

"مقاله پژوهشی"

اثرات علف‌کش اگزادیازون (رونستار) بر برخی شاخص‌های خونی ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*)

مهديه دراج^۱، سورنا ابدالی^۱، ایوب یوسفی جوردهی^{۲*}، علی حلاجیان^۲

۱- گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- انستیتو تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای خزر، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، رشت، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۵/۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۲/۱۷

چکیده

اگزادیازون علف‌کش انتخابی است که به منظور کنترل علف‌های هرز در کشاورزی استفاده می‌شود. هدف از این تحقیق، تعیین اثرات علف‌کش اگزادیازون بر برخی شاخص‌های خونی ماهی فیتوفاگ بود. بعد از سازگاری تعداد ۲۷۰ ماهی فیتوفاگ پرورشی با وزن متوسط ۵۰ تا ۱۰۰ گرم و طول متوسط 13 ± 1 سانتی‌متر به مخزن‌هایی که هر یک ظرفیت ۲۰۰ لیتر را داشتند، معرفی شدند. غلظت‌های سم اگزادیازون در مخازن ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر بود. نمونه‌برداری خون از سیاهرگ دمی ۳ ماهی از هر تیمار (هر تیمار با ۳ تکرار) به صورت کاملاً تصادفی طی ۷۲ ساعت صورت گرفت. بر اساس نتایج حاصل، بعد از معرفی سم بطور قابل ملاحظه‌ای ماهیان ناآرام شدند و برای تنفس روی آب می‌آمدند و در ساعات بعدی بتدریج تغییرات بالینی مشاهده شد. یعنی دم آنها قرمز و تحلیل رفته بود. نتایج شاخص‌های خونی نشان داد که میزان هماتوکریت و هموگلوبین و تعداد گلبول قرمز در تیمار شاهد با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت ($p < 0/05$). میانگین غلظت هموگلوبین خون، میانگین هموگلوبین گلبول قرمز و تعداد گلبول‌های سفید بین شاهد و سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری نشان نداد ($p > 0/05$). اتوزینوفیل، لنفوسیت، مونوسیت، نوتروفیل در تیمار شاهد با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت ($p < 0/05$). بطور کلی، سم اگزادیازون برخی شاخص‌های خونی ماهی را بطور معنی‌داری تغییر داد که بیانگر اثر سمیت حاد آن بر ماهی فیتوفاگ می‌باشد.

کلمات کلیدی: اگزادیازون، شاخص‌های خونی، فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*)

مقدمه

می‌باشد (Tavares – Dias and Moraes, 2007; Satheeshkumar *et al.*, 2010).

شاخص‌های میانگین حجم یاخته قرمز (MCV)، میانگین هموگلوبین یاخته قرمز (MCH) و میانگین غلظت هموگلوبین خون (MCHC) عوامل وابسته به تعداد یاخته‌های قرمز، درصد هماتوکریت و غلظت هموگلوبین خون بوده، تابع تغییرات آنها هستند. وضعیت تغذیه‌ای، سن و شرایط محیطی فاکتورهای اصلی پاسخگویی به تغییرات شاخص‌های یاخته‌های خونی در ماهیان می‌باشند (Bani & Haghi Vayghan, 2011).

اندازه‌گیری شاخص‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک خون می‌تواند به‌عنوان یک شاخص در سم‌شناسی و پایش زیستی بکار رود (Holye *et al.*, 2007; Carvalho and Ferrnandes, 2006; Xiaoyan *et al.*, 2009; Cavas *et al.*, 2005).

تغییر در میزان و سطوح این پارامترها می‌تواند منعکس‌کننده پاسخ‌های ماهیان به تغییرات در محیط زندگی آنها باشد (Satheeskumar *et al.*, 2010). پارامترهای هماتولوژیک در ماهیان ممکن است تحت تأثیر عوامل فیزیولوژیکی و همچنین عوامل خارجی از جمله دمای آب، فصل، استرس‌ها، غذا و انواع آلودگی‌ها، دچار تغییر شوند (Sandstorm, 1989; Oshode *et al.*, 2008; Alen, 1989; Javed, 2003).

ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*) یکی از مهم‌ترین گونه‌های پرورشی ماهیان گرمابی می‌باشد. این گونه به واسطه رشد سریع، قابلیت سازگاری و گوشت لذیذ از گونه‌های غالب در ترکیب ماهیان گرمابی به شمار می‌رود (نظری، ۱۳۷۵).

توسعه روزافزون تکنولوژی در کشاورزی و افزایش تولید در واحد سطح سبب افزایش مصرف سموم کشاورزی جهت مبارزه با آفات گیاهی و سایر بیماریها شده است. از علف‌کش‌ها با اهداف مختلف در کشاورزی استفاده می‌شود که از مهمترین موارد مصرف آنها مبارزه با علف‌های هرز می‌باشد. علف‌کش‌ها دسته‌ای از آفت‌کش‌ها هستند که در جهان کاربرد دارند (Cerdeira *et al.*, 2004).

اگزادiazون علف‌کشی است انتخابی - تماسی که در سال ۱۳۵۰ به ثبت رسیده است. اگزادiazون به عنوان برای کنترل علف‌های هرز مزارع برنج در ایران به کار می‌رود. این علف‌کش در مناطق شمال کشور مورد استفاده قرار می‌گیرد و همچنین بازدارنده عمل فتوسنتز و بازدارنده آنزیم پروتوپورفیرینوژن اکسیداز می‌باشد و متعلق به گروه اکسادiazول می‌باشد (WWW.Gyahcovp.ir).

اگزادiazون توسط ریشه و برگ گیاه قابل جذب بوده و با حرکت در آوندها به بخش‌های دیگر انتقال می‌یابد. نام تجاری آن رونستار (Ronstar) می‌باشد (زند و باغستانی، ۱۳۸۱).

اندازه‌گیری شاخص‌های خونی به عنوان یک ابزار تشخیصی جهت ارزیابی زیستی تغییرات پاتوفیزیولوژیکی حاد و مزمن از قبیل تغذیه، کیفیت آب و بیماری کاربرد دارند (De pedro *et al.*, 2005).

درصد هماتوکریت و پارامترهای وابسته شاخص‌های خونی جهت تشخیص کم‌خونی در ماهیان هستند که به تغذیه، سن و بیماری وابسته

از آنجایی که اطلاعات کافی در مورد اثر علف کش اگزادiazون روی گونه فیتوفاگ وجود ندارد و با توجه به وجود این علف کش در آب مزارع پرورشی و مشکلات ناشی از آن (جلالی جعفری و آقازاده مشکى، ۱۳۸۶)، این مطالعه با هدف تعیین اثرات فیزیولوژیکی علف کش اگزادiazون بر برخی از شاخص های سیتولوژیکی خون ماهی فیتوفاگ به انجام رسید.

مواد و روش ها

این تحقیق در تابستان ۱۳۹۴ در بخش فیزیولوژی و بیوشیمی مؤسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر به انجام رسید. برای مطالعه اثرات آلاینده گی در غلظت های ۵ و ۱۰ میلی گرم در لیتر روی تعداد ۲۷۰ ماهی فیتوفاگ جوان با طول

لیتر آب

$$\text{درصد خلوص} = \frac{\text{غلظت} \times \text{میزان سم (X)}}{\text{درصد خلوص}}$$

میکروسکوپ نوری انجام شد (Maheswaran *et al.*, 2008).

در شمارش افتراقی گلبول سفید از هر ماهی جهت تهیه گسترش خونی ۳ لام تهیه گردید. گسترش های تهیه شده بعد از تثبیت با محلول رنگی گیمسا ۱۰٪ به مدت ۲۰ دقیقه رنگ آمیزی، سپس با آب شستشو و خشک گردیده، و توسط لنز ۴۰ میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت (کازمی و همکاران، ۱۳۸۹).

برای اندازه گیری درصد هماتوکریت دستگاه میکروهماتوکریت مورد استفاده قرار گرفت و به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۷۰۰۰ دور در دقیقه

خون گیری از ماهیان در گروه شاهد و تیمارهای ۰ و ۱۰ میلی گرم به صورت کاملاً تصادفی به تعداد ۳ ماهی از هر مخزن در هر تیمار با ۳ تکرار با استفاده از سرنگ های هپارینه با حجم ۲ میلی لیتر از سیاهرگ (Caudal vein) و از زیر باله مخرجی تا ۹۶ ساعت انجام شد. پس از خونگیری از ماهیان، استفاده از دستگاه سانتریفیوژ با دوز ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه پلاسما تهیه گردید (کازمی و همکاران، ۱۳۸۹). جهت شمارش گلبول های قرمز به کمک ملانژور و محلول رقیق کننده هایم (Hiem) شمارش در هر دو توسط لام هموستیومتر با لنز ۴۰ توسط

(One-way Anova) انجام و نتایج به صورت Mean±SE ارائه گردید (پورغلام و همکاران، ۱۳۸۹)

نتایج

بر اساس نتایج حاصل، تعداد کل گلبول‌های سفید خون ماهی فیتوفاگک در مواجهه با سم اگزادیازون پس از گذشت ۷۲ ساعت در تیمار شاهد با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری نداشت ($p > 0.05$). تعداد یاخته‌های لنفوسیت، نوتروفیل، ائوزینوفیل و مونوسیت خون ماهی فیتوفاگک در تیمار شاهد با سایر تیمارها پس از ۷۲ ساعت مواجهه با سم اگزادیازون تغییرات معنی‌داری نشان داد ($p < 0.05$) (جدول ۱). میانگین تغییرات حجم متوسط سلولی (MCV) و میانگین غلظت هموگلوبین خون (MCHC) و میانگین هموگلوبین گلبول قرمز خون (MCH) در شاهد و سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری نشان نداد ($p > 0.05$) (جدول ۲).

تعداد گلبول قرمز (RBC) ماهیان پس از ۷۲ ساعت مواجهه با سم اگزادیازون در تیمار شاهد با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت. حداقل تعداد گلبول قرمز (20000 ± 13800000 عدد) در هر میلی‌لیتر مکعب خون در غلظت ۱۰ میلی‌گرم سم دیازینون در زمان ۷۲ ساعت و حداکثر تعداد آنها در تیمار شاهد برابر با 35000 ± 1806700 عدد در هر میلی‌لیتر مشاهده گردید. میزان هماتوکریت و

سانتریفوژ گردید. و درصد هماتوکریت با استفاده از خط کش‌های مخصوص خوانده شد.

غلظت هموگلوبین خون به روش رنگ‌سنجی و جذب هموگلوبین به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل ۷۷-۶۵۰۵) (شرکت Jenway ساخت انگلیس) و کیت پارس آزمون با طول موج ۵۴۰ نانومتر ثبت گردید. و مقدار هموگلوبین بر حسب گرم در دسی‌لیتر محاسبه شد (کازمی و همکاران، ۱۳۸۹). شاخص یاخته‌های قرمز (MCH, MCHC, MCV) که برای توصیف اندازه یاخته‌ها و میزان هموگلوبین آنها به کار می‌رود و از شمارش یاخته‌های قرمز هموگلوبین و هماتوکریت به دست می‌آید، از طریق روابط زیر محاسبه گردید (Penev *et al.*, 2007).

$$\text{حجم متوسط گلبول قرمز بر حسب فمتولیت (fl)} \\ M.C.V = \frac{HCT(\%) \times 10}{RBC / \text{million}}$$

غلظت متوسط هموگلوبین گلبولی بر حسب پیکوگرم (pg)

$$M.C.H = \frac{Hb(\text{gr}\%) \times 10}{RBC / \text{million}}$$

غلظت متوسط هموگلوبین گلبول‌های قرمز بر حسب درصد

$$M.C.H.C = \frac{Hb \times 100}{HCT}$$

آمار عمومی و توصیفی برای بیان حداقل و حداکثر میانگین / انحراف معیار / واریانس و خطای استاندارد مربوط به شاخص‌های خونی مورد استفاده قرار گرفت. داده‌ها در نرم افزار Excel ثبت و برای بررسی وضعیت نرمال بودن داده‌ها از آزمون (کولموگروف-اسمیرنوف) بهره گرفته شد و با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS تحت ویندوز و آنالیز آماری به روش آنالیز واریانس یک طرفه

هموگلوبین در تیمار شاهد با سایر تیمارها اختلاف معنی داری نشان داد ($p < 0/05$) (جدول ۲).

جدول ۱: تغییرات تعداد کل و شمارش افتراقی گلبول های سفید خون ماهی فیتوفاگ در مواجهه با سم آگزا دیازون پس از ۷۲ ساعت

تیمارها			
شاخص خونی	تیمار شاهد	غلظت ۵ میلی گرم در لیتر	غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر
گلبول های سفید (N/mm^3)	$4866 \pm 1677/29^a$	$5366 \pm 1193/03^a$	$5966 \pm 1850/49^a$
لنفوسیت (%)	$61/33 \pm 1/52^a$	$61/33 \pm 1/52^a$	$63/00 \pm 1^a$
نوتروفیل (%)	$24/33 \pm 0/33^a$	$24/33 \pm 0/33^a$	$31/00 \pm 2/08^b$
ائوزینوفیل (%)	$0/33 \pm 0/57^a$	$0/66 \pm 0/57^a$	$0/33 \pm 0/57^a$
منوسیت (%)	$4/00 \pm 2/00^a$	$4/00 \pm 1/00^a$	$2/00 \pm 1/00^a$

تیمارهای مشخص شده با حروف مختلف، اختلاف معنی داری با یکدیگر دارند ($p < 0/05$)

جدول ۲: تغییرات شاخص های خونی وابسته به گلبول قرمز در ماهی فیتوفاگ در مواجهه با سم آگزا دیازون پس از ۷۲ ساعت

تیمارها			
شاخص خونی	تیمار شاهد	غلظت ۵ میلی گرم در لیتر	غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر
گلبول های قرمز (N/mm^3)	1806700 ± 35000^d	1560000 ± 30000^{bc}	1380000 ± 20000^{ab}
هماتوکریت (%)	38 ± 2^b	30 ± 2^a	29 ± 1^a
هموگلوبین (gr/dl)	$7/10 \pm 0/10^d$	$6 \pm 0/10^b$	$5/26 \pm 0/25^a$
(fl) MCV	213 ± 2^a	209 ± 2^a	210 ± 6^a
(pg) MCH	40 ± 2^a	39 ± 1^a	40 ± 2^a
(gr/dl) MCHC	19 ± 2^a	19 ± 1^a	20 ± 2^a

تیمارهای مشخص شده با حروف مختلف، اختلاف معنی داری با یکدیگر دارند ($p < 0/05$)

بحث

در این مطالعه اثرات تحت کشنده سم اگزادiazون بر علائم بالینی و برخی شاخص‌های خونی بچه‌ماهیان فیتوفاگک طی ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت اندازه‌گیری شد.

تعداد لنفوسیت، نوتروفیل، ائوزینوفیل و مونوسیت‌ها در تیمار شاهد با سایر تیمارها تغییرات معنی‌داری نشان نداد. عمادی و همکاران (۱۳۹۷)، بیان داشتند افزایش دوز سم اگسادiazون اثرات منفی بر شاخص‌های رشد و ضریب تبدیل مواد غذایی ماهی کپور به همراه داشت و که خود روند سمیت و خون‌سازی موجود را تشریح می‌کند که این روند با اثر سمیت سم مورد تحقیق تطبیق دارد.

زنجان‌ی و همکاران (۱۳۹۶)، دریافتند که علف-کش اگزادiazون سبب آسیب DNA گلبول‌های قرمز (اریتروسیت‌ها) در ماهی کپور معمولی پس از ۳۰ روز گردید. این می‌تواند به تفاوت‌های ذاتی در سیستم ترمیم‌کننده آنزیم و یا تغییرات در گلبول‌های قرمز نسبت داده شود. با این وجود، مطالعات زیادی برای اثبات این فرضیه مورد نیاز است.

در پاسخ به یک عامل استرس‌زا مانند قرار گرفتن در معرض سموم دفع آفات، ماهی‌ها در تلاش برای جبران چالش تحمیل شده به آنها و در نتیجه مقابله با استرس، دچار یک سری تغییرات بیوشیمیایی و خونریزی می‌شوند (Wendelaar-Bonga, 1997). بطور مشابهی، تغییرات قابل توجهی در شاخص‌های خونی ماهیان در معرض اکسادiazون در این مطالعه مشاهده شد.

Saravanan و همکاران (۲۰۱۷)، با ارزیابی اثرات سمیت حاد ۵/۵، ۵ و ۵۰ میکروگرم بر لیتر غلظت اگزادiazون در ماهی کپور معمولی به مدت ۹۶ ساعت،

دریافتند که این علف‌کش باعث کاهش قابل توجه RBC، Hb و Hct می‌شود. در حالی که، MCV، MCH، WBC در گروه تحت تیمار بالاتر بود.

کاهش RBC، Hct و Hb در این مطالعه می‌تواند به عنوان یک پاسخ جبرانی توضیح داده شود که ظرفیت حمل اکسیژن را برای حفظ انتقال گاز کاهش می‌دهد و نشان دهنده تغییر درصد خون آب برای تبادل گاز در غشای لاملا می‌باشد. همچنین، تغییر مشاهده شده در سطح WBC در مطالعه حاضر نشان دهنده پتانسیل ایمنی سمی علف‌کش و همچنین فعالیت اگزادiazون آن است. زیرا اگزادiazون لکوسیت‌ها را هدف قرار داده است (Ahmadivand et al., 2015). Ajoni و همکاران (۲۰۱۵)، نشان دادند که با افزایش غلظت اگزادiazون در گربه ماهی (*Clarias gariepinus*) میزان رشد و وزن کاهش یافت که اثرات منفی این سم را نشان می‌دهد.

به طور خلاصه، این مطالعه نشان می‌دهد که اگزادiazون برای اندام‌های ماهی بسیار سمی است و باعث تغییرات قابل توجهی در شاخص‌های خونی می‌شود و همچنین نشان‌دهنده پتانسیل جهش‌زایی اگزادiazون در سلول‌های گلبول قرمز فیتوفاگک است، که نشان می‌دهد استفاده از آن با توجه به تأثیر بالقوه آن بر جانوران آبی باید با دقت کنترل شود. برای روشن‌شدن اثرات سمی آن ماهیان مطالعات بیشتری لازم است. پارامترهای بیولوژیکی ماهی، به ویژه تولید مثل و سیستم ایمنی بدن مورد نیاز است. از این‌رو، بایستی مصرف این سم و سموم مشابه را با ارزیابی دقیق در محیط‌های کشاورزی استفاده کرد که کمترین آسیب را به آبزیان مهم پرورشی برساند.

سپاسگزاری

از حمایت های بی دریغ پرسنل انستیتو تحقیقات بین المللی تاس ماهیان دریای خزر تشکر قدردانی به عمل می آید.

منابع

۱. پزند، ذ.، ۱۳۷۸. تعیین میزان LC50 سم علف کش رونستار بر ماهیان خاویاری قره برون و ازون-برون. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، ۱۱۰ ص.
۲. پورغلام، ر.، مکرمی رستمی، ع.، سعیدی، ع.ا.، شریف پور، ع.، عزتی، ا.، پورغلام، ح.، ۱۳۸۹. بررسی اثرات حاد باکتری *Streptococcus faecium* بر برخی از بافتها و مشخصه های خونی بچه ماهیان قزل-آلای رنگین کمان. مجله علمی شیلات ایران، ۱۹(۲)، ۱۸-۹.
۳. جلالی جعفری، ب.، آقازاده مشکى، م.، ۱۳۸۶. سمومیت ماهیان در اثر فلزات سنگین و اهمیت آن در بهداشت عمومی. انتشارات مان کتاب. تهران. ۱۳۸ صفحه.
۴. زنجانی، س.، و عمادی، ح.، و جمیلی، ش.، و ماشینچیان مرادی، ع. ۱۳۹۶. بررسی اثرات سم آگزا دیازون بر میزان آسیب DNA و پارامترهای خون شناسی در ماهی کپور معمولی. مجله بین المللی زیست شناسی آبزیان، ۵(۶): ۲۹۳ - ۳۸۷.
۵. زند، ا.، باغستانی، م.ع.، ۱۳۸۱. مقاومت علف های هرز به علف کش ها انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد. ص ۴.
۶. عمادی، ح.، شریعت زاده، س.، جمیلی، ش.، ماشینچیان، ع.، ۱۳۹۷. بررسی اثرات علف-کش
- اگساد یارژیل بر پارامترهای رشد و بیوشیمیایی در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). مجله علمی شیلات ایران، ۶۰-۵۵، (۲) ۶.
۷. کاظمی، ر. پوردهقانی، م.، یوسفی جوردهی، ا.، یارمحمدی، م.، ۱۳۸۹. روش های کاربردی خون شناسی ماهیان. انتشارات بازرگان ایران. ۱۹۴ ص.
۸. نظری، ر.، ۱۳۷۵. زیست شناسی و تکثیر ماهی کپور نقره ای. معاونت تکثیر و پرورش آبزیان، اداره کل آموزش و ترویج. ۹۴ ص.
9. Ahmadivand, S., Farahmand, H., Mirvaghefi, A., Eagderi, S. & Zargar, A. 2015. Effects of (anti) androgenic endocrine disruptors (DEHP and butachlor) on immunoglobulin M (IgM) and leukocytes counts of male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 94, 695-700.
10. Ajoni, F., Ajiboye, A., 2015. Effects of oxadiazon on Nutrient Utilization and growth of African catfish (*Clarias gariepinus*). American journal of Agricultural Science, 2(3), 121-125.
11. Alen, G., 1989. Toxicology, water pollution and fish physiology. CRC press INC. USA.
12. Bani, A., Kaghi Vayghan, A., 2011. Temporal variations in haematological and biochemical indices of the Caspian kutum. *Rutilus frisii kutum*. Ichthyology Research, 58, 54-59.
13. Carvalho, C.S., Fernandez, M.N., 2006. Effect of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high PH. Aquaculture, 25(1), 109-117.
14. Cavas, T., Garankon., N.N., 2005. Induction of micronuclei and binucleiin blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate food and chemical toxicology, 43, 569-574.
15. Cerdeira, A., Santos, N., Ueta, J., Shuhama, I., Pessoa, M., Smith, S.,

- hematological and biochemical indices on wild marine teleost fishes from vallar estuary southeast coast of India journal of comparative clinical pathology, 10, 1091-1095.
25. Tavares, M., Moraes, F.R., 2007. Hematological and biochemical reference intervals for farmed channel catfish. Journal of fish biology, 71, 383-388.
26. Xiaoyan, Z., Mingyu, L., Khalid, A., Weinmin, W., 2009. Comparative of hematology and serum biochemistry of cultured and wild dojo loach, *Misgrurus angullicadatus*. Fish physiology biochemistry, 35, 435-447.
27. Wwww.Gyahcovp.ir
- Lanchote, V. 2004. Atrazine in water and biodegradation in a recharge area of Guarany Aquifer in Brazil. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 73, 117-124.
16. De Pedro, N., Guijarro, A. E., Lopez-patino, M.A., Marinez- Alvarez, R., Delgado Daily, M., 2005. Seasonal variation in hematological and blood biochemical parameters in Tench (*Tinca tinca*). Aquaculture Research, 36, 185-196.
17. Holye, I., Shaw, B.J., Handy, R.D., 2007. Dietary copper exposure in the African walking catfish, *Clarias gariepinus*: Transient osmoregulatory disturbances and oxidative stress. Aquatic Toxicology, 83 (1), 62-72.
18. Javed, M., 2003. Relationship among water, sediments and plankton for the uptake and accumulation of heavy metals in the river ravi. Indian Journal of pharmacology, 2, 326-331.
19. Maheswaran, R., Pevapanl, A., Muralidharan, S., Velmurug, B., Ignaeimuthu, S., 2008. Heematological studies of fresh water fish, *Clarias batrachus* (L) exposed to mercuric chloride International Journal of integrative biology, 1, 2(1), 49-54.
20. Oshode, O.A., Bakare, A., Adeogun, A.O., Efuntoye, M.O., Sowldnmi, A.A., 2008. Ecotoxicological assessment using *Clarias gariepinus* and microbial characterization of leachate from municipal solid waste I and fill. International journal of Environmental Research, 2(4), 391-400
21. Penev, M., Pukova-Peneva, P., 2007. Laboratory hematology. Artik sofia.
22. Sandstorm, O., 1989. Seasonal variations in some blood parameters in Prerch, *Perca fluviatilis* L. journal of applied Ichthyology, 5, 85-95.
23. Saravanan, M., Kim, J.Y., Hur, K.J., Ramesh, M., Hur, J.H., 2017. Responses of the freshwater fish *Cyprinus carpio* exposed to different concentrations of butachlor and oxadiazon. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 11, 275-281.
24. Satheeshkumar, p., Ananthan, G., Senthikumar, D., Jeevanantheam, K., 2010. Comparative investigation on