اثر سمیت حاد روی نیترات بر بافت آبشش و کبد ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*)

مهزاد شکوری* و سورنا ابدالی

گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۲/۱۵ تاریخ پذیرش:۱۳۹۴/۰۵/۲۱

چکیده

فلزات سنگین از آلاینده‌های سمی اکوسیستم‌های آبی محسوب می‌شوند. هدف از این مطالعه، بررسی اثر سمی فلز سنگین روی بر بافت کبد و آبشش ماهی فیتوفاگ پرورشی می‌باشد. تحقیق مزبور در بهار سال ۱۳۹۰ در انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان رشت انجام گرفت. تعداد ۱۳۵ قطعه ماهی فیتوفاگ با طول ۱±۱۳ سانتی متر و وزن ۱۰±۵۰ گرم پس از آداپتاسیون، در یک گروه شاهد و دو تیمار ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر روی نیترات $Zn(NO_3)_2$، در آکواریوم‌های ۹۰ لیتری قرار داده شدند. پس از گذشت ۷۲،۴۸،۲۴،۱۲ و ۹۶ ساعت نمونه برداری از بافت‌های کبد و آبشش انجام شد. بافت‌های برداشته شده در محلول بوئن تثبیت و در مقاطع ۵ میکرومتری با روش هماتوکسین-ائوزین رنگ آمیزی شدند. نتایج نشان داد که سلول‌های پوششی بافت آبشش دچار هیپرپلازی شدند و سلول‌های لاملا چروکیده شده و بین لاملاها جداشدگی (Lifting) و چسبندگی (Fusion) مشاهده شد. این آسیب‌ها با افزایش غلظت، شدت بیشتری یافتند. در بافت پارانشیم کبد ماهیانی که در معرض روی نیترات قرار گرفته بودند، عوارضی همچون آتروفی سلولی، ملانوماکروفاژ، تورم ابری، پرخونی، واکوئوله شدن سلول‌های کبدی و در نهایت نکروزیس مشاهده شد که با افزایش غلظت و زمان مجاورت در مقایسه با گروه شاهد شدت بیشتری یافتند.

واژگان کلیدی: روی، سمیت، کبد، آبشش، کپور نقره‌ای

* **نگارنده پاسخگو:** mahzadshakoori@yahoo.com

مقدمه

تغییرات عوامل زیستی و غیر زیستی در تعادل و پایداری هر اکوسیستم نقش عمده‌ای دارد. کلیه این عوامل در حد مطلوب، مفید بوده ولی کاهش یا افزایش زیاد آنها سبب بر هم زدن تعادل یا روابط موجود در محیط می‌گردد که این امر، تغییرات شدید در جمعیت موجودات زنده را به دنبال خواهد داشت. فلزات سنگین از جمله این عوامل می‌باشند که به طور طبیعی کمتر از ۱ درصد از وزن بدن موجودات زنده را تشکیل می‌دهند و نوسانات غلظتی آن‌ها سبب ناپایداری محیط و ایجاد اختلال در موجود می‌شود (Clark, 1986).

فلزات سنگین بطور طبیعی در سطوح مختلف زمین و آب‌های سطحی وجود دارند، اگر میزان این فلزات کمی بیشتر از میزان طبیعی شود با توجه به ثبات شیمیایی، تجزیه پذیری ضعیف و توانایی تجمع زیستی در بدن موجودات زنده به سرعت تبدیل به آلاینده‌های سمی می‌شوند. به طوری که امروزه فلزات سنگین جز مهم‌ترین آلاینده‌های منابع آبی کره زمین بشمار می‌آیند و حضور آنها در موجودات زنده آبزی گزارش شده است (Adham *et al*., 2002; Oliojo *et al*., 2005). برخی از فلزهای سنگین موجود در آب می‌توانند در بافت‌های ماهی و موجودات آبزی متمرکز شوند (Karan *et al*., 2002) . مسمومیت ماهیان ناشی از فلزات سنگین، سبب ایجاد استرس مزمن در ماهیان پرورشی شده و تحمیل استرس‌های اضافی مانند عفونت و نیز مرگ و میر آنها را تسریع خواهد نمود. در چنین شرایطی فرایند فساد در ماهیان سریع‌تر می‌شود و کیفیت ماهیان تلف شده با شتاب بیشتری کاهش می‌یابد (آقازاده مشگی، ۱۳۸۰).

از بین فلزات سنگین می‌توان به فلز روی، به عنوان یک ریزمغذی، به منظور افزایش تولید پلانکتون که سبب افزایش رشد ماهی شده و به آب استخرها اضافه می‌شود، اشاره نمود (Ayyappan, 2004 & . Adhikari) از این رو ماهیان به عنصر روی، که جز ۱۵ عنصر معدنی و ضروری محسوب می‌شود، نیازمند می‌باشند اگر چه غلظت‌های بیشتر آن می‌تواند سبب بروز ضایعات پاتولوژیک در بافت‌های مختلف ماهی به خصوص بافت آبشش شود (ناجی و همکاران،۱۳۸۶ Wood, 2001; Handy, 1996: Swarup *et al*., 2006: Patra *et al*., 2005;).

این عنصر به صورت یون دو ظرفیتی است که برای فرایندهای فیزیولوژیک مانند رشد و تقسیم سلولی، متابولیسم، بهبود زخم‌ها، سیستم دفاعی و تولید مثل، عملکرد سیستم چشایی و بینایی ضروری است (Aggett & Comeford, 1995). تغییرات فیزیولوژیکی و بافتی بدن ماهی، به عنوان بیومارکر آلاینده‌های محیطی، مطرح می‌باشند. آبشش‌ها در معرض مداوم محیط خارجی قرار دارند و اولین اندام هدف برای آلاینده‌ها می‌باشند، بنابر این معمولاً آلاینده‌ها در کوتاه مدت سبب آسیب و تخریب آبشش‌ها می‌شوند. کبد به عنوان اندام مسئول سم زدایی بیش از سایر بافت‌ها تحت تأثیر آلاینده‌ها قرار گرفته و تأثیر آلایندگی فلزات سنگین به صورت افزایش یا کاهش فعالیت آنزیم‌های کبدی و ایجاد تغییرات هیستوپاتولوژیک کبدی بروز می‌کند (Rocha & Monteiro, 1999). میزان این تأثیرات بستگی مستقیم به نوع و غلظت فلز، گونه ماهی، مدت زمان در معرض آلاینده بودن و سایر فاکتورها دارد (Paris Palacios *et al*., 2000). به همین دلیل بررسی تغییرات هیستوپاتولوژیک کبد، شیوه‌ای دقیق و مطمئن برای ارزیابی تأثیر فلزات سنگین در محیط و شرایط آزمایشگاهی می‌باشد. در پژوهش حاضر، تأثیر غلظت‌های کشنده و تحت کشنده روی نیترات در بافت‌های آبشش و کبد ماهی فیتوفاگ پرورشی مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

در بهار سال ۱۳۹۰ تعداد ۱۳۵ قطعه ماهی فیتوفاگ جوان پرورشی از مرکز پرورش ماهیان گرمابی کوئی کارپ واقع در ۱۰ کیلومتری جاده تهران _ رشت

خریداری و به انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان رشت منتقل شدند. سپس نمونه‌ها مورد زیست سنجی قرار گرفتند. طول کل، وزن کل و طول چنگالی توسط تخته زیست سنجی با دقت ۱ میلی متر و ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم اندازه گیری شد. پس از آداپتاسیون، تعداد ۱۵ عدد ماهی فیتوفاگ پرورشی با متوسط وزنی ۱۰±۵۰/۰۰ گرم و متوسط طول کل ۱±۱۳ سانتی‌متر، در ۹ آکواریوم ۱۰۰ لیتری حاوی ۹۰ لیتر آب شیر (tap water) (بدون خروجی و مجهز به هوادهی) ریخته شدند. برای ثابت نگهداشتن شرایط محیطی، در طول آزمایش پارامترهای فیزیکی مانند دما توسط دماسنج جیوه‌ای،pH (توسط pH سنج دیجیتال مدل Multi 340I ساخت کشور آلمان) و میزان اکسیژن محلول توسط دستگاه اکسیژن سنج دیجیتال مدل WIW 3301 ساخت کشور آمریکا اندازه‌گیری شد. در طول آزمایش، دمای آب برابر با ۱±۲۴ درجه سانتی‌گراد، میانگین pH برابر با ۰/۲±۸ و میانگین اکسیژن محلول آب در طول آزمایش برابر با ۵/۲ میلی گرم در لیتر نگه داشته شد. در مجموع ۳ گروه، شامل گروه شاهد (با دوز صفر) و دو تیمار با غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی گرم در لیتر روی نیترات $Zn(NO_3)_2$ و هر گروه با سه تکرار در نظر گرفته شد. غلظت‌های مورد نظر روی نیترات بر اساس رابطه $C_1V_1=C_2V_2$ تعیین شد (Hovis *et al.*, 2005). در رابطه فوق C غلظت وزنی برحسب میلی گرم بر لیتر و V حجم محلول می‌باشد. در طول آزمایش آب تعویض نشد و غلظت فلز در طول مراحل تحقیق ثابت بود.

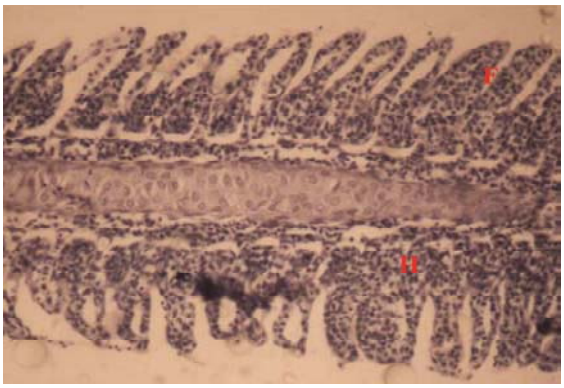
برای بررسی آسیب‌های بافتی در زمان‌های ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت، کبد و آبشش ماهیان به طور کامل و توسط تیغه از جنس استیل از بدن جدا شد (Farkas *et al.*, 2000). بافت‌های برداشته شده در محلول بوئن تثبیت گردید و بعد از شستشو، آبگیری بوسیله الکل با درجه خلوص مختلف از نزولی به صعودی انجام شد. در مرحله بعد شفاف کردن به وسیله گزیلول انجام شد، سپس قالبگیری و تهیه بلوک بافتی و برش گیری در مقاطع ۵ میکرومتری بوسیله دستگاه میکروتوم Laitz ساخت کشور آلمان صورت گرفت. نمونه‌های لام به روش هماتوکسیلن– ائوزین رنگ آمیزی و با استفاده از میکروسکوپ نوری از نظر آسیب شناسی و هیستوپاتولوژیکی مورد مطالعه قرار گرفت (بنائی و همکاران،۱۳۹۰). از لام های تهیه شده برای بررسی تغییرات پاتولوژیک، عکسبرداری شد و مطالعات مقایسه‌ای با نمونه شاهد صورت گرفت.

نتایج

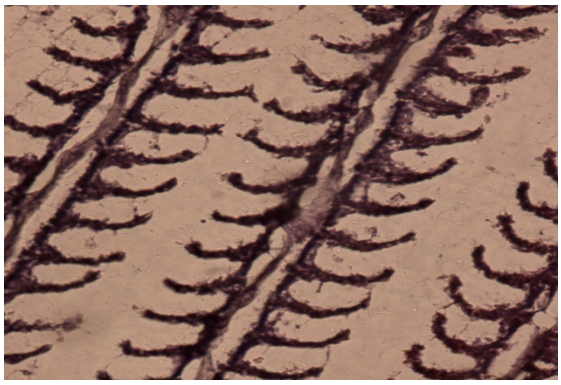
علایم ظاهری در ماهیانی که در معرض غلظت‌های مختلف روی نیترات قرار داشتند، مانند بی قراری شدید، باز و بسته شدن شدید سرپوش‌های آبششی و حفره دهان، حرکات تشنجی و برخورد با کناره‌های آکواریوم، بلعیدن هوا از سطح آب و قرمز شدن آبشش‌ها مشاهده گردید. در بافت آبشش هر دو تیمار عوارضی همچون، پرخونی، چسبندگی لاملاهای ثانویه آبشش به یکدیگر یا فیوژن، هیپرپلازی (شکل‌های ۳،۲ و ۴) و نکروز سیتوپلاسمی (شکل‌های ۳ و ۴) دیده شد، ولی با گذشت زمان تا ۹۶ ساعت عوارض اشاره شده در تیمار ۱۰ میلی‌گرم در لیتر در مقایسه با تیمار ۵ میلی گرم در لیتر افزایش نشان داد.

در گروه شاهد، آبشش‌ها طبیعی و به رنگ صورتی بودند، در حالی که در غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر آبشش‌ها دچار تغییر رنگ شده و از صورتی به خاکستری و در نهایت در غلظت ۱۰ میلی گرم بر لیتر به رنگ خاکستری تیره مشاهده شدند. در نمونه شاهد میزان ترشح موکوس به میزان طبیعی بود و در گروه‌های تیمار، در اثر رسوب روی، افزایش ترشح موکوس مشاهده گردید که میزان ترشح با غلظت آلاینده رابطه مستقیم داشت. بنابراین با افزایش غلظت روی نیترات و با افزایش زمانی که ماهی‌ها در معرض سم تا ۹۶ ساعت قرار گرفتند، شدت آسیب‌های بافتی در آبشش هم تشدید گردید.

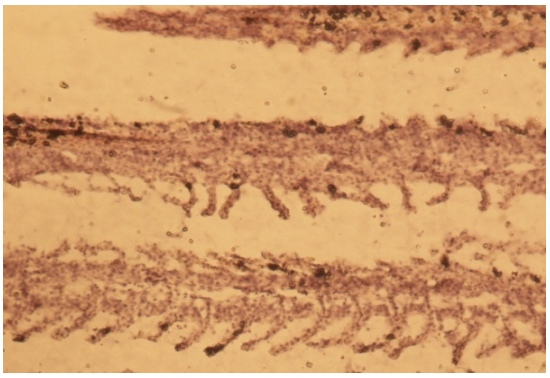
مطالعات هیستوپاتولوژیکی کبد در گروه شاهد طبیعی بود و سلول‌های هپاتوسیت (کبدی) سالم و بدون آسیب بودند. هپاتوسیت‌ها دارای ساختار پلی گنال هستند، به صورت طبیعی بازوفیل بوده و سیتوپلاسم یکنواخت دارند و غشا سلولی هپاتوسیت‌ها به خوبی قابل تشخیص است (شکل ۵). ولی بعد از ۱۲ ساعت مجاورت با روی در هر دو گروه تیمار، ضایعات حاد واضح مانند آتروفی سلولی، نکروز سلولی، پرخونی و رکود صفراوی و واکوئله شدن هپاتوسیت‌ها مشاهده شد (شکل‌های ۶ الی ۱۰).



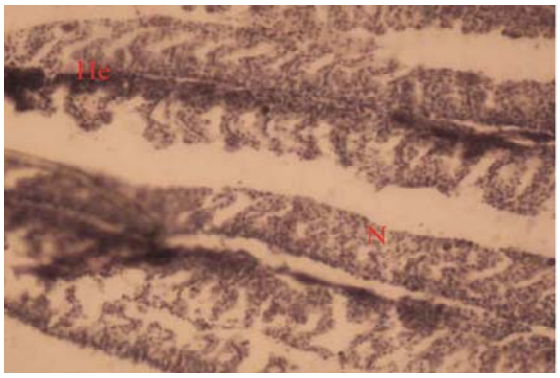
شکل ۲- هیپرپلازی (H) و چسبندگی رشته‌های ثانویه آبششی (F) در تیمار ۵ میلی گرم در لیتر و در زمان ۲۴ ساعت (100x-H&E)



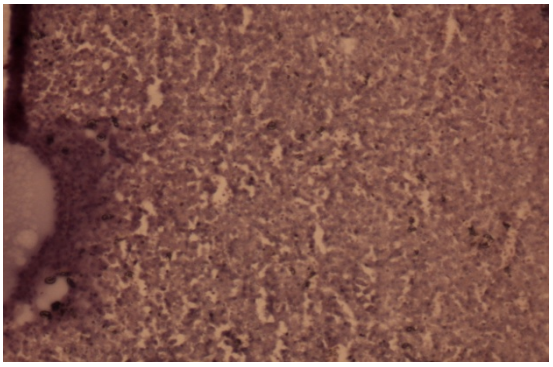
شکل ۱- مقطع آبشش، نمونه شاهد با مورفولوژی و شرایط بافتی نرمال مشاهده رشته‌های ثانویه آبشش در تیمار شاهد (100x-H&E)



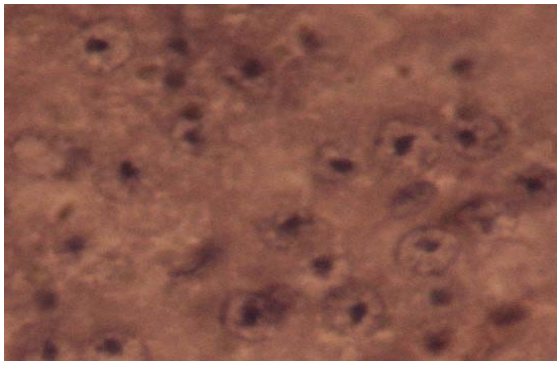
شکل ۴- پرخونی، هیپرپلازی، چسبندگی رشته‌های آبششی، هموسیدرین (He) و نکروز سلولی بافت آبشش در تیمار ۱۰ میلی گرم در لیتر و در زمان ۹۶ ساعت (100x-H&E)



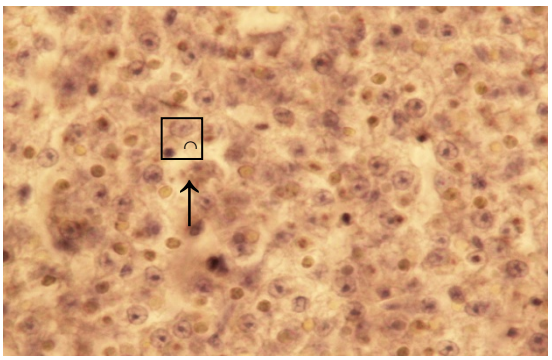
شکل ۳- پرخونی، هیپرپلازی، نکروز سلولی و چسبندگی رشته‌های ثانویه آبششی در تیمار ۵ میلی گرم در لیتر و در زمان ۹۶ ساعت (100x-H&E)



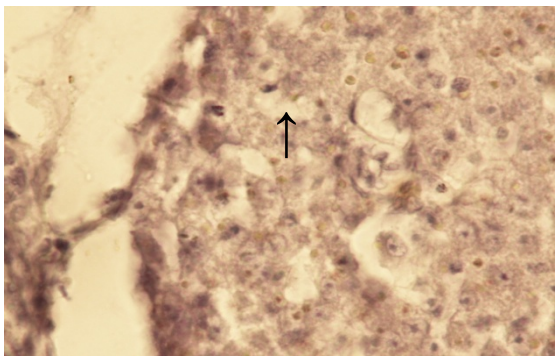
شکل ۶- آتروفی سلولی، تورم ابری و رکود صفرا در تیمار ۵ میلی گرم بر لیتر، در زمان ۲۴ ساعت (40x-H&E)



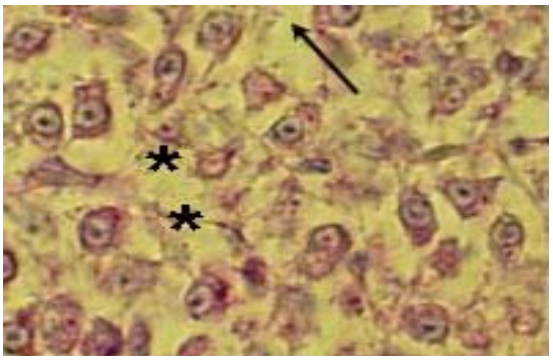
شکل ۵- سلول‌های سالم هپاتوسیت کبدی (H) در ماهیان گروه شاهد (100x-H&E)



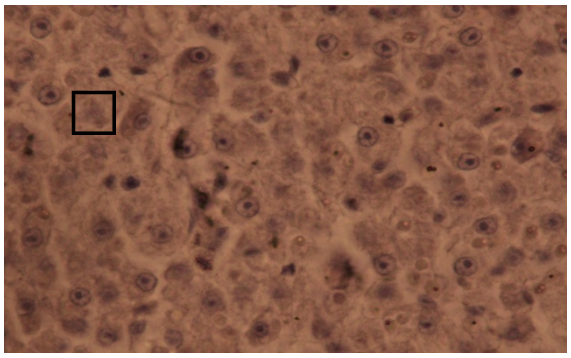
شکل ۸- نکروز سیتوپلاسمی (فلش سیاه) و هموسیدرین (مربع) در تیمار ۱۰ میلی گرم بر لیتر و در زمان ۴۸ ساعت (100x-H&E)



شکل ۷- نکروز سیتوپلاسمی (فلش سیاه)، در تیمار ۱۰ میلی گرم بر لیتر و در زمان ۲۴ ساعت (100x- H&E)



شکل ۱۰- *واکوئله شدن، فلش سیاه: نواحی نکروزه، تیمار ۱۰ میلی گرم بر لیتر در ۹۶ ساعت (100x-H&E)



شکل ۹- تورم ابری، ملانوماکروفاژ (مربع)، رکود صفرا در تیمار ۵ میلی‌گرم بر لیتر و در زمان ۹۶ ساعت (100x- H&E)

همان گونه که در شکل (۱۰) مشاهده می‌شود، بیشترین شدت ضایعات در تیمار با غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر روی نیترات ایجاد شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

تغییرات بافت شناسی در موجودات زنده در اثر محرک‌های داخلی و خارجی ایجاد می‌شود که در نتیجه‌ی آشفتگی در سطح مولکولی و سازماندهی زیستی رخ می‌دهد. بررسی بافتی، پارامتری جامع است که به صورت کامل وضعیت سلامت ماهی را مشخص می‌کند و می‌تواند وجود و تجمع بیش از حد قابل قبول ماده آلاینده در محیط زیست طبیعی را مشخص نماید (Hinton & Lauren, 1999: Hassanin, 2008;Van der ost *et al*., 2003).

بر اساس نتایج تحقیق حاضر، تخریب آبشش مانند افزایش ضخامت اپیتلیوم آبشش که در نتیجه هایپرتروفی سلول‌های کلراید و سنگفرشی ایجاد می‌شود، در همان ساعات اولیه بعد از در معرض قرار گرفتن ماهیان مشاهد شد. تغییر در مورفولوژی آبشش مانند تکثیر سلول‌ها، ترشح موکوس، جداشدگی لایه اپی تلیوم یا (lifting) و هایپرتروفی برای جلوگیری از ورود آلاینده از طریق سلول‌های آبششی به بدن ماهی صورت می‌گیرد، همچنین پرخونی در لاملاها و تکثیر سلولی افزایش می‌یابد. نتایج مطالعه بافتی (شکل‌های ۲، ۳ و ۴) نشان داد که افزایش موکوس و همراه با آن کاهش خصوصیت موکوپلی ساکاریدی سطحی در آبشش، سبب شده است تا لاملاهای ثانویه به صورت کانونی یا سرتاسری به هم چسبیده و چسبندگی لاملایی (Lamellar fusion) واضح به وجود بیاورد. تصور می‌رود که علت فیوژن یا چسبندگی ناشی از این

باشد که فلزات سنگین از جمله فلز روی موجب تغییر یا انعقاد موکوس از طریق تغییر در ترکیب گلیکوپروتئین موکوسی که در سطح سلول‌های آبشش وجود دارد، گردیده و نهایتاً سبب ایجاد شرایط هیپوکسی خواهد شد (Chreck & Moyle, 1990). این امر نیز به نوبه خود منجر به گرفتن اکسیژن از سطح آب شده و در نتیجه تماس لاملاها با هوا یا اکسیژن صورت می‌گیرد و به این ترتیب کلاپس و چسبندگی ایجاد می‌گردد. به هر جهت این تغییرها منجر به عدم جریان آب کافی از بین لاملاها و کاهش سطح تنفسی شده و ماهی مشکل تنفسی پیدا می‌کند (Marioara *et al*., 2009). در تحقیق حاضر، در گروه‌های تیمار، در اثر تماس با فلز سنگین، هیپرسلولاریتی و هیپرپلازی در سلول‌های اپیتلیوم برانش دیده شد (شکل ۳،۲ و ۴) که ناشی از عدم توانایی سلول‌ها در پوسته شدن و در نتیجه افزایش تقسیم سلولی یا میتوز است. Lian Tien و Sen-Shyong (۱۹۹۸) در مطالعه‌ای که بر روی غلظت فلز روی در اندام‌های مختلف ماهی کپور در مقایسه با سایر ماهیان آب شیرین و دریایی انجام دادند، دریافتند که بافت آبشش یکی از اندام‌هایی است که به طور متوسط از نظر بالا بودن غلظت فلز روی نسبت به سایر اندام‌ها در جای دوم و یا سوم قرار دارد. به عبارت دیگر آبشش پس از اندام‌هایی مانند پوست، کلیه و دستگاه گوارش بالاترین مقدار جذب و نگهداری روی را نشان داد. همچنین غلظت فلز روی جمع شده در آبشش کپور معمولی در مقایسه با سایر ماهیان آب شیرین مانند کپور سرگنده (*Aristichthys nobillis*)، کپور نقره‌ای (*Hypophthalimychthis molitrix*)، کپور علفخوار (*Cetenopharygodon idellus*) و مار ماهی ژاپنی (*Anguilla japonica*) بیشتر است. Moor و Ramamurty (۱۹۸۷) در مطالعه‌ای مشابه دریافتند که روی با وارد شدن به بافت آبشش تغییراتی منفی را به وجود می‌آورد. تلانژکتازی یا همان گشاد شدن دهانه مویرگ‌های آبششی و افزایش تعداد گلبول‌های قرمز و تحلیل دستگاه پیلار، بارزترین تأثیر منفی غلظت بالای روی از نقطه نظر ناهنجاری‌های گردش خون می‌باشد. ضایعات ایجاد شده در ماهیان به حدی است که برگشت پذیر نبوده و بقای ماهی را به شکل جدی تحت تأثیر قرار می‌دهد. به طور کلی تخریب بافت آبشش علاوه بر تأثیر بارز بر فاکتورهای خونی سبب پائین آمدن کارایی تنفسی نیز می‌گردد. کبد اندامی حیاتی است که نقش مهمی در متابولیسم و دفع مواد زائد شیمیایی و فلزات سنگین ایفاء می‌کند. سلول‌های کبدی اولین هدف مواد سمی است و غلظت مواد سمی معمولاً در کبد بیشتر از سایر ارگان‌های بدن است. بنابر این، این بافت می‌تواند بیو مارکرهای مناسبی برای بررسی آلودگی‌های محیط آبی باشد (Braunbeck *et al*., 1990). در مطالعه حاضر در مقاطع بافتی نمونه‌های گروه شاهد تغییر پاتولوژیک مشاهده نشد و سلول‌های هپاتوسیت به شکل چند وجهی با سیتوپلاسم یکنواخت و هسته درشت مرکزی پارانشیم کبدی را شکل داده بودند (شکل ۵). مطالعه‌ی گروه‌های تیمار مشخص نمود که روی سبب تغییر شکل و بر هم خوردن نظم پارانشیم کبدی و واکوئوله شدن سلول‌های کبدی و در نهایت نکروزیس می‌گردد (شکل‌های ۷، ۸ و ۱۰). این تغییرات با افزایش غلظت روی شدت بیشتری پیدا می‌کند و در نهایت می‌تواند منجر به مرگ ماهی گردد. دگرگونی‌های ایجاد شده بیشتر به علت دژنره شدن و نکروز سلول‌ها ایجاد می‌شود. مطالعات پیشین نیز نشان داده است که هپاتوسیت ها در اثر تجمع روی لیز شده و در نهایت منجر به مرگ جانور می‌شوند (Varanka *et al*., 2001; Visoottiviseth *et al*., 1999). Braunbec و همکاران (۱۹۹۰) دریافتند که تغییر در اندازه و شکل هسته‌های هپاتوسیت نشانه‌ای از افزایش فعالیت متابولیک است ولی می‌تواند منشاء پاتولوژیک داشته باشد. Paris-Palacos و همکاران (۲۰۰۰) تغییر شکل در هسته‌های سلول‌های کبدی در ماهی (*Brachydanio rario*) را در اثر آلودگی با روی کلراید دانستند. در مطالعه‌ای مشابه Figuerieo-

Fernandses و همکاران در سال (۲۰۰۶) نشان دادند که افزایش اندازه هپاتوسیت‌ها در ماهیان تیلاپیا که در معرض فلز روی قرار گرفته بودند، می‌تواند ناشی از افزایش میزان چربی باشد. واکوئله شدن هپاتوسیت ها به علت ذخیره چربی افزایش می‌یابد و ساختار پارانشیم نیز بهم می‌خورد که این تغییر با افزایش مدت زمان تأثیر آلاینده، افزایش می‌یابد. همراه با افزایش غلظت آلاینده، واکوئل‌ها بزرگ شده و در نهایت باعث پارگی سلول کبدی و نکروز می‌شود.

نتایج نشان داد که ضایعات مشاهده شده هر چند که باعث مرگ ماهی‌های فیتوفاگ در بازه زمانی تا ۹۶ ساعت نشده بود، ولی با توجه به تأثیر زمان، اگر ماهیان به طور طولانی مدت در معرض آلاینده‌ها قرار داشته باشند، رشد و زندگی طبیعی آن‌ها تحت تأثیر قرار خواهد گرفت و اگر دچار مرگ و میر نشده باشند، از نقطه نظر بهداشت عمومی به دلیل انباشتگی زیستی و انتقال آلاینده از طریق زنجیره غذایی، می‌توانند برای انسان خطرآفرین و بیماری زا باشد.

منابع

آقازاده مشگی، م. ۱۳۸۰ .عوامل میکروبی مولد فساد در ماهی و فرآورده‌های آن. دکتری تخصصی بهداشت مواد غذایی. دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی. دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران.

ناجی، ط.، صفائیان، ش.، رستمی، م.، و صبرجو، م. ۱۳۸۶. بررسی اثرات سولفات روی بر بافت آبشش بچه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). علوم و تکنولوژی محیط زیست، ۹(۲): ۳۶-۲۹.

Adham, K.G., Hamed, S.S., Ibrahim, H. M. & Saleh, R.A. 2002. Impaired functions in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757), from Polluted Waters. *Acta hydrochimica et hydrobiologica*, 29(5):278-288.

Adhikari, S. & Ayyappan, S. 2004. Behavioral role of Zinc on primary productivity, plankton and grow of a fresh water teleost. *Labeo rohita* (Homilton). *Aquaculture*, 231 (14), 327-336.

Aggett, P. & Comeford, J. G. 1995. Zinc and human health. *Nutrition Reviews*, 53: 16-22.

Braunbeck, T., Storch, V. & Bresch, H., 1990. Species-specific reaction of liver ultra-structure in Zebra fish (*Brachydanio rerio*) and trout (*Salmo gairdneri*) after exposure to 4-chloroaniline. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology,* 19:405-418.

Chreck, C.B. & Moyle, P.B. 1990. Methods for fish biology. American Fisheries Society. Oxford University Press, USA.

Clark, R. B. 1986. Marine pollution. Oxford University Press, USA.

Farkas, A, Salanki, J. & Varanka, I. 2000. Heavy metal concentrations in fish of Lake Balaton, lakes & reservoirs. *Research and Management*, 5: 271-279.

Figueiredo-Fernandes, A., Fontaínhas-Fernandes, A., Monteiro, R.A.F., Reis-Henriques, M.A. & Rocha E. 2006. Effects of the fungicide mancozeb in the liver structure of Nile tilapia,*Oreochromis niloticus*-Assessment and quantification of induced cytological changes using qualitative histopathology and the stereological point-sampled intercept method. *The Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology,* 76(2):249-255.

Handy, R. D. 1996. Dietary exposure to toxic metals in fish, In: Taulor E.W. (Ed), Toxicology of aquatic pollution: physiological cellular and molecular approaches. Cambridge University Press. Cambridge, England.

Hassanin, S.I.A. 2008. Metals residues, histological alterations and cooking methods of fish cultured in wastewater ponds. 8th International Symposium on *Tilapia* in Aquaculture. Cairo International Convention & Exhibition Center (CICC), Cairo. 12-14 Oct 2008.

Hinton, D.E. & Lauren, D.J. 1990. Liver structural alterations accompanying chronic toxicity in fishes: potential biomarkers of exposure. In: *Biomarkers of Environmental Contamination.* (Eds.) J.F. McCarthy and L.R. Shugart. Lewis Publishers. USA.

Hovis, M., Kimball, R. & Peterson, J. 2005.Mathematics exercises in biotechnology. Dilutions of stock liquid solutions. *National Science Foundation*, 2: 12-14.

Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 76 (4): 1092-1097.

Rocha, E. & Monteiro, R.A.F. 1999. Histology and cytology of fish liver: In Saksena D.N. (ed.) Ichthyology: Recent research advances. Science Publishers. Enfield, New Hampshire.

Swarup, D., Patra, R.C., Naresh Ram Puneet, K., Pallav, S. & Balagangatharathilagar, M. 2006. Deficiency of copper and cobalt in goats reared around lead and zinc smelter. *Small Ruminant Research*, 63 (3): 309-313.

Van der Oost, R., Beber, J. & Vermeulen., N. P. E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13: 57-149.

Varanka, Z., Rojik, I., Varanka, I., Nemcsók, J. & Ábrahám, M. 2001. Biochemical and morphological changes in carp (*Cyprinus carpio* L.) liver following exposure to copper sulfate and tannic acid. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C*, 128:467-478.

Visoottiviseth, P., Thamamaruitkun, T., Sahaphong, S., Riengrojpitak, S. & Kruatrachue, M. 1999.Histopathological effects of triphenyltin hydroxide on liver, kidney and gill of Nile tilapia(*Oreochromis nilotica*). *Applied Organometallic Chemistry***,** 13:749-763.

Wood, C. M. 2001. Toxic responses of the gill. In schlenk, D, Benson, W.H. (Eds), Target organ. Toxicity in marine and freshwater teleost. Vol.1.Taylor and Francis. London.

Karan, V., Victoric, S., Tutundic, V. & Poleksic, V. 2002. Functional enzymes activity and histology of carp after copper sulfate exposure and recovery. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 40: 49-55.

Lian-Tien, S.& Sen-Shyong, J. 1998. Comparative Zinc concentrations in tissues of Common carp and other aquatic organisms. *Zoological Studies*, 37(3):184-190.

Marioara, N., Gabi, D., Liliana, P.C., Motmaria, B.D., Tapalaga, I., Lunca, M. & Liliana, B. 2009. Pathologycal tissue lesions induced by chronic cadmium intoxication in Silver crucian carp *Carassius auatus gibelio*. *Zootehnie and Biotehnologii*, 42 (2): 84-90.

Moor, G. & Ramamurty, S. 1987. Heavy metals in natural waters. Mir. Moscow.

Olojo, E. A. A., Olurin, K.B., Mbaka, G. & Oluwemimo, A.D. 2005. Histopathology of the gill and liver tissues of the African catfish *Clarias gariepinus* exposed to lead. *African Journal of Biotechnology*, 4(1):117-122.

Paris-Palacios, S., Biagianti-Risbourg, S. & Vernet G. 2000. Biochemical and (ultra) structural hepatic perturbation of *Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sub lethal concentrations of copper sulphate. *Aquatic Toxicology*, 50:109-124.

Patra, R.C., Swarup, D., Naresh, R., Puneet, K. & Shekhar, P. 2005. Cadmium level in blood and milk from animals reared around different polluting sources in India. *The*