ผลกระทบของสารพิษกลุ่ม Organophosphorus ชนิด chlopyrifos ; ความสัมพันธ์ของ detoxifying enzymes กับการเกิดรอยโรคของเนื้อเยื่อของปลาตะเพียนขาวสกุล *Puntius Gonionotus*

Effect of chlorpyrifos on *Puntius Gonionotus*; Relationship of detoxifying enzymes change and Histopathological cause

สิริพร เหลืองสุชนกุล ผกาสินี คล้ายมาลา และมลิสา เวชยานนท์

กลุ่มงานวิจัยผลกระทบจากการใช้วัตถุมีพิษการเกษตร กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร
สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

บทคัดย่อ

การศึกษาผลกระทบของสารพิษกลุ่ม organophosphorus ชนิด chlorpyrifos ในสัตว์น้ำ โดยดำเนินการทดลองในปลาตะเพียนขาว สกุล *Puntius gonionotus verticillata (L.F.) Royle* ในสภาวะจำลองทดสอบโดยให้สารพิษ chlorpyrifos ความเข้มข้น 3 ระดับคือ ระดับต่ำ กลาง และสูง (0.005, 0.05, และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) เป็นเวลา 4 วัน ผลการทดลองพบว่า สารพิษ chlorpyrifos มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด โดยที่ความเข้มข้นของสารพิษ chlorpyrifos ระดับต่ำ (0.005 มิลลิกรัมต่อลิตร) เอนไซม์ Ethoxyresorufin-*O*-Deethylase จะมีการเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน และเอนไซม์ Acetylcholinesterse จะถูกยับยั้งอย่างชัดเจน แต่เอนไซม์ Glutathione-*S*-transferase จะเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนที่ความเข้มข้นของสารพิษ chlorpyrifos ระดับสูง (0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) ส่วนการเกิดรอยโรค(histopathological cause) ในเนื้อเยื่อปลาตะเพียนขาว สามารถพบได้ในทุกระดับความเข้มข้นของ cholrpyrifos โดยในเหงือกปลาพบว่ามีการรวมตัวเซคันดารีลาเมลลา เกิดการเพิ่มจำนวนเซลล์เอพิทีเลียน ในตับพบการเปลี่ยนแปลงคือการเกิดช่องว่างหรือแวคิลโอลในไซโตพลาสซึมของเซลล์และการหดตัวของโครมาตินในนิวเคลียส ในไตพบการเปลี่ยนแปลงคือการหดตัวของโกลเมอรูลัส และการตายของเซลล์บุท่อดิสตอลและพรอกซิมอล ทั้งนี้ความผิดปกติรุนแรงของการเปลี่ยนแปลงพบในปลาตะเพียนขาวที่สัมผัสสารในระดับความเข้มข้นสูง (0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร)

รหัสโครงการ 03-06-54-05-04-04-01-54

คำนำ

ปัญหาการใช้สารเคมีป้องกันและกำจัดศัตรูพืชอย่างไม่ถูกต้อง หรือใช้ในปริมาณมากเกินกำหนด มากกว่าหนึ่งชนิด หรือใช้เป็นระยะเวลายาวนานเกินไปนั้น ผลจากปัญหาที่เกิดขึ้นส่งผลกระทบโดยตรงต่อเกษตรกรและผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในสิ่งแวดล้อมบริเวณพื้นที่เกษตรกรรม เช่น สัตว์น้ำ ซึ่งการตรวจหาผลกระทบของสารพิษในสัตว์น้ำที่ได้รับความนิยมในปัจจุบันนอกจากการตรวจหาปริมาณการสะสมของสารพิษตกค้างแล้วยังมักใช้เทคนิคการตรวจวัดเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกระบวนการเปลี่ยนแปลงความเป็นพิษ(Biotransformationซึ่งมีความจำเพาะต่อชนิดต่อสารพิษที่สิ่งมีชีวิตได้รับ ได้แก่ เอนไซม์ในกลุ่ม Cytochrome-P450 (CYP1A) Glutathione-S-transferase (GST) และ Acetylcholinesterase (AChE) (Deniele Werck-Reichhart. 2001; Milan, 2001; Ron van der Oost, 2003) และการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา ได้แก่ การเกิดรอยโรคในในเนื้อเยื่อ (Histopathology)

chlorpyrifos จัดเป็นสารกำจัดแมลงอยู่ในกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส ที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบัน chlorpyrifos มีความสามารถในการกำจัดแมลงช่วงกว้าง มีความเป็นพิษสูง และตกค้างยาวนาน องค์การอนามัยโลกได้จัดให้ chlorpyrifos อยู่ในประเภทความเป็นพิษลำดับที่ II (อันตรายปานกลาง) ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงทำการทดลองเพื่อศึกษาผลกระทบของ chlorpyrifos ต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำ ได้แก่ ปลาตะเพียนขาว สกุล *Puntius gonionotus* เพื่อหาความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงเอนไซม์กลุ่ม detoxifying enzyme ต่อการเกิดรอยโรคในเนื้อเยื่อของปลาตะเพียนขาวเมื่อได้รับสารพิษ chlorpyrfos ในปริมาณความเข้มข้นที่ต่างกัน ๓ ระดับ ได้แก่ ปริมาณต่ำ (๐.๐๕ มก./ลิตร) กลาง(๐.๕ มก./ลิตร) และสูง (๕ มก./ลิตร)

วิธีดำเนินการ

1. สารเคมี

1.1 สารเคมีสำหรับศึกษาการเปลี่ยนแปลง เอนไซม์กลุ่ม Detoxifying enzymes ได้แก่ di-Potassium hydrogen phosphate Potassium dihydrogen phosphate Ethoxy resorufin β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced (NADPH) 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) Glutathione reduced(GSH) Acetylthiocholine iodide 5,5-Dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) Bio-Quan solution BSA standard protien Primary Secondary Amine (PSA) Glycerol

1.2 สารเคมีสำหรับศึกษาการเกิดรอยโรคบนเนื้อเยื่อ ได้แก่ Ethanol, Xylene, lithium carbonate, Eosin, Hematoxylin, parafin, permount, gelatin

2. วัสดุอุปกรณ์และเครื่องแก้ว

2.1 Gas chromatograph accessories ได้แก่ column, liner, o-ring, septum, injection syringe

2.2 spectrophometer และspectrofluorometer accessories ได้แก่ cuvette, 96-well plate

2.3 Micropipette และpipette tips

2.4 ลูกปลาตะเพียนขาว สกุล *Puntius gonionotus*

2.5 ตู้เลี้ยงปลาและชุดอุปกรณ์เลี้ยงปลา

2.6 หลอดปั่นตกตะกอน ขนาด 1.5, 15, 50 มิลลิลิตร

2.7 เครื่องแก้ว ได้ บีกเกอร์ กระบอกตวง กรวยกรอง หลอดทดลอง ขวดทดลอง

2.8 ชุดอุปกรณ์ย้อมสีเนื้อเยื่อ แผ่นสไลด์แก้วและกระจกปิดสไลด์

3. เครื่องมือ

3.1 Spectrophometer

3.2 Spectrofluorometer

3.3 Ultracentrifuge

3.4 เครื่องตัดเนื้อเยื่อ Microtome

3.5 กล้งจุลทรรศน์ Microscope

3.6 Slide warmer

3.7 Wax dispenser

3.8 pH meter

4. วิธีการทดลอง

4.1 การเปลี่ยนแปลงของ specific enzymes และการเกิดรอยโรคบนเนื้อเยื่อปลาตะเพียนขาว

โดยทดสอบให้ chlorpyrifos ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ ได้แก่ สูง (0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) กลาง (0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) ต่ำ (0.005 มิลลิกรัมต่อลิตร) โดยใช้ปลาจำนวน 10 ตัว เป็นระยะเวลา 3 วัน หลังจากนั้นนำปลาตะเพียนมาผ่าเอาสมองและตับปลามาล้างด้วยสารละลาย physiological saline pH 7.4 เพื่อล้างเลือดและสิ่งสกปรกอื่นๆ จากนั้นชั่งตัวอย่างก่อนสกัด 0.5 กรัม นำชิ้นตัวอย่างที่ชั่งแล้วมาบดในสารละลาย phosphate buffer pH 7.0 ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ หลังบดนำไปปรับปริมาตรเป็น 2 มิลลิลิตร แล้วแบ่งสารละลายดังกล่าวออกเป็น 2 ส่วน โดยตัวอย่างตับให้แบ่งออกเป็นสองส่วนได้แก่

- ส่วนที่ 1 centrifuge ด้วยความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 1.30 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายใสด้านบน นำไปตรวจวัดเอนไซม์ GST อ้างอิงวิธีการของ Habig et al. (1974)
- ส่วนที่ 2 centrifugeด้วยความเร็ว 43,000 g เป็นเวลา 40 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายใสไปด้านบนไป centrifuge ต่อด้วยความเร็ว 100,000 g เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายใสด้านบนทิ้งไป เติม สารละลาย phosphate buffer pH 7.0 ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ และนำไปตรวจวัดเอนไซม์ EROD อ้างอิงและปรับปรุงจากวิธีของ Pohl และ Fouts (1980)
- ส่วนตัวอย่างสมองปลาให้นำไป centrifuge ด้วยความเร็ว 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายใสด้านบนตรวจเอนไซม์ วัด AChE อ้างอิงและปรับปรุงจากวิธีของ Ellman et al. (1961)

4.2 การสกัดสารพิษ chlorpyrifos ในเนื้อปลา ใช้วิธีการของ FEEI SUN (2000)

ชั่งตัวอย่างเนื้อปลาบด 10 กรัม ใส่ขวดปริมาตร 125 มิลลิลิตร เติม acetonitrile 50 มิลลิลิตร สกัดโดยใช้ เครื่อง homogenizer 1 นาที กรองผ่านกระดาษกรองด้วยระบบสุญญากาศ (vacuum pump) ใส่ใน Erlenmeyer flask ล้างขวดใส่ตัวอย่างด้วย acetonitrile 100 มิลลิลิตร ตวงแบ่งสารสกัด 50 มิลลิลิตร ใส่ใน round bottom flask นำไปลดปริมาตรจนเกือบแห้ง เติม acetonitrile 15 มิลลิลิตร นำไปขจัดสิ่งปนเปื้อน (clean up) โดย ใช้ Solid Phase Extraction; SPE ชนิด C18 ต่อกับ SPE ชนิด florisil ที่บรรจุเพิ่มด้วย anh. sodium sulfate 2 กรัม เป็นคอลัมม์สำหรับขจัดสิ่งปนเปื้อน ล้างคอลัมม์ด้วย acetonitrile 6 มิลลิลิตร โหลดตัวอย่างใส่คอลัมม์และปรับอัตราการไหล 3 หยดต่อวินาที ใส่ใน graduated tube ลดปริมาตรสารสกัดด้วย nitrogen evaporator และปรับปริมาตร ด้วย ethyl acetate (PR) ให้ได้ 1 มิลลิลิตร นำไปตรวจวิเคราะห์กลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส โดยใช้เครื่อง GC ชนิด FPD

4.3 การเตรียมเนื้อเยื่อปลาด้วยวิธีการทางไมโครเทคนิคเพื่อศึกษารอยโรค มีขั้นตอนดังนี้

4.3.1 ตัดชิ้นเนื้อเยื่อตับ เงือก และไตปลาตะเพียนขาว หนาขนาด 5 มิลลิเมตร

4.3.2 แช่ใน neutral buffer formalin

4.3.3 แช่ในน้ำยา Bouin's fluid 48 ชั่วโมง

4.3.4 กำจัดน้ำในเนื้อเยื่อออกด้วย ethanol (50, 70, 95, and 100 %) และ xylene

4.3.5 ทำให้เนื้อเยื่อใสด้วย Lithium carbonate solution

4.3.6 ฝังชิ้นเนื่อเยื่อในบล๊อกparaplast

4.3.7 นำบล๊อกเนื้อเยื่อไปตัดหนา 5 ไมครอน ด้วยเครื่องmicrotome

4.3.8 นำชิ้นเนื้อเยื่อที่ตัด ติดบนสไลด์ และนำไปย้อมสี Harris'Haematoxylin และ Eosin

4.3.9 ปิดสไลด์และนำไปตรวจดูความผิดปกติของเนื้อเยื่อใต้กล้องจุลทรรศน์

ระยะเวลา เดือนตุลาคม 2554 ถึง เดือนกันยายน 2555

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยผลกระทบจากการใช้วัตถุมีพิษการเกษตร
กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลของสารพิษ chlorpyrifos ต่อการเปลี่ยนแปลงเอนไซม์ Acetylcholinesterase (AChE) , Ethoxyresorufin-*O*-Deethylase(EROD) และ Glutathione-*S*-transferase(GST)

จากการทดลองให้สารพิษ chlorpyrifos ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ ต่ำ (0.05 มก./ลิตร) กลาง (0.5 มก./ลิตร) และสูง (5 มก./ลิตร) เป็นเวลา 3 วัน ในสภาวะระบบนิเวศน์จำลองที่ประกอบด้วย น้ำ ตะกอน ปลาตะเพียนขาว (ตารางที่ 1) พบว่าการสะสมของสารพิษ chlopyrifos ในปลาเพิ่มขึ้น ตามระดับความเข้มข้นของสารพิษ chlorpyrifos โดยเอนไซม์ EROD และ GST จะมีการเพิ่มขึ้น และ AChE จะถูกยับยั้ง ตามระดับความเข้มข้นของ

สารพิษ chlorpyrifos จะเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบความชัดเจนของการเปลี่ยนแปลงพบว่าเอนไซม์ EROD จะมีการเพิ่มขึ้นแตกต่างกันอย่างชัดเจนที่สุด ซึ่งในภาวะที่สิ่งมีชีวิตได้รับสารพิษปริมาณความเข้มข้นต่ำๆ แต่สามารถตรวจพบการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ อาจบ่งบอกได้ถึงความจำเพาะ (specific) ของเอนไซม์ต่อสารพิษ

ตารางที่ 1 ผลของ chlorpyrifos ที่มีต่อปลาตะเพียนขาว หลังจากให้ chlorpyrifos เป็นเวลา 3 วัน ในสภาวะระบบนิเวศน์จำลอง (จำนวนปลา 10 ตัว)

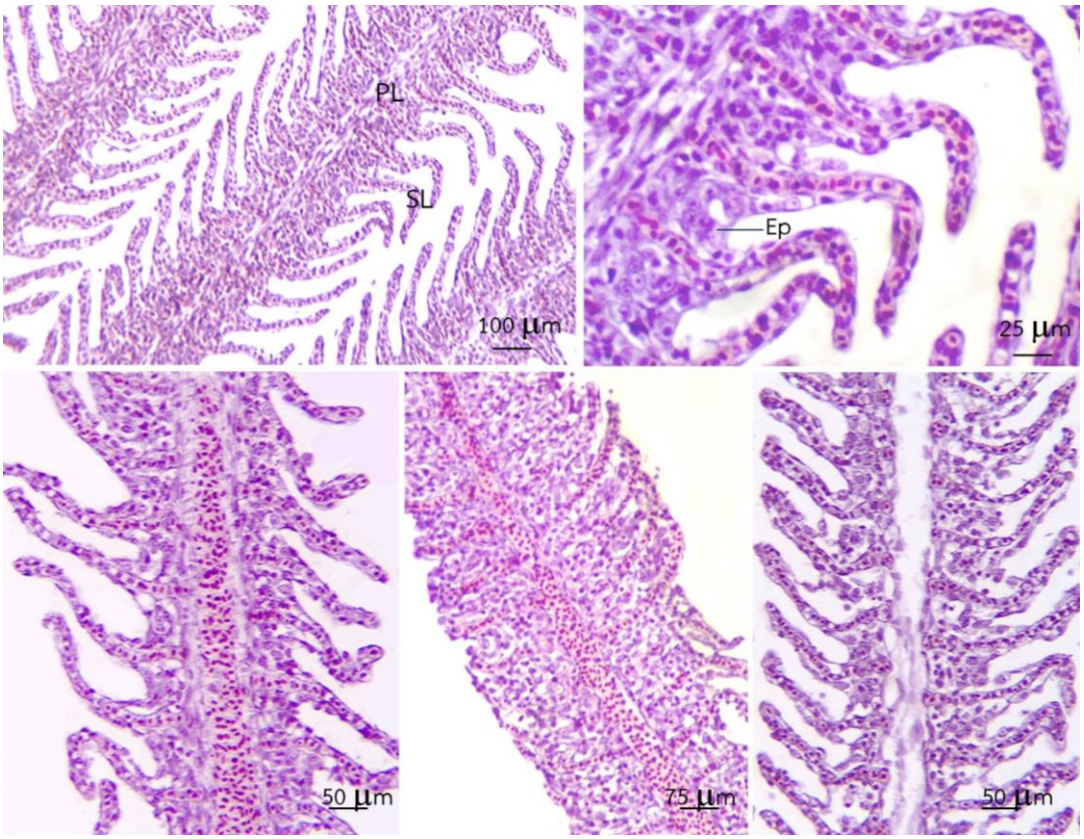
	0 มก./ลิตร (ชุดควบคุม)	0.05 มก./ลิตร (ระดับต่ำ)	0.5 มก./ลิตร (ระดับกลาง)	5 มก./ลิตร (ระดับสูง)
chlorpyrifos ในปลาตะเพียนขาว (มก./กก.)	ไม่พบ*	0.377±0.03	0.939±0.044	1.398±0.097
AChE** (nmole/min/mg protein)	0.29±0.01	0.27±0.02	0.25±0.02	0.13±0.01
GST*** (mmole/min/mg protein)	1.66±0.20	2.18±0.14	2.91±0.33	4.36±0.45
EROD**** (pmole/min/mg protein	0.81±0.011	4.399±0.086	8.585±0.072	14.101±0.12

* ค่าที่วัดได้ต่ำกว่า 0.01 มก./ลิตร

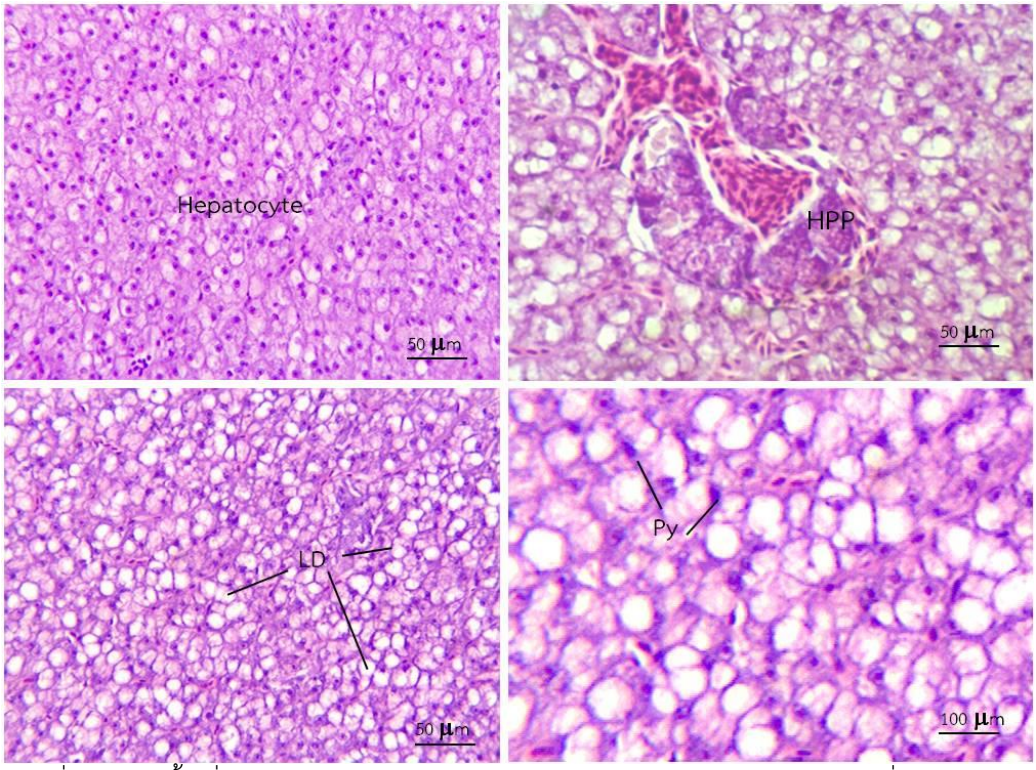
** AChE ; Acetylcholinesterase enzyme actvity

***GST ; Glutathione-*S*-Transferase enzyme activity

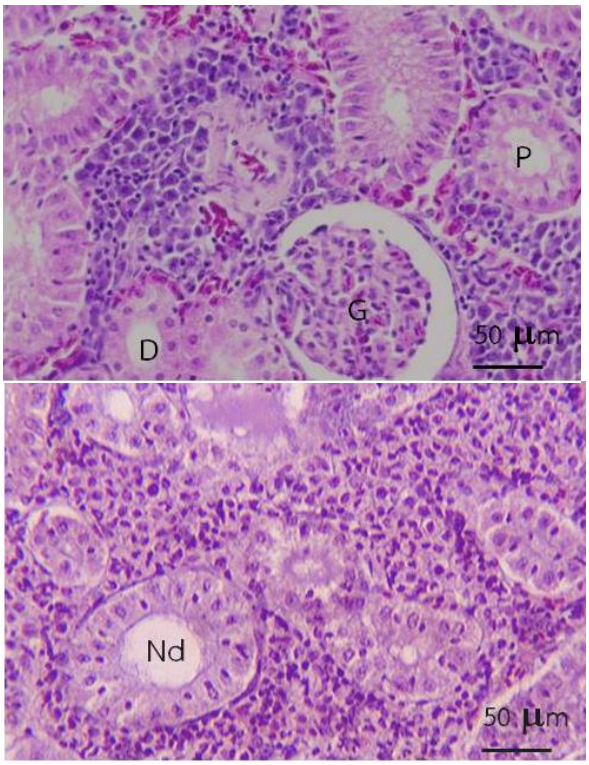
**** EROD ; Ethoxyresorufin-*O*-Deethylase enzyme activity

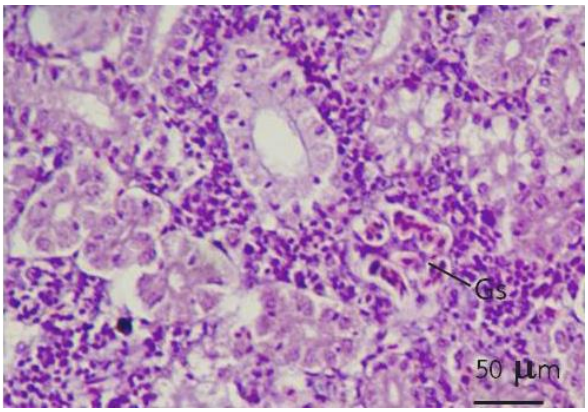


ภาพที่ 1 แสดงเนื้อเยื่อเหงือกปลาตะเพียนขาวใน (1.และ 2) ชุดควบคุม และ (3ถึง5) ชุดทดลองที่ให้ chlorpyrifos 0.05, 0.5, และ 5 มก./ลิตร (PL: Primary lamellae ; SL: Secondary lamellae ; Ep: epithelial cell)



ภาพที่ 2 แสดงเนื้อเยื่อตับปลาตะเพียนขาวใน (1.) ชุดควบคุม และ (2ถึง4) ชุดทดลองที่ให้ chlorpyrifos 0.05, 0.5, และ 5 มก./ลิตร (Hepatocyte (เซลล์ตับ); HPP: Hepatopancrease ; LD: vacuolation ; Py: Pyknotic nucleus)





ภาพที่ 3 แสดงเนื้อเยื่อไตปลาตะเพียนขาวใน (1.) ชุดควบคุม และ (2ถึง3) ชุดทดลองที่ให้ chlorpyrifos 0.05, 0.5, และ 5 มก./ลิตร (D: distal tubule ; G: glomerulus ; P: proximal tubule; Nd:tubule dilation Gs : Glomerulus shrinkage)

2. ผลของสารพิษ chlorpyrifos ต่อการเกิดรอยโรค (histopathological change) ในเนื้อเยื่อปลาตะเพียนขาว *P. gonionotus*

การเกิดรอยโรคบนเนื้อเยื่อเหงือกของปลาตะเพียนขาว *P. gonionotus* โดยเปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อเหงือกปลาตะเพียนขาวชุดควบคุม (ภาพที่ 1: 1-2) กับชุดทดลองที่ได้รับสารพิษ chlorpyrifos 0.05, 0.5 และ 5 มก./ลิตร พบว่าชั้นเซลล์ epithelial ของชั้นเหงือกทุติยภูมิ (secondary lamellae; SL)เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 1: 3) จนเชื่อมติดกันระหว่างชั้นเหงือกทุติยภูมิ (secondary lamellae; SL) (ภาพที่ 1: 4) และเกิดการตายของเซลล์ของepithelial (necrotic epithelial cell) (ภาพที่ 1:5) ซึ่งพบในเหงือกปลาตะเพียนที่ได้รับสารพิษ chlorpyrifos 0.5 และ 5 มก./ลิตร

การเกิดรอยโรคบนเนื้อเยื่อตับของปลาตะเพียนขาว *P. gonionotus* โดยเปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อตับปลาตะเพียนขาวชุดควบคุม (ภาพที่ 1: 1-2) กับชุดทดลองที่ได้รับสารพิษ chlorpyrifos 0.05, 0.5 และ 5 มก./ลิตร พบว่าชั้นเซลล์ตับ(hepatocyte) มีขนาดของแวคิโอลใหญ่ขึ้น (ภาพที่ 1: 3) ในตับปลาตะเพียนที่ได้รับสารพิษ chlorpyrifos 0.5 และ 5 มก./ลิตร พบว่านิวเคลียสของเซลล์ตับหดตัวลง(pyknotic nucleus) (ภาพที่ 1: 3) และพบการตายของเซลล์ตับ (necrotic hepatocytes) มากขึ้น

การเกิดรอยโรคบนเนื้อเยื่อไตของปลาตะเพียนขาว *P. gonionotus* โดยเปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อไตปลาตะเพียนขาวชุดควบคุม (ภาพที่ 1: 1) กับชุดทดลองที่ได้รับสารพิษ chlorpyrifos 0.05, 0.5 และ 5 มก./ลิตร พบว่าท่อproximal และ distal ความกว้างมากขึ้น (dilation) และเซลล์บุท่อบวมขึ้น (hydropic swelling) และหลุดออกจากฐาน (ภาพที่ 1:2) และพบการหดตัวลงโกเมอรูลัส (Glomerulus shrinkage) และการตายของเซลล์ hemopoitic cell (ภาพที่ 1: 3)

สรุปผลการทดลอง

1. สารพิษ chlorpyrifos มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด โดย Ethoxyresorufin-*O*-Deethylase เพิ่มขึ้น และยับยั้งการทำงานของAcetylcholinesterse อย่างเด่นชัดได้ตั้งแต่ความเข้มข้นของสารพิษ chlorpyrifos ต่ำๆ (0.05 มก./ลิตร) แต่การกระตุ้นทำงานของGlutathione-*S*-transferase จะเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนที่ความเข้มข้นของสารพิษ Chlorpyrifos สูงๆ
2. สารพิษ chlorpyrifos ทำให้เกิดรอยโรคในเนื้อเยื่อเหงือก ตับ และไต ของปลาตะเพียนขาว โดยการเกิดรอยโรคจะปรากฏให้เห็นที่ความเข้มข้นสารพิษ chlorpyrifos ตั้งแต่ 0.05 มก./ลิตร จนถึงระดับรุนแรงมาก(พบการตายของเซลล์เนื้อเยื่อ) ที่ความเข้มข้น 0.5 มก./ลิตร
3. ผลกระทบของสารพิษ chlorpyrifos โดยตรวจหาการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ (Ethoxyresorufin-*O*-Deethylase , Acetylcholinesterse , Glutathione-*S*-transferase) สามารถตรวจพบได้ตั้งแต่ความเข้มข้นของสารพิษต่ำ(0.05 มก./ลิตร) แต่ผลกระทบต่อปลาตะเพียนขาวจากการตรวจหารอยโรคที่เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อเหงือก ตับ และไต ปรากฏให้เห็นตั้งแต่ความเข้มข้นต่ำ (0.05 มก./ลิตร) ดังนั้นการวัดการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์กลุ่ม P450 ; EROD จึงเหมาะสมที่สุดสำหรับการวัดผลกระทบต่อปลาตะเพียนขาว

การนำไปใช้ประโยชน์

ผลการทดลองนี้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาตัวชี้วัดด้านพิษวิทยา(Biomarker) เพื่อพัฒนาเป็นเครื่องมือใช้ในการตรวจติดตามผลกระทบจากวัตถุมีพิษทางการเกษตรที่มีประสิทธิภาพ

เอกสารอ้างอิง

ASTM Standard on Biological Effects and Environmental Fate, 2008 (reapproved edition)

Back C.A. 1965. “Method of soil analysis: part I physical and mineralogical properties”. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA.

Deniele Werck-Reichhart , Alain Hehn and Luc Didierjean. 2000. Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance; a review.Trend in plant science.5(3);116-123

Ellman, G.L.,Courtney,K.D.,Andres, V., and Featherstone, R.M. 1961. A new rapid colorimetric deterrmination of acetylcholinesterase activity. J. Biochemistry and Pharmacology. 7:88-95

Feel Sun, Feng-Yi Lin, Sue-Sun Wong and Gwo-Chen Li.2000. Determination of Organochlorine and Nitrogen-Containing Pesticide Residues in Fish with Different Fat Content. Journal of food and drug analysis.8(2):103-111

Holfman D.J. and the others. 1995. Handbook of Ecotoxicology. CRC Press Inc.

Milan Jokanovic. 2001. Biotransformation of Organophosphorus compounds. Toxicology. 166:139-160

Muhammad Zafar, Yasmin Mussaddeq, Shamin Akhter and Aneesa Sutan. 2003. Weight-length and Condition Factor Relationship of thaila, Catla catla from Rawal Dam Islamabad, Pakistan. Pakistan Journal of Biological Sciences. 6(17):1532-1534

Ron Van Der Oost, Jonny Beyer and Nico P.E. Vermeulen. 2003. Fish bioaccumulation and Biomarkers in environmental risk assessment: a review. Envi. Toxico.&Pharmaco. 13:57-149

Takashima F. and Hibiya T. 1995. An atlas of fish histology: Normal and pathological Features. 195 pp.