تقييم السمية الجينية لنوعين من أسماك الأبراميس النهرية باستخدام فحص المذنب

Genotoxicity Assessment of two River *Abramis* Fish Species Using Comet Assay

د. مسطفي سليم ابورقيبة – كلية العلوم الصحية – جامعة المرقب

الملخص

في هذه الدراسة، تم التحقق من إمكانية استخدام نوعين الأسماك السيبرينية من جنس أبراميس-*Abramis* وهما *A. bjoerkna* و *A. sapa* كمؤشرات حيوية لإمكانية السمية الجينية لمياه نهر سافا (Sava) باستخدام اختبار المذنب (Comet Assay). وينتمي الموقع المختار لتجميع العينات إلى منطقة النشاط الزراعي المكثف، وهو معرض لمياه الصرف الصحي لمدينة أوبرينوفاتش (Obrenovac)، ويقع بالقرب من أكبر محطة للطاقة الحرارية في صربيا "نيكولا تيسلا". تم أخذ العينات في الفترة من يناير إلى أغسطس 2019، بما في ذلك شهر مايو، عندما حدثت فيضانات شديدة في حوض نهر سافا. تشير النتائج التي تم الحصول عليها إلى أنه يمكن استخدام الأنواع التي تم اختبارها لتقييم إمكانات السمية الجينية.

الكلمات المفتاحية: اختبار المذنب، السموم الجينية، نهر سافا، اسماك، السيبرينية، أبراميس.

Abstract

In this study, the possibility of using two Cypriot bream *Abramis* species (*A. bjoerkna* and *A. sapa*) as bioindicators of the genotoxic potential of Sava River water was investigated using the Comet Assay. The site chosen for sample collection belongs to the area of intense agricultural activity, is a wastewater exposure of the city of Obrenovac, and is located near the largest thermal power plant in Serbia “Nikola Tesla”. Samples were taken from January to August 2019, including May, when severe flooding occurred in the Sava River basin. The results obtained indicate that the tested species can be used to evaluate their genotoxic potential.

Keywords: Comet assay, Genotoxicology, Sava River, Fishes, Cypriot bream, *Abramis*.

المقدمة

تساهم المركبات الكيميائية التي تنشأ من مصادر مختلفة بشكل كبير في تلوث عمود الماء والرواسب في الأنهار (Vargas et al., 2001). العديد من هذه المواد تمتلك خصائص سمية جينية، مما يؤدي إلى تكوين آفات في جزيء الحمض النووي (Theodorakis, 2001)، ونظرًا لسميتها المحتملة وسميتها الجينية وقدرتها على التراكم في الكائنات الحية، لذا تحظى المعادن الثقيلة باهتمام كبير (Višnjić-Jeftić et al., 2010; Sunjog et al., 2012). يمكن أن يؤدي تعرض الأسماك لفترات طويلة لمستويات شبه مميتة من المعادن النزرة إلى اضطرابات في تنظيم الأيونات، وانخفاض سرعة السباحة، وإعاقة النمو (Bervoets and Blust, 2003). تنتشر الأنواع التي تنتمي إلى جنس أبراميس (*Abramis*) مثل *A. bjoerkna* و *A. sapa*، على نطاق واسع في النظم البيئية بالمياه العذبة في جميع أنحاء أوروبا وآسيا (Galaris and Evangelou, 2002) وترتبط هذه الأسماك السيبرينية، وتحديدًا أنواع جنس أبراميس "عائلة أسماك المياه العذبة التي تشمل أنواعًا مثل الكارب، والبنوس، والأشواك" ارتباطًا وثيقًا بالرواسب السطحية نظرًا لنمط حياتها القاعي (Breukelaar et al., 1994). تساهم أحداث الفيضانات في 40% من الكوارث الطبيعية في جميع أنحاء العالم، مما يؤثر على العديد من البلدان. وبما أن الرواسب تعمل كمستودع لمختلف الملوثات (Yang et al., 2008)، فمن المعتقد أن إعادة تحرك وإثارة الرواسب أثناء الفيضانات تؤدي إلى إدخال الملوثات إلى عمود الماء "المياه المفتوحة بعيداً عن القاع"، وبالتالي زيادة توافرها للكائنات المائية

(Ockenfeld et al., 2005). وبالنظر إلى أن مجموعة من الملوثات قد تمتلك إمكانات السمية الجينية، فإن مقايسة المذنب (Comet assay) أو التحلل الكهربائي للهلام أحادي الخلية (single cell gel electrophoresis-SCGE) هي طريقة سريعة وحساسة لتقييم تلف الحمض النووي في الخلايا الفردية، حيث تم استخدامها على نطاق واسع في دراسات السمية الجينية (Tice et al., 2000). لذا تهدف هذه الدراسة إلى استخدام مقايسة المذنب لتقييم تلف الحمض النووي في خلايا الدم لنوعين من أنواع الأسماك السيبرينية أبراميس من نوعي (*A. bjoerkna* و *A. sapa*) وتقييم مدى ملاءمتها ككائنات ذات مؤشر حيوي. وبالنظر إلى حدوث الفيضانات خلال فترة أخذ العينات (من يناير إلى أغسطس 2019)، تم إجراء تقييم مواز لاحتمالات الفيضانات لفهم التعديل المحتمل لآثار الملوثات الموجودة بالفعل في البيئة على أسماك المياه العذبة المفتوحة.

المواد والطرق

تم جمع العينات المدروسة كل شهر، امتدت من يناير إلى أغسطس من عام 2019 وتجدر الإشارة إلى أن أخذ العينات لم يتم في شهر أبريل بسبب الظروف البيئية غير المناسبة. وكان الموقع المختار لأخذ العينات هو دوبوكو (Duboko)، الذي يقع على بعد حوالي 23 كيلومترًا من وسط مدينة بلغراد. تم اختيار هذا الموقع تحديدًا نظرًا لتعرضه لملوثات مختلفة، مثل النشاط الزراعي المكثف ومياه الصرف الصحي غير المعالجة القادمة من مدينة أوبرينوفاتش (Obrenovac). علاوة على ذلك، أن أكبر محطة للطاقة الحرارية في صربيا، والمعروفة باسم "نيكولا تيسلا- Nikola Tesla"، بالإضافة إلى حقول الرماد المرتبطة بها والتي تقع على بعد بضعة كيلومترات فقط من موقع أخذ العينات.

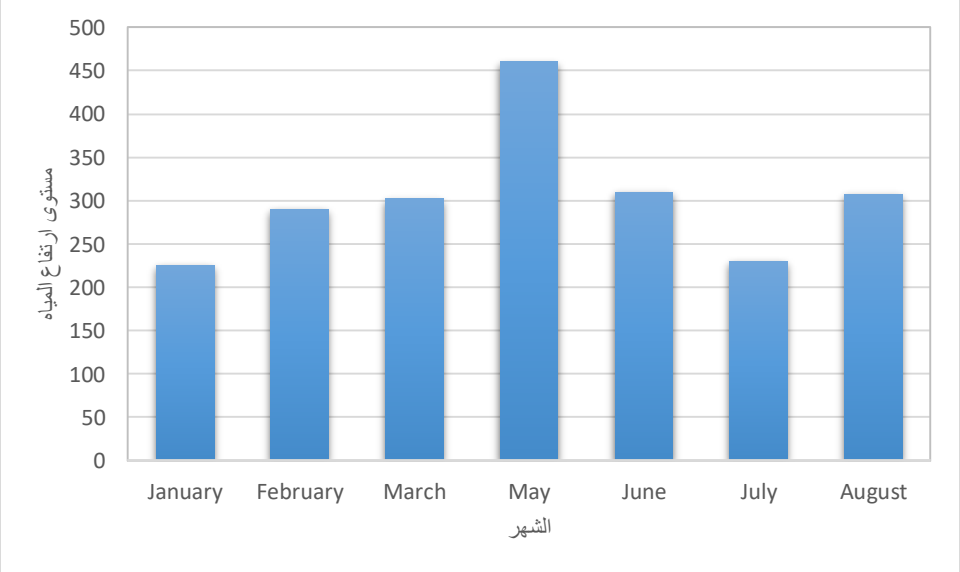
وقد تم قياس المعلمات الفيزيائية والكيميائية مباشرة في الموقع اثناء جمع البيانات. تم الحصول على مستويات المكونات الدقيقة للمعادن، وتحديداً الزنك (Zn) والنحاس (Cu)، والكروم (Cr)، والكادميوم (Cd)، والنيكل (Ni)، والزرنيخ (As)، في صورتها الكلية والمذابة، من وكالة حماية البيئة في صربيا. بالإضافة إلى ذلك، قامت الدراسة أيضًا برصد مؤشرات جودة المياه الميكروبيولوجية للتلوث البرازي (fecal pollution)، وتضمن ذلك تحديد إجمالي القولونيات (Total coliforms TC) والإشريكية القولونية (E-coli EC) باستخدام طريقة الرقم الأكثر احتمالًا (Most Probable Number MPN) باستخدام نظام Colilert 18 من شركة (IDEXX, Ludwigsburg, Germany). وبالمثل، تم تحديد وجود المكورات المعوية (*Enteroocci* EF) باستخدام طريقة MPN مع لوحات العيار الدقيق MUD/SF من شركة (BIORAD, Vienna, Austria) وفقا لطريقة (ISO 7899-1:1998). ولعزل المطثية الحاطمة المفترضة (*Clostridium perfringens* (CP)) تم استخدام طريقة الترشيح الغشائي، تليها الحضانة على وسائط البريتوسولفيت-سيكلوسيرين ((TSC tryptosesulfite-cycloserine (TSC)) كما تم بيانه في (ISO 14189:2013).

تم اجراء التحليل الاحصائي باستخدام برنامج Statistica 6.0 المعترف به على نطاق واسع والذي طورته شركة StatSoft, Inc. من أجل تقييم مدى طبيعية توزيع قيم OTM، تم استخدام اختبار Kolmogorov-Smirnov، وهو اختبار إحصائي قوي، تم استخدامها لتحديد الاختلافات بين العينات والتحكم السلبي المقابل لها (التأقلم-acclimation)، تم استخدام اختبار Man-Whitney U غير البارامترى، وهو مناسب تمامًا للبيانات التي لا تلبي افتراضات الحالة الطبيعية. تم تحديد مستوى الأهمية لهذه الاختبارات عند $P < 0.05$، مما يضمن إجراء تقييم دقيق للنتائج. بالإضافة إلى ذلك، لاستكشاف العلاقات المحتملة بين مستوى تلف الحمض النووي وتركيزات المعادن الثقيلة في الماء، تم استخدام اختبار ارتباط سبيرمان. تم اختيار هذا الاختبار، المعروف بقدرته على التقاط العلاقات غير الخطية، نظرًا لملاءمته لدراسة الارتباطات بين المتغيرات التي قد لا تتبع اتجاهًا خطيًا. مثل الاختبارات السابقة، تم أيضًا تحديد مستوى الأهمية لاختبار ارتباط سبيرمان عند $p<0.05$، مما يضمن إجراء تحقيق قوي لأي روابط محتملة بين المتغيرات محل الاهتمام.

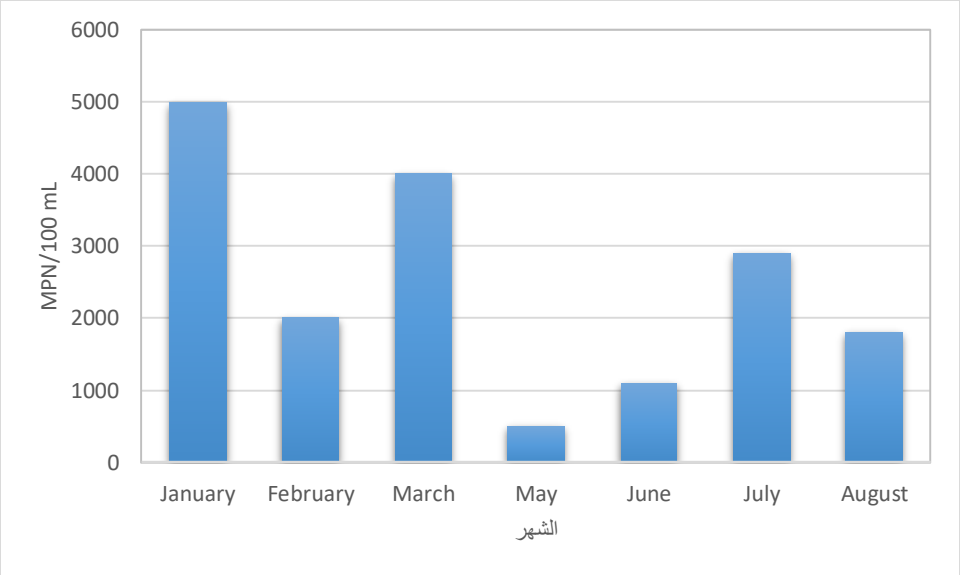
النتائج

أظهرت النتائج ان منسوب المياه وصل الي ذروته في حوض نهر صافا وذلك خلال شهر مايو (الشكل 1). بمجرد حدوث الفيضانات، تم إجلاء غالبية السكان المقيمين في بلدة أوبرينوفاتش (Obrenovac) على الفور لضمان

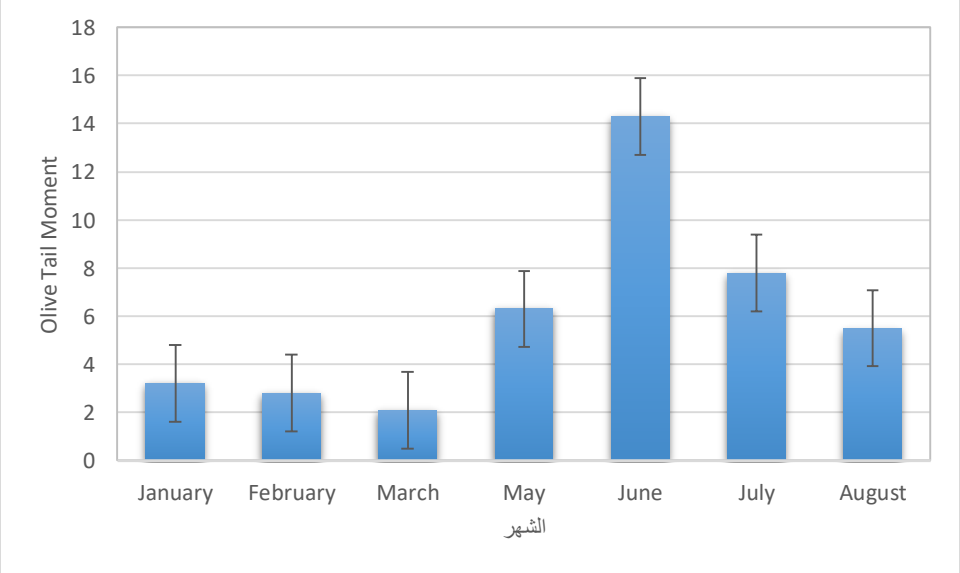
سلامتهم. ومن الجدير بالذكر أن شهري مايو ويونيو كانا حاسمين بشكل خاص من حيث الفيضانات، حيث أظهرا أعلى تراكيز للمعادن الثقيلة مثل النيكل والمنجنيز، والكادميوم، والرصاص، والكوبالت، والزرنيخ والبورون في الماء. من النتائج الجديرة بالملاحظة من هذه الدراسة هو الارتباط الإيجابي العالي الذي لوحظ بين مستوى الماء وتراكيز النيكل (Ni (r = 0.81، والكادميوم (Cd (r = 0.71، والكوبالت (Co (r = 0.65، والمنجنيز (Mn (r = 0.63)، والرصاص (Pb (r=0.61. في الشهر الذي شهد أعلى مستوى للمياه (مايو)، وصلت تركيزات TC إلى ذروتها، بينما خلال شهر مايو ويونيو التالي، كان هناك انخفاض ملحوظ في تركيزات البكتيريا وفق مؤشرات التلوث البرازية (EF, EC, CP) (وفقاً للشكل 2). علاوة على ذلك، لوحظ وجود علاقة سلبية كبيرة بين مستوى المياه وتراكيز المفوضية الأوروبية (r=-0.86). علاوة على ذلك، فيما يتعلق بصلاحية خلايا الدم، فقد وجد أن نطاقها يتراوح من 87% إلى 100%. بالمقارنة مع المستوى الأساسي لتلف الحمض النووي (OTM= 2.2±0.2) الذي تم الحصول عليه بعد 10 أيام من التأقلم، تم توثيق أعلى مستوى من تلف الحمض النووي في شهر يونيو، في حين أظهر شهر مارس أدنى مستوى من تلف الحمض النووي (الشكل 3). ومن الجدير بالذكر أنه لوحظ وجود ارتباط إيجابي كبير بين مستوى تلف الحمض النووي وتركيز الزرنيخ المذاب (r = 0.76)، بالإضافة إلى وجود ارتباط كبير مع إجمالي تركيز الزرنيخ (r= 0.71) على العكس من ذلك، تم ظهور علاقة سلبية بين مستوى تلف الحمض النووي ومستويات تراكيز كل من الزنك (Zn (r= -0.79، والأمونيا (NH^{4+} (r= -0.77، والمكورات المعوية - (EF (r= 0.79)، و المطثية الحاطمة المفترضة (CP (r= -0.79.



الشكل 1. التباين في مستوى ارتفاع المياه خلال فترة أخذ العينات



الشكل 2. التباين في تركيز الإشريكية القولونية خلال فترة أخذ العينات



الشكل 3. التباين في تلف الحمض النووي في خلايا الدم للعينات خلال فترة الدراسة

المناقشة

في هذا المسعى البحثي بالتحديد، كان هدف الدراسة الأساسي هو تقييم وقياس مدى تلف الحمض النووي داخل خلايا الدم ليس فقط لنوع واحد، بل لنوعين متميزين من الأسماك السيبرينية وهما A. bjoerkna و A. sapa.؛ علاوة على ذلك، كان الهدف هو التحقيق في التطبيق المحتمل لهذه الأنواع في سياق رصد السمية الجينية المتعلقة على وجه التحديد بنهر سافا (Sava river). ومن الأهمية بمكان أنه خلال شهر مايو من عام 2019، كانت الظروف الهيدرولوجية التي شهدتها المنطقة كانت غير مواتية بشكل استثنائي، مما أدى في النهاية إلى حدوث فيضانات مؤسفة. كنتيجة مباشرة لهذه الكارثة الطبيعية، اضطرت مدينة أوبرينوفاتش بأكملها إلى الإخلاء، وبالتالي القضاء بشكل فعال على أي تأثير محتمل لمياه الصرف الصحي المنزلية على موقع الدراسة المحدد. ونتيجة لذلك، لوحظ هذا الانخفاض المفاجئ والجذري في مؤشرات تراكيز البكتيريا البرازية والتي تم إثبات انخفاضها من خلال علاقة الارتباط السلبي

الملحوظ الموجود بين مؤشرات تركيز البكتيريا البرازية ومستوى الماء، مما يؤكد بشكل أكبر على صحة وموثوقية النتائج المتحصل عليها.

وعلى العكس من ذلك، شهد تأثير محطة الطاقة الحرارية "نيكولا تيسلا" وما تلاها من انتشار لحقول الرماد زيادة كبيرة. لقد كان من المسلم به على نطاق واسع وراسخ في المجتمع العلمي أن أحداث الفيضانات لها تأثير عميق على حركة الرواسب واضطرابها، مما يؤدي إلى إطلاق العديد من المواد الخطرة الموجودة بالفعل في البيئة المحيطة. وتشمل هذه المواد، على سبيل المثال لا الحصر، المعادن الثقيلة وأشباه الفلزات، كما وثقها (Wölz et al., 2009). ومن الجدير بالذكر أنه عندما وصلت موجة الفيضان إلى ذروتها، والتي تحدث عادة خلال شهري مايو ويونيو، تم الكشف عن أعلى تراكيزلكل من الكادميوم والكوبالت والمنجنيز والرصاص والزرنيخ والبورون. وفي محاولة لمعالجة وجود وسلوك غالبية هذه العناصر بشكل شامل، قام (Kosti et al., 2012) بإجراء دراسة شاملة ركزت على مجال التخلص من الرماد المتطاير لمحطة توليد الكهرباء "نيكولا تيسلا"، وبالتالي يمكن الافتراض بأن العناصر المذكورة قد نزحت وأعيد توزيعها نتيجة حدوث الفيضان، مما أدى إلى ارتفاع تركيزها داخل المسطحات المائية. تم إثبات هذه الفرضية أيضًا من خلال الارتباط الإيجابي الملحوظ بين تركيزات Ni وCd وCo وMn وPb ومستوى الماء. علاوة على ذلك، أظهر مستوى تلف الحمض النووي في خلايا الدم ارتباطًا كبيرًا بتركيز الزرنيخ المذاب في الماء، وارتباطًا مهمًا للغاية مع مستوى الزرنيخ الإجمالي. وفي دراسة منفصلة أجراها (Ramírez and García, 2005) ، أفيد أن التعرض للزرنيخ أدى إلى زيادة في ترددات النوى الصغيرة داخل الخلايا الخيشومية لأسماك الحمار الوحشي (دانيو ريريو-Danio rerio). ومن المثير للاهتمام أنه لوحظ وجود علاقة سلبية ملحوظة بين مستوى تلف الحمض النووي وتركيز الزنك في الماء. هذه النتيجة ليست مفاجئة، حيث أن الأبحاث السابقة التي أجراها (Galaris and Evangelou, 2002) سلطت الضوء على قدرة الزنك على منع وتقليل الإجهاد التأكسدي بشكل فعال. بالإضافة إلى ذلك، فإن الارتباط السلبي بين مؤشرات تراكيز البكتيريا البرازية EF وCP وتركيز NH^{4+} في الماء يعد بمثابة مؤشر مهم على أن التأثيرات السمية الجينية الملحوظة في الأسماك لا ينبغي أن تعزى إلى وجود مياه الصرف الصحي القادمة من مدينة أوبرينوفاتش.

الاستنتاجات

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها من خلال الاختبارات الحقلية للعينات بوضوح إلى أن الأنواع المختلفة التي تنتمي إلى جنس الأسماك السيبرينية من جنس *Abramis* تمتلك القدرة على العمل ككائنات حية قيمة عندما يتعلق الأمر بتقييم إمكانات السمية الجينية من خلال استخدام اختبار المذنب (Comet Assay). علاوة على ذلك، أثبتت نتائج الدراسة إلى بيان التأثير المحتمل للفيضانات على تغيير جودة المياه، نتيجة عملية إعادة حركة وانتشار الملوثات الموجودة بالفعل في البيئة المحيطة (الرواسب) والتي كان لها تأثير مباشر على مستوى تلف الحمض النووي الذي يحدث داخل الكائنات قيد الفحص.

المراجع:

Aborgiba, M., Kostić, J., Kolarević, S., Kračun-Kolarević, M., Elbahi, S., Knežević-Vukčević, J., Lenhardt, M., Paunović, M., Gačić, Z., Vuković-Gačić, B. (2015). Flooding modifies the genotoxic effects of pollution on a worm, a mussel and two fish species from the Sava River. *Science of The Total Environment*, 540, 358-367.

Bervoets, L., Blust, R. (2003). Metal concentrations in water, sediment and gudgeon (Gobio gobio) from a pollution gradient: relationship with fish condition factor. *Environmental Pollution*, 126(1): 9-19.

Breukelaar, A. W., Lammens, E. H., Breteler, J. G. K., Tatrai, I. (1994). Effects of benthivorous bream (Abramis brama) and carp (Cyprinus carpio) on sediment resuspension and concentrations of nutrients and chlorophyll a. *Freshwater Biology*, 32(1): 113-121.

Galaris, D., Evangelou, A. (2002). The role of oxidative stress in mechanisms of metalinduced carcinogenesis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 42(1): 93-103.

Kolarević, S., Knežević-Vukčević, J., Paunović, M., Kračun, M., Vasiljević, B., Tomović, J., Vuković-Gačić, B., Gačić, Z. (2013). Monitoring of DNA damage in haemocytes of freshwater mussel Sinanodonta woodiana sampled from the Velika Morava River in Serbia with the comet assay. *Chemosphere*, 93(2): 243-251.

Kostić, O., Mitrović, M., Knežević, M., Jarić, S., Gajić, G., Đurđević, L., Pavlović, P. (2012). The potential of four woody species for the revegetation of fly ash deposits from the 'Nikola Tesla-a' thermoelectric plant (Obrenovac, Serbia). *Archives of Biological Sciences*, 64(1): 145-158.

Ockenfeld, K., Böhme, M., Knöchel, A., Geller, W. (2005). Displacement of pollutants during the River Elbe Flood in August 2002. *Acta hydrochimica et hydrobiologica*, 33(5): 391-394.

Ramírez, O. A. B., García, F. P. (2005). Genotoxic damage in zebra fish (Danio rerio) by arsenic in waters from Zimapan, Hidalgo, Mexico. *Mutagenesis*, 20(4): 291-295.

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*, 175(1): 184-191.

Squier, M.K., Cohen, J.J. (2001). Standard quantitative assays for apoptosis. *Molecular Biotechnology*, 19: 305-312.

Sunjog, K., Gačić, Z., Kolarević, S., Višnjić-Jeftić, Ž., Jarić, I., Knežević-Vukčević, J., Gačić-Vuković, B., Lenhardt, M. (2012). Heavy metal accumulation and the genotoxicity in barbel (Barbus barbus) as indicators of the Danube River pollution. *The Scientific World Journal*, 2012.

Theodorakis, C. W. (2001). Integration of genotoxic and population genetic endpoints in biomonitoring and risk assessment. *Ecotoxicology*, 10(4): 245-256.

Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, 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*, 35(3): 206-221.

Vargas, V. M. F., Migliavacca, S. B., de Melo, A. C., Horn, R. C., Guidobono, R. R., de Sá Ferreira, I. C. F., Pestana, M. H. D. (2001). Genotoxicity assessment in aquatic environments under the influence of heavy metals and organic contaminants. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 490(2): 141-158.

Višnjić-Jeftić, Ž., Jarić, I., Jovanović, L., Skorić, S., Smederevac-Lalić, M., Nikčević, M., Lenhardt, M. (2010). Heavy metal and trace element accumulation in muscle, liver and gills of the Pontic shad (Alosa immaculata Bennet 1835) from the Danube River (Serbia). *Microchemical Journal*, 95(2): 341-344.

Vuković-Gačić, B., Kolarević, S., Sunjog, K., Tomović, J., Knežević-Vukčević, J., Paunović, M., Gačić, Z. (2014). Comparative study of the genotoxic response of freshwater mussels Unio tumidus and Unio pictorum to environmental stress. *Hydrobiologia*, 735(1): 221-231.

Wölz, J., Cofalla, C., Hudjetz, S., Roger, S., Brinkmann, M., Schmidt, B., Schäffer, A., Kammann, U., Lennartz, G., Hecker, M., Schüttrumpf, H., Hollert, H. (2009). **In** search for the ecological and toxicological relevance of sediment re-mobilisation and transport during flood events. *Journal of Soils and Sediments*, 9(1): 1-5.

Yang, Y., Ligouis, B., Pies, C., Grathwohl, P., Hofmann, T. (2008). Occurrence of coal and coal-derived particle-bound polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in a river floodplain soil. *Environmental Pollution*, 151(1): 121-129.