اثر سمیت حاد و مزمن نانو ذرات مس بر بازماندگی و آسیب‌های بافتی هپاتوپانکراس و آبشش در میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*)

ندا خسروی‌زاده[۱]، ایمان سوری‌نژاد[۱*]، سیدعلی جوهری[۲]، زهرا قاسمی‌لله‌وجه‌سری[۳]

چکیده

شناخت اثرات سمی نانومواد بر آبزیان در قالب علم نانو سم‌شناسی آبزیان دارای اهمیت است. این مطالعه به منظور بررسی اثر سمیت حاد و مزمن نانو ذرات مس بر بازماندگی و آسیب‌های بافتی هپاتوپانکراس و آبشش در پست لارو مرحله ۱۶ میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) انجام شد. آزمایش سم‌شناسی حاد طبق استاندارد شماره ۲۰۳ OECD، طی ۹۶ ساعت انجام و تلفات میگو پس از رویارویی با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۳۲، ۱، ۳/۲، ۱۰، ۳۲، ۱۰۰ میلی گرم در لیتر نانوذرات مس با اندازه ۴۰ نانومتر، هر ۲۴ ساعت یکبار ثبت شد و داده ها با نرم افزار پروبیت آنالیز شدند. به دلیل عدم وجود نظم خاص در داده‌های سمیت حاد و در واقع سمیت غیر وابسته به غلظت این ماده در این گونه، امکان محاسبه غلظت کشنده میانی (LC_{50}) میسر نگردید. در آزمون سمیت مزمن میگوها به مدت ۲۱ روز در معرض غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر قرار داده شدند. بافت‌شناسی آبشش عوارض زیادی از جمله نکروز شدید، کوتاه شدن طول تیغه‌های آبششی ثانویه، افزایش شدید سلول‌های هموسیت و کاهش سلول‌های پیلار را نسبت به گروه شاهد نشان داد. در بافت هپاتوپانکراس عوارضی مثل آکرومگالی (بزرگ شدن) هسته سلول‌ها، نکروز برخی از سلول‌ها، همچنین کاهش تعداد سلول‌های عملکردی و تخریب دیواره توبول‌ها نسبت به گروه شاهد مشاهده گردید. در جمع بندی، قرار گرفتن در معرض نانوذرات مس موجب آسیب بافت‌های هپاتوپانکراس و آبشش در میگوی سفید غربی شده و در نهایت عوارض ایجاد شده می تواند باعث مرگ و میر در میگو شود.

واژگان کلیدی: نانو سم شناسی، نانوذرات‌مس، آسیب بافتی، میگوی سفید غربی

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۴/۲/۲۳

مقدمه

فناوری نانو، شناخت و کنترل مواد در ابعاد بین ۱۰۰-۱ نانومتر است. در این ابعاد خواص فیزیکی، شیمیایی و زیستی ماده غیر معمول بوده و کاربردهای جدید و منحصر به فردی از مواد نانومتری ممکن می شود. نانومواد سنتزی بطور گسترده‌ای در علوم پزشکی، زیست فناوری، انرژی، شیلات و محیط زیست و کشاورزی استفاده می‌شوند، به طوری که گسترشِ تولید و کاربرد نانومواد سنتزی موجب می‌شود که زیستمندان آبی، بیشتر در معرض نانومواد رهاسازی شده به بوم سازگان‌های آبی قرار گیرند (۱۶). بوم سم‌شناسی (Ecotoxicology) تأثیر آلاینده‌های طبیعی یا مصنوعی، به تنهایی یا در ترکیب با عوامل تنش زا، بر اجزای تشکیل دهنده اکوسیستم می باشد. نانو بوم سم‌شناسی (Nano ecotoxicology) اخیرا به عنوان یک رشته فرعی از بوم سم‌شناسی پدید آمده و بطور ویژه هدف آن شناسایی و پیش بینی اثر نانومواد در بوم سازگان می باشد (۱۷). از جمله مواد سنتزی با فناوری نانو می‌توان به نانوذرات مس (Cu Nanoparticles) اشاره نمود که امروزه در تهیه برخی محصولات در صنایع مختلف مورد استفاده قرار می گیرند. رهایش نانوذرات به محیط زیست و راه یابی آنها به محیط‌های آبی، جزو مشکلات جدید زیست محیطی به شمار می رود که باید مورد مطالعه قرار گیرد (۱۲).

مس فلزی است که به مقدار کم برای سخت‌پوستان ضروری بوده و در ساخت سلول‌های خونی، فعالیت برخی آنزیم‌ها مانند سیتوکروم اکسیداز، تیروزیناز و سوپر اکسید دسموتاز نقش دارد. همچنین سخت‌پوستانی مانند میگو دارای هموسیانین

* ۱. گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی و جوی، دانشگاه هرمزگان، هرمزگان، ایران
sourinejad@hormozgan.ac.ir
۲. گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه کردستان، کردستان، ایران
۳. گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

Archive of SID
www.SID.ir

حاوی مس هستند که رنگدانه اصلی برای حمل اکسیژن است. با این حال وجود مس به مقدار زیاد در محیط‌های زیست آبزیان به دلیل اثرات مهم فیزیولوژیکی و زیستی در سطح مولکولی و سلولی برای موجودات آبزی مثل میگوها سمی می باشد. قرار گرفتن در معرض غلظت‌های بالای مس تظیمات فیزیولوژیکی و متابولیکی را در میگو تغییر می دهد و می تواند سنتز پروتئین متالوتیونئین را تحریک کند. همچنین کاهش رشد در مواجهه با غلظت‌های مختلف مس مشاهده شده است که این کاهش عملکرد رشد، احتمالاً به دلیل افزایش سوخت و ساز بدن جهت سم زدایی و حفظ تعادل اتفاق می افتد. به علاوه قرارگرفتن در معرض مس دفعات پوست اندازی را در میگو افزایش می‌دهد (٦ و ١). آبشش و هپاتوپانکراس اندام‌های اصلی هستند که تحت تاثیر غلظت بالای مس قرار می گیرند به این دلیل که آبشش به عنوان مسیر اصلی برای جذب این فلز و هپاتوپانکراس به عنوان ارگان اصلی ذخیره‌سازی مس عمل می‌کنند (٩).

میگوی پا سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) از خانواده پنائیده و بومی سواحل غربی آمریکای لاتین از پرو در جنوب تا مکزیک در شمال می باشد که با توجه به خصوصیاتی نظیر تحمل طیف گسترده ای از شرایط پرورشی، تحمل تراکم های بالا، نیاز کمتر به پروتئین حیوانی نسبت به سایر گونه ها و مقاومت نسبت به بیماری ها و رشد سریع به عنوان مهمترین گونه پرورشی در بسیاری از نقاط جهان از جمله ایران محسوب می شود. به دلیل ورود نانوذرات مسِ مورد استفاده در صنایع مختلف به زیستگاه‌های طبیعی و مراکز تکثیر و پرورش آبزیان و با توجه به اثرات نامطلوبی که غلظت‌های بالای نانومواد مس می توانند بر موجودات زنده بوم سازگان های آبی داشته باشند، در مطالعه حاضر سعی بر آن است که برخی از جنبه‌های سمیت این ماده بر اندام های آبشش و هپاتوپانکراس گونه میگوی پا سفید غربی که مهمترین گونه پرورشی در ایران می‌باشد بررسی گردد.

مواد و روش کار

تحقیق حاضر در ایستگاه تحقیقات شیلاتی نرم‌تنان خلیج فارس ـ بندرلنگه انجام شد. ابتدا ظرف‌های شیشه‌ای و مخازن مورد نیاز تهیه شده و با استفاده از مواد شوینده شسته شدند و در هوای آزاد قرار گرفتند. شلنگ‌ها، سنگ‌های هوا و ساچوک‌ها نیز با آب نمک غلیظ ضدعفونی گردیدند. سپس مخازن با آب دریا آبگیری و در آن شلنگ و سنگ‌های هوا که به پمپ هواده مرکزی متصل بودند قرار داده شدند تا آب مخازن هوادهی شود. دمای محیط آزمایشگاه در ٢٧ درجه سانتی‌گراد نگه داشته شد.

تعداد ١٠٠٠ قطعه پست لارو مرحله ١٦ میگوی وانامی از کارگاه تکثیر میگو واقع در شهرستان جاسک تهیه شد. میگوها به مدت سه روز در مخزن ٣٠٠ لیتری در دمای ٢٧ درجه سانتی‌گراد و شوری ٣٩ قسمت در هزار و pH= ٧/٧٥ به منظور طی دوره سازگاری نگهداری شدند. در این مدت هر شش ساعت با غذای پلت غذادهی انجام شد و غذاهای نخورده روزانه از کف مخزن جمع‌آوری شد. پودر نانوذرات مس از شرکت نانو ثانی مشهد تهیه شد. بر اساس اطلاعات شرکت مذکور، این پودر حاوی نانوذرات مس با خلوص ٩٩/٩٪ و اندازه ٤٠ نانومتر می باشد. برای تبدیل پودر نانوذرات به سوسپانسیون نانوذرات از دستگاه حمام سونیکاتور (Retch Gmbh, VRI, Germany) استفاده شد. سونیکاسیون در دمای اتاق، در سه مرحله و هر مرحله به مدت ٣٠ دقیقه انجام شد. بعد از این سه مرحله، سنجش غلظت کل مس انجام شد که برای این کار ١٠ سی سی سوسپانسیون حاصل از سونیکاسیون با ١٠ سی سی اسید نیتریک غلیظ مخلوط شد تا نانوذرات مس تبدیل به یون مس شوند (رنگ سوسپانسیون که قهوه ای تیره بود تبدیل به محلول سبز رنگ گردید). سپس این مخلوط با آب دیونیزه ١٠ برابر رقیق شد و نهایتاً غلظت مس در آن با دستگاه جذب اتمی مجهز به کوره گرافیتی (Philips PU 9400, UK) اندازه‌گیری گردید. پس از سونیکیت کردن پودر نانوذرات

www.SID.ir

مس و عبور از فیلتر ۰/۲ میکرون، غلظت واقعی سوسپانسیون نانوذرات مس ٤١٤٨/٢٨ میلی گرم در لیتر تعیین شد.

برای دستیابی به غلظت ماده مورد نظر از سوسپانسیون نانوذرات برای انجام آزمون‌های حاد و مزمن، پیش آزمون انجام شد. پیش آزمون به مدت ۹٦ ساعت انجام و تلفات در این مدت هر ٢٤ ساعت یکبار ثبت گردید. ٢٤ ساعت قبل از شروع پیش آزمون غذادهی قطع شد تا روده‌ی میگو تخلیه شود. سپس ظرف‌های شیشه‌ای ۵ لیتری به میزان یک لیتر آبگیری شده و پس از قرار دادن سنگ هوا درون آن‌ها، تعداد ۱۰ عدد پست لارو در هر ظرف قرار داده شد. غلظت‌های انتخاب شده برای پیش آزمون شامل ۰، ۰/۱، ۰/۳۲، ۱، ۳/۲، ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم نانومس در لیتر و در ۳ تکرار بود. در این مدت جهت جلوگیری از همنوع خواری میگوها، روزانه مقدار کمی غذا به هر ظرف اضافه شد و یک ساعت بعد باقیمانده‌های غذایی سیفون شد (۵ و ۱۰).

برای انجام آزمون سمیت حاد ۹٦ ساعته، بر اساس آزمون و خطاهایی که در مرحله پیش آزمون انجام شد و مقدار تلفات به دست آمده از هر غلظت، غلظت‌های آزمون حاد اصلی بر اساس بالاترین غلظت غیر کشندگی و بالاترین غلظت کشندگی تعیین شد. بر اساس داده‌های بدست آمده در پیش آزمون، غلظت‌های انتخابی شامل ۱۰، ١٤، ٢٧، ٣٧، ۵۲، ۷۲ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر و در ۳ تکرار بود. ٢٤ ساعت قبل از شروع آزمون غذادهی قطع شد تا روده‌ی میگو تخلیه شود. سپس ظرف‌های شیشه‌ای ۵ لیتری به میزان یک لیتر آبگیری شده و پس از قرار دادن سنگ هوا درون آن‌ها، تعداد ۱۰ عدد پست لارو در هر ظرف قرار داده شد. شرایط و پارامترهای آب شامل دما، شوری و pH در مدت زمان انجام آزمایش در طی آزمون سمیت حاد ۹٦ ساعته، هر ٢٤ ساعت یکبار اندازه گیری و ثبت شد. هر ٢٤ ساعت یکبار میگوهای مرده در هر ظرف، خارج شده و تعداد آنها ثبت گردید. در نهایت از نتایج تلفات برای بدست آوردن LC_{50} استفاده شد. آزمایش به روش ساکن و بدون تعویض آب انجام شد (۹).

برای انجام آزمون سمیت مزمن، با توجه به نتایج حاصل از پیش آزمون و آزمون سمیت حاد، غلظت‌های آزمون سمیت مزمن تعیین گردید که عبارت بودند از ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر. آزمون بلافاصله پس از اتمام مرحله حاد و در شرایط محیطی مشابه و به مدت ۲۱ روز انجام شد. آزمون سمیت مزمن با ۳ تیمار و ۳ تکرار انجام شد. گروه شاهد با غلظت ۰ میلی‌گرم بر لیتر با ۳ تکرار برای آگاهی از سالم بودن میگوها طی دوره آزمایش در نظر گرفته شد. طی دوره آزمون مزمن روزانه ۱۰۰٪ آب تعویض و با آب هوادهی شده جایگزین شد و بلافاصله غلظت ماده مورد نظر به ظرف‌های شیشه‌ای اضافه شد. غذادهی به صورت روزانه و در حد سیری انجام شد و یک ساعت بعد از غذادهی تعویض آب صورت می گرفت.

جهت انجام مطالعات آسیب‌شناسی بافتی، طی دوره ۲۱ روزه آزمون سمیت مزمن، دو مرحله نمونه برداری یکبار در وسط دوره (روز یازدهم) و یکبار در انتهای دوره (روز بیست و دوم) صورت گرفت و از هر ظرف، سه نمونه میگو برای بررسی تغییرات ساختاری بافت آبشش و هپاتوپانکراس با روش بافت شناسی کلاسیک برداشته شد (۹ و ۱۸).

نتایج

در آزمون سمیت حاد ۹٦ ساعته، بررسی علائم رفتاری میگوها نشان داد که اگر چه تیمارهای قرار گرفته در معرض نانوذرات مس در ٢٤ ساعت اولیه، علائم رفتاری طبیعی (شنای طبیعی و تغذیه طبیعی) داشتند، اما بعد از ۷۲ ساعت، علائمی شامل افزایش دفعات پوست اندازی، کاهش اشتها، بی حالی، شنا در سطح آب و عدم تعادل در شنا در میگوها مشاهده می شود. گروه شاهد در طول ۹٦ ساعت رفتار طبیعی داشتند. در خصوص آسیب شناسی ریختی نیز در غلظت های ۵۲، ۷۲ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر نانوذرات مس، علائمی شامل تیره شدن تلسون در اثر رسوب نانوذرات و تیره شدن آبشش و هپاتوپانکراس در اثر تجمع نانوذرات مس مشاهده شد.

Archive of SID

www.SID.ir

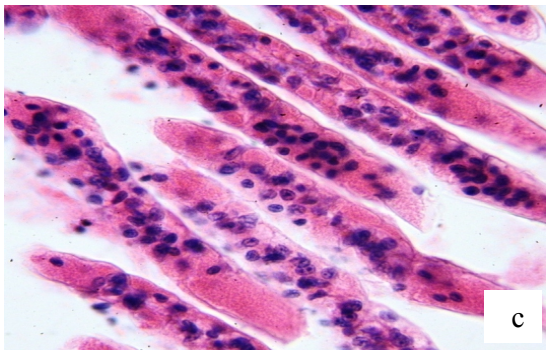
در آزمون سمیت حاد ۹۶ ساعته برای تعیین غلظت کشنده میانی (LC_{50})، پس از چندین مرحله تکرار آزمایشات به دلیل این که رابطه غلظت و تعداد تلفات تا حدی نامنظم بود، آنالیز داده‌ها با استفاده از آزمون پروبیت میسر نگردید و بنابراین محاسبه غلظت کشنده میانی امکانپذیر نبود. نتایج بررسی تلفات میگوها به شرح جدول ذیل می باشد (جدول ۱).

جدول ۱- میانگین تعداد تلفات پست لارو میگوی وانامی در چندین مرحله انجام آزمون سمیت حاد ۹۶ ساعته

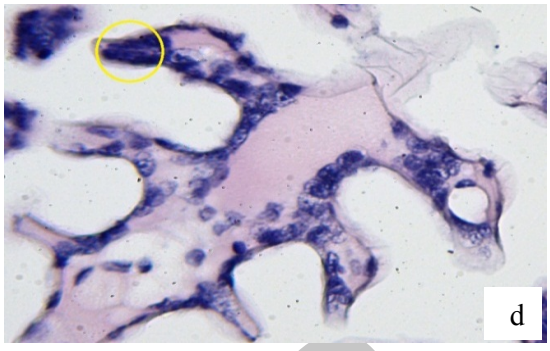
غلظت (میلی‌گرم در لیتر)	مجموع تلفات			
	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
۱۰	۰	۲	۴	۱۰
۱۴	۱	۶	۱۳	۲۱
۱۹	۱	۴	۸	۱۷
۲۷	۲	۴	۱۱	۱۶
۳۷	۲	۷	۷	۱۲
۵۲	۲	۷	۱۶	۲۲
۷۲	۴	۱۰	۱۸	۲۳
۱۰۰	۵	۱۰	۲۲	۲۹

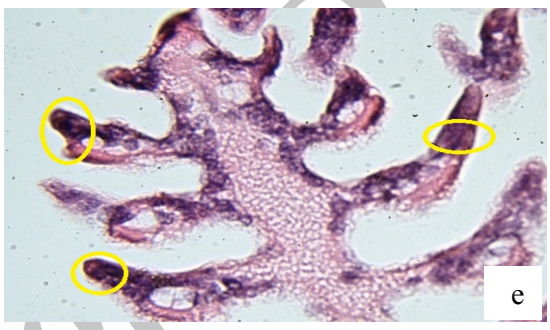
در آسیب‌شناسی بافت آبشش، عوارضی از جمله نکروز شدید، کوتاه شدن طول تیغه‌های آبششی ثانویه، افزایش شدید سلول‌های خونی و کاهش سلول‌های پیلار نسبت به گروه شاهد دیده شد (شکل ۱ و ۲). در تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات مس، افزایش سلول‌های خونی و کاهش سلول‌های پیلار، در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات مس، نکروز و کوتاه شدن طول تیغه‌های آبششی ثانویه و در تیمار یک میلی‌گرم در لیتر نانوذرات مس، نکروز شدید و کوتاه شدن طول تیغه‌های آبششی ثانویه مشاهده گردید.

نگاره ۱ a,b- آبشش گروه شاهد (a): تیغه آبششی اولیه (پیکان بزرگ) و تیغه‌های آبششی ثانویه (پیکان‌های کوچک)، درشت‌نمایی ۱۰۰۰× ؛ (b): تیغه‌های آبششی ثانویه گروه شاهد، سلول‌های پیلار، سلول‌های خونی و فاصله بین دیواره کوتیکولی. درشت‌نمایی(۱۰۰۰×، رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین)



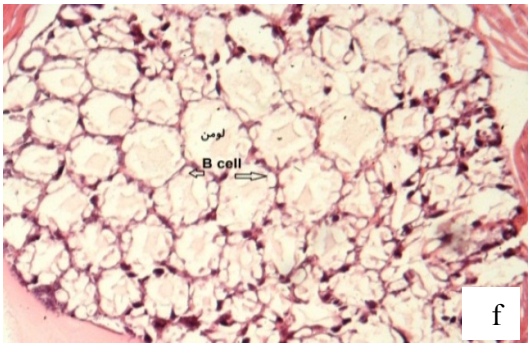
Archive of SID
www.SID.ir

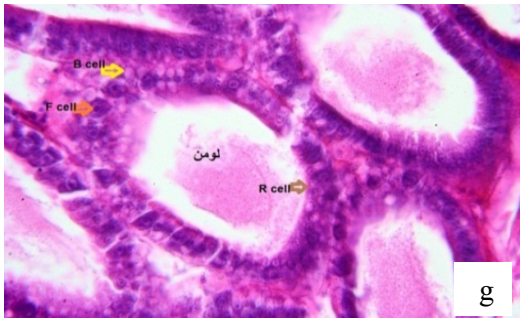




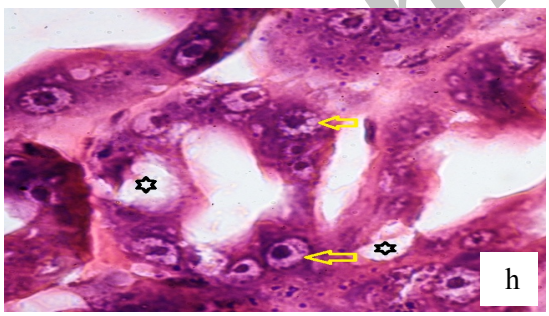
نگاره ۲ c,d,e– (c): آسیب‌شناسی آبشش در تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات مس، افزایش سلول‌های خونی و کاهش سلول‌های پیلار. درشت‌نمایی ۱۰۰۰×؛ (d): تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات مس، نکروز (دایره) و کوتاه شدن طول تیغه‌های آبششی ثانویه. درشت‌نمایی ۱۰۰۰×؛ (e): تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات مس، نکروز شدید (دایره) و کوتاه شدن طول تیغه‌های آبششی ثانویه. درشت‌نمایی ۱۰۰۰×، رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین–ائوزین

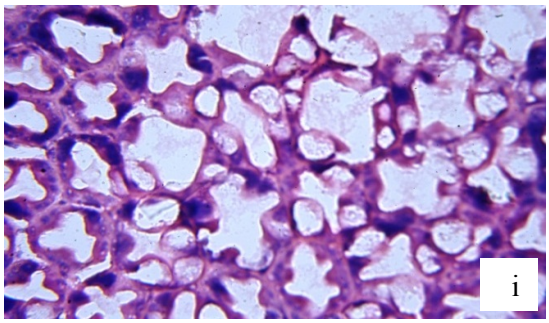
در آسیب‌شناسی بافت هپاتوپانکراس، عوارضی چون آکرومگالی (بزرگ شدن) هسته سلول‌ها، نکروز برخی از سلول‌ها، همچنین کاهش تعداد سلول‌های عملکردی و تخریب دیواره توبول‌ها نسبت به گروه شاهد مشاهده گردید (نگاره ۳ و ٤). در تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات مس، آکرومگالی (بزرگ شدن) هسته سلول‌ها، نکروز برخی از سلول‌ها و کاهش تعداد سلول‌های عملکردی، در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات مس، تخریب ساختمان توبول‌ها و از بین رفتن سلول‌های عملکردی و در تیمار یک میلی‌گرم در لیتر نانوذرات مس، تخریب دیواره لوله‌ها و کاهش شدید سلول‌های عملکردی دیده شد.



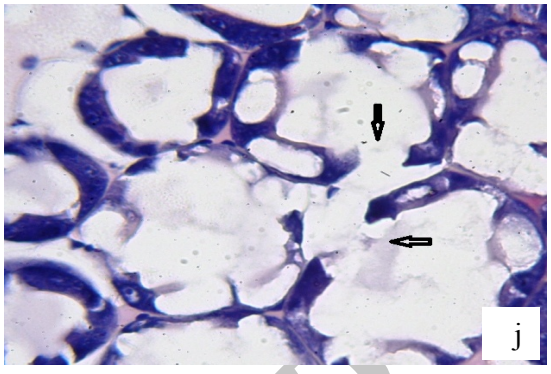


نگاره ۳ f,g– (f): هپاتوپانکراس گروه شاهد، توبول‌های منظم هپاتوپانکراس و سلول‌های B. درشت‌نمایی ٤۰۰×؛ (g): هپاتوپانکراس گروه شاهد، توبول‌ها (لومن)، سلول‌های عملکردی هپاتوپانکراس (B، F، R) و نحوه چینش آن‌ها. درشت‌نمایی ۱۰۰۰×، رنگ آمیزی هماتوکسیلین–ائوزین





www.SID.ir



نگاره ٤ h,i,j–(h): آسیب‌شناسی هپاتوپانکراس در تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات مس، آکرومگالی (بزرگ شدن) هسته سلول‌ها (پیکان)، نکروز برخی دیگر از سلول‌ها (ستاره) و کاهش تعداد سلول‌های عملکردی. درشت‌نمایی ۱۰۰۰×؛ (i): تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات مس، تخریب ساختمان توبول‌ها و از بین رفتن سلول‌های عملکردی. درشت‌نمایی ۱۰۰۰×؛ (j): تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات مس، تخریب دیواره توبول‌ها (پیکان-ها) و کاهش شدید سلول‌های عملکردی. درشت‌نمایی ۱۰۰۰×، رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین

بحث

مطالعات پیشین نشان می‌دهند که نانوذرات مس سمیت بالاتری نسبت به یون‌های مس یا ترکیبات مس دارند و نانوذرات مس به عنوان مخزنی از یون‌های مس عمل کرده و به طور مداوم یون مس آزاد می‌کنند(۱۲ و ۲، ۳). عواملی دیگری مانند pH آب، سختی، مواد آلی و شوری نیز نقش مهمی در میزان سمیت مس دارند. میزان سمیت مس در آب شیرین بیشتر از آب شور می باشد. در پژوهشی که توسط Bambang و همکاران در سال ۱۹۹۵ در میگوی ژاپنی *Penaeus japonicus* در آب شور انجام شد، LC_{50} مس یونی طی ۹٦ ساعت ۱/٤٥ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد اما در تحقیق Murti و Shuk در سال ۱۹۸٤ در میگوی آب شیرین *Macrobrachium amarrei*، LC_{50} مس یونی طی ۹٦ ساعت ۰/۲٤۷ میلی‌گرم در لیتر تعیین شد. یکی از دلایل سمیت بیشتر مس در آب شیرین این است که آب شیرین فاقد کاتیون بوده و در نتیجه Cu^{2+} در فعالیت‌های زیستی با هیچ کاتیونی رقابت نکرده و باعث سمیت می شود. pH و سختی آب در آب شیرین نقش مهمتری در میزان سمیت مس نسبت به آب شور دارند. افزایش pH سمیت مس را تشدید می کند، زیرا این افزایش، رقابت بین مس و یون‌های هیدروژن را در سطح سلول کاهش می دهد (۲۰). همچنین کاتیون‌هایی که در سختی آب نقش دارند (Ca^{2+} و Mg^{2+}) در اتصال‌های زیستی با Cu^{2+} رقابت می کنند (٤). بنابراین میزان دسترسی زیستی به Cu^{2+} (جذب مس توسط موجود)، در آب سخت نسبت به آب نرم کمتر است.

یکی از راه‌های ورود نانوذرات مس به بدن میگو نوشیدن آب دریا می‌باشد. میگو جهت تنظیم اسمزی (هایپو-اسمزی) آب دفع کرده و برای جبران آب دفع شده، آب دریا می نوشد. راه دیگر ورود نانوذرات تغذیه می‌باشد. در صورت رسوب نانوذرات روی غذای میگو، در هنگام خوردن غذا نانوذرات وارد بدن میگو می‌شود. پوست‌اندازی نیز یکی دیگر از راه‌های ورود نانوذرات می‌باشد. در هنگام پوست-اندازی، پوسته قدیمی جدا شده و پوسته جدید سخت می شود. در حین سخت شدن پوسته جدید، میگو آب جذب می کند که در صورت وجود نانوذرات در آب، ذرات نیز همراه با آب جذب میگو می شود. مسیر اصلی ورود ذرات به بافت داخلی میگو اپیتلیوم آبشش می باشد که به عنوان یک واسطه بین محیط داخلی و محیط خارجی بدن عمل می کند. جذب مواد از محیط و ورود آن‌ها از طریق رشته‌های آبششی اتفاق می افتد. در میگو، آبشش به عنوان مکان اصلی برای انتقال گازهای تنفسی، دفع ضایعات نیتروژنی، تنظیم اسید-باز و جذب یون عمل می کند. ذرات از طریق انتشار غیر فعال توسط منافذ و یا از طریق مکانیسم‌های انتقال فعال جذب می شوند. حضور یک پوشش محافظ خارجی نفوذ ناپذیر احتمال جذب فلز از طریق بخش‌های دیگر بدن را (به جز در مواقع پوست اندازی) کاهش می دهد (۸ و ۵). بنابراین در سخت‌پوستان، آبشش و هپاتوپانکراس اندام‌های

Archive of SID
www.SID.ir

اصلی هستند که تحت تاثیر غلظت بالای آلاینده‌ها و از جمله ترکیبات مس قرار می گیرند (۹).

LC_{50} نشان‌دهنده غلظتی از مواد سمی می‌باشد که باعث ۵۰ درصد مرگ و میر در جمعیت مورد مطالعه می شود. رایج‌ترین زمان برای تعیین LC_{50} در آزمون‌های سمیت حاد معمولاً ۹۶ ساعت می‌باشد. اختلاف در LC_{50} معمولاً به عوامل زیستی و فیزیکو -شیمیایی بستگی دارد. نتایج سمیت حاد ممکن است در گونه‌های مختلف متفاوت باشد. سمیت به اندازه، سن، جنس، شوری، pH، سختی، یون‌های تک ظرفیتی و دو ظرفیتی و عوامل دیگر وابسته است (۱٤ و ۱۳). در پژوهشی که توسط قربانی و همکاران در سال ۱۳۸۵ انجام شد، میزان LC_{50} مس یونی در میگوی سفید غربی در زمان‌های ۲٤، ٤۸، ۷۲ و ۹٦ ساعت به ترتیب ۸٦/۷۱، ۲۷/۲۸، ۷/۹۸ و ۳/۹۰ میلی گرم در لیتر تعیین گردید. همچنین در پژوهش دیگری که توسط Frias-Espericueta و همکاران در سال ۲۰۰۳ انجام شد، LC_{50} مس یونی طی ۹٦ ساعت برای میگوی سفید غربی ٤/۲ میلی گرم در لیتر تعیین شد. در پژوهش حاضر علیرغم تکرار چندین باره آزمایشات و بررسی سمیت غلظت‌های مختلفی از نانوذرات مس در میگوی سفید غربی، به دلیل عدم وجود نظم خاص در داده-های سمیت حاد و در واقع سمیت غیر وابسته به غلظت این ماده در این گونه آبزی، امکان محاسبه غلظت کشنده میانی (LC_{50}) میسر نگردید. این نتایج از این جهت جالب توجه است که نشان دهنده رفتار متفاوت نانوذرات مس نسبت به حالت یونی این ماده می باشد. در واقع عدم توزیع یکنواخت نانوذرات در محیط آبی می تواند دلیل بی نظمی نتایج سم‌شناسی در غلظت‌های مختلف باشد (۲۱ و ۱۹، ۱۱، ۷). در مطالعه Fabrega و همکاران در سال ۲۰۰۹ با هدف بررسی فعل و انفعالات نانوذرات نقره با باکتری *Pseudomonas putida*، سمیت غیر وابسته به غلظت مشاهده شد. همچنین سمیت غیر وابسته به غلظت نانو لوله های کربنی در پژوهش Warheit و همکاران در سال ۲۰۰٤ و Jia و همکاران در سال ۲۰۰۵ مشاهده شد.

در تحقیق حاضر، آسیب‌شناسی بافت آبشش عوارضی از جمله نکروز شدید، کوتاه شدن طول تیغه‌های آبششی ثانویه، افزایش شدید سلول‌های خونی و کاهش سلول‌های پیلار را نشان داد و در هپاتوپانکراس عوارضی چون آکرومگالی (بزرگ شدن) هسته سلول‌ها، نکروز برخی از سلول‌ها، کاهش تعداد سلول‌های عملکردی و تخریب دیواره توبول‌ها نسبت به گروه شاهد مشاهده گردید. در پژوهشی که توسط Bautista-covarrubias و همکاران در سال ۲۰۱٤ انجام شد، بررسی نتایج نشان داد که در مدت زمان ٤۸ ساعت مقدار هموسیانین و تعداد هموسیت همولنف با افزایش غلظت مس کاهش یافته و فعالیت آنزیم فنولوکسیداز افزایش می یابد. بعد از ٤۸ ساعت مقدار هموسیانین و تعداد هموسیت روند افزایشی و آنزیم فنولوکسیداز روند کاهشی را نشان داد. در مطالعه حاضر افزایش تعداد سلول‌های هموسیت مشاهده شد که با نتایج این پژوهش همخوانی دارد.

در پژوهشی که توسط Li و همکاران در سال ۲۰۰۷ در میگوی آب شیرین نوجوان *Macrobrachium rosenbergi* انجام شد، بررسی نتایج نشان داد که قرار گرفتن در معرض مس در محدوده ۰/۰۱ تا ۰/٤ میلی‌گرم در لیتر منجر به تغییرات ساختاری شامل تجمع هموسیت در فضای hemocoelic، تورم و پیوستگی لاملا و نکروز آبشش می شود. همچنین افزایش تعداد سلول‌های هموسیت، نفوذ سلول‌های خونی در سینوس بینابینی و نکروز در هپاتوپانکراس مشاهده شد. در مطالعه‌ی حاضر نکروز آبشش و هپاتوپانکراس و همچنین افزایش تعداد سلول‌های هموسیت مشاهده شد که با نتایج این پژوهش همخوانی دارد. در پژوهش دیگری که توسط Soegianto و همکاران در سال ۱۹۹۹ با هدف بررسی تاثیر یون مس بر ساختار آبشش در میگوی ژاپنی انجام شد، نتایج نشان داد که قرار

Archive of SID

www.SID.ir

گرفتن میگو در معرض ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم در لیتر مس به مدت ۱۵ روز تغییرات ساختاری قابل ملاحظه‌ای را در آبشش ایجاد نمی‌کند اما در غلظت ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در لیتر بعد از گذشت ٤ روز تغییرات ساختاری مانند از بین رفتن سلول‌های اپیتلیال در آبشش مشاهده شد. در مطالعه‌ی حاضر نکروز سلول‌های آبشش مشاهده شد که با نتایج این پژوهش همخوانی دارد.

تحقیقی توسط Abad-Rosales و همکاران در سال ۲۰۱۰ با هدف بررسی اثرات بافت‌شناسی مس بر میگوی سفید غربی نوجوان در شوری‌های کم انجام شد. بررسی نتایج نشان داد پس از گذشت ۱۰ روز مس باعث تخریب سلول‌های اپیتلیال، نفوذ هموسیت و کاهش سلول‌های R و B در میگوی قرار گرفته در شوری ۵ و ۱۰ psu می شود. در مطالعه‌ی حاضر نیز کاهش تعداد سلول‌های عملکردی و تخریب سلول‌های اپیتلیال مشاهده شد. پژوهشی توسط Yang و همکاران در سال ۲۰۰۷ با هدف بررسی اثرات یون مس موجود در آب بر ساختار میکروسکوپی آبشش و هپاتوپانکراس و سنتز متالوتیونئین در خرچنگ گرد *(Eriocheir sinensis)* انجام شد. در این آزمایش غلظت‌های ۰/۰۱، ۱ و ۵ میلی‌گرم در لیتر یون مس مورد استفاده قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که تجمع مس باعث آسیب بافتی به آبشش و هپاتوپانکراس و کاهش سنتز متالوتیونئین در هپاتوپانکراس می‌شود. قرار گرفتن در معرض مس در محدوده‌ی ۵-۰/۱ میلی‌گرم در لیتر به مدت ۱۰ روز منجر به ضخیم شدن لاملا، افزایش هموسیت و آسیب به اپیتلیوم آبشش شد. در هپاتوپانکراس غشای پایه چروکیده و حتی پاره شد و تخریب دیواره توبول‌ها و بزرگ شدن هسته سلول اتفاق افتاد. در مطالعه‌ی حاضر افزایش هموسیت، آسیب به اپیتلیوم آبشش، تخریب دیواره توبول‌ها و بزرگ شدن هسته سلول مشاهده شد که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد. در جمع بندی، وجود نانوذرات مس در محیط زیست میگوی وانامی مضر بوده و در بلند مدت می‌تواند اثرات نامطلوبی بر بوم سازگان آبی داشته باشد. همچنین این مطالعه نشان می دهد که قرار گرفتن در معرض نانوذرات مس می تواند موجب آسیب بافت‌های هپاتوپانکراس و آبشش در میگوی وانامی شده و در نهایت عوارض ایجاد شده می‌تواند باعث مرگ و میر در میگو شود.

تشکر و سپاسگزاری

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از ستاد ویژه توسعه فناوری نانو به دلیل حمایت مادی تحقیق حاضر سپاسگزاری نمایند.

فهرست منابع

1. Abad-Rosales, S.M., Frías-Espericueta, M.G., Inzunza-Rojas, A., Osuna-López, A., Páez-Osuna, F., Lozano-Olvera, R., Voltolina, D. (2010): Histological effects of Cu2+ to white shrimp Litopenaeus vannamei (Crustacea: Decapoda) juveniles at low salinities. Rev. Biol. Mar. Oceanogr. 45(1):99-105.
2. Bambang, Y., Thuet, P., Charmantier-Daures, M., Trilles, J.P., Charmantier, G. (1995): Effects of copper on survival and osmoregulation of various developmental stages of the shrimp Penaeus japonicus (Crustacea: Decapoda). Aquat. Toxicol. 33:125-139.
3. Bautista-Covarrubias, J.C., Frías-Espericueta, M.G., Velarde- Montes, G.J., Voltolina, D., García-de la Parra, L.M., Soto-Jiménez, M.F. (2014): Effects of copper on the defense mechanisms of the Pacific White Shrimp, Litopenaeus vannamei. TSWJ. http://dx.doi.org/10.1155/2014/903452.
4. Boulanger, B., Nikolaidis, N.P. (2003): Mobility and aquatic toxicity of copper in an urban watershed. JAWRA. 39(2):325-336.
5. Carvalho, R.A., Benfield, M.C., Santschi, P.H. (1999): Comparative bioaccumulation studies of colloidally complexed and free-ionic heavy metals in juvenile brown shrimp Penaeus aztecus (Crustacea: Decapoda: Penaeidae). Limnol. Oceanogr. 44(2):403-414.

Archive of SID
www.SID.ir

6. Chen, Q.L., Lou, Z., Pan, Y.X., Zheng, J.L., Zhu, Q.L., Sun, L.D., Zhou, M.Q., Hu, W. (2013): Differential induction of enzymes and genes involved in lipid metabolism in liver and visceral adipose tissue of juvenile yellow catfish Pelteobagrus fulvidraco exposed to copper. Aquat. Toxicol. 136-137:1-112.
7. Fabrega, J., Renshaw, J.C., Lead, J.R. (2009): Interactions of silver nanoparticles with Pseudomonas putida biofilms. Environ. Sci. Technol. 43(23):9004-9009.
8. Frias-Espericueta, M.G., Voltolina, D., Osuna-López, J.I. (2003): Acute toxicity of copper, zinc, iron, andmanganese and of themixtures copper-zinc and iron-manganese towhiteleg shrimp Litopenaeus vannamei postlarvae. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 71:68-74.
9. Frias-Espericueta, M.G., Castro-Longoria, R., Barrón-Gallardo, G.J., Osuna-López, J.I., Abad-Rosales, S.M., Páez-Osuna, F., Voltolina, D. (2008): Histological changes and survival of Litopenaeus vannamei juveniles with different copper concentrations. Aquaculture. 278:97-100.
10. Ghorbani, R., Asadi Samani, N., Faghih, G., Shariati, F. (2006): LC50 of copper in Pacific white shrimp Litopenaeus vannamei in laboratory conditions. Iran. Sci. Fish. J. 15(4):103-110.
11. Jia, C., Wang, H., Yan, L., Wang, X., Pei , R., Yan, T., Zhao, Y., Guo, X. (2005): Cytotoxicity of Carbon Nanomaterials: Single-Wall Nanotube, Multi-Wall Nanotube, and Fullerene. Environ. Sci. Technol. 39(5):1378-1383.
12. Kiaune, L., Singhasemanon, N. (2011): Pesticidal copper (I) oxide: Environmental fate and aquatic toxicity. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 213:1-26.
13. Kumar Pandey, R., Nayan Singh, R., Krishna Das, V. (2008): Effect of temperature on mortality and behavioral responses in freshwater catfish, Heteropneustes fossilis (Bloch) exposed to Dimethoate. Glob. J. Environ. Res. 2:126-132.
14. Li, N., Zhao, Y., Yang, J. (2007): Impact of waterborne copper on the structure of gills and hepatopancreas and its impact on the content of metallothionein in juvenile giant freshwater prawn Macrobrachium rosenbergi (Crustacea: Decapoda). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 52:73-79.
15. Murti, R., Shukla, G.S. (1984): Toxicity of copper sulphate and zinc sulphate to Macrobrachium lamarrei (H. Milne Edwards) (Decapoda, Palaemonidae). Crustaceana. 47(2):168-173.
16. Nowack, B., Bucheli, T.D. (2007): Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. Environ. Pollut. 150:5-22.
17. Schirmer, K., Behra, R., Sigg, L., Suter, M.J.F. (2013): Ecotoxicological Aspects of Nanomaterials in the Aquatic Environment. Saf. Asp. Eng. Nanomat. 141-162.
18. Soegianto, A., Charmantier-Daures, M., Trilles, J.P., Charmantier, G. (1999): Impact of Copper on the Structure of Gills and Epipodites of the Shrimp Penaeus japonicus (Decapoda). J. Crustac. Biol. 19(2):209-223.
19. Warheit, D.B., Laurence, B.R., Reed, K.L., Roach, D.H., Reynolds, G.A., Webb, T.R. (2004): Comparative Pulmonary Toxicity Assessment of Single-wall Carbon Nanotubes in Rats. Toxicol. Sci. 77(1):117-125.
20. Wilde, K.L., Stauber, J.L., Markich, S.J., Franklin, N.M., Brown, P.L. (2006): The effects of pH on the uptake and toxicity of copper and zinc in a tropical freshwater alga (Chlorella sp.). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 51:174-185.
21. Yang, Z.B., Zhao, Y.L., Yang, J. (2007): Effect of Waterborne Copper on the Microstructures of Gill and Hepatopancreas in Eriocheir sinensis and Its Induction of Metallothionein Synthesis. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 52:222-228.

Archive of SID

www.SID.ir