






# Comparative Toxicity of Selected Herbicides in Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos as Ecotoxicant Bioindicators

Mojtaba Alishahi<sup>1\*</sup> , Dana Eshagh Harooni<sup>2</sup> , Hadideh Maboudi<sup>2</sup> 

1. Department of livestock, poultry and aquatic animals Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
2. Department of Fisheries, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran.

## Article history:

Received: 26 July 2025  
Revised: 17 October 2025  
Accepted: 21 October 2025  
ePublished: 21 October 2025

\*Corresponding author: Mojtaba Alishahi, Department of livestock, poultry and aquatic animals Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

E-mail: [alishahim@scu.ac.ir](mailto:alishahim@scu.ac.ir)

## Abstract

The use of biological indicators of pollution to evaluate the effects of pollutants on the environment is of special importance. Herbicides are considered one of the most widely used toxicant in the agricultural sector worldwide. Therefore, in this research, the biological index of contamination of Zebrafish (*Danio rerio*) embryos was used to compare the toxicity of five widely used agricultural herbicides: atrazine, paraquat, 2,4-D, glyphosate, and trifluralin. For this purpose, the OECD method and a static system were employed to determine the acute toxicity of these toxins in zebrafish eggs. In the case of each poison, 6-8 increasing concentrations were considered, and 10 zebra eggs were added to each concentration (all experiments were performed in three repetitions), with losses recorded daily up to 48 hours. The results were analyzed using Probit software. Finally, LC50 was determined after 12, 24, 36, and 48 hours for each toxin separately for zebrafish eggs. The maximum acceptable concentration (MAC) of each poison was also calculated. The 48-hour LC50 for the five toxins, atrazine, 2,4-D, trifluralin, paraquat, and glyphosate in zebrafish eggs were 51.4, 39, 12.5, 1.7, and 213.7, respectively. Increasing the concentration of these toxins resulted in higher loss of zebrafish embryo, while increasing the duration of exposure to the poisons had no effect on the increase in loss of zebrafish eggs. According to the current research, among the five herbicides, widely used in agriculture and aquaculture, glyphosate has the least toxicity in zebrafish eggs, while paraquat and trifluralin cause the most toxicity. Since the effective concentration of these poisons is almost similar in agriculture, it is recommended to use glyphosate followed by atrazine and tofordi in agriculture and aquaculture.

**Keywords:** Herbicides, Zebrafish embryo, LC50, acute toxicity, Bioindicator.

**Please cite this article as follows:** Alishahi M., Eshagharoni D., Maboudi H. Comparative Toxicity of Selected Herbicides in Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos as Ecotoxicant Bioindicators. J Mar Bio, 2025; 17(3): 38–57. DOI:



Copyright © 2025 Journal of Marine Biology. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cite

مقاله اصلی

## مقایسه سمیت برخی سموم علف‌کش بر شاخص زیستی جنین ماهی زبرا

مجتبی علیشاهی<sup>۱\*</sup>، دانا اسحاق‌هارونی<sup>۲</sup>، حدیده معبودی<sup>۲</sup>

۱. گروه بهداشت دام، طیور و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
۲. گروه شیلات، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران.

### چکیده

به‌کارگیری شاخص‌های زیستی آلودگی جهت ارزیابی تأثیرات ناشی از آلاینده‌ها بر محیط زیست، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. علف‌کش‌ها، به‌عنوان یکی از پرمصرف‌ترین سموم در بخش کشاورزی در سراسر جهان به‌شمار می‌آیند. لذا در این تحقیق از شاخص زیستی آلودگی جنین گوره‌خرماهی برای مقایسه سمیت ۵ علف‌کش پرمصرف کشاورزی (آترازین، پاراکوات، توفوردی، گلایفوسیت و تریفلورالین) استفاده گردید. به این منظور از روش OECD و سیستم استاتیک برای تعیین سمیت حاد این سموم در تخم‌ماهی زبرا استفاده شد. در مورد هر سم، ۸-۶ غلظت افزایشی از سم در نظر گرفته شده و تعداد ۱۰ عدد تخم زبرا به هر غلظت اضافه شده (تمام آزمایشات در سه تکرار انجام گرفت) و تلفات بصورت روزانه تا ۴۸ ساعت ثبت گردید و نتایج بوسیله نرم افزار پروبیت آنالیز شد. سرانجام LC50 بعد از ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت در مورد هر سم بطور جداگانه برای تخم‌ماهی زبرا مشخص گردید. سپس حداکثر غلظت قابل قبول (MAC) هر سم نیز محاسبه گردید. LC50 48 ساعته در مورد پنج سم آترازین، توفوردی، ترفلان، پاراکوات و گلایفوسیت در تخم گوره‌خرماهی به ترتیب برابر ۵۱/۴، ۳۹، ۱۲/۵، ۱/۷، ۲۱۳/۷ بود. در این سموم افزایش غلظت باعث افزایش تلفات تخم ماهی زبرا شد اما افزایش مدت مجاورت با سموم تأثیری در افزایش تلفات تخم ماهی زبرا نداشت. بر اساس تحقیق حاضر در بین پنج سم علف‌کش (آترازین، توفوردی، ترفلان، پاراکوات و گلایفوسیت) پرمصرف در کشاورزی و آبی‌پروری، سم گلایفوسیت کمترین سمیت را در تخم ماهی زبرا دانیو دارد و پاراکوات و ترفلان بیشترین سمیت را در آنها ایجاد می‌کند. از آنجا که تقریباً غلظت موثره این سموم در کشاورزی مشابه است، توصیه می‌شود از سم گلایفوسیت و در درجه بعد از سم آترازین و توفوردی در کشاورزی و آبی‌پروری استفاده شود.

**واژگان کلیدی:** سموم علف‌کش، جنین ماهی زبرا، LC50، سمیت حاد، شاخص زیستی.

### تاریخچه مقاله

- تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۴/۵/۴  
تاریخ ویرایش مقاله: ۱۴۰۴/۷/۲۵  
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۴/۷/۲۹  
تاریخ انتشار مقاله: ۱۴۰۴/۷/۲۹

تمامی حقوق برای دانشگاه آزاد اهواز محفوظ است.

\* نویسنده مسئول: مجتبی علیشاهی، گروه بهداشت دام، طیور و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

ایمیل: alishahim@scu.ac.ir

**استناد:** علیشاهی، مجتبی؛ اسحاق‌هارونی، دانا؛ معبودی، حدیده. مقایسه سمیت برخی سموم علف‌کش بر شاخص زیستی جنین ماهی زبرا. مجله زیست‌شناسی دریا، پاییز

۱۴۰۴؛ ۱۷(۳): ۳۸-۵۷

## مقدمه

با گسترش صنعت کشاورزی برای مبارزه با علف‌های هرز از روش‌های مختلفی استفاده می‌شود (زند و همکاران، ۱۳۷۸). یکی از این روش‌ها استفاده از سموم کشاورزی که از عوامل مهم در آلودگی اکوسیستم‌های آبی هستند، می‌باشد. ورود این سموم به اکوسیستم‌های آبی اثرات بسیار سمی بر موجودات غیر هدفی که در محیط‌های طبیعی و نزدیک زمین‌های کشاورزی هستند می‌گذارد. این ترکیبات علاوه بر دارا بودن اثرات سوء مستقیم بر ماهی به طور غیر مستقیم نیز باعث از بین رفتن پلاکتون‌ها و زنجیره غذایی موجود در محیط‌های آبی و گیاهان و جانوران آبی می‌شوند (کوهکن و همکاران، ۱۳۹۳).

زیست‌آزمونی روشی است که برای سنجش تأثیر سموم و عوامل محیطی بر ارگانسیم‌های آبی، از طریق قرار دادن این موجودات در معرض دوزهای مختلف آلاینده‌ها و ارزیابی اثرات سمیت بر رفتارها و خصوصیات بیولوژیکی آن‌ها استفاده می‌شود. این فرآیند بویژه برای بررسی سریع آلودگی‌ها و آلاینده‌هایی با پتانسیل ایجاد مسمومیت حاد در انسان‌ها و حیوانات آبی، کاربرد دارد (AL-Khazraji et al., 2020). ماهی زبرا در سال‌های اخیر به دلیل شباهت‌های زیاد از لحاظ ژنتیکی و فیزیولوژیکی که با انسان دارد، برای آزمایش عملکرد ژن‌ها و بررسی تأثیر مولکول‌های آلی بر بدن مفید واقع شده است. اندازه کوچک، سیکل تولید مثلی کوتاه، باروری بالا، شفافیت لارو و رشد سریع خارج از رحم، این ماهی را به گزینه‌ای ایده‌آل برای تحقیقات تبدیل کرده است (حاجی‌اقایی، ۱۳۸۸).

توفوردی-ام سی پی آ یکی از پرمصرف‌ترین علف‌کش‌ها در دنیا محسوب می‌شود این سم نوعی علف‌کش هرمونی (اکسین سنتتیک<sup>۱</sup>) است که عمدتاً در مزارع گندم و جو به کار رفته و به فرم‌های نمک و استر فرموله می‌شود. سمیت آن نسبت به آبزیان به فرم شیمیایی اش بستگی دارد؛ فرم استری در آب هیدرولیز شده و به اسید تبدیل می‌شود که نفوذ بیشتری به آبزیان داشته و ماندگاری بیشتری نسبت به فرم‌های دیگر دارد (علی، ۱۳۹۳).

گلایفوسیت، علف‌کش غیرانتخابی محلول در آب (SL ۴۱٪) از گروه اسیدفسفونیک است که برای از بین بردن عمومی علف‌های هرز در باغات و زمین‌های زراعی یا غیرزراعی به کار رود. استفاده از آن اخیراً افزایش یافته است (محقق منتظری، ۱۳۹۱).

پاراکوات، علف‌کشی است که به اکوسیستم‌های آبی نفوذ کرده و بر ماهیان اثرات سمی دارد. این سم با تحریک تولید آنیون‌های سوپراکسید، رادیکال‌های بسیار سمی ایجاد می‌کند که به ماکرومولکول‌ها آسیب می‌زند و به اندام‌ها آسیب جدی وارد می‌کند (کوهکن و همکاران، ۱۳۹۳).

آترزین، یکی از پرمصرف‌ترین علف‌کش‌ها، برای کنترل علف‌های هرز در مزارع پنبه، نیشکر، و ذرت استفاده می‌شود. باقیمانده‌های این سم به آب‌های زیرزمینی و رودخانه‌ها نفوذ کرده و برخی ماهی‌ها از جمله ماهی زبرا را تحت تأثیر قرار می‌دهد (سالنامه بهاری جهاد کشاورزی، ۱۳۹۲).

تری‌فلورالین، یک علف‌کش دی‌نیتروآیلینی با نام تجاری ترفلان، برای کنترل علف‌های هرز در سویا استفاده می‌شود و ورود مستقیم آن به آب می‌تواند ماهی‌ها را مسموم کند (رودی و همکاران، ۱۳۸۸).

با توجه به آمار بالای استفاده از سموم علف‌کش در کشاورزی ایران، بویژه استان خوزستان که یکی از قطب‌های کشاورزی کشور است، مقایسه سمیت علف‌کش‌های رایج و میزان تهدید آنها برای سلامت موجودات، بویژه آبزیان، یکی از نیازهای ضروری است، لذا این مطالعه با هدف مقایسه سمیت ۵ سم علف‌کش آترزین، پاراکوات، توفوردی، تری‌فلورالین و گلایفوسیت با استفاده از شاخص‌های زیستی سمیت محیطی، جنین‌گورخرماهی<sup>۲</sup> صورت گرفت تا کم‌خطرترین سم علف‌کش از نظر خطر زیست محیطی برای موجودات غیر هدف، در بین سموم علف‌کش پرکاربرد معرفی شود.

<sup>1</sup> Oxine synthetic

<sup>2</sup> *Danio rerio*

## مواد و روش‌ها

### تهیه تخم ماهی زبرا

برای تهیه تخم ماهی زبرا، ابتدا اقدام به تهیه ماهی زبرا دانیو گردید. ماهی پیش مولد زبرا دانیوی ساده از گرگان (کارگاه وکیلی) تهیه و به اهواز منتقل شد. ماهی‌ها تا مرحله بلوغ کامل جنسی در شرایط مناسب از لحاظ محیط پرورش و تغذیه نگهداری شدند. ۱۰۰ عدد ماهی ماده و نر پیش مولد زبرا دانیو در یک تانک ۱۲۰ لیتری مجهز به هوادهی، فیلتر اکسترنال و هیتر ترموستاتیک نگهداری شدند. روزانه ۳ بار تغذیه ماهی‌ها ترجیحا با خوراک زنده (دافنی و روتیفر) یا خوراک دستی با کیفیت (بیومار شماره ۵/۰، شیرونومید) تغذیه شدند. سیکل نوری ۱۴:۱۰ نور/ تاریکی رعایت گردید. بعد از مشخص شدن کامل جنسیت، ماهی‌های نر و ماده به دو آکواریوم مجزا منتقل گردیدند، بطوریکه ماهی‌های نر و ماده همدیگر را نبینند. برای انجام مرحله تکثیر، غروب روز قبل از تخم‌ریزی، ماهی‌های ماده رسیده و نر به نسبت ۲ به ۱ در آکواریوم تهیه شده برای تکثیر قرار داده شدند. برای جلوگیری از عفونت باکتریایی و قارچی تخم‌ها، ضمن ضدعفونی کامل وسایل قبل از ماهیدار کردن، از آب اتوکلاو شده در مراحل کار استفاده گردید.

آکواریوم بوسیله یک توری پلاستیکی مخصوص به صورت افقی به ۲ قسمت تقسیم شد. از خورده شدن تخم‌ها بوسیله مولدین پس از تخم‌ریزی جلوگیری شود. دمای آب ۲۸ درجه تنظیم گردید.

صبح روز بعد با طلوع آفتاب و شروع سیکل نوری، ماهی‌ها تخم‌ریزی کرده و بعد از خارج کردن مولدین از تانک، تخم‌ها با ملایمت سیفون و جمع‌آوری شدند. تخم‌های لقاح یافته که شفاف بودند از تخم‌های لقاح نیافته که سفید بودند جداسازی شدند.

### روش انجام آزمون زیست‌سنجی در زبرا دانیو

در مطالعه حاضر از پنج سم آترازین، پاراکوات، توفوردی، گلايفوسیت و تریفلورالین جهت بررسی اثر سمیت حاد آنها بر روی تخم ماهی زبرا استفاده شد. این سموم بر اساس پر مصرف‌ترین سموم علف‌کش در استان خوزستان انتخاب گردیدند. مهم‌ترین مرحله برای انجام زیست‌سنجی آزمون با استفاده از ماهی زبرا، به علت سیکل تولید مثلی کوتاه و تولید تعداد زیاد تخم در یک دوره، تخم ماهی است. آزمون سمیت حاد مطابق استاندارد OECD 202 برای تست مواد شیمیایی (OECD 2004) بر روی تخم (جنین) ماهی زبرا و همچنین بر اساس پروتکل شماره EPA-821- R-02-012 سازمان حفاظت محیط زیست آمریکا به منظور بررسی سمیت انجام شد (نشریه سازمان حفاظت محیط زیست آمریکا، ۲۰۰۲). برای انجام این آزمون ابتدا غلظت‌های مختلف سموم در درصد‌های حجمی تعیین شده آماده و سپس مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از هر یک از غلظت‌ها در ۳ تکرار، در پلیت‌های مخصوص کشت سلول ۶ خانه ای ریخته شد و به تمام ظروف حاوی سم و نمونه شاهد تعداد ۱۰ عدد تخم جنین دار ماهی زبرا اضافه گردید. مشاهده نمونه‌ها به طور منظم بعد از ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت در زیر لوپ انجام گرفت و تعداد تخم‌های مرده (بدون حرکت، بدون ضربان قلب) در هر ظرف شمارش و ثبت شد. در پایان آزمایش‌ها، واحد سمیت حاد، غلظت کشنده ۴۸ ساعته و نیز تعیین LC15، LC50 و LC90 در ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت با استفاده از نرم افزار Probit و ویرایش ۱/۵ نرم افزار SPSS محاسبه گردید. نتایج آزمایش‌ها زمانی قابل قبول بود که کمتر از ۱۰ درصد تخم‌های ماهی زبرا در ظرف شاهد مرده باشند.

### تعیین حداکثر غلظت قابل قبول (MAC) سموم مورد استفاده در تخم ماهی زبرا

برای تعیین MAC از رابطه زیر استفاده گردید. ابتدا غلظت ایجاد کننده ۵۰٪ تلفات بعد از ۴۸ ساعت مشخص شده و سپس از رابطه زیر حداکثر غلظت مجاز هر یک از سموم تعیین گردید.

$$\text{Maximum Acceptable Concentration (MAC)} = (10 / 48 \text{ LC50 ساعته})$$

## آنالیز آماری

برای سنجش سمیت سموم علف‌کش در تخم ماهی زبرا از نرم افزار SPSS ویرایش ۲۳ استفاده گردید، ارتباط بین غلظت سم و تلفات به روش Probit (رگرسیون بین لگاریتم بر مبنای ۲ غلظت و درصد تلفات) اندازه‌گیری شد. در این روش با توجه به درصد تلفات در تیمارها و گروه کنترل، تحت تاثیر غلظت‌های مختلف سم، غلظت سم برای ایجاد تلفات مشخص (مثلا ۵۰٪ یا ۹۰٪) تخمین زده می‌شود. برای مقایسه سمیت سموم از میانگین و حداکثر و حداقل LC50 ۴۸ ساعته سموم در دافنیا ماگنا استفاده گردید. برای رسم نمودارها از نرم افزار اکسل ۲۰۱۳ استفاده شد.

## نتایج

در مطالعه حاضر برای انجام آزمون سمیت حاد از غلظت‌های مختلفی از سموم آترازین، پاراکوات، توفوردی، گلایفوسیت و تریفلورالین تهیه گردید که در جدول شماره ۱ ذکر شده‌اند.

**جدول ۱. غلظت‌های انتخاب شده برای تعیین سمیت حاد سموم علف‌کش مورد مطالعه در تخم ماهی زبرا**

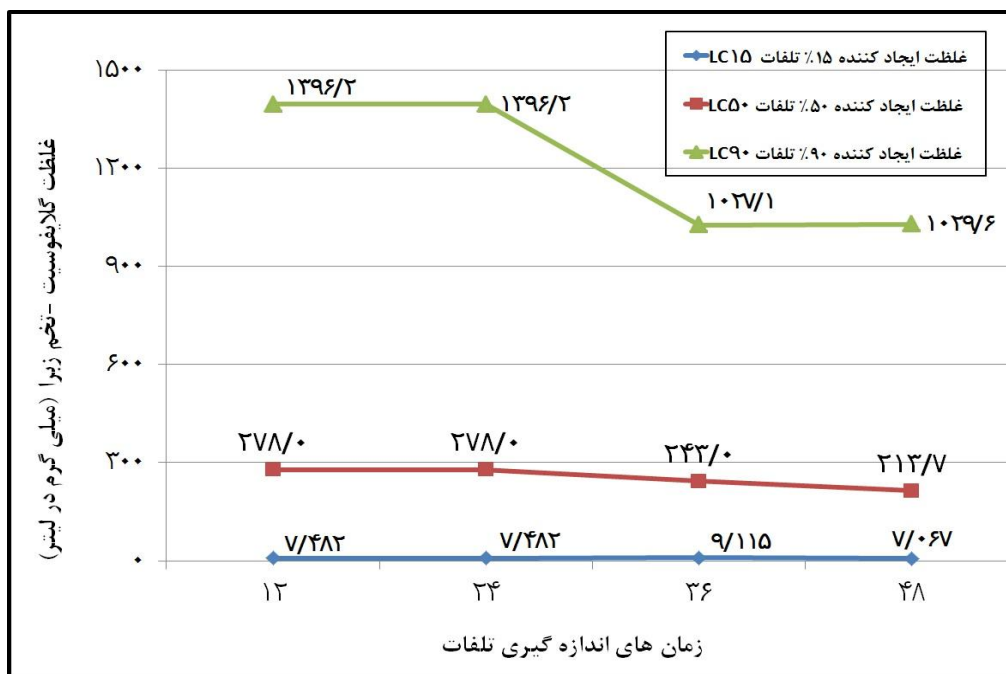
غلظت‌های مورد استفاده در هر سم							تعداد تیمار	سم علف‌کش	نمونه مورد آزمایش
۱۶۰۰	۸۰۰	۴۰۰	۲۰۰	۱۰۰	۴۰	۲۰			
							۸	گلایفوسیت	تخم زبرا برای دانیو
					۲/۵	۱/۲۵	۰	پاراکوات	
					۲/۵	۱/۲۵	۰	تری فلورالین	
					۲۰	۱۰	۰	آترازین	
					۲۰	۱۰	۰	توفوردی	

نتایج حاصل از آنالیز تلفات ایجاد شده در تخم زبرا برای دانیو مجاور شده با غلظت‌های مختلف هر یک از سموم بعد از ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت در جدول شماره ۲ آورده شده است. در این جدول غلظت‌های ایجاد کننده ۵، ۱۵، ۵۰، ۶۵، ۷۵ و ۹۰ درصد تلفات آورده شده است.

جدول ۲. نتایج حاصل از آنالیز تلفات ایجاد شده در تخم‌زبری مجاور شده با غلظت‌های مختلف سموم علف‌کش بعد از ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت

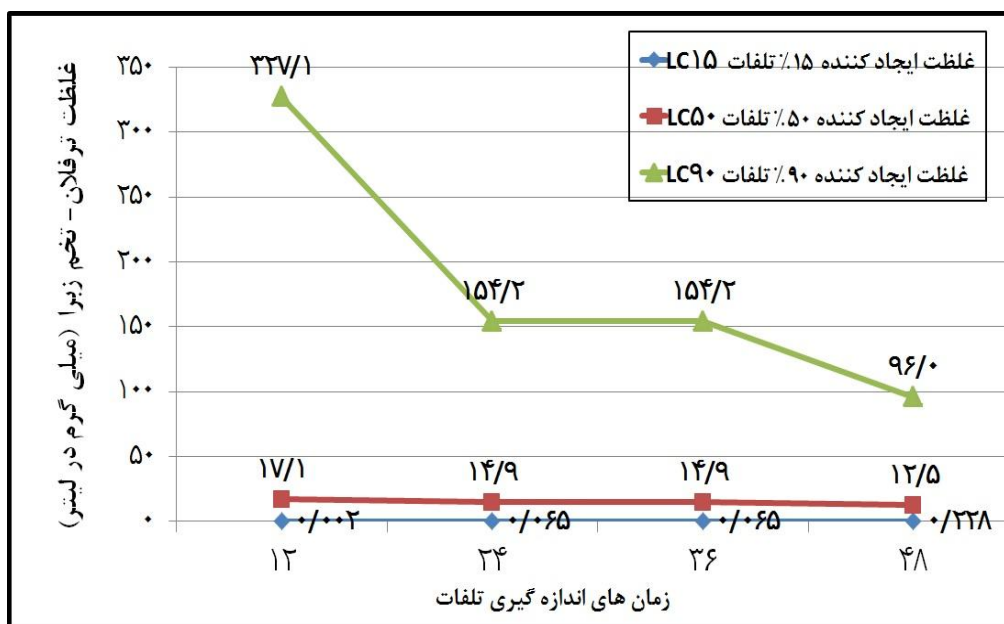
نوع سم	غلظت ایجاد کننده تلفات (میلی گرم در لیتر)				
	بعد از ۴۸ ساعت	بعد از ۳۶ ساعت	بعد از ۲۴ ساعت	بعد از ۱۲ ساعت	
گلایفوسیت	۱/۰۳۷	۱/۱۳۷	۱/۴۶۶	۱/۴۶۶	LC ۵
	۵/۰۶۷	۶/۱۱۵	۷/۴۸۲	۷/۴۸۲	LC ۱۵
	۵۰/۵	۵۲/۰	۵۷/۰	۵۷/۰	LC ۴۰
	۲۱۳/۷	۲۴۳/۰	۲۷۸/۰	۲۷۸/۰	LC ۵۰
	۴۵۹/۱	۴۷۸/۸	۶۱۴/۳	۶۱۴/۳	LC ۶۵
	۶۴۳/۱	۶۵۵/۷	۸۶۶/۶	۸۶۶/۶	LC ۷۵
	۱۰۲۷/۶	۱۰۲۹/۱	۱۳۹۶/۲	۱۳۹۶/۲	LC ۹۰
پاراکوات	۰/۰۳۲	۰/۰۴۲	۰/۰۴۲	۰/۰۴۸	LC ۵
	۰/۱۲۱	۰/۱۷۲	۰/۱۷۲	۰/۱۸۶	LC ۱۵
	۱/۳۲	۱/۳۶	۱/۳۶	۱/۴۸	LC ۴۰
	۱/۶۳۵	۱/۷۱۱	۱/۷۱۱	۱/۸۵۴	LC ۵۰
	۴/۹	۵/۳	۵/۳	۷/۹	LC ۶۵
	۸/۳	۹/۵	۹/۵	۱۴/۱	LC ۷۵
	۱۵/۴	۱۸/۴	۱۸/۴	۲۶/۹	LC ۹۰
ترفلان	۰/۰۳۴	۰/۰۰۴	۰/۰۰۴	۰	LC ۵
	۰/۰۱۲۸	۰/۰۱۶۵	۰/۰۱۶۵	۰/۰۲	LC ۱۵
	۱۰	۱۱/۹۲	۱۱/۹۲	۱۳/۶۸	LC ۴۰
	۱۲/۵	۱۴/۹	۱۴/۹	۱۷/۱	LC ۵۰
	۳۷/۶	۵۶/۸	۵۶/۸	۱۱۰/۳	LC ۶۵
	۵۶/۵	۸۸/۲	۸۸/۲	۱۸۰/۳	LC ۷۵
	۹۶/۰	۱۵۴/۲	۱۵۴/۲	۳۲۷/۱	LC ۹۰
توفوردی	۳/۰۱۳	۳/۰۲۲	۳/۰۳۲	۳/۰۸۲	LC ۵
	۷/۴۱۵	۷/۴۱۵	۷/۱۷۶	۷/۰۵۱	LC ۱۵
	۲۳/۱	۲۳/۱	۲۴/۸	۲۷/۳	LC ۴۰
	۳۹/۰	۳۹/۰	۴۳/۵	۴۸/۴	LC ۵۰
	۶۳/۱	۶۳/۱	۷۱/۸	۸۰/۳	LC ۶۵
	۸۱/۲	۸۱/۲	۹۳/۱	۱۰۴/۳	LC ۷۵
	۱۱۹/۳	۱۱۹/۳	۱۳۷/۸	۱۵۴/۷	LC ۹۰
آترازین	۱/۳۹۵	۱/۴۵۶	۱/۵۲۹	۱/۵۲۹	LC ۵
	۴/۳	۴/۶	۴/۸	۴/۸	LC ۱۵
	۹/۸	۱۷/۷	۲۱/۱	۲۱/۱	LC ۴۰
	۵۱/۴	۶۰/۵	۶۳/۳	۶۳/۳	LC ۵۰
	۱۱۴/۷	۱۲۵/۶	۱۳۷/۶	۱۳۷/۶	LC ۶۵
	۱۶۲/۲	۱۷۴/۴	۱۷۵/۸	۱۷۵/۸	LC ۷۵
	۲۶۲/۰	۲۷۷/۰	۲۷۷/۰	۲۷۷/۰	LC ۹۰

نتایج حاصل از مجاورت تخم زبرا برای دانیو با سم علف‌کش گلایفوسیت و درصد تلفات آن‌ها بعد از ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت مجاورت با سم در نمودار ۱ آورده شده است.



نمودار ۱. ارتباط بین غلظت‌های سم گلایفوسیت و درصد تلفات تخم زبرا برای دانیو مجاور شده با این غلظت‌ها بعد از ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت

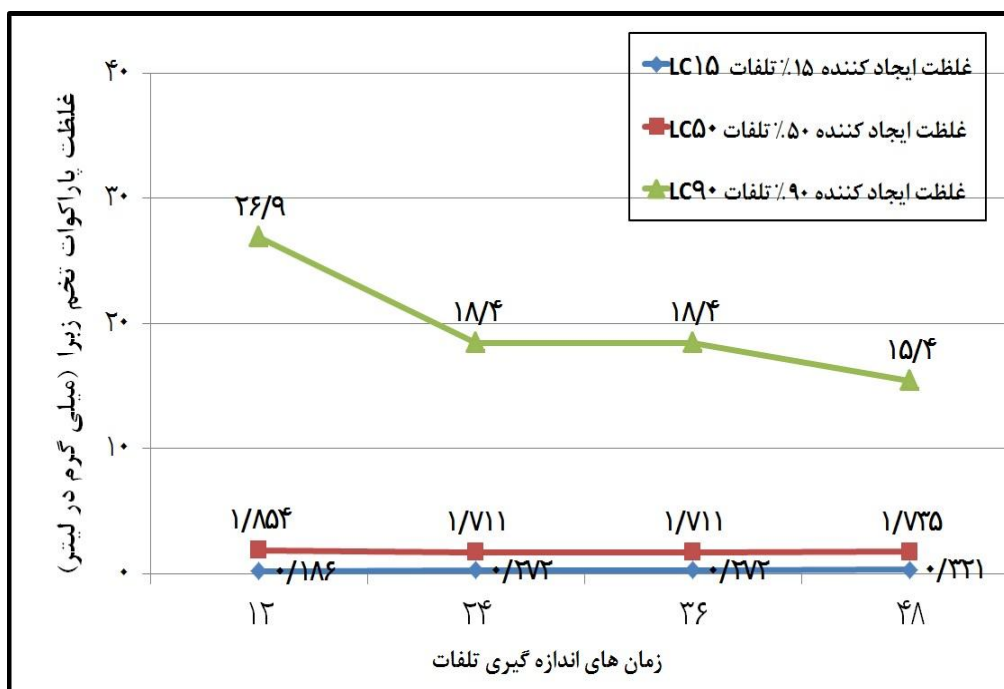
سمیت گلایفوسیت در تخم زبرا دانیو تحت تاثیر دو عامل غلظت سم و مدت مجاورت بوده است بطوریکه غلظت ایجاد کننده ۱۵، ۵۰ و ۹۰٪ تلفات بعد از ۱۲ ساعت به ترتیب برابر ۷/۴۸۲، ۲۷۸/۰ و ۱۳۹۶/۳ می‌باشند و نشان دهنده این است که با افزایش غلظت سم درصد تلفات نیز افزایش می‌یابد. این روند در همه مراحل بررسی (۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت) نیز مشاهده گردید. عامل دوم یا مدت مجاورت با سم، تاثیر چندانی روی تلفات تخم زبرا نداشته است، بطوریکه غلظت مورد نیاز از سم گلایفوسیت برای ایجاد ۱۵٪ تلفات بعد از ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت به ترتیب برابر ۷/۴۸۲، ۷/۴۸۲، ۹/۱۱۵ و ۷/۰۶۷ بوده است که تفاوت معنی داری باهم نشان نداده و تقریباً این روند در هر سه دوز کشنده مشابه بوده است. نتایج حاصل از مجاورت تخم زبرا برای دانیو با سم علف‌کش ترفلان و درصد تلفات آن‌ها بعد از ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت مجاورت با سم در نمودار ۲ آورده شده است.



نمودار ۲. ارتباط بین غلظت‌های سم ترفلان و درصد تلفات تخم ماهی زبرای دانیو مجاور شده با این غلظت‌ها بعد از ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت

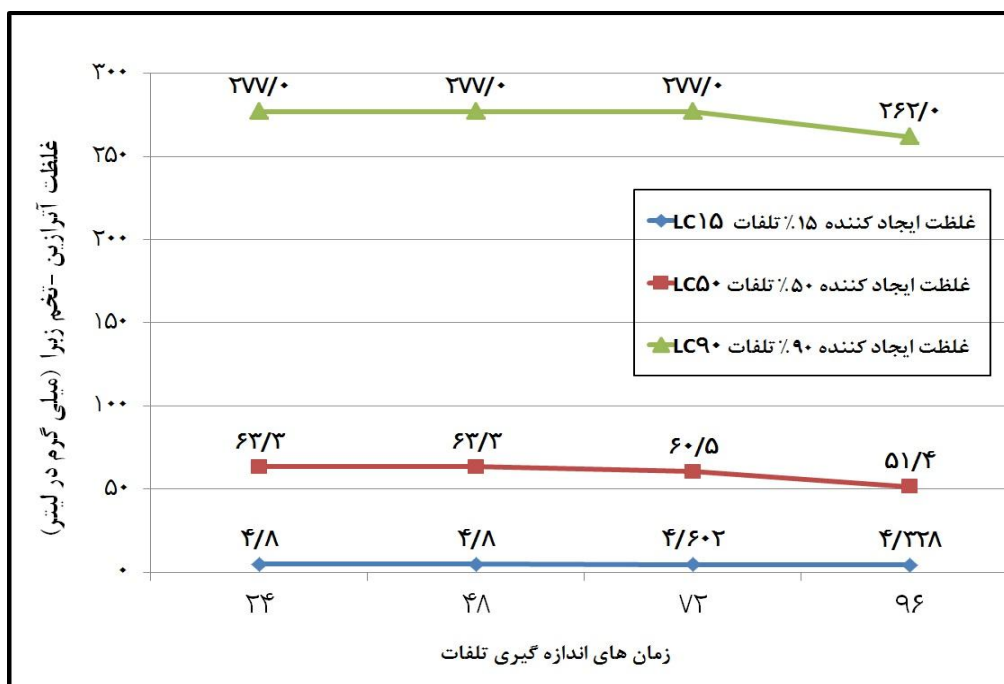
در نمودار ۲ همانگونه که مشاهده می‌شود با افزایش غلظت سم ترفلان درصد تلفات تخم ماهی زبرای دانیو نیز افزایش می‌یابد، بطوریکه غلظت ایجاد کننده ۱۵، ۵۰ و ۹۰٪ تلفات بعد از ۱۲ ساعت به ترتیب برابر ۰/۰۰۲، ۱۷/۱ و ۳۲۷/۱ می‌باشند ولی مدت مجاورت با سم تاثیر چندانی در روند تلفات نداشته و به طور مثال غلظت مورد نیاز از سم ترفلان برای ایجاد ۵۰٪ تلفات بعد از ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت به ترتیب برابر ۱۷/۱، ۱۴/۹، ۱۴/۹ و ۱۲/۵ می‌باشد. با افزایش مدت مجاورت تخم زبرای دانیو با سم ترفلان، تلفات حاصل از مجاورت بجز در غلظت ایجاد کننده ۹۰٪ تلفات تقریباً یکنواخت بوده و تاثیری معنی داری نداشته است.

نتایج حاصل از مجاورت تخم زبرای دانیو با سم علف‌کش پاراکوات و درصد تلفات آن‌ها بعد از ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت مجاورت با سم در نمودار ۳ آورده شده است.



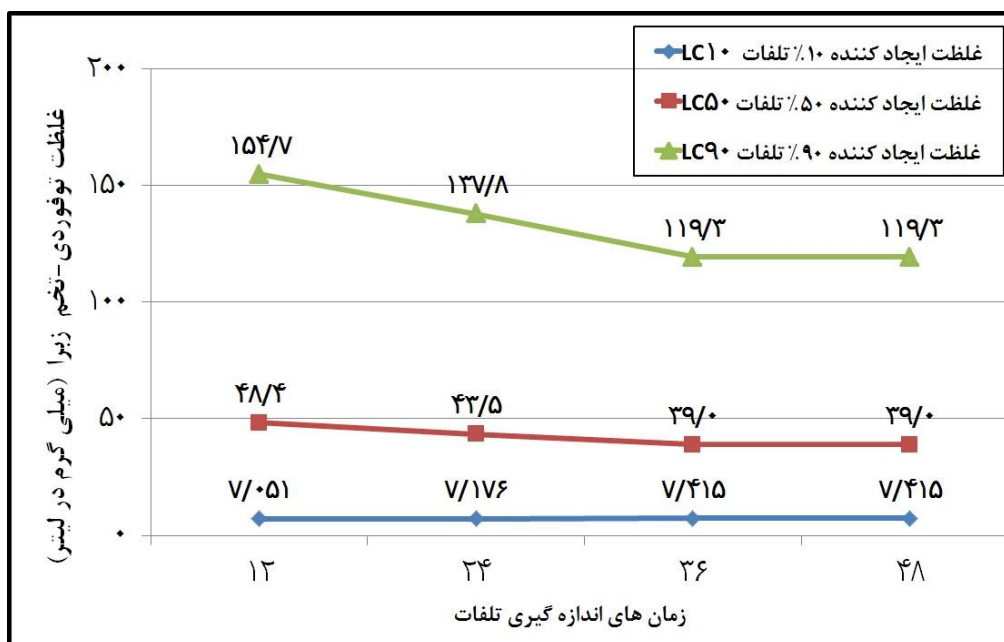
نمودار ۳. ارتباط بین غلظت‌های سم پاراکوات و درصد تلفات تخم زبرای دانیو مجاور شده با این غلظت‌ها بعد از ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت

نمودار ۳ نشان می‌دهد سه غلظت ایجاد کننده ۱۵، ۵۰ و ۹۰٪ تلفات سم پاراکوات با هم اختلاف معنی‌داری دارند و با افزایش غلظت درصد تلفات نیز افزایش می‌یابد. این غلظت‌ها بعد از ۱۲ ساعت به ترتیب برابر ۲۰، ۴۳/۲ و ۷۱/۸ می‌باشند. مدت مجاورت با سم، تاثیر چندانی روی تلفات تخم زبرا نداشته است، بطوریکه غلظت مورد نیاز از سم پاراکوات برای ایجاد ۱۵٪ تلفات بعد از ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت به ترتیب برابر ۲۰، ۴/۷، ۱/۲ و ۷/۶ بوده است که تفاوت معنی‌داری باهم نشان نمی‌دهند و تقریباً این روند در هر سه دوز کشنده مشابه بوده است. نتایج حاصل از مجاورت تخم زبرای دانیو با سم علف‌کش آترازین و درصد تلفات آن‌ها بعد از ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت مجاورت با سم در نمودار ۴ آورده شده است.



**نمودار ۴.** ارتباط بین غلظت‌های سم آترازین و درصد تلفات در تخم زبرای دانیو مجاور شده با این غلظت‌ها بعد از ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت

همانطور که در نمودار ۴ مشخص است، با افزایش مدت مجاورت تخم زبرای دانیو با سم آترازین، تلفات حاصل از مجاورت تغییر معنی داری پیدا نمی‌کند، بطوریکه، غلظت ایجاد کننده ۵۰٪ تلفات بعد از ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت به ترتیب برابر ۶۳/۳، ۶۳/۳، ۶۰/۵ و ۵۱/۴ میلی‌گرم بر لیتر است. ولی با افزایش غلظت سم آترازین درصد تلفات تخم ماهی زبرای دانیو نیز افزایش می‌یابد، بطوریکه غلظت ایجاد کننده ۱۵، ۵۰ و ۹۰٪ تلفات بعد از ۱۲ ساعت به ترتیب برابر ۴/۸، ۶۳/۳ و ۲۷۷/۰ می‌باشد. لذا این ماده برای تخم زبرا به عنوان سم مطرح می‌باشد. نتایج حاصل از مجاورت تخم زبرای دانیو با سم علف‌کش توفوردی و درصد تلفات بعد از زمان ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت مجاورت با سم در نمودار ۵ آورده شده است.



نمودار ۵. ارتباط بین غلظت‌های سم توفوردی و درصد تلفات تخم زبرای دانیو مجاور شده با این غلظت‌ها بعد از ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت

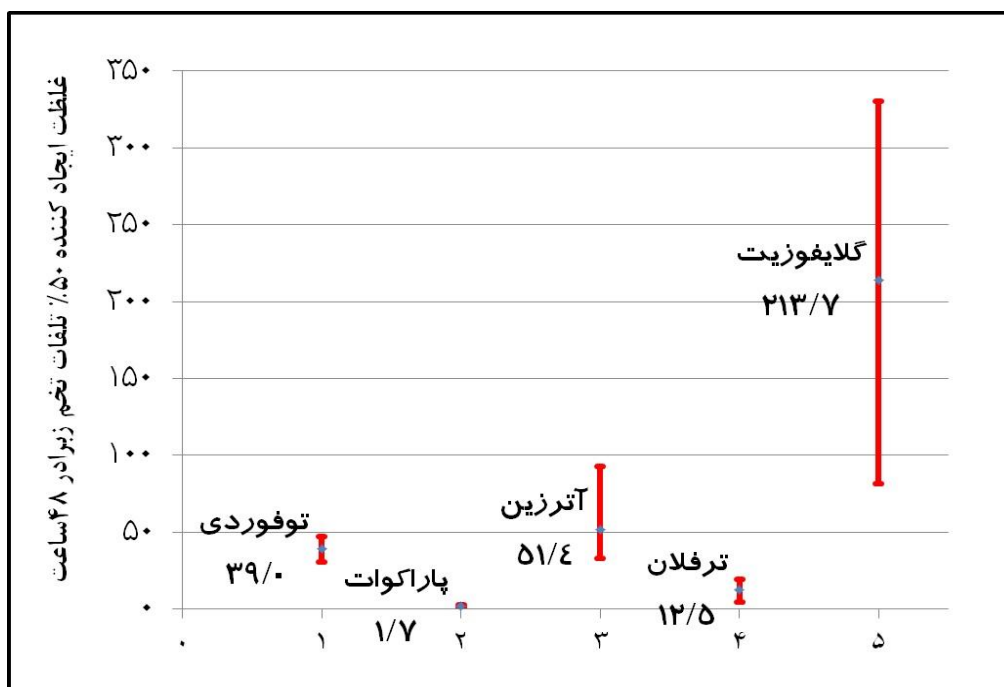
سم توفوردی در نمودار ۵ نشان می‌دهد می‌شود که با افزایش غلظت سم درصد تلفات تخم ماهی زبرای دانیو نیز افزایش می‌یابد، بطوریکه غلظت ایجاد کننده ۱۵، ۵۰ و ۹۰٪ تلفات بعد از ۱۲ ساعت به ترتیب برابر ۷/۰۵۱، ۴۸/۴ و ۱۵۴/۷ می‌باشند. مدت مجاورت با سم تاثیر چندانی در روند تلفات نداشته و به طوریکه غلظت مورد نیاز از سم توفوردی برای ایجاد ۵۰٪ تلفات بعد از ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت به ترتیب برابر ۴۳/۵، ۴۸/۴، ۳۹/۰ و ۳۹/۰ می‌باشد. با افزایش مدت مجاورت تخم زبرای دانیو با سم توفوردی، تلفات حاصل از مجاورت بجز در غلظت ایجاد کننده ۹۰٪ تلفات تقریباً یکنواخت بوده و تاثیری معنی داری نداشته است.

برای تعیین حداکثر غلظت قابل قبول (MAC) از رابطه زیر استفاده گردید. ابتدا غلظت ایجاد کننده ۵۰٪ تلفات بعد از ۴۸ ساعت مشخص شده و سپس از رابطه زیر حداکثر غلظت مجاز هر یک از سموم تعیین گردید.

جدول ۳. حداکثر غلظت قابل قبول پنج سم مورد استفاده در این تحقیق در تخم زبرای دانیو

سموم مورد استفاده در تحقیق	LC50 ۴۸ ساعته تخم زبرای دانیو	MAC
توفوردی	۳۹	۳/۹
پاراکوات	۱/۷	۰/۱۷
آترزین	۵۱/۴	۵/۱۴
ترفلان	۱۲/۵	۱/۲۵
گلایفوسیت	۲۱۳/۷	۲۱/۳۷

مقایسه‌ی سمیت غلظت ایجاد کننده ۵۰٪ تلفات در ۴۸ ساعت پنج سم آترزین، توفوردی، ترفلان، پاراکوات و گلایفوسیت در تخم زبرای دانیو در نمودار ۶ آورده شده است.

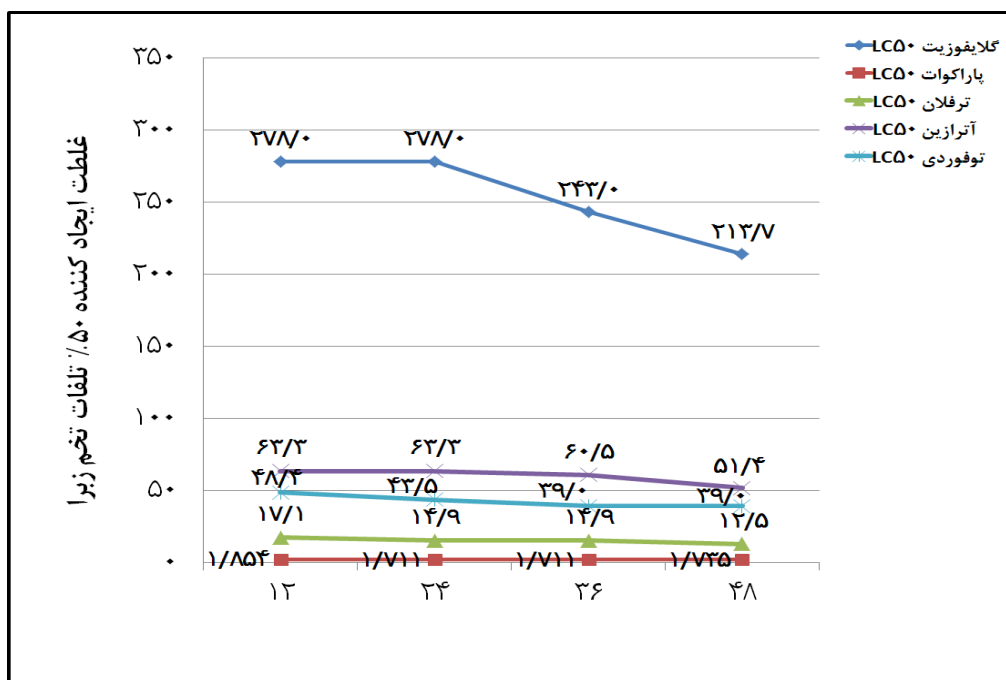


نمودار ۶. مقایسه غلظت ایجاد کننده ۵۰٪ تلفات بعد از ۴۸ ساعت (LC50 ۴۸ ساعته) پنج سم توفوردی، پاراکوات، آترزین، ترفلان و گلايفوزیت در تخم زبرای دانیو

جدول ۴. نتایج حاصل از آنالیز تلفات غلظت ایجاد کننده ۵۰٪ تلفات بعد از ۴۸ ساعت (LC50 ۴۸ ساعته) پنج سم توفوردی، پاراکوات، آترزین، ترفلان و گلايفوزیت در تخم زبرای دانیو

نام سم مورد تحقیق	LC50	uper	lower
توفوردی	۳۹/۹	۸/۱	۸/۴
پاراکوات	۱/۷	۱/۲	۱/۱
آترزین	۵۱/۴	۴۱/۵	۱۸/۳۸
ترفلان	۱۲/۵	۶/۹	۸/۳
گلايفوسیت	۲۱۳/۷	۱۱۶/۸	۱۳۲/۵

همانطور که در نمودار بالا مشاهده می‌گردد LC50 ۴۸ ساعته پنج سم ارزیابی شده در این تحقیق متفاوت است، بیشترین غلظت برای ایجاد تلفات ۵۰٪ بعد از ۴۸ ساعت (مشخصه سمیت حاد در جنین زبرا) در سم علف کش گلايفوسیت مشاهده گردید بطوریکه این میزان تفاوت معنی داری با تمام سموم مورد بررسی داشت (۲۱۳/۷). در مرحله بعد دو سم توفوردی و آترزین (با میزان ۳۹ و ۵۱/۴) سمیت بیشتری نسبت گلايفوسیت داشته و دو سم ترفلان و پاراکوات (با میزان ۱۲/۵ و ۱/۷) با بالاترین سمیت در تخم زبرا و با غلظت‌های بسیار کم ایجاد تلفات می‌نمایند. نتایج حاصل از مجاورت تخم زبرای دانیو با پنج سم علف‌کش آترزین، توفوردی، ترفلان، پاراکوات و گلايفوسیت و میزان ۵۰٪ تلفات آن‌ها در مدت زمان ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت در نمودار ۷ آورده شده است.



نمودار ۷. مقایسه غلظت ایجاد کننده ۵۰٪ تلفات بعد از ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت پنج سم توفوردی، پاراکوات، آترازین، ترفلان و

#### گلایفوسیت در تخم زبرا برای دانیو

همانطور که در نمودار مشاهده می‌گردد غلظت ایجاد کننده ۵۰٪ تلفات طی مراحل مختلف تحقیق در تخم زبرا دانیو تحت تاثیر سموم علف‌کش مورد تحقیق با هم تفاوت معنی‌داری دارند، بطوریکه بیشترین سمیت (کمترین غلظت برای ایجاد ۵۰٪ تلفات) در تمام مراحل تحقیق (۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸) به ترتیب در سم پاراکوات و ترفلان مشاهده گردید. بر اساس نتایج نمودار فوق سمیت سم گلایفوسیت با فاصله زیادی کمتر از بقیه سموم مورد بررسی می‌باشد. نمودار ۷ روند تلفات در تخم‌های مجاور شده با سموم مورد تحقیق را نیز نشان می‌دهد، تقریباً در تمام سموم مورد بررسی غلظت سم تاثیر موثرتری نسبت به مدت مجاورت به سم داشته است بطوریکه به جز گلایفوسیت تفاوت زیادی در غلظت ایجاد کننده ۵۰٪ تلفات در ۴ مقطع زمانی بین سموم دیگر مشاهده نگردید.

#### بحث و نتیجه‌گیری

پیشرفت کشاورزی مرهون استفاده از تکنولوژی و مواد شیمیایی مختلف برای کنترل بیماری‌ها و آفات است این آفت‌کش‌ها در عرض چند هفته پس از استفاده در فعالیت‌های کشاورزی از طریق روان آب‌های سطحی، وارد اکوسیستم‌های آبی می‌شوند. آلودگی برخی از زیستگاه‌ها از این طریق به اثبات رسیده است. این ترکیبات علاوه بر دارا بودن اثرات سوء مستقیم بر ماهی، به صورت غیر مستقیم نیز باعث از بین بردن جوامع پلانکتونی و زنجیره‌های غذایی موجود در محیط‌های آبی و همچنین سایر گیاهان و جانوران آبی می‌شوند (کوهکن، ۱۳۹۳).

در استان خوزستان بیش از ۱۰۰ هزار هکتار مزرعه کشت نیشکر وجود دارد که علف‌کش‌ها بیشترین مورد استفاده در این صنعت هستند. از طرفی حدود ۳۰٪ آب‌های سطحی کشور در این استان جریان داشته و احتمال آلودگی آب‌های سطحی و رودخانه‌ها به این سموم بالاست و دور از انتظار نیست که برخی مشکلات بهداشتی و حساسیتی برای آبریان منطقه و ماهیان پرورشی استان به مسمومیت‌های مزمن از جمله مسمومیت با این سموم مرتبط باشد. لذا بررسی اثر این سموم بر محیط زیست با شاخص‌های پذیرفته شده زیستی ارزشمند می‌باشد.

درخصوص تخم ماهی زبرا دانیو مشاهده می‌گردد LC50 ۴۸ ساعته پنج سم ارزیابی شده در این تحقیق متفاوت است، بیشترین غلظت برای ایجاد تلفات ۵۰٪ بعد از ۴۸ ساعت (مشخصه سمیت حاد در تخم زبرا) در سم علف‌کش گلایفوسیت مشاهده گردید بطوریکه این میزان تفاوت معنی‌داری با تمام سموم مورد بررسی داشت (۲۱۳/۷) در مرحله بعد دو سم توفوردی و آترازین (با میزان ۳۹ و ۲۹/۸) سمیت بیشتری نسبت

گلایفوسیت داشته و دو سم ترفلان و پاراکوات (با میزان ۱۲/۵ و ۱۰/۷) با بالاترین سمیت در تخم زبرا و با غلظت‌های بسیار کم ایجاد تلفات می‌نماید. همچنین در بررسی غلظت ایجاد کننده ۵۰٪ تلفات طی مراحل مختلف تحقیق در تخم ماهی زبرا تحت تاثیر سموم علف کش مورد تحقیق با هم تفاوت معنی داری دارند، بطوریکه بیشترین سمیت (کمترین غلظت برای ایجاد ۵۰٪ تلفات) در تمام مراحل تحقیق (۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸) در تخم زبرا برای دانیو به ترتیب در سم پاراکوات و ترفلان مشاهده گردید. بر اساس نتایج فوق سمیت سم گلایفوزیت با فاصله زیادی کمتر از بقیه سموم مورد بررسی می‌باشد. روند تلفات در تخم‌های مجاور شده با سموم مورد تحقیق نشان می‌دهد، تقریباً در تمام سموم مورد بررسی غلظت سم تاثیر موثرتری نسبت به مدت مجاورت به سم داشته است بطوریکه به جز گلایفوزیت تفاوت زیادی در غلظت ایجاد کننده ۵۰٪ تلفات در ۴ مقطع زمانی بین سموم دیگر مشاهده نگردید.

نتایج این بررسی نشان داد که همه سموم علف‌کش مورد استفاده در این تحقیق در تخم زبرا برای دانیو سمیت ایجاد کرده و سمیت آنها متفاوت است که اثر هر یک از سموم در این دو به ترتیب بررسی گردید.

### بررسی تاثیر سم گلایفوسیت بر تخم ماهی زبرا دانیو

تخم زبرا دانیو در بررسی سمیت گلایفوسیت، تحت تاثیر دو عامل غلظت سم و مدت مجاورت بوده است بطوریکه غلظت ایجاد کننده ۱۵، ۵۰ و ۹۰٪ تلفات بعد از ۱۲ ساعت به ترتیب برابر ۷/۴۸۲، ۲۷۸/۰ و ۱۳۹۶/۲ می‌باشند و نشان دهنده این است که با افزایش غلظت سم درصد تلفات نیز افزایش می‌یابد. این روند در همه مراحل بررسی (۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت) نیز مشاهده گردید. عامل دوم یا مدت مجاورت با سم، تاثیر چندانی روی تلفات تخم زبرا نداشته است، بطوریکه غلظت مورد نیاز از سم گلایفوسیت برای ایجاد ۱۵٪ تلفات بعد از ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت به ترتیب برابر ۷/۴۸۲، ۷/۱۱۵، ۹/۰۶۷ و ۷/۰۶۷ بوده است که تفاوت معنی داری با هم نداشتند و تقریباً این روند در هر سه دوز کشنده مشابه بوده است. به عبارت دیگر می‌توان گفت غلظت سم اثر بیشتری بر سمیت آن در مرگ تخم زبرا نسبت به مدت مجاورت دارد و افزایش مدت مجاورت غلظت خاصی از سم به مدت ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت تاثیر چندانی بر افزایش مرگ و میر جنین این ماهی ندارد. در سایر تحقیقات انجام شده در مورد اثر سم گلایفوسیت در جانوران آبی نتایج متفاوتی حاصل شده است که برخی از آنها با نتایج تحقیق جاری تطابق دارد.

در مطالعه ای که توسط لویز و همکاران در سال ۲۰۲۲ بر روی اثر سم گلایفوزیت بر روی رفتار ماهی از زمان جنینی تا بلوغ انجام شد مشخص شد که گلایفوسیت باعث اختلالات رفتاری در جنین این ماهی شده و این علف کش شنا، فرار، جستجوی غذا و جفت گیری را به خطر می‌اندازد و همینطور تغییرات سیستمیک ممکن است با اثرات علف کش بر رفتار ماهی مرتبط باشد (Lopez et al, 2022). همچنین در مطالعه که توسط فیورینو و همکاران در سال ۲۰۱۸ بر روی اثر گلایفوزیت بر روی مراحل جنینی و نوزادی ماهی کپور معمولی و ماهی زبرا انجام شد، اثر روی افزایش اختلالات تکاملی، افت میزان تخمه‌گشایی، افزایش معنی دار دفرمیتی‌های مادر زادی را گزارش نمودند. همچنین این مطالعه حساسیت بیشتر ماهی کپور نسبت به ماهی زبرا را به غلظت‌های سم گلایفوزیت در تکامل ابتدایی جنینی را نشان داد (Fiorino et al, 2018). در همین راستا در مطالعه ای که توسط وبستر و همکاران در سال ۲۰۱۴ بر روی اثر علف کش رانداپ یا گلایفوسیت در تولید مثل ماهی زبرا انجام شد سمیت تولیدمثلی این سم در زبرا گزارش گردید، آنها علیرغم اینکه ایجاد سمیت با غلظت‌های بالا را در اکوسیستم‌های طبیعی بعید دانستند، اما مکانیسم‌های احتمالی سمیت را شامل اختلال در مسیر بیوسنتز استروئیدهای جنسی و استرس اکسیداتیو دانستند (webster et al, 2014).

هیلبرند و همکاران در سال ۱۹۸۰ اثر علف کش رانداپ یا گلایفوسیت را بر روی جمعیت دافنیا ماگنا در برکه‌های جنگلی مورد ارزیابی قرار دادند. بازماندگی ارگانسم‌ها تفاوت قابل توجهی بین شاهد و نمونه تحت آزمایش نشان نداد که با نتایج بدست آمده در تحقیق جاری مشابهت دارد. همچنین در این یافته با توجه به نقش دافنی در زنجیره غذایی، بر امکان استفاده از دافنی برای بررسی سمیت سموم مشابه به جای استفاده از ماهی یا سایر آبزیان با ارزش اقتصادی بالا تاکید شده است (Hilbrand et al, 1988). در همین ارتباط جنینی چپو در سال ۲۰۰۹ اثرات برخی آلاینده‌های زیست محیطی در بیان ژن هموگلوبین در دافنیا ماگنا را به عنوان یک نشانگر زیستی مناسب برای پایش کیفیت آب‌های شیرین

بررسی کرد. نتایج نشان داد که هموگلوبین دافنی می‌تواند اطلاعات مفیدی را برای تشخیص شرایط سلامت عمومی در یک اکوسیستم آب شیرین داشته باشد (Jinhee choi, 2009) از دافنی به عنوان شاخص زیستی در تحقیق باروس و همکاران (۲۰۰۷) نیز برای بررسی میزان آلاینده‌گی پساب کشتارگاه پرندگان و خوک استفاده شد و به این نتیجه دست‌یافتند که به طور کلی از چهارده کشتارگاه تحت تجزیه و تحلیل آزمون سمیت زیستی، پنج کشتارگاه با اثرات مخرب زیست محیطی دیده شد که این سمیت در فصل خشک و بارانی متفاوت بود (Barros et al, 2007). تحقیقی در مورد بررسی اثرات سمی و آلاینده‌گی این سم در تخم ماهی زبرا در منابع یافت نگردید. شاید به دلیل حساسیت زیاد جنین این ماهی به سموم محیطی بویژه سموم علف‌کش، گرایش به استفاده از این شاخص زیستی در ارزیابی سمیت کمتر بوده است. ولی تحقیقات در مورد اثر این سم بر سایر آبزیان و بویژه ماهی انجام شده است. در این زمینه محمدنژاد شמושکی و همکاران در سال ۱۳۸۹ با تعیین غلظت کشنده (LC50) 96h علف‌کش رانداپ (گلایفوسیت) بر روی بچه ماهیان سفید، سمیت ناچیز این سم را گزارش نمودند (محمد نژاد شמושکی، ۱۳۸۹). همچنین در گزارشی از محقق منتظری و همکاران در سال ۱۳۹۱ تأثیرات علف‌کش رانداپ بر تغییرات هیستوپاتولوژی بافت گناد و شاخص گنادی ماهی قزل آلائی مولد نر<sup>۳</sup> در دریای خزر را بررسی و اثرات محدود این علف‌کش بر سلامت بیضه‌های ماهی را گزارش نمودند (محقق منتظری، ۱۳۹۱) نتایج مشابهی از تحقیقات لویز و همکاران ۲۰۱۴ در ماهی زبرا و همچنین نغان و همکاران (۲۰۱۳) در ماهی قرمز<sup>۴</sup> نیز گزارش گردید (Fan et al, 2013).

### بررسی تاثیر سم ترفلان بر تخم ماهی زبرا دانیو

افزایش غلظت، باعث افزایش درصد تلفات تخم ماهی زبرا دانیو نیز شد، بطوریکه غلظت ایجاد کننده ۱۵، ۵۰ و ۹۰٪ ولی مدت مجاورت با سم تاثیر چندانی در روند تلفات نداشته و به طور مثال غلظت مورد نیاز از سم ترفلان برای ایجاد ۵۰٪ تلفات بعد از ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت به ترتیب برابر ۱۷/۱، ۱۴/۹، ۱۴/۹ و ۱۲/۵ می‌باشد. با افزایش مدت مجاورت تخم زبرا دانیو با سم ترفلان، تلفات حاصل از مجاورت بجز در غلظت ایجاد کننده ۹۰٪ تلفات تقریباً یکنواخت بوده و تاثیری معنی داری نداشته است. همانگونه که نتایج حاصل نشان داد، سم علف‌کش ترفلان در مقایسه با سایر سموم علف‌کش بسیار سمی بوده و لازم است نسبت به محدودیت استفاده از این سم توجه شود.

در سایر تحقیقات انجام شده در مورد اثر سم ترفلان در گونه‌های مختلف آبزیان نتایج مختلف و بعضاً متناقضی حاصل شده است. در مطالعه ای توسط پولکسیک و همکاران در سال ۱۹۹۹ اثرات سم ترفلان بر شاخص‌های بیوشیمیایی و بافت‌شناسی ماهی کپور را گزارش نمود. آنها اثرات منفی آن سم را بر فعالیت آنزیم‌های کبدی و شاخصهای استرس ماهی گزارش نمودند (Poleksich et al, 1999). همچنین خمیس‌ها و همکاران (۲۰۰۹) اثرات توکسیک ترفلان را در بافت آبشش، کبد و کلیه ماهی سیاه مولی<sup>۵</sup>، شامل هایپرتروفی، نکروز، تورم و دژنراسانس را گزارش نمودند (Haba, 2009). ژنوتوکسیسیتی تری فلورالین توسط سیلوا و همکاران در سال ۲۰۱۷، در ماهی پاکوی سیاه شامل افزایش شاخص آسیب ژنتیکی، بدشکلی‌های مادرزادی، هستکهای تخریب شده در گلبولهای قرمز و افزایش شاخص کامت گزارش گردید (Silva JM et al, 2017). سیلوا و همکاران ۲۰۱۵، مهار فعالیت کولین استراز را تحت شرایط درون تنی و برون تنی در بچه ماهی پاکوی سیاه توسط علف‌کش تری فلورالین را مورد سنجش قرار دادند. فعالیت اختصاصی استیل کولین مغز پس از قرار گرفتن به مدت ۹۶ ساعت با غلظت سمیت مزمن تری فلورالین به طور قابل توجهی کاهش یافت، استیل کولین مغز نسبت به تری فلورالین بسیار حساس بود. آنها این ماهی را به عنوان یک نشانگر زیستی مناسب برای پایش زیستی آلودگی تری فلورالین در پهنه‌های آبی پیشنهاد کردند. در مورد اثر سم ترفلان بر روی آبزیان تحقیقات محدودی نسبت به سایر سموم انجام گرفته اما در ایران. شاید سمیت بسیار بالای این سم در گونه‌های ماهی و عدم توصیه مصرف این سم در

<sup>3</sup> *Onchorhynchus mykiss*

<sup>4</sup> *Carassius Auratus*

<sup>5</sup> *Poecilia latipinna*

<sup>6</sup> *Colossoma macropomum*

آبزی پروری، دلیل تحقیقات محدود روی اثرات این سم در گونه‌های ماهی است. هر چند سمیت این سم در ماهی بسیار بالاست، ولی غلظت توصیه شده برای مصرف این سم در مزارع کشاورزی مشابه چهار سم دیگر است، لذا در شرایطی که امکان شستشو و انتقال سم به منابع آبی حاوی ماهی وجود دارد استفاده از این سم در کشاورزی نیز توصیه نمی‌گردد.

### بررسی تاثیر سم پاراکوات بر تخم ماهی زبرا دانپو

بررسی نتایج تاثیر سم پاراکوات بر تخم ماهی زبرا دانپو نشان می‌دهد سه غلظت ایجاد کننده ۱۵، ۵۰ و ۹۰٪ تلفات سم پاراکوات با هم اختلاف معنی‌داری دارند و با افزایش غلظت درصد تلفات نیز افزایش می‌یابد. این غلظت‌ها بعد از ۱۲ ساعت به ترتیب برابر ۲۰، ۴۳/۲ و ۷۱/۸ می‌باشند. مدت مجاورت با سم، تاثیر چندانی روی تلفات تخم زبرا نداشته است، بطوریکه غلظت مورد نیاز از سم پاراکوات برای ایجاد ۱۵٪ تلفات بعد از ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت به ترتیب برابر ۲۰، ۴/۷، ۱/۲ و ۷/۶ بوده است که تفاوت معنی‌داری باهم نشان نمی‌دهند و تقریباً این روند در هر سه دوز کشنده مشابه بوده است.

این سم نیز همانند سم ترفلان در بین پنج سم علف‌کش مورد بررسی در این تحقیق سمیت بالایی را در تخم ماهی زبرا نشان داد. بطوریکه غلظت ایجاد کننده تلفات ۵۰٪ بعد از ۴۸ ساعت برابر ۱/۷۳۵ میلی‌گرم در لیتر بود که در مقایسه با سم توفوردی (۳۹/۰ میلی‌گرم در لیتر) بیش از ۲۰ برابر و در مقایسه با سم گلایفوسیت (۲۱۳/۷ میلی‌گرم در لیتر) بیش از ۱۰۶ برابر سمی‌تر می‌باشد. در مورد این سم نیز مانند ترفلان احتمالاً عواقب و عوارض شدید ناشی از سمیت بالای آن باعث محدودیت مصرف و به تبع آن محدودیت در انجام تحقیقات بیشتر شده است.

تحقیقات روی بررسی سمیت علف‌کش پاراکوات در آبزیان نتایج متفاوتی در بر داشته است که برخی با نتایج تحقیق جاری مطابقت داشته و برخی با این نتایج همخوانی ندارد. در مطالعه‌ای که توسط باردو و همکاران بر روی اثرات سمی علف‌کش پاراکوات دی کلرید بر مشخصات بافتی (آبشش، کبد و کلیه) ماهی آب شیرین *Channa punctatus* انجام شد به این نتیجه رسیدند که تغییرات هیستوپاتولوژیک شدید در آبشش شامل: نکروز و هیپرپلازی سلولهای آبششی، افزایش مراکز ملانوماکروفاژی و چسبندگی فیلامنتهای آبششی و کلیه شامل: تورم کپسول بومن، نکروز و دژنراسیون نفرونها بوده و تاثیر زیادی در حیات ماهی دارد. تاثیر این سم بر عملکردهای حیاتی مانند تنفس، دفع و تنظیم متابولیک موجودات غیر هدف می‌باشد که بر سلامت ماهی تأثیر می‌گذارد و یک تهدید جدی است (Badroo IA et al., 2020). در کشور نیز امیدکوهکن و همکاران (۱۳۹۳) سمیت علف‌کش پاراکوات را در ماهی بنی<sup>۷</sup> که ماهی بومی خوزستان است، گزارش کردند. آنها عوارض پاتولوژیک در کبد و لندهای حیاتی ماهی مسموم شده را گزارش کردند (کوهکن و همکاران ۱۳۹۳). در همین راستا بنایی در سال ۲۰۱۳ تغییرات هیستوپاتولوژیک کبد (تورم و ایجاد واکوئل‌های سیتوپلاسمی و نکروز و اپوپتوز) را بدنبال مجاورت با غلظت‌های ۰/۱۵ و ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر پاراکوات ماهی گورامی را گزارش کرد. هیچگونه مرگ و میری در تمام گروه‌های مورد مطالعه در طول تحقیق ثبت نشد. بر اساس گزارش ارائه شده توسط ایالات متحده آمریکا، LC<sub>50</sub> ۹۶ ساعته پاراکوات در کیل فیش، گامبوزیا، ماهی زبرا، مولی، مداکا، ماهی آبشش آبی، گویی، ماهی قزل‌آلا رنگین کمان، ماهی قزل‌آلای قهوه‌ای، گربه ماهی کانال بترتیب ۱، ۳۶۰، ۷.۵، ۱۲، ۱۳، ۱۵، ۲۵، و بیش از ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر گزارش شده است. تفاوت حساسیت گونه‌ای به سم و شرایط محیطی متنوع احتمالاً می‌تواند مهم‌ترین عامل برای چنین تفاوت قابل توجهی در LC<sub>50</sub> محاسبه شده برای پاراکوات در گونه‌های متنوع ماهی باشد. همچنین اثر سم پاراکوات بر افت و سرکوب سیستم ایمنی و کاهش عملکرد رشد ماهی قزل‌آلای رنگین کمان<sup>۸</sup> نیز گزارش شده است (تکمه چی و همکاران، ۲۰۱۴). اثر مخرب این سم در فعالیت فیزیولوژیک گربه ماهی جوان آفریقایی<sup>۹</sup> نیز گزارش گردیده است (نونانی و همکاران، ۲۰۱۵).

آکینسورتان و همکاران در سال ۲۰۱۹ سمیت حاد پاراکوات دی کلرید را در ماهی تیلپایا بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که پاسخ‌های رفتاری شامل بی‌قراری، شنای نامنظم، از دست دادن تعادل، تغییر رنگ و مرگ ناگهانی ماهی در غلظت سمی پاراکوات مشاهده شد. مرگ و میر با

<sup>7</sup> *Barbus sharpeyi*

<sup>8</sup> *Oncorhynchus mykiss*

<sup>9</sup> *Clarias gariepinus*

افزایش غلظت افزایش یافت. تفاوت‌های مشاهده شده در مرگ و میر ماهی تیلاپپای نیل در غلظت‌های مختلف سم معنی‌دار بود (Akinsorotan AM et al., 2019). کیم و همکاران (۲۰۰۹) به بررسی اثر شرایط محیطی معمول کشاورزی در سمیت پاراکوات در شاخص‌های دافنی، دافنی‌ماگنا، پرده‌خاکی و گزارش نمود که سم پاراکوات در آب همراه رسوبات سمیت بسیار کمتری نسبت به آب (به تنهایی) برای دافنی‌ماگنا دارد، لذا علیرغم سمیت بالای این سم برای ماهی در شرایط آزمایشگاه، در شرایط طبیعی و در حضور عوامل دخیل مثل رسوبات، سمیت این علف‌کش کاهش می‌یابد و ایجاد سمیت حاد این سم در موجودات غیر هدف، در طبیعت به ندرت اتفاق می‌افتد (Kim et al., 2009). این استدلال می‌تواند برای ادامه تحقیق حاضر ارزشمند باشد، یعنی مقایسه سمیت این سموم برای دافنی در آب معمولی و آب همراه رسوبات معمول بستر منابع آبی و تفاوت این دو حالت گویای برخی نکات مهم در اثرات زیست‌محیطی این سموم خواهد بود. اثر این سم بر آبزیان مختلف به جز دافنی و ماهی نیز مورد مطالعه قرار گرفته است، به عنوان مثال کاناپالا در سال ۲۰۱۳ اثر آسیب‌شناسی پاراکوات در غدد دستگاه گوارش حلزون آب شیرین<sup>۱۰</sup> بررسی کرد. تمام مشاهدات بافت‌شناسی نشان داد که قرار گرفتن در معرض غلظت‌کننده پاراکوات باعث تخریب بافت‌های *L. luteola* می‌شود. بنابراین استفاده بی‌رویه از پاراکوات توسط کشاورزان باید به ویژه در مناطق نزدیک به محیط‌های آبی کنترل شود. در مطالعه‌ای دیگر جیشار و ناندیتا در سال ۲۰۱۵ با در معرض سم پاراکوات قرار دادن لارو گوره خر ماهی در دوران ایجاد بافت عصبی گیرنده‌های دوپامین تاثیرات سم را در کاهش در سطح GSH، افزایش در پراکسیداسیون چربی و آپوپتوز (مرگ سلولی)، به ترتیب، در مراحل مختلف نمو گزارش نمودند. همچنین نتایج بطور غیرمنتظره، نشان داد که قرار گرفتن در معرض پاراکوات مانند یک محرک مخرب باعث مختل شدن سیستم استیل‌کولین (پیام‌رسان عصبی) ناشی از استرس اکسیداتیو و ایجاد پارکینسون در طول زندگی می‌شود (Jayshree, Nandita, 2015).

### بررسی تاثیر سم آترازین بر تخم ماهی زبرای دانیو

علیرغم اینکه سمیت این سم در جنین ماهی زبرا مشخص شد ولی با افزایش مدت مجاورت تخم زبرای دانیو با این سم، تلفات تغییر معنی‌داری پیدا نمی‌کند، ولی با افزایش غلظت سم آترازین درصد تلفات تخم ماهی زبرای دانیو نیز افزایش می‌یابد. نتایج بدست آمده از این تحقیق در مورد سم آترازین با نتایج چند بررسی در داخل و خارج از ایران مطابقت دارد از جمله بلاهوا و همکاران (۲۰۲۰) اثر توکسیک آترازین بر مراحل اولیه زندگی ماهی زبرا را گزارش نمودند. این سم با ایجاد ادم پریکاردا و آسیب کبدی و مغزی باعث آسیب جنینی و تلفات ماهی زبرا می‌شود (Blahova J et al., 2020). در مطالعه‌ای مشابه توسط لیندزی و همکاران (۲۰۱۷) تاثیر سم آترازین بر اختلال تولید مثلی، تکامل و رشد در مراحل اولیه رشد ماهی سالمون sockeye در انکوباتور را گزارش نمود. لذا احتمالاً این سم اثرات سمی بالاتری در مراحل اولیه رشد ماهی نسبت به سایر مراحل رشدی دارد (Du Gas LM et al, 2017). همچنین آپوت و همکاران (۲۰۲۰) اثرات سمی غلظت غیرکننده آترازین را بر اختلال در تشکیل جنین، و ایجاد بدشکلی‌های جنینی، کاهش زنده‌مانی لارو و رشد گربه ماهی افریقایی گزارش نمودند (Opote PA et al, 2020). زالوسکی و همکاران (۲۰۲۱) نیز اثرات توکسیک آترازین بر زنده‌مانی، تکامل جنین و رفتار مرحله لارو و بالغ ماهی زبرا گزارش نمودند که با افزایش غلظت سم میزان زنده‌مانی و تخمه‌گشایی کاهش معنی‌داری یافته و مقدار ناهنجاری‌های مادرزادی نیز افزایش پیدا می‌کند (Zaluski AB et al, 2021).

ناجی (۱۳۹۰) سم آترازین را ایجادکننده اختلال در اووژنز در تخمدان ماهی زبرا دانسته و کاهش درصد لقاح، افزایش ناهنجاریهای مادرزادی و کاهش بازماندگی لاروها را در ماهی مسموم شده گزارش نمودند. در مطالعه‌ای توسط علیشاهی در سال ۱۳۹۳ اثر سمیت مزمن علف‌کش آترازین بر روند تجمع پذیری آن در فیله ماهی شیربت<sup>۱۱</sup> مورد بررسی قرار گرفت، نتایج نشان داد میزان تجمع پذیری آترازین با افزایش طول دوره معنی

<sup>10</sup> *luteola Lymnaea*

<sup>11</sup> *Barbus grypus*

دار بود. در مجموع می‌توان نتیجه گرفت که هنگامی که ماهی شیربت در معرض غلظت‌های زیاد سم آترازین قرار گیرد منجر به افزایش تجمع پذیری سم در این ماهی می‌شود (علیشاهی، ۱۳۹۳).

همانطور که قبلاً هم اشاره شد براساس نتایج حاصل از این تحقیق و تحقیقات انجام شده در گذشته می‌توان سم آترازین را نیز به عنوان یک سم علف‌کش با میزان سمیت بالا در شاخص زیستی تخم ماهی زبرا دانیو و اکثر آبزیان معرفی کرد.

### بررسی تاثیر سم توفوردی بر تخم ماهی زبرا دانیو

همانطور که در نتایج مشخص است افزایش غلظت و افزایش مدت مجاورت جنین تخم زبرا دانیو با توفوردی باعث افزایش تلفات شده است، هر چند در ۴۸ ساعت اندازه گیری تلفات، تفاوت زیادی در تعداد تلفات مشاهده نشد. لذا سمیت حاد توفوردی اهمیت بیشتری برای جنین ماهی زبرا دارد.

نتایج حاصل از بررسی سم توفوردی با نتایج مطالعات مشابه در داخل و خارج از ایران مطابقت دارد بعنوان نمونه اثر سمیت کبدی و اثرات سمی توفوردی روی آبشش ماهی *Poecilia vivipara* تحت تاثیر علف‌کش توفوردی گزارش شده است (Vigario and Saboia., 2014). در مطالعه ای مشابه در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مجاور شده با غلظت‌های غیر کشنده سم توفوردی، اختلال در شاخص‌های خونی و آنزیم‌های کبدی و آسیب بافتی کبد مشاهده گردید (علی و همکاران، ۱۳۹۳).

دهنارت و همکاران در سال ۲۰۲۱ اثرات در معرض قرار گرفتن مزمن با علف‌کش تجاری توفوردی بر مراحل رشد چندین گونه ماهی آب شیرین را بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که مجاورت مرحله جنینی و لاروی این ماهی‌ها با غلظت‌های مشابه محیط زیست توفوردی، بقا را در مراحل اولیه رشد شش گونه آب شیرین که شامل پنج خانواده فیلوژنتیکی متفاوت از سه ردیف فیلوژنتیکی بودند، کاهش داد. با این حال بین میزان حساسیت به سم توفوردی و ارتباط فیلوژنتیکی ماهیها ارتباطی مشاهده نگردید. در مجموع، نتایج آن‌ها نشان می‌دهد که استفاده از علف‌کش‌های ۲-۴D در اکوسیستم‌های آبی در غلظت‌های توصیه‌شده فعلی (کمتر از ۲ppm) امکان ایجاد خطر برای برخی گونه‌های آبزیان را داراست، هر چند برای برخی گونه‌ها تهدیدی به شمار نمی‌رود (Dehnert GK et AL, 2021).

آرکوت و همکاران (۲۰۱۶) نیز اثرات ژنوتوکسیک (القای MNs و شکستگی DNA، افزایش شاخص کامت) و افزایش تلفات و کاهش ساختار سلامت را در ماهی نئوتروپیکال *Cnesterodon decemmaculatus* در مجاورت با علف‌کش توفوردی را گزارش نمودند. (De, 2016). همچنین در تحقیقی مشابه سالو و همکاران (۲۰۱۵) سمیت توفوردی را در کشت سلول‌های کبد ماهی گزارش نمودند (Salvo LM et al, 2015).

بر اساس تحقیق حاضر در بین پنج سم علف‌کش (آترازین، توفوردی، ترفلان، پاراکوات و گلایفوسیت) پرمصرف در کشاورزی و آبی‌پروری، سم گلایفوسیت کمترین سمیت را در جنین ماهی زبرا دانیو دارد و پاراکوات و ترفلان بیشترین سمیت را در آنها ایجاد می‌کند، از آنجا که تقریباً غلظت موثره این سموم در کشاورزی مشابه است، توصیه می‌شود از سم گلایفوسیت و در درجه بعد از سم آترازین و توفوردی (بارعایت احتیاط لازم و کاربرد درست آن) در کشاورزی و آبی‌پروری بیشتر استفاده گردد و ترجیحاً سم ترفلان و پاراکوات که اسید زیست محیطی بیشتری برای حیوانات غیر هدف سم هستند، کمتر استفاده گردد، بویژه اگر آب زهکش مزارع به آب‌های آزاد حاوی ماهیان بومی راه یابد.

## References

۱. حاجی آقایی، رضا، شاهرودی، احمد رضا. ماهی زبرا فناوری کسف و ارزیابی ترکیبات طبیعی، فصلنامه گیاهان دارویی، سال هشتم، دوره چهارم، شماره ۳۲، پاییز ۱۳۸۸، ص ۱۴-۲۴
۲. رودی، داوود. بررسی تاثیر علف‌کش تری فلورالین و کود آهن بر خصوصیات مرفولوژیک و جذب آهن ارقام سویا (*Glycin max L*)، مجله پژوهش علف‌های هرز، جلد ۱، شماره ۱، بهار ۱۳۸۸، ص ۳۶-۲۵.

۳. زند، اسکندر، موسوی، سید کریم، حیدری، احمد. ۱۳۷۸، علف کش ها و روش های کاربرد آنها با رویکرد بهینه سازی و کاهش مصرف، مشهد: جهاد دانشگاهی
۴. علی، محسن. بررسی اثر مقدار حاد علفکش ترکیبی (dichlorophenoxyacetic acid-۲,۴) و (methyl-4-chlorophenoxyacetic acid-۲) بر فاکتورهای خونی و آنزیمهای کبدی ALT و ASY قزل آلاهی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) rainbow trout، مجله سلامت و محیط، فصلنامه علمی- پژوهشی انجمن بهداشت محیط ایران، دوره هفتم، شماره اول، بهار ۱۳۹۳، ص ۹۴-۱۰۳.
۵. علیشاهی، مجتبی. سمیت حاد علف کش (dichlorophenoxyacetic acid-۲,۴) در بچه ماهی کپور معمولی، ۱۳۹۲.
۶. کوهکن، امید. ۱۳۹۳، آسیب شناسی بافتی ناشی از مسمومیت تحت حاد علف کش پاراکوات در بافت کبد ماهی بنی انگشت فد (*barbus shapie*)، پاتوبیولوژی مقایسه ای، علمی- پژوهشی، سال یازدهم، بهار، شماره ۱، ۱۱۶۷-۱۱۷۲.
۷. محقق منتظری، الهام. بررسی تاثیرات علف کش رانداپ بر تغییرات هیستوپاتولوژی بافت گنآد و شاخص گنآدی ماهی قزل آلاهی مولد نر (*Oncorhynchus mykiss*) در دو دوره زمانی در حوضه جنوبی دریای خزر، مجله شیلات دانشگاه آزاد اسلامی واحد آزاد شهر، سال ششم، شماره چهارم، زمستان ۱۳۹۱، ص ۵۸-۵۱.
۸. محمدنژاد شמושکی، مجید، تعیین غلظت کشنده (96h-LC50) علف کش رانداپ (گلایفوزیت) بر روی بچه ماهیان سفید (*Rutilus frisi kutum*) کلمه (*Rutilus rutilus caspicus*) و کپور دریایی (*Cyprinus carpio*)، مجله علوم زیستی واحد لاهیجان، سال چهارم، شماره اول، بهار ۱۳۸۹، ص ۷۹-۸۶.
۹. ناجی، زهره. ۱۳۹۰ تابستان، تاثیر علف کش آترزین بر اووزن در گوره خر ماهی (*Danio rerio*)، مجله سلول و بافت (علمی-پژوهشی)، جلد ۲، شماره ۲، ص ۱۴۷-۱۵۵.
10. Abdali, Soorena. Effects of Atrazine (Herbicide) on Blood Biochemical Indices of Grass Carp (*Ctenopharhyngoden idella*), Journal of the Persian Gulf (Marine Science), vol. 2, No. 5, September 2011, p. 51-56.
11. Akinsorotan AM, Ajisodun AF, Izah SC, Jimoh JO. Acute toxicity of paraquat dichloride on fingerlings of *Oreochromis niloticus*. International Journal of Research Studies in Biosciences. 2019;7(1):29-36.
12. AL-Khazraji, H. I., Thakir, B. M., & EL-Hadeeti, S. A. (2020). Bioindicators of pesticides pollution in the aquatic environment: A review. *Plant Archives*, 20(1), 1607-1618.-Kim, B. S., Park, Y. K., Jeong, M. H., You, A. S., Lee, Y. H., Yang, Y. J., & Ahn, Y. J. (2009). Toxicity of paraquat to *Daphnia magna* under different exposure conditions associated with Korean agricultural conditions. *Aquatic Ecosystem Health & Management*, 12(3), 330-336.
13. Badroo IA, Nandurkar HP, Khanday AH. Toxicological impacts of herbicide paraquat dichloride on histological profile (gills, liver, and kidney) of freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch). *Environmental Science and Pollution Research*. 2020 Nov;27:39054-67.
14. Banaee, M., Davoodi, M.H., Zoheiri, F., Histopathological changes induced by paraquat on some tissues of gourami fish (*Trichogaster trichopterus*), *Open Veterinary Journal*, Vol. 3(1), 2013, p. 36-42.
15. Barros, L. S. S., *Daphnia magna* – bio-indicator of pollution from poultry and pig abattoir Effluents, *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, vol.8, no.3,2007, p. 217-228.
16. Blahova J, Cocilovo C, Plhalova L, Svobodova Z, Faggio C. Embryotoxicity of atrazine and its degradation products to early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental toxicology and pharmacology*. 2020 Jul 1;77:103370.

17. **De Arcaute CR, Soloneski S, Larramendy ML.** Toxic and genotoxic effects of the 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D)-based herbicide on the Neotropical fish *Cnesterodon decemmaculatus*. *Ecotoxicology and environmental safety*. 2016 Jun 1;128:222-9.
18. **Dehnert GK, Freitas MB, Sharma PP, Barry TP, Karasov WH.** Impacts of subchronic exposure to a commercial 2, 4-D herbicide on developmental stages of multiple freshwater fish species. *Chemosphere*. 2021 Jan 1;263:127638.
19. **Du Gas LM, Ross PS, Walker J, Marlatt VL, Kennedy CJ.** Effects of atrazine and chlorothalonil on the reproductive success, development, and growth of early life stage sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Environmental toxicology and chemistry*. 2017 May;36(5):1354-64.
20. **Fan, Jinyu,** Time-Effect relationship of toxicity induced by Roundup and its main constituents in Liver of *Carassius Auratus*, *Computational Water, Energy, and Environmental Engineering* vol. 2, 2013,p. 20-25.
21. **Fiorino E, Sehonova P, Plhalova L, Blahova J, Svobodova Z, Faggio C.** Effects of glyphosate on early life stages: comparison between *Cyprinus carpio* and *Danio rerio*. *Environmental science and pollution research*. 2018 Mar;25:8542-9.
22. **Hildebrand, L. D.,** Effects of Roundup herbicide on populations of *Daphnia magna* in a forest pond, *Journal of Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol. 25, No. 3, 1980, p. 353-357.
23. **Jayshree Nellorea, Nandita P.,** Paraquat exposure induces behavioral deficits in larval zebrafish during the window of dopamine neurogenesis, *Toxicology Reports* 2, 2015, 950-956.
24. **Jinhee Choi, M.,** Effects of Environmental Contaminants on Hemoglobin Gene Expression in *Daphnia magna*: A Potential Biomarker for Freshwater Quality Monitoring, *Arch Environ Contam Toxicol*, vol. 57, 2009, p. 330-337.
25. **Kelly, David W.,** Synergistic effects of glyphosate formulation and parasite infection on fish malformations and survival, *Journal of Applied Ecology*, Vol.47, 2010, p. 498-504.
26. **Le Mer C, Roy RL, Pellerin J, Couillard CM, Maltais D.** Effects of chronic exposures to the herbicides atrazine and glyphosate to larvae of the threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Ecotoxicology and environmental safety*. 2013 Mar 1;89:174-81.
27. **Lopes AR, Moraes JS, Martins CD.** Effects of the herbicide glyphosate on fish from embryos to adults: a review addressing behavior patterns and mechanisms behind them. *Aquatic Toxicology*. 2022 Oct 1;251:106281.
28. **Lopes, FM., et al.,** Effect of glyphosate on the sperm quality of zebrafish *Danio rerio*, *Aquatic Toxicology* (Impact Factor: 3.51),vol. 155, 2014, p. 322-326.
29. **Moreira, RA. et al.,** A comparative study of the acute toxicity of the herbicide atrazine to cladocerans *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia silvestrii* and *Macrothrix flabelligera*, *Acta Limnologica Brasiliensia*, vol. 26, no. 1, 2014, p. 1-8.
30. **Nwani, C. D., Ekwueme, H. I., Ejere, V. C., Onyeke, C. C., Chukwuka, C. O., Peace, O. S., & Nwadinigwe, A. O. (2015).** Physiological effects of paraquat in juvenile African catfish *Clarias gariepinus* (Burchiel 1822). *Journal of Coastal Life Medicine*, 3(1), 35-43.
31. **Nwani, Christopher Didigwu, et al.,** Physiological effects of paraquat in juvenile African catfish *Clarias gariepinus*(Burchel 1822), *Journal of Coastal Life Medicine*, vol. 3, 2015, p. 35-43.
32. **Opute PA, Oboh IP.** Effects of sub-lethal atrazine concentrations on embryogenesis, larval survival and growth of African Catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Aquaculture Studies*. 2020 Dec 17;21(1):143-52.

33. **Palma ,p., Barbosa,I.R.,** Embryo-toxic effects of atrazine environmental concentrations on the crustacean *Daphnia magna*, *Global Journal of Environmental Science and Technology*, 2011, 1: 12.
34. **PoleksicH, V., Karan, V.,** Effects of Trifluralin on Carp: Biochemical and Histological Evaluation, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 43,1999, p. 213-221.
35. **Salvo LM, Malucelli MI, da Silva JR, Alberton GC, Silva De Assis HC.** Toxicity assessment of 2, 4-D and MCPA herbicides in primary culture of fish hepatic cells. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*. 2015 Jul 3;50(7):449-55.
36. **Silva JM, de Brito Santos FL, Santos RV, de Oliveira Barreto E, Santos EL, Santana AE, Rodarte RS, Machado SS, Abreu FC.** Determination of genotoxic effect of trifluralin on *Colossoma macropomum* (Teleostei: Characidae: Serrasalminae, Cuvier, 1816) using a multibiomarker approach. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*. 2017 Dec 8;12(1):85-93.
37. **Silva JM, Santos FL, Tenório HA, Pereira HJ, Costa JG, Santana AE, Machado SS, De Abreu FC.** In vivo and in vitro inhibition of cholinesterase activity in *Colossoma macropomum* (tambaqui) fingerlings by the herbicide trifluralin. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*. 2015 Dec 17;10(1):23-30.
38. **Tukmechi, A., Rezaee, J., Nejati, V. and Sheikhzadeh, N.,** Effect of acute and chronic toxicity of paraquat on immune system and growth performance in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, Vol. 45, no 11, 2014, p. 1737–1743.
39. **Uren Webster TM, Laing LV, Florance H, Santos EM.** Effects of glyphosate and its formulation, roundup, on reproduction in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science & Technology*. 2014 Jan 21;48(2):1271-9.
40. **Vigário A.F. & Sabóia-Morais S.M.T. 2014.** Effects of the 2,4-D herbicide on gills epithelia and liver of the fish *Poecilia vivipara*. *Pesquisa Veterinária Brasileira, Pesq. Vet. Bras.* vol.34 no.6 Rio de Janeiro, June 2014.
41. **Webster, Tamsyn M. Uren, Santos, Eduarda M.,** Effects of Glyphosate and its Formulation, Roundup, on Reproduction in Zebrafish (*Danio rerio*), *Environmental Science & Technology*, Vol. 48, 2014, p.1271–1279.
42. **Yilmaz, Mehmet,** Investigation of acute toxicity and the effect of 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) herbicide on the behavior of the common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758; Pisces, Cyprinidae), *Chemosphere* 52, 2003, 195–201.
43. **Zaluski AB, Wiprich MT, de Almeida LF, Bonan CD, Vianna MR.** Atrazine and Diuron Effects on Survival, Embryo Development, and Behavior in Larvae and Adult Zebrafish. *Frontiers in Pharmacology*. 2022 Apr 4;13:841826.