

بررسی پاسخ‌های فیزیولوژیکی ماهی زبرا گورخری (*Danio rerio*) در مواجهه با علف‌کش بوتاکلر

پیمان رستمی^{۱*}، علی شعبانی^۲، رقیه صفری^۲ و سید علی اکبر هدایتی^۳

۱: دانشجوی دکتری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۲: هیئت علمی (دانشیار) دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۳: هیئت علمی (استاد) دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

Peyman Rostami^a, Ali Shaabani^b, Roghieh Safari^c and Seyed Aliakbar Hedayati^d

a: Ph.D. student of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran . E-mail: p.rostamy1373@gmail.com.

Tell: 09118221452

b: Associate Prof., Dept. of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: ashabani@gau.ac.ir.

c: Associate Prof., Dept. of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: fisheriessafari@yahoo.com.

d: Professor., Dept. of Fisheries and Aquatic Ecology, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: marinebiology1@gmail.com.

چکیده

هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر غلظت‌های تحت کشنده علف‌کش بوتاکلر (Butachlor) بر برخی از پاسخ‌های آنتی-اکسیدانی (بیان ژن‌های SOD و CAT)، استرس (HSP70) و آنزیم‌های کبدی ماهی زبرا گورخری (*Danio rerio*) می-باشد. به همین منظور در ابتدا میزان LC₅₀ بوتاکلر در مدت زمان ۹۶ ساعت مشخص شد سپس بچه‌ماهیان زبرا با میانگین وزنی ۰/۳±۰/۰۱ گرم به مدت ۱۴ روز در معرض غلظت‌های ۰، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ درصد بوتاکلر (LC₅₀) قرار گرفتند و در پایان دوره آزمایش به منظور ارزیابی بیان ژن‌های مذکور و بررسی فاکتورهای بیوشیمیایی از ماهیان زبرا (کل بدن) نمونه‌برداری انجام شد. نتایج نشان داد که سطح بیان ژن‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و پروتئین شوک حرارتی (HSP70) در ماهیانی که در معرض غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ درصد قرار گرفته بودند نسبت به تیمار ۱۰ درصد و گروه شاهد بالاتر بودند و اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد و تیمار ۱۰ درصد داشتند ($P<0/05$). میزان آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز

(ALP)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) نیز با افزایش غلظت بوتاکلر تا سطح ۲۵ درصد روندی افزایشی را داشتند و بالاترین میزان در تیمار ۲۵ درصد بود که اختلاف معنی‌داری با شاهد داشت ($P < 0.05$). با توجه به تاثیر سم بوتاکلر بر فاکتورهای فیزیولوژیک ماهی زیرا به‌عنوان یک مدل آزمایشگاهی و همچنین راه‌یابی این سم به آب‌ها و محیط‌زیست ماهیان، می‌توان چنین استنباط کرد که سمیت بوتاکلر حتی در غلظت‌های پایین نیز می‌تواند آثار مخربی را بر فیزیولوژی ماهی و حتی جمعیت ماهی اعمال کند.

کلمات کلیدی: علف‌کش، بیان ژن، آنزیم‌های کبدی، سم

مقدمه

امروزه به‌دلیل گسترش صنعت کشاورزی، استفاده از علف‌کش‌ها برای کنترل علف‌های هرز بخشی از شیوه‌های کشاورزی مدرن برای افزایش بهره‌وری است (۱) با این حال، استفاده گسترده و بی‌رویه از این مواد شیمیایی از طریق رواناب کشاورزی، صنعتی و زهکشی شهری به محیط آبی راه پیدا می‌کند و اکوسیستم‌های آبی را در معرض تهدید شدید قرار می‌دهد (۱). موجودات غیرهدف از جمله ماهی‌های ساکن در محیط‌های آبی نزدیک مزارع کشاورزی، آسیب‌پذیرترین موجوداتی هستند که می‌توانند تحت تاثیر علف‌کش‌ها قرار گیرند. علف‌کش‌ها پس از رسیدن به محیط آبی، ممکن است در ماهی‌ها یا سایر آبزیان غیرهدف تجمع کنند و اثرات مخرب مختلفی را بر سلامتی این گونه‌ها برجای گذارند (۲). علف‌کش بوتاکلر متعلق به خانواده کلرواستانیلید است که به‌طور گسترده برای کنترل علف‌های هرز و علف‌های هرز پهن برگ در شالیزارها استفاده می‌شود (۳). به‌طور کلی، بوتاکلر در محیط پایدار است و نیمه عمر ۱۱ تا ۱۸ روزه در خاک دارد، بنابراین می‌تواند تهدیدی برای آبزیان و همچنین حیوانات خشکی باشد (۴). مطالعات گسترده‌ای در ارتباط با بقایای بوتاکلر در اکوسیستم‌های آبی و آثار مخرب آن‌ها بر موجودات آبزی گزارش شده است (۵، ۶ و ۷). ابراهیم‌زاده و همکاران (۲۰۲۱) گزارش کردند که قرار گرفتن در معرض سمیت ناشی از بوتاکلر به مدت ۱۴ روز باعث افزایش سطح آنزیم‌های ALT، ALP و AST در ماهی قرمز می‌شود (۷). به‌منظور ارزیابی زیست محیطی، سم شناسی و ایمنی آفت‌کش‌ها، ماهی‌ها به‌عنوان یک مدل، عالی عمل می‌کنند زیرا آن‌ها دارای تحرک بالا، تنوع و تراکم زیادی هستند همچنین به‌عنوان تجمع‌کننده‌های زیستی شناخته شده‌اند که قادرند آلودگی‌های چندساله یک منطقه زیستی را نشان دهند (۸). ماهی زبرا گورخری با نام علمی (*Danio rerio*) به‌عنوان یک مدل موثر و محوری جهت بررسی‌آزمایشات سم‌شناسی شناخته شده است (۹). ماهی زبرا دارای تخم‌های شفاف و رشد و تکامل سریع است و اندام‌های اصلی آن ۲۴ ساعت پس از لقاح قابل مشاهده هستند (۱۰). نشانگرهای زیستی مختلفی از قبیل آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی: سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT)، پروتئین شوک حرارتی (HSP70) و آنزیم‌های کبدی: آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) جهت پایش وضعیت سلامت ماهی هنگام قرار گرفتن در معرض عوامل مخرب بیگانه از جمله علف‌کش‌ها مورد سنجش قرار می‌گیرند (۱۱) و SOD و CAT به‌عنوان اولین سد سیستم دفاعی بدن در مقابل بروز آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از قرارگرفتن در معرض

علف‌کش‌ها هستند که از سلول و بافت در برابر بروز آسیب‌های اکسیداتیو محافظت می‌کنند. همچنین سطح آنزیم‌های ALT و AST نیز یک فاکتور مهم جهت ارزیابی آسیب‌های بافتی (کبد) در نظر گرفته می‌شود (۱۳). بنابراین با توجه به استفاده از حجم انبوهی از سم بوتاکلر در مزارع کشاورزی و ورود آن به منابع آبی، هدف از این تحقیق بررسی اثرات مخرب سم بوتاکلر بر تغییرات فیزیولوژیک ماهی جهت ارائه به سازمان‌های مدیریتی به منظور اعمال راهکارهای مدیریتی کنترل و محدودیت در کاربرد سم می‌باشد.

مواد و روش‌ها

آماده سازی شرایط آزمایشی و تهیه ماهی و سم بوتاکلر

این تحقیق در پاییز ۱۴۰۰ در شرایط آزمایشگاهی جهت بررسی اثر سمیت بوتاکلر بر ماهی زبرا گورخری انجام شد. سم بوتاکلر با درجه خلوص ۶۰ درصد همراه با یک امولسیون به عنوان حلال از یک فروشگاه سموم کشاورزی تهیه و جهت تست‌های مربوط به LC_{50} و طرح آزمایش مذکور مورد استفاده قرار گرفت. ۴۰۰ قطعه بچه‌ماهی زبرا گورخری از کارگاه خصوصی تکثیر و پرورش ماهیان زینتی واقع در شصت کلای استان گلستان خریداری شد و توسط کیسه‌های پلاستیکی حاوی آب و اکسیژن با نسبت ۱ به ۳ به دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان بخش آزمایشگاه شهید ناصر فضلی برآبادی (سالن ونیرو) انتقال داده شدند. ماهیان به مدت ۲ هفته با شرایط آزمایشگاه سازگار شدند و در طول این مدت با غذای بیومار تغذیه شدند. کلیه فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب (دمای آب ۲۵ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول ۷/۸ و pH ۷/۶) روزانه اندازه‌گیری می‌شد.

آزمایش تعیین LC_{50}

به منظور تعیین میزان LC_{50} تعداد ۱۵۰ قطعه بچه‌ماهی زبرا در ۱۵ آکواریوم تقسیم‌بندی شدند و در معرض غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر بوتاکلر به مدت ۹۶ ساعت قرار گرفتند. پس از گذشت هر ۲۴ ساعت تعداد تلفات شمارش و ثبت می‌شد. میزان LC_{50} به دست آمده ۱/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر محاسبه شد.

طرح آزمایش بررسی سمیت حاد

جهت پرورش، پس از مشخص شدن میزان LC_{50} تعداد ۲۴۰ قطعه بچه‌ماهی با میانگین وزنی 0.3 ± 0.1 گرم در ۱۲ عدد آکواریوم ۲۰ لیتری (۲۰ قطعه در هر آکواریوم) توزیع شدند و به مدت ۱۴ روز در معرض غلظت‌های تحت کشنده ۰ (شاهد)، ۱۰ (تیمار ۱)، ۲۵ (تیمار ۲) و ۵۰ (تیمار ۳) درصد بوتاکلر (LC_{50}) قرار گرفتند. تیمارها دارای ۳ تکرار بودند و با جیره بیومار (کشور فرانسه) ۳ بار در روز و در حد سیری تغذیه می‌شدند. در طول مدت آزمایش شرایط پرورش برای همه تیمارها یکسان بود، کلیه فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب روزانه اندازه‌گیری و ثبت می‌شد و میزان دما، pH و اکسیژن آب به ترتیب ۲۵ درجه- سانتی‌گراد، ۷/۶ و ۷/۸ میلی‌گرم بر لیتر بود.

نمونه برداری ژنتیکی

جهت سنجش میزان بیان ژن های SOD، CAT و HSP70 از ماهیان زیر نمونه برداری شد. ابتدا ماهیان با پودر گل میخک (۰/۵ گرم بر لیتر) بیهوش شدند. پس از زدن سر و دم در شرایط استریل، در ویال های از قبل استریل شده قرار گرفتند و بلافاصله به ازت مایع منتقل شدند و تا زمان انجام تست ها ژنتیکی در فریزر ۸۰- نگهداری شدند.

استخراج RNA و سنتز cDNA

جهت استخراج RNA ابتدا نمونه های مربوط به هر تیمار در هاوئ های چینی و در مجاورت با ازت مایع پودر شدند و به ویال های استریل منتقل شدند سپس با استفاده از کیت RNX-Plus و طبق مراحل ذکر شده در دستورالعمل شرکت سازنده مراحل بعدی استخراج انجام شد. سنتز cDNA نیز با استفاده از کیت جینت بایو در ویال های مخصوص PCR انجام شد.

طراحی پرایمر

جهت طراحی توالی های مربوط به ژن های فوق الذکر از بانک ژنی NCBI و نرم افزار PRIMER3.0 استفاده شد.

جدول ۱: توالی پرایمرهای (SOD، CAT و HSP70) و ژن رفرنس (B-Actine)

نام پرایمر	توالی	طول قطعه (جفت باز)	شماره دسترسی
SOD	F:GGGTGGCAATGAGGAAAG	200	BC055516.1
	R:GCCCACATAGAAATGCACAG		
CAT	F:GCATGTTGGAAAGACGACAC	197	AJ007505.1
	R:GTGGATGAAAGACGGAGACA		
HSP70	F: CTGCTGCTGCTGGATGTG	200	AB062281.1
	R: GCTGGTTGTCTGGAGTAAGTG		
Beta-Actine	F:ATGGGCCAGAAAGACAGCTACGTG	140	NM_001124235.1
	R: CTTCTCCATGTCGTCCCAGTTGGT		

ریل تایم PCR

بیان نسبی ژن‌های هدف با استفاده از دستگاه qPCR-(Bio-Rad) ساخت کشور امریکا صورت گرفت. هر ویال محتوی ۱۸ میکرولیتر مستر و ۲ میکرولیتر cDNA بود. مستر مورد استفاده در این قسمت از ترکیب ۱۰ میکرولیتر سایبر گرین، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم تگ پلی‌مراز، آغازگر پیش‌رونده و پس‌رونده هر کدام ۰/۲ میکرولیتر، ۶/۴ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز و ۱ میکرولیتر DMSO به‌دست آمد.

آنزیم‌های کبدی

۳ عدد ماهی از هر تیمار با محلول پودر گل میخک (۰/۵ گرم بر لیتر) بیهوش شدند و در ویال به ازت مایع منتقل شدند و سپس ماهیان هر تیمار به‌صورت جداگانه در مجاورت با ازت مایع پودر شدند و درون ویال با محلول آماده فسفات بافر به-میزان ۱ سی‌سی مخلوط شدند. ویال‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور ۸۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. پس از اتمام سانتریفیوژ، فاز بالایی و شفاف توسط سمپلر به ویال‌های جدید منتقل شد و میزان آنزیم‌های ALP، ALT و AST با استفاده از کیت پارس آزمون و دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

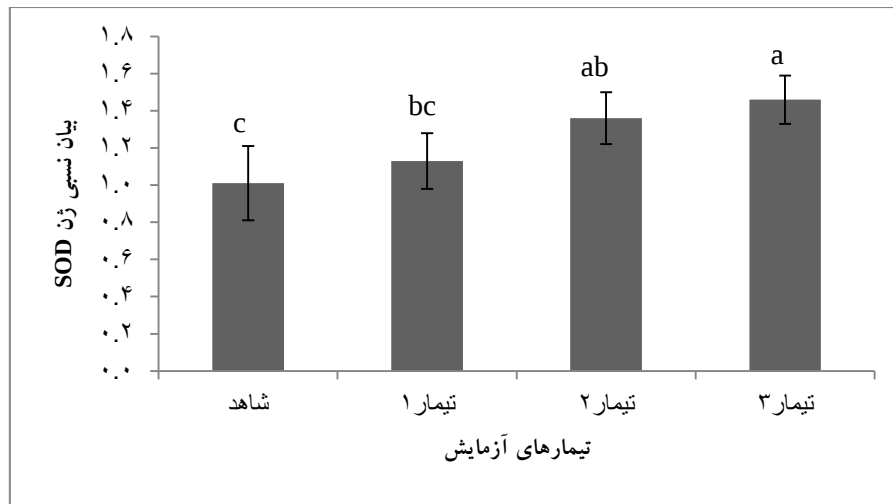
تجزیه و تحلیل داده‌ها

آزمون کولموگروف-اسمیرنوف Kolmogorov – Smirnov جهت توزیع نرمال و همگنی داده‌ها استفاده شد. بیان نسبی ژن‌ها با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ و نرم‌افزار اکسل انجام گرفت. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA) و تست دانکن در فضای نرم‌افزار Spss ۲۰ استفاده شد.

نتایج

سطح بیان ژن سوپراکسید دیسموتاز (SOD)

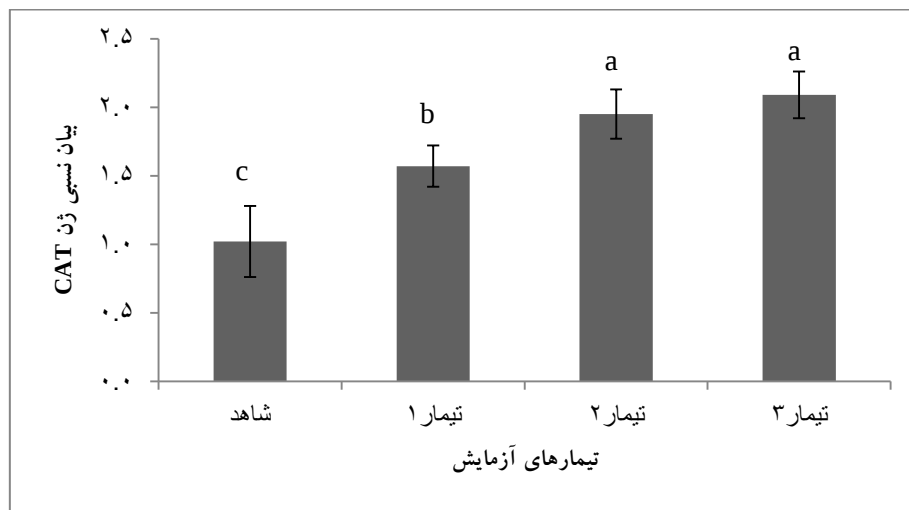
نتایج به‌دست آمده از ارزیابی بیان ژن SOD در شکل ۱ خلاصه شده است. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت بوتاکلر میزان بیان ژن SOD افزایش یافت به طوری که بالاترین سطح بیان در ماهیان قرار گرفته در معرض ۵۰ درصد بوتاکلر بود که اختلاف معنی‌داری با شاهد داشت ($P < 0/05$). بین تیمارهای ۱ و ۲ اختلاف معنی‌داری در سطح بیان ژن SOD مشاهده نشد ($P > 0/05$).



شکل ۱: تأثیر غلظت‌های تحت کشنده بوتاکلر (۰ (شاهد)، ۱۰ (تیمار ۱)، ۲۵ (تیمار ۲) و ۵۰ (تیمار ۳) درصد بوتاکلر (LC_{50}) بر بیان ژن سوپراکسید دیسموتاز (SOD) ماهی زبرا. حروف انگلیسی غیر مشترک نشان دهنده معنی‌دار بودن در سطح ۰/۰۵ در بین تیمارها می‌باشد.

سطح بیان ژن کاتالاز (CAT)

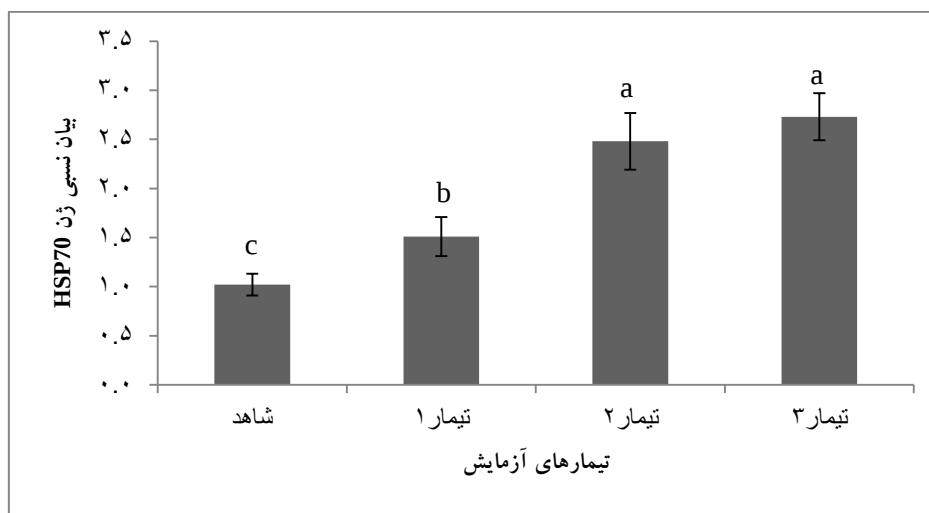
غلظت‌های مختلف بوتاکلر بر بیان ژن CAT در ماهیان زبرا تأثیر معنی‌داری داشته است (شکل ۲). طبق نتایج به‌دست آمده تیمارهای ۲ و ۳ درصد اختلاف معنی‌داری را با شاهد و تیمار ۱۰ درصد داشتند ($P < 0/05$) و بالاترین میزان بیان ژن کاتالاز در ماهیانی مشاهده شد که در معرض ۵۰ درصد بوتاکلر قرار گرفته بودند. بین تیمار ۲ و ۳ درصد اختلاف آماری معنی‌داری وجود نداشت ($P > 0/05$).



شکل ۲: تأثیر غلظت‌های تحت کشنده بوتاکلر (۰ (شاهد)، ۱۰ (تیمار ۱)، ۲۵ (تیمار ۲) و ۵۰ (تیمار ۳) درصد بوتاکلر (LC_{50}) بر بیان ژن کاتالاز (CAT) ماهی زبرا. حروف انگلیسی غیر مشترک نشان دهنده معنی‌دار بودن در سطح ۰/۰۵ در بین تیمارها می‌باشد.

سطح بیان ژن پروتئین شوک حرارتی (HSP70)

نتایج حاصل از بیان ژن HSP70 نشان داد که بیشترین سطح بیان در تیمار ۳ بود و اختلاف معنی داری با شاهد و تیمار ۱ داشت ($P < 0.05$) (شکل ۳). اختلاف آماری معنی داری در سطح بیان پروتئین شوک حرارتی (HSP70) در تیمار ۲ و ۳ مشاهده نشد ($P > 0.05$).



شکل ۳: تأثیر غلظت‌های تحت کشنده بوتاکلر (۰ (شاهد)، ۱۰ (تیمار ۱)، ۲۵ (تیمار ۲) و ۵۰ (تیمار ۳) درصد بوتاکلر (LC_{50}) بر بیان ژن کاتالاز (HSP70) ماهی زبرا. حروف انگلیسی غیر مشترک نشان دهنده معنی دار بودن در سطح ۰/۰۵ در بین تیمارها می‌باشد.

فاکتورهای بیوشیمیایی سرم

فاکتورهای ALT، ALP و AST تحت تأثیر غلظت‌های مختلف بوتاکلر قرار گرفت (جدول ۲). بیشترین مقدار این آنزیم‌ها در ماهیانی بود که در مجاورت با غلظت ۲۵ درصد بوتاکلر قرار گرفتند و اختلاف معنی داری با شاهد و تیمار ۳ داشتند ($P < 0.05$). کمترین سطح آنزیم‌ها ALT، ALP و AST در گروه شاهد مشاهده شد.

جدول ۲: سطح آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز، آلانین آمینوترانسفراز و آسپارات آمینوترانسفراز ماهی زبرا در مواجهه با غلظت‌های تحت کشنده بوتاکلر (۰ (شاهد)، ۱۰ (تیمار ۱)، ۲۵ (تیمار ۲) و ۵۰ (تیمار ۳) درصد بوتاکلر (LC_{50})).

فاکتورهای بیوشیمیایی	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳
آلکالین فسفاتاز (گرم بر دسی لیتر)	$104/153 \pm 5/30^c$	$129/57 \pm 7/85^{ab}$	$147/04 \pm 15/91^a$	$122/53 \pm 5/30^b$
آلانین آمینوترانسفراز (گرم بر)	$148/43 \pm 3/17^b$	$177/54 \pm 16/97^b$	$239/96 \pm 32/03^a$	$161/16 \pm 7/07^b$

دسی لیتر)

آسپاراتات آمینوترانسفراز (گرم بر

دسی لیتر)

$272/82 \pm 13/58^b$

$316/27 \pm 20/05^a$

$283/41 \pm 11/19^b$

$241/06 \pm 15/78^c$

حروف غیرمشترک در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۵ می باشد.

بحث و نتیجه گیری

. در تحقیق انجام شده، افزایش سطح بیان ژن های SOD، CAT و HSP70 در ماهیان زبرا تحت تاثیر قرار گرفتن در معرض سمیت بوتاکلر همراه با نتایج به دست آمده از گزارشات سایر محققان که با سموم دیگر انجام شده بودند می باشد. Wang و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کردند که میزان بیان ژن SOD تحت تاثیر قرار گرفتن ماهیان زبرا در معرض سم دیکوات افزایش یافت (۱۴) همچنین افزایش سطح بیان ژن های SOD، HSP70 و HSP90 تحت تاثیر سم بوتاکلر در ماهیان رویتا توسط Kumar و همکاران در سال ۲۰۲۲ گزارش شد (۱۲). هنگامی که موجود در شرایط استرس اکسیداتیو ناشی از حضور سموم قرار می گیرد، به منظور کنترل گونه های فعال اکسیژنی (ROS) مسیرهای دفاعی مختلفی را به کار می گیرد. در این شرایط سیستم دفاعی سلولی با تولید آنزیم های آنتی اکسیدانی از قبیل SOD و CAT می تواند بر رادیکال های آزاد غلبه کند و از این طریق از سلول های بدن محافظت به عمل آورد (۱۵). در مطالعه حاضر افزایش سطح بیان ژن های SOD و CAT به دلیل حضور ROS ناشی از سمیت بوتاکلر می باشد که در چنین شرایطی SOD رادیکال های سوپراکسید را به پراکسید هیدروژن تبدیل می کند و CAT پراکسید هیدروژن را به آب و اکسیژن تجزیه می کند. بنابراین افزایش سطح ژن CAT به دلیل افزایش سطح H_2O_2 ناشی از افزایش فعالیت SOD می باشد و افزایش سطح آنزیم های SOD و CAT می تواند از مایه در مقابل آسیب های اکسیداتیو ناشی از علف کش ها محافظت کند (۱۶). علاوه بر این HSP70 به عنوان محافظ ملکولی عمل می کند و در شرایط بروز استرس های مختلف و آسیب های اکسیداتیو سطح بیان آن در سلول افزایش پیدا می کند تا با جلوگیری از گردهم آیی پروتئین های ناخواسته و کنترل نشده در این شرایط، به حفظ هومئوستازی سلول کمک کند (۱۷). در این مطالعه نیز افزایش سطح بیان HSP70 نیز ناشی از بروز شرایط استرس ناشی از قرار گرفتن در معرض سمیت بوتاکلر در ماهیان زبرا می باشد.

ALT و AST آنزیم های اختصاصی کبد هستند که پاسخ های سریعی به سمیت موجود در کبد و تغییرات بافشناسی آن نشان می دهند (۷). این آنزیم ها غیر پلاسمایی هستند که در سلول های کبدی، قلب، ماهیچه ها، آبش و دیگر ارگان های بدن یافت می شوند بنابراین حضور آن ها در پلاسما نشان دهنده وجود آسیب و یا نقص عملکرد در اندام می باشد (۷). تغییر در فعالیت آنزیم ALP نشان دهنده وجود اختلال در عملکرد کبد می باشد و به عنوان یک شاخص برای ارزیابی اثرات ناشی از آلودگی ها در نظر گرفته می شود. افزایش فعالیت ترانس آمینازها نشان دهنده کاتابولیز شدن پروتئین ها و یا آسیب های وارد شده به سلول های کبدی می باشد (۱۸). ترانس آمینازهای ماهی شامل آنزیم های میتوکندریایی و سیتوپلاسمی هستند که در

کاتابولیسم امینواسیدها و انتقال اسیدهای آلی نقش دارند (۷). در این مطالعه قرار گرفتن ماهیان زبرا در مجاورت با بوتاکلر به مدت ۱۴ روز منجر به افزایش سطح آنزیم‌های ALT و AST در پلاسما شد که نشان دهنده آسیب ناشی از علف‌کش بوتاکلر به سلول‌های کبدی می‌باشد. درواقع افزایش سطح آنزیم‌های ALT و AST در ماهیانی که در مجاورت با آب آلوده شده با بوتاکلر قرار گرفتند ناشی از نشت احتمالی این آنزیم‌ها از سیتوپلاسم میتوکندی سلول‌های کبدی به جریان خون و یا به دلیل سنتز آن‌ها در اثر نقص عملکرد کبد می‌باشد (۱۹). همراه با نتایج به دست آمده از این تحقیق Somaiah و همکاران (۲۰۱۵) افزایش معنی‌دار آنزیم‌های ALT و AST را در ماهی رویتا (*Labeo rohita*) تحت تاثیر سمیت علف‌کش بوتاکلر گزارش کردند (۲۰). همچنین افزایش سطح فعالیت آنزیم‌های ALP، ALT و AST در ماهی قرمز (*Carassius auratus*) که به مدت ۵ هفته در معرض سم بوتاکلر قرار گرفتند نیز توسط محققان گزارش شد (۷). از این مطالعه می‌توان چنین نتیجه گرفت که باتوجه به تاثیری که علف‌کش بوتاکلر بر ژن‌های آنتی‌اکسیدانی، استرس و فاکتورهای بیوشیمیایی سرم داشت، می‌توان از این فاکتورها به عنوان یک شاخص زیستی جهش پایش و ارزیابی سلامت اکوسیستم‌های آبی بهره گرفت. در حقیقت وجود سموم در اکوسیستم‌ها آبی حتی در غلظت‌های پایین می‌تواند در دراز مدت اثرات مخربی را بر آبزیان اعمال کند که این امر از دیدگاه آبریز پرووری بسیار حائز اهمیت می‌باشد.

منابع

- 1 Oluah, N. S., Aguzie, I. O., Ekechukwu, N. E., Madu, J. C., Ngene, C. I., & Oluah, C. (2020). Hematological and immunological responses in the African catfish *Clarias gairepinus* exposed to sublethal concentrations of herbicide Ronstar®. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 201, 110824.
- 2 Elbadawi, A.A., and Ramadan, O. A. (2006). Some toxicological studies of the insecticide "pymetrozine" on *Oreochromis niloticus*. *Journal of Egyptian Academic Society for Environmental Development*, 7(3): 125–138.
- 3 Rao, A. N., Singh, R. G., Mahajan, G., & Wani, S. P. (2020). Weed research issues, challenges, and opportunities in India. *Crop Protection*, 134, 104451.
- 4 Akoto, O., Azuure, A. A., & Adotey, K. D. (2016). Pesticide residues in water, sediment and fish from Tono Reservoir and their health risk implications. *SpringerPlus*, 5(1), 1-11.
- 5 Eurie, F. M. A., Isabel, G. A., Arne, D., Lenin, R. F., Liesbeth, J., Pieter, S., ... & LM, G. P. (2021). From field to plate: Agricultural pesticide presence in the guayas estuary (Ecuador) and commercial mangrove crabs. *Environmental Pollution*, 289, 117955.
- 6 Xu, H. D., Wang, J. S., Li, M. H., Liu, Y., Chen, T., & Jia, A. Q. (2015). 1H NMR based metabolomics approach to study the toxic effects of herbicide butachlor on goldfish (*Carassius auratus*). *Aquatic Toxicology*, 159, 69-80.

- 7 Ebrahimzadeh, M., Heidari, B., Nazarhaghighi, F., & Valipour, A. (2021). Physiological responses of the goldfish (*Carassius auratus*) during subacute exposure to organic pollutants. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 106, 773-778.
- 8 Van Geast, J., (2010). Bioaccumulation of sediment-associated contaminants in freshwater organism: development and standardization of a laboratory method. PhD thesis, University of Guelph, Canada.:1-232.
- 9 OECD (Organization for Economic Co-Operation and Development), 1992. OCED Test. Guideline 203 for Fish, Acute Toxicity Test. OECD, Paris, France.
- 10 D'costa, A., & Shepherd, I. T. (2009). Zebrafish development and genetics: introducing undergraduates to developmental biology and genetics in a large introductory laboratory class. *Zebrafish*, 6(2), 169-177.
- 11 Bharti, S., & Rasool, F. (2021). Analysis of the biochemical and histopathological impact of a mild dose of commercial malathion on *Channa punctatus* (Bloch) fish. *Toxicology Reports*, 8, 443-455.
- 12 Kumar, V., Swain, H. S., Roy, S., Das, B. K., Upadhyay, A., Ramteke, M. H., ... & Banerjee, H. (2022). Integrated biomarker approach strongly explaining in vivo sub-lethal acute toxicity of butachlor on *Labeo rohita*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 261, 109427.
- 13 Meng, D., Zhang, P., Zhang, L., Wang, H., Ho, C. T., Li, S., ...& Zhao, H. (2017). Detection of cellular redox reactions and antioxidant activity assays. *Journal of Functional Foods*, 37, 467-479.
- 14 Wang, X. H., Souders II, C. L., Zhao, Y. H., & Martyniuk, C. J. (2018). Mitochondrial bioenergetics and locomotor activity are altered in zebrafish (*Danio rerio*) after exposure to the bipyridylum herbicide diquat. *Toxicology letters*, 283, 13-20.
- 15 Song, S.B., Xu, Y., and Zhou, B.S. (2006). Effects of hexachlorobenzene on antioxidant status of liver and brain of common carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere*, 65, 699–706.
- 16 Gupta, P., & Verma, S. K. (2022). Evaluation of genotoxicity induced by herbicide pendimethalin in fresh water fish *Clarias batrachus* (linn.) and possible role of oxidative stress in induced DNA damage. *Drug and Chemical Toxicology*, 45(2), 750-759.
- 17 Liu, X., Shi, H., Liu, Z., Wang, J., & Huang, J. (2019). Effect of heat stress on heat shock protein 30 (Hsp30) mRNA expression in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 19(8), 681-688.
- 18 Patnaik, L. (2010). Biochemical alterations induced by sevin in *Clarias batrachus*. *Asian J Exp Biol Sci*, 1(1), 124-127.
- 19 Gabriel, U. U., Akinrotimi, O. A., & Ariweriokuma, V. S. (2012). Changes in metabolic enzymes activities in selected organs and tissue of *Clarias gariepinus* exposed to cypermethrin. *Journal of Chemical Engineering*, 1(1), 25-30.
- 20 Somaiah, K., & Sunita, K. (2015). Biochemical changes induced by Butachlor, pre-emergent herbicide to sub lethal concentrations in the freshwater fish *Labeo rohita* (Hamilton). *Journal de Afrikana*, 2(4), 99Y122.

Investigation of zebrafish (*Danio rerio*) exposure to Butachlor herbicide on some physiological indices

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of sub-lethal concentrations of Butachlor on some antioxidant responses and stress genes expression and some biochemical indices of zebra fish. After determination of LC_{50} for 96 hours, zebra fish ($0/3 \pm 0/01$ g) in four experimental groups including (T_1 : 10%, T_2 : 25%, T_3 : 50% of LC_{50} and control) were exposed to different levels of the herbicide Butachlor for 14 days. At the end of the exposure to Butachlor, samples of whole body were collected to measure SOD, CAT and HSP70 genes expression and some biochemical indices including: ALP, ALT and AST. At the end of experimental period, results revealed that SOD, CAT and HSP70 genes expression were up-regulated at 25 and 50% treatments that had significant differences with 10% and control ($P < 0/05$). ALP, ALT and AST activities in fish treated with 25% Butachlor had remarkable differences with others groups ($P < 0/05$). Therefore, it can be concluded that, Butachlor had destructive effects on zebra fish.

Keywords: Herbicide, gene expression, liver enzyme, toxin