بررسی اثرات فلز روی (Zn) بر برخی شاخص‌های خونی ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*)

مهزاد شکوری[1*]، سورنا ابدالی[2]، حسین نگارستان[3] و علی حلاجیان[4]

۱ و۲- گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال
۳- گروه شیلات،دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال
۴- کارشناس موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر، رشت

تاریخ دریافت: ۹۱/۱/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۱/۸/۳۰

چکیده

هدف از این تحقیق بررسی اثرات سمی فلز روی بر شاخص‌های خونی ماهی فیتوفاگ می‌باشد. پس از سازگارسازی نمونه‌های ماهی، تعداد ۱۳۵عدد ماهی فیتوفاگ پرورشی با طول متوسط ۱±۱۳سانتی متر و وزن متوسط ۱۰±۵۰ گرم در گروه شاهد و تیمارهای ۵ و ۱۰ میلی گرم در لیتر نیترات روی Zn(NO3)2، در ۹ دستگاه آکواریوم هر یک به ظرفیت ۹۰ لیتر قرار داده شدند. نمونه‌برداری خون از سیاهرگ دمی، ۳ عدد ماهی از هر آکواریوم (هر تیمار با ۳ تکرار)، به صورت کاملا تصادفی هر ۱۲ ساعت یکبار تا ۹۶ ساعت صورت گرفت. نتایج نشان داد که درصد هماتوکریت Hematocrit (HTC) از ۳/۴±۲۴/۳ درصد در تیمار شاهد به طور معنی داری به ۴/۴±۳۸/۳ درصد در۲۴ ساعت در غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر افزایش یافت(P<۰/۰۵). و حداکثر میزان آن در غلظت ۵ میلی گرم در لیتر در ۹۶ ساعت برابر با ۲/۳± ۴۳/۳ درصد بود که نسبت به شاهد افزایش معنی داری نشان داد(P<۰/۰۵). حجم متوسط سلولی Mean cell volium (MCV) از ۵/۳±۱۰۸/۱ فمتولیتر در تیمار شاهد افزایش معنی داری به ۱±۴۴۴/۱ فمتولیتر در تیمار ۹۶ ساعت در غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر نشان داد(P<۰/۰۵). و حداکثر میزان آن در غلظت ۵ میلی گرم در لیتر در ۹۶ ساعت به ۱۵۷/۴±۳۳/۵ فمتولیتر رسید. میانگین هموگلوبین یاخته قرمز Medial cell hemoglobin (MCH) از(۲۰/۶±۳۰۲/۶ گرم در دسی لیتر) در تیمار شاهد به (۳۰±۸۵۸/۹ گرم در دسی لیتر) در تیمار ۹۶ ساعت در غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر افزایش یافت(P<۰/۰۵). و در ۹۶ ساعت در غلظت ۵ میلی گرم در لیتر برابر با (۱۹۵/۵±۶۰۸/۴ گرم در دسی لیتر) مشاهده شد که اختلاف معنی داری با شاهد و دوز ۱۰ میلی گرم در لیتر نشان نداد(P>۰/۰۵). تعداد گلبولهای سفید White blood cell(WBC) ابتدا کاهش و در ۹۶ ساعت بطور معنی داری افزایش یافت(P<۰/۰۵). بطوریکه حداقل میزان آن در تیمار ۵ میلی گرم در لیتر در ۷۲ ساعت برابر با (۱۲۵۸±۴۰۰۰ عدد در هر میلی متر مکعب خون) و حداکثر میزان آن برابر (۴۵۰۰±۶۵۵۰۰ عدد در هر میلی متر مکعب خون) در تیمار با غلظت ۵ میلی گرم در لیتر در زمان ۹۶ ساعت بود. تعداد گلبولهای قرمز Red blood cell (RBC) از (۲۱۶۹۷۴۱/۱ ± ۲۲۳۶۶۶۷ عدد در هر میلی متر مکعب خون) درتیمار شاهد، به (۲۸۸۶۷/۵±۷۰۰۰۰۰ عدد در هر میلی متر مکعب خون) در ۹۶ ساعت در غلظت ۱۰ میلی گرم

* نگارنده پاسخگو: mahzadshakoori@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

در لیتر کاهش یافتند (P<۰/۰۵). بطوریکه در ۱۲ ساعت در تیمار ۵ میلی گرم در لیتر برابر با (۵۵۰۷۵/۷ ±۱۵۴۰۰۰۰ عدد در هر میلی متر مکعب خون)،که با شاهد و غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر اختلاف معنی داری مشاهده نشد(P>۰/۰۵). با توجه به نتایج بدست آمده پارامترهای خونی فاکتورهای حساس در پایش سمیت روی و استرس ناشی از آن خصوصاً در غلظتهای حاد(کشنده) می‌باشد.

واژگان کلیدی

روی، شاخص‌های خونی، فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*)

مقدمه

فلزات سنگین بطور طبیعی در سطوح مختلف زمین و آب‌های سطحی وجود دارند، اگر میزان این فلزات بیشتر از میزان طبیعی شود با توجه به ثبات شیمیایی، تجزیه پذیری ضعیف و داشتن قدرت تجمع زیستی در بدن موجودات زنده به سرعت تبدیل به آلاینده‌های سمی می‌شوند. بطوریکه امروزه فلزات سنگین جزو مهم ترین آلاینده‌های منابع آبی کره زمین بشمار می‌ورود (Olojo *et al*., 2005). آلاینده‌های مختلف به اکوسیستم‌های آبی می‌توانند عاملی تنش‌زا برای موجودات آبزی محسوب گردد که واکنش موجودات به این عوامل تنش زا بصورت پاسخ‌های رفتاری، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی می‌باشد (Iwama *et al*., 2004). برخی از پارامترهای خونی به عنوان شاخص آلودگی فلزات در محیط آبی محسوب می‌شوند

(Basa & Usha 2003; Witeska., 2003; Shah & Altindag.,2005). اندازه گیری پارامترهای خونی به عنوان یک ابزار تشخیصی جهت پایش زیستی تغییرات پاتوفیزیولوژیکی حاد و مزمن از قبیل تغذیه، کیفیت آب و بیماری کاربرد دارند (De Pedro *et al*., 2005). مراکز خون ساز یکی از مهم ترین بافت‌های جانوری است که تحت تاثیر سموم دچار پیامدها و عوارض نامطلوبی می‌گردد (بنایی و همکاران،۱۳۹۰). درصد هماتوکریت و پارامترهای وابسته به آنها عمومی ترین شاخص‌های خون شناسی جهت تشخیص کم خونی در ماهیان هستند که به تغذیه، سن و بیماری وابسته می‌باشد (Tavares-Dias & Moraes., 2007; Satheeshkumar *et al*., 2010). پارامترهای میانگین حجم یاخته قرمز Mean cell volium(MCV)، میانگین هموگلوبین یاخته قرمز Mean cell hemoglobin (MCH) و میانگین غلظت هموگلوبین خون Mean cell hemoglobin concentration (MCHC) عوامل وابسته به تعداد یاخته‌های قرمز، درصد هماتوکریت و غلظت هموگلوبین خون بوده، تابع تغییرات آنها هستند. وضعیت تغذیه ای، سن و شرایط محیطی، فاکتورهای اصلی پاسخگویی به تغییرات شاخص‌های یاخته‌های خونی در ماهیان می‌باشند (Bani& Haghi Vayghan., 2011 ; Tavares-Dias & Moraes., 2007).

اندازه گیری پارامترهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیک خون می‌تواند بعنوان یک ابزار تشخیصی در سم شناسی و پایش زیستی بکار رود (Xiaoyan *et al*., 2009; Cavas *et al*., 2005; Hoyle *et al*., 2007; Carvalho & Fernandes, 2006).

تغییر در میزان و سطوح این پارامترها می‌تواند منعکس کننده پاسخ‌های ماهیان به تغییرات در محیط زندگی آنها باشد (Satheeshkumar *et al*.,2010). پارامترهای هماتولوژیک در ماهیان ممکن است تحت تأثیر عوامل فیزیولوژیکی و همچنین عوامل خارجی از جمله دمای آب، فصل، استرس‌ها، غذا، انواع آلودگی‌ها و بیماری‌ها و کیفیت‌های زیست محیطی دچار تغییر شوند (Sandströ m., 1989 ; Oshode *et al*., 2008; Alen., 1989; Javed., 2003). روی عنصری است که در مقادیر اندک برای ماهی ضروری است و به عنوان کاتالیزور در ساختار اکثر آنزیم‌های فعال درسوخت و ساز انرژی، فعالانه نقش دارد (جلالی جعفری و آقا زاده مشکی،۱۳۸۶). روی به عنوان یک ریزمغذی به منظور افزایش تولید

Archive of SID

www.SID.ir

پلانکتون‌ها و در نتیجه افزایش رشد ماهی به آب استخرها اضافه می‌شود. بنابراین تاثیر مصرف زیاد فلز روی از این نظر هم حائز اهمیت است (Adhikari & Ayyappan., 2004).

روی درطبیعت به ندرت به صورت یون‌های آزاد وجود دارد و اغلب در ترکیب با سایر عناصر معدنی یافت می‌شود. این عنصر در مقادیر بالاتر از نیاز زیستی برای آبزیان سمی است. افزایش سطوح روی در اکوسیستم‌های آبی می‌تواند بر اثر تخلیه پساب‌های صنعتی و ورود روی از طریق اتمسفر، شستشوی فاضلاب‌های محلی و مواد زائد فعالیت‌های معدنی، آفت کش‌ها و فرآیندهای گالوانیزاسیون باشد (Yim & Kim., 2006; Obasohan *et al*., 2008).

ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*) یکی از مهمترین گونه‌های پرورشی ماهیان گرمابی می‌باشد. این گونه به واسطه رشد سریع، قابلیت سازگاری و گوشت لذیذ از گونه‌های غالب در ترکیب ماهیان گرمابی پرورشی به شمار می‌رود (نظری، ۱۳۷۵). از آنجا که اطلاعات کافی در مورد اثر فلز روی بر گونه فیتوفاگ وجود ندارد، و با توجه به حضور فلز روی در آب مزارع پرورشی و مشکلات ناشی از آن (جلالی جعفری و آقازاده مشکی،۱۳۸۶)، این مطالعه با هدف بررسی اثرات فیزیولوژیکی فلز سنگین روی بر برخی از فاکتورهای سیتولوژیکی خون ماهی فیتوفاگ به انجام رسید.

مواد و روش کار

طرح مزبور در بهار سال ۱۳۹۰در بخش‌های فیزیولوژی و بیوشیمی انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان رشت به انجام رسید. برای مطالعه اثرات آلایندگی در غلظتهای مختلف فلز روی تعداد ۱۳۵ عدد ماهی فیتوفاگ جوان با طول متوسط ۱±۱۳سانتی متر و وزن متوسط ۱۰±۵۰ گرم از مرکز پرورش ماهیان گرمابی کوئی کارپ واقع در ۱۰ کیلومتری جاده تهران –رشت خریداری و به موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر رشت واقع در جاده سنگر منتقل شدند. پس از سازگارسازی، ماهیان بر اساس تیمارهای مورد نظر در ۹ آکواریوم ۱۰۰ لیتری حاوی ۹۰ لیتر آب چاه (بدون خروجی و مجهز به هوادهی) قرار داده شدند. در هر آکواریوم تعداد ۱۵ عدد ماهی فیتوفاگ قرار داده شد. دمای آب در طول پژوهش برابر با ۱±۲۴ درجه سانتی گراد و میانگین pH برابر با ۰/۲±۸ ، و میانگین میزان اکسیژن محلول آب در طول پژوهش برابر با ۵/۲ میلی گرم در لیتر بود. در مجموع ۳ تیمار، شامل تیمار شاهد و تیمارهای با غلظت ۵ و ۱۰ میلی گرم در لیتر نیترات روی (Zn(No 3)2) و هر تیمار با سه تکرار در نظر گرفته شد. غلظت‌های مورد نظر نیترات روی بر اساس جرم مولکولی و به روش جرمی _ حجمی تعیین شد، بطوریکه ابتدا کل مقدار سم مورد نیاز برای انجام طرح محاسبه و پس از حل کردن ۴ گرم از فلز روی در حجم معینی از آب مصرفی، محلول ذخیره (Stock) تهیه گردید. سپس بر اساس غلظت‌های مورد نظر، حجم معینی از این محلول را برداشته و به آکواریوم‌ها اضافه گردید. جهت محاسبه غلظت سم مورد نیاز از فرمول C1V1=C2V2 استفاده شد (Hovis *et al*., 2005).

V1: حجم یک لیتر آب C1: میزان کل روی مورد نیاز بر حسب گرم

V2: حجم آب موجود در هر آکواریوم C2: غلظت مورد نیاز روی که در این تحقیق ۵ و۱۰ میلی گرم در لیتر است

خون‌گیری از ماهیان در هر ۳ گروه شاهد و تیمار ۵ و۱۰میلی گرم در لیتر به صورت کاملا تصادفی، به تعداد ۳ عدد از هر آکواریوم (هر تیمار با ۳ تکرار)، هر ۱۲ ساعت یکبار تا ۹۶ ساعت با استفاده از سرنگ‌های هپارینه با حجم ۲ میلی لیتر از سیاهرگ دمی (Caudal vein) و از زیر باله مخرجی انجام شد. پس از خونگیری، از نمونه‌ها با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه پلاسما تهیه گردید. (کاظمی و همکاران،۱۳۸۹). جهت شمارش گلبول‌های قرمز به کمک ملانژور قرمز و محلول رقیق کننده هایم (Hiem) و لام هموسیتومتر و شمارش گلبول‌های سفید توسط ملانژور سفید و محلول رقیق کننده ریس و شمارش در هر دو توسط لام هموسیتومتر با لنز ۴۰ توسط میکروسکوپ

Archive of SID

www.SID.ir

نوری انجام شد (Maheswaran *et al*., 2008; Shah & Altindag., 2005). در شمارش افتراقی گلبول‌های سفید از هر ماهی جهت تهیه گسترش خونی ۳ لام تهیه گردید. گسترش‌های تهیه شده بعد از فیکس شدن با متانل با محلول رنگی گیمسا ۱۰٪ به مدت ۲۰ دقیقه رنگ آمیزی سپس با آب شستشو و خشک گردید، وتوسط لنز ۴۰ میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت (کاظمی وهمکاران،۱۳۸۹). برای اندازه گیری درصد هماتوکریت دستگاه میکروسانتریفیوژ مورد استفاده قرار گرفت و به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۷۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ انجام گردید و درصد هماتوکریت با استفاده از خط کش‌های مخصوص، خوانده شد. غلظت هموگلوبین خون به روش رنگ سنجی و جذب هموگلوبین بوسیله دستگاه اسپکتوفتومتر(مدل UV/VIS – ۶۵۰۵، شرکت Jenway، ساخت انگلیس) و کیت پارس آزمون، با طول موج ۵۴۰ نانومتر ثبت گردید و مقدار هموگلوبین بر حسب گرم در دسی لیتر محاسبه گردید(کاظمی و همکاران،۱۳۸۹). شاخص یاخته‌های قرمز (MCV، MCHC و MCH) که برای توصیف اندازه یاخته‌ها و میزان هموگلوبین آنها بکارمی رود و از شمارش یاخته‌های قرمز، غلظت هموگلوبین و هماتوکریت به دست می‌آید از روابط مربوط محاسبه گردید (Penev *et al*., 2007).

آمار عمومی و توصیفی برای بیان حداقل،حداکثر، میانگین، انحراف معیار، واریانس و خطای استاندارد مربوط به شاخص‌های خونی مورد استفاده قرار گرفت. داده‌ها در نرم افزار میکروسافت Excel ثبت و برای بررسی وضعیت نرمال بودن داده‌ها از آزمون (کولموگرف- اسمیرنف) بهره گرفته شد. و با استفاده از نرم افزار آماری SPSS 14.0 تحت ویندوز و آنالیز آماری به روش آنالیز واریانس یک طرفه (One - way ANOVA) انجام و نتایج بصورت Mean ± SE ارائه گردید.(پور غلام و همکاران،۱۳۸۹).

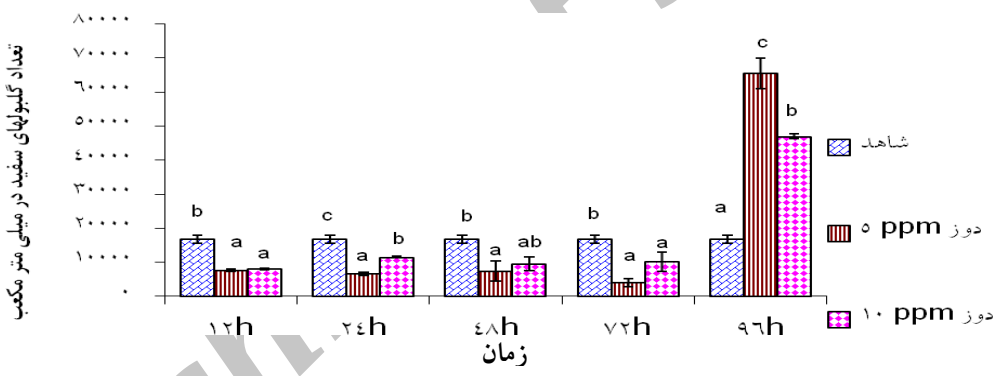
نتایج

نتایج تحقیق نشان داد که متوسط تعداد گلبول‌های سفید (WBC) در تیمارهای ۵ و ۱۰ میلی گرم در لیتر تا ۷۲ ساعت نسبت به شاهد کاهش یافت ($P < ۰/۰۵$). ولی در مدت ۹۶ ساعت تعداد گلبول‌های سفید با افزایش معنی داری نسبت به شاهد همراه بود($P < ۰/۰۵$). بطوریکه حداقل میزان آن برابر (۱۲۵۸±۴۰۰۰ عدد در هر میلی متر مکعب خون) در زمان ۷۲ ساعت در مجاورت با غلظت ۵ میلی گرم در لیتر مشاهده گردید و حداکثر میزان آن برابر (۴۵۰۰±۶۵۵۰۰ عدد در هر میلی متر مکعب خون) در تیمار با غلظت ۵ میلی گرم در لیتر در زمان ۹۶ ساعت بود (شکل ۱). متوسط تعداد گلبول‌های قرمز (RBC) در هر میلی متر مکعب خون در کلیه زمان‌ها تا ۹۶ ساعت نسبت به شاهد کاهش معنی داری را نشان دادند ($P < ۰/۰۵$). حداقل تعداد گلبول‌های قرمز برابر با (۲۸۸۶۷/۵±۷۰۰۰۰۰ عدد در هر میلی متر مکعب خون در تیمار با غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر نیترات روی در زمان ۹۶ ساعت و حداکثر تعداد آنها در تیمار شاهد برابر با (۲۱۶۹۷۴/۱±۲۲۳۶۶۶۷) عدد در هر میلی متر مکعب خون مشاهده گردید(شکل۲). نتایج شمارش افتراقی گلبول‌های سفید نشان داد که در تمامی زمان‌ها و غلظت‌ها میانگین درصد لنفوسیت، مونوسیت و نوتروفیل اختلاف معنی داری($P>۰/۰۵$) با شاهد ندارند (شکل‌های۳،۴و۵). میانگین درصد هماتوکریت خون در زمان‌های متفاوت دارای نوسان بود. بطوریکه بین تیمارهای شاهد، ۵ و ۱۰ میلی گرم بر لیتر در۱۲، ۴۸ و۷۲ ساعت اختلاف معنی داری مشاهده نگردید($P>۰/۰۵$). ولی در ۲۴ و ۹۶ ساعت افزایش معنی داری نسبت به شاهد مشاهده شد($P<۰/۰۵$). بطوریکه حداقل میزان آن(۱/۵± ۱۹/۶درصد) در تیمار ۱۰ میلی گرم در لیتر در ۷۲ ساعت و حداکثر میزان آن (۴/۴± ۳۸/۳درصد) در تیمار با غلظت۱۰ میلی گرم در لیتر در زمان ۲۴ ساعت بود (شکل ۶). میانگین تغییرات حجم متوسط سلولی (MCV) در ۱۲، ۲۴ و ۹۶ ساعت نسبت به شاهد افزایش معنی داری را نشان داد($P<۰/۰۵$). بطوریکه حداقل میزان آن در تیمار شاهد (۵/۳±۱۰۸/۱ فمتولیتر) و حداکثر میزان آن در ۹۶ ساعت در غلظت ۱۰ میلی گرم بر لیتر نیترات روی(۱±۱/ ۴۴۴ فمتولیتر) بود اما در ۴۸ و ۷۲ ساعت اختلاف معنی داری مشاهده نشد($P>۰/۰۵$)(شکل۷).

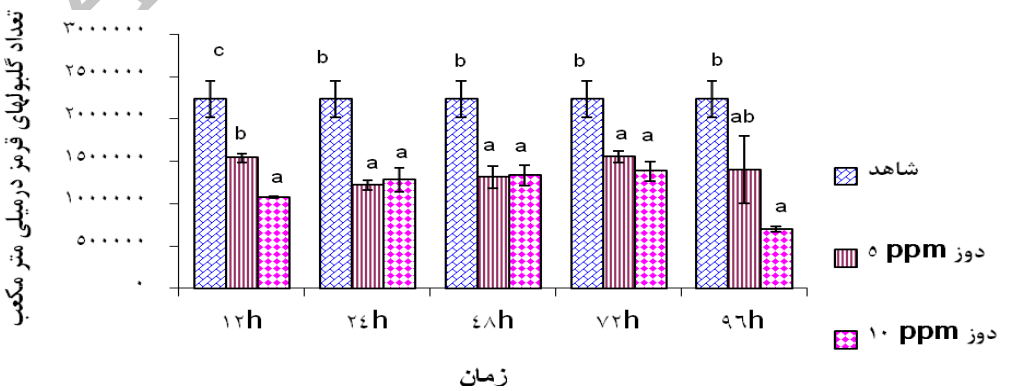
Archive of SID

www.SID.ir

میانگین غلظت هموگلوبین خون (MCHC) در ۱۲، ۴۸، ۷۲، ۹۶ ساعت اختلاف معنی داری بین تیمارها مشاهده نشد(P>۰/۰۵). ولی در ۲۴ ساعت در تیمارهای ۵ و ۱۰ با تیمار شاهد کاهش معنی داری مشاهده شد(P<۰/۰۵). اما تیمارهای ۵ و ۱۰ با یکدیگر اختلاف معنی داری نشان ندادند(P>۰/۰۵). بطوریکه حداقل درصد آن در تیمار ۱۰ میلی گرم در لیتر در ۲۴ ساعت برابر با (۱۱/۲±۱/۴) و حداکثر درصد آن در تیمار ۱۰ میلی گرم در لیتر در ۱۲ ساعت برابر با (۳۲/۷±۴/۹) مشاهده شد(شکل ۸). میانگین هموگلوبین گلبول قرمز خون (MCH) در ۲۴ و ۷۲ ساعت اختلاف معنی داری بین تیمارها مشاهده نشد(P>۰/۰۵). ولی در۱۲و۴۸ و۹۶ ساعت افزایش معنی داری مشاهده شد(P<۰/۰۵).(شکل۹). (MCH) در ۱۲ ساعت در تیمار ۵ میلی گرم در لیتر کمتر از شاهد و در تیمار۱۰ بیشتر از شاهد مشاهده گردید و شاهد با تیمار ۵ اختلاف معنی داری نشان نداد، اما با تیمار ۱۰ اختلاف معنی داری نشان داد (P<۰/۰۵). همچنین تیمار ۵ و ۱۰ با هم اختلاف معنی داری نشان دادند. در زمان‌های ۲۴ تا ۹۶ ساعت اختلاف معنی داری بین تیمارها مشاهده نشد(P>۰/۰۵). بطوریکه حداقل میزان آن در تیمار شاهد برابر با (۲۰/۶±۳۰۲/۱) گرم در دسی لیتر و حداکثر میزان آن در ۹۶ ساعت در غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر برابر با (۳۰±۸۵۸/۹) گرم در دسی لیترمشاهده شد (شکل۹).

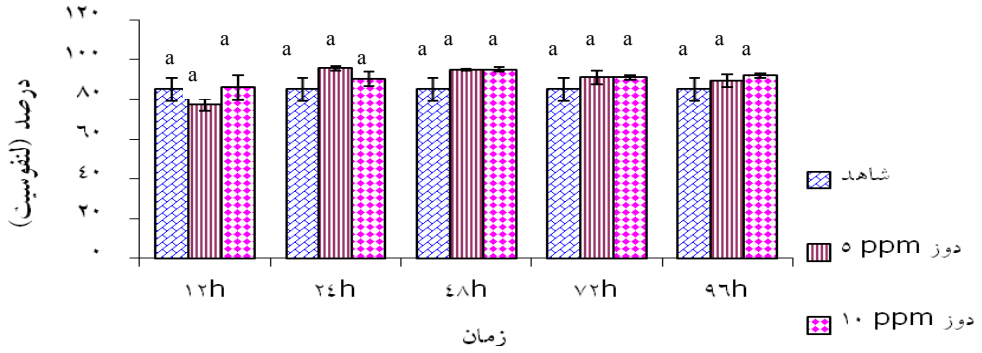


شکل۱- میانگین تعداد گلبول‌های سفید خون (*Hypophthalmichthys molitrix*) تحت اثر غلظتهای متفاوت فلز روی در گروه‌های مورد مطالعه.(حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار است) (آنتنک‌ها نشان دهنده انحراف معیار هستند) Mean±SE

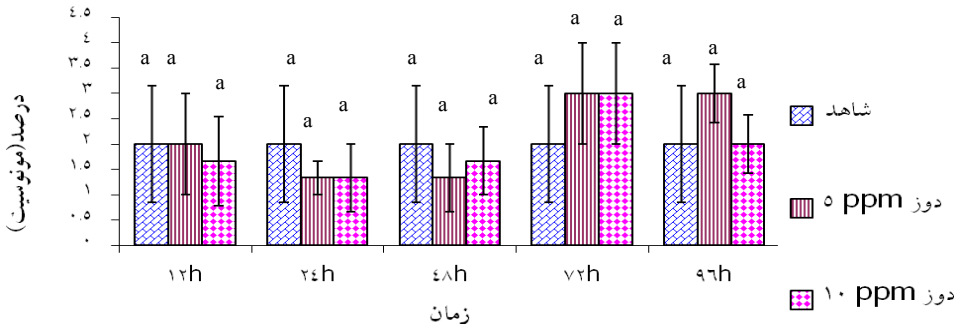


شکل۲- میانگین تعداد گلبول‌های قرمز خون (*Hypophthalmichthys molitrix*) تحت اثر غلظتهای متفاوت فلز روی در گروههای مورد مطالعه.(حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار است) (آنتنک‌ها نشان دهنده انحراف معیار هستند) Mean±SE

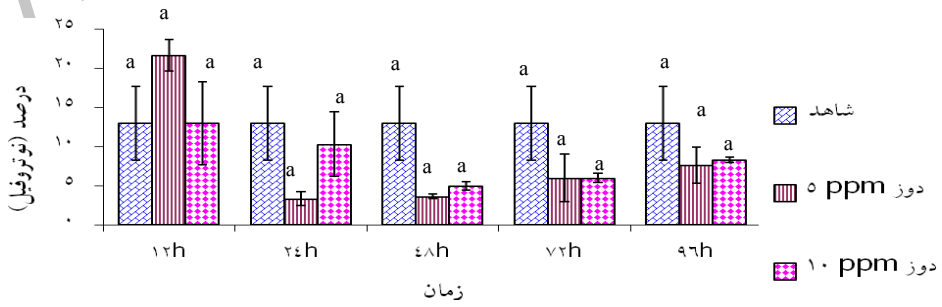
www.SID.ir



شکل۳- میانگین درصد لنفوسیت خون(*Hypophthalmichthys molitrix*) تحت اثر غلظت‌های متفاوت فلز روی در گروه‌های مورد مطالعه.(حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار است) (آنتنکها نشان‌دهنده انحراف معیار هستند) Mean±SE

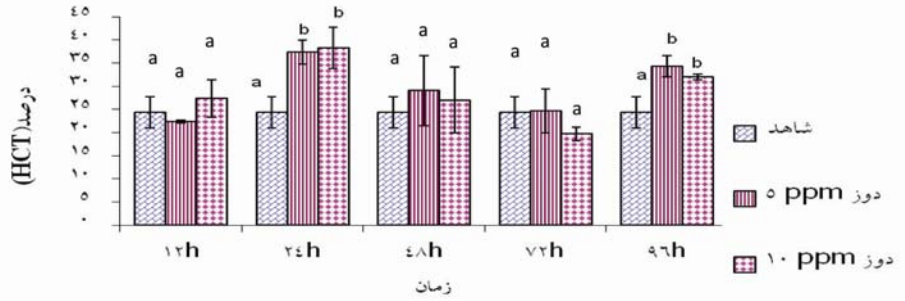


شکل۴- میانگین درصد مونوسیت خون (*Hypophthalmichthys molitrix*) تحت اثر غلظتهای منفاوت فلز روی در گروههای مورد مطالعه .(حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار است) (آنتنکها نشان دهنده انحراف معیار هستند) Mean±SE

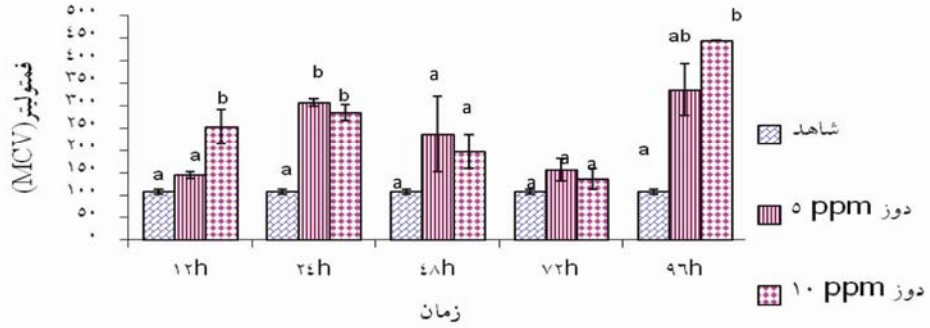


شکل۵- میانگین درصد نوتروفیل خون (*Hypophthalmichthys molitrix*) تحت اثر غلظت های متفاوت فلز روی در گروههای متفاوت مورد مطالعه .(حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار است) (آنتنکها نشان دهنده انحراف معیار هستند) Mean±SE

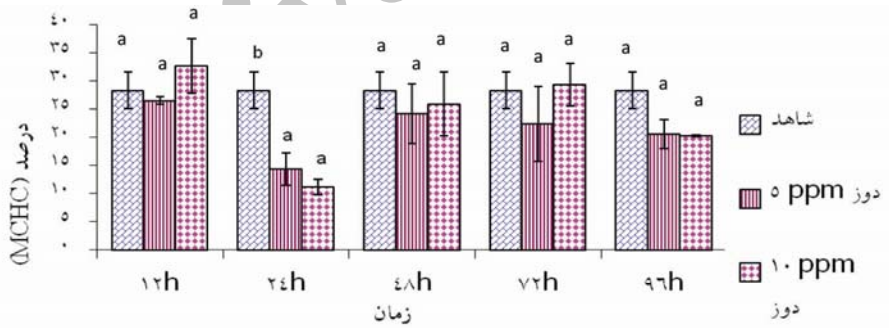
www.SID.ir



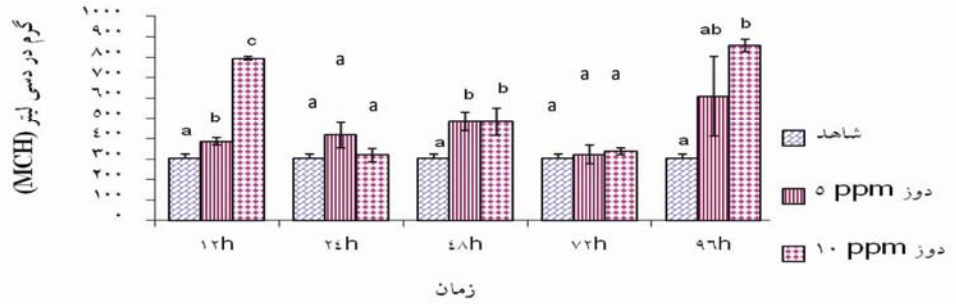
شکل۶- میانگین درصد هماتوکریت پلاسمای خون (*Hypophthalmichthys molitrix*) تحت اثر غلظتهای متفاوت فلز روی در گروههای مورد مطالعه .(حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار است) (آنتنکها نشان دهنده انحراف معیار هستند) Mean±SE



شکل۷- حجم متوسط سلولی (MCV) خون (*Hypophthalmichthys molitrix*) تحت اثر غلظتهای متفاوت فلز روی در گروههای مورد مطالعه (حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار است) (آنتنکها نشان دهنده انحراف معیار هستند) Mean±SE

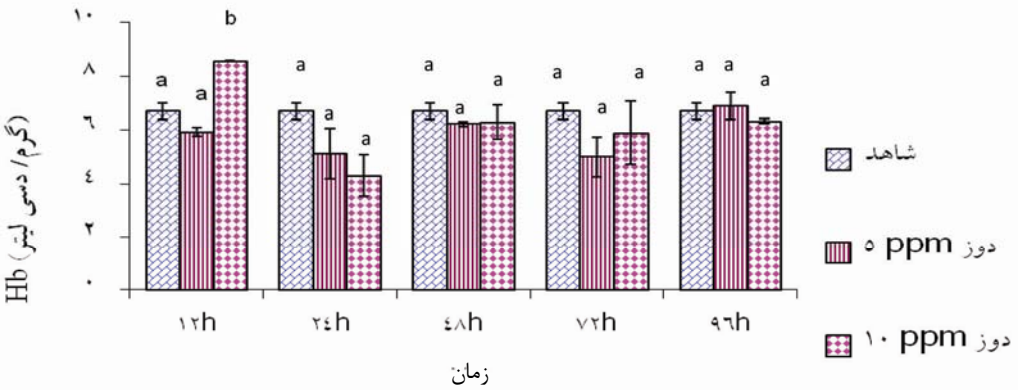


شکل۸- میانگین غلظت هموگلوبین خون (MCHC) (*Hypophthalmichthys molitrix*) تحت اثر غلظتهای متفاوت فلز روی در گروههای مورد مطالعه.(حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار است) (آنتنکها نشان دهنده انحراف معیار هستند) Mean±SE



شکل۹- میانگین هموگلوبین گلبول قرمز خون (MCH)(*Hypophthalmichthys molitrix*) تحت اثر غلظتهای متفاوت فلز روی در گروههای مورد مطالعه .(حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار است) (آنتنکها نشان دهنده انحراف معیار هستند) Mean±SE

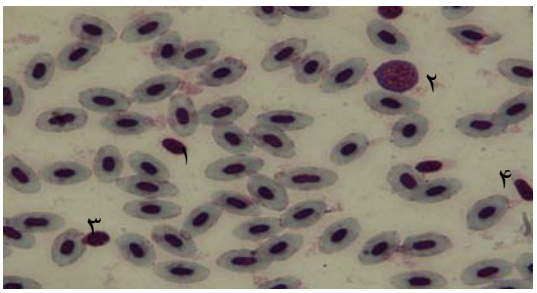
www.SID.ir



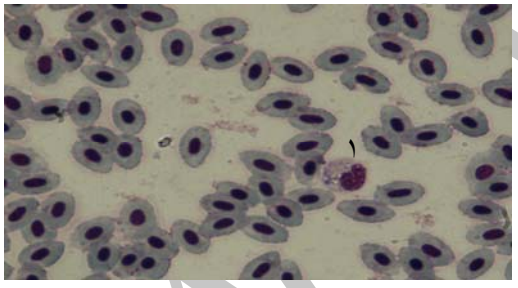
شکل۱۰- تغییرات سطوح هموگلوبین خون (*Hypophthalmichthys molitrix*) تحت اثر غلظتهای متفاوت فلز روی در گروههای مورد مطالعه.(حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار است) (آنتنکها نشان دهنده انحراف معیار هستند) Mean±SE

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(شکل ۱).

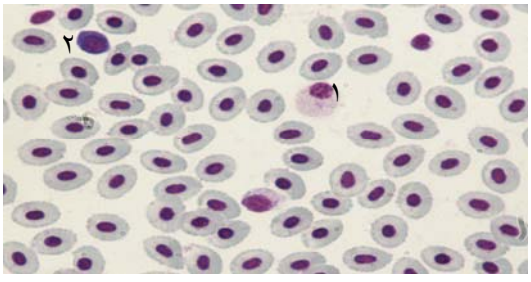
همچنین کاهش لکوسیتها در تیمارهای ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر در زمانهای ۱۲ تا ۹۶ ساعت قابل مشاهده است (شکلهای ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶). تورم نسبی گلبولهای قرمز در تیمارهای ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر در ۲۴ ساعت مشاهده گردید (شکل ۱۳)، که این امر می‌تواند به علت تأثیر فلز روی باشد. همچنین تجمع لنفوسیتها در تیمارهای ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر در ۷۲ ساعت (شکل ۱۵) و تجمع ترومبوسیتها در تیمارهای ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر در زمان ۹۶ ساعت مشاهده گردید (شکل ۱۶)، که این امر نیز می‌تواند به علت تأثیر فلز روی باشد.



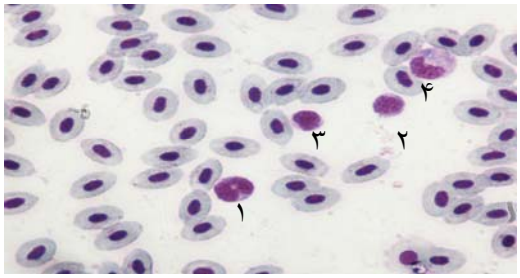
شکل۱۱- سلول‌های خونی مشاهده شده در تیمار شاهد.۱گلبول قرمز، ۲ لنفوسیت، ۳ و ۴ ترومبوسیت (بزرگنمایی 100 X)



شکل۱۲- لکوسیت‌های مشاهده شده در تیمارهای ۵ و ۱۰ میلی گرم در لیتر ۱۲ ساعت ۱- نوتروفیل (بزرگنمایی 100 X)



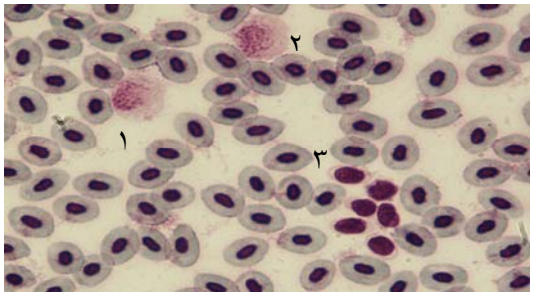
شکل۱۳- لکوسیت‌های مشاهده شده در تیمارهای ۵ و ۱۰ میلی گرم در لیتر در۲۴ ساعت(تورم گلبولهای قرمز) ۱- نوتروفیل، ۲-لنفوسیت (بزرگنمایی 100 X)



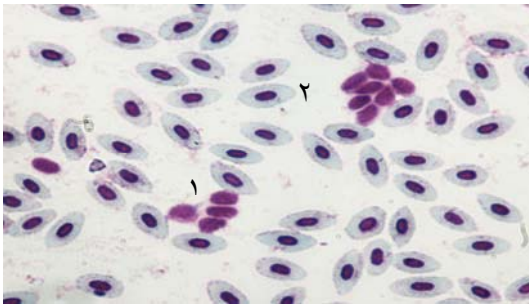
شکل۱۴- لکوسیت‌های مشاهده شده در تیمارهای ۵ و ۱۰ میلی گرم در لیتر در ۴۸ ساعت۱- منوسیت، ۲ و۳- لنفوسیت ۴- نوتروفیل (بزرگنمایی 100 X)

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱۵- لکوسیت‌های مشاهده شده در تیمارهای ۵ و ۱۰ میلی گرم در لیتر در۷۲ ساعت۱و ۲- ائوزینوفیل(آسیب یافته)، ۳- تجمع لنفوسیت (بزرگنمایی 100 X)



شکل۱۶- لکوسیت‌های مشاهده شده در تیمارهای ۵ و ۱۰ میلی گرم در لیتر در ۹۶ ساعت ۱و ۲- تجمع ترومبوسیت‌ها (بزرگنمایی 100 X)

بحث و نتیجه‌گیری

در این پژوهش غلظتهای متفاوت فلز روی در زمان‌های مختلف بر برخی از شاخص‌های خونی ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichtys molitrix*) مطالعه شد. نتایج مطالعه نشان داد که، تعداد گلبول‌های سفید بدلیل حضور فلز سنگین روی و استرس ایجاد شده تا زمان ۷۲ ساعت کاهش، ولی در ساعت ۹۶ تعداد آنها نسبت به سایر تیمارهای مورد بررسی بطور معنی داری افزایش یافت($P<۰/۰۵$). بطوریکه حداقل میزان آن برابر (۱۲۵۸±۴۰۰۰ عدد در هر میلی متر مکعب خون) در زمان ۷۲ ساعت در مجاورت با غلظت ۵ میلی گرم در لیتر مشاهده گردید. حداکثر میزان آن نیز برابر (۴۵۰۰±۶۵۵۰۰ عدد در هر میلی متر مکعب خون) در تیمار با غلظت ۵ میلی گرم در لیتر در زمان ۹۶ ساعت بود (شکل۱). این مسئله می‌تواند به دلیل سازگاری و از بین رفتن استرس ایجاد شده باشد (Pravda *et al.*,1989). همچنین در تحقیق صورت گرفته توسط Niimi (1997) که بر روی خون ماهی کپور معمولی انجام شد، دریافت که مواد سمی و آلودگی محیطی موجب کاهش گلبول‌های سفید می‌شود. کاهش گلبول‌های سفید در اثر حضور مواد سمی و آلودگی محیطی و وجود هر نوع استرس رخ می‌دهد. استرس‌های وارده از دستکاری‌ها و سایر عوامل محیطی استرس زا تعداد لنفوسیت‌های خون ماهیان را کاهش می‌دهد (Tomova *et al.*, 2008). کاهش تعداد گلبول‌های سفید ممکن است به علت تجمع زیستی فلز روی در کبد و کلیه و همچنین افزایش سطح هورمون‌های کورتیکواستروئیدی باشد ترشح این هورمون‌ها پاسخی غیر اختصاصی به استرس‌های محیطی است (Kori *et al.*, 2006). آسیب‌های وارده به سلول‌های خون ساز بافت بینابینی کلیه منجر به کاهش تعداد لکوسیت‌ها و کم خونی در طی مسمومیت با فلز سنگین روی می‌شود(Farag *et al.*, 2006). همچنین کاهش گلبول‌های سفید خون در مجاورت سموم می‌تواند بدلیل آزاد شدن اپی نفرین ناشی از استرس وارده باشد که به دلیل انقباض طحال است، که باعث کاهش تعداد گلبول‌های سفید می‌شود. که این امر نشانه ضعف سیستم ایمنی می‌باشد (Ololade *et al.*,2009). به طور کلی هر گونه عفونت و استرس باعث افزایش نوتروفیل‌ها می‌شود (Singh *et al.*, 2008). متوسط تعداد گلبول‌های قرمز (RBC) در هر میلی متر مکعب خون در هر ۲ تیمار در کلیه زمان‌ها تا ۹۶ ساعت نسبت به شاهد کاهش معنی داری را نشان دادند ($P < ۰/۰۵$). بطوریکه حداقل تعداد گلبول‌های قرمز برابر با (۲۸۸۶۷/۵±۷۰۰۰۰۰ عدد در هر میلی متر مکعب خون در تیمار با غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر نیترات روی در زمان ۹۶ ساعت و حداکثر تعداد آنها در تیمار شاهد برابر با (۲۱۶۹۷۴/۱±۲۲۳۶۶۶۷ عدد در هر میلی متر مکعب خون مشاهده گردید. بطوریکه در ۱۲ ساعت در تیمار ۵ میلی گرم در لیتر برابر با (۵۵۰۷۵/۷ ±۱۵۴۰۰۰۰ عدد در هر میلی متر مکعب خون) که با شاهد و غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر اختلاف معنی داری مشاهده

Archive of SID

www.SID.ir

نشد(P>۰/۰۵). (شکل۲). بر اساس نتایج حاصل، با افزایش دوز و مدت زمان مجاورت ماهی با فلز روی تعداد گلبول‌های قرمز کاهش یافت که می‌توان از آن به عنوان شاخص تعیین میزان سمیت روی استفاده کرد. در این تحقیق کاهش میزان گلبول‌های قرمز در تمام گروه‌های آزمایشی مشاهده شد. این امر می‌تواند در نتیجه تخریب بافت آبشش (ورود آب از محیط به بدن) و کلیه (عدم توانایی در دفع اضافه آب از بدن) اتفاق افتاده باشد. در صورتیکه افزایش تعداد گلبول‌های قرمز می‌تواند ناشی از استرس شیمیایی محیطی و یا بر اثر هیپرپلازی بافت آبشش، برای تأمین اکسیژن مورد نیاز باشد که در اثر آن، میزان گلبول‌های قرمز خون افزایش معنی داری را نشان می‌دهد(Dethloff *et al.*,1999) . میانگین درصد هماتوکریت خون در زمان‌های متفاوت دارای نوسان بود. بطوریکه بین تیمارهای شاهد، ۵ و ۱۰ میلی گرم بر لیتر در۱۲، ۴۸ و۷۲ ساعت اختلاف معنی داری مشاهده نگردید(P>۰/۰۵). ولی در ۲۴ و ۹۶ ساعت افزایش معنی داری نسبت به شاهد مشاهده شد(P<۰/۰۵). بطوریکه حداقل میزان آن(۱/۵± ۱۹/۶درصد) در تیمار ۱۰ میلی گرم در لیتر در ۷۲ ساعت و حداکثر میزان آن (۴/۴± ۳۸/۳درصد) در تیمار با غلظت۱۰ میلی گرم در لیتر در زمان ۲۴ ساعت بود (شکل ۶). میانگین تغییرات حجم متوسط سلولی (MCV) در۲۴ و ۹۶ ساعت افزایش معنی داری با شاهد نشان داد (P<۰/۰۵). بطوریکه حداقل میزان آن در تیمار شاهد (۵/۳±۱۰۸/۱ فمتولیتر) و حداکثر میزان آن در ۹۶ ساعت در غلظت ۱۰ میلی گرم بر لیتر نیترات روی(۱±۴۴۴/۱ فمتولیتر) بود. در ۴۸ و ۷۲ ساعت اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد(P>۰/۰۵)(شکل۷). ابتدا افزایش و سپس کاهش فاکتورهای (HCT) و (MCV) نشان‌دهنده سازگاری ماهی در غلظت‌های مورد بررسی است. ولی غلظت‌های بالاتر Zn^{+2} برای ماهی قابل تحمل نبوده و آبزی فرصت بازسازی و سازگاری را ندارد (Vosyliene , 1999). میانگین غلظت هموگلوبین خون (MCHC) در ۲۴ ساعت غلظت ۵ و ۱۰ میلی گرم در لیتر کاهش معنی داری با شاهد نشان دادند(P<۰/۰۵). ولی در بقیه زمان‌ها اختلاف معنی داری مشاهده نشد(P>۰/۰۵). بطوریکه حداقل میزان آن در تیمار ۱۰ میلی گرم در لیتر در ۲۴ ساعت برابر با (۱/۴±۱۱/۲) و حداکثر درصد آن در تیمار ۱۰ میلی گرم در لیتر در ۱۲ ساعت برابر با (۴/۹±۳۲/۷) مشاهده شد (شکل۸). میانگین هموگلوبین گلبول قرمز خون (MCH) در ۲۴ و۷۲ ساعت اختلاف معنی داری مشاهده نشد(P>۰/۰۵) ولی در۱۲،۴۸و۹۶ ساعت بین تیمارها نسبت به شاهد افزایش معنی داری مشاهده شد (P<۰/۰۵). بطوریکه حداقل میزان آن در تیمار شاهد برابر با (۲۰/۶±۳۰۲/۱) گرم در دسی لیتر و حداکثر میزان آن در ۹۶ ساعت در غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر برابر با (۳۰±۸۵۸/۹) گرم در دسی لیتر بود (شکل۹). سطوح هموگلوبین Hemoglobin(Hb) در ۱۲ ساعت تنها در غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر با شاهد اختلاف معتی داری نشان داد(P<۰/۰۵). که با افزایش همراه بود ولی در سایر زمان‌ها اختلاف معنی داری مشاهده نشد(P>۰/۰۵)(شکل ۱۰). بر اساس نتایج مطالعات Tishinova-Nanova (1980) بعد از یک روز تماس کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) با غلظت‌های غیر کشنده فلز روی تعداد گلبول‌های قرمز و غلظت هموگلوبین در خون افزایش یافت ولی تعداد کل لکوسیت‌ها افزایش نیافت. معمولاً تعداد گلبول‌های قرمز خون ماهیان در واکنش به حضور فلزات سنگین کاهش یافته و کم خونی ایجاد می‌شود ولی در برخی موارد، بخصوص بعد از تماس‌های کوتاه مدت، فاکتورهای خونی (Hct,RBC,MCV,Hb) ممکن است افزایش یابند (Pravda *et al.*,1989; Witeska., 1998; Vosyliene., 1999; Sovobodava *et al.*, 1994). بعد از یک روز تماس ماهی کپور با غلظت‌های غیر کشنده فلز روی تعداد گلبول‌های قرمز و غلظت هموگلوبین و هماتوکریت در کپور معمولی افزایش یافت. در مورد گلبول‌های قرمز، تحریک ایجاد شده توسط استرس، فعالیت طحال(محل ذخیره سلول‌های خونی) توسط کاتکول آمین افزایش یافته و در نتیجه ظرف مدت کوتاهی تعداد گلبول‌های قرمز در خون بالا می‌رود (Coldwell & Hinshaw, 1994; Houston *et al.*,1996).

Archive of SID

www.SID.ir

افزایش اولیه فاکتورهای(HCT) و(MCV) و کاهش بعدی آنها نشان دهنده سازگاری ماهی است. ولی به شرطی که غلظت آلاینده مورد نظر Zn^{+2} بیش از حد قابل تحمل نبوده و ماهی فرصت بازسازی و سازگاری را داشته باشد(Vosyliene , 1999). در مطالعه ای که توسط Arnaudov و همکاران (2009) پس از ۹۶ ساعت تماس غلظت‌های مختلف فلز روی بر ماهی حوض(*Carassius auratus*) انجام شد، افزایش اندازه گلبول‌های قرمز و کاهش غلظت هموگلوبین و هماتوکریت مشاهده شد. Ololade و همکاران (2009) در تحقیقی مشابه اثر فلز روی را طی ۹۶ ساعت بر روی گربه ماهی آفریقایی(*Clarias gariepinus*) انجام دادند،که کاهش معنی داری در هموگلوبین و هماتوکریت مشاهده شد و به استثنای فاکتور (MCHC) میزان فاکتورهای خونی(MCH) و(MCV) با افزایش غلظت فلز روی افزایش یافت.

در مجموع می‌توان چنین نتیجه گرفت که، تغییرات آشکار فاکتورهای خونی، تحت تاثیر غلظت‌های مختلف فلز سنگین روی می‌تواند بیانگر تاثیر سوء فلز روی بر سیستم ایمنی و فیزیولوژیک ماهیان باشد. بنابراین از پارامترهای خونی نظیر (WBC) (RBC)،(MCV)،(MCH)،(MCHC) و(Hb) می‌توان به عنوان شاخص برای سنجش آلودگی فلز روی در محیط‌های آبی استفاده کرد. همچنین با عنایت به ایجاد اختلالات مهم در فعالیت‌های طبیعی ماهیان در اثر بروز مسمومیت‌های مزمن با فلزات سنگینی همچون روی که بر سلامت، رشد و تولید مثل تاثیرگذار می‌باشد (جلالی جعفری و آقازاده مشکی،۱۳۸۶)، انجام اقدامات لازم جهت جلوگیری از آلودگی آب استخرهای پرورشی، به فلزات سنگین و سایر آلاینده‌ها توصیه می‌گردد. تفاوت شرایط تغذیه ای، محیطی، گونه ماهی، سن، جنس، زمان نمونه گیری دقت و حساسیت روش‌های اندازه گیری از جمله فاکتورهایی است که می‌تواند عامل تفاوت نتایج بدست آمده باشد، اما با توجه به محدودیت منابع و مطالعات نسبتاً اندک صورت گرفته بر روی پارامترهای بیوشیمیایی و خونشناسی سرم خون آبزیان و با توجه به گسترش روز افزون صنعت آبزی پروری به نظر می‌رسد، باید مطالعات بیشتری در ارتباط با پارامترهای خونی آبزیان و چگونگی تغییرات آنها در شرایط مختلف فیزیولوژیک و پاتولوژیک صورت گیرد. تا به موازات گسترش این صنعت بتوان پاسخگوی نیازهای علمی در زمینه پیشگیری، تشخیص و درمان بیماری بود.

منابع

بنایی، م.، میرواقفی، ع.، مجازی امیری، ب.، رفیعی، غ. و نعمت دوست، ب.۱۳۹۰. بررسی خون شناسی و آسیب شناسی تجربی با دیازینون در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) نشریه شیلات، مجله منابع طبیعی ایران، ۶۴ (۱): ۱۳-۱.

پورغلام، ر.، مکرمی رستمی، ع.، سعیدی، ع .ا. ، شریف پور، ع.، غرقی، ا. و پورغلام، ح .۱۳۸۹. بررسی اثرات حاد باکتری استرپتوکوکس فسیوم(*Streptococcus faecium*) روی برخی از بافتها و مشخصه‌های خونی بچه ماهیان قزل آلای رنگین کمان.مجله علمی شیلات ایران.۱۹(۲): ۱۸-۹.

جلالی جعفری،ب. و آقازاده مشگی، م. ۱۳۸۶.مسمومیت ماهیان در اثر فلزات سنگین و اهمیت آن در بهداشت عمومی. انتشارات مان کتاب. تهران.

کاظمی، ر.، پوردهقانی، م.، یوسفی جوردهی، ا. یارمحمدی، م. و نصری تجن، م. ۱۳۸۹. فیزیولوژی دستگاه گردش خون آبزیان و فنون کاربردی خون شناسی ماهیان. انتشارات بازرگان. ایران.

Archive of SID

www.SID.ir

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

Adhikari, S. & Ayyappan. S. 2004. Behavioral role of zinc on primary productivity, plankton and grow of a fresh water teleost *Labeo rohita* (Homilton). Aquaculture. 231(14), 327- 336.

Alen, G. 1989. Toxicology, water pollution and fish physiology. CRC Press INC. USA.

Arnaudov, I., Velcheva, E. & Tomova, E. 2009.Change in the erythrocytes indexes of *Carassius auratus* under the influence of Zinc. Journal of Environmental Biology, 2:167-169.

Bani, A. & Haghi Vayghan, A. 2011. Temporal variations in haematological and biochemical indices of the Caspian kutum, *Rutilus frisii kutum*. Ichthyology Research, 58: 54-59.

Basa, S.P. & Usha, R.A. 2003. Zinc induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). Ecotoxicology and Environmental Safety, 56 (2): 218 – 221.

Carvalho, C. S. & Fernandes, M. N. 2006. Effect of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish Prochilodus scrofa at low and high pH. Aquaculture, 251 (1): 109-117.

Cavas, T., Garanko N. & Arkhipchuk, V. 2005. Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. Food and Chemical Toxicology, 43: 569-574.

Coldwell, C.A & Hinshaw J. 1994. Physiological and hematological responses in rainbow trout subjected to supplemental dissolve oxygen in fish culture. Aquaculture, 126:183-193.

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.

Dethloff, G. M., Schlenk, D., Khan, S. & Bailey, H. C. 1999. The effects of Zinc on blood and biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 36: 415-423.

Farag, A. M., Marty, G. D., Eston, M. & Harper, D. D. 2006. The effect of chromium exposure on the heels of Chinok salmon (*Onchorhynchus tshawytscha*). Aquatic Toxicology, 76:246-257.

Houston, A.H., Roberts W.C. & Kennigton J.A. 1996. Haematological response in fish. Pronephric and splenic involvements in the goldfish, (*Carassius auratus*). Fish Physiology and Biochemistry, 15: 481-489.

Hovis, M., Kimball, R. & Peterson, J. 2005.Mathematics exercises in biotechnology. Dilutions of stock liquid solutions. National Science Foundation, 2: 12-14.

Hoyle, I., Shaw, B. J. & Handy, R. D. 2007. Dietary copper exposure in the African walking catfish, Clarias gariepinus: Transient osmoregulatory disturbances and oxidative stress. Aquatic Toxicology, 83 (1): 62-72.

Javed, M. 2003. Relationship among water, sediments and plankton for the uptake and accumulation of heavy metals in the river Ravi. Indian Journal of Pharmacology, 2: 326-331.

Archive of SID

www.SID.ir

Kori-Siakpere, O., Ake, J.E.G. & Avworo, U.M. 2006. Sublethal effects of some selected haematological parameters of Heteroclarias (A hybrid of *Heterobranchus bidorsalis* and *Clarias gariepinus*). International Journal of Zoological Research, 2: 77-83.

Iwama, G. K, Afonso, L.O.B.& Vijayan, M.M. 2004. Stress in Fish. AquaNet Workshop on Fish Welfare, Campbell River, B.C. Canada.

Maheswaran, R., Devapanl, A., Muralidharan ,S., Velmurugan ,B.,& Ignaeimuthu ,S. 2008. Haematological studies of fresh water fish,*Clarias batradrus* (L) exposed to mercuric chloride. International Journal of Integrative Biology, 2(1): 49-54.

Nebeker, A.V., Savonen, C. & Stevens, D.G. 1985. Sensitivity of rainbow trout early life stages to nickel chloride. Environmental Toxicology and Chemistry, 4: 233- 239.

Niimi, A.J.1997.Biological and toxicological effects of environmental contaminations in fish. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science, 40:306-312.

Obasohan, E., Oronsaye J.A. & Eguavoen, O. 2008. A comparative assessment of the heavy metal loads in the tissues of a common catfish (*Clarias gariepinus*) from Ikpoba and Ogba Rivers in Benin City. Nigeria. South African Journal of Science, 9(1): 13-23.

Olojo, E.A.A., Olurin, K.B., Mbaka, G. & Oluwemimo, A.D. 2005. Histopathology of the gill and liver tissues of the African catfish *Clarias gariepinus* exposed to lead. African Journal of Biotechnology, 4(1):117-122.

Ololade, I. A. & Ogini O. 2009. Behavioural and hematological effects of zinc on African Catfish, *Clarias gariepinus*. International Journal of Fisheries and Aquaculture, 1 (2): 022-027.

Oshode, O.A., Bakare, A, A., Adeogun, A, O., Efuntoye, M, O. & Sowunmi, A. A. 2008. Ecotoxicological assessment using *Clarias gariepius* and microbial characterization of leachate from municipal solid waste landfill. International Journal of Environmental Research, 2(4): 391-400.

Penev, M. & Dukova-Peneva, P. 2007. Laboratory Hematology. Artik. Sofia.

Pravda, D., Palackova, J., Zima, S., Vavrova, M., & Jirasek, J. 1989. Dynamika casnych zme hemogramu a biochemic Krve V pokusu experimentalnimi dietami S obsahem PCB a S primesemie Hg a Cd ve vodnim prostredi kapriho pludku. 2end. Celostatni Ichtyo Hematologica Conference, {In Czech}.

Sandströ m, O. 1989. Seasonal variations in some blood parameters in perch, Perca fluviatilis L. Journal of Applied Ichthyology, 5: 85-95.

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 Clinical Pathology, 10: 1091 – 1095.

.

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 and Animal Sciences, 29: 1163 – 1168.

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

Archive of SID

www.SID.ir

Sovobodova, Z., Vykusova, B. & Machova, J. 1994. The effects of pollutants on selected haematological and biochemical parameters in fish In: Sub lethal chronic effects of pollutants on freshwater fish. Papers submitted to a Symposium held in conjunction with the Seventeenth Session of EIFAC, 19-22 May 1992, Lugano, Switzerland.

Tavares, M. & Sandrim, E. F. S. 1998. Caracteristicas hematologicas de teleosteos brasileiros. I. Serie vermelha e dosagens de cortisol e glucose do plasma sanguineo de especimes de Colossoma macropomum em condicoes de cultivo. Acta Scientiaum, 20:157-160.

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

Tishanova-Nanova, V., 1980. Changes in some blood parameters of the Common carp after 24-hour treatment with a Cu2+ solution. Hydrobiology, pp. 36-48 (Bg).

Tomova E., Arnaudov, A.& Velcheva, I. 2008. Changes in the erythrocytes indexes of *Carassius gibelio* (Pisces, Cyprinidae) under the influence of zinc. Journal of Environmental Biology, 29(6), 897-902.

Vosyliene, M.Z. 1999. The effect of heavy metal mixture on hematological parameters of Rainbow trout. In D.A. Lovejoy (Ed), Heavy metals in environment. An integrated approach. Institute of Geology. Metalecology Society. Vilnuius.

Witeska, M. 1998. Changes in selected blood indices of Common carp after acute exposure to cadmium. Acta Veterinaria Brno, 67: 289-293.

Witeska, M. 2003. The effects of metals (Pb, Cu, Cd, and Zn) on hematological parameters and blood cell morphology of common carp. Rozprawa naukowa nr 72, Wydawnictwo Akademii Podlaskiej Siedlce[In Polish].

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

46. Yim, J.H. & Kim, S. D. 2006. Effects of hardness on acute toxicity of metal mixtures using Daphnia magna. Hazard Material, 138: 16-21.

Archive of SID

www.SID.ir