13 (2) 283-286, Summer 2021

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

Original Research Paper

The effects of sub-lethal doses of copper sulfate in zebra fish ovary tissue

Bahareh Shokouhian ghahfarokhi, Roghieh Safari*, Mohammadreza Imanpour, Ali Jafar

Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Key Words

Copper sulfate
Ovary
Zebra fish

Abstract

Introduction: Copper is one of the heavy metals used in aquaculture for the elimination of algae, as well as prevention and treatment of fish diseases. The effects of sub-lethal doses of copper sulfate in zebra fish ovary tissue were investigated in 30-day exposure.

Materials & Methods: For this purpose, 270 females with average weight of 0.3±0.05 were subjected to 0, 0.02 and 0.04 mg/l cuso4. At the end trail, samplings were done from gonad tissue and the tissue sections were prepared.

Result: Results showed that in the control group, ovary tissue was normal and major of the oocytes were sexually at the beginning and end of fourth stage. In 0.02 mg/l oocytes were in the second and third stage. In 0.04 mg/l, the slight growth of ovarian was observed and oocytes were in the second stages and a number of oocytes were observed at the beginning of third stage and atrotic follicles were observed in gonad tissue.

Conclusion: This process shows an increase in egg growth with increasing copper sulfate concentration.

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

Received: 2 March 2020; Reviewed: 13 April 2020; Revised: 27 May 2020; Accepted: 22 June 2020
(DOI): 10.22034/aej.2021.138395

مقاله پژوهشی

تاثیر غلظت‌های تحت‌کشنده سولفات مس بر بافت تخمدان در ماهی گورخری (*Danio rerio*)

*بهاره شکوهیان‌قهفرخی، رقیه صفری**، محمدرضا ایمانپور، علی جافر*

گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

کلمات کلیدی

سولفات مس
تخمدان
ماهی گورخری

چکیده

مقدمه: مس یکی از فلزات سنگین است که در پرورش آبزیان برای از بین بردن جلبک‌ها و هم‌چنین در پیشگیری و درمان برخی از بیماری‌های ماهی به‌کار می‌رود. در این پژوهش اثرات غلظت‌های تحت‌کشنده سولفات‌مس بر بافت تخمدان ماهی گورخری در مواجهه ۳۰ روزه مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: بدین‌منظور ۲۷۰ ماهی ماده بامیانگین وزنی ۰/۰۵±۰/۳ گرم در ۲ تیمار تحت‌کشنده سولفات مس ۰/۰۲ و ۰/۰۴ میلی‌گرم بر لیتر و تیمار شاهد با ۳ تکرار قرار گرفتند. در پایان دوره نمونه‌برداری از بافت گناد ماهیان انجام و مقاطع بافتی تهیه شد.

نتایج: نتایج نشان داد که در تیمار شاهد، بافت تخمدان طبیعی و اکثر تخمک‌ها در ابتدا و انتهای مرحله چهارم رسیدگی جنسی بودند. در تیمار ۰/۰۲ میلی‌گرم بر لیتر تخمک‌ها در مرحله دوم و سوم رسیدگی جنسی مشاهده شدند. در تیمار ۰/۰۴ میلی‌گرم بر لیتر، رشد ناچیز تخمدان مشاهده و تخمک‌ها عمدتاً در مرحله دوم رسیدگی جنسی و تعداد محدودی در ابتدای مرحله سوم رسیدگی جنسی خود قرار داشته و فولیکول‌های آترتیک در بافت تخمدان مشاهده شد.

نتیجه‌گیری و بحث: این روند رسیدگی نشان‌دهنده کاهش رشد تخمک با افزایش غلظت سولفات مس می‌باشد.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: roghi_safari@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۲ اسفند ۱۳۹۸؛ تاریخ داوری: ۲۵ فروردین ۱۳۹۹؛ تاریخ اصلاح: ۷ خرداد ۱۳۹۹؛ تاریخ پذیرش: ۲ تیر ۱۳۹۹
(DOI): 10.22034/aej.2021.138395

مقدمه

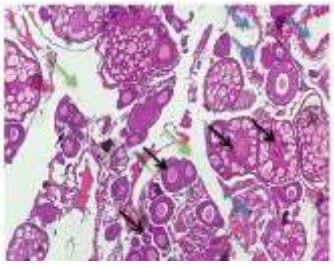
امروزه صنعت و شیوه‌های نوین کشاورزی موجب وارد شدن مقادیر زیادی از ترکیبات شیمیایی مختلف و فلزات سنگین به محیط زیست شده است. در اکوسیستم‌های آبی فلزات سنگین به‌عنوان مهم‌ترین آلاینده محسوب می‌شود. مس یکی از این فلزات سنگین است که به سبب ثبات شیمیایی، تجزیه‌پذیری ضعیف و افزایش قدرت تجمع زیستی در بدن موجودات زنده برای سلامتی ماهی خطرناک بوده، سیستم ایمنی بدن را تضعیف کرده و به‌طور موثر بر حیات و تولید مثل ماهی‌ها تاثیر می‌گذارد (Ling و همکاران، ۲۰۰۹). در این راستا پژوهشگران توجه خود را به انجام تحقیقاتی درخصوص مشخص نمودن میزان آلودگی منابع مختلف آبی، چگونگی تقلیل آلودگی، نحوه جذب فلزات سنگین توسط آبزیان، تجمع زیستی فلزات سنگین در بافت‌های مختلف آبزیان، امکان استفاده از برخی آبزیان به‌عنوان شاخص‌های زیستی، تغییرات وآسیب‌های ایجاد شده در بافت‌ها و بسیاری از زمینه‌های تحقیقی دیگر معطوف کرده‌اند (شاپوری و همکاران، ۱۳۸۸؛ Finpederson، ۱۹۹۴). مس اغلب به‌صورت سولفات مس برای کنترل رشد فیتوپلانکتون‌ها و جلبک‌های رشته‌ای وکنترل برخی بیماری‌های ماهی‌ها در کارگاه‌های پرورش ماهی استفاده می‌شود (Boyd، ۱۹۹۰). سولفات مس به‌خوبی در آب حل شده و می‌تواند همراه با آب به‌صورت یون توسط موجودات زنده جذب شود و در نهایت در بافت‌های مختلف تجمع می‌یابد. اثرات سمی مس از برهم‌زدن تعادل اسمزی تا مرگ می‌تواند متغیر باشد. مس از طریق آب یا غذا وارد بدن ماهی می‌شود و اعتقاد بر این است آلودگی با این فلز بافت‌هایی نظیر ماهیچه، پوست و به‌طور عمده اندام‌های آبشش، کبد، کلیه و گناد را درگیر می‌نماید (Sobha و همکاران، ۲۰۰۷). براساس منابع علمی تماس با غلظت‌های متفاوت این فلز در ماهیان موجب آسیب‌های بافتی، تغییرات آنزیمی، تغییرات فراسنجه‌های خون‌شناسی،ژنتیکی،رفتاری، تولیدمثلی و حتی مرگ در گونه‌های مختلف آبزیان می‌گردد (Sassi و همکاران، ۲۰۱۳). شدت آسیب وارد شده به نوع آلاینده، غلظت و مدت زمان مواجهه و نوع گونه بستگی دارد (Fanta و همکاران، ۲۰۰۳؛ Sassi و همکاران، ۲۰۱۳). مطالعات متعددی در رابطه با اثرات آلاینده‌ها بر فیزیولوژی تولیدمثل آبزیان در سطح بافت شناسی صورت گرفته است که از آن جمله می‌توان به مطالعه Kown و همکاران(۲۰۱۶) در ماهی گورخری در مواجهه با میکروسیستین، Zhang و همکاران (۲۰۱۶) و Jinling و همکاران (۲۰۱۹) در گربه‌ماهی و ماهی گورخری در مواجهه با فلز سنگین مس اشاره نمود. تاکنون تحقیقات مختلفی بر روی اختلالات تخمدان آبزیان به‌علت قرارگرفتن در معرض آلاینده‌های مختلف صورت گرفته است اما در مورد اثرات سولفات مس به‌عنوان یک فلز سنگین روی آسیب بافت تخمدان ماهی گورخری تحت غلظت‌های مورد بررسی یافت نشده است. مطالعه حاضر باهدف بررسی آسیب‌های بافتی احتمالی ناشی از مواجهه با این فلز سنگین در این‌گونه صورت پذیرفت.

مواد و روش‌ها

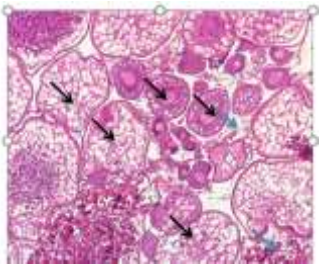
بچه‌ماهیان گورخری با میانگین وزنی ۰/۰۵±۰/۳ گرم از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان زینتی شصت‌کلاته گرگان خریداری و به مرکز تحقیقات آبزی‌پروری شهیدفضلی برآبادی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل گردید. پس از دو هفته سازگاری ماهی‌ها با تراکم ۳۰ عدد در آکواریوم به‌طور تصادفی در معرض ۳ تیمار ۰، ۰/۰۲، ۰/۰۴ میلی‌گرم بر لیتر سولفات مس (براساس LC۵۰ به‌دست آمده توسط شکوهیان‌قهفرخی و همکاران، منتشر نشده) برای مدت ۳۰ روز نگه‌داری شدند. در طی دوره ماهی‌ها روزانه به‌میزان ۳ درصد وزن بدن در ۴ نوبت در روز با استفاده از غذای بیومار (فرانسه) تغذیه شدند. در انتهای دوره آزمایش جهت مطالعات بافت‌شناسی و تعیین مرحله رسیدگی جنسی ۶ ماهی به‌طور تصادفی از هر تیمار صید و با استفاده از پودر گل میخک ۰/۵ گرم بر لیتر بی‌هوش و کشته شدند. نمونه‌برداری از گناد ماهی‌ها انجام و در فرمالین ۱۰ درصد فیکس شد. بافت‌های گناد تثبیت شده در فرمالین پس از ۲۴ ساعت به الکل ۷۰ درصد منتقل شد. سپس آبگیری با افزایش اتانول (۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰) درصد انجام و در ادامه در زایلن وارد شدند. تمامی این مراحل توسط دستگاه پاساژ بافت تحت برنامه تعریف شده برای این‌کار صورت گرفت. بافت‌ها سپس با پارافین (دمای‌ذوب ۵۸-۵۶ درجه سانتی‌گراد) بر روی قالب‌های تیشیوتک قالب‌گیری و پارافینه شدند (Fernandes وهمکاران، ۲۰۰۷).از قالب‌های پارافینِ با استفاده از دستگاه میکروتوم برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرومتر تهیه و پس از قرار دادن بر روی لام، به‌مدت ۳۰ دقیقه در آون (۶۰ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شد تا پارافین اضافه از روی بافت حذف شود. نمونه‌ها پس از پارافین‌زدایی و جایگزینی آن با زایلن به‌وسیله سری‌های کاهشی اتانول (۱۰۰، ۹۰، ۷۰) آب‌دهی مجدد و با استفاده از محلول‌های هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شدند. بافت‌های تهیه شده مجدداً به آون منتقل شده تا خشک شوند. تمامی موارد استفاده در این مراحل محصول شرکت مرک می‌باشد. در نهایت با استفاده از چسب هیستوفلیود برروی لام‌های تهیه شده لامل چسبانده شد(Fanta و همکاران، ۲۰۰۳). سپس اسلایدهای تهیه شده توسط میکروسکوپ اینورت (مدل نیکون TS۱۰۰) آزمایشگاه ماهی‌شناسی دانشکده شیلات و محیط‌زیست مورد مطالعه قرار گرفت و سپس با استفاده از میکروسکوپ از نمونه‌ها عکس‌هایی به بزرگ‌نمایی (۱۰X) تهیه شد و عکس‌ها به‌صورت کیفی مورد بررسی قرار گرفت. دمای آب ۲۵ درجه سانتی‌گرادو میانگین PH آب ۸/۲ اندازه‌گیری شد.

نتایج

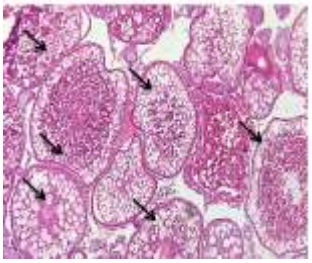
در پایان دوره ۳۰ روزه مواجهه با غلظت‌های تحت‌کشنده فلز سنگین سولفات مس هیچ‌گونه مرگ و میری در تیمارها مشاهده نشد. کاهش اشتها، شنای آرام و عدم تعادل ازجمله علائم رفتاری در تیمارهای با دوز بالا بود. در بررسی بافتی تخمدان از مهم‌ترین علائم مشاهده شده کاهش چشمگیر اندازه تخمدان در تیمار با دوز بالا (۲ درصد) نسبت به گروه شاهد بود. در بررسی رسیدگی جنسی تخمک‌ها، بخش عمده تخمک‌های گروه شاهد (شکل۱) که در معرض سم قرار نگرفته بودند در انتهای مرحله سوم و ابتدای مرحله چهارم رسیدگی جنسی قرار بودند. درصورتی‌که تخمک‌های تیمارهای دیگر در مراحل پایین‌تر رسیدگی جنسی قرار داشتند. در تیمار ۱ درصد (شکل ۲) تخمک‌ها در مرحله دوم و سوم رسیدگی جنسی و تیمار ۲ درصد (شکل ۳) بخش عمده در مرحله دوم رسیدگی جنسی و تعداد محدودی در ابتدای مرحله سوم رسیدگی جنسی خود قرار داشتند. این روند رسیدگی تخمک‌ها در تیمارهای مختلف نشان‌دهنده کاهش رشد تخمک نسبت به افزایش غلظت فلز سنگین می‌باشد. هم‌چنین در غلظت بالا فولیکول‌های آترتیک و هایپرپلازیا در لایه گرانولوزا نیز مشاهده شد درصورتی‌که بافت تخمدان در تیمار شاهد رشد طبیعی و خوبی داشته است.



شکل ۳: تیمار ۲ و ۳ درصد غلظت کشنده سولفات‌مس(۰/۰۴میلی‌گرم) درماهی گورخری
بخش عمده در مرحله دوم رسیدگی جنسی و تعداد محدودی در ابتدای مرحله سوم (فلش مشکی). وجود مناطق فاقد سلول (فلش سبز). وجود فولیکول‌های آترتیک (فلش آبی)



شکل ۲: تیمار ۱ و ۲ درصد غلظت کشنده سولفات‌مس(۰/۰۲میلی‌گرم) درماهی گورخری
بخش عمده اووسیت‌ها در انتهای مرحله دوم و مرحله سوم رسیدگی جنسی (فلش مشکی). وجود فولیکول‌های آترتیک (فلش آبی)



شکل۱: تیمار شاهد (فاقد سولفات مس) بخش عمده اووسیت‌ها در انتهای مرحله سوم و ابتدای مرحله چهارم (فلش مشکی)

بحث

مطالعات هیستوپاتولوژی به‌عنوان یک نشانگر برای ارزیابی فاکتورهای نامطلوب ازجمله آلاینده‌ها مختلف مورد توجه قرار گرفته‌است. آلاینده‌ها مستقیماً از طریق آبشش یا همراه با آب یا غذا ازطریق مجاری گوارشی وارد روده شده و پس از جذب توسط سیاهرگ‌های کبدی وارد کبد می‌شود، هرچند بخشی از این سموم ازطریق سم‌زدایی در کبد از بدن دفع می‌شود اما بخشی در اندام‌های مختلف بدن ذخیره و آسیب‌های مختلفی ازجمله یافتی وارد می‌نماید (Shobikhuliatul و همکاران، ۲۰۰۳). مطالعات انجام شده حاکی از این است که انباشت و سمیت فلزات سنگین ازجمله مس در بافت‌ها به غلظت فلز، PH آب و مدت زمان قرارگیری در معرض فلز سنگین، دمای آب، غلظت اکسیژن، سختی و شوری بستگی دارد. اگرچه گزارشاتی از مرگ و میر در ماهیان در غلظت‌های بالای این فلز ارائه شده، اما کاهش توان تولید مثل و میزان باروری ازجمله تبعات ناشی از قرارگیری در معرض این فلز حتی در مقادیر کم می‌باشد (Krishnani و همکاران، ۲۰۰۳). هم‌چنین اثرات سمیت مزمن فلز مس ازجمله تضعیف رشد، کاهش ایمنی بدن، مشکلات تولیدمثلی و تغییراتی در بافت گناد مشاهده شده است (Gad و Yacoub، ۲۰۱۲). در مطالعه شاپوری و همکاران (۱۳۸۸) در تخمدان کپورمعمولی تغییرات نکروتیک و دژنرسانس در تخمک‌ها در مواجهه با سولفات مس مشاهده شد. فلزات هم‌چنین بر ماکرومولکول‌ها به‌عنوان مثال آنزیم‌هایی که در حفظ فیزیولوژی طبیعی موثرند اثر گذاشته و سبب غیرفعال شدن آن‌ها می‌گردند (Liu و همکاران، ۲۰۱۰a). مطالعات زیادی در رابطه با میزان تاثیرگذاری فلز سنگین بر وضعیت تولیدمثل و آسیب بافت تخمدان انجام شده که همه آن‌ها گویای تاثیر مخرب بر روند تولیدمثلی می‌باشند. در مطالعه Jinling و همکاران (۲۰۱۹) بر تاثیر مس بر تخمدان ماهی گورخری، کاهش درصد فولیکول‌های ثانویه و بالغ و ضایعاتی در تخمدان ماهی مشاهده شد و به‌مدت زمان مواجهه و میزان فلز سنگین نسبت داده شد. نتایج مشابهی در گربه ماهی در معرض مس توسط Zhang و همکاران (۲۰۱۶) گزارش شد. Krian و همکاران (۲۰۱۷). در بررسی حاضر مطالعات انجام شده بر تخمدان ماهی گورخری در مواجهه با غلظت‌های مختلف سولفات مس نشان‌دهنده پیدایش آسیب‌های هیستو پاتولوژیکی در بافت تخمدان می‌باشدکه این آسیب با افزایش غلظت سولفات مس و هم‌چنین افزایش مدت زمان در معرض قرارگیری بافت تخمدان با سولفات مس تشدید شده است.کاهش اندازه تخمدان، کاهش رشد و مراحل رسیدگی جنسی تخمک‌ها به‌ویژه در تیمار ۰/۰۴ نسبت به گروه شاهد از مهم ترین علائم مشخص در این آزمایش می‌باشد.در تیمار شاهد بافت تخمدان در حالت طبیعی بوده و تخمک‌ها در ابتدا و انتهای مراحل چهارم رسیدگی جنسی خود می‌باشند در

صورتی‌که این‌حالت‌در تیمارهای‌دیگر مشاهده نمی‌گردد. در تیمارهای مواجه شده با سولفات مس سلول‌هایی با فولیکول‌های آترزیا نیز مشاهده می‌شود. پدیده آترزیا یک فرایند کنترل شده هورمونی و فاسد کننده طبیعی است که برای توصیف شکست و دوباره جذب شدن گامت‌ها استفاده می‌گردد (Santos و همکاران، ۲۰۰۸). بنابراین وقوع آترزیا یا دژنره‌شدن اووسیت در اغلب تخمک‌های در مرحله زرده‌سازی ممکن است از نظر فیزیولوژیک امری طبیعی باشد، اما افزایش تعداد تخمک‌هایی‌که دچار پدیده آترزیا می‌شوند در شرایط نامساعد محیطی و فیزیولوژیکی می‌تواند یک شاخص زیستی به‌حساب می‌آید (بنایی و همکاران، ۱۳۸۸). شموشکی و همکاران (۱۳۹۰)، اثر غلظت‌های تحت کشنده سم دیازینون را بر بافت گناد ماهی سفید مولد نرمورد بررسی قرار داده، نتایج نشان داد وزن گناد و شاخص‌گنادی کاهش یافته و عوارضی ازقبیل اتروفی و کاهش اسپروماتید مشاهده شد. به‌طورکلی وجود آلاینده‌هایی چون فلز سنگین مس در محیط سبب استفاده از بخش‌قابل‌توجهی‌ازانرژی‌دریافتی‌ازطریق‌غذاجهت‌برقراری‌هوموستازی و حفظ تعادل فیزیولوژیکی بدن و ایمنی شده و کاهش رشد غدد جنسی‌و رسیدگی‌جنسی را به‌همراه خواهد‌داشت. آسیب‌های بافتی ناشی از فلزات سنگین به غلظت و مدت زمان مواجهه بستگی دارد. نتایج نشان داد که در تیمار شاهد، بافت تخمدان طبیعی و اکثر تخمک‌ها در ابتدا و انتهای مرحله چهارم رسیدگی جنسی بودند. در تیمار ۰/۰۲ میلی گرم بر لیتر تخمک‌ها در مرحله دوم و سوم رسیدگی جنسی مشاهده شدند. در تیمار ۰/۰۴ میلی‌گرم بر لیتر، رشد ناچیز تخمدان مشاهده و تخمک‌ها عمدتاً در مرحله دوم رسیدگی جنسی و تعدادمحدودی در ابتدای‌مرحله‌سوم رسیدگی جنسی خود قرار داشته و فولیکول‌های‌آترتیک‌در بافت‌تخمدان‌مشاهده شد. این‌روند رسیدگی نشان‌دهنده کاهش‌رشدتخمک با افزایش‌غلظت سولفات‌مس می‌باشد.

منابع

۱. **بنایی، م.؛ میرواقفی، ع.ر.؛ احمدی، ک. و عاشوری، ر.، ۱۳۸۸.** تاثیر غلظت تحت‌کشنده دیازینون بر تغییرات هیستوپاتولوژیک بیضه و تخمدان ماهی کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*). مجله بیولوژی دریا. دوره ۱، شماره ۲، صفحات ۱۴ تا ۲۶.

۲. **درویشی، م.؛ صفری، ر.؛ شعبانی، ع. و حسینی‌فر، س.ح.، ۱۳۹۷.** تاثیر غلظت‌های تحت کشنده دیازینون بر بافت تخمدان در ماهی گورخری (*Danio rerio*). فصلنامه محیط زیست جانوری. سال ۱۰، شماره ۱، صفحات ۲۵۷ تا ۲۶۲.

۳. **شاپوری، م.؛ عریان، ش. و اسماعیلی‌ساری، ع.، ۱۳۸۸.** بررسی تاثیر فلز مس بر تغییرات هیستوپاتولوژیک بافت‌های عضله، کبد و گناد ماهی کپورمعمولی. مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی. سال ۳، شماره ۶، صفحات ۲۴ تا ۲۹.

۴. **محمدنژادشموشکی، م.؛ سلطانی، م.؛ شریف‌پور، ع.؛ ایمانپور، م.ر.؛ بهارلویی، ا. و نعیمی، م.ا.، ۱۳۹۰.** بررسی اثر غلظت‌های تحت‌کشنده سم دیازینون بر بافت‌های گناد، مغز و قلب مولدین نر ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum* Kamensky, 1901). مجله دامپزشکی دانشگاه‌آزاد اسلامی واحد تبریز. دوره ۵، شماره ۳، صفحات ۱ تا ۱۵.

5. **Boyd, C.E., 1990.** Water quality in ponds for aquaculture. Alabama Agricultura. Experiment Station, Auburn University, USA.

6. **De Boeck, G.; aeminck, A. and Blust, R., 1997.** Effects of sublethal Cu exposure on Cu accumulation, food consumption, growth, energy stores, and nucleic acid content in common carp. Arch. Environ. Contam. Toxicol. Vol. 33, pp: 415-422.

7. **Fanta, E.; Rios, F.S.; Romao, S.; Vianna, A. and Freiberger, S., 2003.** Histopathology of the fish Corydoras paleatus contaminated with sublethal levels of organo phosphorus in water and food. Ecotoxicology and Environmental Safety. Vol. 54, pp: 119-130.

8. **Fernandes, A.; Ferreira-Cadoso, J.V.; Garcia-Santos, S.; Monteiro, S.M.; Carrola, J.; Matos, P. and Fontainhas Fernandes, A., 2007.** Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), exposed to waterborne copper. Pesquisa Veterinaria Brasileria. Vol. 27, No. 3, pp: 103-109.

9. **Finpederson, R., 1994.** Ecotoxicological Evaluation of indutrial wast water, Ministry of the Envoronment, Denmark, 1994. pp: 360-380.

10. **Jinling, C.; Guodong, W.; Tianyu, W.; Jianjie, Ch.; Guo Wenjinga, P.; Wua, X.H. and Lingtian, X., 2019.** Copper caused reproductive endocrine disruption in zebrafish (*Danio rerio*). Aquatic Toxicology. Vol. 211, pp: 124-136.

11. **Kwon, B.; Shin, H.; Moon, H.B.; Ji, K. and Kim, K.T., 2016.** Effects of tris (2-butoxyethyl) phosphate exposure on endocrine systems and reproduction of zebrafish (Danio rerio). Environmental Pollution. Vol. 214, pp: 568-574.

12. **Krishnani, KK.; Azad, K.; IS, M.; Thirunavukkarasu, AR. and Gupta, B.P., 2003.** Acute toxicity of some heavy metals to *Lates calcarifer* fry with a note on its histopathological manifestations. J Environ Sci Health A. Vol. 38, pp: 645-655.

13. **Ling, X.P.; Zhu, J.Y.; Haung, L. and Huang, H.Q., 2009.** Proteomic changes in response to acute cadmium toxicity in gill tissue of Paralichthys olivaceus. Environmental Toxicology and Pharmacology. Vol. 27, pp: 211-218.

14. **Liu, C.; Deng, J.; Yu, L.; Ramesh, M. and Zhou, B., 2010a.** Endocrine disruption and reproductive impairment in zebrafish by exposure to 8:2 fluorotelomer alcohol. Aquat. Toxicol. Vol. 96, pp: 70-76.

15. **Mcgeer, J.C.; Szebedinszky, C.; Mcdonald, D.G. and Wood, C.M., 2015.** Effects of chronic sublethal exposure to waterborne cu, cd or zn in rainbow trout. 1: iono-regulatory disturbance and metabolic costs. Aquat. Toxicol. Vol. 50, No. 3, pp: 231-243.

16. **Santos, H.B.; Sato, Y.; Moro, L.; Bazzoli, N. and Rizzo, E., 2008.** Relationship among follicular apoptosis, integrin β1 and collagen type IV during early ovarian regression in the teleost *Prochilodus argenteus* after induced spawning. Cell and tissue research. Vol. 332, pp: 159-170.

17. **Sassi, A.; Darias, M.J.; Said, K.; Messaoudi, I. and Gisbert, E., 2013.** Cadmium exposure affects the expression of genes involved in skeletogenesis and stress response in gilthead sea bream larvae. Fish Physiology and Biochemistry. Vol. 39, No. 3, pp: 649-659.

18. **Shobikhuliatul, J.J.; Andayani, S.; Couteau, J.; Risjani, Y. and Minier, C., 2013.** Some aspect of reproductive biology on the effect of pollution on the histopathology of gonads in puntius javanicus from mas river, surabaya, indonesia. J. Biol. Life Sci. Vol. 4, pp: 191-205.

19. **Sobha, K.; Poornima, A.; Harini, P. and Veeraiah, K., 2007.** A study on biochemical changes in the fresh water fish. (*Catla catla*) exposed to the heavy metal toxicant cadmium chloride. Journal of Science Engineering and Technology. Vol. 1, No. 5, pp: 1-11.

20. **Yacoub, A.M. and Gad, N.S., 2012.** Accumulation of some heavy metals and biochemical alterations in muscles of *Oreochromis niloticus* from the River Nile in Upper Egypt. Int. J. Environ. Sci. Eng. Vol. 3, pp: 1-10.

21. **Zhang, Q.F.; Li, Y.W.; Liu, Z.H. and Chen, Q.L., 2016.** Reproductive toxicity of inorganic mercury exposure in adult zebrafish: histological damage, oxidative stress, and alterations of sex hormone and gene expression in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. Aquatic Toxicology. Vol. 177, pp: 1-10.