

## ارزیابی ثبات لیزوزومی و شکنندگی غشاء سلول گلبول قرمز خون ماهی گل خورک (*Boleophthalmus dussumieri*) به عنوان نشانگر زیستی هیدروکربن های

### آروماتیک چند حلقه‌ای

محمود سینایی<sup>(۱)\*</sup>؛ پیمان اقتصادی عراقی<sup>(۲)</sup>؛ علی ماشینچیان<sup>(۳)</sup>؛ سید محمد رضا فاطمی<sup>(۴)</sup> و

غلامحسین ریاضی<sup>(۵)</sup>

oceanography.sina@gmail.com

۱-دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه بیولوژی دریا، تهران، ایران

۲-موسسه ملی اقیانوس شناسی، تهران

۳-دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه شیمی دریا، تهران، ایران

۵-مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه تهران، ایران

تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۱

### چکیده

این مطالعه به منظور بررسی برخی پاسخ های فیزیولوژیک ماهی گل خورک گونه *Boleophthalmus dussumieri* به عنوان نشانگر زیستی هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای (PAHs) صورت گرفته است. نمونه برداری از پنج ایستگاه (اروند، جعفری، زنگی، سمایی و بحرکان) و در طول سواحل شمال غرب خلیج فارس (سواحل خوزستان) صورت گرفته است. میزان غلظت PAHs توسط دستگاه HPLC و تغییرات غشاء لیزوزوم توسط تست NRRT و میزان پایداری غشاء لیزوزوم توسط تست میزان پایداری گلبول قرمز آنالیز گردید. میزان غلظت کل PAHs در نمونه های رسوب بین ۱۱۳/۵۰-۳۳۸۴/۳۴ نانوگرم در گرم وزن خشک و در بافت کبد بین ۳/۹۹-۴۶/۶۴ نانوگرم در گرم وزن خشک بود. بیشترین میزان آلودگی در بافت کبد و رسوبات در ایستگاه جعفری و کمترین آن در ایستگاه بحرکان مشخص گردید. اختلاف معنی داری بین آنها یافت گردید. کمترین میزان میانگین RT نمونه های خون ماهی گل خورک در ایستگاه جعفری (۳۴ دقیقه) و بیشترین آن در ایستگاه بحرکان (۷۸ دقیقه) ثبت گردید. میانگین RT بین ایستگاه های نمونه برداری به جز ایستگاه اروند با زنگی، اختلاف معنی داری را نشان می دهد. منحنی میزان تغییرات در پایداری غشاء گلبول قرمز ماهی گل خورک نسبت به شیب غلظتی نمک (منحنی EOF) در ایستگاه های مختلف نمونه برداری نشان می دهد که غشاء گلبول قرمز ماهیان صید شده از ایستگاه جعفری در مقایسه با دیگر ایستگاه ها قوام و پایداری کمتری دارد که ایستگاه های زنگی < اروند < سمایی < و بحرکان از این نظر در رتبه های بعدی قرار دارند. نتایج این تحقیق می تواند استفاده از ثبات لیزوزوم و همچنین پایداری غشاء سلول گلبول قرمز را به عنوان نشانگرهای زیستی در طرح های پایش آلودگی نفتی گسترش دهد.

کلمات کلیدی: آلاینده های نفتی، گاو ماهیان، خلیج فارس

\*نویسنده مسئول

## مقدمه

ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای از طریق رودخانه، مصب، آب های ساحلی و اتمسفر وارد اکوسیستم های دریایی می گردد. این ترکیبات توسط ماهی و سایر ارگانیسم های دریایی از طریق غذای مصرفی، آب و رسوبات جذب می شوند. انواع گونه های ماهی با تغییر و یا اصلاح عملکرد متابولیک خود نسبت به ورود ترکیبات آلاینده واکنش نشان می دهند (Ali et al., 2008). بر این اساس ماهیان می توانند گونه مناسبی در استفاده به عنوان شاخص زیستی مطرح باشد (Sinaei et al., 2010). نشانگرهای زیستی سطح سلامت ماهی را در سطوح پایین زیستی (سطوح بیوشیمیایی یا سلولی) نشان می دهند. استفاده از نشانگرهای زیستی در مباحث سم شناسی دارای اهمیت و ارزش بسزایی است و میزان سطوح آلودگی در اکوسیستم های آبی را می توان با بررسی آنها مورد ارزیابی قرار داد (Pandey et al., 2003).

ماهی گل خورک (*Boleophthalmus dussumieri*) از خانواده گاوماهیان به عنوان یک ماهی دوزیست به میزان قابل توجهی جهت زندگی در سواحل و در مناطق بین جزر و مدی سازگاری پیدا کرده است. گل خورک ها ماهیانی کوچک هستند که در خوریات و سواحل مناطق گرمسیری به وفور یافت می شوند که بیشتر دوران زندگی خود را در نخبه هایی که درون رسوبات گلی حفر می کنند، می گذرانند (Polgar, 2010).

غشاء سلول به دلیل دارا بودن میزان زیاد چربی مقصد مناسبی برای آلاینده های چربی دوست محسوب می گردد. این عوامل، در کنار راحتی و سهولت در دستیابی و جداسازی سلول های گلبول قرمز، این سلول ها را مدل مناسبی برای مطالعه اثرات عوامل آلاینده به ویژه آلاینده های چربی دوست بر غشاهای زیستی قرار می دهد (Abdel-Raheem et al., 2009). تاثیرات مستقیم و یا غیر مستقیم عوامل آلاینده بر ساختار، پایداری و سیالیت غشاء سلول های گلبول قرمز خون ماهی در نهایت می تواند منجر به همولیز یا شکسته شدن غشاء گلبول قرمز و آزاد شدن هموگلوبین به پلاسما (خون) این سلول ها گردد. یکی از روش های کم هزینه ولی با کارایی بالا در کسب اطلاعات پیرامون ساختار و ترکیبات غشاء و تاثیر عوامل آلاینده بر آن تست میزان پایداری (Osmotic Fragility Test: EOF) غشاء

سلول است. این تست در واقع توانایی غشاء سلول های گلبول قرمز خون را در حفظ میزان پایداری و قوام خود در برابر شوک اسمزی را مورد بررسی قرار می دهد.

لیزوزوم به عنوان مقصد نهایی بسیاری از عوامل آلاینده محسوب می گردد. قسمت های مختلف لیزوزوم نسبت به ورود آلاینده حساس بوده و واکنش نشان می دهند. یکی از تغییرات مشخص و بارز، افزایش تردی و ناپایداری غشاء لیزوزوم است (Martínez-Gómez et al., 2006). آسیب به غشاء لیزوزوم می تواند موجب رهاسازی محتویات آن به درون سیتوزول گردد که این امر در نهایت ساختار و عملکرد سلول تاثیر گذار است. از این رو پایداری غشاء لیزوزوم از شاخص های مناسب در تعیین سطح سلامت و یا آسیب سلول محسوب می گردد. این تغییرات در سطح درون سلولی را می توان به عنوان نشانگرهای اولیه زیستی از ورود عوامل آلاینده در نظر گرفت (Dailianis et al., 2003).

Lowe و همکاران در سال ۱۹۹۲ روشی را تحت عنوان Neutral Red Retention time (NRRT) جهت تعیین میزان پایداری غشاء لیزوزوم بر اساس ظرفیت جذب، نگهداری و دفع ماده رنگی قرمز خنثی (Neutral Red Dye) توسط لیزوزوم معرفی کردند. این روش میزان خروج محتوای لیزوزوم به درون سیتوزول را در موجوداتی که در معرض استرس و یا عوامل آلاینده قرار دارند نشان می دهد. این روش همچنین می تواند ظرفیت پروسه های سلولی را در سازگاری نسبت به عوامل استرس زا را نشان دهد (Dailianis et al., 2003).

مهم ترین اهداف این تحقیق عبارتند از:

- ۱- بررسی میزان آلودگی هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در ماهی گل خورک گونه *B. dussumieri* سواحل شمال غربی خلیج فارس؛
- ۲- ارزیابی استفاده از پاسخ های فیزیولوژیک ماهی به عنوان نشانگر زیستی در پایش زیست محیطی
- ۳- و مقایسه پاسخ های فیزیولوژیک ماهی گل خورک نسبت به حضور هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در ایستگاه های مختلف

## مواد و روش کار

جغرافیایی و دلایل انتخاب ایستگاهها در جدول ۱ نشان داده شده است.

نمونه برداری از پنج ایستگاه واقع در سواحل شمال غرب خلیج فارس (سواحل خوزستان) انجام گردید (شکل ۱). موقعیت

جدول ۲: موقعیت ایستگاههای نمونه برداری در شمال غرب خلیج فارس

دلیل انتخاب	موقعیت		ایستگاه نمونه برداری
	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	
پالایشگاه آبادان	۲۹° ۵۴' ۳۵" N	۴۸° ۴۰' ۵۸" E	اروند (St1)
منطقه ویژه اقتصادی، نفتی و صنایع پتروشیمی	۳۰° ۲۶' ۵۲" N	۴۹° ۰۶' ۵۲" E	جعفری (St2)
صنایع پتروشیمی، بندرگاه	۳۰° ۲۸' ۵۲" N	۴۹° ۰۳' ۵۲" E	زنگی (St3)
بندرگاه و اسکله شناورهای صیادی، مخازن ذخیره نفتی	۳۰° ۲۷' ۴۵" N	۴۹° ۱۰' ۵۱" E	سمایلی (St4)
ایستگاه شاهد	۳۰° ۰۸' ۱۴" N	۴۹° ۵۰' ۵۴" E	بحرکان (St5)

آزمایشات بعدی از طریق ایجاد سوراخ در قلب ماهی گل خورک گرفته شد. در یک مرحله، خون توسط سرنگ های هیپارینه به روش فوق گرفته و جهت سنجش میزان پایداری گلبول قرمز به میکروتیوب های هیپارینه منتقل گردید. در مرحله دیگری، خون ماهی توسط سرنگ های که از قبل به میزان ۰/۱ میلی لیتر توسط سرم فیزیولوژیک پر شده بود گرفته و جهت سنجش میزان تغییرات غشاء گلبول قرمز به روش NRR time به لوله های میکروتیوب منتقل گردید. لوله های مربوط به تست NRR time به مدت پانزده دقیقه قبل از آزمایش درون یخچال نگهداری گردید. بلافاصله پس از خونگیری، بافت کبد ماهی در روی یخ جدا و به دو بخش تقسیم گردید. بافت کبد جهت سنجش میزان هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای جداسازی و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد تا زمان آنالیز نگهداری گردید.

جهت استخراج ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای از نمونه های رسوب از روش توصیه شده توسط Moopam (۱۹۹۹) و جهت استخراج این ترکیبات در نمونه های بافت ماهی از روش توصیه شده توسط Perugini و همکاران (۲۰۰۷) استفاده گردید. آنالیز میزان غلظت هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در نمونه های رسوب و بافت ماهی از دستگاه HPLC مدل Hewlett-Packard 1100 استفاده

نمونه برداری از ماهی گل خورک گونه *B. dussumieri* به چند روش و با حداقل آسیب و استرس به ماهی صورت گرفت. ماهیان با استفاده از تور پرتابی، تور ساچوک، صید مستقیم به وسیله دست و یا روشن کردن چراغ در خلال شب (منجر به جمع شدن ماهی به اطراف چراغ شده که صید آنها را راحت تر می کند) در ایستگاه های نمونه برداری انجام شد. از هر ایستگاه تعداد ۵۰ عدد ماهی صید گردید. ماهی گل خورک (نسبت جنسی ۱:۱) درون تانک های ۳۰ لیتری و تحت شرایط درجه حرارت  $25/2 \pm 0/7$  درجه سانتیگراد و شوری ۳۸ppt، ضمن هوادهی به آزمایشگاه منتقل گردید.

نمونه های رسوب در محل صید ماهیان از ۸ سانتیمتر بالایی رسوبات و از پنج نقطه در هر ایستگاه جمع آوری و در سینی استیل تمیز قرار گرفت. به وسیله یک قاشق تمیز مکعبی به عمق ۵ سانتیمتر از سطح رسوب برداشته و در فویل های آلومینیومی پیچیده و برچسب گذاری شد. نمونه های رسوب در یخ تا آزمایشگاه حمل و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد تا زمان سنجش ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای نگهداری گردید. در آزمایشگاه ماهیان توسط عصاره پودر گل میخک بیهوش و عملیات زیست سنجی جهت تعیین طول و وزن ماهیان صورت پذیرفت. نمونه های خون ماهی جهت انجام

رگرسیون خطی و همبستگی اسپیرمن استفاده شد و معادله رگرسیونی آن به دست آمد.

### نتایج

میانگین طول و وزن ماهیان گل خورک صید شده به ترتیب  $17 \pm 0.1$  سانتیمتر و  $16 \pm 0.2$  گرم بود. جدول ۲ مقادیر ثبت شده از میزان تجمع زیستی هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای در رسوبات و بافت کبد ماهی در ایستگاه‌های مختلف نمونه برداری نشان داده شده است. در نتایج مربوط به مجموع ۱۶ تایی ترکیبات هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای ( $\Sigma 16\text{PAH}$ ) در بافت کبد و رسوبات، ایستگاه جعفری بیشترین میزان را نشان می‌دهد که ایستگاه‌های زنگی، ارونند، سمایلی و بحرکان از این حیث در رتبه‌های بعدی قرار دارند.

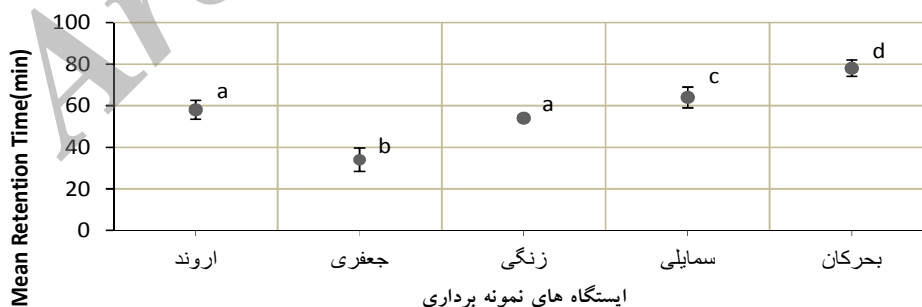
نتایج مربوط به میانگین NRR time نمونه‌های خون ماهی گل خورک در ایستگاه‌های نمونه برداری در نمودار ۱ نشان داده شده است. میانگین RT مربوط به سی نمونه خون ماهی گل خورک به عنوان شاخص هر ایستگاه مد نظر قرار گرفت. میانگین RT نمونه‌های خون ماهی گل خورک در تمامی ایستگاه‌های نمونه برداری پایین‌تر از ۹۰ دقیقه بود. کمترین میزان میانگین RT نمونه‌های خون ماهی گل خورک در ایستگاه جعفری (۳۴ دقیقه) و بیشترین آن در ایستگاه بحرکان (۷۸ دقیقه) ثبت گردید. میانگین RT بین ایستگاه‌های نمونه برداری به جز ایستگاه ارونند با زنگی، اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد ( $P < 0.05$ ).

گردید. تمام شرایط تزریق نمونه‌های بافتی ماهی شبیه نمونه‌های رسوب است با این تفاوت که در نمونه‌های بافتی از دکتور‌های فلوروسانس به جای دکتور UV استفاده گردید.

سنجش میزان تغییرات در پایداری غشاء لیزوزوم در نمونه‌های خون ماهی گل خورک از روش توصیه شده توسط ICES در سال ۲۰۰۴ و همچنین UNEP/RAMOG (۱۹۹۹) استفاده گردید. در بررسی اسلایدها در زیر میکروسکوپ علائمی نظیر ترشح لیزوزوم به درون سیتوزول، هرگونه تغییر در سایز و رنگ لیزوزوم و شکل سلول جهت تعیین میزان RT (Retention Time) مد نظر قرار گرفت.

در این بررسی، سنجش میزان تغییرات در پایداری غشاء گلبول قرمز با استفاده از تست میزان پایداری غشاء گلبول قرمز (تست EOF) در نمونه‌های خون ماهی گل خورک از روش توصیه شده توسط Aldrich و Saunders (۲۰۰۰) استفاده گردید.

تجزیه و تحلیل آماری داده با نرم‌افزار (Version 19 SPSS) انجام پذیرفت. از ANOVA یک طرفه جهت تعیین وجود و یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها استفاده شد. جهت تعیین دقیق وجود یا عدم وجود تفاوت معنی‌دار از پس آزمون Tukey استفاده شد. اختلاف بین میانگین داده در سطح معنای ۵ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت. برای تعیین وجود ارتباط خطی و میزان آن بین مقادیر تجمع زیستی هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای و نشانگرهای زیستی در بافت‌های ماهی از آزمون



نمودار ۱: میانگین RT نمونه‌های خون ماهی گل خورک در ایستگاه‌های نمونه برداری

اعداد مشابه نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار هستند

جدول ۲: میانگین  $\pm$  انحراف معیار مجموع کل PAHs در بافت کبد (نانوگرم در گرم وزن خشک بدن) و رسوبات (نانوگرم در گرم وزن خشک بدن) ایستگاههای مختلف نمونه برداری

PAHs	نمونه	ایستگاه اروند	ایستگاه جعفری	ایستگاه زنگی	ایستگاه سمایلی	ایستگاه بحرکان
N	S	ND	ND	ND	ND	ND
	L	ND	ND	ND	ND	ND
AC	S	۱۳/۲۹۷ $\pm$ ۱/۴۵۱ <sup>a</sup>	۱۳۲/۱۱۲ $\pm$ ۹/۹۰ <sup>b</sup>	۷۴/۹۰۳ $\pm$ ۶/۰۱۵ <sup>c</sup>	۱/۹۷۹ $\pm$ ۰/۴۶۱ <sup>d</sup>	ND
	L	۳/۵۳۲ $\pm$ ۰/۴۹ <sup>a</sup>	۴/۳۸۱ $\pm$ ۰/۵۴ <sup>a</sup>	۱/۸۲۹ $\pm$ ۰/۱۷۷ <sup>b</sup>	۲/۲۳۳ $\pm$ ۰/۵۵ <sup>b</sup>	ND
ACE	S	ND	ND	ND	ND	ND
	L	ND	ND	ND	ND	ND
F	S	۴۴/۰۰۵ $\pm$ ۱/۵۹۰ <sup>a</sup>	۱۷/۳۵۳ $\pm$ ۱/۴۸۰ <sup>b</sup>	۳/۳۲۳ $\pm$ ۰/۷۹۳ <sup>c</sup>	۴/۳۱۹ $\pm$ ۰/۶۹۰ <sup>c</sup>	۴/۶۹۸ $\pm$ ۰/۶۹۰ <sup>c</sup>
	L	۲/۴۷۱ $\pm$ ۰/۵۵ <sup>a</sup>	۱/۰۵۱ $\pm$ ۰/۱۳۲ <sup>b</sup>	۰/۵۵۸ $\pm$ ۰/۰۸۳ <sup>b</sup>	۰/۶۶۰ $\pm$ ۰/۰۹۵ <sup>c</sup>	ND
Ph	S	۲۰/۹۸۹ $\pm$ ۲/۷۶۹ <sup>a</sup>	۶۳۲/۶۸۲ $\pm$ ۲۷/۷۲ <sup>b</sup>	۳۳/۴۲۹ $\pm$ ۲/۶۹۰ <sup>a</sup>	۳۶/۸۶۱ $\pm$ ۳/۰۰۳ <sup>a</sup>	۱۵/۴۳۸ $\pm$ ۱/۶۴ <sup>a</sup>
	L	۳/۵۷۶ $\pm$ ۰/۶۷۶ <sup>a</sup>	۰/۸۲۶ $\pm$ ۰/۲۶۵ <sup>b</sup>	۲/۶۱۹ $\pm$ ۰/۴۴۹ <sup>a</sup>	۳/۰۷۳ $\pm$ ۰/۶۲۵ <sup>a</sup>	۱/۰۵۳ $\pm$ ۰/۳۳۰ <sup>c</sup>
A	S	ND	ND	ND	ND	ND
	L	ND	ND	ND	ND	ND
Fl	S	۵/۱۶۴ $\pm$ ۰/۲۳۷ <sup>a</sup>	۱۷۸/۹۷۵ $\pm$ ۹/۳۸ <sup>b</sup>	۲۹/۵۴۶ $\pm$ ۳/۰۰۱ <sup>c</sup>	۱۷/۴۴۵ $\pm$ ۲/۴۳۲ <sup>d</sup>	۱۴/۲۸۹ $\pm$ ۱/۷۴ <sup>d</sup>
	L	۱/۰۱۹ $\pm$ ۰/۴۳۵ <sup>a</sup>	۳/۲۲۲ $\pm$ ۰/۷۶۳ <sup>b</sup>	۱/۰۳۶ $\pm$ ۰/۴۳۱ <sup>a</sup>	۴/۱۱۹ $\pm$ ۰/۳۳۷ <sup>db</sup>	ND
Py	S	۱۱۴/۲۶۰ $\pm$ ۴/۶۴۵ <sup>a</sup>	۱۲۶/۰۵۱ $\pm$ ۷/۹۷۹ <sup>a</sup>	۴۲۶/۰۱۵ $\pm$ ۱۴/۵۵ <sup>b</sup>	۷۱/۲۹۸ $\pm$ ۶/۰۷۴ <sup>c</sup>	۲۸/۴۷۶ $\pm$ ۳/۴۶ <sup>d</sup>
	L	۵/۶۳۴ $\pm$ ۰/۸۳۰ <sup>a</sup>	۲/۱۶۸ $\pm$ ۰/۴۶۸ <sup>b</sup>	۹/۵۸۶ $\pm$ ۱/۰۳۰ <sup>c</sup>	۱۳/۲۹۶ $\pm$ ۰/۹۷۶ <sup>b</sup>	۲/۹۳۲ $\pm$ ۰/۷۹۲ <sup>b</sup>
B(a)A	S	۶۲۳/۲۰۱ $\pm$ ۱۸/۱۶ <sup>a</sup>	۱۱۳۲/۵۶۲ $\pm$ ۵۹/۹۲۳ <sup>b</sup>	۶۴۹/۱۵۱ $\pm$ ۲۰/۰۶ <sup>a</sup>	۱۸۸/۶۲۳ $\pm$ ۸/۳۸۸ <sup>cd</sup>	۳۳/۲۲۰ $\pm$ ۳/۳۷۹ <sup>d</sup>
	L	۵/۲۷۵ $\pm$ ۱/۱۱۰ <sup>a</sup>	۱۴/۴۶۰ $\pm$ ۲/۹۳۱ <sup>b</sup>	۷/۱۵۳ $\pm$ ۱/۴۵۱ <sup>c</sup>	ND	ND
Ch	S	۳۳۰/۵۷۹ $\pm$ ۱۶/۰۵ <sup>a</sup>	۷۶۰/۷۰۶ $\pm$ ۷/۲۸ <sup>b</sup>	۳۰۷/۶۹۵ $\pm$ ۱۴/۰۹ <sup>a</sup>	۴۰/۲۹۹ $\pm$ ۳/۲۴۵ <sup>cd</sup>	۱۷/۳۷۹ $\pm$ ۱/۴۹۱ <sup>d</sup>
	L	۴/۱۱۰ $\pm$ ۰/۶۲۷ <sup>a</sup>	۹/۸۲۸ $\pm$ ۱/۲۷۰ <sup>b</sup>	۴۰/۹۷ $\pm$ ۰/۸۹۷ <sup>a</sup>	ND	ND
B(b)Fl	S	۲۶/۳۶۰ $\pm$ ۳/۲۰۳ <sup>a</sup>	۵۹/۸۱۳ $\pm$ ۴/۱۲۰ <sup>b</sup>	۱۱۱/۲۷۷ $\pm$ ۷/۹۰۱ <sup>c</sup>	ND	ND
	L	۰/۷۵۰ $\pm$ ۰/۱۸۳ <sup>a</sup>	ND	۳/۰۳۶ $\pm$ ۰/۸۴۷ <sup>b</sup>	ND	ND
B(k)Fl	S	۲۷/۹۶۸ $\pm$ ۳/۷۲۱ <sup>a</sup>	۴۱/۵۳۲ $\pm$ ۴/۱۹۸ <sup>b</sup>	۷۲/۸۳۳ $\pm$ ۴/۸۵۴ <sup>c</sup>	ND	ND
	L	ND	ND	ND	ND	ND
B(a)Py	S	۲۴۰/۵۵۱ $\pm$ ۱۲/۴۹۴ <sup>a</sup>	۳۰۲/۵۵۷ $\pm$ ۱۴/۸۹۱ <sup>b</sup>	۱۹۹/۶۳۶ $\pm$ ۷/۲۰۶ <sup>c</sup>	ND	ND
	L	۳/۳۰۷ $\pm$ ۰/۸۲۷ <sup>a</sup>	۲/۲۶۳ $\pm$ ۰/۶۸۷ <sup>b</sup>	۲/۳۰۳ $\pm$ ۰/۵۲۴ <sup>b</sup>	ND	ND
IPy	S	ND	ND	ND	ND	ND
	L	ND	ND	ND	ND	ND
DB(ah)A	S	ND	ND	ND	ND	ND
	L	ND	ND	ND	ND	ND
B(ghi)Pe	S	ND	ND	ND	ND	ND
	L	ND	ND	ND	ND	ND
$\Sigma$ PAH	S	۱۴۴۶/۳۲۳ $\pm$ ۲۰۰/۹۵۰*	۳۳۸۴/۳۴۳۷۶/۹۴۶*	۱۹۰۷/۸۱ $\pm$ ۲۱۰/۴۸۶*	۳۶۰/۸۲ $\pm$ ۶۵/۰۲۸	
	L	۲۹/۶۷ $\pm$ ۱/۶۷۸ <sup>a</sup>	۴۶/۶۴ $\pm$ ۴/۷۸۲ <sup>b</sup>	۳۲/۲۲ $\pm$ ۲/۹۷۱ <sup>a</sup>	۳/۹۹ $\pm$ ۱/۳۳۸ <sup>d</sup>	

حروف مشابه نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار در هر ردیف است ( $P>0.05$ ). \* نشان دهنده اختلاف معنی دار در ردیف است ( $P>0.05$ ).

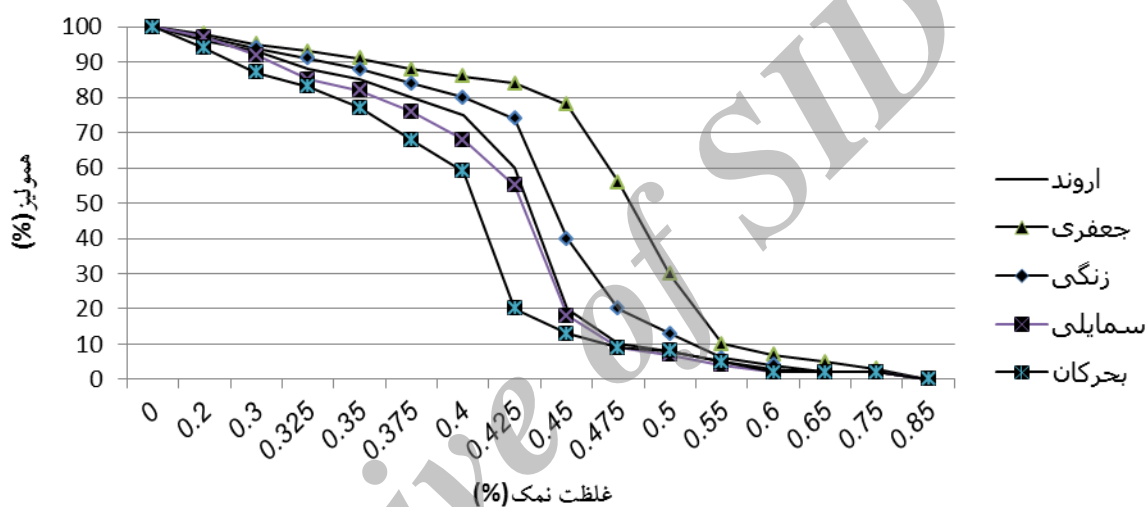
رسوب: L; کبد: ND; Non Detected

قرمز ماهیان صید شده از ایستگاه جعفری در مقایسه با دیگر ایستگاهها قوام و پایداری کمتری دارد (بسیار شکننده و ترد است) که ایستگاههای زنگی < اروند < سمایلی < و بحرکان از این

منحنی میزان تغییرات در پایداری غشاء گلبول قرمز ماهی گل خورک نسبت به شیب غلظتی نمک (منحنی EOF) در ایستگاههای مختلف نمونه برداری نشان می دهد که غشاء گلبول

همان طور که در جدول ۴ نشان داده شده است، نتایج نشان دهنده وجود رابطه معنی داری قوی بین میزان غلظت هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در رسوب و بافت کبد ماهی گل خورک با نشانگر های زیستی (تغییرات غشاء لیزوزوم و میزان پایداری غشاء سلول گلبول قرمز خون ماهی گل خورک) است ( $P < 0.01$ ).

نظر در رتبه های بعدی قرار دارند (نمودار ۲). میانگین میزان تغییر در مقادیر ثبت شده از میزان جذب هموگلوبین سلول های لیز شده در طول موج ۳۴۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج بررسی نشان می دهد که میزان پایداری غشاء گلبول قرمز ماهی گل خورک در ایستگاه های مختلف نمونه برداری با یکدیگر اختلاف معنی داری دارند ( $P < 0.05$ ).



نمودار ۲: نمودار EOF ماهی گل خورک در ایستگاه های مختلف نمونه برداری

جدول ۳: میزان EOF بدست آمده در ایستگاه های نمونه برداری

ایستگاه نمونه برداری	EOF (n=۳۰)
اروند	$0.439 \pm 0.041^a$
جعفری	$0.542 \pm 0.032^b$
زنگی	$0.462 \pm 0.051^c$
سمایلی	$0.420 \pm 0.060^d$
بحرکان	$0.379 \pm 0.042^e$

اعداد مشابه نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار است.

جدول ۴: رابطه بین غلظت هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در رسوب و بافت کبد ماهی گل خورک با نشانگر های زیستی

	NRRt	EOF	Liver PAHs	Sediment
NRR time	-	۰/۹۵۳	۰/۹۴۹	۰/۹۴۹
EOF	-	-	۰/۹۲۷	۰/۹۲۷
Liver PAHs	-	-	-	۱/۰۰
Sediment PAHs	-	-	-	-

## بحث

کیفی رسوب که توسط سازمان NOAA (۴۰۲۲ نانوگرم درگرم وزن خشک بدن) ارائه گردیده است کمتر است. این مسئله نشان دهنده کمتر بودن میزان آلودگی ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در ایستگاههای نمونه برداری واقع شده در رسوبات سواحل شمال غرب خلیج فارس از استانداردهای جهانی نظیر NOAA است.

نتایج این بررسی نشان می دهد که ورود یا تجمع ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای و متابولیت آنها به درون سلول روی میزان پایداری غشاء لیزوزوم ماهی گل خورک تاثیرگذار بوده است. آزمایشات دقیق روی غشا لیزوزوم توسط روشهای آزمایشگاهی در سلولهای خونی به عنوان یکی از انواع سلولهایی که غنی از لیزوزوم هستند در ارزیابی اثرات ناشی از عوامل آلاینده در اکوسیستم های دریایی کمک بسزایی می نمایند (Lowe *et al.*, 1995; Catsiki *et al.*, 2001). لیزوزوم به عنوان یک اندامک درون سلولی که توسط غشاء احاطه شده است دارای آنزیم های هیدرولیتیک است که در تجزیه مواد درون سلول یا موادی که از خارج سلول جذب می شوند (نظیر آلاینده ها) نقش ایفا می کند (D.W.T., 2004). براین اساس لیزوزوم توانایی جذب آلاینده های آلی نظیر هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای را دارد. تغییر بر میزان پایداری و قوام غشاء لیزوزوم همچنین می تواند بر عملکرد پمپ های یونی لیزوزوم و همچنین میزان حجم لیزوزوم تاثیرگذار باشد (D.W.T., 2004). به نظر می رسد غلظت های مختلف آلودگی هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در ایستگاههای مختلف نمونه برداری روی عملکرد پمپ های یونی غشا لیزوزوم سلول خونی ماهی گل خورک تاثیر گذار بوده اند. وجود رابطه معنی دار قوی بین تجمع زیستی هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای و میزان NRR

در این مطالعه ترکیبی از نشانگرهای زیستی جهت ارزیابی پاسخهای فیزیولوژیک ماهی گل خورک گونه *B. dussumieri* به عنوان شاخص زیستی آلودگی و همچنین پایش وضعیت زیست محیطی شمال غرب خلیج فارس (سواحل خوزستان) از لحاظ آلودگی هیدروکربن های آروماتیک چندحلقه ای استفاده شده است. علاوه بر آن رابطه بین نشانگر های زیستی (تغییرات غشاء لیزوزوم و پایداری غشاء گلیکول قرمز) و غلظت مجموع ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای جهت ارزیابی اهمیت و کاربرد نشانگر های زیستی مورد استفاده در پایش زیستی آلودگی این ترکیبات مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته است.

در نمونه های بافت کبد بررسی الگوی پراکنش ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای بیانگر حضور میزان بالای ترکیبات با وزن مولکولی کم (ترکیباتی با ساختار سه و چهارحلقه ای) است. حضور ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای با وزن مولکولی کم در نمونه های بافت کبد ماهی، می تواند در نتیجه انتقال متابولیک ترکیبات با وزن مولکولی بالا در این بافت باشد (Meador *et al.*, 1995). بطور کلی ماهی می تواند در حدود ۹۹ درصد از ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای را در طول ۲۴ ساعت اول جذب به متابولیت تبدیل کند، علاوه بر این نیمه عمر زیستی این ترکیبات در انواع مختلف ماهی به کم است (Meador *et al.*, 1995). این عوامل می تواند در تغییر الگوی پراکنش و همچنین میزان این ترکیبات در بافت های مختلف ماهی تاثیرگذار باشد (Perugini *et al.*, 2007).

غلظت مجموع ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در ایستگاههای مختلف نمونه برداری از میزان استاندارد

و پایش زیستی اثرات آلودگی به ویژه هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه‌ای در انواع مختلف گونه‌های ماهی صورت گرفته است. اکثر مطالعات در این زمینه به بررسی اثرات آلودگی روی میکروارگانسیم‌ها محدود شده است (Bekatas & Ayik, 2010; Sikkema et al., 1995). وجود رابطه معنی‌دار بین تجمع زیستی هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای و میزان پایداری غشاء گلبول قرمز (تست EOF) نشان می‌دهد که این ترکیبات یا تولیدات آنها دارای خاصیت همولیز کننده هستند. بررسی ها در شرایط محیط طبیعی نشان می‌دهد که تست میزان پایداری غشاء شاخص مناسبی از قرارگیری ماهی گل خورک گونه *B. dussumieri* در معرض آلودگی هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای است.

### تشکر و قدردانی

نهایت تشکر و قدردانی خود را از مسئولین محترم مرکز تحقیقات شیلات اهواز، موسسه ملی اقیانوس شناسی تهران و آقایان مهندس هاشمی، صحراییان، قدم گاهی، شهبایی، ادگی پور و اسدی به دلیل همکاری صمیمانه در طول پروژه ابراز می‌دارم.

### منابع

- Abdel-Raheem M.S., El-Hussieni Z.M., Ragab N. and Al-Gohary E., 2009.** Study of Erythrocyte Superoxide Dismutase, Plasma Malondialdehyde and Osmotic Fragility test in Psoriasis, 201P.
- Aldrich K. and Saunders D.K., 2000.** Comparison of erythrocyte osmotic fragility among ectotherms and endotherms at three temperatures, Journal of Thermal Biology 26 (2001), pp.179–182.
- Ali F.Kh A.M., El-Shehawi M. and Seehy A., 2008.** Micronucleus test in fish genome: As Sensitive monitor for water pollution. African Journal of. Biotechnology, 7(5):606-612.
- Bekatas S. and Ayik O., 2010.** Alteration in

time در نمونه‌های خون ماهی گل خورک گونه *B. dussumieri* نشان می‌دهد که میزان NRR time به عنوان شاخص حساس و دقیق از تاثیرات و آسیب های وارد شده به لیزوزوم در ماهی گل خورک است. با در نظر گرفتن نتایج فوق به نظر می‌رسد میزان NRR time می‌تواند نشانگر زیستی مناسبی از قرارگیری ماهی گل خورک در معرض ترکیبات هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه‌ای محسوب گردد. استفاده از پایداری غشاء لیزوزوم به عنوان یک نشانگر زیستی غیراختصاصی و مفید جهت بررسی حضور آلاینده‌های آلی به ویژه هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه‌ای به میزان زیادی مورد استفاده قرار گرفته است ( Broeg 2002; Cajaville et al., 2000 et al., 2002; Einsporn et al., 2002; Galloway et al., 2002; Moore et al., 2006a; Schiedek et al., 2006; Köhler et al., 2002; Wedderburn et al., 2000).

نتایج نشان داد ترکیبات هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای بر میزان پایداری غشاء گلبول قرمز ماهی گل خورک تاثیرگذار بوده است. از مکانیسم‌های مهم ورود این ترکیبات به درون سلول، قرارگیری آنها به درون لایه چربی غشاء سیتوپلاسمی است. قرارگیری این ترکیبات در بین چربی‌های غشاء سیتوپلاسمی (در بین زنجیره‌های فسفولیپید) می‌تواند باعث به هم ریختن ساختار غشاء گردد (Rodrigues et al., 2011). از سوی دیگر، آلاینده‌های چربی دوست به دلیل اندرکنش غیراختصاصی با چربی‌های غشاء منجر به افزایش جریان فعال پتاسیم از خلال غشاء سلول گلبول قرمز می‌گردند. این ترکیبات همچنین می‌توانند روی انتقال آنیون ها از خلال غشاء نیز تاثیرگذار بوده و میزان ورود و خروج نرمال آنها را تغییر می‌دهند. این ترکیبات منجر به کاهش جریان و انتشار فسفات از خلال غشاء نیز می‌گردند (Seibert et al., 2001; Bekatas & Ayik, 2010). به نظر می‌رسد ورود ترکیبات هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای به خون ماهی گل خورک یا تولید فاکتورهای همولیتیک توسط آنها از طریق عوامل فوق‌الذکر منجر به بروز تغییر در نفوذ پذیری (قابلیت تراوایی) و در نهایت میزان تردی و قوام غشاء سلول گلبول قرمز خون ماهی گردیده است. تاکنون مطالعات کمی در زمینه استفاده از تست میزان پایداری غشاء گلبول قرمز خون ماهی به عنوان نشانگر زیستی در ارزیابی



- erthrocyte osmotic fragility and erythrocyte membrane fatty acid profile of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) experimentally infected with *Aeromonas salmonicida*. Journal of Animal and Veterinary Advances, 9(19):2472-2476.
- Broeg K., Kohler A. and Westernhagen H.V., 2002.** Disorder and recovery of environmental health monitored by means of lysosomal stability in liver of European flounder *Platichthys flesus* L. Marine Environmental Research, 54:569-573.
- Cajaraville M.P., Bebianno M.J., Blasco J., Porte C., Sarasquete C. and Viarengo A., 2000.** The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian peninsula: A practical approach. Science of the Total Environment, 247:295-311.
- Catsiki V., Hatzianestis I., Stroglyoudi E., Belou O., Gogou M. and Rigas F., 2001.** Distribution of metals and organic contaminants in mussels from Thermaikos Gulf. Proceedings of the 7th International Conference on Environmental Science and Technology. vol. A Syros island, Greece, September, pp.106-113.
- Chimezie A., Ogbechea A., Palmerb P., Cokera H., 2005.** Determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in marine samples of Siokolo Fishing Settlement. Journal of Chromatography A, 1073:323-330.
- Dailianis S., Domouhtsidou G.P., Raftopoulou E., Kaloyianni M. and Dimitriadis V.K., 2003.** Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test, acetylcholinesterase activity and a signal transduction molecule (cAMP) in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (L.), in pollution monitoring. Marine Environmental Research, 56:443-470.
- D.W.T. Au., 2004.** The application of histocytological biomarkers in marine pollution monitoring: A review. Marine Pollution Bulletin 48:817-834.
- Einsporn S., Broeg K. and Köhler A., 2005.** Toxic effects of transported contaminants in flatfish and mussel of the Wadden Sea. Marine Pollution Bulletin, 50:423-429.
- Galloway T.S., Sanger R.C., Smith K.L., Fillmann G., Readman J.W., Ford T.E. and Depledge M.H., 2002.** Rapid assessment of marine pollution using multiple biomarkers and chemical immunoassays. Environmental Science Technology, 2002, 36: 2219-2226.
- ICES., 2004.** Biological effects of contaminants: Measurements of lysosomal membrane stability. By M.N. Moore, D. Lowe and Köhler. ICES Techniques in Marine Environmental Sciences, 36:31P.
- Kohler A., Wahl E. and Soffker K., 2002.** Functional and Morphological changes of lysosomes as prognostic biomarkers of toxic liver injury in a marine flatfish (*Platichthys flesus* (L.)). Environmental Toxicology and Chemistry, 21:2434-2444.
- Lowe D.M., Moore M.N. and Evans B.M., 1992.** Contaminant impact on interactions of molecular probes with lysosomes in living hepatocytes from dab *Limanda limanda*. Marine Ecology Progress Series, 91:135-140.
- Lowe D.M., Fossato V.U. and Depledge M.H., 1995.** Contaminant induced lysosomal membrane damage in blood cells of mussels

- Mytilus galloprovincialis* from the Venicelagoon: An *in vitro* study. Marine Ecology Progress Series, 129:189–196.
- Martínez-Gómez C., Valdés J. and Benedicto J., 2006.** Lysosomal membrane stability in blue mussels as a tool in biomonitoring networks: Results of the Iberian Mediterranean coast (2002-2004). Marine Environmental Research 62:S1-S456. S360-S410. ISSN:0141-1136.
- Meador J.P., Stein J.E., Reichert W.L. and Varanasi U., 1995.** Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms. Reviews of Environmental and Contamination Toxicology, 143:79–165.
- Moopam (Manual of oceanographic observations and pollutant analyses icoly, ogmethods), 1999.** 3rd Ed. section 6, Regional organization for the protection of the marine environment (ROPME). Kuwait.
- Moore M.N., Allen J.I. and McVeigh A., 2006a.** Environmental prognostics: an integrated model supporting lysosomal stress responses as predictive biomarkers of animal health status. Mar. Environ. Res. In press.
- Pandey S., Parvez S., Sayeed I., Haque R., Bin-Hafeez B. and Raisuddin S., 2003.** Biomarkers of oxidative stress: A comparative study of river Yamuna fish *Wallagoattu* (Bl. & Schn.). Science of the Total Environment, 309:105-115.
- Perugini M., Visciano P., Giammarino A., Manera M. and Nardo W.D., 2007.** Polycyclic aromatic hydrocarbons in marine organisms from the Adriatic Sea, Italy. Chemosphere. 66:1904-1910.
- Polgar G., 2010.** The mudskipper, world wide web electronic publication, www.mudskipper.it
- Rodrigues H.G., Penha-Silva N., Pereira de Araujo M.F., Nishijo H. and Aversí-Ferreira T.A., 2011.** Effects of Roundup® Pesticide on the Stability of Human Erythrocyte Membranes and Micronuclei Frequency in Bone Marrow Cells of Swiss Mice. The Open Biology Journal, 4:54-59.
- Seibert C.S., Guerra-Shinohara E.M., Gomes de Carvalho E. and Marques E.E., 2001.** Red blood cell parameters and osmotic fragility curve of *Colossoma macropomum* (Pisces, Osteichthyes, Mileinae) in captivity. Maringá, 23(2) pp.515-520.
- Sikkema J., De Bont J.A.M. and Poolman B., 1995.** Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydrocarbons. Microbiological Reviews, pp.201–222.
- Sinaie M., Darvish Bastami K., Ghorbanpour M., Najafzadeh H., Shekari M. and Haghparast S., 2010.** Metallothionein biosynthesis as a detoxification mechanism in mercury exposure in fish, spotted scat (*Scatophagus argus*). Fish Physiology and Biochemistry, 36(4):1235-42.
- Schiedek D., Broeg K., Barsiene J., Lehtonen K.K., Gercken J., Pfeifer S., Vuontisjärvi H., Vuorinen P. J., Köhler A., Balk L. and Schneider R., 2006.** Biomarker responses and indication of contaminant effects in blue mussel (*Mytilus edulis*) and eelpout (*Zoarces viviparus*) from the western Baltic Sea. Marine Pollution Bulletin, 53:387–405.
- Tolosa I., Stephen J., de Mora., Scott W., F., V. Jean-Pierre, Bartocci. J. and Cattini C., 2005.** Aliphatic and aromatic hydrocarbons in marine

biota and coastal sediments from the Gulf and the Gulf of Oman. Marine Pollution Bulletin, 50:1619–1633.

**UNEP/RAMOGEE.,1999.** Manual on the biomarkers recommended for the MED POL biomonitoring programme. UNEP.Athens. pp.1-92.

**Wedderburn J., McFadzen I., Sanger R.C., Beesley A., Heath C., Hornsby M. andLowe D., 2000.** The field application of cellular and physiological biomarkers, in the mussel *Mytilus edulis*, in conjunction with early life stage bioassays and adult histopathology. Marine Pollution Bulltein, 40:257–267.

Archive of SID

**Evaluation of lysosomal stability and red blood cell membrane fragility in mudskipper (*Boleophthalmus dussumieri*) as a biomarker of poly aromatic hydrocarbons**

**Mahmood S.<sup>(1)\*</sup>; Eghtesadi Araghi P.<sup>(2)</sup>; Mashinchian A.<sup>(3)</sup>; Fatemi M.R.<sup>(4)</sup> and Riazi G.H.<sup>(5)</sup>**

oceanography.sina@gmail.com

1,4-Department of marine biology, Science and research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2-Iranian National Institute for Oceanography (INIO), Tehran, 1411813389, Iran

3-Department of marine chemistry, Science and research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

5-Institute of biochemistry and biophysics, university of Tehran, Iran

Received: July 2012

Accepted: July 2013

**Keywords:** Oil pollution, Persian Gulf, Gobiidae,

### **Abstract**

This research was carried out to study some physiological responses of mudskipper (i.e., *Boleophthalmus dussumieri*) as a biomarker Poly Aromatic Hydrocarbons (PAHs). Fish specimens were obtained 5 stations (Arvand, Jafari, Zangi, Samayeli, Bahrakan) along north western coast of the Persian Gulf (Khuzestan Coast). PAHs concentration was measured by HPLC method. Lysosomal membrane change was measured by NRR time method and stability of red blood cell membrane was evaluated by EOF test. Total PAH concentrations in the sediments and the liver tissue ranged between 113.50-3384.34 ng g<sup>-1</sup>dw, 3.99-46.64ng g<sup>-1</sup> dw, respectively. Highest PAHs pollution was found at Jafari while the lowest was detected at Bahrakan, with significant between these 2 stations. Values of mean RT of the dye ranged from 34 (for the blood samples of mudskipper collected from Jafari site) to 78 minutes (for the blood samples of mudskipper collected from Bahrakan). Preliminary results showed a significant difference among stations except between Arvand and Zangi. Osmotic fragility curves indicated that erythrocytes collected from mudskippers at Jafari were the most fragile followed by Zangi> Arvand> Samayeli> and Bahrakan. The results suggest that lysosomal membrane change and red blood cell membrane stability in *B. dussumieri* could be extended as a biomarker of oil pollution in marine biomonitoring programs.

\*Corresponding author