

Hallazgos tisulares en peces adultos de *Gambusia punctata* (Poey 1854) crecidos bajo influencia minera

Tissue findings in adult fish of *Gambusia punctata* (Poey 1854) grown under mining influence

Aníbal Domínguez Odio¹, Yoandra Mora Tassé², Juan Esmérito Betancourt Hernández², Onel Fong Lores², Daniel Leonardo Cala Delgado^{3*}

RESUMEN

Se notifica la respuesta tisular del pez *Gambusia punctata* (Poey, 1854) crecido en condiciones naturales bajo la exposición crónica de metales pesados. Se capturaron individuos adultos de ambos sexos, a 10 km aguas debajo de una antigua zona minera a cielo abierto en Santiago de Cuba, Cuba. Se identificaron deformaciones branquiales con una extensión moderada en el 80% de los individuos investigados. Asimismo, el 100% presentó numerosos depósitos de hierro férrico en el interior de los enterocitos.

Palabras clave: *Gambusia punctata*, peces, histopatología, metales pesados

ABSTRACT

The tissue response of the fish *Gambusia punctata* (Poey, 1854) grown under natural conditions under chronic heavy metal exposure is reported. Adult individuals of both sexes were captured 10 km downstream of a former open-pit mining area in Santiago de

¹ Dirección de Investigación e Innovación. Grupo Empresarial LABIOFAM. Avenida Independencia km 16 ½, Boyeros, La Habana, Cuba.

² Centro de Toxicología y Biomedicina. Universidad de Ciencias Médicas de Santiago de Cuba. Cuba

³ Grupo de Investigación en Ciencia Animal, Universidad Cooperativa de Colombia, Bucaramanga, Colombia

* E-mail: daniel.cala@campusucc.edu.co

Recibido: 28 de abril de 2022

Aceptado para publicación: 15 de enero de 2023

Publicado: 28 de abril de 2023

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

Cuba, Cuba. Branchial deformities with moderate extension were identified in 80% of the investigated individuals. Likewise, 100% presented numerous ferric iron deposits inside the enterocytes.

Key words: *Gambusia punctata*, fish, histopathology, heavy metals

INTRODUCCIÓN

El mundo en la actualidad sufre una serie de graves, crecientes y complejos problemas ecológicos, siendo la contaminación química por actividades antropogénicas uno de las que causan mayor impacto (Rahman y Singh, 2011; Jahandari, 2020). Los compuestos que intervienen en esta situación son diversos, pero los metales pesados sobresalen por su variedad y peligrosidad (Ali *et al.*, 2019; Abalaka 2020). El uso social e industrial variado y extendido de estos elementos, unido al manejo inadecuado de la actividad minero-extractiva y sus residuales han favorecido el incremento alarmante de sus concentraciones globales, a tal punto, que se les considera uno de los mayores retos de la sociedad moderna (Alam *et al.*, 2020).

Los conocimientos acumulados sobre metales pesados indican que los componentes bióticos y abióticos de los ecosistemas de agua dulce superficial son los más afectados (Rosales *et al.*, 2019; Aportela y Paulino, 2020); sin embargo, no siempre es posible estimar el impacto real de la interacción biota-metales pesados. Influyen en este hecho la existencia de una gran variedad de elementos metálicos, la formación de mezclas difíciles de prever y cuantificar, y los complejos mecanismos de acción, así como la enorme variedad de organismos acuáticos involucrados, entre otros factores (Wu *et al.*, 2016; Ali y Khan, 2017; Timpano *et al.*, 2022).

En este contexto tan complejo, la histopatología puede convertirse en una valiosa herramienta en estudios ambientales de fuentes antropogénicas generadoras de es-

pecies metálicas (Van der Oost *et al.*, 2003). El análisis de la severidad y extensión de las modificaciones en tejidos procedentes de individuos expuestos permite aportar evidencias irrefutables de sensibilidad o tolerancia a estos elementos, proponer mecanismos de acción, y además realizar inferencias sobre el estado de salud de la población a la cual pertenece (Gernhofer *et al.*, 2001; Fagbuaro *et al.*, 2020). A pesar de estas ventajas, no es frecuente encontrar en la literatura especializada experiencias prácticas en peces de agua dulce, aspecto que complica aún más la búsqueda de evidencias sobre la toxicidad *in vivo* de metales.

Estas dificultades ambientales y científicas también se visualizan en Cuba, siendo la mina grande de cobre en Santiago de Cuba el mejor ejemplo de ello. La literatura nacional consultada refiere que el vertido histórico de residuales mineros en el río aledaño (desde 1544 hasta 2001) ha provocado un deterioro de sus segmentos abióticos y bióticos (González *et al.*, 2009; Gámez *et al.*, 2019). Si bien la clausura de la mina constituyó un gran avance desde el punto de vista ambiental, no evitó la persistencia del impacto químico negativo en las aguas superficiales en años posteriores (Marañón *et al.*, 2009), tal y como ha sucedido en otros casos a nivel mundial (Luís *et al.*, 2011; Camizuli *et al.*, 2014; Gigantone *et al.*, 2020). Bajo estas condiciones se hace necesario profundizar en las consecuencias biológicas asociadas que las actividades minero-extractivas de cobre provocan en la ictiofauna del lugar, razón por la cual se realizó un estudio para describir la respuesta tisular del pez *Gambusia punctata* crecido en condiciones naturales y bajo la exposición crónica de metales pesados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización y Peces

El sitio de estudio se localizó en el río Cobre (20° 02' 28" N 75° 54' 23" W), a una distancia aproximada de 10 km aguas abajo del área que ocupa la antigua gran mina de cobre a cielo abierto, cercano al canal de entrada del embalse artificial denominado Parada, ubicado en la costa sur de la provincia de Santiago de Cuba, Cuba (Figura 1).

Se capturaron 40 peces adultos de *Gambusia punctata* en horario de la mañana y en época poco lluviosa. Los especímenes de ambos sexos fueron inspeccionados *in situ*, desechándose los de talla menor de 2 cm de largo total, mutilados o de apariencia externa no saludable (según color y textura de la piel). Los peces seleccionados fueron colocados en bolsas plásticas, conservados en recipientes con hielo y trasladados al laboratorio.

Histoquímica e Histopatología

El material de estudio fue trasladado en un inicio al laboratorio de histopatología perteneciente al Centro de Toxicología y Biomedicina, ubicado en Santiago de Cuba,

fijados en formol al 10% y ,osteriormente deshidratados con soluciones de alcohol a concentraciones crecientes (50, 70, 90 y 100%) por 5 min cada uno y aclarados con xilol. Los ejemplares por separado fueron embebidos en parafina en forma de bloques y cortados a 7 μ m de grosor (Leica RM 2125 RT), e hidratados. Se obtuvieron tres cortes por individuo, con una distancia entre cortes de 14 μ m.

Los ejemplares para su tinción fueron remitidos al departamento de anatomía patológica perteneciente al hospital docente-clínico-quirúrgico Dr. Joaquín Castillo Duany de Santiago de Cuba. De estos, 20 fueron teñidos con Hematoxilina-eosina y los individuos restantes fueron divididos en partes iguales para su coloración con la técnica de nitrato piridina de Cajal (para visualizar prolongaciones nerviosas) y Perls (detección de depósitos de hierro no hemático) según lo describen Corominas *et al.* (1992) y Meguro *et al.* (2007), respectivamente.

Análisis de Datos

Para identificar las posibles anomalías histológicas en las estructuras que conforman a los especímenes, los cortes utilizados tenían que cumplir los criterios de integridad del tejido y epitelio claramente definido. La

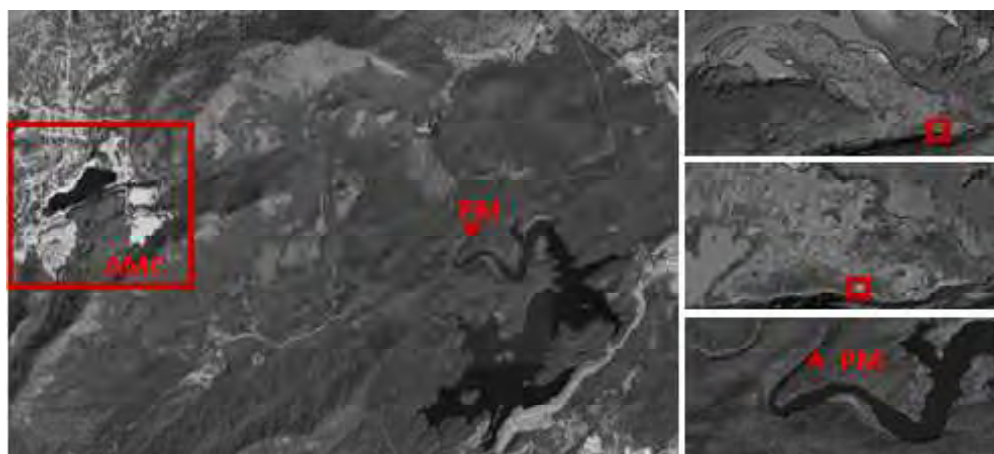


Figura 1. Localización aproximada del área correspondiente a la antigua gran mina de cobre (AMC), y el punto de muestreo (PM). Santiago de Cuba, Cuba

Cuadro 1. Valoración subjetiva semicuantitativa de hallazgos tisulares microscópicos en peces *Gambusia punctata* según su grado de extensión

Grado de lesión	Extensión en la sección de corte (400x)
Ausencia	Sin cambios
Leve / Escaso	Presencia hasta 30%
Moderada	Presencia de 31 a 60%
Severo / Abundante	Presencia difusa o más de 61%

severidad de cada lesión (Cuadro 1) fue evaluada de acuerdo con el grado de extensión (Bernet *et al.*, 1999).

El cálculo de la frecuencia de aparición de modificaciones histológicas (MH) en los órganos se realizó según la fórmula $MH (\%) = (\text{Peces con modificaciones histológicas} / \text{Total de peces}) \times 100$.

RESULTADOS

Hallazgos Tisulares

La observación detenida de los tejidos procedentes de *G. punctata* permitieron identificar daños branquiales con extensión mo-

derada en el 80% de los individuos investigados (Figura 2b). Las deformaciones branquiales se caracterizaron, en general, por pérdida irreversible de la simetría lamelar y de sus evaginaciones, lo cual condujo a una rigidez de la estructura con disminución del área de superficie para el intercambio gaseoso. En particular, la deformación branquial se caracterizó por pérdida del epitelio simple plano que recubre la estructura, engrosamiento lamelar con pérdida completa de su morfología normal (Figura 2a), desorganización epitelial, congestión venosa y fusión de las lamelas secundarias en diferentes grados de evolución (Figura 2b). Teniendo en cuenta la importancia de las branquias en el proceso respiratorio (Roa *et al.*, 2011) y el número elevado de individuos afectados por las deformaciones, se infiere que la población de esta especie en condiciones naturales está sometida a continuas situaciones de hipoxia.

El análisis comparativo del cuadro histopatológico observado en *G. punctata* con estudios similares corroboró la sensibilidad del tejido branquial frente a bioagresores con independencia de la especie (Bibi *et al.*, 2021) y, por tanto, su utilidad para reflejar las condiciones ambientales próximas a los sitios de captura (Oliveira *et al.*, 2021). Asimismo, se reveló un patrón lesional común con *Oreochromis niloticus*, *Clarias gariepinus* y salmónidos expuestos a mezclas de meta-

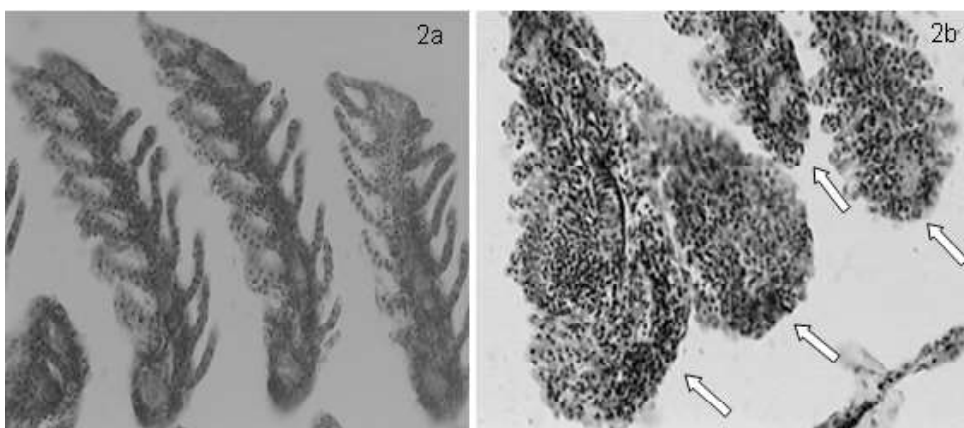


Figura 2. Microfotografía de estructuras branquiales de *Gambusia punctata* sin lesiones aparentes (a) y con pérdida total de la morfología tisular típica en diferentes grados de evolución (b). H&E. 400x



Figura 3. Epitelio entérico de *Gambusia punctata* con presencia de numerosas zonas de hemosiderina (flechas). Tinción de Perls. 400x

les pesados (Roa *et al.*, 2011; Oladapo *et al.*, 2019; Abalaka *et al.*, 2020), incluyendo el cobre (Wani *et al.*, 2011). Estas similitudes, unido a los antecedentes de contaminación minera del ecosistema por más de 400 años (Marañón *et al.*, 2009; Gámez *et al.*, 2019) y la ausencia de lesiones compatibles con agentes infecciosos, señalan como probable responsable a los metales pesados.

Otro hallazgo tisular que dio una clara idea del posible y persistente impacto minero en *G. punctata* fue el hallazgo donde se visualizan numerosos agregados (gránulos) de hierro insolubles en forma de hemosiderina, ubicados en el interior las células epiteliales intestinales (Figura 3). La abundancia de depósitos observados por campo visual en todos los especímenes analizados permitió inferir la existencia de una sobrecarga férrica del ecosistema, biodisponibilidad del metal, existencia de receptores específicos para captarlo y vías para almacenarlo intracelularmente (Chifman *et al.*, 2014; Forrellat *et al.*, 2000).

Explicar la presencia de depósitos corporales de hierro en el 100% de los individuos de vida libre, capturados aguas abajo de una mina de cobre abandonada, puede resultar complicado por los múltiples factores a tener en cuenta (Brázová *et al.*, 2012). La entrada del hierro por la membrana apical de los enterocitos (sistema digestivo) y su permanencia intracelular es consistente con la biodisponibilidad del metal, el hábito de esta especie de ingerir sedimentos (Falcón-Hidalgo *et al.*, 2011), y con el papel que desempeña este último en la acumulación de metales pesados por periodos prolongados (Niu *et al.*, 2020), lo cual permite que interactúe a largo plazo con la biota local (Jones *et al.*, 2020). Es así que la llegada de grandes cantidades de hierro al sedimento y, en consecuencia, a *G. punctata* pudo facilitarse por la combinación de vertimientos mineros y la alta carga orgánica que impactó al ecosistema tiempo atrás, producto del rápido incremento poblacional generado por la industrialización del yacimiento (Marañón *et al.*, 2009).

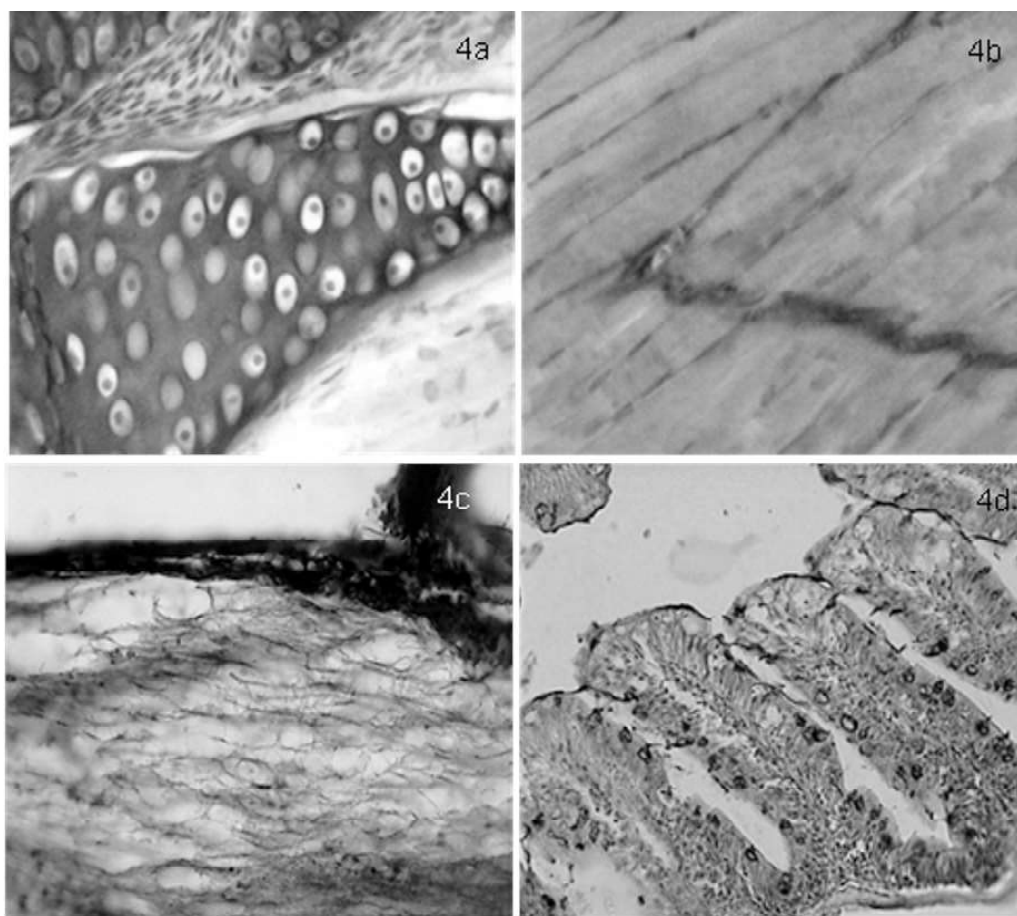


Figura 4. Microfotografía de los tejidos óseo y conectivo (a), muscular estriado (b), nervioso y óseo (c), e intestinal (d) de *Gambusia punctata* sin lesiones aparentes. H&E (a, b, d). Tinción de Cajal (c). 400x

De acuerdo con los conocimientos sobre el metabolismo del hierro en mamíferos se puede afirmar que su permanencia en las células entéricas es temporal (Bury y Grosell, 2003; Chifman *et al.*, 2014); sin embargo, su destino final en *G. punctata* no está del todo esclarecido, pues podría excretarse en el próximo recambio celular normal o transportarse hacia otros tejidos para bioacumularse, tal y como ocurre en otras especies (Abalaka *et al.*, 2020). De confirmarse una o las dos vías propuestas, se estaría en condiciones de entender mejor los posibles mecanismos moleculares adaptativos o de tolerancia desarrollados por *G. punctata* para reducir sus cargas corporales de hierro y poder habitar

ecosistemas contaminados. De manera general, en este caso, se puede asegurar que la transferencia de metales pesados procedente de la antigua mina de cobre hacia organismos vivos no es historia pasada.

Con tales hallazgos tisulares, se esperó encontrar otras señales de alarma en diversos órganos, pero no fue así. La observación de los tejidos óseo, conectivo, muscular, nervioso (columna vertebral) e intestinal (Figura 4) mostró ausencia de daños histológicos en todos los especímenes evaluados. Estos resultados no son del todo desconcertantes, pues estos tejidos no están expuestos de forma directa al contaminante, ni son lugares activos de detoxificación (Abalaka *et al.*, 2020).

Los resultados en su conjunto permiten inferir que la mina a pesar de haber cesado sus labores extractivas continúa siendo una fuente contaminante para la biota residente aguas abajo, lo cual se corresponde en términos generales con investigaciones realizadas en antiguos sitios de extracción de oro (Soto-Benavente *et al.*, 2020). En el presente caso, la extensa área que ocupa la mina a cielo abierto sin cubierta vegetal (Figura 1), propicia que gran cantidad de desechos mineros continúen en contacto directo con el oxígeno y la lluvia (Marañón *et al.*, 2009). Bajo estas condiciones, se liberan constantemente pequeñas partículas conteniendo metales pesados, proceso que se acelera por las altas temperaturas. Estas partículas son dispersadas por los vientos o arrastradas por las precipitaciones hacia las aguas dulces superficiales cercanas, provocando la persistente contaminación (Punia, 2020; Perlatti *et al.*, 2021) y los efectos biológicos en *G. punctata* descritos en este estudio.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Facultad de Biológica de la Universidad de Oriente, y a los laboratorios de histopatología del hospital Dr. Joaquín Castillo Duany y del Centro de Toxicología y Biomedicina por las facilidades prestadas para realizar el estudio.

LITERATURA CITADA

1. **Abalaka SE, Enem SI, Idoko IS, Sani NA, Tenuche OZ, Ejeh SA, Sambo WK. 2020.** Heavy metals bioaccumulation and health risks with associated histopathological changes in *Clarias gariepinus* from the Kado Fish Market, Abuja, Nigeria. *J Health Pollut* 10: 200602. doi: 10.5696/2156-9614-10.26.-200602
2. **Alam I, Khattak M, Mulk S, Dawar F, Shahi L, Ihsanullah I. 2020.** Heavy metals assessment in water, sediments, algae and two fish species from river swat, Pakistan. *B Environ Contam Tox* 105: 546-552.
3. **Ali H, Khan E. 2017.** Environmental chemistry in the twenty-first century. *Environ Chem Lett* 15: 329-346.
4. **Ali H, Khan E, Ilahi I. 2019.** Environmental chemistry and ecotoxicology of hazardous heavy metals: environmental persistence, toxicity, and bioaccumulation. *J Chem-NY* 2019: 1-14. doi: 10.1155/2019/6730305
5. **Aportela O, Paulino LR. 2020.** Evaluación de metales pesados en ríos y truchas *Oncorhynchus mykiss* de la región Pasco, Perú. *Rev Iberoam Amb Sustent* 3: 32-48.
6. **Bernet D, Schmidt H, Meier W, Burkhardt-Holm P, Wahli T. 1999.** Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J Fish Dis* 22: 25-34. doi: 10.1046/j.1365-2761.1999.00134.x
7. **Bibi S, Naz S, Saeed S, Chatha AM. 2021.** A review on histopathological alterations induced by heavy metals (Cd, Ni, Cr, Hg) in different fish species. *Punjab Univ J Zool* 36: 81-89. doi: 10.17582/journal.pujz/2021.36.1.81.89
8. **Brázová T, Torres J, Eira C, Hanzelová V, Miklisová D, Salamún P. 2012.** Perch and its parasites as heavy metal biomonitoring in a freshwater environment: the case study of the Ružín water reservoir, Slovakia. *Sensors* 12: 3068-3081. doi: 10.3390/s120303068
9. **Bury N, Grosell M. 2003.** Iron acquisition by teleost fish. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 135: 97-105. doi: 10.1016/s1532-0456(03)00021-8
10. **Camizuli E, Monna F, Scheifler R, Amiotte-Suchet P, Losno R, Beis P, Bohard B, et al. 2014.** Impact of trace metals from past mining on the aquatic ecosystem: a multi-proxy approach in the Morvan (France). *Environ Res* 134: 410-419. doi: 10.1016/j.envres.2014.07.008
11. **Chifman J, Laubenbacher R, Torti S. 2014.** A systems biology approach to iron metabolism. *Adv Exp Med Biol* 844: 201-225. doi: 10.1007/978-1-4939-2095-2_10

12. **Corominas JM, García MA, Xarrie S. 1992.** Técnicas en patología. Patología 25: 125-129.
13. **Fagbua O, Ola-Oladimeji F, Ekundare O, Abolaji TR. 2020.** Histopathological studies of gills, liver and gonads of *Clarias gariepinus* and *Oreochromis niloticus* collected from rivers Ureje and Ogbese in Ado-Ekiti, Nigeria. Int J Zoo Animal Biol 3: 000238. doi: 10.23880/izab-16000238
14. **Falcón-Hidalgo B, Forrellat-Barrios A, Carrillo Farnés O, Ubieta Hernández K. 2011.** Digestive enzymes of two freshwater fishes (*Limia vittata* and *Gambusia punctata*) with different dietary preferences at three developmental stages. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 158: 136-141. doi: 10.1016/j.cbpb.2010.10.009
15. **Forrellat BM, Gautier DH, Fernández DN. 2000.** Metabolismo del hierro. Rev Cuban Hematol Inmunol Hemoterapia 16: 149-160.
16. **Gámez OR, Laffont-Schwob I, Prudent P, Vassalo L, Rodríguez IA, Macías RP, Petit ME, et al. 2019.** Assessment of water quality from the Blue Lagoon of El Cobre mine in Santiago de Cuba: a preliminary study for water reuse. Environ Sci Pollut R 26: 16366-16377. doi: 10.1007/s11356-019-05030-3
17. **Gernhofer M, Pawet M, Schramm M, Müller E, Triebkorn R. 2001.** Ultrastructural biomarkers as tools to characterize the health status of fish in contaminated streams. J Aqua Ecosyst. Stress Recov 8: 241-260.
18. **Gigantone CB, Sobremisana MJ, Trinidad LC, Migo VP. 2020.** Impact of abandoned mining facility wastes on the aquatic ecosystem of the Mogpog river, Marinduque, Philippines. J Health Pollut 10: 200611. doi: 10.5696/2156-9614-10.26.200611
19. **González MA, Marañón RA, Pérez PN, Reyes TB, Díaz AS, Ruiz EA. 2009.** Influencia del cierre de la mina grande en la calidad de las aguas del río Cobre de la provincia Santiago de Cuba. Rev Cuban Quím 21: 37-44.
20. **Jahandari A. 2020.** Pollution status and human health risk assessments of selected heavy metals in urban dust of 16 cities in Iran. Environ Sci Pollut R 27: 23094-23107. doi: 10.1007/s11356-020-08585-8
21. **Jones JI, Murphy JF, Collins AL, Spencer KL, Rainbow PS, Arnold A, Pretty JL, et al. 2020.** The Impact of metal-rich sediments derived from mining on freshwater stream life. Rev Environ Contam Toxicol 248: 111-189. doi: 10.1007/398_2018_21
22. **Luis AT, Teixeira P, Almeida SF, Matos JX, da Silva EF. 2011.** Environmental impact of mining activities in the Lousal area (Portugal): chemical and diatom characterization of metal-contaminated stream sediments and surface water of Corona stream. Sci Total Environ 409: 4312-4325. doi: 10.1016/j.scitotenv.-2011.06.052
23. **Marañón RA, Pérez PN, Dip MM. 2009.** Evaluación del impacto ambiental producido por los residuales de la mina grande en el río Cobre. Rev Cuban Quím 21: 59-65.
24. **Meguro R, Asano Y, Odagiri S, Li C, Iwatsuki H, Shoumura K. 2007.** Histoquímica de hierro no hemo para microscopía óptica y electrónica: una revisión histórica, teórica y técnica. Arch Histol Citol 70: 1-19.
25. **Niu Y, Chen F, Li Y, Ren B. 2020.** Trends and sources of heavy metal pollution in global river and lake sediments from 1970 to 2018. Rev Environ Contam T 257: 1-35. doi: 10.1007/398_2020_59
26. **Oladapo AO, Jacob AA, Hezekiah AS, Cecilia AO, Taiwo AB, Omowumi IM. 2019.** Histopathological biomarking changes in the internal organs of tilapia (*Oreochromis niloticus*) and catfish (*Clarias gariepinus*) exposed to heavy metals contamination from Dandaru pond, Ibadan, Nigeria. J Taibah Univ Sci 13: 903-911. doi: 10.1080/16583655-2019.1658400

27. **Oliveira HHQ, Reis-Filho JA, Nunes JACC, Dos Santos RM, de F Esteves Santiago E, Aguilar L, de Mello Affonso PRA, et al. 2022.** Gill histopathological biomarkers in fish exposed to trace metals in the Todos os Santos Bay, Brazil. *Biol Trace Elem Res* 200: 3388-3399. doi: 10.1007/s12011-021-02930-9
28. **Perlatti F, Martins EP, de Oliveira DP, Ruiz F, Asensio V, Rezende CF, Otero XL, Ferreira TO. 2021.** Copper release from waste rocks in an abandoned mine (NE, Brazil) and its impacts on ecosystem environmental quality. *Chemosphere* 262: 127843. doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.127843
29. **Punia A. 2020.** Role of temperature, wind, and precipitation in heavy metal contamination at copper mines: a review. *Environ Sci Pollut R* 28: 4056-4072. doi: 10.1007/s11356-020-11580-8
30. **Rahman Z, Singh VP. 2019.** The relative impact of toxic heavy metals (THMs) (arsenic (As), cadmium (Cd), chromium (Cr)(VI), mercury (Hg), and lead (Pb)) on the total environment: an overview. *Environ Monit Assess* 191: 419. doi: 10.1007/s10661-019-7528-7
31. **Roa I, Castro R, Rojas M. 2011.** Deformación de branquias en salmónidos: análisis macroscópico, histológico, ultraestructural y de elementos. *Int J Morphol* 29: 45-51. doi: 10.4067/S0717-95022011000100007
32. **Rosales OE, Cotrina DM, Valdivieso AG, Sales DF, García ZE, Ordoñez SE. 2019.** Bioacumulación de metales pesados en tres especies de peces bentónicos del río monzón, región Huánuco. *REBIOL* 40: 69-78.
33. **Soto-Benavente M, Rodríguez-Achata L, Olivera M, Arostegui V, Colina C, Garate J. 2020.** Riesgos para la salud por metales pesados en productos agrícolas cultivados en áreas abandonadas por la minería aurífera en la Amazonia peruana. *Sci Agropecu* 11: 49-59. doi: 10.17268/sci.agropecu.2020.01.06
34. **Timpano AJ, Jones JW, Beaty B, Hull M, Soucek DJ, Zipper CE. 2022.** Combined effects of copper, nickel, and zinc on growth of a freshwater mussel (*Villosa iris*) in an environmentally relevant context. *Aquat Toxicol* 242: 106038. doi: 10.1016/j.aquatox.2021.-106038
35. **Van der Oost R, Beyer J, Vermeykebm N. 2003.** Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *J Environ Toxicol Pharmacol* 13: 57-149. doi: 10.1016/S1382-6689(02)00126-6
36. **Wani A, Sikdar-Bar M, Borana K. 2011.** Histopathological alterations induced in gill epithelium of African catfish, *Clarias gariepinus*, exposed to copper sulphate. *Asian J Exp Biol Sci* 2: 278-282.
37. **Wu X, Cobbina SJ, Mao G, Xu H, Zhang Z, Yang L. 2016.** A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. *Environ Sci Pollut Res Int* 23: 8244-8259. doi: 10.1007/s11356-016-6333-x