

مقاله پژوهشی

اثر ژنوتوکسیک کارباریل بر شکستگی DNA در بافت‌های کبد و آبشش گورماهی کویری (*Aphanius kavirensis* (Aphaniidae)) با استفاده از منطق فازی

هادی پورباقر^۱، سهیل ایگدری^{۱*}، پریسا صمدزاده^۲، شیوا ندایی^۳

تاریخ دریافت: تیر ۹۸

تاریخ پذیرش: شهریور ۹۸

چکیده

مصرف بالای سموم کاربامات باعث افزایش نگرانی نسبت به اثرات سمی آن شده است. در این راستا، این مطالعه به منظور بررسی اثر ژنوتوکسیک سم کارباریل بر شکستگی DNA بافت‌های کبد و آبشش گورماهی کویری *Aphanius kavirensis* در شرایط آزمایشگاهی به اجرا درآمد. طول دوره آزمایش ۹ روز با غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر سم کارباریل بود و نمونه‌گیری از آبشش و کبد در روزهای اول، پنجم و نهم صورت گرفت. نتایج نشان داد که درصد شکستگی DNA با افزایش غلظت سم رابطه معنی‌داری نداشت ($P > 0/05$). اما مدت زمان مواجهه بر روی سطح آسیب اثر کاهشی معنی‌داری داشت ($P < 0/05$). روند تغییرات در آسیب DNA در طی زمان در بین دو بافت کاملاً متفاوت بود به نحوی که بیشترین آسیب در بافت آبشش در روز اول و در بافت کبد در روز پنجم مشاهده شد و پس از آن کاهش معنی‌داری در درصد شکستگی DNA در هر دو بافت در روز نهم مشاهده شد که نشان دهنده مکانیسم‌هایی در هر دو ساختار برای ترمیم آسیب وارد شده توسط سم است. در مجموع، بیشترین شکستگی DNA در این گونه در اوایل قرارگیری در معرض آفت کش مشاهده شد که نرخ این شکستگی به مرور زمان ممکن است کمتر یا محو شود.

واژگان کلیدی: شکستگی، کارباریل، ژنوتوکسیک، زمان، بازسازی.

۱- دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

۲- کارشناس ارشد محیط زیست، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

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

* نویسنده مسئول: soheil.eagderi@ut.ac.ir

مقدمه

کبد ماهیان را تحریک می‌کنند، بنابراین این بافت‌ها می‌توانند یک ابزار مفید برای سنجش تاثیرات Xenobioticها (زیست‌بیگانه‌ها) بر اکوسیستم‌های آبی باشند (Bernet et al., 1999). ماهی‌ها می‌توانند به عنوان یک شاخص مناسب آلودگی‌های محیطی و تخمین کیفیت آب مورد استفاده قرار گیرند (Dautremepuits et al., 2004; Flores-Lopes and Thomaz, 2011). زیرا مستقیماً با مواد شیمیایی که به صورت رواناب کشاورزی یا به صورت غیرمستقیم به واسطه استفاده از مواد غذایی در ارتباط قرار می‌گیرند (Ateeq et al., 2002).

شکستگی DNA به عنوان یک شاخص آلودگی محیطی در ماهی و دیگر آبزیان مطالعه شده (Mitchelmore and Chipman, 1998) و توجه زیاد پژوهشگران را به خود جلب کرده است (Benton et al., 2001). وقتی که شکستگی DNA ترمیم نشود، می‌تواند سبب بیماری‌هایی مانند از بین رفتن عملکرد پروتئین‌ها، فعال‌سازی ژن‌های تومورزا (Oncogene Activation)، نقص‌های کروموزومی (Chromosomal Aberrations)

آلودگی آب به واسطه سموم و مواد شیمیایی یکی از مشکلات امروزه اکوسیستم‌های آبی است (Varo et al., 2008)، چرا که این آلاینده‌ها در نهایت به رودخانه، دریاچه، تالاب و دریا وارد می‌شوند و تاثیر منفی بر آبزیان می‌گذارند (Chapman et al., 1998; Hoffman et al., 2003; Suter, 2007). سم کارباریل (L-naphthyl N-methylcarbamate) (سوین، Carbaryl) از جمله حشره‌کش‌های کاربامات (Carbamate) است که به منظور مقابله با حشرات و آفت‌های گیاهی، سبزیجات خانگی، مزارع برنج و تعداد زیادی از درختان میوه استفاده می‌شود و به دلیل سمیت پایین بر روی گیاهان و مهره‌داران، در سال‌های اخیر کاربرد آن به طور چشمگیری افزایش یافته است. این سم قابلیت نفوذ زیادی در آب‌های سطحی و زیرزمینی دارد (Todd and Van Leeuwen, 2002) و همچنین قدرت تاثیر آن بر موجودات غیر هدف زیاد است (Cox, 1993).

ماهیان استخوانی شاخص مناسبی برای آلودگی اکوسیستم‌های آبی هستند، چرا که پاسخ‌های بیوشیمیایی آن‌ها شباهت زیادی با پستانداران دارد (Banaee et al., 2013). سموم و آلاینده‌های شیمیایی آبشش، کلیه و

گورماهی کویری و امکان استفاده از این گونه به عنوان یک شاخص آلودگی محیطی به اجرا درآمد.

مواد و روش‌ها نمونه‌برداری

با توجه به وجود دو شکلی جنسی در این گونه، نمونه‌برداری از ماهیان جنس نر گورماهی کویری (*Aphanius kavirensis*) با حدود میانگین وزن 1 ± 0.3 گرم و طول 4 ± 0.8 سانتی‌متر در فصل تابستان (مردادماه ۱۳۹۲) توسط تور ساچوک از چشمه علی دامغان انجام شد. ماهیان صید شده برای مطالعات بعدی در تانک‌های هوادهی شده به آزمایشگاه شیلات دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران منتقل شدند. ماهی‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه، برای سازگاری به مدت ۱۴ روز در مخازن با هوادهی مناسب نگهداری و با استفاده از دافنی و غذای تجاری (Biomar، فرانسه) تغذیه شدند. آب مخازن به صورت روزانه با آب تازه کلرزدایی شده تعویض می‌شد. پس از پایان دوره سازگاری، ماهی‌ها به صورت تصادفی در ۴ تیمار شامل غلظت‌های صفر (شاهد)، $1/5$ و $1/5$ میلی‌گرم در لیتر سم کاربaryl در آکواریوم‌های ۲۰ لیتری هر کدام با سه تکرار توزیع شدند. هر وان حاوی

و بسیاری از نواقص دیگر که شانس بقای موجود را کاهش می‌دهد (Kurelec, 1993)، شود.

گورماهی کویری *Aphanius kavirensis* یکی از گونه‌های بوم‌زاد خانواده کپورماهیان دندانانی Aphaniidae است. کپورماهیان دندانانی آب شیرین توانایی بالایی در تحمل دامنه وسیعی از شرایط شوری و درجه حرارت را دارند که به آن‌ها اجازه می‌دهد تا به محیط‌های مختلفی از جمله آبگیرهای صحرایی و باتلاق‌های آب شور سازگار شوند (Helfman et al., 2009). این ماهی‌ها در محیط‌های با شوری بالا که گونه‌های دیگری توانایی زیست ندارند، یافت می‌شوند (Al-Daham et al., 1977). در حال حاضر آفت‌کش کاربaryl به صورت گسترده‌ای به منظور از بین بردن برخی آفات کشاورزی در ایران مورد استفاده قرار می‌گیرد (Poorbagher et al., 2016)، با این حال مطالعه‌ها در زمینه بررسی تاثیرات کاربaryl بر گونه‌های غیرهدف به ویژه ماهی‌ها در ایران بسیار اندک است. گورماهی کویری یکی از گونه‌های مقاوم است که مطالعات کمی در زمینه تاثیر آلودگی‌ها و استفاده از آن‌ها به عنوان شاخص آلودگی صورت گرفته است. از این رو، این مطالعه با هدف بررسی اثرات ژنوتوکسیک آفت‌کش کاربaryl بر روی بافت کبد و آبشش

ساعت قرار گرفت. استخراج DNA طبق دستور العمل شرکت سازنده کیت (CinnaPure-DNA، Cat. No. PR881613، سیناژن، ایران) انجام شد. به طور خلاصه، ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه با ۴۰۰ میکرولیتر از محلول لیز کننده ترکیب و با دستگاه ورتکس (پدیده نوژن پارس، ایران) مخلوط شد و به آن محلول رسوب دهنده افزوده شد. سپس نمونه‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری و بعد با دور ۱۲۰۰۰rpm برای ۳ دقیقه سانتریفوژ (پارس تجهیز، ایران) شدند. در ادامه مایع رویی به تیوب دیگر منتقل شد و سپس بافر شستشو به آن‌ها اضافه شد. مجدداً سانتریفوژ در ۱۲۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد، بافر شستشو (کیت سیناژن، ایران) تخلیه شد و میکروتیوب‌ها در حمام آبی قرار داده شدند تا خشک شوند. به ماده خشک شده، بافر حل کننده (کیت سیناژن، ایران) اضافه شد و نمونه‌ها در حمام آب قرار داده شدند تا به طور کامل حل شوند. سپس ۳ دقیقه سانتریفوژ با دور ۱۲۰۰۰rpm انجام شد. DNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱ درصد قرار داده شد و با استفاده از بافر TBE الکتروفورز شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز افقی ژل آگارز

۱۰ عدد ماهی بود و هوادهی در تمامی طول دوره آزمایش ادامه داشت. غلظت سم در هر روز با تعویض آب ۱۰۰ درصد بر اساس مقادیر مورد نظر مجدداً تنظیم می‌شد. غذادهی ماهی‌ها مشابه دوره سازگاری انجام شد. دوره نوری طی آزمایش به صورت ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی در نظر گرفته شد. نمونه‌گیری از ماهی‌ها در روزهای اول، پنجم و نهم انجام شد و در هر بار تعداد ۳ ماهی از هر تیمار برداشت شد.

آماده‌سازی بافت

نمونه‌های بافت‌های کبد و آبشش هر ماهی در الکل ۹۶ درصد تثبیت و در تیوب‌ها قرار داده شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از Prelysis Buffer و ۱۰ میکرولیتر از آنزیم Ributininase به هر تیوب اضافه شد (Jafarian et al., 2011) و نمونه‌ها به مدت ۳ ساعت در درجه حرارت ۵۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا بافت مورد نظر به خوبی هضم شود.

استخراج DNA

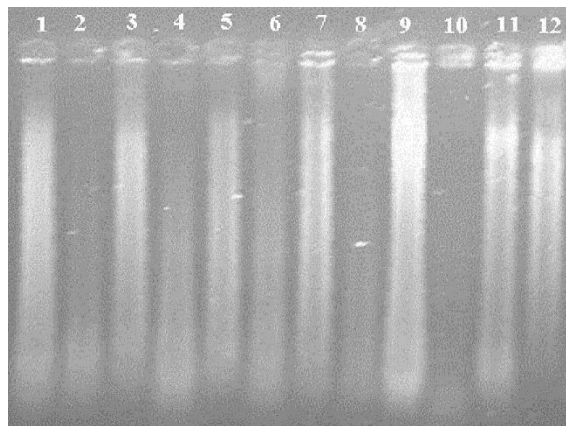
حدوداً ۵۰ میلی‌گرم از هر نمونه با ۱۰۰ میکرولیتر بافر پروتئاز مخلوط و ۵ میکرولیتر پروتئیناز به آن اضافه شد و سپس در حمام آب با دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ تا ۳

بررسی شد و از ژل‌ها با استفاده از سیستم Gel Doc® عکس‌برداری شد (Lee et al., 2012). بعد از عکس‌برداری از ژل‌ها (شکل ۱) منحنی به دست آمده توسط نرم‌افزار ImageJ به سه قسمت تبدیل شد و داده‌های هر نمونه ماهی در یکی از ۲۷ قانون قرار گرفت و میزان شکستگی بر حسب عددی بین ۰ تا ۱ تعیین شد. با ضرب این اعداد در ۱۰۰، مقدار شکستگی بر حسب درصد به دست آمد.

استخراج و تحلیل داده‌ها

گسترش به دست آمده از حرکت DNA بر روی ژل با استفاده از منطق فازی کمی شد (Poorbagher et al., 2016). برای این منظور

تصاویر ژل به نرم‌افزار ImageJ وارد و منحنی تراکم پیکسل آن‌ها به دست آمد. سطح زیر منحنی با استفاده از یک ماکرو به زبان Java به سه قسمت تقسیم شد و مساحت هر قسمت با استفاده از ابزار Wand در نرم‌افزار ImageJ محاسبه شد. هر مساحت کل زیر منحنی تقسیم شد و بدین طریق داده‌ها استانداردسازی شد. مقدار اولیه DNA از هر نمونه در محاسبات تاثیری نداشت. ۲۷ قانون اما- اگر (If-then Rules) تعریف شد، به طوری که هر چه DNA از چاهک دورتر شد، مقدار DNA شکسته شده بیشتر در نظر گرفته شد. سپس داده‌های به دست آمده از استنتاج فازی، فازی‌زدایی شد.



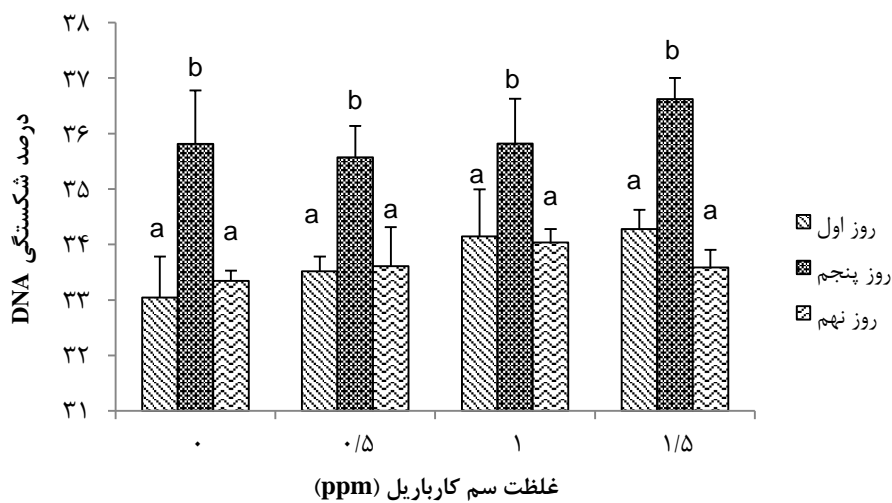
شکل ۱: باندهای به دست آمده از الکتروفورز DNA تیمارها. ۱-۴: به ترتیب غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ آبخش روز اول؛ ۵-۸: به ترتیب غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ آبخش روز پنجم؛ ۹-۱۲: به ترتیب غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ آبخش روز نهم.

میزان شکستگی DNA بافت کبد در همه غلظت‌ها در روز پنجم به طور معنی‌داری بیشتر از روزهای اول و نهم بود. به عبارت دیگر میزان شکستگی DNA از روز پنجم به نهم، کاهش معنی‌داری داشت ($P < 0/05$; شکل ۲). همچنین میزان شکستگی در غلظت ۱/۵ از نظر مقدار بیشتر بود ولی تفاوت معنی‌داری با غلظت‌های دیگر نداشت.

داده‌های فازی‌زدایی شده با استفاده از موم تحلیل واریانس دو طرفه و پس‌آزمون توکی در سطح اطمینان ۹۵ درصد بررسی شدند. این تحلیل با نرم‌افزار SPSS 15 انجام شد.

نتایج

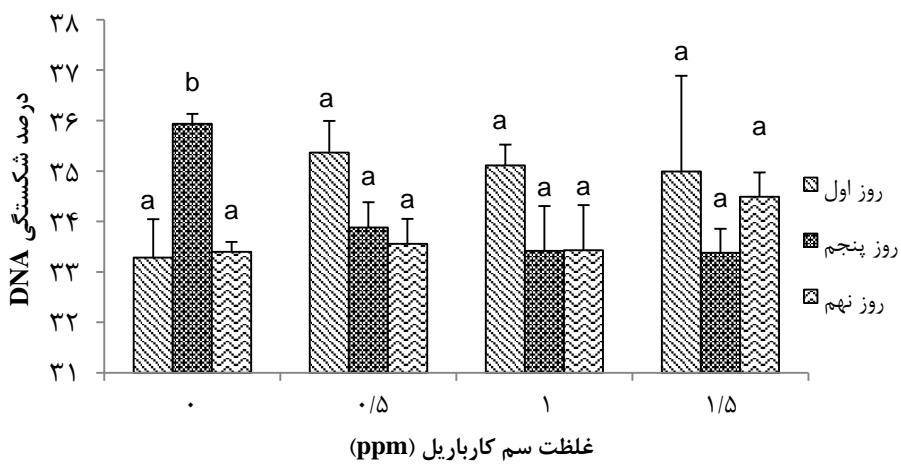
بر اساس نتایج، مدت زمان مواجهه با سم اثرات متفاوتی بر میزان درصد شکستگی DNA در هر یک از بافت‌های کبد و آبشش داشت.



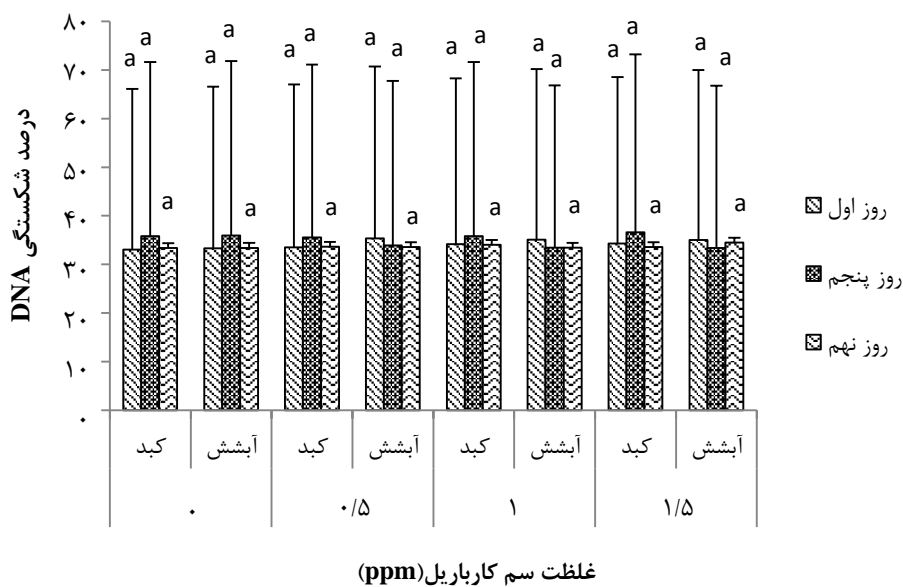
شکل ۲: تغییرات میزان شکستگی DNA در غلظت‌های مختلف سم کاربایل طی زمان در بافت کبد گورماهی کویبری (میانگین \pm خطای استاندارد). حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در هر تیمار است ($P < 0/05$).

طبق نتایج، غلظت سم بر روی سطح آسیب DNA در بافت آبشش بین تیمارهای مختلف غلظت سم معنی‌دار نبود. بیشترین آسیب DNA در سلول‌های این بافت در روز اول مشاهده شد و پس از آن کاهش معنی‌داری به ترتیب در روزهای پنجم و نهم داشت، به طوری که کمترین آسیب مربوط به روز نهم بود (شکل ۳).

بیشترین میزان شکستگی DNA در بافت کبد در روز پنجم و در بافت آبشش در روز اول مشاهده شد. نتایج همچنین نشان داد که اثر غلظت سم بر روی میزان شکستگی DNA در بین دو بافت معنی‌دار نبود ($P < 0.05$)، به عبارت دیگر میزان آسیب DNA در غلظت‌ها و زمان‌های ذکر شده بین دو بافت مشابه بود (شکل ۴).



شکل ۳: تغییرات میزان شکستگی DNA در غلظت‌های مختلف سم کارباریل طی زمان در بافت آبشش گورماهی کوبیری (میانگین \pm خطای استاندارد). حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در هر تیمار است ($P < 0.05$).



شکل ۴: مقایسه اثر زمان بر روی میزان شکستگی DNA در دو بافت کبد و آبشش گورماهی کوبیری (میانگین \pm خطای استاندارد). حروف مشابه نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار است ($P > 0.05$).

بحث

این تفاوت‌ها می‌تواند به تفاوت در ظرفیت بافت در تجمع مواد شیمیایی مرتبط باشد، به طور مثال کبد مقدار زیادی از مواد شیمیایی را در خود ذخیره می‌کند و در نتیجه در زمان مواجهه با سموم آسیب بیشتری در بافت آن مشاهده می‌شود. Nwani و همکاران (۲۰۱۰) بیان داشتند که تفاوت در سطح آسیب DNA بین بافت‌های ماهی سرماری *Channa punctatus* در مواجهه با آفت‌کش کربوسولفان (Carbosulfan) را می‌توان به علت تنوع در تعداد نواحی پایدار بازی که در DNA بافت‌های

اگرچه نتایج این مطالعه نشان داد که میزان آسیب DNA در غلظت‌ها و زمان‌های مورد بررسی بین دو بافت کبد و آبشش تفاوت معنی‌داری نداشت، ولی مقادیر آن در بافت کبد از نظر مقدار بیشتر بود که این یافته مشابه نتایج Ahmed و همکاران (۲۰۱۳) است. به طور کلی تفاوت میان دو بافت در میزان شکستگی DNA را می‌توان مرتبط با توانایی مکانیسم‌های موجود در آن‌ها در فعال ساختن مکانیسم‌های ترمیم و یا دفع سموم شیمیایی در نظر گرفت. همچنین

به عنوان جایگاه مهم برای تجمع مواد در نظر گرفته می‌شود (Yilmaz, 2003). همچنین Laovithayangoon و Aramphongphan (۲۰۰۹) نشان دادند که بیشترین آسیب در بافت کبد، پس از ۹۶ ساعت مواجهه با آلاینده مشاهده شد و میزان آسیب در بافت آبشش در زمان کوتاهتری خود را نشان داد.

نتایج نشان داد که میزان شکستگی DNA در هر دو بافت کبد و آبشش پس از گذشت ۹ روز کاهش یافت. بنابراین احتمالاً سم کارباریل در غلظت‌ها و زمان‌های مورد بررسی باعث ایجاد پاسخ‌های سازگاری می‌شود. به طوری که آسیب ناشی از سم ترمیم شده بود که این مشاهدات مشابه نتایج Henao و همکاران (۲۰۰۵) روی ماهی تیلاپیا (*Oreochromis sp.*) در مواجهه با آفت‌کش سایپرمتترین (Cypermethrin) و دیازینون (Diazinon) است. همچنین در مطالعه‌ای که Sharma و همکاران (۲۰۰۷) بر روی گربه‌ماهی *Mystus vittatus* انجام دادند، بیشترین میزان آسیب DNA در همه بافت‌ها یک روز پس از مواجهه با سم مشاهده شد ولی میزان آسیب تا روز هفتم کاهش یافت. دو پدیده ترمیم شکستگی و از بین رفتن سلول‌هایی که آسیب زیادی به آن‌ها وارد شده است، می‌تواند به مرور زمان باعث کاهش سطح آسیب شوند

مختلف متغیر است و متفاوت بودن سطوح پایه آسیب DNA بین انواع سلول‌ها به علت تنوع در میزان فعالیت سیستم ترمیم برش، فعالیت متابولیک و میزان آنتی‌اکسیدان‌ها مرتبط دانست. مطالعه Guilherme و همکاران (۲۰۱۰) بر روی مارماهی *Anguila anguila* پس از مواجهه با آفت‌کش رانداپ گلی فسفات (Roundup Glyphosate) نیز نشان داد که تفاوت سطح آسیب ژنومی بین بافتی تحت تاثیر عواملی مثل گونه، نوع و غلظت سم و زمان مواجهه است. به علاوه عدم تفاوت معنی‌دار بین دو بافت مورد مطالعه در پژوهش حاضر شاید به این دلیل باشد که اختلاف در بین غلظت‌های مختلف سم آن قدر زیاد نبوده است که بتواند سبب ایجاد پاسخ‌های متفاوت شود.

نتایج همچنین نشان داد که تاثیر زمان در مواجهه با سموم بر روی بافت‌های مختلف متفاوت است، به طوری که بیشترین آسیب در بافت کبد در پنج روز پس از مواجهه و بیشترین آسیب در بافت آبشش یک روز پس از مواجهه با سم مشاهده شد. به نظر می‌رسد آبشش در مقایسه با کبد در زمان کوتاهی پس از مواجهه، غلظت بالاتری از سم را ذخیره می‌کند، ولی کبد در مدت طولانی‌تری پس از مواجهه، مقادیر بالاتری از سم را در خود نگه می‌دارد، زیرا کبد

(Banu et al., 2001). اگرچه مکانیسم ترمیم DNA در ماهی‌ها به اندازه پستانداران مورد مطالعه قرار نگرفته است، ولی رابطه معکوس بین زمان مواجهه و میزان آسیب DNA ممکن است به خاطر مسمومیت با آلاینده‌هایی باشد که می‌توانند در فرآیندهای آنزیمی مرتبط با ایجاد آسیب در DNA، اختلال ایجاد کنند (Rank and Jensen, 2003). دلیل دیگر می‌تواند فعال شدن ژن آنزیم‌های متابولیت‌مانند Cytochrome P450 در بافت‌های مختلف باشد که مکانیسم دفاعی را علیه آلاینده‌های آلی فعال می‌کند (Wong et al., 2001). مطالعه حاضر نشان داد که غلظت‌های مختلف سم کارباریل تاثیر شدیدی بر شکستگی DNA در گورماهی نداشت. به نظر می‌رسد استفاده از این گونه به عنوان اندیکاتور سم کارباریل مناسب نباشد، زیرا مطالعه روی اثر زمان حاکی از ترمیم DNA بود.

منابع

- Ahmed M.K., Kundu G.K., Al-Mamun M.H., Sarkar S.K., Akter M.S. and Khan M.S. 2013.** Chromium (VI) induced acute toxicity and genotoxicity in freshwater stinging catfish, *Heteropneustes fossilis*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 92: 64–70.
- Al-Daham N.K., Sarkar A.L., Bhatti M.N. 1977.** Diel pattern of feeding in *Heteropneustes fossilis* from Southern Iraq. Transactions of the American Fisheries Society, 106: 614–616.
- Aramphongphan A. and Laovithayangoon S. 2009.** Snakehead-fish cell line, SSN-1 (*Ophicephalus striatus*) as a model for cadmium genotoxicity testing. Toxicology in Vitro, 23(5): 963–968.
- Ateeq B., Abdul Farah M., Niamat Ali M. and Ahmad W. 2002.** Induction of micronuclei and erythrocyte alterations in the catfish *Clarias batrachus* by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor. Mutation Research, 518: 135–144.
- Banaee M., Davoodi M.H. and Zoheiri F. 2013.** Histopathological changes induced by paraquat on some tissues of gourami fish (*Trichogaster trichopterus*). Open Veterinary Journal, 3(1): 36–42.
- Banu B.S., Danadevi K., Rahman M.F., Ahuja Y.R. and Kaiser J. 2001.** Genotoxic effect of monocrotophos to sentinel species using the comet assay. Food and Chemical Toxicology, 39: 361–366.
- Benton J.M., Malott M.L., Trybula J., Dean D.M. and Guttman S.H.I. 2001.** Genetic effects of mercury contamination on aquatic snail populations: Allozyme genotypes and DNA strand breakage. Journal of Environmental Toxicology and Chemistry, 21(3): 584–589.
- Bernet D., Schmidt H., Meier W., Burkhardt-Holm P. and Wahli T. 1999.** Histopathology in fish: Proposal for a protocol to assess aquatic pollution. Journal of Fish Disease, 22: 25–34.
- Chapman P.M., Fairbrother A. and Brown D.A. 1998.** Critical evaluation of safety (uncertainty) factors for ecological risk assessment. Environmental Toxicology and Chemistry, 17: 99–108.
- Cox C. 1993.** The problems with Sevin (carbaryl). Journal of Pesticide Reform Archives, 13: 31–36.
- Dautremepuits C., Paris-Palacios S., Betoulle S. and Vernet G. 2004.** Modulation in hepatic and head

- kidney parameters of carp (*Cyprinus carpio*) induced by copper and chitosan. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 137(4): 325–333.
- Flores-Lopes F. and Thomaz A.T. 2011.** Histopathologic alterations observed in fish gills as a tool in environmental monitoring. *Universidade Federal do Rio Grande do Sul*, 71(1): 179–188.
- Guilherme S., Gaivao I., Santos M.A. and Pacheco M. 2010.** European eel (*Anguilla anguilla*) genotoxic and pro-oxidant responses following short-term exposure to Roundup glyphosate-based herbicide. *Mutagenesis*, 25: 523–530.
- Helfman G.S., Collette B.B., Facey D.E. and Bowen B.W. 2009.** *The Diversity of Fishes: Biology, Evolution and Ecology*. John Wiley and Sons, USA. 736P.
- Henao B., Palacio J. and Camargo M. 2005.** Genotoxic evaluation of pesticide cypermethrin and diazinon in red Tilapia (*Oreochromis* sp.). *Actualidades Biológicas*, 27: 405–504.
- Hoffman D.J., Rattner B.A., Burton G.H. and Cairns J. 2003.** *Handbook of Ecotoxicology*. CRC Press, USA. 1290P.
- Jafarian H., Farhadi A., Behzad B.A., Sharifzad H., Emamirad Z. and Aboualizadeh F. 2011.** An efficient method for DNA extraction and purification from formalin-fixed and paraffin-embedded autopsied brain specimens. *Cell Journal (Yakhteh)*, 12 (supplement 1): 88–88.
- Kurelec B. 1993.** The genotoxic disease syndrome. *Marine Environmental Research*, 35: 341–348.
- Lee P.Y., Costumbrado J., Hsu C.Y. and Kim Y.H. 2012.** Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of Visualized Experiments*, (62): 1–5 (e3923).
- Mitchelmore C.L. and Chipman J.K. 1998.** DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 399(2): 135–147.
- Nwani C.D., Lakra W.S., Nagpure N.S., Kumar R., Kushwaha B. and Srivastava S.K. 2010.** Mutagenic and genotoxic effects of carbosulfan in fresh water fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 202–208.
- Poorbagher H., Moghaddam M.N., Eagderi S. and Farahmand H. 2016.** Estimating the DNA strand breakage using a fuzzy inference system and agarose gel

- electrophoresis, a case study with toothed carp *Aphanius sophiae* exposed to cypermethrin. *Ecotoxicology*, 5(25): 1040–1046.
- Rank J. and Jensen K. 2003.** Comet assay on gill cells and hemocytes from the blue mussel *Mytilus edulis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 45(3): 323–329.
- Sharma S., Nagpure N.S., Kumar R., Pandey S., Srivastava S.K., Singh P.J. and Mathur P.K. 2007.** Studies on the genotoxicity of endosulfan in different tissues of fresh water fish *Mystus vittatus* using the comet assay. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 53: 617–623.
- Suter G.W. 2007.** Ecological Risk Assessment. CRC Press, USA. 680P.
- Todd N.E. and Van Leeuwen M.V. 2002.** Effects of Sevin (carbaryl insecticide) on early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 53: 267–272.
- Varo I., Amat F. and Navarro J.C. 2008.** Acute toxicity of dichlorvos to *Aphanius iberus* (Cuvier & Valenciennes, 1846) and its anti-cholinesterase effects on this species. *Journal of Aquatic Toxicology*, 88: 53–61.
- Wong C.K.C., Yeung H.Y., Woo P.S. and Wong M.H. 2001.** Specific expression of cytochrome P4501A1 gene in gill, intestine, and liver of tilapia exposed to coastal sediments. *Aquatic Toxicology*, 54: 69–80.
- Yilmaz A.B. 2003.** Levels of heavy metals (Fe, Cu, Ni, Cr, Pb and Zn) in tissue of *Mugil cephalus* and *Trachurus mediterraneus* from Iskenderun Bay, Turkey. *Environmental Research*, 92: 277–281.



Research Paper

Genotoxic effects of carbaryl on the DNA breakage of the liver and gill tissues in *Aphanius kavirensis* (Aphaniidae) using a fuzzy inference system

Hadi Poorbagher¹, Soheil Eagderi^{1*}, Parisa Samadzadeh², Shiva Nedaei³

Received: July 2019

Accepted: September 2019

Abstract

A high rate of pesticide use has increased the concern regarding the toxic effects of pesticides. In this respect, the genotoxic effects of carbamate in the liver and the gill of *Aphanius kavirensis* have been investigated. The experiment was run for up to nine days. The specimens were exposed to 0, 0.5, 1 and 1.5 mg.L⁻¹ of carbamate and the gill and liver of the specimens were sampled at 1, 3 and 5 days after the start of the experiment. The results showed that the pesticide concentration had no significant effect on DNA breakage ($P>0.05$). But, exposure duration had a significant effect on DNA breakage ($P<0.05$). There were dissimilar trend in DNA breakage of the gill and liver. The highest rate of DNA breakage in the gill was found at day 1 and in the liver at day 5. A decrease in the percentage of DNA breakage was found in two organs after day 9 indicating that there was a mechanism in both organs to recover the damaged DNA. In conclusion, the highest rate of DNA breakage in this species was found in initial stages of exposure to the pesticide and the rate of the breakage may be decreased or disappeared over time.

Key words: *Breakage, Carbaryl, Genotoxicity, Time, Recovery.*

1- Associate Professor in Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

2- M.Sc. in Environmental Science, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

3- M.Sc. in Fisheries, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

*Corresponding Author: soheil.eagderi@ut.ac.ir