Archive of SID

تاثیر فاز محلول نفت خام بر میزان تغییرات آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در بچه فیل ماهی (*Huso huso* Linnaeus, 1754) انگشت قد به عنوان بیومارکر آلودگی نفتی

الهه خدابخش*[۱]، شهلا جمیلی[۲]، عباسعلی مطلبی[۲]، علی ماشینچیان مرادی[۱]، حسن نصرالله زاده ساروی[۳]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم و فنون دریایی، گروه زیست شناسی دریا، تهران، ایران، صندوق پستی: ۷۷۵-۱۴۵۱۵

۲- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۱۶-۱۳۱۸۶

۳- پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ساری، ایران، صندوق پستی: ۹۶۱

تاریخ دریافت: ۶ شهریور ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: ۸ دی ۱۳۹۲

چکیده

در این تحقیق تاثیر فاز محلول نفت خام برفعالیت دو آنزیم کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز بچه فیل ماهیان با وزن ۱۰/۷۶ ±۰/۲۳ گرم بررسی شد. بدین منظور ابتدا میزان LC_{50} فاز محلول نفت خام معادل ۴۶/۶۸ میلی‌گرم در لیتر محاسبه شد و سپس ۳ تیمار زیر محدوده کشندگی ($0/4 LC_{50}$، $0/6 LC_{50}$ و $0/8 LC_{50}$) و یک تیمار شاهد (بدون حضور نفت خام) انتخاب و برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد. در هر تکرار تعداد ۳۰ قطعه ماهی ذخیره‌سازی شد و هر ۲۴ ساعت از تمامی تیمارها نمونه‌گیری کبد جهت مطالعات آنزیمی انجام گرفت. در طول مدت آزمایش شاخص‌های کیفی آب اندازه‌گیری و سعی شد که شرایط کیفی برای تمامی تکرارها مشابه باشد. مطابق با نتایج در زمان‌های۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت مقدار آنزیم کاتالاز تمامی تیمارها با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نشان دادند و حتی در روز چهارم سطح آنزیم تمامی تیمارها با هم نیز اختلاف معنی‌داری داشتند و روند افزایش این آنزیم مشاهده شد ($P<0/05$)، تنها استثناء میزان آنزیم کاتالاز تیمار حاوی ۰/۴ غلظت LC_{50} (کمترین دوز) و در زمان ۲۴ ساعت اول بود که بر خلاف دو تیمار دیگر اختلاف معنی‌داری با شاهد نشان نداد ($P>0/05$). میزان آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در همه تیمارها و در روز چهارم با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نشان داد ($P<0/05$). در تمام ۴ روز دوره آزمایش، بیش‌ترین میزان آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در تیمار $0/8 LC_{50}$دیده شد و تنها همین تیمار که حاوی بیش‌ترین دوز آلاینده بود از روز دوم روند افزایشی به خود گرفت. اما نتایج آنالیز رگرسیون نشان داد که نمی‌توان به طور قطع نتیجه گرفت که مقدارآلاینده نفتی موجب تغییر در این آنزیم‌ها گردیده است. همچنین هیچ همبستگی بین میزان این دو آنزیم با هم دیده نشد. نتایج نشان داد که فاز محلول نفت خام برالقای دو آنزیم کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز بچه فیل ماهیان با وزن ۱۰/۷۶ ±۰/۲۳ گرم موثر است.

کلمات کلیدی: فیل ماهی (*Huso huso*)، نفت خام، کاتالاز ، سوپراکسید دیسموتاز.

* عهده‌دار مکاتبات (✉)، elahe_iran2001@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

دریای خزر بزرگ‌ترین بدنه قاره‌ای آبی در جهان است که توسط کشورهای آذربایجان، روسیه، جمهوری اسلامی ایران، قزاقستان و ترکمنستان احاطه شده است (Yablonskaya and Kosarev, 1994). در محیط‌های آبی، از میان انواع مختلف آلودگی‌ها، تولیدات نفتی یکی از مهم‌ترین آلاینده‌ها می‌باشند (Pacheco and Santos, 2001)، که حوزه آبی بسته خزر نیز حاوی این آلودگی‌هاست. سطح آب دریای خزر در ۲۰ سال گذشته حدود ۲/۵ متر بالا آمده است که نتیجه آن به زیر آب رفتن حوزه‌های نفتی، زمین‌های کشاورزی می‌باشد، که بدین وسیله آلودگی‌های مهمی به دریای خزر وارد می‌شود (Dumond,1998). نفت و ترکیبات آن اثرات حادی بر ماهیان داشته و اثرات آن‌ها بر مرحله لاروی و جوانی ماهیان شامل تغییرات مورفولوژیک، هیستوپاتولوژیک و آسیب‌های ژنتیکی گزارش شده است. ذراتی از نفت که بیش‌ترین تأثیر را بر ماهیان استخوانی دارند، هیدروکربن‌های محلول شامل هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی (PAHs) بوده که به خاطر سمیت و پایداری در محیط دارای اهمیت فراوانی می‌باشند (Hose *et al*., 1996). ارگانیسم‌های آبزی PAHs (هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی) موجود در آب را جذب می‌کنند، در نتیجه اثرات متفاوتی بعد از در معرض قرارگرفتن در برابر این آلودگی در آن‌ها رخ می‌دهد (Teh *et al*., 2004). کبد اندامی است که بیش‌ترین ارتباط را با سم‌زدایی و فرآیندهای تغییر شکل زیستی دارد که به دلیل این عملکرد، موقعیت و منبع خون، یکی از اندام‌هایی است که بیش‌ترین تأثیر را از آلاینده‌های موجود در آب می‌پذیرد (Tophan *et al*., 2001). در دهه‌های اخیر سنجش آنتی اکسیدان ها به عنوان نشانگرهای زیستی قرارگیری در معرض انواع آلاینده‌ها در بسیاری از آبزیان به خصوص در طیف وسیعی از مطالعات سم‌شناسی را به خود اختصاص داده‌اند. در واقع تاکید بسیاری از این مطالعات بر روی اندازگیری و سنجش مقدار انواع آنتی‌اکسیدان‌ها و آنزیم‌های اکسیداز در اندام‌های مختلف به دلیل پتانسیل بالای واکنش‌دهی آنتی اکسیدان‌ها به عنوان بخشی از سیستم دفاعی بدن در برابر انواع آلاینده‌ها و سموم می‌باشد. به‌عنوان مثال Peter و همکاران در سال ۲۰۰۱ بر روی فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی لارو ماهی (*Sprattus Sprattus*) در بخش جنوبی دریای شمال تحقیق نمودند. همچنین تحقیقاتی توسط Orbea و همکاران در سال ۲۰۰۲ بر روی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی دوکفه‌ای‌ها، خرچنگ‌ها و ماهی‌های خلیج Plentzia که تحت تاثیر PAH و PCB قرار گرفته بودند انجام شد. تحقیقات دیگری نیز توسط Tetiana و همکاران در سال ۲۰۰۵ بر روی آنزیم کاتالاز ماهی حوض طلایی که تحت تاثیر استرس اکسیداتیو قرار داشت انجام شد. در همین راستا Stanic و همکاران در سال ۲۰۰۶ تحقیقاتی بر روی بیومارکرهای آنزیمی مختلف در ماهی (*Acipenser ruthenus*) که در معرض آلاینده‌های متفاوت قرار داشت انجام دادند.

www.SID.ir

Archive of SID

فیل ماهی یکی از مهمترین ماهیان دریای خزر بوده و با توجه به ارزش غذایی بالا، کیفیت عالی گوشت و لذیذ بودن و همین‌طور اهمیت آن در استحصال خاویار مورد توجه می‌باشد. اگر چه در مطالعاتی تاثیر آلودگی‌های نفتی بر آبزیان و سیستم آنزیمی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفته است، اما تا کنون مطالعه‌ای پیرامون اثرات آن بر فیل ماهی و بیشتر ماهیان دریای خزر صورت نگرفته است .با توجه به ارزش اقتصادی فیل ماهی و کاهش ذخایر آن‌ها از سویی و وجود ده‌ها چاه نفت در کشورهای حاشیه دریای خزر و استحصال نفت و آلودگی روز افزون این محیط از سوی دیگر، این تحقیق با هدف مشخص کردن میزان تاثیر احتمالی فاز محلول نفت خام بر بقاء این آبزی با ارزش و تغییرات برخی از آنزیم‌های اکسیداتیو در مواجهه با این آلاینده انجام گردید.

مواد و روش‌ها

ماهی‌های مورد آزمایش از مرکز تکثیر ماهی شهید رجایی در سمسکنده شهرستان ساری تهیه گردیدند. قبل از آغاز آزمایش وضعیت ظاهری ماهیان مورد بررسی قرار گرفت و تعدادی از آن‌ها که از نظر ظاهری سالم به نظر می‌رسیدند به طور تصادفی انتخاب شده و وزن آن‌ها اندازه‌گیری شد، بچه فیل ماهیان با محدوده وزنی یکسان و مورد نظر (۱۰/۷۶ ±۰/۲۳ گرم) انتخاب و در تانک‌های فایبرگلاس به حجم ۵۰۰ لیتر و آبگیری ۳۳۰ لیتر نگهداری شدند و غذادهی آن‌ها به صورت دوبار در روز و از غذای تجاری SFT استفاده شد. جهت پی‌بردن به سلامت و کیفیت ماهیان مورد مطالعه، آزمایش بقا در سه تکرار با شرایط زیر انجام شد:۱۰ ماهی در هر تکرار، تراکم ماهی یک گرم در لیتر، هوادهی ثابت در طول دوره و به صورت تمام وقت، دوره آزمایش ۸ روز، استفاده از آبی که در طول دوره سازگاری ماهی استفاده شده بود، تعویض نکردن آب در طول آزمایش، دوره نوری ۱۲ ساعته، قطع تغذیه ۴۸ ساعت قبل از آزمایش، ثبت تلفات هر ۲۴ ساعت. با توجه به شرایط فوق میزان تلفات کمتر از ۵٪ بود که این امر نشان دهنده مناسب بودن ماهیان جهت انجام آزمایش محدوده کشندگی و LC_{50} بود. فاز محلول نفت خام نیز طبق روش Anderson و همکاران (۱۹۷۴) به‌دست آمد. اندازه‌گیری محدوده کشندگی برای یافتن ۲ غلظت از سم (بیش‌ترین غلظتی که هیچ مرگ و میری در بین نمونه‌ها ایجاد نکند و دیگری کمترین غلظتی که باعث مرگ و میر ۱۰۰٪ ماهیان موجود شود) و سمیت حاد از روش O.E.C.D و به روش نیمه ساکن انجام شد. جهت انجام این مرحله، گروه‌های ۱۰ تایی ماهیان در ۳ تکرار به تانک‌ها با شرایط کیفی آب مشابه آزمایش بقا منتقل گردید. سپس ۷ غلظت از فاز محلول نفت خام به روش لگاریتمی انتخاب و به تانک‌ها اضافه شد (برای هر غلظت سه تکرار در نظر گرفته شد و سه تکرار نیز بدن حضور نفت به عنوان شاهد). آب هر تانک هر ۲۴ ساعت با محلول هم غلظت تازه جایگزین شد و هر ۲۴ ساعت ماهی‌های مرده از هر تانک جدا شده و شمرده شدند. بعد از ۹۶ ساعت تعداد کل ماهی‌های تلف شده مشخص گردید. در انتهای آزمایش با

www.SID.ir

Archive of SID

استفاده از داده‌های به‌دست آمده و با به کارگیری نرم‌افزار SPSS (نسخه۱۹)، مقدار LC_{50} به روش Probit value محاسبه گردید (Finney, 1978). برای انجام مرحله اصلی آزمایش اثر فاز محلول نفت خام بر میزان القای دو آنزیم کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز به عنوان بیومارکر آلودگی ماهیان در ۴ تیمار (شاهد و تیمارهای با غلظت $0/4 LC_{50}$، $0/6 LC_{50}$، $0/8 LC_{50}$) و در هر تیمار با سه تکرار دسته‌بندی شدند و ۳۰ قطعه ماهی در هر تکرار استفاده شد. مدت زمان این آزمایش ۹۶ ساعت بود و در تمام مدت هوادهی انجام گردید. نمونه‌برداری برای سنجش‌های آنزیمی در هر ۲۴ ساعت انجام شد. در طول مدت آزمایش پارامترهای کیفی آب اندازه‌گیری شد و سعی شد شرایط کیفی برای تمام مخازن مشابه باشد. برای اندازه‌گیری فعالیت آنتی اکسیدانی کبد در تیمارهای مختلف آزمایش، در فواصل ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بعد از قرارگرفتن در غلظت‌های فاز محلول نفت خام نسبت به نمونه‌گیری تصادفی از ماهیان اقدام گردید و نمونه کبد در درجه حرارت ۶۰- نگهداری شد. مقدار ۰/۱ گرم بافت کبد در یک لوله پلاستیکی کوچک ریخته شد و پس از چرخش متوالی نمونه در سانتریفیوژ یخچال‌دار در ۴ درجه سانتیگراد و دورگردش ۱۰۰۰دور در دقیقه و جداسازی آب سطحی، مقدار ۰/۵میلی لیتر بافر سرد (۵۰ میلی‌مولار فسفات پتاسیم، با pH برابر۷ و یک میلی‌لیتر EDTA) بر روی بافت ته نشین شده اضافه گردید. در مرحله بعد لوله حاوی نمونه سه بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه در ازت مایع قرار داده شد. بین دفعات سرد کردن و در زمانی که نمونه از ازت مایع خارج گردید، نمونه به مدت ۳ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا عمل Freeze - Thaw انجام گردد. محلول حاصل ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد با ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید و در نهایت از مایع رویی برای سنجش مرحله بعد استفاده شد. در این آزمایش پروتئین موجود در نمونه به روش برادفورد تعیین گردید. برای اندازه‌گیری آنزیم کاتالاز از روش (Xu *et al.*,1997) و برای اندازه‌گیری سوپر اکسید دیسموتاز از روش (Marklund and Marklund, 1974) استفاده گردید.

کلیه آزمون‌های آماری به‌وسیله نرم افزار SPSS ویرایش هجدهم انجام شد. پیش از آغاز طرح آزمایشی، جهت اطمینان از هم وزن بودن ماهیان هر گروه وزنی، تست نرمالیتی (normality) به وسیله آزمون Shapiro-Wilk انجام شد. برای محاسبه میزان سمیت حاد از روش Probit value در نرم‌افزار استفاده گردید. همچنین برای مقایسه آماری داده‌ها در بین تیمارهای مختلف از آنالیز واریانس یک طرفه Anova و بر اساس آزمون چند دامنه‌ای (تست جدا ساز) دانکن (Duncan multiple-range test) با سطح معنی‌داری ۹۵ ٪، آزمون همبستگی و رگرسیون استفاده شد. برای کشیدن نمودارها نیز از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

نتایج

تغییرات غلظت فاز محلول نفت خام

در محیط آزمایش غلظت هیدروکربن‌های محلول فاز محلول نفت خام که می‌بایست در

www.SID.ir

Archive of SID

آزمایش محدوده کشندگی، مورد استفاده قرار می‌گرفتند، در لحظه شروع آزمایش و مقاطع زمانی ۶، ۱۲، ۱۸ و ۲۴ ساعت پس از شروع آزمایش بدون حضور ماهی اندازه‌گیری شد. غلظت هیدروکربن‌های موجود در محلول در بازه‌های زمانی مذکور به ترتیب ۳۴/۲۸، ۳۷/۵، ۴۴/۴۰،۳۴/۲۲، ۴۹ میلی‌گرم بر لیتر اندازه‌گیری شد. نتایج نشان‌دهنده کاهش غلظت هیدروکربن‌های محلول طی ۲۴ ساعت بودند. مقدار خروج هیدروکربن‌ها از محیط پس از ۲۴ ساعت ۱۴/۷۲ میلی‌گرم در لیتر محاسبه گردید.

میزان مرگ و میر بچه ماهیان طی آزمایش تعیین LC_{50}

میانگین تعداد تلفات در غلظت‌های مختلف آزمایش در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بچه فیل ماهیان در جدول ۱ آورده شده است. با استفاده از روش آماری Probit value در نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ میزان LC_{50} فاز محلول نفت خام بر روی فیل ماهیان گروه وزنی ۱۰/۷۶گرمی به‌دست آمد و همچنین با استفاده از همین نرم‌افزار میزان LC_{10}، LC_{50}، LC_{90} در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و۹۶ ساعت محاسبه گردید (جدول ۲). پس از محاسبه میزان LC_{50} برای شروع مرحله اصلی آزمایش مقادیر ۰/۴، ۰/۶ و ۰/۸ غلظت LC_{50} برای بچه فیل ماهیان محاسبه گردید که در جدول ۳ آمده است.

تغییرات آنزیم کاتالاز

پس از ۲۴ ساعت قرار دادن بچه فیل ماهیان محدوده وزنی۰/۲۳±۱۰/۷۶ گرمی سطوح میزان آنزیم کاتالاز در تیمارهای مورد آزمایش تیمارهای ۰/۶ و ۰/۸ LC_{50}از نظرآماری ارتباط معنی‌داری با شاهد نشان دادند ($P<0/05$).

جدول ۱: تعداد مرگ و میر ماهیان ۰/۲۳±۱۰/۷۶ گرمی تحت آزمایش حدکشندگی غلظت‌های مختلف WSF در زمان‌های مختلف (میانگین سه تکرار)

غلظت ppm / زمان (ساعت)	۲۴	۴۸	۷۲	۹۶
۳۴	۰	۰	۰	۰
۳۶/۵	۰	۰	۰	۰/۳۳
۳۹	۰	۰	۰/۳۳	۰/۶۶
۴۱/۵	۰	۰/۶۶	۱/۳۳	۲/۳۳
۴۴	۱/۳۳	۲	۲	۳/۶۶
۴۶/۵	۱/۳۳	۳/۳۳	۴/۳۳	۵
۴۹	۴/۶۶	۷	۷/۶۶	۹

جدول ۲: مقادیر غلظت کشنده (LC) فاز محلول نفت خام بر بچه فیل ماهی ۰/۲۳±۱۰/۷۶ گرمی بر حسب میلی‌گرم در لیتر

LC / زمان (ساعت)	۲۴	۴۸	۷۲	۹۶
LC_{10}	۳۹/۵۰	۳۸/۳۴	۳۷/۲۸	۳۶/۶۲
LC_{50}	۵۱/۰۱	۴۸/۶۳	۴۷/۴۳	۴۶/۶۸
LC_{90}	۵۴/۱۲	۵۳/۲۸	۵۲/۱۸	۴۹/۳۵

جدول ۳: میزان غلظت‌های مورد استفاده فاز محلول نفت خام در آزمایش بر حسب میلی‌گرم در لیتر

وزن بچه ماهی(گرم)	$0/4LC_{50}$	$0/6LC_{50}$	$0/8LC_{50}$
۱۰/۷۶	۱۸/۶۷	۲۸	۳۴/۳۷

www.SID.ir

Archive of SID

همچنین تیمار $0/8LC_{50}$ با تیمار $0/4LC_{50}$ اختلاف معنی‌داری نشان داد اما بین تیمار $0/6LC_{50}$ با دو تیمار دیگر اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P>0/05$). پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت تمامی تیمارها با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نشان دادند ($P<0/05$). همچنین تیمار $0/8LC_{50}$ با تیمار $0/4LC_{50}$ اختلاف معنی‌داری نشان داد. در روز دوم تیمار $0/6LC_{50}$ با دو تیمار دیگر اختلاف معنی‌داری نشان نداد همچنین این تیمار در روز سوم تنها با تیمار $0/4LC_{50}$ اختلاف معنی‌داری نشان نداد ($P>0/05$). بررسی‌های آماری نشان داد که بعد از ۹۶ ساعت قرارگرفتن بچه ماهیان در تیمارهای مورد آزمایش، همه تیمارها با تیمار شاهد و با هم اختلاف معنی‌داری نشان دادند ($P<0/05$). همچنین بررسی‌های آماری حاکی از این بودکه آنزیم کاتالاز تیمار حاوی LC_{50} ۰/۴ فاز محلول نفت خام در روز اول با آنزیم‌های روز سوم و چهارم اختلاف معنی‌داری داشت و آنزیم روز دوم هم با روز چهارم اختلاف معنی‌داری نشان داد ($P<0/05$) ولی بین آنزیم‌های روز سوم و چهارم و روز دوم و سوم هیچ اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P>0/05$). آنزیم کاتالاز در تیمار حاوی $0/6LC_{50}$ فاز محلول نفت خام در روزهای اول ، دوم و سوم با روز چهارم اختلاف معنی‌داری داشتند. همچنین بین آنزیم‌های روزهای دوم و سوم هم اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($P<0/05$). میزان آنزیم در تیمار حاوی $0/8LC_{50}$ در روز اول و دوم با روزهای سوم و چهارم ومیزان آنزیم در روزهای دوم و سوم با هم اختلاف معنی‌داری نشان دادند ($P<0/05$). در بررسی ارتباط و همبستگی بین فعالیت آنزیم کاتالاز کبد ماهیان در معرض غلظت‌هایی از فاز محلول نفت خام در زمان‌های ۲۴ و۹۶ ساعت که توسط تست رگرسیون انجام شد هیچ ارتباط مشخص و همبستگی معنی‌داری مشاهده نشد (شکل‌های ۱و۲). اما نتایج رگرسیون در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت ارتباط و همبستگی معنی‌داری نشان داد که این همبستگی بسیار بالا و در زمان ۴۸ ساعت ضریب همبستگی یا $r^2=0/998$ و در ۷۲ ساعت به میزان $r^2=0/999$ محاسبه گردید (شکل‌های ۳و۴).

جدول ۴: میزان آنزیم کاتالاز کبد فیل ماهیان ۰/۲۳±۱۰/۷۶ گرمی در غلظت‌های متفاوت فاز محلول نفت خام

غلظت فاز محلول نفت خام (میلی‌گرم در لیتر)	فعالیت آنزیم کاتالاز (میکرومول در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین) در ساعت‌های مختلف نمونه‌گیری			
	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
۰	۲۱/۸۷ ± ۰/۶۱^{a}	۲۱/۸۴ ± ۰/۵۷^{a}	۲۲/۷۳ ± ۰/۲۰^{abc}	۲۲/۷۲ ± ۰/۷۱^{abc}
۱۳/۹۳	۲۲/۳۶ ± ۰/۵۵^{ab}	۲۲/۸۰ ± ۰/۶۱^{abc}	۲۳/۹۰ ± ۰/۴۵^{cde}	۲۴/۲۶ ± ۰/۲۰^{de}
۲۰/۹۲	۲۲/۹۸ ± ۰/۰۷^{abcd}	۲۳/۴۸ ± ۰/۳۸^{bcde}	۲۴/۲۰ ± ۰/۲۶^{de}	۲۶/۸۶ ± ۰/۲۴^{f}
۲۷/۸۹	۲۳/۶۰ ± ۰/۴۳^{bcde}	۲۴/۳۳ ± ۰/۱۳^{e}	۲۵/۸۳ ± ۰/۵۷^{f}	۲۸/۴۳ ± ۰/۲۵^{g}

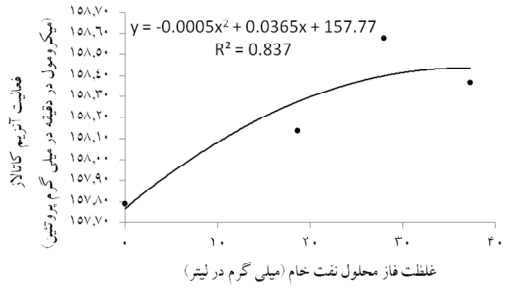
* حروف غیر همسان نشانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها می‌باشد ($P<0/05$).

www.SID.ir

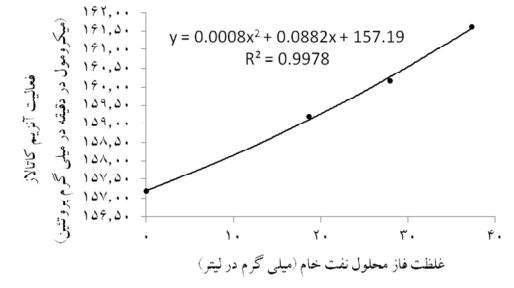
Archive of SID

تغییرات آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز

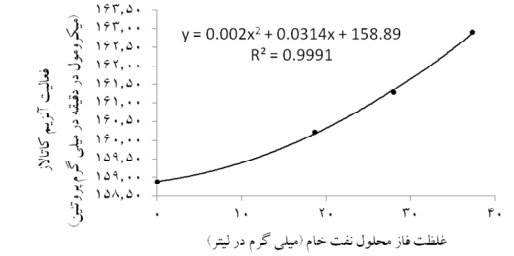
نتایج اندازه‌گیری میزان آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در کبد بچه ماهیان ۰/۲۳± ۱۰/۷۶ گرمی پس از سپری شدن ۲۴ ساعت، نشان داد که که هیچ اختلاف معنی‌داری بین تیمارها و تیمار شاهد و همچنین بین خود تیمارها وجود نداشت($P>0/05$). پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت تنها تیمار $0/8LC_{50}$ با شاهد اختلاف معنی‌داری داشت و خود تیمارها نیز اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند ($P>0/05$). نتایج تست آماری در روز چهارم نشان داد که همه تیمارها با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند. همچنین تیمار $0/8LC_{50}$ با تیمار ۰/۶ و LC_{50} ۰/۴ اختلاف معنی‌داری داشت ($P<0/05$). لازم به ذکر است که در تمامی این روزها بیش‌ترین میانگین آنزیم مربوط به تیمار $0/8LC_{50}$ بود. آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در تیمار حاوی $0/4LC_{50}$ فاز محلول نفت خام در روزهای اول، دوم و سوم با روز چهارم اختلاف معنی‌داری داشتند ($P<0/05$)، ولی بین روزهای اول و دوم و سوم با هم هیچ اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P>0/05$). آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در تیمار حاوی $0/6LC_{50}$ در روزهای اول تا سوم با روز چهارم اختلاف معنی‌داری داشتند ($P<0/05$)، ولی بین روزهای اول، دوم و سوم هیچ اختلاف معنی‌داری دیده نشد ($P>0/05$). آنزیم سوپر اکسید دیسموتازدر تیمار حاوی $0/8LC_{50}$ فاز محلول نفت خام در روز اول با روزهای دوم، سوم و چهارم اختلاف معنی‌داری داشت روزهای دوم و سوم هم با روز چهارم اختلاف معنی‌داری داشتند ($P<0/05$) ولی بین روزهای دوم و سوم با هم هیچ اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P>0/05$).



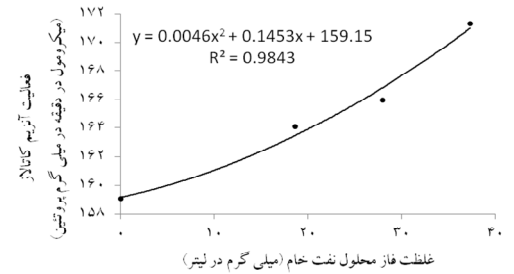
شکل ۱: تغییرات آنزیم کاتالاز کبد فیل ماهیان ۰/۲۳± ۱۰/۷۶ گرمی در برابر تغییرات غلظت فاز محلول نفت خام بعد از ۲۴ ساعت



شکل ۲ : تغییرات آنزیم کاتالاز کبد فیل ماهیان ۰/۲۳± ۱۰/۷۶ گرمی در برابر تغییرات غلظت فاز محلول نفت خام بعد از ۴۸ ساعت



شکل ۳: تغییرات آنزیم کاتالاز کبد فیل ماهیان ۰/۲۳± ۱۰/۷۶ گرمی در برابر تغییرات غلظت فاز محلول نفت خام بعد از ۷۲ ساعت



شکل ۴: تغییرات آنزیم کاتالاز کبد فیل ماهیان ۰/۲۳± ۱۰/۷۶ گرمی در برابر تغییرات غلظت فاز محلول نفت خام بعد از ۹۶ ساعت

www.SID.ir

Archive of SID

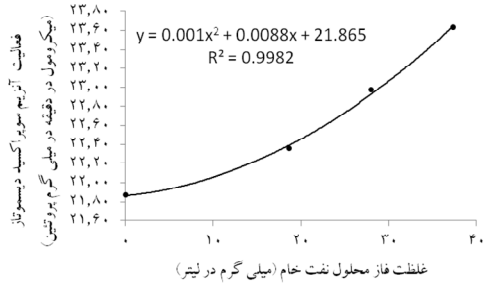
در بررسی ارتباط و همبستگی بین فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز کبد ماهیان در معرض غلظت‌هایی از فاز محلول نفت خام توسط تست رگرسیون تنها در زمان ۲۴ ساعت ارتباط مشخص و معنی‌داری مشاهده گردید و ضریب همبستگی بالا $r^2 =$ ۰/۹۹۸ مشاهده گردید (شکل ۵). ولی در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ و ۹۶ ساعت پراکندگی نقاط در رگرسیون نشان از عدم وجود همبستگی قابل توجهی بود و ارتباط مشخص و همبستگی مشاهده نشد (شکل‌های ۶، ۷ و ۸).

همچنین نتایج حاصل از آزمون همبستگی بین دو آنزیم کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز در طی ۴ روز و در تیمارهای آزمایش نشان داد که هیچ همبستگی بین میزان این دو آنزیم در بچه فیل ماهیان وجود ندارد (جدول ۶).

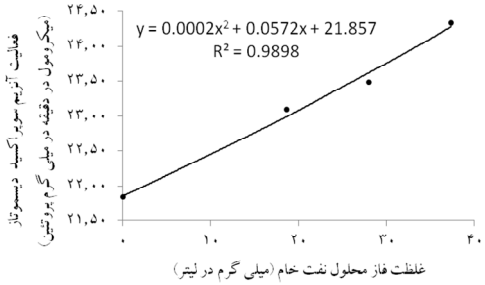
جدول ۵: میزان آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز کبد فیل ماهیان ۰/۲۳±۱۰/۷۶ گرمی در غلظت‌های متفاوت فاز محلول نفت خام

غلظت فاز محلول نفت خام (میلی‌گرم در لیتر)	فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز(میکرومول در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین) در ساعت‌های مختلف نمونه‌گیری			
	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
۰	۱۵۷/۷۹ ± ۰/۶۸^{ab}	۱۵۷/۱۸ ± ۰/۷۶^{a}	۱۵۸/۸۸ ± ۱/۹۰^{ab}	۱۵۹/۰۵ ± ۱/۷۰^{ab}
۱۳/۹۳	۱۵۸/۱۴ ± ۱/۰۹^{ab}	۱۵۹/۲۰ ± ۰/۹۱^{abc}	۱۶۰/۲۳ ± ۰/۰۵^{abcd}	۱۶۴/۱۰ ± ۰/۳۶^{ef}
۲۰/۹۲	۱۵۸/۵۸ ± ۰/۴۸^{ab}	۱۶۰/۶۰ ± ۰/۶۰^{abcde}	۱۶۱/۲۸ ± ۰/۵۲^{bcde}	۱۶۵/۹۹ ± ۰/۸۰^{f}
۲۷/۸۹	۱۵۸/۷۰ ± ۰/۵۳^{ab}	۱۶۲/۶۹ ± ۱/۵۵^{cdef}	۱۶۳/۱۳ ± ۲/۵۹^{def}	۱۷۱/۳۱ ± ۱/۰۵^{g}

*حروف غیر همسان نشانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها می‌باشد (P<۰/۰۵).



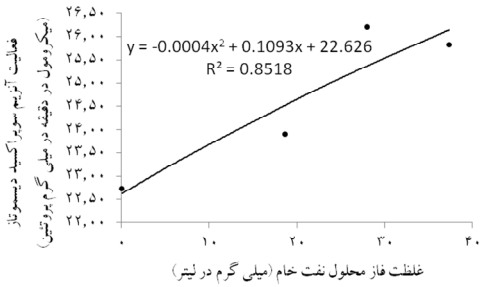
شکل ۵: تغییرات آنزیم سوپراکسید دیسموتاز کبد فیل ماهیان ۰/۲۳±۱۰/۷۶ گرمی در برابر تغییرات غلظت فاز محلول نفت خام بعد از ۲۴ ساعت



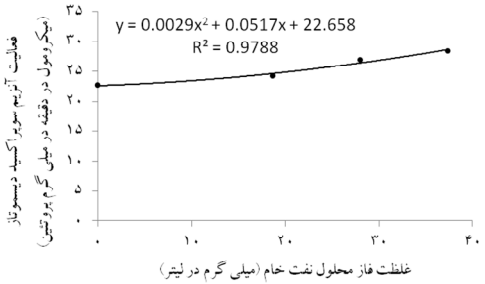
شکل ۶: تغییرات آنزیم سوپراکسید دیسموتاز کبد فیل ماهیان ۰/۲۳±۱۰/۷۶ گرمی در برابر تغییرات غلظت فاز محلول نفت خام بعد از ۴۸ ساعت

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۷: تغییرات آنزیم سوپراکسید دیسموتاز کبد فیل ماهیان ۱۰/۷۶±۰/۲۳ گرمی در برابر تغییرات غلظت فاز محلول نفت خام بعد از ۷۲ ساعت



شکل ۸: تغییرات آنزیم سوپراکسید دیسموتاز کبد فیل ماهیان ۱۰/۷۶ ±۰/۲۳ گرمی در برابر تغییرات غلظت فاز محلول نفت خام بعد از ۹۶ ساعت

جدول ۶: ضرایب معنی‌داری آزمون همبستگی بین آنزیم‌های کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز در زمانهای ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت در تیمارهای آزمایش در بچه فیل ماهیان محدوده وزنی ۱۰/۷۶ ±۰/۲۳ گرمی

زمان (ساعت) / تیمار	۲۴	۴۸	۷۲	۹۶
LC_{50}۰/۴ (۱۸/۶۷میلی گرم در لیتر)	۰/۷۷۸	۰/۳۸۶	۰/۹۲۷	۰/۲۱۷
LC_{50}۰/۶ (۲۸میلی گرم در لیتر)	۰/۴۷۶	۰/۵۰۷	۰/۹۰۶	۰/۲۵۳
LC_{50}۰/۸ (۳۴/۳۷میلی گرم در لیتر)	۰/۳۶۸	۰/۷۲۱	۰/۲۴۵	۰/۱۴۳

بحث

مهم‌ترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی آنزیم‌های کاتالاز، سوپر اکسید دیسموتازو گلوتاتیون پراکسیداز بوده که وظایف هر کدام به صورت زیر می‌باشد. کاتالاز باعث تجزیه پراکسید هیدروژن به مولکول اکسیژن و آب می‌شود سوپر اکسید دیسموتاز باعث تجزیه سوپر اکسیدها به پراکسید هیدروژن می‌شود و گلوتاتیون پراکسیداز به همراه گلوتاتیون اکسیداز باعث کاهش هیدرو پراکسیداز چربی و پراکسید هیدروژن می‌شود(Almedia *et al.*, 2007).کبد یک اندام یکنواخت بوده که بیش‌ترین فعالیت‌های آنزیم‌های انتی اکسیدانی نظیر کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتازدر آن مشاهده می‌شود. این می‌تواند به این دلیل باشد که کبد جایگاه واکنش‌های اکسیدانی چندگانه و حداکثر تولید رادیکال‌های آزاد می‌باشد (Gule *et al.*, 1997). زمانی که استرس اکسیداتیو رخ می‌دهد، بسیاری از آنیون‌های سوپر اکسید رها شده در داخل سلول به مولکول‌های پراکسید هیدروژن تبدیل می‌شود که این مولکول‌ها توسط کاتالاز از بین می‌روند. سوپر اکسید دیسموتاز نیز همانند کاتالاز یک آنزیم محرک بوده و با اکسیژن فعال کاهش می‌یابند.

در تحقیق حاضر بعد از قرارگرفتن بچه فیل ماهیان محدوده وزنی ۱۰/۷۶ ±۰/۲۳ گرمی در تیمارهای موردآزمایش در زمان‌های۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت مشاهده شد که مقدار آنزیم کاتالاز روندی افزایشی داشت در تمامی تیمارها با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نشان دادند و حتی در

www.SID.ir

Archive of SID

زمان ۹۶ ساعت سطح آنزیم تمامی تیمارها نیز با هم اختلاف معنی‌داری داشتند، تنها استثنا میزان آنزیم کاتالاز تیمار حاوی غلظت LC_{50} ۰/۴ (کمترین دوز) ودر زمان ۲۴ ساعت اول بود که بر خلاف دو تیمار دیگر اختلاف معنی‌داری با شاهد نشان نداد.

در بسیاری از موارد تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای تحت آلودگی و تیمار شاهد از نظر فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانی در اندام‌هایی مانند کبد و هپاتوپانکراس وجود دارد که می‌تواند به دلیل قابلیت بالای آن اندام در بروز تاثیرات آلاینده‌های مورد نظر باشد (Hung *et al*., 2007). اما تست رگرسیون نشان داد که بین فعالیت آنزیم کاتالاز در معرض غلظت‌های مختلف نفت خام در زمانهای ۲۴ و ۹۶ ساعت هیچ ارتباط مشخص و همبستگی معنی‌داری مشاهده نشد. ولی در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت ارتباط و همبستگی بالایی دیده شد. در نتیجه نمی‌توان به طور قاطع نتیجه گرفت که تنها قرار گرفتن در معرض آلاینده موجب تغییر سطح آنزیم کاتالاز در تمامی تیمارها شده است.

در تحقیقی که کرامتی و همکاران در سال ۱۳۸۸ بر روی تاثیر سم دیازینون بر فعالیت آنزیم کاتالاز در بافت کلمه انجام دادند ارتباط معنی‌داری بین میزان آلاینده و آنزیم مشاهده نشد. Olive و همکاران در سال ۲۰۱۰ تاثیر هیدروکربن‌های آروماتیک (PAH_S) بر ماهی *Solea senegalesis* در ساحل Huelva در سنگال بررسی کردند و همبستگی مثبت بین افزایش PAH_S و افزایش میزان کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز به عنوان بیومارکر آلودگی مشاهده کردند.

میزان آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز همگی تیمارها بعد از گذشت ۳ روز و در زمان ۹۶ ساعت میزان آنزیم همگی تیمارها با تیمار شاهد ارتباط معنی‌داری داشتند و در تمام این ۴ روز بیش‌ترین میانگین آنزیمی مربوط به تیمارLC_{50} ۰/۸ بود و تنها همین تیمار که حاوی بیش‌ترین دوز آلاینده بود از روز دوم روند افزایشی به خود گرفت. همچنین مقدار آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در تمامی تیمارها در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ با مقدار آنزیم در زمان ۹۶ ساعت ارتباط معنی‌داری نشان دادند. نتایج تست رگرسیون برای بیان ارتباط و همبستگی بین فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتازو میزان افزایش غلظت فاز محلول نفت خام نشان داد که تنها در زمان ۲۴ ساعت ارتباط مشخص و معنی‌داری بین آن‌ها وجود دارد ولی در زمان‌های ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پراکندگی نقاط در نمودار نشان از عدم وجود همبستگی بود. در نتیجه برای این آنزیم هم نمی‌توان این گونه نتیجه گرفت که تنها وجود آلاینده باعث تغییرات این آنزیم گشته است.

نتایج آزمون همبستگی بین دو آنزیم کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز در طی ۴ روز و در تمامی تیمارها نشان داد که هیچ همبستگی بین این دو آنزیم در بچه فیل ماهیان محدوده ۱۰/۷۶ گرمی وجود ندارد و تغییرات این دو آنزیم از نظر آماری با هم همخوانی ندارند. Niyogi و همکارانش در سال ۲۰۰۱ تحقیقاتی را انجام دادند و بیان کردند وقتی ارگانیسم‌ها در معرض آلاینده‌هایی مثل هیدروکربن قرار می‌گیرند سیستم ROS فعال می‌شود و افزایش آنزیم‌های آنتی اکسیدانی به

www.SID.ir

Archive of SID

خصوص سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز افزایش می‌یابد. DiGiulio طی تحقیقی در سال ۱۹۹۱ بیان داشت که میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در ماهیانی که در معرض آلاینده‌های هیدروکربنی قرار داشتند دارای روند افزایشی بود.

Milinkovich و همکاران در سال ۲۰۱۱ آنتی اکسیدان‌های آنزیمی کبد ماهی *Liza aurata* را که در معرض نفت خام قرار گرفته بود بررسی کردند و همانند نتایج تحقیق حاضر افزایش همزمان آنزیم‌های آنتی اکسیدانی را مشاهده کردند.

در مطالعاتی که Yilmaz و همکارانشان در سال ۲۰۰۶ بر روی ماهی کپور انجام دادند مشخص شده که با افزایش آلاینده‌ها افزایش شدید میزان آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز و کاهش آنزیم کاتالاز مشاهده شد و این گونه عقیده داشتند که نحوه پاسخ بافت‌های مختلف ماهی به میزان آلودگی متفاوت است و ممکن است یک بافت یه استرس اکسیداتیو پاسخ ندهد و سیستم آنزیمی به خوبی فعال نشود و در نتیجه تخریب بافتی بیشتر باشد. اما در تحقیق حاضر باکمی اختلاف زمانی هر دو آنزیم روند افزایشی از خود نشان دادند. در بررسی انجام شده در مورد اثرات آلودگی برروی برخی از ماهیان خانواده کپور ماهیان که توسط Gul و همکاران در سال ۲۰۰۴، فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی نظیر کاتالاز، سوپر اکسید دیسموتاز و لاکتیک دهیدروژناز در کبد آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت که همگی فاکتورها شدیداً تحت تاثیر آلودگی بودند. ماهیان مورد بررسی عبارت بودند از: مروارید ماهی *Alburnus alburnus*، سیم *Abramis brama*، باربوس *Barbus barbus*، سوف *Lucioperca lucioperca*، کپور معمولی *Cyprinus carpio*، مار ماهی *Anguila anguila*.

نتایج مطالعات متعددی نشان داده‌اند که لزوماً هنگامی که ماهی تحت تاثیر سموم و آلاینده‌ها قرار می‌گیرد سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی آن فعال نمی‌شود و از سویی دیگر تغییرات فعالیت این آنزیم‌ها با توجه به نوع و ماهیت آلاینده‌ها در یک اندام خاص بروز می‌کند و در بسیاری از موارد میزان فعالیت آن‌ها در یک اندام کم و در همان هنگام در اندامی دیگر زیاد می‌گردد (Rosa *et al*., 2005). Petres و همکاران در سال ۲۰۰۱ در بررسی اثرات آلاینده‌های هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه ای در لارو ماهی اسپرات *Sprattus sprattus* دریافتند که میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز در لاروهای موجود در مصب که بیشتر در معرض این آلاینده‌ها قرار داشتند نسبت به لاروهایی که دور از این منطقه بودند بسیار بیشتر بود. در بررسی Orbea و همکاران در ۲۰۰۲ سطوح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در مقابله با هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای در ماسل *Mytilus galloprovincialis* و اویستر *Crassostrea sp.*، خرچنگ *Carcinus maenas* و ماهی کفال *Mugil cephalus* نتایج نشان داد که میزان این آلاینده‌ها در این موجودات در زمستان بیشتر از تابستان بوده ولی میزان آنتی‌اکسیدان‌ها در تابستان بیشتر از زمستان بوده است. امروزه مطالعات متعددی

www.SID.ir

Archive of SID

به خوبی نشان داده‌اند که سموم و آلاینده‌های آلی و فلزی می‌توانند منجر به تحریک فرآیند تولید ROS و نقصان در فعالیت‌های آنزیم‌های آنتی اکسیدانی و در نتیجه آسیب‌های اکسیداسیونی در موجودات آبزی در آزمایشات حاد گردند، از سویی دیگر امکان جلوگیری و یا کاهش اثرات سمیت ROS توسط آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی وجود دارد (Pinto *et al*., 2003). اگر چه در آزمایشات مزمن فعالیت‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به طور معمول دارای روند افزایشی در موجودات می‌باشند ولی باید توجه داشت که تغییرات آنزیم‌های آنتی اکسیدانی با توجه به گونه آبزی و نوع آلاینده متفاوت است و تاثیرگذاری آلاینده بر سطوح آنتی‌اکسیدانی تا اندازه‌ای بستگی به اندام مورد نظر دارد (Oruce *et al*., 2004). زمان تولید مثل، غذای در دسترس، درجه حرارت ، فصل و ... نیز در این امر دخالت بسیاری دارند (Almedia *et al*., 2007; Frenzilli *et al*., 2004; Manduzio *et al*.,2004).

تغییرات فعالیت سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی در برابر بسیاری از آلاینده‌ها دارای دو مرحله مجزا می‌باشد: یک مرحله حاد که معمولاً در ساعات اولیه در معرض آلاینده قرار گرفتن ماهی بروز می کند (اغلب ۲۴ ساعت اولیه) و یک مرحله سازگاری که با توجه به گونه و نوع آلاینده می‌تواند تا چندین روز به طول انجامد. همچنین باید توجه داشت که برخی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نسبت به برخی آلاینده‌ها واکنش نشان نداده و در واقع به نوعی تخصصی عمل می‌نمایند (Tetiana *et al*., 2005). افزایش میزان آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز ممکن است به عواملی نظیر توان تولید آنزیم در هر موجود ، سن و جنس، نوع آلاینده دما و از همه مهم‌تر مدت زمان که موجود با آلاینده درگیر است می‌باشد. همچنین در بررسی‌هایی که Zhang و همکارانش در سال ۲۰۰۴ بر روی ماهی Gold fish انجام دادند به این نتیجه رسیدند که حضور بعضی از یون‌های فلزی (روی و مس) در کنار آلاینده‌ها نیز می‌تواند میزان توان تولید آنزیم‌ها و سم زدایی این مواد آلاینده توسط آنزیم‌های اکسیداتیو تاثیرگذار باشد چون این یون‌ها به عنوان کوفاکتور برای بعضی از آنزیم‌های اکسیداتیو نظیر سوپر اکسید دیسموتاز می‌باشد و با تولید سوپر اکسید دیسموتاز و افزایش پراکسید هیدروژن افزایش بیشتر آنزیم کاتالاز مشاهده می‌شود. Hamed در سال ۲۰۰۴ تاثیر PAH_S در نواحی آلوده رود نیل بر میزان آنزیم‌های اکسیداتیو *Clarias lazaris* ,*Oreochrromis sp.* بررسی نمود و مشخص شد که آنزیم‌ها در بافت‌های مختلف ماهیان متفاوت و گونه‌های مختلف مقاومت‌های متفاوتی در برابر آلودگی دارند.

نوع ماده آلاینده و حساسیت جانوران به آن‌ها نیز در میزان القای آنزیمهای آنتی‌اکسیدانی موثر است مثلا مطالعات نشان داد میزان حساسیت ماهیان نسبت نفت خام بیشتر از روغن دیزل و حساسیت به روغن دیزل بیشتر از گازوئیل بود چون میزان انواع هیدروکربن‌های در نفت خام بیشتر از روغن دیزل و گازوئیل می‌باشد (Sole *et al*., 2001).

یکی دیگر از فاکتورهای مهم در میزان القای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی زمان مواجهه با آلاینده

www.SID.ir

Archive of SID

است معمولا در بررسی آلاینده‌ها و تاثیر آن‌ها بر سیستم دفاعی و بافت هر دو روش حاد و مزمن مورد استفاده قرار می‌گیرد و عکس‌العمل موجودات بر اساس حساسیت‌های گونه‌ای به آلاینده بسیار متفاوت است. هر چه زمان ماندگاری در برابر آلاینده بیشتر باشد میزان عکس‌العمل آنزیمی به آلاینده بیشتر می‌باشد. بر طبق نظر Zhang و همکارانش در سال ۲۰۰۴ تعدادی از آنزیم‌ها یک نقش مشترک را در سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی ایفا می‌کنند مثلاً آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز (GP_X) علاوه بر از بین بردن لیپید پراکسیدها همانند آنزیم کاتالاز در از بین بردن پراکسید هیدروژن در استرس‌های اکسیداتیو نقش دارد ممکن است حضور این آنزیم (گلوتاتیون پراکسیداز) از بین بردن پراکسید هیدروژن را انجام دهد و در نتیجه میزان تولید و فعالیت آنزیم کاتالاز کاهش یابد. آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز می‌تواند همزمان هیدروژن پراکساید و لیپید پراکساید را تجزیه کند بنابراین در تجزیه پراکسید هیدروژن با آنزیم کاتالاز همکاری می‌کند. گونه‌های مختلف ماهیان و جانوران ممکن است در مواجهه با آلاینده‌ها مختلف از هر دو آنزیم کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز همزمان بهره ببرند و یا اینکه در کوتاه مدت از یک آنزیم و با گذشت زمان و افزایش مدت زمان مواجهه با آلاینده از آنزیم دیگر و یا از هر دو آنزیم استفاده کنند و این امر در موجودات بسیار متفاوت است و حتی بعضی از موجودات در برابر یک آلاینده از یک آنزیم و در برابر آلاینده‌ای دیگر از آنزیم دیگر استفاده می‌کنند (Lazawa *et al.*, 1996). Stanic و همکاران نیز در سال ۲۰۰۶ بر روی تاثیر آلودگی را بر بیومارکرهای آنتی‌اکسیدانی در ماهی *Acipenser ruthenus* در رودخانه دانوب بررسی و بیان کردند که آلاینده‌ها باعث افزایش بیومارکرهای آنتی‌اکسیدانی در این ماهی شده است.

در تحقیق حاضر همراه با آنزیم سوپر اکسیداز دیسموتاز افزایش میزان کاتالاز نیز مشاهده شد (البته پس از گذشت ۳ روز)، شاید در فیل ماهی در این گروه وزنی آنزیم کاتالاز نقش پر رنگ‌تری نسبت به آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز برای از بین بردن پراکسید هیدروژن بازی می‌کند که برای رسیدن به پاسخ قطعی در این خصوص نیاز به تحقیق بیشتر در این زمینه حس می‌شود. به طور کلی نتایج نشان داد که آنزیم‌های کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز کبد، بیومارکرهای مناسبی برای آلودگی فاز محلول نفت خام در بچه فیل ماهی محسوب می‌شوند و حتی دوز زیر حدکشندگی هم در آزمایشات تعیین مسمومیت حاد (۹۶ ساعت) بر تغییرات میزان این آنزیم‌ها تاثیرگذار است.

سپاسگزاری

بدین وسیله از کارکنان گرامی پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، آزمایشگاه مرکز تحقیقات شیلاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل و همه عزیزانی که در پیشبرد این تحقیق با نویسندگان نهایت همکاری را داشته‌اند قدردانی می‌گردد.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

۱. کرامتی، و.، جمیلی، ش.، ماشینچیان مرادی، ع.، ۱۳۸۸. تاثیر سم دیازینون بر میزان فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدان کاتالاز در بافت کبد ماهی کلمه *Rutilus rutilus*. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم و تحقیقات تهران، ۷۶ صفحه.

2. Almedia, E. A., Loureiro, G. R., Martinez, S. Miyamoto, J., Onuki, L. F., Barbosa, C. C., 2007. Oxidative stress in Perna perna and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marie environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. Comparative Biochemestery and Physiology, Part A, 146, 588-600.
3. Anderson, J. W., Neef, J. M., Cox, B. A., Tatem, H. E., Hightower, G. M., 1974, Characteristics of dispersions and water-soluble extracts of crude and refined oils and their toxicity to estuarine\ crustaceans and fish. Marine Biology, 27, 75–88.
4. DiGiulio, R. T., Washburn, P. C., Wenning, R. J., Winston, G. W. and Jewell, C. S., 1989. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. Environment Toxicology and Chemistry, 8, 1103–1123.
5. Dumond, H. J., 1998. The Caspian lake: History, biota, structure and function. Limnology and Oceanography, 43(1), 44-52.
6. Finney, D. L., 1978. Statistical method in biological assay. London: Charles Griffin, 68-77.
7. Frenzili, G., Bocchetti, R., Pagliarecci, M., Nigro, m., Annarumma, F., Scarcelli, V., Fattorini, D., Regoli, F., 2004. Thime-course evaluation of ROS mediated toxicity in mussle, (*Mutilus galloprovincialis*), during a fild trans location experiment. Marine Environmental Resources, 58, 609-613.
8. Gül, S., Belge-Kurutaş, E., Yildiz, E., Sahan, A., Doran, F., 2004. Pollution correlated modifications of liver antioxidant systems and histopathology of fish (Cyprinidae) living in Seyhan Dam Lake, Turkey. Environment International, 30(5), 605-9.
9. Gule, I., Leonard, B., Holdway, D. A., 1997. Oil and dispersed oil toxicity to amphipods and snails. Spill Sciences Technology Bulltain, 4, 1–6.
10. Hamed, R., 2004. Evalution of Detoxification Enzyme level in Egyptian cat fish, *Clarias lazera* Exposed to Dimethoate, Bulletin of Environment Contamination Toxicology, 63, 789-796.
11. Hasspieler, E. B., Behar, J. V., Di Giulio, R. T., 1994. Glotathion-dependent defense in channel cat fish(*Ictalurus punctatus*) and brawn bullhed (*Ameriurus nebulosus*). Ecotoxicology and Eenvironmental Safety, 28, 82-90.
12. Hose, J. E., McGurk, D., Marty, G. D., Hinton, D. E., Brown, E. D., Baker, T. T., 1996. Sublethal effects of the Exxon Valdez oil spill on herring embryos and larvae: morphological, cytogenetic and histopathological assessments, 1989–1991. Canadian Journal of Fish and Aquatic Sciences, 53, 2355–2365
13. Hung, D. J., Zang, Y. M., Stone, G., Long, J., Lio, J. H., Ji, W. H., 2007. Contaminants-Induced oxidative Damage on carp *Cyprinus carpio* Collected from the Upper Yellow river, china Environment Monitoring Assessment, 128, 483-488.
14. Kosarev, A.N. and Yablonskaya, E.A., 1994. The Caspian Sea, SPB Academic Publishing, The Hague, 259 P.
15. Lazawa, S., Inoue, Y., Kimura, A., 1996. Importance of catalase in the adaptive Response to hydrogen proxide, Biochemistry Journal., 320, 61-67.
16. Manduzio, H., Monsinjion, T., Galap, C., Leboulenger, F., Rocher, B., 2004. Seasonal variation in antioxidant defenses in blue mussels collected frome a pollution area: major contributions of in gill of inducible isoform of Cu/Zn-Super oxide dismutase and glutation transferase. Aquatic Toxicology, 70, 83-93.
17. Marklund, S., Marklund, G., 1974. Involvement of the superoxide anion radicalin the autoxidation of pyrogallol and aconvenient assay for superoxide dismutase. Europ Journal of Biochemistry, 47, 469–474.
18. Milinkovitch, T., Ndiaye, A., Sanchez, V., Le Floch, S., 2011. Liver antioxidant and plasma immune responses in juvenile golden grey mullet (*Liza aurata*) exposed to dispersed crude oil. Aquatic Toxicology, 101(1), 155-164.

www.SID.ir

Archive of SID

19. Niyogi, S., Biswas, S., Sarker, S., Datta, A.G., 2001a., Antioxidant enzymes in brackishwater oyster, *Saccostrea cucullata* as potential biomarkers of polyaromatic hydrocarbon pollution in Hooghly Estuary (India): seasonality and its consequences. Science of Total Environment, 281, 237–246.
20. Niyogi, S., Biswas, S., Sarker, S., Datta, A.G., 2001b., Seasonal variation of antioxidant and biotransformation enzymes in barnacle, *Balanus balanoides*, and their relation with polyaromatic hydrocarbon. Marine Pollution Bulletin, 52, 13–26.
21. Oliva, M., González de Canales,M., Gravato, C., Guilhermino, L., 2010., Biochemical effects and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in senegal sole (*Solea senegalensis*) from a Huelva estuary (SW Spain). Ecotoxicology and Environmental Safety, 73(8), 1842-1851.
22. Orbea, A., Ortiz-Zarragoitiaa, M., Sole, C., Cajaravill, M. P., 2002. Antioxidant enzyme and peroxisome proliferation in relation to contaminant body burdens of PAH_S And PCB_S in bivalve mollusca, crabs and fish from the Urdabai and plentzia estuaries (Bay of Biscay). Aquatic Toxicology, 58, 75-98.
23. Oruce, E. O., Sevgiler, Y., Uner, N., 2004. Tissue-specific oxidative stress response in fish exposed to 2,4-D andazinphosmethyl. Comparative Biochemistry and physiology, 137, 43-51.
24. Pacheco, M., and Santos ,A.M., 2001. Biotransformation, endocrine, and genetic responses of *Anguilla anguilla* L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. Ecotoxicology and Environmental Safety 49, 64-75.
25. Petres, L. D., Port , C., Livingston, D. R. 2001., Variation of antioxidant enzyme activitiese of Spart (*Sprattus Sprattus*) Larvae and organic contaminant levels in mixed Zooplankton from the southern North Sea. Marine Pollution Bulletin, 42(11), 1087-1095.
26. Pinto, E., Siggaud-Kutner, T. C. S., Leitao, M. A. S., Okamoto, O. K., Morse, D., Colepicolo, P., 2003. Heave metal induced oxidative stress in algae. Journal of Physiology, 39, 1008-1018.
27. Rosa, M. M., Amila, E. M., Ana, S., 2005. Antioxidant defencees in fish: Biotic and abiotic factors. Review in Fish Biology and Fisheries, 15, 75-88.
28. Sole, M., Porte, C., Albaiges, J., 2001. Hydrocarbons, PCBs and DDT in the NW Mediterranean deep-sea fish Mora moro. Deep Sea, 48(2), 495-513.
29. Stanic, B., Andric, N., Zoric, S., 2006. Assessing pollution in the Danube River near Novi Sad (Serbia) using several biomarkers in sterlet (*Acipenser ruthenus* L.), Ecotoxicology and Environmental Safety, 65(3), 395-402.
30. Teh, S.J., Deng, X., Deng, D.F., Teh, F.C., Hung, S.S., Fan, T.W., Liu, J., Higashi, R.M., 2004. Chronic effects of dietary selenium on juvenile Sacramento splittail (*Pogonichthys macrolepidotus*). Environmental Science and Technology, 38, 6085–6093.
31. Tetiana, V. B., Vasilkiv, K. B. Storry, V. I., 2005. Catalase inhibition amino triazole induces oxidative stress in gold fish brain. Brain research, 1052, 180-186.
32. Tophan, M.K., Prescott, S.M., 2001. Diacylglycerol kinase zeta regulates Ras activation by a novel mechanism. Journal of Cell Biology, 152, 1135-1143.
33. Xu, J. B., Yuan, X. F., Lang, P. Z., 1997. Determination of catalase activity and catalase inhibition by ultraviolet spectrophotometry. China Environmental Chemistry, 16, 73–76.
34. Yilmaz, H., 2006. An In vestigation of Antioxidant Activities in liver of *Cyprinus carpio* Taken from Difrantation Station in the Karakaya dam lake.1, 1, pp. 1-6.
35. Zhang, J. F., Wang, X. R., Guo, H.I., Wu, J.C. and Xue, Y. Q., 2004. Effect of water soluble fraction of diesel oil on the antioxidant defense of the gold fish *Carassius auratus*, Ecotoxicology and Environmental Safety, 58, 110-116.

www.SID.ir