

بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف پساب خروجی از تصفیه‌خانه فاضلاب شهری بر فاکتورهای بیوشیمیایی خون، هورمون کورتیزول، بافت کبد و بافت آبشش ماهی کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*)

کیوان الحاقی^۱، کامران رضایی توابع^{۲*}، غلامرضا رفیعی^۳، علیرضا میرواقفی^۳، آرش جوانشیر^۴

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

۲. استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

۳. استاد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

۴. دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۲۱ تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۳/۱۳

چکیده

این تحقیق با هدف بررسی کاربرد غلظت‌های مختلف پساب خروجی از تصفیه‌خانه پساب شهری در محیط پرورش و تأثیر آن بر فاکتورهای خونی، هورمون کورتیزول و بافت‌های کبد و آبشش ماهی کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) انجام گردید. برای این تحقیق، پنج تیمار غلظت پساب خروجی از تصفیه‌خانه فاضلاب شهری با غلظت‌های ۰٪ (شاهد)، ۲۵٪، ۵۰٪، ۷۵٪ و ۱۰۰٪ با سه تکرار در نظر گرفته شد و در هر مخزن (۶۰ لیتر) ۸ قطعه ماهی کپور نقره‌ای با میانگین وزنی 120 ± 5 معرفی شد. طول دوره تحقیق ۲ ماه بود و در طول آزمایش ماهی‌ها روزانه یک بار با پلت تجاری ماهی کپور غذادهی شدند. کمترین تلفات مربوط به تیمار شاهد (۸ درصد) و بیشترین تلفات مربوط به تیمارهای ۷۵٪ (۲۰ درصد) و ۱۰۰٪ (۱۶ درصد) پساب بود. بر اساس نتایج، با افزایش غلظت پساب، میزان هورمون کورتیزول نیز به‌طور معنی‌داری ($P \leq 0/05$) افزایش یافت. نتایج آنالیز فاکتورهای بیوشیمیایی خون نشان داد که فاکتورهای گلبول سفید (WBC)، گلبول قرمز (RBC)، هماتوکریت (HCT)، هموگلوبین (Hb) و متوسط حجم گلبولی (MCV) با افزایش درصد غلظت پساب به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. اما بین متوسط هموگلوبین گلبولی (MCH) و غلظت متوسط هموگلوبین داخل خون (MCHC) در تیمارها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P \geq 0/05$). همچنین نتایج بافت‌شناسی نشان داد که افزایش غلظت پساب باعث بروز ضایعات و واکنش‌هایی در هر دو بافت کبد و آبشش شد که ناشی از قرارگیری در یک شرایط استرسی و مقابله با آن شرایط بود.

واژگان کلیدی: پساب تصفیه‌شده، فاکتورهای بیوشیمیایی خون، هورمون کورتیزول، بافت آبشش.

۱. مقدمه

آن‌ها به افراد محدود و اندک می‌باشد. اگر از ماهی یا گیاه پرورش یافته در پساب آلوده به ترماتودها به طور خام و یا کم پخته شده استفاده شود، در این صورت انتقال آلودگی به انسان اتفاق خواهد افتاد. شاخص کیفی میکروبی مربوط به حوضچه‌های پرورش ماهی، وجود و یا عدم وجود تخم زنده ترماتودها در پساب مورد استفاده می‌باشد. البته مطالعات نشان می‌دهد افرادی که در تماس طولانی مدت با گیاهان آبی پرورش یافته در برکه‌های آلوده که به وسیله فاضلاب یا پساب‌های صنعتی هستند، معمولاً از میزان بروز بیماری‌های پوستی مانند سوزش و التهابات پوستی بیش‌تری برخوردار می‌باشند (Qadir et al., 2010). بر اساس دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی (WHO) پساب مورد استفاده برای استخرهای پرورش ماهی باید عاری از تخم انگل نماتودها باشد و تعداد کلی‌فرم مدفوعی در آن‌ها بیش از ۱۰۰۰۰ عدد در هر ۱۰۰ میلی‌لیتر نباشد.

مهم‌ترین عامل محدودیت کیفی در استفاده از پساب‌های خانگی جهت استفاده در محیط‌زیست، کلی‌فرم‌های مدفوعی و BOD می‌باشد و در استفاده از زه‌آب‌های کشاورزی بقایای سموم و علف‌کش‌ها در استفاده از پساب‌های صنعتی بسته به نوع صنعت، غلظت فلزات سنگین و مواد آلی می‌باشد. هدف از اجرای این تحقیق، بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف پساب خروجی از پساب تصفیه‌خانه شهری بر فاکتورهای بیوشیمیایی خون، هورمون کورتیزول، بافت کبد و آبشش ماهی کپور نقره‌ای است تا بتوان در صورت سازگاری ماهی، از پساب خروجی از تصفیه‌خانه‌ها در جهت آبی‌پروری با رعایت استانداردهای لازم استفاده نمود. بنابراین هدف کاربردی در این تحقیق، بررسی امکان زنده‌مانی، سازگاری و تغییرات بیوشیمیایی خونی و بافتی ماهی کپور نقره‌ای تحت تأثیر غلظت‌های مختلف پساب می‌باشد.

۲. مواد و روش‌ها

برای اجرای تحقیق، ۲۰۰ قطعه ماهی کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) با میانگین وزنی 120 ± 5 گرم از مرکز خصوصی بهنمیر

یکی از راه‌های اصلی برای مقابله با مسئله بحران آب، کاربرد زنجیره‌ای آب، متناسب با تغییر کیفیت آن در بخش‌های مختلف مصرف می‌باشد (Abedi, 2004). به همین خاطر در کشورهای مختلف پساب‌های تصفیه‌شده با رعایت ضوابط زیست‌محیطی برای کاربری‌های مختلف مورد استفاده مجدد قرار می‌گیرند (Yargholi et al., 2010). به طور کلی پساب همان آب مصرفی است که در نتیجه کاربردهای مختلف، آلوده شده و قابل استفاده برای مصرف مطلوب و مورد نظر نمی‌باشد. مهم‌ترین اهداف سامانه‌های تصفیه پساب شامل حفظ بهداشت همگانی و تأمین شرایط بهداشتی برای زندگی انسان‌ها، پاک نگه‌داشتن و حفاظت از محیط‌زیست و جلوگیری از آلودگی منابع آب و استفاده مجدد از پساب تصفیه‌شده در کشاورزی، صنعت، آبیاری، فضای سبز و پرورش آبیان است (Monzavi, 1987). پراکندگی غیر یکنواخت منابع آب و خشک‌سالی‌های پی‌درپی (Ma and Liu, 2002)، افزایش جمعیت و توسعه حاشیه‌نشینی و به دنبال آن تولید پساب‌های خانگی و شهری (Qadir et al., 2010)، افزایش فعالیت‌های صنعتی، کشاورزی و تخلیه پساب‌های تولیدشده از آن‌ها به آب‌های سطحی، منجر به کاهش کیفیت آب شده و تأثیر سوئی بر سلامت جوامع و محیط‌زیست دارد (Sartaj et al., 2004).

در مورد عوارض بهداشتی استفاده از پساب‌ها و آب‌های برگشتی برای آبی‌پروری در مقایسه با استفاده از پساب‌ها در کشاورزی، تحقیقات کمتری انجام شده و به همان میزان اطلاعات کمتری نیز در دسترس می‌باشد. مدارک و شواهدی که در مورد ماهی‌ها و گیاهان پرورش یافته در پساب وجود دارد، نشان می‌دهد که انتقال آلودگی از طریق سطوح خارجی گیاهان و بدن ماهی‌ها به افرادی که در معرض و تماس با آن‌ها هستند (Sartaj et al., 2004)، انجام گرفته و باعث آلودگی می‌شود. نتایج و تجربیات نشان می‌دهد که علی‌رغم امکان انتقال آلودگی از طریق محصولات تولیدی از آب‌های باز‌یافتی به‌ویژه از طریق سطوح خارجی بدن ماهی‌ها و گیاهان با افراد در معرض تماس، امکان انتقال از طریق بافت‌های داخلی

تغذیه ماهیان ۲۴ ساعت قبل از خون‌گیری قطع شد و سپس ماهیان در محلول پودر گل میخک به میزان ۲۰۰ ppm بیهوش شدند و خون‌گیری از سیاهرگ ساقه دمی آن‌ها با استفاده از سرنگ ۲/۵ میلی‌متری به میزان ۱/۵ سی‌سی انجام شد (Torrecillas *et al.*, 2011). از نمونه‌های خون جمع‌آوری شده، ۱ میلی‌لیتر برای جداسازی سرم در میکروتیوب‌های فاقد ماده ضد انعقاد هپارین و ۰/۵ میلی‌لیتر در ویال حاوی ماده ضد انعقاد هپارین تقسیم گردید. بعد از اتمام نمونه‌گیری از ماهیان، بلافاصله برای جداسازی سرم، نمونه‌های موجود را در میکروتیوب فاقد ماده ضد انعقاد هپارین در سانتریفیوژ آزمایشگاه ژنتیک گروه شیلات دانشگاه تهران قرار داده و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس با استفاده از سمپلر، سرم از نمونه‌ها جدا و در میکروتیوب‌های دیگر قرار داده شدند. در آخر دور میکروتیوب‌ها و ویال را با پارافیلیم پوشانده و نمونه‌های حاوی پلاسما را در فریزر ۴- درجه سانتی‌گراد و نمونه‌های موجود در ویال تا زمان بررسی در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. شاخص‌های بیوشیمیایی خون شامل هماتوکریت، (Hct) هموگلوبین (Hb)، تعداد گلبول‌های قرمز (RBC)، تعداد گلبول‌های سفید (WBC)، متوسط هموگلوبین گلبولی (MCH)، حجم متوسط گلبولی (MCV) و غلظت متوسط هموگلوبین داخل گلبول قرمز (MCHC) (Henry, 1996) آنالیز و اندازه‌گیری شدند.

۴.۲. اندازه‌گیری هورمون کورتیزول خون

برای اندازه‌گیری هورمون کورتیزول خون، با روش رادیوایمونواسی (RIA) با استفاده از دستگاه اتوماتیک Gamma counter مدل L.K.B ساخت کشور فنلاند و با به کارگیری کیت‌های هورمونی ایمونوتک (Immonotech) ساخت کشور فرانسه انجام گردید. برای این منظور ابتدا ۱۰ میکرولیتر از پلاسما و ۵۰۰ میکرولیتر از هورمون کورتیزول نشان‌دار به میکروتیوب‌های موجود در کیت اضافه و سپس میکروتیوب‌ها پس از ورتکس شدن، به مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند. پس از آن محتوای میکروتیوب‌ها تخلیه و پس از خشک شدن

واقع در بابلسر تهیه گردید و به کارگاه تکثیر و پرورش آبزیان دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران انتقال داده شد. ماهیان به منظور سازگاری با شرایط محیطی جدید به مدت یک هفته در یک مخزن ۱۰۰۰ لیتری فایبرگلاس نگهداری شدند. به منظور تأمین اکسیژن در حد اشباع، هوادهی توسط پمپ هواده و سنگ هوا صورت گرفت.

۱.۲. تهیه پساب مورد نیاز تحقیق

حدود ۱۰۰۰ لیتر پساب تصفیه‌شده از خروجی تصفیه‌خانه فاضلاب شهر قدس به کارگاه تکثیر و پرورش آبزیان دانشکده منابع طبیعی انتقال داده شد و در دو مخزن ۵۰۰ لیتری قرار داده شدند. طبق نتایج آزمایشگاه تصفیه‌خانه و آنالیزها در آزمایشگاه آب دانشکده منابع طبیعی، مهم‌ترین شاخص‌های پساب خروجی از تصفیه‌خانه به ترتیب شامل BOD: ۱۹/۶، COD: ۳۲/۶ و TSS: ۲۱/۷ بود.

۲.۲. تیمارها و تکرارها

بعد از گذراندن دوره سازگاری، ۵ تیمار با غلظت‌های مختلف در سه تکرار، هر تیمار وزنی شامل ۳ مخزن ۶۰ لیتری که شامل ۶ قطعه ماهی کپور نقره‌ای بود با میانگین وزن 120 ± 5 گرم بسته شد. تیمار شاهد بدون پساب و ۴ تیمار آزمایشی شامل ۲۵٪، ۵۰٪، ۷۵٪ و ۱۰۰٪ پساب تصفیه شده و بعد از معرفی ماهیان به مخازن حاوی فاضلاب به مدت دو ماه مورد آزمایش قرار گرفتند. در طی دور تحقیق هیچ‌گونه تعویض آب صورت نگرفت و غذادهی به صورت حداقل با یکبار غذادهی روزانه به وسیله پلت تجاری (محصول کارخانه فرادانه) تغذیه شدند. همچنین میانگین دمای مخازن تیمارها در محیط کنترل شده 23 ± 1 سانتی‌گراد بود.

۳.۲. خون‌گیری از ماهیان و آنالیز فاکتورهای

بیوشیمیایی خون

در پایان دور تحقیق، ماهیان بیومتری و خون‌گیری (سیاهرگ ساقه دمی) شدند، به این صورت که از هر تیمار سه ماهی به صورت تصادفی انتخاب شدند.

جدول ۱- میزان تلفات کپور نقره‌ای در طول دوره آزمایش

درصد تلفات	WG	مشخصات
۸ درصد	۵±۲ درصد	تیمار شاهد
۱۲ درصد	۵±۲ درصد	تیمار ۲۵٪
۱۲ درصد	۵±۱ درصد	تیمار ۵۰٪
۲۰ درصد	۵±۲ درصد	تیمار ۷۵٪
۱۶ درصد	۵±۱ درصد	تیمار ۱۰۰٪

میانگین تیمارهای مختلف (با سطح معنی‌داری $P < 0.05$) با آزمون دانکن و با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ انجام شد.

میکروتیوب‌ها، مقدار تشعشعات گامای آن‌ها در دستگاه Gamma counter اندازه‌گیری گردید.

۵.۲. بافت‌شناسی

بعد از اتمام خون‌گیری از هر ماهی قسمتی از بافت کبد و آبشش جدا شده و در محلول اتانول ۷۰٪ فیکس داده شدند و نمونه‌ها به آزمایشگاه بیمارستان امام خمینی کرج منتقل شدند. پس از آماده‌سازی بافت و برش از محل مورد نظر، بافت وارد دستگاه آماده‌سازی یا Tissue Processor شد. بافت مورد نظر توسط دستگاه به طور اتوماتیک آبگیری و شفاف شده و در نهایت درون گزیلول و پارافین آماده قالب‌گیری قرار داده شد. بافت به‌دست آمده از دستگاه Tissue Processor به دستگاه Dispanser برای قالب‌گیری انتقال داده شد و توسط قالب‌های مخصوص و پارافین ذوب شده قالب‌گیری شدند. سپس با استفاده از دستگاه میکروتوم بافت‌ها را برش داده و درون آب الکل ۵۰٪ قرار گرفته تا چروک‌های آن باز شود. قسمت‌های مورد نظر از برش بافتی را توسط لام از آب الکل ۵۰٪ برداشته و در سطح آب ولرم درون Tissue Flot قرار داده و توسط لام، بخش‌های مورد نظر از آن برداشته شد. لام‌های آماده را به دستگاه فور ۱۰۰ درجه منتقل نموده و ۱۰ دقیقه صبر کرده تا پارافین اضافی خارج شده و بافت روی لام بچسبد. سپس لام‌ها برای مطالعات بافت‌شناسی به وسیله هماتوکسلین-اٹوزین (Poosti *et al.*, 2000) رنگ آمیزی شدند و مقاطع تهیه شده با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند.

۳. نتایج

۱.۳. شاخص‌های رشد و زنده‌مانی

در طول دوره آزمایش که به مدت دو ماه، ماهی کپور نقره‌ای در مواجهه با غلظت‌های مختلف پساب خروجی از فاضلاب شهری بود، کمترین تلفات (۸ درصد) مربوط به تیمار شاهد و بیشترین تلفات مربوط به تیمارهای ۷۵٪ (۲۰ درصد) و ۱۰۰٪ (۱۶ درصد) بود. همچنین در پایان دوره وزن نهایی تیمارها هم مورد اندازه‌گیری قرار گرفت و مشاهده شد ماهیان همه تیمارها به طور میانگین شاخص WG برابر با ۵ درصد داشته‌اند که در جدول ۱ نشان داده شده است.

۲.۳. هورمون کورتیزول

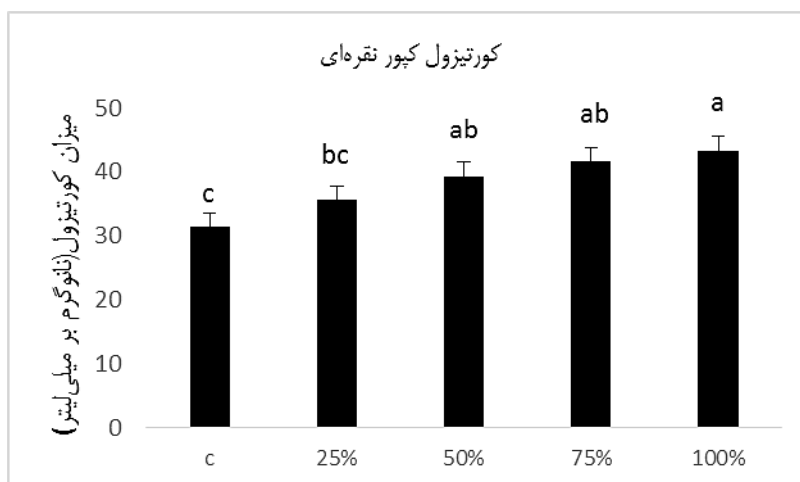
نتایج در مورد تأثیر غلظت‌های مختلف پساب شهری بر میزان کورتیزول خون در نمودار ۱ آمده است. با توجه به نتایج، مشاهده می‌شود که با افزایش غلظت پساب شهری، میزان کورتیزول خون افزایش یافته است. طبق نتایج میزان کورتیزول خون در تیمار شاهد نسبت به بقیه تیمارها کمتر بود و با افزایش غلظت پساب، میزان کورتیزول نیز به طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافته است.

۳.۳. شاخص‌های خونی

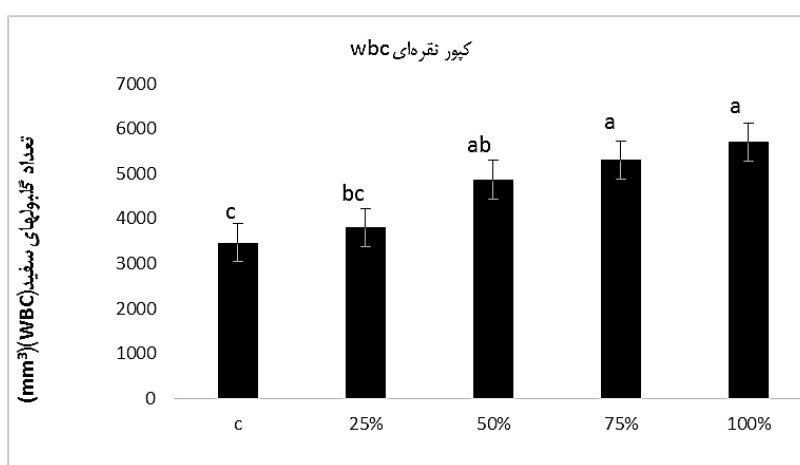
در پایان آزمایش نتایج حاصل از آنالیز واریانس یک‌طرفه شاخص‌های خونی نشان داد که با افزایش غلظت پساب، میزان هماتوکریت، هموگلوبین، حجم متوسط گلبولی، تعداد گلبول‌های قرمز و تعداد گلبول‌های سفید افزایش یافت و بین تیمارهای شاهد و ۱۰۰٪ اختلاف معنی‌داری ($P \leq 0.05$) وجود داشت

۶.۲. تجزیه و تحلیل داده‌ها

قبل از انجام آنالیز واریانس، نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Shapiro-Wilk بررسی شد. برای آنالیز داده‌ها آنالیز تجزیه واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) مورد استفاده قرار گرفت. مقایسه



شکل ۱- تغییرات میانگین (میانگین \pm SD) میزان کورتیزول (ng/ml) در خون ماهی کپور نقره‌ای در تیمارهای مختلف پس‌آب (حروف غیر مشابه اختلاف معنی‌دار را نشان می‌دهد).



نمودار ۲- تغییرات میانگین (میانگین \pm SD) میزان گلبول‌های سفید خون ماهی کپور نقره‌ای در غلظت‌های مختلف پس‌آب ($P < 0.05$). (حروف غیر مشابه اختلاف معنی‌دار را نشان می‌دهد).

جدول ۲- میانگین (میانگین \pm SD) هموگلوبین گلبولی و غلظت متوسط هموگلوبین داخل گلبول قرمز خون در ماهی کپور نقره‌ای.

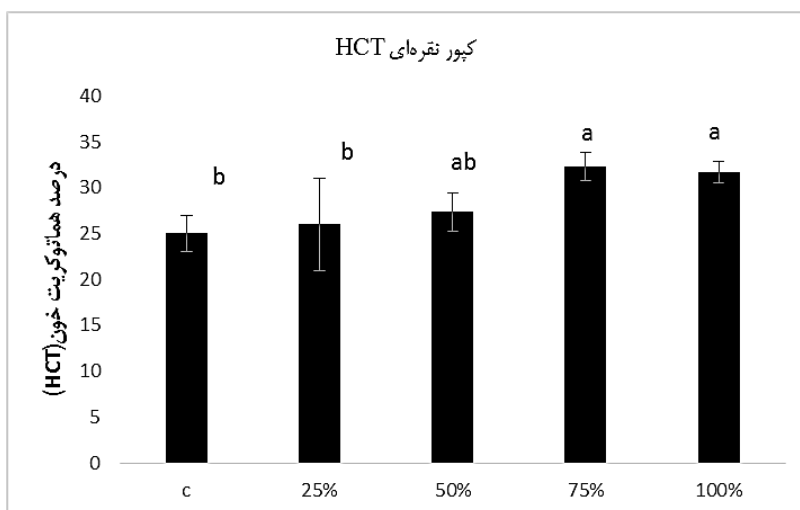
MCH	MCHC	Unit
pg	g/dl	مشخصات
59 ± 1	28 ± 2	تیمار شاهد (کپور نقره‌ای)
57 ± 1	28 ± 1	تیمار ۲۵٪ (کپور نقره‌ای)
60 ± 1	27 ± 1	تیمار ۵۰٪ (کپور نقره‌ای)
60 ± 2	26 ± 2	تیمار ۷۵٪ (کپور نقره‌ای)
59 ± 2	31 ± 2	تیمار ۱۰۰٪ (کپور نقره‌ای)

گلبولی و غلظت متوسط هموگلوبین داخل گلبول قرمز در هیچ‌یک از تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود نداشت که در جدول ۲ آمده است.

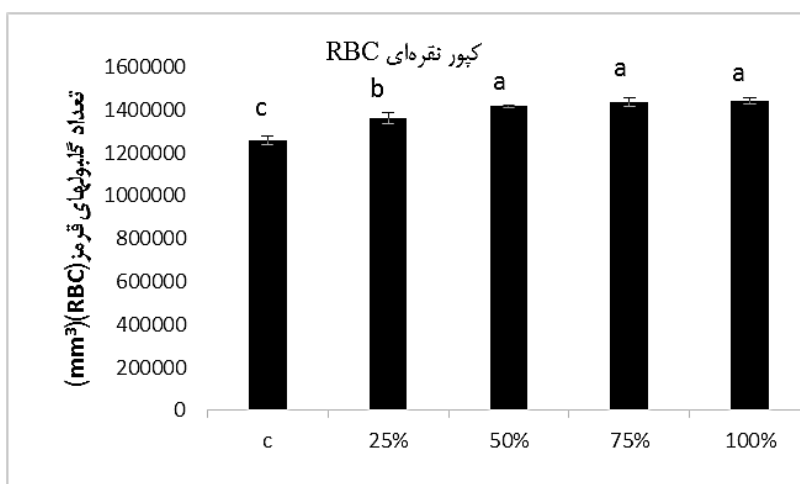
۴.۳. بافت آبشش

نتایج بافت‌شناسی آبشش ماهیان شاهد و مقایسه آن با بافت آبشش ماهیانی که تحت تأثیر

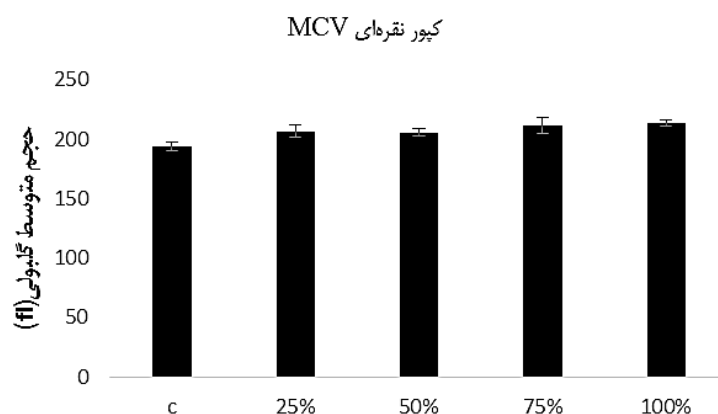
(نمودارهای ۲-۵). در گلبول قرمز و گلبول سفید از تیمار ۵۰٪ تا ۱۰۰٪ روند افزایشی جزئی بود و اختلاف معنی‌دار نبود. اما نمودار حجم متوسط گلبولی نشان داد فقط بین تیمار شاهد و بقیه تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود داشت و بین تیمارهای ۲۵٪ تا ۱۰۰٪ اختلاف معنی‌دار نبود ($P \geq 0.05$). همچنین با توجه به نتایج، مشاهده شد که بین میزان متوسط هموگلوبین



نمودار ۳- تغییرات میانگین (میانگین \pm SD) میزان هماتوکریت خون ماهی کیپور نقره‌ای در غلظت‌های مختلف پساب ($P < 0.05$). (حروف غیرمشابه اختلاف معنی‌دار را نشان می‌دهد).



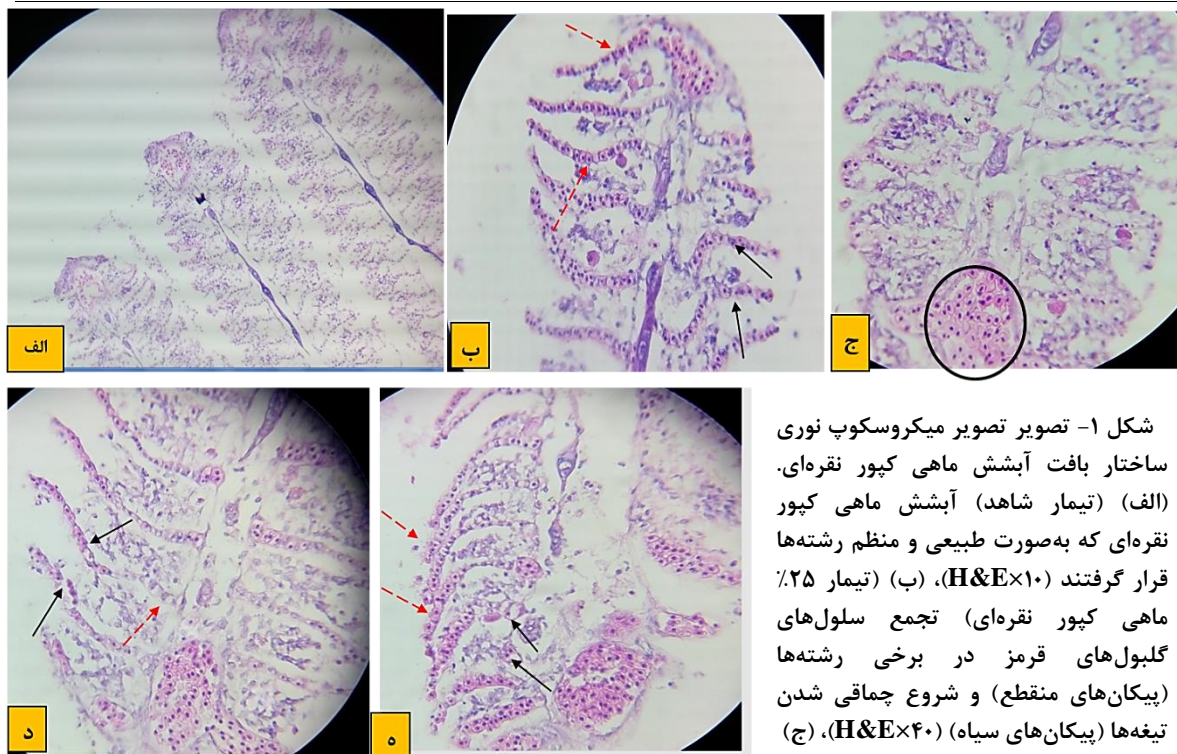
نمودار ۴- تغییرات میانگین (میانگین \pm SD) میزان گلبول‌های قرمز خون ماهی کیپور نقره‌ای در غلظت‌های مختلف پساب ($P < 0.05$). (حروف غیرمشابه اختلاف معنی‌دار را نشان می‌دهد).



نمودار ۵- تغییرات میانگین (میانگین \pm SD) حجم متوسط گلبولی خون ماهی کیپور نقره‌ای در غلظت‌های مختلف پساب ($P < 0.05$). (حروف غیرمشابه اختلاف معنی‌دار را نشان می‌دهد).

مجاور، چماقی شدن انتهای تیغه‌ها، هیپرپلازی سلول‌های پوششی و هیپرتروفی سلول‌های موکوسی

غلظت‌های مختلف پساب بودند نشان دهنده ضایعات هیستوپاتولوژیکی آبشش مانند چسبندگی تیغه‌های



شکل ۱- تصویر تصویر میکروسکوپ نوری ساختار بافت آبشش ماهی کپور نقره‌ای. (الف) (تیمار شاهد) آبشش ماهی کپور نقره‌ای که به صورت طبیعی و منظم رشته‌ها قرار گرفتند ($H\&E \times 10$)، (ب) (تیمار ۲۵٪ ماهی کپور نقره‌ای) تجمع سلول‌های گلبول‌های قرمز در برخی رشته‌ها (پیکان‌های منقطع) و شروع چماقی شدن تیغه‌ها (پیکان‌های سیاه) ($H\&E \times 40$)، (ج)

(تیمار ۵۰٪ ماهی کپور نقره‌ای) تورم گلبول‌های قرمز (دایره). ($H\&E \times 40$)، (د) (تیمار ۷۵٪ ماهی کپور نقره‌ای) از بین رفتن قسمتی از رشته‌ها (پیکان‌های سیاه) و هیپرتروفی سلول‌های موکوسی (پیکان منقطع). ($H\&E \times 40$)، (ه) (تیمار ۱۰۰٪ ماهی کپور نقره‌ای) هیپرتروفی سلول‌های کلراید (پیکان‌های سیاه)، هیپرپلازی سلول‌های موکوسی و چسبندگی تیغه‌های مجاور (پیکان‌های منقطع) ($H\&E \times 40$).

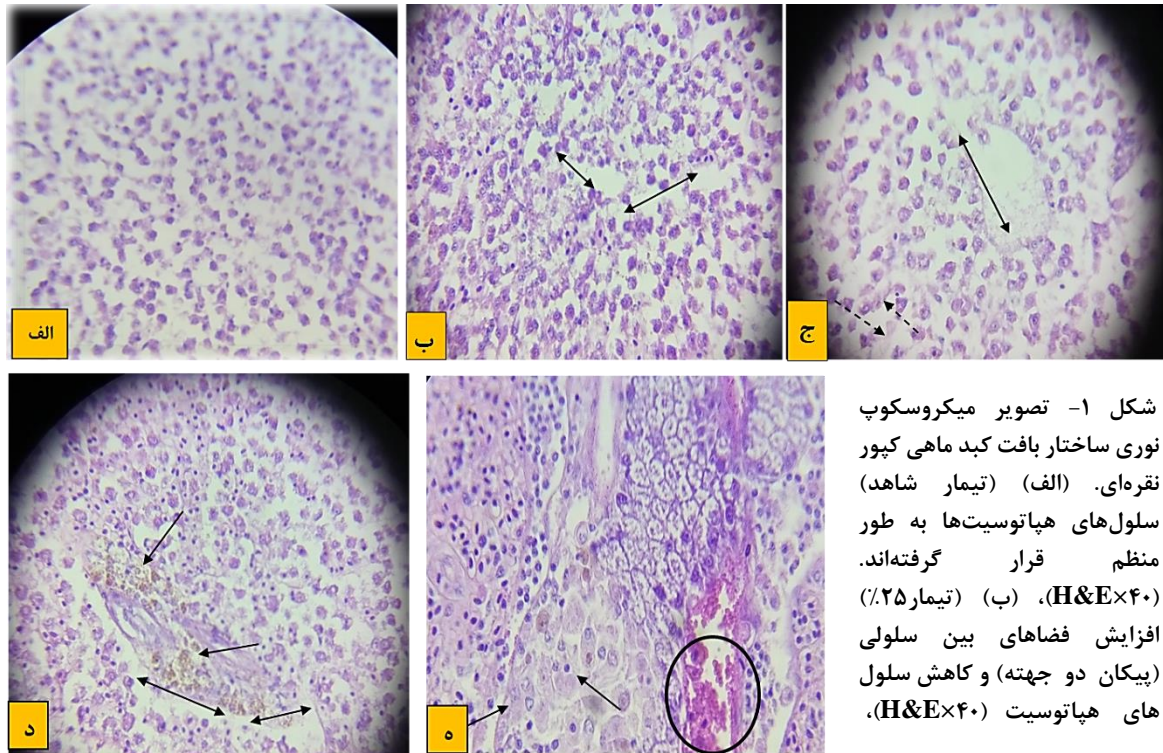
یکی از اهداف این آزمایش امکان‌سنجی زنده ماندن و سازگاری گونه کپور نقره‌ای در پساب خروجی از تصفیه‌خانه فاضلاب بود. در این تحقیق با توجه به نتایج مشاهده شد که ماهی کپور نقره‌ای امکان سازگاری و زنده‌مانی در غلظت‌های مختلف پساب را دارد. طبق نتایج، تیمار شاهد کمترین تلفات را نشان داد و بقیه غلظت‌ها هم از نظر تلفات تفاوت معنی‌داری نداشتند اما به لحاظ رشد از آن جایی که مقدار غذای کمی به ماهیان برای آلودگی کمتر تیمارها با توجه به عدم تعویض آب داده می‌شد بین تیمارها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. در تحقیقی که Agharokh و همکاران (۲۰۰۱) با هدف بررسی امکان پرورش گل‌ها و زنده‌مانی ماهیان زینتی به روش آکواریوم در پساب تصفیه‌خانه شهری بوشهر برای استفاده بیشتر و بهتر از پساب شهری انجام دادند نشان داده شد که گونه‌هایی از ماهیان زینتی نظیر پیرانای شکم قرمز و جونیت توانایی سازگاری، زنده‌مانی و رشد در پساب شهری تصفیه‌خانه بوشهر را دارا بودند. در تحقیق دیگر، Birgit Hoeger و همکاران (۲۰۰۴) که به بررسی واکنش سیستم دفاعی بدن ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بعد از قرار گرفتن در غلظت‌های مختلف از پساب

بود که با افزایش غلظت پساب، این ضایعات نیز شدیدتر بود. اما در تیمار شاهد رشته‌ها و تیغه‌های آبششی به طور منظم قرار داشتند که در شکل ۱ نشان داده شده است.

۵.۳. بافت کبد

مطالعه هیستوپاتولوژیکی کبد در گروه شاهد طبیعی بود و سلول‌های هپاتوسیت سالم و بدون آسیب بودند. نتایج حاصل از بررسی تأثیر پساب در غلظت‌های مختلف بر بافت کبد ماهی کپور نقره‌ای نشان داد با افزایش غلظت پساب، تغییراتی در ساختار کبد ماهیان به وجود آمده است که بارزترین و شدیدترین اثرات آن آتروفی (کوچک شدن سلول‌های هپاتوسیت)، تورم ابری (Cloudy swelling)، به هم خوردن نظم سلول‌ها و رکود صفراوی، می‌باشد. با افزایش غلظت پساب، اثرات فوق در بافت کبد ماهیان نیز افزایش یافته است که در شکل ۲ نشان داده شده است.

۴. بحث و نتیجه‌گیری



شکل ۱- تصویر میکروسکوپ نوری ساختار بافت کبد ماهی کپور نقره‌ای. (الف) (تیمار شاهد) سلول‌های هیپاتوسیت‌ها به طور منظم قرار گرفته‌اند. (ب) (تیمار ۲۵٪) (H&E×۴۰)، افزایش فضاهای بین سلولی (پیکان دو جهته) و کاهش سلول‌های هیپاتوسیت (H&E×۴۰)،

(ج) (تیمار ۵۰٪) افزایش فضاهای بین سلولی (پیکان دو جهته)، آتروفی (کوچک شدن) سلول‌ها و کاهش سلول‌های هیپاتوسیت (پیکان منقطع) (H&E×۴۰)، (د) (تیمار ۷۵٪) برهم خوردن نظم و افزایش فاصله بین سلول‌ها (پیکان‌های دو جهته)، تورم ابری و رکود صفراوی (پیکان‌های سیاه) (H&E×۴۰) و (ه) (تیمار ۱۰۰٪) نفوذ عروق خونی، هیپر تروفی سلول‌ها (دایره سیاه)، پیکنوزده شدن و کاربورکسیس در هسته سلول‌ها (پیکان سیاه) (H&E×۴۰).

به‌عنوان یکی از شاخص‌های استرس تلقی می‌شود (Barton, 2002). تنش‌های دیگری مانند افزایش یا کاهش شوری، کاهش اکسیژن، افزایش آمونیاک نیز عوامل دیگری هستند که در آبزیان نشان از افزایش هورمون کورتیزول دارند. در مطالعه حاضر با توجه به نتایج این تحقیق مشخص شده است که با افزایش غلظت پساب، میزان هورمون کورتیزول در کپور نقره‌ای به‌طور معنی‌داری روند افزایشی داشته است. این افزایش نشان می‌دهد که مواجهه با تیمارهای حاوی پساب یک شرایط استرسی برای ماهی به وجود آورده که باعث ترشح هورمون کورتیزول و افزایش آن در تیمارهای با غلظت بالاتر می‌باشد. به نظر می‌رسد علت این افزایش وجود برخی آلاینده‌ها از جمله فنل‌ها، سیانید، دترجنت‌ها، مالاتیون، THMs، PAHs و فلزات سنگین پساب فاضلاب می‌باشد که باعث به وجود آمدن شرایط استرسی در ماهی و بالا رفتن میزان کورتیزول شده است. در مطالعه Cataldi و همکاران (۱۹۹۸)، با تأثیر استرس بر تاس ماهی آدریاتیک (*A. naccarii*) مشخص شد که میزان کورتیزول به

فاضلاب شهری (۱۰، ۳۰ و ۷۰ درصد) به مدت ۲۷ روز پرداختند، مشاهده شد که هیچ مرگ و میری در هیچ‌کدام از تیمارها وجود نداشت. همچنین در تحقیقی دیگر که Asharitarbar و همکاران (۲۰۰۷) با هدف امکان‌سنجی بهینه‌سازی کیفیت پساب توسط آبزیان با استفاده از پساب تصفیه‌خانه شهر قم صورت گرفت، نشان داده شد که گونه‌های گامبوزیا، سیاه‌ماهی، کپور معمولی و کپور نقره‌ای و همچنین آرتمیا حداکثر ماندگاری را داشتند و این آزمون نشانگر آن بود که انواع قابل توجهی از آبزیان که پرورش آن‌ها رایج و با صرفه اقتصادی است می‌توانند با بهینه‌سازی روش‌ها در پساب ماندگاری خوبی داشته باشند که نتایج مشابه نتایج تحقیق حاضر بود.

ماهیان همواره درگیر استرس‌های گوناگون محیطی هستند. تغییر در کیفیت آب، فاکتورهای محیطی، شرایط فیزیولوژیکی خود ماهی و میزان تراکم ماهی در واحد حجم، هر یک عاملی برای ایجاد استرس در ماهی هستند (Koeypudsa and Jongjarea- njai, 2011) و سطح کورتیزول پلاسما به‌طور معمول

و یا رقیق شدن خون در زمان رویارویی ماهیان با استرس حاد می‌باشد.

در طی شرایط استرس در پاسخ به مطالبات سوخت‌وساز بالاتر، بالا رفتن هموگلوبین و هماتوکریت، افزایش ظرفیت حمل اکسیژن خون و در نتیجه اکسیژن‌رسانی به اندام‌های اصلی رخ می‌دهد (Ruane *et al.*, 1999; Dobsikova *et al.*, 2009). تعداد گلبول‌های قرمز می‌تواند تأثیر معنی‌داری بر توازن کل انرژی بدن داشته باشد. بنابراین هنگامی که ماهی فعالیت کمتری دارد شمار زیادی از گلبول‌های قرمز مورد نیاز نیستند و تعداد آن‌ها رو به کاهش می‌گذارد (Sattari, 2002). با توجه به نتایج و افزایش گلبول‌های قرمز می‌توان گفت که با افزایش غلظت پساب، میزان استرس بالا رفته، فعالیت ماهیان بیشتر شده و گلبول‌های قرمز نیز افزایش یافته‌اند. همچنین طبق نتایج مشاهده می‌شود که با افزایش غلظت پساب، میزان هماتوکریت، هموگلوبین افزایش یافته است. با توجه به موارد گفته شده این افزایش ناشی از قرارگیری در یک شرایط تنش‌زا و استرسی می‌باشد. علت افزایش هموگلوبین یا هماتوکریت در طول استرس می‌تواند ناشی از یکی از عوامل ۱- کاهش حجم پلاسما، ۲- تورم گلبول‌های قرمز و ۳- آزاد شدن تعداد بیشتری اریتروسیت در خون از بافت‌های خون‌ساز باشد (Mesbah *et al.*, 2015). تغییر هر یک از شاخص‌های فوق منجر به تغییر هماتوکریت می‌شود و تنها تغییر در حالت ۱ و ۳ قادر به تغییر غلظت هموگلوبین خون است (Benfey and Biron, 2000). با توجه به نتایج حاضر می‌توان گفت مورد ۳ باعث تغییر در غلظت هموگلوبین شده است. به‌طور معمول در صورت مواجهه جاندار با شرایط استرس تعداد گلبول‌های سفید افزایش یافته که به این پدیده لکتوسیتوزیس گفته می‌شود. اما در صورت رویارویی جاندار با شرایط استرس‌های حاد، به‌طور معمول تعداد آن‌ها کاهش یافته که به این حالت لکوپنیا گویند (Benfey and Biron, 2000). در این آزمایش با توجه به افزایش هورمون کورتیزول و با توجه به اینکه تعداد گلبول‌های سفید طبق نمودار ۲ افزایش یافته است (لکتوسیتوزیس صورت گرفته)، می‌توان نتیجه گرفت که شرایط استرسی حاد نبوده است. شاخص‌های MCH، MCV و MCHC که تابعی از تعداد

طور معنی‌داری افزایش یافته است. نتایج تحقیقات در رابطه با دیگر تنش‌ها نظیر شوری نیز نشان از افزایش هورمون کورتیزول می‌دهند. در تحقیقی که به بررسی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نوجوان قرار گرفته در معرض پساب انجام شد، تغییرات متابولیکی مورد مطالعه قرار گرفت که بر اساس شواهد، قرار گرفتن در معرض پساب شهری بر کورتیزول و پاسخ قند خون تأثیر داشت و باعث افزایش هورمون کورتیزول و قند خون شد که با نتایج حاضر مطابقت داشت (Jennifer *et al.*, 2012). همچنین در مطالعه Daniel Bernet و همکاران (۲۰۰۰) که تأثیر پساب فاضلاب بر سلامت ماهی قزل‌آلای قهوه‌ای رودخانه بررسی کردند نشان داد که میزان هورمون کورتیزول پس از مواجهه ماهی در پساب به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد.

تغییر در پارامترهای هماتولوژیکی از جمله واکنش‌هایی است که موجود در پاسخ به تنش از خود نشان می‌دهد (Rozati *et al.*, 2013). بخشی از این تغییرات وابسته به ویژگی‌های خود گلبول قرمز است مانند تغییر در اندازه سلول و میزان ذخیره هموگلوبین و بخشی دیگر به غلظت پلاسما بستگی دارد که می‌تواند اثر خود را به صورت تغییر در تعداد گلبول‌ها در واحد حجم و همچنین تغییر در میزان هماتوکریت نشان دهد (Miligan and Wood, 1989). هورمون‌های استرس ممکن است مسیرهای متابولیکی را فعال کند که نتیجه‌اش تغییر در وضعیت شیمیایی و هماتولوژیکی خون است (Mommsen, 1999; Barton, 2002). فاکتورهای خونی در ماهی به‌عنوان نشانگرهای فیزیولوژیکی واکنش به استرس بسیار استفاده می‌شوند (Cataldi *et al.*, 1998) و هماتوکریت خون به‌عنوان یکی از مهم‌ترین شاخص‌ها در تعیین سلامت و بیماری ماهیان مورد استفاده قرار می‌گیرد (Houston and Rupert, 1997). نتایج این پژوهش با یافته‌های Benfey و Biron (۲۰۰۰) مطابقت دارد. این محققین ذکر کردند که بررسی‌های هماتولوژیک می‌تواند اطلاعات ارزشمندی را در رابطه با حد تحمل جانوران در برابر شاخص‌های استرس‌زا ارائه نماید. روند تغییرات گلبول‌های قرمز از روی هماتوکریت ارزیابی می‌گردد، همچنین هموگلوبین خود شاخص مناسبی جهت تعیین پدیده غلیظ شدن

گلبول‌های قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین هستند، با تغییر در مقدار این فاکتورها تغییر می‌یابند (Rozati *et al.*, 2013) که در این بین میزان MCV با بالا رفتن غلظت پساب افزایش یافت که نشان دهنده بزرگ‌تر شدن سلول‌ها نسبت به گروه‌های دیگر است. به عبارت دیگر می‌توان این گونه بیان داشت که با افزایش سرعت تکثیر سلول‌ها، گلبول‌ها با اندازه بزرگ‌تری به داخل خون آزاد شده‌اند. با توجه به روند افزایشی تعداد گلبول‌های قرمز و هموگلوبین تحت تأثیر غلظت‌های مختلف پساب، شاخص MCH تغییرات خاصی را نداشت که نشان می‌دهد میزان هموگلوبین درون گلبول‌ها نسبت به همدیگر تفاوت معنی‌داری ندارد و گلبول‌های قرمز و هموگلوبین تقریباً به یک نسبت زیاد شدند. به عبارت دیگر می‌توان گفت سرعت تکثیر گلبول قرمز با سرعت سنتز هموگلوبین بین همه تیمارها تقریباً یکسان بوده است. از طرف دیگر با افزایش میزان هموگلوبین و هماتوکریت تحت تأثیر غلظت‌های مختلف پساب بین تیمارهای مختلف، شاخص MCHC هم مانند MCH تغییرات خاصی نداشت و بین گروه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری دیده نشد که نشان می‌دهد هماتوکریت و هموگلوبین به یک نسبت زیاد شده‌اند. در مقابل روند ثابت MCHC، افزایش هر دو پارامتر هموگلوبین و هماتوکریت نشان می‌دهد که اگرچه میزان هموگلوبین نسبت به سایر تیمارها افزایش یافته ولی مقدار آن نسبت به حجم خود گلبول تغییری نکرده است. در واقع با افزایش حجم سلول‌ها میزان هموگلوبین درون آن‌ها نسبت به حجمشان تقریباً یکسان بوده است.

تغییر در کیفیت آب، فاکتورهای محیطی، شرایط فیزیولوژیکی خود ماهی و میزان تراکم ماهی در واحد حجم، هر یک عاملی برای ایجاد استرس در ماهی هستند (Koeypudsa and Jongjareanjai, 2011). تغییرات بافت‌شناسی در موجودات زنده در اثر محرک‌های داخلی و خارجی ایجاد می‌شود که در نتیجه آشفستگی در سطح مولکولی و سازمان‌دهی زیستی رخ می‌دهد. بررسی بافتی، پارامتری جامع است که به صورت کامل وضعیت سلامت ماهی را مشخص می‌کند و می‌تواند وجود بیش از حد قابل قبول ماده آلاینده در محیط‌زیست طبیعی را مشخص نماید (Hinton and Lauren, 1990; Hassanin,)

آبشش‌های ماهیان دارای عملکردهای مختلفی همچون تبادل گازهای تنفسی، تنظیم اسمزی، دفع نیترژن و تعادل اسید-باز هستند و به جهت این عملکردها، دارای ویژگی‌های خاصی بوده که در تبادل مواد شیمیایی سمی بین ماهی و محیط اثرگذار هستند (Hibiya *et al.*, 1982). همچنین آبشش اولین اندامی است که پس از قرار گرفتن در معرض هرگونه ماده خارجی تحریک شده و عکس‌العمل دفاعی نشان می‌دهد (Poosti *et al.*, 2000). آبشش‌ها چون دارای موقعیت خارجی بوده و پر خون می‌باشند و تماس بسیار نزدیکی با آب دارند مرتباً تحت تأثیر عوامل و محرک‌های گوناگون محلول و یا معلق در آب قرار دارند و صدمه می‌بینند. به همین دلیل آبشش‌ها محیط مناسبی جهت ایجاد ضایعات اولیه می‌باشند. در تحقیق حاضر مشاهده شد که تیمار شاهد تغییرات خاصی را از خود نشان نداد و آبشش‌ها حالت نرمال و طبیعی از خود نشان دادند. با افزایش غلظت پساب در تیمار ۲۵٪ کم‌کم بروز پدیده چماقی شدن تیغه‌ها و تا حدودی

سد از ورود آلاینده‌ها جلوگیری می‌کنند (Fernandes and Mason, 2003; Mitruvic-Tutundzic and Poleksic, 1994; Mallat, 1990). به‌علاوه با افزایش فاصله بین آب و خون، اکسیژن‌گیری مختل می‌شود و ماهی برای جبران کمبود اکسیژن سرعت تنفس را افزایش می‌دهد. این هیپوکسی ایجاد شده ممکن است در برخی موارد منجر به ایجاد تغییرات بافتی شود (Fernandes and Mason, 2003).

کبد به دلیل حساسیت بالا نسبت به آلودگی‌ها، مستعد بروز صدمات ناشی از مواد شیمیایی بوده و اندام مناسبی در بررسی تأثیر محرک‌های محیطی در جانوران است (Rezvani *et al.*, 2006). آسیب‌پذیری کبد در برابر آلاینده‌ها و مواد شیمیایی به دلیل جریان خون نسبتاً آهسته‌ای است که در مقایسه با برون‌ده قلبی دارد. میزان جریان صفرا در ماهیان تقریباً ۵۰ برابر کندتر از پستانداران می‌باشد که این امر می‌تواند موجب حساسیت بیشتر ماهی نسبت به آلودگی‌ها باشد چرا که سرعت کم صفرا موجب دفع کندتر متابولیت‌ها و مواد شیمیایی از کبد می‌شود (Gingirich, 1982). کبد به‌خاطر عملکرد، موقعیت و جریان خونی که دریافت می‌کند بیشترین اثر را از آلاینده‌های موجود در آب می‌پذیرد و در مجموع عوامل متعددی می‌توانند باعث آسیب کبدی شوند که با توجه به وظایف متابولیسمی کبد چنین صدماتی می‌توانند اثرات جدی روی متابولیسم آبی داشته باشد (Langiano and Martinez, 2008). تغییرات بافتی کبد با آسیب‌های بافتی آبشش و کلیه مرتبط است. هر ماده سمی یا آلاینده که وارد بدن ماهیان می‌شود جهت ذخیره‌سازی یا انتقال توسط سیستم گردش خون وارد کبد می‌شود. در صورتی که در کبد تجمع نیابد وارد صفرا شده و جهت دفع به آبشش و کلیه منتقل می‌شود (Lindstoma-Seppa *et al.*, 1981). بنابراین تغییر در ساختار کبد نقش مهمی در ارزیابی سلامت ماهیان دارد (Heydari, 2009). در مطالعه حاضر بعد از بررسی بافت کبد ماهی کپور نقره‌ای در مواجهه با غلظت‌های مختلف از پساب، در نمونه‌های شاهد تغییر و آسیب پاتولوژیک مشاهده نشد و سلول‌های هپاتوسیت به‌طور منظم قرار داشتند. اما در تیمارهای حاوی پساب، در مقایسه با تیمار کنترل، تفاوت‌هایی مشاهده شد. نتایج این بررسی نشان داد تغییرات

پرخونی و شروع هیپرپلازی سلول‌های موکوسی مشاهده شد در غلظت‌های ۵۰٪ و ۷۵٪ این پدیده‌ها با شدت بیشتری مشاهده شدند و سلول‌های کلراید نیز افزایش پیدا کرده بودند. در بعضی قسمت‌های آبشش ماهی کپور نقره‌ای هم تعدادی از رشته‌ها آسیب دیده بودند و تورم سلول‌های موکوسی نیز مشاهده شد. در تیمار ۱۰۰٪ هم چسبندگی تیغه‌ها، هیپرپلازی، افزایش سلول‌های کلراید مشاهده شد. در کل می‌توان گفت که ضایعات ایجاد شده یک پاسخ طبیعی به شرایط محیطی ماهی تحت تأثیر محیط ناشی از پساب بوده و برای جلوگیری از ورود ماده آلاینده و مقابله با آن این پاسخ‌ها در بافت آبشش به وجود آمده و آسیب جدی برگشت‌ناپذیر یا نکروز بافتی در هیچ‌کدام از تیمارها مشاهده نشد. Thiyagarajah و همکاران (۱۹۹۶) نشان دادند تغییراتی مانند هیپرپلازی سلول‌های موکوسی، هیپرپلازی سلول‌های کلراید و تکثیر سلول‌های اپیتلیال در آلودگی میکروبی و سایر آلاینده‌ها رخ می‌دهد که با نتایج این تحقیق نیز مطابقت داشت. Camargo و Martinez (۲۰۰۷)، هیپرپلازی سلول‌های اپیتلیال، چسبندگی تیغه‌های آبششی و پرخونی را در آبشش یک گونه گرمسیری و دتریت‌خوار *Prchilodus lineatus* از رودخانه کامب در برزیل که آلوده به پساب‌های کشاورزی، صنعتی و شهری بود مشاهده کردند. در تحقیق Saberi و همکاران (۲۰۱۴) که به مطالعه ضایعات ایجاد شده در آبشش ماهی مید (گاریز) تحت تأثیر آلودگی‌های صنعتی و پساب فاضلاب شهری در سواحل غربی بندرعباس انجام شد، ضایعاتی مثل جدایی اپیتلیوم تنفسی و ایجاد فضای ادماتوس، هیپرپلازی سلول‌های اپیتلیال و چسبندگی تیغه‌های آبششی مجاور، چماقی شدن انتهای تیغه‌ها، تغییر در تعداد سلول‌های کلراید و موکوسی و... ایجاد شد. همچنین برخی نمونه‌ها نیز آلوده به انگل بودند. در تحقیق حاضر مقایسه بافت آبشش ماهیان کپور نقره‌ای در تیمار شاهد با تیمارهای حاوی پساب تغییرات متعددی را نشان داده است که طبق تحقیقات Mallat (۱۹۸۵)، این تغییرات اختصاص به آلاینده خاصی نداشته و با طیف وسیعی از آلاینده‌ها ایجاد می‌شوند که مطابق با تحقیق حاضر بود. این گونه تغییرات باعث افزایش فاصله بین جریان آب و خون شده، بنابراین مانند یک

زیستی فلزات سنگین (سرب، کادمیوم، آهن و...) را در بافت‌های ماهیچه، کبد، آبشش و پوست دو ماهی کپور معمولی و کپور نقره‌ای در سد قشلاق سندنج بررسی کردند، نتایج نشان داد که بالاترین و کمترین میزان تجمع فلزات به ترتیب در آبشش و پوست بوده است و بافت آبشش از اندام هدف و از فعال‌ترین اندام‌ها در تجمع فلزات سنگین می‌باشد. در واقع به دلیل پایین بودن فعالیت‌های متابولیکی بافت‌های ماهیچه و پوست، تجمع فلزات در این بافت‌ها نسبت به کبد و آبشش، کمتر می‌باشد. در مطالعه Naji و همکاران (۲۰۰۹) که به بررسی اثر سمیت آمونیاک بر بافت کبد پرداخته شد، نتایج بافت‌شناسی کبد نشان‌دهنده ضایعات هیستوپاتولوژیک در کبد بود که با افزایش غلظت آمونیاک ضایعات شدیدتر بود. از جمله این ضایعات در غلظت‌های بالا ادم داخل سلولی هپاتوسیت‌ها، نکروز کانونی مزمن، نکروز بافتی (انهدام بافتی)، ترومبوز عروق، حضور ملانین و صفرا و خونریزی مشاهده شد. بافت کبد برای بررسی پاتولوژی بسیار مناسب است زیرا ضایعات پاتولوژیکی ناشی از مسمومیت با آمونیاک در ماهی‌های مختلف غالباً مختص به این بافت بوده است. انجام این تحقیق نشان داد که امکان سازگاری و زنده‌مانی گونه کپور نقره‌ای در پساب خروجی از تصفیه‌خانه شهر قدس وجود دارد و این امکان نیز وجود خواهد داشت که از پساب تصفیه‌خانه شهر قدس جهت پرورش ماهیان مناسب و سازگار استفاده کرد. همچنین این مطالعه نشان داد که طی قرارگیری ماهیان در دور تحت آزمایش هیچ‌گونه آسیب جدی و نکروز بافتی در آبشش و کبد، که دو اندام مهم در تعیین سلامت آبزیان در مواجهه با آلاینده‌ها می‌باشد، وجود نداشت و ضایعات به وجود آمده برای مقابله با عامل خارجی و به دلیل وجود شرایط استرسی حاکم بر ماهی بوده است.

هیستوپاتولوژیک در کبد به صورت تورم ابری، آتروفی، افزایش فضای بین سلولی، هیپرتروفی سلول‌های هپاتوسیت، ایجاد فضای واکوئله، رکود صفراوی، بر هم خوردن نظم سلولی بروز پیدا کردند. در واقع با افزایش غلظت پساب، ضایعات ذکر شده نیز بیشتر و واضح‌تر بروز پیدا کردند. همچنین بررسی‌ها نشان داد که در هیچ‌کدام از تیمارها آسیب جدی و برگشت‌ناپذیر وجود نداشته و تغییرات به وجود آمده ناشی از قرارگیری ماهی در یک محیط نامتعارف و استرسی و مقابله با شرایط موجود می‌باشد. Patricia و همکاران (۲۰۱۴) در تحقیقی به بررسی شواهد مستقیم از تأثیرات هیستوپاتولوژیک تخلیه پساب در ماهی‌های ساکن قطب جنوب پرداختند که در این مطالعه، تغییراتی با درجات و شدت متفاوت در کبد ماهی‌ها رخ داد. آسیب‌هایی که اغلب در بافت کبد مشاهده شد عبارت‌اند از: نکروز همراه با التهاب، حضور چربی، واکوئله شدن، حضور کیست در کبد و... که در سایت‌های نزدیک به دهانه پساب این آسیب‌ها شدیدتر بود. در تحقیق Askari Sari و همکاران (۲۰۱۵) که به بررسی مقایسه فلز آرسنیک در عضله و کبد ماهیان پرورشی کپور معمولی، کپور نقره‌ای، کپور علفخوار و کپور سرگنده پرداختند، مشاهده شد که میزان این عنصر در کبد این ماهیان بالاتر از عضله بود. Shakoori و Ebdali (۲۰۱۵) در مطالعه اثر سمیت حاد روی نیترات بر بافت کبد ماهی فیتوفاگ مشاهده کردند که روی سبب تغییر شکل و بر هم خوردن نظم پارانیشیم کبدی و واکوئله شدن سلول‌های کبدی و در نهایت نکروزیس می‌گردد. این تغییرات با افزایش غلظت روی شدت بیشتری پیدا می‌کند و در نهایت منجر به مرگ ماهی شده است. اما در مطالعه ما اثری از نکروز و مرگ ماهی در اثر پساب وجود نداشت. در تحقیقی که Mansouri و همکاران (۲۰۱۴) تجمع

References

- Abedi koopaei, J. Bakhtiarifar, A., 2004. Effect of treated wastewater on hydraulic characteristics of emitters in drip. *Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources* 3, 33-42.
- Askari sari, A., Mohammadi, M., 2015. Comparison of metal arsenic in muscle and liver breeding of common carp, silver carp, grass carp, big head carp and rainbow trout in Ahvaz and Shahrekord. *Wetland Ecobiology* 23, 69-76.
- Ashari tabar, N., Zahedi movahed, H., Mohaghegh, M.R., Bakhtiari, H., 2010. Feasibility optimize the quality of effluent by aquatic. *Environmental Science* 48, 3-12.
- Agharokh, A., 2001. Exploring the possibility of growing flowers and ornamental plants in the aquaponic method of sewage treatment plant in Bushehr in the pilot house. *Journal of Water and Wastewater* 19, 47-53

- Barton, B.A., 2002. Stress in Fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology* 42, 517-525.
- Bayunova, L., Barannikova, I., Semenkova, T., 2002. Sturgeon stress reactions in aquaculture. *Journal of Applied Ichthyology* 18, 397-404.
- Benfey, T.C., Biron, M. 2000. Acute stress response in triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Aquaculture* 184, 167-176
- Bernet, D., Schmidt-Posthaus, H., Wahli, T., Patricia Burkhardt-Holm, P., 2000. Effects of wastewater on fish health: an integrated approach to biomarker responses in brown trout (*Salmo trutta*). *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* 8, 143-151.
- Hoeger, B., Van den Heuvel, M.R., Hitzfeld, B.C., Dietrich, D.R., 2004. Effects of treated sewage effluent on immune function in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 70, 345-355.
- Camargo, M.M. and Martinez, C.B., 2007. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. *Neotropical Ichthyology* 5, 327-336.
- Cataldi, E., Di Marco, P., Mandich, A., Cataudella, S., 1998. Serum parameters of Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* (Pisces: Acipenseriformes): effects of temperature and stress. *Comparative Biochemistry and Physiology* 121, 351-354.
- Chen, C., Wooster, G.A., Bowser, P.R., 2004. Comparative blood chemistry and histopathology of Tilapia infected with *Vibrio vulnificus* or *Streptococcus iniae* or exposed to carbon tetrachloride, gentamicin or copper sulfate. *Aquaculture* 239, 421-443.
- Davis, K.B., 2004. Temperature effects physiological stress responses to acute confinement in sunshine bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 139, 433-440.
- Dobsikova, R., Svobodova, Z., Blahova, j., Modra, H., Velisek, J., 2009. The effect of transport on biochemical and haematological indices of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Czech Journal of Animal Science* 54, 510-518.
- Fernandes, M.N., Mazon, A.F., 2003. Environmental effects on fish gill morphology. *Physiological Zoology* 64, 4-25.
- Gingirich, W.H., 1982. Hepatic toxicology in fishes. In: *Aquatic Toxicology*, ed. L.F. Weber, New York: Plenum Press. pp. 55-105.
- Goos, H.J.T., Consten, D., 2002. Stress adaptation, cortisol and pubertal development in the male common carp, *Cyprinus carpio*. *Molecular and Cellular Endocrinology* 197, 105-116.
- Hassanin, S.I.A., 2008. Metals residues, histological alterations and cooking methods of fish cultured in wastewater ponds. 8th International Symposium on *Tilapia* in Aquaculture. Cairo International Convention & Exhibition Center (CICC), Cairo.
- Ham E.H.V., Anholt R.D.V., Kruitwagen G., Imsland A.K., Foss A., Sveinsbo B.O., FitzGerald R., Parpoura A.C., Stefansson S.O. and Bonga S.E.W., 2003. Environment affects stress in exercised turbot. *Comparative Biochemistry and Physiology* 136, 525-538.
- Henry J.B., 1996. Clinical diagnosis and management by laboratory methods. Academic Press, New York, 1584 p.
- Heydari jame bozorgi, F., 2009. Effects of the soluble fraction of crude oil on liver, gills and kidney of the Caspian Sea Kutum. Master's Thesis, Tarbiat Modarres University, 75 p.
- Hibiya, T., Yokote, M., Oguri, M., Sato, H., Takashima, F., Aida, K., 1982. An atlas of fish histology. Normal and pathological features. 2nd edition. Gustav Fischer Verlag. 284 p.
- Hinton, D.E., Lauren, D.J., 1990. Liver structural alterations accompanying chronic toxicity in fishes: potential biomarkers of exposure. In: *Biomarkers of Environmental Contamination*. (Eds.) J.F. McCarthy and L.R. Shugart. Lewis Publishers. USA.
- Hoseinian, M., 2002. Re-use of purified wastewater in agriculture, aquaculture, industry and artificial recharge of groundwater, Oloome rooz Press, 240 p.
- Houston, A.H., Rupert, R., 1997. Immediate response of hemoglobin system of gold fish (*Cyprinus auratus*) to tempera change. *Canadian Journal of Zoology* 54, 1731-1741.
- Jennifer S.I., Mathilakath M.V., Mark R.S., 2012. Tissue-specific metabolic changes in response to an acute handling disturbance in juvenile rainbow trout exposed to municipal wastewater effluent. *Aquatic Toxicology* 108, 53-59.
- Koeypudsa, W., Jongjareanjai, M., 2011. Impact of water temperature and sodium chloride (NaCl) on stress indicators of hybrid catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell x *C. macrocephalus*, Gunther). *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 33, 369-374.
- Langiano, V., Martinez, C.B., 2008. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 147, 222-231.
- Lindstoma-Seppa, P., Koivussri, V., Hanninen, D.O., 1981. Exterahepatic xenobiont metabolism in north European freshwater fish. *Comparative Biochemical Physiology* 69, 291-299.
- Ma, J. Liu, W., 2002. Effectiveness of ferrate peroxidation in enhancing the coagulation of surface waters. *Water Research* 36, 4959-4962.
- Mallat, J., 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: A statistical review. *Canadian Journal of Fish and Aquatic Sciences* 42, 630-648.
- Milligan, C.L., Wood, C.M., 1982. Disturbances in hematology, fluid volume distribution and

- circulatory function associated with low environmental pH in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *The Journal of Experimental Biology* 99, 397-415.
- Mansouri, B., Majnooni, F., Maleki, A., Rezaei, Z., Azadi, N., Gharibi, F., 2014. Bioaccumulation of lead, cadmium, zinc, iron, nickel, chromium and copper in muscle tissue, liver, gills and skin of silver carp and common carp in winter Dam in Sanandaj. *Journal of Medical Sciences* 12, 26-35.
- Mesbah, M., Takavarian, M., Karami, A., Molayem rafter, T., Nazari, M., The effects of salinity stress on some blood parameters and cortisol in fish Benny (*Mesopotamichthys Sharpeyi*). *Journal aquatic ecology* 5, 68-78.
- Mommsen, T.P., Vijayan, M.M., Moon, T.W., 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 9, 211-268.
- Monzavi, M.T., 1987. Wastewater collection, Tehran University Press, Tehran. 268 p.
- Morales, A.E., Cardenete, G., Abellan, E., Garcia-Rejon, L., 2005. Stress related physiological responses to handling in common dentex (*Dentex dentex* Linnaeus, 1758). *Aquaculture Research* 36, 33-40.
- Naji, T., Khara, H., Rostami, M., Nasiri, A., 2009. The effect of ammonia on the liver toxicity of common carp. *Journal of Environmental Science and Technology* 11, 131-148.
- Patricia, A.C., Catherine, K.K., Jonathan, S.S., Julie A.M., 2014. Direct evidence of histopathological impacts of wastewater discharge on resident Antarctic fish (*Trematomus bernacchii*) at Davis Station, East Antarctica. *Marine Pollution Bulletin* 87, 48-56
- Poleksic, V., Mitrovic-Tutundzic, V., 1994. Fish gills as a monitor of sub lethal and chronic effects of pollution. pp: 339-352. In: Müller, R. & R. Lloyd (Eds.). Sub lethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish. Oxford. Fishing News Books.
- Poosti, A., Adibmoradi, M., 2000. Histological comparison and Hystvtknyk, Tehran University Press, 531 p.
- Qadir, M., Wichelns, L., Raschid-Sally, P.G., Drechsel, P., Bahri, A., 2010. The challenges of wastewater irrigation in developing countries. *Agricultural Water Management* 97, 561-568.
- Rezvani, G. S., Sharifpour, A., Kazemi, R., 2006. Histopathologic effects of environmental factors on the Caspian Sea Hunter bony fishes (salmon and sea perch). Iranian Fisheries Research Organization, Technical report, 50 p.
- Ruane, N.M., Wendelaar Bonga, S.E., Balm, P.H.M., 1999. Differences between rainbow trout and brown trout in the regulation of the pituitary-interrenal axis and physiological performance during confinement. *General and Comparative Endocrinology* 115, 210-219.
- Rozati, A., Haghi, N., Avarjeh, S., 2013. Temperature and salinity stress effects on blood factors of Carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Physiology and Biotechnology of aquatic animals* 1, 95-113.
- Saberi, M., Abdi, R., Morovati, H., Ronagh, M., Dehghani, R., 2014. Garyz fish gill tissue lesion studies (*Liza klunzingeri*) affected by industrial pollution and municipal wastewater in the west coast of Bandar Abbas. *Journal of Animal Environment* 6, 225-231.
- Sartaj, M., Fathollahi Dehkordi, F., Filizadeh, Y., 2004. Survey of pollutant Resources, self-purification and elimination of industrial agricultural and municipal pollutants. *Iranian Natural Resources Journal* 58, 623-634.
- Sattari, M., 2002. Ichthyology (1) Anatomy and physiology. University of Guilan, 225 p.
- Shakoori, M., Ebdali, S., 2015. Effects of acute toxicity on fish gills and liver tissue nitrate of silver carp. *Scientific Research and Essays* 8, 1324-1327.
- Tanck M.W.T., Booms G.H.R., Eding, E.H., Bonga, S.E., Komen J., 2000. Cold shocks: a stressor for common carp. *Journal of Fish Biology* 57, 881- 894.
- Tiyagarajah, A., Hartley, W.R., Major, S.E., Broxon, M.W., 1996. Gill histopathology of two species of Buffalo fish from a contaminated swamp. *Marine Environmental Research* 42, 261-266.
- Torreillas, S., Makol, A., Caballero, M.J., Montero, D., Gines, R., Sweetman, J., zquierdo, M.S., 2011. Improved feed utilization, intestinal mucus production and immune parameters in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides (MOS). *Aquaculture Nutrition* 17, 223-233
- Van der Oost, R., Beber, J., Vermeulen., N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13, 57-149.
- Yargholi, B., 2010. Environmental regulations and waste water re-use return. Naghsh Mehr press, Tehran. 535 p.

