بهره‌برداری و پرورش آبزیان
جلد پنجم، شماره چهارم، زمستان ۱۳۹۵
http://japu.gau.ac.ir

اثر مسمومیت تحت کشنده حشره‌کش دانیتول بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گلبول‌های قرمز ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

سید مرتضی حسینی*
استادیار پژوهشی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی ایران،
مرکز تحقیقات ذخایر آبزیان آب‌های داخلی، گرگان
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۲/۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۲٤

چکیده

دانیتول یک حشره‌کش غیر سیستمیک است که در کشاورزی استفاده می‌شود. با توجه به مطالعات معدود در خصوص سمیت دانیتول در ماهی‌ها، هدف از این تحقیق تعیین سمیت حشره‌کش دانیتول در ماهی کپور معمولی و اثر آن بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گلبول‌های قرمز بود. به‌این منظور، ماهیان به‌مدت ۹٦ ساعت در معرض غلظت‌های صفر، ۰/۲، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر دانیتول قرار گرفتند و غلظت کشنده دانیتول با استفاده از داده‌های تلفات ۰/٤۷ میلی‌گرم بر لیتر محاسبه شد. سپس، جهت بررسی اثر مسمومیت تحت کشنده دانیتول بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گلبول‌های قرمز، ماهیان به‌مدت ۲۱ روز در معرض ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر دانیتول قرار گرفتند. در پایان دوره، از تیمارهای مختلف نمونه خون گرفته و جهت بررسی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان استفاده شد. نتایج نشان داد که دانیتول یک ماده "بسیار سمی" برای ماهی کپور معمولی است. همچنین، مسمومیت با دانیتول باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های سوپرکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پرکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز می‌شود ولی این کاهش معنی‌دار نبود. همبستگی منفی و معنی‌داری بین غلظت دانیتول و

*مسئول مکاتبه: seyyedmorteza.hoseini@gmail.com

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان وجود داشت. در نهایت می‌توان گفت مسمومیت تحت کشنده با دانیتول باعث بروز استرس اکسیداتیو در ماهی کپور می‌شود و اندازه‌گیری آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌تواند شاخص مناسبی برای بررسی آن باشد.

واژه‌های کلیدی: آلاینده، آفت‌کش، خون، فیزیولوژی

مقدمه

سموم کشاورزی از جمله رایج‌ترین آلاینده‌های محیط زیست هستند. انواع مختلفی از سموم کشاورزی از گذشته تا به امروز مورد استفاده بشر بوده‌اند. این سموم وارد آب‌های سطحی و زیر زمینی می‌شوند و باعث تهدید زندگی موجودات آبزی می‌شوند (واچوپ، ۱۹۷۸؛ فلوری، ۱۹۹٦؛ ریتر، ۱۹۹۰). لذا تعیین میزان مسمومیت و آثار این سموم بر آبزیان ضروری است. این سموم آثار زیانبار متنوعی بر ماهی دارند. کاهش رشد، تضعیف سیستم ایمنی، آسیب‌های بافتی، اختلالات هورمونی و تولید مثلی، کاهش توانایی مقابله با استرس و بروز استرس اکسیداتیو از جمله آثار مخرب سموم کشاورزی در ماهیان است (شولز و دابروسکی، ۲۰۰۱؛ وارو و همکاران، ۲۰۰۲؛ دوروال و همکاران، ۲۰۰۳؛ اوروچ، ۲۰۱۰؛ کوک و همکاران، ۲۰۰۵؛ هانسون و همکاران، ۲۰۰۷؛ کریستین و همکاران، ۲۰۰۳؛ هارفورد و همکاران، ۲۰۰۵؛ فانت و همکاران، ۲۰۰۳).

انواع مختلفی از سموم کشاورزی وجود دارند که یکی از انواع آن‌ها سموم پایرتروئیدی هستند که امروزه مصرف زیادی دارند. پایرتروئید یک ترکیب شیمیایی است که در گیاه *Chrysanthemum cineraiaefolium* وجود دارد (ویران و همکاران، ۲۰۰۳). این ماده دارای خاصیت حشره‌کشی است، لذا از آن به‌طور گسترده‌ای در تولید انواع حشره‌کش‌ها مانند، دلتامترین، سایپرمترین، فنپروپاترین و غیره استفاده می‌شود. سموم پایرتروئیدی حدود ۳۰ درصد بازار جهانی حشره‌کش‌ها را به خود اختصاص داده‌اند (کوپروکو و آیدین، ۲۰۰٤).

دانیتول ($C_{22}H_{23}NO_3$) یکی از انواع جدید سموم پایرتروئیدی است که جهت مبارزه با آفات در مزارع گوجه‌فرنگی، تمباکو، پنبه و باغات میوه استفاده می‌شود (بنایی و همکاران، ۲۰۱٤). در کل سموم پایرتروئیدی برای آبزیان بسیار سمی بوده و به‌دلیل چربی دوستی، به راحتی جذب بدن آن‌ها می‌شوند (سوتا و همکاران، ۲۰۱۰). سمیت حاد دانیتول در ماهی کپور علفخوار

(*Ctenopharyngodon idella*) و شاه‌کولی (*Alburnus mossulensis*) به‌ترتیب ۳/۵۹ و ۱۲۱/۳۸ میکروگرم بر لیتر گزارش شده است (بنایی و همکاران، ۲۰۱٤؛ احمد و همکاران، ۱۹۹۵). با توجه به مطالعات اندکی که روی مسمومیت دانیتول انجام شده، تحقیقات بیشتری در خصوص سمیت آن در ماهیان نیاز است.

یکی از شایع‌ترین آثار آلاینده‌ها بر ماهیان، ایجاد استرس اکسیداتیو است (تالاس و همکاران، ۲۰۰۸؛ جیا و همکاران، ۲۰۱۱؛ گارسیا مدینا و همکاران، ۲۰۱۰؛ تلس بانولئوز همکاران، ۲۰۰۹؛ اوزکان و همکاران، ۲۰۱۲). استرس اکسیداتیو زمانی ایجاد می‌شود که نرخ تولید اکسنده‌ها از نرخ خنثی‌سازی آن‌ها در بدن بیشتر باشد. در صورت بروز استرس اکسیداتیو، رادیکال‌های آزاد در بدن تولید می‌شوند که به بافت‌ها حیاتی بدن آسیب رسانده و باعث بروز مشکلات جدی و مرگ می‌شوند (ماریتیم و همکاران، ۲۰۰۳). در شرایط طبیعی، دو مکانیسم آنتی‌اکسیدانی بدن را در مقابل رادیکال‌های آزاد محافظت می‌کنند: مکانیسم آنزیمی و غیرآنزیمی. مکانیسم غیرآنزیمی شامل عملکرد موادی همچون ویتامین C و E و عناصری مثل سلنیوم می‌باشد. مکانیسم آنزیمی وابسته به آنزیم‌هایی است که فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارند که این آنزیم‌ها شامل سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پرکسیداز و گلوتاتیون اس ترنسفراز می‌باشند (ماریتیم و همکاران، ۲۰۰۳). اندازه‌گیری فعالیت این آنزیم‌های می‌تواند شاخص مناسبی از وضعیت آنتی‌اکسیدانی ماهی باشد. مطالعات پیشین نشان داده که سموم پایرتروئیدی باعث بروز استرس اکسیداتیو در ماهیان می‌شوند (سعید و همکاران، ۲۰۰۳؛ انصاری و همکاران، ۲۰۱۱؛ جین و همکاران، ۲۰۱۳؛ گواردیولا و همکاران، ۲۰۱٤). اگرچه اطلاعات در خصوص بروز استرس اکسیداتیو به‌دلیل مسمومیت با دانیتول در درسترس نیست. لذا، بررسی وضعیت اکسیداتیو ماهی در مواجهه با دانیتول حائز اهمیت می‌باشد. از این رو، این تحقیق به بررسی اثر سم دانیتول بر استرس اکسیداتیو در گلبول قرمز ماهی کپور پرداخته است.

مواد و روش‌ها

ماهیان مورد استفاده در این تحقیق بچه ماهیان کپور معمولی با وزن حدود ۳۰ گرم بودند. تعداد ۲۷۰ قطعه ماهی کپور در این تحقیق استفاده شد که ۱۸۰ قطعه آن برای تعیین مسمومیت حاد و مابقی برای بررسی اثر سم بر استرس اکسیداتیو استفاده شدند.

جهت تعیین سمیت حاد دانیتول، ابتدا دامنه مناسب غلظت دانیتول بر اساس اطلاعات پیشین و آزمایشات اولیه تعیین شد و ماهیان در معرض غلظت‌های مختلف سم (صفر، ۰/۲، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر دانیتول) قرار گرفتند. به‌این منظور، برای هر غلظت، سه مخزن ۳۰ لیتری در نظر گرفته شد. در هر مخزن ۷ ماهی قرار داده شد و آب مخازن روزانه تعویض و مقدار سم موردنیاز محاسبه و به این مخازن اضافه شد. یک تیمار نیز به‌عنوان شاهد در آب عاری از سم قرار گرفت. تلفات ماهیان پس از ۹٦ ساعت ثبت گردید و بر اساس آن غلظت نیمه کشنده ۹٦ ساعته محاسبه شد. در خلال آزمایش، ماهیان تلف شده به‌صورت روزانه از مخازن خارج شدند. همچنین، مخازن به‌طور مداوم هوادهی می‌شدند.

پس از مشخص شدن LC50 ۹٦ ساعته، یک پنجم و یک دهم این غلظت برای آزمایش تحت کشنده استفاده شد. یک گروه از ماهیان هم به‌عنوان شاهد در آب تمیز قرار گرفتند. برای هر تیمار ۳ تکرار و برای هر تکرار ۱۰ ماهی استفاده شد و دوره آزمایش ۲۱ روز بود. ماهیان در تانک‌های ۲۰۰ لیتری قرار داده شدند. غلظت موردنیاز دانیتول برای هر یک از تانک‌ها به‌صورت روزانه محاسبه شد و به آب تانک اضافه شد. ماهیان روزانه ۲ درصد وزن بدن تغذیه شدند. میزان تعویض آب روزانه ۷۵ درصد بود و تانک‌ها به‌طور مداوم هوادهی شدند. در پایان آزمایش، نمونه خون از همه تیمارها گرفته شد. برای خونگیری ابتدا از هر تانک یک ماهی صید و با محلول پودر میخک (۲ گرم بر لیتر) بیهوش شد. سپس نمونه خون با استفاده از سرنگ هپارینه گرفته شد.

نمونه‌های خون بلافاصله بعد از جمع‌آوری سانتریفیوژ شدند. پلاسمای خون جدا و دور ریخته شد و به گلبول‌های قرمز سرم فیزیولوژیک اضافه شد و مجدداً سانتریفیوژ شدند. این کار سه بار تکرار گردید. سپس به نمونه‌ها به میزان ٤ برابر آب مقطر اضافه شد و در دمای منهای ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. فعالیت کاتالاز بر اساس روش گوت (۱۹۹۱) و استفاده از آمونیوم مولیبدات و آب اکسیژنه اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم‌های سوپرکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پرکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز با استفاده از کیت‌های تجاری (Randox) بر اساس دستوالعمل آن‌ها و با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. مقادیر فعالیت آنزیم‌ها بر مبنای هموگلوبین ارائه شد.

غلظت کشنده دانیتول با استفاده از رگرسیون پروبیت محاسبه شد. داده‌های مربوط به فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان با استفاده از تحلیل واریانس یک طرفه (One way ANOVA) و آزمون دانکن (Duncan) تجزیه و تحلیل شدند. داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شدند.

معنی‌داری در سطح ۵ درصد بررسی شد. کلیه تجزیه و تحلیل‌های آماری توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام شد.

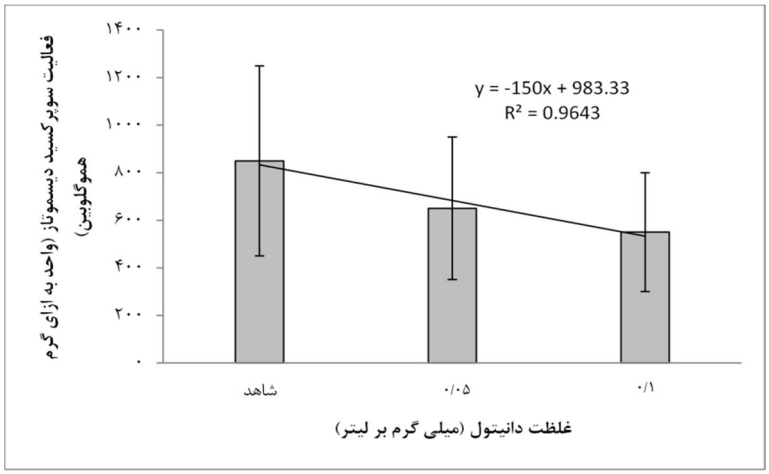
نتایج

غلظت حاد کشنده دانیتول پس از ۹٦ ساعت (LC_{1-99}) مواجهه ماهیان محاسبه شد و در جدول ۱ ارائه شده است. بر اساس نتایج به‌دست آمده، غلظت حاد کشنده سم دانیتول که باعث تلفات ۵۰ درصد ماهیان در مدت ۹٦ ساعت می‌شود ($96h\text{-}LC_{50}$)، ۰/٤۷ میلی‌گرم بر لیتر (با فاصله اطمینان ۰/۳۳–۰/٦۱ میلی‌گرم بر لیتر) بود.

جدول ۱- غلظت حاد کشنده سم دانیتول در ماهی کپور در خلال ۹٦ ساعت مواجهه.

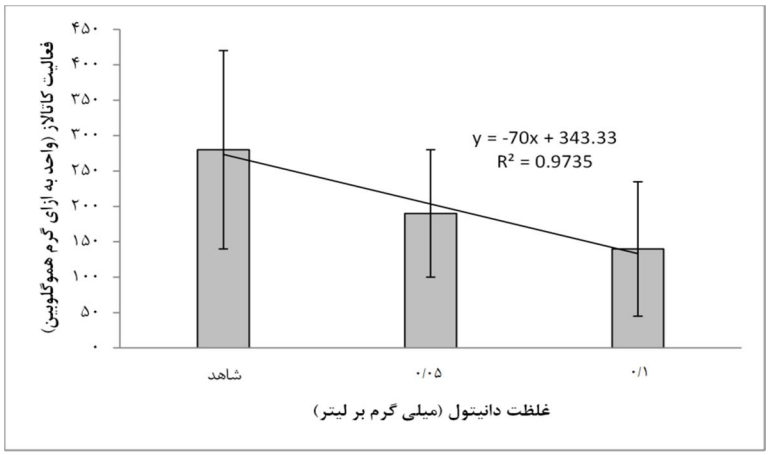
	غلظت کشنده دانیتول (میلی‌گرم بر لیتر)	فاصله اطمینان
LC_1	۰/۰۷	۰/۰۳–۰/۱۵
LC_5	۰/۱٤	۰/۰٦–۰/۲۲
LC_{10}	۰/۱۸	۰/۰۹–۰/۲۷
LC_{20}	۰/۲۵	۰/۱٤–۰/۳۵
LC_{50}	۰/٤۷	۰/۳۳–۰/٦۱
LC_{80}	۰/۸٦	۰/٦۵–۱/۲۸
LC_{90}	۱/۱۸	۰/۸۷–۲/۰۲
LC_{95}	۱/۵٤	۱/۰۸–۲/۹۹
LC_{99}	۲/۵۳	۱/٦۰–٦/٤۰

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گلبول‌های قرمز پس از ۲۱ روز قرار گرفتن در معرض غلظت‌های صفر، ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر دانیتول در شکل‌های ٤–۱ ارائه شده است. نتایج نشان داد که فعالیت سوپرکسید دیسموتاز در ماهیانی که در معرض سم دانیتول قرار گرفته بودند نسبت به گروه شاهد کمتر بود ولی این اختلاف معنی‌دار نبود. همچنین، همبستگی منفی و معنی‌داری بین غلظت دانیتول و فعالیت سوپرکسید دیسموتاز وجود داشت (شکل ۱).



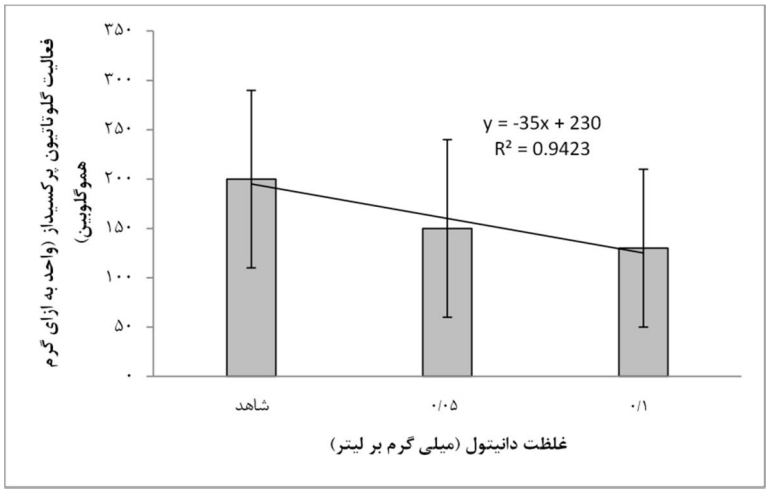
شکل ۱- میانگین فعالیت آنزیم سوپرکسید دیسموتاز در گلبول‌های قرمز ماهی کپور و همبستگی آن با غلظت‌های مختلف دانیتول. اختلاف معنی‌داری بین تیمارها وجود نداشت ولی ارتباط منفی و معنی‌داری بین غلظت دانیتول و فعالیت آنزیم وجود داشت.

نتایج نشان داد که فعالیت کاتالاز در ماهیانی که در معرض سم دانیتول قرار گرفته بودند نسبت به گروه شاهد کمتر بود ولی این اختلاف معنی‌دار نبود. همچنین، همبستگی منفی و معنی‌داری بین غلظت دانیتول و فعالیت کاتالاز وجود داشت (شکل ۲).



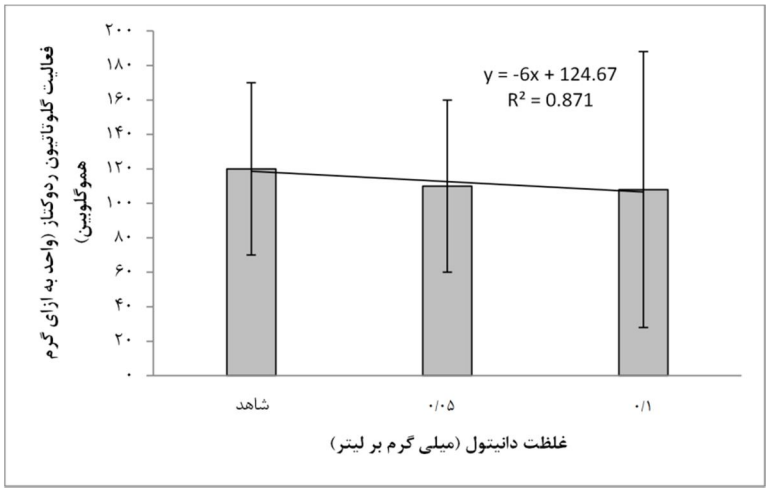
شکل ۲- میانگین فعالیت آنزیم کاتالاز در گلبول‌های قرمز ماهی کپور و همبستگی آن با غلظت‌های مختلف دانیتول. اختلاف معنی‌داری بین تیمارها وجود نداشت ولی ارتباط منفی و معنی‌داری بین غلظت دانیتول و فعالیت آنزیم وجود داشت.

فعالیت گلوتاتیون پرکسیداز در ماهیانی که در معرض سم دانیتول قرار گرفته بودند نسبت به گـروه شاهد کمتر بود ولی این اختلاف معنی‌دار نبود. همچنین، همبستگی منفـی و معنـی‌داری بـین غلظـت دانیتول و فعالیت گلوتاتیون پرکسیداز وجود داشت (شکل ۳).



شکل ۳- میانگین فعالیت آنزیم گلوتاتیون پرکسیداز در گلبول‌های قرمز ماهی کپور و همبستگی آن با غلظت‌های مختلف دانیتول. اختلاف معنی‌داری بین تیمارها وجود نداشت ولی ارتباط منفی و معنی‌داری بین غلظت دانیتول و فعالیت آنزیم وجود داشت.

فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز در ماهیانی که در معرض سم دانیتول قرار گرفته بودند نسبت بـه گـروه شاهد کمتر بود ولی این اختلاف معنی‌دار نبود. همچنین، همبستگی منفـی و معنـی‌داری بـین غلظـت دانیتول و فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز وجود داشت (شکل ٤).



شکل ٤- میانگین فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز در گلبول‌های قرمز ماهی کپور و همبستگی آن با غلظت‌های مختلف دانیتول. اختلاف معنی‌داری بین تیمارها وجود نداشت ولی ارتباط منفی و معنی‌داری بین غلظت دانیتول و فعالیت آنزیم وجود داشت.

بحث و نتیجه‌گیری

سموم پایرتروئیدی از جمله مواد بسیار سمی برای آبزیان هستند که به‌دلیل سمیت کم برای پستانداران، استفاده از آن‌ها رواج زیادی داشته و جایگزین سموم ارگانوکلره و ارگانوفسفره شده‌اند (کوپروکو و آیدین، ۲۰۰٤). لذا در مناطقی که کشاورزی رواج دارد، موجودات آبزی در معرض مسمومیت با این سموم قرار دارند. ماهی کپور یکی از ارزشمندترین گونه‌های ساکن دریای خزر است که سهم بزرگی در تأمین پروتئین دریایی مردم منطقه دارد. با این حال علی رغم استفاده از دانیتول در کشاورزی مناطق حاشیه دریای خزر، تا کنون مطالعه‌ای در خصوص میزان حساسیت این‌گونه نسبت به دانیتول انجام نشده است. در کل، مطالعات مربوط به سمیت دانیتول در ماهیان محدود به دو گونه است. در ماهی کپور علفخوار *C. idella* مسمومیت حاد دانیتول ۰/۰۰٤ میلی‌گرم بر لیتر بود و در ماهی شاخ کولی *A. mussulensis* مسمومیت حاد در مدت ۹٦ ساعت ۰/۱۲ میلی‌گرم بر لیتر بود (احمد و همکاران، ۱۹۹۵؛ بنایی و همکاران، ۲۰۱٤). در این تحقیق، سمیت حاد دانیتول در مدت زمان ۹٦ ساعت در ماهی کپور ۰/٤۷ میلی‌گرم بر لیتر بود که بالاتر از دو تحقیق قبلی است. عوامل زیادی بر میزان مسمومیت مواد در ماهی نقش دارند که می‌توان به گونه ماهی، منشاء سم، خصوصیات

فیزیکوشیمیایی آب و روش اجرا اشاره کرد. همچنین، با توجه به این‌که LC50 نود و شش ساعته دانیتول در کپور، کمتر از یک میلی‌گرم بر لیتر بود، این سم در گروه "بسیار سمی" برای این گونه طبقه‌بندی می‌شود (ای پی ای، ۲۰۰٤).

استرس اکسیداتیو یکی از شایع‌ترین آثار فیزیولوژیکی مواد سمی در ماهیان است (تالاس و همکاران، ۲۰۰۸؛ جیا و همکاران، ۲۰۱۱؛ گارسیا مدینا و همکاران، ۲۰۱۰). آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نسبت مواد مسموم کننده بسیار حساسند و می‌توانند به‌عنوان شاخص مسمومیت استفاده شوند (تلس بانولئوز همکاران، ۲۰۰۹؛ اوزکان و همکاران، ۲۰۱۲). سوپرکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پرکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز آنزیم‌هایی هستند که در تمامی سلول‌ها یافت می‌شود. سوپرکسید دیسموتاز باعث تبدیل یون سوپرکسید (که یک ماده با قدرت اکسیدکنندگی بالاست) به پرکسید هیدروژن می‌شود و پرکسید هیدروژن تحت تأثیر آنزیم کاتالاز و گلوتاتیون پرکسیداز خنثی شده و تبدیل به آب می‌شود (ماریتیم و همکاران، ۲۰۰۳). آنزیم کاتالاز به تنهایی پرکسید هیدروژن را خنثی می‌کند ولی گلوتاتیون پرکسیداز با استفاده از مولکول احیاء شده گلوتاتیون این عمل را انجام می‌دهد. گلوتاتیون پس از این واکنش باید مجدداً احیاء شود تا در چرخه آنزیم گلوتاتیون پرکسیداز وارد شود (ماریتیم و همکاران، ۲۰۰۳). آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز مسئول تبدیل گلوتاتیون اکسید شده به گلوتاتیون احیاء شده می‌باشد. لذا این آنزیم‌ها طی یک واکنش زنجیره‌ای باعث خنثی‌سازی مواد اکسید کننده می‌شوند و به‌عنوان اولین سد آنتی‌اکسیدانی آنزیمی در موجودات زنده مطرح هستند (ماریتیم و همکاران، ۲۰۰۳).

در این مطالعه سطح فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گلبول‌های قرمز ماهی کپور پس از ۲۱ روز مواجهه با سم دانیتول روند کاهشی نشان داد ولی این کاهش معنی‌دار نبود. علت عدم معنی‌داری داده‌ها می‌تواند به روش اندازه‌گیری (که مختص ماهی نبود) و تکرار کم (به‌دلیل هزینه بالای آزمایشات) باشد که باعث پراکندگی زیاد داده‌ها شد. بهینه‌سازی روش اندازه‌گیری این آنزیم‌ها برای ماهی و انجام آزمایش با تعداد تکرار بیشتر می‌تواند این مشکلات را مرتفع سازد. با این حال روند کاهشی فعالیت این آنزیم‌ها حاکی از تغییر وضعیت آنتی‌اکسیدانی ماهی می‌باشد. به‌طور کل بدن موجودات زنده دو واکنش برای پاسخ به مواد اکسید کننده از خود بروز می‌دهد. در شرایط بروز استرس اکسیداتیو به خصوص در اوایل استرس و وقتی شدت استرس کم باشد، انتظار می‌رود فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان افزایش یافته و از بروز آسیب به مولکول‌های زیستی جلوگیری کنند. ولی در

برخی موارد مواجهه با شرایط اکسیداتیو باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و افزایش تولیدات ناشی از استرس اکسیداتیو (مثل مالون دی آلدهید و کربونیل پروتئین) می‌شود. این حالت نشانه اثر مستقیم سم بر ساختار و عملکرد آنزیم‌ها بوده یا می‌تواند نشانه شدت بالای استرس باشد که از حد مقابله ماهی خارج بوده و باعث تحلیل سیستم آنتی‌اکسیدانی می‌شود. نتایج این تحقیق نشان داد که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گلبول‌های قرمز در ماهی کپور در معرض سم دانیتول کاهش یافت. این نتایج می‌تواند بیانگر بروز استرس شدید اکسیداتیو یا اثر دانیتول بر عملکرد این آنزیم‌ها باشد.

در نهایت نتیجه‌گیری می‌شود که دانیتول برای ماهی کپور بسیار سمی است و باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گلبول قرمز می‌شود. همچنین، افزایش غلظت دانیتول باعث کاهش فعالیت آنزیم‌ها می‌شود. پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی، تعداد تکرار بیشتری برای مطالعه آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان استفاده شود تا اختلاف بین تیمارها بیشتر مشخص شود.

منابع

1. Ahmad, F., Ali, S.S., and Shakoori, A.R. 1995. Sublethal effects of Danitol (Fenpropathrin), a synthetic pyrethroid, on Chinese grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. Folia Biol. 43: 151-160.
2. Ansari, R.A., Rahman, S., Kaur, M., Anjum, S., and Raisuddin, S. 2011. In vivo cytogenetic and oxidative stress-inducing effects of cypermethrin in freshwater fish, *Channa punctata* Bloch. Ecotoxicol. Env. Saf. 74: 150-156.
3. Banaee, M., Sureda, A., Zohiery, F., Hagi, B.N., and Garanzini, D.S. 2014. Alterations in biochemical parameters of the freshwater fish, *Alburnus mossulensis*, exposed to sub-lethal concentrations of Fenpropathrin. Int. J. Aquat. Biol. 2: 58-68.
4. Christin, M.S., Gendron, A.D., Brousseau, P., Ménard, L., Marcogliese, D.J., Cyr, D., and Fournier, M. 2003. Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Rana pipiens* and on its resistance to parasitic infection. Env. Toxicol. Chem. 22: 1127-1133.
5. Cook, L.W., Paradise, C.J., and Lom, B. 2005. The pesticide malathion reduces survival and growth in developing zebrafish. Env. Toxicol. Chem. 24: 1745-1750.
6. Dorval, J., Leblond, V.S., and Hontela, A. 2003. Oxidative stress and loss of cortisol secretion in adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed in vitro to endosulfan, an organochlorine pesticide. Aquat. Toxicol. 63: 229-241.

7. EPA 2004. Chemical hazard classification and labeling. Environmental protection agency. https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/ghscriteria-summary.pdf.
8. Fanta, E., Rios, F.S.A., Romão, S., Vianna, A.C.C., and Freiberger, S. 2003. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. Ecotoxicol. Env. Saf. 54: 119-130.
9. Flury, M. 1996. Experimental evidence of transport of pesticides through field soils—a review. J. Env. Qual. 25: 25-45.
10. García-Medina, S., Razo-Estrada, A.C., Gómez-Oliván, L.M., Amaya-Chávez, A., Madrigal-Bujaidar, E., and Galar-Martínez, M. 2010. Aluminum-induced oxidative stress in lymphocytes of common carp (*Cyprinus carpio*). Fish. Physiol. Biochem. 36: 875-882.
11. Goth, L. 1991. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. Clin. Chim. Acta, 196: 143-151.
12. Guardiola, F.A., Gónzalez-Párraga, P., Meseguer, J., Cuesta, A., and Esteban, M.A. 2014. Modulatory effects of deltamethrin-exposure on the immune status, metabolism and oxidative stress in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Fish. Shell. Immunol. 36: 120-129.
13. Hanson, R., Dodoo, D.K., Essumang, D.K., Blay Jr, J., and Yankson, K. 2007. The effect of some selected pesticides on the growth and reproduction of fresh water O*reochromis niloticus*, *Chrysicthys nigrodigitatus* and *Clarias gariepinus*. Bull. Env. Contam. Toxicol. 79: 544-547.
14. Harford, A.J., O'Halloran, K., and Wright, P.F. 2005. The effects of in vitro pesticide exposures on the phagocytic function of four native Australian freshwater fish. Aquat. Toxicol. 75: 330-342.
15. Islam, S., and Tanaka, M. 2004. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. Mar. Poll. Bull. 48: 624-649.
16. Jia, X., Zhang, H., and Liu, X. 2011. Low levels of cadmium exposure induce DNA damage and oxidative stress in the liver of Oujiang colored common carp *Cyprinus carpio* var. color. Fish. Physiol. Biochem. 37: 97-103.
17. Jin, Y., Pan, X., Cao, L., Ma, B., and Fu, Z. 2013. Embryonic exposure to *cis*-bifenthrin enantioselectively induces the transcription of genes related to oxidative stress, apoptosis and immunotoxicity in zebrafish (*Danio rerio*). Fish. Shell. Immunol. 34: 717-723.
18. Köprücü, K., and Aydın, R. 2004. The toxic effects of pyrethroid deltamethrin on the common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryos and larvae. Pest. Biochem. Physiol. 80: 47-53.
19. Maritim, A.C., Sanders, A., and Watkins, J. 2003. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. J. Biochem. Mol. Toxicol. 17: 24-38.

20. Oruç, E.Ö. 2010. Oxidative stress, steroid hormone concentrations and acetylcholinesterase activity in *Oreochromis niloticus* exposed to chlorpyrifos. Pest. Biochem. Physiol. 96: 160-166.
21. Özkan, F., Gündüz, S.G., Berköz, M., Hunt, A.Ö., and Yalın, S. 2012. The protective role of ascorbic acid (vitamin C) against chlorpyrifos-induced oxidative stress in *Oreochromis niloticus*. Fish. Physiol. Biochem. 38: 635-643.
22. Ritter, W.F. 1988. Reducing impacts of nonpoint source pollution from agriculture: a review. J. Env. Sci. Health. A. 23: 645-667.
23. Sayeed, I., Parvez, S., Pandey, S., Bin-Hafeez, B., Haque, R., and Raisuddin, S., 2003. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. Ecotoxicol. Env. Saf. 56: 295-301.
24. Schulz, R., and Dabrowski, J.M. 2001. Combined effects of predatory fish and sublethal pesticide contamination on the behavior and mortality of mayfly nymphs. Env. Toxicol. Chem. 20: 2537-2543.
25. Suvetha, L., Ramesh, M., and Saravanan, M. 2010. Influence of cypermethrin toxicity on ionic regulation and gill Na+/K+-ATPase activity of a freshwater teleost fish *Cyprinus carpio*. Env. Toxicol. Pharmacol. 29: 44-49.
26. Talas, Z.S., Orun, I., Ozdemir, I., Erdogan, K., Alkan, A., and Yılmaz, I. 2008. Antioxidative role of selenium against the toxic effect of heavy metals (Cd+ 2, Cr+ 3) on liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792). Fish. Physiol. Biochem. 34: 217-222.
27. Tellez-Bañuelos, M.C., Santerre, A., Casas-Solis, J., Bravo-Cuellar, A., and Zaitseva, G. 2009. Oxidative stress in macrophages from spleen of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to sublethal concentration of endosulfan. Fish. Shell. Immunol. 27: 105-111.
28. Varo, I., Serrano, R., Pitarch, E., Amat, F., Lopez, F.J., and Navarro, J.C. 2002. Bioaccumulation of chlorpyrifos through an experimental food chain: study of protein HSP70 as biomarker of sublethal stress in fish. Arch. Env. Contam. Toxicol. 42: 229-235.
29. Viran, R., Ünlü Erkoç, F., Polat, H., and Koçak, O. 2003. Investigation of acute toxicity of deltamethrin on guppies (*Poecilia reticulata*). Ecotoxicol. Env. Saf. 55: 82-85.
30. Wauchope, R.D. 1978. The pesticide content of surface water draining from agricultural fields—a review. J. Env. Qual. 7: 459-472.