بررسی تأثیر نفت خام بر آسیب سیتوژنتیک با استفاده از سنجش آزمون ریزهسته در نرم‌تن دوکفه‌ای *Anodonta cygnea* به عنوان بیواندیکاتور

صابر اسکندری[۱*]، پرگل قوام‌مصطفوی[۲]، حسین مزدارانی[۳]، علی ماشینچیان مرادی[۴]، محمدحسن شاه‌حسینی[۵]

چکیده

با توجه به اینکه نفت خام جزء یکی از آلاینده‌های آلی مخرب و مضّر اکوسیستم‌های آبی محسوب می‌شود و می‌تواند اثرات بسیار نامطلوبی بر ساختار ماده وراثتی (DNA) و روند تقسیم سلولی داشته باشد، تأثیر این آلاینده در غلظت‌های مختلف بر روی نرم‌تن دوکفه‌ای *Anodonta cygnea* در شرایط آزمایشگاهی (In vitro)، برای مشاهده میزان تخریب DNA و انحرافات کروموزومی بررسی شد تا علاوه بر شناسایی میزان اثرات مخرب نفت خام، این دوکفه‌ای به عنوان شاخص زیستی محیطی معرفی شود.

غلظت‌های ppm ۰/۲۵ ، ppm ۰/۵ و ppm ۱ نفت خام در آکواریوم‌های تیمار تهیه گردید و ۲ آکواریم نیز به عنوان آکواریوم‌های شاهد که در یکی آب و در دیگری آب به همراه DMSO (Dimethyl sulfoxide) بود در نظر گرفته شد.

دوکفه‌ای‌ها به مدت ۱۰ روز در معرض آلایندهٔ مورد نظر (نفت خام) با غلظت‌های مشخص قرار گرفتند. در پایان روز دهم دوکفه‌ای‌ها جهت استخراج سلول‌های آبششی از بافت آبششی جداسازی شدند. بعد از استخراج، سلول‌ها وارد آزمون ریزهسته (micronuclei test) شدند.

بعد از تهیه سوسپانسیون سلول‌های آبششی بر روی لام، اجازه داده شد این سوسپانسیون خشک شود و با متانول مطلق فیکس گردید در نهایت با رنگ‌آمیزی گیمسا شمارش ریزهسته‌ها با میکروسکوپ نوری انجام شد. در این آزمایش سطح ریزهسته‌ها بین ۰ تا ۲/۶ ریزهسته/۱۰۰۰ سلول آبششی اندازه‌گیری شد. در آکواریوم شاهد۱ (آب) میزان صفر ریزهسته/۱۰۰۰ سلول آبششی، در آکواریوم شاهد۲ (آب+DMSO) میزان ۰/۲ ریزهسته/۱۰۰۰ سلول آبششی، در آکواریوم تیمار۱ (غلظت ppm ۰/۲۵ نفت خام) میزان ۱/۶ ریزهسته/۱۰۰۰ سلول آبششی، در آکواریوم شاهد۲ (آب+DMSO) میزان ۰/۲ ریزهسته/۱۰۰۰ سلول آبششی، در آکواریوم تیمار۱ (غلظت ppm ۰/۲۵ نفت خام) میزان ۱/۶ ریزهسته/۱۰۰۰ سلول آبششی، در آکواریوم تیمار۲ (غلظت ppm ۰/۵ نفت خام) میزان ۲/۶ ریزهسته/۱۰۰۰ سلول آبششی، آکواریوم تیمار۳ (غلظت ppm ۱ نفت خام) میزان ۲ ریزهسته/۱۰۰۰ سلول آبششی برآورد شد.

واژگان کلیدی: نفت خام، آبشش، آزمون ریزهسته، *Anodonta cygnea*

۱- دانش آموختهٔ کارشناسی ارشد رشته بیولوژی دریا – جانوران دریا ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات
saber_eskandari_64@yahoo.com
۲- استادیار و عضو هیأت علمی تمام وقت گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات
۳- استاد و عضو هیأت علمی گروه ژنتیک پزشکی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تهران
۴- استادیار و عضو هیأت علمی تمام وقت گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات
۵- دانشیار و عضو هیأت علمی گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس

مقدمه

یکی از مهم‌ترین و کاربردی‌ترین راه‌هایی که می‌توان میزان آلودگی محیط (اکوسیستم‌های آبی) و اثرات سوء آن بر موجودات را بررسی کرد روش‌های سنجش هسته‌ای، سیتوژنیک و بررسی‌های مولکول DNA است.

هزاران ترکیب شیمیایی که می‌توانند اثرات خطرناک زیادی بر موجودات آب شیرین و دریایی داشته باشند، امروزه به اکوسیستم‌های آبی وارد شده‌اند. این مواد شامل فلزات سنگین، ترکیبات نفتی، آفت‌کش‌های کلره و هیدروکربن‌های آروماتیک هالوژن‌دار می‌باشند که به راحتی می‌توانند در بدن موجودات آبزی تجمع کنند. در بین این مواد ترکیبات نفتی به صورت گسترده در محیط زیست آبی پخش شده‌اند. هیدروکربن‌ها شناخته شده‌ترین مواد با اثرات سمی در این ناحیه می باشند [۱۲ و ۱۴].

تالاب انزلی از جمله تالاب‌های ارزشمند جنوب غربی دریای خزر واقع در استان گیلان محسوب می‌شود که به دلیل شرایط خاص بوم‌شناسی (اکولوژیک)، اقتصادی، اجتماعی و تنوع گونه‌های گیاهان و جانوران آبزی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. دوکفه‌ای *Anodonta cygnea* یکی از دو-کفه‌ای‌های موجود در تالاب انزلی و رودخانه‌های مربوط به آن می‌باشد که این منطقه زیستگاه اصلی این موجود در ایران بشمار می‌رود [۱].

از آنجایی که امروزه موضوعات و مسایل مربوط به آلودگی دریا به ویژه آلودگی‌های نفتی (آلاینده‌های آلی) به عنوان یکی از نگرانی‌های بشر جایگاه ویژه و مهمّی دارد، تمامی اندیشه-های پژوهشگران و متخصصان را به خود معطوف کرده است. با توجه به این که، این آلاینده اثرات بسیار مخرب و سویی بر پیکرهٔ اکوسیستم‌های آبی داشته و خسارات جبران ناپذیری را به بار آورده است، لذا بررسی میزان تأثیر نفت خام (که حاوی هیدروکربن‌های خطی و حلقوی متعدد و خطرناکی می‌باشد) بر اکوسیستم‌های آبی و دریایی دارای اهمیّت بالایی می‌باشد. این آلاینده تأثیر بسیار نامطلوبی بر ویژگی‌های اکوسیستمی، میزان تولید مثل موجودات این مناطق، نحوه پراکنش آن‌ها، بقا و به طور کلی حیات، داشته است و حتی اثرات نامطلوب آنها در زندگی انسان نیز به چشم می‌خورد. این آلاینده آلی بسیار سرطان‌زا و جهش‌زا بوده و امروزه از راه‌های مختلف و به مقادیر بسیار زیادی وارد اکوسیستم‌های آبی و دریایی شده است اثرات مخرب متفاوتی از PAHs (هیدروکربن‌های چند حلقه‌ای) با تأثیر بر فرایندهای متابولیتی سلولی ثبت شده است [۷ و ۱۱].

نفت خام مخلوط پیچیده‌ای از هیدروکربن‌ها با ۴ الی ۲۴ یا بیشتر اتم کربن در مولکول است. انواع آرایش‌ها شامل زنجیره‌های راست، زنجیره‌های منشعب یا حلقوی شامل ترکیبات آروماتیک (با حلقه‌های بنزنی) می‌باشند. برخی از هیدروکربن‌های چند حلقه‌ای آروماتیک (PAHs)[1] به عنوان عوامل سرطان‌زا شناخته شده‌اند [۳].

مهمترین و اصلی‌ترین بخش در حیات جانوران، که تمامی علوم موجود را وابسته به خود کرده و همچنین جانداران حیات خود را مدیون این بخش هستند، ماده وراثتی (DNA) می‌باشد. از آنجایی که یکی از اثرات مخرب آلاینده‌های نفتی می‌تواند در این ناحیه واقع شود و نسل‌های بعدی را با مخاطره روبرو سازد، بررسی این قسمت بسیار حائز اهمیّت است. با توجه به اینکه نفت خام دارای هیدروکربن‌های پلی-سیکلیک آروماتیک (PAH) زیادی می‌باشد، و جزء یکی از آلاینده‌های آلی مخرب و مضر محسوب می‌شود، می‌تواند اثرات بسیار نامطلوبی بر روند تقسیم سلولی (هسته) و همچنین بر ساختار ماده وراثتی (DNA) داشته باشد، به همین منظور تأثیر این آلاینده در غلظت‌های مختلف بر روی نرم‌تن دوکفه‌ای *Anodonta cygnea* (به عنوان شاخص زیستی) در شرایط آزمایشگاهی (In vitro) برای مشاهده تعداد ریزهسته-های ناشی از انحراف کروموزومی و میزان شکست رشته DNA مورد بررسی قرار گرفته است [۱۵].

ریزهسته‌ها، گویچه‌ها یا کپسول‌های حاوی DNA در اطراف هسته هستند. که این ساختارها توسط انحراف کروموزومی و تخریب دوک‌های تقسیم سلولی به وجود می-آیند. این ناهماهنگی‌ها به علت وجود آلاینده‌ها و ترکیبات سمی در محیط است، که باعث می‌شود بعد از مراحل اولیه تقسیم سلولی در مرحله آنافاز، بخشی از کروموزوم یا همه کروموزوم که هنوز به انتها نرسیده بدون سانترومر، با

1- Poly aromatic hydrocarbons

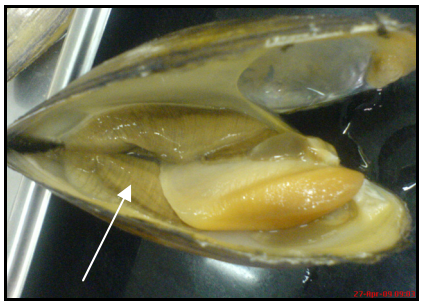
سانترومر تخریب شده و یا اختلال در سیتوکینز به صورت هسته ثانویه کوچکی جدا از هسته اصلی در سیتوپلاسم باقی بماند آزمون ریزهسته روشی آسان است که می‌تواند آسیب ژنتیکی سلول را نشان دهد. در این روش تعداد کافی سلول با تراکم مناسب جداسازی شده و بعد از دسته‌بندی و رنگ-آمیزی توسط میکروسکوپ نوری با کمک روغن امرسیون، تعداد سلول‌های با ریزهسته شمارش می‌شوند [۵ و ۶].

مواد و روش‌ها

تعداد ۱۰۰ نمونه دوکفه‌ای *Anodonta cygnea* از تالاب انزلی جمع‌آوری و به مدت دو هفته جهت آلوده‌زدایی (سم زدایی) و سازگاری در آکواریوم ذخیره به حجم ۳۰۰ لیتر گذاشته شدند. طی مدتی که دوکفه‌ای‌ها در آکواریوم ذخیره نگهداری می‌شدند محلول مورد نیاز برای انجام مراحل آزمون ریزهسته ساخته شد. نمونه‌های دوکفه‌ای *Anodonta cygnea* ۲ ساعت قبل از معرض‌گذاری در آکواریوم‌های حاوی نفت خام بیومتری و وزن شدند و در هر آکواریوم تعداد ۱۰ نمونه توزیع شد. طول دوکفه‌ای‌ها بین ۹ تا ۱۱/۵ سانتی‌متر، ارتفاع آنها بین ۵ تا ۶ سانتی‌متر و وزن‌ها بین ۶۵ تا ۱۳۵ گرم اندازه‌گیری شد و به طور متناسب و متعادل در آکواریوم‌ها توزیع شدند (جدول ۱).

دو آکواریوم یکی با آب (آکواریوم شماره ۱) و دیگری با آب و DMSO (آکواریوم شماره ۲) به عنوان آکواریوم‌های شاهد و سه آکواریوم دیگر با غلظت‌های ppm ۰/۲۵ (آکواریوم شماره ۳)، ppm ۰/۵ (آکواریوم شماره ۴) و ppm ۱ (آکواریوم شماره ۵) از نفت خام به عنوان آکواریوم‌های تیمار در نظر گرفته شدند. نمونه‌ها به مدت ۱۰ روز با روش استاتیک نوع اول در آکواریوم‌ها در معرض غلظت‌های مختلف نفت خام قرار داده شدند. پارامترهای مختلف از قبیل میزان اکسیژن، دما و pH در هر آکواریوم طی ده روز، از روز دوم تا نهم سنجیده شد (جدول ۲). پایان روز دهم تعداد ۸ نمونه دوکفه‌ای *Anodonta cygnea* از هر آکواریوم مورد آزمایش قرار گرفت [۱۰].

بعد از باز کردن کامل صدف‌های دوکفه‌ای، هر دو آبشش به صورت کامل جدا شد (شکل ۱) مقدار ۱۰۰ میکرولیتر (یک قطرهٔ بزرگ) از محلول استیک اسید – اتانول با نسبت ۱ به ۳ که از قبل ساخته شده بود، بر روی لام گذاشته شد سپس آبشش کامل روی لام حاوی محلول قرار گرفت، به آرامی با پشت اسکالپل ضربه‌های پی در پی به مدت ۵ دقیقه روی آبشش زده شد (نباید بافت آبششی تکه تکه یا از هم گسیخته شود) تا سوسپانسیون سلولی با کمک محلول استیک اسید – اتانول روی لام ایجاد شود در نهایت آبشش به آرامی از روی لام برداشته و سوسپانسیون سلول‌ها روی تمام لام پخش شد (شکل ۱). لام‌ها در هوای آزمایشگاه خشک و در متانول مطلق به مدت ۱۰ دقیقه فیکس شدند. سپس لام‌های خشک شده با گیمسای ۵ درصد که در محلول PBS ساخته شده بود به مدت ۳۰ دقیقه رنگ‌آمیزی و در نهایت به آرامی با آب شسته و خشک شدند. شمارش ریز هسته‌ها با میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰۰x انجام شد به طوری که از هر آکواریوم ۵ دوکفه‌ای و از هر دوکفه‌ای ۱۰۰۰ سلول بررسی شد.[۵ و ۶ و ۱۳] .



شکل ۱: آبشش‌های دوکفه‌ای *Anodonta cygnea*

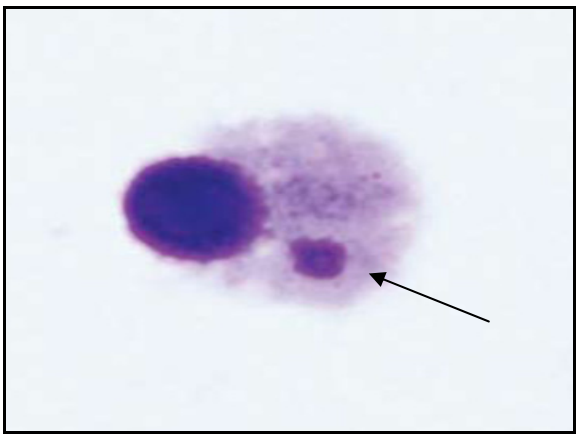
آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌های به دست آمده توسط نرم‌افزار-های Excel و SPSS انجام شد. از آزمون ANOVA و تست Tukey جهت بررسی وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین شاهدها و تیمارهای مختلف استفاده شد. همچنین از آنالیز رگرسیون و محاسبات ضریب همبستگی جهت بررسی ارتباط میان غلظت نفت خام و میزان آسیب-دیدگی DNA استفاده گردید.

نتایج

شمارش ریزهسته‌ها در هر آکواریوم

پنج لام و از هر لام که مربوط به یک دوکفه‌ای بود ۱۰۰۰ سلول به شرح زیر شمارش شد و تعداد ریزهسته‌های شمارش شده در ۵۰۰۰ سلول در هر بخش تقسیم بر پنج شد. بدین ترتیب میزان آسیب در ۱۰۰۰ سلول محاسبه و مورد تجزیه تحلیل آماری قرار گرفت.



شکل ۲: وجود ریزهسته در کنار هسته اصلی سلول آبششی دوکفه‌ای *Anodonta cygnea* (1,000×)

بعد از بررسی نتایج حاصل از آزمون ریزهسته، افزایش تعداد ریز هسته‌ها از آکواریوم‌های شاهد به آکواریوم‌های تیمار به صورت کاملاً واضح مشاهده شد. سطح ریزهسته‌ها بین ۰ تا ۲/۶ ریزهسته/۱۰۰۰ سلول آبششی اندازه‌گیری شد، یعنی در آکواریوم شاهد۱ (آب) میزان صفر ریزهسته/۱۰۰۰ سلول آبششی، در آکواریوم شاهد۲ (آب+DMSO) میزان ۰/۲ ریزهسته/۱۰۰۰ سلول آبششی اندازه‌گیری شد. در آکواریوم تیمار۱ (غلظت ۰/۲۵ ppm نفت خام) میزان ۱/۶ ریزهسته/۱۰۰۰ سلول آبششی، در آکواریوم تیمار۲ (غلظت ۰/۵ ppm نفت خام) میزان ۲/۶ ریزهسته/۱۰۰۰ سلول آبششی، آکواریوم تیمار۳ (غلظت ۱ ppm نفت خام) میزان ۲ ریزهسته/۱۰۰۰ سلول آبششی برآورد شد (جدول ۳) (نمودار ۱).

بررسی معنی‌دار بودن تفاوت میزان آسیب‌دیدگی DNA در شاهد و تیمارها

بعد از انجام آزمون ANOVA و تست Tukey توسط نرم‌افزار SPSS اختلاف معنی‌داری ($p < ۰/۰۵$) بین نمونه‌های هر دو شاهد با تیمارها دیده شد در صورتیکه بین نمونه‌های تیمار اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (جدول ۴).

ضریب همبستگی و آنالیز رگرسیون

همبستگی نقاط به دست آمده برای میزان ریزهسته‌ها بسیار زیاد و نزدیک ۱+ (۰/۷۹۲+) اندازه‌گیری شد که نشان‌دهنده شیب پیوسته و صعودی آسیب‌دیدگی است (نمودار ۲).

بحث و نتیجه‌گیری

نفت خام باعث انحرافات کروموزومی می‌شود و هر چه غلظت نفت خام بیشتر شود میزان انحرافات کروموزومی و تشکیل ریزهسته‌ها بیشتر می‌شود. در نهایت، آزمایش‌های انجام شده و نتایج حاصله فرضیات را تأیید می‌کنند؛ به این صورت که بعد از القاء نفت خام به صورت جداگانه در غلظت‌های مختلف ۰/۲۵ ppm ، ۰/۵ ppm و ۱ ppm طی مدت زمان مشخص (۱۰ روز)، میزان آسیب‌دیدگی کروموزومی و تشکیل ریزهسته به شکل صعودی و معنی‌دار ($p < ۰/۰۵$) افزایش یافت به طوری که پس از تجزیه و تحلیل آماری مشخص شد همبستگی نقاط بدست آمده بسیار زیاد و نزدیک ۱+ (۰/۷۹۲+) می‌باشد. این امر نشان داد که اجزای مختلف نفت خام به صورت آلاینده‌های آلی مخرب، می‌توانند به راحتی ساختار اصلی مولکول DNA را تخریب کنند و به هم بریزند طوری که با ادامه روند موجب مرگ سلول و در نهایت مرگ موجود خواهند شد.

تقسیم سلولی با پروفاز شروع می‌شود، که با متراکم شدن کروموزوم‌ها (که آغاز آن از مرحله G_2 است) آغاز می‌شود مرحله بعد یعنی متافاز هنگامی آغاز می‌شود که کروماتیدهای جفت در مرکز یاخته در یک سطح قرار بگیرند. هر سانترومر دو طرف دارد و یک ریزلوله سانترومری به هر طرف آن متصل شده و به قطب‌های مخالف کشیده می‌شود. این نظم و ترتیب برای روند میتوز کاملاً مهم است. هر اشتباهی در استقرار این ریزلوله‌ها خطرناک است. به عنوان مثال، اتصال دو ریزلوله سانترومری به همان قطب سبب جدا نشدن کروماتیدهای خواهر و در نتیجه باقی ماندن آنها در همان یاخته دختر می‌شود [۴]. اجزای نفت خام باعث می‌شود در

مراحل انتهایی تقسیم سلولی ناهماهنگی ایجاد شود و بخشی از ماده وراثتی که می‌بایست طی شرایط برنامه‌ریزی شده در دو سلول تقسیم شود به صورت هسته کوچک در سیتوپلاسم باقی بماند که یکی از دلایل آن شکست پی در پی رشته DNA است[۸ و ۹].

بعد از بررسی نتایج حاصل از آزمون ریزهسته، افزایش تعداد ریز هسته‌ها از آکواریوم‌های شاهد به آکواریوم‌های تیمار به صورت کاملاً واضح مشاهده شد. نبودن ریزهسته در نمونه‌های شاهد۱ روند طبیعی تقسیمات سلولی را نشان می-دهد. بعد از تجزیه و تحلیل آماری نتایج، افزایش معنی‌داری از وجود ریزهسته‌ها در تیمارها دیده شد. بررسی ریزهسته‌ها در هزار سلول به این علت است که، اختلال در روند تقسیم سلولی و وجود انحرافات کروموزومی پدیده‌ای است که بندرت اتفاق می‌افتد ولی در غلظت‌های باالای نفت خام افزایش قابل توجه ریزهسته‌ها بیانگر آسیب‌رسانی بالا در هسته سلول می‌باشد. البته در تیمار۳ (بالاترین غلظت نفت خام) میزان ریز هسته‌ها نسبت تیمار۲ کمتر شد. در هر دو تیمار۲ و۳ آسیب‌دیدگی بالایی مشاهده شد اما با توجه به اینکه انتظار می‌رفت تیمار۳ نسبت به تیمار۲ آسیب بیشتری را نشان دهد این مسئله قابل بررسی است. با مراجعه به منابع، علت این امر با آنالیز انحراف کروموزومی قابل توجیه است چرا که در بالاترین غلظت نفت خام یک وقفه در تقسیم سلولی ایجاد می‌شود که این وقفه به علت اثر بیشتر آلاینده است و این توقف به سلول اجازه می‌دهد تا با هماهنگی بیشتر هسته را تقسیم کند [۱۱]. البته این به این منظور نیست که با افزایش غلظت آلاینده (بالاتر از ۱ ppm) روند به همین ترتیب ادامه یابد و وقفه ایجاد شده اثر کنترلی مثبت بر روند تخریب داشته باشد. در سال ۲۰۰۶ وجود ریز هسته‌ها در سلول‌های آبششی نرم‌تن دوکفه‌ای *Anodonta anatina* L. که تحت تأثیر نفت خام قرار داشت توسط Barsiene و همکارانش مورد بررسی قرار گرفت. دوکفه‌ای‌ها به مدت ۱۰ روز در معرض غلظت‌های ۰/۲۵ ppm ، ۰/۵ ppm و ۱ ppm از نفت خام قرار داده شدند. در غلظت‌های ۰/۲۵ ppm و ۰/۵ ppm از نفت خام افزایش معنی‌داری از ریز هسته‌ها پس از معرض‌گذاری مشاهده شد [۶]. که در این تحقیق نیز افزایش معنی‌دار در تعداد ریزهسته‌ها در غلظت‌های بالای نفت خام دیده شد.

سلیمی در سال ۱۳۸۸ میزان برخی از هیدروکربن‌های چند حلقه‌ای آروماتیک نفتی (۱۶ نوع PAHs) را در چند بخش از رسوبات و بدن دوکفه‌ای *Anodonta cygnea* در تالاب انزلی اندازه‌گیری کرد. در این مطالعه بالاترین میانگین غلظت PAHs در رسوبات و دوکفه‌ای‌های ایستگاه ماهروزه به ترتیب برابر ۰/۰۶ ppm و ۰/۳۶ ppm و در رسوبات و دوکفه‌ای‌های ایستگاه سلکه به ترتیب برابر ۰/۰۸ ppm و ۰/۳۵ ppm اندازه‌گیری شد. همچنین در یک ایستگاه آلوده که محل استقرار و سوخت‌گیری قایق‌ها بود میانگین غلظت PAHs برابر ۱/۳۲ ppm برآورد شد [۲]. از آنجایکه PAHs اصلی‌ترین بخش مخرب در نفت خام هستند و نتایج تحقیق سلیمی نشان‌دهنده غلظت بالای آن‌ها در بدن دوکفه‌ای‌ها است می‌توان آثار مخرب آن‌ها را در ساختار مولکول DNA این موجود حدس زد، لذا با ادامه روند و افزایش این آلاینده‌های آلی امکان از بین رفتن این دوکفه‌ای در بخش‌های آلوده تالاب پیش‌بینی می‌شود.

شکل ۳: نقشه تالاب انزلی (موقعیت ایستگاه ماهروزه و سلکه در بخش ۳۹ درجه جنوبی تالاب)

جدول ۱: میانگین طول، ارتفاع و وزن دوکفه‌ای‌های *Anodonta cygnea*

آکواریم / میانگین	آکواریوم۱(شاهد۱)	آکواریوم۲(شاهد۲)	آکواریوم۳ (تیمار۱)	آکواریوم۴ (تیمار۲)	آکواریوم۵ (تیمار۳)
طول	۹/۶۲	۹/۵	۹/۷۵	۱۰	۱۰/۵
ارتفاع	۵/۳۷	۵/۵	۵/۵	۵/۶۲	۵/۶۲
وزن	۷۸/۵	۷۷/۶۲	۸۳/۲۵	۹۴/۲۵	۹۹/۲۵

جدول ۲: پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب

روز معرض‌گذاری / پارامترها / آکواریم	روز دوم			روز سوم			روز چهارم			روز پنجم		
	دما (درجه سانتی‌گراد)	pH	اکسیژن (میلی‌گرم در لیتر)	دما (درجه سانتی-گراد)	pH	اکسیژن (میلی‌گرم در لیتر)	دما (درجه سانتی-گراد)	pH	اکسیژن (میلی‌گرم در لیتر)	دما (درجه سانتی-گراد)	pH	اکسیژن (میلی‌گرم در لیتر)
شاهد ۱	۲۰	۷/۸۸	۵/۵	۲۰/۵	۸	۵/۸	۱۹/۳	۷/۵	۶	۲۱	۸/۱۵	۶
شاهد ۲	۱۹/۷	۸/۴	۵/۷	۲۱/۸	۸	۵	۲۰/۹	۸/۳	۶/۳	۱۹/۹	۸/۲۵	۶/۱
تیمار ۱	۲۲/۱	۷/۵	۵	۲۰	۸/۳	۵/۶	۲۲/۴	۸	۵	۱۹	۸/۳۰	۵/۸
تیمار ۲	۲۱	۸/۵	۶/۲	۲۰/۳	۷/۲	۶	۲۱/۲	۸/۵	۵/۵	۲۰/۷	۸/۳۰	۵/۵
تیمار ۳	۲۰	۸	۶	۲۱	۸/۱	۵/۹	۱۷/۵	۷/۸	۵/۴	۱۸/۲	۸	۵

روز معرض‌گذاری / پارامترها / آکواریم	روز ششم			روز هفتم			روز هشتم			روز نهم		
	دما (درجه سانتی-گراد)	pH	اکسیژن (میلی‌گرم در لیتر)	دما (درجه سانتی‌گراد)	pH	اکسیژن (میلی‌گرم در لیتر)	دما (درجه سانتی‌گراد)	pH	اکسیژن (میلی‌گرم در لیتر)	دما (درجه سانتی‌گراد)	pH	اکسیژن (میلی‌گرم در لیتر)
شاهد ۱	۲۲	۷/۶۰	۵/۸	۱۸/۹	۸/۴۱	۵/۵	۲۰	۸/۱	۵/۸	۲۰/۵	۸/۲	۶/۱
شاهد ۲	۲۰/۹	۸/۱۵	۵/۸	۱۷/۸	۸	۵/۶	۲۱/۵	۷/۷	۶	۲۱	۸/۵	۵/۸
تیمار ۱	۱۸	۸/۳۰	۵	۲۰	۸/۳۵	۶/۱	۲۲	۷/۴	۶	۱۹/۶	۸/۳	۵
تیمار ۲	۲۱/۱	۸/۳۵	۶	۲۱	۸/۲۰	۵/۹	۱۹/۹	۸	۵/۵	۲۱/۲	۸/۲	۶/۳
تیمار ۳	۲۱/۴	۸/۴۰	۶/۴	۲۰/۵	۷/۶۸	۵	۱۹	۸/۲	۵/۶	۲۰	۷/۹	۵/۵

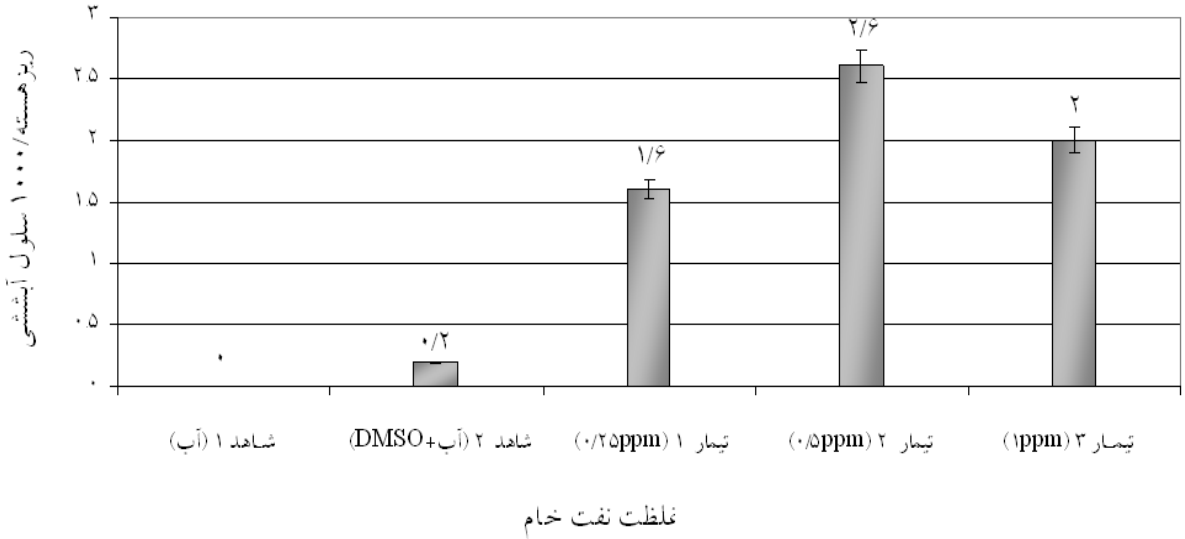
جدول ۳: عداد ریزهسته‌ها و میزان آسیب دیدگی در ۱۰۰۰ سلول (‰)

آکواریوم / شمارش ریزهسته	A (شاهد ۱)	B (شاهد ۲)	C (تیمار ۱)	D (تیمار ۲)	E (تیمار ۳)
تعداد ریزهسته (شمارش ۵۰۰۰ سلول)	۰	۱	۸	۱۳	۱۰
میزان آسیب دیدگی در ۱۰۰۰ سلول (‰)	۰	۰/۲± ۰/۰۱	۱/۶± ۰/۰۸	۲/۶± ۰/۱۳	۲± ۰/۱

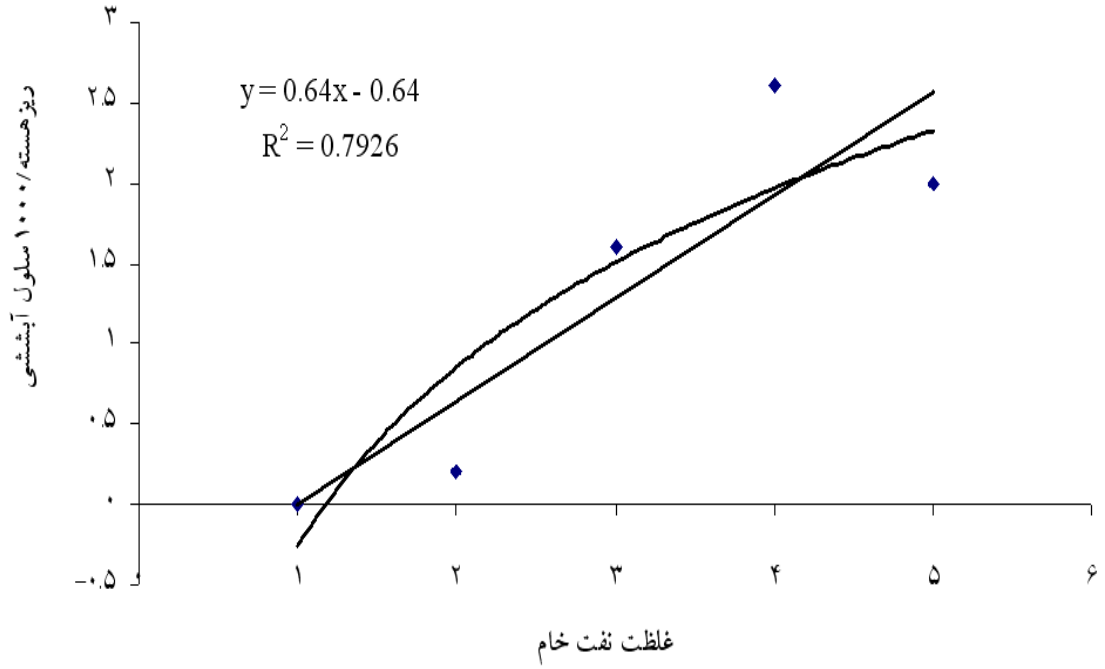
جدول ۴: نتایج آزمون ANOVA و تست Tukey جهت بررسی وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار ($p < ۰/۰۵$)

	شاهد ۱	شاهد ۲	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳
شاهد ۱	–	–	❊	❊	❊
شاهد ۲	–	–	❊	❊	❊
تیمار ۱	❊	❊	–	–	–
تیمار ۲	❊	❊	–	–	–
تیمار ۳	❊	❊	–	–	–

❊: علامت ستاره به معنی وجود اختلاف معنی‌دار در سطح $p < ۰/۰۵$ می‌باشد



نمودار ۱: نمودار میزان آسیب‌دیدگی DNA با وجود ریز هسته‌ها در سلول‌های آبششی



نمودار ۲: نمودار ضریب همبستگی و معادله خط

منابع

۱- اشجع اردلان، آ. ۱۳۸۵. مقایسه میزان فلزات سنگین (Cd , Pb , Cu , Zn , Hg) در آب رسوبات و بافت نرم‌تن دوکفه‌ای *Anodonta cygnea* تالاب انزلی در دو فصل پاییز و بهار. مجله پژوهش و سازندگی در امور دام و آبزیان، شماره ۷۳، ۱۱ص.

۲- سلیمی، ل. ۱۳۸۸. پایش زیستی هیدروکربن‌های چند حلقه‌ای (PAHs) و فلزات سنگین نیکل و وانادیوم در رسوبات و دو کفه-ای *Anodonta cygnea* تالاب انزلی و تعیین کاربرد بیومارکر Neutral Red Retention assay (NRR) به عنوان شاخص زیستی این آلاینده. رساله دکترای تخصصی رشته بیولوژی دریا دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران.

۳- کلارک، آر.بی، ت: زاهد، محمدعلی.، محمدی دشتکی، زینب ۱۳۷۹، آلودگی دریا، تهران: نقش‌مهر، ۲۴۸ص.

۴- مجد، احمد.، شریعت‌زاده، محمدعلی، ۱۳۸۱، زیست شناسی سلولی و مولکولی، تهران: آییژ، ۷۳۲ص، ۲۹/۵۸ ر۳م.

5- Baršienė, J., & Andreikėnaitė, L. 2007. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in blue mussels exposed to crude oil from the North Sea. *EKologija,* 53: 9–15.

6- Baršienė, J., Andreikėnaitė, L., & Rybakovas, A. 2006. Cytogenetic damage in perch (*Perca fluviatilis* L.) and Duck mussel (Anodonta anatina L.) exposed to crude oil. *Ekolojia,* 1: 25–31.

7- Depledge, M.H. 1998. The ecotoxicological significance of genotoxicity in marine invertebrates. *Mutation Research,* 399: 109–122.

8- Laffon, B., Ra´bade, T., Pa´saro, E., Me´ndez, J. 2005. Monitoring of the impact of Prestige oil spill on *Mytilus galloprovincialis* from Galician coast. *Environment International,* 32: 342 – 348.

9- Liyan, Z., Ying, H., & Guangxing, L. 2005. DNA damage to monitor water environment. *Chinese Journal oceanology and limnology,* 23: 340-348(Oceanology and Limnology).

10- Lo´pez-Barea, J., & Pueyo, C. 1998. Mutagen content and metabolic activation of promutagens by molluscs as biomarkers of marine pollution. *Mutation Research,* 399: 3–15.

11-Luczynski, M.L., Gora, M., Bruzzan, P., Wilamowski, G., & Kozik, B. 2005. oxidative metabolism, mutagenic and carcinogenic properties of some polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental biotechonlogy,* 16-28.

12- Verlecar, X.N., Pereira, N., Desai, S.R., & Jena, K.B. 2006. Marine pollution detection through biomarkers in marine bivalves. *Currente Science*, 91: 1153

13- Woźnicki, P., Lewandowska, R., Brzuzan, P., Ziomek, E., & Bardega, R. 2004. the level of DNA damage and the frequency of micronuclei in haemolymph of freshwater mussel *Anodonta woodiana* exposed to benzo[a]pyrene. *Acta Toxicology,* 12: 41-45(Polish Society).

14- Wirgin, I., & Waldman, J.R. 1998. Altered gene expression and genetic damage in North American fish populations. *Mutation Research,* 399: 193–219.

15- Yu, H., Xia, Q., Herreno-Saenz, D., Wu, Y.S., Tang, I.W., & Fu, P.P. 2006. Photoirradiation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons with UVA Light – A Pathway Leading to the Generation of Reactive Oxygen Species, Lipid Peroxidation, and DNA Damage. *Environmental Research and Public Health,* 3(4): 348-354.