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

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

تاریخ دریافت: آبان ١٣٩٦ تاریخ پذیرش: بهمن ١٣٩٦

چکیده

تحقیق حاضر جهت اندازه‌گیری میزان غلظت آنزیم گلوتاتیون اس ترانسفراز کاتالاز و استیل کولین استراز به‌عنوان نشانگرهای آلاینده فلزات سنگین در صدف دوکفه‌ای مروارید ساز محار (*Pinctada radiata*) انجام گرفته است. نمونه‌برداری از بهار تا زمستان سال ١٣٩٢ به‌روش غواصی در ایستگاه‌های لاوان، هندورابی و نخیلو انجام شد که در طی نمونه‌برداری صدف‌های با اندازه کوچک (٤-١سانتی‌متر) و بزرگ (٤-٦ سانتی‌متر) جمع‌آوری گردیدند. برای اندازه‌گیری میزان غلظت فلزات سنگین از روش استاندارد Moopam، برای اندازه‌گیری آنزیم گلوتاتیون اس ترانسفراز از روش Habig، برای اندازه‌گیری آنزیم استیل کولین استراز از روش Ellman و برای اندازه‌گیری غلظت آنزیم کاتالاز از روش Abei استفاده گردید. میزان غظت آنالیز فلزات سنگین نیکل، کادمیوم و سرب در بافت نرم صدف محار (*Pinctada radiata*) در هر سه ایستگاه به‌ترتیب ١٢/٠±٥٨/٠و٠٤/٠±٨٦/١ و٣٠/٠±٩٤/١ 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 گلوتاتیون اس ترانسفراز تقریباً مشابه یکدیگر بوده و ایستگاه و فصل هر دو پارامتر اختلاف معنی‌داری بر میزان غلظت این آنزیم‌ها داشتند. تغییرات فصلی آنزیم‌های آنتی اکسیدان (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 به‌میزان 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 گلوتاتیون اس ترانسفراز، استیل کولین استراز، کاتالاز، فلزات سنگین

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول:ali2m@yahoo.com

مقدمه

امروزه افزایش جمعیت و توسعه‌صنایع 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، پایداری‌و خاصیت تجمع زیستی ازجمله آلودگی‌های جدی و خطرناک محیط زیست می‌باشند، هم‌چنین فلزات سنگین می‌توانند با تجمع زیستی در زنجیره غذایی به سمیت مزمن و شدید دامن زنند (Ahmad و همکاران،۲۰۱۰). صدف محار گونه‌ای از رده دوکفه‌ای‌هاست که همانند اکثر دوکفه‌ای‌ها توانایی جذب فلزات سنگین را در خود دارد و به‌عنوان یک نشانگر زیستی شناخته شده‌است(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 ازجمله پزشکی، بیولوژی سلولی، روانشناسی، ژنتیک، سم‌شناسی، اپیدمولوژی و محیط زیست، جایگاه مهمی‌دارند(اسماعیلی‌تاجیک، ۱۳۸۸)و می‌توان‌از‌آن‌هابه‌عنوان بیان‌کننده تغییرات فیزیولوژیک، بیوشیمی و بافت‌شناختی حاصل از مواد شیمیایی و آلاینده‌های محیط زیست در موجودات نام برد. این تغییرات در سطوح مختلف، مانند سطح سلولی، جمعیتی و حتی اکوسیستمی‌رخ می‌دهند (امتیازجو، ۱۳۷۹). بیش‌ترین میزان آلودگی درخلیج فارس ناشی از ورود فلزات سنگین نیکل، سرب و کادمیوم در نتیجه فاضلاب‌های صنعتی می‌باشد. برخی آلاینده‌های آلی و غیرآلی، سبب‌تنش‌های اکسایشی در ارگانیسم‌های آبزی می‌شوند. Giguère و همکاران (۲۰۰۳)، کاربرد بیومارکرهای ویژه‌مواد‌سمی‌مانند‌متالوتیونین را به‌طور گسترده‌ای برای‌تشخیص‌حضور فلزات‌سنگین معرفی نمودند. صدف محار(*Pinctada radiata*) به‌دلیل عدم تحرک، پراکنش جهانی، رفتارغذایی فیلترفیدر و توانایی‌تجمع‌زیستی آلاینده‌هاگونه‌ای مناسب جهت تعیین سطح سلامت اکوسیستم‌های دریایی در سطح دنیا محسوب می‌گردد. هر موجودی در شرایط مناسب، قادر به زندگی است و آبزیان نیز از این قاعده مستثنی نیستند، بنابراین، به‌منظور حفاظت از آبزیان باید سنجش آلاینده‌های محیط زیست آن‌ها تحت کنترل قرارگیرند. آبزیان 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 حاضر با گسترش مراکز صنعتی و شهری در سواحل دریا، تردد کشتی‌ها، حفاری‌ها و تاسیسات استخراج نفت و گاز از حاشیه و بستردریاها، تولیدات نفتی، سموم‌کشاورزی و بازگشت پساب‌ها به‌دریاها ازطریق رودخانه‌ها عوامل اصلی آلاینده محیط آبزیان به‌شمار می‌آیند. در ترکیب شیمیایی این پساب‌ها، فلزات سنگین، شاخص‌ترین وخطرناک‌ترین اجزا هستند این آلودگی‌ها در دریاهای نیمه بسته‌ای هم‌چون خلیج فارس، به‌دلیل پایین بودن درجه تعویض و مبادله آب بین بخش‌های مختلف دریا، کم‌عمقی، محدودیت مساحت، تبخیر بیش ازحد 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 آبزیان در این دریا انجام داده است (نیک‌بین، ۱۳۸۸). از مهم‌ترین مطالعاتی که همه ساله توسط این سازمان انجام می‌شود، ارزیابی غلظت فلزات سنگین در آب، رسوبات و در برخی از آبزیان است (Ahmad، ۱۹۸۸). عموماً پساب خروجی از صنایع، فاضلاب‌های‌خانگی، 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 تجمع‌زیستی در آبزیان مختلف و درنتیجه تاثیر آن‌ها در زنجیره غذایی آبزیان، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (مرتضوی، ۱۳۸۴). گرچه مقادیر جزئی از این فلزات در بسیاری از واکنش‌ها و فعالیت‌های بدن‌ضروری‌می‌باشندولی بیش‌تر ازحد مجاز آن‌هاسبب‌عوارض جبران ناپذیری 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 درحفظ 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 ازجمله 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

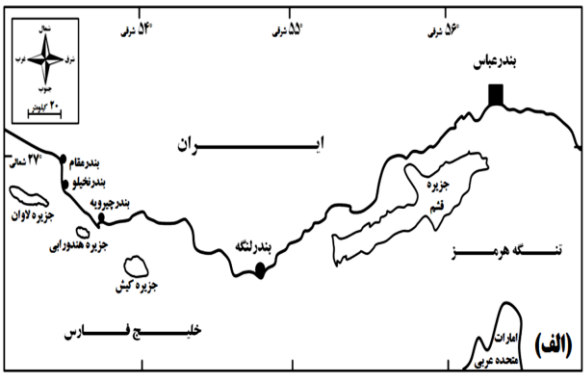
سمی تولید شده ممکن است سبب آسیب به DNA، عدم فعالیت آنزیمی و بروز پراکسیداسیون چربی‌ها گردند. سیستم‌های دفاعی آنتی اکسیدانی تحت تاثیر تماس با موادشیمیایی بوده و بنابراین سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی می‌توانند به‌عنوان نشانگرهای زیستی جهت پایش آلودگی‌های زیست‌محیطی مورد استفاده قرار گیرند(Rosa و همکاران، ۲۰۰۵). Regoli و همکاران (۱۹۹۵) در تحقیقی آنزیم گلوتاتیون را به‌عنوان نشانگر فلزات سنگین در صدف *Mytilus galloprovincialis* بررسی نمودند. میزان آنزیم‌های گلوتاتیون رداکتاز، گلوتاتیون پری اکسیداز، کاتالاز سوپراکسید دیسموتاز و آلکالین فسفتاز (glutathione reductase, glutathione peroxidases, catalase, superoxide dismutase و 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 گلوتاتیون کم‌تر و فعالیت آنزیم گلی اکسالاز بیش‌تر است که نشان‌دهنده این موضوع است که از دوکفه‌ای می‌توان به‌عنوان نشانگر فلزات سنگین استفاده نمود. Bull و همکاران (۱۹۹۷) از آنزیم استیل کولین استراز به‌عنوان نشانگر آلودگی در خلیج Agadir استفاده کردند ونشان دادند که میزان فعالیت آنزیم‌استیل کولین‌استراز در برابر آلودگی با فلزات سنگین کم‌تر می‌شود و صدف دوکفه‌ای به‌عنوان نشانگر خوبی برای سنجش میزان آلودگی در آزمایشگاه و محیط به‌شمار می‌رود. luk'yanova (۲۰۱۱) فعالیت گلوتاتیون اس ترانسفراز GST در صدف دوکفه‌ای *Crenomytilus grayanus*، میگوی *Neomysis mirabilis* و سفره ماهی *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 گلوتاتیون 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 گردید (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 موردبررسی قرار گیرد. به‌همین‌سبب صدف مروارید ساز محار (*Pinctada radiata*) بابهره‌گیری از عملیات غواصی به‌روش SCUBA تا عمق حدود ۱۵ متری منطقه با استفاده از یک فروند قایق موتوری صورت گرفت. به‌منظور یافتن زیستگاه‌های صدف محار (*Pinctada radiata*)جهت‌بررسی‌اولیه، از مختصات جغرافیایی موجود، مربوط به زیستگاه‌های سال‌های گذشته استفاده گردید و از دستگاه موقعیت یاب 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.

جدول۱: موقعیت جغرافیایی ایستگاه‌های مورد مطالعه

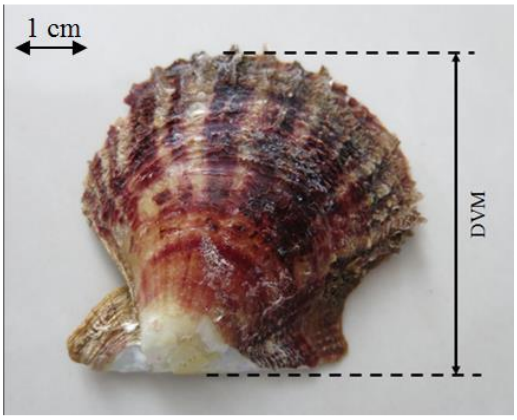
ردیف	نام ایستگاه	طول و عرض جغرافیایی
۱	لاوان	N- ۲۰ °۵۳ E ۴۷°۲۶´
۲	هندورابی	N- ۳۵ °۵۳ E ۴۰°۲۶´
۳	نخیلو	N- ۳۵ °۵۳ E ۵۰°۲۶´



شکل۱: موقعیت ایستگاه‌های هندورابی، لاوان و نخیلو درناحیه غربی استان هرمزگان

سنجش فلزات سنگین در بافت نرم صدف محار (*Pinctada radiata*): نمونه‌های تهیه شده به‌صورت مجزا در ظروف پلی‌اتیلن قرار

داده شدند و هرکدام به‌وسیله برچسب و ماژیک ضد آب 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 ۶-۴ سانتی‌متر تقسیم‌بندی شدند. برای اندازه‌گیری پوسته صدف یا اندازه پشتی-شکمی DVM(Dorso-Ventral Measurement) (شکل۲) به‌وسیله کولیس ورنیه با دقت ۰/۱ میلی‌متر اندازه‌گیری گردید و اندازه‌گیری میزان فلزات سنگین در بافت صدف با روش استاندار Moopam انجام گردید.



شکل۲: اندازه پشتی - شکمی DVM صدف محار (*Pinctada radiata*) جهت زیست‌سنجی (Sims و Gervis، ۱۹۹۲)

جهت اندازه‌گیری میزان فلزات سنگین سرب، کادمیوم و نیکل از دستگاه جذب اتمی با کمک شعله مدل Sprctrophotometr AA:200 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 آماده‌شد و برای رسم منحنی کالیبراسیون دستگاه جذب اتمی به آزمایشگاه تحویل داده شدند.

آماده سازی بافت نرم صدف محار (*Pinctada radiata*) برای اندازه‌گیری میزان آنزیم: میزان غلظت آنزیم گلوتاتیون اس ترانسفراز نمونه‌ها صید شده برای آنالیز در دمای ۸۰- سانتی‌گراد نگه‌داری گردید (۳۶۰ نمونه در یک‌سال) و در زمان آنالیز پس از ذوب شدن نمونه‌ها، بافت نرم صدف توسط تیغه شیشه‌ای تمیز به قطعات ریز برش داده‌شد و پس از اضافه کردن محلول بافر (pH ۶/۵، buffer phosphate saline)، نمونه‌ها در سانتریفیوژ یخچال‌دار با دور ۵۰۰۰ rpm و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا زمانی که کاملاً به‌صورت محلول درآید، سپس ماده شناور رویی محلول جهت آنالیز در دمای ۸۰-درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

سنجش آنزیم گلوتاتیون اس ترانسفراز: برای آنالیز میزان غلظت آنزیم گلوتاتیون 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 ۸۰-۴۰-۲۰-۱۰-۰ نانوگرم در میلی‌لیتر 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 آن را به‌آرامی تکان داده و در دمای ۳۷ درجه به‌مدت ۶۰ دقیقه نگه‌داری می‌کنیم. درپوش روی پلیت را به‌آرامی برداشته محلول رویی را خالی کرده و با محلول شستشو آن را ۵ بار شستشو دادیم. برای این‌که 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 به‌آرامی تکان داده شد و برای تغییر رنگ به‌مدت ۱۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ قرار داده‌شد. در آخرین مرحله ۵۰ میکرولیتر Stop Solution به آن اضافه شد تا واکنش پایان پذیرد (تغییر رنگ از آبی به زرد اتفاق می‌افتد). سپس جذب نوری محلول حاصل در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا (Model: BioTac El-x800) 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 متد Abei (۱۹۷۴) مورد ارزیابی قرار گرفت. برای اندازه‌گیری غلظت آنزیم کاتالاز ابتدا محلول‌های استاندارد در غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۶۰ نانو گرم در میلی‌لیتر تهیه گردیدند. سپس مخلوط واکنش شامل ۵۰ میکرولیتر از محلول استاندارد، ۵۰ میکرولیتر از streptomycin-HRP، ۴۰ میکرولیتر از نمونه، ۱۰ میکرولیتر از CAT antibodies، ۵۰ میکرولیتر از streptavidin-HRP در پلیت‌های ۹۶ خانه تهیه گردید. بعد از این مرحله روی پلیت را پوشانده آن‌را به‌آرامی تکان داده و در دمای ۳۷ درجه به‌مدت ۶۰ دقیقه نگه‌داری

کردیم. سپس درپوش روی پلیت را به‌آرامی برداشته محلول رویی را خالی کرده و با محلول شستشو آن را ۵ بار شستشو دادیم برای این‌که اثری از محلول در آن باقی نماند. بعد از آن ۵۰ میکرولیتر chromogen solution A و را به پلیت اضافه کرده و سپس ۵۰ میکرولیتر از chromogen solution B به پلیت افزوده شد و به‌آرامی تکان داده شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ برای تغییر رنگ قرار داده شد. در آخرین مرحله ۵۰میکرولیتر 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 (El-x800 Model:BioTac) قرائت گردید. معادله خط با توجه به غلظت نمونه‌ها محاسبه شد.

اندازه‌گیری میزان غلظت آنزیم استیل کولین استراز: برای اندازه‌گیری یکی از دقیق‌ترین روش‌های سنجش آنزیم کولین استراز روش Ellman می‌باشد که در آن از سوبسترای استیل تیوکولین یا پروپیل تیوکولین استفاده می‌گردد. تیوکولین آزاد شده ناشی از تجزیه سوبسترا با ترکیب ۵ و ۵- دی تیو بیس (۲- نیتروبنزوئیک اسید) واکنش می‌دهد و این آزمایش براساس سرعت هیدرولیز استیل تیوکولین توسط کولین استراز در بافر فسفات با PH=۶/۷ در طول موج ۴۱۲ نانومتر می‌باشد. تغییرات جذب به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر UV در نمونه‌های مختلف قابل سنجش می‌باشد. برای اندازه‌گیری این آنزیم استیل کولین استراز از بافت نرم‌صدف‌محار (*Pinctada radiata*) استفاده گردید که آن‌را هموژن کرده و هم‌چنین محلول‌های استاندارد در غلظت‌های ۰-۴-۸-۱۶-۳۲-۶۴ نانوگرم درمیلی‌لیتر تهیه گردیدند. سپس مخلوط واکنش شامل ۵۰ میکرولیتر از محلول استاندارد، ۵۰ میکرولیتر از streptomycin-HRP، ۴۰ میکرولیتر از نمونه، ۱۰ میکرولیتر از AChE antibodies، ۵۰میکرولیتر از streptavidin-HRP در پلیت‌های ۹۶ خانه تهیه گردیدند. بعد از این مرحله روی پلیت را پوشانده آن‌را به‌آرامی تکان دادیم و در دمای ۳۷ درجه به‌مدت ۶۰ دقیقه قرار دادیم. درپوش روی پلیت را به‌آرامی برداشته و محلول رویی را خالی کرده و با محلول شستشو آن را ۵ بار شستشو دادیم تا اثری از محلول در آن باقی نماند، سپس ۵۰ میکرولیتر chromogen solution A را به پلیت اضافه کرده و سپس ۵۰ میکرولیتر دیگر از chromogen solution B را به پلیت افزوده و به‌آرامی تکان داده شد و سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ برای تغییر رنگ قرار گرفت و در آخرین مرحله ۵۰ میکرولیتر Stop Solution به‌آن اضافه‌شد تا واکنش پایان پذیرد (تغییر رنگ از آبی به‌زرد اتفاق می‌افتد) و درنهایت جذب نوری محلول حاصل در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا (Model: BioTac El-x800) خوانده شد، و با توجه به معادله خط غلظت نمونه‌ها محاسبه گردید.

آنالیز آماری نمونه‌ها: تجزیه و تحلیل آماری داده با استفاده از نرم‌افزار SPSS (Version18) انجام پذیرفت. برای تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از انجام آزمایش ابتدا پراکنش نرمال داده‌ها توسط آزمون کولموگراف- اسمیرنف بررسی شد. پس از حصول از نرمال بودن داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس چندمتغیره (Manova) جهت تعیین وجود و یا عدم وجود اختلاف معنی‌داری در بین داده‌ها استفاده شد. سپس جهت تعیین دقیق وجود یا عدم وجود تفاوت معنی‌داری از آزمون Tukey استفاده شد. اختلاف بین میانگین داده‌ها در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ مورد ارزیابی قرار گرفت. برای تعیین این ارتباط بین مقادیر تجمع زیستی فلزات سنگین در بافت نرم و رسوب و هم‌چنین غلظت آنزیم‌های مورد بررسی از همبستگی پیرسون استفاده گردید.

نتایج

غلظت فلزات سنگین در بافت نرم صدف محار (*Pinctada radiata*): پس از انجام آنالیز شیمیایی نمونه‌ها به دستگاه جذب اتمی داده شد که نتایج آن‌ها نشان داد بیش‌ترین میزان سرب در فصل گرم در ایستگاه هندورابی و در اندازه کوچک صدف‌محار (*Pinctada radiata*) 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 معنی‌داری 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 (۰/۶ 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 به‌دست آمد (۰/۴۱ ppm). به‌نظر می‌رسد غلظت فلز نیکل تحت تاثیر ایستگاه نباشد اما فصل و اندازه به‌طور معنی‌داری غلظت آن را تحت تاثیر قرار داده است. بدین صورت که غلظت آن به‌طور معنی‌داری 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

معنی‌دار نبود. تغییرات فصلی سرب در اندازه کوچک نشان داد که غلظت میزان سرب در فصل سرد در ایستگاه‌های هندورابی، لاوان به‌طور معنی‌داری کم‌تر از فصل گرم است و در ایستگاه نخیلو غلظت سرب در فصل سرد به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از فصل گرم است. تغییرات فصلی نیکل نیز نشان داد که غلظت میزان نیکل در فصل سرد در ایستگاه‌های هندورابی، لاوان و نخیلو به‌طور معنی‌داری از فصل گرم بیش‌تر است.

تغییرات فصلی آنزیم گلوتاتیون اس ترانسفراز(GST)، کاتالاز(CAT) و استیل کولین استراز(AChE) : جهت اندازه‌گیری غلظت آنزیم‌های گلوتاتیون اس ترانسفراز، کاتالاز و استیل کولین استراز از دستگاه الایزا استفاده گردید که نتایج حاصل از این اندازه‌گیری در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۲: میانگین غلظت 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 میلی‌لیتر

فصل/ایستگاه	آنزیم	گلوتاتیون اس ترانسفراز (Glotathion S transferase)				کاتالاز(CAT)				استیل کولین استراز(AChE)			
		اندازه ۱		اندازه۲		اندازه ۱		اندازه۲		اندازه ۱		اندازه۲	
		میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار
بهار	هندورابی	۷/۷۳	۰/۷۵	۶/۵	۲/۶۸	۹/۱۳	۰/۵۶	۶/۵۶	۲/۲۷	۷۱/۳	۵/۶۸	۶۸/۶	۱۵/۱
	نخیلو	۵/۶	۰/۴۳	۵/۱	۰/۳	۳/۳۳	۰/۷۲	۳/۴۳	۰/۲۸۸	۴۸	۴	۴۵/۶	۱/۱۵
	لاوان	۸/۲	۰/۲۶	۶/۳	۱/۹۸	۶/۲	۰/۲۶	۷/۳۳	۰/۹۶	۷۹/۳	۴/۰۴	۸۸/۳	۹/۲۹
تابستان	هندورابی	۸/۹	۰/۸۱	۷/۲	۲/۰۶	۸/۱۳	۰/۴	۷/۱	۱/۸۳	۹۱/۶	۳/۵۱	۸۲/۳	۵/۸۵
	نخیلو	۴/۱	۰/۳۶	۴/۲	۰/۱۱	۳/۱۶	۰/۶۵	۳/۰۶	۰/۲۵	۴۹	۵/۵۶	۵۱/۳	۱/۵۲
	لاوان	۷/۱	۰/۳۵	۵/۶	۰/۶۵	۲/۶	۰/۲۶	۳/۹۶	۰/۴	۷۶/۶	۸/۳۲	۴۰	۷/۲۱
پاییز	هندورابی	۳/۴	۰/۳۶	۳/۲۳	۰/۲۳	۲/۵۳	۰/۳	۲/۷۳	۱/۵۳	۲۷/۳	۱۶/۴	۳۲	۰۷/۱۳
	نخیلو	۳/۹	۰/۲	۳/۶	۰/۲۶	۳/۱۳	۰/۴۵	۳/۲۳	۰/۳۷	۳۵/۶	۵/۵	۴۳/۶	۷/۶۳
	لاوان	۴/۳	۰/۳۲	۳/۰۶	۰/۴۵	۲/۷۳	۰/۵۸	۳/۵۶	۰/۳۰۵	۳۱	۳	۴۲/۳	۱۳/۶۵
زمستان	هندورابی	۲/۸	۰/۲	۳/۴۶	۱/۲۵	۳/۱	۰/۲	۳/۳۳	۰/۶۸	۴۰	۲	۴۴	۱۶/۵۲
	نخیلو	۲/۷	۰/۲۰	۳/۳۶	۱/۷۶	۴	۰/۲	۵/۶	۷۷/۲	۳۶	۶/۲	۵۳/۶	۱۴/۴۵
	لاوان	۲/۵	۰/۲۳	۲/۸۳	۰/۵۱	۲/۸۳	۰/۳۰۵	۴/۵۳	۱/۰۹	۳۷/۶	۳/۷۸	۴۴	۱۲/۲۸

نتایج نشان داد که بیش‌ترین میزان آنزیم (GST) در فصل گرم در ایستگاه هندورابی و در اندازه کوچک (۸/۹ نانوگرم بر میلی‌لیتر) و کم‌ترین میزان آن نیز در فصل سرد در ایستگاه لاوان در اندازه کوچک بود (۲/۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر). بیش‌ترین میزان آنزیم کاتالاز نیز در فصل گرم در ایستگاه هندورابی و در اندازه کوچک (۹/۱۳ نانوگرم بر میلی‌لیتر) و کم‌ترین میزان آن نیز در فصل سرد در ایستگاه لاوان در اندازه کوچک مشاهده گردید (۲/۷۳ نانوگرم بر میلی‌لیتر). هم‌چنین بیش‌ترین میزان آنزیم (AChE) در فصل گرم در ایستگاه هندورابی و در اندازه کوچک (۹۱/۶ نانوگرم بر میلی‌لیتر) و کم‌ترین میزان آن نیز در فصل سرد در ایستگاه لاوان در اندازه کوچک مشاهده شد (۳۱ نانوگرم بر میلی‌لیتر). از جدول ۳ می‌توان این‌گونه استنباط کرد که غلظت آنزیم (AChE) در هیچ‌کدام از ایستگاه‌ها و اندازه‌ها و فصول اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند. دو آنزیم (CAT) 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 گرم در اندازه یک دیده شد (به‌ترتیب ۸/۶۳ و ۸/۳۱ نانوگرم بر میلی‌لیتر) و کم‌ترین میزان آن‌ها نیز به‌صورت مشترک در لاوان در اندازه کوچک فصل سرد مشاهده شد (به‌ترتیب ۲/۷۸ و ۲/۹۴ نانوگرم بر میلی‌لیتر).

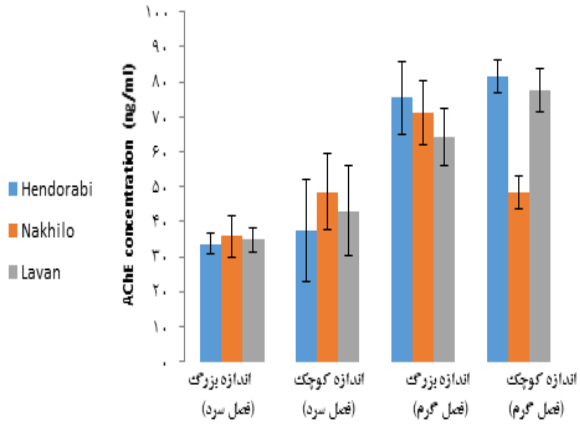
براساس نتایج به‌دست آمده از جدول ۴ همبستگی معنی‌دار قوی و مثبتی بین میزان غلظت آنزیم (GST) در بافت نرم صدف محار و غلظت آنزیم (CAT) در بافت نرم صدف محار دیده شد (R=۰/۸۲). هم‌چنین بین میزان غلظت (GST) فلز نیکل در بافت نرم صدف محار همبستگی متوسط و معکوسی مشاهده گردید (R= -۰/۴۵). آنزیم (CAT) و فلز سرب نیز در بافت نرم صدف محار همبستگی ضعیف و مثبتی داشت (R=۰/۳۱). همبستگی ضعیف مثبتی بین میزان نیکل در بافت نرم صدف محار و فلز سرب مشاهده شد (R=۰/۲۴).

جدول ۳: میانگین غلظت CAT, AChE, GST ±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 میلی‌لیتر و تحلیل آماری تست Manova

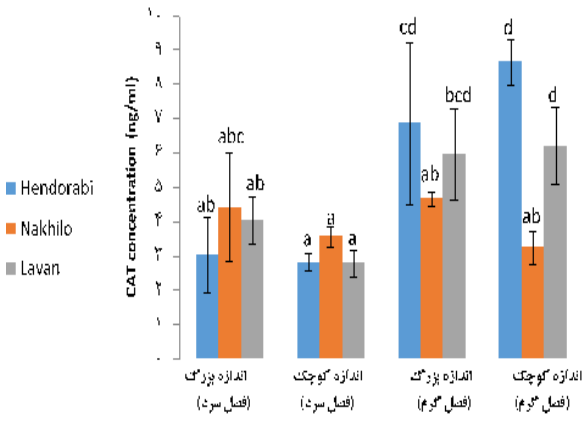
فصل/ایستگاه		آنزیم	استیل کولین استراز(AChE)	کاتالاز(CAT)	گلوتاتیون اس ترانسفراز(GST)
فصل گرم	اندازه۱	هندورابی	۸۱/۴۵±۴/۶	۸/۶۳±۰/۴۸ d	۸/۳۱±۰/۷۸ d
		نخیلو	۴۸/۵±۴/۸	۳/۲۴±۰/۶۸ ab	۴/۸۵±۰/۳۹ abc
		لاوان	۷۷/۵±۶/۱۸	۶/۲±۱/۱۲d	۷/۶۵±۰/۳۰ d
	اندازه۲	هندورابی	۷۵/۴۵±۱۰/۴۷	۶/۸۳±۱/۳ cd	۶/۸۵±۲/۳۷ cd
		نخیلو	۷۱/۲۵±۹/۱۲	۳/۲۴±۰/۲۶ ab	۴/۶۵±۰/۲ abc
		لاوان	۶۴/۱۵±۸/۲۵	۵/۶۴±۰/۶۸ bcd	۵/۹۵±۱/۳۱ bcd
فصل سرد	اندازه۱	هندورابی	۳۳/۶۵±۳/۰۸	۲/۸۱±۰/۲۵ a	۳/۱±۰/۲۸ a
		نخیلو	۳۵/۸±۵/۸۵	۳/۵۶±۰/۲۹ a	۳/۳±۰/۲ ab
		لاوان	۳۴/۸±۳/۳۹	۲/۷۸±۰/۳۸ a	۲/۹۴±۰/۲۷ a
	اندازه۲	هندورابی	۳۷/۵±۱۴/۷۹	۳/۰۳±۱/۱ ab	۳/۳۴±۰/۷۴ ab
		نخیلو	۴/۸۶±۵/۳۷	۴/۴۱±۱/۵۷ abc	۳/۴۸±۱/۰۱ ab
		لاوان	۴۳/۱۵±۱۲/۹۶	۴/۰۴±۰/۶۹ ab	۲/۹۵±۰/۴۸ a
تحلیل آماری		ایستگاه	ns	**	**
		فصل	ns	***	***
		اندازه	ns	ns	Ns
		فصل * اندازه	ns	*	*
		ایستگاه *اندازه	ns	ns	Ns
		ایستگاه * فصل	ns	***	***
		فصل * ایستگاه * اندازه	ns	ns	Ns

ns: اختلاف معنی‌داری را نشان نمی‌دهد.

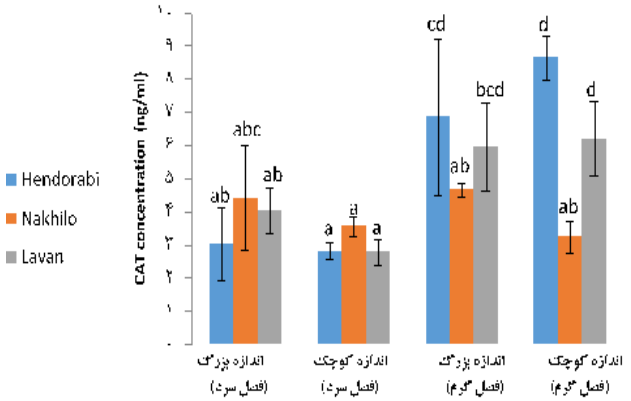
حروف a,b, c, d اختلاف‌های معنی‌دار را نشان می‌دهند. p<0.05:* , p<0.01: ** , p<0.001:***



شکل۳:مقایسه تغییرات فصلی غلظت آنزیم استیل کولین استراز AChEدر بافت نرم صدف محار (*Pinctada radiata*)اندازه بزرگ و کوچک، در ایستگاه‌های هندورابی، لاوان و نخیلو در فصل گرم و سرد بر حسب نانوگرم بر میلی لیتر



شکل۴: مقایسه تغییرات فصلی غلظت آنزیم‌های CAT در بافت نرم صدف محار (*Pinctada radiata*)اندازه بزرگ و کوچک، در ایستگاه‌های هندورابی، لاوان و نخیلو در فصل گرم و سرد بر حسب نانوگرم بر میلی لیتر



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

جدول ۴: ضرایب همبستگی فلزات سنگین Cd, Pb ,Ni و آنزیم‌های CAT, AChE, GST در صدف محار (*Pinctada radiata*)

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

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

بحث

صدف‌های دوکفه‌ای از نظر تعداد گونه‌ها، دومین رده نرم‌تنان می‌باشند که دارای انتشار جغرافیایی زیادی در دریاها و دریاچه‌های آب‌شور 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 آبزیان 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 به‌دلایل زیر می‌تواند باشد:

با توجه به این‌که در این تحقیق از رسوبات ریز (کم‌تر از ۶۳ میکرون) نسبت به کل رسوبات استفاده شده است و این نسبت در هر سه ایستگاه تقریباً برابر است (۱۲/۳ درصد در لاوان، ۱۲/۹ درصد در هندورابی و ۱۲/۴ 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 به‌دلیل وجود کانون‌های آلاینده بیش‌تر در این ایستگاه ارتباط داد. این امر می‌تواند به‌دلیل 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، ۱۳۹۰؛ حیدری‌چهارلنگ، ۱۳۹۰) 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 موردمطالعه: اصولاً روابط متقابل بین فلزات در بدن جانوران ممکن است ناشی از خواص فیزیکوشیمیایی مشابه آن‌ها و هم‌چنین به‌دلیل مسیرهای بیوشیمیایی یکسان و در ساده‌ترین حالت وجود لیگاندهای خاص بین آنها باشد (Paez-Osuna و همکاران، ۱۹۹۵). Wright (۱۹۹۵) روابط مشاهده شده بین برخی جفت‌های فلزات در بدن جانوارن ناشی از نوعی رقابت یا اثر مضاعف روی بایندرها و انتقال‌دهندگان فلزات در سطح سلول دانست.

باتوجه‌به‌نزدیک بودن موقعیت نسبی ایستگاه‌های نمونه برداری، 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 فیزیکوشیمیایی 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 به‌واسطه فاکتورهای مختلف فیزیکی، شیمیایی و زیستی مشخص می‌گردد (Luoma، ۱۹۸۹). مکانیسم‌های مختلفی برای جذب عناصر در اویسترهای وجود دارد که به‌واسطه تغییر در شرایط فیزیولوژیکی، عوامل محیطی و یا حتی وضعیت جنسی این جانوران تغییر می‌کند (Luoma، ۱۹۸۹). منابع نقطه‌ای برای تولیدکننده کانون آلاینده‌ها وجود داشت. البته نتایج تحقیقات مختلف حاکی از آن است که به‌ویژه در دوکفه‌ای‌ها 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 (۲۰۰۶) که ارتباط معنی‌داری بین اندازه بدن و تجمع فلزات مشاهده کرد. معمولاً در دوکفه‌ای‌ها 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 دوکفه‌ای‌ها دو نوع سازگاری که شامل کاهش نسبت سطح به حجم و در اندازه‌های بزگ‌تر کاهش فعالیت‌های متابولیک رخ می‌دهدکه هر دو عامل منجر به کاهش میزان جذب فلزات با افزایش ابعاد بدن آبزیان می‌گردد. البته نتایج تحقیقات مختلف حاکی از آن است که به‌ویژه در دوکفه‌ای‌ها 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، ۲۰۰۶). البته طبق تحقیق Hédouin (۲۰۰۶) از آن‌جایی‌که ارتباط معنی‌داری بین اندازه بدن و تجمع فلزات معمولاً، در دوکفه‌ای‌ها 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. 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 از تنها یک نشانگر که ممکن است وضعیت سلامت یک گونه را به‌خوبی نشان ندهد، افزایش چشمگیری داشته است. در تحقیقی که Lima (۲۰۰۷) بر روی صدف *Mytilus gallopravincialis* انجام داد 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 براین 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 (ROS)ها، به‌سلول‌های ازطریق ازبین بردن آن‌ها و پایین آوردن سطح (ROS) کمک می‌کند (Geret، ۲۰۰۰). بنابراین اندازه‌گیری آنزیم‌های مختلف که در سیستم دفاع سلولی به‌عنوان نشانگرهای استرس اکسیداتیو در گیر هستند، می‌تواند اثرات آلودگی را نشان دهد (Livingstone و

همکاران، ۱۹۹۳). این انتظار می‌رفت که آلاینده‌های فلزی به‌عنوان 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) به‌عنوان 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، به‌علت استرس ناشی از به‌حرکت در آمدن رسوبات و صدف در هنگام صید آن نقش مهمی ایفا می‌کنند. هم‌چنین مهار فعالیت آنزیم‌استیل کولین استراز به‌عنوان پاسخ به فلزات سنگین هم‌سو با برخی از مطالعات است مانند (Monserrat و همکاران، ۲۰۰۲). علاوه بر این به‌خاطر مشارکت آنزیم استیل کولین استراز در انتقال‌های عصبی نسبت به پارامترهای زنده و غیرزنده بسیار حساس است (Banni و همکاران، ۲۰۱۰). نبودن ارتباط معنی‌دار 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 به‌غیر 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 (Khessiba 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 به‌صورت مشترک در لاوان در اندازه کوچک فصل سرد به‌دست آمد. باافزایش دمادر 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 توانایی‌موجود را برای خنثی‌سازی ROS ضعیف‌نمایدو این‌برای موجود بسیار مضر است (Frenzilli و همکاران، ۲۰۰۴). عدم مشاهده اختلاف معنی‌دار بین‌فصول به‌علت 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 به‌شدت تحت تاثیر دما و شوری هستند (Cailleaudو همکاران، ۲۰۰۷). 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) به‌طور 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 به‌علت دوره رسیدگی جنسی تکامل گنادها و تخم‌ریزی آن‌ها می‌باشد. Filho (۲۰۰۱) تغییرات فصلی‌در میزان آنزیم GSTرا در گونه *Perna perna* گزارش کرد. درحالی‌که Regoli و همکاران (۲۰۰۶) در گونه *Mytilus galloprovincialis* هیچ‌گونه تغییرات فصلی را گزارش نکرده‌اند. 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 علامت

دهنده‌های سلولی، اختلال در هموستازی کلسیم گردند (Stohs و همکاران، ۱۹۹۵). فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند CAT, GST می‌توانند به‌میزان غلظت و مدت‌زمانی 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 به‌دلیل 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) به‌عنوان 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 به‌عنوان 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 به‌وضوح مشخص کرد (Vlahogianni و همکاران، ۲۰۰۷). مطالعات Jing و همکاران (۲۰۰۷) نشان داد که تجمع فلزات سنگین سرب و مس در پوسته صدف مرواریدساز محار می‌تواند فعالیت آنزیم‌های GPX و SOD را به‌روش مشابهی تغییر دهند.افزایش سطح آنزیم‌های GST، 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) 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 به‌دلیل برخی فاکتورهایی مانند پراکنش جغرافیایی وسیع، فراوانی، ریزه‌خوار 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 این‌گونه مطالعات است. به‌طورکلی میزان فلزات سنگین که در بافت نرم صدف دوکفه‌ای و رسوبات منطقه مورد مطالعه اندازه‌گیری گردید نسبت به استانداردهای مرتبط به‌طور 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 به‌میزان 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 این‌حال به این دلیل که میزان آنزیم‌ها در حد طبیعی بود نمی‌توان 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 به‌عنوان شاخص زیستی آلودگی فلزات سنگین (Ni,V,Cd)در خلیج فارس-جزیره خارک، پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد مدیریت محیط زیست. دانشکده محیط زیست و انرژی. دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات.

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.؛ دقوقی، ب. و رامشی، ح.، ۱۳۷۹.** اطلس نرم‌تنان خلیج فارس. موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۲۴۸ صفحه.

۴. **حیدری‌چهارلنگ،ب.؛ ریاحی‌بختیاری،ع. و یاوری، و.، ۱۳۹۰.** بررسی غلظت فلزات سنگین (Pb,Zn,Cd and Cu) در رسوبات سطحی سواحل بندرلنگه. پنجمین همایش تخصصی مهندسی محیط‌زیست.

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. دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال.

۷. **صفاهیه، ع.؛ عبداله‌پورمنیخ، 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.

۸. **مرتضوی، ش.؛ اسماعیل‌ساری، ع. و ریاحی‌بختیاری، ع.، ۱۳۸۴.** تعیین نسبت نیکل و وانادیوم ناشی از آلودگی‌های نفتی در صدف خوراکی و مرواریدساز در حاشیه سواحل، استان هرمزگان. مجله منابع طبیعی. جلد ۵۸، شماره۱، صفحات ۱۱ تا ۲۲.

۹. **Aebi, H., 1974**. Catalase. In: Bergmeyer HV, editor. Methods in enzymatic analysis. New York: Acadamic press. Vol 2.

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, spodopthera eridania. Arch Insect Bio Chem Physiol. Vol. 7, pp: 173-186.

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 Bull. 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 petro chemical 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.

۳۶. **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.

۳۷. **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.

۳۸. **Páez-Osuna, F. and Ruíz-Fernández, C., 1995**. Trace metals in the mexican shrimp Penaeus vannamei from estuarine & marine environments. Archives of environmental Contamination and Toxicology. Vol. 87, No. 2, pp: 243-247.

۳۹. **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.

۴۰. **Regoli, F.; Winston, G.W.; Gorbi, S.; Frenz illi, 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.

۴۱. **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.

۴۲. **Rosa, M.M.; Amila, E.M. and Ana, S., 2005**. Antioxidant defencees in fish: Biotic and abiotic factors. Review in fish Biology and fisheries. Vol. 15, pp: 75-88.

۴۳. **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.

۴۴. **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.

۴۵. **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.

۴۶. **Stohs, S.J. and Bagchi, D., 1995**. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. Free Radic Biol Med. Vol. 18, pp: 321-336.

۴۷. **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.

۴۸. **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.

۴۹. **Vlahogianni, T., Dassenakis, M.; Scoullos, 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.

۵۰. **Wright, D.A., 1995.** Trace metal and major ion interactions in aquatic animals. Marine Pollution Bull. Vol. 31, pp: 8-18.

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 radiate* (Pearl Oyster): A Bioindicator for Metal Pollution Monitoring in the Qatari Waters. 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, pp: 325-331.

۱۴. **Banni, M.; Negri, A.; Dagnino, A.; Jebali, J.; Ameur, 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. ٤٥, pp: ١٠٦-١٢١.

۲۰. **Ellman, G.L.; Courtney, K.; Andres, D.; Jr, V. Featherstone, R.M., 1961**. A new and rapidcolorimetric determination of acetylcholinesterase activity, Biochem. Pharmacol. Vol. 7, pp: 88-95.

۲۱. **Elumalai, M. and Balasubramanian, M.P., 1999.** Influence of naphthalene on esterase activity during vitellogenesis of marine edible crab, *Scylla sarrata*. 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 & 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