بررسی اثر متیل ترشیو بوتیل اتر (MTBE) بر DNA سلول‌های خونی ماهی کلمه دریای خزر (*Rutilus caspicus*) به روش کامت قلیایی در شرایط آزمایشگاهی

سعید محمدزاده باران[1*]، علی ماشینچیان مرادی[1]، عیسی شریف‌پور[2]، شهلا جمیلی[2]، پرگل قوام مصطفوی[1]

۱- گروه منابع طبیعی و محیط زیست، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: smb_6464@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۶/۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۱۰

چکیده

متیل ترشیو بوتیل اتر (MTBE) سبب افزایش میزان اکسیژن سوخت می‌شود و میزان مونواکسید کربن و آلودگی هوا را کاهش می‌دهد. MTBE در خاک بسیار متحرک است و حرکت آن در آب تابع قوانین حرکت آب در خاک است. MTBE مقاومت زیادی به تخریب زیستی دارد و نیمه عمر آن در آب بالاست. جذب آن توسط ذرات خاک ضعیف، دارای حلالیت بالایی در آب و بسیار متحرک است. این تحقیق به منظور بررسی میزان اثر این آلاینده بر روی DNA سلول‌های خونی ماهی کلمه دریای خزر که در معرض غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر MTBE به مدت ۷، ١٤ و ۲۱ روز قرار گرفته بودند انجام شد. میانگین درجه حرارت آب ۱ ± ۱۹، اکسیژن آب ۰/۲ ± ۷/٦ میلی‌گرم در لیتر و شوری صفر در نظر گرفته شد. تعداد ۲۲۰ عدد ماهی کلمه دریای خزر با متوسط طول بدن ۳۰ ± ۱۵۰ میلی‌متر و وزن ۳ ± ۱۵ گرم از کارگاه تکثیر سیجوال واقع در بندر ترکمن در استان گلستان تهیه شد و توسط کیسه‌های حاوی آب (۱/۳) و اکسیژن (۲/۳) به آزمایشگاه منتقل شد. بعد از دوره آداپتاسیون تعداد ۱۳ عدد ماهی در آکواریوم‌های ۵۰ لیتری قرار داده شد که مجموع آکواریوم‌های شاهد ۳ عدد و تعداد آکواریوم های تیمار ۹ عدد بود. در هفته اول، دوم و سوم آزمایش، سه ماهی به صورت تصادفی از هر آکواریوم برداشت و خون ماهیان گرفته شد و پس از انجام مراحل تعیین شده خون ماهیان بر روی لام تثبیت و برای مشاهده با میکروسکوپ فلورسانس لام‌ها در یخچال نگه داری شدند. در این مطالعه برای بررسی میزان تخریب DNA از نرم‌افزار Casp 1.2.3b1 استفاده شد. در این نرم-افزار چند مورد از مشخصات کامت قلیایی به صورت داده استخراج می‌شود. نتایج تحقیق حاضر نشان داد، که اختلاف معنی‌داری بین شاهد و سایر تیمارها از لحاظ میزان تخریب DNA وجود دارد. همچنین با افزایش زمان در معرض قرارگیری، میزان آسیب DNA به طور معناداری افزایش یافته است ($p< ۰/۰۱$).

کلمات کلیدی: متیل ترشیو بوتیل اتر، ماهی کلمه، کامت قلیایی، DNA، سلول‌های خونی.

مقدمه

متیل ترشیو بوتیل اتر (MTBE) معمولاً به عنوان تقویت‌کننده اکتان در افزایش اکسیژن در فرمول بنزین استفاده می‌شود. MTBE افزایش میزان اکسیژن سوخت و منواکسیدکربن و آلودگی هوا را کاهش می-دهد (۱۹). اگرچه با استفاده از MTBE سلامتی جامعه و محیط زیست ارتقا می‌یابد، اما تولید بالای آن در جهان (۲٦ میلیون تن در سال) و کاربرد وسیع آن در ایران (۹۰۰ هزار تن در سال) موجب آزادسازی

مقادیر بسیار زیاد MTBE به محیط می‌شود که می‌تواند اثرهای زیان‌آوری بر سلامتی انسان‌ها و محیط زیست داشته باشد. حد آستانه چشایی و بویایی MTBE به ترتیب ۲/۵ و ۲ میکروگرم برلیتر است، از این رو MTBE در غلظت‌های بسیار پایین هم مصرف آب شرب را از نظر احساسی نامطلوب می‌سازد. سازمان EPA (Environmental Protection Agency) حد مجاز توصیه‌ای ۲۰ تا ٤٠ میکروگرم بر لیتر را بر مبنای حدود آستانه بویایی و چشایی MTBE ارایه کرده است. اعتقاد براین است که در این غلظت، بو و مزه نامطلوب MTBE احساس نخواهد شد و فاصله ایمنی مناسبی از اثرهای سرطان زایی بالقوه MTBE ایجاد خواهد شد (۱۹). آلودگی منابع آبی به MTBE ناشی از نشتی تانک‌های سوخت زیرزمینی، خطوط انتقال، پرشدن مخازن رو زمینی و ریخت و پاش در پمپ بنزین‌ها است. در محیط‌های آبی، از میان انواع مختلف آلودگی‌ها، تولیدات نفتی یکی از مهم‌ترین آلاینده‌ها می‌باشند (۱۵) که حوزه آبی بسته خزر نیز حاوی این آلودگی‌هاست.

ماهی کلمه (*Rutilus caspicus*) از ماهیان با ارزش اقتصادی دریای خزر می باشد که ذخایر آن در سال‌های اخیر به دلایل مختلفی از جمله آلودگی آب‌ها، به شدت کاهش یافته است. به طوریکه این ماهی جزء گونه‌های در معرض تهدید منطقه محسوب می‌شود (۱۰). یکی از مهم‌ترین عوامل موثر بر کاهش ذخایر این ماهیان، آلودگی آب ناشی از آلاینده‌های شیمیایی مختلف است. از آنجایکه شناسایی و حذف عوامل شیمیایی مضر از محیط همواره مدنظر بوده است. در نتیجه دستیابی به روش مناسب و قابل اعتماد شناسایی‌کننده آسیب DNA در موارد مختلف ضرورت دارد. به نظر می‌رسد روش سنجش کامت بسیاری از این شاخصه‌ها را دارا باشد. آزمون کامت روشی سریع، آسان و ارزان است که نیاز به میزان مواد بیولوژیکی کمی برای سنجش دارد. این ویژگی‌ها باعث شده که در طی ده سال گذشته آزمون کامت روشی فراگیر و مورد علاقه دانشمندان واقع شود. آزمون ژل الکتروفورز تک سلول (SCGE) که به آزمون کامت (ستاره دنباله‌دار) نیز معروف است، روشی حساس، ساده و سریع برای اندازه‌گیری DNA در سلول‌های مختلف می‌باشد.

این مطالعه با هدف بررسی اثر متیل ترشیو بوتیل اتر (MTBE) بر DNA سلول‌های خونی ماهی کلمه دریای خزر (*Rutilus caspicus*) به روش کامت قلیایی در شرایط آزمایشگاهی انجام شد.

مواد و روش کار

تعداد ۲۲۰ عدد ماهی کلمه دریای خزر با متوسط طول بدن ۳۰±۱۵۰ میلی‌متر و وزن ۳±۱۵ گرم از کارگاه تکثیر سیجوال واقع در بندر ترکمن در استان گلستان تهیه شد و توسط کیسه‌های حاوی آب (۱/۳) و اکسیژن (۲/۳) به آزمایشگاه دانشگاه اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران منتقل شد. در آزمایشگاه برای آداپتاسیون ماهی‌ها با شرایط محیطی آنها را در آکواریوم به حجم ۱۵۰ لیتر آب و به کمک پمپ اکسیژن به مدت ۱۰ روز برای انجام آزمایش نگهداری شدند. در این مدت از غذای آماده ماهی (بیومار شناور) استفاده شد. بعد از دوره آداپتاسیون تعداد ۱۳ عدد ماهی در آکواریوم های ۵۰ لیتری قرار داده شد که مجموع آکواریوم‌های شاهد ۳ عدد و تعداد آکواریوم‌های تیمار ۹ عدد بود. تمام آکواریوم‌ها بوسیله پمپ اکسیژن هوادهی می‌شد. شوری آب صفر و درجه حرارت آب ۱ ± ۱۹ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. بر اساس آزمون های مقدماتی و نتایج قبلی، غلظت زیر کشنده ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر MTBE در این آزمایش استفاده شد. ماهی‌ها به مدت ۲۱ روز تحت شرایط نیمه استاتیک (۷۰ درصد

آب هر ٤٨ ساعت تعویض و دوباره دوز مورد نظر MTBE جایگزین می‌شد) قرار گرفتند و ماهی های شاهد فقط در معرض آب خالص و تازه قرار می-گرفتند.

نمونه‌برداری: سه عدد ماهی به طور تصادفی از هر آکواریوم گرفته شد. ماهی‌ها داخل تانک کوچکی که عصاره گل میخک ریخته شده بود، قرار داده می‌شد. زمانی که ماهی بیهوش می‌شد، ماهی از تانک برداشته شده و توسط دستمال کاغذی حوله‌ای به طور کامل خشک شده و سپس بوسیله قطع ساقه دمی خونگیری انجام می‌شد. یک قطره از خون ماهی در میکروتیوپ هپارینه ریخته شد. با تکان دادن میکروتیوپ خون و هپارین ترکیب شد.

سپس خون با آگارز low melt ترکیب شد و بر روی لام‌های آغشته به آگارز معمولی منتقل شد (۵، ۲۰). لام‌ها داخل محلول بافر لیز کننده در داخل یخچال به مدت یک ساعت قرار گرفت. سپس داخل بافر خنثی کننده به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت. یک ساعت در دستگاه الکتروفورز داخل یخچال به منظور گسسته شدن پیچش DNA و پس از آن به مدت بیست دقیقه با ولتاژ ۲۵ و جریان ۳۰۰ میلی آمپر الکتریسته برقرار شد. لام‌ها پس از الکتروفورز در محلول خنثی‌کننده قرار گرفت و سپس در الکل اتانول مطلق تثبیت شده و خشک گردید و تا زمان مشاهده با میکروسکوپ فلورسانس در یخچال نگهداری شد (۵، ۱۷).

به منظور ایجاد شفافیت و وضوح و تفکیک سلول‌های خونی، روی هر یک از لام‌ها میزان ۵ میکرولیتر، Jell Red اضافه کردیم (۵).

برای بررسی لام‌های کامت از عدسی ٤٠ میکروسکوپ فلورسانس استفاده شد. به منظور عکس‌برداری از لام‌های کامت از دوربین SONY با زوم 7.7 مگاپیکسل استفاده شد.

آنالیز آماری: نرمال بودن داده‌ها و همگنی واریانس به ترتیب با استفاده از آزمون‌های کولموگروف-اسمیرنوف (Kolmogrov-smirnov) و Levene سنجش شد. سپس داده‌هایی که از الگوی نرمال بودن پیروی می‌کردند از روش پارامتریک و داده‌هایی که از الگوی نرمال نبودن پیروی می‌کردند از روش ناپارامتریک در نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ مورد آنالیز آماری قرار گرفتند.

مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از روش آزمون اندازه‌های تکراری (Repeated measures) انجام شد. همبستگی پیرسون و اسپیرمن بین داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ محاسبه و نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندارد بیان می‌شوند. نماد (X) نشان‌دهنده درجه آزادی می‌باشد. نمودارها توسط نرم افزار Microsoft Excel 2013 رسم شدند.

برای بررسی تغییرات کامت قلیایی و میزان تخریب DNA از نرم‌افزار Casp 1.2.3b1 استفاده شد. عکس-های گرفته شده توسط میکروسکوپ فلورسانس مجهز به دوربین عکاسی انجام شد و با استفاده از نرم افزار فتوشاپ به فرمت TIF تبدیل شد و بعد وارد نرم افزار Casp شد. در این نرم‌افزار چند مورد از مشخصات کامت قلیایی به صورت داده استخراج می-شود.

LHead طول سر کامت، LTail طول دم کامت و LComet طول کل کامت، یعنی مجموع طول سر و دم کامت را مشخص می‌کند. HeadDNA، DNA سر کامت و TailDNA، DNA دم کامت را نشان می‌دهد. TM اختصار عبارت Tail Moment می‌باشد که از حاصلضرب درصد DNA دم کامت و طول دم کامت محاسبه می‌شود. OTM اختصار عبارت Olive Tail Moment می‌باشد که از حاصلضرب درصد DNA سر کامت و فاصله بین مرکز جاذبه DNA در دم و مرکز جاذبه DNA در سر کامت می‌باشد.

نتایج

همانطور که در شکل۱ و جدول ۱ مشاهده می شود با افزایش غلظت MTBE و مدت زمان در معرض قرار گیری ماهی کمه در برابر این آلاینده، میزان درصد طول دم کامت افزایش می یابد، بطوریکه در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر MTBE روز ۷، کمترین و در غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر MTBE روز ۲۱، بیشترین میزان درصد طول دم کامت را نسبت به گروه شاهد مشاهده می کنیم.

همانطور که در شکل ۲ و جدول ۲ مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت MTBE و مدت زمان در معرض قرارگیری ماهی کمه در برابر این آلاینده، میزان DNA دم کامت افزایش می‌یابد بطوریکه در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر MTBE روز ۷، کمترین و در غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر MTBE روز ۲۱، بیشترین میزان DNA دم کامت را نسبت به گروه شاهد مشاهده می-کنیم.

همانطور که در شکل۳ و جدول ۳ مشاهده می شود، با افزایش غلظت MTBE و مدت زمان در معرض قرار گیری ماهی کمه در برابر این آلاینده، میزان DNA سر کامت کاهش می‌یابد، بطوری که در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر MTBE روز ۷، بیشترین و در غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر MTBE روز ۲۱، کمترین میزان DNA سر کامت را نسبت به گروه شاهد مشاهده می‌کنیم.

همانطور که در شکل٤ و جدول ٤ مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت MTBE و مدت زمان در معرض قرارگیری ماهی کمه در برابر این آلاینده، میزان OTM افزایش می‌یابد، بطوریکه در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر MTBE روز ۷، کمترین و در غلظت ۱۵۰ میلی-گرم بر لیتر MTBE روز ۲۱، بیشترین میزان OTM را نسبت به گروه شاهد مشاهده می‌کنیم. به منظور بررسی فرضیه‌های پژوهش ضریب همبستگی بین غلظت MTBE و زمان در معرض‌گذاری با متغیرهای مورد مطالعه محاسبه شده است. بدین منظور از آزمون همبستگی پیرسون استفاده گردید (جدول۵). همانطور که در جدول ۵ مشاهده می شود، نتایج نشان داد که بین غلظت با درصد طول دم کامت و OTM، همچنین بین DNA دم کامت با درصد طول دم و بین OTM با درصد طول دم و DNA دم کامت رابطه بسیار قوی مثبت و معناداری وجود دارد.بین غلظت با DNA دم کامت و بین زمان با درصد طول دم کامت، OTM و DNA دم کامت رابطه متوسط مثبت و معناداری وجود دارد. بین زمان با DNA سر کامت رابطه متوسط منفی و معناداری وجود دارد.

بین غلظت با DNA سر کامت رابطه قوی منفی و معناداری وجود دارد. همچنین نتایج نشان داد که بین DNA سر کامت با درصد طول دم، بین DNA دم کامت با DNA سر کامت رابطه بسیار قوی منفی و معناداری وجود دارد. بین OTM با DNA سر کامت رابطه بسیار قوی منفی و معناداری وجود دارد ($p<۰/۰۱$). به منظور بررسی وجود و یا عدم وجود اختلاف معنادار در پارامترهای مورد مطالعه در زمان-های مختلف پرداخته شده است. بدین منظور از آزمون اندازه‌های تکراری (Repeated measures) استفاده گردید (جدول ٦).

چنانچه در جدول ٦ مشاهده می‌شود، نتایج نشان می-دهد که در مقدار درصد طول دم کامت، مقدار DNA سرکامت، مقدار DNA دم کامت، مقدار OTM در زمان‌های مختلف در غلظت MTBE صفر اختلاف معناداری مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$).

نتایج نشان می‌دهد که در مقدار درصد طول دم کامت، مقدار DNA سرکامت، مقدار DNA دم کامت و مقدار OTM در زمان‌های مختلف در غلظت MTBE ۵۰ اختلاف معناداری مشاهده شد. نتایج نشان می‌دهد که در مقدار درصد طول دم کامت، مقدار DNA

سرکامت، مقدار DNA دم کامت و مقدار OTM در زمان‌های مختلف در غلظت MTBE ۱۰۰ اختلاف معناداری مشاهده شد. نتایج نشان می‌دهد که در مقدار درصد طول دم کامت، مقدار DNA سرکامت، مقدار DNA دم کامت و مقدار OTM در زمان‌های مختلف در غلظت MTBE ۱۵۰ اختلاف معناداری مشاهده شد.

به منظور بررسی وجود و یا عدم وجود اختلاف معنادار بین متغیرهای کامت قلیایی در غلظت‌های مختلف با زمان ثابت پرداخته شده است. بدین منظور از آزمون اندازه‌های تکراری استفاده گردید (جدول ۷). چنانچه در جدول ۷ مشاهده می‌شود مقدار درصد طول دم در غلظت‌های مختلف در هفته اول اختلاف معناداری مشاهده شد ($p<۰/۰۱$).

جدول ۱- میانگین میزان درصد طول دم کامت در سلول‌های خونی ماهی کلمه دریای خزر

غلظت MTBE (mg/L)/ زمان	روز ۷	روز ۱٤	روز ۲۱
۰	۲/۱٤	۲/۹٦	۲/۳۱
۵۰	۲/۹٦	۷/۰٦	۱۲/۲۲
۱۰۰	٤/۰٤	۱۱/۱۹	۱۸/۹۲
۱۵۰	٦/۹٦	۱۸/۰۹	۲۵/۰۵

جدول ۲- میانگین میزان DNA دم کامت در سلول‌های خونی ماهی کلمه دریای خزر

غلظت MTBE (mg/L)/زمان	روز ۷	روز ۱٤	روز ۲۱
۰/۲۳	۰/٤۰	۰/۰۱	۰
۸/۳۸	۲/۰۷	۰/۰۰۱	۵۰
۹/٦٤	۵/۰۳	۰/۸٤	۱۰۰
۱٦/٦۹	۹/۹۱	٤/۲۱	۱۵۰

جدول ۳- میانگین میزان DNA سر کامت در سلول‌های خونی ماهی کلمه دریای خزر

غلظت MTBE (mg/L)/ زمان	روز ۷	روز ۱٤	روز ۲۱
۹۹/۷٦	۹۹/۵۸	۹۹/۹۸	۰
۹۱/۰۸	۹۷/۹۲	۹۹/۹۹	۵۰
۹۰/۳۵	۹٤/۹٦	۹۹/۱۵	۱۰۰
۸۳/۳۰	۹۰/۰۸	۹۵/۷۸	۱۵۰

جدول ٤- میانگین میزان OTM کامت در سلول‌های خونی ماهی کلمه دریای خزر

غلظت MTBE (mg/L)/ زمان	روز ٧	روز ١٤	روز ٢١
٠/٢٠	٠/٢١	٠/٠٠٥	٠
٥/٣٥	١/٤٣	٠/٠٠١	٥٠
٦/٧٤	٣/٦٩	٠/٤٣	١٠٠
١١/٣٩	٧/٩٨	٣/٦٦	١٥٠

جدول ٥- همبستگی پیرسون میان غلظت و زمان با متغیرهای کامت

متغیرها	١	٢	٣	٤	٥	٦
غلظت	١					
زمان	٠/٠٠١	١				
درصد طول دم	٠/٦٩**	٠/٥٧**	١			
DNA سر	-٠/٥٧**	-٠/٥٠**	-٠/٨٤**	١		
DNA دم	٠/٥٨**	٠/٥٠**	٠/٨٥**	-٠/٩٩**	١	
OTM	٠/٦٠**	٠/٤٤**	٠/٨٠**	-٠/٨٨**	٠/٨٨**	١

** نشان دهنده‌ی تفاوت معنی دار در سطح $p<$٠/٠١ است و در بقیه موارد تفاوت‌ها معنی‌دار نبوده است.

جدول ٦- مقایسه میزان متغیرهای کامت در زمان‌های مختلف با غلظت ثابت

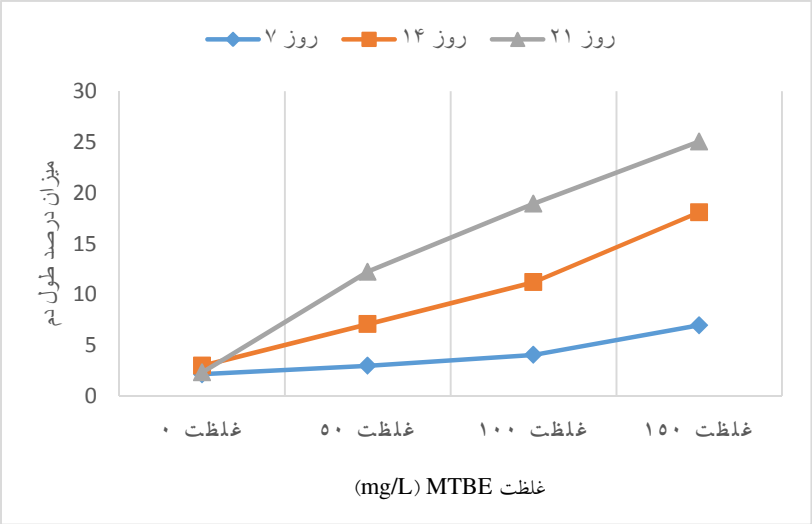
متغیرها/غلظت MTBE (mg/L)	٠	٥٠	١٠٠	١٥٠
درصد طول دم	٢/٤٧ ±٠/١	٧/٤١ ±٠/٢٨ **	١١/٣٩ ±٠/٤٣ **	**١٦/٧٠ ±٠/٣٥
DNA سرکامت	٩٩/٧٧ ±٠/١٣	٩٦/٣٣ ±٠/٥٦ **	٩٤/٨٢ ±٠/٧٦ *	**٨٩/٧٢ ±٠/٨٦
DNA دم کامت	٠/٢١ ±٠/١٣	٣/٤٧ ±٠/٤٢ **	٥/١٧ ±٠/٧٦ *	**١٠/٢٧ ±٠/٨٦
OTM	٠/١٤ ±٠/٠٨	٢/٢٦ ±٠/٢٧ **	٣/٦٢ ±٠/٦٢ **	*٧/٦٨ ±٠/٩٨

** نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی دار در سطح $p<$٠/٠١ و * تفاوت معنی‌دار در سطح p <٠/٠٥ و در بقیه موارد تفاوت‌ها معنی‌دار نبوده است.

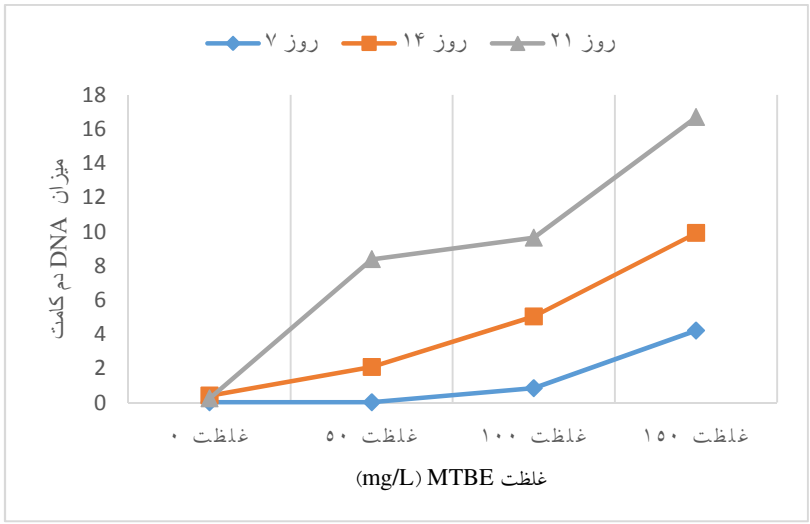
جدول ٧- جدول مقایسه میزان متغیرهای کامت در غلظت های مختلف با زمان ثابت

متغیر/زمان (روز)	٧	١٤	٢١
درصد طول دم	**٤/٠٣ ±٠/١٣	**٩/٨٣ ±٠/٢٠	**١٤/٦٣ ±٠/٣٦
DNA سرکامت	*٩٨/٧٣ ±٠/٥١	**٩٥/٦٤ ±٠/٤٦	**٩١/١٢ ±١/٠٠
DNA دم کامت	*١/٢٦ ±٠/٥١	**٤/٣٥ ±٠/٤٦	**٨/٧٣ ±٠/٩١
OTM	*١/٠٢ ±٠/٤٤	**٣/٣٣ ±٠/٤٢	**٥/٩٢ ±٠/٥٩

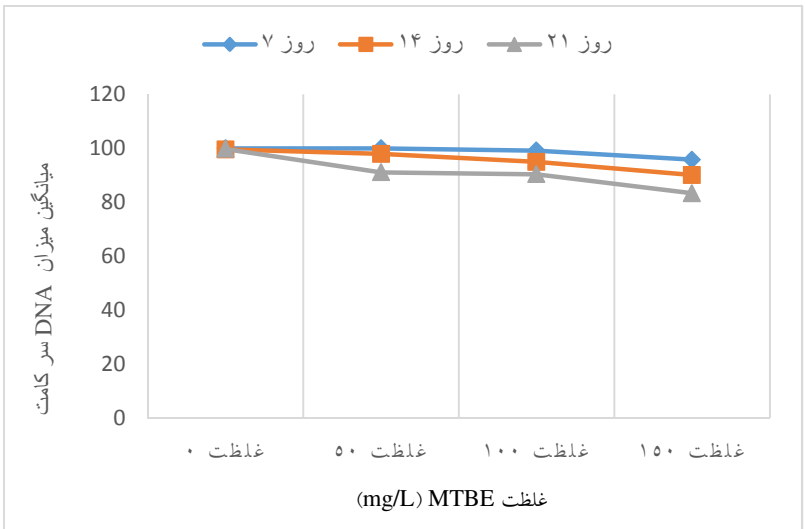
** نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی دار در سطح $p<$٠/٠١ و * تفاوت معنی‌دار در سطح p <٠/٠٥ و در بقیه موارد تفاوت‌ها معنی‌دار نبوده است.



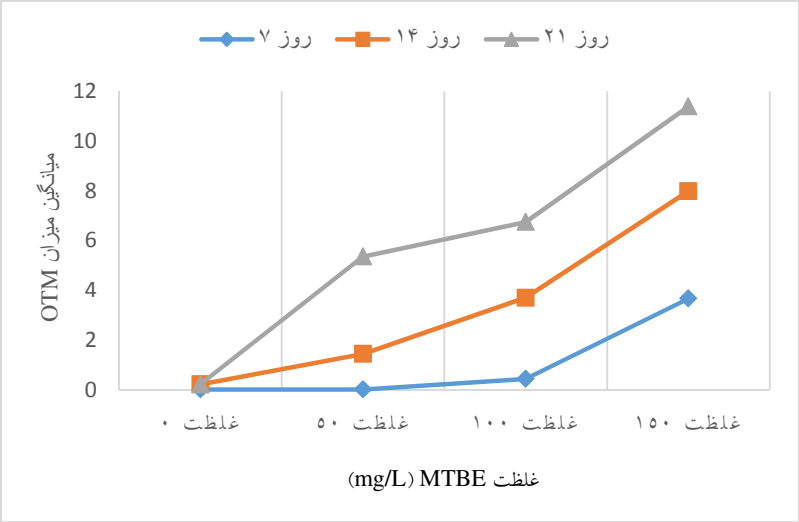
شکل ۱- میانگین میزان درصد طول دم کامت در سلول‌های خونی ماهی کلمه دریای خزر



شکل ۲- میانگین میزان DNA دم کامت در سلول‌های خونی ماهی کلمه دریای خزر



شکل ۳- میانگین میزان DNA سر کامت در سلول‌های خونی ماهی کلمه دریای خزر



شکل ٤- میانگین میزان OTM کامت در سلول‌های خونی ماهی کلمه دریای خزر

بحث

آزمون کامت ابزار مناسبی برای اندازه‌گیری ارتباط بین آسیب DNA موجودات آبزی که در معرض آلاینده-های ژنوتوکسیک قرار می‌گیرند، می‌باشند زیرا شکستن تک رشته DNA می‌تواند یک شاخص خوب برای آلاینده‌های ژنوتوکسیک باشد (١٤) و از این رو می‌تواند در مطالعات سم‌شناسی ژنتیکی و پایش زیستی، برای اندازه‌گیری بین آسیب DNA و آلاینده-هایی که آسیب ژنتیکی در موجودات زنده ایجاد می کنند به طور گسترده، به کار رود (١٢).

شکست تک‌رشته DNA، نوعی آسیب می‌باشد که توانایی ایجاد پیش جهش‌زایی یک ماده را نشان می-دهد، ایجاد شکست تک رشته‌ای DNA با جهش‌زایی و سرطان‌زایی ماده شیمیایی مرتبط است. تخریب DNA در موجودات آبزی می‌تواند منجر به کاهش رشد و نمو، کاهش بقای جنین و بالغین گردد (١٨).

نتایج تحقیق حاضر نشان داد، که اختلاف معنی‌داری بین شاهد و سایر تیمارها از لحاظ میزان تخریب DNA وجود دارد. همچنین با افزایش زمان در معرض قرارگیری، میزان آسیب DNA به طور معناداری افزایش یافته است ($p < ۰/۰۱$).

علی دوست سلیمی (١٣٨٩)، نیز جهت بررسی اثر علف‌کش بوتاکلر در تخریب DNA گلبول قرمز ماهی کپور معمولی، از روش کامت قلیایی استفاده نمود (٣).

نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که علف‌کش بوتاکلر توانایی تخریب DNA گلبول قرمز ماهی کپور معمولی، همچنین نتایج نشان داد که با افزایش سم، میزان آسیب DNA بیشتر می‌شود.

همچنین در تحقیقی مشابه Geng و همکاران در سال ۲۰۱۰ اثر غلظت‌های مختلف بوتاکلر را بر روی DNA گلبول قرمز لارو قورباغه *Rana zhenhaiensis* (٩) و Ateep و همکاران در سال ۲۰۰۵ اثر غلظت-های مختلف بوتاکلر را بر روی DNA گلبول قرمز ماهی *Clarias batrachus* بررسی کردند که در هر دو آزمایش، گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه شاهد به طور معناداری باعث افزایش تخریب DNA شده است (٧) که نتایج این آزمایشات مشابه نتیجه تحقیق حاضر است.

Ali و Kumar در سال ۲۰۰۸ آسیب شناسی ژنتیکی آفت‌کش ارگانوفسفره مونو کروتوفوز را در بافت‌های

مختلف ماهی *Channa punctatus* با استفاده از آزمون کامت قلیایی مورد استفاده قرار دادند (۱۱، ۱٦).
آنها دو غلظت زیر حد کشندگی و غیرکشندگی را برای بررسی میزان تخریب DNA در بافت‌های کلیه، کبد و هموسیت در مدت زمان ۲۱ روز، در نظر گرفتند. نتایج، اختلاف معنی‌داری را بین غلظت‌ها و هم چنین گذشت زمان نشان داد به طوری که بیشترین میزان تخریب DNA در روز چهارم بوده است و بعد از آن میزان تخریب DNA کاهش یافته است. علاوه بر این سلول‌های بافت آبشش نسبت به سایر بافت‌ها حساس‌تر بوده‌اند.
فرخی در سال ۱۳۹۳ در تحقیقی تحت عنوان اثر بررسی امکان تعیین بیومارکر سم مالاتیون در ماهی کلمه دریای خزر (*Rutilus rutilus caspicus*) انجام داد (٤). نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین تیمار شاهد و سایر تیمارها از لحاظ میزان تخریب DNA وجود دارد، همچنین مشخص شد که با افزایش غلظت در معرض قرار گرفتن و همچنین افزایش زمان، میزان آسیب DNA به طور معنی‌داری افزایش یافته است که نتایج حاصل با مطالعه حاضر مطابقت دارد، به این صورت که با افزایش غلظت MTBE و افزایش مدت زمان در معرض قرارگیری ماهی‌های تیمار نسبت به گروه شاهد، میزان آسیب DNA به طور معناداری افزایش یافته است ($p < ۰/۰۱$).
میررحیمی در سال ۱۳۹۳ تعیین اثرات ژنوتوکسیک نانوذره اکسید تیتانیوم در تخریب DNA گلبول قرمز ماهی کلمه (*Rutilus rutilus*) توسط سنجش کامت مورد بررسی قرار داد (٦).
نتایج تحقیقی که با استفاده از نرم‌افزار Open Comet مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت نشان داد که میزان تخریب DNA در گلبول‌های قرمز ماهی کلمه با حضور نانو اکسید تیتانیوم در محیط مرتبط است. افزایش مقدار دنباله در کامت‌ها در تیمار نانواکسید تیتانیوم نسبت به شاهد، دلیلی مستند بر این ادعا خواهد بود. بنابر این نانواکسید تیتانیوم توانایی تخریب DNA را دارد. همچنین از دیگر یافته‌های این تحقیق آن است که با افزایش غلظت و زمان تماس نانواکسید تیتانیوم، مقدار آسیب DNA ماهی کلمه افزایش می‌یابد.
در تحقیق حاضر، نمونه‌های تیمار در حضور MTBE دچار آسیب‌دیدگی DNA شدند و همچنین با توجه با افزایش غلظت و زمان در معرض‌گذاری میزان آسیب و تخریب بیشتر شد.
اسکندری در سال ۱۳۸۸، موضوعی تحت عنوان تاثیر نفت خام در غلظت‌های مختلف بر روی نرم‌تن دوکفه‌ای *Anodonta cygnea* در شرایط آزمایشگاهی برای مشاهده میزان تخریب DNA با استفاده از روش کامت قلیایی را مورد بررسی قرار داد (۱).
نتایج بدست آمده از تاثیر نفت خام در غلظت‌های مختلف، بر دوکفه‌ای *Anodonta cygnea* نشان‌دهنده اثرات سمی و مخرب این ترکیب در ساختار DNA این موجود می‌باشد. در این مطالعه نیز همانگونه که مشاهده شد، MTBE به عنوان یک ماده آلاینده برای محیط زیست و به خصوص محیط زیست آبی شناخته می‌شود چرا که در این آزمایش گروه تیمار در مقایسه با گروه شاهد دچار آسیب و تخریب DNA شده بودند و این روند با افزایش میزان غلظت MTBE و زمان در معرض‌گذاری بیشتر می‌باشد.

نتیجه‌گیری

نتیجه اینکه اگر شرایط آلودگی MTBE ادامه یابد با توجه به شدت آسیب‌های وارده ممکن است منتهی به مرگ و میر گونه‌های تیمار مورد آزمایش شود. در محیط‌های طبیعی نیز وجود این آلاینده در آب در ابعاد وسیع‌تر و غلظت بیشتر چنین خسارات جبران ناپذیری را هم برای بقای همان نسل و هم برای بقای

نسل‌های آینده از موجودات آبزی هم بصورت مستقیم و هم غیرمستقیم رقم خواهد زد، چون این آلاینده هم ممکن است باعث مرگ و میر در ماهیان شود که در این صورت علاوه بر به خطر افتادن بقای گونه مورد نظر، چرخه اکوسیستم دچار مشکل می‌شود (ایجاد اختلال در زنجیره غذایی) و یا ممکن است با ایجاد بیماری و ایجاد جهش و سرطان‌زایی در ماده وراثتی نسل‌های آینده را مورد تهدید و خطر انقراض قرار دهد.

منابع

۱- اسکندری، ص.، ۱۳۸۸. بررسی تاثیر نفت خام بر تخریب ساختار مولکولی زیستی (DNA) با استفاده از روش کامت قلیایی در نرم‌تن دوکفه‌ای *Anadonta sygnea* به عنوان بیواندیکاتور. پایان نامه کارشناسی ارشد زیست دریا- جانوران دریا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران.

۲- شریف‌پور، ع.، ،سلطانی، م.، عبدالحی، ح.، قیومی، ر.، ۱۳۸۱. اثر بیوش‌کنندگی اسانس گل میخک (*Eugenia caryophyllata*) در شرایط مختلف PH و درجه حرارت در بچه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). مجله علمی شیلات ایران، سال یازدهم، شماره ٤، صفحات ٧٤-٥٩.

۳- علی‌دوست سلیمی، م.، ۱۳۹۰. بررسی اثر علف کش بوتاکلر در تخریب DNA گلبول قرمز ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) با استفاده از روش کامت قلیایی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد زیست شناسی دریا-آلودگی دریا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران.

٤- فرخی، ف.، جمیلی، ش.، شهیدی، م. ماسینچیان، ع.، وثوقی، غ. ۱۳۹٤. بررسی تاثیر حشره کش مالاتیون بر بافت و آنزیم‌های کبدی ماهی کلمه دریای خزر (*Rutilus rutilus caspicus*). مجله علمی شیلات ایران. دوره بیست و چهارم، شماره ٤، صفحات ١٢٦-١١٧.

۵- مزدارانی، ح.، ۱۳۸۲. دوزیمتری بیولوزیکی: زیست نشانگرها و روش‌ها. تهران: طب نوین، ٢٦٨ صفحه.

٦- میررحیمی، ه.س.، ۱۳۹٤. تعیین اثرات ژنوتوکسیک نانوذره اکسید تیتانیوم در تخریب DNA گلبول قرمز ماهی کلمه (*Rutilus rutilus*) توسط سنجش گامت. پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته بیولوژی دریا - آلودکی دریا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران.

7- Ateep B., Farah M.A., Ahmad W.و 2005. Detection of DNA damage by alkaline single cell gel electrophoresis in 2, 4-dichlorophenoxyacetic-acid and butachlor-exposed erythrocytes of *Clarias batrachus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 62: 348-354.

8- Genai F.A., Malik M., Nisar Z., 2011. Genoctoxic Effect of Organophosphate pesticide phorate in some exotic fisher of Kashmir. *Journal of American Science*, 7(4): 46-50.

9- Geng B., Lin L., Zhang Q., Zhong B., 2010. Genotoxicity of the Pesticide Dichlorvos and Herbicide Butachlor on *Rana zhenhaiensis* Tadpoles. *Asian Herpetological Research*, 1(2): 118-285.

10- Kiabi B.H., Abdoli A., Naderi M., 1999. Status of the fish fauna in the South Caspian basin of Iran. *Zoology in the Middle East*, 18: 57-65.

11- Kumar S., Ali D., 2008. Long-term genotoxic effect of monocrotophos in different tissues of freshwater fish Channa punctatus (Bloch) using alkaline single cell gel electrophoresis. *Science Total Environment*, 405(1-3): 345-350.

12- Kumar R., Nagpue N.S., Kwshwaha B., Srivastava S.K., Lakra W.S., 2010. Investigation of the Genotoxicity of Malathoin to Freshwater Teleost Fish *Channa punctatus* (Bloch) using the Micronucleus Test and Comet Assay. *Archives of Environment and Contamination Toxicology*, 58: 123-130.

13- Liu W.Y., Wang C.Y., Wang T.S., Fellers G.M., Lai B.C., Kam Y.C., 2011. Impacts of the herbicide butachlor on the Larvae of a paddy field breeding frog (*Fejervarya limnocharis*) in subtropical Taiwan. *Ecotoxicology*, 20: 377-384.

14- Mitchelmore C.L., Birmelin C., Livingstone D.R., Chipman J.K., 1998. Detection of DNA strand breaks in isolated mussel (*Mytilus edulis* L.) digestive gland cells using the comet assay. *Ecotoxicology and Environmentl Safety*, 41: 51-58.

15- Pacheco M., Santos M.A., 2002. Biotransformation, genotoxic and histopathological effects of environmental contaminants in European eel, Anguilla anguilla L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 53: 331-347

16- Pandey S., Nagpure N.S., Kumar R., Shama S.H., Srivastava S.K., Verma M.S., 2006. Genotoxicity evaluation of acute doses of endosulfan to freshwater teleost *Channa punctatus* (Bloch) by alkaline single-cell gel electrophoresis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65(1): 56-61.

17- Pavlica M., Klobucarm G.I.V., Mojas N., Erben R., Papes D., 2001. Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using comet assay. *Mutation Research*, 490: 209-14.

18- Simoniello J.D., Guedes C.L.B., Martinez C.B.R., 2008. Biochemical, Physiological and histological changes in the Neotropical fish Prochilodus lineatus exposed to diesel oil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 69: 112-120

19- US EPA. 1998. MTBE Fact Sheet 1: Overview. EPA 510-F-97-014, US. EPA, Office of Solid Waste and Emergency Response, Washington, DC.

20- Wilson J.T., Pascoe P.L., Parry J.M., Dixon D.R., 1998. Evaluation of the comet assay as a method for the detection of DNA damage in the cells of a marine invertebrate, *Mytilus edulis* L. (Mollusca: Pelecypoda). *Mutation Research*, 399: 87-95.