

ارزیابی استفاده از متالوتیونین به عنوان نشانگر زیستی فلزات سنگین (جیوه، کادمیوم، سرب و مس) در دوکفه‌ای *Crassostrea gigas* در منطقه بندر امام خمینی^(ه)

علی عظیمی^۱، علیرضا صفاهیه^{۲*}، علی داداللهی سهراب^۳، حسین ذوالقرنین^۴، بهناز صفار^۵، احمد سواری^۶

- ۱- کارشناس پژوهشی مؤسسه ملی اقیانوس‌شناسی ایران، تهران، پست الکترونیکی: azimi.1985@yahoo.com
- ۲- استادیار گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، استان خوزستان، خرمشهر، پست الکترونیکی: safahieh@hotmail.com
- ۳- استادیار گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، استان خوزستان، خرمشهر، پست الکترونیکی: p_dadolahi@yahoo.com
- ۴- استادیار گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، استان خوزستان، خرمشهر، پست الکترونیکی: zolgharnine@yahoo.com
- ۵- استادیار گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، پست الکترونیکی: saffar_b@sci.sku.ac.ir
- ۶- استاد گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، استان خوزستان، خرمشهر، پست الکترونیکی: savari53@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۹۰/۳/۳۰

* نویسنده مسوول

تاریخ دریافت: ۱۹/۱۰/۱۹

© نشریه علمی - پژوهشی اقیانوس‌شناسی ۱۳۹۱، تمامی حقوق این اثر متعلق به نشریه اقیانوس‌شناسی است.

چکیده

در این مطالعه از غلظت متالوتیونین به عنوان نشانگر زیستی فلزات سنگین به منظور پایش زیستی فلزات جیوه، کادمیوم، سرب و مس در دوکفه‌ای *Crassostrea gigas* در منطقه بندر امام خمینی^(ه) استفاده شده است. به این منظور صدف‌های متصل به اسکله‌های بندر امام خمینی از ۵ ایستگاه شامل اسکله پتروشیمی، داک سرسره، اسکله ۱۵، اسکله ۲۸ و اسکله ۳۳ در اسفند ماه ۱۳۸۸ جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه پس از مراحل آماده‌سازی و هضم شیمیایی، میزان فلزات سنگین بافت نرم دوکفه‌ای‌ها با دستگاه جذب اتمی اندازه‌گیری گردید. میزان متالوتیونین نیز پس از مراحل استخراج و رسوب‌دهی به روش اسپکتروفتومتری سنجش شد. میانگین غلظت‌های جیوه، کادمیوم، سرب و مس در بافت نرم دوکفه‌ای‌های نمونه برداری شده به ترتیب $3/12 \pm 2/7$ ، $10/34 \pm 3/98$ ، $7/1 \pm 3/30$ و $440/57 \pm 66/17$ میکروگرم بر گرم وزن خشک و دامنه غلظت متالوتیونین از $96/5 \pm 5/53$ تا $185/75 \pm 7/34$ میکروگرم بر گرم وزن تر در صدف‌های نمونه‌برداری شده از ایستگاه‌های مختلف بود. بیشترین مقادیر جیوه، سرب و مس در صدف‌های اسکله پتروشیمی و بیشترین غلظت کادمیوم در صدف‌های اسکله ۱۵ اندازه‌گیری شد. صدف‌های ایستگاه اسکله ۲۸ کم‌ترین مقادیر آلودگی فلزات اندازه‌گیری شده را نشان دادند. به همین ترتیب کمترین میزان ستر متالوتیونین نیز در صدف‌های اسکله ۲۸ مشاهده شد. بالاترین سطوح متالوتیونین در صدف‌های اسکله ۱۵ گزارش شد. در بین فلزات مطالعه شده همبستگی قوی و مثبتی بین غلظت‌های

کادمیوم و متالوتیونین در صدف‌های مورد مطالعه در تمام ایستگاه‌ها مشاهده شد ($P < 0.01$). سایر فلزات همبستگی معناداری با متالوتیونین نشان ندادند ($P > 0.05$). از نتایج حاصله استنباط می‌گردد که می‌توان از متالوتیونین دوکفه‌ای *C. gigas* به عنوان نشانگر زیستی فلز کادمیوم در منطقه بندر امام خمینی استفاده نمود.

کلمات کلیدی: متالوتیونین، نشانگر زیستی، فلزات سنگین، دوکفه‌ای *Crassostrea gigas*، بندر امام خمینی، خلیج فارس

۱. مقدمه

دسترسی زیستی آلاینده و اثر احتمالی آنان در اختیار قرار می‌دهد (Amiard et al., 2006).

متالوتیونین^۵ پروتئینی با وزن مولکولی کم در حدود ۶ تا ۸ هزار دالتون، سرشار از اسیدآمینه سیستئین (۳۰ - ۲۰ درصد)، غیر آنزیمی و متصل شونده به فلزات است (Linde et al., 2006). این پروتئین در پاسخ به آلودگی فلزات سنگین مانند جیوه، کادمیوم، مس و روی در بدن مهره داران و بی مهرگان سنتز می‌شود (Piccinni and Albergoni, 1996). مطالعات متعدد نشان داده است که رابطه‌ی مستقیمی بین میزان سنتز این پروتئین با غلظت فلزات سنگین در بافت‌های بدن آبزیان به‌ویژه دوکفه‌ای‌ها وجود دارد و از این نظر در مطالعات آلودگی می‌توان از آن به‌عنوان نشانگر زیستی فلزات سنگین در بوسامانه استفاده کرد (Langston et al., 1998).

بندر امام خمینی^(ه) در انتهای شمال غربی خلیج فارس واقع شده است و بزرگترین بندر ایران به‌شمار می‌رود. فعالیت صنایع و مجتمع‌های پتروشیمی در منطقه، تخلیه فاضلاب این واحدها به دریا و همچنین تردد فراوان کشتی‌ها و لایروبی رسوبات جهت سهولت در حرکت کشتی‌ها می‌تواند سبب افزایش میزان آلودگی از جمله فلزات سنگین در این منطقه شود. با توجه به احتمال آلودگی بندر امام خمینی به فلزات سنگین، لازم است برای مطالعات این آلاینده‌ها و اثر آن‌ها بر موجودات و بوسامانه، از نشانگرهای زیستی مناسب از جمله سنتز متالوتیونین در آبزیان به ویژه دوکفه‌ای‌ها بهره برد.

در ایران تحقیقات و مطالعات کمی در مورد تغییرات سامانه‌های درون سلولی آبزیان پس از قرارگیری در معرض عوامل آلاینده به ویژه فلزات سنگین صورت گرفته است. تاکنون مطالعه‌ای در کشورمان در زمینه استفاده از پروتئین متالوتیونین

فلزات سنگین از جمله آلاینده‌های مهم و خطرناک در محیط زیست دریا هستند که به دلیل پایداری در بخش‌های مختلف بوسامانه‌ی دریایی از جمله بافت‌های بدن آبزیان تجمع می‌نمایند. این فلزات با تأثیر بر فرایندهای فیزیولوژیک و حیاتی موجودات زنده برای آنان ایجاد سمیت می‌کنند. در بسیاری از موارد انتقال این فلزات از موجودی به موجود دیگر در طول زنجیره غذایی منجر به بزرگ‌نمایی زیستی^۱ (Mance, 1990) و حتی انتقال این آلاینده‌ها به انسان به عنوان مصرف‌کننده نهایی آبزیان می‌گردد، که این امر خطرات بالقوه‌ای را می‌تواند دربرداشته باشد (Zhou et al, 2007).

مطالعات زیست محیطی مربوط به آلاینده‌ها عمدتاً شامل پایش^۲ شیمیایی (اندازه‌گیری آلاینده‌ها در محیط مانند آب، رسوب، خاک) و زیستی (اندازه‌گیری آلاینده‌ها در بدن موجودات) در بوسامانه‌های طبیعی است (deMora et al., 2004; Abdallah and Abdallah, 2008). اگرچه پایش شیمیایی آلاینده‌ها نسبتاً ساده‌تر و در مواردی ارزان‌تر است، ولی اطلاعات کافی در مورد میزان دسترسی زیستی^۳ موجود زنده به آلاینده فراهم نمی‌سازد (Giusiti, 2001). از سوی دیگر محیط طبیعی دستخوش تغییرات شدید عوامل فیزیوشیمیایی حاکم قرار گرفته که این منجر به اختلاف فاحش در داده‌های حاصل از پایش شیمیایی آلاینده‌ها می‌گردد. پایش زیستی که با استفاده از نشانگرهای زیستی^۴ مناسب صورت می‌گیرد، روشی مطمئن‌تر بوده که اطلاعات قابل قبول‌تری را در مورد میزان

¹ Biomagnification

² Monitoring

³ Bioavailability

⁴ Biomarkers

⁵ Metallothionein

جدول ۱- موقعیت جغرافیایی ایستگاه‌های مورد مطالعه

نام ایستگاه	مختصات جغرافیایی	نوع فعالیت انسانی
اسکله پتروشیمی	۱۵° ۱۵' E ۰۶° ۰۶' N ۲۲/۶"	تخلیه پساب پتروشیمی
داک سرسره	۵/۴° E ۰۵° ۰۵' N ۲۹/۷"	تممیر کشتی‌ها
اسکله ۱۵	۳۱/۴° E ۰۳° ۰۳' N ۲۵/۵' ۵/۶"	تخلیه و پارگیری غلات
اسکله ۲۸	۲۰/۶° E ۰۴° ۰۴' N ۴۴/۸"	تخلیه و پارگیری مواد معدنی
اسکله ۳۳	۰۱° E ۰۲° ۰۲' N ۲۱/۲"	پارگیری مواد نفتی

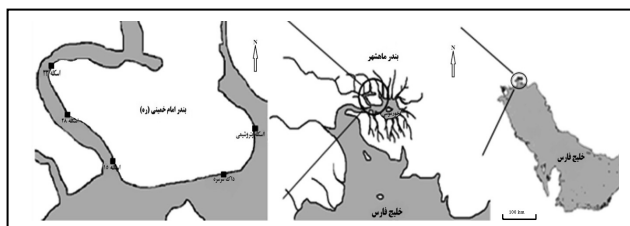
به‌عنوان بایومارکر فلزات سنگین در بی‌مهرگان همچون نرم‌تنان دوکفه‌ای منتشر نگردیده است.

هدف از انجام این تحقیق، مطالعه غلظت فلزات سنگین جیوه، کادمیوم، سرب و مس در دوکفه‌ای *Crassostrea gigas* و همبستگی آن‌ها با غلظت متالوتیونین در بافت نرم دوکفه‌ای به منظور ارزیابی امکان استفاده از آن به‌عنوان نشانگر زیستی در منطقه بندر امام خمینی بوده است.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱. نمونه‌برداری

نمونه‌برداری در اسفند ماه ۱۳۸۸ توسط قایق‌های صیادی در زمان جزر از اسکله‌های بندر امام خمینی صورت گرفت. بدین منظور صدف‌های هم‌اندازه (طول پوسته 35 ± 5 میلی‌متر) از ۵ ایستگاه شامل اسکله پتروشیمی، داک سرسره، اسکله ۱۵، اسکله ۲۸ و اسکله ۳۳ جمع‌آوری گردیدند. نقشه منطقه مورد مطالعه و موقعیت ایستگاه‌ها در منطقه در شکل ۱ و مختصات جغرافیایی ایستگاه‌های نمونه‌برداری در جدول ۱ نشان داده شده است. از هر ایستگاه تعداد ۶۰ صدف برداشت شد و بلافاصله درون یخدان محتوی یخ به آزمایشگاه منتقل گردیدند.



شکل ۱- نقشه منطقه‌ی مورد مطالعه و موقعیت ایستگاه‌ها در منطقه

سپس در آزمایشگاه به‌سرعت بافت نرم صدف‌ها از پوسته خارج و نیمی از نمونه‌ها (حدود ۳۰ عدد) به‌منظور سنجش میزان متالوتیونین، پس از رفع رطوبتشان ابتدا در نیتروژن مایع سپس تا زمان شروع سنجش در دمای 80°C - نگهداری شدند (Pellerin and Amiard, 2009). بقیه نمونه‌ها نیز جهت سنجش مقدار فلزات سنگین، تا زمان شروع سنجش در فریزر در دمای 20°C - نگهداری شدند (Gavrilovic et al., 2007).

۲-۲. آماده‌سازی نمونه‌ها و سنجش فلزات

بافت نرم صدف‌ها به‌مدت ۷۲ ساعت (تا ثابت شدن وزنشان) در خشک‌کننده انجمادی^۱ خشک گردید (Shi et al., 2005)، سپس با هاون چینی کاملاً پودر و یکنواخت شد. جهت سنجش فلزات کادمیوم، سرب و مس، ۱ گرم از بافت خشک یکنواخت شده را با افزودن ۱۰ میلی‌لیتر اسید نیتریک غلیظ و قرار دادن بر روی دستگاه هضم^۲، ۱ ساعت در دمای 40°C و ۳ ساعت در دمای 140°C هضم نموده و پس از سرد شدن نمونه‌ها، با آب دو بار تقطیر به حجم معین رسانده شدند و از کاغذ صافی واتمن ۴۲ عبور داده شدند (Yap et al., 2002). غلظت فلزات مذکور توسط دستگاه جذب اتمی (AAS) با شعله مدل GBC-Savanta Σ دستگاه جذب اتمی (AAS) با شعله مدل GBC-Savanta Σ سنجش گردید. به‌منظور حصول اطمینان از درستی نتایج به‌دست آمده، از ماده مرجع استاندارد Dorm-3 (fish protein، کانادا) برای سنجش درستی داده‌ها استفاده شد. درصد بازیافت نمونه‌های مرجع بین ۹۳٪ تا ۱۰۷٪ به‌دست آمد.

به‌منظور سنجش جیوه، ابتدا ۱ گرم از بافت خشک یکنواخت شده با ۵ میلی‌لیتر اسید نیتریک غلیظ و ۴۵ میلی‌گرم پنتا اکسید وانادیوم^۳ درون لوله‌های آزمایش مخلوط گردیده و پس از بستن درب لوله‌ها با فویل آلومینیومی، نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق قرار داده شدند. سپس آن‌ها به مدت ۳ ساعت در دمای 90°C هضم گردیدند. بعد از سرد شدن کامل نمونه‌ها، ۱ میلی‌لیتر محلول دی کرومات پتاسیم^۴ به آن‌ها افزوده شد و پس از به حجم رساندن و صاف کردن (MOOPAM, 1999)، میزان جیوه موجود در آن‌ها توسط دستگاه جذب اتمی بدون شعله

¹ Freeze drier

² Hot plate digester

³ V_2O_5

⁴ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

۲۰°C - نگهداری گردیدند و سپس با دور ۶۰۰۰ g برای ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب‌های محتوی متالوتیونین در مخلوط بافر یکنواخت کننده، اتانول ۸۷٪ و کلروفرم ۱٪ شسته شده، سپس برای ۱۰ دقیقه در دور ۶۰۰۰ g سانتریفیوژ و تحت جریان گاز نیتروژن خشک گردیدند (Kimura et al., 1979).

۴-۲. سنجش متالوتیونین

رسوب‌های خشک شده در ۱۵۰ میکرولیتر NaCl (۰/۲۵ مولار) به صورت سوسپانسیون^۹ درآمدند و سپس ۱۵۰ میکرولیتر اسید کلریدریک (۱ نرمال) که محتوی ۴ میلی مول EDTA بود به آن‌ها افزوده شد. ۴/۲ میلی لیتر NaCl (۲ مولار) محتوی ۰/۴۳ میلی مول^{۱۰} DTNB با بافر Na-phosphate (pH= ۸) مخلوط گردید (Ellmann, 1958) و در دمای اتاق به نمونه‌ها اضافه شد. در پایان، نمونه‌ها در دور ۳۰۰۰g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. جذب نوری ماده شناور در طول موج ۴۱۲ نانومتر اندازه‌گیری و غلظت متالوتیونین با استفاده از گلوکوتایون کاهیده^{۱۱} (GSH) به عنوان استاندارد مرجع تعیین گردید. میزان متالوتیونین با فرض محتوی سیستئین ۲۸٪ در متالوتیونین اویستر *C.gigas* محاسبه شد (Tanguy et al., 2002).

۵-۲. پردازش داده‌ها

به منظور بررسی پراکنش نرمال داده‌ها از آزمون Shapiro-wilk استفاده شد. از آنالیز واریانس یک طرفه برای مقایسه میانگین‌ها و پس آزمون دانکن جهت مقایسات چندگانه و معنی دار بودن اختلاف‌ها در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده گردید. از ضریب همبستگی پیرسون جهت بررسی میزان همبستگی سطوح متالوتیونین و غلظت فلزات استفاده شد. معادله رگرسیون خطی ساده $y = ax + b$ برای محاسبه معادله خط رگرسیون استفاده شد، که در آن y میزان متالوتیونین، x غلظت فلز در بافت صدف، a ضریب شیب خط و b عرض از مبدأ است.

(CVAAS) مدل UNICAM 919 با روش بخار سرد^۱ اندازه‌گیری شد. به منظور حصول اطمینان از صحت نتایج به دست آمده، از ماده مرجع استاندارد Dorm-3 (fish protein، کانادا) جهت سنجش درستی داده‌ها استفاده گردید. درصد بازیافت نمونه‌های مرجع بین ۹۸٪ تا ۱۰۲٪ به دست آمد.

برای تبدیل غلظت فلزات در وزن خشک بافت به وزن تر، بافت نرم ۲۰ صدف را به طور دقیق وزن نموده و پس از خشک شدن بافت‌ها در خشک‌کننده انجمادی و ثابت شدن وزنشان، وزن آن‌ها را مجدداً سنجیده و نسبت بین این دو محاسبه گردید. با استفاده ضریب به دست آمده (۰/۱۴۹) × غلظت فلز بر حسب وزن خشک = غلظت فلز بر حسب وزن تر (غلظت فلزات در وزن تر بافت محاسبه شد).

۳-۲. استخراج متالوتیونین

استخراج و سنجش متالوتیونین بر اساس روش تعریف شده توسط Viarengo و همکاران (۱۹۹۷) صورت گرفت. در این روش ابتدا ۱ گرم از بافت صدف توسط ۳ حجم بافر یکنواخت کننده^۲ کاملاً یکنواخت گردید. بافر تهیه شده شامل ساکارز (۰/۵ مول)، Tric-Hcl pH= ۸,۶ (۲۰ میلی مول) به علاوه لیوپپتین^۳ (۰/۰۰۶ میلی مول) و PMSF (۰/۵ میلی مول) به عنوان عوامل جلوگیری کننده از تجزیه پروتئین^۵ و بتا-مرکاپتواتانول^۶ (۰/۰۱٪) به عنوان عامل کاهنده بود. پس از آن مخلوط یکنواخت شده به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰۰ g در دمای صفر تا ۴°C به منظور استحصال ماده شناور^۷ محتوی متالوتیونین‌ها سانتریفیوژ گردید. سپس به ازای هر ۱ میلی لیتر ماده شناور به دست آمده، ۱/۰۵ میلی لیتر اتانول خالص سرد (۲۰°C-) و ۸۰ میکرولیتر کلروفرم افزوده گردید. نمونه‌ها برای ۱۰ دقیقه در دور ۶۰۰۰ g در دمای صفر تا ۴°C سانتریفیوژ شدند. سپس ۴۰ میکرولیتر اسید کلریدریک ۳۷٪ به ماده شناور حاصل شده اضافه شد و ماده شناور به ۳ حجم اتانول سرد (غلظت نهایی ۸۷٪) رسید. نمونه‌ها برای ۱ ساعت در دمای

¹ Cold vapor

² Homogenizing buffer

³ Leupeptine

⁴ Phenyl Methyl Sulphonyl Fluoride

⁵ Antiproteolytic agents

⁶ β-mercaptoethanol

⁷ Supernatant

⁸ Pellet

⁹ Resuspension

¹⁰ 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid

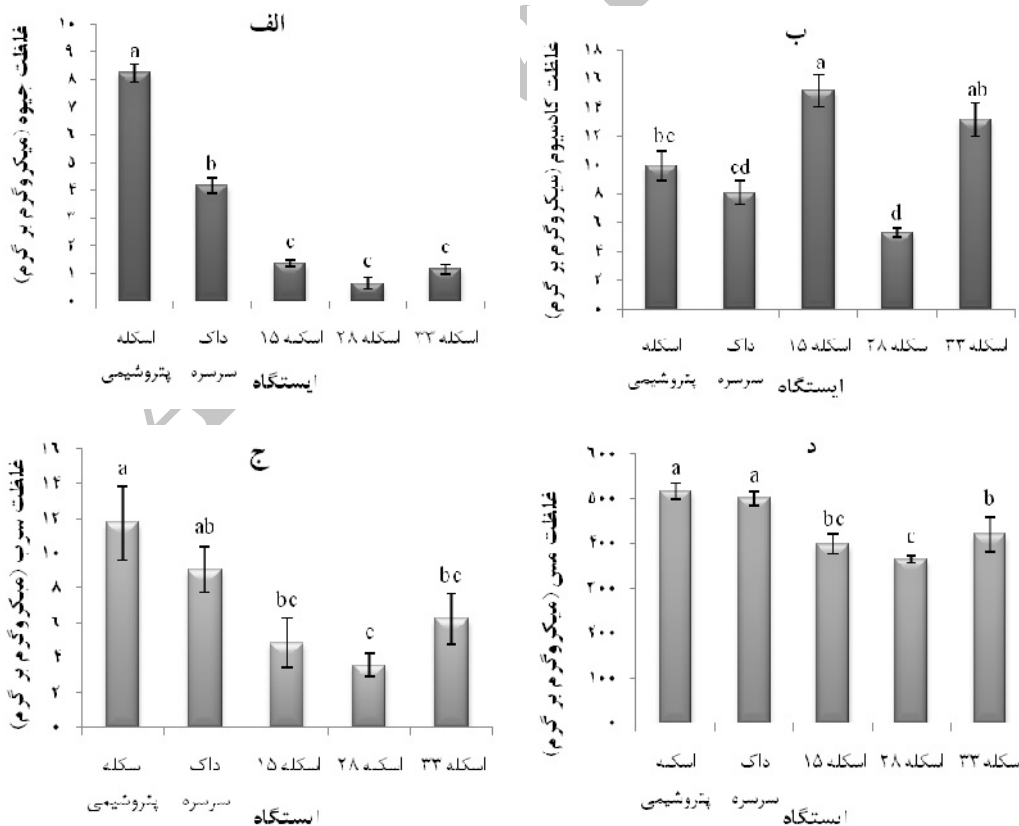
¹¹ Reduced glutathione

۳. نتایج

مطالعه شده بیشتر بود. میزان مس در صدف‌ها بین ۳۶۴/۹۸ تا ۵۱۷/۳۲ میکروگرم بر گرم اندازه‌گیری شد که دارای تفاوت معنی‌داری در بین ایستگاه‌های مختلف بود ($P < 0.05$, ANOVA). همانند فلزات جیوه و سرب، اسکله پتروشیمی بالاترین مقدار و اسکله ۲۸ کم‌ترین میزان مس را دارا بودند. بنابراین اسکله پتروشیمی به استثنای کادمیوم، نسبت به سایر فلزات مورد مطالعه، آلوده‌ترین ایستگاه شناخته شد. اسکله ۲۸ در مورد همه فلزات مورد مطالعه، پایین‌ترین میزان آلودگی را دارا بود (شکل ۲).

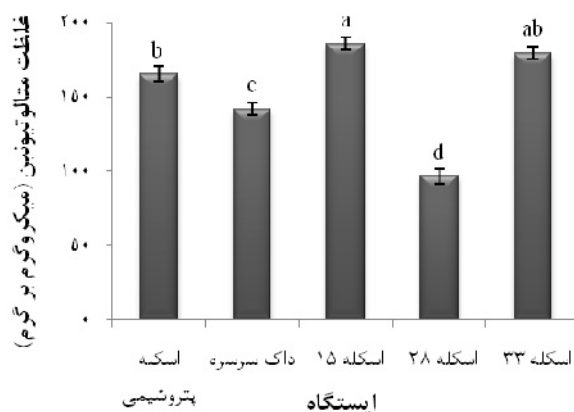
غلظت متالوتیونین در بافت نرم دوکفه‌ای *C.gigas* در ایستگاه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری را نشان داد ($P < 0.05$, ANOVA). بالاترین غلظت متالوتیونین (185.75 ± 7.34) میکروگرم بر گرم وزن تر) در ایستگاه اسکله ۱۵ اندازه‌گیری شد، در حالی که کمترین مقدار آن (96.5 ± 5.53) میکروگرم بر گرم وزن تر) در اسکله ۲۸ به‌دست آمد. میزان متالوتیونین در ایستگاه‌های دیگر 165.32 ± 9.27 ، 141.67 ± 7.49 ، 179.53 ± 7.19 به ترتیب برای ایستگاه‌های اسکله پتروشیمی، داک سرسره و اسکله ۳۳ بود (شکل ۳).

غلظت جیوه در بافت نرم دوکفه‌ای *C.gigas* بین ۰/۶۶ تا ۸/۲۴ میکروگرم بر گرم وزن خشک سنجیده شد. بین غلظت جیوه در ایستگاه‌های مختلف اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید ($P < 0.05$, ANOVA). بر این اساس بیشترین مقدار جیوه در ایستگاه اسکله پتروشیمی و کمترین مقدار آن در اسکله ۲۸ اندازه‌گیری شد. غلظت کادمیوم در بافت نرم صدف بیشتر از غلظت جیوه بود و بین ۵/۲۳ تا ۱۵/۱۸ میکروگرم بر گرم وزن خشک اندازه‌گیری شد، غلظت کادمیوم در صدف‌های جمع‌آوری شده از ایستگاه‌های مختلف دارای تفاوت معنی‌داری بود ($P < 0.05$, ANOVA). بالاترین میزان آن مربوط به اسکله ۱۵ و کمترین میزان مربوط به اسکله ۲۸ بود. غلظت سرب در بافت نرم دوکفه‌ای از دامنه ۳/۵۸ تا ۱۱/۷۳ میکروگرم بر گرم برخوردار بود و اختلاف معنی‌داری در بین ایستگاه‌های مختلف نشان داد ($P < 0.05$, ANOVA)، که بالاترین مقدار مربوط به اسکله پتروشیمی و کمترین مقدار مربوط به اسکله ۲۸ بود. غلظت مس در بافت نرم دوکفه‌ای به مراتب از دیگر فلزات

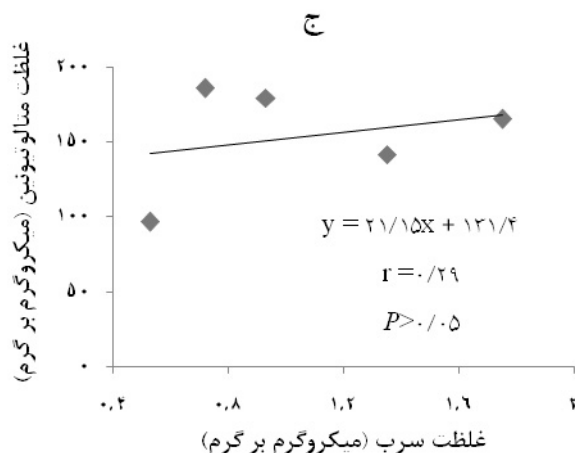
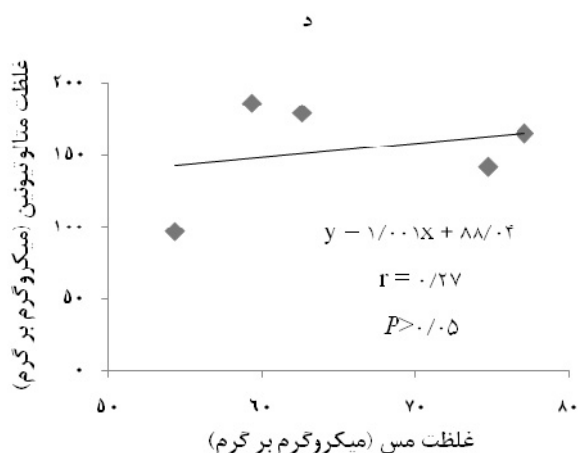
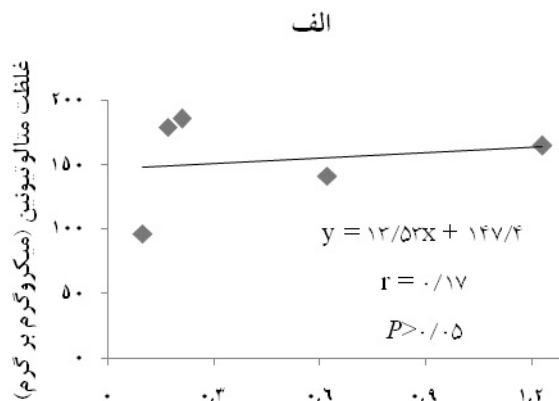
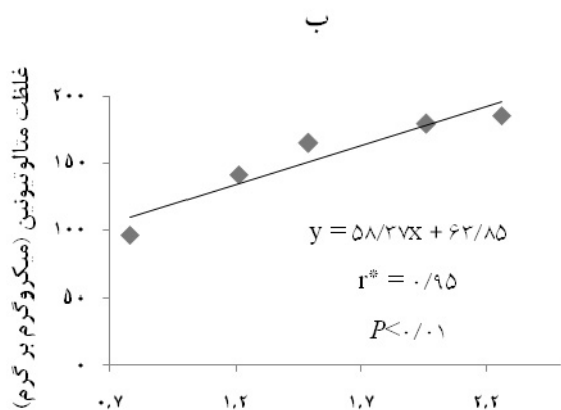


شکل ۲- مقایسه غلظت فلزات سنگین در بافت نرم دوکفه‌ای *C.gigas* در ایستگاه‌های مختلف (بر حسب میکروگرم بر گرم وزن خشک): الف) جیوه، ب) کادمیوم، ج) سرب، د) مس. (مقادیر مشخص شده با حروف متفاوت، دارای تفاوت معنی‌داری هستند ($P < 0.05$)).

شکل ۴ همبستگی بین غلظت هر یک از فلزات جیوه، کادمیوم، سرب و مس را با سطوح متالوتیونین در بافت نرم صدف نشان می‌دهد. به منظور بررسی همبستگی میان غلظت فلزات با سطوح متالوتیونین، غلظت فلزات بر اساس وزن تر محاسبه شد. نتایج حاصله نشان داد که بین غلظت فلز کادمیوم و میزان متالوتیونین در بافت نرم صدف در ایستگاه‌های مورد مطالعه ارتباط مستقیم، قوی و معنی‌داری وجود دارد ($P < 0.01$). در عین حال ارتباط معنی‌داری بین غلظت فلزات جیوه، سرب و مس بافت نرم صدف و سطوح متالوتیونین مشاهده نشد ($P > 0.05$).



شکل ۳ میانگین سطوح متالوتیونین در بافت نرم دوکفه‌ای *C.gigas* در ایستگاه‌های مورد مطالعه (ستون‌های مشخص شده با حروف متفاوت، دارای تفاوت معنی‌داری هستند ($P < 0.05$)).



شکل ۴- همبستگی بین غلظت فلزات سنگین (میکروگرم بر گرم وزن تر) با محتوای متالوتیونین (میکروگرم بر گرم وزن تر) در بافت نرم دوکفه‌ای *C.gigas* در ایستگاه‌های مورد مطالعه: الف) جیوه، ب) کادمیوم، ج) سرب، د) مس

۴. بحث و نتیجه گیری

مقادیر جیوه، کادمیوم، سرب و مس در بافت نرم صدف‌ها در بین ایستگاه‌های مختلف دارای اختلافات معناداری بود ($P < 0/05$, ANOVA). این امر می‌تواند حاکی از این باشد که منابع آلودگی به صورت نقطه‌ای در این بندر وجود دارد. میزان جیوه در بافت نرم صدف‌های ایستگاه اسکله پتروشیمی و نیز داک سرسره که در نزدیکی آن است بالا است. فعالیت واحد کلرالکالی مجتمع پتروشیمی بندر امام که پساب آن محتوی مقادیر بالای جیوه است (کاظمی، ۱۳۸۱)، فعالیت‌های مربوط به بارگیری و تخلیه کشتی‌ها در منطقه، مصرف سوخت‌های فسیلی توسط کشتی‌ها و واحدهای پتروشیمی و بارگیری نفت خام در بندر امام خمینی می‌توانند از جمله دلایلی برای افزایش مقدار فلزاتی همانند جیوه در این منطقه باشند. با فاصله گرفتن از منابع پتروشیمی و منطقه ویژه از میزان جیوه در صدف‌ها کاسته شد. UNEP نیز در سال ۱۹۹۷ بیان نمود عواملی مانند سوختن سوخت‌های فسیلی، فعالیت کارخانه‌های کلرالکالی و ریزش ترکیبات نفتی می‌توانند دلایلی بر افزایش جیوه در منطقه باشند. همچنین Alam و Sadiq در سال ۱۹۹۲ دریافتند که دوکفه‌ای‌های *Meretrix meretrix* که از ایستگاه‌های نزدیک به بندرگاه‌ها و محل بارگیری و ریزش مواد نفتی در خلیج فارس جمع آوری شده بودند محتوای جیوه بیشتری نسبت به دوکفه‌ای‌های جمع‌آوری‌شده از مکان‌های دیگر داشتند.

مقادیر بالایی از کادمیوم در اسکله ۱۵ (محل تخلیه غلات) و اسکله ۳۳ (محل بارگیری مواد نفتی) مشاهده شد. فلز کادمیوم دارای کاربردهای مختلفی است. این فلز در رنگ‌هایی که برای آبرکاری استفاده می‌شوند و همچنین در مواد نگه دارنده رنگ به کار می‌رود (CCREM, 1987). در اسکله ۱۵ صدف‌ها بر روی پایه‌های فلزی که توسط رنگ‌های آنتی فولینگ پوشیده شده‌اند، زیست می‌کنند. این رنگ‌ها حاوی مقادیری کادمیوم هستند. لذا تغییر در میزان شوری، حرارت، و pH آب می‌تواند سبب آزاد شدن و افزایش دسترسی زیستی این فلز برای ارگانسیم‌های زنده از جمله صدف‌ها یا غذای آن‌ها در این ایستگاه شود (Knezovich et al., 1994). همچنین ترافیک کشتی در این اسکله فوق‌العاده بالا است. بدنه این کشتی‌ها که با رنگ پوشیده می‌شوند در مجاورت صدف‌ها قرار می‌گیرند. لذا این عمل نیز می‌تواند باعث افزایش غلظت کادمیوم در بافت نرم دوکفه‌ای شود. یکی دیگر از منابع کادمیوم احتراق سوخت‌های فسیلی است (CCREM, 1987).

بر اساس نتایج به دست آمده، توالی غلظت فلزات سنگین در بافت نرم دوکفه‌ای *C. gigas* در بندر امام خمینی به صورت $Cu > Hg > Pb > Cd$ است. این روند نشان می‌دهد که فلز مس در دوکفه‌ای *C. gigas* نسبت به فلزات جیوه، کادمیوم و سرب دارای تجمع بیشتری است. به طور کلی صدف‌ها می‌توانند فلزاتی مانند مس و روی را در غلظت‌هایی بسیار بالا بدون هیچ گونه اثرات زیان‌آور در بدن خود تجمع دهند (Chen et al., 2003). فلز مس فلزی ضروری است که صدف‌ها از آن برای ساخت هموسیانین جهت انجام فرایند تنفس استفاده می‌کنند (Caussy et al., 2003). الگوی به دست آمده از فلزات نشان می‌دهد که دوکفه‌ای‌ها احتمالاً فلز مس جذب شده را در بافت نرم خود ذخیره می‌کنند. غلظت بالای مس در بافت نرم به احتمال زیاد مربوط به غلظت بالای هموسیانین در بافت صدف است. محققین دیگری نیز در مطالعه نرم‌تنان از قبیل *Crassostrea virginica* (Greig et al., 1975)، *Saccostrea cuculata* (Chen et al., 2003) و *Fowler* (et al., 2007) به نتیجه‌ی مشابهی دست یافته‌اند. غلظت فلز کادمیوم نیز در بافت نرم صدف‌ها در منطقه‌ی بندر امام خمینی به طور کلی بالا بود. این نتیجه نشان دهنده این نکته است که دسترسی زیستی این فلز در محیط، بالا بوده و باعث افزایش تجمع در بافت شده است (Paez-Osuna et al., 1999). همچنین کادمیوم دارای فاکتور تغلیظ‌سازی زیستی بسیار بالایی است که این امر به علت دفع بسیار ضعیف آن توسط دوکفه‌ای‌ها است (Warren et al., 1998). جذب کادمیوم دارای مکانیسم مشابهی با جذب کلسیم و آهن بوده و بنابراین با یک عنصر ضروری اشتباه گرفته شده و جذب می‌شود (Rainbow et al., 2003). از این رو جذب کادمیوم به وضعیت تشدید کمبود آهن کمک می‌کند (Thompson, 2005). یکی از منابع اصلی کادمیوم در محیط دریایی فاضلاب و لجن حاصل از تصفیه آن می‌باشد (Rainbow, 2005; 2006). گسترش شهرهای سربندر و ماهشهر می‌تواند بر آلودگی آب‌های منطقه بیافزاید. با افزایش توسعه شهری مقدار فاضلاب‌های تخلیه شده به آب‌های خور نیز افزایش می‌یابد. ترتیب فلزات در بافت نرم صدف‌ها در این منطقه در مقایسه با بسیاری از مطالعات انجام شده در مناطق آبی دیگر دارای روند مشابهی است (Jeng et al., 2000; Chen et al., 2003; de Astudillo et al., 2005; Gaspic et al., 2007).

جدول ۲- مقایسه غلظت فلزات سنگین (میکروگرم بر گرم در وزن خشک) در صدف دوکفه‌ای *C. gigas* با سایر نقاط جهان

منبع	مس	سرب	کادمیوم	جیوه	منطقه	گونه
فقیری، ۱۳۸۸	۶۶۲/۰۱	۱۱/۹۰	—	۵/۵۲	بندر امام خمینی	<i>C.gigas</i>
Jeng et al., 2000	۲۲۹/۵	۰/۴۴۶	۰/۳۸۹	۰/۲۷۰	سواحل تایوان	<i>C.gigas</i>
Amiard et al., 2005	۵۵/۰۰	۰/۲	۰/۱۲	—	سواحل مدیترانه	<i>C.gigas</i>
Maanan, 2008	۲۴/۱	۶/۷	۲/۱	—	خلیج Morrocan	<i>C.gigas</i>
Kumar et al., 2008	—	<۱/۵-۴	<۱/۵-۲/۹	۰/۰۹۳-۰/۹۱	مصب ساوانا (آمریکا)	<i>C.virginica</i>
Fowler et al., 2007	۵۱/۵	۰/۲۱	—	۰/۰۴۹	سواحل عمان	<i>Saccostrea cucullata</i>
Einollahi et al., 2010	۲۰۸/۸۶	۴/۵۵	—	—	سواحل چابهار- عمان	<i>Saccostrea cucullata</i>
Besada et al., 2002	۵۰/۱	۰/۹-۳	۰/۵-۲/۷	۱۲۵	خلیج Ussurigsky (اسپانیا)	<i>Mytilus galoprovincialis</i>
مطالعه حاضر	۴۴۰/۵۷	۷/۱	۱۰/۲۳	۳/۱۲	بندر امام خمینی(ره)	<i>C.gigas</i>

دارا بودند. به طوری که غلظت متالوتیونین در بافت نرم صدف‌های ایستگاه‌های دیگر حدوداً دو برابر غلظت این پروتئین در صدف‌های ایستگاه اسکله ۲۸ اندازه‌گیری شد. میزان متالوتیونین بافت نرم صدف‌ها در اسکله ۱۵ بالاتر از ایستگاه‌های دیگر گزارش شد، از طرفی تجمع کادمیوم نیز در صدف‌های این ایستگاه بالاتر از سایر ایستگاه‌ها بود. با توجه به همبستگی قوی مستقیم و معنی‌دار کادمیوم با غلظت متالوتیونین در صدف‌ها علت افزایش سنتز متالوتیونین را می‌توان به غلظت بالای کادمیوم در این صدف‌ها نسبت داد، به نظر می‌رسد که دسترسی زیستی بالای کادمیوم در این ایستگاه سبب تحریک بیشتر سنتز متالوتیونین در دوکفه‌ای *C.gigas* به عنوان مکانیسم سم زدایی این فلز شده است. در تأیید این فرضیه، محققین مختلفی نیز در مطالعات میدانی بر روی اویسترها و ماسل‌ها دریافته‌اند که در میان فلزات سنگین کادمیوم قوی‌ترین محرک جهت سنتز متالوتیونین می‌باشد (Geret, Geffard., 2001, 2002; Pellerin and Amiard, 2009) (2000).

شرط اساسی برای مناسب بودن یک نشانگر زیستی در برنامه‌های پایش زیستی، وجود رابطه همبستگی مستقیم بین غلظت فلزات سنگین و میزان نشانگر زیستی در بدن موجود مورد مطالعه است. در حالت‌های ایده‌آل این رابطه بایستی به صورت خطی باشد (Amiard et al., 2006). نتایج این مطالعه نشان داد که بین غلظت کادمیوم در بافت نرم *C.gigas* و سطوح متالوتیونین همبستگی قوی مستقیم و معنی‌داری وجود دارد ($P < 0/01$). این نتیجه، قابلیت فلز سنگین کادمیوم را برای القاء بیوسنتز^۱ متالوتیونین در این گونه بی‌مهره نشان می‌دهد. تحریک

ترافیک سنگین کشتی در اسکله ۳۳ و نیز بارگیری سوخت‌های فسیلی و مواد نفتی و ریزش اتفاقی این مواد در اسکله ۳۳ می‌تواند از دلایل افزایش کادمیوم در این اسکله باشد. کمترین مقدار کادمیوم در اسکله ۲۸ و داک سرسره مشاهده شد. دلایل مختلفی برای این امر وجود دارد. کمترین تراکم و پهلوگیری کشتی در اسکله ۲۸ اتفاق می‌افتد، همچنین در این اسکله صدف‌ها بر روی پایه‌های بتونی زیست می‌کنند. هیچ کشتی بزرگی به داک سرسره وارد نمی‌شود. در داک سرسره باراناکل‌ها بر روی تخته‌های چوبی رشد می‌کنند که فاقد رنگ است. این موارد باعث کاهش دسترسی زیستی کادمیوم در این ایستگاه‌ها شده است.

عنصر مس و سرب در صنایع پتروشیمی کاربردهای زیادی دارند و به میزان زیادی استفاده می‌شوند. فاضلاب واحد آمونیاک و واحد استالدئید که در مجاورت اسکله پتروشیمی تخلیه می‌شود، از بار آلودگی مواد ازته، آمونیاک، روغن، کلراستالدئید، سرب، کلرید مس و مس برخوردار است (منوری، ۱۳۸۱). به همین دلیل وجود مقادیر بالای سرب و مس در اسکله پتروشیمی و بعد از آن در داک سرسره که در نزدیکی آن است، احتمالاً به عوامل فوق مربوط می‌شود.

محققین مختلفی ثابت نموده‌اند که در یک گونه واحد، جمعیت‌هایی که در محیط آلوده به فلز زندگی می‌کنند غلظت‌های بالاتری از متالوتیونین دارند (Stuhlbacher et al., 1992; Ross et al., 2002). در این مطالعه نیز مشاهده شد که در بین ایستگاه‌های مورد مطالعه، صدف‌های ایستگاه اسکله ۲۸ که آلودگی کمتری نسبت به سایر ایستگاه‌ها به همه فلزات مورد مطالعه (جیوه، کادمیوم، سرب و مس) داشتند، پایین‌ترین غلظت متالوتیونین را

¹ Biosynthesis

C. gigas را در آزمایشگاه در معرض فلزات جیوه، کادمیوم، نقره، مس و روی محلول در آب قرار داد و مشاهده نمود که در واکنش به همه فلزات مطالعه شده افزایش معنی‌داری در غلظت‌های متالوتیونین حاصل شد. در حالی‌که Pellerin و Amiard در سال ۲۰۰۹ در مطالعه‌ای میدانی بر روی دوکفه‌های *Mya arenaria* که از دو منطقه پاک و آلوده در ساحل شمالی مصب Lawrence نمونه برداری کرده بودند، مشاهده نمودند در بین فلزات جیوه، کادمیوم، مس و روی تنها فلز کادمیوم همبستگی مثبت و معنی‌داری با متالوتیونین داشت.

غلظت‌های سرب و مس در بافت نرم صدف‌های ایستگاه اسکله ۲۸ به طور معنی‌داری از سایر ایستگاه‌ها پایین‌تر بودند؛ به‌همین ترتیب سطوح متالوتیونین نیز در این ایستگاه به‌طور معنی‌داری پایین‌تر از سایر ایستگاه‌ها اندازه‌گیری شد، با این وجود همبستگی مثبت و معنی‌داری بین غلظت‌های سرب و مس و سطوح متالوتیونین در ایستگاه‌های مورد مطالعه به‌دست نیامد ($P > 0.05$)، این نتیجه در تطابق با بسیاری از مطالعات انجام شده در شرایط میدانی در مورد مس و سرب است. در مطالعه‌ای که Boutet و همکاران در سال ۲۰۰۲ بر روی صدف‌های *C. gigas* در شرایط میدانی انجام دادند مشاهده کردند که اگرچه غلظت‌های متالوتیونین به‌طور کلی در ایستگاه‌های آلوده افزایش یافته است، اما همبستگی بین غلظت‌های هر یک از فلزات سرب و مس با غلظت‌های متالوتیونین معنی‌دار نبود. همچنین Geffard و همکاران در سال ۲۰۰۱ و ۲۰۰۲ اثر آلودگی فلزات کادمیوم، مس و روی را بر غلظت متالوتیونین در آبشش و غده گوارشی صدف *C. gigas* در مصب آلوده Gironde و خلیج غیر آلوده Bourgneuf در طول یک سال بررسی نمودند و تنها بین فلز کادمیوم و متالوتیونین همبستگی مثبت و معنی‌داری مشاهده نمودند.

این مطالعه نشان داد که غلظت فلزات مس، کادمیوم و سرب در صدف *C. gigas* در منطقه بندر امام خمینی از حد استانداردهای WHO و FAO (Shulkin et al., 2003) بیشتر است. غلظت جیوه نیز در ایستگاه‌های اسکله پتروشیمی و داک سراسره از این استانداردها بالاتر است. همچنین از نتایج حاصل از این مطالعه استنباط می‌شود که با توجه به‌وجود همبستگی قوی بین غلظت فلز کادمیوم و سنتز متالوتیونین در بافت نرم دوکفه‌ای *C. gigas*، این پروتئین می‌تواند به‌عنوان نشانگر زیستی مناسب

سنتز متالوتیونین به دنبال تجمع کادمیوم در دوکفه‌های دریایی نمونه‌برداری شده از طبیعت در مطالعات زیادی به اثبات رسیده است. (Bebiano et al., 1993; Hamza-Chaffai et al., 2000; Geret et al., 2000; Hamza-Chaffai, 2000) و همکاران در سال‌های ۱۹۹۹ و ۲۰۰۰ رابطه مثبت و معنی‌داری بین غلظت‌های Cd و متالوتیونین در غده گوارشی جمعیت‌های طبیعی صدف‌های *Ruditapes decussatus* به‌دست آوردند، و نیز Serafim و Bebianno در سال ۲۰۰۳ این رابطه را برای همین گونه در هر دو بافت آبشش و غده گوارشی گزارش دادند. همچنین در مطالعه‌ای که توسط Smaoui-Damak و همکاران در سال ۲۰۰۹ بر روی آلودگی دوکفه‌ای *R. decussates* به فلز کادمیوم در خلیج Gabes و سنتز متالوتیونین به‌عنوان مکانیسم سمیت زدایی این فلز صورت گرفت، رابطه خطی مستقیم بین کادمیوم و غلظت‌های متالوتیونین در غده گوارشی صدف‌های منطقه آلوده El Hofra که پساب‌های صنعتی زیادی دریافت می‌کرد به‌خوبی مشاهده گردید.

بین غلظت‌های جیوه و سطوح متالوتیونین در بافت نرم دوکفه‌ای در ایستگاه‌های مورد مطالعه همبستگی مثبت و معناداری مشاهده نشد ($P > 0.05$). جیوه در شرایط آزمایشگاهی نسبت به سایر فلزات سنگین نظیر کادمیوم، سرب، روی، مس یا نقره از توانایی بالاتری در تحریک سنتز و ترکیب با متالوتیونین برخوردار است (Stewart et al., 1996). با این حال، همبستگی بین متالوتیونین و جیوه در شرایط محیطی کمتر گزارش شده است. خصوصیات ویژه محیطی جیوه (فرم‌های آلی یا غیرآلی)، آنتاگونیسم^۱ Hg-Se درون بدن موجود ممکن است موجب این نتیجه گردد. محققین مختلفی اذعان نموده‌اند که به‌طور کلی همبستگی سطوح متالوتیونین با غلظت فلزات سنگین در شرایط آزمایشگاهی به‌نسبت مطالعه میدانی بیشتر و مشهودتر می‌باشد، یک تفسیر احتمالی برای این اختلاف، القای ایزوفرم‌های خاص متالوتیونین توسط فلزات سنگین در محیط آزمایشگاهی می‌باشد. در حالی‌که در طبیعت الگوی بیان ایزوفرم‌های مختلف متالوتیونین می‌تواند با انواع عوامل مداخله‌کننده شامل اثرات سینرژیستیک^۲ و آنتاگونیستیک بین آلاینده‌ها مورد تأثیر قرار گیرد (Legras et Hamza-Chaffai et al., 1998; Sharma et al., 1983; Cosson et al., 2000). برای مثال، Cosson در سال ۲۰۰۰ دوکفه‌ای

¹ Antagonism

² Synergistic

metal interactions on the accumulation of Ag, Cd, Pb and Cu in oysters *Crassostrea gigas* Thunberg. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 48: 68-74.

Bebianno, M.J.; Nott, J.A.; Langston, W.J., 1993. Cadmium metabolism in the clam *Ruditapes decussata*: the role of metallothioneins. Aquatic Toxicology, 27: 315-334.

Bebianno, M.J.; Serafim, M.A., 2003. Variation of metal and metallothionein concentrations in a natural population of *Ruditapes decussatus*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 44: 53-66.

Bebianno, M.J.; Serafim, M.A.; Simes, D., 2000. Metallothioneins in the clam *Ruditapes decussatus*: an overview. Analusis, 28: 386-390.

Besada, V.; Fumega, J.; Vamonde, A., 2002. Temporal trends of Cd, Cu, Hg, Pb and Zn in *Mytilus galoprovincialis* from Spanish North-Atlantic coast 1991-1999. Science of Total Environment, 288: 239-253.

Boutet, I.; Tanguy, A.; Auffret, M.; Riso, R.; Moraga, D., 2002. Immunochemical quantification of metallothioneins in marine molluscs: characterization of a metal exposure bioindicator. Environmental Toxicology and Chemistry, 21: 1009-1014.

Caussy, D.; Gurzau, D.M.; Neagu, C. and Ruedel, H., 2003. Ecotoxicology and lessons from case studies of metals: investigating exposure, bioavailability and risk. Environmental Safety, 56: 45-51.

CCREM (Canadian council of Resource and Environment Ministers), 1987. Canadian water quality prepared by the task force on water quality guidelines.

Chen, C.Y.; Chen, M.H., 2003. Investigation of Zn, Cu, Cd and Hg Concentrations in the Oyster of Chi-ku, Tai-shi and Tapeng Bay, Southwestern Taiwan. Journal of Food and Drug Analysis, Vol. 11, No. 1, 32-38 pp.

Cosson, R.P., 2000. Bivalve metallothionein as a biomarker of aquatic ecosystem pollution by trace metals: limits and perspectives. Cellular and Molecular Biology, 46:

برای در معرض قرار گرفتن با فلز کادمیوم در این گونه نرم تن محسوب گردد.

۵. سپاسگزاری

بدین وسیله از ریاست و پرسنل پژوهشکده زیست فناوری و آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه شهرکرد به جهت همکاری و مهیا نمودن امکانات و شرایط لازم و نیز از مساعدت‌های آقایان مهندس سینایی و مهندس منصور و خانم عظیمی تقدیر و تشکر به عمل می‌آید. همچنین از نظرات و راهبردهای آقای دکتر Dusica Ivankovic عضو هیئت علمی مؤسسه تحقیقات محیط زیست دریایی کرواسی، در روش سنجش پروتئین متالوتیونین، قدردانی می‌گردد.

منابع

فقیری، ا، ۱۳۸۸. پایش زیستی فلزات جیوه، سرب و مس با استفاده از صدف دوکفه ای *Crassostrea gigas* در بندر امام خمینی (ره). پایان نامه کارشناسی ارشد آلودگی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر. ۱۰۶ صفحه.

کاظمی، ژ، ۱۳۸۱. اثرات زیست محیطی جیوه موجود در پساب پتروشیمی بندر امام بر محیط زیست خور موسی. پایان نامه کارشناسی ارشد محیط زیست، واحد علوم تحقیقات اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی اهواز.

منوری، س.م، ۱۳۸۱. راهنمای اثرات زیست محیطی کارخانجات پتروشیمی، تهران، انتشارات فرزانه، چاپ اول.

Abdallah, M. A. M.; Abdallah, A. M. A., 2008. Biomonitoring study of heavy metals in biota and sediments in the South Eastern coast of Mediterranean sea, Egypt. Environmental Monitoring and Assessment, 146: 139-145.

Amiard, J. C.; Amiard-Triquet, C.; Barka, S., Pellerin, J.; Rainbow, P. S., 2006. Metallothionein in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. Aquatic Toxicology, 76: 160-202.

Amiard, J.C.; Perrein-Ettajani, H.; Gerard, A.; Baud, J.P.; Amiard-Triquet, C., 2005. Influence of ploidy and metal-

- C., 2001. Temporal variations of metallothionein and metal concentrations in the digestive gland of oysters *Crassostrea gigas* from a clean and a metal-rich sites. *Biomarkers*, 6 (2): 91–107.
- Geret, F., 2000. Synthèse de metallothioneines chez deux bivalves (l'huître et la moule) en réponse à une contamination métallique par la voie directe et par la voie trophique. Ph.D. thesis, University of Nantes, 307 p.
- Geret, F.; Geffard, A.; Amiard, J.C.; Cosson, R.P.; Mouneyrac, C.; Amiard-Triquet, C., 2000. Field and laboratory assessment of metallothionein as a biomarker of metal exposure in oysters. In: Proceedings of the Third SETAC, World Congress, Global Environmental Issues in the 21st Century: Problems, Causes and Solutions, Brighton, United Kingdom, 21–25 May.
- Giusiti, L., 2001. Heavy metal concentration of brown seaweed and sediment from the UK coastline between the Wear river and Tees river. *Environmental International*, 26: 275-286.
- Greig, R.A.; Nelson, B.A.; Nelson, D.A., 1975. Trace metal content in the American oyster. *Marine Pollution Bulletin*, 6: 72–73.
- Hamza-Chaffai, A.; Amiard, J.C.; Cosson, R.P., 1999. Relationship between metallothioneins and metals in a natural population of the clam *Ruditapes decussatus* from Sfax coast: a non-linear model using Box-Cox transformation. *Comparative Biochemistry and Physiology*, C 123: 153–163.
- Hamza-Chaffai, A.; Amiard, J.C.; Pellerin, J.; Joux, L.; Berthet, B., 2000. The potential use of metallothionein in the clam *Ruditapes decussatus* as a biomarker of in situ metal exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology*, C 127: 185–197.
- Hamza-Chaffai, A.; Romeo, M.; Gnassia-Barelli, M.; El Abed, A., 1998. Effect of copper and lindane on some biomarkers measured in the clam *Ruditapes decussatus*. *Bulletin of Environmental Contamination and* 295-309.
- de Astudillo, L.R.; Yen I.C.; Berkele I., 2005. Heavy metals in sediments, mussels and oysters from Trinidad and Venezuela. *Revista de Biología Tropical*, 53: 41–53.
- deMora, S.; Fowler, S.W.; Wyse, E.; Azemard, S., 2004. Distribution of heavy metals in marine bivalves, fish and coastal sediments in the Gulf and Gulf of Oman. *Marine Pollution Bulletin*, 49: 410-424.
- Einollahi, P.F.; Safahieh, A.; Dadollahi Sohrab, A.; Pakzad T.S., 2010. Heavy metal concentrations in rock oyster *Sacostrea cucullata* from Iranian of the Oman sea. *Trakia Journal of Sciences*, 8: 79-86.
- Ellmann, G.L., 1958. A calorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. *Experientia Supplementum*, Birkhauser, Basel. Vol. 24, 163-168 pp.
- Fowler, W.S.; Villeneuve, J.; Wyse, E.; Jupp, B.; de Mora, b.S., 2007. Temporal survey of petroleum hydrocarbons, organochlorinated compounds and heavy metals in Benthic marine organisms from Dhofar, southern Oman. *Baseline / Marine Pollution Bulletin*, 54: 339–367.
- Gaspic, Z.K.; Ujevic, I.; Zvonaric, T.; Baric, A., 2007. Biomonitoring of trace metals (Cu, Cd, Cr, Hg, Pb, Zn) in Mali Ston Bay (eastern Adriatic) using the Mediterranean blue mussel (1998-2005). *ACTA ADRIATICA*, 48(1): 73-88.
- Gavrilovic, A.; Srebocan, F.; Gotal, P.; Peterniec, Z.; Prevedar, A.; Matasin, Z., 2007. Heavy metals concentrations in oysters from the Mali Ston Bay, south-eastern Adriatic, Croatia – potential safety hazard aspect. *Spatiotemporal variation of some metal*. *Veterinarni Medicina*, 52 (10): 457–463.
- Geffard, A.; Amiard, J.C.; Amiard-Triquet, C., 2002. Use of metallothionein in gills from oysters (*Crassostrea gigas*) as a biomarker: seasonal and intersite fluctuations. *Biomarkers*, 7 (2): 123-137.
- Geffard, A.; Amiard-Triquet, C.; Amiard, J.C.; Mouneyrac,

- molluscs from the Moroccan coastal region. *Environmental Pollution*, 153:176-183.
- Mance G., 1990. Pollution threat of heavy metal in aquatic environments, New York: Elsevier Applied Science.
- Manual of Oceanographic Observations and Pollutant Analyses Methods (MOOPAM), 1999. ROPME, Kuwait.
- Paez-Osuna, F.; Bojorquez-Leyva, H.; Ruelas-Inzunza, J., 1999. Regional variations of heavy metal concentrations in tissues of barnacles from the subtropical pacific coast of Mexico. *Environment International*, 25: 647-654.
- Pellerin, J.; Amiard, J.C., 2009. Comparison of bioaccumulation of metals and induction of metallothioneins in two marine bivalves (*Mytilus edulis* and *Mya arenaria*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, C 150: 186-195.
- Piccinni, E.V.; Albergoni, V., 1996. Cadmium detoxification in protists. *Comparative Biochemistry and Physiology*, C 113: 141-147.
- Rainbow, P.S., 2006. Biomonitoring of trace metals in estuarine and marine environments. *Australasian Journal of Ecotoxicology*, 12: 107-122.
- Rainbow, P.S.; Blackmore, G.; Wang, W.X., 2003. Effects of previous field-exposure history on the uptake of trace metals from water and food by the barnacle *Balanus amphitrite*. *Marine Ecology Progress Series*, 259: 201-213.
- Ross, K.; Cooper, N.; Bidwell, J.R.; Elder, J., 2002. Genetic diversity and metal tolerance of two marine species: a comparison between populations from contaminated and reference sites. *Marine Pollution Bulletin*, 44: 671-679.
- Sadiq, M., Alam, I.A., 1992, Bioaccumulation of mercury by clams (*Meretrix meretrix*) collected from the Saudi Coast of the Persian Gulf. *Chemical Speciation and Bioavailability*, 4 (1): 9-17.
- Sharma, R.P., 1983. Ligands binding cadmium, zinc, and Toxicology, 61: 397-404.
- Jeng, M.S.; Jeng, W.L.; Hung, T.C.; Yeh, H.; Tseng, R.J.; Meng, Han, B.C., 2000. Mussel Watch: a review of Cu and other metals in various marine organisms in Taiwan, 1991-98. *Environmental Pollution*, 110: 207-215.
- Kimura, M.; Otaki, N.; Imano, M., 1979. Rabbit liver metallothionein tentative amino acid sequence of metallothionein B. In Kagi, J. H. R. and Nordberg, M. (eds). *Metallothionein*. *Experientia Supplementum*, 24: 163-168.
- Knezovich, J.P., 1994. Chemical and biological factors affecting bioavailability of contaminants in seawater. In: Hamelink, J.L.; Landrum, P.F.; Bergman, H.L., Benson, W. (Eds.), *Bioavailability. Physical, Chemical and Biological Interactions*. CRC Press, Boca Raton, FL, 23-30 pp.
- Kumar, K.S.; Sajwan, K.S.; Richardson, J.P.; Kannan, K., 2008. Contamination profiles of heavy metals, organochlorine pesticides, polycyclic aromatic hydrocarbons and alkyl phenols in sediment and oyster collected from marsh/estuarine Savannah GA, USA. *Marine Pollution Bulletin*, 56: 136-162.
- Langston, W.J.; Bebianno, M.J.; Burt, G.R., 1998. Metal handling strategies in molluscs. In: Langston, W.J., Bebianno, M.J. (Eds.), *Metal Metabolism in Aquatic Environments*. Chapman and Hall, London. 219-283 pp.
- Legras, S.; Mouneyrac, C.; Amiard, J.C.; Amiard-Triquet, C.; Rain- bow, P.S., 2000. Changes in metallothionein concentrations in response to variation in natural factors (salinity, sex, weight) and metal contamination in crabs from a metal-rich estuary. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 246: 259-279.
- Linde, A.R.; Garcia-Vazquez, E., 2006. A Simple Assay to Quantify Metallothionein Helps to Learn about Bioindicators and Environmental Health. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 34: 360-363.
- Maanan, M., 2008. Heavy metal concentrations in marine

- Pacific oyster *Crassostrea gigas* as a biomarker of response to metal exposure. *Biomarkers*, 7: 439-450
- Thompson, K.C., 2005. *Environmental Toxicity Testing*. Blackwell Publishing, 388p.
- UNEP., 1997. Assessment of land-based sources and activities affect-ing the marine sediment in the Red sea and Gulf of Aden, UNEP Regional Seas Reports Studies, No. 166.
- Viarengo, A.; Ponzano, E.; Dondero, F.; Fabbri, R., 1997. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Marine Environmental Research*, 44 (1): 69-84.
- Warren, L.A., 1998. Modelling cadmium accumulation by benthic invertebrates in situ: the relative contributions of sediment and overlying water reservoirs to organism cadmium concentrations. *Limnology and Oceanography*, 43: 1442-1454.
- Yap, C. K.; Ismail, A.; Tan, S.G.; Omar, H., 2002. Correlations between speciation of Cd, Cu, Pb and Zn in sediment and their concentrations in total soft tissue of green-lipped mussel *Perna viridis* from the west coast of Peninsular Malaysia. *Environment International*, 28: 117-128.
- Zhou, F.; Gou, H.; Hao, Z., 2007. Spatial distribution of heavy metals in Hong Kong's marine sediments and their human impacts: A GIS-based chemometric approach. *Marine Pollution Bulletin*, 54: 1372-1384.
- copper in a species of New Zealand oyster (*Ostrea lutaria*). *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology*, 30: 428-434.
- Shi, J.; Liang, L.; Jiang, G.; Jin, X., 2005. The speciation and bioavailability of mercury in sediments of Haihe River, China. *Environment International*, 31: 357-365.
- Shulkin, V.M.; Presley, B.J., 2003. Metal concentration in mussel *Crenomytilus grayanus* and oyster *Crassostrea gigas* in relation to contamination of ambient sediment. *Environment International*, 29: 493- 502.
- Smaoui-Damak, W.; Berthet, B.; Hamza-Chaffai, A., 2009. In situ potential use of metallothionein as a biomarker of cadmium contamination in *Ruditapes decussates*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72: 1489 - 1498.
- Stewart, F.M.; Furness, R.W.; Monteiro, L.R., 1996. Relationships between heavy metal and metallothionein concentrations in lesser black-backed gulls, *Larus fuscus*, and Cory's shearwater, *Calonectris diomedea*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 30: 299-305.
- Stuhlbacher, A.; Bradley, M.C.; Naylor, C.; Calow, P., 1992. Induction of cadmium tolerance in two clones of *Daphnia magna* Straus. *Comparative Biochemistry and Physiology, C* 101 (3): 571-577.
- Tanguy, A.; Boutet, I.; Bonhomme, F.; Boudry, P.; Moraga, D., 2002. Polymorphism of metallothionein genes in the