

بررسی تغییرات فصلی آنزیم گلوکاتایون اس ترانسفراز کاتالاز و استیل کولین استراز در اندازه‌های مختلف صدف دوکفه‌ای مرواریدساز *Pinctada radiata*

- **الهه علی‌عسگری:** گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
- **علی ماشینیچیان مرادی*:** گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
- **فریبرز احتشامی:** موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
- **شبهلا جمیلی:** موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
- **محمد ربانی:** گروه شیمی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹۶

چکیده

تحقیق حاضر جهت اندازه‌گیری میزان غلظت آنزیم گلوکاتایون اس ترانسفراز کاتالاز و استیل کولین استراز به‌عنوان نشانگرهای آلاینده فلزات سنگین در صدف دوکفه‌ای مرواریدساز محار (*Pinctada radiata*) انجام گرفته است. نمونه‌برداری از بهار تا زمستان سال ۱۳۹۲ به‌روش غواصی در ایستگاه‌های لاوان، هندورایی و نخیلو انجام شد که در طی نمونه‌برداری صدف‌های با اندازه کوچک (۴-۶ سانتی‌متر) جمع‌آوری گردیدند. برای اندازه‌گیری میزان غلظت فلزات سنگین از روش استاندارد Moopam، برای اندازه‌گیری آنزیم گلوکاتایون اس ترانسفراز از روش Habig، برای اندازه‌گیری آنزیم استیل کولین استراز از روش Ellman و برای اندازه‌گیری غلظت کاتالاز از روش Abei استفاده گردید. میزان غلظت آنالیز فلزات سنگین نیکل، کادمیوم و سرب در بافت نرم صدف محار (*Pinctada radiata*) در هر سه ایستگاه به‌ترتیب 0.058 ± 0.012 ، 0.014 ± 0.008 و 0.30 ± 0.094 قسمت در میلیون می‌باشد، که نتایج نشان داد غلظت فلز سرب در رسوبات ایستگاه دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد. غلظت آنزیم استیل کولین استراز در ایستگاه‌های مختلف و در بین اندازه‌های بزرگ و کوچک و در بین دو فصل اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. تغییرات دو آنزیم کاتالاز و گلوکاتایون اس ترانسفراز تقریباً مشابه یکدیگر بوده و ایستگاه و فصل هر دو پارامتر اختلاف معنی‌داری بر میزان غلظت این آنزیم‌ها داشتند. تغییرات فصلی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (با فرض ثابت بودن شوری و اکسیژن) به سن، چرخه تولیدمثل، در دسترس بودن میزان غذا و دمای آب مرتبط است. با افزایش دما در فصل گرم میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان افزایش یافته، با افزایش دما و فراوانی غذا در محیط ممکن است میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان افزایش یابد. با توجه به میزان کم آلاینده‌های فلزات سنگین در مناطق مورد مطالعه، سطح پایین‌تری از آلاینده‌ها در بافت صدف محار (*Pinctada radiata*) از نظر استانداردهای جهانی مشاهده گردید و ارتباط قوی نیز بین میزان این آلاینده فلزات سنگین در بافت صدف محار (*Pinctada radiata*) و میزان آنزیم‌های مورد مطالعه مشاهده نشد، لذا میزان آلاینده‌های گونه مورد مطالعه در حد طبیعی می‌باشد و گونه در وضعیت سالمی به‌سر می‌برد.

کلمات کلیدی: *Pinctada radiata*، خلیج فارس، آنزیم گلوکاتایون اس ترانسفراز، استیل کولین استراز، کاتالاز، فلزات سنگین



مقدمه

حاضر با گسترش مراکز صنعتی و شهری در سواحل دریا، تردد کشتی‌ها، حفاری‌ها و تاسیسات استخراج نفت و گاز از حاشیه و بستر دریاها، تولیدات نفتی، سموم کشاورزی و بازگشت پساب‌ها به دریاها از طریق رودخانه‌ها عوامل اصلی آلاینده محیط آبریان به‌شمار می‌آیند. در ترکیب شیمیایی این پساب‌ها، فلزات سنگین، شاخص‌ترین و خطرناک‌ترین اجزا هستند این آلودگی‌ها در دریاها نیمه‌بسته‌ای هم‌چون خلیج فارس، به‌دلیل پایین بودن درجه تعویض و مبادله آب بین بخش‌های مختلف دریا، کم‌عمقی، محدودیت مساحت، تبخیر بیش از حد آب و نیز عدم اختلاط آلاینده‌ها در کل سبب شده است در منطقه آلودگی تشدید شود و این امر، نیاز به پایش و کنترل بیش‌تری نیاز دارد (مرتضوی، ۱۳۸۴). خلیج فارس از مهم‌ترین مناطق دریایی جهان است. در سال ۱۹۷۹، سازمانی تحت عنوان سازمان منطقه‌ای حفاظت از محیط زیست دریایی (ROPME) تشکیل شد که تاکنون مطالعات بسیاری در زمینه آب، رسوبات و آبریان در این دریا انجام داده‌است (نیک‌بین، ۱۳۸۸). از مهم‌ترین مطالعاتی که همه‌ساله توسط این سازمان انجام می‌شود، ارزیابی غلظت فلزات سنگین در آب، رسوبات و در برخی از آبریان است (Ahmad, ۱۹۸۸). عموماً پساب خروجی از صنایع، فاضلاب‌های خانگی، شهری و آلودگی‌های نفتی، حاوی مخلوطی از مواد آلی، معدنی، کربوهیدرات، فلزات سنگین و غیره است. از میان انواع منابع آلاینده، فلزات سنگین به‌دلیل اثرات سمی در محیط و ایجاد پدیده تجمع زیستی در آبریان مختلف و در نتیجه تاثیر آن‌ها در زنجیره غذایی آبریان، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (مرتضوی، ۱۳۸۴). گرچه مقادیر جزئی از این فلزات در بسیاری از واکنش‌ها و فعالیت‌های بدن ضروری می‌باشند ولی بیش‌تر از حد مجاز آن‌ها سبب عوارض جبران‌ناپذیری در جانداران می‌گردد از این جهت، یکی از موارد مهم در صدور گواهی بهداشت مواد غذایی بررسی مقادیر فلزات می‌باشد (Clark, ۲۰۰۱). آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نقش حیاتی و مهمی را در حفظ هموستازی سلول بازی می‌کنند. واکنش‌های تحریک‌پذیری آن‌ها پاسخی ویژه نسبت به آلاینده‌ها محسوب شده و بنابراین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به‌عنوان نشانگرهای زیستی مواد آلاینده و ایجادکننده استرس‌های اکسیدانی در بسیاری از موجودات زنده دریایی از جمله ماهی‌ها، سخت‌پوستان و نرم‌تنان مطرح و معرفی شده‌اند. اگر این آنزیم‌ها فعال نشده و از فعالیت آن‌ها ممانعت شود و سیستم دفاعی دچار اشکال و آسیب شود، مواد اکسیدکننده سمی تولید شده ممکن است سبب آسیب به DNA، عدم فعالیت آنزیمی و بروز پراکسیداسیون چربی‌ها گردند. سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی تحت تاثیر تماس با مواد شیمیایی بوده و بنابراین سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی می‌توانند به‌عنوان نشانگرهای زیستی جهت پایش آلودگی‌های زیست‌محیطی مورد استفاده قرار گیرند (Rosa و

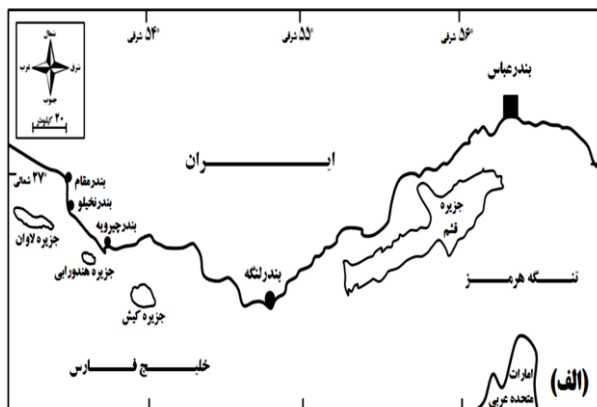
امروزه افزایش جمعیت و توسعه صنایع مختلف و گسترش مناطق کشاورزی باعث ورود حجم بالای آلاینده‌های مختلف به محیط‌های آبی گردیده‌است. ورود پساب‌های کشاورزی، شهری و صنعتی که حاوی آلاینده‌های گوناگون هستند می‌تواند باعث بروز مشکلات زیادی برای محیط‌های آبی گردد (Lamanso, ۱۹۹۱). از میان مواد آلاینده وارد شده به اکوسیستم‌های آبی، فلزات سنگین به‌علت اثرات سمیت، پایداری و خاصیت تجمع‌زیستی از جمله آلودگی‌های جدی و خطرناک محیط زیست می‌باشند، هم‌چنین فلزات سنگین می‌توانند با تجمع زیستی در زنجیره غذایی به سمیت مزمن و شدید دامن‌زنند (Ahmad و همکاران، ۲۰۱۰). صدف محار گونه‌ای از رده دوکفه‌ای‌ها است که همانند اکثر دوکفه‌ای‌ها توانایی جذب فلزات سنگین را در خود دارد و به‌عنوان یک نشانگر زیستی شناخته شده است (Al-Madfa و همکاران، ۱۹۹۸). از این‌رو، موجوداتی مانند برخی از گروه‌های دوکفه‌ای‌ها، ماهی‌ها ابزار مفیدی هستند که از طریق آن‌ها می‌توان میزان مواد آلاینده وارد شده به محیط را مورد ارزیابی قرار داد (ذوالقدری‌قره‌بلاغ، ۱۳۸۲). نشانگرهای زیستی در علوم مختلف از جمله پزشکی، بیولوژی سلولی، روانشناسی، ژنتیک، سم‌شناسی، اپیدمیولوژی و محیط‌زیست، جایگاه مهمی دارند (اسماعیلی‌تاجیک، ۱۳۸۸) و می‌توان از آن‌ها به‌عنوان بیان‌کننده تغییرات فیزیولوژیک، بیوشیمی و بافت‌شناختی حاصل از مواد شیمیایی و آلاینده‌های محیط‌زیست در موجودات نام برد. این تغییرات در سطوح مختلف، مانند سطح سلولی، جمعیتی و حتی اکوسیستمی رخ می‌دهند (امتیازجو، ۱۳۷۹). بیش‌ترین میزان آلودگی در خلیج فارس ناشی از ورود فلزات سنگین نیکل، سرب و کادمیوم در نتیجه فاضلاب‌های صنعتی می‌باشد. برخی آلاینده‌های آلی و غیرآلی، سبب تنش‌های اکسایشی در ارگانیسم‌های آبری می‌شوند. Giarratano و همکاران (۲۰۰۳)، کاربرد بیومارکرهای ویژه مواد سمی مانند متالوتیونین را به‌طور گسترده‌ای برای تشخیص حضور فلزات سنگین معرفی نمودند. صدف محار (*Pinctada radiata*) به‌دلیل عدم تحرک، پراکنش جهانی، رفتار غذایی فیلتر فیدر و توانایی تجمع زیستی آلاینده‌ها گونه‌ای مناسب جهت تعیین سطح سلامت اکوسیستم‌های دریایی در سطح دنیا محسوب می‌گردد. هر موجودی در شرایط مناسب، قادر به زندگی است و آبریان نیز از این قاعده مستثنی نیستند، بنابراین، به‌منظور حفاظت از آبریان باید سنجش آلاینده‌های محیط زیست آن‌ها تحت کنترل قرار گیرند. آبریان به‌دلیل جایگاه خاص در رژیم غذایی انسان، از اهمیت بالایی برخوردارند و به‌همین جهت، حفظ و کنترل کمی و کیفی آن‌ها برای انسان نقش حیاتی دارد. در عصر



SCUBA تا عمق حدود ۱۵ متری منطقه با استفاده از یک فروند قایق موتوری صورت گرفت. به منظور یافتن زیستگاه‌های صدف محار (*Pinctada radiata*) جهت بررسی اولیه، از مختصات جغرافیایی موجود، مربوط به زیستگاه‌های سال‌های گذشته استفاده گردید و از دستگاه موقعیت‌یاب ماهواره‌ای GPS دستی استفاده گردید. برای آنالیز فلزات سنگین و آنزیم‌ها از هر ایستگاه ۱۰ نمونه صدف محار با ۳ تکرار برای دو فصل گرم و سرد و دو اندازه بزرگ و کوچک نمونه‌برداری گردید که در مجموع ۳۶۰ نمونه جمع‌آوری شد.

جدول ۱: موقعیت جغرافیایی ایستگاه‌های مورد مطالعه

| ردیف | نام ایستگاه | طول و عرض جغرافیایی |
|------|-------------|---------------------|
| ۱ | لاوان | ۲۶°۴۷' E ۴۰°۵۳' N |
| ۲ | هندورابی | ۲۶°۴۰' E ۴۵°۵۳' N |
| ۳ | نخیلو | ۲۶°۵۰' E ۴۵°۵۳' N |



شکل ۱: موقعیت ایستگاه‌های هندورابی، لاوان و نخیلو در ناحیه غربی استان هرمزگان

سنجش فلزات سنگین در بافت نرم صدف محار *Pinctada radiata*

نمونه‌های تهیه شده به صورت مجزا در ظروف پلی اتیلن قرار داده شدند و هر کدام به وسیله برچسب و مازیک ضدآب علامت‌گذاری و تا زمان انتقال به آزمایشگاه در دمای کم‌تر از ۲۵- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند تا این‌که تغییری در میزان آلاینده‌های موجود در آن‌ها ایجاد نگردد (Krogh و همکاران، ۱۹۹۶). در زمان انجام آزمایش طول کل و وزن کل کلیه صدف‌ها اندازه‌گیری گردید و براساس اندازه به دو گروه ۴-۱ و ۴-۶ سانتی‌متر تقسیم‌بندی شدند. برای اندازه‌گیری پوسته صدف یا اندازه پشتی-شکمی Dorso-Ventral Measurement (DVM) (شکل ۲) به وسیله کولیس ورنیه با دقت ۰/۱ میلی‌متر اندازه‌گیری گردید و اندازه‌گیری میزان فلزات سنگین در بافت صدف با روش استاندارد Moopam انجام گردید.

همکاران، (۲۰۰۵). Frenzilli و همکاران (۲۰۰۴) در تحقیقی آنزیم گلوکاتایون را به عنوان نشانگر فلزات سنگین در صدف *Mytilus galloprovincialis* بررسی نمودند. میزان آنزیم‌های گلوکاتایون رداکتاز (glutathione reductase)، گلوکاتایون پری اکسیداز (glutathione peroxidases)، کاتالاز سوپراکسید دیسموتاز (catalase superoxide dismutase) و آلکالین فسفاتاز (alkaline phosphatase) را در دو جمعیت بررسی نمودند. جمعیت اول از صدف‌هایی که در ساحل وجود داشتند نمونه‌برداری گردید و جمعیت دوم نمونه‌ها در آزمایشگاه با مقادیر مختلفی از فلز سرب آلوده گردیدند. نتایج نشان داد که در نمونه‌های آلوده فعالیت آنزیم گلوکاتایون کم‌تر و فعالیت آنزیم گلی‌اکسالاز بیش‌تر است که نشان‌دهنده این موضوع است که از دو کفه‌ای می‌توان به عنوان نشانگر فلزات سنگین استفاده نمود. Bull و همکاران (۱۹۹۷) از آنزیم استیل کولین استراز به عنوان نشانگر آلودگی در خلیج Agadir استفاده کردند و نشان دادند که میزان فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در برابر آلودگی با فلزات سنگین کم‌تر می‌شود و صدف دو کفه‌ای به عنوان نشانگر خوبی برای سنجش میزان آلودگی در آزمایشگاه و محیط به شمار می‌رود. luk'yanova (۲۰۱۱) فعالیت گلوکاتایوناس ترانسفراز GST در صدف دو کفه‌ای *Crenomytilus grayanus*، میگوی *Neomysis mirabilis* و سفره‌ماهی *Liopsetta pinnifasciata* در خلیج ژاپن مورد مطالعه قرار داد، نتایج آن‌ها نشان داد میزان فعالیت آنزیم GST در ماهی و نرم‌تن مورد مطالعه در مناطق آلوده افزایش یافته و در میگو آلودگی باعث مهار فعالیت این آنزیم شده است. در تحقیق حاضر به تعیین فصلی میزان آنزیم گلوکاتایون اس ترانسفراز، استیل کولین استراز و کاتالاز ارتباط آن با میزان فلزات سنگین نیکل، سرب و کادمیوم در صدف محار (*Pinctada radiata*) در جزایر هندورابی، لاوان و نخیلو در صدف محار پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

ایستگاه‌های نمونه‌برداری: ایستگاه‌های لاوان، هندورابی و نخیلو برای نمونه‌برداری انتخاب گردیدند (شکل ۱)، نمونه‌برداری در دو فصل سرد و گرم (بهار و پاییز) در سال ۱۳۹۲ انجام گردید. با توجه به تحقیقاتی که صورت گرفته است می‌توان فرض کرد که تغییرات فصول، تغییرات در حجم غذای در دسترس و تغییرات فیزیولوژیکی بدن (طی فرآیند رشد و افزایش اندازه بدن) و هم‌چنین توسعه اندام‌هایی مانند گنادها سبب تغییراتی در سطح غلظت آلاینده‌ها و سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌گردد، لذا نمونه‌برداری براساس تغییرات فصل و چرخه زندگی جاندار باید مورد بررسی قرار گیرد. به همین سبب صدف مرواریدساز محار (*Pinctada radiata*) با بهره‌گیری از عملیات غواصی به روش

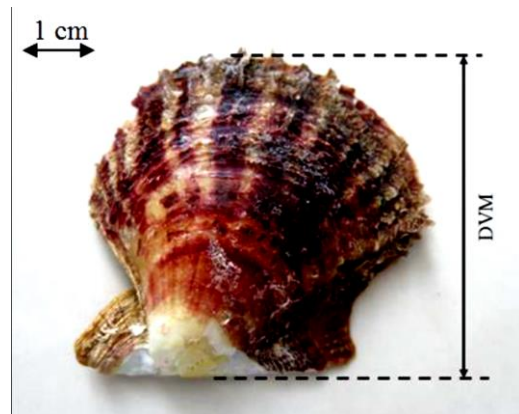
به مدت ۶۰ دقیقه نگهداری شد. درپوش روی پلیت را به آرامی برداشته محلول رویی را خالی کرده و با محلول شستشو ۵ بار شستشو داده شد. برای این که اثری از محلول در آن باقی نماند. سپس ۵۰ میکرولیتر chromogen solution A را به پلیت اضافه کرده و سپس ۵۰ میکرو لیتر از chromogen solution B را به پلیت اضافه شد و به آرامی تکان داده شد و برای تغییر رنگ به مدت ۱۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ قرار داده شد. در آخرین مرحله ۵۰ میکرولیتر Stop Solution به آن اضافه شد تا واکنش پایان پذیرد (تغییر رنگ از آبی به زرد اتفاق می افتد). سپس جذب نوری محلول حاصل در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا (Model: BioTac El-x۸۰۰) قرائت گردید و غلظت نمونه‌ها با توجه به معادله خط محاسبه گردید.

سنجش آنزیم کاتالاز: تعیین میزان غلظت آنزیم کاتالاز در

سوپرناتانت حاصل از هموژنیت بافت نرم صدف محار *Pinctada radiata* بر مبنای روش Abei (۱۹۷۴) مورد ارزیابی قرار گرفت. برای اندازه گیری غلظت آنزیم کاتالاز ابتدا محلول‌های استاندارد در غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ نانوگرم در میلی لیتر تهیه گردیدند. سپس مخلوط واکنش شامل ۵۰ میکرولیتر از محلول استاندارد، ۵۰ میکرولیتر از streptomycin-HRP، ۴۰ میکرولیتر از نمونه، ۱۰ میکرولیتر از streptavidin-HRP، ۵۰ میکرولیتر از CAT antibodies، ۹۶ خانه تهیه گردید. بعد از این مرحله روی پلیت را پوشانده، به آرامی تکان داده و در دمای ۳۷ درجه به مدت ۶۰ دقیقه نگهداری شد. سپس درپوش روی پلیت را به آرامی برداشته محلول رویی را خالی کرده و با محلول شستشو، ۵ بار شستشو داده شد. برای این که اثری از محلول در آن باقی نماند. بعد از آن ۵۰ میکرولیتر chromogen solution A را به پلیت اضافه کرده و سپس ۵۰ میکرو لیتر از chromogen solution B به پلیت افزوده شد و به آرامی تکان داده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ برا تغییر رنگ قرار داده شد. در آخرین مرحله ۵۰ میکرولیتر Stop Solution به آن افزوده شد تا واکنش پایان پذیرد (تغییر رنگ از آبی به زرد اتفاق افتاد) سپس جذب نوری محلول حاصل در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا (Model: Bio Tac El-۸۰۰) قرائت گردید. معادله خط با توجه به غلظت نمونه‌ها محاسبه شد.

اندازه گیری میزان غلظت آنزیم استیل کولین استراز: برای

اندازه گیری یکی از دقیق ترین روش‌های سنجش آنزیم کولین استراز روش Ellman می باشد که در آن از سوبسترای استیل تیوکولین یا پروپیل تیوکولین استفاده می گردد. تیوکولین آزاد شده ناشی از تجزیه سوبسترا با ترکیب ۵ و ۵ - دی تیو بیس (۲ - نیتروبنزوتیک اسید) واکنش می دهد و این آزمایش براساس سرعت هیدرولیز استیل تیوکولین توسط کولین استراز در بافر فسفات با $\text{PH}=6/7$ در طول موج ۴۱۲



شکل ۲: اندازه پشتی - شکمی DVM صدف محار *Pinctada radiata* جهت زیست‌سنجی (Sims و Gervis، ۱۹۹۲)

جهت اندازه گیری میزان فلزات سنگین سرب، کادمیوم و نیکل از دستگاه جذب اتمی با کمک شعله مدل AA:۲۰۰ Spectrophotometr مجهز به سیستم کوره گرافیتی استفاده گردید. محلول‌های استاندارد سرب در غلظت‌های ۲/۵، ۵، ۱۰، ۱۵ و محلول استاندارد کادمیوم و نیکل نیز در غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ تهیه گردید سپس محلول‌های استاندارد آماده شد و برای رسم منحنی کالیبراسیون دستگاه جذب اتمی به آزمایشگاه تحویل داده شدند.

آماده سازی بافت نرم صدف محار (*Pinctada radiata*) برای

اندازه گیری میزان آنزیم: میزان غلظت آنزیم گلوکوتایون اس ترانسفراز نمونه‌ها صید شده برای آنالیز در دمای ۸۰- سانتی‌گراد نگهداری گردید (۳۶۰ نمونه در یک سال) و در زمان آنالیز پس از ذوب شدن نمونه‌ها، بافت نرم صدف توسط تیغه شیشه‌ای تمیز به قطعات ریز برش داده شد و پس از اضافه کردن محلول بافر (pH/۵)، buffer phosphate saline، نمونه‌ها در سانتریفیوژ یخچال دار با دور ۵۰۰۰ rpm و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا زمانی که کاملاً به صورت محلول درآید، سپس ماده شناور رویی محلول جهت آنالیز در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

سنجش آنزیم گلوکوتایون اس ترانسفراز: برای آنالیز میزان غلظت

آنزیم گلوکوتایون اس ترانسفراز در نمونه‌های بافت صدف دوکفه‌ای از روش توصیه شده توسط Habig و همکاران (۱۹۷۴) و همچنین Rudneva و همکاران (۲۰۱۰) استفاده گردید. محلول‌های استاندارد در غلظت‌های ۰، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ نانوگرم در میلی لیتر تهیه گردیدند. سپس مخلوط واکنش شامل ۵۰ میکرولیتر از محلول استاندارد، ۵۰ میکرولیتر از streptomycin-HRP، ۴۰ میکرولیتر از نمونه، ۱۰ میکرولیتر از GSTs antibodies و ۱۰ میکرولیتر از Metmyoglobin، ۵۰ میکرولیتر از streptavidin-HRP در پلیت‌های ۹۶ خانه تهیه گردید. بعد از این مرحله روی پلیت را پوشانده و به آرامی تکان داده و در دمای ۳۷ درجه



دیده شد (۳/۰۷ ppm) و کمترین میزان آن نیز در همان فصل و همان اندازه در ایستگاه نخیلو بود (۱/۲۱ ppm). افزایش غلظت سرب تحت تاثیر ایستگاه بود و اختلاف معنی داری بین ایستگاهها مشاهده شد. همچنین بیشترین میزان غلظت فلز کادمیوم در ایستگاه نخیلو در فصل سرد در اندازه بزرگ صدف محار مشاهده شد (۳/۴۲ ppm) و کمترین میزان آن نیز مربوط به ایستگاه نخیلو در فصل گرم در اندازه کوچک صدف محار بود (۰/۰۶ ppm). بیشترین میزان غلظت فلز نیکل مربوط به ایستگاه نخیلو در فصل سرد در اندازه بزرگ صدف محار مشاهده (۰/۸ ppm) و کمترین میزان آن نیز مربوط به ایستگاه لاوان در فصل گرم در اندازه کوچک صدف محار به دست آمد (۰/۴۱ ppm). به نظر می رسد غلظت فلز نیکل تحت تاثیر ایستگاه نباشد اما فصل و اندازه به طور معنی داری غلظت آن را تحت تاثیر قرار داده است. بدین صورت که غلظت آن به طور معنی داری در فصل سرد نسبت به فصل گرم افزایش یافته است. در صدفهایی که دارای اندازه بزرگتری بودند فلز نیکل به میزان بیشتری در آنها تجمع یافته بود اما تغییرات آنها معنی دار نبود. تغییرات فصلی سرب در اندازه کوچک نشان داد که غلظت میزان سرب در فصل سرد در ایستگاههای هندورابی، لاوان به طور معنی داری کمتر از فصل گرم است و در ایستگاه نخیلو غلظت سرب در فصل سرد به طور معنی داری بیشتر از فصل گرم است. تغییرات فصلی نیکل نیز نشان داد که غلظت میزان نیکل در فصل سرد در ایستگاههای هندورابی، لاوان و نخیلو به طور معنی داری از فصل گرم بیشتر است.

تغییرات فصلی آنزیم گلوکوتایون اس ترانسفراز (GST)، کاتالاز (CAT) و استیل کولین استراز (AChE): جهت اندازه گیری غلظت آنزیمهای گلوکوتایون اس ترانسفراز، کاتالاز و استیل کولین استراز از دستگاه الیزا استفاده گردید که نتایج حاصل از این اندازه گیری در جدول ۲ آورده شده است. نتایج نشان داد که بیشترین میزان آنزیم (GST) در فصل گرم در ایستگاه هندورابی و در اندازه کوچک (۸/۹ نانوگرم بر میلی لیتر) و کمترین میزان آن نیز در فصل سرد در ایستگاه لاوان در اندازه کوچک بود (۲/۵ نانوگرم بر میلی لیتر). بیشترین میزان آنزیم کاتالاز نیز در فصل گرم در ایستگاه هندورابی و در اندازه کوچک (۹/۱۳ نانوگرم بر میلی لیتر) و کمترین میزان آن نیز در فصل سرد در ایستگاه لاوان در اندازه کوچک مشاهده گردید (۲/۷۳ نانوگرم بر میلی لیتر). همچنین بیشترین میزان آنزیم (AChE) در فصل گرم در ایستگاه هندورابی و در اندازه کوچک (۹۱/۶ نانوگرم بر میلی لیتر) و کمترین میزان آن نیز در فصل سرد در ایستگاه لاوان در اندازه کوچک مشاهده شد (۳۱ نانوگرم بر میلی لیتر). از جدول ۳ می توان این گونه استنباط کرد که غلظت آنزیم (AChE) در هیچ کدام از ایستگاهها و اندازهها و فصول اختلاف معنی داری با یکدیگر ندارند. دو آنزیم (CAT)

نانومتر می باشد. تغییرات جذب به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر UV در نمونه های مختلف قابل سنجش می باشد. برای اندازه گیری این آنزیم استیل کولین استراز از بافت نرم صدف محار (*Pinctada radiata*) استفاده گردید که آن را هموژن کرده و هم چنین محلول های استاندارد در غلظت های ۰، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲ و ۶۴ نانو گرم در میلی لیتر تهیه گردیدند. سپس مخلوط واکنش شامل ۵۰ میکرو لیتر از محلول استاندارد، ۵۰ میکرو لیتر از streptomycin-HRP، ۴۰ میکرو لیتر از نمونه، ۱۰ میکرو لیتر از AChE antibodies، ۵۰ میکرو لیتر از streptavidin-HRP در پلیت های ۹۶ خانه تهیه گردیدند. بعد از این مرحله روی پلیت را پوشانده، به آرامی تکان داده شد و در دمای ۳۷ درجه به مدت ۶۰ دقیقه قرار گرفت. در پوش روی پلیت را به آرامی برداشته و محلول رویی را خالی کرده و با محلول شستشو، ۵ بار شستشو داده شد تا اثری از محلول در آن باقی نماند، سپس ۵۰ میکرو لیتر chromogen solution A را به پلیت اضافه کرده و سپس ۵۰ میکرو لیتر دیگر از chromogen solution B را به پلیت افزوده و به آرامی تکان داده شد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ برای تغییر رنگ قرار گرفت و در آخرین مرحله ۵۰ میکرو لیتر Stop Solution به آن اضافه شد تا واکنش پایان پذیرد (تغییر رنگ از آبی به زرد اتفاق می افتد) و در نهایت جذب نوری محلول حاصل در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا (Model: BioTac EI-x8۰۰) خوانده شد، و با توجه به معادله خط غلظت نمونه ها محاسبه گردید.

آنالیز آماری نمونه ها: تجزیه و تحلیل آماری داده با استفاده از نرم افزار SPSS (Version ۱۸) انجام پذیرفت. برای تجزیه و تحلیل داده های حاصل از انجام آزمایش ابتدا پراکنش نرمال داده ها توسط آزمون کولموگراف-اسمیرنوف بررسی شد. پس از حصول از نرمال بودن داده ها از آزمون آنالیز واریانس چند متغیره (Manova) جهت تعیین وجود یا عدم وجود اختلاف معنی داری در بین داده ها استفاده شد. سپس جهت تعیین دقیق وجود یا عدم وجود تفاوت معنی داری از آزمون Tukey استفاده شد. اختلاف بین میانگین داده ها در سطح معنی داری ۰/۰۵ مورد ارزیابی قرار گرفت. برای تعیین این ارتباط بین مقادیر تجمع زیستی فلزات سنگین در بافت نرم و رسوب و همچنین غلظت آنزیم های مورد بررسی از همبستگی پیرسون استفاده گردید.

نتایج

غلظت فلزات سنگین در بافت نرم صدف محار (*Pinctada radiata*)

پس از انجام آنالیز شیمیایی نمونه ها به دستگاه جذب اتمی داده شد که نتایج آن ها نشان داد بیشترین میزان سرب در فصل گرم در ایستگاه هندورابی و در اندازه کوچک صدف محار (*Pinctada radiata*)



گرم در اندازه یک دیده شد (به ترتیب ۸/۶۳ و ۸/۳۱ نانوگرم بر میلی لیتر) و کم‌ترین میزان آن‌ها نیز به صورت مشترک در لاوان در اندازه کوچک فصل سرد مشاهده شد (به ترتیب ۲/۷۸ و ۲/۹۴ نانوگرم بر میلی لیتر).

و (GST) تغییرات مشابه یکدیگر داشته و پارامترهای ایستگاه و فصل هر دو اختلاف معنی‌داری را بر روی میزان غلظت این آنزیم‌ها داشتند. بیش‌ترین میزان آنزیم (CAT) و (GST) در ایستگاه هندورابی در فصل

جدول ۲: میانگین غلظت \pm GST, AChE, CAT انحراف معیار، در بافت نرم صدف محار (*Pinctada radiata*) در جزایر هندورابی، لاوان و نخیلو، در فصول مختلف بر حسب نانوگرم بر میلی لیتر

| فصل / ایستگاه | آنزیم | | گلو‌تاتیون اس ترانسفراز (Glutathion S transferase) | | کاتالاز (CAT) | | استیل کولین استراز (AChE) | |
|---------------|----------|----------|--|---------|---------------|---------|---------------------------|---------|
| | اندازه ۱ | اندازه ۲ | انحراف معیار | میانگین | انحراف معیار | میانگین | انحراف معیار | میانگین |
| هندورابی | ۷/۷۳ | ۰/۷۵ | ۶/۵ | ۹/۱۳ | ۰/۵۶ | ۶/۵۶ | ۲/۲۷ | ۷۱/۳ |
| | ۵/۶ | ۰/۴۳ | ۵/۱ | ۳/۳۳ | ۰/۷۲ | ۳/۴۳ | ۰/۲۸۸ | ۴۸ |
| بهار | ۸/۲ | ۰/۲۶ | ۶/۳ | ۱/۹۸ | ۰/۲۶ | ۷/۳۳ | ۰/۹۶ | ۷۹/۳ |
| | ۸/۹ | ۰/۸۱ | ۷/۲ | ۲/۰۶ | ۰/۴ | ۷/۱ | ۱/۸۳ | ۹۱/۶ |
| تابستان | ۴/۱ | ۰/۳۶ | ۴/۲ | ۳/۱۶ | ۰/۱۶۵ | ۳/۰۶ | ۰/۲۵ | ۴۹ |
| | ۷/۱ | ۰/۳۵ | ۵/۶ | ۲/۶ | ۰/۲۶ | ۳/۹۶ | ۰/۴ | ۷۶/۶ |
| هندورابی | ۳/۴ | ۰/۳۶ | ۳/۲۳ | ۲/۵۳ | ۰/۳ | ۲/۷۳ | ۱/۵۳ | ۲۷/۳ |
| | ۳/۹ | ۰/۲ | ۳/۶ | ۳/۱۳ | ۰/۴۵ | ۳/۲۳ | ۰/۳۷ | ۳۵/۶ |
| پاییز | ۴/۳ | ۰/۳۲ | ۳/۰۶ | ۲/۷۳ | ۰/۵۸ | ۳/۵۶ | ۰/۳۰۵ | ۳۱ |
| | ۲/۸ | ۰/۲ | ۳/۴۶ | ۱/۲۵ | ۰/۲ | ۳/۳۳ | ۰/۶۸ | ۴۰ |
| زمستان | ۲/۷ | ۰/۲۰ | ۳/۳۶ | ۱/۷۶ | ۰/۲ | ۵/۶ | ۷۷/۲ | ۳۶ |
| | ۲/۵ | ۰/۲۳ | ۲/۸۳ | ۰/۵۱ | ۲/۸۳ | ۴/۵۳ | ۱/۰۹ | ۳۷/۶ |

جدول ۳: میانگین غلظت \pm GST, AChE, CAT انحراف معیار، در اندازه‌های کوچک و بزرگ بافت نرم صدف محار

(*Pinctada radiata*) در جزایر هندورابی، لاوان و نخیلو در فصل گرم و سرد بر حسب نانوگرم بر میلی لیتر و تحلیل آماری تست Manova

| فصل / ایستگاه | آنزیم | استیل کولین استراز (AChE) | کاتالاز (CAT) | گلو‌تاتیون اس ترانسفراز (GST) |
|------------------------|----------|---------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| فصل گرم | هندورابی | ۸۱/۴۵ \pm ۴/۶ | ۸/۶۳ \pm ۰/۴۸ ^d | ۸/۳۱ \pm ۰/۷۸ ^d |
| | نخیلو | ۴۸/۵ \pm ۴/۸ | ۳/۲۴ \pm ۰/۶۸ ^{ab} | ۴/۸۵ \pm ۰/۳۹ ^{abc} |
| | لاوان | ۷۷/۵ \pm ۶/۱۸ | ۶/۲ \pm ۱/۱۲ ^d | ۷/۶۵ \pm ۰/۳۰ ^d |
| فصل سرد | هندورابی | ۷۵/۴۵ \pm ۱۰/۴۷ | ۶/۸۳ \pm ۱/۳ ^{cd} | ۶/۸۵ \pm ۲/۳۷ ^{cd} |
| | نخیلو | ۷۱/۲۵ \pm ۹/۱۲ | ۳/۲۴ \pm ۰/۲۶ ^{ab} | ۴/۶۵ \pm ۰/۲ ^{abc} |
| | لاوان | ۶۴/۱۵ \pm ۸/۲۵ | ۵/۶۴ \pm ۰/۶۸ ^{bcd} | ۵/۹۵ \pm ۱/۳۱ ^{bcd} |
| فصل سرد | هندورابی | ۳۳/۶۵ \pm ۳/۰۸ | ۲/۸۱ \pm ۰/۲۵ ^a | ۲/۱ \pm ۰/۲۸ ^a |
| | نخیلو | ۳۵/۸ \pm ۵/۸۵ | ۳/۵۶ \pm ۰/۲۹ ^a | ۳/۳ \pm ۰/۲ ^{ab} |
| | لاوان | ۳۴/۸ \pm ۳/۳۹ | ۲/۷۸ \pm ۰/۳۸ ^a | ۲/۹۴ \pm ۰/۲۷ ^a |
| فصل سرد | هندورابی | ۳۷/۵ \pm ۱۴/۷۹ | ۳/۰۳ \pm ۱/۱ ^{ab} | ۳/۳۴ \pm ۰/۷۴ ^{ab} |
| | نخیلو | ۴/۸۶ \pm ۵/۳۷ | ۴/۴۱ \pm ۱/۵۷ ^{abc} | ۳/۴۸ \pm ۱/۰۱ ^{ab} |
| | لاوان | ۴۳/۱۵ \pm ۱۲/۹۶ | ۴/۰۴ \pm ۰/۶۹ ^{ab} | ۲/۹۵ \pm ۰/۴۸ ^a |
| ایستگاه | ns | ** | ** | ** |
| فصل | ns | *** | *** | *** |
| اندازه | ns | ns | ns | Ns |
| فصل * اندازه | ns | * | * | * |
| ایستگاه * اندازه | ns | ns | ns | Ns |
| ایستگاه * فصل | ns | *** | *** | *** |
| فصل * ایستگاه * اندازه | ns | ns | ns | Ns |

ns: اختلاف معناداری را نشان نمی‌دهد. اختلاف‌های معنی‌دار را نشان می‌دهند: *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001. حروف



جدول ۴: ضرایب همبستگی فلزات سنگین Ni, Pb, Cd و

آنزیم‌های GST, AChE, CAT در صدف محار (*Pinctada radiata*)

| آنزیم GST | آنزیم AChE | آنزیم CAT | نیکل | سرب | کادمیوم |
|-----------|------------|-----------|---------|--------|---------|
| | | | | ۱ | ۱ |
| | | | ۱ | ۰/۳۱** | ns |
| | | ۱ | ns | ns | ۰/۲۴* |
| | ۱ | ns | Ns | ns | ns |
| ۱ | ns | ۰/۸۲** | -۰/۴۵** | ns | ns |

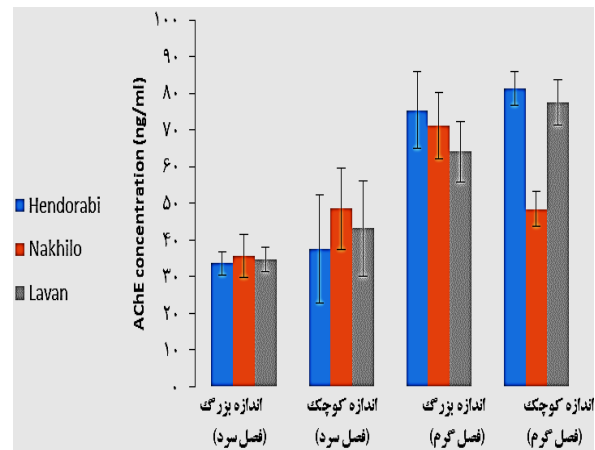
ns: اختلاف معنی‌داری دیده نشد. همبستگی معنی‌دار است * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

براساس نتایج به‌دست آمده از جدول ۴ همبستگی معنی‌دار قوی و مثبتی بین میزان غلظت آنزیم (GST) در بافت نرم صدف محار و غلظت آنزیم (CAT) در بافت نرم صدف محار دیده شد ($R = 0.82$) و همچنین بین میزان غلظت (GST) فلز نیکل در بافت نرم صدف محار همبستگی متوسط و معکوسی مشاهده گردید ($R = -0.45$). آنزیم (CAT) و فلز سرب نیز در بافت نرم صدف محار همبستگی ضعیف و مثبتی داشت ($R = 0.31$)، همبستگی ضعیف مثبتی بین میزان نیکل در بافت نرم صدف محار و فلز سرب مشاهده شد ($R = 0.24$).

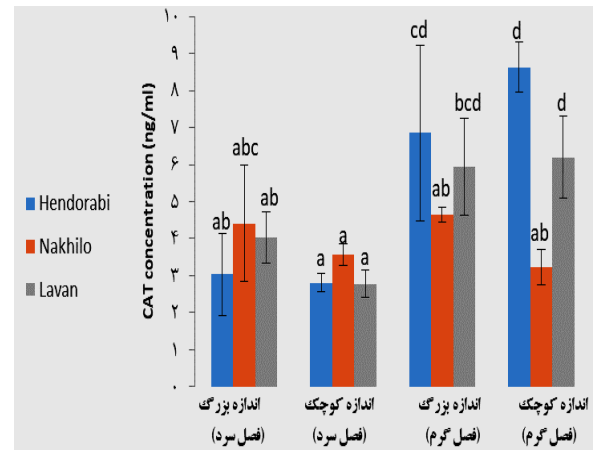
بحث

صدف‌های دوکفه‌ای از نظر تعداد گونه‌ها، دومین رده نرم‌تنان می‌باشند که دارای انتشار جغرافیایی زیادی در دریاها و دریاچه‌های آب شور و شیرین می‌باشند. این موجودات از بهترین شاخص‌های سنجش پایش زیست‌محیطی در دریا به‌شمار رفته و فقدان برخی از آن‌ها دلالت بر وجود آلودگی یا سایر شرایط غیرطبیعی زیست‌محیطی می‌کند. این آبیان به‌دلیل ذخیره مواد سمی وارد شده به محیط زیست در بدن خود، کمک شایانی به پایش محققین جهت بررسی اثرات مواد آلاینده نفتی و شیمیایی می‌کنند. علاوه بر این، تنوع و پراکنش گونه‌های بومی و تغییرات کمی و کیفی و احیاناً وجود و یا عدم وجود گونه‌های غیربومی می‌توانند در تفسیر شرایط آلودگی به‌طور موثری کمک نمایند (حسین‌زاده‌صحافی، ۱۳۷۹).

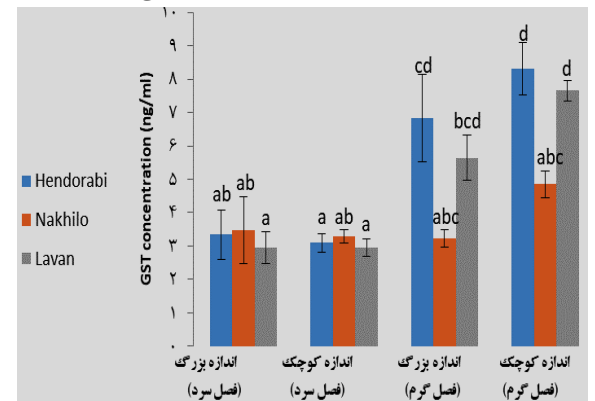
بررسی تغییرات فصلی میزان تجمع عناصر در رسوبات در ایستگاه‌های مورد مطالعه: رسوبات بستر عمده‌ترین بخش پذیرنده و در واقع ذخیرگاه آلاینده‌های مختلف مخصوصاً عناصر سنگین در اکوسیستم‌های آبی می‌باشند (دبیری، ۱۳۷۹). عدم مشاهده اختلاف معنی‌دار بین تجمع عناصر مورد بررسی در ایستگاه‌های مورد بررسی می‌تواند به‌دلایل زیر باشد:



شکل ۳: مقایسه تغییرات فصلی غلظت آنزیم استیل کولین استراز AChE در بافت نرم صدف محار (*P. radiata*) اندازه بزرگ و کوچک، در ایستگاه‌های هندورابی، لاوان و نخیل در فصل گرم و سرد بر حسب نانوگرم بر میلی‌لیتر



شکل ۴: مقایسه تغییرات فصلی غلظت آنزیم‌های CAT در بافت نرم صدف محار (*P. radiata*) اندازه بزرگ و کوچک، در ایستگاه‌های هندورابی، لاوان و نخیل در فصل گرم و سرد بر حسب نانوگرم بر میلی‌لیتر



شکل ۵: مقایسه تغییرات فصلی غلظت آنزیم‌های GST در بافت نرم صدف محار (*P. radiata*) اندازه بزرگ و کوچک، در ایستگاه‌های هندورابی، لاوان و نخیل در فصل گرم و سرد بر حسب نانوگرم بر میلی‌لیتر



به واسطه تغییر در شرایط فیزیولوژیکی، عوامل محیطی و یا حتی وضعیت جنسی این جانوران تغییر می‌کند (Luoma, 1989). منابع نقطه‌ای برای تولیدکننده کانون آلاینده‌ها وجود داشت. البته نتایج تحقیقات مختلف حاکی از آن است که به‌ویژه در دو کفه‌ای‌ها مکانیسم‌های متنوعی در این رابطه دخیل می‌باشند که بسته به نوع گونه و نوع فلز ممکن است منجر به کاهش یا افزایش و یا عدم تغییر میزان تجمع فلزات با افزایش ابعاد بدن گردد.

با توجه به تحقیق Hédouin و همکاران (2006) که ارتباط معنی‌داری بین اندازه بدن و تجمع فلزات مشاهده کرد. معمولاً در دو کفه‌ای‌ها و صدف‌ها با اندازه‌های مختلف با توجه به نیازهای متابولیکی بدن و نسبت سطح به حجم میزان متفاوتی از فلزات انباشته می‌گردد. با بزرگ شدن ابعاد بدن در دو کفه‌ای‌ها دو نوع سازگاری که شامل کاهش نسبت سطح به حجم و در اندازه‌های بزرگ‌تر کاهش فعالیت‌های متابولیک رخ می‌دهد که هر دو عامل منجر به کاهش میزان جذب فلزات با افزایش ابعاد بدن آریان می‌گردد. البته نتایج تحقیقات مختلف حاکی از آن است که به‌ویژه در دو کفه‌ای‌ها مکانیسم‌های متنوعی در این رابطه دخیل می‌باشند که بسته به نوع گونه و نوع فلز ممکن است منجر به کاهش یا افزایش و یا عدم تغییر میزان تجمع فلزات با افزایش ابعاد بدن گردد (Hédouin و همکاران، 2006). البته طبق تحقیق Hédouin و همکاران (2006) از آنجایی که ارتباط معنی‌داری بین اندازه بدن و تجمع فلزات معمولاً در دو کفه‌ای‌ها وجود دارد بیان شده است که صدف‌هایی با اندازه‌های مختلف با توجه به نیازهای متابولیکی بدن و نسبت سطح به حجم میزان متفاوتی از فلزات را انباشته می‌کنند. مقایسه نتایج حاصل از این تحقیق با استانداردهای مرتبط و همچنین سایر تحقیقات مشابه در سطح منطقه‌ای و بین‌المللی حاکی از آن است که در تمامی موارد به‌طور قابل ملاحظه‌ای کم‌تر از تمام استانداردها و مقادیر راهنمای مرتبط می‌باشد و همچنین در مقایسه با سایر تحقیقات در جهان نیز نتایج کنونی کم‌تر از نتایج سایر تحقیقات بوده است که کم‌تر بودن این نتایج نیز با توجه به این‌که نیکل یکی از شاخص‌های آلودگی نفتی می‌باشد لذا احتمال انتشار آلاینده‌های نفتی در منطقه مطالعاتی نسبتاً اندک است.

بررسی تغییرات فصلی میزان غلظت آنزیم‌های CAT

AChE, GST در بافت نرم صدف در ایستگاه‌ها مورد مطالعه: در مطالعه حاضر از آنزیم‌های (CAT)، (AChE) و (GST) به‌عنوان نشانگر آلاینده‌های فلزات سنگین (سرب، کادمیوم و نیکل) در گونه صدف محار در ایستگاه‌های لاوان، هندورابی و نخیلو استفاده گردید. استفاده از چند نشانگر برای نظارت بر کیفیت محیط زیست و سلامت موجودات زنده ساکن اکوسیستم آلوده در طول سال‌های اخیر نسبت به استفاده

با توجه به این‌که در این تحقیق از رسوبات ریز (کم‌تر از 63 میکرون) نسبت به کل رسوبات استفاده شده است و این نسبت در هر سه ایستگاه تقریباً برابر است (12/3 درصد در لاوان، 12/9 درصد در هندورابی و 12/4 درصد در نخیلو) و از سوی دیگر با توجه به نزدیک بودن نسبی موقعیت سه ایستگاه نمونه‌برداری، مشترک بودن منابع انتشار عناصر مورد نظر در محدوده ایستگاه‌ها، عدم مشاهده اختلاف معنی‌دار بین تجمع عناصر مورد بررسی در این ایستگاه‌ها قابل توجیه هست. بیش‌تر بودن میزان تجمع عناصر در ایستگاه لاوان را می‌توان به دلیل وجود کانون‌های آلاینده بیش‌تر در این ایستگاه ارتباط داد. این امر می‌تواند به دلیل تردد نفتکش‌ها، قایق‌ها و شناورها باشد که حجم قابل توجهی از پساب حاوی مواد روغنی و نفت را وارد آب می‌کنند که می‌تواند دلیل مناسبی برای افزایش فلزات سنگین در این ایستگاه باشد (صفاهیه، 1390؛ حیدری‌چهارلنگ، 1390) و همین‌طور فاضلاب‌های خانگی و پساب‌های صنعتی نیز در افزایش میزان این آلاینده‌ها نقش دارند.

بررسی تغییرات فصلی میزان تجمع عناصر در بافت نرم

صدف محار در ایستگاه‌های مورد مطالعه: اصولاً روابط متقابل بین فلزات در بدن جانوران ممکن است ناشی از خواص فیزیوشیمیایی مشابه آن‌ها و همچنین به دلیل مسیرهای بیوشیمیایی یکسان و در ساده‌ترین حالت وجود لیگاند‌های خاص بین آن‌ها باشد (Paez-Osuna و همکاران، 1995). Wright (1995) روابط مشاهده شده بین برخی جفت‌های فلزات در بدن جانوران ناشی از نوعی رقابت یا اثر مضاعف روی بایندها و انتقال دهندگان فلزات در سطح سلول دانست.

با توجه به نزدیک بودن موقعیت نسبی ایستگاه‌های نمونه‌برداری، تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین منابع آلاینده و همچنین شرایط محیطی سه ایستگاه مشاهده نگردید اما برای مواردی که دارای اختلاف معنی‌دار بودند می‌توان بیان کرد برخی از عوامل مانند تفاوت در قابلیت زیستی برخی عناصر در ایستگاه‌های نمونه‌برداری، تفاوت احتمالی در مکانیسم جذب عنصر مورد نظر و وجود منابع تولیدکننده کانون آلاینده‌ها در میزان تغییرات فاکتورهای مورد نظر موثر باشد.

تفاوت در قابلیت زیستی برخی عناصر در ایستگاه‌های نمونه‌برداری (احتمالاً ناشی از تغییرات مقطعی در برخی پارامترهای فیزیوشیمیایی آب یا رسوبات می‌باشد) اصولاً در اکوسیستم‌های آبی میزان پراکنش فلزات در میان فازهای مختلف (شامل ستون آب، رسوبات و آب میان ذرات رسوبی) بر میزان دسترسی زیستی فلزات موثر است. در هر یک از فازهای مزبور، میزان دسترسی زیستی به واسطه فاکتورهای مختلف فیزیکی، شیمیایی و زیستی مشخص می‌گردد (Luoma, 1989). مکانیسم‌های مختلفی برای جذب عناصر در اویسترها وجود دارد که



بین فلزات سنگین و آنزیم استیل کولین استراز ممکن است به این دلیل باشد که فلزات سنگین ابزار مناسبی جهت تحریک کردن این نشانگر نیستند و یا عوامل دیگری به غیر از فلزات سنگین در افزایش یا مهار آن‌ها نقش ایفا می‌کند. در مطالعه‌ای که Sifi (۲۰۱۳) انجام داد اختلاف معنی‌دار بین کادمیوم و غلظت استیل کولین استراز را گزارش کرد. در مطالعه دیگری که Borg (۱۹۸۴) انجام داد بیش‌ترین میزان بازدارندگی استیل کولین استراز را در آلوده‌ترین ایستگاه از نظر میزان غلظت فلزات سنگین گزارش کرد. میزان استیل کولین استراز می‌تواند در اثر فاکتورهای محیطی مانند دمای آب و غلظت فلزات سنگین نیز تغییر کند (Khesiba و همکاران، ۲۰۰۱).

تغییرات دو آنزیم CAT و GST تقریباً مشابه یکدیگر بوده و پارامترهای ایستگاه و فصل هر دو اختلاف معنی‌داری را بر روی میزان غلظت این آنزیم‌ها داشتند. تغییرات فصلی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در بین گونه‌های مختلف دوکفه‌ای با یکدیگر می‌تواند متفاوت باشد و البته این تغییر در بین اعضای متعلق به یک گونه در دو محیط نیز با یکدیگر متفاوت است (Nahrgang و همکاران، ۲۰۱۰). تغییرات فصلی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان به سن، چرخه تولیدمثل، در دسترس بودن میزان غذا و دمای آب مرتبط است (Hagger و همکاران، ۲۰۱۰).

بیش‌ترین میزان آنزیم CAT و GST در ایستگاه هندورابی در فصل گرم در اندازه یک مشاهده شد و کم‌ترین میزان آن‌ها نیز به صورت مشترک در لاوان در اندازه کوچک فصل سرد به دست آمد. با افزایش دما در فصل گرم میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان افزایش یافته، با افزایش دما و فراوانی غذا در محیط ممکن است میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان افزایش یابد (Nahrgang و همکاران، ۲۰۱۰). افزایش سطح GST، CAT، در صدف محار در تابستان ممکن است پاسخی برای مقابله با اثرات مختلف تکاملی، فصلی و زیست محیطی در طول چرخه عمر صدف باشد. قبلاً توسط Borkovic و همکاران (۲۰۰۵) گزارش گردیده بود. حضور بیش‌تر غلظت آنزیم‌ها ممکن است نشان‌دهنده این باشد که میزان بیش‌تری از آنزیم برای از بین بردن ROSها فعالیت می‌کند تا گونه در وضعیت سالم‌تری قرار گیرد (Cossu و همکاران، ۲۰۰۰). کمبود میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان برای دفاع سلولی ممکن است توانایی موجود را برای خنثی‌سازی ROS ضعیف نماید و این برای موجود بسیار مضر است (Frenzilli و همکاران، ۲۰۰۴).

عدم مشاهده اختلاف معنی‌دار بین فصول به علت تغییرات کم دما و میزان شوری در منطقه در بین فصول می‌باشد (Riser و همکاران، ۲۰۱۰). در مقایسه با مطالعاتی که این تغییر را محسوس‌تر مشاهده کرده‌اند مانند دریای مدیترانه (Nahrgang و همکاران، ۲۰۱۰). در کل نشانگرها به شدت تحت تاثیر دما و شوری هستند (Cailleaud و همکاران، ۲۰۰۷).

از تنها یک نشانگر که ممکن است وضعیت سلامت یک گونه را به خوبی نشان ندهد، افزایش چشمگیری داشته است.

در تحقیقی که Lima و Moreira (۲۰۰۷) بر روی صدف *Mytilus galloprovincialis* انجام دادند، مشخص گردید که تغییرات فصول، تغییرات در حجم غذای در دسترس و تغییرات فیزیولوژیک بدن موجود (طی فرایند رشد و افزایش سایز بدن) و همچنین توسعه اندام‌هایی چون گنادها سبب تغییراتی در سطح غلظت آلاینده‌ها و سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌شود بر این اساس باید بررسی تغییرات فصل و چرخه زندگی جاندار مورد توجه قرار گیرد، برخی جانداران در بعضی سنین، حساس‌ترند (Reid، ۲۰۰۳). عدم تعادل در تولید و حذف ROS می‌تواند منجر به ایجاد استرس اکسیداتیو گردد و تجمع فلزات سنگین معمولاً باعث افزایش میزان (ROS) می‌گردد، در نتیجه باعث عدم تعادل در این چرخه می‌گردد (Torres، ۲۰۰۲). سیستم‌های آنزیم آنتی‌اکسیدان به عنوان عوامل محافظ در برابر اثرات مخرب اکسی رادیکال‌ها و سایر ROSها، به سلول‌های از طریق از بین بردن آن‌ها و پایین آوردن سطح ROS کمک می‌کند (Geret، ۲۰۰۲). بنابراین اندازه‌گیری آنزیم‌های مختلف که در سیستم دفاع سلولی به عنوان نشانگرهای استرس اکسیداتیو در گیر هستند، می‌تواند اثرات آلودگی را نشان دهد (Livingstone و همکاران، ۱۹۹۳). این انتظار می‌رفت که آلاینده‌های فلزی به عنوان منبع استرس اکسیداتیو می‌تواند باعث تغییرات در فعالیت آنزیم در صدف محار (*Pinctada radiata*) در ایستگاه‌های مختلف گردند (Santovito و همکاران، ۲۰۰۵).

غلظت آنزیم AChE در ایستگاه‌های مختلف و در بین اندازه‌های بزرگ و کوچک و در بین دو فصل اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. عموماً آنزیم AChE به عنوان نشانگرهای سموم ارگانوفسفره و کاربامات‌ها استفاده می‌گردد (Regoli و همکاران، ۲۰۰۴). آنزیم AChE آنزیم کلیدی در سیستم عصبی مرکزی می‌باشد که وظیفه آن هیدرولیز نوروترنسمیترهای استیل کولین در محل سیناپس به کولین و استات است (Borg و همکاران، ۱۹۸۴). اگر فعالیت این آنزیم متوقف گردد باعث تجمع استیل کولین در محل سیناپس و در نتیجه مرگ موجود می‌گردد (Elumalai و همکاران، ۱۹۹۹). کاهش فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در مطالعه فصلی Matozzo (۲۰۰۵) نشان داد، به علت استرس ناشی از به حرکت در آمدن رسوبات و صدف در هنگام صید آن نقش مهمی ایفا می‌کنند.

همچنین مهار فعالیت آنزیم استیل کولین استراز به عنوان پاسخ به فلزات سنگین هم‌سو با برخی از مطالعات (از جمله Monserrat و همکاران، ۲۰۰۲). است علاوه بر این به خاطر مشارکت آنزیم استیل کولین استراز در انتقال‌های عصبی نسبت به پارامترهای زنده و غیرزنده بسیار حساس است (Banni و همکاران، ۲۰۱۰). نبودن ارتباط معنی‌دار



گزارش شده است. متابولیسم دوکفه‌ای‌ها با تغییر فصل در پاسخ به پارامترهای غیرزنده مانند شوری، دما، میزان اکسیژن و ویژگی‌های بیوتیک مانند در دسترس بودن مواد غذایی و چرخه تولیدمثل تغییر می‌کند (Livingstone و همکاران، ۱۹۸۱).

دوکفه‌ای‌ها به دلیل برخی فاکتورهایی مانند پراکنش جغرافیایی وسیع، فراوانی، ریزه خوار بودن، توانایی تحمل بالا نسبت به تغییرات محیطی، جمعیت ثابت، اندازه مناسب، سازگار بودن با شرایط جدید، توانایی مطالعه در محیط و آزمایشگاه گونه مناسبی برای این گونه مطالعات است. به طور کل میزان فلزات سنگین که در بافت نرم صدف دوکفه‌ای و رسوبات منطقه مورد مطالعه اندازه‌گیری گردید نسبت به استانداردهای مرتبط به طور قابل ملاحظه‌ای کم‌تر بود. با توجه به آلوده نبودن موجود و محیط مورد بررسی لذا تغییرات دیده شده در میزان غلظت آنزیم‌ها در ایستگاه و فصول مختلف را نمی‌توان به میزان آلاینده ارتباط داد و تحقیق صورت گرفته همبستگی معنی‌دار ضعیفی بین میزان فلزات سنگین در بافت و آنزیم‌ها پیدا کرد.

مطالعه حاضر همبستگی معنی‌دار ضعیفی بین میزان فلزات سنگین در بافت و آنزیم‌ها نشان داد. با این حال به این دلیل که میزان آنزیم‌ها در حد طبیعی بودن می‌توان با اطمینان بیان کرد این گونه نشانگر مناسبی برای نشان دادن میزان تجمع فلزات سنگین مانند سرب و کادمیوم و نیکل باشد.

منابع

۱. اسماعیلی‌تاجیک، ف.، ۱۳۸۸. بررسی سطوح آنزیم‌های ضد اکسیداسیون در بارناکل به عنوان شاخص زیستی آلودگی فلزات سنگین (Ni, V, Cd) در خلیج فارس- جزیره خارک. پایان‌نامه کارشناسی ارشد مدیریت محیط زیست. دانشکده محیط زیست و انرژی. دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات.
۲. امتیازجو، م.، ۱۳۷۹. بررسی تنوع زیستی و پتانسیل تولید مواد زیستی فعال از سیانوباکتری‌های خلیج فارس. پایان‌نامه دکتری بیولوژی دریا. دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات تهران.
۳. حسین‌زاده‌صحافی، ه.؛ دوقی، ب. و رامشی، ح.، ۱۳۷۹. اطلس نرم‌تنان خلیج فارس. موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۲۴۸ صفحه.
۴. حیدری‌چهارلنگ، ب.؛ ریاحی‌بختباری، ع. و یآوری، و.، ۱۳۹۰. بررسی غلظت فلزات سنگین (Cu, Pb, Zn, Cd) در رسوبات سطحی سواحل بندرلنگه. پنجمین همایش تخصصی مهندسی محیط زیست
۵. دبیری، م.، ۱۳۷۹. آلودگی محیط زیست آب، خاک، هوا، صوت. انتشارات اتحاد. ۴۰۰ صفحه.
۶. ذوالقدری‌قره‌بلاغ، ص.، ۱۳۸۲. اثرات فلزات سنگین بر روی آبزیان. پایان‌نامه کارشناسی، دانشکده علوم و فنون دریایی.

در زمان رسیدگی جنسی و فصل تخم‌ریزی گنادها فعالیت آنزیم CAT افزایش می‌یابد (Nahrgang و همکاران، ۲۰۱۰) که تحقیق حاضر نیز بیانگر همین موضوع بود و میزان CAT به طور معنی‌داری در فصل گرم از فصل سرد بیش‌تر بود. Viarengo (۱۹۹۱) نیز نتایج مشابهی ارائه داد که کاهش میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در زمستان و افزایش آن در تابستان را به فعالیت‌های متابولیکی بدن نسبت داد که بیش‌تر به علت دوره رسیدگی جنسی تکامل گنادها و تخم‌ریزی آن‌ها می‌باشد. Filho (۲۰۰۱) تغییرات فصلی در میزان آنزیم GST را در گونه *Perna perna* گزارش کرد. در حالی که Regoli و همکاران (۲۰۰۶) در گونه *(Mytilus galloprovincialis)* هیچ‌گونه تغییرات فصلی را گزارش نکردند. فلزات سنگین در بدن موجودات زنده تجمع می‌یابند و با افزایش تشکیل ROS می‌تواند باعث آسیب به پروتئین، DNA و لیپید (Regoli و همکاران، ۲۰۰۴) مهار آنزیم، اختلال علامت‌دهنده‌های سلولی، اختلال در هموستازی کلسیم گردند (Stohs و همکاران، ۱۹۹۵). فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند CAT و GST می‌توانند به میزان غلظت و مدت زمانی که موجودات در معرض آلاینده‌ها هستند و حساسیت گونه مورد مطالعه تغییر نماید (Ballesteros و همکاران، ۲۰۰۹). در تغییرات فصلی آنزیم GST نیز بین دو فصل اختلاف معنی‌داری گزارش گردید که در فصل گرم میزان آن بیش‌تر بود این افزایش می‌تواند به دلیل چرخه تولیدمثلی و افزایش رشد گونه، دما، میزان اکسیژن محلول آب میزان آلاینده‌ها و pH آب باشد (Sifi و همکاران، ۲۰۱۳). القای فعالیت آنزیم GST به عنوان یک نشانگر آلودگی شناخته شده است (Hayes و همکاران، ۲۰۱۰). در برخی از مطالعات صورت گرفته در این زمینه با افزایش میزان آلاینده‌های فلزات سنگین در بافت موجودات باعث افزایش میزان ROS می‌گردند که این خود باعث تحریک افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌گردد (Bagnyukova و همکاران، ۲۰۰۶). در مطالعه‌ای که Giarratano و همکاران (۲۰۱۳) انجام دادند رابطه‌ای مثبت و معنی‌دار بین میزان آهن و ROS در صدف دوکفه‌ای را گزارش دادند.

صدف‌های دوکفه‌ای از لحاظ علمی به عنوان شاخص‌های زیستی مناسب برای پایش زیستی آلودگی آب مورد استفاده قرار گرفتند. بررسی‌ها، نقش فلزات را در آسیب اکسایشی و نیز غلبه بر عملکردهای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مثل CAT به وضوح مشخص کرد (Vlahogianni و همکاران، ۲۰۰۷). مطالعات Jing و همکاران (۲۰۰۷) نشان داد که تجمع فلزات سنگین سرب و مس در پوسته صدف مرورایدساز محار می‌تواند فعالیت آنزیم‌های GPX و SOD را به روش مشابهی تغییر دهند. افزایش سطح آنزیم‌های GST و CAT در صدف محار در تابستان پاسخی است برای مقابله با اثرات مختلف تکاملی، فصلی و زیست محیطی در طول چرخه عمر صدف که قبلاً توسط Borkovic (۲۰۰۵)



۲۱. Elumalai, M. and Balasubramanian, M.P., 1999. Influence of naphthalene on esterase activity during vitellogenesis of marine edible crab, *Scylla serrata*. Bull Environ Contam Toxicol. Vol. 62, No. 6, pp:743-748.
۲۲. Frenzilli, G.; Lasagna, C.; Perrone, E. and Roggie, P., 2004. enotoxicity biomarkers in *Mytilus galloprovincialis*: wild versus caged mussels. Mutat. Res. Vol. 552, pp: 153-162.
۲۳. Jing, R.; Bolshakov, V.I. and Flavell, A.J., 2007. The tagged microarray marker (TAM) method for high throughput detection of single nucleotide and indel polymorphisms. Nat. Protoc. Vol. 2, pp: 168-177.
۲۴. Geret, F.; Serafim, A.; Barreira, L. and Bebianno, M.J., 2002. Effect of cadmium on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the clam *Ruditapes decussatus*. Biomarkers. Vol. 7, pp: 242-256.
۲۵. Giarratano, E.; Gil, M.N. and Malanga, G., 2013. Assessment of antioxidant responses and trace metal accumulation by digestive gland of ribbed mussel *Aulacomya atra atra* from Northern Patagonia. Ecotoxicol Environ Saf. Vol. 92, pp: 39-50.
۲۶. Giguère, A.; Couillard, Y.; Campbell, P.G.C.; Perceval, O.; Hare, L.; Pinel-Alloul, B. and Pellerin, J., 2003. Steady-state distribution of metals among metallothionein and other cytosolic ligands and links to cytotoxicity in bivalves living along a polymetallic gradient. Aquat Toxicol Vol. 64, pp: 185-200.
۲۷. Habig, W.H.; Pabst, M.J. and Jakoby, W.B., 1974. Glutathione-S-transferases, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. J. Biol. Chem. Vol. 249, pp: 7130-7139.
۲۸. Hagger, J.A.; Lowe, D.; Dissanayake, A.; Jones, M.B. and Galloway, T.S., 2010. The influence of seasonality on biomarker responses in *Mytilus edulis*. Ecotoxicology. Vol. 19, pp: 953-962.
۲۹. Hayes, J.D. and Pulford, D.J., 1995. The Glutathione-S transferase family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprevention and drug resistance. Crit. Review Biochem. Molecul. Biol. Vol. 30, pp: 445-600.
۳۰. Hédouin, L.; Metian, M.; Teyssié, J.L.; Fowler, S.W.; Fichez, R. and Warnau, M., 2006. Allometric relationships in the bioconcentration of heavy metals by the edible tropical clam *Gafrarium tumidum*. Science of the Total Environment, Vol. 366, pp: 154-163.
۳۱. Khessiba, A.; Hoarau, P.; Gnassia-Barelli, M.; Aissa, P. and Roméo, M., 2001. Biochemical response of the mussel *Mytilus galloprovincialis* from Lake Bizerte (Tunisia) with exposure to chemical pollutants Arch. Environ. Contam. Toxicol. Vol. 40, pp: 222-229.
۳۲. Krogh, M. and Scanes, P., 1996. Organochlorine compound and trace metal contaminants in fish near Sydney, s Ocean out full. Marin Pollution Bulletin. Vol. 33, No. 7-12, pp: 213-235.
۳۳. Lamanso, R.; Cheung, Y. and Chan, K.M., 1991. Metal concentration in the tissues of rabbit fish collected from Tolo Harbour in Hong kong. Marine Pollution Bulletin. Vol. 39, pp: 123-134.
۳۴. Lima, I. and Moreira, S.M., 2007. Biochemical responses of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* to petrochemical environmental contamination along the North western cost of Portugal. Chemosphere. Vol. 66, pp: 1230- 1242.
۳۵. Livingstone, D.R., 1993. Contaminant stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. Mar Pollut Bull. Vol. 42, pp: 656-666.
۷. صفاهیه، ع؛ عبدالله پورمنیخ، ف. و سواری، ا.، ۱۳۹۰. غلظت فلزات سنگین در رسوب و ماهی شبه شوریده (*Johnius belangerii*) صید شده از خور موسی در استان خوزستان. مجله شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آزادشهر. شماره ۵، صفحات ۲۲ تا ۳۴.
۸. مرتضوی، ش؛ اسماعیلی ساری، ع. و ریاحی بختیاری، ع.، ۱۳۸۴. تعیین نسبت نیکل و وانادیوم ناشی از آلودگی های نفتی در صدف خوراکی و مرواریدساز در حاشیه سواحل، استان هرمزگان. مجله منابع طبیعی. جلد ۵۸، شماره ۱، صفحات ۱۷ تا ۲۸.
۹. Aebi, H., 1974. Catalase. In: Bergmeyer HV, editor. Method sin enzymatic analysis. Vol. 12, New York: Academicpress.
۱۰. Ahmad, S.; Pritsos, C.A.; Bowen, S.M.; Heisler, C.R.; Blomquist, G.J. and Pardini, R.S., 1988. Subcellular distribution and activities of superoxide dismutase, Catalase, glutathione peroxidase and glutathione reductase in the southern armyworm, *spodoptera eridania*. Arch Insect Bio Chem Physiol. Vol. 7, pp: 173-186.
۱۱. Ahmad, A.K. and Shuhaimi-Othman, M., 2010. Heavy metal concentration in sediments and fishes from Lake Chini, Pahang, Malaysia. Journal of Biological Sciences. Vol. 10, No. 2, pp: 93-100.
۱۲. Al-Mafda, H.; Abdel-Moati, M.A.R. and Al-Gimaly, F.H., 1998. *Pinctada radiata* (Pearl Oyster): A Bioindicator for Metal Pollution Monitoring in the Qatari Waters (Arabian Gulf). Bull. Environm. Contam Toxicol. Vol. 60, pp: 245-251.
۱۳. Bagnyukova, T.V.; Chahrak, O.I. and Lushchak, V.I., 2006. Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress. Aquat. Toxicol. Vol. 78, No. 4, pp: 325-331.
۱۴. Banni, M.; Negri, A.; Dagnino, A.; Jebali, J.; Ameer, S. and Boussetta, H., 2010. Acute effect sofbenzo[a] pyreneon digestive gland enzymatic biomarkers and DNA damageonmussel *Mytilus galloprovincialis*. Ecotoxicology and Environmental Safety. Vol. 73, pp: 842-848.
۱۵. Borković, S.S.; Šaponjić, J.S.; Pavlović, S.Z.; Blagojević, D.P. and Milošević, S.M., 2005. The activity of antioxidant defence enzymes in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Adriatic Sea. Comp Biochem Physiol. Vol. 141, pp: 366-374.
۱۶. Borg, D.C. and Schaich, K.M., 1984. Cytotoxicity from coupled redox cycling of autoxidizing xenobiotics and metals. Israel J. Chem. Vol. 24, pp: 38-53.
۱۷. Cailleaud, K.; Maillet, G.; Budzinski, H.; Souissi, S. and Forget-Leray, J., 2007. Effects of salinity and temperature on the expression of enzymatic biomarkers in *Eurytemora affinis* (Calanoida, Copepoda). Comp. Biochem. Physiol. Vol. 147, pp: 841-849.
۱۸. Clark, R.B., 2001. Marine Pollution. 5th Edition, Oxford University Press. 237 p.
۱۹. Cossu, C.; Doyotte, A.; Babut, M.; Exinger, A. and Vasseur, P., 2000. Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, unio tumidus, in response to different contamination profiles of aquatic sediments. Ecotoxicol. Environ. Saf. Vol. 45, pp: 106-121.
۲۰. Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andres, V.J. and Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, Biochem. Pharmacol. Vol. 7, pp: 88-95

۵۱. **Wright, D.A., 1995.** Trace metal and major ion interactions in aquatic animals. *Marine Pollution Bulletin*. Vol. 31, pp: 8-18.
۳۶. **Livingstone, D.R., 2013.** Acetylcholinesterase, glutathione S-transferase activities and pattern of recovery. *Eur J Exp Biol*. Vol. 3, No. 2, pp: 54-56.
۳۷. **Lukyanova, O.N. and Korchagin, V.P., 2011.** Glutathione S-transferase as a molecular biomarker of the state of marine organisms influenced by anthropogenic pressure *Biology Bulletin*. Vol. 38, No. 4, 386 p.
۳۸. **Nahrgang, J.; Camus, L.; Gonzalez, P.; Jönsson, M. and Hop, H., 2010.** Biomarker responses in polar cod (*Boreogadus saida*) exposed to dietary crude oil, *Aquatic Toxicology*. Vol. 96, No. 1, pp: 77-83.
۳۹. **Páez-Osuna, F. and Ruíz-Fernández, C., 1995.** Trace metals in the mexican shrimp *Penaeus vannamei* from estuarine and marine environments. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. Vol. 87, No. 2, pp: 243-247.
۴۰. **Regoli, F.; Orlando, E.; Mauri, M.; Nigro, M. and Cognetti, G.A., 1995.** Heavy metal accumulation and calcium content in the bivalve *Donacilla cornea*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. 74, pp: 219-224.
۴۱. **Regoli, F.; Winston, G.W.; Gorbi, S.; Frenzi, G.; Nigro, M.; Corsi, I. and Focardi, S., 2004.** Integrating enzymatic responses to organic chemical exposure with total oxyradical absorbing capacity and DNA damage in the European eel *Anguilla anguilla*. *Environ. Toxicol. Chem.* Vol. 22, pp: 56-65.
۴۲. **Reid, D.J. and Maefarlane, G.R., 2003.** Potential biomarkers of crude oil exposure in the gastropod mollusc, *Austrocochlea poecata*: Laboratory and manipulative field studies. *Environmental Pollution*. Vol. 12, pp: 147-155
۴۳. **Rosa, M.M.; Amila, E.M. and Ana, S., 2005.** Antioxidant defences in fish: Biotic and abiotic factors. *Review in fish Biology and fisheries*. Vol. 15, pp: 75-88.
۴۴. **Rudneva, I.I.; Zavyalov, A.V. and Skuratovskaya, E.N., 2010.** The role of molecular systems in protective reactions of fish infected by parasites. *Ryb. gosp-vo Ukraini, Russian*.
۴۵. **Santovito, G.; Piccinni, E.; Cassini, A.; Irato, P. and Albergoni, V., 2005.** Antioxidant responses of the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, to environmental variability of dissolved oxygen. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 140, pp: 321- 329.
۴۶. **Sifi, K.; Amira, A. and Soltani, N., 2013.** Oxidative stress and biochemical composition in *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia) from the gulf of Annaba (Algeria). *Adv Environ Biol*. Vol. 7, No. 4, pp: 595-604.
۴۷. **Stohs, S.J. and Bagchi, D., 1995.** Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med*. Vol. 18, pp: 321-336.
۴۸. **Torres, M.A.; Dangl, J.L. and Jones, J.D., 2002.** Arabidopsis p91phox homologues *AtrbohD* and *AtrbohF* are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc Natl Acad Sci USA*. Vol. 99: pp: 517-522.
۴۹. **Viarengo, A.; Canesi, L.; Pertica, M. and Livingstone, D.R., 1991.** Seasonal variations in the antioxidant defence systems and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 100, pp: 187-190.
۵۰. **Vlahogianni, T.; Dassenakis, M.; Scoullou, M.J. and Valavanidis, A., 2007.** Integrated Use of Biomarkers (Superoxide Dismutase, Catalase and Lipid Peroxidation) in Mussels *Mytilus galloprovincialis* for Assessing Heavy Metals' Pollution in Coastal Areas from the Saronikos Gulf. *Journal of Chemical Ecology*. Vol. 23, pp: 361-371.

