"مقاله پژوهشی"

اثرجایگزینی سولفات مس با نانو اکسید مس در جیره غذایی بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی و آسیب‌شناسی بافت روده ماهی قرمز (*Carassius auratus*)

سهیلا کریمیان کاکلکی[۱]، فردین شالویی *[۱]، محمد شادخواست[۲]، مهدی عرب مارکده[۳]

۱. گروه شیلات و محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و علوم زمین، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
۲. گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، ایران
۳. کارخانه تولید خوراک آبزیان فرادانه، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۲/۳۰

چکیده

عنصر مس یک میکرونوترینت ضروری در حیوانات برای رشد نرمال، نمو استخوان‌ها، بافت پیوندی، قلب و چندین عضو دیگر است؛ بدین جهت که حدود ۳۰ آنزیم شناخته شده از مس به عنوان کوفاکتور استفاده می‌کنند. خوراک تجاری باید میزان مس لازم را فراهم سازد، که به ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی فرم مکملی که مس در آن به غذا افزوده می‌شود، بستگی دارد. با این حال، صنعت خوراک به دلایل اقتصادی همچنان سولفات مس را ترجیح می‌دهد. این پژوهش به جهت ارزیابی اثرات منابع مختلف مس بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی و آسیب‌شناسی روده در ماهی قرمز، *Carassius auratus* انجام شده است. پنج رژیم آزمایشی شامل مقادیر متفاوت نانوذرات مس(۰، ۳، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره) و ۳ میلی‌گرم سولفات مس در کیلوگرم جیره غذایی تنظیم و به مدت ۸ هفته به ماهی قرمز داده شد (میانگین وزن و طول ابتدایی به ترتیب ۷/۷۸±۰/۶۷ گرم و ۵/۸۶±۰/۴۳ سانتی‌متر). در مقایسه با گروه شاهد فعالیت لیپاز و پروتئاز روده‌ای به وسیله‌ی نانوذرات مس افزایش و آمیلاز کاهش یافت ($p<۰/۰۵$). در این مطالعه، تغذیه ماهی قرمز با سولفات مس منجر به آسیب‌های بافتی همچون التهاب و نفوذ فراوان سلول‌های آماسی به شکل آنتریت حاد به‌همراه پرخونی در بافت روده ماهیان قرمز گردید. با توجه به نتیجه کلی این تحقیق، ۳ میلی‌گرم نانوذره مس در ۱کیلوگرم جیره غذایی باعث بهبود سلامت روده و گوارش روده‌ای شد؛ درحالیکه غلظت مشابه از سولفات مس تأثیرات منفی بر روده و آنزیم‌های گوارشی ماهی قرمز داشت. با این وجود، مطالعات بیشتری برای توجیه مکانیسم‌های مولکولی نانوذرات مس و همچنین غلظت‌های پایین‌تر سولفات مس نیاز است.

کلمات کلیدی: سولفات مس، نانواکسیدمس، بافت شناسی، روده، آنزیم‌های گوارشی، ماهی‌قرمز

* عهده‌دار مکاتبات (✉). fardin.shaluei@gmail.com

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.2.8.5]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.2.115]

مقدمه

مواد معدنی از جمله مهم‌ترین اجزای جیره غذایی آبزیان هستند که در تغذیه، فیزیولوژی و حیات اهمیت زیادی دارند (Prabhu *et al*., 2016). مس یک عنصر حیاتی یا ضروری کمیاب در جیره غذایی حیوانات از جمله ماهی است که نقش مهمی در استخوان سازی، تشکیل بافت پیوندی، قلب، سیستم ایمنی، ترمیم بافت-های آسیب دیده دارد (Scott *et al*., 2018). مس در ترکیب آنزیم‌های سیتوکروم اکسیداز، تیروزیناز، سوپراکسیددیسموتاز، آمین‌اکسیداز، لیزیل اکسیداز و سرولوپلاسمین وجود دارد. همچنین به نظر می‌رسد وجود عنصر مس برای تشکیل رنگدانه‌ی ملانین و رنگدانه‌های پوستی ضروری باشد. جزئی از بخش هِم در هموسیانین سخت‌پوستان، کوفاکتور در تیروزیناز و اسیداسکوبیک اکسیداز می‌باشد (Lall & Milley, 2008).

غذای تجاری باید میزان مس لازم را در یک فرم بیولوژیکی پرانرژی تأمین کند، که این به خواص فیزیکی و شیمیایی فرم مکملی بستگی دارد که به جیره افزوده شده است. میزان نیاز آبزی به مس به شرایط فیزیولوژیکی، نوع گونه، محتوای مس آب و میزان یون‌های روی، کادمیوم، آهن و مولیبدن غذا بستگی دارد که همگی به عنوان آنتاگونیست‌های متابولیکی مس می باشد (Kamunde *et al*., 2002). مس به میزان ۳ تا ۱۱ میلی‌گرم در هر کیلوگرم جیره غذایی، عنصری ضروری در خوراک بیشتر گونه‌های آبزی می‌باشد. به کارگیری ۳ میلی‌گرم مس در هر کیلوگرم جیره غذایی موجب افزایش رشد ماهی کپور معمولی انگشت‌قد و قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌گردد. میزان نیاز غذایی به مس در گربه ماهی روگاهی از ۱/۵ میلی‌گرم و میگوها از ۲۵ میلی‌گرم در هر کیلوگرم جیره غذایی و فراتر نیست (Lundebye *et al*., 1999). سولفات مس یک ترکیب معدنی متشکل از مس، گوگرد و اکسیژن است که مهم‌ترین منبع تأمین مس در خوراک دام، طیور و آبزیان می‌باشد (Scott *et al*., 2018). براساس مطالعات انجام شده، مس آلی یا مس به فرم نانوذرات در مقایسه با مس معدنی زیست فراهمی بیشتری دارد و اگر اندازه ذرات مولکول‌های بزرگ مس به اندازه ذرات نانو کاهش یابند، مولکول‌های کوچک به آسانی می‌توانند از روده جذب شده و در نتیجه گوارش‌پذیری مس در دستگاه گوارش افزایش می‌یابد. با این وجود، همچنان صنعت خوراک به دلایل توجیه اقتصادی سولفات مس را ترجیح می دهد (Scott *et al*., 2018).

نانوذرات با توجه به خواص منحصربه‌فرد فیزیکی و شیمیایی خود، می‌توانند در مطالعات بیولوژیکی و زیست‌محیطی مورداستفاده قرار گیرند و ازاین‌رو توجه دانشمندان و محققان زیادی را به خود جلب کرده‌اند. در صورتیکه اندازه مولکول‌های عناصر معدنی مانند مس به حد میلیاردم متر برسد، در واقع نانوذرات مس تولید می‌شود که با اینکار، سطح ویژه آن به‌طور قابل توجهی زیاد می‌شود. همچنین نسبت اتم‌های خارجی (سطحی) به داخلی با کاهش اندازه ذرات به‌سرعت افزایش می‌یابد و نانوذرات مس سطح خارجی بزرگتر و فعالیت سطحی بالاتری درمقایسه با مس معمولی خواهند داشت (Hajipour *et al*., 2012). لازم به ذکر است که انواع نانوذرات همانند نانوذرات مس براساس مقادیر آن‌ها در فرآیندهای زیستی به عنوان محرک و یا بازدارنده رشد و ایمنی عمل می‌کنند؛ لذا باید به میزان کاربرد آن‌ها در جیره غذایی و سمیت آن‌ها در آبزیان مختلف توجه ویژه‌ای شود. الگوی آنزیم‌های گوارشی می‌توانند بازتابی از عادات تغذیه‌ای ماهی باشند و همچنین می‌توانند ظرفیت گوارشی ماهی را منعکس کنند (Xiong *et al*., 2011). هضم و جذب

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.2.8.5]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.2.115]

فرآیندهای مهم در ارتباط با استفاده بهینه از جیره غذایی هستند و ثابت شده که آنزیم‌های دستگاه گوارش نقش مهمی در کارایی تغذیه و سلامتی میزبان بر عهده دارند. (Yufera *et al*., 2007). آثار بافتی یکی دیگر از شاخص‌های ارزیابی سلامت آبزیان است. مطالعه دستگاه گوارش ماهی و به‌ویژه بافت روده به‌عنوان یکی از پیچیده‌ترین بافت‌های بدن ماهی می‌تواند از نظر بافت‌شناسی، کالبدشناسی مقایسه‌ای، فیزیولوژی و زیست‌شناسی آبزیان بسیار حائز اهمیت باشد. همچنین مطالعه چگونگی عملکرد بافت روده در هنگام برخورد با عوامل بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا مانند مواد غذایی و یا مواد سمی و داروهای گوناگون از نظر فرآیند عملی آن بسیار مهم است (Debnath *et al*., 2007).

ماهی قرمز (*Carassius auratus*) یک ماهی بسیار مهم به لحاظ اقتصادی و مطالعاتی است. علاوه بر این، گونه بسیار مناسبی جهت مطالعات تولیدمثلی، ایمنی-شناسی، مطالعه فیزیولوژی غدد داخلی، سم‌شناسی و سلولی و مولکولی می‌باشد، زیرا از اندازه مناسبی جهت تحقیقات آزمایشگاهی برخوردار بوده و همچنین در اندازه کوچک به بلوغ جنسی می‌رسد و لقاح مصنوعی و پرورش لارو نسبتاً آسانی دارد؛ در واقع از این گونه به عنوان مدل جهت بررسی کپور ماهی‌ها استفاده می-شود (Munakata and Kobayashi., 2010). باوجود اهمیت اقتصادی ماهی قرمز، اطلاعات زیادی درمورد نیازهای غذایی آن به‌خصوص عناصر ضروری مثل مس و کارایی انواع آن در این ماهی وجود ندارد. بنابراین، با توجه به محدود بودن اطلاعات در این زمینه این مطالعه با هدف تعیین اثرات نانوذرات مس در مقایسه با سولفات مس بر عملکرد آنزیم‌های گوارشی و آسیب‌شناسی بافتی روده در ماهی قرمز انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

شرایط آزمایش

مراحل عملی و اجرایی پژوهش در سال ۱۳۹۷ انجام گردید. ماهیان قرمز به تعداد ۱۰۵ قطعه از مرکز تکثیروپرورش ماهیان زینتی استان چهارمحال و بختیاری تهیه و به مرکز تحقیقاتی آبزی‌پروری دانشگاه شهرکرد انتقال یافت. ماهیان دارای میانگین طول ۵/۸۶ ±۰/۴۳ سانتی‌متر و میانگین وزن ۷/۷۸±۰/۶۷ گرم بودند. دوره‌ی سازش‌پذیری ماهیان به شرایط آزمایشگاه، به مدت ۱۴ روز بود. طی یک دوره ۶۰ روزه، ماهی‌ها ۲ بار در روز به میزان ۴ درصد وزن بدن و به روش دستی تغذیه شدند. پارامترهای آب با استفاده از دستگاه مولتی‌پارامتر دوکاناله مدل HQ40D شرکت HACH آمریکا اندازه‌گیری و اطلاعات آن‌ها ثبت - گردید. در طی دوره آزمایش، میانگین درجه حرارت آب ۲±۲۰ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول با میانگین ۷ میلی‌گرم بر لیتر، سختی آب به میزان mg ۱۹۰$CaCO_3$/L ، pH در حدود ۷/۶ و EC به میزان ۴۵۰ میکروزیمنس بر سانتی‌متر بود.

تیمارهای مورد بررسی

در این تحقیق از یک تیمار شاهد و ۳ غلظت نانو اکسید مس (۳، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا) و غلظت توصیه شده سولفات مس برای کپور ماهیان به میزان ۳ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا استفاده شد (هریک با سه تکرارا) (جدول ۱) (Lundebye *et al*., 1999).

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.2.8.5]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.2.115]

جدول ۱: تیمارهای غذایی آزمایشی

تیمار	ماده مورد استفاده در تیمار
۱	شاهد
۲	سولفات مس (۳ میلی‌گرم/ کیلوگرم جیره غذایی)
۳	نانواکسیدمس (۳ میلی‌گرم/ کیلوگرم جیره غذایی)
۴	نانواکسیدمس (۵ میلی‌گرم/ کیلوگرم جیره غذایی)
۵	نانواکسیدمس (۱۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم جیره غذایی)

ساخت جیره‌های غذایی آزمایشی

در این پژوهش از جیره غذایی پایه براساس نیازهای غذایی ماهی قرمز و مخلوط معدنی فاقد ترکیبات مس استفاده گردید و سولفات مس ($CuSO_4.5H_2O$, Sigma-Aldrich) و نانواکسیدمس (تهیه‌شده از شرکت US Research Nanomaterials، با قطر ۴۰ نانومتر) با توجه به تیمارهای آزمایشی توزین و با جیره غذایی به خوبی مخلوط گردید و درنهایت خمیر حاصل به وسیله چرخ‌گوشت، پلت شده و برای خشک کردن، به مدت ۲۴ ساعت در معرض جریان هوا قرار داده شدند. اجزای غذایی مورداستفاده و آنالیز بیوشیمیایی آن‌ها در جدول ۲ آورده شده است. پس از اتمام مرحله ساخت، جیره‌های غذایی تا زمان مصرف در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. تصویر الکترونی نگاره (SEM) و نمودار طیف پراش اشعه X نانو اکسید مس در شکل ۱ نشان داده شده است.

جدول۲: اجزای غذایی مورد استفاده جیره‌های غذایی آزمایشی (gr/kg)

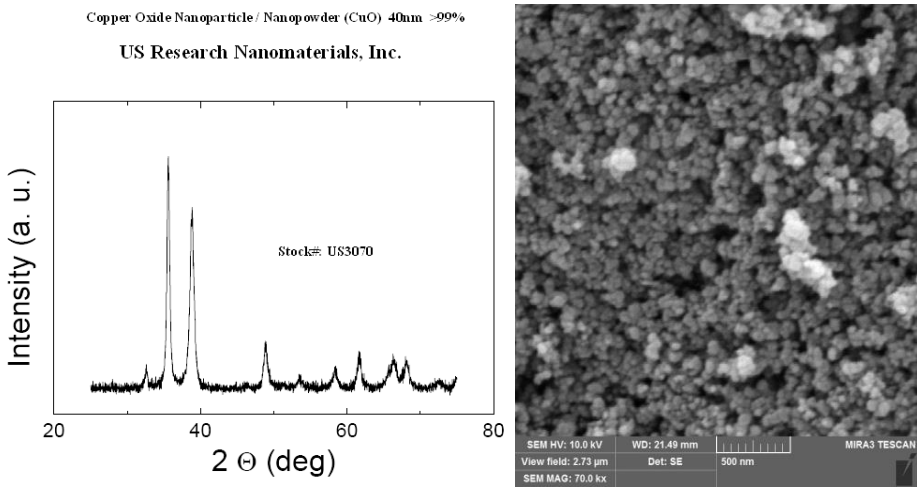
پودرماهی کیلکای صنعتی	۴۰
پودر ماهی جنوب HP	۴۰
پودر ماهی جنوب LP	۲۰
پودر گوشت	۱۳۰
آرد سویا	۲۴۰
آرد گندم	۱۱۶
آرد کلزا	۱۰۰
گلوتن گندم	۱۲/۵
آرد ذرت	۱۵۰
سبوس گندم	۱۲۵
دی کلسیم فسفات	۱۰
کربنات کلسیم	۴
مخلوط مواد معدنی و ویتامین	۱۲/۵

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.2.8.5]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.2.115]

جدول۳: آنالیز بیوشیمیایی جیره‌های غذایی آزمایشی

پروتئین خام (٪)	۳۱/۷۱	متیونین (٪)	۰/۶۷
پروتئین قابل هضم (٪)	۲۱/۷۶	متیونین+ سیستئین (٪)	۱/۰۶
چربی خام (٪)	۶/۹۰	لیزین (٪)	۱/۹۵
رطوبت (٪)	۱۱/۴۲	ترئونین (٪)	۱/۱۷
خاکستر (٪)	۸/۵۳	لوسین (٪)	۲/۲۸
نشاسته (٪)	۲۳/۲۵	والین (٪)	۱/۵۲
فیبر (٪)	۵/۱۷	آرژنین (٪)	۲/۰۱
انرژی خام (kcal/kg)	۳۴۰۰	ضریب پروتئین	۵/۴۸
انرژی قابل هضم (kcal/kg)	۲۸۹۰	DP/CP (٪)	۶۰/۵۶
انرژی قابل متابولیسم (kcal/kg)	۲۳۸۰	DE/DP (kcal/g)	۱۳
مواد معدنی جیره غذایی (gr or mg / kg) (NRC, 1993)			
فسفر	۶ –۸ gr		
منیزیم	۰/۴ -۰/۵ gr		
آهن	۱۵۰mg		
روی	۱۵ –۳۰ mg		
منگنز	۱۳ mg		
مس	mg متغیر		
کبالت	۰/۱ mg		
ویتامین های جیره غذایی (mg/kg) (NRC, 1993)			
تیامین	۰/۵		
پانتوتنیک اسید	۳۰		
ریبوفلاوین	۷		
پیریدوکسین	۶		
نیاسین	۲۸		
بیوتین	۱		
کولین	۵۰۰		
اینوزیتول	۴۴۰		
ویتامین A	۴۰۰۰IU		
ویتامین E	۱۰۰		
ویتامین C	Required		

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.2.8.5]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.2.115]



شکل ۱: تصویر الکترونی نگاره Scanning Electron Microscopy (SEM) و نمودار طیف پراش اشعه X (X-ray) نانوذرات اکسید مس

سنجش فعالیت آنزیم‌های گوارشی

برای سنجش فعالیت آنزیم‌های گوارشی در پایان ۶۰ روز دوره پرورشی، ۳ قطعه ماهی از هر تکرار (۹ قطعه از هر تیمار) به صورت تصادفی انتخاب و به‌وسیله پودر گل‌میخک به میزان ۳۰mg/L بی‌هوش شدند. (Velisek *et al*., 2005). در ادامه، کل دستگاه گوارش ماهیان با استفاده از تیغ اسکالپل خارج شد و بافت روده جداسازی گردید. به منظور به حداقل رساندن فعالیت آنزیمی، تشریح در مجاورت یخ انجام گرفت. ابتدا برای ساخت بافر هموژن، ۱۰۰ میلی مولار Tris-HCL، ۰/۱میلی مولار EDTA و ۰/۱ درصد میلی مولار Triton X-100 ترکیب شدند و سپس برای تنظیم pH بر روی ۷/۸ از محلول NaOH ۱ مولار استفاده گردید (Hamza *et al*., 2008). سپس از هر نمونه روده به میزان ۰/۵ گرم بوسیله ترازوی آزمایشگاهی با دقت ۰/۰۰۱ گرم توزین می‌گردید و در داخل ظرف هموژن گذاشته می‌شد. سپس به نسبت ۱ به ۹ (w/v) محلول بافر هموژن روی نمونه ریخته و نمونه‌ها در مجاورت یخ بوسیله هموژنایزر اولتراسونیک MTops مدل SR30 یکنواخت‌سازی انجام گردید (Rungruangsak-Torrissen *et al*., 2006). نمونه‌های هموژن شده به داخل ظروف اپندورف ۲ میلی‌لیتری ریخته شد. در ادامه به مدت ۳۰ دقیقه در سانتریفیوژ یخچال‌دار Hettich آلمان مدل Mikro22R در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۸۰۰۰U/min سانتریفیوژ شدند (Azarm *et al*., 2013). سپس مایع سطحی را با پیپت جدا کرده و در ویال‌های ۲ میلی‌لیتری تقسیم شدند و در نهایت از مایع رویی برای سنجش آنزیمی استفاده شد. در نهایت جهت سنجش فعالیت آنزیم‌های گوارشی لیپاز، پروتئاز و آمیلاز از کیت پارس آزمون، تهران، ایران و دستگاه اسپکتروفتومتر UV/Vis مدل DR6000 شرکت HACH آمریکا استفاده شد و میزان فعالیت آنها بر اساس $U\ mg\ protein^{-1}$ گزارش گردید.

آسیب شناسی بافتی

پس از بیهوشی، تشریح از سطح شکمی ماهیان صورت گرفت و کل دستگاه گوارش ماهیان با استفاده از تیغ خارج شد. برای خارج شدن ضایعات باقی مانده در دستگاه گوارش، شستشو با سرم فیزیولوژی انجام شد و سپس نمونه برداری از روده صورت پذیرفت و در ظروف حاوی فرمالین ۱۰ درصد بافر مرک آلمان قرار داده شد. برای تثبیت بهتر بافت‌ها بعد از ۲۴ ساعت

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.2.8.5]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.2.115]

نمونه‌ها خارج شده و در فرمالین جدید با همان ترکیب قرار داده شد. بعد از تثبیت سازی بقیه مراحل تهیه مقاطع بافتی انجام پذیرفت. از نمونه‌ها پس از انجام عملیات معمول بافت‌شناسی مقاطع بافتی به ضخامت ۶ میکرون تهیه گردید. و سپس به روش معمول رنگ-آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین Haematoxylin & Eosin (H&E) انجام شد و در نهایت عکس‌برداری از لام‌های تهیه‌شده زیر میکروسکوپ نوری Olympus CKX53ساخت ژاپن مجهز به دوربین با بزرگنمایی ۴۰۰X عکس‌برداری گردید (Martoja 1967 ,and Martoja–Pierson).

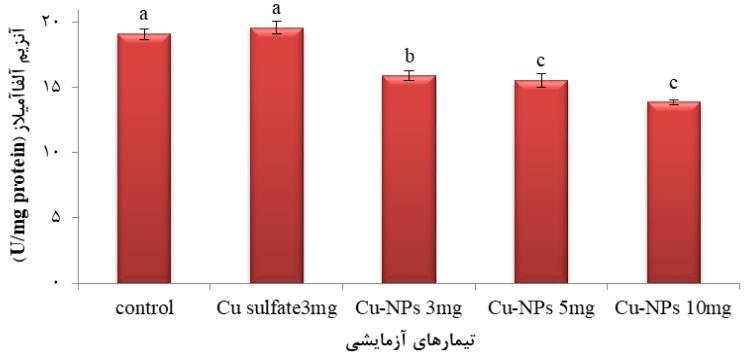
تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. پس از بررسی نرمال بودن داده‌ها، جهت آنالیز از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه استفاده شد و وجود تفاوت معنی‌دار در داده‌ها در سطح احتمال ($P \leq ۰/۰۵$) به کمک پس آزمون Duncan، بررسی شد. تجزیه‌و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS19 و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel 2007 استفاده شد.

نتایج

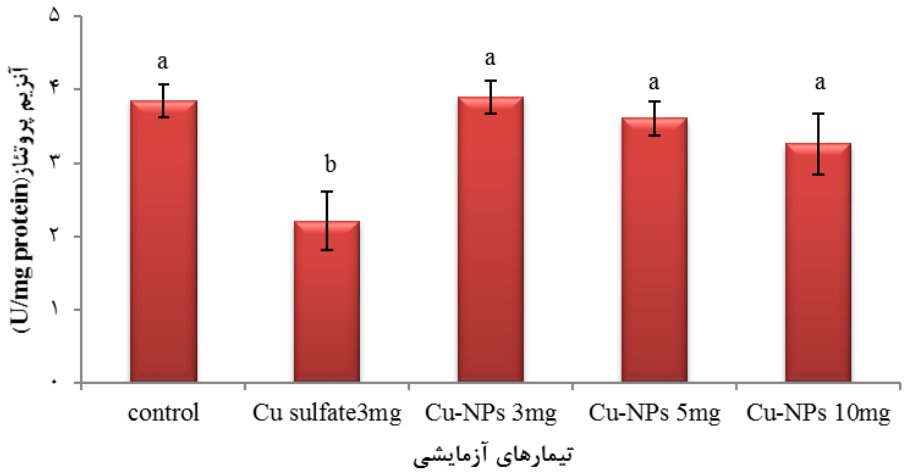
آنزیم‌های گوارشی

براساس نتایج به دست آمده، میان فعالیت آلفاآمیلاز تیمارهای شاهد و سولفات مس با تیمارهای حاوی نانوذرات مس اختلاف معنی‌داری وجود داشت. همچنین فعالیت این آنزیم در تیمارهای نانواکسید مس ۵mg و ۱۰mg با تیمار نانومس ۳mg دارای اختلاف معنی دار بود ($P<۰/۰۵$). میزان فعالیت آنزیم پروتئاز تیمار سولفات مس اختلاف معنی‌داری با تیمارهای شاهد و نانوذرات مس داشت ($P<۰/۰۵$) و فعالیت پروتئاز در تیمار سولفات مس نسبت به سایر تیمارها کاهش داشت. فعالیت این آنزیم در تیمارهای نانوذرات مس با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت ($P>۰/۰۵$). میان فعالیت آنزیم لیپاز تیمار شاهد با تیمارهای دارای ۵mg و ۱۰mg نانوذرات مس اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید ($P<۰/۰۵$)؛ اختلاف میان تیمار سولفات مس با تیمار ۱۰mg نانواکسید مس نیز معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$). فعالیت لیپاز در تیمارهای ۳mg نانوذره مس و سولفات مس با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نداشتند ($P>۰/۰۵$).

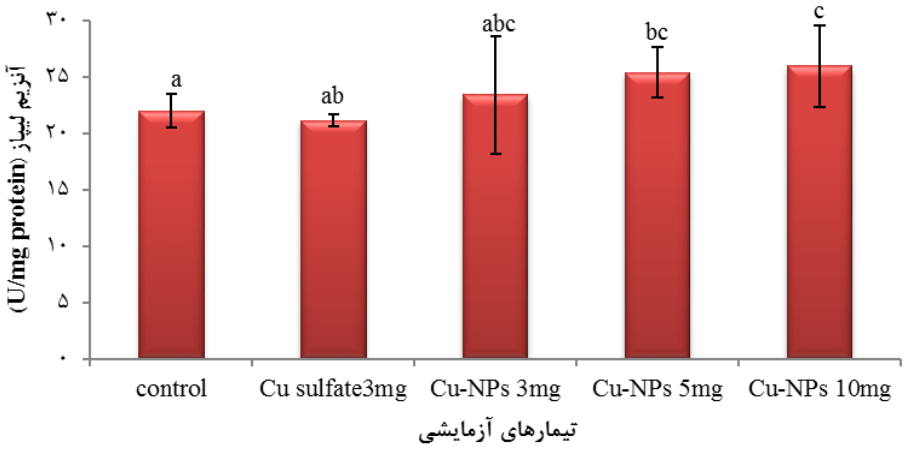


شکل ۲: نتایج اثر جایگزینی سولفات مس با نانو اکسید مس در جیره غذایی بر فعالیت آنزیم گوارشی آلفاآمیلاز ماهیان قرمز
حروف متفاوت نشانه وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی است.

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.2.8.5]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.2.115]



شکل ۳: نتایج اثر جایگزینی سولفات مس با نانو اکسید مس در جیره غذایی بر فعالیت آنزیم گوارشی پروتئاز ماهیان قرمز
حروف متفاوت نشانه وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی است.



شکل ۴: نتایج اثر جایگزینی سولفات مس با نانو اکسید مس در جیره غذایی بر فعالیت آنزیم گوارشی لیپاز ماهیان قرمز
حروف متفاوت نشانه وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی است.

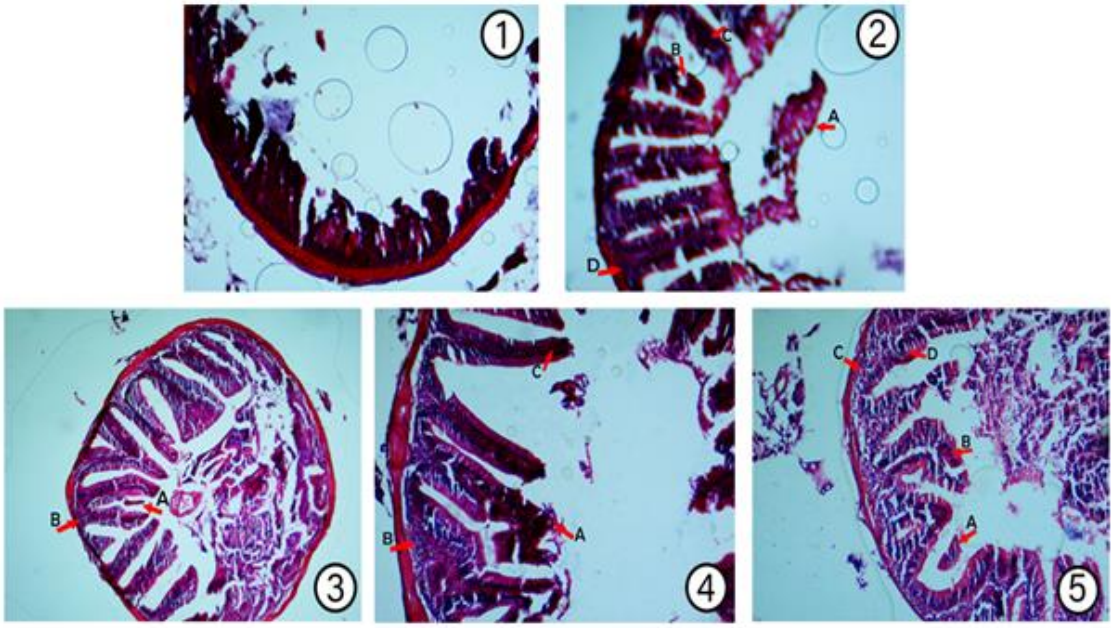
آسیب شناسی بافت روده

نتایج به‌دست آمده از آسیب‌شناسی مقاطع بافتی، در تیمارهای مختلف آزمایشی در جدول ۲ و شکل ۵ نشان داده شده است. براساس نتایج در تیمار دارای سولفات مس، نشانه‌هایی همچون التهاب و نفوذ فراوان سلول-های آماسی بخصوص لنفوسیت‌ها به شکل آنتریت حاد به‌همراه پرخونی و خونریزی در بافت روده ماهیان قرمز دیده گردید و در تیمارهای دارای نانواکسیدمس، علائم نکروز لایه مخاطی و تشکیل واکوئل در روده ها مشاهده گردید که درجات ایجاد این علائم در غلظت های مختلف نانواکسیدمس متفاوت بود و با افزایش غلظت این ماده، تشدید شده بود. در تیمار شاهد، بافت پوششی کامل طبیعی و سالم و بدون ضایعه؛ در تیمار نانومس ۳mg/kg، ضایعات خیلی‌کم و حالت طبیعی تقریباً حفظ شده؛ در تیمار نانومس ۵mg/kg، پیوستگی ویلی‌های روده حفظ شده و ضایعات کمتر؛ در تیمار نانومس ۱۰mg/kg، نکروز در لایه مخاطی، کنده شدن لایه داخلی روده و ایجاد واکوئل در روده مشاهده شده و سلول‌های بافت پوششی، حالت استوانه‌ای خود را از دست داده بودند.

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.2.8.5]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.2.115]

جدول ۳: نتایج آسیب شناسی بافت روده در تیمارهای مختلف آزمایشی

آسیب بافتی / تیمار	التهاب	نکروز	پرخونی	واکوئله شدن سلول
۱ (شاهد)	–	–	–	–
۲ (سولفات مس ۳ mg/kg)	***	***	***	***
۳ (نانوذره مس ۳ mg/kg)	*	*	*	–
۴ (نانوذره مس ۵ mg/kg)	*	*	*	*
۵ (نانوذره مس ۱۰ mg/kg)	**	**	**	**



شکل ۵: تصاویر آسیب شناسی مقاطع بافتی روده در تیمارهای آزمایشی مختلف؛ ۱) شاهد ۲) سولفات مس ۳mg/kg [A:کنده شدن ویلی روده/ B: کنده شدن سلول‌های اپی تلیال/ C: نکروز سلول‌های بافت پوششی روده/ D: نفوذ سلول‌های آماسی و ایجاد التهاب] ۳) نانوذره مس ۳mg/kg [A: کنده شدن مخاط بافت روده/ B: نفوذ سلول‌های التهابی] ۴) نانوذره مس ۵mg/kg [A: کنده شدن و تخریب مخاط بافت پوششی/ B: هجوم سلول‌های آماسی / C: پرخونی ضعیف] ۵) نانوذره مس ۱۰mg/kg [A:کنده شدن و تخریب مخاط بافت/ B: نکروز سلول‌های بافت پوششی/ C: هجوم سلول‌های تک هسته ای بخصوص لنفوسیت‌ها/ D: ایجاد واکوئل در روده]

بحث

فعالیت آنزیم‌های گوارشی (پروتئاز، آمیلاز و لیپاز) می‌تواند به‌عنوان یک شاخص مصرف غذا و اختلاف رشد مطرح باشد (Gomez-Requeni *et al.*, 2013). نوع، منبع و میزان مواد مغذی می‌تواند آنزیم و میزان فعالیت آن را در دستگاه گوارش تغییر دهد. این ویژگی تطبیقی آنزیم‌ها می‌تواند با موفقیت در مورداستفاده از مواد مغذی موجود در جیره غذایی استفاده گردد. همچنین فعالیت‌های آنزیم‌های گوارشی در میان گونه-های مختلف ماهی متفاوت است، که تحت تأثیر سن، مقدار و نوع جیره غذایی (Debnath *et al.*, 2007)، pH و دمای بهینه می‌باشد (Xiong *et al.*, 2011). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که نانوذرات مس سبب کاهش معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم آمیلاز و افزایش

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.2.8.5]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.2.115]

معنی‌دار آنزیم لیپاز در غلظت های ۵ و ۱۰ میلی‌گرم نسبت به گروه شاهد شدند ولی درمورد آنزیم پروتئاز اختلاف معنی‌داری دیده نشد. استفاده از مس به صورت سولفات مس سبب کاهش فعالیت آنزیم پروتئاز شده، ولی فعالیت آنزیم لیپاز و آمیلاز این تیمار با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نداشته است. با توجه به روند افزایشی آنزیم لیپاز و روند کاهشی آلفاآمیلاز در تیمارهای نانوذرات بصورت وابسته به دوز چنین به نظر می‌رسد که ماهیان تیمارهای نانوذرات با افزایش غلظت نانوذرات تمایل بیشتر به سمت بهره‌برداری بیشتر از چربی جیره غذایی معطوف کرده‌اند. این امر می‌تواند به دلیل اهمیت تأمین انرژی مورد نیاز در این گروه‌های آزمایشی باشد. فعالیت کمتر آنزیم‌های پروتئاز و لیپاز در تیمار سولفات مس نسبت به تیمارهای نانوذرات ممکن است به دلیل غذاگیری و اشتهای کمتر این گروه ناشی از آسیب‌های وارد شده، بازگردد. همچنین یکی از اثرات سولفات مس آسیب به بافت روده و مهار برخی آنزیم‌های گوارشی است و می‌تواند دلیل کاهش فعالیت این آنزیم‌ها در تیمار سولفات مس باشد.

عوامل مختلفی نظیر نانوذره و اندازه آن، گونه پرورشی، مدت زمان آزمایش و همچنین مرحله زیستی مورداستفاده می‌تواند در تفاوت نتایج مطالعات با یکدیگر مؤثر باشد که مستلزم مطالعات مقایسه‌ای بیشتر است. چنین تفاوت‌هایی ممکن است به منظور پاسخ به تقاضای انرژی برای مقابله با تأثیر سوء به عنوان یک پاسخ تنظیمی باشد. علاوه بر این، عملکردهای آنزیمی در برابر شرایط محیطی متفاوت است. آلاینده‌ها می‌توانند به طور مستقیم بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی و یا مراحل ساخت آن‌ها تأثیر بگذارند. همچنین با اثر منفی خود بر رفتار ماهی، موجب کاهش فعالیت تغذیه‌ای شده و به شکل غیرمستقیم بر میزان آنزیم‌های گوارشی اثر می‌گذارند. این ترکیبات همچنین کمیت و کیفیت مواد غذایی در دسترس را تغییر داده و موجب تغییر الگوی فعالیت آنزیم‌های گوارشی مختلف می‌شوند (Suzer *et al*., 2006). میزان جذب و تجمع فلزات در ماهی می‌تواند تحت تآثیر شرایط فیزیکی و شیمیایی آب، غلظت فلزات در آب و رسوب، عادت تغذیه‌ای و عوامل دیگر باشد (یونسی‌پور و همکاران، ۱۳۹۳). همچنین نتایج مطالعه Wang و همکاران (۲۰۱۵) درمورد تأثیر استفاده از نانوذرات مس و همچنین یون مس به صورت سولفات مس بر فعالیت پروتئاز، آمیلاز و لیپاز در بچه ماهیان هامور نارنجی (*Cephalopholis hemistiktos*) نشان داد که با افزایش غلظت نانوذرات مس و همچنین یون‌های فلزی مس، فعالیت آنزیم‌های مذکور کاهش پیدا می‌کند. دلایل مختلفی برای این کاهش در فعالیت آنزیم‌های گوارشی می‌تواند مطرح باشد که ازجمله می‌توان به تأثیر مستقیم یون‌های فلزی در کاهش سنتز این آنزیم‌ها اشاره کرد (Suzer *et al*., 2006). همچنین به تأثیرات غیرمستقیم این مواد بر رفتار ماهی و تأثیر بر کیفیت مواد غذایی و درنتیجه کاهش مصرف غذایی در ماهی اشاره کرد که می‌تواند کاهش ترشح آنزیم‌های گوارشی را در پی داشته باشد (Fokina *et al*., 2013; Najdegerami *et al*., 2016).

در کنار بررسی اثرات سولفات مس و نانوذرات مس بر میزان آنزیم‌های گوارشی، برای ارزیابی دقیق‌تر روند آسیب‌ها و حصول اطمینان از آسیب‌های بافت روده، نمونه‌های آزمایشی از لحاظ بافت‌شناسی مورد بررسی قرار گرفتند. آثار بافتی یکی دیگر از شاخص‌های ارزیابی سلامت آبزیان است. عوامل زیادی می‌توانند در ماهیان ایجاد ضایعه بافتی کنند که با توجه به شرایط

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.2.8.5]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.2.115]

بیولوژیکی و اکولوژیکی ماهی و محیط اطراف آن، ماهی مستعد ابتلا به انواع آلودگی می‌باشد. در مطالعه حاضر، نتایج بافت شناسی نشان داد که میزان آسیب-های بافتی روده در تیمار سولفات مس نسبت به تیمارهای دارای نانوذرات مس بیشتر و شدیدتر بود و در تیمارهای دارای نانوذرات مس به شکل وابسته به دوز این آسیب‌ها افزایش یافته است که حاکی از سمیت سولفات مس و غلظت‌های بالای نانوذرات مس می‌باشد و نشان می‌دهد توانایی جذب در این تیمارها کاهش داشته و به صورت آسیب بافتی بروز کرده است. از نظر بافت‌شناسی با کاهش ترشح آنزیم پروتئاز در تیمار سولفات مس مخاط روده قادر به هضم پروتئین‌ها نبوده و بنابراین بافت روده دچار آسیب شده است. فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز نیز در تیمارهای نانوذرات نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری داشته است و با عدم ترشح کافی این آنزیم، مخاط روده قادر به هضم کربوهیدرات‌ها نبوده و در نتیجه‌ی این کمبود و عدم هضم کربوهیدرات‌ها، به صورت آسیب بافتی در این تیمارها نمود یافته است. تغییرات آسیب‌شناسی مشاهده شده در بافت‌ها، نوعی عکس‌العمل بافت به آلاینده‌های محیطی می‌باشد. می‌توان چنین بیان نمود که نانوذرات به دلیل نفوذپذیری بالا و ایجاد آسیب‌های فراوان، باید به طور جدی مورد مطالعات گسترده سم-شناسی قرار گیرند تا با شناخت آثار پاتولوژیک آن‌ها بتوان از آثار سوء آن‌ها تا حد امکان کاست. مطالعات آسیب‌شناسی بافتی برای کشف روابط علت و معلولی بین مواجهه آلاینده‌های مختلف و پاسخ‌های بیولوژیکی ماهی، انجام شده است. همچنین استفاده از این تحقیقات به عنوان ابزاری حساس جهت شناسایی اثرات مستقیم ترکیبات شیمیایی روی اندام‌های هدف، در تجارب آزمایشگاهی، بارها به اثبات رسیده است (Gaber *et al*., 2014). مطالعه Wang و همکاران (۲۰۱۶)، نیز نشان داد که درصد آپوپتوزیس و نکروز بافت‌های مختلف در ماهی هامور معمولی پس از قرارگیری در معرض نانوذرات مس و سولفات مس به طور معنی‌داری بیشتر از تیمار شاهد بود. همچنین در مطالعه Hoseini و همکاران (۲۰۱۶)، مشخص گردید که هر دو نوع مس (سولفات مس و نانوذرات مس)، به کبد و کلیه ماهی آسیب می‌رساند، اما سولفات مس منجر به آسیب شدید نسبت به نانو ذرات مس می‌شود و به طور کلی به نظر می‌رسد سولفات مس سمی‌تر از نانوذرات مس برای ماهی کپور معمولی است. در مطالعه‌ی احمدی و همکاران (۱۳۹۳)، به تأثیر سختی و pH آب بر سمیت مس اشاره شده و سختی حدود ۲۳۰ سبب کاهش سمیت نانوذره اکسید مس و عدم مشاهده تلفات در بچه ماهیان کپورمعمولی شد. Ostaszewska و همکاران (۲۰۱۶) نیز با بررسی اثرات هیستوپاتولوژیک نانوذرات نقره و مس بر ماهی خاویاری سیبری دریافتند که این نانوذرات سبب ایجاد ساختار نامنظم و پیکنوزه‌شدن هسته سلول‌های اپیدرمی و کبد، بهم چسبیدن لاملاهای ثانویه آبشش، نکروز اپیتلیال، بلند شدن رشته‌های آبششی، آماس فضای سینوسی، پر شدن بیش از حد رگ‌های خونی می‌شود. همچنین نتایج مطالعه Mansouri و همکاران (۲۰۱۵)، حاکی از این بود که نانوذرات اکسید مس و یون مس می‌توانند سبب ایجاد ناهنجاری‌های قابل توجه در بافت روده همچون افزایش تعداد سلول‌های جامی و تورم آن‌ها، دژنره شدن سلول‌ها، حفره حفره شدن، نکروز بافتی و فساد و تحلیل تدریجی شوند.

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.2.8.5]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.2.115]

بطورکلی سنجش فعالیت آنزیم‌های گوارشی و آسیب‌شناسی بافتی نشان داد که سولفات مس و غلظت‌های بالای نانوذرات مس در تیمارهای ۵ و ۱۰ میلی‌گرم نانوذره مس در کیلوگرم جیره غذایی، اثرات منفی بر آنزیم‌های گوارشی داشته و باعث ایجاد ضایعات بافتی و اثرات مخرب می‌شوند. آسیب‌های غلظت بالای نانوذرات مس (۱۰mg/kg) با آسیب‌های غلظت پایینی از سولفات مس (۳mg/kg) برابری می‌کند که این نشان‌دهنده‌ی سمیت و مخرب بودن سولفات مس حتی در غلظت‌های پایین ماده است. به‌طورکلی، می‌توان نتیجه گرفت که میزان ۳ میلی‌گرم نانوذره مس در ۱ کیلوگرم رژیم غذایی باعث بهبود سلامت روده و گوارش روده‌ای بهتر شد درحالی‌که غلظت مشابه از سولفات مس تأثیرات منفی بر روده ماهی قرمز داشت. با توجه به سمیت بالای غلظت ۳ میلی‌گرم در کیلوگرم سولفات مس بر دستگاه گوارش ماهی قرمز توصیه می‌شود در تحقیقات بعدی غلظت‌های کمتر این ماده یا ترکیبات آلی مس مورد مطالعه قرار بگیرد.

سپاسگزاری

در اینجا بر خود لازم می‌دانیم از زحمات تمام عزیزانی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند، سپاسگزاری نماییم.

منابع

۱. احمدی، ح.، نعیمی، ا.، نظر حقیقی، ف. و غفوری، ح.، ۱۳۹۵. اثرات نیمه مزمن نانوذره‌ی اکسید مس بر برخی پارامترهای خونی و بافت آبشش بچه‌ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). نشریه توسعه آبزی پروری، ۱۰(۴)، ۱۴-۱.

۲. یونسی پور، ح.، نصراله زاده ساروی، ح.، ساداتی پور، م. ت.، ۱۳۹۳. بررسی تجمع زیستی فلزات سنگین ضروری (آهن، مس و روی) و نیمه ضروری (نیکل، کبالت و منگنز) در بافت خوراکی ماهی کپور (*Cyprinus carpio*) دریای خزر. نشریه توسعه آبزی‌پروری، ۸ (۱)،۱۰۶-۹۵.

3. Azarm, H.M., Kenari, A.A., Hedayati, M., 2013. Effect of dietary phospholipid sources and levels on growth performance, enzymes activity, cholecystokinin and lipoprotein fractions of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. Aquaculture Research, 44, 634-644.
4. Debnath, D., Pal, A., Sahu, N., Yengkokpam, S., Baruah, K., Choudhury, D., Venkateshwarlu, G., 2007. Digestive enzymes and metabolic profile of *Labeo rohita* fingerlings fed diets with different crude protein levels. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 146, 107-114.
5. Fokina, N.N., Ruokolainen, T.R., Nemova, N.N., Bakhmet, I.N., 2013. Changes of blue mussels *Mytilus edulis* L. lipid composition under cadmium and copper toxic effect. Biological trace element research, 154, 217-225.
6. Gaber, H.S., Abbas, W.T., Authman, M.M., Gaber, S.A., 2014. Histological and biochemical studies on some organs of two fish species in Bardawil Lagoon, North Sinai, Egypt. Global Veterinaria, 12, 01-11.
7. Gomez-Requeni, P., Bedolla-Cazares, F., Montecchia, C., Zorrilla, J., Villian, M., Toledo-Cuevas, E.M., Canosa, F., 2013. Effects of increasing the dietary lipid levels on the growth performance, body composition and digestive enzyme activities of the teleost pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). Aquaculture, 416, 15-22.
8. Hajipour, M.J., Fromm, K.M., Ashkarran, A.A., de Aberasturi, D.J., de Larramendi,

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.2.8.5]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.2.115]

I.R., Rojo, T., Serpooshan, V., Parak, W.J., Mahmoudi, M., 2012. Antibacterial properties of nanoparticles. Trends in biotechnology, 30, 499-511.
9. Hamza, N., Mhetli, M., Khemis, I.B., Cahu, C., Kestemont, P., 2008. Effect of dietary phospholipid levels on performance, enzyme activities and fatty acid composition of pikeperch (*Sander lucioperca*) larvae. Aquaculture, 275, 274-282.
10. Hoseini, S.M., Hedayati, A., Mirghaed, A.T., Ghelichpour, M., 2016. Toxic effects of copper sulfate and copper nanoparticles on minerals, enzymes, thyroid hormones and protein fractions of plasma and histopathology in common carp *Cyprinus carpio*. Experimental and Toxicologic Pathology, 68, 493-503.
11. Kamunde, C., Grosell, M., Higgs, D., Wood, C.M., 2002. Copper metabolism in actively growing rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): interactions between dietary and waterborne copper uptake. Journal of Experimental Biology, 205, 279-290.
12. Lall, S., Milley, J., 2008. Trace mineral requirements of fish and crustaceans. Trace elements in animal production systems, 203-214.
13. Lundebye, A.-K., Berntssen, M., Bonga, S.W., Maage, A., 1999. Biochemical and physiological responses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) following dietary exposure to copper and cadmium. Marine Pollution Bulletin, 39, 137-144.
14. Mansouri, B., Rahmani, R., Azadi, N.A., Davari, B., Johari, S.A., Sobhani, P., 2015. Effect of waterborne copper oxide nanoparticles and copper ions on guppy (*Poecilia reticulata*): Bioaccumulation and histopathology. Journal of Advances in Environmental Health Research, 3, 215-223.
15. Martoja R., Martoja–Pierson M. 1967. Initiation Aux Techniques de l histology animale. Masson et Cie, Paris. 345 P.
16. Munakata, A., Kobayashi, M., 2010. Endocrine control of sexual behavior in teleost fish. General and comparative endocrinology, 165, 456-468.
17. Najdegerami, E.H., Bakhshi, F., Lakani, F.B., 2016. Effects of biofloc on growth performance, digestive enzyme activities and liver histology of common carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings in zero-water exchange system. Fish physiology and biochemistry, 42, 457-465.
18. NRC (National Research Council, USA). 1993. Nutrient Requirements of fish. National Academy of sciences, Washington. D.C, USA, 114.
19. Ostaszewska, T., Chojnacki, M., Kamaszewski, M., Sawosz-Chwalibóg, E., 2016. Histopathological effects of silver and copper nanoparticles on the epidermis, gills, and liver of Siberian sturgeon. Environmental Science and Pollution Research, 23, 1621-1633.
20. Prabhu, P.A.J., Geurden, I., Fontagné-Dicharry, S., Veron, V., Larroquet, L., Mariojouls, C., Schrama, J.W., Kaushik, S.J., 2016. Responses in micro-mineral metabolism in rainbow trout to change in dietary ingredient composition and inclusion of a micro-mineral premix. PloS one 11, e0149378.
21. Rungruangsak-Torrissen, K., Moss, R., Andresen, L., Berg, A., Waagbo, R., 2006. Different expressions of trypsin and chymotrypsin in relation to growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Fish Physiology and Biochemistry, 32, 1-7.
22. Scott, A., Vadalasetty, K.P., Chwalibog, A., Sawosz, E. 2018. Copper nanoparticles as an alternative feed additive in poultry: A review. Nanotechnol Rev, 7:69–93
23. Suzer, C., Fırat, K., Saka, Ş., 2006. Ontogenic development of the digestive enzymes in common pandora, *Pagellus erythrinus*, L. larvae. Aquaculture Research, 37, 1565-1571.
24. Velisek, J., Svobodova, Z., Piackova, V., Groch, L., Nepejchalova, L., 2005. Effects of clove oil anaesthesia on common carp (*Cyprinus carpio* L.). Vet Med, 50, 269-275.
25. Wang, T., Long, X., Liu, Z., Cheng, Y., Yan, S., 2015. Effect of copper nanoparticles and copper sulphate on oxidation stress, cell apoptosis and immune responses in the intestines of

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.2.8.5]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.2.115]

juvenile *Epinephelus coioides*. Fish & shellfish immunology, 44, 674-682.
26. Wang, T., Chen, X., Long, X., Liu, Z., Yan, S., 2016. Copper nanoparticles and copper sulphate induced cytotoxicity in hepatocyte primary cultures of Epinephelus coioides. PloS one 11, e0149484.
27. Xiong, D., Xie, C., Zhang, H., Liu, H., 2011. Digestive enzymes along digestive tract of a carnivorous fish *Glyptosternum maculatum* (*Sisoridae, Siluriformes*). Journal of animal physiology and animal nutrition, 95, 56-64.
28. Yufera, M., Darias, M., 2007. The onset of exogenous feeding in marine fish larvae. Aquaculture, 268, 53-63.

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.2.8.5]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.2.115]