

## بررسی اثر مقایسه‌ای نانو ذرات اکسید مس و سولفات مس بر شاخص‌های رشد و آسیب‌شناسی بافت آبشش بچه ماهیان آمور

فاطمه عبدالله‌زاده<sup>۱\*</sup>، جینا خیاط‌زاده<sup>۱</sup>، فرشته قاسم‌زاده<sup>۲</sup>

\*fatemehabdollahzadeh915@yahoo.com

۱- گروه زیست تکوین، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران

۲- دانشکده علوم پایه، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: تیر ۱۳۹۵

تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۶

### چکیده

پژوهش حاضر به منظور ارزیابی اثرات نانو ذرات اکسید مس (با اندازه ۵۰nm) و سولفات مس آبدار به عنوان ضد عفونی کننده، بر شاخص‌های رشد و آبشش ماهی آمور یا کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*)، انجام شد. به این منظور ۲۰۰ قطعه بچه ماهی (با میانگین وزن ۴/۵±۰/۵ گرم)، به مدت ۳۰ روز در گروه‌های شاهد و تیمارهای سولفات مس با غلظت‌های ۱ و ۱/۵ میلی گرم در لیتر و نانو اکسید مس با غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم در لیتر در سه تکرار نگهداری و با خوراک بیومار مخصوص کپور تغذیه شدند، در روزهای پنج، ده، بیست و سی، پس از مواجهه نمونه برداری انجام شد، شاخص‌های رشد و مشاهدات میکروسکوپی آبشش ماهیان مورد مقایسه قرار گرفت. در گروه‌های سولفات مس ۱/۵ میلی گرم در لیتر و نانو ذره اکسید مس ۲۰۰ میلی گرم در لیتر رشد ویژه، شاخص وضعیت، میانگین وزن و درصد بازماندگی از سایر گروه‌ها کمتر بود (۰/۰۵ < p) در سایر شاخص‌های رشد اختلاف معنی داری مشاهده نشد. در آبشش همه گروه‌ها (غیر از شاهد) بویژه گروه سولفات مس ۱/۵ میلی گرم در لیتر آسیب‌هایی شامل پریاختگی، پرخونی، چماقی شدن تیغه‌ها و تحلیل تیغه اولیه آبششی، دیده شد. در نتیجه کاهش شاخص‌های رشد، درصد بازماندگی و آسیب‌های بافتی آبشش در گروه‌های سولفات مس ۱/۵ میلی گرم در لیتر و بعد از آن نانو اکسید مس ۲۰۰ میلی گرم در لیتر بیشتر دیده شد و به دلیل اهمیت آبشش در تبادل گازها و نیز هم افزایی این دو ماده، لزوم استفاده از غلظت مناسب سولفات مس به عنوان ضد عفونی کننده، برای هرگونه ی ماهی و استفاده آگاهانه از نانو ذره اکسید مس توصیه می شود.

**لغات کلیدی:** سولفات مس، نانو ذره اکسید مس، ماهی آمور، شاخص‌های رشد، آسیب شناسی آبشش

\*نویسنده مسئول

## مقدمه

ماهی کپور علفخوار (grass carp) از خانواده کپورماهیان (Cyprinidae) با نام علمی *Ctenopharyng idella* منبع مهم پروتئینی و به دلیل تغذیه از گیاهان آبی کنترل کننده گیاهان آبی محسوب می شود، لذا از نظر اقتصادی قابل توجه و دارای ارزش شیلاتی می باشد (زهتاب ور و همکاران، ۱۳۹۰). این ماهی بدون سبیلک و دارای باله ی پشتی کوتاه است، سر از بالا به پایین فشرده و پهن، رنگ بدن سفید متمایل به سبز می باشد (حسین پور حموله و همکاران، ۱۳۸۹). با توجه به اینکه ماهیان گرمابی به علت پرورش در استخرهای خاکی بیشتر در معرض بیماریهای عفونی هستند، یکی از ضد عفونی کننده های مورد استفاده برای کنترل جلبک ها و عوامل بیماری زا، سولفات مس آبدار،  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  است که با غلظت ۱-۰/۲۵ میلی گرم در لیتر بسته به شرایط فیزیکی آب استفاده می شود (مشتاقی و همکاران، ۱۳۹۱). از طرفی فاضلاب های صنعتی و شهری و پساب های کشاورزی هر کدام حاوی مقادیر متناهی فلزات سنگین هستند که پس از ورود به محیط های آبی موجب آلودگی و تجمع در بدن موجودات آبی می شوند (ناجی و همکاران، ۱۳۸۵). نانو ذرات با اندازه ۱۰۰-۱۰ نانو متر، به دلیل بزرگی نسبت سطح به حجم، زیست فعالی بالایی دارند (Chang et al., 2012) اکثر نانو ذرات در گونه های جانوری موجب ایجاد استرس اکسیداتیو و تغییرات تولید مثلی می گردند و با تاثیر بر آنزیم های بدن، اثرات کاهش طول عمر و سرطانزایی دارند (Roh et al., 2009). نانو ذرات اکسید مس با استفاده فراوان در زندگی روزمره، به محیط های آبی وارد شده و آسیب های متعددی در بافت های موجودات آبی ایجاد می کنند. سمیت نانو ذرات اکسید مس نه تنها از طریق تولید گونه های اکسیژن فعال، بلکه از طریق سرکوب کردن آنتی اکسیدان های داخل سلولی نیز می باشد. گونه های اکسیژن فعال می توانند DNA را بشکنند و بر بیان ژن تاثیر بگذارند. اثرات سمی این نانو ذره، شامل ایجاد استرس اکسیداتیو و برهم زدن فعالیت یون ها و آنزیم ها می باشد (Chang et al., 2012). آبشش به دلیل انتقال گازهای تنفسی، تنظیم اسمزی و

تبادل یونی، یکی از اندام های حیاتی در آبزیان می باشد (احمد مرادی و همکاران، ۱۳۹۲). غلظت کشنده ( $\text{LC}_{50}$ ) سولفات مس در ماهی آمور به مدت ۲۴ ساعت، ۲/۴۲ میلی گرم در لیتر گزارش شده است (Nekoubin et al., 2012) غلظت کشنده سولفات مس در تاسماهی ایرانی ۰/۱۵ گرم گزارش شد. در پژوهشی، اثر مقایسه ای سولفات مس و نانو ذره اکسید مس در ماهی قزل آلا مورد بررسی قرار گرفت، نتایج نشان داد که سولفات مس اثر بیشتری بر آبشش دارد (Al-Bairuty et al., 2013). بررسی تاثیر برخی فلزات سنگین از جمله سولفات مس، سولفات روی و سولفات جیوه بر بافتهای ماهی کپور معمولی آسیب های زیادی در کبد، کلیه، آبشش و روده ماهیان نشان داده است، اما در عضله و قلب تاثیر قابل توجهی مشاهده نشد (رستمی بشمن، ۱۳۷۹). همچنین در تقسیم بندی فلزهای سنگین از لحاظ میزان سمیت مس دارای سمیت شدید و آهن و سلیوم دارای سمیت ملایم هستند (عبیدی و پذیرا، ۱۳۹۷). بر طبق پژوهشهای انجام شده، اثر مقایسه ای سولفات مس و نیترات سرب بر پاسخ های حرکتی ماهی آمور مورد بررسی قرار گرفت که اثر سولفات مس بیشتر بود (Nekoubin et al., 2012). همچنین در بررسی انباشتگی نانوذرات مس در بدن نوجوان کپور معمولی، بیشترین انباشتگی در روده و آبشش ماهی گزارش شد (Zhao et al., 2011). محوریت پژوهش حاضر بررسی اثر دو ماده نانو اکسید مس و سولفات مس بر درصد بازماندگی و شاخص های رشد و همچنین آسیب های بافتی بر آبشش ماهی کپور علفخوار بود.

## مواد و روش کار

تعداد ۲۰۰ بچه ماهی آمور با میانگین وزن  $4/5 \pm 0/5$  گرم از مرکز پرورش ماهی های گرمابی در نیشابور (خراسان رضوی) خریداری شد. سپس ماهی ها در کیسه های هوادهی شده به آزمایشگاه منتقل و در ۵ آکواریوم با ابعاد  $35 \times 45 \times 50$  سانتیمتر (۷۸ لیتر) که از قبل با هیپوکلریت سدیم شستشو و ضد عفونی شده بودند، رها شدند (Ghazala et al., 2011). در هر آکواریوم ۲۰ ماهی

به مدت کمی با کیسه ی دارای هوا قرار داده شد سپس، جهت سازگاری با شرایط جدید، به مدت ۲ هفته قبل از مواجهه، در آب نگهداری و با غذای با نام تجاری بیومار (مخصوص ماهی کپور) با قطر ۰/۸ میلی متر تغذیه شدند. در این مدت شرایط ۱۲ ساعت نور و تاریکی رعایت شد (Koprucu, 2012). ماهی ها در دو نوبت ساعت ۱۰ صبح و ۵ بعد از ظهر به میزان ۳-۵ درصد وزن بدن غذادهی شدند. بعد از دو هفته گروه بندی ماهیان شامل: تیمار سولفات مس با غلظت ۱ میلی گرم بر لیتر، تیمار سولفات مس با غلظت ۱/۵ میلی گرم بر لیتر، تیمار نانوذرات اکسید مس ۵۰ نانومتر با غلظتهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر و گروه شاهد انجام شد (Al- Nekoubin et al., 2012., Bairuty et al., 2013). فاکتورهای فیزیوشیمیایی آب آکواریم: تجزیه شاخص های موجود در آب بوسیله شرکت آب و فاضلاب مشهد انجام شد که شامل  $pH=8/03$ ،  $Ca^{2+}=77/1\text{ mg}^2+$ ،  $Na^+=143/5$ ،  $K^+=6/3$  سختی کل  $=360/36$  و سختی کلسیم  $=194/04$  بود و بوسیله دستگاههای، pH متر WTW Inolab level 2 اندازه گیری شد. میزان اکسیژن محلول بوسیله پمپ هوای الکتریکی بالاتر از  $7/55 \pm 0/55\text{ mg/L}$  نگهداری شد. روزانه ۱/۳ آب آکواریم ها تعویض شد (Nekoubin et al., 2012).

### مراحل تهیه سوسپانسیون حاوی نانو ذرات

نانو ذرات اکسید مس ۵۰ نانومتر از شرکت پیشگامان نانو در مشهد تهیه شد. آنالیز ساختاری و فازی نانو ذره مس با

استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) در مرکز پژوهشهای متالوژی رازی تهران به روش پوشش دهی با طلا انجام شد (Al-Bairuty et al., 2013, Zhao, et al., 2011). سپس نانو ذرات اکسید مس در ۲۰۰ سی سی آب در دستگاه اولتراسونیک در دو نوبت و هر نوبت ۲۰ دقیقه سونیک شد و بلافاصله مورد استفاده قرار گرفت (Abdel-Khalek et al., 2015, Zhao et al., 2011). سولفات مس پنج آبه ( $CuSO_4.5H_2O$ ) متداول ترین فرم این نمک است که به رنگ آبی روشن است. سولفات مس مرک آلمان از آزمایشگاه دانشگاه تهیه شده و در غلظت های ۱ و ۱/۵ میلی گرم در لیتر، مورد استفاده قرار گرفت.

### زیست سنجی بچه ماهیان

وزن سنجی ماهیان در روزهای پنجم، دهم، بیستم و سی ام پس از تیمار با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ انجام شد، طول کل (از نوک پوزه تا انتهای باله دمی) ماهیان نیز با کولیس مدرج با دقت ۰/۰۱ میلی متر اندازه گیری شد (حسین پور حموله و همکاران، ۱۳۸۹). در هر بار ۳ ماهی به صورت تصادفی از هر آکواریم وزن سنجی و طول سنجی شدند و شاخص های وزن اکتسابی بچه ماهیان یا (WG) weight gain، نرخ رشد روزانه (DGR، daily growth rate)، نرخ رشد ویژه یا specific growth rate (SGR)، درصد افزایش وزن WG%، شاخص وضعیت FC و ضریب تبدیل غذایی یا feed conversion Ratio (FCR)، از طریق فرمول های ذیل محاسبه گردیدند (عنایت غلامپور و همکاران، ۱۳۹۰).

$100 \times \text{تعداد روزهای پرورش} / \text{وزن نهایی ماهی در پایان دوره پرورش} - \text{وزن ماهی در ابتدای دوره پرورش} = \text{DGR} (\text{gr})$

$\text{طول اولیه} - \text{طول ثانویه} = \text{افزایش طول LG}$  (Koprucu., 2012)  $\text{وزن اولیه} - \text{وزن نهایی} = \text{وزن اکتسابی (WG)}$

(Luz., 2008)  $L^3$  (سانتی متر)  $\times 100 / \text{وزن نهایی (گرم)} = \text{شاخص وضعیت (FC)}$

(Koprucu., 2012)  $\text{دوره پرورش به روز} / 100 \times \text{وزن اولیه Ln} - \text{وزن ثانویه Ln} = \text{ضریب رشد ویژه SGR\%}$

(Luz., 2008)  $\text{افزایش وزن} / \text{خوراک مصرفی} = \text{ضریب تبدیل خوراک FCR}$

(Lin et al., 2012)  $100 \times \text{تعداد ماهی مانده} \div \text{تعداد ماهی اولیه} = \text{درصد بازماندگی}$

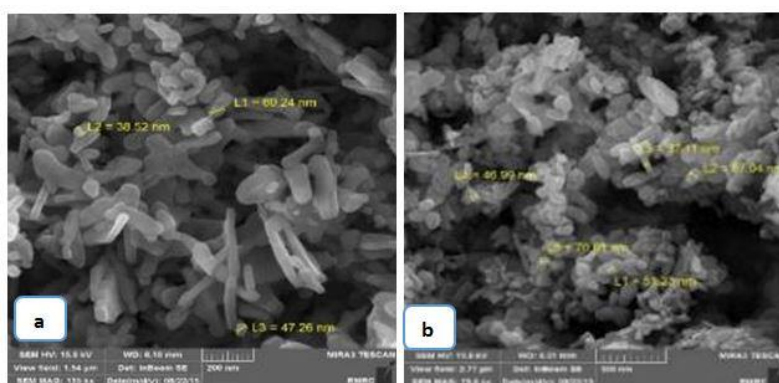
وایانس یک طرفه (One-Way ANOVA) بررسی شد و جداول مربوطه در نرم افزار Excel رسم شد. به منظور مطالعات میکروسکوپی، بافت آبشش جدا شده، نمونه ها

پژوهش حاضر با استفاده از طرح کاملاً تصادفی، در سه تکرار انجام گردید و شاخص های DGR، WG، FC، SGR و FCR بین تیمارهای مختلف و شاهد با آنالیز

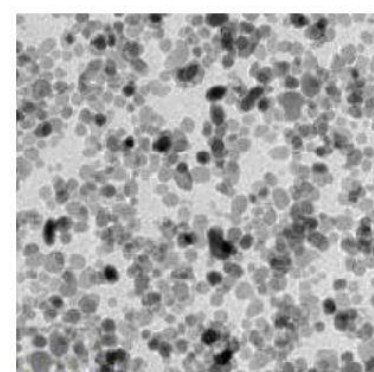
در فیکساتور فرمالین ۱۰ درصد بافری فیکس و پس از انجام مراحل پاساژ بافت، رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین انجام شد (حسین پور حموله و همکاران، ۱۳۸۹).

## نتایج

نانو ذره اکسید مس مورد استفاده با میانگین قطر ۵۰ نانو متر بود (شکل‌های ۱ و ۲). تجزیه ساختاری نانو ذره بیسی



شکل ۲: a, b تصاویر نانو ذره اکسید مس (SEM)  
Figure 2: a, b, copper oxide nanoparticle images (SEM)



شکل ۱: تصویر نانو ذره اکسید مس (TEM)  
Figure 1: Copper oxide nanoparticle image (TEM).

جدول ۱: آنالیز ساختمانی نانو ذره اکسید مس

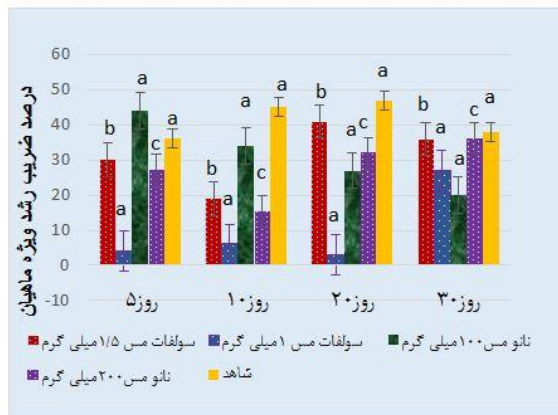
Table 1: structural analysis of copper oxide nanoparticles.

| It | Line | Int   | Error  | K      | Kr     | W%    | A%    | ZAF    | Ox%  | Pk/Bg | Class | LConf | HConf | Cat# |
|----|------|-------|--------|--------|--------|-------|-------|--------|------|-------|-------|-------|-------|------|
| O  | Ka   | ۶۲/۸  | ۰/۸۴۷۳ | ۰/۱۰۸۴ | ۰/۰۹۴۰ | ۱۷/۸۸ | ۴۶/۳۸ | ۰/۵۲۵۵ | ۰/۰۰ | ۱۱/۶۲ | A     | ۱۷/۲۱ | ۱۸/۵۵ | ۰/۰۰ |
| cu | Ka   | ۱۴۶/۵ | ۱/۰۱۴۸ | ۰/۸۹۱۶ | ۰/۷۷۲۷ | ۸۲/۱۲ | ۵۳/۶۲ | ۰/۹۴۰۹ | ۰/۰۰ | ۲۹/۱۰ | A     | ۸۰/۱۰ | ۸۴/۱۴ | ۰/۰۰ |
|    |      |       |        | ۱/۰۰۰  | ۰/۸۶۶۶ | ۱۰۰/۰ | ۱۰۰/۰ |        | ۰/۰۰ |       |       |       |       | ۰/۰۰ |

سی پس از مواجهه در گروه های سولفات مس ۱ و ۱/۵ میلی گرم در لیتر از همه گروه ها بیشتر بود. در روز سی پس از مواجهه، بعد از گروه سولفات مس، ضریب تبدیل غذا در گروه نانو مس ۲۰۰ میلی گرم در لیتر از همه بیشتر بود. طی دوره آزمایش در شاخص میانگین وزن، ضریب رشد ویژه و شاخص وضعیت، در ماهیان گروه سولفات مس ۱/۵ میلی گرم در لیتر و نانو اکسید مس ۲۰۰

## نتایج زیست‌سنجی

تفاوت معناداری بین تیمارهای مختلف در مقایسه با گروه شاهد در شاخص وزن اکتسابی و نرخ رشد، افزایش طول و میانگین ضریب تبدیل غذا مشاهده نشد ( $p > 0.05$ ). میانگین ضریب تبدیل غذا در گروه نانو اکسید مس با غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر و بعد از آن در گروه شاهد از همه گروه ها کمتر بود. ضریب تبدیل غذا در روزهای پنج و

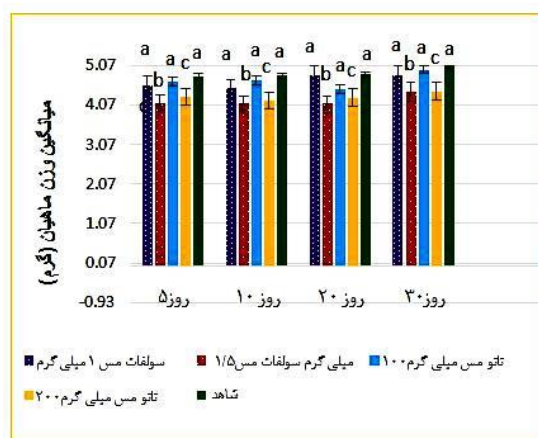


نمودار ۳: میانگین ضریب رشد ویژه ماهیان در طی آزمایش  
Graph 3: fish specific growth rate during the test

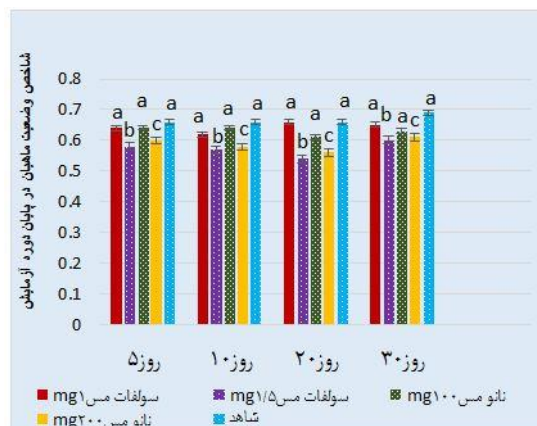
### آسیب های بافتی آبشش ماهیان

طبق نتایج پژوهش حاضر در بررسی میکروسکوپی آبشش، آسیب های زیادی در همه گروه ها (به جز شاهد) و بویژه در گروه سولفات مس ۱/۵ میلی گرم در لیتر به شرح زیر دیده شد. در روز پنجم پس از مواجهه، بیشترین آسیب ها در گروه سولفات مس ۱/۵ میلی گرم در لیتر شامل دفرمیتی (Deformity)، پرخونی (Congestion) و پریاختگی (Hyperplasia) مشاهده شد (شکل ۳). در روز دهم پس از مواجهه، بیشترین آسیب ها در گروه سولفات مس ۱/۵ میلی گرم بر لیتر شامل دفرمیتی، پرخونی، پریاختگی و نکروز نیز مشاهده گردید (شکل ۴). در روز بیستم پس از مواجهه، بیشترین آسیب ها در گروه سولفات مس ۱/۵ میلی گرم در لیتر شامل دفرمیتی و پریاختگی شدید و پرخونی، نکروز و جوش خوردگی تیغه مجاور نیز بچشم خورد (شکل ۵). در روز سی ام پس از مواجهه، نتایج مشابه روز بیستم بود.

میلی گرم در لیتر کاهش معنی داری ( $p \leq 0.05$ ) در مقایسه با گروه شاهد مشاهده شد (نمودارهای ۱، ۲ و ۳). درصد بازماندگی: درصد بازماندگی پس از ۱۵ روز در گروه شاهد و نانو اکسید مس ۱۰۰ میلی گرم در لیتر، صد درصد، در گروه نانو مس ۲۰۰ میلی گرم در لیتر و سولفات مس ۱ میلی گرم در لیتر ۸۵ درصد و در گروه سولفات مس ۱/۵ میلی گرم در لیتر ۷۰ درصد بود. مقایسه شاخص های رشد، در جدول ۲ ارائه شده است.



نمودار ۱: میانگین وزن ماهیان طی آزمایش  
Graph 1: fish average weight during the test

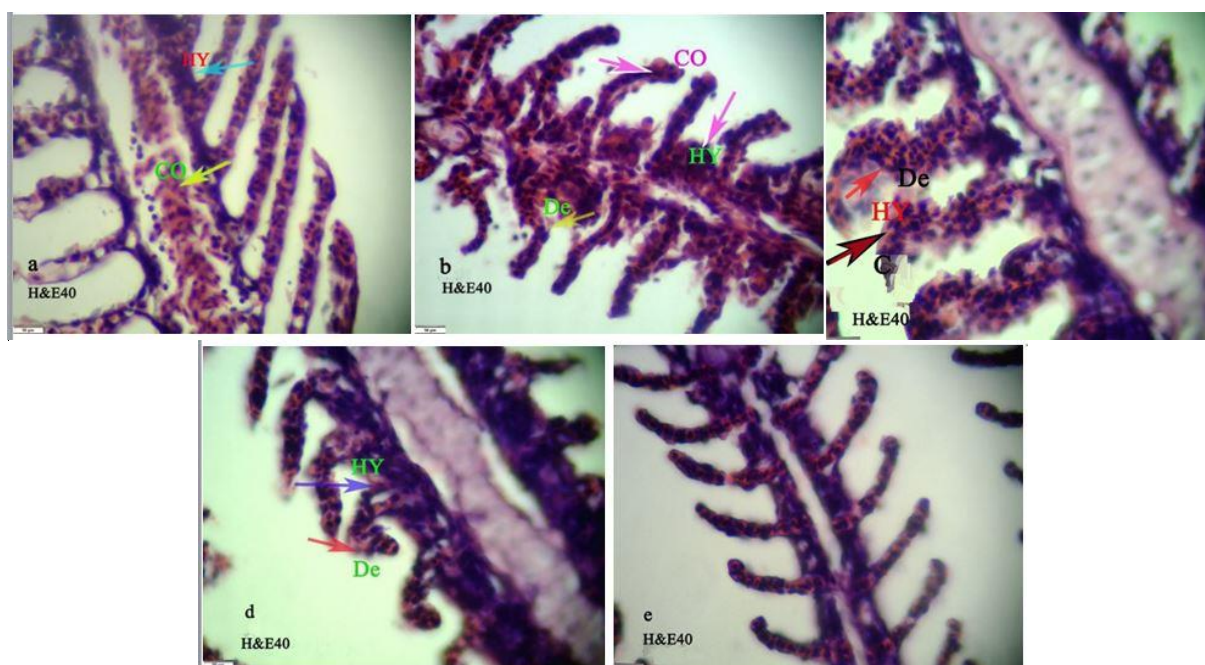


نمودار ۲: شاخص وضعیت ماهیان طی آزمایش  
Graph 2: fish status indicator during the test

جدول ۲: مقایسه شاخصهای رشد ماهیان آمور، حروف غیر مشابه نشانه اختلاف معنا دار هستند.

Table 2: Comparison of Amur fish growth indices.

| تیمار                  | میانگین وزن             | وزن اکتسابی (WG)        | افزایش طول (LG)         | ضریب تبدیل غذا (FCR)    | ضریب رشد ویژه (SGR)     | شاخص وضعیت (FC)         | نرخ رشد (DGR)            |
|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| سولفات مس ۱ mg/L       | 4.82± 0.18 <sup>a</sup> | 0.03± 0.25 <sup>a</sup> | 0.04± 0.06 <sup>a</sup> | 22.2± 34.3 <sup>a</sup> | 0.26± 0.10 <sup>a</sup> | 0.66± 0.04 <sup>a</sup> | 0.06± 0.05 <sup>a</sup>  |
| سولفات مس ۱/۵ mg/L     | 4.41± 0.31 <sup>b</sup> | 0.31± 0.47 <sup>a</sup> | 0± 0.09 <sup>a</sup>    | 21.4± 28.6 <sup>a</sup> | 0.12± 0.11 <sup>b</sup> | 0.54± 0.08 <sup>b</sup> | 0± 1.03 <sup>a</sup>     |
| نانو اکسید مس ۱۰۰ mg/L | 4.62± 0.29 <sup>a</sup> | 0.19± 0.24 <sup>a</sup> | 0.07± 0.07 <sup>a</sup> | 1.4± 0.92 <sup>a</sup>  | 0.05± 0.33 <sup>a</sup> | 0.61± 0.01 <sup>a</sup> | -0.04± 0.07 <sup>a</sup> |
| نانو اکسید مس ۲۰۰ mg/L | 4.27± 0.32 <sup>c</sup> | 0.20± 0.22 <sup>a</sup> | 0.06± 0.05 <sup>a</sup> | 20± 16.8 <sup>a</sup>   | 0.21± 0.10 <sup>c</sup> | 0.58± 0.07 <sup>c</sup> | 0.01± 0.01 <sup>a</sup>  |
| شاهد                   | 5.07± 0.47 <sup>a</sup> | 0.23± 0.24 <sup>a</sup> | 0.06± 0.09 <sup>a</sup> | 6 ± 5.43 <sup>a</sup>   | 0.23± 0.1 <sup>a</sup>  | 0.66± 0.03 <sup>a</sup> | 0.04± 0.04 <sup>a</sup>  |



شکل ۳: برش آبخش ماهیان انگشت قد آمور روز پنجم پس از تیمار، رنگ آمیزی H&E, X40

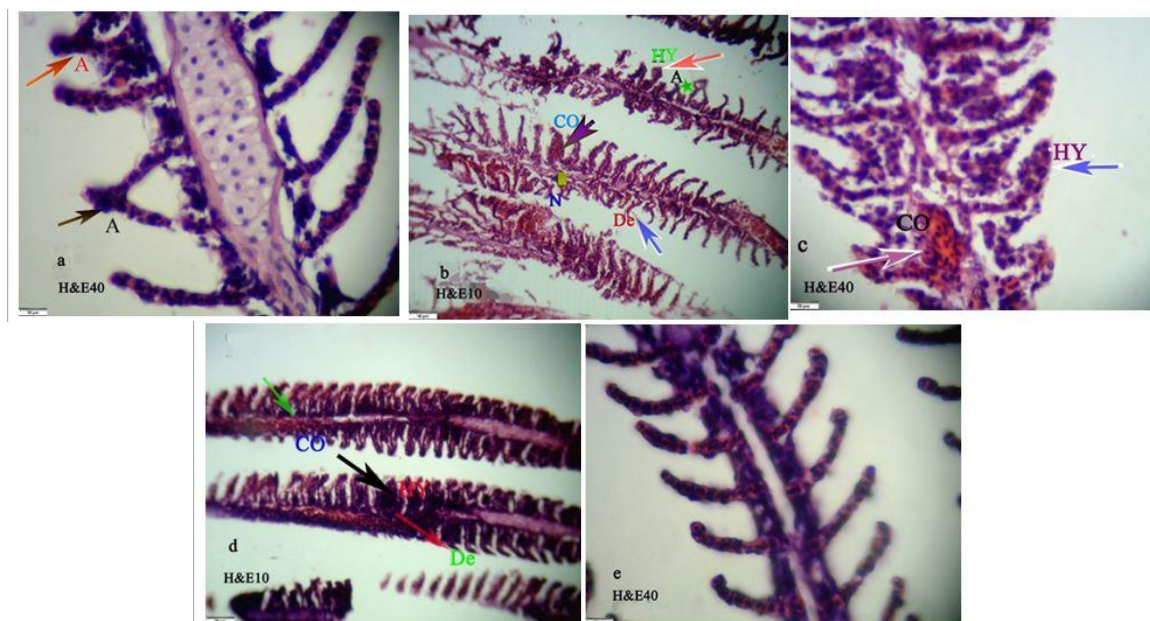
Figure 3: Gill cutting of Amur fingerling on fifth day after treatment.

a: گروه سولفات مس ۱mg/l، پریاختگی، Hy، پریاختگی (congestion) Co، پرخونی،

b: گروه سولفات مس ۱/۵ mg/l، Co، Hy، De، چماقی شدن تیغه های آبخش (دفرمیتی)،

c: گروه نانو اکسید مس ۱۰۰ mg/l، De، Hy،

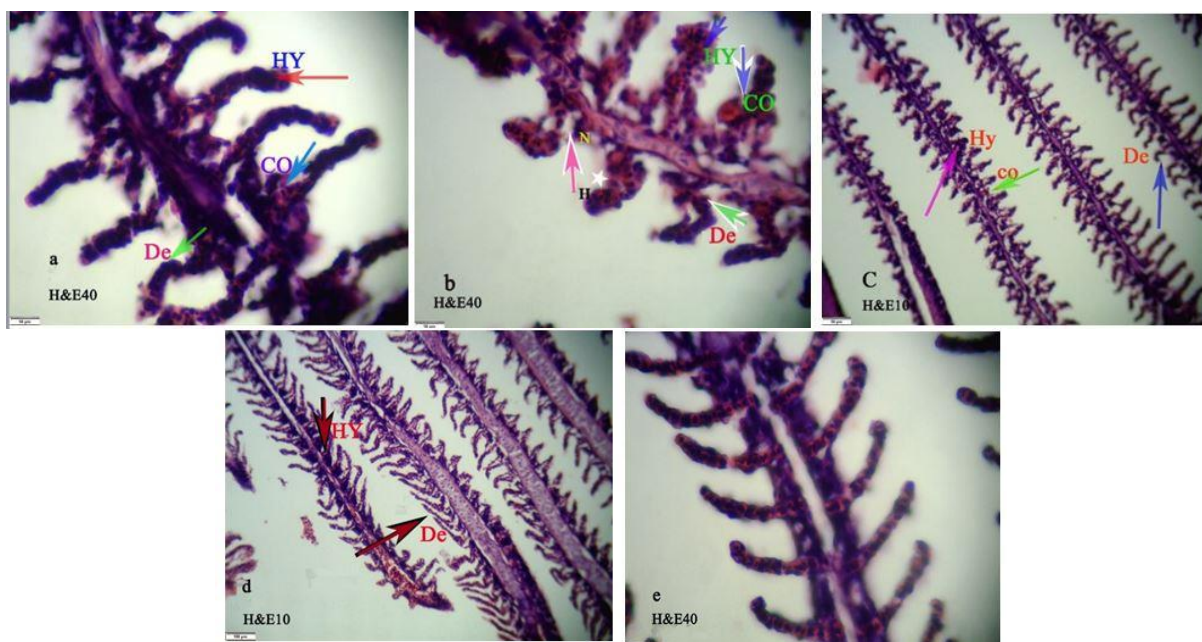
d: گروه نانو اکسید مس ۲۰۰ mg/l، De، Hy



شکل ۴: برش آبشش ماهیان انگشت قد آمو، روز دهم

Figure 4: Gill cutting of Amur fingerling on tenth day after treatment

a: گروه سولفات مس  $1 \text{ mg/l}$  Co، پرخونی، Hy، پریاختگی، De، دفرمیتی H&E، X40. b: گروه سولفات مس  $1/\Delta \text{mg/l}$  Co، Hy، De، N، نکروز، c: گروه نانو اکسید مس  $100 \text{ mg/l}$  Co، Hy، De H&E، X10. d: گروه نانو اکسید مس  $200 \text{ mg/l}$  Hy، De H&E، X10. e: گروه شاهد



شکل ۵: برش آبشش ماهیان انگشت قد آمو روز بیستم پس از تیمار

Figure 5: Gill cutting of Amur fingerling on twentieth day after treatment.

a: گروه سولفات مس  $1 \text{ mg/l}$  A، چسبندگی، H&E، X40. b: گروه سولفات مس  $1/\Delta \text{mg/l}$  Co، Hy، N، De، A، رنگ آمیزی H&E، X10. c: گروه نانو اکسید مس  $100 \text{ mg/l}$  Co، Hy، De، رنگ آمیزی H&E، X10. d: گروه نانو اکسید مس  $200 \text{ mg/l}$  Co، Hy، De، رنگ آمیزی H&E، X10. e: گروه شاهد

## بحث

در بین گروه‌ها، اختلاف معنا داری در طول، وزن اکتسابی ضریب تبدیل غذا دیده نشد، اما در گروه‌های سولفات مس ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر و بعد از آن در گروه نانو اکسید مس ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر رشد ویژه، شاخص وضعیت و میانگین وزن از سایر گروه‌ها کمتر بود، درصد بازماندگی نیز در گروه‌های سولفات مس ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر از همه کمتر بوده است، در بررسی میکروسکوپیک در آبشش، اثرات پاتولوژیک متعدد در همه گروه‌ها (به جز شاهد) و بویژه در گروه سولفات مس ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر شامل پریاختگی، پرخونی، چماقی شدن تیغه‌های ثانویه و تحلیل رفتن تیغه اولیه آبششی مشاهده شد. در تیمار نانو ذره اکسید مس حالت سوختگی و تیرگی (رنگ خاکستری تیره) پوست ایجاد شد که در تیمار نانو مس ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر بیشتر بود و ممکن است به علت تجمع نانو ذرات در پوست ماهیان باشد و حرکات شدید سرپوش آبششی، بلعیدن هوا در ماهیان دیده شد که بعد از مدت کوتاهی می‌مردند. این آسیب ممکن است به علت تغییرات ایجاد شده در آبشش آنها و اختلال و کاهش در عملکرد تنفسی باشد. در پژوهشی که به وسیله (Nekoubin et al., 2012) با عنوان بررسی اثر سولفات مس ۱/۷-۲/۴ میلی‌گرم در لیتر، بر حرکات ماهی کپور نوجوان علف خوار با وزن  $4 \pm 0.5$  گرم انجام شد، حرکات سرپوش آبششی و بلعیدن هوا شدیدتر دیده شد که می‌تواند به علت افزایش غلظت مورد استفاده باشد (Nekoubin et al., 2012). علاوه بر این در پژوهش حاضر حرکات دسته جمعی و جمع شدن در گوشه آکواریوم و گاهی حرکات رو به عقب در همه تیمارها، مشاهده می‌شد که همراستا با پژوهش انجام شده توسط جوینده و همکاران (۱۳۹۲) به عنوان اثر پرمنگنات پتاسیم روی ماهی کپور علف خوار بود. در پژوهش حاضر درصد بازماندگی گروه‌ها بعد از ۱۵ روز به این ترتیب بود: گروه‌های شاهد و نانو اکسید مس ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر صد درصد بازماندگی داشتند؛ نانو اکسید مس ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر و سولفات مس ۱ میلی‌گرم در لیتر، ۸۵ درصد؛ در حالیکه گروه سولفات مس ۱/۵

میلی‌گرم در لیتر، ۷۰ درصد بازماندگی داشتند که می‌تواند به علت آسیب‌های وارد شده به آبشش باشد که به تدریج بازماندگی ماهی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. در ضریب رشد ویژه، میانگین افزایش وزن بدن و شاخص وضعیت در بین تیمارهای سولفات مس ۱/۵ و نانو اکسید مس ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر کاهش معناداری مشاهده شد. گروه‌های سولفات مس ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر و نانو اکسید مس ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر، رشد ویژه کمتری نسبت به بقیه گروه‌ها داشتند که می‌تواند در ارتباط با تاثیر گذاری فلزات سنگین در مخاط و پرزهای روده باشد و با پژوهشی که به وسیله Zhao و همکاران (۲۰۱۱) با عنوان اثر نانو ذرات مس بر نوجوان کپور همراستا می‌باشد و نشان می‌دهد که نانو ذرات مس ابتدا در روده و بعد از آن در آبشش تجمع می‌نمایند و همچنین همراستا با پژوهشی به عنوان پایش زیستی فلزات سنگین سرب و مس و نیکل و آهن روی و کادمیم توسط بافتهای مختلف سیاه ماهی که توسط فرهادی و یآوری (۱۳۹۱) انجام گرفت که نشان دهنده تجمع بیشتر فلزات سنگین در آبشش نسبت به عضله بود. در شاخص میانگین وزن نیز گروه سولفات مس ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر و بعد از آن گروه نانو اکسید مس ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر، میانگین وزنی کمتری را نشان دادند که می‌تواند به دلیل اثر تخریبی این ماده در پرزهای روده در این گروه‌ها باشد. شاخص ضریب تبدیل غذا در گروه نانو اکسید مس ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر ( $p = 0.05$ ) به دست آمد که از همه گروه‌ها کمتر بوده است و در مقابل در روزهای پنج و بیست در گروه‌های سولفات مس ضریب تبدیل غذا از همه گروه‌ها بیشتر بوده است و ممکن است، با ادامه آزمایش در پژوهش‌های بعدی تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های تیمار و شاهد مشاهده شود. در این پژوهش آسیب‌های آبششی شامل از بین رفتن و نکرور رشته‌های اولیه آبشش و پریاختگی، پرخونی، چماقی شدن رشته‌های ثانویه آبششی بویژه در گروه‌های سولفات مس ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد، آسیب‌های آبششی می‌توانند به علت پاسخ عمومی به تحریکات یا برای سازش باشد که بر تبادلات گازی تاثیر می‌گذارد و در حالت‌های شدیدتر منجر به چسبیدگی دو

علف خوار، فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی تکوین  
 جانوری ۴۸-۴۱: (۱) ۷، ۲۴.

حسین پور حموله، م.، پیغان، ر.، محمدیان،  
 ب.، ۱۳۸۹. بررسی ضایعات آبششی ناشی از آلودگی  
 انگلی در ماهیان کپور علفخوار، مجله بیولوژی دریا،  
 ۵۵-۴۷: (۱)، ۲.

رستمی بضمن، م.، سلطانی، م.، ساسانی، ف.، ۱۳۷۹.  
 اثرات هیستوپاتولوژی برخی فلزات سنگین (سولفات  
 مس، سولفات روی، سولفات جیوه و کلرور کادمیم)  
 بریافت های کپور معمولی، مجله دامپزشکی دانشگاه  
 تهران، ۳-۱۱: (۴)، ۵۵.

عبیدی، ر.، پذیرا، ع.، ۱۳۹۷. بررسی سطح غلظت  
 فلزات ضروری (مس، آهن و سلنیوم) در بافتهای  
 عضلات، کبد و آبشش ماهی  
 قباد (*Scomberomorus guttatus*) در بندر بوشهر،  
 یافته علمی، مجله علمی شیلات، ۱۷۰-۱۶۵: (۱)، ۲۷،  
 DOI:10.22092/ISFJ.2018.116455

عنایت غلامپور، ط.، ایمانپور، م.، حسینی، ع.،  
 شعبانپور، ب.، ۱۳۹۰. تأثیر سطوح مختلف شوری بر  
 شاخصهای رشد، میزان بازماندگی، غذا گیری و  
 پارامترهای خونی در بچه ماهیان سفید مجله زیست  
 شناسی ایران، ۵۴۹-۵۳۹: (۴)، ۲۴.

فرهادی، ا.، یآوری، و.، ۱۳۹۱. پایش زیستی فلزات  
 سنگین مس، روی، نیکل، آهن، سرب، کادمیم، توسط  
 بافتهای مختلف سیاه ماهی فلس ریز در رودخانه سزار  
 استان لرستان، مجله علمی شیلات ۱۳۱-۱۲۶: (۳)،  
 ۲۲.

مشتاقی، ب.، نظامی، ش.، خارا، ح.، پژند، ذ.، شناور،  
 ع.، ۱۳۹۱. تأثیر سمیت حاد سولفات مس و پرمنگنات  
 پتاسیم بر آبشش و کبد بچه تاسماهی  
 ایرانی *Acipenser persicus* مجله علمی پژوهشی  
 زیست شناسی دریا، ۴۴-۳۵: (۱۵)، ۴.

ناجی، ط.، صفائیان، ش.، رستمی، م.، صبرجو،  
 م.، ۱۳۸۵. بررسی اثرات سولفات روی بر بافت آبشش  
 بچه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) علوم  
 و تکنولوژی محیط زیست، ۳۶-۲۹: (۲)، ۹.

تیغه مجاور و مرگ ماهیان می شود. مسمومیت ناشی از  
 فلزات سنگین مانند سولفات مس ممکن است به علت  
 ایجاد نقص در اعمال سلولی یا تداخل متقابل با ساختمان  
 های سلولی باشد (رستمی بضمن، ۱۳۷۹). همچنین  
 پریاختگی، جوش خوردگی دو تیغه مجاور، نکروز، مشاهده  
 شد که همراستا با مطالعه Al-Bairuty و همکاران  
 (۲۰۱۳)، با عنوان مقایسه تاثیر سولفات مس و نانو ذره  
 اکسید مس در ماهی قزل آلا بود. با توجه به غلظت مورد  
 استفاده سولفات مس ۱ و ۱/۵ میلی گرم در لیتر، در این  
 آزمایش و با توجه به شیوع دو نوع انگل، *Trichodina* و  
*Dactylogyrus* در ماهی کپور علف خوار و عوارضی  
 همچون تلائذکتازی و ادم و پریاختگی که این دو نوع انگل  
 ایجاد می کنند (حسین پور حموله و همکاران، ۱۳۸۹).  
 طبق این مطالعات استفاده از ضد عفونی کننده سولفات  
 مس، به مدت طولانی با عوارض زیادی بویژه در آبشش،  
 توام می باشد. در مورد نانو ذرات مس شناخت اثرات زیانبار  
 ناشی از این مواد می تواند هشدار در استفاده بی رویه و  
 جلوگیری از ورود آنها به محیط های آبی و کاهش اثرات  
 آسیب شناسی این ماده در موجودات آبی باشد. همچنین  
 مطالعات آسیب شناسی اندام های آبیان می تواند در  
 تشخیص و کاهش آلودگی های زیست محیطی مورد  
 استفاده قرار گیرد.

## تشکر و قدردانی

با سپاس فراوان از خانم دکتر شاهرخ آبادی، آقای دکتر  
 راجی و آقای سبحانی آقای مهندس مظفر و خانم مهندس  
 ثمری که در انجام این مطالعه کمک شایانی کردند.

## منابع

احمد مرادی، ا.، موسوی، م.، رضائی، آ.، ۱۳۹۲. بررسی  
 آسیب شناسی آبشش و پوست ماهیان گلدفیش و  
 آنجل در شهرستان های آبادان و خرمشهر، مجله  
 دامپزشکی ایران، ۲۷-۱۳: (۳)، ۹.

جوینده، ف.، صادق پور، ع.، خارا، ح.، پژند، ذ.، ۱۳۹۲.  
 تعیین LC<sub>50</sub> و ارزیابی ضد عفونی کنندگی پرمنگنات  
 پتاسیم بر بار میکروبی و پوست و آبشش ماهی کپور

- Abdel-Khalek, A. A.M., Kadry, M. R., Badran, Sh. M. and Assem, M., 2015.** Comparative toxicity of copper oxide bulk and nanoparticles in Nile Tilapia; *Oreochromis niloticus*: Biochemical and oxidative stress. *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 72: 43–57.
- Al-Bairuty, G., Shawa, B., Handya, R. and Henry, T., 2013.** Effects of waterborne copper nanoparticles and copper sulphate on rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 126:104-115.
- Chang, Ya. Nan, Zhang, M., Lin, X., Zhang, J. and Xing, G., 2012.** The Toxic Effects and Mechanisms of CuO and ZnO Nanoparticles. *Materials*, (5): 2850-2871, doi:10.3390/ma5122850
- Ghazala, R., Tabinda, A.B. and Yasar, A., 2011.** Growth response of juvenile GRASS CARP (*Ctenopharyngodon idella*) fed isocaloric diets with variable protein levels. *The Journal of Animal and Plant Sciences*, 21(4): 850-856.
- Koprucu, K., 2012.** Effects of dietary protein and lipid levels on growth, feed utilization and body composition of juvenile grass carp. *Journal of Fisheries Sciences*, 6(3):243-251 DOI: 10.3153/jfscom.2012028.
- Lin, S., Mao, S., Guan, Y., Luo, L., and Pan, Y., 2012.** Effects of dietary chitosan oligosaccharides and *Bacillus coagulans* on the growth, innate immunity and resistance of koi (*Cyprinus carpio koi*). *Aquaculture*, 342–343,36-41- DOI:10.1016/j.aquaculture.2012.02.009.
- Luz, R.K., Martinez-Alvarez, R.M. and De Pedro Delgado, N., 2008.** Growth, Food intake and metabolic adaptations in gold fish (*Carassius auratus*) exposed to different salinities. *Aquaculture*, 276: 171-178.
- Nekoubin, H., Gharedaashi, E., Hatefi, S., Sudagar, M., Ramezan, S et al., 2012.** Determination of LC<sub>50</sub> of Copper sulfate and lead(II) nitrate and behavioral response of Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Walailak journal*, 9(4)330
- Roh, Jy, Sim, Sj., Jongheop, Yi, J., Park, K., Chung, KH., Ryu, Dy., 2009.** Ecotoxicity of silver nanoparticles on the soil nematode *Caenorhabditis elegans* Using Functional Ecotoxicogenomics, *Environ. science and Technology* 43(10): 3933-3940, <https://doi.org/10.1021/es803477u>.
- Zhao, J., Wang, Z., Liu, X., Xie, X., Zhang, K. and Xing, B., 2011.** Distribution of CuO nanoparticles in juvenile carp (*Cyprinus carpio*) and their potential toxicity. *Journal of Hazardous Materials*, 197: 304 –310, doi:10.1016/j.jhazmat.2011.09.094.

## Comparing study of the effects of copper nanoparticles and copper sulphate on gill histopathology and growth rate of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)

Abdollahzadeh F.<sup>1\*</sup>; Khayatzaadeh J.<sup>1</sup>; Ghasemsadeh F.<sup>3</sup>

\*fatemehabdollahzadeh915@yahoo.com

1- Basic Sciences Department, Azad University of Mashhad, Iran

2- Mashhad Ferdowsi University, Iran

### Abstract

This study was performed in order to investigate effects of CuO nanoparticle (50 nm) and CuSO<sub>4</sub>, 5H<sub>2</sub>O as a disinfectant, on growth indices and gill histopathology of grass carp fingerlings. For this aims, 200 grass carp fingerlings (4.5±0.5g), were divided to four treatments included: copper sulfate (1, 1.5 mg/L), CuO-NPs) 100, 200 mg/L) and control group with triplicate, then were studied during 30 days. They were fed with 0.8 French BioMar carp and sampled on, 5<sup>th</sup>, 10<sup>th</sup>, 15<sup>th</sup>, 20<sup>th</sup>, 30<sup>th</sup> day after exposure. Growth indices of fishes were analyzed by SPSS software. Also, the gill microscopic studies were done. Specific growth rate, condition index, average weight and survival respectively, in copper sulfate 1.5 mg/L group and then CuO-NPs 200 mg/L had significantly decreased (p<0.05). But other growth indices did not have significant differences. All treatments had gill injuries, especially in copper sulfate 1.5 mg/L several abnormalities such as hyperplasia, congestion, deformity in secondary lamella and degeneration in primary lamella, were observed. It seems that copper sulfate 1.5 mg/L and then CuO -NPs 200 mg/L, showed higher influence on growth indices, survival and pathological signs on gills. According to important role of gill in gas exchange, also synergy between these two substances, precise use of copper sulfate concentrations as disinfectant for any kind of fishes and necessity to consciously use of CuO-NPs is recommended.

**Keywords:** Copper Sulfate, CuO Nanoparticle, Grass Carp, Gill Histopathology, Growth index

\*Corresponding author