علوم و تکنولوژی محیط زیست ، دوره هفدهم، شماره یک ، بهار ۹۴

ارتباط بین در معرض‌گذاری آزمایشگاهی به نفت خام و پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی بارناکل‌های *Tetraclita rufotincta*

مژگان امتیازجو [۱]
لیدا سلیمی [۲]
مجید زینلی [۳]
بهار شهابی [۴]
مریم قاسم‌پورملکی [۵*]
Maryam_ghasempoor@yahoo.com

تاریخ دریافت:۸۸/۵/۱۲ **تاریخ پذیرش:۸۸/۹/۲۵**

چکیده

زمینه و هدف: امروزه اثرات مخرب آلودگی‌های نفتی حاصل از منابع مختلف در آب‌ها و نیز آب‌زیان شناسایی و مشخص گردیده است. به‌منظور بررسی اثرات نفت خام در غلظت‌های متفاوت، بر تغییرات سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی(کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز) در بارناکل *Tetraclita rufotincta* و امکان معرفی این آنزیم‌ها به‌عنوان بیومارکرهای زیستی.

روش: بارناکل‌های *Tetraclita rufotincta* جمع‌آوری شده از منطقه نفتی بهرگان در معرض دوزهای نفتی ppb ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵، ۱۵/۶۲۵و۳ppb به‌عنوان شاهد قرار گرفتند. در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸، ۷۲و ۹۶ ساعت، به‌طور متوسط تعداد ۱۵ بارناکل از آکواریوم‌ها خارج، و برای تعیین سنجش میزان آنزیم‌های کاتالاز(CAT) و سوپراکسید دیسموتاز(SOD) مورد آزمایش قرار گرفتند.

نتایج: این مطالعه نشان داد که در آکواریوم۱، با غلظتppb ۳ در طی دوره‌های زمانی ۲۴، ۴۸، ۷۲و ۹۶ ساعت فعالیت آنزیم SOD به‌ترتیب ۱۲۸/۹۸، ۳۰/۰۴، ۷۵/۸، U/ml/mg protein ۶۲/۰۵ می‌باشد. در آکواریوم۲ و ۳، با غلظتppb ۱۵/۶۲۵ و ppb ۳۱/۲۵ در طی دوره‌های زمانی ذکر شده فعالیت آنزیم SOD به‌ترتیب ۱۰۴/۴۵، ۷۴/۹۵، ۱۳/۵۷، U/ml/mg protein ۱۰۹ و ۶۹/۹۶، ۶۱/۵۶،

۱- استادیار، PhD، بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران – شمال، دانشکده علوم و فنون دریایی
۲- مربی، PhD، آلودگی محیط زیست، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران- شمال، دانشکده شیمی
۳- پژوهشگر، PhD، بیوشیمی، پژوهشکده شرکت نفت، پژوهشکده حفاظت صنعتی محیط زیست
۴- شرکت نفت فلات قاره ایران
۵- کارشناسی ارشد، بیولوژی دریا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران – شمال، دانشکده علوم و فنون دریایی *(مسئول مکاتبات)

۶۰/۵، ۸۶/۴۶ U/ml/mg protein ثبت گردید. در آکواریوم ۴ و ۵، با غلظتppb ۶۲/۵ و ppb۱۲۵ در طی دوره‌های زمانی یاد شده فعالیت آنزیم SOD به‌ترتیب ۹۸/۷۹، ۱۹۳/۹، ۴۲/۷۵، U/ml/mg protein ۱۲۴/۷۷ و ۶۹/۲۲، ۴۰/۰۸، ۸۶/ ۸۱، U/ml/mg protein ۵۹/۹۵ ثبت گردید. در آکواریوم۶، با غلظتppb ۲۵۰ در طی دوره‌های زمانی مذکور فعالیت آنزیم SOD به‌ترتیب۶۲/۱۱، ۸۷/۱، ۲۰/۷۱، U/ml/mg protein ۹۳/۴۷ ثبت گردید.

نتایج همچنین نشان داد که در آکواریوم۱، با غلظتppb ۳ در طی دوره‌های زمانی ۲۴، ۴۸، ۷۲و ۹۶ ساعت فعالیت آنزیم CAT به‌ترتیب ۱۳/۲۹، ۱۵/۳۱، ۱۵/۵، nmol/min/ml/mg protein ۱۶/۲۵ می‌باشد. در آکواریوم۲ و ۳، با غلظتppb ۱۵/۶۲۵ و ppb ۳۱/۲۵ در طی دوره‌های زمانی یاد شده فعالیت آنزیم CAT به‌ترتیب ۱۳/۰۳، ۱۶/۷۴، ۱۳/۶۵، nmol/min/ml/mg protein ۱۳/۶۱ و ۱۱/۴۶، ۱۶/۵۴، ۱۵/۷، nmol/min/ml/mg protein ۱۳/۵۸ ثبت گردید. در آکواریوم۴ و ۵، با غلظت ppb ۶۲/۵ و ppb۱۲۵ در طی دوره‌های زمانی یاد شده فعالیت آنزیم CAT به‌ترتیب۱۸/۷۴، ۱۱/۸۶، ۱۱/۹۱، nmol/min/ml/mg protein ۱۶/۲۲ و ۲۱/۱، ۱۵/۸، ۱۵/۰۴، nmol/min/ml/mg protein ۳۹/۲۲ ثبت گردید. در آکواریوم۶، با غلظتppb ۲۵۰ در طی دوره‌های زمانی یاد شده فعالیت آنزیم CAT به‌ترتیب ۱۵/۵۴، ۱۸/۸، ۱۵/۸۱، nmol/min/ml/mg protein ۱۵/۹۷ ثبت گردید.

نتیجه‌گیری: همبستگی بین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز(SOD) و غلظت‌های مختلف نفت خام، در طول مدت در معرض‌گذاری به نفت خام وجود ندارد. همچنین مشخص شد که آنزیم CAT پارامتر حساس‌تری نسبت به SOD می‌باشد و می‌تواند بیومارکر مفیدی برای ارزیابی آلودگی در اکوسیستم‌های آبی در بارناکل‌های *Tetraclita rufotincta* باشد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم، کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، نفت خام، بارناکل *Tetraclita rufotincta*، شرایط آزمایشگاه.

مقدمه

تأثیر فعالیت‌های انسانی روی محیط‌های دریایی در حال پیش‌روی است(۱). انواع زیادی از آلاینده‌ها در جهان امروز وجود دارند که موجب آلودگی اکوسیستم های گوناگون می‌گردند. این مواد سمی به طرق مختلف وارد آب شده و آن را آلوده می‌سازند(۲). این آلودگی‌ها توسط حیوانات بومی گرفته می‌شوند و سرانجام وجود آن‌ها را به مخاطره می‌اندازند. آشکارسازی تأثیرات پنهانی و کشنده این قبیل آلودگی‌ها روی موجودات مصب‌ها و دریاها در سطوح جامعه و جمعیتی موجودات زیستی اغلب حیرت‌آور است(۱). بسیاری از ترکیبات اگزوژن Exogen (ترکیباتی که از محیط خارج وارد یک اکوسیستم می‌شوند) که به‌عنوان زنوبیوتیک Xenobiotic نیز شناخته شده‌اند، سمی می‌باشند. این ترکیبات قادرند فعالیت‌های حیاتی موجودات زنده را مختل نموده و محیط زیست آبی را در معرض تهدید قرار دهند(۳). یکی از آلودگی‌های محیطی نفت و مشتقات آن به‌ویژه هیدروکربن‌های آروماتیک PAHs است(۴). برخی از هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه ای (PAHs) به‌عنوان عوامل سرطان‌زا شناخته شده‌اند(۵). موجودات زنده به حضور این آلاینده‌ها در اکوسیستم عکس‌العمل نشان می‌دهند. چنانچه واکنش موجودات و جمعیت‌ها در یک اکوسیستم آبی به این قبیل عوامل استرس‌زا توأم با تغییر در برخی از پارامترهای بیوشیمیایی، فیزیولوژی و یا هیستوپاتولوژی باشد، اصطلاح بیومارکر برای آن به‌کار برده می‌شود(۶). به‌کارگیری بیومارکرها به‌عنوان یک روش اساسی در سنجش سلامت اکوسیستم به‌حساب می‌آید و منجر به کشف سریع تغییرات زیستی می‌شود(۳). ساز و کار سم‌زدایی آلودگی‌های آلی در بدن موجودات زنده، شامل وارد شدن یک مجموعه آنزیمی اصلی ضمیمه شده به فازI (واکنش های اصلی) و فاز II (واکنش‌های توام) انتقال زیستی می‌باشد(۷). ارگانیسم‌های آبی، زنوبیوتیک‌های آلی را به‌وسیله فاز I متابولیسم می‌کنند و منجر به تولید رادیکال‌های آزاد واکنشی (ROS) Reactive oxygen species می‌گردند(۸). هیدروکربن‌ها و سایر

ترکیبات حاصل از متابولیت آن‌ها تولید ROS می‌کنند. در نهایت توسط چند فرایند مختلف نظیر اکسید شدن پروتئین، پراکسید شدن چربی و صدمه دیدن DNA، باعث افزایش آسیب سلولی می‌شوند. برای جلوگیری از چنین صدمه‌هایی سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی برای حذف و برطرف نمودن تحریکات ROS فعال می‌شود. در این وضعیت، موجود این امکان را می‌یابد که استرس‌های اکسیداسیونی در محیط‌های آلوده را تحمل نموده و بر آن‌ها غلبه کند(۹-۱۱). بخشی از پاسخ های فیزیولوژیکی موجودات در مواجهه با این نوع مواد آلاینده شیمیایی به این صورت است که موجود ساز و کارهای دفاعی خود نظیر تولید آنتی‌اکسیدان‌ها و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را افزایش و توسعه می‌دهد(۱۲). احیای رادیکال‌های سوپراکسید به‌وسیله آنزیم سوپراکسید دیسموتاز(SOD) و پراکسید هیدروژن به‌وسیله CAT از شکل‌گیری واسطه‌های تشکیل رادیکال از طریق ساز و کار احیای اکسیژن جلوگیری می‌نماید(۹). SOD و CAT به‌عنوان اولین سری دفاعی آنتی‌اکسیدانی به افزایش سطوح آلودگی که تحریک‌کننده تولید ROS است، حساس می‌باشند (۹،۱۳،۱۴). مقدار آسیب زیستی که رادیکال‌های اکسیژن آزاد شده می‌گذارند، به توان دفاعی آنتی‌اکسیدانی بستگی دارد. بنابراین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نقش حیاتی و مهمی را در حفظ هوموستازی سلول بازی می‌کنند(۹). واکنش تحریک‌پذیری آنتی‌اکسیدان‌ها یک پاسخ ویژه نسبت به آلاینده‌ها محسوب می‌شود. بر این اساس آن‌ها به‌عنوان بیومارکرهای زیستی مواد آلاینده ایجادکننده استرس‌های اکسیداسیونی در بسیاری از موجودات زنده دریایی، ازجمله ماسل ها، مطرح و معرفی شده‌اند(۱۱). در این وضعیت اکثریت کارها بر روی نرم‌تنان دوکفه‌ای، مخصوصاً ماسل‌ها و اویسترها متمرکز شده است، ولی اطلاعات کمی در مورد وجود این سیستم‌ها در سخت‌پوستان دریایی مثل بارناکل‌ها وجود دارد. فراوانی، چسبیدن به بستر و هرمافرودیت بودن آن‌ها، باعث می‌شود که این موجودات امکان خوبی برای این مطالعات به‌شمار روند(۱). بارناکل‌ها دارای توانایی عمومی برای تجمع دادن زیستی و تغلیظ اغلب آلاینده‌ها، در بدن خود بوده و همچنین قادرند تا اندازه‌ای، مقادیری از این آلودگی‌ها را تحمل کرده و نسبت به آن مقاومت نشان دهند. بنابراین شناخت مقادیر تجمع یافته آلاینده‌ها در آن‌ها از موضوعات مهم مربوط به سلامتی انسانی است(۶). رویکرد استفاده از مارکرهای زیستی که به‌تازگی در مجموعه حفظ محیط زیست قرار گرفته است، از اهمیت به‌سزایی برخوردار است به این منظور از آنتی اکسیدان‌ها در این مورد برای به صدا در آوردن زنگ خطر محیطی می‌توان استفاده کرد. بررسی‌های انجام یافته گویای وجود این پتانسیل بالقوه می‌باشد(۱ و ۱۶-۱۴). سنجش‌های یک پارچه سطوح آلودگی‌های شیمیایی و پاسخ‌های بیومارکری به‌طور ممتد در بازبینی‌های آلودگی در محیط‌های دریایی در سال‌های اخیر به‌کار گرفته می‌شوند. هدف از این پژوهش، تعیین تأثیرات آلودگی نفتی بر سیستم آنتی‌اکسیدانی بارناکل‌ها و بررسی امکان معرفی این آنزیم‌ها به‌عنوان بیومارکر می‌باشد.

مواد و روش کار

۱- زمان و مکان تحقیق

نمونه‌برداری از بارناکل‌ها طی سفر به منطقه نفتی بهرگان (واقع در استان بوشهر) در آذر ماه ۱۳۸۷ و از پایه‌های سکوی نفتی نوروز صورت پذیرفت. نمونه‌ها توسط ضربات آرام وارد شده بر قلم از پایه‌های سکو جدا شده و به‌همراه آب منطقه در یخدان توسط هلیکوپتر به آزمایشگاه شرکت نفت فلات قاره بهرگان انتقال یافتند. سپس، نمونه‌ها درون بسته‌های غیر قابل نفوذی که با چند لایه تنظیف و آب منطقه از قبل آماده شده بود، قرار گرفت. پس از هوادهی درب ظروف کاملاً بسته شد و داخل یخدان قرار گرفت و توسط هواپیما به تهران انتقال یافت(۱۷،۱۸).

۲- شناسایی بارناکل

بارناکل‌های مورد آزمایش با توجه به تعداد، اشکال و موقعیت قرارگیری صفحات آهکی دیواره‌ای و همچنین وضعیت

tergum و scutum، از جنس و گونه *Tetraclita rufotincta* شناسایی گردیدند(۲۱-۱۹).

۳- انتقال و تطابق

پس از انتقال بارناکل‌ها به تهران، بلافاصله نمونه‌ها درون آکواریوم‌هایی که از قبل کاملاً شستشو و حجم‌سنجی شده و با حجم مساوی از آب پر شده بودند، قرار گرفتند. تعداد بارناکل‌ها در هر آکواریوم مساوی انتخاب شد(۱۰). حداکثر تراکم بارناکل‌ها در هر آکواریوم به‌حدی بود، تا ضایعات و استرس‌های احتمالی را به حداقل برساند و فضولات ناشی از اعمال متابولیکی باعث بروز عوارض در موجودات و کیفیت آب نشود که با توجه به حجم بالای آکواریوم‌ها به‌طور متوسط برای هر آکواریوم تعداد ۱۳۰ بارناکل در نظر گرفته شد(۲۲). آب آکواریوم‌ها در طول مدت آزمایش تعویض نشد و تغذیه نیز صورت نگرفت. بارناکل‌ها به مدت ۷۲ ساعت با شرایط آزمایشگاه سازگار شدند و سپس دوزهای نفتی به آکواریوم‌ها اضافه گردید(۱۰).

۴- شرایط آزمایشگاه

رطوبت اتاق آکواریوم ها توسط دستگاه بخور تأمین می‌شد. میزان دمای اتاق در ۲± ۲۰ درجه سانتی‌گراد. میزان pH آب ۷/۱ و شوری آب ۲۴ppt بود (شوری آب منطقه نمونه‌برداری ۲۷ppt اندازه‌گیری شد که برای ایجاد هماهنگی آداپتاسیون به مدت ۷۲ ساعت در محیط آزمایشگاه صورت گرفت). نسبت روشنایی به تاریکی ۱۲/۱۲ در نظر گرفته شد(۱۰).

۵- شرح عملیات در معرض‌گذاری

پس از انقضای دوره آداپتاسیون بارناکل‌ها(۱۰)، نفت خام منطقه نفتی بهرگان به‌میزان ۲۵۰ppb، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵، ۱۵/۶۲۵و ۳ppb به‌عنوان شاهد(۲۳)، به آکواریوم‌ها اضافه شد. از زمان انتقال بارناکل‌ها به آکواریوم‌های حاوی دوزهای نفتی، هر ۲۴، ۴۸، ۷۲و ۹۶ ساعت(۱۰)، از هر دوز نفتی و آکواریوم تکرار آن ۱۵ بارناکل خارج، درون فویل‌های آلومینیومی قرار گرفته و پس از کدگذاری بلافاصله به فریزر منتقل شد. این بارناکل‌ها برای تعیین تغییرات آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز مورد آزمایش قرار گرفتند(۱۰).

۶- سنجش آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

سنجش آنزیم کاتالاز بر طبق روش کیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز انجام یافت(۲۴).

۷- سنجش آنزیم کاتالاز

سنجش آنزیم کاتالاز بر طبق روش کیت آنزیم کاتالاز انجام یافت(۲۵).

۸- آمار و پردازش

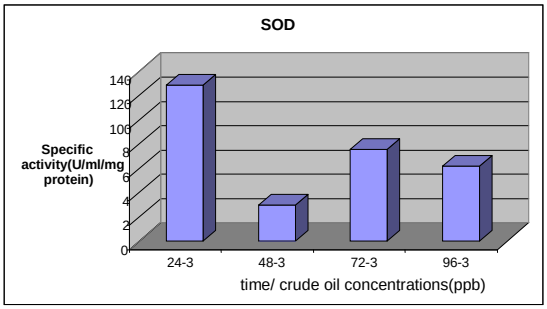
برای تحلیل داده‌ها از آنالیز واریانس یک‌طرفه و برای مقایسه نتایج از ضریب همبستگی در نرم افزار SPSS 16.0 استفاده شد(۸،۱۰،۱۴) رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار EXCEL انجام گرفت.

یافته‌های تحقیق

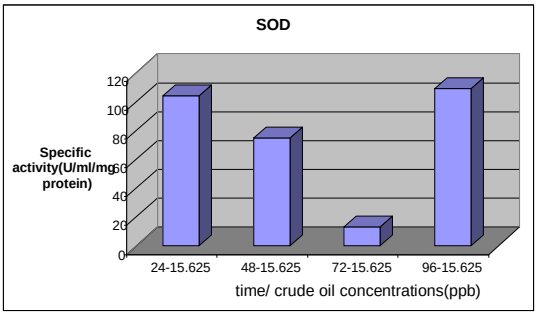
در آکواریوم شاهد شماره ۱ که دارای نفت خامی با غلظت ۳ppb بود، در دوره زمانی ۲۴ ساعت، فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز ۱۲۸/۹۸ U/ml/ mg protein بوده است که نسبت به دوره‌های زمانی ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت، دارای بیش‌ترین فعالیت می‌باشد. بعد از طی ۴۸ ساعت فعالیت این آنزیم کاهش یافته و به ۳۰/۰۴ U/ml/ mg protein رسیده است. در دوره زمانی ۴۸ تا ۷۲ ساعت، یک روند افزایشی در فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در آکواریوم شاهد مشاهده شده است که مجدداً با افزایش دوره زمانی و رسیدن به ۹۶ ساعت، کاهش کمی در فعالیت این آنزیم ایجاد و به U/ml/ mg protein ۶۲/۰۵ رسیده است که این میزان نیمی از فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در ۲۴ ساعت اولیه می‌باشد(نمودار شماره ۱-الف).

در آکواریوم شماره ۲ که در معرض نفت با غلظت ppb ۱۵/۶۲۵ قرار داشت، از۲۴ تا ۷۲ ساعت یک روند کاهشی در فعالیت SOD، به چشم می‌خورد و سپس فعالیت آنزیم به

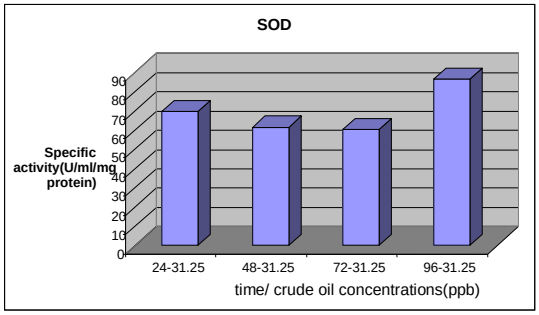
U/ml/ mg protein ۱۰۹ می‌رسد که نزدیک به‌میزان فعالیت آنزیم در ۲۴ ساعت اولیه می‌باشد. میزان فعالیت SOD در دوره‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به‌ترتیب ۱۰۴/۴۵، ۷۴/۹۵ و U/ml/ mg protein ۱۳/۵۷ بوده است، میزان فعالیت ۱۳/۵۷کم‌ترین میزان فعالیت SOD در این آکواریوم و نیز در طول دوره در معرض‌گذاری می‌باشد(نمودارشماره۱- ب). SOD در آکواریوم شماره ۳ که در معرض نفت با غلظت ۳۱/۱۵ppb بود تقریباً یک روند فعالیتی کاهشی را طی دوره‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت داشته و از ۶۹/۹۶ به ۶۱/۵۶ و سپس به U/ml/ mg protein ۶۰/۵ رسیده، بعد از آن در زمان ۹۶ ساعت فعالیت این آنزیم به U/ml/ mg protein ۸۶/۹۶ رسیده است(نمودارشماره۱-ج). بیش‌ترین فعالیت SOD در آکواریوم شماره ۴ که در معرض نفت با غلظت ۶۲/۵ ppb بود، بعد از ۴۸ ساعت مشاهده شد. اگرچه در این آکواریوم در ابتدا میزان فعالیت در ۲۴ ساعت، از ۹۸/۷۹ به U/ml/ mg protein ۱۹۳/۹ در ۴۸ ساعت رسیده و یک روند افزایشی را نشان داده است، اما بعد از ۷۲ ساعت میزان فعالیت به U/ml/ mg protein ۴۲/۷۵ می‌رسد، که تقریباً برابر با نیمی از فعالیت آنزیم در ۲۴ ساعت اولیه در این آکواریوم می‌باشد، سپس یک روند افزایشی فعالیت از ۷۲ساعت به ۹۶ ساعت ایجاد و میزان فعالیت به U/ml/ mg protein ۱۲۴/۷۷ می رسد(نمودارشماره ۱-د). در آکواریوم شماره ۵ که در معرض نفت با غلظت ۱۲۵ppb نفت خام قرار داشت، بعد از ۲۴ ساعت ، فعالیت آنزیم SOD , U/ml/ mg protein ۶۹/۲۲ بود و بعد از آن با طی یک روند کاهشی به U/ml/ mg protein ۴۰/۰۸ در دوره زمانی ۴۸ ساعت رسیده است. بیش‌ترین فعالیت SOD در این آکواریوم در ۷۲ ساعت اتفاق افتاده است و کم‌ترین آن مربوط به ۴۸ ساعت می‌باشد. در انتها فعالیت SOD به U/ml/ mg protein ۵۹/۹۵ رسیده‌است(نمودارشماره ۱- ه). در آکواریوم شماره ۶ با غلظت نفت ppb ۲۵۰، به‌جز در دوره زمانی ۷۲ ساعت با فعالیت U/ml/ mg protein ۲۰/۷۱، یک روند افزایشی به چشم می‌خورد، میزان این فعالیت‌ها در دوره‌های زمانی مشخص شده به‌ترتیب ۶۲/۱۱، ۸۷/۱ و U/ml/ mg protein ۹۳/۴۷ بوده است(نمودار شماره ۱- و).



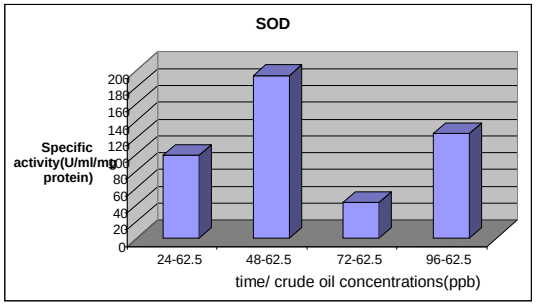
الف.



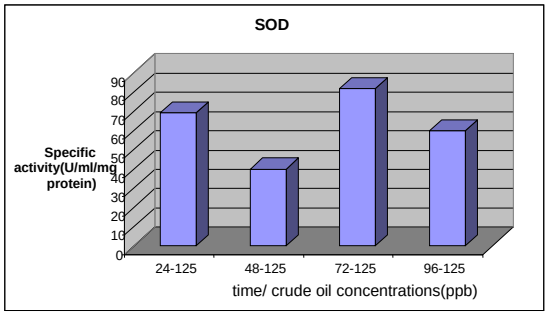
ب.



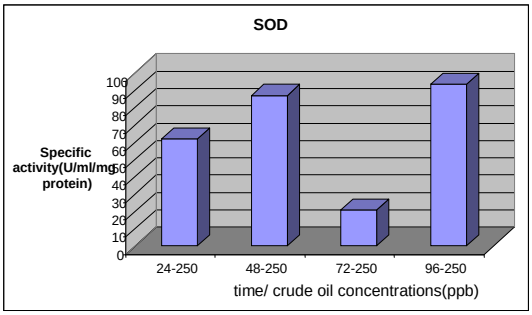
ج.



د.



ه.

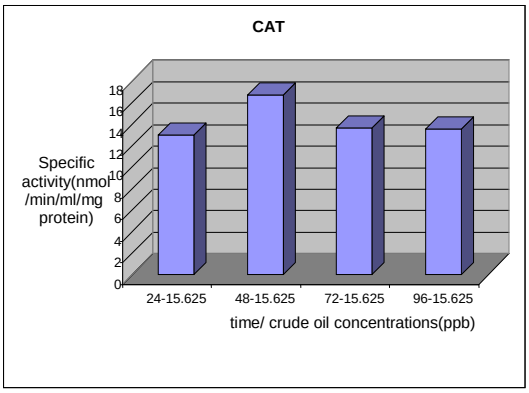


و.

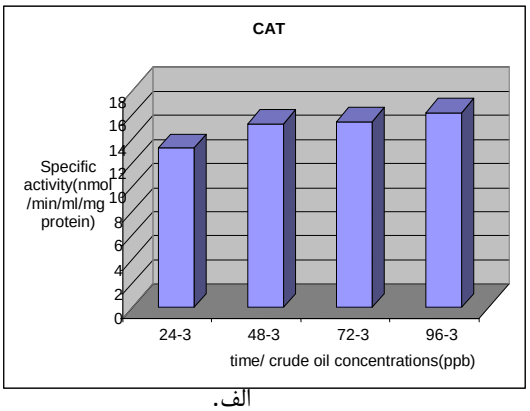
نمودار ۱- فعالیت آنزیم SOD بعد از ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت، به‌ترتیب در آکواریوم‌های با غلظت نفت خام: الف) آکواریوم شماره ۱ (۳ppb)، ب) آکواریوم شماره ۲ (۱۵/۶۲۵ppb)، پ) آکواریوم شماره ۳ (۳۱/۲۵ ppb)، ت) آکواریوم شماره ۴ (۶۲/۵ppb)، ث) آکواریوم شماره ۵ (۱۲۵ppb)، ج) آکواریوم شماره ۶ (۲۵۰ppb)

فعالیت کاتالاز در آکواریوم شماره ۱(شاهد۳ppb) با غلظت ۳ppb نفت خام، با این که در هر دوره زمانی نسبت به دوره زمانی بعدی یک افزایش جزئی را نشان می‌دهد ولی در کل می‌توان گفت فعالیت آنزیم دارای یک روند منطقی بوده‌است. افزایش در فعالیت دوره‌های زمانی آکواریوم شاهد به‌ترتیب ۱۳/۲۹، ۱۵/۳۱، ۱۵/۵ و nmol/min/ml/mg protein ۱۶/۲۵ است (نمودار۲-الف). در آکواریوم شماره ۲(۱۵/۶۲۵ppb)، به‌جز در دوره زمانی ۴۸ ساعت، CAT فعالیت ثابتی را نشان داده است. میزان تفاوت این فعالیت در ۴۸ ساعت در حدود ۳ بوده است. به‌ترتیب دوره‌های زمانی۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ساعت، فعالیت آنزیم CAT ۱۳/۰۳، ۱۶/۷۴، ۱۳/۶۵ و nmol/min/ml/mg protein ۱۳/۶۱ بوده است(نمودار ۲- ب). فعالیت کاتالاز در دوره‌های زمانی آکواریوم شماره ۳(۳۱/۱۵ppb) نیز تقریباً در یک سطح بوده است و از ۱۱/۴۶ nmol/min/ml/mg protein پس از طی ۲۴ ساعت به ۱۶/۵۴ nmol/min/ml/mg protein در ۴۸

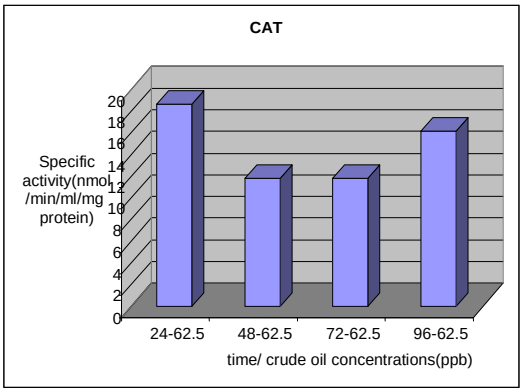
ساعت رسیده است که نشان‌دهنده افزایش در فعالیت CATمی‌باشد، سپس فعالیت این آنزیم یک دوره کاهشی را طی کرده و در ۷۲ و ۹۶ساعت دارای فعالیت‌های ۱۵/۷ و ۱۳/۵۸ nmol/min/ml/mg protein بوده است(نمودارشماره ۲- ج). آنزیم‌هایCAT در آکواریوم شماره ۴ با غلظتppb ۶۲/۵ اگرچه در ۲۴ ساعت اولیه با ۱۸/۷۴ nmol/min/ml/mg protein بیش‌ترین میزان فعالیت را در این آکواریوم به ثبت رسانده‌اند ولی در ادامه، غلظت‌های CAT به ۱۱/۸۶، ۱۱/۹۱ و nmol/min/ml/mg protein ۱۶/۲۲ در زمان‌های ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت رسیده است. می‌توان گفت CAT بعد از طی دوره ۲۴ ساعته یک فعالیت بدون تغییری را در دوره‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت طی کرده است و سپس یک افزایش جزئی در فعالیت این آنزیم در ۹۶ ساعت مشاهده شده است(نمودار ۲- د). بیش‌ترین فعالیت CAT در طول دوره آزمایشی در آکواریوم شماره ۵(۱۲۵ppb)، در دوره زمانی ۹۶ ساعت رخ داده است. اما در دوره‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، شاهد یک روند کاهشی هستیم و فعالیتCAT از ۲۱/۱ بهnmol/min/ml/mg protein ۱۵/۸ و سپس ۱۵/۰۴ nmol/min/ml/mg protein می‌رسد (نمودار ۲- ه). آکواریوم شماره ۶ با بالاترین غلظت نفت خام یعنی ۲۵۰ppb، در همه دوره‌ها به‌جز ۴۸ ساعت، دارای فعالیت مساوی بوده است و در دوره ۴۸ ساعت دارای فعالیت ۱۸/۸ می‌باشد. میزان فعالیتCAT در دوره‌های ۲۴، ۷۲ و ۹۶ ساعت به‌ترتیب ۱۵/۵۴، ۱۵/۸۱ و nmol/min/ml/mg protein ۱۵/۹۷ گزارش شده است(نمودار ۲- و).



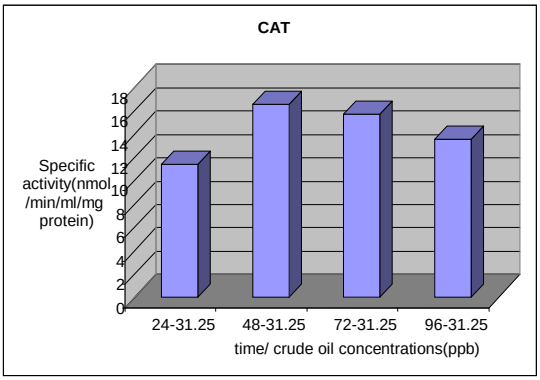
ب.



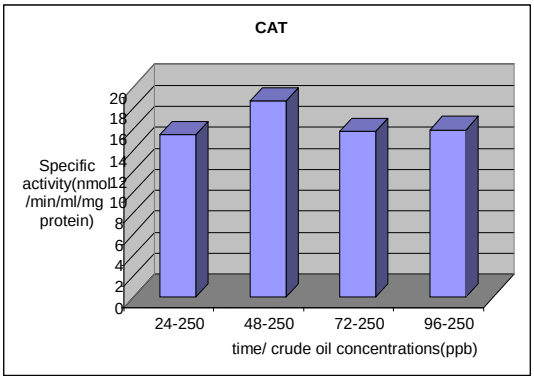
الف.



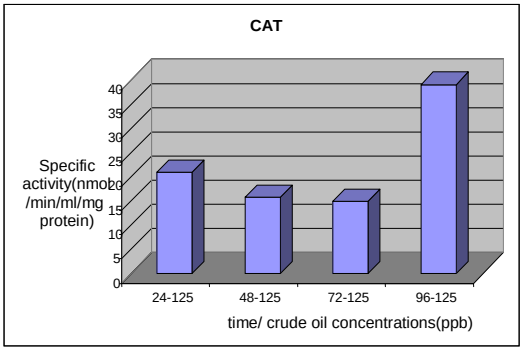
د.



ج.



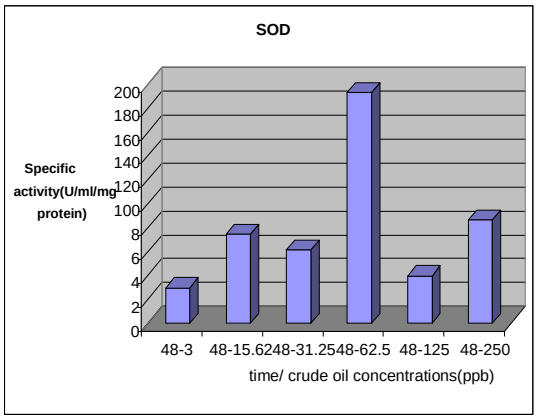
و.



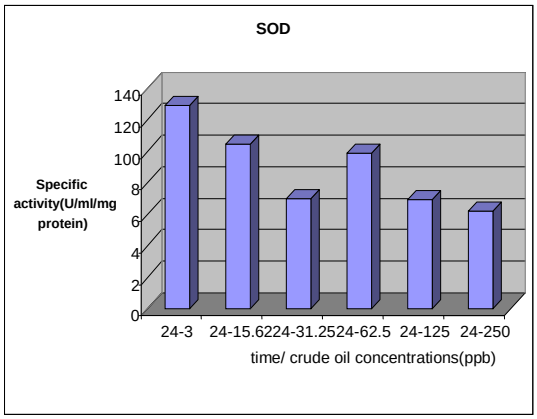
ه.

نمودار ۲- فعالیت آنزیم CAT بعد از ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت، به ترتیب در آکواریوم‌های با غلظت نفت خام: الف) آکواریوم شماره ۱ (۳ppb)، ب) آکواریوم شماره ۲ (۱۵/۶۲۵ppb)، پ) آکواریوم شماره ۳ (۳۱/۲۵ ppb)، ت) آکواریوم شماره ۴ (۶۲/۵ppb)، ث) آکواریوم شماره ۵ (۱۲۵ppb)، ج) آکواریوم شماره ۶ (۲۵۰ppb)

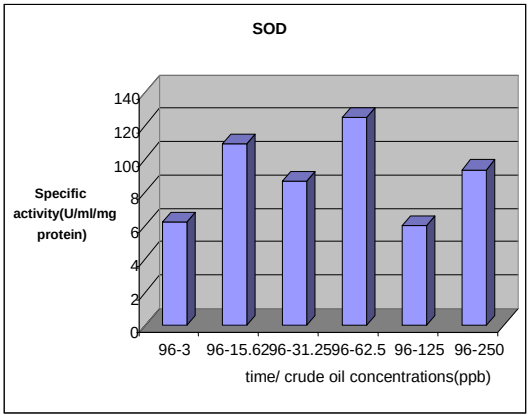
در طول دوره در معرض‌گذاری بارناکل‌ها به غلظت‌های مختلف نفت خام، بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم‌های SOD در دوره ۲۴ ساعته، در غلظت ۳ppb (آکواریوم شاهد) صورت گرفته است (نمودار شماره الف-۳) و در دوره‌های ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت به‌ترتیب غلظت‌های ۶۲/۵، ۱۲۵ و ۶۲/۵ U/ml/ mg protein دارای بیش‌ترین فعالیت بوده‌اند(نمودار شماره ۳- الف، ب، ج).



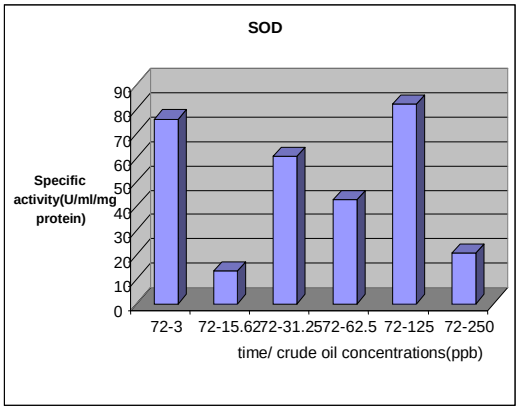
ب.



الف.



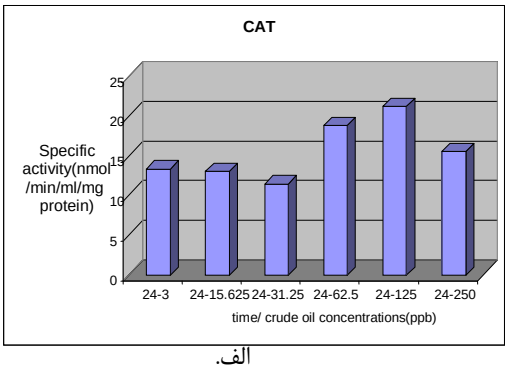
د.



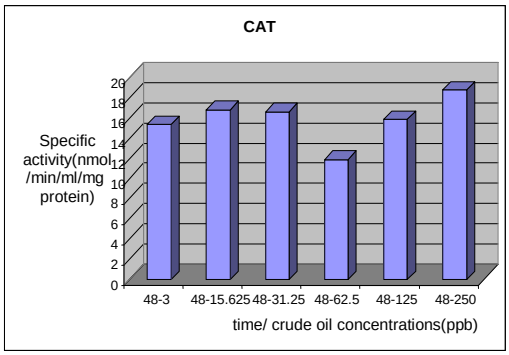
ج.

نمودار ۳- فعالیت آنزیم SOD در غلظت‌های مختلف نفت خام، به تفکیک ساعت: الف) فعالیت آنزیم SOD در۲۴ ساعت ب) فعالیت آنزیم SOD در۴۸ ساعت پ) فعالیت آنزیم SOD در۷۲ ساعت ت) فعالیت آنزیم SOD در۹۶ ساعت

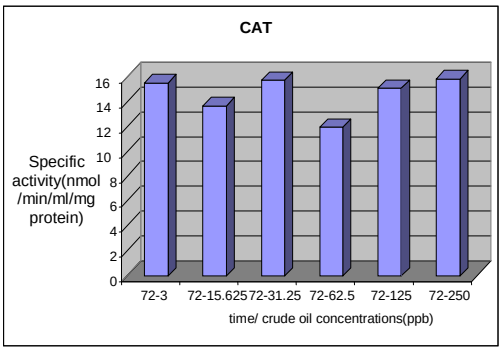
بیش‌ترین میزان فعالیت CAT در دوره‌های زمانی ۲۴و ۹۶ ساعت در بین تمامی آکواریوم‌ها، در غلظت نفتی ۱۲۵ppb (نمودارشماره ۴- الف، ج) و در دوره‌های ۴۸ و ۷۲ ساعته در دوز نفتی ۲۵۰ppb بوده است(نمودارشماره ۴- ب، د).



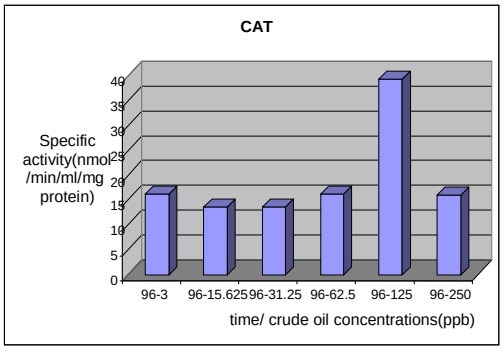
الف.



ب.



ج.



د.

نمودار ۴- فعالیت آنزیمCAT در غلظت های مختلف نفت خام، به تفکیک ساعت: الف) فعالیت آنزیم CAT در۲۴ ساعت ب) فعالیت آنزیم CAT در۴۸ ساعت پ) فعالیت آنزیم CATدر۷۲ ساعت ت) فعالیت آنزیم CAT در۹۶ ساعت

در اکثر موارد سطح فعالیت آنزیم SOD نسبت به سطح فعالیت آنزیم CAT بالاتر بوده ولی یک روال منطقی را طی نکرده است(نمودار۳و۴).

نتایج به‌دست آمده از آنزیم سوپراکسید دیسموتاز(SOD) نشان می‌دهد که همبستگی بین فعالیت آنزیم‌ها در بارناکل‌های در معرض‌گذاری شده به دوزهای مختلف نفت خام، در طول مدت آزمایش وجود ندارد.

جدول ۱- تعداد مرگ و میر بارناکل‌ها در آکواریوم‌های مختلف تحت تأثیر قرار گرفته در غلظت‌های مختلف نفت خام.

غلظت نفت (ppb)	مرگ و میر در			
	۲۴ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
۳ (آکواریوم شاهد)	_	۱	۱	۳
تکرار۳ (آکواریوم شاهد)	_	۱	-	۲
۱۵/۶۲۵(آکواریوم ۲)	_	_	۳	۱
تکرار۱۵/۶۲۵(آکواریوم ۲)	_	_	_	_
۳۱/۲۵(آکواریوم ۳)	_	۱	۱	_
تکرار۳۱/۲۵(آکواریوم ۳)	۱	_	_	۱
۶۲/۵(آکواریوم ۴)	_	_	۲	۲
تکرار۶۲/۵(آکواریوم ۴)	۱	_	_	۱
۱۲۵(آکواریوم ۵)	_	_	_	_
تکرار۱۲۵(آکواریوم ۵)	۱	_	۱	۱
۲۵۰(آکواریوم ۶)	_	_	_	_
تکرار۲۵۰(آکواریوم ۶)	-	-	۱	۱

بحث و نتیجه‌گیری

در طول دوره آزمایش، میزان مرگ و میر نمونه‌های بارناکل بعد از دوره‌های زمانی ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت ثبت گردید.

نتایج نشان داد در آکواریوم ۱ با غلظت نفت خام ۳ppb، بعد از ۲۴ ساعت هیچ‌گونه مرگ و میری مشاهده نشد، اما بعد از گذشت هر یک از زمان‌های ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت به‌ترتیب تعداد ۱، ۱ و ۳ بارناکل مردند. در آکواریوم تکرار۱ نیز میزان مرگ و میر به‌ترتیب ۰، ۱، ۰ و ۲ بارناکل در طی ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بود. در آکواریوم شماره ۲ که دارای غلظت ۱۵/۶۲۵ppb بود، فقط در دوره ۷۲ ساعت، ۳ مرگ و میر و در دوره ۹۶ ساعت ۱ مرگ و میر داشتیم. اما در آکواریوم تکرار۲ هیچ‌گونه مرگ و میری مشاهده نشد و در کل ۴ عدد بارناکل در این آکواریوم مردند. در آکواریوم شماره ۳ با غلظت ۳۱/۲۵ ppb، ۱ مرگ و میر در هر یک از دوره‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت داشتیم که در تکرار ۳ این میزان به ۱ عدد در هر یک از دوره های ۲۴ و ۹۶ ساعت رسید. در آکواریوم شماره ۴ که دارای غلظت ۶۲/۵ppb بود، تعداد ۲ مرگ و میر بارناکل در هر یک از زمان‌های ۷۲ و ۹۶ ساعت دیده شد، بدین ترتیب میزان مرگ و میرهای کل بارناکل‌ها در این آکواریوم به ۴ عدد رسید و در آکواریوم تکرار ۴ در کل ۲ بارناکل مردند که در دوره‌های زمانی ۲۴ و ۹۶ ساعت بود. در آکواریوم شماره ۵ با غلظت ۱۲۵ ppb مرگ و میری مشاهده نشد، اما آکواریوم تکرار آن دارای ۳ مرگ و میر به‌ترتیب در دوره‌های ۲۴، ۷۲ و ۹۶ ساعت بود. آکواریوم شماره ۶ با غلظت بالای ۲۵۰ppb نیز فاقد مرگ و میر در بارناکل‌ها بود و تکرار این آکواریوم دارای ۱ مرگ و میر در هر یک از دوره های ۷۲ و ۹۶ ساعت بود.

مقایسه نتایج مرگ و میر بارناکل‌ها نشان داد، تعداد مرگ و میرها ارتباط چندانی با افزایش غلظت‌های نفت خام تزریقی به آکواریوم‌ها ندارد، مثلاً در آکواریوم۱ با غلظت ۳ppb بیش‌ترین میزان مرگ و میر را داشتیم (۵ عدد بارناکل)، اما در غلظت‌های بالا، یعنی ۱۲۵ و ۲۵۰ppb (آکواریوم‌های ۵ و ۶) مرگ و میری ثبت نگردید. از طرف دیگر مقایسه ارقام ثبت شده نشان می‌دهد که میزان مرگ و میر ها با افزایش دوره‌های

در معرض‌گذاری افزایش می‌یابد، بدین ترتیب که کل مرگ و میرهای ثبت شده در دوره‌های ۲۴، ۴۸ ، ۷۲ و ۹۶ ساعت در تمامی آکواریوم‌ها به‌ترتیب نشان دهنده تعداد مرگ و میر ۳ ،۳، ۹ و ۱۲ عدد بارناکل می‌باشد(جدول ۱).

در آزمایش حاضر، آنزیم‌های کاتالاز(CAT)، در غلظت نفتی ۱۲۵ppb و در دوره زمانی ۹۶ ساعت به حداکثر مقدار فعالیت خود رسیده‌اند و در غلظت‌های قبل از آن (۳۱/۲۵ppb، ۱۵/۶۲) تقریباً تغییرات ثابت بوده است و میزان سطح این آنزیم‌ها در دو آکواریوم با غلظت‌های ۳۱/۲۵ppb و ۱۵/۶۲تغییر محسوسی نسبت به سطح آنزیم‌های بارناکل‌های آکواریوم شاهد نداشته اند که می‌توان عنوان کرد، این آنزیم‌ها در این دوزهای نفتی در حد اشباع بوده‌اند. بعد از افزایش سطح فعالیت آنزیم‌های کاتالاز در بارناکل‌های تحت تأثیر قرار گرفته با غلظت ۱۲۵ppb و در دوره زمانی ۹۶ ساعت، مجدداً فعالیت این آنزیم‌ها کاهش یافته و به میزان مشابه با دوزهای ۳۱/۲۵ppb، ۱۵/۶۲، ۳ رسیده است. این مطلب می‌تواند گویای این موضوع باشد که:

۱- در این غلظت بالای نفتی (۲۵۰ppb)، توان دفاعی آنتی‌اکسیدانی بارناکل‌ها کاهش یافته و سطح آنزیم‌های CAT نیز کاهش می‌یابد که در این صورت باید میزان بالایی از مرگ و میر را در بارناکل‌های این آکواریوم مشاهده کنیم. بیش‌ترین میزان مرگ و میر در بین آکواریوم‌ها در دوره زمانی ۹۶ ساعت (در همه آکواریوم‌ها) صورت گرفته است و با توجه به این‌که هیچ‌گونه ارتباطی بین افزایش میزان مرگ و میر با افزایش دوزهای نفتی تزریق شده به آکواریوم‌ها وجود نداشته (با توجه به جدول ۱، بیش‌ترین میزان مرگ و میر در آکواریوم با غلظت پایین یعنی آکواریوم شماره ۳ صورت گرفته است)، می‌توان این‌طور بیان کرد که کاهش مواد غذایی در بین آکواریوم‌ها که به خاطر عدم تغذیه‌کنندگی بارناکل‌ها در طول دوره آزمایش صورت گرفته‌است، علت قوی‌تر این مرگ و میر می‌باشد(جدول ۱).

۲- آنزیم‌های کاتالاز بعد از در معرض قرارگیری به غلظت ۱۲۵ppb نسبت به دوزنفتی ۲۵۰ppb سازش پیدا کرده‌اند.

در مطالعه حاضر در اکثر موارد سطح فعالیت آنزیم SOD نسبت به CAT بالا بود، اما این آنزیم یک روال منطقی را طی نکرد. به‌طور کلی، آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز در بارناکل‌های تحت تأثیر قرار گرفته با دوز نفتی ۶۲/۵ppb و در دوره زمانی ۴۸ ساعت دارای حداکثر افزایش در فعالیت می‌باشند، اما با توجه به این‌که تغییرات سطح فعالیت این آنزیم‌ها در سایر آکواریوم‌ها یک روند منطقی را طی نکردند، نمی‌توان اظهار کرد که بیش‌ترین حساسیت موجود نسبت به آلودگی نفت خام، در این دوز نفتی بوده است. همچنین تغییرات سطح آنزیم کاتالاز در غلظت های مختلف نفت خام تقریباً یک روند ثابتی را داشته است و فقط در دوره زمانی ۹۶ ساعته، در غلظت نفت خام ۱۲۵ppb بیش‌ترین میزان نوسان در فعالیت کاتالاز دیده شد که می‌تواند بیانگر این موضوع باشد که کاتالاز دارای حساسیت بیش‌تری نسبت به آلودگی نفت خام در این دوز نفتی است، لذا می‌توان اظهار داشت با توجه به نتایج به‌دست آمده و مقایسه تغییرات سطح آنزیم کاتالاز(CAT) و سوپراکسید دیسموتاز(SOD) با میزان دوزهای نفت خام تزریقی به آکواریوم‌ها، کاتالاز در مقایسه با سوپراکسید دیسموتاز می‌تواند بیومارکر قوی‌تری در بارناکل *Tetraclita rufotincta* باشد.

با توجه به این‌که نتایج تست‌های سمیت انجام یافته در شرایط آزمایشگاهی اغلب به‌عنوان پایه پیش‌بینی‌های اکولوژیکی مطرح (۱۰) و سنجش‌های آزمایشگاهی یک مرحله تعیین‌کننده را در تست‌کردن‌های تأثیرات شیمیایی میسر می‌سازند، اما نمی‌توانند مستقیماً با محیط‌های طبیعی قیاس شوند زیرا هر دو فاکتورهای زنده و غیرزنده در پاسخ‌های ارگانیسم در محیط دخالت دارند(۱۰). تغییرات سطح فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز نسبت به غلظت‌های بالای آلاینده‌ها، با این‌که در بسیاری از آزمایش‌ها رابطه مستقیمی داشته است(۱ و ۱۶-۱۴)، اما نمی‌تواند به‌عنوان یک روند عمومی به‌شمار رود، در برخی از آزمایش‌ها نیز عکس این مطلب وجود داشته است که شاید به‌دلیل دوره کوتاه در معرض‌گذاری موجود در مقابل

آلاینده باشد که این خود باعث ایجاد نتایج ناپایداری در سطوح آنزیمی می‌گردد(۹).

منابع

1. Niyogi, S., Biswas, S., Sarker, S.and Datta, A.G., 2001. Antioxidant enzymes in brackishwater oyster, *Saccostrea cucullata* as potential biomarkers of polyaromatic hydrocarbon pollution in Hooghly Estuary (India): seasonality and its consequences. The Science of the Total Environment 281. Pp. 237-246.
2. Dawes, C. J. 1998. Marine Botany. John wiley and sons. N. Y. Pp. 480.

۳. کریم‌زاده، ک.، ۱۳۸۳. خالص‌سازی آنزیم سیتوکروم P4501A1 از کبد تاس ماهی ایرانی و طراحی روش ELISA برای سنجش آن. پایان‌نامه دکتری دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات.

۴. عمیدی، ر.، ۱۳۸۳. بررسی و اندازه‌گیری عناصر سنگین (نیکل و وانادیوم) و هیدروکربن‌های نفتی در صدف خوراکی Saccostrea cucullata در محدوده جزر و مدی جزیره کیش. پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال. دانشکده علوم و فنون دریایی. آلودگی و حفاظت محیط زیست دریا.

۵. کلارک، ار. بی.، ۱۹۹۷. آلودگی دریا. ترجمه زاهد، م. ع. عمیدی دشتی، ز. ۱۳۷۹. انتشارات نقش مهر. ص ۱۰۳-۶۵.

۶. اسماعیلی‌ساری، ع.، ۱۳۸۱. آلاینده‌ها و بهداشت و استاندارد در محیط زیست. انتشارات نقش مهر. ص ۵۹۰-۵۹۸.

7. Bebianno, M., Lopes, B., Guerra, L., Hoarau, P. and Ferreira, M., 2007. Glutathione S-tranferases and cytochrome P450 activities in Mytilus galloprovincialis from the South coast of Portugal: Effect of abiotic factors. Environment International 33. Pp. 550–558.
8. Orbea, A., Ortiz-Zarragoitia, M., Sole, M., Porte, C. and Cajaraville, M., 2001. Antioxidant enzymes and peroxisome proliferatin in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCBs in bivalve mollusks, crab and fish from the Uradaibai and plentzia estuaries (Bay of Biscay). Aquatic Toxicology 58. Pp. 75-98.
9. Cheung, C.C.C., Zheng, G.s., Lig, A.M.Y., Richardson, B.J. and Lam, P.K.S., 2001. Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *perna riridis*. Aquatic Toxicology 52. Pp. 189-203.
10. Reid, D. J. Macfarlane, G.R. 2003. Potential biomarkers of crude oil exposure in the gastropod mollusc, *Austrocochlea poecata*: Laboratory and manipulative field studies. Environmental pollution 12. Pp. 147-155.
11. Lima, I. Moreira, S.M. etc. 2007 Biochemical responses of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* to petrochemical environmental contamination along the North-Western cost of Portugal. Chemosphere 66. 1230-1242.
12. Luca-Abbott, S.B. Richardson, B.J. Mcclellaw, K.E. Zheng, G.J. Mrtin, M. Lam, P.K.S. 2005. Field validation of antioxidant enzyme biomarkers in mussels *perna riridis* and clams *Ruditapes philippinarrum* transplanted in Hong Kong coastal waters. Marine Pollution Bulletin 51. 694-707.

13. Matozzo, V., Ballarin, L. and Gabriella Marin, M., 2004. Exposure of the calm Tapes philippinarum to 4-nonylphenol: changes in anti-oxidant enzyme activities and re-burrowing capability. Marine pollution Bulletin 48. 563-571.
14. Box, A., Sureda, A., Galgani, F., Pons, A. and Deuderi, S., 2007. Assessment of environmental pollution at Blearic Islands applying oxidative stress biomarkers in mussel *Mytilus galloprovincialis*. Comparative Biochemistry and physiology part c146. 531-539.
15. Cajaraville, M.P., Ortiz-Zarragoitia, M., 2006. Specificity of the peroxisome proliferation response in mussels exposed to environmental pollutants. Aquatic Toxicology 78S. Pp. S117-S123.
16. Niyogi, S., Biswas, S., Sarker, S. and Datta, A.G., 2000. Seaonal variation of antioxidant and biotransformation enzymes in barnacle, *Balanus balanoides*, and their relation with polyaromatic hydrocarbons. Marine Environmental research 25. Pp. 13-26.

۱۷. رحمـــانی، م. ۱۳۸۰. مطالعـــه تولیـــد مثـــل کشتی‌چسب دریای خزر. پایـان‌نامـه کارشناسـی ارشد زیسـت‌شناسـی. دانشـکده علـوم. دانشـگاه تهران. ص ۲-۱۲.

۱۸. راس، ل و راس، ب. ۱۳۸۴. ترجمـه میرزرگـر، س و صـیدگر، م. فنـون بیهوشـی و تسـکین در آب‌زیـان. انتشارات دانشگاه تهران. ۲۴۶ص.

19. Benny K. K. Chan. 2001. Studies on Tetraclita Squamosa and Tetraclita Japonica (Cirripedia: Thoracica). I: ADULT MORPHOLOGY. Journal of Crustacean Biology 21(3). Pp. 616-630.
20. Benny K. K. chan, l. M. Tsang, K. Y. Ma, c.-H. Hsu, and K. H. chu. 2007. Taxonomic revision of the acorn barnacles Tetraclita japonica and Tetraclita formosana (Crustacea: Cirripedia) in East Asia based on molecular and morphological analyses. BULLETIN OF MARINE SCIENCE, 81(1). Pp. 101–113.

۲۱. شهدادی، ع.، ۱۳۸۵. تاکسونومی و جغرافیای زیستی کشتی‌چسب‌های بین جـزر و مـدی خلـیج فـارس و دریـــای عمـــان. پایـــان‌نامـــه کارشناســـی ارشـــد زیست‌شناسی. دانشکده علوم. دانشگاه تهران.

22. Shaw, J. P., Large, A. T., Livingstone, D. R., Doyotte, A., Renger, J., Chipman, J. K. and Peters, L. D. 2002. Elevation of cytochrome P450-immunopositive protein and DNA damage in mussels (Mytilus edulis) transplanted to a contaminated site. Marine Environmental Research. NO. 54. Pp. 505-509.
23. Livingstone. D. R., 1988. Responses of microsomal NADPH-cytochrome c reductase activity and cytochrome P-450 in digestive glands of *Mytilus edulis* and *Littorina littorea* to environmental and experimental exposure to pollutants. Vol. 46: 37-43, l MARINE ECOLOGY - PROGRESS SERIES Mar. Ecol. Prog. Ser. I Published June 30.
24. Cayman Chemical Company, 2008. Superoxide Dismutase Assay Kit, Catalog No 706002.
25. Cayman Chemical Company, 2008. Catalase Assay Kit, Catalog No 707002.