



Original Research Paper

Exposure of *Litopenaeus vannamei* to water-born copper and its effect on some hemolymph immunological and stressed parameters and lysozyme activity

Maysa Enayatmehr¹, Shahla Jamili^{2*}, Saeed Yalghi³, Seyed Hossein Hosseinifar⁴, Mehdi Shamsaei Mehrjan⁵

¹ Department of Marine Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

² Iranian Fisheries Science Research Institute, Agriculture Research Education and Organization, Tehran, Iran

³ Reservoir Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agriculture Research Education and Organization, Gorgan, Iran

⁴ Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

⁵ Department of Fisheries, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Key Words

L. vannamei
Copper
Stressed parameters
Hemolymph
Lysozyme

Abstract

Introduction: The aim of study was to evaluate the effect of copper sulfate on some hemolymph immunological and stressed parameters and lysozyme activity of *L. vannamei*.

Materials & Methods: Four hundred fifty *L. vannamei* post larvae 12 were exposed to copper at 0, 0.005, and 0.01 mg l⁻¹ for 60 days. This study was performed in three treatments with 3 replicates in the Islamic Azad University, Tehran Branch. OECD 203 instruction was used to determination of copper level. At the end of experimental period, cortisol, glucose levels, total protein, lysozyme activity, lactate and lactate dehydrogenase were measured.

Results: The results of study showed that cortisol, glucose, and total protein levels in 0.01 mg l⁻¹ group was significantly increased compared to control group (P<0.05). The concentration of lactate increased with the increase of copper level, whereas the activity of lactate dehydrogenase decreased with the increased copper concentration in the water (P<0.05). Additionally, a significant decrease in lysozyme activity in copper groups (P<0.05).

Conclusion: The results of this study showed that exposure of *L. vannamei* to copper at 0.005 and 0.01 mg l⁻¹ has a negative effect on their hemolymph biochemical parameters and enzyme activity.

* Corresponding Author's email: shahlajamili45@yahoo.com

Received: 9 April 2021; Reviewed: 17 May 2021; Revised: 8 July 2021; Accepted: 18 August 2021

(DOI): 10.22034/AEJ.2021.291649.2564

مقاله پژوهشی

تأثیر مس بر برخی شاخص‌های استرس و ایمنی همولنف و فعالیت آنزیم لیزوزیم در میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*)

مایسا عنایت‌مهر^۱، شهلا جمیلی^{۲*}، سعید یلقی^۳، سیدحسین حسینی‌فر^۴، مهدی شمسایی‌مهرجان^۵

^۱ گروه زیست‌شناسی دریا، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۲ موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

^۳ مرکز تحقیقات ذخایر آب‌های داخلی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران

^۴ گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

^۵ گروه شیلات، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

کلمات کلیدی

مقدمه: هدف از تحقیق حاضر بررسی اثر فلز مس بر برخی شاخص‌های استرس و ایمنی همولنف میگوی وانامی و فعالیت آنزیم لیزوزیم بود. **مواد و روش‌ها:** برای این منظور ۴۵۰ قطعه پست لارو ۱۲ میگوی وانامی در معرض غلظت‌های ۰، ۰/۰۰۵ و ۰/۰۱ میلی گرم بر لیتر سولفات مس به مدت ۶۰ روز قرار داده شدند. این آزمایش با ۳ تیمار و ۳ تکرار در هر تیمار در دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران انجام شد. طول دوره قرارگیری در معرض مس ۶۰ روز در نظر گرفته شد. برای تعیین میزان فلز مس از دستورالعمل پیشنهادی OECD 203 استفاده شد. در پایان دوره آزمایش میزان کورتیزول، گلوکز، پروتئین کل، آنزیم لیزوزیم، لاکتات و لاکتات دی‌هیدروژناز ارزیابی شد. **نتایج:** نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که میزان کورتیزول، گلوکز و پروتئین کل در گروه ۰/۰۱ میلی گرم بر لیتر در مقایسه با تیمار شاهد افزایش معنی‌داری داشت ($P < 0/05$). میزان لاکتات با افزایش غلظت مس افزایش یافت ($P < 0/05$) در حالی که میزان لاکتات دی‌هیدروژناز با افزایش مس روندی کاهشی داشت ($P < 0/05$). همچنین کاهش معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم در گروه‌های حاوی مس مشاهده شد ($P < 0/05$). **بحث و نتیجه‌گیری:** نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که قرارگیری میگوی وانامی در معرض مس به میزان ۰/۰۰۵ و ۰/۰۱ میلی گرم اثر منفی بر شاخص‌های بیوشیمیایی و فعالیت آنزیمی داشت.

میگوی وانامی
مس
شاخص‌های استرس
همولنف
لیزوزیم

مقدمه

آلودگی اکوسیستم‌های آبی روز به روز در حال افزایش می‌باشد. از جمله آلودگی‌ها فلزات سنگین هستند که فاضلاب‌های شهری، صنعتی و پساب‌های کشاورزی حاوی مقادیر متفاوتی از آن‌ها می‌باشد. در سال‌های اخیر نگرانی در خصوص اثرات دراز مدت فلزات سنگین به دلیل پایداری بالای محیطی و همچنین جذب آن توسط موجودات دریایی رو به افزایش می‌باشد. یکی از این آلاینده‌ها مس بوده که در بافت آبزیان تجمع می‌یابد. مقادیر کم مس برای جانوران عالی مورد نیاز می‌باشد. در سخت‌پوستان مس نقش مهمی در ساخت سلول‌های خونی و فعالیت برخی از آنزیم‌ها دارد. به عنوان مثال، رنگدانه هموسیانی که نقش مهمی در حمل اکسیژن دارد، حاوی مس می‌باشد. با این حال مقادیر بالای این فلز در محیط‌های دریایی اثر منفی بر تنظیمات متابولیکی و فیزیولوژیکی موجودات دریایی دارد (۱). مس می‌تواند منجر به تغییرات رفتاری و فیزیولوژیکی در موجود زنده شود. از جمله این تغییرات کاهش عملکرد آنزیم‌ها همچون گلوکاتانیون، افزایش اکسیژن‌های فعال، پراکسیداسیون لیپیدها و تخریب بافت در قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌باشد (۲، ۳). در مطالعه‌ای قرارگیری ماهی سفید (*Rutilus kutum*) در معرض مس منجر به آسیب بافت در آبشش هم‌چون خونریزی، کوتاه شدن لاملای ثانویه، گریز شدن تیغه‌های آبشش و تجمع آب میان بافتی در آبشش می‌شود (۴). از طرفی استفاده از غلظت کشنده سولفات مس به میزان ۰/۱۵ میلی‌گرم در لیتر به مدت ۹۶ ساعت منجر به فساد چربی، آتروفی سلولی، نکروز سلولی و پرخونی در کبد تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) شد (۵). در مطالعه‌ای دیگر حداکثر غلظت مجاز مس در یک میگوی وانامی در یک دوره ۹۶ ساعته برابر با ۰/۳۹۰ میلی‌گرم در لیتر بود (۶). فلز مس می‌تواند با اختلال در فرآیندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی ماهی سبب کاهش مصرف اکسیژن و متابولیسم آبزیان شود. به‌طوری‌که متابولیسم ماهی لوچ بهایی (*Turcinoemacheilus bahaii*) بعد از قرارگیری در معرض غلظت‌های مزمن و تحت کشنده مس کاهش یافت. که این امر به دلیل تجمع مس در آبشش ماهی و جلوگیری از تبادل اکسیژن می‌باشد (۷). همچنین استفاده از سولفات مس به میزان ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر منجر به کاهش فلور باکتریایی در پوست و افزایش کورتیزول و گلوکز در خون بچه‌ماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) شد (۸). به دلیل پتانسیل بالای تجمع فلزات سنگین و آلاینده‌ها در سخت‌پوستان، از این موجودات به‌طور گسترده‌ای به عنوان شاخص زیستی فلزات سنگین در محیط‌های آبی استفاده می‌کنند. به‌طوری‌که میزان مس موجود در بافت عضله میگوی سرتیز (*Metapenaeus affinis*) صید شده در سواحل استان بوشهر ۳۵/۸۱

میلی گرم بر کیلوگرم وزن خشک بود که در مقایسه با استانداردهای جهانی پایین‌تر بود (۹). به علاوه، میزان این فلز در میگوی وانامی (*L. vannamei*) پرورش‌یافته در مزارع استان بوشهر نیز کم‌تر از استانداردهای جهانی تعریف شده بود (۱۰). میگوی وانامی از خانواده پنائیده و بومی سواحل غربی آمریکای لاتین از پرو در جنوب تا مکزیک در شمال می‌باشد که با توجه به خصوصیات نظیر تحمل طیف گسترده‌ای از شرایط پرورشی، تحمل تراکم‌های بالا، نیاز کم‌تر به پروتئین حیوانی نسبت به سایر گونه‌ها و مقاومت نسبت به بیماری‌ها و رشد سریع به عنوان گونه پرورشی مهم در دنیا از جمله ایران به حساب می‌آید. این میگو از سال ۲۰۰۳ به بعد رتبه اول تولید میگوی پرورشی را در جهان به خود اختصاص داده است. همان‌طور که اندازه‌گیری شاخص‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک خون می‌تواند به عنوان یک ابزار تشخیصی در سم‌شناسی و پایش زیستی به کار رود. تغییر در میزان و سطوح این شاخص‌ها می‌تواند منعکس‌کننده پاسخ‌های آبزیان به تغییرات در محیط زندگی آن‌ها باشد (۱۱). با توجه به مطالب بیان شده، اطلاعات کمی در خصوص تأثیر فلز مس بر شاخص‌های بیوشیمیایی همولنف سخت‌پوستان وجود دارد. بنابراین، هدف از انجام این مطالعه بررسی اثرات فلز مس بر برخی از شاخص‌های استرس و ایمنی همولنف و همچنین فعالیت آنزیم‌های لیروزیم در میگوی وانامی می‌باشد.

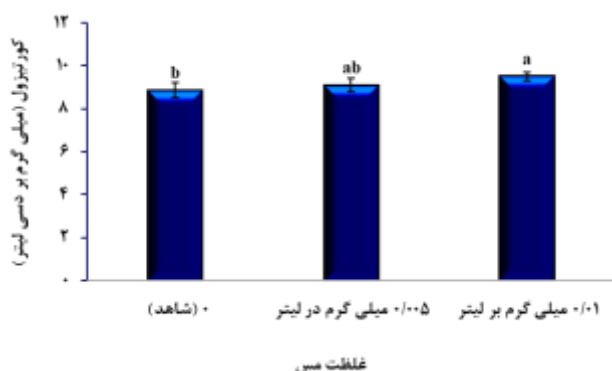
مواد و روش‌ها

جهت تعیین سمیت مزمن مس، با توجه به نتایج حاصل از پیش‌آزمون و آزمون سمیت حاد، غلظت‌های آزمون سمیت مزمن به‌دست آمدند که عبارت از ۵ و ۱۰ میکروگرم بر لیتر بود. برای این منظور ۱۵۰ قطعه میگو مورد آزمایش قرار گرفت. برای تعیین میزان فلز مس از دستورالعمل OECD 203 و مطابق روش پیشنهادی Moghimi و همکاران استفاده شد (۷). ابتدا در مرحله لاروی تعداد ۹۰۰۰۰ قطعه ناپلیوس ۱ میگوی وانامی از کارگاه تکثیر میگوی محک واقع در گمیشان استان گلستان تهیه و به محل انجام آزمایش دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران انتقال داده شد. برای انجام آزمایش تعداد ۹ عدد مخزن ۳۰۰ لیتری پلی‌اتیلنی (با حجم آگیری ۱۰۰ لیتر) برای ۳ تیمار حاوی غلظت‌های ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر و تیمار شاهد در نظر گرفته شد که در هر تانک تعداد ۱۰۰۰۰ قطعه ناپلیوس ۱ ذخیره‌سازی شدند. ناپلیوس‌ها به مدت ۲۰ روز در تانک‌ها نگهداری شدند تا به مرحله پست لارو مرحله ۱۲ رسیدند. سپس ۴۵۰ قطعه پست لارو را به حوضچه‌های بتنی به ابعاد ۷ متر مربع انتقال داده شد. در نهایت میگوها به مدت ۶۰ روز در معرض مس قرار گرفتند. در طول دوره آزمایش، فاکتورهای فیزیوشیمیایی آب شامل شوری

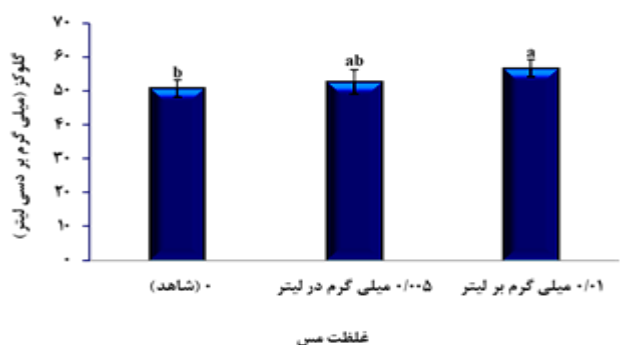
کاملاً تصادفی در ۳ تیمار و ۳ تکرار تعیین و نتایج حاصله با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه، با استفاده از نرم افزار SPSS 19 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. جهت مقایسه میانگین از آزمون دانکن در سطح احتمال ۹۵ درصد استفاده شد.

نتایج

تغییرات ایجاد شده در شاخص های همولنف میگو و انامی پس از قرارگیری در معرض غلظت های ۰/۰۵ و ۰/۰۱ میلی گرم بر لیتر مس در شکل های ۱ تا ۶ نمایش داده شده است. بر همین اساس مقدار کورتیزول با افزایش میزان مس موجود در آب افزایش پیدا کرد (شکل ۱) ($P < 0/05$). همین روند نیز برای گلوکز به ثبت رسید به طوری که بیش ترین مقدار گلوکز نیز در تیمار ۰/۰۱ میلی گرم بر لیتر ($56/66 \pm 2/52$) مشاهده شد (شکل ۲) ($P < 0/05$).



شکل ۱: میزان کورتیزول (میانگین $\pm$ انحراف معیار) همولنف میگو و انامی بعد از قرارگیری در معرض غلظت های مختلف مس به مدت ۶۰ روز حروف لاتین غیرهمنام، تفاوت معنی دار را نشان می دهند ($P < 0/05$).

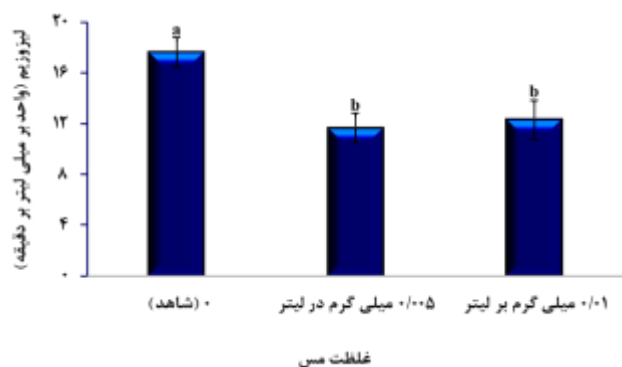


شکل ۲: میزان گلوکز (میانگین $\pm$ انحراف معیار) همولنف میگو و انامی بعد از قرارگیری در معرض غلظت های مختلف مس به مدت ۶۰ روز حروف لاتین غیرهمنام، تفاوت معنی دار را نشان می دهند ($P < 0/05$).

(۱۹ گرم در لیتر)، دما (۲۸-۳۰ درجه سانتی گراد) و pH (۸/۳-۸/۵) در نوسان بود که به صورت روزانه با استفاده از دستگاه مولتی پارامتر پرتابل (HANNA، HI98194 آمریکا) اندازه گیری شد. در مرحله ناپلیوس ۱ تا ۶ هیچ گونه غذادهی و تعویض آبی صورت نمی گیرد. غذادهی از مرحله زوا ۱ شروع می شود و میگوها روزانه ۵ بار در ساعت های ۶، ۱۰، ۱۴، ۱۸ و ۲۲ با جیره های آزمایشی غذادهی شدند و تعویض آب با ۳۰ درصد هر ۴۸ ساعت یکبار از مرحله مایسیس ۳ شروع شد. هوادهی ثابت و شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی می باشد. **سنجش شاخص های بیوشیمیایی همولنف:** در روز ۶۰ قرارگیری در معرض مس (۱۲)، نمونه گیری از همولنف میگوها به عمل آمد. برای این منظور، برای جلوگیری از بروز استرس ۲۴ ساعت قبل از نمونه گیری غذای دهی به میگوها قطع شد و سپس ۶ قطعه میگو به ازای هر تکرار به صورت تصادفی انتخاب شدند. نمونه گیری به وسیله سرنگ انسولین (۱ میلی لیتر) با سر و سوزن شماره ۲۶ از طریق سینوس شکمی انجام شد. سپس ۳۰۰ میکرو لیتر از همولنف با ۲۷۰۰ میکرو لیتر ماده ضد انعقاد الزور (Alsever) (حاوی ۳۲۶ میلی مولار سیترات سدیم، ۲۷ میلی مولار کلرید سدیم، ۱۱۵ میلی مولار گلوکز و ۹ میلی مولار EDTA و pH ۷/۵۵) مخلوط شد (۱۳). سپس مقداری از نمونه برای اندازه گیری همولنف توسط سانتریفیوژ یخچال دار شرکت Eppendorf (مدل ۵۸۱۰، کشور آلمان) در دمای ۴ درجه سانتی گراد با سرعت ۱۲۰۰۰ g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. پروتئین پلاسما کی کل توسط روش Lowry و با استفاده از سرم آلبومین بونین به عنوان استاندارد اندازه گیری شد (۱۴). اندازه گیری کورتیزول، لاکتات، لاکتات دی هیدروژناژ نیز با استفاده از کیت های تشخیصی پارس آزمون در آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران انجام شد. اندازه گیری میزان گلوکز در همولنف به روش فتومتریک صورت گرفت. در این روش کینونیمین در مجاورت آنزیم گلوکز اکسیداز، با فنول، ۴-آمینو آنتی پیرین و آنزیم پراکسیداز از آب اکسیژنه آزاد می شود که در نهایت کینونیمین به روش فتومتریک با طول موج ۵۴۶ نانومتر اندازه گیری شد (۱۵). میزان لیزوزیم همولنف بر اساس روش شرح داده شده توسط Sirirustananun و همکاران اندازه گیری شد (۱۳). بر همین اساس، ۳۰۰ میکرو لیتر از همولنف سانتریفیوژ شده و سپس رسوب آن با ۱ میلی لیتر (۰/۰۲ درصد) باکتری *Micrococcus lysodeikticus* مخلوط شد و اکشن در دمای اتاق گرفت. بعد از ۰/۵ و ۴/۵ دقیقه جذب در طول ۵۳۰ نانومتر اندازه گیری شد (۱۳).

تجزیه و تحلیل آماری: پراکنش نرمال بودن داده ها با استفاده از آزمون کلموگراف-اسمیرنوف مورد سنجش قرار گرفت. با توجه به نرمال بودن داده ها، اختلاف موجود بین تیمارها در قالب یک طرح

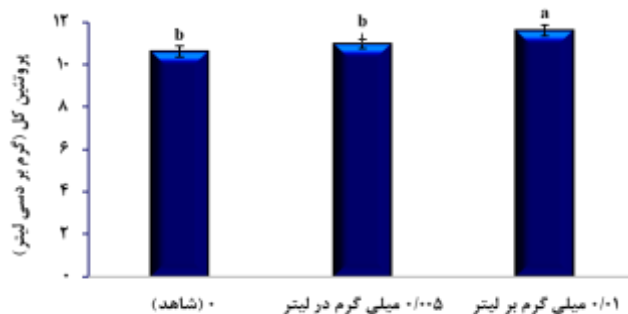
ثبت رسید که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها نشان داد (شکل ۳) ($P < 0.05$). میزان لاکتات نیز در تیمارهای ۰/۰۵ و ۰/۰۱ میلی گرم بر لیتر به ترتیب ۱۳ و ۲۱ درصد نسبت به تیمار شاهد افزایش داشت که این اختلاف معنی‌دار بود (شکل ۴) ($P < 0.05$). بیش‌ترین و کم‌ترین میزان لاکتات دی‌هیدروژناز به ترتیب در تیمار شاهد و ۰/۰۵ میلی گرم در لیتر به ثبت رسید (شکل ۵) ($P < 0.05$). کاهش معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم در تیمارهای قرار گرفته در معرض مس به ثبت رسید (شکل ۶) ($P < 0.05$).



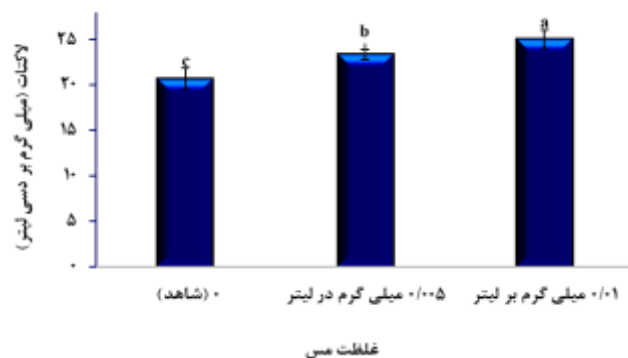
شکل ۶: میزان لیزوزیم (میانگین $\pm$ انحراف معیار) همولف میگو وانامی بعد از قرارگیری در معرض غلظت‌های مختلف مس به مدت ۶۰ روز
حروف لاتین غیرهمان، تفاوت معنی‌دار را نشان می‌دهند ($P < 0.05$).

بحث

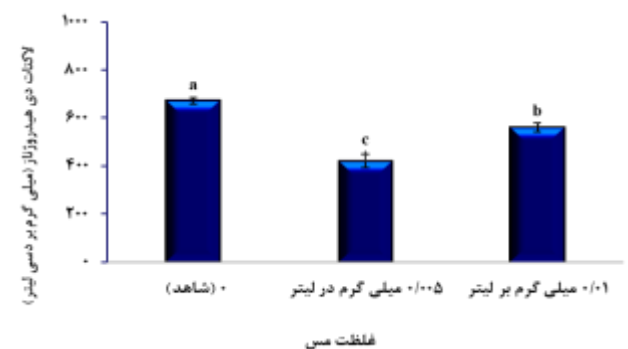
شاخص‌های بیوشیمیایی به عنوان ابزار دقیق پایش آلودگی فلزات سنگین در آبزیان مطرح می‌باشند (۱۶). نتایج این مطالعه نشان داد که افزایش میزان مس در آب منجر به افزایش کورتیزول در همولف میگوی وانامی شد. همچنین در روزهای ۱۰ و ۲۰ قرارگیری در معرض ۰/۱ میلی گرم سرب، افزایش معنی‌داری در کورتیزول سرم خون ماهی تیلاپای نیل (*Oreochromis niloticus*) مشاهده شد (۱۷). کورتیزول به عنوان اصلی‌ترین هورمون در زمان استرس مطرح بوده و نقش مهمی در حفظ هموستازی موجود زنده در شرایط استرس‌زا را برعهده دارد (۱۸). ترشح زیاد کورتیزول با افزایش غلظت گلوکز خون (هیپرگلیسمی) مرتبط بوده که در نتیجه سرکوب سیستم ایمنی در موجودات آبی قرار گرفته در شرایط استرس‌زا را به دنبال خواهد داشت (۱۹). افزایش معنی‌داری در میزان گلوکز و پروتئین در همولف میگوی وانامی بعد از قرارگیری در معرض ۰/۰۱ میلی گرم مس نسبت به سایر تیمارها مشاهده شد که این اختلاف معنی‌دار بود. Emad و همکاران به بررسی اثر سمیت مس در ماهی کفال دریایی پرداختند (۲۰). نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که میزان پروتئین کل و گلوکز در این ماهی بعد از قرارگیری در معرض مس به میزان ۰/۵



شکل ۳: میزان پروتئین کل (میانگین $\pm$ انحراف معیار) همولف میگو وانامی بعد از قرارگیری در معرض غلظت‌های مختلف مس به مدت ۶۰ روز
حروف لاتین غیرهمان، تفاوت معنی‌دار را نشان می‌دهند ($P < 0.05$).



شکل ۴: میزان لاکتات (میانگین $\pm$ انحراف معیار) همولف میگو وانامی بعد از قرارگیری در معرض غلظت‌های مختلف مس به مدت ۶۰ روز
حروف لاتین غیرهمان، تفاوت معنی‌دار را نشان می‌دهند ($P < 0.05$).



شکل ۵: میزان لاکتات دی‌هیدروژناز (میانگین $\pm$ انحراف معیار) همولف میگو وانامی بعد از قرارگیری در معرض غلظت‌های مختلف مس به مدت ۶۰ روز
حروف لاتین غیرهمان، تفاوت معنی‌دار را نشان می‌دهند ($P < 0.05$).

ارزیابی میزان پروتئین کل نشان داد با وجود افزایش اندک پروتئین کل در تیمار ۰/۰۵ میلی گرم بر لیتر تفاوت آماری با تیمار شاهد نداشت ($P > 0.05$); در حالی که بیش‌ترین میزان پروتئین کل در تیمار ۰/۰۱ میلی گرم بر لیتر به

میگوی وانامی در تیمارهای قرار گرفته در معرض مس مشاهده شد. مشابه با نتایج این مطالعه، افزایش معنی داری در میزان لاکتات همولنف خرچنگ *Carcinus maenas* بعد از قرارگیری در معرض مس به ثبت رسید (۳۱). در واقع افزایش لاکتات می تواند ناشی از افزایش بی هوازی میزان گلیکولیز باشد (۳۲). لیروزیم به عنوان پپتید ضد باکتری نقش مهمی برابر تهاجم عوامل بیماری زا هم چون باکتری ها و ویروس ها ایفا می کند (۳۳). این مولکول قادر به هیدرولیز اتصالات گلیکوزیدی پپتیدو گلیکان های دیواره باکتری ها به ویژه باکتری های گرم مثبت است. این آنزیم هم چنین به ساختارهای حاوی مورامیک اسید حمله کرده و گلیکوکتین را هیدرولیز می کند. در این مطالعه میزان فعالیت آنزیم لیروزیم در تیمارهای حاوی مس کاهش معنی داری داشت. کاهش فعالیت آنزیم لیروزیم در ماهی *Puntius gonionotus* بعد از قرارگیری به مدت ۶۶ روز در معرض غلظت های مختلف مس (۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۱۵ میلی گرم بر لیتر) مشاهده شد که نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که استفاده از سولفات مس در محیط پرورش میگو به میزان ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی گرم در لیتر موجب افزایش میزان گلوکز و کورتیزول شد. هم چنین کاهش معنی داری در میزان آنزیم لاکتات دی هیدروژناز و لیروزیم در تیمارهای حاوی مس به ثبت رسید. در مجموع می توان نتیجه گرفت که حضور فلز مس در آب منجر به بروز اختلالاتی در برخی از شاخص های بیوشیمیایی همولنف میگوی وانامی شده است که این موضوع بیانگر اثر سوء این فلز بر فیزیولوژی میگوی وانامی می باشد.

منابع

1. Chen, Q.L., Luo, Z., Pan, Y.X., Zheng, J.L., Zhu, Q.L., Sun, L.D., Zhuo, M.Q. and Hu, W., 2013. Differential induction of enzymes and genes involved in lipid metabolism in liver and visceral adipose tissue of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* exposed to copper. *Aquatic toxicology*, 136: 72-78.
2. Khabbazi, M., Harsij, M., Hedayati, S.A.A., Gerami, M.H. and Ghafari Farsani, H., 2015. Effect of CuSO₄ sub-lethal concentration on some hematological indices of Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Aquatic Ecology*, 4(4): 1-7. (In Persian)
3. Lotfi, Z., Borhani, S., Jamili, Sh. And Kadkhodaei, A., 2013. Toxic effect of copper sulfate on gill and liver tissue of *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Animal Environment*, 5(4): 79-84. (In Persian)
4. Mahdipoor, N., Hedayati, A. and Imanpoor, M., 2015. Effects of sub lethal concentrations of nickel and copper on histopathological lesions of gill tissue in Kutum fry *Rutilus kutum* (Kamensky, 1901). *Journal of Applied Ichthyological Research*, 3(3): 73-82. (In Persian)
5. Moshtaghi, B., Nezami, S., Khara, H., Pazhand, Z., Shenavar Masouleh, A. and Hallajan, A., 2012. Effect of acute toxicity of copper sulfate and potassium permanganate on gill and liver tissues of Persian sturgeon, *Acipenser persicus* Borodin, 1897. *Journal of Marine Biology*, 4(3): 35-44. (In Persian)
6. Ghorbani, R., Samani, N., Shariati, F. and Faghhi, Gh., 2007. Determining the LC₅₀ of copper in

میلی گرم در لیتر افزایش پیدا کرد. هم چنین میزان گلوکز خون این ماهی با گذشت زمان روندی افزایشی داشت و بعد از گذشت ۴ روز به بالاترین میزان خود رسید (۲۰). به علاوه، در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) قرارگیری در معرض فلز روی موجب افزایش معنی دار میزان گلوکز و پروتئین شد (۲۱). در سخت پوستان، هپاتوپانکراس به عنوان بافت اصلی ذخیره پلی ساکاریدهایی هم چون گلوکز می باشد؛ گلوکز ذخیره شده در این بافت (به شکل گلیکوژن) به عنوان یک منبع انرژی برای تولید ATP استفاده می شود. زمانی که موجود زنده در معرض شرایط استرس زا قرار می گیرد، به سرعت گلیکوژن موجود در بافت کاتابولیزه شده و گلوکز ذخیره شده وارد همولنف می شود (۲۲). افزایش غلظت گلوکز مربوط به واکنش های گلیکوژنوز و تغییر گلیکوژن به گلوکز می باشد (۲۳). افزایش پروتئین های پلاسماي خون به تولید متالوتئین ها در هپاتوپانکراس و رهاسازی آن ها در خون برای اتصال با یون های فلزات سنگین ارتباط دارد (۲۱). میزان پروتئین خون ماهی فیتوفاگ پرورشی (*Hypophthalmichthys molitrix*) بعد از قرارگیری در معرض ۵ میلی گرم در لیتر نیترات مس و نیترات سرب تغییری نکرد (۲۴، ۲۵) که با نتایج این مطالعه مطابقت و هم خوانی دارد. لاکتات دی هیدروژناز آنزیمی است که لاکتات را به پیروات کاتالیز می کند و در تمام بافت ها یافت می شود. در کلیه، عضلات و کبد مقدار این آنزیم بیش از سایر بافت ها می باشد. از تست لاکتات برای تعیین آسیب های بافتی و کمک به تشخیص کم خونی، بیماری های آبشش و کبد استفاده می شود. هم چنین از آن برای بررسی آسیب های کبدی هم چون تخریب سلولی استفاده می شود (۲۶). نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که فعالیت آنزیم لاکتات دی هیدروژناز بعد از قرارگیری در معرض مس کاهش یافت. در تحقیقی که بر روی مولدین نر ماهی سفید انجام شد، ۴۵ روز نگه داری این ماهی در سم دیازینون با غلظت ۰/۰۴ MAC منجر به کاهش معنی دار میزان آنزیم لاکتات دی هیدروژناز در این ماهی شد (۲۷) که با نتایج این مطالعه هم سو بود. هم چنین فعالیت این آنزیم در کبد ماهی شانک سر طلایی (*Sparus auratus*) بعد از قرارگیری در معرض مس کاهش یافت (۲۸). به نظر می رسد کاهش فعالیت این آنزیم به دلیل تخریب بافت کبد توسط مس باشد. بنابراین مس از فعالیت لاکتات دی هیدروژناز جلوگیری می کند. اما در مطالعه دیگر استفاده از غلظت های مختلف نانوقره تأثیری بر فعالیت آنزیم لاکتات دی هیدروژناز در بافت های عضله، هپاتوپانکراس و آبشش نداشت که این امر می تواند ناشی از افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی و کاهش رادیکال های آزاد باشد (۲۹). لاکتات محصول نهایی متابولیسم غیرهوازی بوده و به عنوان ابزاری برای بررسی میزان استرس در میگو به کار می رود (۳۰). افزایش معنی داری در میزان لاکتات در همولنف

20. **Emad, H., Abou, E.N., Khalid, M., Moselhy, E. and Mohamed, A.H., 2005.** Toxicity of cadmium and cooper and their effect on some biochemical parameters of marine fish *Mugil seheli*. Egyptian Journal of Aquatic Research. 31: 60-71.
21. **Ghovvati, N., Mohammadi, S. and Mohammadi V., 2011.** Comparison and investigation of hardness and alkalinity changes with heavy metal zinc poisoning in common carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Wetland Ecobiology. 2(8): 1-9. (In Persian)
22. **Nagur Babu, K., Pallavi, P.N., Reddy, D.C. and Kalarani, V., 2012.** Effect of 5-Hydroxytryptamine and dopamine on the carbohydrate metabolism in the shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius). World Journal of Fish and Marine Sciences. 4: 586-593.
23. **Ahmadifar, A., Akrami, R., Ghelichi, A. and Mohammadi Zarejabad, A., 2010.** Effects of different dietary prebiotic inulin levels on blood serum enzymes, hematologic, and biochemical parameters of great sturgeon (*Huso huso*) juveniles. Comparative Clinical Pathology. 20: 447-451.
24. **Sepahi, M.J., Nokhbeh Zareh, D., Fadai Raini, R. and Yousefi, T., 2020.** Study on heavy metal Zn on some physiological indces in Juvenile of Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). Journal of Animal Environment. 11(2): 205-214. (In Persian)
25. **Shakoori, M. and Abdali, S., 2018.** Effect of Lead on Some Biochemical Indices of Farmed Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). Journal of Marine science and technology research. 12(1): 1-12. (In Persian)
26. **Mohammad Nejad, M., Shahrokhi, S. and Ghelichi, A., 2018.** Evaluation of Some Haematological, Enzymes and Immunological Blood Indices of Carp (*Cyprinus carpio*) Fed with Different Levels of Vitamins C and E. Journal of Animal Physiology and Development. 11(4): 78-85. (In Persian)
27. **Mohammad Nejad Shamoushaki, M., Soltani, M., Sharifpour, I., Imanpoor, M.R., Baharlouei, A. and Naieme, M.E., 2011.** Study effects sublethal concentration of diazinon on testis, brain and heart of *Rutilus frisii kutum* (Kamensky, 1901) male brood stocks. Vet. J. of Islamic Azad Uni. Tabriz Branch. 5(3): 1287-1294. (In Persian)
28. **Antognelli, C., Romani, R., Baldracchini, F., De Santis, A., Andreani, G. and Talesa, V., 2003.** Different activity of tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. Comparative Biochemistry and Physiology. 143: 218-224.
29. **Bitá, S., 2020.** The sublethal effects of silver nanoparticles on metabolic and antioxidant enzymes levels of Whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Iranian Scientific Fisheries Journal. 29(2): 193-200. (In Persian)
30. **Mercier, L., Palacios, E., Campa-Córdova, Á.I., Tovar-Ramírez, D., Hernández-Herrera, R. and Racotta, I.S., 2006.** Metabolic and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to a repeated handling stress. Aquaculture. 258: 633-640.
31. **Truchot, J.P. and Rtal, A., 1998.** Effects of long-term sublethal exposure to copper on subsequent uptake and distribution of metal in the shore crab *Carcinus maenas*. J. Crust. Biol. 18: 224-231.
32. **Farhadi, A. and Jensen, M.A., 2016.** Effects of photoperiod and stocking density on survival, growth and physiological responses of narrow clawed crayfish (*Astacus leptodactylus*). Aquaculture Research. 47: 2518-2527.
33. **Pourmozaffar, S., Hajimoradloo, A. and Miandare, H.K., 2017.** Dietary effect of apple cider vinegar and propionic acid on immune related transcriptional responses and growth performance in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish & Shellfish immunology. 60: 65-71.
7. **Moghim, M., Mahboobi-Soofiani, N. and Malekpouri, P., 2018.** Effect of water-borne copper on Baha'i loach (*Turcinoemacheilus bahaii*) metabolism. Journal of Animal Research. 31(2): 213-221. (In Persian)
8. **Ghasemi, S., Khara, H. and Jalilpour, J., 2015.** The effects of various copper sulfate and potassium permanganate bathing treatments on the bacterial-fungal flora of the skin and gills and some hematological indicators and stress of sterliad fish (*Acipenser ruthenus*). The 4th Iran Fisheries Conference. 147-152. (In Persian)
9. **Solgi, E. and Moradi, Z., 2019.** Study of white shrimp (*Metapenaeus affinis*) from Bushehr coastal with the perspective of contamination by heavy metals Fe, Zn, Cu, Mn, and Ni and risk estimation for consumer. Journal of Animal Research. 31(4): 437-448. (In Persian)
10. **Khoramabadi, A., Alizadeh doughikollae, E., Mohammadi, M. and Eynollahi, F., 2014.** Survey Heavy metals concentration (Cu, Zn and Ni) of muscle tissue of *Litopenaeus vannamei* in farms of Bushehr province. Journal of Marine Science and Technology. 12(3): 91-100. (In Persian)
11. **Satheeshkumar, P., Ananthan, G., Senthilkumar, D., Khan, A.B. and Jeevanantham, K., 2012.** Comparative investigation on haematological and biochemical studies on wild marine teleost fishes from *Vellar estuary*, southeast coast of India. Comparative Clinical Pathology. 2: 275-281.
12. **Karimian, S., 2020.** Effect of Copper Sulfate Replacement with Copper Nano Oxide in Diet on Growth performance and Enzymatic Activity and Tissue Pathology of Goldfish Liver (*Carassius auratus*). Journal of Fisheries Science and Technology. 9(1): 39-49. (In Persian)
13. **Sirirustananun, N., Chen, J.C., Lin, Y.C., Yeh, S.T., Liou, C.H., Chen, L.L., Sim, S.S. and Chiew, S.L., 2011.** Dietary administration of a *Gracilaria tenuistipitata* extract enhances the immune response and resistance against *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fish & shellfish immunology. 31: 848-855.
14. **Tamadoni Jahromi, S., Pourmozaffar, S., Jahanbakhshi, A.R., Rameshi, H., Gozari, M., Khodadadi, M., Sohrabipour, J., Behzadi, S., Bazrkar, N., Nahavandi, R. and Zahedi, M.R., 2021.** Effect of different levels of dietary *Sargassum cristaefolium* on growth performance, hematological parameters, histological structure of hepatopancreas and intestinal microbiota of *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture. 533: 1-17.
15. **Abdollahi Arpanahi, D., Jafaryan, H., Soltani, M. and Gholipour Kanani, H., 2015.** Use of *Bacillus probiotics* for immune responses and intestinal microflora of white leg shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) post larvae. Iranian Scientific Fisheries Journal. 23(4): 105-117. (In Persian)
16. **Shah, S.I. and Altindag, A., 2005.** Alternation of immunological parameters of tench (*Tinca tinca*) after acute and chronic exposure to lethal and sub lethal treatments with mercury, cadmium and lead. Tur Vetand Ani Sciences. 29: 1163-1168.
17. **Çoğun, H.Y. and Şahin, M., 2013.** The effect of lead and zeolite on hematological and some biochemical parameters in Nile fish (*Oreochromis niloticus*). Current Progress Biological Research. 12: 277-286.
18. **Pourmozaffar, S., Tamadoni Jahromi, S., Rameshi, H. and Gozari, M., 2019.** Evaluation of some haemolymph biochemical properties and F-cell prevalence in hepatopancreas of white leg shrimp (*Litopenaeus vanammei*) after fed diets containing apple cider vinegar and propionic acid. Aquaculture Research. 50: 3435-3443.
19. **Khalesi, M.K., Abedi, Z., Behrouzi, S. and Eskandari, S.K., 2017.** Haematological, blood biochemical and histopathological effects of sublethal cadmium and lead concentrations in common carp. Bulgarian Journal of Veterinary Medicine. 20: 141-150.