بسم الله الرحمن الرحيم

**دانشکده شیلات و محیط زیست**

**پایان‌نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته**
**بوم شناسی آبزیان**

# مقایسه تاثیر نانو ذرات روی و سولفات روی بر برخی شاخص-های خون‌شناسی و بافت آبشش سیاه‌ماهی

**پژوهش و نگارش:**
زهره سلطانی

**استاد راهنما:**
دکتر رسول قربانی
دکتر علی اکبر هدایتی

**اساتید مشاور:**
دکتر افشین عادلی
دکتر محمد مازندرانی

**تابستان ۱۳۹۳**

**تعهدنامه پژوهشی**

نظر به اینکه انجام فعالیت‌های پایان نامه‌های تحصیلی با بهره‌گیری از حمایت‌های علمی، مالی و پشتیبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان صورت می‌پذیرد به منظور رعایت حقوق دانشگاه نسبت به رعایت موارد زیر متعهد می‌شوم:

۱- این گزارش حاصل فعالیت‌های علمی-پژوهشی و دانش و آگاهی نگارنده است مگر آنکه در متن به نویسنده یا پدید آورنده اثر ارجاع داده شده باشد.

۲- چاپ هر تعداد نسخه از پایان‌نامه با کسب اجازه کتبی از مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه خواهد بود.

۳- انتشار نتایج پایان نامه به هر شکل (از قبیل کتاب، مقاله و همایش) با اطلاع و کسب اجازه کتبی از استاد راهنما خواهد بود. نام کامل دانشگاه:

به فارسی: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

و به انگلیسی: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

و در بخش آدرس دهی درج خواهد شد.

٤- در انتشار نتایج پایان‌نامه در قالب اختراع، اکتشاف و موارد مشابه، نام کامل دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان به عنوان عضو حقوقی در انتهای فهرست اسامی درج گردد.

۵- تعیین ترتیب اسامی نویسندگان در انتشار نتایج مستخرج از پایان‌نامه و هرگونه تفاوت احتمالی در آن با فهرست مصوب اسامی هیات راهبری پایان‌نامه با تایید استاد راهنمای اول خواهد بود.

اینجانب **زهره سلطانی** دانشجوی رشته **بوم شناسی آبزیان** مقطع **کارشناسی‌ارشد** تعهدات فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده و به آن ملتزم می‌شوم.

نام ونام خانوادگی و امضاء

# تقدیم به

پدر و مادر عزیزم

خدای را بسی شاکرم که از روی کرم، پدر و مادری فداکار نسیم ساخته تا در سایه درخت پربار وجودشان بیاسایم و از ریشه آنها شاخ و برگ گیرم و از سایه وجودشان در راه کسب علم و دانش تلاش نمایم. والدینی که بودنشان تاج افتخاری است بر سرم و نامشان دلیلی است بر بودنم، چرا که این دو وجود، پس از پروردگار، مایه هستی ام بوده اند دستم را گرفتند و راه رفتن را در این وادی زندگی پر از فراز و نشیب آموختند. آموزگارانی که برایم زندگی، بودن و انسان بودن را معنا کردند. . . .

## تشکر و قدردانی

سپاس ویژه خود را تقدیم اساتید راهنمای بزرگوارم جناب آقای دکتر **رسول قربانی** و دکتر **سید علی اکبر هدایتی** می‌دارم که صبورانه مرا یاری کردند و در این راه همیشه راهنمای من بوده اند.

از اساتید مشاور جناب آقای دکتر **افشین عادلی** و دکتر **محمد مازندرانی** کمال قدردانی را دارم.

از سرکار خانم دکتر **حدیثه کشیری** و جناب آقای دکتر **حسین حسینی فر** برای داوری این پایان نامه سپاسگزارم.

از دوست خوبم خانم مهندس **صفورا ابرقویی** برای همه ی همراهی‌های خواهرانه‌اش تشکرم و آرزوی بهترین‌ها را برایشان دارم.

## چکیده

باتوجه به کاربرد روزافزون نانوتکنولوژی و جایگاه آن در کاهش اثرات نامطلوب فلزات سنگین در بدن موجودات زنده، در تحقیق حاضر به مقایسه تاثیر نانو ذرات روی و سولفات روی بر برخی شاخص‌های خون‌شناسی و بافت آبشش سیاه‌ماهی پرداخته شده است. تعداد ۷۰ قطعه سیاه ماهی از رودخانه‌ی زرین‌گل استان گلستان صیدشده و تحت تاثیر غلظت‌های (۵، ۲۰ و ppm۱۰۰) و تیمار شاهد به مدت چهارده روز در دو گروه سولفات روی و نانواکسید روی انجام شد. پس از اتمام آزمایش از ماهی‌ها نمونه خون و بافت گرفته شده و فاکتورهای مختلف خون شامل: شاخص‌های اریتروسیتی و لکوسیتی خون بود. نمونه های بافتی نیز پس از تثبیت مورد بافت شناسی قرار گرفته و در نهایت اسلایدهای تهیه شده برای تشخیص عوارض موجود مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که میزان گلبول‌های قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت کاهش معنی‌دار و گلبول‌های سفید افزایش معنی‌دار یافت. این آلاینده‌ها باعث بروز کم‌خونی و ایجاد اختلال در سیستم ایمنی ماهی شد که ممکن است به دلیل اثرات مخرب آن بر اندام‌های خون‌ساز مانند کبد و کلیه باشد. آبشش ماهی‌هایی که در معرض سولفات روی قرار گرفتند، ناهنجاری‌های مختلف را به‌شکل شدید نسبت به تیمار شاهد نشان دادند. با افزایش غلظت سولفات روی، این عوارض بیشتر مشاهده شد، ولی نمونه‌هایی که در معرض نانو روی قرار گرفتند، با افزایش غلظت به‌صورت تدریجی از حالت اولیه خارج شدند. شدت تخریب آبشش‌ها نسبت به سولفات روی کمتر دیده شد. عوارض مشاهده شده شامل: نکروز لاملاهای ثانویه، هایپرپلازی، ادم و ... در آبشش‌ها بود. اما در نهایت اثرات حاصل از سولفات روی شدیدتر از نوع نانوفلز روی بوده است. در مجموع نانوذرات روی اثرات مخربی کمتری داشته و جهت کاربرد در صنایع مختلف پیشنهاد می شوند.



**کلمات کلیدی:** نانوذرات، خون شناسی، بافت شناسی، سیاه‌ماهی

فهرست مطالب

**عنوان** **صفحه**

**فصل اول**

کلیات ..... ۲

۱-۱) اکوسیستمهای آبی ..... ۲

۱-۲) فلزات سنگین و آلودگی ..... ۲

۱-۳) روی ..... ۳

۱-٤) نانوتکنولوژی ..... ۳

۱-۵) زیست آزمونی ..... ٤

۱-٦) سیاه ماهی ..... ٤

۱-۷) ضرورت تحقیق ..... ۵

۱-۸) فرضیات تحقیق ..... ۵

۱-۹) اهداف تحقیق ..... ۵

**فصل دوم**

۲) مرور منابع ..... ۸

۲-۱) مرور منابع داخلی ..... ۸

۲-۲) مرور منابع خارجی ..... ۹

**فصل سوم**

۳) مواد و روشها ..... ۱۲

۳-۱) نمونه برداری ..... ۱۲

۳-۲) شرایط نگهداری ماهیان ..... ۱۲

۳-۳) تعیین غلظت کشندگی LC50 ..... ۱۲

۳-٤) آزمایش تحت حاد ..... ۱۳
۳-٥) نمونه برداری از بافت آبشش ..... ۱۳
۳-٥-۱) مراحل آنالیز بافتی ..... ۱٤
۳-٦) خونگیری ..... ۱٦
۳-۷) محاسبات آماری ..... ۱۷
فصل چهارم
٤) نتایج ..... ۲۰
٤-۱) میزان مرگ و میر سیاه ماهیها در زمان تعیین غلظت کشنده نمک سولفات روی ..... ۲۰
٤-۲) تعیین میزان LC ..... ۲۰
٤-۳) اثرات سم بر ویژگیهای ظاهری و رفتاری ماهی ..... ۲۰
٤-٤) نتایج حاصل از آزمایشات هیستوپاتولوژی ..... ۲۱
٤-٥) نتایج حاصل از آزمایشات هماتولوژی ..... ۲٤
فصل پنجم
٥) بحث و نتیجه گیری ..... ۳۰
٥-۱) بحث ..... ۳۰
٥-۱-۱) اندازه گیری فاکتورهای خونی ..... ۳۱
٥-۱-۱-۱) شاخص های اریتروسیتی ..... ۳۱
٥-۱-۱-۲) شاخصهای لوکوسیتی ..... ۳۲
٥-۱-۱-۳) نوتروفیل ..... ۳۳
٥-۱-۱-٤) لنفوسیت ..... ۳۳
٥-۲) نتیجه گیری ..... ۳۷
٥-۳) پیشنهادات پژوهشی ..... ۳۷

۵-٤) پیشنهادات اجرایی..... ۳۸
منابع
فهرست منابع ..... ٤۰

فهرست جدول‌ها

**عنوان** **صفحه**

جدول ٤-١-) میزان غلظت کشنده سولفات روی در زمان‌های (٢٤، ٤٨، ٧٢ و ٩٦ ساعت)..... ٢٠

جدول ٤-٢-) تعیین عارضه های آبشش در مواجهه با غلظتهای تحت کشنده نانو اکسید روی ٢٣

جدول ٤-٣-) تعیین عارضه های آبشش در مواجهه با غلظتهای تحت کشنده سولفات روی ... ٢٤

جدول ٤-٤-) میزان پارامترهای خونی سیاه ماهی در غلظتهای تحت کشنده نانو اکسید روی .. ٢٥

جدول ٤-٥-) میزان پارامترهای خونی سیاه ماهی در غلظتهای تحت کشنده سولفات روی .....٢٦

فهرست شکل‌ها

**عنوان** **صفحه**

شکل ۳-۱) آماده سازی ظروف نمونه گیری بافت و خون ..... ۱۳

شکل ۳-۲) مراحل آماده سازی بافت سیاه ماهی ..... ۱۶

شکل ٤-۱-) نمونه شاهد آبشش سالم سیاه ماهی (٤۰۰*) ..... ۲۲

شکل ٤-۲-)A.ادم، B. هایپرپلازی، C.نفوذ سلولهای آماسی (ستاره)، هایپرپلازی (دایره)، نکروز (فلش)، D. بهم چسبیدگی لاملاهای ثانویه (فلش)، ادم (ستاره)، E. نفوذ سلولهای خونی (دایره)، نکروز (ستاره)، هایپرپلازی (فلش)، F. نکروز. (٤۰۰*) ..... ۲۲

شکل ٤-۳-) مقایسه سمیت LC50 سولفات روی با غلظتهای بی اثر و کم اثر در سیاه ماهی ..... ۲۷

# فصل اول

# کلیات

### ۱-۱) اکوسیستم‌های آبی

مطالعه بیولوژیکی و اکولوژیکی گونه‌های مختلف آبزیان در یک اکوسیستم آبی منجر به شناخت و تحلیل اکولوژیکی زنجیره غذایی اکوسیستم می‌گردد که این امر در اعمال مدیریت صحیح شیلاتی کاربرد فراوان دارد (کازانچف، ۱۹۸۱). آلودگی اکوسیستم‌های آبی به یکی از معضلات امروز جوامع بشری در سراسر جهان تبدیل شده است، چرا که این منابع دارای کاربری‌های متنوع‌اند (پیربیگی و همکاران، ۱۳۹۲).

### ۱-۲) فلزات سنگین و آلودگی

تکنولوژی و تولید فراورده‌های جدید و متنوع شیمیایی مورد نیاز در صنعت، کشاورزی و بهداشت در دهه‌های اخیر به‌صورت فزاینده‌ای گسترش یافته، به‌طوری‌که با افزایش جمعیت و پیشرفت صنایع و مواد شیمیایی مختلف، مورد توجه سازمان‌ها و نهادهای بهداشتی بین‌المللی واقع شده اس ت(حمیدی، ۱۳۹۰).

از انواع آلاینده‌ها می‌توان به فلزات سنگین اشاره کرد که به‌طور طبیعی از اجزای تشکیل دهنده اکوسیستم‌های آبی محسوب می‌گردند. فلزات سنگین از جمله آلاینده‌های محیط زیست هستند که مواجه شدن انسان‌ها با بعضی از آن‌ها از طریق آب و مواد غذایی می‌تواند مسمومیت‌های مزمن و یا خطرناکی را ایجاد نمایند که از جمله آن‌ها می‌توان به فلزاتی نظیر سرب، کادمیوم، جیوه، نیکل، روی، آلومینیوم، آرسنیک، مس و آهن اشاره کرد. در دهه گذشته ورود آلاینده‌ها با منشأ انسانی مانند فلزات سنگین به داخل محیط‌های آبی، به مقدار زیادی افزایش یافته است که به‌عنوان یک خطر جدی برای حیات محیط‌های آبی به‌شمار می‌آیند (محمدی، ۱۳۹۰). فلزات سنگین در یک مقیاس وسیع، وارد محیط زیست می‌شوند. میزان ورود این فلزات سنگین به محیط زیست، بسیار فراتر از میزانی است که به وسیله‌ی فرایندهای طبیعی برداشت می‌شوند. بنابراین تجمع فلزات سنگین در محیط زیست قابل ملاحظه است. سیستم‌های آبی به‌طور طبیعی دریافت کننده‌ی نهایی این فلزات هستند (محمدی، ۱۳۹۰).

### ۱-۳) روی

روی در طبیعت به ندرت به‌صورت یون‌های آزاد وجود دارد و اغلب در ترکیب با سایر عناصر معدنی یافت می‌شود. این عنصر در مقادیر بالاتر از نیاز زیستی برای آبزیان سمی است. افزایش

سطوح روی در اکوسیستم‌های آبی می‌تواند بر اثر تخلیه پساب‌های صنعتی، تخلیه و رسوب روی از طریق اتمسفر، شستشوی فاضلاب‌های محلی و مواد زائد فعالیت‌های معدنی، آفت‌کش‌ها و فرآیندهای گالوانیزاسیون باشد (ییم و کیم[1]، ۲۰۰۶).

فراوانی روی در سنگ کره حدود ۸۰ میلی گرم در کیلوگرم است. این عنصر به پیوند با سولفیدها تمایل زیادی دارد که منجر به تشکیل معمول‌ترین کانی روی، یا همان اسفالریت می‌شود. تاثیر باران‌های اسیدی بر مواد ساختمانی حاوی روی، منابع عمده ی ورود این عنصر به آب و محیط زیست هستند (کریمی، ۱۳۷۷). روی به طور عمده در استخوان و پوست تجمع می‌یابد، اگر چه کبد، آبشش و کلیه نیز میزان قابل توجهی از آن را جمع می‌کنند.

### ۱-٤) نانوتکنولوژی

نانو تکنولوژی یکی از جدیدترین تکنولوژی‌هاست که امروزه با پیشرفت چشمگیری همراه است. نانوذرات به ذراتی گفته می‌شود که ابعاد آن‌ها در محدوده nm ۱۰۰-۱ باشد. امروزه از نانوذرات در گستره وسیعی از علوم و صنایع مختلف استفاده می‌شود که از آن جمله، الکترونیک، پزشکی، داروسازی، لوازم آرایشی و بهداشتی، تولید انرژی، محیط‌زیست و کاتالیزورها را می‌توان نام برد و به‌طور فزاینده‌ای در تولیدات صنعتی و همچنین علمی، بیولوژیکی و پزشکی مورد استفاده قرار گرفته است. از آن جا که نانوذرات مصنوعی تولید بشر هستند و در فرآیند تکامل وجود نداشته‌اند، در حال حاضر، نگرانی زیادی پیرامون آلودگی موجودات زنده با آن‌ها وجود دارد (شبه‌رنگ و میرواقفی، ۱۳۹۱). ذرات در مقیاس نانو بدلیل افزایش مساحت سطحی واکنش‌پذیری بالایی دارند.

### ۱-٥) زیست آزمونی

زیست آزمونی[2] روشی است که عکس العمل‌های موجودات آبزی برای آشکار سازی، اندازه‌گیری یا تأثیر یک یا چند ماده سمی یا عامل محیطی به تنهایی یا توأم با یکدیگر را مورد بررسی قرار می‌دهد (مارتین[3] و همکاران، ۲۰۰۷). با استفاده از در معرض قرار دادن ارگانیسم‌ها در دوزهای

[1] Yim and Kim
[2] Bioassay
[3] Martins

مختلف آلوده کننده، زیست آزمونی برای ارزیابی اثرات سمیت آن‌ها انجام می‌گیرد که به وسیله پایش خصوصیات و رفتارهای بیولوژیک این ارگانیسم‌ها و مقایسه آن با ارگانیسم‌های که هیچ گونه مواجه ای با مواد آلوده کننده نداشته اند امکان پذیر می‌باشد ( ندافی و همکاران، ۱۳۹۰). در محیط‌های آبی، ماهی به عنوان یک آبزی برای ارزیابی اثر آلاینده‌های محیطی در بوم سامانه‌های آبی در نظر گرفته می‌شود. ماهی در بالاترین نقطه زنجیره غذایی آبی قرار گرفته است و توانایی بزرگنمایی زیستی فلزات سنگین، حتی در غلظت‌های پایین موجود در محیط را دارد (بهاگوانت[1] و همکاران، ۲۰۰۰).

**۱-٦) سیاه‌ماهی**

گونه سیاه‌ماهی در آفریقا، آسیای صغیر، سراسر ناحیه قفقاز، در محدوده سوریه، ایران، جنوب آسیای مرکزی، شمال هند، ترکمنستان دریاچه آرال، خاورمیانه و جنوب چین پراکنش دارد (عبدلی، ۱۳۷۸ و ترکمن و همکاران ۲۰۰۲ ). پراکنش زیر گونه ***Capoeta capoeta gracilis*** در ایران در حوضه های جنوب دریای خزر، حوضه دریاچه ارومیه، اطراف اصفهان و در جنوب شرقی خراسان می باشد (برگ[2]، ۱۹٤۹ و عبدلی، ۱۳۷۸ ). گونه سیاه‌ماهی از خانواده کپور ماهیان (*Cyprinidae*) بوده و در تمام رودخانه‌های آب شیرین حوضه جنوبی دریای خزر و دریاچه ارومیه پراکنش دارد.

[1] Bhagwant
[2] Berg

### ۱-۷) ضرورت تحقیق

با پیشرفت تکنولوژی نانو بسیاری از این فلزات جای خود را با نوع نانو در طبیعت عوض کرده‌اند. از اینرو بررسی تاثیرات مستلزم بررسی موجودات زنده‌ی محیط آبی می‌باشد. به دلیل اینکه سیاه‌ماهی یک گونه‌ی رودخانه‌ای بوده و حضور پررنگی در زنجیره‌ی غذایی دارد و تجمع این فلزات در بدن این ماهی، تغییرات زیادی را در شاخص‌های خونی و بافت آبشش که بیشترین تاثیر را می‌پذیرد، به وجود می‌آورد؛ به ضرورت این مطالعه پی می‌بریم.

### ۱-۸) فرضیات تحقیق

- میزان سمیت کشندگی نانوذرات روی با نمک روی تفاوت معنی‌دار ندارند.
- نانوذرات روی و نمک روی بر سطوح شاخص‌های خون‌شناسی و بافتی سیاه‌ماهی اثر معنی‌دار ندارند.

### ۱-۹) اهداف تحقیق

- مقایسه‌ی تاثیر غلظت‌های مختلف نانوروی و نمک روی بر شاخص‌های خون‌شناسی و بافت‌شناسی سیاه‌ماهی به‌عنوان گونه شاخص رودخانه‌ای

# فصل دوم

# مرور منابع

## ۲) مرور منابع

### ۲-۱) مرور منابع داخلی

رستمی بشمن و همکاران (۱۳۷۹) اثرات هیستوپاتولوژیک برخی از فلزات سنگین (سولفات مس، سولفات روی و سولفات جیوه – کلرور کادمیوم) را بر بافت‌های ماهی کپور معمولی[1] بررسی کردند. غیاثی و همکاران (۱۳۸۸) پارامترهای خونی و بیوشیمی سرمی کپور معمولی متعاقب مواجهه با غلظت کم کادمیوم را مورد مطالعه قرار دادند. منصوری و همکاران (۱۳۸۹) در مطالعه‌ای به تعیین میزان برخی فلزات سنگین در بافت‌های مختلف سیاه‌ماهی در قنات‌های بخش مرکزی بیرجند پرداختند. پشت پناه و همکارانش (۱۳۹۱) بر روی تعیین سمیت حاد علف‌کش گلایفوزیت (Roundup) و تاثیر آن بر فاکتورهای خونی بچه ماهیان کپور معمولی مطالعه انجام دادند. آزمایش‌ها بر اساس روش OECD و به صورت ساکن انجام شد. مهدی پور و ایمانپور (۱۳۹۱) اثرات سمی آهن، مس، نیکل و روی را بر تغییرات مورفولوژیک بافت کبد ماهی سفید[2] بررسی کردند. زیادلو و همکاران (۱۳۹۱) واکنش‌های خون شناسی و بافت شناسی ماهی کپور معمولی قرار گرفته در مجاورت سولفات مس در آب را بررسی کردند. یوسف زاده و همکاران (۱۳۹۱) مطالعه‌ای بر روی پارامترهای خون شناسی سیاه‌ماهی رودخانه تالار قائمشهر، مازندران انجام دادند. علی قاضی و همکاران (۱۳۹۱) به بررسی تغییرات هیستوپاتولوژیک ناشی از نانوذرات اکسید روی بر آبشش ماهی کپور معمولی پرداختند. هدایتی و همکاران (۱۳۹۲) اثرات سمیت کشنده نانواکسید روی (ZnO NPs)، نانو اکسید مس (CuO NPs) و نانو دی‌اکسید تیتانیوم ($TiO_2$ NPs) و اثرات سمیت تحت کشنده آنها بر فاکتورهای خون و بافت آبشش ماهی قرمز[3]، کپور معمولی و کلمه[4] را بررسی کردند.

---

[1] *Cyprinus carpio*
[2] *Rutilus frissi kutum*
[3] *Carassius auratus*
[4] *Rutilus rutilus*

### ۲-۲) مرور منابع خارجی

کارینگ[1] (۱۹۹۳) اثرات فلز سنگین روی را بر آبشش، گناد و خون ماهی آب شیرین تیلاپیا[2] مورد بررسی قرار داد. جزیرسکا و ویتسکا[3] (۲۰۰۶) میزان جذب و تجمع فلزات را در آب‌های آلوده‌ی ماهی بررسی کردند. سنتیل موروگان[4] و همکارانش (۲۰۰۸) تحقیقی را بر الگوی تجمع زیستی فلز روی پس از قرار گیری مزمن ماهی سرماری خالدار[5] در مقابل این فلز انجام دادند. دوبروا[6] و همکاران (۲۰۰۸) بر روی اثرات فلز روی بر ساختار آبشش ماهی حوض وحشی[7] (کاراس) بلوچی تحقیقی را انجام دادند. گل[8] و همکاران (۲۰۰۹) اثر سولفات روی را بر ماهی گوپی بررسی کردند. ایلیانا[9] و همکارانش (۲۰۱۰) اثر روی بر مورفولوژی آبشش ماهی حوض وحشی (کاراس) را بررسی کردند. هاو و چن[10] (۲۰۱۲) پاسخ های استرس اکسیداتیو در بافت‌های مختلف کپور با قرار گرفتن در معرض نانوذرات اکسید روی را مورد بررسی قرار دادند. هاو و همکاران (۲۰۱۳) مطالعه‌ای را بر تجمع زیستی و سمیت تحت حاد نانو اکسید روی درون آب در کپور نوجوان انجام دادند. ساباشکومار و سلوانایاگام[11] (۲۰۱٤) به بررسی سمیت حاد و اثرات هیستوپاتولوژی آبشش ماهی آب شیرین کپور معمولی در مواجهه با نانو ذرات اکسید روی پرداختند.

---

[1] Caring
[2] *Tilapia nilotica*
[3] Jezierska and Witeska
[4] Senthil Murugan
[5] *Channa punctatus*
[6] Dobreva
[7] *Carassius auratus gibelio*
[8] Gul
[9] Iliana
[10] Hao and Chen
[11] Subashkumar and Selvanayagam