14(1) 267-276, Spring 2022

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

Study of mortality rate, behavioral and histopathological changes in of roach, *Rutilus rutilus caspicus* exposed to Zinc sulfate

Mohamad Farhangi**, *Hossein Adineh, Ziya Kordjazi

Department of Fisheries, Faculty of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran

Key Words
Zinc
Mortality
Histopathology
Rutilus rutilus caspicus

Abstract

Introduction: In this study aimed to determine behavioral and histopathological changes of Zinc in Roach (*Rutilus rutilus caspicus*) in acute toxicity tests for 96 h.

Materials & Methods: The experiments were done by 200 *Rutilus sp.* fish with average weight 2.5±0.27 g. To determinate behavioral and histopathological changes, 13 fish were distributed in groups of 0, 10, 30, 50, 70, 80 and 90 mg/l of Zinc. A group of fish was considered as control. Sulphate zinc salt was used as source of zinc. Thanks were aerated for 24 hours, so dissolved oxygen was maintained at range saturation by aeration. Test temperature, pH value and dissolved oxygen were measured using portable multiparameter meter Hack (Model 2000). Kidneys, livers, and gills were collected for evaluation.

Results: There was total mortality of 90 mg/l. Observations of behavioral response of fish fingerlings exposed to zinc were such as vertical and downward swimming patterns, loss of equilibrium, convulsion, and spending more time at the bottom. Following this, the fish died with their mouth and operculum open. Gills presented vascular congestion, complete fusion of secondary lamellae, and epithelial cell hypertrophy. In the kidneys, changes such as Bowman's capsule clearance, tubular degeneration, and glomerular capillary dilatation were common. Liver samples showed cytoplasmic vacuolization and cellular degeneration. Zinc induces a clinical condition of liver, gill and kidney damage in Roach.

Conclusion: The results revealed, the use of Zinc in water can be harmful to increase fish mortality rate acute exposure to Zinc.

---

* Corresponding Author's email: s.farhangi@yahoo.com

Received: 2 January 2021; Reviewed: 7 February 2021; Revised: 10 April 2021; Accepted: 19 May 2021
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.278656.2485

Journal of Animal Environment, Vol. 14, No. 1, Spring 2022
فصلنامه علمی محیط‌زیست جانوری، سال ۱۴، شماره ۱، بهار ۱۴۰۱

مقاله پژوهشی

تعیین نرخ مرگ و میر، تغییرات رفتاری و آسیب‌شناسی ماهی کلمه‌خزری (*Rutilus rutilus caspicus*) در مواجهه با سولفات‌روی

محمد فرهنگی[*]*، حسین آدینه، ضیاء کردجزی*

گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه دانشگاه گنبدکاووس، گنبدکاووس، ایران

کلمات کلیدی

روی
مرگ و میر
آسیب‌شناسی
ماهی کلمه
Rutilus rutilus

چکیده

مقدمه: تحقیق حاضر به‌منظور تعیین نرخ مرگ و میر، تغییرات رفتاری و آسیب‌شناسی ماهی کلمه‌خزری (*Rutilus rutilus caspicus*) در مواجهه با سولفات‌روی در آزمایش مسمومیت ۹۶ ساعته صورت گرفت.

مواد و روش‌ها: ۲۰۰ قطعه بچه‌ماهی کلمه‌خزری با وزن‌متوسط ۲/۵±۰/۲۷ گرم جهت انجام آزمایشات استفاده شد. برای تعیین تغییرات رفتاری و آسیب‌شناسی، ۱۳ قطعه بچه‌ماهی کلمه در معرض غلظت‌هایی از فلز روی (۰، ۱۰، ۳۰، ۵۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰ میلی‌گرم در لیتر) قرار گرفتند. یک گروه به‌عنوان شاهد درنظر گرفته شد. از نمک سولفات‌روی به‌منظور منبع فلز روی استفاده شد. تانک‌های آزمایشی در مدت ۲۴ ساعت هوادهی شدند تا میزان اکسِژن‌محلول درحد اشباع باقی بماند. درجه‌حرارت، پی اچ و اکسیژن‌محلول در طول آزمایش به وسیله دستگاه چندپارامتره هک مدل ۲۰۰۰ اندازه‌گیری شدند. نمونه‌هایی از بافت‌آبشش، کلیه و کبد جمع‌آوری‌ و مورد ارزیابی‌ قرار گرفتند.

نتایج: مرگ و میر کامل در غلظت ۹۰ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمد. مشاهدات ظاهری بچه‌ماهیان در مواجهه با روی شامل شنای عمودی و به سمت پایین، از دست دادن حالت تعادل، تشنجات عصبی و ماندن در ته تشت بود. در نهایت ماهیان با دهان و سرپوش باز مردند. در آبشش، متراکم شدن رگ‌ها، به‌هم جوش‌خوردگی لاملاهای ثانویه و هایپرتروفی سلول‌های‌پوششی دیده شد. در کلیه، تخریب مجاری کلیوی و کپسول‌بومن، گشادی مویرگ‌های گلومرول دیده شد. نتایج نشان داد که عمده تغییرات کبد به‌صورت تخریب سلول‌های کبدی و واکوئل‌های سیتوپلاسمی‌ مشاهده شد. آزمایش‌ نشان داد، روی سبب بروزعلایم بالینی‌ در آبشش، کلیه و کبد ماهی‌ کلمه خزری‌ شد.

بحث و نتیجه‌گیری: به‌هرحال آزمایش نشان داد که حضور روی در آب می‌تواند سبب افزایش میزان مرگ و میر ماهیان در مواجهه با فلز روی باشد.

---

[*] پست الکترونیکی نویسنده مسئول: s.farhangi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳ دی ۱۳۹۹؛ تاریخ داوری: ۱۹ بهمن ۱۳۹۹؛ تاریخ اصلاح: ۲۱ فروردین ۱۴۰۰؛ تاریخ پذیرش: ۲۹ اردیبهشت ۱۴۰۰
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.278656.2485

مقدمه

آسیب‌شناسی بافتی یا هرگونه مطالعه‌ای در خصوص بافت‌ها و اندام‌های داخلی می‌تواند برای بیان آلودگی‌ها یا هرگونه شرایط بحرانی حاکم بر محیط‌زیست جاندار مناسب باشد. آلاینده‌های مختلف سبب آسیب‌های بافتی مشخصی در اندام‌های ماهی‌ها می‌شوند که با تعیین این نوع آسیب‌ها، می‌توان از آن‌ها به‌عنوان نشانگرهای زیستی به منظور بررسی وجود آلاینده‌ها در اکوسیستم‌های طبیعی استفاده کرد. عنصر روی به‌عنوان یک فلز نادر در فرآیندهای متابولیسمی ماهی نقش دارد و می‌تواند به‌عنوان یک کوفاکتور آنزیم‌های مختلف ازجمله آلکالین فسفاتاز، الکل دهیدروژناز، سوپراکسید دیسموتاز و کربونیک انیدراز عمل کند. سطح طبیعی عنصر روی در ماهیان آب‌شیرین و آب‌شور به‌منظور پاسخگویی به نیاز رشد آبزی ناکافی گزارش شده است. از این‌رو این عنصر به‌عنوان ریزمغذی ضروری در تغذیه ماهیان مورد توجه قرار گرفته است و می‌تواند جهت تامین نیازهای غذایی ماهیان به جیره اضافه گردد (۱). ماهی کلمه خزری (*Rutilus rutilus caspicus*) به‌دلیل عواملی چون تخریب زیستگاه طبیعی و تولیدمثلی و صید بی‌رویه و آلودگی آب، جمعیت آن‌ها در حال کاهش و نابودی می‌باشد. لذا سازمان شیلات در پی حفظ ذخایر ماهی کلمه و بازسازی آن برآمده است. در این راستا کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان استخوانی (سیجوال) با هدف حفظ و افزایش ذخایر دریای خزر و تقویت تخم‌ریزی طبیعی ماهیان مهاجر استخوانی و اهمیت و نقش ویژه ماهیان استخوانی ازجمله ماهی کلمه در اکوسیستم‌آبی و تامین ذخایر دریای‌خزر فعالیت می‌نماید. با توجه به حضور فلزاتی چون روی و مس در منابع آبی منتهی به دریای خزر (۲، ۳، ۴، ۵، ۶) به‌دست آوردن میزان دقیق غلظت‌های کشنده مواد به‌عنوان یکی از عوامل مهم در دستیابی به تولید مناسب مطرح است. درخصوص سمیت موادفلزی و خصوصاً فلز روی تحقیقات زیادی برروی گونه‌های متعدد ماهیان صورت گرفته است (۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳)، اما مطالعات محدودی در رابطه با عنصر روی بر گونه مورد مطالعه (کلمه خزری) وجود دارد. Svecevičius، با بررسی سمیت روی بر چند گونه ماهی در کشور لیتوانی شامل ماهی سه‌خاره (*Gasterosteus aculeatus*)، قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، کلمه (*Rutilus rutilus*)، سوف (*Perca fluviatilis*) و اردک‌ماهی (*Leuciscus leuciscus*) بیان کرد، غلظت نیمه‌کشنده روی بین ۱۱/۳۷–۳/۷۹ میلی‌گرم در لیتر است (۱۴). آن‌ها هم‌چنین بیان کردند، میزان سمیت حاد برای هر گونه با توجه به حساسیت گونه به‌ترتیب از نظر حساس بودن شامل: *Oncorhynchus mykiss*> *Gasterosteus aculeatus*> *Perca fluviatilis*> *Leuciscus leuciscus*> *Rutilus rutilus* است. با توجه به موارد مذکور و هم‌چنین اهمیت ماهی کلمه در تغذیه فیل‌ماهی و ارزش شیلاتی آن برای مردم منطقه شمال کشور، مطالعه حاضر با هدف به‌دست آوردن غلظت‌های مجاز، بی‌اثر، کشنده و نیمه‌کشنده سولفات‌روی درطی ۹۶ ساعت و مشخص کردن ضایعات آسیب‌شناسی بافت‌های کبد، کلیه و آبشش در طی استرس‌پذیری از سولفات‌روی صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

انتخاب ماهی: جهت انجام آزمایش ۲۰۰ قطعه بچه‌ماهی کلمه خزری با میانگین وزنی ۰/۲۷±۲/۵ گرم از مرکز بازسازی ذخایر سیجوال- بندرترکمن (استان گلستان) تهیه و توسط نایلون‌های پلاستیکی با گنجایش ۳۰ لیتر آب به دانشگاه گنبدکاووس منتقل شدند. ماهیان به‌مدت ۴۸ ساعت در مخازن ۲۰۰ لیتری جهت سازگاری با شرایط آزمایشگاه نگه‌داری شدند. سپس جهت انجام آزمایش، ماهیان به‌صورت تصادفی در تشت‌های آزمایش با ظرفیت ۲۵ لیتر جابایی شدند.

شرایط آزمایش: مدت زمان آزمایش برای هر گروه ۹۶ ساعت بود. در این‌مدت درصدتلفات و علائم مسمومیت ثبت گردید. از نمک سولفات روی ($ZnSO_4, 5H_2O$) جهت ایجاد سمیت روی بر طبق روش‌های استاندارد (۱۵، ۱۶، ۱۷) استفاده شد. ۱۳ قطعه بچه‌ماهی کلمه‌خزری در معرض غلظت‌های مختلف نمک سولفات‌روی از صفر تا ۹۰ میلی‌گرم در لیتر قرار گرفتند. آزمایشات با ۶ تیمار و سه تکرار شامل غلظت‌های ۱۰،۳۰،۵۰،۷۰،۸۰،۹۰ میلی‌گرم در لیتر فلز روی و با ظرفیت ۱۳ قطعه بچه‌ماهی در هر تیمار صورت گرفت. غلظت صفرکه بدون حضور سولفات‌روی بود به‌عنوان شاهد درنظر گرفته شد. ماهیان در تشت‌های پلاستیکی با گنجایش ۲۵ لیتر آب جایابی شدند. به‌منظور تامین اکسیژن‌محلول کافی برای ماهیان، در تمام‌تشت‌ها ازسنگ‌هوا به‌عنوان هواده استفاده گردید. میزان اکسیژن تولیدی هر سنگ هوا طی ۲۴ ساعت برابر با ۲/۳ میلی‌گرم در لیتر بود. برای پیداکردن محدوده کشندگی سولفات‌روی (Range Finding Test)، پس از یک‌سری مطالعات مقدماتی (۱۵، ۹)، ابتدا غلظت‌های فرضی (۵، ۲۰، ۷۰، ۱۰۰، ۱۵۰ میلی‌گرم‌در‌لیتر) جهت برآورد میزان تلفات ماهی و شدت اثرپذیری ماهی در غلظت‌های نزدیک به آزمایش تعیین شد. سپس جهت انجام آزمایش، پس از تعیین حجم آب و به ازای واحد حجمی، سولفات‌روی توزین و به آب اضافه گردید. برای حل کردن سولفات‌روی در آب تشت، ابتدا آن‌را در بشر حل و سپس محلول حاصله به تشت آزمایش اضافه گردید، تا محلول یکنواختی به‌دست آید. آزمایش‌ها با استفاده از روش آب‌ساکن (Water Static

Method) و براساس دستورالعمل استاندارد O.E.C.D. صورت گرفت (۱۸). در پایان آزمایش غلظت‌های بی‌اثر NOEC (No Observed Effect Concentration)، کم‌اثر LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) و حداکثر غلظت مجاز MATC (Maximum Allowable Toxicant) تعیین شد.

تظاهرات رفتاری و بافت‌شناسی: هر ۱۲ ساعت جهت ثبت تظاهرات رفتاری ماهی در برابر سمیت روی و آسیب‌های قابل مشاهده با چشم در طول آزمایش، ماهیان مورد ارزیابی قرار گرفتند. به‌منظور بررسی آسیب‌های ناشی از فلز روی بر بافت‌های ماهی، هر ۱۲ ساعت یک‌بار ماهیان مرده جمع‌آوری و در ظروف حاوی فرمالین ۱۰ درصد تا پایان آزمایش نگه‌داری شدند. در پایان ۹۶ ساعت، تمام ماهیان مورد آزمایش (زنده-مرده) که در معرض غلظت‌های مختلف سولفات روی قرار داشتند، جمع‌آوری و در محلول فرمالین تثبت شدند. از نمونه‌های بافتی آبشش، کلیه و کبد فیکس شده در محلول فرمالین ۱۰درصد، پس از طی مراحل آب‌گیری، شفاف‌کردن و پارافینه کردن، با استفاده از میکروتوم دوار مقاطع ۵ میکرونی تهیه و به‌روش هماتوکسیلین ائوزین رنگ‌آمیزی شدند. نهایتاً با استفاده از میکروسکوپ نوری و کلیدهای موجود مورد مطالعه قرار گرفتند (۱۹، ۲۰، ۲۱).

روش آماری: آزمایش مورد نظر در طرح کاملاً تصادفی (۶×۳) صورت گرفت. نتایج حاصل از آزمایش با استفاده از نرم‌افزار مینی‌تب ۱۴ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. به‌منظور تعیین غلظت نیمه کشنده از نرم‌افزار پروبیت (Probite) و شیب خط رگرسیون تحت نرم‌افزار Spss نسخه ۱۵ استفاده شد.

نتایج

نتایج حاصل از در معرض قرارگیری ماهی با فلز روی:

نتایج حاصل از قرارگیری ماهیان در معرض غلظت‌های مختلف سولفات روی درجدول ۱ آمده است. در طول آزمایش فاکتورهای فیزیک و شیمیایی آب شامل دما (^{o}C ۱±۲۵)، اکسیژن محلول (۷/۰±۹/۲) و پی‌اچ (۷/۰±۸/۲) ثابت بود.

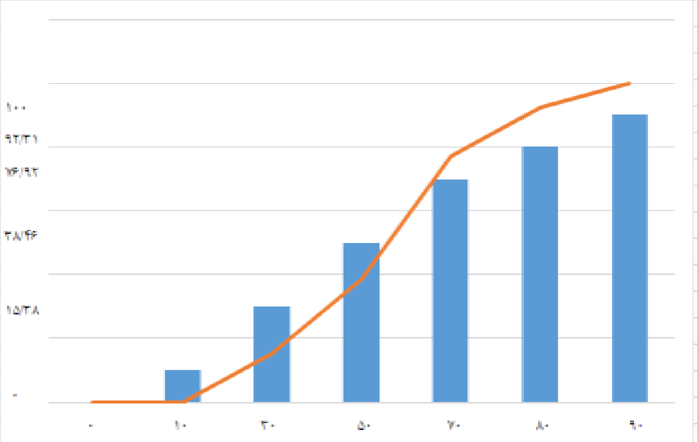
جدول ۱: نتایج حاصل از قرارگرفتن ماهی کلمه‌خزری در معرض غلظت‌های مختلف سولفات‌روی

غلظت سولفات‌روی (میلی‌گرم درلیتر)	تعداد تلفات				درصد تلفات تجمعی پس از ۹۶ ساعت
	پس از ۲۴ ساعت	پس از ۴۸ ساعت	پس از ۷۲ ساعت	پس از ۹۶ ساعت	
۰	۰	۰	۰	۰	۰
۱۰	۰	۰	۰	۰	۰
۳۰	۰	۰	۱	۱	۱۵/۳۸
۵۰	۳	۱	۱	۰	۳۸/۴۶
۷۰	۷	۲	۰	۱	۷۶/۹۲
۸۰	۱۰	۱	۰	۱	۹۲/۳۱
۹۰	۱۰	۳	۰	۰	۱۰۰

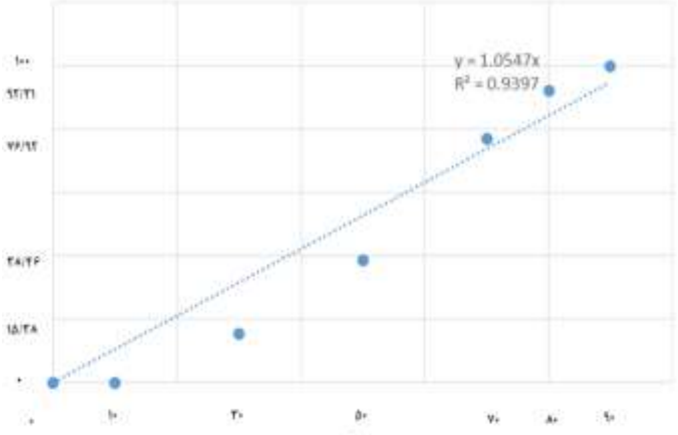
نتایج حاصل از آزمایش نشان داد که در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر از سولفات‌روی هیچ‌گونه تلفاتی مشاهده نشد (NOEC). با این حال کم‌ترین غلظتی که سبب تلفات در ماهی شد برابر ۳۰ میلی‌گرم در لیتر در مدت ۹۶ ساعت بود (LOEC)(جدول ۱). همان‌طور در جدول ۱ مشخص است با افزایش غلظت روی میزان درصد تجمعی تلفات ماهی افزایش معنی‌داری داشت، به‌طوری‌که در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر میزان تلفات ماهی بعد از گذشت ۲۴ ساعت برابر با ۳ قطعه (۲۳/۰۷ درصد) و بعد از گذشت ۹۶ ساعت برابر ۵ قطعه (۳۸/۴۶ درصد) بود. هم‌چنین تلفات ماهی در غلظت ۸۰ میلی‌گرم در لیتر بعداز گذشت ۲۴ ساعت برابر ۱۰ قطعه (۷۶/۹۲ درصد) و بعدازگذشت ۹۶ ساعت برابر ۱۲ قطعه (۹۲/۳۱ درصد) بود(شکل ۱).

نتایج حاصل از آزمایش ثابت کرد میزان تلفات ماهی در غلظت‌های بالاتر بیش‌تر است، به‌طوری‌که تلفات ماهی در غلظت ۷۰ میلی‌گرم در لیتر نسبت به غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر دو برابر شده است. در تمامی تیمارها میزان تلفات ماهی در ۲۴ ساعت اولیه بیش‌ترین میزان را داشته است (جدول ۱)، گرچه درنهایت در غلظت ۹۰ میلی‌گرم در لیتر در تمامی گروه‌ها تلفات تجمعی ۱۰۰ درصد بوده است (جدول ۱). با توجه به آزمون همبستگی بین زمان ۹۶ ساعت قرارگیری در معرض سولفات‌روی و تعداد تلفات معادله خط $Y=۱/۰۵۴۷x$ به‌دست آمد. از آن‌جاکه میزان R^2 بالا و برابر ۹۴ درصد است، می‌توان با این معادله میزان غلظت نیمه‌کشنده را به‌دست آورد. بر این اساس و با توجه به درصد تلفات ماهی و منحنی شیب خط رگرسیون غلظت

نیمه‌کشنده (LC50,96h) روی برابر با ۴۷/۴۰۷ میلی‌گرم در لیتر به دست آمد(شکل ۲). غلظت‌های کشنده روی برای ماهی کلمه با استفاده از نرم‌افزار پروبیت در مدت ۹۶ ساعت در جدول ۲ آمده است. همان طوری‌که در جدول ۲ نمایش داده شده است میزان LC5096h برای ماهی کلمه ۵۱/۳۵۴ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمد.



شکل ۱: منحنی هیستوگرام درصدتلفات ماهی کلمه‌خزری پس از گذشت ۹۶ ساعت، در معرض غلظت‌های مختلف سولفات‌روی تحت شرایط آزمایشی



شکل ۲: منحنی رگرسیون درصد تلفات ماهی کلمه‌خزری پس از گذشت ۹۶ ساعت، درمعرض غلظت‌های مخلتف روی تحت شرایط آزمایشی

جدول ۲: غلظت‌کشنده (LC_{10-95}) در ماهی کلمه‌خزری با حدود اطمینان ۹۵٪ پس از ۹۶ ساعت قرارگیری در معرض سولفات‌روی

LC	غلظت‌کشنده	حدود اطمینان	
		حدپایین	حدبالا
LC10	۳۰/۰۲۶	۱۳/۶۸۹	۳۹/۲۸۸
LC20	۳۸/۱۴۳	۲۵/۲۶۵	۴۶/۱۱۷
LC30	۴۳/۹۹۶	۳۳/۳۰۷	۵۱/۳۴۷
LC40	۴۸/۹۹۸	۳۹/۸۶۰	۵۶/۱۳۴
LC50	۵۱/۳۵۴	۴۲/۸۱۲	۵۸/۵۲۴
LC60	۵۸/۳۴۷	۵۰/۹۶۴	۶۶/۲۲۸
LC70	۶۳/۳۴۸	۵۶/۲۱۲	۷۲/۳۲۰
LC80	۶۹/۲۰۲	۶۱/۸۳۳	۷۹/۹۷۰
LC90	۷۷/۳۱۹	۶۸/۹۹۱	۹۱/۲۱۸
LC95	۸۴/۰۲۲	۷۴/۵۶۴	۱۰۰/۸۴۴
LC99	۹۶/۵۹۷	۸۴/۵۹۳	۱۱۹/۳۲۶

نتایج حاصل از آسیب‌شناسی بافتی در مواجهه با روی:

علائم ظاهری مسمومیت با روی در طی آزمایش در غلظت‌های بالای ۸۰ میلی‌گرم در لیتر از سولفات‌روی در همان ابتدای آزمایش و با افزودن سولفات‌روی به تشت‌های آزمایشی به‌شکل حرکات سریع و برخورد ماهی با کناره‌های تشت، سعی در بیرون پریدن از آب بروز کرد. باز و بسته شدن سریع و تند سرپوش‌های آبششی در هنگام شنا کردن و قرمزشدن آبشش‌ها که نشان‌دهنده پرخونی شدید در آبشش‌بود، از دیگر علایم مسمومیت به‌حساب آمد. در نهایت ماهیان در سطح آب معلق مانده و با حرکات کند آبششی از بین رفتند. ماهیانی که در این غلظت‌ها هنوز زنده بودند به‌شکل بی‌حال در گوشه‌ای از تشت آزمایشی قرار گرفتند. آن‌چه مشخص بود در همان ساعات‌اولیه از آزمایش با غلظت‌های‌بالای سولفات‌روی شدت واکنش ماهی در برابر سمیت حاصل از روی بسیار شدید بود. مطالعه به‌عمل آمده در تعیین میزان و شدت آسیب‌های وارده بر بافت‌های ماهی در نتیجه قرارگیری در معرض نمک سولفات‌روی نشان داد، در قسمت راس فیلامنت‌های آبششی چماقی شدن سلول‌های راسی رخ داده است که نتیجه جوش‌خوردن بسیاری از لاملاها و کاهش سطح تنفس در برخی فیلامنت‌ها بود. ادم در ناحیه لاملاهای ثانویه و خونریزی در آبشش بوضوح دیده شد. در آبشش ماهیان گروه شاهد، شواهدی از ضایعات مشخص و بارز دیده نشد (شکل‌های ۳ و ۴). به‌هم‌چسبندگی یا فیوژن فیلامنت‌ها در تمامی تیمارها مشاهده شد. در ماهیان گروه شاهد، لاملاها و فیلامنت‌ها آرایش منظم خود را حفظ کرده‌بودند و هیچ ضایعه خاصی مشاهده نشد. ادم یا جدا شدن اپیتلیال لاملای ثانویه نیز به شکل شدید مشاهده شد. علایم مشاهده شده در بافت کلیه ماهیانی که در معرض غلظت کشنده روی قرار داشتند به‌صورت خونریزی، تخریب مجاری کلیوی و گلرمرول‌ها بود (شکل‌های ۵ و ۶). در بافت کبد نکروز سلول‌های کبدی، خون‌ریزی و پرخونی به‌وضوح دیده شد. رکود صفرا، واکوئولاسیون و مرزنشینی هسته‌ها یا به‌عبارت دیگر حرکت هسته از مرکز به مجاورت دیواره سلولی به‌وضوح خصوصاً در غلظت‌های بالا مشهود بود(شکل ۷ و ۸). میزان تخریب بافت‌های مورد مشاهده بر حسب میزان در معرض قرارگیری با روی در جدول ۳ آمده است.

جدول ۳: ضایعات مشاهده شده در بافت‌های آبشش، کلیه و کبد ماهیان کلمه‌خزری پس از ۹۶ ساعت قرارگیری در معرض فلز روی

الف- ضایعات مشاهده شده در آبشش

غلظت روی (میلی‌گرم در لیتر)	ادم	پرخونی	خون‌ریزی	چماغی‌شدن	فیوژن	هایپرپلازی
۰	-	-	-	-	–	–
۱۰	–	–	–	–	+	+
۳۰	+	+	+	+	++	++
۵۰	+	+++	+	+	+++	+++
۷۰	++	+++	+++	++	+++	+++
۸۰	+++	+++	+++	+++	+++	+++
۹۰	+++	+++	+++	+++	+++	+++

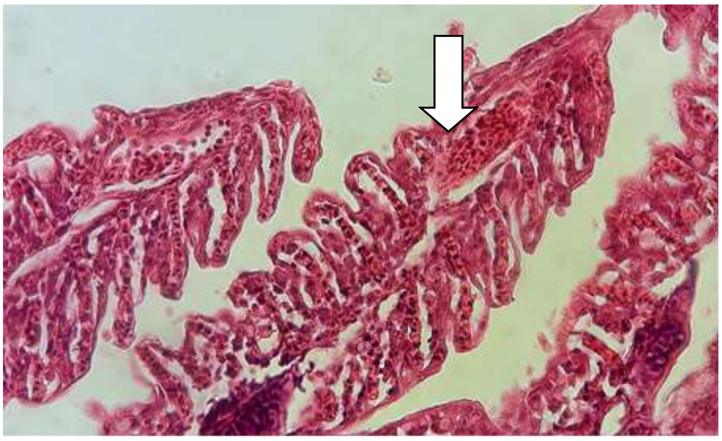
ب- ضایعات مشاهده شده در کلیه

غلظت روی (میلی‌گرم در لیتر)	تخریب مجاری	تخریب گلومرل‌ها	خون‌ریزی	نفوذ سلول‌های آماسی
۰	–	–	–	–
۱۰	–	–	–	+
۳۰	+	+	++	++
۵۰	++	++	++	+++
۷۰	+++	+++	+++	+++
۸۰	+++	+++	+++	+++
۹۰	+++	+++	+++	+++

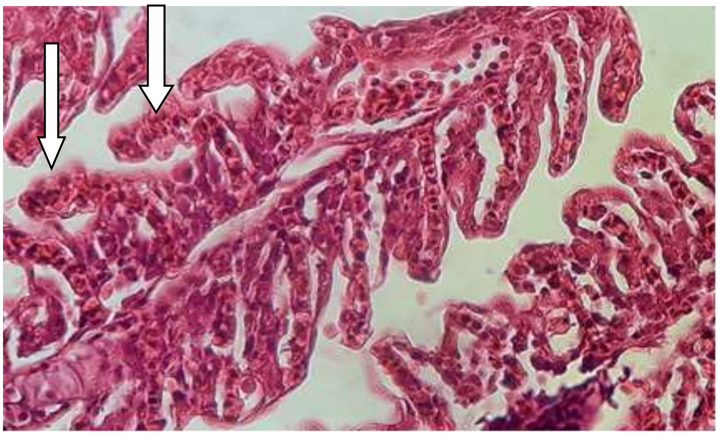
ج- ضایعات مشاهده شده در کبد

غلظت روی (میلی‌گرم در لیتر)	نکروز	خون ریزی	رکود صفرا	مزرنشینی هسته
۰	–	–	–	–
۱۰	–	+	–	–
۳۰	+	++	+	++
۵۰	++	+++	++	++
۷۰	++	+++	++	+++
۸۰	+++	+++	+++	+++
۹۰	+++	+++	+++	+++

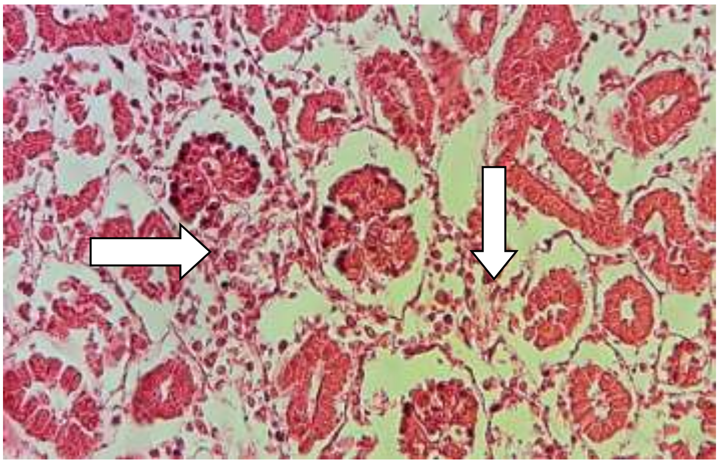
(–): بدون آسیب در بافت؛ (+): آسیب ۲۰٪> ؛ (++): آسیب‌های ۶۰-۲۰٪؛ (+++): آسیب‌های ۶۰٪<



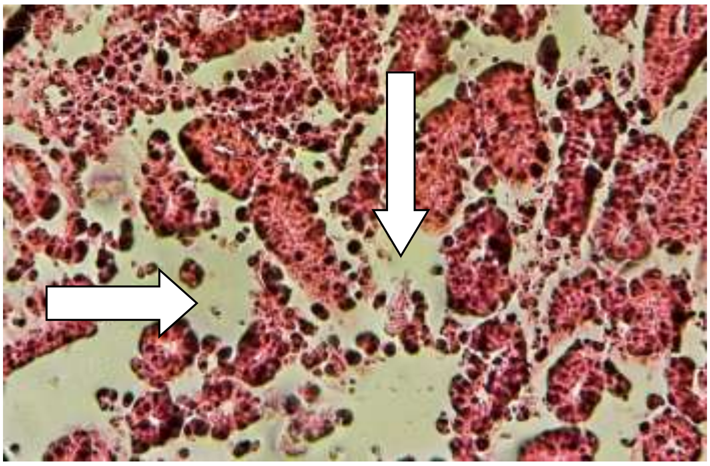
شکل ۳: مقطع عرضی تهیه شده از آبشش ماهیان کلمه‌خزری پس از قرارگیری در معرض غلظت کشنده روی. نوک پیکان پرخونی را نشان می‌دهد. رنگ‌آمیزی H&E×400



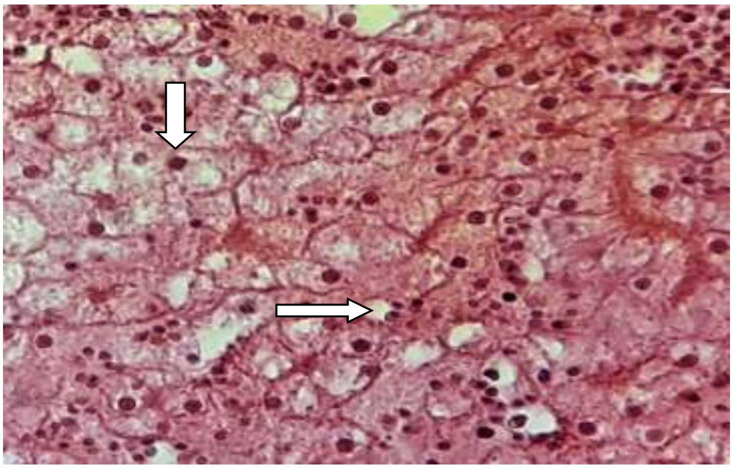
شکل ۴: مقطع عرضی تهیه شده از آبشش ماهیان کلمه‌خزری پس از قرارگیری در معرض غلظت کشنده روی. نوک پیکان چماقی‌شدن راس رشته‌های آبشش را نشان می‌دهد. رنگ‌آمیزی H&E×400



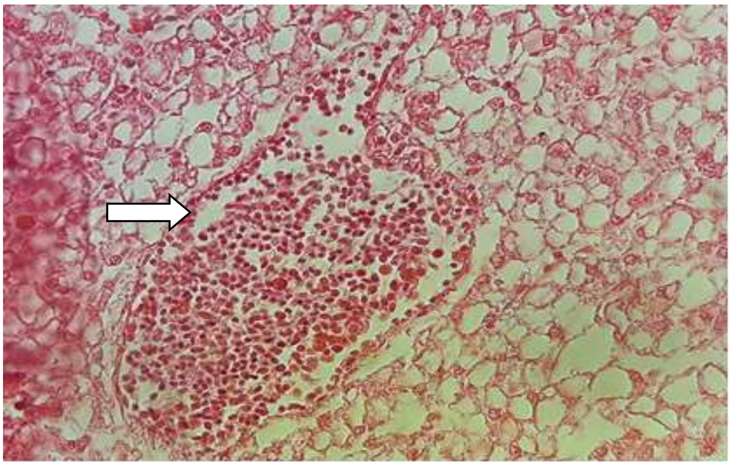
شکل ۵: مقطع عرضی تهیه شده از کلیه ماهیان کلمه‌خزری پس از قرارگیری در معرض غلظت نیمه‌کشنده روی. نوک پیکان تخریب مجاری کلیوی و گلومرول‌ها را نشان می‌دهد. رنگ‌آمیزی H&E×400



شکل ۶: مقطع عرضی تهیه شده از کلیه ماهیان کلمه‌خزری پس از قرارگیری در معرض غلظت کشنده روی. نوک پیکان تخریب وسیع مجاری کلیوی و گلومرول‌ها را نشان می‌دهد. رنگ‌آمیزی H&E×400



شکل ۷: مقطع عرضی تهیه شده از کبد ماهیان کلمه‌خزری پس از قرارگیری در معرض غلظت کشنده روی. نوک پیکان مرزنشینی هسته را نشان می‌دهد. رنگ‌آمیزی H&E×200



شکل ۸: مقطع عرضی تهیه شده از کبد ماهیان کلمه‌خزری پس از قرارگیری در معرض غلظت کشنده روی. نوک پیکان مرزنشینی هسته را نشان می‌دهد. رنگ‌آمیزی H&E×400

بحث

روی یکی از عناصر فلزی است که در همه جا حضور دارد و به‌عنوان یکی از عناصر کم‌یاب در رشد و تقسیم‌سلولی، سوخت و ساز، بهبود زخم‌ها، سیستم دفاعی بدن و حتی در افزایش بیوماس پلانکتونی و افزایش تولید ماهی در قالب بارورکننده استخرها مورد نیاز است (۲۲، ۲۳). نشانه‌های ظاهری مسمومیت با فلز روی در آزمایش حاضر به‌شکل رنگ پریدگی، تجمع در اطراف سنگ‌های هوا، پرخونی رشته‌های آبششی، سعی در بیرون پریدن ماهی از تشت‌های آزمایش و بلعیدن هوا از سطح بود. Naji و همکاران، با مطالعه بر روی ماهیان کپور با وزن ۱۵۰-۱۲۰ گرم نشان دادند که غلظت نیمه کشنده سولفات‌روی در۹۶ ساعت برابر با ۵۰ میلی‌گرم در لیتر است (۱۶). آن‌ها هم‌چنین نشان دادند، شایع‌ترین ضایعه در آبشش ماهی شامل ادم، هیپرپلازی و پرخونی بود. Soltani و همکاران،میزان سمیت نیمه‌کشنده فلز روی را برای گونه سیاه‌ماهی در مدت ۹۶ ساعت برابر ۲۵۳/۰۵ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آورند. آن‌ها عمده ضایعات ناشی از سولفات‌روی و نانواکسیدروی را به‌صورت نکروز لاملاهای ثانویه، هایپرپلازی، هایپرتروفی و چسبیدگی لاملاهای ثانویه در آبشش‌ها بیان کردند (۹) که با یافته‌های مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد. بیش‌ترین میزان تلفات ماهی در ساعات اولیه پس از در معرض قرارگیری با فلز روی رخ داد. آزمایشات مختلفی که بر روی انواع ماهی‌ها صورت گرفته است این امر را تایید می‌کند (۸، ۲۳). آزمایش‌های اولیه به‌منظور تعیین غلظت‌های موردنظر نشان داد، در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر هیچ‌گونه اثرات قابل توجهی مشاهده نشد (NOEC). هم‌چنین حداکثر غلظت مجاز (MATC) که در آن هیچ‌گونه تلفاتی مشاهده نشد برابر ۲۰ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمد. هم‌چنین بررسی‌ها نشان می‌دهد، ماهیانی که به یک ماده حساسیت بیش‌تری دارند، نسبت به مواد دیگر حساسیت کم‌تری را در غلظت‌های یکسان بروز خواهند داد. در آزمایش فوق، غلظت‌های کشنده و نیمه‌کشنده در طی ۹۶ ساعت برای ماهی کلمه‌خزری به‌ترتیب برابر با ۹۰ و ۴۷/۴۰۷ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمد. در مقایسه با مطالعه حاضر، Farhangi و همکاران، سمیت روی را برای ماهی کپور در مدت ۹۶ ساعت برابر ۲۷۰ میلی‌گرم در لیتر و غلظت نیمه‌کشنده آن برابر با ۱۲۹/۰۷ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آورند (۱۵). Zeng و همکاران، سمیت نیمه‌کشنده روی را طی ۹۶ ساعت برای ماهی آب‌شیرین *Percocypris pingi* برابر ۲/۸۵۲ میلی گرم در لیتر به‌دست آوردند (۲۳). این درحالی است که آن‌ها سمیت فلز مس را در مقایسه با فلز روی برای گونه مورد نظر برابر ۱/۳۴۰ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آورند. این بدان معناست که سمیت مس در مقایسه با روی بیش‌تر و کشنده‌تر است. Farhangi، با مطالعه سمیت فلز مس در ماهی کلمه‌خزری، غلظت نیمه‌کشنده مس را در مدت ۹۶ ساعت برابر ۰/۲۰۸ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آوردند. با مقایسه سمیت دو فلز روی و مس بر ماهی کلمه‌خزری با شرایط برابر می‌توان به سمیت بسیار بالای مس در مقابل روی اشاره کرد (۸). Taweel و همکاران، میزان سیمت نیمه‌کشنده روی را برای ماهی تیلاپیا *(Oreochromis niloticus)* برابر با ۱۶/۱۷۷ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آورند (۲۴). مطالعه حاضر و سایر تحقیقات مشابه بیانگر آن است که با افزایش غلظت یک ماده سمی و طول زمان در معرض قرارگیری نرخ‌بقاء کاهش می‌یابد. یکی از دلایل عمده می‌تواند به‌دلیل عملکرد فلزات سنگین بر افزایش واکنش‌پذیری انواع گروه‌های اکسیژنی باشد (ROS, Reactive Oxygen Species) هم‌چون پراکسید هیدروژن، رادیکال‌های سوپراکسید و هیدروکسیل که سبب آسیب‌زنی به متابولیسم طبیعی فرایند اکسیداتیو و درنهایت استرس اکسیداتیو در ماهی‌ها می‌شود (۲۵) با مطالعه تحقیقات مختلف، تفاوت‌هایی در غلظت کشنده فلز روی بر روی گونه‌های ماهی به‌دست آمده است که هر کدام تحت شرایط متفاوتی بوده است. به‌بیان دیگر، تفاوت در فاکتورهای آزمایشی (دما، سختی و pH) و تفاوت‌های گونه‌ای (جنس، گونه، سایز) در این امر دخیل بوده است باشد. Bielmyer و همکاران، در بررسی اثرات شوری بر سمیت حاد در دو گونه ماهی یوری‌هالین شامل گونه *Fundulus heteroclitus* و گونه *Kryptolebias marmoratus* بیان کردند که با افزایش شوری میزان سمیت فلز روی کاهش می‌یابد و در شوری‌های بالای ۱۰ گرم در لیتر گونه *K. marmoratus* حساس‌تر است (۲۶). آن‌ها بیان کردند که تغییرات سمیت غلظت نیمه‌کشنده روی برای گونه *F. heteroclitus* در آب‌های سخت و شیرین تا شوری ۳۶ گرم در لیتر از ۰/۲۳ تا ۳۴/۵ میلی‌گرم در لیتر متغیر است. این در حالی است که برای گونه *K. marmoratus* از ۰/۱۳ تا ۲۷/۸۸ میلی‌گرم در لیتر متغیر است. Gervehi و همکاران، با مطالعه سمیت حاد سولفات‌آلومینیوم بر بافت آبشش کلمه‌خزری بیان کردند، با افزایش مقادیر سولفات‌آلومینیوم و کاهش pH اثرات تخریبی فلز آلومینیوم بر بافت آبشش نیز بیش‌تر می‌شود، هم‌چنین ضایعات مشاهده شده در ۲۴ ساعت اول کم‌تر و با گذشت زمان تا ۹۶ ساعت بر مقدار آن افزوده می‌شود (۲۷). به‌عنوان مثال آن‌ها بیان کردند، میزان خون‌ریزی و پرخونی ارتباط مستقیمی با غلظت آلاینده و زمان در معرض قرارگیری دارد. مطالعات نشان داده است با افزایش عناصر سمی در آب ضمن اثرات مستقیم سمیت مواد بر روی اندام‌های ماهی، این مواد به‌طور غیرمستقیم می‌توانند اثرات سمیت را تشدید کنند. عواملی هم‌چون کمبود اکسیژن، درجه حرارت و افزایش اسیدیته معمولاً حساسیت ماهی را به مواد سمی افزایش می‌دهد، درحالی‌که مواد معدنی هم‌چون سختی و شوری

سبب کاهش سمیت مواد می‌شود. بافت‌شناسی ارزیابی کاملی از سلامتی موجود زنده فراهم می‌کند و به‌طور موثری اثرات مواجهه با آلاینده‌های محیطی را انعکاس می‌دهد. هیستوپاتولوژی یا هر گونه مطالعه‌ای درخصوص بافت‌ها و اندام‌های داخلی می‌تواند مناسب برای بیان آودگی‌ها یا هرگونه شرایط بحرانی حاکم بر محیط‌زیست جاندار باشد. در شرایط آزمایشگاهی آلاینده‌های مختلف، باعث ایجاد آسیب‌های بافتی مشخصی در اندام‌های ماهی‌ها می‌شوند که با تعیین این نوع آسیب‌ها، از آن‌ها می‌توان به‌عنوان نشانگر زیستی به‌منظور بررسی وجود آلاینده‌ها در اکوسیستم‌های طبیعی استفاده کرد (۲۸). بنابراین مطالعات آسیب‌شناسی منعکس‌کننده شرایط زیستی، محیطی و سلامت ماهی می‌باشد. در مطالعه حاضر نیز اثرات سمیت‌حاد سولفات روی بر اندام‌های داخلی ماهی به شکل‌های پرخونی، خون‌ریزِی، تخریب مجاری کلیوی و نکروز سلول‌های کبدی و آبشش رخ داد. گرچه ضایعاتی که در مطالعه حاضر رخ داده است، در غلظت‌های مختلف اثرات متفاوتی را نشان داد. بافت آبشش دارای محافظت کم‌تری نسبت به سایر بافت‌هاست و به‌طور مستقیم در مجاورت با آب قرار دارد، بنابراین از حساسیت بیش‌تری نیز برخوردار است. Naji و همکاران، با مطالعه سمیت حاد سولفات روی در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) بیان کردند، عمده ضایعات ناشی از سمیت روی در ماهی کپور در بافت آبشش به شکل هایپرتروفی و هایپرپلازی سلول‌های پوششی آبشش، فیوژن یا چسبندگی لاملای‌های ثانویه، و افزایش و تکثیر سلول‌های مخاطی در آبشش بود (۱۶). در بررسی به‌عمل آمده در مطالعه حاضر بر روی ماهی کلمه خزری نیز ضایعات مشابه دیده شد، گرچه سمیت به‌دست آمده در مطالعه حاضر (۹۰ میلی‌گرم در لیتر) کم‌تر از سمیت به‌دست آمده در مطالعه Naji و همکاران بود (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر)(۱۶). اصولاً هایپرپلازی در آبشش ماهیان یکی از واکنش‌های دفاعی بدن در پاسخ به مسمومیت‌ها و آلاینده‌های فلزی است (۲۹). هایپرپلازی افزایشی غیرطبیعی در تعداد سلول‌های اپیتلیوم آبشش است که به دو صورت چماقی‌شدن سر لاملاهای ثانویه و ضخیم‌شدن بافت اپی‌تلیوم نزدیک پایه لاملا، خود را نشان می‌دهد. عارضه بر تبادل گاز و تنفس تأثیر گذاشته و در حالات شدیدتر می‌تواند منجر به اتصال تیغه‌های مجاور به یکدیگر و جلوگیری از تبادل گاز شود. Ghasemzadeh و همکاران، بیان کردند، تغییر در اندازه و شکل هپاتوسیت‌ها نشانه افزایش فعالیت متابولیک می‌باشد با این‌حال، این تغییر بافتی می‌تواند منشاء پاتولوژیک نیز داشته باشد (۳۰). Khosravi Katoli و همکاران، ضمن بررسی اثر غلظت‌های تحت‌کشنده نانوذرات نقره و نیترات نقره بر بیان ژن HSP70 و آسیب‌های بافت‌های آبشش، کبد و روده در ماهی کپور معمولی بیان کردند، گرچه هر دو شکل نقره روی بافت‌های آبشش، کبد و روده تاثیرگذار بوده، اما با توجه به نقش بافت کبد در سم‌زدایی، بیش‌ترین تغییرات نیز در همین بافت مشاهده گردید. در آزمایش فوق نیز تغییر و جابجایی هسته‌های سلول‌های کبدی می‌تواند نشانه‌ای از آسیب‌های فلزی بر بافت کبد باشد. در واقع این تغییرات می‌تواند خود به‌عنوان یک شاخص زیستی در بررسی اثرات آلاینده‌ها باشد. مطالعات متعدد این امر را ثابت می‌کند (۳۲). Ghasemzadeh و همکاران، بیان کردند که کبد ماهیانی که معرض سمیت فلز روی و مس قرار داشتند دچار ضایعات شدیدی به شکل خون‌ریزی، نکروز، واکوئله شدن، رکود صفرا، تجمع چربی و سینوزوئید کبدی شدند (۳۰) که کاملاً با مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد. با این‌حال آن‌چه که ثابت شد، هرچه غلظت ماده سمی بیش‌تر شود، تخریب حادث شده بر بافت‌های ماهی بیش‌تر می‌شود. همان‌طوری که مشخص است رفتارهای ظاهری مسمومیت با عناصر سمی به‌ویژه روی می‌تواند نتیجه تغییرات ساختاری اندام‌های داخلی ماهی باشد. در این خصوص پیشنهاد می‌گردد، فاکتورهای خونی ماهی در مواجهه با سمیت روی نیز مورد ارزیابی قرار گیرد. با مطالعه حاضر می‌توان نتیجه گرفت که حداکثر غلظت مجاز (MATC) فلز روی برای ماهی کلمه‌خزری برابر ۲۰ میلی‌گرم در لیتر و غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر به‌عنوان غلظتی که هیچ اثر قابل توجهی نداشت، معرفی شد.

تشکر و قدردانی

این طرح با حمایت مالی دانشگاه گنبدکاووس و با مصوبه شورای پژوهشی دانشگاه به‌شماره ۶/۱۸۴ اجرا شده است. بدین‌وسیله از حمایت‌های ریاست محترم دانشگاه و مدیریت محترم پژوهشی دانشگاه و هم‌چنین ریاست محترم دانشکده کشاورزی و منابع‌طبیعی و همکاران گروه شیلات تقدیر و تشکر می‌گردد.

منابع

1. **Dekani, L. and Johari, S.A., 2015.** The role of zinc element in aquatic nutrition. The fourth national conference of natural resources researches of Iran, focusing on fisheries and aquatic ecosystems, Kurdistan, Iran. (In Persian)
2. **Bagheri, H., Sharmad, T., KhairAbadi, V., Darvish Bastami, K. and Bagheri, Z., 2011.** Tracing and Assessment of Heavy Metals in Gorganrud Sediments. Journal of Oceanography. 2(5) :35-39. (In Persian)
3. **Parizanganeh, A. and Lakhan, C., 2007.** A Survey of Heavy Metal Concentrations in the Surface Sediments along

the Iranian Coast of the Caspian Sea. 18(3): 2-12. (In Persian)

4. **Movafagh Behnam, M., Esmaili Sari, A. and Majedi, S.M., 2020.** Accumulation of mercury and zinc in muscle tissue of four species of fishes in Caspian Sea (Case study: coastal of Mahmoud Abad-Noshahr). Journal of Animal Environment. 12(3): 183-189. (In Persian)
5. **Rajaei, Q., Hasanpour, M. and Mehdinejad, M.H., 2013.** Heavy Metals Concentration (Zinc, Lead, Chrome and Cadmium) in Water and Sediments of Gorgan Gulf and Estuarine Gorganroud River, Iran. Journal of Health System Research. 8(5): 748-756. (In Persian)
6. **Bagheri, H. and Khairabadi, V., 2016.** Assessment of seasonal changes in the concentration of heavy metals in the sediments of the Gorganrood River and their origin. Human and Environment Journal. 2(1): 45-55. (In Persian)
7. **Mohammadnejad Shamushki, M., Nezami, Sh., Esmaili-Sari, A., Khara H. and Pazhand, Z. 2013.** Determination of the lethal concentration LC50 96h of lead, zinc and cadmium metals on sheep fry. Iranian Journal of Marine Sciences. 3(4): 44-53. (In Persian)
8. **Farhangi, M., 2012.** Behavioral and pathophysiological studies of acute copper poisoning in the Caspian fish. Journal of Animal Environment. 5(1): 154-145. (In Persian)
9. **Soltani, Z., Ghorbani, R., Hedayati, S.A.A., Adeli, A. and Mazandarani, M., 2015.** The comparison of sub lethal concentration effects of zinc sulfate and zinc nano-oxide on gill histopathological lesions of *Capoeta capoeta gracilis* (Keyserling, 1861). Journal of Applied Ichthyological Research. 2(4): 13-22. (In Persian)
10. **Sadeghi, P. and Kaslekha, N., 2016.** Investigating the average lethal concentration of zinc chloride ZnCl2 and its behavioral effects in gray mullet (*Mugil cephalus*). Journal of Experimental Animal Biology. 6(2): 22-34. (In Persian)
11. **Lynch, N.R., Hoang, T.C. and O'Brien, T.E., 2016.** Acute toxicity of binary-metal mixtures of copper, zinc, and nickel to *Pimephales promelas*: Evidence of more-than-additive effect. Environmental Toxicology. 35(2): 446-457.
12. **Wong, M.H., Luk, K.C. and Choi, K.Y., 1977.** The effects of zinc and copper salts on *Cyprinus carpio* and *Ctenopharyngodon idellus*. Acta Anatomica. 99: 450-454.
13. **Delahaut, V., Rašković, B., Salvado, M.S., Bervoets, L., Blust, R. and Boeck, G.D., 2020.** Toxicity and bioaccumulation of Cadmium, Copper and Zinc in a direct comparison at equitoxic concentrations in common carp *(Cyprinus carpio)* juveniles. PLoS One. 15(4). doi: 10.1371/journal.pone.0220485.
14. **Svecevičius, G., 2012.** Acute Toxicity of Zinc to Common Freshwater Fishes of Lithuania. Acta Zoologica Lituanica. 9(2): 114-118.
15. **Farhangi, M., Hajimoradloo, A.M. and Rostami Charati, F., 2014.** Determination of lethal concentration 50, 96h of Zinc (LC5096h, ZnSO4) on Common carp (*Cyprinus carpio*) under experimental condition. Journal of Animal Research. 27(1): 119-125. (In Persian)
16. **Naji, T., Safaiyan, Sh., Rostami, M. and Sabrjo, M., 2016.** Investigating the effects of zinc sulfate on the gill tissue of common carp juveniles. Environmental Science and Technology. 9(2): 29-36. (In Persian)
17. **Li, X.F., Wang, P.F., Feng, C.L., LiU, D.Q., Chen, J.K. and Wu, F.C., 2019.** Acute Toxicity and Hazardous Concentrations of Zinc to Native Freshwater Organisms Under Different pH Values in China. Bull Environmenal Contamination Toxicology. 103(1): 120-126.
18. **TRC. 1984.** OECD Guideline for testing of chemical, Section 2, Effects on biotic systems. OECD. 39 p.
19. **Ramírez-Duarte, W.F., Rondón-Barragán, I.S., Pedro, R. and Eslava-Mocha, P.R., 2008.** Acute toxicity and histopathological alterations of Roundup herbicide on cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). Pesquisa Veterinária Brasileira. 28(11): 1001-1007.
20. **Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P. and Wahli, T., 1999.** Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. Journal Fish Disease. 22(1): 25-34.
21. **Roberts, R.J., 2012.** Fish pathology. 4th edition. Wiley Blackwell, UK. 590 p.
22. **Adhikari, S., 2004.** Interference of magnesium on zinc adsorption by pond sediment and on zinc accumulation in a freshwater teleost, *Labeo Rohita* (Hamilton). Ecotoxicology and environmental safety. 59: 228-231.
23. **Zeng, L., Huang, L., Zhao, M., Liu, Sh., He, Zh., Feng, J., Qin, Ch. and Yuan, D., 2018.** Acute toxicity of zinc sulfate heptahydrate ($ZnSO_4.7H_2O$) and copper (II) sulfate pentahydrate ($CuSO_4.5H_2O$) on freshwater fish, *Percocypris pingi*. Fisheries and Aquaculture Journal. 9(1): 1-5.
24. **Taweel, A.; Shuhaimi, O.M. and Ahmad, A.K., 2013.** In vivo Acute Toxicity Tests of Some Heavy Metals to Tilapia Fish *(Oreochromis niloticus)*. Journal of Biological Sciences. 13: 365-371.
25. **Lushchak, V.I., 2011.** Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. Aquat Toxicol. 101: 13-30.
26. **Bielmyer, G.K., Bullington, J.B., Decarlo, C.A., Chalk, S.J. and Smith, K., 2012.** The Effects of salinity on acute toxicity of Zinc to two euryhaline species of fish, *Fundulus*

heteroclitus and *Kryptolebias marmoratus.* Integrative and Comparative Biology. 25(6): 753-760.

27. **Gervehi, H., Jamili, Sh. and Rostami, M., 2017.** The effect of aluminum sulfate toxicity on the gill tissue of Kalema fish. Journal of research in livestock and aquatic affairs. 79: 193-198. (In Persian)

28. **Saedmochshi, S., Sudagar, M., Mazandarani, M.R. and Hosseini, S.S., 2014.** Histopathological effects of nanoparticles on aquatic animals. Ornamental Aquatic Journal. 2(1): 25-30. (In Persian)

29. **Van, H., Vosloo, A. and Nikinmaa, M., 2004.** Effects of short-term copper exposure on gill structure, methallothionein and hypoxia-inducible factor-1á (HIF-1á) levels in rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss)*. Aquatic Toxicology. 69: 271-280.

30. **Ghasemzadeh, J., Nourozi, Z., Sinaii, M., Kuhkan, A. and Shahabadi, H.A., 2015.** Histopathology of the Liver and Gills of Grey Mullet (*Mugil cephalus* L.), Fed with Dietary Amino-acid cysteine under Exposure to Heavy Metals Cu and Zn. Journal of Marine Biology. 8(4): 21-34. (In Persian)

31. **Khosravi Katoli, Kh., Shabani, A., Kolangi Miandarreh, H. and Imanpour, M., 2017.** The effect of sublethal concentrations of silver nanoparticles and silver nitrate on HSP70 gene expression and gill, liver and intestinal tissue damage in common carp. Journal of Animal Environment. 10(4): 339-350. (In Persian)

32. **Mok, W., Hatanaka, Y., Seoka, M., Itoh, T., Tsukamasa, Y. and Ando, M., 2014**. Effects of additional cysteine in fish diet on mercury concentration. Food Chemistry. 147: 340 345.