



دانشگاه گنبد کاووس

نشریه "پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی"

دوره دوم، شماره چهارم، زمستان ۹۳

<http://jair.gonbad.ac.ir>

مقایسه سمیت غلظت‌های تحت کشنده نانواکسید روی و سولفات روی بر عوارض هیستوپاتولوژیک آبشش سیاه‌ماهی (*Capoeta capoeta gracilis* Keyserling, 1861)

زهره سلطانی^۱، رسول قربانی^{۲*}، سیدعلی اکبر هدایتی^۳، افشین عادلی^۳، محمد مازندرانی^۳

^۱دانش آموخته کارشناسی ارشد بوم‌شناسی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

^۲دانشیار، گروه شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

^۳استادیار، گروه شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ ارسال: ۹۳/۱۲/۱۸ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱/۲۱

چکیده

نانو تکنولوژی یک فناوری جدید و رو به پیشرفت است که تأثیرات زیادی در محیط زیست و موجودات زنده دارد. لذا هدف این مطالعه مقایسه اثرات فلز سنگین روی و نانو ذره آن بر بافت آبشش سیاه‌ماهی (*Capoeta capoeta gracilis*) است. تعداد ۷۰ قطعه سیاه‌ماهی از رودخانه زرین‌گل استان گلستان صید شده و پس از تیمار بندی به مدت چهارده روز در دو گروه سولفات روی و نانواکسید روی در غلظت‌های (۵، ۲۰، ۴۰ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر) و یک تیمار شاهد قرار گرفت. پس از تثبیت نمونه‌ها در فرمالین، از بافت آبشش برش بافتی تهیه گردید. عوارض مشاهده شده سولفات روی در مجموع نسبتاً شدید و در نانواکسید روی در حد متوسط بود که شامل: نکروز لاملاهای ثانویه، هایپرپلازی، هایپرتروفی و چسبیدگی لاملاهای ثانویه در آبشش‌ها بود. نتایج نشان داد بافت آبشش ماهی‌هایی که در معرض سولفات روی قرار گرفتند، ناهنجاری‌های شدیدی را نسبت به تیمار شاهد نشان دادند. با افزایش غلظت سولفات روی این عوارض بیشتر مشاهده شد. در مقابل نمونه‌هایی که در معرض نانو روی قرار گرفتند، با افزایش غلظت به صورت تدریجی عوارض هیستوپاتولوژی را نشان دادند و شدت تخریب آبشش‌هایی که در معرض نانو روی بودند نسبت به سولفات روی کمتر دیده شد. در مجموع نانو ذرات روی اثرات مخربی کمتری داشته و جهت کاربرد در صنایع پیشنهاد می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: آبشش، سیاه‌ماهی، سولفات روی، نانو ذره روی.

*نویسنده مسئول: ghorbaninasrabadi@yahoo.com

مقدمه

با توسعه صنایع و کارخانجات، پساب‌های زیادی تولید و وارد اکوسیستم آبی می‌شوند که دارای آلودگی‌های زیادی نظیر مواد آلی آفت‌کش‌ها، حشره‌کش‌ها، علف‌کش‌ها و ... است. استفاده از این مواد در صنعت و زندگی روزمره امری ضروری و اجتناب‌ناپذیر می‌باشد که با استفاده رو به رشد این آلاینده‌ها روزانه میزان بیشتری به محیط رهاسازی می‌شود. مقصد نهایی تمام آلاینده‌های محیطی آب است. در نتیجه با تغذیه از آبزیان، این آلاینده‌ها در زنجیره غذایی به انسان منتقل شده و در طول زمان در بدن انسان انباشته می‌شود. وجود آنها در بدن خطرات جبران‌ناپذیری را در سال‌های طولانی به دنبال دارد (Esmaili et al., 2007).

فلزات سنگین یکی از پایداری‌ترین آلاینده‌ها در پساب هستند (Metcalf et al., 2003; Hussein et al., 2005). این آلاینده‌ها به دو علت در محیط‌های آبی خطر آفرین هستند. اولاً، فلزات سنگین پایداری طولانی در اکوسیستم‌های طبیعی دارند و دوم این که توانایی تجمع در سطوح متوالی زنجیره غذایی بیولوژیکی را دارا هستند (Fuggle, 1983). یکی از این فلزات سنگین روی است. فراوانی روی در سنگ‌کره حدود ۸۰ میلی‌گرم در کیلوگرم است. این عنصر به پیوند با سولفیدها تمایل زیادی دارد که منجر به تشکیل معمول‌ترین کانی روی، یا همان اسفالریت می‌شود. روی هوا زده شده از سنگ‌های آذرین در سنگ‌های شیل و ماسه سنگ تجمع می‌یابد که غلظت نهایی آن در شیل حدود ۱۰ مرتبه بیشتر از ماسه سنگ است. مهمتر اینکه روی در حکم پوشش محافظ سطح سایر فلزات مانند آهن و فولاد گالوانیزه کاربرد دارد و در لوله‌های انتقال آب در مزارع پرورش ماهی و ناودان‌ها استفاده می‌شود (Jalali and Barzegar, 1999). روی به‌طور عمده در استخوان و پوست تجمع می‌یابد. اگر چه در کبد، آبشش و کلیه نیز میزان قابل توجهی از آن تجمع می‌نماید.

از آنجا که فناوری نانو، پتانسیل زیادی برای ارتقاء محیط زیست از دو طریق کاربرد مستقیم نانو مواد برای پیشگیری و رفع آلاینده‌ها و کاربرد غیرمستقیم، با استفاده از فرآیند طراحی صنعتی و تولید محصولات سازگار با محیط زیست دارد در نتیجه به موازات توسعه کاربردهای فناوری نانو در طی زمان، فناوری نانو این پتانسیل را دارد که تأثیر انسان را در محیط زیست محدود کند. ذرات در مقیاس نانو به دلیل افزایش مساحت سطحی واکنش‌پذیری بالایی دارند. همچنین خواص آنها از جمله مقاومت الکتریکی یا نقطه ذوب کاملاً متفاوت است (Abedi koupaei, 2006).

یکی از مهم‌ترین و کاربردی‌ترین راه‌هایی که می‌توان میزان آلودگی محیط (اکوسیستم‌های آبی) و اثرات سوء آن بر موجودات را مطالعه کرد، روش‌های بررسی تغییرات بافتی آبزیان در نتیجه تأثیر فلزات سنگین می‌باشد (Esmaili et al., 2007).

هاو و چن (Hao and Chen, 2012)، پاسخ‌های استرس اکسیداتیو در بافت‌های مختلف کپور با قرار گرفتن در معرض نانو ذرات اکسید روی را مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که گرایش مختلف سیستم‌های دفاعی آنتی اکسیدانی و سطوح LPO با افزایش غلظت و زمان مواجهه بیشتر قابل توجه می‌باشد. ۵۰ میلی گرم در لیتر نانو اکسید روی، کاهش قابل توجهی را در فعالیت بسیاری از آنزیم‌ها و محتوای GSH و افزایش سطوح LPO ایجاد می‌کند. این نشانگرهای زیستی برای پایش استرس اکسیداتیو وضعیت ماهی بعد از قرار گرفتن در معرض نانو اکسید روی مناسب می‌باشد. آبشش، کبد و مغز اندام‌های پاسخ حساس‌تر بوده و روده اندامی با حداقل حساسیت است. ارزیابی‌های اکوتوکسیکولوژیکال بیشتر باعث بروز نگرانی برای خطر نانو اکسید روی در محیط‌های آبی می‌شود. با توجه به کاربرد روزافزون فناوری نانو تکنولوژی و جایگاه آن در کاهش اثرات نامطلوب فلزات سنگین در بدن موجودات زنده، در تحقیق حاضر به مقایسه اثرات فلز سنگین روی و نانو ذره آن بر بافت آبشش سیاه‌ماهی پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

در پاییز ۱۳۹۲ تعداد ۷۰ قطعه سیاه‌ماهی از رودخانه زرین‌گل استان گلستان با استفاده از دستگاه الکتروشوکر صید شد. ماهی‌ها به سالن آبی‌پروری دانشگاه علوم کشاورزی گرگان منتقل شدند. این آزمایش به مدت چهارده روز بر ماهی‌هایی با میانگین وزنی $20 \pm 3/5$ گرم در دو گروه سولفات روی و نانو اکسید روی هر کدام با ۴ تیمار و ۳ تکرار در هر تیمار، در غلظت‌های (۵، ۲۰، ۴۰ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر)، ۲ ماده نانو روی و سولفات روی قرار گرفتند. همچنین دو تیمار شاهد نیز در همان شرایط نگهداری شد. ماهی‌ها در تانک‌های ۱۰۰ لیتری در دمای ۱۹-۲۱ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول $8-7/2$ میلی گرم در لیتر، پی‌اچ $8/5-7/6$ و دوره نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی قرار گرفتند. قبل از انتخاب غلظت‌ها ابتدا آزمایش سمیت حاد انجام شد. میزان LC_{50} برای این ماده $253/05$ میلی گرم در لیتر بدست آمد. انتخاب غلظت‌ها بر این اساس انجام شد که هم موجب مرگ و میر ماهی نشود و هم اثرات سم در بافت ماهی قابل مشاهده باشد. قبل از شروع آزمایش به مدت دو هفته ماهی‌ها در همین شرایط سازگار شدند. در دوران آدآپتاسیون غذایی روزی یکبار انجام شد. پس از اتمام آزمایش از ماهی‌ها نمونه بافتی از کمان دوم آبششی سمت چپ گرفته شد. نمونه‌ها پس از تثبیت در فرمالین ۴ درصد جهت تهیه اسلاید بافت به آزمایشگاه تشخیص طبی گرگان انتقال یافت.

مراحل آنالیز بافتی

آبگیری: با توجه به اینکه نفوذ پارافین به داخل بافت‌ها در حضور آب انجام نمی‌شود، لازم است تا برای پارافین کردن بافت ابتدا آب میان بافتی و مایعات تثبیت کننده از درون آن خارج شود. پس از خارج نمودن نمونه‌ها از بوئن و شستشو در آب مقطر، آبگیری توسط قرار دادن در سری افزایشی اتانل (۸۰، ۹۰، ۹۷ و ۱۰۰ درصد) انجام شد.

شفاف سازی: پس از مرحله آبگیری مرحله الکل‌زدایی انجام شد زیرا الکل باقی‌مانده روی بافت سبب آب رفتگی و چروکیدگی برای جدا کردن الکل مواد مختلفی مورد استفاده قرار می‌گیرد (همچون تولوئن، بنزن، کلروفرم و گزلیل) که از میان آن‌ها گزلیل استفاده شد.

پارافینه کردن: در مرحله شفاف‌سازی با توجه به این که موادی همچون چربی‌ها از داخل بافت‌ها حذف می‌شوند، بنابراین لازم است جهت حفظ شکل طبیعی بافت‌ها محل آن‌ها با پارافین پر شود. زمان قرار گرفتن بافت در داخل پارافین به اندازه نمونه و نوع ماده شفاف کننده بستگی دارد. در این جا با توجه به استفاده از گزلیل در مرحله قبل از ترکیب گزلیل و پارافین برای پارافین نرم به نسبت ۱ به ۴ و همچنین از پارافین خالص به عنوان پارافین سخت استفاده شد.

قالب‌گیری: برای تهیه برش از بافت‌های پارافینه شده لازم است در ابتدا این بافت‌ها در قالب‌های پارافین قرار گیرند تا کار برش‌گیری از آنها تسهیل شود. برای این امر از ۲ قطعه فلز شکل آلومینیومی که بر روی سطوح شیشه‌ای قرار گرفت استفاده شد، سپس پر کردن بقیه قالب و ثبت نمونه انجام شد. پس از سرد شدن پارافین، قطعات فلزی به آرامی از آن جدا شده سپس نمونه‌ها در یخچال نگهداری شدند.

برش بافت: نمونه‌های آماده پس از جدا کردن قسمت‌های اضافی پارافین توسط اسکالپل جهت تسهیل در امر برش بر روی قالب‌های چوبی قرار گرفت. این کار توسط اسکالپل داغ جهت چسباندن پارافین به قالب چوبی انجام شد. سپس قالب‌های چوبی بر روی دستگاه میکروتوم قرار گرفته، برش‌هایی با ضخامت ۵ - ۶ میکرون تهیه گردید.

چسباندن برش‌ها بر روی لام: در این مرحله ابتدا لام‌ها به مدت چند دقیقه در الکل ۷۰ درصد قرار داده شد تا کاملاً تمیز و شفاف شوند سپس آنها را توسط چسب مخصوص آغشته شده و اجازه داده شد تا لام‌ها کاملاً خشک شوند. پس از آن، برش‌ها را از سطح آب با فرو بردن لام با زاویه ۴۵ درجه بر روی آنها قرار گرفتند. پس از آن توسط قلم الماسه لام‌ها شماره‌گذاری شدند.

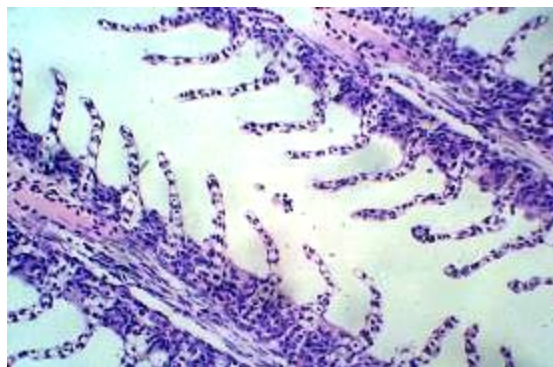
رنگ آمیزی: روش رنگ آمیزی مورد استفاده در این مطالعه رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین بود. در این روش سیتوپلاسم سلول‌ها آبی تیره و هسته آنها آبی خاکستری رنگ شدند.

چسباندن لامل: پس از انجام رنگ آمیزی، به‌منظور حفظ و ثبات آن روی لام، روی نمونه با لامل پوشانده شد. لامل‌های مورد استفاده قبلاً توسط متانول تبخیر و خشک شده بود. قبل از قرار دادن لامل روی لام ابتدا یک قطره چسب کانادابالزام بر روی برش رنگ آمیزی شده ریخته شد. پس از آن برش‌های بافتی توسط میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت و عکس‌هایی از نمونه‌ها توسط میکروسکوپ نوری تهیه شد (Hedayati *et al.*, 2013).

در نهایت اسلایدهای تهیه شده برای تشخیص عوارض موجود با میکروسکوپ نوری با عدسی‌های با بزرگنمایی ۴۰ و ۱۰۰ مورد بررسی قرار گرفتند.

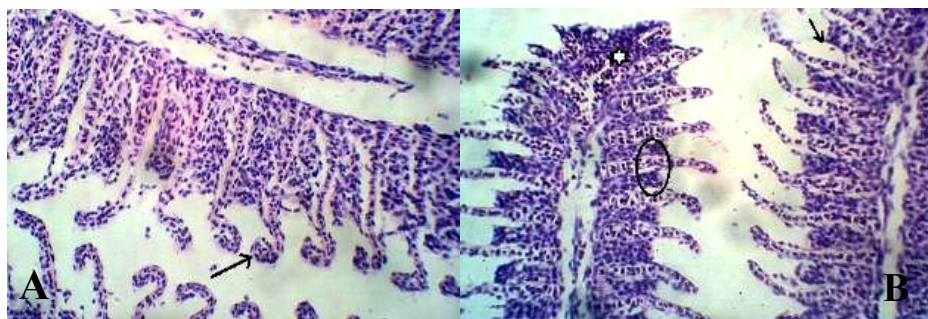
نتایج

در این آزمایش با قرارگیری سیاه‌ماهی‌ها در معرض دو ماده‌ی نانواکسیدروی و سولفات روی، ماهی‌ها دارای واکنش‌های مختلفی بودند. همه آنها در اطراف پمپ هوا جمع شدند و حرکتشان نیز کم شد. آبشش ماهی‌هایی که در معرض سولفات روی قرار گرفتند ناهنجاری‌های مختلف را به‌شکل شدید از تیمار اول نشان دادند. با افزایش غلظت این ماده این عوارض بیشتر مشاهده شد، ولی نمونه‌هایی که در معرض نانو روی قرار گرفتند، با افزایش غلظت به‌صورت تدریجی از حالت اولیه خارج شدند. ولی شدت تخریب آبشش‌ها نسبت به سولفات روی کمتر دیده شد. شکل (۱) نمونه یک آبشش سالم سیاه‌ماهی را نشان داده است.



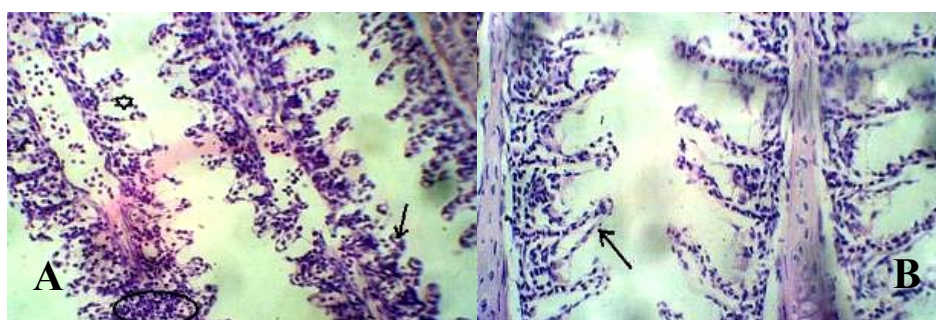
شکل ۱- نمونه شاهد آبشش سالم سیاه‌ماهی (بزرگنمایی ۴۰۰)

انواع عارضه‌های مشاهده شده در غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر آبشش‌های در معرض دو ماده نانو اکسید روی و سولفات روی در شکل (۲) آورده شده است.



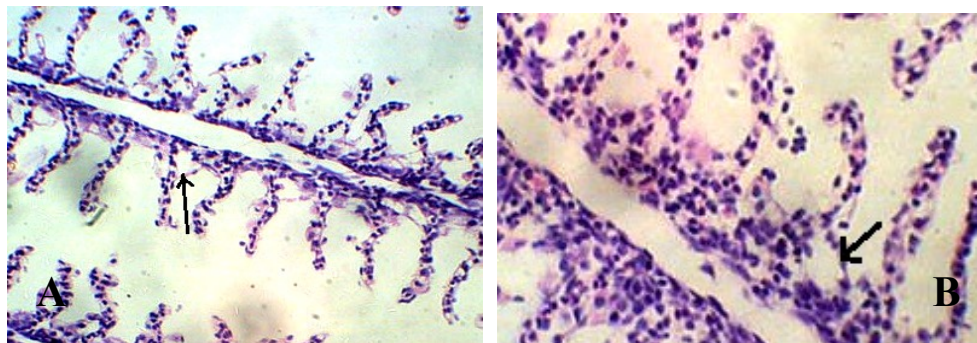
شکل ۲- A: (نانو اکسید روی) هایپرپلازی، B: (سولفات روی) نفوذ سلول‌های آماسی (ستاره)، هایپرپلازی (دایره)، نکروز (فلش)، (بزرگنمایی ۴۰۰)

در غلظت‌های مختلف میزان سمیت دو ماده نانو اکسید روی و سولفات روی کاملاً متفاوت بود. در غلظت ۲۰ میلی‌گرم در لیتر عارضه‌های مشاهده شده در آبخش مواجه با نانو روی و سولفات روی در شکل (۳) کاملاً مشخص است.



شکل ۳- A: (سولفات روی) نفوذ سلول‌های خونی (دایره)، نکروز (ستاره)، هایپرپلازی (فلش)، B: (نانو اکسید روی) ادم، (بزرگنمایی ۴۰۰)

انواع عارضه‌های مشاهده شده در غلظت ۴۰ میلی‌گرم در لیتر آبخش‌های در معرض دو ماده نانو اکسید روی و سولفات روی در شکل (۴) آورده شده است.



شکل ۴- A: (سولفات روی) نکروز B: (نانو اکسید روی) نکروز (بزرگنمایی ۴۰۰)

در سیاه‌ماهی‌های گروه شاهد هر دو ماده سولفات روی و نانو اکسید روی هیچ‌گونه بیماری یا ناهنجاری دیده نشد. تغییرات بافتی آبشش سیاه‌ماهی تحت اثر نانو روی پس از دو هفته شامل نکروز لاملاهای ثانویه، ادم، نفوذ سلول‌های آماسی در سر آبشش، جوش خوردگی لاملای ثانویه، هایپرپلازی و نفوذ سلول‌های خونی می‌باشد. در غلظت ۵ میلی گرم در لیتر در سیاه‌ماهی‌های در معرض نانو اکسید روی عوارضی همچون نکروز، جوش خوردگی لاملای ثانویه و هایپرپلازی دیده شد. در غلظت ۲۰ میلی گرم در لیتر عارضه ادم نیز به همراه عوارض قبل بوجود آمد. نفوذ سلول‌های آماسی در سر آبشش در هیچ یک از نمونه‌های نانو اکسید روی مشاهده نشد ولی تمامی عوارض قبل با افزایش غلظت به صورت بیشتر و شدیدتری دیده شدند.

تغییرات بافتی آبشش سیاه‌ماهی تحت اثر سولفات روی پس از دو هفته شامل نکروز لاملاهای ثانویه، ادم، نفوذ سلول‌های آماسی در سر آبشش، جوش خوردگی لاملای ثانویه، هایپرپلازی و نفوذ سلول‌های خونی می‌باشد. در غلظت ۵ میلی گرم در لیتر عوارض نکروز، نفوذ سلول‌های آماسی، هایپرپلازی و نفوذ سلول‌های خونی دیده شد. عوارضی همچون ادم و جوش خوردگی لاملای ثانویه در این غلظت دیده نشد. در غلظت ۲۰ میلی گرم در لیتر تمامی عارضه‌ها مشاهده شد و شدت آن نسبت به قبل افزایش یافت. در غلظت‌های ۴۰ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر همه عوارض به صورت کاملاً شدید و بسیار زیاد در همه نمونه‌ها مشاهده شد.

بحث و نتیجه‌گیری

هایپرپلازی افزایشی غیرطبیعی در تعداد سلول‌های اپی‌تلیوم آبشش است که به دو صورت چماقی شدن سر لاملاهای ثانویه و ضخیم شدن بافت اپی‌تلیوم نزدیک پایه لاملا، خود را نشان می‌دهد. این

عارضه بر تبادل گاز و تنفس تأثیر گذاشته و در حالات شدیدتر می‌تواند منجر به اتصال تیغه‌های مجاور به یکدیگر و جلوگیری از تبادل گاز شود. ادم یا جدا شدن اپیتلیال لاملای ثانویه نیز به شکل شدید مشاهده شد. اتصال تیغه‌های ثانویه مجاور نیز یکی از مشهودترین عوارض می‌باشد. در این عارضه اپی تلیوم دو تیغه ثانویه مجاور بواسطه هیپرپلازی یا برآمدگی و در برخی موارد هیپرتروفی اپی تلیوم به هم اتصال می‌یابد در اینجا دو تیغه مجاور در قسمت پایه به هم متصل شده و تبادلات گازی مختل می‌گردد و در نهایت موجب توقف تبادل گاز از طریق سطوح مربوطه می‌شود. نکروز، نفوذ سلول‌های آماسی در سر لاملاها و نفوذ سلول‌های خونی نیز در این آبشش‌ها مشاهده شد. طبق نتایج بدست آمده عارضه‌های مشاهده شده بافت آبشش تحت اثر دو ماده نانواکسید روی و سولفات روی با هم یکسان نبود. در حالی که روی عنصری ضروری برای انجام متابولیسم سلولی است دارای سمیت جزئی نیز می‌باشد ولی در صورتی که مقدار آن از حد معینی تجاوز کند از عناصر سمی به‌شمار می‌رود. سمیت حاد این فلز بر گونه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. ماهی‌ها در مجاورت غلظت‌های (۵، ۲۰، ۴۰ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر) این ماده قرار گرفتند. سپس بافت آبشش بچه ماهی کپور معمولی از نظر ضایعات میکروسکوپی و هیستوپاتولوژیک بررسی شدند. نتایج نشان داد که این عمل منجر به بروز آسیب‌هایی مانند هیپرتروفی و هایپرپلازی سلول‌های پوششی آبشش، فیوژن یا چسبندگی لاملاهای ثانویه و افزایش و تکثیر سلول‌های مخاطی گردید که در این تحقیق نیز این عارضه‌ها مشاهده شدند (Naji et al., 2006).

از آنجا که بافت آبشش دارای محافظت کمتری نسبت به سایر بافت‌هاست و به‌طور مستقیم با آب مجاورت دارد از حساسیت بیشتری برخوردار است. در مطالعه اثرات هیستوپاتولوژی برخی از فلزات سنگین (سولفات مس، سولفات روی و سولفات جیوه - کلرور کادمیوم) بر بافت‌های ماهی کپور معمولی نتایج نشان داد که در آبشش، چسبندگی لاملاها، پرخونی و خونریزی، آنوریسم، تلانژیکتازی و نفوذ سلول‌های آماسی و هیپرپلازی سلول‌های پوششی رشته‌های آبششی قابل مشاهده بود. در تحقیق حاضر نیز تمامی این عوارض به‌جز آنوریسم در تیمارهای سولفات روی و نانو اکسید روی مشاهده شد و روند افزایشی خود را با افزایش غلظت نشان داد (Rostami Bashman et al., 2000).

در تحقیق منصوری و همکاران (Mansouri et al., 2010)، سنجش میزان فلزات سنگین (نیکل، کبالت، کادمیوم، کروم و روی) در بافت‌های مختلف سیاه‌ماهی (*Capoeta fusca*) در بیرجند انجام شد که پس از اتمام آزمایش و نمونه‌گیری از بافت‌ها بیشترین تجمع در بافت کبد و سپس آبشش و کمترین آن در بافت پوست بوده است، از طرفی فلز روی بیشترین و فلز کادمیوم کمترین میزان تجمع را در بافت‌های سیاه‌ماهی داشته است.

بافت آبشش در سیاه‌ماهی‌های این مطالعه نیز مورد آسیب فراوانی قرار گرفتند به‌طوری‌که آسیب ناشی از سولفات روی بیشترین تأثیر و نانوروی کمترین تأثیر را داشته است. نانواکسیدروی نسبت به سولفات روی دارای میزان سمیت کمتری است. به نظر می‌رسد در صنایع مختلفی که از سولفات روی استفاده می‌شود جایگزینی این ماده با نانواکسید روی از آلودگی‌های زیست محیطی بکاهد.

منابع

- Abedi koupaei J. 2006. Application of Nanotechnology in the Environment. Proceedings of the First Conference on Environmental Nanotechnology. Isfahan University of Technology, pp: 94-95. (In Persian).
- Esmaili A. 2007. Cycle of heavy metals lead, mercury, cadmium and their uptake and effects on aquatic. Proceedings of the First National Conference on proper operation of the Persian Gulf and Oman Sea fish stocks. Fisheries Corporation, pp: 269-277. (In Persian).
- Fuggle RF. 1983. Nature and Ethics of Environmental Concerns. In: Environmental Concerns in South Africa. Fuggle RF, Rabie MA (eds), Juta Cape Town.
- Hao L., Chen L. 2012. Oxidative stress responses in different organs of carp (*Cyprinus carpio*) with exposure to ZnO nanoparticles. Ecotoxicology and Environmental Safety. Elsevier Inc., 80: 103-110.
- Hedayati A., Jahanbakhshi A., Ghaderi Ramazi F. 2013. Aquatic toxicology: 210p. (In Persian).
- Hussein H, Farag S, Kandil K, Moawad H. 2005. Tolerance and uptake of heavy metals by Pseudomonads. Process Biochemistry, 40: 955-96
- Jalali B., Barzegar M. 1999. Instructions for use of drugs and toxins in fish farms (Salt and copper sulfate). Iranian Journal of Fisheries Science, (2): 48-50. (In Persian).
- Mansouri B., Ebrahimpour M., Babaei H. 2010. Determine the amount of heavy metals in different tissues of black fish in the central part of Birjand Qnathay: *Capoeta capoeta*. Journal of Veterinary Medicine, (89): 45-54. (In Persian).
- Metcalf X., Eddy X. 2003. Wastewater Engineering: Treatment and Reuse. In: Wastewater Engineering, Treatment, Disposal and Reuse. Techobanoglous G, Burton FL, Stensel HD (eds), Tata McGraw- Hill Publishing Company Limited, 4th edition. New Delhi, India.
- Naji T., Safaeyan SH., Rostami M., Sabrjoo M. 2006. Effects of zinc sulfate on gill tissue of Common Carp. Environmental Science and Technology, 9(2): 29. (In Persian).

Rostami bashman, M., Soltani, M., Sasani F. 2000. Study of the effects histopathological of heavy metals (Copper sulfate, zinc sulfate and mercury-cadmium chloride) the tissues of Common Carp. Journal of Veterinary Research (Tehran University), 55(4):1-3.