



اثرات غلظت‌های مختلف پساب خروجی تصفیه‌خانه فاضلاب شهری بر شاخص‌های خون‌شناسی، کورتیزول و بافت‌شناسی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

کامران رضایی توابع^{*}، غلامرضا رفیعی، کیوان الحاقی، علیرضا میرواقفی، آرش جوانشیر

گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

چکیده

نوع مقاله:

پژوهشی

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۹۵/۱۲/۰۵

اصلاح: ۹۶/۰۷/۲۰

پذیرش: ۹۶/۰۸/۰۵

کلمات کلیدی:

بافت‌شناسی

پساب

شاخص‌های خونی

ماهی کپور معمولی

هورمون کورتیزول

این مطالعه با هدف بررسی اثرات مزمن تحت استرسی غلظت‌های مختلف پساب خروجی از تصفیه‌خانه فاضلاب شهری به مدت دو ماه بر هورمون استرسی کورتیزول، شاخص‌های خون‌شناسی و بافت‌های کبد و آب‌شش ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) انجام گرفت. برای انجام این تحقیق، تعداد ۱۲۰ قطعه ماهی کپور معمولی با وزن متوسط 120 ± 5 گرم در ۵ تیمار و سه تکرار در غلظت‌های ۰٪ (شاهد)، ۲۵٪، ۵۰٪، ۷۵٪ و ۱۰۰٪ فاضلاب خروجی از تصفیه‌خانه در مخازن ۶۰ لیتری قرار گرفتند. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت فاضلاب در تیمارها، میزان هورمون کورتیزول به‌طور معنی‌داری در بدن ماهیان افزایش می‌یابد. نتایج شاخص‌های خون‌شناسی شامل گلبول سفید (WBC)، گلبول قرمز (RBC)، هماتوکریت (HCT)، هموگلوبین (Hb) و متوسط حجم گلبولی (MCV) با افزایش درصد غلظت فاضلاب به‌طور معنی‌داری افزایش نشان دادند، اما در سایر شاخص‌های خونی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین نتایج بافت‌شناسی نشان داد که با افزایش غلظت فاضلاب، تغییرات و آسیب‌های بافتی نظیر هایپرتروفی و تورم ابری در هر دو بافت کبد و آب‌شش مشاهده گردید. به‌طور کلی بر اساس نتایج تلفات ماهی، غلظت هورمون استرسی کورتیزول، شاخص‌های خون‌شناسی و نتایج بافت‌شناسی در تیمارهای ۷۵٪ و ۱۰۰٪ فاضلاب، برای مباحث مدیریتی پرورش ماهی کپور معمولی با استفاده از فاضلاب شهری و سلامت زیستی این ماهی، تیمار ۵۰٪ فاضلاب (۵۰٪ فاضلاب و ۵۰٪ آب معمولی) برای پرورش پیشنهاد می‌گردد.

مقدمه

امروزه با توجه به کمبود منابع آبی در بیشتر کشورها و خشک‌سالی‌های پی‌درپی، بازچرخانی و استفاده مجدد از آب‌های نامتعارف برای کاربری‌های مختلف امری ضروری است. در برخی کشورها، فاضلاب تصفیه شد تصفیه‌خانه‌های فاضلاب شهری برای آبی‌پروری استفاده می‌شود که به آن آبی‌پروری شهری^۱ اطلاق می‌گردد (Costa-Pierce et al., 2005). استفاده از فاضلاب تصفیه‌شده تصفیه‌خانه‌های شهری می‌تواند به‌عنوان منبع نسبتاً قابل اعتماد آب موردتوجه قرار گیرد (Masoudinezhad et al., 2011)، زیرا هر تصفیه‌خانه موظف به رعایت ضوابط محیط‌زیستی و رساندن فاضلاب به شرایط

^{*} نویسنده مسئول، پست الکترونیک: krtavabe@ut.ac.ir

^۱ Urban Aquaculture

استاندارد برای سلامت افراد جامعه و محیط‌زیست می‌باشد. بر اساس دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی (WHO)^۲ فاضلاب مورد استفاده برای استخرهای پرورش ماهی باید عاری از تخم انگل نماتودها بوده و تعداد کلی‌فرم مدفوعی در آن‌ها بیش از ۱۰۰۰ عدد در هر ۱۰۰ میلی‌لیتر نباشد. بعضی از نماتودها از جمله کلونورکیس، شیستوزوما از جمله انگل‌هایی هستند که در استفاده از این منابع برای آبی‌پروری دارای محدودیت می‌باشند و در استفاده از فاضلاب‌های شهری در آبی‌پروری مهم‌ترین عامل محدودیت‌زا، کلی‌فرم، فکال کلی‌فرم و تخم انگل نماتود بیان شده است (Kane and Salierno, 2005). در صورت تأمین استانداردهای بهداشتی امکان استفاده از این منابع در این بخش مقدور بوده ولی نیاز به پایش دقیق محصولات تولیدی و فاضلاب ورودی به برکه دارد. در زمینه استفاده از پساب‌های کشاورزی در آبی‌پروری با توجه به استانداردهای سخت‌گیرانه، سموم و علف‌کش‌ها مهم‌ترین عامل محدودیت‌زا بوده که استفاده از این منابع را با محدودیت مواجه می‌سازد. درحالی‌که زمینه فاضلاب‌های صنعتی با توجه به کیفیت این منابع و وجود فلزات سنگین، ترکیبات شیمیایی و نوسانات شدید pH و قلیائیت برای استفاده در آبی‌پروری توصیه نمی‌گردد.

فاضلاب ممکن است به دو صورت مستقیم (تصفیه نشده) یا غیرمستقیم (استفاده از فاضلاب تصفیه‌شده) به‌عنوان باروری استخرهای پرورش ماهی استفاده شود. در مواردی ممکن است فاضلاب تصفیه‌شده به جریان‌های سطحی که محل پرورش آبزیان است هدایت شود (Hoseinian, 2002). گاهی مصارف غیرمستقیم فاضلاب ۲۰ تا ۴۰ درصد جریان‌های بعضی رودخانه‌ها را تشکیل می‌دهد. در لندن رودخانه تایمز که ۷۵٪ آب مصرفی مورد نیاز شهر لندن را تأمین می‌کند، محتوی ۱۴ درصد فاضلاب است. یا در هلند گاهی ۱۰۰ درصد رودخانه راین را فاضلاب تشکیل می‌دهد (Hoseinian, 2002). مهم‌ترین عامل محدودیت‌زای کیفی در استفاده از فاضلاب‌های خانگی جهت استفاده در محیط‌زیست، کلی‌فرم‌های مدفوعی و برخی مواد مضر سمی، در استفاده از پساب‌های کشاورزی بقایای سموم و علف‌کش‌ها و در استفاده از فاضلاب‌های صنعتی بسته به نوع صنعت، غلظت فلزات سنگین و مواد آلی می‌باشد.

طبق توصیه کمیته استاندارد فاضلاب سازمان مدیریت و برنامه‌ریزی، تا زمانی که اندازه‌گیری‌های واقعی از مقدار فاضلاب شهرهای مختلف در ایران برآورد نشود، متوسط رقم ۱۵۰ لیتر سرانه روزانه هر فرد در مصرف آب بوده و با ضریب ۸۰٪ در تولید فاضلاب، سرانه روزانه هر فرد ۱۲۰ لیتر تولید فاضلاب شهری و خانگی در هر روز می‌باشد. امروزه بیش از ۹۰ درصد تصفیه‌خانه‌های فاضلاب شهرهای مختلف کشور از نوع برکه‌های تثبیت بوده و به‌طور مداوم فاضلاب تصفیه‌شده این مراکز تصفیه‌خانه وارد منابع آب‌های سطحی یا چاه‌های جاذب برای تزریق به منابع آب‌های زیرزمینی می‌شود (Hoseinian, 2002). معمولاً در تصفیه‌خانه‌های شهری طی سه مرحله تصفیه فیزیکی، شیمیایی و زیستی کارایی تصفیه در حذف بسیاری از ناخالصی‌های فاضلاب مناسب می‌باشد، اما ترکیباتی مانند فلزات سنگین، سیانیدها، THMs و بسیاری از ترکیبات مضر دیگر همچنان در پساب خروجی از تصفیه‌خانه وجود دارند که علاوه بر اثرات زیست‌محیطی بر موجودات زیستی نیز اثرات منفی و استرسی دارند. این مطالعه باهدف بررسی اثرات مزمن تحت استرسی غلظت‌های مختلف پساب خروجی از تصفیه‌خانه فاضلاب شهری به مدت دو ماه بر هورمون استرسی کورتیزول، شاخص‌های خون‌شناسی و بافت‌های کبد و آب‌شش ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

تعداد ۱۲۰ قطعه ماهی کپور معمولی در محدوده وزنی ۱۲۰ گرم از مرکز تکثیر و پرورش چپکرد واقع در بابلسر تهیه و به آزمایشگاه تکثیر و پرورش آبزیان دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران منتقل گردید. ماهیان به مدت یک هفته به‌منظور سازش با شرایط جدید نگهداری شدند. سپس حدود ۱۰۰۰ لیتر فاضلاب از خروجی تصفیه‌خانه شهر قدس به آزمایشگاه تکثیر و پرورش آبزیان دانشکده منابع طبیعی انتقال داده شد. طبق نتایج آزمایشگاه تصفیه‌خانه و تأیید مجدد اندازه‌گیری در آزمایشگاه آب دانشکده منابع طبیعی، شاخص‌های فاضلاب تصفیه‌شده خروجی از تصفیه‌خانه به ترتیب شامل BOD:

² World Health Organization

۱۹/۶ میلی‌گرم در لیتر، COD: ۳۲/۶ میلی‌گرم در لیتر، TSS: ۲۱/۷ میلی‌گرم در لیتر، $T^{\circ}C$: ۲۴ درجه سانتی‌گراد و NO_3 : ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر بود.

بعد از گذراندن دوره سازگاری، ماهیان در ۵ تیمار و سه تکرار به‌صورت تصادفی و با میانگین وزنی 5 ± 120 در مخازن ۶۰ لیتری تیمار بندی شدند. در هر تیمار ۸ قطعه ماهی کپور معمولی قرار داده شد و تیمارها شامل تیمار شاهد یا فاقد فاضلاب، تیمار ۲۵٪، تیمار ۵۰٪، تیمار ۷۵٪ و تیمار ۱۰۰٪ بود. در طول دوره دو ماهه تحقیق تعویض پساب موجود در مخازن وجود نداشت و برای جلوگیری از ایجاد آلودگی توسط غذای مصرف نشده در محیط مخازن ماهیان در تمامی تیمارها به‌صورت مساوی و روزانه یک‌بار با پلیت تجاری کپور غذادهی شدند و میانگین دمای تیمارها در طول مدت آزمایش 23 ± 2 بود. همچنین با ماندگی ماهیان نیز روزانه مورد بررسی قرار گرفت. در پایان آزمایش، خون‌گیری از ماهیان (از هر تیمار ۳ ماهی به‌صورت تصادفی) انجام شد. به این صورت که پس از بی‌هوش نمودن ماهیان با محلول پودر گل میخک، از سیاهرگ ساقه دمی توسط سرنگ ۲/۵ سی‌سی انجام شد (Torrecillas et al., 2011). خون‌گیری به میزان ۱/۵ سی‌سی انجام شد و از این مقدار، ۱ سی‌سی به میکروتیوب و مابقی به ویال حاوی ماده ضد انعقاد هپارین منتقل گردید. نمونه‌های موجود در میکروتیوب به سانتریفیوژ آزمایشگاه ژنتیک گروه شیلات دانشگاه تهران به‌منظور جداسازی سرم پلاسما منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و سرم پلاسما با سمپلر به میکروتیوب‌های دیگر برای اندازه‌گیری هورمون کورتیزول منتقل گردید. نمونه‌های موجود در ویال هپارین نیز به‌منظور بررسی فاکتورهای خون شامل هماتوکریت، (Hct) هموگلوبین (Hb)، تعداد گلبول‌های قرمز (RBC)، تعداد گلبول‌های سفید (WBC) و شاخص‌های متوسط هموگلوبین گلبولی (MCH)، حجم متوسط گلبولی (MCV) و غلظت متوسط هموگلوبین داخل گلبول قرمز (MCHC) مورد استفاده قرار گرفتند.

گلبول قرمز با محلول Lewis و لام نتوبار شمارش شده است. گلبول سفید به کمک محلول Lewis در ۰/۱ گرم (Brilliantcrystal blue) به کمک ملانزور و لام نتوبار شمارش شده است. هموگلوبین (HB) با واحد گرم در دسی‌لیتر با استفاده از محلول درابکین (سیانومت هموگلوبین) در طول موج ۵۴۰ نانومتر با استفاده از منحنی استاندارد اندازه‌گیری شده است. هماتوکریت با سانتریفیوژ Nuve در دور ۱۴۰۰۰ rpm اندازه‌گیری شده است. تشخیص افتراقی با رنگ‌آمیزی گیمسا انجام گرفته است. شاخص‌های MCH، MCV و MCHC به ترتیب طبق فرمول‌های ۱، ۲ و ۳ محاسبه شدند (Henry, 1996).

$$\text{فرمول ۱: } MCV \text{ (fL)} = [\text{Hct/RBC (per million)}] \times 10$$

$$\text{فرمول ۲: } MCH \text{ (pg)} = [\text{Hb/RBC (per million)}] \times 10$$

$$\text{فرمول ۳: } MCHC \text{ (\%)} = (\text{Hb/HCT}) \times 100$$

اندازه‌گیری هورمون کورتیزول خون از روش رادیوایمونواسی (RIA) با استفاده از دستگاه اتوماتیک Gamma counter مدل L.K.B ساخت کشور فنلاند و با به‌کارگیری کیت‌های هورمونی ایمونوتک (Immonotech) ساخت کشور فرانسه انجام گردید. به این منظور ابتدا ۱۰ میکرولیتر از پلاسما و ۵۰۰ میکرولیتر از هورمون کورتیزول نشان‌دار به میکروتیوب‌های موجود در کیت اضافه و سپس میکروتیوب‌ها پس از ورتکس شدن، به مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. سپس محتوای میکروتیوب‌ها خالی شده و پس از خشک شدن میکروتیوب‌ها، مقدار تشعشعات گامای آن‌ها در دستگاه Gamma counter اندازه‌گیری گردید.

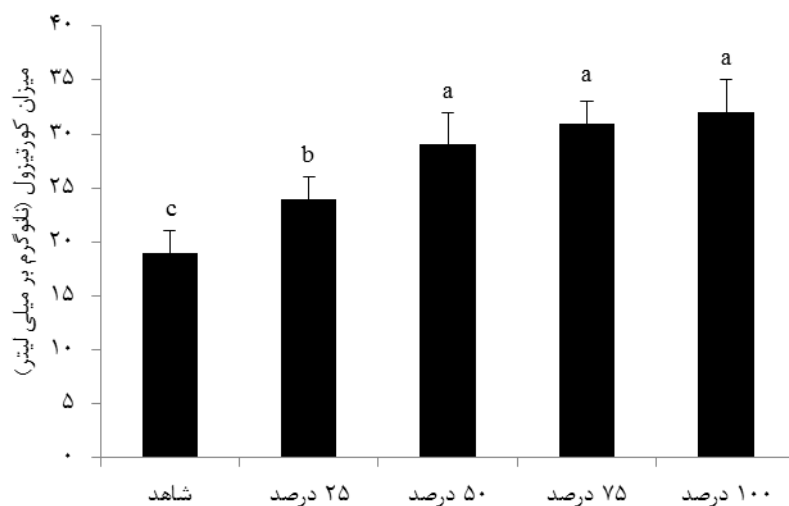
بعد از اتمام خون‌گیری قسمتی از بافت کبد و آب‌شش برداشته شده و تا زمان آماده‌سازی در محلول اتانول ۷۰٪ فیکس شدند. پس از طی مراحل اولیه آماده‌سازی، بافت وارد دستگاه آماده‌سازی یا Tissue Processor شد. بافت موردنظر توسط دستگاه به‌طور اتوماتیک آبگیری و شفاف شده و در نهایت درون گزیلول و پارافین آماده قالب‌گیری قرار داده شد. بافت به دست آمده از دستگاه Tissue Processor به دستگاه Dispenser برای قالب‌گیری انتقال داده شد و توسط قالب‌های مخصوص و پارافین ذوب شده توسط دستگاه Dispenser قالب‌گیری شدند و سپس به فریزر منتقل شدند تا منجمد گردد. سپس با استفاده از

دستگاه میکروتوم بافت‌ها را برش داده و درون آب الکل ۵۰٪ قرار گرفته تا چروک‌های آن باز شود. قسمت‌های مورد نظر از برش بافتی را توسط لام از آب الکل ۵۰٪ برداشته و در سطح آب ولرم درون Tissue Flot قرار داده و توسط لام، بخش‌های مورد نظر از آن برداشته شد. لام‌های آماده را به دستگاه فور ۱۰۰ درجه منتقل نموده و ۱۰ دقیقه صبر کرده تا پارافین اضافی خارج شده و بافت روی لام بچسبد. سپس لام‌ها برای مطالعات بافت‌شناسی به وسیله هماتوکسلین-اوتوزین (Poosti *et al.*, 2000) رنگ‌آمیزی شدند و مقاطع تهیه شده با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند.

آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۷ و به‌منظور تحلیل داده‌های جمع‌آوری‌شده از آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون دانکن در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ برای بیان معنی‌دار بودن و یا نبودن اختلاف میانگین تیمارها با یکدیگر استفاده شد. جهت رسم نمودارها نیز از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

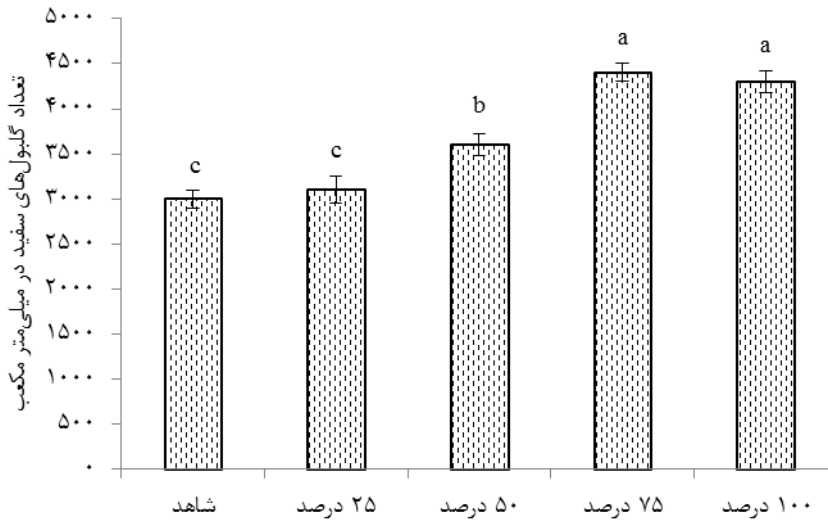
نتایج

بر اساس هدف کلی تحقیق، با توجه به اهمیت استفاده از گونه‌های آبزیان در کاهش مواد جامد معلق و مواد آلی کربنی پساب تصفیه‌خانه، اثرات زیستی و تاکسولوژیک غلظت‌های مختلف پساب خروجی از تصفیه‌خانه بر سلامت زیستی فاکتورهای خون‌شناسی و بافت‌شناسی ماهی کپور معمولی مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به تأثیرپذیری بالای گوشت ماهی کپور معمولی از شرایط محیط اطراف، تغذیه این ماهیان جهت مصارف انسانی توصیه نمی‌شود و با انجام تحقیقات تکمیلی آلودگی میکروبی و تاکسولوژیک بافت‌های این ماهیان، می‌توان در صورت تولید انبوه در پساب تصفیه‌خانه شهری جهت تولید پودر ماهی و در خوراک آبزیان و طیور مورد مصرف قرار گیرد. در این تحقیق در طول دوره آزمایش که به مدت دو ماه، ماهیان در مواجهه با غلظت‌های مختلف فاضلاب خروجی از فاضلاب شهری بودند، تیمارهای شاهد، ۲۵٪ و ۵۰٪ هیچ تلفاتی نداشتند و فقط تیمارهای ۷۵٪ (۱۶ درصد) و تیمار ۱۰۰٪ (۸ درصد) تلفات داشتند. همچنین طبق نتایج میزان کورتیزول ماهی کپور معمولی با افزایش غلظت فاضلاب به‌طور معنی‌داری ($p < 0/05$) افزایش یافته است که در شکل ۱ نشان داده شده است.

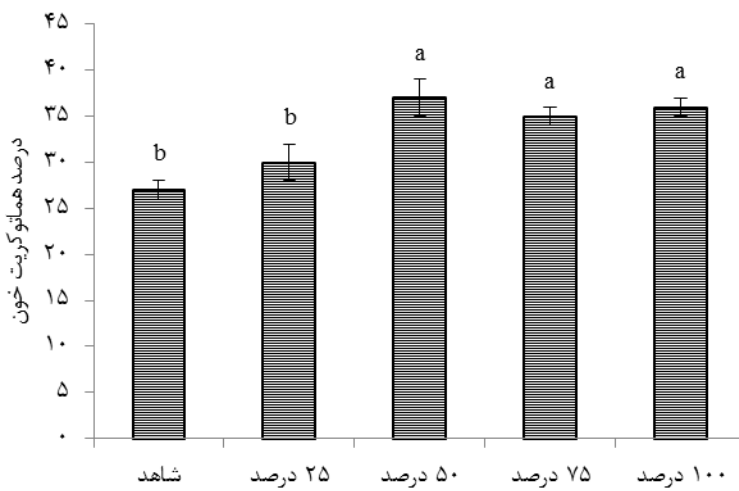


شکل ۱. تغییرات میانگین (انحراف معیار ± میانگین) مقایسه نتایج میزان کورتیزول ماهی کپور معمولی در تیمارهای مختلف فاضلاب. حروف لاتین متفاوت بیان‌گر اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.

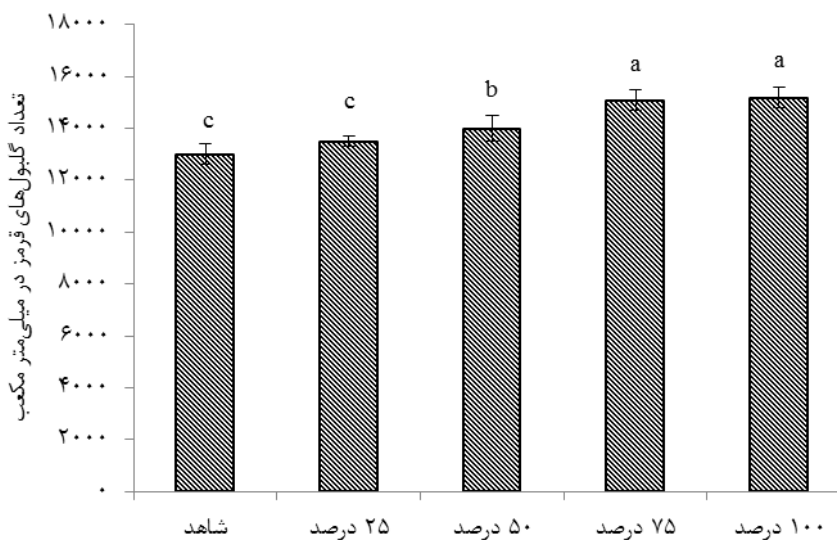
نتایج حاصل از آنالیز شاخص‌های خون‌شناسی که در شکل‌های ۲ تا ۶ آورده شده‌اند، نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های شاهد و تیمار ۱۰۰٪ فاضلاب در میزان هماتوکریت (HCT)، هموگلوبین (HB)، حجم متوسط گلبولی (MCV)، تعداد گلبول‌های قرمز (RBC) و تعداد گلبول‌های سفید (WBC) وجود داشت ($p < 0/05$). اما بین میزان متوسط هموگلوبین گلبولی (MCH) و غلظت متوسط هموگلوبین داخل گلبول قرمز (MCHC) در هیچ‌یک از تیمارها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد که در جدول ۱ آورده شده است.



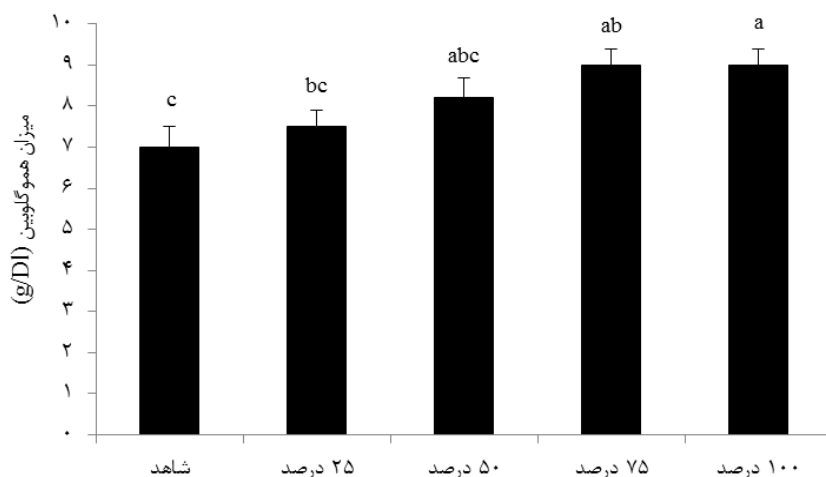
شکل ۲. تغییرات میانگین (انحراف معیار \pm میانگین) میزان گلبول‌های سفید خون ماهی کپور معمولی در غلظت‌های مختلف فاضلاب. حروف لاتین متفاوت بیان‌گر اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.



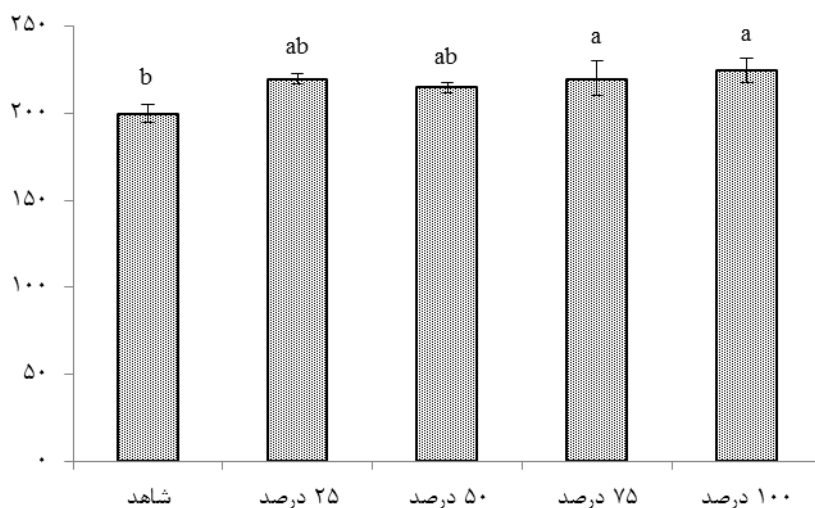
شکل ۳. تغییرات میانگین (انحراف معیار \pm میانگین) میزان هماتوکریت خون ماهی کپور معمولی در غلظت‌های مختلف فاضلاب. حروف لاتین متفاوت بیان‌گر اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.



شکل ۴. تغییرات میانگین (انحراف معیار \pm میانگین) میزان گلبول‌های قرمز خون ماهی کپور معمولی در غلظت‌های مختلف فاضلاب. حروف لاتین متفاوت بیان‌گر اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.



شکل ۵. تغییرات میانگین (انحراف معیار \pm میانگین) میزان هموگلوبین خون ماهی کپور معمولی در غلظت‌های مختلف فاضلاب. حروف لاتین متفاوت بیان‌گر اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.

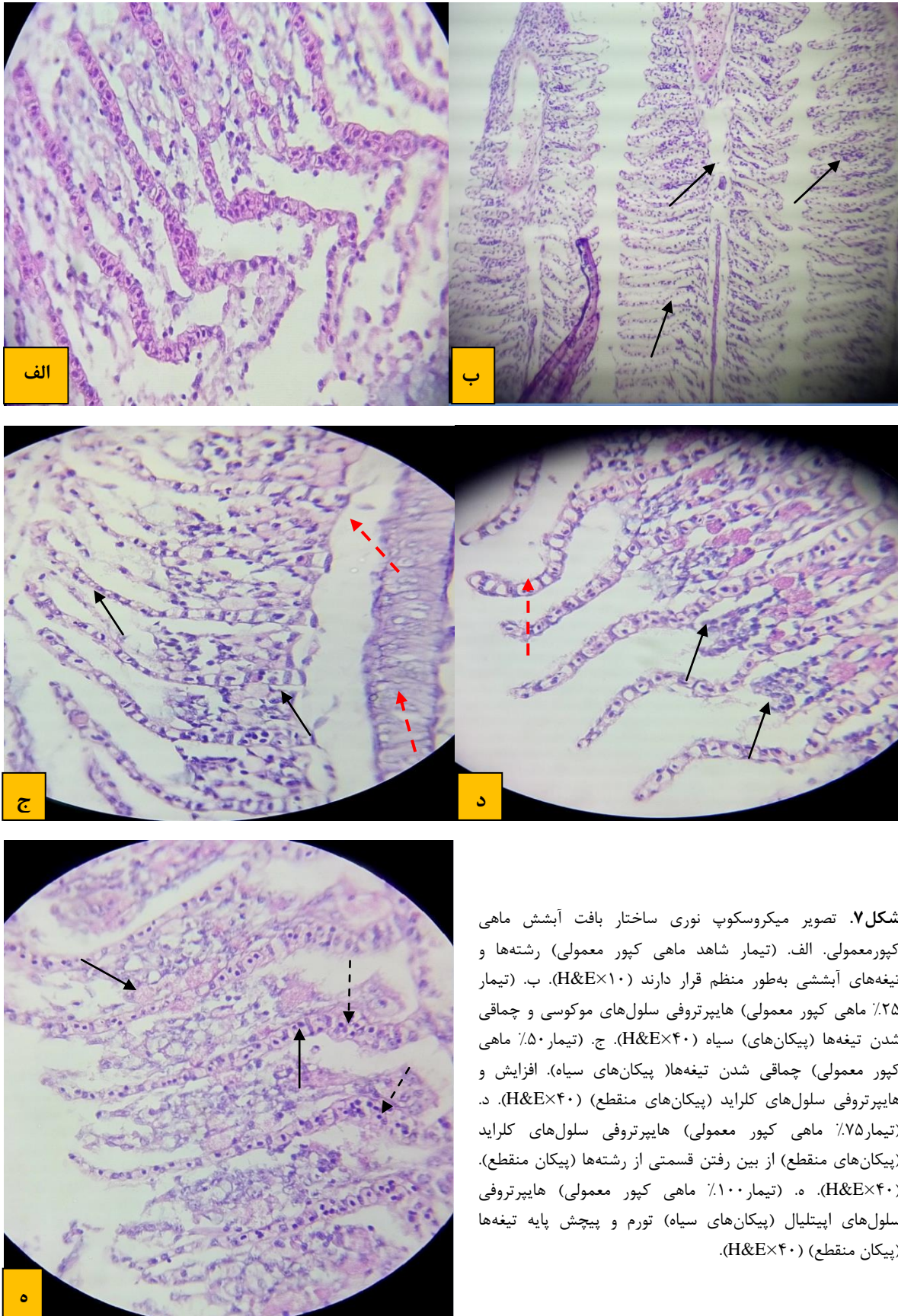


شکل ۶. تغییرات میانگین (انحراف معیار \pm میانگین) حجم متوسط گلبولی خون ماهی کپور معمولی در غلظت‌های مختلف. حروف لاتین متفاوت بیان‌گر اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.

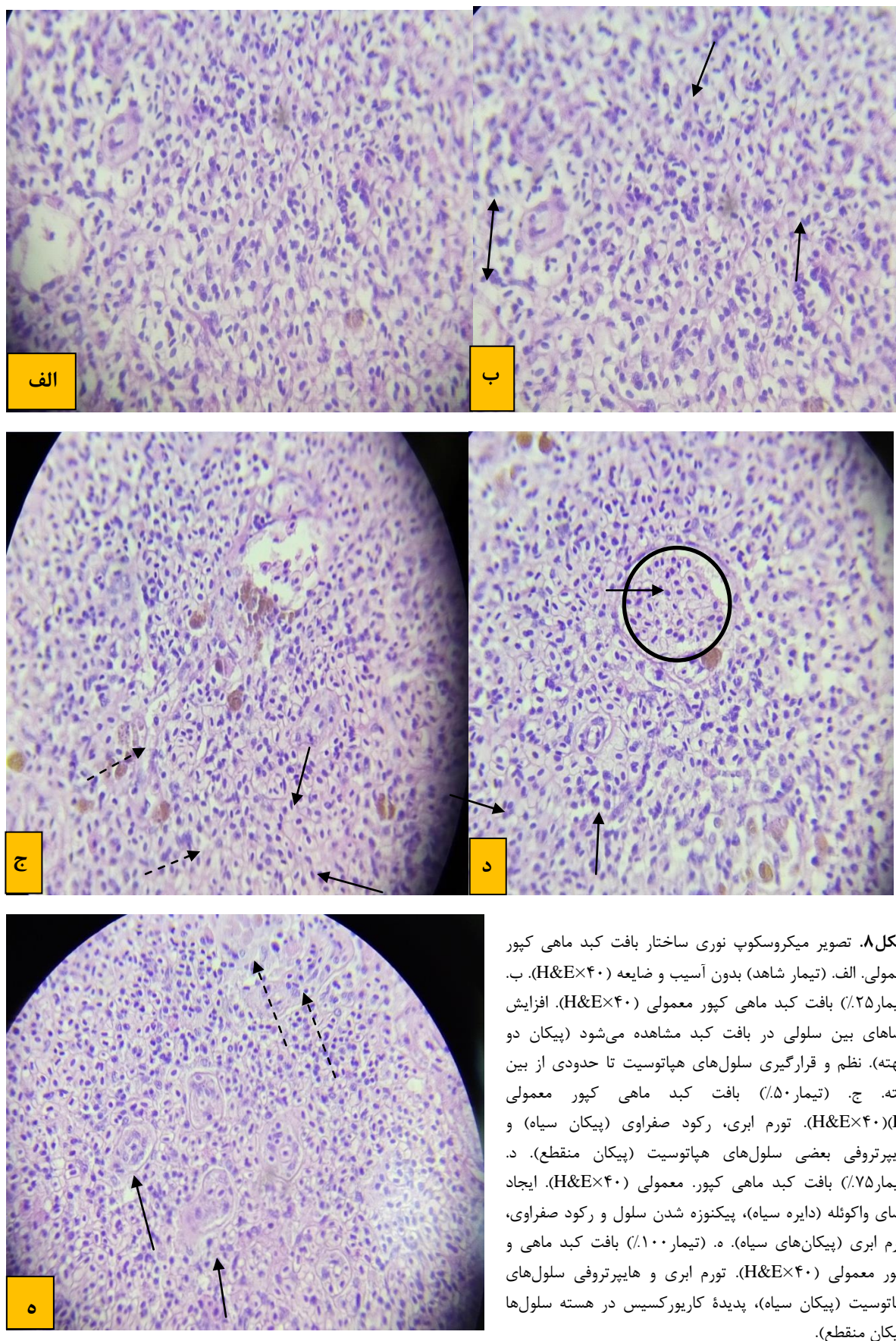
جدول ۱. تغییرات میانگین (انحراف معیار \pm میانگین) هموگلوبین گلبولی و غلظت متوسط هموگلوبین داخل گلبول قرمز خون در ماهی کپور معمولی.

تیمارها	MCH (Pg)	MCHC (g/dl)
تیمار شاهد	۵۴±۲	۲۵±۱
تیمار ۲۵٪ فاضلاب	۵۴±۲	۲۴±۲
تیمار ۵۰٪ فاضلاب	۵۵±۲	۲۵±۱
تیمار ۷۵٪ فاضلاب	۵۶±۲	۲۵±۲
تیمار ۱۰۰٪ فاضلاب	۵۴±۲	۲۵±۱

تغییرات هیستوپاتولوژیک آب‌شش ماهی کپور معمولی در گروه‌های مختلف آزمایشی نشان داده شده است. در تیمار شاهد رشته‌ها و تیغه‌های آبششی به‌طور منظم قرار داشتند و ضایعات خاصی مشاهده نشد. اما در تیمارهای آلوده به فاضلاب اغلب ضایعاتی مانند چماقی شدن انتهای تیغه‌ها، هیپرپلازی سلول‌های پوششی، هایپرتروفی سلول‌های موکوسی، افزایش سول‌های کلراید، تورم و پیچش پایه تیغه‌ها که این ضایعات در تیمارهای با غلظت ۱۰۰٪ و ۷۵٪ نمود بیشتری داشت (شکل ۷). نتایج حاصل از بررسی تأثیر فاضلاب در غلظت‌های مختلف بر بافت کبد ماهی کپور معمولی نشان داد که در گروه‌های شاهد هیچ‌گونه آسیب جدی مشاهده نشد. اما در سایر تیمارها اثراتی داشت شامل بر هم خوردن نظم سلول‌های هیپاتوسیت، آتروفی (کوچک شدن سلول‌های هیپاتوسیت)، هایپرتروفی، تورم ابری، رکود صفراوی، کاریورکسیس و پیکنوزیس می‌باشد (شکل ۸).



شکل ۷. تصویر میکروسکوپ نوری ساختار بافت آبشش ماهی کپور معمولی. الف. (تیمار شاهد ماهی کپور معمولی) رشته‌ها و تیغه‌های آبششی به‌طور منظم قرار دارند ($H\&E \times 100$). ب. (تیمار ۲۵٪ ماهی کپور معمولی) هایپرتروفی سلول‌های موکوسی و چماقی شدن تیغه‌ها (پیکان‌های سیاه $H\&E \times 40$). ج. (تیمار ۵۰٪ ماهی کپور معمولی) چماقی شدن تیغه‌ها (پیکان‌های سیاه)، افزایش و هایپرتروفی سلول‌های کلراید (پیکان‌های منقطع) ($H\&E \times 40$). د. (تیمار ۷۵٪ ماهی کپور معمولی) هایپرتروفی سلول‌های کلراید (پیکان‌های منقطع) از بین رفتن قسمتی از رشته‌ها (پیکان منقطع). ه. (تیمار ۱۰۰٪ ماهی کپور معمولی) هایپرتروفی سلول‌های اپیتلیال (پیکان‌های سیاه) تورم و پیچش پایه تیغه‌ها (پیکان منقطع) ($H\&E \times 40$).



بحث

هورمون کورتیزول به‌عنوان یکی از بهترین شاخص‌ها برای سنجش قدرت تحمل تغییرات و استرس‌ها در شرایط اکولوژیکی و محیطی در ماهیان مطرح است. محیط زندگی و شرایط پرورش ماهی‌ها، محتویات و متابولیت‌های خون آن‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Bullis, 1993). استرس نیز که می‌تواند ناشی از عوامل محیطی و آلاینده‌ها باشد، تغییرات زیادی در سطح هورمون‌ها، پروتئین‌ها، قند، کلسترول و دیگر ترکیبات پایه‌ای خون ایجاد می‌کند (Bahmani et al., 2001). در مطالعه حاضر با توجه به نتایج شکل ۱ مشخص شده است که با افزایش غلظت فاضلاب میزان هورمون کورتیزول در ماهی کپور معمولی روند افزایشی داشته است ($p < 0.05$) که این افزایش از لحاظ آماری معنی‌دار بوده و حاکی از واکنش فیزیولوژیکی ماهیان نسبت به شرایط استرس‌زا می‌باشد. می‌توان گفت تحت شرایط استرس، ACTH³ مترشح از هیپوتالاموس به قسمت قدامی کلیه وارد و با تحریک سلول‌های بین کلیوی سبب ترشح کورتیزول می‌شود (Kubilay and Ulukay, 2002). در تحقیقی که به بررسی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نوجوان قرار گرفته در معرض فاضلاب انجام شد، تغییرات متابولیکی مورد مطالعه قرار گرفت که بر اساس شواهد، قرار گرفتن در معرض فاضلاب شهری بر کورتیزول و پاسخ قند خون تأثیر داشت و باعث افزایش هورمون کورتیزول و قند خون شد که با نتایج حاضر مطابقت داشت (Jennifer et al., 2012). همچنین در مطالعه Bernet و همکاران در سال ۲۰۰۰ که تأثیر فاضلاب بر سلامت ماهی قزل‌آلای قهوه‌ای رودخانه بررسی کردند نشان داد که میزان هورمون کورتیزول پس از مواجهه ماهی در فاضلاب به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است که با نتایج حاضر مطابقت دارد.

فاکتورهای خون‌شناسی در ماهی به‌عنوان نشانگرهای فیزیولوژیکی واکنش به استرس بسیار استفاده می‌شوند (Cataldi et al., 1998) هماتوکریت خون به‌عنوان یکی از مهم‌ترین شاخص‌ها در تعیین سلامت و بیماری ماهیان مورد استفاده قرار می‌گیرد (Houston and Rupert, 1976). نتایج این پژوهش با یافته‌های Benfey و Biron در سال ۲۰۰۰ مطابقت دارد. آن‌ها ذکر کردند که بررسی‌های هماتولوژیک می‌تواند اطلاعات ارزشمندی را در رابطه با حد تحمل جانوران در برابر شاخص‌های استرس‌زا ارائه نماید. روند تغییرات گلبول‌های قرمز از روی هماتوکریت ارزیابی می‌گردد، همچنین هموگلوبین خود شاخص مناسبی جهت تعیین پدیده غلیظ شدن و یا رقیق شدن خون در زمان رویارویی ماهیان با استرس حاد (نظیر آلودگی) می‌باشد. علت افزایش هموگلوبین یا هماتوکریت در طول استرس می‌تواند ناشی از یکی از عوامل ۱- کاهش حجم پلاسما ۲- تورم گلبول‌های قرمز و ۳- آزاد شدن تعداد بیشتری اریتروسیت در خون از بافت‌های خون‌ساز باشد. تغییر هر یک از شاخص‌های فوق منجر به تغییر هماتوکریت می‌شود و تنها تغییر در حالت ۱ و ۳ قادر به تغییر غلظت هموگلوبین خون است (Benfey and Biron, 2000). در تحقیقی که Makvandi و همکاران (۲۰۱۲) به بررسی تأثیر استرس شوری بر مقادیر هموگلوبین و هماتوکریت ماهی کپور علفخوار انگشت‌قد پرداختند، مشاهده کردند که افزایش شوری تا ۳ گرم در لیتر، این فاکتورها را تحت تأثیر قرار نداد اما شوری‌های بالاتر (۶ و ۹ گرم در لیتر) تأثیر منفی بر هماتوکریت و هموگلوبین بدن گذاشتند. همچنین این ماهیان علائم بی‌قراری از خود نشان می‌دادند و تمایل به پرش از مخزن داشتند که نشان از شرایط استرسی بالا برای ماهیان بوده است و با نتایج ما مطابقت ندارد. به‌طور معمول در صورت مواجهه جاندار با شرایط استرس تعداد گلبول‌های سفید افزایش یافته که به این پدیده لکتوسیتوزیس گفته می‌شود. اما در صورت رویارویی جاندار با شرایط استرس‌های حاد، به‌طور معمول تعداد آن‌ها کاهش یافته که به این حالت لکوپنیا گویند (Benfey and Biron, 2000). در این آزمایش با توجه به شکل ۱ که نشان دهنده تغییرات کورتیزول در غلظت‌های مختلف فاضلاب است، مشاهده می‌شود که میزان کورتیزول سیر صعودی داشته و با افزایش غلظت فاضلاب میزان کورتیزول هم افزایش یافته است که نشان می‌دهد مواجهه با فاضلاب برای ماهیان یک شرایط استرسی بوده است. از طرفی با توجه به اینکه تعداد گلبول‌های سفید طبق شکل ۲ افزایش یافته است (لکتوسیتوزیس صورت گرفته) می‌توان نتیجه گرفت که شرایط استرسی حاد نبوده است. همچنین طبق نتایج شکل‌های ۳ تا ۵ مشاهده می‌شود که با افزایش غلظت فاضلاب، میزان گلبول قرمز، هماتوکریت، هموگلوبین افزایش یافته است. با توجه به موارد گفته شده این افزایش ناشی از قرارگیری در یک شرایط تنش‌زا و استرسی می‌باشد. شاخص‌های

³ Adrenocorticotropic Hormone

MCH، MCV و MCHC که تابعی از تعداد گلبول‌های قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین هستند، با تغییر در مقدار این فاکتورها تغییر می‌یابند که در این بین میزان MCV (متوسط حجم گلبولی) با بالا رفتن غلظت فاضلاب افزایش یافت که نشان دهنده بزرگ‌تر شدن سلول‌ها نسبت به گروه‌های دیگر است. به عبارت دیگر می‌توان این‌گونه بیان داشت که با افزایش سرعت تکثیر سلول‌ها، گلبول‌ها با اندازه بزرگ‌تری به داخل خون آزاد شده‌اند. با توجه به روند افزایشی تعداد گلبول‌های قرمز و هموگلوبین تحت تأثیر غلظت‌های مختلف فاضلاب، شاخص MCH تغییرات خاصی را نداشت که نشان می‌دهد میزان هموگلوبین درون گلبول‌ها نسبت به همدیگر تفاوت معنی‌داری ندارد و گلبول‌های قرمز و هموگلوبین تقریباً به یک نسبت زیاد شدند. به عبارت دیگر می‌توان گفت سرعت تکثیر گلبول قرمز با سرعت سنتز هموگلوبین بین همه تیمارها تقریباً یکسان بوده است. از طرف دیگر با افزایش میزان هموگلوبین و هماتوکریت تحت تأثیر غلظت‌های مختلف فاضلاب بین تیمارهای مختلف، شاخص MCHC هم مانند MCH تغییرات خاصی نداشت و بین گروه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری دیده نشد که نشان می‌دهد هماتوکریت و هموگلوبین به یک نسبت زیاد شده‌اند. در مقابل روند ثابت MCHC، افزایش هر دو پارامتر هموگلوبین و هماتوکریت نشان می‌دهد که اگرچه میزان هموگلوبین نسبت به سایر تیمارها افزایش یافته ولی مقدار آن نسبت به حجم خود گلبول تغییری نکرده است. در واقع با افزایش حجم سلول‌ها میزان هموگلوبین درون آن‌ها نسبت به حجم‌شان تقریباً یکسان بوده است.

تغییرات بافت‌شناسی در موجودات زنده در اثر محرک‌های داخلی و خارجی ایجاد می‌شود که در نتیجه آشفستگی در سطح مولکولی و سازمان‌دهی زیستی رخ می‌دهد. بررسی بافتی، پارامتری جامع است که به‌صورت کامل وضعیت سلامت ماهی را مشخص می‌کند و می‌تواند وجود بیش از حد قابل قبول ماده آلاینده در محیط‌زیست طبیعی را مشخص نماید (Hinton and Lauren, 1990; Van der Oost *et al.*, 2003). مطالعات رفتاری، الگوهای شنا، الگوهای تنفسی، عکس‌العمل‌های داخلی و خارجی بدن روش مناسبی برای ارزیابی پاسخ موجود به استرس‌های محیطی است (Kane and Salierno, 2005). درحالی‌که بررسی هیستوپاتولوژی یک وسیله مناسب برای تعیین تغییرات مورفولوژیکی است (Gernhofer *et al.*, 2000). آب‌شش‌های ماهیان دارای عملکردهای مختلفی همچون تبادل گازهای تنفسی، تنظیم اسمزی، دفع نیترژن و تعادل اسید-باز هستند و به جهت این عملکردها، دارای ویژگی‌های خاصی بوده که در تبادل مواد شیمیایی سمی بین ماهی و محیط اثرگذار هستند (Hibiya *et al.*, 1982). همچنین آب‌شش اولین اندامی است که پس از قرار گرفتن در معرض هر گونه ماده خارجی تحریک شده و عکس‌العمل دفاعی نشان می‌دهد (Poosti *et al.*, 2000). آب‌شش‌ها چون دارای موقعیت خارجی بوده و پر خون می‌باشند و تماس بسیار نزدیکی با آب دارند مرتباً تحت تأثیر عوامل و محرک‌های گوناگون محلول و یا معلق در آب قرار دارند و صدمه می‌بینند. به همین دلیل آب‌شش‌ها محیط مناسبی جهت ایجاد ضایعات اولیه می‌باشند. آلاینده‌های موجود در محیط اطراف آبزیان دو نوع تغییر بافتی را در آن‌ها ایجاد می‌کنند که شامل تأثیر مستقیم سموم ناشی از آلاینده‌ها می‌باشد که منجر به تغییرات نکروری و دژنراتیو در آن‌ها می‌شود. برخی ضایعات نیز در اثر مکانیسم‌های دفاعی بافت برای جلوگیری از نفوذ بیشتر آلاینده‌ها می‌شود که شامل تغییرات هیپرپلازی و هایپرتروفی می‌باشد (Fernandes and Mason, 2003; Poleksic and Mitrovic-Tutundzic, 1994). البته اگر مدت زمان برخورد با آلاینده‌ها از محدوده تحمل بیولوژیکی آبزیان فراتر رود، پاسخ‌های دفاعی ممکن است منجر به بروز ناهنجاری‌های برگشت‌پذیر در آبزیان شود (Wedemeyer *et al.*, 1990). در تحقیق حاضر مقایسه بافت آب‌شش ماهیان کپور معمولی در تیمار شاهد با تیمارهای حاوی فاضلاب تغییرات متعددی را نشان داده است که طبق تحقیقات Mallat (۱۹۸۵)، این تغییرات اختصاص به آلاینده خاصی نداشته و با طیف وسیعی از آلاینده‌ها ایجاد می‌شوند که مطابق با تحقیق حاضر بود. این‌گونه تغییرات باعث افزایش فاصله بین جریان آب و خون شده، بنابراین مانند یک سد از ورود آلاینده‌ها جلوگیری می‌کنند (Fernandes and Mason, 2003; Poleksic and Mitrovic-Tutundzic, 1994; Mallat, 1985). به علاوه با افزایش فاصله بین آب و خون، اکسیژن‌گیری مختل می‌شود و ماهی برای جبران کمبود اکسیژن سرعت تنفس را افزایش می‌دهد. این هیپوکسی ایجاد شده ممکن است در برخی موارد منجر به ایجاد تغییرات بافتی شود (Fernandes and Mason, 2003). در تحقیق حاضر با توجه به شکل ۷ مشاهده می‌شود که تیمار شاهد تغییرات خاصی را از خود نشان نداد و آب‌شش‌ها حالت نرمال و طبیعی در هر دو گونه را از خود نشان دادند. با افزایش غلظت فاضلاب در تیمار

۲۵٪ کم کم بروز پدیده چماقی شدن تیغه‌ها و تا حدودی شروع هیپرپلازی سلول‌های موکوسی مشاهده شد در غلظت‌های ۵۰٪ و ۷۵٪ این پدیده‌ها با شدت بیشتری مشاهده شدند و سول‌های کلراید نیز افزایش پیدا کرده بودند. چماقی شدن تیغه‌ها، هیپرپلازی و هایپرتروفی مشاهده شد. در تیمار ۱۰۰٪ هم تورم و پیچش پایه تیغه‌ها نمود پیدا کرده بود. در کل می‌توان گفت که ضایعات ایجاد شده یک پاسخ طبیعی به شرایط محیطی ماهی تحت تأثیر محیط ناشی از فاضلاب بوده و برای جلوگیری از ورود ماده آلاینده و مقابله با آن این پاسخ‌ها در بافت آب‌شش به وجود آمده و آسیب جدی برگشت‌ناپذیر یا نکروز بافتی در هیچ‌کدام از تیمارها مشاهده نشد. Tiyagarajah و همکاران (۱۹۹۶) نشان دادند تغییراتی مانند هیپرپلازی سلول‌های موکوسی، هیپرپلازی سلول‌های کلراید و تکثیر سلول‌های اپیتلیال در آلودگی میکروبی و سایر آلاینده‌ها رخ می‌دهد که با نتایج این تحقیق نیز مطابقت داشت. Martinez و Camargo (۲۰۰۷)، هیپرپلازی سلول‌های اپیتلیال، چسبندگی تیغه‌های آبششی و پرخونی را در آب‌شش یک گونه گرمسیری و دتریت‌خوار *Prchiloduso lineatus* از رودخانه کامب در برزیل که آلوده به فاضلاب‌های کشاورزی، صنعتی و شهری بود مشاهده کردند. در تحقیق Saberi و همکاران (۲۰۱۴) که به مطالعه ضایعات ایجاد شده در آب‌شش ماهی مید (گاریز) تحت تأثیر آلودگی‌های صنعتی و فاضلاب شهری در سواحل غربی بندرعباس انجام شد، ضایعاتی مثل جدایی اپیتلیوم تنفسی و ایجاد فضای ادماتوس، هیپرپلازی سلول‌های اپیتلیال و چسبندگی تیغه‌های آبششی مجاور، چماقی شدن انتهای تیغه‌ها، تغییر در تعداد سلول‌های کلراید و موکوسی و... ایجاد شد. همچنین برخی نمونه‌ها نیز آلوده به انگل بودند.

چند دلیل مهم برای انتخاب کبد به‌عنوان شاخص زیستی نشان دهنده آلودگی‌ها در محیط وجود دارد، از جمله اینکه کبد ماهیان عملکردهایی مانند ذخیره‌سازی نوترینت‌ها، آزادسازی فراورده‌های کاتابولیسیم دیگر بافت‌ها و حفظ همئوستازی بدن با تولید صفرا که نقش مهمی در هضم اسیدهای چرب و دفع متابولیت‌های مسموم کننده دارد را بر عهده دارد. در واقع کبد اندامی است که اعمال مختلفی را در ارتباط با متابولیسیم انجام می‌دهد و از آنجایی که در پروسه‌هایی مثل نقل و انتقالات زیستی شرکت دارد در ماهیان دارای اهمیت بالایی می‌باشد (Rezvani et al., 2006). در مطالعه حاضر با توجه به اشکال ۶ تا ۱۰ بعد از بررسی بافت کبد ماهی کپور معمولی در مواجهه با غلظت‌های مختلف از فاضلاب، در نمونه‌های شاهد تغییر و آسیب پاتولوژیک مشاهده نشد و سلول‌های هپاتوسیت به‌طور منظم و به شکل چند وجهی در اطراف سینوزوئیدها قرار داشتند. اما در تیمارهای حاوی فاضلاب در مقایسه با تیمار کنترل، تفاوت‌هایی مشاهده شد. نتایج این بررسی نشان داد تغییرات هیستوپاتولوژیک در کبد به‌صورت تورم ابری، آتروفی، افزایش فضای بین سلولی، هایپرتروفی سلول‌های هپاتوسیت، ایجاد فضای واکوئله، رکود صفراوی، بر هم خوردن نظم سلولی و پدیده پیکنوزیس و کاریورکسیس هسته بروز پیدا کردند. در واقع با افزایش غلظت فاضلاب، ضایعات ذکر شده نیز بیشتر و واضح‌تر بروز پیدا کردند. همچنین بررسی‌ها نشان داد که در هیچ‌کدام از تیمارها آسیب جدی و برگشت‌ناپذیر وجود نداشته و تغییرات به‌وجود آمده ناشی از قرارگیری ماهی در یک محیط نامتعارف و استرسی و مقابله با شرایط موجود می‌باشد. Barber و همکاران (۲۰۰۶) در تحقیقی به مطالعه بافتی دو ماهی تیلاپیا و گامبوزیا آفینیس قرار گرفته در معرض فاضلاب تصفیه‌شده از فاضلاب پرداختند، تجمع ترکیبات آلی را در بافت و ترکیبات ماهی مشاهده کردند. غلظت عناصر کمیاب و ترکیبات آلی در بافت‌های مختلف متفاوت بود اما در بافت کبد تیلاپیا نسبت به سایر اندام‌ها و بافت‌های دیگر بیشتر بود. در مطالعه Bernet و همکاران (۲۰۰۰) که به بررسی اثر فاضلاب بر سلامت ماهی قزل‌آلای قهوه‌ای پرداخته شد. در این تحقیق ماهیان بالادست و پایین‌دست رودخانه مورد مطالعه قرار گرفتند. تغییر در فاکتورهای خون‌شناسی و بروز ضایعات هیستوپاتولوژیک در کبد و آب‌شش ماهیان مشاهده گردید که در ماهیان پایین دست این تغییرات و علائم شدت بیشتری داشتند. Patricia و همکاران در سال ۲۰۱۴ در تحقیقی به بررسی شواهد مستقیم از تأثیرات هیستوپاتولوژیک تخلیه فاضلاب در ماهی‌های ساکن قطب جنوب پرداختند که در این مطالعه، تغییراتی با درجات و شدت متفاوت در کبد ماهی‌ها رخ داد. آسیب‌هایی که اغلب در بافت کبد مشاهده شد عبارت‌اند از: نکروز همراه با التهاب، حضور چربی، واکوئله شدن، حضور کیست در کبد و ... که در سایت‌های نزدیک به دهانه فاضلاب این آسیب‌ها شدیدتر بود. در تحقیق Askary Sary و Mohammadi (۲۰۱۵) که به بررسی مقایسه فلز آرسنیک در عضله و کبد ماهیان پرورشی کپور

معمولی، کیپور نقره‌ای، کیپور علفخوار و کیپور سرگنده پرداختند، مشاهده شد که میزان این عنصر در کبد این ماهیان بالاتر از عضله بود.

هدف بازچرخانی و مصرف مجدد فاضلاب در پرورش آبزیان در کشورهای مختلف متفاوت است؛ برای کشورهای در حال توسعه، مهم‌ترین انگیزه تولید پروتئین بیشتر است. درحالی‌که در کشورهای توسعه یافته فقط تصفیه فاضلاب برای ممانعت از آلودگی بیشتر است. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که امکان سازگاری و زنده‌مانی گونه کیپور معمولی در پساب خروجی از تصفیه‌خانه شهری وجود دارد و این امکان نیز وجود دارد که از پساب تصفیه‌خانه شهری جهت پرورش ماهیان مناسب و سازگار استفاده کرد. به‌طور کلی بر اساس نتایج تلفات ماهی، غلظت هورمون استرسی کورتیزول، شاخص‌های خون‌شناسی و نتایج بافت‌شناسی در تیمارهای ۷۵٪ و ۱۰۰٪ فاضلاب، برای مباحث مدیریتی پرورش ماهی کیپور معمولی با استفاده از فاضلاب شهری و سلامت زیستی این ماهی، تیمار ۵۰٪ فاضلاب (۵۰٪ آب معمولی) برای پرورش پیشنهاد می‌گردد.

منابع

- Askary Sary, A., Mohammadi, M. 2015. The arsenic survey and comparison accumulation in muscle and liver of economic species (*Cyprinus carpio*, *Hypophthalmichthys molitrix*, *Ctenopharyngodon idella*, *Aristichthys nobilis*, *Oncorhynchus mykiss*) farmed fishes from Iran. *Wetland Ecobiology*. 7(1): 69-76. (in Persian)
- Bahmani, M., Kazemi, R., Donskaya, P. 2001. A comparative study of some hematological features in young reared sturgeons (*Acipenser persicus* and *Huso huso*). *Fish Physiology and Biochemistry*. 24(3): 135-140.
- Benfey, T.C., Biron, M. 2000. Acute stress response in triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Aquaculture*. 184(2): 167-176.
- Bernet, D., Schmidt-Posthaus, H., Wahli, T., Patricia Burkhardt-Holm, P. 2000. Effects of wastewater on fish health: an integrated approach to biomarker responses in brown trout (*Salmo trutta*). *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*. 8(2): 143-151.
- Bullis, R.A. 1993. Clinical Pathology of Temperate Freshwater and Estuarine Fish. In: Stoskopf, M. (ed.). *Fish Medicine*. ART Sciences LLC. pp. 232-239.
- Camargo, M.M., Martinez, C.B. 2007. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. *Neotropical Ichthyology*. 5(3): 327-336.
- Cataldi, E., Di Marco, P., Mandich, A., Cataudella, S. 1998. Serum parameters of Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* (Pisces: Acipenseriformes): effects of temperature and stress. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 121(4): 351-354.
- Costa-Pierce, B.A., Desbonnet, A., Edwards, P., Baker, D. 2005. *Urban Aquaculture*. CABI publishing. 378 p.
- Fernandes, M.N., Mazon, A.F. 2003. Environmental pollution and fish gill morphology. In: Val, A.L., Kapoor, B.G. (eds.). *Fish adaptations*. Enfield, Science Publishers. pp. 184-201.
- Gernhofer, M., Pawert, M., Schramm, E. 2000. Ultrastructural biomarkers as tools to characterize the health status of fish in contaminated streams. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*. 8(3): 241-260.
- Henry, J.B. 1996. *Clinical diagnosis and management by laboratory methods*. Saunders Company press. 1556 p.
- Hibiya, T., Yokote, M., Oguri, M., Sato, H., Takashima, F., Aida, K. 1982. *An atlas of fish histology. Normal and pathological features*. 2nd edition. Gustav Fischer Verlag. 680 p.
- Hinton, D.E., Lauren, D.J. 1990. Liver structural alterations accompanying chronic toxicity in fishes: potential biomarkers of exposure. In: McCarthy, J.F., Shugart, L.R. (eds.). *Biomarkers of Environmental Contamination*. Lewis Publishers. pp. 311-341.
- Hoseinian, M. 2002. Re-use of purified wastewater in agriculture, aquaculture, industry and artificial recharge of groundwater. *Oloome rooz Press*, 240 p. (in Persian)
- Houston, A.H., Rupert, R. 1976. Immediate response of hemoglobin system of gold fish (*Cyprinus auratus*) to tempera change. *Canadian Journal of Zoology*. 54(10): 1737-1741.

- Jennifer S.I., Mathilakath, M.V., Mark, R.S. 2012. Tissue-specific metabolic changes in response to an acute handling disturbance in juvenile rainbow trout exposed to municipal wastewater effluent. *Aquatic Toxicology*. 108(1): 53-59.
- Kane, J.D., Salierno, S.K. 2005. Fish models in behavioral toxicology: automated techniques, updates and perspectives. In: Ostrander G. (ed.). *Methods in Aquatic Toxicology*. Lewis Publishers. pp. 559-590.
- Kubilay, A., Ulukay, G. 2002. The effect of acute stress on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Turkish Journal of Zoology*. 26(4): 249-254.
- Barber, L.B., Keefe, S.H., Antweiler, R.C., Taylor, H.E., Wass, R.D. 2006. Accumulation of Contaminants in Fish from Wastewater Treatment Wetlands. *Environmental Science Technology*. 40(2): 603-611.
- Mallat, J. 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: A statistical review. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 42(4): 630-648.
- Masoudinezhad, M.R., Alinezhad, A., Mohammadi, H., Aghayani, A., Najafi, H., Mehdipour, F., Parseh, A., Fazeli, S. 2011. Using potassium ferrate filtration efficiency for advanced municipal wastewater. *Shahrekord Journal of Medical Sciences*. 15(2): 100-108. (in Persian)
- Makvandi, Z., Koochenin, P., Pashazanoosi, H. 2012. Effect of salinity stress on body composition of silver carp fingerlings (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Journal of Aquatic Animals and Fisheries*. 10(3): 61-68. (in Persian)
- Patricia, A.C., Catherine, K.K., Jonathan, S.S., Julie, A.M. 2014. Direct evidence of histopathological impacts of wastewater discharge on resident Antarctic fish (*Trematomus bernacchii*) at Davis Station, East Antarctica. *Marine Pollution Bulletin*. 87(2): 48-56.
- Poleksic, V., Mitrovic-Tutundzic, V. 1994. Fish gills as a monitor of sub lethal and chronic effects of pollution. In: Müller, R., Lloyd, R. (eds.). *Sub lethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish*. Oxford. Fishing News Books. pp. 339-352.
- Poosti, A., Adibmoradi, M., Fazili, A. 2000. *Comparative Histology*. University of Tehran Press. 458 p. (in Persian)
- Rezvani, G.S., Sharifpour, A., Kazemi, R. 2006. Histo-pathological effects of environmental factors on the Caspian Sea bony fishes (salmon and sea perch). *Iranian Fisheries Research Journal*. 19(4): 77-86. (in Persian)
- Saberi, M., Abdi, R., Morovati, H., Ronagh, M., Deghani, R. 2014. Study of histopathology in gill of *Liza klunzingeri* Caused by industrial and municipal waste water pollution. *Journal of Animal Environment*. 6(3): 225-231. (in Persian)
- Tiyagarajah, A., Hartley, W.R., Major, S.E., Broxon, M.W. 1996. Gill histopathology of two species of Buffalo fish from a contaminated swamp. *Marine Environmental Research*. 42(1): 261-266.
- Torrecillas, S., Makol, A., Caballero, M.J., Montero, D., Gines, R., Sweetman, J., Zquierdo, M.S. 2011. Improved feed utilization, intestinal mucus production and immune parameters in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides (MOS). *Aquaculture Nutrition*. 17(2): 223-233.
- 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(3): 57-149.
- Wedemeyer, G., Barton, B.A., McLeay, D.J. 1990. Stress and acclimation in fishes. In: Schreck, C.B., Moyle, P.B. (eds.). *Methods in fish biology*. American Fisheries Society. pp: 451-489.