# بررسی اثرات فلز سنگین مس بر برخی شاخص‌های فیزیولوژیکی ماهی فیتوفاگ پرورشی (*Hypophthalmichthys molitrix*)


- **جواد سپاهی***: گروه شیلات، واحد بندرعباس، دانشگاه آزاد اسلامی، بندرعباس، ایران
- **دل‌آرام نخبه‌زارع**: گروه شیلات، واحد بندرعباس، دانشگاه آزاد اسلامی، بندرعباس، ایران
- **رها فدایی‌راینی**: گروه شیلات، دانشکده مهندسی منابع طبیعی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، ایران


تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۷

## چکیده

**در این تحقیق، به‌منظور تعیین سمیت حاد فلز سنگین مس بر برخی شاخص‌های خونی و بیوشیمیایی ماهی فیتوفاگ، ۲۷۰ قطعه ماهی در مجاورت غلظت‌های ۰، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات مس (Cu(No3)2) قرار گرفتند. نمونه‌برداری از ماهیان در زمان‌های ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت انجام شد. همه ماهیان در مجاورت غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر پس از ۱۲ ساعت و در مجاورت ۵ میلی‌گرم در لیتر پس از ۲۴ ساعت تلف شدند و میزان LC۵۰ در ۲۴ ساعت آن ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر تعیین گردید. نتایج نشان داد که درصد هماتوکریت (Hct) با افزایش غلظت مس و با گذشت زمان افزایش یافت (p<۰/۰۵). سطوح هموگلوبین (Hb)، تعداد گلبول‌های سفید (WBC)، میانگین غلظت هموگلوبین ذره‌ای (MCHC) و میانگین هموگلوبین ذره‌ای (MCH) به‌طور معنی‌داری از ساعت صفر تا ساعت ۲۴ کاهش یافت (p<۰/۰۵). نتایج شمارش افتراقی گلبول‌های سفید نشان داد که با افزایش غلظت مس و با گذشت زمان، تعداد لنفوسیت‌ها کاهش و تعداد نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها افزایش یافت (p<۰/۰۵). تغییرات سطوح تری‌گلیسرید در زمان ۲۴ ساعت بین تیمار ۵ میلی‌گرم در لیتر و شاهد اختلاف معنی‌داری نشان داد (p<۰/۰۵)، ولی سطوح کلسترول فاقد اختلاف معنی‌دار بود. سطوح گلوکز و آلبومین پلاسمای خون با افزایش غلظت نیترات مس در زمان ۱۲ و ۲۴ ساعت به‌طور معنی‌داری تغییر کرد (p<۰/۰۵). سطوح پروتئین کل در زمان ۲۴ ساعت در تیمار ۵ میلی‌گرم در لیتر نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری را نشان داد (p<۰/۰۵). براساس نتایج حاصل، شاخص‌های خونی فاکتورهای حساس در پایش سمیت مس و استرس ناشی از آن به‌ویژه در غلظت‌های مورد مطالعه، می‌باشند.**

**کلمات کلیدی:** مس، شاخص‌های خونی، شاخص‌های بیوشیمیایی، فیتوفاگ



* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: sepahijavad@yahoo.com

## مقدمه

فلزات سنگین از منابع کشاورزی، شهری و صنعتی به آب‌ها رهاسازی و از طریق زنجیره غذایی به ماهی و انسان منتقل می‌شوند (شریف‌فاضلی و همکاران، ۱۳۸۴).اثرات غلظت‌های تحت‌کشنده فلزات سنگین بر فرایند فیزیولوژیکی در ماهیان به‌خوبی مطالعه نشده است. استفاده از منابع آب‌های داخلی با افزایش بی‌رویه جمعیت، گسترش شهرها و صنایع ازجمله عواملی است که نگرانی‌های بشر را نسبت به دستاوردهای تکنولوژی خویش بیش‌تر کرده است. شرایط هنگامی بحرانی خواهد شد که تجمع این فلزات از سطوح پایین هرم غذایی به سطوح بالاتر زنجیره همواره رو به افزایش باشد. این معضل بعد از گذشت چند نسل شدت خاصی پیدا می‌کند و سرانجام به موجوداتی می‌رسد که مستقیم در جیره غذایی انسان قرار می‌گیرند و سبب بیماری‌ها و نارسایی‌های خاص و خطرناک می‌گردد (WHO، ۲۰۰۰). آلودگی آب با عناصر فلزات سنگین، منجر به مسمومیت خونی ماهیان و به‌دنبال آن تلفات مستقیم و یا مسمومیت مزمن و تغییرات مهم در فیزیولوژی ماهیان می‌شود که نتیجه آن عدم توانایی جانور برای ادامه حیات خواهدبود. فلزات‌سنگین تغییرات قابل‌ملاحظه‌ای در چرخه‌های بیوژئوشیمیایی ایجاد می‌کنند و هر یک از آن‌ها دارای آثار بیوشیمیایی خاصی در بدن موجودات زنده هستند (جلالی و آقازاده، ۱۳۸۵). متأسفانه اغلب اوقات زمانی از وجود فلزات سنگین در محیط زیست آبزیان آگاه می‌شویم که غلظت‌های بالای آن‌ها، موجب بروز تلفات در میان موجودات شده است. درحالی‌که، وجود مقادیر غیرکشنده در اغلب موارد، عوارض‌بالینی خاصی در پی نداشته و هم‌چون یک بیماری پنهان، از نظرها دور می‌ماند. یکی از این فلزات مس می‌باشد که به طرق مختلف وارد محیط‌های آبی شده و همواره نگرانی‌هایی را سبب می‌شود. مس یکی از عناصر سنگین است که اگر چه سمیت آن برای ماهی زیاد می‌باشد، ولی ترکیبات آن در پرورش ماهی، برای از بین بردن جلبک‌ها و هم‌چنین در پیشگیری و درمان برخی از بیماری‌های ماهی، به‌کار می‌رود. اثر مس به‌صورت نیترات مس که به‌عنوان جلبک‌کش به‌کار برده می‌شود، بر آبشش‌ها تا ۳ برابر بیش‌تر از سایر فلزات سنگین گزارش شده است. با توجه به این‌که تغییرات غلظت فلزات سنگین در محیط‌های آبی، اثرات سوءزیستی قابل‌توجهی را بر موجودات آبزی به‌ویژه انواع ماهی‌ها پدید آورده و با عنایت به تسلسل زنجیره‌های غذایی در عالم موجودات زنده و ثبات و پایداری فلزات سنگین در بدن موجودات زنده و انتقال آن‌ها به حلقه‌های بعدی زنجیره‌های غذایی، تأثیر فلزات سنگین در حیات موجودات آبزی بسیار حائز اهمیت است (امینی‌رنجبر، ۱۳۷۳). اهمیت علم هماتولوژی به‌عنوان یک علم مبنا و مهم در پاراکلینیک و اهمیت خون به‌عنوان یک شاخص برای تعیین سلامت و بیماری و درجات آن، بر هیچ شخص آگاه از مسائل طب و حیات پوشیده نیست، چون این بافت حیاتی سیال آئینه تمام نمای بسیار روشنی از وضعیت فیزیولوژیک یا احتمالاً پاتولوژیک بدن است.اندازه‌گیری شاخص‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک خون می‌تواند به‌عنوان یک ابزار تشخیصی در سم‌شناسی و پایش زیستی به‌کار رود (Xiaoyan و همکاران، ۲۰۰۹). تغییر در میزان و سطوح این پارامترها می‌تواند منعکس‌کننده پاسخ‌های ماهیان به تغییرات در محیط زندگی آن‌ها باشد (Satheeshkumar و همکاران، ۲۰۱۰). ماهی بخش مهمی از رژیم غذایی انسان است و به‌همین دلیل تحقیقات متعددی در مورد تجمع فلزات سنگین در بافت‌های ماهی در جهان و تعدادی در ایران صورت گرفته است. از مطالعات صورت گرفته در زمینه اثرات فلزات سنگین بر ماهی در ایران می‌توان به بررسی فاکتورهای خونی ماهی حوض (وثوقی و همکاران، ۱۳۷۶)، مطالعه اثرات برخی از فلزات سنگین بر بافت‌های ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) (رستمی بشمن و همکاران، ۱۳۷۹؛ ناجی و همکاران، ۱۳۸۶؛ رستمی‌بشمن و سلطانی، ۱۳۸۸)، در ماهی کلمه (*Rutilus rutilus*) (جاویدگلشن‌آباد وهمکاران، ۱۳۹۴)،درقزل‌آلای‌رنگین‌کمان(*Oncorhynchus mykiss*) (فرهنگی‌وحاجی‌مرادلو،۱۳۸۶)ودربچه‌تاس‌ماهیان‌ایرانی( *Acipenser persicus*) (فتح‌الهی و همکاران، ۱۳۸۹) اشاره نمود. در سایر کشورها مطالعات تخصصی بیش‌تری به‌ویژه در مورد اثر فلزات سنگین ازجمله مس برشاخص‌های خونی‌ماهیان انجام‌شده است. Weiguang و Chen (۱۹۹۵)، مطالعه‌ای در مورد سمیت حاد جیوه، سولفات مس، کادمیوم و سولفات روی در لاروهای ماهی سیم قرمز دریایی (*Chrysophrys major*) انجام دادند. Emad و همکاران(۲۰۰۵)،سمیت‌مس و کادمیوم و اثرات آن بر برخی از شاخص‌های بیوشیمیایی ماهی انگشت‌قد کفال دریایی *Mugil seheli* را بررسی کردند. Georgievaوهمکاران(۲۰۱۰)، اثرات کلینیکی، هماتولوژیکی و مورفولوژیکی سمیت مس در ماهی کاراس(*Carasius gibelio*)رامورد‌مطالعه‌قراردادند. Yilmazوهمکاران (۲۰۱۱)، اثرات سولفات کادمیوم در *گونه Leuciscus cephalus* از خانواده کپورماهیان را مورد مطالعه قرار دادند. Serezli و همکاران (۲۰۱۱)، اثرات حاد مس و سرب بر برخی پارامترهای خونی در گونه Coruh trout (*Salmo coruhensis*) را طی یک دوره مجاورت کوتاه مدت در برابر غلظت‌های بالای ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر مورد مطالعه قرار دادند. از آن‌جاکه اطلاعات کافی در مورد اثر فلز مس بر گونه فیتوفاگ پرورشی وجود ندارد. تحقیق فوق در جهت تعمیم فاکتورهای قابل‌بررسی از نظر غلظت‌های مضر و نامناسب این فلز در کنترل شرایط پرورشی این گونه اقتصادی، حائز اهمیت می‌باشد. با توجه به اهمیت موضوع، این مطالعه با هدف تعیین اثرات فیزیولوژیکی فلز سنگین

مس بر بافت‌های هدف و برخی فاکتورهای سیتولوژیکی، سرولوژیکی و بیوشمیایی خون ماهی فیتوفاگ انجام شد.

## مواد و روش‌ها

**تهیه فلز سنگین، ماهی و نمونه‌گیری**: این تحقیق در مجتمع دانشگاهی سراوان به‌مدت ۲ ماه از آذر تا بهمن ماه ۱۳۹۵ انجام گرفت. تعداد ۲۷۰ عدد ماهی فیتوفاگ پرورشی با میانگین وزنی ۸/۱±۵۱/۶ گرم و میانگین طولی ۲±۱۷/۱ سانتی‌متر، از مراکز پرورش ماهی سراوان در استان سیستان و بلوچستان تهیه و پس از سازگاری ماهیان براساس تیمارهای مورد نظر در ۱۸ عدد آکواریوم ۱۰۰ لیتری حاوی ۹۰ لیتر آب شیر (بدون خروجی و مجهز به هوادهی) و به تعداد ۱۵ عدد ماهی در هر آکواریوم معرفی شدند. نیترات مس خالص در قوطی ۵۰ گرمی تهیه گردید. در مجموع ۳ تیمار، شامل تیمار شاهد (با دوز صفر) و با غلظت ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر به‌طور مجزا برای نیترات مس و هر تیمار با سه تکرار درنظر گرفته شد. پس از تهیه فلزات سنگین نیترات مس با غلظت‌های مورد نظر، مقدار ۱۱۱ میلی‌لیتر از محلول استوک را در هر یک از تکرارهای غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر و ۲۲۲ میلی‌لیتر از استوک در تکرارهای غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر ریخته شد. نمونه‌برداری از ماهیان پس از ۱۲ و ۲۴ ساعت انجام شد. در هر دوره نمونه‌برداری از ناحیه سیاهرگ دمی ماهیان خون‌گیری به‌عمل آمد. عملیات خون‌گیری با استفاده از سرنگ‌های هپارینه باحجم ۲ میلی‌لیتر از سیاهرگ دمی و از زیر باله مخرجی انجام شد. سپس خون در تیوب‌های مخصوص ریخته و به‌منظور انجام مطالعات خون‌شناسی به آزمایشگاه مجتمع دانشگاهی سراوان منتقل شد.

**آزمایشات خون‌شناسی**: در آزمایشگاه، نمونه‌ها با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه، پلاسما تهیه گردید. جهت انجام آزمایش‌های سیتولوژیک و اندازه‌گیری میزان هماتوکریت، هموگلوبین، شمارش گلبول‌های قرمز و سفید، شمارش افتراقی لکوسیت‌ها (لنفوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها) از خون ماهیان و برای اندازه‌گیری برخی شاخص‌های بیوشیمیایی از قبیل میزان کلسترول، تری‌گلیسرید، پروتئین کل، آلبومین و گلوکز از پلاسمای خون ماهیان استفاده گردید (کاظمی و همکاران، ۱۳۸۹).

**شمارش یاخته‌های قرمز ( =Count White Blood cells WBC) و سفید خون (RBC=Count Red Blood cells)**: برای شمارش و رقیق‌سازی گلبول‌های سفید و قرمز و تشخیص آن‌ها از همدیگر از محلول رنگ‌آمیزی گیمسا و به‌وسیله پیپت ملانژور به اندازه کافی محلول به‌دست آمده روی لام نئوبار زیر لامل ریخته شد و با لنز ۴۰ میکروسکوپ نوری یاخته‌ها مورد شمارش قرار گرفت که در آن ۵ مربع کوچک مرکزی جهت شمارش گلبول‌های قرمز و ۴ مربع بزرگ کناری جهت شمارش گلبول‌های سفید استفاده گردید (Klontz، ۱۹۹۴). نحوه محاسبه تعداد یاخته‌های قرمز در هر میلی‌متر مکعب با رقت یک دویستم (کاظمی و همکاران، ۱۳۸۹):

$N = n \times S \times h \times d$

n: مجموع تعداد یاخته‌های قرمز شمارش شده در ۵ مربع کوچک، S: مساحت ۵ مربع (یک پنجم میلی‌متر مربع، h: ارتفاع هر مربع (۰/۱ میلی‌متر)، d: رقت خون در محلول رقیق‌کننده (یک دویستم).

$N = n \times ۵ \times ۱۰ \times ۲۰۰ = n \times ۱۰۰۰۰$

نحوه محاسبه تعداد یاخته‌های سفید در هر میلی‌متر مکعب خون با رقت یک بیستم (کاظمی و همکاران، ۱۳۸۹): $N = n \times S \times h \times d$

n: مجموع تعداد یاخته‌های سفید شمارش شده در ۴ مربع بزرگ، S: مساحت ۴ مربع (۴ میلی‌متر مربع)، h: ارتفاع هر مربع (۰/۱ میلی‌متر)، d: رقت خون در محلول رقیق کننده (یک بیستم)

$N = n \times ۰/۲۵ \times ۱۰ \times ۲۰۰ = n \times ۵۰۰$

**شاخص‌های یاخته‌های قرمز (Red Blood Cell Indices)**: شاخص‌های یاخته‌های قرمز (MCHC و MCH) که برای توصیف اندازه یاخته‌ها و میزان هموگلوبین آن‌ها به‌کار می‌رودو از شمارش یاخته‌های قرمز، غلظت هموگلوبین و هماتوکریت به‌دست می‌آید از روابط زیر محاسبه گردید:

**میانگین غلظت هموگلوبین ذره‌ای (MCHC= MeanCorpuscular Haemoglobin Concentration)**:

درصد MCHC = (گرم در دسی‌لیتر) هموگلوبین / هماتوکریت × ۱۰۰

**میانگین هموگلوبین ذره‌ای (MCH= Mean Corpuscular Haemoglobin )**:

MCH= پیکوگرم

(گرم در دسی‌لیتر) هموگلوبین / (میلیون در میلی‌متر مکعب) تعداد یاخته‌های قرمز × ۱۰

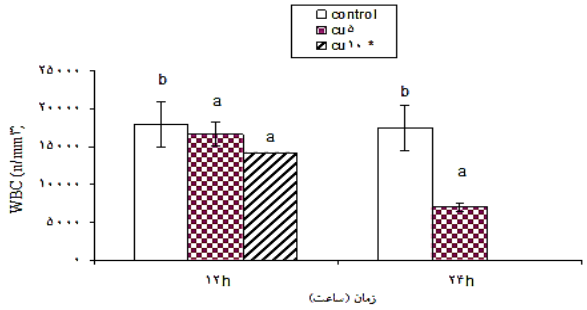
**اندازه‌گیری شاخص‌های بیوشیمیایی**: با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل ۶۵۰۵-UV/VIS، شرکت Jenway، ساخت انگلیس) و کیت پارس آزمون، میزان گلوکز، کلسترول، تری‌گلیسرید، پروتئین کل و آلبومین محاسبه گردید.

**آنالیز آماری**: در نهایت اطلاعات حاصل در فرم‌های مخصوص ثبت و برای رسم نمودار از نرم‌افزار Excel و برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS ۲۱,۰ استفاده شد. جهت آنالیز آماری داده‌ها از آمار توصیفی به‌منظور تعیین میانگین، خطای استاندارد (SE±) مربوط به شاخص‌های خونی (سرولوژیک و سیتولوژیک) و از آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه براساس شاخص‌های مورد بررسی به‌منظور بررسی اختلاف معنی‌دار در سطح خطای ۵ درصد بین تیمارها استفاده گردید.

# نتایج

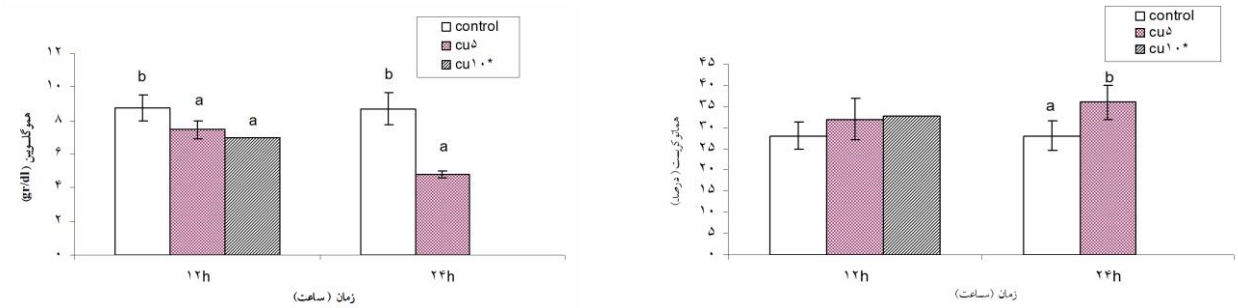
**تلفات و تغییرات رفتاری ماهیان به تفکیک غلظت‌های مختلف:** بیش‌ترین درصد تلفات تا ۱۲ ساعت پس از مجاورت مربوط به غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر (۱۰۰ درصد) بود. پس از ۲۴ ساعت همه ماهیان تیمار ۵ میلی‌گرم در لیتر نیز تلف شدند. ماهیان بلافاصله پس از اضافه کردن فلز سنگین نیترات مس، دچار حرکت چرخشی شده و درسطح آب تجمع کردند. پس از گذشت ۵ ساعت در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌گرم رفتار پرشی ماهیان به بیرون مشاهده گردید و در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر شنای برعکس دیده شد. با گذشت ۶ ساعت پس از اضافه کردن فلز سنگین، تجمع ماهیان در کف و شنای واژگون در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌گرم مشاهده گردید.

**نتایج حاصل از بررسی شاخص‌های سیتولوژیکی خون:** نتایج روند تغییرات سطوح گلبول‌های سفید خون نشان داد که میزان آن با افزایش غلظت نیترات مس و با گذشت زمان به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($p<0/05$). به‌طوری‌که، حداقل میزان آن (۵۰۰±۷۰۰۰ عدد در هر میلی‌متر مکعب خون) در زمان ۲۴ ساعت در مجاورت با غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر مشاهده گردید. هم‌چنین نتایج شمارش گلبول‌های قرمز خون ماهیان قرار گرفته در مجاورت غلظت‌های مختلف نیترات مس با افزایش غلظت و زمان مجاورت سیر نزولی داشت، ولی فاقد اختلاف معنی‌دار بود. حداقل تعداد گلبول‌های قرمز (۱۵۰۰۰۰±۱۶۱۰۰۰۰ عدد در هر میلی‌متر مکعب خون) در تیمار با غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر نیترات مس در زمان ۲۴ ساعت مشاهده گردید (شکل ۱). نتایج روند تغییرات سطوح هموگلوبین خون نشان داد که میزان آن با افزایش غلظت نیترات مس و با گذشت زمان به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($p<0/05$). به‌طوری‌که، حداقل میزان آن (۰/۲±۴/۸ گرم در دسی‌لیتر) در تیمار با غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر در زمان ۲۴ ساعت مشاهده گردید. میزان هماتوکریت خون با افزایش غلظت نیترات مس و با گذشت زمان افزایش یافت و بین تیمار با غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر با شاهد در زمان ۲۴ ساعت اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید ($p<0/05$). به‌طوری‌که، حداقل میزان آن (۳/۱±۲۸ درصد) در تیمار شاهد و حداکثر میزان آن (۴±۳۶ درصد) در تیمار با غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر در زمان ۲۴ ساعت بود (شکل ۲). میانگین غلظت هموگلوبین ذره‌ای در تیمارهای مورد مطالعه در زمان ۱۲ ساعت اختلاف معنی‌داری نشان نداد. درحالی‌که، در زمان ۲۴ ساعت بین غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر و تیمار شاهد کاهش معنی‌داری مشاهده گردید ($p<0/05$). تغییرات میانگین هموگلوبین ذره‌ای در زمان ۱۲ ساعت بین تیمارها اختلاف معنی‌داری نشان نداد. درحالی‌که، تیمار با غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر در زمان ۲۴ ساعت کاهش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نشان داد ($p<0/05$) (شکل ۳).



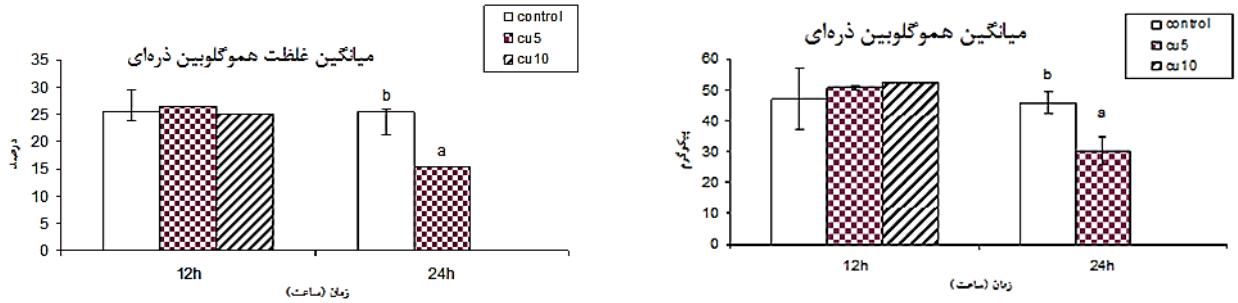

**شکل ۱: تغییرات سطوح گلبول‌های سفید و قرمز خون در غلظت‌های مختلف نیترات مس در زمان‌های متفاوت**

(* همه ماهیان در مجاورت غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر تا ساعت ۲۴ تلف شدند).




**شکل ۲: تغییرات سطوح هموگلوبین و میزان هماتوکریت خون در غلظت‌های مختلف نیترات مس در زمان‌های متفاوت**

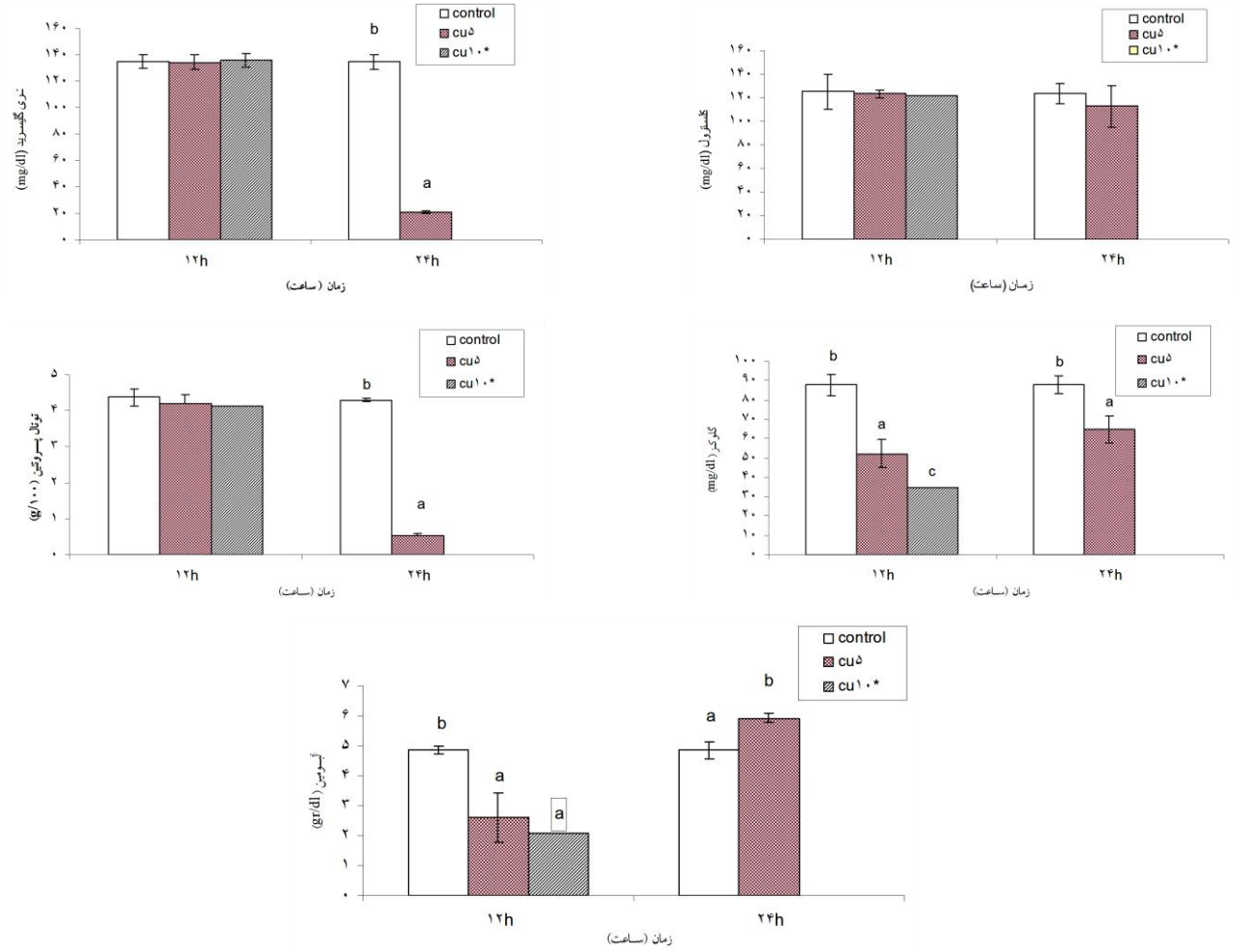
(* همه ماهیان در مجاورت غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر تا ساعت ۲۴ تلف شدند).




**شکل ۳: میانگین غلظت هموگلوبین ذره‌ای (MCHC) و میانگین هموگلوبین ذره‌ای (MCH) در غلظت‌های مختلف نیترات مس در زمان‌های متفاوت**

(* همه ماهیان در مجاورت غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر تا ساعت ۲۴ تلف شدند).

**نتایج حاصل از مطالعه شاخص‌های سرولوژیک خون:** نتایج روند تغییرات سطوح تری‌گلیسرید پلاسمای خون در بین تیمارها در زمان ۱۲ ساعت اختلاف معنی‌داری‌نشان نداد. درحالی‌که در زمان ۲۴ ساعت‌بین تیمار ۵ میلی‌گرم در لیتر و شاهد اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید. به‌طوری‌که حداقل میزان آن (۶±۲۰/۷ میلی‌گرم در لیتر) در مجاورت‌با غلظت ۵میلی‌گرم‌درلیتردرزمان ۲۴ ساعت مشاهده گردید ($p<0/05$). سطوح کلسترول پلاسمای خون با افزایش غلظت نیترات مس و با گذشت زمان تغییرات معنی‌داری بین تیمارها نشان نداد.

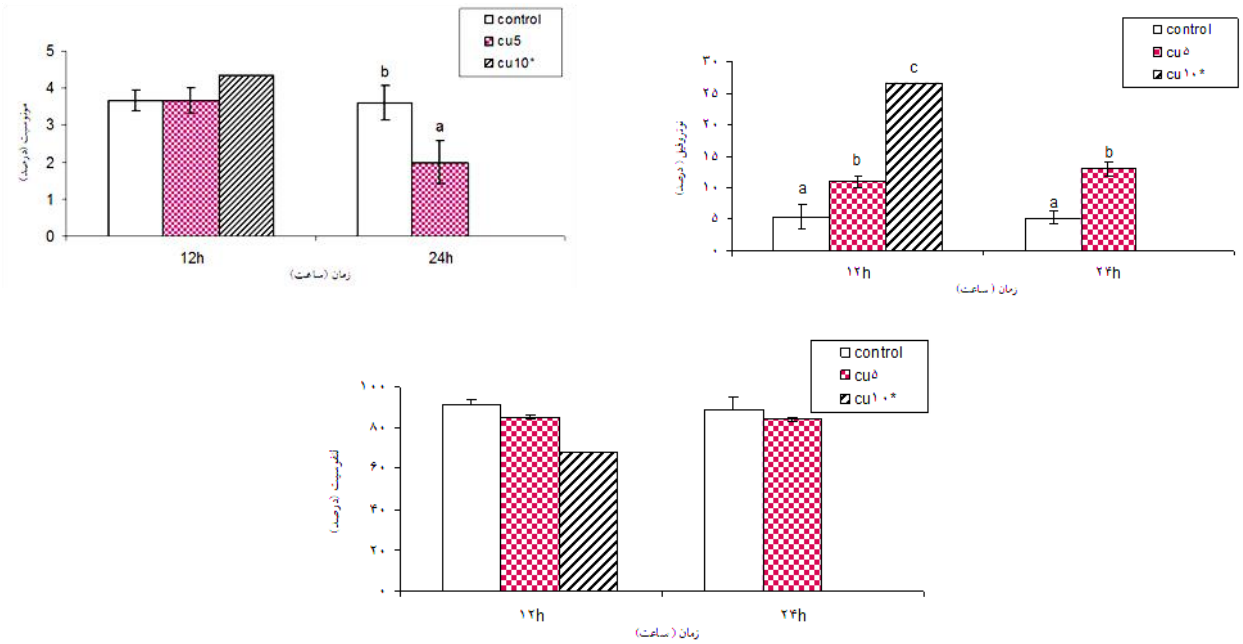



**شکل ۴: تغییرات سطوح تری‌گلیسرید، کلسترول، گلوکز، پروتئین کل و آلبومین پلاسمای خون در غلظت‌های مختلف نیترات مس در زمان‌های متفاوت**

(* همه ماهیان در مجاورت غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر تا ساعت ۲۴ تلف شدند).

سطوح گلوکز پلاسمای خون با افزایش غلظت نیترات مس در زمان ۱۲ ساعت اختلاف معنی‌داری نشان‌داد و در غلظت ۱۰ میلی‌گرم‌در لیتر به‌حداقل (۹/۵±۳۴/۳ میلی‌گرم در دسی‌لیتر) رسید. در زمان ۲۴ ساعت نیز کاهش معنی‌داری بین تیمار با غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر و شاهد مشاهده گردید ($p<0/05$). سطوح پروتئین کل پلاسمای خون با افزایش غلظت نیترات مس سیر نزولی را در زمان ۱۲ ساعت نشان داد، اما فاقد اختلاف معنی‌دار بود. درحالی‌که در زمان ۲۴ ساعت در تیمار ۵ میلی‌گرم در لیتر نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری را نشان داد و به‌حداقل (۰/۰۰۳±۰/۵ میلی‌گرم در دسی‌لیتر) رسید ($p<0/05$). سطوح آلبومین پلاسمای خون در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر در زمان ۱۲ ساعت نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری نشان‌داد ($p<0/05$). به‌طوری‌که در زمان ۱۲ ساعت به‌حداقل (۰/۶±۲/۰ گرم در دسی‌لیتر) در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر رسید. درحالی‌که در تیمار ۵ میلی‌گرم در لیتر در زمان ۲۴ ساعت به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافت و به حداکثر (۵/۱±۹/۱ گرم در دسی‌لیتر) رسید (شکل ۴).

**نتایج حاصل از مطالعه گلبول‌های سفید خون:** تعداد لنفوسیت‌های خون ماهیان با گذشت زمان و افزایش غلظت نیترات مس کاهش یافت ولی معنی‌دار نبود. به‌طوری‌که، حداکثر میزان لنفوسیت‌ها (۱/۲±۹۱ درصد) مربوط به تیمار شاهد و حداقل (۶±۶۸/۶ درصد) میزان آن مربوط به بالاترین غلظت نیترات مس (۱۰ میلی‌گرم در لیتر) در زمان ۱۲ ساعت بود. تعداد نوتروفیل‌های خون ماهیان با گذشت زمان و با افزایش غلظت نیترات مس به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($p<0/05$). به‌طوری‌که حداکثر تعداد نوتروفیل‌ها (۲±۲۶ درصد) مربوط تیمار ۱۰ میلی‌گرم‌در لیتر در زمان ۱۲ ساعت و حداقل تعداد آن (۱±۵/۴ درصد) مربوط به تیمار شاهد بود. تعداد مونوسیت‌های خون ماهیان با افزایش غلظت نیترات مس در زمان ۱۲ ساعت افزایش یافت، ولی فاقد اختلاف معنی‌دار بود. درحالی‌که تیمار ۵ میلی‌گرم در لیتر در زمان ۲۴ ساعت کاهش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نشان داد ($p<0/05$)(شکل ۵).




**شکل ۵: روند تغییرات تعداد لنفوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌های خون در غلظت‌های مختلف نیترات مس در زمان‌های متفاوت**

(* همه ماهیان در مجاورت غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر تا ساعت ۲۴ تلف شدند).

## بحث

ماهیان شاخص‌های زیستی (بیومارکر) آسان و قابل اعتمادی از آلودگی مس در پیکره‌های آبی هستند (Lodhi و همکاران، ۲۰۰۶). اثر منفی فلزات سنگین بر ماهیان به اختلال ایجاد شده در فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی آن‌ها مربوط می‌شود (Viella و همکاران، ۱۹۹۹). نیترات مس دارای اثر کشندگی شدیدی بر ماهی فیتوفاگ بود. این ماهی در برابر غلظت‌های کشنده مس حساس بود، به‌طوری‌که همه ماهیان پس از ۲۴ ساعت مجاورت با غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات مس تلف شدند و $LC_{50}$-۲۴h آن ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر تعیین گردید. در مطالعه‌ای که Weiguang و Chen (۱۹۹۵)، در مورد سمیت حاد جیوه، سولفات مس، کادمیوم و سولفات روی در

لاروهای ماهی سیم قرمز دریایی (*Chrysophrys major*) انجام دادند، $LC_{50}$ - ۹۶ ساعت را به‌ترتیب ۰/۰۰۴، ۰/۰۷، ۰/۲۷ و ۰/۴۴ میلی‌گرم در لیتر بیان داشتند. در مطالعه‌ای که Gioda و همکاران (۲۰۰۷)، در خصوص تغییرات پارامترهای بیوشیمیایی $Cu^{2+}$ و $Zn^{2+}$ در گونه *Leporinus obtusidens* انجام دادند، میزان $LC_{50}$ در ۹۶ ساعت را به ترتیب ۲/۳ و ۴/۶ میلی‌گرم در لیتر اعلام کردند که قدرت کشندگی مس دو برابر روی بود. تفاوت بین $LC_{50}$ در مورد یک فلز مشابه می‌تواند مربوط به نوع گونه، ساختار شیمیایی فلز سنگین و شرایط آزمایش (درجه حرارت، شوری، اکسیژن محلول و pH آب) باشد. میانگین هموگلوبین ذره‌ای و میانگین غلظت هموگلوبین ذره‌ای از عوامل وابسته به تعداد یاخته‌های قرمز، درصد هماتوکریت و غلظت هموگلوبین خون بوده و تابع تغییرات آن‌ها می‌باشند. وضعیت تغذیه‌ای، سن و شرایط محیطی، فاکتورهای اصلی پاسخگویی به تغییرات شاخص‌های یاخته‌های خونی در ماهیان است (Tavares-Dias و Moraes، ۲۰۰۷). برخی از شاخص‌های خونی به‌عنوان شاخص آلودگی فلزات در محیط آبی محسوب می‌شوند (Shah و Altindag، ۲۰۰۵). اندازه‌گیری شاخص‌های خونی به‌عنوان یک ابزار تشخیصی جهت پایش زیستی تغییرات پاتوفیزیولوژیکی حاد و مزمن از قبیل تغذیه، کیفیت آب و بیماری کاربرد دارند (De Pedro و همکاران، ۲۰۰۵). درصد هماتوکریت و پارامترهای وابسته به آن‌ها عمومی‌ترین شاخص‌های خون‌شناسی جهت تشخیص کم‌خونی در ماهیان هستند که به تغذیه، سن (Tavares-Dias و Moraes، ۲۰۰۷) و بیماری وابسته می‌باشد. از این فاکتور می‌توان به‌عنوان ابزاری برای کنترل آبزی‌پروری و مدیریت صیادی جهت کنترل شرایط کم‌خونی مورد استفاده قرار داد و به‌نظر می‌رسد ارتباط معکوسی بین تعداد یاخته‌های قرمز و یاخته‌های سفید خون مشاهده می‌شود. یعنی تعداد بالای یاخته‌های قرمز نیاز بالای تعداد یاخته‌های سفید خون را کاهش می‌دهد (Satheeshkumar و همکاران، ۲۰۱۰). کاهش هماتوکریت سبب افزایش میانگین غلظت هموگلوبین خون می‌شود. کاهش حجم متوسط یاخته قرمز خون از مقدار طبیعی می‌تواند بیانگر آسیب‌های کبدی، طحال و یا فقر ویتامین و آهن در جیره غذایی باشد. اما کاهش میانگین غلظت هموگلوبین خون عمدتاً ناشی از کمبود آهن یا ناتوانی در استفاده از آهن جیره غذایی است. غلظت هموگلوبین خون ماهیان که بهترین شاخص تغییرات محیطی است (Bani و Haghi Vayghan، ۲۰۰۹) در مقایسه با پستانداران کم‌تر است و معمولاً در محدوده ۱۰-۵ گرم در دسی‌لیتر قرار دارد. اثرات سمیت مس بر ماهی فیتوفاگ از طریق تغییرات پاتولوژیکی در خون و بافت، ناشی از القای نوعی آنمی بود. Mazon و همکاران (۲۰۰۲)، اثر سمیت حاد مس بر گونه *Prochilodus scrofa* را بررسی کردند و افزایش معنی‌داری در میزان هماتوکریت و گلبول‌های قرمز را گزارش دادند.

افزایش گلبول‌های قرمز به‌خاطر افزایش میزان هموگلوبین کل فقط در ماهی قرار گرفته در مجاورت غلظت‌های بالای مس بود. Singh و همکاران (۲۰۰۸)، اثر مس بر پروفیل خون خامه ماهی (*Channa punctatus*) آب شیرین را مورد مطالعه قرار دادند و دریافتند که میزان هموگلوبین، هماتوکریت و تعداد گلبول‌های قرمز در پایان دوره ۴۵ روز به‌طور معنی‌داری در مقایسه با شاهد کاهش یافت. در حالی‌که تعداد گلبول‌های سفید افزایش یافت. هرچند میزان میانگین هموگلوبین ذره‌ای و میانگین غلظت هموگلوبین ذره‌ای افزایش معنی‌داری طی روزهای ۱۵ تا ۳۰ نشان داد. Witeska (۲۰۰۵)، در مطالعه اثرات هماتولوژیکی و ایمونولوژیکی فلزات سنگین بر ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)، با قرار دادن ماهیان در مجاورت ۵ میلی‌گرم در لیتر فلز سنگین مس به‌مدت ۹۶ ساعت دریافتند که ماهیان دچار استرس شده و درصد هماتوکریت آن‌ها بدون ایجاد تغییرات معنی‌دار در تعداد گلبول‌های قرمز افزایش یافت که به‌دلیل بادکردگی و تغییر شکل گلبول‌های قرمز از حالت بیضوی به کروی و بروز پدیده اریتروپویتیک ناشی از افزایش تعداد گلبول‌های قرمز نابالغ بود. تعداد گلبول‌های سفید خون به‌طور معنی‌داری کاهش یافت که ناشی از کاهش تعداد لنفوسیت‌ها بود. درصد نوتروفیل‌ها افزایش یافت، ولی معنی‌دار نبود. افزایش تعداد گلبول‌های قرمز به‌منظور آماده کردن ماهی جهت تامین انرژی افزوده مورد نیاز جهت مقابله با استرس ناشی از مجاورت با فلز سنگین مس بود. درحالی‌که تغییرات مشاهده شده در گلبول‌های سفید بیانگر اثر سرکوب‌کنندگی ایمنی توسط استرس القائی ناشی از فلز سنگین می‌باشد (Witeska، ۲۰۰۵). از یاخته‌های سفیدخون به‌عنوان شاخص وضعیت سلامت ماهیان استفاده می‌شود. زیرا یاخته‌های سفیدخون از ترکیبات کلیدی و جدایی‌ناپذیر یاخته‌های دفاعی بدن هستند که در تنظیم عملکرد ایمنولوژیک ماهیان، درگیر می‌باشند. هم‌چنین تعداد یاخته‌های سفید خون عموماً بیانگر کیفیت محیط آبزی است (کاظمی و همکاران، ۱۳۸۹). لنفوسیت‌ها مسئول پاسخ ایمنی در بدن هستند. هسته در تمام سطح سلول وجود دارد. تعداد لنفوسیت‌ها در خون ماهیان به‌طور قابل توجهی بیش‌تر از پستانداران می‌باشد. در ماهیان مشاهده شده است که منوسیت‌ها ذرات خارجی از قبیل کربن را جذب می‌کنند. نوتروفیل‌ها و منوسیت‌ها سلول‌های خونی مهمی جهت دفاع بدن از طریق فعالیت بیگانه‌خواری‌شان هستند. رهاسازی نوتروفیل‌ها به خون سبب بروز بیماری نوتروفیلیا (Neutrophilia) شده و به‌عنوان پاسخ ایمنی غیراختصاصی به انواع عوامل استرس‌زا محسوب می‌شود (Singh و همکاران، ۲۰۰۸). درصد این سلول‌ها معمولاً در سمیت‌های حاد مس کاهش می‌یابد (Nussey و همکاران، ۱۹۹۵) و گزارش شده است که در سمیت‌های مزمن افزایش می‌یابد (Dick و Dixon، ۱۹۸۵). یاخته‌های لنفوسیت خون

ماهیان مانند مهره‌داران عالی نقش سیستم ایمنی جهت مصونیت عمده‌بر واکنش‌های تشخیصی، تخریبی، خروج اجسام خارجی، ساخت آنتی‌بادی، حفاظت از تمامیت افراد و شکل‌دهی مصونیت جهت سازگاری موجود را بازی می‌کنند. آن‌ها وابسته به گروهی از یاخته‌های سیستم ایمنی هستند که سریع‌ترین واکنش را نسبت به معرفی اجسام خارجی درون موجود زنده به‌منظور تعدیل فشار عوامل مختلف استرس‌های طبیعی انجام می‌هند. این یاخته‌ها با تولید آنتی‌بادی‌های ویژه و افزایش آن در ماکروفاژها سیستم دفاعی و ایمنی بدن ماهی را در برابر شرایط نامساعد و بد محیطی ارتقاء می‌بخشند (Mikryakov و همکاران، ۲۰۰۹). Gale و همکاران (۱۹۹۸) در مطالعه اثرات مس بر شاخص‌های سیستم ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onchorhynchus mykiss*) دریافتند که هر نوع سلول لکوسیت در شمارش افتراقی پاسخ مختص به خود را در مجاورت مس نشان دادند. به‌طوری‌که تعداد لنفوسیت‌ها در همه غلظت‌ها و در هر نمونه‌برداری‌ها کاهش یافت. هم نوتروفیل‌ها و هم مونوسیت‌ها در همه غلظت‌ها و در هر نمونه‌برداری افزایش یافتند. مطالعات قبلی پاسخ‌های متفاوتی از لکوسیت‌ها به فلزات سنگین را نشان دادند. به‌طوری‌که ماهی طلایی (*Carassius auratus*) قرار گرفته در مجاورت کادمیوم به‌مدت ۳ هفته، تعداد مونوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها افزایش و تعداد لنفوسیت‌ها کاهش یافت (Murad و Houston، ۱۹۹۷). شاخص‌های بیوشیمیایی جهت تشخیص اثرات تحت‌کشنده مواد سمی مختلف از جمله فلزات سنگین در ماهیان به‌کار می‌روند (Theodorakis و همکاران، ۱۹۹۲). پروتئین، چربی و کربوهیدرات از منابع اصلی تأمین انرژی در ماهیان هستند. بنابراین، تغییر و نوسان در میزان پروتئین، کلسترول و تری‌گلیسرید می‌تواند در ارتباط به مصرف آن‌ها جهت تأمین انرژی لازم جهت انجام فعالیت‌های حیاتی بدن باشد (Emad و همکاران، ۲۰۰۵). Emad و همکاران (۲۰۰۵)، سمیت مس و کادمیوم و اثرات آن بر برخی از شاخص‌های بیوشیمیایی ماهی انگشت قد کفال دریایی (*Mugil seheli*) را مورد بررسی قرار دادند و بیان داشتند که سطح گلوکز پس از ۴ روز در مجاورت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر مس با گذشت زمان افزایش یافت و به بالاترین سطح خود رسید. میزان پروتئین کل، تری‌گلیسرید و کلسترل پلاسما نسبت به شاهد افزایش یافت. Gopal و همکاران (۱۹۹۷)، اثر فلزات سنگین بر بیوشیمی پروتئین خون ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) را به‌عنوان یک شاخص زیستی استرس‌زا مورد مطالعه قرار دادند و دریافتند که سطوح پروتئین کل و گلوبولین سرم خون ماهیان از ساعت ۲ تا ۲۰ افزایش و سپس تا ساعت ۷۲ کاهش یافت. سطوح آلبومین سرم در ابتدا از ساعت ۲ تا ۴ به‌شدت کاهش و سپس به حالت اولیه برگشته و متعاقباً تا ساعت ۷۲ کاهش یافت. آن‌ها دریافتند که غلظت‌های کشنده و تحت‌کشنده فلزات سنگین روند مشابهی را نشان دادند و بیان داشتند که اندازه‌گیری سطوح پروتئین و آلبومین به‌عنوان یک شاخص پاسخ به عوامل استرس‌زای محیطی مطرح می‌باشد. مقدار گلوکز سرم خون شاخص مناسبی برای پاسخ‌های ثانویه استرسی ماهی به شرایط نامناسب محیطی است (Yousefi و همکاران، ۲۰۱۱). گلوکز اصلی‌ترین ماده حاصل از سوخت و ساز مواد کربوهیدراتی می‌باشد (Zhou و همکاران، ۲۰۰۹) که تغییرات روزانه آن با تغییرات هورمون‌های کورتیزول و تیروئید در ارتباط است. مقدار گلوکز خون بسته به گونه ماهی در محدوده ۳۵۰-۳۵ میلی‌گرم در دسی‌لیتر متغیر می‌باشد (Ahmadifar و همکاران، ۲۰۱۰). افزایش غلظت گلوکز خون از طریق مکانیزمی رخ می‌دهد که در آن واکنش بیوشیمیایی گلیکوژنز و تغییر بافت گلیکوژن به گلوکز رخ می‌دهد و گلوکز در داخل خون تجمع می‌یابد (Ahmadifar و همکاران، ۲۰۱۰). غلظت کلسترول خون ماهیان در بین و درون گونه‌ها بسته به نوع تغذیه، شدت فعالیت و مرحله رشد و نمو جنسی می‌تواند متفاوت و متغیر باشد. کلسترول پیش ماده ساخت هورمون‌های استروئیدی است (Bolasina، ۲۰۰۶) که تحت شرایط استرس، غلظت آن در خون افزایش می‌یابد و ممکن است تهیه کننده افزایش ساخت هورمون کورتیزول باشد (Hoseini و Ghelichpour، ۲۰۱۰). سطوح غلظت تری‌گلیسرید، کلسترول به‌عنوان شاخص‌های اصلی وضعیت سلامت ماهیان استخوانی عالی مطرح می‌باشد (Gul و همکاران، ۲۰۱۱)، به طوری‌که تغییر در غلظت کلسترول بازگو کننده سوخت و ساز در کبد است. مقدار کلسترول در ماهیان پرورشی نسبت به ماهیان وحشی همان گونه بالاتر است. افزایش بیش از حد کلسترول بیانگر بی‌نظمی سوخت و ساز چربی و لیپوپروتئین به‌ویژه تخریب کارایی فیزیولوژیک کبد است (Gul و همکاران، ۲۰۱۱). غلظت کلسترول با افزایش چربی در جیره غذایی و اندازه ماهی افزایش می‌یابد (Satheeshkumar و همکاران، ۲۰۱۰). از نتایج تحقیق انجام شده می‌توان دریافت که گرچه مس یک فلز ضروری برای انجام بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی است، ولی اثرات سمی شدیدی بر ماهی فیتوفاگ نشان داد. بنابراین، بایستی میزان این فلز در آب‌های محیط پرورش این ماهی در حد میکروگرم در لیتر باشد. از پارامترهای خونی و بیوشیمیایی می‌توان به‌عنوان شاخص، برای سنجش آلودگی فلز مس در محیط‌های آبی استفاده کرد. با عنایت به ایجاد اختلال مهم در فعالیت‌های طبیعی ماهیان در اثر بروز مسمومیت‌های مزمن با فلز سنگینی هم‌چون مس که بر سلامت، رشد و تولیدمثل تأثیرگذار می‌باشد، انجام اقدامات لازم جهت جلوگیری از آلودگی آب استخرهای پرورشی، به این فلز سنگین توصیه می‌گردد.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از دانشگاه آزاد اسلامی واحد بندرعباس، مجتمع آموزش عالی سراوان، اداره کل شیلات سراوان تشکر نمایند.

## منابع

۱. **امینی‌رنجبر، غ.، ۱۳۷۳.** بررسی میزان تجمع فلزات سنگین در رسوبات تالاب انزلی. مجله علمی شیلات ایران. سال ۳، شماره ۳، صفحات ۵ تا ۲۶.

۲. **جاویدگلشن‌آباد، ع.؛ تقوی‌جلودار، ح.؛ امجدی، م. و فضلی، ح.، ۱۳۹۴.** بررسی غلظت فلزات سنگین (آهن، روی، مس و کادمیم) در بافت‌های مختلف ماهی کلمه (*Rutilus rutilus caspicus*) در نواحی جنوبی دریای خزر. تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک (پژوهش و سازندگی). دوره ۲۸، شماره ۲، صفحات ۹ تا ۱۶.

۳. **جلالی، ب. و آقازاده، م.، ۱۳۸۵.** مسمومیت ماهیان در اثر فلزات سنگین و اهمیت آن در بهداشت عمومی. انتشارات کتاب. ۳۶ صفحه.

۴. **رستمی‌بشمن، م.؛ سلطانی، م. و ساسانی، ف.، ۱۳۷۹.** مطالعه اثرات هیستوپاتولوژی برخی از فلزات سنگین (سولفات مس، سولفات روی و سولفات جیوه، کلرور کادمیوم) بر بافت‌های ماهی کپورمعمولی. مجله تحقیقات دامپزشکی (دانشگاه تهران). دوره ۵۵، شماره ۴، صفحات ۱ تا ۳.

۵. **رستمی‌بشمن، م. و سلطانی، م.، ۱۳۸۸.** مطالعه اثرات بافتی دوز مزمن سولفات‌مس بر برخی اندام‌های ماهی کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*). مجله تحقیقات دامپزشکی (دانشگاه تهران). دوره ۶۴، شماره ۳، صفحات ۱۹۳ تا ۱۹۸.

۶. **شریف‌فاضلی، م.؛ ابطحی، ب. و صباغ‌کاشانی، آ.، ۱۳۸۴.** سنجش تجمع فلزات سنگین سرب، نیکل و روی در بافت‌های ماهی کفال طلایی (*Liza auratus*) سواحل جنوبی دریای خزر. مجله علمی شیلات ایران. دوره ۱۴، شماره ۱، صفحات ۶۵ تا ۷۸.

۷. **فتح‌الهی، ر.؛ خارا، ح.؛ پژند، ذ.؛ شناورماسوله، ع.ر.؛ حلاجیان، ع.و مشتاقی، ب.، ۱۳۸۹.** تعیین غلظت کشندگی (LC5096h) کلرید سدیم و اثرات آن بر بافت آبشش بچه تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*). نشریه علوم زیستی. دوره ۴، شماره ۳، صفحات ۶۵ تا ۷۲.

۸. **فرهنگی، م. و حاجی‌مرادلو، ع.، ۱۳۸۶.** علایم بالینی و اثرات آسیب‌شناسی مسمومیت حاد با آمونیاک در قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). نشریه شیلات. دوره ۱، شماره ۴، صفحات ۷۲ تا ۷۹.

۹. **کاظمی، ر.؛ پوردهقانی، م.؛ یوسفی‌جوردهی، ا.؛ یارمحمدی، م. و نصری‌تجن، م.، ۱۳۸۹.** فیزیولوژی دستگاه گردش خون آبزیان و فنون کاربردی خون‌شناسی ماهیان. انتشارات بازرگان. ۱۹۴ صفحه.

۱۰. **ناجی، ط.؛ صفاییان، ش.؛ رستمی‌بشمن، م. و صبرجو، م.، ۱۳۸۶.** بررسی اثرات سولفات روی بر بافت آبشش بچه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). نشریه علوم و تکنولوژی محیط زیست. دوره ۹، شماره ۲، صفحات ۲۹ تا ۳۶.

۱۱. **وثوقی، غ.م.؛ شاهسونی، د. و پیغان، ر.، ۱۳۷۶.** بررسی فاکتورهای خونی ماهی حوض (*Carassius auratus*). مجله تحقیقات دامپزشکی (دانشگاه تهران). دوره ۵۲، شماره ۴، صفحات ۳۶ تا ۴۲.

۱۲. **Ahmadifar, A.; Akrami, R.; Ghelichi, A. and Mohammadi Zarejabad, A., 2010.** Effects of different dietary prebiotic inulin levels on blood serum enzymes, hematologic, and biochemical parameters of great sturgeon (*Huso huso*) juveniles. Comparative Clinical Pathology. Vol. 20, No. 5, pp: 447-451

۱۳. **Bolasina, S.L., 2006.** Cortisol and hematological response in Brazilian codling, *Urophycis brasiliensis* (Pisces, Phycidae) subjected to anesthetic treatment. Aquaculture International Journal. Vol. 14, pp: 569-575.

۱۴. **Bani, A. and Haghi Vayghan, A., 2009.** Temporal variations in haematological and biochemical indices of the Caspian kutum, *Rutilus frisii kutum*. Ichthyological Society of Japan. pp: 126-133

۱۵. **DePedro, N.; Guijarro, A.E.; Lopez-Patino, M.A.; Marinez Alvarez, R. and Delgado Daily, M., 2005.** Seasonal variation in hematological and blood biochemical parameters in Tench (*Tinca tinca*). Aguac Res. Vol. 36, pp: 185-196.

۱۶. **Dick, P.T. and Dixon, D.G., 1985.** Changes in circulating blood cell levels of rainbow trout, *Salmo gardener*, following acute and chronic exposure to copper. Journal Fish Biology. Vol. 26, pp: 475-480.

۱۷. **Emad, H.; Abou, E.N.; Khalid, M.; Moselhy, E. and Mohamed, A.H., 2005.** Toxicity of cadmium and cooper and their effect on some biochemical parameters of marine fish *Mugil seheli*. Egyptian Journal of Aquatic Research. Vol. 31, pp: 60-71.

۱۸. **Gale, L.; Wixson, B.G. and Hardy, M.G., 1998.** Aquatic organisms and heavy metals Miseries new lead belt. Water Research Bull. Vol. 9, pp: 673-688.

۱۹. **Georgieva, E.; Arnaudov, A. and Velcheva, I. 2010.** Clinical, Hematological and Morphological studies on ex situ induced copper intoxication in crucian carp (*Carassius gibelio*). Journal Central European Agriculture. Vol. 11, No. 2, pp: 165-172.

۲۰. **Gioda, C.R.; Lissner, L.A.; Pretto, A.; da Rocha, J.B.T.; Schetinger, M.R.C.; Neto, J.R.; Morsch, V.M. and Loro, V.L., 2007.** Exposure to sub lethal concentrations of Zn (II) and Cu (II) changes biochemical parameters in *Leporinus obtusidens*. Vol. 98, pp: 170-175.

۲۱. **Gopal, V.; Parvathy, S. and Balasubra, P.R., 1997.** Effect of heavy metals on the blood protein biochemistry of the fish *Cyprinus carpio* and its use as a bio-indicator of pollution stress. Environmental Monitoring and Assessment. Vol. 48, pp: 117-124.

۲۲. **Gul, Y.; Gao, Z.X.; Qian, X.Q. and Wang, W.M., 2011.** Hematological and serum biochemical characterization and comparison of wild and cultured northern snakehead (*Channa argus* Cantor, 1842). Journal Applied Ichthyology. Vol. 27, pp: 122-128.

۲۳. **Hoseini, S.M. and Ghelichpour, M., 2010.** Efficacy of clove solution on blood sampling and hematological study in Beluga, *Huso huso* (L.). Fish Physiology and Biochemistry. Vol. 38, No. 2, pp: 493-498.

۲۴. **Klontz, G.W., 1994.** Fish Hematology. In: Techniques in Fish Immunology, SOS Publications, and USA. Vol. 2, pp: 121-132.

۲۵. **Lodhi, H.S.; Khan, M.A.; Verma, R.S. and Sharma, U.D., 2006.** Acute toxicity of copper sulphate to fresh water prawns. Journal Environmental Biology. Vol. 27, pp: 585-588.

۲۶. **Mazon, A.F.; Monteiro, E.A.; Pinheiro, G.H. and Fernandez, M.N., 2002.** Hematological and physiological changes induced by short-term exposure to copper in the freshwater fish, *Prochilodus scrofa*. Brazilian Journal of Biology. Vol. 62, pp: 621-631.

۲۷. **Mikryakov, V.R.; Balabanova, L.V. and Mikryakov, D.V., 2009.** The Reaction of Leukocytes of Sterlet, *Acipenser ruthenus* Hormone Induced Stress. Journal of Ichthyology. Vol. 49, No. 7, pp: 540-543.

۲۸. **Murad, A. and Houston, A.H., 1997.** Leucocytes and leucopoietic capacity in goldfish, *Carassius auratus*, exposed to sub lethal levels of cadmium. Aquat Toxicol. Vol. 13, pp: 141-154.

۲۹. **Nussey, G.; Van Vuren, J.H.J. and Du Preez, H.H., 1995.** Effect of copper on the differential white blood cell counts of the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). Comp. Biochem. Physiol. Vol. 111, pp: 381-388.

۳۰. **Satheeshkumar, P.; Ananthan, G.; Senthilkumar, D. and Jeevanantham, K., 2010.** Comparative investigation on hematological and biochemical studies on wild marine teleost fishes from Vellar estuary, southeast coast of India. Journal of Comparative Clinical Pathology. Vol. 10, pp: 1091-1095.

۳۱. **Serezli Akhan, S. and Delihasan, F., 2011.** Acute effects of copper and lead on some blood parameters on Coruh trout (*Salmo coruhensis*). African Journal of Biotechnology. Vol. 10, pp: 3204-3209.

۳۲. **Shah, S.l. and Altindag, A., 2005.** Alternation of immunological parameters of tench (*Tinca tinca*) after acute and chronical exposure to lethal and sub lethal treatments with mercury, cadmium and lead. Tur Vetand Ani Sciences. Vol. 29, pp: 1163-1168.

۳۳. **Singh, D.; Nath, K.; Trivedi, S.P. and Sharma, Y.K., 2008.** Impact of copper on haematological profile of freshwater fish, *Channa punctatus*. Journal of Environmental Biology. Vol. 29, pp: 253-257.

۳۴. **Tavares-Dias, M. and Moraes, F.R., 2007.** Hematological and biochemical reference intervals for farmed channel catfish. Journal of Fish Biology. Vol. 71, pp: 383-388.

۳۵. **Theodorakis, C.W.; D'Surney, S.J.; Bickham, J.W.; Lyne, T.B.; Bardley, B.P.; Hawkins, W.E.; Farkas, W.L.; Mc. Carthy, J.F. and Shugart, L.R., 1992.** Ecotoxicology. Vol. 1, pp: 45-73.

۳۶. **Viella, S.; Ingrossi, L.; Lionetto, M.; Schettino, T.; Zonno, V. and Stroelli, C., 1999.** Effect of cadmium and zinc on the Na/H exchanger on the brush ٣٤ B.K. Hassan border membrane vesicles isolated from eel kidney tankular cells. Toxicol. Vol. 48, pp: 25-36.

۳۷. **Weiguang, L. and Chen, N., 1995.** Acute toxicity of Hg, Cu, Cd, Zn to larvae of red sea bream, *Chrysophrys major*. Journal of marine science. Vol. 20, pp: 1000- 1015.

۳۸. **World health organization (W.H.O). 1988.** Gide line fur drinking water quality, Recommendation, W.H.O. Geneva, Switzerland. 130 p.

۳۹. **Witeska, M., 2005.** Stress in fish- hematological and immunological effects of heavy metals. Electronic Journal of Ichthyology. Vol. 1, pp: 35-41.

۴۰. **Xiaoyun, Z.; Mingyun, L.; Khalid, A. and Weinmin, W., 2009.** Comparative of hematology and serum biochemistry of cultured and wild Dojo loach, *Misgrurnus anguillicadatus*. Fish Physiology Biochemistry. Vol. 35, pp: 435-441.

۴۱. **Yilmaz, M.; Selami, A. and Ferhat, D., 2011.** Metal accumulation in sediment, water, and freshwater fish in a Dam Lake. Toxicological and Environmental Chemistry. Vol. 94, pp: 49-55.

۴۲. **Yousefi, M.; Abtahi, B. and Abdian Kenari, A., 2011.** Hematological, serum biochemical parameters, and physiological responses to acute stress of Beluga sturgeon (*Huso huso*) juveniles fed dietary nucleotide. Comparative Clinical Pathology. Vol. 21, No. 5, pp: 1043-1048.

۴۳. **Zhou, X.; Li, M.; Abbas, Kh. and Wang, W., 2009.** Comparison of hematology and serum biochemistry of cultured and wild Dojo loach *Misgurnus anguillicaudatus*. Fish Physiology Biochemistry. Vol. 35, pp: 435-441.