

## ارزیابی تغییرات بافتی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) و کلمه (*Rutilus caspicu*) تحت سمیت حاد با سولفات مس

محمد فرهنگي<sup>۱\*</sup>، حجت‌اله جعفریان<sup>۱</sup>

۱- گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۲/۱۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۶/۴

### چکیده

مس به‌عنوان یک میکروالمنت برای ماهیان ضروری است که می‌توانند آن را از محیط آبی یا جیره غذایی به‌دست بیاورند. از طرف دیگر سولفات مس یک جلبک‌کش موثر برای کنترل جلبک در مزارع پرورش ماهی است. به‌همین منظور آزمایش سمیت برای پیش‌بینی غلظت‌های ایمن از مواد شیمیایی محیط‌زیست ضروری به‌نظر می‌رسد. این مطالعه به‌منظور بررسی تلفات ناشی از سمومیت حاد با مس ( $\text{CuSO}_4 \cdot 96\text{h}$ ) در ماهیان کلمه و کپور اجرا گردید. در هر تیمار تعداد ۱۳ قطعه بچه‌ماهی کلمه و کپور معمولی به‌ترتیب با میانگین وزنی  $20 \pm 2/2$  و  $2 \pm 0/5$  گرم در معرض غلظت‌های مختلفی از مس قرار گرفتند. آزمایش‌ها به‌روش آب‌ساکن در مدت ۹۶ ساعت اجرا شد. در آزمایش‌ها از غلظت‌های مختلف سولفات مس شامل ۰ (شاهد)، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴، ۰/۴۵ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر استفاده شد. در شرایط ثابت دما و  $\text{pH} = 7/8 \pm 0/2$ ،  $T = 25 \pm 1^{\circ}\text{C}$  غلظت‌کشنده ( $\text{LC}_{50}$ ) مس در مدت ۹۶ ساعت به‌ترتیب ۰/۴ و ۰/۴۵ میلی‌گرم در لیتر برای ماهی کلمه و کپور معمولی به‌دست آمد. نتایج اختلاف معنی‌داری را در بین گروه‌ها و گروه شاهد نشان داد ( $P < 0.05$ ). به‌طوری‌که با افزایش مقادیر مختلف مس در تیمارها، نرخ مرگ‌ومیر ماهیان در هر تیمار به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ( $P < 0.05$ ). به‌منظور مطالعات بافت‌شناسی از هر تیمار ۳ نمونه ماهی به‌صورت تصادفی انتخاب و مقاطع بافتی شامل آیشش، کبد و کلیه تهیه شدند. نمونه‌های تهیه شده با استفاده از روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین (H&E) آماده و اثرات سمیت مس بر ارگان‌ها به کمک میکروسکوپ نوری مطالعه شدند. مطالعات آسیب‌شناسی بافت‌های تهیه شده از ماهیان نشان داد، بیشترین ضایعات ناشی از سمومیت حاد شامل پرخونی، خون‌ریزی، هیپرپلازی، تخریب مجاری کلیوی و نکروز سلول‌های کبدی در تیمارهای ۰/۴۵، ۰/۴، ۰/۳ مشاهده شد. در گروه شاهد ضایعه‌ای مشاهده نشد.

**کلمات کلیدی:** آسیب‌شناسی بافت، مس، مرگ‌ومیر، آب‌ساکن، کلمه، کپور معمولی.

## مقدمه

حضور فلزات در آب از جمله مواردی هستند که سبب برهم زدن کیفیت آب می‌شوند و همواره از فاکتورهای اساسی کاهش تولید آبزیان به حساب می‌آیند، به طوری که نوسانات غلظت آنها سبب ناپایداری محیط می‌شود. فلزات سمی که در اثر فاضلاب‌های صنعتی، شهری و پساب‌های کشاورزی درون منابع آبی انباشته می‌شوند، در برابر تجزیه شدن مقاوم می‌باشند و در بدن آبزیان تجمع می‌یابند. میزان جذب و تجمع فلزات سمی توسط آبزیان به نوع عنصر، گونه آبی، فیزیولوژی بدن جاندار، شرایط اکولوژیک، رفتار تغذیه‌ای، آلودگی‌های محیطی، سطح غذا، سن، اندازه، زمان ماندگاری فلزات و فعالیت‌های تنظیمی هم‌نوستازی بدن بستگی دارد (Talas and Gulhan, 2009). تصور می‌شود که مس در رژیم غذایی ضروری باشد. با این حال زمانی که غلظت مورد استفاده بیش از حد نیاز باشد و یا اینکه هر روز وارد بدن شود، می‌تواند مضر باشد (احمدی و همکاران، ۱۳۹۵). اثرات مضر آن هم با غلظت و هم با طول مدت در معرض بودن فلز افزایش می‌یابد. سولفات مس قابل حل بوده و وقتی با آب مخلوط شود، به شکل محلول در می‌آید. باید توجه داشت که گرچه سمیت مواد برای موجودات آبی به طور مجزا مورد مطالعه قرار می‌گیرد، ولی اکوسیستم‌های آبی به طور هم‌زمان در معرض مخلوطی از مواد سمی قرار دارند. مطالعات مقایسه‌ای سمیت مواد نشان داد که سمیت ترکیبی مواد سمی اثرات متفاوت تری را نسبت به سمیت ترکیبی ساده مواد دارد (Bagdonas and Vosylienė, 2006). اثر مسمومیت شدید در شکل ظاهری، در دو مرحله آبی و تاخیری اتفاق می‌افتد. در مرحله آبی گیجی و

کاهش شدت تنفس، پرش از آب و در مرحله تاخیری بی‌رنگی پوست و نهایتاً مرگ می‌باشد (Farhangi et al., 2014). ترکیبات مس برای کنترل بیماری‌های ماهی استفاده می‌شود. ترکیبات مس دار همچون برای کنترل جلبک‌ها، کشتن حلزون‌ها در سیستم‌های آبیاری و سیستم‌های آب شهری استفاده می‌شوند (Altas, 2009). سمیت مس برای زندگی آبزیان با شرایط فیزیکی و شیمیایی آب تغییر می‌کند. فاکتورهایی از قبیل سختی آب، خاصیت قلیایی، پی‌اچ، اکسیژن محلول و دما بر سمیت مس بر ماهی اثر می‌گذارند (Mustafa et al., 2012). با توجه به اهمیتی که سولفات مس و مسمومیت با آن در ماهیان و میگو دارد تحقیقات زیادی در این رابطه صورت گرفته است. Boeck و همکاران (۲۰۱۰) با مطالعه سمیت مس در ماهی کاراس ثابت کردند که سمیت مس در درجه اول به کاهش میزان سدیم در بدن بستگی داشته و در واقع یک نوع سمیت اسمزی است. معمولاً آبشش اولین بافت در مواجهه با تغییرات محیطی و سموم است و مواجهه طولانی مدت با آلودگی سبب اثرات تخریبی قابل مشاهده در این بافت خواهد شد (Svecevicius et al., 2012). حسینی و همکاران (۱۳۹۴) محدوده کشندگی سولفات مس را برای بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین کمان برابر ۱۰۰۰-۱ میلی گرم در لیتر بدست آوردند. Hoseini و Nodeh (۲۰۱۲) با مطالعه اثرات سمیت مس و جیوه بر روی ماهی کلمه دریای خزر نشان دادند که کمترین غلظت موثر برای مس در مدت ۹۶ ساعت برابر ۰/۲ میلی گرم در لیتر بود (LOEC). Balambiga و Arunai (۲۰۱۱) می‌تواند غلظت نیمه کشنده سولفات مس را در مدت ۷۲ ساعت در ماهی کپور معمولی ۸ میلی گرم در لیتر گزارش دادند. این نتایج بیانگر واکنش متفاوت گونه‌های متعدد

درصد تلفات و علائم ظاهری مسمومیت (شنای ناموزون، تهویه ناموزون، رفتارهای عصبی) در ماهی ثبت گردید. ۱۳ قطعه بچه ماهی از هر نوع در معرض غلظت های مختلف نمک سولفات مس (۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴ و ۰/۴۵ میلی گرم در لیتر) قرار گرفتند. یک گروه ۱۳ تایی نیز به عنوان شاهد (بدون سولفات مس) در نظر گرفته شد (Boeck *et al.*, 2010). برای تعیین غلظت های سولفات مس، پس از تعیین حجم آب به ازای واحد حجمی، سولفات مس توزین و به آب اضافه گردید. برای حل کردن سولفات مس در آب مخزن، ابتدا آن را در بشر حل و سپس محلول حاصل به آب اضافه گردید تا محلول یکنواختی به دست آید. پس از پایان آزمایش ها از ماهیان زنده و ماهیانی که در اثر مسمومیت با سولفات مس دچار تلفات شدند بلافاصله نمونه گیری به عمل آمد. از هر تیمار و تکرارهای آن ۳ عدد ماهی (در مجموع ۹ ماهی) انتخاب و نمونه هایی از کبد، کلیه و آبشش به صورت تصادفی به دست آمد. نمونه ها به طور جداگانه در ظرف های حاوی فرمالین ۱۰٪ فیکس و به آزمایشگاه بافت شناسی (پاتوبیولوژی-گرگان) انتقال و به روش مرسوم مقاطع بافتی توسط آزمایشگاه تهیه شد (Humason, 1962). از هر نمونه بافتی، سه نمونه لام به صورت مجزا تهیه شد. مقاطع بافتی تهیه شده به کمک رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انوزین (H&E)، آماده شدند (احمدی و همکاران، ۱۳۹۵). در نهایت تصاویر مقاطع تهیه شده توسط دوربین متصل به میکروسکوپ نوری و نرم افزار مربوطه به کامپیوتر انتقال یافته و مورد مطالعه قرار گرفتند. (Ramírez-Duarte *et al.*, 2008). براساس کلیدهای شناسایی موجود آسیب های بافتی مورد مطالعه قرار گرفتند (Martoja and Martoja-Pierson, 1967;

ماهی در شرایط متفاوت به سولفات مس و دیگر سموم است. مطالعات ثابت کرده است که مس یکی از آلاینده های مهم دریای خزر است (Taghipour and Azizi, 2011)، لذا ضرورت انجام این طرح با هدف ارزیابی تغییرات بافتی ماهی کپور *Cyprinus carpio* و کلمه *Rutilus caspicus* در مواجهه حاد با سولفات مس صورت گرفت.

### مواد و روش ها

۲۵۰ قطعه ماهی کپور معمولی با وزن متوسط  $20 \pm 3$  گرم از کارگاه پرورش ماهی سد و شمشگیر- آق قلا از توابع استان گلستان تهیه شد. ۲۵۰ قطعه ماهی کلمه نیز با میانگین وزنی  $2 \pm 0.5$  گرم از کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان استخوانی بندر ترکمن (کلمه سیجوال) تامین گردید. ماهی ها قبل از انجام آزمایش در آکواریوم جداگانه ای نگهداری شدند. این ماهیان قبل از آزمایش با غذای کپور معمولی (مخلوط کنسانتره و آرد گندم) به میزان کم تغذیه شدند. ماهیان پس از انتقال به آزمایشگاه هیدروبیولوژی دانشگاه گنبد کاووس از نظر سلامت مورد معاینه قرار گرفتند. آزمایش ها تحت شرایط ثابت از نظر دما و pH (به ترتیب  $10 \pm 25$  و  $7.8 \pm 0.2$ ) در مدت ۹۶ ساعت برای هر گروه صورت گرفت. آزمایش ها با استفاده از روش آب ساکن (Water Static Method) صورت گرفت (Gul *et al.*, 2009). در طول آزمایش ها از سنگ هوا استفاده شد. شدت اکسیژن تولیدی توسط سنگ هوا در طول شبانه روز معادل ۱/۹ میلی گرم در لیتر بود. در طول آزمایش ها غذادهی قطع گردید. آزمایش ها در مخازن پلاستیکی با حجم آبی ۳ و ۱۰ لیتر به ترتیب برای ماهی کلمه و کپور استفاده شد. در طول مدت آزمایش

افزایش یافت، به طوری که بعد از گذشت ۹۶ ساعت غلظت کشنده مس برای ماهی کپور و کلمه به ترتیب معادل ۰/۴۵ و ۰/۴ میلی گرم در لیتر به دست آمد (جدول ۱). درصد تلفات ماهی کپور در غلظت‌های مختلف مس (۰/۵ و ۰/۴۵، ۰/۴، ۰/۳، ۰/۲، ۰/۱، ۰، ۰ میلی گرم در لیتر) بعد از گذشت ۹۶ ساعت به ترتیب برابر ۱۰۰ و ۱۰۰، ۹۲/۳۱، ۶۹/۲۳، ۴۶/۱۵، ۰، ۰ به دست آمد. این در حالی است که در غلظت‌های فوق درصد تلفات ماهی کلمه در ۹۶ ساعت به ترتیب برابر ۰، ۰/۶۹، ۳۰/۷۷، ۸۴/۶۲، ۱۰۰ و ۱۰۰ بود (جدول ۱).

(Roberts, 2012). آزمایش‌ها در طرح کاملاً تصادفی متعادل ۳×۶ اجرا گردید. جهت تعیین غلظت‌های کشنده از منحنی شیب درصد تلفات در غلظت‌های مختلف و بر اساس مدل میکائیل-منتن (Green et al., 2018) و با استفاده از نرم‌افزار SPSS, 15 استفاده شد.

## نتایج

### نتایج حاصل از قرار گرفتن ماهی در معرض غلظت‌های مختلف مس

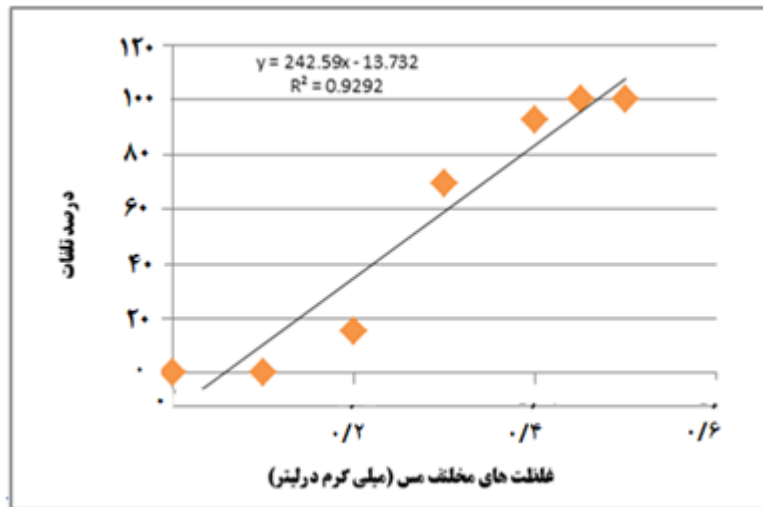
مطالعات نشان داد با افزایش مقادیر سولفات مس به ظروف آزمایشی، تلفات هر ماهی به طور معنی داری

جدول ۱: درصد تلفات ماهی در برابر غلظت‌های مختلف مس بعد از گذشت ۹۶ ساعت

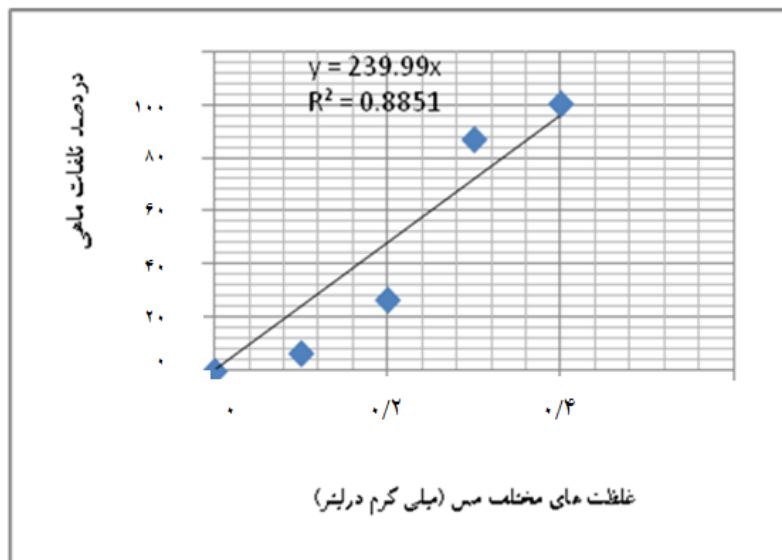
درصد تلفات		تعداد تلفات		غلظت مس (میلی گرم در لیتر)	تیمار مورد آزمایش
کلمه	کپور	کلمه	کپور		
۰	۰	۰	۰	۰	شاهد
۷/۶۹	۰	۱	۰	۰/۱	۱
۳۰/۷۷	۱۵/۳۸	۴	۲	۰/۲	۲
۸۴/۶۲	۶۹/۲۳	۱۱	۹	۰/۳	۳
۱۰۰	۹۲/۳۱	۱۳	۱۲	۰/۴	۴
۱۰۰	۱۰۰	۱۳	۱۳	۰/۴۵	۵
۱۰۰	۱۰۰	۱۳	۱۳	۰/۵	۶

یافت. با توجه به درصد تلفات ماهی و منحنی شیب خط- رگرسیون غلظت نیمه کشنده (LC<sub>50,96h</sub>) مس برای ماهی کپور و ماهی کلمه به ترتیب برابر با ۰/۲۷۲ و ۰/۲۲۵ میلی گرم در لیتر به دست آمد (شکل ۱).

همان طوری که در جدول مشخص است، درصد- تلفات ماهی در غلظت ۰/۳ میلی گرم در لیتر افزایش خیلی معنی داری را نسبت به غلظت ۰/۲ و ۰/۱ میلی گرم در لیتر از خود نشان داد، به طوری که درصد تلفات ماهی کلمه از ۳۰/۷۷ به ۸۴/۶۲ میلی گرم در لیتر افزایش



الف- ماهی کپور



ب- ماهی کلمه

شکل ۱- منحنی شیب خطر گرسیون درصد تلفات ماهی در معرض غلظت های مختلف مس بعد از گذشت ۹۶ ساعت

الف- ماهی کپور ب- ماهی کلمه

حالی است که برای ماهی کلمه در غلظت های ۰/۴۵ و ۰/۵ میلی گرم در لیتر در ۳ ساعت اول آزمایش برابر ۱۰۰ درصد بود. درصد تلفات ماهی در غلظت ۰/۴ میلی گرم در لیتر در ۲۴ ساعت اول برابر ۵۳/۸۴ درصد، برای ۴۸ و ۷۲ ساعت برابر ۸۴/۶۱ درصد و در ۹۶ ساعت برابر ۱۰۰٪ بود. غلظت های کشنده مس برای

مطالعات نشان داد، درصد تلفات ماهی کپور در غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر در ۲۴ ساعت اول برابر ۱۰۰ درصد بود. درصد تلفات ماهی در غلظت ۰/۴۵ میلی گرم در لیتر در ۲۴ ساعت اول برابر ۳۸/۴۶ درصد، در ۴۸ ساعت برابر ۶۹/۲۳ درصد، در ۷۲ ساعت برابر ۹۲/۳۱ درصد و در ۹۶ ساعت برابر ۱۰۰٪ بود. این در

ماهی کپور و کلمه با استفاده از نرم‌افزار پروبیت در  
مدت ۹۶ ساعت در جدول ۲ و ۳ آمده است. همان-  
طوری‌که در جدول نمایش داده شده است میزان

جدول ۲: غلظت کشنده (LC<sub>10-95</sub>) با حدود اطمینان ۹۵٪ در طی زمان ۹۶ ساعت

الف- ماهی کپور

LC	حدود اطمینان		غلظت کشنده
	حد پایین	حد بالا	
LC10	۰/۱۰۲	۰/۲۲۲	۰/۱۸۱
LC20	۰/۱۵۲	۰/۲۴۹	۰/۲۱۳
LC30	۰/۱۸۴	۰/۲۷۰	۰/۲۳۶
LC40	۰/۲۱۱	۰/۲۸۹	۰/۲۵۵
LC50	۰/۲۳۵	۰/۳۰۹	۰/۲۷۴
LC60	۰/۲۵۷	۰/۳۳۰	۰/۲۹۲
LC70	۰/۲۷۸	۰/۳۵۶	۰/۳۱۲
LC80	۰/۳۰۰	۰/۳۸۰	۰/۳۳۵
LC90	۰/۳۲۸	۰/۴۳۵	۰/۳۶۶
LC95	۰/۳۵۰	۰/۴۷۶	۰/۳۹۳

جدول ۳: غلظت کشنده (LC<sub>10-95</sub>) با حدود اطمینان ۹۵٪ در طی زمان ۹۶ ساعت

ب- برای ماهی کلمه

LC	حدود اطمینان		غلظت- کشنده
	حد پایین	حد بالا	
LC10	۰/۰۵۱	۰/۱۷۱	۰/۱۳۰
LC20	۰/۱۰۲	۰/۱۹۹	۰/۱۶۳
LC30	۰/۱۳۶	۰/۲۲۱	۰/۱۸۶
LC40	۰/۱۶۴	۰/۲۴۲	۰/۲۰۲
LC50	۰/۱۸۷	۰/۲۶۳	۰/۲۲۵
LC60	۰/۲۰۹	۰/۲۸۷	۰/۲۴۴
LC70	۰/۲۲۹	۰/۳۱۴	۰/۲۶۴
LC80	۰/۲۵۱	۰/۳۴۹	۰/۲۸۷
LC90	۰/۲۷۹	۰/۴۰۰	۰/۳۲۰
LC95	۰/۳۰۰	۰/۴۴۳	۰/۳۴۷

نتایج حاصل از مطالعات رفتاری و آسیب-

شناسی

علائم ظاهری اولیه نشان داد که ماهی‌ها اضطراب اولیه را به صورت حرکات سریع در شنا کردن، افزایش حرکات سریع سرپوش‌های آبششی و اکسیژن‌گیری از سطح آب نشان دادند. در نهایت بدن‌شان به طور کامل بی حرکت گشته و تمایل به استقرار در کف از خود نشان دادند. تشنجات عصبی، برخورد ماهی با کناره‌های تشت و قرمز شدن آبشش‌ها از دیگر علائم ظاهری مسمومیت در ماهی بود. نتایج نشان داد که تظاهرات ماهی در برابر سمیت با سولفات مس، با افزایش غلظت آن بیشتر شد. آسیب‌شناسی مقاطع بافتی تهیه شده از آبشش ماهیانی که در معرض غلظت کشنده مس قرار داشتند، نشان داد که در قسمت راس رشته‌های آبششی

هیپرپلازی یا چماقی شدن رشته‌های آبششی رخ داده است که نتیجه این هیپرپلازی جوش خوردن بسیاری از لاملاها و کاهش سطح تنفس در برخی فیلامنت‌ها مشاهده شد. ادم در ناحیه لاملاهای ثانویه (شکل ۲) و خون‌ریزی و پرخونی (شکل ۳) در آبشش به وضوح دیده شد. در بافت کلیه و کبد ماهیان قرار گرفته در معرض غلظت کشنده مس ضایعات همچون دژنره شدن توبول‌های کلیوی (شکل ۴)، خون‌ریزی (شکل ۵)، نفوذ سلول‌های آماسی و تخریب سول‌های کبدی به- وضوح دیده شد (شکل ۶).

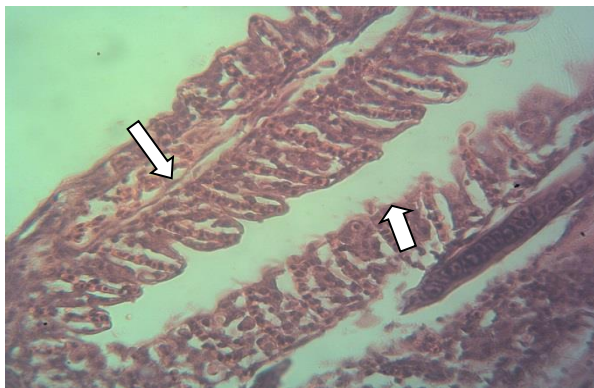


(۲) بزرگنمایی  $\times 1000$



(۱) بزرگنمایی  $\times 400$

شکل ۲: بافت آبشش ماهی کپور (۱) و کلمه (۲) در غلظت کشنده سولفات مس. نوک پیکان ادم و چماقی شدن رشته‌های آبشش را نشان می‌دهد

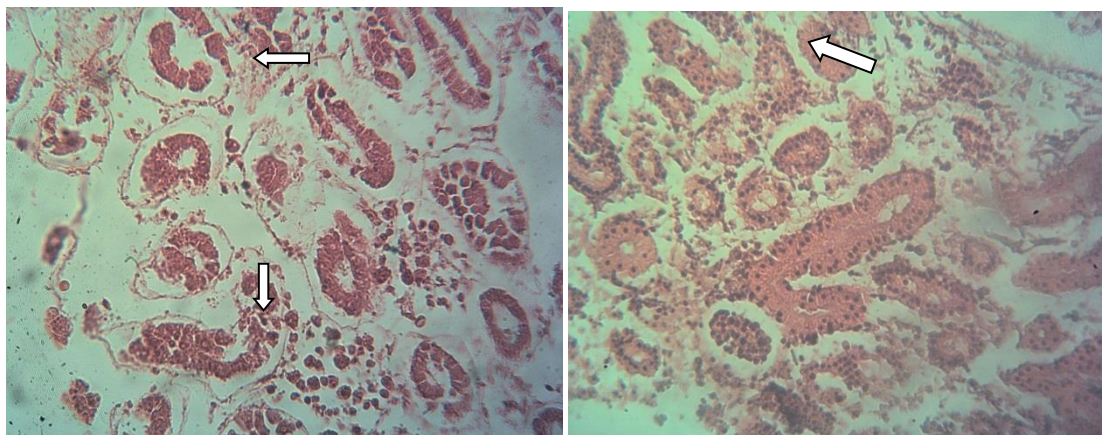


(۲) بزرگنمایی  $\times 200$



(۱) بزرگنمایی  $\times 400$

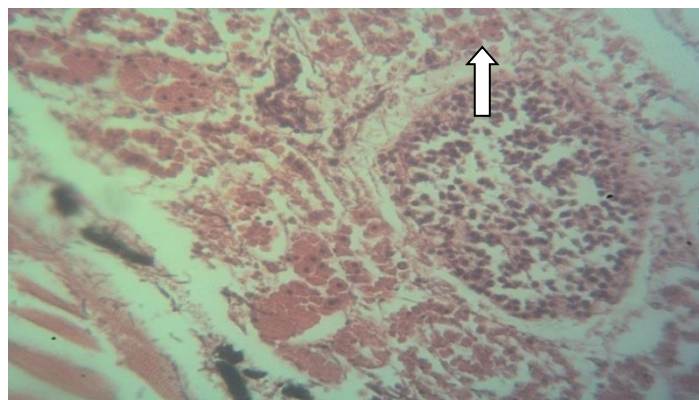
شکل ۳- بافت آبشش ماهی کپور (۱) و کلمه (۲) در غلظت کشنده سولفات مس. نوک پیکان‌ها پرخونی را نشان می‌دهد



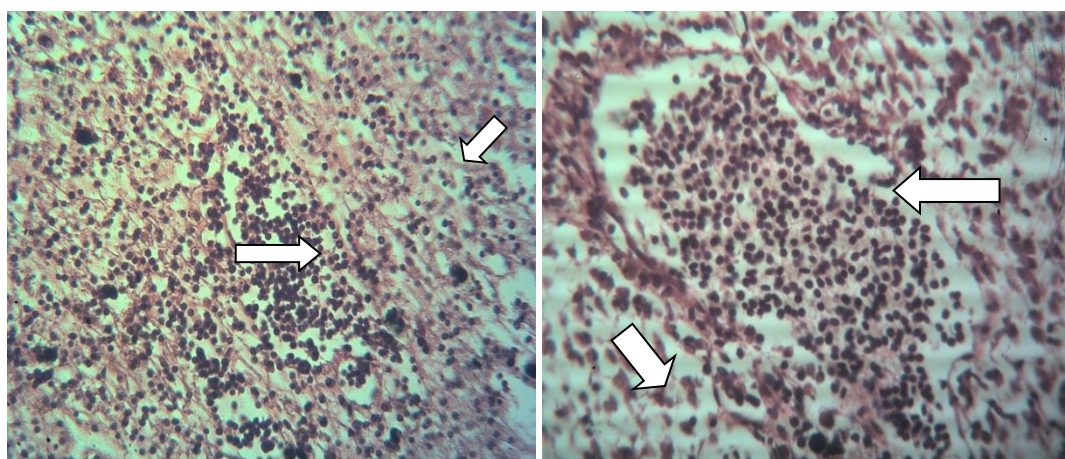
(۱) بزرگنمایی  $\times 200$

(۲) بزرگنمایی  $\times 400$

شکل ۴- بافت کلیه ماهی کلمه (۱) و کپور (۲) در غلظت کشنده سولفات مس. نوک پیکان تخریب مجاری کلیوی را نشان می دهد



شکل ۵- بافت کلیه ماهی کلمه در غلظت کشنده سولفات مس. نوک پیکان خونریزی را نشان می دهد



(۱) بزرگنمایی  $\times 400$

(۲) بزرگنمایی  $\times 100$

شکل ۶- بافت کبد ماهی کپور (۱) و کلمه (۲) در غلظت کشنده سولفات مس. نوک پیکان نفوذ سلول های آماسی و تخریب سلول های کبدی را نشان می هد

## بحث

ماهی کپور ۰/۴۵ میلی گرم در لیتر به دست آمد. پس از رسم منحنی درصد تلفات ماهی در غلظت‌های مختلف، غلظت نیمه کشنده مس برای ماهی کپور و کلمه بعد از گذشت ۹۶ ساعت به ترتیب برابر ۰/۲۷۲ و ۰/۲۲۵ میلی-گرم در لیتر به دست آمد (جدول ۲ و ۳). همان طوری که در جدول ۱ نشان داده شده است با افزایش غلظت-مس در آزمایش‌ها درصد تلفات ماهی به طور معنی داری افزایش یافت ( $P < 0.05$ ). آزمایش‌های مقدماتی نشان داد، غلظت بی اثر برای فلز مس برابر ۰/۱ میلی گرم در لیتر بود که در این غلظت‌ها هیچگونه تلفاتی مشاهده نشد (NOEC). این در حالی است که Hoseini و Nodeh (۲۰۱۲) با مطالعه اثرات سمیت مس و جیوه بر روی ماهی کلمه دریای خزر نشان دادند که کمترین غلظت موثر برای مس در مدت ۹۶ ساعت برابر ۰/۲ میلی گرم در لیتر بود (LOEC). غلظت نیمه کشنده هیچ-گاه یک مقدار ثابت مطلق نمی‌باشد، زیرا عوامل بسیاری نظیر اختلافات فردی، سنی، جنسی، وزنی، فاکتورهای محیطی در تعیین آن موثرند. پس از شروع آزمایش و تشدید مسمومیت ماهیان اضطراب اولیه خود را با حرکات سریع شنا، افزایش حرکات سریع سرپوش‌های آبششی و اکسیژن‌گیری از سطح آب نشان دادند. در نهایت بدن‌شان به طور کامل بی حرکت گشته و تمایل استقرار در کف را از خود نشان دادند. آزمایش حاضر با نتایج حاصل از آزمایش سولفات مس روی میگوی آب شیرین *Caridina Africana* (Bello- Olusoji and Adebola, 2006) و گربه ماهی آفریقایی *Clarias gariepinus* (Olaifa et al., 2010) و بر ماهی کاراس *Carassius auratus gibelio* (Boeck et al., 2010) کاملاً مطابقت داشت. در مطالعات کشتکار لنگرودی و تهرانی فرد (۱۳۹۷) و همچنین

مطالعات بافت‌شناسی یکی از راه‌های موثر در بررسی آسیب‌های وارد شده در مسمومیت‌هاست. آزمایش‌های حاضر به منظور بررسی مسمومیت حاد (96h) سولفات مس بر ماهی کپور و کلمه و تعیین ضایعات ناشی از آن بر بافت‌های آبشش، کبد و کلیه ماهیان تحت شرایط آزمایشگاهی صورت گرفت. مسمومیت‌زایی سولفات مس در ماهیان در شرایط مختلف محیطی و گونه‌های مختلف گزارشات متعددی وجود دارد. بر اساس مطالعات مختلف مشخص شده است که غلظت کشنده مس برای ماهیان از ۰/۲ تا ۱۰ میلی گرم در لیتر بر اساس سختی، pH، گونه و سن ماهی می‌تواند متفاوت باشد (Giguere et al., 2004). به عنوان Vosylienė و Bagdonas (۲۰۰۶) غلظت نیمه کشنده مس را برای ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در مدت ۹۶ ساعت برابر ۰/۱۲۵ میلی گرم در لیتر به دست آوردند. مشتاقی و همکاران (۱۳۹۱) با مطالعه اثرات سمیت حاد سولفات مس و پرمنگنات پتاسیم در بچه تاس ماهیان ایرانی غلظت کشنده فلز مس و پرمنگنات-پتاسیم را در مدت ۹۶ ساعت به ترتیب برابر ۰/۱۵ و ۰/۴۱ میلی گرم در لیتر به دست آوردند. Arunai و Balambiga (۲۰۱۱) میزان غلظت نیمه کشنده سولفات-مس را در مدت ۷۲ ساعت در ماهی کپور معمولی ۸ میلی گرم در لیتر گزارش دادند. این نتایج بیانگر واکنش متفاوت گونه‌های متعدد ماهی در شرایط متفاوت به سولفات مس و دیگر سموم است. در مطالعه حاضر نیز سمیت سولفات مس در ماهی کلمه و کپور متفاوت بود، به طوری که غلظت کشنده مس در ماهی کلمه ۰/۴ و در

رزاقی‌قاضیانی و همکاران (۱۳۹۶) بر آبخش ماهیان قره‌برون و استرلیاد در مواجهه با سم دیازینون بیان شد که علائم رفتاری ناشی از مواجهه شدن در برابر سم شامل انحنای ستون فقرات (فلج عصبی)، قرمزی روی سطح زیرین بدن و آبخش، شنای چرخشی، باز و بست سریع آبخش‌ها و خوابیدن به پشت از جمله علائم بالینی سم دیازینون بود. این امر حاکی از عملکرد مشابه سموم و فلزات بر رفتارهای ظاهری ماهی در مواجهه با سمیت است. مطالعات آسیب‌شناسی بخشی از بیماری‌شناسی و اکوتوکسیکولوژی ماهیان را نشان می‌دهد. عوامل زنده و غیرزنده محیط‌زیست ماهیان دارای آثاری بر دستگاه‌ها و بافت‌های مختلف بدن هستند که کم و بیش می‌توان آن‌ها را با روش‌های هیستوپاتولوژی بیان کرد. هر کدام از این عوارض بافتی موجب حساسیت ماهی نسبت به بیماری‌های ثانویه و بالقوه مرگ و میر می‌شود. معمولاً آبخش اولین بافت در مواجهه با حیطی و سموم است و مواجهه طولانی مدت با آلودگی سبب اثرات تخریبی قابل مشاهده در این بافت خواهد شد. در مطالعه حاضر جداشدگی لایه اپیتلیوم لاملاهای ثانویه و هایپرپلازی از واضح‌ترین علائم بافتی بود. ادم در آبخش ماهیان به‌حالتی اطلاق می‌شود که لایه اپیتلیوم از سطح لاملاهای ثانویه جدا می‌شود؛ در این حالت بین اپیتلیوم و عروق خونی فاصله می‌افتد در حقیقت این واکنش یک عمل دفاعی بوده و به این طریق ماهی سعی می‌کند تا از مسمومیت بیشتر در امان باشد (Svecevicus *et al.*, 2012). هایپرپلازی نیز عملکردی مشابه با ادم داشته و یک واکنش دفاعی به‌حساب می‌آید که به‌راحتی قابل مشاهده است (Van *et al.*, 2004). همان‌طوریکه در آزمایش‌ها مشهود بود با افزایش مدت زمان مواجهه و یا افزایش غلظت

مسمومیت جداشدگی کامل بافت اپیتلیوم و نکروز در این بافت به‌شدت بیشتری رخ داد (Hedayat *et al.*, 2014) آزمایش‌های مختلف ثابت کرد، در ماهیانی که در معرض موادمسمی قرار دارند، ترشح موکوس افزایش یافته و دفع بیش از اندازه صورت می‌گیرد (فرخ‌روز و همکاران، ۱۳۹۲؛ Khunyakari و همکاران، ۲۰۰۱). رستمی و سلطانی (۱۳۸۸) با مطالعه اثرات بافتی دوز مزمن سولفات مس بر برخی اندام‌های ماهی عمولی نشان دادند، در آبخش مهمترین ضایعات شامل ادم، هایپرتروفی لاملاهای ثانویه، هایپرپلازی سلول‌های پوششی آبخش، چسبندگی لاملاهای ثانویه به یکدیگر، افزایش سلول‌های کلراید و مخاطی، پرخونی بود. هپاتوسیت‌های کبدی و سلول‌های کلیوی در متابولیسم و غیرفعال‌سازی سموم نقش اساسی دارند در عین حال به‌دلیل خون‌رسانی بالای این بافت‌ها در صورت مسمومیت با فلزات سنگین بیشتر در معرض مواجهه با سموم قرار می‌گیرند و در نهایت اثرات آسیب‌شناسی در سلول‌های این بافت‌ها نسبت به سایر بافت‌های داخلی سریع‌تر قابل مشاهده است. میزان این آسیب بسته به نوع مسمومیت، دوز مواجهه، گونه و سن ماهی، زمان مواجهه و شرایط فیزیکی‌وشیمیایی آب پرورش متفاوت است (مازندرانی و همکاران، ۱۳۹۴). آسیب‌شناسی بافت‌های کلیه و کبد در مطالعه حاضر نشان داد که عمده‌ترین ضایعات در غلظت‌کشنده مس برای ماهی کپور و کلمه شامل دژنره شدن توپول‌های کلیوی، خونریزی، نفوذ سلول‌های آماسی در بین سلول‌های کبدی و تخریب سلول‌های کبدی بود. رستمی و سلطانی (۱۳۸۸) بیان کردند که مهمترین ضایعات کبدی شامل نکروز-کانونی، واکنش‌شدن، پرخونی و هجوم لنفوسیت‌ها در بافت همبندی کپسول کبدی بودند. آنچه مطالعات

کشندگی و غلظت کشنده (LC50) سولفات مس در قزل آلائی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان، ۳ (۲)، ۸۷-۷۸.

۳. خبازی، م.، هرسیج، م.، هدایتی، س.ع.ا.، گرامی، م.ح.، غفاری فارسانی، ح.، ۱۳۹۴. تأثیر غلظت های تحت کشنده فلز مس در پارامترهای هماتولوژیک خون قزل آلائی رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss*. مجله بوم شناسی آبزیان، ۴ (۴)، ۱-۷.

۴. رستمی، م.، سلطانی، م.، ۱۳۸۸. مطالعه اثرات بافتی دوز مزمن سولفات مس بر برخی اندام های ماهی کپور معمولی. مجله تحقیقات دامپزشکی، ۳ (۶۴)، ۱۹۸-۱۹۳.

۵. رزاقی قاضیانی، م.، ایمانپورنمین، ج.، پزند، ذ.، ۱۳۹۶. نشریه توسعه آبی پروری، ۱۱ (۲)، ۶۰-۴۹.

۶. فرخ روز، م.، زمینی، ع.، مظفری، ا.، ۱۳۹۲. بررسی تاثیرات فرمالین و سولفات مس بر بافت های آبشش بچه ماهی سفید دریای خزر. مجله علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری، ۴ (۶)، ۳۵-۲۷.

۷. کشتکارلنگرودی، ا.، تهرانی فرد، ا.، ۱۳۹۷. تاثیر زیر حد کشندگی سم دیازینون بر پارامترهای خونی و بافت های آبشش و عضله بچه ماهی قره برون، نشریه توسعه آبی پروری، ۱۲ (۳)، ۱۲۹-۱۱۹.

۸. مازندرانی، م.، سوداگر، م.، نمرودی، س.، ۱۳۹۴. هیستوپاتولوژی کلیه، کبد و آبشش بچه ماهیان کپور در مواجهه حاد با سولفات مس. مجله بوم-شناسی آبزیان، ۱ (۵)، ۱۶-۹.

۹. مشتاقی، ب.، نظامی، ش.، خارا، ح.، پزند، ذ.، شناورماسوله، ع.، حلاجیان، ع.، فتح الهی، ر.،

مختلف نشان داد این بود که رفتارهای ظاهری سمیت مواد بر گونه های مختلف ماهی به یک شکل بروز می کند، گرچه ممکن است اثرات بافتی ناشی از مسمومیت در گونه های مختلف و عناصر سمی متفاوت عمل کند.

تغییرات بافتی در اثر عوامل مختلف محیطی ایجاد می شود و می تواند سبب بروز اختلالاتی در رفتار و فیزیولوژی گردد. بنابراین بررسی بافت شناسی یک شاخص جامع بوده که می تواند به صورت دقیق وضعیت سلامت ماهی و تجمع مواد آلاینده را بیش از حد نرمال در محیط زیست مشخص نماید.

### سپاسگزاری

تحقیق حاضر با حمایت مالی دانشگاه گنبد کاووس در قالب طرح های تحقیقاتی به شماره ۶/۷۶۷ و ۶/۵۹۰ اجرا شده است. بدینوسیله از حمایت های ریاست محترم دانشگاه و مدیریت محترم پژوهشی دانشگاه و همچنین ریاست محترم دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی و سایر همکارانی که در این امر ما را یاری رساندند، تقدیر و تشکر می نمایم.

### منابع

۱. احمدی، ن.، نعیمی، ا.س.، نظر حقیقی، ف.، غفوری، ح.، ۱۳۹۵. اثرات نیمه مزمن نانوذره های اکسید مس بر برخی پارامترهای خونی و بافت آبشش (*Cyprinus carpio*) بچه ماهی کپور-معمولی، نشریه توسعه آبی پروری، ۱۰ (۴)، ۱۴-۱.

۲. حسینی، ص.، موحدنیا، ع.، حیدری، م.، مهدوی، ج.، جادی، ی.، فیضی، ز.، ۱۳۹۴. تعیین محدوده

- Environmental Chemistry, 96 (10), 1535-1545.
18. Hosseini, S.A. Nodeh, A.J., 2012. Toxicity of Copper and Mercury to Caspian Roach *Rutilus rutilus caspicus*. Journal of the Persian Gulf, 3 (9), 9-14.
  19. Humason, G. L., 1962. Animal tissue techniques ,United States of America, 492p.
  20. Kazlauskiene, N., 2002. Long- term effect of copper on sea trout (*salmo trutta trutta*) in early ontogenesis, Ecology, 2, 65-69.
  21. Khunyakari, R.P., Vrushali, T., Sharma, R.N., Tare, V., 2001. Effects of some trace heavy metals on *Poecilia reticulata*”, Journal Environment Biology., 22 (2),141-144.
  22. Martoja, R., Martoja–Pierson, M., 1974. Initiation Aux Techniques de l histology animale. 1rd ed. Paris: Masson et Cie; 345 p.
  23. Mustafa, S.A., Davies, S.J., Jha, A.N., 2012. Determination of hypoxia and dietary copper mediated sub-lethal toxicity in carp, *Cyprinus carpio*, at different levels of biological organisation, Chemosphere, 87, 413-422.
  24. Ololade, A., Oginni, I., 2010. Toxic stress and hematological effects of African catfish, *Clarias gariepinus*, fingerlings, Journal of environmental chemistry and ecotoxicology, 2, 2, 14-19.
  25. Olaifa, F.E., Olaifa, A.K., Onmude, T.E., 2004. Lethal and sub-lethal effects of copper to the African catfish (*Clarias gariepinus*) juveniles, African Journal of Biomedical Research, 7, 65 -70.
  26. Perchbacher, P.W., Wurts, W.A., 1999. Effects of Calcium and Magnesium hardness on acute Copper toxicity to juvenile *Channel Catfish*, *Ictalurus punctatus*. Journal of Aquaculture, 172 (3-4), 275 – 280.
  27. Ramírez-Duarte, W.F., Rondón-Barragán, I.S., Pedro, R., Eslava-Mocha, P.R., 2008. Acute toxicity and histopathological alterations of Roundup herbicide on cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). Pesquisa Veterinária Brasileira, 28(11), 1001-1007.
- منافی حویق، ز، ۱۳۹۱. تاثیر سمیت حاد سولفات- مس و پرمنگنات پتاسیم بر آبشش و کبد بچه تاس- ماهی ایرانی. مجله علمی پژوهشی زیست‌شناسی- دریا، ۴ (۱۵)، ۱-۱۱.
10. Bagdonas, E., Vosylienė, M.Z., 2006. A study of toxicity and genotoxicity of copper, zinc and their mixture to rainbow trout, Biologija, 1, 8-13.
  11. Balambigai, N., Aruna, D., 2011. Impact of copper sulfate, an essential micronutrient on ACh, AChE and Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> ATP ase in various tissues of the fish (*Cyprinus carpio*), Research journal of environmental toxicology, 5(2), 314- 319.
  12. Bello-Olusoji, O.A., Adebola, B.O., 2006. Toxic Effect of aldrin and copper sulphate on freshwater Prawn *Caridina Africana*, Journal of Fisheries International, 1(1-2), 12-16.
  13. Boeck, G., Smolders, R., Blust, R., 2010. Copper toxicity in gibelio carp *Carassius auratus gibelio*: Importance of sodium and glycogen, Ecophysiology, Biochemistry and Toxicology Group, Department of Biology, University of Antwerp, Groenenborgerlaan, B-2020 Antwerp, Belgium., Pp: 171.
  14. Giguere, A., Campbell, P.G.C., Hare, L., McDonald, D.G., Rasmussen, J.B., 2004. Influence of lake chemistry and fish age on cadmium , copper, zinc concentrations in various organs of indigenous yellow perch (*perca flavescens*), Canadian Fish Aquaculture Sciences, 61, 1702-1716.
  15. Green, J.W., Speinger, T.M., Holbeck, H., 2018. Statical analysis of ecotoxicity studies. John Wiley & Sons, USA. 392P.
  16. Gul, A., Yilmaz, M., Isilak, Z., 2009. Acute toxicity of Zinc Sulphate (ZnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O) to Guppies (*Poecilia reticulata* P., 1859), Journal of Science, 22(2), 52-65.
  17. Hedayati, A., Hoseini, S.M., Ghelichpour, M., 2014. Acute toxicity of waterborne manganese to *Rutilus caspicus* (Yakovlev, 1870) gill histopathology, immune indices, oxidative condition, and saltwater resistance., Toxicological and

- biochemical and hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72, 1994–1998.
32. Van, H.D., Vosloo, A., Nikinmaa, M., 2004. Effects of short-term copper exposure on gill structure, methallothionein and hypoxia-inducible factor- 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Aquatic Toxicology*, 69, 271-280.
  33. Witeska, M., Jezierska, B., 2003. The effect of environmental factors on metal toxicity to fish, *Fresenius Environment Bulletin*, 824- 829.
  28. Roberts, R.J., 2012. *Fish pathology*. 4th edition. Wiley-Blackwell, UK. 590 p.
  29. Svecevičius, G., Kazlauskienė, N., Edvinas Taujanskis, E., 2012. The acute and behavioral effects of a Copper-Nickel mixture on roach *Rutilus rutilus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 89,147–151.
  30. Taghipour, V., Azizi, S.N., 2011. Determination of trace elements in muscle tissue of Caspian roaches (*Rutilus rutilus caspicus*) collected in Iranian coastal waters of the Caspian Sea, *Iranica Journal of Energy and Environment*, 2 (1), 47-51.
  31. Talas, Z.S., Gulhan, M.F., 2009. Effects of various propolis concentrations on