اثر تداخلی کادمیوم و کاهش اکسیژن محیطی بر میزان متابولیسم ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

پدرام ملک پوری[۱*]، رحیم پیغان[۱]، نصرالله محبوبی صوفیانی[۲]، نیل هربرت[۳]، بابک محمدیان[۴]
*p.malekpouri@gmail.com

۱. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
۲. دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران
۳. انیسیتو علوم دریایی، دانشگاه آکلند، نیوزیلند
۴. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: تیر ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۴

چکیده

با توجه به رخداد همزمان هیپوکسی (کم اکسیژنی) و ورود فلزات سنگین به اکوسیستم‌های آبی و تاثیر این دو عامل بر تنفس آبزیان، مطالعه در خصوص تاثیر توام هیپوکسی محیطی و کادمیوم بر میزان متابولیسم ماهی کپورمعمولی ضروری به‌نظر می‌رسد. پس از تعیین LC_{50}-96h کادمیوم (۴۳/۶۷۹mg/l) برای ماهی کپور معمولی، تعداد ۸۰ قطعه ماهی (۱۰۸/۹۶±۱۹/۲۷g) در معرض ۱۰ تیمار ازجمله کنترل، کادمیوم حاد (۴۳/۶۸mg/l)، تحت‌کشنده (۲۱/۸۴mg/l) و مزمن (۴/۳۷mg/l)، و تیمارهای هیپوکسی به‌صورت آنی (۲۰٪ اشباعیت)، ۲۴ساعته (۴۰٪) و یک هفته (۶۰٪) قرار گرفتند. تیمارهای ترکیبی نیز عبارت بودند از کادمیوم+ هیپوکسی به‌صورت آنی، ۲۴ساعته و یک هفته. به‌منظور تعیین ظرفیت متابولیکی ماهی، میزان متابولیسم پایه، متابولیسم بیشینه، حدود هوازی، حدود هوازی نسبی و فشار بحرانی اکسیژن (P_{Crit}) برای هر یک از ماهیان به صورت جداگانه اندازه‌گیری شد. نتایج به‌دست آمده نشان داد که کادمیوم در تیمارهای تحت‌کشنده و مزمن سبب افزایش معنی‌دار($P<0.05$) پارامترهای متابولیسمی شده است، درحالیکه تیمار هیپوکسی سبب کاهش ($P<0.05$) متابولیسم بیشینه و حدود هوازی در مقایسه با گروه کنترل شده است. تیمارهای ترکیبی نیز سبب کاهش متابولیسم پایه و P_{Crit} در تمامی تیمارها و متابولیسم بیشینه، حدود هوازی، حدود نسبی هوازی (به استثنای تیمار یک هفته) شده‌اند. به‌طور کلی می‌توان این‌گونه نتیجه گیری نمود که هیپوکسی به‌عنوان استرس محدودکننده (*limiting stressor*) ولی کادمیوم به‌عنوان استرس القایی (*loading stressor*) عمل می‌کند.

لغات کلیدی: فلزات سنگین، هیپوکسی، حدود هوازی، مصرف اکسیژن، *Cyprinus carpio*

*نویسنده مسئول

مقدمه

فلزات سنگین مانند کادمیوم به طرق مختلف از جمله ورود فاضلاب‌های صنعتی، فعالیت‌های معدنکاری و شستشوی خاک حاوی کودهای کشاورزی می‌توانند وارد اکوسیستم آبی شوند (Yu, 2001). در این حالت، بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و مولکولی موجود زنده دستخوش تغییرات ناخواسته می‌شوند (Scott & Sloman, 1995; De Boeck *et al*., 2004; Malekpouri *et al*., 2011a; Malekpouri *et al*., 2011b). علاوه براین، تنفس ماهی در اثر تماس با فلزات سنگین برهم می‌خورد چراکه تغییرات پاتولوژیک در آبشش ظاهر می‌شود که در جای خود انتشار اکسیژن و فشار نسبی اکسیژن خون را دچار اختلال می‌کند. البته این تغییرات می‌تواند در نتیجه کاهش سرعت شنای ماهی (Mager & Grosell, 2011) و تغییر بودجه انرژی نیز رخ دهد (De Boeck *et al*., 1995).

ایجاد شرایط یوتریفیکاسیون و بالطبع مناطق هیپوکسیک را می‌توان به دفعات در اکوسیستم‌های آبی و حتی مزارع پرورش ماهی مشاهده کرد. در این خصوص بسیاری از محیط‌های دریایی از جمله خلیج گرگان که سکونت‌گاه کپورماهیان نیز محسوب می‌شود، مستعد بروز پدیده هیپوکسی هستند (Diaz & Rosenberg, 2008; Selman *et al*., 2008). در طول دهه گذشته گزارشاتی از آلودگی این منطقه با فلزات سنگین نیز در منابع یافت می‌شود(Ebadati *et al*., 2005). شواهد نشان می‌دهد که مقادیر قابل ملاحظه‌ای از فلزات پس از ورود به اکوسیستم آبی می‌توانند در رسوبات ذخیره شوند. در نتیجه بروز شرایط هیپوکسیک، فاز شیمیایی فلزات تغییر نموده و بالطبع مقادیر بیشتری از فلزات وارد فاز محلول می‌شوند. علاوه براین، هیپوکسی می‌تواند سبب تغییر سایر پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب نیز شود که نتیجه آن تغییر در میزان دسترسی زیستی فلزات برای آبزیان خواهد بود (Hattink *et al*., 2005; Campbell, 2003).

میزان تهویه تنفسی آبزیان در پاسخ به شرایط هیپوکسی و حتی آنوکسی (بی اکسیژنی) می‌تواند تاثیر بسزایی در ایجاد حساسیت آبزیان نسبت به آلاینده‌ها داشته باشد (Hattink *et al*., 2005). آبزیان با استفاده از مجموعه استراتژی‌های سلولی تا فیزیولوژیک و رفتاری می‌توانند هزینه متابولکی خود را تغییر داده تا با شرایط هیپوکسی مقابله نمایند (Timmerman & Chapman, 2004). علاوه براین، هیپوکسی اثرات ناخوشایندی بر رشد و جذب غذا در آبزیان دارد که احتمالاً به‌دلیل تاثیر این شرایط ناخواسته محیطی بر سیستم عصبی مرکزی است (Medale *et al*., 1987; Kramer, 1987; Gaulke *et al*., 2014).

سمیت بیشتر سرب، مس و روی در مقادیر کم اکسیژن مشاهده شده است که احتمالاً به‌دلیل تهویه بیشتر ماهی در اثر وقوع هیپوکسی است (Lloyd, 1961). در مطالعه دیگری در خصوص عنصر روی، نشان داده شده است که سمیت روی در شرایط کم اکسیژنی افزایش می‌یابد چراکه هیپوکسی سبب کاهش بقای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان *Oncorhynchus mykiss* می‌شود (Lloyd & Herbert, 1962). میزان LC_{50}-96 h عنصر روی در ماهی کپور معمولی تحت شرایط هیپوکسی کاهش می‌یابد (Hattink *et al*., 2006). علاوه براین، تماس ماهی مینوی سرچرب *Pimephales promelas* با مقادیر بالای فلز مس سبب کاهش تحمل این گونه نسبت به شرایط کم اکسیژنی شده است (Bennett *et al*., 1995). بنابراین، هیپوکسی محیطی می‌تواند سمیت فلزات را برای آبزیان افزایش و میزان بقای آن‌ها را کاهش دهد. تیمار همزمان هیپوکسی و کادمیوم می‌توانند سبب بروز تغییرات متابولیسمی در نوعی اویستر (*Crassostrea virginica*) شوند (Ivanina *et al*., 2011).

علیرغم وجود مطالعات گسترده در خصوص تاثیرات فلزات سنگین یا هیپوکسی بر آبزیان، تحقیقات در زمینه تاثیر همزمان این دو عامل استرس زا به ندرت قابل مشاهده است. از آنجاییکه پاسخ‌های فیزیولوژیک به شرایط هیپوکسی بسیار متغیر است (Herbert & Steffensen, 2005) و همچنین وقوع همزمان دو پدیده آلودگی با فلزات و هیپوکسی در اکثر اکوسیستم-های آبی امری غیر قابل اجتناب محسوب می‌شود (Ivanina *et al*., 2011)، در این تحقیق تغییرات متابولیسمی ماهی کپور معمولی متعاقب وقوع انفرادی و

توام این دو عامل استرس‌زای محیطی؛یعنی، کادمیوم و هیپوکسی مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش کار

ماهی و مواد شیمیایی

تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده در این آزمایش از کارخانه مرک (آلمان) تهیه شد. نمک کلرید کادمیوم ($CdCl_2$, 2.5 H_2O) از کارخانه شارلو (Scharlau, Spain) خریداری شد.

ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) مورد آزمایش، پس از خریداری به آزمایشگاه منتقل شده و حداقل به مدت دو هفته در سیستم مداربسته با شرایط آزمایشگاه سازگار شدند. به محض ورود ماهیان به آزمایشگاه با استفاده از محلول ضد عفونی کننده متیلن آبی ($1\ mg\ l^{-1}$) و نمک (۵٪) ضدعفونی شدند. ماهیان روزانه به میزان ۳٪ از بیومس با استفاده از جیره غذایی استاندارد (حاوی ۳۱/۳٪ پروتئین، ۱۱/۶٪ چربی و ۱۱/۷٪ خاکستر) مورد تغذیه قرار گرفتند. دمای آب مخازن در حین دوره سازگاری°C ۲۰-۲۲ و میزان اکسیژن محلول بیش از ۸۰٪ اشباعیت بود.

تعیین غلظت کشنده (LC_{50}) و آستانه تحمل هیپوکسی

به منظور تعیین غلظت کشنده کادمیوم، تعداد ۵۶ قطعه ماهی کپور معمولی با میانگین وزنی ۳/۲۲±۲۰/۱۷ گرم و طول ۰/۷۷±۱۱/۴۰ سانتی‌متر در ۷ گروه در معرض غلظت‌های مختلف این فلز قرار گرفتند. این غلظت‌ها عبارتند از کنترل(۰)، ۲۳/۰۷، ۳۰/۰۰، ۳۹/۰۰، ۵۰/۷۰، ۶۵/۹۱ و ۸۵/۶۸ میلیگرم بر لیتر. میزان مرگ ومیر در فواصل زمانی ۲۴ ساعته مشاهده و ثبت شدند. ماهیان در طول دوره تعیین LC_{50} مورد تغذیه قرار نگرفتند. پس از پایان ۹۶ ساعت، داده‌های مورد نظر با استفاده از آنالیز رگرسیون پروبیت به منظور تعیین LC_{50}-96h مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند (OECD, No 203 (OECD, 1992)).

تیمار بندی و تعیین میزان متابولیسم

پس از تعیین میزان کشنده فلز کادمیوم، تعداد ۸۰ ماهی به ۱۰ گروه مختلف تقسیم شدند.گروه‌های مذکور عبارت بودند از گروه کنترل، سه تیمارکادمیوم، سه تیمار هیپوکسی و سه تیمار ترکیبی کادمیوم و هیپوکسی. گروه کنترل تحت تاثیر کادمیوم یا شرایط هیپوکسی قرار نگرفت. تیمارهای کادمیوم شامل تیمار حاد (۴۳/۶۸mg/l، ۱۰۰٪ LC_{50}-96h)، تحت کشنده (۲۱/۸۴mg/l، ۵۰٪ LC_{50}-96h) و مزمن(۴/۳۷ mg/l، ۱۰٪ LC_{50}-96h) به ترتیب به صورت آنی، ۲۴ ساعته و یک هفته در نظر گرفته شد. تیمارهای هیپوکسی نیز به صورت حاد (۲۰٪ اشباعیت)، تحت کشنده (۴۰٪ اشباعیت) و مزمن (۶۰٪ اشباعیت) به‌صورت آنی، ۲۴ ساعته و یک هفته‌ای در نظر گرفته شد. تیمارهای ترکیبی نیز شامل هیپوکسی حاد و کادمیوم حاد، هیپوکسی تحت کشنده و کادمیوم تحت کشنده، و هیپوکسی مزمن و کادمیوم مزمن مطابق با غلظت‌های انفرادی در نظر گرفته شدند. جدول (۱) مقادیر محاسبه شده برای هریک از تیمارها را به‌همراه میزان کادمیوم اندازه گیری شده توسط دستگاه جذب اتمی (Perkin Elmer A Analyst 700) در تیمار مربوطه را نشان می‌دهد.

در ادامه هر یک از ماهیان به منظور تعیین میزان متابولیسم استاندارد، متابولیسم بیشینه، حدود هوازی و حدود نسبی هوازی به داخل رسپیرومتر (Intermittent-flow-through respirometer) به حجم ۳/۱ لیتر معرفی شدند. به‌منظور ثبت تغییرات اکسیژن محلول، آب داخل رسپیرومتر با استفاده از یک پمپ با جریان ثابت (۱/۵l/min) به پروب اکسیژن متر (WTW, 3205, Germany) متصل گردید.سپس حجم ویژه مصرف اکسیژن (MO_2) با استفاده از فرمول زیر (۱) محاسبه گردید:

فرمول (۱):

$$MO2 = \frac{(Vr - Vf) \times \Delta CwO2}{(\Delta t \times Mf)}$$

در این فرمول V_r (l) معادل حجم رسپیرومتر، V_f (l) حجم بدن ماهی، ΔCwO_2 (mg/l) تغییرات غلظت اکسیژن در داخل رسپیرومتر طی مدت زمان (Δt, h) و M_f معادل وزن ماهی در نظر گرفته شد. دمای مخزن

حاوی رسپیرومتر در طول آزمایش بین °C ۲۳-۲۲ و میزان اکسیژن محلول بالاتر از ۸۰٪ اشباعیت حفظ شد. فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب در طول آزمایش به‌طور مرتب اندازه گیری شدند. میزان اکسیژن محلول (۶/۶<)، دما (°C ۲۲/۴-۲۱/۳)، pH (۷/۶۳-۷/۵۱)، هدایت الکتریکی (µs/cm ۵۱۱-۴۷۳)، کل ترکیبات آمونیاکی (۱/۱mg/l-۰/۴)، نیتریت (mg/l ۰/۰۴۶-۰/۰۳۹)، نیترات (۷/۴۴mg/l-۶/۹۳)، فسفات (mg/l ۸۵/۸۵-۷۹/۳۸)، جامدات معلق (mg/l ۷/۷-۱/۸) و محلول (mg/l ۳۸۳/۲-۳۲۰/۸)، سختی کل (mg/l ۲۸۴-۲۳۶)، منیزیم (mg/l۲۳ -۱۶) و کلسیم (mg/l ۲۵۶-۲۲۰) به‌دست آمد(APHA, 2005). دمای هوا (°C ۲۴/۱-۲۲/۳)، رطوبت نسبی (۵۷-۴۹٪) و فشار بارومتریک (mm-Hg ۸۳۲-۸۲۷) نیز طی آزمایشات اندازه‌گیری گردید (TFA Dostmann, Germany).

۲۴ ساعت قبل از معرفی ماهیان به رسپیرومتر، غذادهی قطع گردید تا از افزایش احتمالی میزان متابولیسم پس از تغذیه اجتناب شود (Soofiani and Hawkins, 1982). پیش از اندازه‌گیری متابولیسم پایه، بهترین زمان برای اندازه‌گیری میزان متابولیسم معمول طی دوره سازگاری تعیین شد. به این منظور ۸ عدد ماهی g۱۱۸/۳-۹۸/۵ به رسپیرومتر معرفی و میزان متابولیسم آنها طی دوره ۲۴ ساعته ثبت گردید. براین اساس بهترین زمان برای اندازه‌گیری متابولیسم پایه بین ۱۰-۷ ساعت پس از معرفی به رسپیرومتر در نظر گرفته شد. به منظور تعیین میزان متابولیسم پایه، حداقل ۲۰ اندازه‌گیری از هر یک از ماهیان انجام شد و ۱۰٪ کمترین مقدار به‌عنوان میزان ظاهری متابولیسم پایه در نظرگرفته شد(Clark et al., 2013).

پس از اندازه‌گیری میزان متابولیسم پایه، هر یک از ماهیان به داخل یک محفظه مستطیلی شکل معرفی شدند و در مقابل جریان نسبتاً شدید آب قرار گرفتند. پس از ایجاد حالت خستگی و عدم مقاومت ماهی در مقابل جریان آب (۱۰-۵ دقیقه)، ماهیان مجدد به رسپیرومتر معرفی شدند و میزان متابولیسم بیشینه اندازه‌گیری شد. به منظور تعیین بهترین زمان برای اندازه‌گیری میزان متابولیسم بیشینه، میزان مصرف اکسیژن برای ۱۰ عدد ماهی (g۱۲۲/۹-۱۱۷/۰) به مدت ۸۱۰ دقیقه (هر ۳۰ دقیقه) بررسی شد. براین اساس بهترین زمان برای ثبت متابولیسم بیشینه حدود ۹۰ دقیقه ابتدایی در نظر گرفته شد.

به دلیل عدم قطعیت در خصوص ظرفیت متابولیکی، در این تحقیق هر دو فاکتور محدوده هوازی (Aerobic Scope) و محدوده نسبی هوازی (Factorial Aerobic Scope) مورد محاسبه قرار گرفت. به این ترتیب که پارامتر اول به صورت تفریق میزان متابولیسم پایه از میزان متابولیسم بیشینه و پارامتر دوم از تقسیم میزان متابولیسم بیشینه بر میزان متابولیسم پایه به‌دست آمد(Clark et al., 2013).

تخمین نقطه بحرانی اکسیژن (P_{Crit})

در ادامه برای تعیین P_{Crit}، میزان متابولیسم بیشینه در شرایط اکسیژنی محیطی مختلف مورد بررسی قرار گرفت. براین اساس با ترسیم منحنی متناسب، منحنی حداقل اکسیژنی (Limiting O_2 Curve) به‌دست آمد. با برازش میزان متابولیسم پایه برای هر یک تیمارها، نقطه‌ای که در آن میزان متابولیسم پایه منحنی حداقل اکسیژنی را قطع می‌کند به‌عنوان میزان P_{Crit} در نظر گرفته شد (Cook et al., 2013).

تجزیه و تحلیل آماری

پس از بررسی نرمال بودن داده‌ها (kolmogorov-smirnov) و همگن بودن واریانس (leven)، به منظور بررسی تفاوت‌های آماری در خصوص پارامترهای متابولیکی ماهی، داده ها با استفاده از آنالیز کوواریانس چند متغیره MANCOVA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. در این آزمون، وزن و طول کل ماهی به‌عنوان عوامل کوواریانس در نظر گرفته شد. از آزمون تکمیلی دانکن برای بررسی تفاوت‌های آماری بین گروه‌های مختلف استفاده شد. برای تعیین میزان LC_{50}-96h، میزان تلفات ثبت شده با استفاده از آزمون رگرسیون پروبیت مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند(SPSS 18). برای تخمین P_{Crit} ، منحنی حداقل اکسیژنی به صورت لگاریتمی (فرمول ۲) یا هایپربولیک (فرمول ۳) ترسیم شد (Sigmaplot 12).

فرمول (۲):

$$y = y_0 + a\ lnx + b\ (lnx)^2$$

فرمول (۳):

$$y = y_0 + \frac{ax}{(b+x)}$$

در فرمول ۲ و ۳، میزان y_0 معادل صفر در نظر گرفته شد. حروف a و b نیز مقادیر ثابت هستند. در تمامی موارد، معنی داری در سطح *P value* کمتر از ۵٪ در نظر گرفته شد.

نتایج

به منظور بررسی تاثیر وزن بر متابولیسم ماهی، از آزمون MANCOVA استفاده گردید. نتایج به دست آمده نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در خصوص پارامترهای مذکور بین تیمارهای مختلف بوده است. میانگین و انحراف معیار (mean±SD) وزن و طول کل برای هریک از تیمارها در جدول (۲) آورده شده است.

میزان LC_{50}-96h برای کادمیوم برابر mg/l ۴۳/۶۷۹ با ۹۵٪ حدود اطمینان (۴۲/۱۲۱-۴۵/۴۰۸) به‌دست آمد. میزان تحمل هیپوکسی نیز بین mg/l ۰/۲ (۳٪ و mm-Hg ۶) الی mg/l ۰/۴(۶٪ و mm-Hg ۱۱) به‌دست آمد. جدول (۱) غلظت کادمیوم در تیمارهای مختلف را نشان می‌دهد که مبین اختلاف کمتر از ۳٪ بین غلظت محاسبه شده و غلظت اندازه گیری شده است.

پس از تعیین بهترین زمان برای اندازه‌گیری میزان متابولیسم پایه در خصوص ماهی کپور معمولی، میزان متابولیسم پایه در هر یک از تیمارها مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. میزان متابولیسم پایه در گروه کنترل نسبتاً ثابت بوده و در حدود ۵۳/۲۹±۳/۴۴ mg O_2/kg.h به‌دست آمد. تمامی تیمارهای کادمیوم سبب افزایش معنی دار ($P<0.05$) در میزان متابولیسم پایه نسبت به گروه کنترل شده است. تیمار هیپوکسی حاد سبب افزایش ۱۱/۱۴ درصدی در میزان متابولیسم پایه نسبت به گروه کنترل شده ($P<0.05$) و هیپوکسی تحت کشنده تغییر معنی‌داری در میزان متابولیسم پایه ایجاد نکرده است. ماهیان در گروه هیپوکسی مزمن نیز کاهش ۴۰/۱٪ متابولیسم پایه نسبت کنترل را از خود نشان دادند. تیمار-های ترکیبی کادمیوم و هیپوکسی نیز کاهش معنی‌داری ($P<0.05$) در میزان متابولیسم پایه نسبت به گروه کنترل یا تیمار کادمیوم (انفرادی) از خود نشان دادند، اما این کاهش تنها در تیمار ترکیبی حاد و تحت کشنده نسبت به تیمار انفرادی هیپوکسی قابل مشاهده بوده است و تیمار ترکیبی مزمن افزایش معنی‌داری ($P<0.05$) نسبت به تیمار هیپوکسی مزمن از خود نشان داده است (جدول شماره ۲).

نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که بهترین زمان برای اندازه‌گیری متابولیسم بیشینه طی ۹۰ دقیقه اول پس از پایان شنای ممتد و سریع (رخداد حالت خستگی) و معرفی مجدد به رسپیرومتر است. بر این اساس متابولیسم بیشینه برای ماهی کپور در گروه کنترل حدود mg O_2/kg.h ۲۴۶/۷۳±۱۵/۵۱ به دست آمد. میزان متابولیسم بیشینه در تیمار کادمیوم حاد تغییر معنی‌داری از خود نشان نداد ولی تیمارهای تحت کشنده و مزمن به ترتیب سبب افزایش ۱۹/۷۹٪ و ۳۹/۳۴٪ متابولیسم بیشینه نسبت به تیمار کنترل شده است. تمامی تیمارهای هیپوکسی سبب کاهش معنی‌دار ($P<0.05$) در میزان متابولیسم بیشینه نسبت به گروه کنترل شده‌اند. میزان متابولیسم بیشینه در تیمارهای ترکیبی حاد و تحت کشنده نسبت به گروه کنترل یا کادمیوم یا هیپوکسی مربوطه کاهش معنی‌داری ($P<0.05$) از خود نشان داده-اند. در تیمار ترکیبی مزمن افزایش معنی‌داری ($P<0.05$) در متابولیسم بیشینه نسبت تیمار کنترل یا هیپوکسی مزمن قابل مشاهده است در حالیکه این مقدار نسبت به تیمار کادمیوم مزمن کاهش ($P<0.05$) یافته است (جدول شماره ۲).

جدول ۱: غلظت کادمیوم در تیمارهای مختلف

تیمار		درصد LC_{50}-96h	غلظت محاسبه شده (mg/l)	غلظت اندازه گیری شده (mg/l)
کنترل/ هیپوکسی		-	۰/۰۰	۰/۰۰۰۱>
کادمیوم	حاد	٪۱۰۰	۴۳/۶۸	۴۴/۱۳۰±۰/۰۲۴
کادمیوم	تحت کشنده	٪۵۰	۲۱/۸۴	۲۲/۰۶۰±۰/۰۰۹
کادمیوم	مزمن	٪۱۰	۴/۳۷	۴/۴۱۱±۰/۰۱۸

اعداد نشان دهنده mean±SD مربوط به ۳ اندازه‌گیری است.

جدول ۲: تاثیر تیمارهای مختلف کادمیوم و هیپوکسی بر میزان متابولیسم پایه، متابولیسم بیشینه، محدوده هوازی و محدوده نسبی هوازی را در ماهی کپور معمولی

تیمار		پارامتر					
		وزن (گرم)	طول کل (سانتی‌متر)	متابولیسم پایه (mg O_2/ kg. h)	متابولیسم بیشینه (mg O_2/ kg. h)	محدوده هوازی (mg O_2/ kg. h)	محدوده نسبی هوازی
کنترل		۹۸/۴۲±۲۳/۶۴	۱۹/۷۱±۲/۵۴	۵۳/۲۹±۳/۴۴ ^{e}	۲۴۶/۷۳±۱۵/۵۱ ^{c}	۱۹۳/۴۳±۱۳/۲۰ ^{d}	۴/۶۳±۰/۲۱ ^{c}
کادمیوم	حاد	۹۵/۲۵±۴۶/۱۹	۱۹/۴۲±۷/۱۸	۶۵/۵۴±۶/۴۱ ^{c}	۲۵۹/۷۰±۸/۵۴ ^{c}	۱۹۴/۱۵±۳/۰۷ ^{d}	۳/۹۸±۰/۲۶ ^{e}
کادمیوم	تحت کشنده	۱۱۲/۴۲±۳۲/۹۵	۲۱/۰۷±۲/۸۹	۸۵/۳۳±۳/۵۵ ^{a}	۲۹۵/۵۶±۱۳/۳۰ ^{b}	۲۱۰/۲۲±۱۲/۲۰ ^{c}	۳/۴۶±۰/۱۶ ^{f}
کادمیوم	مزمن	۱۲۴/۵۰±۲۷/۷۳	۲۰/۱۶±۲/۱۳	۷۸/۷۰±۵/۸۲ ^{b}	۳۴۳/۸۰±۹/۹۸ ^{a}	۲۶۵/۱۰±۱۴/۵۷ ^{a}	۴/۳۹±۰/۴۱ ^{cd}
هیپوکسی	حاد	۱۲۲/۶۰±۲۴/۳۹	۱۹/۴۰±۰/۸۹	۵۹/۲۳±۴/۵۹ ^{d}	۱۲۷/۲۹±۱۰/۶۷ ^{f}	۶۸/۰۵±۱۰/۲۳ ^{g}	۲/۱۵±۰/۲۱ ^{h}
هیپوکسی	تحت کشنده	۱۱۸/۸۳±۴۰/۶۸	۱۹/۰۸±۳/۶۱	۵۲/۳۴±۲/۲۱ ^{e}	۲۱۵/۰۸±۲۱/۱۷ ^{d}	۱۶۲/۷۴±۲۱/۵۶ ^{e}	۴/۱۱±۰/۴۸ ^{de}
هیپوکسی	مزمن	۱۱۰/۲۵±۱۳/۲۲	۱۹/۷۵±۰/۶۴	۳۱/۹۰±۰/۷۴ ^{gh}	۱۷۹/۳۲±۳/۵۳ ^{e}	۱۴۷/۴۱±۳/۷۶ ^{f}	۵/۶۲±۰/۱۸ ^{b}
هیپوکسی+ کادمیوم	مزمن	۸۹/۵۰±۶/۳۶	۱۸/۵۰±۰/۷۰	۲۸/۱۸±۲/۸۸ ^{h}	۷۰/۳۱±۸/۴۳ ^{h}	۴۲/۱۳±۷/۰۸ ^{h}	۲/۵۰±۰/۲۴ ^{g}
هیپوکسی+ کادمیوم	تحت کشنده	۱۲۹/۶۷±۱۰/۹۶	۲۱/۲۳±۱/۱۰	۳۴/۸۱±۳/۵۷ ^{g}	۹۳/۱۲±۵/۶۵ ^{g}	۵۸/۳۰±۵/۵۳ ^{g}	۲/۶۹±۰/۲۷ ^{g}
هیپوکسی+ کادمیوم	مزمن	۱۲۲/۰۰±۲۳/۳۳	۱۹/۳۷±۱/۸۸	۴۶/۷۱±۱/۹۸ ^{f}	۲۸۴/۶۶±۱۸/۶۶ ^{b}	۲۳۷/۹۴±۱۹/۹۴ ^{b}	۶/۱۱±۲۳/۵۹ ^{a}

اعداد به‌دست آمده عبارتند از mean±SD مربوط به ۸ نمونه (به جز تیمار هیپوکسی و کادمیوم مزمن که از میانگین ۶ نمونه به‌دست آمده است). حروف الفبای انگلیسی نشان‌دهنده وجود یا عدم وجود اختلاف معنی دار ($P<0.05$) بین تیمارهای مختلف است.

به منظور بررسی تغییرات مطلق و نسبی میزان متابولیسم ماهی، به ترتیب دو پارامتر محدوده هوازی و محدوده نسبی هوازی محاسبه و نتایج در جدول شماره (۲) نشان داده شده است. براین اساس محدوده هوازی برای تیمار کادمیوم حاد تغییر معنی‌داری نسبت به کنترل نداشته است. سایر تیمارهای کادمیوم (تحت کشنده و مزمن) افزایش معنی‌داری ($P<0.05$) در میزان محدوده هوازی (به ترتیب ۸/۶۸ و ۳۷/۰۵٪) نسبت به کنترل از خود نشان دادند. به‌طور کلی، هیپوکسی سبب کاهش معنی‌دار محدوده هوازی نسبت کنترل شده است. تیمارهای ترکیبی حاد و تحت کشنده نیز همانند متابولیسم بیشینه، کاهش معنی‌دار ($P<0.05$) محدوده هوازی را سبب شده‌اند اما تیمار ترکیبی مزمن سبب افزایش معنی‌داری ($P<0.05$) در این پارامتر نسبت به کنترل یا هیپوکسی مزمن شده است که البته در مقام مقایسه با تیمار کادمیوم مزمن کاهش ($P<0.05$) یافته است. محدوده هوازی

نسبی تحت تاثیر کادمیوم کاهش یافته است اما تنها در گروه حاد و تحت کشنده این افزایش معنی‌دار ($P<0.05$) بوده است. در اثر هیپوکسی حاد و تحت کشنده، میزان محدوده هوازی نسبی کاهش یافته ($P<0.05$) و تیمار مزمن هیپوکسی سبب افزایش ($P<0.05$) محدوده هوازی نسبی شده است. تیمار ترکیبی حاد و تحت کشنده سبب کاهش معنی‌دار ($P<0.05$) محدوده نسبی هوازی نسبت به گروه کنترل یا کادمیوم شده است اما این تغییرات نسبت به تیمار هیپوکسی افزایشی ($P<0.05$) بوده است. در تیمار ترکیبی مزمن، افزایش معنی دار ($P<0.05$) محدوده نسبی هوازی نسبت به کنترل یا تیمارهای انفرادی هیپوکسی مزمن و کادمیوم مزمن قابل مشاهده است.

نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که کادمیوم سبب افزایش میزان P_{Crit} نسبت به گروه کنترل شده است. هیپوکسی تحت کشنده و مزمن سبب کاهش قابل ملاحظه ای در P_{Crit} نسبت به گروه کنترل شده اند. تیمار توام هیپوکسی و کادمیوم تحت کشنده سبب ایجاد تغییر قابل توجهی در این فاکتور نشده است. تیمار ترکیب هیپوکسی و کادمیوم مزمن نیز سبب کاهش P_{Crit} نسبت به کنترل شده است. این در حالیست که تغییرات مذبور نسبت به تیمار انفرادی کادمیوم کاهش یافته است (جدول شماره ۳).

جدول ۳: میزان *PCrit* در اثر تیمارهای کادمیوم و هیپوکسی را به‌همراه مدل منحنی حداقل اکسیژنی

تیمارها		پارامتر				
		وزن (گرم)	طول کل (سانتی‌متر)	P_{Crit} (mm-Hg)	مدل LOC	R^2
کنترل		۱۳۴/۲۵±۲۱/۲۶	۲۰/۰۰±۱/۴۱	۱۷/۵۵	Hyperbolic	۰/۹۸۵۳
کادمیوم	حاد	۱۱۰/۲۵±۱۶/۱۳	۱۹/۳۲±۲/۱۸	۳۲/۲۷	Hyperbolic	۰/۹۸۷۱
کادمیوم	تحت کشنده	۸۵/۰۵±۱۲/۴۵	۱۷/۲۵±۳/۹۳	۳۱/۵۹	Hyperbolic	۰/۹۷۴۲
کادمیوم	مزمن	۹۶/۳۲±۲/۲۳	۱۷/۵۰±۰/۴۹	۲۴/۳۴	Hyperbolic	۰/۹۷۸۰
هیپوکسی	حاد	-	-	-	-	-
هیپوکسی	تحت کشنده	۱۲۸/۰۳±۲۱/۸۶	۲۰/۹۰±۲/۰۱	۷/۶۹	Logarithmic	۰/۹۶۱۱
هیپوکسی	مزمن	۱۰۹/۹۵±۱۴/۹۲	۱۹/۵۶±۱/۳۳	۱۳/۰۹	Hyperbolic	۰/۹۸۳۱
هیپوکسی+کادمیوم	حاد	-	-	-	-	-
هیپوکسی+کادمیوم	تحت کشنده	۱۰۹/۶۶±۱۰/۰۰	۱۹/۵۰±۰/۹۸	۱۹/۵۲	Hyperbolic	۰/۹۹۸۷
هیپوکسی+کادمیوم	مزمن	۹۱/۵۰±۱۳/۵۶	۲۰/۶۷±۱/۳۸	۸/۷۰	Hyperbolic	۰/۹۸۳۳

هر یک از اعداد با استفاده از اندازه‌گیری تغییرات متابولیسم بیشینه ۶ ماهی در مقادیر متفاوت اکسیژن محیطی به‌دست آمده است. مقدار *PCrit* برای تیمار هیپوکسی حاد و تیمار ترکیبی آن در این مطالعه قابل تخمین نبوده است.

بحث

در مطالعه حاضر اختلاف معنی‌داری در پارامتر وزن بین تیمارهای مختلف مشاهده نشده است. این امر احتمالاً به‌دلیل پراکندگی وزنی ماهیان مورد استفاده در هر یک از تیمارها بوده است. بهترین زمان برای اندازه‌گیری متابولیسم بیشینه مربوط به چهار اندازه‌گیری اول طی ۹۰ دقیقه ابتدایی پس از ایجاد حالت خستگی در ماهی است. در مطالعه دیگری بر روی ماهی هالیبوت، *Reinhardtius hippoglossoides* محدوده زمانی یک ساعته پس از شنای ممتد (ایجاد خستگی) به‌عنوان بازه زمانی بهینه برای اندازه‌گیری متابولیسم بیشینه تعیین گردید (Dupont-Prinet *et al*., 2013).

در تحقیق حاضر، هیپوکسی حاد (۲۰٪ اشباعیت) سبب افزایش میزان متابولیسم پایه در مقایسه با کنترل شده است (جدول شماره ۲) که احتمالاً به‌دلیل تهویه بیشتر تحت شرایط هیپوکسی شدید رخ داده است. در این حالت، ماهی به انرژی بیشتری برای تامین تهویه بالاتر نیاز دارد(Hughes *et al*., 1983). احتمالاً تغییرات هیستولوژیک ایجاد شده در آبشش طی شرایط هیپوکسی به نوبه خود سبب افزایش راندمان تنفسی می شود اما فرایند تنظیم اسمزی را برهم می‌ریزد که نتیجتاً نیاز متابولیکی ماهی را افزایش می‌دهد (Gonzalez & Nilsson & Renshaw, McDonald, 1992 ; 2004; Mitrovic *et al*., 2009;) و افزایش میزان متابولیسم پایه را مسجل می‌سازد. فو و همکاران (Fu et al., 2011) کاهش متابولیسم بیشینه و محدوده هوازی را در ماهی کاراس (*C. auratus*) تحت تاثیر هیپوکسی حاد (۱ mg/l) نشان داد. در مطالعه مشابهی بر روی ماهی کاد اقیانوس اطلس (*Gadus morhua*)، هیپوکسی حاد (۴۰٪ اشباعیت) سبب افزایش متابولیسم پایه و کاهش متابولیسم بیشینه و محدوده هوازی شده است (Petersen & Gamperl, 2010). به‌هر حال این اختلافات می تواند به دلیل تفاوت در وزن بدن، دمای آب، نوع آزمایش، نحوه سازگاری، محاسبه محدوده هوازی و غیره باشد.

بطور شگفت انگیزی، هیپوکسی تحت کشنده (۴۰٪ به مدت ۲۴ ساعت) هیچ تغییر معنی‌داری در میزان متابولیسم پایه ایجاد نکرده است (جدول شماره ۲). به‌نظر می‌رسد که این گونه قابلیت تحمل این سطح از هیپوکسی را به‌مدت ۲۴ ساعت داشته باشد. چراکه این گونه ظرفیت قابل توجهی برای استخراج اکسیژن محلول از آب و حفظ سطح متابولیکی خود تحت شرایط هیپوکسی دارد. این گونه می‌تواند تهویه تنفسی خود را در شرایط هیپوکسی (نه چندان شدید) طی چند ساعت حفظ نماید که در جایگاه خود نشان‌دهنده غلبه بر شرایط کم اکسیژنی با استفاده از تغییرات رفتار تنفسی است(Glass *et al*., 1990). در مطالعه دیگری بر روی ماهی هالیبوت *R. hippoglossoides* به عنوان یک گونه مقاوم به هیپوکسی، میزان متابولیسم پایه تحت تاثیر هیپوکسی افزایش یافته در حالیکه متابولیسم بیشینه و محدوده هوازی کاهش یافته است(Dupont-Prinet *et al*., 2013). هنگامیکه ماهی کپور در معرض هیپوکسی مزمن به مدت یک هفته قرار می‌گیرد، متابولیسم پایه کاهش معنی‌داری از خود نشان می‌دهد (جدول شماره ۲). مکانیسم احتمالی این کاهش شاید مربوط به این نکته باشد که اغلب آبزیان پاسخ‌های فیزیولوژیک و رفتاری برای مقابله با شرایط هیپوکسی اتخاذ می‌نمایند. برای مثال، ظرفیت آبشش برای جذب اکسیژن و سیستم انتقال اکسیژن به بافت تا حدی بهبود می‌یابد (Lai *et al*., 2006; Richards, 2009; Gaulke *et al*., 2014). علاوه براین، ماهی می‌تواند کاتابولیسم خود را به سمت استفاده از اسیدهای آمینه تغییر دهد که نشان‌دهنده افزایش ظرفیت متابولیسم بی‌هوازی موجود زنده است(Smith & Heath, 1980). میزان متابولیسم بیشینه در هر دو تیمار هیپوکسی تحت کشنده و مزمن کاهش یافته است که با نتایج گزارش شده در خصوص ماهی کاراس و ماهی کپور مطابقت دارد(Fu *et al*., 2011; Fu *et al*., 2014).

اگرچه تمامی تیمارهای هیپوکسی سبب کاهش محدوده هوازی شده است اما محدوده نسبی هوازی فقط در تیمارهای حاد و تحت کشنده کاهش یافته است (جدول شماره ۲). همانطور که پیش از این پیشنهاد شده است، محدوده نسبی هوازی بیشتر به متابولیسم پایه (به‌عنوان مخرج کسر) وابسته است. بنابراین، افزایش محدوده نسبی هوازی در تیمار مزمن در نتیجه کاهش قابل توجه متابولیسم پایه در این تیمار است. مقدار P_{Crit} ماهی کپور

در آزمایش فعلی متعاقب هیپوکسی تحت کشنده و مزمن افزایش یافته است که دلیلی بر ایجاد سازگاری برای حفظ متابولیسم پایه خود در شرایط طولانی مدت هیپوکسی است (Timmerman & Chapman, 2004). نشان داده شده است که سازگاری با هیپوکسی سبب بهبود قابلیت تحمل هیپوکسی در کپورماهیان می‌شود (Fu *et al.*, 2011). بطور مشابه میزان P_{Crit} در ماهی کاد اقیانوس اطلس متعاقب هیپوکسی بلندمدت کاهش یافته است که البته نسبت به کپورماهیان به مراتب کمتر است(Petersen & Gamperl, 2010).

نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که کلیه تیمارهای کادمیوم سبب افزایش معنی دار ($P<0.05$) متابولیسم پایه و بیشینه شده است (جدول شماره ۲). احتمالاً تشدید متابولیسم اکسیداتیو سبب افزایش جذب اکسیژن به منظور تامین نیاز متابولیکی افزایش یافته تحت تاثیر استرس آلودگی، شده است (Sampath *et al.*, 1990). پاسخ‌های رفتاری متنوعی در خصوص غلبه بر استرس‌های ناشی از مواد سمی در ماهیان دیده شده است. از آن جمله، افزایش حجم تنفسی یا شدت تهویه به منظور تامین افزایش نیاز متابولیکی و یا حتی کاهش آن است(Hughes *et al.*, 1983; Waiwood & Beamish, 1978). علاوه براین، مکانیسم های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی به منظور غلبه بر استرس نیز فراخوانده می‌شوند(Taylor *et al.*, Jones & Randall, 1979; 1996).

افزایش مصرف اکسیژن در ماهی کپور علفخوار(*Ctenopharyngodon idella*) متعاقب تماس ۹۶ ساعته با کادمیوم نیز مشاهده شده است(Espina *et al.*, 2000). این افزایش در میزان متابولیسم ماهی متعاقب مسمومیت با کادمیوم می‌تواند در اتباط با انرژی مورد استفاده جهت سم زدایی کادمیوم و همچنین مرمت بافتی باشد. بنابراین، در مواردی که میزان تجمع بیشتر فلزات و تخریبات بافتی شدیدتر در ارگان‌های داخلی رخ می‌دهد، میزان متابولیسم تشدید می‌شود (Calow, 1991). در تایید نتایج به‌دست آمده، افزایش مصرف اکسیژن در ماهی شش آبی (*Lepomis macrochirus*) متعاقب تیمارهای غذایی و محلول درآب سلنیم نشان داده شده است (Lemly, 1993). میزان متابولیسم پایه و بیشینه در ماهی زبرا (*Danio rerio*) نیز پس از مسمومیت با ترکیبات آلی سلنیم افزایش یافته است که خود نشان‌دهنده صرف انرژی بیشتر به منظور حفظ هموستاز است. مس می تواند سبب افزایش میزان متابولیسم در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان شود (Campbell Waiwood & Beamish, 1978; *et al.*, 2002). بنابراین تصور براین است که ماهیان می‌توانند یک استراتژی سازگاری مازاد را برای خود فراهم سازند چراکه افزایش میزان متابولیسم پایه در نتیجه تماس با کادمیوم به‌عنوان یک عامل استرس القایی (loading stress) به موجود زنده اجازه صرف انرژی بیشتر برای ترمیم بافتی را می‌دهد. علاوه براین، فلزات سنگین می‌توانند سبب افزایش تحرک ماهی شوند و همزمان رهاسازی انتقال دهنده های عصبی را متوقف نمایند(Jebali *et al.*, Campbell *et al.*, 2002; 2006) که خود دلیلی بر افزایش هزینه‌های انرژی در ماهی است (Waiwood & Beamish, 1978; Sherwood *et al.*, 2000). افزایش تحرک ماهی مانند افزایش شدت تهویه تنفسی در نتیجه تماس با آلاینده‌های فلزی (Diamond *et al.*, 1990) می تواند بازگوکننده نیاز بیشتر انرژی باشد. به‌عبارتی ماهی کپور میزان متابولیسم خود را با توجه به افزایش میزان نیاز متابولیکی در مواقعی که استرس آلاینده‌ها ممتد است، افزایش می‌دهد. این فرضیه در مطالعه حاضر بسیار مشهود است چراکه میزان محدوده هوازی ماهی در نتیجه تیمارهای تحت کشنده و مزمن کادمیوم افزایش یافته است (جدول شماره ۲).

با توجه به بروز همزمان شرایط هیپوکسی و آلودگی فلزات سنگین در اکثر اکوسیستم‌های آبی، بررسی نحوه پاسخ فیزیولوژیک ماهی کپور معمولی به حضور همزمان دو عامل استرس‌زای فوق بسیار حائز اهمیت است. سابق براین، نشان داده شده است که زمانیکه خرچنگ آبی *Cancer pagurus* به‌صورت همزمان در معرض کادمیوم و هیپوکسی یا روی و هیپوکسی قرارگیرد هیچ تغییری در میزان متابولیسم و حتی رفتار تنفسی از خود بروز نمی‌دهد(Spicer & Weber, 1992). اگرچه

تجمع بیشتر فلزات سنگین (کادمیوم، روی و مس) تحت شرایط هیپوکسی افزایش نمی‌یابد اما شدت تهویه تنفسی به‌عنوان دلیلی برای افزایش حساسیت بیشتر ماهی به حضور توام هیپوکسی و فلزات سنگین محسوب می شود (Pilgaard *et al*., Hughes & Flos, 1978 ; 1994; Hattink *et al*., 2005; Dangre *et al*., 2010).

نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که میزان متابولیسم پایه ماهی کپور در اثر تماس همزمان کادمیوم و هیپوکسی نسبت به گروه کنترل کاهش ($P<0.05$) یافته است. تمامی تیمارهای ترکیبی حاد و تحت کشنده سبب کاهش ($P<0.05$) متابولیسم بیشینه و محدوده هوازی در مقایسه با کنترل شده اند در حالیکه تیمار ترکیب مزمن افزایش معنی‌داری ($P<0.05$) از خود نشان داده است. در صورت مقایسه تیمارهای ترکیبی با تیمارهای ساده هیپوکسی یا کادمیوم می‌توان به تاثیر همزمان این دو عامل بهتر پی برد. بنابراین، تیمارهای حاد و تحت کشنده سبب کاهش معنی‌دار ($P<0.05$) میزان متابولیسم پایه و متابولیسم بیشینه در مقایسه با تیمار کادمیوم یا هیپوکسی مربوطه می‌شوند که نشان‌دهنده اثر سینرژیسم این دو عامل در حالت حاد و تحت کشنده است. در مقابل تیمار مزمن ترکیبی سبب افزایش میزان متابولیسم پایه و بیشینه (و تا حدی محدوده هوازی) نسبت به هیپوکسی مزمن و کاهش آن نسبت به تیمار کادمیوم مزمن شده است که مبین اثر آنتاگونیسم این دو عامل درحالت مزمن است. سابق براین، اثر آنتاگونیستی کادمیوم و هیپوکسی در لارو نوعی ماهی مینو (*Cyprinodon variegatus*) نشان داده شد. در این مطالعه، القا رونویسی ژن EPO در اثر هیپوکسی در صورت تماس همزمان با کادمیوم متوقف می گردید. البته این اثر آنتگونیست در خصوص بروز ژن سنتز کننده هموگلوبین دیده نشد(Dangre *et al*., 2010).

عدم وجود اطلاعات بیشتر در خصوص تاثیر ترکیبی هیپوکسی و فلزات سنگین امکان بحث بیشتر در این خصوص را فراهم نمی‌کند. به هرحال عدم وجود یک الگوی یکسان برای تمامی تیمارهای ترکیبی احتمالاً به دلیل رقابت بین این دو عامل استرس‌زا می باشد که به‌صورت همزمان رخ می‌دهد. افزایش نیاز ماهی برای مصرف اکسیژن در کنار تقلای ماهی برای کسب اکسیژن بیشتر (اگرچه توانایی جذب اکسیژن به دلیل تخریب بافت آبشش، کاسته شده است) ممکن است تغییرات گسترده و متنوعی را در خصوص ظرفیت متابولیکی ماهی سبب شود.

نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که هنگامیکه ماهی کپور در معرض شرایط هیپوکسی قرار می‌گیرد، با استفاده از مکانیسم‌هایی نظیر باریک و طویل شدن لاملای ثانویه (مشاهدات عینی نویسنده، اطلاعات منتشر نشده) سعی در استخراج بیشتر اکسیژن از آب دارد. این در حالیست که ماهی در مواجهه با کادمیوم رفتار مشابهی از خود نشان نمی‌دهد. براین اساس، هیپوکسی به‌عنوان استرس محدود کننده (*limiting stressor*) عمل می‌کند چراکه سبب کاهش متابولیسم بیشینه در ماهی مورد نظر شده است ولی کادمیوم به عنوان استرس القایی (*loading stressor*) عمل می‌کند چراکه سبب افزایش متابولیسم پایه شده است. نتایج متناقض در خصوص تاثیر فلزات سنگین بر میزان متابولیسم ماهی چندان دور از انتظار نیست چراکه اینها اساساً تحت تاثیر تفاوت‌های درون گونه‌ای یا حتی بین گونه‌ای قرار می‌گیرد. بنابراین لزوم بررسی‌ها و مطالعات بیشتر در خصوص تداخلات احتمالی بین پاسخ‌های رفتاری، بیوشیمیایی، فیزیولوژیک و آسیب شناسی در کنار تاثیر همزمان سایر عوامل زیستی و غیر زیستی به منظور درک تفاوت‌های مشاهده شده در خصوص تاثیر عوامل استرس‌زا ضروری به‌نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله مراتب تشکر و قدردانی صمیمانه خود را از کلیه اعضای هیئت علمی و کارشناسان دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان و همینطور دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز اعلام می‌دارد.

منابع

APHA, A., 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21.

Bennett, W., Sosa, A. and Beitinger, T., 1995. Oxygen tolerance of fathead minnows previously exposed to copper. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 55, 517-524.

Calow, P., 1991. Physiological costs of combating chemical toxicants: ecological implications. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology 100, 3-6.

Campbell, H., Handy, R. and Sims, D., 2002. Increased metabolic cost of swimming and consequent alterations to circadian activity in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) exposed to dietary copper. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 59, 768-777.

Campbell, P., 2003. How might hypoxia affect metal speciation, accumulation and toxicity: some speculation, Proceedings of the Seventh International Symposium on Fish Physiology, Toxicology and Water Quality, Tallinn, Estonia.

Clark, T.D., Sandblom, E. and Jutfelt, F., 2013. Aerobic scope measurements of fishes in an era of climate change: respirometry, relevance and recommendations. The Journal of experimental biology 216, 2771-2782.

Cook, D.G., Iftikar, F.I., Baker, D.W., Hickey, A.J. and Herbert, N.A., 2013. Low-O2 acclimation shifts the hypoxia avoidance behaviour of snapper (Pagrus auratus) with only subtle changes in aerobic and anaerobic function. The Journal of experimental biology 216, 369-378.

Dangre, A., Manning, S. and Brouwer, M., 2010. Effects of cadmium on hypoxia-induced expression of hemoglobin and erythropoietin in larval sheepshead minnow, Cyprinodon variegatus. Aquatic Toxicology 99, 168-175.

De Boeck, G., De Smet, H. and Blust, R., 1995. The effect of sublethal levels of copper on oxygen consumption and ammonia excretion in the common carp, Cyprinus carpio. Aquatic Toxicology 32, 127-141.

Diamond, J.M., Parson, M.J. and Gruber, D., 1990. Rapid detection of sublethal toxicity using fish ventilatory behavior. Environmental Toxicology and Chemistry 9, 3-11.

Diaz, R.J. and Rosenberg, R., 2008. Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems. science 321, 926-929.

Dupont-Prinet, A., Vagner, M., Chabot, D., Audet, C. and MacLatchey, D., 2013. Impact of hypoxia on the metabolism of Greenland halibut (Reinhardtius hippoglossoides). Canadian Journal of

Glass, M., Andersen, N., Kruhøffer, M., Williams, E. and Heisler, N., 1990. Combined effects of environmental PO2 and temperature on ventilation and blood gases in the carp Cyprinus carpio L. Journal of Experimental Biology 148, 1-17.

Gonzalez, R.J. and McDonald, D., 1992. The relationship between oxygen consumption and ion loss in a freshwater fish. Journal of Experimental Biology 163, 317-332.

Hattink, J., Boeck, G.D. and Blust, R., 2005. The toxicokinetics of cadmium in carp under normoxic and hypoxic conditions. Aquatic Toxicology 75, 1-15.

Hattink, J., De Boeck, G. and Blust, R., 2006. Toxicity, accumulation, and retention of zinc by carp under normoxic and hypoxic conditions. Environmental Toxicology and Chemistry 25, 87-96.

Herbert, N. and Steffensen, J., 2005. The response of Atlantic cod, Gadus morhua, to progressive hypoxia: fish swimming speed and physiological stress. Marine Biology 147, 1403-1412.

Hughes, G., Albers, C., Muster, D. and Götz, K., 1983. Respiration of the carp, Cyprinus carpio L., at 10 and 20 C and the effects of hypoxia. Journal of Fish Biology 22, 613-628.

Hughes, G. and Flos, R., 1978. Zinc content of the gills of rainbow trout (S. gairdneri) after treatment with zinc Fisheries and Aquatic Sciences 70, 461-469.

Ebadati, F., Esmaeeli, A. and Riahi, B.A., 2005. Heavy metals in macrophyts and sediments of Minkaleh wetland. J Environ Studies 31, 53-57.

Espina, S., Salibian, A. and Díaz, F., 2000. Influence of cadmium on the respiratory function of the grass carp Ctenopharyngodon idella. Water, Air, and Soil Pollution 119, 1-10.

Fu, S.-J., Brauner, C.J., Cao, Z.-D., Richards, J.G., Peng, J.-L., Dhillon, R. and Wang, Y.-X., 2011. The effect of acclimation to hypoxia and sustained exercise on subsequent hypoxia tolerance and swimming performance in goldfish (Carassius auratus). The Journal of experimental biology 214, 2080-2088.

Fu, S.-J., Fu, C., Yan, G.-J., Cao, Z.-D., Zhang, A.-J. and Pang, X., 2014. Interspecific variation in hypoxia tolerance, swimming performance and plasticity in cyprinids that prefer different habitats. The Journal of experimental biology 217, 590-597.

Gaulke, G.L., Dennis III, C.E., Wahl, D.H. and Suski, C.D., 2014. Acclimation to a low oxygen environment alters the hematology of largemouth bass (Micropterus salmoides). Fish Physiology and Biochemistry 40, 129-140.

Lloyd, R., 1961. Effect of dissolved oxygen concentrations on the toxicity of several poisons to rainbow trout (Salmo gairdnerii Richardson). Journal of Experimental Biology 38, 447-455.

Lloyd, R. and Herbert, D., 1962. The effect of the environment on the toxicity of poisons to fish. J. Inst. Public Health Eng 61, 132-145.

Mager, E.M. and Grosell, M., 2011. Effects of acute and chronic waterborne lead exposure on the swimming performance and aerobic scope of fathead minnows (Pimephales promelas). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 154, 7-13.

Malekpouri, P., Moshtaghie, A.A., Hosseini, R. and Ebrahimi, E., 2011a. Short and Long-Term Effects of Waterborne Cadmium on Growth and Its Muscle Accumulation in Common Carp Fish (Cyprinus carpio), an Experimental Study. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 11.

Malekpouri, P., Moshtaghie, A.A., Kazemian, M. and Soltani, M., 2011b. Protective effect of zinc on related parameters to bone metabolism in common carp fish (Cyprinus carpio L.) intoxified with cadmium. Fish Physiology and Biochemistry 37, 187-196.

solutions under normoxic and hypoxic conditions. Journal of Fish Biology 13, 717-728.

Ivanina, A.V., Froelich, B., Williams, T., Sokolov, E.P., Oliver, J.D. and Sokolova, I.M., 2011. Interactive effects of cadmium and hypoxia on metabolic responses and bacterial loads of eastern oysters Crassostrea virginica Gmelin. Chemosphere 82, 377-389.

Jebali, J., Banni, M., Guerbej, H., Almeida, E., Bannaoui, A. and Boussetta, H., 2006. Effects of malathion and cadmium on acetylcholinesterase activity and metallothionein levels in the fish Seriola dumerilli. Fish Physiology and Biochemistry 32, 93-98.

Jones, D.R. and Randall, D.J., 1979. The Respiratory and Circulatory Systems During Exercise. Fish Physiology 7, 425-501.

Kramer, D., 1987. Dissolved oxygen and fish behavior. Environmental Biology of Fishes 18, 81-92.

Lai, J.C., Kakuta, I., Mok, H.O., Rummer, J.L. and Randall, D., 2006. Effects of moderate and substantial hypoxia on erythropoietin levels in rainbow trout kidney and spleen. Journal of Experimental Biology 209, 2734-2738.

Lemly, A.D., 1993. Metabolic stress during winter increases the toxicity of selenium to fish. Aquatic Toxicology 27, 133-158.

McKenzie, D., Garofalo, E., Winter, M., Ceradini, S., Verweij, F., Day, N., Hayes, R., Van der Oost, R., Butler, P. and Chipman, J., 2007. Complex physiological traits as biomarkers of the sub-lethal toxicological effects of pollutant exposure in fishes. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 362, 2043-2059.

Medale, F., Parent, J. and Vellas, F., 1987. Responses to prolonged hypoxia by rainbow trout (Salmo gairdneri) I. Free amino acids and proteins in plasma, liver and white muscle. Fish Physiology and Biochemistry 3, 183-189.

Mitrovic, D., Dymowska, A., Nilsson, G.E. and Perry, S.F., 2009. Physiological consequences of gill remodeling in goldfish (Carassius auratus) during exposure to long-term hypoxia. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 297, R224-R234.

Nilsson, G.E. and Renshaw, G.M., 2004. Hypoxic survival strategies in two fishes: extreme anoxia tolerance in the North European crucian carp and natural hypoxic preconditioning in a coral-reef shark. Journal of Experimental Biology 207, 3131-3139.

OECD, 1992. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Organization for Economic.

Petersen, L. and Gamperl, A., 2010. Effect of acute and chronic hypoxia on the swimming performance, metabolic capacity and cardiac function of Atlantic cod (Gadus morhua). The Journal of experimental biology 213, 808-819.

Pilgaard, L., Malte, H. and Jensen, F.B., 1994. Physiological effects and tissue accumulation of copper in freshwater rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) under normoxic and hypoxic conditions. Aquatic Toxicology 29, 197-212.

Richards, J.G., 2009. Metabolic and molecular responses of fish to hypoxia. Fish Physiology 27, 443-485.

Sampath, K., Stanley, A. and Sivakumar, V., 1990. Respiratory responses of Heteropneustes fossilis exposed to different temperatures and sublethal levels of methyl parathion. Environment and Ecology 8, 92-94.

Scott, G.R. and Sloman, K.A., 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. Aquatic Toxicology 68, 369-392.

Selman, M., Greenhalgh, S., Diaz, R. and Sugg, Z., 2008. Eutrophication and hypoxia in coastal areas: a global assessment of the state of knowledge. World Resources Institute 284, 1-6.

Sherwood, G.D., Rasmussen, J.B., Rowan, D.J., Brodeur, J. and Hontela, A.,

Taylor, S., Egginton, S. and Taylor, E., 1996. Seasonal temperature acclimatisation of rainbow trout: cardiovascular and morphometric influences on maximal sustainable exercise level. The Journal of experimental biology 199, 835-845.

Timmerman, C.M. and Chapman, L.J., 2004. Behavioral and physiological compensation for chronic hypoxia in the sailfin molly (Poecilia latipinna). Physiological and Biochemical Zoology 77, 601-610.

Waiwood, K. and Beamish, F., 1978. Effects of copper, pH and hardness on the critical swimming performance of rainbow trout (Salmo gairdneri Richardson). Water Research 12, 611-619.

Yu, M.H., 2001. Environmental Toxicology: Impacts of environmental toxicants on living systems. Lewis Publishers.

2000. Bioenergetic costs of heavy metal exposure in yellow perch (Perca flavescens): in situ estimates with a radiotracer (137Cs) technique. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 57, 441-450.

Smith, M.J. and Heath, A.G., 1980. Responses to acute anoxia and prolonged hypoxia by rainbow trout (Salmo gairdneri) and mirror carp (Cyprinus carpio) red and white muscle: use of conventional and modified metabolic pathways. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry 66, 267-272.

Soofiani, N. and Hawkins, A., 1982. Energetic costs at different levels of feeding in juvenile cod, Gadus morhua L. Journal of Fish Biology 21, 577-592.

Spicer, J.I. and Weber, R.E., 1992. Respiratory impairment by water-borne copper and zinc in the edible crab Cancer pagurus (L.)(Crustacea: Decapoda) during hypoxic exposure. Marine Biology 112, 429-435.

The interactive effect of water-borne cadmium and environmental hypoxia on common carp (*Cyprinus carpio*) metabolism

Malekpouri P.[1*]; Peyghan R.[1]; Mahboobi-Soofiani N.[2]; Herbert N.[3]; Mohammadian B.[4]

[*]p.malekpouri@gmail.com

1-Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
2-Fisheries Division, Department of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan 8415683111, Iran.
3-Institute of Marine Science, Leigh Marine Laboratory, University of Auckland, PO Box 349, Warkworth 0941, New Zealand
4-Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Received: July 2015 Accepted: December 2015

Keywords: Heavy metals, Hypoxia, Oxygen Consumption, Aerobic Scope, *Cyprinus carpio*

Abstract

Regarding to the tight association between aquatic hypoxia and heavy metal contaminations in one hand and the role of both parameters on fish respiration, metabolism of carp could be assessed under single and mutual exposures to hypoxia and cadmium. Following measuring LC_{50}-96h of cadmium (43.679 mg/l) for this species, 80 common carp were exposed to 10 different treatments, including control, acute (43.68 mg/l), sub-lethal (21.84 mg/l) and chronic (4.37 mg/l) cadmium as well as hypoxia for immediately (20% of saturation), 24h (40%) and 7 days (60%), and joint exposure of each similar treatment. By using of respirometer technique, we measured oxygen consumption rate in different time spans to calculate each individual standard metabolic rate (SMR), maximum metabolic rate (MMR), aerobic scope (AS), factorial aerobic scope (FAS) and critical oxygen tension (P_{Crit}). Obtained data show that acute and sub-lethal cadmium treatments led to significant ($P<0.05$) increases in all metabolic indices in comparison with control group whilst the MMR and AS have been reduced ($P<0.05$) following hypoxia treatments. Combined treatments of hypoxia and cadmium led to reduce SMR and P_{Crit} in all treatments and MMR, AS and FAS only in acute and sub-lethal treatments. In overall, hypoxia can act as a *limiting stressor* in carp while cadmium can account as a *loading stressor*.

* Corresponding author