فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال دوم، شماره دوم، تابستان ۱۳۹۳

بررسی میزان هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای (PAHs) در بافت و آرد ماهی کیلکای معمولی صید شده از آب‌های خزری استان گیلان (بندر انزلی)

افشین فلاح اسکندرپور[۱]*، آریا اشجع آردلان[۲]، لیدا سلیمی[۳]

۱- کارشناس ارشد بیولوژی دریا- آلودگی دریا، گروه بهبود کیفیت آبزیان، سازمان شیلات ایران
۲- دانشیار گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال
۳- استادیار گروه محیط زیست دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

چکیده

در پژوهش حاضر مقدار و نوع آلاینده‌ها (PAHs)، درکیلکای معمولی سواحل استان گیلان (بندر انزلی) و آرد تولید شده از آن به دلیل قرار داشتن در زنجیره غذایی، برای اولین بار بررسی شد. نمونه‌برداری، تیر ماه ۱۳۹۱ در تنها صیدگاه استان گیلان «بندر انزلی» صورت گرفت. حدود سیصد کیلوگرم از نمونه‌ها پس از کدگذاری مخزن حمل ماهی، جهت تولید آرد به کارخانه تحویل و دو کیلوگرم ماهی کیلکا نیز به طور کاملا تصادفی جداسازی شد. برای انجام مراحل زیست‌سنجی (اندازه‌گیری طول چنگالی، وزن و سن نمونه‌ها به روش اتولیت) ماهی کیلکا به همراه نمونه آرد تولید شده به آزمایشگاه منتقل و برای تعیین PAHها به روش HPLC آنالیز شد. طبق نتایج به دست آمده در ماهیان ۳ ساله، از مجموع ۱۶ ترکیب مورد آزمایش در جدول (EPA)، شش ترکیب نفتالن، ایندنو(۱،۲،۳- cd)پایرن، پایرن، فلورن، آنتراسن و دی‌بنزو(a,h)آنتراسن با مقادیر ۹۰/۶۷، ۱۹/۷۵، ۸/۴۲، ۵/۹۳، ۳/۳۰ و ۰/۳۷(ppb)، در ماهیان ۵ ساله نفتالن، ایندنو(۱،۲،۳- cd)پایرن و فلورن با مقادیر ۷۴/۰۰، ۱۴/۲۵ و ۳/۹۶(ppb) و در ماهیان ۷ ساله هیچ مقداری شناسایی نشد. همچنین در تمام گروه‌های سنی، دو ترکیب نفتالن و ایندنو(۱،۲،۳- cd)پایرن به ترتیب با مقادیر ۱۷/۶۷ و ۸/۹۷(ppb) مشاهده شد. در نمونه آرد ماهی کیلکای معمولی نیز تنها ترکیبات نفتالن و ایندنو(۱،۲،۳- cd)پایرن با مقدار ۱۱/۷۳ و ۵/۹۸(ppb) ثبت شد. نتایج نشان داد که ترکیبات نفتالن، فلورن، آنتراسن، پایرن، ایندنو(۲،۳،۱- cd)پایرن و دی‌بنزو(a,h)آنتراسن با افزایش سن روند کاهشی معنی‌داری داشتند (P<۰/۰۵). ولی بین بافت و آرد تولید شده از آن باوجود روند کاهشی تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (P>۰/۰۵)، همچنین نتایج آزمایش‌ها نشان داد که مقادیر PAHها در کیلکای معمولی و آرد ماهی تهیه شده از آن کم‌تر از حد استاندارد بود. اختلاف معنی‌داری بین داده‌ها دیده نشد.

واژگان کلیدی: *آلودگی نفتی، PAH، ماهی کیلکا، آرد ماهی، بندر انزلی، دریای خزر.*

تاریخ دریافت: خرداد ۹۳ تاریخ پذیرش: شهریور ۹۳

* نویسنده مسئول: afshinfallah@hotmail.com

مقدمه

در دریای خزر گونه‌های متعدد گیاهی و جانوری یافت می‌شوند. از این میان کیلکاماهیان از خانواده Clupeidae، ماهیان با ارزش غذایی و اقتصادی این ناحیه هستند که در سه گونه شامل آنچوی (*Clupeonella engrauliformis*)، کیلکای چشم درشت (*C. grimmi*) و کیلکای معمولی (*C. cultriventris caspia*) وجود دارند. کیلکاماهیان از جمله ماهیان پلاژیک دریای خزر هستند که به صورت گله‌ای زندگی می‌کنند و به علت تغذیه از زئوپلانکتون‌ها، یکی از فراوان‌ترین ماهی‌ها در دریای خزر و به عنوان نان دریای خزر (به دلیل تغذیه سایر آبزیان از آن‌ها) محسوب می‌شوند (فضلی و همکاران، ۱۳۸۴). بنا به گزارش موسسه تحقیقات علوم شیلاتی ایران این ماهیان نه تنها به طور مستقیم در سفره غذایی انسان‌ها قرار می‌گیرند، بلکه بیش از ۹۰٪ صید این گونه از آبزیان صرف تولید آرد ماهی می‌شود.

آرد ماهی فرآورده‌ای جامد به صورت تفاله است که پس از حذف آب و استخراج تمام یا قسمتی از روغن، از ماهی یا ضایعات آن به دست می‌آید. مصرف عمده این محصول در غذای طیور، دام‌های گوشتی و خود ماهی است که به صورت افزودنی به غذای اصلی استفاده می‌شود. آرد ماهی معمولا از چهار جزء اصلی، پروتئین، چربی، رطوبت و خاکستر، تشکیل شده است. در سال‌های اخیر با بهبود عادات غذایی، تقاضا برای گوشت و به طور کلی تأمین پروتئین سالانه افزایش می یابد. از این رو تقاضای آردماهی، برای پرورش دام، طیور و آبزیان بیشتر شده، در نتیجه تولید آردماهی و توجه به این صنعت توسعه پیدا کرده است. به طور کلی فرآیند تولید آردماهی شامل تبدیل یک ماده غذایی با قابلیت فساد بالا به یک محصول پایدار است. (کاوسیان، ۱۳۶۷).

متاسفانه در حال حاضر، دریای خزر در معرض تهدید آلاینده‌های مختلفی مانند ورود زباله‌ها و فاضلاب‌های شهری و غیره است. یکی از آلاینده‌ها مهم، ترکیبات نفتی و PAHها می‌باشند. در واقع هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای یا PAHs (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) گروهی از ترکیبات شیمیایی با دو یا چند حلقه بنزنی هستند. این مواد به علت پتانسیل بالای سرطان‌زایی و ایجاد جهش‌های ژنی، اهمیت ویژه‌ای در مطالعات زیست‌محیطی دارند. سرطان‌زایی PAHها به دلیل پیوند بین این ترکیبات با مولکول‌های درشت DNA و RNA یا پروتئین حاصل می‌شود. با افزایش تعداد حلقه‌های آروماتیک و در نتیجه افزایش وزن مولکولی،

قابلیت انحلال این ترکیبات کاهش می‌یابد. PAHها در اغلب حلال‌های آلی به خوبی حل می‌شوند و به دلیل خاصیت لیپوفیلی به راحتی می‌توانند در بافت‌های چرب تجمع یابند و به مرور اثرات خطرناک خود را در بدن موجودات نشان دهند (سلیمی، ۱۳۸۷). منشاء آلودگی آب با PAHها، منابع استخراج نفت، نشت از طریق مخازن و خطوط انتقال نفت، استفاده از سوخت‌های فسیلی، دفع غیراصولی پساب‌های صنعتی، سوزاندن و خاکستر کردن زباله‌ها و غیره است. این ترکیبات نه تنها حیات آبزیان را به مخاطره می‌اندازد، بلکه از طریق زنجیره‌های غذایی، زندگی سایر موجودات خشکی را که با دریا ارتباط غذایی دارند نیز تهدید می‌کند. در انتهای این زنجیره می‌توان به جامعه انسانی اشاره کرد (باغبان و ناصری، ۱۳۸۸). کیلکای معمولی از ساکنین اصلی آب‌های ساحلی دریای خزر، با عمق کم‌تر از ۷۰ متر است (جانباز و عبدالملکی، ۱۳۸۷). بیش‌ترین غلظت ترکیبات پلی‌آروماتیک (PAHs) در دریاها و اقیانوس‌ها، رسوبات کف و جمعیت‌های زیستی موجود در ساحل و نزدیک به مناطق شهری و صنعتی وجود دارد، این ترکیبات حتی در غلظت‌های کم به عنوان آلاینده‌های محیطی شناخته می‌شوند که می‌توانند به صورت محلول یا معلق در محیط‌های آبی باقی مانده یا با خورده شدن، توسط موجودات دریایی جذب شوند. این ترکیبات از طریق تغذیه به ماهی کیلکا و سپس از طریق زنجیره غذایی به بدن انسان وارد شده، به مرور زمان تجمع پیدا می‌کنند و پس از آن که به غلظت مشخصی رسیدند مشکلات متعددی را مانند بروز سرطان، ایجاد می‌کنند (تاتینا و همکاران، ۱۳۸۴). آژانس حفاظت محیط زیست آمریکا (EPA)، ۱۶ ترکیب PAH شاخص را به عنوان عوامل بسیار مهم دخیل در مسمومیت پستانداران و موجودات آبزی معرفی کرده است. (EPA, 1987)، جدول ۱ نام و علامت اختصاری این شانزده ترکیب را نشان می‌دهد.

مطالعات مختلفی در زمینه تجمع ترکیبات مختلف PAH در جهان و ایران توسط پژوهشگران مختلف انجام شده است. نصراله‌زاده ساروی در سال ۱۳۷۶، مواد آلاینده نفتی پلی‌آروماتیک را در ماهی آزاد دریای خزر بررسی کرد، مقایسه مقادیر به دست آمده در این مطالعه با مطالعات انجام شده در خارج از کشور نشان می‌دهد که غلظت PAHها در بافت عضلانی ماهی آزاد دریای خزر از ماهیان مورد مطالعه در مناطق مختلف مانند ژاپن، استرالیا، خلیج فارس و آمریکا بسیار کم‌تر است. دلیل کم بودن غلظت این نوع ترکیبات، آلودگی کم‌تر، پایین بودن فاکتور غلظت زیستی در ماهی،

انجام فرآیند بیوترانسفورماسیون و متابولیسم در بافت‌های مختلف بدن ماهی عنوان شده است. قربانی و همکاران نیز در سال ۱۳۹۰ به بررسی کمی و کیفی مقادیر PAHها در بافت عضله اردک ماهی (*Esox lucius*) تالاب انزلی پرداختند، نتایج حاکی از آن بود که آسنفتن با وزن مولکولی پایین، دارای بیش‌ترین مقدار و بنزو(a)پایرن با وزن مولکولی بالا دارای پایین‌ترین میزان غلظت بود. بین نفتالن و سن ماهی ارتباط معنی‌دار منفی وجود داشت ($P<۰/۰۵$) و این احتمال عنوان شد که کاهش نفتالن در بدن ماهی با افزایش سن به سبب متابولیزه شدن است. همچنین نتایج آزمایش‌ها نشان داد که مقادیر PAHها در اردک ماهی پایین‌تر از حد استاندارد بود.

جدول ۱: نام ایوپاک، علامت اختصاری، وزن ملکولی و نقطه جوش ۱۶ ترکیب PAH (Kennish, 1997)

شماره	نام آیوپاک	علامت اختصاری	وزن ملکولی (گرم بر مول)	نقطه جوش (درجه سانتی‌گراد)
۱	Naphthalene	N	۱۲۸/۲	۲۱۸
۲	Acenaphtylene	Acl	۱۵۲/۲	۲۸۰
۳	Acenaphtene	Ace	۱۵۴/۲	۲۷۹
۴	Fluorene	F	۱۶۶/۲	۲۹۸
۵	Phenanterene	P	۱۷۸/۲	۳۴۰
۶	Anteracene	An	۱۷۸/۲	۳۴۲
۷	Flouranthene	Fl	۲۰۲/۳	۳۸۴
۸	Pyrene	Py	۲۰۲/۳	-
۹	Benza (a) antracene	BaA	۲۲۸/۳	۴۳۸
۱۰	Chrysene	C	۲۲۸/۳	۴۴۸
۱۱	Benzo (b) flouranthene	BbF	۲۵۲/۳	-
۱۲	Benzo (k) flouranthene	BkF	۲۵۲/۳	-
۱۳	Benzo (a) pyrene	BaP	۲۵۲/۳	۴۹۵
۱۴	Dibenzo (a,h) antrancene	DA	۲۷۶/۰	-
۱۵	Benzo (ghi) pyrene	BgP	۲۷۶/۳	>۵۰۰
۱۶	Indeno (1,2,3-cd) pyrene	ID	۲۷۸/۴	۵۲۴

این پژوهش در صدد آن است که میزان ترکیبات PAH را به عنوان یک آلاینده مهم در بافت سنین مختلف و همچنین آرد تولید شده از کیلکای معمولی استان گیلان بررسی و مقایسه کرده، اثرات احتمالی تغییرات سن بر میزان PAHها و همچنین تاثیر فرآیند حرارتی را در مراحل تولید آرد ماهی، بر آروماتیک‌های چند حلقه‌ای معطر ارزیابی کند.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری این پژوهش در تیر ماه ۱۳۹۱ در منطقه بندر انزلی با مختصات جغرافیایی ۳۷°۳۴'۵۷''N و ۴۹°۲۷'۵۳''E توسط شناور صیادی مطلع الفجر ۲۳ انجام شد. فاصله صیدگاه تا ورودی تالاب انزلی (موج شکن) ۶/۶۸ مایل دریایی و عمق صید نمونه‌ها ۴۲ متر ثبت و اعلام شد. از مخزن نمونه‌های صید شده، حدود دو کیلوگرم ماهی به طور تصادفی برای زیست‌سنجی در آزمایشگاه پژوهشکده آبزی پروری شیلات انزلی جداسازی شد. بقیه نمونه‌ها (حدود سیصد کیلوگرم) همراه مخازن، برای تولید آرد ماهی به روش سنتی (Batch) به کارخانه انتقال یافت. پس از اتمام کار تولید، ۱۰۰۰ گرم از آرد تهیه شده جدا و پس از انجماد برای آنالیز ترکیبات PAH به آزمایشگاه منتقل شد.

وزن دقیق نمونه‌ها ۲۰۷۰ گرم و تعداد کل ۲۰۶ عدد ماهی کیلکا بود. ابتدا تفکیک گونه‌ای انجام شد که از تعداد کل نمونه‌ها ۲ عدد کیلکای آنچوی و مابقی کیلکای معمولی بود. سپس به طور کاملا تصادفی از ۲۰۴ عدد کیلکای معمولی تعداد ۱۰۰ عدد جهت زیست‌سنجی و انجام آزمایش‌ها جدا شد. زیست‌سنجی شامل تعیین طول چنگالی (میلی متر)، وزن (گرم) و سن (تعیین سن به روش بررسی اتولیت) بود. نمونه‌ها بر اساس گروه‌های سنی (جدول ۲) تفکیک شدند.

نمونه‌ها پس از انجام زیست‌سنجی و تعیین سن بلافاصله در فویل‌های آلومینیومی قرار داده شدند و پس از برچسب‌گذاری و انجماد به آزمایشگاه شیمی انتقال یافت و تا مرحله آماده‌سازی برای آنالیزهای شیمیایی در فریزر نگهداری شد.

در مرحله آماده‌سازی، با توجه به این که در آنالیز PAHها ترکیبات آبی مزاحم هستند بنابراین نمونه‌ها باید کاملا خشک شوند، به این منظور نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دستگاه فریز درایر

(Freeze dry) با برودت (۵۰-) درجه سانتی‌گراد و تحت شرایط خلاء قرار داده شد تا آب آن‌ها کاملا خشک شود.

مرحله استخراج از طریق روش مایکروویو انجام شد (Pena et al., 2006). به این منظور، به ۰/۲ گرم از هر نمونه که توسط فریز درایر خشک شده بود، ۴ میلی‌لیتر محلول اشباع هیدرواکسید پتاسیم حل شده در الکل و ۱۰ میلی‌لیتر ان- هگزان اضافه شد. با استفاده از روش مایکروویو، عملیات استخراج در دمای ۱۲۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۷ دقیقه انجام شد. پس از خنک‌سازی، ۶ میلی لیتر از فاز آلی جدا و با دور rpm ۳۰۰۰ به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس عصاره حاصل توسط دستگاه روتاری تا حجم ۰/۵ میلی‌لیتر تبخیر و تغلیظ شد و با استفاده از ورقه‌های سیلیسی که با ۴ میلی‌لیتر محلول دی‌کلرومتان و ۴ میلی‌لیتر هگزان- دی‌کلرومتان (به نسبت ۱:۱ حجمی) فعال شده بود صاف شد. مواد حاصل با استفاده از ۴ میلی‌لیتر هگزان- دی‌کلرومتان شستشو شد و مجددا توسط دستگاه Evaporator (تبخیر کننده) تا ۰/۵ میلی‌لیتر تغلیظ شد. سپس یک میلی‌لیتر استونیتریل به آن اضافه شد و مخلوط مجددا تا مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر تغلیظ شد. عصاره به دست آمده به یک بالن ژوژه ۲ میلی‌لیتری حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر آب فوق خالص منتقل و با استونیترات به حجم رسانده شد. پس از آن عصاره حاصل توسط فیلتر پارچه‌ای با چشمه ۰/۲۲ میکرون صاف شده، در نهایت ۲۰ میکرولیتر از آن به دستگاه HPLC تزریق شد و طیف‌های PAH به دست آمده مورد بررسی قرار گرفت (Pena et al., 2006).

برای ثبت داده‌ها و تهیه جداول و نمودارها از برنامه Microsoft Office 2003 و برای آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار آماری SPSS16 استفاده شد. برای بررسی نرمال بودن داده‌ها از آزمون Kolmogorov-Smirnov، برای مقایسه و یافتن اختلاف معنی‌دار بین بافت و آرد از Independent Samples Test و برای مقایسه و پیدا کردن اختلاف معنی دار در ۳ گروه سنی سه، پنج و هفت سال از آزمون‌های ANOVA، Multiple Comparisons (LSD) و Duncan استفاده شد.

نتایج

بر اساس نتایج مشاهده شده از زیست‌سنجی نمونه‌های ماهی کیلکای معمولی (جدول ۲)، نمونه‌ها در پنج گروه سنی سه، چهار، پنج، شش و هفت سال با تعداد فراوانی به ترتیب ده، سی و نه، بیست و شش، هجده و هفت عدد شناسایی شدند. طول چنگالی نمونه‌ها از ۸۴ تا ۱۱۸ میلی‌متر و میانگین وزن آن‌ها از ۷/۲۱ گرم برای سه سال تا ۱۳/۸۶ گرم برای هفت سال به دست آمد.

بر اساس نتایج به دست آمده از اندازه‌گیری میزان هیدروکربن‌های نفتی آروماتیک چندحلقه‌ای در ماهیان کیلکای معمولی از مجموع ۱۶ ترکیب خطرناک مورد آزمایش در جدول EPA تنها ۶ ترکیب نفتالن، فلورن، آنتراسن، پایرن، دی‌بنزو(a,h)آنتراسن و ایندنو(۱،۲،۳- cd)پایرن توسط دستگاه HPLC اندازه‌گیری شد که در جداول ۳ و۴ آمده است.

جدول ۲: نتایج زیست‌سنجی نمونه‌های کیلکای معمولی

ردیف	سن (سال)	تعداد	وزن نمونه‌ها (گرم)	میانگین وزن (گرم)	طول چنگالی (mm)
۱	۳	۱۰	۷۲/۱۰	۷/۲۱	۸۴-۹۳
۲	۴	۳۹	۳۵۶/۷۰	۹/۱۵	۹۴-۱۰۲
۳	۵	۲۶	۲۷۶/۱۰	۱۰/۶۲	۱۰۳-۱۰۹
۴	۶	۱۸	۲۱۲/۲۰	۱۱/۷۹	۱۱۰-۱۱۴
۵	۷	۷	۹۷/۰۰	۱۳/۸۶	۱۱۵-۱۱۸
	جمع کل	۱۰۰	۱۰۱۴/۱۰		

جدول ۳: مقادیر PAHها در بافت‌های گروه‌های سنی ۳، ۵ و ۷ کیلکای معمولی (میانگین ± انحراف معیار)

PAH (ppb)	۳ ساله	۵ ساله	۷ ساله
نفتالن	۹۰/۶۷^{b} ±۱۵/۱۴	۷۴/۰۰^{b} ±۱۵/۵۲	nd^{a}
فلورن	۵/۹۳^{b} ±۱/۸۴	۳/۹۶^{b} ±۱/۵۴	nd^{a}
آنتراسن	۳/۳۰^{b} ±۱/۹۲	nd^{a}	nd^{a}
پایرن	۸/۴۲^{b} ±۳/۷۴	nd^{a}	nd^{a}
دی بنزو(a,h)آنتراسن	۰/۳۷^{b} ±۰/۰۷	nd^{a}	nd^{a}
ایندنو(۱،۲،۳- cd)پایرن	۱۹/۷۵^{b} ±۴/۲۵	۱۴/۲۵^{b} ±۲/۱۹	nd^{a}
مجموع مقادیر PAHها	۱۲۸/۴۳	۹۲/۲۱	nd

مقادیر نمایانگر میانگین ± انحراف معیار است.

nd : مشاهده نشد.

حروف کوچک انگلیسی متفاوت بالای اعداد نشانگر وجود اختلاف معنی‌دار است (P<۰/۰۵)

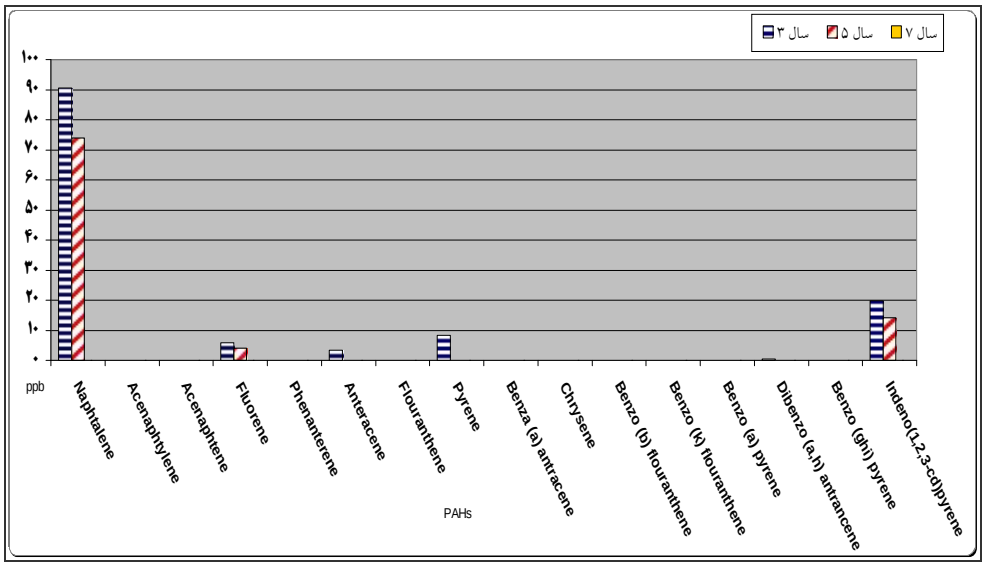
جدول ۴: مقادیر PAHها در بافت‌های تمام گروه‌های سنی و آرد ماهی کیلکای معمولی (ppb)

مجموع مقادیر PAHها	ایندنو(۱،۲،۳- cd)پایرن	نفتالن	نمونه‌ها
۲۶/۶۳	۸/۹۷±۰/۹۰	۱۷/۶۷±۳/۵۱	در بافت همه گروه‌های سنی
۱۷/۷۰	۵/۹۸±۲/۴۹	۱۱/۷۳±۳/۰۹	آرد ماهی

مقادیر نمایانگر میانگین ± انحراف معیار است

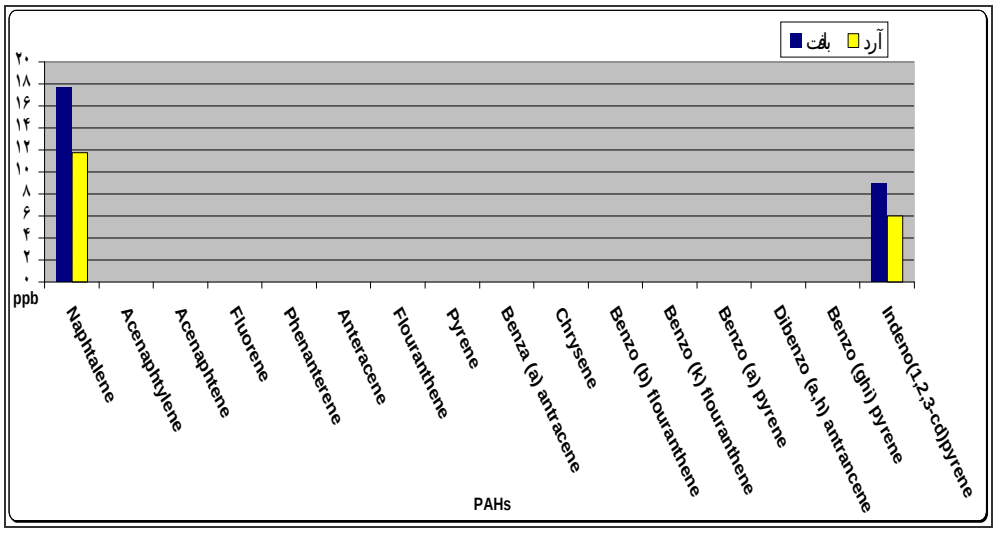
در اندازه‌گیری ۱۶ ترکیب PAH طبق جدول EPA، ترکیبات آسنافتیلن، آسنافتن، فنانترن، فلورانتن، بنزا(a)آنتراسن، کریسن، بنزو(b)فلورانتن، بنزو(k)فلورانتن، بنزو(a)پایرن و بنزو(g,h,i)پایرن در هیچ یک از نمونه‌ها مشاهده نشد (شکل ۱). با توجه به اطلاعات به دست آمده از جدول ۳ در ماهیان سه ساله از مجموع ۱۶ ترکیب مورد آزمایش در جدول EPA تنها ۶ ترکیب توسط دستگاه HPLC مورد شناسایی قرار گرفت که مقدار ترکیبات نفتالن، ایندنو(۱،۲،۳-cd)پایرن، پایرن، فلورن، آنتراسن و دی‌بنزو(ah)آنتراسن به ترتیب ۹۰/۶۷، ۱۹/۷۵، ۸/۴۲، ۵/۹۳،

۳/۳۰ و ۰/۳۷(ppb) بود. بر اساس جدول ۳ در ماهیان ۵ ساله تنها ۳ نوع از ترکیبات شناسایی شد که از نظر مقدار نفتالن، ایندنو(۱،۲،۳- cd)پایرن و فلورن به ترتیب ۷۴/۰۰، ۱۴/۲۵ و ۳/۹۶(ppb) بود. هم چنین طبق نتایج به دست آمده در ماهیان ۷ ساله از ۱۶ فاکتور مورد آزمایش هیچ مقداری شناسایی نشد. در مقایسه سنی سه گروه، مطابق جدول ۳، مقدار ترکیبات شناسایی شده در سن پنج سال نسبت به سن سه سال کاهش داشت و تعدادی نیز شناسایی نشدند، به این صورت که ترکیبات نفتالن، ایندنو(۱،۲،۳- cd)پایرن و فلورن با افزایش سن از سه سال به پنج سال کاهش یافتند و در مورد سه ترکیب پایرن، آنتراسن و دی بنزو(a,h)آنتراسن که در گروه ماهیان سه سال شناسایی شد، در گروه سنی پنج سال هیچ مقداری ثبت نشد. بر اساس روش مقایسه چندگانه (آزمون LSD) در سطح اطمینان ۹۵٪ بین میانگین مقادیر نفتالن و فلورن موجود در گروه‌های سنی سه سال و هفت سال، هم چنین پنج سال و هفت سال اختلاف معنی‌دار وجود داشت (P<۰/۰۵). بین میانگین مقدار آنتراسن موجود در گروه‌های سنی سه سال و پنج سال و سه سال و هفت سال اختلاف معنی‌دار وجود داشت (P<۰/۰۵). بین میانگین مقدار پایرن موجود در گروه‌های سنی سه سال و پنج سال و سه سال و هفت سال اختلاف معنی‌دار مشاهده شد (P<۰/۰۵). بین میانگین مقدار دی بنزو(a,h)آنتراسن موجود در گروه‌های سنی سه سال و پنج سال و سه سال و هفت سال اختلاف معنی‌دار مشاهده شد (P<۰/۰۵). بین میانگین مقدار ایندنو(۱،۲،۳- cd)پایرن موجود در گروه‌های سنی سه سال و پنج سال، سه سال و هفت سال و پنج سال و هفت سال اختلاف معنی‌دار وجود داشت (P<۰/۰۵).



شکل ۱: مقایسه مقادیر PAHها در ۳ گروه سنی ماهی کیلکای معمولی (ppb)

طبق یافته‌های جدول ۴ در بافت‌های همه گروه‌های سنی، دو ترکیب نفتالن و ایندنو(۱،۲،۳-cd)پایرن به ترتیب با مقادیر ۱۷/۶۷ و ۸/۹۷(ppb) مشاهده شد. همچنین بر اساس یافته‌ها در نمونه آرد ماهی آزمایش شده نیز تنها دو ترکیب نفتالن و ایندنو(۱،۲،۳- cd)پایرن با مقدار ۱۱/۷۳ و ۵/۹۸(ppb) ثبت شد. در مقایسه بافت‌های همه گروه‌های سنی با آرد ماهی تولید شده، مطابق جدول ۴، نفتالن و ایندنو(۱،۲،۳- cd)پایرن در بافت و آرد ماهی کیلکای معمولی مشاهده شد که مقادیر هر دو ترکیب در آرد ماهی نسبت به نمونه بافت ماهی کاهش داشت. پس از انجام آزمون *t*، بین بافت و آرد ماهی کیلکای معمولی مشاهده شد که با وجود کاهش میزان نفتالن و ایندنو(۱،۲،۳- cd)پایرن در آرد نسبت به بافت، اختلاف معنی داری وجود نداشت (P>۰/۰۵؛ شکل ۲).



شکل ۲: مقایسه مقادیر PAHها در بافت‌های تمام گروه‌های سنی با آرد ماهی کیلکای معمولی (ppb)

بحث

حوضه جنوبی دریای خزر در نوار ساحلی دارای رسوبات نرم است که می‌تواند مواد نفتی را در خود جای دهد و در اثر تلاطم دریایی منتقل کند. بنابراین احتمال آلودگی در موجودات کفزی افزایش می‌یابد. آلودگی در گونه‌های میان‌زی نیز به مطالعه نیاز دارد. با توجه به استخراج نفت و وجود مقادیر نسبتا بالای آلاینده‌های نفتی در سواحل کشورهای آسیای میانه، احتمال انتقال آلودگی‌های فوق به حوضه جنوبی دریای خزر وجود دارد. وجود پالایشگاه‌های نفتی و گازی و صنایع سلولزی، شیلاتی، الیاف و پتروشیمی آلودگی نفتی دریای خزر را دو چندان می‌کند که این آلودگی‌ها از طریق چرخش آبی خلاف عقربه‌های ساعت، وارد حوضه جنوبی دریای خزر (ایران) شده و روند آلودگی نفتی آن را افزایش داده است (نصرالله‌زاده ساروی، ۱۳۷۶). در بین ترکیبات نفتی، ترکیبات آروماتیک به لحاظ داشتن حلقه‌های بنزنی دارای پایداری بیش‌تری است. هر چه تعداد حلقه‌های بنزن بیش‌تر باشد، تجزیه میکروبی آن نیز سخت‌تر خواهد بود (Bauer and Capone, 1985). در این پژوهش به بررسی PAHها در بافت و آرد ماهی کیلکای معمولی پرداخته شد و با توجه به استاندارد EPA، ۱۶مورد PAH مورد بررسی قرار گرفت. اختلاف در

مقدار ترکیبات شناسایی شده را می‌توان در تفاوت توزیع ترکیبات آروماتیک در لایه‌های مختلف آب به دلیل اختلاف در وزن ملکولی، تعداد زنجیره کربنی و دانسیته آن‌ها و از سوی دیگر توانایی متابولیزه کردن تعدادی از این ترکیبات با افزایش سن در ماهیان استخوانی و در نهایت تجمع زیستی برخی از PAHها در بافت چربی ماهیان عنوان کرد.

طبق مشاهدات (جدول ۳)، بین نفتالن، فلورن، آنتراسن، پایرن، ایندنو(۱،۲،۳- cd)پایرن، دی‌بنزو(a,h)آنتراسن با افزایش سن ماهی اختلاف معنی‌دار کاهشی مشاهده شد (P<۰/۰۵). این احتمال وجود دارد که کاهش این ترکیبات در بدن ماهی با افزایش سن به سبب متابولیزه شدن آن‌ها باشد. این نتیجه با پژوهش‌های سلیمی (۱۳۸۷) و قربانی و همکاران (۱۳۹۰) مطابقت دارد. یکی از دلایل احتمالی تفاوت در ترتیب تجمع ترکیبات مختلف PAH در این مطالعه را می‌توان تفاوت در توانایی سوخت و ساز برخی از ترکیبات PAH توسط آبزیان عنوان کرد که می‌توانند آن‌ها را به ترکیبات دیگری و گاهی ترکیبات کم خطرتر تجزیه کنند. این نتیجه در مطالعات Kennish (۲۰۰۱)، McElroy و همکاران (۱۹۸۹) و McLeese و همکاران (۱۹۸۵) نیز عنوان شده است. روغن ماهی کیلکای معمولی کم‌تر از سایر گونه‌ها است (کوچکیان صبور، ۱۳۷۳). کم بودن غلظت ترکیبات در بافت ماهیان را می‌توان به دلیل آلودگی کم‌تر همچنین پایین بودن فاکتور غلظت زیستی در ماهی کیلکا به دلیل کم بودن بافت چرب و انجام فرآیند بیوترانسفورماسیون و متابولیسم در بافت‌های مختلف بدن این ماهی نسبت داد که سبب خروج این نوع ترکیبات به فرم هیدرولیز از بدن ماهی شده است و با مطالعات نصراله‌زاده ساروی (۱۳۷۶) و اسماعیلی ساری (۱۳۸۱) مطابقت دارد. ماهیان استخوانی ظرفیت بالایی جهت سوخت و ساز و دگرگونی PAHها دارند زیرا در بافت‌های خود دارای مقادیر بالایی از آنزیم‌های خانواده سیتوکروم P–450 هستند، به ویژه در کبد که با اکسیداسیون PAHها، آن‌ها را به ترکیبات هیدروکسیل تبدیل می‌کند. سیتوکروم P–450 اغلب در فاز یک فرآیند متابولیسم شرکت دارد. ماهیان استخوانی دارای سیستم‌های آنزیمی فاز دو نیز هستند که قابلیت ترکیبات هیدروکسیله شده را برای حل شدن در آب بیش‌تر می‌کند. بنابراین نتیجه واکنش یک و دو آنزیمی که مرکز آن کبد ماهیان است، باعث تبدیل PAHهای چربی‌دوست به ترکیبات آب‌دوست شده، در نهایت باعث دفع آن‌ها از بدن می‌شود (Turcotte, 2008). بنابراین می‌توان عدم شناسایی PAHها در بافت ماهیان ۷ ساله و کاهش برخی از آن‌ها در ماهیان ۵ ساله

نسبت به ۳ ساله را به این فرآیند نسبت داد، این نتیجه‌گیری با مطالعات Tuvikene (۱۹۹۵) در خصوص متابولیسم PAHها در بافت ماهی نیز مطابقت دارد.

بیش‌ترین مقادیر PAHها در ماهی‌های کوچک‌تر و کم‌ترین آن‌ها در ماهی‌های با سن بالاتر دیده شد. این موارد با نتایج تحقیقات Hellou و همکاران (۱۹۹۰) مطابقت دارد. این نکته نیز می‌تواند وجود سیستم آنزیمی سمیت‌زدایی سیتوکروم P–450 را در ماهی کیلکای معمولی تأیید کند. آنزیم‌های خانواده سیتوکروم P نقش مهمی در اکسیداسیون ترکیبات سمی و سرطان‌زا دارند که در این بین، تاثیر آن‌ها بر PCBها و PAHها و آریل‌آمین‌ها قابل توجه است. از ترکیبات این خانواده، سیتوکروم P–450 در پستانداران دریایی و ماهیان استخوانی یافت شده است (Godard et al., 2000). از روند کلی ترکیبات شناسایی شده می‌توان چنین نتیجه گرفت که، ترکیبات شیمیایی سبک‌تر بهتر در ستون آب قرار می‌گیرند و می‌توانند همراه با آب از طریق آبشش‌ها وارد بدن ماهی شوند در صورتی که ترکیبات سنگین‌تر معمولا در رسوبات قرار گرفته، کم‌تر در ستون آب وجود دارند. نتایج حاصل از این مطالعه با نتایج مطالعات Budzinski و همکاران (۲۰۰۴)، Silva و همکاران (۲۰۰۷)، Cheevaporn و همکاران (۲۰۱۰) و Llobet و همکاران (۲۰۰۶) مشابه است. همچنین با توجه به این که نفتالن دارای وزن مولکولی پایین و تعداد حلقه‌های بنزنی کمی است، انحلال آن در آب بیش‌تر است. بنابراین می‌تواند به سهولت همراه با آب وارد بدن ماهی کیلکا شود. این نتایج با مطالعات سلیمی در سال ۱۳۸۷ سازگار است. با توجه به این که طبق مشاهدات آماری در خصوص میزان PAHها در بافت و آرد ماهی کیلکای معمولی اختلاف معنی‌داری وجود ندارد ($P>0/05$) می‌توان بیان کرد که فرآیند حرارتی تولید آرد ماهی به روش سنتی به تنهایی و با حرارت مستقیم در دمای حدود ۱۰۰ تا ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد با توجه به نقطه جوش بالای این ترکیبات (پایین‌ترین دمای نقطه جوش مربوط به نفتالن با ۲۱۸ درجه سانتی‌گراد و بیش‌ترین دمای نقطه جوش، ایندنو(۱،۲،۳- cd)پایرن با ۵۲۴ درجه سانتی‌گراد) تاثیری در کاهش میزان PAHها در آرد ماهی ندارد. ممکن است روش پیوسته تولید آرد به دلیل خروج میزان زیادی از آب و روغن ماهی در مرحله پرس، تغییرات معنی‌داری را نشان دهد.

در موجودات دریایی سه فاکتور به شدت تحمل بدن را در مقابل PAHها تحت تاثیر قرار می‌دهد که شامل غلظت ترکیبات PAH در محیط، در دسترس بودن زیستی ترکیبات و توانایی

موجودات برای متابولیسم آن‌ها، است (Grandby and Spliid, 1995). پژوهش‌ها نشان می‌دهد که گونه‌های بالغ و بزرگ‌تر به دلیل عمل تولیدمثل و یا تخم‌ریزی می‌توانند میزان زیادی از آلاینده‌ها را از بدن خود دفع کنند، ولی گونه‌های نابالغ و کوچک‌تر به دلیل عدم فعالیت‌های تولیدمثلی مقادیر بیش‌تری از آلاینده‌ها را در بدن خود تغلیظ می‌کنند. بنابراین با توجه به این که در مطالعه حاضر نمونه‌برداری در تیرماه یعنی پس از زمان تولیدمثل و تخم‌ریزی این گروه از ماهیان انجام شد، می‌توان نتیجه گرفت یکی از دلایل کم بودن PAHها در نمونه‌های آزمایش شده به دلیل فعالیت‌های تولیدمثلی این ماهیان باشد.

منابع

اسماعیلی ساری ع. ۱۳۸۱. آلاینده‌ها، بهداشت و استاندارد در محیط زیست. انتشارات نقش مهر. ۷۶۷ ص.

باغبان م. و ناصری ش. ۱۳۸۸. اندازه‌گیری ترکیبات هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای (PAHs) در آب تصفیه شده تصفیه خانه‌ها و شبکه توزیع آب شهر تهران و مخازن استان تهران. سومین همایش تخصصی مهندسی محیط زیست، ۱۴ص.

تاتینا م.، عریان ش. و قریب خانی م. ۱۳۸۴. بررسی میزان ترکیبات آروماتیک حلقوی (PAHs) در ماهی کفشک چپ رخ در حوضه شمالی خلیج فارس. مجله علمی پژوهشی زیست‌شناسی دریا، جلد ۱، شماره ۱، ص‌ص: ۴۴-۲۹.

جانباز ع.ا. و عبدالملکی ش. ۱۳۸۷. بررسی سن، رشد و مرگ و میر کیلکای (*Clupeonella cultriventris caspia*) در سواحل استان مازندران. پژوهش و سازندگی، امور دام و آبزیان، شماره ۸۱، ص‌ص: ۸۰-۷۸.

سلیمی ل. ۱۳۸۷. پایش زیستی هیدروکربن‌های چندحلقه‌ای آروماتیک (PAHs) و فلزات سنگین نیکل و وانادیوم در رسوبات و دوکفه‌ای آنادونت تالاب انزلی و تعیین کاربرد بایومارکر NRR به عنوان شاخص زیستی این آلاینده‌ها. رساله دکتری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران.

فضلی ح.، صیاد بورانی م. و جانباز ع.ا. ۱۳۸۴. شاخص‌های زیستی کیلکای معمولی *Clupeonella cultriventris caspia* در سواحل جنوبی و اثرات *Mnemiopsis leidyi* بر اکوسیستم دریای خزر. ششمین همایش علوم و فنون دریایی

قربانی س.، سلیمی ل. و مطلبی ع. ۱۳۹۰. بررسی کمی و کیفی میزان PAHs (۱۶ مورد لیست شاخص EPA) در بافت عضله اردک ماهی *Esox lucius* تالاب انزلی، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال.

کاوسیان ع. ۱۳۶۷. بررسی وضعیت تولید و توزیع آرد ماهی. شیلات ایران .

کوچکیان صبور ا. ۱۳۷۳. تهیه فرآورده از ماهی کیلکا و تولید فیش بال از آن. چاپ اول.

نصراله‌زاده ساروی ح. ۱۳۷۶. بررسی میزان آلودگی‌های نفتی و فلزات سنگین در حوضه جنوبی دریای مازندران. پژوهشکده اکولوژی دریای خزر.

Budzinski H., Mazeas O., Tronczynski J., Desaunay Y., Bocquene G. and Claireaux G. 2004. Link between exposure of fish (*Solea solea*) to PAHs

and metabolites: Application to the "Erika" oil spill. Aquatic Living Resources, 17: 329–334.

Bauer J.E. and Capone D.G. 1985. Effects of four aromatic organic pollutants on microbial glucose metabolism and hiymidine incorporation in marine sediments. Applied and Environmental Microbiology, 49: 828–835.

Cheevaporn V., Pindang M. and Helander H.F. 2010. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon contamination in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): analysis in liver and bile. Environment Asia, 3(2): 8–14.

Godard C.A., Leaver M.J., Said M.R., Dickerson R.L., George S. and Stegeman J.J. 2000. Identification of cytochrome P-450 1B-like sequences in two teleost fish species (scup, *Stenotomus chrysops* and plaice, *Pleuronectes platessa*) and in a cetacean (striped dolphin, *Stenella coeruleoalba*). Marine environmental research, 50(1-5): 7–10.

Grandby K. and Spliid N.H. 1995. Hydrocarbons and organochlorines in common mussels from the Kattegat and the belts and their relation to condition indices. Marine Pollution Bulletin, 30: 167–178.

Hellou J., Stenson G. and Payen J.F. 1990. Polycylic aromatic hydrocarbons in muscle tissue of marine. Marine Pollution Bulletin, 21(10): 469–473.

Kennish M.J. 1997. Pollution impacts on marine biotic communities. CRC Press, P: 310.

Kennish M.J. 2001. Practical handbook of marine science. CRC Press. P: 876.

Llobet J.M., Bocio A., Domingo J.L., Teixido A., Casas C. and Muller L. 2006. Levels of polychlorinated biphenyls in foods from Catalonia, Spain: estimated dietary intake. Journal of Food Protection, 66: 479–484.

McElroy A.E., Farrington J.W. and Teal J.M. 1989. Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment, In Varanasi U. (Ed.).Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. Pp: 1–39.

McLeese D.W., Ray S. and Burridge L.E. 1985. Accumulation of polynuclear aromatic hydrocarbons by the clam *Mya arenaria*, In Ketchum B.H., Capuzzo J.M., Burt W.V., Duedall I.W., Park P.K. and Kester D.R. (Eds). Wastes in the Ocean, Vol. 6, Nearshore Waste Disposal. John Wiley & Sons, New York. NY, USA. Pp: 81–88.

Pena T., Pensado L., Casais C., Mejuto C., Phan-Tan-Luu R. and Cela R. 2006. Optimization of a microwave-assisted extraction method for the

analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons from fish samples. Journal of chromatography, 1121(2):163-169.

Silva E., PesoAguiar M., Navarro M. and Chastinet C. 2007. Impact of petroleum pollution on aquatic coastal ecosystems in Brazil. Environmental Toxicology and Chemistry, 16: 112–118.

Turcotte D. 2008. Toxicity and metabolism of alkyl-polycyclic aromatic hydrocarbons in fish. Queen's University, Canada, PhD Thesis, P: 203.

Tuvikene A. 1995 . Responses of fish to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Annales Zoologici Fennici, 32: 295–309.

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 2, No. 2, Summer 2014

Qualitative and quantitative analyze of PAHs (sixteen of important PAHs in EPA list) in tissues and meal of *Clupeonella cultriventris caspia* of Guilan Province Caspian waters (Bandar Anzali)

Afshin Fallah Eskandarpour[1]*, Aria Ashja Ardalan[2], Lida Salimi[3]
1-M.Sc. in Marine Biology, Iran Fisheries Organization
2- Associate Professor in Department of Marine Biology, Science and Research Branch of Islamic Azad University, Tehran, Iran.
3- Assistant Professor in Department of Marine Environment, Science and Research Branch of Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Received: June 2014 Accepted: September 2014

Abstract

In present study common Klika from Guilan province coastal area (Bandar–e-Anzali) and fish meal produced from that, has been examined to investigate types and amount of Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Bio-monitoring of pollutants is very important because they are carcinogenic and mutagen components, if they enter human food chain. Samples were collected from Anzali fishing port. 300Kg of fish sample sent to fish meal producing plant after fish containers were coded. 2 Kg of randomly selected sample was sent to laboratory for biometric analysis including fork length, weight and age determination by inner ear otolith method. For measuring PAHs, frozen samples were eventually taken to the laboratory and out of 16 PAH's compounds in EPA table for 3 year old fishes, 6 compounds were found namely: Naphthalen, Indeno (1,2,3…cd) pyrene, Pyrene, Fluorene, Anthracene and Dibanzo (ah) anthracene with quantity of 90.67, 19.75, 8.42, 5.93, 3.30 and 0.37 ppb respectively. In 5 years old fishes 74.00, 14.25 and 3.96 ppb Naphthalen, Indeno (1,2,3…cd) pyrene and Fluorene were determined respectively. While for 7 years old fishes no PHA has been found. For all age combinations 2 compounds i.e. Naphthalen and Indeno (1,2,3…cd) pyrene were present found with amount of 17.67 and 8.97 ppb respectively. In fish meal sample only Naphthalen and Indeno (1,2,3…cd) pyrene were recorded with amount of 11.73 and 5.98 ppb in order. The results also show that there is a significant difference between age increase and decline of Naphthalen, Pyrene, Indeno (1,2,3…cd) pyrene and Dibanzo (ah) anthracene. However there are no significances found between meal texture and produced meal in spite of decreasing trend. The results also showed that PAH amounts both in fresh Kilka and fish meal fortunately are below standard levels.

Key words: *Petroleum pollutants, PAHs, Kilka, Fish meal, Caspian Sea.*

*Corresponding Author: afshinfallah@hotmail.com