



## اثر سولفات مس بر شاخص‌های فیزیولوژیک زنجیره غذایی ماهیان زینتی در مدل آزمایشگاهی

مریم میرزایی‌وند خانقاه<sup>۱\*</sup>، سید علی اکبر هدایتی<sup>۲</sup>، سمانه ناظری<sup>۳</sup>، حمید محمدی آزر<sup>۴</sup>، رسول قربانی<sup>۲</sup>

۱. دانشجوی دکتری گروه تولید و بهره برداری آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست،

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۲. استاد گروه تولید و بهره برداری آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۳. دکتری گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۴. دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریایی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۲۱

تاریخ ارسال: ۱۴۰۰/۰۹/۱۲

DOR: [20.1001.1.20085729.1401.75.4.1.6](https://doi.org/10.22085/229.1401.75.4.1.6)

### چکیده

به دلیل افزایش استقرار صنایع در سواحل و توسعه شهرهای ساحلی، اکوسیستم‌های آبی و آبزیان آنها از آلاینده‌های تخلیه شده به ویژه فلزات سنگین تاثیر می‌پذیرند. فلزات سنگین پس از ورود به اکوسیستم‌های آبی و تجمع در بافت‌های آبزیان و از جمله ماهیان، نهایتاً از طریق زنجیره غذایی می‌توانند وارد بدن انسان گردند. هدف از این تحقیق تعیین میزان انتقال فلز سنگین مس در طی زنجیره غذایی ماهیان زینتی جهت برآورد حضور آلاینده‌ها در زنجیره غذایی بود. به همین منظور در مطالعه حاضر بزرگنمایی زیستی فلز سنگین سولفات مس ( $\text{CuSO}_4$ ) و انتقال آن در زنجیره غذایی آرتمیا فرانسیسکانا (*Artemia franciscana*)، ماهی زبرا (*Danio rerio*) و ماهی اسکار (*Astronotus ocellatus*) مورد بررسی قرار گرفت. پس از محاسبه ابتدا غلظت مزمون سولفات مس روی ناپلی آرتمیا در ۲۴ ساعت به دست آمد. در مرحله اول، آرتمیای آلوده مورد تغذیه ماهی زبرا *Danio rerio* به عنوان مصرف کننده دوم در دو محیط جداگانه (آب تمیز و آب حاوی مس) قرار داده شد. در مرحله دوم، ماهی زبرا مورد تغذیه ماهی اسکار *Astronotus ocellatus* به عنوان مصرف کننده سوم در دو محیط جداگانه (آب بدون آلودگی و آب حاوی مس) قرار داده شد. در مرحله آخر، غلظت مس در بافت کبد ماهی زبرا و اسکار اندازه‌گیری شد. همچنین، تغییرات گلوکز و آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپارات آمینوترانسفراز (AST)، اسید فسفاتاز (ACP) اندازه‌گیری شد. نتایج این مطالعه افزایش معنی‌داری غلظت مس در بافت کبد ماهی زبرا و اسکار تحت تیمارهای غذایی مختلف در معرض این فلز سنگین را نشان داد. علاوه بر این، افزایش قابل توجهی در غلظت آنزیم‌های مختلف (ALT، AST، ACP) و گلوکز در تیمارهای معرض مس مشاهده شد که می‌تواند نشان‌دهنده آسیب به بافت‌های کبدی باشد.

واژگان کلیدی: فلزات سنگین، بزرگ نمایی زیستی، آسیب کبدی، سولفات مس ( $\text{CuSO}_4$ )، زنجیره غذایی



## Effect of copper sulfate on some physiological parameters of ornamental fish food chain in a laboratory model

Maryam Mirzaeevand Khanghah<sup>1\*</sup>, Seyyed Aliakbar Hedayati<sup>2</sup>, Samaneh Nazeri<sup>3</sup>,  
Hamid Mohammadi Azarm<sup>4</sup>, Rasoul Ghorbani<sup>2</sup>

1. PhD Student, Department of Fisheries and Aquatic Ecology, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

2. Professor, Department of Fisheries and Aquatic Ecology, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

3. PhD in Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Tehran, Iran

4. Associate Professor, Department of Fisheries, Faculty of Marine Natural Resources, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran

Received: 03-Dec-2021

Accepted: 11-Jun-2022

### Abstract

Due to the increasing of industries on the coast and the development of coastal cities, aquatic ecosystems and species are affected by discharged pollutants, especially heavy metals. After entering aquatic ecosystems, heavy metals accumulate in aquatic tissues, including fish, and eventually enter the food chain, which can enter the human body through feeding on contaminated fish. The aim of this study was to determine the amount of copper as a heavy metal and its transferring during the food chain of ornamental fish to estimate the presence of contaminants in the food chain. So the effect of copper sulfate (CuSO<sub>4</sub>) and its transmission were investigated in the food chain of *Artemia franciscana*, *Danio rerio* (Zebra) and *Astronotus ocellatus* (Oscar). Initially, lethal concentration of Cu on *Artemia* was obtained in 24 hours. At the first step, infected *Artemia* was fed to zebrafish *Danio rerio* as the second consumer in two separate environments (clean water and water containing 10% of CuSO<sub>4</sub>). At the second step, zebra fish were fed Oscar fish *Astronotus ocellatus* as the third consumer in two separate environments (unpolluted water and water containing 10% of CuSO<sub>4</sub>). In the last step, CuSO<sub>4</sub> was measured in the liver tissue of zebrafish and oscar. Also, changes in glucose and alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and acid phosphatase (ACP) enzymes were measured. The results of this study showed a significant increase in zebra fish and oscar under different treatments exposed to this heavy metal. In addition, a significant increase was observed in different enzymes (ALT, AST, and ACP) and glucose, which indicates damage to body tissues.

**Key word:** Heavy metal, Biomagnification, Liver damage, Copper sulfate (CuSO<sub>4</sub>), Food chain.

## ۱. مقدمه

بشر تولیدکننده آلاینده‌های متعدد و متنوعی است که بخش اعظم این مواد بطور مستقیم یا غیر مستقیم به محیط‌های آبی راه می‌یابد بخشی از آلاینده‌ها از قبیل مواد آلی طی فرآیندهای زیستی تجزیه می‌گردند ولی سایر مواد از قبیل سموم دفع آفات نباتی (هیدروکربن‌های کلردار) و فلزات سنگین در مقابل تجزیه مقاومند و مدت زیادی در محیط آبی باقی می‌مانند (Ebrahimi et al., 2012; Iri et al., 2021).

فلزات سنگین عناصری‌اند که دارای وزن مخصوص بیش از ۵ گرم بر سانتی‌متر مکعب‌اند و حداقل پنج مرتبه از آب چگال‌ترند، این فلزات اکثراً دارای اثرات سمی برای موجودات زنده هستند. یکی از اساس‌ترین مسئله در ارتباط با فلزات سنگین عدم متابولیزه شدن آنها در بدن است. هنگامیکه فلزات سنگین وارد بوم‌سازگان آبی می‌شوند به علت توانایی در بزرگنمایی زیستی (Biomagnification)، سبب تنش می‌شوند (Pourang et al., 2005). امروزه ارزیابی بزرگنمایی زیستی فلزات در طول زنجیره غذایی اهمیت زیادی به واسطه نقش آنها در فعالیت‌های زیستی دارد. این فلزات به صورت ترکیب با آنزیم‌ها و پروتئین‌های حامل، وارد یاخته‌ها شده و به این شکل بر فعالیت سلول اثر دارند و مانع عملکرد اختصاصی آنها و در نهایت باعث مرگ سلولی می‌شوند. فلزات سنگین همچنین می‌توانند با جایگزین شدن جای عناصر دیگر مانند کلسیم و منیزیم نقش عملکردی این عناصر را مختل نمایند. این آلاینده‌ها از طریق اثرات انباشت و بزرگنمایی زیستی در بافت‌ها و اندام موجودات آبی در زنجیره غذایی ذخیره می‌شوند و در نهایت تهدیدی برای سلامت انسان و سایر موجوداتند (Madreseh et al., 2020). از طرفی، اهمیت تغذیه آبزیان با غذای زنده در ارتقای ارزش غذایی، افزایش ضریب بازماندگی، مقاومت در مقابل عوامل بیماری‌زا، بهتر شدن طعم و رنگ گوشت آنان و تولید تخم‌های رنگین‌تر با درصد تخم‌گشایی بالا، بیشتر شده است که نشان دهنده

وابستگی توسعه صنعت آبی‌پروری به شناخت این موجودات غذایی است. تغذیه از برخی انواع غذای زنده در مرا حل مختلف رشد، بیانگر ضرورت شناخت زیست‌شناسی و اهمیت نقش تغذیه از آنها است (Olivotto et al., 2006; Gatesoupe, 1982; Khodabandeh et al., 2018).

آرتمیا جاندار است سخت‌پوست که در آب‌های شور زندگی می‌کند. دریاچه ارومیه در ایران، یکی از غنی‌ترین منابع آرتمیا در جهان شمرده می‌شود. با توجه به آبی بودن گونه‌ها و آلودگی‌های زیست محیطی روزافزون منابع آبی، امکان تجمع مواد مضر در این حلقه از زنجیره غذایی و انتقال آن به حلقه‌های بالاتر وجود دارد که از این جنبه حائز اهمیت می‌باشد (Khodabandeh et al., 2018).

برای ارزیابی میزان سمیت آلاینده‌های محیطی شاخص‌های فیزیولوژیک متفاوتی در ماهی‌ها وجود دارد که از جمله آنها بافت‌شناسی است. با توجه به ماهیت اغلب سموم و آلاینده‌های زیست‌محیطی، این ترکیبات به راحتی از سد دفاعی بدن آبزیان گذشته و وارد خون می‌شوند و از طریق خون به بافت‌های مختلف بدن انتقال می‌یابند از طرفی این عناصر سمی در اندام‌ها ذخیره می‌شود و بزرگ‌نمایی زیستی رخ می‌دهد (Clark, Rezaei shadegan et al., 2018). پس از بررسی اثرات سمیت نیترات نقره در رژیم غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به این نتیجه رسیدند که بالاترین تجمع نقره در بافت‌های روده، کلیه، کبد و کیسه صفرا بوده است. Ostaszewska و همکاران در سال (۲۰۱۶) اثرات سمیت نیترات نقره و مس را در اپیدرم، آبشش و کبد ماهی خاویاری سیبری بررسی و آسیب بافتی در آبشش و کبد را گزارش کردند.

Khosravi-Katuli و همکاران (۲۰۱۸) اثرات مزمن نانو پلاستیک نقره و نیترات نقره را بر کبد و آبشش کپور معمولی مورد بررسی قرار دادند و نتایج ضایعات بافتی در تیمارهای در معرض نانو نقره و نیترات نقره را نشان داد. همچنین حساسیت گونه‌های مختلف به مواد سمی متغیر است از این رو انجام آزمایش‌های سم‌شناسی برای گونه‌های

همچنین انتقال آلاینده در چرخه غذایی به دست آید.

## ۲. مواد و روش‌ها

این پژوهش در پاییز ۱۳۹۸ انجام شد. ابتدا آزمایش سمیت کشنده سولفات مس برای آرتمیا *Artemia franciscana* تعیین شد. ۵ گرم سیست آرتمیا برای تفریح در آب شور (pH: 8-ppt28) تحت هوادهی شدید استفاده شد. سپس، حدود ۲۰ ناپلی در استوانه (۱۵ میلی لیتر) با غلظت‌های مختلف سولفات مس (۰، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ میلی گرم در لیتر) در محل تاریک به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. این آزمایش به غذادهی و هوادهی نیاز نداشت و پس از ۲۴ ساعت، تعداد ناپلی‌های زنده شمارش شد. این آزمایش با توجه به روش‌های استاندارد مطالعات قبلی انجام شد (Gajbhiye et al., 1990; Hadjispyrou et al., 2001; Amat et al., 2005) پس از تعیین میزان مرگ و میر، با استفاده از آنالیز رگرسیون پروبیت، مقدار  $LC_{50}$  24h سولفات مس برای ناپلی آرتمیا محاسبه شد. قابل ذکر است که غلظت‌های مس با رقیق سازی متوالی از محلول استوک در دی متیل سولفوکساید (DMSO) از قبل آماده شده بود. آب محیط ظروف شیشه‌ای بشر تجدید نشده و کیفیت آب ثابت باقی ماند (Neff, 2002). در طی آزمایش شرایط فیزیکی-شیمیایی آب از قبیل دما، شوری و سختی کنترل شد و تمام شرایط در طی دوره‌ی آزمایش یکسان نگهداری شد تا تنها عامل متغیر غلظت‌های تحت تیمار یا مورد نظر باشد (Di Giulio et al., 2008).

در مرحله دوم، چهار گروه از ماهی‌های *Danio rerio* با این دو تیمار ناپلی آرتمیا یعنی با آرتمیای آلوده شده و آلوده نشده، و در معرض آب تمیز و آلوده تولید شده تغذیه شدند. گروه کنترل تغذیه شده با آرتمیای سالم و آب بدون مس (آرتمیای پاک، آب تمیز: CA-CW<sup>۲</sup>)، گروه

مختلف ضروری است (Rezaei shadegan et al., 2018) که البته در این خصوص تحقیقاتی مشابه صورت گرفته است. به عنوان مثال تحقیقات حاکی از آن است که نحوه انتقال سم در زنجیره غذایی در محیط آبی با کاهش درجه سختی آب افزایش یافته و بدین ترتیب میزان صدمات وارده به آبزیان و نیز میزان مرگ و میر در آنها بیشتر شده است (Kakavand et al., 2020; Malekpoor et al., 2016). همچنین Mohammadnabizadeh و همکاران در سال (۱۳۹۳) در بررسی غلظت سولفات مس در بافت خوراکی ماهی حلواسفید در یک زنجیره غذایی در منطقه حرا، دریافتند که میانگین غلظت سولفات مس در بافت عضله ماهیان آب شیرین پایین تر از میزان استانداردهای جهانی بوده و از نظر سلامت برای آبزیان و انسان‌هایی خطر اعلام شده است. همچنین در تحقیق (Malik et al., 2010) روند انتقال سولفات مس در زنجیره غذایی ماهیان و مقدار تجمع سم وابسته به فعالیت‌های متابولیکی، نیازهای اکولوژیکی و محل تغذیه شناخته شده است.

فلزات سنگین پس از ورود به اکوسیستم‌های آبی در بافت‌ها و اندام‌های آبزیان و از جمله ماهیان تجمع یافته و نهایتاً وارد زنجیره غذایی می‌شوند. از آنجایی که ماهی‌ها بخش عمده‌ای از رژیم غذایی انسان را تشکیل می‌دهند، این فلزات سنگین می‌توانند از طریق تغذیه از ماهیان آلوده وارد بدن انسان گردند.

هدف از این تحقیق بررسی تعیین تجمع فلز سنگین مس که احتمال بروز تأثیرات مخرب بر اکوسیستم‌های آبی کشور و خصوصاً مناطق شمالی دارند، بر روی زنجیره غذایی (آرتمیا *Artemia franciscana*، ماهی زبرا *Danio rerio* و اسکار *Astronotus ocellatus*)، پاسخ‌های فیزیولوژیکی این آبزیان و میزان انتقال آلاینده به رده بالاتر زنجیره غذایی بوده تا از این طریق الگوی جامعی از تاثیر آلاینده‌های غالب کشور به دست آمده و تفاوت آلاینده‌های مختلف از نظر میزان کشندگی و سمیت و

<sup>۱</sup> یک مدل خطی جهت ارائه یک مدل رگرسیونی بین متغیر پاسخ دو حالتی با متغیرهای پیش‌بینی کننده کمی یا کیفی

<sup>۲</sup> Clean artemia-clean water

انجام شد. پس از تهیه نمونه‌های بافت کبد ماهی، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد در فریزر نگهداری شدند. در مرحله بعد، یک گرم وزن خشک از هر نمونه با ۱۰ میلی‌لیتر اسید نیتریک (۰.۶۵٪) ترکیب شد و جهت هضم کامل، نمونه‌ها یک ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و سه ساعت در دمای ۱۴۰ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. در نهایت نمونه‌ها از طریق کاغذ صافی واتمن فیلتر شده و با آب دیونیزه به حجم ۲۵ میلی‌لیتر رسیده و در ظروف پلی‌اتیلن ذخیره می‌شوند. غلظت مس با استفاده از دستگاه جذب اتمی PerkinElmer Spectrum 100 از دستگانه جذب اتمی FT-IR اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری شاخص‌های بیوشیمیایی سرم و آنزیم‌های کبدی آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST)، به روش رنگ سنجی کینتیک و از کیت‌های تجاری پارس آزمون توسط دستگاه‌های اتوآنالیزور مخصوص استفاده گردید (Shahsavani *et al.*, 2010). گلوکز به روش آنزیماتیک (glucose oxidase) اندازه‌گیری شد (Asadi *et al.*, 2009). به منظور بررسی اثرات هیستوپاتولوژیکی نمونه‌ها ابتدا به مدت ۲۴ ساعت در محلول بوئن تثبیت شده و پس از گذشت ۲۴ ساعت چندین مرتبه با الکل اتانول ۷۰ (مرک، آلمان) درصد مورد شستشو قرار گرفتند. پس از آن توسط الکل ۹۵ و ۱۰۰ (مرک، آلمان) و نهایتاً توسط الکل بوتانول (مرک، آلمان) آبگیری و پس از قرار دادن نمونه‌ها در گزیلول به مدت سه ساعت به منظور شفاف‌سازی، برای پارافینه کردن در پارافین مایع (مرک، آلمان) در داخل آون قرار داده، سپس با پارافین قالب‌گیری شدند. از بافت‌ها برش‌هایی به ضخامت ۵-۶ میکرومتر تهیه شد. پس از

دوم تغذیه شده با آرتمیا سالم و آب آلوده با سولفات مس ۱۰ درصد (آرتمیای تمیز، آب آلوده: CA-PW<sup>۱</sup>)، گروه سوم تغذیه شده با آرتمیا آلوده و آب بدون مس (آرتمیا آلوده، آب تمیز: PA-CW<sup>۲</sup>)، گروه چهارم تغذیه شده با آب آلوده با سولفات مس ۱۰ درصد و آرتمیای آلوده (آرتمیا آلوده، آب آلوده: PA-PW<sup>۳</sup>). همه گروه‌ها به مدت ۴ روز با ناپلی آرتمیا یک روزه تغذیه شدند (Ferard *et al.*, 1983). سپس از سرم خون ماهی‌های زبرا به منظور تأثیر سولفات مس بر میزان گلوکز، ALT<sup>۴</sup>، AST<sup>۵</sup> و ACP<sup>۶</sup> نمونه‌گیری انجام گرفت. همچنین میزان سولفات مس در کل بافت بدن ماهی‌های زبرا در همه گروه‌ها مورد سنجش قرار گرفت.

در مرحله سوم، ماهی اسکار *Astronotus ocellatus* با چهار گروه از ماهیان زبرا *Danio rerio* طی چهار روز تغذیه شدند. گروه کنترل تغذیه شده با ماهی زبرا سالم و آب بدون مس (ماهی زبرا تمیز، آب تمیز: CZ-CW<sup>۷</sup>)، گروه دوم تغذیه شده با ماهی زبرا سالم و آب آلوده با مس ۱۰ درصد (ماهی زبرا تمیز، آب آلوده: CZ-PW<sup>۸</sup>)، گروه سوم تغذیه شده با ماهی زبرا آلوده و آب بدون مس (ماهی زبرا آلوده، آب تمیز: PZ-CW<sup>۹</sup>)، گروه چهارم تغذیه شده با آب آلوده با مس ۱۰ درصد و ماهی زبرا آلوده (ماهی زبرا آلوده، آب آلوده: PZ-PW<sup>۱۰</sup>). سپس مطابق آزمون قبل از سرم خون ماهی‌های اسکار به منظور تأثیر سولفات مس بر میزان گلوکز، ALT، AST و ACP نمونه‌گیری انجام گرفت. همچنین میزان سولفات مس در بافت کبد ماهی اسکار در همه گروه‌ها مورد سنجش قرار گرفت. ابتدا همه نمونه‌ها با آب مقطر تمیز و سپس اندازه‌گیری شاخص‌های بیومتریکی شامل طول، وزن و جنس ماهیان

<sup>1</sup> Clean artemia-polluted water

<sup>2</sup> Polluted artemia-clean water

<sup>3</sup> Polluted artemia-polluted water

<sup>4</sup> Alkaline Phosphatase

<sup>5</sup> Aspartate Aminotransferase

<sup>6</sup> Acid phosphatase

<sup>7</sup> clean zebra-clean water

<sup>8</sup> clean zebra-polluted water

<sup>9</sup> polluted zebra-clean water

<sup>10</sup> polluted zebra-polluted water

### ۳. نتایج

#### ۳.۱. تغییرات میزان مس

ابتدا سمیت کشنده مس بر ناپلی آرتمیا اندازه‌گیری شد و میزان سمیت کشنده (LC50) برابر ۳/۳۶ میلی‌گرم بر لیتر تعیین شد و جهت انجام آزمایش ۱۰ درصد از سمیت کشنده برابر ۰/۳۳ میلی‌گرم بر لیتر استفاده شد. نتایج غلظت مس در بافتهای کبدی تحت تیمارهای مختلف در جدول ۱ و ۲ ارائه شده است. نتایج تیمارهای مختلف برای ماهی زبرا نشان داد که سولفات مس در تیمارهای CA-CW و CA-PW مشاهده نشده است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که آب آلوده (حاوی ۱۰٪ CuSO<sub>4</sub>) باعث تجمع مس در بافتهای کبدی نشده است. تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای PA-CW و PA-PW مشاهده شد و میانگین غلظت مس برای این دو تیمار به ترتیب ۲/۱۵ و ۱/۸۰ ppm محاسبه شد. همچنین نتایج، افزایش میزان غلظت سولفات مس را در بافتهای کبدی ماهی زبرا تغذیه شده با آرتمیای آلوده و آب تمیز را در مقایسه با ماهی زبرا تغذیه شده با آب آلوده نشان داد (جدول ۱).

نگهداری به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس آون، به روش استاندارد هماتوکسیلین ائوزین رنگ‌آمیزی صورت گرفت. در نهایت به منظور بررسی عوارض بافتی ناشی از اثر سولفات مس و مقایسه بافت‌های مورد نظر با نمونه‌های شاهد از میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین عکس برداری (CX21، المپیوس، ژاپن) استفاده گردید (Martoja et al., 1967).

#### ۲.۱. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

این آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی بر نامهریزی و اجرا گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از تجزیه واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncan's Multiple Range Test) در سطح احتمال ( $P < 0/05$ ) انجام شد. کلیه تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS (ویرایش ۲۲) انجام شد. برای مقایسه درجات آسیب‌های بافتی نیز از آزمون ناپارامتری کروسکال والیس (Kruskal-Wallis test)، سپس آزمون یو-من وایتنی (Mann-Whitney test) استفاده شد. در تمام بررسی‌ها سطح معنی‌داری آزمون‌ها  $p < 0/05$  در نظر گرفته شد.

جدول ۱- مقدار مس اندازه‌گیری شده در ماهی زبرا (*Danio rerio*) در تیمارهای مختلف (میلی‌گرم/کیلوگرم)

تیمارها	ماهی زبرا ( <i>Danio rerio</i> )
CA-CW	۰/۰۰ <sup>a</sup>
CA-PW	۰/۰۰ <sup>a</sup>
PA-CW	۲/۱۵ ± ۰/۳ <sup>b</sup>
PA-PW	۱/۸۰ ± ۰/۵ <sup>c</sup>

مس در بافتهای کبدی ماهی اسکار شود. بیشترین مقدار غلظت مس برای PW-PZ با میانگین ۰/۶۲ میلی‌گرم/کیلوگرم (ppm) محاسبه شد. که نشان دهنده این است که غلظت مس در ماهیان اسکار تحت تیمار آب و آرتمیای آلوده در بالاترین سطح است.

نتایج اندازه‌گیری غلظت سولفات مس برای ماهیان اسکار تفاوت معنی‌داری را بین هر ۴ گروه تیمار نشان داد (جدول ۲) در تیمار CA-CW هیچ اثری از سولفات مس در بافتهای کبدی مشاهده نشد. در مقایسه با ماهی زبرا، آب آلوده (حاوی ۱۰ درصد CuSO<sub>4</sub>) می‌تواند سبب تجمع

جدول ۲- مقدار مس اندازه‌گیری شده در ماهی اسکار (*Astronotus ocellatus*) در تیمارهای مختلف (ppm)

تیمار	ماهی اسکار ( <i>Astronotus ocellatus</i> )
CA-CW	۰/۰۰ <sup>a</sup>
CZ-PW	۰/۰۲ <sup>b</sup> ± ۰/۲۱
PZ-CW	۰/۰۷ <sup>d</sup> ± ۰/۲۶
PZ-PW	۰/۱۵ ± ۰/۶۲ <sup>c</sup>

همچنین، تفاوت معنی‌داری بین تیمار CA-PW و PA-PW برای ماهی زبرا وجود نداشت ( $P > 0.05$ ). نتایج نشان داد که سطح آنزیم ALT تحت تیمار PA-CW برای ماهی‌های زبرا در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌داری را دارد ( $P < 0.05$ ) و کاهش معنی‌دار سطح این آنزیم در مقایسه با گروه کنترل در تیمار PA-PW و CA-PW مشاهده شد ( $P < 0.05$ ). افزایش معنی‌دار سطح ACP در تمامی تیمارها در مقایسه با گروه کنترل ثبت شد که بالاترین مقدار ACP برای ماهی زبرا در تیمار PA-PW اندازه‌گیری شد.

### ۳.۲. تغییرات میزان گلوکز، ALT، AST و ACP

اثرات مس بر آنزیم‌های کبدی (ALT، AST)، پروتئین ACP و گلوکز ماهی‌های زبرا در جدول ۳ ارائه شده است. نتایج نشان داد که سطح گلوکز تحت تیمار PA-CW برای ماهی‌های زبرا در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌داری را دارد ( $P < 0.05$ ) و همچنین، کاهش قابل توجه سطح گلوکز در تیمار CA-PW مشاهده شد. بالاترین مقدار AST برای ماهی زبرا در تیمارهای PA-CW و PA-PW اندازه‌گیری شد که به صورت معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش نشان داد ( $P < 0.05$ ).

جدول ۳- تغییرات میزان گلوکز، ALT، AST و ACP در ماهی زبرا (*Danio rerio*) در تیمارهای مختلف (میلی گرم/کیلوگرم)

تیمار زبرا	گلوکز Glucos	اسید فسفاتاز ACP	آسپاراتات آمینو ترانسفراز AST	آلانین آمینو ترانسفراز ALT
CA-CW	۱۱۱ ± ۱۴ <sup>c</sup>	۸ ± ۱ <sup>d</sup>	۱۹ ± ۲ <sup>a</sup>	۲۲ ± ۲ <sup>d</sup>
CA-PW	۹۵ ± ۱۱ <sup>a</sup>	۱۹ ± ۳ <sup>a</sup>	۳۴ ± ۳ <sup>b</sup>	۱۹ ± ۴ <sup>a</sup>
PA-CW	۱۳۴ ± ۱۳ <sup>b</sup>	۱۲ ± ۲ <sup>b</sup>	۶۸ ± ۹ <sup>c</sup>	۳۸ ± ۷ <sup>b</sup>
PA-PW	۱۱۰ ± ۱۵ <sup>c</sup>	۲۸ ± ۴ <sup>c</sup>	۳۷ ± ۳ <sup>b</sup>	۱۱ ± ۴ <sup>c</sup>

معنی‌دار سطح آنزیم ALT را در تمامی تیمارها در مقایسه با گروه کنترل نشان داد که بالاترین مقدار آنزیم ALT برای ماهی زبرا در تیمار PZ-CW اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که سطح آنزیم ACP تحت تیمار PZ-CW و PZ-PW برای ماهی‌های زبرا در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0.05$ ) و همچنین کاهش معنی‌دار سطح این آنزیم در تیمار CZ-PW در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد ( $P < 0.05$ ).

اثرات مس بر آنزیم‌های کبدی (ALT، AST)، پروتئین ACP و گلوکز ماهی‌های اسکار در جدول ۴ ارائه شده است. در ماهی‌های اسکار، سطح گلوکز افزایش معنی‌داری را در تیمارهای CZ-PW و PZ-PW در مقایسه با گروه کنترل نشان داد ( $P < 0.05$ ). اما تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل و PZ-CW مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ). علاوه بر این، تفاوت معنی‌داری بین CZ-PW و PW-PZ با کنترل وجود نداشت ( $P > 0.05$ ). در مقایسه با کنترل، بیشترین غلظت AST در PZ-CW و PW-PZ با تفاوت معنی‌داری برای اسکار اندازه‌گیری شد ( $P < 0.05$ ). نتایج افزایش

جدول ۴- تغییرات میزان گلوکز، ALT، AST و ACP در ماهی اسکار (*Astronotus ocellatus*) در تیمارهای مختلف (میلی گرم/کیلوگرم)

تیمار اسکار	گلوکز Glucos (ppm)	اسید فسفاتاز ACP (ppm)	آسپاراتات آمینو ترانسفراز AST (ppm)	آلانین آمینو ترانسفراز ALT (ppm)
CZ-CW	۸۶±۹ <sup>b</sup>	۱۳±۳ <sup>a</sup>	۲۶±۳ <sup>c</sup>	۱۱±۲ <sup>c</sup>
CZ-PW	۱۰۲±۱۴ <sup>a</sup>	۱۱±۲ <sup>a</sup>	۱۹±۲ <sup>a</sup>	۱۷±۴ <sup>a</sup>
PZ-CW	۸۹±۹ <sup>b</sup>	۳۱±۳ <sup>b</sup>	۴۱±۵ <sup>b</sup>	۲۸±۴ <sup>b</sup>
PZ-PW	۱۰۹±۱۱ <sup>a</sup>	۳۱±۳ <sup>c</sup>	۴۱±۵ <sup>b</sup>	۱۶±۳ <sup>a</sup>

#### ۴. بحث و نتیجه گیری نهایی

وجود آلاینده‌ها در اکوسیستم‌های آبی سبب آسیب‌های بافتی در ماهیان می‌شود که این آسیب‌ها و عوارض را با روش‌های هیستوپاتولوژی می‌توان مورد بررسی قرار داد. مطالعه شاخص‌های هیستوپاتولوژیک به‌عنوان بیومارکرهای نشانگر زیستی عموماً به یک شاخص قابل سنجش از برخی حالت‌ها و شرایط بیولوژیک یا زیستی اشاره دارد. از جمله مهم‌ترین شاخص‌های زیستی شاخص‌های خون‌شناسی، بیوشیمیایی، هورمونی و بافتی است (Van der Oost *et al.*, 2003). با توجه به آلودگی محیط‌زیست آبیان و افزایش روزافزون آلاینده‌ها در اکوسیستم‌ها یا بوم‌سازگان‌های آبی و ایجاد عوارض و آسیب بر آبیان، مطالعه این اکوسیستم‌ها امری ضروری محسوب می‌شود و تعیین تجمع و مقدار فلزات سنگین در بافت موجودات مختلف دارای اهمیت زیادی است (Kakavand *et al.*, 2020). ارزیابی وضعیت کبد ماهی یکی از شاخص‌ها در تعیین میزان آلودگی محیط است و به دلیل بزرگنمایی زیستی فوق‌العاده در این بافت، نسبت به سایر بافت‌های بدن، اکثر مطالعات اخیر برای تعیین آلودگی، بر این اندام متمرکز شده است (Rezaei and Banaee, 2018). Ostaszewska و همکاران (۲۰۱۶) اثرات سمیت نانو ذرات نقره و مس را در اپیدرم، آبشش و کبد ماهی خاویاری سیبری بررسی کردند همچنین در بافت کبد از ساع فضای سینه‌سی، رگ‌های خونی بیش از حد و هسته‌های پیکنوتیک را گزارش

کردند. Jain و Batham در سال ۲۰۱۶ اثرات نیترا ت سرب را بر کبد ماهیان استخوانی آب شیرین بررسی کردند. نتایج عارضه‌های سلول‌های کبدی نامنظم، تخلیه سیتوپلاسمی، دژنراسیون کبدی، احتقان خون و ... در کبد را نشان داد. Clark و همکاران در سال ۲۰۱۹ با قرار دادن نیترا ت نقره در رژیم غذایی و مقایسه آن با حضور نانو ذرات نقره در غذای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به این نتیجه رسیدند که بالاترین تجمع نقره در بافت‌های کبد و کلیه و کیسه صفرا بوده است که تجمع صفرا آسیب احتمالی به متابولیسم کبدی را نشان می‌دهد. گلوکز یکی از نشانگرهای زیستی حساس در شرایط استرس است. به عبارت دیگر، در پاسخ به شرایط استرس زاء، گلوکز خون افزایش می‌یابد. علاوه بر این، آسیب به کبد، اختلال عملکرد شدید کلیه و تجزیه ذخایر گلیکوژن در کبد و عضلات اسکلتی سطح گلوکز خون را افزایش می‌دهد (Rezaei and Banaee, 2018). در شرایط استرس زاء، گلوکز در مسیر گلیکولیتیک به پیرووات تبدیل می‌شود و پیرووات در بافتهای هوازی به استیل-CoA متابولیزه می‌شود، که می‌تواند به عنوان پیش ماده در سنتز کلاسترول و اسیدهای چرب در چرخه اسید سیتریک استفاده شود. (dos Santos Carvalho *et al.*, 2008; Vinodhini *et al.*, 2009). در مطالعه حاضر قرار گرفتن در معرض سولفات مس سبب ایجاد تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مختلف شد که بیشترین مقدار گلوکز برای تیمارهای PA-CW و PZ-PW به ترتیب برای ماهی زبرا و اسکار اندازه‌گیری شد. آنزیم‌های کبدی به عنوان شاخص



فعالیت‌های AST و ALT ممکن است به منظور انتقال بیشتر و سنتز این آنزیم‌ها در شرایط استرس برای حمایت از گلوکونئوژنز برای تولید بیشتر انرژی تعیین شود. از آنجا که آمینوترانسفراز در میتوکندری قرار دارد و یک نشانگر زیستی مفید برای آسیب سلولی است (Yousefi *et al.*, 2018) تغییر در فعالیت آمینوترانسفراز در خون نیز می‌تواند با اختلال در میتوکندری و آسیب بافتی همراه باشد.

(Hatami *et al.*, 2019) آمینوترانسفرازها معرفی برای سلامت سلول‌های کبدی به شمار می‌روند و در مراحل اولیه تخریب کبد، آنزیم‌های سیتوپلاسمی هپاتوسیت‌ها احتمالاً از سلول‌ها به داخل جریان خون نشت می‌کنند و نفوذپذیری غشا افزایش می‌یابد. احتمالاً در اثر از دست دادن سلول‌های کبدی این آنزیم‌ها در خون آزاد می‌شوند. بنابراین، افزایش این آنزیم‌ها نشان‌هایی از آسیب سلول‌های کبدی است که به نتایج آنزیمی بافت کبد در این مطالعه مطابقت دارد (Christ-Crain *et al.*, 2004).

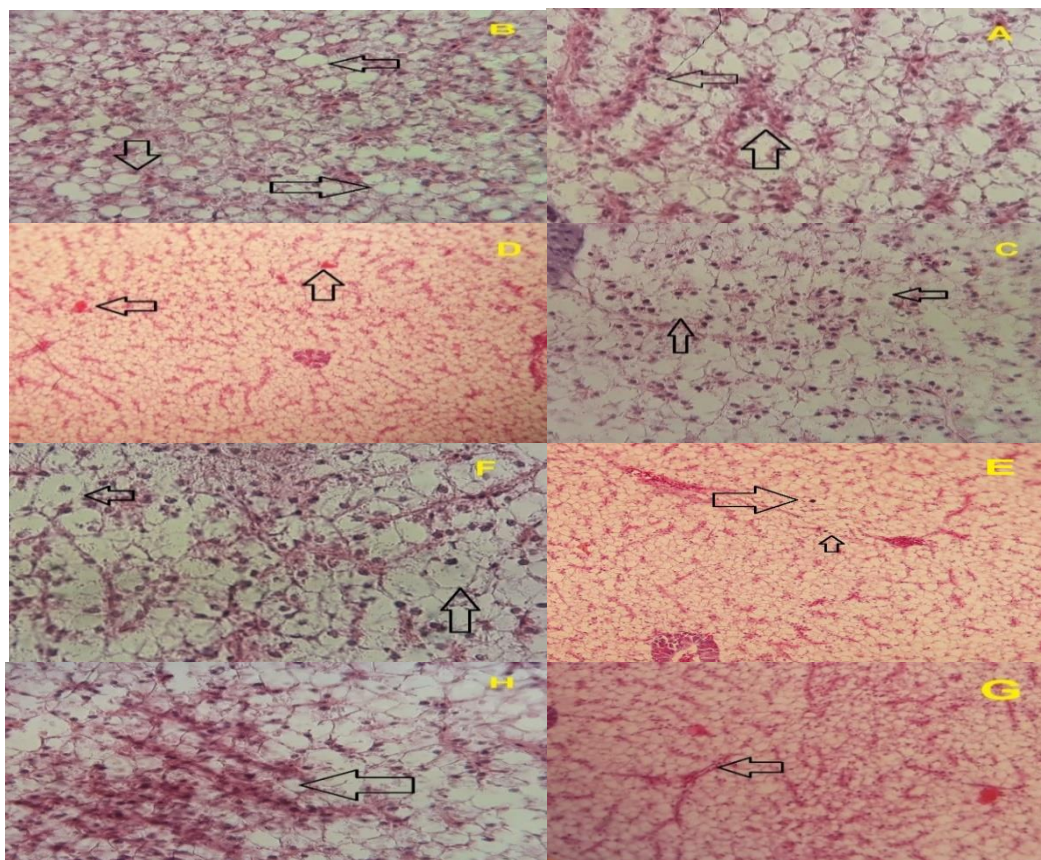
Hatami و همکاران (۲۰۱۹) در بررسی اثرات سمیت سلولی کلریپیروفوس و پلی اتیلن گلیکول (PEG) بر استرس اکسیداتیو و پارامترهای بیوشیمیایی در کپور معمولی افزایش سطح ALT و AST را گزارش کردند (Hatami *et al.*, 2019). نعمت دوست و بنایی در سال ۲۰۱۷ افزایش فعالیت AST و ALT در پلاسمای ماهی کپور معمولی در معرض ذرات ریز پلاستیک و پاراکوات را گزارش کردند (Nematdoost and Banaee., 2017). رنگسामी و همکاران در سال ۲۰۱۸ به این نتیجه رسیدند که فعالیت AST و ALT در گورخرماهی پس از قرار گرفتن در معرض داروی ضد التهاب کتوپروفن به طور قابل توجهی افزایش یافته است (Rangasamy *et al.*, 2018) که با نتایج این تحقیق همخوانی داشت. آنزیم اسید فسفاتاز (ACP) یک پروتئین است که در سرم خون موجود می‌باشد. از تست ACP برای آسیب‌های کبدی استفاده می‌شود. بالاترین مقادیر ACP برای تیمارهای مختلف ماهی زبرا و ماهی اسکار به ترتیب برای PA-PW و PZ- CW بدست آمد. یافته‌ها بیان می‌کنند که آنزیم ACP

فعالیت کبدی محسوب می‌شوند و تغییر در میزان فعالیت ترشح آن‌ها می‌تواند متأثر از فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب، تراکم، شرایط پرورشی، نوع جیره مصرفی، سن، جنس و وضعیت سلامت ماهیان باشد (Park *et al.*, 2010). نتایج این تحقیق نشان داد که در مجموع تیمارهای آزمایشی بر میزان آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST)، آلانین ترانس آمیناز (ALT) سرم خون ماهی افزایش معنی‌داری داشت. از آنجائیکه کبد اندامی است که متابولیسم اولیه مواد غیر زیستی را انجام می‌دهد و با تغییر در ساختار مورفولوژیک این مواد، در برخی موارد، سم زدایی می‌نماید، تاثیر آلاینده‌گی فلزات به صورت افزایش یا کاهش فعالیت آنزیم‌های کبدی و ایجاد تغییرات هیستوپاتولوژیک کبدی بروز می‌کند. به همین دلیل در ارزیابی آسیب کبد، سنجش سطوح آنزیم‌های نظیر ALT، AST به طور وسیع مورد استفاده قرار می‌گیرد. وقوع نکروز یا آسیب غشا سلول باعث رها شدن این آنزیم‌ها به گردش خون می‌شود (Park *et al.*, 2010). در جریان آسیب حاد، آنزیم‌های ALT و AST حساس‌ترین مارکرها برای سرمی هستند. هرگاه غشا سلول صدمه ببیند هر دو آنزیم به مقادیر فزاینده‌ای در خون آزاد می‌شوند (Kakavand *et al.*, 2020). افزایش سطح AST در سرم می‌تواند به علت آسیب کبد نظیر هپاتیت‌های ویروسی، انفارکتوس قلبی و صدمات عضلانی باشد. ALT که تبدیل آلانین به پیرووات و گلوتامات را کاتالیز می‌کند، برای کبد اختصاصی تر بوده و پارامتر مناسب تری برای تشخیص آسیب کبد می‌باشد. سطوح افزایش یافته آنزیم‌های سرمی حاکی از نشت سلولی بوده و نشانگر آسیب ساختار و اختلال عملکرد غشاهای سلولی در کبد است (Drotman and Lawhan, 1987). یکی از دلایل افزایش سطح سرمی این آنزیم‌ها ممکن است تغییر در نفوذپذیری غشای پلاسما می‌باشد. سلول‌های کبدی یا صدمات سلولی حاصل از قرار گرفتن در معرض سموم باشد (Banaee *et al.*, 2011). در مطالعه حاضر، افزایش فعالیت‌های AST و ALT ممکن است به افزایش انتقال آمینو اسیدها به چرخه تری کربوکسیلیک اسید (TCA) نسبت داده شود. علاوه بر این، افزایش

نظر تغذیه نشان داد که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی داشت همچنین در مطالعه امیدپور و همکاران (۱۳۹۶) میانگین غلظت فلزات سنگین نیکل و مس در بافت کبد هشت گونه ماهی حلوا سفید (*Pampus argenteus*)، شانک زردباله (*Acanthopagrus latus*)، هامور معمولی (*Epinephelus coioides*)، بیاه (*Liza macrolepis*)، مید (*Liza klunzingeri*)، صبور (*Tenualosa ilisha*)، کفشک زبان گاوی (*Cynoglossus arel*)، زمین کن دم نواری (*Platycephalus indicus*) در منطقه بحرکان با نتایج این تحقیق همخوانی داشته است. بنابراین به نظر می‌رسد تغییرات هیستوپاتولوژیک ایجاد شده در کبد ماهی اسکار پس از مواجهه با سولفات مس نوعی پاسخ فیزیولوژیک باشد که جاندار برای ممانعت از ورود این مواد به بدن خود و جلوگیری از آسیب‌های احتمالی ایجاد کرده است.

آبزیان با قرارگیری در معرض سولفات مس افزایش معنی‌داری می‌یابد (Gioda et al., 2013). در طول دوه آزمایش، مرگ و میر در هیچ کدام از تیمارها و همچنین گروه کنترل مشاهده نشد. بررسی بافت شناسی ماهیان در معرض فلزات سنگین نشان دهنده ناهنجاری‌های ساختاری در بافت کبد بود. بیشترین عارضه‌های مشاهده‌شده در بافت کبد ماهی اسکار شامل: آتروفی، چربی، نکروز، رقیق شدن سینوزوئید، گرانول تیره، انسداد خونی، ریزش خون و رکود صفرا بود. (جدول ۵) نتایج نشان داد که این تغییرات در مقایسه با بافت‌های گروه کنترل بسیار متفاوت است (شکل ۱).

در مطالعه‌ای که Bostanzadeh و همکاران (۱۳۹۹) در رابطه با ارزیابی انتقال فلزات سنگین در زنجیره غذایی تالاب هورالعظیم داشتند مقایسه میانگین غلظت فلزات در عضله ماهی بنی، ناسالم بودن کبد و عضله ماهی را از



شکل ۱- بررسی عارضه‌های بافتی مشاهده‌شده در کبد ماهی اسکار تحت تیمارهای مختلف در مواجهه با سولفات مس (با بزرگنمایی  $\times 400$ )  
A: (آتروفی)، B: (چربی)، C: (نکروز)، D: (خون‌ریزش)، E: (گرانول تیره)، F: (تورم)، G: (رقیق شدن سینوزوئید)، H: (انسداد خونی)

جدول ۵- اثر سولفات مس بر تخریب بافت کبد ماهی اسکار در تیمارهای آزمایشی مختلف

PW-PZ	PZ-CW	CZ-PW	شاهد	عارضه‌های کبد
+++	+	+++	-	آتروفی
+++	+	+++	-	چربی
++	++	+++	-	نکروز
++	+++	+	-	رقیق شدن سینوزئید
+	+	+++	-	گرانول تیره
-	++	+++	-	تورم
+++	+++	+++	-	انسداد خونی
+++	++	+++	-	خون‌ریزش

عدم مشاهده عارضه (-)، ۱ تا ۳ عارضه مشاهده شده (+)، ۳ تا ۵ عارضه مشاهده شده (++)، ۵ تا ۱۱ عارضه مشاهده شده (+++)، و بیشتر از ۱۱ (++++).

## نتیجه‌گیری نهایی

آلودگی آب‌های سطحی از جمله رودخانه‌ها، دریاچه‌ها، دریاها و اقیانوس‌ها توسط فلزات سنگین یکی از مهم‌ترین چالش‌های زیست‌محیطی است که به دلیل بزرگنمایی زیستی و انتقال در زنجیره غذایی، اکوسیستم‌های آبی را درگیر می‌کند. مقدار معینی از این فلزات برای فعالیت متابولیک ضروری است، اما اگر غلظت فلزات سنگین بیش از حد استاندارد باشد، سلامت آبزیان و در نهایت انسان را به خطر می‌اندازد. در این مطالعه سمیت  $CuSO_4$  و جذب مس در بافت‌های کبد و انتقال آن در زنجیره غذایی سه گونه (*Danio rerio*، *Artemia franciscana*)

*Astronotus ocellatus*) مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج این مطالعه افزایش معنی‌داری غلظت مس در بافت کبد ماهی زبرا و اسکار تحت تیمارهای غذایی مختلف در معرض این فلز سنگین را نشان داد. علاوه بر این، افزایش قابل توجهی در غلظت آنزیم‌های مختلف (AST، ALT)، ACP و گلوکز در تیمارهای معرض مس مشاهده شد که نشان‌دهنده آسیب به بافت‌های کبدی است. پایش آلودگی‌های منابع آبی طی سال‌های آینده با استفاده از موجودات دیگر پیشنهاد می‌گردد ارتباط حلقه‌های پایینی زنجیره غذایی اهمیت بی‌شتری داشته و قادر خواهند بود روند تغییرات آلودگی فلزات را نشان دهند.

## ۵. منابع

## References

- Amat. F., Hontoria. F., Ruiz. o. Green. A.J., Sanchez. M.I., Figuerola. J., Hortas. F., 2005. The American brine shrimp as an exotic invasive species in the western Mediterranean. *Issues in Bioinvasion Science* 163(-), 37-47.
- Asadi. F., Hallajian. A., Asa dian. P., Shahriari. A., Pourkabir. M., 2009. Serum lipid, free fatty acid, and proteins in juvenile sturgeons: *Acipenser persicus* and *Acipenser stellatus*. *Comparative Clinical Pathology* 18, 287-289.
- Banaee, M., Sureda A., Mirvaghefi A.R., Ahmadi K., 2011. Effects of diazinon on biochemical parameters of blood in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 99(1), 1-6.
- Bostanzadeh, M., Rumyani, L., Payandeh, KH., Sabz Alipour, S., Mohammadi Rozbahani, M., 2020. Evaluation of transfer of heavy metals (lead, nickel and vanadium) in the food chain of Horulazim lagoon. *Scientific Research Journal of Oceanology* 11(42), 15-48.

- Christ-Crain, M., Meier, Cpuder J., Staub, J., Huber, P., Keller, U., 2004. Changes in liver function correlate with the improvement of lipid profile after restoration of euthyroidism inpatients with subclinical hypothyroidism. *Experimental and Clinical Sciences: International online journal for advances in science* 3(2),1-9.
- Clark. N. J., David. B., Benjamin. P. E., Richard. D. H., 2019. Dietary exposure to silver nitrate compared to two forms of silver nanoparticles in rainbow trout: bioaccumulation potential with minimal physiological effects. *Journal of Environmental Science* 6,1393-1405.
- Di Giulio. R.T., Hinton, D.E., 2008. The toxicology of fishes. 1st edition. CRC press. eBook ISBN: 9780429188961.
- Dos Santos Carvalho. C., Fernandes. M.N., 2008. Effect of copper on liver key enzymes of anaerobic glucose metabolism from freshwater tropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comp Biochemistry Physiology* 151, 437-442.
- Drotman, R., Lawhan G., 1987. Serum enzymes are indications of chemical induced liver damage. *Drug and Chemical Toxicology*. 1, 163-171.
- Ebrahimi Sirizi. Z., Sakizadeh. M., Ismaili Sari. A., Bahramifar. N., Ghasempouri. S.M., Abbasi. K., 2012. Investigation of heavy metals cadmium, lead, copper and zinc in duck muscle tissue of Anzali International Wetland, accumulation and risk assessment. *Mazandaran University of Medical Sciences* 22, 63-57 (In persian).
- Ferard. J.F., Jouany, J.M., Truhaut. R Vasseur., 1983. Accumulation of Cadmium in a Freshwater Food Chain Experimental Model. *Ecotoxicology and Enviornmental safety* 5, 43-52.
- Gajbhiye. SN., Hirota. R., 1990. Toxicity of heavy metals to brine shrimp *Artemia*. *Journal Indian Fish* 20, 43-50.
- Gatesoupe. F., 1982. Nutritional and antibacterial treatments of live food organisms: the influence on survival, growth rate and weaning success of Turbot (*Scophthalmus maximus*). *Ecotoxicology Environmental Safety* 31, 353-368.
- Gioda. C.R., Loro. V.L., Pretto. A., Salbego. J., Dressler. V., Flores. E.M.M., 2013. Sublethal zinc and copper exposure affect acetylcholinesterase activity and accumulation in different tissues of *Leporinus obtusidens*. *Bull. Environmental Contam Toxicology* 90, 12-16.
- Hadjispyrou. S., Kungolos. A., Anagnostopoulos. A., 2001. Toxicity, bioaccumulation, and interactive effects of organotin, cadmium, and chromium on *Artemia franciscana*. *Ecotoxicology Environmental Safety* 49, 179-186.
- Hatami, M., Banaee, M., Nematdoost Haghi, B., 2019. Sub-lethal toxicity of Chlorpyrifos alone and in combination with polyethylene glycol to common carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere* 219, 981-988.
- Hedayati. A., Bahmani. M., Alizadeh. M., Kazemi. R., Baqeri. T., 2008. Investigation of some biochemical factors of blood serum of farmed fish (*Huso huso*) in brackish water. *Iranian Journal of Biology* 21, 15-8 (In prsian).
- Kakavand, F., Hedayati, A., Jafar Nodeh, A., Maddah, S., Rezaei Shadegan, M., 2020. Toxicological Effect of Silver Nanoparticles on Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Environmental Health Engineering* 7(1), 26-31.
- Khosravi-Katuli. K., Shabani. A., Paknejad. H. Imanpoor. M. R., 2018. Comparative toxicity of silver nanoparticle and ionic silver in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*): Accumulation, physiology and histopathology. *Journal of hazardous materials* 5, 373-381.
- Malik. N., Biswas. A.K., Qureshi. T.A., Borana. K., Virha. R., 2010. Bioaccumulation of heavy metals in fish tissues of a freshwater lake of Bhopal. *Environmental Marine policy* 160, 267-276.

- Mansuri. B., Poor Mohammad. A., Babaii. H., 2010. Determination of heavy metals in different tissues of black fish (*Capoeta fusca*) in the central part of the aqueduct of Birjand. *Health and Reconstruction* 24, 45-52.
- Mohammadnabizadeh. S., Pourkhabbaz. A., Afshari. R., 2012. Concentrations of Cd, Ni, Pb, and Cr in the Two Edible Fish Species *Liza klunzingeri* and *Sillago sihama* Collected From Hara Biosphere in Iran. *Toxicology Environmental Chemistry* 6, 1144-1151.
- Neff. J.M., 2002. Bioaccumulation in marine organism, effect of contaminant from oil well produced water. *Health and Reconstruction* 62, 56-61.
- Nematdoost Haghi, B. and Banaee, M., 2017. Effects of micro-plastic particles on paraquat toxicity to common carp (*Cyprinus carpio*): biochemical changes. *Environmental Science Technology* 14 (3), 521-530.
- Olivotto. I., Rollo. A., Sulpizio., Avella. M., Tosti. L., Carnevali. O., 2006. Breeding and rearing the Sunrise Dottyback *Pseudochromis flavivertex*: the importance of live prey enrichment during larval development. *Aquaculture* 255, 480-487.
- Ostaszewska. T., Chojnacki. M., Kamaszewski. M. Sawosz-Chwalibóg. E., 2016. Histopathological effects of silver and copper nanoparticles on the epidermis, gills, and liver of Siberian sturgeon. *Journal of Environmental science and pollution research* 23, 1621-1633.
- Park, E.J., Bae, E., Yi, J., Kim, Y., Choi, K. and Lee, S.H., 2010. Repeated-dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nanoparticles. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 30(2), 162-168.
- Pourang. N., Nikouyan. A., Denni. HS., 2005. Trace element concentration in fish, surficial sediments and water from Northern part of the Persian gulf. *Environmental Mon Assess* 109(9), 293-316.
- Rangasamy, B., Hemalatha, D., Shobana, C., Nataraj, B. and Ramesh, M., 2018. Developmental toxicity and biological responses of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to anti-inflammatory drug ketoprofen. *Chemosphere* 213, 423-433.
- Rezaei Shadegan, M. and Banaee, M, 2018. Effects of dimethoate alone and in combination with Bacilar fertilizer on oxidative stress in common carp, *Cyprinus carpio*. *Chemosphere*. 208, 101-107.
- Shahsavani. D., Mohri. M., Gholipour Kanani. H., 2010. Determination of normal values of some blood serum enzymes in *Acipenser stellatus* Pallas. *Fish Physiology Biochemical* 36, 39-43.
- Truhaut. R., Ferard. J.F., Jouany. JM., 1980. Cadmium IC50 determinations on *Chlorella vulgaris* involving different parameters. *Ecotoxicology Environmental Safety* 4, 215-223.
- Ullah, S., Li, Z., Arifeen, M.Z., Khan, S.U. and Fahad, S., 2019. Multiple biomarkers based appraisal of deltamethrin induced toxicity in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Chemosphere* 214, 519-533.
- Vinodhini. R., Narayanan. M., 2009. The impact of toxic heavy metals on the hematological parameters in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Journal of Environmental Health Science* 6, 23-28.
- Yousefi, S. and Hoseinifar, S.H, 2018. Protective effects of prebiotic in zebrafish, *Danio rerio*, under experimental exposure to Chlorpyrifos. *Aquaculture* 6 (2), 49-54.

