

Histopathological lesions in liver and gill of *Capoeta capoeta gracilis* in exposed to butachlor

Mohammad Forouhar Vajargah^{1*},
Hamed Ghafari Farsani²,

Saeid Shahbazi Naserabad³, Aliakbar Hedayati⁴

1. Ph.D. Candidate in Aquatic Ecology, Faculty of Natural Resources, Guilan University, Iran

2. Ph.D. Candidate in Fisheries, Young Researchers and Elite Club, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

3. Ph.D. Candidate in Aquatic Ecology, Young Researchers and Elite Club, Yasooj Branch, Islamic Azad University, Yasooj, Iran

4. Associate Professor, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

(Received: Dec. 10, 2016 - Accepted: Apr. 14, 2019)

تغییرات آسیب‌شناسی بافت آبشش و کبد سیاه ماهی (*Capoeta capoeta gracilis*) در مواجهه با سم بوتاکلر

محمد فروهر واجارگاه^{۱*}، حامد غفاری فارسانی^۲،

سعید شهبازی ناصرآباد^۳، سید علی اکبر هدایتی^۴

۱. دانشجوی دکتری بوم‌شناسی آبریان، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، ایران

۲. دانشجوی دکتری شیلات، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۳. دانشجوی دکتری شیلات، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد یاسوج، دانشگاه آزاد اسلامی، یاسوج، ایران

۴. دانشیار، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۹/۲۰ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱/۲۵)

Abstract

Different organisms like aquatics are constantly exposed to pesticide residues, this study's overall assessment patho-biological changes in gills and livers of *Capoeta capoeta gracilis* during exposure to butachlor pollutant. First of all the 96-hour lethal concentration of the toxin was calculated as 46.2 mg per liter. Then, 96 fish were divided into four groups: one control group and three experimental groups (with concentrations of 0.2, 0.4, and 0.8 mg l⁻¹) and were exposed for 2 weeks. In the end point, histological changes were studied by hematoxylin and eosin staining method in light microscopy. Lethal concentration of this toxin was 2.46 mg/l that means moderate toxicity of this species. There was many histological changes in the gills of fish treated with butachlor include: hyperplasia, shortening the secondary lamella, edema, fusion, hemorrhage and atrophy in compared to the control group. Treatment with liver butachlor cause obstruction, dark granules, necrosis, and bile stagnation and sinusoid dilution in studied fish. The results of this study showed that in both studied organs with increase of toxin concentration, more severe tissue damage was observed, so gill and liver tissues of this fish could be used as an appropriate biomarker for pollutant measurement.

Keywords: Butachlor, *Capoeta capoeta gracilis*, Herbicide, Histopathology, Tissue.

چکیده

موجودات مختلف از جمله آبریان همواره در معرض آلودگی با سموم کشاورزی هستند، این مطالعه به ارزیابی کلی تغییرات پاتوبیولوژیکی آبشش و کبد سیاه ماهی در مواجهه با غلظت‌های تحت کشنده سم بوتاکلر پرداخته است. در ابتدا غلظت کشنده ۹۶ ساعته این سم ۲/۴۶ میلی‌گرم بر لیتر تعیین شد. سپس ۹۶ قطعه ماهی به چهار گروه شامل یک گروه شاهد و سه گروه تجربی (با غلظت‌های تحت کشنده ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۸ میلی‌گرم بر لیتر) تقسیم گردیدند و به مدت دو هفته در معرض این غلظت‌ها قرار گرفتند. در پایان دوره آزمایش، مقاطع بافتی تهیه و به روش هماتوکسیلین-ائوزین رنگ‌آمیزی و تغییرات بافتی با میکروسکوپ نوری مطالعه شد. غلظت کشنده سم بوتاکلر برای سیاه ماهی ۲/۴۶ میلی‌گرم بر لیتر به دست آمد که نشان‌دهنده سمیت نسبی آن برای این ماهی می‌باشد، تغییرات شدید بافت‌شناسی در آبشش شامل هیپرپلازی، کوتاه شدگی لاملای ثانویه، ادم، فیوزن، هموراژ و آتروفی نسبت به گروه شاهد دیده شد. همچنین آسیب‌های بافت کبد توسط بوتاکلر موجب بروز انسداد، گرانول تیره، نکروز، صفرا و سینوزوئید در سیاه ماهی شد. نتایج پژوهش حاضر حاکی از آن بود که، با افزایش غلظت سم، آسیب‌های بافتی شدیدتری در اندام‌های مورد مطالعه مشاهده شد، بنابراین دو بافت آبشش و کبد سیاه ماهی می‌توانند به‌عنوان یک بیومارکر مناسب جهت سنجش آلودگی به‌کار روند.

واژه‌های کلیدی: هیستوپاتولوژی، علف‌کش، بوتاکلر، سیاه ماهی، بافت.

مقدمه

امروزه آفت‌کش‌ها عمدتاً در کشاورزی و به‌منظور کنترل آفات گیاهی به کار برده می‌شوند، اما استفاده مداوم و بیش از حد آفت‌کش‌ها سلامت بشر را به مخاطره انداخته و اثرات معکوسی بر موجودات غیرهدف داشته و نیز موجب آلودگی منابع آب، خاک و هوا می‌گردند (Das & Mukherjee, 2003). آلاینده‌های آلی که در اثر فعالیت‌های صنعتی، کشاورزی و شهری بشر تولید می‌شوند، در غلظت‌های تحت‌کشنده، موجب بروز تغییرات هیستوپاتولوژیکی در آبزیان می‌شوند (Velisek *et al.*, 2009; Jayachandran & Pugazhendy 2009). این تغییرات به‌نوبه خود می‌توانند به‌عنوان شاخصی جهت بررسی اثرات آلاینده‌های مختلف انسانی در جانوران آبی، استفاده شوند و بازتابی از سلامت عمومی کل جمعیت اکوسیستم باشند (Cengiz & Unlu, 2006). بوتاکلر با فرمول مولکولی $C_{17}H_{26}ClNO_2$ و نیز فرمول شیمیایی N-(Butoxymethyl)-2-chloro-N-(2,6-diethylphenyl) acetamide یکی از سموم کشاورزی پرمصرف ارگانوکلره بوده با نام تجاری ماچتی تولید می‌گردد و جهت مبارزه با علف‌های هرز مزارع برنج در مناطق شمال مورد استفاده قرار می‌گیرد (Lasheidani *et al.*, 2008). آسیب‌شناسی بافتی یا تغییرات سلولی در بافت‌ها به‌عنوان شاخص زیستی ارزیابی اثرات استرس‌های محیطی بکار می‌رود. در واقع بررسی تغییرات هیستوپاتولوژی ماهی، به‌عنوان بخش اصلی بیومارکرهای مورد استفاده در برنامه‌های پایش اکوسیستم‌های آبی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Schwaiger, 1996; Cengiz & Unlu, 2006). موقعیت آبشش‌ها به‌عنوان یک اندام خارجی موجب می‌شود تا آن‌ها به‌عنوان اندام هدف اولیه آلاینده‌ها محسوب شوند. آسیب‌های وارده به آبشش با اختلالات تنفسی، نارسایی تنظیم اسمزی و یونی و

غیره همراه است. این اختلالات به نوبه خود زنگ خطری برای سلامت ماهیان به‌حساب می‌آید و می‌تواند بر تداوم حیات آن‌ها آثار مخربی بگذارد (Alazemi *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 2007).

کبد نیز ارگانی اولیه برای متابولیسم، سم‌زدایی بیوتیک‌های خارجی و همچنین دفع مواد مضر است. در عین حال که کبد توانایی کاهش دادن ترکیبات سمی را دارد، اما این مکانیزم‌های تنظیمی می‌تواند با افزایش غلظت‌های این ترکیبات تحت الشعاع قرار گیرد، که متعاقب آن باعث آسیب ساختاری این ارگان می‌گردد (Cengiz & Unlu, 2006; Velmurugan *et al.*, 2009).

سیاه ماهی (Capoeta) از ماهیان خانواده Cyprinidea از مرکز تا غرب آسیا پراکندگی داشته (Turan, 2008) که این جنس از لحاظ ماهی‌گیری ورزشی در آب‌های داخلی مهم و تا حدودی دارای ارزش اقتصادی می‌باشد. پراکنش زیر گونه *Capoeta capoeta gracilis* در ایران در حوضه‌های جنوب دریای خزر، حوضه دریاچه ارومیه، اطراف اصفهان و در جنوب شرقی خراسان می‌باشد (Abdoli, 2000).

در بسیاری از موارد به‌ویژه در مسمومیت‌های تحت کشنده لزوماً علایم کلینیکی و یا رفتارهای غیرطبیعی واضح در ماهیان ممکن است مشاهده نشود، که در چنین مواردی بررسی‌های پاراکلینیکی قادر است میزان آسیب‌های وارده را شناسایی کند. یکی از این روش‌های پاراکلینیکی بررسی‌های آسیب‌شناسی بافتی است که در بسیاری موارد می‌توان با پایش بافت‌هایی که در مسمومیت‌ها بیشتر در معرض آسیب قرار دارند وضعیت سلامت ماهی را چه در موارد مواجهه با مسمومیت کشنده و چه در موارد مسمومیت تحت‌کشنده مورد بررسی قرار داد (Cengiz, 2006; Farsani *et al.*, 2015). بنابراین در مطالعه حاضر با توجه به کاربرد گسترده سم بوتاکلر در مزارع برنج شمال کشور و نیز با توجه به این‌که مزارع برنج عمدتاً در حاشیه رودخانه‌ها واقع شده‌اند و نیز آگاهی از حضور سیاه ماهی در این

رودخانه‌ها، آثار این سم بر روی بافت آبشش و کبد سیاه ماهی مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

ابتدا ۲۳۱ قطعه سیاه ماهی با وزن متوسط 1 ± 16 گرم (میانگین $\pm SD$) از رودخانه‌ی زرین‌گل استان گلستان با استفاده از دستگاه الکتروشوکر صید شده و در ۱۱ عدد آکواریوم ۷۰ لیتری قرار داده شدند. رودخانه زرین‌گل یکی از سرشاخه‌های اصلی گرگان‌رود بوده که در استان گلستان قرار دارد و دارای موقعیت جغرافیایی (طول جغرافیایی ۴۰ ۴۳ ۵۴ تا ۳۶ ۱۱ شرقی و عرض جغرافیایی ۳۰ ۴۳ ۳۶ تا ۴۴ ۰۸ ۳۷ شمالی) می‌باشد. لازم به ذکر است ابتدا کلیه ماهیان صید شده از محل مذکور پس از انتقال به سالن آبی‌پروری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، به مدت ۱۲۰ ساعت با شرایط جدید (جدول ۱) آداپت و سازگار گردیدند. در این مدت تلفات ناشی از حمل و نقل و آداپتاسیون کمتر از حد انتظار بود و در این بین ماهیان سالم که دارای رفتار طبیعی بودند به منظور انجام آزمایش‌های سمیت و همچنین آزمایش اصلی به آکواریوم‌های تعبیه شده برای این منظور منتقل شدند. برای تعیین سمیت بوتاکلر از روش استاندارد O.E.C.D (1993) استفاده شد. از آنجا که اطلاعاتی در مورد بررسی سمیت بوتاکلر در این گونه موجود نبود، غلظت‌های متوالی از بوتاکلر برای سیاه ماهی در نظر گرفته شد، به طوری که غلظت کشنده ۱۰۰٪ تلفات و غلظت غیر کشنده در بین این غلظت‌ها قرار گیرد. ثبت تلفات به صورت روزانه طی مدت ۹۶ ساعت انجام شد و بعد از ثبت تلفات، اقدام به تعیین LC₁₀, LC₃₀, LC₅₀, LC₇₀, LC₉₀ در ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت با استفاده از نرم‌افزار پروبیت گردید (Finney, 1971).

به‌منظور انجام آزمایش تحت‌کشنده هیستوپاتولوژی نیز تعداد ۹۶ قطعه سیاه ماهی به آکواریوم‌های ۱۵۰ لیتری انتقال داده شدند. آزمایش اصلی به مدت ۱۴ روز

با ۴ تیمار (با غلظت‌های ۰، ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۸ میلی‌گرم بر لیتر) و ۳ تکرار برای هر تیمار انجام گردید. به هر آکواریوم ۸ عدد ماهی اختصاص داده شد. همچنین تیمار شاهد نیز در همان شرایط نگهداری شد. در طول دوره آزمایش سعی بر آن شد تا شرایط آکواریوم‌ها بدون استرس باشد و نیز هوادهی به‌طور مرتب در آکواریوم‌ها برقرار باشد. تمامی شرایط یکسان و بدون تغییر بود تا تنها عامل متغیر آلاینده باشد. در پایان دوره آزمایش ماهیان به‌وسیله عصاره گل میخک به میزان ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر بیهوش شدند. نمونه‌های آبشش و کبد اخذ و در محلول بوئن تثبیت شدند. سپس چندین مرتبه با الکل اتانول ۷۰ درصد مورد شستشو قرار گرفتند. پس از آن توسط الکل ۹۵ و ۱۰۰ و نهایتاً توسط الکل بوتانول آگیری شدند. در مرحله بعد سایر مراحل معمول آماده‌سازی بافت مانند شفاف‌سازی و آغشتگی به پارافین انجام گردید و با پارافین قالب‌گیری شدند. در نهایت از قالب‌های پارافینی برش‌هایی به ضخامت ۵-۶ میکرون توسط میکروتوم ساخت آلمان تهیه گردید. پس از نگهداری نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در آون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، به‌روش استاندارد رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین انجام گردید (Martoja & Martoja-Pierson, 1967; Velmurugan et al., 2009) سپس به منظور بررسی عوارض بافتی ناشی از اثر سم و مقایسه بافت‌های موردنظر با نمونه‌های شاهد، مقاطع بافتی حاصله در زیر میکروسکوپ نوری مدل Olympus BX60 مطالعه شدند و فتومیکروگراف‌های لازم با استفاده از دوربین دیجیتال (COOLPIX 950, Nikon) تهیه گردید.

جدول ۱. فاکتورهای فیزیکی‌شیمیایی آب در طول دوره

آداپتاسیون و آزمایش اصلی

| درجه حرارت (°C) | محلول pH | اکسیژن (mg/l) | سختی کل CaCO ₃ (mg/l) |
|--------------------|-------------|------------------|-------------------------------------|
| ۲۱±۱ | ۶/۸±۰/۷۶ | ۷/۳±۰/۸۲ | ۲۱±۱۵ |

نتایج

غلظت‌های مختلف سم بوتاکلر قرار داشتند نشان داد که این بافت‌ها دارای تغییرات هیستوپاتولوژیکی می‌باشند که نتایج این بررسی به شرح زیر می‌باشد:

بافت آبشش

شکل ۱ نمونه یک آبشش سالم سیاه ماهی (تیمار کنترل) را نشان می‌دهد. در طول مدت آزمایش هیچ تغییر قابل تشخیصی در آبشش سیاه ماهی گروه کنترل مشاهده نشد. لاملاها دارای ساختاری کاملاً طبیعی هستند و سالم به نظر می‌رسند.

جدول ۲. میزان مرگ و میر در تست سمیت حاد (LC₅₀ 96h) (تعداد در هر تیمار=۲۱ عدد) سیاه ماهی

| غلظت (mg/l) | ۲۴ ساعت | ۴۸ ساعت | ۷۲ ساعت | ۹۶ ساعت |
|-------------|---------|---------|---------|---------|
| شاهد | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ |
| ۱ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ |
| ۲ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ |
| ۲/۴ | ۰ | ۲ | ۴ | ۱۰ |
| ۲/۸ | ۲ | ۴ | ۱۰ | ۱۸ |
| ۳ | ۶ | ۱۳ | ۱۵ | ۱۹ |
| ۴ | ۶ | ۱۶ | ۱۹ | ۲۱ |
| ۵ | ۱۵ | ۱۸ | ۲۱ | ۲۱ |
| ۶ | ۱۷ | ۲۰ | ۲۱ | ۲۱ |
| ۷ | ۲۱ | ۲۱ | ۲۱ | ۲۱ |
| ۱۰ | ۲۱ | ۲۱ | ۲۱ | ۲۱ |

مهمترین عارضه‌های مشاهده شده در بافت آبشش سیاه ماهی که در معرض سم بوتاکلر با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر قرار داشتند ادم و فیوژن بود که در شکل ۲ قابل مشاهده است.

در طول مدت انجام آزمایش اصلی جهت تعیین LC₅₀ هیچ‌گونه مرگ‌ومیری در گروه شاهد مشاهده نشد. در طی تست تعیین محدوده کشندگی بوتاکلر بر روی سیاه ماهی در غلظت‌های صفر، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر، مرگ و میری مشاهده نشد ولی در غلظت‌های بیشتر از ۴ میلی‌گرم بر لیتر، درنهایت در طول ۹۶ ساعت میزان تلفات ۱۰۰ درصد بود (جدول ۲). همچنین در مطالعه حاضر صد درصد مرگ‌ومیر ماهیان در ساعات ابتدایی آزمایش در غلظت ۷ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد. نتایج به‌دست‌آمده برای LC₅₀ در مدت ۹۶ ساعت نشان داد که میزان LC₅₀ با افزایش غلظت و مدت زمان قرارگیری در برابر سم کاهش یافته است (جدول ۲)، به عبارت دیگر مقدار LC₅₀ در ۲۴ ساعت اولیه آزمایش همواره بیشتر از LC₅₀ در پایان ۹۶ ساعت می‌باشد. مقادیر LC₁₀، LC₃₀، LC₅₀ و LC₉₀ در ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت برای سم بوتاکلر بر روی سیاه ماهی در جدول ۳، ارائه شده است. میزان LC₅₀ 96-h سم بوتاکلر برای سیاه ماهی برابر ۲/۴۶ میلی‌گرم بر لیتر به‌دست آمد.

پس از انجام آزمایش و بررسی‌های دقیق ماکروسکوپی لام‌های تهیه شده از مقاطع بافتی آبشش و کبد، نتایج نشان داد که در گروه شاهد از هر دو بافت ساختار طبیعی و بدون عارضه قابل مشاهده است. با این حال مطالعات آسیب‌شناسی بافت‌های آبشش (شکل‌های ۱ تا ۴) (جدول ۴) و کبد (شکل‌های ۵ تا ۸) (جدول ۵) ماهیان که در معرض

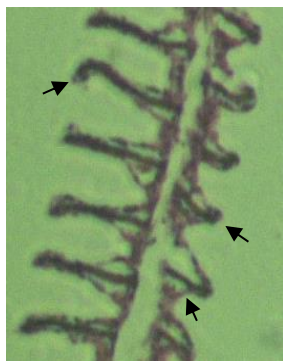
جدول ۳. غلظت کشنده (LC₁₀₋₉₀) بوتاکلر در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت برای سیاه ماهی (*Capoeta capoeta gracilis*)

| Point | غلظت سم بوتاکلر (mg/l) (حد پایینی - حد بالایی) | | | |
|------------------|--|------------------|------------------|------------------|
| | ۲۴ ساعت | ۴۸ ساعت | ۷۲ ساعت | ۹۶ ساعت |
| LC ₁₀ | ۲/۸۳ (۲/۳۱-۳/۲۱) | ۲/۰۹ (۱/۲۰-۲/۸۵) | ۲/۱۳ (۱/۷۴-۲/۳۵) | ۱/۸۲ (۱/۳۲-۲/۰۶) |
| LC ₃₀ | ۳/۸۰ (۳/۴۴-۴/۱۲) | ۲/۹۲ (۲/۳۹-۳/۳۴) | ۲/۵۸ (۲/۳۶-۲/۷۵) | ۲/۱۹ (۱/۹۱-۲/۳۶) |
| LC ₅₀ | ۴/۴۶ (۴/۱۴-۴/۸۳) | ۳/۵ (۳/۰۸-۴/۰۰) | ۲/۸۹ (۲/۷۲-۳/۰۹) | ۲/۴۶ (۲/۲۷-۲/۶۱) |
| LC ₉₀ | ۶/۱ (۶/۸۱-۵/۶۱) | ۴/۹۲ (۴/۳۵-۶/۰۴) | ۳/۶۶ (۳/۴۰-۴/۱۴) | ۳/۱ (۲/۸۹-۳/۵۰) |

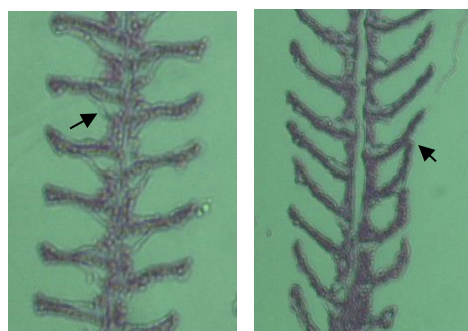
شده در تمامی سطوح غلظتی، قابل تشخیص بودند با این حال هموراژ و آتروفی با شدت بسیار کمتری نسبت به تیمار ۰/۸ میلی‌گرم بر لیتر قابل مشاهده بود، این در حالی است که در تیمار کنترل هیچ‌گونه عارضه‌ای قابل مشاهده نبود.



شکل ۱. تیمار کنترل: هیچ عارضه‌ای مشاهده نشد (با بزرگنمایی ۱۰۰×) و رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین و اتوزین



شکل ۳. مهم‌ترین عوارض بافتی مشاهده شده در تیمار سوم (غلظت ۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر): ۱- هیپرپلازی (چماقی شدن) ۲- کوتاه‌شدگی لاملای ثانویه ۳- ادم. (با بزرگنمایی ۱۰۰×) و رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین و اتوزین



شکل ۲. مهم‌ترین عوارض بافتی مشاهده شده در تیمار دوم (غلظت ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر): ۱- ادم (شکل سمت چپ)، ۲- فیوژن (شکل سمت راست). (با بزرگنمایی ۱۰۰×) و رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین و اتوزین



شکل ۴. مهم‌ترین عوارض بافتی مشاهده شده در تیمار چهارم (غلظت ۰/۸ میلی‌گرم بر لیتر): ۱- هموراژ ۲- کوتاه‌شدگی لاملای ثانویه ۳- آتروفی. (با بزرگنمایی ۱۰۰×) و رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین و اتوزین

با افزایش غلظت سم بوتاکلر (۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر)، عوارض گسترده‌تری در سطح آبشش سیاه ماهی قابل مشاهده بود که از این میان عارضه‌های هیپرپلازی، کوتاه‌شدگی لاملای ثانویه و ادم در شکل ۳ مشهود است.

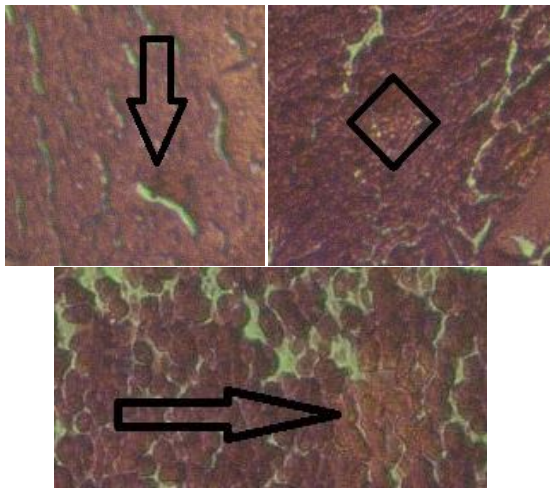
در نهایت در بیشترین غلظت از سم بوتاکلر (۰/۸ میلی‌گرم بر لیتر) علاوه بر عارضه‌های ایجاد شده در غلظت‌های پایین‌تر نظیر کوتاه‌شدگی لاملای ثانویه، فیوژن و ادم، آتروفی نیز در بافت آبشش ماهیان مورد آزمایش مشاهده گردید که در شکل ۴ نشان داده شده است.

همان‌طور که در جدول ۴ نشان داده شده است، بیشترین آسیب‌های وارده به بافت آبشش سیاه ماهی در معرض سم بوتاکلر با شدیدترین شدت در غلظت ۰/۸ میلی‌گرم بر لیتر ایجاد شده است، در غلظت ۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر سم بوتاکلر نیز همه عارضه‌های ایجاد

جدول ۴. آسیب‌های بافت آبشش سیاه ماهی طی غلظت تحت کشنده سم بوتاکلر

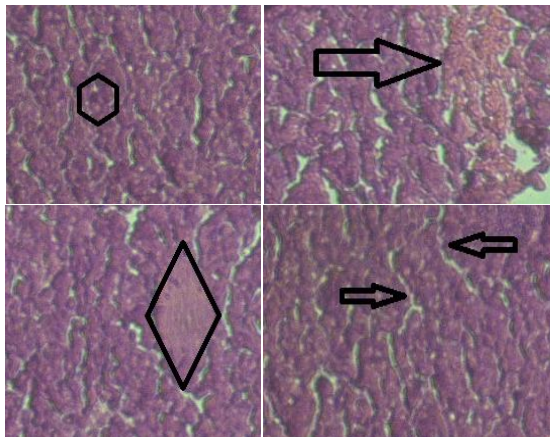
| آسیب | غلظت تحت کشنده (میلی‌گرم بر لیتر) | | | شاهد |
|--------------------------|-----------------------------------|-----|-----|------|
| | ۰/۸ | ۰/۴ | ۰/۲ | |
| ادم | +++ | +++ | +++ | - |
| فیوژن | +++ | ++ | ++ | - |
| هیپرپلازی راسی | +++ | +++ | - | - |
| کوتاه‌شدگی لاملای ثانویه | +++ | +++ | - | - |
| هموراژ | +++ | + | - | - |
| آتروفی | +++ | + | - | - |

عدم مشاهده عارضه (-)، کم (+)، متوسط (++)، شدید (+++)



شکل ۷. مهم‌ترین عوارض بافتی مشاهده شده در تیمار سوم (غلظت ۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر): ۱- انسداد (شکل پایین) ۲- نکروز (شکل بالا سمت راست) ۳- سینوزوئید (شکل بالا سمت چپ). (با بزرگنمایی ۱۰۰×) و رنگ آمیزی با هماتوکسیلین و اتوزین

سینوزوئید، گرانول تیره، انسداد و نکروز مهمترین عارضه‌های بافت کبد سیاه ماهی در معرض غلظت ۰/۸ میلی‌گرم بر لیتر سم بوتاکلر در شکل (۸) نشان داده شده است.



شکل ۸. مهم‌ترین عوارض بافتی مشاهده شده در تیمار چهارم (غلظت ۰/۸ میلی‌گرم بر لیتر): ۱- سینوزوئید (شکل پایین سمت راست) ۲- گرانول تیره (شکل بالا سمت چپ) ۳- انسداد (شکل بالا سمت راست) ۴- نکروز (شکل پایین سمت راست). (با بزرگنمایی ۱۰۰×) و رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین و اتوزین

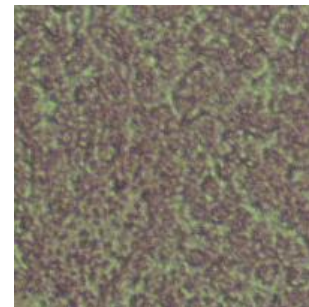
همان‌طور که در جدول ۵ نشان داده شده است، آسیب‌های وارده به بافت کبد سیاه ماهی در معرض

بافت کبد

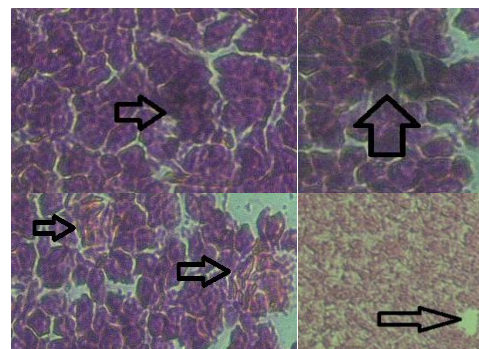
همان‌گونه که در شکل ۵ قابل مشاهده است، در تیمار شاهد بافت کبد هیچ‌گونه عارضه‌ای مشاهده نگردید به‌گونه‌ای که این شکل بافت کبد سالم (در شرایط عدم حضور سم) سیاه ماهی را در آزمایش حاضر نشان می‌دهد.

در غلظت ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر سم بوتاکلر بافت کبد سیاه ماهی عارضه‌های متعددی از جمله سینوزوئید، انسداد و رکود صفرا قابل مشاهده بود که در شکل ۶ نمایش داده شده است.

شکل ۷ عارضه‌های بافت کبد سیاه ماهی در معرض غلظت ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر را نشان می‌دهد که همانند غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر شامل انسداد، نکروز و سینوزوئید می‌باشد.



شکل ۵. تیمار کنترل: هیچ عارضه‌ای مشاهده نشد (با بزرگنمایی ۱۰۰×) و رنگ آمیزی با هماتوکسیلین و اتوزین



شکل ۶. مهم‌ترین عوارض بافتی مشاهده شده در تیمار دوم (غلظت ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر): ۱- گرانول تیره (شکل بالا سمت چپ) ۲- انسداد (شکل پایین سمت چپ) ۳- سینوزوئید (شکل پایین سمت راست) ۴- رکود صفرا (شکل بالا سمت راست). (با بزرگنمایی ۱۰۰×) و رنگ آمیزی با هماتوکسیلین و اتوزین

برای ماهی کپور سرگنده (*Hipophthalmichthys molitrix*) در ۴۸ ساعت ۰/۳۷ پی‌پی‌ام (Sadeghi & Hedayati, 2014) و برای ماهی گامبوزیا (*Gambusia*) ۱۵/۴۵ پی‌پی‌ام (Sadeghi et al., 2013) گزارش شده است. مطالعه Vajargah et al. (2014) مشخص نمود که غلظت کشنده سم بوتاکلر در ۹۶ ساعت برای ماهی سفید (*Rutilus frisii Kutum*) ۰/۲۵ پی‌پی‌ام می‌باشد. همچنین Vajargah & Hedayati (2017) میزان سمیت کشنده سم بوتاکلر برای ماهی کلمه خزری (*Rutilus rutilus caspicus*) و سوف معمولی (*Sander lucioperca*) را به ترتیب ۰/۳۴۲ و ۰/۷۶ پی‌پی‌ام گزارش کردند. با این حال Tomlin در سال ۱۹۹۴ میزان LC₅₀ 96h این سم را برای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ۰/۵۲ میلی‌گرم بر لیتر گزارش دادند. این تفاوت‌ها در میزان سمیت کشنده برای یک گونه ماهی به عوامل متعددی مانند وزن و سایز ماهی و همچنین فاکتورهای محیطی نظیر دما، pH، سختی کل و اکسیژن محلول بستگی دارد (Pandey et al., 2005).

نتایج مطالعه کنونی، تغییرات هیستوپاتولوژیکی بارزی را در آبشش سیاه ماهی در مواجهه با آلاینده بوتاکلر نشان داد. تغییرات دیده شده نظیر هیپرپلازی بافت پوششی تیغه‌های آبششی و متعاقب آن، کوتاه‌شدگی لاملاهای ثانویه، ادم، فیوژن و آتروفی از شایع‌ترین عوارض مشاهده شده در آبشش ماهیان در مواجهه با سم مذکور هستند. مطالعه Butchiram در سال ۲۰۰۹ با بررسی سم آلاکلر (Alachlor)، بر روی ماهی *Channa punctatus* نیز عوارض مشابهی نظیر آتروفی و فیوژن را بر بافت آبشش نشان داد. نتایج مطالعات دیگر نظیر Ahmadivand et al. (2014) در زمینه بررسی سم بوتاکلر بر آبشش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، همچنین مطالعه Ramah در سال ۲۰۱۳ با بررسی این سم بر تغییرات هیستوپاتولوژی آبشش کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*)، مطالعه Tilak et al. (2005) با بررسی

سم بوتاکلر در تمام تیمارها یکسان بوده که البته این عارضه‌ها در غلظت‌های مختلف با درجات متفاوتی از نظر شدت و کثرت قابل مشاهده است، به‌طور مثال درجه شدت عارضه گرانول تیره در غلظت ۰/۲ و ۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر سم بوتاکلر بیشتر از غلظت ۰/۸ میلی‌گرم بر لیتر سم بوتاکلر بود و این در حالی است که نکروز و سینوزوئید با بیشترین شدت در تیمار ۰/۸ میلی‌گرم بر لیتر سم بوتاکلر اتفاق افتاده بود.

جدول ۵. آسیب‌های بافت کبد سیاه ماهی طی غلظت تحت کشنده سم بوتاکلر

| آسیب | غلظت تحت کشنده (میلی‌گرم بر لیتر) | | |
|-------------|-----------------------------------|-----|-----|
| | شاهد | ۰/۲ | ۰/۴ |
| گرانول تیره | - | ++ | +++ |
| انسداد | - | +++ | +++ |
| رکود صفاوی | - | +++ | ++ |
| نکروز | - | ++ | +++ |
| سینوزوئید | - | ++ | +++ |

عدم مشاهده عارضه (-)، کم (+)، متوسط (++)، شدید (+++)

بحث و نتیجه‌گیری

بررسی‌های هیستوپاتولوژیک به‌عنوان ابزاری حساس و روشی سریع برای تشخیص اثرات مستقیم مواد شیمیایی و محرک‌ها در اندام‌های هدف ماهی در مقیاس آزمایشگاهی محسوب می‌شوند (Dezfuli et al., 2006; Camargo & Martinez 2007). در پژوهش حاضر میزان LC₅₀ 96h سم بوتاکلر برای سیاه ماهی برابر ۲/۴۶ میلی‌گرم بر لیتر بدست آمد. غلظت نیمه کشنده سم بوتاکلر در ۹۶ ساعت (LC₅₀ 96h) برای ماهیان در محدوده ۰/۱۴ تا ۰/۵۲ میلی‌گرم بر لیتر ذکر شده است (Tomlin, 1994; Ahmadivand et al., 2014). در پژوهشی Hedayati et al. (2014)، LC₅₀ 96h سم بوتاکلر برای ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) را ۱/۲۴۳ میلی‌گرم بر لیتر گزارش کرد. همچنین میزان LC₅₀ 96h سم بوتاکلر برای ماهیان سیچلاید گورخری (*Cryptoheros nigrofasciatus*) ۸/۹۳ پی‌پی‌ام،

غلظت‌های تحت کشنده سم بوتاکلر بر ماهی *Channa punctatus* و نیز فلزات سنگین نظیر نانو اکسید روی و سولفات روی بر روی سیاه ماهی نیز عوارض مشابهی را نشان داد.

در بررسی حاضر تغییرات شدید بافت‌شناسی در آبشش ماهیان در معرض سم بوتاکلر شامل آتروفی، هموراژ و ادم ممکن است به دلیل جذب وسیع این ماده شیمیایی از این طریق باشد (Cengiz, 2006). Keizer *et al.* (1990)، تأثیر سم دیازینون در ماهی گوپی (Guppy) بر روی اندام‌های حیاتی آبشش عوارضی نظیر پرخونی، هیپرپلازی، چسبندگی، نکروز، آتروفی و عریض شدن لاملاها ایجاد نمودند که بعضی از این عوارض نظیر نکروز و آتروفی، تخریب بافتی است که در پی تأثیر سم بر روی سلول‌های اندام‌های فوق‌الذکر به وجود می‌آید.

در پژوهش حاضر هیپرپلازی (افزایش تعداد سلول‌ها) یکی از عوارض معمول و شایع در بافت آبشش سیاه ماهی در معرض سم بوتاکلر بود. مطالعات پیشین نشان داده است هیپرپلازی بافت پوششی سطح تیغه‌های ثانویه آبششی ممکن است به‌عنوان یک مکانیسم دفاعی سبب کاهش میزان سطح تنفس و افزایش فاصله در سطح انتشار بوتاکلر و ورود آن به گردش خون مطرح باشد (Cengiz & Unlu, 2006). بررسی هیستوپاتولوژیکی سموم مختلف بر بافت آبشش ماهیان، بر هیپرپلازی به‌عنوان یک عارضه شایع به منظور عمل دفاعی برای مقابله با مسمومیت بیشتر تأکید کرده است (Lauren & McDonald, 1985; Van *et al.*, 2004; Farsani *et al.*, 2015). همچنین نتایج مطالعه حاضر نشان داد در تیمار ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر از سم بوتاکلر عارضه فیوژن قابل مشاهده است، فیوژن لاملایی می‌تواند محافظی در کاهش میزان آسیب‌پذیری سطح آبشش باشد (Safavi *et al.*, 2015; Farsani *et al.*, 2015; Forouhar *et al.*, 2017). در واقع در اثر عارضه فیوژن، اپیتلیوم دو تیغه‌ای ثانویه مجاور به‌واسطه

هیپرپلازی و یا برآمدگی و در برخی موارد هیپرتروفی اپیتلیوم به هم اتصال می‌یابد و موجب توقف تبادل گاز از طریق سطوح مربوطه می‌شود (Cengiz & Unlu, 2006).

در پژوهش حاضر در آبشش سیاه ماهیان، ادم یکی از عارضه‌های مشهود حتی در تیمارهای با غلظت پایین سم بود، ادم در آبشش ماهیان به حالتی اطلاق می‌شود که لایه اپیتلیوم از سطح لاملاهای ثانویه جدا می‌شود؛ در این حالت بین اپیتلیوم و عروق خونی فاصله می‌افتد. ادم نیز مانند هیپرپلازی در حقیقت یک عمل دفاعی بوده و به این طریق ماهی سعی می‌کند تا از مسمومیت بیشتر در امان بماند (Cengiz *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2006; Unlu & Cengiz, 2011). همانگونه که در بخش نتایج بیان شد، بررسی هیستوپاتولوژیکی آبشش در تیمار با بیشترین غلظت از سم بوتاکلر (۰/۸ میلی‌گرم بر لیتر) آتروفی را نشان داد، که در واقع تخریب بافت آبششی می‌باشد.

بنابراین با بررسی کلی عارضه‌های مشاهده شده در اثر سم بوتاکلر بر بافت آبشش سیاه ماهی، می‌توان چنین بیان نمود که این آلاینده نیز مانند سایر آلاینده‌های مشابه باعث به راه افتادن مکانیسم‌های دفاعی جهت ممانعت از ورود بیشتر آلاینده‌ها به درون بدن ماهی می‌شوند. در واقع تغییرات بافتی ایجاد شده توسط آلاینده‌های آلی در غلظت‌های تحت کشنده، به منظور سازگاری ماهی با محیط زندگی آلوده رخ داده است به همین دلیل باعث مرگ ماهی نمی‌شود. هرچند تفاوت‌ها در میزان تخریب و نوع عارضه ممکن است بخاطر غلظت علف‌کش و نیز زمان قرار گرفتن در معرض یا گونه ماهی بوده باشد.

در مجموع می‌توان گفت، تغییرات پاتولوژیکی ایجاد شده در آبشش، نتیجه اثر مستقیم آلاینده بوتاکلر بوده و یک شاخص کیفی مناسب و مطمئن برای نشان دادن استرس ناشی از ورود سطوح مختلف این سم به محیط زیست سیاه ماهی، محسوب می‌شود.

اشاره نمود (Maxwell & Dutta, 2005; Ogundiran *et al.*, 2010; Farsani *et al.*, 2017; Forouhar Vajargah *et al.*, 2015). از دیگر تغییرات هیستوپاتولوژیک شایع قابل مشاهده در کبد ماهیان در معرض سم می‌توان به انسداد گردش خون اشاره کرد (Boran *et al.*, 2012; Farsani *et al.*, 2015; Forouhar Vajargah *et al.*, 2017) که در پژوهش حاضر نیز قابل مشاهده بود. در واقع مطالعات پیشین نشان داده است که غلظت بالای بوتاکلر باعث از بین بردن ساختار سلول می‌گردد (Tilak *et al.*, 2007).

همانگونه که بیان شد در تیمار اول این آزمایش (۰/۲ غلظت سم بوتاکلر) رکود صفرا در کبد سیاه ماهی قابل مشاهده بود. کاهش صفرا در داخل سلول‌های کبدی نشانگر تحت تأثیر قرار گرفتن متابولیسم است (Fanta *et al.*, 2003). در واقع رکود صفرا از جمله عارضه‌هایی است که در صورت تداوم می‌توانند منجر به صدمات و جراحات کبدی و اختلالات در مکانیسم‌های فیزیولوژیک مهم کبدی گردد (Hedayati *et al.*, 2013).

در نهایت می‌توان چنین بیان کرد در پژوهش حاضر تغییرات ساختاری ایجاد شده در آبشش و کبد ماهیان در معرض سم بوتاکلر، الفاکنده پاسخ موجودات به تغییرات محیطی بوده به طوری که دو نوع اصلی تغییرات ساختاری قابل مشاهده بود. نوع اول اثرات سمی مستقیم آلاینده بوده که منجر به نکروز کبد شده و نوع دوم تکامل مکانیسم‌های جبرانی در آبشش نظیر هیپرپلازی سلول‌ها و ادم برای مقابله با استرس می‌باشد. این مکانیسم‌های جبرانی فاصله بین محیط خارجی و خون را افزایش داده و به‌عنوان سدی برای ورود مواد آلاینده به کار می‌روند (Belicheva & Sharova, 2015).

نتایج این مطالعه نشان داد تغییرات هیستوپاتولوژیکی سیاه ماهی در مواجهه با آلاینده بوتاکلر تغییرات اختصاصی نیستند و ممکن است،

همانگونه که گفته شد کبد توانایی کاهش ترکیبات سمی بدن را دارا می‌باشد، اما با این وجود ممکن است با انجام این فرایندهای کاهنده سموم، دچار آسیب ساختاری گردد (Cengiz & Unlu, 2006). دلایل مختلفی مبنی بر حساسیت کبد به آلاینده‌های محیطی وجود دارد از جمله اینکه آلاینده‌ها همراه با آب اغلب از طریق مجاری گوارشی وارد روده شده و پس از جذب توسط سپاهرگ‌های کبدی وارد کبد می‌شوند، بنابراین کبد اولین اندامی است که در معرض آلاینده‌های جذب شده در روده قرار می‌گیرد (Hedayati *et al.*, 2013).

در پژوهش حاضر در تمامی تیمارهای آزمایش، چهار عارضه سینوزوئید، گرانول تیره، انسداد و نکروز قابل مشاهده بود. به عبارت دیگر غلظت‌های مختلف سم بوتاکلر اثرات مشابهی را بر بافت کبد سیاه ماهی داشتند. با این حال در تیمار ۰/۲ از غلظت سم بوتاکلر رکود صفرا نیز قابل مشاهده بود. مطالعه Gholamian (2014) نیز با بررسی تأثیرات سم بوتاکلر بر بافت کبد بچه تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) نیز عوارض مشابهی را نشان داد.

گشادشدگی سینوزوئیدها از عوارض بافت کبد تحت تنش آلاینده‌ها است که در پژوهش حاضر نیز در تیمارهای آزمایشی قابل مشاهده بود. در این حالت فضای سینوزوئیدی عریض‌تر شده و تعداد گلبول‌های قرمز بیشتری در کنار هم قرار می‌گیرند. به‌نظر می‌رسد که علت این تغییر، نیاز بیشتر بافت کبد به خون برای افزایش سمیت زدایی آلاینده‌ها می‌باشد (Rodrigues *et al.*, 2010).

از دیگر عارضه‌های شایع در پژوهش حاضر و نیز بسیاری از مطالعات هیستوپاتولوژیکی بافت کبد، می‌توان به نکروز اشاره کرد. نکروز دلایل مختلفی دارد که از جمله آن می‌توان به ناتوانی ماهی در بازسازی سلول‌های کبدی جدید و یا تلاش ماهی برای پاکسازی سم از بدنش در طول فرآیند سم زدایی

و بر شدت عوارض بیفزاید. با توجه به بررسی تغییرات هیستوپاتولوژیکی دو بافت آبشش و کبد می‌توان بیان نمود که این دو بافت سیاه ماهی می‌توانند به‌عنوان یک بیومارکر مناسب جهت سنجش آلودگی به‌کار روند.

توسط آلاینده‌های متفاوت القا شوند. همچنین بوتاکلر به‌عنوان یکی از ترکیبات آلوده کننده و بر هم زننده اکوسیستم‌های آبی قادر است با جذب شدن از محیط و ورود به محیط داخلی بدن ماهی سبب بروز عارضه و تغییرات اثرگذاری در بافت‌های آبشش و کبد آن شده

REFERENCES

- Abdoli, A.; (2000). The Inland Water Fishes of Iran. Iranian Museum of Nature and Wildlife, Tehran, 378p.
- Ahmadvand, S.; Farahmand, H.; Mirvaghefi, A. R.; Eagderi, S.; Shokrpour, S.; Rahmati-Holasoo, H.; (2014). Histopathological and haematological response of male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) subjected to butachlor. *Veterinarni Medicina*; 59(9): 433-439.
- Alazemi, B.M.; Lewis, J.W.; Andrews, E.B.; (1996). Gill damage in the freshwater fish *Gnathonemus petersii* (family: Mormyridae) exposed to selected pollutants: an ultrastructural study. *Environment Technology*; 17(3): 225-238.
- Ateeq, B.; Farah, M.A.; Ali, M.N.; Ahmed, W.; (2002). Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by Allium root tip test. *Mutation Research*; 514: 105-113.
- Belicheva, L. A.; Sharova, J. N.; (2015). Assessment of fish health status under long-term water pollution: Vygozero reservoir, north-west Russia. In *Environment. Technology. Resources. Proceedings of the International Scientific and Practical Conference*; 2: 368-373.
- Boran, H.; Capkin, E.; Altinok, I.; Terzi, E.; (2012): Assessment of acute toxicity and histopathology of the fungicide captan in rainbow trout. *Experimental and Toxicological Pathology*; 64: 175-179.
- Butchiram, M.S.; Tilak, K.S.; Raju, P.W.; (2009). Studies on histopathological changes in the gill, liver and kidney of *Channa punctatus* (Bloch) exposed to Alachlor. *Environment Biology*; 30(2): 303-306.
- 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.
- Cengiz, E.I.; (2006). Gill and kidney histopathology in the freshwater fish *Cyprinus carpio* after acute exposure to deltamethrin. *Environmental Toxicology and Pharmacology*; 22(2): 200-204.
- Cengiz, E.I.; Unlu, E.; (2006). Sublethal effects of commercial deltamethrin on the structure of the gill, liver and gut tissues of mosquitofish *Gambusia affinis*, A microscopic study. *Environmental Toxicology and Pharmacology*; 21(3): 246-253.
- Chen, J.; Dong, X.; Xin, Y.; Zhao, M.; (2011). Effects of titanium dioxide nano-particles on growth and some histological parameters of zebrafish (*Danio rerio*) after a long-term exposure. *Aquatic Toxicology*; 101(3-4): 493-499.
- Das, B.K.; Mukherjee, S.C.; (2003). Toxicity of cypermethrin in *Labeo rohita* fingerlings: biochemical, enzymatic and haematological consequences. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology Pharmacology*; 134(1): 109-121.
- Dezfuli, B. S.; Simoni, E.; Giari, L.; Manera, M.; (2006). Effects of experimental terbuthylazine exposure on the cells of *Dicentrarchus labrax* (L.). *Chemosphere*; 64(10): 1684-1694.

- Fanta, E.; Rios, F.S.A.; Romão, S.; Vianna, A.C.C.; Freiburger, S.; (2003). Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. *Ecotoxicology and environmental safety*; 54(2): 119-130.
- Farsani, H.G.; Rashidian, G.; Narimanizad, F.; Khodadadi, M.; Gerami, M. H.; (2015). Histopathology and Biochemical Analysis of Common Carp (*Cyprinus carpio*) Exposed to Sublethal Concentrations of Carboxin-thiram (*Vitavax thiram*). *Journal of Fisheries and Aquatic Science*; 10(5): 337-346.
- Finney, D.; (1971). Probit analysis, a statistical treatment of the sigmoid response curve. Cambridge. 256 p.
- Forouhar Vajargah, M.; Mohamadi Yalsuyi, A.; Hedayati, A.; Faggio, C.; (2018). Histopathological lesions and toxicity in common carp (*Cyprinus carpio* L. 1758) induced by copper nanoparticles. *Microscopy research and technique*; 81(7): 724-729.
- Gholamian, S.; (2014). The effect of Butachlor sublethal concentrations on some biochemical indices and liver tissue of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*). *Journal of Marine Biology*; 6(2): 1-9.
- Hedayati, A.; Jahanbakhshi, A.; Ghaderiremazi, F.; (2013). Aquatic toxicology. Publications University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, 210p. (In Persian)
- Hedayati, A.; Vajargah, M.F.; Yalsuyi, A.M.; Abarghoei, S.; Hajiahmadyan, M.; (2014). Acute toxicity test of pesticide abamectin on common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Coastal Life Medicine*; 2(11): 841-844.
- Jayachandran, K.; Pugazhendy, K.; (2009). Histopathological changes in the gill of *Labeo rohita* (Hamilton) fingerlings exposed to atrazine. *American-Eurasian Journal of Scientific Research*; 4(3): 219-221.
- Keizer; J.D.; Agostino; G.; Vittozzi; L.; (1990). Metabolism based differences of diazinon toxicity to guppy (*P.reticulata*) and zebra fish (*Brachydanio rario*). 12th ESCPB Conference.
- Khabbazi, M.; Harsij, M.; Hedayati, S.A.A.; Gerami, M.H.; Ghafari-Farsani, H.; (2014 a). Histopathology of rainbow trout gills after exposure to copper. *Iranian Journal of Ichthyology*; 1(3): 191-196.
- Khabbazi, M.; Harsij, M.; Hedayati, S.A.A.; Gerami, M.H.; Ghafari-Farsani, H.; (2014 b). Investigation on destructive effect of water-born CuO nanoparticles on gill histopathology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquatic Physiology and Biotechnology*; 2(1): 75-88.
- Lasheidani, M.F.; Balouchi, S.N.; Keyvan, A.; Jamili, S.; Falakrou, K.; (2008). Effects of butachlor on density, volume and number of abnormal sperms in caspian kutum (*Rutilus frisii kutum*, Kamenskii 1901). *Research Journal of Environmental Sciences*; 2(6): 474-482.
- Laurèn, D.J.; McDonald, D.G.; (1985). Effects of copper on branchial ionoregulation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Comparative Physiology*, 155(5): 635-644.
- Martoja, R.; Martoja-Pierson, M.; (1967). *Initiation Aux Techniques de l histology animale*. Masson et Cie, Paris, 345 p.
- Maxwell, L. B.; Dutta, H. M.; (2005). Diazinon- induced endocrine disruption in blue gill sunfish, *lepomis macrochirus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*; 60(1): 21-70.
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development); (1993). *OECD Guidelines for Testing of Chemicals* OECD, Organization for Economic. Paris
- Ogundiran, M.A.; Fawole, O.O.;

- Adewoye, S.O.; Ayandiran, T.A.; (2010). Toxicological impact of detergent effluent on juvenile of African Catfish (*Clarias gariepinus*) (Buchell 1822). Agriculture and Biology Journal of North America; 1(3): 330-342.
- Pandey, S.; Kumar, R.; Sharma, S.; Nagpure, N.S.; Srivastava, S.K.; Verma, M.S.; (2005). Acute toxicity bioassays of mercuric chloride and Malathion on air-breathing fish *Channa punctatus* (Bloch). Ecotoxicology and environmental safety; 61(1): 114-120.
- Ramah, K.; (2013). Histopathological study on the effect of rice herbicides on grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). African Journal of Biotechnology; 10(7): 1112-1116.
- Rodrigues, R.V.; Miranda-Filho, K.C.; Gusmão, E.P.; Moreira, C.B.; Romano, L.A.; Sampaio, L.A.; (2010). Deleterious effects of water-soluble fraction of petroleum, diesel and gasoline on marine pejerrey *Odontesthes argentinensis* larvae. Science of the Total Environment; 408(9): 2054-2059.
- Roy, N.K.; (2002). Chemistry of pesticides. Indian Agriculture. Research. 346 pp.
- Sadeghi, A.; Hedayati, A.; (2014). Investigation of Acute Toxicity Diazinon, Deltamethrin, Butachlor and pretilachlor on Zebra Cichlid (*Cryptoheros nigrofasciatus*). Iranian Journal of Toxicology; 8(25): 1086-1092.
- Sadeghi, A.; Imanpoor, M.R.; Hedayati, A.; Masoodi, E.; (2013). Determination of LC, NOEC and LOEC for Toxin Butachlor on Gambusia. World Journal of Zoology; 8(3): 308-311.
- Safavi, F.; Poorbagher, H.; Javanshir, A.; Eagderi, S.; (2015). Effect of different concentration of cypermethrin on gill of *Capoeta damascina* (Valenciennes, 1842). Journal of Aquatic Ecology; 4(4): 88-95.
- Schwaiger, J.; Fent, K.; Stecher, H.; Ferling, H.; Negele, R.D.; (1996). Effects of sublethal concentrations of triphenyltinacetate on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Archives of Environmental Contamination and Toxicology; 30(3): 327-334.
- Smith, C. J.; Shaw, B. J.; Handy, R. D.; (2007). Toxicity of single walled carbon nanotubes to rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects. Aquatic toxicology; 82(2): 94-109.
- Tilak, K. S.; Veeraiyah, K.; Thathaji, P. B.; (2005). Histopathological changes in gill tissues of the fish *Channa punctatus* exposed to sublethal concentration of butachlor and machete. Aquatic Biology; 20(1): 111-115.
- Tilak, K. S.; Veeraiyah, K.; Thathaji, P. B.; (2007). Histopathological changes in the kidney of the fish *Channa punctata* exposed to sublethal concentration of Butachlor and Machete. Journal of Ecotoxicology and Environmental Monitoring; 17(2): 129.
- Tomlin, C.; (1994). The Pesticide Manual. 10th ed. Crop Protection Publications, British Crop Protection Council, Farnham, Surrey, UK. 1341 pp.
- Turan, C.; (2008). Molecular systematics of the Capoeta (Cypriniformes: Cyprinidae) species complex inferred from mitochondrial 16s rDNA sequence data. Acta Zoologica; 51: 1-14.
- Vajargah, M. F.; Hedayati, A.; (2017). Acute Toxicity of Butachlor to *Rutilus rutilus caspicus* and *Sander lucioperca* in Vivo Condition. Transylvanian Review of Systematical and Ecological Research; 19(3): 85-92.
- Vajargah, M.F.; Hedayati, A.; Yalsuyi, A.M.; Abarghoei, S.; Gerami, M.H.; Farsani, H.G.; (2014). Acute toxicity of Butachlor to Caspian Kutum (*Rutilus frisii Kutum* Kamensky, 1991). Journal of Environmental Treatment Techniques; 2(4): 155-157.
- Van, H.D.; Vosloo, A.; Nikinmaa, M.;

- (2004). Effects of short-term copper exposure on gill structure, methallothionein and hypoxia-inducible factor- 1 α (HIF-1 α) levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*; 69: 271-280.
- Velisek, J.; Svobodova, Z.; Piackova, V.; (2009). Effects of acute exposure to bifenthrin on some haematological, biochemical and histopathological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinarni Medicina*; 54(3): 131-137.
- Velmurugan, B.; Mathews, T.; Cengiz, E.I.; (2009). Histopathological effects of cypermethrin on gill, liver and kidney of fresh water fish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822), and recovery after exposure. *Environmental technology*; 30(13): 1453-1460.