

علوم و تکنولوژی محیط زیست، دوره بیست و سوم، شماره دو، اردیبهشت ماه ۱۴۰۰

بررسی اثرات ژنوتوکسیک آرسنیک بر ماهی کلمه (*Rutilus caspicus*) با استفاده از آزمون های میکرونوکلئوس و کامت

مهسا دانشیان^۱

حدیثه کشیری^{*۲}

hadiskashiri@gmail.com

سید علی اکبر هدایتی^۳

کاوه خسرویانی^۴

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۵

تاریخ پذیرش: ۹۷/۲/۱۹

چکیده

زمینه و هدف: آرسنیک به عنوان یک آلاینده می تواند منجر به بروز مشکلات جدی در آبزیان و انسان گردد. در پژوهش حاضر با توجه به ارزش اقتصادی و بوم شناختی ماهی کلمه دریای خزر (*Rutilus caspicus*)، به ارزیابی اثرات ژنوتوکسیک آرسنیک بر این گونه با استفاده از آزمون های کامت و میکرونوکلئوس در سال ۱۳۹۵ پرداخته شده است.

روش بررسی: ابتدا ماهیان در معرض غلظت های ۳، ۶ و ۹ میلی گرم در لیتر آرسنیک قرار گرفتند. یک تیمار شاهد نیز که فاقد آرسنیک بود، در نظر گرفته شد. نمونه برداری طی روزهای ۳ و ۷ مواجهه انجام گرفت. به منظور انجام تست میکرونوکلئوس، خون گیری طی دو نوبت انجام و فراوانی میکرونوکلئوس ها تعیین شد. برای انجام آزمون کامت از بافت آبشش ماهیان نمونه برداری و پارامترهای آسیب DNA ارزیابی شد.

یافته ها: مواجهه با آرسنیک باعث القای بروز میکرونوکلئوس ها در اریتروسیت ها و آسیب به DNA در بافت آبشش گردید. به نحوی که فراوانی میکرونوکلئوس ها و مقادیر پارامترهای آسیب در تیمارهای مواجهه یافته با آرسنیک در مقایسه با شاهد به طور معنی داری افزایش یافت ($P \leq 0.05$). میزان آسیب وارد شده وابسته به زمان و غلظت مواجهه بود. بالاترین میزان پارامترهای آسیب شامل Tail Length، Tail Moment، Tail DNA % و همچنین فراوانی میکرونوکلئوس ها به ترتیب 1.01 ± 1.55 ، 57.11 ± 1.64 ، 59.45 ± 3.09 و 2.26 ± 0.58 بود که در تیمار مواجهه یافته با ۹ میلی گرم در لیتر آرسنیک مشاهده شد.

۱- کارشناس ارشد بوم شناسی آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران.

۲- استادیار، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران. * (مسوول مکاتبات)

۳- دانشیار، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران.

۴- کارشناس ارشد شیلات، دانشکده منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران، ایران.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج پژوهش حاضر حاکی از آن است که غلظت‌های تحت‌کشنده آرسنیک می‌تواند باعث بروز میکرونوکلئوس‌ها و القای آسیب DNA در ماهی کلمه شود. لذا، می‌توان بیان داشت که آرسنیک دارای اثرات ژنوتوکسیک بر ماهی کلمه است.

واژه‌های کلیدی: آرسنیک، ژنوتوکسیک، کامت، میکرونوکلئوس، *Rutilus caspicus*.

An Investigation on Genotoxic Effects of Arsenic on Caspian Roach (*Rutilus Caspicus*) Using Micronucleus and Comet Assays

Mahsa Daneshian¹

Hadiseh Kashiri^{2*}

hadiskashiri@gmail.com

Seyed Ali Akbar Hedayati³

Kaveh Khosraviani⁴

Admission Date: May 9, 2018

Date Received: December 26, 2017

Abstract

Background and Objective: Arsenic, as a pollutant, can lead to serious problems in aquatic organisms and human. In the present study, considering the economic and ecological value of Caspian roach, *Rutilus caspicus*, genotoxic effects of arsenic on this species were assessed using the comet and micronucleus assays in 2016.

Method: At first, the fish were exposed to the concentrations of 3, 6 and 9 mg L⁻¹ arsenic. A control treatment without arsenic was also considered. Sampling was done during the 3 and 7th exposure days. To perform micronucleus test, blood sampling was done at two times and micronuclei frequency was determined. To perform comet assay, sampling was done from the fish gill tissue and the DNA damage parameters were assessed.

Findings: Exposure to the arsenic led to the induction of micronuclei formation in the erythrocytes and DNA damage in the gill tissue. So that micronuclei frequency and values of damage parameters in the treatments exposed to arsenic significantly increased compared to the control ($P \leq 0.05$). The induced damage level was dependent on the exposure time and concentration. The highest levels of damage parameters including Tail Length, Tail Moment, %Tail DNA and also micronuclei frequency were 101.1 ± 1.55 , 57.11 ± 1.64 , 59.45 ± 3.09 and 2.26 ± 0.58 , respectively which observed in the treatment exposed to 9 mg L⁻¹ arsenic.

Discussion and Conclusion: The results from the present study indicated sub-lethal concentrations of arsenic can cause micronuclei formation and induction of DNA damage in Caspian roach. Therefore, it could be stated that arsenic has genotoxic effects on Caspian roach.

Keywords: Arsenic, Genotoxic, Comet, Micronucleus, *Rutilus Caspicus*.

1- M.S.c of Aquatic Ecology, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

2- Assistant Professor, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.* (Corresponding Author)

3- Associate Professor, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

4- M.S.c of Fisheries. Natural Resources Faculty of Karaj, Tehran University, Tehran, Iran.

مقدمه

آرسنیک در نواحی جنوبی دریای خزر، نشأت گرفته از فرسایش سنگ‌های حوضه آبریز می‌باشد. علاوه بر عوامل طبیعی، عوامل انسانی نیز نقش مهمی در افزایش ورود آرسنیک به دریای خزر دارند (۱۲). بررسی‌ها نشان داده که آرسنیک می‌تواند بر سیستم عصبی، خون و کلیه موجودات اثرگذار باشد (۱۳). مشخص شده که مواجهه مداوم با غلظت‌های پایین آرسنیک منجر به تجمع زیستی به‌ویژه در کبد و کلیه موجودات آبی همچون ماهی می‌گردد. بنابراین آرسنیک می‌تواند روی فعالیت آنزیم‌ها و عملکرد صحیح سیستم ایمنی اثرگذار باشد و منجر به القای سمیت‌های مزمن و حاد شود (۱۱). در این راستا گزارش‌هایی دال بر تاثیرپذیری پارامترهای خون‌شناسی *Channa punctatus* تحت مواجهه با آرسنیک (۱۴)، القای پاسخ‌های بیوشیمیایی و خون‌شناسی در *Clarias batrachus* (۱۵)، افزایش استرس اکسیداتیو (۱۶)، آسیب کبد و تغییرات متابولیک در *Danio rerio* (۱۷) منتشر شده است.

روش‌های مختلفی به منظور بررسی اثرات ژنوتوکسیک فلزات در آبزیان وجود دارد که در این میان، آزمون‌های میکرونوکلوئوس و کامت به‌عنوان روش‌هایی با حساسیت و دقت بالا مطرح می‌باشند. میکرونوکلوئوس‌ها قطعات کروموزومی هستند که طی مرحله آنافاز تقسیم سلولی به سلول‌های دختر منتقل نشده و در سیتوپلاسم مادر باقی می‌مانند (۱۸). ارزیابی این میکرونوکلوئوس‌ها یکی از دقیق‌ترین روش‌ها برای تعیین اثرات ژنوتوکسیک ترکیباتی با میزان تجمع پایین و همچنین به عنوان شاخصی برای آسیب‌های ژنتیکی وارد شده به سلول‌ها می‌باشد (۱۹). علت استفاده از این آزمون، سادگی روش کار، حساسیت کافی، سرعت بالا در آشکارسازی تغییرات ژنومی و اختلالات دوک‌های میتوزی در اثر سموم مختلف می‌باشد (۲۰). آزمون کامت نیز به‌عنوان روشی با حساسیت و سرعت بالا برای شناسایی آسیب‌های وارد شده به DNA سلول مطرح است. در این روش، شناسایی آسیب وارد شده به DNA مبتنی بر مهاجرت قطعات آسیب دیده از هسته سلول می‌باشد (۲۱). تاکنون گزارش‌هایی در خصوص اثرات ژنوتوکسیک

دریای خزر به‌عنوان یک بوم‌سازگان آبی مهم در ایران مطرح است که از نظر حیات وحش، زیستگاه تعدادی از گونه‌های بومی مهم می‌باشد. در این راستا، ماهی کلمه (*Rutilus caspicus*) از خانواده کپور ماهیان (*Cyprinidae*) به‌عنوان یکی از گونه‌های بومی دریای خزر با ارزش تجاری بالا مطرح می‌باشد. متأسفانه طی سال‌های اخیر بنا به دلایل مختلف همچون آلودگی آب‌ها و صید بی‌رویه، میزان ذخایر آن به شدت کاهش یافته به طوری که این ماهی جزو گونه‌های در معرض تهدید در منطقه محسوب می‌شود (۱). نزدیک بودن شهرها، صنایع مختلف، زمین‌های کشاورزی و همچنین جریان رودخانه‌های منتهی به دریای خزر که حاوی پساب‌ها، مواد معلق و رسوبات هستند، باعث تخلیه بسیاری از آلاینده‌ها مانند سموم و کودهای شیمیایی، پساب‌های شهری و صنعتی و همچنین تجمع فلزات سنگین در این محیط آبی شده است (۲). فلزات سنگین را می‌توان به‌عنوان یکی از مهم‌ترین آلاینده‌های خطرناک در اکوسیستم‌های مختلف در نظر گرفت که می‌تواند منجر به بروز مشکلات جدی در آبزیان و انسان گردد (۳). این آلاینده‌ها ممکن است ساختار و سیستم‌های فیزیولوژیکی موجودات را تحت تاثیر قرار داده و با تجمع در بدن جاندار به‌طور مستقیم و یا از طریق شبکه‌های غذایی و انتقال به سطوح تغذیه‌ای بعدی به‌صورت غیر مستقیم تاثیر گذار باشند. تاکنون بررسی‌های مختلفی برای تعیین غلظت فلزات مختلف در دریای خزر انجام یافته است (۴-۷). در این راستا، Bagheri و همکارانش، میزان آرسنیک در خلیج گرگان در اعماق مختلف را $5-7/7 \text{ mg L}^{-1}$ گزارش نمودند (۴). آرسنیک به‌عنوان یک آلاینده گسترده در نواحی مختلف دنیا مطرح است (۸). این عنصر، شیمی پیچیده‌ای در محیط زیست آبی داشته و ترکیبات متفاوت بسیاری از هر دو گونه آلی و غیر آلی آن شناخته شده است (۹). میلیون‌ها نفر در سراسر جهان به‌ویژه در کشورهای آسیایی به دلیل آلودگی آب‌های سطحی و زیرزمینی در معرض مقادیر سمی آرسنیک ($< 50 \mu\text{g L}^{-1}$) قرار دارند (۱۰). ورود آرسنیک به اکوسیستم‌های آبی ناشی از عوامل طبیعی و انسانی می‌باشد (۱۱). بررسی‌ها نشان داده که بخشی از فلزاتی همچون

نمونه برای هر تکرار). بدین منظور، تعداد ۲۱ آکواریوم با ابعاد ۴۰×۳۰×۶۰ سانتی متر مکعب با ۱۰ لیتر آب، آبگیری شدند. ماهیان به مدت ۹۶ ساعت در معرض غلظت‌های $0, 5, 10, 25, 35, 45$ آرسنیک قرار گرفتند. مرگ و میر ماهیان طی زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت ثبت و بر اساس آن درصد تغییرات مرگ و میر ماهی نسبت به شاهد محاسبه شد. داده‌های آزمایش با استفاده از روش پروبیت در نرم‌افزار SPSS 19 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در این خصوص، آزمون رگرسیون SPSS و آنالیز رگرسیونی پروبیت انجام شد. مقادیر $LC_1, LC_{10}, LC_{30}, LC_{50}, LC_{70}$ انجام شد. LC_{90} و LC_{99} به صورت میانگین به همراه دامنه بالا و پایین از طریق رگرسیون اعداد ۱۰، ۳۰، ۵۰، ۷۰، ۹۰ و ۹۹ تعیین شد (۲۹).

۳.۱. طراحی آزمایش

در پژوهش حاضر، از آرسنیک تری‌اکسید (As_2O_3 , Sigma-) به عنوان پرکاربردترین ترکیب تجاری آرسنیک (۲۵) استفاده شد. با توجه به نتایج به‌دست آمده از آزمایش‌های اولیه و آزمایش LC_{50} ، در قالب یک طرح تصادفی ۳ تیمار آزمایشی شامل غلظت‌های تحت‌کشنده (تیمار ۱، ۲ و ۳ به-ترتیب حاوی ۳، ۶ و ۹ میلی‌گرم در لیتر آرسنیک) و ۱ گروه به عنوان شاهد (بدون آرسنیک) در نظر گرفته شد. برای هر تیمار و همچنین گروه شاهد، سه تکرار در نظر گرفته شد (۷ نمونه برای هر تکرار). نمونه‌برداری طی روزهای ۳ و ۷ مواجهه پس از بی‌هوشی ماهیان با استفاده از پودر گل میخک ($200 mgL^{-1}$) انجام پذیرفت. ۲۴ ساعت قبل از شروع آزمایش از غذادهی به ماهیان خودداری شد تا از آلودگی محیط آزمایش جلوگیری شود (۲۹، ۳۰).

۴.۱. تست میکرونوکلوئوس

به‌منظور انجام تست میکرونوکلوئوس، خون‌گیری از محل ساقه دمی انجام شد و گسترش خونی روی اسلایدهای شیشه‌ای تمیز تهیه گردید. سپس اسلایدها در معرض هوا خشک و با استفاده از اتانول خالص تثبیت شدند. پس از رنگ‌آمیزی، نمونه‌ها با استفاده از میکروسکوپ اینورت مشاهده شدند. برای

آرسنیک بر برخی گونه‌ها منتشر شده که از آن جمله می‌توان به مطالعات صورت گرفته روی گونه‌های *Danio rerio* (۲۲)، *Channa* (۲۳)، *Oreochromis mossambicus* و *Carassius auratus punctatus* (۲۴)، *Cirrhina* (۲۵) و *O. niloticus* (۲۶)، *mrigala* (۲۷، ۲۸) اشاره نمود. در تحقیق حاضر، با توجه به اهمیت بوم‌شناختی و ارزش اقتصادی ماهی کلمه و خلاء تحقیقاتی در خصوص اثرات ژنوتوکسیک فلزات سنگین بر این گونه ارزشمند و همچنین با در نظر گرفتن ورود روزافزون آلودگی‌های مختلف از جمله فلزات سنگین از کشورهای حاشیه دریای خزر، به ارزیابی اثرات ژنوتوکسیک آرسنیک بر ماهی کلمه دریای خزر با استفاده از آزمون کامت و تست میکرونوکلوئوس پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

۱.۱. تهیه بچه ماهیان کلمه

تعداد ۲۴۰ قطعه بچه ماهی کلمه با وزن متوسط 1 ± 7 گرم از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان استخوانی سیجوال تهیه شد که از این تعداد، ۲۳۱ قطعه به منظور تعیین LC_{50} و ارزیابی سمیت ژنتیکی آرسنیک مورد استفاده قرار گرفت. ماهیان به منظور سازگاری با شرایط جدید در ۶ عدد تانک فایبرگلاس ۴۰۰ لیتری به مدت ۷ روز نگهداری شدند. در هر تانک ۳۰ عدد ماهی قرار داده شد. در طول دوره سازگاری، ماهیان به‌طور مداوم تحت شرایط هوادهی قرار داشتند و دوبار در روز غذادهی (غذای بیومار) شدند. تعویض آب هر ۲۴ ساعت انجام گرفت. شاخص‌های فیزیولوژیکی آب نیز طی مدت نگهداری بدین شرح بود: دما: 1 ± 23 درجه سانتی‌گراد، pH: 7.38 ± 0.29 ، اکسیژن محلول: 4.34 ± 0.78 میلی‌گرم در لیتر و سختی آب: 9 ± 253 میلی‌گرم در لیتر.

۲.۱. تعیین LC_{50}

به‌منظور تعیین غلظت‌های کشنده و تحت‌کشنده آرسنیک آزمایش LC_{50} انجام شد. آزمایش در قالب ۶ تیمار همراه با یک گروه شاهد انجام پذیرفت (۳ تکرار برای هر تیمار و ۷

هر ماهی یک لام گسترش خونی تهیه و فراوانی میکرونوکلئوس‌ها در ۱۰۰۰ سلول اریتروسیت برای هر ماهی ثبت شد (۳۱). معیارهای شناسایی میکرونوکلئوس‌ها، عدم ارتباط با هسته اصلی، رنگ و شفافیت و اندازه کوچک‌تر از یک سوم هسته اصلی (۳۲) بود. در نهایت، فراوانی میکرونوکلئوس‌ها برای هر اسلاید در هر ۱۰۰۰ سلول بیان گردید.

۵.۱. آزمون کامت

برای اندازه‌گیری آسیب DNA از روش سنجش کامت قلبیایی پیشنهادی توسط Singh و همکاران (۳۳) و همچنین Tice و همکاران (۳۴) با کمی تغییرات استفاده شد. بدین منظور، ابتدا بافرهای مورد نیاز شامل بافر PBS به عنوان هموژنایزر (۷/۴) (pH: ۰/۸) گرم کلرید سدیم، ۰/۰۲ گرم کلرید پتاسیم، ۰/۱۴۴ گرم دی سدیم هیدروژن فسفات و ۰/۰۲۴ گرم دی هیدروژن پتاسیم فسفات، بافر خنثی (۷/۵) (pH: ۴/۸) گرم تریس) و یافر الکترولیت برای الکتروفورز (۱۲) گرم هیدروکسید سدیم، ۰/۳۷۲ گرم EDTA تهیه شد. همچنین بافر لایز (۱۰) (pH: با ترکیبی شامل ۱۴/۱ گرم کلرید سدیم، ۳/۷۲۲ گرم EDTA، ۰/۱۲ گرم تریس و ۰/۸ گرم هیدروکسید سدیم، به صورت تازه به ازای هر زمان نمونه‌برداری تهیه گردید. پس از جداسازی قسمتی از بافت آبشش و شستشو با PBS، سوسپانسیون سلولی با استفاده از PBS تهیه شد. پس از افزودن تریپسین-EDTA (۰/۲۵٪)، FBS اضافه و سانتریفیوژ (۴ °C، ۱۰ min، ۱۱۷۰ rpm) انجام یافت. ۱۰۰ میکرولیتر بافر هموژنایزر به رسوب سلولی اضافه و سانتریفیوژ (۴ °C، ۷ min، ۱۱۳۰ rpm) انجام گرفت. پس از افزودن ۱۰

میکرولیتر هموژنایزر و ۱۰۰ میکرولیتر آگار نقطه ذوب پایین، محتویات روی لام‌هایی با پوشش آگارز نرمال (۱/۲٪) بارگذاری و به مدت ۱ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از تیمار با بافر لایز، الکتروفورز با جریان ۲۱ ولت به مدت ۲۰ دقیقه انجام گرفت. لام‌ها به مدت ۲ دقیقه با بافر خنثی تیمار و پس از رنگ‌آمیزی، ۱۰۰ سلول برای هر فرد مورد بررسی قرار گرفت. پارامترهای آسیب DNA شامل Tail length (TL)، Tail moment (TM) و (%TDNA) Tail DNA % با استفاده از نرم‌افزار CASP نسخه ۱،۲،۲ مورد ارزیابی قرار گرفت (۳۵).

۶.۱. تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌ها به کمک نرم‌افزار SPSS 19 انجام گرفت. داده‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی به کمک آزمون اسپلیت پلات در زمان مورد آزمون قرار گرفت. مقایسات میانگین نیز به کمک آزمون دانکن در سطح $P \leq 0.05$ انجام یافت.

نتایج

۱.۱. نتایج تعیین LC₅₀

بر اساس مقادیر مرگ و میر ثبت شده ماهیان کلمه مواجهه یافته با آرسنیک و همچنین استفاده از نرم‌افزار پروبیت آنالایزر، مقادیر LC₁، LC₁₀، LC₃₀، LC₅₀، LC₇₀، LC₉₀ و LC₉₉ آرسنیک طی زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت صورت پذیرفت (جدول ۱).

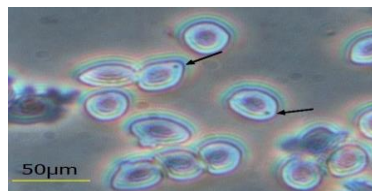
جدول ۱- غلظت‌های کشنده و محدوده کشندگی (mg/l) آرسنیک طی ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت برای ماهی کلمه

Table 1. Lethal concentrations and lethal range (mg/l) during 24, 48, 72 and 96 hours for Caspian roach

LC	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
LC ₁	۱۰/۲۵ (۰-۲۴/۳۳)	۹/۰۳ (۰-۱۵/۲۴)	۱۵/۲۹ (۰-۲۰/۰۸)	۱۴/۱۸ (۰-۱۸/۲۸)
LC ₁₀	۲۹/۸۶ (۰-۴۶/۷۹)	۱۵/۶۴ (۴/۶-۲۰/۲۶)	۱۸/۲۱ (۰-۲۱/۸۵)	۱۶/۸ (۳/۳۶-۲۰/۷۲)
LC ₃₀	۴۴/۰۷ (۳۲/۸۳-۲۲۵/۲۸)	۲۰/۴۳ (۱۳/۵۳-۲۴/۶۸)	۲۰/۳۳ (۰-۲۳/۴۴)	۱۸/۶۹ (۱۰/۱۴-۲۳/۳۷)
LC ₅₀	۵۳/۹۱ (۴۰/۷۱-۳۹۳/۰۱)	۲۳/۷۵ (۱۸/۷۴-۲۸/۷۲)	۲۱/۷۹ (۰-۱۲/۲۵)	۲۰/۰۱ (۱۳/۹-۲۶/۱۴)
LC ₇₀	۶۳/۷۵ (۴۶/۸۱-۵۶۲/۵۲)	۲۷/۰۶ (۲۲/۸-۳۳/۹)	۲۳/۲۶ (۰-۲۹/۷۳)	۲۱/۳۱ (۱۶/۶۵-۲۹/۹۹)

۲۳/۲۱(۱۹/۳۹-۳۶/۶۹)	۲۵/۳۷(۲۱/۵۸-۷۳/۷)	۳۱/۸۵(۲۷/۲۴-۴۲/۸۱)	۹۶/۷۷(۵۴/۸۲-۸۰/۰۷)	LC ₉₀
۲۵/۸۲(۲۱/۷۲-۴۷/۲۷)	۲۸/۲۹(۲۵-۱۶۱/۵۵)	۳۸/۴۶(۳۲/۲۸-۵۶/۱۹)	۹۷/۵۷(۶۵/۳۷-۱۱۴۷/۳۹)	LC ₉₉

القای بروز میکرونوکلیئوس‌ها در ماهی کلمه شد به نحوی که فراوانی میکرونوکلیئوس‌ها در تمامی تیمارهای مواجهه یافته با آرسنیک، به‌طور معنی‌داری بالاتر از تیمار شاهد بود ($P \leq 0/05$). با افزایش غلظت آرسنیک، فراوانی میکرونوکلیئوس‌ها به‌طور معنی‌داری ($P \leq 0/05$) افزایش یافت و بالاترین میزان در هر دو نوبت نمونه برداری در تیمار مواجهه یافته با غلظت ۹ میلی‌گرم در لیتر آرسنیک مشاهده شد (جدول ۲). همچنین، با افزایش مدت زمان مواجهه، فراوانی میکرونوکلیئوس‌ها افزایش یافته است که برای تمامی تیمارهای مواجهه یافته با آرسنیک معنی‌دار بود ($P \leq 0/05$).



شکل ۱- نمونه حاوی میکرونوکلیئوس در ماهی کلمه مواجهه یافته با آرسنیک

Figure 1. the sample containing micronucleus in Caspian roach exposed to Arsenic

جدول ۲- فراوانی میکرونوکلیئوس‌ها در ماهی کلمه تحت غلظت‌ها و زمان‌های مختلف مواجهه با آرسنیک

Table 2. Micronuclei frequency in Caspian roach under different concentrations and times of exposure to Arsenic

زمان مواجهه (روز)		غلظت (میلی‌گرم در لیتر)
۷	۳	شاهد
$0/33 \pm 0/58^{Da}$	$0/26 \pm 0/58^{Da}$	۳
$1/03 \pm 0/58^{Ca}$	$0/73 \pm 0/58^{Cb}$	۶
$1/53 \pm 0/58^{Ba}$	$1/26 \pm 1/15^{Bb}$	۹
$2/26 \pm 0/58^{Aa}$	$1/79 \pm 1/0^{Ab}$	

حروف بالانویس بزرگ نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در هر ستون و حروف بالانویس کوچک نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در هر ردیف می‌باشد. مقادیر به‌صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده است.

۳.۲. آزمون کامت

پایین‌ترین غلظت مورد بررسی معنی‌دار بود ($P \leq 0/05$). با افزایش غلظت آرسنیک میزان تخریب DNA نیز افزایش یافت به نحوی که افزایش مشاهده شده در پارامترهای مورد بررسی

طبق نتایج جدول ۱، مقادیر LC₅₀ ۲۴ ساعته، LC₅₀ ۴۸ ساعته، LC₅₀ ۷۲ ساعته و LC₅₀ ۹۶ ساعته آرسنیک به ترتیب برابر با ۲۱/۷۹، ۲۳/۷۵، ۵۳/۹۱ و ۲۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر به دست آمد. محدوده کشندگی آرسنیک برای ماهی کلمه در ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت به ترتیب برابر با ۳۹۳/۰۱-۴۰/۷۱، ۴۰/۷۱-۲۸/۷۲، ۱۸/۷۴-۰-۱۲/۲۵ و ۱۳/۹-۲۶/۱۴ میلی‌گرم در لیتر تعیین شد.

۲.۲. نتایج تست میکرونوکلیئوس

شکل ۱ نشان دهنده نمونه حاوی میکرونوکلیئوس در ماهی کلمه تحت مواجهه با آرسنیک است. مواجهه با آرسنیک منجر به

مواجهه با آرسنیک منجر به القای آسیب به DNA بافت آبشش ماهی کلمه گردید (جدول ۳). اختلاف مشاهده شده از نظر میزان آسیب وارد شده، بین گروه شاهد و تیمار حاوی

غلظت‌های مورد بررسی با افزایش زمان مواجهه (به استثنای TDNA% در تیمار سوم) بود. افزایش مشاهده شده با گذشت زمان تنها در پارامترهای TL (در هر سه تیمار) و TDNA% (در تیمار ۱) معنی‌دار بود ($P \leq 0.05$). در این خصوص، در گروه شاهد تغییر چندانی مشاهده نشد ($P > 0.05$).

در هر نوبت نمونه‌برداری (به استثنای افزایش TDNA% از تیمار ۲ به ۳ در آخرین روز مواجهه) معنی‌دار بود ($P \leq 0.05$). بالاترین مقادیر TL، TM و TDNA% مربوط به تیمار سوم بود.

بررسی اثر زمان مواجهه با آرسنیک بر میزان آسیب DNA حاکی از روند افزایشی میانگین پارامترهای مورد نظر در تمامی

جدول ۳- پارامترهای آسیب DNA در ماهی کلمه تحت غلظت‌ها و زمان‌های مختلف مواجهه با آرسنیک

Table 3- Parameters of DNA damage in Caspian roach under different concentrations and times of exposure to Arsenic

%Tail DNA (%TDNA)		Tail moment (TM)		Tail length (TL)		
روز ۷	روز ۳	روز ۷	روز ۳	روز ۷	روز ۳	
۵/۸۷±۰/۷۶ ^{Ca}	۵/۳۵±۰/۴۳ ^{Da}	۰/۴۷±۰/۳۳ ^{Da}	۰/۴±۰/۲۱ ^{Da}	۶/۰۸±۰/۳۱ ^{Da}	۵/۸۲±۰/۱۴ ^{Da}	شاهد
۴۸/۲۶±۱/۵۷ ^{Ba}	۳۹/۳۲±۲/۰۳ ^{Cb}	۱۱/۷۴±۲/۱۸ ^{Ca}	۸/۲۶±۱/۰۳ ^{Ca}	۲۲/۹۱±۰/۳۶ ^{Ca}	۲۰/۱۸±۰/۹۶ ^{Cb}	تیمار ۱
۵۶/۲۸±۲/۷۸ ^{Aa}	۵۰/۸۴±۱/۴۹ ^{Ba}	۳۲/۰۱±۳/۴۸ ^{Ba}	۲۶/۱۸±۲/۸۱ ^{Ba}	۵۵/۰۳±۰/۱۴ ^{Ba}	۵۳/۲۳±۰/۲۱ ^{Bb}	تیمار ۲
۵۷/۸۴±۲/۰۰ ^{Aa}	۵۹/۴۵±۳/۰۹ ^{Aa}	۵۷/۱۱±۱/۶۴ ^{Aa}	۵۴/۷۰±۲/۷۰ ^{Aa}	۱۰۱/۱±۱/۵۵ ^{Aa}	۹۵/۰۹±۱/۹۱ ^{Ab}	تیمار ۳

حروف بالانویس بزرگ نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در هر ستون و حروف بالانویس کوچک نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در هر ردیف می‌باشد. مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده است.

بحث

در افزایش غلظت آرسنیک تا ۹ میلی‌گرم در لیتر افزایش یافت. در این خصوص، Ahmed و همکاران (۲۳) نیز افزایش وابسته به غلظت TDNA% در گونه *Oreochromis mossambicus* تحت مواجهه با آرسنیک را گزارش نمودند. تاکنون در ارتباط با ساز و کار سمیت ژنتیکی آرسنیک، مدل‌های بالقوه مختلفی برای پستانداران شناسایی شده است، این در حالیست که با وجود برخی پژوهش‌های صورت گرفته در خصوص اثرات سیتوتوکسیک و ژنوتوکسیک آرسنیک بر آبزیان، مطالعات انجام یافته برای تعیین ساز و کارهای دقیق دخیل در ژنوتوکسیسیته آرسنیک در آبزیان محدود است. بر اساس مطالعات صورت گرفته روی مدل‌های پستاندار و همچنین برخی گونه‌های آبی، ساز و کارهای احتمالی سمیت ژنتیکی آرسنیک را می‌توان به دو صورت ساز و کارهای غیر مستقیم (القای واسطه‌ها) و مستقیم (اثر مستقیم بر ساختار DNA) در نظر گرفت. مشخص شده که آرسنیک می‌تواند منجر به تولید

در سراسر جهان، هزاران آلاینده مختلف در اثر فعالیت‌های بشر وارد محیط‌های آبی می‌شود (۳۶). در این میان، رشد فعالیت‌های کشاورزی و صنعتی مختلف طی سال‌های اخیر، منجر به افزایش ورود آرسنیک به محیط‌های طبیعی شده (۱۱)، به نحوی که افزایش ورود این عنصر به آب‌های طبیعی و مشکلات ناشی از آن به عنوان یکی از دغدغه‌های اساسی در زمینه سلامت بشر و محیط زیست مطرح می‌باشد (۱۰). نتایج پژوهش حاضر حاکی از آن بود که مواجهه با آرسنیک منجر به القای آسیب DNA در سلول‌های بافت آبشش ماهی کلمه شده است. این امر در تطابق با نتایج حاصل از مطالعات پیشین صورت گرفته روی گونه‌های *Carassius auratus* (۳۷)، *Cirrhina mrigala* (۲۷) و همچنین رده سلولی کبد ماهی *Poeciliopsis lucida* (PLHC-1) (۳۸) می‌باشد. میزان آسیب مشاهده شده در این بررسی، وابسته به غلظت مواجهه بود به نحوی که مقادیر پارامترهای TL، TM و TDNA% با

تست میکرونوکلتوس در ماهیان به طور معمول برای شناسایی و برآورد آسیب‌های ژنوتوکسیک ناشی از آلاینده‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد (۴۶). نتایج حاصل از تست میکرونوکلتوس حاکی از آن بود که مواجهه با غلظت‌های مختلف آرسنیک منجر به القای بروز میکرونوکلتوس‌ها در اریتروسیت‌های ماهی کلمه شده است. با وجود تفاوت‌های مشاهده شده، فراوانی میکرونوکلتوس‌ها در تیمارهای مورد بررسی در سطح نسبتاً پایینی قرار داشت که این امر در مطالعات پیشین توسط Grisolia و همکاران (۴۷) و Rocha و همکاران (۴۸) نیز گزارش شده است. بررسی‌ها نشان داده که نرخ میتوتیک در اریتروسیت‌های ماهیان پایین بوده و اصولاً نرخ شکل‌گیری میکرونوکلتوس‌ها و فراوانی پایه آن‌ها در ماهیان پایین می‌باشد (۴۹). میکرونوکلتوس‌ها پیکره‌های کوچک کروماتینی سیتوپلاسمی هستند که در اثر شکست کروموزوم ناشی از آسیب DNA یا نقص در فرایند میتوز تشکیل می‌شوند. پیدایش میکرونوکلتوس‌ها می‌تواند مرتبط با استرس اکسیداتیو، مواجهه با کلاستوزن‌ها یا آئوزن‌ها، نقص در ژن‌های ترمیم DNA و جدایی کروموزوم‌ها باشد (۲۶). در این راستا، Yadav و Trivedi (۵۰) در ارزیابی توان ژنوتوکسیک تری‌اکسید آرسنیک، کلرید جیوه و سولفات مس در ماهی *C. punctatus*، بیان نمودند که فراوانی میکرونوکلتوس‌ها تحت مواجهه با آرسنیک در مقایسه با دو فلز دیگر به طور قابل توجهی بالاتر بود. Vanzella و همکاران (۵۱) بیان داشتند که بهترین زمان مواجهه به منظور ارزیابی آسیب‌های ژنوتوکسیک، ۲۴ ساعت است چرا که این مدت زمان برای فعال‌سازی موثر ساز و کارهای ترمیم‌کننده DNA در سلول‌های آسیب دیده کافی نمی‌باشد. این درحالی است که Udrouiu (۵۲) بیان داشت که اریتروسیت‌های واجد میکرونوکلتوس برای قابل تشخیص بودن نیازمند پاساژ طی میتوز می‌باشند که این فرایند در اغلب گونه‌ها حداقل ۲ تا ۳ روز زمان می‌برد. Al-Sabti و Metcalfe (۵۳) نیز بازه زمانی ۱ تا ۵ روزه را برای حداکثر القای میکرونوکلتوس‌ها در ماهیان پس از مواجهه با عامل استرس‌زا معرفی نمودند. Ahmed و

گونه اکسیژن فعال (ROS) و استرس اکسیداتیو شود، هرچند ساز و کارهای دقیق دخیل در این امر هنوز نامشخص است (۳۹). در این خصوص، متیلاسیون اکسیداتیو آرسنیک که احتمالاً با آسیب اکسیداتیو DNA مرتبط می‌باشد، به عنوان یکی از ساز و کارهای احتمالی در شکل‌گیری ROS پیشنهاد شده است (۴۰). اکسیداسیون DNA با ROS می‌تواند از طریق شکل‌گیری بازهای اکسیده منجر به تخریب بازی DNA گردد (۴۱). علاوه بر این، آسیب DNA ناشی از مواجهه با آرسنیک می‌تواند مرتبط با توانایی آرسنیک در واکنش با تیول‌ها باشد که نقش اساسی در عملکرد سلول دارند (۱۱). این امر می‌تواند از طریق ممانعت از لیگاسیون یا کاهش بیان ژن آنزیم‌های دخیل در ترمیم DNA به‌ویژه آنزیم DNA پلی‌مراز δ ، بر ساز و کارهای ترمیم DNA اثر گذار باشد (۴۲). همچنین تمایل آرسنیک به اتصال با تیول‌ها ممکن است منجر به تخلیه گلوپروتئین به عنوان یک آنتی‌اکسیدان نانوپروتئینی مبتنی بر تیول نیز شود (۴۳). تحت تاثیر قرار گرفتن آنزیم‌های دخیل در ترمیم DNA همراه با کاهش سطح گلوپروتئین، روی ساز و کارهای حفاظتی سلول در مقابل ROS اثر گذار بوده و می‌تواند به عنوان عامل محرک در افزایش استرس اکسیداتیو و آسیب DNA نقش داشته باشد (۳۷). علاوه بر این موارد، آرسنیک ممکن است مستقیماً از طریق محل اتصال آمید یا کربونیل با DNA باند شده و با تاثیر مستقیم بر ساختار DNA، منجر به آسیب آن شود (۴۳). با وجود این، برخی مطالعات صورت گرفته روی مدل‌های پستاندار حاکی از غیر فعال بودن آرسنیک و عدم توانایی آن در واکنش مستقیم با DNA می‌باشد (۴۴). روی‌هم‌رفته، با توجه به اطلاعات موجود، استرس اکسیداتیو را می‌توان به عنوان عامل عمده در بروز سمیت ژنتیکی ناشی از آرسنیک در نظر گرفت. القای استرس اکسیداتیو در ماهیان ناشی از مواجهه با آرسنیک در مطالعات قبلی توسط Ventura-Lima و همکاران (۴۵) نیز گزارش شده است. به هر حال، مطالعات بیشتر برای نمایان ساختن ساز و کارهای دقیق دخیل در بروز شکست DNA ناشی از مواجهه با آرسنیک در آبزیان به‌ویژه ماهیان، مهم به نظر می‌رسد.

آرسنیک در صنایع مختلف و ورود آن به محیط‌های آبی، امری مهم به نظر می‌رسد.

همکاران (۲۳) بیان نمودند که فراوانی میکروکلئوس‌ها در گونه *Oreochromis mossambicus* پس از ۴ روز مواجهه با آرسنیک روند افزایشی نشان داد، در حالی که میزان فراوانی میکروکلئوس‌ها پس از روز هشتم رو به کاهش نهاده است. این در حالی است که در مطالعه‌ای دیگر، Sayed و همکاران (۲۶) افزایش متداوم در فراوانی میکروکلئوس‌ها در گونه *O. niloticus* را پس از ۳ هفته مواجهه با ۷ میلی‌گرم در لیتر آرسنیک گزارش نمودند. در پژوهش حاضر نیز روند افزایشی در تعداد میکروکلئوس‌های مشاهده شده با گذشت زمان تا روز هفتم مواجهه مشاهده شد. با توجه به نتایج تحقیقات مختلف، به نظر می‌رسد عواملی همچون شرایط مواجهه و نوع گونه روی روند تغییرات در فراوانی میکروکلئوس‌ها با گذشت زمان اثرگذار باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از پژوهش حاضر حاکی از آن بود که مواجهه با آرسنیک منجر به القای بروز میکروکلئوس‌ها و آسیب DNA در ماهی کلمه شده است. در این خصوص، اگرچه سطح آسیب شناسایی شده از طریق آزمون کامت نسبت به تست میکروکلئوس نمایان‌تر بود، اما نتایج هر دو روش هم‌سو و در تطابق با یکدیگر بودند، به نحوی که نتایج هر دو آزمون کامت و میکروکلئوس نشان داد که اثرات ژنوتوکسیک مشاهده شده شامل آسیب DNA و بروز میکروکلئوس‌ها با افزایش مدت زمان مواجهه تا ۷ روز، افزایش یافت. با توجه به اثرات ژنوتوکسیک مشاهده شده، مطالعات آتی در خصوص تعیین ساز و کارهای دقیق بروز سمیت ژنتیکی ناشی از آرسنیک در ماهیان توصیه می‌شود. همچنین ارزیابی روند تغییرات آسیب‌های ژنوتوکسیک وارد شده در بازه‌های زمانی طولانی‌تر برای تعیین توانایی ترمیم DNA در ماهی کلمه در مواجهه با آرسنیک مهم به نظر می‌رسد. روی هم‌رفته، با توجه به نتایج حاصل از پژوهش حاضر می‌توان بیان داشت که آرسنیک دارای توان ژنوتوکسیک بالایی در ماهی کلمه است. با توجه به کاربرد گسترده آرسنیک در بخش‌های مختلف صنعت و کشاورزی، در نظر گرفتن تدابیر مدیریتی مناسب به منظور کنترل استفاده از

Reference

1. Kiabi, B.H., Abdoli, A., Naderi, M., 1999. Status of the fish fauna in the South Caspian basin of Iran. *Journal of Zoology in the Middle East*, Vol. 18, pp. 57-65.
2. DeMora, S., Sheikholeslami, M.R., Wyse, E., Azemard, S., Cassi, R., 2004. An assessment of metal contamination in coastal sediments of the Caspian Sea. *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 48, pp. 61-77.
3. Di Gioacchino, M., Petrarca, C., Perrone, A., Farina, M., Sabbioni, E., Hartung, T., Martino, S., Esposito, D.L., Lotti, L.V. Mariani-Costantini, R., 2008. Autophagy as an ultrastructural marker of heavy metal toxicity in human cord blood hematopoietic stem cells. *Science of the Total Environment*, Vol. 392, pp. 50-58.
4. Bagheri, H., Darvish Bastami, K., Sharmad, T., Bagheri, Z., 2013. Assessment of the distribution of heavy metals pollution in Gorgan bay. *Oceanography*, Vol. 3(11), pp. 65-72. (In Persian)
5. Hashemi, S.J., Riahi Bakhtiari, A.R., Lak, R., 2013. Source identification and distribution of lead, copper, zinc, nickel, chromium and vanadium in surface sediments of Caspian Sea. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*, Vol. 23(1), pp. 36-50. (In Persian)
6. Bagheri, H., Azimi, A., 2016. Study of the heavy metals distribution in surface sediments of Sisangan coasts-

2017. Effect of Arsenic on hematological parameters of freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch). International Journal of Zoology and Applied Biosciences, Vol. 2(3), pp. 117-121.
15. Kumar, R., Banerjee, T.K., 2016. Arsenic induced hematological and biochemical responses in nutritionally important cat fish *Clarias batrachus* (L.). Toxicology Reports, Vol. 3, pp. 148-152.
16. Hallauer, J., Geng, X., Yang, H.C., Shen, J., Tsai, K.J., Liu, Z., 2016. The effect of chronic Arsenic exposure in zebrafish. Zebrafish, Vol. 13(5), pp. 405-412.
17. Li, C., Li, P., Tan, Y.M., Lam, S.H., Chan, E.C.Y., Gong, Z., 2016. Metabolic characterizations of liver injury caused by acute Arsenic toxicity in zebrafish. PLOS ONE, Vol. 11(3), e0151225.
18. Siu, W.H.L., Caob, J., Jack, R.W., Wu, R.S.S., Richardson, B.J., Xu, L., Lam, P.K.S., 2004. Application of the comet and micronucleus assays to the detection of B[a]P genotoxicity in haemocytes of the green-lipped mussel (*Perna viridis*). Aquatic Toxicology, Vol. 66, pp. 381-392.
19. Gravato, C., Santos, M.A., 2003. Genotoxicity biomarkers' association with B(a)P biotransformation in *Dicentrarchus labrax* L. Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 55, pp. 352-358.
20. Bolognesi, C., Perrone, E., Roggieri, P., Sciutto, A., 2006. Bioindicators in monitoring long term genotoxic impact of oil spill: Haven case study. Marine Environmental Research, Vol. 62, pp. 287-291.
- south of Caspian Sea. Oceanography, Vol. 6(21), pp. 27-36. (In Persian)
7. Saghali, M., Baqraf, R., Patimar, R., Hosseini, S.A., Baniemam, M., 2014. Determination of heavy metal (Cr, Zn, Cd and Pb) concentrations in water, sediment and benthos of the Gorgan Bay (Golestan province, Iran). Iranian Journal of Fisheries Sciences, Vol. 13(2), pp. 449- 455.
8. Ventura-Lima, J., Bogo, M.R., Monserrat, J.M., 2011. Arsenic toxicity in mammals and aquatic animals: A comparative biochemical approach. Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 74, pp. 211-218.
9. Zhang, W., Huang, L., Wang, W.X., 2011. Arsenic bioaccumulation in a marine juvenile fish *Terapon jarbua*. Aquatic Toxicology, Vol. 105, pp. 582-588.
10. Chakraborti, D., 2011. Arsenic: Occurrence in Groundwater. In: Nriagu JO (eds), Encyclopedia of Environmental Health. Burlington, Elsevier. pp. 165-80.
11. Kumari, B., Kumar, V., Sinha, A.K., Ahsan, J., Ghosh, A.K., Wang, H., DeBoeck, G., 2016. Toxicology of arsenic in fish and aquatic systems. Environmental Chemistry Letters, Vol. 15(1), pp. 43-64.
12. Bagheri, H., 2017. Study of arsenic distribution in sediments of the southeastern Caspian Sea. Journal of Marine Sciences and Technology, Vol. 79, pp. 35-42. (In Persian)
13. World Health Organization, 2001. Environmental Health Criteria, arsenic and arsenic compounds. 114p.
14. Vanitha, S., Amsath, A., Muthukumaravel, K., Sugumaran, J.,

- peripheral blood erythrocytes of fish exposed to arsenic under laboratory conditions. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, Vol. 3(11), pp. 877-888.
28. Kousar, S., Javed, M., 2016. Determination of Arsenic induced nuclear abnormalities in peripheral blood erythrocytes of carps using micronucleus test. *The Journal of Animal and Plant Sciences*, Vol. 26(5), pp. 1501-1506.
29. Di Giulio, R.T. Hinton, D.E., 2008. *The Toxicology of Fishes*. Taylor and Francis. pp. 319-884.
30. Hedayati, S.A.A., Jahanbakhshi, A.R., Qadermarzi, A., Bagheri, T., 2014. *Aquatic toxicology*. Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, 212 p.
31. Oliveira, M., Pacheco, M., Santos, M.A., 2007. Cytochrome P4501A, genotoxic and stress responses in golden grey mullet (*Liza aurata*) following short-term exposure to phenanthrene. *Chemosphere*, Vol. 66, pp. 1284-91.
32. Ayllon, F., Garcia-Vazquez, E., 2000. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. , Vol. 467(2), pp. 177-86.
33. Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, Vol. 175, pp. 184-191.
34. Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae Y., Rojas, 21. Mizuno, K., Shinohara, N., Miyakoshi, J., 2015. *In Vitro* Evaluation of genotoxic effects under magnetic resonant coupling wireless power transfer. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, Vol. 12, pp. 3853-3863.
22. Ramirez, O.A.B., Garcia, F.P., 2005. Genotoxic damage in zebra fish (*Danio rerio*) by arsenic in waters from Zimapan, Hidalgo, Mexico. *Mutagenesis*, Vol. 20(4), pp. 291-295.
23. Ahmed, M.K., Al-Mamun, H., Hossain, M.A., Arif, M., Parvin, E., Akter, M.S., Khan, M.S., Islam, M., 2011. Assessing the genotoxic potentials of arsenic in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) using alkaline comet assay and micronucleus test. *Chemosphere*, Vol. 84, pp. 143-149.
24. Das, S., Unni, B., Bhattacharjee, M., Wann, S.B., Rao, P.G., 2012. Toxicological effects of arsenic in a freshwater teleost fish, *Channa punctatus*. *African Journal of Biotechnology*, Vol. 11(19), pp. 4447-4454.
25. Kumar, A., Kesari, V.P., Khan, P.K., 2013. Fish micronucleus assay to assess genotoxic potential of arsenic at its guideline exposure in aquatic environment. *Biometals*, Vol. 26, pp. 337-346.
26. Sayed, A.E.D.H., Elbaghdady, H.A.M., Zahran, E., 2015. Arsenic-induced genotoxicity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*); the role of *Spirulina platensis* extract. *Environmental Monitoring and Assessment*, Vol. 187, pp. 1-10.
27. Kousar, S., Javed, M., 2014. Assessment of DNA damage in

- Fisheries and Aquatic Studies, Vol. 4(4), pp. 08-13.
40. Asophian, H.V., Asophian, M.M., 2006. Arsenic Toxicology: Five questions. Chemical Research in Toxicology, Vol. 19, pp. 1-15.
 41. Engstrom, J., Hedenstierna, G., Larsson, A., 2010. Pharyngeal oxygen administration increases the time to serious desaturation at incubation in acute lung injury: an experimental study. Critical Care, Vol. 14, R93.
 42. Ding, W., Liu, W., Cooper, K.L., Qin, X.J., Bergo, P.L.S., Hudson, L.G., Liu, K.J., 2009. Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase-1 by arsenite interferes with repair of oxidative DNA damage. Journal of Biological Chemistry, Vol. 284(11), pp. 6809-6817.
 43. Flora, S.J., Mittal, M., Pachauri, V., Dwivedi, N., 2012. A possible mechanism for combined arsenic and fluoride induced cellular and DNA damage in mice. Metallomics, Vol. 4, pp. 78-90.
 44. Shen, S., Li, X.F., Cullen, W.R., Weinfeld, M., Le, X.C., 2013. Arsenic binding to proteins. Chemical Reviews, Vol. 113, pp. 7769-7792.
 45. Ventura-Lima, J., Fattorini, D., Regoli, F., Monserrat, J.M., 2009. Effects of different inorganic arsenic species in *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) tissues after short-time exposure: bioaccumulation, biotransformation and biological responses. Environmental Pollution, Vol. 157, pp. 3479-3484.
 46. Parveen, N., Shadab, G.G.H.A., 2012. Cytogenetic evaluation of cadmium chloride on *Channa punctatus*. Journal of Fisheries and Aquatic Studies, Vol. 4(4), pp. 08-13.
 - E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 35(3), pp. 206-221.
 35. Konca, K., Lankoff, A., Banasik, A., Lisowska, H., Kuszewski, T., Gozdz, S., Koza, Z., Wojcik, A.A., 2003. cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay. Mutation Research, Vol. 534, pp. 15-20.
 36. Ullah, S., Hasan, Z., Zorriehzahra, M.J., Ahmad, S., 2017. Diagnosis of endosulfan induced DNA damage in rohu (*Labeo rohita*, Hamilton) using comet assay. Iranian Journal of Fisheries Sciences, Vol. 16(1), pp. 138-149.
 37. Kumar, A., Kesari, V.P., Alok, A.K., Kazim, S.N., Khan, P.K., 2014. Assessment of arsenic-induced DNA damage in goldfish by a polymerase chain reaction-based technique using random amplified polymorphic DNA markers. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, Vol. 67(4), pp. 630-638.
 38. Selvaraj, V., Armistead, M.Y., Cohenford, M., Murray, E., 2013. Arsenic trioxide (As₂O₃) induces apoptosis and necrosis mediated cell death through mitochondrial membrane potential damage and elevated production of reactive oxygen species in PLHC-1 fish cell line. Chemosphere, Vol. 90, pp. 1201-1209.
 39. Sunaina, A., Bhardwaj, A.K., Ansari, B.A., 2016. Oxidative stress biomarkers in assessing arsenic trioxide toxicity in the zebrafish, *Danio rerio*. International Journal of

- impact of oil spill: Haven case study. *Marine Environmental Research*, Vol. 62, pp. 287-291.
50. Yadav, K.K., Trividi, S.P., 2009. Sublethal exposure of heavy metals induces micronuclei in fish, *Channa punctatus*. *Chemosphere*, Vol. 77, pp. 1495-1500.
51. Vanzella, T.P., Martinez, C.B.R., Colus, I.M.S., 2007. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water fraction on a neotropical fish species. *Mutation Research*, Vol. 631, pp. 36-43.
52. Udriou, I., 2006. The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquatic Toxicology*, Vol. 79, pp. 201-204.
53. Al-Sabti, K., Metcalfe, C.D., 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research*, Vol. 343(23), pp. 121-135.
- of *Environmental Biology*, Vol. 33, pp. 663-666.
47. Grisolia, C.K., Rivero, C.L.G., Starling, F.L.R. M., Silva, I.C.R., Barbosa, A.C.B., Dorea, J.G., 2009. Profile of micronucleus frequencies and DNA damage in different species of fish in a eutrophic tropical lake. *Genetics and Molecular Biology*, Vol. 32(1), pp. 138-14.
48. Rocha, C., Cavalcanti, B., Pessoa, C.O., Cunha, L., Pinheiro, R.H., Bahia, M., Ribeiro, H., Cestari, M., Burbano, R., 2011. Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Aequidens tetramerus* exposed to methylmercury. *In vivo*, Vol. 25(6), pp. 929-933.
49. Bolognesi, C., Perrone, E., Roggeri, P., Scitutto, A., 2006. Bioindicators in monitoring long term genotoxic