**شیلات، مجله منابع طبیعی ایران**
دوره ۷۴، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۰
صفحات ۶۳۲-۶۱۳

# تأثیر غلظت‌های مختلف کادمیوم و کربنات کلسیم و دما بر سطح سرمی آنزیم‌های ALT و ALP و نسبت‌های مورفولوژیک خرچنگ گرد آب‌شیرین *Potamon persicum* (Pretzmann, 1962)

**مینا توانا[۱]، کامران رضایی توابع[۲*]، علیرضا میرواقفی[۳]**

*۱. دانشجوی دکتری گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران*
*۲. دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران*
*۳. استاد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران*

**تاریخ ارسال: ۱۴۰۰/۰۴/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۷/۱۸**

## چکیده

به منظور بررسی تأثیر کادمیوم و کربنات کلسیم در دماهای مختلف بر خصوصیات ریختی خرچنگ گرد آب‌شیرین *Potamon persicum* (Pretzmann, 1962) با کاربرد روش ریخت‌سنجی سنتی، ۶۰ نمونه به صورت تصادفی از رودخانه‌های البرز مرکزی و غرب مازندران در تابستان ۱۳۹۸ برداشت شد. در این تحقیق، خرچنگ‌ها در مخازنی با غلظت صفر کادمیوم و ۲۰۵ میلی‌گرم بر لیتر کربنات‌کلسیم به عنوان تیمار شاهد و غلظت‌های ۴/۵ و ۹ میلی‌گرم بر لیتر کادمیوم و سختی‌های ۳۰۲/۵ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کربنات‌کلسیم در دماهای ۱۸، ۲۴ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد به منزلهٔ تیمارهای آزمایش، به مدت ۶ هفته تیمار داده شدند. در پایان دوره تحقیق، تأثیر عوامل فیزیکو-شیمیایی مورد مطالعه بر شاخص‌های بیوشیمیایی سرم همولنف شامل آنزیم‌های ALT و ALP و نسبت‌های مورفومتریک مابین CW/CHL ، CW/CHD و CW/MBDWt در نرها و CW/MBDWt هم در نرها و هم در ماده‌ها ارزیابی شد. نتایج نشان داد که افزایش دو عامل دما و غلظت کادمیوم هر یک به تنهایی اثر معنی‌دار مثبتی بر افزایش میزان آنزیم ALT همولنف خرچنگ های مورد مطالعه دارد (p<۰/۰۵). همچنین، اثر متقابل غلظت های کادمیوم و کربنات‌کلسیم بر سطح سرمی آنزیم ALT همولنف خرچنگ‌های مورد مطالعه، معنی‌دار و منفی بود و اثر منفی کادمیوم بر سطح آنزیم ALT با افزایش سختی کربنات‌کلسیم، کاهش یافت (P<۰,۰۱). اما هیچ یک از عوامل فیزیکو- شیمیایی مورد مطالعه اثر معنی‌داری بر سطح سرمی آنزیم ALP نداشتند (P>۰/۰۵). اما اثر متقابل کربنات‌کلسیم با کادمیوم بر سطح سرمی آنزیم ALP معنی‌دار بود و با افزایش توام هر دو متغیر، مقدار آنزیم ALP در همولنف خرچنگ‌ها افزایش یافت (P<۰/۰۵). همچنین تحقیق حاضر نشان داد اثر متقابل هر سه متغیر مورد مطالعه با یکدیگر بر CW/CHD و نسبت CW/CHL خرچنگ‌های نر معنی‌دار نشد (P>۰/۰۵) اما اثر متقابل هر سه متغیر با یکدیگر بر CW/MBDWt خرچنگ‌های نر و ماده در سطح اطمینان ۹۵ معنی‌دار شد (P<۰/۰۵). با توجه به مقادیر به دست آمده در پیدا کردن نقاط بهینه متغیرهای مورد بررسی بر ماکزیمم نسبت‌های مورفولوژیک و سطح بهینه آنزیم‌های ALP و ALT، دما ۱۸-۲۰ درجه سانتی‌گراد، سختی کربنات‌کلسیم در حدود ۲۴۰-۳۱۱ میلی‌گرم بر لیتر و عدم حضور کادمیوم در محیط آبی با بیشترین میزان مطلوبیت (۸۰-۹۵ درصد) پیشنهاد شد.

**واژگان کلیدی:** خرچنگ، کربنات کلسیم، دما، کادمیوم، ریخت شناسی، آنزیم ALP، آنزیم ALT

* نویسنده مسئول: کامران رضایی توابع
Email: krtavabe@ut.ac.ir

**Journal of Fisheries**
Vol. 74, No. 4, Winter 2021
pp. 613-632

# Effect of Cd and $CaCO_3$ concentration at different temperatures on serum levels of ALT and ALP enzymes and morphological ratios of freshwater crab *Potamon persicum* (Pretzmann, 1962)

**Mina Tavana[1], Kamran Rezaei Tavabe[2*], Ali Reza Mirvaghefi[3]**

*1. Ph.D student, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, College of Agriculture & Natural Resource, University of Tehran, Karaj, Iran.*
*2. Associate Prof., Department of Fisheries Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.*
*3. Professor, Department of Fisheries Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.*

**Received: 01-Jul-2021** **Accepted: 10-Oct-2021**

## Abstract

The effects of cadmium and calcium carbonate concentration were investigated at different temperatures on the morphological characteristics of freshwater crabs *Potamon persicum* (Pretzmann, 1962) using traditional morphometrics methods, 60 samples of random sampling in the west of Mazandaran and Karaj Rivers in the Central Alborz, Iran. The crabs were exposed to zero cadmium and 205 mg/l calcium carbonate as a control treatment and 4.5 and 9 mg/l cadmium concentrations and 302.5 and 400 mg/l carbonate calcium hardnesses at 18, 24, and 30 ° C temperatures for 6-weeks as experimental treatments. We studied the effects of water physicochemical parameters on serum biochemical properties in the hemolymph of the crabs including ALT and ALP enzymes and morphometric ratios between CW/CHL, CW/CHD, and CW/MBDWt in males and CW/MBDWt in both males and females. The results showed that increasing the two factors of temperature and cadmium alone had a significant positive effect on increasing the amount of ALT hemolymph enzyme in the studied crabs ($P < 0.05$).In this study, the interaction of cadmium and calcium carbonate on the serum level of ALT enzyme hemolymph in crabs was significant and the negative effects of cadmium on ALT enzyme decreased with increasing calcium carbonate hardness ($P<0.01$). However, studied physicochemical factors had no significant effects on the serum level of ALP ($P> 0.05$). However, the interaction of calcium carbonate with cadmium on the serum level of ALP enzyme was significant and with increasing both variables, the amount of ALP enzyme in crab hemolymph increased ($P < 0.05$). The present study also showed that the interaction of all three variables on CW/CHD and CW/CHL ratio of male crabs was not significant ($P> 0.05$), but the interaction of all three variables on CW/MBDWt of male and female crabs was significant at a 95% confidence level ($P < 0.05$). According to the values obtained in finding the optimal points of the studied variables on the maximum morphological ratios and the optimal level of ALP and ALT enzymes, recommend using high rates of desirability (80-95%) with temperature 18-20°C, Calcium carbonate hardness about 240-311 mg/l, And the absence of cadmium in the aqueous medium.

**Key Words:** Crab, Calcium carbonate, Temperature, Cadmium, Morphology, ALP Enzyme, ALT Enzyme

Corresponding author: Kamran Rezaei Tavabe Email: krtavabe@ut.ac.ir

## ۱. مقدمه

خرچنگ‌های آب شیرین در آب‌های داخلی قاره‌ها و جزایر مجاور مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری (مناطق Neotropical، Palaearctic، Oriental، Australasian و Afrotropical)، پراکنش دارند. آن‌ها از جمله بزرگ‌ترین بی‌مهرگان پوده‌خوار (Klaus *et al*., 2013) در اکوسیستم‌های آب شیرین هستند که نقش حیاتی را در ساختار و عملکرد اکولوژیک اکوسیستم آب شیرین، بازی می‌کنند (Dobson, 2004). تغییرات مکانی و زمانی تاریخ زندگی جانوران، عمدتاً به تغییرات عوامل محیطی نسبت داده می‌شوند (Shields *et al*., 1991). از دیدگاه بیولوژیک، همه گونه‌ها محدوده دمایی خاصی دارند و بنابراین، توزیع جغرافیایی، پراکنش آن‌ها را محدود می‌سازد. از آن جا که مهم‌ترین فرآیندی که در جهت رشد، تکثیر و حفظ ذخایر این آبزی مدنظر زیست‌شناسان و پرورش‌دهندگان آن بوده، چرخهٔ پوست‌اندازی و رشد آن است و دما اثر پیچیده‌ای روی آن دارد، لذا، جهت تکثیر و پرورش و حفظ ذخائر این گونه و داشتن اطلاعات بیشتر در مورد زیست‌شناسی آن، تعیین بهینه دمای زیست دارای اهمیت زیادی است. همچنین سختی آب نیز یکی از مهم‌ترین شاخص‌های کیفی آب است که در فعالیت‌های زیستی سخت‌پوستان نظیر تولیدمثل (Mente *et al*., 2003)، پوست‌اندازی و رشد (Huong *et al*., 2010) و در تثبیت برخی شاخص‌های فیزیکو-شیمیایی آب نظیر قلیایی بودن و اسیدیته (Brown and Daniel, 1991) ، نقش حیاتی دارند. به‌طور طبیعی سالانه مقدار بسیار زیادی کادمیوم، حدود ۲۵۰۰۰ تن در سال، وارد محیط‌زیست می‌شود. حدود نیمی از این کادمیوم از طریق هوازدگی سنگ‌ها وارد رودخانه‌ها می‌شود و بخشی از کادمیوم از طریق آتش سوزی‌های جنگل و آتش فشان‌ها وارد هوا می شود، بقیه کادمیوم از طریق فعالیت‌های بشری مانند کارهای صنعتی وارد محیط می‌شود. در طی تحقیقات اخیر، نشان داده شده است که غلظت‌های بالای کادمیوم در مناطقی با فعالیت‌های انسانی بالاست و می‌توان نتیجه گرفت که ورود این آلاینده‌ها از منابع ذکر شده به محیط رودخانه‌های نزدیک به آلاینده های فلزات سنگین مثل کادمیوم، تهدیدی جدی برای آبزیان منطقه، محسوب می‌شود (Sadiq, 1992). از طرفی خرچنگ‌ها به عنوان فراسنجه‌های مهم در ارزیابی کیفیت آب و نیز تشخیص حضور ترکیبات سمی در آب شناخته می‌شوند که پاسخ به تغییرات فیزیکو-شیمیایی محیط آبی باعث تغییر در میزان فعالیت برخی آنزیم‌های موجود می‌شود که از تغییرات آنزیمی به عنوان شاخص سلامتی جانور و ارزیابی کیفیت آب منطقه زیستی موجود، استفاده می‌شود. آلکالین فسفاتاز (ALP) نوعی آنزیم غشایی هیدرولازی است که باعث انتقال گروه فسفات از انواع مولکول‌ها شامل نوکلئوتیدها، پروتئین‌ها و آلکالوییدها می‌شود (Malamy *et al*.,1964). عملکرد اصلی آنزیم آلکالین فسفاتاز احتمالاً تسهیل انتقال متابولیت‌های مختلف غشاء سلولی است که در ارتباط با حمل و نقل چربی‌ها و استخوان سازی انجام می شود (Garen *et al*., 1960). فعالیت آلکالین‌فسفاتاز که یکی از مارکرهای اختلالات کبدی و استخوانی در مهره داران محسوب می‌شود، در بافت‌های مختلف سخت‌پوستان مانند همولنف، آبشش‌ها، عضلات و هپاتوپانکراس گزارش شده است (Pratt *et al*., 2000) و به نظر می‌رسد در هنگام اختلالات هپاتوپانکراس، استرس‌های محیطی از جمله افزایش دمای آب و حمله پاتوژن‌ها به موجود و تشکیل اسکلت خارجی جدید مقدار آن در همولنف خرچنگ‌ها افزایش یابد و برعکس در هنگام سوءتغذیه و کمبود فسفات خون مقدار سرمی آن کاهش می‌یابد. آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، عضوی از خانواده ترانس آمینازها است و تنها در سیتوپلاسم وجود دارد و در بافت‌های کبدی و کلیوی یافت می‌شود. در بیماری‌های حاد کبدی که منجر به ایجاد صدمات غشایی یا نکروز سلولی می‌شوند، فعالیت آلانین آمینوترانسفراز در سرم خون به‌طور قابل توجه‌ای افزایش می‌یابد که در ماهیان مختلف گزارش شده است (Mojabi, 1379) و تغییر سطح سرمی

آن در آسیب‌های کبدی از ویژگی بیشتری نسبت به آسپارا تات آمینوترانسفراز (AST) برخوردار بوده و اختصاصی‌تر است (Kricka, 1999) و به احتمال زیاد در اختلالات هپاتو پانکراس، میزان آن در سطح سرمی همولنف خرچنگ‌ها، افزایش می‌یابد. بر طبق گفته محققین اندازه بدن مهم‌ترین خصوصیت کمی یک موجود است که به طور قابل ملاحظه‌ای تمام خصوصیات فیزیولوژی (نظیر میزان سوخت‌و ساز) و تولیدمثلی (نظیر هماوری و موفقیت جفت‌گیری) را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد (McNab, 1971). بنابراین، در توالی پوست‌اندازی در طول رشد، مطمئناً ابعاد بدن جانور نسبت به دیگر قسمت‌ها ممکن است رشد خیلی بیشتری داشته باشد (Hartnoll, 1978). لذا، اطلاعات به دست آمده از مطالعات نسبت‌های مورفولوژیک می‌تواند متمایز کننده دو جنس نر و ماده از یکدیگر و نیز ارتباط‌های موجود در ویژگی‌های افراد بالغ باشد که از اهمیت بسیار بالایی در مطالعه آن‌ها از جنبه‌های مختلف زیست‌شناسی، بوم‌شناسی و فیزیولوژی برخوردار است (Mohapatra *et al*., 2010). همچنین از آنجایی که از داده‌های تغییرات سطح سرمی آنزیم‌ها به صورت گسترده برای توصیف وضعیت سلامت جانور و ارزیابی پاسخ‌های استرس و سازش‌های فیزیولوژیک جانور استفاده می‌شود، از این رو، در این تحقیق، اثرات غلظت‌های متغیرهای زیست محیطی مثل کادمیوم و سختی کربنات کلسیم در آب در دماهای مختلف بر سطح سرمی آنزیم های ALT و ALP و نسبت های مورفولوژ یک خرچنگ گرد آب‌شیرین *Potamon persicum* مورد بررسی قرار گرفت.

## ۲. مواد و روش‌ها

### ۲.۱. تهیه خرچنگ‌های گرد

نمونه‌برداری این تحقیق از تیر تا شهریورماه سال ۱۳۹۸ از رودخانه های کردان، طالقان، کرج و چالوس استان البرز و رودخانه‌های دوهزار و سه‌هزار و آبشارهای آلاشور و آب‌پری استان مازندران صورت گرفت. تعداد ۶۰ قطعه خرچنگ آب شیرین جنس پوتامون تهیه و به آزمایشگاه تکثیر و پرورش آبزیان دانشکدهٔ منابع طبیعی کرج منتقل شدند.

### ۲.۲. طرح و شرح آزمایش

در این تحقیق، واحدهای آزمایش، مخازن ۵۰ لیتری بودند که از مجموع ۶۰ عدد خرچنگ (۳۷ عدد نر و ۲۳ عدد ماده)، با میانگین وزنی۳۶/۶ گرم، سه عدد خرچنگ در هر مخزن، رقم‌بندی و قرار داده شدند. خرچنگ‌ها به منظور سازگاری با شرایط کارگاه به مدت چهار ماه در این شرایط نگهداری شدند. سپس با نرم افزار دیزایناکسپرت (Design Expert) طرح RSM تیمارهای آزمایش طراحی گردیدند. به این منظور، ۲۰ تیمار با یک تکرار برای تیمار شاهد و شش تکرار برای نقاط مرکزی بر اساس متغیرهای مورد آزمایش، طراحی شد. از آن‌جایی که آب مرکز تکثیر، از مجموعه آب زیرزمینی متصل به رودخانه کرج می‌باشد، لذا آب مرکز تکثیر بدون کادمیوم با سختی ۲۰۵ میلی‌گرم بر لیتر بر حسب کربنات کلسیم که به شدت در ظرف چند روز با چندین هواده، هوادهی شده بود، به منزله تیمار شاهد انتخاب شد و سپس برای سنجش شاخص‌های فیزیکو-شیمیایی محیط آبی خرچنگ‌های جنس پوتامون، سختی‌های ۳۰۲/۵ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بر حسب کربنات‌کلسیم (مرک-آلمان) و غلظت های ۴/۵ و ۹ میلی‌گرم بر لیتر کادمیوم (مرک-آلمان) به منزله تیمارهای آزمایش در نظر گرفته شدند. با در نظر گرفتن این نکته که منابع آلاینده رودخانه‌ها در حوزه البرز مرکزی متنوع است و بیشترین مقدار شاخص آلودگی، مربوط به آلودگی فلزات سنگین، به‌ویژه در نواحی پایین‌دست رودخانه ها ناشی از فعالیت‌های انسانی مانند ورود فاضلاب‌های کشاورزی، روستایی و تفرجگاهی، فاضلاب‌های صنعتی و رسوبات معادن می‌باشد. همچنین یافته‌ها نشان از آن دارند که رودخانه کردان از دیدگاه تقسیم‌بندی ساپروبی در ناحیه‌ای با آلودگی کم-متوسط قرار دارد (Ahmadi *et al*, 2000)، نیز نواحی پایین‌دست رودخانه

دوهزار تنکابن، با آلودگی متوسط طبقه‌بندی می‌شود (Mesgaran Karimi *et al*., 2012). همچنین بر اساس نتایج به دست آمده از نظر کیفی، بخش های مختلف رودخانهٔ کرج را می‌توان در طبقهٔ کیفی II و III ساپروبی طبقه بندی کرد (Qalandarzadeh *et al*., 2020). از آن جایی که میزان دقیقی از فلز سنگین کادمیوم در رودخانه‌های مورد مطالعه، برآورد نشده بود، لذا، مبنای تعیین غلظت فلز سنگین در این مطالعه، داده‌های تاریخی در مورد میزان فلز سنگین موجود در انشعاب‌های تالاب انزلی، بود (Rahbar Hashemi *et al*., 2013). Dibia (2006) و Jamabo (2008)، همچنین گزارش دادند که محدوده دمایی بین ۲۷ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد برای رشد و سلامتی سخت پوستان، ایده‌آل است. بنابراین به منظور بررسی اثر دمای آب بر شرایط فیزیکو-شیمیایی آب محل زیست خرچنگ‌های مورد مطالعه، با استفاده از هیترهای ترموستات‌دار دمای آب تیمارها، بر ۱۸ درجهٔ سانتی‌گراد به عنوان تیمار شاهد و ۲۴ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد به عنوان تیمارهای آزمایش، تنظیم گردید. آب مورد استفاده در این تحقیق، آب چاه بود که پس از هوادهی وارد تیمارهای خرچنگ‌های مورد مطالعه شد و شرایط فیزیکو-شیمیایی آب قبل از شروع آزمایش‌ها، شامل دمای ۱۸-۲۲ درجه سانتی‌گراد، pH ۷-۷/۴ و اکسیژن محلول ۶-۷/۲ میلی‌گرم بر لیتر اندازه گیری شد. در طول تحقیق آب تمام مخازن روزانه به میزان یک سوم از کف مخازن سیفون شد و همان میزان آب تمیز که حاوی غلظت‌های عنوان شده از کادمیوم و کربنات کلسیم بود، به آن‌ها اضافه شد. برای غذادهی خرچنگ‌ها نیز از گوشت مرغ پخته شده، استفاده شد. میزان غذادهی در این تحقیق، در اواخر بعداز ظهر (ساعات ۱۸-۲۰ عصر) و به میزان روزانه ۱۰ درصد وزن بدن خرچنگ‌ها صورت گرفت (Karimpour *et al*., 1371). خرچنگ‌ها به تعداد سه عدد در هر تیمار، به مدت ۶ هفته در تیمارهای مورد آزمایش قرار داده شدند و سپس، شاخص‌های بیومتریک و مورفولوژیک آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

### ۲.۳. شاخص‌های زیست سنجی

برای تعیین وزن و ابعاد خرچنگ‌ها، هر سه خرچنگ هر تیمار یک بار قبل از شروع آزمایش‌ها و یک بار پس از پایان شش هفته، با ساچوک برداشته شد و پس از خشک کردن با دستمال، با ترازوی دیجیتال با حساسیت ۰/۰۱گرم توزین شدند. همچنین عرض و طول کاراپاس و عمق و طول چلای خرچنگ‌ها نیز به وسیله کولیس عقربه دار اندازه‌گیری شد. داده‌های مربوط به شاخص‌های زیست سنجی یا بیومتریک و ریخت سنجی یا مورفولوژیک بر اساس فرمول‌های زیر محاسبه شدند (Immanuel *et al*., 2001; Bandral *et al*., 2015).

میانگین افزایش وزن بدن (MBDWt) =
میانگین وزن نهایی (gr) - میانگین وزن اولیه (gr)

میانگین افزایش عرض کاراپاس (CW) =
میانگین عرض نهایی کاراپاس (cm) - میانگین عرض اولیه کاراپاس (cm)

میانگین افزایش طول چلا (ChL) =
میانگین طول نهایی چلا (cm) - میانگین طول اولیه چلا (cm)

میانگین افزایش عمق چلا (ChD) =
میانگین عمق نهایی چلا (cm) - میانگین عمق اولیه چلا (cm)

### ۲.۴. نمونه‌برداری از هملونف

برای هملونف‌گیری از خرچنگ های مورد مطالعه، هملونف از حفره پریکاردیوم مابین Cheliped و دومین جفت پاهای حرکتی خرچنگ‌ها توسط سرنگ استریل یک میلی‌لیتری گرفته شد و در تیوب‌های اپندورف با بافر سیترات/EDTA (۰,۴۵ M) کلرید سدیم، ۱۰۰ mM گلوکز، ۳۰ mM تری سیترات سدیم، ۲۶ mM اسید سیتریک، ۱۰ mM EDTA، pH ۴,۶) با نسبت ۴:۱ رقیق سازی شد و در دمای ۸۰- تا بررسی مقادیر آنزیمی نگهداری شدند. هملونف‌های جمع آوری شده پس از سانتریفیوژ با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند (Vogan and Rowley, 2002).

محلول بالایی بلافا صله پس از سانتریفیوژ برای سنجش آنزیم‌های ALT و ALP با ا ستفاده از کیت‌های مخصوص این آنزیم‌ها (شـــرکت پارس آزمون) مورد ســـنجش قرار گرفت و با روش الایزاســـاندویچی اندازه‌گیری شـــدند (Moss and Henderson, 1999).

### ۲.۵. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

همان‌طوری که در جدول ۱ و ۲ و ۳ مشاهده می‌شود، شـــرح علایم اختصـــاری هر یک از متغیرها و پاســـخ‌های بررســـی شـــده در طی آزمایش‌ها به همراه واحدهای آن‌ها، به تفصیل آورده شده ا ست. در این آزمایش‌ها از نرم افزار آمـــاری Design-Expert نســـخـــه ۱۲ طـــرح RSM (Response Surface ) نوع Central Composite استفاده گردید. شـــاخص‌های آنزیمی و نســـبت‌های مورفولوژیک خرچنگ‌ها تحت اثر متغیرهای مورد آزمایش در ۲۰ تیمار و تکرار، هر تیمار به صـــورت ۱، ۶ و ۱ (یک تکرار برای تیمار های شـــاهد، ۶ تکرار برای تیمار های مرکزی)، با اســـتفـاده از نرم افزار Design-Expert طراحی و مورد بررســـی قرار گرفتند. در هر تیمار و مخزن، ســـه عدد خرچنگ (که هر عدد خرچنگ، به دلیل محدودیت گونه، یک تکرار در نظر گرفته شـــد)، برای بررســـی متغیرهای مورد آز مایش بر شـــاخص های آنزیمی و نســـبت های مورفولوژیک خرچنگ‌ها، حضور داشتند.

**جدول ۱- توضیح هر یک از متغیرهای بررسی شده در آزمایش‌ها**

| انحراف معیار | میانگین | ماگزیمم | مینیمم | مدل آماری | علامت اختصاری سطح پاسخ با واحد | علامت اختصاری |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ۱۳/۹۷ | ۴۳/۲ | ۶۹ | ۲۷ | Quartic | ALT ( U/L) | $R_1=Y_1$ |
| ۳۸/۲ | ۱۲۳/۴ | ۱۹۶ | ۷۳ | Cubic | ALP ( U/L) | $R_2=Y_2$ |
| ۰/۳۴۳۷۳۳ | ۰/۴۵۵ | ۱ | ۰ | RQuadratic | CW/ChL ( cm) | $R_3=Y_3$ |
| ۰/۲۵۶۰۳۵ | ۰/۳۱۸ | ۱ | ۰ | Cubic | CW/ChD ( cm) | $R_4=Y_4$ |
| ۰/۲۹۶۸۰۵ | ۰/۳۴۷۵ | ۰/۸۸ | ۰ | Cubic | CW/MBDwt ( cm/gr) | $R_5=Y_5$ |

**جدول ۲- توضیح هر یک از پاسخ‌های بررسی شده در واکنش به متغیرهای مورد نظر در آزمایش‌ها**

| انحراف معیار | میانگین | ماگزیمم | مینیمم | واحد با علامت اختصاری | عوامل مورد بررسی | علامت اختصاری |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ۴/۳۵۲۸۶ | ۲۴ | ۳۰ | ۱۸ | °C | درجه‌حرارت | $A=X_1$ |
| ۷۰/۷۳۳۹ | ۳۰۲/۵ | ۴۰۰ | ۲۰۵ | mg/L | سختی‌کربنات‌کلسیم | $B=X_2$ |
| ۳/۲۶۴۶۴ | ۴/۵ | ۹ | ۰ | mg/L | سختی‌کادمیوم | $C=X_3$ |

**جدول ۳- توضیح هر یک از تیمارهای بررسی شده در واکنش به متغیرهای مورد نظر در آزمایش‌ها**

| تیمارها و تکرارها | A: درجه‌حرارت (°C ) | B: سختی کربنات کلسیم (mg/L ) | C: غلظت کادمیوم (mg/L ) |
|---|---|---|---|
| ۱ | ۲۴ | ۳۰۲/۵ | ۴/۵ |
| ۲ | ۱۸ | ۲۰۵ | ۰ |
| ۳ | ۲۴ | ۳۰۲/۵ | ۴/۵ |
| ۴ | ۱۸ | ۴۰۰ | ۹ |
| ۵ | ۲۴ | ۲۰۵ | ۴/۵ |
| ۶ | ۲۴ | ۳۰۲/۵ | ۴/۵ |
| ۷ | ۲۴ | ۴۰۰ | ۴/۵ |

**ادامه جدول ۳**

| تیمارها و تکرارها | A: درجه‌حرارت (°C) | B: سختی کربنات کلسیم (mg/L) | C: غلظت کادمیوم (mg/L) |
|---|---|---|---|
| ۸ | ۱۸ | ۲۰۵ | ۹ |
| ۹ | ۳۰ | ۳۰۲/۵ | ۴/۵ |
| ۱۰ | ۳۰ | ۲۰۵ | ۰ |
| ۱۱ | ۳۰ | ۴۰۰ | ۰ |
| ۱۲ | ۲۴ | ۳۰۲/۵ | ۴/۵ |
| ۱۳ | ۲۴ | ۳۰۲/۵ | ۹ |
| ۱۴ | ۳۰ | ۴۰۰ | ۹ |
| ۱۵ | ۲۴ | ۳۰۲/۵ | ۴/۵ |
| ۱۶ | ۱۸ | ۳۰۲/۵ | ۴/۵ |
| ۱۷ | ۳۰ | ۲۰۵ | ۹ |
| ۱۸ | ۲۴ | ۳۰۲/۵ | ۴/۵ |
| ۱۹ | ۲۴ | ۳۰۲/۵ | ۰ |
| ۲۰ | ۱۸ | ۴۰۰ | ۰ |

## ۳. نتایج

مدل به کار رفته در تجزیه و تحلیل متغیرها و برر سی اثر آن‌ها بر تغییرات سطح آنزیم ALT، Quartic بود و همان‌طوری که در جدول ۴ مشاهده می‌شود، مدل Quartic معنی‌دار شده است ($p<۰/۰۵$). در بررسی متغیرهای مورد آزمایش، اثر دماها و غلظت‌های مختلف کادمیوم بر تغییرات سطح آنزیم ALT در سطح اطمینان ۹۵ درصد معنی‌دار شد ($p<۰/۰۵$)، اما اثر غلظت‌های مختلف سختی کربنات‌کلسیم، معنی‌دار نشد ($p>۰/۰۵$).

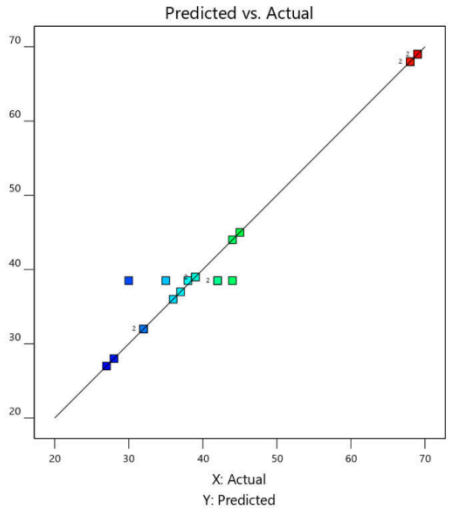
همان‌طوری که در معادله ۱ و نمودار شکل ۱ و جدول ۴ مشاهده می شود، اثر متقابل کربنات‌کلسیم با کادمیوم در سطح اطمینان ۹۹ در صد بر تغییرات سطح آنزیم ALT معنی‌دار شد ($p<۰/۰۱$). معادله ۱ بر اساس Coded Factors تعریف شده است.

معادله (۱):

$$Y_1 = +38.5 + 14.5\ X_1 - 2.5\ X_2 + 12.5\ X_3 + X_1X_2 + 3\ X_1\ X_3 - 11.5\ X_2\ X_3 + 2.25\ X_1X_2\ X_3 + 15\ X_1^2 + 18\ X_3^2 - 14.75\ X_1\ X_2^2 - 24.5\ X_1^2\ X_2^2$$

**جدول ۴- جدول تجزیه واریانس ANOVA با استفاده از طرح RSM مدل Quartic**

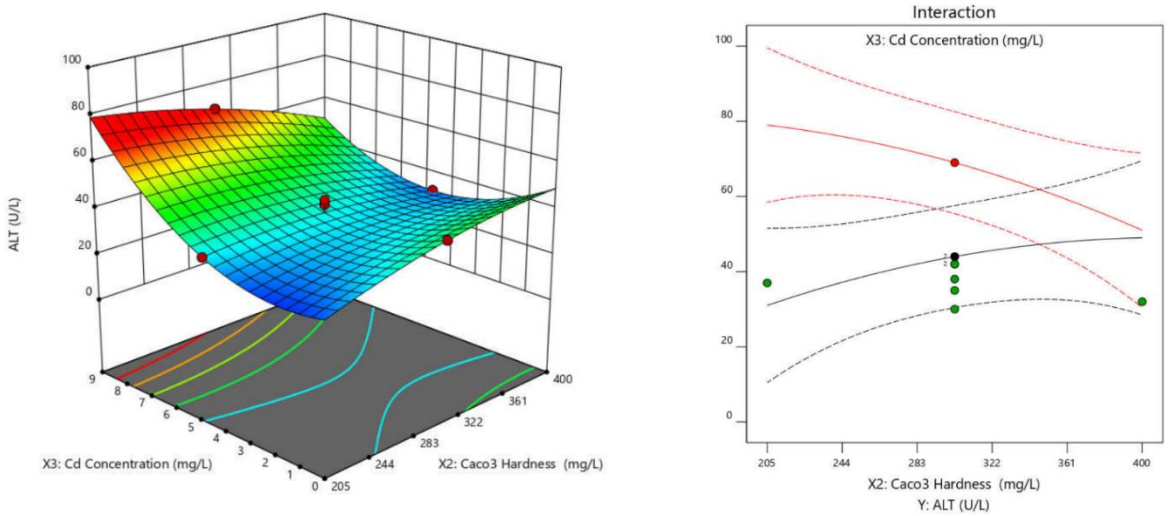
| | P-Value | F-Value | $Y_1$ = ALT |
|---|---|---|---|
| Significant | ۰/۰۱۱۶ | ۹/۱۳ | Model* |
| | ۰/۰۱۱۶ | ۱۵/۰۷ | $X_1$-Temp* |
| | ۰/۰۲۰۴ | ۱۱/۲۰ | $X_3$-Cd Concentration* |
| | ۰/۰۰۱۶ | ۳۷/۹۲ | $X_2\ X_3$** |
| | ۰/۰۱۷۷ | ۱۲/۱۰ | $X_1^2$* |
| | ۰/۰۰۸۷ | ۱۷/۴۲ | $X_3^2$** |
| | ۰/۲۸۲۲ | ۱/۴۵ | $X_1\ X_2\ X_3$ |
| | ۰/۰۱۶۷ | ۱۲/۴۸ | $X_1\ X_2^2$* |
| | ۰/۰۲۸۰ | ۹/۳۹ | $X_1^2\ X_2^2$* |




**شکل ۱-نمودار بررسی پراکنش و تطابق داده‌های واقعی یا آزمایشگاهی با داده‌های پیش بینی شده باستفاده از طرح RSM مدل Quartic**

همان‌طوری که در شکل یک نشان داده شده است، داده‌های واقعی و آزمایشگاهی به دست آمده (Actual Data) در بررسی سطح آنزیم ALT با داده‌های پیش بینی شده (Predicted Data) توسط مدل آماری مورد استفاده، تطابق زیادی دارند ($R^2$=0.96). در اکثر خرچنگ‌های مورد مطالعه، سطح آنزیم ALT، ۴۵ U/L-۳۰ بود و بیشترین افزایش سطح آنزیم ALT در آزمایشگاه، در خرچنگ‌های مورد مطالعه تا ۶۹ U/L بود.

مدل به کار رفته مربوط به تجزیه متغیرها و بررسی اثر آن ها بر تغییرات سطح آنزیم ALP، Cubic است و همان‌طوری که در جدول ۵ مشاهده می‌شود، مدل Cubic معنی‌دار نشده است (p>۰/۰۵). در بررسی متغیرهای مورد آزمایش، اثر متغیرهای مختلف بر تغییرات سطح آنزیم ALP معنی‌دار نشد (P>۰/۰۵). اما اثر متقابل غلظت‌های مختلف کربنات‌کلسیم و کادمیوم بر تغییرات سطح آنزیم ALP در سطح اطمینان ۹۵ در صد معنی‌دار شد (p<۰/۰۵) (نمودارشکل ۳).



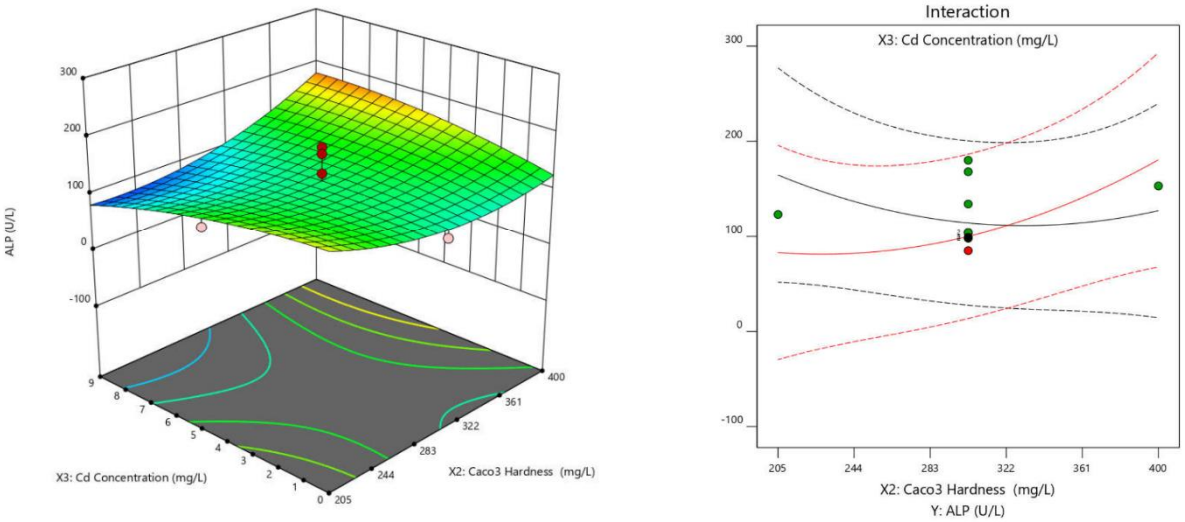

**شکل ۲- نمودار بررسی اثرات متقابل مابین سختی کربنات کلسیم و تغییرات غلظت کادمیوم بر تغییرات سطح آنزیم ALT بر اساس داده‌های واقعی یا آزمایشگاهی با استفاده از طرح RSM مدل Quartic. (p<۰/۰۵).**

**$X_1$ = A: Temp, $X_2$ = B: $Caco_3$ Hardness, $X_3$= C: Cd Concentration**

**$X_1$=24°C, $X_3$= 0, +9 mg/L**

**جدول ۵- جدول تجزیه واریانس ANOVA با استفاده از طرح RSM مدلCubic**

| $Y_2$=ALP | F-Value | P-Value | |
|---|---|---|---|
| Model | ۱/۰۶ | ۰/۵۰۱۳ | Not Significant |
| Temp-$X_1$ | ۰/۵۷۱۶ | ۰/۴۷۸۳ | |
| $X_2$- $Caco_3$ Hardness | ۰/۳۲۱۵ | ۰/۵۹۱۳ | |
| $X_3$- Cd Concentration | ۰/۰۷۰۰ | ۰/۸۰۰۲ | |
| $X_1$ $X_2$ | ۱/۰۸ | ۰/۳۳۸۶ | |
| $X_1$ $X_3$ | ۱/۹۰ | ۰/۲۱۶۹ | |
| $X_2$ $X_3$* | ۶/۵۱ | ۰/۰۴۳۴ | |
| $X_1$ $X_2$ $X_3$ | ۰/۵۴۳۴ | ۰/۴۸۸۹ | |
| Lack of Fit | ۱/۶۴ | ۰/۲۵۶۷ | Not Significant |




**شکل ۳-نمودار بررسی اثرات متقابل مابین سختی کربنات کلسیم و تغییرات غلظت کادمیوم بر تغییرات سطح آنزیم ALPبر اساس داده‌های واقعی یا آزمایشگاهی با استفاده از طرح RSM مدل Cubic. (P<۰/۰۵).**
**$X_1$ = A: Temp, $X_2$ = B: $Caco_3$ Hardness, $X_3$= C: Cd Concentration**
**$X_1$=24°C, $X_3$= 0, +9 mg/L**

داده های واقعی و آزمایشگاهی به دست آمده (Actual Data) در بررسی سطح آنزیم ALP با داده‌های پیش‌بینی شده (Predicted Data) توسط مدل آماری مورد استفاده، تطابق متوسطی دارند ($R_2$=0.69). در اکثر خرچنگ‌های مورد مطالعه، سطح آنزیم ALP، ۱۳۰- U/L ۷۵ بود و بیشترین افزایش سطح آنزیم ALP در آزمایشگاه، در خرچنگ‌های مورد مطالعه تا ۱۹۶ U/L بود.

در بررسی متغیرهای مورد آزمایش، اثر متغیرهای مختلف بر CW/ChL معنی‌دار نشد (p>۰/۰۵). مدل به کار رفته در تجزیه متغیرها و بررسی اثر آن ها بر CW/ChD، Cubic است و همان‌طوری که در جدول ۶ مشاهده می‌شود، مدل Cubic درسطح اطمینان ۹۵ درصد، معنی‌دار شده است (P<۰/۰۵). در بررسی متغیرهای مورد آزمایش، اثر دماهای مختلف بر CW/ChD خرچنگ‌ها در سطح اطمینان ۹۵ درصد (p<۰/۰۵) و اثر غلظت های مختلف کادمیوم در سطح اطمینان ۹۹ درصد معنی دار شد (p<۰/۰۱). همان‌طوری که در نمودار ۹ و جدول ۶ و معادله ۳ مشاهده می‌شود،

اثرات متقابل تغییرات دما و سختی کربنات‌کلسیم بر CW/ChD خرچنگ‌ها در سطح اطمینان ۹۵ درصد معنی‌دار بوده است ($p<۰/۰۵$). در صورتی که اثرات متقابل تغییرات دما و تغییرات غلظت کادمیوم و همچنین اثرات متقابل سختی کربنات‌کلسیم و تغییرات غلظت کادمیوم و به‌علاوه اثر متقابل هر سه متغیر با یکدیگر (تغییرات دما و سختی کربنات کلسیم و تغییرات غلظت‌های مختلف کادمیوم) بر تغییرات CW/ChD خرچنگ‌ها معنی‌دار نبوده است ($p>۰/۰۵$). معادله زیر بر اساس داده‌های کد شده یا (Coded Factors) تعریف شده است.

(معادله ۲):

$$Y_5 = +0.34 - 0.29\,X_1 - 0.17X_2 - 0.47X_3 + 0.13\,X_1X_2 + 0.081\,X_1X_3 - 0.069\,X_2X_3 + 0.033\,X_1^2 - 0.22\,X_2^2 + 0.14\,X_3^2 + 0.021\,X_1X_2X_3 + 0.26\,X_1^2X_2 + 0.42\,X_1^2X_3 + 0.32X_1X_2^2$$

**جدول ۶- جدول تجزیه واریانس ANOVA با استفاده از طرح RSM مدل Cubic**

| $Y_5$ = CW/ChD | F Value | P-Value | |
|---|---|---|---|
| Model* | ۵/۷۷ | ۰/۰۲۰۶* | Significant |
| $X_1$-Temp* | ۱۰/۹۴ | ۰/۰۱۶۳* | |
| $X_2$-Caco3 Hardness | ۳/۵۴ | ۰/۱۰۸۹ | |
| $X_3$-Cd Concentration** | ۲۸/۷۳ | ۰/۰۰۱۷** | |
| $X_1X_2$* | ۹/۳۱ | ۰/۰۲۲۵* | |
| $X_1X_3$ | ۳/۴۳ | ۰/۱۱۳۳ | |
| $X_2X_3$ | ۲/۴۶ | ۰/۱۶۷۹ | |
| $X_1^2$ | ۰/۲۰ | ۰/۶۷۲۸ | |
| $X_2^2$* | ۸/۸۰ | ۰/۰۲۵۱* | |
| $X_3^2$ | ۳/۶۷ | ۰/۱۰۴۰ | |
| $X_1X_2X_3$ | ۰/۲۳ | ۰/۶۴۵۱ | |
| $X_1^2X_2$* | ۷/۲۴ | ۰/۰۳۶۰* | |
| $X_1^2X_3$** | ۱۸/۴۶ | ۰/۰۰۵۱** | |
| $X_1X_2^2$* | ۱۰/۵۷ | ۰/۰۱۷۴* | |
| Lack of Fit | ۱/۳۴ | ۰/۲۹۹۷ | Not Significant |

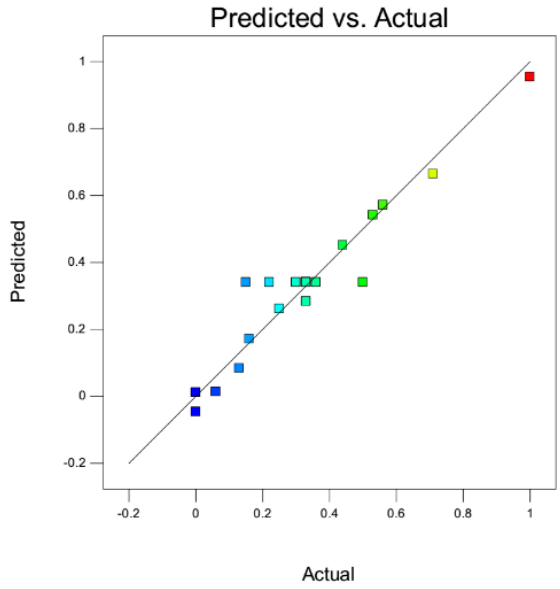
همان‌طوری که در نمودارشکل ۴ نشان داده شده است، در اکثر خرچنگ‌های مورد مطالعه، تغییرات نسبت عرض کاراپاس بر عمق چلای خرچنگ‌ها بین ۰/۱ تا ۰/۶ سانتی‌متر و بیشترین نسبت به دست آمده در آزمایشگاه، در خرچنگ‌های مورد مطالعه تا ۱ سانتی‌متر بود.

مدل به کار رفته در تجزیه و تحلیل متغیرها و بررسی اثر آن‌ها بر CW/MBDwt خرچنگ‌ها، Cubic یا مکعبی‌اند و همان‌طوری که در جدول ۷ مشاهده می‌شود، مدل Cubic در سطح اطمینان ۹۵ در صد، معنی‌دار شده است ($p<۰/۰۵$). در بررسی متغیرهای مورد آزمایش، اثر غلظت‌های مختلف کادمیوم بر CW/MBDwt خرچنگ‌ها در سطح اطمینان ۹۵ در صد معنی‌دار شد ($p<۰/۰۵$). اما اثر دماهای مختلف و نیز، اثر سختی کربنات کلسیم در غلظت‌های مختلف بر CW/MBDwt خرچنگ‌ها در سطح اطمینان ۹۵ درصد معنی‌دار نشد ($p>۰/۰۵$). همان‌طوری که در نمودارهای شکل‌های ۶ و ۷ و جدول ۷ و معادله ۳

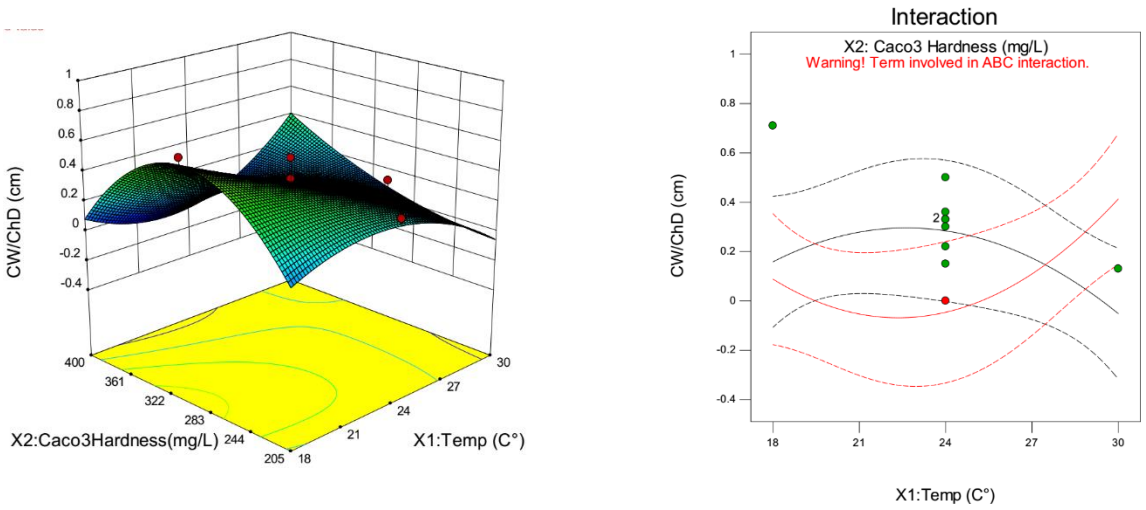
مشـــاهده می‌شـــود، اثرات متقابل دما با غلظت‌های مختلف کادمیوم بر CW/MBDwt خرچنگ‌ها در ســـطح اطمینان ۹۹ در صد معنی دار شد ($p<۰,۰۱$). در صورتی که اثرات متقابل تغییرات دما و تغییرات سختی کربنات کلسیم معنی دار نبود ($p>۰/۰۵$). همین نتایج برای اثرات متقابل سختی کربنات کلسیم و تغییرات غلظت کادمیوم بر CW/MBDwt خرچنگ‌ها، تکرار شد ($p>۰/۰۵$). در صورتی که اثر متقابل هر ســـه متغیر با یکدیگر در ســـطح اطمینان ۹۵ درصـــد معنی‌دار شد ($p<۰/۰۵$). معادله زیر بر ا ساس داده‌های کد شده یا (Coded Factors) تعریف شده است.

معادله (۳):

$$Y_8 = +0.35 - 0.025\ X_1 - 0.12X_2 - 0.28X_3 + 0.075\ X_1 X_2 + 0.22\ X_1 X_3 - 0.032\ X_2 X_3 + 0.43\ X_1^2 - 0.3\ X_2^2 - 0.14\ X_3^2 + 0.15\ X_1 X_2 X_3 + 0.28\ X_1^2 X_2 + 0.27\ X_1^2 X_3 + 0.027 X_1 X_2$$




**شکل ۴- نمودار بررسی پراکنش و تطابق داده‌های واقعی یا آزمایشگاهی با داده‌های پیش‌بینی شده با استفاده از طرح RSM مدل Cubic**



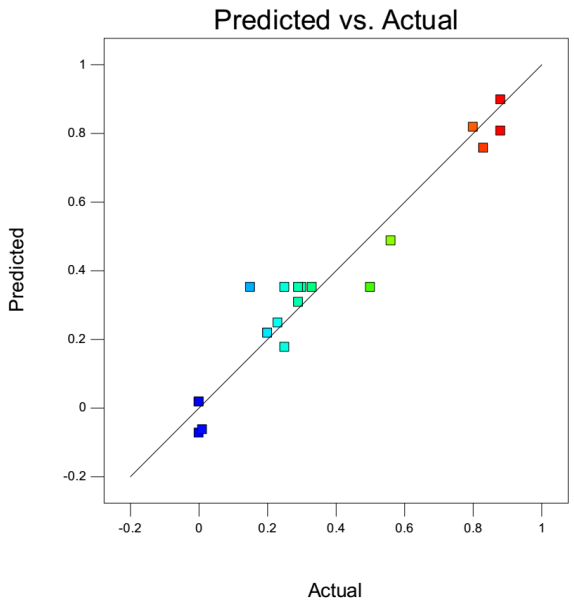

**شکل ۵- نمودار بررسی اثرات متقابل تغییرات دما و سختی کربنات کلسیم بر اساس داده‌های آزمایشگاهی بر تغییرات نسبت عرض کاراپاس بر عمق چلای خرچنگ‌ها با استفاده ازطرح RSM مدل Cubic ($p<۰/۰۵$).**

**$X_1$ = A: Temp, $X_2$ = B: $Caco_3$ Hardness, $X_3$= C: Cd Concentration**

**$X_3$=4.5 mg/L, $X_2$= -205, +400 mg/L**

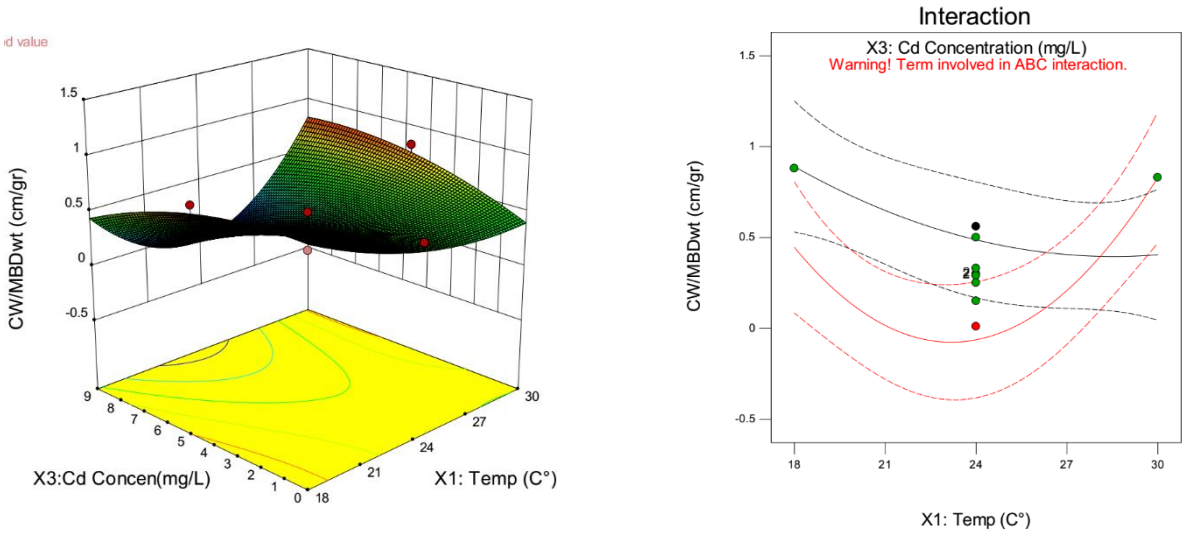
**جدول ۷- جدول تجزیه واریانس ANOVA با استفاده از طرح RSM مدل Cubic**

| CW/MBDwt=$Y_8$ | FValue | P-Value | |
|---|---|---|---|
| Model* | ۶/۲۹ | *۰/۰۱۶۶ | Significant |
| Temp-$X_1$ | ۰/۰۶۶ | ۰/۸۰۶۵ | |
| $X_2$-Caco3 Hardness | ۱/۶۴ | ۰/۲۴۷۸ | |
| $X_3$-Cd Concentration* | ۷/۹۳ | *۰/۰۳۰۵ | |
| $X_1$ $X_2$ | ۲/۳۶ | ۰/۱۷۵۴ | |
| $X_1$ $X_3$** | ۱۹/۸۵ | **۰/۰۰۴۳ | |
| $X_2$ $X_3$ | ۰/۴۴ | ۰/۵۳۰۴ | |
| $X_1^2$** | ۲۶/۷۲ | **۰/۰۰۲۱ | |
| $X_2^2$* | ۱۲/۹۴ | *۰/۰۱۱۴ | |
| $X_3^2$ | ۲/۸۱ | ۰/۱۴۴۸ | |
| $X_1$ $X_2$ $X_3$* | ۸/۸۲ | *۰/۰۲۵۰ | |
| $X_1^2$ $X_2$* | ۶/۴۶ | *۰/۰۴۴۰ | |
| $X_1^2$ $X_3$* | ۶/۱۲ | *۰/۰۴۸۳ | |
| $X_1$ $X_2^2$ | ۰/۰۶۳ | ۰/۸۰۹۵ | |
| Lack of Fit | ۳/۶۸ | ۰/۱۱۳۳ | Not Significant |




**شکل ۶- نمودار بررسی پراکنش و تطابق داده‌های واقعی یا آزمایشگاهی با داده‌های پیش بینی شده با استفاده از طرح RSM مدل Cubic**

همان‌طوری که در نمودار شکل ۶ نشان داده شده است، در اکثر خرچنگ‌های مورد مطالعه، تغییرات نسبت عرض کاراپاس بر میانگین وزن بدن خرچنگ‌ها بین ۰/۱ تا ۰/۵ سانتی‌متر و بیشترین نسبت به دست آمده در آزمایشگاه، در خرچنگ های مورد مطالعه تا ۰/۸۸ سانتی‌متر بود.




**شکل ۷- نمودار بررسی اثرات متقابل مابین تغییرات دما و تغییرات غلظت کادمیوم بر تغییرات نسبت عرض کاراپاس بر میانگین وزن بدن خرچنگ‌ها بر اساس داده‌های واقعی یا آزمایشگاهی با استفاده از طرح RSM مدل Cubic (p<۰,۰۱).**

**$X_1$ = A: Temp, $X_2$ = B: $Caco_3$ Hardness, $X_3$= C: Cd Concentration**

**$X_2$=302.5 mg/L, $X_3$= 0, +9 mg/L**

## ۴. بحث و نتیجه گیری

در این تحقیق، اثر سه متغیر فیزیکو-شیمیایی بر سطح سرمی آنزیم‌های ALT و ALP و نسبت‌های مورفولوژیک مورد بررسی قرار گرفت تا اثرات آن ها بر واکنش های فیزیولوژیک خرچنگ‌ها و میزان حضور و پراکنش خرچنگ‌های جنس پوتامون در حوضه البرز مرکزی نشان داده شود. آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آسپارات آمینوترانسفراز (AST) شاخص سلامت هپاتوپانکراس محسوب می‌شوند و در حیواناتی که هپاتوپانکراس آن‌ها آسیب دیده است، به همولنف رها می‌شوند (Kumar *et al.*, 2011). در بیشتر موارد آسیب‌های کبدی در انسان افزایش آنزیم ALT بیشتر از افزایش آنزیم AST خود را نشان می دهد (AST <ALT) (Nasiri Tusi *et al.*, 2013). به همین جهت در مطالعه حاضر، سطح سرمی آنزیم ALT همولنف خرچنگ‌های گرد آب‌شیرین حوضه البرز مرکزی مورد تیمار و سنجش قرار گرفت. با در نظر گرفتن دمای بهینه زیست خرچنگ‌های جنس پوتامون حوضه البرز مرکزی در دماهای ۱۸ و ۲۴ درجه سانتی‌گراد و سختی آب ۲۰۵ و ۳۰۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر در تیمارهای بدون حضور فلز سنگین کادمیوم، سطح سرمی آنزیم ALT و ALP همولنف خرچنگ‌های مورد مطالعه به ترتیب، U/L ۴۴-۳۲ و U/L ۱۴۸-۹۹ به دست آمد که می‌توان به عنوان میزان طبیعی این آنزیم‌ها در همولنف خرچنگ‌های مورد مطالعه در نظر گرفت. به منظور آشکار کردن تأثیر متغیرهای فیزیکو-شیمیایی بر تغییرات سطح سرمی آنزیم‌های ALT و ALP خرچنگ‌ها، همبستگی انجام شد و مقدار $R^2$ برای آنزیم ALT و ALP به ترتیب ۰/۹۶ و ۰/۶۹ به دست آمد. همبستگی مثبت بین تغییرات سطح سرمی آنزیم‌های ALT و ALP و اثر متقابل متغیرهای مورد مطالعه مانند دما، سختی کربنات کلسیم و مقدار فلز سنگین کادمیوم در آب مشاهده شد و نتایج، رابطه مثبت اثر متقابل سه متغیر دمای آب و سختی کربنات کلسیم و کادمیوم بر تغییرات سطح سرمی آنزیم ALT را نشان داد.

دما با توجه به تأثیر مستقیم یا غیرمستقیم بر سایر متغیرهای اکولوژیک عاملی اساسی بر زیست آبزیان و حتی به عنوان عاملی محدود کننده در محیط آبزیان محسوب می‌شود، دمای محیط اگر در خارج از محدوده

تحمل جانور باشد، فعالیت‌های متابولیک، رشد، مصرف اکسیژن، تکثیر، دفعات پوست‌اندازی، بقا، زیست و رفتارهای مهاجرتی سخت‌پوستان را مختل می کند (Moullac & Haffner, 2000). سخت‌پوستان به دلیل تجمع زیستی فلزات به عنوان یک شاخص زیستی محسوب می‌شوند (Ghotbuddin & Shirali, 2014). سن، طول، وزن، جنسیت، عادت تغذیه‌ای و خواص شیمیایی آب عوامل مؤثر در تجمع فلزات در خرچنگ محسوب می شوند (Demirak *et al*., 2006). کادمیوم یکی از مهم‌ترین آلاینده‌های آبزیان و انسان‌هاست که از طریق نزولات جوی و نیز در اثر تخلیه فاضلاب انسانی ابتدا وارد رودخانه‌ها و سپس به مناطق ساحلی و محیط‌های دریایی وارد می‌گردد. کادمیوم از معدود عناصری است که هیچ گونه نقش ساختاری در بدن جانوران ندارد و اثرات سمی زیادی از جمله بر سیستم عصبی مرکزی دارد (Watanabe *et al*., 1997). این فلز ساختار اسیدهای نوکلئیک، فعالیت های خاص آنزیمی، جذب کاتکول امین‌ها و سطوح انتقال دهنده‌های عصبی مختلف را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Cooper and Manalis, 1984). به دلایل ذکر شده، افزایش دو عامل دما و کادمیوم نیز هر یک به تنهایی اثر معنی‌دار مثبتی بر افزایش میزان آنزیم ALT همولنف خرچنگ‌های مورد مطالعه داشت و هر یک از عوامل دما ۳۰ درجه و کادمیوم ۹ میلی‌گرم بر لیتر نیز به تنهایی میزان آنزیم ALT را در همولنف خرچنگ‌های مورد مطالعه به ۶۹-۶۸ U/L رساند. با توجه به میزان طبیعی این آنزیم در همولنف، دو تا سه برابر حد طبیعی آن در همولنف یا کمتر از ۱۰۰ U/L شد که به معنی افزایش خفیف یا mild آنزیم ALT در همولنف خرچنگ‌های مورد مطالعه است. با توجه به اینکه آنزیم ALT نقش مهمی در تنظیم متابولیسم پروتئین‌ها، آمینواسیدها، فعالیت ترانس آمینازها و تنظیم فرآیند گلوکونئوژنز دارند (Atli *et al*., 2006). احتمالا با افزایش ترانس آمینازها که یک پاسخ ایمنی در مراحل اولیه استرس (ناشی از وجود کادمیوم و دما بالا) جهت پاسخ به تقاضای انرژی مورد نیاز جانور است، افزایش سطح آنزیم ALT در همولنف خرچنگ های قابل توجیه است. بنابراین، تغییرات معنی‌دار در افزایش میزان آنزیم ALT همولنف خرچنگ‌های مورد مطالعه هم می‌تواند نشان‌دهنده تغییر نرخ تبدیل پروتئین به انرژی و نیز به علت وقوع سمیت سلولی و القای آسیب سلولی در هپاتوپانکراس به علت تجمع فلز کادمیوم و رهاسازی این آنزیم در همولنف خرچنگ‌ها باشد. سختی کل آب از فلزات قلیایی معدنی به ویژه یون‌های کلسیم و منیزیم ساخته شده است. به علاوه، در سخت‌پوستان، بعد از پوست‌اندازی تا شکل‌گیری پوستهٔ جدید کوتیکولی، لایهٔ اپیدرمیس سطح بدن بسیار نازک است و در این مرحله موجود برخی از مواد معدنی مورد نیاز خود نظیر کلسیم، منیزیم، سدیم و پتاسیم را به طور مستقیم از آب محیط اطراف جذب می‌کند (Cheng *et al*., 2003; Rezaei Tavabe and Rafiee, 2015) و هر چقدر سختی کربنات کلسیم محیط آبی بالاتر باشد، مواد معدنی کلسیمی بیشتری در اختیار خرچنگ‌ها جهت ساخت اسکلت جدید قرار می‌گیرد. همچنین پژوهش‌ها نشان داده‌اند که حضور فلزات سنگین در محیط آبزیان بدون ایجاد حالت سمیت برای آن‌ها، به سختی و قلیائیت آب وابسته است (Takasusuki *et al*., 2004). غلظت بالای کلسیم آب که یکی از اجزای سختی آب محسوب می‌شود سمیت فلزات سنگین را کاهش می‌دهد، کلسیم این کار را از طریق بهبود مکانیسم تبادل یونی در آبشش‌ها در برابر اثرات مخرب یون‌های فلزات سنگین انجام می‌دهد (Abdel-Tawwab and Mousa, 2005). در همین راستا، نتایج تحقیق حاضر نشان داد که اثر متقابل کادمیوم و کربنات کلسیم بر سطح سرمی آنزیم ALT همولنف خرچنگ‌های مورد مطالعه، معنی‌دار و منفی است و سختی کربنات کلسیم ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به شدت اثر منفی کادمیوم ۹ میلی‌گرم بر لیتر را تا حد ۳۹-۲۷ U/L کاهش خواهد داد. مطابق با نتایج مطالعه حاضر، افزایش فعالیت این آنزیم در آسیب بافت‌های بدن گربه ماهی آفریقایی (Velmurugan *et al*., 2008) و آسیب بافت کبد *Sparus aurata* (Vaglio & Landriscina, 1999) کبد و

آسیب آبشش ماهی کپور معمولی (De la Torre *et al*., 2000) تحت تاثیر کادمیوم گزارش شده است. Fırat و Kargın در سال ۲۰۱۰ نیز آسیب بافتی در گونه *Oreochromis niloticus* و در نتیجه افزایش میزان این آنزیم را گزارش کردند. Khandan Barani و Miri در سال ۲۰۱۷، افزایش معنی‌دار سطوح آنزیم آلانین آمینوترانسفراز در کبد و آبشش ماهی سفیدک سیستان (*Schizothorax zarudnyi*) تحت تاثیر کادمیوم را نشان دادند. تحقیقاتی روی ماهی *Oreochromis niloticus*، مسمومیت با انواع فلزات سنگین (جیوه، نقره، مس، کادمیوم و...) را نشان دهنده افزایش میزان آنزیم‌های ALT و AST در بافت کبد گزارش کرده است (Öner *et al*., 2008) و همچنین اثبات شده است که کادمیوم در ماهی تیلاپیای نیل *Oreochromis niloticus* میزان آنزیم‌های ALT و AST را در بافت‌ها و سرم خون تغییر می‌دهد (Almeida *et al*., 2001).

اما در بررسی شاخص‌های مورد مطالعه بر سطح سرمی آنزیم ALP هیچ یک از شاخص‌های فیزیکو-شیمیایی مورد مطالعه اثر معنی‌داری بر سطح سرمی آنزیم ALP نداشتند. همچنین اثر متقابل کربنات کلسیم با کادمیوم معنی‌دار و مثبت شد. در تیمارهایی با کادمیوم ۹ میلی‌گرم بر لیتر در دماهای مورد آزمایش با سختی ۲۰۵ و ۳۰۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر کربنات کلسیم، سطح سرمی آنزیم ALP، ۸۷ U/L-۷۵ به دست آمد، اما در تیمارهایی با سختی ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کربنات کلسیم این میزان تا ۱۹۶ U/L افزایش پیدا کرد. آنزیم ALP از چند ایزو آنزیم تشکیل شده است که در بافت‌های مختلف سخت‌پوستان مانند همولنف، آبشش‌ها، عضلات و هپاتوپانکراس گزارش شده است (Sreenivasan *et al*., 2010; Banaee & Ahmadi, 2011). این آنزیم‌ها در هیدرولیز و سنتز استرهای اسید فسفریک و انتقال گروه‌های فسفات از اسید فسفریک به سایر ترکیبات در pH قلیایی تأثیر داشته و آن را تسریع می‌کند. میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز قلیایی در سرم خرچنگ‌ها، در تیمارهایی با سختی ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کربنات کلسیم نسبت به مقادیر پایه و گروه کنترل، افزایش داشت. آنزیم فسفاتاز قلیایی نقش مهمی در فرآیند معدنی‌سازی اسکلت حیوانات آبزی به ویژه سخت‌پوستان و رشد و نمو آن‌ها بر عهده داشته و در فرآیندهای متابولیکی مختلف به ویژه در رشد و تشکیل استخوان در مهره‌داران (Segner *et al*., 1995) و پوست‌اندازی و تشکیل پوسته جدید سخت‌پوستان نقش دارد و این مهم با اتصال به گیرنده موجود در غشای سیتوپلاسمی سلول‌ها و ایفای نقش به عنوان اکتوآنزیم انجام می‌گیرد. افزایش در سطح این آنزیم تا حدودی می‌تواند مبین اثر مثبت کربنات کلسیم بر تشکیل اسکلت خارجی جدید باشد. بنابراین، به نظر می‌رسد این افزایش معنی‌دار در تیمارهایی با سختی ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کربنات کلسیم نسبت به گروه کنترل و مقادیر پایه، نشانگر افزایش فعالیت ایزوآنزیم استخوانی آلکالین فسفاتاز در پوست‌اندازی و تشکیل پوسته جدید خرچنگ‌ها و در نهایت افزایش فعالیت سنتزی اسکلت خارجی جدید در خرچنگ‌های مورد مطالعه باشد. در مطالعه حاضر، احتمالا افزایش فیزیولوژیک ایزوآنزیم استخوانی ALP در خرچنگ‌های مورد بررسی رخ داده است و علت افزایش این آنزیم، افزایش پاتولوژیک مربوط به حضور فلز سنگین کادمیوم بر افزایش سطح سرمی این آنزیم نبود، در راستای مطالعه حاضر، تحقیقات Khandan Barani و Miri در سال ۲۰۱۷، نشان داد که کادمیوم باعث افزایش میزان ALP در کبد، آبشش و عضله ماهیان سفیدک می‌شود. افزایش میزان این آنزیم تحت تاثیر کادمیوم در آبشش، کبد و کلیه ماهی *Oreochromis mossambicus* (Thirumavalavan, 2010) و همچنین در کبد ماهی کپور معمولی و تیلاپیا نیز گزارش شده است (Atli & Canli, 2007; Rajamanickam & Muthuswamy, 2008). این در حالی است که کاهش فعالیت این آنزیم نیز به علت وجود کادمیوم نیز گزارش شده است (El-Demerdash & Elagamy, 1999).

عرض کاراپاس مهم‌ترین بعد بدن و کاملاً نشان‌دهنده تغییرات فیزیولوژیک است که در طول زندگی خرچنگ‌ها

رخ می‌دهد (Bandral *et al*., 2015). بنابراین عرض کاراپاس (CW) به عنوان مهم‌ترین پارامتر سنجی خرچنگ‌ها در برابر تغییرات شاخص‌های فیزیکو-شیمیایی مورد مطالعه برای بررسی نسبت‌های مورفولوژیک در نظر گرفته شد. چلا در خرچنگ‌های نر برای مبارزه، حرکات نمایشی و جفت‌گیری مورد استفاده قرار می‌گیرد (Hartnoll, 1974). بنابراین طول و عمق چلا نیز به عنوان شاخص‌های مهم در بیان نسبت‌های ریختی جنس نر در نظر گرفته شدند.

مطالعه‌ی حاضر تاثیر برخی عوامل فیزیکو-شیمیایی را با تاکید بر پیش‌بینی تاثیر این شاخص‌ها بر روابط ریخت سنجی شامل CW/CHL, CW/CHD و CW/MBDWt برای نرها و CW/MBDWt برای ماده‌ها به عنوان بهترین شاخص بلوغ جنسی مورفولوژیک بررسی نمود. هدف از این بررسی، تخمین دقیق اندازه بلوغ جنسی نرها و ماده‌ها نبود، بلکه صرفا تاثیر برخی شاخص‌های محیطی بر مهم‌ترین شاخص‌های بلوغ جنسی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تحقیق حاضر، همبستگی و اثر متقابل مثبت دما، سختی کربنات کلسیم و غلظت فلز سنگین کادمیوم بر تغییرات نسبت عرض کاراپاس بر عمق چلای خرچنگ های نر با R-Squared و Adj R-Squared به ترتیب شامل ۰/۹۲ و ۰/۷۶ را نشان داد (معادله ۲، جدول ۵ و نمودار ۵). همین نتایج برای همبستگی و اثر متقابل مثبت شاخص‌های فیزیکو-شیمیایی مورد مطالعه بر تغییرات نسبت عرض کاراپاس بر میانگین وزن بدن خرچنگ‌های نر و ماده با R-Squared و Adj R-Squared به ترتیب شامل۰/۹۳ و ۰/۷۸ به‌دست آمد (معادله ۳، جدول ۶ و نمودار ۷) که با سایر نتایج تحقیق حاضر و با نتایج تحقیقات Bandral و همکاران در سال ۲۰۱۵، همین طور Naderi و همکاران در سال ۲۰۱۸ مطابقت داشت. همچنین در بحث اثر سختی بالای آب بر کاهش اثرات منفی کادمیوم، نتایج پژوهش حاضر با تحقیقات Song و همکاران در سال ۲۰۱۳ و تحقیقات Gill و Epple در سال ۱۹۹۲ مطابقت داشت. اما اثر شاخص‌های فیزیکو-شیمیایی مورد مطالعه بر نسبت CW/CHL در خرچنگ‌های نر معنی‌دار نشد. با توجه به مقادیر به دست آمده در پیدا کردن نقاط بهینه متغیرهای مورد بررسی بر ماگزیمم نسبت‌های مورفولوژیک و سطح بهینه آنزیم‌های ALP و ALT، دمای ۱۸-۲۰ درجه سانتی گراد، سختی کربنات کلسیم در حدود ۲۴۰-۳۱۱ میلی‌گرم بر لیتر و عدم حضور کادمیوم در محیط آبی با بیشترین میزان مطلوبیت (۸۰-۹۵ درصد) پیشنهاد می‌شود.

### ۴-۱- نتیجه‌گیری نهایی

امید است که یافته‌های تحقیق حاضر، به شناسایی مناطق دارای اولویت برای حفاظت از گونه های مختلف خرچنگ‌های آب‌های شیرین ایران به ویژه خرچنگ‌های حوضه البرز مرکزی مثل *P.persicum* و برجسته سازی هر گونه درگیری احتمالی با اولویت های حفاظت در آینده، کمک کند. به علاوه، تلاش بر این بود تا نتایج این تحقیق، به کسب دانش کافی از بوم شناسی خرچنگ‌های گونه‌های آب‌های شیرین ایران و هم‌چنین درک جنبه‌های مختلف اکولوژیک، زیست‌شناسی و فیزیولوژیک این جانوران، کمک شایانی کرده باشد. بنابراین، هدف از این مطالعه، تولید داده‌های علمی و ارائه اطلاعاتی بود که سیاست‌گذاران را در مورد نحوه حفاظت و به‌ویژه، حفظ گونه های ارزشمند خرچنگ‌های بومی آب‌های شیرین ایران، راهنمایی کند.

## تقدیر و تشکر

در خاتمه، از کمک‌های دلسوزانه اساتید محترم گروه تکثیر و پرورش آبزیان شیلات دانشگاه تهران، به ویژه دکتر کامران رضایی، کمال تشکر و قدردانی را دارم. همین طور از زحمات دکتر علیرضا میرواقفی، در مسیر تحقیق حاضر، صمیمانه، سپاسگزاری می نمایم. همچنین از کارشناسان محترم آزمایشگاه جناب آقای عاشوری از مرکز تکثیر و پرورش آبزیان دانشکده شیلات دانشگاه تهران و مهندس ملک از شرکت آنالیز ویرومد گیلان، کمال تشکر را دارم.

## References ۵. منابع


ABDEL, T.M., Mousa, M.A.A., 2005. Effect of calcium pre-exposure on acute copper toxicity to juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, 80-87.

Ahmadi, M.R., Karami, M., Kazemi, R., 2000. Determination of biomass and production estimation in Aghsht and Kordan rivers. *Natural Resources*, 3-20.

Almeida, J.A., Novelli, E.L.B., Silva, M.D.P., Júnior, R.A., 2001. Environmental cadmium exposure and metabolic responses of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Environmental Pollution 114*(2), 169-175.

Atli, G. and Canli, M., 2007. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 145*(2), 282-287.

Atli, G., Alptekin, Ö., Tükel, S., Canli, M., 2006. Response of catalase activity to $Ag^{+}$, $Cd^{2+}$, $Cr^{6+}$, $Cu^{2+}$ and $Zn^{2+}$ in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 143*(2), 218-224.

Banaee, M. and Ahmadi, K., 2011. Sub-lethal toxicity impact of endosulfan on some biochemical parameters of the freshwater crayfish (*Astacus leptodactylus*). *Research Journal of Environmental Sciences 5*(11), 827-835.

Bandral, M., Gupta, K., Langer, S., 2015. Morphometric studies of freshwater crab, *M. Masoniana* from lower reaches of River Chenab (Gho-Manhasan) Jammu, *J&K* (North India).

Brown, T.C. and Daniel, T.C., 1991. Landscape aesthetics of riparian environments: relationship of flow quantity to scenic quality along a wild and scenic river. *Water Resources Research 27*(8), 1787-1795.

Cheng, W., Liu, C.H., Cheng, C.H., Chen, J.C., 2003. Osmolality and ion balance in giant river prawn *Macrobrachium rosenbergii* subjected to changes in salinity: role of sex. *Aquaculture Research 34*(7), 555-560.

Cooper, G.P. and Manalis, R.S., 1984. Cadmium: effects on transmitter release at the frog neuromuscular junction. *European journal of pharmacology 99*(4), 251-256.

De la Torre, F.R., Salibian, A., Ferrari, L., 2000. Biomarkers assessment in juvenile *Cyprinus carpio* exposed to waterborne cadmium. *Environmental Pollution 109*(2), 277-282.

Demirak, A., Yilmaz, F., Tuna, A.L., Ozdemir, N., 2006. Heavy metals in water, sediment and tissues of *Leuciscus cephalus* from a stream in southwestern Turkey. *Chemosphere 63*(9), 1451-1458.

Dibia, A.E.N., 2006. Effect of biotope difference on aquatic Macrophytes along MiniChindah Stream in Port Harcourt, Rivers State. *M.Sc. Thesis, Rivers State University of Science and Technology Port Harcourt Nigeria*, 120.

Dobson, M., 2004. Freshwater crabs in Africa. *In Freshwater Forum* 21, 3-26.

El-Demerdash, F.M., Elagamy, E.I., 1999. Biological effects in *Tilapia nilotica* fish as indicators of pollution by cadmium and mercury. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 9, 173-186.

Farrokhi, F., Jamili, Sh., Shahidi, M., Machinchian, A., Vosoughi, Gh., 2016. Investigation of the effect of maathion insecticide on the tissue and liver enzymes of Caspian Sea fish (*Rutilus rutilus caspicus*). *Iranian Journal of Fisheries 24*(4), 117-126.

Fırat, Ö. and Kargın, F., 2010. Individual and combined effects of heavy metals on serum biochemistry of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology 58*(1), 151-157.

Garen, A. and Levinthal, C., 1960. A fine-structure genetic and chemical study of the enzyme alkaline phosphatase of *E. coli I.* Purification and characterization of alkaline phosphatase. *Biochimica et biophysica acta 38*, 470-483.

Ghotbuddin, N. and Shirali, B., 2014. Concentration of heavy metals Ni, Cd, Zn in gills, muscle and Hepatopancrases of *Litopenaeus vannamei* shrimp at Chouebdeh Abadan shrimp breeding site. *Journal of Marine Biology 6*(25), 1-8.

Gill, T.S. and Epple, A., 1992. Impact of cadmium on the mummichog *Fundulus heteroclitus* and the role of calcium in suppressing heavy metal toxicity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology 101*(3), 519-523.

Hartnoll, R.G., 1974. Variation in growth pattern between some secondary sexual characters in crabs (*Decapoda Brachyura*). *Crustaceana 27*(2), 131-136.

Hartnoll, R.G., 1978. The determination of relative growth in Crustacea. *Crustaceana*, 281-293.

Huong, D.T.T., Wang, T., Bayley, M., Phuong, N.T., 2010. Osmoregulation, growth and moulting cycles of the giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) at different salinities. *Aquaculture Research 41*(9), e135-e143.

Immanuel, G., 2001. Effects of feeding lipid enriched Artemia nauplii on survival, growth, fatty acids and Stress Resistance of postlarvae *Penaeus indicus*. *Asian Fish Sci 14*, 377-388.

Jamabo, N.A., 2008. Ecology of *Tympanotonus fuscatus* (Linnaeus, 1758) in the mangrove swamps of the Upper Bonny River, Niger Delta, Nigeria. *Ph.D. Thesis, Rivers State University PH*, 340.

Karimpour, M., Hosseinpour, S.N., Haghighi, D., 1992. Evaluation of freshwater crab stocks in Anzali Wetland. *Guilan Province Fisheries Research Center Bandar Anzali*, 26.

Khandan Barani, H. and Miri, M., 2017. Changes in metabolic enzyme levels under the influence of heavy metals zinc and cadmium in *Schizothorax zarudnyi*. *Journal of Aquatic Ecology 6*(4), 39-51.

Klaus, S., Selvandran, S., Goh, J.W., Wowor, D., Brandis, D., Koller, P., Schubart, C.D., Streit, B., Meier, R., Ng, P.K., Yeo, D.C., 2013. Out of Borneo: Neogene diversification of Sundaic freshwater crabs (Crustacea: Brachyura: Gecarcinucidae: Parathelphusa). *Journal of Biogeography 40*(1), 63-74.

Kricka, L.J., 1999. Human anti-animal antibody interferences in immunological assays. *Clinical chemistry 45*(7), 942-956.

Kumar, V., Makkar, H.P.S., Becker, K., 2011. Nutritional, physiological and haematological responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles fed detoxified Jatropha curcas kernel meal. *Aquaculture Nutrition 17*(4), 451-467.

Le Moullac, G. and Haffner, P., 2000. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. *Aquaculture 191*(1-3), 121-131.

Malamy, M.H. and Horecker, B.L., 1964. Purification and crystallization of the alkaline phosphatase of *Escherichia coli*. *Biochemistry 3*(12), 1893-1897.

McNab, B.K., 1971. The structure of tropical bat faunas. *Ecology 52*(2), 352-358.

Mente, E., Deguara, S., Santos, M.B., Houlihan, D., 2003. White muscle free amino acid concentrations following feeding a maize gluten dietary protein in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). *Aquaculture 225*(1-4), 133-147.

Mesgaran Karimi, J., Azari Takami, Gh., Hossein Abbaspour, R., 2012. The effect of aquaculture effluent on the large biodiversity of benthic invertebrates in the Tonekabon River. *Animal Biology 5* (1).

Mohammadian, T., Ghani Motlagh, R., Heydari, A., Mashjour, S., Imam, M., 2020. The effect of digestarum supplementation on growth performance, antioxidant system and some liver enzymes of common carp (*Cyprinus Carpio*). *Journal of Aquaculture 8*(1), 67-80.

Mohapatra, A., Mohanty, R.K., Mohanty, S.K., Dey, S.K., 2010. Carapace width and weight relationships, condition factor, relative condition factor and gonado-somatic index (GSI) of mud crabs (*Scylla spp.*) from Chilika Lagoon, India.

Mojabi, S.A., 1379. Biochemistry in a veterinary clinic. *Noorbakhsh Publications*, 512.

Moss, D.W. and Henderson, R., 1999. Clinical Enzimology. In: Burtis, C.A. and Asheewd, E.R., 1994. Text book of clinical chemistry.3rd Ed. *W.B. Saunders Company Philadelphia*, 617-721.

Naderi, M., Hosseini, S.A., Hedayati, S.A., Pazouki, J., Lastra, M., 2018. Investigation of some morphometric characteristics, growth parameters index in *Ocypode rotundata* Crab (Miers, 1882) on the southwest coast of Qeshm Island. *Scientific Journal of Aquatic Ecology 8*(2), 61-73.

Nasiri Tusi, M., Ajal Louiian, Z., Armandei, M., Alikhani, R., Khodadadegi, M., Mortazavi, S.H., Jahan, S., Daneshparvar, A., 2013. Interpretation of liver enzyme tests. *Office of Education Development of Medicine, Tehran University of Medical Sciences*, 5-7.

Öner, M., Atli, G., Canli, M., 2008. Changes in serum biochemical parameters of freshwater fish *Oreochromis niloticus* following prolonged metal (Ag, Cd, Cr, Cu, Zn) exposures. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal 27*(2), 360-366.

Pratt, D.S. and Kaplan, M.M., 2000. Evaluation of abnormal liver-enzyme results in asymptomatic patients. *New England Journal of Medicine 342*(17), 1266-1271.

Qalandarzadeh, F.S., Rezaei Tavabeh, K., Shirazi, H.S.M., Samadi, K., 2020. Investigation of changes in the concentrations of heavy metals cadmium, chromium and zinc in water and sediment and determination of bioavailability index (Z) in Karaj river. *Fisheries 73* (2), 199-212.

Qasemzadeh, A. and Bahr Kazemi, M., 2021. The effect of calcium carbonate pretreatment at different temperatures on reducing the toxicity of copper sulfate in common carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758). *Applied Biology 33*(4).

Rahbar Hashemi, M.M., Ashournia, M., Rahimipour, M.A. and Modaberi, H., 2013. Survey of heavy metal (Copper, Iron, Lead, Cadmium, Zinc and Nickel) concentrations and their effects on the water quality of Anzali wetland. *Caspian Journal of Environmental Sciences 11*(1), 11-18.

Rajamanickam, V., Muthuswamy, N. 2008. Effect of heavy metals induced toxicity on metabolic biomarkers in common carp, *Cyprinus Carpio*. *Maejo International Journal of Science and Technology* 2, 192-200.

Rezaei tavabe, K. and Rafiei, Gh., 2015. Investigation of the effect of different concentrations of vitamin C and total hardness in storage tank water on reproductive indices of large freshwater shrimp breeders (*Macrobrachium rosenbergii*) in RAS. *Fisheries 68*(4), 533-544.

Sadiq, M., 1992. Toxic metal chemistry in marine environments. *Marcel Dekker New York*, 390.

Segner, H., Storch, V., Reinecke, M., Kloas, W., Hanke, W., 1995. A tabular overview of organogenesis in larval turbot (*Scophthalmus maximus L.*). *In ICES Marine Science Symposia* 201, 35-39.

Shields, J.D., Okazaki, R.K., Kuris, A.M., 1991. Fecundity and the reproductive potential of the yellow rock crab *Cancer anthonyi*. *Fishery Bulletin 89*(2), 299-305.

Song, Y.F., Luo, Z., Chen, Q.L., Liu, X., Liu, C.X., Zheng, J.L., 2013. Protective effects of calcium pre-exposure against waterborne cadmium toxicity in *Synechogobius hasta*. *Archives of environmental contamination and toxicology 65*(1), 105-121.

Sreenivasan, R.S., Moorthy, P.K., Deecaraman, M., 2010. Variations in the enzyme activity of gills and hemolymph in cypermethrin, a pesticide treated fresh water female field crab, *Spiralothelphusa hydrodroma* (Herbst). *Int J Sustainable Agric 2*, 10-15.

Takasusuki, J., Araujo, M.R.R., Fernandes, M.N., 2004. Effect of water pH on copper toxicity in the neotropical fish, *Prochilodus scrof*(Prochilodondidae). *Bulletin of environmental contamination and toxicology 72*(5), 1075-1082.

Thirumavalavan, R., 2010. Effect of cadmium on biochemical parameters in fresh water fish, *Oreochromis mossambicus*. *Asian Journal of Science and Technology* 5, 100-104.

Vaglio, A. and Landriscina, C., 1999. Changes in liver enzyme activity in the Teleost *Sparus auratain* response to cadmium intoxication. *Ecotoxicology and Environmental Safety 43*(1), 111-116.

Velmurugan, B., Selvanayagam, M., Cengiz, E.I., Uysal, E., 2008. Levels of transaminases, alkaline phosphatase, and protein in tissues of *Clarias gariepienus* fingerlings exposed to sublethal concentrations of cadmium chloride. *Environmental Toxicology: An International Journal 23*(6), 672-678.

Vogan, C.L. and Rowley, A.F., 2002. Effects of shell disease syndrome on the haemocytes and humoral defences of the edible crab. *Cancer pagurus*. *Aquaculture 205*(3-4), 237-252.

Watanabe, T., Kiron, V., Satoh, S., 1997. Trace minerals in fish nutrition. *Aquaculture 151*(1-4), 185-207.