اثر کادمیوم بر برخی شاخص‌های ایمنی ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*)

نگین جلایی[1]*، سورنا ابدالی[2]، ایوب یوسفی جوردهی[3] و مهتاب یارمحمدی[4]

۱، ۲ و ۳ – دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

۴- موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۵/۱۱ تاریخ پذیرش:۱۳۹۱/۱۰/۲۵

چکیده

در این مطالعه، ۱۳۵ عدد ماهی فیتوفاگ پرورشی با میانگین وزن ۸/۶ ± ۵۰/۶ گرم و طول کل ۳ ± ۱۶/۲ سانتی‌متر، در غلظت‌های ۰، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کلرید کادمیوم ($Cd(Cl)_2$) به مدت ۹۶ ساعت در آکواریوم‌های ۱۰۰ لیتری قرار گرفتند. هر تیمار در ۳ تکرار و هر تکرار شامل ۱۵ عدد ماهی بود. خونگیری از ماهیان هر ۲۴ ساعت انجام شد. تعداد گلبول‌های سفید خون در ابتدا ۲۱۸۵ ± ۵۱۶۶ عدد در میلی‌متر مکعب بود که تا ۷۲ ساعت نسبت به شاهد سیر نزولی، ولی در ساعت ۹۶ افزایش یافت و به ۱۱۵۴ ± ۸۰۰۰ عدد در میلی‌متر مکعب رسید ($P < ۰/۰۵$). شمارش افتراقی لکوسیت ها نشان داد که تعداد لنفوسیت‌ها از ۵/۷ ± ۸۸/۳ درصد در ابتدا به ۰/۳ ± ۸۸ درصد در انتها رسید که طی ۹۶ ساعت در تیمارهای مختلف فاقد تغییرات معنی‌دار بود ($P > ۰/۰۵$). تعداد نوتروفیل‌ها در ابتدا ۴ ± ۱۶ درصد بود که با گذشت زمان کاهش یافت و در انتها به ۱ ± ۲ درصد رسید ($P < ۰/۰۵$). این در حالی بود که شمار ائوزینوفیل‌ها بطور معنی‌داری افزایش یافت و از ۱ ± ۱/۵ درصد در ابتدا (شاهد) به ۲ ± ۸/۳ درصد و در انتها در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر طی ساعت ۹۶ رسید ($P < ۰/۰۵$). تعداد مونوسیت‌ها در ابتدا ۰/۶ ± ۱/۳ درصد بود که در انتها به ۰/۳ ± ۱/۶ افزایش یافت و در طول دوره نوسانات نامنظمی را نشان داد. بنابراین، افزایش غلظت فلز سنگین کادمیوم در آب و افزایش مدت زمان مجاورت با آن بر سیستم ایمنی ماهی فیتوفاگ تاثیر منفی می‌گذارد.

واژگان کلیدی: کادمیوم، شاخص‌های ایمنی، ماهی فیتوفاگ، *Hypophthalamichtys molitrix*

* نگارنده پاسخگو: negin_jalaie@yahoo.com

مقدمه

آلودگی منابع آبی همواره حیات روی زمین را تهدید می‌کند. دریاها و اقیانوس‌ها به علت ارتباط با منابع آبی دیگر در معرض خطر ورود منابع آلودگی می‌باشند. صنعت و تکنولوژی در سراسر دنیا روزانه در حال گسترش و پیشرفت است که در پی آن به صورت مستقیم یا غیر مستقیم مسائل و مشکلاتی ایجاد می-شود. آلودگی به فلزات سنگین یک مشکل جهانی است که خطرات سلامتی جدی برای انسان‌ها و حیوانات دارد. امروزه فلزات سنگین منبع مهم آلودگی برای موجودات آبزی می‌باشند (Adeyemo, 2008). فلزات سنگین گروهی از فلزات هستند که دارای وزن مخصوص بیشتر از ۴ بوده و در نیمه پایین جدول تناوبی قرار دارند و دارای نمک‌های رنگین با طیف‌های پیچیده و کاملاً آمفوتر هستند. بسیاری از این فلزات نه تنها برای حیات بیولوژیکی ضروری نیستند، بلکه بسیار هم سمی‌اند (Pickering & Pottinger,1987). کادمیوم و جیوه و سرب از عناصر حیاتی نیستند. بر اساس گزارش‌های متعدد در منبع علمی مسمومیت‌های مزمن با فلزات سنگین موجب بروز اثراتی همچون کاهش رشد و اختلال در تولیدمثل، اثرات هیستوپاتولوژیک، تغییرات فاکتورهای خون‌شناسی، ضایعات تخم، جنین و لارو ها در گونه‌های مختلف ماهیان می‌گردد (Metin, 2001; Kulkarini et al., 2002 James, 1992; Thophon *et al*., 2003). کادمیوم عنصری فلزی و نرم به رنگ سفید مایل به آبی است و بسیار سمی است. در اکوسیستم‌های آبی کادمیوم در بافت نرمتنان و خرچنگ ها و ماهی ها تجمع می‌یابد. جاندارانی که این عنصر وارد بدنشان می‌شود، دچار فشار خون بالا، بیماری‌های کبدی و صدمات مغزی - نخاعی می‌شوند (Donmez et al., 1993). ماهی فیتوفاگ از خانواده کپور ماهیان و ساکن آب شیرین است. این گونه در عمق ۴ تا ۲۰ متری آبها هم زندگی می‌کند. این ماهی عمدتاً فیتوپلانکتون خوار است، اما از تخم و لارو جانوران آبزی نیز تغذیه می‌کند (Rodriguez, 1990). هدف از این مطالعه تعیین اثرات کادمیوم بر پاسخ سیستم ایمنی ماهی فیتوفاگ پرورشی بود.

مواد و روش کار

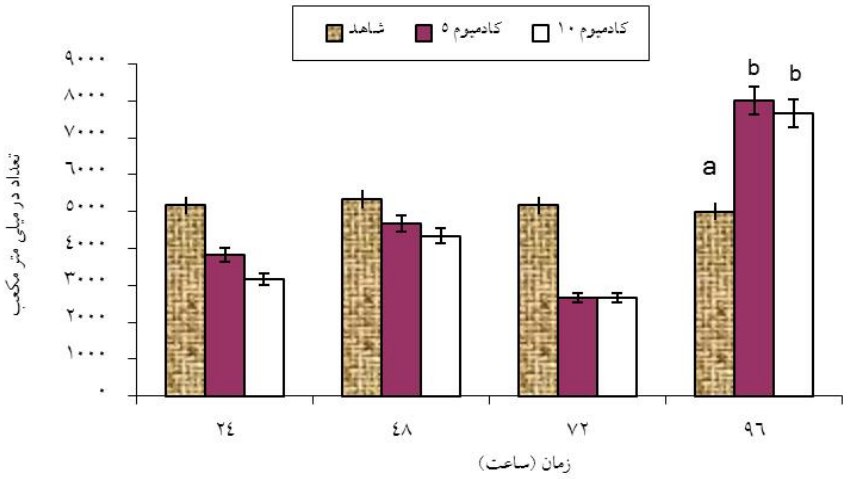
تعداد ۱۳۵ قطعه ماهی فیتوفاگ پرورشی با وزن تقریبی ۸/۶ ± ۵۰/۶ گرم و طول ۳ ± ۱۶/۲ سانتی‌متر از کارگاه‌های پرورش ماهیان گرمابی کوئی کارپ در ۱۰ کیلومتری رشت خریداری و به انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان منتقل گردید. ماهیان پس از سازگارسازی با شرایط آب در آزمایشگاه به مدت یک هفته، زیست‌سنجی شدند. به این طریق که با استفاده از یک خط‌کش با دقت ۰/۱سانتی‌متر فاصله بین ابتدای پوزه تا انتهای باله دمی تعیین گردید و وزن کل با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۱گرم اندازه گیری شد . نمونه‌ها به طور تصادفی در آکواریوم‌های ۱۰۰ لیتری حاوی ۹۰ لیتر آب تحت تیماربندی به مدت ۹۶ ساعت قرار گرفتند. هر تیمار شامل ۳ تکرار و هر تکرار شامل ۱۵ عدد ماهی بود. یک گروه بعنوان شاهد و تیمارهای دوم و سوم شامل دوز های ۵ و۱۰ میلی‌گرم فلز سنگین کلرید کادمیوم در هر لیتر آب بود (Zyadah & Abdel-Baky, 2000). برای آماده سازی غلظت های مورد بررسی، ابتدا میزان نهایی

کادمیوم مورد نیاز محاسبه، سپس استوک تهیه گردید و بر اساس دوزهای تعیین شده حجم مشخصی از استوک به تیمارها اضافه شد. فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی مانند دما، اکسیژن محلول (میلی‌گرم بر لیتر) با استفاده از اکسیژن سنج مدل multi 340i ساخت آلمان، و pH با استفاده از دستگاه ترمومتر مخصوص به طور روزانه از اکواریوم ها اندازه‌گیری شد. سپس واکنش‌های رفتاری و میزان مرگ و میر ماهیان پایش و ثبت گردید.

در هر ۲۴ ساعت و طی ۹۶ ساعت از ماهیان با استفاده از سرنگ های هپارینه ۲ میلی لیتری از ناحیه ساقه دمی خونگیری بعمل آمد (کاظمی و همکاران، ۱۳۸۹). با استفاده از این روش می توان به دفعات از ماهیان بزرگتر خون گیری نمود. سپس تهیه گسترش خونی جهت شمارش افتراقی لکوسیت‌ها انجام شد و با استفاده از رنگ گیمسا ۱۵ درصد به مدت نیم ساعت رنگ آمیزی شدند. تعداد لنفوسیت، ائوزونوفیل ، نوتروفیل ، بازوفیل و مونوسیت ها در گسترش های خونی با میکروسکوپ نوری و دستگاه شمارشگر سلولی تعیین شد (کاظمی و همکاران، ۱۳۸۹). داده ها در نرم افزار Excel ثبت و برای بررسی وضعیت نرمال بودن داده ها از آزمون (کولموگرف-اسمیرنف) استفاده شد. آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار آماری SPSS 14 تحت ویندوز و به روش آنالیز واریانس یک طرفه در سطح اطمینان ۹۵ درصد انجام و نتایج به میانگین ± خطای استاندارد ارائه گردید.

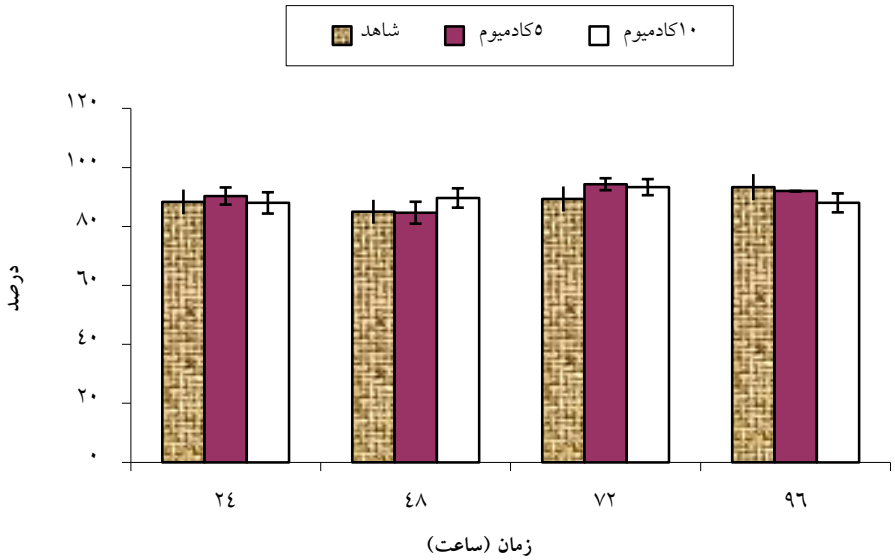
نتایج

شمار گلبول‌های سفید خون در ابتدا ۲۱۸۵ ± ۵۱۶۶ عدد در میلی‌متر مکعب بود که تا ۷۲ ساعت نسبت به شاهد سیر نزولی، ولی در ساعت ۹۶ افزایش یافت و به ۱۱۵۴ ± ۸۰۰۰ عدد در میلی‌متر مکعب رسید و اختلاف معنی‌داری نشان داد ($P < ۰/۰۵$) (شکل ۱).



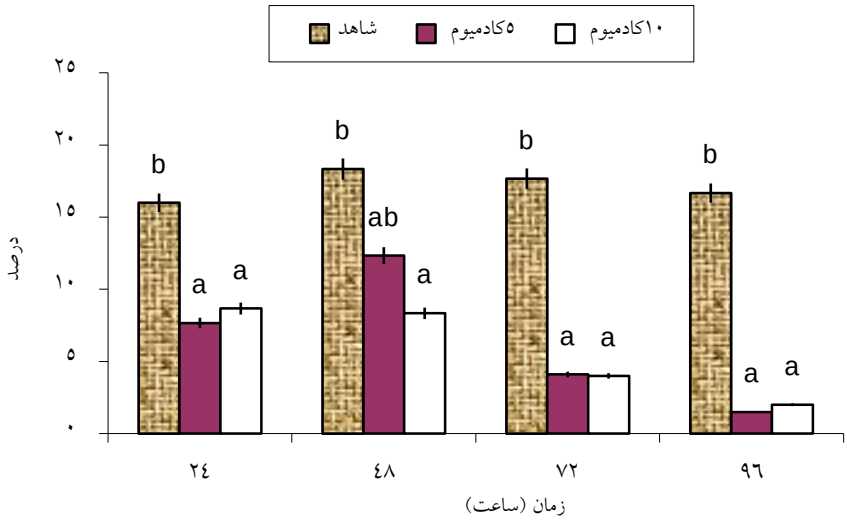
شکل ۱- میانگین تغییرات گلبول‌های سفید خون ماهی فیتوفاگ در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف (میله‌ها بیانگر خطای استاندارد است).

شمار لنفوسیت‌ها از ۵/۷ ± ۸۸/۳ درصد در ابتدا به ۰/۳ ± ۸۸ درصد در انتها رسید که طی ۹۶ ساعت در تیمارهای مختلف فاقد تغییرات معنی‌دار بود (P > ۰/۰۵) (شکل ۲).



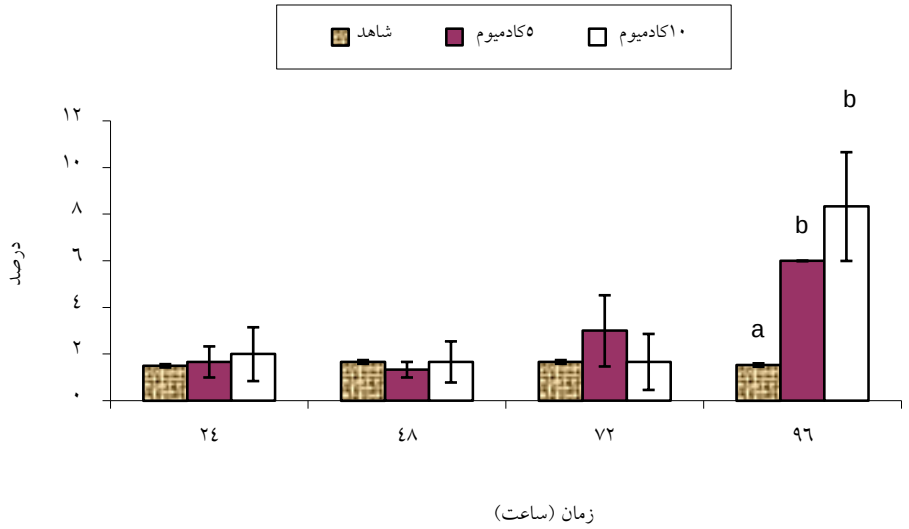
شکل ۲- میانگین تغییرات لنفوسیت ماهی فیتوفاگ در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف (میله‌ها بیانگر خطای استاندارد است).

نوتروفیل‌ها در ابتدا ۴ ± ۱۶ درصد بود که با گذشت زمان کاهش یافت و در انتها به ۱ ± ۲ درصد رسید (P < ۰/۰۵) (شکل۳).



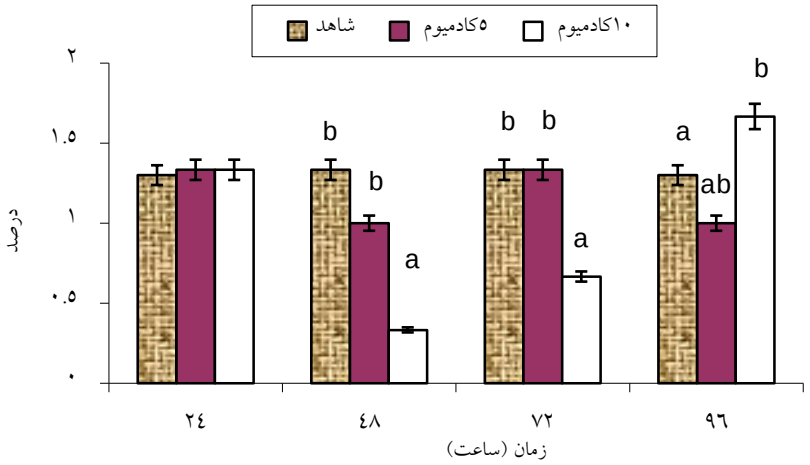
شکل ۳- میانگین تغییرات درصد نوتروفیل ماهی فیتوفاگ در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف (میله‌ها بیانگر خطای استاندارد است).

شمار ائوزینوفیل‌ها بطور معنی‌داری افزایش یافت و از ۱ ± ۱/۵ درصد در ابتدا (شاهد) به ۲ ± ۸/۳ درصد در انتها در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر طی ساعت ۹۶ رسید (P < ۰/۰۵) (شکل ۴).



شکل ۴ - میانگین تغییرات درصد ائوزینوفیل ماهی فیتوفاگ در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف (میله‌ها بیانگر خطای استاندارد است).

میزان مونوسیت‌ها در ابتدا ۰/۶ ± ۱/۳ درصد بود که در انتها به ۰/۳ ± ۱/۶ درصد در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر رسید و در ساعت ۲۴ اختلاف معنی‌داری در تیمارها نشان نداد (P > ۰/۰۵). ولی در ساعت‌های ۴۸ و ۹۲ بین تیمار ۱۰ میلی‌گرم در لیتر فلز کادمیوم با بقیه تیمارها اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید (P < ۰/۰۵). در ساعت ۹۶ روند تغییرات برخلاف زمان‌ها ۷۲ و ۴۸ ساعت بود (شکل ۵).



شکل ۵- میانگین تغییرات درصد مونوسیت ماهی فیتوفاگ در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف (میله‌ها بیانگر خطای استاندارد است).

بحث و نتیجه‌گیری

فلزات سنگین عملکرد سلول‌های ایمنی را از طریق مکانیسم‌های مختلف تحت تأثیر قرار می‌دهند. بسته به نوع فلز خاص، ویژگی‌های آن، غلظت و زیست فراهمی فلز و برخی خصوصیات دیگر، مجاورت مداوم با فلز سنگین منجر به تحریک سیستم ایمنی و یا سرکوب آن می‌شود. سلول‌های ایمنی از قبیل ماکروفاژها ترکیبات فلزات سنگین را در خود ذخیره می‌کنند که در بسیاری از گونه‌های ماهیان گزارش شده است (Nigro & Leonzio, 1996). بسته به غلظت، فلز سنگین می‌تواند برای سلول‌های ایمنی سمیت ایجاد کند که در همه موارد از طریق اتصال به پروتئین‌های گیرنده صورت می‌پذیرد. سطوح پایین غلظت‌های فلزات سنگین سیستم ایمنی را تعدیل می‌کند (Valentine-Thon & Schiwara, 2003).

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تعداد گلبول‌های سفید خون تا ۷۲ ساعت نسبت به شاهد سیر نزولی، ولی در ۹۶ ساعت افزایش یافت ($P < ۰/۰۵$). نتایج شمارش افتراقی لکوسیت‌ها نشان داد که تعداد لنفوسیت‌ها طی ساعت ۹۶ در تیمارهای مختلف فاقد تغییرات معنی‌دار بود ($P > ۰/۰۵$). تعداد نوتروفیل‌ها با گذشت زمان کاهش یافت. این در حالی بود که تعداد ائوزینوفیل‌ها افزایش یافت و در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر در ۹۶ ساعت به حداکثر رسید. تعداد مونوسیت‌ها نوسانات نامنظمی را نشان داد. در مطالعه‌ای که Radhakrishnan در سال ۲۰۱۰، در خصوص اثرات ایمنولوژیکی کادمیوم (۱۰ میلی‌گرم در لیتر) بر گونه *Heteropeneus fossillis* طی ۹۶ ساعت انجام داد دریافت که تعداد گلبول‌های سفید خون با کاهش قابل ملاحظه‌ای در تعداد لنفوسیت‌ها کاهش و درصد نوتروفیل‌ها افزایش یافت. این تغییرات می‌تواند بواسطه کورتیزول مترشحه ناشی از استرس ایجاد شده در مجاورت با فلز کادمیوم باشد که از مهاجرت نوتروفیل‌ها به بافت‌ها ممانعت بعمل می‌آورد (Eliss, 1997).

Vinodhini وNarayanan در سال ۲۰۰۹، اثر سمی فلزات سنگین بر پارامترهای خونی در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) را مورد مطالعه قرار دادند و دریافتند که وجود فلزات سنگین سمی در محیط‌های آبی اثرات قوی بر پارامترهای خونی درکپور معمولی آب شیرین دارد. در مطالعه‌ای که Omima در سال ۲۰۱۰، در مورد اثر سرب، جیوه، کادمیوم بر پاسخ ایمنی در گونه تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) انجام داد، دریافت که تیتر آنتی‌بادی در ماهیان قرار گرفته در مجاورت این فلزها در مقایسه با شاهد بیشتر بود. همچنین دریافتند که این فلزها اثر بازدارندگی بر عملکرد سیستم ایمنی همورال دارند. این اثر بازدارندگی فلزات مذکور بر پاسخ سیستم ایمنی می‌تواند ناشی از اثرات وارده به اندام‌های کبد، طحال و کلیه باشد. Palakova و همکاران در سال ۱۹۹۲ گزارش دادند که تغییر در تعداد گلبول‌های سفید WBC خون ماهی کپور معمولی وابسته به مدت مواجهه با کادمیوم است و در ابتدا افزایش WBC (لنفوسیت و مونوسیت) و بعد از ۱۱ روز کاهش در تعداد WBC مشاهده گردید. Larsson, Jahnsson-Sjobeck در سال ۱۹۸۷مشاهده نمودند که WBC در ماهی فلاندر (کفشک) در ابتدای تماس با کادمیوم افزایش در WBC بوجود آمد. اما وقتی

مدت تماس ۹ هفته به طول انجامید، تعداد گلبول‌های سفید به دلیل کاهش لنفوسیت‌ها کاهش یافت.

Yammawaki و همکاران در سال ۱۹۸۶ ماهیان کپور ۱۳۰ گرمی را در معرض مقادیر ۲، ۱۰ و ۴۲ قسمت در بیلیون (ppb) کلرور کادمیوم برای مدت ۱۵، ۲۹، ۶۴ و ۱۲۰ قرار دادند. سطوح پروتئین کل، آلبومین، گلبولین و گلوکز کاهش، و آنزیم های AST، ALT، LDH در مجاورت کادمیوم افزایش یافته بود.

Canli and Atli در سال ۲۰۰۳، گزارش کردند که درصد فاگوستیوز در گونه‌های قرار گرفته در مجاورت فلز کادمیوم نسبت به شاهد کاهش یافت. اما تفاوت معنی‌داری را بین استات سرب و کلرید کادمیوم پس از یک هفته مجاورت مشاهده نشد و نتایج آنها تقریباً مشابه بود. بر اساس نتایج حاصل، سطوح بالای فلز سنگین کادمیوم بر سیستم ایمنی و سلامت ماهی فیتوفاگ اثر می‌گذارد. اطلاعات بسیاری وجود دارد که نشان می‌دهد فلزات سنگین می‌توانند موجب افزایش و یا کاهش مصرف انرژی توسط ماهی شوند (Jezierska & Witeska, 2001). Suresh در سال ۲۰۰۹، اثر کلرید کادمیوم بر مراکز ملانوماکروفاژی کبد، طحال و کلیه در گونه *Tilapia mossambica* را مورد بررسی قرار دادند و دریافتند که میانگین تعداد و اندازه مراکز ملانوماکروفاژی به طور معنی‌داری در مقایسه با شاهد افزایش یافت.

در مطالعه‌ای دیگر که توسط Witeska در سال ۱۹۹۸ در مورد خون ماهی کپور معمولی به مدت ۴ روز بعد از ۳ ساعت تماس با غلظت ۱۰میلی‌گرم dm-3 کادمیوم انجام شد در ۲۴ و ۴۸ ساعت تعداد اریتروسیت‌های نابالغ افزایش یافت هم چنین تخریب اریتروسیت‌ها بعد از ۹۶ ساعت و neutropenia در پایان آزمایش مشاهده شد. به دنبال لنفوپنیا در ۴۸ و ۹۶ ساعت بعد از پایان آزمایش تعداد نوتروفیل‌ها در آزمایش کاهش پیدا کرد.

در تحقیق حاضر، بر اساس نتایج حاصل، سیستم ایمنی ماهی فیتوفاگ در غلظت‌های مختلف کادمیوم طی زمان‌های متفاوت تأثیر پذیرفت. همچنین، لکوسیت‌ها می‌توانند بعنوان یک شاخص جهت تعیین عملکرد سیستم ایمنی ماهی فیتوفاگ در برابر فلز سنگین کادمیوم مورد استفاده قرار گیرند.

منابع

ر.، یوسفی جوردهی، ا.، پوردهقانی، م.، یارمحمدی، کاظمی، م. و نصری تجن، ع. ۱۳۸۹. فیزیولوژی دستگاه گردش چاپ خون آبزیان و فنون کاربردی خون شناسی ماهیان. ایران. اول. انتشارات شابک.

Adeyemo, O.K. 2008. Histological alterations observed in the liver and brain of *Clarias gariepinus* exposed to chronic sublethal does of lead .Bulletin of. European Association of Fish Pathology, 28:105-114.

Canli, M. & Atli, G. 2003. The relationships between heavy metal (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) levels and the size of six Mediterranean fish species. Environmental pollutants, 121: 129–36.

Christensen, G.M., Hunt, E.P. & Fiant, J. 1977 .The effect of methylmercuric chloride, cadmium chloride and lead nitrate on six biochemical factors of the brook trout (*Salvelinus fontinalis*).

Toxicology and Applied Pharmacology, 42:523-527.

Donmez, H., Dursun, N., Ozkul, Y.& Demiratas, H. 1993. Increased sister chromatid exchange in workers exposed to occupational lead and zinc. Biological Trace Element Research, 61(1): 105.

Eliss, A.E. 1997. The leucocytes of fish. A review. Journal of Fish Biology, 11: 453 – 491.

Haux, C.& Larrson, A. 1984. Long-term sublethal physiological effect on Rainbow trout, *Salmo gairdneri*, during exposure to cadmium and after subsequent recovery. Aquatic Toxicology, 5: 129-142.

Health, A.G. 1983.Water pollution and fish physiology. CRC Press Inc. Delhi, India.

James, R. 1992. Utilization of *Eichornia crassipes* for reduction of mercury toxicity on food transformation in *Hetropneustes fossilis*. Aqua Trop, 7:146-186.

Jezierska, B. and Witeska, M. 2001. Metal toxicity to fish. Wydawnictwo Akademii Podlaskiej, Siedlce.

Johansson-Sjobeck, M.L. & Larsson, A. 1978. The effect of cadmium on the hematology and on the activity of delta–aminolevulic acid dehydrates (ALA-D) in blood and hematopoietic tissues of the *Flounder pleuronectes*. Environmental Research, 17:1991-2004.

Kulkarini, R.S., Veeresh, VU., Sindhe, V.R. 2002. Ovarian changes in response to heavy metal exposure to the fish, *Notopterus notopterus* (palls). Journal of Environmental Biology, 23:137-171.

Larsson, A .1975. Some biochemical effect of cadmium on fish. In: Koeman JH, Strik JJTWA (eds) sub –lethal effects of toxic chemicals on aquatic animals. Elsevier, Amsterdam.

Metin, C. 2001. Effects of Aqueous cadmium on embryos and larvae of Mirror carp. The Indian Journal of Animal Sciences, 71:885-888.

Nigro, M., & Leonzio, C. 1996. Intracellular storage of mercury and selenium in different marine vertebrates. Marine Ecology-Progress Series, 135: 137-143.

Omima, A.S.A. 2010. Impact of pollution with lead, mercury and cadmium on the immune response of *Oreochromis niloticus.* Science Journal, 3:12-16.

Palakova, J., Parvada, D., Fasaic, K., Celechovska, O.1992. Sublethal effects of cadmium on common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings. In Sulethal chronic effects of pollutants on fresh water. Edited by R. Muller and R .Lioyd (lsted) FAO and Fishing news Book, Oxford, UK.

Pickering, A.D., and Pottinger, T.G. 1987. Lymphocytopenia and interregnal activity during sexual maturation in the Brown trout, Fish Biology, 30: 41-50.

Radhakrishnan, M.V. 2010. Immunological effect of cadmium in *Hetreropeneustes fossiliss* Bloch. Global Veterinarian, 4:544 – 547.

Rodriguez, H.1990. Zn uptake from Blood in to brain and other tissues in the Rat. Neurochemical Research, 15(10):1003-1008.

Suresh, N. 2009. Effect of cadmium chloride on liver, spleen and kidney melano macrophage centers in Tilapia mossambica. Journal of Environmental Biology, 30(4): 505-508.

Thophon, S., Kruatrachue, M., Upatham, G.S., Pokethitiyook, P., Sahaphog, S.& Garitkhuan, S. 2003. Histopathological alternation of White Sea bass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. Environmental Pollution, 121:307-320.

Valentine-Thon, E. & Schiwara, H. W. 2003. Validity of MELISA for metal sensitivity testing. Neuro endocrinology Letters, 24: 57-64.

Vinodhini, R. & Narayanan, M. 2009. The impact of toxic heavy metals on the hematological parameters in common carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Environmental Health Science Engineering, 6(1): 23-28.

Witeska, M. 1998. Changes in selected blood indices of Common carp (*Cyprinus carpio*) after acute exposure to cadmium. Acta Veteriniaria Brno, 67: 289-293.

Yamawaki, K.W., Hoshimoto, K., Fujii, J., Koyama, T., Ikeda & Ozaki, H. 1986. Hemochemical changes in Carp exposed to low cadmium concentrations. Bulletin of Asian Fisheries Society , 1:56-60.

Zyadah, M. A. & Abdel-Baky, T. E. 2000. Toxicity and bioaccumulation of copper, zinc, and cadmium in some aquatic organisms. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 64:740-747.