مقاله پژوهشی

مجله سلامت و محیط، فصلنامه‌ی علمی پژوهشی
انجمن علمی بهداشت محیط ایران
دوره هفتم، شماره سوم، پاییز ۱۳۹۳، صفحات ۴۱۳ تا ۴۲۶

پاسخ نشانگر متالوتیونین در صدف دوکفه ای *Crassostrea sp.* به گرادیان جیوه و کادمیوم

علی عظیمی*[۱]، علیرضا صفاهیه[۲]، علی دادالهی سهراب[۳]، حسین ذوالقرنین[۲]، احمد سواری[۴]، بهناز صفار[۵]

دریافت: ۹۲/۰۸/۰۱ پذیرش: ۹۲/۱۰/۳۰

چکیده

زمینه و هدف: این مطالعه به منظور بررسی پاسخ متالوتیونین در صدف دوکفه ای .Crassostrea sp به غلظت های آزمایشی جیوه و کادمیوم جهت ارزیابی امکان استفاده از این پروتئین به عنوان نشانگر زیستی آلودگی فلزات مذکور در این نرم تن، انجام شده است.

روش بررسی: صدف ها از بندر امام خمینی نمونه‌برداری و پس از ۷ روز سازگاری با محیط آزمایشگاه، به مدت ۱۴ روز در معرض غلظت های آزمایشی جیوه (۱۵ و ۷۵ µg/L) و کادمیوم (۱۵ و ۱۵۰ µg/L) قرار داده شدند. غلظت پروتئین متالوتیونین، پس از مراحل استخراج و رسوب دهی، به روش اسپکتروفتومتری سنجش گردید. میزان فلزات سنگین نیز پس از مراحل آماده سازی و هضم شیمیایی، توسط دستگاه جذب اتمی اندازه گیری شد.

یافته ها: سطوح متالوتیونین در صدف های در معرض قرار گرفته با فلزات به طور معنی داری از غلظت این پروتئین در نمونه های شاهد بیشتر بود ($P< ۰/۰۵$). در دوکفه ای های قرار گرفته در معرض جیوه حداکثر میزان بیوسنتز متالوتیونین ۱۳۷/۲±۷/۶ µg/g وزن تر و در صدف های قرار گرفته در معرض کادمیوم بیشترین میزان بیوسنتز متالوتیونین ۳۱۲/۴±۱۷/۹ µg/g وزن تر اندازه گیری گردید، که در حدود ۳ برابر غلظت این پروتئین در بافت نرم نمونه های شاهد بود. بیوسنتز متالوتیونین در طی دوره در معرض‌گذاری با تجمع زیستی کادمیوم همبستگی مستقیم قوی و معنی داری نشان داد ($P< ۰/۰۱$). در حالی که با تجمع زیستی جیوه همبستگی معنی داری نداشت ($P> ۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: از نتایج حاصله استنباط می گردد که پروتئین متالوتیونین در دوکفه ای .Crassostrea sp، نشانگر زیستی مناسبی برای حضور کادمیوم در محیط و بدن موجود است و می توان از آن جهت ارزیابی آلودگی اکوسیستم و پایش منطقه استفاده نمود.

واژگان کلیدی: نشانگر، متالوتیونین، جیوه، کادمیوم، در معرض گذاری، صدف .Crassostrea sp

۱- (نویسنده مسئول): دانشجوی دکتری آلودگی محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس *ali.azimi@modares.ac.ir*
۲- استادیار گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر
۳- استادیار گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر
۴- استاد گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر
۵- استادیار گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-05]

مقدمه

آزمایشات سم شناسی محیطی را می توان به کوتاه مدت (حاد) و بلند مدت (مزمن) طبقه بندی نمود. اثرات مضر ایجاد شده توسط آنها در سطح موجود زنده شامل کشندگی کوتاه مدت و بلند مدت و اثرات غیر کشنده مانند تغییر در رفتار، رشد، تولید مثل، فعالیت های سم زدایی و اثر بر ساختار بافت است (۱). بر اساس نتایج آزمایشات سم شناسی می توان سمیت و خطرات زیست محیطی آلاینده ها را ارزیابی نموده و استانداردهای کیفیت زیست محیطی را تعریف نمود (۱ ، ۲). مطالعات آزمایشگاهی، خطر بالقوه سموم را در اکوسیستم های آبی نشان می دهند.

فلزات سنگین دارای نیمه عمر زیستی طولانی بوده و به همین جهت خطری جدی برای موجودات آبزی محسوب می گردند. فلز جیوه به عنوان سمی ترین آلاینده در اکوسیستم های آبی شناخته شده است و میزان بیش از حد مجاز آن منجر به خسارات محیطی از طریق صدمات اکولوژیکی شدید یا تهدید سلامت عمومی می شود (۳). کادمیوم یکی دیگر از تهدید کننده های مهم محیط زیست است که پس از جیوه دومین فلز سمی در محیط دریایی محسوب می گردد (۴). این فلز به علت سمیت بالا برای موجودات و پراکندگی وسیع در محیط های آبی به عنوان یک آلاینده مهم محسوب می شود (۵).

طی دهه گذشته استفاده از نشانگرهای زیستی حساس و کاربرد آنها به عنوان ابزار پردازشگر زیستی جهت ارزیابی خطر برای موجودات آبزی در محیط‌های آلوده گسترش پیدا کرده است (۶ ، ۷). یکی از مهم‌ترین نشانگرهای زیستی پروتئین متالوتیونین است که از نشانگرهای منتخب جهت مانیتورینگ محیط زیست دریا در برنامه کاری مدیترانه و برنامه زیست محیطی سازمان ملل متحد (UNEP) است (۸). سنجش میزان این پروتئین در موجودات می تواند نشانگر مناسبی از وضعیت سلامت اکوسیستم و موجودات آن باشد (۹).

تجمع کاتیون های فلزات سنگین درون سلول، منجر به تحریک سنتز متالوتیونین می گردد. این پروتیئن از خانواده پروتیئن های باند شونده با فلزات سنگین (Metalloprotein) بوده و مهمترین نشانگر زیستی در معرض قرار گرفتن موجودات با فلزات سنگین است (۸، ۱۰ ، ۱۱).

مهم‌ترین و اصلی ترین ویژگی متالوتیونین، محتوای سیستئین بسیار بالای آن است. این پروتئین به دلیل ظرفیت بالای ترکیب با اتم های فلزی که به گروه های SH در اسیدهای آمینه سیستئین متصل شده و تشکیل خوشه های تیولات می دهد به عنوان مقصد نهایی برخی یون های فلزی شناخته می شود (۱۲).

در مطالعات مربوط به استفاده از غلظت‌های متالوتیونین به عنوان نشانگر زیستی فلزات سنگین، عمدتا دوکفه ای ها بهترین گزینه هستند (۹، ۱۳–۱۵). از طرف دیگر دوکفه ای ها تجمع دهنده های بسیار مناسبی برای مطالعات پایش زیستی محسوب می شوند. از دهه هفتاد، دوکفه ای ها به عنوان تجمع دهنده های ترکیبات شیمیایی در برنامه های پایش زیستی که "Mussel Watch" نامیده می شود استفاده گردیده اند (۱۶). دوکفه ای ها به دلیل توان بالا در فیلتر نمودن آب و زندگی به صورت ثابت و غیر متحرک، به طور گسترده جهت ارزیابی سطوح آلودگی به خصوص آلودگی فلزات سنگین در محیط زیست های آبی، استفاده می شوند (۱۷ ، ۱۸). دلیل دیگر این که دوکفه ای ها به طور گسترده در برنامه های پایش زیستی و استفاده از غلظت متالوتیونین به عنوان نشانگر زیستی مطالعه می شوند این است که پروتئین متالوتیونین در اویستر ها و ماسل ها خصوصیاتی دارد که به عنوان متالوتیونین کلاس I محسوب می گردد و با اکثر خصوصیات پروتئین متالوتیونین پستانداران مشترک است (۹ ، ۱۶).

در ایران تحقیقات و مطالعات کمی در مورد تغییرات سیستم های درون سلولی و مولکولی آبزیان پس از قرار گیری در معرض عوامل آلاینده به ویژه فلزات سنگین صورت گرفته است. Azimi و همکاران در سال ۲۰۱۲ در مطالعه ای میدانی از پروتئین متالوتیونین صدف .Crassostrea sp به عنوان نشانگر زیستی فلزات سنگین در منطقه جنوب غرب خلیج فارس استفاده نمودند (۱۹). در این مطالعه که به صورت آزمایشگاهی است با در معرض قرار دادن صدف .Crassostrea sp در غلظت های آزمایشی جیوه و کادمیوم در محیط آزمایشگاه، میزان تجمع زیستی این فلزات و همچنین بیوسنتز متالوتیونین به عنوان مکانیسم سمیت زدایی این فلزات که می تواند شاخص مناسبی از در معرض قرارگیری صدف به این فلزات باشد، مورد مطالعه قرار گرفته است.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-05]

مواد و روش‌ها

جهت در معرض گذاری آزمایشگاهی، حدود ۱۵۰۰ صدف از غیر آلوده ترین اسکله بندر امام خمینی به فلزات جیوه و کادمیوم، که بر اساس مطالعات پیشین اسکله ۲۸ است (۱۹) در اسفند ۱۳۸۸ نمونه برداری گردید و به آزمایشگاه انتقال داده شدند. پس از انتقال صدف ها به آزمایشگاه، صدف های هم اندازه (طول پوسته mm ۵ ± ۳۵) در مخزن قرنطینه قرار داده شدند و به منظور سازگاری با محیط آزمایشگاه به مدت ۷ روز دوره سازگاری باکتری (adaption) با محیط سپری گردید (۲۰).

برای انجام آزمایش تست سمیت، از تعداد ۱۵ آکواریوم شیشه ای به ابعاد cm ۴۰×۳۰×۳۰ استفاده گردید. آب مورد استفاده در آزمایش، آب دریای طبیعی بوده که در مخزن L ۱۰۰۰ ذخیره و به طور مرتب هوادهی شده و پس از انجام فیلتراسیون وارد آکواریوم ها می گردید. هر آکواریوم مجهز به سیستم هوادهی و تنظیم اکسیژنی جداگانه ای بود، بدین ترتیب میزان آب و محتوای اکسیژنی هر آکواریوم ثابت و کنترل شده بود.

در معرض گذاری با غلظت های جیوه و کادمیوم

سطوح جیوه و کادمیوم جهت در معرض گذاری صدف ها بر اساس غلظت LC۵۰ (غلظتی که موجب مرگ ۵۰ درصد از نمونه ها در ۹۶ ساعت می گردد) و غلظت آستانه مرگ (Lethal Threshold Concentration) این فلزات در صدف مورد مطالعه تعیین گردید. به طوری که LC۵۰ ۹۶ ساعته جیوه و کادمیوم برای صدف .Crassostrea sp، به ترتیب mg/L ۱/۱ و mg/L ۱۹/۵ و غلظت آستانه مرگ این فلزات برای ۷ روز در این صدف mg/L ۱ جیوه و mg/L ۲ کادمیوم است (۲۱). بر این اساس صدف ها در معرض دو سطح متفاوت از هر یک از فلزات (µg/L ۱۵ و ۷۵ جیوه – µg/L ۱۵ و ۱۵۰ کادمیوم) و سه تکرار برای هر غلظت قرار داده شدند. یک آکواریوم نیز بدون افزودن فلز به عنوان تیمار شاهد در نظر گرفته شد.

در طول دوره های سازگاری و در معرض گذاری، پارامتر های فیزیکو شیمیایی آب به طور مداوم و روزانه کنترل شدند. به صورتی که میزان دما، اکسیژن و شوری، دو مرتبه در روز و pH نیز یک مرتبه در روز اندازه گیری شد. پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب در آزمایشگاه مشابه با شرایط طبیعی مکان زیست این صدف ها تنظیم گردیدند. به طوری که دمای آب ^{o}C ۱± ۱۷، شوری ppt ۲± ۴۳، اکسیژن محلول mg/L ۰/۵±۸ و میزان pH ۰/۲± ۸ تنظیم و کنترل گردید. همچنین صدف ها در طول دوره آزمایشات، در دوره های روشنایی ۱۲ ساعته نگهداری شدند (۲۲).

در طی دوره های سازگاری و در معرض گذاری، آب آکواریوم ها یک روز در میان تعویض گردید (۱۰). فیلتراسیون آب مورد استفاده در آکواریوم ها توسط تور چشمه ریز (µ ۲۰) انجام شد. تغذیه صدف ها نیز یک روز در میان صورت گرفت، بدین صورت که یک ساعت پیش از هر بار تعویض آب، میکروجلبک های کشت داده شده Chlorella و Chithoserous برای تغذیه صدف ها به آب آکواریوم ها اضافه گردیدند (۲۳). صدف های تلف شده در طول دوره های سازگاری و در معرض گذاری، بلافاصله از آکواریوم ها خارج و تعداد آن ها ثبت گردید.

پس از آغاز تست سمیت، هر h ۴۸ یکبار از هر کدام از تیمار های آزمایشی و همچنین تیمار شاهد، تعداد ۱۵ صدف به طور تصادفی نمونه برداری گردید. سریعا بافت نرم صدف‌ها استخراج شده، ابتدا در نیتروژن مایع منجمد، سپس در دمای ^{o}C ۸۰- تا زمان شروع آنالیز ها نگهداری شدند (۲۴).

استخراج متالوتیونین

g ۱ از بافت صدف توسط بافر هموژن کننده که متشکل از ساکارز (Mol ۰/۵)، Tric–HCl با pH ۸،۶ (mmol ۲۰)، لیوپپتین (mM ۰/۰۰۶) و PMSF (mM ۰/۵) و بتا- مرکاپتواتانول (٪۰/۰۱) بود کاملا هموژن گردید. جهت استحصال سوپرناتانت محتوی متالوتیونین ها، مخلوط هموژن شده به مدت min ۲۰ با دور g ۳۰۰۰۰ در دمای صفر درجه سانتریفیوژ شد. به ازای هر mL ۱ سوپرناتانت به دست آمده، mL ۱/۰۵ اتانول خالص سرد(^{o}C ۲۰-) و µL ۸۰ کلروفرم افزوده گردید و به مدت min ۱۰ در دور g ۶۰۰۰ در دمای ^{o}C ۰ سانتریفیوژ شد. به سوپرناتانت ایجاد شده µL ۴۰ اسید کلریدریک ٪۳۷ اضافه شد و با اتانول سرد (غلظت ٪۸۷) حجم آن ۳ برابر شد. نمونه ها به مدت h ۱ در دمای ^{o}C ۲۰- نگهداری و سپس با دور g ۶۰۰۰ برای min ۱۰ سانتریفیوژ شدند. پلت (Pellet) های محتوی متالوتیونین در مخلوط «بافر هموژن کننده، اتانول ٪۸۷ و کلروفرم ٪۱» شسته شده، سپس به مدت min ۱۰ در دور g ۶۰۰۰ سانتریفیوژ و تحت جریان گاز نیتروژن خشک گردیدند (۲۵، ۲۶).

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-05]

سنجش متالوتیونین

پلت های خشک شده با استفاده از ۱۵۰ µL NaCl (۰/۲۵ M) به صورت سوسپانسیون درآمده و سپس ۱۵۰ µL اسید کلریدریک (۱ N) که محتوی ۴ mM EDTA بود به آن ها افزوده شد. محلول ۴/۲ mL NaCl (۲ M) محتوی ۰/۴۳ mM DTNB مخلوط با بافر Na-phosphate (pH= ۸) به نمونه ها اضافه شد. سپس نمونه ها به مدت ۵ min در دور g ۳۰۰۰ سانتریفیوژ گردیدند. در نهایت جذب نوری سوپرناتانت در طول موج ۴۱۲ nm اندازه گیری و غلظت متالوتیونین با استفاده از گلوتاتیون کاهیده (GSH) به عنوان استاندارد مرجع تعیین شد (۲۶). میزان متالوتیونین با فرض محتوای سیستئین ۲۸٪ در متالوتیونین صدف Crassostrea sp. محاسبه گردید (۲۷).

سنجش جیوه و کادمیوم

بافت نرم صدف ها به مدت ۴۸ h (تا ثابت شدن وزنشان) در فریز درایر خشک شدند (۲۸)، سپس با هاون چینی کاملا پودر و هموژن گردیدند. جهت سنجش کادمیوم به ۱ g از بافت خشک هموژن شده ۱۰ mL اسید نیتریک غلیظ افزوده و بر روی هات پلیت، به مدت ۱ h در دمای ۴۰ °C و ۳ h در دمای ۱۴۰ °C هضم نموده و پس از سرد شدن نمونه‌ها از کاغذ صافی واتمن ۴۲ عبور داده شدند و با آب دو بار تقطیر به حجم معین رسانده شدند (۲۹). غلظت کادمیوم توسط دستگاه جذب اتمی (AAS) با شعله مدل GBC-Savantaa Σ سنجش گردید. به منظور حصول اطمینان از صحت نتایج به دست آمده، از ماده مرجع استاندارد Dorm-۳ (fish protein، کانادا) استفاده شد. درصد بازیافت نمونه های مرجع در دامنه ۹۳٪ تا ۱۰۷٪ به دست آمد.

جهت سنجش جیوه، به ۱ g از بافت خشک هموژن شده mg ۵ اسید نیتریک غلیظ و mg ۴۵ پنتا اکسید وانادیوم (V_2O_5) درون لوله های آزمایش اضافه شد و پس از بستن درب لوله ها با فویل آلومینیومی، نمونه ها به مدت ۱ h در دمای اتاق قرار داده شدند، سپس به مدت ۳ h در دمای ۹۰ °C هضم گردیدند. بعد از سرد شدن کامل نمونه ها، ۱ mL محلول دی کرومات پتاسیم ($K_2Cr_2O_7$) به آن ها افزوده شد و پس از صاف کردن و به حجم رساندن، میزان جیوه موجود در آن ها توسط دستگاه جذب اتمی بدون شعله (CVAAS) مدل UNICAM ۹۱۹ به روش بخار سرد اندازه گیری شد (۳۰). به منظور حصول اطمینان از صحت نتایج به دست آمده، از ماده مرجع استاندارد Dorm-۳ (fish protein، کانادا) استفاده گردید. درصد بازیافت نمونه های مرجع بین ۹۸٪ تا ۱۰۲٪ بدست آمد.

برای تبدیل غلظت فلزات در وزن خشک بافت به وزن تر، بافت نرم ۲۰ صدف را به طور دقیق وزن نموده و پس از خشک شدن بافت ها در فریزدرایر و ثابت شدن وزنشان، وزن آن ها را مجددا سنجیده و نسبت بین این دو محاسبه گردید. با استفاده ضریب به دست آمده (۰/۱۴۹ × غلظت فلز بر حسب وزن خشک = غلظت فلز بر حسب وزن تر) غلظت فلزات در وزن تر بافت محاسبه شد.

پردازش داده ها

تجزیه و تحلیل آماری داده های حاصل از اندازه گیری تراکم جیوه و کادمیوم و بیوسنتز متالوتیونین، با استفاده از نرم افزار SPSS version ۱۷ صورت پذیرفت. برای بررسی پراکنش نرمال داده ها از آزمون Shapiro-wilk استفاده شد. پس از حصول اطمینان از نرمال بودن داده ها، به منظور مقایسه بین غلظت فلزات سنگین و سطوح متالوتیونین در بین تیمار های مختلف، از روش آنالیز واریانس یک طرفه (one way ANOVA) و در صورت معنی‌دار بودن اختلاف میانگین ها در سطح اطمینان ۹۵ درصد، جهت مقایسات چند گانه از پس آزمون توکی استفاده گردید. جهت بررسی میزان همبستگی سطوح متالوتیونین با تجمع فلزات جیوه و کادمیوم از ضریب همبستگی پیرسون استفاده شد. معادله رگرسیون خطی ساده $y = ax + b$ برای محاسبه معادله خط رگرسیون استفاده شد، که در آن y میزان متالوتیونین، x غلظت فلز در بافت صدف، a ضریب شیب خط و b عرض از مبدا است. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار (SD) ارائه گردیده است.

یافته‌ها

تجمع زیستی فلزات جیوه و کادمیوم در بافت نرم صدف

تجمع جیوه در بافت نرم صدف های در معرض قرار گرفته با دو سطح این فلز و همچنین در مقایسه با نمونه های کنترل، اختلاف معنی داری داشت ($P< ۰/۰۵$). همان طور که انتظار می رود صدف های در معرض قرار گرفته با غلظت بالاتر (۷۵ µg/L جیوه) تجمع بیشتری نسبت به صدف های در

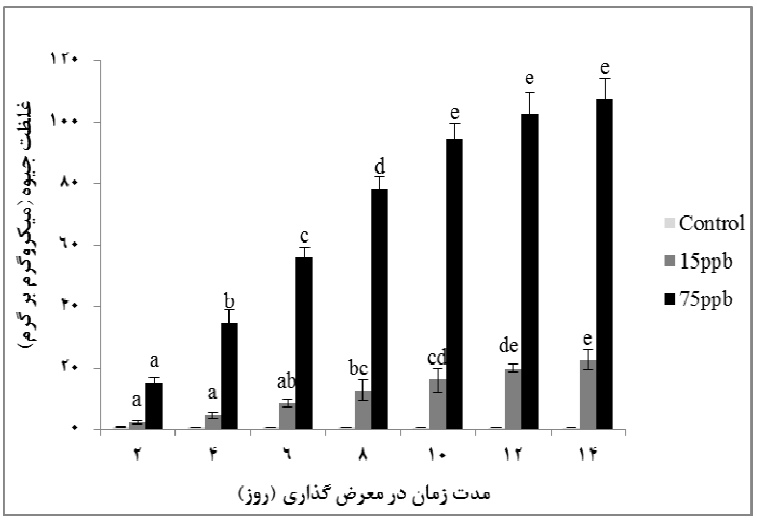
[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-05]

معرض قرار گرفته با غلظت کمتر (µg/L ۱۵ جیوه) نشان دادند. همچنین تجمع جیوه در بافت نرم دوکفه‌ای های در معرض قرار گرفته با غلظت واحد اما در مدت زمان های متفاوت، اختلافات معنی داری را نشان داد (P< ۰/۰۵). بیشترین تجمع جیوه مربوط به صدف های در معرض قرار گرفته با غلظت µg/L ۷۵ جیوه به مدت ۱۴ روز بود. میزان جیوه در بافت نرم این تیمار µg/g ۶/۷۳±۱۰۷/۵۹ وزن خشک اندازه گیری شد. کمترین تجمع جیوه نیز مربوط به صدف های در معرض قرار گرفته با غلظت µg/L ۱۵ جیوه به مدت h ۴۸ بود که میزان آن µg/g ۰/۵۶±۲/۲۷ وزن خشک سنجش گردید. میزان جیوه در بافت نرم نمونه‌های شاهد µg/g ۰/۱۴±۰/۶ در روز دوم و µg/g ۰/۰۴±۰/۴۷ در پایان آزمایش اندازه گیری شد، نمونه های شاهد در طول ۱۴ روز آزمایش اختلاف معنی داری با هم از لحاظ میزان جیوه نشان ندادند (P> ۰/۰۵).

میزان تجمع زیستی کادمیوم در بافت نرم صدف های در معرض قرار گرفته با دو سطح متفاوت این فلز در شکل ۲ نشان داده شده است. تجمع کادمیوم در بافت نرم صدف های در معرض قرار گرفته با غلظت های متفاوت و همچنین در مقایسه با نمونه های شاهد، اختلافات معنی داری را نشان داد (P< ۰/۰۵). در مورد کادمیوم نیز همان طور که انتظار می رود صدف های در معرض قرار گرفته با غلظت بالاتر کادمیوم (µg/L ۱۵۰) تجمع بیشتری نسبت به صدف های در معرض قرار گرفته با غلظت کمتر این فلز (µg/L ۱۵) نشان دادند. مقادیر تجمع زیستی کادمیوم در بافت نرم صدف های در معرض قرار گرفته با غلظت معین و مدت زمان های متفاوت، دارای اختلافات معنی داری بودند (P< ۰/۰۵). بیشترین تجمع کادمیوم µg/g ۷/۶۲±۸۶/۴۹ وزن خشک اندازه گیری شد که مربوط به دوکفه ای های در معرض قرار گرفته با µg/L ۱۵۰ کادمیوم به مدت ۱۴ روز بود و کمترین میزان آن µg/g ۰/۷۱±۶/۶۷ وزن خشک و مربوط به دوکفه ای های در معرض قرار گرفته با µg/L ۱۵ کادمیوم به مدت h ۴۸ بود. مقادیر کادمیوم در بافت نرم نمونه های کنترل از ۰/۴۳±۳/۴۹ در روز دوم تا µg/g ۰/۵۹±۲/۹۱ در روز چهاردهم کاهش یافت که البته اختلاف معنی داری بین غلظت های کادمیوم در نمونه های کنترل در طی ۱۴ روز مشاهده نگردید (P>۰/۰۵)

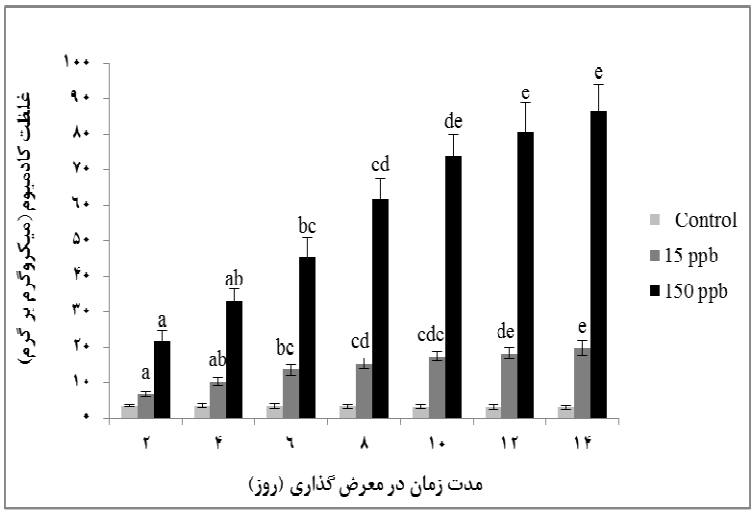
سطوح متالوتیونین در صدف های در معرض قرار گرفته با غلظت های جیوه

در شکل ۳ سطوح متالوتیونین در بافت نرم صدف ها پس از قرار گیری در معرض غلظت های جیوه در طی زمان‌های مختلف مقایسه شده است. غلظت متالوتیونین در نمونه های در



شکل ۱. مقایسه میزان تجمع زیستی جیوه در بافت نرم دوکفه ای .Crassostrea sp در طی دوره در معرض گذاری (ستون های مشخص شده با حروف متفاوت، دارای تفاوت معنی داری هستند (P< ۰/۰۵)).

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-05]



شکل ۲. مقایسه میزان تجمع زیستی کادمیوم در بافت نرم دوکفه ای.Crassostrea sp در طی دوره در معرض گذاری(ستون های مشخص شده با حروف متفاوت، دارای تفاوت معنی داری هستند (P< ۰/۰۵)).

معرض قرار گرفته با جیوه نسبت به نمونه های شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان داد(P< ۰/۰۵). اما سطوح این پروتئین در بافت نرم صدف های در معرض قرار گرفته با غلظت های $\mu g/L$ ۱۵ و ۷۵ جیوه به جز در برخی تیمار ها که اختلاف معنی داری داشتند، در سایر تیمار ها اختلاف معنی داری نشان ندادند (P> ۰/۰۵). بیشترین میزان بیوسنتز متالوتیونین $\mu g/g$ ۱۳۷/۲±۷/۶۳ وزن تر سنجش شد که مربوط به صدف های در معرض قرار گرفته با $\mu g/L$ ۱۵ جیوه به مدت ۱۰ روز بود و در حدود ۱/۵ برابر غلظت متالوتیونین در بافت نرم نمونه های شاهد بود. کمترین میزان متالوتیونین $\mu g/g$ ۹۸/۲۴±۱۲/۵۷ وزن تر اندازه گیری شد و مربوط به صدف های در معرض قرار گرفته با غلظت $\mu g/L$ ۷۵ جیوه به مدت ۱۴ روز بود که اختلاف معنی داری با نمونه شاهد نداشت. سطوح متالوتیونین در بافت نرم صدف های کنترل $\mu g/g$ ۹۵/۳±۴/۲۶ وزن تر در روز دوم و $\mu g/g$ ۹۰/۲۱±۹/۱ در پایان آزمایش بود که اختلاف معنی داری بین غلظت های متالوتیونین در نمونه های شاهد در طی ۱۴ روز مشاهده نگردید (P> ۰/۰۵).

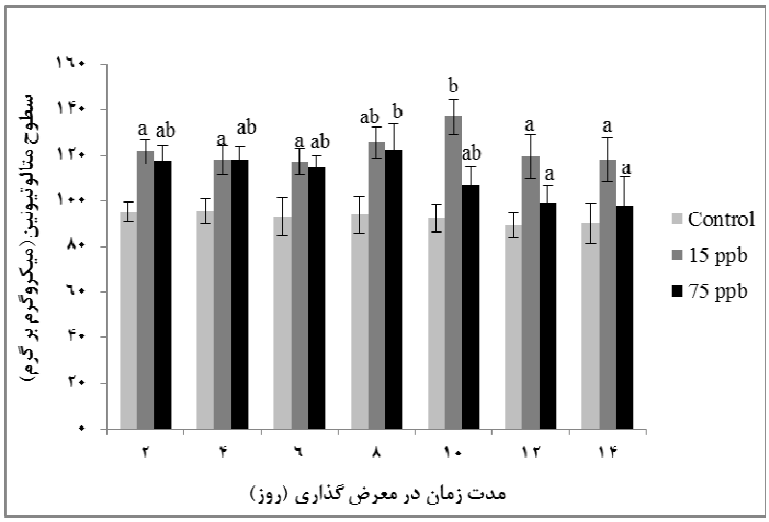
سطوح متالوتیونین در صدف های در معرض قرار گرفته با غلظت های کادمیوم

میزان بیوسنتز متالوتیونین در بافت نرم صدف های در معرض قرار گرفته با غلظت های کادمیوم نسبت به نمونه های شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان داد (P< ۰/۰۵). همچنین میزان این پروتئین در بافت نرم دوکفه ای های در معرض قرار گرفته با غلظت های $\mu g/L$ ۱۵ و $\mu g/L$ ۱۵۰ کادمیوم در مدت زمان های متفاوت اختلافات معنی داری داشتند (P< ۰/۰۵). بیشترین میزان بیوسنتز متالوتیونین $\mu g/g$ ۳۱۲/۴۱±۱۷/۹۳ وزن تر در بافت نرم صدف های در معرض قرار گرفته با $\mu g/L$ ۱۵۰ کادمیوم به مدت ۱۲ روز اندازه گیری گردید که در حدود ۳/۵ برابر غلظت این پروتئین در بافت نرم نمونه های شاهد بود. کمترین میزان پروتئین $\mu g/g$ ۹۹/۳۹±۳/۶۹ وزن تر سنجش شد و مربوط به صدف های در معرض قرار گرفته با غلظت $\mu g/L$ ۱۵ کادمیوم به مدت h ۴۸ بود که اختلاف معنی داری با نمونه شاهد نداشت (شکل ۳-۶).

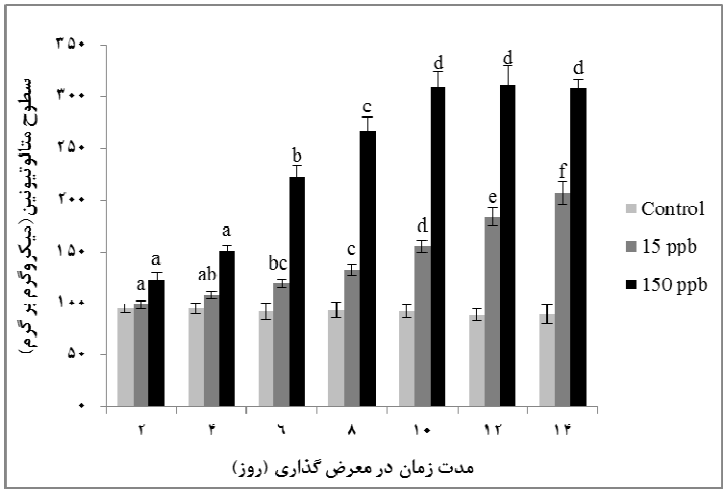
همبستگی بیوسنتز متالوتیونین و تجمع زیستی جیوه و کادمیوم

ضرایب همبستگی سطوح متالوتیونین با میزان تجمع زیستی هر یک از فلزات جیوه و کادمیوم در بافت نرم دو کفه ای جهت ارزیابی استفاده از غلظت های متالوتیونین دو کفه ای به عنوان نشانگر زیستی فلزات جیوه و کادمیوم مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور غلظت های فلزات با استفاده از ضریب به دست آورده (۰/۱۴۹ × غلظت فلز بر حسب وزن خشک = غلظت فلز بر حسب وزن تر) به غلظت بر اساس وزن تر بافت تبدیل شده و رگرسیون آن ها با سطوح متالوتیونین بررسی گردید.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-05]



شکل ۳. مقایسه سطوح پروتئین متالوتیونین در بافت نرم دو کفه ای .Crassostrea sp در معرض قرار گرفته با غلظت های جیوه (ستون های مشخص شده با حروف متفاوت، دارای تفاوت معنی داری هستند (P< ۰/۰۵)).



شکل ۴. مقایسه سطوح پروتئین متالوتیونین در بافت نرم دو کفه ای .Crassostrea sp در معرض قرار گرفته با غلظت های کادمیوم (ستون های مشخص شده با حروف متفاوت، دارای تفاوت معنی داری هستند (P< ۰/۰۵)).

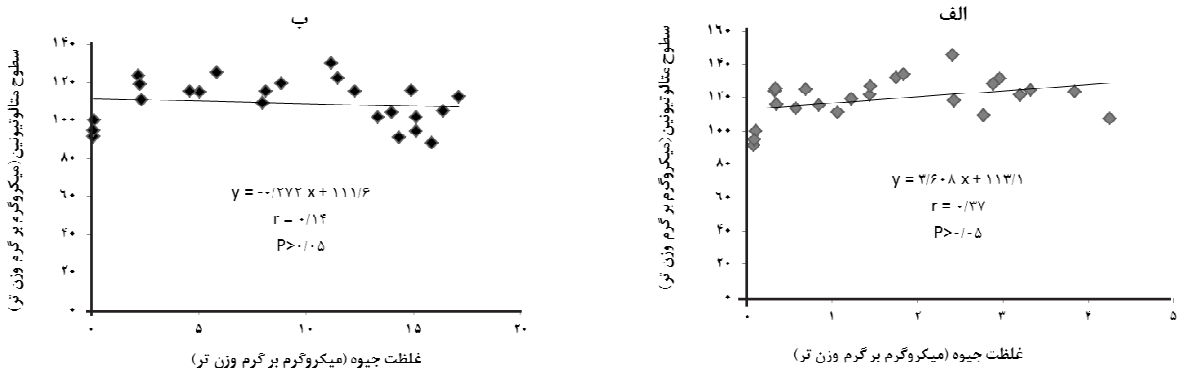
در شکل ۵ رابطه بین بیوسنتز متالوتیونین و تجمع زیستی جیوه در بافت نرم دو کفه ای های در معرض قرار گرفته با غلظت های ۱۵ µg/L و ۷۵ µg/L جیوه به مدت ۱۴ روز، نمایش داده شده است. ضرایب همبستگی و معادله رگرسیونی حاکی از آن است که بیوسنتز متالوتیونین با تجمع زیستی جیوه در بافت نرم همبستگی معنی‌داری ندارد (P> ۰/۰۵).

در شکل ۶ رابطه بین بیوسنتز متالوتیونین و تجمع زیستی کادمیوم در بافت نرم دو کفه ای های در معرض قرار گرفته با غلظت های ۱۵ µg/L و ۱۵۰ µg/L کادمیوم به مدت ۱۴ روز، نشان داده شده است. ضرایب همبستگی و معادلات رگرسیونی نشان می دهند که بیوسنتز متالوتیونین در طی دوره در معرض گذاری با کادمیوم با تجمع زیستی این فلز رابطه مستقیم قوی و معنی داری دارد (P< ۰/۰۱).

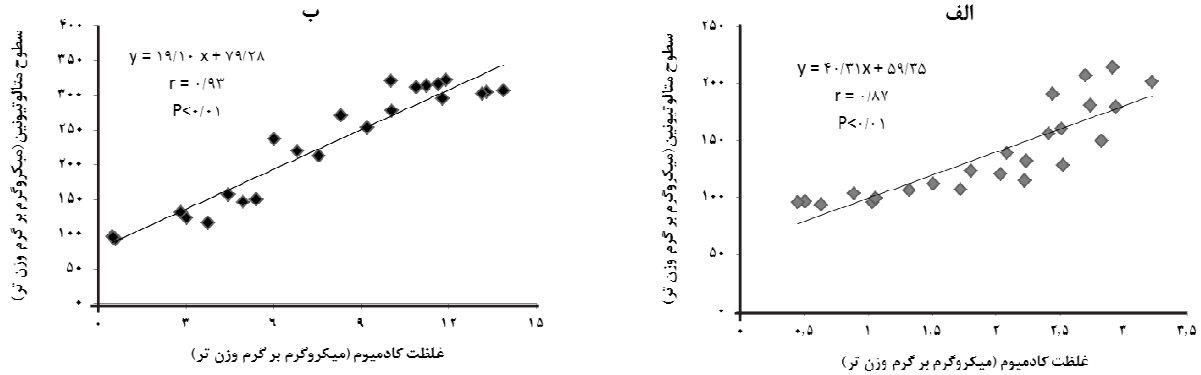
بحث

نتایج حاصل از در معرض گذاری صدف ها با فلزات سنگین جیوه و کادمیوم به مدت ۱۴ روز در محیط آزمایشگاه نشان داد که تجمع زیستی فلز جیوه در بافت نرم صدف علی رغم

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-05]



شکل ۵. رابطه بیوسنتز متالوتیونین و تجمع زیستی جیوه در بافت نرم دوکفه ای .Crassostrea sp در معرض قرار گرفته با غلظت های جیوه: الف) ۱۵ µg/L ب) ۷۵ µg/L



شکل ۶. رابطه بیوسنتز متالوتیونین و تجمع زیستی کادمیوم در بافت نرم دوکفه ای .Crassostrea sp در معرض قرار گرفته با غلظت های کادمیوم: الف) ۱۵ µg/L ب) ۱۵۰ µg/L

غلظت کمتر به کار رفته، قوی تر و بیشتر از تجمع کادمیوم است. این نتیجه در مطالعات دیگری نیز که محققین مختلف در سایر نقاط دنیا دو کفه ای ها را در معرض فلزات سنگین اعم از جیوه و کادمیوم قرار داده اند به دست آمده است. Baudrimont و همکاران در سال ۱۹۹۷ دوکفه ای های Corbicula fluminea را در معرض فلزات جیوه و کادمیوم در غلظت های مختلف قرار دادند و مشاهده نمودند که پس از ۳۰ روز در معرض گذاری، تجمع جیوه در بافت نرم صدف، ۴ برابر تجمع کادمیوم بود (۲۲). Geret و همکاران در سال ۲۰۰۲ دو کفه ای های Crassostrea gigas و Mytilus edulis را به مدت ۲۱ روز در معرض فلزات جیوه (۲۰ µg/L) و کادمیوم (۲۰۰ µg/L) قرار دادند و مشاهده نمودند که تجمع زیستی جیوه با وجود غلظت کمتر، هم در اویستر و هم در ماسل بیشتر از کادمیوم است (۳۱). در مطالعه ای دیگر Blackmore و همکار در سال ۲۰۰۴ با در معرض قرار دادن اویستر Saccostrea cucullata و حلزون Thais clavigera با کادمیوم، جیوه، متیل جیوه و روی، به این نتیجه رسیدند که اویستر ها قابلیت جذب خیلی بیشتری برای جیوه و متیل جیوه در مقایسه با کادمیوم و روی نسبت به حلزون‌ها دارند (۳۲). به همین ترتیب Paul-Pont و همکاران در سال ۲۰۱۰ با در معرض قرار دادن صدف های Cerastoderma edule با فلزات جیوه (۱/۵ µg/L) و کادمیوم (۵ µg/L) به مدت ۷ روز و بررسی تجمع آن ها در بافت های مختلف مشاهده نمودند که تجمع زیستی فلز جیوه سریع تر و بیشتر از کادمیوم است (۳۳).

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-05]

تجمع زیستی فلزات در بافت نرم دو کفه ای های در معرض قرار گرفته با غلظت µg/L ۱۵ از هر کدام، تا پایان در معرض گذاری (روز چهاردهم) با روندی تقریبا یکنواخت افزایش یافته است. درحالی‌که میزان تجمع زیستی در صدف های در معرض قرار گرفته با غلظت های بالاتر این فلزات (µg/L ۷۵ جیوه و µg/L ۱۵۰ کادمیوم) طی ۱۰ روز نخست در معرض قرار گیری با روندی صعودی، افزایش یافته ولی از روز دهم به بعد این روند ملایم تر شده است، که در صدف های در معرض قرار گرفته با جیوه به تدریج رو به ثبات می رود. بنابراین با افزایش غلظت جیوه و کادمیوم در بافت نرم، میزان جذب آن ها از محیط کمتر شده است. Naimo و همکاران در سال ۱۹۹۲ بیان کردند که دوکفه ای در معرض قرار گرفته با آلاینده در غلظت خیلی بالا به مدت زیاد، دریچه طولی کفه خود را بسته و فعالیت فیلترینگ را متوقف می نماید، که این واکنش به عنوان یک مکانیسم دفاعی عمومی در صدف ها، از ورود بیشتر آلاینده ها به بدن جلوگیری می نماید (۳۴). Serafim و همکار در سال ۲۰۱۰ با در معرض گذاری صدف های Ruditapes decussates با فلزات کادمیوم، مس و روی به مدت ۲۵ روز مشاهده نمودند که تجمع زیستی فلزات تا ۱۴ روز نخست آزمایش شدید و رو به افزایش بوده، در حالی- که از روز چهاردهم تا پایان در معرض گذاری، شیب تجمع زیستی این فلزات به خصوص کادمیوم به تدریج کم شده است (۱۰).

سنتز متالوتیونین در پاسخ به تجمع زیستی جیوه و کادمیوم

غلظت های پروتئین متالوتیونین در بافت نرم دو کفه ای های در معرض قرار گرفته با فلز جیوه با سطوح این پروتئین در بافت نرم نمونه های شاهد اختلاف معنی داری نشان داد (P< ۰/۰۵). بین صدف های در معرض قرار گرفته با دو غلظت متفاوت جیوه در مدت زمان های مختلف، تنها روز دهم در معرض گذاری صدف ها با غلظت µg/L ۱۵ جیوه و روز هشتم در معرض گذاری صدف ها با غلظت µg/L ۷۵ جیوه، دارای اختلاف معنی داری در سطوح پروتئین متالوتیونین با تیمار های دیگر بود ولی سایر تیمار ها اختلاف معنی‌داری در بیوسنتز متالوتیونین نشان ندادند.

در معرض گذاری صدف ها با جیوه منجر به تحریک سنتز پروتئین متالوتیونین در سلول گردید، اما سنتز متالوتیونین در بافت نرم دو کفه ای های در معرض قرار گرفته با دو غلظت جیوه بر خلاف روند مشخص و صعودی تجمع این فلز، روند مشخصی نداشت. به طوری‌که بیشترین نرخ متالوتیونین در صدف های در معرض قرار گرفته با غلظت µg/L ۱۵ جیوه به مدت ۱۰ روز دیده شد. در حالی که بیشترین نرخ تجمع جیوه مربوط به دوکفه ای های در معرض قرار گرفته با غلظت µg/L ۷۵ جیوه به مدت ۱۴ روز بود. از این رو بین غلظت های متالوتیونین و تجمع زیستی جیوه در بافت نرم دوکفه ای ها همبستگی مستقیم و معنی داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵). محققین مختلفی نیز در مطالعات آزمایشگاهی خود بر دوکفه ای های دریایی و آب شیرین، همبستگی مستقیم و معنی داری بین غلظت های متالوتیونین و جیوه مشاهده ننموده اند. Cosson در سال ۲۰۰۰ با در معرض گذاری دوکفه ای C. gigas با فلزات جیوه، کادمیوم، نقره، مس و روی مشاهده نمود که برای هر ۵ فلز مطالعه شده افزایش معنی داری در غلظت های متالوتیونین آبشش حاصل شد. اما تنها فلزات کادمیوم و مس با غلظت های متالوتیونین همبستگی مستقیم و معنی داری نشان دادند (۳۵). Geret و همکاران در سال ۲۰۰۲ با مطالعه اثر جیوه بر سطوح پروتئین های متالوتیونین و MDA در اویستر C. gigas و ماسل M. edulis در طی در معرض گذاری با این فلز، مشاهده نمودند که تجمع زیستی جیوه، تحریک این پروتئین ها را به دنبال داشته است، با این حال همبستگی مستقیم و معنی داری بین سطوح متالوتیونین با مقادیر جیوه مشاهده نکردند (۳۱). Blackmore و همکار در سال ۲۰۰۴ با در معرض گذاری دو کفه ای های S.cucullata با غلظت های µg/L ۵، ۲۰ و ۱۰۰ کادمیوم و µg/L ۰/۰۳۴، ۰/۱۷۲، ۰/۶۸۶، ۳/۴۳۰ و ۱۷/۱۵ جیوه به مدت ۱۴ روز، القاء پروتئین متالوتیونین را در بافت نرم صدف ها توسط کادمیوم و جیوه مشاهده نمودند (۳۲). Paul- Pont و همکاران در سال ۲۰۱۰ سنتز پروتئین متالوتیونین را در صدف های C. edule پس از در معرض گذاری با فلزات جیوه و کادمیوم مطالعه و مشاهده نمودند که القاء متالوتیونین در دوکفه ای های در معرض قرار گرفته با جیوه علی رغم تجمع قوی تر و بیشتر جیوه در بافت ها نسبت به کادمیوم،

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-05]

اختلاف معنی داری با نمونه های کنترل نشان نداد (۳۳).
مقادیر متالوتیونین در بافت نرم دو کفه ای های در معرض قرار گرفته با فلز کادمیوم نیز با سطوح این پروتئین در بافت نرم نمونه های شاهد اختلاف معنی داری را نشان داد ($P< ۰/۰۵$). به همین ترتیب سطوح این پروتئین در صدف های در معرض قرار گرفته با دو غلظت متفاوت کادمیوم در مدت زمان های مختلف، دارای اختلافات معنی داری بود.
روند سنتز متالوتیونین در بافت نرم صدف های در معرض قرار گرفته با غلظت های کادمیوم با روند تجمع زیستی این فلز کاملا مطابقت داشت. به طوری که با افزایش تجمع کادمیوم در بافت نرم، سنتز پروتئین متالوتیونین نیز افزایش یافته است. بنابراین همبستگی مستقیم، قوی و معنی داری بین سطوح متالوتیونین با تجمع زیستی کادمیوم در دوکفه ای های در معرض قرار گرفته با هر دو غلظت به کار رفته مشاهده شد ($P< ۰/۰۱$). به طوری که صدف های در معرض قرار گرفته با غلظت بالاتر کادمیوم (۱۵۰ µg/L کادمیوم) همبستگی بالاتری با ضریب همبستگی ۰/۹۳، نسبت به صدف های در معرض قرار گرفته با غلظت کم این فلز (۱۵ µg/L کادمیوم) با ضریب همبستگی ۰/۸۷ نشان دادند. Langston و همکاران در سال ۱۹۹۸، Viarengo و همکاران در سال ۲۰۰۰، Geret در سال ۲۰۰۰، Geffard و همکاران در سال ۲۰۰۱ و ۲۰۰۲ و Paul-Pont و همکاران در سال ۲۰۱۰ در مطالعات آزمایشگاهی خود به این نتیجه رسیدند که در دو کفه ای های دریایی، فلز کادمیوم نسبت به فلزات دیگر پتانسیل بسیار قوی تری جهت تحریک پروتئین متالوتیونین دارد (۳۳، ۳۶-۴۰).
Blackmore و همکار در سال ۲۰۰۲ با در معرض گذاری صدف سبز Pernaviridis با کادمیوم به مدت ۲۱ روز، مشاهده نمودند که توزیع کادمیوم در فراکشن MTLP همراه با افزایش بار کادمیوم بدن افزایش یافته است و بیان داشتند که افزایش کادمیوم در فراکشن MTLP بدین معنا است که القاء متالوتیونین، سمیت زدایی کادمیوم جدیدی که وارد بدن صدف شده است را عهده دار است (۴۱). Lecoeur و همکاران در سال ۲۰۰۴ با در معرض گذاری صدف های D. polymorpha با غلظت های کادمیوم و مس و همچنین اختلاط این دو فلز، مشاهده نمودند که تنها فلز کادمیوم همبستگی قوی و معنی داری با بیوسنتز متالوتیونین نشان داد، در حالی که بین مس و متالوتیونین همبستگی معنی داری مشاهده نکردند، همچنین اختلاط دو فلز موجب تحریک متالوتیونین گردید، اما همبستگی معنی داری با آن نداشت (۱۴). Ivankovic و همکاران در سال ۲۰۰۹ صدف های Dressiena polymorpha را در معرض شیب آلودگی، فلز کادمیوم قرار دادند و القاء قوی متالوتیونین مطابق با تجمع زیستی بالای کادمیوم در صدف را مشاهده نمودند (۴۲). Serafim و همکار در سال ۲۰۱۰ با در معرض گذاری دوکفه ای های Ruditapes decussates با فلزات مس، روی و کادمیوم، مشاهده نمودند که در بین فلزات مطالعه شده، تنها کادمیوم تاثیر مثبت و معنی داری بر القاء متالوتیونین ایجاد نموده است (۱۰).
روند بیوسنتز متالوتیونین در صدف های در معرض قرار گرفته با غلظت ۱۵ µg/L کادمیوم نشان داد که تا روز ششم در معرض گذاری اختلاف معنی داری در غلظت های متالوتیونین رخ نداد. همان طور که Geret و همکاران در سال ۲۰۰۲ اویستر های C. gigas و ماسل های M. edulis را در معرض فلزات سنگین جیوه، کادمیوم، مس، روی و نقره برای دو دوره ۴ و ۲۱ روزه قرار داده و مشاهده نمودند که پس از ۴ روز در معرض گذاری دوکفه ای ها با فلزات تغییری در غلظت های متالوتیونین رخ نداد، اما پس از ۲۱ روز در معرض گذاری آن ها با فلزات، افزایش معنی داری در غلظت های این پروتئین حاصل شد (۳۱). Moraga و همکاران در سال ۲۰۰۵ با در معرض گذاری صدف های C. gigas با غلظت های ۰/۴ µM و ۴ M فلزات کادمیوم و مس، مشاهده نمودند که در غلظت ۰/۴ µM فلزات، القاء متالوتیونین حاصل نشد، در حالی که در غلظت ۴ M از آن ها القاء متالوتیونین بارز بود (۲۰).
حداکثر سنتز متالوتیونین مربوط به صدف های در معرض قرار گرفته با غلظت ۱۵۰ µg/L کادمیوم به مدت ۱۲ روز بود که البته اختلاف معنی داری با غلظت متالوتیونین در دوکفه های در معرض قرار گرفته با این غلظت به مدت ۱۰ روز نداشت. بنابراین با وجود ادامه در معرض گذاری تا روز چهاردهم، سطوح متالوتیونین در صدف ها از روز دهم به بعد افزایش معنی داری نیافت. همچنین در دوکفه ای های در معرض قرار گرفته با جیوه مشاهده شد که بیوسنتز متالوتیونین در صدف های مربوط

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-05]

به تیمار µg/L ۱۵ بیشتر از صدف های در معرض قرار گرفته با غلظت µg/L ۷۵ جیوه بود. به عقیده محققین مختلف، علت این اثر بازدارندگی این است که غلظت های بالای فلز می تواند برای صدف ها سمی باشد به دلیل تجاوز از ظرفیت دفاع سلولی تحریک شدنی آن ها که مطابق با اثر کلی بازدارندگی جیوه و کادمیوم بر سنتز پروتئین سلولی است (۳۱ ، ۴۳). Martinez و همکاران در سال ۱۹۹۶ محدودیت تحریک سنتز متالوتیونین در آمفی پود E. echinosetosus را در بالاترین دوز کادمیوم تست شده (µg /L ۲۰۰۰) که برای این گونه کاملا سمی بود و موجب مرگ و میر حدود ۳۵٪ گردید را به اثبات رساندند (۴۴). Mouneyrac و همکاران در سال ۲۰۰۲ در آمفی پود O. gammarellus در معرض قرار گرفته با دوز های مس و روی بیشتر از LC۵۰s ۱۷ روز، عدم تحریک سنتزمتالوتیونین یا حتی تخلیه غلظت های متالوتیونین را مشاهده نمودند (۴۵). بر اساس نتایج Ivankovic و همکاران در سال ۲۰۰۹ تحریک سنتز متالوتیونین در غلظت های بالاتر از µg/L ۱۰۰ (۱۰۰ تا µg/L ۵۰۰) خفیف تر از آن در غلظت های ۰ تا µg/L ۱۰۰ بود، به طوری که در غلظت های بالاتر از µg/L ۱۰۰ فقط یک افزایش ناچیزی در غلظت متالوتیونین رخ داد (۴۲). Fang و همکاران در سال ۲۰۱۰ با در معرض گذاری دوکفه ای های Mactra veneriformis با سه غلظت کادمیوم مشاهده نمودند که غلظت متالوتیونین بر اثر در معرض گذاری با کادمیوم تا روز یازدهم افزایش یافته و از روز یازدهم به بعد به تدریج کاهش یافته است. آن ها اختلال فیزیولوژیکی در اثر سمیت کادمیوم به مدت طولانی را دلیل این امر بیان نمودند (۱۳).

محققین مختلفی اذعان نموده اند که به طور کلی همبستگی سطوح متالوتیونین با غلظت فلزات سنگین در شرایط آزمایشگاهی به نسبت مطالعه میدانی بیشتر و مشهود تر است. یک تفسیر احتمالی برای این تفاوت، تحریک سنتز ایزوفرم های خاص متالوتیونین توسط فلزات سنگین در محیط آزمایشگاهی است. در حالی که در طبیعت الگوی بیان ایزوفرم های مختلف متالوتیونین می تواند با انواع فاکتور های مداخله کننده شامل اثرات سینرژیستیک و آنتاگونیستیک بین آلاینده ها متاثر باشد (۴۶ ، ۴۷). همچنین فاکتور های دیگری در شرایط محیطی همچون دمای آب، فصل، کمبود اکسیژن، مرحله جنسی، گرسنگی، انجماد، حضور آنتی بیوتیک ها و حشره کش ها می توانند بر سنتز پروتئین متالوتیونین تاثیر بگذارند (۹ ، ۴۸).

نتیجه گیری

از یافته های حاصل از این تحقیق نتیجه می گردد که در معرض گذاری صدف .Crassostrea sp با غلظت های زیر حد کشنده (Sublethal) فلزات جیوه و کادمیوم، منجر به تغییر در سطوح متالوتیونین می گردد. اما با توجه به این که تنها فلز کادمیوم همبستگی مستقیم و معنی داری با بیوسنتز متالوتیونین نشان داد استنتاج می شود که این پروتئین در دوکفه ای Crassostrea .sp نشانگر زیستی استرس ایجاد شده توسط آلودگی کادمیوم در محیط و بدن موجود است و می توان از آن جهت ارزیابی آلودگی اکوسیستم و پایش منطقه، به عنوان نشانگر در معرض بودن موجود با کادمیوم استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه با عنوان ارزیابی استفاده از متالوتیونین به عنوان نشانگر زیستی آلودگی جیوه و کادمیوم در صدف .Crassostrea Sp در منطقه بندر امام خمینی (ره) و محیط آزمایشگاه در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۳۹۰ است که با حمایت دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر و نیز مرکز پژوهش پتروشیمی بندر امام خمینی اجرا شده است. همچنین نگارندگان بر خود لازم می دانند از آقای دکتر Dusika Ivankovic به موجب مساعدت و راهنمایی های بی دریغ خود در روش سنجش پروتئین متالوتیونین تقدیر و تشکر نمایند.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-05]

منابع

1-Thompson KC, Wadhia K, Loibner AP. Environmental Toxicity Testing. Oxford: Blackwell Publishing; 2005.

2- Calow PP. Handbook of Ecotoxicology. Volume one. Oxford: Blackwell Publishing; 1993.

3- Hylander LD, Goodsite ME. Environmental costs of mercury pollution. Science of the Total Environment. 2006;368(1):352-70.

4- Frery N, Nessmann C, Girard F, Lafond J, Moreau T, Blot P, et al. Environmental exposure to cadmium and human birthweight. Toxicology. 1993;79(2):109-18.

5- Nordberg GF. Cadmium and health in the 21st century–historical remarks and trends for the future. Biometals. 2004;17(5):485-89.

6- Funes V, Alhama J, Navas J, López-Barea J, Peinado J. Ecotoxicological effects of metal pollution in two mollusk species from the Spanish South Atlantic littoral. Environmental Pollution. 2006;139(2):214-23.

7- Geffard A, Amiard-Triquet C, Amiard J-C. Do seasonal changes affect metallothionein induction by metals in mussels, Mytilus edulis? Ecotoxicology and Environmental Safety. 2005;61(2):209-20.

8- United Nations Environment Programme. Manual on the biomarkers recommended for the Med Pol biomonitoring programme. Greece: United Nations Environment Programme; 1999.

9- Amiard J-C, Amiard-Triquet C, Barka S, Pellerin J, Rainbow P. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. Aquatic Toxicology. 2006;76(2):160-202.

10- Serafim A, Bebianno M. Effect of a polymetallic mixture on metal accumulation and metallothionein response in the clam *Ruditapes decussatus*. Aquatic Toxicology. 2010;99(3):370-78.

11- Smaoui-Damak W, Berthet B, Hamza-Chaffai A. In situ potential use of metallothionein as a biomarker of cadmium contamination in *Ruditapes decussatus*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2009;72(5):1489-98.

12- Dabrio M, Rodríguez AR, Bordin G, Bebianno MJ, De Ley M, Šestáková I, et al. Recent developments in quantification methods for metallothionein. Journal of Inorganic Biochemistry. 2002;88(2):123-34.

13- Fang Y, Yang H, Wang T, Liu B, Zhao H, Chen M. Metallothionein and superoxide dismutase responses to sublethal cadmium exposure in the clam *Mactra veneriformis*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. 2010;151(3):325-33.

14- Lecoeur S, Videmann B, Berny P. Evaluation of metallothionein as a biomarker of single and combined Cd/Cu exposure in *Dreissena polymorpha*. Environmental Research. 2004;94(2):184-91.

15- Lionetto M, Giordano M, Caricato R, Pascariello M, Marinosci L, Schettino T. Biomonitoring of heavy metal contamination along the Salento coast (Italy) by metallothionein evaluation in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus*. Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems. 2001;11(4):305-10.

16- Beliaeff B, O'Connor T, Claisse D. Comparison of chemical concentrations in mussels and oysters from the United States and France. Environmental Monitoring and Assessment. 1998;49(1):87-95.

17- Hedge L, Knott N, Johnston E. Dredging related metal bioaccumulation in oysters. Marine Pollution Bulletin. 2009;58(6):832-40.

18- Maanan M. Heavy metal concentrations in marine molluscs from the Moroccan coastal region. Environmental Pollution. 2008;153(1):176-83.

19- Azimi A, Safahieh A, Dadollahi Sohrab A, Zolgharnein H, Saffar B, Savari A. Assessment of metallothionein as a biomarker of heavy metal (Hg, Cd, Pb and Cu) in Oyster *Crassostrea gigas* in Imam Khomeini Port. Journal of Oceanography. 2012;3(9):27-39 (in Persian).

20- Moraga D, Meistertzheim A-L, Tanguy-Royer S, Boutet I, Tanguy A, Donval A. Stress response in Cu^{2+} and Cd^{2+} exposed oysters (*Crassostrea gigas*): An immunohistochemical approach. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. 2005;141(2):151-56.

21- Park J, Kim H. Bioassays on marine organisms; acute toxicity test of mercury, cadmium and copper to arkshell, Anadara broughtonii, from Jindong bay, and to oyster *Crassostrea gigas*, from *Kwangdo B*ay, Coast of Korea [R.]. Journal of the Oceanological Society of Korea. 1978;13(2):35-43.

22- Baudrimont M, Metivaud J, Maury-Brachet R, Ribeyre F, Boudou A. Bioaccumulation and metallothionein response in the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*) after experimental exposure to cadmium and inorganic mercury. Environmental Toxicology and Chemistry. 1997;16(10):2096-105.

23- Boutet I, Tanguy A, Auffret M, Riso R, Moraga D. Immunochemical quantification of metallothioneins in marine mollusks: Characterization of a metal exposure bioindicator. Environmental Toxicology and Chemistry. 2002;21(5):1009-14.

24- Pellerin J, Amiard JC. Comparison of bioaccumulation of metals and induction of metallothioneins in two marine bivalves (*Mytilus edulis* and *Mya arenaria*). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. 2009;150(2):186-95.

25- Kimura M, Otaki N, Imano M. Rabbit liver metallothionein. Tentative amino acid sequence of metallothionein-B. Metallothionein. Experientia Supplementurn. 1979;34(2):163-68.

26- Viarengo A, Ponzano E, Dondero F, Fabbri R. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. Marine Environmental Research. 1997;44(1):69-84.

27- Tanguy A, Boutet I, Bonhomme F, Boudry P, Moraga D. Polymorphism of metallothionein genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* as a biomarker of response to

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-05]

metal exposure. Biomarkers. 2002;7(6):439-50.
28- Shi J-b, Liang L-n, Jiang G-b, Jin X-l. The speciation and bioavailability of mercury in sediments of Haihe River, China. Environment International. 2005;31(3):357-65.
29- Yap C, Ismail A, Tan S, Omar H. Correlations between speciation of Cd, Cu, Pb and Zn in sediment and their concentrations in total soft tissue of green-lipped mussel *Perna viridis* from the west coast of Peninsular Malaysia. Environment international. 2002;28(1):117-26.
30- Regional Organization for the Protection of the Marine Environment. Manual of Oceanographic Observations and Pollutant Analyses Methods (MOOPAM). 3rd ed. Kuwait: Regional Organization for the Protection of the Marine Environment; 1999.
31- Géret F, Jouan A, Turpin V, Bebianno MJ, Cosson RP. Influence of metal exposure on metallothionein synthesis and lipid peroxidation in two bivalve mollusks: The oyster (*Crassostrea gigas*) and the mussel (*Mytilus edulis*). Aquatic Living Resources. 2002;15(01):61-66.
32- Blackmore G, Wang W-X. The transfer of cadmium, mercury, methylmercury, and zinc in an intertidal rocky shore food chain. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 2004;307(1):91-110.
33- Paul-Pont I, Gonzalez P, Baudrimont M, Nili H, de Montaudouin X. Short-term metallothionein inductions in the edible cockle Cerastoderma edule after cadmium or mercury exposure: Discrepancy between mRNA and protein responses. Aquatic Toxicology. 2010;97(3):260-67.
34- Naimo TJ, Atchison GJ, Holland-Bartels LE. Sublethal effects of cadmium on physiological responses in the pocketbook mussel, *Lampsilis ventricosa*. Environmental Toxicology and Chemistry. 1992;11(7):1013-21.
35- Cosson R. Bivalve metallothionein as a biomarker of aquatic ecosystem pollution by trace metals: Limits and perspectives. Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-Grand, France). 2000;46(2):295-309.
36- Geffard A, Amiard J, Amiard-Triquet C. Use of metallothionein in gills from oysters (*Crassostrea gigas*) as a biomarker: Seasonal and intersite fluctuations. Biomarkers. 2002;7(2):123-37.
37- Geffard A, Amiard-Triquet C, Amiard J-C, Mouneyrac C. Temporal variations of metallothionein and metal concentrations in the digestive gland of oysters (*Crassostrea gigas*) from a clean and a metal-rich site. Biomarkers. 2001;6(2):91-107.
38- Geret F. Synthese de metallothioneines chez deux bivalves (l'huõtre et la moule) en reponse a une contamination metallique par la voie directe et par la voie trophique [dissertation]. Nantes: University of Nantes; 2000.
39- Langston WJ, Bebianno MJ, Burt GR. Metal handling strategies in molluscs. In: Langston WJ, Bebianno MJ, editors. Metal metabolism in aquatic environments. London: Chapman and Hall; 1998.
40- Viarengo A, Burlando B, Ceratto N, Panfoli I. Antioxidant role of metallothioneins: A comparative overview. Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-Grand, France). 2000;46(2):407-17.
41- Blackmore G, Wang W-X. Uptake and efflux of Cd and Zn by the green mussel *Perna viridis* after metal pre-exposure. Environmental Science and Technology. 2002;36(5):989-95.
42- Ivanković D, Pavičić J, Beatović V, Klobučar RS, Klobučar GIV. Inducibility of metallothionein biosynthesis in the whole soft tissue of zebra mussels *Dreissena polymorpha* exposed to cadmium, copper, and pentachlorophenol. Environmental Toxicology. 2010;25(2):198-211.
43- George SG, Olsson PE. Metallothioneins as indicators of trace metal pollution. In: Kramer KJM, editors. Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries. Boca Raton: CRC Press; 1994.
44- Martinez M, Ramo JD, Torreblanca A, Pastor A, Diaz-Mayans J. Cadmium toxicity, accumulation and metallothionein induction in *Echinogammarus echinosetosus*. Journal of Environmental Science and Health Part A. 1996;31(7):1605-17.
45- Mouneyrac C, Amiard J, Amiard-Triquet C, Cottier A, Rainbow P, Smith B. Partitioning of accumulated trace metals in the talitrid amphipod crustacean *Orchestia gammarellus*: A cautionary tale on the use of metallothionein-like proteins as biomarkers. Aquatic Toxicology. 2002;57(4):225-42.
46- Hamza-Chaffai A, Roméo M, Gnassia-Barelli M, El Abed A. Effect of copper and lindane on some biomarkers measured in the clam *Ruditapes decussatus*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 1998;61(3):397-404.
47- Legras S, Mouneyrac C, Amiard J, Amiard-Triquet C, Rainbow P. Changes in metallothionein concentrations in response to variation in natural factors (salinity, sex, weight) and metal contamination in crabs from a metal-rich estuary. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 2000;246(2):259-79.
48- George SG, Olsson PE. Metallothioneins as indicators of trace metal pollution. In: Suzuki KT, Imura N, Kimura M, editors. Metallothionein (vol III): biological roles and medical implications. Basel: Birkhäuser Verlag; 1993. p. 29–55.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-05]

Response of Metallothionein biomarker in oyster *Crassostrea sp.* to the mercury and cadmium gradient

A. Azimi*[1], A. R. Safahieh[2], A. Dadollahi Sohrab[3], H. Zolgharnein[2], A. Savari[4], B. Saffar[5]

[1.] Iranian National Institute for Oceanography and Atmospheric Sciences (INIOAS), Tehran Iran,

[2.] Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Oceanography, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran

[3.] Department of Environment, Faculty of Natural Resources, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran

[4.] Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Oceanography, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran

[5.] Department of Genetic, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord University. Shahrekord. Iran.

Received; 23 October 2013 Accepted; 20 January 2014

Abstract

Background and Objective: Present study aimed to investigate response of metallothionein (MT) in oyster Crassostrea sp. to the experimental concentrations of Hg and Cd in order to assess the possibility of MT usage as a biomarker of Hg and Cd contamination in this mollusk.

Materials and Methods: Oysters were collected from docks of Imam Khomeini Port. After seven days acclimation period in laboratory, they were exposed with Hg at concentrations of 15 and 75 $\mu g.L^{-1}$ and Cd at concentrations of 15 and 150 $\mu g.L^{-1}$ for 14 days. MT levels were measured through spectrophotometric method after extraction and precipitation. After preparation and acid digestion, the concentration of heavy metals was quantified by atomic absorption.

Results: The amounts of MT in oysters exposed with Hg and Cd were significantly increased compared with control samples ($P<0.05$). The highest value of MT biosynthesis in oysters exposed with concentrations of Hg and Cd were 137.2±7.6 and 312.4±17.9 $\mu g.g^{-1}$ w.w respectively. Exposing the oysters with Cd induced biosynthesis of MT more than three times compared with control samples. Among Hg and Cd, there was only significant correlation between biosynthesis of MT and Cd bioaccumulation in oysters ($P<0.01$).

Conclusion: MT protein in oyster Crassostrea sp. can be considered as a suitable biomarker of Cd contamination in body and environment. Hence, it could be used for assessing and monitoring ecosystems.

Key Words: Biomarker, Metallothionein, mercury, cadmium, exposure, Oyster Crassostrea sp

***Corresponding Author**: *a.azimi@inio.ac.ir*
Tel:

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-05]