سنجش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی بعنوان بایومارکر آلودگی نفتی در ماهیان گل خورک *Periophthalmus waltoni* در سواحل بوشهر (خلیج فارس)

- **مهرنوش شیرانی**: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج صندوق پستی: ٤١١١
- **علیرضا میرواقفی***: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج صندوق پستی: ٤١١١
- **حمید فرحمند**: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج صندوق پستی: ٤١١١
- **محمد عبداللهی**: گروه سم‌شناسی و داروشناسی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران، صندوق پستی: ١٤١٥٥-٥٥٨٣

تاریخ دریافت: خرداد ١٣٩٠ تاریخ پذیرش: آذر ١٣٩٠

چکیده

خلیج فارس بدلیل دارا بودن ذخایر عظیم نفتی و اثرات سوء ناشی از آن نیز منطقه‌ای آلوده بشمار می رود که می تواند پیامدهای سوء زیست محیطی بسیاری را برای موجودات زنده موجود و نیز حلقه‌های بالاتر زنجیره غذایی مانند انسان به همراه داشته باشد، لذا پایش مداوم موجودات ساکن در این محیط دارای اهمیت می‌باشد و نیازمند روشهای ساده و مقرون بصرفه است. در این تحقیق بایومارکرهای آنزیمی آنتی اکسیدانی کاتالاز (CAT) و گلوتاتیون رداکتاز (GR) در کبد ماهی گل خورک *Periophthalmus waltoni* در سه ایستگاه خور سلطانی، جزیره شیف و بندر عامری در منطقه بوشهر نشان‌دهنده فعالیت بالا و تفاوت معنی‌دار ($P<0.05$) این آنزیم‌ها در منطقه خور سلطانی نسبت به دو ایستگاه دیگر بودند. اگر چه تفاوتی میان دو جنس نر و ماده در هر یک از ایستگاهها دیده نشد. داده‌های حاصل از سنجش هیدروکسی پیرن در صفرای ماهیان سه ایستگاه نشان از مواجهه ماهیان خور سلطانی با بار بالای آلاینده‌های نفتی داشت ($P<0.05$) که این سه بایومارکر تأییدی بر نتایج یکدیگر بودند و می‌توانند در مطالعات بعدی نیز مورد استفاده و سنجش قرار گیرند.

کلمات کلیدی: بایومارکر، کاتالاز، گلوتاتیون رداکتاز، آلودگی نفتی، گل خورک، خلیج فارس

*پست الکترونیکی نویسنده مسئول: avaghefi@ut.ac.ir

مقدمه

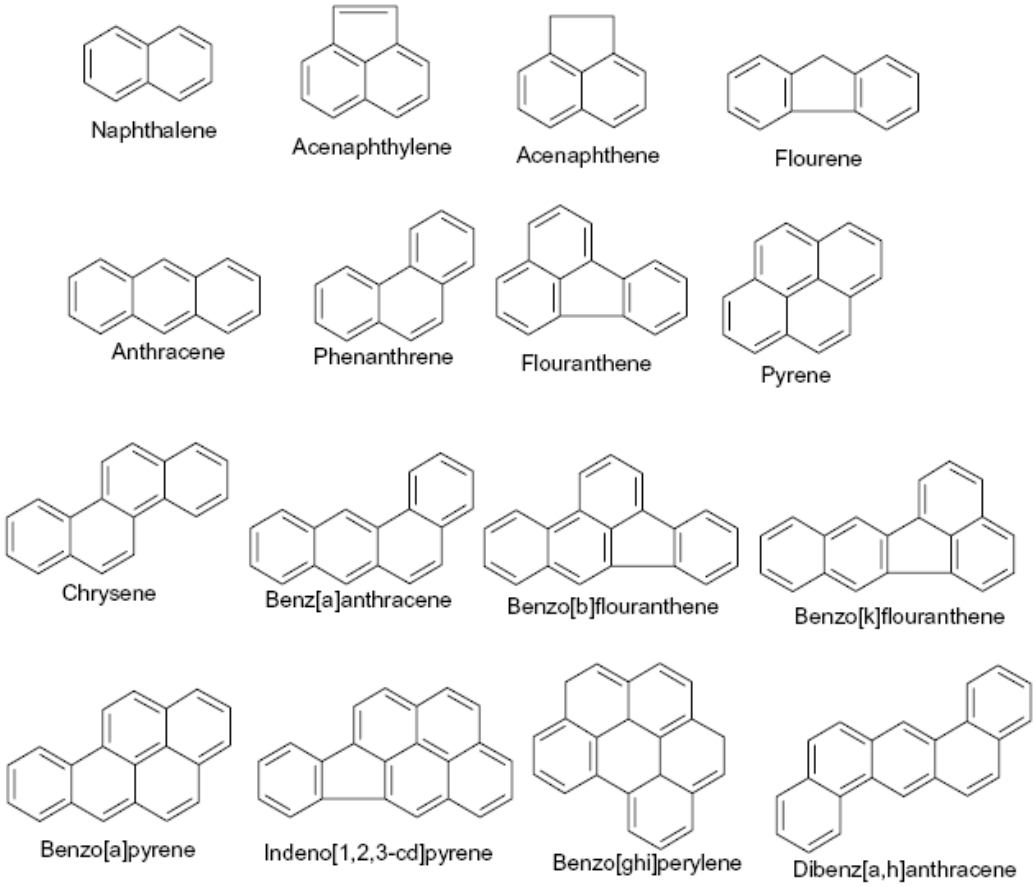
واژه آلودگی در مناطق و محیط‌های طبیعی، بطور معمول اشاره به مخلوطی از آلاینده‌هاست که می‌توانند منجر به اثرات رقابتی یا سینرژتیک شوند؛ سنجش این اثرات توسط آنالیزهای شیمیایی به تنهایی نمایانگر میزان مواجهه موجودات ساکن در محیط، با آلاینده نیست؛ لذا، استفاده از بایومارکرها می‌تواند علاوه بر نشان دادن ماهیت ماده سمی و ارگان هدف، اثرات آن بر موجودات زنده را نیز نشان دهد. در این بین ماهیان برای سنجش اثر آلاینده‌ها در محیط‌های آبی بعنوان گونه‌های بایواندیکاتور نقش مهمی در پایش آلودگی‌ها ایفا می‌کنند چرا که پاسخ‌های بایومارکری در آنها دارای حساسیت بالایی به تغییرات در محیط می‌باشد (۱۰).

خلیج فارس بعنوان یکی از پهنه‌های آبی وسیع و مهم جهان دارای ویژگی‌های قابل ملاحظه‌ای از جمله زمان تعویض آب ۳ تا ۵ ساله است که نشان می‌دهد آلاینده‌ها برای مدت قابل ملاحظه‌ای در آن باقی می‌مانند، همچنین بخش‌های شمالی این حوضه بعلت عمق کم، چرخش محدود، شوری و دمای بالا به میزان بیشتری تحت تاثیر آلاینده‌ها می‌باشند. این منطقه به سبب ویژگی‌های جغرافیایی و منابع عظیم نفت و گاز و با توجه بوقوع حوادث محیطی مختلف در آن طی سال‌های اخیر، از جمله بزرگترین ریزش نفتی دنیا در سال ۱۹۹۱، از لحاظ آلاینده‌های نفتی دچار بحران شده است. بعلاوه مشخص شده که حدود ۳۰ درصد از حمل و نقل نفتی کل جهان در خلیج فارس صورت می‌گیرد (۱۵). همچنین سالانه بیش از ۱۵۰ هزار تن نفت از طریق نشت به اشکال طبیعی، بهره‌برداری از فلات قاره، آب توازن کشتی‌ها و غیره وارد خلیج فارس می‌گردد (۱۴) بطوریکه میزان آلودگی هیدروکربن‌های نفتی کل ۱۴/۳ تا ۱۴۳/۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم گزارش شده است (۱۹) که لزوم مطالعه اثر آن بر شرایط زیستی و موجودات ساکن در آن را افزایش می‌دهد.

پس از تخلیه مواد نفتی به درون دریا بین ۲ تا ۵ درصد مواد آلی آن در آب حل می‌شوند، بخش حل شده بیشتر در دسترس موجودات زنده آبزی است (۷) بخش دیگری از ترکیبات آلی چربی دوست که از منابع نفتی با منشاء پیروژنیک و پتروژنیک وارد محیط آبی می‌شوند، پلی سیکلیک آروماتیک هیدروکربن‌ها (polycyclic aromatic hydrocarbons) PAHs هستند که پس از جذب توسط آبشش، سطح بدن یا تغذیه و مواجهه با رسوبات آلوده به سرعت و در اولین قدم توسط سیستم مونوکسیژناز سایتوکروم P450 اکسیده شده و با افزایش هیدروفیلی حذفشان توسط ادرار یا صفرا تسهیل می‌شود (۸ و ۱۸). اگر چه ماهیان در معرض این آلاینده، مقادیر کمی از PAHs را در بافت‌های خود نشان می‌دهند ولی، فعالیت‌های دفع و تغییر و تبدیل این ترکیبات توسط آنزیم‌های درگیر در فرآیند دفع سمیت از موارد مؤثر در ارزیابی میزان مواجهه موجودات می‌باشد. در این بین آنزیم‌های آنتی اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز (superoxide dismutase (SOD، کاتالاز catalase (CAT)، گلوتاتیون پراکسیداز (glutathione peroxidese (GPx) و گلوتاتیون رداکتاز (GR) glutathione reductase به سبب نقشی که در تبدیل رادیکال‌های آزاد به فرم مولکولهای غیر آسیب زننده دارند مهم بوده و از آنجایی که ترکیبات PAHs از سرطانزاهای بالقوه و از عاملین افزایش رادیکال‌های آزاد بشمار می‌روند، سنجش آنها در بسیاری از مطالعات آزمایشگاهی و میدانی صورت گرفته است (۱۷). در این بین سنجش فعالیت CAT بعنوان آنزیمی که نقش حفاظت سلول را با تبدیل ROS (reactive oxygen species) و H_2O_2 به H_2O انجام داده و اینگونه واکنش‌ها را کاتالیز می‌کند (۲ و ۱۳)، دارای اهمیت است، همچنین گلوتاتیون رداکتاز (GR) نقش مهمی در انجام واکنش‌های آنزیمی گلوتاتیون اس- ترانسفراز (glutathione S-transferase) (GST) و GPx بعنوان ماده کنترلی در میزان پراکسیدها و رادیکال‌های آزاد دارد (۱۳). اگر چه این آنزیم مشابه دیگر آنزیم‌های آنتی اکسیدانی مورد اشاره در این خط دفاعی فعال نبوده اما به سبب اهمیت آن در حفظ پایداری نسبت گلوتاتیون احیا شده به گلوتاتیون اکسید شده reduced and oxidized glutathione ratio (GSH/GSSG) تحت شرایط استرس اکسیداتیو به آن توجه شده است. GR، GSSG را با اکسیداسیون NADPH به $NADP^+$، به گلوتاتیون احیا شده (GSH) تبدیل می‌کند (۱۷). شکل ۱، نشان‌دهنده ساختار ۱۶ نوع از PAHs می‌باشد که از نظر سازمان بهداشت جهانی و آژانس حفاظت محیط‌زیست ایالات متحده دارای ارجحیت و اثرات سمی می‌باشد (۴ و ۱۶). حضور هر ۱۶ نوع این ترکیبات آلوده‌کننده در خلیج فارس تأیید و ثبت شده است (۱۴). مواجهه

با این ترکیبات ۳ تا ۶ حلقه‌ای متابولیت‌هایی را در صفرا تولید می‌نماید که سنجش غلظت آنها توسط روشهایی مانند (HPLC) high pressure liquid chromatography و (GCMS) gas chromatography mass spectrometry بطور مستقیم و توسط آنالیزهای فلورسنت با روش (SFS) synchronous fluorescence spectrometry و (FF) Fix Florance بصورت غیرمستقیم مورد ارزیابی قرار می‌گیرند (۸).

از آنجایی که پاسخ GR به حضور آلاینده‌ها در ماهیان کمتر مورد توجه قرار گرفته و داده‌های متناقضی از تحریک و عدم تحریک CAT در مواجهه با آلاینده‌های نفتی وجود دارد بدین منظور این مطالعه برای پر کردن بخش کوچکی از خلأ اطلاعاتی موجود در این بخش و نیز سنجش اثر آلاینده نفتی منطقه خلیج فارس با استفاده از ترکیب پایه متابولیت 1-OH pyrene در صفرای ماهی گل خورک بعنوان یکی از متابولیت‌های اصلی تولیدی و با روش FF صورت گرفته و بعلاوه به این وسیله توان بالقوه ماهی گل خورک *P. waltoni* بعنوان گونه اندیکاتور در چنین محیط‌هایی را مورد ارزیابی قرار داد.

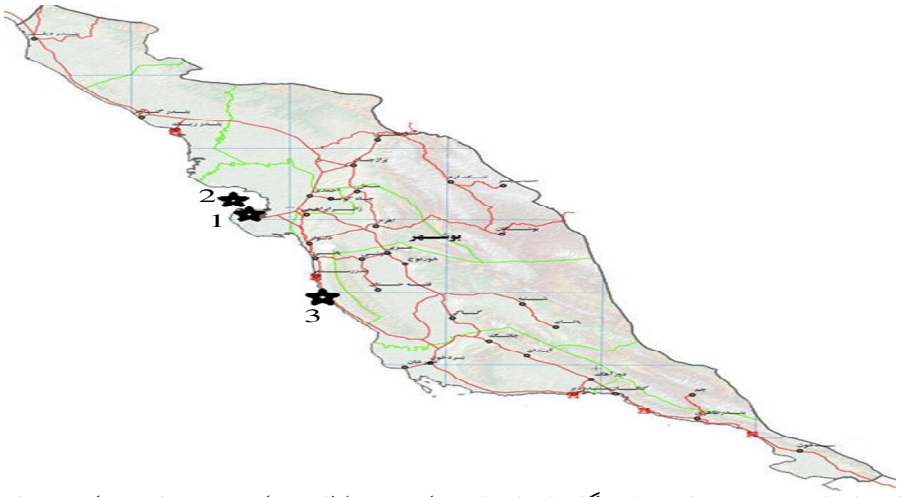


شکل ۱: ساختار شیمیایی ١٦ نوع از PAHs آلوده‌کننده دارای ارجحیت مضرات از نظر سازمان بهداشت جهانی و آژانس حفاظت محیط‌زیست ایالات متحده (٤ و ١٦)

مواد و روشها

منطقه بوشهر به سبب ورود آلاینده‌های صنعتی و آلودگی ناشی از تردد کشتی‌ها، وجود منابع آلاینده نفتی و فاضلاب‌های خانگی و شهری برای این تحقیق انتخاب شد، سه ایستگاه: خور سلطانی در شرق بوشهر ("۵۳٬۴۴ °۵۰ ٬۵۰ "۵۵٬۱۷ °۲۸ ~)، جزیره شیف از توابع بخش مرکزی استان بوشهر ("۶٬۸۳ °۵۰ ٬۵۷ "۱۴٬۲۵ °۲۹ ~) و بندر عامری در جلگه‌ای در ۴۰ کیلومتری بندر بوشهر ("۱٬۱۰ °۵۱ ٬۴ "۲٬۲۱ °۲۸ ~)، (شکل ۲) تعیین و با سنجش میزان ماده آلی و کربن آلی موجود در رسوبات این مناطق، بترتیب بعنوان مناطقی با بار آلاینده آلی بالا، متوسط و کم تحت نمونه‌برداری قرار گرفتند. انتخاب ماهی گل خورک *P. waltoni* براساس پراکنش و فراوانی مناسب آن در سواحل شمالی و جنوبی خلیج فارس بوده و از آنجایی که این ماهیان یوری‌هالین و دارای زندگی آبی- خاکی می‌باشند و همین نوع زندگی باعث شده که بصورت منحصر بفردی به زیستگاههای جزر و مدی سازگاری یابند (۳) و نیز مورد صید بسیاری از شکارچیان قرار گرفته و به سبب اینکه حلقه مهمی از زنجیره غذایی اکوسیستم را تشکیل می‌دهد، بنابراین برای مطالعه انباشت آلودگی مناسب است (۵).

در این تحقیق، که در فصل بهار (نیمه دوم فروردین و نیمه اول اردیبهشت ماه)، بخش‌های مورد اشاره از سواحل خلیج فارس و به منظور مقایسه میزان مواجهه ماهیان با آلاینده‌های نفتی در مناطق نزدیک به محلهای اکتشاف و انتقال نفت و محلهای دور دست صورت گرفت و روش نمونه‌برداری بصورت تصادفی و به تعداد ۱۵ نمونه برای گونه گل خورک در هر ایستگاه بود (جدول ۱) بر همین اساس روش صید، زنده‌گیری انتخاب شد و نمونه‌ها تا زمان سنجش فعالیت آنزیمهای انتخابی در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.



شکل ۲: نقشه استان بوشهر و موقعیت ایستگاههای انتخابی ۱) خور سلطانی، ۲) جزیره شیف و ۳) بندر عامری

جدول ۱: طول (سانتیمتر) و وزن (گرم) ماهیان *P. waltoni* هر ایستگاه برحسب Means±SE (n=15)

ایستگاه	طول (سانتیمتر)	وزن (گرم)	CF (گرم در سانتیمترمترمکعب)
خور سلطانی	۱۱/۷۵±۰/۸۵۰	۱۱/۲۸±۰/٤۷۰	۰/٦۸±۰/۰٦۳
جزیره شیف	۱۲/٤۱±۰/۵۱۰	۱۱/۸±۰/۸٦۰	۰/٦۱±۰/۰۵۸
بندر عامری	۹/۰٤۳±۰/۱٤۹	۷/۲۳±۰/۳۰۵	۰/۹۷±۰/۰۲۸

سنجش فعالیت آنزیم‌ها در کبد ماهیان گل خورک بدین صورت انجام شد که براساس روش Abrahamson و همکاران (۲۰۰۸)، بافت‌ها پس از جداسازی با سرم فیزیولوژی سرد شستشو شده و در بافر فسفات (M ۰/۱) با pH ۷/۵ هموژن شدند (۲ میلی‌لیتر بافر به ازای ۰/۵ گرم بافت یا ۲۵ درصد وزن به حجم) سپس نمونه‌ها در سانتریفیوژ یخچال‌دار در ۱۴۰۰۰ در دور و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار گرفتند، پس از خروج لایه رونشین بعنوان منبع آنزیم در دمای ۸۰– درجه سانتیگراد تا زمان انجام آزمایشات نگهداری شد.

برای سنجش آنزیم‌ها طبق روش Martinez-Gomez و همکاران (۲۰۰۶ همراه با بهینه‌سازی روش)، مخلوط واکنش در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه تهیه شد. فعالیت GR با ثبت کاهش جذب در ۳۴۰ نانومتر و براساس اکسیداسیون NADPH سنجیده شد (۰/۰۴ میلی‌مولار بر سانتیمتر ε=[1]). حجم نهایی در کووت شامل: بافر فسفات ۱۰۰ میلی مولار، (pH ۷)، GSSG (۰/۱ میلی مولار) و NADPH (۶۰ میکرومولار) می‌باشد.

سنجش فعالیت CAT با کاهش جذب در ۳۴۰ نانومتر و با مصرف هیدروژن پروکسید (H_2O_2) سنجیده شد که حجم نهایی در کووت شامل: بافر فسفات ۵۰ میلی مولار، pH ۷ و ۵۰ میلی مولار از H_2O_2 می‌باشد (۰/۰۴ میلی‌مولار بر سانتیمتر ε=). فعالیت همگی این آنزیم‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و در سه تکرار مورد سنجش قرار گرفته و براساس میزان پروتئین سنجش شده با روش Bradford نرمال شد (۱۲).

سنجش متابولیت‌های صفراوی براساس روش Nahrgang و همکاران (۲۰۱۰) (همراه با بهینه‌سازی روش) صورت گرفت. بدین صورت که صفرا به میزان ۱:۱۲۰۰۰ در آب مقطر حل شده و ترکیب مورد نظر برای سنجش توسط روش FF آماده شد. متابولیت ترکیب چهار حلقه‌ای پیرن با نام 1-OH Pyrene در دو طول موج ۳۴۱/۳۸۳ نانومتر excitation/emission، (ex/em) با استفاده از دستگاه اسپکتروفلورومتر و در سه تکرار مربوط به هر نمونه ردیابی شده و میزان جذب آب مقطر بعنوان حلال در همین طول موج ثبت و از اعداد حاصل از نمونه‌ها کسر شد.

هر یک از پاسخ‌های آنزیمی در ۱۵ نمونه جمع‌آوری شده از هر ایستگاه مورد سنجش قرار گرفت و داده‌ها براساس (میانگین ± خطای استاندارد) ارائه شده‌اند. تفاوت آماری پاسخ‌های بایومارکری درون ایستگاهها بوسیله آنالیز آماری یک طرفه ANOVA مورد محاسبه قرار گرفته است. تفاوت بین ایستگاهها در سطح معنی‌دار $P<0.05$ با استفاده از آزمون دانکن و نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۶ صورت گرفت. همچنین نرمال بودن و همگن بودن داده‌ها نیز مورد آزمون قرار گرفت.

نتایج

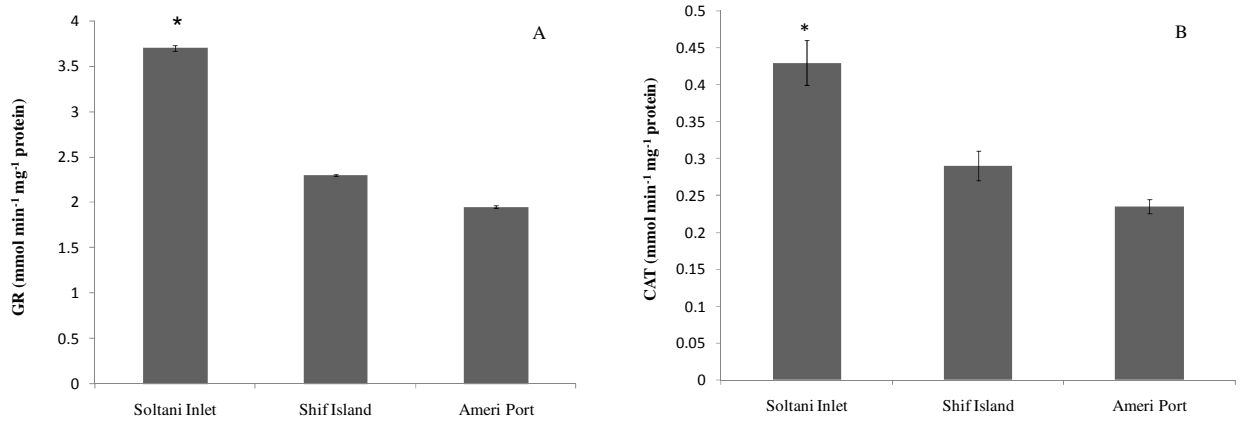
نتایج حاصل از فعالیت آنزیم‌های CAT و GR در کبد نمونه ماهیان سه ایستگاه مورد پایش نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار ($P<0.05$) میزان این دو آنزیم در منطقه خور سلطانی نسبت به بندر عامری و جزیره شیف بود (نمودار ۱) به گونه‌ای که بیش از ۱/۸ برابر فعالیت آنزیم CAT نسبت به منطقه بندر عامری و حدود ۱/۵ برابر نسبت به جزیره شیف بود. این بالا بودن میزان فعالیت در آنزیم GR حدود ۲ برابر نسبت به بندر عامری و بیش از ۱/۵ برابر نسبت به جزیره شیف بود، اگر چه تفاوت معنی‌داری میان دو جنس نر و ماده در هر یک از ایستگاهها برای هیچ یک از آنزیم‌ها وجود نداشت (جدول ۲).

[1] - extinction coefficient

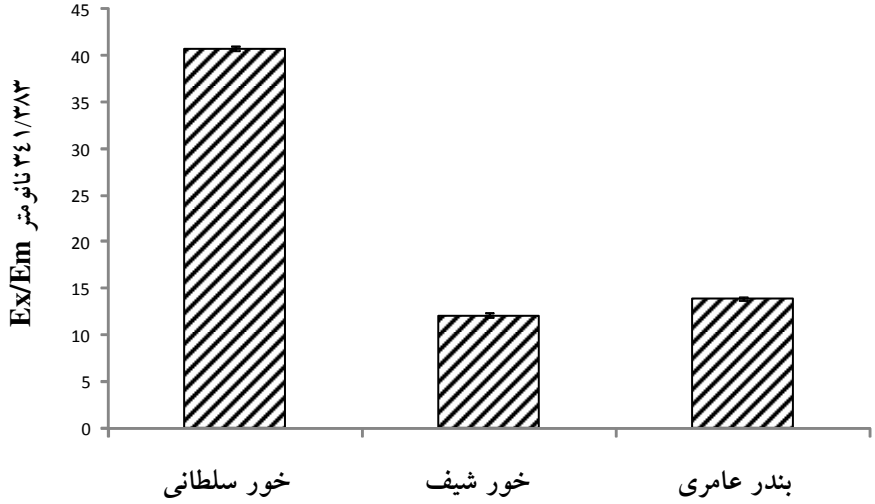
جدول ۲: میزان فعالیت آنزیم‌های GR و CAT در نمونه‌های کبد ماهیان گل خورک (میانگین ± انحراف استاندارد). بایومارکرهای انتخابی در نمونه‌های منطقه خور سلطانی (*) نسبت به دو ایستگاه دیگر در هر دو جنس تفاوت معنی‌دار نشان دادند (P<0.05).

ایستگاه	جنس (تعداد)	GR (میلی‌مول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین)	CAT (میلی‌مول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین)
خور سلطانی	نر(۷)	*۳/۸±۰/۰۲	*۰/۲۵±۰/۰۱
	ماده(۸)	*۳/۲±۰/۰۳	*۰/۲۳±۰/۰۲
جزیره شیف	نر(٦)	۲/۱±۰/۰۱	۰/٤٥±۰/۰۳
	ماده(۹)	۲/٥±۰/۰۲	۰/٤۳±۰/۰۳
بندر عامری	نر(۷)	۱/۹±۰/۰۱	۰/۳۰±۰/۰۲
	ماده(۸)	۲/۲±۰/۰۱	۰/۲۷±۰/۰۱

از آنجایی که متابولیت‌های مرتبط با ترکیب چهار حلقه‌ای Pyrene از نوع 1-OH Pyrene (1-hydroxypyrene) در اکثر مطالعات بعنوان شاخص مد نظر قرار می‌گیرد، در این تحقیق نیز بعنوان بایومارکر تعیین کننده میزان مواجهه موجودات هر ایستگاه با ترکیبات PAHs مورد سنجش قرار گرفت. نتایج حاصل از آنالیز توسط روش FF (براساس فرکانس پاسخ) نشان‌دهنده میانگین ۴۰/۷۵±۰/۲۳ در صفرای ماهیان منطقه خور سلطانی (منطقه دارای بار آلودگی بالا) و ۱۲/۱۲۵±۰/۰۱۷ در ماهیان منطقه بندر عامری (منطقه دارای کمترین بار آلودگی) و اختلاف معنی‌دار (P<0.05) نمونه‌های این ایستگاهها بود (نمودار ۲). بعلاوه نتایج نشان‌دهنده صحت انتخاب ایستگاههای خور سلطانی و بندر عامری بعنوان مناطق با بار آلودگی نفتی بالا و پایین بود در صورتیکه نتایج آنالیز نمونه‌های صفرا مربوط به ایستگاه جزیره شیف نمایانگر بار پایین آلودگی نفتی در مقایسه با منطقه خور سلطانی بود و حضور آلاینده‌های دیگر آلی در این منطقه می‌تواند منجر به افزایش بار ماده آلی در رسوبات منطقه باشد.



نمودار ١: فعالیت GR (A) (میلی‌مول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین) و CAT (B) (میلی‌مول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین) در نمونه‌های سه منطقه خور سلطانی، جزیره شیف و بندر عامری (میانگین ±انحراف استاندارد) (n=15)



نمودار ٢: میزان متابولیت 1-OH Pyrene در صفرای ماهیان گل خورک ٣ ایستگاه انتخابی (n=١٠)

بحث

تحریک فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی CAT و GR در منطقه خور سلطانی نشان‌دهنده حضور هیدروکسیل رادیکال‌هاست که بیشترین میزان سمیت را در تولید ROS دارند؛ بعلاوه که انتظار افزایش این تحریک نیز در کبد وجود دارد و یافته‌های این مطالعه مطابق با نتایج Oliveira و همکاران (٢٠٠٩)، Martinez-Gomez و همکاران (٢٠٠٦) و Akcha و همکاران (٢٠٠٠) می‌باشد بعلاوه Yuan yuan و همکاران (٢٠٠٩) در مطالعه‌ای آزمایشگاهی و وابسته به دوز تحریک فعالیت آنزیم کاتالاز را با افزایش دوز ترکیبات نفتی مشاهده نمود. اگر چه پس از ورود آلاینده با دوزهای بالاتر اختلال در میزان فعالیت این آنزیم وجود داشت اما، مقایسه نتایج حاصل از برخی مطالعات آزمایشگاهی و میدانی که توسط van der Oost و همکاران (٢٠٠٣) گردآوری شده اشاره دارد که اغلب مطالعات آزمایشگاهی تحریک قابل ملاحظه‌ای را نشان نداده‌اند که

Nahrgang و همکاران (۲۰۱۰) نیز در تحقیق خود، براساس نتایج حاصل از داده‌های فعالیت آنزیم و بیان ژن محرک آن این آنزیم را بعنوان بایومارکر ضعیفی در مطالعات پایش آلودگی نفتی معرفی نمودند؛ بطور کل می‌توان نتیجه گرفت که سنجش فعالیت CAT به تنهایی نمی‌تواند بعنوان بایومارکر تأیید شده‌ای برای پایش محیط‌زیست باشد چرا که هم تحریک و هم توقف فعالیت آن در مواجهه با آلاینده‌های محیطی مشاهده شده است. افزایش GR نشان‌دهنده بازیابی گلوتاتیون است و نشان می‌دهد که نسبت GSH/GSSG افزایش یافته و در واقع میزان پایداری این دو ترکیب را در شرایط استرس اکسیداتیو نشان می‌دهد (۱۳). در رابطه با GR مطالعات آزمایشگاهی و میدانی مختلف تحریک فعالیت این آنزیم در کبد را در ماهیان مواجه با آلاینده‌های آلی مانند PAHs، polychlorinated biphenyls (PCBs) و ناگواردهای هالوژن‌دار (xenobiotics) گزارش نموده‌اند (۱۷ و ۹). بعلاوه بالا بودن میزان تحریک این آنزیم‌ها در نمونه‌های جزیره شیف نیز نشان‌دهنده بار آلی بالا در این منطقه است که لزوماً با داده‌های متابولیت صفرا همبستگی بالایی را نشان نمی‌دهد که می‌تواند ناشی از پساب مزارع پرورش میگو با بار ماده آلی بیشتر نیز باشد. عدم وجود تفاوت معنی‌دار میان جنس‌های مختلف مشابه نتایج Martinez-Gomez و همکاران (۲۰۰۶) بود هر چند مطالعات کمی به تفکیک جنس در رابطه با اثر این دو آنزیم پرداخته‌اند.

برخی مواد آلاینده در بافت‌ها انباشته می‌شوند اما برخی دیگر مانند PAHs با وزن مولکولی پایین به سبب خواص شیمیایی خود به سختی قابل پایش و ردیابی در موجود هستند چرا که به سرعت کاتابولیز شده و دفع می‌گردند (۶). به سبب سرعت متابولیسم، کمی سازی مواد شیمیایی و PAHs در بافت ماهیان تنها اطلاعات محدودی را در اختیار قرار می‌دهد. بنابراین بایومارکر پیشنهادی بیشتر محققین متابولیت‌های PAH در صفراست که اصلی‌ترین آنها 1-OH Pyrene می‌باشد و در بیش از ۷۶ درصد متابولیت‌های PAH شرکت دارد. در این تحقیق نیز تفاوت معنی‌دار میزان این متابولیت در ترکیبات صفرای ماهیان منطقه خور سلطانی مؤید نتایج حاصل از سنجش بایومارکرهای آنزیمی آنتی اکسیدانی بود.

بطور کل می‌توان نتیجه گرفت استفاده از مجموعه‌ای از بایومارکرهای مناسب در موجودات مواجه با آلاینده‌ها می‌تواند نشان‌دهنده وضعیت سلامت موجود در منطقه و میزان اثرگذاری آن بر فعالیت‌ها و مکانیسم‌های دفع سمیت داشته باشد. واضح است که افزایش فرآیندهای مرتبط با سم‌زدایی نیازمند صرف انرژی قابل ملاحظه‌ای در موجود هدف بوده و می‌تواند بر سهم انرژی دیگر فرآیندهای حیاتی مانند تولید مثل اثر گذارد. در این میان از آنجایی که آنالیزهای شیمیایی محیط نیز به تنهایی نشان‌دهنده میزان اثرات آلاینده بر موجودات زنده موجود در هر منطقه نیستند، سنجش بایومارکرها در گونه‌های بایواندیکاتور اطلاعات قابل اعتمادتری را ارائه می‌دهد. در این تحقیق نیز نتایج بایومارکرهای انتخابی یکدیگر را تأیید نمودند اگر چه آنزیم CAT مقبولیت عمومی در میان محققین نداشته و نیازمند تحقیقات بیشتر برای استفاده بعنوان بایومارکر مناسب در این گونه مطالعات می‌باشد اما در کنار GR و 1-OH Pyrene می‌تواند مجموعه بایومارکری مناسبی را تشکیل دهد. هر چند استفاده از بایومارکرهای دیگر آنزیمی در سطح بیوشیمیایی یا بطور کل بایومارکرهای سطوح مختلف صحت داده‌ها را در هر مطالعه افزایش می‌دهد. گونه *P. waltoni* نیز با وجود پراکنش و فراوانی مناسب و نیز توان ارائه پاسخ‌های تحت بررسی، گونه مناسبی می‌تواند بشمار آید.

منابع

1-Abrahamson, A.; Brandt, I.; Brunström, B.; Sundt, R.C. and Jørgensen, E.H., 2008. Monitoring contaminants from oil production at sea by measuring gill EROD activity in Atlantic cod (*Gadus morhua*). Enviro. Poll., 153:169-175.

2-Akcha, F.; Izuel, C.; Venier, P.; Budzinski, H.; Burgeot, T. and Narbonne, J.F., 2000. Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in benzo[a] pyrene-contaminated mussels, *Mytilus galloprovincialis*. Aqua. Toxicol., 49:269-287.

3-Al-Behbehani, B.E. and Ebrahim, H.M.A., 2010. Environmental studies on the mudskippers in the intertidal zone of Kuwait Bay. Nat. Sci., Vol. 8., No. 5, pp.79-89.

4-Anyakora, C.; Ogbeche, A.; Palmer, P.; Coker, H.; Ukpo, G. and Ogah, C., 2005. GC/MS analysis of polynuclear aromatic hydrocarbons in sediment samples from the Niger Delta region. Chemosphere, 60:990-997.

5-Bu-Olayan, A.H. and Thomas, B.V., 2008. Trace metals toxicity and bioaccumulation in mudskipper *Periophthalmus waltoni* Koumans 1941 (Gobiidae: Perciformes). Turk. J. Fish. Aquacult. Sci., 8:215-218.

6-Cheevaporn, V. and Beamish, F.W.H., 2007. Cytochrome P450 1A activity in liver and fixed wavelength fluorescence detection of polycyclic aromatic hydrocarbons in the bile of tongue-fish (*Cynoglossus acrolepidotus* Bleeker) in relation to petroleum hydrocarbons in the eastern Gulf of Thailand. J. Environ. Biol., Vol. 28, No. 4, pp.701-705.

7-Gagnon, M.M. and Holdway, D.A., 2000. EROD induction and biliary metabolite excretion following exposure to the water accommodated fraction of crude oil and to chemically dispersed crude oil. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 38:70-77.

8-Lee, R.F. and Anderson, J.W., 2005. Significance of cytochrome P450 system responses and levels of bile fluorescent aromatic compounds in marine wildlife following oil spills. Mar. Pollut. Bull., 50:705-723.

9-Martinez-Gomez, C.; Campillo, J.A.; Benedicto, J.; Fernández, B.; Valdés, J.; García, I. and Sánchez, F., 2006. Monitoring biomarkers in fish (*lepidorhombus boscii* and *Callionymus lyra*) from the northern Iberian shelf after the *Prestige* oil spill. Mar. Poll. Bull., 53:305-314.

10-Mdegela, K.; Myburgh, J.; Correia, D.; Braathen, M.; Ejobi, F.; Botha, C.; Sanvik, M. and Utne Skoare, J., 2006. Evaluation of the gill filament-based EROD assay in African sharptooth catfish (*Clarias* gariepinus) as a monitoring tool for waterborne PAH-type contaminants. Ecotoxicol., 15:51-59.

11-Nahrgang, J.; Camus, L.; Carls, M.G.; Gonzalez, P.; Jönsson, M.; Taban, I.C.; Bechmann, R.K., Christiansen, J.S. and Hop, H., 2010. Biomarker responses in polar cod (*Boreogadus saida*) exposed to the water soluble fraction of crude oil. Aquacult. Toxicol., 97:234-242.

12-NSF (National Science Foundation), 2006. Bradford protein assay protocol. MSUM Biochemistry, pp.1-3.

13-Oliveira, M.; Maria, V.L.; Ahmad, I.; Serafim, A.; Bebianno, M.J.; Pacheco, M. and Santos, M.A., 2009. Contamination assessment of a coastal lagoon (Ria de Aveiro, Portugal) using defense and damage biochemical indicators in gill of *Liza aurata* – An integrated biomarker approach. Environ. Pollut., 157: 959-967.

14-Tatina, M. and Oryan, Sh., 2009. Consideration the effects of crude oil pollution on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) accumulation in *Siganus javus* and *Siganus sutor* of Persian Gulf. 12th Conference of Environmental Health. November, Shahid Beheshti University of Medical Science, School of Public Health, pp.92-105.

15-Tatina, M.; Oryan, Sh. and Gharibkhani, M., 2009. Surveying the amount of heavy metals (Ni, Pb, Cd & V) accumulation derived from oil

pollution on the muscle tissue of *Pelates quadrilineatus* from the Persian Gulf. Mar. Biol. J., pp.28-39.

16-Tuvikene, A., 1995. Responses of fish to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Ann. Zool. Fennici., 32:295-309.

17-van der Oost, R.; Beyer, J. and Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environ. Toxicol. Pharmacol., 13:57-149.

18-Vuorinen, P.J.; Keniänen, M.; Vuontisjä, H.; Baršienė J.; Broeg, K.; Förlin, L.; Gercken, J.; Kopecka, J.; Köhler, A.; Parkkonen, J.; Pempkowiak, J. and Schiedek, D., 2006. Use of biliary PAH metabolites as a biomarker of pollution in fish from the Baltic Sea. Mar. Pollu. Bull., 53:479-487.

19-Yousefi, S.; Vosoughy, Gh. and Rezaee, S., 2006. Genetic diversity of *Saccostrea cucullata* in the northern coast lines of the Persian Gulf and Oman Sea. J. Pajouhesh & Sazandegi, 66:2-7.(in Persian).

20-Yuanyuan, W.; Qixing, Z.; Shengwei, P.; Lena, Q.M. and Xiaowe, N., 2009. Toxic effects of crude-oil-contaminated soil in aquatic environment on *Carassius auratus* and their hepatic antioxidant defense system. J. Environ. Sci., 21:612-617.