

Ham Petrolün Suda Çözünebilen Kısımlarının *Poecilia Sphenops*'ta Meydana Getirdiği Genotoksik Etkiler

Özlem ÖNEN^{1,*}, Sema İŞİSAĞ ÜÇÜNCÜ²

¹ Kafkas Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kars

² Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, İzmir

8-11A

Özet: Ham petrol ve türevleri, özellikle hidrokarbonlar başta olmak üzere karmaşık kimyasal karışımlardan oluşmaktadır. Çıkarıldığı kaynağa ve kullanıma göre bileşimindeki maddeler önemli farklılıklar gösterir. Çevreye yayılan zararlı atıkların sucul canlılara ulaşma ve sucul ekosistemi olumsuz etkileme potansiyeli mevcuttur. Ham petrol ve türevleri ile ilgili çok sayıda saçılma ve sızıntı meydana gelmiştir. Bu olaylara tropikal balıkların genotoksik yanıtına ilişkin bilginin yetersiz olması ve deniz balıklarına dair bilginin daha fazla olması göz önünde bulundurularak; bu çalışmada ham petrolün suda çözünebilen kısımlarının tropik bir balık olan *P. sphenops* üzerindeki akut maruziyetiyle [40% (h/h); 24, 48, 72 v 96 sa] meydana gelebilecek genotoksik potansiyelin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Sonuçlar, ham petrolün suda çözünebilen kısımlarına maruz bırakılan balıkların eritrositlerinde genotoksik hasar meydana getirdiğini göstermiştir. Ham petrolün suda çözünebilen kısımlarına akut maruziyet sonucunda, *P.sphenops*'ta mikronukleuslu ve anormal nukleuslu eritrositlerin frekanslarının, negatif kontrol grubundaki (aynı zamanda temiz suya maruz bırakılan balıklar) değerlerle karşılaştırıldığında, anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür. Artan maruziyet süresine paralel olarak, mikronukleuslu ve anormal nukleuslu eritrositlerin sayısı artış göstermiştir. Elde edilen bu sonuçlar, ham petrole akut maruziyetin *P.sphenops*'un eritrositleri üzerinde genotoksik etkisi olduğunu, mikronükleus testinin tamamlayıcı yönü sebebiyle de hem kullanışlı hem de ham petrolün genotoksik etkisinin değerlendirilmesinde faydalı olduğunu göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Ham petrol, Genotoksisite, *Poecilia sphenops*, Nükleus anomalileri, Mikronükleus.

The genotoxic effects caused by water soluble fractions of crude oil in *Poecilia sphenops*

Abstract: Bu çalışmada; Crude oil and derivatives consist of complex chemical mixtures, mainly hydrocarbons. Their composition varies considerably with source and use. Harmful effluents discharged into the environment have the potential to reach waterbodies and disturb aquatic ecosystems. Numerous spills and leakages involving crude oil and its derivatives have recently occurred in the world. Considering the lack of information regarding the genotoxic response of tropical fish to these events and the predominance of information regarding saltwater fish, which offers no genuine comparisons, it was aimed to evaluate the genotoxic potential of water soluble fraction of crude oil (WSF) on the tropical fish *P. sphenops* under acute [40% (v/v); 24, 48, 72 and 96 h] exposure, using the micronucleus test in the present study.

The results indicated genotoxic damage in erythrocytes of the fish exposed to WSF. The relative frequencies of micronucleated and abnormal nucleated erythrocytes for *P. sphenops* exposed to WSF under acute was significantly higher than their respective negative controls (fish exposed to clean water for the same period). In parallel with increased exposure time, the micronucleated and abnormal nucleated erythrocytes were increased in number. Taken these results showed that acute exposure to crude oil produce genotoxic effects on the erythrocytes of *P. sphenops* and that the micronucleus test proved to be both suitable and useful in the evaluation of the genotoxicity of crude oil due to their complementary action.

Keywords: Petroleum, Genotoxicity, *Poecilia sphenops*, Nucleus abnormalities, Micronuclei.

e-mail: onenozlem@gmail.com

Giriş

Yoğun insan aktivitelerinin deniz ve kıyı ekosistemleri üzerinde ciddi tahribat oluşturma riski her geçen gün artmaktadır. Ham petrolün suda çözünebilen kısımları çok uçucu ve toksik özellikler taşıyan hidrokarbonlar içerir. İçerikleri kaynağına ve kullanımına göre büyük ölçüde değişiklik gösterir. Açık deniz platformlarındaki üretim tesislerinden ve özellikle de nakliye süreçlerindeki yayılımlardan kaynaklanan ham petrol kirliliği hem açık denizleri kirletir, hem de önemli yumurtlama ve kuluçkalama alanları olan nehir ağızları ve kıyısız bölgelere ulaşarak buralardaki yaşamı olumsuz etkiler (Ramachandran vd., 2006). Yakın geçmişte Exxon Valdez, Amoco Cadiz tanker kazaları ve Meksika Körfezinde oluşan ve her gün okyanusa binlerce varil ham petrol karışmasına neden olan petrol platformu kazası gibi çok çarpıcı örneklerden da hatırlanacağı üzere, ham petrol kıyısız kesimler için olağanüstü zarar verici olabileceğinin en yakın örnekleridir (McGinn, 1999; Marty vd.,2003; Martı'nez-Go'mez ve ark., 2006-2009-2010; Lavarías ve ark., 2006-2011; Crone ve Tolstoy, 2010; Rodrigues ve ark., 2010; Kakkar ve ark., 2011; Upton, 2011; Goodbody-Gringley vd., 2013; Perhar ve Arhonditsis, 2014).

Bu noktalardan hareketle dişi ve erkek *Poecilia sphenops* (moli) örneklerinde ham

petrolden kaynaklanan sorunların belirlenebilmesi için, mikronukleus test yöntemiyle ham petrolün genotoksik potansiyelinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Materyal and Metot

Bu çalışma Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 2008-49 sayılı onayı ile gerçekleştirilmiştir.

Ticari akvaryumculardan temin edilen kırk adet ergin *P. sphenops* örneği dinlendirilmiş şebeke suyu ile doldurulan onar litrelik cam akvaryumlarda 15 gün boyunca laboratuvar ortamına alıştırmıştır. Onar balıktan oluşan üç deneme grubu (%10, %20 ve %40 konsantrasyonlarda) ile bir kontrol grubuna ayrılmış; deneme grupları 24, 48, 72 ve 96 saat sürelerle ham petrolün suda çözünebilen kısımlarına maruz bırakılmıştır.

Mikronukleus ve morfolojik nukleus anomalilerinin oluşumunu ortaya koyabilmek amacıyla tercih edilen mikronukleus testi için herbir maruziyet süresi sonunda MS 222 uygulanarak uyuşturulan *Poecilia sphenops* (moli) örneklerinin kaudal venlerinden alınan birer damla kan örneğinden üçer adet periferik kan yayma preparatı yapıp üç gün süreyle havada kurumaya bırakılmıştır.

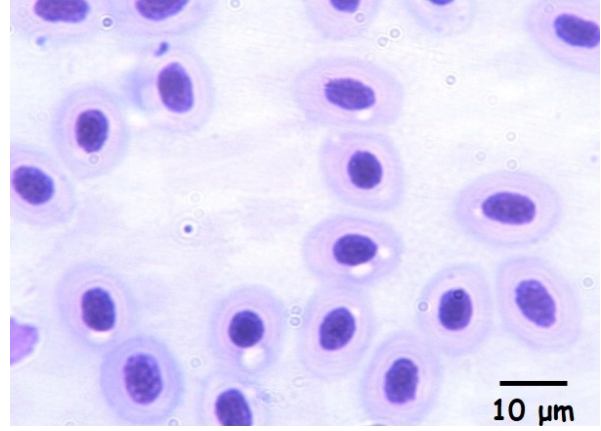
Kurutulan preparatlar metanol ile fiske edilmek üzere yatay bir düzenek üzerine

dizilmiştir. Ardından Wright boyası damlatılarak boyanmış, sonrasında da distile su eklenmiştir. Preparatlar distile su ile yıkandıktan sonra ksilende tutulmuş, kuruduktan sonra entellan ile kapatılıp ışık mikroskopunda incelenerek, eritrositlerde meydana gelen morfolojik değişimler belirlenmiştir. Preparatlar hazırlandıktan sonra sayımların daha kolay yapılabilmesi için her preparat rastgele dört bölgeye ayrılıp, her bölgeden 250 eritrosit hücresi ışık mikroskopunda incelenmiştir. Mikronukleuslu ve morfolojik nukleus düzensizlikleri taşıyan hücrelerin sayım işlemi üç kez tekrarlanmış, her örnekten 3000 hücre, dört farklı deneme süresi (24, 48, 72 ve 96 saat) olduğundan her konsantrasyon için 12.000 hücre sayımı gerçekleştirilmiştir.

Bulgular

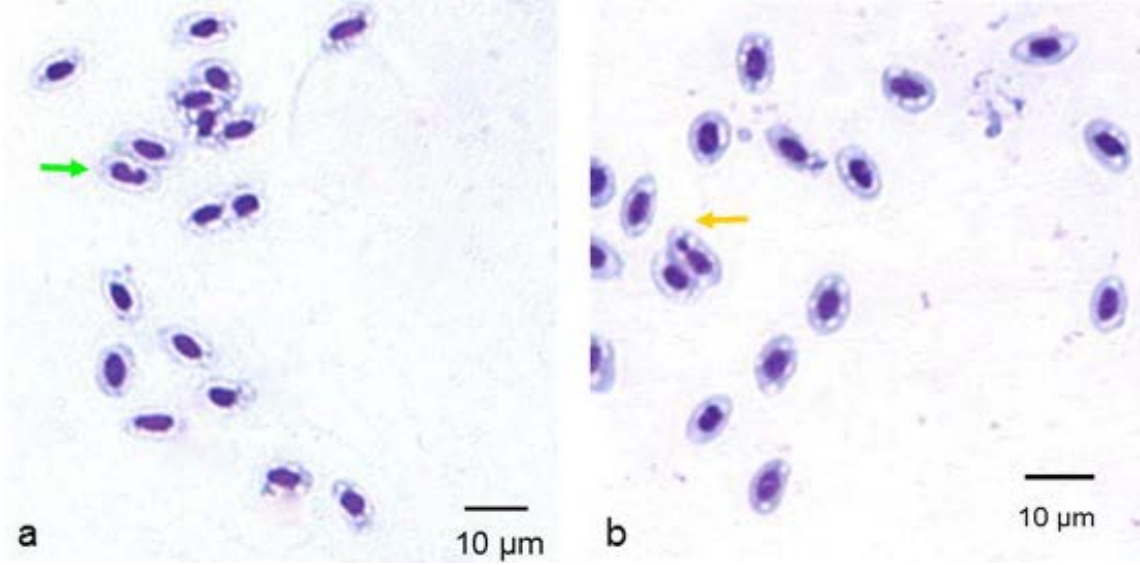
Kontrol grubundan alınan kan örneklerinin ışık mikroskopik incelemelerinde oval formda nukleusa sahip oval eritrositler gözlenmiştir (Şekil 1). Deneme grubundan alınan kan örneklerinin mikroskopik incelemelerinde çeşitli nukleus anomalileri (mikronukleus, çentikli nukleus, tomurcuklu

nukleus, loblu nukleus, binukleus) gözlenmiştir (Şekil 2-4).

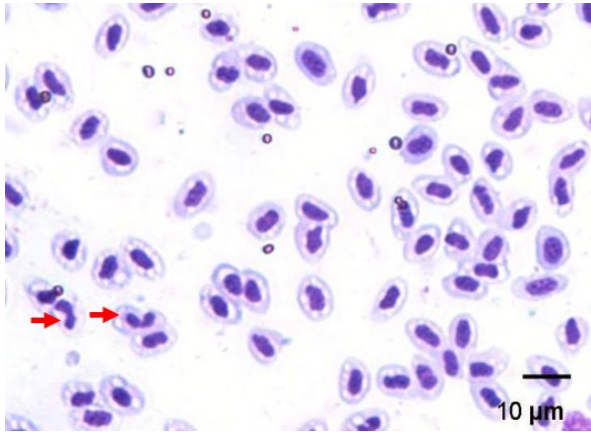


Şekil 1. Kontrol grubu - *P. sphenops*'da periferik eritrositler.

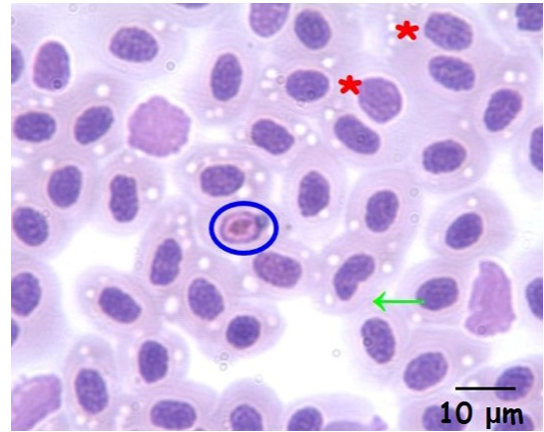
Elde edilen sonuçlar ham petrolün suda çözünebilen kısımlarına maruz bırakılan *P.sphenops*'un eritrositlerinde genotoksik hasar meydana geldiğini göstermiştir. Ham petrolün suda çözünebilen kısımlarına akut maruziyet sonucunda, *P.sphenops*'ta mikronukleuslu ve anormal nukleuslu eritrositlerin frekanslarının, kontrol grubundaki değerlerle karşılaştırıldığında, anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 1-4). Artan maruziyet süresine paralel olarak, mikronukleuslu ve anormal nukleuslu eritrositlerin sayısı artış göstermiştir.



Şekil 2 a, b. Deneme grubu - Periferik eritrositlerinde çentikli (→) ve tomurcuklu nukleus (←) varlığı.



Şekil 3. Deneme grubu - Periferik eritrositlerde loblu nukleus (→) varlığı.



Şekil 4. Deneme grubu – Periferik eritrositlerde binukleus (*) ve çentikli nukleus (←) varlığının yanısıra farklı tonda refle veren nukleus (○) varlığı.

Gözlenen nukleus anomalilerinin (mikronukleus, çentikli nukleus, tomurcuklu nukleus, loblu nukleus, binukleus) sayısal kayıtları yapılmış, bu sayısal değerlerden yola çıkarak verilerin anlamlandırılıp güçlendirilmesi adına PASW Statistics 18 paket programında işlenerek değerlendirme yapılmıştır. Verilerin Shapiro-Wilk Testi ile

normal dağılım gösterdiği görülmüştür ($P>0,05$). Verilerin homojenite (Test of Homogeneity of Variances → $P>0,05$) gösterdiği görülmüştür.

Elde edilen verilerin konsantrasyon grupları arasında nukleus anomalilerinin karşılaştırabilmesi amacıyla Two Way Anova

Testi uygulanmış; Tukey HSD Testi ile konsantrasyon grupları arası ve deneme süreleri arasında ayrı ayrı istatistiki değerlendirme yapılmıştır. Buna göre tüm konsantrasyonlar arası farkların anlamlı olduğu görülmüş ($P \leq 0,05$ olduğundan); yalnızca %10 konsantrasyonluk deneme grubu ile kontrol grubu arasındaki sonuçlar anlamlı bulunmamıştır (Tablo 1). Deneme süresi bağlamında 96 saatlik deneme süresi verileri ile diğer deneme süreleri (24, 48, 72 saat) arasındaki farklar anlamlı bulunmuş, ancak diğer deneme sürelerinin birbirleri arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır (Tablo 2).

Periferik kan incelenmesi halen devam ederken, eritrositlerde mikronukleus varlığının yanısıra morfolojik nukleus düzensizlikleri de gözlenmiştir.

Tartışma ve Sonuç

Mikronukleus testi terimi, ilk kez 1970'li yıllarda Boller ve Schmidt ile Heddle tarafından önerilmiştir. Genotoksik etkiyi belirlemede en çok kullanılan yöntemlerden biridir. Bazı kromozom anomalilerinin tespit edilmesinin zor olduğu diğer metodlara göre daha uygun olması, daha çok sayıda hücrenin incelenebilmesi ve istatistiksel olarak daha anlamlı sonuçlar elde edilmesi gibi avantajlar sağlaması nedeniyle, hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak farklı ajanların mutajenik etkilerini değerlendirmek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (Katalay ve Parlak, 2004; Güner ve Muranlı, 2011; Özkan vd., 2009-2011).

Tablo 1. Two Way Anova Testi ile konsantrasyonlar arası istatistiksel değerlendirme

Multiple Comparisons							
ANM_SYS Tukey HSD							
(I) KON	(J) KON	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
					Lower Bound	Upper Bound	
-	%40	%20	7,75*	1,626	,005	2,68	12,82
		%10	15,00*	1,626	,000	9,93	20,07
		kontrol	20,00*	1,626	,000	14,93	25,07
	%20	%40	-7,75*	1,626	,005	-12,82	-2,68
		%10	7,25*	1,626	,007	2,18	12,32
		kontrol	12,25*	1,626	,000	7,18	17,32
	%10	%40	-15,00*	1,626	,000	-20,07	-9,93
		%20	-7,25*	1,626	,007	-12,32	-2,18
		kontrol	5,00	1,626	,054	-,07	10,07
kontrol	%40	-20,00*	1,626	,000	-25,07	-14,93	
	%20	-12,25*	1,626	,000	-17,32	-7,18	
	%10	-5,00	1,626	,054	-10,07	,07	

Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = 5,285.

*. The mean difference is significant at the ,05 level.

Tablo 2. Two Way Anova Testi ile deneme süreleri arası istatistiksel değerlendirme

Multiple Comparisons							
ANM_SYS Tukey HSD							
(I) GÜN	(J) GÜN	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
					Lower Bound	Upper Bound	
-	4.GÜN	3.GÜN	5,25*	1,626	,043	,18	10,32
		2.GÜN	6,75*	1,626	,011	1,68	11,82
		1.GÜN	8,75*	1,626	,002	3,68	13,82
	3.GÜN	4.GÜN	-5,25*	1,626	,043	-10,32	-,18
		2.GÜN	1,50	1,626	,794	-3,57	6,57
		1.GÜN	3,50	1,626	,208	-1,57	8,57
	2.GÜN	4.GÜN	-6,75*	1,626	,011	-11,82	-1,68
		3.GÜN	-1,50	1,626	,794	-6,57	3,57
		1.GÜN	2,00	1,626	,625	-3,07	7,07
1.GÜN	4.GÜN	-8,75*	1,626	,002	-13,82	-3,68	
	3.GÜN	-3,50	1,626	,208	-8,57	1,57	
	2.GÜN	-2,00	1,626	,625	-7,07	3,07	

Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = 5,285.

*. The mean difference is significant at the ,05 level.

Teleostlar düşük derişimlerdeki genotoksinlere duyarlı olduklarından biyoindikator olarak uygun organizmalardır. Ayrıca, insanlar için potansiyel olarak teratojenik, karsinojenik ve mutajenik bazı maddelerin değerlendirilmesinde, bu toksik ajanlara karşı daha yüksek omurgalılara benzer cevaplar verirler. Mikronukleus yöntemi, balıklar için uygun bir yöntem olması bakımından en çok tercih edilen metodlardan biridir. Mikronukleus testi, balıklarda genellikle kolay elde edilebilen periferik kan eritrositlerinde incelenir. Eritrositlerin yanında, solungaç ve karaciğer hücresi gibi başka hücre tipleri de eritrositlere alternatif olarak kullanılsa da mikronukleus yöntemi için bu dokuların hücrelerinin kullanılması, karaciğer hücrelerinin mitotik indekslerinin düşük olması ve solungaç hücrelerinin de analiz için hazırlanmasının kolay olmaması nedeniyle tercih edilmez (Minisi vd., 1996; Yılayaz, 2006).

Periferik eritrositlerin kullanıldığı çalışmalarda hücre hazırlama ve deney hayvanlarından doku çıkarılması gibi karmaşık işlemler olmadığından ve hematopoyetik dokuların mitotik oranı yüksek olduğundan genotoksik ajanların etkilerine hızlı cevap verdiği için tercih sebebidirler (Campana vd., 1999; Koçak, 2005; Yırtıcı, 2007; Yılayaz, 2008).

Mikronukleus testi, klastojenik aktiviteyi

incelemede oldukça duyarlı ve yararlı bir yöntem olarak kabul edilmesi nedeniyle tercih edilmiştir. Genotoksik ajanların canlılarda, mikronukleus oluşumu yanında, hücrelerin ve çekirdeğin morfolojik özelliklerinde de değişikliklere neden olduğu bilinmektedir (Campana vd., 1999; Demirel ve Zamani, 2002; Parlak, 2007; Çakal Arslan vd., 2009; Galindo ve Moreira, 2009; Sumak, 2009; Ortiz et al. 2011; Kankaya vd., 2012).

Mikronukleuslar hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dahil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom fragmanlarından köken alan oluşumlardır. Mikronukleus sayısındaki artış, çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Klastojenler kromozom kırıkları oluşturarak mikronukleus oluşumuna katkıda bulunmaktadır (Şengün vd., 2003).

Günümüzde, hızlı endüstrileşmeye bağlı olarak çevresel kirliliğin giderek artmasıyla, canlılar daha fazla fiziksel ve kimyasal ajana maruz kalmakta dolayısıyla güçlü toksik, mutajenik, karsinojenik ve teratojenik faktörlerin olumsuz etkilerini tespit etme ve önlemler alma ihtiyacı kaçınılmaz olmaktadır. Bu nedenle, mikronukleus testi sitogenetik harabiyetin tespitinde, kromozom analizine göre kolay uygulanabilmesi, daha

40 *Ham Petrolün Suda Çözünebilen Kısımlarının...*
fazla sayıda hücre sayılması ve istatistiksel
yönden daha anlamlı sonuçlar elde edilmesi
avantajı sağlamasıyla yaygın kullanım alanı
bulan bir teknik olmuştur (Yavuz, 2005).

Sayısal ve yapısal kromozom
düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak
değerlendirilen bakımından mikronukleus
testi, organizmayı etkileyen çeşitli fiziksel ve
kimyasal ajanların sitogenetik etkilerini
belirlemek için yapılabilecek büyük çaplı
tarama çalışmalarında güvenle kullanılabilir.

Elde edilen bu sonuçlar, ham petrole akut
maruziyetin *P.sphenops*'un eritrositleri
üzerinde genotoksik etkisi olduğunu,

Kaynaklar

Atlı-Şekeroğlu Z, Şekeroğlu V 2011 Genetik Toksikite Testleri. *Tübav Bilim Dergisi*, 4:3, 221-229.

Boller K, Schmid W 1970 Chemische Mutagenese beim Sauger. Das Knochemark des Chinesischen Hamsters als in vivo- Testsystem. Haematologische Befunde nach Behandlung mit Trenimon. *Humangenetik*, 11: 35-54.

Campana MA, Panzeri AM, Moreno VJ, and Dulout, FN 1999 Genotoxic Evaluation of the Pyrethroid Lambdacyhalothrin using the Micronucleus Test in Erythrocytes of the Fish *Cheirodon interruptus*. *Mutat Res*, 438(2): 155- 61.

Crone TJ, Tolstoy M 2010 Magnitude of the 2010 Gulf of Mexico Oil Leak. *Science*, 330(6004): 634.

Çakal Arslan Ö, Parlak H, Katalay S, Boyacioglu M, Karaaslan MA, Güner H 2010 Detecting micronuclei frequency in some aquatic organisms for monitoring pollution of Izmir Bay (Western Turkey). *Environ Monit Assess*, 165(1-4): 55-66.

Demirel S, Zamani AG 2002 Mikronukleus tekniği ve kullanım alanları. *Genel Tıp Derg*, 12(3): 123-127.

mikronukleus testinin tamamlayıcı yönü sebebiyle de hem kullanışlı hem de ham petrolün genotoksik etkisinin değerlendirilmesinde faydalı olduğunu göstermiştir.

Teşekkür

Ham petrol temini konusunda yardımlarını esirgemeyen Tüpraş A.Ş.'ye, Çalışmamın yapılabilmesi için her türlü olanaklarından faydalanmamı sağlayan Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Zooloji Anabilim Dalı'na teşekkür ederim. Özel olarak bu çalışmada emeği geçen çalışma arkadaşlarımıza çok teşekkür ederiz.

Galindo TP, Moreira LM 2009 Evaluation of genotoxicity using the micronucleus assay and nuclear abnormalities in the tropical sea fish *Bathygobius saporator* (Valenciennes, 1837) (Teleostei, Gobiidae). *Genet Mol Biol* 32(2): 394–398.

Goodbody-Gringley G, Wetzel, DL, Gillon D, Pulster E, Miller A, Ritchie KB 2013 Toxicity of Deepwater Horizon Source Oil and the Chemical Dispersant, Corexit 9500, to Coral Larvae. *Plos One*, 8 (1): e45574.

Gundlach E 2013 Coastal Hazards: Coastal Hazards from Oil Spills. *Coastal Research Library*, 1000: 781-808.

Güner U, Muranlı FDG 2011 Micronucleus Test, Nuclear Abnormalities and Accumulation of Cu and Cd on *Gambusia affinis* (Baird & Girard, 1853). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 11: 615-622.

Heddle JA 1973 A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 18(2): 187-190.

İlhan A 2009 Tamiflu'nun İnsan Periferik Lenfositlerinde In Vitro Genotoksik ve Sitotoksik Etkileri. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 89 s., Adana/Türkiye.

Kakkar PH, Saxena RM, Rathee NS, Joshi M 2011 Water Soluble Fraction of Diesel Fuel Induced Histopathological Alterations in the Liver of *Channa punctatus*. *Toxicol Int*, 18(1): 14-16.

Kankaya E, Arslan ÖÇ, Parlak H, Ünal G 2012 Induction of Micronuclei in *Chalcalburnus tarichi* (Pallas, 1811) Exposed to Sub-Lethal Concentrations of Methyl Parathion. *Fresen Environ Bull*, 21(6): 1417-1421.

Katalay S, Parlak H 2004 Kadmiyum'un *Gobius niger* L., 1758 (Pisces: Gobiidae)'in Eritrosit Yapısı Üzerine Etkileri. E.U. *J Fish Aquat Sci*, 21(1-2): 99 - 102.

Koçak Y 2005 Sitrik Asitin *Tinca tinca* [L., 1758] [Pisces: Cyprinidae] üzerindeki genotoksik etkisinin mikronukleus testi ile belirlenmesi. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara/Türkiye.

Kondera E, Witeska M 2013 Cadmium and copper reduce hematopoietic potential in common carp (*Cyprinus carpio* L.) head kidney. *Fish Physiol Biochem*, 39: 755–764.

Kumar SP 2012 Micronucleus assay: a sensitive indicator for aquatic pollution. *Int J Res in BioSciences*, 1(2): 32-37.

Lavarías S, Pollero RJ, Heras H 2006 Activation of Lipid Catabolism by the Water-Soluble Fraction of Petroleum in the Crustacean *Macrobrachium borellii*. *Aquat Toxicol*, 77: 190-196.

Lavarias S, Heras H, Pedrini N, Tournier H, Ansaldo M 2011 Antioxidant Response and Oxidative Stress Levels in *Macrobrachium borellii*. (Crustacea: Palaemonidae) Exposed to the Water-Soluble Fraction of Petroleum. *Comp Biochem Physiol*, 153(Part C): 415–421.

Marti'nez-Go' mez C, Campillo J, Benedicto J, Ferna'ndez B, Valde's J, Garcı'a I, Sa'nchez F 2006 Monitoring Biomarkers in Fish (*Lepidorhombus boscii* and *Callionymus lyra*) from the Northern Iberian Shelf After the Prestige Oil Spill. *Mar Pollut Bull*, 53: 305-314.

Marti'nez-Go' mez C, Ferna'ndez B, Valde's J, Campillo J, Benedicto J, Sa'nchez F, Vethaak AD 2009 Evaluation of Three-Year Monitoring with Biomarkers in Fish Following the Prestige Oil Spill (N Spain). *Chemosphere*, 74: 613-620.

Marti'nez-Go' mez C, Vethaak AD, Hylland K, Burgeot T, Ko'hler A, Lyons BP, Thain J, Gubbins MJ, Davies IM 2010 A Guide to Toxicity Assessment and Monitoring Effects at Lower Levels of Biological Organization Following Marine Oil Spills in European Waters. *ICES J Mar Sci*, 67(6): 1105-1118.

Marty GD, Hoffmann A, Okihiro MS, Hepler K, Hanes D 2003 Retrospective analysis: bile hydrocarbons and histopathology of demersal rockfish in Prince William Sound, Alaska, after the Exxon Valdez oil spill. *Mar Environ Res*, 56: 569–584.

Mcginn AP (1999): Safeguarding the Health of Oceans. Worldwatch Institute, Edit. Jane A. Peterson. Worldwatch Paper, 145: 87. [<http://www.worldwatch.org/system/files/EWP145.pdf>, Accessed: 05.05.2013].

Minissi S, Ciccotti E, Rizzoni M 1996 Micronucleus Test in Erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, pisces) from Two Natural Environments: A Bioassay for the In situ Detection of Mutagens in Freshwater. *Mutat Res*, 367: 245-251.

Obiakor MO, Okonkwo JC, Nnabude PC, Ezeonyejiaku CD 2012 Eco-genotoxicology: Micronucleus Assay in Fish Erythrocytes as In situ Aquatic Pollution Biomarker: a Review. *J Anim Sci Adv*, 2(1): 123-133

Ortiz GG, Reiter RJ, Zuniga O, Meichiorri D, Sewerynek E, Pabios MI, Oh CS, Garcia JJ, Bitzer-Quintero OK 2000 Genotoxicity of paraquat: induced micronuclei induced in bone marrow and peripheral blood are inhibited by melatonin. *Mutat Res*, 464: 239-245.

Özkan D, Yüzbaşıoğlu D, Ünal F, Yılmaz S, Aksoy H 2009 Evaluation of the cytogenetic damage induced by the organophosphorous insecticide acephate. *Cytotechnology*, 59: 73-80.

Özkan F, Gündüz SG, Berköz M, Özlüer Hunt A 2011 Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, following exposure to sublethal cadmium doses. *Turk J Zool*, 35(4): 585-592.