شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۶۷، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۳/۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱/۲۱

ص ۵۶۵-۵۸۳

بررسی فعالیت کولین استرازی بافت‌های سیاه ماهی (*Capoeta capoeta gracilis*, Keyserling, 1861) در حوضهٔ گرگان‌رود به‌منزلهٔ شاخصی زیستی در پایش محیط زیست

❖ **نیما شیری:** دانشجوی کارشناسی‌ارشد،گروه شیلات، دانشکدهٔ منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ایران
❖ **علیرضا میرواقفی*:** دانشیار، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ایران
❖ **خلیل طالبی جهرمی:** استاد گروه گیاه‌پزشکی، دانشکدهٔ علوم کشاورزی، دانشگاه تهران، ایران
❖ **غلامرضا رفیعی:** استاد گروه شیلات، دانشکدهٔ منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ایران

چکیده

شاخص‌های زیستی سیستم‌های هشدار اولیه در مواجههٔ جانداران آبی با آلاینده‌ها هستند. در میان آن‌ها اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های استرازی و خصوصاً کولین استرازها در بافت‌های ماهی شاخصی برای مواجهه با آفت‌کش‌های فسفرهٔ آلی و کاربامات‌هاست و از این شاخص در مطالعات مختلف استفاده شده است. سیاه‌ماهیان از ایستگاه‌های تعیین‌شده در حوضهٔ گرگان‌رود در چهار فصل صید شدند و از بافت‌های کبد، ماهیچه و مغز آن‌ها نمونه‌برداری شد. فعالیت ویژه و درصد مهارشدگی استرازهای عمومی (به روش ون اسپرن) و استیل کولین استراز (به روش المن) اندازه‌گیری شد. نتایج حاکی از آن بود که سطح آنزیمی هر سه بافت بین ایستگاه‌ها تفاوت معنی‌داری با هم داشت و بیشترین درصد مهارشدگی آنزیم‌های کولین استرازی در ایستگاه پایین‌دست (ایستگاه ۵) گرگان‌رود و در فصل تابستان به میزان ۳۸/۷۵، ۳۱/۰۱ و ۱۰/۶۲ درصد به ترتیب در بافت‌های کبد، ماهیچه و مغز مشاهده شد. بنابراین استفاده از استیل کولین استراز کبدی این گونه ماهی به دلیل مهارشدگی بیشتر نسبت به آنزیم سایر بافت‌ها، به‌منزلهٔ شاخصی زیستی در تعیین و درجه‌بندی آلودگی اکوسیستم‌های آب‌های جاری مورد پایش، توصیه می‌شود. همچنین بافت ماهیچه به علت وجود بوتیریل کولین استراز (در سنجش استرازهای عمومی)، که حساسیت بیشتری نسبت به مهارکننده‌ها دارد، می‌تواند در پایش محیط زیست به کار رود. بررسی این شاخص‌های آنزیمی در فصول مختلف سال نشان داد که بهتر است برنامه‌های پایش محیط زیست در فصول گرم سال و هم‌زمان با تقویم زراعی و سم‌پاشی زمین‌های کشاورزی انجام شود.

واژگان کلیدی: آنزیم‌های استرازی، استیل کولین استراز، سیاه‌ماهی، شاخص‌های زیستی، گرگان‌رود.

* نویسندهٔ مسئول : ۰۹۱۲۲۶۰۵۸۷۴
Email: avaghefi@ut.ac.ir

۱.مقدمه

حوضهٔ آبریز گرگان‌رود- قره‌سو در بخش جنوب شرقی دریای خزر واقع شده است و از شمال و شرق به حوضهٔ رودخانهٔ اترک و از جنوب به حوضه‌های آبریز کویر نمک و از جنوب غربی به حوضهٔ رودخانهٔ نکاء محدود است (Azarmdel *et al.*, 2010). کل مساحت حوضهٔ رودخانهٔ گرگان‌رود یک میلیون و ۱۹ هزار و ۷۰۰ هکتار است که مساحتی نزدیک به ۴۸ درصد سطح استان گلستان را دارد و ۳۹ درصد آن را اراضی زراعی به مساحت ۳۹۷ هزار و ۶۸۴ هکتار تشکیل می‌دهد که همه‌ساله انواع محصولات زراعی در آن کشت و برداشت می‌شود و یکی از مناطق بسیار مهم مصرف انواع آفت‌کش‌های کشاورزی و کودهای شیمیایی است (Abyar & Kiani, 2001). یکی از بزرگ‌ترین مسائل زیست‌محیطی در بخش کشاورزی دربارهٔ رودخانهٔ گرگان‌رود مصرف زیاد آفت‌کش‌ها و کودهای فوق است. در این مناطق از آب رودخانه‌های گرگان‌رود، قره‌سو و اترک برای آبیاری مزارع استفاده می‌شود؛ به طوری که از سالیان دور کشاورزان حاشیهٔ رودخانه‌ها مستقیماً از آب رودخانه و برخی از کشاورزان پایین‌دست از زهاب مزارع بالادست برای آبیاری مزارع استفاده می‌کنند (ibid). بر اساس نتایج بررسی بقایای آزینفوس متیل و دیازینون در رودخانه‌های قره‌سو و گرگان‌رود استان گلستان، میزان این آفت‌کش‌ها در فصول مختلف سال متفاوت است و اختلاف معنی‌داری بین فصل تابستان و سایر فصول وجود دارد. به طوری که بیشترین مقدار حشره‌کش‌ها در هر دو رودخانه در این فصل مشاهده شد (Shayeghi *et al.*, 2008).

شاخص‌های زیستی[1] به منظور ارزیابی و پایش اکوسیستم‌های آبی از منظر وجود آلاینده‌ها به‌منزلهٔ پیش اخطار در تشخیص اولیه کاربرد دارند (Lam & Gray, 2003). اختصاصی‌ترین شاخص نسبت به آفت‌کش‌های فسفرهٔ آلی تغییر در فعالیت کولین استرازی بافت‌های جانوری است (Ferrari *et al.*, 2007; Varo *et al.*, 2008). سازوکار آن در واقع مهار برگشت‌ناپذیر آنزیم کولین استراز با این گروه آفت‌کش‌هاست، به طوری که این ترکیبات همانند یک سوبسترا برای آنزیم رفتار می‌کنند (Varo *et al.*, 2008). بر این اساس، جداشدن باقی‌ماندهٔ ترکیب فسفره از آنزیم استرازی آن چنان کند صورت می‌گیرد که آنزیم قادر به هیدرولیزکردن پیام‌رسان عصبی نیست، استیل کولین در شیار عصبی تجمع می‌یابد و انتقال عصبی به‌تدریج متوقف می‌شود (Moralev *et al.*, 2003). از آنزیم کولین استراز، و به شکل عمومی آن از آنزیم‌های استراز نوع B، به‌منزلهٔ شاخص زیستی آفت‌کش‌های ارگانوفسفره و کاربامات، در پژوهش‌های متعدد و پایش‌های محیطی استفاده شده است (Ferenczy *et al.*, 1997; Moralev *et al.*, 2003; Ebrahimzade *et al.*, 2004; Ferrari *et al.*, 2007).

ماهیان بررسی‌شده در حوضهٔ رودخانهٔ گرگان‌رود، متعلق به ۱۱ خانواده و ۲۴ جنس و ۳۰ گونه‌اند که در بین آن‌ها خانوادهٔ کپورماهیان دارای بیشترین فراوانی با میزانی حدود ۵۰ درصد است (Olomi, 2001). Abdoli *et al.* (1999) در مطالعه‌ای لیمنولوژیک دربارهٔ گرگان‌رود و سرشاخه‌های آن که از سال ۱۳۷۵ تا ۱۳۷۸ و با الکتروشوکر انجام دادند،

1. Biomarkers

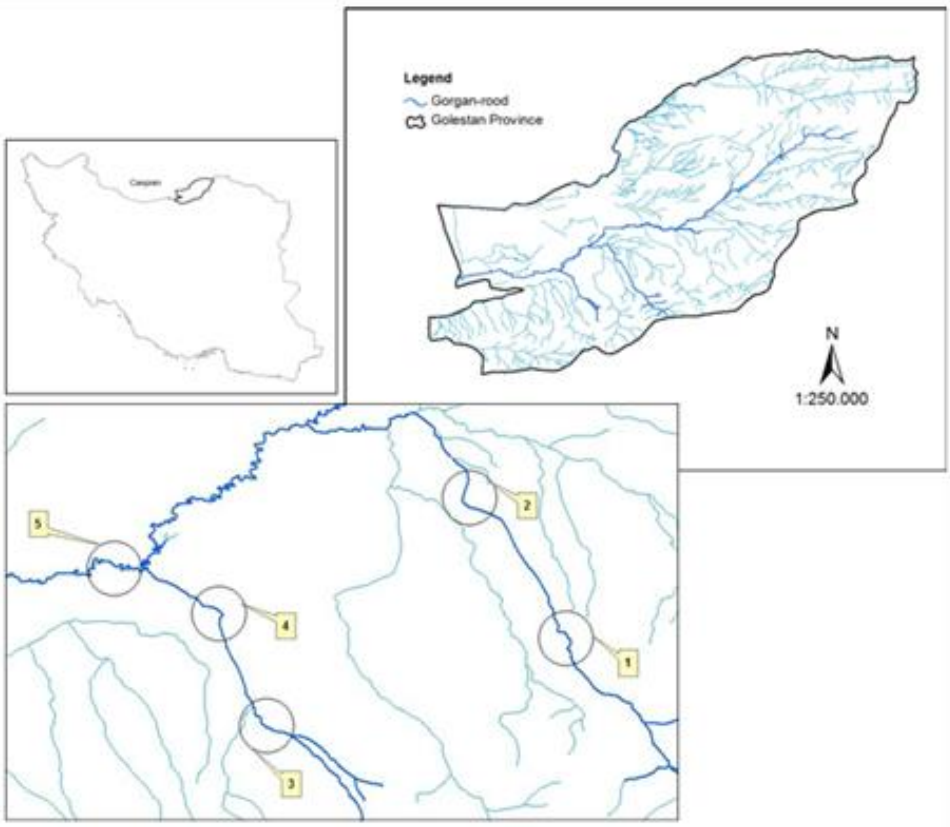
Capoeta capoeta gracilis (Keyserling, 1861) را فراوان‌ترین ماهی این حوضه اعلام کردند که پراکنش بسیار وسیعی دارد. بنابراین با توجه به فراوانی، سازگاری با شرایط محیطی و بنتوپلاژیک‌بودن (Samaee *et al*., 2006)، این گونه می‌تواند شاخص مناسبی برای پایش‌های زیستی باشد.

در مزارع شمال ایران از آفت‌کش‌های فسفرهٔ آلی (به‌ویژه دیازینون) به مقیاس وسیعی استفاده می‌شود (Abyar & Kiani, 2001). این حشره‌کش‌ها به همراه آب ناشی از بارش‌های طبیعی یا آبیاری زمین‌های زراعی به سایر منابع آب شیرین به‌ویژه رودخانه‌ها راه می‌یابد و به طور مستقیم با مصرف آب شیرین، یا غیرمستقیم از طریق زنجیره‌های غذایی، به انسان منتقل می‌شود (Shayeghi *et al*., 2008). در حال حاضر کنترلی بر سرنوشت آفت‌کش‌های مصرف‌شده در مزارع اعمال نمی‌شود. از این رو پایش این سموم در اکوسیستم‌های آب شیرین الزامی است. مطالعهٔ حاضر در نظر دارد فعالیت آنزیم Acethyle cholinesterase (AChE) و استرازهای عمومی (نوع B) بافت‌های سیاه‌ماهی در این حوضه را در ایستگاه‌های تعیین‌شده بررسی کند. همچنین دربارهٔ زمان مهارشدگی آنزیم پس از مواجههٔ احتمالی با آفت‌کش در فصول مختلف و تقویم زراعی منطقه نیز مطالعه شده است تا سازوکار استفاده از این شاخص، تعیین و بافت مناسب به منظور پایش محیطی انتخاب شود. چنین مطالعه‌ای می‌تواند امکان استفاده از آنزیم‌های استراز بافتی این سیاه‌ماهی (*C. capoeta gracilis*) را به‌منزلهٔ شاخص تشخیص سموم فسفرهٔ آلی در فصل مناسب مشخص کند.

۲. مواد و روش‌ها

۲. ۱. مکان‌های نمونه‌برداری

پنج ایستگاه در منطقهٔ مورد بررسی بر اساس وجود زمین‌های کشاورزی و رهاشدن پساب حاصل از آن‌ها به داخل رودخانه تعیین شدند. ایستگاه‌های مورد بررسی در این حوضه شامل ایستگاه یک و دو به ترتیب بالادست و پایین‌دست زیرشاخهٔ زرین‌گل بودند که در بین دو شهر علی‌آباد کتول و خان ببین با طول جغرافیایی ۵۴ درجه و ۵۷ دقیقه و عرض جغرافیایی ۳۶ درجه و ۵۲ دقیقه قرار دارد و دارای ناحیهٔ جلگه‌ای وسیعی است. ایستگاه یک قبل از روستای زرین‌گل (سرخ‌محله) قرار گرفته که از ناحیه‌ای جنگلی- کوهستانی عبور می‌کند و ایستگاه دو پس از روستا واقع شده و بیشتر این منطقه را زمین‌های زراعی تشکیل می‌دهد. ایستگاه‌های سه و چهار به ترتیب بالادست و پایین‌دست زیرشاخهٔ محمدآباد است که در شرق علی‌آباد کتول با طول جغرافیایی ۵۴ درجه و ۴۵ دقیقه و عرض جغرافیایی ۳۶ درجه و ۴۲ دقیقه قرار دارد و دارای ناحیهٔ کوهستانی نسبتاً وسیع‌تر و وسعت کمتر زمین‌های زراعی نسبت به زیرشاخهٔ زرین‌گل است. همچنین بیشترین تراکم مزارع پرورش ماهی قزل‌آلا (به تعداد سه مزرعه) را در این استان در خود جای داده است. ایستگاه سه پیش از روستای فاضل‌آباد قرار گرفته و ایستگاه چهار که از بین زمین‌های کشاورزی می‌گذرد (پس از روستا). ایستگاه پنج از شاخهٔ اصلی رودخانهٔ گرگان‌رود قبل از ورود به شهر آق‌قلا با طول جغرافیایی ۵۴ درجه و ۳۹ دقیقه و عرض جغرافیایی ۳۷ درجه و ۴۱ دقیقه قرار داشت.



شکل ۱. موقعیت مکانی گرگان‌رود و ایستگاه‌های مورد استفاده در پژوهش

این ایستگاه در مسیر جریان به فاضلاب شهری و روستایی (به‌ویژه فاضلاب شهری شهرستان گنبد کاووس) آلوده می‌شود (Shapouri *et al.*, 2010). موقعیت مکانی حوضهٔ مورد بررسی در شکل ۱ نشان داده شده است.

۲. ۲. صید ماهیان، نمونه‌برداری از بافت‌ها و تهیهٔ رونشین[1]

صید سیاه‌ماهی از ایستگاه‌های یک، دو، سه و چهار در همهٔ فصول به جز فصل زمستان به وسیلهٔ تور سالیک پرتابی ریزچشمه همچنین دام (ابزار انتظاری) انجام شد، اما در ایستگاه پنج در همهٔ فصول صید به کمک الکتروشوکر (با قدرت ۱/۷ کیلووات، جریان مستقیم با ولتاژ ۳۰۰-۲۰۰ ولت) انجام گرفت. از تمامی ماهیان صیدشده، نمونه‌هایی از سه بافت مغز، کبد و عضلهٔ اسکلتی (از بخش زیرین بالهٔ پشتی) جدا شدند و پس از اندازه‌گیری وزن به‌سرعت داخل فلاسک ازت مایع (هفت لیتری) گذاشته شدند و به آزمایشگاه سم‌شناسی منتقل شدند. در آن‌جا بافت‌های حاصل با کمک محلول بافر فسفات (۰/۱ مولار با pH هفت و حاوی ۱ درصد ترایتون ایکس۱۰۰) به صورت دستی هموژن شد، سپس رونشین حاصل از سانتریفیوژ نمونه‌ها جدا شد تا به‌منزلهٔ منبع آنزیم استفاده شود (Ellman *et al.*, 1961).

1. Supernatant

۲. ۳. سنجش پروتئین کل و فعالیت آنزیم‌های استراز عمومی و استیل کولین استراز

میزان غلظت پروتئین کل بافت‌ها با روش (Lowry *et al.* (1951 در طول موج ۵۴۰ نانومتر به وسیلهٔ دستگاه الایزا (Biotek Elx 808) تعیین شد. در این روش از فولین به‌منزلهٔ معرف رنگی استفاده شد. سپس از روی منحنی حاصل و معادلهٔ خط آن غلظت پروتئین موجود در نمونه بافت‌ها به دست آمد. اندازه‌گیری میزان فعالیت ویژهٔ کولین استرازی با روش (Ellman *et al.* (1961 در طول موج ۴۲۰ نانومتر به وسیلهٔ دستگاه الایزا انجام شد. بدین منظور، مخلوط رونشین (آنزیم)، بافر فسفات ۰/۱ مولار، معرف رنگی DTNB و استیل تیوکولین آیوداید، به هر تیوب افزوده شد 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) با دستگاه خوانده شد. همچنین فعالیت ویژهٔ استرازهای عمومی با روش (Van (1998 Asperen *et al.* در طول موج ۴۲۰ نانومتر و با کمک معرف رنگی فست بلو[1] و سوبسترای آلفا نفتیل استات[2]، به وسیلهٔ دستگاه ذکرشده سنجش شد. فعالیت ویژهٔ آنزیمی استیل کولین استراز، بر اساس نانومول استیل تیوکولین هیدرولیزشده در دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین[3] هر بافت، و برای استرازهای عمومی بر اساس جذب در دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین[4] هر بافت بیان شد. همچنین درصد مهارشدگی آنزیم‌های هر تیمار محاسبه شد.

1. Fast blue reagent
2. α- Naphthyle acetate
3. nmol hydrolyzed ASCh /min/mg protein
4. OD/min/mg protein

۲. ۴. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

اثبات نرمال‌بودن داده‌های به‌دست‌آمده با آزمون کولموگروف- اسمیرنوف[5] انجام گرفت و با توجه به نرمال‌بودن و همگنی، واریانس داده‌ها با آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه[6] با هم مقایسه شد. سپس مقایسهٔ میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن[7] با میزان خطای نوع اول ۰/۰۵ ارزیابی شد.

۳. نتایج

۳. ۱. فعالیت ویژه و درصد مهارشدگی استرازهای عمومی

نتایج آنالیز واریانس داده‌های فعالیت ویژهٔ استراز عمومی بافت‌های کبد، ماهیچه و مغز ماهیان صیدشده از ایستگاه‌ها نشان می‌دهد که با احتمال ۹۵ درصد بین تیمارها اختلاف معنی‌دار وجود دارد ($P<0/05$). همچنین نتایج مقایسهٔ میانگین‌ها حاکی از این است که بالاترین سطح فعالیت آنزیمی در هر سه بافت کبد، ماهیچه و مغز در ایستگاه سوم به ترتیب به میزان ۲/۸۵±۰/۳۲، ۲/۹۶±۰/۲۳ و ۷/۹۳±۰/۲۷ بر حسب O.D./min/mg protein مشاهده شد که نشان‌دهندهٔ کمترین درصد مهارشدگی و به معنای آلودگی کشاورزی کمتر در این ایستگاه است. جداول مربوط به مقایسهٔ میزان فعالیت ویژه (جدول ۱) و درصد مهارشدگی (جدول ۲) استرازهای عمومی تیمارها در بافت‌های مختلف، همچنین نمودارهای مقادیر فعالیت آنزیم‌های استرازی به تفکیک در بافت‌های کبد، ماهیچه و مغز در تیمارها در ذیل آورده شده است (شکل ۲).

5. Kolmogorov-Smirnov
6. ANOVA
7. Duncan Test

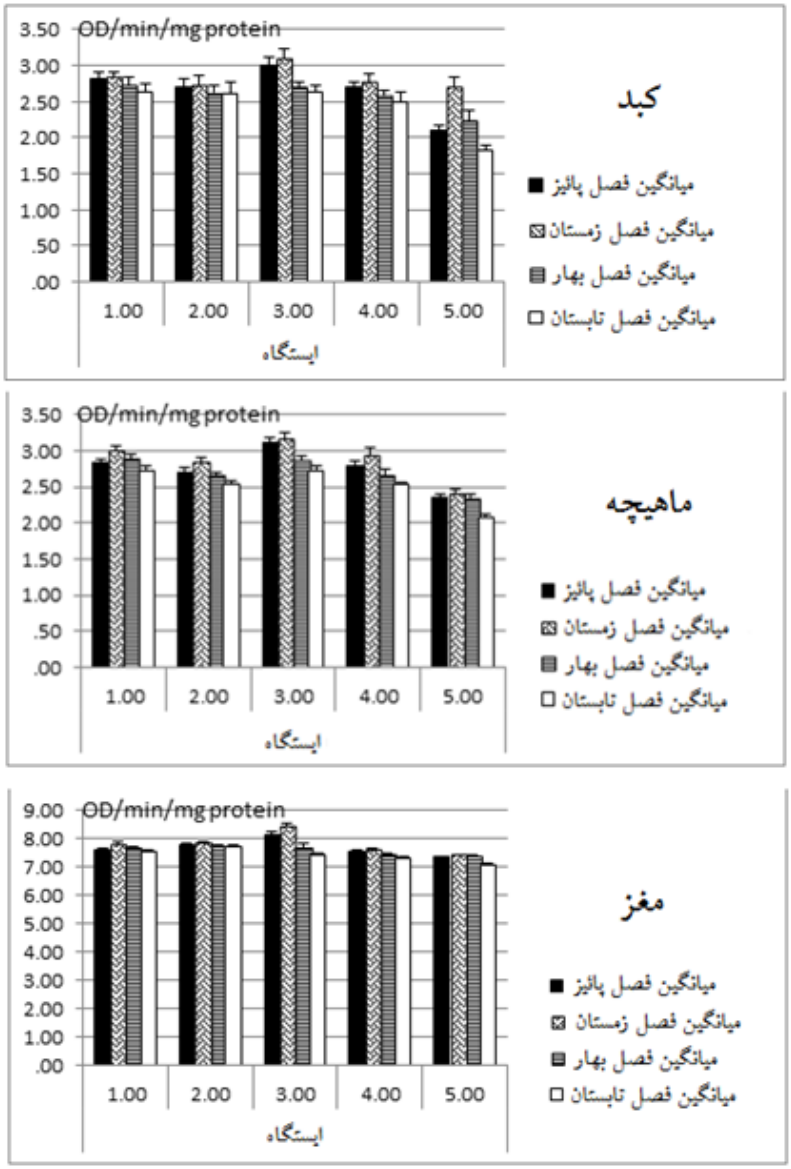
جدول ۱. مقایسهٔ میزان فعالیت استراز عمومی تیمارها (میانگین ± انحراف معیار) در بافت‌های مختلف

بافت	فصل	تیمار				
		ایستگاه ۱	ایستگاه ۲	ایستگاه ۳	ایستگاه ۴	ایستگاه ۵
کبد	پاییز	۲/۸۱±۰/۲۹^{a}	۲/۱±۰/۲^{d}	۲/۶۹±۰/۲۶^{c}	۳±۰/۳۴^{c}	۲/۷±۰/۳۸^{b}
	زمستان	۲/۷۱±۰/۳۴^{e}	۲/۷۳±۰/۴^{b}	۳/۱±۰/۴۲^{c}	۲/۷±۰/۳۷^{d}	۲/۷±۰/۳۴^{e}
	بهار	۲/۲۵±۰/۴۱^{e}	۲/۵۸±۰/۲^{d}	۲/۶۹±۰/۲۶^{c}	۲/۶±۰/۳۴^{b}	۲/۷±۰/۳۷^{a}
	تابستان	۱/۸۳±۰/۱۴^{d}	۲/۵±۰/۴۲^{c}	۲/۶۳±۰/۲۶^{a}	۲/۶±۰/۴۶^{b}	۲/۶±۰/۳۳^{a}
	کل	۲/۴۷±۰/۲۷^{e}	۲/۶±۰/۳۱^{d}	۲/۸۵±۰/۳۲^{c}	۲/۶±۰/۳۹^{b}	۲/۷±۰/۳^{a}
ماهیچه	پاییز	۲/۳۶±۰/۱۳^{e}	۲/۸±۰/۲۳^{d}	۳/۱۲±۰/۲۲^{c}	۲/۷±۰/۲۲^{b}	۲/۸±۰/۱۴^{a}
	زمستان	۲/۴۱±۰/۱۶^{e}	۲/۹±۰/۳۴^{d}	۳/۱۶±۰/۲۸^{c}	۲/۸±۰/۲۲^{b}	۳±۰/۱۹^{a}
	بهار	۲/۳۴±۰/۲۱^{c}	۲/۶۵±۰/۲۲^{b}	۲/۸۶±۰/۲۱^{a}	۲/۶±۰/۱۲^{b}	۲/۸±۰/۲۳^{a}
	تابستان	۲/۰۸±۰/۱۱^{c}	۲/۵±۰/۱۱^{b}	۲/۷۳±۰/۲۱^{a}	۲/۵±۰/۱۴^{b}	۲/۷±۰/۲۷^{a}
	کل	۲/۲۹±۰/۱۵^{e}	۲/۷±۰/۲۲^{d}	۲/۹±۰/۲۳^{c}	۲/۶۸±۰/۷^{b}	۲/۸۵±۰/۲^{a}
مغز	پاییز	۷/۳۶±۰/۰۸^{d}	۷/۵۶±۰/۱۹^{a}	۸/۱۶±۰/۲۱^{c}	۷/۷۶±۰/۱۵^{b}	۷/۵۸±۰/۲^{a}
	زمستان	۷/۴۲±۰/۰۶^{e}	۷/۶۲±۰/۱۶^{d}	۸/۴۶±۰/۳۳^{c}	۷/۸±۰/۱۵^{b}	۷/۷۹±۰/۳^{a}
	بهار	۷/۳۸±۰/۱	۷/۴۲±۰/۲۱^{c}	۷/۶۹±۰/۴۱^{a}	۷/۷±۰/۱۳^{b}	۷/۷±۰/۱۶^{a}
	تابستان	۷/۰۶±۰/۱۳^{e}	۷/۳±۰/۱۹^{d}	۷/۴۲±۰/۱۶^{c}	۷/۷±۰/۱۶^{b}	۷/۵±۰/۱۴^{a}
	کل	۷/۳±۰/۱۲^{e}	۷/۴±۰/۱۸^{d}	۷/۹۳±۰/۲۷^{c}	۷/۷±۰/۱۴^{b}	۷/۶۶±۰/۲^{a}

* حروف انگلیسی متفاوت در سطرهای افقی بیان‌گر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

جدول ۲. مقایسهٔ درصد مهارشدگی استراز عمومی تیمارها در بافت‌های مختلف (بر حسب درصد)

بافت	فصل	تیمار				
		ایستگاه ۱	ایستگاه ۲	ایستگاه ۳	ایستگاه ۴	ایستگاه ۵
کبد	پاییز	۹/۵۱	۱۳/۰۵	۳/۳۲	۱۳/۳۲	۳۲/۱۸
	زمستان	۸/۲۶	۱۱/۹۸	۰/۰۰	۱۰/۶۱	۱۲/۷
	بهار	۱۲/۳۴	۱۵/۵۳	۱۳/۱۱	۱۶/۸۶	۲۷/۵۸
	تابستان	۱۵/۱۷	۱۵/۶۵	۱۵/۱۱	۱۹/۳۵	۴۰/۹۶
	کل	۱۱/۳۲	۱۴/۰۵	۷/۸۸	۱۵/۰۳	۲۸/۳۵
ماهیچه	پاییز	۱۰/۳۳	۱۴/۴۹	۱/۲۸	۱۱/۸۴	۲۵/۲۶
	زمستان	۴/۷۸	۱۰/۳۴	۰/۰۰	۷/۳۴	۲۳/۸۵
	بهار	۸/۹۱	۱۶/۰۶	۹/۶۴	۱۵/۹۹	۲۵/۹۲
	تابستان	۱۴/۱۲	۱۹/۳۹	۱۳/۷	۱۹/۹۳	۳۴/۲۶
	کل	۹/۵۳	۱۵/۰۶	۶/۱۵	۱۳/۷۷	۲۷/۳۲
مغز	پاییز	۱۰/۳۶	۸/۲۲	۳/۵۸	۱۰/۶۶	۱۲/۹۹
	زمستان	۷/۹۸	۶/۹۴	۰/۰۰	۹/۹۴	۱۲/۲۵
	بهار	۹/۰۳	۸/۴۴	۹/۱۱	۱۲/۳۳	۱۲/۷۵
	تابستان	۱۰/۵۵	۸/۵۵	۱۲/۳	۱۳/۲۸	۱۶/۵۹
	کل	۹/۴۸	۸/۰۳	۶/۲۴	۱۱/۵۵	۱۳/۶۴



شکل ۲. نمودارهای مقادیر فعالیت آنزیم‌های استراز عمومی بافت‌های کبد، ماهیچه و مغز در تیمارها (میانگین ±خطای معیار)

بررسی اجمالی بافت‌ها نمایان‌گر این است که در هر سه بافت بین تمامی ایستگاه‌ها اختلاف معنی‌داری وجود داشت (P<۰/۰۵) و به طور کلی بین میانگین سطوح آنزیمی بافت‌های نمونه‌های صیدشده از ایستگاه‌ها در فصول مختلف سال اختلاف معنی‌دار دیده شد (P<۰/۰۵). در ذیل به تفکیک هر فصل ایستگاه‌ها بررسی می‌شوند.

الف) فصل پاییز

در بافت کبد بین ایستگاه‌های یک، دو و پنج اختلاف معنی‌دار وجود داشت، اما بین ایستگاه‌های سه و چهار اختلافی مشاهده نشد (P>۰/۰۵). در بافت ماهیچه بین تمامی ایستگاه‌ها در این فصل اختلاف معنی‌دار دیده شد. همچنین در بافت مغز فقط بین ایستگاه‌های اول و چهارم اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (P>۰/۰۵).

ب) فصل زمستان

در هر سه بافت کبد، ماهیچه و مغز بین تمامی ایستگاه‌ها اختلاف معنی‌دار دیده شد (P<۰/۰۵).

ج) فصل بهار

در بافت کبد بین تمامی ایستگاه‌ها اختلاف معنی‌دار وجود داشت (P<۰/۰۵). در بافت ماهیچه بین ایستگاه‌های اول و سوم، همچنین بین ایستگاه‌های دوم و چهارم، اختلاف معنی‌داری دیده نشد، اما بین ایستگاه پنجم با سایر ایستگاه‌ها اختلاف وجود داشت. همچنین در بافت مغز فقط بین ایستگاه‌های اول و سوم اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

د) فصل تابستان

در بافت کبد به غیر از ایستگاه‌های اول و سوم بین سایر ایستگاه‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (P<۰/۰۵). در بافت ماهیچه بین ایستگاه‌های اول و سوم، همچنین بین ایستگاه‌های دوم و چهارم، اختلاف معنی‌داری دیده نشد (P>۰/۰۵)، اما بین ایستگاه پنجم با سایر ایستگاه‌ها اختلاف وجود داشت. در بافت مغز بین تمامی ایستگاه‌ها اختلاف معنی‌دار وجود داشت.

نتایج حاکی از این است که بیشترین سطوح آنزیمی بافت‌ها در ایستگاه سوم در فصل زمستان دیده شد، بنابراین به‌منزلهٔ شاهد مبنایی برای تعیین درصد مهارشدگی قرار گرفت. بر همین اساس بیشترین درصد مهارشدگی در ایستگاه پنجم در فصل تابستان و در بافت کبد به میزان ۴۰/۹۶ درصد محاسبه شد (جدول ۲).

۳. ۲. فعالیت ویژه و درصد مهارشدگی استیل کولین استراز

نتایج آنالیز واریانس داده‌های فعالیت ویژهٔ استیل کولین استراز بافت‌های کبد، ماهیچه و مغز ماهیان صیدشده از ایستگاه‌ها نشان می‌دهد که با احتمال ۹۵ درصد بین تیمارها اختلاف معنی‌دار وجود دارد (P<۰/۰۵). همچنین نتایج مقایسهٔ میانگین‌ها حاکی از این است که بالاترین سطح فعالیت آنزیمی در هر سه بافت کبد، ماهیچه و مغز در ایستگاه سوم به ترتیب به میزان ۱۱/۱۶±۹۹/۶، ۱۱/۹۳±۱۵۳/۴۱ و ۱۸/۳۱± ۵۱۷/۷۲ بر حسب نانومول سوبسترای هیدرولیزشده در دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین مشاهده شد که نشان‌دهندهٔ کمترین درصد مهارشدگی و به معنای آلودگی کشاورزی کمتر در این ایستگاه است.

بررسی اجمالی بافت‌ها نمایان‌گر این است که در بافت مغز بین ایستگاه‌های اول، دوم و چهارم اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (P>۰/۰۵)، اما ایستگاه‌های سوم و پنجم دارای اختلاف معنی‌داری بین خود و سایر ایستگاه‌ها بودند. در بافت ماهیچه به غیر از ایستگاه‌های اول و سوم، بین سایر ایستگاه‌ها با هم اختلاف معنی‌دار وجود داشت. همچنین در بافت مغز بین ایستگاه‌های یک و سه، همچنین بین ایستگاه‌های دو و چهار اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (P>۰/۰۵)، اما بین ایستگاه پنجم با سایر ایستگاه‌ها اختلاف دیده شد (P<۰/۰۵).

جداول مربوط به مقایسهٔ میزان فعالیت ویژه (جدول ۳) و درصد مهارشدگی (جدول ۴) استیل کولین استراز تیمارها در بافت‌های مختلف، همچنین نمودارهای مقادیر فعالیت این آنزیم به تفکیک در بافت‌های کبد، ماهیچه و مغز در تیمارها در ذیل

آورده شده است (شکل ۳). به طور کلی، بین میانگین سطوح آنزیمی بافت‌های نمونه‌های صیدشده از ایستگاه‌ها در فصول مختلف سال اختلاف معنی‌دار دیده شد (P<۰/۰۵). در ذیل به تفکیک هر فصل، ایستگاه‌ها بررسی می‌شوند.

الف) فصل پاییز

در بافت‌های کبد و مغز بین ایستگاه‌های یک و سه، همچنین بین ایستگاه‌های دو و چهار اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (P>۰/۰۵)، اما بین ایستگاه پنجم با سایر ایستگاه‌ها اختلاف آماری دیده شد. در بافت ماهیچه بین تمامی ایستگاه‌ها در این فصل اختلاف معنی‌دار دیده شد (P<۰/۰۵).

ب) فصل زمستان

در این فصل در بافت کبد، فقط بین ایستگاه‌های دوم و پنجم اختلاف معنی‌داری دیده نشد. در بافت ماهیچه بین ایستگاه‌های اول، سوم و چهارم اختلافی وجود نداشت (P>۰/۰۵)، اما ایستگاه‌های دوم و پنجم دارای اختلاف معنی‌داری بین خود و سایر ایستگاه‌ها بودند. در بافت مغز بین ایستگاه‌های دو و چهار، همچنین سه و پنج اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵)، اما ایستگاه اول با سایرین اختلاف معنی‌داری داشت.

ج) فصل بهار

در بافت‌های کبد و مغز همانند فصل پاییز، بین ایستگاه‌های یک و سه، همچنین بین ایستگاه‌های دو و چهار اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (P>۰/۰۵)، اما بین ایستگاه پنجم با سایر ایستگاه‌ها اختلاف دیده شد. در بافت ماهیچه به غیر از ایستگاه‌های اول و سوم، بین سایر ایستگاه‌ها با هم اختلاف معنی‌دار وجود داشت (P<۰/۰۵).

د) فصل تابستان

در این فصل در بافت کبد بین ایستگاه‌های اول، دوم و سوم اختلافی وجود نداشت (P>۰/۰۵)، اما ایستگاه‌های چهارم و پنجم دارای اختلاف معنی‌داری بین خود و سایر ایستگاه‌ها بودند. در بافت ماهیچه همانند فصل بهار، به غیر از ایستگاه‌های اول و سوم، بین سایر ایستگاه‌ها با هم اختلاف معنی‌دار وجود داشت (P<۰/۰۵)، اما در بافت مغز بین ایستگاه‌های یک و سه، همچنین بین ایستگاه‌های دو و چهار اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵)، اما بین ایستگاه پنجم با سایر ایستگاه‌ها اختلاف وجود داشت.

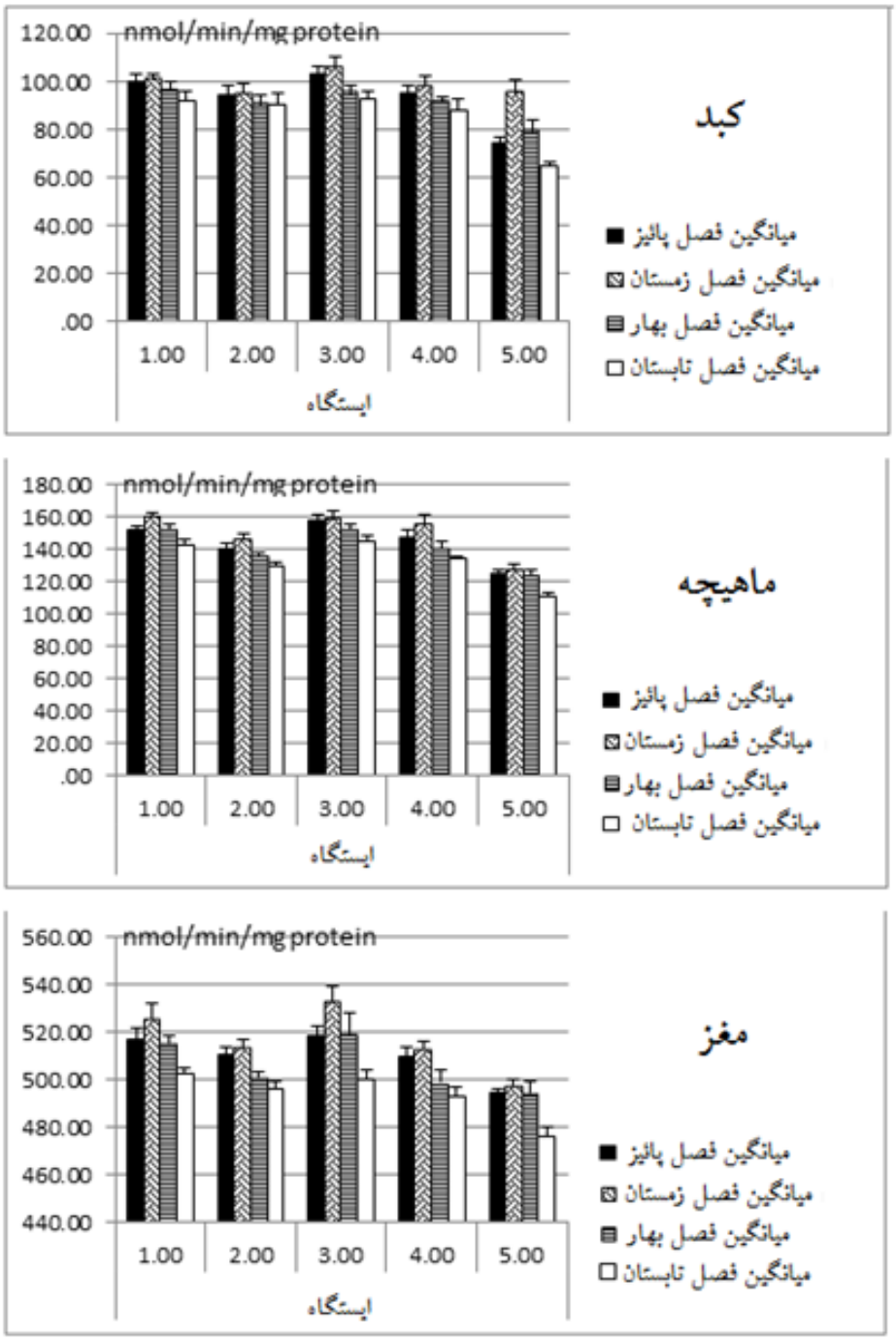
جدول ۳. مقایسهٔ میزان فعالیت استیل کولین استراز تیمارها (میانگین ± انحراف معیار) در بافت‌های مختلف

بافت	فصل	تیمار				
		ایستگاه ۱	ایستگاه ۲	ایستگاه ۳	ایستگاه ۴	ایستگاه ۵
کبد	پاییز	۷۴/۴۸±۷/۰۷^{c}	۹۵/۳±۹/۳۶^{b}	۱۰۳±۱۱/۷۱^{a}	۹۴/۴۷±۱۳/۳۷^{b}	۱۰۰/۱۸±۱۰/۵^{a}
	زمستان	۹۵/۸±۱۲/۰۷^{b}	۹۸/۳±۱۳/۳^{d}	۱۰۶/۱۶±۱۴/۲۹^{c}	۹۵/۱۹±۱۳/۷۸^{b}	۱۰۱/۰۹±۷/۵۴^{a}
	بهار	۷۹/۴۷±۱۴/۴۴^{c}	۹۱/۴±۷/۰۱^{b}	۹۵/۷±۹/۳۱^{a}	۹۰/۹۳±۱۱/۶۹^{b}	۹۶/۱۳±۱۲/۹۶^{a}

ادامه جدول ۳. مقایسهٔ میزان فعالیت استیل کولین استراز تیمارها (میانگین ± انحراف معیار) در بافت‌های مختلف

بافت	فصل	تیمار				
		ایستگاه ۱	ایستگاه ۲	ایستگاه ۳	ایستگاه ۴	ایستگاه ۵
کبد	پاییز	۷۴/۴۸±۷/۰۷^{c}	۹۵/۳±۹/۳۶^{b}	۱۰۳±۱۱/۷۱^{a}	۹۴/۴۷±۱۳/۳۷^{b}	۱۰۰/۱۸±۱۰/۵^{a}
	زمستان	۹۵/۸±۱۲/۰۷^{b}	۹۸/۳±۱۳/۳^{d}	۱۰۶/۱۶±۱۴/۲۹^{c}	۹۵/۱۹±۱۳/۷۸^{b}	۱۰۱/۰۹±۷/۵۴^{a}
	بهار	۷۹/۴۷±۱۴/۴۴^{c}	۹۱/۴±۷/۰۱^{b}	۹۵/۷±۹/۳۱^{a}	۹۰/۹۳±۱۱/۶۹^{b}	۹۶/۱۳±۱۲/۹۶^{a}
	تابستان	۶۵/۰۲±۵/۰۵^{c}	۸۸/۶±۱۴/۷۵^{b}	۹۳/۴۶±۹/۳۴^{a}	۹۰/۳۷±۱۵/۸۴^{a}	۹۲/۵۹±۱۱/۵۹^{a}
	کل	۷۸/۷±۹/۶۵^{c}	۹۳/۴۲±۱۱/۱^{a}	۹۹/۶±۱۱/۱۶^{b}	۹۲/۷۴±۱۳/۶۷^{a}	۹۴/۴۹±۱۰/۶۴^{a}
ماهیچه	پاییز	۱۲۵±۶/۶۶^{e}	۱۴۷±۱۲/۰۶^{d}	۱۵۸±۱۰/۹۸^{c}	۱۴۰±۱۱/۲۹^{b}	۱۵۱/۸±۷/۴۱^{a}
	زمستان	۱۲۷/۲۸±۸/۶۷^{c}	۱۵۵±۱۷/۹۵^{a}	۱۵۸±۱۴/۰۸^{a}	۱۴۶±۱۱/۱۵^{b}	۱۶۰/۰۵±۹/۹۱^{a}
	بهار	۱۲۳/۷۳±۱۱/۰۹^{d}	۱۴۰±۱۱/۸۴^{c}	۱۵۱/۷۷±۱۱/۴^{a}	۱۳۶/۲۷±۶/۳۶^{b}	۱۵۲±۱۲/۰۵^{a}
	تابستان	۱۱۰/۴۱±۶/۰۲^{d}	۱۳۴±۵/۹۱^{c}	۱۴۴/۸۶±۱۱/۲۹^{a}	۱۲۹/۹۷±۷/۱۷^{b}	۱۴۲±۱۴/۰۴^{a}
	کل	۱۲۱/۶±۸/۱۱^{d}	۱۴۴±۱۱/۹۴^{c}	۱۵۳/۴۱±۱۱/۹۳^{a}	۱۳۸/۳۷±۸/۹۹^{b}	۱۵۱±۱۰/۸۵^{a}
مغز	پاییز	۴۹۴/۲۳±۵/۳۱^{c}	۵۰۹±۱۲/۶۸^{b}	۵۱۸/۴۷±۱۳/۶۶^{a}	۵۱۰/۸۳±۱۰/۱۴^{b}	۵۱۷/۰۸±۱۳/۵^{a}
	زمستان	۴۹۸±۴/۲۳^{c}	۵۱۲/۹۵±۱۱/۰۲^{b}	۵۳۲/۹±۲۰/۶۸^{c}	۵۱۳/۴۷±۹/۶۶^{b}	۵۲۶/۰۲±۲۰/۳۴^{a}
	بهار	۴۹۴/۷±۱۳/۸^{c}	۴۹۸/۹۱±۱۳/۹۸^{b}	۵۱۹/۱۱±۲۷/۸^{a}	۵۰۰/۸۴±۸/۴۳^{b}	۵۱۵±۱۰/۹۴^{a}
	تابستان	۴۷۶/۳۱±۸/۷۹^{c}	۴۹۳/۰۵±۱۲/۷۴^{b}	۵۰۰/۴۲±۱۱/۱۲^{a}	۴۹۵/۹۶±۱۰/۴۱^{b}	۵۰۲/۲۸±۹/۱۳^{a}
	کل	۴۹۰/۸۱±۸/۰۳^{c}	۵۰۳/۵۵±۱۲/۶^{b}	۵۱۷/۷۲±۱۸/۳۱^{a}	۵۰۵/۲۷±۹/۶۶^{b}	۵۱۵±۱۳/۴۷^{a}

* حروف انگلیسی متفاوت در سطرهای افقی بیان‌گر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.



شکل ۳. نمودارهای مقادیر فعالیت آنزیم استیل کولین استراز بافت‌های کبد، ماهیچه و مغز در تیمارها (میانگین ±خطای معیار)

نتایج حاکی از این است که بیشینهٔ سطوح آنزیمی بافت‌های کبد و مغز در ایستگاه سوم و برای بافت ماهیچه در ایستگاه اول است، که البته همگی آن‌ها در فصل زمستان دیده شدند و مبنایی برای تعیین درصد مهارشدگی قرار گرفتند. بر همین اساس بیشترین درصد مهارشدگی در ایستگاه پنجم در فصل تابستان و در بافت کبد به میزان ۳۸/۷۵ درصد محاسبه شد (جدول ۴).

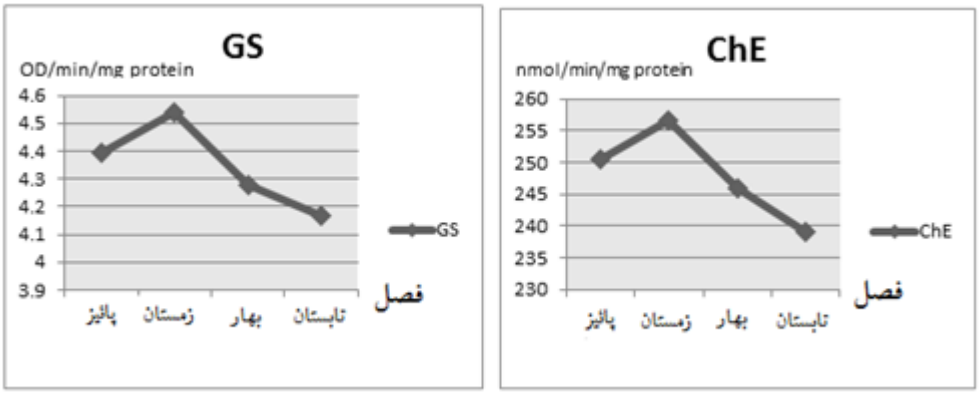
جدول ۴. مقایسهٔ درصد مهارشدگی استیل کولین استراز تیمارها در بافت‌های مختلف (بر حسب درصد)

بافت	فصل	تیمار				
		ایستگاه ۱	ایستگاه ۲	ایستگاه ۳	ایستگاه ۴	ایستگاه ۵
کبد	پاییز	۵/۶۳	۱۱/۰۱	۲/۸۸	۱۰/۱۶	۲۹/۸۴
	زمستان	۴/۷۸	۱۰/۳۴	۰/۰۰	۷/۳۹	۹/۷۳
	بهار	۹/۴۴	۱۴/۳۵	۹/۸۶	۱۳/۹۱	۲۵/۱۵
	تابستان	۱۲/۷۸	۱۴/۸۷	۱۱/۹۷	۱۶/۵۲	۳۸/۷۵
	کل	۸/۱۵	۱۲/۶۴	۶/۱۷	۱۱/۹۹	۲۵/۸۶
ماهیچه	پاییز	۵/۱۶	۱۲/۰۷	۱/۲۳	۷/۶۱	۲۱/۹
	زمستان	۰/۰۰	۸/۴۴	۰/۶۹	۲/۹۶	۲۰/۴۸
	بهار	۵/۰۱	۱۴/۸۶	۵/۱۸	۱۲/۰۸	۲۲/۶۹
	تابستان	۱۱/۰۷	۱۸/۸	۹/۴۹	۱۶/۲۷	۳۱/۰۱
	کل	۵/۳	۱۳/۵۴	۴/۱۴	۹/۷۲	۲۴/۰۲
مغز	پاییز	۲/۹۷	۴/۱۴	۲/۷۱	۴/۴۳	۷/۲۶
	زمستان	۱/۲۹	۳/۶۵	۰/۰۰	۳/۷۴	۶/۵۵
	بهار	۳/۳	۶/۰۲	۲/۵۹	۶/۳۸	۷/۱۷
	تابستان	۵/۷۵	۶/۹۳	۶/۰۹	۷/۴۸	۱۰/۶۲
	کل	۳/۳۲	۵/۱۸	۲/۸۴	۵/۵	۷/۹

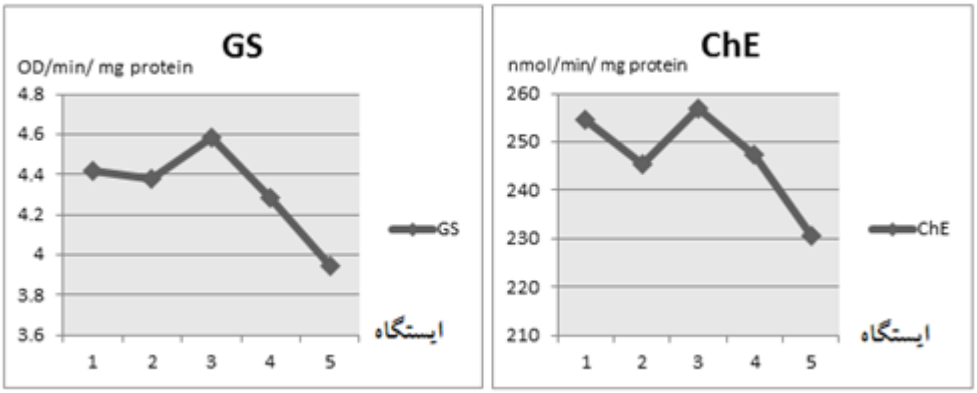
۳. ۳. درجه‌بندی ایستگاه‌ها و فصول بر اساس فعالیت آنزیمی

درجه‌بندی کلی فصول از نظر سطح فعالیت استرازی در شکل ۴ نشان داده شده است. سطح فعالیت آنزیم‌های استرازی و استیل کولین استراز بافت‌ها با گذر زمان از پاییز به سمت تابستان روندی کاهشی را طی کرده است. البته به طور دقیق‌تر حالتی افزایشی از پاییز تا بهار مشاهده‌شدنی است که با شروع این فصل یک افت در سطح فعالیت آنزیمی دیده می‌شود و این روند کاهشی در فصل تابستان به اوج خود می‌رسد.

درجه‌بندی کلی ایستگاه‌ها بر اساس سطح فعالیت آنزیم‌های استراز عمومی و استیل کولین استراز بافت‌ها در شکل ۵ مشاهده می‌شود. ایستگاه سوم به‌منزلهٔ ناحیهٔ دارای حداقل آلودگی بر اساس هر دو شاخص آنزیمی معرفی شد، اما جایگاه ایستگاه نخست در هر کدام از شاخص‌های آنزیمی متفاوت است، به طوری که بر مبنای استیل کولین استراز این ایستگاه آلودگی قابل توجهی نداشت، اما استرازهای عمومی این ایستگاه را هم‌ردیف ایستگاه‌های دوم و سوم (با آلودگی متوسط) قرار داد.



شکل ۴. نمودارهای روند فعالیت آنزیم‌های استراز عمومی و استیل کولین استراز طی فصول



شکل ۵. نمودارهای روند فعالیت آنزیم‌های استراز عمومی و استیل کولین استراز در ایستگاه‌ها

۴. بحث و نتیجه‌گیری

بافت مغز به‌منزلهٔ سیستم مرکزی اعصاب دارای حد طبیعی بالاتری از انتقال‌دهنده‌های عصبی است و آنزیم‌های هیدرولاز آن‌ها نسبت به سایر بافت‌ها، از قبیل کبد و ماهیچه، بیشتر است (Ferenczy *et al.*, 1997; Sturm *et al.*, 1999; Leticia and Gerardo, 2008). بر اساس یافته‌های این پژوهش درصد مهارشدگی استرازهای عمومی و استیل کولین استراز کبد بیشتر از سایر بافت‌ها بود و این بافت به منظور پایش محیطی مناسب‌تر از عضله و مغز به نظر می‌رسد. در مطالعهٔ Sturm *et al.* (1999) نشان داده شد که استیل کولین استراز عضله و مغز اختلاف معنی‌داری در ثابت مهارکنندگی با هم دارند. به علاوه، یافته‌های مطالعهٔ Leticia and Gerardo (2008) نمایان‌گر این بود که میزان فعالیت کولین استرازی و کربوکسیل استرازی در مغز بیشتر از بافت‌های کبد، عضله و چشم است و این نتایج مطالعات ذکرشده با یافته‌های این پژوهش مطابقت داشت. همچنین پژوهش Sturm *et al.* (1999) نشان داد که بوتیریل کولین استراز دارای حساسیت بالاتری نسبت به استیل کولین استراز در بافت عضله در برابر حشره‌کش‌های فسفرهٔ آلی است. از آن‌جا که استرازهای عمومی (شامل استرازهای نوع B که همگی به وسیلهٔ ترکیبات ارگانوفسفره مهار می‌شوند) هر دو نوع کولین استرازها (استیل کولین استراز و

بوتیریل کولین استراز) همچنین کربوکسیل استراز را شامل می‌شود، پژوهش ذکرشده با مطالعهٔ پیش رو همخوانی دارد. به طوری که مقایسهٔ درصد مهارشدگی آنزیم‌های سنجش‌شده در هر سه بافت مبیّن این مسئله است که استرازهای عمومی از حساسیت بالاتری نسبت به استیل کولین استراز در مواجهه با مهارکننده‌ها برخوردار بودند. گرچه بوتیریل کولین استراز جایگاه اثر حشره‌کش‌های فسفره و کاربامات نیست و تعداد بسیاری استر را تجزیه می‌کند (Sole *et al*., 2008).

در مطالعهٔ Rodriguez-Fuentes *et al*. (2008) نتایج حاکی از این است که در حدود ۳۰ درصد میزان کولین استراز کل در بافت عضلهٔ هر دو گونهٔ ماهی را بوتیریل کولین استراز به خود اختصاص داد. بدین ترتیب می‌توان نتیجه گرفت که مطالعهٔ استیل کولین استراز به تنهایی نمی‌تواند تمامی خصوصیات فعالیت‌های استرازی را در این گونه ارزیابی‌ها نشان دهد؛ بنابراین مطالعهٔ استرازهای عمومی لازم به نظر می‌رسد. در مطالعهٔ حاضر نیز یافته‌ها نشان‌دهندهٔ تغییرات معنی‌دار استرازهای عمومی در ایستگاه‌ها و فصول مختلف بود. البته می‌توان بوتیریل کولین استراز را با سوبسترای اختصاصی نیز شناسایی کرد.

روند کاهشی سطح فعالیت آنزیم‌های استرازی و استیل کولین استراز بافت‌ها با گذر زمان از پاییز به سمت تابستان می‌تواند به علت آغاز فصل گرانول‌پاشی و سم‌پاشی باشد که با توجه به پژوهش Shayeghi *et al*. (2008) بر گرگان‌رود کاملاً توجیه‌پذیر است. بر اساس نتایج این بررسی، میزان آفت‌کش‌های آزینفوس متیل و دیازینون در فصول گوناگون سال متفاوت بود و اختلاف معنی‌داری بین فصل تابستان و سایر فصول وجود دارد. به طوری که بیشترین مقدار حشره‌کش‌ها در این رودخانه در این فصل مشاهده شد و کمترین میزان آن در زمستان بوده است. با وجود تغییرات میزان باقی‌ماندهٔ این دو حشره‌کش در فصول دیگر (بهار، زمستان و پاییز)، اختلاف آن از نظر آماری معنی‌دار نیست (Shayeghi *et al*., 2008). به طور کلی سه بار سم‌پاشی در این نواحی صورت می‌گیرد، که نخستین بار در اواخر بهار و مراتب بعدی در اوایل و اواخر تابستان است. در ضمن تاریخ زراعی دقیق آن در دست نیست، زیرا در هر روستا و هر مزرعه بسته به شرایط می‌تواند متفاوت باشد (Abyar & Kiani, 2001). آب گرگان‌رود با توجه به مسیر طولانی خود در قسمت‌های مختلف در معرض آلودگی شدید قرار می‌گیرد و به بخش‌های پایین‌دست (مثل ایستگاه پنج) منتقل می‌شود و طبق برآورد وزارت کشاورزی سهم عظیمی از کودها و سموم شیمیایی در این منطقه استفاده و در اثر شست‌وشو وارد رودخانه می‌شوند (Abyar & Kiani, 2001; Shayeghi *et al*., 2008; Shapouri *et al*., 2010).

همان طور که پیش‌تر بیان شد، ارتباط معنی‌داری بین سطوح فعالیت آنزیم‌های استرازی و به‌ویژه استیل کولین استراز با وجود آفت‌کش‌های فسفرهٔ آلی و کاربامات‌ها وجود دارد (Lockhart *et al*., 1985; Moralev *et al*., 2003; Arufe *et al*., 2007; Corsi *et al*., 2007; Jung *et al*., 2007) و بازدارندگی فعالیت کولین استرازی در عضلات و مغز ماهیان اختصاصی‌ترین شاخص بیولوژیک تشخیصی برای تماس با این حشره‌کش‌هاست و به عبارت دیگر این آفت‌کش‌ها از مهم‌ترین مهارکننده‌های استرازی‌اند

Kriby *et al*., 2000; Dizer *et al*., 2001; Ferrari *et al*., 2007; Varo *et al*., 2008). همچنان که Cong *et al*. (2008; 2009) نشان دادند که اثر دیازینون مصرفی در شالیزارها فعالیت استرازی مغز ماهی سرماری را مهار می‌کند و این آفت‌کش سبب تشکیل کمپلکس دیازینون- استراز در اکثر ماهیان در معرض آفت‌کش شده بود. با توجه به نتایج پژوهش Ebrahimzade *et al*. (2004)، می‌توان دریافت که نواحی جلگه‌ای رودخانه‌ها دارای آلودگی آفت‌کش به مراتب بیشتری نسبت به دریا و آب چاه است و درصد مهارشدگی آنزیم استیل کولین استراز بافت مغز در ماهیان پرورش‌یافته با آب رودخانه افزایش معنی‌داری به نسبت سایر منابع آبی داشت. در این پژوهش نیز ایستگاه دو، چهار و پنج به علت قرارداشتن در ناحیه‌ای جلگه‌ای با وجود مزارع کشاورزی بیشتر و سرعت جریان آب کمتر، دارای قدرت محدودی در خودپالایی به نسبت ایستگاه‌های اول و سوم است. بنابراین میزان فعالیت ویژه و مهارشدگی آنزیم‌های استرازی جمعیت سیاه‌ماهیان ساکن در آن‌ها به ترتیب کاهش و افزایش به مراتب بیشتری داشته است.

با توجه به این‌که تاکنون واحد صنعتی عمده‌ای به منظور استفاده از آب گرگان‌رود در حاشیهٔ آن خصوصاً در زیرحوضه‌هایی مثل زرین‌گل و محمدآباد مستقر نشده است (Shapouri *et al*., 2010)، مهارشدگی در سطح آنزیم‌های استرازی و به‌ویژه استیل کولین استراز ماهیان به دلیل وجود این آفت‌کش‌ها احتمال بیشتری خواهد داشت. کاهش معنی‌دار سطح آنزیم‌های مورد سنجش در فصل تابستان و بیشینهٔ این سطح در فصل زمستان با یافته‌های پژوهش Shayeghi *et al*. (2008) همخوانی دارد، اما در مورد سایر فصول این امر صادق نیست. در واقع آلوده‌ترین زمان متعلق به فصل تابستان بود، که مهارشدگی آنزیم‌های مورد نظر بیش از سایر فصول است. در فصل بهار، وجود سیلاب‌ها و دبی بالای آب در رودخانه‌ها سبب خودپالایی سریع آن‌ها می‌شود و بدین سان بسیاری از آلاینده‌های آلی مثل سموم فسفرهٔ آلی به‌سرعت هیدرولیز می‌شوند و آلودگی در آن‌ها کاهش می‌یابد (Abbasian *et al*., 2008). بنابراین مشاهدهٔ سطوح بالاتر استیل کولین استراز و سایر استرازها نسبت به فصل تابستان قابل انتظار است. در مطالعه‌ای که کرایبی و همکاران با اندازه‌گیری میزان فعالیت کولین استراز بافت عضله، به‌منزلهٔ شاخصی زیستی، انجام دادند کاهش معنی‌داری در فعالیت استرازی در فصول گرم سال نشان داده شد (Kriby *et al*., 2000) و بر یافته‌های این پژوهش منطبق است که کاهش سطح آنزیمی در فصول بهار و تابستان را نشان می‌دهد.

یافته‌ها نشان می‌دهند که بین سطوح استراز عمومی در بافت‌های عضله، مغز و کبد جمعیت سیاه‌ماهیان بین هر پنج ایستگاه اختلاف معنی‌داری وجود دارد، اما در سطوح استیل کولین استراز وضعیت متفاوت است؛ به طوری که در بافت‌های کبد و ماهیچه بین ایستگاه‌های اول و سوم از نظر آماری اختلاف معنی‌دار وجود نداشت. این تفاوت‌نداشتن احتمالاً می‌تواند به علت تشابه محیط کوهستانی- جنگلی این دو ایستگاه باشد، اما در بافت مغز تفاوت معنی‌داری بین این دو ایستگاه دیده می‌شود، در صورتی که شاهد اختلافی در بین ایستگاه‌های یک، دو و چهار از لحاظ آماری نیستیم.

شاید علت این است که این بافت چندان قادر به نشان‌دادن تفاوت‌ها نیست. نمونه‌های صیدشده از ایستگاه سوم سطوح نرمالی از فعالیت آنزیمی را به نمایش گذاشتند و میانگین سطح فعالیت آنزیم‌های استرازی نسبت به سایر ایستگاه‌ها دارای بیشینهٔ فعالیت ویژه و کمترین حد مهارشدگی بود و حدود متغیری از سطح فعالیت آنزیمی و مهارشدگی با آلاینده‌ها در نمونه‌های سایر ایستگاه‌ها وجود داشت. در میان آن‌ها نمونه‌های ایستگاه پنجم دارای مهارشدگی شدیدی در سطوح آنزیم‌های استراز عمومی و استیل کولین استراز نسبت به سایر ایستگاه‌ها بودند. این امر با توجه به میزان پایین دبی آب این ایستگاه خصوصاً در فصل تابستان، دمای بالای ثبت‌شده (۳۲/۸ درجه سانتی‌گراد) و در نتیجه تبخیر شدیدتر در این ناحیه توجیه‌پذیر است. با توجه به این‌که در اواخر بهار و سراسر فصل تابستان چندین بار مزارع و باغات این ناحیه سم‌پاشی می‌شوند (Abyar & Kiani, 2001) همچنین به علت نبود امکان خودپالایی (Olomi, 2001; Shapouri *et al.*, 2010)، آفت‌کش‌ها ماندگاری بیشتری نسبت به سایر ایستگاه‌ها (با دبی بالاتر) داشتند و میزان تأثیر این آلاینده‌ها در مواجهه با جمعیت ماهیان افزایش می‌یابد و به همان نسبت میزان مهارشدگی کولین استراز نیز بالا می‌رود. به علاوه دمای بالای آب در این ناحیه باعث افزایش متابولیسم ماهیان می‌شود و اثر مادهٔ ناگوارد را بیشتر می‌کند (Lang *et al.*, 1997).

در نهایت می‌توان این طور نتیجه‌گیری کرد که استفاده از استرازهای عمومی بافت ماهیچه و استیل کولین استراز کبدی این گونه ماهی (*C. capoeta gracilis*)، به‌منزلهٔ شاخصی زیستی در تعیین و درجه‌بندی آلودگی اکوسیستم‌های آب‌های جاری مورد پایش، نتایج بهتری (نزدیک‌تر به واقعیت) را در پی دارد؛ به‌ویژه که برنامه‌های پایش محیط زیست در فصول گرم سال و هم‌زمان با تقویم زراعی و سم‌پاشی زمین‌های کشاورزی صورت گیرد. همچنین، علاوه بر شاخص‌های عصبی- عضلانی مانند آنزیم‌های استرازی و استیل کولین استراز، استفاده از سایر شاخص‌های زیستی نیز به منظور پایش تکمیلی محیط زیست آبی ضروری است. تحقیقات چندجانبه در نواحی بحرانی (بسیار آلوده) که طیف وسیعی از آلاینده‌ها دارند پیشنهاد می‌شود.

تقدیر و تشکر

در این‌جا از سرکار خانم دکتر باقری و جناب آقای مهندس منتجمی برای یاری و راهنمایی‌های بی‌شائبه‌شان در این پژوهش سپاس‌گزاری می‌کنیم.

References

[1]. Abbasian, H., Ashayeri, A., and Hasanzadeh, H., 2008. Agricultural drainage water in the Caspian sea and their ecological impacts. Aqua Sciences 5, 123-129.

[2]. Abdoli, A., Hasanzadeh Kiyabi, B., Hajimoradlo, A., Kamali, A., 1999. Limnological Study on Gorganroud River. Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan University. 3, 108-121 (In Persian).

[3]. Abyar, N., Kiani, A.R., 2001. Economic evaluation of wheat farms using saltwater in Golestan province. Journal of Agricultural Economics 11(1), 45-52 (In Persian).

[4]. Arufe, M.I., Arellano, J.M., García, L., Albendín, G., and Sarasquete, C., 2007. Cholinesterase activity in gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae: characterization and sensitivity to the organophosphate azinphosmethyl. Aquatic Toxicology 84, 328-336.

[5]. Azarmdel, H., Mostafazadeh, R., Ghasemi, A., 2010, Assessment of surface water quality network stations Gorganrood river Golestan Province. Iran Watershed Science and Engineering 4, 98-111 (In Persian).

[6]. Cong, N.V., Phuong, N.T., 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.

[7]. 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.

[8]. Corsi, I., Pastore, A.M., Lodde, A., Palmerini, E., Castagnolo, L., and Focardi, S., 2007. Potential role of cholinesterases in the invasive capacity of the freshwater bivalve, *Anodonta woodiana* (Bivalvia: Unionacea): A comparative study with the indigenous species of the genus, *Anodonta* sp. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 145, 413-419.

[9]. Dizer, H., da Silva de Assis, H.C., and Hansen, P.D., 2001. Cholinesterase Activity as a Bioindicator for Monitoring Marine Pollution in the Baltic Sea and the Mediterranean Sea. In: Biomarkers in Marine Organisms, edited by Philippe G ,Hartmut B, Colin HW, Jean François NarbonneA2 - Philippe Garrigues HBCHW, and Jean François N. Amsterdam: Elsevier Science p. 331-342.

[10]. Ebrahimzade, M.A., Karami, M., Golrokh, M., 2004. Determination of cholinesterase enzyme activity in the brain of *Rutilus frisii kutum* in variety of marine and cultural as indicator of this fish. Journal of Shahrekord University of Medical Science 6(3), 33-38 (In Persian).

[11]. Ellman, G.L., Courtney, K.D., and Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology 7, 88-90, IN81, 91-95.

[12]. 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.

[13]. Ferrari, A., Venturino, A., and Pechén de D'Angelo, A.M., 2007. Muscular and brain cholinesterase sensitivities to azinphos methyl and carbaryl in the juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 146, 308-313.

[14]. Jung, J.H., Addison, R., and Shim, W.J., 2007. Characterization of cholinesterases in marbled sole, *Limanda yokohamae*, and their inhibition in vitro by the fungicide iprobenfos. Marine Environmental Research 63, 471-478.

[15]. Kirby, M., Morris, S., Hurst, M., Kirby, S., Neall, P., Tylor, T., and Fagg, A., 2000. The use of cholinesterase activity in flounder (*Platichthys flesus*) muscle tissue as a biomarker of neurotoxic contamination in UK estuaries. Marine Pollution Bulletin 40, 780-791.

[16]. Lam, P.K.S., and Gray, J.S., 2003. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. Marine Pollution Bulletin 46, 182-186.

[17]. Leticia, A.G., and Gerardo, G.B., 2008. Determination of esterase activity and characterization of cholinesterases in the reef fish *Haemulon plumieri*. Ecotoxicology and Environmental Safety 71, 787-797.

[18]. Lockhart, W., Metner, D., Ward, F., and Swanson, G., 1985. Population and cholinesterase responses in fish exposed to malathion sprays. Pesticide Biochemistry and Physiology 24, 12-18.

[19]. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biology and Chemistry 193, 265-275.

[20]. 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.

[21]. Moralev, S., Esaulova, A., Kurapov, A., Rozengart, E., and Khovanskikh, A., 2003. The Study of Cholinesterase Activity of the Liver of Some Fish of Caspian Sea. Springer, 2003, p. 271-273.

[22]. Olomi, Y., 2001, Study of some biological characteristics of Gorganroud during 1990-1991. Scientific Journal of Fisheries, Fisheries Research Institute of Iran, 2: 23-34 (In Persian).

[23]. 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.

[24]. Samaee, S.M., Mojazi-Amiri, B., and Hosseini-Mazinani, S.M., 2006. Comparison of *Capoeta capoeta gracilis* (Cyprinidae, Teleostei) populations in the south Caspian Sea River basin, using morphometric ratios and genetic markers. Folia Zoologica-Praha- 55, 323.

[25]. Shapouri, M., Zolriasatein, N., Azarpad, H., 2010. Rapid assessment of Gorganroud water quality based biomarkers. Science and Technology of Natural Resources 5, 13-23 (In Persian).

[26]. Shayeghi, M., Khoobdel, M., Bagheri, F., 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).

[27]. Solé, M., Lobera, G., Aljinovic, B., Ríos, J., Garcia de la Parra, L., Maynou, F., and Cartes, J.E., 2008. Cholinesterases activities and lipid peroxidation levels in muscle from shelf and slope dwelling fish from the NW Mediterranean: Its potential use in pollution monitoring. Science of the Total Environment 402, 306-317.

[28]. Sturm, A., Da Silva de Assis, H., and Hansen, P.D., 1999. Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination. Marine Environmental Research 47, 389-398.

[29]. Van Asperen, J., van Tellingen, O., van der Valk, M.A., Rozenhart, M., and Beijnen, J.H., 1998. Enhanced oral absorption and decreased elimination of paclitaxel in mice cotreated with cyclosporin A. Clinical Cancer Research 4: 2293-2297.

[30]. 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.