مقایسه تغییرات فصلی فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در دوکفه‌ای *Mytilaster lineatus* و سخت‌پوست *Pontogammarus maeoticus* در دریای خزر

هانیه نیکوخرد[1*]، شیلا صفائیان[2]، عبدالحسین روستائیان[3]، ناهید رحیمی فرد[4]

۱- کارشناسی ارشد زیست شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، استان تهران، تهران، پست الکترونیکی: h_nikokherad@yahoo.com

۲- هیئت علمی گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، استان تهران، تهران، پست الکترونیکی: shila2462462@yahoo.co.in

۳- هیئت علمی گروه شیمی، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، استان تهران، تهران، پست الکترونیکی: arustaiyan@yahoo.it

۴- هیئت علمی گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، استان تهران، تهران، پست الکترونیکی: rahimifn@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۱/۷/۱۷ ** نویسنده مسوول* *تاریخ پذیرش: ۹۲/۵/۳*

© نشریه علمی ـ پژوهشی اقیانوس‌شناسی ۱۳۹۳، تمامی حقوق این اثر متعلق به نشریه اقیانوس‌شناسی است.

چکیده

در این بررسی به تأثیرات فصلی روی فعالیت آنزیم استیل کولین استراز و پروتئین، در دوکفه‌ای *Mytilaster lineatus* و سخت‌پوست *Pontogammarus maeoticus* در سال ۹۰-۸۹، در سواحل بابلسر در حاشیه جنوبی دریای خزر، پرداخته شده است. نتایج به‌دست آمده در مورد دوکفه‌ای *Mytilaster lineatus*، بیشترین مقدار میانگین پروتئین (۱۰/۴۶۱±۰/۴۸۳۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در اواخر فصل زمستان و بیشترین میزان میانگین فعالیت آنزیم استیل کولین استراز (۲۴/۶۳۵±۰/۷۸۲۹ میکرومول در دقیقه در میلی‌گرم از پروتئین) در اواخر فصل پاییز را نشان داد. در سخت‌پوست *Pontogammarus maeoticus*، بیشترین مقدار میانگین پروتئین (۹/۵۲۱±۰/۶۵۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در اواخر فصل تابستان و بیشترین میزان میانگین فعالیت آنزیم استیل کولین استراز (۱/۵۱۸ ± ۲۵/۱۵۵ میکرومول در دقیقه در میلی‌گرم از پروتئین) در اواخر فصل تابستان سنجش گردید. همچنین نتایج آماری روش آنالیز واریانس یک‌طرفه، با سطح P<۰/۰۵ اختلاف معنی‌داری را بین سطوح فعالیت آنزیم استیل کولین استراز و پروتئین معنی‌داری در هر دو موجود در فصل‌های مختلف سال را نشان داد. نتیجه‌ی نهایی نشان‌دهنده‌ی این بود که در دوکفه‌ای *Mytilaster lineatus* کمترین تنش مربوط به فصول سرد سال و در سخت‌پوست *Pontogammarus maeoticus* کمترین تنش مربوط به فصول گرم سال مشاهده می‌شود.

کلمات کلیدی: *Mytilaster lineatus*، *Pontogammarus maeoticus*، *تغییرات فصلی*، *استیل کولین استراز*، *پروتئین*.

۱. مقدمه

بیومارکرها شاخص‌هایی برای تشخیص آلودگی و تنش‌های محیطی هستند که با ایجاد تغییرات بیوشیمیایی، بافتی و فیزیولوژیکی، سبب آشکارسازی فشارهای زیست‌محیطی می‌گردند (Picado et al., 2007; Lam, 2009). در دهه‌های گذشته پروژه‌های پایش محیطی تنها بر مبنای اندازه‌گیری تغییرات فیزیکی و شیمیایی صورت می‌گرفت و گاهی اوقات نیز با تغییرات زیستی درآمیخته می‌گردید (Fulton and Key., 2001) بررسی‌های روزمره از ستون آب در سامانه‌های آبی اغلب شامل درجه حرارت، شوری، اکسیژن محلول در آب، مواد مغذی و آلوده‌کننده‌های شیمیایی بودند، که این فراسنج‌ها (پارامترها) به‌عنوان اندیکاتورهای مهمی برای تعیین کیفیت محیطی به‌کار گرفته می‌شدند و به نسبت سنجش آنها نیز آسان بود (Leiniö and Lehtonen., 2005; Livingston et al., 2000) اگر چه این گونه پروژه‌ها اطلاعات مهمی را در مقادیر آلودگی در اختیار ما می‌گذاشتند، ولی اثرات آلودگی‌ها را بر روی سامانه‌های زیست‌شناختی را بیان نمی‌کردند (Lam, 2009; Bocchetti et al., 2008; Gaitonde et al., 2006).

بررسی‌هایی که از طریق خصوصیات شیمیایی محیط، به کمک آنالیزهای شیمیایی صورت می‌گیرند، الزاماً کمکی در فهم اثرات این آلودگی‌ها در سامانه‌های زیست‌شناختی ندارند. همان‌طور که می‌دانیم هدف اصلی از پایش زیستی حمایت از سامانه‌های زیست‌شناختی/ بوم‌شناختی است، که در معرض آلودگی‌های شیمیایی و تنش‌های محیطی قرار گرفته‌اند (Pfeifer et al., 2006; Cailleaud et al., 2006; Lam, 2003; De La Torre et al., 2002).

اگرچه در گذشته از بیومارکرها تنها به‌عنوان اندیکاتورهای ویژه‌ای برای پایش‌های محیطی بر پایه‌ی مواد شیمیایی استفاده می‌گردید که شامل تغییرات بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی، ریخت‌شناختی و یا خصوصیات موجودات در یک نمونه یا اجتماعی از نمونه‌ها بود، اما اخیراً بیومارکرها در آکادمی ملی علوم آمریکا طبق جمله‌ی زیر تعریف گردیده است: در نتیجه‌ی ورود یا حضور ترکیباتی با ویژگی زنوبیوتیک، تغییراتی در ساختار بیوشیمیایی و یا سلولی موجود زنده ایجاد می‌شود. این ویژگی می‌تواند با تغییر ساختار یا عملکرد و یا تغییر مراحل انجام واکنش‌های گوناگون موجود زنده همراه بوده و پاسخ‌های زیست‌شناختی قابل اندازه‌گیری را در یک مدل زیست‌شناختی ایجاد نماید. این به این معناست که بیومارکرها تنها به بررسی آلودگی‌های ناشی از ترکیبات آلی و معدنی محیطی نمی‌پردازند، بلکه هر گونه تغییر در موجود که می‌تواند در اثر تنش‌های محیطی از قبیل شوری، درجه حرارت، اندازه، pH و غیره باشد، نیز به کمک بیومارکرها قابل اندازه‌گیری است (Menezes et al., 2006; Rodriguez-fuentes et al., 1999; Lam, 2009; Rickwood and Galloway, 2003; Pfeifer et al., 2006; Nunes, 2011).

در طی سال‌های اخیر، تغییرات زمانی – مکانی سامانه‌های زیست‌شناختی، به کمک بیومارکرها مورد ارزیابی قرار می‌گیرند و این پایش را می‌توان با کمک سنجش باقیمانده‌های شیمیایی در بافت‌هایی از ارگانیسم‌های زنده مورد بررسی قرار داد (Lau et al., 2004). بیومارکرها را می‌توان با اندازه‌گیری آنزیم‌های بدن موجودات معرفی نمود، که این ترکیبات توسط روش‌های مختلف و نیز با حضور آلاینده‌ها و تنش‌های محیطی به کمک پاسخ میزبان به آنها مورد ارزیابی قرار می‌گیرند (Bodin et al., 2004; Lam, 2009; Assis et al., 2007; Massoulié and Bon., 1982).

از جمله آنزیم‌های مهم می‌توان به کولین‌استرازها اشاره نمود که این آنزیم‌ها در مهره‌داران و بی‌مهرگان کاملاً متفاوت هستند و در بی‌مهرگان به‌طور معمول تنها یک شکل را از خود نشان می‌دهند که از مهم‌ترین آنها آنزیم استیل کولین استراز به‌عنوان یک آنزیم تمام و کمال برای پایش آلودگی‌های محیطی مطرح است (Hernandez et al., 2004; Widdows et al., 1982; Bernal – Hernández et al., 2010).

جایگاه عمل آنزیم استیل کولین استراز در غشاهای سلولی مهره‌داران و بی‌مهرگان بوده و آنزیم کنترل جریانات یونی را در غشاءها تحریک کرده و نقش اساسی را در فرایند هدایت عصبی در اتصالات عضلانی – عصبی را دارا هستند، که اندازه‌گیری فعالیت آنزیم با استفاده از روش‌های سنجش اسپکتروفتومتریک صورت می‌گیرد. هر چه فعالیت آنزیم استیل کولین استراز کمتر باشد، یعنی هیدرولیز استیل کولین کمتر بوده و لذا نشان دهنده‌ی تنش بیشتر در موجود است. به‌طور کلی سموم، آلودگی‌ها و تنش‌ها، کولین استرازهای بدن را از فعالیت باز می‌دارند و در نتیجه استیل کولین هیدرولیز نشده و در بدن تجمع پیدا می‌کند (Pfeifer et al., 2005; Ellman et al., 1960; Strik et al., 2007; Forget et al., 2003).

اگرچه استیل کولین استراز به‌خوبی در نتیجه عواملی مانند حشره‌کش‌های آلی و کاربامات‌ها تغییر می‌کنند، اما به‌تازگی اثرات

Ecotoxicology (اکوتوکسیوکولوژی) استیل کولین استراز مورد مطالعه قرار گرفته است که نشان می‌دهد عوامل محیطی از قبیل شوری، تغییرات درجه حرارت، pH، اندازه، وزن و غیره نیز ممکن است بتواند بر روی استیل کولین استراز تأثیر داشته باشند (Cousin et al., 2005; Schoor and Brausch, 1980; Binelli et al., 2005; Day and Scott., 1999; Pickering and Pickering., 1971).

بنابراین در این مطالعه بر آن شدیم که در دو گونه‌ی جانوری شامل *Mytilaster lineatus* به‌عنوان یک گونه‌ی مدیترانه‌ای پیوند زده شده با دریای خزر و *Pontogammarus maeoticus*، یکی از گونه‌های بومی دریای خزر، که هر دو از بنتوزهای بسیار مهم دریای خزر هستند، مشخص نماییم که آیا استیل کولین استراز نشان‌دهنده‌ی درصد تنش محیطی در آن‌ها است یا خیر؟

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱. نمونه‌برداری

نمونه‌های سخت‌پوست *Pontogammaru maeoticus* و دوکفه‌ای *Mytilaster lineatus* از سواحل دریای خزر در شهر بابلسر، در مختصات (E ″۵۸/۸۱ ′۳۸ °۵۲) و (N ″۴۶/۶۴ ′۴۲ °۳۶) جمع‌آوری شدند (شکل ۱).

نمونه‌ها به‌صورت تصادفی در ۴ فصل سال در آخر فصول (پاییز و زمستان ۸۹ و بهار و تابستان ۹۰) جمع‌آوری شدند. آزمون‌ها با ۶ تکرار در یک ایستگاه در هر نمونه انجام شد.

شکل ۱: محل نمونه‌برداری

در هر فصل از نمونه‌برداری حدود ۱۰۰ عدد سخت‌پوست و ۵۰ عدد دوکفه‌ای برداشت شد و نمونه‌ها بلافاصله در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد فریز و به آزمایشگاه منتقل شدند. در زمان نمونه‌برداری برخی از فراسنج‌های اصلی آب از جمله:

۱- درجه حرارت، ۲- شوری، ۳- EC، ۴- pH، ۵- Do نیز توسط دماسنج، شوری‌سنج، EC متر و اکسی متر اندازه‌گیری شد (DO_2 Master: مارک JENWAY (مدل 970)، pH meter and EC meter: مارک JENWAY).

۲-۲. آنالیزهای بیوشیمیایی

۲-۲-۱. سنجش پروتئین

در این بررسی پروتئین بر طبق روش لوری اندازه‌گیری شد و از بوین سرم آلبومین (BSA) به‌عنوان استاندارد بهره گرفته شد و منحنی استاندارد ترسیم شد. میزان پروتئین حاصل بر حسب مقدار پروتئین در واحد وزن تر در هر نمونه محاسبه گردید (Lowry et al., 1951).

۲-۲-۲. سنجش مقدار آنزیم استیل کولین استراز

سنجش فعالیت آنزیم استیل کولین استراز طبق روش المان بررسی گردید. در این روش ابتدا سوبسترا (استیل تیوکولین) و معرف (DTNB) آماده و سپس ۰/۰۲ گرم از نمونه وزن شد، آنگاه ترکیب حاصل به‌صورت هموژن درآمد و با ۱۰ میلی‌لیتر بافر ۸ مخلوط گردید. سپس ۰/۴ میلی لیتر از مخلوط هموژن برداشته و به آن ۲/۶ میلی‌لیتر بافر ۸ افزوده شد. پس از آن ۱۰۰ µl به کمک میکروپیپت به آن اضافه و در ۴۱۲ nm جذب آن اندازه‌گیری شد. سرانجام ۲۰ µl استیل‌کولین استراز به‌ترکیب اضافه شد و دوباره در ۴۱۲ nm جذب آن اندازه‌گیری گردید و سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه جذب آن هر ۳۰ ثانیه یک‌بار در ۴۱۲ nm توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد و ثبت گردید. فعالیت آنزیم استیل‌کولین استراز طبق فرمول زیر و بر اساس میکرومول در دقیقه در هر میلی گرم از پروتئین به‌دست خواهد آمد (Elman, 1960).

$$R = \frac{\Delta A}{۱/۳۶\,(۱۰^{۴})} \times \frac{۱}{(۳۲۰/۴۰۰)C_0} = ۵/۷۴(۱۰۴)\,\frac{\Delta A}{C_0} \qquad (۱)$$

R: مقدار مول‌های هیدرولیز شده سوبسترا در دقیقه در هر گرم از بافت

ΔA: تغییرات جذب در دقیقه

C_0: میزان تجمع بافت برحسب mg/ml

۲-۲-۳. سنجش فعالیت آنزیم استیل کولین استراز

برای سنجش فعالیت آنزیم ابتدا باید مقدار آنزیم استیل کولین استراز از فرمول ۱ به‌دست آید و سپس تقسیم بر پروتئین سنجش‌شده گردد. سپس میزان فعالیت آنزیم استیل کولین استراز بر حسب میکرومول دردقیقه در هر میلی گرم از پروتئین محاسبه شود (Ellman, 1960).

۲-۲-۴. بررسی آماری

بررسی‌های آماری توسط آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) با سطح معنی‌داری P<۰/۰۵ با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۴ با ۶ تکرار جهت مقایسه‌ی تفاوت‌ها و درجه معنی‌داری داده‌ها شامل، میانگین پروتئین، مقدار آنزیم در ۴ فصل، و فعالیت آنزیم در ۴ فصل تجزیه و تحلیل شد.

۳. نتایج

نتایج به‌دست آمده از فراسنج‌های غیرزیستی در سال ۹۰–۸۹ در ایستگاه بابلسر در میان محل جمع‌آوری ارگانیسم‌های *Mytilaster lineatus* و *Pontogammarus maeoticus* در جدول ۱ بیان شده است.

جدول ۱: نتایج فراسنج‌های دما، شوری، EC، pH، DO و اندازه موجودات در منطقه بابلسر در سال ۹۰ – ۸۹

فصول فراسنج‌های غیرزیستی	پاییز ۸۹	زمستان ۸۹	بهار ۹۰	تابستان ۹۰
دما (°C)	۹/۸±۰/۵۰۹۹	۷/۹ ± ۰/۵۵۱۳	۱۹/۴ ± ۰/۵۳۶۶	۲۶ ± ۰/۸۹۹۸
شوری (ppt)	۱۱/۴۲ ± ۰/۳۷۴۰	۱۰/۷۵ ± ۰/۴۸۳۵	۱۱/۵۸ ± ۰/۵۹۸۸	۱۰/۴± ۰/۳۸۹۳
EC (ms)	۱۴/۶۹ ± ۰/۴۱۰۹	۱۵/۳۰ ± ۰/۱۶۲۱	۱۵/۹۰ ± ۰/۲۰۹۴	۱۱/۴۷ ± ۰/۲۵۰۵
pH	۷/۶۵ ± ۰/۰۷۹۴	۷/۲۷ ± ۰/۰۹	۷/۹۸ ± ۰/۰۶۵۵	۸/۰۳ ± ۰/۰۵۳۱
DO (*mg / L*)	۸/۵ ± ۰/۴۳۵۵	۱۰/۴ ± ۰/۴	۸/۵ ± ۰/۱۸۶۱	۷/۴ ± ۰/۲۳۱۶
اندازه *M. lineatus*	۱۵/۴ ±۱/۸۱۶۵	۱۴/۶ ± ۲/۳۰۲۱	۱۶/۸ ± ۱/۳۰۳۸	۲۱/۴ ± ۱/۵۱۶۵
اندازه *P. maeoticus*	۸/۶ ± ۱/۵۱۶۵	۵/۴ ± ۱/۱۴۰۱	۱۰/۸ ± ۰/۸۳۶۶	۱۳/۲ ± ۰/۸۳۶۶

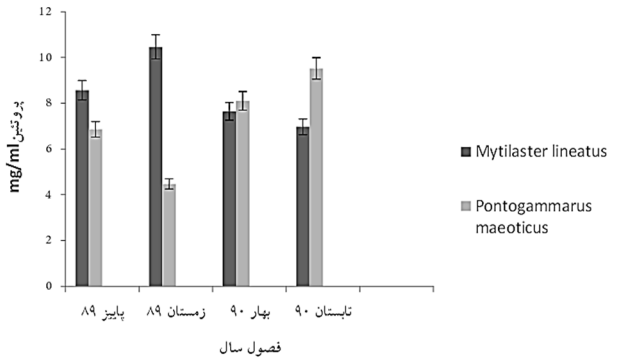
نتایج آماری آنالیز داده‌ها با سطح معنی‌داری P<۰/۰۵ نشان داد که اختلاف معنی‌داری در میزان pH وجود نداشت ولی مقدار اکسیژن محلول و درجه حرارت از عوامل مهم متغیر بوده و اختلاف معنی‌داری را بین فصول سال نشان دادند.

۳-۱. نتایج تغییرات فصلی پروتئین‌های دوکفه‌ای *Mytilaster lineatus*

نتایج آماری با سطح معنی‌داری P<۰/۰۵ نشان داد که بالاترین مقدار میانگین پروتئین در *Mytilaster lineatus* (۱۰/۴۶۱±۰/۴۸۳۳ میلی گرم در میلی‌لیتر در وزن تر) در اواخر فصل تابستان سنجش گردید (نمودار ۱).

۳-۲. نتایج تغییرات فصلی پروتئین‌های سخت‌پوست *Pontogammarus maeoticus*

نتایج آماری با سطح معنی‌داری P<۰/۰۵ نشان داد که بالاترین مقدار میانگین پروتئین در *Pontogammarus maeoticus* (۹/۵۲۱±۰/۱۴۸۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در وزن تر) سنجش شده در اواخر فصل تابستان، تعیین گردید. در حالی که کمترین مقدار میانگین پروتئین (۴/۴۶۹±۰/۰۲۵۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در وزن تر) در اواخر فصل زمستان به دست آمد (نمودار ۱).

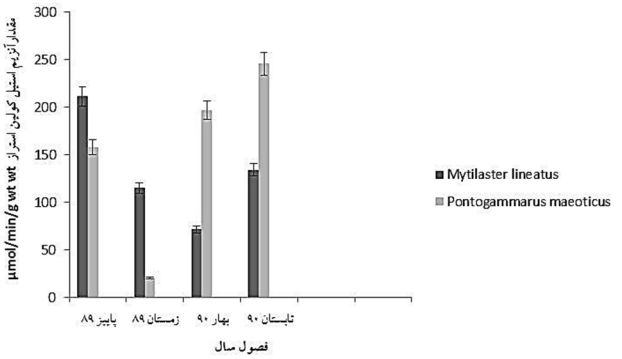


نمودار ۱: مقایسه تغییرات مقدار میانگین پروتئین در هر دو نمونه در ۴ فصل سال ۹۰ – ۸۹ در منطقه‌ی بابلسر

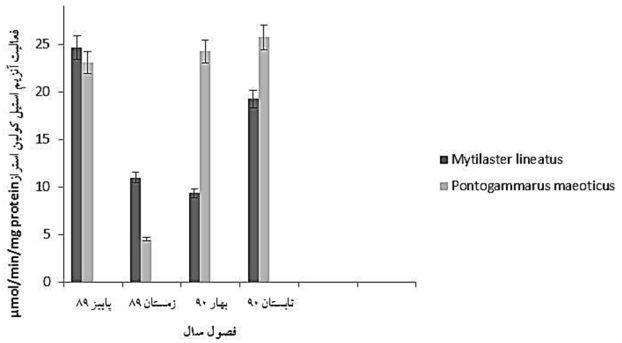
۳-۳. نتایج تغییرات فصلی استیل کولین استراز در دوکفه‌ای *Mytilaster lineatus*

نتایج آماری با سطح معنی‌داری P<۰/۰۵ نشان داد که بالاترین سطح آنزیم استیل کولین استراز (۲۱۱/۱۳۳ ±۰/۶۷۰۰ میکرومول در دقیقه در هر گرم بافت وزن تر) در نمونه‌های *Mytilaster lineatus* که در اواخر فصل پاییز جمع آوری شده بودند، سنجش شد. همچنین بیشترین میزان فعالیت آنزیم استیل کولین استراز (۲۴/۶۵±۰/۷۸۲۹ میکرومول در دقیقه در هر میلی‌گرم از پروتئین) در نمونه‌های *Mytilaster lineatus* که در اواخر فصل پاییز جمع-آوری شده بودند، به دست آمد. در حالی‌که کمترین سطح آنزیم استیل کولین استراز (۷۱/۶۵ ±۰/۰۸۴۹ میکرومول در دقیقه در

هر گرم بافت وزن تر) در نمونه‌های *Mytilaster lineatus* که در اواخر بهار جمع‌آوری شده بودند، تعیین گردید. همچنین کمترین میزان فعالیت آنزیم استیل کولین استراز (۱/۱۱۰۳±۹/۳۷۳ میکرومول در دقیقه در هر میلی‌گرم از پروتئین) در نمونه‌های *Mytilaster lineatus* که در آواخر فصل بهار جمع‌آوری شده بودند، به‌دست آمد (نمودارهای ۲ و ۳).



نمودار ۲: مقایسه‌ی سطح آنزیم استیل کولین استراز در هر دو نمونه در ۴ فصل سال ۹۰ – ۸۹ در منطقه‌ی بابلسر



نمودار ۳: مقایسه‌ی فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در هر دو نمونه در ۴ فصل سال ۹۰ – ۸۹ در منطقه‌ی بابلسر

۴-۳. *نتایج تغییرات فصلی در آنزیم استیل کولین استراز در سخت‌پوست Pontogammarus maeoticus*

نتایج آماری با سطح معنی‌داری P<۰/۰۵ نشان داد که بالاترین سطح آنزیم استیل کولین استراز (۱/۷۵۱±۲۴۵/۴۳۳ میکرومول در دقیقه در هر گرم بافت وزن تر) در نمونه‌های *Pontogammarus maeoticus* که در اواخر فصل تابستان جمع‌آوری شده بودند، سنجش شد.

بیشترین میزان فعالیت آنزیم استیل کولین استراز (۱/۵۱۸۰±۲۵/۱۵۵ میکرومول در دقیقه در هر میلی گرم از پروتئین) در نمونه‌های *Pontogammarus maeoticus* که در اواخر فصل پاییز جمع‌آوری شده بودند، به‌دست آمد.

در حالی‌که کمترین سطح آنزیم استیل کولین استراز (۰/۰۴۶۵±۲۰/۲۸۳ میکرومول در دقیقه در هر گرم از بافت وزن تر) در نمونه‌های *Pontogammarus maeoticus* که در اواخر فصل زمستان جمع‌آوری شده بودند، حاصل شد. همچنین کمترین میزان فعالیت آنزیم استیل کولین استراز (۱/۰۴۱۵±۴/۵۳۸ میکرومول در دقیقه در هر میلی‌گرم از پروتئین) در نمونه‌های *Pontogammarus maeoticus* که در اواخر فصل زمستان جمع‌آوری شده بودند، سنجش شد (نمودارهای ۲ و ۳).

۴. بحث و نتیجه‌گیری

استفاده از بیومارکرها جهت پایش ترکیبات شیمیایی در معرض، نیازمند اطلاعات پایه‌ای از سطوح آنزیمی در گونه‌ها و عوامل موثر بر آنها است. این فراسنج‌ها شامل فراسنج‌های زیستی مانند ژنتیک ارگانیسم، سن، تغذیه از لحاظ کمی و کیفی و فراسنج‌های محیطی مانند درجه حرارت، اکسیژن محلول در آب، pH، موقعیت جغرافیایی، فصل و غیره است، که می‌توانند فعالیت آنزیم را تحت تأثیر قرار دهند (Domingues et al., 2009; Cailleaud et al., 2006).

علاوه بر تنوع طبیعی فصلی – مکانی، عوامل ذاتی مربوط به وضعیت فیزیولوژیکی شامل: سن، وضعیت باروری، اندازه و آنالیز بافت نیز می‌تواند عاملی برای پاسخ بیومارکرها در بی‌مهرگان بسیاری باشند، اما پیش‌بینی رابطه‌ی این عوامل و تأثیر آنها بر پاسخ بیومارکرها، بین گونه‌های مختلف بسیار دشوار است (Domingues et al., 2009).

نتایج به‌دست آمده برای فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در رابطه با تأثیر تغییرات فصلی از قبیل درجه حرارت، pH، EC، شوری و سایز دوکفه‌ای *Mytilaster lineatus* در ایستگاه بابلسر در سال ۹۰-۸۹ نشان داد که فعالیت آنزیم بین (۰/۷۸۲۹±۲۴/۶۵، ۱/۱۱۰۳±۹/۳۷۳ میکرومول در دقیقه در هر میلی‌گرم از پروتئین) تغییر کرده و بیشترین میزان فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در این دوکفه‌ای در اواخر فصل پاییز بوده و کمترین میزان فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در دوکفه‌ای *Mytilaster lineatus* در اواخر فصل بهار سنجش شده است. با توجه به اینکه تولید مثل این

دوکفه‌ای در فصول گرم بود، به‌نظر می‌رسد که باعث ایجاد تنش در موجود شده باشد. همچنین می‌دانیم که در فصول گرم سال با کاهش اکسیژن محلول در آب مواجه می‌شویم، که این نیز به نوبه‌ی خود می‌تواند تأثیرگذار باشد. آنزیم استیل کولین استراز مسوول هیدرولیز استیل کولین به کولین و اسید استیک است و کاهش آن به‌طور مستقیم در اثر مکانیسم تأثیر تنش‌های محیطی به‌صورت برگشت‌پذیر یا برگشت‌ناپذیر است (Pfeifer et al., 2005).

مشاهدات مشابهی نیز بر روی گونه دوکفه‌ای *Mytilus galloprovincialis* صورت گرفته که در آن کمترین مقدار فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در بهار گزارش شده است (Taleb et al., 2007). اطلاعات به‌دست آمده از تغییرات طبیعی از فعالیت بیوشیمیایی در ارگانیسم‌های هدف نشان می‌دهد که فراسنج‌های فیزیکوشیمیایی کلیدی با فعالیت آنزیم‌ها ارتباط دارند. بنابراین ضرورت دارد که این تغییرات مورد بررسی قرار گرفته و اثرات آنها به‌طور دقیق مورد شناسایی قرار گیرد. این مطلب می‌تواند مطالعه‌ای کاربردی در جهت ارتباط تغییرات سطوح آنزیم مرتبط با تغییرات جمعیت و عوامل فیزیکوشیمیایی آب به‌منظور نشان دادن تنش‌های محیطی و همچنین ارتباط آلاینده‌ها به‌ویژه آلاینده‌های سموم ارگانوفسفره قلمداد گردد. نتایج به‌دست آمده بر روی فعالیت آنزیم استیل کولین استراز نشان داد که فعالیت آنزیم بین (۱/۵۱۸۰±۲۵/۷۷۸ – ۱/۰۴۱۵±۴/۵۳۸ میکرومول در دقیقه در هر میلی گرم از پروتئین) متغیر است و بیشترین میزان فعالیت آنزیم در اواخر فصل تابستان و کمترین میزان میانگین فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در اواخر فصل زمستان سنجش گردید، که می‌تواند در نتیجه‌ی تغییرات درجه حرارت آب در فصول مختلف سال بوده و نیز از عوامل بسیار مؤثر بر روی آن که دارای اختلاف معنی‌داری در طول سال بوده است، می‌توان به اندازه گاماروس‌ها پی برد، همان طور که در جدول ۱ آورده شده است، آن‌ها در فصول سرد دارای کوچک‌ترین اندازه هستند که می‌دانیم موجودات در اندازه-های کوچکتر آسیب‌پذیرتر بوده و این ممکن است نتیجه‌ی تنش موجود در این فصل بوده باشد و گاماروس‌ها در فصول سرد از تراکم پایینی در محیط برخوردارند. همچنین نتایج مشابهی نیز بر روی گونه های دیگر گاماروس *Gammarus fossarum* مشاهده شده است که نشان‌دهنده‌ی تحت تنش بودن این موجودات در فصول سرد سال بوده است (Graney et al., 1986).

هدف از استفاده این دو ارگانیسم مقایسه‌ی بین آن‌ها نبوده، بلکه به بررسی هر کدام به‌طور جداگانه پرداخته شده است. البته علت انتخاب این دو ارگانیسم بر مبنای تحقیقات مشابه گزارش شده در مورد دوکفه‌ای‌ها و آمفی‌پودها بوده که به‌خوبی نشان داده است که این ارگانسیم در برابر تنش‌ها، فعالیت آنزیم استیل کولین استراز پاسخ مناسبی را از خود نشان می‌دهد (Pain and Parant, 2003; Hagger et al., 2006; Sundelin and Eriksson, 1998).

منابع

Assis, C.R.D.; Amaral, I.P.G.; Castro, P.F.; Carvalho, L.B.; Bezerra, R.S., 2007. Effect of dichlorvos on the acetylcholinesterase from tambaqui (*Colossoma macropomum*) brain. Environmental Toxicology and Chemistry. 26: 1451 – 1453.

Bernal-Hernández, Y.Y.; Medina-Diaz, I.M.; Robled-Marenco, M.L.; Velázquez- Fernández, J.B.; Giron-Perez, M.I.; Ortega-Cervantes, L.; Maldonado-Vázques, W.A.; Rojas-García, A.E., 2010. Acetylcholinesterase and metallothionein in oysters (*Crassostrea corteziensis*) from a subtropical Mexican pacific estuary. Ecotoxicology. 19: 519 - 525.

Binelli, A.; Ricciard, F.; Riva, C.; Provini, C., 2005. Screening of POP pollution by AChE and EROD activities in Zebra mussels from the Italian Great Lakes. Chemosphere. 61: 1074 – 1082.

Bodin, N.; Burgeot, T.; Stanisiere, J.; Bocquene, G.; Menard, D.; Minier, C.; Boutet, I.; Amat, A.; Cherel, Y.; Budzinski, H., 2004. Seasonal variation of a battery of biomarkers and physiological indices for the mussel *Mytilus gallaprovincialis* transplanted into the northwest Mediterranean Sea. Comaparative Biochemistry and Physiology. Part C, 138: 411 – 427.

Bocchetti, R.; Lamberti, C.; Pisanelli, B.; Razzeti, E.; Maggi, C.; Catalano, B.; Sesta, G.; Martuccio, G.; Gabellini, M.; Regoli, F., 2008. Seasonal variations of exposure biomarkers, oxidative stress responses and cell damage in the clams, *Tapes philippinarum*, and mussels, *Mytilus galloprovincialis*, from Adriatic Sea.

indicator of organophosphorous insecticide exposure and effects. Environmental Toxicology and Chemistry. 20: 37 – 45.

Gaitonde, D.; Sarkar, A.; Kaisary, S.; Silva, C.D.; Dias, C.; Rao, D.P.; Ray, D.; Nagarajan, R.; De Sausa, S.N.; Sarkar, S.; Patill, D., 2006. Acetylcholinesterase activities in marine snail (*Cronia contracta*) as a biomarker of neurotoxic contaminants along the Goa coast, West coast of India. Ecotoxicology. 15: 353 – 358.

Hagger, J.A.; Depledge, M.; Galloway, T.S., 2005. Toxicity of tributyltin in the marine mollusc *Mytilus edulis*. Marine Pollution Bulletin. 51:811–816.

Hernandez, A.F.; Gomez, M.; Penan, A.G.; Fernandez, G.; Lourdes, R.; Villanuera, E., Antonio, P., 2004. Effect of long term exposure to pesticides on plasma esterase from plastic green house workers. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A. 67: 1095 – 08.

Lam Paul, K.S., 2009. Use of biomarkers in environmental monitoring. Ocean and Coastal Management. 52: 348-354.

Lam, P.K.S.; Gray, J.S., 2003. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. In: Marine Pollution Bulletin, 46: 182 – 186.

Lau, P.S.; Wong, H.L.; Garrigues, P.H., 2004. Seasonal variation in antioxidative responses and acetylcholinesterase activity in Pernavirdis in estern oceanic and western estuarine waters HongKong. Continental Shelf Research. 24: 1969 -1987.

Leiniö, S.; Lehtonen, K.K., 2005. Seasonal variability in biomarkers in the bivalves *Mytilus edulis* and *Macoma balthica* from the northern Baltic Sea. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C. 140: 408 – 421.

Livingston, D.R.; Chipman, J.K.; Lowe, D.M.; Minier, C.; Mitchelmore, C.L.; Moore, M.N.; Peters, L.D.; Pipe, R.K., 2000. Development of biomarkers to detect the effects of organic pollution on aquatic invertebrates: Marine Environmental Research. 66: 24 – 26.

Cailleaud, K.; Maillet, G.; Budzinski, S.; Souissi, S.; Forget-Leray, J., 2007. Effects of salinity and temperature on the expression of enzymatic biomarkers in *Eurytemora affinis* (Calanoida, Copepoda). Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology. 147: 841-849.

Cousin, X.; Strahle, U.; Chatonnet, A., 2005. Are there non-catalytic functions of acetylcholinesterases? Lessons from mutant animal models. BioEssays. 27: 189–200.

Day, K.E.; Scott, I.M., 1990. Use of acetylcholinesterase activity to detect sublethal toxicity in stream invertebrates exposed to low concentrations of organophosphate insecticides: In: Aquatic Toxicology. 18: 101-114.

De la Torre, F.R.; Salibian, A.; Ferrari, L., 2002. Freshwater pollution biomarker : Response of brain acetylcholinesterase activity in two fish species. Comparative Biochemistry Physiology Toxicology Pharmacology. 131: 271–280.

Domingues, I.; Agra, A.R.; Monaghan, K.; Soares, A.; Nogueira, A.J.A., 2009. Cholinesterase and GST activities in freshwater invertebrates as biomarkers to assess pesticide contamination. Environmental Toxicology and Chemistry. 29: 5 – 18.

Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andres, V.; Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology. 7: 88 – 95.

Forget, J.; Beliaeff, B.; Bocquené, G., 2003. Acetylcholinesterase activity in copepods (*Tigriopus brevicornis*) from the Vilaine River estuary, France, as a biomarker of neurotoxic contaminants. Aquatic Toxicology. 62: 195 – 204.

Fulton, M.H.; Key, P.B., 2001. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an

Acetylcholinesterase inhibition as a biomarker of adverse effect a study of *Mytilus edulis* exposed to the priority pollutant chlorfenvinphos. Aquatic Toxicology, 67: 45 – 56 .

Rodriguez-Fuentes, G.; Gold-Bouchot, G., 2000. Environmental monitoring using acetylcholinesterase inhibition in vitro. A case study in two Mexican lagoons. Marine Environmental Research. 50: 357 – 360.

Schoor, W.P.; Brausch, J., 1980. The inhibition of acetylcholinesterase activity in pink shrimp *Penaeus duorarum* by methyl parathion and its oxon. Environmental Contamination and Toxicology. 9: 599 – 605 .

Strik, W.A.; Reinecke, D.L.; Johannes Van, S., 2007. Seasonal variation in antifungal, antibacterial and acetylcholinesterase activity in seven south African seaweeds. Journal of Applied Phycology. 19: 271-276.

Sundelin, B.; Eriksson, A.K., 1998. Malformations in embryos of the deposit-feeding amphipod *Monoporeia affinis* in the Baltic Sea. Marine Ecology Progress Series. 171: 165–180.

Taleb, Z.M.; Benghali, S.; Kaddour, A.; Boutiba, Z., 2007. Monitoring the biological effects of pollution on the Algerian west coast using mussels *Mytilus galloprovincialis*. Oceanologia. 49: 543 – 564.

Widdows, J.; Bakke, T.; Bayne, B. L,; Donkin, P.; Livingstone, D.R.; Lowe, D.M.; Moore, M.N.; Evans, S.V.; Moore, S.L., 1982. Responses of *Mytilus edulis* on exposure to the water accommodated fraction of North Sea oil. Marine Biology. 67:15–31.

recent molecular, genotoxic, cellular and immunological studies on the common mussel (*Mytilus edulis* L.) and other mytilids . Journal of Environment and Pollution. 13: 56 – 91.

Lowry, O.H.; Roserbrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J., 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry. 193: 265 – 275 .

Massoulié, J.; Bon, S., 1982. The molecular forms of cholinesterase invertebrates. Annual Review of Neuroscience. 5: 57- 106.

Nunes, B., 2011. The use of cholinesterase in ecotoxicology. Environmental Contamination and Toxicology. 212: 29-59.

Pain, S.; Parant, M., 2003. Multixenobiotic defence mechanism (MXDM) in bivalves. Comptes Rendus Biologies. 326:659–672

Pfeifer, S.; Schiedek, D.; Dippner, J.W., 2005. Effect of temperature and salinity on acetylcholinesterase activity a common pollution biomarker, in *Mytilus* sp. from the south-western Baltic Sea. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 320: 93 – 103.

Picado, A.; Bebianno, M.J.; Costa, M.H.; Ferreira, A.; Vale, C., 2007. Biomarkers: a strategic tool inthe assessment of environmental quality of coastal waters. Hydrobiologia, 587: 79 – 87.

Pickering, C.E.; Pickering, R.G., 1971. Methods for the estimation of acetylcholinesterase activity in the plasma and brain of laboratory animals given carbamates or organophosphorus compounds. Toxicology, 27: 292 – 310.

Rickwood, C.J.; Galloway, T.S., 2003.