

"مقاله پژوهشی"

اثرات علف کش اگزادiazon (رونستار) بر برخی شاخص های خونی ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*)

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

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

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

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۵/۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۲/۱۷

چکیده

اگزادiazon علف کش انتخابی است که به منظور کنترل علف های هرز در کشاورزی استفاده می شود. هدف از این تحقیق، تعیین اثرات علف کش اگزادiazon بر برخی شاخص های خونی ماهی فیتوفاگ بود. بعد از سازگاری تعداد ۲۷۰ ماهی فیتوفاگ پرورشی با وزن متوسط ۵۰ تا ۱۰۰ گرم و طول متوسط 13 ± 1 سانتی متر به مخزن هایی که هر یک ظرفیت ۲۰۰ لیتر را داشتند، معرفی شدند. غلظت های سم اگزادiazon در مخازن ۵ و ۱۰ میلی گرم در لیتر بود. نمونه برداری خون از سیاهرگ دمی ۳ ماهی از هر تیمار (هر تیمار با ۳ تکرار) به صورت کاملاً تصادفی طی ۷۲ ساعت صورت گرفت. بر اساس نتایج حاصل، بعد از معرفی سم بطور قابل ملاحظه ای ماهیان ناآرام شدند و برای تنفس روی آب می آمدند و در ساعات بعدی بتدریج تغییرات بالینی مشاهده شد. یعنی دم آنها قرمز و تحلیل رفته بود. نتایج شاخص های خونی نشان داد که میزان هماتوکریت و هموگلوبین و تعداد گلبول قرمز در تیمار شاهد با سایر تیمارها اختلاف معنی داری داشت ($p < 0.05$). میانگین غلظت هموگلوبین خون، میانگین هموگلوبین گلبول قرمز و تعداد گلبول های سفید بین شاهد و سایر تیمارها اختلاف معنی داری نشان نداد ($p > 0.05$). اتوزینوفیل، لنفوسیت، مونوسیت، نوتروفیل در تیمار شاهد با سایر تیمارها اختلاف معنی داری داشت ($p < 0.05$). بطور کلی، سم اگزادiazon بر برخی شاخص های خونی ماهی را بطور معنی داری تغییر داد که بیانگر اثر سمیت حاد آن بر ماهی فیتوفاگ می باشد.

کلمات کلیدی: اگزادiazon، شاخص های خونی، فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*)

مقدمه

توسعه روزافزون تکنولوژی در کشاورزی و افزایش تولید در واحد سطح سبب افزایش مصرف سموم کشاورزی جهت مبارزه با آفات گیاهی و سایر بیماریها شده است. از علف کش ها با اهداف مختلف در کشاورزی استفاده می شود که از مهمترین موارد مصرف آنها مبارزه با علف های هرز می باشد. علف کش ها دسته ای از آفت کش ها هستند که در جهان کاربرد دارند (Cerdeira et al., 2004).

اگزادiazون علف کشی است انتخابی - تماسی که در سال ۱۳۵۰ به ثبت رسیده است. اگزادiazون به عنوان برای کنترل علف های هرز مزارع برنج در ایران به کار می رود. این علف کش در مناطق شمال کشور مورد استفاده قرار می گیرد و همچنین بازدارنده عمل فتوسنتز و بازدارنده آنزیم پروتوپورفیرینون اکسیداز می باشد و متعلق به گروه اکسادیازول می باشد (WWW.Gyahcovp.ir).

اگزادiazون توسط ریشه و برگ گیاه قابل جذب بوده و با حرکت در آوندها به بخش های دیگر انتقال می یابد. نام تجاری آن رونستار (Ronstar) می باشد (زند و باغستانی، ۱۳۸۱).

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

درصد هماتوکریت و پارامترهای وابسته شاخص های خونی جهت تشخیص کم خونی در ماهیان هستند که به تغذیه، سن و بیماری وابسته

می باشد (Tavares – Dias and Moraes, 2007; Satheeshkumar et al., 2010).

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

اندازه گیری شاخص های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی خون می تواند به عنوان یک شاخص در سم شناسی و پایش زیستی بکار رود (Holye et al., 2007; Carvalho and Fernandes, 2006; Xiaoyan et al., 2009; Cavas et al., 2005).

تغییر در میزان و سطوح این پارامترها می تواند منعکس کننده پاسخ های ماهیان به تغییرات در محیط زندگی آنها باشد (Satheeskumar et al., 2010).

پارامترهای هماتولوژیکی در ماهیان ممکن است تحت تأثیر عوامل فیزیولوژیکی و همچنین عوامل خارجی از جمله دمای آب، فصل، استرس ها، غذا و انواع آلودگی ها، دچار تغییر شوند (Sandstorm, 1989; Oshode et al., 2008; Alen, 1989; Javed, 2003).

ماهی فیتوفاگ (Hypophthalmichthys molitrix) یکی از مهم ترین گونه های پرورشی ماهیان گرمابی می باشد. این گونه به واسطه رشد سریع، قابلیت سازگاری و گوشت لذیذ از گونه های غالب در ترکیب ماهیان گرمابی به شمار می رود (نظری، ۱۳۷۵).

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

مواد و روش‌ها

این تحقیق در تابستان ۱۳۹۴ در بخش فیزیولوژی و بیوشیمی مؤسسه تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای خزر به انجام رسید. برای مطالعه اثرات آلاینده‌گی در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی گرم در لیتر روی تعداد ۲۷۰ ماهی فیتوفاگ جوان با طول

لیتر آب

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

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

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

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

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

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

غلظت هموگلوبین خون به روش رنگ سنجی و جذب هموگلوبین به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل ۷۷-۶۵۰۵) (شرکت Jenway ساخت انگلیس) و کیت پارس آزمون با طول موج ۵۴۰ نانومتر ثبت گردید. و مقدار هموگلوبین بر حسب گرم در دسی لیتر محاسبه شد (کاظمی و همکاران، ۱۳۸۹). شاخص یاخته های قرمز (MCH, MCHC, MCV) که برای توصیف اندازه یاخته ها و میزان هموگلوبین آنها به کار می رود و از شمارش یاخته های قرمز هموگلوبین و هماتوکریت به دست می آید، از طریق روابط زیر محاسبه گردید (Penev *et al.*, 2007).

حجم متوسط گلبول قرمز بر حسب فمتولتر (fl)

$$M.C.V = \frac{HCT(\%) \times 10}{RBC / million}$$

غلظت متوسط هموگلوبین گلبولی بر حسب پیکوگرم (pg)

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

غلظت متوسط هموگلوبین گلبول های قرمز بر حسب درصد

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

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

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

نتایج

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

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

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

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

تیمارها			
شاخص خونی	تیمار شاهد	غلظت ۵ میلی گرم در لیتر	غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر
گلبول های سفید (N/mm^3)	$4866 \pm 1677/29^a$	$5366 \pm 1193/0.3^a$	$5966 \pm 1850/49^a$
لنفوسیت (%)	$61/33 \pm 1/52^a$	$61/33 \pm 1/52^a$	$63/00 \pm 1^a$
نوتروفیل (%)	$24/33 \pm 0/33^a$	$24/33 \pm 0/33^a$	$31/00 \pm 2/08^b$
ائوزینوفیل (%)	$0/33 \pm 0/57^a$	$0/66 \pm 0/57^a$	$0/33 \pm 0/57^a$
منوسیت (%)	$4/00 \pm 2/00^a$	$4/00 \pm 1/00^a$	$2/00 \pm 1/00^a$

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

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

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

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

بحث

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

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

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

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

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

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

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

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

سپاسگزاری

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

منابع

۱. پزند، ذ.، ۱۳۷۸. تعیین میزان LC50 سم علف کش رونسار بر ماهیان خاویاری قره برون و ازون-برون. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، ۱۱۰ ص.
۲. پورغلام، ر.، مکرمی رستمی، ع.، سعیدی، ع.ا.، شریف پور، ع.، عزتی، ا.، پورغلام، ح.، ۱۳۸۹. بررسی اثرات حاد باکتری *Streptococcus faecium* بر برخی از بافتها و مشخصه های خونی بچه ماهیان قزل-آلای رنگین کمان. مجله علمی شیلات ایران، ۱۹(۲)، ۹-۱۸.
۳. جلالی جعفری، ب.، آقازاده مشکى، م.، ۱۳۸۶. مسمومیت ماهیان در اثر فلزات سنگین و اهمیت آن در بهداشت عمومی. انتشارات مان کتاب. تهران. ۱۳۸ صفحه.
۴. زنجانی، س.، و عمادی، ح.، و جمیلی، ش.، و ماشینچیان مرادی، ع.، ۱۳۹۶. بررسی اثرات سم اگزادiazon بر میزان آسیب DNA و پارامترهای خون شناسی در ماهی کپور معمولی. مجله بین المللی زیست شناسی آبزیان، ۵(۶): ۲۹۳-۳۸۷.
۵. زند، ا.، باغستانی، م.ع.، ۱۳۸۱. مقاومت علف-های هرز به علف کش ها انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد. ص ۴.
۶. عمادی، ح.، شریعت زاده، س.، جمیلی، ش.، ماشینچیان، ع.، ۱۳۹۷. بررسی اثرات علف-کش

- اگسادiazon بر پارامترهای رشد و بیوشیمیایی در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). مجله علمی شیلات ایران، ۶۰-۵۵، ۶(۲).
۷. کاظمی، ر.، پوردهقانی، م.، یوسفی جوردی، ا.، یارمحمدی، م.، ۱۳۸۹. روش های کاربردی خون شناسی ماهیان. انتشارات بازرگان ایران. ۱۹۴ ص.
۸. نظری، ر.، ۱۳۷۵. زیست شناسی و تکثیر ماهی کپور نقره ای. معاونت تکثیر و پرورش آبزیان، اداره کل آموزش و ترویج. ۹۴ ص.
9. Ahmadvand, S., Farahmand, H., Mirvaghefi, A., Eagderi, S. & Zargar, A. 2015. Effects of (anti) androgenic endocrine disruptors (DEHP and butachlor) on immunoglobulin M (IgM) and leukocytes counts of male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 94, 695-700.
10. Ajoni, F., Ajiboye, A., 2015. Effects of oxadiazon on Nutrient Utilization and growth of African catfish (*Clarias gariepinus*). American journal of Agricultural Science, 2(3), 121-125.
11. Alen, G., 1989. Toxicology, water pollution and fish physiology. CRC press INC. USA.
12. Bani, A., Kagh Vayghan, A., 2011. Temporal variations in haematological and biochemical indices of the Caspian kutum. *Rutilus frisii kutum*. Ichthyology Research, 58, 54-59.
13. Carvalho, C.S., Fernandez, M.N., 2006. Effect of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high PH. Aquaculture, 25(1), 109-117.
14. Cavas, T., Garankon., N.N., 2005. Induction of micronuclei and binucleiin blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate food and chemical toxicology, 43, 569-574.
15. Cerdeira, A., Santos, N., Ueta, J., Shuhama, I., Pessoa, M., Smith, S.,

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