اثر مس (Cu^{2+}) بر تغییرات شاخص‌های خونی ماهی فیتوفاگ پرورشی (*Hypophthalmichthys molitrix*)

سمیه شکوهی*[۱]، سورنا ابدالی[۲]، ایوب یوسفی جوردهی[۳] و حسین نگارستان[۴]

۱ و ۲- گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

۳- موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر (سازمان آموزش، تحقیقات و ترویج کشاورزی)

۴- گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۳/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۲/۱۲

چکیده

در این تحقیق، به منظور بررسی سمیت حاد فلز سنگین مس بر شاخص‌های خونی ماهی فیتوفاگ، ۱۳۵ قطعه ماهی در مجاورت غلظت‌های ۰، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات مس $Cu(NO_3)_2$ قرار گرفتند. میزان 24h - LC50 آن ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر تعیین گردید. نتایج نشان داد تعداد گلبول‌های سفید خون (WBC) با افزایش غلظت نیترات مس و با گذشت زمان به‌طور معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) کاهش یافت. تعداد گلبول‌های قرمز (RBC) اختلاف معنی‌داری نشان نداد ($P\geq۰/۰۵$). سطوح هموگلوبین خون با افزایش غلظت نیترات مس و با گذشت زمان به‌طور معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) کاهش یافت. میزان هماتوکریت، میانگین تغییرات حجم متوسط سلولی (MCV)، تغییرات سطوح متوسط هموگلوبین ذره‌ای (MCH) و میانگین تغییرات غلظت هموگلوبین ذره‌ای (MCHC) در تیمارهای مورد مطالعه با گذشت زمان کاهش معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) نشان داد. سطوح تری‌گلیسرید به‌طور معنی‌داری تغییر کرد، اما سطوح کلسترول معنی‌دار نبود ($P\geq۰/۰۵$). سطوح گلوکز پلاسمای خون با افزایش غلظت نیترات مس در زمان ۱۲ و ۲۴ ساعت اختلاف معنی‌داری نشان داد ($P<۰/۰۵$). سطوح پروتئین کل در زمان ۲۴ ساعت در تیمار ۵ میلی‌گرم در لیتر نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) را نشان داد. نتایج شمارش افتراقی گلبول‌های سفید نشان داد تعداد لنفوسیت‌ها به‌طور معنی‌داری ($P\geq۰/۰۵$) کاهش یافت. تعداد نوتروفیل‌ها و منوسیت‌ها با گذشت زمان و با افزایش غلظت نیترات مس به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($P<۰/۰۵$). بر اساس نتایج حاصل، غلظت‌های تحت حاد نیترات مس تغییرات معنی‌داری بر بسیاری از شاخص‌های مورد مطالعه ایجاد کرد و سمیت شدیدی بر ماهی فیتوفاگ برجای گذاشت که با افزایش غلظت و زمان مجاورت تشدید گردید. بنابراین، می‌توان گفت این گونه، مقاومت کمی در برابر غلظت‌های تحت حاد مس دارد.

واژگان کلیدی: مس، شاخص‌های خونی، کپور نقره‌ای (*Hypophthalmicthys molitrix*)

* نگارنده پاسخگو: Somayeh_shokohi@yahoo.com

مقدمه

فلزات سنگین از منابع کشاورزی، شهری و صنعتی به آبها رهاسازی و بدین طریق به ماهی و انسان منتقل می‌شوند. ماهیان شاخص‌های زیستی (بیومارکر) آسان و قابل اعتمادی از آلودگی مس در پیکره‌های آبی هستند. (Taylor *et al*., 2000; Lodhi *et al*., 2006). اخیراً، شاخص‌های بیوشیمیایی جهت تشخیص اثرات تحت کشنده مواد سمی مختلف از جمله فلزات سنگین در ماهیان بکار می‌روند (Theodorakis *et al*., 1992). اثر غلظت‌های تحت کشنده فلزات سنگین بر فرایند فیزیولوژیکی در ماهیان به‌خوبی مطالعه نشده است. ماهی فیتوفاگ با نام انگلیسی Silver carp و نام علمی *Hypophthalmichthys molitrix* یکی از مهم‌ترین گونه‌های ماهیان گرمابی می‌باشد که به واسطه رشد سریع، قابلیت سازگاری وسیع و گوشت لذیذ از گونه‌های غالب در ترکیب ماهیان گرمابی پرورشی به شمار می‌رود (نظری، ۱۳۷۵).

مس یکی از عناصر سنگین با سمیت شدید برای ماهی می‌باشد، ولی ترکیبات آن در پرورش ماهی، برای از بین بردن جلبک‌ها و همچنین در پیشگیری و درمان برخی از بیماری‌های ماهی، به کار می‌رود. اثر مس به صورت نیترات مس که به عنوان جلبک‌کش به کار می‌رود، 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 سوء زیستی قابل توجهی بر موجودات آبزی به ویژه انواع ماهی‌ها دارند، تأثیر فلزات سنگین در زیست آبزیان بسیار حائز اهمیت است (امینی رنجبر، ۱۳۸۲). آلودگی آب با ترکیبات یا عناصر فلزات سنگین، منجر به مسمومیت خونی ماهیان و به دنبال آن تلفات مستقیم و یا مسمومیت مزمن و تغییرات مهم در فیزیولوژی ماهیان می‌شود که نتیجه آن عدم توانایی جانور برای ادامه حیات خواهد بود (جلالی و آقازاده، ۱۳۸۵). خون به عنوان یک شاخص مهم، وضعیت فیزیولوژیک اندام‌های بدن را نشان می‌دهد. آنالیز خون محیطی از نظر پارامترهای هماتولوژی، سرولوژی و بیوشیمیایی در تشخیص بیماریها، سم‌شناسی متابولیک و کنترل روند زیستی موجودات زنده از جمله آبزیان به ما کمک می‌کند (غلامیان، ۱۳۸۳). برخی از پارامترهای خونی به عنوان شاخص آلودگی فلزات در محیط آبی محسوب می‌شوند (Shah & Altindag, 2005). اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیک خون می‌تواند به‌عنوان یک ابزار تشخیصی در سم شناسی و پایش زیستی بکار رود (Xiaoyan *et al*., 2009). تغییر در میزان و سطوح این پارامترها می‌تواند منعکس کننده پاسخ‌های ماهیان به تغییرات در محیط زندگی آنها باشد (Satheeshkumar *et al*., 2010). از آنجا که اطلاعات کافی در مورد اثر فلز مس بر گونه فیتوفاگ پرورشی وجود ندارد و با توجه به اهمیت موضوع، این مطالعه با هدف بررسی اثرات فیزیولوژیکی فلز سنگین مس بر بافت‌های هدف و برخی فاکتورهای سیتولوژیکی، سرولوژیکی و بیوشمیایی خون به انجام رسید.

مواد و روش‌ها

تعداد ۱۳۵ قطعه ماهی فیتوفاگ پرورشی با میانگین وزن ۸/۱ ± ۵۲/۶ گرم و طول ۲ ± ۱۷/۲ سانتی‌متر انتخاب شد. پس از سازگاری با محیط، ماهیان بر اساس تیمارهای مورد نظر در ۹ آکواریوم ۱۰۰ لیتری حاوی ۹۰ لیتر آب چاه (بدون خروجی و مجهز به هوادهی) و به تعداد ۱۵ قطعه ماهی در هر آکواریوم رهاسازی شدند. در مجموع ۳ گروه، شامل گروه شاهد و گروه‌های تیمارهای با غلظت ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات مس و هر گروه با سه تکرار در نظر گرفته شد.

جهت تهیه غلظت‌های مورد نظر نیترات مس از روش جرمی - حجمی استفاده شد. به طوری که، ابتدا میزان کل فلز مورد نیاز محاسبه شده (۴/۰۵ گرم) و پس از حل کردن در یک لیتر آب مقطر، محلول استوک تهیه گردید. سپس حجم معینی از محلول

ذخیره (۱۱۱ میلی‌لیتر برای غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر و ۲۲۲ سی سی برای غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر) به اکواریوم‌ها افزوده شد. میزان LC50 - ۲۴ ساعت با استفاده از برنامه نرم‌افزاری Probit تحت SPSS16 تعیین گردید.

بررسی شاخص‌های سیتولوژیک

نمونه برداری از ماهیان در ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از افزودن آب حاوی فلز به آکواریوم‌ها انجام شد. خون‌گیری با استفاده از سرنگ‌های با حجم ۲ میلی لیتر، از ناحیه سیاهرگ دمی (caudal vein) و از پشت باله مخرجی انجام شد. در هر مرحله مقدار ۲ میلی‌لیتر خون گرفته شد. اندازه‌گیری شاخص‌های سیتولوژیک خون از قبیل شمارش گلبول‌های سفید و قرمز با استفاده از لام نئوبار و با محلول رنگی رقیق کننده ریکس به ترتیب با رقت یک بیستم و یک دویستم انجام شد. جهت شمارش افتراقی لکوسیت‌ها، از نمونه‌ها گسترش خونی تهیه گردید. گسترش‌های تهیه شده پس از رنگ‌آمیزی با رنگ گیمسای ۱۰ درصد به مدت ۳۰ دقیقه، با استفاده از میکروسکوپ نوری شمارش گردید. میزان هماتوکریت به روش میکرو هماتوکریت با دور ۷۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه و سطوح هموگلوبین با استفاده از کیت پارس آزمون و با طول موج ۵۴۶ نانومتر به روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد. جداسازی پلاسما از خون توسط سانتریفوژ (مدل Labofuge ۲۰۰ ساخت شرکت Heraeus Sepatech، ساخت آلمان) به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور انجام گرفت. سپس با استفاده از میکروسمپلر، پلاسما به اپندورف‌های شماره‌گذاری شده و با مشخصات کامل منتقل و تا زمان سنجش پارامترهای مورد نظر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Pottinger & Carrick, 2001). میزان گلوکز به صورت آنزیمی و کالریمتریک با روش فتومتریک با طول موج ۵۴۶ نانومتر و مقادیر کلسترول، تری‌گلیسرید، پروتئین کل و آلبومین با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل UV/VIS – ۶۵۰۵، شرکت Jenway، ساخت انگلیس) و به‌کارگیری کیت پارس آزمون (ساخت ایران) با طول موج ۵۴۰ نانومتر و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد.

مطالعات آماری

آنالیز آماری، داده‌ها با استفاده از برنامه آماری SPSS 14.0 و به روش آنالیز واریانس یک طرفه (One – way ANOVA) انجام گردید.

نتایج

میانگین دمای آب ۱ ± ۲۴ درجه سانتی‌گراد، میانگین اکسیژن محلول ۰/۸ ± ۵/۲، میانگین شوری آب ۰/۰۲ ± ۱ در هزار و میانگین pH معادل ۰/۲ ± ۸ بود. پس از ۲۴ ساعت همه ماهیان هر دو تیمار تلف شدند. ماهیان بلافاصله پس از افزودن آب حاوی فلز نیترات مس، دچار حرکت چرخشی شده و در سطح آب تجمع کردند. پس از گذشت رفتار پرشی ماهیان به بیرون، شنای معکوس مشاهده گردید. عوارضی از قبیل تغییر رنگ (کم‌رنگی و بی‌رنگی) آبشش‌ها، تورم در ناحیه کمان آبششی، سفید رنگ شدن آبشش‌ها، ایجاد لخته‌های خون در آبشش، تورم و تیرگی کیسه صفرا در ماهیان تحت تیمار مشاهده گردید.

تعداد گلبول‌های سفید خون (WBC) با افزایش غلظت نیترات مس و با گذشت زمان به‌طور معنی‌داری ($P<0/05$) کاهش یافت. به طوری که کمترین تعداد آن (۵۰۰ ± ۷۰۰۰ عدد در هر میلی‌متر مکعب خون) در ساعت ۲۴ در غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر نیترات مس مشاهده گردید. نتایج شمارش گلبول‌های قرمز خون ماهیان قرار گرفته در مجاورت غلظت‌های مختلف نیترات مس با افزایش غلظت و زمان مجاورت سیر نزولی نشان داد ($P\geq0/05$). کمترین تعداد گلبول‌های قرمز (۱۵۰۰۰۰ ± ۱۶۱۰۰۰۰ عدد در هر میلی‌متر مکعب خون) در تیمار با غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر نیترات مس در ساعت ۲۴ ثبت گردید. سطوح

هموگلوبین خون با افزایش غلظت نیترات مس و با گذشت زمان به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) کاهش یافت. به طوری که حداقل میزان آن (۰/۲ ± ۴/۸ گرم در دسی‌لیتر) در تیمار با غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر در ساعت ۲۴ بود.

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 ساعت ۲۴ اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) مشاهده گردید. به طوری که 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. میانگین تغییرات حجم متوسط سلولی با افزایش غلظت سم در زمان‌های مختلف فاقد اختلاف معنی‌دار (P≥۰/۰۵) بود.

میانگین تغییرات غلظت هموگلوبین ذره‌ای در تیمارهای مورد مطالعه در زمان ۱۲ ساعت اختلاف معنی‌داری (P≥۰/۰۵) نشان نداد. در حالیکه در ساعت ۲۴ بین غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر و تیمار شاهد کاهش معنی‌داری (P<۰/۰۵) مشاهده گردید. تغییرات سطوح متوسط هموگلوبین ذره‌ای در ساعت ۱۲ بین تیمارها اختلاف معنی داری (P≥۰/۰۵) نشان نداد. در حالی که تیمار با غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر در زمان ۲۴ ساعت کاهش معنی‌داری (P<۰/۰۵) نسبت به تیمار شاهد نشان داد (جدول ۱).

جدول ۱- میانگین و انحراف معیار تغییرات شاخص‌های سیتولوژیک خون ماهی فیتوفاگ در غلظت‌های مختلف نیترات مس در زمان‌های مختلف

زمان مجاورت	۱۲ ساعت			۲۴ ساعت		
غلظت (mg/lit) شاخص	۰	۵	۱۰	۰	۵	*۱۰
گلبول سفید (n/mm3)	۱۸۰۰۰ ± ۵۱۶ [b]	۱۶۶۶۶ ±۱۹۶[a]	۱۴۱۶۶ ± ۵۹۶۰ [a]	۱۷۵۰۰ ±۱۶۰۷ [b]	۷۰۰۰ ± ۵۰۰ [a]	–
گلبول قرمز (n/mm3)	۲۰۰۰۰۰۰ ± ۱۲۲۵۴۲ [a]	۱۸۹۰۰۰۰ ±۲۲۷۲۲۹ [a]	۱۸۰۰۰۰۰ ± ۱۱۰۲۰۱ [a]	۱۹۹۰۰۰۰ ± ۱۱۳۱۷۳ [a]	۱۶۱۰۰۰۰ ±۱۵۰۰۰۰ [a]	–
هموگلوبین (gr/dl)	۸/۷ ± ۰/۸[b]	۷/۴ ± ۰/۹[a]	۷ ± ۰/۱[a]	۸/۷ ± ۰/۵[b]	۴/۸ ± ۰/۲[a]	–
هماتوکریت (٪)	۲۸ ± ۳/۲ [a]	۳۲ ± ۳/۴ [a]	۳۲/۶ ± ۲/۴ [a]	۲۸ ± ۴/۹ [a]	۳۶ ± ۴ [b]	–
MCV	۱۸۲/۳ ± ۱۳/۲ [a]	۱۷۰ ± ۱۵ [a]	۱۹۰ ± ۲۱/۶ [a]	۱۸۲ ± ۱۴/۹ [a]	۱۵۷/۱ ± ۲۰ [a]	–
MCHC	۲۵/۳ ± ۳/۲ [a]	۲۶/۵ ± ۰/۸ [a]	۲۴/۹ ± ۱/۱ [a]	۲۵/۳ ± ۳/۲ [b]	۱۵/۴ ± ۰/۴ [a]	–
MCH	۴۷ ± ۹/۹ [a]	۵۰/۵ ± ۴/۴ [a]	۵۲/۲ ± ۳ [a]	۴۶/۵ ± ۹/۸ [b]	۳۰/۴ ± ۳/۴ [a]	–

*همه ماهیان در مجاورت غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر تا ساعت ۲۴ تلف شدند. a,b: حروف متفاوت نشانه اختلاف معنی‌دار در زمان ۱۲ ساعت است. *a,b*: حروف متفاوت نشانه اختلاف معنی‌دار در زمان ۲۴ ساعت است.

نتایج روند تغییرات سطو ح تری‌گلیسرید پلاسمای خون در بین تیمارها در ساعت ۱۲ اختلاف معنی‌داری (P≥۰/۰۵) نشان نداد. در حالی که در ساعت ۲۴ بین تیمار ۵ میلی‌گرم در لیتر و شاهد اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) مشاهده گردید. به طوری که کمترین میزان آن (۷ ± ۲۰/۶ میلی‌گرم در لیتر) در مجاورت با غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر در زمان ۲۴ ساعت مشاهده گردید. سطوح کلسترول پلاسمای خون با افزایش غلظت نیترات مس و با گذشت زمان تغییرات معنی‌داری بین تیمارها نشان نداد (P≥۰/۰۵). سطوح گلوکز پلاسمای خون با افزایش غلظت نیترات مس در زمان ۱۲ ساعت اختلاف معنی‌داری نشان داد و در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر به کمترین میزان (۳/۵ ± ۳۴/۹ میلی‌گرم در دسی‌لیتر) رسید.

در ساعت ۲۴ نیز کاهش معنی‌داری (P<۰/۰۵) بین تیمار با غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر و شاهد مشاهده گردید. سطوح توتال پروتئین پلاسمای خون با افزایش غلظت نیترات مس سیر نزولی را در ساعت ۱۲ نشان داد، اما فاقد اختلاف معنی‌دار بود (P≥۰/۰۵). در حالی که در ساعت ۲۴ در تیمار ۵ میلی‌گرم در لیتر نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۵) و به حداقل (۰/۰۰۳ ± ۰/۵ میلی‌گرم در دسی‌لیتر) رسید. سطوح آلبومین پلاسمای خون در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر در ساعت ۱۲ نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵).

به طوری که در ساعت ۱۲ به کمترین میزان (۰/۱ ± ۲/۰۶ گرم در دسی‌لیتر) در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر رسید. در حالی که در تیمار ۵ میلی‌گرم در لیتر در ساعت ۲۴ به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافت و به حداکثر (۱/۱ ± ۵/۹ گرم در دسی‌لیتر) رسید (جدول ۲).

جدول ۲- میانگین و انحراف معیار تغییرات شاخص‌های بیوشیمیایی خون ماهی فیتوفاگ در غلظت‌های مختلف نیترات مس در زمان‌های مختلف

زمان مجاورت	۱۲ ساعت			۲۴ ساعت		
غلظت (mg/lit) شاخص	۰	۵	۱۰	۰	۵	۱۰*
تری گلیسرید (mg/dl)	۱۳۵ ± ۵ ^{a}	۱۳۴/۲ ±۱۹ ^{a}	۱۳۵/۷ ± ۱۶/۴ ^{a}	۱۳۴/۵ ± ۵ ^{b}	۲۰/۶ ± ۷ ^{a}	-
کلسترول (mg/dl)	۱۲۵/۳ ± ۱۴/۹ ^{a}	۱۲۳/۴ ±۳/۸ ^{a}	۱۲۲ ± ۱۲ ^{a}	۱۲۴ ± ۹/۱ ^{a}	۱۱۳ ±۱۵۰۰۰۰ ^{a}	-
گلوکز (mg/dl)	۸۷/۶ ± ۵/۲^{c}	۵۲/۱ ± ۴/۵^{b}	۳۴/۹ ± ۳/۴^{a}	۸۸ ± ۷/۲ ^{b}	۶۴/۷ ± ۹/۶^{a}	-
پروتئین کل (mg/dl)	۳/۴ ± ۰/۲ ^{a}	۴/۲ ± ۰/۰۵ ^{a}	۴/۱ ± ۰/۱ ^{a}	۳/۴ ± ۰/۰ ^{b}	۰/۵ ± ۰/۰۲ ^{a}	-
آلبومین (mg/dl)	۴/۸ ± ۰/۲ ^{b}	۲/۶ ± ۰/۲ ^{a}	۲ ± ۰/۱ ^{a}	۴/۸ ± ۰/۱ ^{a}	۵/۹ ± ۰/۱^{b}	-

*همه ماهیان در مجاورت غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر تا ساعت ۲۴ تلف شدند. a,b,c: حروف متفاوت نشانه اختلاف معنی‌دار در زمان ۱۲ ساعت است. *a,b*: حروف متفاوت نشانه اختلاف معنی‌دار در زمان ۲۴ ساعت است.

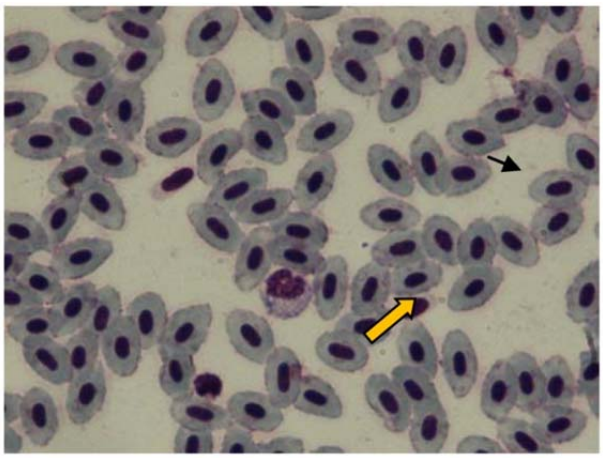
تعداد لنفوسیت‌های خون ماهیان با گذشت زمان و افزایش غلظت نیترات مس به‌طور معنی‌داری کاهش (P<۰/۰۵) یافت. به طوری که بیشترین میزان لنفوسیت‌ها (۱/۲ ± ۹۱ درصد) مربوط به تیمار شاهد و کمترین تعداد (۶/۶ ± ۶۸ درصد) میزان آن مربوط به بالاترین غلظت (۱۰ میلی‌گرم در لیتر) نیترات مس در ساعت ۱۲ بود. تعداد نوتروفیل‌های خون ماهیان با گذشت زمان و با افزایش غلظت نیترات مس به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (P<۰/۰۵). به طوری که بیشترین تعداد نوتروفیل‌ها (۲ ± ۲۶ درصد) مربوط تیمار ۱۰ میلی‌گرم در لیتر در زمان ۱۲ ساعت و کمترین تعداد آن (۱/۴ ± ۵ 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 (P<۰/۰۵) بود. در حالی که، تیمار ۵ میلی‌گرم در لیتر در ساعت ۲۴ کاهش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نشان داد (جدول ۳).

جدول ۳- میانگین و انحراف معیار تغییرات تعداد لکوسیت‌های خون ماهی فیتوفاگ در غلظت‌های مختلف نیترات مس در زمان‌های مختلف

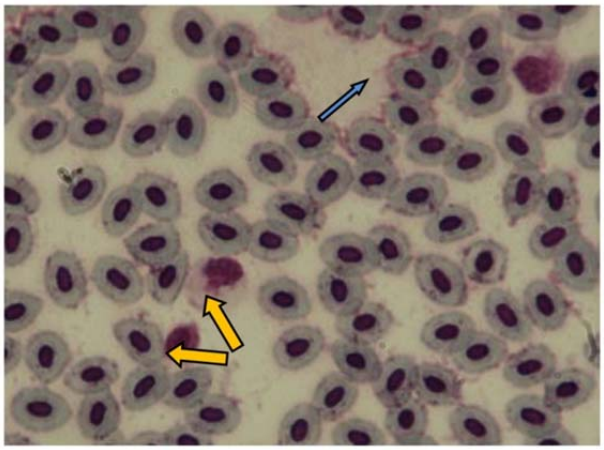
زمان مجاورت	۱۲ ساعت			۲۴ ساعت		
غلظت (mg/lit) شاخص	۰	۵	۱۰	۰	۵	۱۰*
لنفوسیت (٪)	۹۱ ± ۳ ^{b}	۸۵/۳ ± ۶/۲ ^{b}	۶۷/۶ ± ۶/۶ ^{a}	۹۰ ± ۲ ^{a}	۸۴/۳ ± ۶ ^{a}	-
نوتروفیل (٪)	۵/۳ ± ۱/۸ ^{a}	۱۱ ± ۱ ^{b}	۲۶/۶ ± ۲ ^{c}	۵/۳ ± ۱ ^{a}	۱۳ ± ۱ ^{b}	-
مونوسیت (٪)	۳/۶ ± ۰/۲ ^{c}	۳/۶ ± ۰/۴ ^{b}	۴/۳ ± ۰/۶ ^{a}	۳/۶ ± ۰/۳ ^{b}	۲ ± ۰/۶ ^{a}	-

*همه ماهیان در مجاورت غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر تا ساعت ۲۴ تلف شدند. a,b,c: حروف متفاوت نشانه اختلاف معنی‌دار در زمان ۱۲ ساعت است. *a,b*: حروف متفاوت نشانه اختلاف معنی‌دار در زمان ۲۴ ساعت است.

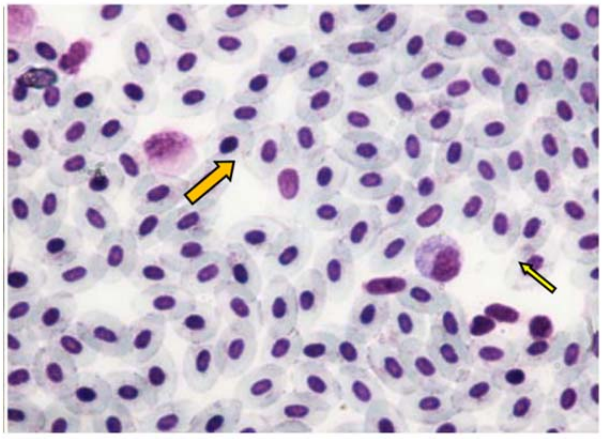
نتایج نشان داد که شکل نرمال گلبول‌های قرمز (اریتروسیت‌ها) بالغ ماهی فیتوفاگ بیضوی با سیتوپلاسم اسیدوفیلیک صاف بود که هسته‌های بیضی شکل دارای کروماتین تقریباً همولوگ در مرکز آن قرار داشتند. گلبول‌های قرمز در مجاورت مس به شکل کروی تغییر وضعیت داده و هسته‌های کوچک‌تری داشتند. در مجاورت غلظت‌های مختلف نیترات مس عوارضی از قبیل تورم و اشکی‌شدن گلبول‌های قرمز، دژنره شدن گلبول‌های سفید (لنفوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها، مونوسیت‌ها و منوسیت‌ها) در مقایسه با تیمار شاهد مشاهده گردید (شکل‌های ۱ الی ۷).



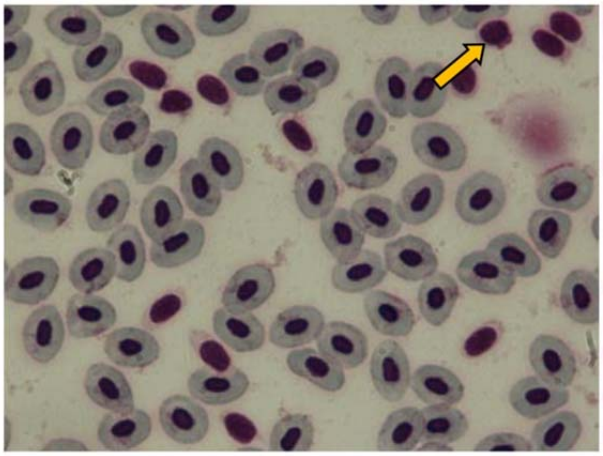
شکل ۱- وضعیت گلبول‌های قرمز (فلش کوچک) و نوتروفیل (فلش قطور) در تیمار شاهد (H&E، ۲۰X)



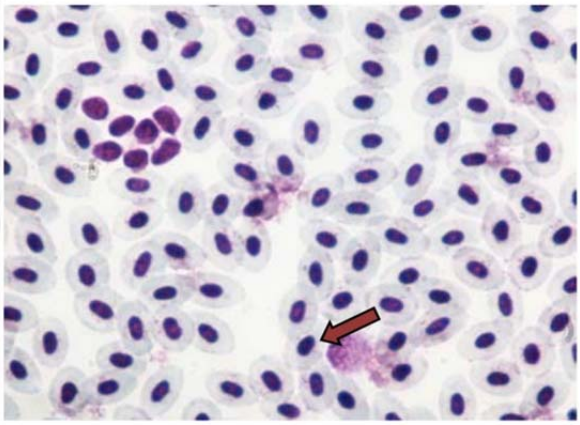
شکل ۲- تورم و تغییر شکل گلبول‌های سفید (فلش قطور) و قرمز (فلش کوچک) در مجاورت ۵ میلی‌گرم در لیتر نیترات مس پس از ۱۲ ساعت (H&E، ۲۰X)



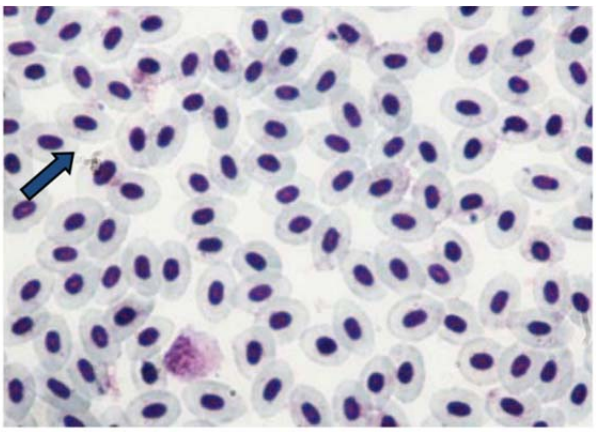
شکل ۳- وضعیت نوتروفیل (فلش قطور) و نوتروفیل (فلش نازک) در مجاورت غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر پس از ۱۲ ساعت (H&E، ۲۰X)



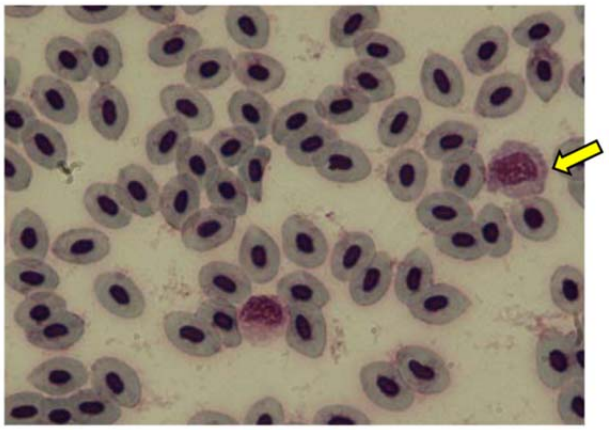
شکل ۴- ترومبوسیت‌ها (فلش) در مجاورت ۵ میلی گرم در لیتر نیترات مس پس از ۱۲ ساعت (H&E، ۲۰X)



شکل ۵- آسیب نوتروفیل (فلش) در مجاورت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات مس (۱۲ ساعت) (H&E، ۲۰X)



شکل ۶- تجمع لنفوسیت‌ها (فلش) در مجاورت ۱۰ میلی‌گرم نیترات مس (۱۲ ساعت) (H&E، ۲۰X)



شکل ۷- مونوسیت (فلش) در غلظت ۵ میلی گرم در لیتر نیترات مس پس از ۱۲ ساعت (H&E، ۲۰X)

بحث و نتیجه‌گیری

نیترات مس دارای اثر کشندگی شدیدی بر ماهی فیتوفاگ است. این ماهی در برابر غلظت‌های کشنده مس حساس بود، به طوری که همه ماهیان پس از ۲۴ ساعت مجاورت با غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات مس تلف شدند و LC_{50}-۲۴ ساعته آن ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر تعیین گردید. در مطالعه‌ای که Weiguang و Chen (۱۹۹۵)، در مورد سمیت حاد سولفات مس در لاروهای ماهی سیم قرمز دریایی (*Chrysophrys major*) انجام دادند، LC_{50} -۹۶ ساعت را ۰/۰۷ 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.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که سطوح هموگلوبین (Hb) با افزایش غلظت نیترات مس و با گذشت زمان به‌طور معنی‌داری کاهش، ولی درصد هماتوکریت (Hct) افزایش یافت. در حالی که تعداد گلبول‌های قرمز (RBC) تغییر معنی‌داری نشان نداد. تعداد گلبول‌های سفید (WBC)، میانگین غلظت هموگلوبین ذره‌ای (MCHC) و میانگین هموگلوبین ذره‌ای (MCH) به‌طور معنی‌داری از ساعت صفر تا ۲۴ کاهش یافت ($P<0/05$). نتایج شمارش افتراقی لکوسیت‌ها نشان داد که با افزایش غلظت مس و با گذشت زمان، تعداد لنفوسیت‌ها کاهش و تعداد نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها افزایش یافت ($P<0/05$). اثرات سمیت مس بر ماهی فیتوفاگ از طریق تغییرات پاتولوژیکی در خون و بافت ناشی از القای نوعی آنمی بود.

Serezli و همکاران (۲۰۱۱)، اثرات حاد مس و سرب بر برخی پارامترهای خونی در گونه trout Coruh (*Salmo coruhensis*) را طی یک دوره مجاورت کوتاه مدت در برابر غلظت‌های بالای ۵ و ۱۰ میلی گرم در لیتر مورد مطالعه قرار دادند و دریافتند که تعداد لکوسیت‌ها و اریتروسیت‌ها پس از مجاورت با غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر، ابتدا کاهش و پس از ۴۸ ساعت تعداد اریتروسیت‌ها به حالت اولیه بازگشت. در حالیکه تعداد لکوسیت‌ها در مجاورت مس افزایش یافت و اثر مس باعث افزایش سطوح هموگلوبین و هماتوکریت گردید. Mazon و همکاران (۲۰۰۲)، اثر سمیت حاد مس بر گونه *Prochilodus scrofa* را بررسی کردند. آن‌ها افزایش معنی‌دار در میزان هماتوکریت و گلبول‌های قرمز را گزارش دادند. افزایش گلبول‌های قرمز به خاطر افزایش میزان هموگلوبین کل فقط در ماهی قرار گرفته در مجاورت غلظت‌های بالای مس بود. افزایش در میزان هماتوکریت توسط Schjolden و همکاران (۲۰۰۷) در *Carassius crassius* مشاهده گردید. Singh و همکاران (۲۰۰۸)، اثر مس بر پروفیل خون ماهی *Channa punctatus* آب شیرین را مورد مطالعه قرار دادند و دریافتند که میزان هموگلوبین (Hb)، هماتوکریت (PCV) و تعداد گلبول‌های قرمز (RBC) در پایان دوره ۴۵ روز به‌طور معنی داری در مقایسه با شاهد کاهش یافت. در حالی که تعداد گلبول‌های سفید (WBC) افزایش یافت. هر چند میزان MCV، MCH و MCHC افزایش معنی‌داری طی روزهای ۱۵ تا ۳۰ نشان داد. Georgieva و همکاران (۲۰۱۰)، اثرات کلینیکی، هماتولوژیکی و مورفولوژیکی سمیت مس در ماهی کاراس (*Carasius gibelio*) را مورد مطالعه قرار دادند و دریافتند که با افزایش غلظت مس از ۰ به ۲ میلی‌گرم در لیتر میزان هماتوکریت، MCV، MCH و MCHC تغییرات معنی‌داری را نشان داد. پارامترهای میانگین حجم یاخته قرمز (MCV)، میانگین هموگلوبین یاخته قرمز (MCH) و میانگین غلظت هموگلوبین خون (MCHC) عوامل وابسته به تعداد یاخته‌های قرمز، درصد هماتوکریت و غلظت هموگلوبین خون بوده، تابع تغییرات آنها هستند. وضعیت تغذیه‌ای، سن و شرایط محیطی، فاکتورهای اصلی پاسخگویی به تغییرات شاخص‌های یاخته‌های

خونی در ماهیان است (Tavares-Dias & Moraes, 2007). 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 به مدت ۹۶ ساعت دریافت که ماهیان دچار استرس شده و درصد هماتوکریت آن‌ها بدون ایجاد تغییرات معنی‌دار در تعداد گلبول‌های قرمز افزایش یافت که به دلیل بادکردگی و تغییر شکل گلبول‌های قرمز از حالت بیضوی به کروی و بروز پدیده اریتروپویتیک ناشی از افزایش تعداد گلبول‌های قرمز نابالغ بود. درصد هماتوکریت و پارامترهای وابسته به آنها عمومی‌ترین شاخص‌های خون شناسی جهت تشخیص کم خونی در ماهیان هستند که به تغذیه، سن (Tavares-Dias & Moraes, 2007) و بیماری وابسته می‌باشد. تعداد بالای یاخته‌های قرمز نیاز بالای تعداد یاخته‌های سفید خون را کاهش می‌دهد (Satheeshkumar *et al*., 2010). MCV بیانگر اندازه و بازتاب وضعیت طبیعی یا غیر طبیعی بودن تقسیمات یاخته در چرخه ساخت گلبول‌های قرمز خون است. 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. از یاخته‌های سفید خون به عنوان شاخص وضعیت سلامت ماهیان استفاده می‌شود. زیرا گلبول‌های سفید خون از ترکیبات کلیدی و جدایی ناپذیر گلبول‌های 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). غلظت هموگلوبین خون ماهیان بهترین شاخص تغییرات محیطی است (Bani & Haghi Vayghan, 2009). عموماً در محدوده ۱۰ -۵ گرم در دسی‌لیتر قرار دارد. در تحقیق حاظر تعداد گلبول‌های سفید خون به‌طور معنی‌داری کاهش یافت که ناشی از کاهش تعداد لنفوسیت‌ها بود. رها سازی نوتروفیل‌ها به خون سبب بروز بیماری نوتروفیلیا (Neutrophilia) می‌شود و به‌عنوان پاسخ ایمنی غیر اختصاصی به انواع عوامل استرس‌زا محسوب می‌شود (Singh *et al*., 2008). درصد این سلول‌ها معمولاً در سمیت‌های حاد مس کاهش می‌یابد (Nussey *et al*., 1995) و گزارش شده است که در سمیت‌های مزمن درصد آنها افزایش می‌یابد (Dick & Dixon, 1985). یاخته‌های لنفوسیت 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. Gail و همکاران (۱۹۹۹)، در مطالعه اثر مس بر پارامترهای سیستم ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Onchorhynchus mykiss*) دریافتند که هر نوع سلول لکوسیت در شمارش افتراقی پاسخ مختص به خود را در مجاورت مس نشان دادند. به طوری که تعداد لنفوسیت‌ها در همه غلظت‌ها و در هر نمونه‌برداری کاهش یافت. در حالی که نوتروفیل و هم مونوسیت‌ها در کلیه غلظت‌ها و در تمام نمونه‌برداری‌ها افزایش نشان دادند. مطالعات قبلی پاسخ‌های متفاوتی از لکوسیت‌ها به فلزات سنگین را نشان دادند، به طوری که ماهی طلایی (*Carassius auratus*) قرار گرفته در مجاورت کادمیوم به مدت ۳ هفته، تعداد مونوسیت ها و نوتروفیل ها افزایش و تعداد لنفوسیت‌ها کاهش یافت (Murad & Houston, 1998).

اثر منفی فلزات سنگین بر ماهیان به اختلال ایجاد شده در فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی آنها مربوط می‌شود (Viela *et al*., 1999). بیوشیمی پلاسمای خون ماهی می‌تواند در تشخیص وضعیت سلامت ماهی استفاده شود (De Pedro *et al*., 2005). پروتئین، چربی و کربوهیدرات از منابع اصلی تأمین انرژی در ماهیان هستند. بنابراین تغییر و نوسان در میزان پروتئین، کلسترول و تری گلیسرید می‌تواند در ارتباط به مصرف آنها جهت تأمین انرژی لازم جهت

انجام فعالیت‌های حیاتی بدن باشد (Emad *et al.*, 2005). در این تحقیق، نتایج سطوح تری‌گلیسرید در ساعت ۲۴ بین تیمار ۵ میلی‌گرم در لیتر نیترات مس نسبت به تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($P<۰/۰۵$). این کاهش می‌تواند به دلیل مصرف بالای آن جهت تأمین انرژی به منظور مقابله با استرس ناشی از سمیت فلز مس باشد. سطوح کلسترول فاقد اختلاف معنی‌دار بود ($P\geq۰/۰۵$). کلسترول پیش ماده ساخت هورمون‌های استروئیدی است که تحت شرایط استرس، غلظت آن در خون افزایش می‌یابد و ممکن است فراهم کننده افزایش ساخت هورمون کورتیزول باشد (Hoseini & Ghelichpour, 2011). سطوح غلظت تری‌گلیسرید و کلسترول به عنوان شاخص‌های اصلی وضعیت سلامت ماهیان استخوانی عالی مطرح می‌باشد (Gul *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2009)؛ به‌طوری که تغییر در غلظت کلسترول بیانگر سوخت و ساز در کبد است. افزایش بیش از حد کلسترول بیانگر بی‌نظمی سوخت و ساز چربی و لیپوپروتئین به‌ویژه تخریب کارایی فیزیولوژیک کبد است (Gul *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2009). سطوح گلوکز پلاسمای خون با افزایش غلظت نیترات مس در زمان ۱۲ و ۲۴ ساعت به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد کاهش یافت ($P<۰/۰۵$). سطوح توتال پروتئین در زمان ۲۴ ساعت در تیمار ۵ میلی‌گرم در لیتر نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) را نشان داد. سطوح آلبومین پلاسمای خون در زمان ۱۲ و ۲۴ ساعت نوسان معنی‌داری نشان داد ($P<۰/۰۵$). 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، سطوح آلبومین سرم در ابتدا از ساعت ۲ تا ۴ بشدت کاهش و سپس به حالت اولیه برگشته و متعاقباً تا ساعت ۷۲ کاهش یافت. غلظت‌های کشنده و تحت کشنده فلزات سنگین روند مشابهی را نشان داد و اندازه‌گیری سطوح پروتئین و آلبومین به‌عنوان یک شاخص پاسخ به عوامل استرس‌زای محیطی بیان گردید. مقدار گلوکز سرم خون شاخص مناسبی برای پاسخ‌های ثانویه استرسی ماهی به شرایط نامناسب محیطی است (Yousefi *et al.*, 2012). گلوکز اصلی‌ترین ماده حاصل از سوخت و ساز مواد کربوهیدراتی می‌باشد (Zhou *et al.*, 2009) 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 (Ahmadifar *et al.*, 2010) متغیر می‌باشد. بالا رفتن غلظت گلوکز در خون ماهی بیانگر وجود استرس در ماهی است که به میزان زیادی نیازمند انرژی است. 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 *et al.*, 2010). افزایش در میزان گلوکز در خون قزل‌آلای رنگین کمان در معرض سمیت حاد ۰/۱۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر مس مشاهده گردید و افزایش مشابهی در گلوکز خون قزل‌آلای رنگین کمان پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت مجاورت با ۲ میلی‌گرم در لیتر مس نیز مشاهده شد (Nemsock & Hughes, 1988). با این وجود، میزان گلوکز در خون گربه ماهی هندی (*Heteropneustes fossilis*) پس از ۲۴ ساعت مجاورت با غلظت ۲۵۰ میکروگرم در لیتر مشاهده گردید (Singh & Reddy, 1990). Emad و همکاران (۲۰۰۵)، سمیت مس و اثرات آن بر برخی از پارامترهای 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 پس از ۴ روز به بالاترین سطح خود رسید. همچنین میزان توتال پروتئین و تری‌گلیسرید و کلسترل پلاسما

نسبت به شاهد افزایش یافت. آن‌ها میزان LC50 -۹۶ ساعت مس را ۱/۶۴ میلی‌گرم در لیتر تعیین کردند. در حالی که در تحقیق حاضر LC_{50}- 24h آن ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر تعیین گردید. نتایج این تحقیق نشان داد که گرچه مس یک فلز ضروری برای انجام بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی است، ولی در ترکیب با نیترات در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر اثرات سمی شدیدی بر ماهی فیتوفاگ دارد و می‌تواند اثرات خطرناکی در موجودات آبزی و محیط زیست آنها ایجاد کنند.

منابع

امینی رنجبر، ن. ۱۳۸۲. حذف بیولوژی فلزات سنگین کروم و روی توسط سرخس آزولا. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال.

جلالی، ب. و آقازاده، م. ۱۳۸۵. مسمومیت ماهیان در اثر فلزات سنگین و اهمیت آن در بهداشت عمومی. انتشارات مان کتاب. ایران.

غلامیان، س. ۱۳۸۳. بررسی اثرات سمی مس بر بافت کبد و اندازه‌گیری پروتئین کل و برخی از آنزیم‌های سرم خون در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). پایان‌نامه کارشناسی ارشد. مرکز ملی علوم اکادمیک آذربایجان، باکو.

نظری، ر. ۱۳۷۵. بررسی کاربرد هورمون‌های غده هیپوفیز ماهی اسبله در تکثیر کپور ماهیان. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران. ایران.

Ahmdifar, A., Akrami, R., Ghelichi, A. & Mohammadi Zarejabad, A. 2011. Effects of different dietary prebiotic inulin levels on blood serum enzymes, hematologic, and biochemical parameters of Great sturgeon (*Huso huso*) juveniles. *Comparative Clinical Pathology*, 20(5):447-451.

Bani, A. & Haghi Vayghan, A. 2011. Temporal variations in haematological and biochemical indices of the Caspian kutum, *Rutilus frisii kutum*. *Ichthyological Research*, 58 (2), 126-133.

De Pedro, N., Guijarro, A. E., Lopez – Patino, M. A., Marinez – Alvarez, R. & Delgado Daily, M. 2005. Seasonal variation in hematological and blood biochemical parameters in Tench (*Tinca tinca*). *Aquaculture Research*, 36: 185 – 196.

Dick, P. T. & Dixon, D. G. 1985. Changes in circulating blood cell levels of Rainbow trout, *Salmo gardener* Richardson, Following acute and chronic exposure to copper. *Journal of Fish Biology*, 26: 475-480.

Emad, H., Abou, E-N., Khalid, M., Moselhy, E. & 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*, 31: 60-71.

Gail, M. D., Daniel, S., Jonathan T. H. & Howard, C. B. 1999. Alterations in physiological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with exposure to copper and copper/zinc mixtures. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 42: 253–264.

Georgeva, E., Arnaudov, A. & Velcheva, I. 2010. Clinical, hematological and morphological studies on ex- siyu induced copper intoxication in Crucian Carp (*Carassius gibello*). *Journal of Central European Agriculture*, 11:165-172).

Gioda, C. R., Lissner, L. A., Pretto, A., Da Rocha, J. B. T., Schetinger, M. R. C., Neto, J. R., Morsch, V. M. & Loro, V. L. 2007. Exposure to sub lethal concentrations of Zn (II) and Cu (II) changes biochemical parameters in *Leporinus obtusidens*. *Chemosphere*, 69(1):170-175.

Gopal, V., Parvathy, S. & 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*, 48: 117–124.

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

Hoseini, S. M. & Ghelichpour, M. 2011. Efficacy of clove solution on blood sampling and hematological study in Beluga, *Huso huso* (L.). *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(2):493-498.

Lodhi, H.S., Khan, M.A., Verma, R. S. & Sharma, U.D. 2006. Acute toxicity of copper

Singh, D., Nath, K., Trivedi, S. P. & Sharma, Y.K. 2008. Impact of copper on haematological profile of freshwater fish, *Channa punctatus*. *Environmental Biology of Fishes*, 29: 253-257.

Taylor, J. C., Geer, L. N., Wood, C. M. & Donald, D. G. Mc. 2000. Physiological effects of chronic copper exposure to Rainbow trout (*Oncorhychus mykiss*) in hand and soft water, evaluation of chronic indicators. *Environmental Toxicology and Chemistry,* 19: 2298-2308.

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

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. & Shugart, L. R. 1992. *Ecotoxicology*, 1: 45-73

Viella, S., Ingrossi, L., Lionetto, M., Schettino, T., Zonno, V. & Stroelli, C. 1999. Effect of cadmium and zinc on the Na/H exchanger on the brush border membrane vesicles isolated from eel kidney tankular cells. *Aquatic Toxicology*, 48: 25-36.

Weiguang, L. & Chen, N. 1995. Acute toxicity of Hg, Cu, Cd, Zn to larvae of Red Sea bream, *Chrysophrys major*. *Journal of Marine Science,* 20: 1000- 1015.

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

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

Yousefi, M., Abtahi, B. & Abdian Kenari, A. 2012. Hematological, serum biochemical parameters, and physiological responses to acute stress of Beluga sturgeon (*Huso huso*, Linnaeus 1785) juveniles fed dietary nucleotide. *Comparative Clinical Pathology*, 21(5): 1043-1048.

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

sulphate to fresh water prawns. *Journal of Environmental Biology,* 27: 585-588.

Mazon, A. F., Monteiro, E. A., Pinheiro, G.H. & Fernandez, M. N. 2002b. Hematological and physiological changes induced by short-term exposure to copper in the freshwater fish, *Prochilodus scrofa*. *Brazilian Journal of Biology,* 62: 621-31.

Murad, A. & Houston, A. H. 1988. Leucocytes and leucopoietic capacity in Goldfish, *Carassius auratus*, exposed to sub lethal levels of cadmium. Aquatic Toxicology, 13:141–154.

Nemscok, J. G. & Hughes, G. M. 1988. The effect of copper sulphate on some biochemical parameters of rainbow trout. *Environmental Pollution,* 49: 77-85.

Nussey, G., Van Vuren, J. H. J. & Du Preez, H. H. 1995 .Effect of copper on the differential white blood cell counts of the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology,* 111:381-388.

Pottinger, T. G. & Carrick, T.R. 2001. ACTH does not mediate divergent stress responsiveness in Rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology,* 129: 399-404.

Satheeshkumar, P., Ananthan, G., Senthilkumar, D. & 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 Pathology*, 10: 1091 – 1095.

Schjolden, J., Sorensen, J., Nilsson, G.E. & Poleo, A.B. 2007. The toxicity of copper to Crucian carp (*Carassius carassius*) in soft water. *Science of the Total Environment*, 384: 239-251.

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

Shah, S.l. & 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. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Science*, 29: 1163 – 1168.