اثر مس نیترات بر برخی شاخص‌های خون بچه‌تاسماهی شیپ (*Acipenser nudiventris*)

آیین محمدرضایی*[1]، سورنا ابدالی[2]، ایوب یوسفی جوردهی[3] و زهرا سالاری[4]

۱ و۲ - گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

۳ – موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی(AREEO) ، رشت، ایران

۴- گروه منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بافت

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۳/۰۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۲/۰۵

چکیده

به‌منظور تعیین سمیت حاد فلز سنگین مس بر برخی شاخص‌های خون تاسماهی شیپ، ۱۲۰ قطعه ماهی در مجاورت غلظت‌های صفر(شاهد)، ۱ ، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات مس ($Cu(NO_3)_2$) قرار گرفتند. در غلظت-های ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر همه ماهی‌ها بعد از ۲۴ ساعت تلف شدند و فقط در گروه شاهد و تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر همه ماهی‌ها تا ۹۶ ساعت زنده ماندند. نتایج نشان داد که سطوح هموگلوبین (Hb) با افزایش غلظت مس و با گذشت زمان به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < ۰/۰۵$). تعداد گلبول‌های قرمز (RBC) در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر در ۲۴ ساعت کاهش معنی‌داری نشان داد ($P < ۰/۰۵$). درصد هماتوکریت (Hct) از ۳/۴ ± ۲۲/۳۳ درصد در تیمار شاهد به ۴/۴ ± ۴۵ درصد در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر مس در ۲۴ ساعت افزایش یافت ($P < ۰/۰۵$). تعداد گلبول‌های سفید (WBC) کاهش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد داشت ($P < ۰/۰۵$). حجم متوسط گلبول قرمز (MCV) از ۵/۳ ± ۱۴۸/۶ فمتولیتر در گروه شاهد به ۱ ± ۲۷۴ فمتولیتر در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر در ۲۴ ساعت رسید ($P < ۰/۰۵$). میانگین هموگلوبین ذره‌ای (MCH) در گروه شاهد ۲۰ ± ۳۱/۸ گرم در دسی‌لیتر بود و به ۳۰ ± ۵۰/۴ گرم در دسی‌لیتر در تیمار ۱۰ میلی‌گرم در لیتر در زمان ۲۴ ساعت رسید ($P < ۰/۰۵$). میانگین غلظت هموگلوبین ذره‌ای (MCHC) به بیشترین میزان (۴/۹ ± ۵۰/۳ پیکوگرم) در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر در زمان ۹۶ ساعت رسید. تعداد لنفوسیت‌ها از ۱ ± ۶۲/۶۶ درصد در گروه شاهد به ۱/۲ ± ۷۰ درصد در تیمار ۵ میلی‌گرم در لیتر در زمان ۲۴ ساعت کاهش در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر به‌طور معنی‌داری افزایش (۲/۵ ± ۸۲ درصد) در زمان ۴۸ ساعت داشت ($P < ۰/۰۵$). تعداد مونوسیت‌ها از ۱/۵ ± ۳/۶۶ درصد در گروه شاهد به کمترین میزان (۰/۵ ± ۰/۶۶ درصد) در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر رسید ($P < ۰/۰۵$). از نتایج تحقیق انجام شده می‌توان دریافت که گرچه مس یک فلز ضروری برای انجام بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی است؛ ولی غلظت بیش از حد مجاز آن اثرات سمی شدیدی بر بچه‌ماهی شیپ نشان داد.

واژگان کلیدی: مس نیترات، شاخص‌های خونی، بچه‌تاسماهی شیپ (*Acipenser nudiventris*)

*نگارنده پاسخگو: **Aeen974@hotmail.com**

مقدمه

ماهیان شاخص‌های زیستی (بیومارکر) آسان و قابل اعتمادی از آلودگی مس در پیکره‌های آبی هستند (Taylor *et al.*, 2000; Lodhi *et al.*, 2006). اثر منفی فلزات سنگین بر ماهیان به اختلال ایجاد شده در فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی آنها مربوط می‌شود (Viella *et al.*, 1999). در مطالعه‌ای که Weiguang و Chen (۱۹۹۵)، در مورد سمیت حاد جیوه، مس سولفات، کادمیوم و روی سولفات در لاروهای ماهی سیم قرمز دریایی (*Chrysophrys major*) انجام دادند، میزان LC_{50} - 96 ساعت را به‌ترتیب ۰/۰۰۴، ۰/۰۷ ، ۰/۲۷ و ۰/۴۴ میلی‌گرم در لیتر بیان داشتند.

Bagdonas و Vosyliene (۲۰۰۶) در مطالعه اثر مس بر قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) به نتایج مشابهی دست یافتند. هماتوکریت (PCV) به‌منظور اندازه‌گیری حجم گلبول قرمز خون بکار رفته و بر حسب حجم گلبول قرمز درصد میلی‌لیتر خون (dl) بیان می‌گردد. درصد هماتوکریت و پارامترهای وابسته به آنها عمومی‌ترین شاخص‌های خون‌شناسی برای تشخیص کم خونی در ماهیان هستند که به تغذیه، سن (Tavares-Dias & Moraes, 2007) و بیماری وابسته می‌باشد. از این فاکتور می‌توان به‌عنوان ابزاری برای کنترل آبزی‌پروری و مدیریت صیادی جهت کنترل شرایط کم خونی استفاده نمود. به‌نظر می‌رسد ارتباط معکوسی بین تعداد یاخته‌های قرمز و تعداد یاخته‌های سفید خون وجود دارد. یعنی تعداد بالای یاخته‌های قرمز نیاز بالای تعداد یاخته‌های سفید خون را کاهش می‌دهد (Satheeshkumar *et al.*, 2010). MCV بیانگر اندازه و بازتاب وضعیت طبیعی یا غیرطبیعی بودن تقسیمات یاخته در چرخه ساخت یاخته‌های قرمز خون است. بنابراین، افزایش MCV منتج از یاخته‌های بالغ و بزرگ قرمز خون در چرخه گردش خون است. کاهش حجم متوسط یاخته قرمز خون از مقدار طبیعی می‌تواند بیانگر آسیب‌های کبدی، طحال و یا فقر ویتامین و آهن در جیره غذایی باشد. اما کاهش میانگین غلظت هموگلوبین خون عمدتاً ناشی از کمبود آهن یا ناتوانی در استفاده از آهن جیره غذایی است. از یاخته‌های سفید خون به‌عنوان شاخص وضعیت سلامت ماهیان استفاده می‌شود. زیرا یاخته‌های سفید خون از ترکیبات کلیدی و جدایی‌ناپذیر یاخته‌های دفاعی بدن هستند که در تنظیم عملکرد ایمنولوژیک ماهیان، درگیر می‌باشند (کاظمی و همکاران، ۱۳۸۹). غلظت هموگلوبین خون ماهیان که بهترین شاخص تغییرات محیطی است (Bani & Haghi Vayghan, 2009) در مقایسه با پستانداران کمتر است و عموماً در محدوده ۱۰ - ۵ گرم در دسی‌لیتر قرار دارد.

فلزات سنگین از منابع کشاورزی، شهری و صنعتی به آب ها رهاسازی و بدین‌طریق به ماهی و انسان منتقل می‌شوند. اثرات غلظت‌های تحت کشنده فلزات سنگین بر فرایند فیزیولوژیکی در ماهیان به خوبی مطالعه نشده است. ماهی شیپ با نام علمی *Acipenser nudiventris* یکی از مهم‌ترین گونه‌های ماهیان خاویاری می‌باشد که به‌واسطه استعداد رشد سریع، قابلیت سازگاری بالا و گوشت لذیذ از گونه‌های غالب در ترکیب ماهیان خاویاری پرورشی به‌شمار می‌رود (نظری، ۱۳۷۵).

مس یکی از عناصر سنگین است که اگر چه سمیت آن برای ماهی زیاد می‌باشد، ولی ترکیبات آن در پرورش ماهی، برای از بین‌بردن جلبک‌ها و همچنین در پیشگیری و درمان برخی از بیماری‌های ماهی، به‌کار می‌رود. اثر مس به‌صورت مس نیترات که به‌عنوان جلبک‌کش به‌کار برده می‌شود، بر آبشش‌ها تا ۳ برابر بیشتر از سایر فلزات سنگین گزارش شده است. با توجه به اینکه تغییرات غلظت فلزات سنگین در محیط‌های آبی، اثرات سوء زیستی قابل توجهی را روی موجودات آبزی به‌ویژه انواع ماهی‌ها دارد، تاثیر فلزات سنگین در حیات موجودات آبزی بسیار حائز اهمیت است. آلودگی آب با ترکیبات یا عناصر فلزات سنگین، منجر به مسمومیت خونی ماهیان و به دنبال آن تلفات مستقیم و یا مسمومیت مزمن و تغییرات مهم در فیزیولوژی ماهیان می‌شود. که نتیجه آن عدم توانایی جانور برای ادامه حیات خواهد بود (جلالی و آقازاده، ۱۳۸۵).

اندازه‌گیری شاخص‌های بیوشیمایی و فیزیولوژیک خون می‌تواند به‌عنوان ابزار تشخیصی در سم‌شناسی و پایش زیستی به‌کار رود (Xiaoyun *et al.*, 2009). تغییر در میزان و سطوح این پارامترها می‌تواند منعکس کننده پاسخ‌های ماهیان به تغییرات در محیط زندگی آنها باشد (Satheeshkumar *et al.*, 2010). از آنجا که اطلاعات کافی در مورد اثر فلز مس بر گونه بچه‌ماهی شیپ وجود ندارد، این مطالعه با هدف بررسی اثرات فیزیولوژیکی فلز سنگین مس بر برخی شاخص‌های خونی ماهی شیپ انجام شد.

مواد و روش‌ها

به‌منظور انجام تحقیق، تعداد ۱۲۰ عدد ماهی شیپ پرورشی با میانگین وزنی ۱۰ ± ۵۰ گرم و میانگین طولی ۵/۱ ± ۶/۲۱ سانتی‌متر انتخاب شدند. پس از سازگاری، ماهیان بر اساس تیمارهای مورد نظر در ۱۲ دستگاه آکواریوم ۱۰۰ لیتری حاوی ۹۰ لیتر آب چاه (بدون خروجی و مجهز به هوادهی) و به تعداد ۱۰ عدد ماهی در هر آکواریوم معرفی شدند. در مجموع ۴ تیمار، شامل تیمار شاهد (با دوز صفر) و تیمارهای با غلظت ۱ و ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر مس نیترات و هر تیمار با سه تکرار در نظر گرفته شد. غلظت‌های حاوی مس نیترات (معادل ۴/۳۲ گرم) بر اساس جرم مولکولی و به روش جرمی – حجمی تعیین شد (پژند و همکارن، ۱۳۸۴) و پس از حل‌کردن در حجم معینی از آب مصرفی، محلول استوک تهیه گردید. سه تیمار ۱، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر مس نیترات و گروه شاهد بدون مصرف استوک برای انجام آزمایش آماده شد. سپس بر اساس غلظت‌های مورد نظر، حجم معینی از استوک برداشته و در مخزن‌ها ریخته شد. برای انجام این کار از بشر، استوانه مدرج و پیپت مدرج استفاده شد. برای این منظور و با توجه به حجم اکواریوم-ها مقدار ۲۲/۲ میلی‌لیتر از استوک برای تیمار یک، و مقدار ۱۱۱ میلی‌لیتر برای تیمار ۲ و مقدار ۲۲۲ میلی-لیتر برای تیمار ۳ استفاده گردید. نمونه‌برداری از ماهیان پس از ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت انجام شد. در هر دوره نمونه‌برداری از ناحیه سیاهرگ دمی ماهیان خون‌گیری بعمل آمد. میزان هماتوکریت، هموگلوبین، شمارش سلولی (WBC و RBC)، شمارش افتراقی لکوسیت‌ها (لنفوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها، ائوزینوفیل‌ها، مونوسیت‌ها) و ترومبوسیت‌های خون ماهیان تعیین شد (کاظمی و همکاران، ۱۳۸۹).

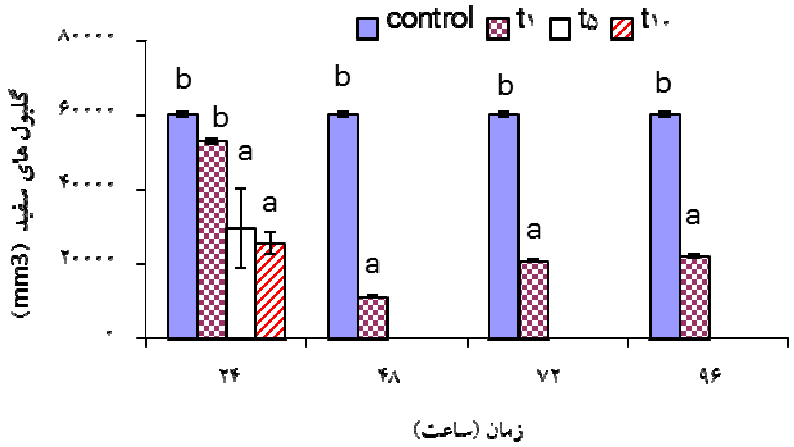
آنالیز آماری

جهت آنالیز آماری، از نرم افزار SPSS 14.0 تحت ویندوز و به‌روش آنالیز واریانس یک‌طرفه نرمال (one – way ANOVA) و t - Test انجام و نتایج به‌صورت Mean± SE ارائه گردید. جهت رسم نمودار از نرم افزار Excel استفاده شد.

نتایج

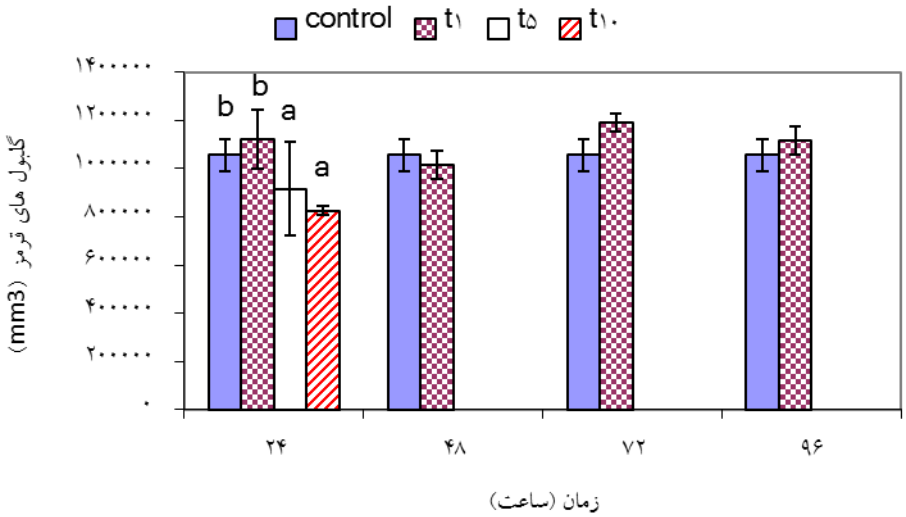
بیشترین درصد تلفات تا ۲۴ ساعت پس از مجاورت در برابر سم به‌ترتیب مربوط به غلظت‌های ۱۰ (۷۰ درصد) و ۵ (۵۰ درصد) و ۱ (۱۰ درصد) میلی‌گرم در لیتر بود. به-طوری‌که در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر در هر سه تیمار پس از ۲۴ ساعت تنها ۳ ماهی زنده ماندند و در غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر در تیمار ۱، ۴ عدد و در تیمار ۲، ۷ عدد و در تیمار ۳، ۸ ماهی تلف شدند. همه ماهیان تیمارهای ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر تلف شدند. ولی در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر تقریباً ۲۰ درصد ماهی‌ها تا ۹۶ ساعت از خود مقاومت نشان دادند.

شمار گلبول‌های سفید خون (WBC) با افزایش غلظت مس نیترات و با گذشت زمان به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($P < ۰/۰۵$). به‌طوری‌که حداقل تعداد گلبول‌های سفید مربوط به غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر در زمان ۴۸ ساعت (۵۰۰ ± ۱۱۱۶۶ در هر میلی‌متر مکعب خون) و بیشترین تعداد گلبول‌های سفید مربوط به غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر در زمان ۲۴ ساعت (۴۵۰۰ ± ۵۳۰۰۰ عدد در هر میلی‌متر مکعب خون) مشاهده گردید (شکل ۱).



شکل ۱ – تغییرات گلبول‌های سفید در بچه‌تاسماهی شیپ (*Acipenser nudiventris*) در غلظت‌های مختلف مس نیترات و زمان‌های مختلف (آنتنک‌ها نشان‌دهنده خطای استاندارد می‌باشد)

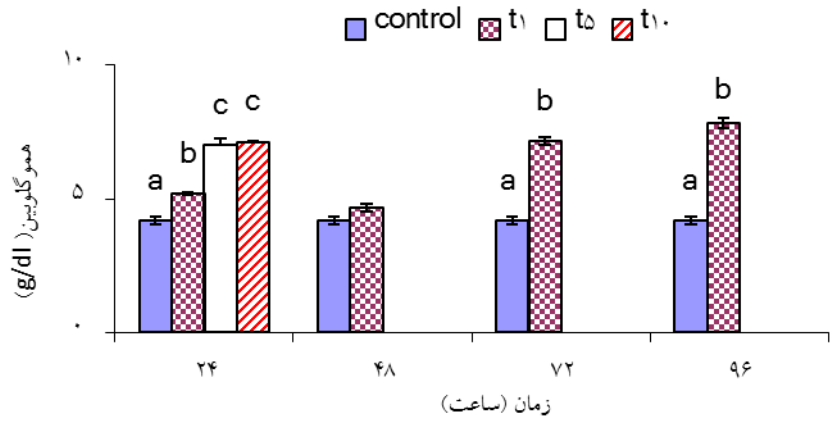
نتایج شمارش گلبول‌های قرمز خون با افـزایش غلظـت و زمان مجاورت سیر نزولی داشت و در غلظت‌هـای ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتـر دارای کـاهش معنـی‌دار در مقایسـه بـا گروه شاهد بود ($P < ۰/۰۵$). به‌طوری‌که حداقل تعداد آن به‌ترتیب مربوط بـه ۱۰ میلـی‌گـرم در لیتـر در زمـان ۲۴ ساعت (۱۵۰۰۰۰ ± ۸۲۶۶۶۶/۷ عـدد در هـر میلـی‌متـر مکعب خون) و بیشترین تعداد آن در غلظت ۱ میلی‌گـرم در لیتر در زمان ۲۴ ساعت (۲۱۶۹۷۴ ± ۱۱۲۳۳۳۳ عدد در هر میلـی‌متـر مکعـب خـون) مشـاهده گردیـد. شـمار گلبول‌های قرمز تیمار ۱ فاقد اختلاف معنی‌داری با شـاهد بود ($P \geq ۰/۰۵$) (شکل ۲).



شکل ۲– تغییرات گلبول‌های قرمز در بچه‌تاسماهی شیپ (*Acipenser nudiventris*) در غلظت‌های مختلف مس نیترات و زمان-های مختلف (آنتنک‌ها نشان‌دهنده خطای استاندارد می‌باشد)

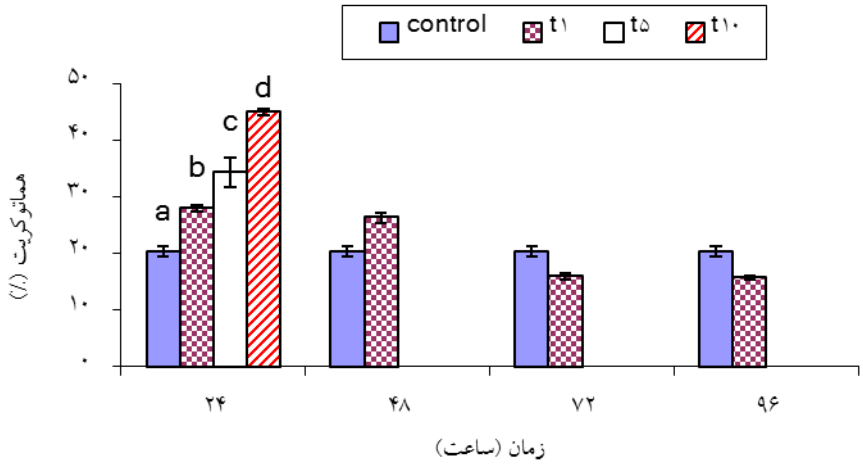
سطوح هموگلوبین خون با افزایش غلظت مـس نیتـرات و با گذشت زمان به‌طـور معنـی‌داری ($P < ۰/۰۵$) افـزایش یافت. به‌طوری‌که حداکثر میزان آن به‌ترتیـب مربـوط بـه غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتـر در زمـان ۹۶ سـاعت (۰/۲ ± ۷/۸۳۳ گرم در دسی‌لیتر) و حداقل میزان آن مربـوط بـه

غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر در زمان ۲۴ ساعت (۰/۱ ± ۵/۲ گرم در دسی‌لیتر) بود (شکل ۳).



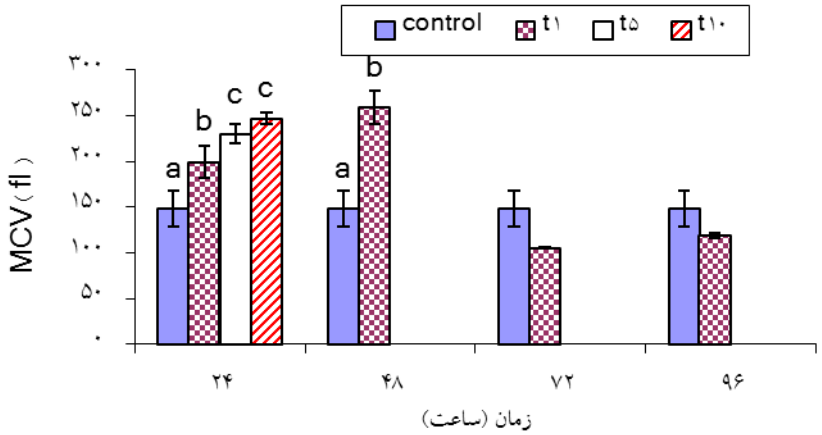
شکل ۳– تغییرات سطوح هموگلوبین در بچه‌تاسماهی شیپ (*Acipenser nudiventris*) در غلظت‌های مختلف مس نیترات و و زمان‌های مختلف (آنتنک‌ها نشان‌دهنده خطای استاندارد می‌باشد)

میزان هماتوکریت خون با افزایش غلظت مس نیتراتدر ۲۴ ساعت افزایش یافت و گروه شاهد با تمامی غلظت‌ها در زمان ۲۴ ساعت اختلاف معنی‌دار ($P < ۰/۰۵$) مشاهده گردید. به‌طوری‌که بیشترین میزان آن به‌ترتیب مربوط به غلظت‌های ۱۰ میلی‌گرم در لیتر (۳/۱ ± ۴۵ درصد) و کمترین میزان آن مربوط به تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر (۱/۵ ± ۲۸ درصد) بود (شکل ۴).



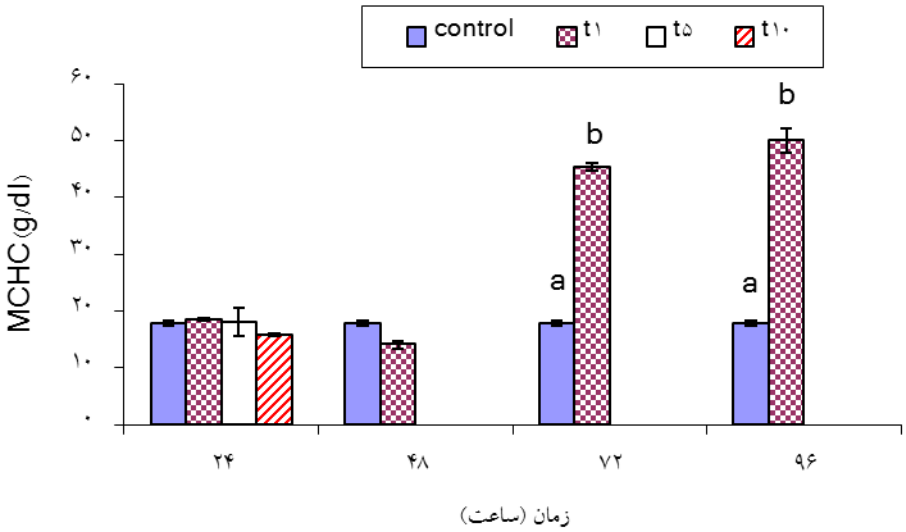
شکل ۴– تغییرات میزان هماتوکریت در بچه‌تاسماهی شیپ (*Acipenser nudiventris*) در غلظت‌های مختلف مس نیترات و زمان‌های مختلف (آنتنک‌ها نشان‌دهنده خطای استاندارد می‌باشد)

میانگین تغییرات حجم متوسط سلولی با افزایش غلظت سم در زمان‌های ۲۴ ساعت در همه غلظت‌ها دارای اختلاف معنی‌دار بود ($P < ۰/۰۵$) که با افزایش همراه بود. به طوری که کمترین(۵/۳ ± ۴۸ فمتولیتر) و بیشترین میزان (۱ ± ۲۵۹ فمتولیتر) به تیمار ۱ میلی-گرم در لیتر در زمان ۴۸ ساعت تعلق داشت (شکل ۵).



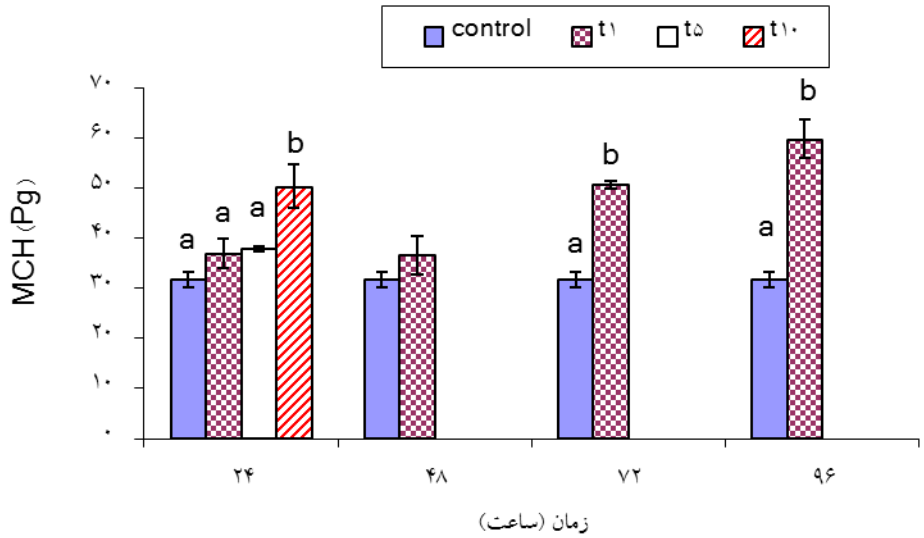
شکل ۵– تغییرات میزان متوسط حجم گلبول قرمز در بچه‌تاسماهی شیپ (*Acipenser nudiventris*) در غلظت‌های مختلف مس نیترات و زمان‌های مختلف (آنتنک‌ها نشان‌دهنده خطای استاندارد می‌باشد)

میانگین تغییرات غلظت هموگلوبین ذره‌ای در تیمارهای مورد مطالعه در زمان۲۴ و ۴۸ ساعت فاقد اختلاف معنی-داری بود ($P \geq ۰/۰۵$). در حالی‌که در زمان‌های ۷۲ و ۹۶ ساعت بین غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر و گروه شاهد افزایش معنی‌داری ($P < ۰/۰۵$) مشاهده گردید. به-طوری‌که کمترین میزان آن (۴/۹ ± ۵۰/۰۳) در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر در زمان ۹۶ ساعت مشاهده گردید (شکل ۶).



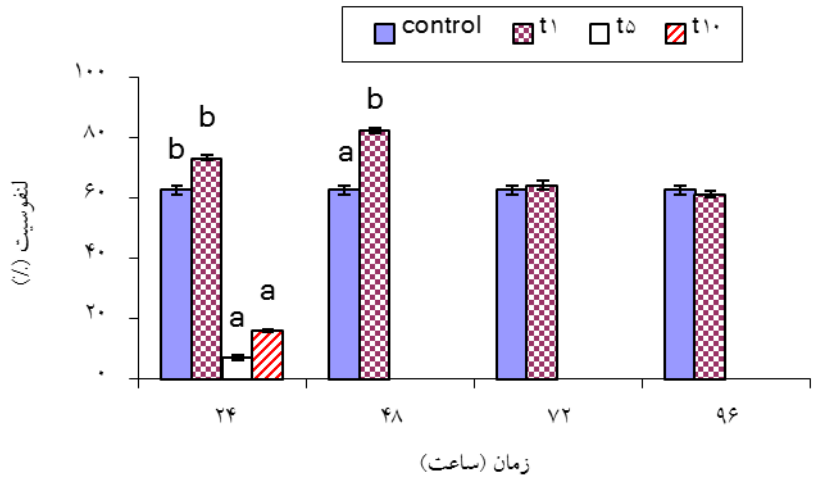
شکل ۶– تغییرات غلظت هموگلوبین ذره‌ای در بچه‌تاسماهی شیپ (*Acipenser nudiventris*) در غلظت‌های مختلف مس نیترات و زمان‌های مختلف (آنتنک‌ها نشان‌دهنده خطای استاندارد می‌باشد)

در میزان متوسط غلظت هموگلوبین در زمان ۲۴ ساعت در بین تیمارهای ۱۰ میلی‌گرم و شاهد اختلاف معنی-داری وجود داشت که با افزایش همراه بود و در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر در زمان‌های ۷۲ و ۹۶ ساعت افزایش معنی‌داری ($P < ۰/۰۵$) نسبت به گروه شاهد نشان داد. به‌طوری‌که، کمترین (۲۰/۶ ± ۳۱/۸ گرم در دسی‌لیتر) در گروه شاهد و بیشترین (۳۰ ± ۵۹/۸ گرم در دسی-لیتر) میزان آن در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر در زمان ۹۶ ساعت بدست آمد (شکل ۷).



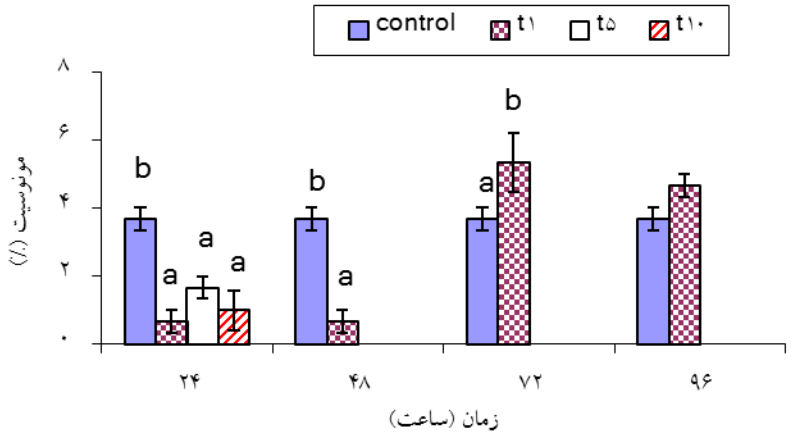
شکل ۷ – تغییرات غلظت هموگلوبین در بچه‌تاسماهی شیپ (*Acipenser nudiventris*) در غلظت‌های مختلف مس نیترات و زمان‌های مختلف (آنتنک‌ها نشان‌دهنده خطای استاندارد می‌باشد)

تعداد لنفوسیت‌های خون ماهیان با افزایش غلظت مس نیترات و با گذشت زمان در ۲۴ ساعت در تیمارهای ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کاهش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد داشت. به‌طوری‌که، کمترین میزان (۱/۲ ± ۷۰ درصد) در تیمار حاوی ۵ میلی‌گرم مس نیترات و بیشترین میزان (۲/۵ ± ۸۲ درصد) در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر در زمان ۴۸ ساعت بدست آمد که به‌طور معنی-داری افزایش داشت ($P < ۰/۰۵$) (شکل ۸).



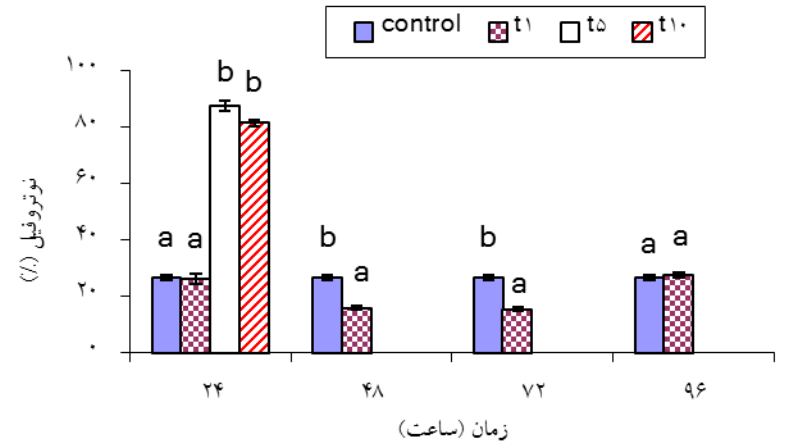
شکل ۸- روند تغییرات تعداد لنفوسیت‌های خون در بچه‌تاسماهی شیپ (*Acipenser nudiventris*) در غلظت‌های مختلف مس نیترات و زمان‌های مختلف (آنتنک‌ها نشان‌دهنده خطای استاندارد می‌باشد)

تعداد مونوسیت‌های خون ماهیان با افزایش غلظت مس نیترات در زمان ۲۴ ساعت به‌طور معنی‌داری کاهش یافت به‌طوری‌که از (۱/۵ ± ۳/۶۶ درصد) در شاهد به کمترین میزان (۰/۵ ± ۰/۶۶ درصد) در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر در زمان ۲۴ ساعت رسید. ولی در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر در زمان ۷۲ ساعت به‌طور معنی‌داری ($P < ۰/۰۵$) افزایش (۲ ± ۵/۳۳ درصد) یافت (شکل ۹).



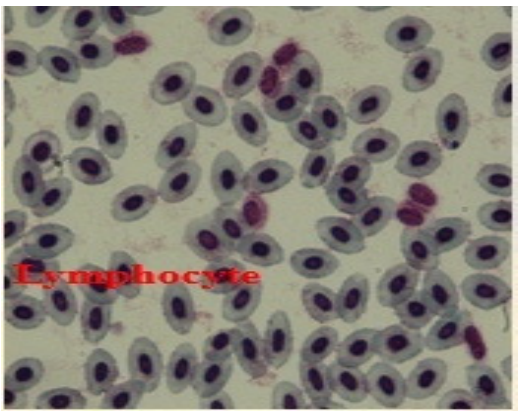
شکل ۹- روند تغییرات تعداد مونوسیت‌های خون در بچه‌تاسماهی شیپ (*Acipenser nudiventris*) در غلظت‌های مختلف مس نیترات و زمان‌های مختلف (آنتنک‌ها نشان‌دهنده خطای استاندارد می‌باشد) *ماهیان در مجاورت غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر تا ساعت ۲۴ تلف شدند

تعداد نوتروفیل‌های خون ماهیان با افـزایش غلظـت مـس نیترات و با گذشت زمان به‌طور معنی‌داری افزایش یافـت. بیشترین تعداد (۲ ± ۸۷ درصد)در غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر در زمان ۲۴ ساعت مشاهده گردید. ولی در غلظـت ۱ میلی‌گرم در لیتر در زمان‌های ۴۸ ساعت نسبت به شـاهد کـاهش (۱/۴ ± ۱۶ درصـد) یافـت ($P < ۰/۰۵$) (شـکل ۱۰).

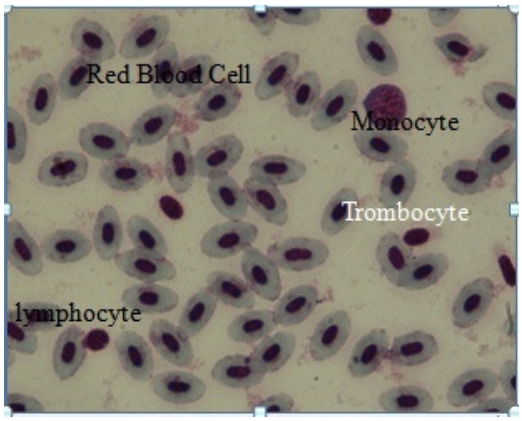


شکل ۱۰- روند تغییرات تعداد نوتروفیل‌ها در بچه‌تاسماهی شیپ (*Acipenser nudiventris*) در غلظت‌های مختلف مس نیترات و زمان‌های مختلف (آنتنک‌ها نشان‌دهنده خطای استاندارد می‌باشد)

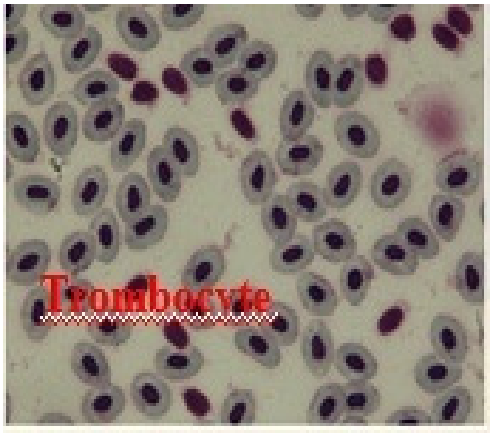
مجاورت بچه تاسماهیان شیپ، با مس نیترات باعث بـروز عوارضی بـر لکوسـیت‌هـا از قبیـل تجمـع لنفوسـیت‌هـا و منوسیت‌ها، دناتوره شـدن نوتروفیـل‌هـا، ائوزینوفیـل‌هـا و منوسیت‌ها گردید (شکل‌های ۱۱ الی ۱۶).



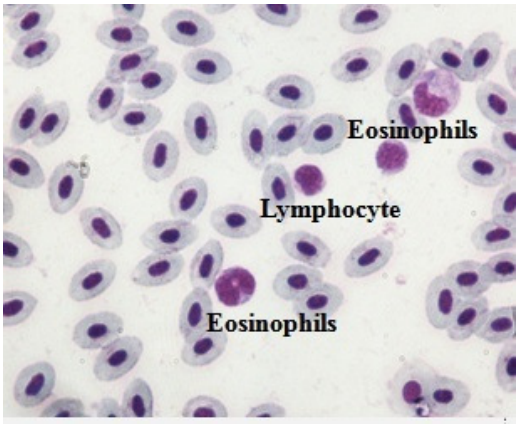
شکل ۱۱- وضعیت گلبول‌های خونی
گروه شاهد



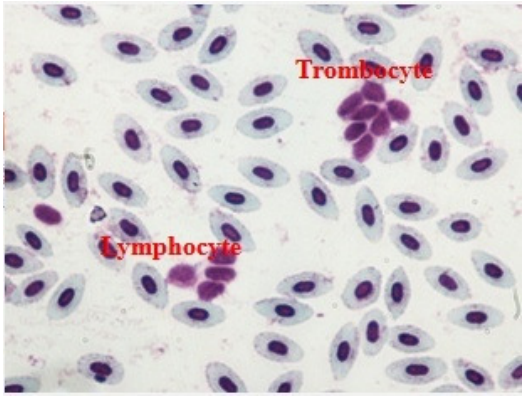
شکل ۱۲- تغییر شکل لنفوسیت‌ها در مجاورت ۱۰ میلی‌گرم
در لیتر مس نیترات پس از ۲۴ ساعت



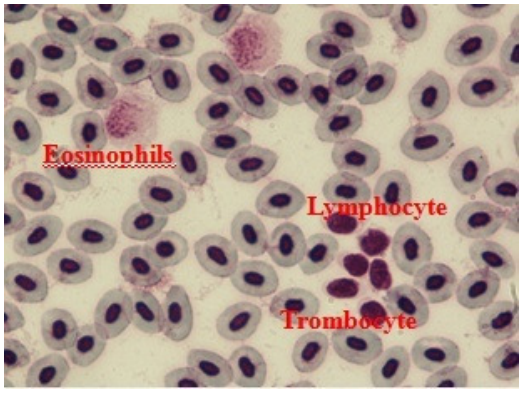
شکل ۱۳- تجمع ترومبوسیت‌ها در مجاورت ۵ میلی‌گرم در لیتر



شکل ۱۴ – تغییر شکل ازینوفیل‌ها و لنفوسیت‌ها
در مجاورت ۱ میلی‌گرم در لیتر **مس نیترات** بعد
از ۴۸ ساعت



شکل ۱۵- تجمع ترومبوسیت‌ها مجاورت ۱
میلی‌گرم در لیتر مس نیترات بعد از ۷۲ ساعت



شکل ۱۶ - تجمع لنفوسیت‌ها و ترومبوسیت‌ها در
مجاورت ۱ میلی‌گرم در لیتر مس نیترات بعد از۹۶ ساعت

بحث و نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر، غلظت‌های مختلف مس نیترات در زمان‌های متفاوت بر برخی از شاخص‌های خونی بچه-تاسماهی شیپ (*Acipenser nudiventris*) مطالعه شده است. نتایج نشان داد که تعداد گلبول‌های سفید تا زمان ۹۶ ساعت به‌طور معنی‌داری کاهش یافته است(شکل ۱). به‌طوری‌که حداقل میزان آن برابر (۵۰۰ ± ۱۱۱۶۶ عدد در هر میلی‌متر مکعب خون) در مجاورت با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر در زمان ۴۸ ساعت ثبت گردید. مطابق با نتایج تحقیق حاضر، Niimi (۱۹۸۷)نیز نشان داد که مواد سمی، سبب کاهش تعداد گلبول‌های سفید در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) می گردد. اثر سمیت مس بر ماهی شیپ از طریق تغییرات پاتولوژیکی خون و بافت، ناشی از القای نوعی آنمی ایجاد می گردد. Serezli و همکاران (۲۰۱۱)، اثر حاد مس و سرب بر برخی شاخص‌های خونی در گونه Coruh trout (*Salmo coruhensis*) را طی یک دوره مجاورت کوتاه مدت در برابر غلظت‌های بالای ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر مورد مطالعه قرار داده و دریافتند که تعداد لکوسیت‌ها و اریتروسیت‌ها پس از مجاورت با غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر، ابتدا کاهش و پس از ۴۸ ساعت تعداد اریتروسیت‌ها به حالت اولیه باز می گردد که با نتایجی که در تحقیق حاضر بدست آمده، همسو بوده است. این کاهش ناشی از شرایط پراسترس حاکم بر محیط زیست ماهی می‌باشد. نتایج تحقیق حاضر نشان دهنده ی افزایش میزان هماتوکریت در ماهیان با افزایش غلظت مس نیترات طی ۲۴ ساعت بود(شکل ۴) و با نتایج Schjolden و همکاران (۲۰۰۷) در *Carassius crassius* مطابقت دارد. افزایش هماتوکریت احتمالا به‌دلیل بادکردگی و تغییر شکل گلبول‌های قرمز از حالت بیضوی به کروی و بروز پدیده اریتروپویتیک ناشی از افزایش تعداد گلبول‌های قرمز نابالغ صورت گرفته باشد. تعداد گلبول‌های قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین به عنوان شاخص های مناسبی از وضعیت سلامت ماهی و واکنش به تنش‌های محیطی مطرح می باشد (کاظمی و همکاران، ۱۳۸۹). به‌نظر می‌رسد افزایش نیاز اکسیژنی ماهی در مواجهه با تنش منجر به بروز این تغییرات شده باشد. افزایش نیاز اکسیژنی در مواجه با تنش محیطی در آبزیان مختلف نظیر افزایش مصرف اکسیژن در قزل‌آلای‌رنگین‌کمان پس از تغذیه با غذای آلوده به مس گزارش شده است (Naghsh *et al.*, 2012 ;رزم آرا و همکاران، ۱۳۹۳) که معمولا به‌دلیل افزایش تقاضای انرژی برای مواجهه با شرایط تنش‌زا است (کاظمی و همکاران، ۱۳۸۹). از آنجایی‌که قسمت اعظم اکسیژن به‌صورت اتصال با هموگلوبین در گلبول قرمز منتقل می‌شود، در شرایط تنش‌زا معمولا هموگلوبین و هماتوکریت افزایش پیدا می کند. Singh و همکاران (۲۰۰۸)، اثر مس را در خامه ماهی (*Channa punctatus*) آب شیرین مورد مطالعه قرار دادند و دریافتند که میزان هموگلوبین (Hb)، هماتوکریت (PCV) و تعداد گلبول‌های قرمز (RBC) در پایان دوره ۴۵ روز به‌طور معنی‌داری در مقایسه با شاهد کاهش یافت. در حالی‌که تعداد گلبول‌های سفید (WBC) افزایش یافت. هر چند میزان MCV، MCH و MCHC افزایش معنی‌داری طی روزهای ۱۵ تا ۳۰ را نشان داد لیکن به‌جز میزان هموگلوبین و هماتوکریت سایر فاکتورهای ذکر شده با تحقیق حاضر همسو بوده و مطابقت نشان می دهد. Georgieva و همکاران (۲۰۱۰)، اثرات کلینیکی، هماتولوژیکی و مورفولوژیکی سمیت مس در ماهی کاراس (*Carasius gibelio*) را مورد مطالعه قرار دادند و دریافتند که با افزایش غلظت مس از صفر به ۲ میلی‌گرم در لیتر میزان هماتوکریت، MCV، MCH و MCHC تغییرات معنی‌داری را نشان می دهد. مشابه نتایج تحقیق حاضر، Witeska (۲۰۰۵)، در مطالعه اثرات هماتولوژیکی و ایمنولوژیکی فلزات سنگین بر ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)، با قرار دادن ماهیان در مجاورت ۵ میلی‌گرم در لیتر فلز سنگین مس به مدت ۹۶ ساعت دریافتند که ماهیان دچار استرس شده و درصد هماتوکریت آنها بدون ایجاد تغییرات معنی‌دار در تعداد گلبول‌های قرمز افزایش می یابد. نتایج متناقضی در خصوص تاثیر عوامل تنش‌زا از جمله آلاینده‌های محیطی بر شاخص‌های ثانویه خون-

شناسی وجود دارد. به‌عنوان مثال، مواجهه با نانوذرات - اکسید آهن پس از ۹۶ ساعت سبب افزایش MCV و MCHدر تیلاپیای موزامبیک شد (Karthikeyeni *et al.*, 2013). درحالی‌که مواجه تاس‌ماهی استرلیاد، *Acipenser ruthenus* با کادمیوم محلول در آب منجر به تغییر معنی‌دار در شاخص‌های ثانویه خون-شناسی نشد (عروجعلی و همکاران، ۱۳۹۲). به نظر می‌رسد پاسخ شاخص‌های ثانویه خون‌شناسی به عوامل تنش‌زای محیطی متاثر از عوامل مختلفی هم چون نوع گونه، شرایط زیستی، نوع و غلظت مواد آلاینده باشد. در تحقیق حاضر تعداد کل گلبول‌های سفید خون و لنفوسیت های ماهی شیب در مجاورت مس نیترات با افزایش غلظت و مدت زمان مجاورت به‌طور معنی‌داری کاهش یافت(شکل ۱) لیکن مونوسیت و نوتروفیل ها به صورت غیر معنی دار افزایش یافته بودند. گلبول‌های سفید خون نقش مهمی را در ایمنی غیراختصاصی ایفا می‌کنند و تعداد آن‌ها شاخصی از میزان سلامتی در ماهیان است. لنفوسیت‌ها مسئول پاسخ ایمنی در بدن هستند و نوتروفیل‌ها سلول‌های خونی مهمی جهت دفاع از بدن از طریق فعالیت بیگانه‌خواری شان هستند (Singh *et al.*, 2008). مطالعات مختلف نشان داده است که معمولا شرایط تنش‌زا منجر به افزایش تعداد گلبول‌های سفید می‌شود که احتمالا نشان دهنده تغییرات فیزیولوژیک آبزی در مواجه با عامل تنش‌زا است (Roberts, 1978). تغییر در شمارش افتراقی گلبول‌های سفید می‌تواند به‌عنوان شاخصی برای ارزیابی ایمنی بدن در مواجه با مواد آلاینده مورد استفاده قرار گیرد. تغییرات ناشی از تنش می‌تواند تعادل هومئوستازی بدن را به‌هم‌زده و منجر به نابسامانی‌هایی در سیستم ایمنی بدن شود. تغییر در میزان کورتیکواستروئیدها متاثر از بروز تنش می‌تواند توجیه کننده تغییر در شمارش افتراقی گلبول‌های سفید باشد. در بسیاری از موارد، تنش‌های فیزیولوژیک می‌تواند منجر به کاهش تعداد لنفوسیت‌ها و افزایش نسبت نوتروفیل‌ها شود (Pickering, 1981). از نتایج تحقیق حاضر می‌توان دریافت که گرچه مس به‌صورت مس اکسید و ترکیب مس سولفات به‌عنوان یک عنصر ضروری در جیره غذایی ماهیان برای انجام بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی است، ولی ترکیب مس نیترات در غلظت‌های بالا در آب اثرات سمی شدیدی بر بچه‌ماهی شیپ دارد و چنین تغییراتی شاید در دراز مدت بتواند با تاثیر بر بخش های مختلف فیزیولوژیک آبزی، منجر به بروز پاسخ‌های تنشی و در نهایت کاهش رشد و مرگ آبزی شود.

منابع

پژند، ذ.، اسماعیلی ساری، ع. و پیری، م. ۱۳۸۴. تعیین غلظت کشنده علف‌کش ماچتی (Butachlor) بر بچه‌ماهیان قره‌برون (*Acipenser persicus*) .*مجله علمی شیلات ایران*، ۱۴(۱): ۵۰ – ۴۱.

جلالی، ب. و آقازاده، م. ۱۳۸۵. مسمومیت ماهیان در اثر فلزات سنگین و اهمیت آن در بهداشت عمومی. انتشارات مان کتاب. ایران.

رزم‌آرا، پ.، پیکان حیرتی، ف. و درافشان، س. ۱۳۹۳. اثر نانوذرات‌نقره بر برخی پارامترهای خون‌شناسی گربه ماهی رنگین کمان (*Pangasius hypophthalmus*). *مجله سلول و بافت*، ۵(۳): ۲۶۳-۲۷۲.

عروجعلی، م.، پیکان حیرتی، ف.، محبوبی صوفیانی، ن. و درافشان، س. ۱۳۹۲. اثر غلظت های تحت کشنده کادمیوم بر برخی شاخص های خون شناسی بچه ماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*). *مجله علوم و فنون شیلات*، ۲(۲): ۲۲-۱۱.

کاظمی، ر.، پوردهقانی، م.، یوسفی جوردهی، ا. یارمحمدی، م. و نصری تجن، م. ۱۳۸۹. فیزیولوژی دستگاه گردش خون آبزیان و فنون کاربردی خون-شناسی ماهیان. انتشارات بازرگان. رشت، ایران.

نظری، ر. ۱۳۷۵. بررسی کاربرد هورمون‌های غده هیپوفیز ماهی اسبله در تکثیر کپور ماهیان. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران. ایران.

Roberts, R.J. 1978. The pathophysiology and systemic pathology of teleosts, 1th Ed. Bailliere Tindal. London.

Satheeshkumar, P., Ananthan, G., Senthilkumar, D. & Jeevanantham, K. 2010. Comparative investigation on hematological and biochemical studies on wild marine teleost fishes from Vellar estuary, southeast coast of India. *Journal of Comparative Clinical Pathology*, 10: 1091 – 1095.

Schjolden, J., Sorensen, J., Nilsson, G.E. & Poleo, A.B. 2007. The toxicity of copper to crucian carp (*Carassius carassius*) in soft water. *Science of the Total Environment*, 384: 239-251.

Serezli, R., Akhan, S. & Delihasan-Sonay, F. 2011. Acute effects of copper and lead on some blood parameters on Coruh trout (*Salmo coruhensis*). *African Journal of Biotechnology*, 10: 3204-3209.

Singh, D., Nath, K., Trivedi, S.P. & Sharma, Y.K. 2008. Impact of copper on haematological profile of freshwater fish, *Channa punctatus*. *Journal of Environmental Biology*, 29: 253-257.

Tavares-Dias, M. & Moraes, F.R. 2007. Hematological and biochemical reference intervals for farmed channel catfish. *Journal of Fish Biology*, 71: 383–388.

Taylor, J.C., Geer, L.N., Wood, C.M. & Donald, D.G. Mc. 2000. Physiological effects of chronic copper exposure to Rainbow trout (*Oncorhychus mykiss*) in hand and soft water, evaluation of chronic indicators. *Environmental Toxicology* and *Chemistry*, 19: 2298-2308.

Viella, S., Ingrossi, L., Lionetto, M., Schettino, T., Zonno, V. & Stroelli, C. 1999. Effect of cadmium and zinc on the Na/H exchanger on the brush 34 B.K. Hassan border membrane vesicles

Bagdonas, E. & Vosyliene, M.Z. 2006. Study of toxicity and genotoxicity of copper, zinc and their mixture to Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *BIOLOGIJA*, 1: 8–13

Bani, A. & Haghi Vayghan, A. 2011. Temporal variations in haematological and biochemical indices of the Caspian kutum, *Rutilus frisii kutum*. *Ichthyology Research*, 58(2):126-133.

Georgieva, E., Amaudov, A. & Vlcheva, I. 2010. Clinical, hematological and morphological studies on ex siyu induced copper intoxication in Crucian Carp (*Carassius gibello*). *Journal of Central European Agriculture*, 11:165-172.

Karthikeyeni, S., Vijayakumar, T.S., Vasanth, S. & Ganesh, A. 2013. Biosynthesis of iron oxide nanoparticles and its haematological effects on fresh water fish *Oreochromis mossambicus*, J. Acad. Indus. Res. 1(10): 645-649.

Lodhi, H.S., Khan, M.A., Verma, R.S. & Sharma, U.D. 2006. Acute toxicity of copper sulphate to fresh water prawns. *Journal* of *Environmental Biology,* 27: 585-588.

Naghsh, N., Noori, A., Aqababa, H. & Amirkhani, S. 2012. Effect of nanosilver particles on alanin amino transferase (ALT) activity and white blood cells (WBC) level in male Wistar rats, In vivo condition. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 14(7): 34-37.

Niimi, A.J. 1987. Biological half-lives of chemicals in fishes. *Reviews of* Environmental Contamination *and* Toxicology, 99: 1–46.

Pickering, A. D. (ed.).1981. *Stress and fish*. Academic Press, New York.

effects of heavy metals. *Electronic Journal of Ichthyology*, 1:35 - 41.

Xiaoyun, Z., Mingyun, L., Khalid, A. & Weinmin, W. 2009. Comparative of hematology and serum biochemistry of cultured and wild Dojo loach, *Misgrurnus anguillicadatus*. *Fish Physiology Biochemistry*, 35: 435 – 441.

isolated from eel kidney tankular cells. *Aquatic Toxicology*, 48: 25-36.

Weiguang, L. & Chen, N. 1995. Acute toxicity of Hg, Cu, Cd, Zn to larvae of red sea bream, *Chrysophrys major*. *Journal of marine science*, 20: 1000-1015.

Witeska, M. 2005. Stress in fish– hematological and immunological

The effect of copper on some hematological indices in Ship sturgeon (*Acipenser nudiventris*)

Mohamadrezayei[1*], A., Abdali[2], A., Yousefi Jourdehi[3], A. & Salari[4], Z.
1 & 2- Dept. of Marine Science, Faculty of Marine Science and Technology, Islamic Azad University, Tehran North Branch
3- International Sturgeon Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organizaton (AREEO), Rasht, Iran
4- Dept. of Natural Sciences, Islamic Azad University, Baft Branch

Abstract

To study the effect of copper toxicity on some hematological indices of *Acipenser nudiventris*, a group of 120 fish were exposed to different concentrations of copper nitrate ($Cu(NO_3)_2$) (0, 1, 5, 10 mg/lit). The results showed that the level of hemoglobin (Hb) was increased with the increase in the concentration of copper and also time ($P < 0.05$). For the concentrations of 5 and 10 mg/lit, the numbers of red blood cells (RBC) were considerably reduced after 24 hours ($P < 0.05$). After 24 hours, the percent of hematocrit (Hct) was increased and the number of white cells (WBC) was decreased, and the volume of red blood cells (MCV) was considerably increased for all concentrations ($P < 0.05$). The average of hemoglobin concentration (MCHC) did not change and was the same in all concentrations after 24 and 48 hours ($P \geq 0.05$) but was increased considerably after 72 and 96 hours ($P < 0.05$). The average of hemoglobin concentration (MCH) was increased considerably in 10 mg/lit concentration after 24, but was increased considerably in 1 mg/lit after 72 and 96 hours ($P < 0.05$). The results of differentiation counting of leucocytes showed that with increase in copper concentration and time, the number of lymphocytes in the 5 and 10 mg/lit concentrations were decreased considerably after 24 hours, but were increased in 1 mg/lit concentration after 48 hours ($P < 0.05$). The number of monocytes was considerably decreased after 24 and 48 hours in all concentrations, but was considerably increased in 1 mg/lit after 72 hours ($P < 0.05$). The number of eutrophil was considerably increased in 5 and 10 mg/lit after 24 hours, but was considerably decreased in 1 mg/lit after 48 and 72 hours ($P < 0.05$). The study showed that although the copper is an essential element for most of physiologic processes but it showed severe toxic effects on the *Acipenser nudiventris*.

Keywords: Copper nitrate, Blood indices, *Acipenser nudiventris*
***Corresponding author: Aeen974@hotmail.com**