مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۲، دوره ۶۸، شماره ۳، ۲۶۷- ۲۵۷
Original Article
Journal of Veterinary Research. 68,3: 257-267, 2013

ارزیابی سمیت مالاتیون، کاربارِیل و گلایفوزیت در بچه ماهیان کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

سید جلیل غلامی سیدکلایی[1*] نیما شیری[1] علیرضا میرواقفی[1] غلامرضا رفیعی[1] چنگیز مخدومی[2]
۱) گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران، تهران - ایران
۲) مرکز تکثیر و پرورش ماهی شهید رجایی ساری، ساری - ایران

(دریافت مقاله: ۱۳ بهمن ماه ۱۳۹۱ ، پذیرش نهایی: ۹ اردیبهشت ماه ۱۳۹۲)

چکیده

زمینه مطالعه: بچه ماهیان کپور معمولی (*Cyprinus carpio*, Linnaeus, ۱۷۵۸) اغلب به هنگام رهاسازی در مصب رودخانه‌های حوزه خزری در معرض طیف وسیعی از آفت‌کش کشاورزی قرار می‌گیرند. **هدف:** هدف از این مطالعه بررسی اثرات سه آفت‌کش مالاتیون، کاربارِیل و گلایفوزیت بر بچه ماهیان کپور معمولی در سطح کشنده با تعیین LC_{50} (۹۶ ساعت) و سطوح زیر کشنده با سنجش فعالیت استیل کولین استراز می‌باشد. **روش کار:** حدکشندگی آفت‌کش‌ها با روش No.203 OECD تعیین گردید. تعداد ۳۰۰ قطعه بچه ماهی با میانگین وزن ۰/۴g±۲ در سه تیمار (۰/۱ و ۰/۲ LC_{50} و گروه کنترل) و سه تکرار برای هر یک از آفت‌کش‌ها معرفی شدند. ۵، ۱۰ و ۱۵ روز پس از شروع دوره آزمایش، نمونه گیری از سر و بدن ماهی جهت انجام آزمایش آنزیمی انجام و فعالیت کولین استرازی به روش بیوشیمیایی سنجیده شد. **نتایج:** میزان متوسط غلظت کشنده سموم LC_{50} گلایفوزیت، مالاتیون و کاربارِیل در ۹۶ ساعت به ترتیب ۶/۷۵mg/L، ۱/۳ و ۱۲/۶۷ بدست آمد. میانگین حد نرمال فعالیت آنزیم کولین استراز بخش‌های سر و بدن بچه ماهیان کپور معمولی (در گروه شاهد) به ترتیب برابر با ۱۲۴۱/۳۵۶ و ۷۲۳/۱۰۳ میکرو یونیت در دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه گردید که بر این اساس فعالیت کولین استرازی سر ۱/۷ برابر فعالیت این آنزیم در بدن بود. در طی دوره‌ی آزمایش، مهار فعالیت آنزیم کولین استراز به طور معنی‌داری ($p<0/05$) در ماهیان تحت تیمار با هر سه ترکیب نسبت به گروه شاهد مشاهده شد. با این حال، گروه‌های مسموم با کاربارِیل و گلایفوزیت، علی‌رغم کاهش سطحی که نسبت به گروه شاهد در فعالیت کولین استرازی از خود نشان دادند، مهارشدگی کمتری نسبت به تیمارهای مالاتیون داشتند. زمان در مقایسه با غلظت اثر معنی‌دار تری در مواجهه با انواع آفت‌کش‌های مورد بررسی نشان داد. **نتیجه‌گیری نهایی:** غلظت‌هایی از آفت‌کش‌ها که از نظر آزمون زیست‌سنجی و کشندگی، غیر موثر و مجاز برای گونه‌های غیرهدف شناخته می‌شوند، می‌توانند باعث بروز پاسخ‌های آنزیمی و آسیب‌های زیستی در آنها گردند.

واژه‌های کلیدی: کپور معمولی، آفت‌کش‌های کشاورزی، متوسط غلظت کشنده، فعالیت کولین استرازی

مقدمه

حاشیه جنوبی دریای خزر به عنوان یکی از مهمترین قطب‌های کشاورزی کشور بوده که با توجه به تراکم کشت محصولات مختلف در مزارع کشاورزی، باعث استفاده‌ی بیش از حد آفت‌کش‌های از قبیل انواع حشره‌کش، قارچ‌کش و علف‌کش در این مناطق می‌شود (۳۵). غالباً پس از مصرف، این ترکیبات از طریق شستشوی خاک مزارع در اثر بارش باران و نشت زهاب کشاورزی به منابع آب شیرین به ویژه رودخانه‌ها، راه یافته و می‌توانند تا مدت‌ها پس از سم‌پاشی، در نواحی ساحلی و مصبی دریای خزر انباشته گردند(۱). در حال حاضر کنترلی بر سرنوشت آفت‌کش‌های مصرف شده در مزارع وجود نداشته و این ترکیبات قادرند با ورود به بدن ماهیان به عنوان موجودات غیر هدف آبزی، سبب بروز پاسخ‌های زیستی در آنها شده و از طریق انباشتگی زیستی و زنجیره‌های غذایی به انسان منتقل گردند(۳۵). از این‌رو بررسی اثرات کشنده و تحت کشنده این سموم بر گونه‌های تجاری دریای خزر نظیر کپور و ماهی سفید الزامی به نظر می‌رسد.

حشره‌کش کاربارِیل با نام تجاری سوین، یکی از آفت‌کش‌های پرمصرف از گروه سموم کاربامات بوده که به طور عمومی در باغات کاربرد فراوان دارد (۴۲). مالاتیون نیز یک حشره‌کش و کنه‌کش فسفره‌ی آلی است که بیشترین کاربرد آن در ایران مربوط به سمپاشی باغات مرکبات بوده و در موارد دیگری از قبیل شالیزارها نیز از این سم استفاده می‌شود (۳۸). گلایفوزیت با فرمول تجاری رانداپ (۴۸٪ ماده موثر) نیز از پرکاربردترین علف‌کش‌ها در ایران است که استفاده بی رویه از این ترکیب در کشورهای جهان سوم، بیش از سایر ترکیبات کشاورزی عمومیت دارد (۳۹). نیمه عمر گلایفوزیت در محیط‌های آبی حدود یک تا دو هفته گزارش شده و وجود آن در بسیاری از رودخانه‌ها تشخیص داده شده است (۲۵).

در مطالعات سم شناسی، اثرات کشنده هر ترکیب به وسیله‌ی آزمایش‌های زیست‌سنجی و تعیین LC50 شناخته می‌شود. تعیین این غلظت از سم، برای پژوهش‌های سم شناسی ضروری بوده و پژوهشگران

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۳۲۲۴۵۹۰۸-۰۲۶ نمابر: ۳۲۲۴۵۹۰۸-۰۲۶ Email: sjalilgholamis@ut.ac.ir

را در بررسی اثرات زیرکشنده و شاخص‌های زیستی یاری می‌دهد (۲۲). از مهمترین و اختصاصی‌ترین اثرات زیرکشنده در مواجهه با آفت‌کش‌های فسفره‌ی آلی و کاربامات که به عنوان شاخصی زیستی از آن یاد می‌شود، تغییر در فعالیت کولین استرازی بافت‌های جانوران است (۱۸،۴۰). سازوکار آن عمدتاً مهار برگشت‌ناپذیر آنزیم استیل کولین استراز توسط این گروه آفت‌کش‌هاست، بطوری که این ترکیبات همانند یک سوبسترا برای آنزیم رفتار می‌کنند (۴۰). بر این اساس، جدا شدن باقی‌مانده ترکیب فسفره از آنزیم استرازی آن چنان کند صورت می‌گیرد که آنزیم قادر به هیدرولیز کردن پیام‌رسان عصبی نبوده، استیل کولین در شیار عصبی تجمع یافته و به دنبال آن انتقال عصبی بتدریج متوقف می‌شود (۱۷). از آنزیم کولین استراز به عنوان شاخص زیستی آفت‌کش‌های ارگانوفسفره، کاربامات و برخی علف‌کش‌ها در پژوهش‌های متعدد استفاده شده است (۴،۱۷،۲۴).

کپور معمولی با نام علمی *Cyprinus carpio* (Linnaeus, ۱۷۵۸) یکی از مهمترین گونه‌ها از خانواده‌ی کپورماهیان بوده که نژاد بومی آن در حوزه‌ی آبریز دریای خزر پراکنش دارد (۳،۴۱) و در ایران معمولاً با نام‌های کپور دریایی و وحشی یا سازان شناخته می‌شود. در نواحی سرد و معتدل نرها سن ۳ تا ۴ سالگی و ماده‌ها در ۴ تا ۵ سالگی و در نواحی استوایی ماهی در سن ۱ تا ۲ سالگی به بلوغ می‌رسند. میزان روز - درجه مورد نیاز برای بلوغ ماهی کپور معمولی برای نرها معمولاً ۱۰۰۰ و برای ماده‌ها حدود ۱۵۰۰۰ می‌باشد این ماهی برای تخم‌ریزی به رودخانه‌های جنوبی دریای خزر مهاجرت می‌کند و دوره تخم‌ریزی آنها ۸ ماه از سال بوده. اوج تخم‌ریزی در ماه‌های تیر و مرداد می‌باشد (۱۹). این گونه بدلیل عادت غذایی همه چیز خواری‌اش می‌تواند در معرض طیف وسیعی از آلاینده‌های محیطی باشد. همچنین تکثیر مصنوعی و رهاسازی بچه‌ماهیان با هدف بازسازی ذخایر این گونه، هر ساله توسط سازمان شیلات ایران صورت می‌گیرد (۴۱). میزان پائین صید سالانه‌ی کپور دریای خزر (۲)، گویای این مطلب است که بچه‌ماهیان تکثیر شده، در مصب رودخانه‌های محل رهاسازی درصد تلفات بالایی دارند و می‌توان این مورد اخیر را با فقدان شرایط مناسب برای سازگاری بچه‌ماهیان پیش از مهاجرت به دریا، نظیر آلودگی‌های کشاورزی در محل رهاسازی آنها مرتبط دانست (۵). باقیماندهٔ ترکیبات شیمیایی مورد بررسی در این پژوهش، می‌تواند نقش مهمی در کیفیت رهاسازی این گونه داشته باشد.

مطالعهٔ حاضر در نظر دارد تا اثرات سه آفت‌کش کشاورزی مالاتیون، کاربارل و گلایفوزیت (علف‌کش) را در سطوح کشنده (تعیین LC10، LC50 و LC90 در دوره‌ی ۹۶ ساعته) و زیرکشنده (سنجش فعالیت استیل کولین استراز) بر کپور معمولی در مواجهه با غلظت‌های مختلف این ترکیبات شیمیایی را بررسی نماید. چنین مطالعه‌ای می‌تواند رهاسازی بهینهٔ بچه‌ماهیان کپور دریای خزر را با توجه به غلظت ترکیبات کشاورزی مورد بررسی باقیمانده در محل رها کرد، زمان سمپاشی و مهارشدگی آنزیم پس از مواجهه با هر ترکیب را توصیف کند و همچنین با مقایسهٔ میزان مهارشدگی آنزیمی در دو بخش سر و بدن این جانور، سازوکار استفاده از این شاخص تعیین گردد.

مواد و روش کار

مواد شیمیایی: کربنات سدیم، سدیم هیدروکساید، سولفات مس، پتاسیم سدیم تارتارات، آلبومین سرم گاوی، اسید فسفریک، تریس و اسید کلریدریک از نمایندگی رسمی شرکت مرک آلمان خریداری شد. همچنین حشره‌کش‌های - کاربارل و مالاتیون به ترتیب از شرکت‌های Hualong chemical (China) و Arysta lifeScience (France)، و علف‌کش گلایفوزیت نیز از شرکت بازرگان کالا خریداری شدند. برای خواندن میزان جذب از دستگاه الایزا میکروپلیت ریدر (مدل ELx 808 BioTek) استفاده گردید.

واکنشگرها: بافر فسفات ۰/۱mol با pH هفت (بدون ترایتون)، معرف رنگی فولین (رقیق شده با نسبت برابر آب مقطر)، معرف رنگی DTNB (حل شده در بافر (TRIS/HCl) و محلول سوبسترای استیل تیوکولین آیوداید (Acethylethiocholine iodide (ASCh)) در آزمایش‌های مورد بررسی بکار گرفته شدند.

تعداد ۲۰۰۰ قطعه بچه‌ماهی کپور وحشی با وزن متوسط ۲±۰/۴g (میانگین±SD) از مرکز تکثیر و پرورش شهید رجایی در سمسکنده‌ی ساری تهیه و به کارگاه تکثیر و پرورش گروه شیلات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران (واقع در کرج) منتقل شدند. ماهیان جهت سازگاری با محیط جدید به مدت ۱۵ الی ۲۰ روز در دو تانک ۱۰۰۰L فایبرگلاس نگه‌داری شدند. شاخص‌های فیزیکی و شیمیایی آب از جمله اسیدیته در حدود ۷، سختی کل ۱۷۵mg/lit CaCO3، اکسیژن محلول بیش از ۷ppm و دمای ۲۰±۲°C تحت کنترل بودند. محلول مادر هر ترکیب (کاربارل، مالاتیون و گلایفوزیت) با غلظت ۱۰۰۰۰ppm تهیه گردید. لازم به ذکر است که، آزمایش‌های زیست‌سنجی و سمیت زیرکشنده برای هر کدام از سموم مورد مطالعه به دلیل محدودیت در تعداد تانک، بطور همزمان انجام نشد.

آزمایش سمیت کشنده (زیست‌سنجی): برای انجام آزمایش‌های زیست‌سنجی ابتدا محدوده غلظت‌های هر سم و فاصله لگاریتمی آن، با آزمایش مقدماتی تعیین شده و سپس آزمایش اصلی صورت گرفت. غلظت‌های آزمایش سمیت اصلی بر اساس این پیش آزمایش، تعیین شده و ماهیان در معرض دامنهٔ غلظت‌های مختلف کاربارل (شامل: ۱۰mg/L، ۱۳، ۱۶، ۱۹ و ۲۲)، مالاتیون (شامل: ۰/۵mg/L، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵) و گلایفوزیت (شامل: ۵/۵mg/L، ۶/۵، ۷/۵، ۸/۵ و ۹/۵) به مدت ۹۶ ساعت قرار گرفتند. ارزیابی اثر و تعیین مقادیر میانه غلظت کشنده این سموم، بر اساس راهنمای OECD شماره No.203 و در شرایط استاتیک آب صورت گرفت (۲۵،۲۹). آزمایش زیست‌سنجی هر سم روی ۱۵۰ قطعه بچه ماهی (مجموعاً ۴۵۰ عدد) که به طور تصادفی در تعداد ۱۵ تانک فایبرگلاس ۱۰۰N (سه تکرار برای هر غلظت و هر تانک شامل ۱۰ قطعه ماهی) توزیع شده

بودند، در شرایط آب نزدیک به شرایط زمان سازگاری انجام شد. در طول دوره آزمایش غذادهی ماهیان قطع گردید. تمام گروه‌های آزمایشی روزی دو مرتبه کنترل و رفتار ماهیان بررسی گردید همچنین مرگ و میر آنها در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از افزودن سموم، ثبت شد.

آزمایش سمیت زیرکشنده: بچه‌ماهیان بطور تصادفی در نه تانک فایبرگلاس ۱۰۰N (برای هر سم) توزیع شدند. در هر تانک تعداد ۴۰ قطعه بچه‌ماهی قرار داده شده و شرایطی مشابه آزمایش‌های پیشین در این تانک‌ها وجود داشت. میزان غذادهی به ماهیان نیز به همان مقدار دوره‌ی نگهداری و سازگاری (دو درصد وزن بدن) انجام گرفت و ۲۴ ساعت پیش از کشتار غذادهی به ماهیان آزمایشی متوقف گردید. به منظور انجام آزمون سمیت تحت کشنده بچه‌ماهیان در مجاورت سه غلظت متفاوت از سموم کاربارل (شامل: ۰mg/L (شاهد)، ۱/۲ و ۲/۴)، مالاتیون (شامل: ۰mg/L (شاهد)، ۰/۱۵ و ۰/۳) و گلایفوزیت (شامل: ۰mg/L (شاهد)، ۰/۶ و ۱/۲)، هر کدام در سه تکرار و در طول ۱۵ روز دوره‌ی آزمایش قرار گرفتند. غلظت‌های سم در این آزمایش براساس آزمایش سمیت کشنده تعیین گردید ۱۰٪ تعویض آب روزانه به منظور عمل سیفونینگ، خارج کردن مواد دفعی ماهی و کاهش میزان آمونیاک انجام می‌گرفت. برای ثابت ماندن شرایط آزمایش، به همان نسبت آب همدماً و با غلظت عددی اولیه به مخازن اضافه شدند (۳۶).

نمونه‌برداری و تهیه‌ی عصاره (لایه فوقانی): نمونه‌برداری از هر غلظت و در روزهای پنجم، دهم و پانزدهم، پس از اولین مواجهه‌ی ماهیان با سم انجام گرفت و به دلیل کوچک بودن اندازه ماهی، امکان خون‌گیری یا نمونه‌برداری از بافت‌ها وجود نداشت. بنابراین سر ماهی از بدن جدا شده و هر دو بخش جانور (سر و بدن) در فریزر $-70^{o}C$ منجمد گردید تا برای تهیه‌ی عصاره (لایه فوقانی) مورد استفاده قرار گیرند. بافت‌های حاصل با کمک محلول بافر فسفات (۰/۱mol با pH هفت و حاوی ۱٪ تریتون ایکس ۱۰۰) به صورت دستی هموژن شده، سپس عصاره (لایه فوقانی) حاصل از سانتریفیوژ نمونه‌ها جدا گردید تا به عنوان منبع آنزیم مورد استفاده قرار گیرد (۱۴).

سنجش پروتئین کل و فعالیت آنزیم استیل کولین استراز: میزان غلظت پروتئین کل بافت‌ها با روش لوری (۲۳) در طول موج ۵۴۰nm به وسیلهٔ دستگاه الایزا تعیین گردید. در این روش از فولین به عنوان معرف رنگی استفاده شد. سپس از روی منحنی حاصل و معادلهٔ خط آن، غلظت پروتئین موجود در نمونه بافت‌ها بدست آمد. اندازه‌گیری میزان فعالیت ویژه‌ی کولین استرازی (برحسب میکرو یونیت در دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین) با روش المن (۱۴) در طول موج ۴۲۰nm به وسیلهٔ دستگاه میکروپلیت ریدر انجام شد. بدین منظور، مخلوط عصاره (لایه فوقانی)، بافر فسفات ۰/۱mol، معرف رنگی DTNB و استیل تیوکولین آیوداید، به هر تیوب افزوده شده و در نهایت حجم ۱۰۰mL از محلول نهایی به هر یک از چاهک‌های میکروپلیت انتقال و میزان جذب در یک دقیقه (O.D./min) توسط دستگاه خوانده شد.

انجام محاسبات و آنالیز آماری: اطلاعات به دست آمده از آزمایش زیست سنجی و میزان مرگ و میر بچه ماهیان کپور با استفاده از روش تجزیه پروبیت آنالیز و سپس مقادیر حاصل از زیست‌سنجی توسط نرم‌افزار POLO-PC 2002 (تحت امتیاز دانشگاه تهران) تخمین زده شد. فعالیت ویژه‌ی آنزیمی بر اساس میکرو یونیت در دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین، به عنوان عامل وابسته محاسبه شد. آنالیز آماری از طریق آنالیز واریانس دو طرفه صورت پذیرفت که غلظت‌های آفت‌کش و زمان‌های مواجهه با آنها، فاکتورهای مستقل بودند. تفاوت میانگین‌ها نیز توسط آزمون دانکن، با میزان خطای نوع اول ۰/۰۵ ارزیابی گردید.

نتایج

۱- نتایج آزمایش‌های زیست‌سنجی: در مرحلهٔ سازگاری بچه‌ماهیان، هیچ‌گونه تلفاتی در بین آنها دیده نشد. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت سموم مورد مطالعه، میزان مرگ و میر بچه‌ماهیان افزایش یافت. بر اساس میزان مرگ و میر در آزمایش‌های زیست‌سنجی، میانگین مقادیر LC_{10}، LC_{50}، LC_{90} در ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت برای ترکیبات گلایفوزیت، مالاتیون و کاربارل روی بچه‌ماهیان کپور معمولی نژاد خزری محاسبه گردیده (α=۰/۹۵) و در جدول ۱ نشان داده شده است. مقادیر مندرج در جدول فوق از نمودار ۱ که حاصل انطباق درصد مرگ و میر ماهیان بر غلظت‌های ترکیبات گلایفوزیت (نمودار ۱-A)، مالاتیون (نمودار ۱-A) و کاربارل (نمودار ۱-C) می‌باشند، بدست آمده است.

بر طبق این نتایج LC_{50} ۹۶ ساعت گلایفوزیت، مالاتیون و کاربارل برای بچه ماهیان کپور به ترتیب ۶/۷۵mg/L، ۱/۳ و ۱۲/۶۷ و حداقل غلظت موثر، LOEC (LC_{10} ۹۶ ساعت) این سموم به ترتیب شامل ۵/۵۴۸mg/L، ۰/۶۴۶ و ۹/۴۸ محاسبه گردید.

معمول ترین عارضه برای تمامی ماهیان مسموم شده با این ترکیبات، وجود مخاط فراوان روی سطح بدن و آبشش و همچنین پرخونی آبشش‌ها بود. تغییرات رفتاری مشاهده شده در ماهیان مسموم نشان داد که آنها ظاهراً دچار اختلالات تنفسی شده‌اند، بطوری که سرپوش‌های آبششی خود را تندتر باز و بسته کرده و نزدیک سنگ هوا تجمع پیدا می‌کردند. این رفتار به ویژه در ماهیان تحت استرس با گلایفوزیت بیش از سایرین دیده شد. بررسی بالینی لاشهٔ این ماهیان نیز نشان داد که یک لایه‌ی روغنی بر روی آبشش آنها قرار گرفته بود که احتمالاً ناشی از امولسیون روغنی رانداپ بوده است. حالت فلج عصبی را می‌توان مهمترین عامل مرگ و میر ماهیان مسموم شده با کاربارل و مالاتیون به شمار آورد، به طوری که بچه‌ماهیان در معرض این حشره‌کش‌ها به تدریج دچار سستی شده و عدم تعادل و شنای مارپیچی و سقوط آنها به کف، نشان‌دهندهٔ اختلال در سیستم اعصاب بود (۲۶). از دیگر عوارض ظاهری مسمومیت با این ترکیبات، وجود لکه‌های خونی در اطراف چشم و آبشش

جدول ۱. میانگین مقادیر حاصل از آزمایش‌های زیست‌سنجی بر کپور معمولی دریای خزر.

نام ترکیب	غلظت‌کشنده (mg/L)	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
گلایفوزیت	LC10	۵/۹۹۵	۵/۹۷۶	۵/۸۶۵	۵/۵۴۸
	LC50	۷/۲۰۲	۷/۱۷۲	۶/۹۸۵	۶/۷۵۳
	LC90	۸/۶۵۱	۸/۶۰۶	۸/۳۱۹	۸/۱۶۸
مالاتیون	LC10	۱/۱۸۴	۱/۱۰۵	۰/۹۰۳	۰/۶۴۶
	LC50	۱/۸۵۷	۱/۷۰۳	۱/۵۶۲	۱/۳۰۱
	LC90	۲/۴۱	۲/۱۲۳	۱/۸۰۲	۱/۶۱۷
کاربریل	LC10	۱۱/۴۸۷	۱۱/۲۲۲	۱۰/۶۴۵	۹/۴۸۱
	LC50	۱۵/۵۵	۱۴/۷۸۸	۱۳/۸۱۲	۱۲/۶۷۹
	LC90	۲۱/۰۵	۱۹/۴۸۸	۱۷/۹۲۱	۱۶/۹۵۷

بوده است.

۲- نتایج آزمایش‌های زیرکشنده (آنزیمی)، (فعالیت کولین استراز تحت تیمار مالاتیون): نتایج تجزیه واریانس نشان می‌دهد که در برابر غلظت‌های مختلف مالاتیون، بین سطوح فعالیت کولین استراز سر (F(۲،۴۵)=۳۶۲/۳۰۱ و p=۰/۰۰۰) و بدن (F(۲،۴۵)=۲۴۱۱/۶۱۱ و p=۰/۰۰۰) اختلاف معنی‌داری وجود داشته است. همچنین در زمان‌های مواجهه با این سم، بین فعالیت آنزیمی سر (F(۲،۴۵)=۵/۹۹۴ و p=۰/۰۰۵) و بدن (F(۲،۴۵)=۳۲۳/۹۲۴ و p=۰/۰۰۰) تفاوت معنی‌داری دیده شد. در مقابل اثرات متقابل غلظت‌های سم و زمان مواجهه‌ی ماهی با آنها، بین فعالیت آنزیم سر (F(۴،۴۵)= ۹/۲۴۸ و p=۰/۰۰۰) و بدن (F(۴،۴۵)=۲۲/۳۲۰ و p=۰/۰۰۰) اختلاف آماری وجود داشت. اثر غلظت‌های مالاتیون و زمان در معرض بودن، بر فعالیت استیل کولین استرازی سر و بدن، در نمودار ۲-A نشان داده شده است.

نتایج مقایسه میانگین‌ها در نمودار ۲-A نشان می‌دهد که در زمان دوم (روز دهم آزمایش)، اختلاف معنی‌داری برای مواجهه با مالاتیون بین تمام گروه‌های آزمایشی وجود دارد (p<۰/۰۵). افزایش غلظت سم مالاتیون، سبب ایجاد یک روند کاهشی در فعالیت کولین استرازی شده است. به عبارتی مهارشدگی این آنزیم رابطه مستقیم با غلظت آفت‌کش دارد. همچنین زمان در معرض قرار گیری این ترکیب با سم، نیز اثر معنی‌داری و عمده‌ای بر فعالیت آنزیمی سر و بدن داشت. تفاوت در میزان نرمال فعالیت آنزیم بین بخش‌های سر و بدن بچه‌ماهیان کپور نیز در نمودار شکل ۲-A دیده می‌شود، به طوری که میانگین حد نرمال این آنزیم (در گروه شاهد) در بخش سر (شامل مغز) برابر ۱۲۴۱/۳۵۶ و در بخش بدن (عضلات و کبد) برابر با ۷۲۳/۱۰۳۶ (میکرو یونیت در دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین) محاسبه شده است.

فعالیت کولین استراز تحت تیمار کاربریل: نتایج تجزیه واریانس غلظت‌های مختلف کاربریل نشان می‌دهد که بین سطوح فعالیت کولین استراز سر (F(۲،۴۵)=۲۱/۵۴۲ و p=۰/۰۰۰) و بدن (F(۲،۴۵)=۸/۳۷۹ و p=۰/۰۰۱) اخلاف معنی‌داری وجود دارد. ولی در زمان‌های مواجهه با این سم، بین فعالیت آنزیمی سر اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید (F(۲،۴۵)=۰/۷۴۹ و p=۰/۴۷۹)، در حالی که بین فعالیت آنزیمی بدن تفاوت آماری وجود داشت (F(۲،۴۵)=۵/۵۴۰ و p=۰/۰۰۷). به علاوه در برابر اثرات متقابل غلظت‌های سم و زمان مواجهه‌ی ماهی با آنها، بین فعالیت این آنزیم سر (F(۴،۴۵)=۱/۲۶۱ و p=۰/۲۹۹) و بدن (F(۴،۴۵)=۰/۲۵۴ و p=۰/۹۰۶) اختلاف آماری دیده نشد. اثر غلظت‌های کاربریل و زمان در معرض بودن، بر فعالیت استیل کولین استرازی سر و بدن، در نمودار ۲-B نشان داده شده است.

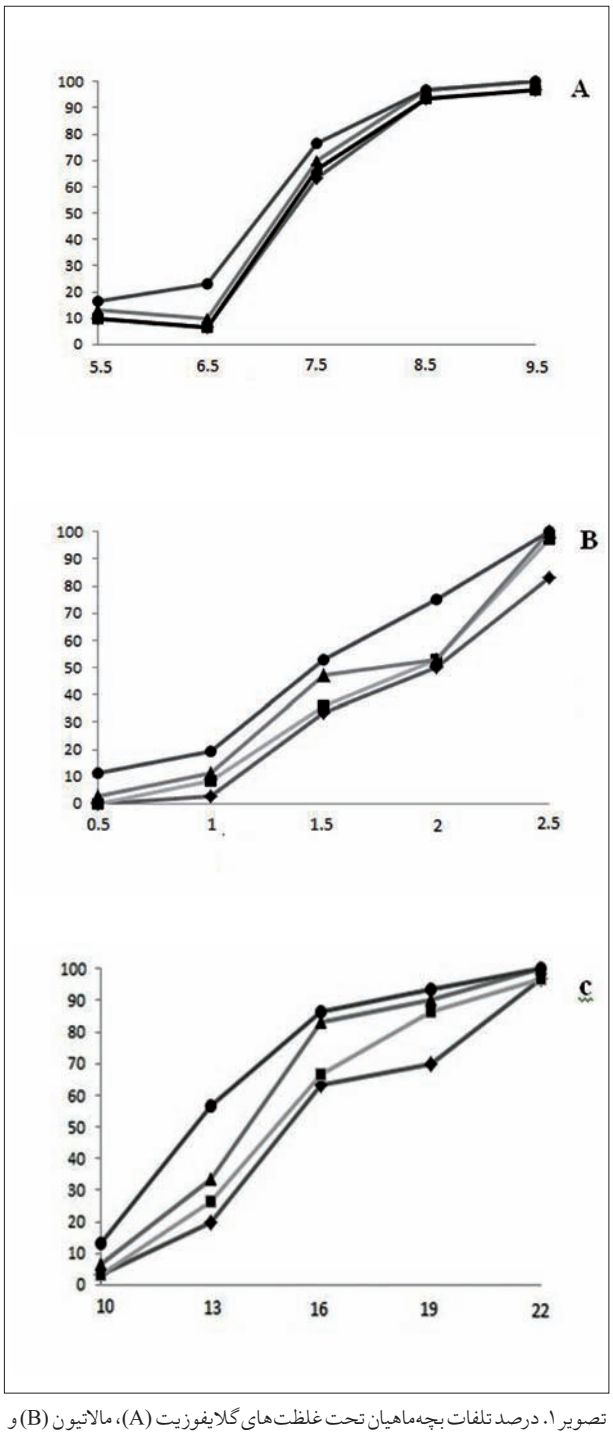
نتایج مقایسه میانگین‌ها در نمودار ۲-B حاکی از این بود که در روز پنجم آزمایش (زمان نخست)، در فعالیت کولین استرازی هر دو بخش سر و بدن بین تیمارهای ۱/۲ppm و شاهد با تیمار ۲/۴ppm اختلاف معنی‌دار وجود داشت (p<۰/۰۵). ولی زمان در معرض قرار گیری با این ترکیب اثر عمده‌ای بر فعالیت آنزیمی سر نداشته است، در صورتی که بین کولین استراز بدن این اثر دیده شد.

فعالیت کولین استراز تحت تیمار گلایفوزیت: نتایج تجزیه واریانس نشان می‌دهد که در برابر غلظت‌های مختلف گلایفوزیت، بین سطوح فعالیت کولین استراز سر (F(۲،۴۵)=۲۷/۰۷۱ و p=۰/۰۰۰) و بدن (F(۲،۴۵)=۱۱/۸۱۸ و p=۰/۰۰۰) اختلاف معنی‌داری وجود داشته است. همچنین در زمان‌های مواجهه با این سم، بین فعالیت آنزیمی سر اختلاف معنی‌دار دیده شد (F(۲،۴۵)=۲۱/۱۳۰ و p=۰/۰۰۰)، در حالیکه بین فعالیت آنزیمی بدن تفاوت آماری وجود نداشت (F(۲،۴۵)=۱/۵۸۳ و p=۰/۲۱۷). همچنین اثرات متقابل غلظت‌های سم و زمان مواجهه‌ی ماهی با آنها، بین فعالیت آنزیمی سر تفاوت معنی‌داری وجود داشت (F(۴،۴۵)=۴/۷۶۱ و p=۰/۰۰۳) ولی بین فعالیت آنزیمی بدن اختلاف آماری دیده نشد (F(۴،۴۵)=۰/۱۳۴ و p=۰/۹۶۹). اثر غلظت‌های گلایفوزیت و زمان در معرض آن بودن، بر فعالیت استیل کولین استرازی سر و بدن، در نمودار ۲-C نشان داده شده است.

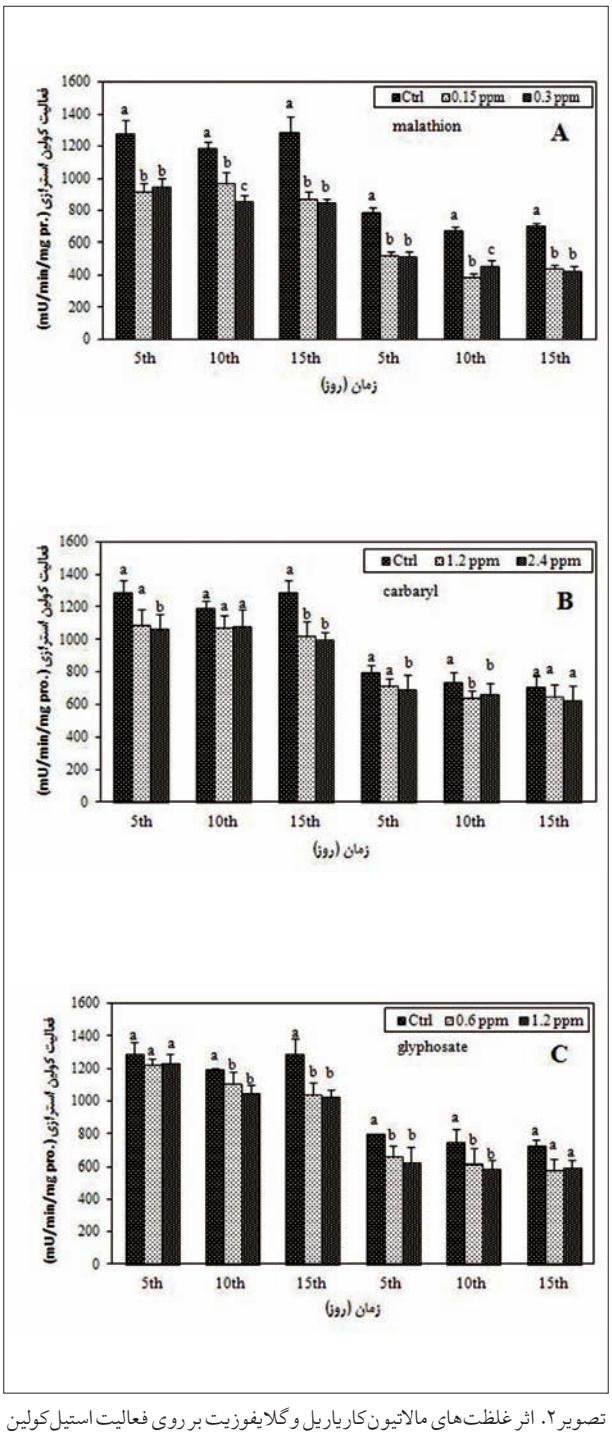
نتایج مقایسه میانگین‌ها در نمودار ۲-C حاکی از این بود در استیل کولین استراز سر در طول زمان اثرپذیری بیشتری از سم پیدا کرده است ولی استیل کولین استراز بدن به طور وارونه‌ای (نسبت به آنزیم سر) در طی زمان، مهارشدگی کمتری داشته است بطوریکه در روز پانزدهم آزمایش هیچ تفاوت آماری بین تیمارها با شاهد دیده نشد نمی‌شود (p>۰/۰۵).

بحث

در این تحقیق، اثرات کشنده و زیرکشنده (فعالیت کولین استرازی) آفت‌کش‌های مالاتیون، کاربریل و گلایفوزیت بر ماهی کپور وحشی دریای خزر (*C. carpio*) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده برای LC_{50} در مدت ۴ روز متوالی (۹۶ساعت) نشان داد که با افزوده شدن سموم تا غلظت مورد مطالعه، میزان مرگ و میر بچه‌ماهیان افزایش یافت. به علاوه، با افزایش ساعات آزمایش میزان غلظت کمتری از سموم لازم است تا ۵۰٪ از جمعیت ماهیان تلف شوند. میزان غلظت کشنده‌ی سموم



تصویر ۱. درصد تلفات بچه‌ماهیان تحت غلظت‌های گلایفوزیت (A)، مالاتیون (B) و کاربارایل(سوین) (C) در آزمایش زیست‌سنجی.



تصویر ۲. اثر غلظت‌های مالاتیون کاربارایل و گلایفوزیت بر روی فعالیت استیل کولین استرازی سر (سه بخش اول نمودار) و بدن (سه بخش دوم نمودار) بچه‌ماهیان کپور معمولی دریای خزر طی روزهای ۵، ۱۰ و ۱۵ پس از شروع آزمایش (حروف یکسان بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح $p<۰/۰۵$ می‌باشد).

گلایفوزیت، مالاتیون و کاربارایل در طی ۹۶ ساعت برای ۵۰٪ از بچه ماهیان کپور به ترتیب ۶/۷۵mg/L، ۱/۳ و ۱۲/۶۷ بوده و بر پایه‌ی این مقادیر، غلظت غیر موثر (NOEC) عبارتی حداکثر غلظت مجاز (MAC value) این سموم در محیط زیست، به ترتیب به میزان ۰/۶۷۵، ۰/۱۳ و ۱/۲۶۷ برای این سموم محاسبه شد. مقایسه‌ی مقادیر میانه غلظت کشنده (LC_{50}) برای ۹۶ ساعت با جدول طبقه‌بندی سمیت آفت‌کش‌ها در موجودات زنده (۷،۲۶) نشان می‌دهد که مالاتیون و گلایفوزیت جزء سموم با «سمیت متوسط» محسوب می‌گردند (LC_{50} بین ۱mg/L تا ۱۰)، ولی کاربارایل دارای «سمیت کم» برای این گونه ماهی (LC_{50} بین ۱۰mg/L تا ۱۰۰) است.

تاکنون مطالعه چندانی در مورد اثر کشنده‌ی رانداپ و مالاتیون بر

ماهیان در ایران صورت نگرفته و تنها می توان به Shamloofar و Hajimoradlou در سال ۲۰۰۸ اشاره نمود که سمیت متوسط کاربارل برای کپور معمولی پرورشی، با LC_{50} ۹۶ ساعت برابر با ۱۴/۱۸۷mg/L، گزارش نمودند. علی رغم نزدیکی عددی نتایج این پژوهش با مطالعه حاضر، دسته بندی سمیت این حشره کش در مطالعهٔ مذکور با یافته های حاضر مطابقت نداشت. Mel و همکارانش در سال ۲۰۰۵ مقدار LC_{50} ۹۶ ساعتهٔ سم کاربارل برای کپور معمولی، برابر ۷/۸۵mg/L گزارش نمودند. LC_{50} ۹۶ ساعت کاربارل برای ماهی حوض (*Carassius auratus*) و کپور کلرادو (*Ptychocheilus Lucius*) به ترتیب برابر با ۱۳/۹mg/L و ۰/۲۹۳ گزارش شده است (۹)، نشان می دهد اثرات یک سم بر گونه های متعلق به یک خانواده گاهی می توانند بسیار متفاوت باشد، ولی در برخی گونه های متعلق به دو شاخه ی متفاوت تکاملی، گاهی نزدیکی های بسیاری از نقطه نظر سم شناسی و زیست سنجی وجود دارد. بطوریکه مقادیر LC_{50} ۹۶ ساعت سم کاربارل برای گونه گورامی (*Colisa fasciatus*) و گونه صدف آب شیرین (*Utterbackia imbecillis*) به ترتیب برابر ۸/۰۰mg/L و ۷/۹ گزارش شده است (۱۲،۳۷). LC_{50} ۴۸ ساعت برای گربه ماهی راه رونده (*Clarius batracus*) به میزان ۱۳/۲۴ توسط Yogesh و همکارانش در سال ۲۰۰۹ گزارش گردید، که برای ۹۶ ساعت مواجهه، مقدار کمتر این غلظت مورد انتظار است. تحقیق حاضر، در مقایسه با سایر گونه های گزارش شده توسط محققین از نظر حساسیت ماهیان در برابر سم کاربارل، به صورت "کپور کلرادو > گورامی > گربه ماهی راه رونده > ماهی حوض > کپور معمولی" می باشد.

نتیجه مقایسه بین سم های مورد آزمون در این تحقیق نشان داد که غلظت های کشنده کاربارل، سمیت کمتری نسبت به گلایفوزیت و مالاتیون برای کپور معمولی دارد و همچنین این گونه ماهی نسبت به سایر گونه ها دارای حساسیت کمتری به این آفت کش می باشد.

میانه غلظت کشنده ی سم مالاتیون در ۹۶ ساعت برای کپور روهو (*Labeo rohita*)، ۰/۰۰۹mg/L (۳۰)، و در گونه *Ptychocheilus Lucius*، ۳/۷۱mg/L (حدود چهارصد برابر بیشتر از گونه کپور روهو) (۸) برای *Colisa fasciatus*، ۲/۲mg/L گزارش گردید (۳۶). حشره کش مالاتیون سمیت بسیار کمتری برای گربه ماهی آبی (*Ictalurus furcatus*) داشته، بطوریکه LC_{50} آن برابر ۱۷mg/L بوده است (۴). اما مالاوکسون که می تواند در واکنش های فاز اول آنزیمی و در کبد جانوران از مالاتیون تولید شود، با LC_{50} برابر ۳/۱mg/L سمیت بالاتری نسبت به مالاتیون داشت (۴). آفت کش فسفرهٔ آلی کلرپیریفوس در LC_{50} ۹۶ ساعته برای ماهی کلمه (*Rutilus rutilus caspicus*) و کپور معمولی، به ترتیب ۰/۰۱۶mg/L و ۰/۰۰۸ محاسبه گردید (۱۳،۲۶). همچنین LC_{50} ۱۶ ساعته سم دیازینون (آفت کش هم خانواده با مالاتیون) برای ماهی اوزون برون (*Acipenser stellatus*) ۴/۹۸mg/L گزارش شده است (۲۱). در پژوهش حاضر آفت کش فسفره آلی مالاتیون برای کپور معمولی، سمی تر از سایر ترکیبات مورد آزمایش بود و بر اساس مطالعات بالا، در موارد زیادی این حشره کش سمیت بالایی برای کپورماهیان دارد، بطوریکه مقایسه از نظر حساسیت گونه های مختلف ماهیان در برابر سم مالاتیون، به صورت "روهو > کپور معمولی > گورامی > کپور کلرادو > گربه ماهی آبی" می باشد. به علاوه حساسیت بالای کپورماهیان نسبت به یک حشره کش ارگانوفسفره دیگر (کلرپیریفوس) به اثبات رسیده است (۲۶).

میزان LC_{50} ۹۶ ساعته گلایفوزیت برای کپور معمولی در این تحقیق (۶/۷۵mg/L) به مراتب از میزان گزارش شده توسط Neskovic و همکاران در سال ۱۹۹۶ (۶۲۰mg/L) در سال ۱۹۹۶ کمتر بود. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که سمیت علف کش گلایفوزیت برای کپور معمولی کمتر از تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) جوان (۱/۰۵mg/L) توسط Ayoola در سال ۲۰۰۸ گزارش شده، ولی این سمیت برای کپور در مقایسه با تیلاپیای نیل بالغ (۳۶/۸mg/L) توسط Jiraungkoorskul و همکاران در سال ۲۰۰۲ گزارش شده بیشتر بوده است. بررسی علف کش ترایبونورون متیل در سه گونه از کپورماهیان (کپور نقره ای، کپور معمولی و کلمه) نشان داد که LC_{50} ۹۶ ساعته برای این سم به میزان بسیار بالا و به ترتیب برابر با ۱۳۹/۴۵mg/L، ۲۸۹/۰۸ و ۱۵۲/۷۴ بود (۵) ولی نتایج پژوهش مذکور نشان داد که علف کش گلایفوزیت سمیت بیشتری نسبت به علف کش ترایبونورون متیل دارد. بطور کلی، میانه غلظت کشنده سم گلایفوزیت برای ماهیان بیشتر از این غلظت در دوکفه ای ها می باشد بطوریکه LC_{50} ۷۲ ساعت گلایفوزیت برای دوکفه ای *decussatus Ruditapes* به میزان ۳۲/۷mg/L (۱۳) و برای دوکفه ای *imbecillis Utterbackia* برابر با ۱۸/۳ بود (۱۱). بنابراین بر اساس نتایج بدست آمده، سمیت گلایفوزیت برای کپور معمولی نسبت به حشره کش سوین بالاتر بوده ولی حشره کش مالاتیون، خطرناک تر از این علف کش ارزیابی گردید.

مهارشدگی معنی دار ($p<0/05$) فعالیت آنزیم استیل کولین استراز ماهیان تحت تیمار این سه ترکیب کشاورزی نسبت به گروه شاهد در طی دوره ی آزمایش کاملاً محسوس بود (نمودار A-C۲). کاهش فعالیت AChE مغز و BChE کبد گربه ماهی *Ictalurus furcatus* در مواجهه با غلظت های بیش از ۵mg/L مالاتیون نشان داد که سمیت و مهارکنندگی این سم برای استیل کولین استراز کپور معمولی بیشتر از گربه ماهی می باشد (۴). در پژوهش مذکور غلظت های سم بر اساس LC_{50} و IC_{50} (میانه غلظت مهارکنندگی) محاسبه شده بود. مالاتیون با مهار کولین استراز بافتی در کپور هندی *Labeo rohita* و افزایش نرخ مصرف اکسیژن آن تحت غلظت های کشنده این سم سبب مرگ و میر آنها گردید (۲۶). Singh و همکاران در سال ۲۰۰۴ مهارشدگی این آنزیم عصبی را سبب تونوس ماهیچه ها و احتمالاً فلج عضلانی دانسته اند که این حالت فلجی در عضلات تنفسی از مهمترین دلایل مرگ و میر ماهیان لابیرنت دار *Colisa fasciatus* تحت استرس با مالاتیون و کاربارل بر شمرده شده است. علاوه بر مالاتیون، آفت کش های فسفره نظیر کلرپیریفوس و

دیازینون نیز سبب مهارشدگی AChE در بافت‌ها و سرم خون کپور معمولی شده‌اند (۱۲). کاربارل به عنوان مهمترین سم گروه کاربامات دارای اثرگذاری و خاصیت مهارکنندگی بالایی بر فعالیت کولین استراز *Ptychocheilus Lucius* بود که تقریباً ۱۳ مرتبه بیشتر از توان مالاتیون در مهارکنندگی کولین استرازی تخمین زده شد (۱۰). غلظت‌های بسیار کم کاربارل (۰/۰۰۳ μM) سبب مهارشدگی معنی‌داری در AChE مغز گربه ماهی راه رونده (*Clarius gariepinus*) شدند (۲۴). مهارشدگی ۸۶٪ کولین استراز مغزی ماهی حوض در برابر غلظت‌های کشنده‌ی کاربارل، علت مرگ آنها شناخته شد (۱۸). بر اساس پژوهش Cattaneo و همکاران در سال ۲۰۱۱، گلایفوزیت به عنوان یک علف‌کش فسفره غیر آلی قادر به مهار فعالیت استیل کولین استراز کپور معمولی در هر دو بافت مغز و ماهیچه بوده است ولی پس از دوره‌ی بازیابی ۹۶ ساعته فعالیت این آنزیم رو به افزایش گذاشت. Modesto و Martinez در سال ۲۰۱۰ گزارش کردند که گلایفوزیت تنها قادر به مهار معنی‌دار AChE ماهی *Prochilodus lineatus* در روز چهارم بوده، همچنین علف‌کش کلومازون نیز تنها بر فعالیت کولین استرازی ماهیچه در کپور معمولی اثر معنی‌داری داشت و مهارشدگی آنزیم در مغز این ماهی رخ نداد (۱۰). اما کولین استراز مغز ماهی *Leporinus obtusidens* می‌تواند در مواجهه بلندمدت (۹۰ روز) با گلایفوزیت به عنوان یک شاخص مناسب به کار رود زیرا مهارشدگی معنی‌داری را نسبت به شاهد از خود نشان داد (۳۳). بنابراین به نظر می‌رسد مرگ و میر ماهیان (به ویژه تحت تیمار با مالاتیون) در آزمایشات کشنده و زیر کشنده که با اختلالات عصبی و تنفسی توام بود، ناشی از مهارشدگی آنزیم استیل کولین استراز در بخش‌های عصبی (سر) و عضلات (بدن) این جانوران بوده است. به نظر می‌رسد، این عامل (مهارشدگی) به همراه اختلالات تنفسی ناشی از لایه روغنی امولسیون ترکیب رانداپ بر روی آبشش، را بتوان علت مرگ بچه‌ماهیان تحت تیمار با این گلایفوزیت دانست.

زمان اثر معنی‌داری را در بین تیمارها با مالاتیون نشان داد به ویژه این که در روز دهم مواجهه با مالاتیون بین تمام گروه‌های آزمایشی اختلاف معنی‌دار دیده شد (نمودار ۲-A). آنزیم بخش‌های سر و بدن در برابر اثر زمان مواجهه با کاربارل و گلایفوزیت با هم متفاوت بودند، بطوریکه استیل کولین استراز سر در طول زمان اثرپذیری بیشتری از سم گلایفوزیت پیدا کرد ولی استیل کولین استراز بدن به طور وارونه‌ای (نسبت به آنزیم سر) در طی زمان، مهارشدگی کمتری داشته است و در روز ۱۵ آزمایش هیچ تفاوت آماری بین تیمارها با شاهد مشاهده نگردید (نمودار ۲-C). اهمیت اثر غلظت مالاتیون در مطالعه پیش رو بسیار بیشتر از اثر زمان مواجهه با آنها تشخیص داده شد (بر اساس مقایسه آماره F اثرات غلظت و زمان). بر خلاف نتایج این پژوهش، مطالعه Ferrari و همکاران در سال ۲۰۰۴ تأثیر زمان بر مهارشدگی کولین استرازی در ماهی حوض انجام گرفته و نشان داد که زمان اهمیت بیشتری نسبت به غلظت‌های کاربارل داشته است و زمانی که جانور در معرض غلظت ثابتی از سم باشد، از مقاومت آنها به مرور کاسته شده و سم فرصت بیشتری برای اثرگذاری بر ماهی دارد. در بررسی مسمومیت ماهیان تحت تیمار گلایفوزیت در بلند مدت نیز به اثر زمان اشاره شده (۳۳) و اهمیت این عامل در مطالعات دیگر نیز تائید گردیده است (۱۱،۱۵،۲۵). به هر حال، زمان برای انجام فرآیندهای سم‌زدایی غلظت‌های مختلف سموم، همواره موثر است (۱۸).

میانگین حد نرمال فعالیت آنزیم کولین استراز بین بخش‌های سر و بدن بچه‌ماهیان کپور معمولی (در گروه شاهد) به ترتیب برابر با ۱۲۴۱/۳۵۶μ و ۷۲۳/۱۰۳۶ یونیت در دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شده است که بر این اساس فعالیت ChE سر ۱/۷ برابر فعالیت این آنزیم در بدن می‌باشد (نمودار ۲-A). کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) کپور نقراهای (*Hypophthalmichthys molitrix*) تاسماهی روسی (سیبری) (*Acipencer baeri*) مارماهی اروپایی (*Anguilla anguilla*) گربه ماهی (*Silurus glanis*) دارای بیشترین میزان فعالیت کولین استراز بافتی بوده و فعالیت استیل کولین استراز بافت‌های مغز، قلب، عضله اسکلتی و کبد این ماهیان به ترتیب برابر با ۱۳۶۱/۲، ۵۷۵/۰، ۱۴۶/۵ و ۱۲۶/۵ (mU/min/mg protein) گزارش شده است (۱۷). مقدار فعالیت آنزیمی مغز کپور معمولی در پژوهش مذکور تقریباً با این مقدار برای بخش سر (جایگاه مغز) در این مطالعه مطابق بوده است ولی در مورد سایر بافت‌ها با بخش بدن این ماهی مطابقت وجود نداشت. همچنین بخش‌های سر (شامل بافت مغز) و بدن (شامل عضلات اسکلتی و کبد) از لحاظ نوع مهارشدگی آنزیم در برابر غلظت‌های سموم (به ویژه مالاتیون) و زمان‌های مواجهه با آنها، نسبتا مشابه بودند. آنزیم کولین استراز معمولا در عضلات و کبد جانوران به شکل ترکیبی از اشکال ملکولی استیل کولین استراز و بوتیریل کولین استراز وجود دارد (۲۷) و در برخی تحقیقات نیز هر دو نوع از آنزیم کولین استراز در بافت هموژنیزه شده‌ی سر شناسایی شده است (۲۷). در حدود ۳۰٪ میزان کولین استراز کل در بافت عضله‌ی گونه‌های کفشک ماهی را بوتیریل کولین استراز به خود اختصاص داد (۳۲). درصد این ترکیب در شاخه‌های مختلف و حتی بین گونه‌ها، می‌تواند متفاوت باشد (۳۱). Sturm و همکاران در سال ۱۹۹۹ نشان داد که بوتیریل کولین استراز دارای حساسیت بالاتری نسبت به استیل کولین استراز در بافت عضله برخی ماهیان دریایی در برابر حشره‌کش‌های فسفره آلی می‌باشد. به نظر می‌رسد دلیل همسانی مهارشدگی کولین استراز سر و بدن در این پژوهش، عدم استفاده از سوبسترای اختصاصی آنزیم BChE (S-butyrylthiocholine) برای سنجش کولین استراز بدن باشد. بنابراین مطالعه‌ی استیل کولین استراز به تنهایی نمی‌تواند تمامی خصوصیات فعالیت‌های کولین استرازی را در این گونه ارزیابی‌ها نشان دهد.

بطور کلی بررسی زیست‌سنجی و فعالیت کولین استرازی بچه ماهیان کپور معمولی نشان داد که سمیت این ترکیبات برای آنها به شکل

«مالاتیون > گلایفوزیت > کاربارِیل» می‌باشد. سمیت زیر کشنده مالاتیون برای ماهیان تحت تیمار با مهارشدگی کولین استراز، حتی در غلظت‌های پائین (۰/۱۵mg/L) نیز دیده شد، در صورتی که حداکثر غلظت مجاز این آفت‌کش برای ورود به محیط زیست حدود ۰/۱۳mg/L است که نزدیک به این رقم می‌باشد. بنابراین چنین غلظتی که از نظر آزمون زیست سنجی و کشندگی، غیر موثر و مجاز برای کپور معمولی شناخته می‌شود، می‌تواند باعث بروز پاسخ‌های آنزیمی و آسیب‌های زیستی گردد. پیشنهاد می‌گردد پس از فصل سم‌پاشی اقدام به رهاسازی بچه‌ماهیان کپور حاصل از تکثیر مصنوعی صورت گیرد تا از خطرات احتمالی و تلفات بالای ناشی از باقیمانده سموم کشاورزی به ویژه حشره‌کش‌های فسفره آلی نظیر مالاتیون جلوگیری شود. همچنین می‌توان با مدیریت هرز آب‌های کشاورزی از ورود آنها به رودخانه‌ها کناری آن جلوگیری نمود و یا در صورت امکان حداقل یک یا چند رودخانه را به صورت آزمایشی از نواحی مصبی تا بالادست به طور کامل از منابع آلاینده حفظ و با بازسازیِ بستر واحیایِ دوباره شکل طبیعی آنها، امکان تخم‌ریزی طبیعی مولدین و بقای پایدار لاروها را تضمین کنیم. به طور حتم در صورت تحقق این امر شاهد دمیدن روحی تازه به پیکره بی جانِ اکوسیستم خزری و تحقق اقتصاد پایدار در این مناطق خواهیم شد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله نویسندگان از جناب آقای دکتر طالبی جهرمی عضو هیئت علمی گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران و سرکار خانم شکراللهی کارشناس آزمایشگاه سم‌شناسی این گروه به جهت در اختیار قرار دادن دستگاه الایزا برای سنجش فعالیت آنزیمی، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایند. همچنین از جناب آقای مهندس جابر نصیری و محمدتقی قریب زاهدی که در رفع پاره‌ای از نواقص مساعدت نمودند، سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Abbasian, H., Ashayeri, A., Hasanzadeh, H. (2008) Agricultural drainage water in the Caspian sea and their ecological impacts. Aqua Sci. 5: 123-129.
2. Abdolhay, H.A., Daud, S.K., Rezvani Ghilkolahi, S., Pourkazemi, M., Siraj, S.S., Abdul Satar, M. (2011) Fingerling production and stock enhancement of Mahisefid (Rutilus frisii kutum) lessons for others in the south of Caspian Sea. Rev Fish Biol Fish. 21: 247-257.
3. Abdoli, A. (2000) Inland Water Fishes of Iran. (1st ed.). Iranian museum of nature and wild life. Tehran, Iran.
4. Aker, WG., Hu, X., Wang, P., Hwang, H.M. (2008) Comparing the relative toxicity of malathion and malaoxon in blue catfish Ictalurus furcatus. Environ Toxicol. 23: 548-554.
5. Arjmandi, R., Tavakol, M., Shayeghi, M. (2010) Determination of organophosphorus insecticide residues in the rice paddies. Int Environ Sci Technol. 7: 175-182
6. Ayoola, S.O. (2008) Toxicity of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juvenile. Afr J Agric Res. 3: 825-834.
7. Baghfalaki, M., Shaluei, F., Hedayati, A., Jahan-bakhshi, A., Khalili, M. (2012) Acute toxicity assessment of tribenuron-methyl herbicide in silver carp (*Hypophthalmicthys molitrix*), common carp (*Cyprinus carpio*) and caspian roach (*Rutilus rutilus caspicus*). Global Veterinaria. 8: 280-284.
8. Beyers, DW., Sikoski, P.J. (1994) Acetylcholinesterase inhibition in federally endangered colorado squaw-fish exposed to carbaryl and malathion. Environ Toxicol Chem. 13: 935-939.
9. Cattaneo, R., Clasen, B., Loro, V.L., De Menezes, C.C., Pretto, A., Baldisserotto, B., et al. (2011) Toxicological responses of *Cyprinus carpio* exposed to a commercial formulation containing glyphosate. Bull Environ Contamin Toxicol. 87: 597-602.
10. Cattaneo, R., Moraes, B.S., Loro, V.L., Pretto, A., Menezes, C., Sartori, G.M.S., et al. (2010) Tissue biochemical alterations of *Cyprinus carpio* exposed to commercial herbicide containing clomazone under rice-field conditions. Arch Environ Contamin Toxicol. 62: 97-106.
11. Conners, D.E., Black, M.C. (2004) Evaluation of lethality and genotoxicity in the freshwater mussel *Utterbackia imbecillis* (Bivalvia: Unionidae) exposed singly and in combination to chemicals used in Lawn Care. Arch Environ Contamin Toxicol. 46: 362-371.
12. Dembele, K., Haubruge, E., Gasper, C. (2000) Concentration effects of selected insecticides on

brain acetylcholinesterase in common carp (*Cyprinus carpio* l.). Ecotoxicol Environ Saf. 45: 49-54.

13. De Mel, G.W.J.L.M.V.T.M., Pathiratne, A. (2005) Toxicity assessment of insecticides commonly used in rice pest management to the fry of common carp, *Cyprinus carpio*, a food fish culturable in rice fields. J Appll Ichthyol. 21: 146-150.
14. Ellman, G.L., Courtney, K.D., Featherstone R.M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem Pharmacol. 7: 88-90, IN81, 91-95.
15. El-Shenawy, N.S., Abdel-Nabi, I.M., Moawad, T.I., Taha, I.A. (2003) Physiological and behavioural responses of *Ruditapes decussatus* to roundup and reldan. Egypt J Biol. 5: 108-119.
16. Fatemi, S., Kaymaram, F., Jamili, S., Motlagh, S., Ghasemi, S. (2009) Estimation of growth parameters and mortality rate of common carp (*Cyprinus carpio*, Linnaeus 1758) population in the southern Caspian Sea. Iran J Fish Sci. 8: 127-140.
17. Ferenczy, J., Szegletes, T., Bálint, T., Abrahám, M., Nemcsók, J. (1997) Characterization of acetylcholinesterase and its molecular forms in organs of five freshwater teleosts. Fish Physiology and Biochemistry. 16: 515-529.
18. Ferrari, A., Venturino, A., De D Angelo, A.M.P. (2004) Time course of brain cholinesterase inhibition and recovery following acute and subacute azinphosmethyl, parathion and carbaryl exposure in the goldfish (*Carassius auratus*). Ecotoxicol Environ Saf. 57: 420-425.
19. Ghelichi, A., Akrami1,R., Bandani ,Gh., Jorjani, S. (2010) Reproduction biology of female common carp (*Cyprinus carpio*) in southeast of the Caspian Sea (Miankale Fishing Station). J Fish Iran J Nat Res. 63: 197-208.
20. Jiraungkoorskul, W., Upatham, E.S., Kruatrachue, M., Sahaphong, S., Vichasri-Grams, S., Pokethitiyook, P. (2003) Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Environ Toxicol. 18: 260-267.
21. Khoshbavar Rostami, H.A., Soltani, M., Yelghi, S. (2005) Effects of diazinon on the histopatological profiles of Acipenser stellatus and detetmination of LC_{50}. J Agric Sci Nat Resour. 5: 100-108.
22. Lam, P.K.S., Gray, J.S. (2003) The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. Mar Pollut Bull. 46: 182-186.
23. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 193: 265-275.
24. Mdegela, R.H., Mosha, R.A., Sandvik, M., Skaare, J.U. (2010) Assessment of acetylcholinesterase activity in *Clarias gariepinus* as a biomarker of organophosphate and carbamate exposure. Ecotoxicology. 19: 855-863.
25. Modesto, A.K., Martinez, K.B.R. (2010) Roundup causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. Chemosphere. 78: 294-299.
26. Mohammad Nejad Shamoushaki, M., Shahkar, E. (2009) Determination the lethal concentration (Lc_{50} 96 H) of chloropyrifos and diazinon on (*Rutilus rutilus caspicus*). J Fish. 4: 133-140.
27. Monteiro, M., Quintaneiro, C., Morgado, F., Soares, A., Guilhermino, L. (2005) Characterization of the cholinesterases present in head tissues of the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: Application to biomonitoring. Ecotoxicol Environ Saf. 62: 341-347.
28. Neškovic, N.K., Poleksic, V., Elezovic, I., Karan, V., Budimir, M. (1996) Biochemical and histopathological effects of glyphosate on carp, *Cyprinus carpio* L. Bull Environ Contamin Toxicol. 56: 295-302.
29. Organisation for Economic Co-operation and Development (1992) Guidelines for the Testing of Chemicals Fish, Acute Toxicity Test No. 203 Section 2, OECD Publishing.doi: 10.1787/9789264069961-en.
30. Patil, V.K., David, M. (2008) Behaviour and respiratory dysfunction as an index of malathion toxicity in the freshwater fish, *Labeo rohita* (Hamilton). Turk J Fish Aquat Sci. 8: 233-237.

31. Pezzementi, L., Chatonnet, A. (2010) Evolution of cholinesterases in the animal kingdom. Chem Biol Int. 187: 27-33.
32. Rodríguez-Fuentes, G., Armstrong, J., Schlenk, D. (2008) Characterization of muscle cholinesterases from two demersal flatfish collected near a municipal wastewater outfall in Southern California. Ecotoxicol Environ Saf. 69: 466-471.
33. Salbego, J., Pretto, A., Gioda, C.R., de Menezes, C.C., Lazzari, R., Neto, J.R., et al. (2010) Herbicide formulation with glyphosate affects growth, acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in Piava (*Leporinus obtusidens*). Arch Environ Contamin Toxicol. 58: 740-745.
34. Shamloofar, M., Hajimoradlou, A.M. (2008) Determination of LC50 and some histopatological changes due to sevin in common carp *Cyprinus carpio* juveniles. J Fish. 3: 76-85.
35. Shayeghi, M., Khoobdel, M., Bagheri, F., Abtahi, M. (2008) Azinphos-methyl and diazinon residues in Gorganrood and Gharesoo river Golestan province. J School Pub Health and Institute of Public Health Research. 6: 75-82.
36. Singh, SK., Tripathi, PK., Yadav, R.P., Singh, D., Singh, A. (2004) Toxicity of malathion and carbaryl pesticides: effects on some biochemical profiles of the freshwater fish *Colisa fasciatus*. Bull Environ Contamin Toxicol. 72: 592-599.
37. Sturm, A., Da Silva de Assis, H., Hansen, P.D. (1999) Cholinesterases of marine teleost fish: enzymo-logical characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination. Mar Environ Res. 47: 389-398.
38. Talebi Jahromi, Kh. (2007) Pesticides Toxicology. University of Tehran Press. (2nd ed.) Tehran, Iran.
39. Tu, M., Hurd, C., Randall, J.M. (2001) Weed Control Methods Handbook: Tools and Techniques for Use in Natural Areas. The Nature Conservancy,Washington, D.C., USA.
40. Varo, I., Amat, F., Navarro, J. (2008) Acute toxicity of dichlorvos to *Aphanius iberus* (Cuvier & Valenciennes, 1846) and its anti-cholinesterase effects on this species. Aquat Toxicol. 88: 53-61.
41. Vazirzadeh, A., Mojazi Amiri, B., Yelghi, S., Hajimoradloo, A., Nematollahi, M.A., Mylonas, C.C. (2011) Comparison of the effects of different methods of mammalian and salmon GnRHa administration on spawning performance in wild-caught female carp (*Cyprinus carpio* carpio) from the Caspian Sea. Aquaculture. 320: 123-12.
42. Ware, G.W. (1994) The pesticide book. Fresno, USA: Thomson publications. p. 103-126.
43. Yogesh, H.W., Yashshri, A.G., Prakash, P.A. (2009) Sublethal and chronic effect of Carbaryl and Malathion on *Clarius batrachus*. J Appl Sci Environ Manage. 13: 22-26.

Toxicity evaluation of Malathion, Carbaryle and Glyphosate in common carp fingerlings (*Cyprinus carpio*, Linnaeus, 1758)

Gholami Syedkolaei, S.J.[1*], Shiri, N.[1], Mirvaghefi, A.R.[1], Rafiee, G.R.[1], Makhdomi, Ch.[2]

[1]*Department of Fishery and Environment, Natural Resource Faculty, University of Tehran, Karaj-Iran*

[2]*Deputy of Propagation and Extension of Fisheries Organization, Sari-Iran*

(Received 19 January 2013 , Accepted 29 April 2013)

Abstract:

BACKGROUND: Common carp (*Cyprinus carpio*) fishes during release into the rivers estuary of the Caspian southern basin are generally exposed to a broad spectrum of agricultural pesticides. **OBJECTIVES:** The objective of this study was to investigate the effects of three agricultural pesticides including Malathion, Carbaryle and Glyphosate on *C. carpio* in lethal level by determining LC_{50} 96h and sub-lethal levels via cholinesterase (ChE) activity. **METHODS:** The median lethal concentration using a standard method which is called OECD No. 203 (1992), was measured. About 300 fingerlings with average weight of 2.0 ± 0.4 g were randomly selected and were then exposed to each pesticide in three treatments (0.1, 0.2 LC_{50} 96h and negative control) in three replications. 5, 10 and 15 days after the test period, sampling from the head and body of fishes was carried out. The ChE activity was assayed with biochemical method described by Ellman. **RESULTS:** The LC_{50} 96h for three glyphosate, malathion and carbaryle pesticides were obtained as 6.75, 1.3 and 12.67 mg/L, respectively. The mean values of ChE for both head and body under control conditions were found 1241.356 and 723.103 mU/min/mg protein, respectively. Therefore, the ChE activity of head was 1.7 times more than the body. During the test period, inhibition activitiy of ChE was significantly observed in the fishes treated by any of three components in comparison with control ($p<0.05$). The ChE inhibition potential by carbaryle and glyphosate was lower than malathion as compared with control. The exposure time concentration exhibited a significant effect compared to the fishes treated by the investigated pesticide types. **CONCLUSIONS:** The used pesticide concentrations for non-target species which were ineffective and permissible according to the lethality bioassay test can lead to their enzyme responses and bio-damages.

Key words: common carp (*Cyprinus carpio*), agricultural pesticides, LC_{50}, cholinesterase activity

Figure Legends and Table Captions

Figure 1. Mortality rate of the against juvenile of Caspian Sea common carp (*C.carpio*) under concentrations of Glyphosate(A), Malathion (B), Carbaryl (C) in bioassay test. 24h 48h 72h 96h

Figure 2. Effect of different concentrations of Malathion (A), Carbaryl (B), Glyphosate (C) on the head (the first three sections of graphs) and body (the second three sections of graphs) AChE activity of Caspian Sea common carp (*C.carpio*) juveniles, during different experimental periods (5, 10 and 15 days) (Same letters indicate no significant difference among groups at $p<0.05$ level).

Table1. Toxicity rate (LC_{10}, LC_{50} and LC 90) of glyphosate, malathion, carbaryl against juvenile of Caspian Sea common carp (*C.carpio*).

***Corresponding author's email: sjalilgholamis@ut.ac.ir, Tel: 026-32245908, Fax: 026-32245908**