تغییرات سطوح کورتیزول و لاکتات دهیدروژناز در بچه ماهی سفید (*Rutilus frisii*) انگشت قد در معرض قرارگرفته با آلودگی نفت خام

سمانه صبوری[۱]، بهرام فلاحتکار[۱*]، مجید رضا خوش‌خلق[۱]، سمانه پورسعید[۲] و بهروز ابطحی[۳]

[۱] صومعه‌سرا، دانشگاه گیلان، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات

[۲] نور، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، گروه شیلات

[۳] تهران، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم زیستی،گروه زیست دریا

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۰/۹ تاریخ پذیرش: ۹۵/۸/۱

چکیده

دریای خزر به‌عنوان بزرگترین دریاچه جهان در معرض انواع آلاینده‌ها می‌باشد که در این بین مشتقات نفتی (هیدروکربن‌ها) به‌عنوان مهمترین عامل اصلی آلودگی در این حوزه آبی محسوب می‌شوند. با توجه به اهمیت دریای خزر ازنظر شیلاتی و اقتصادی، ضروری است که اثر آلودگی نفتی روی گونه‌های مهم و بومی این دریاچه بررسی گردد. ازآنجایی‌که یکی از گونه‌های بومی و اقتصادی دریای خزر ماهی سفید (*Rutilus frisii*) است بنابراین مطالعه حاضر باهدف بررسی اثرات حاد فاز محلول در آب نفت خام (Water Soluble Fraction of crude oil; WSF) بر تغییر برخی پارامترهای فیزیولوژیک بچه ماهی سفید انگشت قد در زمان‌های مختلف انجام‌شده است. در این مطالعه دو گروه آزمایشی (WSF با LC50 صفر و ۵۰ درصد) و سه تکرار برای هر گروه در نظر گرفته شد. برای هر تکرار ۸۰ عدد بچه ماهی با میانگین وزنی ۰/۰۶± ۰/۷۷ گرم در آکواریوم‌های با ابعاد cm ۵۰ ×۳۰ × ۷۰ نگهداری شدند و به مدت ۱۲۰ ساعت در معرض تیمار آزمایشی قرار گرفتند. در هر آکواریوم میزان ۷۰ لیتر محلول WSF با غلظت‌های بیان شده اضافه گردید. سپس صفر (قبل از اضافه نمودن WSF)، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت بعد از تماس با WSF، ۱۵ بچه ماهی نمونه‌گیری و میزان فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز و هورمون کورتیزول کل بدن در آنان اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز نیز در بچه ماهیان که در معرض WSF (LC50=٪۵۰) بودند به‌طور معنی‌داری در زمان‌های مختلف نمونه‌گیری بالاتر از ماهیان نگهداری شده در آب دریا (LC50=٪۰) بود ($P < ۰/۰۵$). همچنین غلظت کورتیزول کل بدن به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر همزمان غلظتWSF و زمان قرارگرفته بود ($P < ۰/۰۵$). نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که آلودگی نفتی اثرات حادی بر روی فیزیولوژی و سلامت بچه ماهیان دارد و هرچه مدت‌زمان در معرض قرارگیری بیشتر باشد پاسخ‌های فیزیولوژیک نیز شدیدتر می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: ماهی سفید، فاز محلول در آب نفت خام، استرس، فیزیولوژی، دریای خزر

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۲۰۳۷۴۲۸، پست الکترونیکی: falahatkar@guilan.ac.ir

مقدمه

موجودات آبزی به‌ویژه ماهی‌ها یکی از منابع مهم تأمین غذای جوامع بشری و سایر موجودات وابسته به زنجیره-های غذایی دریا هستند. افزایش جمعیت مناطق شهری در نواحی ساحلی و توسعه بخش‌های مختلف صنایع، موجب آلودگی پهنه‌های آبی شده که نتیجه آن به مخاطره انداختن حیات موجودات از جمله ماهیان می‌باشد. این آلاینده‌ها قادر به تغییر کیفیت آب بوده و سبب بروز مشکلات بسیاری مانند انواع بیماری‌ها و تغییرات ساختاری در

بافت‌ها و اندام‌های ماهی‌ها می‌شوند (۶). در میان انواع مختلف آلاینده‌ها، سوخت‌های فسیلی یکی از مهم‌ترین آلاینده‌های محیط‌های آبی محسوب می‌شوند (۲۵). نفت خام آمیزه‌ای از ترکیبات پیچیده‌ای است که یکی از اجزای سمی آن هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای (PHAs) هستند (۳). PHAها گروهی از ترکیبات هیدروکربنی لیپوفیلیک می‌باشند که به‌شدت سلامت موجودات ازجمله آبزیان را تهدید می‌کنند (۴۲). مشتقات نفت و PHAها به دلیل سمیت و تجمع در بافت‌های مختلف بدن آبزیان اثرات حاد و یا کشنده دارند. این ترکیبات بسته به غلظت و مدت‌زمان تماس می‌توانند رشد (۱۸)، تکوین جنین (۵)، متابولیسم (۸)، عملکرد سیستم تنفسی (۷)، سیستم ایمنی (۳۵ و ۳۶) و تولیدمثل (۲۲) را در ماهیان مختل سازند و حتی باعث جهش و یا تغییر در مواد ژنتیکی بعد از تغییر زیستی شوند (۲۶ و ۳۲). مطالعات انجام‌شده بر روی برخی گونه‌ها نیز نشان داده است که مشتقات نفتی و PHA ها باعث القای استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدها می‌شوند (۱۵، ۲۴ و ۳۱). بنابراین اندازه‌گیری برخی از متابولیت‌ها نظیر آنزیم‌ها و هورمون‌ها می‌تواند به‌عنوان شاخص‌های زیستی در نواحی آلوده به محصولات پتروشیمی استفاده شوند چراکه ارتباط قوی در تحمل به تنش‌های محیطی و تغییر غلظت متابولیت‌ها در ماهیان وجود دارد. یکی از آنزیم‌هایی که به‌عنوان نشانگر زیست‌محیطی در محیط‌های آلوده به آلاینده‌های نفتی در ماهیان استفاده می‌شود آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH) می‌باشد (۱۰ و ۴۲). LDH آنزیمی کلیدی در مسیرهای بی‌هوازی تولید انرژی است که در رویارویی با استرس‌های شیمیایی بسیار حائز اهمیت است چراکه در این شرایط میزان بالایی انرژی در مدت‌زمان کوتاهی موردنیاز است (۱۰). نتایج متناقضی در مورد روند تغییرات LDH ماهیان در پاسخ به آلودگی‌های نفتی گزارش‌شده است. مطالعه بر روی اثر بنزوپیرن بر روی فعالیت آنزیم LDH در قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) نشان داد که بنزوپیرن اثر معنی‌داری بر روی فعالیت این آنزیم ندارد (۴۱) درحالی‌که یک افزایش و یا سرکوب در فعالیت LDH بعد از مواجه‌شدن با فاز محلول در آب نفت خام (Water Soluble Fraction of crude oil; WSF) به ترتیب در ماهی رنگین‌کمانی (*Melanotaenia fluvialis*) و ماهی آزاد اطلس (*Salmo salar*) گزارش‌شده است (۱۳ و ۲۷). بنابراین بررسی اثرات آلودگی نفتی بر روی روند تغییرات این آنزیم در سایر گونه‌ها نیز لازم و ضروری است.

در ماهیان، کورتیزول از مهمترین فاکتورهای سنجش میزان استرس می‌باشد که در مواقع استرس‌های محیطی میزان ترشح این هورمون افزایش می‌یابد و از مهمترین اثرات آن، افزایش مقاومت بدن در مواقع استرس، حفظ هموستازی و تداوم حیات است (۲۱ و ۴۳). چندین مطالعه حاکی از تغییر غلظت کورتیزول خون بعد از تماس ماهیان با مشتقات نفتی است (۲، ۱۴، ۱۶، ۱۷، ۲۵، ۳۷ و ۳۸) که نشان می‌دهد این آلاینده‌ها قادرند سیستم اندوکرینی و پاسخ‌های استرسی را تحت تأثیر قرار دهند. بنابراین اندازه‌گیری سطوح این هورمون می‌تواند به‌عنوان یک نشانگر زیستی استفاده شود.

در دریای خزر سالانه مقدار زیادی نفت در اثر تردد رو به افزایش نفتکش‌ها و گسترش حمل‌ونقل دریایی، توسعه روزافزون فعالیت‌های اکتشاف و حفاری توسط کشورهای حاشیه، خصوصاً آذربایجان و قزاقستان و استقرار پالایشگاه‌های نفت وارد دریا می‌گردد. با وجود انجام تحقیقاتی در خصوص تأثیر آلودگی WSF بر ماهیان (۱۶، ۱۷، ۲۸، ۲۹، ۳۳ و ۳۴)، تحقیقات بسیار اندکی در مورد اثر این نوع آلاینده‌ها بر روی ماهیان بومی و مهم به لحاظ اکولوژی و اقتصادی دریای خزر صورت گرفته است (۱۴). بررسی شدت آسیب‌های وارده و به‌خصوص تغییرات فیزیولوژیک گونه‌های دریای خزر در مواجهه با آلاینده‌های خاص می‌تواند با هدف ایجاد تمهیداتی برای افزایش بقای

آبزیان در هنگام رهاسازی به محیط طبیعی مورداستفاده قرارگیرد.

ماهی سفید (*Rutilus frisii*, Kamansky 1901)، از خانواده کپور ماهیان، از مهم‌ترین ماهیان استخوانی اقتصادی سواحل و رودخانه‌های حاشیه جنوبی دریای خزر می‌باشد که ذخایر آن می‌تواند در معرض خطرات متعددی قرارگیرد (۱). به‌منظور بازسازی ذخایر این ماهی سالانه بیش از ۲۵۰ میلیون عدد بچه ماهی ۱-۲ گرمی توسط سازمان شیلات ایران در کارگاه‌های تکثیر، تولید و به رودخانه‌ها رهاسازی می‌شوند. بنابراین در این مطالعه اثرات ناشی از مواجه‌شدن بچه ماهیان سفید با آب آلوده به درجه مشخصی از فاز محلول نفت خام، بر هورمون کورتیزول و آنزیم LDH بدن به‌عنوان دو نشانگر فیزیولوژیک مهم مورد بررسی قرارگرفته است.

مواد و روشها

ماهی و شرایط نگهداری: تعداد ۱۰۰۰ عدد بچه ماهی سفید با میانگین وزن g ۰/۰۶± ۰/۷۷ و طول cm ۰/۱۷± ۴/۲۲ برای این مطالعه انتخاب شدند. این بچه ماهیان ماحصل تکثیر فروردین ۱۳۸۹ بودند که پس از پرورش در استخرهای خاکی از کارگاه تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان دریایی شادروان دکتر یوسف‌پور سیاهکل تهیه و به کارگاه تکثیر و پرورش دانشکده منابع طبیعی دانشگاه گیلان واقع در صومعه‌سرا منتقل شدند. بچه ماهیان به مدت یک هفته به‌منظور سازگاری با شرایط آزمایش و آب دریا، در آکواریوم‌های ۱۰۰ لیتری با ابعاد ۳۰×۵۰×۷۰ سانتی‌متر پرشده از آب دریا نگهداری شدند. در طی این مدت دمای آب ^{o}C۱۸- ۱۷، شوری ppt ۸/۵ و دوره نوری ۱۲D:۱۲L در نظر گرفته شد. ماهیان در این زمان دو بار در روز (۹ صبح و ۳ بعدازظهر) و با استفاده از غذای تجاری قزل‌آلا (شرکت فرادانه؛ ۵۰٪ پروتئین، ۱۳٪ چربی، ۱۲٪ خاکستر و kcal/kg ۳۷۰۰ انرژی) تغذیه شدند.

تهیه فاز محلول در آب نفت خام (WSF= Water Soluble Fraction of crude oil): فاز محلول نفت خام طبق روش اندرسون و همکاران (۴) تهیه شد. برای این منظور نفت خام و آب با نسبت ۱ به ۹ در یک ظرف شیشه‌ای ریخته شد و به مدت ۲۳ ساعت بوسیله دستگاه شیکر مخلوط شدند. سپس به مدت ۱ ساعت به‌صورت ساکن قرار گرفتند تا فاز محلول آن جدا شود. درنهایت بخش زیرین که همان محلول WSF بود استخراج و جداسازی گردید و به‌عنوان محلول مادر در آزمایشها مورداستفاده قرارگرفت.

طراحی آزمایش: بعد از تطابق‌پذیری با شرایط آزمایش، ماهیان به‌صورت تصادفی در درون ۶ آکواریوم ۷۰ لیتری توزیع شدند (۸۰ ماهی در هر آکواریوم). برای انجام این مطالعه دو گروه آزمایشی (گروه‌های شاهد و WSF) و سه تکرار برای هر گروه در نظر گرفته شد. در گروه آزمایشی WSF، محلول WSF با غلظت ppm ۱۷ (معادل ۵۰٪ غلظت کشنده فاز محلول در آب نفت خام) محاسبه‌شده به روش نیمه پایدار به آکواریوم‌ها اضافه گردید و هر ۲۴ ساعت یکبار محلول آکواریوم‌ها با محلول هم غلظت تجدید شدند (۴۴). در گروه آزمایشی شاهد ماهیان در آب دریا عاری از هرگونه ترکیبات نفتی نگهداری شدند. ۲۴ ساعت قبل از شروع آزمایش غذادهی به ماهیان متوقف شد. به‌منظور بررسی اثر WSF بر روی غلظت لاکتات دهیدروژناز و کورتیزول، تعداد ۱۵ عدد بچه ماهی از هر تیمار در زمان‌های صفر (قبل از روبرو شدن با WSF)، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت بعد از تماس با WSF نمونه‌برداری و تا زمان انجام آنالیزهای آزمایشگاهی در دمای ^{o}C۸۰- نگهداری شدند. فاکتورهای آب شامل pH و اکسیژن محلول در اول و میانه دوره و دما بطور روزانه در سه نوبت اندازه‌گیری شدند که میانگین آنها به ترتیب برابر ۰/۱۲ ± ۷/۹، ۰/۲۱ ± ۷/۱۵ میلی‌گرم در لیتر و ^{o}C۰/۲۶ ± ۱۷/۵ بود.

اندازه‌گیری میزان کورتیزول بدن ماهی: کورتیزول موجود در بافت بچه ماهیان مطابق روش پورسعید و همکاران (۲۸) استخراج گردید. به‌طور خلاصه، پس از نمونه‌برداری، بچه ماهیان با محلول بافرفسفات (0.1 M, pH= 7.2) سرد توسط دستگاه هموژنایزر (T 10 basic Ultra turrax, IKA, Germany) هموژن گردیدند. به‌منظور استخراج کورتیزول از درون بافت به ۳۰۰µl بافت هموژن شده محلول دی اتیل اتر اضافه گردید. پس از نگهداری در دمای ۷۰°C- به مدت ۳۰ دقیقه فاز رویی جمع‌آوری شد. بعد از تبخیر، به عصاره خشک‌شده تتراکلروکربن و محلول بافر فسفات اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه مخلوط شدند. پس از سانتریفیوژ کردن نمونه‌ها (۱۵۰۰gبه مدت ۱۰ دقیقه)، لایه رویی که حاوی هورمون کورتیزول بود جمع‌آوری و تا زمان اندازه‌گیری در دمای ۷۰°C- نگهداری شدند. غلظت کورتیزول موجود در بافت با روش ELISA اندازه‌گیری شد (۲۸).

اندازه‌گیری میزان آنزیم لاکتات دهیدروژناز در بدن ماهی: به‌منظور سنجش میزان فعالیت LDH در بافت بدن، بافت بدن بچه ماهیان توسط دستگاه هموژنایزر در محلول بافر فسفات (۷/۲M, pH= ۰/۱) همگن شد. پس از سانتریفیوژ و جدا کردن مایع رویی، نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل شدند. برای اندازه‌گیری از روش DGKC (کینیتیک فوتومتری) استفاده شد. برای اندازه‌گیری LDH از معرف‌هایی حاوی بافر فسفات (pH= ۷/۲) پیروات و کلرید سدیم (معرف اول) و NADH (معرف دوم) با نسبت ۱ (معرف اول) به ۴ (معرف دوم) استفاده گردید. ابتدا جذب دستگاه توسط آب مقطر به‌عنوان بلانک صفر شد و پس از گذشت یک دقیقه جذب نمونه‌ها خوانده شد (جذب اولیه در زمان صفر دقیقه). سپس در فواصل یک دقیقه به مدت ۳ دقیقه جذب نمونه خوانده شد و اختلاف جذب در هر دقیقه و میانگین آن محاسبه گردید. کیت تشخیص کمی LDH (شرکت پارس آزمون، تهران، ایران) جهت تغییرات جذب نوری ۰/۱۵ در دقیقه طراحی‌شده و چون‌که مقدار تغییرات جذب نوری بیش از ۰/۱۵ در دقیقه بود، نمونه به نسبت ۱ بعلاوه ۱۰ با سرم فیزیولوژی رقیق و جواب آزمایش در عدد ۱۱ ضرب شد (۴۰).

اندازه‌گیری میزان پروتئین در بدن ماهی: به منظور تعیین میزان آنزیم LDH در بافت بدن ماهیان، لازم بود تا میزان پروتئین نیز سنجیده شود زیرا این آنزیم براساس واحد بر میلی‌گرم پروتئین بدن بیان می‌شود. بدین منظور پس از هموژن کردن بافت بچه ماهیان در محلول بافر فسفات، نمونه‌ها سانتریفیوژ (۱۵۰۰g) و مایع رویی به‌منظور اندازه-گیری پروتئین جدا گردید. در این اندازه‌گیری از چند معرف استفاده شد. نمونه‌ها در تیوب‌های ۳ تا ۱۰ میلی‌لیتری ریخته و سپس یک میلی‌لیتر معرف اول (۵۰ ml معرف A (Na_2CO_3 2% در NaOH ۰/۱ نرمالیته) به ۱ ml معرف B ($CuSO_4.5H_2O$ 0.5% در جوهر پتاسیم یا جوهر سدیم ۱٪) مخلوط شده و به مدت یک روز ساکن قرارداده شد) اضافه و به‌خوبی مخلوط کرده، ۱۰ دقیقه به‌طور ساکن در دمای اتاق قرارداده شد. پس از آن به‌سرعت ۰/۱ ml معرف D (محلول فنول فولین رقیق‌شده) اضافه و به مدت یک ثانیه مخلوط شد. بعد از ۳۰ دقیقه میزان جذب نمونه‌ها از طریق دستگاه کالریمتر یا اسپکتروفتومتر خوانده شد. لازم به ذکر است جذب دستگاه توسط آلبومین شفاف گاوی بعنوان محلول بلانک صفر شد (۲۰).

آنالیز آماری: ابتدا نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov و همگنی واریانس‌ها از طریق آزمون Levene بررسی شد. از آنالیز واریانس دوطرفه (Two-way ANOVA) به‌منظور بررسی روند تغییرات LDH و کورتیزول در زمان‌های مختلف و بین دو گروه آزمایشی استفاده گردید. از تست Tukey به‌منظور مقایسه معنی‌دار بودن تفاوت بین میانگین‌ها استفاده شد. کلیه این آزمون‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (Version 15) در سطح اطمینان ۹۵٪ انجام گرفت و برای ترسیم نمودارها از

نرم‌افزار Excel استفاده شد. داده‌های درون متن به‌صورت میانگین ± خطای استاندارد بیان‌شده‌اند.

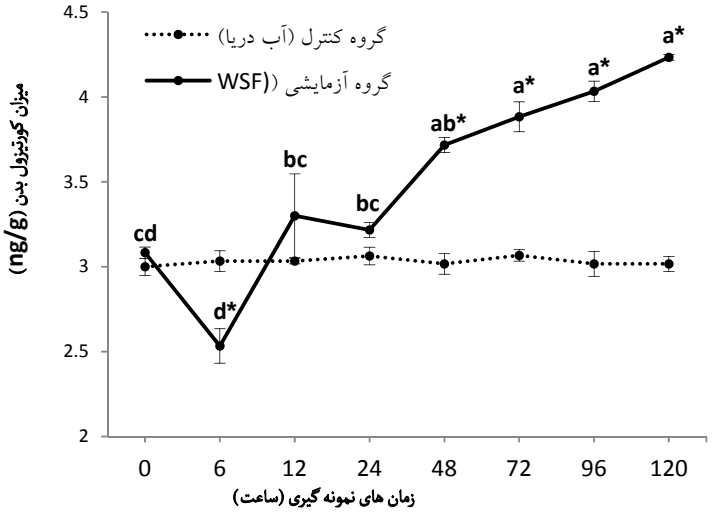
نتایج

تفاوت معنی‌داری در زمان، تیمار و اثر متقابل تیمار- زمان در غلظت کورتیزول بدن بچه ماهیان سفید بعد از ۱۲۰ ساعت تماس با WSF مشاهده شد (جدول ۱، P <۰/۰۵).

جدول ۱- تجزیه واریانس دوطرفه در رابطه با میزان کورتیزول بدن بچه ماهیان سفید انگشت قد در معرض قرارگرفته با فاز محلول در آب نفت خام در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف.

منبع (تیمار)	F	df	مربع میانگین	مجموع مربعات	P -value
تیمار	۱۲۹/۴۱	۱	۲/۶۴	۲/۶۴	۰/۰۰۰
زمان	۲۳/۴۶	۷	۰/۴۷	۳/۳۵	۰/۰۰۰
تیمار× زمان	۲۳/۷۴	۷	۰/۴۸	۳/۳۹	۰/۰۰۰
خطا	-	۳۲	۰/۰۲	۰/۶۵	-

اگرچه غلظت کل کورتیزول بدن بچه ماهیان سفید ۶ ساعت بعد از تماس با WSF کاهش یافت (۰/۱ ng/g ± ۲/۵۳) اما بااین‌وجود با شروع آزمایش (قبل از تماس با WSF) اختلاف معنی‌داری نداشت (شکل ۱). این در حالی بود که بعد از ۱۲ ساعت تماس با WSF باعث گردید غلظت کورتیزول بدن افزایش یابد و از ۲۴ ساعت تا انتهای آزمایش یک روند افزایشی و معنی‌داری مشاهده شد (P <۰/۰۵)، درحالی‌که غلظت کورتیزول در ماهیان گروه شاهد از شروع تا انتهای آزمایش روند نسبتاً ثابتی داشت. اختلاف معنی‌داری در غلظت کورتیزول بدن بین دو گروه آزمایشی در زمان‌های نمونه‌گیری ۶، ۴۸، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت مشاهده شد که به‌جز ساعت ۶ در سایر زمان‌ها غلظت کورتیزول در ماهیان گروه آزمایشی WSF به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل بود (P <۰/۰۵).



شکل ۱- روند تغییرات کورتیزول (ng/g) بدن بچه ماهیان سفید انگشت قد در طی زمان‌های مختلف بعد از تماس با فاز محلول نفت خام (WSF) و آب دریا (گروه کنترل). حروف بیانگر اختلاف معنی‌دار در یک تیمار طی زمان است (P<۰/۰۵).

* بیانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در هر زمان نمونه‌گیری است (P<۰/۰۵). داده‌ها به‌صورت میانگین ± خطای استاندارد ارائه‌شده‌اند (برای هر زمان n= ۱۵).

نتایج آنالیز واریانس دوطرفه در خصوص فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز نشان داد که تیمار و زمان هریک به‌تنهایی اثر معنی‌داری بر روی فعالیت آنزیم دارند (P <۰/۰۵) اما اثر متقابل آنها تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (جدول ۲، P >۰/۰۵).

نتایج این اندازه‌گیری نشان داد که تماس با WSF منجر به

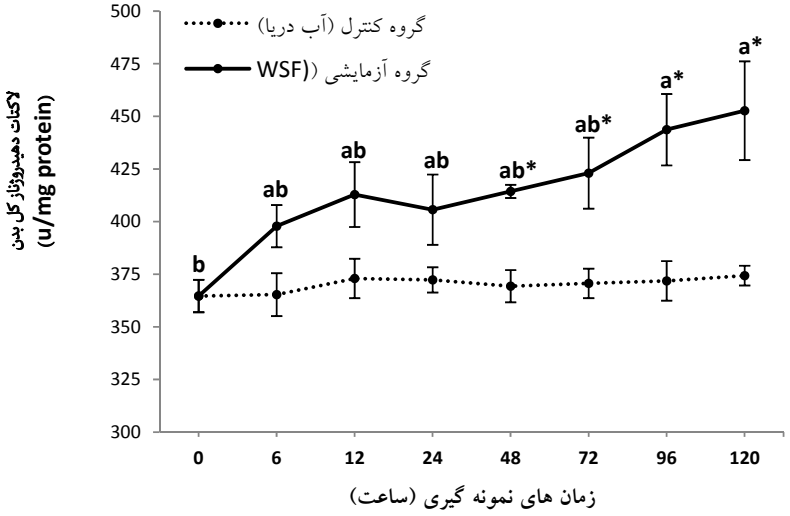
افزایش فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز در طی زمان می‌شود (P <۰/۰۵) به‌طوری که یک‌روند صعودی قابل‌مشاهده بود و بیشترین میزان آن (u/mg protein ۲۳/۴۴ ± ۴۵۲/۶۶) در ۱۲۰ ساعت اندازه‌گیری شد (شکل ۲). همچنین نتایج آنالیز آماری نشان داد که فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز از ۴۸ ساعت تا انتهای آزمایش در گروه آزمایشی WSF به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل بود (P <۰/۰۵).

بحث

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که تماس با WSF به مدت ۱۲۰ ساعت باعث ایجاد تغییراتی در وضعیت فیزیولوژیک بچه ماهیان سفید می‌شود به‌طوری که با گذشت زمان غلظت کورتیزول بدن و فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز افزایش یافت. مطالعاتی در ارتباط با اثر حاد نفت خام بر میزان کورتیزول در بافت و خون گونه‌های مختلف ماهی صورت گرفته است که با نتایج بدست آمده در این بررسی مطابقت دارد.

جدول ۲- تجزیه واریانس دوطرفه در رابطه با میزان کورتیزول بدن بچه ماهیان سفید انگشت قد در معرض قرارگرفته با فاز محلول در آب نفت خام در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف.

منبع (تیمار)	F	df	مربع میانگین	مجموع مربعات	P-value
تیمار	۵۳/۹۳	۱	۲۳۳۸۶/۲۵	۲۳۳۸۶/۲۵	۰/۰۰۰
زمان	۳/۱۶	۷	۱۳۷۰/۲۴	۹۵۹۱/۷	۰/۰۱۲
تیمار × زمان	۲/۰۸	۷	۹۰۴/۹۵	۶۳۳۴/۷	۰/۰۷
خطا	-	۳۲	۴۳۳/۶۳	۱۳۸۷۶/۳۳	-



شکل ۲- روند فعالیت لاکتات دهیدروژناز (u/mg protein) بدن بچه ماهیان سفید انگشت قد در طی زمان‌های مختلف بعد از تماس با فاز محلول نفت خام (WSF) و آب دریا (گروه کنترل). حروف بیانگر اختلاف معنی‌دار در یک تیمار طی زمان است (P<۰/۰۵).

* بیانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در هر زمان نمونه‌گیری است (P<۰/۰۵). داده‌ها به‌صورت میانگین ± خطای استاندارد ارائه‌شده‌اند (برای هر زمان n= ۱۵).

توماس و همکاران در سال ۱۹۸۰ با مطالعه بر روی کفال راه‌راه (*Mugil cephalus*) نشان دادند که ۹۶ ساعت تماس با WSF به‌طور معنی‌داری غلظت کورتیزول پلاسما را افزایش می‌دهد (۴۰). همچنین مطالعه بر روی لاروهای ماهی هرینگ اطلس (*Clupea harengus*) نشان داد که ۲۴ ساعت تماس با نفت باعث افزایش کورتیزول کل بدن می‌شود (۳۰). استیفنس و همکاران نشان دادند که در معرض قرارگیری بچه ماهیان توربوت (*Scophthalmus maximus*)

با غلظت‌های مختلف WSF به مدت شش هفته باعث می‌شود که میزان کورتیزول کل بدن در غلظت‌های بالا نسبت به گروه کنترل در طی زمان به‌طور معنی‌داری افزایش یابد (۳۸). افزایش در غلظت کورتیزول بدن بچه ماهیان سفید ۱۲ ساعت بعد از تماس با WSF نشان می‌دهد که WSF قادر است پاسخ متداول استرسی را در بچه ماهی سفید تحریک کند. علاوه بر این روند صعودی مشاهده‌شده در غلظت کورتیزول بدن و عدم برگشت آن به غلظت اولیه (قبل از تماس با WSF) بیان‌کننده عدم تطابق‌پذیری بچه ماهیان سفید با WSF در طی دوره آزمایش (۱۲۰ ساعت) است. این در حالی است که مطالعه بر روی ماهی هرینگ (*Clupea pallasi*) نشان داد که پاسخ‌های استرس در این ماهی موقت است و غلظت کورتیزول بعد از ۹۶ ساعت تماس با WSF کاهش می‌یابد (۱۷). پاسخ استرسی مشاهده‌شده در این مطالعه احتمالاً به دلیل وجود ترکیبات فرار سمی نظیر نفتالین، بنزن، تولوئن، اتیل بنزن و تری متیل بنزن در WSF است که به‌شدت برای ماهیان سمی می‌باشند. این فرضیه با نتایج کسب‌شده از ماهی کفال و *Fundulus heteroclitus* بعد از تماس با نفتالین تأیید می‌شود به‌طوری‌که در این بررسی‌ها نفتالین محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- بافت اینتررنال (HPI) را تحریک کرد و ترشح کورتیزول افزایش یافت (۱۱ و ۴۰). نکته جالب توجه در مطالعه حاضر کاهش معنی‌دار غلظت کورتیزول بدن بچه ماهیان سفید ۶ ساعت بعد از تماس با WSF نسبت به گروه شاهد بود. این نتایج با مطالعه جهانبخشی و همکاران در سال ۲۰۱۴ بر روی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) مطابقت دارد به‌طوری که در این مطالعه تماس به مدت ۲۴ ساعت با نفت خام اثر معنی‌داری بر غلظت کورتیزول خون نداشت (۱۴). کاهش غلظت کورتیزول در مطالعه حاضر را می‌توان به اختلال در عملکرد هیپوفیز و یا بافت بین کلیوی نسبت داد زیرا برخی از اجزای تشکیل‌دهنده WSF به‌عنوان مختل‌کننده‌های سیستم اندوکرینی (endocrine disruptors) شناخته‌شده‌اند که قادرند با سرکوب کردن محور HPI از ترشح کورتیکوستروئیدها جلوگیری کنند (۱۲و ۳۹). البته سایر مکانیسم‌ها نظیر افزایش در متابولیسم و سرعت پاک شدن کورتیزول از بدن به دلیل تحریک فعالیت آنزیم‌های کبدی در اثر مواجه‌شدن با WSF را نمی‌توان نادیده گرفت (۱۷). بااین‌حال افزایش در میزان کورتیزول بعد از ۱۲ ساعت تماس با WSF می‌تواند نشان‌دهنده بازگشت عملکرد صحیح محور HPI در پاسخ به تنش محیطی باشد زیرا ترشح کورتیکوستروئیدها به‌عنوان یک استراتژی برای حفظ حالت هموستازی و افزایش بقا در مقابل استرس‌های حاد و طولانی‌مدت لازم و ضروری شناخته‌شده است (۲۱ و ۴۳).

نتایج بدست آمده از این بررسی نشان داد که باگذشت زمان میزان فعالیت آنزیم LDH به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد افزایش یافت. این نتایج با مطالعات انجام‌شده بر روی سایر گونه‌ها مطابقت دارد. لانگ و همکاران در سال ۲۰۰۳ بامطالعه بر روی نرم‌تن ماسل (*Mytilus planulatus*) نشان دادند که در معرض قرارگرفتن با WSF به مدت ۹۶ ساعت باعث افزایش میزان فعالیت آنزیم LDH در بافت آبشش می‌شود (۱۹). همچنین کوهن و همکاران در سال ۲۰۰۵ با بررسی اثر WSF بروی فعالیت آنزیم LDH در باس استرالیایی (*Macquaria novemauleata*) نشان دادند که میزان فعالیت این آنزیم در بافت‌های آبشش، کبد و عضلات سفید افزایش می‌یابد (۹). نتایج مشابهی نیز در ماهی گوبی (*Pomatoschistus microps*) و ماهی رنگین‌کمانی گزارش‌شده است (۱۳ و ۴۲). LDH آنزیمی کلیدی در مسیرهای بی‌هوازی تولید انرژی است که در سیتوپلاسم سلول‌ها یافت می‌شود و برای احیای NAD^+ از NADH در ادامه مسیر گلیکولیتیک ضروری می‌باشد (۱۰ و ۴۲). بنابراین افزایش فعالیت آنزیم LDH در مطالعه حاضر نشان می‌دهد که بچه ماهیان سفید در حال گرفتن انرژی بیشتر از مسیر بی‌هوازی بودند تا بتوانند انرژی لازم برای مکانیسم سم‌زدایی را فراهم کنند.

از طرفی بخش عمده نفت خام ترکیبات لیپوفیلیک هستند و بنابراین می‌توانند با غشاء فسفولیپید ترکیب شوند که این امر می‌تواند در کاهش سیالیت غشاء تأثیر داشته باشد و عملکرد آنها را مختل سازد. این تغییرات می‌تواند مانع عبور مولکول‌هایی مانند پیرووات (که در چرخه هوازی فعالیت دارد) در طول غشاء شود که این امر از چرخه اسیدسیتریک ممانعت نموده و تنفس غیرهوازی و در نتیجه LDH را افزایش می‌دهد (۱۹ و ۲۳).

بررسی نتایج حاضر و مقایسه آن با نتایج مطالعات مشابه نشان می‌دهد که بچه ماهی سفید دریای خزر نسبت به آلودگی WSF حساس بوده و به‌منظور افزایش بقا، حفظ هموستازی و تأمین انرژی بیشتر برای سم‌زدایی، غلظت کورتیزول و آنزیم LDH را افزایش می‌دهد. درنتیجه این آلاینده‌ها بر عملکرد زیستی بچه ماهیان سفید تأثیر منفی دارند و قرارگرفتن در معرض نفت به مدت طولانی‌تر می‌تواند آسیب‌های جدی به ذخایر این ماهی وارد کند. بنابراین با توجه به وقوع آلودگی نفتی در بسیاری از نقاط سواحل دریای خزر به‌ویژه در مناطق رهاسازی و نوزادگاهی این ماهیان پیشنهاد می‌گردد این امر در ارزیابی‌های زیستی و مکان‌های رهاسازی این بچه ماهیان موردتوجه قرارگیرد.

تشکر و قدردانی

از پالایشگاه نفت تهران و مسئولین دانشکده منابع طبیعی گیلان، همچنین از جناب آقای مهندس ابراهیم لاری و خانم مهندس مریم عاطف که به نحوی ما را در اجرای این تحقیق یاری نموده‌اند تشکر و قدردانی می‌نماییم.

منابع

۱. عبدالهی، م و ایمانپور، م. ر.، ۱۳۹۳. اثر زمان مهاجرت تولید مثلی روی برخی از خصوصیات زیست شناختی تخمک و تخم ماهی سفید *Rutilus frisii kutum*. مجله زیست شناسی ایران، دوره ۲۷، شماره۱ ، ص ۸۰-۸۸.

۲. رستگار، س.، موحدی نیا، ع.، یاراحمدی، ز.، ۱۳۹۴. بررسی اثر استرس بنزوآلفاپایرین بر بافت های آبشش و سطوح کورتیزول پلاسما در ماهی شانک زرد باله *Acanthopagrus latus* مجله زیست شناسی ایران، دوره ۲۸، شماره ۲، ص ۱۶۱-۱۶۹.

3. Albaigés, J., Bayona, J.M., 2003. El fuel. In: Santiago Fundación, Fernández-Latorre Rey, editors. La Huella del Fuel. Ensayos sobre el "Prestige". A Coruna, Espana: 80-103.

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

5. Anderson, B.S., Arenella-Parkerson, D., Phillips, B.M., Tjeerdema, R.S., Crane, D., 2009. Preliminary investigation of the effects of dispersed Prudhoe Bay crude oil on developing topsmelt embryos, *Atherinops affinis*. Environ. Pol 157, 1058-1061.

6. Chang, S., Zdanowicz, V.S., Murchelano, R.A., 1998. Associations between liver lesions in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) and sediment chemical contaminants from north-east United States estuaries. ICES J. Mar. Sci. 55, 954-969.

7. Claireaux, G., Davoodi, F., 2010. Effect of exposure to petroleum hydrocarbons upon cardio-respiratory function in the common sole (*Solea solea*). Aquat. Toxicol. 98, 113-119.

8. Cohen, A.M., Nugegoda, D., Gagnon, M.M., 2001. Metabolic responses of fish following exposure to two different oil spill remediation techniques. Ecotoxicol. Environ. Saf. 48, 306-310.

9. Cohen A.M., Nugegoda, D., Gagnon, M.M., 2005. The effect of different oil spill remediation techniques on petroleum hydrocarbon elimination in Australian Bass (*Macquaria novemaculeata*). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 40, 264-270.

10. De Coen, W.M., Janssen, C.R., Segner, H., 2001. The use of biomarkers in Daphnia magna toxicity testing V. In vivo alterations in the carbohydrate metabolism of *Daphnia magna* exposed to sublethal concentrations of mercury and lindane. Ecotoxicol. Environ. Saf. 48, 223-34.

11. DiMichele, L., Taylor, M.H., 1978. Histopathological and physiological responses on *Fundulus heteroclitus* to naphthalene exposure. J. Fish. Res. Board Can. 35, 1060-1066.

12. Dorval J, Leblond VS, Hontela A., 2003. Oxidative stress and loss of cortisol secretion in adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed in vitro to endosulfan, an organochlorine pesticide. Aquat. Toxicol. 63, 229-241.

13. Gagnon, M.M., Holdway, D.A., 1999. Metabolic enzyme activities in fish gills as biomarkers of exposure to petroleum hydrocarbons. Ecotoxicol. Environ. Saf. 44, 92-99.

14. Jahanbakhshi, A., Hedayati, A., Harsij, M., Barkhordar, M., 2014. Hematological and biochemical responses of common carp *Cyprinus carpio* to direct infusion of crude oil. Comp. Clin. Pathol. 23, 799-803.

15. Jifa, W., Zhiming, Y., Xiuxian, S., You, W., 2006. Response of integrated biomarkers of fish (*Lateolabrax japonicus*) exposed to benzo pyrene and sodium dodecylbenzene sulfonate. Ecotoxicol. Environ. Saf. 65, 230-236.

16. Kennedy, C.J., Farrell, A.P., 2005. Ion homeostasis and interregnal stress responses in juvenile Pacific herring, *Clupea pallasi*, exposed to the water-soluble fraction of crude oil. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 323, 42-56.

17. Kennedy, C., Farrell, A., 2006. Do altered cortisol dynamic play a role in the multifaceted toxicities of oil exposure in. VII the International Congress on the Biology of Fish, July 19-22, St. John's, Canada.

18. Kerambrun, E., Le Floch, S., Sanchez, W., Thomas Guyon, H., Meziane, T., Henry, F., Amara, R., 2012. Responses of juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*, exposed to acute concentrations of crude oil, as assessed by molecular and physiological biomarkers. Chemosphere 87, 692-702.

19. Long, S.M., Ryder, K.J., Holdway, D.A., 2003. The use of respiratory enzymes as biomarkers of petroleum hydrocarbon exposure in *Mytilus edulis planulatus*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 55, 261-270.

20. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.

21. Mommsen, T.P., Vijayan, M.M., Moon, T.W., 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. J. Fish Biol. 9, 211-268.

22. Monteverdi, G.H., Di Giulio, R.T., 2000. Vitellogenin-associated maternal transfer of exogenous and endogenous ligands in the estuarine fish, Fundulus heteroclitus. Mar. Environ. Res. 50, 191-199.

23. Neff, J.M., 1979. Polycyclic Aromatic Hydrocarbonsin the Aquatic Environment Sources, Fates and Biological Effects. Applied Science Publishers. 262 p.

24. Orbea, A., Zarragoitia, O., Solé, M., Porte, C., Cajaraville, M., 2002. Antioxidant enzymes and peroxisome proliferation in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCBs in bivalve molluscs, crabs and fish from the Urdaibai and Plentzia estuaries (Bay of Biscay). Aquat. Toxicol. 58, 75-98.

25. Pacheco, M., Santos, M.A., 2001. Biotransformation, endocrine, and genetic responses of (*Anguilla anguilla*) to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. Ecotoxicol. Environ. Saf. 49, 64-75.

26. Peterson, S.K., Bain, L.J., 2004. Differential gene expression in anthracene-exposed mummichogs (*Fundulus heteroclitus*). Aquat. Toxicol. 66, 345-55.

27. Pollino, C.A., Holdway, D.A., 2003. Hydrocarbon-induced changes to metabolic and detoxification enzymes of the Australian crimson-spotted rainbowfish (*Melanotaenia fluvialis*). Environ. Toxicol. 18, 21-28.

28. Poursaeid, S., Falahatkar, B., Mojazi Amiri, B., Van Der Kraak, G., 2012. Effects of long-term cortisol treatments on gonadal development, sex steroids levels and ovarian cortisol content in cultured great sturgeon *Huso huso*. Comp. Biochem. Physiol. 163A, 111-119

29. Prasad, M.S., 1991. SEM study on the effects of crude oil on the gills and air breathing organs of climbing perch, Anabas testudineus. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 47, 882-889.

30. Ramsay, N. C., 1991. The effects of pollutants on osmotic and ionic regulation of herring, *Clupea harengus*. Ph.D. thesis, University of Aberdeen.

31. Reid, D.J., MacFarlane, G.R., 2003. Potential biomarkers of crude oil exposure in the gastropod mollusc, *Austrocochlea porcata*: laboratory and manipulative field studies. Environ. Pollut. 126, 147-55.

32. Rotchell, M.J., Lee, J., Chipman, J.K., Ostrander, G.K., 2001. Structure, expression and activation of fish ras genes. Aquat. Toxicol. 55, 1-21.

33. Rudolph, A., Yanez, R., Troncoso, L. 2001, Effects of exposure of *Oncorhynchus mykiss* to the water accommodated fraction of petroleum hydrocarbons. J. Environ. Contamin. Toxicol. 66: 400-406.

34. Simonto, J.D., Guedes, C.L.B., Martinez, C.B.R., 2008. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish Prochilodus lineatus exposed to diesel oil. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 69, 112-120.

35. Song, J.Y., Nakayama, K., Murakami, Y., Jung, S.J., Oh, M.J., Matsuoka, S., Kawakami, H., Kitamura, S.I., 2008. Does heavy oil pollution induce bacterial diseases in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*? Mar. Pollut. Bull. 57, 889-894.

36. Song, Y., Wu, N., Han, J., Shen, H., Tan, Y., Ding, G., 2011. Levels of PCDD/Fs and DLPCBs in selected foods and estimated dietary intake for the local residents of Luqiao and Yuhang in Zhejiang, China. Chemosphere 85, 329-334.

37. Stephens, S.M., Brown, J.A., Frankling, S.C., 1997. Stress responses of larval turbot, *Scophthalmus maximus* L., exposed to sub-lethal concentrations of petroleum hydrocarbons. Fish Physiol. Biochem. 17, 433-439.

38. Stephens, S.M., Frankling, S.C., Stagg, R.M., Brown, J.A., 2000. Sub-lethal effects of exposure of juvenile turbot to oil produced water. Mar. Pollut. Bull. 40, 928-937.

39. Thomas, P., Robertson, L., 1991. Plasma cortisol and glucose stress responses of red drum, *Sciaenops ocellatus*, to handling and shallow water stressors and anaesthesia with MS-222, quinaldine sulfate and metomidate. Aquaculture 96, 69-86.

40. Thomas, P., Woodin, B.R, Neff, J.M., 1980. Biochemical responses of the striped mullet *Mugil cephalus* to oil exposure: I. Acute responses-interrenal activations and secondary stress responses. Mar. Biol. 59, 114-141.

41. Tintos, A., Gesto, M., Míguez, M.J., Soengas, J.L., 2008. ß-Naphthoflavone and benzo(a)pyrene treatment affect liver intermediary metabolism and plasma cortisol levels in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 69, 180-186.

42. Vieira, L.R., Sousa, A., Frasco, M.F., Lima, I., Morgado, F., Guilhermino, L., 2008. Acute effects of benzo[a]pyrene, anthracene and a fuel oil on biomarkers of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). Sci. Total Environ. 395, 87-100.

43. Vijayan, M.M., Reddt, P.K., Leatherland, J.F., Moon, T.W., 1994. The effects of cortisol on hepatocyte metabolism in rainbow trout. A study using the steroid analogue RU-486. Gen. Comp. Endocrinol. 96, 75-84.

44. Walker, C.H., Hopkin, S.P., Sibly, R.M., Peakall, D.B., 1996. Principles of Ecotoxicology. Taylor and Francis, London, 321 p.

Cortisol and Lactate dehydrogenase alternation in Caspian Kutum (*Rutilus frisii*) fingerlings exposed to crude oil pollution

Sabouri S.[1], Falahatkar B.[1], Khoshkholgh M.R.[1], Poursaeid S.[2] and Abtahi B.[3]

[1] **Fisheries Dept., Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Sowmeh Sara, I.R. of Iran**

[2] **Fisheries Dept., Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, I.R. of Iran**

[3] **Marine Biology Dept., Faculty of Biological Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran, I.R. of Iran**

Abstract

The Caspian Sea as the greatest lake in the world has been faced with the different types of pollution. Among the different types of pollutants, petroleum (hydrocarbons) is one of the most important pollutants in the aquatic environment. Considering the economic and fisheries importance of the Caspian Sea, it is necessary to investigate the effect of such pollutant on valuable and endemic fish species. Since Caspian Kutum (*Rutilus frisii*) is a native and economic species of the Caspian Sea in the southern parts, the present study aimed to investigate the acute effects of water-soluble fraction of crude oil (WSF) on some physiological parameters of Caspian Kutum fingerlings at different times. Two experimental groups (WSF with LC50 of 0 and 50%) with three replicates for each one were considered in the experiment. Eighty fish (average weight of 0.77 ± 0.06 g) for each replicate were kept in an aquarium with the dimensions of 50 × 30 × 70 cm and exposed to WSF for 120 h. Then, 70 L WSF solution was added to each aquarium with the mentioned concentrations. Fifteen fish were sampled at 0 (before adding WSF), 6, 12, 24, 48, 72, 96 and 120 h after exposure to WSF for the measurement of lactate dehydrogenase activity and whole-body cortisol concentration. The results showed that the lactate dehydrogenase activity in fingerlings exposed to WSF (LC50=50%) was significantly higher than those kept in sea water (LC50=0%) during the sampling times ($P<0.05$). There was a significant interaction between WSF concentration and time on the whole-body cortisol levels ($P<0.05$). The results showed that crude oil had adverse effects on the physiology and welfare of Kutum fingerlings and the physiological responses were amplified in association with prolonged exposure to WSF.

Key words: *Rutilus frisii, crude oil, stress, physiology, Caspian Sea.*