



دانشگاه گنبد کاووس

نشریه "پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی"

دوره ششم، شماره اول، بهار ۹۷

<http://jair.gonbad.ac.ir>

بررسی اثر اسید آمینه ال – سیستئین بر فراسنجه‌های خونی بچه‌ماهیان کفال خاکستری *Mugil cephalus* Linnaeus, 1758 در برابر آلودگی فلزات سنگین مس و روی

زهرا نوروزی^۱، جواد قاسم زاده^{۲*}، محمود سینایی^۳، حسن زادعباس شاه‌آبادی^۴

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران

^۲ استادیار گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران

^۳ استادیار گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد چابهار، چابهار، ایران

^۴ کارشناس گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران

تاریخ ارسال: ۹۵/۱۲/۱۰؛ تاریخ پذیرش: ۹۶/۴/۱۱

چکیده

اسید آمینه سیستئین موجود در پروتئین متالوتیونین تمایل زیادی به اتصال با فلزات سنگین جیوه، کادمیوم، مس و روی و سمیت زدایی متعاقب آنها دارد. این پژوهش به منظور بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف اسید آمینه سیستئین بر فراسنجه‌های خونی بچه‌ماهیان کفال خاکستری (*M. cephalus*) در برابر آلودگی فلزات سنگین مس و روی اجرا شد. بچه‌ماهیان کفال مورد نیاز با میانگین وزنی حدود $27/4 \pm 3$ گرم از ساحل خلیج چابهار صید شدند. ماهیان مورد آزمایش در معرض فلزات سنگین مس و روی ($107/47$ نانوگرم بر میلی‌لیتر مس و $41/75$ نانوگرم بر میلی‌لیتر روی) قرار گرفتند و با چهار جیره غذایی با غلظت‌های صفر، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اسید آمینه سیستئین، نسبت به سیستئین موجود در جیره پایه به مدت ۴۵ روز غذادهی گردید. در سه فاصله زمانی ۴، ۲۲ و ۴۵ روز پس از شروع آزمایش نمونه خون از تمام تیمارها گرفته شد و شاخص‌های خونی شامل تعداد سلول‌های قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت، متوسط حجم هر سلول قرمز (MCV)، متوسط میزان هموگلوبین در هر سلول قرمز (MCH) و متوسط غلظت هموگلوبین موجود در واحد حجمی از سلول‌های قرمز (MCHC)، اندازه‌گیری شد. بیشترین میزان RBC، در تیمار دوم مس و روی به ترتیب $(1/81 \pm 0/18)$ و $(1/01 \pm 0/06)$ ، میلیون بر میکرولیتر به دست آمد. بالاترین میزان Hct، در تیمار اول مس و روی به ترتیب $(462/18 \pm 31/12)$ و $(477/94 \pm 29/86)$ ، میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر مشاهده شد. بالاترین میزان

* نویسنده مسئول: jghasemz@gmail.com

Hb، در تیمار اول مس ($477/40 \pm 31/28$) و تیمار دوم روی ($469/97 \pm 43/12$)، گرم بر دسی لیتر مشاهده شد. تمامی این فاکتورها با گروه شاهد اختلاف معنی‌دار نشان دادند. نتایج این بررسی نشان‌دهنده تأثیر معنی‌دار فلزات سنگین مس و روی بر فراسنجه‌های خونی بچه‌ماهیان کفال است. نتایج همچنین آشکار نمود که افزودن اسید آمینه سیستئین به جیره غذایی پایه به‌طور مستقیم تأثیری بر فاکتورهای خونی بچه‌ماهیان ندارد. با این حال اضافه کردن سیستئین به جیره غذای ماهی با افزایش بیوستنز متالوتیونین در بدن ماهی و در نتیجه افزایش سمیت زدایی فلزات سنگین و کاهش و یا افزایش توانایی مکانیسم دفاعی بدن ماهی، بر فراسنجه‌های خون‌شناسی مورد بررسی تأثیرگذار بوده است. به هر حال یافته‌های این مطالعه مشخص نمود که فاکتورهای خونی این آبزی می‌تواند بیومارکر مناسبی جهت بررسی وجود فلز مس و روی در منابع آبی باشد.

واژه‌های کلیدی: *M. cephalus*، ال-سیستئین، فلزات سنگین، فراسنجه‌های خونی، مس، روی

مقدمه

امروزه ورود مداوم آلاینده‌های زیست‌محیطی به بوم سازگان‌های آبی، این محیط‌ها را به‌شدت آسیب پذیر نموده و آن‌ها را به انباری برای این مواد تنش‌زا و خطرناک مبدل ساخته است (Lawrence and Hemingway, 2003). از گروه‌های اصلی این آلاینده‌ها، فلزات سنگین می‌باشند که به‌عنوان آلاینده‌های غیرقابل تجزیه، برای مدت‌های طولانی در بوم سازگان‌های آبی باقی مانده و تعادل شیمیایی آن‌ها را مختل می‌سازند. غلظت بالای فلزات موجب تهدید حیات آبزیان می‌شود و غلظت‌های پایین نیز با فرایند تجمع زیستی جذب بافت‌های مختلف انواع موجودات آبزی شده و به‌تدریج تغلیظ گردیده و با انتقال به سطوح بالاتر زنجیره غذایی، سلامت و پایداری جمعیت آن‌ها را به خطر می‌اندازد (Di Giulio and Hinton, 2008). فلزات روی و مس براساس مقادیرشان در فرآیندهای زیستی ایفای نقش محرک یا بازدارنده ایفا می‌کنند (Anderson and Morel, 1978). این فلزات از جمله عناصر ضروری در واکنش‌های زیستی می‌باشند و به‌صورت همواستاتیک تنظیم می‌شوند. غلظت‌های این عناصر در بافت‌های یکسان از گونه‌های متفاوت می‌توانند تغییرات زیادی داشته باشند (Wagemann and Muir, 1984).

فلزات سنگین در ماهیان موجب تغییرات رفتاری مختلفی از جمله تغییر در روش‌های تغذیه، شنا، فرار شکار و شکارچی، تولید مثل، استرس‌های تنفسی، تغییر رشد، تغییر شاخص‌های خونی، تجمع در اندام‌های حیاتی، تغییر در بیان متالوتیونین، اختلال در تنظیم اسمزی و آسیب‌های بافتی می‌شود (Oroujaji et al. 2013; Di Giulio and Hinton, 2008; Lawrence and Hemingway, 2003). ویژگی‌های خون‌شناسی ماهیان یکی از مهمترین شواهد مراحل فیزیولوژیک آن‌ها و منعکس‌کننده ارتباط خصوصیات اکوسیستم آبی و سلامتی آن‌ها می‌باشد. تغییرات خصوصیات خون ماهیان در پاسخ به

شرایط زیست محیطی پاسخی است نسبت به استرس‌های محیطی و می‌تواند به‌عنوان یک شاخص مهم زیستی مد نظر قرار گیرد (Rahimi Bashar et al., 2007). مطالعات خون شناسی اغلب در تشخیص تغییرات فیزیولوژیک موجود زنده، در پی مواجهه با استرس‌های محیطی مختلف به‌عنوان مثال مواجهه با فلزها استفاده می‌شود. سنجش تغییرات به‌خصوص فراسنجه‌های فیزیولوژیک و عوامل بیوشیمیایی خون ماهیان در مواجهه با آلاینده‌ها، امکان پیش بینی آثار مزمن را بر بقا، تولید مثل و رشد ممکن می‌سازد (Al-Attar et al., 2005). سیستئین $\text{NH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{SH})\text{COOH}$ به‌طور طبیعی آبرزین می‌باشد و آمینو اسیدی است که شامل یک گروه تیول بوده و به‌مقدار کم در بسیاری از پروتئین‌ها یافت می‌شود (Mok et al., 2014). سیستئین در انسان باعث سم‌زدایی جیوه، کادمیم و سرب می‌شود. همچنین مطالعات نشان داده که عضلات ماهی و سلول‌ها را می‌توان با آغشته کردن به سیستئین سم‌زدایی جیوه کرد (Mok et al., 2014).

ماهی کفال خاکستری *Mugil cephalus* L. با اهمیت‌ترین گونه ماهی خانواده کفال‌ماهیان از نظر شیلاتی بوده که به‌دلیل خصوصیات مناسب بیولوژیکی مانند مقاومت زیاد در برابر دامنه وسیعی از دما و شوری، ضریب رشد قابل قبول، تغذیه از سطوح پائین هرم غذایی، ضریب تبدیل غذایی مناسب و بازار پستندی عالی می‌توان آن را به‌صورت تک گونه‌ای یا به‌صورت توأم با گونه‌های دیگری مانند میگو، خامه ماهی، تیلپیا و کپور ماهیان چینی پرورش داد (Saleh, 2006). این ماهی مهاجر کرانه‌ای و پوده‌خوار بوده و دارای یک معده نسبتاً عضلانی می‌باشد که برای تغذیه از دیتریت‌ها یا مواد در حال پوسیدن بستر مناسب است (Hoseini Aghozbeni et al., 2015). ماهی کفال خاکستری در آب‌های ساحلی شمال دریای عمان و خلیج چابهار به وفور یافت می‌شود و در مجتمع پرورش میگوی گواتر به‌صورت توأم با میگوی سفید هندی پرورش داده شده است (Hoseini Aghozbeni et al., 2015).

بیشتر مطالعات صورت گرفته تاکنون به اثرات قرارگیری ماهی در معرض فلزات سنگین بر فاکتورهای خونی شناخته شده پرداخته‌اند (Shakuri et al., 2012; Shekuhi et al., 2013; Khabazi et al., 2015; Goel and Sharma, 1987). لذا با توجه به اهمیت موضوع و گسترش آلودگی‌های فلزات سنگین، توسعه سیستم‌های نوین پرورشی در ایران به‌ویژه پرورش ماهی در قفس بررسی و مطالعه میزان غلظت اسید آمینه سیستئین در جیره غذایی بر فراسنجه‌های خونی و مکانیسم‌های سمیت‌زدایی فلزات سنگین در بدن ماهی دارای اهمیت بسزایی می‌باشد. مطالعه حاضر در همین راستا و با هدف بررسی تأثیر افزایش اسید آمینه ال-سیستئین در جیره غذایی بر تغییرات فراسنجه‌های خون‌شناسی بچه‌ماهیان کفال خاکستری (*M. cephalus*) قرار گرفته در معرض فلزات سنگین مس و روی صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها

این بررسی از اوایل بهمن ۱۳۹۴ تا اواخر اسفند ۱۳۹۴ به مدت ۴۵ روز در مجموعه کارگاهی تکثیر و پرورش آبزیان واقع در دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار انجام گردید. ماهیان پس از صید از ساحل خلیج چابهار با میانگین طول 13.2 ± 1 سانتی‌متر و وزن 27.4 ± 3 گرم جهت سازگاری به شرایط اسارت و تغذیه دستی به مدت ۱۰ روز درون مخازن ۳۰۰ لیتری نگهداری شدند. یک روز پس از انتقال بچه‌ماهیان را از نظر وضع ظاهر، سلامت، تعادل و شنای عادی بررسی نموده و تلفات موجود جمع‌آوری و حذف گردید و به‌منظور عادت دادن آن‌ها به غذای دستی تغذیه آن‌ها با استفاده از غذای کنسانتره، به شکل جیره کور در هنگام روز آغاز گردید (Choi et al., 2014).

بچه‌ماهیان کفال خاکستری، بعد از دو هفته سازگاری، ابتدا با ترازویی با دقت ۰/۱ گرم توزین و به‌طور تصادفی به ۷ تیمار با ۳ تکرار تقسیم بندی گردیدند (جدول ۱). بچه‌ماهیان در تیمارهای مختلف و به‌طور جداگانه در معرض غلظت‌های بالاتر از غلظت محیط طبیعی (۱۰۷/۴۷ نانوگرم بر میلی‌لیتر مس و ۴۱/۷۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر روی) و پایین تر از LC₅₀ فلزات مس و روی قرار گرفتند. در تعیین غلظت‌های مورد استفاده در این آزمایش، غلظت‌های سنجش شده در نمونه آب خلیج چابهار توسط قیاسی (Gheytasi, 2013) مورد استفاده قرار گرفت.

هر تیمار با جیره غذایی حاوی مکمل آمینو اسیدی (اسید آمینه ال-سیستئین (C3H7NO2S) افزودنی) و تیمار شاهد با جیره غذایی فاقد مکمل آمینو اسیدی (فاقد اسید آمینه ال-سیستئین افزودنی و صرفاً براساس میزان ال-سیستئین جیره) تغذیه گردیدند (اقتباس از Mok et al., 2014). با توجه به نقش مهم اسید آمینه سیستئین در بیوسنتز پروتئین متالوتیونین به‌عنوان پروتئین اصلی در سمیت زدایی فلزات سنگین، در این تحقیق با هدف بررسی اثرات غلظت‌های مختلف این اسید آمینه در جیره غذایی بر فراسنجه‌های خونی بچه‌ماهیان کفال، درصدهای متفاوت و افزایشی نسبت به میزان پایه آن در جیره غذایی انتخاب گردید. از سوی دیگر اثرات نامتعادلی اسیدهای آمینه، رقابت اسیدآمینه‌ای و مسمومیت اسیدآمینه‌ای نیز بر فراسنجه‌های خونی بچه‌ماهیان کفال نیز مشخص می‌گردد. جیره‌های غذایی آزمایشی شامل ترکیباتی از جمله پودر ماهی دریایی و پودر سویا به‌عنوان منابع اصلی پروتئین، روغن ماهی دریایی و روغن سویا به‌عنوان منابع اصلی چربی، آرد گندم، مکمل ویتامین‌ها و مواد معدنی و مقادیر مختلف اسید آمینه بودند. جهت تهیه جیره دارای مکمل افزودنی اسید آمینه (اسید آمینه ال-سیستئین) از روش توصیه شده توسط ال-تاویل و همکاران (El-Tawil et al., 2014) استفاده گردید. ابتدا ال-سیستئین را با آب مقطر مخلوط نموده و به ۱۰۰ گرم از غذای پلت تجاری اضافه شد. سپس این مخلوط در آسیاب برقی (مدل National MK-G28NR) همگن گردیده و از چرخ گوشت عبور داده شد تا به شکل رشته‌های پلت در آورده شود. رشته‌ها در زیر هود

به مدت ۲۴ ساعت خشک می‌گردید. سپس پلت‌ها با ۲ میلی‌لیتر روغن ماهی به ازای هر ۱۰۰ گرم پلت پوشش داده شدند. غذا به صورت روزانه تهیه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شد. تغذیه به میزان ۲ درصد وزن بدن و روزانه در دو نوبت صورت گرفت (Vabunian et al., 2013).

جدول ۱- اطلاعات طراحی آزمایش تأثیر افزایش اسید آمینه ال-سیستئین در جیره غذایی بر تغییرات فراسنجه‌های خون شناسی بچه‌ماهیان کفال خاکستری (*M. cephalus*) قرار گرفته در معرض فلزات سنگین

مس و روی				
عنوان	علامت اختصار	تکرار	غلظت سیستئین در تیمارها (mg/g)	توضیحات
تیمار ۱ (شاهد)	کنترل (C)	-	۲/۱	میزان پایه سیستئین در جیره غذایی
تیمار ۲	CuT2	۳	۳/۸۷۵	افزودن ۰.۲۵٪ مکمل آمینو اسیدی (اسید آمینه ال سیستئین) نسبت به جیره پایه
تیمار ۳	CuT3	۳	۴/۶۵	افزودن ۰.۵۰٪ مکمل آمینو اسیدی (اسید آمینه ال سیستئین) نسبت به جیره پایه
تیمار ۴	CuT4	۳	۶/۲	افزودن ۱.۰۰٪ مکمل آمینو اسیدی (اسید آمینه ال سیستئین) نسبت به جیره پایه
تیمار ۵	ZnT5	۳	۳/۸۷۵	افزودن ۰.۲۵٪ مکمل آمینو اسیدی (اسید آمینه ال سیستئین) نسبت به جیره پایه
تیمار ۶	ZnT6	۳	۴/۶۵	افزودن ۰.۵۰٪ مکمل آمینو اسیدی (اسید آمینه ال سیستئین) نسبت به جیره پایه
تیمار ۷	ZnT7	۳	۶/۲	افزودن ۱.۰۰٪ مکمل آمینو اسیدی (اسید آمینه ال سیستئین) نسبت به جیره پایه

فراسنجه‌های کیفی آب در شرایط آزمایش شامل: دمای آب در محدوده زمانی معین ۲۶/۵-۲۷/۵ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول ۴/۲-۵/۵ میلی‌گرم در لیتر، آمونیاک کل ۰/۲۱-۰/۲۸ میلی‌گرم در لیتر، pH برابر ۷/۵-۷/۷ و قلیائیت ۱۷۶-۱۸۰ میلی‌گرم بر لیتر و شوری ۳۵ میلی‌گرم بر لیتر (Fisher Scientific, OH, USA, EL-Tawil et al., 2014) بود. آزمایش سمیت در شرایط آزمایشگاهی نیمه ثابت (Semistatistic) انجام گرفت و میزان سولفات مس و نیترات روی خارج شده محاسبه و روزانه این مقدار از طریق ظروف حاوی استوک تعبیه شده برای هر تیمار جبران شد (Alvarado et al., 2006).

خون‌گیری از ماهیان در ۳ مرحله زمانی ۴ روز پس از شروع آزمایش، ۲۲ روز (میان دوره) و ۴۵ روز (انتهای دوره) و از هر تیمار ۶ ماهی (هر تکرار ۲ ماهی) به طور تصادفی انتخاب و توسط عصاره پودر گل میخک (Khabazi et al., 2015) بیهوش گردید. جهت جلوگیری از اثرات ماده بیهوشی بر

فراسنجه‌های خونی، خونگیری بلافاصله و قبل از زیست‌سنجی با استفاده از سرنگ ۲/۵ میلی‌لیتری آغشته به ماده ضد انعقاد EDTA پنج درصد، از قلب آنها طبق قلیچی و همکاران (Ghelichi et al., 2011) صورت گرفت (Oroujali et al., 2013). نمونه‌های خونی در ظروف آغشته به EDTA و در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل گردید.

اندازه‌گیری میزان هموگلوبین: سنجش میزان هموگلوبین براساس روش توصیه شده توسط کوندرا و همکاران (Kondera et al., 2012) صورت گرفت. نمونه‌های خونی با نسبت ۱ به ۱۰ با محلول درایکین مخلوط و همگن گردید و پس از ۱۰ دقیقه با تغییر رنگ محلول، میزان هموگلوبین توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۵۰ نانومتر سنجش شد.

اندازه‌گیری هماتوکریت: برای سنجش میزان هماتوکریت از روش میکروهماتوکریت استفاده شد. هر لوله موئین، از خون یک ماهی پر و با خمیر مخصوص سر هر لوله مسدود گردید. لوله‌ها در درون سانتریفوژ با دور ۱۰ هزار دور در دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. سپس با کمک خط‌کش مخصوص میزان هماتوکریت به درصد محاسبه و ثبت شد (Vazquez and Guerrero, 2007).

اندازه‌گیری تعداد سلول‌های قرمز خون: برای سنجش این شاخص خونی برحسب میلیون در میکرولیتر از میکروسکوپ نوری استفاده گردید. نوک پپیت ملانژور را با زاویه ۴۵ درجه در قطره خون قرار داده و برای جلوگیری از انعقاد خون با محلول هایم به نسبت ۱ به ۵۰ رقیق گردید. سپس ملانژورها به مدت ۳ دقیقه درون دستگاه ملانژور قرار گرفت و پنجمین قطره خون به روی لام هموسیستم ریخته شد (Kondera et al., 2012). با کمک عدسی ۴۰، سلول‌های قرمز درون پنج عدد از خانه‌های لام هموسیستم خوانده شد و به کمک فرمول زیر تعداد کل سلولهای قرمز خون محاسبه گردید:

$$RBC = N \times 2 \times 10^6$$

محاسبه فراسنجه‌های MCV، MCH و MCHC: بعد از تعیین فاکتورهای فوق مقادیر این فراسنجه‌های تنفسی براساس فرمول‌های زیر محاسبه و ثبت شدند.

۱- مقدار متوسط حجم هر سلول قرمز خون (MCV)، $(MCV = (Hct / RBC) \times 10)$.

۲- متوسط هموگلوبین هر سلول قرمز خون (MCH)، $(MCH = (Hb / RBC) \times 10)$.

۳- مقدار غلظت هموگلوبین در هر سلول قرمز خون (MCHC)، $(MCHC = (Hb / Hct) \times 100)$ (Afshinfar et al., 2013).

آنالیز آماری: تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با نرم‌افزار SPSS-19 انجام گرفت. برای تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از انجام آزمایش ابتدا نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون کولموگراف - اسمیرنوف بررسی شد. روش آنالیز واریانس دو طرفه جهت بررسی تأثیر غلظت و مدت زمان در معرض قرارگیری بر

فراسنجه‌های خونی در سطح معنای ۵ درصد صورت گرفت. همچنین روش آنالیز واریانس یک‌طرفه جهت بررسی وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح معنای ۵ درصد بین تیمارهای مختلف با یکدیگر و همچنین با نمونه شاهد صورت گرفت. جهت تعیین دقیق وجود یا عدم وجود تفاوت معنی‌دار از پس آزمون Tukey استفاده شد.

نتایج

نتایج به‌دست آمده از نمونه‌برداری اول در روز چهارم در تعداد سلول‌های گلبول قرمز بین دو فلز مختلف متفاوت بود، به‌طوری‌که تیمارهای فلز مس و روی اختلاف معنی‌داری را با گروه شاهد نشان دادند ($p < 0.05$)، تنها تیمار ZnT7 با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری بروز نداد ($p > 0.05$). میزان هماتوکریت در بین تیمارهای دو فلز نسبت به یکدیگر و نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نشان ندادند ($p > 0.05$)، تنها تیمار CuT3 با سایر تیمارها و تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری داشت ($p < 0.05$). میزان هماتوکریت در بین دو فلز نسبت به یکدیگر متفاوت بودند، به‌طوری‌که تنها تیمار سوم فلز روی با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری نشان نداد ($p > 0.05$) و سایر تیمارها با گروه شاهد اختلاف معنی‌دار داشتند ($p < 0.05$). نتایج نشان می‌دهد که بین مقدار متوسط حجم هر سلول قرمز خون و مقدار غلظت هموگلوبین در هر سلول قرمز خون در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری وجود ندارد ($p > 0.05$). صرفاً مقدار متوسط حجم هر سلول قرمز خون در تیمار ZnT7 با گروه شاهد اختلاف معنی‌دار نشان داد ($p < 0.05$). در صورتی‌که میزان متوسط هموگلوبین هر سلول قرمز خون در تیمارهای هر دو فلز نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌دار نشان دادند ($p < 0.05$) و تنها تیمار اول روی با شاهد اختلاف معنی‌دار نداشت ($p > 0.05$). نتایج حاصل از نمونه‌برداری اول در جدول ۲ ارائه شده است.

جدول ۲- فراسنجه‌های خونی بچه‌ماهیان کفال خاکستری (*M. cephalus*) (میانگین $\pm$ انحراف معیار) پس از قرارگیری در معرض سولفات مس و نیترات روی (۴ روزه)

شاخص‌ها تیمارها	RBC (m/ μ l)	MCH (pg/cell)	MCHC (g/dl)	MCV (fl/cell)	هموگلوبین (g/dl)	هماتوکریت (%)
شاهد	1/0.6 $\pm$ 0.13 ^a	26/91 $\pm$ 4/60 ^a	9/0.9 $\pm$ 2/0.1 ^a	298/0.5 $\pm$ 21/43 ^a	2/88 $\pm$ 0.82 ^a	31/43 $\pm$ 2/11 ^a
CuT2	2/69 $\pm$ 0.77 ^b	15/71 $\pm$ 4/64 ^b	10/74 $\pm$ 1/28 ^a	145/25 $\pm$ 35/83 ^a	3/98 $\pm$ 0.21 ^b	37/31 $\pm$ 3/22 ^{ac}
CuT3	2/81 $\pm$ 0.24 ^b	13/57 $\pm$ 0.89 ^b	9/82 $\pm$ 1/24 ^a	139/59 $\pm$ 19/51 ^a	3/81 $\pm$ 0.15 ^b	39/0.7 $\pm$ 3/33 ^{bc}
CuT4	2/55 $\pm$ 0.33 ^b	13/91 $\pm$ 2/24 ^b	9/37 $\pm$ 1/38 ^a	148/54 $\pm$ 11/65 ^a	3/53 $\pm$ 0.48 ^b	37/72 $\pm$ 1/84 ^{ac}
ZnT5	1/85 $\pm$ 0.24 ^b	20/0.1 $\pm$ 0.48 ^{ac}	10/41 $\pm$ 2/0.8 ^a	196/24 $\pm$ 31/0.2 ^{ab}	3/72 $\pm$ 0.57 ^{bc}	35/96 $\pm$ 2/39 ^a
ZnT6	1/99 $\pm$ 0.40 ^b	18/16 $\pm$ 3/15 ^b	9/82 $\pm$ 1/91 ^a	187/27 $\pm$ 31/46 ^{ab}	3/55 $\pm$ 0.35 ^{bc}	36/7 $\pm$ 4/76 ^a
ZnT7	1/67 $\pm$ 0.30 ^a	19/64 $\pm$ 8/30 ^{bc}	9/0.5 $\pm$ 2/42 ^a	213/18 $\pm$ 41/13 ^b	3/12 $\pm$ 0.63 ^{ac}	35/0.2 $\pm$ 4/36 ^a

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($p > 0.05$).

نتایج حاصل شده از نمونه برداری دوم (۲۲ روز پس از شروع دوره آزمایش) به همراه آنالیز آماری در جدول ۳ نشان داده شده است. همان‌طور که جدول ۳ آورده شده است تعداد گلبول‌های قرمز خون در بین تیمارهای دو فلز نسبت به یکدیگر و نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری ندارند ($p > 0.05$). درصد هماتوکریت در برخی از تیمارهای دو فلز نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نشان دادند ($p < 0.05$). همچنین نتایج بررسی نشان می‌دهد که تیمار CuT_3 ، تیمار ZnT_6 و تیمار ZnT_7 با گروه شاهد اختلاف معنی‌دار ندارند ($p > 0.05$). در بررسی میزان هموگلوبین در هر دو فلز در مقایسه با گروه شاهد اختلاف معنی‌دار یافت گردید ($p < 0.05$) و تنها در تیمار CuT_4 با گروه شاهد اختلاف معنی‌دار یافت نشد ($p > 0.05$). مقدار متوسط حجم هر سلول قرمز خون و متوسط هموگلوبین هر سلول قرمز خون در تیمارهای هر دو فلز نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌دار داشتند ($p < 0.05$)، نتایج همچنین بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در مقدار غلظت هموگلوبین در هر سلول قرمز خون در تیمار CuT_2 و تیمار ZnT_5 با گروه شاهد است ($p > 0.05$)، اما در سایر تیمارها با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری ملاحظه گردید ($p < 0.05$).

جدول ۳- فراسنجه‌های خونی بچه‌ماهیان کفال خاکستری (*M. cephalus*) (میانگین $\pm$ انحراف معیار) پس از قرارگیری در معرض سولفات مس و نیترات روی (۲۲ روزه).

شاخص‌ها تیمارها	RBC (m/ μ l)	MCH (pg/cell)	MCHC (g/dl)	MCV (fl/cell)	هموگلوبین (g/dl)	هماتوکریت (%)
شاهد	1.04 ± 0.09^a	27.55 ± 4.18^a	9.05 ± 0.44^a	$30.57 \pm 0.55/69^a$	2.86 ± 0.19^a	31.69 ± 2.71^a
CuT_2	1.54 ± 0.48^a	25.44 ± 8.60^a	10.79 ± 2.37^b	243.88 ± 91.48^{bc}	3.69 ± 0.55^{bc}	34.61 ± 3.36^a
CuT_3	1.63 ± 0.17^a	20.66 ± 3.33^b	9.14 ± 1.51^a	227.50 ± 35.44^{bc}	3.34 ± 0.39^{ac}	36.75 ± 2.19^a
CuT_4	1.26 ± 0.20^a	26.07 ± 9.31^a	9.66 ± 2.49^a	266.12 ± 29.30^{ac}	3.17 ± 0.55^{ac}	33.31 ± 3.30^a
ZnT_5	1.21 ± 0.31^a	28.95 ± 7.87^a	10.45 ± 1.11^b	277.37 ± 74.20^a	3.35 ± 0.43^a	32.02 ± 1.29^a
ZnT_6	1.33 ± 0.23^a	24.28 ± 6.59^a	9.11 ± 1.41^a	263.96 ± 36.33^a	3.13 ± 0.22^a	34.74 ± 3.67^a
ZnT_7	1.08 ± 0.03^a	27.64 ± 2.25^a	9.88 ± 1.27^a	280.92 ± 16.56^a	2.99 ± 0.18^a	30.48 ± 2.58^a

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($p > 0.05$).

نتایج حاصل از نمونه‌برداری سوم در جدول ۴ ارائه شده است. نتایج حاصله از سومین نمونه‌برداری (روز ۴۵) در تعداد گلبول قرمز خون، درصد هماتوکریت، میزان هموگلوبین، میزان، متوسط هموگلوبین هر سلول قرمز خون و مقدار غلظت هموگلوبین در هر سلول قرمز خون تیمارهای هر دو فلز مس و روی، نسبت به یکدیگر و نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌داری نشان ندادند ($p > 0.05$).

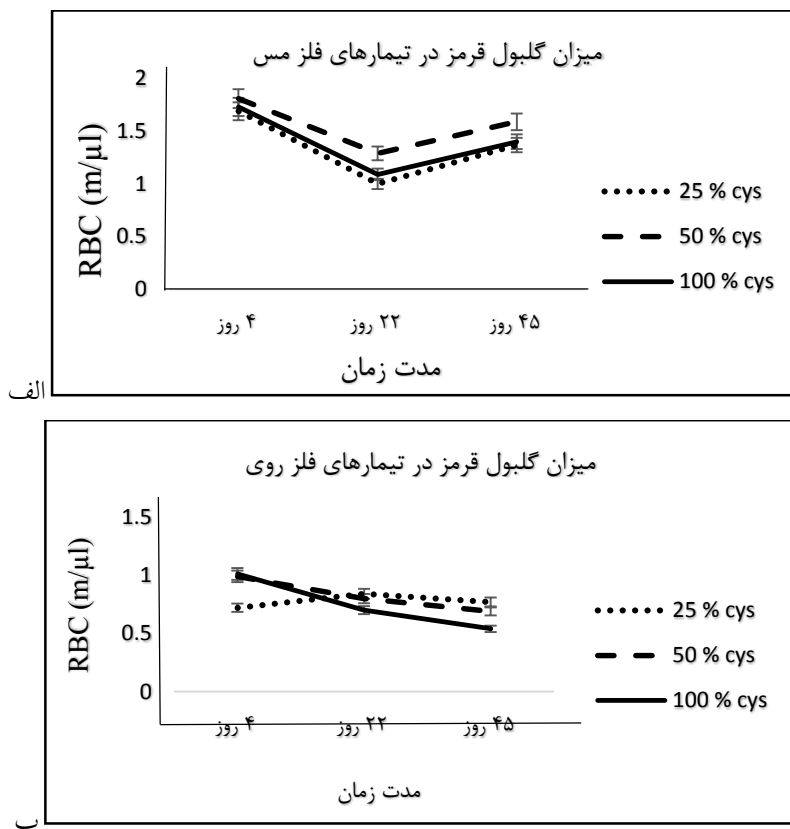
جدول ۴- فراسنجه‌های خونی بچه‌ماهیان کفال خاکستری (*M. cephalus*) (میانگین $\pm$ انحراف معیار) پس از قرارگیری در معرض سولفات مس و نیترات روی (۴۵ روز).

شاخص‌ها تیماها	RBC (m/ μ l)	MCH (pg/cell)	MCHC (g/dl)	MCV (fl/cell)	هموگلوبین (g/dl)	هماتوکریت (%)
شاهد	1/07 $\pm$ 0/09 ^a	26/28 $\pm$ 1/67 ^a	9/03 $\pm$ 1/26 ^a	294/35 $\pm$ 28/44 ^a	2/81 $\pm$ 0/18 ^a	31/39 $\pm$ 2/81 ^a
CuT ₂	1/37 $\pm$ 0/46 ^a	24/52 $\pm$ 7/99 ^a	9/70 $\pm$ 0/10 ^a	252/45 $\pm$ 81/45 ^a	3/14 $\pm$ 0/25 ^a	32/32 $\pm$ 2/36 ^a
CuT ₃	1/26 $\pm$ 0/21 ^a	24/55 $\pm$ 6/04 ^a	9/73 $\pm$ 0/73 ^a	254/29 $\pm$ 74/01 ^a	3/00 $\pm$ 0/25 ^a	31/01 $\pm$ 3/71 ^a
CuT ₄	1/16 $\pm$ 0/21 ^a	24/99 $\pm$ 3/18 ^a	9/63 $\pm$ 1/07 ^a	262/34 $\pm$ 47/56 ^a	2/87 $\pm$ 0/16 ^a	29/98 $\pm$ 2/78 ^a
ZnT ₅	1/13 $\pm$ 0/14 ^a	26/99 $\pm$ 5/70 ^a	9/74 $\pm$ 1/89 ^a	276/51 $\pm$ 8/67 ^a	3/01 $\pm$ 0/33 ^a	31/43 $\pm$ 3/62 ^a
ZnT ₆	1/08 $\pm$ 0/06 ^a	27/33 $\pm$ 0/85 ^a	9/81 $\pm$ 0/98 ^a	280/73 $\pm$ 33/80 ^a	2/96 $\pm$ 0/10 ^a	30/36 $\pm$ 2/04 ^a
ZnT ₇	0/98 $\pm$ 0/02 ^a	28/11 $\pm$ 4/14 ^a	9/65 $\pm$ 1/57 ^a	291/64 $\pm$ 5/25 ^a	2/78 $\pm$ 0/39 ^a	28/86 $\pm$ 1/22 ^a

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($p > 0/05$).

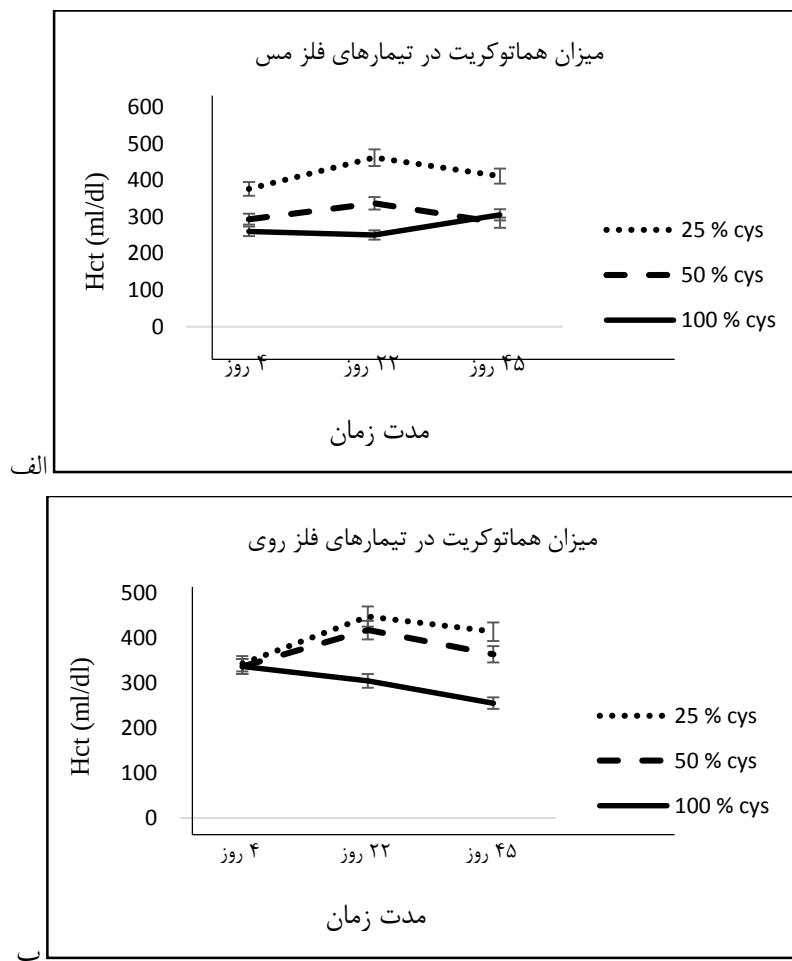
انجام تست ANOVA دو طرفه (سطوح اسید آمینه مکمل در جیره غذایی و مدت زمان در معرض قرارگیری) نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد که این نشانگر وجود اثر سطوح مختلف اسید آمینه مکمل (ال سیستئین) در جیره غذایی و مدت زمان در معرض قرارگیری می‌باشد. بین این دو فاکتور نیز رابطه معنی‌داری وجود دارد ($p < 0/05$).

همان‌طور که در شکل ۱- الف نشان داده شده است، میزان گلبول قرمز خون در تیمارهای فلز مس در تمامی تیمارها از روز چهارم تا روز بیست و دوم در مقایسه با جیره پایه سیر کاهشی و از روز بیست و دوم تا روز چهل و پنجم روند افزایشی داشته‌اند. این مقدار افزایش در روز چهل و پنجم از مقادیر آن در روز چهارم کمتر بود. در آزمایشات انجام شده با فلز روی میزان گلبول قرمز خون در تیمارهای با جیره غذایی حاوی ۵۰ و ۱۰۰٪ سیستئین (شکل ۱- ب) در مقایسه با جیره پایه، در طول دوره آزمایش روند کاهشی داشت، درحالی‌که در تیمار حاوی ۲۵٪ سیستئین تا بیست و دو روز اول روند افزایشی و پس از آن سیر کاهشی داشت.



شکل ۱- نمودار میزان گلبول قرمز بچه‌ماهیان کفال خاکستری (*M. cephalus*) در تیمارهای فلز مس (الف) و روی (ب) نسبت به افزایش زمان در غلظت‌های مختلف سیستئین

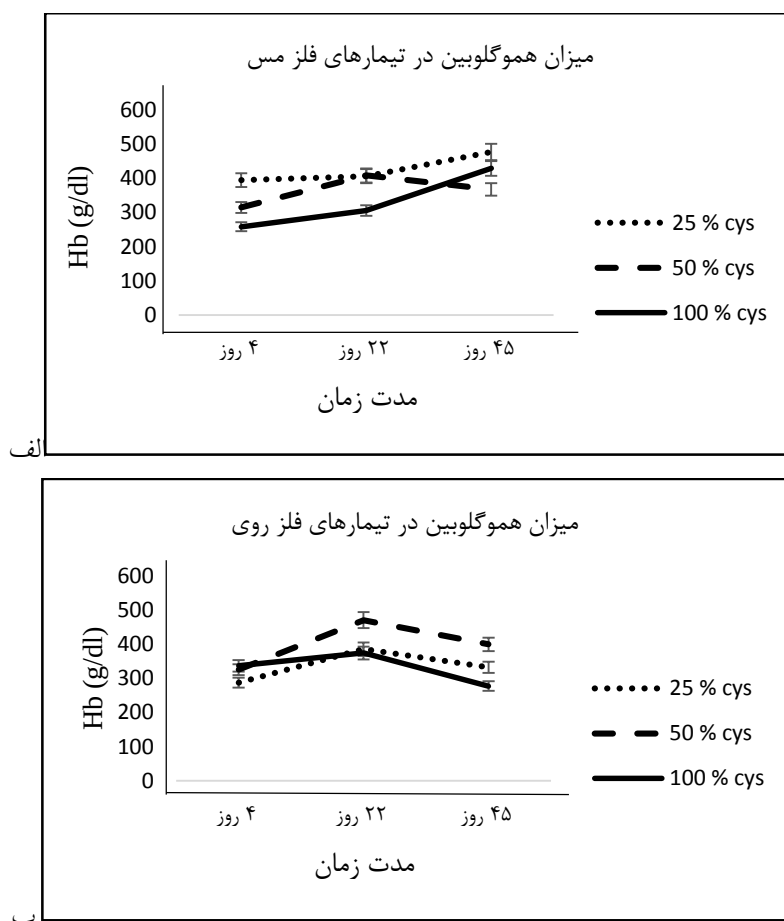
براساس شکل ۲- الف میزان هماتوکریت در تیمارهای فلز مس در غلظت‌های سیستئین ۲۵ و ۵۰ درصد از روز چهارم تا روز بیست و دوم نسبت به جیره پایه روند افزایشی داشت. در حالیکه از روز بیست و دوم تا روز چهل و پنجم، سیر کاهشی نشان داد. در غلظت ۱۰۰٪ سیستئین میزان هماتوکریت در مقایسه با جیره پایه، از روز چهارم تا روز بیست و دوم، تقریباً ثابت بود، ولی پس از آن تا روز چهل و پنجم، سیر افزایشی داشت. در آزمایشات انجام شده با فلز روی میزان هماتوکریت در تیمارهای با جیره غذایی حاوی ۲۵ و ۵۰٪ سیستئین (شکل ۲- ب) تا روز بیست و دوم پس از شروع آزمایش در مقایسه با جیره پایه سیر افزایشی داشت و پس از آن تا روز چهل و پنجم روند کاهشی نشان داد. درحالی‌که در تیمار حاوی ۱۰۰٪ سیستئین، میزان هماتوکریت از ابتدا تا پایان آزمایش سیر نزولی داشت و شدت این کاهش از روز بیست و دوم به بعد با سرعت و شیب بیشتری بود.



شکل ۲- نمودار میزان هماتوکریت بچه‌ماهیان کفال خاکستری (*M. cephalus*) در تیمارهای فلز مس (الف) و روی (ب) نسبت به افزایش زمان در غلظت‌های مختلف سیستئین

همچنان‌که در شکل ۳- الف نشان داده شده است میزان هموگلوبین در تیمارهای فلز مس با جیره‌های غذایی حاوی غلظت‌های سیستئین ۲۵ و ۱۰۰٪ نسبت به جیره پایه در تمام مدت آزمایش و از روز چهارم تا روز چهل و پنجم سیر افزایشی داشت. درحالی‌که در غلظت ۵۰٪ سیستئین در مقایسه با جیره پایه، از روز چهارم تا روز بیست و دوم، سیر افزایشی و از روز بیست و دوم تا روز چهل و پنجم، سیر کاهشی ملایمی را نشان داد. در آزمایشات انجام شده با فلز روی، میزان هموگلوبین قرمز خون در

تمام تیمارها (شکل ۳-ب) در طول آزمایش و در مقایسه با جیره پایه، تا روز بیست و دوم پس از آزمایش روند افزایشی داشت، ولی پس از آن پایان آزمایش سیر کاهشی نشان داد.



شکل ۳- نمودار میزان هموگلوبین بچه‌ماهیان کفال خاکستری (*M. cephalus*) در تیمارهای فلز مس (الف) و روی (ب) نسبت به افزایش زمان در غلظت‌های مختلف سیستئین

بحث و نتیجه‌گیری

خلیج چابهار که صنایع سنگینی مانند پتروشیمی در آن رو به گسترش است که این امر می‌تواند منجر به افزایش آلودگی آب به‌ویژه ورود انواع فلزات سنگین گردد. ماهی کفال خاکستری نیز به‌عنوان یک ماهی دریایی و با ارزش تجاری بالا می‌تواند گونه مناسبی جهت استفاده به‌عنوان شاخص زیستی

موجودات در معرض آلودگی باشد. هم‌چنین از فراسنجه‌های خونی نظیر RBC, MCV, MCH, MCHC و Hb می‌تواند به‌عنوان شاخص برای سنجش آلودگی فلزات مس و روی در محیط آبی استفاده گردد. ورود آلاینده‌ها به محیط منجر به ایجاد پاسخ‌های پیچیده‌ای در سطوح مختلف بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی، رفتاری، جمعیت و اجتماع می‌گردد که هر سری از این پاسخ‌ها به سه مرحله اول، دوم و سوم تقسیم می‌گردد که مطابق با سه مرحله اعلام خطر، جبران خسارت، ناتوانی در جبران آن (خستگی) می‌باشد. مکانیسم عمده و اصلی سمیت زدایی فلزات سنگین در بدن آبزیان بیوسنتز پروتئین متالوتیونین می‌باشد. متالوتیونین‌ها از پروتئین‌های غنی از سیستئین (۳۰٪) هستند و وابستگی زیادی با جیوه و کادمیوم و هم‌چنین مس و روی دارند. با عنایت به ایجاد اختلالات مهم در فعالیت‌های طبیعی ماهیان در اثر بروز مسمومیت‌های حاد و یا مزمن با فلزات سنگینی مانند مس و روی که بر سلامت، رشد و تولید مثل آنها تأثیرگذار می‌باشد، این مطالعه به اثر افزودن اسید آمینه سیستئین به جیره غذایی بر فراسنجه‌های خونی بچه‌ماهیان کفال در زمان مواجهه با آلودگی فلزات سنگین (مس و روی) پرداخته است.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که بین برخی از شاخص‌های خونی تیمارهای مختلف فلز مس با فلز روی و همچنین با گروه شاهد تفاوت‌هایی وجود دارد. آنالیزهای آماری نشان دادند که میزان گلبول‌های قرمز خون گروه شاهد با برخی از تیمارها تفاوت معنی‌داری دارد. به نحوی که میزان گلبول‌های قرمز خون در نمونه‌برداری سوم (۴۵ روز) نسبت به نمونه‌برداری دوم (۲۲ روز) کاهش و نمونه‌برداری دوم نسبت به نمونه‌برداری اول (۴ روز) افزایش یافته است. میزان گلبول‌های قرمز خون در تیمارهای فلز مس در ابتدا از مرحله چهار روزه به مرحله بیست و دو روزه روند کاهشی را نشان دادند و از مرحله بیست و دو روزه به مرحله چهل و پنج روزه روند افزایشی داشتند و بیشترین مقدار آن در نمونه‌های خون بچه‌ماهیان تغذیه‌شده با جیره غذایی حاوی ۵۰٪ غلظت اسید آمینه سیستئین بیشتر نسبت به جیره غذایی پایه (نمونه شاهد) مشاهده شد که این مقادیر با مقادیر گلبول‌های قرمز نمونه‌های خون بچه‌ماهیان تغذیه‌شده با جیره غذایی حاوی ۲۵٪ غلظت اسید آمینه سیستئین بیشتر نسبت به جیره غذایی پایه تفاوت معنی‌داری نشان ندادند. هم‌چنین میزان گلبول‌های قرمز خون در تیمارهای فلز روی در بازه زمانی آزمایش سیر کاهشی نشان دادند، که بیشترین مقدار آن در غلظت ۲۵٪ غلظت اسید آمینه سیستئین بیشتر نسبت به جیره غذایی پایه بود که با مقادیر غلظت ۵۰٪ غلظت اسید آمینه سیستئین بیشتر نسبت به جیره غذایی پایه تفاوت معنی‌داری نشان ندادند. کاهش میزان گلبول‌های قرمز 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 یا بر اثر هایپرپلازی بافت آبشش، برای تأمین اکسیژن مورد

نیاز باشد که در اثر آن، میزان گلبول‌های قرمز خون افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد (Dethloff et al., 1999). یکی از دلایل کاهش تعداد گلبول‌های قرمز خون، تجمع گلبول‌های قرمز در آبشش ماهیان، در معرض استرس ناشی از آلاینده می‌باشد (Narain and Srivastava, 1989). البته مشاهده کاهش تعداد گلبول‌های قرمز می‌تواند ناشی از مرگ گلبول‌های در معرض آلاینده نیز باشد (Kudirat-Adeyemo, 2007).

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که میزان هموگلوبین و هماتوکریت در تیمارهای مورد بررسی نسبت به گروه شاهد دارای اختلاف معنی‌داری بودند، با این تفاوت که میزان هماتوکریت سیر کاهشی را نسبت به افزایش غلظت سیستئین در جیره غذایی تیمارهای هر دو فلز داشته است به‌طوری که بیشترین مقدار آنها با افزایش ۲۵ درصد غلظت اسید آمینه سیستئین بیشتر نسبت به جیره غذایی پایه مشاهده شد که در تیمارهای فلز روی مقدار ۲۵ و ۵۰ درصد غلظت اسید آمینه سیستئین بیشتر نسبت به جیره غذایی پایه باهم اختلاف معنی‌داری نداشتند. اما میزان هموگلوبین در تیمارهای مربوط به فلز روی روند کاهشی (بیشترین مقدار در غلظت ۵۰٪ سیستئین بیشتر نسبت به جیره غذایی پایه) و در تیمارهای مربوط به فلز مس روند افزایشی (بیشترین مقدار در غلظت ۲۵٪ سیستئین بیشتر نسبت به جیره غذایی پایه) را نشان دادند. ماک و همکاران (Mok et al., 2014) بیان کردند که سیستئین همراه با آنتی‌اکسیدان‌ها می‌تواند تجمع جیوه در ماهی‌ها را کاهش دهد. در نتایج این مطالعه بیان شده که جیره شامل ۱ و ۱۰ درصد سیستئین نسبت به جیره فاقد سیستئین (0% cysteine) با موفقیت باعث کاهش غلظت جیوه در ماهی گردید و می‌توان عضلات ماهی را با آغشته کردن به سیستئین سم‌زدایی جیوه نمود. علاوه بر این در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است که سیستئین در انسان باعث سم‌زدایی جیوه، کادمیم و سرب می‌شود (Jalali Jafari and Aghazadeh Meshgi, 2007). تحقیقات دیگر با هدف بررسی تأثیر فلز مس بر فراسنجه‌های خونی سایر آبزیان نیز نشان می‌دهد که در غلظت‌های بالاتر از ۰/۱۵ میلی‌گرم بر لیتر فلز مس میزان گلبول‌های قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت کاهش می‌یابد (Goel and Sharma, 1987).

عموماً تغییرات هموگلوبین و هماتوکریت در ارتباط با تغییرات گلبول‌های قرمز است. معمولاً تعداد گلبول‌های قرمز خون ماهیان در واکنش به حضور فلزات سنگین کاهش یافته و کم‌خونی ایجاد می‌شود ولی در برخی موارد به‌خصوص بعد از تماس‌های کوتاه مدت، فاکتورهای خونی (Hct, RBC, MCV, Hb) ممکن است افزایش یابند (Witeska, 1998). محققینی همچون سینگ و سیرواستاوا (Singh and Sirvastava, 2010)، اظهار داشته‌اند که تغییر در میزان هموگلوبین می‌تواند در اثر تغییر در تعداد گلبول‌های قرمز باشد. از آنجا که هموگلوبین در داخل گلبول‌های قرمز قرار دارد، پس اختلالات حاصله در گلبول‌های قرمز می‌تواند در مقدار هموگلوبین تأثیر بگذارد، به‌عنوان مثال کاهش هموگلوبین

می‌تواند ناشی از پاره شدن گلبول‌های قرمز باشد (Olodade and Ogini, 2010). علاوه بر این بنایی و همکاران (Banaee et al., 2008)، بیان کردند عواملی که باعث تغییر در اندازه یا تعداد گلبول‌های قرمز می‌شوند، می‌توانند سبب تغییر در میزان هماتوکریت نیز شوند و اگر آلاینده‌ای توانایی ایجاد تغییر و کاهش گلبول‌های قرمز جانوری را داشته باشد، در نتیجه هماتوکریت خون آن نیز کاهش می‌یابد و سنجش آن می‌تواند در تشخیص بیماری مؤثر باشد. بنابراین می‌توان روند کاهش افزایش هماتوکریت را به همین روند در فراسنجه گلبول‌های قرمز نسبت داد.

در این تحقیق افزایش و کاهش در میزان گلبول‌های قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین می‌تواند به این دلیل باشد که زمانی که ماهی در معرض آلودگی قرار می‌گیرد در ابتدا یک مکانیسم دفاعی مفید علیه عامل آلودگی ایجاد می‌شود. در واقع سیستم ایمنی ماهی فعال می‌شود، در نتیجه فاکتورهای خونی گلوکز خون، کورتیزول، گلبول‌های قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت افزایش می‌یابد. دفاع ماهیان در برابر مسمومیت ناشی از فلزات سنگین با بی اثر کردن این سموم در کبد به وسیله آنزیم متالوتیونین انجام می‌شود (Jalali Jafari and Aghazadeh Meshgi, 2007). متالوتیونین‌ها از پروتئین‌های غنی از سیستئین (۳۰٪) هستند و وابستگی زیادی با جیوه و کادمیوم و هم چنین مس و روی دارند. سیستئین در فعال کردن سیستم‌های دفع مسمومیت درون‌زا در بدن موجودات زنده نقش محوری دارد و قرار گرفتن در معرض فلزات بر وضعیت سیستئین فشار می‌آورد (Quig, 1998).

هنگامی که فلزات سنگین وارد بدن ماهی شدند با ترکیبات آلی و مواد آنزیمی واکنش نشان داده و پس از اتصال به پروتئین‌ها به کمک گردش خون جابه‌جا می‌شوند. در واقع طی مدت زمانی که جهت تولید و سنتز پروتئین متالوتیونین صرف می‌شود، فلزات سنگین اثرات خود را بر فاکتورهای خونی اعمال می‌کنند و تعادل فاکتورهای بیوشیمیایی خون را بر هم می‌زنند، بنابراین میزان مصرف انرژی و نیاز اکسیژنی ماهی به‌طور توأم افزایش می‌یابد که در نتیجه توانایی و مکانیسم دفاعی ماهی کاسته می‌شود و فاکتورهای خونی (گلوکز خون، کورتیزول، گلبول‌های قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت) نیز دچار تغییر شده و کاهش می‌یابد.

نتایج نشان می‌دهد که افزودن اسیدآمینه سیستئین به جیره غذایی پایه به‌طور مستقیم تأثیری بر فاکتورهای خونی ماهی ندارد، با این حال اضافه کردن سیستئین به جیره ماهی با افزایش بیوسنتز متالوتیونین در بدن ماهی و در نتیجه افزایش سمیت‌زدایی فلزات سنگین و کاهش و یا افزایش توانایی مکانیسم دفاعی بدن ماهی، بر فراسنجه‌های خون شناسی مورد بررسی تأثیرگذار بوده است. همچنین تغییرات آشکار فاکتورهای خونی، تحت تأثیر غلظت فلزات سنگین مس و روی می‌تواند بیانگر تأثیر سوء این فلزات بر سیستم ایمنی و فیزیولوژیک ماهیان باشد. با این حال تفاوت شرایط تغذیه‌ای،

محیطی، گونه، سن، جنس، زمان نمونه‌گیری، دقت و حساسیت روش‌های اندازه‌گیری از جمله فاکتورهایی هستند که می‌بایست در بررسی‌های مشابه این تحقیق مد نظر و مورد استفاده قرار گیرند.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی و همکاری کارکنان آزمایشگاه دانشکده علوم دریایی دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

منابع

- Afshinfar A., Noori A., Akbarzadeh A., Kalvani Nitly B., Sajadi M. 2013. Investigation of the respiratory factors of blood in Mudskipper (*Scartelaos tenuis*) and its comparison with mullet (*Liza klunzingeri*) in coastal waters of Persian Gulf, Hormozgan Province. Journal of Aquatic Ecology, 3: 22-33. (In Persian).
- Al-Attar A. 2005 Changes in haematological parameters of the fish, *Oreochromis niloticus* treated with sublethal concentration of cadmium. Pakistan Journal of Biological Sciences, 8: 421-424.
- Alvarado N., Quesada I., Hylland K., Marigomez I., Soto M. 2006. Quantitative changes in metallothionein expression in target cell types in the gills of turbot *Scophthalmus maximus* exposed to Cd, Cu, Zn and after a depuration treatment. Aquatic Toxicology, 7: 64-77.
- Anderson D., Morel F. 1978. Copper sensitivity of *Gonyaulax tamarensis*. Limnology Oceanography, 23: 283-295.
- Banaee M., Mirvagefei A., Rafei G., Majazi Amiri B. 2008. Effect of sub-lethal diazinon concentration on blood plasma biochemistry. International Journal of Environmental Research, 22: 189-198.
- Choi S.I., Kim S.Y., Lee J., Cho E.W., Kim I.G. 2014. TM4SF4 overexpression in radiation-resistant lung carcinoma cells activates IGF1R via elevation of IGF1. Oncotarget, 5(20): 9823-9837.
- Dethloff G., Schlenk D., Khan S., Bailey H. 1999. The effects of Zinc on blood and biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 36: 415-423.
- Di Giulio R., Hinton D. 2008. The toxicology of fishes. CRC Press (Taylor & Francis Group). New York, 1071P.
- EL-Tawil N., Amer T., Hassan A. 2014. Effect of cysteine and dietary protein levels on striped mullet (*Mugil cephalus*) performance. Fisheries and Aquaculture, 2: 139-147.
- Ghelichi A., Kezemi R., Rahati M. 2011. The effects of amino acid L-Alanine on some of the hematological indicators of the Iranian Acipenser (*Acipenser*

- persicus*) fingerlings. Journal of Fisheries. Islamic Azad University, Azadshahr Branch, 5(3): 17-26. (In Persian).
- Gheytasi H. 2013. Monitoring of the Heavy Metals Concentration in Intertidal Oysters of Chabahar Bay and Oman Sea. M.Sc. Thesis in Marine Biology. Chabahar Maritime University. (In Persian).
- Goel K., Sharma S. 1987. Some haematological characteristics of *Clarias batrachus* under metallic stress of arsenic. Comparative Physiology & Ecology, 12: 63-66.
- Hoseini Aghozbeni H., Haji Rezaei S. 2015. The effects of polyculture of white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and grey mullet (*Mugil cephalus*) on diversity and extension of *Vibrio* bacteria species in shrimp farms. Journal of Aquaculture Extension, 9(1): 25-30. (In Persian).
- Jalali Jafari B., Aghazadeh Meshgi M. (2007). Fish poisoning by heavy metals in water and its importance in public health, Man Publication Book, First Edition, Tehran, 134P. (In Persian).
- Khabazi M., Hersij M., Hedayati A., Gerami M., Ghaffari Farsani H. 2015. The effect of lethal concentrations of Copper (CuSo₄) on the hematologic parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Aquatic Ecology, 4: 1-7. (In Persian).
- Kondera E., Dmowska A., Rosa M., Witeska M. 2012. The effect of bleeding on peripheral blood and head kidney hematopoietic tissue in common carp (*Cyprinus carpio*). Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 36(2): 169-175.
- Kudirat Adeyemo O. 2007. Haematological profile of *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) exposed to lead. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 7: 163-169.
- Lawrence A., Hemingway K. 2003. Effects of Pollution on Fish: Molecular Effects and Population Responses. Oxford, UK, Blackwell Science Ltd. 376 P.
- Mok W., Hatanaka Y., Seoka M., Itoh T., Tsukamasa Y., Ando M. 2014. Effects of additional cysteine in fish diet on mercury concentration. Food Chemistry, 147: 340-345.
- Narain A., Srivastava P. 1989. Anemia in the freshwater teleost, *Heteropneustes fossilis*, under the stress of environmental pollution. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 43: 627-634.
- Olodade I.A., Oginni O. 2010. Toxic stress and hematological effects of nickel on African catfish (*Claris gariepinus*) fingerlings. Journal of Environment Chemical Ecotoxicology, 2: 14-19.
- Oroujali M., Peykan Heirati F., Mahbubi Sufiani N., Dorafshan S. 2013. The effect of lethal concentrations of cadmium on some hematological indicators of the Acipenserid Sterlet (*Acipenser ruthenus*) fingerlings. Quarterly Journal of Fisheries Sciences and Technologies, 2(2): 11-22. (In Persian).

- Quig, D. 1998. Cysteine Metabolism and Metal Toxicity. *Alternative Medicine Review: A Journal of Clinical Therapeutic*, 3(4): 262-270.
- Rahimi Bashar M., Tehrani Fard A., Ghasemi Nejad A., Alipour V., Fallah Chai M. 2007. Determination of some hematological factors of Caspian Kutum (*Rutilus frissii Kutum*) during different stages of gonad development. *Journal of Biology, Lahijan Azad University*, 1(3): 45-56. (In Persian).
- Saleh M. 2006. Cultured Aquatic Species Information Programme (CASIP). *Mugil cephalus*. FAO Fisheries and Aquaculture Department, FAO, Rome, Italy. 269P.
- Shakuri M., Abdali S., Negarestan H., Halajian A. 2012. Investigation of the effects of Zinc metal on the blood parameters of Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Journal of Marine Science and Technology*, 7(3): 69-82. (In Persian).
- Shekuhi S., Abdaly S., Yusefi Jurdehi A., Negarestan H. 2013. Investigation of the effects of the lethal concentrations of Copper Nitrate on the biochemical reaction of Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Journal of Marine Science and Technology Research*, 9(2): 43-54. (In Persian).
- Singh N., Srivastava A. 2010. Haematological parameters as bioindicators of insecticide exposure in teleosts. *Ecotoxicology*, 19: 838-854.
- Vabunian A., Movahedinia A., Safahie A., Hedayati S. 2013. Determination of the lethal concentration (LC 50) of cadmium chloride in yellow fin bream (*Acanthopagrus latus*). *Journal of Marine Science and Technology*, 12(3): 26-32. (In Persian).
- Vazquez G., Guerrero G. 2007. Characterization of blood cells and hematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). *Tissue and Cell*, 39(3): 151-160.
- Wagemann R., Muir D. 1984. Concentration of heavy metals and organochlorine in marine mammals of northern waters overview and evaluation. *Canadian Technology Reproduction Fisheries and Aquatic Science*, 97P.
- Witeska M. 1998. Changes in selected blood indices of *Common carp* after acute exposure to cadmium. *Acta Veterinaria Brno*, 67: 289-293.