



نقش فاکتورهای محیطی در تغییرات غلظت بیومارکر متالوتیونین پر تار *Glycinde boundari* در خلیج چابهار

مهران لقمانی^{۱*}، احمد سواری^۲، بابک دوست شناس^۲، بیتا ارچنگی^۲، کیوان کبیری^۳

^۱ گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار

^۲ گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر

^۳ پژوهشگاه ملی اقیانوس‌شناسی و علوم جوی

نوع مقاله:	چکیده
پژوهشی	
تاریخچه مقاله:	
دریافت: ۹۵/۰۳/۱۲	
اصلاح: ۹۵/۰۴/۰۷	
پذیرش: ۹۵/۱۰/۰۹	
کلمات کلیدی:	
خلیج چابهار	
فلزات سنگین	
مانسون	
متالوتیونین	
	فاکتورهای دما، شوری، اکسیژن محلول و کدورت در سه دوره پیش مانسون - مانسون و پس مانسون و فلزات سنگین (مس، روی، کادمیوم) از ۹ ایستگاه زیرجزرمدی خلیج چابهار در سال ۹۳-۱۳۹۲ انتخاب و ارتباط آنها با تغییرات غلظت متالوتیونین پر تار بررسی شد. میانگین کل متالوتیونین در پیش مانسون $28/33 \pm 5/2$ ، مانسون $15/50 \pm 4/9$ ، پس مانسون $21/39 \pm 4/37$ میکروگرم بر گرم بود که آزمون واریانس میان ایستگاه‌ها و فصول اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($p \leq 0/05$). مقادیر فلزات در رسوب و بافت پر تار در ایستگاه‌ها و فصول همبستگی معنی‌دار باهم نداشته و این ارتباط میان فلزات و متالوتیونین نیز مشاهده نشد ($p \geq 0/05$). به‌غیر از فاکتور دما و شوری که در مانسون افزایش داشتند، سایر پارامترها و متالوتیونین در این فصل کاهش معنی‌داری را نشان دادند. در آزمون PCA، سه مؤلفه اول در مجموع ۷۵/۲۴ درصد از واریانس را داشته که مؤلفه دوم با ۲۸/۷۳ درصد واریانس اکسیژن، کدورت و متالوتیونین را شامل شد. تغییرات معنی‌دار بیومارکر و فاکتورهای محیطی در فصول مختلف و عدم همبستگی معنی‌دار آن با فلزات به عنوان عوامل اصلی القاء متالوتیونین نشان از نقش موثر پارامترهای زیست محیطی خلیج چابهار بر نوسانات بیومارکر است. طبق PCA در میان فاکتورها، اکسیژن محلول از عوامل اصلی موثر در کاهش سنتز متالوتیونین در <i>G.bonhourei</i> می‌باشد.

مقدمه

پرتاران جزء اجتماعات غالب محیط‌های دریایی‌اند: این گروه دارای بیشترین تراکم و تنوع در همه رسوبات دریایی از منطقه جزرمدی تا اعماق دریا می‌باشند. پرتاران نقش حیاتی را در ساختار، تولیدات، دینامیک و سلامت بنتوزهای دریایی و محیط‌زیست دریایی دارا هستند (Shou et al., 2009). پرتاران علاوه بر واکنش به وجود آلاینده‌های محیطی، نسبت به

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: Loghmani_mehran@yahoo.com

استرس‌های محیطی خود که ناشی از تغییرات پارامترهای فیزیوشیمیایی و پدیده‌های طبیعی بوده عکس‌العمل نشان داده و این نوسانات هم بر ساختار اجتماعات و هم بر سیکل حیات و سیستم فیزیولوژیکی بدن پرتاران اثرگذار است. *G. bonhourei* از خانواده Goniadidae بوده و زیستگاه آنها رسوبات نرم شنی و گلی زیر جزرومدی است. قابلیت زندگی هم در سطح رسوبات و هم در درون رسوبات را دارند و جزء گونه‌هایی هستند که از بی‌مهرگان کوچک بستری و هم از ذرات دتریتوس بستر تغذیه می‌کنند و اصولاً رژیم همه‌چیزخواری دارد (Hutchings, 2000).

برخی از مهم‌ترین بیومارکرها در موجودات دریایی که نمایانگر قرارگیری آنها در معرض عوامل استرس‌زا هستند شامل: سیتوکروم P450، استیل کولین استراز، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، پایداری غشاء لیزوزومی، افزایش پروکسی زوم، القاء ویتلوژنین و سنتز متالوتیونین است (Amiard *et al.*, 2006). مهم‌ترین پروتئین متصل شونده در سلول، متالوتیونین است که به دلیل ویژگی‌های خاص ساختاری به‌خصوص میزان بالای تیول، تمایل بالایی برای اتصال به فلزات دارد. بنابراین سمیت فلزات را برای سایر سلول‌ها کاهش می‌دهد (Sigel *et al.*, 2009).

نوسانات بالا در میزان دما، اکسیژن و شوری در محیط‌زیست موجودات آبی می‌تواند سبب افزایش غلظت متالوتیونین سلولی گردد (Viarengo *et al.*, 1999). بسیاری از مطالعاتی که برای استفاده از متالوتیونین‌ها به‌عنوان بیومارکر فلزات انجام پذیرفته در شرایط آزمایشگاهی و به کار بردن غلظت فلزات در مقادیر بالا و غیرمعمول بوده است که با مقادیر فلزات در شرایط محیط طبیعی فاصله بسیاری دارد (Suriya *et al.*, 2012). اگرچه بسیاری از مطالعات نشان می‌دهد که القاء متالوتیونین در مهره‌داران و بی‌مهره‌گان به وسیله فلزات صورت می‌گیرد، ولی فاکتورهای زیستی و غیرزیستی دیگری غیر از فلزات مثل جابجایی، گرسنگی، کمبود اکسیژن، دما و شوری، اندازه و وزن در سنتز متالوتیونین مؤثر می‌باشند (Mosleh *et al.*, 2004).

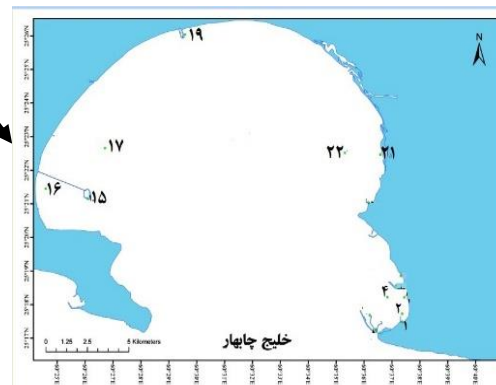
در ایران تا پیش از این مطالعه ای در مورد این بیومارکر در پرتاران صورت نگرفته و تنها Azimi و همکاران (۲۰۱۰) استفاده از متالوتیونین را به‌عنوان نشانگر زیستی فلزات سنگین (کادمیوم و جیوه) در گونه دوکفه‌ای *Crassostrea gigas* در بندر امام خمینی پیشنهاد نمودند. در خارج از کشور می‌توان در مورد اثر فاکتورهای محیطی بر متالوتیونین به مطالعات Baykan و همکاران (2007)، Hauser-Davis و همکاران (2014)، Mouneyrac و همکاران (2000) اشاره نمود.

دریای عمان و خلیج چابهار عمدتاً تحت تأثیر دو مانسون جنوب غربی تابستانه و شمال شرقی زمستانه قرار دارد. به‌طور کلی شدت امواج حاصل از تأثیرات مانسون تابستانه در سواحل منطقه مورد مطالعه بسیار زیاد است و تأثیر بسزایی در تغییرات نرخ فرسایش و افزایش بار رسوبی در این دوره زمانی دارد. جریان‌های مانسونی به دلیل به همراه داشتن گل‌ولای، باعث افزایش کدورت آب می‌شوند و بر تولیدمثل و ساختار اجتماعات تأثیر منفی می‌گذارند (Kumar *et al.*, 2013) و شرایط سخت زیستی را برای آنها سبب می‌گردند. سایر پارامترهایی که به دنبال این پدیده در محیط‌زیست کف‌زیان تغییر می‌کند شامل پارامترهای فیزیوشیمیایی مانند: دما، شوری، اکسیژن محلول و pH و مواد آلی بستر است (Chakraborty *et al.*, 2009).

با توجه به نقش برخی از فاکتورهای زیست محیطی علاوه بر فلزات بر نوسانات بیومارکر متالوتیونین در این تحقیق اثر برخی از این فاکتورها بر تغییرات بیومارکر متالوتیونین در یک گونه از پرتاران در خلیج چابهار مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از رسوبات بستر با سه تکرار به وسیله گرب‌ون-وین با مساحت ۲۵٪ مترمربع (Holms and McIntyre, 1984) در طول سه فصل پیش مانسون در اواخر اسفند ۱۳۹۲، مانسون مرداد ۱۳۹۳ و پس مانسون در آبان ۱۳۹۳ از ۹ ایستگاه در منطقه زیر جزرومدی خلیج چابهار انجام گرفت (شکل ۱). فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی که با سه تکرار اندازه‌گیری شدند عبارتند از: اکسیژن محلول (DO) به وسیله دستگاه WTW-Oxi 340i ساخت کشور آلمان، دما و شوری به وسیله دستگاه WTW-Con315i ساخت کشور آلمان، pH به وسیله دستگاه WTW-330i ساخت کشور آلمان، شفافیت آب به وسیله صفحه سی‌سی ساخت ایران.



شکل ۱. موقعیت ایستگاههای نمونه برداری در خلیج چابهار

ایستگاه	نام منطقه	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی
۱	اسکله هفت تیر (داخل)	۲۵° ۱۷' ۴۳/۰۸"	۶۰° ۳۷' ۲۰/۷۱"
۲	اسکله هفت تیر (خارج)	۲۵° ۱۷' ۵۶/۹۶"	۶۰° ۳۷' ۲۰/۷۱"
۳	ساحل دانشگاه	۲۵° ۱۸' ۲۶/۵۴"	۶۰° ۳۷' ۲۴/۴۴"
۱۵	کنارک (داخل اسکله)	۲۵° ۲۱' ۱۱/۷۷"	۶۰° ۲۵' ۵۹/۳۰"
۱۶	کنارک (خارج اسکله)	۲۵° ۲۱' ۲۷/۴۴"	۶۰° ۲۴' ۲۹/۰۸"
۱۷	لنج سازی	۲۵° ۲۳' ۲۴/۰۴"	۶۰° ۲۴' ۱۴/۳۱"
۱۹	آب شیرین کن	۲۵° ۲۵' ۵۸/۲۸"	۶۰° ۲۹' ۲۳/۰۵"
۲۱	کشتی سازی	۲۵° ۲۳' ۴۰/۹۳"	۶۰° ۳۶' ۲۸/۰۵"
۲۲	کشتی سازی	۲۵° ۲۲' ۴۱/۸۰"	۶۰° ۳۵' ۳۳/۳۱"

سنجش فلزات سنگین (مس، روی و کادمیوم) در پرتار *G. bonhourei*

هضم نمونه‌های بافتی پرتاران طبق روش (Sun and Zhou (2007) انجام پذیرفت. برای حذف نمک و موکوس نمونه‌ها بعد از جداسازی، از آب دوبار تقطیر استفاده شد. نمونه‌ها در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد خشک و به دقت وزن شدند و با توجه به نسبت وزنی (یک گرم بافت، ۱۰ سی سی اسید) به آنها اسید نیتریک غلیظ (HNO_3) اضافه و در هات پلیت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۲ ساعت قرار داده شدند. پس از هضم کامل نمونه‌ها به اندازه دو برابر حجم نمونه به آن آب مقطر دوبار تقطیر اضافه و از کاغذ فیلتر واتمن شماره ۴۲ عبور داده شد. محلول فیلتر شده برای سنجش فلزات به دستگاه اسپکتروفتومتری جذب اتمی شعله‌ای انتقال یافت.

سنجش میزان متالوتیونین

اندازه‌گیری میزان متالوتیونین بر اساس روش تغییر یافته اسپکتروفتومتری Viaregno و همکاران (1999) انجام شد (Calisi et al., 2014). نمونه‌های پرتار جداسازی شده در آزمایشگاه بلافاصله در داخل منع نیتروژن مایع ۸۰- قرار گرفت و تا زمان آنالیز، به فریزر ۸۰- درجه انتقال داده شد.

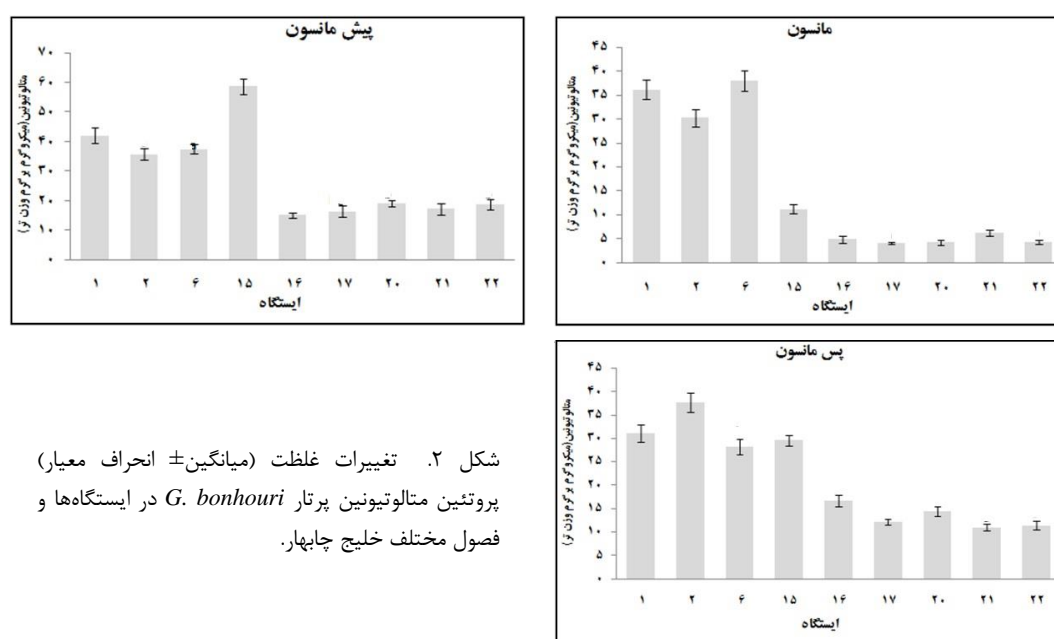
طبق روش Viaregno و همکاران (1999)، به نمونه‌های پرتاران هموزن شده با نسبت ثابت یک گرم بافت، ۳ میلی لیتر بافر به عنوان عوامل جلوگیری کننده از تجزیه پروتئین و بتا- مرکاپتوتانول (سیگما) ۱/۰ درصد به عنوان یک عامل احیاء کننده اضافه شد. محلول هموزن شده در دور ۳۰۰۰۰ g برای ۲۰ دقیقه به سانتریوفیوژن یخچال دار منتقل شدند. در این شرایط، محلولی با دو فاز تشکیل می‌شود که مایع بالایی حاوی پروتئین متالوتیونین است. پس از اضافه کردن کلروفورم و سانتریوفیوژن فاز پروتئین، رسوب باقی مانده حاوی پروتئین متالوتیونین با بافر هموزن کننده شسته شدند که این امر سبب خارج ساختن تیولهای سولفید می‌گردد. سپس مجدداً سانتریوفیوژن انجام گرفت. در مرحله پایانی، نمونه‌ها در دمای اتاق برای مدت ۵ دقیقه در دور ۳۰۰۰ g سانتریوفیوژن و سپس توسط دستگاه اسپکتروفتومتری مدل UV-2100 در طول موج ۴۱۲ نانومتر سنجیده شدند. برای تعیین غلظت متالوتیونین از منحنی استاندارد گلوکاتینون (GSH) استفاده شد. محلول مادر را به صورت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر در کلرید سدیم ۲۵٪، نرمال آماده کرده و حداقل ۳ استاندارد مرجع ۲۰، ۴۰، ۸۰ میکرو لیتر و یک شاهد

از آن تهیه گردید. در محاسبه نهایی میزان متالوتیونین با فرض ۳۰٪ سیستئین صورت گرفت (Calisi et al., 2014). آزمونهای آماری تحلیل واریانس یک طرفه و همبستگی پیرسون با کمک نرم افزار SPSS 22، نمودارها با Excel 2013، و آزمون چند متغیره PCA با چرخش واریماکس در نرم افزار XLSAT انجام گرفت.

نتایج

بررسی فصلی سطوح تغییرات بیومارکر متالوتیونین (شکل ۲) نشان داد که در فصل پیش مانسون، دامنه تغییرات غلظت پروتئین متالوتیونین از ۱۳/۳ تا ۵۸/۶۳ میکروگرم بر گرم وزن تر می باشد که بیشترین و کمترین مقدار به ترتیب در ایستگاههای ۱۵ و ۱۷ ثبت گردید. میانگین کل غلظت متالوتیونین کرم پرتار $28/33 \pm 5/2$ میکروگرم بر گرم وزن تر بود. در دوره مانسون، ایستگاه ۶ با ۳۸/۱۴ میکروگرم بر گرم وزن تر بیشترین میزان و ایستگاه ۱۷ با ۴/۱۲ میکروگرم بر گرم وزن تر کمترین میزان غلظت متالوتیونین را دارا بودند. میانگین غلظت متالوتیونین در این منطقه در این دوره $15/50 \pm 4/9$ میکروگرم بر گرم وزن تر بود که در مقایسه با دوره قبل از میانگین کمتری برخوردار بوده است. در پس مانسون دامنه تغییرات آن در این دوره از ۳۷/۷ میکروگرم بر گرم در ایستگاه ۲ تا ۱۱/۰ میکروگرم بر گرم که کمترین مقدار محسوب می شود در ایستگاه ۲۱ متغیر بوده است. میانگین کل این دوره با $21/39 \pm 4/37$ میکروگرم بر گرم از دوره مانسون بیشتر ولی از دوره پیش مانسون کمتر بود. آزمون آنالیز واریانس برای تعیین معنی داری تفاوتها بین فصول، اختلاف معنی داری را نشان داد ($p \leq 0/05$) که در پس آزمون توکی فصل مانسون با دو فصل دیگر اختلاف را نشان داد.

در بررسی فاکتورهای فیزیکوشیمیایی (جدول ۱) نتایج آنالیز واریانس نشان داد که فاکتورهای دما، اکسیژن محلول، شوری، شفافیت در بین فصول دارای اختلاف معنی داری بوده که با انجام پس آزمون توکی مشخص شد تغییرات آنها در فصل مانسون با دو فصل دیگر دارای اختلاف آماری معنی داری است ($p \leq 0/05$). با توجه به اهمیت این پارامترها و اثرگذاری آنها بر فعالیت‌های زیستی موجودات به خصوص پرتاران، ارتباط آنها با تغییرات سطوح پروتئین متالوتیونین بررسی گردید. به غیر از فاکتورهای دما و شوری که در فصل مانسون دارای افزایش نسبت به دوره‌های دیگر بود، سایر پارامترها و متالوتیونین در این فصل کاهش نشان دادند.



شکل ۲. تغییرات غلظت (میانگین \pm انحراف معیار) پروتئین متالوتیونین پرتار *G. bonhourii* در ایستگاه‌ها و فصول مختلف خلیج چابهار.

جدول ۱. مقایسه میانگین تغییرات برخی از پارامترهای فیزیکی - شیمیایی و فلزات سنگین در سه دوره نمونه برداری در خلیج چابهار (میانگین \pm انحراف معیار)

پیش مانسون	مانسون	پس مانسون	
۲۵/۳۶ \pm ۰/۴۹	۳۰/۷۰ \pm ۰/۵۸	۲۴/۵۰ \pm ۰/۵۶	دما (درجه سانتیگراد)
۳۶/۷۶ \pm ۰/۳۰	۳۷/۳۱ \pm ۰/۴۷	۳۷/۱۲ \pm ۰/۳۰	شوری (گرم در لیتر)
۶/۹۱ \pm ۰/۲۱	۴/۱۸ \pm ۰/۳۹	۶/۷۳ \pm ۰/۳۷	اکسیژن محلول (میلی گرم در لیتر)
۱/۹۵ \pm ۰/۶۳	۰/۷۷ \pm ۰/۳۷	۲/۲۳ \pm ۰/۸۳	شفافیت (متر)
۶/۳۹ \pm ۲/۰۴	۳/۵۱ \pm ۱/۴۶	۴/۹۸ \pm ۱/۴۴	مس - بافت (میکروگرم بر وزن خشک)
۲۰/۹۵ \pm ۴/۵۱	۱۱/۸۴ \pm ۲/۶۵	۱۶/۵۱ \pm ۳/۵۸	روی - بافت (میکروگرم بر وزن خشک)
۰/۱۳۶ \pm ۰/۰۴	۰/۰۵۹ \pm ۰/۰۱	۰/۱۵۲ \pm ۰/۰۱	کادمیوم - بافت (میکروگرم بر وزن خشک)
۱۹/۸۹ \pm ۳/۳۴	۱۴/۴۲ \pm ۴/۴۷	۱۲/۹ \pm ۳/۴	مس - رسوب (میکروگرم بر وزن خشک)
۷۳/۴۲ \pm ۵/۵۱	۶۶/۰۴ \pm ۶/۳۷	۶۱/۷۲ \pm ۴/۸۶	روی - رسوب (میکروگرم بر وزن خشک)
۰/۱۶ \pm ۰/۰۴	۰/۱ \pm ۰/۰۴	۰/۰۹ \pm ۰/۰۴	کادمیوم - رسوب (میکروگرم بر وزن خشک)

شفافیت آب با اکسیژن محلول رابطه مستقیم داشته به طوریکه در طول دوره مانسون به دلیل جریان‌های دریایی و اختلاط‌های شدید آب و افزایش ذرات معلق، شفافیت کاهش چشمگیری داشته است که به‌طور مستقیم بر تولید اکسیژن آب تأثیرگذار می‌باشد. دمای آب هم با توجه به تغییر فصل افزایش نسبی داشته است. طبق شکل ۳ اثر این تغییرات در مورد اکسیژن و شفافیت با تغییرات متالوتیونین رابطه مستقیم داشته و با دما حالت عکس را در دوره مانسون نشان دادند.

همبستگی غلظت فلزات کادمیوم - روی و مس در رسوب و بافت پرتار با میزان بیوسنتز متالوتیونین:

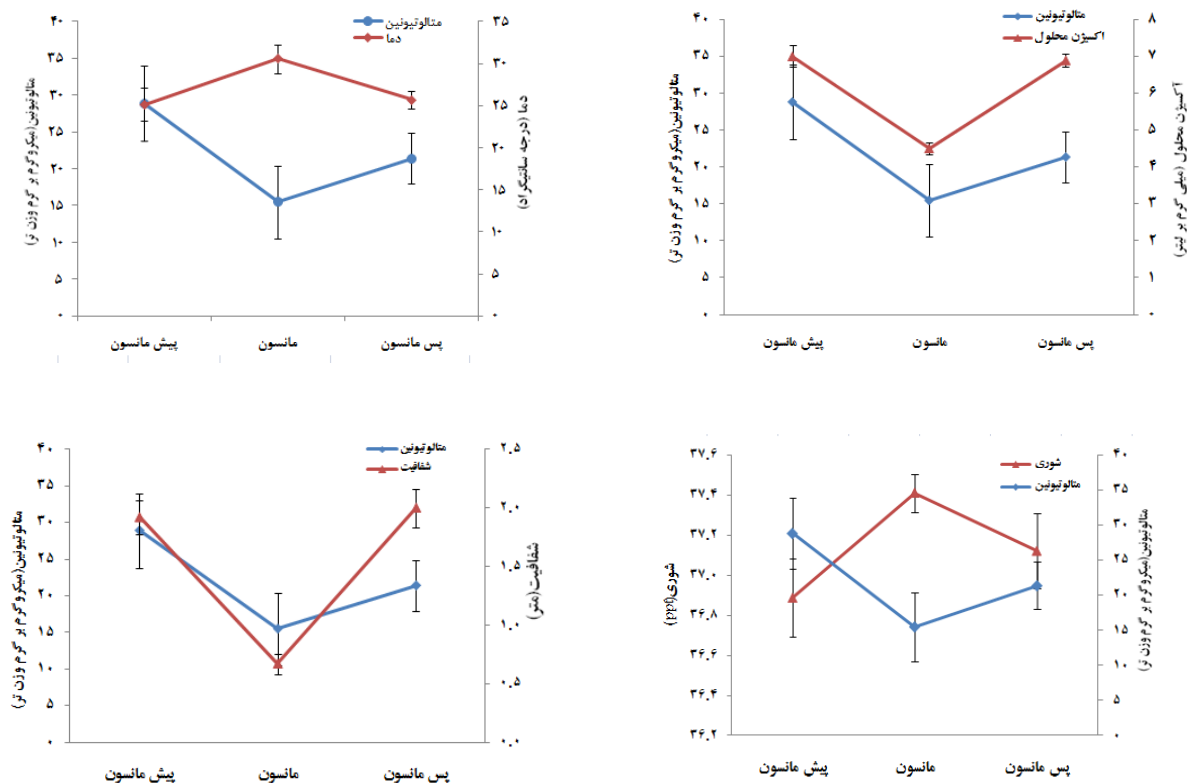
آلاینده‌های فلزات سنگین به‌ویژه کادمیوم، مس و روی از عواملی هستند که می‌تواند سبب القاء متالوتیونین گردند، به همین دلیل میزان ارتباط این فلزات با سطوح متالوتیونین در فصول مختلف در منطقه با روش همبستگی پیرسون بررسی گردید که نتایج آن همراه با ضرایب همبستگی (r) در جدول ۲ قابل مشاهده است.

در فصل پیش مانسون، همبستگی معنی‌داری میان غلظت فلزات در رسوب و هم در بافت با سطوح متالوتیونین به دست نیامد ($p > 0.05$) ولی فلزات روی و مس در بافت در این فصل همبستگی مثبت متوسطی را با غلظت متالوتیونین نشان دادند که این روند را در دو فصل دیگر مانسون و پس مانسون شاهد هستیم (جدول ۲) و تغییرات مقادیر فلزات در رسوبات و بافت پرتار در ایستگاهها و فصول مختلف ارتباط مثبت یا منفی معنی‌داری با یکدیگر نداشتند ($p > 0.05$).

دسته‌بندی فاکتورهای مؤثر در القاء پروتئین متالوتیونین با آزمون چند متغیره تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) انجام گرفت. در این آزمون ابتدا برای اطمینان از مناسب بودن تعداد نمونه‌ها از ضریب کایزر (KMO) و آزمون بارتلت استفاده شد. معمولاً مقادیر برابر ۰/۵ و بالاتر از آن در ضریب کایزر برای تحلیل در آزمون PCA مناسب می‌باشند.

تغییرات شاخص ضریب کایزر برابر با ۰/۶۶ بوده و آزمون بارتلت هم معنی‌دار بود ($p < 0.01$) که در نهایت مطابق نتایج PCA (شکل ۴) بر اساس منحنی چرخش واریمکس و مقدار ویژه بالای یک، چهار مؤلفه اصلی (PC) به‌دست آمد که ریشه مشخصه آنها بزرگ‌تر از یک بود. سه مؤلفه اول در مجموع ۷۵/۲۴ درصد از واریانس را شامل شدند که مؤلفه اول ۳۶/۶۰ درصد واریانس را دارا بود و در این مؤلفه فاکتور فلزات بافت و رسوب رابطه عملی قوی داشتند. مؤلفه دوم ۲۸/۷۳ درصد واریانس را دارا بود که فاکتورهای اکسیژن و شفافیت و متالوتیونین را شامل شد. مؤلفه سوم ۹/۹ درصد از کل واریانس را به خود اختصاص داد. طول، جهت و زاویه بردارها اطلاعاتی را در ارتباط با همبستگی عوامل ارائه می‌دهد. برای نمونه اکسیژن محلول و شفافیت در

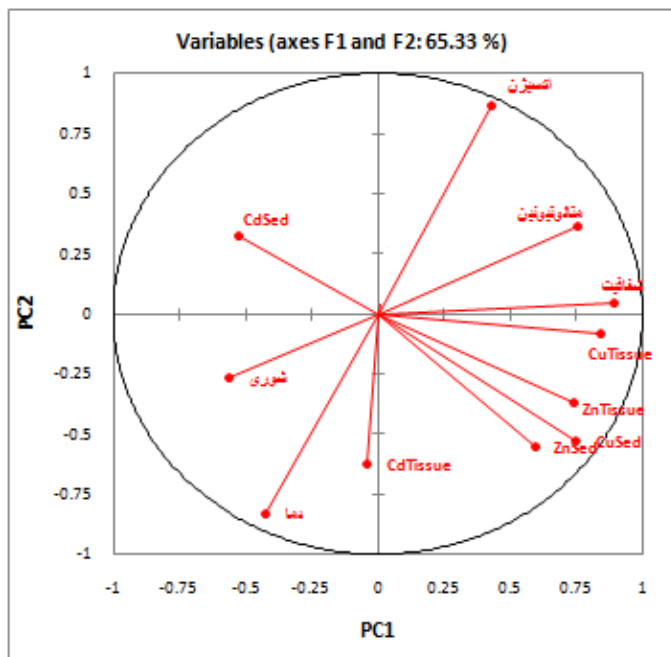
مؤلفه PC2 با دما و شوری رابطه عکس دارند. سایر روابط در شکل ۴ مشخص می‌باشد. جدول ۲ واریانس به‌دست‌آمده از مؤلفه‌های مختلف در PCA را نشان می‌دهد.



شکل ۳. مقایسه تغییرات میانگین دما، اکسیژن محلول، شوری و شفافیت نسبت به سطوح ماتالوتیونین در طی سه فصل پیش مانسون، مانسون و پس مانسون

جدول ۲. همبستگی غلظت فلزات مس و روی و کادمیوم در پرتار *G. bonhourii* و رسوب با غلظتهای ماتالوتیونین در سه دوره زمانی

	پیش مانسون			مانسون			پس مانسون		
	Cu	Zn	Cd	Cu	Zn	Cd	Cu	Zn	Cd
	$r=0/48$	$r=0/40$	$r=-0/29$	$r=0/33$	$r=0/55$	$r=-0/26$	$r=0/45$	$r=0/41$	$r=0/257$
بافت	$p=0/165$	$p=0/286$	$p=0/532$	$p=0/067$	$p=0/125$	$p=0/156$	$p=0/119$	$p=0/212$	$p=0/657$
رسوب	$r=0/28$	$r=-0/283$	$r=0/33$	$r=0/31$	$r=0/20$	$r=0/23$	$r=0/31$	$r=0/36$	$r=0/28$
	$p=0/242$	$p=0/463$	$p=0/288$	$p=0/177$	$p=0/286$	$p=0/167$	$p=0/335$	$p=0/351$	$p=0/358$



شکل ۴. رابطه متغیرهای زیست‌محیطی در کل فصول با مؤلفه اول (PC1) و مؤلفه دوم (PC2)

جدول ۲. واریانس هریک از مؤلفه‌ها در روش تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA)

مؤلفه‌های اصلی (PrincipalComponent)	وزن مؤلفه (Eigenvalues)	درصد واریانس (% Variance)	درصد واریانس تجمعی (%Cumulative Variance)
۱	۴/۳۹	۳۶/۶	۳۶/۶
۲	۳/۴۵	۲۸/۷	۶۵/۳
۳	۱/۱۹	۹/۹	۷۵/۲
۴	۱/۰۹	۹/۱	۸۴/۳
۵	۰/۵۸۲	۴/۸	۸۹/۲
۶	۰/۴۴۱	۳/۷	۹۲/۸
۷	۰/۳۲	۲/۷	۹۵/۵
۸	۰/۲۰۷	۱/۷	۹۷/۲
۹	۰/۱۴۵	۱/۲	۹۸/۴
۱۰	۰/۰۸۲۴	۰/۷	۹۹/۱
۱۱	۰/۰۷۹۴	۰/۷	۹۹/۸
۱۲	۰/۰۲۶۳	۰/۲	۱۰۰

بحث

میانگین غلظت‌های پروتئین متالوتیونین در کرم پرتار در فصول مختلف دارای اختلاف معنی‌داری بود و در بررسی اثرات غلظت‌های فلزات سنگین بر القاء این پروتئین مشخص گردید که تغییرات آن در هر سه دوره با فلزات همبستگی معنی‌داری نداشته و در بررسی ایستگاه‌ها نیز تغییرات نامنظم و معنی‌داری میان غلظت‌های فلز و غلظت‌های متالوتیونین به دست آمد. Poirier و همکاران (2006) در مطالعه خود ارتباط معنی‌داری میان پروتئین متالوتیونین و فلزات سنگین (Cd, Zn, Pb, Ag) در کرم پرتار *Nereis diversicolor* در خور به دست نیاوردند، لذا متالوتیونین را بیومارکر مناسب نداشتند. همچنین Liu و

Wang (2011) در مطالعه خود در دوکفه‌ای اسکالوپ به دلیل عدم ارتباط متالوتیونین با غلظت‌های مختلف کادمیوم این بیومارکر را در دوکفه‌ای فوق الذکر برای پایش محیطی مناسب ندانسته و اثرات دما، تغذیه و اندازه را تأثیرگذار دانستند. از آنجا که در فصل مانسون تغییرات شدیدی در بسیاری از فاکتورهای زیست‌محیطی ایجاد می‌گردد، بنابراین کاهش معنی‌دار غلظت متالوتیونین در این فصل در اثر استرس‌های محیطی را می‌توان در تغییرات پارامترهای ناشی از تغییر فصل، بررسی نمود. در بررسی فاکتورهای محیطی مشخص گردید که چهار فاکتور دما، اکسیژن، کدورت و شوری بیشترین تغییرات را در بین فصول به ویژه در فصل مانسون داشته‌اند، به طوریکه آزمون آماری اختلاف معنی‌داری را نشان داده بود. تغییرات دما و شوری و کدورت می‌توانند سبب تغییر سطوح متالوتیونین گردند که باید مورد توجه قرار گیرند (Bodin *et al.*, 2004). بنابراین به نظر می‌رسد در تغییرات سطوح متالوتیونین در فصل مانسون اثر فاکتورهای زیست‌محیطی بیشتر از سایر فاکتورها مثل غلظت فلزات سنگین بوده است. دسته‌بندی کل فاکتورهای تأثیرگذار بر متالوتیونین در کل دوره با کمک آزمون تحلیل مؤلفه‌های اصلی که در آن تعداد اندکی از مؤلفه‌های اصلی (PC) بیانگر بخش مهم و زیادی از کل اطلاعات هستند صورت پذیرفت. هریک از این مؤلفه‌ها ترکیب خطی از ۱۰ فاکتور ابتدایی بوده که واریانس آنها را نیز شامل می‌شود. بنابراین متغیرهای زیست‌محیطی ارزیابی شده با تعداد کمی از مؤلفه‌های جدید به سهولت قابل توجیه بوده و این موضوع در فضای دوبعدی یا سه بعدی نیز قابل نمایش است. متالوتیونین طبق شکل ۴ در مؤلفه دوم در کنار متغیرهایی مثل اکسیژن، وزن، دما و شوری قرار دارد که با دما و شوری رابطه عکس نشان داده است. بر اساس این نمودار فاکتور اکسیژن تأثیرگذارترین صفت بوده است؛ هر چند که همبستگی بالایی را با آن نشان نمی‌دهد. افزایش دما در این دوره ناشی از تغییر فصل بوده، مانسون تابستانه از اواخر خردادماه شروع و تا شهریورماه ادامه داشته و ما در این فصل همواره افزایش گرما و دما را در محیط شاهد هستیم. به دلیل ورود جریانهای آبی که از سمت اقیانوس وارد خلیج شده و دارای بار رسوبی بالایی است و نیز طوفانهای دریایی که سبب آشفته‌گی‌های بستر خلیج می‌گردند و سبب ورود رسوبات به ستون آب می‌گردند، شفافیت آب به شدت کاهش می‌یابد. از آنجا که شفافیت با اکسیژن رابطه مستقیمی دارد با کاهش شفافیت و عدم نفوذ نور و همچنین کاهش فعالیت فیتوپلانکتونها اکسیژن تولیدی محیط به شدت کاهش می‌یابد و در دمای بالا حلالیت اکسیژن کاهش می‌یابد. از آنجاکه اکسیژن تأثیرگذارترین پارامتر در حیات و فعالیت‌های فیزیولوژیکی آبزیان محسوب می‌گردد کاهش اکسیژن سبب کاهش فعالیت‌های متابولیکی (Larade and Storey, 2002) پرتار شده و در نتیجه اثر منفی بر ترجمه ژن متالوتیونین دارد (David *et al.*, 2005). به دلیل تبخیر بالا در اثر افزایش دما و نیمه بسته بودن خلیج، شوری در فصل تابستان افزایش نشان می‌دهد. در فصل پیش مانسون که میزان میانگین متالوتیونین در پرتار *G. bonhourei* خلیج افزایش می‌یابد، می‌تواند با افزایش اکسیژن محلول آب و کاهش نسبی دما و شوری در این دوره نیز مرتبط باشد. در مورد تأثیر فاکتورهای محیطی بر سطوح غلظت‌های متالوتیونین در آبزیان مطالعات زیادی صورت گرفته است. Ivankovic و همکاران (2005)، Mouneyrac (2000) و Baykan و همکاران (2007) و Serafim و همکاران (2002) در مطالعات خود ارتباط معکوس دما را با متالوتیونین و فلزات سنگین نشان داده و علت آن را اثرات قوی فصل و شرایط فصلی بر فعالیت رشد و تولیدمثل موجود ذکر کرده‌اند. Serra و همکاران (1999) در مطالعات خود مشاهده کردند که بالا رفتن دمای آب در آگوست (مرداد ماه) سبب کاهش جذب فلزات (مثل کادمیوم) و کاهش متالوتیونین می‌گردد. Amiard-Triquet و همکاران (1998) ارتباط بسیار کم شوری با متالوتیونین را در مطالعه خود در مورد دوکفه‌ای *Macoma baltica* و *Mytilus edulis* گزارش کردند و Mouneyrac و همکاران (1998) ارتباطی را بین تغییرات شوری و نوسانات متالوتیونین در گونه *Crassostrea gigas* به دست نیاوردند.

Gillis و همکاران (2004) در مطالعه خود در گونه پرتار *Tubufix tubifix* اختلاف معنی‌داری را میان چرخه زیستی کرم و مقادیر متالوتیونین به دست نیاورده و گزارش نمودند که در شرایط غلظت‌های پایین یا نبود فلزات سنگین اختلاف معنی‌داری میان شرایط اکسیژن کم و نرمال و محدودیت غذایی با متالوتیونین وجود نداشته و فقط دما تفاوت معنی‌داری را نشان داد. David و همکاران (۲۰۰۵) در مطالعه خود به اثر هایپوکسی بر کاهش ترجمه ژن متالوتیونین پرداختند. در شرایط کمبود اکسیژن عامل محرک که اکسیژن است، حذف می‌گردد و به‌دنبال آن سطح متالوتیونین کاهش پیدا می‌کند. عموماً کاهش متالوتیونین در شرایط کمبود اکسیژن و فعالیتهای ROS اتفاق می‌افتد (Hauser-Davis et al., 2014)، در شرایط کاهش متالوتیونین و کمبود اکسیژن، افزایش فعالیت چرخه اکسیداتیو جهت تولید تنظیم‌کننده‌های حذف رادیکال‌های آزاد که نقش دفاعی مهم دارند، اتفاق می‌افتد (Issartel et al., 2009). بنابراین در شرایط کمبود اکسیژن و تولید رادیکال‌های اکسیدانت (اکسنده‌ها) در پرتار کاهش مقادیر متالوتیونین سلولی نیز دیده می‌شود.

به طور کلی همواره در بسیاری از مطالعات به نقش فاکتورهای زیستی و غیرزیستی بر شاخص‌ها در سطوح پایین (بیومارکرها) اشاره شده است و بر این نکته تاکید گردیده که شرایط زیستی موجود زنده در شرایط طبیعی و ویژگی‌های اکوسیستمی منطقه بر تغییرات موثر بوده که می‌بایست در نظر گرفته شود. به این منظور در مطالعه حاضر تغییرات معنی دار بیومارکر متالوتیونین در فصول مختلف در کنار تفاوت‌های معنی دار برخی از فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی (دما، شوری، اکسیژن و شفافیت) و عدم همبستگی معنی دار میان فلزات سنگین (روی، مس و کادمیوم) به عنوان عوامل اصلی القاء متالوتیونین و نیز پایین بودن مقادیر فلزات سنگین از استانداردهای جهانی مثل ERM, ERL در رسوبات و بافت نشان دهنده نقش موثر پارامترهای زیست محیطی خلیج چابهار بر نوسانات متالوتیونین است. نتایج PCA نشان داد که در میان فاکتورهای غیر زیستی غلظت‌های اکسیژن که در فصل مانسون در مرز کمبود اکسیژن (۲-۴ میلی‌گرم بر لیتر) بود از عوامل اصلی موثر در کاهش سنتر متالوتیونین در *G. bonhourei* در دوره مانسون بوده است.

منابع

- Azimi, A., Safahieh, A., Dadolahisohrab, A., Zolgharnein, H., Safar, B., Savari, A. 2010. Investigation of use metallothionein as biomarker of heavy metals (Hg, Cd, Pb and Cu) in *Crassostrea gigas* oyster in Imam Khomeini Port area. *Oceanography Journal*. 9: 27-40. (in Persian).
- Amiard-Triquet, C., Rainglet, F., Larroux, C., Regoli, F., Hummel, H. 1998. Metallothioneins in Arctic bivalves. *Ecotoxicology and Environment Safety*. 41: 96 -102.
- Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P.S. 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and use as biomarkers. *Aquatic Toxicology*. 76: 160-202.
- Bodin, N., Burgeot, T., Stanisiere, J.Y., Bocquene, G., Menard, D., Minier, C., Boutet, I., Amat, A., Cherel, Y., Budzinski, H. 2004. Seasonal variations of a battery of biomarkers and physiological indices for the mussel *Mytilus galloprovincialis* transplanted the northwest Mediterranean Sea. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*. 138: 411-427.
- Baykan, U., Atli, G., Canli, M. 2007. The effects of temperature and metal exposures on the profiles of metallothionein like proteins in *Oreochromis niloticus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 23(1): 33-38.
- Chakraborty, R., Zaman, S., Mukhopadhyay, N., Banerjee, K., Mitra, A. 2009. Seasonal variation of Zn, Cu and Pb in the estuarine stretch of West Bengal. *Indian Journal of Marine Science*. 38 (1): 104-109.

- Calisi, A., Lionetto, M.G., De Lorenzis, E., Leomanni, A., Schettino T. 2014. Metallothionein Induction in the coelomic fluid of the earthworm *Lumbricus terrestris* following heavy metal exposure: a short report. *BioMed Research International*. Article ID 109386. 6 p.
- David, E., Tanguy, A., Pichavant, K., Moraga, D. 2005. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia exposure under experimental conditions. *FEBS Journal*. 272(21): 5635-52.
- Gillis, P.L., Dixon, D.G., Borgmann, U., Reynoldson, T.B. 2004. Uptake and depuration of cadmium, nickel, and lead in laboratory-exposed *Tubifex tubifex* and corresponding changes in the concentration of a metallothionein-like protein. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 23(1): 76-85.
- Hutchings, P.A. 2000. An illustrated guide to estuarine polychaete worms of the New South Wales. Australian Museum, Sydney NSW. pp: 120-125.
- Hauser-Davis, R.A., Bastos, F.F., Dantas, R.F., Tobar, S.A., Da Cunha Bastos Neto, J., Da Cunha Bastos, V.L., Zioli, R.L., Arruda, M.A. 2014. Behaviour of the oxidant scavenger metallothionein in hypoxia-induced neotropical fish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 103: 24-28.
- Holms, N.A., McIntyre, D.A. 1984. Methods for the Study of Marine Benthos. 2nd edition. ISP Handbook 16. Blackwell Scientific Publications. Oxford, UK. 387 p.
- Ivankovic, D., Pavicic, J., Erk, M., Filipovic-Marijic, B., 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*. 6: 91-107.
- Issartel, J., Hervant, F., De Fraipont, M., Clobert, J., Voituron, Y. 2009. High anoxia tolerance in the subterranean salamander *Proteus anguinus* without oxidative stress nor activation of antioxidant defenses during reoxygenation. *Journal of Comparative Physiology Bulletin*. 179: 543-551.
- Kumar, P., Khan, S., Basheer, A. 2013. The distribution and diversity of benthic macro-invertebrate fauna in Pondicherry mangroves, India. *Aquatic Biosystems*. 9(15): 1-18.
- Larade, K., Storey, K.B. 2002. A profile of the metabolic responses to anoxia in marine invertebrates. In: Storey, K.B., Storey, J.M. (eds). *Cell and Molecular Responses to Stress*, Vol. 3. Elsevier Press, Amsterdam. PP: 27-46.
- Liu, F., Wang, W.X. 2011. Metallothionein-like proteins turnover, Cd and Zn biokinetics in the dietary Cd-exposed scallop *Chlamys nobilis*. *Aquatic Toxicology*. 105: 361-368.
- Mosleh, Y.Y., Paris-Palacios, S., Arnoult, F., Couderchet, M., Biagianni Risbourg, S., Vernet, G. 2004. Metallothionein induction in aquatic oligochaete *Tubifex tubifex* exposed to herbicide isoproturon. *Environmental Toxicology*. 19: 88-93.
- Mouneyrac, C., Geffard, A., Amiard, J., Amiard-triquet, C. 2000. Metallothionein-like proteins in *Macoma balthica*: effects of metal exposure and natural factors. *Canadian Journal Fisheries and Aquatic Sciences*. 57: 34-42.
- Mouneyrac, C., Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C. 1998. Effects of natural factors: salinity and body weight on cadmium, copper, zinc and metallothionein like protein levels in resident populations of oysters (*Crassostrea gigas*) from a polluted estuary. *Marine Ecology Progress Series*. 162: 125-135.
- Poirier, L., Berthet, B., Amiard, J.C., Jeantet, A.Y., Amiard-Triquet, C. 2006. A suitable model for the biomonitoring of trace metal bioavailabilities in estuarine sediments: the annelid polychaete *Nereis diversicolor*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 86(1): 71-82.
- Shou, L., Huang, Y., Zeng, J., Gao, A., Liao, Y., Chen, Q. 2009. Seasonal changes of macrobenthos distribution and diversity Zhoushan sea area. *Aquatic Ecosystem Health and Management*. 12(1): 110-115.
- Sigel, A., Sigel, H., Sigel, R.K.O. 2009. Metal ions in life sciences: Metallothioneins and Related Chelators. Royal Society of Chemistry. 502 p.

- Suriya, J., Bharathiraja, S., Sekar, V., Rajasekaran, R. 2012. Metallothionein induction and antioxidative responses in the estuarine polychaeta *Capitella capitata* (Capitellidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2(2): S1052-S1059.
- Sun, F.H., Zhou, Q.X. 2007. Metal accumulation in the polychaete *Hediste japonica* with emphasis on interaction between heavy metals and petroleum hydrocarbons. *Environmental Pollution*. 149: 92-98.
- Serafim, M.A., Company, R.M., Bebianno, M.J., Langston, W.J. 2002. Effect of temperature and size on metallothionein synthesis in the gill of *Mytilus galloprovincialis* exposed to cadmium. *Marine Environmental Research*. 54: 361-365.
- Serra, R., Isani, G., Tramontano, G., Carpena, E. 1999. Seasonal dependence of cadmium accumulation and Cd-binding proteins in *Mytilus galloprovincialis* exposed to cadmium. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. 123: 165-174.
- Viarengo, A., Burlando, B., Dondero, F., Marro, A., Fabbri, R. 1999. Metallothionein as a tool in biomonitoring programmes. *Biomarkers*. 4: 455-466.