

تأثیر غلظت‌های نزدیک به کشنده کادمیوم بر روی برخی پارامترهای بیوشیمیایی در خون ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*)

علیرضا کیخسروی^{۱*}، آزاده عتباتی^۱، جعفر وطن‌دوست^۱، هادی شمس^۱، مهشید جلیلی^۲، حسن روکی^۱

۱- گروه زیست‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس سبزوار

۲- مؤسسه ملی اقیانوس‌شناسی

© نشریه علمی - پژوهشی اقیانوس‌شناسی ۱۳۸۹، تمامی حقوق این اثر متعلق به نشریه اقیانوس‌شناسی است.

چکیده

کادمیوم به‌عنوان یکی از فلزات سنگین و غیرضروری در رشد موجودات زنده و با غلظت کشندگی پایین، یکی از سمی‌ترین آلاینده‌ها محسوب می‌شود. مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که پارامترهای فیزیولوژیک و بیوشیمیایی خون ماهی در معرض کادمیوم تغییر می‌کنند. هدف مطالعه حاضر، تعیین تأثیرات غلظت‌های زیر کشندگی کادمیوم بر گلوکز و پروتئین خون ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*) به‌عنوان شاخص‌های زیستی است. در این تحقیق بیست نمونه ماهی برای یک دوره ۹۶ ساعته در ۴ آکواریم حاوی غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱/۰، ۱/۵ ppm کادمیوم قرار داده شد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که بین غلظت‌های زیر غلظت کشنده کادمیوم و میزان پروتئین و گلوکز پلاسما رابطه معنی‌داری ($P \leq 0/005$) وجود دارد. افزایش غلظت کادمیوم در محیط منجر به کاهش پروتئین و افزایش گلوکز خون ماهی می‌شود که این امر می‌تواند ناشی از تغییر در سطح غلظت گلیکوژن کبد و ایجاد ممانعت در سنتز پروتئین باشد.

کلمات کلیدی: کادمیوم، فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*)، پروتئین، گلوکز

۱. مقدمه

محسوب می‌شود، که در مقادیر بحرانی و خطرناک در سامانه‌های آبی یافت می‌شود (Sweet et al., 2007). کادمیوم فلزی غیر ضروری است که نقشی در واکنش‌های بیوشیمیایی بدن موجودات زنده ایفا نمی‌کند، بنابراین اثرات آلاینده‌گی بیشتری نسبت به سایر فلزات سنگین دارد و می‌تواند سبب مسمومیت موجودات آبی حتی در غلظت‌های پایین شود به‌طوری که کادمیوم به‌عنوان یکی از سمی‌ترین آلاینده‌های آب معرفی شده است (Witesko, 2001; Sikorska and Wolnicki, 2000; GT, Wilson, 1992).

طی دهه گذشته استفاده از مارکرهای زیستی حساس و کاربرد آن‌ها به‌عنوان ابزار پردازشگر زیستی جهت ارزیابی خطر برای

فلزات سنگین در محیط دارای نیمه عمر طولانی هستند، بنابراین عامل آلوده‌کننده اصلی موجودات آبی به‌خصوص ماهی‌ها هستند (Gopal et al., 1997). فلزات از طرق متفاوتی مانند پساب‌های صنعتی، معادن، فاضلاب‌های شهری، فعالیت‌های کشاورزی و آلودگی هوا وارد آب می‌شوند و می‌توانند بر زنجیره‌های غذایی تأثیر بگذارند (Sweet et al., 2007, Zyadah and Abdel-Baky, 2000). در میان فلزات سنگین، کادمیوم یکی از آلوده‌کننده‌های محیط‌های آبی

* پست الکترونیکی: akeykhosravi@yahoo.com

$15/5 \pm 3$ سانتی‌متر و وزن آنها $46/3 \pm 10$ گرم بود.

به دلیل تغییر فعالیت متابولیسمی با تغییر اندازه ماهی و تأثیر بر پارامترهای بیوشیمیایی خون، سعی شد از ماهی‌های با اندازه و طول نسبتاً مشابه استفاده شود (Cicik et al., 2005). دمای اتاق و دوره نوری طی مطالعه به ترتیب برابر با $25 \pm 1^\circ\text{C}$ و ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی (۱۴L:۱۰D) در نظر گرفته شد. در طول دوره بعضی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی آب از قبیل اکسیژن حل شده ($7/3 \pm 0/1$ میلی‌گرم بر لیتر)، PH ($8 \pm 0/3$) و دما (27 ± 1) هر ۲۴ ساعت اندازه‌گیری شد.

قبل از انتقال ماهی‌ها، چهار تانک پلاستیکی توسط محلول فرمالین ppm ۷۵ به مدت ۱ الی ۲ ساعت آغشته شدند (Dethloff et al., 1999). سی لیتر محلول کادمیوم $0/5$ ، ۱ و $1/5$ میلی‌گرم بر لیتر در سه تانک پلاستیکی منتقل شد. محلول کادمیوم توسط آب شهری کلرزدایی شده تهیه شده بود. در هر تانک پلاستیکی پنج نمونه ماهی به مدت ۹۶ ساعت در معرض آلودگی کادمیوم قرار گرفت و ۵ نمونه نیز به‌عنوان شاهد یا گروه کنترل در تانک حاوی آب شهری کلرزدایی شده به مدت ۹۶ ساعت نگهداری شد. محلول تانک‌های پلاستیکی در میانه دوره یکبار تعویض شد تا غلظت فلز کادمیوم در طول دوره ثابت نگه داشته شود. پس از ۹۶ ساعت پروتئین و گلوکز پلاسماهای خون بیست ماهی مورد مطالعه نمونه‌گیری شد.

در پایان دوره ۹۶ ساعته، خون‌گیری توسط سرنگ‌های ۲ میلی‌لیتری انسولین (آغشته به هپارین) از محل سیاهرگ دمی در قاعده باله دمی انجام (Blaxhland and Dasely, 1973) و سپس به‌داخل میکروتیوب‌های $1/5$ میلی‌لیتری منتقل شد. جهت آزمایش پروتئین و گلوکز، پلاسماهای خون ماهی به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (3500 دور در دقیقه) شد. آزمایشات پروتئین و گلوکز پلاسما به ترتیب توسط روشهای Bradford (Bradford et al., 1996) و Glucose Oxidase (Burtis and Ashwood, 1994) و تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم افزار spss صورت گرفت.

بررسی میزان تغییر پروتئین و گلوکز سرم خون در غلظت‌های مختلف کادمیوم، توسط آزمون One-Way ANOVA و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون دانکن انجام شد.

۳. نتایج

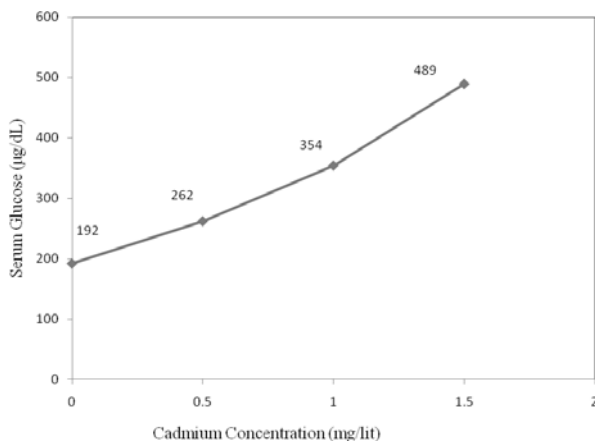
در طول دوره تیمار شدن، هیچگونه مرگ و میری مشاهده

موجودات آبی و خاک‌زی در محیط‌های آلوده گسترش پیدا کرده است (Gernhofeh et al., 2001). در محیط‌های آبی، ماهی به‌عنوان یک جانور برای ارزیابی اثرات آلاینده‌های محیطی در بوم‌سامانه‌های آبی در نظر گرفته می‌شود. ماهی در بالاترین نقطه زنجیره غذایی آبی قرار گرفته است و توانایی بزرگنمایی زیستی فلزات سنگین را حتی در غلظت‌های پایین (موجود در محیط) دارد (Bhagwant et al., 2000). تحلیل تغییرات ریخت‌شناختی و بافت‌شناسی، ابزاری مؤثر برای تشخیص پیامدهای فیزیولوژیکی آلودگی‌های نزدیک به غلظت کشندگی است (Romao et al., 2006). روش‌های بیوشیمیایی و ریخت‌شناختی خون از جمله شاخص‌های زیستی دیگری هستند که در تشخیص پیامدهای فیزیولوژیکی آلودگی‌های نزدیک به غلظت کشندگی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Bhagwant and Bhikagee, 2000). تغییرات پارامترهای خونی اغلب به تغییرات فیزیولوژیکی و محیطی وابسته هستند. در شرایطی که ماهیان در معرض آلاینده‌های فلزات سنگین قرار گیرند، برخی پارامترهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی خون آنها تغییر می‌کند (Sweety et al., 2007; Cicik and Engin, 2005). وجود فلزات سنگین تشش اضافی به ماهی تحمیل می‌کند که این تشش به بروز سایر تغییرات فیزیولوژیکی در ماهی منجر می‌شود (Sweety et al., 2007). هدف مطالعه حاضر تعیین تأثیرات غلظت‌های زیر غلظت کشندگی کادمیوم بر روی سطح گلوکز و پروتئین موجود در سرم خون ماهی فیتوفاگ است.

۲. مواد و روش‌ها

در این مطالعه شاخص‌های زیستی (بیومارکر) ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*) به‌عنوان گونه پرورشی در استخرهای پرورش ماهیان گرمابی، مورد بررسی قرار گرفت. شاخص‌های زیستی مورد بررسی عبارتند از گلوکز پروتئین کل پلاسماهای خون ماهی. مطالعات نشان می‌دهد که نوع تغذیه ماهی و تاثیر آلاینده‌ها با یکدیگر مرتبطند (عبدلی، ۱۳۷۸). بیست نمونه در تیرماه ۱۳۸۶ از استخرهای ذخیره‌ای شیلات واقع در ۷۰ کیلومتری شرق شهرستان سبزوار (روستای شهرآباد) جمع‌آوری و به محیط آزمایشگاهی کنترل شده منتقل شد. دوره سازش در آکواریومی با ابعاد عرض ۴۰، طول ۱۲۰ و ارتفاع ۶۰ سانتی‌متر حاوی آب آشامیدنی شهری و کلرزدایی شده به مدت ۴ هفته در نظر گرفته شد. متوسط سن ماهیان مورد بررسی ۳ تا ۴ ماه، طول

نشد و ماهی‌ها هیچ علائم قابل مشاهده‌ای از تنش (به عنوان مثال فعالیت زیاد) نشان ندادند. نتایج نشان داد که متناسب با غلظت کادمیوم میزان پروتئین و گلوکز پلاسما در ماهی‌ها تغییر یافته بود.



نمودار ۲- تغییرات میزان گلوکز سرم خون بر حسب غلظت کادمیوم

۴. بحث

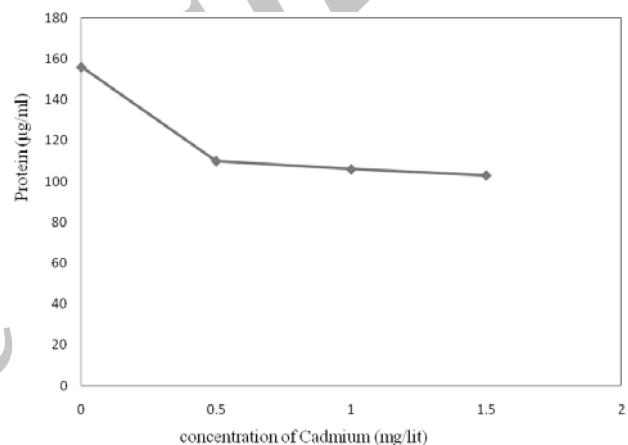
با توجه به اهمیت میزان پروتئین آزاد ماهیان، مطالعاتی در خصوص بررسی اثر آلاینده‌ها بر میزان پروتئین ماهیان فوق انجام شده است (Vosyliene, 1999). در این تحقیق میزان تغییرات پروتئین ماهی فیتوفاگ مورد بررسی قرار گرفته است (عبدلی، ۱۳۷۸).

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که غلظت‌های زیر غلظت کشنده کادمیوم به‌طور معنی‌داری بر میزان پروتئین و گلوکز پلاسما تأثیر می‌گذارند، به‌طوری که با روند افزایشی غلظت آلاینده کادمیوم در محیط میزان پروتئین کاهش و میزان گلوکز افزایش می‌یابد. مطالعات Cicik و Engin در سال ۲۰۰۵ نشان می‌دهد که رابطه مثبتی بین افزایش غلظت کادمیوم در محیط و افزایش میزان گلوکز سرم ماهی کپور *C. carpio* وجود دارد که علت آن، تغییر توسط تغییر در متابولیسم کربوهیدرات و تأثیر آن به روی گلوکز سرم بیان شده است (Cicik and Engin, 2005). نتایج مشابهی در خصوص ماهی *Mugil cephalus* نیز گزارش شده است (Hilmy et al., 1987). علت افزایش غلظت گلوکز خون ماهی می‌تواند ناشی از ترشح حجم وسیعی از موکوس و تورم همراه با نکروز بافتی در اطراف سطح آبشش، به‌عنوان پاسخ ماهی در محیط آلوده به فلزات سنگین از جمله کادمیوم باشد. این امر می‌تواند به ناتوانی اعمال تنفس و سرانجام کاهش جذب اکسیژن و کاهش متابولیسم ماهی‌ها منجر شود و از طرفی حضور

متناسب با هر غلظت، میانگین سطح پروتئین ماهیان هر تانک پس از دوره ۹۶ ساعته محاسبه شد. نتایج نشان می‌دهد که پروتئین پلاسما خون ماهیان مورد بررسی با افزایش غلظت کادمیوم کاهش نسبی یافته است (نمودار ۱).

۳-۱. کادمیوم و پروتئین

متناسب با هر غلظت، میانگین سطح پروتئین ماهیان هر تانک پس از دوره ۹۶ ساعته محاسبه شد. نتایج نشان می‌دهد که پروتئین پلاسما خون ماهیان مورد بررسی با افزایش غلظت کادمیوم کاهش نسبی یافته است (نمودار ۱).



نمودار ۱- تغییرات میزان پروتئین سرم خون بر حسب غلظت کادمیوم

آنالیز واریانس یک طرفه نشان می‌دهد که میزان تغییرات پروتئین پلاسما خون ماهی در غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱/۰ و ۱/۵ میلی گرم لیتر کادمیوم معنی‌دار است ($F=110/571 \leq 0/005$). با مقایسه تست دانکن مشخص شد که تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل و بقیه غلظت‌های کادمیوم وجود دارد. اما این تغییرات بین غلظت‌های ۰/۵، ۱/۰ و ۱/۵ معنی‌دار نبود.

۳-۲. کادمیوم و گلوکز

بررسی میزان گلوکز پلاسما خون ماهیان پس از دوره ۹۶ ساعته نشان می‌دهد که میزان گلوکز خون ماهیان با افزایش غلظت کادمیوم افزایش یافته است (نمودار ۲). آنالیز واریانس یک طرفه نشان می‌دهد که میزان تغییر گلوکز در غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱/۰ و ۱/۵ میلی گرم بر لیتر کادمیوم معنی‌دار

باشد (Neff, 1985). Sastry و Roa پس از انجام مطالعه‌ای روی اثرات کلرید جیوه به روی ماهی *Chanoa punctatus*. بیان می‌کردند که افزایش کورتیزول می‌تواند موجب افزایش فعالیت آنزیم‌هایی شود که نقش مهمی در کاتابولیسم آمینواسید دارند (مانند گلوتامات دهیدروژناز، آمینواسید اکسیداز و گزانتین اکسیداز)، که در نهایت موجب کاهش میزان پروتئین و در مقابل باعث افزایش غلظت گلوکز می‌شود (همان‌طور که در این مطالعه افزایش غلظت گلوکز مشاهده شد) (Sastry and Rao, 1984). تشکیل لیپوپروتئین برای ترمیم سلول‌های تخریب شده، به‌کارگیری مستقیم پروتئین‌ها جهت تولید انرژی در سلول و افزایش لیپولیز را می‌توان از جمله دلایل دیگر کاهش پروتئین دانست (Larsson, 1975).

با توجه به مطالعات ذکر شده در بالا می‌توان گفت عکس‌العمل‌های ماهی نه تنها به وضعیت بیولوژیکی جانور بستگی دارد بلکه به سمیت، نوع و زمان تیمار شدن به آلاینده نیز وابسته است (Vosyliene, 1999). بنابراین مشکل است که با توجه به شرایطی مانند جنس، سن، اندازه و فصل، تنها با استفاده از یک شاخص خونی بتوان تغییرات را بررسی کرد.

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که حتی آلودگی‌های کوتاه‌مدت به غلظت‌های نزدیک به غلظت کشندگی کادمیوم می‌تواند باعث اختلالات در بافت خونی شود که این اختلالات علاوه بر مورفولوژی سلول‌های خونی و بافت‌شناسی (کیخسروی و همکاران، ۱۳۸۲)، موجب تغییر در غلظت‌های پروتئین و گلوکز هم می‌شود. طبیعی است که این تغییرات در بدن ماهی به‌عنوان یک شاخص زیستی، زنگ خطری برای بهداشت و سلامت انسان است که به چنین زنجیره‌های غذایی متأثر از محیط وابسته است. علاوه بر این با توجه به عدم رعایت مسایل زیست‌محیطی در تخلیه پساب‌ها به داخل آب‌های جاری در کشور، پیشنهاد می‌شود از این روش به همراه دیگر بیومارکرهای خونی در بررسی و مطالعه سریع میزان تأثیر آلاینده‌ها بر روی ماهیان آب‌های جاری و به‌عنوان یک شاخص زیستی استفاده شود.

۵. تشکر و قدردانی

در پایان لازم است از زحمات بی‌دریغ جناب آقای مهندس علی اسلامی کارشناس بخش شیلات جهاد کشاورزی شهرستان سبزوار و مسوولین محترم حوزه پژوهشی دانشگاه تربیت معلم

فلزات سنگین غلظت گلیکوژن که فعالیت‌های آنزیم‌های تاثیرگذار در متابولیسم کربوهیدرات (در کبد) را بر عهده دارند را کاهش می‌دهد. لذا این عمل باعث افزایش دوچندان گلوکز خون می‌شود (Langston, 1989). در مطالعه‌ای بر روی ماهی *Heteropneustes fossilis* مشخص شد که کادمیوم با تأثیر بر روی میزان فعالیت آنزیم‌های گلیکولیتیک مانند لاکتات دهیدروژناز، پیروات دهیدروژناز و سوکسینات دهیدروژناز باعث کاهش ذخیره گلیکوژن می‌شود و پیرو آن غلظت گلوکز خون را افزایش می‌دهد (Sastry and Subhadra, 1982). تنش نیز از جمیع عوامل افزایش دهنده غلظت گلوکز خون به‌شمار می‌آید. سطح گلوکز به‌عنوان حساس‌ترین شاخص بیان وضعیت یک ماهی به‌کار برده می‌شود. بدین معنی که غلظت آن در خون نشان می‌دهد که ماهی تحت تنش بوده و از ذخیره انرژی استفاده می‌کند (Remyla et al., 2007; Vosyliene, 1999). از طرفی افزایش گلوکز می‌تواند تا حدی تحت تأثیر تغییرات غدد درون ریز و افزایش کورتیزول باشد که پیرو آن موجب افزایش متابولیسم گلیکوژنولیتیک گلوکز می‌شود (Levesque et al., 2002; Pottinger and Carrick, 1999; Vosyliene and Kazlauskienė, 1999). در این مطالعه نیز کادمیوم به‌عنوان یک عامل تنش‌زا در محیط شناخته شده که می‌تواند بر سطوح گلوکز خون تأثیر گذار باشد.

اما کاهش پروتئین به‌دنبال افزایش غلظت گلوکز می‌تواند عوامل مختلفی مربوط باشد. یکی از این موارد سرکوب سامانه ایمنی به‌وسیله کادمیوم است. Viola و همکاران (۱۹۸۴) طی مطالعه‌ای بر روی ماهی کپور معمولی، کاهش فعالیت لنفوسیت را مشاهده کردند که به تبع خود کاهش پاسخ هورمونی سامانه ایمنی و کاهش نسبی پروتئین خون را به‌دنبال داشت (کاهش تولید آنتی بادی) (Viale and Calamari, 1984). Remyla و همکاران (۲۰۰۷) در مطالعه‌ای بر روی ماهی *Catla catla*، کاهش پروتئین سرم را بعد از طی دوره ۵ روزه در معرض کادمیوم گزارش کردند، که با توجه به نزدیک بودن دوره تیمار شدن به این مطالعه و هم خانواده بودن هر دو گونه مورد مطالعه، می‌توان نتایج دو مطالعه را با یکدیگر مقایسه کرد. مقایسه دو تحقیق نشان می‌دهد که در هر دو تحقیق متناسب با افزایش غلظت کادمیوم، میزان پروتئین خون کاهش یافته است. کاهش پروتئین در طی تنش می‌تواند تحت تأثیر ناتوانی در جذب غذا، بالا رفتن هزینه تولید انرژی جهت ایجاد هوموستازی، ترمیم بافتی و سمیت‌زدایی

- Biochemistry of the fish *Cyprinus Caprio* and its use as a bio-indicator of pollution stress. Environmental monitoring and assessment. 48:117– 124
- GT Wilson, R.W. 1992. Trace elements and organic compounds in the spring River basin of southeastern Kansas. U.S. Fish and Wildlife Service. Contaminant Report No. R6/505M/91. Manhattan. KS. 60.
- Hilmy, A.M. Shabana, M.B. Daabbes, A.Y. 1987. Effects of cadmium toxicity upon the in vivo and in vitro activity of proteins and five enzymes in blood serum and tissue homogenates of *Mugil cephalus*. Comp. Biochem. Physiol. 81:145- 153.
- Langston, R.W. 1989. Toxic effects of metals and the incidence of marine ecosystem. In: Furness, R.W. Rainbow, P.S. Eds. Heavy metals in the marine environment. CRC Press. New York. 128-142.
- Larsson, A. 1975. Some biochemical effects of cadmium on fish. In: Koeman JH. Strik JJTWA (eds) Sub-lethal effects of toxic chemicals on aquatic animals. Elsevier. Amsterdam. 3-13.
- Levesque, H.M. Moon, T.W. Campbell, P.G.C. Hontela, A. 2002. Seasonal variation in carbohydrate and lipid metabolism of yellow perch (*Perca flavescens*) chronically exposed to metals in the field. Aquat. Toxicol. 60:257-267.
- Neff, J.M. 1985. Use of biochemical measurement to detect pollutant- mediated damage to fish. ASTM Spec Tech Publ. 854:155–183.
- Pottinger, T.G. and Carrick, T.R. 1999. A comparison of plasma glucose and plasma cortisol as selection markers for high and low stress-responsiveness in female rainbow trout. Aquaculture. 175: 351–363.
- Remyła, S.R.; Ramesh, M.; Sajwan, K.S. and Kumar, K.S. 2007. Influence of zinc on cadmium induced hematological and biochemical responses in a freshwater teleost fish *Catla catla* Fish Physiol Biochem
- سبزواری آقایان دکتر مصطفی قلی‌زاده و دکتر محمدرضا حامدی‌نیا کمال تشکر و قدردانی به‌عمل‌آید.
- منابع**
- عبدلی، ا. ۱۳۷۸. ماهیان آب‌های داخلی ایران. انتشارات نقش‌مانا. چاپ اول پاییز ۷۸. صفحه ۱۷۸.
- کیخسروی، ع؛ عبتاتی، آ؛ وطن‌دوست، ج و شمس، ه. ۱۳۸۲. تغییرات مورفولوژیکی سلول‌های قرمز خون ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*) بعد از قرار گرفتن در غلظت‌های نزدیک به کشنده کادمیوم. مجله پژوهش و سازندگی بهار. شماره‌های امور دام و آبزیان.
- Bhagwant, S. and Bhikagee, M. 2000. Induction of hypochromic *Macrocytic Anemia* in *Oreochromis* hybrid (*Cichlidae*) exposed to 100mg/L (sub lethal dose) of Aluminum. Science and Technology- Research Journal.
- Blaxhaland, P.C. and Dasely, D.K. 1973. Outline hematological methods for use with fish blood J. Fish Bid. 5:771-781.
- Bollag, D.M. Rozycki, M.D. and Edelstein, S.J. 1996. Protein Methods. Wiley-Liss. 62- 67.
- Cicik, B. and Engin, K. 2005. The effects of cadmium on levels of glucose in serum and glycogen reserves in the liver and muscle tissues of *Cyprinus carpio* (L.,1758). Turk J Vet Anim Sci. 29:113-117.
- Dethloff, G.M. Schlenk, D. Khan, S. and Bailey, H.C. 1999. The effects of copper on blood and biochemical parameters of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Archives of environmental contamination and toxicology. 36:415-423.
- Gernhofer, M. Pawert, M. and Schramm, M. 2001. Ultrastructural biomarkers as tools to characterize the health status of fish in contaminated streams. Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery (Formerly Journal of Aquatic Ecosystem Health). 8:241-260.
- Gopal, V.; Paravathy, S. and Balasubramanian, P.R. 1997. Effect of heavy metal on the blood protein,

- clinical chemistry. Second Edition. WB Saunders Company.
- Viale, G. and Calamari, D. 1984. Immune response in rainbow trout *Salmo gairdneri* after long-term treatment with low levels of Cr, Cd and Cu. Environ. Pollut. A 35: 247-257.
- Vinodhini, R. Narayanan, M. 2009. The impact of toxic heavy metals on the hematological parameters in Common Carp (*Cyprinus Carpio L.*). Iran. J. Environ. Health. Sci. Eng. 6:23-28.
- Vosyliene, M.Z. 1999. The effect of heavy metals on hematological indices of fish. Acta Zoologica Lituanica. 9(2).
- Vosyliene, M. and Kazlauskienė, N. 1999. Alternation in fish health state parameters after exposure to different stressors. Zoologica Lituanica. Hydrobiologia. 9: 84-94.
- Witeska, M. 2001. Changes in the common carp blood cell picture after acute exposure to cadmium. Acta Zoologica Lituanica. 11(4).
- Zyadah, M.A. and Abdel-Baky, T.E. 2000. Toxicity and bioaccumulation of copper, zinc, and cadmium in some aquatic organisms. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 64: 740- 747.
- Sikorska, J. and Wolnicki, J. 2006. Cadmium toxicity to Rudd (*Scardinius erythrophthalmus* (L) larvae after short-term exposure. Archive of Polish Fisheries. 14: 15-27.
- Sastry, K.V. and Rao, D.R. 1984. Effects of mercuric chloride on some biochemical and physiological parameters of the freshwater murrel *Channa punctatus*. Environ. Res. 34: 343- 350.
- Sastry, K.V. and Subhadra, K. 1982. Effect of cadmium on some aspects of carbohydrate metabolism in a freshwater catfish *Heteropneustes fossilis*. Toxicol. Lett. 14:45-55.
- Romao, S.; Donatti, L.; Freitas, M.; Teixeira, J. and Kusma, J. 2006. Blood parameter analysis and morphological alternations as biomarkers on the health of *hoplias malabaricus* and *geophagus brasiliensis*. 49: 441-448. ISSN 1516- 8913. Printed in Brazil.
- Sweety, R.R.; Sajwan, K.S. and Kumar, K.S. 2007. Influence of zinc on cadmium induced hematological and biochemical responses in freshwater teleost fish *Catla catla*. Fish physiol Biochem. 9157-2
- Burtis, C.A. and Ashwood, E.R. 1994. Tietz textbook of