تاثیر فاز محلول نفت خام دریای خزر بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در کبد بچه تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) به عنوان نشانگرهای زیستی آلودگی نفتی

شایان قبادی *[1]، الهه خدابخش[2]

۱- گروه شیلات، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران، صندوق پستی: ۷۵۵

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

تاریخ دریافت: ۲۶ دی ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: ۴ خرداد ۱۳۹۷

چکیده

این تحقیق جهت بررسی تاثیر فاز محلول نفت خام دریای خزر برفعالیت آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز کبد بچه تاس ماهیان ایرانی یا قره برون (*Acipenser persicus*) با میانگین وزن ۰/۱۸± ۳/۱۴ گرم انجام شد. بدین منظور ابتدا میزان LC_{50} فاز محلول نفت خام معادل ۳۱/۹۴ میلی‌گرم در لیتر محاسبه شد و سپس ۳ تیمار زیر حد کشندگی ($0/25\,LC_{50}$، $0/50\,LC_{50}$ و $0/75\,LC_{50}$) 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. آزمایش طی ۹۶ ساعت صورت گرفت و هر ۲۴ ساعت جهت مطالعات آنزیمی از تمامی تیمارها نمونه‌گیری کبد انجام شد. در طول مدت آزمایش شاخص‌های کیفی آب اندازه‌گیری و کنترل شد تا شرایط برای تمامی تکرارها مشابه باشد. مطابق با نتایج، از روز سوم آزمایش میزان آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز همه تیمارها با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نشان دادند، هرچند در این میان سطح این آنزیم در تیمار $0/75\,LC_{50}$ از روز دوم هم بطور معنی داری نسبت به شاهد و سایر تیمارها بیشتر بوده است($P<0/05$). از سوی دیگر، در زمان‌های۲۴ و ۴۸ ساعت مقدار آنزیم کاتالاز هیچ یک از تیمارها با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نداشتند($P>0/05$) و تنها در تیمار $0/75LC_{50}$ از روز سوم بطور معنی داری افزایش آنزیم کاتالاز مشاهده شد و در روز چهارم این تیمار در کنار تیمار $0/50LC_{50}$ تنها تیمارهایی بودند که با هم و با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری نشان دادند($P<0/05$). مطابق با این نتایج، آنزیمهای سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز کبد، بیومارکرهای مناسبی جهت سنجش آلودگی فاز محلول نفت خام در بچه تاسماهیان ایرانی تشخیص داده شدند، هرچند با توجه به تاخیر بیشتر در افزایش سطوح آنزیم کاتالاز، می‌توان آنزیم سوپراکسید دیسموتاز کبد را بیومارکر مناسب تری اعلام نمود.

کلمات کلیدی: تاس ماهی ایرنی (*Acipenser persicus*)، نفت خام، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، نشانگر زیستی.

* عهده‌دار مکاتبات (✉). shgh_science@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

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. دریای خزر بزرگ‌ترین بدنه قاره‌ای آبی در جهان است که توسط کشورهای آذربایجان، روسیه، جمهوری اسلامی ایران، قزاقستان و ترکمنستان احاطه شده است (Kosarev and Yablonskaya, 1994). طی سالهای گذشته و با افزایش سطح آب دریای خزر بسیاری از حوزه‌های نفتی و زمین‌های کشاورزی به زیر آب رفته اند که بدین وسیله آلودگی‌های مهمی به این دریا وارد شده است (Dumond,1998). نفت و ترکیبات آن اثراتی حاد بر ماهیان داشته و در مرحله لاروی و جوانی ماهیان می‌تواند منجر به تغییرات ریخت شناختی، بافت شناسی و آسیب‌های ژنتیکی شود. ذراتی از نفت که بیش‌ترین تأثیر را بر ماهیان استخوانی دارند، هیدروکربن‌های محلول شامل هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی (PAHs) هستند 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 و در نتیجه قرارگرفتن در برابر این آلودگی‌ها، اثرات متفاوتی در آن‌ها بروز می‌کند (Teh *et al.*, 2004). فاز محلول نفت خام می‌تواند منجر به آسیب در بافت‌های مختلف ماهی‌ها شود (حسینی و همکاران، ۱۳۹۶). کبد اندامی است که بیش‌ترین ارتباط را با سم‌زدایی و فرآیندهای تغییر شکل زیستی دارد که به دلیل این عملکرد و موقعیت و همینطور پر خون بودن، یکی از اندام‌هایی است که بیش‌ترین تأثیر را از آلاینده‌های موجود در آب می‌پذیرد (Tophan *et al.*, 2001). در دهه‌های اخیر آنزیم‌های آنتی اکسیدانی به عنوان نشانگرهای زیستی انواع آلاینده‌ها، در بسیاری از آبزیان مورد سنجش قرار گرفته اند و به خصوص در طیف وسیعی از تحقیقات سم‌شناسی مورد مطالعه واقع شدند (خدابخش و همکاران، ۱۳۹۳).

مهم‌ترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز هستند که وظایف هر کدام به صورت زیر می‌باشد. سوپر اکسید دیسموتاز باعث تجزیه سوپر اکسیدها به پراکسید هیدروژن می‌شود، کاتالاز باعث تجزیه پراکسید هیدروژن به مولکول اکسیژن و آب می‌شود و گلوتاتیون پراکسیداز به همراه گلوتاتیون اکسیداز باعث کاهش هیدرو پراکسیداز چربی و پراکسید هیدروژن می‌گردد(Almedia *et al.*, 2007).کبد یک اندام یکنواخت بوده که بیش‌ترین فعالیت‌های آنزیم‌های انتی اکسیدانی نظیر کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتازدر آن مشاهده می‌شود (Gule *et al.*, 1997). در واقع تاکید بسیاری از این مطالعات روی اندازه‌گیری 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. بعنوان مثال Peter و همکاران در سال ۲۰۰۱ 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 روی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی دوکفه‌ای‌ها، خرچنگ‌ها و ماهی‌های خلیج Plentzia که تحت تاثیر PAH وPCB قرار گرفته بودند انجام شد. تحقیقات دیگری نیز توسط

Archive of SID

www.SID.ir

Tetiana و همکاران در سال ۲۰۰۵ 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 روی بیومارکرهای آنزیمی مختلف در ماهی (*Acipenser ruthenus*) که در معرض آلاینده های متفاوت قرار داشت انجام دادند. خدابخش و همکاران هم در سال ۱۳۹۳ تاثیر فاز محلول نفت خام بر تغییرات آنزیم‌های آنتی اکسیدانی کبد بچه فیل ماهی(*Huso huso*) را مورد مطالعه قرار دادند.

تاس ماهی ایرانی(*Acipenser persicus*) یکی از مهمترین ماهیان دریای خزر بوده و با توجه به ارزش غذایی بالا، کیفیت عالی گوشت و همین‌طور اهمیت آن در استحصال خاویار مورد توجه می‌باشد اما تاکنون مطالعه‌ای پیرامون اثرات آلودگی فاز محلول نفت خام دریای خزر بر این ماهی و بیشتر ماهیان دریای خزر صورت نگرفته است. با توجه به ارزش اقتصادی تاس ماهی ایرانی و کاهش ذخایر آن به علل مختلف از یک سو 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 این دریاچه بر بقای این آبزی با ارزش و تغییرات برخی از آنزیم‌های آنتی اکسیدانی به عنوان نشانگرهای زیستی آلودگی نفتی در مواجهه با این آلاینده انجام گردید.

مواد و روش‌ها

ماهی‌های مورد آزمایش در این تحقیق 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 تاس ماهیان ایرانی با محدوده وزنی یکسان و مورد نظر (۰/۱۸± ۳/۱۴ گرم) انتخاب و در تانک‌های فایبرگلاس به حجم ۵۰۰ لیتر و آبگیری ۳۵۰ لیتر نگهداری شدند و غذادهی آن‌ها به صورت دوبار در روز با استفاده از از غذای تجاری بیومار انجام شد. جهت پی‌بردن به سلامت و کیفیت ماهیان مورد مطالعه، آزمایش بقا در سه تکرار و با تعداد ۱۰ ماهی در هر تکرار، تراکم یک گرم ماهی در هر لیتر آب حوضچه، هوادهی ثابت در طول دوره و به صورت تمام وقت، به مدت ۸ روز انجام شد. در طول این مدت از آبی که در طول دوره سازگاری ماهی‌ها استفاده شده بود، استفاده شد و در طول آزمایش تعویض آب صورت نگرفت. دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی بود و قطع تغذیه ۴۸ ساعت قبل از آزمایش انجام می‌شد. هر ۲۴ ساعت ثبت تلفات صورت می‌گرفت. 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.

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

Archive of SID

www.SID.ir

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 شدند. 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 بدون 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 استفاده از داده‌های به‌دست آمده و با به کارگیری نرم‌افزار SPSS (ویرایش ۱۸)، 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 سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز به عنوان بیومارکر آلودگی، ماهیان در ۴ تیمار (شاهد و تیمارهای با غلظت LC_{50} ۰/۲۵، LC_{50} ۰/۵۰، LC_{50} ۰/۷۵) 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. بطوریکه این شاخص‌ها در طول دوره آزمایش شامل دمای ۱/۳±۲۱ (درجه سانتیگراد)، pH معادل ۰/۳± ۸/۱، اکسیژن محلول معادل ۰/۳۳±۸/۶ (میلی‌گرم در لیتر) و سختی آب معادل ۸±۴۲۱ (میلی‌گرم در لیتر کربنات کلسیم) بودند. 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- درجه سانتی‌گراد در سردخانه اداره انتقال خون شهرستان بابل، 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) 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 (خدابخش و همکاران، ۱۳۹۳). برای اندازه‌گیری سوپر اکسید دیسموتاز از روش (Marklund and Marklund, 1974) و برای اندازه‌گیری آنزیم کاتالاز از روش (Xu *et al*., 1997) استفاده شد.

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

Archive of SID

www.SID.ir

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 اطمینان ۹۵ ٪ استفاده شد. برای کشیدن نمودارها نیز از نرم‌افزار Excel استفاده گردید.

نتایج

تغییرات غلظت فاز محلول نفت خام

غلظت هیدروکربن‌های موجود در محلول در بازه‌های زمانی مذکور به ترتیب ۴۸/۸۷، ۴۴/۲۱، ۳۶/۳۹،۵۲/۶۳، ۳۳/۶۴ میلی گرم بر لیتر اندازه گیری شد. نتایج نشان‌دهنده کاهش غلظت هیدروکربن‌های محلول طی ۲۴ ساعت بودند. مقدار خروج هیدروکربن‌ها از محیط پس از ۲۴ ساعت ۱۵/۲۳ میلی گرم 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 ماهیان قره برون در جدول ۱ آورده شده است. با استفاده از روش آماری Probit value در نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ میزان LC_{50} فاز محلول نفت خام برای بچه ماهیان قره برون با وزن ۰/۱۸± ۳/۱۴ گرم به‌دست آمد و همچنین با استفاده از همین نرم‌افزار میزان LC_{10}، LC_{50}، LC_{90} در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت محاسبه گردید (جدول ۲). پس از محاسبه میزان LC_{50} برای شروع مرحله اصلی آزمایش مقادیر ۰/۲۵، ۰/۵۰ و ۰/۷۵ غلظت LC_{50} برای بچه ماهیان قره برون محاسبه گردید که در جدول ۳ آمده است.

جدول ۱: تعداد تلفات ماهیان ۰/۱۸± ۳/۱۴ گرمی تحت آزمایش حدکشندگی غلظت‌های مختلف فاز محلول نفت خام دریای خزر در زمان‌های مختلف (میانگین سه تکرار)

زمان (ساعت) / غلظت ppm	۲۴	۴۸	۷۲	۹۶
۲۴/۷۵	۰	۰	۰	۱
۲۷	۰	۰	۲	۴
۲۹/۲۵	۰	۲	۴	۷
۳۱/۵	۳	۶	۱۰	۱۴
۳۳/۷۵	۸	۱۲	۱۶	۲۳
۳۶	۱۱	۱۶	۲۱	۲۷
۳۸/۲۵	۱۵	۲۰	۲۵	۲۹

جدول ۲: مقادیر غلظت کشنده (LC) فاز محلول نفت خام دریای خزر بر تاس ماهیان ایرانی ۰/۱۸± ۳/۱۴ گرمی بر حسب میلی‌گرم در لیتر

LC / زمان (ساعت)	۲۴	۴۸	۷۲	۹۶
LC_{10}	۳۱/۵۰	۳۰/۱۱	۲۸/۳۲	۲۶/۱۳
LC_{50}	۳۸/۲۵	۳۶/۵۱	۳۴/۱۲	**۳۱/۹۴**
LC_{90}	۴۲/۸۷	۴۰/۴۱	۳۸/۳۳	۳۶/۰۰

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

وزن بچه ماهی (گرم)	$0/4LC_{50}$	$0/6LC_{50}$	$0/8LC_{50}$
۳/۱۴ ±۰/۱۸	۷/۹۸	۱۵/۹۷	۲۳/۹۵

تغییرات آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز

نتایج اندازه‌گیری میزان آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در کبد بچه ماهیان ۰/۱۸± ۳/۱۴ گرمی نشان داد که از

Archive of SID
www.SID.ir

روز سوم آزمایش میزان این آنزیم در همه تیمارها با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری داشته است، هرچند در این میان سطح این آنزیم در تیمار LC_{50} ۰/۷۵ از روز دوم هم بطور معنی داری نسبت به شاهد و سایر تیمارها بیشتر بود($P<۰/۰۵$). لازم به ذکر است که در تمامی این روزها بیش‌ترین میانگین فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز مربوط به تیمار LC_{50} ۰/۷۵ بود که حداکثر این میزان در روز چهارم و معادل ۱۰/۲۱ ±۰/۱۱ (میکرومول در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین) اندازه‌گیری گردید(جدول ۴).

تغییرات آنزیم کاتالاز

نتایج سنجش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز طی ۹۶ ساعت نشان داد که در زمان‌های۲۴ و ۴۸ ساعت مقدار این آنزیم در هیچ یک از تیمارها با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نداشتند($P>۰/۰۵$). این روند در روز سوم نیز مشاهده شد و تنها در تیمار $۰/۷۵LC_{50}$ از این روز بطور معنی‌داری افزایش آنزیم کاتالاز مشاهده شد و در روز چهارم هم این تیمار در کنار تیمار $۰/۵۰LC_{50}$ تنها تیمارهایی بودند که با هم و با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری نشان دادند($P<۰/۰۵$)، (جدول ۵).

جدول ۴: میزان فعالیت ویژه آنزیم سوپراکسید دیسموتاز کبد تاس ماهیان ایرانی ۰/۱۸± ۳/۱۴ گرمی در غلظت‌های متفاوت فاز محلول نفت خام دریای خزر (Mean ± SD)

غلظت فاز محلول نفت خام (میلی‌گرم در لیتر)	فعالیت ویژه آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (میکرومول در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین) در ساعت‌های مختلف نمونه گیری			
	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
۰	۶/۴۲ ± ۰/۰۳ ^{a}	۶/۵۱ ± ۰/۱۲ ^{ab}	۶/۵۵ ± ۰/۰۸ ^{b}	۶/۶۳ ± ۰/۱۱ ^{bc}
۷/۹۸	۶/۳۹ ± ۰/۰۷ ^{a}	۶/۵۵ ± ۰/۰۹ ^{b}	۶/۷۶ ± ۰/۱۰ ^{c}	۶/۹۶ ± ۰/۰۶ ^{d}
۱۵/۹۷	۶/۵۳ ± ۰/۰۳ ^{b}	۶/۶۴ ± ۰/۱۱ ^{bc}	۶/۹۲ ± ۰/۱۳ ^{d}	۷/۸۹ ± ۰/۰۹ ^{e}
۲۳/۹۵	۶/۶۱ ± ۰/۱۰ ^{bc}	۷/۰۱ ± ۰/۰۷ ^{de}	۸/۴۲ ± ۰/۱۵ ^{f}	۱۰/۲۱ ± ۰/۱۱ ^{g}

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

جدول ۵: میزان فعالیت ویژه آنزیم کاتالاز کبد تاس ماهیان ایرانی ۰/۱۸± ۳/۱۴ گرمی در غلظت‌های متفاوت فاز محلول نفت خام دریای خزر (Mean ± SD)

غلظت فاز محلول نفت خام (میلی‌گرم در لیتر)	فعالیت ویژه آنزیم کاتالاز (میکرومول در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین) در ساعت‌های مختلف نمونه گیری			
	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
۰	۶۵/۱۳ ± ۱/۲۱ ^{a}	۶۵/۳۳ ± ۰/۸۱ ^{a}	۶۶/۳۴ ± ۱/۰۳ ^{ab}	۶۶/۳۲ ± ۰/۴۹ ^{ab}
۷/۹۸	۶۵/۶۵ ± ۰/۷۳ ^{a}	۶۵/۶۶ ± ۰/۹۰ ^{a}	۶۶/۲۶ ± ۰/۹۱ ^{ab}	۶۶/۹۱ ± ۰/۳۶ ^{b}
۱۵/۹۷	۶۵/۶۳ ± ۰/۸۱ ^{a}	۶۵/۸۲ ± ۰/۸۵ ^{a}	۶۶/۷۳ ± ۰/۳۹ ^{ab}	۶۹/۳۳ ± ۰/۴۳ ^{c}
۲۳/۹۵	۶۵/۷۲ ± ۰/۶۳ ^{a}	۶۶/۲۳ ± ۰/۶۲ ^{ab}	۶۹/۱۲ ± ۰/۸۹ ^{c}	۷۴/۸۸ ± ۰/۶۷ ^{d}

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

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

در تحقیق حاضر بعد از قرارگرفتن بچه تاس ماهیان ایرانی با محدوده وزنی ۰/۱۸± ۳/۱۴ گرمی در تیمارهای موردآزمایش در زمان‌های۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت مشاهده شد که میزان آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز همه تیمارها بعد از گذشت ۳ روز با یکدیگر و با شاهد دچار اختلاف معنی‌دار شدند و مطابق با نتایج، با افزایش غلظت آلاینده، میزان این آنزیم در تیمارهای مختلف هم روندی افزایشی نشان دادند که با طولانی‌تر شدن قرارگیری ماهیان در معرض آلاینده هم همین روند مشاهده شد(P<۰/۰۵). در تمام این ۴ روز بیش‌ترین میانگین فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در تیمارLC_{50} ۰/۷۵ دیده شد و تنها در همین تیمار که حاوی بیش‌ترین دوز آلاینده بود از روز دوم بطور معنی داری نسبت به سایر تیمارها روند افزایشی به خود گرفت(P<۰/۰۵). چنین روندی در تحقیقات خدابخش و همکاران در سال ۱۳۹۳ که تاثیر فاز محلول نفت خام بر آنزیم‌های آنتی اکسیدانی فیل ماهیان (*Huso huso*) انگشت‌قد ۰/۲۳± ۱۰/۷۶ گرمی را مورد بررسی قرار داده بودند نیز کمابیش مشاهده شد، با این تفاوت که در تحقیق مذکور اختلافات معنی‌دار با یک روز تاخیر بیشتر نسبت به تحقیق حاضر بروز نمود که می‌توان علت این تفاوت را مقاوم‌تر بودن فیل ماهیان انگشت قد نسبت به بچه تاس ماهی ایرانی عنوان کرد که هم ناشی از وزن بالاتر فیل ماهیان مورد بررسی و هم تفاوت گونه ای آنها با تاس ماهیان ایرانی را شامل می‌شود.

در طول آزمایش، مقدار آنزیم کاتالاز تیمارهای مختلف تا روز چهارم با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نشان ندادند و در این میان تنها تیمار LC_{50} ۰/۷۵ بود که از روز سوم بطور معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها افزایش میزان آنزیم را بروز داد(P<۰/۰۵). البته در روز چهارم کلیه تیمارها با یکدیگر دارای اختلاف معنی‌دار بوده اند (P<۰/۰۵). در سنجش آنزیم کاتالاز هم با افزایش غلظت آلاینده و همینطور با طولانی تر شدن قرار گیری ماهیان در معرض آلودگی، روند افزایشی در فعالیت آنزیم مشاهده شدکه با تحقیق خدابخش و همکاران در سال ۱۳۹۳ و DiGiulio در سال ۱۹۹۱ مطابقت داشت.

در بسیاری از موارد در اندام‌هایی مانند کبد و هپاتوپانکراس، تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای تحت آلودگی و تیمار شاهد از نظر فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانی وجود داشت که می‌تواند به دلیل قابلیت بالای این اندام‌ها در بروز تاثیرات آلاینده‌های مورد نظر باشد (Hung *et al.*, 2007). به عنوان مثال، Olive و همکاران در سال ۲۰۱۰ تاثیر هیدروکربن‌های آروماتیک (PAH_S) بر ماهی *Solea senegalesis* در ساحل Huelva سنگال را بررسی کردند و همبستگی مثبتی بین افزایش PAH_S و افزایش میزان کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز به عنوان بیومارکر آلودگی مشاهده نمودند. اما از سوی دیگر در تحقیقی که کرامتی و همکاران در سال ۱۳۸۸ روی تاثیر سم دیازینون بر فعالیت آنزیم کاتالاز در بافت کبد ماهی کلمه (*Rutilus rutilus*) انجام دادند، ارتباط معنی‌داری بین میزان آلاینده و آنزیم مشاهده نشد. علت این امر شاید مربوط به نوع آلاینده های مورد بررسی باشد. 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

Archive of SID

www.SID.ir

به 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 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 به 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 صورت گرفته در مورد اثرات آلودگی روی برخی از ماهیان که توسط Gul و همکاران در سال ۲۰۰۴ انجام شد، فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی نظیر سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز و لاکتیک دهیدروژناز در کبد آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت که همه این آنزیم‌ها شدیداً تحت تاثیر آلودگی بودند. ماهیان مورد بررسی در تحقیق مذکور 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 هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در لارو ماهی اسپرات (*Sprattus sprattus*) دریافتند که میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز 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. حتی برخی از تحقیقات نشان داده اند که تاثیرگذاری آلاینده ها می‌تواند در فصول مختلف، متفاوت باشد که علت آن‌را شاید بتوان در رژیم غذایی و ترکیب لاشه ماهیان در معرض آلودگی جستجو نمود. به عنوان مثال 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 بود. امروزه مطالعات متعددی به خوبی نشان داده‌اند که سموم و آلاینده‌های آلی و فلزی می

Archive of SID

www.SID.ir

توانند منجر به تحریک فرآیند تولید ROS و نقصان در فعالیت‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و در نتیجه آسیب های اکسیداسیونی در موجودات آبزی در آزمایش‌های حاد گردند، از سویی دیگر امکان جلوگیری و یا کاهش اثرات سمیت ROS توسط آنزیم‌های آنتی اکسیدانی وجود دارد (Pinto *et al.*, 2003). اگر چه در آزمایش‌های مزمن فعالیت‌های آنزیم‌های آنتی اکسیدانی به طور معمول دارای روند افزایشی در موجودات می‌باشند ولی باید توجه داشت که تغییرات آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی 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 می‌کند (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 زمانی که موجود با آلاینده درگیر است وابسته باشد. همچنین در بررسی‌هایی که Zhang و همکارانش در سال ۲۰۰۴ روی ماهی Gold fish انجام دادند به این نتیجه رسیدند که حضور بعضی از یون‌های فلزی (روی و مس) در کنار آلاینده‌ها نیز می‌تواند بر 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 عمل می‌نمایند، در ادامه 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*) و *Oreochrromis sp.* را بررسی نمود و مشخص شد که این 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 هیدروکربن‌ها 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 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

Archive of SID

www.SID.ir

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). به طور کلی نتایج نشان داد که آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز کبد، بیومارکرهای مناسبی برای آلودگی فاز محلول نفت خام در بچه تاس ماهیان ایرانی محسوب می‌شوند و حتی دوز زیر حدکشندگی هم در آزمایشات تعیین مسمومیت حاد (۹۶ ساعت) بر تغییرات میزان این آنزیم‌ها تاثیرگذار است. البته با توجه به تاخیر بیشتر آنزیم کاتالاز در افزایش فعالیت، به نظر می‌رسد آنزیم سوپراکسید دیسموتاز شاخص زیستی مناسب‌تری برای آلاینده های نفتی در بچه تاس ماهیان ایرانی باشد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از مدیریت و کارکنان گرامی پژوهشکده اکولوژی دریای خزر و مرکز تکثیر و پرورش ماهیان شهید رجایی ساری و همینطور آزمایشگاه مرکز تحقیقات شیلاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل و حوزه معاونت پژوهشی این واحد که در پیشبرد این طرح پژوهشی با نویسندگان نهایت همکاری را داشته‌اند قدردانی می‌گردد.

منابع

۱. حسینی، س. ژ.، ضیایی نژاد، س.، جوهری، س. ع.، نعمت دوست، ب.، ۱۳۹۶. اثرات نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم بر تغییرات بافتی آبشش کپور معمولی نوجوان (*Cyprinus carpio*) در مواجهه با فاز محلول نفت خام. نشریه توسعه آبزی پروری، ۱۱(۳)، ۱۳-۲۷.

۲. خدابخش، ا.، جمیلی، ش.، مطلبی، ع.، ماشینچیان، ع.، نصراله زاده ساروی، ح.، ۱۳۹۳. تاثیر فاز محلول نفت خام بر میزان تغییرات آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در بچه فیل‌ماهی (*Huso huso*) انگشت

Archive of SID
www.SID.ir

قد به عنوان بیومارکر آلودگی نفتی. نشریه توسعه آبزی پروری، ۸(۱)، ۴۵-۶۰.

۳. 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.

4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Dumond, H. J., 1998. The Caspian lake : History, biota, structure and function. Limnology and Oceanography, 43(1), 44-52.
8. Finney, D. L., 1978. Statistical method in biological assay. London: Charles Griffin. pp. 68-77.
9. 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 field trans location experiment. Marine Environmental Resources, 58, 609-613.
10. 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. 2004 Jul, 30(5), 605-9.
11. Gule, I., Leonard, B., Holdway, D. A., 1997. Oil and dispersed oil toxicity to amphipods and snails. Spill Sciences Technology Bulltain., 4, 1–6.
12. 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.
13. 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
14. 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.
15. Kosarev, A.N. and Yablonskaya, E.A., 1994. The Caspian Sea, SPB Academic Publishing,The Hague, P 259.
16. Lazawa, S., Inoue, Y., Kimura, A., 1996. Importance of catalase in the adaptive Response to hydrogen proxide, Biochemistry Journal., 320, 61-67.
17. 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 glutathione transferees. Aquatic Toxicology, 70, 83-93.
18. Marklund,S.,Marklund,G.,1974.Involveme nt of the superoxide anion radicalin the autoxidation of pyrogallol and aconvenient assay for superoxide dismutase. Europ Journal of Biochemistry, 47, 469–474.
19. Milinkovitch, T., Ndiaye, A., Sanchez, V., Le Floch, S., 2011. Liver antioxidant and plasma immune responses in juvenile

Archive of SID
www.SID.ir

20. 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, 237–246.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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, 137C, 43-51.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. Tophan, M.K., Prescott, S.M., 2001. Diacylglycerol kinase zeta regulates Ras activation by a novel mechanism. Journal of Cell Biology, 152, 1135-1143.
34. 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.
35. Yilmaz, H., 2006. An In vestigation of Antioxidant Activities in liver of *Cyprinus carpio* Taken from Difrantation Station in the Karakaya dam lake. 1, 1-6.
36. 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.

Archive of SID

www.SID.ir