تأثیرات فیزیولوژیک سم گلایفوزیت (رانداپ) بر بافت آبشش و کبد قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

- **فاطمه‌زهرا کیانی**: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران
- **مهدی محمدعلیخانی***: باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۷

چکیده

استفاده از گلایفوزیت جهت کنترل آفات نباتی در بسیاری از مزارع کشاورزی که در مجاورت منابع آب شیرین واقع شده‌اند بسیار رایج می‌باشد. از این‌رو این تحقیق به‌منظور شناسائی تأثیرات فیزیولوژیک گلایفوزیت که یکی از علف‌کش‌های پر مصرف ایران است بر روی ماهی مولد قزل‌آلا پرداخته شده است. این تحقیق در پاییز ۱۳۹۰ در مرکز تحقیقات علوم شیلاتی و فنون دریایی دکتر کیوان به‌منظور تعیین تأثیر علف‌کش گلایفوزیت بر روی برخی از فاکتورهای خونی و بافت ماهی قزل‌آلا با وزن ۲۰۰-۱۵۰ گرم در تحت شرایط کیفی آب ثابت صورت پذیرفت، ماهیان در قالب ٤ گروه ۳۰ تایی (سه گروه آزمایشی و یک گروه شاهد با سه تکرار) با غلظت‌های ٥، ۱۰ و ۱٥ (میلی‌گرم/لیتر) معادل ۲٥، ٥۰ و ۷٥ درصد از Lc5096h مورد استفاده قرار گرفتند. در طول آزمایشات عواملی شامل: pH، سختی، دما و اکسیژن محلول در آب مورد سنجش قرار گرفتند که به‌ترتیب برابر ۷ تا ۸/٤، ۲٥۰ میلی‌گرم در لیتر، ۱±۲۲و اکسیژن بالای ppm ۸ اندازه‌گیری شدند. مدت انجام آزمایش ده روز درنظر گرفته شد و نمونه‌گیری از گروه‌ها هر ٥ روز یک‌بار انجام گردید. نتایج حاصله از نظر آسیب‌شناسی بافتی نیز نشان داد که قرار گرفتن کبد و آبشش در مجاورت سم گلایفوزیت منجر به بروز پدیده‌هایی مانند پرخونی، آتروفی سلولی، رکورد صفراوی، نکروز، تورم ابری و فضای سینوزوئیدی در کبد و پرخونی، هیپرپلازی، نکروز، چسبندگی رشته‌های اولیه و ثانویه، چماخی شدن، گرزی شدن، کوتاه شدن تیغه‌های آبششی ثانویه در بافت آبشش می‌گردد که با گذشت زمان شدت این علائم افزایش می یابد.

کلمات کلیدی: علف‌کش، گلایفوزیت، قزل‌آلا، بافت‌شناسی، Lc5096h

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: m.mohammadalikhani1982@gmail.com

مقدمه

استفاده از آفت‌کش‌های سمی سال‌هاست که در بین کشاورزان ایرانی رواج یافته است. سه استان اصلی تولیدات کشاورزی ایران استان‌های مازندران، گیلان و گلستان هستند که در امتداد سواحل دریای‌خزر قرار دارند. محصولات اصلی این نواحی برنج، مرکبات، پنبه و توتون است. سطحی بالغ بر ۱/۵ میلیون هکتار از اراضی کشاورزی این مناطق به کشت انواع محصولات زراعی و دیم اختصاص دارد. مصرف انواع کودهای شیمیایی و مواد دفع آفات نباتی در این استان‌ها از میزان بسیار بالایی برخورداراست. از مجموع حدود ۳۵۰۰۰ تن ماده دفع آفات نباتی توزیع شده در سطح کشور حدود ۲۵۰۰۰ تن آن در اراضی کشاورزی استان‌های شمالی کشور مورد مصرف کشاورزان قرار می‌گیرد (موسوی، ۱۳۷۶). ایران مبلغ ۱۲۵ میلیون دلار برای واردات آفت‌کش در سال ۲۰۰۲ هزینه کرده است. اگرچه این حجم وسیع آفت‌کش در سراسر کشور توزیع می‌شود، اما ۶۰٪ آن در سه استان شمالی کشور در مجاورت دریای خزر توزیع می‌شود. ۲۵٪ آفت‌کش‌ها در ایران به تنهایی در تولید برنج استفاده می‌شود. از آفت‌کش‌های معمول مورد استفاده، ۲۵ مورد در دیگر کشورها ممنوع شده و بعضی در ایران کنار گـذاشته شده است، اما هنوز به آسانی می‌توان آن‌ها را از بازار سیاه به‌صورت قاچاق خریداری کرد و استفاده از آن‌ها در مزارع برنج، پنبه، مرکبات و دیگر محصولات ادامه دارد (واعظزاده و همکاران، ۱۳۸۶). باید اذعان نمود که در بعضی موارد آفت‌کش‌ها اثرات مخرب بیش‌تری روی موجودات غیر هدف (آبزیان) نسبت به موجودات هدف (آفات) داشته که این خود درحساسیت بالاتر و مرگ و میر سریع‌تر و بیش‌تر آبزیان نهفته است. در سواحل جنوبی دریای خزر عمده رودخانه‌های مهاجرپذیر شامل سفیدرود، گرگانرود، پلرود، تجن، شفارود می‌باشند که این رودخانه‌ها به‌دلیل مجاورت با مزارع بسیار وسیع کشاورزی اعم از شالیزار، گندم‌زار، مرکبات و باغ‌های چای، هر ساله مقادیر بسیار زیادی از باقی‌مانده سموم مختلف کشاورزی را به دریای خزر منتقل می‌کنند. این سموم از طریق تغییر در کیفیت آب باعث مرگ بچه‌ماهیان و حتی ماهیان بزرگ‌تر می‌گردند (موسوی، ۱۳۷۶). شست وشوی سموم توسط باران، آبیاری مزارع و سرریز شدن سموم به رودخانه‌ها و اکو سیستم‌های آبی باعث تاثیرات بر روی آبزیان گشته است که‌این تأثیرات به‌دوصورت: الف)با تأثیر برروی‌سیستم‌های عصبی، به‌طور مستقیم باعث مرگ و میر آبزیان می‌شوند. ب) به‌طور غیرمستقیم تاثیر بر روندهای غذا سازی در زنجیره‌های غذایی موجود گشته است و از این طریق باعث ایجاد کاهش رشد و نهایتاً مرگ و میر ماهی می‌گردد.

اگرچه ممکن است گاهی سبب مرگ و میر مستقم‌ماهی و آبزیان نگردد ولی می‌تواند با ورود به سیستم بدن موجود زنده و جذب در بافت‌ها و اندام‌های داخلی گشته و تاثیرات فیزیولوژیک ازجمله تغییر در بافت‌های در معرض مثل آبشش‌ها، کبد، پوست و.... گردد. امروزه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌صورت گونه اصلی کارگاه‌های تکثیر و پرورش ماهیان سردآبی در بیش‌تر نقاط جهان درآمده است. ایران نیز از جایگاه ویژه‌ای در این زمینه برخوردار است. پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ازجمله فعالیت‌های اقتصادی ممتاز در آب‌های معتدل به‌شمار می‌آید و در مقایسه با ماهی آزاد اقیانوس اطلس، پرورش این ماهی آسان‌تر و زمان رسیدن آن به وزن بازاری کوتاه‌تر است. قزل آلای‌رنگین‌کمان نخستین گونه از خانواده آزادماهیان است‌که به‌عنوان غذای انسان پرورش یافت. از سال ۱۸۸۰ دو نوع از این ماهیان از امریکای شمالی به سایر نقاط دنیا انتقال یافتند که عبارتند از ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان که یک ماهی‌رودرو (Potamodromous)می‌باشد، یعنی تمام مهاجرت‌های تولیدمثلی خودرا در آب‌شیرین‌انجام می‌دهد. این ماهی درسواحل غربی‌شمال امریکازندگی می‌کند. دوره تخم‌ریزی از ماه‌های آخر زمستان تا اواخر بهار و تعداد تخم‌ها بین ۵-۱ هزار عدد است. بچه‌ماهیان تقریباً هنگامی‌که ۱۵ سانتی‌متر طول دارند دارای ۱۲-۱۱ عدد لکه تیره رنگ روی بدن می‌باشند که یکی از مشخصات آن‌ها می‌باشد. گونه دیگر *Salmo Shasta* است که فقط در جویبارهای سیری نوادا زندگی می‌کند (وثوقی و مستجیر، ۱۳۸۱). مشاهداتی که در مورد خصوصیات قزل‌آلای رنگین‌کمان و قزل‌آلای خال قرمز انجام گرفته است، بیانگر این نکته است که قزل‌آلای رنگین کمان، قزل‌آلای خال قرمز را از محل خویش دور می‌کند. قزل‌آلا رنگین‌کمان در مقابل تغییرات درجه حرارت آب و اکسیژن محلول در آب زیاد حساس نیست درصورتی‌که قزل‌آلای خال قرمز نسبت به تغییرات یاد شده و هم‌چنین نوسانات مواد غذایی حساسیت خاصی از خود نشان می‌دهد (وثوقی و مستجیر، ۱۳۸۱). این ماهی بومی مناطقی از اقیانوس آرام می‌باشد که در شمال اقیانوس آرام از کالیفرنیا شروع و تا آلاسکا و در جنوب اقیانوس آرام از شبه جزیره Kamchatka شروع و تا حوزه دریای Okhotska ادامه دارد. این ماهی در اصل سازگار با آب شیرین است اما در شمال‌غربی و شمال‌شرقی آرام ذخایر آنادروموس آن یافت می‌شود. این ذخایر چرخه زندگی‌شان مشابه با ماهی آزاد اطلس می‌باشد. آن‌ها بخشی از زندگی‌شان را در اقیانوس سپری می‌کنند اما برای تخم‌ریزی به دریاچه‌ها و رودخانه‌ها باز می‌گردند و مراحل لاروی تا جوانی را در رودخانه‌ها و دریاچه‌ها سپری می‌کنند. در حال حاضر این ماهی سهم با ارزشی در تأمین غذای انسان دارد، زیرا این ماهی‌ها غنی از چربی‌های اشباع نشده‌ای هستند که وجودشان در غذای سالم ضروری است (فروزانفر، ۱۳۸۰). در حال حاضر ماهی قزل‌آلا اساس صنعتی را تشکیل می‌دهدکه درحال توسعه است و اهمیت آن به‌ویژه در کشورهایی که قادر به تدارک شرایط و

مهیا کردن محیط آب‌شیرین یا شور برای پرورش آن هستند در حال افزایش است. گلایفوزیت یکی از کاربردی‌ترین سموم ارگانوفسفره شناخته‌شده در ایران است که معمولاً از طریق زهکش مزارع کشاورزی وارد آب‌های سطحی و حتی زیرزمینی می‌گردد (Sabra و همکاران، ۲۰۱۵). در مطالعاتی که اخیراً در بسیاری از آب‌های سطحی، ساحلی و مصبی وحتی پساب تصفیه خانه‌های مناطق شهری مناطق مختلف جهان ازجمله ایران صورت گرفته، مقادیر قابل توجهی از این سموم گزارش شده است (U.S. EPA، ۲۰۰۵) که از آن جمله می‌توان وجود گلایفوزیت در زهکش شالیزارهای مناطق مختلف استان‌های شمالی اشاره کرد (Khodadadi و همکاران، ۲۰۱۰). علف‌کش سیستمیکی می‌باشد که پس از سبز شدن علف‌های هرز به‌صورت پاشیدن روی قسمت‌های هوایی آن‌ها مصرف می‌گردد. این علف‌کش به‌وسیله برگ‌ها و سایر اندام‌های هوایی جذب و از طریق آوندها به‌همراه شیره گیاهی به قسمت‌های علف‌های هرز انتقال یافته و باعث از بین رفتن علف‌های هرز می‌گردد. گلایفوزیت، علف‌کشی از گروه اسیدفسفونیک (نمک ایزوپروپیل آمین) است که برای کنترل کلیه گیاهان هرز نازک برگ و پهن‌برگ (یک‌ساله و چندساله) در باغات و زمین‌های زراعی‌وغیرزراعی به‌صورت مایع قابل حل در آب (SL%۴۱) فرموله می‌شود. براساس اطلاعات‌وآمار دریافتی از اداره جهادکشاورزی استان گیلان سم رانداپ ازسال ۱۳۷۰ تا ۱۳۷۶ به‌میزان ۱۰۰ تن به استان وارد و بنابر درخواست کشاورزان مورد مصرف قرار می‌گرفت. از سال ۱۳۸۰ تا ۱۳۸۵ به‌میزان ۶۰ الی ۷۰ تن رسیده است و از سال ۱۳۸۵ به بعد خرید سم رانداپ برای کشاورزان به‌صورت آزاد و از حالت یارانه‌ای خارج شد. بنا به درخواست کشاورزان میزان مصرف از سال ۱۳۸۵ به بعد به‌میزان ۳۵ تا ۵۰ تن رسیده است و می‌توان دلیل آن را هزینه آزاد آن برای کشاورزان دانست. ماده تجارتی آن پس از ۲ سال نگه‌داری در حرارت ۶۰ درجه سانتی‌گراد تا ۵ درصد از بین می‌رود، نمک محلول آن در اثر تماس با فولاد گوانیز و یا بدون پوشش ممکن است واکنش داده و گاز هیدروژن که بسیار آتش‌زا است تولید می‌شود. در آب ۲۵ درجه به‌میزان یک درصد حل می‌شود (املاح آمین و فلزات قلیایی به‌راحتی در آب حل می‌شود). گلایفوزیت و نمک‌های آن غیرقابل تبخیر (فشار بخار گلایفوزیت عملاً صفر است) و در مقابل نور و هوا پایدار است. این ترکیب در خاک توسط میکروارگانیزم‌ها تجزیه می‌شودو در صورت تماس با خاک به سرعت خواص خود را از دست می‌دهد. حاصل تجزیه آن دی‌اکسیدکربن، آب، نیترات و فسفات است، بنابراین باقی‌مانده نداردو پس‌از مصرف‌می‌توان اقدام به کاشت نمود.گلایفوزیت به‌صورت غیرانتخابی عمل نموده و روی تمام علف‌های هرز و درختچه‌ها مؤثر است. حتی علف‌های هرز دائمی رشد یافته و تثبیت شده را هم از بین می‌برد(Sabra و همکاران، ۲۰۱۵). همیشه برای‌علف‌های هرز یک‌ساله جوان باید مقدار کم‌تر و برای علف‌های هرز دائمی و قدیمی بیش‌ترین مقدار سم مورد استفاده قرار گیرد. کارایی بالای گلایفوسیت در از بین بردن اندام‌های زیرزمینی‌مثل ریزوم و ریشه گیاهان دائمی زمانی است که کاربرد آن در پایان رشد رویشی و آغاز گل‌دهی باشد. در زمان مصرف سم بایستی علف‌های هرز شاداب و در حال رشد فعال بوده و درشرایط گرم و خشک‌بهتر است قبل از سم‌پاشی آبیاری صورت گیرد. باید توجه داشت که ذرات این سم روی شاخ و برگ، قسمت‌های سبز گیاه و پا جوش درختان و مزارع مجاور (به‌واسطه بادبردگی) پاشیده نشود. هم‌چنین مدت زمان بین عمل سم‌پاشی و عملیات خاک‌ورزی حداقل باید پنج روز باشد. گلایفوزیت به‌وسیله شیره گیاه به اندام‌های زیرزمینی علف‌های هرز (ریشه، استولون و غده) منتقل می‌شود. این ترکیب برای کنترل علف‌های هرز نازک برگ و پهن برگ یک‌ساله و چندساله درباغات میوه و مرکبات، تاکستان‌ها، مزارع نیشکر، زمین‌های زراعی پس از برداشت محصول، اراضی غیر زراعی، جوی‌ها و کانال‌های آبیاری استفاده می‌شود. افزودن ۲ درصد سولفات آمونیم خاصیت علف کشی گلایفوزیت را افزایش می‌دهد. رانداپ پتانسیل کمی برای انباشتگی در اندام‌های آب‌های آبزی را دارد رانداپ در سال ۱۹۷۱ به بازار معرفی شد(Canadian Council of Ministers of the Environment، ۱۹۹۹).

شکل ۱: تصویری از گلایفوزیت تجاری موجود در بازار

مواد و روش‌ها

طبق تحقیقات انجام‌شده توسط Servizi و همکاران (۱۹۸۷) درجه سمیت سم گلایفوزیت برای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان را معادل Lc_{50} 96h=۸-۲۶ppm به‌دست آوردند. تعداد ۱۸۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نر از کارگاه دوهزار تنکابن به مرکز تحقیقات علوم شیلاتی و فنون دریایی دکتر کیوان واقع در بندر چمخاله انتقال یافتند و جهت آداپتاسیون به‌مدت پنج روز در آب مطلوب از لحاظ فاکتورهای فیزیکو شیمیایی آب رهاسازی و یک‌بار در روز غذادهی شدند. وان‌ها پس از

آبگیری به‌میزان ۴۰۰ لیتر و هوادهی مداوم و بستن خروجی جهت انجام آزمایشات آماده شدند. ابتدا ۱۰۰ سی‌سی از سم توسط پیپت داخل بشر ریخته، وزن شد و بعد از تعیین وزن مخصوص سم، داخل یک لیتر آب مقطر ریخته خوب به‌هم زده شد و توسط فرمول زیر میزان غلظت سمی را که برای هر تیمار مورد نیاز است، به‌دست آمد:

$C_1V_1=C_2V_2$

این آزمایشات در ۳ گروه تیماری به‌غلظت‌های ۵ میلی‌گرم برلیتر، ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر و ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر از Lc_{50} سم راندآپ در مقایسه با گروه شاهد صورت پذیرفت. برای هر تیمار سه تکرار درنظر گرفته شد و داخل هر وان ۸ عدد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان قرار داده شد.

روش کار بافت‌شناسی

نمونه‌برداری بافت: در این بررسی از ۳ عدد بچه‌ماهی قزل‌آلا از هر تیمار که در زمان‌های معین شده (هر ۵روز یک‌بار) خونگیری شده بودند، استفاده شد. برای نمونه‌برداری شاهد نیز تعداد ۳ عدد از ماهیان نگه‌داری شده در آب‌شیرین استفاده شد. برای هر ماهی دومین کمان آبششی از آبشش سمت چپ بریده و در محلول بوئن به‌عنوان نگه‌دارنده، فیکس شد. نمونه‌های کلیه نیز از بخش میانی کلیه تهیه شدند و هر کدام به صورت جداگانه در ظروف حاوی بوئن قرار داده شدند. نمونه‌ها سپس به آزمایشگاه بافت‌شناسی بخش فیزیولوژی و بیوشیمی انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دادمان جهت عمل‌آوری بافت منتقل شدند.

عمل‌آوری بافت: برای تهیه اسلایدهای بافتی نمونه‌های بافتی پس از فیکس از مراحل آبگیری، شفاف‌سازی، پارافینه، قالب‌گیری، برش، رنگ‌آمیزی و مونته به‌شرح زیر عبور داده شدند (کاظمی و بهمنی، ۱۳۷۷).

مرحله آبگیری: این مرحله عبارت است از گرفتن آب از بافت و جایگزینی الکل به‌جای آب. در این مرحله از الکل‌های ۵۰، ۷۰، ۸۰، ۹۶ درجه و الکل ۱- بوتانل به‌شرح زیر استفاده گردید:

عبور نمونه بافت از الکل ۵۰ درجه به‌مدت نیم ساعت
عبور نمونه بافت از الکل ۷۰ درجه به‌مدت نیم ساعت
عبور نمونه بافت از الکل ۸۰ درجه به‌مدت نیم ساعت
عبور نمونه بافت از الکل ۹۶ درجه به‌مدت نیم ساعت
عبور مجدد نمونه بافت از الکل ۹۶ درجه به‌مدت نیم ساعت
عبور نمونه بافت از الکل ۱- بوتانل به‌مدت یک ساعت
عبور مجدد نمونه بافت از الکل ۱- بوتانل به‌مدت یک ساعت

مرحله شفاف‌سازی: این مرحله عبارت است از جایگزینی کلروفرم به‌جای الکل و جذب چربی بافت که به‌قرار زیر بود:

عبور نمونه بافت از کلروفرم به‌مدت نیم ساعت
عبور مجدد نمونه بافت از کلروفرم به‌مدت نیم ساعت

پارافینه کردن بافت: برای نرم شدن، نمونه‌ها در مخلوط کلروفرم و پارافین خالص نرم و به‌شرح زیر قرار گرفتند:

- قرار دادن نمونه بافت در مخلوط کلروفرم و پارافین خالص نرم به نسبت یک به یک در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد
- قرار دادن نمونه بافت در پارافین خالص نرم و تمیز در انکوباتور ۵۶ درجه سانتی‌گراد در دو مرحله و هر مرحله به‌مدت یک ساعت

قالب‌گیری: در این مرحله نمونه بافت‌ها در داخل قالب‌های ویژه قرار گرفتند و با استفاده‌از پارافین‌مذاب پوشانده شدند پس از سرد شدن قالب‌های پارافینی حاوی‌نمونه، بافت جهت تهیه برش‌های بافتی آماده شد. در این مرحله پارافین‌های حاوی نمونه بافت از قالب‌های کاغذی جدا و با استفاده‌از اسکالپر تاحد امکان پارافین‌های اضافه‌از اطراف نمونه‌ها بریده‌و در نهایت قالب‌های پارافینی حاوی نمونه بافت روی پایک‌های چوبی سوار شدند. مشخصات مربوط به هر نمونه بافت روی پایک‌ها یادداشت گردید.

برش زدن نمونه‌ها: در این مرحله با استفاده از میکروتوم دوار (مدل leitz ۱۵۱۲,Germany)، برش‌های بافتی به ضخامت ۷ میکرون تهیه گردیدند. سریال‌های بافتی برش زده که به‌صورت لایه نازکی از پارافین حاوی بافت بودند با استفاده از قلم موهای نازک از روی سطح شیب‌دار میکروتوم برداشته شد و در آب گرم (۳۷ درجه سانتی‌گراد) موجود در دستگاه گرم‌کننده heater، که در مجاورت میکروتوم قرار داده شد تا چین و چروک اسلایدهای تهیه شده از بین بروند. پس از آن، با استفاده از که قبلاً سطح آن‌ها کاملاً تمیز شده و لایه نازکی از ژلاتین به‌عنوان چسب‌روی آن مالیده و خشک‌شده‌بودند، از آب‌گرم‌جمع‌آوری شدند. در این مرحله نیز اطلاعات مربوط به هر نمونه بافت توسط بر چسب‌روی لام‌ها یادداشت گردید. این لام‌های حاوی اسلایدهای برش داده شده، به‌مدت ۲۴ساعت در انکوباتور قرار داده شدند تا خشک شوند. از هر نمونه‌بافتی دو لام جهت بررسی میکروسکوپی تهیه گردید که روی هر لام به‌طور متوسط ۱۰ میدان مورد مطالعه قرار گرفت.

رنگ‌آمیزی: رنگ‌آمیزی به‌کار رفته روش هماتوکسیلن-ائوزین بود که مراحل انجام آن به‌قرار زیر است:

عبور لام حاوی نمونه بافت از گزیلول در دو مرحله به‌مدت ۵-۳ دقیقه
عبور لام حاوی نمونه بافت از الکل ۱۰۰ درجه به‌مدت ۱۰ ثانیه
عبور لام حاوی نمونه بافت از الکل ۱۰۰ درجه به‌مدت ۵-۳ دقیقه
عبورلام حاوی نمونه بافت از الکل ۹۶ درجه به‌مدت ۱۰ ثانیه
عبور لام‌حاوی نمونه بافت از الکل ۸۰ درجه به‌مدت ۱۰ ثانیه
عبورلام حاوی نمونه بافت از الکل ۷۰ درجه به‌مدت ۱۰ ثانیه
شست‌وشوی لام حاوی نمونه بافت با آب جاری به‌مدت۲-۱ دقیقه
عبورلام حاوی نمونه بافت از رنگ هماتوکسیلن به‌مدت ۷-۵ دقیقه
شست‌وشوی لام حاوی نمونه بافت با آب جاری به‌مدت ۲-۱ دقیقه

عبور لام حاوی نمونه بافت از اسید کلریدریک ۱٪ به‌مدت ۱ ثانیه
شستشوی لام حاوی نمونه بافت با آب جاری به‌مدت ۲-۱ دقیقه
عبور لام حاوی نمونه بافت از کربنات لیتیم به‌مدت ۴-۳ ثانیه
شستشوی لام حاوی نمونه بافت با آب جاری به‌مدت ۲-۱ دقیقه
عبور لام حاوی نمونه بافت از رنگ ائوزین به‌مدت ۱۰ ثانیه
عبور لام حاوی نمونه بافت از الکل ۷۰ درجه به‌مدت ۱۰ ثانیه
عبور لام حاوی نمونه بافت از الکل ۸۰ درجه به‌مدت ۱۰ ثانیه
عبور لام حاوی نمونه بافت از الکل ۹۶ درجه به‌مدت ۱۰ ثانیه
عبور لام حاوی نمونه بافت از الکل ۱۰۰ درجه به‌مدت ۱۰ ثانیه
عبور لام حاوی نمونه بافت از گزیلول به‌مدت ۱ دقیقه
عبور لام حاوی نمونه بافت از گزیلول به‌مدت ۵ دقیقه

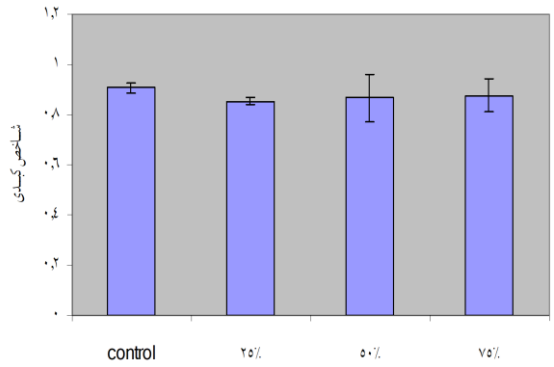
پس از خارج کردن تمام لام‌ها از گزیلول، برای خشک شدن در هوای آزاد قرار داده گرفتند. در نهایت با استفاده از چسب کانادا بالزام لامل‌ها روی لام‌ها چسبانده و برای بررسی میکروسکوپی آماده شدند

بررسی میکروسکوپی: مـرحله آخر کار مرحله بررسی میکروسکوپی می‌باشد. لام‌های آماده شده توسط میکروسکوپ Motic که مجهز به دوربین است مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

روش تجزیه و تحلیل اطلاعات: در نهایت جهت بررسی نرمال بودن توزیع داده‌در تیمارهای مختلف از آزمون Shapiro-Wilk و بررسی وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار آماری هر یک از فاکتورها براساس تیمارهای مختلف به‌دلیل نرمال بودن داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه ANOVA و برای مقایسه میانگین‌ها با یکدیگر به‌صورت دو به دو از آزمون توکی و دانکن و برای به‌دست آوردن ارتباط رگرسیونی بین فاکتور لگاریتم غلظت Probit value از رگرسیون خطی استفاده گردید و در صورت نرمال نبودن داده‌ها جهت مقایسه تیمارها از آزمون Kruskal Wallis و به‌منظور مقایسه بین گروه‌ها از آزمون Mann-Whitney استفاده شد. جهت محاسبات آماری نظیر میانگین، انحراف معیار و مقایسه میانگین از نرم‌افزار SPSS و جهت رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده گردید.

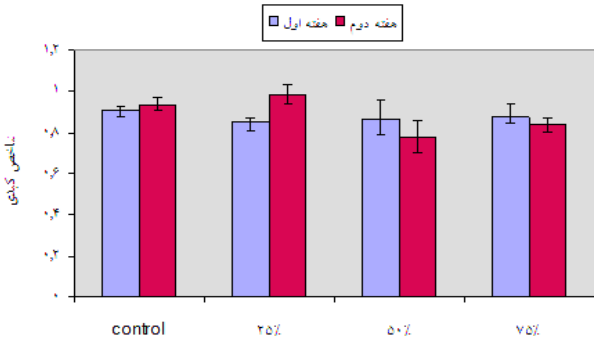
نتایج

نتایج آزمایشات میانگین شاخص کبدی (مرحله دوم) در ماهیان شاهد و تیمارهای ۲۵٪، ۵۰٪ و ۷۵٪ از میزان LC_{50}: بر اساس آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه (Oneway Anova)به‌منظور مقایسه میانگین شاخص کبدی بچه‌ماهیان بین شاهد و تیمارها در هفته دوم اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نشد($P>0/05$). اما میانگین شاخص کبدی در دوزهای ۵۰ و ۷۵ کاهش یافته و کم‌تر از شاهد و تیمار ۲۵ بوده است.



شکل ۲: نمودار آزمایشات میانگین شاخص کبدی (مرحله دوم)

نتایج آزمایشات میانگین شاخص کبدی(مقایسه دو مرحله) در ماهیان شاهد و تیمارهای ۲۵٪ ، ۵۰٪ و ۷۵٪ از میزان LC_{50}: براساس آزمون Independent Samples T-Test به‌منظور مقایسه میزان شاخص کبدی در خون بچه‌ماهیان مورد بررسی شاهد و تیمارها در دو مرحله نمونه‌برداری(هفته اول و دوم)اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نشد ($P>0/05$).



شکل ۳: نمودار آزمایشات میانگین شاخص کبدی (مقایسه)

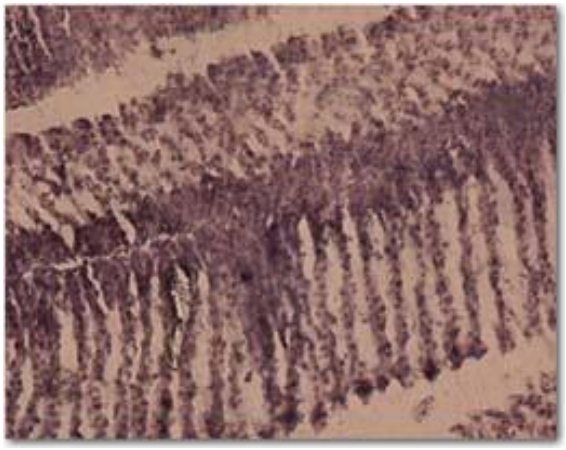
نتایج بافت آبشش در ماهیان قزل آلا در نمونه‌برداری مرحله اول: نتایج این بررسی به‌صورت زیر می‌باشد:

نتایج بافت آبشش در ماهیان قزل آلا در تیمار اول در نمونه‌برداری مرحله اول: سلول‌های بافت آبشش سالم و بدون عارضه می‌باشند.

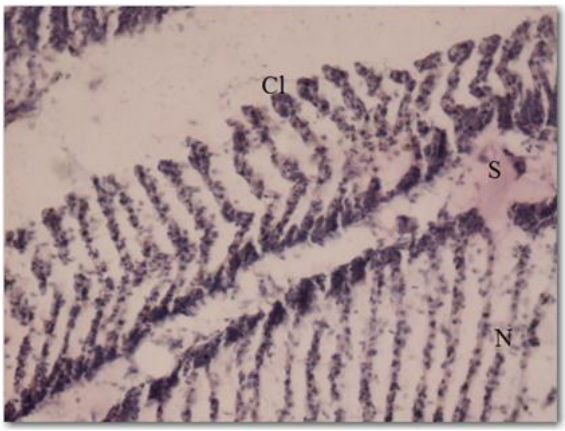
نتایج بافت آبشش ماهی قزل آلا در تیمار دوم مرحله اول: با افزایش غلظت سم گلایفوزیت بر روی بافت آبشش بیانگر ایجاد سم بر ساختار بافت بوده به‌طوری که تأثیر فیزیولوژیک مثل پرخونی (زیاد)، هیپرپلازی و چسبندگی تیغ‌های ثانویه (زیاد)، نکروز سلولی (کم)، تورم رشته‌های اولیه (کم)، چماقی شدن (کم)، کوتاه شدن رشته‌های ثانویه و گرزی شدن (کم) مشاهده شد.

نتایج بافت آبشش ماهی قزل آلا در تیمار سوم مرحله اول: باافزایش غلظت سم گلایفوزیت بر روی بافت آبشش بیانگر ایجاد سم بر ساختار بافت بوده به‌طوری که تأثیر فیزیولوژیک مثل پرخونی (زیاد)، هیپرپلازی و

چسبندگی تیغ‌های ثانویه (زیاد)، نکروز سلولی (زیاد)، تورم رشته‌های اولیه (کم)، چماقی‌شدن (کم) و گرزی شدن (کم) مشاهده شد.



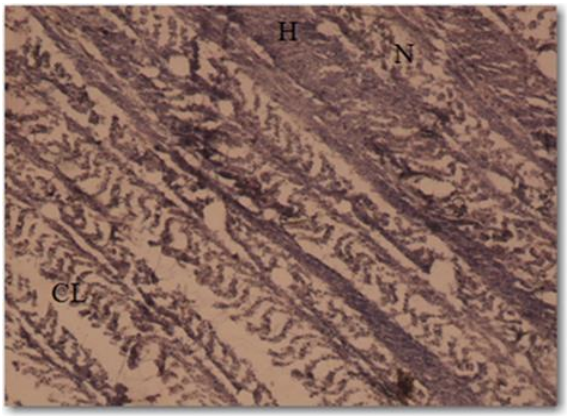
شکل ۴: بافت آبشش تیمار اول A۱ (H&E ،x۲۰)



شکل ۵: بافت آبشش تیمار دوم (مشاهده نکروز سلولی(N)، تورم رشته آبششی (S) چماقی شدن رشته ها (Cl) در آبشش تیمار A2 (H&E,x۲۰)

شکل ۶:بافت آبشش تیمار سوم (مشاهده هیپرپلازی(H)، پرخونی (Hy)، تورم رشته آبششی (S) و چسبندگی رشته‌های (LF) در آبشش تیمار A (H&E ،x۱۰)

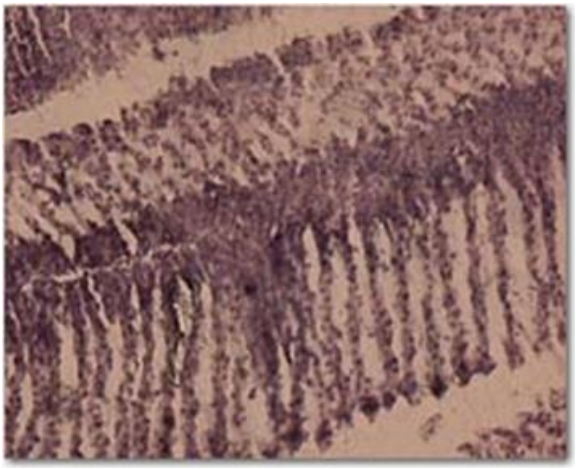
نتایج بافت آبشش ماهی قزل‌آلا در تیمار چهارم مرحله اول: با افزایش غلظت سم گلایفوزیت بر روی بافت آبشش بیانگر ایجاد سم بر ساختار بافت بوده به‌طوری‌که تأثیر فیزیولوژیک مثل پرخونی (زیاد)، هیپرپلازی و چسبندگی تیغ‌های ثانویه (زیاد)، نکروز سلولی (زیاد) و چماقی شدن (زیاد) مشاهده شد.



شکل ۷:بافت آبشش تیمار چهارم (مشاهده هیپرپلازی(H) نکروز سلولی(N) و چماقی شدن رشته‌ها (CL) در آبشش تیمار A) ۴ (H&E،x۱۰

نتایج بافت آبشش ماهی قزل‌آلا در نمونه‌برداری مرحله دوم:

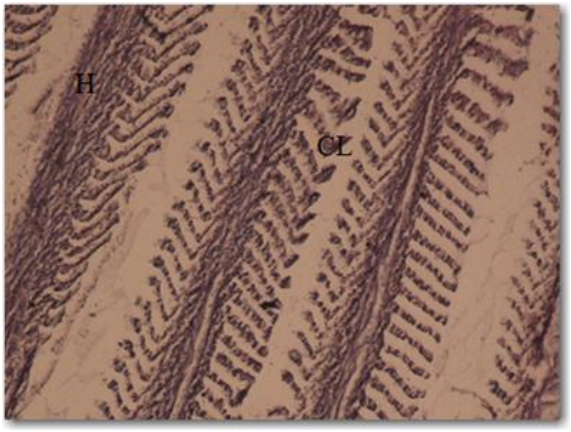
نتایج بافت آبشش ماهی قزل‌آلا در تیمار اول در نمونه‌برداری مرحله دوم: نتایج بررسی تیمار اول آبشش به‌صورت زیر می‌باشد: سلول‌های بافت آبشش سالم و بدون عارضه می‌باشند.



شکل ۸: بافت آبشش تیمار اول B۱ (H&E,x۲۰)

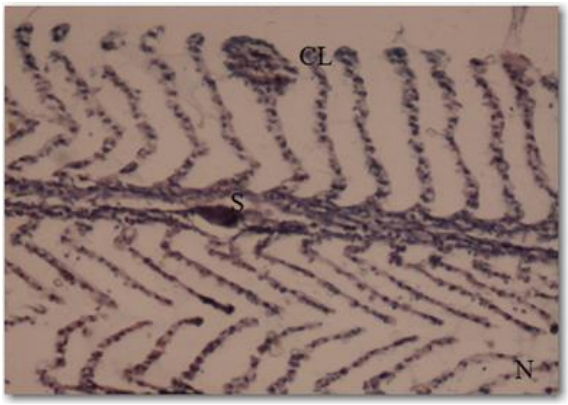
نتایج بافت آبشش ماهی قزل‌آلا در تیمار دوم مرحله دوم: با افزایش غلظت سم گلایفوزیت بر روی بافت آبشش بیانگر ایجاد سم بر ساختار بافت بوده به‌طوری‌که تأثیر فیزیولوژیک مثل پرخونی (زیاد)، هیپرپلازی و چسبندگی تیغ‌های ثانویه (زیاد)، نکروز سلولی (کم)، تورم

رشته‌های اولیه (کم)، چماقی شدن (کم)، کوتاه شدن رشته‌های ثانویه و گرزی شدن (کم) مشاهده شد.



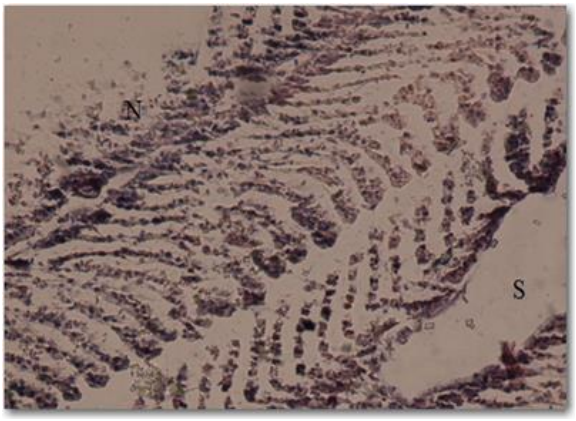
شکل ۹: بافت آبشش تیمار دوم (مشاهده هیپرپلازی(H) و چماقی شدن رشته های آبششی(CL) در تیمار B۲ (H&E ،x۱۰)

با افزایش غلظت سم گلایفوزیت بر روی بافت آبشش بیانگر ایجاد سم بر ساختار بافت بوده به‌طوری‌که تأثیر فیزیولوژیک مثل پرخونی (زیاد)،هیپرپلازی (زیاد)چسبندگی تیغ‌های ثانویه(زیاد)،نکروز سلولی (زیاد)، تورم رشته‌های اولیه (کم)، چماقی شدن و گرزی شدن (کم) مشاهده شد.



شکل ۱۰: بافت آبشش تیمار سوم (مشاهده هیپرپلازیریً.نکروز سلولی(N) و تورم رشته آبششی (CL) در تیمار B۳ (H&E،x۱۰)

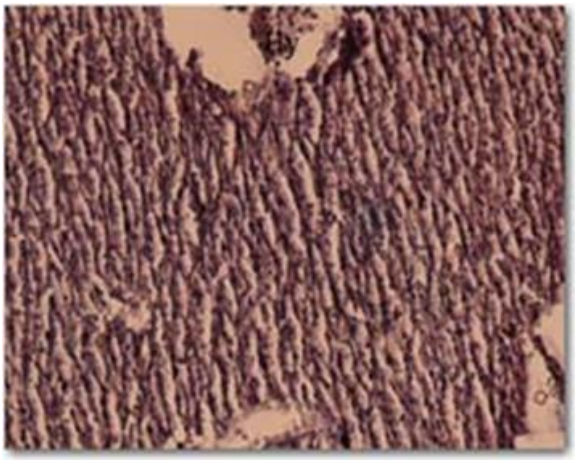
نتایج بافت آبشش ماهی قزل آلا در تیمار چهارم مرحله دوم: با افزایش غلظت سم گلایفوزیت بر روی بافت آبشش بیانگر ایجاد سم بر ساختار بافت‌بوده به‌طوری‌که تأثیر فیزیولوژیک مثل پرخونی (زیاد)، هیپرپلازی (زیاد)چسبندگی تیغ‌های ثانویه (زیاد)، نکروز سلولی (زیاد) مشاهده شد. لازم به توضیح می‌باشد که شدت عارضه آبشش از تیمار ۱ به سمت تیمار ۴ بیش‌تر مشاهده گردید ولی از لحاظ شدت آسیب بین تیمارهای A و B چندان اختلافی دیده نشده است و تنها عوارض پرخونی، هیپرپلازی و نکروز سلولی در تیمارهای B نسبت A کمی بیش‌تر بوده است.



شکل ۱۱: بافت آبشش تیمار چهارم (مشاهده نکروز سلولی(N)و تورم رشته آبششی(S) در آبشش تیمار B۴ (H&E ، x۲۰)

نتایج بافت کبد در ماهیان قزل آلا در نمونه‌برداری مرحله اول: نتایج این بررسی به‌صورت زیر می‌باشد:

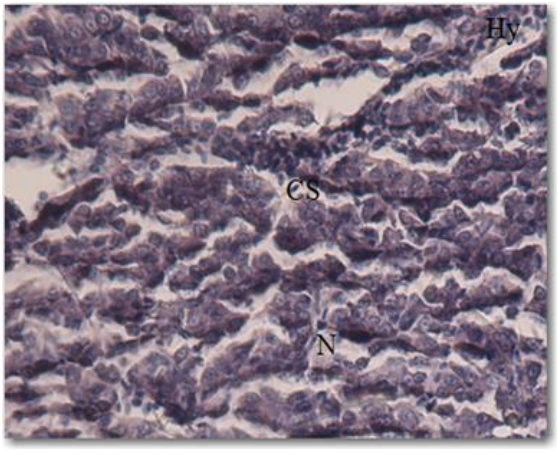
نتایج بافت کبد ماهی قزل آلا در تیمار اول مرحله اول: تنها کمی پرخونی دیده شده است. سلول‌های کبدی سالم.



شکل ۱۲: بافت کبد تیمار اول (مشاهده پرخونی (Hy) در کبد تیمار A۱ (H&E,x۲۰)

نتایج بافت کبد ماهی قزل آلا در تیمار دوم مرحله اول: با افزایش غلظت سم تنها کمی پرخونی و نکروز سلولی دیده شده است. سلول‌های کبدی سالم.

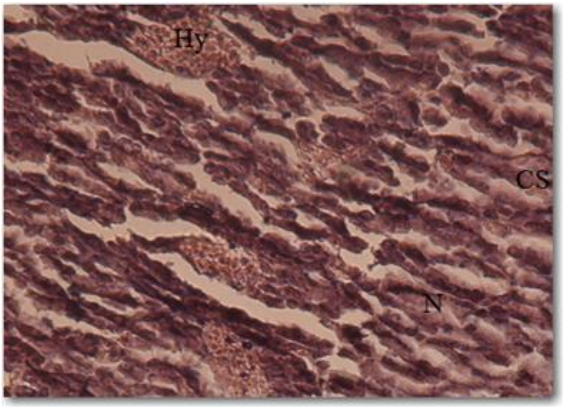
نتایج بافت کبد ماهی قزل آلا در تیمار سوم مرحله اول: با افزایش غلظت سم آتروفی، پرخونی، تورم ابری و رکورد صفراوی خیلی کم دیده شده است.



شکل ۱۳: بافت کبد تیمار دوم (مشاهده پرخونی (Hy)، نکروز سلولی (N) و تورم ابری (CS) در کبد تیمار A۲ (H&E,x۴۰)

شکل ۱۴: بافت کبد تیمار سوم (مشاهده پرخونی در کبد تیمار A۳ (H&E,X۴۰)

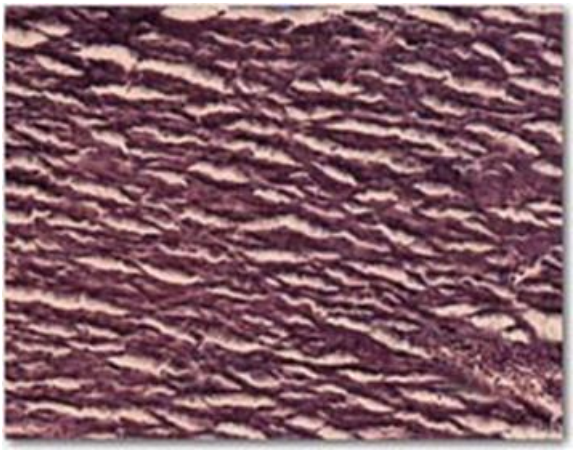
نتایج بافت کبدماهی قزل‌آلا در تیمارچهارم مرحله اول: با افزایش غلظت سم آتروفی (کم)، پرخونی (زیاد)، تورم ابری، نکروز سلولی و رکورد صفراوی کم دیده شده است.



شکل ۱۵: بافت کبد تیمار چهارم (مشاهده پرخونی (Hy)، نکروز سلول (N) و تورم ابری (CS) در کبد تیمار A۴ (H&E,x۴۰)

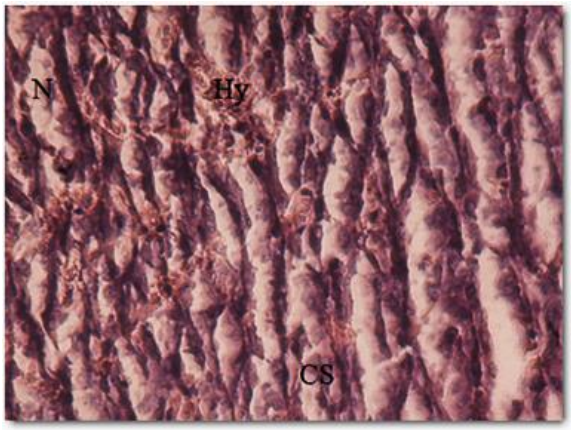
نتایج بافت کبد در ماهیان قزل‌آلا در نمونه‌برداری مرحله دوم: نتایج این بررسی به‌صورت زیر می باشد:

نتایج بافت کبد ماهی قزل‌آلا در تیمار اول مرحله دوم: تنها کمی پرخونی دیده شده است. سلول‌های کبدی سالم.



شکل ۱۶: بافت کبد تیمار اول (B۱)(H&E,x۲۰)

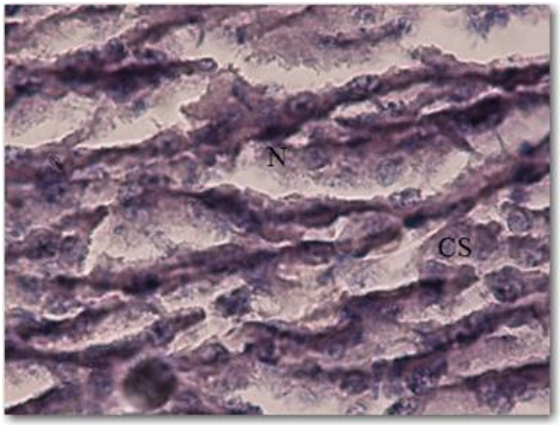
نتایج بافت کبد ماهی قزل‌آلا در تیمار دوم مرحله دوم: با افزایش غلظت سم پرخونی و خونریزی دیده شده است.



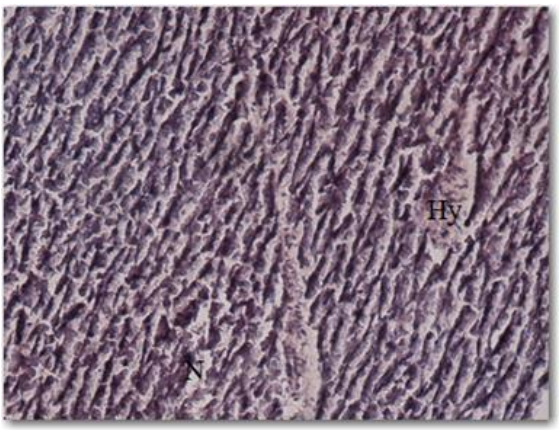
شکل ۱۷: بافت کبد تیمار دوم (مشاهده پرخونی (Hy)، نکروز سلولی (N) و تورم ابری (CS) در کبد تیمار B۲ (H&E,x۴۰)

نتایج بافت کبد ماهی قزل‌آلا در تیمار سوم مرحله دوم: با افزایش غلظت سم فضای سینوزوئیدی (نسبت به ۲ تیمار قبلی بیش‌تر بوده است)، پرخونی، تورم ابری، نکروز سلولی، رکورد صفراوی، دیده شده است.

نتایج بافت کبد ماهی قزل‌آلا در تیمار چهارم مرحله دوم: با افزایش سم پرخونی (زیاد)، نکروز سلولی زیاد دیده شده است.



شکل ۱۸: بافت کبد تیمار سوم (مشاهده نکروز سلول (N) و تورم ابری (CS) در کبد تیمار B۳ (H&E,x۱۰۰)



شکل ۱۹: بافت کبد تیمار چهارم (مشاهده پرخونی (Hy) و نکروز سلول (N) در کبد تیمار B۴ (H&E,x۲۰)

بحث

ترکیبات اورگانوفسفره به‌طورکلی چربی‌دوست بوده و به‌راحتی از طریق پوست، آبشش و سیستم گوارش جذب شده و از سر خون و مغز عبور می‌کند (Vale، ۱۹۹۸) و در اثر ممانعت از فعالیت استیل کولین‌استراز در ماهیان می‌تواند موجب ایجاد تغییراتی در الگوی رفتاری اختلالات شدید در رشد و تغذیه، کاهش نرخ بقا و بروز اختلالات رفتاری در تولیدمثل آن‌ها شود (Dutta و Arend، ۲۰۰۳). از سوی دیگر مغز ماهی‌ها واجد مقادیر بسیار اندکی آنتی‌اکسیدان، مقادیر قابل توجهی کاتاکول آمین قابل اکسیداسیون و هم‌چنین لیپیدهای غیراشباع قابل اکسیداسیون می‌باشند (Song و همکاران، ۲۰۰۶) که این امر موجب شده یا این بافت در مقایسه با دیگر بافت‌ها نسبت به آسیب‌های اکسایشی ناشی از پراکسیداسیون لیپیدی آسیب‌پذیرتر باشد. از مهم‌ترین شاخص‌های رفتاری ماهیانی که در معرض سم رانداپ قرار داشتند می‌توان به بروز رفتارهای غیرطبیعی، شنای نامتعادل، افزایش حساسیت به شرایط محیطی، افزایش ضربات سرپوش آبششی و شنا در سطح آب اشاره کرد که با افزایش غلظت و گذشت زمان تشدید گردید. مشابه این رفتار در ماهیان گوپی *Poecilia reticulata* (Viran و همکاران، ۲۰۰۳) گربه ماهی اروپایی *Silurus glanis* (Koprucu و همکاران، ۲۰۰۶) که در معرض سموم مختلف قرار داشته‌اند گزارش شده است. استفاده از شاخص‌های آسیب‌شناسی بافتی در مطالعات و ارزیابی تأثیر سموم بر روی آبزیان از جایگاه ویژه‌ای در سم‌شناسی محیطی برخوردار است (Rabitto و همکاران، ۲۰۰۵؛ Poleksic و همکاران، ۱۹۹۹) و امروزه به‌عنوان یک ابزار حائز اهمیت در بررسی پیامدهای نامطلوب آلاینده‌ها بر روی سلامت ماهی‌ها محسوب می‌شود. آبشش ماهی‌ها یکی از مهم‌ترین اندام‌هایی است که به‌طور مستقیم در تماس با آلاینده‌ها قرار دارد. تغییر ساختاری در آبشش ماهی‌های تحت تیمار رانداپ به‌خوبی گویای این امر است. نتایج آزمایشات بافت‌شناسی نشان داد که شدت عارضه آبشش از تیمار ۱ به سمت تیمار ۴ بیش‌تر شده ولی از لحاظ شدت آسیب بین تیمارهای مرحله اول و مرحله دوم چندان اختلافی دیده نشده است و تنها عوارض پرخونی، هیپرپلازی و نکروز سلولی در تیمارهای مرحله دوم نسبت مرحله اول کمی بیش‌تر بوده است. تغییرات ساختاری در آبشش ماهی‌های تحت تیمار دیازینون اعم از هایپرپلازی آبشش به هم چسبیدگی لاملاها و افزایش بیش از حد موکوس در دیگر ماهی‌های تحت تیمار سموم آلاینده‌های دیگر نیز مشاهده شده است (Poleksic و Karan، ۱۹۹۹). تعداد سلول‌های کبدی در تیمار مرحله اول بیش‌تر از تیمارهای مرحله دوم نمونه‌برداری بوده است. ولی فضای سینوزوئیدی در تیمارهای مرحله دوم نسبت به تیمارهای مرحله اول نمونه‌برداری بیش‌تر بوده. عارضه از تیمار ۱ به سمت تیمار ۴ (در هر دو مرحله) بیش‌تر دیده می‌شد. کبد تیمارهای نمونه‌برداری مرحله اول سالم‌تر از تیمارهای مرحله دوم بوده است. به‌طورکلی کبد ماهیان سالم و عارضه کم‌تری نسبت به آبشش‌ها داشته است و بیش‌ترین صدمه در آبشش این ماهیان دیده شده است. Hued و همکاران (۲۰۱۱) تأثیرات سم رانداپ را روی آبشش و کلیه (Anablepidae, Cyprinodontiformes) و فعالیت‌های جنسی ماهی نر آن کار کردند و تغییرات بافتی را به‌وضوح مشاهده کردند هم‌چنین فعالیت‌های جنسی نر برای تمایل لقاح کاهش پیدا کرد. Charlen و همکاران (۲۰۱۰) تأثیرات سم رانداپ را بر پارامترهای استرس و بافت گونه ماهی *Rhamdia quelen* کار کرد. Wannee و همکاران (۲۰۰۱) اثرات آسیب بافتی رانداپ یک علف‌کش گلی فسات را بر ماهی *Nile tilapia* (*Oreochromis niloticus*) بررسی کرد. Servizi و Martens (۱۹۸۷) مسمومیت شدید علف‌کش‌های Garlon, Roundup ۴ را برگونه‌های *Salmon*, *Daphnia*, and *Trout* را مورد بررسی قرار دادند. علی‌نژاد (۱۳۸۳) در مورد تعین LC_{50}96h سموم حشره‌کش ریجنت، قارچ‌کش هینوزان و علف‌کش رانداپ روی دو گونه

ماهی خاویاری ازون‌برون و قره‌برون کار کرد. در یک نتیجه‌گیری کلی براساس نتایج این تحقیق و سایر مطالعات انجام گرفته درخصوص تأثیر سم گلایفوزیت بر ماهی و سایر آبزیان می‌توان گفت که این سم برای آبزیان خصوصاً ماهیان، سمی بوده و هم‌چنین بچه‌ماهیان قزل‌آلا نسبت به سم گلایفوزیت حساس‌بوده‌وضمناًدر بافت آبشش نیز علائمی نظیر هیپرپلازی،خونریزی، پرخونی،نکروز سلولی،چسبندگی تیغه‌های ثانویه، تورم رشته‌های اولیه آبشش و در بافت کبد نیز علائمی نظیر آتروفی، رکود صفراوی،پرخونی و خونریزی را ایجاد می‌کندکه‌با اهداف این تحقیق هم‌سو می‌باشد و هم‌چنین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که میزان عکس‌العمل و ضایعات ناشی از این سم در آبزیان به عواملی مانندسن، گونه، وضعیت فیزیولوژی بدن آبزی، شرایط کیفی آب مانند درجه حرارت، pH و سختی کل بستگی دارد (خانجانی و پورمیرزا، ۱۳۸۴) به‌عنوان مثال، هر چه‌قدر درجه سختی آب بالا باشد از میزان سمیت این سم(گلایفوزیت)کاسته می‌شود.در پایان پیشنهاد می‌گردد تأثیرات سم گلایفوزیت و سایر سموم در درازمدت بر روی شاخص‌های خونی و بر روی سایر بافت‌های بدن، بر روی سنین مختلف ماهی قزل آلا مورد مطالعه قرار گیرد.

منابع

۱. **بهمنی، م. و کاظمی، ر.، ۱۳۷۷.** دستورالعمل تهیه و رنگ‌آمیزی بافت‌ها برای مطالعات بافت‌شناسی. انیستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان. ۱۶ صفحه.

۲. **خانجانی، م. و پورمیرزا، ع.ا.، ۱۳۸۴.** سم‌شناسی. انتشارات دانشگاه بوعلی سینا. چاپ سوم. ۴۴۰ صفحه.

۳. **علی‌نژاد،ر.، ۱۳۸۳.** تعیین Lc5096h سموم حشره‌کش ریجنت، قارچ‌کش هینوزان و علف‌کش راندآپ روی دو گونه ماهی خاویاری ازون‌برون و قره‌برون. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد شیلات. دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان. صفحات ۴۰ تا ۵۵.

۴. **فروزانفر، ع.، ۱۳۸۰.** روش‌های نوین در پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان. انتشارات مؤسسه تحقیقات شیلات ایران. ۲۶۰ صفحه.

۵. **موسوی، م.ح. و رستگار، م.ع.، ۱۳۷۶.** آفت‌کش‌ها درکشاورزی. انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین. ۳۰۰ صفحه.

۶. **واعظزاده، و.؛ ماشینچیان‌مرادی، ع.؛ اسماعیلی‌ساری، ع. و فاطمی، م.ر.، ۱۳۸۶.** بررسی غلظت سموم کشاورزی ارگانوکلره در بافت عضلانی دو ماهی اقتصادی کفال (*Liza aurata*) و سیاه کولی (*Vimba vimba*) در سواحل جنوبی دریای خزر. مجله علوم و تکنولوژی محیط زیست. دوره ۱۰، شماره ۴، صفحات ۸ تا ۱۴.

۷. **وثوقی، غ.ح. و مستجیر، ب.، ۱۳۸۱.** ماهیان آب شیرین. انتشارات دانشگاه تهران. چاپ پنجم. ۳۱۷ صفحه.

۸. **Charlene, C.; Milene, B.; Vânia, L.; Adriana, S.; Roberta, C.; Bárbara, C.; Alexandra, P. and Vera, M., 2010.** Roundup Effects on Oxidative Stress Parameters and Recovery Pattern of Rhamdia quelen.: Archives of Environmental Contamination & Toxicology. Vol. 60, No. 4, pp: 665-671.

۹. **Dutta, H.M. and Arends, D., 2003.** Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenaile bluegill sunfish. Environmental Research. Vol. 91, pp: 157-162.

۱۰. **Hued, A.C. and Oberhofer, S., 2012.** Exposure to a Commercial Glyphosate Formulation (Roundup) Alters Normal Gill and Liver Histology and Affects Male Sexual Activity of Jenynsia multidentata (Anablepidae, Cyprinodontiformes). Archives of Environmental Contamination and Toxicology. Vol. 62, pp: 107-117.

۱۱. **Koprucu, S.S.; Koprucu, K.; Ural, M.S.; Ispir, U. and Pala, M., 2006.** Acute toxicity of organophosphorous pesticide diazinon and its effects on behavior and some hematological parameters of fingerling European catfish (*silurus glanis* L.). Pesticide Biochemistry and Physiology. Vol. 86, pp: 99-105.

۱۲. **Khodadadi, M.; Samadi, M.; Rahmani, A.; Maleki, R.; Allahresani, A. and Shahidi, R., 2010.** Determination of organophosphorous and carbamat pesticides residue in drinking water resources of Hamadan. Iranian Journal of Health and Environment. Vol. 2, No. 4, pp: 250-57 (in Persian).

۱۳. **Poleksic, V. and Karan, V., 1999.** Effect of Trifluralin on Carp: Biochemical & Histological Evaluation. Ecotoxicology and Enviromental Safety. Vol. 43, pp: 213-221.

۱۴. **Servizi, J.A. and Martens, D.W., 1987.** Some effects of suspended fraser river sediments on sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). In H.D. Smith, L.M. and Wood, C.C., [ed.] Sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) population biology and future management. Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci. Vol. 96, pp: 254-264.

۱۵. **Sohrabi, T.; Hosseini, A. and Talebi, Kh., 2001.** Tailwater Quality Changes in the Rice-Paddies of Guilan and Foumanat. L. Sci. and Tech. Agric. and Nat. Resour. Vol. 5, No. 1, Isf. Univ. Tech. Isf., Iran.

۱۶. **Song, S.B.; Xu, Y. and Zhou, B.S., 2006.** Effects of hexachlorobenzene on antioxidant of Liver and brain of common carp (*Cyprinus carpio*). Chemosphere. Vol. 65, pp: 699-706.

۱۷. **Sabra, F.S. and Mehana, E.Y., 2015.** Pesticides toxicity in fish with particular reference to insecticides. Asian Journal of Agriculture and Food Sciences. Vol. 3, No. 01, pp: 40-60.

۱۸. **USEPA. 2005.** Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. EPA/630/P-03/001F, http://www.epa.gov/cancer guidelines.

۱۹. **Vale, J.A., 1998.** Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus OP insecticide poisoning. Toxicology Letters. Vol. 649, pp: 102-103.

۲۰. **Viran, R.; Erkoc, F.O.; Polat, H. and Kocak, O., 2003.** Invetigation of acute toxicity of deltamethrin on *guppies* (*Poecilia eticulate*). Ecotoxicol.Environ. Saf. Vol. 55, pp: 82-85.