نشریهٔ محیط زیست طبیعی، منابع طبیعی ایران، دورهٔ ۶۷، شمارهٔ ۲، تابستان ۱۳۹۳
صفحات ۱۸۴-۱۷۵

ارزیابی آثار آلودگی نفتی خلیج‌فارس بر فعالیت ۳ نوع بایومارکر آنزیمی در آبشش ماهیان گل‌خورک *Periophthalmus waltoni* (مطالعهٔ منطقهٔ بوشهر)

مهرنوش شیرانی[۱]، علیرضا میرواقفی[۲*]، حمید فرحمند[۳]، محمد عبداللهی[۴]

۱. کارشناس ارشد بوم‌شناسی آبزیان. گروه شیلات. دانشکدهٔ منابع طبیعی. دانشگاه تهران. کرج. ایران

۲،۳. دانشیار گروه شیلات. دانشکدهٔ منابع طبیعی. دانشگاه تهران. کرج. ایران

۴. استاد مرکز تحقیقات علوم دارویی. گروه سم‌شناسی و داروشناسی دانشکدهٔ داروسازی. دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران. تهران. ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۲/۱۰-تاریخ تصویب: ۱۳۹۱/۱۱/۱۰)

چکیده

میزان قابل ملاحظه‌ای از آلاینده‌های مختلف به‌خصوص نفت خام در خلیج‌فارس و نواحی شمالی آن موجود است. بنابراین، پایش زیستی آثار این آلوده‌کننده‌ها بر زیستمندان این منطقه اهمیت بسیاری دارد. در این مطالعه فعالیت بایومارکرهای آنزیمی شامل اتوکسی رزوروفین أدی اتیلاز (EROD)، گلوتاتیون اس ترانسفراز (GST) و کاتالاز (CAT) در سطح بیوشیمیایی و در آبشش ماهی گل‌خورک *Periophthalmus waltoni* در کرانهٔ خلیج‌فارس و در ۳ ایستگاه خور سلطانی، جزیرهٔ شیف و بندر عامری (به‌ترتیب با میزان بالا، متوسط و کم آلاینده) در ماه‌های فروردین و اردیبهشت با استفاده از روش‌های طیف‌سنجی نوری و فلئورسانس اندازه‌گیری شدند. بایومارکرهای انتخابی به‌طور معناداری در سطح آماری $P<۰/۰۵$ در نمونه‌های منطقهٔ خور سلطانی سطح بالاتری از فعالیت آنزیمی را نشان دادند. ارزیابی این آثار اولیهٔ بیولوژیک (در سطح بیوشیمیایی) نشان‌دهندهٔ توان بالقوه در استفاده از *P. waltoni* به‌عنوان گونهٔ اندیکاتور زیستی در چنین اکوسیستم‌هایی بوده است به علاوه نتایج حاصل، همسو با مطالعات مشابه استفاده از این بایومارکرها را در ارزیابی سلامت مناطق ساحلی تأیید و تصدیق می‌کند.

کلیدواژگان: اتوکسی رزوروفین، بایومارکر، خلیج‌فارس، گلوتاتیون ترانسفراز، گل‌خورک، نفت خام.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۶۳۲۲۳۰۴۴

Email: avaghefi@ut.ac.ir

۱. مقدمه

خلیج‌فارس و سواحل شمالی آن به‌سبب ویژگی‌های منحصربه‌فرد به‌عنوان راه ارتباطی مهم بین المللی و وجود ذخایر عظیم نفت و گاز تحت اثر آلودگی با مواد آلی به‌ویژه ترکیبات نفت بوده و مطالعه آثار این آلاینده ها بر موجودات و بایوتای آن از اهمیت بسیار برخوردار است. نفت که متشکل از ترکیبات متفاوت است حاوی موادی به نام پلی‌سیکلیک آروماتیک هیدروکربن ها (PAHs)[1] است که به‌عنوان سرطان‌زاهای بالقوه شناخته شده و موجب نگرانی‌های جهانی هستند. در خلیج‌فارس نیز عمده آلاینده‌ها نفت و مشتقات آن است به‌طوری‌که میزان آلودگی هیدروکربن‌های نفتی کل ۱۴/۳ تا ۱۴۳/۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم در نفت گزارش شده است (Yousefi *et al.*, 2006). این ترکیبات و به‌ویژه ۱۶ ترکیب از آن‌ها توسط سازمان بهداشت جهانی و آژانس حفاظت محیط‌زیست ایالات متحده به‌عنوان ترکیباتی خطرناک، مضر و سرطان‌زاهای بالقوه شناخته شده‌اند (Anyakora *et al.*, 2005; Fossi *et al.*, 2000; Abrahamson *et al.*, 2008) که این ۱۶ ترکیب در آب‌های خلیج‌فارس نیز حضور دارند (Tatina and Oryan, 2009).

از آنجایی که سنجش آلاینده‌ها به‌وسیلهٔ آنالیزهای شیمیایی گران‌قیمت است و امکان بررسی همهٔ گروه‌های شیمیایی و آلاینده‌های موجود را فراهم نمی‌کند و از طرف دیگر آنالیز آثار بیوشیمیایی زودهنگام (بایومارکرها) داده‌های مرتبط با آثار مزمن پاتولوژیک آلاینده‌ها را فراهم می‌آورد، امکان پیش‌بینی تغییرات اکولوژیک توسط بایومارکرها فراهم شده؛ به‌علاوه در صورت انتخاب بایومارکر مناسب امکان آگاهی نسبت به مشکلات بالقوه نیز وجود دارد و با متمرکزکردن آنالیزهای شیمیایی از زمان و هزینه کاسته می‌شود (Sanchez Oliveira *et al.*, 2009; Hernandez *et al.*, 1998).

PAHs در ماهیان عمدتاً به‌وسیلهٔ آبشش‌ها یا سطح بدن جذب می‌شود ولی ممکن است مقداری از آن به‌وسیلهٔ خوردن غذا یا رسوبات آلوده نیز وارد بدن شود (Vourinen *et al.*, 2006). آثار این آلاینده بر موجودات وسیع است و به‌ویژه شامل آثار ژنتیکی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیک می‌شود (Halldorsson *et al.*, 2008). در سطح بیوشیمیایی متابولیسم زنوبیوتیک‌ها با فرایند دفع سمیت انجام می‌شود که فرایندی است که ترکیبات خارجی را متابولیزه می‌کند و می تواند به دو بخش اصلی تقسیم شود این دو بخش شامل تغییر ماده شیمیایی[2] (تبدیل و اصلاح آن) و تقسیم‌بندی[3] است که این دو فرایند خود به ۳ فاز تقسیم می‌شوند: فاز I فعال‌سازی واکنش، فاز II ترکیب و فاز III تقسیم‌بندی درونی و فرایند ذخیره‌سازی (Karam, 1998). واکنش‌های فاز I و II در فرایند تغییر مادهٔ سمی برای درک متابولیسم مولکول‌های درونی مانند انتقال زنوبیوتیک‌ها و داروها در ماهیان و دیگر گونه‌ها بسیار مهم است و سوبستراهایی چون 7-ethoxyresorufin، 7-ethoxycoumarin، 7-penthoxyresorufin، 7-benzoxylresorufin و 1- chloro 2-4dinitrobenzene (CDNB) در آن‌ها درگیر هستند (Gonzalez *et al.*, 2009). در این بین سنجش فعالیت Ethoxy resorufin O-deethylase (EROD) یکی از بایومارکرهای شاخص هشدار اولیه فاز I در رابطه با اثر آلاینده‌های PAHs و PCBs بوده که مرتبط با Cyt P450 است و اطمینان بالایی در ارزیابی خطر مواجهه با این آلاینده‌ها در محیط دارد (Whyte *et al.*, 2000). در فاز II سیستم دفع سمیت آنزیم‌های اصلی درگیر UDPGT[4] و GST هستند که پاسخ آن‌ها نسبت به فاز I کمتر مطالعه شده است و به همین سبب کمتر به‌عنوان بایومارکر ماهیان به کار رفته‌اند (Della Tore *et al.*, 2010) در این فاز فعالیت آنزیم GST نیز شاخصی مهم در واکنش‌های فاز II است که در اتصال ترکیبات زنوبیوتیک الکتروفیل نقش اساسی ایفا می‌کند (Gonzalez *et al.*, 2009). کاتالاز نیز به همراه دیگر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در دفع سمیت رادیکال‌ها و تبدیل آن‌ها به مولکول‌های غیرفعال اهمیت دارد. به‌علاوه سنجش بایومارکرها در ماهیان که به‌دلایل بسیاری به‌عنوان گونه‌های مناسب برای مطالعه و

1. polycyclic aromatic hydrocarbons

2. biotransformation
3. compartmentation
4. uridine diphosphate glucuronyltransferase

ارزیابی پاسخ‌های بیولوژیک و بیوشیمیایی به آلودگی‌های محیط آبی شناخته می‌شوند و به‌سبب نقش مهم اکولوژیک در شبکه‌های غذایی دریایی و به‌سبب عملکرد خود به‌عنوان حامل انرژی از سطوح پایین تروفی تا بالا، اندیکاتورهای خوبی به شمار می‌روند می‌تواند سنجیده شود (van der Oost *et al*., 2003).

گل‌خورک *Periophthalmus waltoni* در زیستگاه‌های با بستر گلی، مناطق مانگرو و جزر و مدی اقلیم‌های گرمسیری و نیمه گرمسیری یافت می‌شود و پراکنش و فراوانی مناسبی در ایستگاه‌های انتخابی منطقهٔ مطالعه‌شده (خلیج‌فارس) دارد و به‌سبب زندگی آمفیبیوس و اینکه حلقهٔ مهمی از زنجیرهٔ غذایی اکوسیستم را تشکیل می‌دهد برای مطالعه انباشت آلودگی مناسب است (Ravi & Al-Behbehani & Ebrahim, 2010; Rajagopal, 2007) و در این بررسی انتخاب شد.

مطالعه بر گونه‌های مختلف ماهیان نشان داده است که CYP1A به‌شدت در اندوتلیای کل بدن قابل تحریک است (Abrahamson, 2007). اغلب مطالعات پایش محیط‌زیست توجهشان را بر کبد معطوف کرده‌اند که به‌سبب اهمیت آن در متابولیسم و ذخیرهٔ زنوبیوتیک[1] هاست. اما نیاز به کسب اطلاعات دربارهٔ پاسخ دیگر بافت‌ها بسیار اهمیت دارد. آبشش‌ها به‌عنوان اندامی مهم در جذب زیستی و دفع سموم هستند و به‌سبب سطح گسترده در تماس با بستر محیط هدف اول آن‌ها بوده و فاصلهٔ میان بستر بیرونی و درونی را کاهش می‌دهند (Oliveira *et al*., 2009). همچنین آبشش محل اصلی جذب (برداشت) زنوبیوتیک‌ها در ماهیان مواجه با آلاینده‌هاست، این اندام در مطالعات مختلف ازجمله Nahrgang و همکاران (2010b) و Jonsson و همکاران (2003) به‌عنوان محلی برای سنجش بایومارکرهای آنزیمی فاز اول و دوم دفع سمیت سنجیده شده و اغلب پاسخ‌های قابل قبولی را ارائه داده است، اما پاسخ‌های بایومارکری در مطالعات میدانی بسته به شرایط آزمایش و گونه‌های انتخاب‌شده دامنهٔ متفاوتی از تأثیر و عدم تأثیر را داشته‌اند (van der Oost *et al*., 2003)؛ بنابراین، از آنجایی که فعالیت آنزیم EROD، GST و کاتالاز تا کنون در آبشش ماهی گل‌خورک سنجیده نشده است و به‌منظور ارزیابی اثر آلاینده‌های نفتی بر پاسخ‌های انتخابی در ماهی مورد نظر این مطالعه انجام شد.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. منطقهٔ مطالعه‌شده

منطقهٔ بوشهر و نواحی آبی و خلیج آن، به‌دلیل ورود انواع آلاینده‌های صنعتی، آلودگی ناشی از تردد کشتی‌ها، وجود منابع آلایندهٔ نفتی، تخلیهٔ مواد زاید و سمی و ورودی فاضلاب‌های خانگی به این خلیج تأثیر فراوانی بر آلودگی زیست‌محیطی حوضهٔ خلیج‌فارس دارد (Hosseini *et al*., 2010). بنابراین، به‌منظور مطالعهٔ اثر آلودگی نفتی بر ماهیان گل‌خورک ۳ ایستگاه خور سلطانی در شرق بوشهر (۲۸°۵۸'۵۵.۱۷"~، ۵۰°۵۰'۵۳.۴۴")، جزیرهٔ شیف از توابع بخش مرکزی استان بوشهر (۲۹°۴'۱۴.۲۵"~، ۵۰°۵۷'۶.۸۳") (شکل ۱ و ۲) و بندر عامری در جلگه‌ای در ۴۰ کیلومتری بندر بوشهر (۲۸°۴۴'۲.۲۱"~، ۵۱°۴'۱.۱۰")، انتخاب شدند، انتخاب محل‌های نمونه‌برداری براساس مشاهدات منطقه‌ای و گزارشات آلودگی نفتی است و با آنالیز رسوبات منطقه از لحاظ میزان بار ماده آلی وکربن آلی، ایستگاه خور سلطانی به‌عنوان منطقهٔ آلوده و بندر عامری منطقه‌ای با بار آلایندهٔ کم انتخاب شدند. در جزیرهٔ شیف محل نمونه‌برداری نزدیک به خروجی مزارع پرورش میگو بود لذا با توجه به اطلاعات محلی به‌عنوان منطقه‌ای با بار آلودگی متوسط در نظر گرفته شد. این اطلاعات با سنجش متابولیت‌های صفراوی PAH نمونه‌های مورد نظر در دو منطقهٔ خور سلطانی و بندر عامری تأیید شد درحالی‌که میزان متابولیت‌های PAH در منطقهٔ جزیره شیف با وجود بار مادهٔ آلی بیشتر، کمتر از دو ایستگاه دیگر بود که نشان از تفاوت نوع مادهٔ آلی در منطقه داشت و احتمالاً مربوط به پساب ناشی از مزارع پرورش میگو است (Shirani *et al*., 2012).

۲.۲. نمونه‌برداری

در این مطالعه که در بخش‌های اشاره‌شده از سواحل خلیج‌فارس و به‌منظور مقایسهٔ میزان مواجههٔ ماهیان با آلاینده‌های نفتی در مناطق نزدیک به محل‌های

1. xenobiotics

اکتشاف و انتقال نفت و محل‌های دوردست انجام شد و فصل بهار را شامل شد (نیمهٔ دوم فروردین و نیمهٔ اول اردیبهشت‌ماه سال ۱۳۹۰)، روش نمونه‌برداری به‌صورت تصادفی و به تعداد ۱۵ نمونه برای گونهٔ انتخابی در هر ایستگاه بود. سپس فاکتورهای بدنی شامل طول و وزن با استفاده از تختهٔ بیومتری و ترازوی دیجیتال (با دقت ۰/۰۱) به‌طور جداگانه برای ماهیان هر منطقه ثبت و شاخص CF [1] با استفاده از فرمول:

CF = [وزن تر ماهی (g) / (طول استاندارد (cm)) ۳] x ۱۰۰

محاسبه شد (جدول ۱). براساس گونهٔ ماهی، روش صید «زنده‌گیری» انتخاب شد، چراکه صید گل‌خورک‌ها در خشکی با بستر گلی و فعالیت زیاد این ماهی متفاوت از روش‌های مرسوم چون تورکشی یا استفاده از تورهای انتظاری که اغلب برای ماهیان تک‌زیستگاهه استفاده می‌شود است و دشواری‌هایی دارد؛ به‌علاوه از آنجایی که بایومارکرهای انتخابی آنزیمی به تغییرات دمایی حساس‌اند بنابراین، نمونه‌ها بلافاصله در دمای ۸۰°C- فریز و تا زمان انجام آنالیزها نگهداری شد.

شکل۱. موقعیت جزیرهٔ شیف و خور سلطانی از ایستگاه‌های انتخابی

شکل۲. موقعیت جغرافیایی بندر عامری، جزیرهٔ شیف و خور سلطانی

1 .condition factor

جدول۱. طول (cm) و وزن (g) ماهیان **P. waltoni** هر ایستگاه برحسب **Means±SE** (n=۱۵)

ایستگاه	طول (cm)	وزن (g)	CF (g/cm3)
خور سلطانی	۱۱/۷۳±۰/۸۵	۱۱/۲۸±۰/۴۷	۰/۶۸±۰/۰۶۳
جزیره شیف	۱۲/۴۱±۰/۵۱	۱۱/۸±۰/۸۶	۰/۶۱±۰/۰۵۸
بندر عامری	۹/۰۴۳±۰/۱۴۹	۷/۲۳±۰/۳۰۵	۰/۹۷±۰/۰۲۸

۳.۲. سنجش آنزیم‌ها

سنجش فعالیت آنزیم‌ها در آبشش ماهیان گل‌خورک انجام شد. به این ترتیب که براساس روش Abrahamson و همکاران (2008)، بافت‌ها پس از جداسازی با سرم فیزیولوژی سرد شست‌وشو و در بافر فسفات (۰/۱ M) pH=۷/۵ هموژن شدند (۲ml بافر به ازای ۰/۵ g بافت یا ۲۵٪ وزن به حجم) سپس نمونه‌ها در سانتریفیوژ یخچال‌دار (مدل MPW-350R ساخت کشور لهستان) در ۱۴۰۰۰xg و به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۴°C قرار گرفتند، پس از خروج لایهٔ رونشین به‌عنوان منبع آنزیم در دمای ۸۰°C- تا زمان انجام آزمایش‌ها نگهداری شد.

برای سنجش آنزیم‌ها براساس روش Martinez-Gomez و همکاران (2006 با کمی اصلاح) مخلوط واکنش در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه برای EROD و GST و در کووت برای CAT تهیه شد؛ که برای EROD شامل بافر فسفات pH=۸ (۰/۱ M)، منبع آنزیم، NADPH۰/۲۵mM و 7ethoxy resorufin بود و جذب در ۵۳۰/۵۸۵ex/em nm [1] به صورت فلوریمتریک خوانده شد، داده‌ها با منحنی استاندارد رزوروفین نرمال شدند. سنجش GST نیز با مخلوط واکنش حاوی بافر فسفات pH=۷/۵ (۰/۱ M)، منبع آنزیم، GSH (۲۰mM) و CDNB (۲۰ mM) بوده جذب در ۳۴۰ nm خوانده شد (mM-1.cm-1 e=۹.۶)[2]. سنجش فعالیت CAT با کاهش جذب در ۲۴۰nm و با مصرف هیدروژن پروکسید (H_2O_2) سنجیده شد که حجم نهایی در کووت شامل بافر فسفات pH=۷ (۵۰ mM) و ۵۰mM از H_2O_2 است (mM-1.cm-1 e=۰/۰۴). فعالیت همگی این آنزیم‌ها در دمای ۲۵°C و در سه تکرار سنجیده شد و براساس میزان پروتئین سنجش‌شده با روش برادفورد (NSF, 2006) محاسبه شد. سنجش‌های آنزیمی GST و EROD همچنین تعیین میزان پروتئین با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر[3] (مدل Synergy HT multi-mode ساخت ایالات متحدهٔ امریکا) و سنجش فعالیت کاتالاز با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر انجام شد. همچنین تمامی مواد شیمیایی استفاده‌شده ساخت شرکت Sigma Aldrich ایالات متحدهٔ امریکا بود.

۴.۲. آنالیز آماری

هر یک از پاسخ‌ها در ۱۵ نمونه جمع‌آوری شده از هر ایستگاه سنجیده شده و داده‌ها براساس Means±SE ارائه شده‌اند. تفاوت آماری پاسخ‌های بایومارکری درون ایستگاه‌ها به‌وسیلهٔ one way ANOVA محاسبه شده است. تفاوت بین ایستگاه‌ها در سطح معنادار P<۰/۰۵ با استفاده از دانکن و نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۶.۰ انجام شد. همچنین نرمال‌بودن و همگن‌بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف اسمیرنوف بررسی شد.

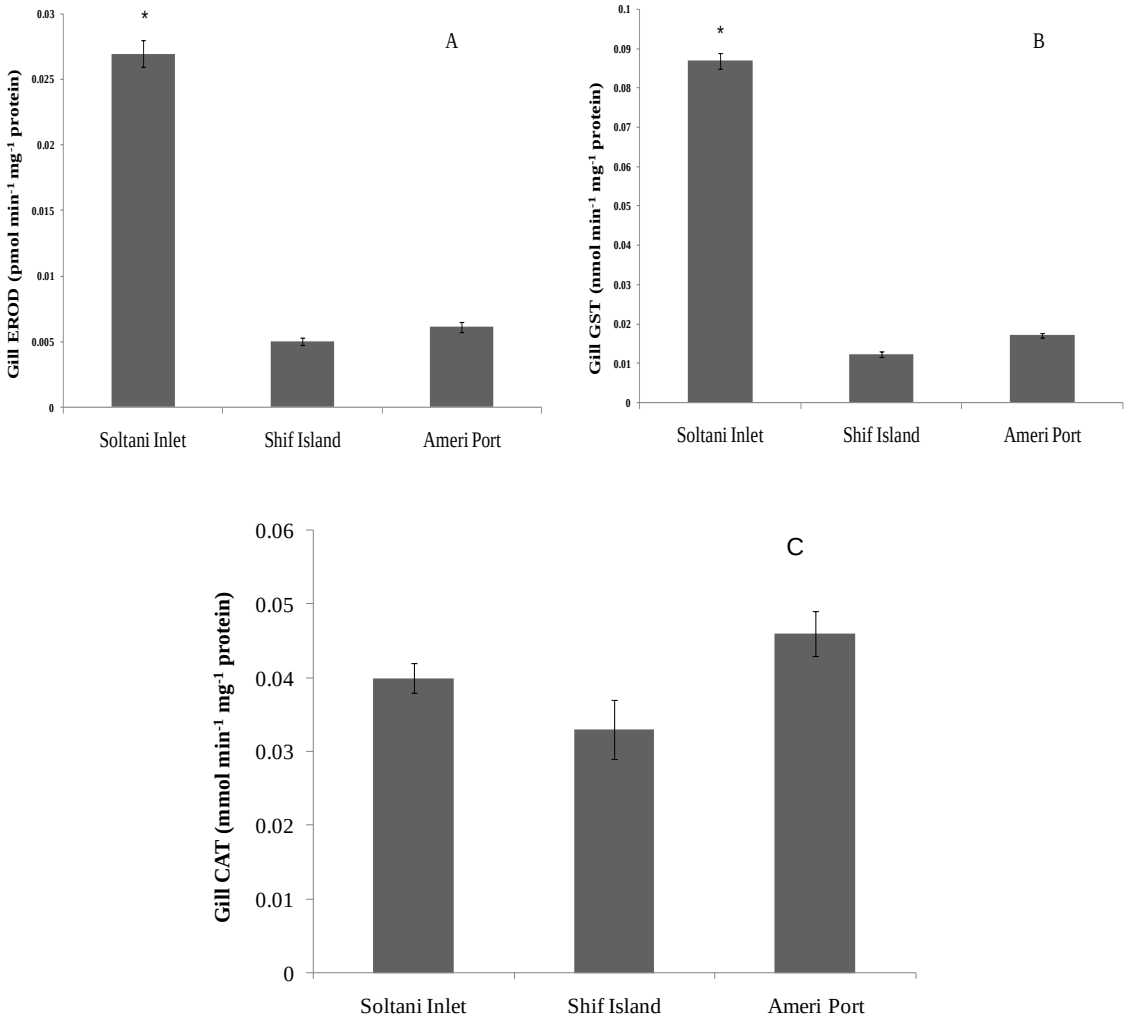
۳. نتایج

نتایج نشان داد که ماهیان خور سلطانی تفاوت معنادار فعالیت آنزیم EROD در مقایسه با نمونه‌های منطقهٔ بندر عامری و جزیرهٔ شیف داشتند (جدول۲)، به‌طوری‌که در حدود ۴ برابر فعالیت آنزیم را نسبت به بندر عامری و بیش از ۵ برابر را نسبت به جزیرهٔ شیف نشان دادند. همچنین فعالیت آنزیم GST نیز این تفاوت را نشان داد و نمونه‌های منطقهٔ خور سلطانی بیش از ۵ برابر فعالیت آنزیم را نسبت به منطقهٔ بندر عامری و بیش از ۷ برابر را نسبت به خور سلطانی داشتند، درحالی‌که CAT تفاوتی نشان نداده و از ارتباطی قاعده‌مند با میزان آلاینده تبعیت نکرد (شکل۳، A،B،C).

1. excitation/emission
2. extinction coefficient
3. Microplate reader

جدول۲. دامنهٔ فعالیت آنزیم‌های EROD، GST و CAT در نمونه‌های آبشش ماهیان گل‌خورک (n=۱۵)

ایستگاه	دامنهٔ فعالیت EROD (pmol min-1mg-1protein)	دامنهٔ فعالیت GST (nmol min-1mg-1protein)	دامنهٔ فعالیت CAT (mmol min-1mg-1protein)
خور سلطانی	۰/۰۱۶-۰/۰۳۲	۰/۰۰۷۱-۰/۱۳	۰/۰۳-۰/۰۵۷
جزیره شیف	۰/۰۰۳-۰/۰۰۷۴	۰/۰۰۸-۰/۰۳	۰/۰۲۳-۰/۰۴۶
بندر عامری	۰/۰۰۴-۰/۰۰۷۶	۰/۰۱-۰/۰۳۳	۰/۰۴۴-۰/۰۶۱



شکل۳. فعالیت EROD (A) (pmol min-1 mg-1 protein)، GST (B) (nmol min-1 mg-1 protein) و CAT (mmol min-1 mg-1 protein) در نمونه‌های سه منطقهٔ خور سلطانی، جزیرهٔ شیف و بندر عامری (means±SE) (n=۱۵). * نشان‌دهندهٔ تفاوت معنادار بین دو ایستگاه در P<۰/۰۵

۴. بحث و نتیجه‌گیری

۱.۴. بحث

CYP1A در آبشش می‌تواند در سلول‌های pillar و سلول‌های تنفسی (respiratory cell) تحریک شود. به‌علاوه فعالیت EROD به‌طور معمول در کبد به‌عنوان عضو منبع این آنزیم و آنزیم‌های مسئول در دفع سمیت سنجیده شده و داده‌های قابل اعتمادی ارائه

داده است. اما آبشش ظرفیت بیوترانسفورماسیون کمتری در میلی‌گرم پروتئین نسبت به کبد - جایی که سطح CYP1A عموماً در آن آنالیز می‌شود- دارد. نرخ انتشار که در آبشش انجام می‌شود بالاست و به همین سبب این اندام اغلب تمام خروجی کاردیاک را دریافت می‌کند. درحالی‌که کبد بخشی از جریان و گردش سیستمیک خون است که در آبشش‌ها حرکت می‌کند و تنها بخشی از خروجی کاردیاک را دریافت می‌کند (Abrahamson, 2007).

افزایش معنادار فعالیت EROD در منطقهٔ خور سلطانی نشان‌دهندهٔ تحریک شدید CYP1A توسط PAHs است. ماهیان بالغ زنوبیوتیک‌ها را از طریق آبشش یا gastrointestinal می‌گیرند(Abrahamson, 2007). تفاوت در میزان و سطح فعالیت آنزیم در کبد و آبشش وابسته به میزان پروتئین CYP1A در این بافت‌هاست چراکه کبد به‌عنوان عضو اصلی برای متابولیزم در ماهیان است و حاوی مقادیر بالای آنزیم‌هاست. همچنین افزایش معنادار فعالیت EROD در آبشش مستقیماً مربوط به مواجههٔ ماهی و واکنش آن به انتقال PAHs از طریق آبشش‌ها و چرخش آن است. ولی نتایج نشان‌دهندهٔ اثر ظرفیت بافت اختصاصی متابولیزم‌کننده PAHs است تا سیستم گردش آن (Nahrgang *et al*., 2010b).

مطالعات متعددی تحریک CYP1A را در کبد ماهیان تصدیق کرده‌اند (Ortiz Delgedo *et al*., 2008) و نتایج مطالعهٔ حاضر مشابه مطالعاتی چون Jonsson و همکاران (2003) تصدیق کردند که سنجش EROD در آبشش ماهیان و دیگر گونه‌های دریایی نیز بایومارکر مناسبی است. به‌طور معمول مطالعات نشان داده‌اند که فعالیت آنزیم‌های انتخابی در کبد بیشتر از آبشش است (Nahrgang *et al*., 2010b; Ortiz Delgado *et al*., 2008، Otte *et al*., 2008; Na *et al*., 2009; Anderson *et al*., 2007)، که مربوط به ظرفیت متابولیک این عضو است اما اگرچه نرخ کاتالیتیک CYP1A در آبشش نسبت به کبد پایین‌تر است، اما نرخ مواجهه آبشش در مقایسه با کبد همچنان از لحاظ لایهٔ اپیتلیوم برانشی به‌عنوان محل قابل ملاحظه‌ای برای بیوترانسفورماسیون بالاتر است که به‌طور ذاتی گردش متابولیک زنوبیوتیک را در این عضو افزایش می‌دهد (Ortiz Delgado *et al*., 2008). برداشت محرکین CYP1A در کبد به‌آرامی انجام می‌شود چراکه جذب و متابولیسم محرکین در بافت‌های خارج از کبد صورت گرفته است. بنابراین، سرعت تحریک آبشش بالاتر اما میزان فعالیت آنزیم در کبد بیشتر است (Jonsson *et al*., 2006).

به‌طورکلی، سنجش فعالیت EROD در ماهیان اندیکاتوری بسیار حساس است که به‌طور موفقیت‌آمیزی در بسیاری مطالعات برای سنجش خطر محیطی ناشی از آلاینده‌ها استفاده شده است (Otte *et al*., 2008) به‌علاوه نتایج این مطالعه نشان‌دهندهٔ قابلیت بایومارکر فعالیت EROD در آبشش برای نمایش میزان مواجهه موجودات با آلاینده‌های نفتی بود گرچه کبد عضو حساس و همچنان قابل اطمینان است (Shirani *et al*., 2012). همچنین این سنجش در گونه‌های متفاوت ماهیان استفاده شده است و فعالیت EROD آبشش را به‌عنوان بایومارکر حساس و قوی برای پایش مجادلهٔ گیرنده‌های آریل هیدروکربن AhR در اکوسیستم‌های دریایی، خورها و آب شیرین تصدیق کرده است (Abrahamson *et al*., 2008).

پاسخ‌های مشابه GST به‌عنوان بایومارکرهای واسط استرس اکسیداتیو هستند که اطلاعات ارزشمندی را از وضعیت محیط ارائه می‌کنند (Oliveira *et al*., 2009). فعالیت زیاد آنزیم GST اغلب به‌سبب افزایش بایوترانسفورماسیون در فاز II است. دفع سمیت زنوبیوتیک‌ها و متابولیت‌های آنان یکی از عملکردهای اصلی گلوتاتیون احیاشده (GSH) است. این ترکیبات الکتروفیل با GSH به صورت خودبه‌خودی یا آنزیمی در واکنش‌های کاتالیزی به‌وسیلهٔ GST اتصال می‌یابند که این فرم اتصالی اغلب از سلول دفع یا به‌عنوان محصول فاز II وارد واکنش بعدی می‌شود (Oliveira *et al*., 2009 ; Mahmud farid *et al*., 2009) و توسط آنزیم‌هایی چون پپتیدازها، هیدرولازها و B-lyaseها کاتابولیزم شده و متابولیت‌های اتصالی فاز II را به فرم ساده و قابل دفع کاتابولیزم می‌کند. از آنجا که کاتالاز یک آنزیم آنتی‌اکسیدانی است و در پروکسی زوم‌های اغلب سلول‌ها حضور دارد و در متابولیسم اسیدهای چرب درگیر است، تفسیر علل تغییر میزان فعالیت آن اغلب دشوار است (van der Oost *et al*., 2003)

به‌علاوه اغلب مطالعات نتوانسته‌اند ارتباط معناداری میان تغییرات آن در مواجهه با آلاینده‌ها نشان دهند (van der Oost *et al*., 2003; Baussant *et al*., 2009; Nahrgang *et al*., 2010a)، گرچه برخی چون Martinez-Gomez و همکاران (2006) افزایش فعالیت آن را در مواجهه با آلاینده‌های نفتی مشاهده کردند.

۲.۴. نتیجه‌گیری

درنهایت باید اشاره کرد که آلودگی اکوسیستم‌های آبی با PAHs اهمیت اکولوژیک بالایی دارد. اگرچه اکثر موارد استفاده از هیدروکربن‌ها در خشکی است اما محیط‌های آبی آخرین گیرندهٔ این نوع آلاینده‌ها هستند و همهٔ گیاهان و موجوداتی که در این محیط ها زندگی می‌کنند تحت اثر این مواد هستند لذا نیاز به پایش مداوم دارند. سیستم Cyt P450 و GSTs در همهٔ یوکاریوت‌ها نقش کلیدی در دفع سمیت (مونوکسیژناسیون و اتصال) مواد شیمیایی خارجی چربی‌دوست مثل PAHs و PCBs ایفا می‌کنند گرچه تفاوت‌های اساسی در فعالیت مونوکسیژناز یا ترانسفراز و تعداد ایزوآنزیم ها در ارگانیزم‌های دریایی گزارش شده است که به زیستگاه، میزان آلودگی و. .. وابسته بوده است (Porte *et al*., 2000) و بایستی در تفسیر و تحلیل نتایج مورد توجه قرار گیرد. نتایج این بررسی نشان‌دهندهٔ حساسیت فعالیت EROD و GST در بافت آبشش ماهی گل‌خورک بود گرچه میزان فعالیت در کبد می‌تواند بیشتر به واقعیت میزان مواجهه نزدیک باشد. به‌علاوه آنزیم کاتالاز تفاوت خاصی را نشان نداد. همچنین گونهٔ گل‌خورک توان ارزیابی اثر آلایندهٔ نفتی را در محیط داشته و پاسخ بایومارکر سنجش‌شده در آن می‌تواند تصدیق شود. با توجه به نتایج، خور سلطانی بار آلودگی بالاتر دارد و منطقهٔ بندر عامری و جزیرهٔ شیف تحت فشار کمتری از طریق آلاینده‌های نفتی هستند.

سپاسگزاری

از زحمات بی‌دریغ سرکار خانم مهندس مریم بعیری و سایر کارشناسان محترم مرکز تحقیقات علوم دارویی دانشکدهٔ داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران و کارشناسان دانشکدهٔ منابع طبیعی دانشگاه تهران سپاسگزاری و از راهنمایی‌های ارزنده پروفسور پیتر هودسون، دکتر جاستینا پیلارکزیک و دکتر علی علیزاده قدردانی می‌شود.

REFERENCES

1. Abrahamson, A., Brandt, I., Brunström, B., Sundt, R. C., Jørgensen, E. H., 2008. Monitoring contaminants from oil production at sea by measuring gill EROD activity in Atlantic cod (Gadus morhua). Environmental Pollution, 153: 169-175.
2. Abrahamson, A., 2007. Gill EROD activity in fish a biomarker for waterborne Ah-receptor agonists. Uppsala University, PhD thesis.
3. Al-Behbehani, B.E., Ebrahim, H.M.A. 2010. Environmental studies on the mudskippers in the intertidal zone of Kuwait Bay. Nature and Science, 8(5): 79-89.
4. Andersson, C., Katsiadaki, I., Lundstedt-Enkel, K., Orberg, J., 2007. Effects of 17α-ethynylestradiol on EROD activity, spiggin and vitellogenin in three-spined stickleback (Gasterosteous aculeatus). Aquatic Toxicology, 83: 33-42.
5. Anyakora, C., Ogbeche, A., Palmer, P., Coker, H., Ukpo, G., Ogah, C., 2005. GC/MS analysis of polynuclear aromatic hydrocarbons in sediment samples from the Niger Delta region. Chemosphere, 60:990-997.
6. Baussant, T., Bechmann, R. K., Taban, I. C., Larsen, B. K., Tandberg, A. H., Bjørnstad, A., Torgrimsen, S., Navdal, A., Oysed, K. B., Jonsson, G., Sanni, S., 2009. Enzymatic and cellular responses in relation to body burden of PAHs in bivalve molluscs: A case study with chronic levels of North Sea and Barents Sea dispersed oil. Marine Pollution Bulletin, 58: 1796-1807.
7. Della Torre, C., Corsi, I., Nardi, F., Perra, G., Tomasino, M.P., Focardi, S., 2010. Transcriptional and post-transcriptional response of drug-metabolizing enzymes to PAHs contaminationin red mullet (Mullus barbatus, Linnaeus, 1758): A field study. Marine Environmental Research, 70:95-101.
8. Fossi, M.C., Casini, S., Savelli, C., Corbelli, C., Franchi, E., Mattei, N., Sanchez-Hernandez, J.C., Corsi, I., Bamber, S., Depledge, M. H., 2000.

Biomarker responses at different levels of biological organisation in crabs (Carcinus aestuarii) experimentally exposed to benzo(a)pyrene. Chemosphere, 40: 861-874.

9. Gonzalez, J.F., Reimschuessel, R., Shaikh, B., Kane, A.S., 2009. Kinetics of hepatic phase I and II biotransformation reactions in eight finfish species. Marine Environmental Research, 67:183-188.

10. Halldorson, H.P., De Pirro, M., Romano, C., Svavarsson, J. and Sara, G., 2008. Immediate biomarker responses to benzo(a)pyrene in polluted and unpolluted populations of the blue mussel (Mytilus edulis L.) at high-latitudes. Environment International, 34:483-489.

11. Hosseini, S.T., Farjami, H., Mohammadi S.S., Mahmoudi M., 2010. Modeling pollutant prevasion in Bushehr Bay with Coherens numeral model. 14th Iran Geophysics Conference. Tehran, Iran, 127-130.

12. Jonsson, E.M., Abrahamson, A., Brunstrom, B., Brandt, I., 2006. Cytochrome P4501A induction in rainbow trout gills and liver following exposure to waterborne indigo, benzo[a]pyrene and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl. Aquatic Toxicology, 79:226-232.

13. Jonsson, M., Abrahamson, A., Brunstrom, B., Brandt, I., Ingebrigtsen, K., Jorgensen, E.H., 2003. EROD activity in gill filaments of anadromous and marine fish as a biomarker of dioxin-like pollutants. Comparative Biochemistry and Physiology Part C. 136: 235-243.

14. Karam, D., 1998. Glutathione S-transferase: an enzyme for chemical defense in plants. http://www.colostate.edu/Depts/Entomology/Courses/en570/papers-1998/karam.htm.

15. Mahmoud Farid, N., Hamed, R.R., Shokeer, A.G., 2009. Glutathione and its related enzymes in Fasciola snails (Lymnaea natalensis): Purification and characterization of Glutathione transferase. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 5(4):317-325.

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

17. Na, N., Guo, H., Zhang, S., Li, Z., Yin, L., 2009. In vitro and in vivo acute toxiciciy of fenpyroximate to flounder Paralichthys olivaceus and its gill cell line FG. Aquatic Toxicology, 92: 76-85.

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

19. Nahrgang, J., Jonsson, M., Camus, L., 2010 (b). EROD activity in liver and gills of polar cod (Boreogadus saida) exposed to waterborne and dietary crude oil. Marine Environmental Research, 70:120-123.

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

21. Oliveira, M., Maria, V. L., Ahmad, I., Serafim, A., Bebianno, M. J., Pacheco, M., 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. Environmental Pollution, 157: 959-967.

22. Ortiz-Delgado, J.B., Behrens, A., Segner, H., Sarasquete, C., 2008. Tissue-specific induction of EROD activity and CYP1A protein in Sparus aurata exposed to B(a)P and TCDD. Ecotoxicology and Environmental Safety, 69: 80-88.

23. Otte, J.C., Andersson, C., Abrahamson, A., Olsman, H., Keiter, S., Engwall, M., Hollert, H., Brunstorm, B., 2008. A bioassay approach to determine the dioxin-like activity in sediment extracts from the Danube River: Ethoxyresorufin-O-deethylase induction in gill filaments and liver of three-spined sticklebacks (Gasterosteus aculeatus L.). Environmental International, 34: 1176-1184.

24. Porte, C., Escartin, E., Garcia, L.M., Sole, M., Albaiges, J., 2000. Xenobiotic metabolizing enzymes and antioxidant defences in deep-sea fish: relationship with contaminant body burden. Marine Ecology Progress Series, 192: 259-266.

25. Ravi, V., Rajagopal, S., 2007. Age and growth of the mudskipper Beleophthalmus boddarti (Pallas, 1770). J. Aquatic Biol, 22(1): 123-128.

26. Sanchez-Hernandez, J.C., Fossi, M.C., Leonzio, C., Focardi, S., 1998. Use of biochemical biomarkers as a screening tool to focus the chemical monitoring of organic pollutants in the Bibio river basine (Chile). Chemosphere, 37(4):699-710.

27. Shirani, M., Mirvaghefi, A.R., Farahmand, H., Abdollahi, M., 2012. Assessing the antioxidant enzymes activity as biomarkers of oil pollution in mudskipper (*Periophthalmus waltoni*) from Bushehr coastal area (Persian Gulf). Journal of Animal Environment, 3(4): 63-72.

28. Tatina, M., 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, 92-105.

29. van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in

environmental risk assessment: a review. Environmental Toxicology and Pharmacology, 13: 57-149.

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

31. Whyte, J.J., Jung, R.E., Schmitt, C.J. and Tillitt, D.E., 2000. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure: Critical Reviews in Toxicology, 30(4): 347-570.

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