تأثير الزئبق على البروتينات الكلية والمرحلة كهربائيا وعلى فعالية ثلاثة أنزيمات في غلاصم بعض الأنواع من محار المياه العذبة *Unio tigridis* و *Pseudontopsis euphraticus* و *Anodonta sp*.

عبد علي ذاكر [*] و سولاف مصطفى محمد [**]

[*] قسم علوم الحياة – كلية العلوم / جامعة الانبار

[**] قسم علوم الحياة – كلية العلوم / جامعة السليمانية

الخلاصة

جمعت نماذج من ثلاثة أنواع من المحار *Unio tigridis* و *Pseudontopsis euphraticus* و *Anodonta sp*. من بحيرة الحبانية/ منطقة العنكور/العراق . عرضت الحيوانات إلى الزئبق بثلاثة تراكيز هي 0.1 و0.2 و0.4 ملغم زئبق/ لتر لمدة ثلاثة أسابيع للتركيز الأول وأسبوعين للتركيز الثاني وأسبوع واحد للتركيز الثالث . بعد انتهاء فترة التعريض ،شرحت الحيوانات واستخدمت الغلاصم لتحضير المستخلص وقدرت كمية البروتينات وفعالية الإنزيمات ، وكانت النتائج كالآتي :

1- سبب الزئبق بتراكيزه المختلفة نقصا في كمية البروتينات في غلاصم. كما لوحظ تأثيرا واضحا على الطرز البروتينية حيث سبب الزئبق ظهور حزم بروتينية جديدة كما في النوع الأول عند التركيز الأول والثالث وقلة في كثافة حزم اخرى كما في النوع الثالث عند جميع التراكيز واختفاء حزم اخرى كما في النوع الثاني عند تراكيز الزئبق المختلفة.

2- اظهرت الانزيمات الفوسفاتيز القاعدي والأنزيمات الناقلة للأمين GPT و GOT استجابة غير منتظمة زيادة او نقصانا باختلاف التراكيز والانواع ، فمثلا زادت فعالية الفوسفاتيز القاعدي عند التركيز الثاني وقلت فعالية الانزيم GPT في النوع الأول عند التركيز الأول كما قلت فعالية الانزيم GOT في غلاصم جميع انواع المحار عند التركيز الثالث

البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الثاني

Effect of mercury on the total and electrophoretic profile of proteins and on the activity of some enzymes in gills of three species of freshwater clam : *Unio tigridis, Pseudontopsis euphraticus and Anodonta sp.*

A. A. Thaker and S. M. Mohamma
College of Science / University of Al-Anbar
College of Science / University of Al-Alsulaimania

Abstract

A three species of clam *Unio tigridis, Pseudontopsis euphraticus and Anodonta sp.* were collected from Al-Habaniya lake, Al-Anbar/Iraq .The animals were exposed to three concentrations of mercury: 0.1, 0.2 and 0.4 mg / l. First group of animals were exposed for three weeks, second group for two weeks and the third group for one week. At the end of the exposure period, the animals were dissected ,then the gills removed for the further study on proteins and enzymes. The results were :

1- Total protein concentration in the gills decreased at different concentrations. We observed prominent effect of mercury on the electrophoretic bands of proteins with the decrease in the intensity of protein bands or induction of new bands.
2- The activity of the three enzymes : Alkaline phosphatase , GPT and GOT were not stable, increased or decreased in different species at different concentrations of mercury, for example, the activity of alkaline phosphatase increased in second species at the second concentration , the activity of GPT decreased in first species at the first concentration and the activity of GOT decreased in the three species at third concentration of mercury.

المقدمة

المحار من النواعم واسعة الانتشار في البيئات المائية ، ويعد من الحيوانات ذات الأهمية التجارية من حيث إنتاج اللؤلؤ ومصدرا غذائيا مهما للأسماك و أحيانا للإنسان. والمحار شأنه شأن الكائنات الحية الأخرى يتأثر بتغيرات محيطه المائي ، ولأعضائه المختلفة القدرة على تجميع العناصر الثقيلة ومنها الزئبق (1 و 2) . الزئبق من العناصر ذات التأثير السمي الكبير على الكائنات الحية المختلفة (3 و4 و 5 و 6) ، ومما يزيد من خطورته هو الطرح المتزايد له إلى الطبيعة من خلال دخوله في تركيب العديد من الصناعات مثل حشوات الاسنان والمبيدات الحشرية واستخدام بعض مركباته في تعفير الحبوب وغير ذلك. ومن المفيد هنا التذكير بحادثة التسمم الكبيرة بالزئبق التي حدثت في العراق بسبب تناول البشر الحبوب المعفرة بالزئبق (6) وحدوث 1200 حالة تسمم بالزئبق وموت العشرات في جزيرة منماتا اليابانية بعد تناولهم حيوانات بحرية ملوثة بالزئبق في احد البحيرات التي اعتبرت مستقبلا نهائيا لرمي النفايات السائلة لاحد المصانع (7) .

للزئبق القابلية على الارتباط بالأغشية الخلوية ويرتبط بفاعلية بمجموعة الكبريت الهيدروجينية (Sulphydral group) الضرورية للنفاذية (8) . لقد وجد ان تعريض الكائنات الحية ومنها المحار الى الزئبق يؤدي الى العديد من التغيرات الكيميائية الحيوية مثل تخليق بروتينات جديدة ترتبط بالزئبق ومنها الميتالوثايونين (1 و 9) ، والتأثير على فعالية الإنزيمات المختلفة بزيادة الفعالية او التثبيط مثل الفوسفاتيز القاعدي والفوسفاتيز الحامضي والاستريز والتربسين والببسين والامينوبتايديز (10 و 11 و12) .

الهدف من هذه الدراسة متابعة بعض التغيرات الكيمياوية الحياتية في غلاصم المحار الذي تم جلبه من بحيرة الحبانية وتعريضه في المختبر الى الزئبق ، وامكانية استخدام هذه التغيرات كمؤشر مبكر على تلوث المياه بهذا العنصر .

المواد وطرائق العمل

تم جمع المحار بانواعه الثلاثة *Unio tigridis* و *Pseudontopsis euphraticus* و *Anodonta sp.* وباوزان تراوحت بين 42.8 – 45.6 غم للنوع الاول 74.48 – 75.9 غم للنوع الثاني و 78.19 – 79.79 غم للنوع الثالث على الترتيب من بحيرة الحبانية ، منطقة العنكور بالاعتماد على شباك الصيادين . نقلت الى المختبر وتم توزيعها في أحواض سعة كل حوض 5 لتر حاوية على ماء خالي من الكلور وبمعدل 10 أفراد في كل حوض ثم تركت في المختبر لمدة اسبوع مع تغيير الماء يوميا وازالة الأفراد الميتة خلال هذه الفترة وذلك لأغراض التأقلم والتخلص من الأفراد غير السليمة (13) ، بعدها تم تعريض المحار الى تراكيز مختلفة من الزئبق بهيئة $HgCl_2$ المذاب في الماء حيث استخدمت التراكيز 0.1 و 0.2 و 0.4 ملغم زئبق / لتر ولفترة ثلاثة اسابيع للتركيز الاول واسبوعان للتركيز الثاني واسبوع واحد للتركيز الثالث على التوالي ، ورافقت كل مجموعة من المجموعات الثلاث مجموعة سيطرة تحت نفس الظروف باستثناء وجود عنصر الزئبق .

تشريح الحيوانات وتحضير المستخلص:-

بعد انتهاء مدة التعريض قتلت الحيوانات بفصل المصراعين عن بعضهما ،واستؤصل العضو المطلوب ووزن باستخدام ميزان حساس نوع Sartorius ثم هرس باستخدام جهاز Homogenizer نوع Kinematica في محيط ثلجي بعد اضافة المحلول الدارئ Tris HCl pH 7.2 وبنسبة 5:1 وزن / حجم لدراسة المحتوى البروتيني وفعالية الانزيمات ، وبنسبة 2:1 وزن / حجم لدراسة الطرز البروتينية . فصل المستخلص باستخدام جهاز الطرد المركزي Centrifuge نوع Eppendorf بسرعة 1500 دورة / دقيقة ولمدة عشر دقائق ، حيث اخذ الرائق وحفظ في –20 درجة مئوية لحين الاستخدام .

استخدمت طريقة بايوريت (Biuret method) في تعيين كمية البروتين وتم الحصول على المواد من معهد المصول واللقاحات التابع لوزارة الصحة في بغداد. تركت الانابيب في حمام مائي Water bath نوع TECAM وبدرجة 37° م لمدة 10 دقائق وتمت قراءة الامتصاصية لجميع الانابيب على طول موجي 540 نانوميتر وباستخدام جهاز Spectrophotometer الطيف الضوئي من نوع MSE / spectro-plus . أما تحديد الطرز البروتينية فقد جرى باستخدام الترحيل الكهربائي على الهلام المتعدد الأكريلامايد العمودي Vertical polyacrylamide gel electrophoresis (12).

تم حساب فعالية انزيم الفوسفاتيز القاعدي بقياس الفينول المتحرر من المادة الأساس بفعل النشاط الأنزيمي ، أما نشاط الأنزيمين الناقلين للأمين GPT وGOT فقد تم حسابه بمتابعة البايروفيت المتحرر (14) .

استعمل T-test لعينتين مستقلتين في التحليل الإحصائي .$P<0.05$

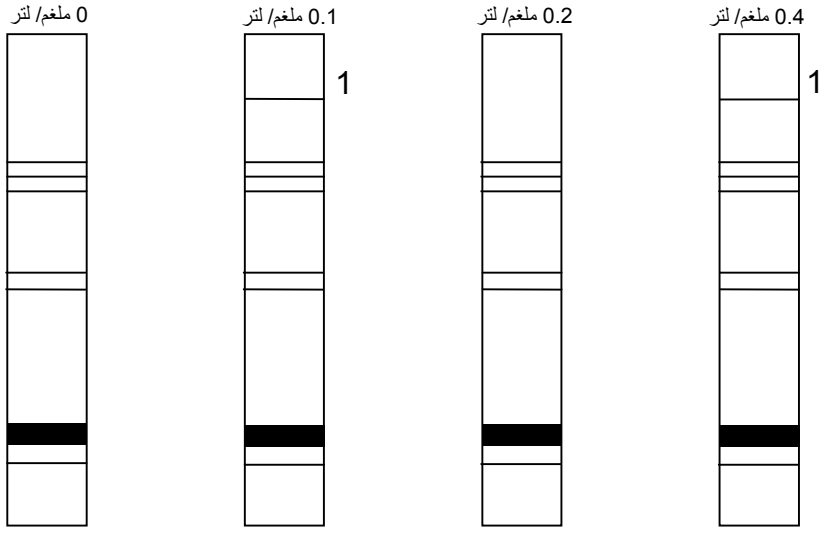
النتائج

يبين الجدول رقم (1) انخفاض المحتوى الكلي للبروتين في الغلاصم للأنواع الأول *Unio tigridis* والثاني *Pseudontopsis euphraticus* والثالث *Anodonta sp*. حيث انخفض تركيز البروتين الكلي عند التعريض لمختلف تراكيز الزئبق وللأنواع الثلاثة وكانت الانخفاض معنويا عدا النوع الأول المعرض لتركيز 0.1 ملغم زئبق/ لتر فقد كانت هناك زيادة في كمية البروتينات المصنعة .

جدول (1) تأثير الزئبق على تركيز البروتين الكلي الذائب (gm/100 ml) في الغلاصم للأنواع الثلاث من المحار

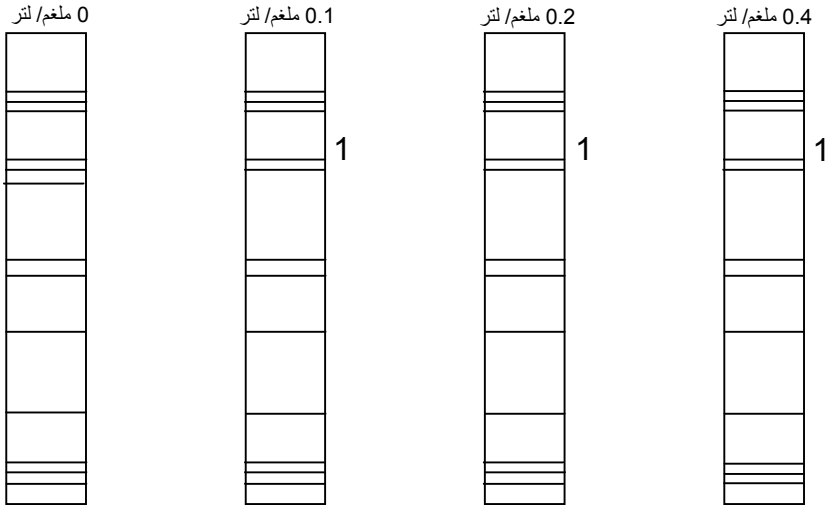
التركيز ملغم زئبق / لتر	*Unio tigridis*			*P. euphraticus*			*Anodonta sp.*		
	الخطأ القياسي		المتوسط	الخطأ القياسي		المتوسط	الخطأ القياسي		المتوسط
التجربة الضابطة	0.063	±	1.4	0.102	±	2.333	0.073	±	2.06
0.1	0.069	±	1.749	0.067	±	0.499	0.039	±	0.524
التجربة الضابطة	0.1	±	1.0	0.033	±	2.495	0.019	±	2.2
0.2	0.069	±	0.749	0.067	±	0.499	0.049	±	0.682
التجربة الضابطة	0.063	±	1.4	0.021	±	2.509	0.023	±	2.14
0.4	0.031	±	0.562	0.075	±	0.75	0.035	±	0.791

الشكل رقم (1) يبين تأثير الزئبق على البروتينات في غلاصم النوع الأول فتبين ظهور حزمة جديدة (رقم 1) عند تراكيز الزئبق 0.1 و 0.4 ملغم زئبق / لتر عند المقارنة بالنماذج المأخوذة من حيوانات التجربة الضابطة ولم يحدث تغير عند االتركيز 0.2 ملغم زئبق / لتر .



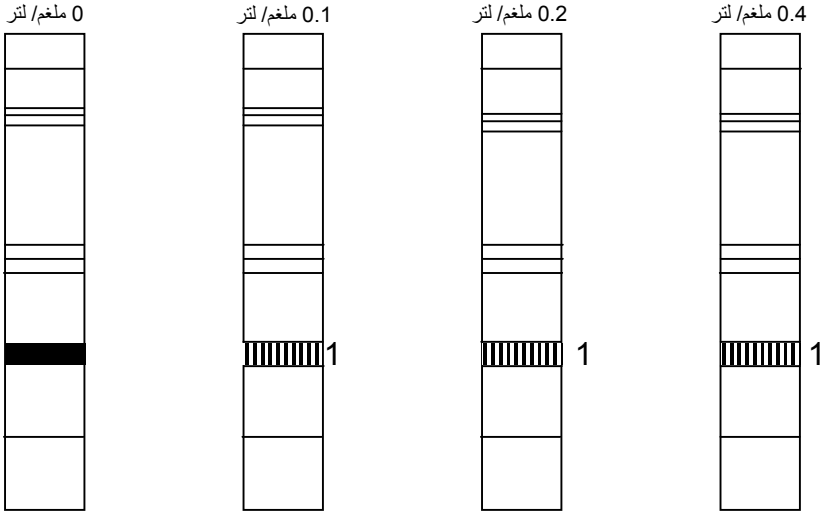
شكل (1) : تأثير الزئبق على البروتينات المرحلة كهربائيا في غلاصم المحار *Unio tigridis*
1- ظهور حزمة

الشكل رقم (2) يبين تأثير الزئبق على طرز البروتينات المرحلة كهربائيا ، فمن الواضح اختفاء حزمة بروتينية (حزمة رقم 1) عند التعريض لمختلف تراكيز الزئبق بالمقارنة مع النماذج المأخوذة من حيوانات التجربة الضابطة .



شكل (2) : تأثير الزئبق على البروتينات المرحلة كهربائيا في غلاصم*P. euphraticus*
1- اختفاء حزمة

اما الشكل رقم (3) يبين تأثير الزئبق على الطرز البروتينية للنماذج المعزولة من الغلاصم وقد سبب الزئبق قلة في كثافة احدى الحزم (حزمة رقم 1) عند كل مستويات الزئبق بالمقارنة مع النماذج المأخوذة من حيوانات التجربة الضابطة .



شكل (3) : تأثير الزئبق على البروتينات المرحلة كهربائيا في غلاصم المحار *Anodonta Sp.*
1- قلت كثافة حزمة

يوضح الجدول رقم 2 تأثير الزئبق على فعالية الفوسفاتيز القاعدي في غلاصم الانواع الثلاثة للمحار ،ففي النوع الأول *Unio tigridis* انخفضت الفعالية عند تعريض الحيوانات الى جميع تراكيز الزئبق المستخدمة في التجربة ، وفي النوع الثاني *Pseudontopsis euphraticus* زادت الفعالية عند التعرض الى التركيزين الأول

والثالث بينما انخفضت الفعالية عند التركيز الثاني ، اما في النوع الثالث *Anodonta sp.* فقد كانت هناك زيادة في الفعالية عند التركيزين الأول والثاني و انخفضت عند التركيز الثالث.

جدول (2) تأثير الزئبق على فعالية انزيم الفوسفاتيز القاعدي (KAU) في الغلاصم للأنواع الثلاث من المحار

التركيز ملغم زئبق / لتر	*Unio tigridis*			*P. euphraticus*			*Anodonta sp.*		
	الخطأ القياسي		المتوسط	الخطأ القياسي		المتوسط	الخطأ القياسي		المتوسط
التجربة الضابطة	0.015	±	4.24	0.049	±	1.3	0.052	±	1.6
0.1	0.025	±	2.452	0.148	±	4.468	0.095	±	1.78
التجربة الضابطة	0.074	±	5.369	0.012	±	1.7	0.052	±	1.6
0.2	0.039	±	4.364	0.135	±	0.7	0.022	±	2.784
التجربة الضابطة	0.015	±	4.24	0.013	±	1.4	0.044	±	1.708
0.4	0.139	±	3.616	0.056	±	3.5	0.092	±	1.137

أما الجدول رقم (3) فيبين فعالية الانزيم الناقل للأمين GPT في غلاصم المحار . ففي النوع الأول *Unio tigridis* انخفضت فعالية هذا الانزيم عند تعريض الحيوانات الى التركيز الأول او الثاني ، و في النوع الثاني *Pseudontopsis euphraticus* فقد ازدادت الفعالية عند التركيز الأول ولكنها انخفضت عند التركيزين الثاني والثالث ، اما النوع الثالث *Anodonta sp.* فقد اظهر زيادة في الفعالية عند التركيزين الأول والثاني بينما انخفضت في التركيز الثالث .

جدول (3) تأثير الزئبق على فعالية الإنزيم جلوتاميك بايروفيك ترانس امينز GPT (IU/L) في الغلاصم للأنواع الثلاث من المحار

التركيز ملغم زئبق / لتر	*Unio tigridis*			*P. euphraticus*			*Anodonta sp.*		
	الخطأ القياسي		المتوسط	الخطأ القياسي		المتوسط	الخطأ القياسي		المتوسط
التجربة الضابطة	0.353	±	84	0.316	±	23	0.547	±	177
0.1	0.353	±	44	0.353	±	37	0.223	±	222.5
التجربة الضابطة	0.223	±	86	0.447	±	23	0.790	±	175
0.2	0.268	±	94.4	0.158	±	12.5	0.487	±	231.25
التجربة الضابطة	0.353	±	84	0.612	±	21	0.418	±	178
0.4	0.651	±	66	0.158	±	12.5	0.395	±	151.25

الإنزيم الناقل للأمين GOT ايضا اظهر اختلافات في الفعالية باختلاف الأنواع وتراكيز الزئبق (جدول رقم 4) ، ففي النوع الأول زادت الفعالية عند التركيزين الأول والثاني بينما انخفضت عند التركيز الثالث ، وفي النوع الثاني انخفضت الفعالية عند التراكيز الثلاثة للزئبق بينما في النوع الثالث فقد انخفضت الفعالية عند التركيزين الاول والثالث ، وزادت عند التركيز الثاني .

جدول (4) تأثير الزئبق على فعالية الإنزيم جلوتاميك اوكزالوستيك ترانس امينز GOT (IU/L) في الغلاصم للأنواع الثلاث من المحار

التركيز ملغم زئبق / لتر	*Unio tigridis*		*P. euphraticus*		*Anodonta sp.*	
	الخطأ القياسي	المتوسط	الخطأ القياسي	المتوسط	الخطأ القياسي	المتوسط

التجربة الضابطة	0.228	±	27	0.353	±	70.5	0.389	±	117.26
0.1	0.192	±	75	0.170	±	55	0.547	±	100
التجربة الضابطة	0.262	±	27	0.17	±	71	0.296	±	115.6
0.2	0.447	±	52	0.387	±	41.5	0.170	±	166
التجربة الضابطة	0.228	±	27	0.344	±	73	0.273	±	114
0.4	0.327	±	20	0.353	±	20	0.254	±	71

المناقشة

الحيوانات التي تتناول الماء الملوث او تعيش فيه لها القابلية على تجميع العناصر الملوثة ومنها الزئبق ، وكميات الزئبق المتراكمة في اجسام هذه الكائنات الحية تعتمد على عدة عوامل منها تركيز الزئبق ومدة التعريض (1 و 9) . بالرغم من عدم امكانيتنا على تقدير كمية الزئبق في غلاصم المحار الا انه من المتوقع ان تكون هناك تراكمات في غلاصم المحار مما أدى الى حدوث تغيرات في كمية البروتينات وفعالية الانزيمات ، حيث لوحظ في هذه الدراسة ان هناك انخفاضا في كمية البروتينات في غلاصم الانواع الثلاثة من المحار عند جميع التراكيز بالمقارنة مع حيوانات التجربة الضابطة . اما السبب المحتمل لمثل هذا الانخفاض في كمية البروتينات قد يعود الى تأثيرات الزئبق التثبيطية في صناعة البروتين قبل ظهور أي علامة تخريبية وتحطيم لوظيفة البروتين المصنع وخاصة انه من الممكن ان يكون كل بروتين هدفا لتأثير الزئبق (18) .

التغير الكمي والنوعي للبروتينات في هذه الدراسة لوحظ ايضا من خلال الترحيل الكهربائي للبروتينات على هلام متعدد الاكريلامايد (Polyacryalamide Gel Electrophoresis) للحيوانات المعرضة للزئبق. وقد اظهرت النتائج قلة في كثافة احد الحزم البروتينية في النوع الثالث *Anodonta sp.* وظهور حزمة جديدة في النوع الاول *Unio tigridis* واختفاء حزمة واحدة في غلاصم النوع الثاني *P. euphraticus* . ان مثل هذه التغيرات الكمية والنوعية لوحظت في دراسات مشابهة حول تأثير الزئبق والكادميوم في الروبيان *Callianassa tyrrhena* المعرض الى الزئبق والكادميوم (12 و 19) وفي المحار *Unio tigridis* المعرض الى الكادميوم (نتائج لم تنشر) ، حيث ظهرت حزم بروتينية جديدة عند بعض التراكيز وقلت كثافة بعض الحزم في حين ادت هذه العناصر الى اختفاء بعض الحزم الاخرى . لقد افترض بأن سبب هذه الاختلافات في بعض البروتينات تحت تأثير المعادن الثقيلة ناتج عن تنشيط او تثبيط الجينات المسؤولة عن صناعة هذه البروتينات (20) .

تعد فعالية الانزيمات المختلفة واحدة من الطرق الحساسة للتغيرات غير الطبيعية التي تحدث في الوظائف الخلوية للعديد من حالات الجسم كما هي في الحالات المرضية . لقد بينت العديد من الدراسات بأن ايونات الزنك مهمة لفعالية الفوسفاتيز القاعدي (21 و 22) ، وان زوجا واحدا من هذه الايونات على الاقل ضروري للفعالية ، لذلك فأن غياب او استبدال ايونات الزنك بواسطة الزئبق او الكادميوم قد تسبب تغيرات في فعالية الانزيم (23) .

لوحظ في هذه الدراسة ان هناك تأثيرا للتراكيز المختلفة للزئبق على فعالية الفوسفاتيز القاعدي في الغلاصم في الانواع الثلاثة من المحار ، فقد سبب الزئبق زيادة في فعالية الانزيم في غلاصم النوع الثاني *P. euphraticus* عند التركيزين الاول والثالث ، وكذلك في النوع الثالث *Anodonta sp.* عند التركيزين الاول والثاني . ان سبب ارتفاع فعالية الانزيم ربما هو صناعة انزيمات جديدة واعادة اصلاح الانسجة المحطمة (24) . ومثل هذه الزيادة في فعالية الانزيم لوحظت في غلاصم الاسماك *Fundulus heteroclitus* (25) وفي كلى ومبايض الاسماك *Channa punctatus* (24) وفي غلاصم ورئة الجرذان (26) المعرضة الى الزئبق . في حين انخفضت فعالية الفوسفاتيز القاعدي وبشكل معنوي في غلاصم النوع الاول *Unio tigridisi* عند جميع

تراكيز الزئبق . أن الفوسفاتيز القاعدي يشترك في عمليات transphosphorelation وعندما تنخفض فعالية الانزيم في الغلاصم يعني ان هذه العملية ايضا ستثبط (24 و 27) ، ان الانخفاض في فعالية هذا الانزيم قد يكون سببه احلال الزئبق محل الايونات المهمة كما هي الحال في الاسماك *Channa punctatus* (24) . كما لوحظ انخفاضا في فعالية الفوسفاتيز القاعدي بشكل واضح في القوقع *Melanopsis nodusa* (نتائج لم تنشر) وفي مصل الاسماك *Aphanius dispar* (15) المعرضة للزئبق . مما سبق يتبين ان استجابة الانزيم في المحار كانت بوجهين تأثرا بالزئبق وقد لوحظت مثل هذه الاستجابة ذات الوجهين في الاسماك *Aphanius dispar* (15) وفي الروبيان *Callianassa tyrrhena* (12) عند تعرضها الى الزئبق وكذلك في الاسماك *Mugil cephalus* (10) والمحار الشعاعي *Misuhopecten yessoensis* (28) والروبيان *Callianassa tyrrhena* (19) عند تعرضها الى الكادميوم .

ارتفعت فعالية الأنزيم الناقل للأمين GPT في غلاصم النوع الاول عند التركيز الاعلى للزئبق . وكذلك بالنسبة للإنزيم GOT عند بعض تراكيز الزئبق، وهذه الزيادة قد تكون نتيجة للاستجابة الوظيفية للزئبق حيث يتم صناعة أنزيمات جديدة واعادة تصليح الأنسجة المحطمة . من جانب اخر اظهر انزيم الـ GOT انخفاضا في الفعالية في غلاصم النوع الثالث عند جميع تراكيز الزئبق . ان هذا الانخفاض في فعالية الانزيمين قد يكون بسبب الارتباط المباشر للزئبق مع الانزيمات (8) حيث يتدخل الزئبق مع مجموعة الـ sulphydral للانزيمات مع المادة الاساس وربما يكون بسبب التأثيرات السامة في الانسجة (11) والتي تؤدي الى انخفاض صناعة الانزيمات .

ان النتائج تبين ان فعالية الانزيمين GPT و GOT في الغلاصم قد تأثرت بعنصر الزئبق وقد تفاوت هذا التأثير بين انواع المحار الثلاثة بفعل التراكيز المختلفة وان استجابة الانزيمين لم تكن منتظمة ولم تتناسب مع ازدياد وانخفاض الزئبق في الماء ، وهذه النتيجة اختلفت مع ما لوحظ في مصل الاسماك *Aphanius dispar* حيث ازدادت الفعالية بزيادة تركيز الزئبق في الماء (15) وفي الاسماك *Mugil cephalus* حيث ازدادت الفعالية في كل من المصل ومستخلص القلب والغلاصم (10) . لقد اثبتت الدراسات المختلفة بأن كميات المعادن الثقيلة المتراكمة تتباين بأختلاف اعضاء جسم الحيوان (28) وبنفس الاتجاه قد يكون التأثير متباينا على الفعاليات الايضية المختلفة ومنها فعالية الانزيمات سواء كانت هذه الاستجابة تخليق او تثبيط المحتوى الكلي للانزيم او التأثير على طرز معينة دون اخرى في الانزيم الواحد (19) .

نستنتج من هذه الدراسة ان هناك استجابة لوجود عنصر الزئبق في محيط هذه الحيوانات من قبل بعض الجوانب الكيمياوية الحياتية مثل التغيرات في كمية وطرز البروتينات وفعالية الانزيمات في غلاصم انواع المحار موضوع الدراسة ، وعليه يمكن القول ان بالامكان استخدام هذه التغيرات كمؤشر مبكر على تلوث المياه بالزئبق .

المصادر

1. Roesijadi, G. (1982). Uptake and incorporation of mercury into mercury – binding proteins of gills of *Mytillus edulis* as a function of time. Mar. Biol. 66, 151 – 157.
2. Frazier, B. E., Wiener, R. G. Rada, and Engstrom, D. R. (2000). Stratigraphy and historic accumulation of mercury in recent depositional sediments in the Sudbury River, Massachusetts, USA. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 57: 1062-1072.
3. Valenti, TW, Cherry DS, Neves, R. J. and Schmerfeld, J. (2005). Acute and chronic toxicity of mercury to early life stages of the rainbow mussel, *Villosa iris* (Bivalvia: Unionidae). Environ. Toxicol. Chem. 24 (5): 1242-1246.

4. Smikiss, K. and Mason, A. Z. (1983). Metal ions: metabolic and toxic effects. In the " Mollusca", Volume 2. Environmental biochemistry and physiology. (Editor-in chief, Karl M. Wilbur, edited by peter. W. Hochachka). Academic press, INC.
5. Addya, S., Chakravarti, K., Basu, A., Santra, M., Halbor, S.and Chatterjee, C. C. (1984). Effect of mercuric chloride on several scavenging enzymes in rat kidney and influence of vitamin E supplementation. Acta vitaminal enzymel. 6, 103-170.
6. Bakir, F. (1973). Methylmercury in Iraq. Science. 181, 230-241.
7. Francis, A. Guther (1984). Reviews of environmental contamination and toxicology residue reviews. Volume 91, Springer-Verlag. Berlin.
8. Passow, H., Rothstein, A., Clarkson, T. W. (1961). The general pharmacology of the heavy metals. Pharmacol. Rev. 13, 185-224.
9. Roesijadi, G. and Hall, R. E. (1981). Charaterization of mercury–binding proteins from the gill of marine mussels exposed to mercury. Comp. Biochem. Physiol. 70c, 59–64.
10. Hilmy, A. M., Shabana, M. B., and Daabees A. Y. (1985). Effects of cadmium toxicity upon *invivo* and *invitro* activity of proteins and five enzymes in blood serum and tissue homogenates of *Mugil cephalus*. Comp. Biochem. Physiol. 81c, 145–153.
11. Sastry, K. V. and Gupta, P. K. (1979). The invivo effect of the mercuric chloride on some digestive enzymes of a freshwater teleost fish *Chana puntatus.* Bull. Environ. Contam. Toxicol. 22, 21-29.
12. Thaker , A. A. and Haritos, A. A. (1991). Mercury bioaccumulation and effects on soluble peptides, proteins and enzymes in hepatopancreas of the shrimp *Callianassa tyrrhena*. MAP Technical Reports Series, 48, 89-104.
13. FAO (1977). Manual of methods in aquatic environment research, part 4. Bases for selecting biological tests to evaluate marine pollution. FAO. Fish. Tech. Pap. (no, 164) 31pp.
14. Wooton, I. D. P. (1964). Microanalysis in medical biochemistry. J. Churchill 1td. 104 Glauster place, London.
15. Hilmy, A. M., Shabana, M. S. and Said, M. M. (1981). The role of the serum transferase (SGOT & SGPT) and alkaline phosphatase in relation to inorganic phosphorus with respect to mercury poisoning in *Aphanius dispar*. Rupp. (teleostei) of red sea. Comp. Biochem. Physiol. 68C, 69-74.
16. Cheria, M. G., and Goyer, R. A. (1978). Metallothionein and their role in the metabolism and toxicity to metals. Life Sci. 23, 1-10.
17. Bouquegneau, J. M., Ballan-Dufrancais, C. and Jeantet, A. Y. (1985). Storage Hg in the ileum of *Blatella germanica.* Biochemical characterization of metallothionein. Comp. Biochem. Physiol. 80C, 95-98.
18. WHO (1973). World Health Organization Report. 26 (12), 720-783.
19. Thaker, A. A. and Haritos, A. A. (1991). Cadmium bioaccumulation and effects on soluble peptides, proteins and enzymes in hepatopancreas of the shrimp *Callianassa tyrrhena* . MAP Technical Reports Series, 48, 79-88.
20. Endersen, L., Thorsrud, A. K. Jellume, E., Willard-Gallo, K. E. and Rugstad, H. E. (1984). Protein mapping of two metallothionein rich cell strains and their parent lines using high resolution two dimentional electrophoresis. Anal., Biochem. 143, 170-178.
21. Borson, W. F., erson, R. A., Folk, M. C., Kennedy, F. S. and Valle, B. L., (1977). Effect of magnesium on the properties of zinc alkaline phosphatase. Biochem. 16, 610-614.

22. Coleman, J. E., Nakamura, K. I. and Chlebowski, J. F. (1983). Zinc,Cd, and Mg binding to alkaline phosphatase of *Escherichia coli* structure–functional effects. J. Biol. Chem., 258, 386-395.
23. Applebury, M. L., Johnson, B. P. and Coleman, J. E. (1970). Phosphate binding to alkaline phosphatase. Metal ion dependence. J. Biol. Chem.. 245, 4968-4976.
24. Sastry, K. V. and Agrawal, M. K. (1979). Mercury chlride induced enzymological changes in kidney and ovary of teleost fish *Channa punctatus*. Bull. Environ. Contam. Toxical. 22, 38–43.
25. Jackim, E., Hamline, J. M. and Sinis, S. (1970). Effect of heavy metals poisoning on five liver enzymes in kill fish *Fundulus heteroclitus*. J. Fish Res. Can. 27, 383–390.
26. Nowk, B. (1969). Hg, Cd-binding alkaline phosphatase of rats functional effect. Med. Pracy. 20, 333.
27. Hinton, D. E., Kendall, M. W. and Silver, S. S. (1973). Biological methods for assessment of water quality. American Society for Testing and Materials. 528, 194.
28. Evtushanko, Z. A., Blecheva, N. N. and Iukyanova, O. N. (1986). Cadmium accumulaionin i- organs of the scallop *Mizuhopecten yessoensis* activities of phosphatases and composition and amount of lipids. Comp. Biochem. Physiol. 83C, 371-376.