

## ارتباط بین در معرض گذاری آزمایشگاهی به نفت خام و پاسخ های آنتی اکسیدانی

### بارناکل های *Tetraclita rufotincta*

مؤگان امتیاز جو<sup>۱</sup>

لیدا سلیمی<sup>۲</sup>

مجید زینلی<sup>۳</sup>

بهار شهابی<sup>۴</sup>

مریم قاسم پورملکی<sup>۵\*</sup>

[Maryam\\_ghasempoor@yahoo.com](mailto:Maryam_ghasempoor@yahoo.com)

تاریخ پذیرش: ۸۸/۹/۲۵

تاریخ دریافت: ۸۸/۵/۱۲

#### چکیده

زمینه و هدف: امروزه اثرات مخرب آلودگی های نفتی حاصل از منابع مختلف در آبها و نیز آبریزان شناسایی و مشخص گردیده است. به منظور بررسی اثرات نفت خام در غلظت های متفاوت، بر تغییرات سطح آنزیم های آنتی اکسیدانی (کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز) در بارناکل *Tetraclita rufotincta* و امکان معرفی این آنزیم ها به عنوان بیومارکرهای زیستی.

روش: بارناکل های *Tetraclita rufotincta* جمع آوری شده از منطقه نفتی بهرگان در معرض دوزهای نفتی ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵، ۱۵/۶۲۵ و ۳ ppb به عنوان شاهد قرار گرفتند. در بازه های زمانی ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت، به طور متوسط تعداد ۱۵ بارناکل از آکواریوم ها خارج، و برای تعیین سنجش میزان آنزیم های کاتالاز (CAT) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج: این مطالعه نشان داد که در آکواریوم ۱، با غلظت ۳ ppb در طی دوره های زمانی ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت فعالیت آنزیم SOD به ترتیب ۱۲۸/۹۸، ۳۰/۰۴، ۷۵/۸، ۶۲/۰۵ U/ml/mg protein می باشد. در آکواریوم ۲ و ۳، با غلظت ۱۵/۶۲۵ ppb و ۳۱/۲۵ ppb در طی دوره های زمانی ذکر شده فعالیت آنزیم SOD به ترتیب ۱۰۴/۴۵، ۷۴/۹۵، ۱۳/۵۷، ۱۰۹ U/ml/mg protein 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 غلظت ۶۲/۵ ppb و ۱۲۵ppb در طی دوره‌های زمانی یاد شده فعالیت آنزیم SOD به ترتیب ۹۸/۷۹، ۱۹۳/۹، ۴۲/۷۵، ۱۲۴/۷۷ U/ml/mg protein و ۴۰/۰۸، ۶۹/۲۲ و ۸۱/۸۶، ۸۱/۸۶ U/ml/mg protein ثبت گردید. در آکواریوم ۶، با غلظت ۲۵۰ ppb در طی دوره‌های زمانی مذکور فعالیت آنزیم SOD به ترتیب ۶۲/۱۱، ۸۷/۱، ۲۰/۷۱، ۹۳/۴۷ U/ml/mg protein ثبت گردید.

نتایج همچنین نشان داد که در آکواریوم ۱، با غلظت ۳ ppb در طی دوره‌های زمانی ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت فعالیت آنزیم CAT به ترتیب ۱۳/۲۹، ۱۵/۳۱، ۱۵/۵، ۱۶/۲۵ nmol/min/ml/mg protein می‌باشد. در آکواریوم ۲ و ۳، با غلظت ۱۵/۶۲۵ ppb و ۳۱/۲۵ ppb در طی دوره‌های زمانی یاد شده فعالیت آنزیم CAT به ترتیب ۱۳/۰۳، ۱۶/۷۴، ۱۳/۶۵، ۱۳/۶۱ و ۱۱/۴۶، ۱۶/۵۴، ۱۵/۷، ۱۳/۵۸ nmol/min/ml/mg protein ثبت گردید. در آکواریوم ۴ و ۵، با غلظت ۶۲/۵ ppb و ۱۲۵ppb در طی دوره‌های زمانی یاد شده فعالیت آنزیم CAT به ترتیب ۱۸/۷۴، ۱۱/۸۶، ۱۱/۹۱، ۱۶/۲۲ و ۱۵/۸، ۲۱/۱ و ۱۶/۲۲ nmol/min/ml/mg protein ثبت گردید. در آکواریوم ۶، با غلظت ۲۵۰ ppb در طی دوره‌های زمانی یاد شده فعالیت آنزیم CAT به ترتیب ۱۵/۵۴، ۱۸/۸، ۱۵/۸۱، ۱۵/۹۷ nmol/min/ml/mg protein 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

چندحلقه‌ای (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 به کار برده می‌شود (۶). به‌کارگیری بیومارکرها به‌عنوان یک روش اساسی در سنجش سلامت اکوسیستم به حساب 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 فاز I (واکنش‌های اصلی) و فاز II (واکنش‌های توأم) انتقال زیستی می‌باشد (۷). ارگانوسم‌های آبی، زئوبیوتیک‌های آلی را به‌وسیله فاز I متابولیسم می‌کنند و منجر به تولید رادیکال‌های آزاد واکنشی (ROS) Reactive oxygen species می‌گردند (۸). هیدروکربن‌ها و سایر

تأثیر فعالیت‌های انسانی روی محیط‌های دریایی در حال پیش‌روی است (۱). انواع زیادی از آلاینده‌ها در جهان امروز وجود دارند که موجب آلودگی اکوسیستم‌های 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 زئوبیوتیک 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

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 نروز 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

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 پاسخ‌های 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 (۱۴، ۱۳، ۹). 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 هموستازی 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، از جمله ماسل‌ها، 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 هرمافروdit 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

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  $128/98 \text{ U/ml/mg protein}$  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  $30/04 \text{ U/ml/mg protein}$  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 ۱۵/۶۲۵ قرار داشت، از ۲۴ تا ۷۲ ساعت یک روند کاهشی در فعالیت SOD، به چشم می‌خورد و سپس فعالیت آنزیم به

scutum و tergum، 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 به حدی 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

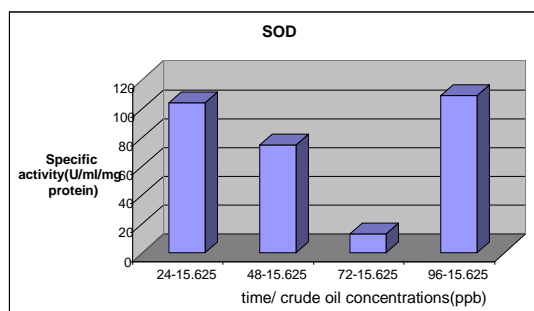
رطوبت اتاق آکواریوم‌ها توسط دستگاه بخور تأمین می‌شد. میزان دمای اتاق در  $20 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد. میزان pH آب ۷/۱ و شوری آب ۲۴ppt بود (شوری آب منطقه نمونه‌برداری ۲۷ppt اندازه‌گیری شد که برای ایجاد هماهنگی آدپتاسیون به مدت ۷۲ ساعت در محیط آزمایشگاه صورت گرفت). نسبت روشنایی به تاریکی ۱۲/۱۲ در نظر گرفته شد (۱۰).

#### ۵- شرح عملیات در معرض‌گذاری

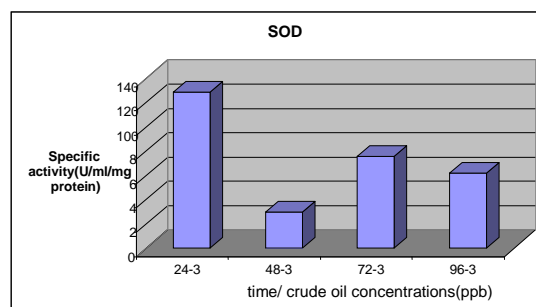
پس از انقضای دوره آدپتاسیون بارناکل‌ها (۱۰)، نفت خام منطقه نفتی بهرگان به‌میزان ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵، ۱۵/۶۲۵ و ۳ppb به‌عنوان شاهد (۲۳)، به آکواریوم‌ها اضافه شد. از زمان انتقال بارناکل‌ها به آکواریوم‌های حاوی دوزهای نفتی، هر ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت (۱۰)، از هر دوز نفتی و آکواریوم تکرار آن ۱۵ بارناکل خارج،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

برابر با نیمی از فعالیت آنزیم در ۲۴ ساعت اولیه در این آکواریوم می‌باشد، سپس یک روند افزایشی فعالیت از ۷۲ ساعت به ۹۶ ساعت ایجاد و میزان فعالیت به  $U/ml/ mg protein$   $124/77$  می‌رسد (نمودار شماره ۱-د). در آکواریوم شماره ۵ که در معرض نفت با غلظت  $125 ppb$  نفت خام قرار داشت، بعد از ۲۴ ساعت، فعالیت آنزیم SOD،  $U/ml/ mg protein$   $69/22$  بود و بعد از آن با طی یک روند کاهشی به  $U/ml/ mg protein$   $40/08$  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  $U/ml/ mg protein$   $59/95$  رسیده است (نمودار شماره ۱-ه). در آکواریوم شماره ۶ با غلظت نفت  $250 ppb$ ، به جز در دوره زمانی ۷۲ ساعت با فعالیت  $U/ml/ mg protein$   $20/71$ ، یک روند افزایشی به چشم می‌خورد، میزان این فعالیت‌ها در دوره‌های زمانی مشخص شده به ترتیب  $62/11$ ،  $87/1$  و  $93/47 U/ml/ mg protein$  بوده است (نمودار شماره ۱-و).

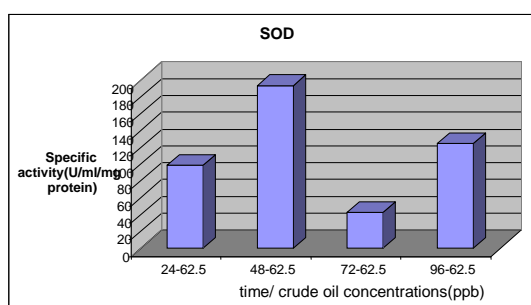
$U/ml/ mg protein$   $109$  می‌رسد که نزدیک به میزان فعالیت آنزیم در ۲۴ ساعت اولیه می‌باشد. میزان فعالیت SOD در دوره‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب  $104/45$ ،  $74/95$  و  $13/57 U/ml/ mg protein$  بوده است، میزان فعالیت  $13/57$  کمترین میزان فعالیت SOD در این آکواریوم و نیز در طول دوره در معرض گذاری می‌باشد (نمودار شماره ۱-ب). SOD در آکواریوم شماره ۳ که در معرض نفت با غلظت  $31/15 ppb$  بود تقریباً یک روند فعالیتی کاهشی را طی دوره‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت داشته و از  $69/96$  به  $61/56$  و سپس به  $U/ml/ mg protein$   $60/5$  رسیده، بعد از آن در زمان ۹۶ ساعت فعالیت این آنزیم به  $U/ml/ mg protein$   $86/96$  رسیده است (نمودار شماره ۱-ج). بیشترین فعالیت SOD در آکواریوم شماره ۴ که در معرض نفت با غلظت  $62/5 ppb$  بود، بعد از ۴۸ ساعت مشاهده شد. اگرچه در این آکواریوم در ابتدا میزان فعالیت در ۲۴ ساعت، از  $98/79$  به  $U/ml/ mg protein$   $193/9$  در ۴۸ ساعت رسیده و یک روند افزایشی را نشان داده است، اما بعد از ۷۲ ساعت میزان فعالیت به  $U/ml/ mg protein$   $42/75$  می‌رسد، که تقریباً



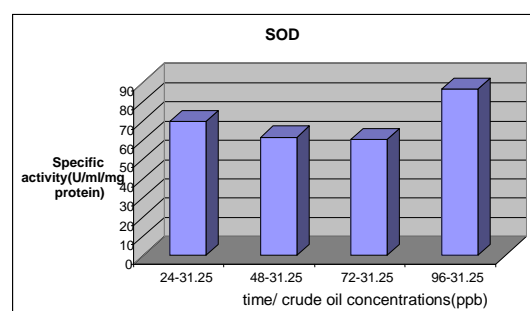
ب.



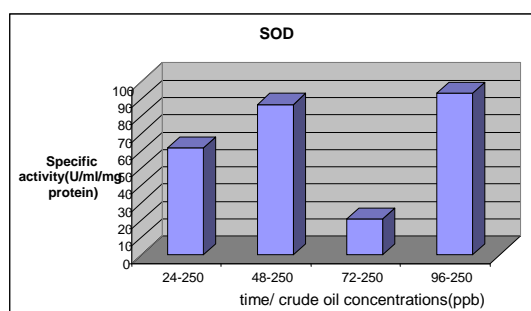
الف.



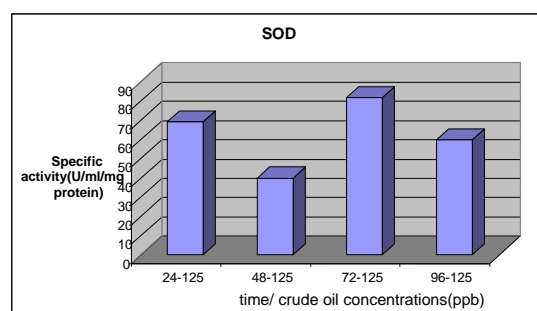
د.



ج.



و.



ه.

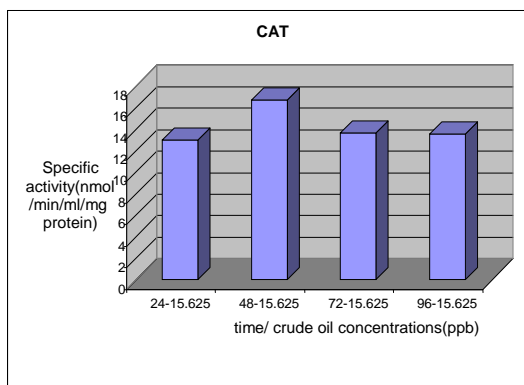
نمودار ۱- فعالیت آنزیم SOD بعد از ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت، به ترتیب در آکواریوم‌های با غلظت نفت خام: الف) آکواریوم شماره ۱ (۳ppb)، ب) آکواریوم شماره ۲ (۱۵/۶۲۵ppb)، پ) آکواریوم شماره ۳ (۳۱/۲۵ ppb)، ت) آکواریوم شماره ۴ (۶۲/۵ppb)، ث) آکواریوم شماره ۵ (۱۲۵ppb)، ج) آکواریوم شماره ۶ (۲۵۰ppb)

فعالیت ثابتی را نشان داده است. میزان تفاوت این فعالیت در ۴۸ ساعت در حدود ۳ بوده است. به ترتیب دوره‌های زمانی ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت، فعالیت آنزیم CAT ۱۳/۰۳، ۱۶/۷۴، ۱۳/۶۱ و ۱۳/۶۵ nmol/min/ml/mg protein 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

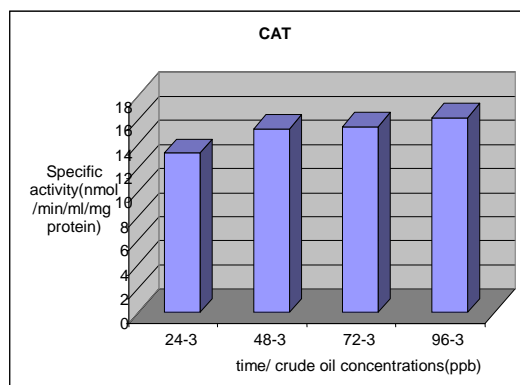
فعالیت کاتالاز در آکواریوم شماره ۱ (شاهد ۳ppb) با غلظت ۳ppb نفت خام، با این که در هر دوره زمانی نسبت به دوره زمانی بعدی یک افزایش جزئی را نشان می‌دهد ولی در کل می‌توان گفت فعالیت آنزیم دارای یک روند منطقی بوده است. افزایش در فعالیت دوره‌های زمانی آکواریوم شاهد به ترتیب ۱۳/۲۹، ۱۵/۳۱، ۱۵/۵ و ۱۳/۲۹ nmol/min/ml/mg protein است (نمودار ۲- الف). در آکواریوم شماره ۲ (۱۵/۶۲۵ppb)، به جز در دوره زمانی ۴۸ ساعت، CAT

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 فعالیت CAT از ۲۱/۱ به  $\text{nmol/min/ml/mg protein}$  و فعالیت CAT ۱۵/۸ و سپس  $\text{nmol/min/ml/mg protein}$  می‌رسد (نمودار ۲-ه). آکواریوم شماره ۶ با بالاترین غلظت نفت خام یعنی ۲۵۰ppb، در همه دوره‌ها به جز ۴۸ ساعت، دارای فعالیت مساوی بوده است و در دوره ۴۸ ساعت دارای فعالیت ۱۸/۸ می‌باشد. میزان فعالیت CAT در دوره‌های ۲۴، ۷۲ و ۹۶ ساعت به ترتیب ۱۵/۵۴، ۱۵/۸۱ و  $\text{nmol/min/ml/mg protein}$  ۱۵/۹۷ گزارش شده است (نمودار ۲-و).

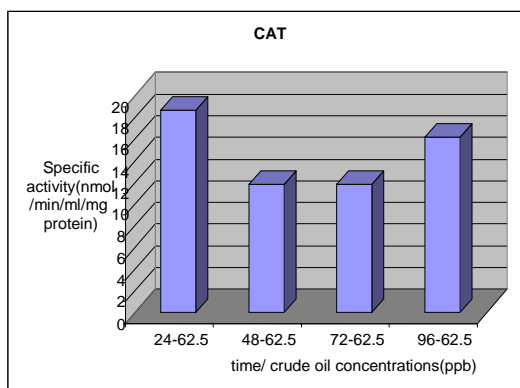
ساعت رسیده است که نشان‌دهنده افزایش در فعالیت CAT می‌باشد، سپس فعالیت این آنزیم یک دوره کاهشی را طی کرده و در ۷۲ و ۹۶ ساعت دارای فعالیت‌های ۱۵/۷ و  $\text{nmol/min/ml/mg protein}$  ۱۳/۵۸ بوده است (نمودار شماره ۲-ج). آنزیم‌های CAT در آکواریوم شماره ۴ با غلظت ۶۲/۵ ppb اگرچه در ۲۴ ساعت اولیه با  $\text{nmol/min/ml/mg protein}$  ۱۸/۷۴ بیشترین میزان فعالیت را در این آکواریوم به ثبت رسانده‌اند ولی در ادامه، غلظت‌های CAT به ۱۱/۸۶، ۱۱/۹۱ و  $\text{nmol/min/ml/mg protein}$  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



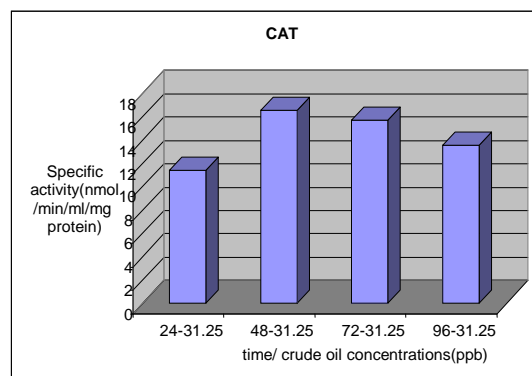
ب.



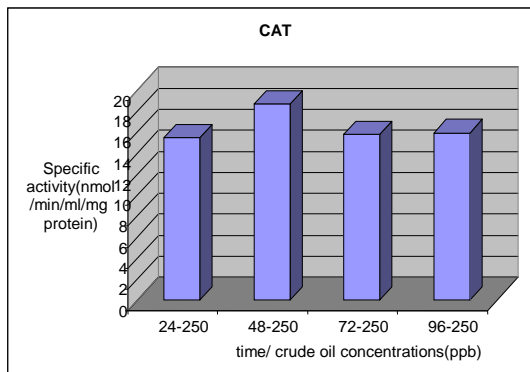
الف.



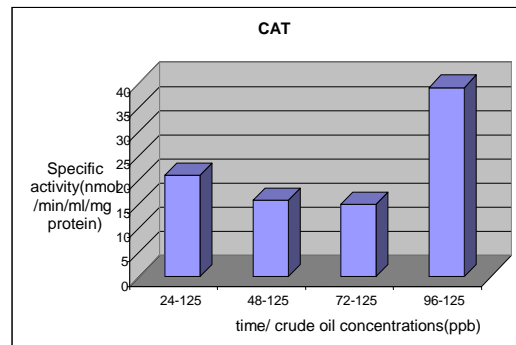
د.



ج.



و.



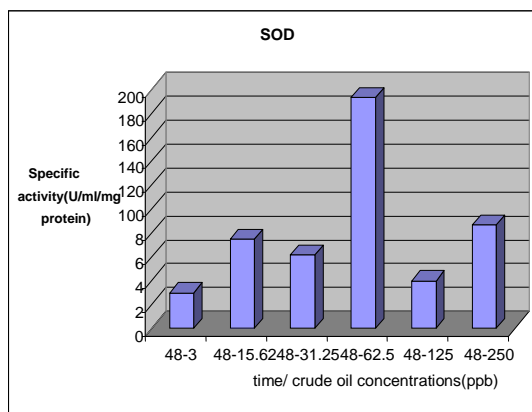
ه.

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 (۲۵۰ppb)، ث) آکواریوم شماره ۵ (۱۲۵ppb)، ج) آکواریوم شماره ۶ (۲۵۰ppb)

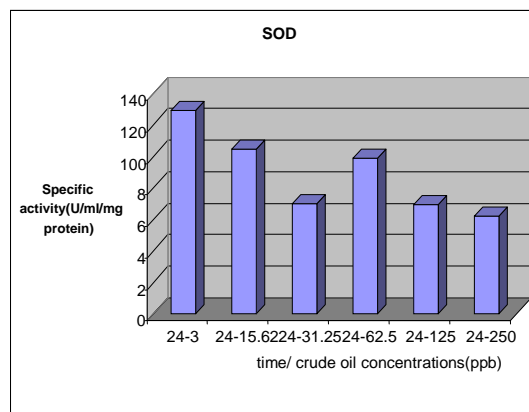
است (نمودار شماره الف-۳) و در دوره‌های ۷۲، ۴۸ و ۹۶ ساعت به ترتیب غلظت‌های ۶۲/۵، ۱۲۵ و ۶۲/۵ U/ml/ mg protein دارای بیش‌ترین فعالیت بوده‌اند (نمودار شماره ۳- الف، ب، ج).

در طول دوره در معرض‌گذاری بارناک‌ها به غلظت‌های مختلف نفت خام، بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم‌های SOD در دوره ۲۴ ساعته، در غلظت ۳ppb (آکواریوم شاهد) صورت گرفته

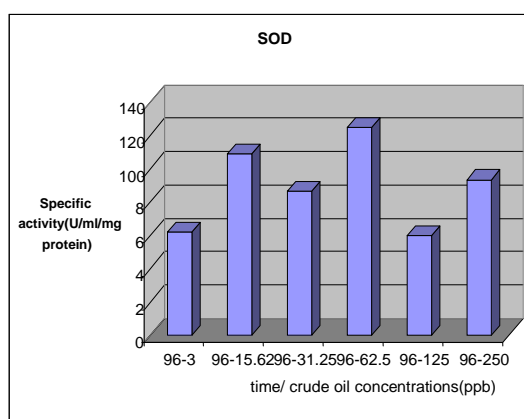




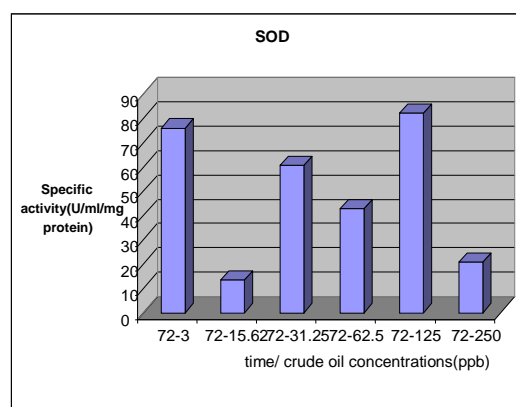
ب.



الف.



د.



ج.

نمودار ۳- فعالیت آنزیم SOD در غلظت‌های مختلف نفت خام، به تفکیک ساعت: الف) فعالیت آنزیم SOD در ۲۴ ساعت

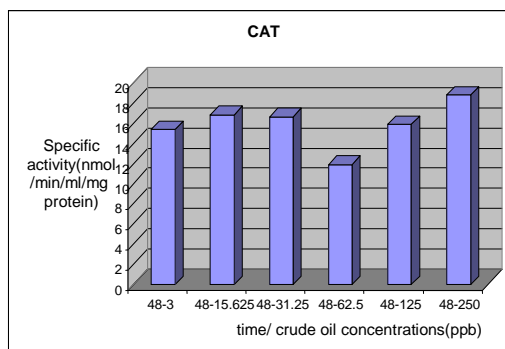
ب) فعالیت آنزیم SOD در ۴۸ ساعت پ) فعالیت آنزیم SOD در ۷۲ ساعت ت) فعالیت آنزیم SOD در ۹۶ ساعت

(نمودار شماره ۴- الف، ج) و در دوره‌های ۴۸ و ۷۲ ساعته در

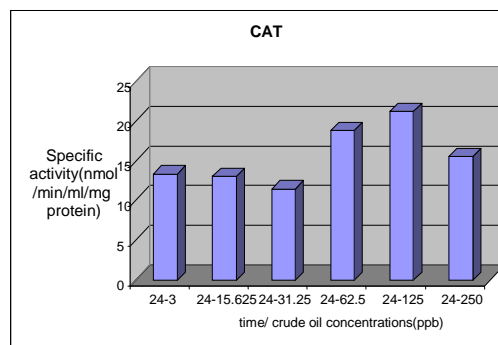
دوز نفتی ۲۵۰ ppb بوده است (نمودار شماره ۴- ب، د).

بیشترین میزان فعالیت CAT در دوره‌های زمانی ۲۴ و ۹۶

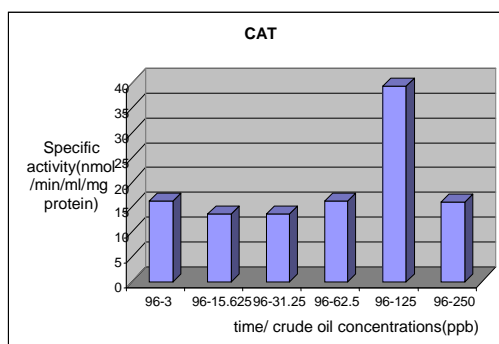
ساعت در بین تمامی آکواریوم‌ها، در غلظت نفتی ۱۲۵ ppb



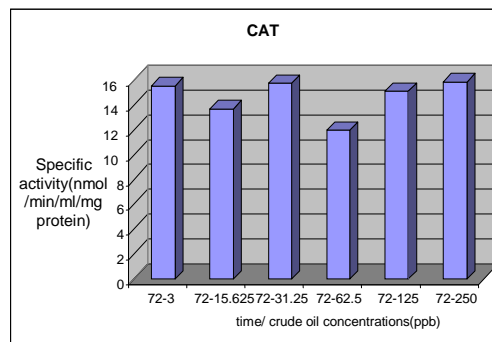
ب.



الف.



د.



ج.

نمودار ۴- فعالیت آنزیم CAT در غلظت های مختلف نفت خام، به تفکیک ساعت: الف) فعالیت آنزیم CAT در ۲۴ ساعت

ب) فعالیت آنزیم CAT در ۴۸ ساعت پ) فعالیت آنزیم CAT در ۷۲ ساعت ت) فعالیت آنزیم CAT در ۹۶ ساعت

معرض گذاری شده به دوزهای مختلف نفت خام، در طول مدت آزمایش وجود ندارد.

در اکثر موارد سطح فعالیت آنزیم SOD نسبت به سطح فعالیت آنزیم CAT بالاتر بوده ولی یک روال منطقی را طی نکرده است (نمودار ۳ و ۴).

نتایج به دست آمده از آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) نشان می دهد که همبستگی بین فعالیت آنزیم ها در بارناکل های در

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

مرگ و میر در				غلظت نفت
۹۶ ساعت	۷۲ ساعت	۴۸ ساعت	۲۴ ساعت	(ppb)
۳	۱	۱	—	۳ (آکواریوم شاهد)
۲	—	۱	—	تکرار ۳ (آکواریوم شاهد)
۱	۳	—	—	۱۵/۶۲۵ (آکواریوم ۲)
—	—	—	—	تکرار ۱۵/۶۲۵ (آکواریوم ۲)
—	۱	۱	—	۳۱/۲۵ (آکواریوم ۳)
۱	—	—	۱	تکرار ۳۱/۲۵ (آکواریوم ۳)
۲	۲	—	—	۶۲/۵ (آکواریوم ۴)
۱	—	—	۱	تکرار ۶۲/۵ (آکواریوم ۴)
—	—	—	—	۱۲۵ (آکواریوم ۵)
۱	۱	—	۱	تکرار ۱۲۵ (آکواریوم ۵)
—	—	—	—	۲۵۰ (آکواریوم ۶)
۱	۱	—	—	تکرار ۲۵۰ (آکواریوم ۶)

### 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 به ترتیب تعداد ۱، ۱ و ۳ بارناکل مردند. در آکواریوم تکرار ۱ نیز میزان مرگ و میر به ترتیب 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 تکرار ۲ 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 دوره‌های 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 به ترتیب 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 دوره‌های 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 آکواریوم ۱ 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 میرها با افزایش دوره‌های

در مطالعه حاضر در اکثر موارد سطح فعالیت آنزیم SOD نسبت به CAT بالا بود، اما این آنزیم یک روال منطقی را طی نکرد. به طور کلی، آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز در بارناکل های تحت تأثیر قرار گرفته با دوز نفتی ۶۲/۵ppb و در دوره زمانی ۴۸ ساعت دارای حداکثر افزایش در فعالیت می باشند، اما با توجه به این که تغییرات سطح فعالیت این آنزیم ها در سایر آکواریم ها یک روند منطقی را طی نکردند، نمی توان اظهار کرد که بیش ترین 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 بیش ترین میزان نوسان در فعالیت کاتالاز دیده شد که می تواند بیانگر این موضوع باشد که کاتالاز دارای حساسیت بیشتری نسبت به آلودگی نفت خام در این دوز نفتی است، لذا می توان اظهار داشت با توجه به نتایج به دست آمده و مقایسه تغییرات سطح آنزیم کاتالاز (CAT) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) با میزان دوزهای نفت خام تزریقی به آکواریم ها، کاتالاز در مقایسه با سوپراکسید دیسموتاز می تواند بیومارکر قوی تری در بارناکل *Tetraclita rufotincta* باشد.

با توجه به این که نتایج تست های سمیت انجام یافته در شرایط آزمایشگاهی اغلب به عنوان پایه پیش بینی های اکولوژیکی مطرح (۱۰) و سنجش های آزمایشگاهی یک مرحله تعیین کننده را در تست کردن های تأثیرات شیمیایی میسر می سازند، اما نمی توانند مستقیماً با محیط های طبیعی قیاس شوند زیرا هر دو فاکتورهای زنده و غیرزنده در پاسخ های ارگانیزم در محیط دخالت دارند (۱۰). تغییرات سطح فعالیت آنزیم های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز نسبت به غلظت های بالای آلاینده ها، با این که در بسیاری از آزمایش ها رابطه مستقیمی داشته است (۱۶-۱۴)، اما نمی تواند به عنوان یک روند عمومی به شمار رود، در برخی از آزمایش ها نیز عکس این مطلب وجود داشته است که شاید به دلیل دوره کوتاه در معرض گذاری موجود در مقابل

در معرض گذاری افزایش می یابد، بدین ترتیب که کل مرگ و میرهای ثبت شده در دوره های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت در تمامی آکواریم ها به ترتیب نشان دهنده تعداد مرگ و میر ۳، ۳، ۹ و ۱۲ عدد بارناکل می باشد (جدول ۱).

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

۱- در این غلظت بالای نفتی (۲۵۰ppb)، توان دفاعی آنتی اکسیدانی بارناکل ها کاهش یافته و سطح آنزیم های CAT نیز کاهش می یابد که در این صورت باید میزان بالایی از مرگ و میر را در بارناکل های این آکواریم مشاهده کنیم. بیش ترین میزان مرگ و میر در بین آکواریم ها در دوره زمانی ۹۶ ساعت (در همه آکواریم ها) صورت گرفته است و با توجه به این که هیچ گونه ارتباطی بین افزایش میزان مرگ و میر با افزایش دوزهای نفتی تزریق شده به آکواریم ها وجود نداشته (با توجه به جدول ۱، بیش ترین میزان مرگ و میر در آکواریم با غلظت پایین یعنی آکواریم شماره ۳ صورت گرفته است)، می توان این طور بیان کرد که کاهش مواد غذایی در بین آکواریم ها که به خاطر عدم تغذیه کنندگی بارناکل ها در طول دوره آزمایش صورت گرفته است، علت قوی تر این مرگ و میر می باشد (جدول ۱).

۲- آنزیم های کاتالاز بعد از در معرض قرارگیری به غلظت ۱۲۵ppb نسبت به دوز نفتی ۲۵۰ppb سازش پیدا کرده اند.

- 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.
- آلاینده باشد که این خود باعث ایجاد نتایج ناپایداری در سطوح آنزیمی می گردد(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. خالص سازی آنزیم سیتوکروم P4501A1 از کبد تاس ماهی ایرانی و طراحی روش ELISA برای سنجش آن. پایان نامه دکتری دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات.
  ۴. عمیدی، ر، ۱۳۸۳. بررسی و اندازه گیری عناصر سنگین (نیکل و وانادیوم) و هیدروکربن های نفتی در صدف خوراکی *Saccostrea cucullata* در محدوده جزر و مدی جزیره کیش. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال. دانشکده علوم و فنون دریایی. آلودگی و حفاظت محیط زیست دریا.
  ۵. کلارک، ا. بی، ۱۹۹۷. آلودگی دریا. ترجمه زاهد، م. ع. عمیدی دشتی، ز. ۱۳۷۹. انتشارات نقش مهر. ص ۶۵-۱۰۳.
  ۶. اسماعیلی ساری، ع، ۱۳۸۱. آلاینده ها و بهداشت و استاندارد در محیط زیست. انتشارات نقش مهر. ص ۵۹۸-۵۹۰.
  7. Bebianno, M., Lopes, B., Guerra, L., Hoarau, P. and Ferreira, M., 2007. Glutathione S-transferases and cytochrome P450 activities in *Mytilus galloprovincialis* from the South coast

- Crustacean Biology 21(3). Pp. 616-630.
20. Benny K. K. chan, I. 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 جزر و مدی خلیج فارس و دریای عمان. پایان‌نامه کارشناسی ارشد 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, 1 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.
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. Seasonal variation of antioxidant and biotransformation enzymes in barnacle, *Balanus balanoides*, and their relation with polyaromatic hydrocarbons. Marine Environmental research 25. Pp. 13-26.
۱۷. رحمانی، م. ۱۳۸۰. مطالعه تولید مثل کشتی‌چسب دریای خزر. پایان‌نامه کارشناسی ارشد زیست‌شناسی. دانشکده علوم. دانشگاه تهران. ص ۲-۱۲.
۱۸. راس، ل و راس، ب. ۱۳۸۴. ترجمه میرزرگر، س و صیدگر، م. فنون بیهوشی و تسکین در آب‌زیان. انتشارات دانشگاه تهران. ۲۴۶ص.
19. Benny K. K. Chan. 2001. Studies on *Tetraclita Squamosa* and *Tetraclita Japonica* (Cirripedia: Thoracica). I: ADULT MORPHOLOGY. Journal of