

تجمع زیستی پایرن در بافت‌های عضله، آبشش و کبد ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در شرایط آزمایشگاهی

سیده رویا علیانی^۱، علیرضا ریاحی بختیاری^{۲*}، عیسی شریف پور^۳

تاریخ پذیرش: ۹۴/۰۱/۳۰

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۰۴

چکیده

زمینه و هدف: طی چند دهه اخیر ورود آلاینده‌ها بخصوص هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای (PAHs) به اکوسیستم‌های طبیعی از قبیل دریاچه‌ها و آب‌های آزاد خطرات زیست محیطی بالقوه‌ای را برای جانداران آبی ایجاد نموده است. این مطالعه به منظور بررسی میزان و الگوی تجمع زیستی ماده نفتی پایرن، در عضله، آبشش و کلیه ماهی کپور معمولی (*Coipracsunirpy*) پرورشی در شرایط آزمایشگاهی انجام شده است.

روش بررسی: در این تحقیق ۳۰ عدد ماهی کپور معمولی در معرض غلظت‌های $10 \mu\text{g/L}$ ، 50 و 100 پایرن به شیوه غوطه‌وری قرار داده شد. در انتهای دوره آزمایشی ۳۵ روزه به منظور بررسی تجمع پایرن در بافت‌های مختلف از ماهیان نمونه‌برداری شد. آنالیز شیمیایی شامل صابونی کردن، استخراج، جداسازی و پاکسازی طی دو مرحله کروماتوگرافی ستونی و در نهایت کروماتوگرافی گازی با استفاده از دستگاه طیف سنجی جرمی (GC-MS) تعیین گردید.

یافته‌ها: مقایسه میزان تجمع زیستی پایرن در بافت‌های عضله، آبشش و کبد ماهی کپور معمولی در غلظت‌های $10 \mu\text{g/L}$ ، 50 و 100 اختلاف معنی‌داری را نشان داد. بیشترین تجمع در دوز $100 \mu\text{g/L}$ در کبد با میانگین $685/67 \pm 78/5 \text{ ng/g dw}$ و کمترین تجمع زیستی در دوز $10 \mu\text{g/L}$ در عضله با میانگین $0/13 \pm 0/52 \text{ ng/g dw}$ بوده است. روند تجمع ترکیب پایرن در تمامی دوزهای مورد مطالعه بصورت مشابه و به ترتیب زیر است: عضله > آبشش > کبد.

نتیجه‌گیری: در مطالعه حاضر تجمع پایرن در بافت‌های چرب به خصوص کبد که اندام پذیرنده آلاینده‌های نفتی است به مراتب بیشتر از آبشش و عضله بوده است.

واژگان کلیدی: ماهی کپور معمولی، ماده نفتی پایرن، تجمع بافتی

۱. کارشناس ارشد زیست شناسی دریا، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، مازندران، نور، ایران

۲. (نویسنده مسئول): دکترای آلودگی محیط زیست، دانشیار گروه محیط زیست، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، مازندران، نور، ایران

riahi@modares.ac.ir

۳. دکترای بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشیار پژوهشی موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور-تهران، ایران

مقدمه

ترکیبات PAH در واقع گروهی از ترکیبات موجود در نفت خام هستند که غیر قطبی و چربی دوست بوده، در هر دو محیط آب شور و شیرین یافت می‌شوند (۱). از مهمترین منابع تولید ترکیبات PAH در اکوسیستم‌های آبی می‌توان به نشت نفت خام در مراحل مختلف پالایش، انتقال و تولید سوخت‌های فسیلی، پساب فاضلاب‌ها، خروجی صنایع و ته نشست‌های اتمسفری اشاره کرد (۲). در دهه‌های اخیر، ارزیابی ریسک اکولوژی ترکیبات PAH با توجه به سمیت این ترکیبات، جهش‌های ژنتیکی، سرطان‌زایی، اختلال در فعالیت غدد درون ریز و همچنین پراکنش گسترده، پایداری محیطی بالا و تجمع زیستی در اکوسیستم‌های آبی، بسیار مهم و حیاتی تلقی می‌شود (۲، ۳). جذب ترکیبات PAH از آب بوسیله آبشش‌ها در طی تنفس، از طریق روده (جذب از طریق غذا یا رسوب)، و جذب مستقیم از طریق جذب پوستی، محتمل‌ترین راه‌های تجمع ترکیبات PAH در بافت‌های ماهیان بوده و میزان تجمع زیستی آن عمدتاً به نوع تغذیه، موقعیت نسبت به منبع آلودگی، مسیر و زمان قرارگیری در معرض ترکیبات PAH، فیزیولوژی گونه‌ها و سن گونه بستگی دارد (۴-۶). ترکیبات PAH به راحتی از طریق غذا، آب و رسوب آلوده جذب بدن ماهی‌ها و دیگر موجودات آبی می‌شوند و به بالاترین غلظت نسبت به محیط اطراف می‌رسند (۷). ترکیبات PAH با وزن مولکولی بالاتر به دلیل افزایش میزان آبگریزی و تمایل به چربی دوستی قابلیت تجمع بیشتری در بافت‌های بدن نسبت به ترکیبات با وزن مولکولی پایین‌تر که آبدوست‌تر هستند، دارند (۸). این ترکیبات طی در معرض قرارگیری موجود، اغلب در بافت‌های چرب بدن تجمع می‌یابند. ماهی‌های با محتوای چربی بالاتر نسبت به ماهی‌های با محتوای چربی پایین‌تر، پتانسیل بیش‌تری برای تجمع این نوع ترکیبات دارند (۹). آژانس حفاظت محیط‌زیست آمریکا (Environmental Protection Agency (EPA) ۱۶ ترکیب PAH را به دلیل سمیت بالا برای پستانداران و موجودات آبی نسبت

به سایر آلاینده‌های آلی مهم‌تر اعلام کرده است، پلیرن با فرمول شیمیایی $C_{16}H_{10}$ یکی از مهمترین هیدروکربن‌های آروماتیک چهار حلقوی بوده و دارای توزیع گسترده‌ای در محیط‌های آبی است. این ترکیب به عنوان آلاینده زیست محیطی در مصب‌ها، مناطق ساحلی و تالاب‌ها یافت می‌شود (۱۰). دامنه غلظت پلیرن در آب‌های آزاد در حد نانوگرم بر گرم یا کمتر بوده ولی در مصب‌ها و اکوسیستم‌های ساحلی دامنه غلظت آن بالاتر از نانوگرم بر گرم (به دلیل بسته بودن محیط و تعامل کم آن با آب‌های آزاد، همچنین نزدیکی با بنادر و محیط‌های شهری) است (۱۱). پلیرن و متابولیت‌های اولیه آن (نظیر ۱-hydroxypyrene) به عنوان شاخص آلودگی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۲). بیشترین میزان ترکیبات PAH موجود در رسوبات و متابولیت‌های آنها حدود 2146 ng/g dw و مربوط به رسوبات کشور جمهوری آذربایجان بوده است. در ایستگاه‌های ساحلی جمهوری اسلامی ایران میزان اندازه‌گیری شده این ترکیبات در حدود $94-1789 \text{ ng/g dw}$ رسوبات تعیین گردیده است (۱۳). در مطالعات انجام شده توسط Mohammadi Zadeh و همکاران (۲۰۰۸-۲۰۰۹) در رسوبات دریای خزر در مناطق بهشهر، بابلسر و ساری، منشأ این رسوبات را پتروژنیک بیان کردند. ترکیباتی چون بنزوآپلیرن، پلیرن، کرایزن و فلورانتین عمده ترین ترکیبات موجود در رسوبات بودند (۱۴). در این تحقیق بر اساس میزان غلظت پلیرن در رسوبات، رودخانه‌ها و تالاب‌های حوزه دریای خزر، غلظت در معرض‌گذاری به ماهی تعیین گردید. نکته مهم در اکثر این مطالعات این است که پلیرن مانند دیگر آلاینده‌های آلی دیگر می‌تواند خطری جدی بر سلامت انسان و آبزیان داشته باشد. در این میان ماهی کپور معمولی از خانواده Cyprinidae با نام علمی *Cyprinus carpio* گونه‌ای از ماهیان آب شیرین است که به دلیل خصوصیات ویژه مانند نرخ رشد سریع و سهولت پرورش در جهان به طور وسیعی پرورش داده می‌شود (۱۵). این گونه بنتوپلاژیک و همه‌چیزخوار بوده و به طور عمده از رسوبات بستر تغذیه می‌کند، جایی که ترکیبات PAH در

غلظت‌های مورد نظر از استوک مذکور، از رابطه ۱ استفاده شده و به مخازن حاوی ۱۰۰ L آب اضافه گردید. مدت زمان در معرض قرارگیری در این تحقیق، ۳۵ روز در نظر گرفته شد. تعویض آب هر ۴۸ h یکبار صورت پذیرفت و پس از هربار تعویض، غلظت‌های مورد نظر پیرن به مخازن افزوده شد (۱۰، ۱۸، ۱۹).

$$C_1 V_1 = C_2 V_2 \quad \text{رابطه ۱:}$$

آماده‌سازی نمونه‌های بافت عضله، آبشش و کبد

پس از پایان دوره آزمایش از کبد، عضله و آبشش ماهیان هر تیمار نمونه‌برداری شده و توسط دستگاه فریز درایر (طی ۴۸ h در دمای -80°C) خشک گردید. نمونه‌های خشک، با هاون کوبیده شده و پس از توزین به ارلن مایر (۲۵۰ mL) منتقل گردید. به منظور صابونی کردن چربی‌ها، ۵۰ mL متانول-پتاسیم هیدروکسید (۳/۵ M (Me-KOH) به آن‌ها (نسبت متانول به آب؛ ۹ به ۱) اضافه شد، سپس به مدت ۲ h در آن در دمای 60°C قرار داده و پس از آن به مدت ۱ h توسط دستگاه اوربیتال شیکر، هم‌زده شدند. پس از آن استخراج مواد آلی با ۵۰ mL هگزان نرمال به مدت ۲ h توسط دستگاه اوربیتال شیکر انجام پذیرفت. پس از انجام مرحله استخراج میزان $100 \mu\text{L}$ ساروگیت (Anthracene- d_{10}) به نمونه‌های بافت اضافه گردید. سپس نمونه‌ها به کیف جداکننده (دکانتور) منتقل شدند، در این مرحله، نمونه‌ها کاملاً دو فازی شده، فاز بالایی که حاوی نمونه به همراه حلال هگزان است جدا گردید و توسط دستگاه حلال پُران چرخشی (Rotary evaporator) تا میزان ۲ mL تغلیظ شدند. پس از تغلیظ نمونه‌ها، از ستون کروماتوگرافی طی دو مرحله به منظور پاکسازی و جداسازی ترکیبات غیر قطبی استفاده شد. طی کروماتوگرافی ستون مرحله اول ترکیبات غیر قطبی شامل ترکیبات PAH با استفاده از ۲۰ mL مخلوط دی کلرومتان/هگزان به نسبت حجمی ۳:۱ جدا گردیدند. در این مرحله از سیلیکاژل ۵٪ غیر فعال شده با آب استفاده گردید. بدین منظور سیلیکاژل ابتدا به مدت ۴ h در دمای ۴۵۰ در کوره فعال و سپس به نسبت وزنی ۵٪ با آب غیر

آن بیشترین تجمع را دارند (۱۶). از نظر زیست‌شناسی نیز شباهت بسیاری بین این ماهی و ماهی‌های بومی رودخانه‌های ایران وجود دارد و به خوبی با شرایط آزمایشگاهی سازگار می‌شود. از این رو این تحقیق در جهت حفظ امنیت غذایی و ارتقای دانش مصرف‌کنندگان در زمینه میزان و نحوه انتقال ماده نفتی پیرن به بافت‌های خوراکی و غیرخوراکی، انجام گرفته است. لذا سعی بر این است تا با قرار دادن ماهی کپور معمولی در معرض غلظت‌های زیر کشنده پیرن، سطوح مختلف و الگوی تجمع این ترکیب در عضله، آبشش و کبد مورد بررسی قرار گیرد.

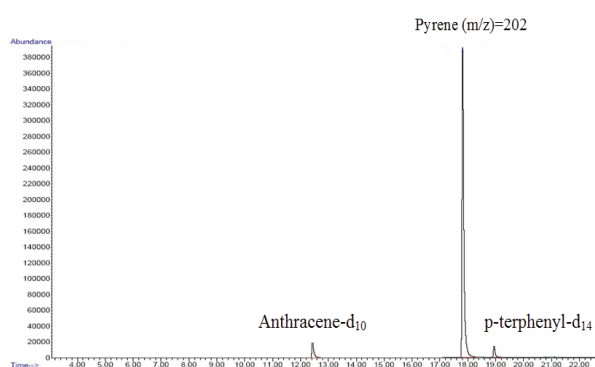
مواد و روش‌ها

ماهی

۳۰ عدد ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)، با وزن تقریبی 10 ± 14 g از استخر پرورش ماهیان گرمابی واقع در فریدونکنار تهیه گردید. ماهیان ابتدا به کارگاه تکثیر و پرورش آبریان واقع در دانشکده علوم دریایی و منابع طبیعی دانشگاه تربیت مدرس واقع در شهرستان نور منتقل شدند. طی گذراندن دو هفته سازگاری، ماهیان هر روز با غذای تجاری تغذیه شدند. ماهیان در مخازن ۳۰۰ L فایبرگلاس حاوی ۱۰۰ L آب شهری کلرزدایی و هوادهی شده با دمای 26 ± 2 pH و $7/6-8/3$ قرار داده شدند و طول دوره روشنایی به تاریکی ۱۲ h به ۱۲ h در نظر گرفته شد (۱۷). تغذیه ماهیان تا دو روز قبل از شروع آزمایش صورت پذیرفته و در طی دوره آزمایشی غذاهای انجام نگردید.

در معرض قرارگیری به پیرن

تیمارهای آزمایشی در ۵ گروه به ترتیب شامل ۰/۰۵، استون (کنترل حلال)، آب کلرزدایی شده (کنترل مثبت) و ۳ گروه تیمار آزمایش شامل غلظت‌های 10 ، 50 و $100 \mu\text{g/L}$ پیرن طبقه‌بندی شده و در هر مخزن ۶ عدد ماهی قرار داده شد. برای تهیه استوک مورد نظر، استاندارد پیرن با خلوص ۹۸ درصد از شرکت (Aldrich, USA) خریداری شده و با غلظت 1000 ng/g در حلال استون حل گردید. برای ایجاد



شکل شماره ۱: کروماتوگرام دستگاه GC-MS و نشان دادن ۳ ترکیب بکار رفته در آزمایش

آنالیز کنترل کیفی

در مطالعه حاضر به هر یک از نمونه‌ها در ابتدا به میزان $100 \mu\text{L}$ ساروگیت با غلظت $500 \mu\text{g/L}$ افزوده شد تا میزان از دست رفتن آنالیت‌ها در طی پروسه آنالیز شیمیایی، تخمین زده شود. محدوده ریکآوری بین 67% – 85% بدست آمد. سپس نتایج با ریکآوری بدست آمده تصحیح شدند و غلظت واقعی آنالیت‌ها محاسبه گردید. همچنین به منظور کنترل کیفیت روش، نمونه Blank با هر سری از نمونه‌ها انجام شد. علاوه بر این برای جلوگیری از انتقال خطا از یک تزریق دستگاه به تزریق دیگر، نمونه‌های Blank بین سایر نمونه‌ها به دستگاه تزریق شدند. حد تشخیص دستگاه نیز سه برابر Baseline دستگاه در نظر گرفته شد و تنها پیک‌های بالای این میزان کمی سازی شدند.

آنالیز آماری

جهت آنالیز آماری داده‌های حاصل از تجمع پیرن در بافت‌های مختلف از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) و جهت بررسی اختلاف میانگین‌ها، از آزمون Duncan استفاده شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها بوسیله نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام گرفت و نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم شدند.

فعال گشت. قطر داخلی ستون در این مرحله 0.9 cm و ارتفاع سیلیکاژل 9 cm بود. به منظور کروماتوگرافی ستونی مرحله دوم، نمونه‌های حاصل از کروماتوگرافی ستون اول با استفاده از حلال پیران چرخشی مجدداً تا 1 mL تغلیظ شدند. جهت جداسازی ترکیب پیرن از ستون کروماتوگرافی سیلیکاژلی کاملاً فعال شده با استفاده از 14 mL مخلوط دی کلرومتان / هگزان به نسبت حجمی ۳:۱ استفاده گردید. قطر داخلی ستون در این مرحله 0.47 cm و ارتفاع سیلیکاژل تا 18 cm است. بخش جدا شده ترکیب PAH حلال پرانی و به ویال $1/5 \text{ mL}$ منتقل شدند. نمونه‌های موجود در ویال با جریان ملایم گاز نیتروژن خشک گردید و قبل از تزریق به ویال‌های محتوی ترکیب پیرن، $100 \mu\text{L}$ استاندارد داخل پارترفنیل- d_{14} (p-terphenyl- d_{14}) اضافه گردید. سپس به دستگاه GC-MS (Gas chromatography-mass spectrometry) تزریق شدند (۲۰، ۲۱).

آنالیز دستگاهی ترکیبات PAH

آنالیز ترکیبات PAH با استفاده از کروماتوگراف گازی Agilent مدل ۷۸۹۰ A ساخت کشور امریکا به همراه طیف سنج جرمی Agilent Technologies انجام شد. ستون استفاده شده در این دستگاه، ستون کاپیلاری سیلوکسان DB-5f با طول 30 m ، قطر داخلی 0.25 mm و ضخامت فاز ساکن $0.25 \mu\text{L}$ است. انرژی یونیزاسیون 70 eV و گاز حامل بکاررفته، گاز هلیوم با جریان $1 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ بود. دمای تزریق (Injector) بر روی $310 \text{ }^\circ\text{C}$ تنظیم گشت. برنامه ریزی دمایی آون برای ترکیبات PAH بصورت زیر است: دمای اولیه ستون 70 برای مدت 2 min ، سپس افزایش دما تا 150 با میزان $30 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ و تا رسیدن به دمای $310 \text{ }^\circ\text{C}$ به میزان $4 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ و به مدت 10 min در این دما نگه داشته شد. حدود $1 \mu\text{L}$ از نمونه با بکارگیری روش SIM (Selected Ion Monitoring) و با تاخیر حلال 3 min به دستگاه تزریق شد. نمونه‌ای از کروماتوگرام در شکل ۱ آمده است.

یافته‌ها

کنترل شاهد و کنترل حلال

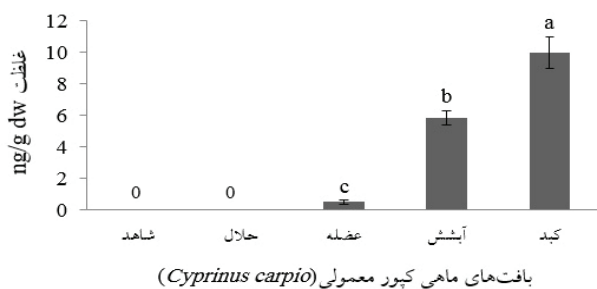
گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های 10 ، 50 و $100 \mu\text{g/L}$ پایرن میانگین غلظت پایرن بر حسب (ng/g dw) در نمونه‌های بافت عضله، آبشش و کبد ماهی کپور معمولی به همراه انحراف معیار مربوطه در جدول ۱ ارائه شده است.

پس از بررسی نتایج حاصل از ۶ نمونه کنترل و کنترل حلال، مقدار ناچیزی تجمع پایرن دیده شد که داده‌های بدست آمده از نمونه‌های شاهد (برای کاهش میزان خطا) کسر و کنترل صفر (Non Detected) در نظر گرفته شد.

جدول شماره ۱: میانگین \pm انحراف معیار مقدار تجمع پایرن در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در معرض

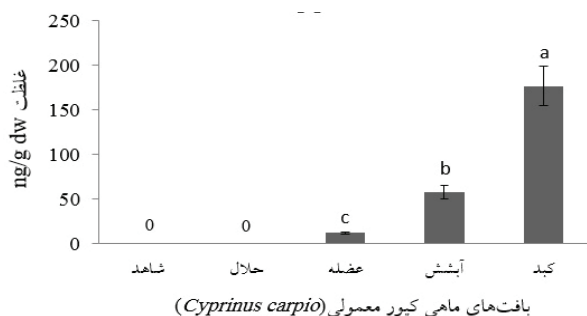
غلظت‌های 10 ، 50 و $100 \mu\text{g/L}$ پایرن

دوز پایرن			
۱۰۰ ng/g dw	۵۰ ng/g dw	۱۰ ng/g dw	بافت‌های مورد مطالعه
$56/67 \pm 9/5$	12 ± 1	$0/52 \pm 0/13$	عضله
103 ± 18	$57/67 \pm 7/64$	$5/85 \pm 0/46$	آبشش
$685/67 \pm 78/5$	$176/67 \pm 22/19$	10 ± 1	کبد



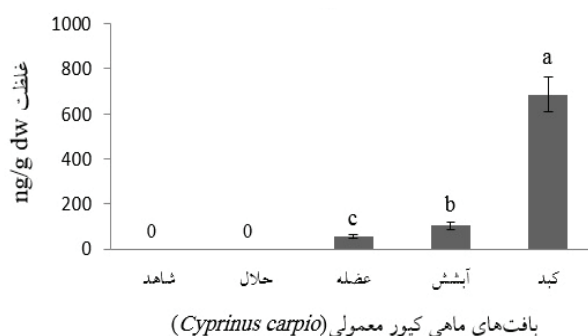
بافت‌های ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

نمودار شماره ۱: میزان تجمع پایرن در بافت‌های عضله، آبشش و کبد در تیمار $10 \mu\text{g/L}$ پایرن



نمودار شماره ۲: میزان تجمع پایرن در بافت‌های عضله، آبشش و کبد در تیمار $50 \mu\text{g/L}$ پایرن

نتایج نشان داد که میزان تجمع ترکیب پایرن در هر سه بافت عضله، آبشش و کبد در غلظت $10 \mu\text{g/L}$ ($P < 0/05$) و در غلظت $50 \mu\text{g/L}$ ($P < 0/05$) دارای اختلاف معنی‌داری بوده است. در غلظت $100 \mu\text{g/L}$ بین بافت کبد با دو بافت عضله و آبشش از نظر تجمع پایرن اختلاف معنی‌دار بوده ($P < 0/05$) در حالی که بین دو بافت عضله و آبشش اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید. به طوری که غلظت این ترکیب در بافت کبد در دوز $100 \mu\text{g/L}$ به طور معنی‌داری بیشتر از بافت‌های آبشش و عضله بدست آمد. روند تجمع ترکیب پایرن در تمامی غلظت‌های مورد مطالعه به صورت مشابه و به ترتیب زیر است: عضله > آبشش > کبد. نمودارهای ۱، ۲ و ۳ نتایج حاصل از آنالیز آماری را نشان می‌دهند.

بافت‌های ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

نمودار شماره ۳: میزان تجمع پایرن در بافت‌های عضله، آبشش و کبد در تیمار $100 \mu\text{g/L}$ پایرن

بحث

در بحث روند تجمع پایرن و ترکیبات مشابه، دو فاکتور کلیدی در تفاوت بین جذب و تجمع ترکیبات PAH در گونه‌های مختلف، میزان و سرعت متابولیسم و دفع این ترکیبات است که نقش مهمی را در تفکیک رفتار ترکیبات PAH در بافت، آب و خاک بازی می‌کند. تجمع ترکیبات PAH در تمامی محیط‌ها و جانوران اتفاق می‌افتد. با این حال ترکیباتی با وزن مولکولی پایین همانند فنانترون ($178/2 \text{ g/mol}$) سریعتر جذب و دفع می‌گردند، اما ترکیباتی با وزن مولکولی بالا همانند بنزوآپایرن ($252/3 \text{ g/mol}$) با سرعت کمتری عمل جذب و دفع را انجام می‌دهند (۲۲). عموماً ترکیبات سه و چهار حلقوی بیشترین فراوانی را در محیط طبیعی داشته و بیشترین تجمع را در بافت‌های بدن به خصوص بافت‌های چرب نشان می‌دهد که با نتایج پیش رو مطابقت دارد (۲۳). ترکیبات PAH به علت خصوصیات آبگریزی و پایداری، در رسوبات عمقی و ساحلی اکوسیستم‌های دریایی انباشته می‌شوند، از اینرو موجودات بنتیک را بطور مستقیم و موجودات پلاژیک را به طور غیر مستقیم در معرض خود قرار می‌دهد و این یکی از دلایل، اختلاف تجمع این ترکیبات در گونه‌های مختلف است (۹). در تحقیقات Beg و همکاران (۲۰۰۹) روی عضله دو گونه ماهی پلاژیک، شانک زرد باله (*Acanthopectrus latus*) و ماهی مید (*Liza klunzingeri*) و یک گونه کفزی به نام کفشک زبان گاوی (*Cynoglossus arel*)، بالاترین میانگین و محدوده غلظت ترکیب PAH در ماهی کفشک زبان گاوی در مقایسه

با دو گونه دیگر گزارش شده که نشان‌دهنده غلظت بالای این ترکیبات در ماهیان بنتیک نسبت به ماهیان پلاژیک بوده است و بیشترین تجمع این ترکیبات در کبد گزارش شده است (۲۴). در تحقیقات Koshbavar-Rostami میزان تجمع ترکیبات PAH روی ماهیان خاویاری دریای خزر در گونه‌های مختلف متفاوت بوده است که علت آن به نوع تغذیه و رفتار مهاجرتی این ماهیان بر می‌گردد. در گونه تاس‌ماهی ایرانی، بیشترین میزان تجمع در کبد سپس آبشش و عضله گزارش شده است (۲۵). لازم به ذکر است میزان جذب ترکیبات PAH توسط گونه‌های ماهی به میزان تنفس، ساختار آبشش و دوره حضور گونه در محیط آلوده بستگی دارد (۵). در رابطه با تجمع بالای پایرن در آبشش می‌توان به مسیر جذب این ترکیب اشاره کرد زمانی که این ترکیبات از طریق غوطه‌وری در معرض ماهی‌ها قرار می‌گیرند جذب از طریق آبشش به طور فعال‌تری نسبت به جذب از طریق پوست صورت می‌گیرد. اصولاً آبشش مکان عمده جذب هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقوی (PAH) محلول در آب است، در واقع افزایش سطوح فیلامنت‌ها به واسطه وجود لاملای ثانویه سبب افزایش جذب این ترکیبات می‌شود. نتایج مطالعات روی ماهی قزل‌آلا نشان داد بیشترین جذب پایرن عمدتاً از طریق آبشش صورت می‌گیرد و اهمیت چشمگیری نسبت به جذب از طریق پوست دارد. در همین مطالعه جذب از طریق روده بسیار ناچیز بوده و سیستم معدی- روده‌ای و اپیدرم پوست به عنوان ارگان‌های جاذب ترکیبات PAH مطرح نیستند (۲۶). از اینرو عمده‌ترین مسیر جذب ترکیبات لیپوفیلک از آب از طریق آبشش است (۲۷) و پایرن به عنوان یکی از این ترکیبات پس از جذب توسط آبشش وارد سیستم گردش خون می‌شود و در تمامی اندام‌ها پخش می‌شود. عمده پایرن جذب شده از طریق سیستم گوارشی برای سم‌زدایی به کبد منتقل می‌گردد و در کبد دستخوش تغییرات زیستی شده و متابولیت‌های حاصل از این ترکیبات آماده ترشح و دفع از طریق صفرا می‌گردد (۲۸). آلودگی‌های سمی که در محیط زیست آبی حضور دارند از قبیل ترکیبات PAH و PCB معمولاً به رسپتورهای آریل هیدروکربن (AHR)

تجمع کم ترکیب پیرن در عضله است (۲۸، ۳۴). میزان تجمع پیرن در عضله ماهیان (*Scomber scombrus*، *Merluccius merluccius*، *Mullus barbatus*، *Micromesistius poutassou*) نشان داد که ترکیبات چهار حلقوی ۳۷٪ کل PAH موجود در بافت عضله را تشکیل می دهند که کمتر از ترکیبات ۵ حلقوی است (۵). در مطالعه روی ماهیان آزاد سالمون بیشترین مسیر جذب بنزوآپیرن در حالت غوطه وری از طریق آبشش بوده و بیشترین میزان تجمع زیستی در بافت های کبد و آبشش گزارش شده است (۳۵). در مطالعات انجام شده روی ماهی *Arius* Cat fish (*bilineatus*)، بیشترین میزان تجمع ترکیبات PAH مربوط به پیرن، در کبد بوده است. نتایج ذکر شده در این گزارشات با مطالعات ما در مورد الگوی تجمع ترکیب نفتی پیرن مطابقت دارد. رسوبات رودخانه ها و دریاها بزرگترین مخزن ترکیبات PAH بوده و به عنوان منبع دائمی این آلاینده ها برای آبزیان محسوب شده، با تجمع در بدن آنها از طریق زنجیره غذایی وارد بدن انسان می شوند (۳۶). از اینرو مطالعه در زمینه روند و الگوی تجمع این ترکیب و ترکیبات مشابه روی آبزیان حائز اهمیت است.

نتیجه گیری

در پایان می توان نتیجه گیری کرد که بیشترین تجمع پیرن در ماهی کپور معمولی به عنوان یک گونه پرورشی در شرایط آزمایشگاهی در بافت کبد مشاهده شده است که به عنوان اندام جاذب زنبیوتیک ها مطرح می شود و با افزایش غلظت در معرض گذاری میزان تجمع در بافت های چرب به خصوص کبد افزایش می یابد و ممکن است تجمع این ترکیب و ترکیبات مشابه در بافت عضله در دراز مدت خطرات جدی بر سلامت آبزیان و مصرف کنندگان محصولات آب شیرین داشته باشد. جهت کسب نتایج بهتر و دقیق تر لازم است در کنار مطالعات آزمایشگاهی، مطالعات میدانی نیز صورت گیرد. همچنین برای تایید این مطالب نیاز به مطالعات بیشتر و بررسی پارامترهای خون شناسی و آسیب شناسی است.

Aryl Hydrocarbon Receptor متصل شده و به دنبال آن باعث القای سیتوکروم $P_{450}1A$ (CYP1A) شده و آن را تحریک می کند. این آنزیم ها در کبد، کلیه، روده و همچنین در آبشش ماهی ها یافت می گردد (۱۸). حضور آنزیم های خانواده P_{450} و گلوکوتایون استرانسفرز در بافت کبد و آبشش ماهی و تمرکز آن ها در این بافت ها دلیلی بر تجمع بالای این ترکیب به واسطه متابولیزه کردن پیرن است (۲۹). نتایج نشان می دهد که با افزایش غلظت ترکیب پیرن، میزان تجمع در بافت های آبشش و کبد که به عنوان اندام های اصلی در جذب و سمیت زدایی این ترکیبات محسوب می شوند افزایش می یابد. با توجه به مطالب ذکر شده در بالا می توان تجمع بیشتر ترکیب پیرن در بافت کبد را منتج از چربی بیشتر آن دانست (۲۲). در مطالعه حاضر کمترین میزان تجمع ترکیب پیرن مربوط به بافت عضله بوده است. در مطالعات صورت گرفته، روی whelk (*Buccinum undatum*)، توسط Beach و همکاران (۲۰۱۰)، جنس و گونه *Salvelinus fontinalis* توسط Leonard و Hellou (۲۰۰۴)، تجمع ترکیبات PAH در بافت عضله نسبت به سایر بافت ها کمتر بوده است (۳۰، ۳۱). بررسی های انجام شده بر روی ماهی sea bass (*Dicentrarchus labrax*)، به صورت پایدار و نیمه پایدار، بیشترین تجمع پیرن در صفرا و کبد و کمترین در عضله بوده است (۳۲). تجمع پیرن در عضله (چه به صورت غوطه وری و چه به صورت تغذیه ای)، به دلیل کم رنگ بودن مسیرهای متابولیزه کننده و آنزیم های فاز ۱ و ۲ بیوترانسفورماسیون (عمده ترین مسیرهای متابولیسم هیدروکربن های با وزن مولکولی بالا)، کمتر از بافت های آبشش و کبد است (۲۸). در مطالعات مشابه دیگری که توسط Silva و همکار در سال (۲۰۰۳) به انجام رسید نشان دهنده تجمع بالای فناترن در کبد بوده است و با افزایش غلظت فناترن میزان فعالیت EROD نیز افزایش یافت (۳۳). همچنین در مطالعه روی عضله ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) و ماهی سوف (*Perca fluviatilis*) (به صورت تغذیه ای) میزان جذب ترکیبات ۴ حلقوی حد واسط ترکیبات ۳ و ۵ حلقوی بوده که نشان دهنده

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از پایان نامه با عنوان تجمع پایرن و آسیب شناسی آن در برخی بافت‌های حیاتی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در شرایط آزمایشگاهی در مقطع

کارشناسی ارشد بوده که در سال ۱۳۹۱ از دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس اجرا شده است. لازم می‌دانم از همکاری و مساعدت کلیه مسئولین این دانشکده تشکر و قدردانی نمایم.

منابع

- 1- Reynaud S, Deschaux P. The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: A review. *Aquatic Toxicology*. 2006;77(2):229-38.
- 2- Wang DQ, Zhang XY, Zhang S, Pang YP, Zang XL, Yu ZQ, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in fish from Taihu lake: Their levels, sources, and biomagnification. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2012;82:63-70.
- 3- Xu FL, Wu WJ, Wang JJ, Qin N, Wang Y, He QS, et al. Residual levels and health risk of polycyclic aromatic hydrocarbons in freshwater fishes from Lake Small Bai-Yang-Dian, Northern China. *Ecological Modelling*. 2011;222:275-86.
- 4- Cheung KC, Leung HM, Kong KY, Wong MH. Residual levels of DDTs and PAHs in freshwater and marine fish from Hong Kong markets and their health risk assessment. *Chemosphere*. 2007;66(3):460-68.
- 5- Logan DT. Perspective on ecotoxicology of PAHs to fish. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*. 2007;13(2):302-16.
- 6- Malik A, Ojha P, Singh KP. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible fish from Gomti River, India. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2008;80:134-38.
- 7- Varanasi U, Reichert WL, Eberhart BTL, Stein JE. Formation and persistence of benzo[a]pyrene-diolepoxide-DNA adducts in liver of English sole (*Parophrys vetulus*). *Chemico-Biological Interactions*. 1989;69(2):203-16.
- 8- Aas E, Baussant T, Balk L, Liewenborg B, Andersen OK. PAH metabolites in bile, cytochrome P4501A and DNA adducts as environmental risk parameters for chronic oil exposure: a laboratory experiment with Atlantic cod. *Aquatic Toxicology*. 2000;51(2):241-58.
- 9- Boonyatumanond R, Wattayakorn G, Tog A, Takada H. Distribution and origins of polycyclic

- aromatic hydrocarbons (PAHs) in riverine, Estuarine and Marine Sediments in Thailand. *Marine Pollution Bulletin*. 2006;52(8):942-95.
- 10- Oliveira M, Gravato C, Guilhermino L. Acute toxic effects of pyrene on *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae): Mortality, biomarkers and swimming performance. *Ecological Indicators*. 2012;19(1):206-14.
- 11- El Nemr A, Abd-Allah AMA. Contamination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in microlayer and subsurface waters along Alexandria coast, Egypt. *Chemosphere*. 2003;52(10):1711-16.
- 12- Vuorinen PJ, Keinänen M, Vuontisjärvi H, Barsiene J, Broeg K. Use of biliary PAH metabolites as a biomarker of pollution in fish from the Baltic Sea. *Marin Pollution Bulletin*. 2006;53(8):479-87.
- 13- Tolosa I, De Mora D, Sheikholeslami MR, Villeneuve JP, Bartocci J, Cattini C. Aliphatic and aromatic hydrocarbons in coastal Caspian Sea sediments. *Marine Pollution Bulletin*. 2004;48(1):44-60.
- 14- Mohammadi Zadeh C, Saify A, Shalikh H. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) along the Estern Caspian Sea Cost. *Global Journal of Environmental Research*. 2010;4(2):59-63 (in Persian).
- 15- Guler GO, Kiztanir B, Aktumsek A, Citil OB, Ozparlak H. Determination of the seasonal changes on total fatty acid composition and w3/w6 ratios of carp (*Cyprinus carpio* L.) muscle lipids in Beysehir Lake. *Food Chemistry*. 2008;108(2):689-94.
- 16- Liang Y, Tse MF, Young L, Won MH. Distribution patterns of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the sediments and fish at Mai Po Marshes Nature Reserve, Hong Kong. *Water Research*. 2007;41(6):1303-11.
- 17- Reynaud S, Marionnet D, Taysse L, Duchiron C, Deschaux P. The effects of 3-methylcholanthrene on macrophage respiratory burst and biotransformation activities in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish and Shellfish Immunology*. 2002;12(1):17-34.
- 18- Van Veld PA, Vogelbein WK, Cochran MK, Goksoyr A, Stegeman JJ. Route-specific cellular expression of cytochrome P4501A (CYP1A) in fish (*Fundulus heteroclitus*) following exposure to aqueous and dietary benzo [a] pyrene. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1997;142(2):348-59.
- 19- Dissanayake A, Galloway TS, Jones MB. Physiological responses of juvenile and adult shore crabs *Carcinus maenas* (Crustacea: Decapoda) to pyrene exposure. *Marine Environmental Research*. 2008;66(4):445-50.
- 20- Riyahi Bakhtiyari A, Zakaria MP, Yaziz MI, Lajins MNH, Bi X. Variations and origins of aliphatic hydrocarbons in sediment cores from Chini Lake in peninsular Malaysia. *Environmental Forensics*. 2011;12(1):79-91.
- 21- Wretling S, Eriksson A, Eskhult GA, Larsson B. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Swedish smoked meat and fish. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2010;23(3):264-72.
- 22- Jensen LK, Honkanen JO, Jager I, Carroll JL. Bioaccumulation of phenanthrene and benzo [a] pyrene in *Calanus finmarchicus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2012;78(1):225-31.
- 23- Al-Hassan JM, Afzal M, Chava VNR, Fayad S. Hydrocarbon pollution in the Persian Catfish (*Arius bilineatus* Val.). *Environmental Contamination and Toxicology*. 2001;66(5):646-52.
- 24- Beg MU, Gevao B, Al-Jandal N, Beg KR, Butt SA, Ali LN, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons in three varieties of fish from Kuwait Bay. *Polycyclic Aromatic Compounds*. 2009;29(2):75-89.
- 25- Khoshbavar-Rostami HA, Soltani M, Yelghi S, Hasanzati-Rostami A. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in water, sediment and tissues of five sturgeon species in the southern Caspian Sea coastal regions. *Caspian Journal of Environmental Sciences*. 2012;10(2):135-144 (in Persian).
- 26- Namdari R, Law F. Toxicokinetics of waterborne pyrene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following branchial or dermal exposure. *Aquatic Toxicology*. 1996;35(3):221-35.
- 27- Liu X, Jing J, Li S, Zhang G, Zou T, Xia X, et al. Measurement of pyrene in the gills of exposed fish using synchronous fluorescence spectroscopy. *Chemosphere*. 2012;86(2):198-201.
- 28- Lazartigues A, Thomas M, Grandclaudeon C, Brun-Bellut J, Feidt C. Bioaccumulation of PAHs and Their Hydroxylated Metabolites in Common Carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus 1758) in Controlled

- Environment. Polycyclic Aromatic Compounds. 2010;30(3):141-52.
- 29- Cailleaud K, Budzinski H, Le Menach K, Souissi S, Forget-Leray J. Uptake and elimination of hydrophobic organic contaminants in estuarine copepods: an experimental study. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2009;28(2):239-46.
- 30- Beach DG, Quilliam MA, Rouleau C, Croll RP, Hellou J. Bioaccumulation and biotransformation of pyrene and 1-hydroxypyrene by the marine whelk *Buccinum undatum*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2010;29(4):779-88.
- 31- Hellou J, Leonard J. Polycyclic aromatic hydrocarbons bioaccumulation and biotransformation products in trout exposed through food plate. *Polycyclic Aromatic Compounds*. 2004;24(4):697-712.
- 32- Almeida JR, Gravato C, Guilhermino L. Challenges in assessing the toxic effects of polycyclic aromatic hydrocarbons to marine organisms: A case study on the acute toxicity of pyrene to the European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Chemosphere*. 2012;86(9):926-37.
- 33- Shailaja MS, D'Silva C. Evaluation of impact of PAH on a tropical fish *Oreochromis mossambicus* using multiple biomarkers. *Chemosphere*. 2003;53(8):835-41.
- 34- Lazartigues A, Thomas M, Grandclaude C, Brun-Bellut J, Feidt C. Polycyclic aromatic hydrocarbons and hydroxylated metabolites in the muscle tissue of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) through dietary exposure during a 56-day period. *Chemosphere*. 2011;84(10):1489-94.
- 35- Lemke MA, Kennedy CJ. The uptake, distribution and metabolism of benzo[a] pyrene in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during the parr-smolt transformation. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 1997;16(7):1384-88.
- 36- Navarro VC, Leppanen MT, Honkanen JO, Kukkonen JVK. Trophic transfer of pyrene metabolites and nonextractable fraction from *Oligochaete* (*Lumbricus variegatus*) to juvenile brown trout (*Salmo trutta*). *Chemosphere*. 2012;88(1):55-61.

Pyrene's bioaccumulation in muscle, gill and liver tissues of common carp (*Cyprinus carpio*): in vitro study

S.R. Olyaei¹, A.R Riahi Bakhtiari^{2*}, I. Sharifpour³

¹ Department of Marine Biology Sciences, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Mazandaran, Noor, Iran

² Department of Environment Sciences, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Mazandaran, Noor, Iran

³ Department of Aquatics Diseases and Health, Iranian Fisheries Research Organization, Tehran, Iran

Received: 24 January 2015; Accepted: 19 April 2015

ABSTRACT

Background and Objectives: Over the past few decades, the entry of pollutants, especially PAHs compounds in natural ecosystems such as lakes and open water for aquatic organisms has created potential environmental hazards. This study aimed to investigate the extent and pattern of bioaccumulation of pyrene oil pollution in muscle, gill, and liver of common carp (*Cyprinus carpio*) cultured in vitro.

Materials and Methods: thirty fishes with mean weight of 140 ± 10 g were exposed to 10, 50, and 100 $\mu\text{g/l}$ pyrene. At the end of the 35 days trial period, fish were sampled in order to study the pyrene accumulation in different tissues. Preparing process of samples include soaping, extracting, and two-phase chromatography and finally injecting samples to the gas chromatography-mass spectrometry.

Results: Comparison between bioaccumulation of pyrene in muscle, gill, and liver tissues of cyprinus carpio in 10, 50, and 100 $\mu\text{g/l}$ doses showed significant differences. Maximum average accumulation was in liver (dose100) with 685.67 ± 78.5 and the minimum was in muscle in dose 10 with 0.52 ± 0.13 pyrene's accumulation trend was the same in all studied doses: liver>gill>muscle.

Conclusion: In the present study, pyrene accumulated in fatty tissue, especially liver-acceptor of all of the oil pollutants- was far more than of gills and muscle.

Keywords: *Cyprinus carpio*, pyrene oil pollution, Accumulation

*Corresponding Author: riahi@modares.ac.ir