۱۱ساعت تاریکی بود.

جدول ۱: فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب

پارامتر	مقدار
درجه‌ی حرارت	۱±۱۵درجه‌ی سانتی‌گراد
اکسیژن محلول	همواره بیشتر از ۵ میلی‌گرم /لیتر
PH	۷/۴۵۶±۰/۱۳۵
EC	۰/۳۵۷۵±۰/۰۲۰۵ میکروموس/سانتی متر
سختی کل	۵۶ میلی‌گرم/لیتر کربنات کلسیم
قلیائیت کل	۱۲۵/۳۳ میلی‌گرم / لیتر
فسفات	۰/۸۵ میلی‌گرم/لیتر
نیترات	۸/ ۴۳ میلی‌گرم/لیتر
نیتریت	۰/۸۶ میلی گرم/لیتر

تخم‌های لقاح یافته ماهی سفید، به گروه‌های ۲۰ تایی و هر گروه در یک لیتر آب و درمعرض غلظت‌های مختلف کلرید جیوه قرار گرفتند. ، ظروفی که غلظت کلرید جیوه در آن برابر صفر بود ، به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. به بقیه ظروف یعنی گروه‌های تیمار به ترتیب غلظت‌های۲۰، ۵۰ ، ۱۰۰ ، ۱۵۰ ،۲۰۰ میکروگرم کلرید جیوه به ازای هر لیتر آ ب اضافه شد. ازمایش در گروه‌های تیمار سه بار تکرار شد. طی دورهٔ آزمایش، ظروف شیشه‌ای به طور یکسان هوادهی شدند.

ظروف شیشه‌ای، طی ۴ روز به صورت هر ۲۴ ساعت یکبار و رأس ساعت مشخص مورد بررسی قرارگرفته و مقدار مرگ و میرجنین ماهی‌ها ثبت شد (ناجی، ۱۳۸۶).

---

[۱] Lc_{50} = غلظتی از سم که در مدت ۹۶ ساعت سبب مرگ ۵۰٪ از ماهی‌ها می‌شود

[۲] OECD = short-term toxicity test on embryo and sac-fry stages

تست ۲: تست سمیت برمورفولوژی در مدت ۷ روز جنینی ماهی سفید

تعداد ۲۴۰ تا از تخم‌های لقاح یافته را درظروف شبیه ویس با غلظت‌های پایین تر از LC50 (۲۰-۵۰-۱۰۰) قرار داده شد.آزمایش با ۳ تیمار و شاهد و هر مورد با ۳ تکرار انجام شد.مقدار حجم معین از غلظت‌های کلرید جیوه توسط پیپت برداشته و به ظروف شیشه‌ای با حجم ۱ لیتری آب شیرین اضافه شد. در هر آکواریوم ۲۰ عدد تخم لقاح یافته اضافه شد. طی دورهٔ آزمایش، ظروف شیشه‌ای به طور یکسان هوادهی شدند. از هر یک از ظروف شیشه‌ای تا قبل از مرحله تفریخ نمونه‌ها در زمان‌های مشخص جنینی ماهی سفید (بلاستولا، گاسترولا، اندام‌زایی، چشم‌زدن، چشم‌دار بهزادی، ۱۳۷۶) به طور تصادفی انتخاب شده و سپس توسط سوزن تشریح جنین از غشاء تخم خارج و یا تخم در اسیداستیک قرار داده و پس از شفاف شدن زرده، توسط لوب دوربین‌دار(Nicon-SMZ1000, japon) با بزرگنمایی ۱۰۰۰ مشاهده و عکس‌برداری انجام شده و برای مقایسه زمان مراحل جنینی اطلاعات به صورت جدول رسم می‌شود. در نهایت از جنین‌های باقی‌مانده در ظروف شیشه‌ای در مرحله چشم‌زده (روز ۷جنینی)، جنین‌ها به صورت تصادفی انتخاب شده و پس از عکس‌برداری، نوع آنورمالی مشخص و با نرم‌افزار فتوشاپ و axsio vition اندازه‌گیری طول نیز انجام شد.

روش آماری

جهت تعین سمیت کشنده از برنامه نرم‌افزاری SPSS روش آماری probit Analysis نمودارها مورد تجزیه تحلیل قرار گرفت. جهت مشخص نمودن وجود و یا عدم وجود اختلافات معینی دار در میزان مرگ و میر وتغییرات طول جنین از تجزیه واریانسی (ANOVA) وآزمون‌های LSD استفاده شد.

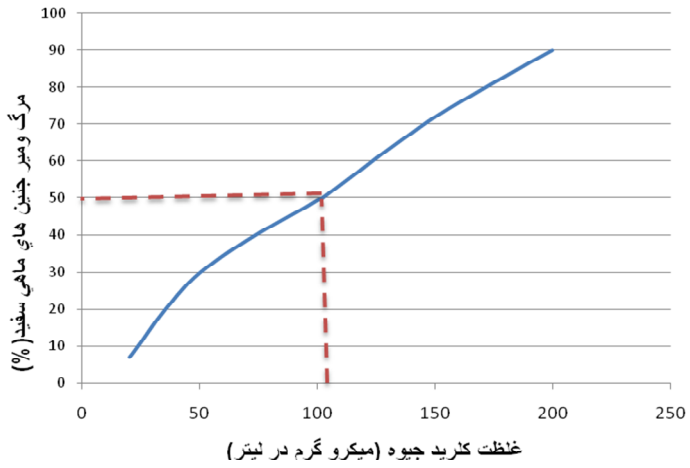
نتایج

با انجام آزمایش‌های متعدد بر روی مراحل تکوین جنینی ماهی سفید، محدودهٔ کشندگی کلرید جیوه بین (۱۰۰ تا ۱۵۰میکروگرم در لیتر) تعیین شد. در نهایت آزمایش‌های اصلی در سه تکرارانجام و نتایج در هر ۲۴ ساعت در غلظت‌های مختلف (۲۰-۵۰-۱۰۰-۱۵۰-۲۰۰) و به مدت ۹۶ ساعت جنین‌های تلف شده شمارش وثبت شد.

با تعیین میانگین تلفات در زمان‌های تعیین شده وبا استفاده از معادله خط و رگرسیون وتعیین ضریب همبستگی بین غلظت و مرگ و میر در هر ۲۴ ساعت و با رسم نمودار LC50 ، در نهایت مقدار LC50 در ۹۶ ساعت ۱۰۲/۴۱ میکروگرم در لیتر محاسبه ودر جدول (۲) ثبت شد.

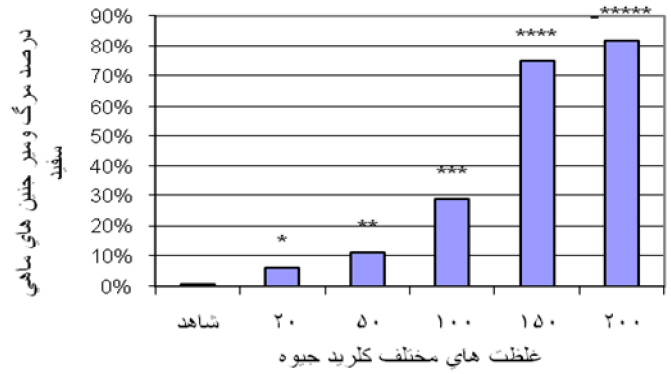
جدول ۲: تعیین مقدار LC_{50} در مدت ۹۶ ساعت

نام سم	غلظت کشنده میکرو گرم بر لیتر	۲۴ساعت	۴۸ساعت	۷۲ساعت	۹۶ساعت
کلرید جیوه	LC_{50}	۱۸۲/۵۹۸	۱۲۳/۸۳۱	۱۰۹/۲۵	۱۰۲/۴۱



شکل ۱: میزان سمیت کشنده در ۵۰٪ جنین های ماهی سفید

تاثیر کلرید جیوه بر روی مرگ و میر جنین ماهیان در زمان‌های مختلف متفاوت بوده، به طوری‌که مرگ و میر جنین‌ها با افزایش زمان کاهش می‌یابد. در داخل ظروف شیشه‌ای شاهد پس از ۹۶ ساعت تعداد بسیار اندکی، تقریباً ۱٪ جنین تلف شده و سفید شدند. در غلظت ۲۰ میکروگرم در لیتر، ۶/۷۵٪ از جنین‌ها مردند و در غلظت ۵۰ میکروگرم در لیتر ۳۰/۲۵٪ جنین‌ها تلف شده و در غلظت، ۱۰۰ میکروگرم در لیتر ۴۹/۵٪ و در غلظت ۱۵۰ میکروگرم در لیتر ۷۵٪ و در غلظت ۲۰۰ میکروگرم در لیتر ۸۹/۵۵٪ از جنین‌ها تلف شده و سفید شدند.



شکل ۲: تغییرات مرگ و میر جنین‌ها در غلظت

۲ -نتایج تست ۷ روزه

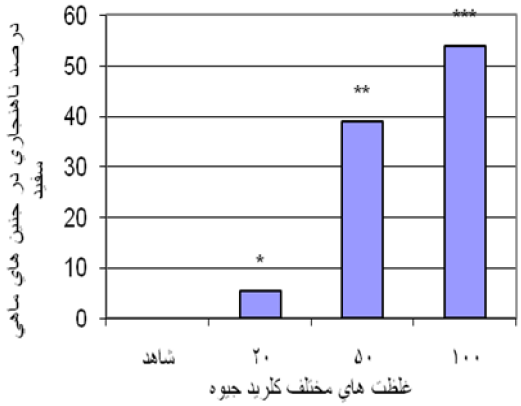
نتایج حاصل از بررسی تصاویر ثبت شده در مراحل مختلف (مورولا گاسترولاسیون، اندام زایی، تشکیل چشم، روز هفتم جنینی) نشان می‌دهد که کلرید جیوه سبب تاخیر در مراحل تکامل جنینی و به خصوص در مراحل اولیه (گاسترولا و اندام‌زایی) می‌شود.

همچنین با افزایش غلظت کلرید جیوه در جنین‌ها، میزان آنورمالی در اندام‌های جنین نیز افزایش می‌یابد. باتوجه به نمودار (۳)، میزان آنورمالی در غلظت ۵۰ میکروگرم در لیتر حدود (۳۸/۹٪) و در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در لیتر (۵۳/۹٪) اندازه‌گیری شد. آنورمالی در غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در لیتر نسبت به گروه شاهد افزایش قابل توجهی دارد ($p< ۰/۰۰۱$).

میزان آنورمالی در غلظت ۲۰ میکروگرم در لیتر حدود (۷/۵٪-۳) بوده که تفاوت قابل توجهی نسبت به گروه کنترل نشان داده نشد. با توجه به جدول (۲) بیشتر آنورمالی مشاهده شده در جنین‌ها شامل عدم تشکیل سر، خمیدگی انتهای دم- بدشکلی ستون فقرات است.

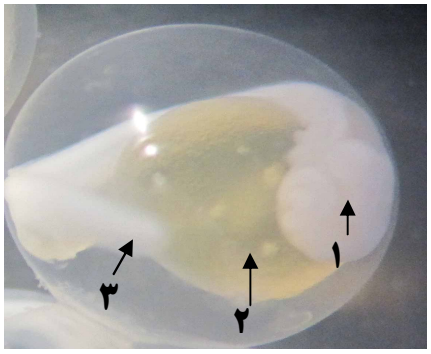
جدول ۳: ناهنجاری در غلظت‌های مختلف کلرید جیوه

شاهد	ناهنجاری دیده نشد
۲۰	جنین‌ها دارای خمیدگی دمی و بد شکلی ستون فقرات
۵۰	خمیدگی دمی- بد شکلی ستون فقرات –ادم در کیسه زرده
۱۰۰	بد شکلی بلاستو دیسک-کرانیو سفالی –خمیدگی دمی- بد شکلی ستون فقرات -عدم تشکیل قلب

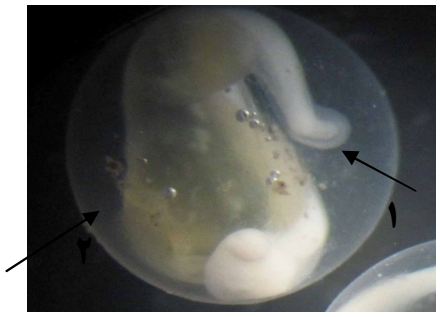


شکل ۳: تغییرات ناهنجاری با غلظت‌های مختلف کلرید جیوه

نتایج حاصل از بررسی ماکروسکوپی تیمارهای تحت تاثیر کلرید جیوه حاکی از وجود ناهنجاری های در جنین های تحت تاثیر بوده است.بطوری که پس از ۹۶ ساعت در جنین با غلظت ۲۰ نسبت به شاهد خمیدگی انتهای دمی و ادم کیسه‌ی زرده نسبت به گروه شاهد مشاهده شد (شکل۴و۵).

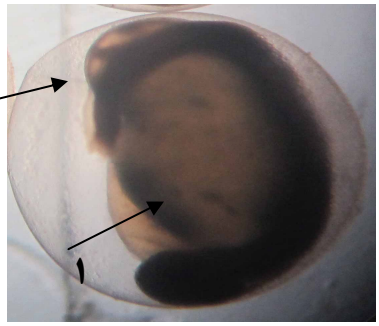


شکل ٤: جنین شاهد ماهی سفید-در مرحله۱۲(۹۶ساعته) بزرگنمایی(X10)
۱-جام بینایی ۲- کیسه زرده ۳-انتهای دمی

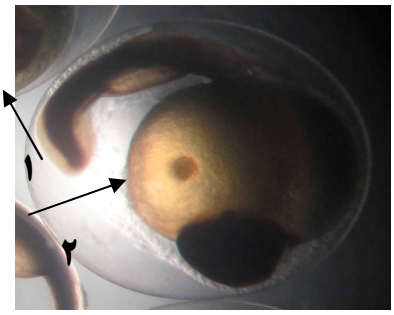


شکل۵: جنین ماهی‌سفید ۲۰- در مرحله۱۲(۹۶ساعته)
۱-خمیدگی انتهای دمی و۲-ادم کیسه زرده-(X10)

در عین حال وجود ناهنجاری در سایر دزها در زمان ۹۶ ساعته مشاهده گردید به طوری که با افزایش دزها ناهنجاری‌های همچون ادم کیسه‌ی زرده، عدم رشد دم، خمیدگی انتهای دمی دیده می‌شود (شکل۶و۷).

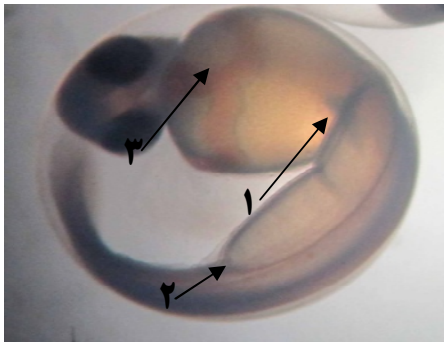


شکل ٦: تصویرازجنین ۵۰-در مرحله۱۲ (۹۶ساعته)
۱-ادم کیسه زرده- ۲-عدم رشد دم (X10)



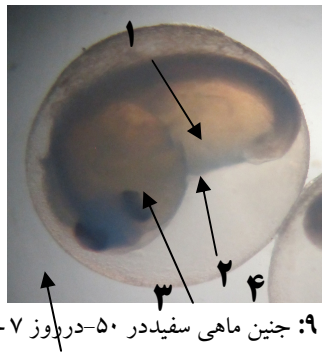
شکل۷: جنین ماهی سفید در۱۰۰-در مرحله۱۲(۹۶ساعته) ، ۱- خمیدگی انتهای دمی-۲-تاخیر در تشکیل سروجام بینایی (X10)

با بررسی‌های ماکروسکوپی در روز ۷ (مرحله ۱۵ جنینی) از تیمارهای ۲۰که تحت تاثیر کلرید جیوه قرار داشتند حاکی از وجود ناهنجاری‌های مانند خمیدگی انتهای دمی و پیچش c شکل نسبت به جنین شاهد دیده شد (شکل ۸).

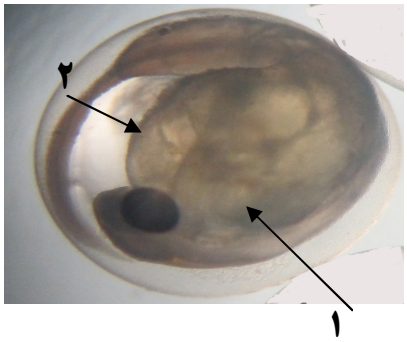


شکل ۸: جنین شاهد ماهی سفید-د ر روز۷ جنینی) (X10)
۱-قلب مشخص ۲- دم رشد یافته ۳- چشم ها باپیگمان‌های مشخص

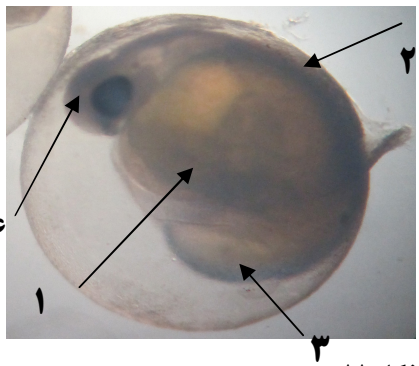
همچنین وجود ناهنجاری در دزهای ۵۰ و ۱۰۰ دیده شد به طوری که در دز ۵۰ در مرحله‌ی ۱۵ خمیدگی انتهای دم، عدم تشکیل دم و در جنین‌های دز ۱۰۰ در همین مرحله ناهنجاری چون عدم تشکیل قلب، ایراد در ستون فقرات در ناحیه‌ی دمی و عدم تشکیل دم دیده می‌شود (شکل ۹, ۱۰و۱۱).



شکل ۹: جنین ماهی سفیددر ۵۰-دروز ۷ جنینی
۱-خمیدگی انتهای دمی-۲- دم رشد نیافته -۳-ادم کیسه زرده- ۴- سر کوچک (X10)



شکل۱۰: جنین ماهی سفید در۱۰۰-در مرحله۱۵(۷-۷.۵)
۱- عدم تشکیل قلب -۲-ایراد در ستون فقرات در ناحیه دمی -(X10)

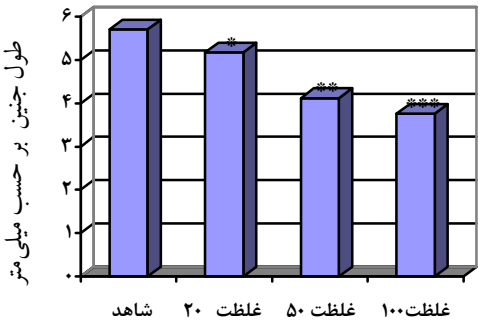


شکل۱۱: جنین ماهی سفید در ۱۰۰-در روز ۷ جنینی
۱- عدم تشکیل قلب ۲-ایراد در ستون فقرات در ناحیه دمی۳- عدم تشکیل دم ۴-بد شکلی در سر-(X10)

نتایج آزمون تشخیصی LSD نشان می‌دهد که میزان ناهنجاری در غلظت‌های ۲۰ و شاهد یکسان و میزان ناهنجاری در این گروه‌ها متفاوت از میزان ناهنجاری در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ است.

نتایج حاصل از بررسی طول جنین

میانگین طول جنین‌ها در تیمار شاهد ۵/۷۱ میلی‌متر تعیین شد و در تیمار ۲۰ میکروگرم در لیتر ۵/۱۸ میلی‌متر و اندازه طول جنین‌های تیمار ۵۰ میکروگرم در لیتر ۴/۱۲ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. عدد اندازه‌ی طول جنین‌های تیمار ۱۰۰ میکروگرم در لیتر برابر ۳/۷۶ میلی‌متر ثبت شد. با مقایسه انداز های به دست آمده، بین طول جنین‌های شاهد و جنین‌های موجود در غلظت ۲۰ میکروگرم در لیتر کلرید جیوه در روز ۷ جنینی، تفاوت قابل توجهی وجود ندارد.



شکل۱۲: رابطه اندازه طول جنین‌های ماهی سفید در روز ۷جنینی باغلظت

بحث

آلودگی محیط زیست، یکی از مسائل متداول در دنیااست که، فلزات سنگین از موارد بسیار مهم این آلودگی به شمار می‌رود. پیشرفت‌های صنعتی منجر به افزایش نشر آلاینده‌ها در اکوسیستم‌ها می‌شوند (Diagomanolin, 2004).

آب‌های آلوده به مواد سنگین از جمله ترکیبات جیوه، تاثیرات نامطلوبی بر مراحل رشد و نمو جنین و لارو ماهی‌ها ایجاد می‌کند (Arabi, 2004). ترکیبات جیوه، سبب تغییرات زیان‌آور بر سیستم‌های بیولوژیکی (تنفسی، عصبی، ایمنی، تولید مثلی) و در نهایت افزایش مرگ و میر آبزیان می‌شود (Verlecar, *et al*., 2008; Guilherme, *et al*., 2008; Dave and Xiu, 1991).

با انجام آزمایش ۹۶ ساعته برای تعیین غلظت کشنده ۵۰٪ از جنین‌ها، میزان این غلظت (LC_{50}) بر جنین ماهی سفید دریای خزر حدود ۱۰۲/۴۱ میکرو گرم در لیتر تعیین شد. اما اثر سمیت جیوه بر جنین ماهی فلاندر در سال ۲۰۱۰ توسط Huang حدود ۴۸/۱ میکرو گرم در لیترتعیین شد.

مطالعات اخیر نشان می دهد که اثر سمیت جیوه بر جنین‌های ماهی سفید بیشتر از میزان LC_{50} در جنین ماهی فلاندراست. همچنین میزان سمیت کلرید جیوه بر ماهی(*Orangerthroat* (*Etheostoma spestabile* darter حدود ۶۴/۵ میکروگرم در لیتر تعیین شد، که از میزان سمیت کلرید جیوه بر جنین ماهی سفید کمتر است. میزان سمیت کلرید جیوه بر ماهی *Kill fish* *(Fundulus hetroclitus)* حدود ۶۷/۴ میکروگرم در لیتر است (Sharp and Neff, 1992). به طوری که از مقدار LC50 ماهی (*Paralichthys olivaceus*) *Flander* بیشتر و از ماهی سفید کمتر است. این تفاوت در نتایج می تواند مربوط به کیفیت مواد مصرفی و روش‌های آزمایشگاهی متفاوت باشد در تحقیق حاضر اثر $LC_{50}96^{h}$ برای جنین‌های ماهی سفید حدود ۱۰۲/۴۱میکروگرم در لیتر است و اثر این سم بر روی

لاروهـای ایـن مـاهی حـدود ۸۶ میکروگـرم در لیتـر گزارش شده است (شهریاری مقدم، ۱۳۸۷). این تقریباً هـم انـدازه بـا میـزان LC_{50} مـوثر بـرلارو مـاهی *Haddock(Melanogrammus aeglefinus)* حدود ۹۸ میکروگرم در لیتر(US EPA, 1982) و نسبت به LC_{50} ماهی فلاندر۴۶ میکروگرم در لیتر بیشتر است (Huang, 2010).

نتـایج حاصـل از مطالعـه حاضـر نشـان مـی‌دهـد، حساسیت جنین‌های ماهی سفید نسبت بـه غلظـت‌هـای متفاوت جیوه کمتر از مرحله لارویی اسـت. زیـرا تخـم در مرحله جنینی توسط پوشـش غشـاء جنـین محافظـت می‌شوند.

عـواملی چـون فلـزات سـنگین بـه عنـوان آلـودگی زیستی، تأثیراتی بر راندمان تکثیر و درصد بقا لاروهـا و مراحـل تکـوین و حتـی درصـد لقـاح گذاشـته اسـت (شـعبانی۱۳۸۳؛ Cavas, 2008; Samson and Shenker, 2000; Perry, *et al*., 1988).

Samson و Shenker در سـال ۲۰۰۰ تـاثیرات نامطلوب جیوه را بر میـزان مـرگ و میـرجنین *Danio rerrio* مورد بررسی قرار داد. در این تحقیق مرگ ۲۰-۱۵٪ جنین‌ها در مدت ۸ ساعت اولیه پس از لقـاح بـوده است.

نتایج حاصل از تحقیق حاضر، تایید این موضوع که بیشترین مرگ و میر در ساعات اولیه بوده و بـا افـزایش سن در جنین‌ها میزان مـرگ و میـر کـاهش مـی‌یابـد، را ثابت می‌کند.

همچنـین قرارگـرفتن در معـرض جیـوه حتـی در غلظـت‌هـای پـایین مـی‌توانـد ناهنجـاری‌هـای ریختـی گوناگون را در جنین‌ها و لاروهای ماهی افزایش بدهـد (Weis and Weis, 1977). نتـایج تحقیـق حاضـر نیـز مطالعات فوق را تایید می‌کند.

در سـال ۱۹۷۷، Weis و Weis تـاثیرات نـامطلوب کلریـد جیـوه را بـر انـدام‌هـای مـاهی *Fundulus hetroctitus* مـورد بررسـی قـرار داد. در ایـن تحقیـق غلظت 1mg/dm/. کلرید جیـوه سـبب، ناهنجـاری‌هـای ۱-عارضه Cyclopia ۲-بـد شـکلی جمجمـه و سیسـتم اسکلتی ۳- ناهنجـاری سیسـتم قلبـی-عروقـی شـده کـه نتایج این مطالعه مشابه نتایج تحقیق حاضر می‌باشد.

در تحقیقـی Samson و Shenker در سـال ۲۰۰۰ اثرات سمی کلرید جیـوه را بـر انـدام‌هـای جنـین مـاهی گـورخری بررسـی کردنـد. در ایـن آزمـایش، بـدفرمی ستون مهره‌ها و خمیدگی انتهای دم در جنـین‌هـایی کـه در معرض ۳۰µg کلرید متیـل جیـوه (CH_3HgCl) قـرار داشتند به اثبـات رسـید. نتـایج ایـن مطالعـه مشـابه نتـایج تحقیق حاضر می‌باشد.

بـد شـکلی در سـتون فقـرات و تغییـر شـکل در آرواره‌هـای جنـین مـاهی (*Pimephales peroelas*) وقتـی در معـرض ۲۵µg جیـوه قـرار مـی‌گیـرد، ظـاهر می‌شود. محقق علت این ناهنجاری را ایراد در میوتوم‌ها اعلام کرده است (Devlin, 2008).

تحقیقی در سـال ۱۹۷۵ توسـط Heisinger و Green انجام شد. در این آزمایش لاروهای تکامل یافتـه مـاهی (*Oryzias tatipes*) در آب‌هـای جیـوه‌دار بـدنی شـبیه حرف C داشته وقادر به حرکت باله دمی نبودنـد. نتـایج ایـن مطالعـه مشـابه نتـایج تحقیـق بـر جنـین‌هـای ۲۰ میکروگرم در لیتر مطالعه حاضر می‌باشد.

در بیشـتر جنـین‌هـای در معـرض فلـزات سـنگین عارضه آنورمالی در اسکلت بـدن و سـردیده مـی‌شـود. مواد سنگین ممکن است سبب مو تازن اکتین شوند. این

تئوری در مورد اثر BAP بر اکتین به اثبات رسیده است (Kocan and Landot, 1984; Hannah, *et al*., 1982).

در سال ۱۹۷۷، Weis و Weis اثرات مخرب کلرید جیوه را بر ماهی *KilliFish* (*Fundulus hetroctitus*) بررسی کرد. در این آزمایش عارضه سیکلوپیا در چشم اثبات شد. تحقیقی دیگر در سال ۱۹۷۵ با هدف تاثیر کلرید جیوه بر ماهی *heteroclitus F.* انجام شد. در این آزمایش جنین‌هایی با چشم و سر ناقص مشاهده شدند.

تحقیقی در سال ۱۹۷۶ توسط Westernhagen و همکاران انجام شد .در این آزمایش جنین‌های ماهی *C.harengus* موجود در جیوه، دارای کیسه زرده بزرگتری نسبت به شاهد بودند. فلزات سنگین از جمله کادمیوم و جیوه مانع استفاده جنین از مواد داخل کیسه زرده می‌شود. بنابرین در این جنین‌ها کیسه زرده بزرگتر و رشد جنین بسیار کمتر از شاهد است.

در مطالعه اخیر بدریختی اندامی نظیر تغییر شکل ستون فقرات جنین در تخم و پیچش و انحناء دم و یا عدم تشکیل دم، کرانیوسفالی (تخریب سر)، ادم کیسه زرده و ناهنجاری در تشکیل عدسی و نکروتیت شدید در سلول خاکستری در چشم جنین‌ها دیده شد. بدشکلی ستون فقرات و بد خلقتی دم از بیشترین نوع آنورمالی در اندام‌ها بود. تغییر شکل ستون فقرات به عنوان یکی از رفتارهای پاتولوژیستی بین ماهی‌هایی که در نواحی آلوده به سیستم مواد شیمیایی شامل فلزات است بیان می‌شود (Hannes and Shenker , 2008 ; Cheng, *et al*., 2000).

یون‌های فلزی همچون Hg به گروه های سولفور (SH-) پروتئین‌هایی چون سیستئین وگلوتاتیون متصل شده و سبب غیر فعال کردن مقدار زیادی از آنزیم‌ها و این ترکیبات بیولوژیکی می‌شود. جیوه و کادمیوم به پروتئین‌های اتصالی کلسیم، مانند کالمود لین متصل شده و جایگزین کلسیم شده و سبب تخلیه یا آزادکردن یون‌هایی، مانند کلسیم و فسفر و یا کاهش در میوزین و میوتین و یا هر دو که هر دو برای شکل‌گیری طبیعی اندام لازم‌اند، می‌شوند (Olivera, et al., 2002; Behr, 1993).

در مطالعات اخیر افزایش تعداد و شدت آنورمالی‌ها در جنین ماهی سفید با افزایش غلظت، رابطه مستقیم دارد. چنین گزارشاتی از دیگر فلزات مانند کادمیوم و Copper نیز ارائه شده است (Bagdonas and Vosyliene, 2006; Dave and Xian, 1991; Chow, 2003; Kapur and Yadav, 1982; Mori, 1979).

رشد ماهی اغلب به عنوان یکی از موارد حساس و مورد توجه در آزمایشات زهرشناسی (سمیت) به شمار می‌رود.

فلزات سنگین مراحل دتوکسی، (نابود شدن انرژی) را فعال می‌کند. بنابراین ماهی سمی شده به یون‌های Hg کم‌ترین انرژی برای رشد مصرف می‌کند. از دست دادن انرژی می‌تواند منجر به کاهش رشد شود (Huang, *et al*., 2010; Jezierska and witeska, 2001).

تحقیقی توسط Peterson وهمکارانش در سال ۱۹۸۳ بر ماهی *Atlantic Salmon* انجام شد. تاثیر مخرب کلرید جیوه بر کاهش رشد جنین ماهی بررسی شد. محقق معتقد است که جیوه مانع مصرف زرده و در نتیجه سبب کاهش رشد می‌شود. همچنین تحقیقات مشابه توسط Nebeke و همکاران در سال ۱۹۷۴

وHalter و Johnson درهمان سال انجام شد، که نتایج به دست آمده مشابه با تحقیق انجام شده است. در تحقیق Blunt وHodson در سال 1978 تاثیر نامطلوب جیوه را بر میزان رشد جنین ماهی قزل‌آلا بررسی کردند. در این آزمایش بیشتر جنین‌ها رشد کمی داشته و آسیب اسکلتی نیز دیده شد. محقق علت این ناهنجاری را اثر کلرید جیوه بر ممانعت از استفاده جنین از مواد کیسه زرده بیان کرده است.

جنین ماهی در حال رشد انرژی را به رشد و تشکیل اندام‌های فیزیولوژی اختصاص می‌دهد. وقتی جنین با افزایش هزینه‌ی انرژی توسط مواد مخرب رو برو می‌شود، میزان انرژی را که مربوط به رشد است را کاهش می‌دهد و این دقیقاً شبیه یک هموستازی است (Houck, 2004). نتایج حاصل از مطالعات، مشابه تحقیق حاضر است.

به عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان بیان کرد که میزان LC50 برای جنین ماهی سفید ۱۰۲/۴۱ میکروگرم در لیتر تعیین شد و در غلظت‌های مورد مطالعه (ppb ۱۰۰-۵۰-۲۰) آسیب‌های مورفو لوژی و کاهش رشد دیده شد که در غلظت ۲۰ میکروگرم کمترین مرگ و میر و ناهنجاری مشاهده شد که با افزایش دوز شدت می‌یابند.

در تحقیق میزان جیوه در آب دریای خزر ppb ۴/۵ اندازه‌گیری شد (بهزادی، ۱۳۷۰). این میزان کمتر از اندازه جیوه در تیمار پایین تحقیق حاضر ppb ۲۰ است بنابراین می‌توان گفت که گرچه وجود این میزان جیوه در آب دریای خزر در درازمدت برای ماهیان سفید بی‌تأثیر نیست اما حد آسیب‌های مورفولوژی ایجاد شده می‌تواند بسیار ناچیز باشد.

سپاسگزاری

از پرسنل محترم مرکز تکثیر و بازسازی آبزیان شهید رجایی ساری و سایر دوستانی که در اجرای این پروژه ما را همراهی کردند نهایت سپاس را داریم.

منابع

۱. بهزادی، ص.، ۱۳۷۰. مطالعات رشد و نمو جنین ماهی سفید. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحدتهران شمال، ۱۴۰ ص .ص ۲۲-۱۵.

۲. شعبانی، ش.، ۱۳۸۳. بررسی اندازه گیری تاثیرفلزات سنگین بر روی عملکردفیزیولوزیک کلیه ی ماهیان استخوانی ، پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، ص۱۲-۱۴.

۳. شهریاری مقدم، م.، ۱۳۸۷. اثرات هیستو پاتولوژیک جیوه غیر آلی محلول در آب بر آبشش ماهی سفید در غلظت LC50 ، دومین همایش مهندسی محیط زیست.

۴. ناجی، ط.، ۱۳۸۵. تعیین ۵۰ LC کلریدکبالت در ماهی کپور معمولی (*Carpio Cyprinus*)، مجله علوم‌وتکنولوژی محیط‌زیست، جلد ۱۹، ص ۲۳ - ۳۱.

5. Arabi, M., 2004. Analyses of impact of metal ion contamination on carp (Cyprinus carpio L.) gill cell suspensions, Biol. Trace Elem. Res. 100, pp. 229–245.
6. Bagdonas E., Vosyliene, M. Z., (2006), A study of toxicity and genotoxicity of copper, zinc and their mixture to rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Biologija (Vilnius) 1, pp.8–13
7. Behra. R., 1993. In vitro effects of cadmium zinc and lead on calmodulin-dependent actions in Oncorhynchus

mykiss, Mytilus sp and Chlamydomonas reinhardtii. ArchEnviron Contam Toxicol 24, pp. 21–27.
8. Coad, B.w., 2000. Criteria for assessing the conseration status of taxas applied to Iranian fresh waterfishes biologia , Bratislava 55, pp. 539-557.
9. Cavas, T., 2008. In vivo genotoxicity of mercury chloride andlead acetate: micronucleus test on acridine orange stainedfish cells. Food Chem Toxicol 46, pp. 352–358.
10. Chow, ESH., Cheng, SH., 2003. Cadmium affects muscle type development and axon growth in zebrafish embryonicsomitogenesis.Toxicol.Sci73, pp. 149–159.
11. Cheng, SH., Chan, PK., 2000. Cellular and molecular Basis of cadmium-induced deformities in zebra fishembryos. Environ Toxicol Chem 19, pp. 3024–3031.
12. Dave, G., Xian, R., 1991. Toxicity of mercury, copper, nickel, lead, and cobalt to embryos and larvae of zebra, Environ Toxicol Chem12, pp. 186-192.
13. Devlin, EW., 2006. Acute toxicity, uptake and histopathology of aqueous methyl mercury to fathead minnow embryos . Ecotoxicol 15, pp. 97–110.
14. Diagomanolin, V; Farhang, M; Ghazi-Khansari, M., and Jafarzadeh, N., 2004. Heavy metals (Ni, Cr, Cu) in the Karoon Waterway river, Iran. Aquatic Toxicology. 50, PP. 63-68.
15. Guilherme, M., Válega, M.E. Pereira, M.A. Santos and M. Pacheco b., 2008. Erythrocytic nuclear abnormalities in wild and caged fish (Liza aurata) along an environmental mercury contamination gradient, Ecotoxicol. Environ 70, pp. 411–421.
16. Hannah, J.B., Hose, J.E., Landolt, M.L., Miller, B.S., Felton, S.P., andIwaoka, W.T. 1982. Benzo (a) pyrene induced morphologicand developmental abnormalities inrainbow rout. Arch.Enuiron.Contam.Toxicol.11, pp. 727-734
17. Hannes, R., Shenker, J., 2008. Acute lethal and teratogenic effects of tributyltin chloride and copper chloride on mahi mahi (*Coryphaena hippurus*) eggs and larvae, Environ. Toxicol. Chem. 27, pp. 2131–2135
18. Halter, M.T., andJohnson, H.E., 1974. Acute toxicities of a polychlorinated biphenyl (PCB) AND DDT,alone and in combination,to early life stages of coho salmon, Fish, Res. Board Can.31, pp. 1543-1547.
19. Heath, A. C., 1995. "Water pollution and fish physiology" 2nd Edition lewis, Boca raton, FL. pp. 425-463.
20. Heisinger, JF., Green,W., 1975. Mercuric chloride uptake by eggsOf the ricefish and resulting teratogenic effects. BullEnviron Contam Toxicol 14, pp. 665–673
21. Hodson, PV., Blunt, BR., Spry, DJ., 1978. chronic toxicity ofwater-borne and dietary lead to rainbow trout(Salmo gairdneri) in lake Ontario water. Water Res12, pp. 869–878.
22. Houck, A., Cech, J., 2004. Effect of dietary methylmercury on juvenile Sacramento blackfish bioenergetics,Aquat toxicoi 69, pp. 107-123
23. Huang, L., Cao, Z.J., Ye, X.B., 2010 Antioxidative responses and bioaccumulation in Japanese flounder larvae and juveniles under chronic mercury exposure, Comp. Biochem. Physiol. Toxicol.152, pp. 99–106.
24. Jezierska, B., Witeska, M., 2001. Metal Toxicity to Fish. UniversityOf Podlasie Publisher, Siedlce, pp. 318-323.
25. Kapur K, Yadav NA., (1982). the effects of certain heavy metalsalts on the development of eggs in common carp, Cyprinus Carpiovar. communis. Acta Hydrochim Hydrobiol10, pp.517–522.
26. Kocan, R. M., Landolt, M. L., 1984. Alterations in patterns of excretion and other metabolic functions in develping fish embryos exposed to benzo(a)pyrene. Helgol. Meeresunters.37, pp. 493-504.
27. Mori, K., 1979. Effects of Hg and Cd upon the eggs and fry of‘‘goldfish’’ Carassius auratus (Linnaeus). Bull Fac FishUniv Mie 6, pp. 173–180.
28. Oliveira Ribeiro, C. A., Torres, R. F., 1995. "Acute effects evaluation of inorganic mercury on epidermis of

Trichomycterus brasiliensis" Ecotoxicol. Environ 32, pp. 260–266.
29. Oliveira Ribeiro, C. A., Belger, E., Pelletier, E. and Rouleau C., 2002. "Histopathological evidence of inorganic mercury and methyl mercury toxicity in the arctic charr (Salvelinus alpinus)" Environmental Research.,90, pp. 217-223.
30. Perry, DM., Weis, J., Weis, P., 1988. Cytogenetic effects of methylmercury in embryos of killifish, Fundulus heteroclitus. Arch Environ Contam Toxicol 17, pp. 569–574.
31. Peterson, R.H., and martin –Robichaud, D.J., 1983.Embryo movements of Atlantic salmon(salmo salar)as in influenced by pH, temperature and state of development. Fish.Aquat. 40, pp. 777-782
32. Samson, JC., Shenker, J., 2000. The teratogenic effects ofmethylmercury on early development of the zebrafish Danio rerio. Aquat Toxicol 48, pp. 343–354.
33. Sharp, J.R., Neff, J.M., 1992. The toxicity of mercuric chloride and methylmercuric chloride to Fundulus heteroclitus embryos in relation to exposure conditions, Environ. Biol. Fish. 7, pp. 277–284.
34. Verlecar, X.N., Jena, K.B., 2008. Modulation of antioxidant defences in digestive gland of Perna viridis (L.), on mercury exposures, Chemosphere.71, pp. 77-85.
35. Westernhagen, H., 1970. Erbriung der Eier vom Dorsch (Gadus morhua), flunfder (Pleuronectes flesus) and Scholle (Pleuronectes platesa) unter kombinieten Temperatuer and Salzgehaltsbedingungen. Helgol. Wiss. Meeresunters.21, pp. 21-102.
36. Weis, J.S., Weis, P., 1977. Effects of heavy metals on developmentof the killifish, Fundulus heteroclitus. J Fish 11, PP.49–54.