نشریهٔ محیط زیست طبیعی،مجلهٔ منابع طبیعی ایران، دورهٔ ۶۶، شمارهٔ ۴، زمستان ۱۳۹۲
صفحات ۳۸۷- ۳۷۷

بررسی آثار کوتاه‌مدت و بلندمدت دیازینون بر فعالیت کولین استرازی در بافت‌های صدف بزرگ آب شیرین (*Anodonta cygnea*, Linnaeus, 1758)

نیما شیری[۱]، سیدجلیل غلامی[۲]، هادی پورباقر[۳]*

۱،۲. کارشناس ارشد شیلات، گروه شیلات، دانشکدهٔ منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۳. استادیار، گروه شیلات، دانشکدهٔ منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۲/۱۰ – تاریخ تصویب: ۱۳۹۱/۷/۱۸)

چکیده

دیازینون یکی از پرمصرف‌ترین آفت‌کش‌های ارگانوفسفره است. صدف بزرگ آب شیرین (*Anodonta cygnea*) را، به‌سبب سکونت نسبتاً دائمی در کانال‌های زهاب کشاورزی، می‌توان شاخصی مناسب در مناطق آلوده به این نوع از آلاینده‌ها در نظر گرفت. در این تحقیق، فعالیت استیل کولین استراز بافت‌های این جانور در مواجهه با غلظت‌ها گوناگون دیازینون (صفر، ۱، ۷، ۱۵، ۱۹، ۲۳ میلی‌گرم بر لیتر)، با تکیه بر آثار کوتاه‌مدت (روز اول تا چهارم) و بلندمدت (روز هفتم تا بیست و یکم) این سم، با هم مقایسه شد و فعالیت آنزیمی به روش المن با دستگاه الایزا ارزیابی شد. نتایج حاکی از این بود که اختلاف معنی‌داری بین سطوح فعالیت آنزیم کولین استراز بافت‌های صدف درغلظت‌های گوناگون دیازینون و زمان‌های مواجهه با این سم وجود داشت. فعالیت ویژهٔ این آنزیم در عضلهٔ جمع‌کننده، ماهیچهٔ پا، غدهٔ گوارشی و درنهایت آبشش به‌ترتیب با مقادیر ۲۷/۲۸۵، ۱۶/۹۲۳، ۲/۷۹۲ و ۱/۹۱۴ نانومول استیل تیوکولین استرازشده در دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین ثبت شد. در برنامه‌های پایش محیط‌زیست می‌توان از بافت‌های ماهیچهٔ پا و ماهیچهٔ جمع‌کننده، هم‌چون یک شاخص کولین استرازی پس از مواجههٔ این جانور با سم دیازینون، به‌منظور ارزیابی خطرهای زیست‌محیطی این آفت‌کش، استفاده کرد. با وجود این، بافت آبشش از میان چهار بافت مورد مطالعه، یگانه بافتی بود که برای تشخیص اثرهای غلظت‌های کم این سم (۱ میلی‌گرم بر لیتر) بر فعالیت کولین استراز مناسب بود.

واژگان کلیدی

استیل کولین استراز، دیازینون، شاخص زیستی، *Anodonta cygnea*

* نویسنده مسئول تلفن: ۰۲۶۳۲۲۲۳۰۴۴

Email: poorbagher@ut.ac ir

۱. مقدمه

دیازینون نوعی ترکیب حشره‌کش و کنه‌کش فسفرهٔ آلی تماسی- گوارشی است که برای کنترل دامنهٔ وسیعی از آفات گیاهی در مزارع و باغ‌های کشاورزی در نقاط مختلف دنیا به‌طور گسترده‌ای از آن استفاده می‌شود. در ایران، این حشره‌کش یکی از رایج‌ترین سموم برای مبارزه با کرم ساقه‌خوار برنج است (Talebi Jahromi, 2007). پس از سم‌پاشی و گرانول‌پاشی، باقیماندهٔ آفت‌کش در پی بارندگی فصلی یا آبیاری به‌تدریج از روی محصولات و گیاهان زراعی شسته و وارد آب‌های سطحی و زیرزمینی می‌شود (Shayeghi *et al*., 2008). نیمه‌عمر حشره‌کش دیازینون در آب‌های با اسیدیتهٔ ۷/۳ و دمای ۲۱ درجهٔ سانتی‌گراد برابر با ۱۷۱ روز است (Abbasian, 2008)؛ ازاین‌رو، تا مدت‌ها پس از سم‌پاشی زمین‌های زراعی، این آفت‌کش در اکوسیستم‌های آبی مجاور و رسوبات بستر باقی می‌ماند.

شاخص‌های زیستی[1] برای ارزیابی و پایش اکوسیستم‌های آبی از منظر وجود آلاینده‌ها، در نقش پیش‌اخطار در تشخیص اولیه، کاربرد دارند (Lam & Gray, 2003). اختصاصی‌ترین شاخص برای آفت‌کش‌های فسفرهٔ آلی تغییر در فعالیت کولین استرازی بافت‌های جانوری است (Ferrari *et al*., 2007; Varo *et al*., 2008). سازوکار آن در واقع مهار برگشت‌ناپذیر آنزیم کولین استراز توسط این گروه آفت‌کش‌هاست، به‌طوری‌که این ترکیبات برای آنزیم هم‌چون یک سوبسترا رفتار می‌کنند (Varo *et al*., 2008). بر این اساس، جداشدن باقی‌ماندهٔ ترکیب فسفره از آنزیم استرازی آن‌چنان کند صورت می‌گیرد که آنزیم قادر به هیدرولیزکردن پیام‌رسان عصبی نیست، استیل کولین در شیار عصبی تجمع می‌یابد و انتقال عصبی به‌تدریج متوقف می‌شود (Moralev *et al*., 2003). از آنزیم کولین استراز، به‌مثابهٔ شاخص زیستی آفت‌کش‌های ارگانوفسفره و کاربامات، در پژوهش‌های متعدد آزمایشگاهی و پایش محیطی بسیار استفاده شده است (Ebrahimzade *et al*., 2004; Ferenczy *et al*., 1997; Moralev *et al*., 2003; Ferrari *et al*., 2007).

صدف بزرگ آب شیرین *Anodonta Cygnea* (Linnaeus, 1758) یکی از مهم‌ترین گونه‌های خانوادهٔ Unionidae است که، در مقایسه با سایر گونه‌های صدف، بیشترین پراکنش را در آب‌های داخلی نقاط گوناگون جهان و ایران دارد. معمولاً در رودخانه‌های با جریان کند، زهکش‌های کشاورزی و آبگیرها دیده شده است (Zieritz & Aldridge, 2009). به‌سبب سکونت نسبتاً دائمی این صدف‌ها در کانال‌های زهاب کشاورزی و همچنین پالایشگربودن این بنتوزها، می‌توان این موجودات را نوعی نشانگر مناسب زیستی در مناطق آلوده به این نوع از آلاینده‌ها در نظر گرفت (Corsi *et al*., 2007; Robillard *et al*., 2003).

در مزارع برنج شمال ایران از آفت‌کش دیازینون در مقیاس وسیعی استفاده می‌شود (Shayeghi *et al*., 2008). با توجه به استفادهٔ زیاد آب در مزارع برنج، این حشره‌کش همراه آب به سایر منابع آب شیرین، به‌ویژه رودخانه‌ها، راه می‌یابد و به‌طور مستقیم با مصرف آب شیرین یا به‌طور غیرمستقیم از طریق زنجیره‌های غذایی به انسان منتقل می‌شود (Shayeghi *et al*., 2008). در حال حاضر، کنترلی بر سرنوشت دیازینون مصرف‌شده در مزارع وجود ندارد. ازاین‌رو، پایش این سم در اکوسیستم‌های آب شیرین الزامی است. تحقیق حاضر در نظر دارد تا فعالیت استیل کولین استراز[2] بافت‌های صدف بزرگ آب شیرین در مواجهه با غلظت‌های گوناگون آفت‌کش فسفرهٔ دیازینون را بررسی کند. همچنین، زمان مهارشدگی آنزیم پس از برخورد نیز بررسی شده است تا سازوکار استفاده از این شاخص تعیین و بافت مناسب برای پایش محیطی انتخاب شود. چنین مطالعه‌ای می‌تواند امکان استفاده از این گونه صدف (*A. cygnea*) را در نقش اندیکاتور سم دیازینون مشخص کند.

۲. مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی: تمامی مواد مصرفی، شامل کربنات سدیم، سدیم هیدروکساید، سولفات مس، پتاسیم سدیم تارتارات، آلبومین سرم گاوی[3]، اسید فسفریک، تریس، اسید کلریدریک، از نمایندگی رسمی شرکت مرک آلمان خریداری شدند. برای قرائت مقدار جذب از دستگاه الایزا میکروپلیت ریدر (مدل BioTek ELx 808) استفاده شد.

واکنشگرها: بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH هفت

1. Biomarkers

2. Acethyle cholinesterase (AChE)
3. Bovine serum albumin (BSA)

(بدون ترایتون)، معرف رنگی فولین[1] (رقیق‌شده با نسبت برابر آب مقطر)، معرف رنگی DTNB[2] (حل‌شده در بافر TRIS/HCl) و محلول سوبسترای استیل تیوکولین آیوداید[3] در فرایند آزمایش استفاده شدند.

جانوران و شرایط آزمایش: تعدادی از صدف‌های گونهٔ A. Cygnea با میانگین وزن و طول به‌ترتیب ۴/۴±۵۳/۶۲ گرم و ۶/۷±۸۰/۳۳ میلی‌متر (میانگین ± SD) از زهاب‌ها و کانال‌های نزدیک به مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان شهید رجایی در سمسکندهٔ ساری جمع‌آوری و به کارگاه شیلات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران (کرج) منتقل شدند. این جانوران به‌مدت ۱۰ روز در یک مخزن ۱۰۰۰ لیتری فایبرگلاس نگهداری شدند تا هم سازگاری با محیط جدید صورت گیرد و هم سطح آنزیم کولین استراز بافت‌ها تحت تأثیر مهارکننده‌های احتمالی در محیط بازیابی شود. صدف‌ها با استوک جلبک سبز آبی اسپیرولینا[4] (کشت داده‌شده با محیط کشت F2)، و پودر دافنی خشک به‌شکل تناوبی دو بار در روز تغذیه شدند. پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب از جمله pH حدود هفت، سختی کل ۱۷۵ $CaCO_3$ mg L^{-1}، اکسیژن محلول بیش از ۷ ppm و دمای ۱±۲۳ درجهٔ سانتی‌گراد تحت کنترل بودند. حشره‌کش دیازینون (۶۰ درصد مادهٔ فعال) از شرکت پرتونار خریداری شد و محلول مادر با غلظت ۱۰۰۰۰ppm تهیه شد. برای انجام‌دادن آزمایش‌ها، صدف‌ها به مخازن پلاستیکی ۱۵ لیتری منتقل شدند. صدف‌ها در مجاورت پنج غلظت متفاوت از سم در دامنه‌ای وسیع قرار گرفتند. غلظت‌های متفاوت دیازینون به‌ترتیب صفر (شاهد)، ۱، ۷، ۱۵، ۱۹، ۲۳ میلی‌گرم بر لیتر و هرکدام با تعداد ۲۲ تا ۲۵ قطعه صدف درون هر مخزن پلاستیکی به‌مثابهٔ تکرار درنظر گرفته شدند. آب در هر روز به‌اندازهٔ ۱۰ درصد تعویض شد و دوباره غلظت‌های سموم برای هر ظرف تنظیم شد.

نمونه‌برداری از بافت‌ها و تهیهٔ رونشین[5]: کشتار صدف‌ها و نمونه‌برداری از بافت‌ها در هفت زمان انجام شد که به‌ترتیب در روزهای اول، دوم، سوم، چهارم (دورهٔ کوتاه‌مدت) و هفتم، چهاردهم و بیست و یکم (دورهٔ بلندمدت) پس از اولین مواجههٔ این جانوران با سم بود. در هر کشتار، سه قطعه صدف از هر غلظت کشته شد و از بافت‌های عضلهٔ جمع‌کننده[6]، غدهٔ گوارشی[7]، پا[8] و آبشش[9] صدف‌ها نمونه برداشته شد و در فریزر ۷۰- درجهٔ سانتی‌گراد منجمد شد. بافت‌های حاصل با کمک محلول بافر فسفات (۰/۱ مولار با pH هفت و حاوی یک درصد ترایتون ایکس۱۰۰) به‌صورت دستی هموژن شده، سپس رونشین حاصل از سانتریفیوژ نمونه‌ها جدا شد تا به‌مثابهٔ منبع آنزیم استفاده شود (Ellman *et al*., 1961).

سنجش پروتئین کل و فعالیت آنزیم استیل کولین استراز: غلظت پروتئین کل بافت‌ها با روش لوری (Lowry *et al*., 1951) در طول موج ۵۴۰ نانومتر با دستگاه الایزا تعیین شد. در این روش از فولین در نقش معرف رنگی استفاده شد. سپس از روی منحنی حاصل و معادلهٔ خط آن، غلظت پروتئین موجود در نمونهٔ بافت‌ها به‌دست آمد. مقدار فعالیت ویژهٔ کولین استرازی با روش المن (Ellman *et al*., 1961) در طول موج ۴۲۰ نانومتر با دستگاه میکروپلیت ریدر اندازه‌گیری شد. بدین منظور، مخلوط رونشین (آنزیم)، بافر فسفات ۰/۱ مولار، معرف رنگی DTNB و استیل تیوکولین آیوداید، به هر تیوب افزوده شد و درنهایت حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول نهایی به هریک از چاهک‌های میکروپلیت انتقال پیدا کرد و مقدار جذب در یک دقیقه (O.D./min) با دستگاه خوانده شد.

انجام‌دادن محاسبات و آنالیز آماری: برای بیان فعالیت ویژهٔ آنزیمی، حجم منبع آنزیم و غلظت پروتئین برحسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مورد نیاز است. این کمیت، براساس نانومول استیل تیوکولین هیدرولیزشده در دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین[10] هر بافت، به‌مثابهٔ عامل وابسته محاسبه شد. آنالیز آماری از طریق آنالیز واریانس دوطرفه[11] انجام پذیرفت که غلظت‌های آفت‌کش و زمان‌های مواجهه با آنها فاکتورهای مستقل بودند. همچنین، از یک آنالیز واریانس یک‌طرفه[12]، برای مقایسهٔ فعالیت کولین استرازی بافت‌های گوناگون بدن این جانور، استفاده شد. تفاوت میانگین‌ها نیز با آزمون دانکن[13]، با مقدار خطای نوع اول ۰/۰۵ ارزیابی شد.

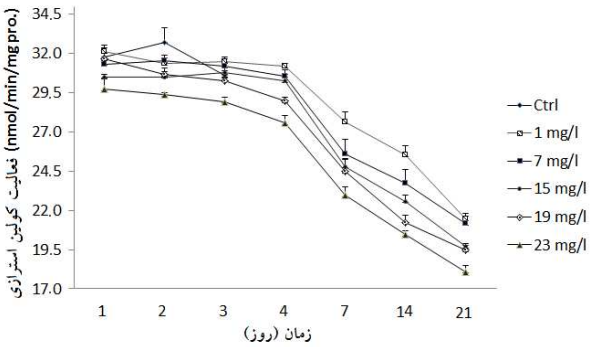
1. Folin reagent
2. Dithiobis nitrobenzoic acid
3. Acethylethiocholine iodide (ASCh)
4. Spirulina sp.
5. Supernatant
6. Adductor muscle
7. Digestive gland
8. Foot
9. Gill
10. nmol hydrolyzed ASCh /min/mg protein
11. Two-way ANOVA
12. One-way ANOVA
13. Duncan Test

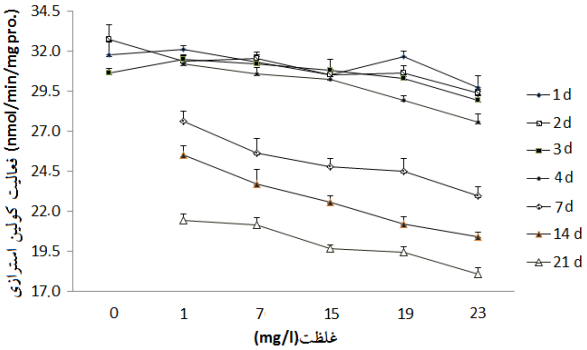
۳. نتایج

اختلاف معنی‌داری بین سطوح فعالیت آنزیم کولین استراز بافت‌های صدف دربرابر غلظت‌های گوناگون دیازینون ($F_{5.16.29}$ =۹۸/۹۹۶ و P =۰/۰۰۰۳۷) و زمان‌های مواجهه با این سم (P=۰/۰۰۰۰۴ و $F_{6.100.364}$ =۱۳۴۵/۱۳۳) وجود داشت. همچنین، بین فعالیت این آنزیم درمقابل اثرهای متقابل غلظت‌های سم و زمان مواجهۀ جانور با آنها نیز تفاوت معنی‌داری مشاهده شد (P=۰/۰۰۱۱ و ۲/۱۶۳= $F_{26.100.277}$). اثر غلظت‌های آفت‌کش و زمان در معرض آنها قرارگرفتن، روی فعالیت استیل کولین استرازی بافت‌های صدف، به‌تفکیک در شکل‌های ۱ (ماهیچۀ جمع‌کننده)، ۲ (غدۀ گوارشی)، ۳ (پا) و ۴ (آبشش)، نشان داده شده است.

افزایش غلظت سم (نمودارهای سمت چپ) و همچنین زمان در معرض سم‌بودن (نمودارهای سمت راست) سبب روندی کاهشی در فعالیت کولین استرازی (برحسب نانومول استیل تیوکولین هیدرولیزشده در دقیقه بر میلی گرم پروتئین) بافت های مورد بررسی شدند و به عبارت دیگر، مهارشدگی این آنزیم رابطۀ مستقیمی با غلظت آفت‌کش و زمان مواجهۀ جانور با آن داشت. همچنین اثر زمان بیش از اثر غلظت سم بر فعالیت کولین استرازی بود (F زمان> F غلظت). باید توجه داشت که اختلاف سطح فعالیت آنزیمی ثبت‌شده در گروه شاهد نشان‌دهندۀ دامنۀ نرمال کولین استراز در بافت‌هاست.

در بافت ماهیچۀ جمع کننده (شکل ۱)، بین گروه شاهد با غلظت های ۱، ۷ و ۱۵ میلی گرم بر لیتر دیازینون، حتی تا روز چهارم کاهش معنی داری در فعالیت آنزیمی دیده نشد و سطح کولین استراز نسبتاً در حد نرمال باقی ماند. اما بین سطح فعالیت کولین استرازی غلظت‌های بالاتر (۱۹ و ۲۳ میلی‌گرم بر لیتر) با یکدیگر و با دیگر غلظت‌ها تفاوت آماری وجود داشت. همچنین، کاهشی نسبی در سطح آنزیم مورد بررسی تا روز چهارم، به‌ویژه در غلظت های بالاتر، وجود داشت، ولی در غلظت‌های کم (۱، ۷ و ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر) تفاوت معنی داری بین روزهای اول تا چهارم (کوتاه مدت) دیده نشد. با وجود این، بین سطح آنزیمی روزهای چهارم تا بیست و یکم، اختلاف معنی‌داری وجود داشت. به‌علاوه، روند نزولی کولین استراز از روز چهارم شدت گرفت و تا روز هفتم ادامه یافت. سپس، تا روز آخر مواجهه با سم (روز ۲۱)، از شیب این نمودار اندکی کاسته شد. به‌عبارت دیگر، فعالیت آنزیمی بافت ماهیچۀ جمع‌کننده، از روز چهارم تا هفتم، افت نسبی شدیدتری از سایر زمان‌ها داشته است. آثار بلندمدت (روزهای هفتم تا بیست‌ویکم) زمان مواجهه بر فعالیت آنزیمی در بافت ماهیچۀ جمع‌کننده بیش از آثار کوتاه‌مدت (روزهای اول تا چهارم) آن مشاهده می‌شد.

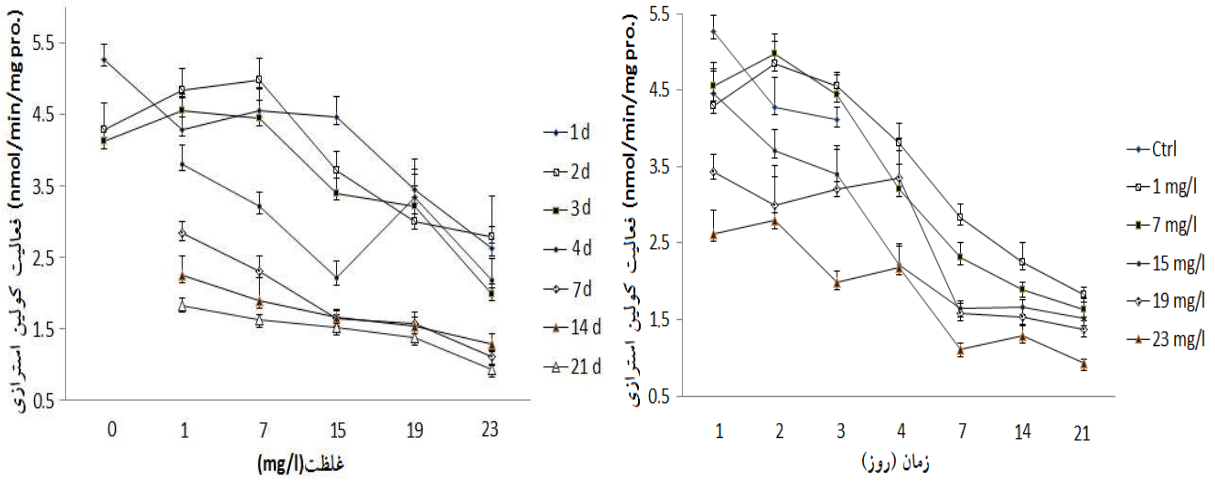




شکل ۱. اثرهای غلظت آفت‌کش (چپ) و زمان مواجهۀ آن (راست)، بر فعالیت استیل کولین استراز عضلۀ جمع‌کننده (هر نقطه نشان‌دهندۀ میانگین + SD است.)

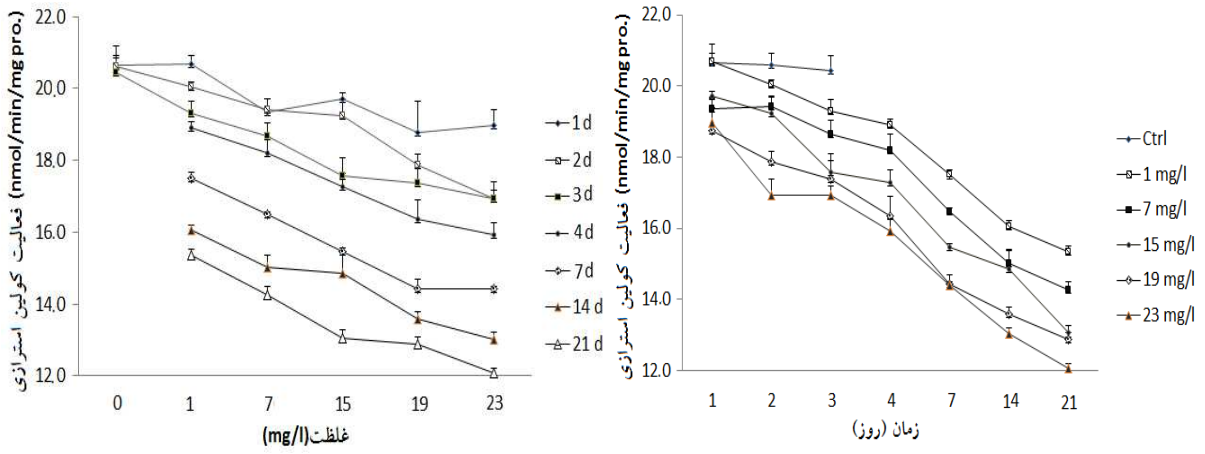
در بافت غدۀ گوارشی (شکل ۲)، در سه روز نخست مواجهه با سم، اختلاف معنی داری بین فعالیت استیل کولین استرازی غلظت های صفر (گروه شاهد)، ۱ و ۷ میلی گرم بر لیتر سم وجود نداشت، ولی در غلظت های بالاتر (۱۵، ۱۹ و ۲۳ میلی‌گرم بر لیتر) کاهش معنی داری در سطح آنزیم دیده شد. در روز چهارم، در

بین بیشتر غلظت‌های دیازینون، به‌جز پاره‌ای از موارد (بین غلظت‌های ۷ و ۱۹ و بین ۱۵ و ۲۳ میلی‌گرم بر لیتر)، اختلاف معنی‌داری مشاهده شد و کاهش چشمگیری نسبت به شاهد وجود داشت. در دورهٔ بلندمدت (روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱) فقط بین غلظت‌های ۱۵ و ۱۹ بود که از نظر سطح کولین استرازی اختلاف آماری دیده نشد. به‌علاوه، روند نزولی سطح آنزیمی با افزوده‌شدن به غلظت آفت‌کش در طول زمان (از روز هفتم به روز بیست و یکم) کاهش یافت. همچنین، فعالیت کولین استراز در غلظت ۱ و ۷ بین روزهای اول تا سوم فاقد اختلاف معنی دار بود و با گذشت زمان بین زمان‌های بعدی (روز ۴ تا ۲۱) کاهش معنی داری وجود داشت که بیشینهٔ این مهارشدگی در روز چهارم تا هفتم دیده شد. فعالیت این آنزیم، در غلظت ۱۵ میلی گرم بر لیتر، تا روز هفتم دارای کاهش معنی دار در طول زمان بود و بیشینهٔ این کاهش (مهارشدگی) از روز سوم تا چهارم بود. اما روزهای پس از آن (۷، ۱۴ و ۲۱) در فعالیت کولین استراز با هم اختلاف معنی‌دار نداشتند. در غلظت‌های ۱۹ و ۲۳ میلی‌گرم بر لیتر، تا روز چهارم شاهد اختلاف معنی دار بین زمان ها بودیم و پس از آن با کاهش شدید فعالیت آنزیم تا روز هفتم توأم بود.



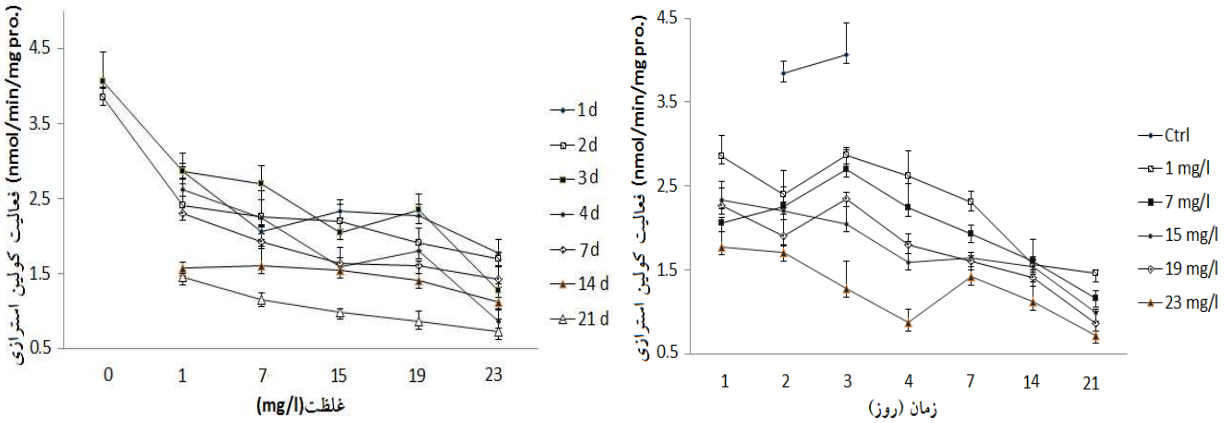
شکل ۲. اثرهای غلظت آفت‌کش (چپ) و زمان مواجههٔ آن (راست) بر فعالیت استیل کولین استراز غدهٔ گوارشی (هر نقطه نشان‌دهندهٔ میانگین + SD است.)

در بافت ماهیچهٔ پا (شکل ۳)، در روز نخست، بین فعالیت آنزیم غلظت های صفر و ۱ میلی گرم بر لیتر، اختلاف معنی‌داری دیده نشد، ولی بین غلظت‌های بالاتر باوجود نوسانات موجود اختلاف آماری وجود داشت. در روز دوم بین فعالیت آنزیم غلظت‌های ۷ و ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر، در روز سوم بین غلظت‌های ۱۵ و ۱۹ میلی‌گرم بر لیتر و در روز هفتم بین غلظت‌های ۱۹ و ۲۳ میلی‌گرم بر لیتر اختلاف معنی‌داری دیده نشد، ولی بین کولین استراز دیگر غلظت ها با شاهد و با یکدیگر در تمامی زمان ها تفاوت معنی دار وجود داشت. همچنین، کاهش معنی داری در فعالیت آنزیم در طول زمان (تفاوت آماری بین روزهای اول تا بیست و یکم) مشهود بود. این روند کاهشی در فعالیت کولین استرازی، همانند فعالیت این آنزیم در بافت ماهیچهٔ جمع کننده، از روز چهارم تا هفتم شدت بالاتری داشت و فقط در غلظت ۲۳ میلی‌گرم بر لیتر بود که از روز اول به روز دوم اوج سیر نزولی در فعالیت آنزیم دیده شد. البته تفاوت‌های آنزیمی بین روزهای دورهٔ کوتاه مدت در این بافت بهتر از بافت نخست (عضلهٔ جمع‌کننده) مشاهده می‌شود و اثرهای سم بر آنزیم در بین تمامی روزهای مواجهه را می‌توان از هم تفکیک کرد.



شکل ۳. اثرهای غلظت آفت‌کش (چپ) و زمان مواجههٔ آن (راست) بر فعالیت استیل کولین استراز ماهیچهٔ پا (هر نقطه نشان‌دهندهٔ میانگین + SD است.)

در بافت آبشش (شکل ۴)، بین فعالیت آنزیمی از غلظت صفر (شاهد) به یک میلی‌گرم اختلاف معنی‌داری وجود داشت و به شکل روندی کاهشی با شیب زیاد مشاهده می‌شد. در دورهٔ کوتاه‌مدت مواجهه با سم (روزهای اول تا چهارم)، بین تمامی غلظت‌ها اختلاف معنی دار دیده شد. در روز هفتم و چهاردهم آزمایش، به‌ترتیب بین غلظت‌های ۱۵ و ۱۹ و بین غلظت‌های ۱، ۷ و ۱۵ اختلاف معنی داری وجود نداشت. اما سطح کولین استرازی تمامی غلظت های دیازینون با یکدیگر، در آخرین روز از دورهٔ بلندمدت مواجهه با این آفت‌کش (روز ۲۱)، دارای تفاوت معنی‌داری بود. همچنین، در غلظت‌های کم (۱، ۷ و ۱۵ میلی‌گرم) بین تمامی زمان‌ها اختلاف معنی‌دار مشهود بود. در بین غلظت‌های ۱، ۷ و ۱۵ میلی گرم بر لیتر، در روز دوم مواجهه با سم، در مقایسه با روز نخست یک حالت افزایش فعالیت آنزیمی دیده می‌شود.

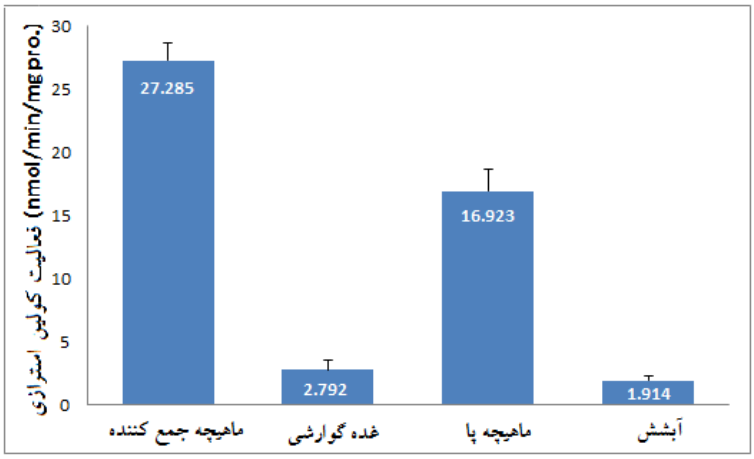


شکل ۴. اثرهای غلظت آفت‌کش (چپ) و زمان مواجههٔ آن (راست) بر فعالیت استیل کولین استراز آبشش (هر نقطه نشان‌دهندهٔ میانگین + SD است.)

به طور کلی، فعالیت استیل کولین استرازی در طول دورهٔ آزمایش و در تمام بافت‌ها، با افزایش غلظت آفت‌کش و زمان مواجهه با آن، کاهش یافت، ولی این مهارشدگی آنزیم در بافت‌های گوناگون یکسان نبود. با افزایش غلظت دیازینون، مهارشدگی کولین استراز نیز افزایش پیدا کرد و در بافت آبشش در فعالیت آنزیمی بین غلظت صفر (شاهد) و غلظت کم سم تفاوت فاحشی دیده شد، ولی بیشترین تفاوت بین این غلظت با غلظت‌های بالاتر و تأثیر آنها بر فعالیت آنزیم در بافت‌های ماهیچهٔ جمع‌کننده و پا وجود داشت. اثرهای

غلظت دیازینون بر فعالیت استیل کولین استراز به‌اندازهٔ اثر زمان بر این آنزیم مشاهده پذیر نبود (به‌ویژه در عضلهٔ جمع کننده). همچنین، افزایش زمان مواجهه با این سم نیز مهارشدگی (کاهش فعالیت) بیشتر آنزیم کولین استراز را در پی داشت و به‌جز بافت آبشش، در سایر بافت ها از روز چهارم تا هفتم نسبت به سایر زمان ها، مهارشدگی آنزیمی شدیدتری وجود داشت. به‌علاوه، در طول زمان تا روز سوم (به‌ویژه در غلظت های کم آزمون) در آبشش روندی افزایشی دیده شد.

درنهایت، مقایسهٔ میانگین فعالیت ویژهٔ آنزیم کولین استراز در بافت‌های گوناگون صدف دارای اختلافی معنی‌دار با هم بود ($P=۰/۰۰۰۵۲$ و $F_{3.63.132}=۷۳۸۹/۴۳۳$). فعالیت آنزیمی بافت های صدف در شکل ۵ نشان داده شده است.



شکل۵. مقایسهٔ فعالیت استیل کولین استراز بافت‌ها در صدف بزرگ آب شیرین (میانگین + SD)
(اعداد روی ستون‌ها نشان‌دهندهٔ میانگین است.)

۴. بحث و نتیجه گیری

در این تحقیق، آثار کوتاه‌مدت و بلندمدت آفت‌کش دیازینون بر فعالیت آنزیم استیل کولین استراز بافت‌های گوناگون گونهٔ دوکفه‌ای A. cygnea بررسی شد و طی مدت ۲۱ روز آزمایش در گروه های آزمون و شاهد تلفاتی مشاهده نشد.

نتایج دورهٔ مسمومیت صدف ها نشان می‌دهد که در گروه‌های مسموم با این آفت‌کش در طول دورهٔ آزمایش و در تمام بافت‌ها، افزایش غلظت سم و زمان مواجهه با آن سبب مهارشدگی (کاهش سطح) فعالیت کولین استرازی بافت‌های این جانوران شد. این مهارشدگی آنزیمی، که در بافت‌های بدن صدف‌های مسموم‌شده مشاهده شد، در پژوهش‌های گوناگون اثر سموم فسفرهٔ آلی بر AChE مهره‌داران و بی‌مهرگان گوناگون گزارش شده و مؤید نتایج پیش روست (Moralev *et al.*, 2003؛Ferenczy *et al.*, 1997 ؛ Corsi*et al.*, 2007؛Robillard *et al.*, 2003). در بافت‌های ماهیچهٔ جمع‌کننده و پا، روزهای نخست مواجهه با غلظت های گوناگون دیازینون تأثیر زیادی در فعالیت کولین استرازی نداشته اند، ولی از روز چهارم به بعد، تأثیر غلظت های سم (به‌ویژه غلظت‌های بالاتر) بر فعالیت این آنزیم کاملاً مشهود بود و مهارشدگی شدیدتری از روز چهارم تا هفتم در مقایسه با سایر زمان‌ها قابل تشخیص است. Cooper و Bidwell (2006) آنزیم استیل کولین استراز صدف تحت استرس با آفت‌کش فسفرهٔ کلروپایریفوس را بررسی کردند؛ این بررسی نشان داد که فعالیت کولین استراز ماهیچهٔ جمع‌کنندهٔ گونهٔ (Corbicula fluminea) در غلظت های بالاتر این سم (۲۵ و ۵۰ میلی گرم بر لیتر) با افزایش زمان و حدوداً در روز دوم مواجههٔ جانور با آفت‌کش کاهش معنی‌داری یافته است و این یافته‌ها با نتایج اثر دیازینون در گونهٔ A. cygnea در تحقیق حاضر همخوانی دارد، گرچه در پژوهش ذکرشده زمان مواجهه فقط در دورهٔ کوتاه‌مدت (تا ۹۶ ساعت) بررسی شده بود. تأثیر اندک غلظت‌های سم بر فعالیت کولین استرازی در روزهای نخست پژوهش می تواند به این

دلیل باشد که دوکفه‌ای با از دست‌دادن آفت‌کش از طریق انتشار اجازهٔ رسیدن غلظت آن در بافت ها به آستانهٔ خطرناک را نداده است (Corsi *et al*., 2007). ولی با افزایش زمان و مواجههٔ دائمی جانور با یک غلظت ثابت از آفت‌کش، ضعف این سیستم ابتدایی در سم‌زدایی (نسبت به مهره‌داران) آشکار و در روزهای بعد، تأثیر غلظت‌های سم بر فعالیت این آنزیم مشاهده شده است. آفت‌کش دیازینون، از طریق جذب پوستی (روپوش) و اپیتلیال آبششی، به‌راحتی وارد بدن نرم‌تنان آبزی می‌شود (Valbonesi *et al*, 2003). همچنین، قابلیت انحلال در چربی سبب می شود تا به‌آسانی از ساختار فسفولیپیدی غشاهای زیستی گذر کند و براساس گزارش Lam و Gray (2003) و در کمتر از ۲۴ ساعت از مواجههٔ موجودات آبزی با این آفت‌کش، در تمام بدن جانور منتشر می شود. غلظت سم در بافت های گوناگون در مواجههٔ دائمی ماهی با غلظت ثابتی از آفت‌کش به‌سرعت افزایش می‌یابد و پس از گذشت حدود ۷۲ ساعت از زمان در معرض واقع‌شدن به حداکثر مقدار خود می رسد. این زمان تقریباً با زمان اوج مهارشدگی آنزیم در بافت‌های ماهیچه‌ای بدن صدف در تحقیق حاضر (روز چهارم تا هفتم)، مطابقت دارد. پیش تر نیز Lang و همکاران (1997) در مطالعه بر ماهی کپور معمولی چنین تأخیری در بروز انتشار سم در بافت‌های گوناگون را گزارش کرده بودند. بنابراین حداکثر مقدار دیازینون تجمع‌یافته در بافت را می‌توان با اوج‌گیری مهار کولین استرازی مرتبط دانست.

در بافت غدهٔ گوارشی، با افزایش غلظت دیازینون کاهش فعالیت آنزیمی دیده شد و همچنین در دورهٔ کوتاه مدت آزمایش، بین روزهای مواجهه با سم (به‌ویژه در غلظت‌های بالاتر) تفاوت زیادی وجود داشت. ولی در روزهای پایانی، اختلاف بین زمان‌های مواجهه با سم کمتر مشاهده می‌شد. به‌عبارت دیگر، اثرگذاری غلظت های سم بر فعالیت آنزیمی این بافت در زمان کوتاه‌تری از بافت‌های ماهیچه‌ای بدن صدف صورت گرفته، ولی در طول زمان از شدت این تأثیر کاسته شده است. Corsi و همکاران (2007) اثرهای سه مهارکنندهٔ اختصاصی را بر استیل کولین استراز بافتی در جنس Anodonta بررسی کردند. بر این اساس، مهارکنندهٔ Iso-OMPA (به‌مثابهٔ مهم‌ترین آنها) سبب کاهش یافتگی فعالیت این آنزیم در بافت های عضلهٔ جمع‌کننده و آبشش شد، ولی بر آنزیم بافت‌های پا و غدهٔ گوارشی اثر معنی‌داری نداشت. برخلاف این نتایج، یافته‌های ما نشان داد که آفت‌کش دیازینون به‌مثابهٔ مهارکننده‌ای رقابتی برای استیل کولین استراز (Varo *et al*, 2008؛ Cong *et al*, 2009)، بر فعالیت آنزیمی تمامی بافت های مورد پژوهش اثرگذار بوده، لیکن مقدار و شدت این اثر بر سطح آنزیمی این جانور (برمبنای غلظت های مهارکننده و یا زمان‌های در معرض‌بودن آن) متفاوت است. علت این اختلاف در یافته ها را می‌توان با نوع مهارکننده مرتبط دانست، زیرا سایر مهارکننده های مورد استفاده[1] در آزمایش مذکور فعالیت کولین استرازی بافت‌های پا و غدهٔ گوارشی را مهارکردند. بنابراین، دیازینون از لحاظ عملکرد نزدیکی بیشتری با این مهارکننده‌ها داشته است.

در بافت آبشش بین غلظت صفر (شاهد) و غلظت کم سم در فعالیت آنزیمی تفاوت فاحشی دیده شد، ولی بین این غلظت با غلظت های بالاتر، با وجود تفاوت معنی‌دار (تقریباً در تمام زمان‌ها)، این کاهش در مقایسه با سایر بافت‌ها (به‌ویژه ماهیچهٔ پا) بسیار اندک بود. بافت آبشش، به‌دلیل نقش آن در تغذیه و تنفس دوکفه‌ای‌ها، برای استفاده به‌مثابهٔ شاخص‌های بیوشیمیایی بسیار مهم است و پالایشگربودن این جانوران سبب شده تا تأثیر مستقیم آلاینده ها بر آنها به‌آسانی مشاهده شود (Mora *et al*., 1999). در پژوهش Corsi و همکاران (2007) بیشترین مقدار مهارشدگی کولین استراز دربرابر حضور مهارکننده‌ها در بافت آبشش مشاهده شد و با یافته های پژوهش حاضر مطابقت داشت که حاکی از حساسیت بالاتر کولین استراز بافت آبشش از سایر بافت‌ها در گروه‌های آزمایشی بود. این در حالی است که، در سایر بافت‌های مورد بررسی در این پژوهش، فعالیت آنزیم بین شاهد و غلظت کم سم تفاوتی چشمگیری نشان نداد و می‌توان ادعا کرد که بافت آبشش، از میان چهار بافت مورد مطالعه، فقط برای تشخیص اثرهای غلظت های کم این سم بر فعالیت کولین استراز مناسب‌تر به‌نظر می‌رسد.

همچنین، در بافت آبشش، در طول زمان تا روز

1. BW248c51, Eserine

سوم، به‌ویژه در غلظت‌های کم آزمون، روندی افزایشی مشاهده شد. آنزیم های استراز جزئی از سیستم حفاظتی هیدرولیزکننده‌اند که به گروه‌های گوناگون تقسیم می شوند و در این بین استیل کولین استراز، که به مثابهٔ پیام رسان عصبی در جانوران شناخته شده است، به استرازهای نوع B تعلق دارد که همگی با ترکیبات فسفرهٔ آلی مهار می‌شوند (Cong *et al*., 2009). گروه دیگری از استرازها، موسوم به استرازهای نوع A، قابلیت هیدرولیزکردن آفت‌کش‌های فسفره را دارند که در مهره‌داران از سلول‌های کبدی ترشح می‌شوند (Ferrari *et al*., 2007). با توجه به اینکه در سایر بافت‌ها پدیدهٔ افزایش مجدد فعالیت کولین استرازی در طول زمان دیده نشد، به‌نظر می رسد در بافت آبشش این دوکفه‌ای استرازهای نوع A با کاهش مقدار آفت‌کش (در غلظت‌های کمتر) سبب رخداد این روند افزایشی در فعالیت آنزیم استیل کولین استراز شده‌اند. وجود احتمالی این نوع استرازها در آبشش صدف ممکن است نوعی محافظت در برابر آلاینده‌ها باشد.

اثرگذاری زمان مواجههٔ سم بر فعالیت استیل کولین استراز بیش از اثر افزایش غلظت سم بر این آنزیم تشخیص داده شد (با مقایسهٔ مقدار آمارهٔ F اثر زمان برابر با ۱۳۴۵/۱۳۳ نسبت به مقدار آمارهٔ F اثر غلظت برابر با ۹۸/۹۹۶) و به‌عبارتی مهارشدگی کولین استرازی در هر بافت وابستگی بیشتری به زمان مواجهه با سم داشت. در تحقیق Ferrari و همکاران (2004) نیز، که به‌طور اختصاصی روی تأثیر زمان بر مهارشدگی کولین استرازی در ماهی حوض انجام گرفته بود، به اهمیت زمان مواجههٔ سم نسبت به غلظت آن اشاره شد و این امر در سایر پژوهش ها نیز تصدیق شده است (El-Cong *et al*., 2009؛ Arufe *et al*., 2007؛ Shenawy *et al*., 2003). مقدار مادهٔ سمی واردشده به بدن، به‌دلیل ناتوانی در متابولیسم دفع سموم جانور دربرابر مسمومیت مزمن، زمان کافی برای تبدیل به ترکیب مزدوج (بی‌اثر) را نداشته است و اثرهای تحت کشنده با افزایش زمان بیشتر نمایان می‌شود. ولی در مسمومیت حاد و با افزایش غلظت آفت‌کش، درصورتی‌که غلظت سم به‌اندازه‌ای نباشد که به اثرهای کشنده منجر شود، زمان برای انجام‌دادن فرایندهای سم‌زدایی غلظت‌های گوناگون همواره تأثیر دارد (Ferrari *et al*., 2004).

مقایسهٔ میانگین فعالیت ویژهٔ آنزیم کولین استراز در بافت‌های گوناگون گونهٔ A. cygnea نشان داد که بیشینهٔ این کمیت به‌ترتیب در عضلهٔ جمع‌کننده، ماهیچهٔ پا، غدهٔ گوارشی و درنهایت آبشش ثبت شد. در پژوهشی که بر فعالیت استیل کولین استراز Anodonta woodiana در پاسخ به استرس چندین آفت‌کش (فنیتروتیون و کلرپیریفوس) و مهارکننده (Iso-OMPA) صورت پذیرفت، در مقایسه با سایر بافت‌ها، بافت‌های ماهیچه‌ای را واجد بالاترین میانگین فعالیت کولین استراز دانستند (Corsi *et al*., 2007) و این در حالی بود که Mora و همکاران (1999) نیز بالاترین فعالیت استیل کولین استراز را در دو گونهٔ صدف دریایی Mytilus galloprovincialis و Corbicula fluminea به ترتیب در آبشش و روپوش[1] گزارش کرد (سوبسترای مورد استفاده در آزمایش برای هر گونه به‌ترتیب ASCh[2] و PrSCh[3] بود). اختلاف بین نتایج این پژوهش با تحقیق ذکرشده می‌تواند به‌علت تفاوت در ویژگی‌های گونه‌ای، نوع زیستگاه و نوع سوبسترای مورد استفاده باشد. به نظر می‌رسد که بافت‌های ماهیچه ای در جنس Anodonta دارای استیل کولین استراز بالاتر در بین سایر بافت هایند. همچنین، این بافت‌ها از لحاظ نوع مهارشدگی آنزیم دربرابر غلظت های دیازینون و زمان های مواجهه با آن تاحدی مشابه‌اند. بافت‌های حرکتی در جانوران، به‌دلیل دریافت و ارسال پیام‌های عصبی بیشتر، از سطح نرمال بالاتری در آنزیم‌های هیدرولیزکنندهٔ پیام‌رسان‌ها برخوردارند (Bartzokis, 2007). معمولاً در دوکفه‌ای‌ها، ماهیچه‌های جمع‌کننده و پا به‌ترتیب وظایف بستن کفه‌ها و نقب‌زنی را بر عهده دارند (Zieritz & Aldridge, 2009).

ارزیابی رفتار آنزیم استیل کولین استراز بافت های گوناگون صدف بزرگ آب شیرین در مقابل غلظت های آفت‌کش دیازینون در محیط و زمان‌های مواجهه با آن را می توان این‌گونه خلاصه کرد که بافت ماهیچهٔ جمع‌کننده می‌تواند، به‌مثابهٔ نوعی شاخص کولین استرازی در روزهای چهارم تا بیست و یکم پس از مواجههٔ این جانور با سم دیازینون (دورهٔ بلند مدت)،

1. Mantle
2. Acetylethiocholine
3. Propionylthiocholine

برای پایش محیط آبی و ارزیابی خطرهای زیست‌محیطی این آفت‌کش به‌کار گرفته شود. در برنامه‌های پایش محیط‌زیست می‌توان از بافت‌های غدهٔ گوارشی و آبشش در روزهای نخست تا روز چهارم مواجهه با این سم (دورهٔ کوتاه‌مدت) استفاده کرد، ولی به‌کارگیری این بافت‌ها توصیه نمی‌شود. یکنواخت‌نبودن و به‌هم ریختگی اثرهای غلظت‌های دیازینون بر AChE غدهٔ گوارشی و فقدان تفاوت‌های بارز بین زمان های گوناگون و سطح فعالیت آنزیمی کمتر بافت آبشش به‌نسبت سایر بافت ها، نشان می دهد که این دو بافت در ارزیابی اثرهای زمانی آفت‌کش بر کولین استراز چندان اعتمادپذیر نیستند. همچنین، مشاهدهٔ روندی افزایشی در طول زمان (در برخی غلظت‌ها)، می‌تواند حاکی از وجود نوعی سیستم حفاظتی هیدرولیزکننده (دربرابر آلاینده ها) در بافت آبشش باشد و گواه دیگری است بر اینکه این بافت مارکر مناسبی برای نشان‌دادن اثرهای زمان نیست. از سویی دیگر، آبشش برای تشخیص حضور آفت کش دیازینون در غلظت‌های کم (درحدود ۱ میلی‌گرم) مناسب شناخته شد، زیرا اثرپذیری مستقیم و حساسیت کولین استرازی نسبتاً زیادی به وجود این آلاینده داشت. درنهایت، ماهیچهٔ پا را می‌توان شاخص زیستی برتری از ماهیچهٔ جمع‌کننده دانست، زیرا علاوه‌بر دورهٔ بلند مدت، در دورهٔ کوتاه مدت (روزهای اول تا چهارم) مواجههٔ جانور با سم دیازینون نیز، اثرهای زمان بر کولین استراز را در روند کاهشی مناسبی نشان داد و در تمامی روزهای پس از ورود آفت کش به زیستگاه این گونه تا تجزیه و غیرفعال‌شدن آن، می‌توان از این بافت به‌مثابهٔ یک شاخص کولین استرازی استفاده کرد. به‌علاوه، ماهیچهٔ پا به‌دلیل بیشینهٔ مهارشدگی این آنزیم دربرابر افزایش غلظت سم و نمایش بهتر تغییرات آنزیمی (در مقایسه با سایر بافت ها)، بافت مناسبی برای دنبال‌کردن تغییرات کولین استرازی در مواجهه با سم دیازینون به‌نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

در اینجا لازم است از جناب آقای دکتر طالبی جهرمی و مسئول آزمایشگاه سم‌شناسی گروه گیاهپزشکی دانشگاه تهران، برای همکاری و راهنمایی‌های بی‌شائبه‌شان در این تحقیق، سپاسگزاری کنیم.

References

1. Abbasian, H., Ashayeri, A., Hasanzadeh H (2008) “Agricultural drainage water in the Caspian sea and their ecological impacts,” *Aqua Sciences*, 5: 123-129.
2. Arufe, M.I., Arellano, J.M., García, L., Albendín, G., Sarasquete, C (2007) “Cholinesterase activity in gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae: characterization and sensitivity to the organophosphate azinphosmethyl,” *Aquatic Toxicology*, 84: 328-336.
3. Bartzokis, G (2007) “Acetylcholinesterase inhibitors may improve myelin integrity,” *Biological Psychiatry*, 62: 294-301.
4. Cong, N.V., Phuong, N.T., Bayley, M (2009) “Effects of repeated exposure of diazinon on cholinesterase activity and growth in snakehead fish (*Channa striata*), *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72: 699-703.
5. Corsi, I., Pastore, A.M., Lodde, A., Palmerini, E., Castagnolo, L., Focardi, S (2007) “Potential role of cholinesterases in the invasive capacity of the freshwater bivalve, *Anodonta woodiana* (Bivalvia: Unionacea): A comparative study with the indigenous species of the genus, *Anodonta* sp,” *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 145: 413-419.
6. Cooper, N.L., Bidwell, J.R (2006) “Cholinesterase inhibition and impacts on behavior of the Asian clam, *Corbicula fluminea*, after exposure to an organophosphate insecticide,” *Aquatic Toxicology*, 76: 258-267.
7. Ebrahimzade, M.A., Karami, M., Golrokh, M (2004) “Determination of cholinesterase enzyme activity in the brain of *Rutilus frisii kutum* in variety of marine and cultural as indicator of this fish,” *Journal of Shahrekord University of Medical Science*, 6(3): 33-38.
8. Ellman, G.L., Courtney, K.D., Featherstone, R.M (1961) “A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity,” *Biochemical Pharmacology*, 7: 88-90.

9. El-Shenawy, N.S., Abdel-Nabi, I.M., Moawad, T.I., Taha, I.A (2003) "Physiological and behavioural responses of *Ruditapes decussatus* to roundup and reldan," *Egyptian Gournal of Biology*, 5: 108-119.

10. Ferenczy, J., Szegletes, T., Bálint, T., Abrahám, M., Nemcsók. J (1997) "Characterization of acetylcholinesterase and its molecular forms in organs of five freshwater teleosts," *Fish Physiology and Biochemistry*, 16: 515-529.

11. Ferrari, A., Venturino, A., Pechén de D'Angelo, A.M (2007) "Muscular and brain cholinesterase sensitivities to azinphos methyl and carbaryl in the juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146: 308-313.

12. Lam, P.K.S., Gray, J.S (2003) "The use of biomarkers in environmental monitoring programmes," *Marine Pollution Bulletin*, 46: 182-186.

13. Lang, G., Kufcsak, O., Szegletes, T., Nemcsok, J (1997) "Quantitative distributions of different cholinesterase and inhibition of acetylcholinesterase by metidathion and paraquat in alimentary canal of Common carp," *Genetical Pharmacology*, 29: 55-59.

14. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J (1951) "Protein measurement with the Folin phenol reagent," *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.

15. Mora, P., Michel, X., Narbonne, J.F (1999) "Cholinesterase activity as potential biomarker in two bivalves," *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 7: 253-260.

16. Moralev, S., Esaulova, A., Kurapov, A., Rozengart, E., Khovanskikh, A (2003) "The study of cholinesterase activity of the liver of some fish of Caspian Sea," *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 392: 271-273.

17. Robillard, S., Beauchamp, G., Laulier, M (2003) "The role of abiotic factors and pesticide levels on enzymatic activity in the freshwater mussel *Anodonta cygnea* at three different exposure sites," *Comparative Biochemistry and Physiology*, 135:49-59.

18. Shayeghi, M., Khoobdel, M., Bagheri, F., Abtahi, M (2008) "Azinphos-methyl and diazinon residues in Gorganrood and Gharesoo river Golestan province," *Journal of School of Public Health and Institute of Public Health Research*, 6(1): 75-82.

19. Talebi Jahromi, K (2007) *Pesticides Toxicology*, (2nd Ed.) Tehran, University of Tehran Press. 492.

20. Valbonesi, P., Sartor, G., Fabbri, E (2003) "Characterization of cholinesterase activity in three bivalves inhabiting the North Adriatic sea and their possible use as sentinel organisms for biosurveillance programmes," *The Science of the Total Environment*, 312: 79-88.

21. Varo, I., Amat, F., Navarro, J (2008) "Acute toxicity of dichlorvos to *Aphanius iberus* (Cuvier & Valenciennes, 1846) and its anti-cholinesterase effects on this species," *Aquatic Toxicology*, 88: 53-61.

22. Zieritz, A., Aldridge, D.C (2009) "Identification of ecophenotypic trends within three European freshwater mussel species (Bivalvia: Unionoida) using traditional and modern morphometric techniques," *Biological Journal of the Linnean Society*, 98: 814-825.