فصلنامه علمی - پژوهشی دانشگاه الزهرا(س)
دوره ۳۳ ، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۹

تأثیر پیش تیمار کربنات کلسیم در دماهای مختلف بر کاهش سمیت سولفات مس در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758)

اکرم قاسم زاده[۱]، معصومه بحرکاظمی[*۲]

تاریخ دریافت:۱۳۹۹/۳/۲۶
تاریخ پذیرش:۱۳۹۹/۵/۵

چکیده

استفاده از سولفات مس به‌عنوان جلبک‌کش در مزارع پرورش ماهیان می‌تواند موجب مسمومیت در ماهیان شود و بر رشد و سلامتی آن‌ها تأثیر منفی داشته باشد. به دلیل تأثیر مقدار کلسیم آب بر سمیت سولفات مس ، در این تحقیق تأثیر پیش تیمار هفت روزه کربنات کلسیم بر کاهش سمیت مس در کپور معمولی (Cyprinus carpio) در دو دمای مختلف مورد بررسی قرار گرفت. در ابتدا نیمی از کپور ماهیان به مدت یک هفته در آبی که ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر کربنات کلسیم به آن افزوده شد پرورش یافتند. سپس تمام ماهی‌ها به مدت ۶۰ روز در معرض غلظت‌های صفر، ۱/۵ و ۳ میلی‌گرم در لیتر سولفات مس در دو دمای ۲۲ و ۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد پرورش یافتند. بر اساس نتایج با افزایش میزان مس و درجه حرارت وزن‌گیری و شاخص وضعیت کاهش معنی‌دار و درصد تلفات و ضریب تبدیل غذایی افزایش معنی‌دار یافت ($P<0/05$). در هر دو گروه از ماهیان با افزایش غلظت سولفات مس و درجه حرارت، تعداد گلبول‌های قرمز و سفید و مقادیر هموگلوبین و هماتوکریت کاهش و مقادیر MCV و MCH افزایش یافت. اما در مورد MCHC روند مشخصی مشاهده نشد. همچنین اثر متقابل مثبت هر سه پارامتر پیش تیمار با کربنات کلسیم، درجه حرارت و غلظت سولفات مس تنها در مورد تلفات و گلبول‌های سفید معنی‌دار نشد ($P>0/05$). بنابراین افزایش سولفات مس به‌ویژه در دمای ۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد می‌تواند بر بازده رشد و تغذیه و بازماندگی ماهیان تأثیرگذار باشد و پیش تیمار با کربنات کلسیم می‌تواند در رقابت با مس تا حد قابل توجهی اثر منفی سولفات مس را تعدیل نماید. تأثیر سه متغیر پیش تیمار با کربنات کلسیم، سولفات مس و دما بر شاخص‌های رشد و تغذیه بسیار مشهودتر از پارامترهای خونی بود. افزایش میزان سولفات مس باعث بروز کم‌خونی و کاهش ایمنی ماهیان گشت و پیش‌تیمار با کربنات کلسیم به‌ویژه در غلظت ۱/۵ میلی‌گرم/ لیتر سولفات مس در دمای ۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد موثر بود. لذا پیش تیمار ۷ روزه ماهیان با ۲۰۰ میلی‌گرم/ لیترکربنات کلسیم به‌ویژه تا غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر سولفات مس حتی در شرایط افزایش دما توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: خون شناسی، سولفات مس، کپور معمولی، کربنات کلسیم

۱- کارشناسی ارشد،گروه شیلات، واحد قائم‌شهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائم‌شهر، ایران.
۲- استادیار،گروه شیلات، واحد قائم شهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائم شهر، ایران
*(نویسنده مسئول: m.bahrekazemi@qaemiau.ac.ir)

مقدمه

برخی از ترکیبات مانند سولفات مس که در صنایع پرورش ماهی تحت عنوان جلبک‌کش و قارچ‌کش مورد استفاده قرار می‌گیرند دارای مقادیری از فلزات سنگین هستند (Takasusuki *et al*., 2004). بر اساس گزارش موجود استفاده از سولفات مس برای کنترل جمعیت فیتوپلانکتون‌ها، به‌ندرت باعث ایجاد مسمومیت برای ماهیان می‌شود اما باعث کشته شدن تعداد زیادی از بی‌مهرگان مانند روتیفرها، کلادوسرها و کپه پودا می‌شود که به‌عنوان غذای آبزیان مطرح هستند (Boyd, 1990)؛ البته غلظت مس بیش از مقدار مشخص می‌تواند برای ماهیان پرورشی مانند آزاد ماهیان، کپورماهیان و گربه ماهیان سمی باشد (Perschbacher & Wurts, 1999). اثر مس نسبت به جیوه، سرب و سایر فلزات سنگین بر روی آبشش‌ها خیلی بیش‌تر است (تا ۳ برابر) (Pagenkopf, 1983) . این ماده فضاهای بین رشته‌های آبششی را پر می‌کند و در نتیجه آب دمی نمی‌تواند به سلول‌های آبششی برسد، همچنین تحرک رشته‌های آبششی کاهش و کار مؤثر قلب به نصف تقلیل می‌یابد یا متوقف می‌شود (Abdel-Tawwab *et al*., 2007). پژوهش‌ها نشان داده‌اند که استفاده‌ی مناسب از سولفات مس بدون ایجاد حالت سمیت برای آبزیان به سختی و قلیائیت آب وابسته است (Takasusuki *et al*., 2004). غلظت بالای کلسیم آب که یکی از اجزای سختی آب است می‌تواند سمیت مس را کاهش دهد، کلسیم این کار را از طریق بهبود مکانیسم تبادل یونی در آبشش‌ها در برابر اثرات مخرب مس انجام می‌دهد (Abdel-Tawwab & Mousa, 2005). همچنین سختی ناشی از کلسیم در مقایسه با منیزیم در کاهش مسمومیت مس در گربه ماهی روگاهی (*Ictalurus punctatus* Rafinesque, 1818) کارایی بیشتری داشته است (Perschbacher & Wurts, 1999). در مطالعه‌ی ۱۰۰ روزه در قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss* walbaum, 1792) ثابت شد که منیزیم نقش چندانی در کاهش سمیت فلز کادمیوم ندارد (Davies *et al*., 1993).

پیش تیمار با اکسید کلسیم موجب کاهش سمیت مس در تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758) و کپور معمولی (*Cyprinus carpio* Linnaeus,1758) گشت (Abdel-Tawwab *et al*., 2007 ; فرهادی و همکاران، ۱۳۹۳). درگونه‌ی (*Synechogobius hasta* (Temminck & Schlegel, 1845 پیش تیمار با کلسیم توانست سمیت کادمیوم را کاهش دهد (Song *et al*., 2013). پیش تیمار با کلسیم توانایی کاهش سمیت مس در گونه‌ی (*Pelteobagrus fulvidraco* (Richardson, 1846 را نیز دارد (Chen *et al*., 2012). بر اساس مطالعه‌ی دیگری کلسیم توانست میزان آسیب‌های بافتی را در تیلاپیای نیل که در تماس با سرب قرار گرفت کاهش دهد (Singhadach *et al*., 2009). همچنین در گله ماهی (*Fundulus heteroclitus* Linnaeus, 1766) سمیت کادمیوم در آب با میزان ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر کلسیم کاهش یافت و تماس اولیه با کلسیم توانست میزان بازماندگی ماهیان را در آب آلوده به کادمیوم افزایش دهد (Gill & Epple, 1992). بر اساس گزارش موجود افزودن کربنات

کلسیم به آب به‌منظور تامین آهک باعث برگشت پذیری تغییرات ایجاد شده در خون گونه‌ی *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822)در تماس با آرسنیک گشت (Abdel-Hameid, 2009).

مطالعات نشان می‌دهد که غلظتی از آلاینده‌ها و فلزات سنگین که در درجه حرارت پایین و متوسط غیر فعال است، می‌تواند با افزایش دمای آب برای ماهیان کشنده باشد (Mehta, 2017). در گربه ماهی کانالی(*Ictalurus punctatus*) با افزایش درجه حرارت آب در فصل بهار سمیت مس افزایش می‌یابد (Boyd, 1990). در گونه‌ی *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881) ، ۱۰ درجه سانتی‌گراد افزایش دما سبب افزایش میزان سمیت مس شد (Carvalho *et al*., 2004). در دامنه‌ی حرارتی ۱۰ تا ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد با افزایش درجه حرارت آب، میزان سمیت فلزات سنگین در بی‌مهرگان آبزی افزایش یافت (Bat *et al*., 2000). همچنین سمیت کادمیوم، مس، و روی در خرچنگ دراز آب شیرین (*Orconectes immunis* Hagen,1870) با افزایش دما از ۲۰ به ۲۴ درجه‌ی سانتی‌گراد حدود ۷ درصد افزایش یافت (Khan *et al*., 2006).

بنابراین با توجه به استفاده فراوان از سولفات مس به‌عنوان جلبک‌کش قوی در مزارع پرورش ماهیان و تأثیر میزان کلسیم و همچنین درجه حرارت آب در بروز سمیت آن، در تحقیق حاضر تأثیر پیش تیمار هفت روزه با کربنات کلسیم در کاهش سمیت سولفات مس در غلظت‌های مختلف در دو دمای ۲۲ و ۲۷ درجه‌ی سانتی گراد در کپور معمولی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

این پژوهش به مدت ۶۷ روز در مرکز تحقیقات ماهیان زینتی جهاد دانشگاهی واحد مازندران در منطقه چیکرود جویبار انجام شد. ۱۰۰۰ قطعه کپور معمولی با میانگین وزن ۰/۰۵± ۶ گرم از مرکز پرورش بچه ماهیان گرم آبی شهرستان ساری تهیه و به محل آزمایش منتقل گردیدند. پس از سازگاری اولیه بچه ماهیان با شرایط کارگاه به مدت یک هفته، نیمی از ماهیان (۵۰۰ قطعه) به مدت هفت روز در یک استخر گرد بتنی (قطر ۴ متر و عمق ۱/۵ متر با عمق آبگیری ۱ متر) که ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر کربنات کلسیم (مرک- آلمان) به آن اضافه شده بود و نیمی دیگر از بچه ماهیان (۵۰۰ قطعه) در استخر دیگری بدون افزودن کربنات کلسیم نگهداری شدند. سپس از هر دو گروه بچه ماهیان تعداد ۷۲۰ قطعه ماهی پس از زیست‌سنجی به طور کاملا تصادفی در ۳۶ آکواریوم با ابعاد ۰/۵×۰/۸×۱/۵ متر و حجم آبگیری ۱۴۰ لیتر ذخیره‌سازی شدند و به مدت ۶۰ روز در آب حاوی غلظت های مزمن سولفات مس با مقادیر ۱/۵ و ۳ میلی‌گرم در لیتر و یک گروه شاهد در دو دمای ۲۲ و ۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد پرورش یافتند. این آزمایش شامل ۱۲ تیمار و هر تیمار شامل۳ تکرار و هر تکرار شامل ۲۰ بچه ماهی بود (جدول ۱).

جدول ۱: تیمارهای آزمایش شامل بچه ماهیان با دریافت (+) و عدم دریافت (–) پیش تیمار کربنات کلسیم در معرض سولفات مس در دو دمای ۲۲ و ۲۷ درجه‌ی سانتی گراد در کپور معمولی

درجه حرارت (درجه‌ی سانتی‌گراد)	۲۲						۲۷					
نام تیمار	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
پیش تیمار/ عدم پیش تیمار با کلسیم	–	–	–	+	+	+	–	–	–	+	+	+
غلظت سولفات مس(میلی‌گرم/ لیتر)	۰	۱/۵	۳	۰	۱/۵	۳	۰	۱/۵	۳	۰	۱/۵	۳

مبنای انتخاب پیش تیمار هفت روزه با کربنات کلسیم نتایجی بود که توسط مولف به‌دست آمد و در آن تأثیر مثبت پیش تیمار ۴ روزه با اکسید کلسیم در کاهش سمیت سولفات مس در کپور معمولی به اثبات رسید (فرهادی و همکاران، ۱۳۹۳). با توجه به تأثیر کمتر کربنات کلسیم از اکسید کلسیم، در تحقیق حاضر از پیش تیمار هفت روزه کربنات کلسیم استفاده شد. غلظت‌های استفاده شده در این تحقیق و دوره ۶۰ روزه آزمایش نیز بر اساس تحقیق‌های انجام شده توسط Gill و Epple (۱۹۹۲) در گله ماهی، Abdel-Tawwab و همکاران (۲۰۰۷) در تیلاپیای نیل و فرهادی و همکاران (۱۳۹۳) در کپور معمولی انتخاب شدند.

آب مورد استفاده در این تحقیق، آب چاه بود که پس از هوادهی وارد مجموعه پرورش بچه ماهیان می‌شد و شرایط فیزیکو - شیمیایی آن در جدول ۲ آمده است. در طول تحقیق آب تمام اکواریوم ها روزانه به‌میزان یک سوم از کف سیفون می‌شد و همان میزان آب تمیز که حاوی غلظت‌های عنوان شده از سولفات مس بود به آن‌ها اضافه می‌شد. برای غذادهی بچه ماهیان نیز از غذای بیومار (فرانسه) که شامل ۴۲/۳۲ درصد پروتئین، ۱۲/۵ درصد چربی، ۸ درصد خاکستر و ۳ درصد فیبر بود استفاده شد. در طول دوره‌ی آزمایش، غذادهی به بچه ماهیان بر اساس بیوماس ماهیان (۴ درصد) در سه نوبت انجام شد (NRC, 1993).

جدول ۲: پارامترهای فیزیکو- شیمیایی آب چاه ذخیره سازی شده در اکواریوم های پرورش بچه ماهیان کپور معمولی با و بدون پیش تیمار کربنات کلسیم در غلظت های مختلف سولفات مس به مدت ۶۰ روز

پارامتر	pH	اکسیژن (mg/ L)	سختی کل (mg/ L)	قلیائیت (mg/ L)	کلسیم (mg/ L)	منیزیم (mg/ L)	مس (mg/ L)
مقدار	۷/۵±۰/۳	۱۰/۱±۰/۱۹	۱۵۹/۰۰±۰/۱۸	۱۴۰/۰۲±۰/۶۱	۱۴۴	۱۱۵/۲	۰/۱۲

پس از پایان دوره ۶۰ روزه آزمایش، به منظور سنجش فاکتورهای خونی، از هر تکرار ۴ قطعه ماهی به صورت تصادفی صید و پس از بیهوشی با پودرگل میخک (۱ گرم در لیتر)، از ساقه دمی خون‌گیری شدند (Nikbakhsh & Bahrekazemi, 2017). نمونه‌های خون به لوله‌های هپارینه منتقل و در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند (Mckenzie & Williams, 2014). شمارش تعداد گلبول‌های قرمز و سفید با ۲۰۰ بار رقیق سازی خون با محلول نات و هریک و به روش

هموسیتومتر نئوبار انجام شد. درصد هماتوکریت با پر کردن لوله های میکروهماتوکریت به میزان دو سوم لوله از خون و سانتریفوژ کردن لوله به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۵۰۰ دور با روش میکروهماتوکریت (Rehulka, 2003) و میزان هموگلوبین با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۴۰ نانومتر به روش سیان‌مت هموگلوبین، تعیین شد (Blaxhall & Daisley, 1973). برای ارزیابی شاخص‌های حجم متوسط گلبول قرمز (MCV)، میزان متوسط هموگلوبین در گلبول قرمز (MCH)، و غلظت متوسط هموگلوبین در گلبول قرمز (MCHC) نیز از فرمول‌های زیر استفاده شد (جمال زاده و همکاران، ۱۳۸۱):

حجم متوسط گلبول قرمز (MCV) (فمتولیتر): (درصد هماتوکریت/ تعداد گلبول‌های قرمز) × ۱۰

میزان متوسط هموگلوبین در گلبول قرمز (MCH) (پیکوگرم): (میزان هموگلوبین/ تعداد گلبول‌های قرمز)× ۱۰

غلظت متوسط هموگلوبین در گلبول قرمز (MCHC) (درصد): (میزان هموگلوبین/ درصد هماتوکریت)× ۱۰۰

همچنین برای ارزیابی شاخص‌های رشد و تغذیه از فرمول‌های زیر استفاده شد (Abdel-Tawwab *et al*., 2007):

افزایش وزن بدن (گرم): وزن نهایی (گرم) – وزن اولیه (گرم)

شاخص وضعیت (درصد): وزن ماهی (گرم)/ طول کل ماهی(سانتی‌متر)^{۳}× ۱۰۰

میزان تلفات (درصد): تعداد ماهیان تلف شده/ تعدادکل ماهیان ×۱۰۰

ضریب تبدیل غذایی: غذای خورده شده (گرم)/ افزایش وزن ماهی (گرم)

برای انجام این تحقیق از طرح فاکتور- یل استفاده شد. در ابتدا نرمال بودن داده ها توسط آزمون کلموگروف- اسمیرنوف بررسی گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها از طریق آنالیز واریانس سه طرفه (Three way- ANOVA) و مقایسه‌ی میانگین بین تیمارها (به دلیل معنی‌دار شدن تفاوت‌ها در هر سه سطح) براساس آزمون چند دامنه بونفرونی انجام شد. در ادامه در مورد پارامترهایی که در هر سه سطح اختلاف معنی‌دار داشتند برای شفاف‌تر شدن اختلاف بین تیمارها ، مقایسه دما و غلظت‌های سولفات مس به تفکیک پیش تیمار یا عدم پیش تیمار با کربنات کلسیم، مقایسه دما و پیش تیمار یا عدم پیش تیمار با کربنات کلسیم به تفکیک غلظت‌های سولفات مس و مقایسه پیش تیمار یا عدم پیش تیمار با کربنات کلسیم و غلظت‌های سولفات مس به تفکیک دما از طریق آنالیز واریانس دو طرفه (Two way- ANOVA) انجام شد. وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد، با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ مورد بررسی قرار گرفت. داده‌ها بصورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شدند.

نتایج

تأثیر پیش تیمار با کربنات کلسیم و غلظت‌های متفاوت سولفات مس و دما بر پارامترهای رشد و تغذیه

بر اساس نتایج جدول ۳ در هر یک از دو گروه ماهیان (Ca- و Ca+) با افزایش غلظت سولفات مس در آب، میزان

افزایش وزن و شاخص وضعیت، کاهش معنی‌دار و درصد تلفات و ضریب تبدیل غذایی افزایش معنی‌دار یافت (P<۰/۰۵). همچنین در مقایسه دو گروه ماهیان با یکدیگر، افزایش میزان وزن‌گیری و شاخص وضعیت و کاهش درصد تلفات و ضریب تبدیل غذایی در ماهیان پیش تیمار شده با کلسیم در مقایسه با گروه دیگر مشاهده شد. در مقایسه‌ی دو دمای پرورش نیز مقادیر تمام شاخص‌های رشد و تغذیه در دمای ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد بهتر از دمای ۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد بود که به‌ویژه از نظر افزایش وزن و شاخص وضعیت اختلاف در تمام تیمارها معنی‌دار شد (P<۰/۰۵). نتایج جدول ۳ همچنین نشان داد که بر خلاف درصد تلفات، تأثیر معنی‌دار و اثر متقابل مثبت هر سه پارامتر پیش تیمار با کربنات کلسیم، درجه حرارت و غلظت سولفات مس در مورد افزایش وزن ماهیان، شاخص وضعیت و ضریب تبدیل غذایی مشاهده شد (P<۰/۰۵). در مورد سه شاخص عنوان شده در مقایسه دما و غلظت‌های سولفات مس به تفکیک پیش تیمار یا عدم پیش تیمار با کربنات کلسیم، مقایسه دما و پیش تیمار یا عدم پیش تیمار با کربنات کلسیم به تفکیک غلظت‌های سولفات مس و مقایسه پیش تیمار یا عدم پیش تیمار با کربنات کلسیم و غلظت‌های سولفات مس به تفکیک دما که از طریق آنالیز واریانس دو طرفه انجام شد نیز نتایج مشابهی به‌دست آمد (α=۰/۰۰۸). در واقع در بررسی اثرات متقابل متغیرها، اثر متقابل کلسیم× دما بر تمام شاخص‌ها به‌جز درصد تلفات، اثر متقابل کلسیم×سولفات مس بر تمام شاخص‌ها به‌جز شاخص وضعیت و اثر متقابل دما× سولفات مس بر تمام شاخص‌ها به‌جز ضریب تبدیل غذایی معنی‌دار بود (P<۰/۰۵) (جدول ۳).

تأثیر پیش تیمار با کربنات کلسیم و غلظت های متفاوت سولفات مس و دما بر پارامترهای خون شناسی

بر اساس نتایج جداول ۴ و ۵ در هر یک از دو گروه ماهیان (Ca- و Ca+) با افزایش غلظت سولفات مس و دما ، تعداد گلبول‌های قرمز و سفید و همینطور مقادیر هموگلوبین و هماتوکریت، کاهش و مقادیر MCV و MCH ، افزایش یافت. در مورد MCHC روند مشخصی مشاهده نشد اما در هر دو دمای پرورش تغییرات در ماهیان بدون پیش تیمار کربنات کلسیم معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵) (جدول ۵). همچنین تیمارهای پیش تیمار شده با کربنات کلسیم در مقایسه با گروه دیگر دارای تعداد بیشتر سلول‌های خونی و میزان هموگلوبین و هماتوکریت و میزان کمتر MCV، MCH و MCHC بودند. در مقایسه نتایج مربوط به دو دما نیز تعداد سلول‌های خونی و میزان هموگلوبین و هماتوکریت در دمای ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد بیشتر از دمای ۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد بود درحالیکه در مورد MCV و MCH نتایج عکس حاصل شد. در ماهیان پیش تیمار شده با کلسیم از نظر مقدار MCHC در مقایسه‌ی دو دما روند یکسانی مشاهده نشد اما در گروه دیگر MCHC در دمای ۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد بیشتر از دمای ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد بود. در مقایسه اختلاف دو دمای پرورش تنها مقدار هموگلوبین در تمام تیمارها تفاوت معنی‌دار نشان داد. نقطه مقابل آن، گلبول‌های سفید بودند که این معنی‌داری تنها در ماهیان پیش تیمار شده با کربنات کلسیم و غلظت ۱/۵ میلی‌گرم/ لیتر سولفات مس به‌دست آمد (P<۰/۰۵). نتایج جداول ۴ و ۵ نشان داد که تأثیر

معنی‌دار و اثر متقابل مثبت هر سه پارامتر پیش تیمار با کربنات کلسیم، درجه حرارت و غلظت سولفات مس تنها در مورد تعداد گلبول‌های سفید معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). در بررسی با سه آنالیز واریانس دو طرفه نیز نتایج نشان داد که اثر متقابل دما× سولفات مس بر تمام پارامترهای خونی به‌جز تعداد گلبول‌های سفید اثر معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵). در ارتباط با گلبول-های سفید تنها اثر متقابل کلسیم×سولفات مس معنی‌دار بود و دما اثر معنی‌داری بر تعداد گلبول‌های سفید خون نداشت. از بین سایر شاخص‌های خونی تنها در مورد مقدار هموگلوبین، اثرات متقابل کلسیم× دما، کلسیم×سولفات مس و دما× سولفات مس معنی‌دار بود (P<۰/۰۵) (جدول ۴، ۵).

جدول ۳: پارامترهای رشد و تغذیه اندازه‌گیری شده در بچه ماهیان کپور معمولی با و بدون پیش تیمار با کربنات کلسیم پرورش یافته در غلظت‌های مختلف سولفات مس در دو دمای ۲۲ و ۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۶۰ روز

سولفات مس (میلی‌گرم/ لیتر)	پیش تیمار کلسیم	افزایش وزن (گرم)		شاخص وضعیت (درصد)		تلفات (درصد)		ضریب تبدیل غذایی	
	دما	۲۲ °C	۲۷ °C	۲۲ °C	۲۷ °C	۲۲ °C	۲۷ °C	۲۲ °C	۲۷ °C
۰	-	۹/۴۴±۰/۱۴۶ aA	۶/۷۳±۰/۲۳۱aB	۱/۷۶±۰/۰۳۰ aA	۱/۴۱±۰/۰۰۶ aB	۰/۰۰±۰/۰۰ aA	۰/۰۰±۰/۰۰ aA	۲/۶۱±۰/۰۳۶ aA	۳/۲۷±۰/۱۱۵ aB
۱/۵	-	۵/۶۷±۰/۰۷۸ bA	۳/۳۵±۰/۲۲۲bB	۱/۳۱±۰/۰۵۷ bA	۱/۱۹±۰/۰۵۳ bB	۴/۴۴±۱/۸۴ bA	۱۷/۷۸±۳/۵۳ bB	۳/۵۳±۰/۰۴۷ bA	۳/۹۸±۰/۲۵۴ bA
۳	-	۱/۸۳±۰/۱۹۷ cA	۰/۹۱±۰/۰۰۰cB	۱/۱۸±۰/۰۳۰ cA	۱/۰۰±۰/۰۲۱ cB	۲۲/۲۲±۳/۸۴ cA	۳۳/۳۳±۶/۶۶ cB	۵/۴۹±۰/۵۶۲ cA	۷/۳۵±۰/۰۴۰ cB
۰	+	۱۱/۵۶±۰/۱۴۶ dA	۸/۵۰±۰/۲۱۰ dB	۱/۸۷±۰/۰۳۲ dA	۱/۴۶±۰/۰۵۶ aB	۰/۰۰±۰/۰۰ aA	۰/۰۰±۰/۰۰ aA	۲/۳۰±۰/۰۳۰ aA	۳/۱۳±۰/۰۸۱ aB
۱/۵	+	۸/۴۷±۰/۱۵۳ eA	۵/۸۷±۰/۰۹۵ eB	۱/۴۲±۰/ ۰۲۳eA	۱/۲۲±۰/۰۱۰ bB	۰/۰۰±۰/۰۰ aA	۱۵/۵۵±۳/۸۵ bB	۲/۷۵±۰/۰۵۱ aA	۳/۴۰±۰/۰۵۶ aB
۳	+	۳/۷۳±۰/۰۷۵ fA	۲/۷۵±۰/۱۳۰ fB	۱/۳۹±۰/ ۰۱۵eA	۱/۱۸±۰/۰۳۰ bB	۱۳/۳۳±۰/۰۰ dA	۲۲/۲۲±۳/۸۰ dB	۴/۱۱±۰/۰۸۱ dA	۴/۸۶±۰/۲۳۰ dB
Three- way ANOVA	P- value								
	کلسیم	۰/۰۰۱		۰/۰۰۱		۰/۰۲۱		۰/۰۰۱	
	دما	۰/۰۰۱		۰/۰۰۱		۰/۰۰۱		۰/۰۰۱	
	سولفات مس	۰/۰۰۱		۰/۰۰۱		۰/۰۰۱		۰/۰۰۱	
	کلسیم× دما	۰/۰۰۱		۰/۰۱۷		۰/۰۹۰		۰/۰۰۱	
	کلسیم×سولفات مس	۰/۰۰۱		۰/۲۷۴		۰/۰۰۱		۰/۰۰۱	
	دما× سولفات مس	۰/۰۰۱		۰/۰۰۱		۰/۰۰۱		۰/۴۰۶	
	کلسیم× سولفات مس× دما	۰/۰۰۱		۰/۰۰۹		۰/۱۵۸		۰/۰۰۱	

داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده‌اند. در هر ستون حروف کوچک متفاوت، تفاوت معنی‌دار را در غلظت‌های متفاوت سولفات مس در گروه پیش تیمار با کربنات کلسیم (+) و بدون پیش تیمار با کربنات کلسیم (-) با یکدیگر نشان می‌دهد. در حالی که حروف بزرگ متفاوت در ردیف‌ها ، تفاوت معنی‌دار بین دو دمای ۲۲ و۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد را در مورد هر پارامتر در تیمارهای مختلف آن نشان می‌دهد ($P<۰/۰۵$). اثر متقابل سه‌گانه با آزمون بونفرونی نیز بررسی شد و تغییرات خاصی ایجاد نشد ($\alpha=۰/۰۰۸$). در مورد شاخص‌هایی که اثر متقابل سه‌گانه آن‌ها معنی‌دار شد برای شفاف‌تر شدن اختلاف‌ها در مقایسه دما و غلظت‌های سولفات مس به تفکیک پیش تیمار یا عدم پیش تیمار با کربنات کلسیم، مقایسه دما و پیش تیمار یا عدم پیش تیمار با کربنات کلسیم به تفکیک غلظت‌های سولفات مس و مقایسه پیش تیمار یا عدم پیش تیمار با کربنات کلسیم و غلظت‌های سولفات مس به تفکیک دما از آنالیز واریانس دو طرفه نیز استفاده شد و اصلاحات آن در جدول اعمال شد.

جدول ۴: پارامترهای خون شناسی در بچه ماهیان کپور معمولی با و بدون پیش تیمار با کربنات کلسیم پرورش یافته در غلظت‌های مختلف سولفات مس در دو دمای ۲۲ و ۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۶۰ روز

سولفات مس (میلی‌گرم /لیتر)	پیش تیمار کلسیم	گلبول قرمز (تعداد ×۱۰^{۶}/ میلی‌متر مکعب)		گلبول سفید (تعداد/ میلی‌متر مکعب)		هماتوکریت (درصد)		هموگلوبین (گرم/ دسی‌لیتر)	
	دما	۲۲°C	۲۷°C	۲۲°C	۲۷°C	۲۲°C	۲۷°C	۲۲°C	۲۷°C
۰	-	۲/۳۵±۰/۱۰۵ ^{aA}	۱/۸۶±۰/۱۲۵ ^{bB}	۶۶۵۳/۳۳±۸۰۸/۲۹ ^{aA}	۶۰۲۰/۰۰±۱۰۰۰/۰۰ ^{acA}	۴۹/۰۰±۷/۰۰ ^{aA}	۴۲/۶۷±۱/۵۲۷ ^{aA}	۹/۳۹±۰/۷۰۳ ^{aA}	۵/۸۵±۰/۱۵۳ ^{aB}
۱/۵	-	۱/۶۸±۰/۰۳۰ ^{bA}	۱/۴۷±۰/۰۹۳ ^{cB}	۶۰۲۰/۰۰±۶۰۰/۰۰ ^{abA}	۵۰۲۰/۰۰±۶۰۰/۰۰ ^{aceA}	۳۹/۶۷±۵/۰۳۳ ^{bA}	۳۹/۶۷±۰/۱۱۰ ^{cA}	۸/۸۸±۰/۰۷۹ ^{abA}	۵/۸۳±۰/۱۱۳ ^{aB}
۳	-	۱/۳۷±۰/۰۷۶ ^{cA}	۱/۳۶±۰/۰۴۰ ^{cA}	۳۸۲۰/۰۰±۴۰۰/۰۰ ^{cA}	۳۵۷۳/۳۳±۷۰۶/۰۷ ^{eA}	۳۵/۱۳±۰/۴۱۶ ^{bA}	۳۲/۲۷±۰/۵۷۷ ^{dB}	۸/۴۰۰±۰/۲۸۵ ^{bA}	۴/۸۸±۰/۲۰۸ ^{bB}
۰	+	۲/۶۹±۰/۲۸۶ ^{aA}	۲/۱۴±۰/۰۷۸ ^{aB}	۷۲۲۰/۰۰±۲۰۰/۰۰ ^{aA}	۶۸۲۰/۰۰±۶۹۲/۰۰ ^{bcdA}	۶۳/۰۷±۴/۰۸۶ ^{cA}	۴۳/۸۷±۱/۱۷۲ ^{aB}	۱۱/۴۲±۰/۸۲۶ ^{cA}	۸/۸۹±۰/۵۰۶ ^{cB}
۱/۵	+	۱/۸۳±۰/۱۳۵ ^{bA}	۱/۷۸±۰/۰۸۹ ^{bA}	۶۶۲۰/۰۰±۴۰۰/۰۰ ^{aA}	۵۵۹۶/۶۷±۴۰۲/۰۳ ^{cdB}	۴۱/۸۰±۴/۵۰۸ ^{abA}	۴۰/۰۰±۰/۰۰۲ ^{bA}	۹/۳۶±۰/۰۱۵ ^{aA}	۶/۴۸±۰/۴۶۰ ^{dB}
۳	+	۱/۴۳±۰/۰۲۵ ^{cA}	۱/۴۰±۰/۱۶۵ ^{cA}	۴۸۲۰/۰۰±۱۰۰۰/ ۰۰ ^{bA}	۳۸۲۰/۰۰±۴۰۰/۰۰ ^{eA}	۳۶/۸۷±۰/۸۰۸ ^{bA}	۳۳/۵۳±۰/۴۶۲ ^{dB}	۸/۷۰±۰/۲۳۰ ^{abA}	۵/۱۵±۰/۰۹۴ ^{bB}
Three- way ANOVA	P- value								
	کلسیم	۰/۰۰۱		۰/۷۲۳		۰/۰۰۱		۰/۰۰۱	
	دما	۰/۰۰۱		۰/۴۵۳		۰/۰۴۱		۰/۰۰۱	
	سولفات مس	۰/۰۰۱		۰/۰۲۹		۰/۰۰۱		۰/۰۰۱	
	کلسیم× دما	۰/۰۳۸		۰/۸۷۸		۰/۱۸۰		۰/۰۰۱	
	کلسیم× سولفات مس	۰/۴۵۶		۰/۰۰۲		۰/۰۰۱		۰/۰۱۷	
	دما× سولفات مس	۰/۰۰۱		۰/۱۷۲		۰/۰۰۱		۰/۰۰۱	
	کلسیم× سولفات مس× دما	۰/۰۰۱		۰/۱۷۹		۰/۰۰۱		۰/۰۰۱	

داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده‌اند. در هر ستون حروف کوچک متفاوت، تفاوت معنی‌دار را در غلظت‌های متفاوت سولفات مس در گروه پیش تیمار با کربنات کلسیم (+) و بدون پیش تیمار با کربنات کلسیم (-) با یکدیگر نشان می‌دهد. در حالی که حروف بزرگ متفاوت در ردیف‌ها ، تفاوت معنی‌دار بین دو دمای ۲۲ و۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد را در مورد هر پارامتر در تیمارهای مختلف آن نشان می‌دهد ($P<۰/۰۵$). اثر متقابل سه‌گانه با آزمون بونفرونی نیز بررسی شد و تغییرات خاصی ایجاد نشد ($\alpha=۰/۰۰۸$). در مورد شاخص‌هایی که اثر متقابل سه‌گانه آن‌ها معنی‌دار شد برای شفاف‌تر شدن اختلاف‌ها در مقایسه دما و غلظت‌های سولفات مس به تفکیک پیش تیمار یا عدم پیش تیمار با کربنات کلسیم، مقایسه دما و پیش تیمار یا عدم پیش تیمار با کربنات کلسیم به تفکیک غلظت‌های سولفات مس و مقایسه پیش تیمار یا عدم پیش تیمار با کربنات کلسیم و غلظت‌های سولفات مس به تفکیک دما از آنالیز واریانس دو طرفه نیز استفاده شد و اصلاحات آن در جدول اعمال شد.

جدول ۵: پارامترهای خون شناسی مرتبط با گلبول‌های قرمز در بچه ماهیان کپور معمولی با و بدون پیش تیمار با کربنات کلسیم پرورش یافته در غلظت‌های مختلف سولفات مس در دو دمای ۲۲ و ۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۶۰ روز

سولفات مس (میلی‌گرم / لیتر)	پیش تیمار کلسیم	MCV (×10^{-6} فمتولیتر)		MCH (×10^{-6} پیکوگرم)		MCHC (درصد)	
	دما	۲۲°C	۲۷°C	۲۲°C	۲۷°C	۲۲°C	۲۷°C
۰	–	۱/۹۳±۰/۱۱ ^{aA}	۲/۵۳±۰/۱۵ ^{abB}	۰/۴۹±۰/۰۱۵ ^{dA}	۰/۵۷±۰/۰۳۰ ^{cB}	۲۲/۷۸±۴/۳۹۶ ^{cA}	۲۹/۰۶±۲/۵۳۲ ^{cB}
۱/۵	–	۲/۱۷±۰/۱۵ ^{aA}	۲/۹۰±۰/۳۸ ^{bA}	۰/۶۲±۰/۰۰۶ ^{eA}	۰/۶۵±۰/۰۴۰ ^{cA}	۲۲/۱۹±۰/۲۰۰ ^{cA}	۲۳/۸۵±۲/۹۶ ^{cbA}
۳	–	۲/۸۳±۰/۳۵ ^{bA}	۲/۹۳±۰/۲۳ ^{bA}	۰/۶۶±۰/۰۸۱ ^{fA}	۰/۶۷±۰/ ۰۵۰ ^{cA}	۲۲/۷۹±۱/۱۱۵ ^{cA}	۲۵/۴۴±۱/۲۴۰ ^{cA}
۰	+	۱/۸۰±۰/۳۰ ^{aA}	۱/۹۷±۰/۰۶ ^{aA}	۰/۱۸±۰/۰۳۵ ^{aA}	۰/۳۵±۰/۰۱۱ ^{aB}	۹/۳۰±۰/۷۸۸ ^{aA}	۲۰/۲۶±۰/۷۳۰ ^{bB}
۱/۵	+	۱/۹۷±۰/۱۵ ^{aA}	۲/۳۷±۰/۰۶ ^{abB}	۰/۲۵±۰/۰۱۱ ^{bA}	۰/۳۸±۰/۰۰۶ ^{aB}	۱۷/۳۸±۰/۳۲۹ ^{bcA}	۱۵/۱۸±۰/۸۵۲ ^{bA}
۳	+	۲/۳۳±۰/۱۵ ^{aA}	۲/۶۷±۰/۱۱ ^{bA}	۰/۳۰±۰/۰۳۰ ^{cA}	۰/۴۷±۰/۰۴۵ ^{bB}	۱۵/۹۵±۰/۰۶۰ ^{bA}	۱۰/۴۲±۰/۷۹۵ ^{aA}
	P- value						
Three- way ANOVA	کلسیم	۰/۰۰۱		۰/۰۰۱		۰/۰۰۱	
	دما	۰/۰۰۱		۰/۰۰۱		۰/۰۶۱	
	سولفات مس	۰/۰۰۱		۰/۰۰۱		۰/۰۹۳	
	کلسیم× دما	۰/۱۹۳		۰/۰۰۸		۰/۰۵۵	
	کلسیم× سولفات مس	۰/۰۰۱		۰/۱۳۹		۰/۰۱۱	
	دما× سولفات مس	۰/۰۰۸		۰/۰۰۱		۰/۰۰۱	
	کلسیم× سولفات مس× دما	۰/۰۰۱		۰/۰۰۱		۰/۰۰۱	

داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده‌اند. در هر ستون حروف کوچک متفاوت، تفاوت معنی‌دار را در غلظت‌های متفاوت سولفات مس در گروه پیش تیمار با کربنات کلسیم (+) و بدون پیش تیمار با کربنات کلسیم (–) با یکدیگر نشان می‌دهد. در حالی که حروف بزرگ متفاوت در ردیف‌ها ، تفاوت معنی‌دار بین دو دمای ۲۲ و۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد را در مورد هر پارامتر در تیمارهای مختلف آن نشان می دهد ($P<۰/۰۵$). اثر متقابل سه‌گانه با آزمون بونفرونی نیز بررسی شد و تغییرات خاصی ایجاد نشد ($\alpha=۰/۰۰۸$). در مورد شاخص‌هایی که اثر متقابل سه‌گانه آن‌ها معنی‌دار شد برای شفاف‌تر شدن اختلاف‌ها در مقایسه دما و غلظت‌های سولفات مس به تفکیک پیش تیمار یا عدم پیش تیمار با کربنات کلسیم، مقایسه دما و پیش تیمار یا عدم پیش تیمار با کربنات کلسیم به تفکیک غلظت‌های سولفات مس و مقایسه پیش تیمار یا عدم پیش تیمار با کربنات کلسیم و غلظت‌های سولفات مس به تفکیک دما از آنالیز واریانس دو طرفه نیز استفاده شد و اصلاحات آن در جدول اعمال شد.

بحث و نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج این تحقیق افزایش غلظت مس و درجه حرارت آب تأثیر منفی بر بازده رشد و تغذیه در کپور ماهیان داشت. فلز مس بر حس بویایی ماهیان تأثیر می‌گذارد و باعث تغییر اشتهای ماهی می‌شود که ممکن است باعث کمبود مواد غذایی در ماهی و تضعیف رشد شود (Abdel-Tawwab *et al.*, 2007)؛ همچنین به‌دلیل ایجاد شرایط استرس‌زا نیاز به اکسیژن را بیشتر کرده و مصرف انرژی را افزایش می‌دهد (Khan *et al.*, 2006). افزایش دما نیز علاوه بر کاهش اکسیژن محلول در آب، موجب بروز پاسخ‌های استرسی ناشی از کمبود اکسیژن در ماهی می‌شود که مهمترین پیامد آن افزایش میزان متابولیسم یا انرژی مصرفی است. همراه شدن این افزایش دما با یک عامل استرس‌زای دیگر مانند آلودگی فلزات سنگین باعث افزایش چند برابری مصرف انرژی در ماهی می‌شود که تأثیر منفی بر بازده رشد خواهد داشت. مجموع این عوامل موجب افزایش ضریب تبدیل غذایی می‌شوند و بازده تغذیه را نیز کاهش می‌دهند. لازم به‌ذکر است که در تیمارهای دریافت کننده کلسیم در هر دو درجه حرارت، بازده رشد و تغذیه بهتر از تیمارهایی بود که پیش تیمار با کلسیم را دریافت نکردند. اثر متقابل مثبت کلسیم× سولفات مس× دما بر افزایش وزن و ضریب تبدیل غذایی نیز موید این مطلب است.

یون کلسیم از طریق اتصال به آبشش نفوذپذیری آن را کنترل می‌کند و هم‌زمان با یون‌های مس در اتصال به آبشش رقابت می‌کند (Pagenkopf, 1983; Playle *et al*., 1993). نتایج این تحقیق مشابه نتایج فرهادی و همکاران (۱۳۹۳) است که تأثیر مثبت پیش تیمار با اکسید کلسیم در کاهش سمیت مس و افزایش بازده رشد در کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) را گزارش کردند. در گونه‌ی *Phoxinus phoxinus* (Linnaeus, 1758) پیش تیمار با کلسیم موجب کاهش میزان جذب کادمیوم شد (Wicklund & Runn, 1988). همچنین در گونه‌ی کپور معمولی که در معرض ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهک قرار داشتند، LC50 کادمیوم از ۱۶۵ به ۲۳۵ میلی‌گرم در لیتر افزایش یافت (Dutta & Kaviraj, 1996). بر اساس گزارش موجود افزایش ۵۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کلسیم می‌تواند سمیت حاد مس را درلارو تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) کاهش دهد (Abdel-Tawwab & Mousa, 2005). در تحقیق دیگری که به بررسی نقش سختی آب ناشی از کلسیم بر میزان سمیت حاد فلزات روی و مس در گونه‌ی *Gambusia holbrooki* (Girard, 1859) پرداخت، میزان سمیت این دو فلز با کاهش سختی آب افزایش یافت (Pourkhabbaz *et al*., 2011). نتایج مشابهی در ارتباط با نقش حفاظتی کربنات کلسیم در برابر سمیت آرسینیک در گربه ماهی نیل (*Clarias gariepinus* Burchell, 1822) گزارش شده است (Abdel- Hameid, 2009). تأثیر منفی افزایش دمای پرورش در سایر آبزیان پرورشی نیز گزارش شده است. در خرچنگ دراز آب شیرین (*Orconectes immunis*) افزایش ۳-۴ درجه‌ی سانتی‌گراد دما میزان سمیت مس را ۷ درصد و میزان مصرف اکسیژن را ۳۴ درصد افزایش داد. در همین تحقیق افزایش ۷ درجه‌ای دما (از ۲۰ به ۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد) میزان مصرف اکسیژن را ۵۴ درصد افزایش داد (Khan *et al*., 2006).

در مطالعه حاضر درصد تلفات با افزایش غلظت مس و همینطور افزایش دمای پرورش افزایش یافت اما پیش تیمار با کلسیم درصد تلفات را کاهش داد و موجب بازماندگی کامل در تیمار ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر سولفات مس و دمای ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد شد. البته معنی‌دار نشدن اثر متقابل کلسیم× سولفات مس× دما و کلسیم× دما بر درصد تلفات عمدتا به‌دلیل بازماندگی ۱۰۰ درصد در دو گروه شاهد بود که نشان داد در صورت عدم آلودگی با سولفات مس، بچه ماهیان قادر به بقاء در دماهای بالاتر هستند هر چند میزان رشد آنها کاهش می‌یابد، اما هم‌زمان شدن افزایش دمای پرورش با آلودگی سولفات مس میزان بقاء را کاهش می‌دهد. نتایج این تحقیق مشابه نتایج بدست آمده در گونه‌ی *Synechogobius hasta* است که درصد بازماندگی آن در غلظت‌های مساوی از کلسیم، با افزایش میزان کادمیوم آب کاهش و با افزایش میزان کلسیم آب افزایش یافت (Song *et al*., 2013). همچنین در گونه‌ی *Fundulus heteroclitus* *میزان سمیت کادمیوم با افزایش غلظت کربنات کلسیم تا ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر کاهش یافت و تماس اولیه با کلسیم طول مدت زنده‌مانی در آب حاوی کادمیوم را افزایش داد (*Gill & Epple, 1992*)*. در گونه‌ی *Prochilodus scrofa* (*Agassiz, 1829*)* درصد تلفات در اثر تماس با سولفات مس در۴/۵ =pH با افزایش دما از ۲۰

به ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد افزایش یافت. در حالی که در pH=۸ میزان تلفات در دو دما تفاوت معنی‌دار نداشت. این امر بیان کننده تأثیر سایر پارامترهای کیفی آب در میزان سمیت سولفات مس است(Carvalho & Fernandes, 2006; *Witeska, 2003*).

در این تحقیق با افزایش غلظت سولفات مس و دمای پرورش، تعداد گلبول‌های قرمز و به دنبال آن میزان هماتوکریت و هموگلوبین کاهش و مقدار MCH وMCV افزایش یافت. کاهش گلبول‌های قرمز و به‌دنبال آن میزان هموگلوبین یکی از شاخص‌های بارز کم‌خونی در ماهیان است. همچنین افزایش مقدار MCH وMCV می‌تواند نشان‌دهنده بروز اختلال در عملکرد طحال، کبد، مسمومیت و کم‌خونی باشد (Munker *et al*., 2007). لازم به ذکر است که در هر دو دمای پرورش در تیمارهای دریافت کننده پیش تیمار کلسیم تا حدودی کم‌خونی ماهیان بهبود یافت که البته بیشتر در تیمار ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر سولفات مس و دمای ۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد مشهود بود. اثر متقابل مثبت کلسیم× سولفات مس× دما بر شاخص‌های عنوان شده نیز موید این مطلب است. نتایجی مشابه این تحقیق در کپور معمولی در ارتباط با کاهش گلبول‌های قرمز و هموگلوبین و افزایش مقدار MCH وMCV با افزایش میزان نانو ذرات اکسید مس تا غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر به مدت ۱۴ روز گزارش شده است (احمدی و همکاران،۱۳۹۵). در گونه‌ی *Heteropeneustes fossilis* (Bloch, 1794) نیز غلظت تحت کشنده سولفات مس موجب کم‌خونی در ماهیان گشت (James & Sampath, 1995). کم‌خونی می‌تواند به‌دلیل تجمع گلبول‌های قرمز در آبشش و یا در اثر تخریب گلبول‌های قرمز خون و یا به‌دلیل ممانعت از ساخته شدن آن ها توسط فلزات سنگین حاصل شود (خبازی و همکاران، ۱۳۹۴). به هر حال برخی نتایج عکس نیز گزارش شده است؛ به‌عنوان مثال در گونه‌ی *Prochildus scrofa* تماس با مس موجب افزایش تعداد گلبول‌های قرمز و میزان هموگلوبین و هماتوکریت شد (Carvalho & Fernandes, 2006). دلیل این امر تخلیه گلبول‌های قرمز از اندام‌های ذخیره‌کننده آن مانند طحال عنوان شده است زیرا حجم متوسط سلول‌ها بدون تغییر ماند. بر اساس گزارش‌های موجود مسمومیت با فلزات سنگین در مقادیر کم (سولفات مس در حد میکروگرم در لیتر) و یا در زمان کم، در راستای اثرات آدرنرژیک (Adrenergic effects) در پاسخ به استرس، سبب تحریک طحال و آزاد سازی گلبول‌های قرمز جوان در جریان خون برای افزایش اکسیژن رسانی به بافت‌ها می‌شود (خبازی و همکاران، ۱۳۹۴). در صورتی‌که زمان تماس و یا غلظت فلزات سنگین در آب افزایش یابد، افزایش گلبول‌های قرمز متوقف می‌شود و ماهیان دچار کم‌خونی می‌گردند (Val *et al*., 2004). همچنین در کپور معمولی افزایش ۱۲ درجه‌ی سانتی‌گراد درجه حرارت (از ۲۴ به ۳۶ درجه‌ی سانتی‌گراد) به‌مدت ۳۰ روز موجب افزایش تعداد گلبول‌های قرمز شد که دلیل تفاوت آن با نتایج این تحقیق مقادیر کمتر افزایش دما و طول بیشتر مدت تحقیق است (Ahmad *et al*., 2011).

تأثیر مثبت پیش‌تیمار با کلسیم بر شاخص‌های خونی در این تحقیق مشابه گونه تیلاپیای نیل بود که سلول‌های خونی در تیمارهای دریافت‌کننده پیش تیمار کلسیم افزایش یافتند (Abdel-Tawwab *et al*., 2007). یادگار و همکاران (۱۳۹۰) در تحقیق خود در باره‌ی ماهی بنی (Günther, 1874) *Barbus sharpeyi* که در معرض غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم

در لیتر سولفات مس قرار داده شدند، روند کاهشی در تعداد گلبول‌های قرمز و سفید و مقدار هموگلوبین و هماتوکریت را گزارش کردند. کاهش چشمگیر در تعداد سلول‌های خونی و کم‌خونی حاصل از آن در اثر تماس با فلز روی نیز در گونه‌ی *Heteropeustes fossilis* گزارش شده است (Goel *et al*., 1985). تأثیر منفی افزایش دما بر میزان شاخص‌های خونی در تحقیق حاضر مشابه تأثیر درجه حرارت بر میزان سمیت مس و شاخص‌های خونی در گونه‌ی *Prochidodu scrofa* در دو pH اسیدی و قلیایی بود که نشان داد با افزایش ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد دمای آب از ۲۰ به ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، در هر دو محیط اسیدی و قلیایی تعداد گلبول‌های قرمز و مقادیر هموگلوبین و هماتوکریت کاهش یافت (Carvalho & Fernandes, 2006).

در تحقیق حاضر نتایج مربوط به گلبول‌های سفید قدری متفاوت از سایر شاخص‌ها بود. اگرچه تعداد گلبول‌های سفید با افزایش غلظت سولفات مس و دما در هر دو گروه از ماهیان روند کاهشی نشان داد اما این تفاوت در بسیاری از تیمارها معنی‌دار نبود و تنها غلظت سولفات مس و اثر متقابل کلسیم× سولفات مس بر تعداد گلبول‌های سفید محسوس بود. بر اساس نتایج، افزایش دمای آب تا ۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد بر تعداد گلبول‌های سفید تأثیر چشمگیری نداشت و مثبت نبودن اثر متقابل کلسیم× دما، سولفات مس× دما و کلسیم× سولفات مس× دما موید این مطلب است؛ بر خلاف نتایج این تحقیق در مطالعه Ahmad و همکاران (۲۰۱۱) افزایش ۱۲ درجه‌ی سانتی‌گراد دما به‌مدت یک ماه موجب افزایش تعداد گلبول‌های سفید شد که می‌تواند به دلیل نیاز به آنتی‌بادی بیشتر برای کمک به زنده‌مانی ماهیان باشد؛ نتیجه‌ای که در تحقیق حاضر حاصل نشد و موجب تلفات معنی‌دار بچه‌ماهیان در دمای ۲۷ نسبت به دمای ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد شد. براساس گزارش‌های موجود افزایش تعداد گلبول‌های سفید معمولا در ساعات و یا روزهای اولیه پس از مواجهه‌ی ماهیان با عوامل استرس‌زا اتفاق می‌افتد که ماهی تلاش می‌کند سیستم ایمنی بدن را تقویت کند و با شرایط سازگار شود (Mazon *et al*., 2002). نتیجه‌ای که در کپور معمولی تا ۱۴ روز پس از تماس با غلظت نیمه مزمن اکسید مس نیز گزارش شده است (احمدی و همکاران، ۱۳۹۵). در صورت طولانی شدن زمان مواجهه با عامل استرس‌زا مانند آلودگی فلزات سنگین و یا افزایش درجه حرارت، تعداد گلبول‌های سفید کاهش می‌یابد که می‌تواند ناشی از تخریب در عملکرد اندام‌های تولیدکننده آن‌ها مانند کلیه و طحال و لکوسیتوپنی (Leukocytopenia) یا کاهش تعداد لکوسیت‌ها باشد (Ellis, 1981). البته نتایج تحقیق حاضر مشابه گزارش‌های موجود در گونه‌ی تیلاپیای نیل (Abdel-Tawwab *et al*., 2007) و ماهی بنی (یادگار و همکاران، ۱۳۹۰) بود که کاهش تعداد گلبول‌های سفید با افزایش میزان سولفات مس را گزارش کردند.

نتیجه‌گیری کلی

در نتیجه، استفاده از سولفات مس به‌عنوان جلبک‌کش در مزارع پرورش کپور معمولی به‌ویژه در زمان افزایش دمای آب می‌تواند بر بازده رشد و تغذیه و بازماندگی ماهیان تأثیرگذار باشد، به‌گونه‌ای که غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر سولفات مس و

دمای ۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد بیشترین تأثیر منفی را بر شاخص‌های عنوان شده داشت. پیش تیمار با کربنات کلسیم می‌تواند در رقابت با مس تا حد قابل توجهی اثر منفی سولفات مس را تعدیل نماید که به‌ویژه بر زنده‌مانی بچه‌ماهیان در تیمار ۱/۵ گرم در لیتر سولفات مس و دمای ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد موثر بوده است. همچنین تأثیر سه متغیر پیش تیمار/ عدم پیش تیمار با کربنات کلسیم، سولفات مس و دما بر شاخص‌های رشد و تغذیه و بازماندگی بسیار مشهودتر از پارامترهای خونی بود. در مورد شاخص‌های خونی به دلیل پیچیدگی‌های تأثیر فیزیولوژیک سه متغیر فوق تفاوت بین برخی تیمارها معنی‌دار نشد. اما در یک نتیجه‌گیری کلی افزایش میزان سولفات مس باعث بروز کم‌خونی و کاهش ایمنی ماهیان گشت و تأثیر پیش‌تیمار با کربنات کلسیم به‌ویژه در غلظت ۱/۵ میلی‌گرم/ لیتر سولفات مس در دمای ۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد موثرتر بود. با توجه به تأثیر بیشتر کلسیم به‌عنوان یکی از اجزای سختی آب در مقایسه با منیزیم، پیش تیمار ۷ روزه ماهیان با ۲۰۰ میلی‌گرم/ لیترکربنات کلسیم به‌ویژه تا غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر سولفات مس حتی در شرایط افزایش دما توصیه می‌شود. پیشنهاد می‌شود تأثیر افزایش غلظت کربنات کلسیم و یا مدت پیش تیمار در تعدیل اثرات منفی سولفات مس در غلظت‌های بیشتر از ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر بررسی شود.

سپاسگزاری

بدین وسیله از پرسنل مرکز تحقیقات ماهیان زینتی جهاد دانشگاهی واحد مازندران بویژه آقای مهندس نیک بخش تقدیر و تشکر می شود.

منابع

احمدی، ح.، سادات نعیمی، ا.، نظر حقیقی، ف.، غفوری، ح. (۱۳۹۵) اثرات نیمه مزمن نانو ذره اکسید مس بر برخی پارامترهای خونی و بافت آبشش بچه‌ماهی کپور معمولی. نشریه توسعه آبزی‌پروری، ۱۰(۴): ۱-۱۴.

جمال زاده، ح.ر.، کیوان، ا.، جمیلی، ش.، عریان، ش.، سعیدی، ع.ا. (۱۳۸۱) بررسی برخی فاکتورهای خونی آزاد ماهی دریای خزر. مجله علمی شیلات ایران، ۱۱(۱): ۲۵-۳۴.

خبازی، م.، هرسیج، م.، هدایتی، ع.ا.، گرامی، م.ح.، جعفری، ح. (۱۳۹۴) تأثیر غلظت تحت کشنده فلز مس بر پارامترهای خون‌شناسی در قزل آلای رنگین کمان. مجله بوم شناسی آبزیان، ۴(۴): ۱-۷.

فرهادی، م.ت.، بحرکاظمی، م.، یوسفیان، م. (۱۳۹۳) تأثیر کلسیم به‌عنوان عامل محافظت کننده در برابر سمیت مس محیط در بچه ماهی کپور معمولی. فن آوریهای های نوین در توسعه آبزی‌پروری، ۸(۱): ۷-۱۸.

یادگار، ن.، جواهری بابلی، م.، ستاری، ب.، سلاطی، ا.پ. (۱۳۹۰) تأثیر سولفات مس و فرمالین بر پارامترهای خون شناسی در ماهی بنی. مجله تحقیقات آزمایشگاهی دامپزشکی، ۳(۲): ۱۰۹-۱۱۶.

Abdel-Hameid, N.H. (2009) A protective effect of calcium carbonate against arsenic toxicity of the Nile catfish, Clarias gariepinus. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 9 (2): 191-200.

Abdel-Tawwab, M. and Mousa, M.A.A. (2005) Effect of calcium pre-exposure in acute copper toxicity to juvenile Nile tilapia, Oreochromis niloticus (L.). Zagazig Veterinary Journal, 33 (1):80-87.

Abdel-Tawwab, M., Mamdouh, A.A., Mohamad, H. and Saleh, F.M. (2007) The use of calcium pre-exposure as a protective agent against environmental copper toxicity for juvenile Nile tilapia, Oreochromis niloticus (L.). Aquaculture, 264 (1-4):236- 246.

Ahmad, S.M., Shah, F.A., Bhat, F.A., Bhat, J.I.A. and Balkhi, M.H. (2011) Thermal adaptability and disease association in common carp *Cyprinus carpio communis* acclimated to different (four) temperatures. Journal of Thermal Biology, 36 (8):492–497.

Bat, L., Akbulut, M., Oulha, M., Gundogdu, A. and Satilmis, H.H. (2000) Effect of Temperature on the Toxicity of Zinc, Copper and lead to the fresh water Amphipod Gammarus pulex pulex. Turkish Journal of Zoology, 24 (2000): 409-415.

Blaxhall, P.C. and Daisley, K.W. (1973) Routine hematological methods for use with fish blood. Journal of Fish Biology, 5 (6): 771-782.

Boyd, C.E. (1990) Water quality in ponds for Aquaculture. Birmingham Publishing. Birmingham. 482 Pp. Alabama. USA.

Carvalho, C.S. and Fernandes, M.N. (2006) Effect of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish Prochilodus scrofa at low and high pH. Aquaculture, 251 (1): 109-117.

Carvalho, C.S., Araujo, H.S.S. and Fernandes, M.N. (2004) Hepatic metallothionein in a teleost (Prochilodus scrofa) exposed to copper at pH 4.5 and pH 8.0. Comparative Biochemistry and Physiology, 137 (2004): 225-235.

Chen, Q.L., Luo, Z., Zheng, L., Li, X.D., Liu, X.Y., Zhao, H. and Gong, Y. (2012) Protective effects of calcium on copper toxicity in Pelteobagrus fulvidraco: Copper accumulation, enzymatic activities, histology. Ecotoxicology and Environmental Safety, 76 (2):126-134.

Davies, P.H., Gorman, W.C., Carlson, C.A. and Brinkman, S.F. (1993) Effect of hardness on bioavailability and toxicity of cadmium to rainbow trout. Chemical Speciation and Bioavailability, 5(2): 67-77.

Dutta, T.K. and Kaviraj, A. (1996) Effects of lime acclimation on the susceptibility of two fresh water teleosts and one oligochaet worm to metabolic pollutant cadmium. Folia Biologica (Krakow), 44 (3-4): 143-148.

Ellis, A.E. (1981) Stress and the modulation of defense mechanisms in fish. Academic Press. 367 Pp. London. England.

Gill, T.S. and Epple, A. (1992) Impact of cadmium on the mummichog, Fundulus heteroclitus and the role of calcium in suppressing heavy metal toxicity. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Comparative Pharmacology, 101 (3): 519-523.

Goel, K.A., Mishra, B.P., Gupta, K. and Wadhwa, S. (1985) A comparative hematological study on a few fresh water teleost. Indian Journal of Fisheries, 31 (3): 108-112.

James, R. and Sampath, K. (1995) Sublethal effects of mixtures of copper and ammonia on selected biochemical and physiological parameters in the catfish Heteropeneustes fossilis. Bulletin of Environment Contamination and Toxicology, 55 (2): 187-194.

Khan, M.A., Ahmed, S.A., Catalin, B., Khodadoust, A., Ajayi, O. and Vaughn, M. (2006) Effect of temperature on heavy metal toxicity to juvenile crayfish, Orconectes immunis (Hagen). Environmental toxicology, 21 (5): 513-520.

Mazon, A.F., Monteiro, E.A.S., Pinteiro, G.H. and Fernandes, M.N. (2002) Hematological and physiological changes induced by short-term exposure to copper in the freshwater fish (Prochilodus scrofa). Brazilian Journal of biology, 62 (4): 621-631.

Mckenzie, SH. B. and Williams, L. (2014) Clinical Laboratory, Hematology. 3rd Edition. Pearson Clinical Laboratory Science. Pp: 253-256. USA.

Mehta, K. (2017) Impact of temperature on contaminants toxicity in fish fauna: a review. Indian Journal of Science and Technology, 10 (18): 1-6.

Munker, R., Hillwe, E., Glass, J. and Paquette, R. (2007) Modern Hematology: Biology and Clinical Management, Second Edition, Humana Press Inc. 513 p.

Nikbakhsh, J. and Bahrekazemi, M. (2017) Effect of Diets Containing Different Levels of Prebiotic Mito on the Growth Factors, Survival, Body Composition, and Hematological Parameters in Common Carp Cyprinus Carpio Fry. Journal of Marine Biology and Aquaculture, 3 (1):1-6.

NRC (National Research Council). (1993) Nutrient Requirements of Fish. Committee on Animal Nutrition. Board on Agriculture. National Research Council. National Academy Press. 128 Pp. Washington DC, USA.

Pagenkopf, G.K. (1983) Gill surface interaction model for trace metal toxicity to fishes: role of complexation, pH and water hardness. Environmental Science and Technology, 17 (6): 342-347.

Perschbacher, P.W. and Wurts, W.A. (1999) Effect of calcium and magnesium hardness on acute copper toxicity to juvenile channel catfish, Ictalurus Punctatus. Aquaculture, 172 (3-4): 275-280.

Playle, R.C., Dixon, D. and Burnison, K. (1993) Copper and cadmium binding to fish gills: modification by dissolved organic carbon and synthetic ligand. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 50 (12): 2667-2677.

Pourkhabbaz, A., Ebrahimpour Kasmani, M., Kiyani, V. and Hosynzadeh, M.H. (2011) Effects of water hardness and Cu and Zn on LC50 in Gambusia holbrooki. Chemical Speciation and Bioavailability, 23 (4): 224-228.

Rehulka, J. (2003) Hematological analysis in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) affected by viral hemorrhagic septicaemia (VHS). Diseases of Aquatic Organisms, 56 (3): 185-193.

Singhadach, P., Jiraungkoorsku, W., Tansatit, T., Kosa, P. and Ariyasrijit, C. (2009) Calcium pre-exposure reducing histopathological alteration in Nile tilapia (Oreochromis niloticus) after lead exposure. Journal of Fisheries and Aquatic Science, 4 (5): 228-237.

Song, Y.F., Luo, Z., Chen, Q.L., Liu, X., Liu, C.X. and Zheng, J.L. (2013) Protective effects of calcium pre-exposure against waterborne cadmium toxicity in Synechogobius hasta. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 65 (1):105–121.

Takasusuki, J., Araujo, M.R.R. and Frenandes, M.N. (2004) Effect of water pH on copper toxicity in the neotropical fish, Prochilodus scrofa (Prochildondidae). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 72 (5): 1075-1082.

Val, A.L., Silva, M.N.P. and Val, V.M. (2004) Physiological stress in fish-adjustments and organic disorders: health of aquatic organisms. Editora Varela. 758 Pp. Sao Paulo.

Wicklund, A. and Runn, P. (1988) Calcium effects on cadmium uptake, redistribution, and elimination in minnows, Phoxinus phoxinus, acclimated to different calcium concentrations. Aquatic Toxicology, 13 (2): 109-121.

Witeska, M. (2003) The effects of environmental factors on metal toxicity to fish (Review). Fresenius Environmental Bulletin, 12 (8):824-829.

The effect of Calcium Carbonate pretreatment at different temperatures on reducing the toxicity of Copper Sulfate in common Carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758)

Akram Qasemzadeh[1], Masoumeh Bahrekazemi[2*]

Received:2020.6.15

Accepted:2020.7.26

Abstract

The use of Copper Sulfate as an algaecide in fish farms can cause poisoning in fish and harm their growth and health. Due to the effect of water Calcium amount on reducing Copper Sulfate toxicity, in this study, the effect of seven-day Calcium Carbonate pretreatment on reducing Copper toxicity in common Carp (*Cyprinus carpio*) was studied at two different temperatures. Initially, the half number of Carp were placed in water which 200 mg / L of Calcium Carbonate was added to for one week. Then, all fish were farmed at concentrations of 0, 1.5 and 3 mg /L of Copper Sulfate at 22 and 27 °C for 60 days. Based on the results, weight gain and condition factor decreased and the percentage of mortality and feed conversion ratio increased significantly, with increasing the amounts of Copper and temperature ($P<0.05$). In both groups of fish, the numbers of red and white blood cells, and the amounts of hemoglobin and hematocrit decreased with increasing Copper Sulfate concentration and temperature but MCV and MCH increased. But in the case of MCHC, no clear trend was observed. Also, the positive interaction of all three parameters of pretreatment with Calcium Carbonate, temperature, And Copper Sulfate concentration was not significant except in the case of white blood cells and mortality ($P>0.05$). Therefore, increased Copper Sulfate can decrease the growth efficiency, nutrition, and survival of fish, especially at 27 ° C, and pretreatment with Calcium Carbonate can significantly reduce the negative effect of Copper Sulfate in competition with Calcium. The effect of three variables of pretreatment with Calcium Carbonate, Copper Sulfate, and temperature on growth and nutrition indices was much more obvious than blood parameters. An increased amount of Copper Sulfate caused anemia and immune deficiency in fish and the effect of pretreatment with Calcium Carbonate was especially effective in reducing the poisonous effect of Copper Sulfate at the concentration of 1.5 mg / L at 27 °C. So, seven-day pretreatment of fish with 200 mg / L of Calcium Carbonate is recommended, especially up to a concentration of 1.5 mg / L of Copper Sulfate, even at elevated temperature.

Keywords: Calcium Carbonate, Copper Sulfate, Common Carp, Hematology

1-M.SC..Department of Fisheries, Qaemshahr Branch, Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran

2-Assistant Professor,Department of Fisheries, Qaemshahr Branch, Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran

*(Corresponding Author:m.bahrekazemi@qaemiau.ac.ir)