

## مطالعه بافت شناسی آبشش ماهیان فلاور هورن تغذیه شده با سطوح مختلف هیدرولیز پوست گاو

امیر ویسی<sup>\*</sup>، عبدالرحیم وثوقی<sup>۲</sup> و شهرام دادگر<sup>۳</sup>

۱ و ۲- گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

۳- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۵/۱۷

### چکیده

مطالعه حاضر به منظور بررسی تغییرات احتمالی ساختار آبشش در ماهیان فلاور هورن (Flower horn) تغذیه شده با جیره‌های حاوی سطوح مختلف هیدرولیز پوست گاو صورت گرفت. برای این منظور، ابتدا تعداد ۲۱۶ قطعه ماهی فلاور هورن با میانگین وزنی  $(0/95 \pm 0/2)$  گرم و میانگین طولی  $(3/7 \pm 0/2)$  سانتی‌متر به مدت ۱۰۰ روز با سطوح ۲۰ درصد ( $T_1$ )، ۴۰ درصد ( $T_2$ )، ۶۰ درصد ( $T_3$ )، ۸۰ درصد ( $T_4$ ) و ۱۰۰ درصد ( $T_5$ ) جایگزینی هیدرولیز پوست گاو به جای آرده‌ماهی، مورد تغذیه قرار گرفتند. جیره گروه کنترل ( $T_0$ ) فاقد هیدرولیز پوست گاو بود. نتایج نشان داد که آبشش ماهیان تغذیه شده با سطوح صفر، ۲۰ و ۴۰ درصد هیدرولیز پوست گاو سالم بود و عارضه خاصی در آنها مشاهده نگردید. در آبشش ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ۶۰ درصد هیدرولیز پوست گاو عوارضی مانند هایپرپلازیای خفیف در پایه تیغه‌های ثانویه و ضایعات جلدی خفیف مشاهده گردید. در برخی از نمونه‌های بافت آبشش ماهیان تیمار ( $T_4$ ) برخی از تیغه‌های ثانویه عریض شده بودند. در آبشش ماهیان تیمار ( $T_5$ ) عوارض مشاهده شده بیشتر بود. ضایعات جلدی در تیغه‌های ثانویه، کوتاه و بلند شدن برخی از رشته‌های ثانویه و آنیوربسم (پرخونی) در انتهای تیغه‌های ثانویه از جمله عوارضی بودند که در نمونه‌های بافت آبشش ماهیان تیمار ( $T_5$ ) مشاهده گردید. از یافته‌های فوق می‌توان دریافت که با افزایش سطوح هیدرولیز پوست گاو از سطح ۴۰ درصد، با افزایش عوارض نامطلوب در آبشش همراه بود.

واژگان کلیدی: بافت شناسی آبشش، هیدرولیز پوست گاو، ماهی فلاورهورن (Flower horn).

## مقدمه

برای ارزیابی میزان سلامت در ماهیان، شاخص‌های فیزیولوژیکی متفاوتی وجود دارد که از جمله آنها بافت شناسی است (Jouni *et al.*, 2003). بافت شناسی امکان ارزیابی کاملی از سلامتی موجود زنده فراهم می‌کند (Witters *et al.*, 1998). آبشش ماهی‌ها به عنوان اندام مبادله گازهای تنفسی، تنظیم اسمزی، تنظیم اسید و باز، دفع مواد زائد نیتروژنی و تنظیمات غدد درون‌ریز است. آبشش به دلیل داشتن میکروفیلانمت‌ها و لایه اپیتلیالی نازک و حساس، یکی از بافت‌های بازتاب دهنده وضعیت سلامت ماهی است (Bais & Lokhande, 2012). هیدرولیز پوست گاو بخشی از جداره داخلی پوست گاو با درصد پروتئین بالا است. این ماده دارای مواد مغذی ارزشمند و اسید آمینه‌های مهمی مانند متیونین، تریپتوفان، لیزین، هیستیدین، والین، لوسین، آرژنین، پرولین، سرین و سیستئین می‌باشد. به همین دلیل می‌تواند نقش مهمی را در جیره غذایی آبزیان داشته باشد. میزان تولید جهانی سالانه این فراورده در سال ۲۰۱۳، حدود ۲۳۰۰۰۰ تن بوده است و در حال حاضر در ایران، ماهانه به‌طور میانگین بین ۱۵۰-۱۲۰ تن از این ماده با روش هیدرولیز اسیدی ۸۵ درصد تولید می‌شود. ماهی فلاور هورن با نام تجاری (Flower horn) متعلق به خانواده (Cichlidae) از گونه‌های زینتی پرطرفدار در جهان محسوب می‌شود. مولد نر این وارسته، گونه *Amphilophus citrinellus* با نام تجاری میداس است و مولد ماده گونه *Cichlasoma trimaculatum* با نام تجاری تریماکو می‌باشد که هر دو متعلق به خانواده (Cichelidae) می‌باشد (دادگر و همکاران، ۱۳۹۰). با توجه به توسعه صنعت تکثیر و پرورش ماهیان زینتی در کشور ضرورت شناخت ساختمان بافت شناسی دستگاه‌های مختلف ماهیان بیش از پیش احساس می‌شود. از طرفی با توجه به اهمیت ویژه آبشش در بازتاب بیماری‌های مختلف، شرایط استرس و وضعیت سیستم ایمنی در ماهی (Evans, 2005) و

نظر به اینکه در کشور در بررسی‌های کتابخانه‌ای گزارشی راجع به بررسی ساختارهای بافتی آبشش ماهی فلاور هورن به دست نیامد، پژوهش حاضر با هدف بررسی اثرات هیدرولیز پوست گاو بر وضعیت آبشش در ماهی زینتی فلاورهورن (Flower horn) صورت گرفت. نتایج حاصل مکمل یافته‌های موجود در دنیا در این زمینه بوده و احتمالاً منبع مناسبی را جهت ارزیابی کلی این فراورده فراهم می‌آورد.

## مواد و روش‌ها

تعداد ۲۱۶ قطعه ماهی فلاور هورن (Flower horn) با میانگین وزن و طول اولیه به ترتیب  $0.7 \pm 0.95$  گرم و  $3.7 \pm 0.2$  سانتی‌متر از یک والد تهیه و در قالب ۶ تیمار، هرکدام با ۳ تکرار در ۱۸ عدد آکواریوم در یک کارگاه شخصی واقع در شهرستان قصرشیرین به طور کاملاً تصادفی رهاسازی شدند. هرکدام از آکواریوم‌ها دارای ابعاد  $45 \times 30 \times 25$  سانتی‌متر بود. در هر آکواریوم ۱۲ قطعه ماهی قرار داده شد. سپس ماهی‌ها با شش جیره غذایی ایزوکالریک با سطوح مشخص هیدرولیز پوست گاو شامل: تیمار یک ( $T_1$ ) حاوی ۲۰ درصد هیدرولیز پوست گاو، جیره دو ( $T_2$ ) حاوی ۴۰ درصد هیدرولیز پوست گاو، جیره سه ( $T_3$ ) حاوی ۶۰ درصد هیدرولیز پوست گاو، جیره چهار ( $T_4$ ) حاوی ۸۰ درصد هیدرولیز پوست گاو، جیره پنج ( $T_5$ ) حاوی ۱۰۰ درصد هیدرولیز پوست گاو و جیره شاهد ( $T_6$ ) حاوی صفر درصد هیدرولیز پوست گاو به مدت ۱۰۰ روز مورد تغذیه قرار گرفتند (به اتمانی، ۱۳۹۰). جیره‌های غذایی با استفاده از مواد اولیه به شرح جدول (۱) و بر مبنای فرمول تهیه شده توسط نرم افزار  $\frac{1}{2}$  win feed تهیه گردید (به اتمانی، ۱۳۹۰). منبع تأمین آب مورد استفاده، آب شرب خانگی بود. دما به‌صورت روزانه و میزان اکسیژن هم با دستگاه اکسیژن متر آزمایشگاهی مدل (JENWAY 970) قبل از زیست‌سنجی در ساعت ۸ صبح کنترل می‌شد، pH با دستگاه pH متر مدل (DEVER UB-10) به صورت

شناسی بیمارستان امام خمینی (ره) کرج منتقل شده و با عصاره گل میخک ۵۰ میلی گرم در لیتر بیهوش شدند (Ellif, 2000). سپس آبشش‌ها جدا شده و به مدت ۴۸ ساعت در فرمالین ۱۰ درصد به عنوان فیکساتور، تثبیت شدند. تهیه مقاطع میکروسکوپی و رنگ آمیزی به روش H & E طبق روش‌های استاندارد (پوستی و مرادی، ۱۳۹۱) صورت پذیرفت و مقاطع تهیه شده با استفاده از میکروسکوپ نوری ساخت شرکت REICHERT-JUNG مورد بررسی قرار گرفتند (Ellif, 2000).

هفته‌ای اندازه‌گیری شد. میانگین دمای آب کارگاه  $27 \pm 1$  درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول  $6/5 \pm 0/5$  میلی‌گرم در لیتر، pH  $7/1 \pm 0/5$  و سختی آب  $168 \pm 1/5$  میلی‌گرم در لیتر بود. ماهیان سه بار در روز (۸ صبح و ۴ بعداز ظهر و ۱۲ شب) به اندازه ۳ درصد بیومس خود تغذیه شدند (به اتمانی، ۱۳۹۰). پس از گذشت ۱۰۰ روز، به مدت ۲۴ ساعت غذاهای قطع گردید و از بین ماهیان تیمارهای مختلف ۹ قطعه ماهی به صورت تصادفی (هر آکواریوم ۳ قطعه) جهت تهیه نمونه‌های آبشش انتخاب گردید. ماهیان انتخاب شده جهت تهیه نمونه‌های بافت به آزمایشگاه بافت

جدول ۱- اجزای جیره غذای ساخته شده برای ماهی فلاور هورن (Flower horn) بر حسب درصد،

فرموله شده توسط نرم افزار win feed 2.8

مواد	تیمارها	(/۲۰)	(/۴۰)	(/۶۰)	(/۸۰)	(/۱۰۰)	(شاهد)
آرد ماهی کلیکا	۲۹/۴۲	۲۳/۱۷	۱۶/۰۶	۷/۶۱	۰	۳۴/۸۳	
آرد گندم	۱۳/۶۴	۱۲/۶۲	۲۱/۲	۱۱/۴۷	۱۱/۵۸	۱۰/۵۸	
هیدرولیز پوست گاو	۷	۱۶/۸	۲۴/۲۹	۲۸/۶۴	۳۱/۳۲	۰	
گلوتن گندم	۲۵/۷	۲۴/۳۳	۱۹/۹۵	۲۱/۵۸	۳۰/۹	۳۳/۷	
روغن ماهی کلیکا	۴/۰	۴/۱	۴/۵	۴/۷۵	۶/۶	۶/۹	
افزودنی	۱۶	۱۷/۹۲	۱۶	۱۶	۱۸/۴	۱۶	
دی کلسیم فسفات	۳/۴۰	۳/۳	۲/۸۰	۰۲/۵۵	۱	-	

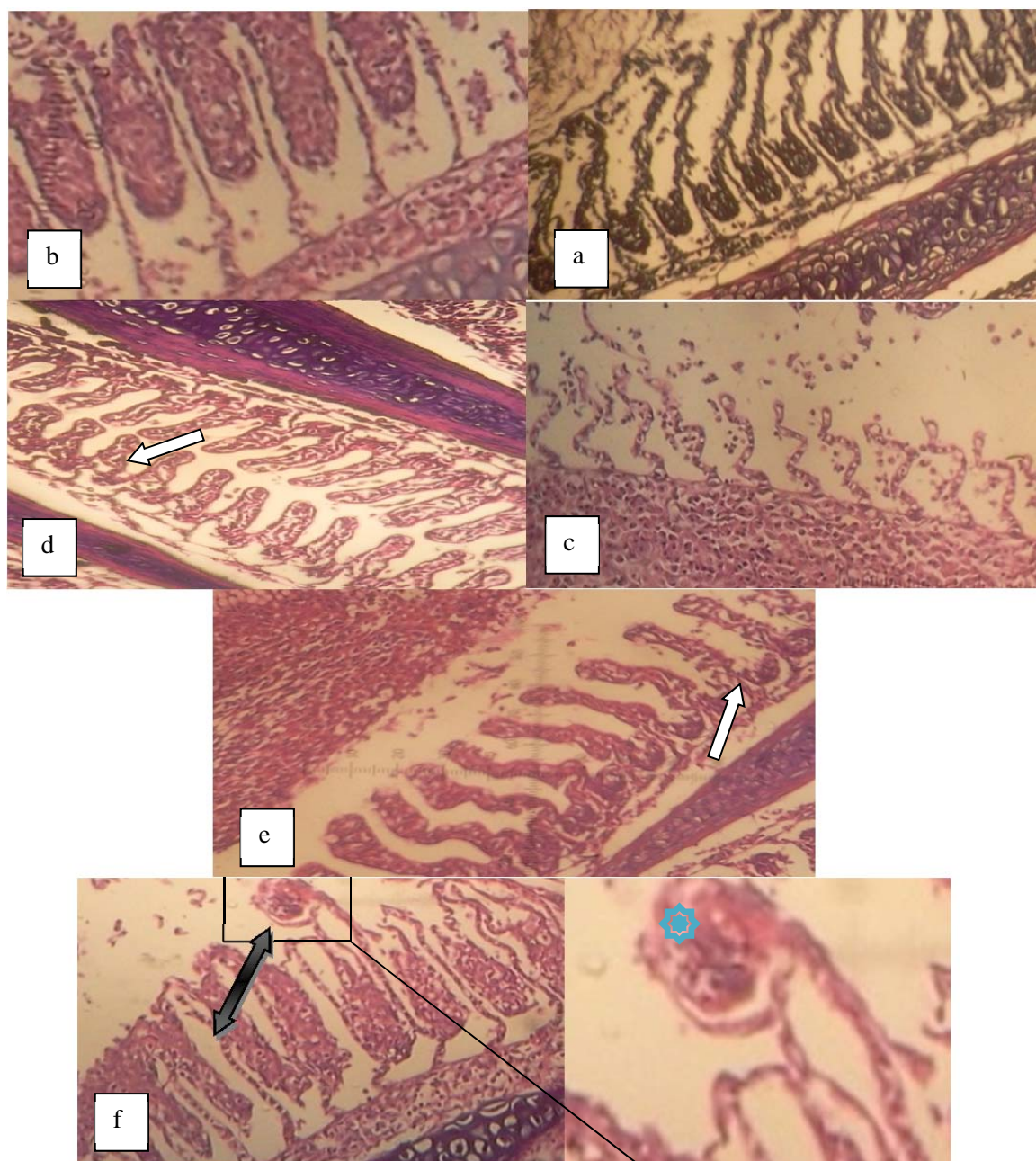
\* مواد افزودنی شامل: هم بند ۳ درصد- لیزین ۱ درصد، متیونین ۱ درصد- آستاگزانتین ۲ درصد - ضدقارچ ۰/۵ درصد- پیش مخلوط معدنی ۲/۵ درصد- پیش مخلوط ویتامین ۳ درصد- آنتی اکسیدان ۱ درصد.

## نتایج

قابل توجهی بود. در بافت آبشش برخی از ماهیان تیمار  $T_3$  (شکل ۱-d)، در مقایسه با تیمار گروه شاهد بعضی از تیغه‌های ثانویه نسبت به لاملاهای دیگر اندکی عریض‌تر بودند. تغییرات مشاهده شده در تیمارهای  $T_4$  (شکل ۱-e) و  $T_5$  (شکل ۱-f) بیشتر بود. پایه برخی از تیغه‌های ثانویه آبشش مربوط به برخی از ماهیان تیمار  $T_4$  دچار هایپرپلازی شده بودند. در نمونه‌های آبشش برخی از ماهیان تیمار  $T_5$  برخی از لاملاها حالت چماقی پیدا کرده بودند که با آنیورسم (پرخونی) همراه بود. همچنین برخی از لاملاها نسبت به

نتایج مربوط به تغییرات بافت آبشش ماهیان تغذیه شده با جیره‌های حاوی سطوح مختلف هیدرولیز پوست گاو در شکل (۱) نشان داده شده است. به طور کلی بافت آبشش در ماهیان این مطالعه سالم بود اما تغییرات بافتی محدودی نیز در آبشش برخی از ماهی‌های تیمارهای مختلف دیده شد که البته عارضه پاتولوژیک جدی محسوب نمی‌شوند. بافت آبشش در ماهیان تیمار  $T_1$  (شکل ۱-a) و تیمار  $T_2$  (شکل ۱-b) در مقایسه با تیمار شاهد (شکل ۱-c) فاقد تغییرات

لاملاهای دیگر کوتاه‌تر بودند.



شکل ۱- بافت آبشش در ماهیان فلاور هورن (Flower horn) تغذیه شده با سطوح مختلف هیدرولیز پوست گاو، b و c) فاقد عارضه قابل توجه، d) عریض شدن لاملا (فلش سفید)، e) هایپرپلازی در پایه لاملا (فلش سفید)، f) کوتاه و بلند شدن بعضی از لاملاها (فلش سیاه)، چماقی شدن و آنیورسم در انتهای لاملا، بزرگنمایی  $\times 10$

### بحث و نتیجه گیری

با بررسی نمونه‌های بافت آبشش ماهیان فلاور هورن در این مطالعه، با افزایش مقدار هیدرولیز پوست گاو در

جیره غذایی از سطح ۴۰ درصد، تغییراتی مانند هایپرپلازی خفیف و ضایعات جلدی در بعضی از تیغه‌های ثانویه (شکل ۱- e)، تغییر در ضخامت و اندازه برخی از تیغه‌ها و آنیورسم در انتهای برخی از

تیغه‌های ثانویه آبششی ماهیان دیده شد (شکل f-1). در جیره غذایی آبزیان، ضایعات کشتارگاهی از نظر داشتن منابع پروتئینی بالا و نیز غنی بودن آنها از نظر ویتامین‌ها، مواد معدنی و آنتی اکسیدان‌ها، دارای اهمیت بوده و جایگاه ویژه‌ای در بین مباحث تغذیه‌ای دارد (Barlow, 1997) اما تا کنون مطالعه جامعی پیرامون هیدرولیز پوست گاو و اثرات مختلف آن بر جنبه‌های زیستی، رشد و سلامت ماهی صورت نگرفته است؛ بنابراین امکان مقایسه این بخش از مطالعه با نتایج کار دیگر پژوهشگران فراهم نمی‌باشد. در سال 2003 در مطالعه‌ای که توسط Hoda و Hasan انجام گرفت، اثرات شوری و آلودگی رودخانه قارون بر روی بافت آبشش ماهی تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*) مورد بررسی قرار گرفت. مشاهدات نشان داد بافت اپیتلیوم تیغه‌های اولیه دچار هایپرپلازی شده و تعداد سلول‌های کلراید و موکوس موجود در بین رشته‌های آبشش افزایش یافته است. Munira و همکاران در سال ۲۰۰۹ گربه ماهیان *Heterropneustes fossilis* را به مدت ۲۴ ساعت در معرض ۵۰ درصد اتیل الکل جدا شده از عصاره گیاه *Madhuca indica* که از آن برای تهیه روغن استفاده می‌شود، قرار دادند و سپس تغییرات بافت آبشش، کبد و روده این ماهیان را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج بافت آبشش این ماهیان عوارضی مانند آدم در تیغه‌های اولیه، کوتاه و بلند شدن برخی از تیغه‌های ثانویه و نکروز بافت اپیتلیال را نشان داد. در مطالعه‌ای که توسط (Ellif, 2000) بر روی بافت آبشش صورت گرفت، تعدادی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) به مدت ۹۶ ساعت در معرض دوزهای ۰/۰۲۹ mg/l و ۰/۰۴۱ mg/l ماده سمی Deltametherin قرار گرفتند. در بررسی نتایج بافت شناسی آبشش ماهیان هر دو تیمار، بروز ضایعات جلدی و نکروز آبشش‌ها، آنیورسم (پرخونی) در تیغه‌های ثانویه و هایپرپلازی در بافت اپیتلیال به وضوح قابل مشاهده بود. Erkmen و همکاران (2000) در بررسی بافت آبشش ماهیان زینتی (*Lepistes*

*reticulatus* که در معرض دوزهای مختلف سم شیمیایی Cyphenothrin قرار گرفته بودند، عوارضی مانند آدم یا خیز لایه اپیتلیال تیغه‌های اولیه، کوتاه شدن تیغه‌های ثانویه و بروز ضایعات نکروز مانند در این تیغه‌ها را مشاهده کردند. آبشش در ماهیان یک اندام بسیار حیاتی برای انجام اعمالی نظیر تنفس، تنظیم اسمزی و دفع مواد زائد می‌باشد. اختلالات تنفسی یکی از مهم‌ترین نشانه‌های اولیه آسیب به آبشش محسوب می‌گردد. تغییرات بافتی که در یک ماهی در شرایط نامساعد و استرس به وقوع می‌پیوندد، در واقع حاصل عملکرد سیستم ایمنی بدن در جهت مقابله برای مبارزه با عوامل بیماریزا تا رسیدن به شرایط مطلوب و آرمانی است. برای مثال آدم یا خیز بافت اپیتلیوم، مسافتی که عوامل بیماریزا تا رسیدن به جریان خون باید طی کنند را افزایش می‌دهد و هایپرپلازی بافت آبشش به عنوان یک مکانیسم دفاعی، منجر به افزایش سطح تنفس ماهی در شرایط استرس می‌گردد (Ellif, 2000).

آبشش اولین اندامی است که پس از قرار گرفتن در معرض هرگونه ماده خارجی و شرایط نامطلوب محیطی تحریک شده و عکس العمل دفاعی نشان می‌دهد (Edith et al., 2003). بنابراین چنانچه محیطی که در آن ماهی به تبادل مواد و گازها می‌پردازد محیط سالمی نباشد یا موادی که ماهی از محیط می‌گیرد فاقد کیفیت مناسب باشد و به هر حال به ضعف سیستم ایمنی ماهی بیانجامد، بافت آبشش با توجه به اینکه به‌طور پیوسته در معرض عوامل پاتوژن ثانویه موجود در فلور طبیعی آب می‌باشد می‌تواند دچار آسیب‌های جدی گردد. در این مطالعه علاوه بر کاهش رشد در ماهیان تغذیه شده با سطوح بالاتر از ۴۰ درصد هیدرولیز پوست گاو، بافت آبشش ماهیان مربوط به این تیمارها نیز با کاهش کیفی سلامت همراه بود که می‌توان دلیل آن را به استرس ناشی از نامناسب بودن جیره‌های غذایی مورد استفاده، تغییرات احتمالی گلبول‌های سفید در اثر مصرف جیره‌های غذایی

- By- Product in practical diets for Mirror carp (*Cyprinus carpio*) fingerling. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 3: 81-85.
- Erkmen, B., Caliskan, M. & Yerli, S.V. 2000. Histopathological effects of cyphenothrin on the gills of *Lebistes reticulatus*. *Veterinary and human toxicology*, 42 (1):57.
- Evans, D. H., Piemarini, P. M. & Choe, K. P. 2005. The multifunctional fish.gill.dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-baseregulation, and excretion of nitrogenous, waste. *Physiological Reviews*, 85:97-177.
- Hoda, M. S. & Hasan, S. G. 2003. Histological and ultrastructural observation on gill of *Tilapia (Oreochromis niloticus)* in Lake Qarun, Fayoum Province, Egypt. *Egyptian journal of aquatic biology and fisheries*, 7(4): 157-181.
- Jouni, H., Jouni, V., Outi, K., Marja, T., Paivi, E., Tapio, K., Dina, N. & Atte, V. W. 2006. Effects of soybean meal based diet on growth performance, gut histopathology and intestinal microbiot of juvenile rainbow trout. *Aquaculture*, 261: 259-268.
- Munira, N., Mohammad, A., & Ashraf, U. 2009. Histopathological changes in the gill, liver and intestine of *Heteropneustes fossilis* (Blooch) treated with extracts of different parts of the plants *Madhuca Indica* (G.F.Gmel). 4:113-119.
- Witters, H., Berckmans, P. & Vangenechten, C. 1998. Immunolocziation of ionocyte cells in gill epithelium  $Na^+$ ,  $K^+$ - ATPase in the calcium transporting sterna epithelium of the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Crustacean). *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 45: 437-446.
- نامناسب و افت کلی وضعیت رشد و سلامت ماهی نسبت داد.
- ### منابع
- به اتمانی، ی. ۱۳۹۰. بررسی اثر کاربرد پودر زردچوبه (*Curcuma longa*) در جیره غذایی ماهی زینتی گرین ترور (*Andinocara rivulatu*) بر شاخص‌های رشد، سنجش پارامترهای خونی و بررسی تغییر رنگ ظاهری بدن. پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال. پوستی، ا. و مرادی، ا. ۱۳۹۱. بافت شناسی مقایسه‌ای و هیستو تکنیک. انتشارات دانشگاه تهران، ایران.
- دادگر، ش.، اکبری، ح. و سرپناه، ع. ۱۳۹۰. اطلس ماهیان آکواریومی آب شیرین. انتشارات موج سبز. تهران.
- Bais, U. E. & Lokhande, M. V. 2012. Effect of cadmium chloride on histopathological changes in the fresh water fish *Ophiocephalus striatus* (Channa). *International Journal of Zoology Research*, 8 (1): 23-32.
- Barlow, S. 1997. Fish meal-supply limits demand. *Feed Tech*, 1(1): 47-35.
- Edith, F., Flavia, S., Silvia, R., Ana, C. & Sander, F., 2003. Histology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal Levels of Organo phosphorus in water and food. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54: 119-130.
- Ellif, I. C. 2000. Gill and kidney histopathology in the fresh water fish *Cyprinus carpio* after aqute exposure to deltamethrin. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 22: 200-204.
- Emre, Y., Sevgili, H. & Diler, E. 2003. Replacing fish meal with poultry