magiran.com

بررسی پروتئین متالوتیونین بعنوان نشانگر زیستی آلودگی جیوه در ماهی زروک (*Scatophagus argus*)

محمود سینایی[۱]؛ کاظم درویش بسطامی[۲]*؛ آلمارا زیادلو[۳]؛ سپیده کردجزی[٤] و مهناز وجدانیان[٥]

Darvish_60@yahoo.com

۱- واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد، تهران صندوق پستی: ۷۷۵-۱٤٥۱٥

۲- موسسه ملی اقیانوس شناسی، تهران صندوق پستی: ۳٦۹-٤٦٥۱٥

۳ و ٤- دانشکده شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان صندوق پستی:۳۸٦-٤۹۱٦٥

٥- دانشگاه پیام نور، فسا صندوق پستی: ۹٥٥۳۹- ۷٤٦۱۸

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۸۸ تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۸۹

چکیده

بررسی انواع نشانگرهای زیستی در تعیین میزان و نوع آلودگی و نیز تعیین سطح سلامت اکوسیستمهای دریایی در طرح‌های پایش زیست‌محیطی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. در این راستا، میزان تجمع زیستی فلز جیوه و بیوسنتز متالوتیونین بعنوان نشانگر زیستی این فلز در بافتهای کبد و آبشش ماهی زروک پس از قرارگیری در معرض غلظت‌های متفاوت جیوه (۱۰، ۲۰ و ۳۰ میکروگرم بر لیتر) در طول ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفته است. میزان تجمع زیستی جیوه توسط روش Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry, Unicam 919, UK (CVAAS) میزان متالوتیونین توسط روش ELISA اندازه‌گیری شده است. بافتهای مختلف ماهی نسبت به تحریک سنتز متالوتیونین الگوهای متفاوتی را نشان می‌دهند بنحویکه میزان تجمع جیوه و بیوسنتز متالوتیونین در بافت کبد نسبت به آبشش میزان بیشتر است. تحریک سنتز متالوتیونین در کبد پس از قرارگیری در معرض غلظتهای مختلف جیوه در زمانهای مختلف نسبت به نمونه شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد ($P<0.05$). این افزایش میزان متالوتیونین با میزان تجمع زیستی جیوه نیز رابطه معنی‌داری را نشان می‌دهد. اگر چه در بافت آبشش غلظتهای مختلف جیوه در زمانهای مختلف بجز در مورد ۳۰ میکروگرم بر لیتر پس از ۷۲ ساعت میزان بیوسنتز متالوتیونین افزایش معنی‌داری را نشان نمی‌دهد با این حال با افزایش تجمع زیستی جیوه دارای رابطه معنی‌داری می‌باشد. نتایج این تحقیق نشان‌دهندهٔ تحریک بیوسنتز این فرم از متالوتیونین در ماهی زروک و همچنین پاسخ و واکنش سریع این گونه نسبت به سطوح مختلف آلودگی جیوه می‌باشد. این امر می‌تواند استفاده از متالوتیونین را بعنوان نشانگر زیستی فلزات سنگین بویژه جیوه در پایش زیستی و طرحهای پایش زیست محیطی اکوسیستم‌های دریایی بویژه خلیج فارس گسترش دهد.

لغات کلیدی: ماهی زورک، اکوسیستم، تجمع زیستی، بیوسنتز، خلیج فارس

* نویسندهٔ مسئول

magiran.com

مقدمه

اکوسیستم‌های دریایی بدلیل فعالیتهای انسانی توسط انواع مختلفی از آلاینده‌ها بویژه فلزات سنگین آلوده شده‌اند. در این میان آلودگی جیوه یکی از خطرات جدی و مهم در محیطهای طبیعی محسوب می‌گردد (Pilon-Smits & Pilon, 2000) بنحویکه دومین عامل سمیت در بین فلزات سنگین بشمار می‌آید. این فلز به دو فرم آلی و غیرآلی (Storelli *et al.*, 2003) در طبیعت وجود دارد و جزء معدود آلاینده‌هایی محسوب می‌گردد که در زنجیرهٔ غذایی بصورت بزرگ نمایی زیستی (Biomagnification) ظاهر می‌گردد (Ribeiro *et al.*, 1996). وضعیت موجود منجر به انجام آزمایشات و تحقیقات بسیاری در زمینه اثرات جیوه بر عملکردهای زیستی موجودات دریایی بویژه مکانیسم دفاعی در ماهیان گردیده است. گونه‌های مختلف ماهی الگوهای متفاوتی را در تجمع فلزات و همچنین بیوسنتز متالوتیونین بعنوان مکانیسم سمیت‌زدایی نشان می‌دهند. بافتهای مختلف نیز بدلیل تفاوت در کارکردهای فیزیولوژیک و بیوشیمیایی، الگوهای متفاوتی را در این زمینه نشان می‌دهند.

زروک ماهیان (Scatophagidae) در منطقه اقیانوس آرام، مصبهای لب شور، پایین دست رودخانه‌ها، به میزان فراوان در بین جنگلهای حراء و در خلیج فارس نیز یافت می‌شود. این گونه در اغلب اوقات بصورت گله‌ای زندگی می‌کند.

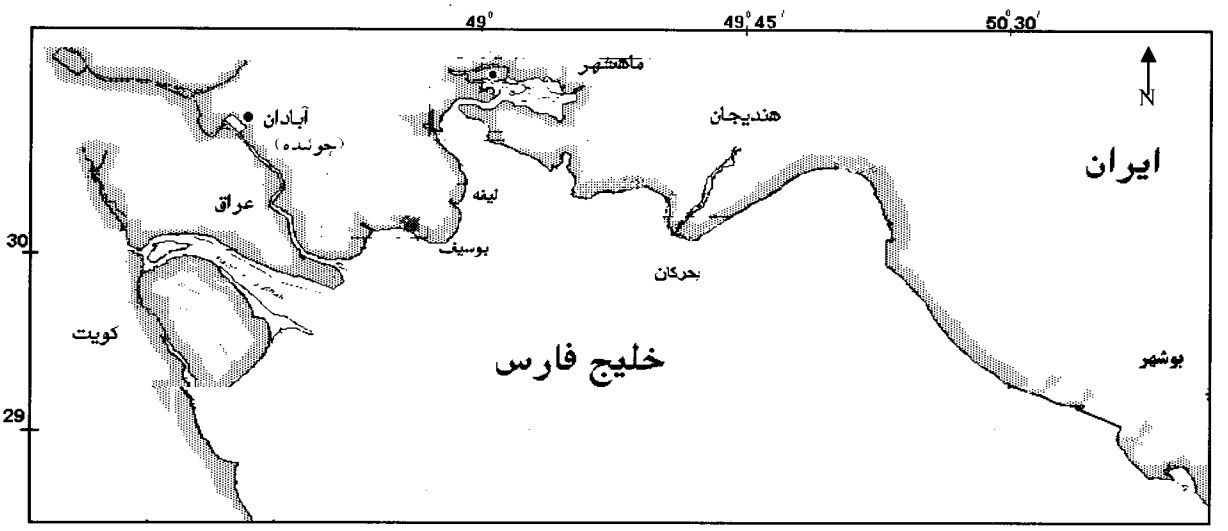
متالوتیونین از جمله پروتئینهای با وزن مولکولی کم (6-8 kda) حاوی ۲۰ اسید آمینه سیستئین درساختمان درونی خود می باشد که همین امر منجر به اعطای ویژگی منحصر بفرد خاصیت ترکیب با فلزات به این پروتئین شده است (Dabrio *et al.*, 2002). متالوتیونین عمدتاً در سیتوزول و همچنین در هسته حضور دارد (De Boeck *et al.*, 2003). این پروتئین به عنوان ماده جاذب فلزات سمی نظیر (کادمیوم , جیوه) وفلزات ضروری (مس و روی) می تواند به عنوان نشانگر زیستی در ارزیابی قرارگیری موجود درمعرض فلزات و پیش بینی پتانسیل تاثیرات ناشی از آلودگی فلزات مورد استفاده قرار گیرد (Ivankovic *et al.*, 2005). تحریک بیوسنتز متالوتیونین یا دیگر پروتئین های مشابه درماهی درشرایط آزمایشگاهی و محیط های طبیعی توسط محققان بسیاری گزارش گردیده است (De Boeck *et al.*, 2003 ;Hamza-Chaffai *et al.*, 2000).

هدف از این بررسی عبارست است از: ۱) ارزیابی کارآیی بافتهای کبد و آبشش در قابلیت تجمع زیستی جیوه، ۲) ارزیابی ظرفیت باند متالوتیونین دردو ارگان مورد نظر با فلز جیوه بعنوان مکانیسم سمیت زدایی، ۳) بررسی رابطه بین بیوسنتز متالوتیونین و میزان تجمع زیستی جیوه در هر بافت، ۴) تعیین اثر زمان و غلظت بر بیوسنتز متالوتیونین در این بافتها، ۵) ارزیابی توانایی و ظرفیت ماهی زروک برای بیوسنتز متالوتیونین جهت کاهش اثرات سمی فلز جیوه و ۶) ارزیابی استفاده از این پروتئین بعنوان شاخص آلودگی جیوه در اکوسیستمهای دریایی با تاکید بر خلیج فارس می‌باشد.

مواد و روش کار

زروک ماهیان (*S. argus*) از سواحل غربی خلیج فارس (بوشهر) (شکل ۱) در طول تابستان ۱۳۸۶ جمع‌آوری (میانگین± انحراف استاندارد وزن ۷±۱۴۳ گرم و طول کل ۱±۱۴ سانتیمتر) به آزمایشگاه دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر منتقل گردید. ماهیان به مدت دو هفته در دو آکواریوم ۲۰۰ لیتری براساس استاندارد OECD و در ۱±۲۶ درجه سانتیگراد در دوره‌های نوری ۱۴-۱۲ ساعته جهت سازگاری با شرایط آزمایشگاهی نگهداری شدند. سختی آب در حدود ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر کربنات کلسیم و pH = ۷/۴±۰/۲ در نظرگرفته شد. آب مورد استفاده فیلتر شده و سطوح آمونیوم، نیتریت و نیترات در آب پایین‌تر از ۰/۱، ۰/۱ و۲۰ میلیگرم در لیتر نگهداری گردید. در طول دوره سازگاری، ماهیان یکبار در روز توسط غذای ماهی Biomar Co و به میزان ۳ درصد توده زنده ماهی تغذیه گردیدند.

magiran.com



شکل ۱: موقعیت ایستگاههای نمونه‌برداری ماهی زروک (*S. argus*) در سواحل غربی خلیج فارس (بوشهر)

پنج عدد ماهی زورک برای هر تیمار با میانگین (± انحراف استاندارد) وزن ۷±۱۴۳ گرم و طول کل ۱±۱۴ سانتیمتر) در معرض غلظتهای ۲۰،۱۰،۰ و ۳۰ میکروگرم بر لیتر در طول ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از جیوه قرار گرفتند ($HgCl_2$,20, extra pure Merck). هیچگونه تلفات در طول آزمایش مشاهده نگردید. آب آکواریوم‌ها بصورت روزانه تعویض و جیوه به آب اضافه گردید. میزان جیوه جهت اطمینان از ثابت بودن سطوح مد نظر توسط روش CVAAS سنجش شد. غذادهی یک روز پیش از شروع آزمایش قطع و در طول آزمایش نیز غذادهی صورت نگرفت. پس از طی شدن هر دوره آزمایش، ماهیان توسط پودر خشک شده گل میخک بیهوش و بافتهای کبد و آبشش در روی یخ جدا گردیدند. نمونه‌ها بدو قسمت تقسیم، وزن و در ۸۰- درجه سانتیگراد جهت آزمایشات بعدی نگهداری گردیدند (De Boeck *et al.*, 2003).

میزان کل سطوح جیوه توسط روش CVAAS سنجش گردید. پس از ذوب شدن نمونه‌ها، یک گرم از بافت در ۲۰ میلی‌لیتر از H_2SO_4, HNO_3 غلیظ قرار گرفت، اکسیداسیون بیشتر در ۱۰ میلی‌لیتر از محلول اشباع $KMnO_4$ انجام شد. سپس جیوه بخار توسط دستگاه جذب اتمی (Unicam 919, UK) سنجش گردید (De Boeck *et al.*, 2003).

پس از ذوب شدن، نمونه‌های کبد و آبشش در محلول بافر (10mM cold Tris-HCl pH = 7.0) که حاوی 5m 2-mercaptoethanol (جهت جلوگیری از اکسیداسیون) با PMSF (بعنوان بازدارنده فعالیت آنزیمهای پروتئاز) در حجم ۲/۵-۳ (W/V) در هموژن کننده تفلونی با دور ۱۲۰۰-۱۰۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت. ماده هموژن شده به مدت ۴۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد با دور ۱۲۰۰۰×g سانتریفیوژ شد. ماده شناور رویی در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت و سپس مجدداً به مدت ۴۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد با دور ۱۲۰۰۰×g سانتریفیوژ شد (Filipovic´& Raspor, 2003).

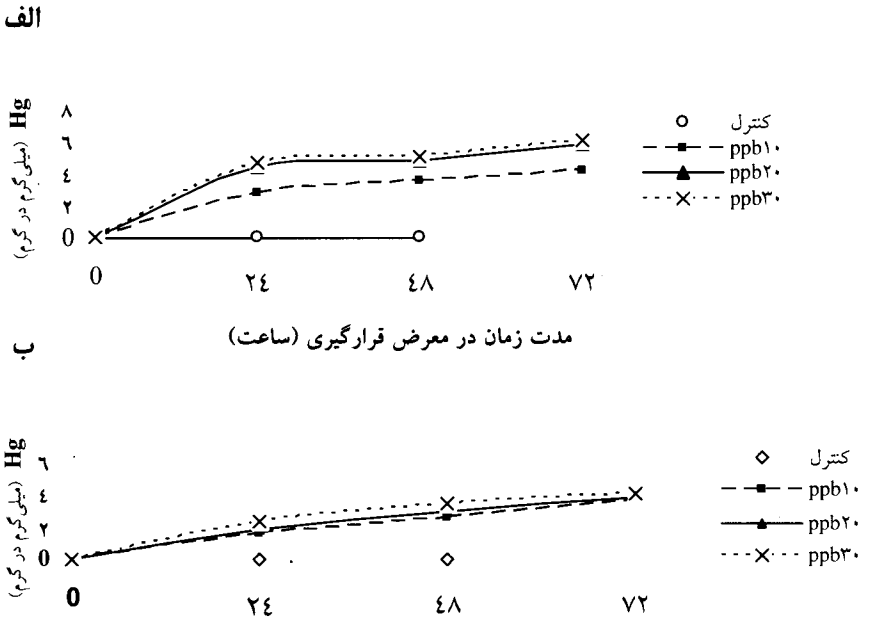
پلیت‌های ۹۶تایی الیزا توسط ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های مختلف برای مدت ۱۲ ساعت در ۴ درجه سانتیگراد قرار گرفت. سپس نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق با ۲۰۰ میکرولیتر از BSA ۳ درصد در PBS ۰/۰۱ درصد مول بر لیتر در pH = ۷/۴ قرار داده شد. پس از چهار بار شستشو توسط BSA ۰/۰۱ درصد، Tween20 ۰/۰۵ درصد در PBS، ۱۰ میکرولیتر آنتی بادی اولیه Metallothionein rabbit anti-cod رقیق شده به نسبت ۱:۱۰۰۰ در هر خانه پلیت اضافه و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲ ساعت قرار گرفت. پس از چهار بار شستشو توسط محلولهای قبلی ۱۰۰ میکرولیتر از HRP (peroxidase labeled goat anti–rabbit IgG) رقیق شده به نسبت ۱:۳۰۰۰ در TBS-Tween به هر خانه اضافه و مدت ۲ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. پس از ۴ بار شستشو ۱۰۰ میکرولیتر از ABTS به هر خانه اضافه و به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگه‌داری شد. پس از تغییر رنگ (گسترش رنگ) سطوح متالوتیونین توسط دستگاه ELISA Reader (DYNATECH MR5000) در طول موج ۴۰۵ نانومتر خوانده شد (Filipovic´& Raspor, 2003). آنالیز آماری داده‌ها با

magiran.com

استفاده از برنامه SPSS (Version15) صورت گرفت. برای تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از انجام آزمایش ابتدا نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون کولموگراف - اسمیرنف بررسی شد. از آنالیز واریانس دو طرفه جهت بررسی تاثیر غلظت و مدت زمان در معرض قرارگیری روی تجمع زیستی جیوه و بیوسنتز متالوتیونین در سطح معنای ۵ درصد استفاده شد. همچنین روش آنالیز واریانس یکطرفه جهت بررسی وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح معنای ۵ درصد بین تیمارهای مختلف با یکدیگر و همچنین با نمونه شاهد صورت پذیرفت. جهت تعیین دقیق وجود یا عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین مقدار تراکم جیوه و غلظت متالوتیونین بین بافتهای مختلف ماهیان مورد آزمایش از آزمون Tukey استفاده شد. برای تعیین وجود ارتباط خطی و میزان آن بین مقادیر تجمع زیستی جیوه و بیوسنتز متالوتیونین نیز از آزمون رگرسیون خطی و همبستگی پیرسون استفاده شد. نمودارها نیز در نرم افزار Excel رسم گردید.

نتایج

تجمع زیستی جیوه در بافتهای کبد و آبشش در مقایسه با نمونه‌های شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد ($P<0.05$). همچنین تجمع زیستی جیوه در بافت کبد از آبشش بیشتر و اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد ($P<0.05$). با این حال تجمع زیستی جیوه در هر دو بافت به میزان زیادی به سطوح مختلف آلودگی و مدت زمان قرارگیری در معرض جیوه بستگی دارد ($P<0.05$). رابطه متقابلی بین این دو فاکتور در بافتهای مورد بررسی (غلظت جیوه و مدت زمان در معرض قرارگیری) یافت نگردید ($P>0.05$). در کبد تجمع زیستی در طول ۲۴ ساعت اول آزمایش افزایش سریع و سپس یک روند افزایش نسبی بین ۲۴ و ۴۸ ساعت در میکروگرم جیوه در لیتر ۱۰ و در یک روند آرام و تقریباً یکنواخت برای ۲۰ و ۳۰ میکروگرم جیوه در لیتر در ۴۸ ساعت مشخص گردید. میزان تجمع زیستی جیوه در شرایط ۳۰ میکروگرم جیوه در لیتر در ۲۴ ساعت میزان پایین‌تری نسبت به ۲۰ میکروگرم جیوه در لیتر پس از ۷۲ ساعت نشان می‌دهد (نمودار ۱- الف). در آبشش روند تجمع نشانگر افزایش جیوه با گذشت زمان بصورت خطی است اما در این بافت تجمع زیستی جیوه در دو سطوح آلودگی (۳۰-۲۰ میکروگرم جیوه بر لیتر) پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت کمتر از ۱۰ و ۲۰ میکروگرم جیوه بر لیتر پس از گذشت ۷۲ ساعت می‌باشد (نمودار ۱- ب).



نمودار ۱: تجمع زیستی جیوه در کبد (الف) و آبشش (ب) در ماهی زروک

magiran.com

بیوسنتز متالوتیونین در بافتهای مختلف الگوهای متفاوتی دارد بنحویکه میزان بیوسنتز آن در کبد از آبشش بیشتر و اختلاف معنی‌داری نشان می‌دهد ($P<0.05$). در کبد، نتایج اختلاف معنی‌دار بین نمونه‌های شاهد و تیمار داشت. بین تیمارهای مختلف نتایج نشان‌دهندهٔ عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۱۰ میکروگرم جیوه بر لیتر پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت با یکدیگر و همچنین با دیگر سطوح آلودگی پس از گذشت ۲۴ ساعت می‌باشد (جدول ۱) . انجام آزمون ANOVA دو طرفه (سطوح آلودگی و مدت زمان در معرض قرارگیری) نشان‌دهندهٔ وجود اختلاف معنی‌دار با میزان متالوتیونین است که این بیانگر وجود اثر سطوح مختلف آلودگی و مدت زمان در معرض قرارگیری بر بیوسنتز متالوتیونین است. بین این دو فاکتور نیز رابطه معنی‌داری مشخص گردید ($P<0.05$). در آبشش، نتایج نشان‌دهندهٔ اثر مدت زمان در معرض قرارگیری و سطوح آلودگی بر بیوسنتز متالوتیونین می‌باشد ($P<0.05$) اما هیچگونه رابطه متقابلی بین غلظت و مدت زمان یافت نگردید ($P>0.05$). در این بافت هیچگونه اختلاف معنی‌داری بین نمونه‌های شاهد و تیمار بجز با سطح آلودگی ۳۰ میکروگرم جیوه بر لیتر پس از گذشت ۷۲ ساعت پیدا نشد. بین تیمارها نیز هیچگونه اختلاف معنی‌داری بجز در سطح آلودگی ۱۰ میکروگرم جیوه بر لیتر در طول ۲۴ تا ۴۸ ساعت و ۲۰ میکروگرم جیوه در لیتر در ۲۴ ساعت با ۳۰ میکروگرم جیوه در لیتر در ۲۴ ساعت یافت نگردید (جدول ۱).

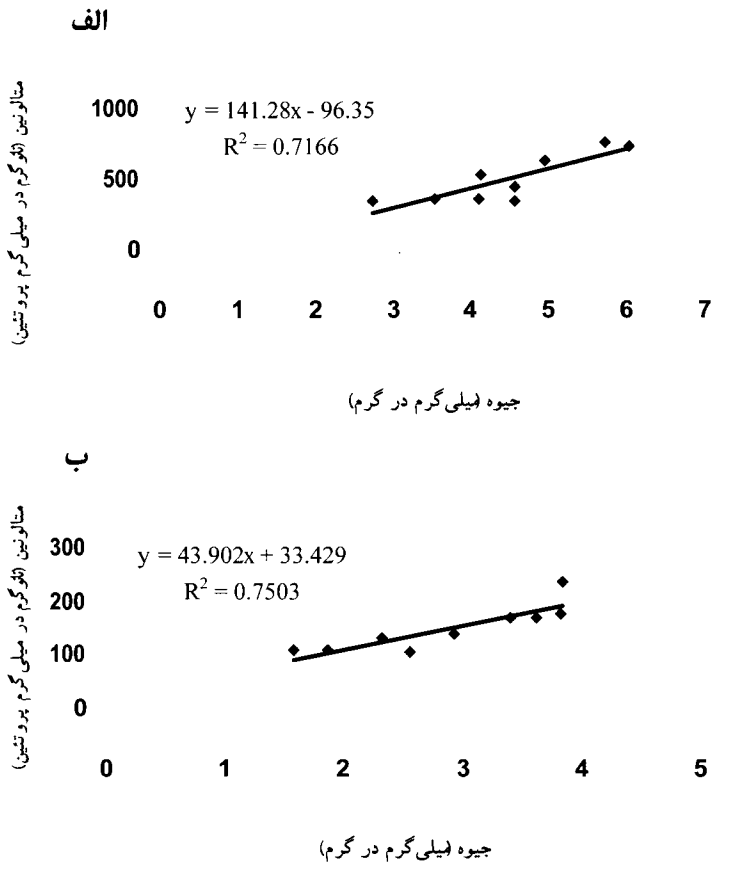
افزایش بیوسنتز متالوتیونین در کبد ماهی زروک رابطه معنی‌داری را ($r = ۰/۸۴$) با تجمع زیستی جیوه نشان می‌دهد (شکل۲-الف). اگر چه هیچگونه اختلاف معنی‌داری در آبشش بین نمونه‌های کنترل و تیمار بجز در مورد ۳۰ میکروگرم جیوه در لیتر در ۷۲ ساعت یافت نگردید. با این حال رابطه معنی‌داری ($r = ۰/۸۷$) بین بیوسنتز متالوتیونین و تجمع زیستی جیوه یافت شد (نمودار۲- ب).

جدول ۱: میانگین غلظت (± انحراف معیار) متالوتیونین در کبد و آبشش ماهی زروک در نمونه‌های شاهد و تیمار

غلظت (میکروگرم جیوه بر لیتر)	زمان (ساعت)	بیوسنتز متالوتیونین (نانوگرم بر گرم پروتئین)	
		کبد	آبشش
شاهد	۰-۲۴-۴۸-۷۲	۲۵۴±۱۵/۳۶۲[a]	۱۱۷/۲ ± ۴۲ /۱۹۸[g]
۱۰	۲۴	۳۸۱/۶±۱۷/۷۸[b]	۱۱۸/۲±۱۴/۱۱۳[g]
	۴۸	۳۹۹/۴ ±۳۶/۱۲[b]	۱۱۷/۸±۱۷/۶۹۷[g]
	۷۲	۶۸۶/۶±۴۴/۰۳[e]	۱۷۹/۶±۴۴/۰۶۰[gh]
۲۰	۲۴	۳۹۴/۶±۵۳/۸۷[b]	۱۲۰/۶±۳۹/۳۸۶[g]
	۴۸	۵۱۳/۲±۳۷/۲۲[d]	۱۴۹/۲±۴۱/۵۸۹[gh]
	۷۲	۸۰۱/۲±۴۸/۶۰[c]	۱۸۸/۶±۷۸/۷۶۴[gh]
۳۰	۲۴	۳۸۲/۰±۱۸/۷۰[b]	۱۴۱/۲±۵۱/۶۱۵[gh]
	۴۸	۶۵۲/۰±۶۷/۵۳[f]	۱۷۹/۴±۸۲/۹۷۴[gh]
	۷۲	۷۷۵/۰±۴۸/۶۰[c]	۲۴۸/۴±۵۵/۶۱۲[h]

در هر ستون اعدادی که با حروف غیر مشابه نشان داده شده‌اند بر مبنای آزمون توکی دارای اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشند ($P<0.05$).

magiran.com



نمودار ۲: رابطه بین بیوسنتز متالوتیونین و تجمع زیستی جیوه در بافت کبد (الف) و آبشش (ب) ماهی زروک

بحث

قرارگیری کوتاه مدت ماهی زروک در معرض غلظتهای مختلف جیوه (۱۰، ۲۰ و ۳۰ میکروگرم بر لیتر) و در مدت زمانهای مختلف (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) منجر به افزایش تجمع زیستی جیوه در بافتهای آبشش و کبد همگام با افزایش غلظت و مدت زمان در معرض قرارگیری گردید. تجمع زیستی جیوه در بافت کبد نسبت به آبشش اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد. این روند تجمع زیستی توسط بسیاری از دیگر محققین نیز گزارش گردیده است و می‌تواند ناشی از ظرفیت پایین پیوند با فلزات در بافت آبشش نسبت به کبد باشد که در نتیجه آن حضور و بیوسنتز متالوتیونین در آبشش نیز کمتر خواهد بود (Lange *et al*., 2001a;De Smet *et al*., 1996; Olsvik *et al*., 2002). (۲۰۰۱) نشان داد که حضور کادمیوم در آبشش ماهی قزل‌آلا به سرعت توسط جریان چرخشی خون پاک شده و به دیگر نقاط بدن نظیر کبد، کلیه (مکانی که می‌تواند به مدت طولانی‌تری باقی بماند) انتقال می‌یابد که این امر در مورد ماهی زروک مورد مطالعه در این بررسی نیز می‌تواند صدق کند.

غلظت و مدت زمان در معرض قرارگیری اثر معنی‌داری بر بیوسنتز متالوتیونین در این بافتها دارد. مطالعات بسیاری در سطح آزمایشگاهی (*in vivo*) و طبیعی (*in vitro*) نیز بیانگر و تایید کننده این نتایج می‌باشد. Wu و همکاران (۲۰۰۵) نشان دادند که غلظت و زمان در معرض قرارگیری اثر معنی‌داری بر تجمع زیستی کادمیوم و بیوسنتز متالوتیونین در بافتهای کبد و آبشش ماهی تیلاپیا (*Oreochromis mosambicus*) پس از قرارگیری در معرض کادمیوم در مدت زمان ۲۴ تا ۷۲ ساعت دارد. بطور کلی، تا زمانی که غلظت آلاینده‌ها در محیط به حدی باشد که منجر به ایجاد اثرات شدید روی سیستمهای فیزیولوژیک ماهی نگردد، رابطه معنی‌داری بین غلظت و مدت زمان در معرض قرارگیری با بیوسنتز متالوتیونین بوجود می‌آید.

نتایج نشاندهندهٔ افزایش سریع و معنی‌دار بیوسنتز متالوتیونین در بافت کبد ماهی زروک پس از قرارگیری در معرض غلظتهای

magiran.com

مختلف جیوه است، اما در بافت آبشش یک روند افزایشی نسبی را در طول تیمارهای مختلف نشان می‌دهد و تنها با بالاترین غلظت و زمان در معرض قرارگیری اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد. عدم وجود اختلاف معنی‌دار بیوسنتز متالوتیونین در بافت آبشش بجز با بالاترین غلظت و مدت زمان در معرض قرارگیری نشاندهندهٔ ظرفیت پایین این بافت جهت تحریک بیوسنتز این پروتئین در هنگام آلودگی با جیوه در کوتاه مدت می‌باشد. برخی محققین معتقدند که آبشش نمی‌تواند اندام مناسبی جهت محاسبه و تخمین بیوسنتز متالوتیونین محسوب گردد (Olsvik *et al.*, ;Chaffai *et al.*, 1997 2001) چرا که تحریک بیوسنتز این پروتئین بستگی به نوع سلول دارد و فقط در سلولهای کلراید رخ می‌دهد (Burkhardt-Holm *et al.*, 1999 ;Dang et *al.*, 2000). با این حال نتایج تحقیق حاضر نشاندهندهٔ رابطه معنی‌دار بین بیوسنتز متالوتیونین و تجمع زیستی جیوه در بافت آبشش است، این امر منجر به ایجاد بیشترین نرخ بقا در مدت در معرض قرارگیری نیز گردیده است که این می‌تواند نشاندهندهٔ وجود ارگانهایی با کارآیی بسیار بالا در ماهی زروک جهت سمیت‌زدایی فلز جیوه باشد. سمیت جیوه در ماهی دارای یک فاز شوک به همراه وجود آسیب‌های گسترده در اولین ساعات یا روزهای در معرض قرارگیری است و پس از آن سیستمهای ترمیمی وارد عمل می‌شوند (McDonald *et al.*, 1993). بنابراین وجود یک واکنش حفاظتی سریع که در کوتاهترین زمان ممکن عمل کرده و آسیب‌های وارده را به حداقل برساند یکی از سودمندترین فوائد برای ماهیان محسوب می‌گردد که به نظر می‌رسد ماهی زروک واجد چنین مکانیسم سودمندی می‌باشد. در بافت کبد نیز نتایج همچنین نشاندهندهٔ رابطه معنی‌دار و قوی بین تجمع زیستی جیوه و بیوسنتز متالوتیونین است. این رابطه معنی‌دار همچنین در کبد ماهی کلمه (Roach) که در معرض کادمیوم (Bonwick *et al.*, 1991) ماهی کپور معمولی و gibel (De Boeck et *al.*, 2003) carp و همچنین gudgeon (Bervoets *et al.*, 2002) پس از قرارگیری در معرض فلز روی نیز نشان داده شده است. محققین بسیاری وجود یک رابطه مثبت بین فلزات و محتوای متالوتیونین در بافتهای ماهی بعنوان جذب کننده آنها و یک رابطه ضعیف در زمان افزایش میزان فلزات نسبت به ظرفیت پیوند متالوتیونین یا دیگر پروتئین‌ها با این فلزات نشان داده‌اند (Filipovic *et al.*, 2003)، براساس این نظر جایگاه جذب پروتئین متالوتیونین جهت به دام انداختن فلز جیوه و سمیت‌زدایی آن در بافتهای ماهی زروک در تیمارهای مورد بررسی بطور کامل اشغال نشده است بعبارت ساده‌تر هنوز پروتئین متالوتیونین در این بافتها دارای جایگاههای خالی جهت جذب و سمیت‌زدایی جیوه است که این بیانگر توانایی بالای این گونه در مقابله با اثرات سمی فلزات سنگین بویژه جیوه است.

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که بافت کبد نسبت به آبشش در تجمع زیستی جیوه و تحریک بیوسنتز متالوتیونین دارای کارآیی به مراتب بیشتری است. نتایج همچنین نشاندهندهٔ وجود اثرات معنی‌دار غلظت و مدت زمان در معرض قرارگیری بر بیوسنتز متالوتیونین در ماهی زروک است. بررسی‌ها همچنین موکد رابطه معنی‌دار بین بیوسنتز متالوتیونین با تجمع زیستی جیوه است. این موارد در کنار واکنش سریع ماهی زروک نسبت به سطوح مختلف آلودگی جیوه در بیوسنتز متالوتیونین بویژه در طول ۲۴ ساعت اول می‌تواند استفاده از متالوتیونین را در این گونه بعنوان نشانگر آلودگی جیوه در خلیج فارس توسعه بخشد.

تشکر و قدردانی

مراتب تشکر و امتنان خود را از مسئولین محترم آزمایشگاه دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز و دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر بدلیل همکاری صمیمانه در انجام پروژه ابراز می‌داریم.

منابع

Bervoets L., Lodts M., Van Campenhout K. and Blust R., 2002. Heavy metals as a threat for restored fish populations in a lowland river. *In*: (eds. M.J. Collares-Pereira, M.M. Coelho, and I.G. Coux). Conservation of freshwater Fishes: Options for the future. Blackwell Science Publications, Oxford, pp.250–261.

Bonwick G.A., Fielden P.R. and Davies D.H., 1991. Hepatic metallothionein levels in roach (*Rutilus rutilus*) continuously exposed to water-borne cadmium. Comparative Biochemistry and Physiology C, 99C:119–125.

magiran.com

Burkhardt-Holm P., Bernet D. and Hogstrand C., 1999. Increase of metallothione in imunopositive chloride cells in the gills of brown trout and rainbow trout after exposure to sewage treatment plant effluents. Histochemical Journal, 31:339-346.

Cattani O., Serra R., Isani G., Giampaolo R., Cortesi P. and Carpene E., 1996. Correlation between metallothionein and energy metabolism in sea bass, *Dicentrarchus labrax*, exposed to cadmium. Comparative Biochemistry and Physiology, 113:193-199.

Chaffai A.H., Triquet C.A. and Abed A.E., 1997. Metallothionein-like protein: Is it an efficient biomarker of metal contamination? A case study based on fish from the Tunisian coast. Archive of Environmental Contamination and Toxicology, 33:53–62.

Dabrio M., Rodrı´guez A.R., Bordin G., Bebianno M.J., De Ley M., S˘esta´kova´ I., Vas˘a´k M. and Nordberg M., 2002. Recent developments in quantification methods for metallothionein. Journal of Inorganic. Biochemistry, 88:123–134.

Dang Z.C., Flik G., Ducouret B., Hogstrand C., Bonga S.E.W. and Lock R.A.C., 2000. Effects of copper on cortisol recepror and metallothionein expression in gills of *Oncorhynchus mykiss*. Aquatic Toxicology, 51:45-54.

De Boeck G., Ngo T.T.H., Van Campenhout K. and Blust R., 2003. Differential metallothionein induction patterns in three freshwater fish during sublethal copper exposure. Aquatic Toxicology, 65:413–424.

De Smet H. and Blust R. 2001a. Stress responses and changes in protein metabolism in carp *Cyprinus carpio* during cadmium exposure. Ecotoxicology and Environmental Safety, 48:255-262.

Filipovic´ V. and Raspor B., 2003. Metallothionein and metal levels in cytosol of liver, kidney and brain in relation to growth parameters of *Mullus surmuletus* and *Liza aurata* from the Eastern Adriatic Sea. Water Research, 37:3253–3262.

Hamza-Chaffai A., Amiard J.C., Pellerin J., Joux L. and Berthet B., 2000. The potential use of metallothionein in the clam *Ruditapes decussatusas* a biomarker of in situ metal exposure. Comparative Biochemistry and Physiology C, 127:185–197.

Ivankovic D., Pavicic J., Erk M., Filipovic-Marijic V. and Raspor B., 2005. Evaluation of the *Mytilus galloprovincialis* Lam. digestive gland metallothionein as a biomarker in a long-term field study: Seasonal and spatial variability. Marine Pollution Bulletin, 50:1303–1313.

Lange A., Ausseil O. and Segner H., 2002. Alterations of tissue glutathione levels and metallothionein mRNA in rainbow trout during single and combined exposure to cadmium and zinc. Comparative Biochemistry and Physiology C, 131:231-243.

McDonald D.G. and Wood C.M., 1993. Branchial mechanisms of acclimation to metals in freshwater fish. *In*: 9eds. J.C. Rankin and F.B. Jensen), Fish Ecophysiology. Chapman & Hall, London, UK. pp.297–321.

Olsvik P.A., Hindar K., Zachariassen K.E. and Andersen R.A., 2001. Brown trout (*Salma trutta*) metallothioneins as biomarkers for metal exposure in two Norwegian rivers. Biomarkers, 6:274- 288.

magiran.com

OECD (Organization for Economic Cooperation and Development), 1993. Fish, Acute Toxicity Test. OECD Guideline 203. Paris, France. pp.99.

Pilon-Smits E. and Pilon M., 2000. Breeding mercury-breathing plants for environmental cleanup. Trends in Plant Science, 5:235–236

Ribeiro C.A.O., Guimara˜es J.R.D. and Pfeiffer W.C., 1996. Accumulation and distribution of inorganic mercury in a tropical fish (*Trichomycterus zonatus*). Ecotoxicology and Environmental Safety, 34:190–195.

Storelli M.M., Giacominelli-Stuffler R. and Marcotrigiano G.O., 2003. Total and methyl mercury residues in cartilaginous fish from Mediterranean Sea. Marine Pollution Bulletin, 44:1354–1358.

Wu S.M. and Hwang P.P., 2005. Copper or cadmium pretreatment increases the protection against cadmium toxicity in Tilapia larvae (*Oreochromis mossambicus*). Zoological Studies, 42(1):179-185.

Wu S.M., Weng J.C., Hwang C.H. and Hwang P.P., 2002. Metallothionein induction in early larval of tilapia *Oreochromis mossambicus*. Physiology and Biochemistry of Zoology, 73:531-537.

magiran.com

Evaluation of Metallothionein protein as a biomarker of Mercury pollution in Scat (*Scatophagus argus)*

Sinaei M.[1]; Darvish Bastami K.[2]*; Ziadlu A.[3], Kordjazi S.[4] and Vojdanian M.[5]

darvish_60@yahoo.com

1- Research and Science Branch of Islamic Azad University, P.O.Box: 14515-775 Tehran, Iran

2- Iranian National Institute for Oceanography (INCO), P.O.Box: 46515-369Tehran, Iran

3,4-Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, P.O.Box: 45165-386 Gorgan, Iran

5- Payam Noor University, P.O.Box: 74618-95539 Fasa, Iran

Received: March 2009 Accepted: October 2010

Keywords: *Scatophagus argus*, Ecosystem, Bioaccumulation, Biosynthesis, Persian Gulf

Abstract

Total Metallothionein (MT) biosynthesis and Mercury bioaccumulation under control & acute Mercury exposure were investigated in Scat (*Scatophagus argus*). Tissues from liver and gill of samples Scats were exposed to different Mercury concentrations (10, 20, 30µg/l) for 24, 48, 72 hours. Mercury contents were determined through Cold Vapour Atomic Absorption Spectrometry (CVAAS). Total MT levels were determined by Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) method. Induction of MT during exposure was tissue specific, displaying different response patterns in gill and liver. Mercury accumulated in liver much stronger than gill and the latter also showed lower MT level. Although after exposure to different mercury concentration during different periods, MT biosynthesis in liver showed a significant increase ($P<0.05$) but in gill did not significantly modify total MT except for 72h exposure at 30µg/l. Nonetheless, the relationship between MT biosynthesis and Mercury bioaccumulation in both tissues was significant. The results suggest that this form of MT presence in *S. argus* was Hg-inducible and could be extended as a biomarker of Mercury pollution in marine ecosystems and especially in Persian Gulf.

* Corresponding author