بهره‌برداری و پرورش آبزیان
جلد سوم، شماره اول، بهار ۱۳۹۳
http://japu.gau.ac.ir

تعیین درجه سمیت دیازینون و بررسی اثر آن بر روی برخی شاخص‌های آنزیمی در فیل‌ماهی (*Huso huso*)

* نیما شیری[۱]، خدیجه خوشنودی‌فر[۲]، غلامرضا رفیعی[۳] و علیرضا میرواقفی[۴]

[۱] دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد بوم‌شناسی آبزیان، گروه شیلات و محیط زیست، دانشگاه تهران،

[۲] دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد تکثیر و پرورش آبزیان، گروه شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۳] استاد گروه شیلات و محیط زیست، دانشگاه تهران،

[۴] دانشیار گروه شیلات و محیط زیست، دانشگاه تهران،

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/٤/۲٤ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۷/۱٦

چکیده

در این پژوهش، به منظور تعیین LC_{50} و درجه سمیت آفت‌کش دیازینون در گونه فیل ماهی ابتدا آزمایش سمیت کشنده انجام شد و سپس اثرات غلظت‌های تحت کشنده‌ی آن بر دو شاخص آنزیمی عمومی (ALT و AST) و یک شاخص آنزیمی اختصاصی (AChE) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج سمیت کشنده نشان داد که غلظت کشنده، حداقل غلظت موثره، حداکثر غلظت مجاز دیازینون در بچه فیل ماهیان برابر ٥/٤٧، ٤/٢٨ و ۰/٥٤ میلی‌گرم بر لیتر محاسبه شد و این حشره‌کش را برای فیل ماهی می‌توان با «درجه سمیت متوسط» طبقه‌بندی کرد. یافته‌های آزمایش زیر کشنده نشان داد که با افزایش غلظت دیازینون در آب، فعالیت آنزیم AST و ALT در پلاسمای ماهیان آزمایشی افزایش یافته است، بنابراین یک رابطه مستقیم بین غلظت سم دیازینون با این شاخص‌های عمومی دیده می‌شود. از طرفی افزایش غلظت سم دیازینون، سبب ایجاد یک روند کاهشی در فعالیت کولین استرازی در هر دو بافت مغز و ماهیچه شده است. به عبارت بهتر، مهارشدگی آنزیم AChE رابطه مستقیمی با غلظت آفت‌کش دارد.

*مسئول مکاتبه: nima.shiry@gmail.com

با توجه به این نتایج می‌توان گفت، غلظت‌هایی از آفت‌کش دیازینون که از نظر آزمون کشندگی، غیرموثر و مجاز برای گونه‌های غیرهدف شناخته می‌شوند، می‌توانند باعث بروز تغییراتی در شاخص‌های آنزیمی سرم خون و مهارشدگی استیل کولین استرازی در آنها گردند.

واژه‌های کلیدی: درجه سمیت، LC_{50}، شاخص‌های آنزیمی، دیازینون، فیل‌ماهی

مقدمه

دیازینون[1] یکی از مهمترین آفت‌کش‌های فسفره‌ی آلی است که به علت کارایی و اثرگذاری بالا، در بسیاری از نواحی کشاورزی ایران مصرف بالایی دارد (عباسیان و همکاران، ۲۰۰۸). این حشره‌کش یکی از رایج‌ترین سموم برای مبارزه با کرم ساقه‌خوار برنج در ایران است که در شالیزارهای شمال ایران در مقیاس وسیعی از آن استفاده می‌گردد (طالبی‌جهرمی، ۲۰۰۷). پس از سم‌پاشی باقیمانده‌ی آفت‌کش در پی بارندگی فصلی یا آبیاری به تدریج از روی محصولات و گیاهان زراعی، شسته شده و وارد آب‌های سطحی و زیر زمینی می‌شود (شایقی و همکاران، ۲۰۰۸). نیمه عمر حشره‌کش دیازینون در آب‌های با اسیدیته‌ی ۷/۳ و دمای ۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد برابر با ۱۷۱ روز می‌باشد. از این رو تا مدت‌ها پس از سم‌پاشی، این آفت‌کش در نواحی ساحلی و مصبی دریای خزر انباشته می‌گردند (عباسیان، ۲۰۰۸). این ترکیب شیمیایی قادر است 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 شوند (رودریگوز- فوئنتس و همکاران، ۲۰۰۸). بنابراین بررسی اثرات کشنده و تحت کشنده‌ی این سموم بر گونه‌های تجاری دریای خزر نظیر فیل ماهی، الزامی به نظر می‌رسد.

ماهیان خاویاری از گونه‌های حساس و با ارزش از لحاظ اقتصادی بشمار می‌روند که ذخایر طبیعی آنها امروزه در معرض خطر جدی با آلاینده‌های شیمیایی قرار گرفته است (کاجیوارا و همکاران، ۲۰۰۳). فیل ماهی *Huso huso* یکی از مهمترین گونه‌های ساکن دریای خزر است که در فصل بهار برای تولیدمثل به رودخانه‌های جنوبی این حوضه آبریز مهاجرت می‌کند و همچنین تکثیر مصنوعی و رهاسازی بچه‌ماهیان با هدف بازسازی ذخایر این گونه، هر ساله توسط سازمان شیلات ایران صورت می‌گیرد (عبدلی، ۱۹۹۹). کاهش میزان صید سالانه‌ی ماهیان خاویاری در سال‌های اخیر، گویای این

1- [O,O-diethyl O-(2-isopropyl-4-methyl-6-pyrimiinyl) phosphorothioate]

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. باقیمانده ترکیبات فسفره آلی مانند دیازینون، می‌تواند نقش مهمی در کیفیت رهاسازی این گونه داشته باشد.

آسپارتات آمینو ترانسفراز (AST) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT) مهمترین آنزیم‌های گروه ترانس آمینازها هستند که با انتقال واحدهای آمین، آلفا کتو اسید را به آمینو اسیدها کاتالیز می‌کنند. این آنزیم‌ها به‌طور عمده در سلولهای کبد یافت می‌شوند و به مقدار کمتری در قلب، کلیه‌ها و عضلات اسکلتی نیز حضور دارند (ابراهیمی، ۲۰۰۵). هرگونه آسیب یا نکروز سلول‌های کبد موجب افزایش ترشح این آنزیم‌ها و وارد شدن آنها به پلاسما می‌گردد. از این‌رو افزایش سطح فعالیت این آنزیم‌ها در پلاسما می‌تواند حاکی از آسیب‌های بافتی به ویژه بافت کبد باشد (بنایی و همکاران، ۲۰۱۰). آسیب‌های کبدی می‌توانند در اثر سمیت ترکیبات متابولیت‌های اوکسون (Oxon) در طی فرایندهای سم‌زدایی آفت‌کش‌های فسفره از جمله دیازینون ایجاد شوند (اوبومانو و همکاران، ۲۰۰۹). دیازینون مانند دیگر سموم فسفره واجد فسفوروتیونات می‌باشد که پس از تجزیه به متابولیت‌های فسفات استر یا اوکسون که از قابلیت بالایی در ممانعت از فعالیت آنزیم استیل کولین استراز (AChE) برخوردار است، تبدیل می‌شود (تانگ و همکاران، ۲۰۰۱) سازوکار آن در واقع، مهار برگشت‌ناپذیر AChE توسط این گروه آفت‌کش‌هاست، بطوریکه این ترکیبات همانند یک سوبسترا برای آنزیم رفتار می‌کنند (وارو و همکاران، ۲۰۰۸). بر این اساس، جدا شدن باقی‌مانده ترکیب فسفره از آنزیم استرازی آن‌چنان کند صورت می‌گیرد که آنزیم قادر به هیدرولیز کردن پیام‌رسان عصبی نبوده، استیل کولین در شیار عصبی تجمع می‌یابد و انتقال عصبی بتدریج متوقف می‌شود (فرنزی و همکاران، ۱۹۹۷). آنزیم کولین استراز معمولا در عضلات و کبد جانوران به شکل ترکیبی از فرم‌های مولکولی استیل کولین استراز[1] و بوتیریل کولین استراز[2] وجود دارد (الکساندر و همکاران، ۲۰۰۷) و در برخی پژوهش‌ها نیز هر دو نوع از آنزیم کولین استراز در بافت هموژنیزه شده سر شناسایی شده است (مونتیرو و همکاران، ۲۰۰۵). در حدود ۳۰ درصد میزان کولین استراز کل در بافت عضله یک گونه ماهی کفزی (*Pleuronectes vetulus*) را بوتیریل کولین استراز به خود اختصاص داد (رودریگوز- فوئنتس و همکاران، ۲۰۰۸). درصد این

1- Acethylcholinesterase (AChE)
2- Butyrylcholinesterase (BChE)

ترکیب در شاخه‌های مختلف و حتی بین گونه‌ها، می‌تواند متفاوت باشد (پزمنتی و چاتونت، ۲۰۱۰). سنجش میزان فعالیت AChE به عنوان یک شاخص زیستی اختصاصی و مطمئن برای آفت‌کش‌های ارگانوفسفره و کاربامات در پژوهش‌های متعدد استفاده شده است (تانگ و همکاران، ۲۰۰۱؛ آکر و همکاران، ۲۰۰۸؛ مدگلا و همکاران، ۲۰۱۰).

این پژوهش حاضر در نظر دارد تا علاوه بر تعیین درجه سمیت دیازینون، اثرات سم دیازینون بر دو شاخص آنزیمی عمومی (ALT و AST) و یک شاخص آنزیمی اختصاصی (AChE) را در فیل ماهی (*Huso huso*) بررسی نماید. چنین مطالعه‌ای می‌تواند رهاسازی بهینه بچه‌ماهیان خاویاری را با توجه به غلظت آفت‌کش کشاورزی مورد بررسی، زمان سمپاشی و پاسخ‌های آنزیمی پس از مواجهه با سم را توصیف کند و سازوکار استفاده از این شاخص‌های زیستی تعیین گردد.

مواد و روش‌ها

ماهیان و شرایط آزمایش: تعداد اسمی ۳۰۰ قطعه بچه فیل‌ماهی با وزن متوسط ۲±۱۳ گرم (میانگین ± SD) از مرکز تکثیر و پرورش شهید رجایی در سمسکنده ساری تهیه شده و به کارگاه تکثیر و پرورش گروه شیلات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران (واقع در کرج) منتقل شدند. بچه ماهیان به مدت ۱۰ روز در دو تانک ۱۰۰۰ لیتری فایبرگلاس نگه‌داری شدند تا هم سازگاری با محیط جدید صورت گیرد و هم سطح آنزیم کولین استراز بافت‌ها تحت تاثیر مهارکننده‌های احتمالی در محیط، بازیابی شود. پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب از جمله اسیدیته در حدود ۷، سختی کل ۱۷۵ $CaCO_3$ mg/lit، اکسیژن محلول بیش از ۷ ppm و دمای ۵±۲۲ درجه سانتی‌گراد تحت کنترل بودند. حشره‌کش دیازینون (به صورت امولسیون با خلوص ٦٠ درصد محلول در زایلون ٤٠ درصد) ساخت ایران شرکت پرتونار خریداری شد و محلول مادر با غلظت ۱۰۰۰۰ ppm تهیه گردید. به منظور انجام آزمایشات، بچه ماهیان به مخازن فایبرگلاس ۱۰۰ لیتری منتقل شدند. تغذیه‌ی بچه‌ماهیان با غذای بیومار فرانسه دو بار در روز به میزان یک درصد وزن بدن صورت گرفت. ٢٤ ساعت قبل از شروع آزمایش و همچنین در زمان کشتار تغذیه متوقف شد.

آزمایش سمیت کشنده: این آزمایش با روش غلظت کشنده میانه (LC_{50}) در ٩٦ ساعت و بر اساس راهنمای OECD (1992) با شرایط استاتیک آب روی بچه فیل‌ماهیان انجام گرفت. به منظور تعیین دامنه کشندگی سم دیازینون، تعداد ۳۰ ماهی در غلظت‌های ٤ و ۷/۵ میلی‌گرم بر لیتر دیازینون تحت

یک پیش آزمایش قرار گرفته و در ماهیان گروه آزمایشی در معرض غلظت ٤ میلی‌گرم بر لیتر هیچ‌گونه مرگ و میر مشاهده نشد ولی ماهیان تحت غلظت ۷/۵ میلی‌گرم بر لیتر همگی تلف شدند. بنابراین غلظت‌های آزمایش سمیت اصلی بر اساس این پیش آزمایش، تعیین شده و ماهیان در معرض دامنه‌ی غلظت‌های مختلف دیازینون (شامل: ۰ (شاهد)، ۵، ٦، ٦/۷۵، ۷/۵ میلی‌گرم بر لیتر) به مدت ۹٦ ساعت قرار گرفتند. آزمایش سمیت حاد روی ۱۵۰ قطعه بچه فیل‌ماهی که به طور تصادفی در تعداد ۱۵ تانک فایبرگلاس ۱۰۰ لیتری (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 به ماهیان غذادهی نشد. تمام گروه‌های آزمایشی روزی دو مرتبه کنترل شده و مرگ و میر ماهیان در معرض غلظت‌های مختلف سموم در زمان‌های ٢٤، ٤٨، ۷۲ و ۹٦ ساعت پس از افزودن این سم، ثبت گردید (ریکو و همکاران، ۲۰۱۱).

آزمایش سمیت زیر کشنده: به منظور انجام تست سمیت زیر کشنده بچه‌ماهیان در مجاورت سه غلظت متفاوت از سم دیازینون (شامل: ۰ (شاهد)، ۰/۵، ۱ میلی‌گرم بر لیتر)، در سه تکرار و در طول ۱۵ روز دوره‌ی آزمایش قرار گرفتند. غلظت‌های سم در این آزمایش براساس آزمایش سمیت کشنده تعیین گردید به‌طوری‌که غلظت‌های آزمایش زیرکشنده حدود ۱۰ درصد و ۲۰ درصد مقادیر بدست آمده از LC_{50} 96h بوده و بر این اساس انتخاب گردید. بچه‌ماهیان بطور تصادفی در نه تانک فایبرگلاس ۱۰۰ لیتری توزیع شدند. در هر تانک تعداد ۱۰ 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 (یک درصد وزن بدن) انجام گرفت و ٢٤ ساعت پیش از کشتار غذادهی به ماهیان آزمایشی متوقف گردید. در دوره‌ی آزمایش سمیت زیر کشنده، هر روز آب به میزان ۱۰ درصد تعویض می‌شد و دوباره این غلظت‌های سموم برای هر تانک تنظیم می‌گردید.

نمونه‌برداری از خون و بافت‌ها: کشتار ماهیان، خون‌گیری و نمونه‌برداری از بافتها، در سه زمان و در روزهای پنجم، دهم و پانزدهم پس از اولین مواجهه‌ی این جانوران با سم انجام شد. در هر کشتار، ابتدا از ماهیان متعلق به هر تیمار به طور جداگانه با استفاده از قطع ساقه دمی خون‌گیری صورت گرفت و برای آنکه میزان خون مورد نیاز تامین شود، بر اساس پیشنهاد ترکر و همکاران (۲۰۰٤) از حدود ٤ قطعه ماهی به ازای هر تیمار خونگیری انجام شد و نمونه‌های خون در لوله‌های اپندورف ۲ میلی‌لیتری حاوی هپارین نگهداری شد. سپس از بافت‌های مغز و عضله اسکلتی ماهیان، نمونه برداشته شده و در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد منجمد گردید.

تهیه پلاسما و Supernatant: به منظور تهیه پلاسما، خون گرفته شده از ماهیان درون همان لوله‌های اپندورف، سانتریفیوژ گردید. این عملیات با دستگاه میکروسانتریفیوژ و با سرعت ٤٥٠٠ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه با دستگاه Eppendorf AG 22311 Hamburg, centrifuge 5415D، صورت گرفته و پلاسمای به دست آمده نیز تا انجام مراحل آزمایش‌های بیوشیمیایی در فریزر ۷۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. همچنین بافت‌های ماهیچه و مغز حاصل از نمونه‌برداری با کمک محلول بافر فسفات (۰/۱ مولار با pH=۷ و حاوی ۱ درصد ترایتون ایکس۱۰۰) به صورت دستی هموژن شده و سپس Supernatant حاصل از سانتریفیوژ (مدت ۲۰ دقیقه در ۱۰۰۰ گرم و دمای چهار درجه سانتی‌گراد) نمونه‌ها جدا گردید و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای استفاده در مراحل بعدی در فریزر نگهداری شد تا به عنوان منبع کولین استراز مورد استفاده قرار گیرد (المن و همکاران، ۱۹٦۱).

سنجش ترانس آمینازها: اندازه‌گیری سطح فعالیت آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT) پلاسما با استفاده از کیت شرکت پارس آزمون (ساخت ایران) و توسط دستگاه فتومتر S200-UV/VIS England بر اساس مقدار مصرف NADPH و تبدیل آن به NAD^+ صورت گرفت که یک واکنش برگشت پذیر است (توماس، ۱۹۹۸). سطح فعالیت این آنزیم‌ها بر اساس واکنش بیوشیمیایی فوق و در طول موج ۳٤۰ نانومتر و در طی ۳ دقیقه اندازه‌گیری شده و بر اساس فرمول اختصاصی کاتالوگ شرکت پارس آزمون محاسبه گردید.

سنجش پروتئین کل و فعالیت آنزیم استیل کولین استراز: میزان غلظت پروتئین کل ماهیچه و مغز با روش لوری و همکاران (۱۹۵۱) در طول موج ٥٤۰ نانومتر به وسیله‌ی دستگاه الایزا (مدل BioTek Elx 808) تعیین گردید. در این روش از فولین به عنوان معرف رنگی استفاده شد. سپس از روی منحنی حاصل و معادله‌ی خط آن، غلظت پروتئین موجود در نمونه بافت‌ها بدست آمد. اندازه‌گیری میزان فعالیت ویژه‌ی کولین استرازی با روش المن و همکاران (۱۹٦۱) در طول موج ٤۲۰ نانومتر به وسیله‌ی دستگاه الایزا میکروپلیت ریدر انجام شد. بدین منظور، مخلوط رونشین (آنزیم)، بافر فسفات ۰/۱ مولار، معرف رنگی DTNB و استیل تیوکولین آیوداید، به هر تیوب افزوده شده و در نهایت حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول نهایی به هر یک از چاهک‌های میکروپلیت انتقال پیدا کرد و میزان جذب در یک دقیقه (O.D./min) توسط دستگاه خوانده شد.

انجام محاسبات و آنالیز آماری: اطلاعات به دست آمده از آزمایش سمیت کشنده بچه فیل ماهیان و مقادیر حاصل از میزان مرگ‌ومیر آنها توسط نرم‌افزار POLO-PC 2002 (تحت امتیاز دانشگاه تهران)

و بر اساس روش Probit program (USEPA, 1985) تجزیه و تحلیل گردید. حداکثر غلظت مجاز سم[1] (MATC) بر اساس فرمول پیشنهادی OECD (2001) و از طریق LC_{50} 96-h تقسیم بر عدد ۱۰ و همچنین حداقل غلظت موثر[2] (LOEC) برابر با LC_{10} 96-h به دست آمدند. فعالیت ویژه‌ی آنزیم‌های ترانس آمینازی و استیل کولین استراز به ترتیب بر اساس واحد بین المللی بر لیتر (U/L) و نانومول استیل تیوکولین هیدرولیز شده در دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین[3]، به عنوان عامل وابسته محاسبه شدند. آنالیز آماری داده‌ها از طریق آنالیز واریانس دوطرفه انجام 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- تعیین میانه غلظت کشنده

در مرحله سازگاری بچه ماهیان، هیچ گونه تلفاتی در بین آنها دیده نشد، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت مرگ و میر ماهیان در طول آزمایش ناشی از افزودن سم به آب تیمارها باشد. نتایج بیانگر آن بود که با افزایش غلظت ترکیب مورد مطالعه، میزان مرگ و میر بچه‌ماهیان افزایش یافت. بر اساس میزان مرگ و میر در آزمایش سمیت کشنده، میانگین مقادیر LC_{10}، LC_{50}، LC_{90} در ۲٤، ٤۸، ۷۲ و ۹٦ ساعت برای آفت‌کش دیازینون روی بچه فیل ماهیان محاسبه گردیده و در جدول ذیل نشان داده شده است (جدول ۱).

جدول ۱- میانگین غلظت حاصل از آزمایش سمیت کشنده دیازینون در فیل ماهی

غلظت کشنده (میلی‌گرم بر لیتر)	۲٤ ساعت	٤۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹٦ ساعت
LC_{10}	٥/٦٥	٥/۱٥	٤/۷۲	٤/۲۸
LC_{50}	۷/۰۹	٦/٦۳	٥/۸۹	٥/٤۷
LC_{90}	۸/۲٤	۷/۷۷	٦/۰۲	٥/۸٦

1- Maximum Allowable Toxicant Concentration
2- Lowest Observed Effect Concentration
3- nmol hydrolyzed ASCh /min.mg protein-1

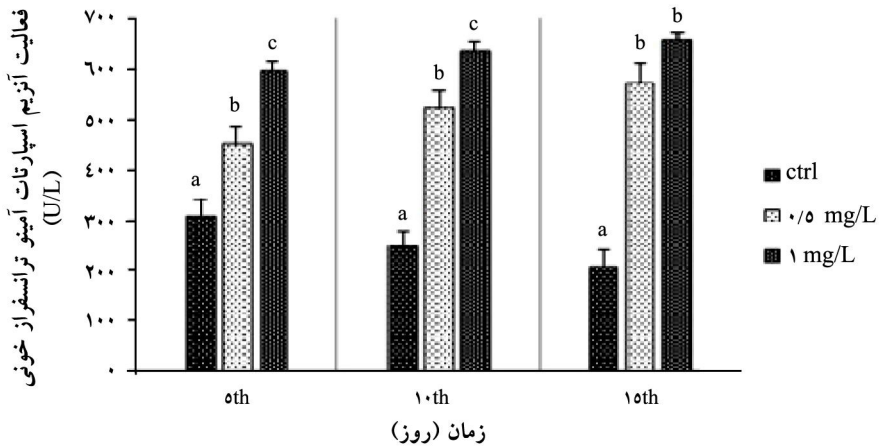
نتایج بدست آمده برای LC_{50} در مدت ۹٦ ساعت نشان می‌دهد که با افزوده شدن به غلظت سموم مورد مطالعه، میزان مرگ و میر بچه‌ماهیان افزایش یافت. به علاوه، با افزایش ساعات آزمایش میزان غلظت کمتری از سموم لازم است تا ۵۰ درصد از جمعیت ماهیان تلف شوند. بر طبق این نتایج LC_{50} 96-h، LOEC و MATC دیازینون برای بچه فیل ماهیان به ترتیب برابر ۵/٤۷، ٤/۲۸ و ۰/٥٤ میلی‌گرم بر لیتر محاسبه شد. مقایسه‌ی مقدار LC_{50} ۹٦ ساعت با جدول طبقه‌بندی سمیت آفت‌کش‌ها در موجودات زنده (دایرهٔ المعارف آفت‌کش‌ها، ۱۹۹۳) نشان می‌دهد که دیازینون برای گونه فیل ماهی جزء سموم با «سمیت متوسط» محسوب می‌شود.

۲- یافته‌های شاخص‌های آنزیمی

الف) آسپارتات آمینوترانسفراز (AST)

نتایج تجزیه واریانس نشان می‌دهد که بین غلظت‌های مختلف دیازینون در سطح فعالیت AST پلاسما اختلاف معنی‌داری وجود داشته است ($P<۰/۰٥$) ولی در بین زمان‌های مواجهه در سطح فعالیت این آنزیم تفاوت معنی‌داری دیده نشد ($P>۰/۰٥$). همچنین اثر متقابل غلظت- زمان در مواجهه‌ی جانوران آزمایشی با سم، حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار در سطح فعالیت AST پلاسما است ($P<۰/۰٥$).

نتایج مقایسه میانگین‌های آنزیم AST خون ماهیان گروه‌های آزمایشی در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج بیانگر این است که در روزهای پنجم و دهم آزمایش سمیت زیر کشنده بین تمام گروه‌های کنترل، ۰/٥ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر تفاوت معنی‌دار وجود داشت ($P<۰/۰٥$). در روز پانزدهم آزمایش بین میانگین فعالیت آنزیم گروه کنترل با دو گروه دیگر اختلاف معنی‌دار دیده شد ولی بین دو گروه دیگر هیچ اختلاف آماری مشاهده نگردید ($P>۰/۰٥$). شکل ۱ نشان می‌دهد که با افزایش غلظت دیازینون در آب، فعالیت آنزیم AST در پلاسمای ماهیان آزمایشی افزایش یافته است، بنابراین یک رابطه مستقیم بین غلظت سم دیازینون با شاخص ذکر شده دیده می‌شود.

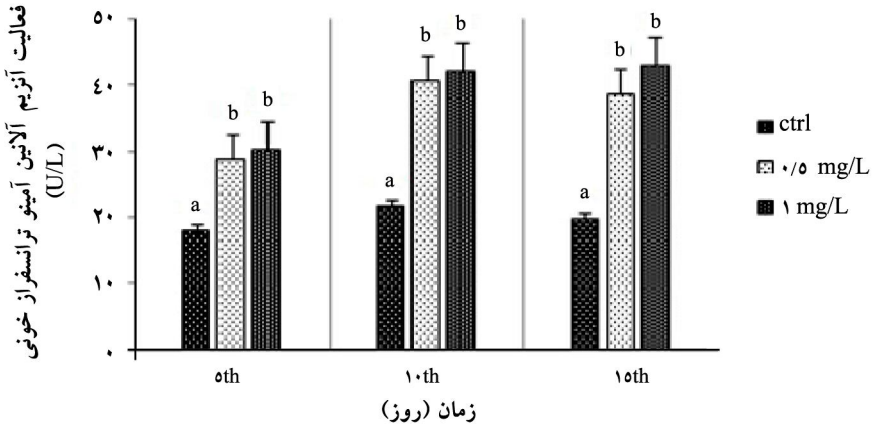


شکل ۱- اثر غلظت‌های دیازینون روی فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز پلاسمای بچه فیل ماهیان طی روزهای ۵، ۱۰ و ۱۵ پس از شروع آزمایش (حروف یکسان بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ = α می‌باشد)

ب) آلانین آمینوترانسفراز (ALT)

نتایج تجزیه واریانس نشان می‌دهد که بین غلظت‌های مختلف دیازینون در سطح فعالیت ALT پلاسما اختلاف معنی‌داری وجود داشته است (P<۰/۰۵) ولی در بین زمان‌های مواجهه در سطح فعالیت این آنزیم تفاوت معنی‌داری دیده نشد (P>۰/۰۵). همچنین اثر متقابل غلظت- زمان در مواجهه‌ی جانوران آزمایشی با سم، بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح فعالیت ALT پلاسما است (P>۰/۰۵).

نتایج مقایسه میانگین‌های آنزیم ALT خون ماهیان گروه‌های آزمایشی در شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج بیانگر این است که در روزهای پنجم، دهم و پانزدهم آزمایش سمیت زیر کشنده بین فعالیت آنزیم ALT پلاسمای ماهیان گروه کنترل (۰ میلی‌گرم بر لیتر) با دو گروه در معرض غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر دیازینون تفاوت معنی‌دار وجود داشته است (P<۰/۰۵)، ولی بین میانگین فعالیت آنزیم دو گروه ذکر شده با یکدیگر هیچگونه اختلاف آماری دیده نمی‌شود (P>۰/۰۵). شکل ۲ نشان می‌دهد که با افزایش غلظت دیازینون در آب، فعالیت آنزیم ALT در پلاسمای ماهیان آزمایشی افزایش یافته است، بنابراین یک رابطه مستقیم بین غلظت سم دیازینون با شاخص ذکر شده دیده می‌شود.



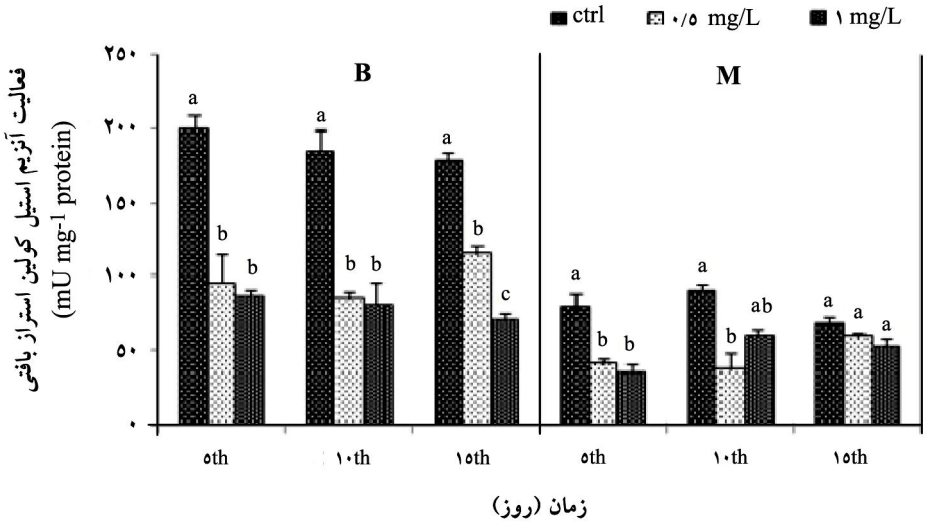
شکل ۲- اثر غلظت‌های دیازینون بر روی فعالیت آنزیم آلانین آمینوترانسفراز پلاسمای بچه فیل ماهیان طی روزهای ۵، ۱۰ و ۱۵ پس از شروع آزمایش (حروف یکسان بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ = α می‌باشد)

ج) استیل کولین استراز (AchE)

نتایج تجزیه واریانس نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌داری بین فعالیت AChE مغز و عضله اسکلتی در بین گروه‌های تحت مواجهه با غلظت‌های دیازینون وجود داشته است (P<۰/۰۵). علاوه بر این در بین زمان‌های مواجهه با این سم، در سطح فعالیت آنزیمی مغز و ماهیچه اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (P<۰/۰۵). همچنین اثر متقابل غلظت‌های سم و زمان مواجهه‌ی جانور با آنها، بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار در فعالیت آنزیم AChE در این دو بافت است.

نتایج مقایسه میانگین‌های آنزیم AChE بافت‌های مغز و ماهیچه اسکلتی بچه فیل ماهیان در شکل ۳ نشان داده شده است. یافته‌های فعالیت کولین استراز مغزی بیانگر این است که در روزهای پنجم و دهم آزمایش بین گروه کنترل با دو گروه دیگر (۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر) تفاوت معنی‌دار وجود داشت (P<۰/۰۵) ولی بین دو گروه مذکور هیچ اختلاف آماری مشاهده نگردید (P>۰/۰۵). در روز پانزدهم آزمایش بین میانگین سطح آنزیم مغز در تمامی غلظت‌ها (۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر) اختلاف معنی‌دار وجود داشت (P<۰/۰۵). همچنین نتایج فعالیت استیل کولین استراز عضله اسکلتی نشان داد که در روزهای پنجم و دهم آزمایش بین گروه کنترل با سایر گروه‌ها تفاوت معنی‌دار دیده شد (P<۰/۰۵) ولی در روز پانزدهم آزمایش اختلاف آماری در بین هیچ کدام از گروه‌های آزمایشی

وجود نداشته است (P>۰/۰۵). از شکل ۳ می‌توان دریافت که افزایش غلظت سم دیازینون، سبب ایجاد یک روند کاهشی در فعالیت کولین استرازی در هر دو بافت مغز و ماهیچه شده است. به عبارت بهتر، مهارشدگی آنزیم AChE رابطه مستقیمی با غلظت آفت‌کش دارد. گرچه ارتباط دوز- پاسخ در فعالیت کولین استرازی مغز بیش از ماهیچه قابل مشاهده بوده است.



شکل ۳- اثر غلظت‌های دیازینون بر روی فعالیت آنزیم استیل کولین استراز بافت مغز (بخش اول نمودار که با حرف انگلیسی B مشخص شده) و عضله اسکلتی (بخش دوم نمودار که با حرف انگلیسی M مشخص شده) بچه فیل ماهیان طی روزهای ۵، ۱۰ و ۱۵ پس از شروع آزمایش (حروف یکسان بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح α=۰/۰۵ می‌باشد)

بحث

در این پژوهش علاوه بر تعیین درجه سمیت دیازینون، اثرات سم دیازینون بر دو شاخص آنزیمی عمومی (ALT و AST) و یک شاخص آنزیمی اختصاصی (AChE) در فیل ماهی (*Huso huso*) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده از آزمایش سمیت کشنده نشان داد که میزان غلظت کشنده در طی ۹۶ ساعت برای ۵۰ درصد از بچه فیل ماهیان برابر با ۵/۴۷ میلی‌گرم بر لیتر می‌باشد و بر پایه‌ی این کمیت و مقایسه‌ی آن با جدول طبقه‌بندی سمیت آفت‌کش‌ها در موجودات زنده دیازینون با درجه سمیت «متوسط» برای این گونه محسوب می‌گردد. شاملوفر و همکاران (۲۰۰۶) مقدار LC_{50} ۹۶

ساعت دیازینون را برای بچه فیل ماهیان، ۵/۸۲ میلی‌گرم بر لیتر محاسبه و این آفت‌کش را برای این گونه جز مواد سمی دسته‌بندی کردند. نتایج پژوهش مذکور تا حد زیادی مشابه با نتایج این پژوهش است. به علاوه، پیش از این سمیت کشنده دیازینون بر روی برخی گونه‌های دیگر ماهیان خاویاری گزارش شده است. بر اساس این گزارش‌ها، LC_{50} 96-h سم دیازینون برای قره برون (*Acipenser persicus*) و اوزون برون (*Acipenser stellatus*) به ترتیب ٤/٣٨ و ٢/٥٤ میلی‌گرم بر لیتر (پژند، ۱۹۹۹) و برای ماهی شیپ (*Acipenser nudiventris*) ۰/۳٦ میلی‌گرم بر لیتر به دست آمد (محمدنژاد شموشکی، ۲۰۰۵). البته پژوهشگر دیگری، نتایج متفاوتی از LC_{50} 96-h سم دیازینون برای گونه‌های اوزون برون (*Acipenser stellatus*) و شیپ (*Acipenser nudiventris*) ارایه کرده که به ترتیب ٤/٩٨ و ٧/٦٧ میلی‌گرم در لیتر می‌باشند (خوشباور رستمی و همکاران، ۲۰۰۵؛ خوشباور رستمی و سلطانی، ۲۰۰۵). کمیت میانه غلظت کشنده برای سم دیازینون بر ماهی سفید (*Rutilus frissi kutum*)، کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) و ماهی سیم (*Abramis brama*) به ترتیب ۰/۳٤، ۱/۹ و ۸/۱ میلی‌گرم بر لیتر گزارش شده است (نصری تجن، ۱۹۹٦). همچنین این کمیت برای دیازینون در بچه ماهیان کلمه (*Rutilus rutilus caspicus*) و ماهی گورخری (*Brachydanio rerio*) و سیاه کولی (*Vimba vimba persa*) به‌ترتیب ۱۲/۸۱، ۲/۱۲ و ۰/۰۹ میلی‌گرم بر لیتر بدست آمد (انصاری و اسلام کومار، ۱۹۸۷؛ محمدنژاد شموشکی و شاهکار، ۲۰۰۹؛ پاشایی چلکاسری و همکاران، ۲۰۱۲). بنابراین در مقایسه از نظر حساسیت گونه‌های مختلف ماهیان در برابر سم دیازینون به صورت «سیاه کولی > سفید > شیپ (محمدنژاد شموشکی، ۲۰۰۵) > کپور نقره‌ای > ماهی گورخری > اوزون برون (پژند، ۱۹۹۹) > قره برون > اوزون برون (خوشباور رستمی و همکاران، ۲۰۰۵) > فیل ماهی (شاملوفر و همکاران، ۲۰۰٦) > شیپ (خوشباور رستمی و سلطانی، ۲۰۰۵) > سیم > کلمه» می‌باشد.

نتایج آنزیم‌های سرمی فیل ماهی حاکی از این است که با افزایش غلظت دیازینون در آب، فعالیت آنزیم‌های AST و ALT در پلاسمای ماهیان آزمایشی افزایش یافته است، بنابراین یک رابطه مستقیم بین غلظت سم دیازینون با شاخص‌های ذکر شده دیده می‌شود. اثر سم دیازینون بر شاخص‌های بیوشیمیایی پلاسمای خون کپور معمولی و قزل آلای رنگین کمان نیز در توافق با نتایج این پژوهش نشان داد که فعالیت آلانین و آسپارتات آمینوترانسفراز پلاسمای گونه‌های مورد پژوهش با افزایش غلظت این سم افزایش معنی‌داری داشته است (لوسکوا و همکاران، ۲۰۰۲؛ بنایی و همکاران، ۲۰۱۰).

همچنین در تائید این یافته‌ها، گزارش شده است که برخی آنزیم‌های سرمی (از جمله AST و ALT) ماهیان پس از مواجهه با سموم گالیم و سایپرمترین و اندوسولفان نیز افزایش یافتند (یانگ و چن، ۲۰۰۳؛ گابریل و همکاران، ۲۰۱۱؛ باچتتا و همکاران، ۲۰۱۱). بر اساس گزارش شاهسونی و همکاران (۲۰۰۷) در مورد میزان طبیعی آنزیم‌های سرمی ماهیان خاویاری، میزان نرمال آنزیم ALT و AST در کل جمعیت فیل ماهی دریای خزر به‌ترتیب ۱/۱٤±٦/۰٦ و ٦۰/۲۹±۲۹۰/۲۷ واحد بین‌المللی در لیتر (IU/L) بوده است، که کمیت‌های ذکر شده به ویژه در مورد AST به نتایج این پژوهش نزدیک است.

یافته‌های فعالیت کولین استراز بافتی نشان داد که افزایش غلظت سم دیازینون، سبب ایجاد یک روند کاهشی در فعالیت کولین استرازی مغز و ماهیچه شده است. به عبارت بهتر، مهارشدگی آنزیم AChE رابطه‌ی مستقیمی با غلظت آفت‌کش دیازینون دارد. گرچه ارتباط دوز-پاسخ در فعالیت کولین استرازی مغز بیش از ماهیچه قابل مشاهده بوده است. نتایج این پژوهش با یافته‌های کونگ و همکاران (۲۰۰۸) مطابق بوده است، به طوری که در پژوهش مذکور آفت‌کش دیازینون سبب مهار کولین استراز مغزی و تشکیل کمپلکس Diazinon-sterase در ۸۰ درصد ماهیان سرماری (*Channa striata*) در معرض آفت‌کش شده بود. به علاوه این پژوهشگر نشان داد که دیازینون می‌تواند روی رشد ماهیان اثر منفی (در حدود ۳۰ درصد) داشته باشد (کونگ و همکاران، ۲۰۰۹). همچنین دیازینون و کلرپیریفوس سبب مهارشدگی AChE در بافت‌ها و سرم خون کپور معمولی شده‌اند (دمبله و همکاران، ۲۰۰۰). آفت‌کش‌های فسفره با مهار کولین استراز بافتی و افزایش نرخ مصرف اکسیژن ماهیان در معرض، می‌توانند سبب مرگ و میر آنها گردند (پاتیل و دیوید، ۲۰۰۸). مهارشدگی این آنزیم عصبی، سبب تونوس ماهیچه‌ها و احتمالا فلج عضلانی می‌باشد که این حالت فلجی در عضلات تنفسی از مهمترین دلایل مرگ و میر ماهیان است (سینگ و همکاران، ۲۰۰٤). بنابراین به نظر می‌رسد در این پژوهش مرگ و میر بچه فیل ماهیان تحت تیمار با دیازینون که با اختلالات عصبی و تنفسی توام بوده است، ناشی از مهارشدگی آنزیم استیل کولین استراز در بافت‌های مغز و عضلات این جانوران باشد. در گزارش فرنزی و همکاران (۱۹۹۷) فعالیت استیل کولین استراز بافت‌های مغز، قلب، عضله اسکلتی و کبد تاس ماهی سیبری به ترتیب برابر با ۱۸۳/۲، ٤۷/۹، ۳۰/۱ و ۲۹/۵ mU/min/mg protein ثبت شده است که کمیت‌های ذکر شده به ویژه در مورد AChE مغزی به نتایج این پژوهش نزدیک است.

در نهایت می‌توان گفت، با وجود اینکه به وسیله‌ی آزمایش‌های سمیت حاد و تعیین LC_{50} می‌توان مقادیری مانند حداقل غلظت موثره، حداکثر غلظت مجاز حداکثر و درجه سمیت ترکیب دیازینون را محاسبه کرد، لیکن غلظت‌هایی از این آفت‌کش که از نظر آزمون کشندگی، غیرموثر و مجاز برای گونه‌های غیرهدف شناخته می‌شوند، می‌توانند باعث بروز تغییراتی در شاخص‌های آنزیمی سرم خون و مهارشدگی استیل کولین استرازی در آنها گردند. بنابراین پیشنهاد می‌گردد پس از فصل سم‌پاشی اقدام به رهاسازی بچه‌ماهیان خاویاری حاصل از تکثیر مصنوعی صورت گیرد تا از خطرات احتمالی و تلفات بالای ناشی از باقیمانده سموم کشاورزی به ویژه حشره‌کش‌های فسفره آلی نظیر دیازینون جلوگیری شود. همچنین ضروری است اندازه‌گیری مقادیر باقیمانده‌ی آفت‌کش‌های مهم در برنامه‌های پایش مداوم محیط زیست به ویژه در مصب رودخانه‌های دریای خزر انجام گیرد. امید است این برنامه‌ها بتواند در حفظ ذخایر ماهیان مهاجر بومی موثر باشد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله نویسندگان مقاله از جناب آقای مهندس مخدومی کارشناس‌ارشد مرکز تکثیر و پرورش ماهی شهید رجایی ساری، آقای مهندس رضا عاشوری و سرکار خانم موسوی مسئولین آزمایشگاه شیلات و بیماری‌های آبزیان گروه شیلات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

1. Abbasian, H., Ashayeri, A., and Hasanzadeh, H. 2008. Agricultural drainage water in the Caspian sea and their ecological impacts. Aquaculture Sciences. 5: 123-129.
2. Abdoli, A. 1999. Inland water fishes of Iran. Iranian Museum of Nature and Wild Life. (1st Ed.) Tehran, Iran. 387p. (In Persian)
3. Aker, WG., Hu, X., Wang, P., Hwang, H.M. 2008. Comparing the relative toxicity of malathion and malaoxon in blue catfish *Ictalurus furcatus.* Environmental Toxicology. 23: 548-554.
4. Alexander D. Serum cholinesterase. Medline Plus Medical Encyclopedia. 2007, Updated by: Daniel R, Alexander MD, Department of Internal Medicine, St. Mary's Hospital, Leonardtown, MD. Review provided by VeriMed Healthcare Network. Update Date: 5/25/2007. Available at www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/003358.htm.
5. Ansari, B.A.M. and Aslam Kumar, K. 1987. Diazinon toxicity: Activities of

acetycholinesterase and Phosphatase in the nervous tissue of zebra Danio, *Brachydanio rerio* (Cyprinidae). Acta Hydrochemistry and Hydrobiology. 15:301-306.
6. Bacchetta, C., Cazenave, J., Parma, M.J. and Biancucci, G.F. 2011. Biochemical stress responses in tissues of the cichlid fish Chichlasoma dimerus exposed to a commercial formulation of endosulfan. Archives of Environmental Contamination Toxicology. 61: 453-460.
7. Banaee, M., Sureda, A., Mirvaghefi, A.R., and Ahmadi, K. 2010. Effects on diazinon on biochemical parameters of blood in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Pesticide Biochemistery and physiology. 99(1): 1-6.
8. Cong, N.V., Phuong, N.T., and Bayley, M. 2009. Effects of repeated exposure of diazinon on cholinesterase activity and growth in snakehead fish (*Channa striata*). Ecotoxicology and Environmental Safety. 72: 699-703.
9. Cong, N.V., Thanh Phuong, N., and Bayley, M. 2008. Brain cholinesterase response in the snakehead fish (*Channa striata*) after field exposure to diazinon. Ecotoxicology and Environmental Safety. 71: 314-318.
10. Dembélé, K., Haubruge, E., and Gasper, C. 2000. Concentration effects of selected insecticides on brain acetylcholinesterase in common carp (*Cyprinus carpio* L.). Ecotoxicology and Environmental Safety. 45: 49-54.
11. Ebrahimi, A. 2005. Clinical interpretation of laboratory tests (1st Ed.). Teimorzadeh-tabib press, Tehran, Iran. 622p. (In Persian)
12. Ellman, G.L., Courtney, K.D., Featherstone R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical pharmacology. 7: 88-90, in 81: 91-95.
13. Ferenczy, J., Szegletes, T., Bálint, T., Abrahám, M., and Nemcsók, J. 1997. Characterization of acetylcholinesterase and its molecular forms in organs of five freshwater teleosts. Fish physiology and biochemistry. 16: 515-529.
14. Gabriel, U.U., Jack, I.R., Egobueze, E., and Edori, O.S. 2011. Impact of Cypermethrin on selected enzymes in Tissues of *Heterobranchus bidorsalis*. West african journal of applied ecology. 18: 121-127.
15. Kajiwara, N., Ueno, D., Monirith, I., Tanabe, S., Pourkazemi, M., and Aubrey, D.G. 2003. Contamination by organochlorine compounds in sturgeons from Caspian Sea during 2001-2002. Marine pollution buletein. 46:741-747.
16. Khoshbavar Rostami, H.A., and Soltani, M. 2005. The effect of diazinon on hematological indicies and LC50 (96h) of *Acipenser nudiventris*. Iranian scientific fisheries journal. 14(3): 49-60. (In Persian)
17. Khoshbavar Rostami, H.A., Soltani, M., and Yelghi, S. 2005. Effects of diazinon on the histopatological profiles of *Acipenser stellatus* and detetmination of LC_{50}. Journal of agricultural sciences and natural resources. 5:100-108. (In Persian)
18. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. 1951. Protein

measurement with the Folin phenol reagent. The journal of biological chemistry. 193: 265-275.
19. Luskova, V., Svoboda, M., and Kolarova, J. 2002. The effect of diazinon on blood plasma biochemistry in carp (*Cyprinus carpio* L.). Acta veterinaria Brno 71: 117-123.
20. Mdegela, R.H., Mosha, R.A., Sandvik, M., and Skaare, J.U. 2010. Assessment of acetylcholinesterase activity in *Clarias gariepinus* as a biomarker of organophosphate and carbamate exposure. Ecotoxicology. 19: 855-863.
21. Mohammad Nejad Shamoushaki, M., and Shahkar, E. 2009. Determination the lethal concentration (LC_{50} 96 H) of chloropyrifos and diazinon on (*Rutilus rutilus caspicus*). Journal of fisheries. 4: 133-140. (In Persian)
22. Mohammad Nejad Shamoushaki, M. 2005. Determination LC_{50} 96h of heavy metals (Lead, Zinc and Cadmium) and agricultural pesticides (Diazinon, Hinozan and Propiconazole) on *Acipencer nudiventris.* M.Sc thesis in fisheries sciences. Islamic Azad University, Lahijan branch. Pp: 1-4. (In Persian)
23. Monteiro, M., Quintaneiro, C., Morgado, F., Soares, A., and Guilhermino, L. 2005. Characterization of the cholinesterases present in head tissues of the estuarine fish Pomatoschistus microps: Application to biomonitoring. Ecotoxicology and environmental safety. 62: 341-347.
24. Nasri Tejen, M. 1996. Determination of LC_{50} Diazinon (Granul 5% and Emulsion 60%) on Bream of Anzali wetland. M.Sc thesis in fisheries sciences. Islamic Azad University, Lahijan branch. Pp: 33-48. (In Persian)
25. Obomanu, F.G., Gabriel, U.U., Edori, O.S., and Emetonjor, J.N. 2009. Biomarker enzymes in muscle tissue and organs of *Clarias gariepinus* after intramascular injection with aqueous extracts of *Lepidagathis alopecuroides* leaves. Journal of Medicinal Plants Research. 3(12): 995-1001.
26. OECD. 1992. Guideline for testing of chemicals No. 203. Section: Fish, acute toxicity test, Adopted by the Council on 17th July. Pp: 1-9.
27. OECD. 2001. Guideline for testing of chemicals No. 210. Section 2. Effect of some biotic system direction. Pp: 1-39.
28. Pajand, Z. 1999. Determination LC50 96h of Butachlor and Diazinon pesticides on *Acipencer stellatus* And *Acipencer persicus.* M.Sc thesis in fisheries sciences. Islamic Azad University, Lahijan branch. Pp: 45-60. (In Persian)
29. Pashaei Chalkasari, H., Farokhrooz, M., Zamini, A.A., and Ebrahimian, Y. 2012. Determination LC_{50} 96h of Diazinon and Butachlor on *Vimba vimba persa*. Journal of oceanology. 3(9): 63-68. (In Persian)
30. Patil, V.K., and David, M. 2008. Behaviour and respiratory dysfunction as an index of malathion toxicity in the freshwater fish, *Labeo rohita* (Hamilton). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 8: 233-237.
31. Pesticide Dictionary. 1993. Concise international chemical assessment document No. 13, Prepared by: World health organization, Geneva. Pp: 333-348.
32. Pezzementi, L., and Chatonnet, A. 2010. Evolution of cholinesterases in the

animal kingdom. Chemico-biological interactions. 187: 27-33.
33. Rico, A., Waichman, A.V., Geber-Correa, R., Van den Brink, P.J. 2011. Effects of malathion and carbendazim on Amazonian freshwater organisms: comparison of tropical and temperate species sensitivity distributions. Ecotoxicology. 20: 625-634.
34. Rodríguez-Fuentes, G., Armstrong, J., and Schlenk, D. 2008. Characterization of muscle cholinesterases from two demersal flatfish collected near a municipal wastewater outfall in Southern California. Ecotoxicology and environmental safety, 69: 466-471.
35. Shahsavani, D., Mohri, M., and Taghvaeimoghadam, A. 2007. Determination of concentration of some blood serum enzymes of *Huso huso*. Journal of vertinary Research. 62(3): 127-129. (In Persian)
36. Shamloofar, M., Kamali, A., Piree, M., Yaghmaie, F., and Makhdomi, N. 2006. Determination of LC_{50} and assessment of sub lethal concentration on hematological parameters in *Huso huso*. Iranian scientific fisheries journal. 15(4): 69-79. (In Persian)
37. Shayeghi, M., Khoobdel, M., Bagheri, F., and Abtahi, M. 2008. Azinphos-methyl and diazinon residues in Gorganrood and Gharesoo river Golestan province. Journal of school of public health and institute of public health research. 6(1): 75-82. (In Persian)
38. Singh, SK., Tripathi, PK., Yadav, R.P., Singh, D., and Singh, A. 2004. Toxicity of malathion and carbaryl pesticides: effects on some biochemical profiles of the freshwater fish *Colisa fasciatus*. Bulletin of environmental contamination and toxicology. 72: 592-599.
39. Talebi Jahromi, Kh. 2007. Pesticides toxicology. University of Tehran press. (2nd Ed.) Tehran,Iran. 492p. (In Persian)
40. Tang, J., Cao, Y., Rose, R.L., Brimfield, A.A., Dai, D., Goldstein, J.A., and Hodgson, E. 2001. Metabolism of chlorpyrifos by human cytochrome P450 isoforms and human, mouse, rat liver microsomes. Drug metabolism and disposition 29: 1201-1204.
41. Thomas, L. 1998. Alanine aminotransferase (ALT), Aspartate aminotransferase (AST). In: Thomas, L., editor. Clinical laboratory diagnostics. 1st ed. Frankfurt. TH-Books verlagsgeselischaft, Pp: 55-65.
42. Turker, A., Ergon, S., and Yigit, M. 2004. Changes in blood levels and mortality rate in different sized rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following direct transfer to sea water. The Israeli journal aquaculture-bamidgeh. 56: 51-58.
43. USEPA. 1985. Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms. 3rd Ed. Environmental protection agency, Environmental monitoring and support laboratory, Cincinnati, OH. EPA-600/4-85/013.

44. Varo, I., Amat, F., and Navarro, J. 2008. Acute toxicity of dichlorvos to *Aphanius iberus* (Cuvier & Valenciennes, 1846) and its anti-cholinesterase effects on this species. Aquatic toxicology. 88: 53-61.
45. Yang, J.L., and Chen, H.C. 2003. Serum metabolic enzyme activities and hepatocyte ultrastructure of common carp after gallium exposure. Zoological studies. 42(3): 455-461.