شیلات، مجله منابع طبیعی ایران

دوره ۷۱، شماره ۱، بهار ۱۳۹۷

صفحات ۹۲-۸۲

بررسی اثرات حفاظتی گیاه رزماری و آویشن در کاهش سمیت آفلاتوکسین B_1 جیره غذایی در بچه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

حسن تاسا[۱]، احمد ایمانی[۲]، کوروش سروی مغانلو[۲]*

۱. دانشجوی کارشناس ارشد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه ، ایران.
۲. دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه ، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۲/۱ تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۳/۱۴

چکیده

کاهش آثار سموم قارچی از مسائل مهم صنعت تولید غذای آبزیان محسوب می‌شود. در این مطالعه تعداد ۱۳۵ قطعه ماهی کپور معمولی ۱/۵±۱۵ گرمی در ۳ تیمار (گروه شاهد، ۴۰۰ ppb سم آفلاتوکسین B_1، ۴۰۰ ppb سم و ترکیب پودر گیاهان آویشن و رزماری) به مدت ۱۲ هفته پرورش یافتند. در پایان آزمایش، نمونه‌های هپاتوپانکراس، روده و خون جهت سنجش فعالیت آلکالین پروتئاز، لیپاز، آمیلاز و برخی شاخص‌های خونی تهیه شدند. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تغذیه با جیره‌های غذایی آلوده به آفلاتوکسین و مکمل شده با رزماری و آویشن به مدت ۱۲ هفته روی میزان فعالیت آنزیم آلکالین پروتئاز هپاتوپانکراس و روده، تعداد RBC، هموگلوبین، نوتروفیل و لنفوسیت تاثیر معنی‌داری داشت ($P<۰/۰۵$)، اما موجب تغییر معنی دار فعالیت آنزیم‌های لیپاز روده، آمیلاز هپاتوپانکراس و سایر شاخص-های خونی نگردید ($P>۰/۰۵$). بیشترین میزان فعالیت آنزیم پروتئاز و آمیلاز روده در تیمار تغذیه شده با جیره غذایی حاوی ۴۰۰ ppb آفلاتوکسین B_1 مشاهده گردید. همچنین کمترین میزان فعالیت مربوط به آنزیم‌های آلکالین پروتئاز، لیپاز و آمیلاز روده و هپاتوپانکراس تیمار تغذیه شده با جیره آلوده به آفلاتوکسین و حاوی پودر گیاهان آویشن و رزماری بود ($P<۰/۰۵$). می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که افزودن آویشن و رزماری به جیره غذایی آلوده به آفلاتوکسین B_1 در کاهش آثار مخرب سم‌قارچی بر فعالیت آنزیم‌های آلکالین پروتئاز و آمیلاز روده، شمارش RBC، میزان هموگلوبین، نوتروفیل و لنفوسیت بچه ماهیان کپور معمولی موثر می‌باشد.

واژگان کلیدی: هپاتوپانکراس، روده، گیاهان دارویی، آلودگی، تغذیه.

* نویسنده مسئول: تلفن: ۰۴۸۹-۳۲۷۷-۹۸۴۴+ ایمیل: a.imani@urmia.ac.ir

۱. مقدمه

مایکوتوکسین‌ها سموم قارچی طبیعی هستند که عمدتاً توسط جنس *Aspergillus* و برخی گونه‌های *Penicillium* تولید می‌شوند (Kabak *et al*., 2006). آفلاتوکسین B_1 از جمله این سموم قارچی است که می‌تواند در تغذیه آبزیان مشکل ایجاد نماید (Hooft *et al*., 2011). اقلام غذایی مانند ذرت و فرآورده‌های جانبی دانه‌های روغنی نظیر بادام زمینی و پنبه دانه که برای تامین احتیاجات غذایی آبزیان قابل استفاده هستند، در شرایط رطوبت و درجه حرارت بالا به‌راحتی در معرض آلودگی با آفلاتوکسین می‌باشند (Kabak *et al*., 2006).

تغذیه ماهیان با جیره‌های حاوی آفلاتوکسین باعث بروز مشکلاتی در اندام‌های حیاتی از جمله کبد، کلیه، طحال، روده و سیستم تولیدمثلی می‌شود (Sahoo, 2000; Gallo *et al*., 2010). قرار گرفتن در معرض آفلاتوکسین B_1 منجر به تغییر رنگ و دژنرسانس چربی کبد، انسداد مجاری صفراوی، هیپرپلازی و سیروز کبدی در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان شده (Hooft *et al*., 2011) و جیره غذایی کپور ماهیان آلوده به آفلاتوکسین باعث بروز تغییرات هیستوپاتولوژیک در بافت‌های حیاتی آن‌ها می‌گردد (Svobodova *et al*., 1982; Sahoo, 2000). در گربه ماهی کانالی تغذیه شده با جیره غذایی آلوده به آفلاتوکسین B_1 عملکرد آبشش، کلیه، طحال، معده، کاهش رشد مختل شده و حتی منجبر به مرگ و میر ماهیان شد (Jantrarotai *et al*., 1990; Gallo *et al*., 2010). در پژوهش‌های پیشین مشخص شده است که سم آفلاتوکسین بر ساخت و ترشح آنزیم‌ها، هضم مواد غذایی و در نتیجه رشد ماهی و طیور می‌تواند موثر باشد (Grenier and Applegate, 2013; Imani *et al*., 2018).

آنزیم ها به‌علت مشارکت در فرآیند هضم و جذب مواد غذایی مورد توجه هستند و با محدود شدن گوارش مواد غذایی، میزان جذب مواد مغذی محدود می‌گردد. پروتئاز قلیایی آنزیم کلیدی در گوارش پروتئین به شمار می‌رود (Einarsson *et al*., 1996). علاوه بر این Guzman و همکاران (۲۰۰۱) نشان دادند که میزان فعالیت آنزیم آمیلاز با میزان افزایش وزن میگوی *Litopenaeus setiferus* همبستگی داشت. از سوی دیگر، چربی غذا منبع مهمی از انرژی محسوب می‌شود و اعتقاد بر این است که آنزیم لیپاز وابسته به نمک‌های صفراوی نقش اصلی گوارش چربی‌ها را در ماهیان بر عهده دارند (Murray *et al*., 2003). بنابراین، مطالعه میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهیان در شرایط مختلف تغذیه‌ای نظیر حضور آلاینده‌ها در جیره‌غذایی می‌تواند شاخص مناسبی برای درک وضعیت فیزیویولوژیکی آبزیان باشد.

در مطالعات مختلف عنوان شده است که یکی از مهمترین مکانیسم‌های آسیب‌زایی بسیاری از سموم ایجاد رادیکال‌های آزاد اضافی در سلول‌های بدن است (Kim *et al*., 2009; Tee *et al*., 2015). برای مثال، سطوح مزمن فلورید در جیره غذایی خوک‌ها از طریق ایجاد فلوروزیس مزمن در خوک‌ها موجب افزایش تولید رادیکاهای آزاد و در پی آن پراکسیداسیون چربی‌ها و سرانجام تخریب بافت‌های نرم می‌گردد. همچنین این عارضه در نهایت موجب آسیب‌های بافتی در لوزالمعده و در نتیجه کاهش ترشح آنزیم‌های گوارشی از جمله پروتئاز و لیپاز می‌گردد (Zhan *et al*., 2015). پژوهشگران بر این یافته اجماع دارند که بسیاری از مشکلات سلامتی (نظیر تخریب بافت کبد، کلیه و ...) ناشی از عدم توازن میان میزان رادیکال‌های آزاد تولیدی و ظرفیت آنتی اکسیدانی سلول‌های بافت‌های مختلف می‌باشد (Virgili and Marino, 2008).

امروزه از مسائل مهم صنعت تولید غذای آبزیان، خنثی‌سازی یا تعدیل اثرات سموم مختلف از جمله آفلاتوکسین می‌باشد (Kalantar Nistanaki and Salari, 2012). در دهه‌های اخیر موفقیت‌های زیادی با استفاده از گیاهان دارویی در این صنعت حاصل شده است (Hahm *et al*., 2001). از این گیاهان می‌توان به رزماری اشاره کرد که دارای ترکیبات آلفا پینن، سینئول، کامفن و کامفور می‌باشد (Benchaar *et al*., 2007) و این ترکیبات فعالیت‌های ضدباکتریایی، ضد قارچی و آنتی‌اکسیدانی دارند (Bozin *et al*., 2007). آویشن یکی دیگر از گیاهان دارویی بومی مناطق جنوبی ایران است (Ashtaral, 2007) و دارای ترکیباتی مانند تانن، ساپونین، ترکیبات فنولی،

جدول ۱- تیمارهای آزمایشی.

تیمار	آفلاتوکسین B_1 (ppb)	پودر گیاه رزماری (g/kg feed)	پودر گیاه آویشن (g/kg feed)
شاهد	۰	۰	۰
تیمار بدون گیاه دارویی	۴۰۰	۰	۰
تیمار دارای گیاه دارویی	۴۰۰	۲۰	۲۰

جدول ۲- فرمولاسیون و تجزیه تقریبی جیره تجاری مورد استفاده در این پژوهش.

اقلام غذایی (درصد)			
کنجاله سویا	۴۶	پرمیکس معدنی	۰/۵
آرد گندم نامرغوب	۱۹/۵	ویتامین C پایدار	۰/۲۳
آرد گندم مرغوب	۱۶	کولین کلراید	۰/۲۲
پودر کیلکا	۵	متیونین	۰/۲
روغن کیلکا	۲/۵	BHT	۰/۱
روغن سویا	۳	هم‌بند	۰/۲
کلسیم دی فسفات	۲/۷	سلولز	۳/۳۵
پرمیکس ویتامینی	۰/۵		
تجزیه تقریبی (درصد)			
رطوبت	۸	خاکستر	۱۲
پروتئین خام	۴۰	عصاره عاری از ازت	۲۴
چربی خام	۱۱	انرژی خام (kcal/kg)	۴۴۸۷
فیبر خام	۵		

ترکیبات فلاونوئیدی، ترپنوئیدها و روغن‌های فرار ترکیبات اکسیژن‌دار مانند تیمول و کارواکرول می‌باشد (Malik *et al*., 2003). این گیاه به‌واسطه داشتن ترکیبات فنولی دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی است (Naghdi Badi *et al*., 2004). در ماهیان، گزارش‌های متعددی مبنی بر اثر گیاهان دارویی بر تحریک اشتها، محرک رشد، افزایش وزن، بهبود عملکرد دستگاه گوارش و تحریک سیستم ایمنی ارائه شده است (Reverter *et al*., 2014).

استفاده از اقلام غذایی با منشا گیاهی در جیره غذایی آبزیان پرورشی و آلودگی ناخواسته این منابع به سموم مختلف از جمله آفلاتوکسین، لزوم استفاده از گیاهان دارویی در جیره غذایی آبزیان را بیش از پیش نمایان می‌کند. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات حفاظتی گیاه رزماری و آویشن در کاهش سمیت آفلاتوکسین B_1 از حیث فعالیت آنزیم‌های گوارشی روده و هپاتوپانکراس و برخی شاخص‌های خونی بچه‌ماهی کپور معمولی انجام گرفت.

۲. مواد و روش‌ها

تعداد ۱۳۵ قطعه بچه‌ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) با میانگین وزنی ۱/۵±۱۵ گرم از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان گرمابی شهید کاظمی (پلدشت، آذربایجان غربی) تهیه و پس از ضدعفونی با محلول نمک ۳ درصد به صورت تصادفی با تراکم ۱۵ قطعه در ۹ آکواریوم ۷۰ لیتری ذخیره سازی گردیدند (Sattari, 2014). آزمایش پس از طی یک هفته سازگاری ماهیان با محیط جدید آغاز شد. این مطالعه در قالب یک طرح کاملاً تصادفی شامل ۳ تیمار و ۳ تکرار (جدول ۱) برای هر تیمار آزماشی به مدت ۱۲ هفته اجرا شد. میانگین دمای آب محیط پرورش ۰/۵±۲۴/۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی تنظیم شد و میزان اکسیژن محلول آب یا هوادهی پیوسته در حد مطلوب ۷ ppm حفظ گردید. روزانه هفتاد درصد آب آکواریوم‌ها با آب چاه هوادهی شده (به مدت ۲۴ ساعت) جهت حفظ کیفیت آب از نظر میزان آمونیاک و سایر ترکیبات ناخواسته، تعویض می‌شد.

از جیره غذایی تجاری (جدول ۲) جهت تغذیه بچه ماهیان در طول آزمایش استفاده شد. با این توضیح که برای ساخت جیره های غذایی گروه‌های آزمایشی، جیره تجاری ابتدا آسیاب شده و در ادامه

غلظت مزمن آفلاتوکسین B_1 (Sahoo *et al*., 2001) و پودر گیاه رزماری (*Rosmarinus officinalis*) و آویشن (*Zataria multiflora*) با توجه به تیمارهای غذایی به جیره غذایی افزوده شد. در مرحله بعد با افزودن رطوبت، خمیر به‌دست آمده با استفاده از چرخ گوشت صنعتی، به‌صورت رشته‌هایی به اندازه ۲ mm در آمد و پس از خشک شدن در آون با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد، جهت تغذیه ماهیان استفاده گردید. غذادهی ماهیان تحت آزمایش به‌صورت روزانه ۳ درصد وزن بدن و در سه نوبت انجام گرفت.

پس از پایان ۱۲ هفته دوره پرورش، عمل غذا-دهی ماهیان ۲۴ ساعت قبل از انجام نمونه‌برداری قطع گردید و از هر تیمار تعداد ۶ قطعه ماهی به طور تصادفی انتخاب و در محلول پودر گل میخک با غلظت ۲۵۵ppm بی‌هوش شدند (Akhlaghi and Mirab Brojerdi, 1997). خون‌گیری با سرنگ‌های آغشته به هپارین انجام گرفت و در ادامه نمونه خون درون یونولیت به همراه یخ، با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه منتقل شد. تعداد گلبول‌های سفید (WBC) و تعداد گلبول‌های قرمز خون (RBC) و سایر شاخص‌های خونی با روش های استاندارد تعیین گردیدند (Stec *et al*., 2008).

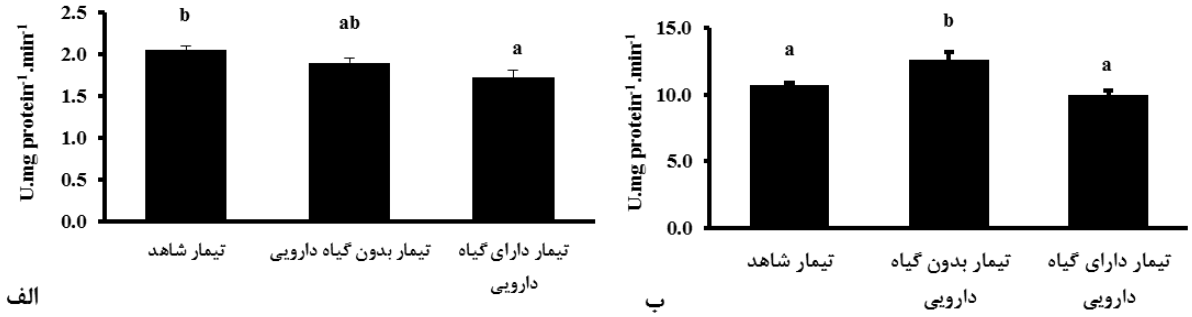
همچنین، نمونه‌های بافت هپاتوپانکراس و روده برای سنجش فعالیت آنزیم‌های گوارشی شامل آلکالین پروتئاز، آلفا آمیلاز و لیپاز، تهیه شدند. البته، چربی‌های زائد اطراف روده و هپاتوپانکراس روی یخ از بافت‌ها جدا گردیده و در سرم نمکی استریل شتشو، خشک و در درون میکروتیوب‌هایی که قبلاً کدگذاری شده بودند، قرار گرفتند. نمونه‌ها تا زمان سنجش فعالیت آنزیم‌ها در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Lemieux *et al*., 1999). سنجش فعالیت آنزیم آلکالین‌پروتئاز با استفاده از محلول سوبسترا آزوکازئین ۲ درصد در ۵۰ میلی مولار بافر Tris-Hcl با pH =۷/۵ به‌عنوان سوبسترا، انجام گرفت (Garcia-Carreno, 1993). برای تعیین فعالیت آلفا آمیلاز از نشاسته به‌عنوان سوبسترا استفاده گردید. نشاسته تحت تأثیر آنزیم، تجزیه شده و تولید مالتوز می‌نماید که از طریق رنگ‌سنجی و تغییر شدت رنگ در معرف دی‌نیتروسالیسیلیک اسید قابل سنجش می‌باشد (Bernfeld, 1955; Worthington, 1991). میزان فعالیت آنزیم لیپاز عصاره خام آنزیمی با استفاده از هیدرولیز p-nitrophenylemyristate و به طریق اسپکتروفتومتری تعیین گردید (Iijima *et al*., 1998).

داده‌های مربوط به شاخص‌های خونی و فعالیت آنزیم‌های گوارشی مورد مطالعه از آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) به کمک نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ مورد بررسی قرار گرفتند. سطح معنی‌داری آزمون‌های آماری کم‌تر از ۵ درصد در نظر گرفته شد. البته پیش از انجام آنالیز واریانس، نرمال بودن توزیع داده‌ها و همگنی واریانس گروه‌های مختلف آزمایشی به ترتیب به کمک آزمون‌های شاپیروویلک و لون بررسی شد. همچنین در صورت معنی‌دار بودن نتایج آنالیز واریانس، از آزمون توکی برای مقایسه میانگین تیمارهای مختلف استفاده شد. نتایج به‌صورت Mean±SE گزارش شدند.

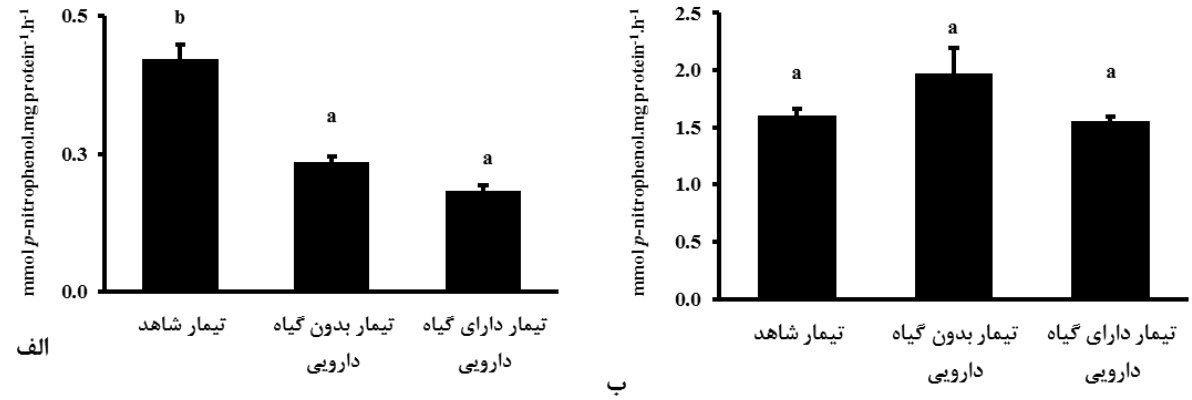
۳. نتایج

فعالیت آنزیم آلکالین پروتئاز بافت‌های هپاتوپانکراس و روده ماهیان تیمارهای مختلف در شکل ۱ آمده است. همان‌طور که از نتایج قابل درک است، میزان فعالیت این آنزیم در بافت های مختلف مورد مطالعه تحت تاثیر تیمارهای مختلف قرار گرفته است (P<۰/۰۵). بیشترین میزان فعالیت این آنزیم در بافت هپاتوپانکراس متعلق به تیمار شاهد بود (P<۰/۰۵)، در حالیکه در بافت روده بیشترین فعالیت آنزیمی در تیمار تغذیه شده با آلوده به ۴۰۰ ppb سم آفلاتوکسین بود (P<۰/۰۵). در بافت روده استفاده از ترکیب پودر گیاهان رزماری و آویشن موجب اصلاح میزان فعالیت آنزیمی شد، به نحوی که میان گروه شاهد و گروه تغذیه با جیره غذایی آلوده به سم که دارای مخلوط پودر گیاهان مذکور بود، از این حیث تفاوتی وجود نداشت (P>۰/۰۵).

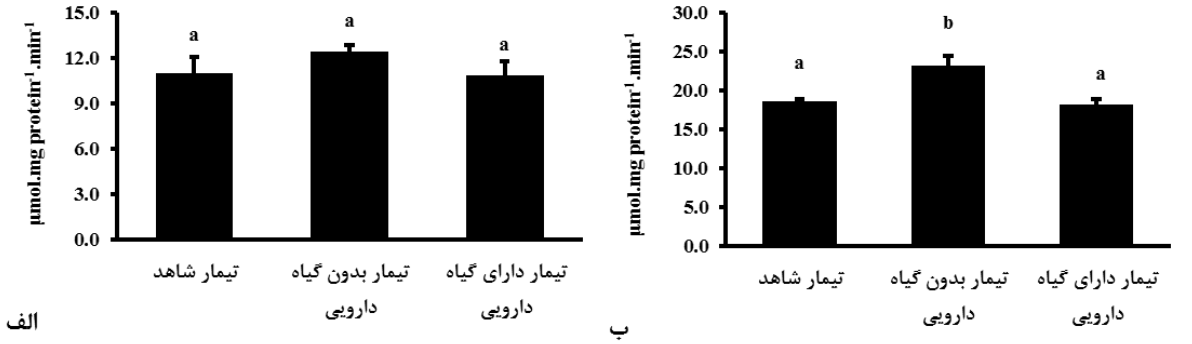
فعالیت آنزیم لیپاز بافت‌های هپاتوپانکراس و روده ماهیان تیمارهای مختلف در شکل ۲ آمده است. همانطور که از نتایج قابل درک است، میزان فعالیت این آنزیم در بافت هپاتوپانکراس تحت تاثیر تیمارهای مختلف قرار گرفت (P<۰/۰۵). بیشترین میزان فعالیت این آنزیم در بافت هپاتوپانکراس متعلق به تیمار شاهد



شکل ۱ - فعالیت آنزیم آلکالین پروتئاز هپاتوپانکراس (الف) و روده (ب) ماهیان تیمارهای مختلف در پایان هفته دوازده. حروف متفاوت در هر نمودار نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار آماری می‌باشد (*P*<۰/۰۵).



شکل ۲ - فعالیت آنزیم لیپاز هپاتوپانکراس (الف) و روده (ب) ماهیان تیمارهای مختلف در پایان هفته دوازده. حروف متفاوت در هر نمودار نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار آماری می‌باشد (*P*<۰/۰۵).



شکل ۳ - فعالیت آنزیم آمیلاز هپاتوپانکراس (الف) و روده (ب) ماهیان تیمارهای مختلف در پایان هفته دوازده. حروف متفاوت در هر نمودار نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار آماری می‌باشد (*P*<۰/۰۵).

بود (*P*<۰/۰۵)، در حالیکه در بافت روده بیشترین فعالیت آنزیمی در تیمار تغذیه شده با آلوده به ppb ۴۰۰ سم آفلاتوکسین بود، البته هرچند این میزان از نظر آماری تفاوتی با سایر تیمارها نداشت (*P*>۰/۰۵). فعالیت آنزیم لیپاز در بافت روده تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت (*P*>۰/۰۵).

فعالیت آنزیم آمیلاز بافت‌های هپاتوپانکراس و روده ماهیان تیمارهای مختلف در شکل ۳ آمده است. میزان فعالیت این آنزیم در بافت روده تحت تاثیر تیمارهای مختلف قرار گرفت (*P*<۰/۰۵). بیشترین میزان فعالیت این آنزیم در بافت هپاتوپانکراس متعلق به تیمار شاهد بود (*P*<۰/۰۵)، در حالیکه در بافت روده بیشترین فعالیت آنزیمی در تیمار تغذیه شده با آلوده به ppb ۴۰۰ سم آفلاتوکسین بود، البته هرچند این میزان از نظر آماری تفاوتی با سایر تیمارها نداشت (*P*>۰/۰۵). فعالیت آنزیم لیپاز در بافت هپاتوپانکراس تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت (*P*>۰/۰۵).

نتایج مربوط به اثر تیمارهای مختلف آزمایشی

جدول ۳- شاخص‌های خونی ماهیان تیمارهای مختلف آزمایشی در پایان دوره (Mean ± SE, n=3).

شاخص	تیمارهای آزمایشی		
	شاهد	تیمار بدون گیاه دارویی	تیمار دارای گیاه دارویی
[1]RBC	۲/۵۰ ± ۰/۵۰[a*]	۲۱/۵۰ ± ۱/۵۰[c]	۱۳/۰۰ ± ۲/۰۰[b]
[2]WBC	۲۹/۵۰ ± ۲/۵۰	۳۳/۵۰ ± ۰/۵۰	۲۹/۵۰ ± ۰/۵۰
هموگلوبین[3]	۳/۲۰ ± ۰/۲۰[a]	۲۲/۲۳ ± ۱/۰۱[c]	۱۴/۵۰ ± ۱/۵۰[b]
هماتوکریت[4]	۳۲/۰۰ ± ۰/۰۰[b]	۳۵/۰۰ ± ۱/۵۰[b]	۲۰/۲۵ ± ۲/۲۵[a]
نوتروفیل[4]	۳۸/۵۰ ± ۴/۵۰[a]	۵۶/۰۰ ± ۱/۰۰[b]	۳۹/۰۰ ± ۱/۰۰[a]
لنفوسیت[4]	۵۳/۵۰ ± ۵/۵۰[b]	۳۶/۰۰ ± ۲/۰۰[a]	۵۱/۵۰ ± ۱/۵۰[b]
بازوفیل[4]	۱ ± ۱	۰ ± ۰	۱ ± ۱
مونوسیت[4]	۶ ± ۱	۷ ± ۴	۹ ± ۲
ائوزینوفیل[4]	۳ ± ۱	۲ ± ۱	۲ ± ۱

* حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار آماری می‌باشد (p<۰/۰۵). [1] ۱۰۶×/µl، [2] ۱۰۳×/µl، [3] g/dl، [4] درصد

بر شاخص‌های خونی در جدول ۳ آمده است. شاخص‌های RBC و هموگلوبین ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی آلوده شده با ۴۰۰ppb آفلاتوکسین B_1 بیشترین میزان بود و با افزودن پودر گیاهان رزماری و آویشن به جیره غذایی آلوده به آفلاتوکسین، میزان این شاخص‌ها به گروه شاهد نزدیک شد اما همچنان سطح آن‌ها بالاتر از گروه شاهد بود (*P*<۰/۰۵). همچنین شاخص هماتوکریت تیمار شاهد با تیمار ۴۰۰ppb آفلاتوکسین B_1 اختلاف معنی‌داری نداشت. از نظر شاخص WBC اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد (*P*>۰/۰۵). با این وجود، درصد نوتروفیل‌ها تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفت، به نحوی که بین گروه شاهد و ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی آلوده به آفلاتوکسین که حاوی پودر گیاهان رزماری و آویشن بود، اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (*P*>۰/۰۵)، اما بین این دو گروه و تیمار ppb ۴۰۰ آفلاتوکسین B_1 اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (*P*<۰/۰۵). وضعیت لنفوسیت میان تیمارهای مختلف کاملاً عکس نوتروفیل بود. همچنین میان درصد لنفوسیت، بازوفیل، مونوسیت و ائوزینوفیل تیمارهای مختلف، تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (*P*>۰/۰۵).

۴. بحث و نتیجه‌گیری

وجود سم آفلاتوکسین در جیره غذایی می‌تواند فیزیولوژی موجود و در نتیجه عملکردهای حیاتی بدن آن‌را تغییر دهد، علاوه بر این تجمع این ترکیبات در بافت‌های آبزیان از طریق مصرف فرآورده‌های غذایی حاصل از آن باعث انتقال این سموم به مصرف کننده نهایی (انسانی) می‌شود (Rymuszka, 2012). استفاده از ترکیباتی همچون پودرهای گیاهی از روش‌های کاهش اثرات این سموم به شمار می‌رود (Mohapatra *et al*., 2013). نتایج این پژوهش نشان داد وجود آلودگی آفلاتوکسینی در جیره غذایی کپور معمولی موجب افزایش فعالیت آنزیم آلکالین پروتئاز در بافت روده که محل اصلی فرآیند هضم و جذب غذا و مواد مغذی است، می‌شود. چنین نتایجی قبلا در مطالعات انجام شده روی ماهی قزل آلای رنگین کمان (Imani *et al*., 2018)، جوجه‌ها (Marchioro *et al*., 2013) و همچنین اردک (Han *et al*., 2008) گزارش شده است. به‌طور مشابهی، پانکراتیتیس و هیپرتروفی سلول‌های آسینی در ماهیان قزل آلای رنگین کمان و همچنین تیلاپیای نیل در مواجهه با مقادیر بالای آفلاتوکسین B1 گزارش شده است (Ashley, 1965; Chavez-Snachez *et al*., 1994). محققین بر این باور هستند که پانکراتیتیس از عوامل اصلی کاهش جذب روده‌ای مواد مغذی بویژه چربی‌ها و پروتئین است (Bliss and Wolfe, 2010). با این وجود، در مطالعه Sahoo (۲۰۰۰) تزریق درون صفاقی آفلاتوکسین به ماهی روهو (Rohu) موجب نکروز سلول‌های آسینی لوزالمعده و کاهش گرانول‌های سیتوپلاسمی گردید که به مفهوم کاهش ساخت/ترشح آنزیم‌های گوارشی و متعاقب آن کاهش اشتهای ماهی بود. نتایج مشابهی در گربه ماهی روگاهی گزارش شده است (Jantrarotai *et al*., 1990). همچنین Osborne و Hamilton (۱۹۸۱) مشاهده کردند که در جوجه‌های تغذیه با آفلاتوکسین سطح فعالیت آنزیم‌های لیپاز، تریپسین و آمیلاز کاهش یافت. تفاوت

موجود میان نتایج پژوهش‌های مختلف می‌تواند با توجه به مدت زمان مواجهه با سم/سموم، ماتریس غذا، اندازه و گونه بسیار متفاوت باشد. Applegate و همکاران (۲۰۰۹) بیان می‌دارند که موجود از یک واکنش جبرانی به دلیل آفلاتوکسیکوزیس و کاهش قابلیت جذب مواد مغذی استفاده می‌کند، که این فرآیند مستلزم زمان است. برای مثال Nazdar و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که علیرغم کاهش فعالیت آنزیم آلکالین پروتئاز ماهیان تغذیه شده با سطوح مختلف نانوذره اکسید نیکل در ماه اول، یک افزایش فعالیتی در ماه دوم مطالعه مشاهده گردید. چنین نتیجه‌ای را Marchioro و همکاران (۲۰۱۳) در جوجه‌ها گزارش کرد، به شکلی که در روز چهاردهم تغذیه با سطوح مختلف آفلاتوکسین، سطح فعالیت آنزیم‌های لیپاز، آمیلاز و تریپسین نسبت به گروه شاهد (فاقد سم آفلاتوکسین در جیره غذایی) کاهش یافت اما در پایان آزمایش سطح فعالیت آنزیم‌های فوق در گروه‌های دریافت کننده سم افزایش معنی‌داری داشت. استفاده از پودر گیاهان رزماری و آویشن تا حدی موجب تعدیل اثر سم آفلاتوکسین بر فعالیت آلکالین پروتئاز گردید. نتایج مشابهی را Imani و همکاران (۲۰۱۸) و Nazdar و همکاران (۲۰۱۷) به ترتیب در ماهیان قزل آلای رنگین کمان تغذیه با جیره‌های غذایی آلوده به آفلاتوکسین و نانوذره اکسید نیکل که با اسانس دارچین و سیلیمارین تغذیه شده بودند، گزارش دادند؛ به این شکل که تغذیه با این ترکیبات گیاهی تا حدی از افزایش پاتولوژیکی فعالیت آنزیم آلکالین پروتئاز کاست. با این وجود تفاوتی از نظر فعالیت این آنزیم در بافت هپاتوپانکراس ماهیان گروه شاهد و تیمار دوم (جیره غذایی حاوی ۴۰۰ ppb سم آفلاتوکسین) وجود نداشت، ولی افزودن پودر گیاهان رزماری و آویشن سبب کاهش فعالیت آنزیم آلکالین پروتئاز گردید. دلیل چنین تفاوتی میان بافت‌های مختلف مشخص نیست و نیازمند بررسی‌های بیشتری است، اما از آن‌جا که روده محل اصلی فعالیت‌های گوارشی است و محتویات سلول‌های آسینار لوزالمعده سرانجام به روده تخلیه می‌شود، شاید مطالعه فعالیت این آنزیم در روده از حیث اثر سموم بر فیزیولوژی هضم و جذب آبزیان کاربردی‌تر باشد. فعالیت آنزیم لیپاز هپاتوپانکراس ماهی کپور تحت تاثیر جیره غذایی آلوده به آفلاتوکسین کاهش یافتو افزودن پودر گیاهان بی-تاثیر بود. با این وجود، فعالیت آنزیم آمیلاز بافت روده تحت تاثیر سمیت، افزایش یافت و افزودن پودر گیاهان رزماری و آویشن به این جیره غذایی سبب تعدیل اثر سم بر فعالیت این آنزیم گردید. در مورد دلیل تفاوت فعالیت آنزیم‌های گوارشی مختلف در ماهیان یک گروه آزمایشی نسبت به حضور یک آلاینده اطلاعاتی دست نیست. چنین تفاوت‌هایی ممکن است به رفتار این آنزیم‌ها باز گردد (Applebaum *et al.*, 2001; Marchioro *et al.*, 2013)، که البته درک چنین نتایجی مستلزم پژوهش‌های بیشتری از نظر سازوکار تنظیم بیان ژن‌های آنزیم‌های مختلف و نحوه تاثیر آلاینده‌ها بر این مسیرهای بیوشیمیایی است.

نتایج این پژوهش در مورد شاخص‌های خونی نشان داد که سم آفلاتوکسین باعث افزایش گلبول‌های قرمز و هموگلوبین خون ماهیان گردید و افزودن پودر گیاهان رزماری و آویشن تا حدی سبب تعدیل و نزدیکی به گروه شاهد گردید. Khani و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که در ماهیان قزل‌آلای رنگین-کمان تغذیه شده با آفلاتوکسین B_1، افزایش گلبول-های قرمز و هموگلوبین اتفاق افتاده است که نتایج به-دست آمده با تحقیق حاضر همسو می‌باشد. همچنین در همان مطالعه، حضور سم آفلاتوکسین B_1 در جیره غذایی ماهی قزل آلای رنگین کمان اثر بر تعداد گلبول‌های سفید ماهیان نداشت و همچنین تعداد آین سلول‌ها تحت تاثیر اسانس دارچین نیز قرار نگرفت، که مشابه نتایج بدست آمده برای شمارش گلبول‌های سفید در این مطالعه بود. Donmez و همکاران (۲۰۱۲) طی پژوهشی روی ماهی قزل‌آلای رنگین-کمان، به این نتیجه رسیدند که سم آفلاتوکسین باعث کاهش گلبول‌های قرمز و هموگلوبین خون می‌شود که با نتیجه تحقیق حضر مغایرت دارد. اختلاف در گونه جانوری مورد مطالعه، غلظت سم و همچنین مدت زمان مواجهه به همراه ماتریس غذای مورد استفاده می‌تواند دلیلی بر این تفاوت باشد. علاوه بر این، شاید سم آفلاتوکسین به شکلی موجب کمبود اکسین در ماهیان تحت بررسی شده و سبب ایجاد واکنش‌های جبرانی در آن‌ها (افزایش تعداد گلبول‌های قرمز و هموگلوبین) شده باشد (Khani *et al.*, 2017). برای مثال تغذیه بره‌ها با ۲ ppm آفلاتوکسین سبب افزایش

تعداد گلبول‌های قرمز و هموگلوبین آن‌ها گردید، که با نتایج مطالعهخ حاضر همخوانی دارد. چنین بیان شده است که وجود آفلاتوکسین در جیره غذایی سبب کاهش برون‌ده قلبی و انتقال گازهای تنفسی در بره‌ها می‌گردد (Fernandez *et al*., 2000). همچنین در مطالعه‌ای مشخص شد که رویارویی جنین ماهی گورخری با غلظت بالای مس در محیط سبب افزایش میزان بیان ژن هموگلوبین گردید، که به افزایش میزان ترکیبات فعال اکسیژنی در جنین‌ها نسبت داده شد (Zhou *et al*., 2016). افزایش میزان ترکیبات فعال اکسیژنی به دلیل سم آفلاتوکسین و در جیره غذایی آبزیان و سایر جانوران گزارش شده است (Koohi *et al*., 2011; Liu and Wang *et al*., 2016). همچنین در این مطالعه مشخص شد که افزودن پودرگیاهان رزماری و آویشن به جیره غذایی آلوده با آفلاتوکسین سبب تعدیل اثر سم بر شاخص‌های یاد شده گردید. چنین اثر تعدیل کنندگی را می‌توان به وجود ترکیبات آنتی‌اکسیدان در این گیاهان اشاره کرد که در مطالعات متعددی به آن اشاره شده است (Naghdi Badi *et al*., 2004; Bozin *et al*., 2007). درصد نوتروفیل و لنفوسیت ماهیان تیمارهای مختلف با یکدیگر متفاوت بود، به شکلی که آلودگی جیره با آفلاتوکسین سبب کاهش درصد نوتروفیل و افزایش درصد لنفوسیت ماهیان گردید و افزودن پودر گیاهان رزماری و آویشن به جیره غذایی آلوده سبب تعدیل این شاخص‌ها و عدم تفاوت آن‌ها با شاخص‌های یاد شده در ماهیان گروه شاهد شد. کاهش لنوسیت سبب مستعد شدن بدن در برابر عفونت‌ها می‌گردد. لنفوسیتوپنیا (Lymphocytopenia) می‌تواند ناشی از آسیب‌های احتمالی سم آفلاتوکسین بر بافت طحال ماهیان این گروه باشد. وجود التهاب در بدن به هر شکل می‌تواند موجب افزایش تعداد نوتروفیل‌ها (Neutrophilia) گردد و در پی وجود نکروز بافتی افزایش تعداد آن‌ها در بدن محتمل است (Longo *et al*., 2012). افزودن پودر گیاهان رزماری و آویشن به دلیل ترکیبات آنتی اکسیدانی موجود، سبب کاهش صدمات و آسیب‌های بافتی احتمالی و در نتیجه بهبود شاخص‌های خونی ذکر شده گردیده است (Khani *et al*., 2017).

در این پژوهش مشخص گردید که آنزیم‌های گوارشی روده به عنوان محل اصلی گوارش غذا و جذب مواد مغذی بیشتر از آنزیم‌های هپاتوپانکراس تحت تاثیر سم آفلاتوکسین قرار گرفتند. همچنین آلودگی جیره غذایی با سم آفلاتوکسین سبب افزایش تعداد گلبول‌های قرمز، میزان هموگلوبین و درصد نوتروفیل-ها گردید که افزودن پودر گیاهان رزماری و آویشن به جیره غذایی آلوده به آفلاتوکسین سبب شد تا این شاخص‌ها به حالت تیمار شاهد بازگردند یا نزدیک شوند. به هرحال درک دقیق سازوکار چنین نتایجی مستلزم مطالعات بیشتری در آینده است.

References

Akhlaghi, M., Mirab Brojerdi, M., 1997. Investigating the effect of anesthetizing clove in fish and determining its LC50. *Journal of Veterinary Research* 54(2), 49-52.

Applebaum, S.L., Perez, R., Lazo, G.P., Holt, G.L. 2001. Characterization of chymotrypsin activity during ontogeny of larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Fish Physiology and Biochemistry* 25, 291-300.

Applegate, T.J., Schatzmayr, G., Pricket, K., Troche, C., Jiang, Z., 2009. Effect of aflatoxin culture on intestinal function and nutrient loss in laying hens. *Poultry Science* 88(6), 1235-1241.

Ashley, L.M., 1965. Histopathology of rainbow trout aflatoxicosis. In Trout Research Conference Papers. U.S.D.H.E.W. and U.S.D. *lnt. Fish/Wildlife Res. Rep*., 70, 103-120.

Ashtaral, N.L., A. Mohammadirad, N., Yasa, B. Minaie, S.H. Nikfar, G.H. Ghazanfari, M.J. Zamani, G.H., Dehghan, H.R. Jamshidi, B. V. Shetab, R., Khorasani, Abdollahi, M., 2007. Benefits of Zataria multiflora Boiss in experimental model of mouse inflammatory bowel disease. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (eCAM)* 4, 43-50.

Benchaar, C., Yuxi, W., Chaves, A.V., McAllister, T.A., Beauchemin, K.A., Acharya, S.N., Thomas, J.E., 2007. Use of plant extracts in ruminant nutrition. *Advances in Medicinal Plant Research* 2007, 465-489.

Bernfeld, P., 1955. Amylase. In: Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (Eds.), Methods in Enzymology. Academic Press, New York, pp. 149-158.

Bliss, M.C. Jr, Wolfe, M.M., 2010. Common Clinical manifestations of gastrointestinal disease. In: Andreoli and Carpenter's Cecil Essentials of Medicine, Benjamin, I.J., Griggs, R.C., Wing, E.J. (Eds.), Saunders Elsevier, Philadephia, pp. 382-400. .

Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik I., Jovin, E., 2007. Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*, Lamiaceae) essential oils. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 55, 7879-7885.

Chavez-Sanchez, M.C., Palacios, C.M., Moreno, I.O., 1994. Pathological effects of feeding young *Oreochromis niloticus* diets supplemented with different levels of aflatoxin B1. *Aquaculture* 127(1), 49-60.

Donmez, N., Donmez, H. H., Keskin, E., Kısadere, I., 2012. Effects of aflatoxin on some haematological parameters and protective effectiveness of esterified glucomannan in merino rams. *The Scientific World Journal* 1-4.

Einarsson, S., Davies, P. S., Talbot, C., 1996. The effect of feeding on the secretion of pepsin, trypsin and chymotrypsin in the Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Fish Physiology and Biochemistry* 22, 237-244.

Fernandez, A., Hernandez, M., Verde, M.T., Sanz, M., 2000. Effect of aflatoxin on performance, hematology and clinical immunology in lambs. The Canadian *Journal of Veterinary Research* 64, 53-58.

Gallo, A., Masoero, F., Bertuzzi, T., Piva, G., Pietri, A., 2010. Effect of the inclusion of adsorbents on aflatoxin B1 quantification in animal feedstuffs. *Food Additives and Contaminants* 27 (1), 54-63.

Garcia-Carreno, F.L., Haard, N.F., 1993. Characterization of proteinase classes in langostilla (Pleuroncodes planipes) and crayfish (Pacifastacus astacus) extracts. *Journal of Food Biochemistry* 17(2), 97-113.

Grenier, B., Applegate, T.J., 2013. Modulation of intestinal functions following mycotoxin ingestion: meta-analysis of published experiments in animals. *Toxins* 5(2), 396–430.

Guzman, C., Gaxiola, G., Rosa, C., Torre-Blanco, A., 2001. The effect of dietary protein and total engergy content on digestive enzyme activities, growth and survival of *Litopenaeus setiferus* (Linnaeus) postlarvae. *Aquaculture Nutrition* 17, 113-122.

Hahm, D.H., Yeom, M., Lee, E.H., Shim, I., Lee, H.J., Kim, H.Y., 2001. Effect of *Scutellariae radix* as a novel antibacterial herb on the ppk (Polyphosphate kinase) mutant of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 11(6), 1061-1065.

Han, X.Y., Huang, Q.C., Li, W.F., Jiang, J.F., Xu, Z.R., 2008. Changes in growth performance, digestive enzyme activities and nutrient digestibility of cherry valley ducks in response to aflatoxin B1 levels. *Livestock Science* 119, 216-220

Hooft, J.M., Elmor, A.E.H.I., Encarnação, P., Bureau, D.P., 2011. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is extremely sensitive to the feed-borne Fusarium mycotoxin deoxynivalenol (DON). *Aquaculture* 311(1), 224-232.

Iijima, N., Tanaka, S., Ota, Y., 1998. Purification and characterization of bile salt-activated lipase from the hepatopancreas of red sea bream, Pagrus major. *Fish Physiology and Biochemistry* 18(1), 59-69.

Imani, A., Bani, M.S., Noori, F., Farzaneh, M., Moghanlou, K.S., 2017. The effect of bentonite and yeast cell wall along with cinnamon oil on aflatoxicosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Digestive enzymes, growth indices, nutritional performance and proximate body composition. *Aquaculture* 476, 160-167.

Jantrarotai, W., Lovell, R.T., Grizzle, J.M., 1990. Acute toxicity of aflatoxin B1 to channel catfish. *Journal of Aquatic Animal Health* 2(4), 237–247.

Kabak, B., Dobson, A.D., Var, I.I.L., 2006. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 46 (8), 593-619.

Kalantar Nistanaki, M. and J. Salari, 2012. Mycotoxins in livestock and poultry feed stuffs. Marz-e-Danesh Publication, Tehran. (In Persian)

Khani, S., Sarvi Moghanlou, K., Imani, A., Agh, N., Razi, M., 2017. The protective effect of dietary cinnamon essential oil (*Cinnamomum verum*) supplementation in reducing the toxicity of aflatoxin B_1 to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. *Journal of Fisheries* 69(4), 481-495. (in Persian)

Kim, S., Choi, J.E., Choi, J., Chung, K.H., Park, K., Yi, J., Ryu, D.Y., 2009. Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicology in Vitro* 23(6), 1076-1084.

Koohi, M.K., Shahroziyan, E., Daraei, B., Javaheri, A., Sadeghi Hashjin, G., 2011. The pretreatment effects of pentoxifylline on aflatoxin B1 induced oxidative damage in perfused rat liver. *Iranian Journal of Veterinary Medicine* 5(1), 43-47.

Lemieux, H., Blier, P. and Dutil, J.D., 1999. Do digestive enzymes set a physiological limit on growth rate and food conversion efficiency in the Atlantic cod (*Gadus morhua*)? *Fish Physiology and Biochemistry* 20(4), 293-303.

Liu, Y., Wang, W., 2016. Aflatoxin B1 impairs mitochondrial functions, activates ROS generation, induces apoptosis and involves

Nrf2 signal pathway in primary broiler hepatocytes. *Animal Science Journal* 87(12), 1490-1500.

Longo, D., Fauci, A., Kasper, D., Hauser, S., Jameson, J., Loscalzo, J., 2012. Harrison's Principles of Internal Medicine Vol.1&2, 18th Edition, The McGraw-Hill Companies, New York. 2800 p.

Malik, M.S., Iqbal M.J., Hamid, H., 2003. Essential oils resources of Pakistan studies on the essential oils of the species of Labiatae: Part-1. *Pakistan Journal of Science* 55, 34-36.

Marchioro, A., Mallmann, A.O., Diel, A., Dilkin, P., Rauber, R.H., Blazquez, F.J.H., Oliveira, M.G.A., Mallmann, C.A., 2013. Effects of aflatoxins on performance and exocrine pancreas of broiler chickens. *Avian Disease* 57(2), 280-284.

Mohapatra S., Sahu N.P., Pal A.K., Prusty A.K., Kumar V., Kumar S., 2011. Haemato-immunology and histo-architectural changes in *Labeo rohita* fingerlings: Effect of dietary aflatoxin and mould inhibitor. *Fish Physiology and Biochemistry* 37, 177-186.

Murray, H.M., Gallant, J. W., Perez-Cazanova, J.C., Johnson, S.C., Douglas, S.E., 2003. Ontogeny of lipase expression in winter flounder. *Journal of Fish Biology* 6, 816-833.

Naghdi Badi, H., Darab, H., Yazdani, D., Sajedi, M., Nazari, F., 2004. Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality of oil in thyme. Industrial crops and products, 19(3), 231-238.

Nazdar, N., Imani, A., Noori, F., Moghanlou, K.S., 2017. Effect of Silymarin Supplementation on Nickel Oxide Nanoparticle Toxicity to Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fingerlings: Pancreas Tissue Histopathology and Alkaline Protease Activity. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science* 1-9.

Osborne, D.J., Hamilton, P.B., 1981. Decreased pancreatic digestive enzymes during aflatoxicosis. *Poultry Science* 60, 1818-1821.

Reverter, M., Bontemps, N., Lecchini, D., Banaigs, B., Sasal, P., 2014. Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. *Aquaculture* 433, 50-61.

Rymuszka, A., 2012. Cytotoxic activity of the neurotoxin anatoxin-a on fish leukocytes in vitro and in vivo studies. *Acta Veterinaria Brno* 81(2), 175-182.

Sahoo, P.K., 2000. Histological distribution and ultrastructure of exocrine pancreas in Indian major carp (*Labeo rohita* Ham.) and its alteration in aflatoxicosis. *Bangladesh Journal of Fisheries Research*, 4 (1), 1-6.

Sahoo, P.K., Mukherjee, S.C., Nayak, S.K., Dey, S., 2001. Acute and subchronic toxicity of aflatoxin B1 to rohu, *Labeo rohita* (Hamilton). *Indian Journal of Experimental Biology* 39, 453-458.

Sattari, M., 2014. Aquatic Animals health and diseases. Haghshenass Publication, 736 p. (In Persian)

Stec, J.A.N., Rachubik, J.A.R.O.S.Ł.A.W., Szczotka, M.A.R.I.A., Kuźmak, J.A.C.E.K., 2008. Effects of Penicillium mycotoxins: citrinin, ochratoxin A, and patulin on in vitro proliferation of bovine lymphocytes. *Bulletin of the Veterinary Institute in Puławy* 52, 163-167.

Svobodova, Z., Piskac, A., Havlikova, J., Groch, L., 1982. Influence of feed with different contents of B sub (1) aflatoxin on the carp health condition. *Zivocisna Vyroba* 27(11), 811-820.

Tee, J.K., Ong, C.N., Bay, B.H., Ho, H.K., Leong, D.T. 2015. Oxidative stress by inorganic nanoparticles. WIREs Nanomed Nanobiotechnol. doi: 10.1002/wnan.1374.

Virgili, F., Marino, M., 2008. Regulation of cellular signals from nutritional molecules: a specific role for phytochemicals, beyond antioxidant activity. *Free Radical Biology and Medicine* 45, 1205-1216.

Worthington, C.C., 1991. Worthigton Enzyme Manual Related Biochemical, 3th Edition. Freehold, New Jersey.

Zhan, X.A., Li, J.X., Xu, Z.R., Wang, M., 2005. Effects of fluoride on pancreatic digestive enzyme activities and ultrastructure in young pigs. Fluoride, 38(3), 215.

Zhou, X-Y., Zhang, T., Ren, L., Wu, J-J., Wang, W., Liu, J-X., 2016. Copper elevated embryonic hemoglobin through reactive oxygen species during zebrafish erythrogenesis. *Aquatic Toxicology*, 175, 1-11.