

## اثر نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم بر تغییرات بافتی آبشنش کپور معمولی نوجوان (*Cyprinus carpio*) در مواجهه با فاز محلول نفت خام

سیده ژینو حسینی<sup>۱</sup>، سعید ضیایی نژاد<sup>۱\*</sup>، سید علی جوهري<sup>۲</sup>، بهزاد نعمت دوست<sup>۱</sup>

۱- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی خاتم الانبیاء (ص)، بهبهان، ایران

۲- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه کردستان، ایران

تاریخ پذیرش: ۶ شهریور ۱۳۹۶

تاریخ دریافت: ۱۱ فروردین ۱۳۹۶

### چکیده

کشور ما یکی از تولید کنندگان بزرگ نفت خام بوده و دارای صنایع بزرگ و گسترهای در زمینه های نفت و پتروشیمی می باشد و در آینده گسترش قابل ملاحظه ای در این صنایع پیش بینی می گردد، درنتیجه امکان آلووده شدن منابع آبی کشور به مواد نفتی به طرق مختلف وجود دارد. این مطالعه باهدف بررسی اثر فتوکاتالیستی نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم جهت تجزیه و کاهش اثر سمیت فاز محلول نفت خام انجام گرفت. بجهه ماهیان با میانگین وزنی ۵۸/۸۹ گرم در ۷ تیمار تحت تأثیر نفت خام و نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم در شرایط تاریکی و فرابنفش قرار داده شدند. در پایان آزمایش، بافت آبشنش به منظور مطالعات آسیب شناسی بافتی مورد ارزیابی قرار گرفت. انواع آسیب های بافتی شامل هایپر تروفی، هایپر پلازی رشته و تیغه ثانویه، چمامقی شدن رأس رشته های ثانویه، فیوزن، آنیوریسم و کوتاه شدن رشته های ثانویه در بافت آبشنش ماهیان مورد مطالعه مشاهده شد. از نظر کمی، به ترتیب بیشترین و کمترین آسیب در بافت آبشنش ماهیان تیمار شده با فاز محلول نفت خام آمده شده در تاریکی و گروه شاهد مشاهده شد. نتایج نشان داد که اگرچه هر سه ترکیب فاز محلول نفت خام، سوسپانسیون نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم و ترکیب فاز محلول نفت خام و سوسپانسیون نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم در آب منجر به افزایش آسیب بافتی در آبشنش کپور معمولی نوجوان می شود، اما در مقادیر برابر، آسیب متأثر از فاز محلول نفت خام آمده شده در تاریکی به مراتب بیشتر بود ( $P<0.05$ ). بر اساس نتایج به دست آمده استفاده از این پژوهش می توان عنوان کرد که فرآیند فتوکاتالیستی نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم و اثر تقویتی پرتوی فرابنفش تا حدودی منجر به کاهش اثرات نامطلوب فاز محلول نفت خام شده است.

**کلمات کلیدی:** فاز محلول نفت خام، دی اکسید تیتانیوم، فتوکاتالیست، آسیب شناسی بافتی، کپور معمولی.

## مقدمه

تابش اشعه UV و در حضور ذرات اکسید فلزی نظری Singh and Singh, ZnO و  $TiO_2$  تجزیه می‌گردند (UV/TiO<sub>2</sub>; Lanouette, 1997). فرآیند UV/TiO<sub>2</sub> یکی از جدیدترین و کاراترین روش‌های تصفیه آلاینده‌ها است. در این فرآیند نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم به طور وسیعی در واکنش‌های فتوکاتالیزی به عنوان کاتالیزور مورد استفاده قرار می‌گیرد. کاهش اندازه ذرات و درنتیجه افزایش سطح ویژه کاتالیزور باعث بهبود فعالیت فتوکاتالیزی آن‌ها می‌شود (Kartikeyan and Navaneetha, 2011). تابش نور UV تأثیر چشمگیری (به عنوان منبع انرژی) در تجزیه نوری واکنش‌دهنده‌ها دارد. فعالیت فتوکاتالیست شدیداً به تابش نور (انرژی در واحد سطح) روی سطح کاتالیست وابسته است. معمولاً اشعه UV با طول موج نزدیک به ۳۷۰-۳۰۰ نانومتر برای تأمین انرژی فرآیند تحریک نوری به کار می‌رود (نبیان و همکاران، ۱۳۸۷). زمانی که نور با انرژی بالا یا پرتو فرابنفش با یک فتوکاتالیست نیمه هادی دی‌اکسید تیتانیوم تماس می‌یابد، سبب تهییج الکترون در اتم‌های تیتانیوم می‌شود. الکترون‌ها بروی سطح فتوکاتالیست پخش شده و با مواد خارجی اطراف خود واکنش می‌دهند که اغلب این الکترون‌ها سبب تشکیل رادیکال‌ها و یون هیدروکسیل OH می‌گردند که قادر به اکسیداسیون مواد شیمیایی آلی در اطراف خود، احیای فلزات، تخریب باکتری‌ها و ویروس‌ها می‌باشند. دی‌اکسید تیتانیوم دارای یک باند ظرفیت پر و یک باند هدایت خالی بوده و بین این دو باند فاصله‌ای خاصی (گاف انرژی) قرار دارد که در صورت تابش نور با طول موج مشخص امکان انتقال الکترون از باند ظرفیت به باند هدایت می‌باشد. در اثر انجام این عمل لایه‌ی ظرفیت، الکترون از دست داده

از میان انواع مختلف آلودگی‌ها، مشتقات نفتی (هیدروکربن‌ها) از مهم‌ترین آلاینده‌های محیط آبی (Pacheco and Santos, 2001) محسوب ساحلی (Connell and Miller, 1981) می‌شوند، که بیشترین تأثیر را بر ماهیان استخوانی دارند (Hose et al., 1996). آبزیان هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی موجود در آب را جذب می‌کنند، درنتیجه اثرات متفاوتی بعد از در معرض قرار گرفتن در برابر این آلودگی‌ها در آن‌ها رخ می‌دهد (Teh et al., 2004). نفت و ترکیبات آن اثرات حادی بر ماهیان داشته و اثرات آن‌ها بر مرحله لاروی و جوانی ماهیان شامل تغییرات مورفولوژیک، هیستوپاتولوژیک و آسیب‌های ژنتیکی گزارش شده است. ذراتی از نفت که بیشترین تأثیر را بر ماهیان استخوانی دارند، هیدروکربن‌های محلول شامل هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی (PAHs) بوده که به خاطر سمیت و پایداری در محیط دارای اهمیت فراوانی می‌باشند (Hose et al., 1996). بررسی‌ها نشان می‌دهند که مواد هیدروکربنی قادرند پس از تغذیه به وسیله موجودات آبزی از دیواره دستگاه گوارش عبور نموده و برای مدت زیادی در آنجا باقی بمانند (Teh et al., 2004).

نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم یکی از رایج‌ترین فتوکاتالیزورها برای از بین بردن آلاینده‌های آلی و غیرآلی در آب است. واژه فتوکاتالیست از دو بخش فتو و کاتالیست تشکیل شده، که فتو معرف نوردهی و کاتالیست بیانگر فرایندی است که سرعت واکنش شیمیایی را برای مواد شرکت کننده، بدون توقف واکنش افزایش می‌دهد (Slamborova et al., 2013). در تجزیه فتوکاتالیزوری، مواد آلوده کننده تحت تأثیر

وسيعى از اين بافت در ارتباط مستقيم با محيط خارجي است بنابراین مورفولوژي آن مفيدترین ابزار در بررسی Schwaiger *et al.*, 1997 (al.) و تغيير در ساختار اين اندام به عنوان اصلی ترين پاسخ در مقابل استرس هاي شيميايي مطرح می باشد.

بررسی های انجام شده نشان داد که تاکنون پژوهشی در رابطه با تأثیر استفاده از نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم به منظور سنجش تجزيء و حذف اثر آلائيندگی مواد نفتی جهت کاهش آسیب های وارد شده به سلامتی آبزیان و تداخل در رشد آنها صورت نگرفته است. لذا در این پژوهش فعالیت فتوکاتالیتيکی نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم جهت از بین بردن تأثيرات آلودگی های نفتی در ماهی کپور معمولی به عنوان یک مدل مهندسی آبزی بررسی شد.

## مواد و روش ها

تعداد ۲۱۰ قطعه ماهی کپور معمولی با ميانگين وزني ۵۸/۸۹ گرم و ميانگين طولي ۱۵/۱۶ سانتي متر در اسفند ماه ۱۳۹۳ از مزرعه‌اي واقع در بهبهان به کارگاه تکثیر و پرورش دانشگاه صنعتی خاتم الانبیاء (ص) بهبهان منتقل شدند. اين ماهیان به مدت دو هفته با شرایط آزمایشگاهی در آب هواده شده شهری سازش داده شدند. پس از اتمام دوره سازگاری، بچه ماهیان به ۷ گروه (با سه تكرار) با تراكم ۱۰ قطعه تقسيم شده و به ۲۱ مخزن ۳۰۰ لитري انتقال داده شدند. در طی مدت زمان آزمایش (از شروع آداپتسیون تا پایان دوره آزمایش) غذاده‌ي به ميزان ۳ درصد بیوماس موجود در هر تانک و با استفاده از جيره غذایي استاندارد ماهی کپور (غذای مرحله رشد کپور CG\_EX، غذای ۲۱

و لایه هدایت دارای الکترون خواهد داشت. اين عمل انتقال در زمان بسيار کوتاهی انجام می گيرد و دوباره الکترون از تراز بالا (باند هدایت) به تراز پایین (باند ظرفیت) برمی گردد. (Linsebigler *et al.*, 1995) زمانی که در معرض فوتونها (معمولًا تابش های UV) قرار می گيرد بعد از جذب انرژي  $h\nu \geq Eg = 3/2 eV$  ذرات باردار الکترونها ( $e^-$ ) در نوار رسانش و حفره ها ( $h^+$ ) جای خالي الکترونها در نوار ظرفیت هستند (Watanabea *et al.*, 1999).

اثر هيدروکربن های نفتی بر ماهیان در شرایط آزمایشگاهی، معمولًا با تعیین مطالعات آسیب شناسی بافتی ماهیان قرار گرفته در معرض آلودگی، يکی از روش های کاربردی و معمول تعیین اثرات آلائيند بروجود زنده می باشد که به درک واکنش های بیولوژیک رخداده کمک می کند Martinez *et al.*, (2004) و يکی از مزایای استفاده از شاخص های آن مطالعه و بررسی اختصاصی اثرات آلائيند بر اندام های هدف خاص مثل آبشنش، کلیه و کبد می باشد که مسئول اعمال حیاتی مثل تنفس، دفع، تجمع و نقل و انتقال ترکیبات ضد حیات (xenobiotic) در ماهی می باشد (Gernhofer *et al.*, 2001) و در اثر مواجهه با آلائيند های محیطی دچار آسیب های حاد و اغلب جرمان تا پذیر می شوند. از بین اندام های حیاتی ماهیان، آبشنش ها اهمیت زیادی در تنفس، تنظیم اسمزی، تعادل اسید-باز و دفع نیتروژن زائد در ماهیان دارند (Simonata *et al.*, 2008). از آنجا که آبشنش ها مهم ترین جایگاه تبادلات یونی بین بدن و محیط به شمار می روند. نقش مهمی در ثابت نگه داشتن ترکیب یونی درون بدن بخصوص در مواجهه با محیط های آلوده دارند (Evans *et al.*, 2005).

کپور معمولی قبل از آزمایش اصلی اندازه‌گیری شد (OECD, 1992). گروه‌های مختلف طی یک دوره ۲۰ روزه به صورت زیر مورد آزمایش قرار گرفتند.

شرکت بیضا) در ۲ نوبت به نسبت مساوی صورت گرفت. در صد غذاده‌ی با توجه به اندازه ماهیان و دمای آب محاسبه شد (Ng *et al.*, 2003)  $LC_{50}^{96h}$ .

جدول ۱: تیمارهای مورد آزمایش

تیمار	نوع آلاینده	مخفف هر تیمار	شرایط آماده‌سازی	غلظت
۱	بدون افزودن آلاینده (گروه شاهد)	Cont	-	$LC_{50}/.10$
۲	سوسپانسیون نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم	TiO <sub>2</sub> /UV	تابش اشعه فرابنفش	$LC_{50}/.10$
۳	سوسپانسیون نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم	TiO <sub>2</sub> /Dark	تاریکی	$LC_{50}/.10$
۴	فاز محلول نفت خام	Oil/UV	تاریکی	$LC_{50}/.10$
۵	فاز محلول نفت خام	Oil/Dark	تابش اشعه فرابنفش	$LC_{50}/.10$
۶	ترکیب سوسپانسیون نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم و نفت خام	Tarkib/UV	تابش اشعه فرابنفش	$LC_{50}/.10$
۷	ترکیب سوسپانسیون نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم و نفت خام	Tarkib/Dark	تاریکی	$LC_{50}/.10$

## طرز تهیه سوسپانسیون نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم

نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم استفاده شده در این پژوهش از فرم آناتاز و به حالت پودری و ساخت کارخانه US NANO آمریکا بود که از شرکت نانو پارس لیما خریداری گردید. از این پودر سوسپانسیونی با غلظت ۱/۱ میلی گرم در لیتر (برای این کار ۱/۱ گرم نانو ذرات وزن شده، سپس قطره قطره آب مقطر به آن اضافه گردید تا تبدیل به یک خمیر یکدست شد، سپس به آرامی آب اضافه شده تا به حجم ۲۰ میلی لیتر برسد. بعد سه نوبت و هر نوبت ۳۰ دقیقه در دستگاه حمام اولتراسونیک قرار داده شد. سپس حجم کل نمونه به ۱۰۰۰ سی سی رسانده شد) تهیه شد و به دلیل حساسیت به تابش نور، این سوسپانسیون تا زمان استفاده‌های بعدی در شیشه تیره‌رنگ و در دمای اتاق نگهداری گردید (توانا و همکاران، ۱۳۹۳). محدوده قطر هیدروودینامیک نانو ذرات ۱۰ تا ۲۵ نانومتر بود و بیشترین تعداد این ذرات دارای اندازه ۲۵/۹۸ نانومتر بودند.

## آباده‌سازی قسمت قابل حل نفت خام در آب

قسمت قابل حل نفت خام در آب از طریق اضافه کردن یک قسمت نفت در ۹ قسمت آب به دست آمد (Anderson *et al.*, 1974). در این مورد ۱۰۰ میلی لیتر نفت خام به ۹۰۰ میلی لیتر آب مقطر در یک ظرف ارلن مایر سربسته اضافه شده و با همزن مغناطیسی به مدت ۲۴ ساعت و با سرعت چرخش ۱۰۰۰ دور در دقیقه به هم زده شد، سپس نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت ساکن گذاشته شد تا فازهای آب و نفت از هم جداسازی شود، سپس از طریق زهکش تحتانی ظرف، مایع موجود در کف آن استخراج گردید. این مایع حاوی هیدروکربن‌های محلول نفت خام یا قسمت قابل حل نفت در آب می‌باشد (Phatarpekar and Ansari, 2002).

عکس تهیه شد (Roberts, 2001). تغییرات ساختاری نظیر هیپرتروفی، هیپرپلازی، نکروز، ادم و سایر تغییرات محتمل ریختی در مقایسه با گروه شاهد مورد بررسی قرار گرفت. همچنین شاخص‌های رشد مانند: طول کل (Wang *et al.*, 2003)، افزایش وزن Misra (Haung *et al.*, 2008)، درصد افزایش وزن (Haung *et al.*, 2006 *et al.*، ضریب رشد ویژه (Ricker, 1975) و درصد (2008)، متوسط رشد روزانه (Mumford, 2004) و درصد بقاء مورد محاسبه قرار گرفتند.

$$\text{طول اولیه} - \text{طول نهایی} = \text{طول کل}$$

$$\text{وزن اولیه} - \text{وزن نهایی} = \text{افزایش وزن}$$

$$\text{تعداد روزهای آزمایش} / 100 \times (\text{وزن اولیه} - \text{وزن نهایی}) = \ln(\text{ضریب رشد ویژه})$$

$$100 \times (\text{وزن اولیه} - \text{وزن نهایی}) = \text{درصد افزایش وزن بدن}$$

$$\text{تعداد روزهای فاصله دو زیست سنجی/میانگین مزن اولیه-میانگین وزن نهایی} = \text{نرخ رشد متوسط روزانه}$$

رشته‌های ثانویه آسیب دیده، در هر رشته اولیه از هر ماهی تعداد ۱۰۰ رشته ثانویه شمارش شد و تعداد رشته‌های ثانویه‌ای که دچار هر یک از تغییرات یا آسیب‌ها شده بودند نسبت به تعداد کل رشته‌های ثانویه محاسبه گردید. تغییرات بافتی هر یک از رشته‌های آبشعی فقط در یکی از گروه‌های زیر قرار گرفت (Bernet *et al.*, 1999)

- تغییرات پرولیفیریشن<sup>۱</sup>: افزایش تعداد انواع خاصی از سلول‌ها یا ساختارها؛ مانند هایپرپلازی<sup>۲</sup> ای سلول‌های کلراید<sup>۳</sup> یا سلول‌های سنگفرشی<sup>۴</sup>.

در پایان آزمایش، بافت آبشع حداقل ۳ قطعه ماهی از هر تیمار به صورت تصادفی نمونه برداری شد و در محلول بوئن ثبت شدند. نمونه‌ها پس از مراحل آبگیری از طریق الکل با درجات مختلف (۵۰، ۷۰، ۸۰ و ۹۶ درصد)، شفاف‌سازی با استفاده از گزیلول، پارافینه کردن، قالب‌گیری، برش و رنگ‌آمیزی به روشن استاندارد هماتوکسیلین ائوزین رنگ‌آمیزی شدند (Mumford, 2004). بافت‌ها برای مشاهده هرگونه علائم تغییر آسیب‌شناسی با استفاده از میکروسکوپ نوری ارزیابی شدند و توسط فتومیکروسکوپ از آن‌ها

پس از اندازه‌گیری و محاسبه داده‌ها، داده‌ها توسط نرم‌افزار Microsoft Office Excel 2010 گروه‌بندی شدند. جهت پردازش نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگراف-اسمیرنوف استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با آنالیز واریانس یک‌طرفه (One Way ANOVA) انجام شده و جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن با سطح اطمینان ۹۰ درصد مورد استفاده قرار گرفت. تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۰) انجام شد.

### کمی سازی آسیب بافتی

تغییرات بافتی آبشع بر اساس روش اصلاح شده و همکاران (1999) به صورت کیفی و نیمه کمی بررسی و ثبت گردیدند. برای تعیین درصد

<sup>1</sup> Proliferation

<sup>2</sup> Hyperplasia

<sup>3</sup> Chloride cells

<sup>4</sup> Pavement cells

جدول ۲: غلظت‌های ایجادکننده تلفات ۱۰، ۵۰ و ۹۰ درصد در کپور معمولی نوجوان بعد از ۹۶ ساعت

96h LC	Conc.	95% Confidence Limits	
		Upper	Lower
LC10	۱۳/۱۹	۱۵/۹۹۱	۹/۴۱۳
LC50	۲۳/۰۷۰	۲۹/۳۵۳	۱۹/۲۶۴
LC90	۳۹/۵۱۸	۷۲/۴۹۷	۴۰/۹۵۸

درصد وزن به دست آمده بین تیمارهای آلوده شده با Oil/UV و Oil/Dark با شاهد اختلاف معنی داری نشان دادند، درصورتی که سایر تیمارها اختلاف معنی داری با گروه شاهد نداشتند. با مقایسه افزایش طول، تیمارهای آلوده شده با Oil/Dark و Oil/UV اختلاف معنی داری با گروه شاهد داشتند، بطوریکه تیمار Oil/UV کمترین مقدار رشد طولی را در بین گروه‌ها داشت، در این پارامتر نیز سایر تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی داری با گروه شاهد نداشتند. درصد بقای تیمار آلوده شده با Oil/Dark کمترین میزان ۷۶/۶۶ درصد) را در بین گروه‌های آزمایشی داشت.

تغییرات هیستوپاتولوژیک آبشش کپور معمولی در گروه‌های مختلف آزمایشی در شکل ۱ تا ۴ نشان داده شده است. در گروه شاهد بافت آبشش سالم با رشته‌های آبششی منظم دیده شد و سلول‌های اپیتلیال و لاملاهای ثانویه و اولیه تغییراتی را نشان ندادند و دارای حالت نرمال بودند. در بافت آبشش تغییرات ساختاری نظیر هیپرتروفی، هیپرپلازی، نکروز، ادم و آسیب عمومی مثل جدا شدن اپیتلیال از غشای پایه تیغه‌های آبششی، چماقی شدن رشته‌های آبششی و چسبندگی تیغه‌ها و سایر تغییرات محتمل ریختی در مقایسه با گروه شاهد مشاهده شد.

- تغییرات دژنریشن<sup>۱</sup>: تخریب بافت‌ها یا سلول‌های خاص؛ مانند نکروز<sup>۲</sup> بافتی.
- تغییرات ساختاری<sup>۳</sup>: تغییر در ساختار بافت‌ها؛ مانند جوش خوردگی لاملا<sup>۴</sup>.
- تغییرات اینفلامیشن<sup>۵</sup>: افزایش حضور سلول‌هایی که در بازسازی بافت‌های تخریب شده نقش دارند؛ مانند جدا شدگی سلول‌های پوششی<sup>۶</sup> یا ایدم<sup>۷</sup> رشته‌های ثانویه.
- تغییرات سیتوپلاسمی<sup>۸</sup>: تغییر در حجم و اندازه سلول‌ها یا محتويات آن‌ها؛ مانند افزایش اندازه یا هایپرتروفی<sup>۹</sup> سلول‌های کلراید، سنگفرشی و موکوسی<sup>۱۰</sup>.

## نتایج

بر اساس نتایج به دست آمده، غلظت کشنده میانی<sup>۱۱</sup> (LC<sub>50</sub>) فاز محلول نفت خام طی ۹۶ ساعت برای ماهی کپور معمولی به میزان ۲۳/۰۷۰ میلی گرم در لیتر برآورد گردید. که ۱۰ درصد LC<sub>50</sub> برای انجام آزمایش‌های بعدی استفاده شد.

جدول ۳ نتایج شاخص‌های رشد را در بچه ماهیان کپور معمولی طی مدت ۲۰ روز نشان می‌دهد. در تیمارهای مختلف، وزن نهایی، ضریب رشد ویژه (SGR) و متوسط رشد روزانه (ADG) اختلاف معنی داری با گروه شاهد نداشتند ( $P > 0.05$ ).

<sup>1</sup> Degeneration

<sup>2</sup> Necrosis

<sup>3</sup> Structural

<sup>4</sup> Lamellar fusion

<sup>5</sup> Inflammation

<sup>6</sup> Epithelial lifting

<sup>7</sup> Oedema

<sup>8</sup> Cytoplasmic

<sup>9</sup> Hypertrophy

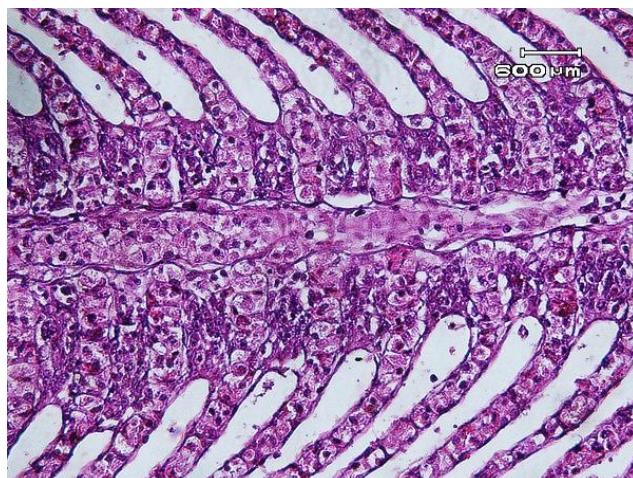
<sup>10</sup> Mucous cells

<sup>11</sup> Median Lethal Concentration

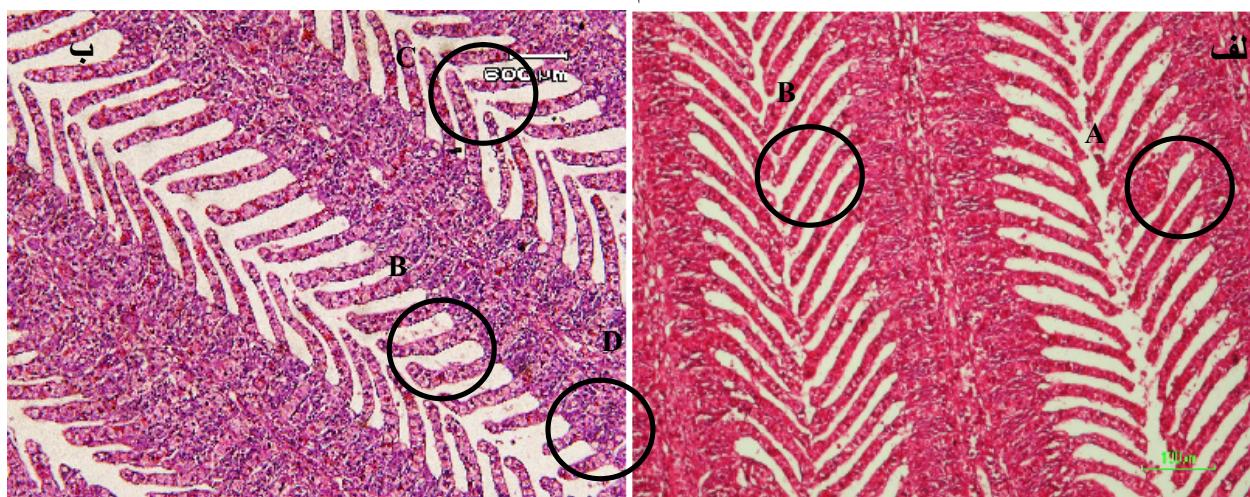
جدول ۳: بررسی شاخص‌های رشد در تیمارهای مختلف بچه ماهی کپور معمولی پس از ۲۰ روز پرورش

WG%	درصد بقاء	طول نهایی	وزن نهایی	ADG	SGR	پارامتر
<sup>b</sup> ۴۸/۳۸ ± ۲۲	<sup>a</sup> ۱۰۰ ± ۰/۰	<sup>b</sup> ۱۹/۴ ± ۳/۲۸	<sup>a</sup> ۷۸/۸۳ ± ۵	<sup>a</sup> ۷۶/۱۲ ± ۴/۷۳	<sup>ab</sup> ۱/۹۴ ± ۰/۷۷	شاهد
ab ۳۳/۰۷ ± ۱/	<sup>a</sup> ۱۰۰ ± ۰/۰	ab ۱۵/۰۳ ± ۱/۳۶	<sup>a</sup> ۷۰/۸۱ ± ۱۴	<sup>a</sup> ۶۸/۱۶ ± ۱۴	<sup>ab</sup> ۱/۴ ± ۰/۷۴	TiO2/UV
ab ۳۷/۲۸ ± ۱	<sup>a</sup> ۹۵ ± ۲/۰	<sup>b</sup> ۱۸/۹۸ ± ۱/۵۲	<sup>a</sup> ۷۵/۹۸ ±	<sup>a</sup> ۷۳/۲۲ ± ۱۳	<sup>ab</sup> ۱/۵۶ ± ۰/۵۹	TiO2/Dark
<sup>a</sup> ۱۹/۱۱ ± ۳/۳۱	<sup>c</sup> ۸۰ ± ۲/۸	<sup>a</sup> ۱۵/۴۹ ± ۰/۹۸	<sup>a</sup> ۶۶/۷۳ ± ۹/۹۴	<sup>a</sup> ۶۳/۹۲ ± ۹	<sup>a</sup> ۰/۸۷ ± ۰/۱۳	Oil/UV
<sup>a</sup> ۱۶/۶۶ ± ۶/۱	<sup>c</sup> ۷۶/۶۶ ± ۳/۵	ab ۱۶/۸۳ ± ۱	<sup>a</sup> ۷۲/۰۵ ± ۳/۵۵	<sup>a</sup> ۶۸/۹۵ ± ۳/۴۵	<sup>a</sup> ۰/۷۶ ± ۰/۲۶	Oil/Dark
<sup>a</sup> ۱۹/۴۸ ± ۵	ab ۹۳/۳۳ ± ۱/۹	ab ۱۶/۳۶ ± ۰/۸۹	<sup>a</sup> ۷۰/۸۵ ± ۸	<sup>a</sup> ۶۷/۸۹ ± ۸	<sup>a</sup> ۰/۸۸ ± ۰/۲۳	Tarkib/UV
ab ۲۸/۹۶ ± ۷/۷۸	ab ۹۰ ± ۳/۲	ab ۱۷/۸۲ ± ۱/۶۳	<sup>a</sup> ۷۴/۰۱ ±	<sup>a</sup> ۷۱/۱۲ ± ۳	<sup>ab</sup> ۱/۲۶ ± ۰/۳	Tarkib/Dark

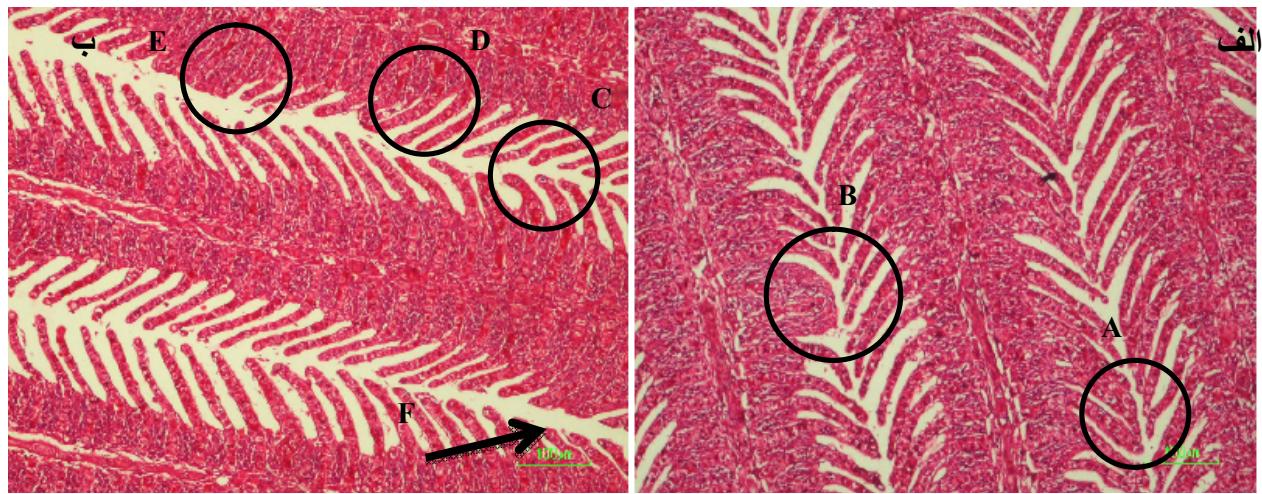
\* در هر ستون میانگین‌های دارای حروف بالا نویس مشترک با یکدیگر اختلاف معنادار ندارند ( $P > 0.05$ ). داده‌ها به صورت mean ± SD نشان داده شده است.



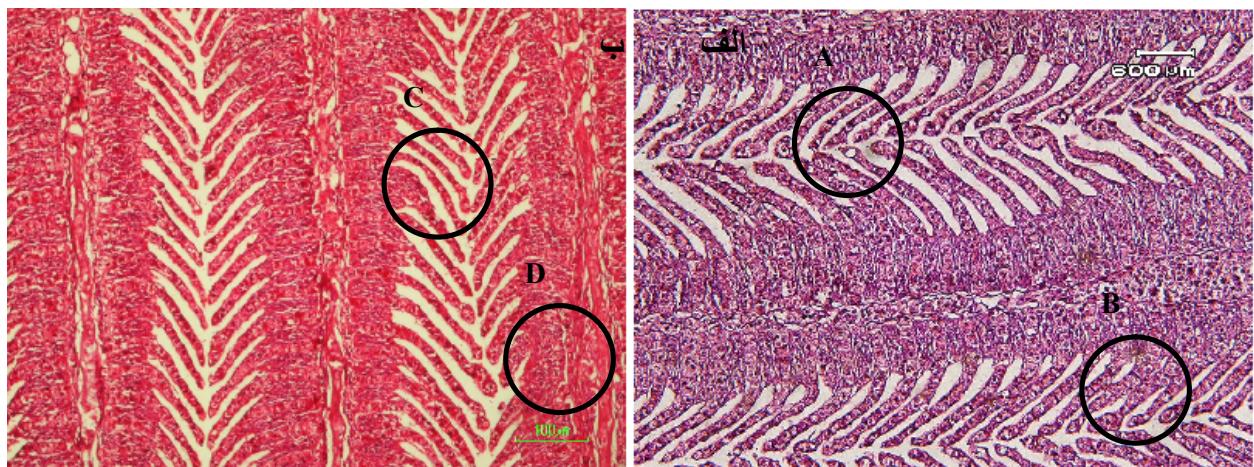
شکل ۱: ساختار آبشن سالم از نمونه‌های گروه شاهد



شکل ۲: انواع تغیرات بافتی مشاهده شده در آبشن کپور معمولی نوجوان پس از مواجهه با سوپرانسیون نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم تحت تاریکی و ب) تحت تابش فرابنفش. A: آتیوریسم؛ B: چماقی شدن رأس رشته‌های ثانویه؛ C: هایپرتروفی سلول‌های اپیتلیومی تیغه‌های ثانویه؛ D: کوتاه شدن رشته‌های ثانویه



شکل ۳: انواع تغییرات بافتی مشاهده شده در آبشش کپور معمولی نوجوان پس از مواجهه با فاز محلول نفت خام (الف) تحت تاریکی و (ب) تحت تابش فرابنفش. A: هایپرتروفی سلول های اپیتلیومی تیغه های ثانویه؛ B: فیوژن؛ C: چمامی شدن رأس رشته های ثانویه؛ D: نکروز؛ E: هایپرپلازی؛ F: کوتاه شدن رشته های ثانویه

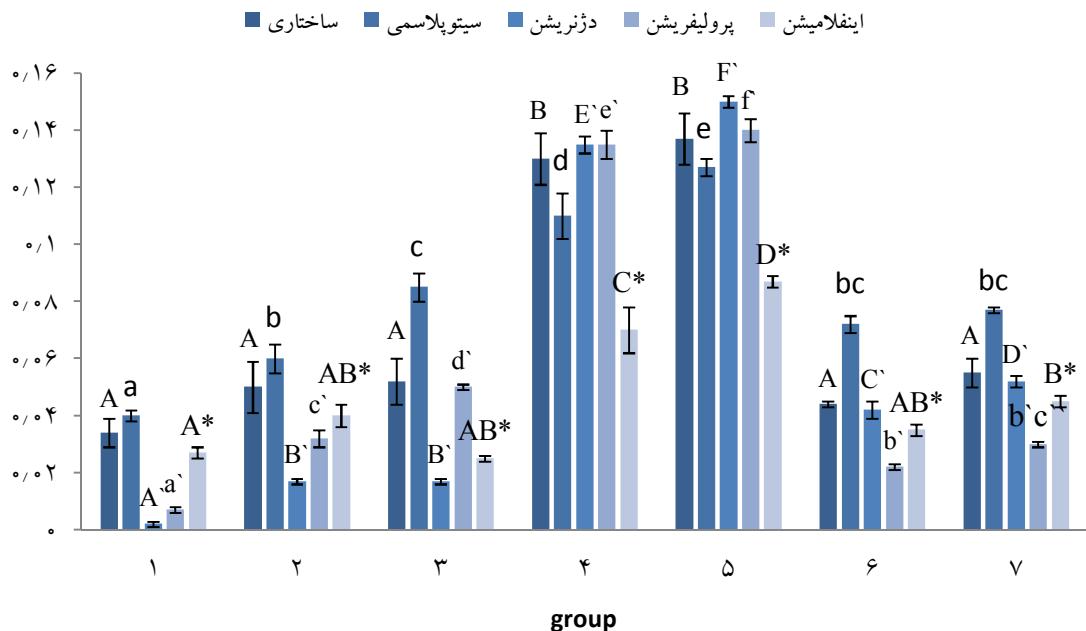


شکل ۴: انواع تغییرات بافتی مشاهده شده در آبشش کپور معمولی نوجوان پس از مواجهه با ترکیب فاز محلول نفت خام و نانو ذرات دی-اکسید تیتانیوم (الف) تحت تاریکی و (ب) تحت تابش فرابنفش. A: چمامی شدن رأس رشته های ثانویه؛ B: آنیوریسم؛ C: هایپرپلازی؛ D: هایپرتروفی سلول های اپیتلیومی تیغه های ثانویه.

جدول ۴: فراوانی رشته های ثانویه آبششی دچار تغییرات مختلف بافتی (نتایج به صورت Mean  $\pm$  SD نشان داده شده است)

آنواع مختلف تغییرات بافتی (درصد)						تیمار
پرولیفیریشن	دئنریشن	اینفلامیشن	ساختماری	ستیوپلاسمی		
<sup>a</sup> ۰/۷ $\pm$ ۰/۸	<sup>a</sup> ۰/۲ $\pm$ ۰/۴	<sup>a</sup> ۲/۷ $\pm$ ۱/۱	<sup>a</sup> ۳/۴ $\pm$ ۲/۲	<sup>a</sup> ۴ $\pm$ ۰/۹		۱
<sup>c</sup> ۳/۲ $\pm$ ۱/۵	<sup>b</sup> ۱/۷ $\pm$ ۰/۸	<sup>ab</sup> ۴ $\pm$ ۲/۱	<sup>a</sup> ۵ $\pm$ ۴/۱	<sup>b</sup> ۶ $\pm$ ۲/۳		۲
<sup>d</sup> ۵ $\pm$ ۰/۵	<sup>b</sup> ۱/۷ $\pm$ ۰/۸	<sup>ab</sup> ۰/۱ $\pm$ ۰/۶	<sup>a</sup> ۵/۲ $\pm$ ۳/۶	<sup>c</sup> ۸/۵ $\pm$ ۲/۳		۳
<sup>e</sup> ۱۳/۵ $\pm$ ۱/۸	<sup>e</sup> ۱۳/۵ $\pm$ ۱/۱	<sup>c</sup> ۸/۷ $\pm$ ۱/۲	<sup>b</sup> ۱۳ $\pm$ ۴/۲	<sup>d</sup> ۱۱ $\pm$ ۳/۶		۴
<sup>f</sup> ۱۴ $\pm$ ۲/۶	<sup>f</sup> ۱۵ $\pm$ ۱/۳	<sup>d</sup> ۷ $\pm$ ۳/۶	<sup>b</sup> ۱۳/۷ $\pm$ ۴/۲	<sup>e</sup> ۱۲/۷ $\pm$ ۱/۵		۵
<sup>b</sup> ۲/۲ $\pm$ ۰/۸	<sup>c</sup> ۴/۲ $\pm$ ۱/۱	<sup>ab</sup> ۴/۵ $\pm$ ۱/۱	<sup>a</sup> ۴/۴ $\pm$ ۲/۵	<sup>bc</sup> ۷/۲ $\pm$ ۰/۸		۶
<sup>bc</sup> ۳ $\pm$ ۰/۵	<sup>d</sup> ۵/۲ $\pm$ ۱/۵	<sup>b</sup> ۳/۵ $\pm$ ۱/۱	<sup>a</sup> ۵/۵ $\pm$ ۰/۶	<sup>bc</sup> ۷/۷ $\pm$ ۱/۶		۷

\* در هر ستون میانگین های دارای حروف بالا نویس مشترک با یکدیگر اختلاف معنادار ندارند ( $P > 0.05$ ).



شکل ۵: درصد تغییرات مختلف بافتی در تیمارهای مختلف

ظاهر می شود. تأثیر روی جمعیت و جامعه ممکن است حتی سال ها بعد از در معرض قرار گیری اولیه قبل تشخیص نباشد.

رشد، مهم ترین پارامتر فیزیولوژیک است که در رابطه با فعل و افعالات اجتماعی ماهیان به خوبی مطالعه شده است (ایمان پور و همکاران، ۱۳۸۸). تحت شرایط استرس، ماهی به انرژی بیشتری نیاز دارد تا صرف فرایندهای هموستاتیک کند (Schereck, 1982). به عبارت دیگر انرژی بیشتر از رشد، صرف استرس می شود (Moradyan *et al.*, 2012) و Sharaf (Tawwab *Oreochromis niloticus*) دارد. Heintz و همکاران (2000) گزارش کردند که قرار گرفتن ماهی قزلآلای صورتی (Onchorhynchus gorbuscha) در معرض فاز محلول نفت خام باعث تحریک عملکرد رشد و بقا ماهی تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*) دارد. Heintz و همکاران (2000) گزارش کردند که قرار گرفتن ماهی قزلآلای صورتی (Onchorhynchus gorbuscha) در معرض فاز محلول نفت خام باعث تأخیر در رشد و کاهش بقا می شود.

## بحث

امروزه مطالعات آزمایشگاهی و میدانی به طور یکسان ثابت کرده اند که هیدروکربن های آروماتیک حلقوی به شدت موجودات مصبی و دریایی را تحت تأثیر قرار می دهند (Smith, 1997). Burger (1979) اشاره کردند که قرار گرفتن ماهی در معرض فاز محلول نفت خام باعث تحریک سوخت و ساز بدن برای رشد بافتی می شود. بر اساس نظریه Connell (1995) بسیاری از موجودات دریایی پاسخ های حادی را در مقابل قرار گیری در معرض PAH<sub>S</sub> از خود نشان نمی دهند اما اثرات زیر کشته ده (بیوشیمیابی، رفتاری، فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی) را تحمل می کنند که حداقل نیاز به چندین ماه دارد تا در موجود رشد نماید و درنتیجه تشخیص آنها بسیار مشکل است. چنین اثراتی توسط مسیرهای متابولیکی آسیب دیده، رشد کم، هماوری پایین و نقص تولید مثل

پاسخ به آلودگی‌های هیدروکربنی توسط Brocksen و Bailey (1973) در بس راه راه (Striped bass) و Omorregie variegatusl Cyprinodon همکاران (1995) نشان داده شده است. از سوی دیگر در یکسری از مطالعات مشخص شد که ترکیبات نفتی موجب تضعیف در توانایی تولیدمثل، رشد و نمو و تغذیه و گوارش موجودات دریایی می‌شوند (کلارک، ۱۳۸۵). که این نتایج با یافته‌های ما هم خوانی ندارد. در این پژوهش عملکردهای رشد به طور ناچیزی کاهش یافت که مشابه پژوهش‌های Afolabi و همکاران (1985) بود که نشان دادند قرار گرفتن ماهی در معرض فاز محلول نفت خام باعث بی‌حالی، حرکت کم و نزدیک به هم ماهی می‌شود که به علت تغذیه کم‌تر است. Cameron و Smith (1979) اشاره کردند که قرار گرفتن ماهی در معرض فاز محلول نفت خام باعث تحریک سوخت‌وساز بدن برای رشد بافتی می‌شود. ممانعت از رشد در آزمایش حاضر، ممکن است به علت اختلال در سوخت‌وساز طبیعی بدن توسط سمیت نفت خام باشد. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که هیچ‌گونه رابطه معنی‌داری در میزان تغذیه، رشد و سلامت عمومی ماهیان در مقایسه با گروه شاهد نیست. این نتایج با یافته‌های Birtwell و همکاران (1999) که تخم‌های ماهی آزاد گوژپشت (Oncorhynchus gorbuscha) تحت تأثیر فاز محلول نفت خام اسلوپ شمالی آلاسکا<sup>۱</sup> آلاسکا<sup>۱</sup> قرار دادند و لاروهای حاصل را در محیط طبیعی رهاسازی کردند. پس از ۱ تا ۳ سال دوباره آن‌ها را صید نموده و موردنبررسی قرار دادند؛ هم‌خوانی دارد.

در این پژوهش وزن و طول نهایی نسبت به وزن و طول اولیه افزایش داشته اما تیمارهای قرار گرفته در معرض فاز محلول نفت خام آماده شده تحت تابش فرابنفش (Oil.UV) نسبت به گروه شاهد کاهش طول داشتند و تیمار ترکیب همزمان نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم و فاز محلول نفت خام آماده شده تحت تابش فرابنفش (Oil.TiO<sub>2</sub>/UV) و ترکیبات نفتی (Oil/UV) (Oil/Dark) موجب کاهش معنی‌دار درصد وزن و ضریب رشد ویژه شد. در این پژوهش وزن و طول نهایی نسبت به وزن و طول اولیه افزایش داشته اما تیمارهای قرار گرفته در معرض فاز محلول نفت خام آماده شده تحت تابش فرابنفش (Oil.UV) نسبت به گروه شاهد کاهش طول داشتند و تیمار ترکیب همزمان نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم و فاز محلول نفت خام آماده شده تحت تابش فرابنفش (Oil.TiO<sub>2</sub>/UV) و ترکیبات نفتی (Oil/UV) موجب کاهش معنی‌دار درصد وزن و ضریب رشد ویژه شد.

قرار گرفتن ماهی در معرض فاز محلول نفت خام ممکن است منجر به کاهش مصرف غذا و وزن بدن شود؛ که مشابه کار Khan و Kicheniuk (1981) و Saborido-Rey (2000) و Kori-Siakpere (2007) بود که نشان دادند قرار گرفتن ماهی در معرض فاز محلول نفت خام، می‌تواند منجر به کاهش تغذیه و وزن بدن شود که بازتاب تغییر در ضریب چاقی است. هم‌چنین Ofojekwu و Onah (2002) نشان دادند که ماهی نرخ سوخت‌وساز بدن خود را با دفع هیدروکربن‌های آروماتیک افزایش می‌دهد، و به تبع آن انرژی بیشتری را برای حفظ هموستازی نسبت به ذخیره‌سازی اختصاص می‌دهد، از این‌رو نرخ رشد کاهش می‌یابد. افزایش سرعت سوخت‌وساز بدن در

<sup>۱</sup> Alaskan north sloop

آفت کش ها و هیدروکربن ها نفتی بر آبشنش مارماهی، همچنین Santos و همکارانش (2011) در بررسی اثر نفتالین بر آبشنش ماهی *Trachinotus carolinus*، هایپرپلازی را گزارش کردند. ماهیان فلاتر Hutz *et al.*, 1999 (PHAs) جمع آوری شده از مکان های آلوده به (al., 1999) و ماهیان قزلآلای آلوده شده با نفت خام (Engelhardt *et al.*, 1981) عوارض بافتی نظری هایپرتروفی و هایپرپلازی سلول های اپیتیلیومی، بر آمادگی و غیرعادی شدن اپیتیلیوم لاملاها و همچنین خونریزی، خون مردگی و افزایش تولید موکوس در آبشنش را نشان دادند. که با نتایج مشاهده شده در این پژوهش مشابه بود. استرس نفوذ آلاینده ها از سوی دیگر موجب القاء هایپرپلازی سلول های اپیتیلیومی و به هم چسبیدن متعاقب لاملاهای ثانویه می شود. جوش خوردن لاملاها به یکدیگر، با وجود کاهش کیفیت فعالیت آبشنش ها، موجب افزایش فاصله بین محیط خارج و خون شده، یک سد دفاعی جهت جلوگیری از نفوذ بیشتر آلاینده ها به بدن ماهی و کاهش عوارض آسیب زننده آن ها ایجاد می کند. این حالت در کوتاه مدت می تواند ماهی را از عوارض ناشی از در معرض قرار گیری با آلاینده های محیطی در امان دارد (Mazon, 2002). فیوژن لاملایی می تواند محافظتی در کاهش میزان آسیب پذیری سطح آبشنش باشد. در اثر عارضه فیوژن، اپیتیلیوم دو تیغه هی ثانویه مجاور به واسطه هایپرپلازی و یا برآمدگی و در برخی موارد هایپرتروفی اپیتیلیوم به هم اتصال می یابد و موجب توقف تبادل گاز از طریق سطوح مربوطه می شود (Nowak, 1992; Mallat, 1985). نکروز آبشنشی و پوسته ریزی اپیتیلیوم آبشنش پاسخ های مستقیم ناشی از عمل سموم است. پوسته پوسته شدن لایه اپیتیلیال در

کاتالیست های پایدار که واکنش های اکسیداسیون را تسريع می کنند، می توانند آلاینده های موجود در هوا یا آب شامل آلاینده های معدنی، آلاینده های آلی و میکرووار گانیسم ها را اکسید کنند. با تجزیه آلاینده ها به مواد کم ضرر تر، می توان نیاز به انباشتن یا منهدم کردن آلاینده ها که از هوا یا آب خارج می شوند را به حداقل رساند (Xie *et al.*, 2007).

آلودگی بوم ساز گان های آبی، با تغییرات آسیب شناسی در ماهیان همراه بوده به طوری که وقتی ماهیان در معرض آلودگی قرار می گیرند، می توان از طریق بررسی آسیب های بافتی میزان آلودگی محیط آبی را تعیین نمود (Roncarati *et al.*, 2006). آبشنش ماهیان دارای عملکردهای مختلفی همچون تبادل گازهای تنفسی، تنظیم اسمزی، دفع نیتروژن و تعادل اسید-باز هستند (Hibiya *et al.*, 1982) و به جهت این عملکردها، دارای ویژگی های خاصی بوده که در تبادل مواد شیمیایی سمی بین ماهی و محیط اثرگذار است. بسیاری از عوارض بافتی مشاهده شده در آبشنش نوعی مکانیسم دفاعی در برابر ورود آلاینده ها به بدن ایجاد می کنند. هایپرتروفی، هایپرپلازی و لیفتینگ اپیتیلیوم سبب افزایش فاصله آب و خون می شوند. (Tintos *et al.*, 2007). هایپرپلازی افزایشی غیر طبیعی در تعداد سلول های اپیتیلیوم آبشنش است. این عارضه بر تبادل گاز و تنفس تأثیر گذاشته و در حالات شدیدتر می تواند، منجر به اتصال تیغه های مجاور به یکدیگر و جلوگیری از تبادل گاز شود (Nowak, 1992). در واقع هایپرپلازی به عنوان یک مکانیسم دفاعی منجر به کاهش سطح تنفسی و افزایش فاصله سطح انتشار سم در خون می شود (Cengiz and Unlu, 2006). Ribeiro و همکاران (۲۰۰۵) در بررسی تأثیرات

بافت آبشش همه‌ی تیمارهای آزمایشی تقریباً با یکدیگر یکسان و مشابه اثر سایر آلاینده‌های آلی بوده و فقط از نظر کمی تفاوت داشتند. این موضوع نشان‌دهنده آن است که برخی از این تغییرات اختصاصی نیستند و ممکن است توسط آلاینده‌های متفاوت القاء شوند. این آلاینده‌ها نیز مانند سایر آلاینده‌ها باعث به راه افتادن سازوکارهای دفاعی به منظور ممانعت از ورود بیشتر آلاینده‌ها به درون بدن ماهی می‌شوند. از آنجایی که آبشش از نظر تنفس و تنظیم اسمزی برای بقای ماهیان اندامی بسیار حیاتی می‌باشد، توجه به اثر آلاینده‌ها بر این اندام و سیستم هورمونی تنظیم‌کننده عملکرد آن بسیار دارای اهمیت است. با توجه به پیشرفت صنعت و آلودگی فزاینده بوم‌سازگان‌های آبی، اثر آلاینده‌های خطرناکی مثل هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی بر آبزیان باید بیش‌تر مورد توجه قرار گیرد.

### سپاسگزاری

در اینجا بر خود لازم می‌دانیم از زحمات کلیه کسانی که مارا در انجام این تحقیق یاری نمودند سپاسگزاری نماییم.

### منابع

- ایمانپور، م.ر.، احمدی، آ.ر.، کردنیز، م.، ۱۳۸۸. اثر تراکم‌های مختلف ذخیره سازی روی بازنده‌گی و شاخص‌های رشد ماهی کپور پرورشی (*Cyprinus carpio*). مجله علمی شیلات ایران، ۱۸(۳)، ۱-۹.
- توان، م.، کلباسی، م.ر.، عابدیان کناری، ع.م.، جوهري، س.ع.، ۱۳۹۳. ارزیابی میزان جذب و رهایش نانو ذرات نقره و دی‌اکسید تیتانیوم در ناپلی آرتیما

تیغه‌های آبششی به دلیل عدم فیلتراسیون مایع میان بافتی ایجاد شده که باعث کاهش مبادله گاز از طریق افزایش فاصله‌ی انتشار و کاهش فاصله‌ی بین لاملای می‌شود، هم‌چنین این عارضه می‌تواند موجب کاهش جذب مواد سمی گردد (Jayachandran and Pugazhendy, 2009). به عبارت دیگر برآمدگی اپیتلیوم، فاصله‌ی رسیدن ماده‌ی سمی به جریان خون را افزایش می‌دهد (Cengiz and Unlu, 2006). شریف پور و همکاران (۱۳۹۰) در مطالعه‌ای آسیب‌شناسی اثرات فاز محلول نفت خام را بر بافت آبشش بچه ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii kutum*) در شرایط آزمایشگاهی موردنبررسی قرار دادند. نتایج مطالعات آن‌ها، جدا شدن اپیتلیال از غشای پایه تیغه‌های آبششی، پرخونی در رشته‌ها و تیغه‌های آبششی، آنیوریسم، چمامی شدن انتهای تیغه‌ها، هایپرتروفی سلول‌های اپیتلیال تیغه‌ها، هایپرپلازی بین تیغه‌ها و چسبندگی تیغه‌های آبششی را در ماهیان آلوده‌شده نشان داد. این نتایج با یافته‌های مطالعه حاضر همسو بودند.

میانگین نتایج حاصله نشان داد که، اگرچه هر سه ترکیب سوسپانسیون نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم، فاز محلول نفت خام و ترکیب نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم و نفت خام در آب منجر به افزایش تغییر رشد در کپور معمولی نوجوان شد، اثرات منفی فاز محلول نفت خام نسبت به سایر تیمارها شدیدتر بود که این امر می‌تواند به دلیل قرار گرفتن در معرض مستقیم آلاینده باشد. به عبارتی دیگر حضور نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم اثرات آلوده‌کننده‌گی نفت خام را در تیمارهایی که همزمان تحت تأثیر فاز محلول نفت خام و نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم قرار گرفته بودند، کاهش داد. همچنین نتایج نشان داد که آسیب‌های وارد شده به

10. Burger, J., 1997. Oil Spills. *Journal of Coastal Research*, 14, 692-694.
11. Cengiz, E.I., Unlu, E., 2006. Sublethal effects of commercial deltamethrin on the structure of the gill, liver and gut tissues of mosquitofish *Gambusia affinis*, A microscopic study. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 21(3), 246-253.
12. Connell, D.W., 1995. Prediction of bioconcentration and related lethal and sublethal effects with aquatic organisms, *Marine Pollution Bulletin*, 31.
13. Connell, D.W., Miller, G.J., 1981. Petroleum hydrocarbons in aquatic ecosystems-Behaviour and effects of sublethal concentrations: Part 1. *C R C Critical Reviews in Environmental Control*, 11(1), 37-104.
14. Engelhardt, F., Wong, M.P., Duey, M., 1981. Hydromineral balance and gill morphology in rainbow trout *Salmo gairdneri*, acclimated to fresh and sea water. As affected by petroleum exposure. *Aquatic Toxicology*, 8, 175-186.
15. Gernhofer, M., Pawet, M., Schramm, M., Müller, E., Triebeskorn, R., 2001. Ultrastructural biomarkers as tools to characterize the health status of fish in contaminated streams. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, 8, 241-260.
16. Heintz, R.A., Rice, S.D., Wertheimer, A.C., Bradshaw, R.F., Thrower, F.P., Joyce J.E., 2000. Delayed effects on growth and marine survival of pink salmon *Oncorhynchus gorbuscha* after exposure to crude oil during embryonic development. *Marine Ecology Progress Series*, 208, 205-216.
17. Hibiya, T., Yokote, M., Oguri, M., Sato, H., Takashima, F., Aida, K., 1982. An atlas of fish histology. Normal and pathological features. 2nd edition. Gustav Fischer Verlag. 68-71.
18. Hose, J.E., McGurk, D., Marty, G.D., Hinton, D.E., Brown, E.D., Baker, T.T., 1996. Sublethal effects of the Exxon Valdez oil spill on herring embryos and larvae: morphological, cytogenetic and histopathological assessments, 1989-1991. *Canadian Journal of Fish and Aquatic Sciences*, 53, 2355-2365.
19. Huang, S.S.Y., Fu, C.H.L., Higgs, D.A., Balfry, S.K., Schulte, P.M., Brauner, C.J., 2008. Effects of dietary canola oil level on growth performance, fatty acid composition and ionoregulatory development of spring Chinook salmon parr, *Oncorhynchus tshawytscha*. *Aquaculture*, 274, 109-117.
20. Hutz, R.J., Wimpee, B.A., Dasmahapatra, A., Weber, D.N., Heimler, I., Chaffin, C.L., 1999. Differential modulation by aromatic hydrocarbon receptor agonist of circulating

- فرانسیس کانا در شوری های مختلف. مجله اقیانوس شناسی، ۱۹(۵)، ۹۱-۱۰۳.
۳. شریف پور، ع.، ابطحی، ب.، حیدری جامع بزرگی، ف.، سیف آبادی، ج.، تقی زاده رحمت آبادی، ز.، ۱۳۸۹. آسیب شناسی اثرات فاز محلول نفت خام بر *Rutilus frisii kutum* در شرایط آزمایشگاهی، مجله علمی شیلات ایران، ۲۰(۱)، ۸۹-۱۰۰.
۴. نیان، ن.، سیفی، م.، حسینی، س.م.، ۱۳۸۷. حذف آلاینده های هوا با استفاده از فرآیند فتوکاتالیستی توسط دی اکسید تیتانیوم ( $TiO_2$ )، دوازدهمین کنگره ملی مهندسی شیمی ایران، تبریز، انجمن مهندسی شیمی ایران، دانشگاه صنعتی سهند.
5. Afolabi, O.A., Adeyemi, S.A., Imebore, M.A., 1985. Studies on toxicity of some Nigerian crude oils on some aquatic organisms. In: Proceedings of 1985 International Seminar on Petroleum industry and the Nigerian environment, Lagos. 269-273.
  6. Anderson, J.W., Neef, J.M., Cox, B.A., Tatem, H. E., Hightower, G. M., 1974. Characteristics of dispersions and water-soluble extracts of crude and refined oils and their toxicity to estuarine\ crustaceans and fish, *Marine Biology*, 27, 75-88.
  7. Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T., 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Disease*. 22, 25-34.
  8. Birtwell, I.K., Fink, R., Brand, D., Alexander, R., McAllister, C. D., 1999. Survival of pink salmon (*Oncorhynchus Gorbuscha*) fry to adult hood following a 10-day exposure to the aromatic hydrocarbon water-soluble fraction of crude oil and release to the Pacific Ocean, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 56, 2087-2098.
  9. Brocksen, R.W., Bailey, H.T., 1973. Respiratory response of juvenile Chinook salmon and striped bass exposed to crude oil. In: Proceedings of joint conferences on prevention and control of oil spills. American Petroleum Institute, Washington, District of Columbia, United States of America. 783 - 791.

32. Mumford, S.L., 2004. Histology for Finfish. 2nd edition. National Wild Health Fish Survey. Laboratory Procedures Manual. 4-10.
33. Ng, W.K., Lim, P.K., Boey, P.L., 2003. Dietary lipid and palm oil source affects growth, fatty acid composition and muscle  $\alpha$ - tocopherol concentration of African Catfish, *Claris gariepinus*. Aquaculture, 215, 229- 243.
34. Nowak, B., 1992. Histological changes in gills induced by residues of endosulfan. Aquatic Toxicology. 23(1), 65-83.
35. OECD, 1992. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test No. 203. Fish, Acute Toxicity Test. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
36. Ofojekwu, P.C., Onah, J.A., 2002. Effects of water-soluble fractions of crude oil on growth of the catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). African Journal of Environmental Pollution and Health, 1(2), 1-7.
37. Omorogie, E., Ufodike, E.B.C., Onwuliri, C.O.E., 1995. Effects of petroleum effluent on carbohydrate reserves of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. West African Journal of Biological Sciences, 3,70-76.
38. Omorogie, E., Ufodike, E.B.C., 2000. Effects of Water Soluble Fractions of Crude Oil on Growth of the Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). Bulletin Environmental Contamination and Toxicology, 64, 601-605.
39. Pacheco, M., Santos, M.A., 2001. Biotransformation, endocrine, and genetic responses of *Anguilla Anguilla* L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. Ecotoxicol. Environ. Saf, 49, 64-75.
40. Phatarpekar, P.V., Ansari, Z.A., 2002. Comparative toxicity of water soluble fractions of four oils on the growth of a microalga. Botanica Marina, 43, 367-75.
41. Ribeiro, C., Vollaire, Y., Sanchez-Chardi, A., Roche, H., 2005. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. Aquatic Toxicology, 74, 53-69.
42. Ricker, W.E., 1975. Computation and interpretation biological statistics of fish populations, Bulletin of the fisheries Research Board of Canada, 191, 207-211.
43. Roberts, R. J., 2001. Fish physiology. W.B. Sanders. P: 472. Simonato J.D., Guedes, C.L.B., Martinez, C.B.R., Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed estradiol- $17\beta$  and estrogen-receptor DNA-binding capability in female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Zoological science, 16, 161-166.
21. Jayachandran, K., Pugazhendy, K., 2009. Histopathological changes in the gill of *Labeo rohita* (Hamilton) fingerlings exposed to atrazine. American-Eurasian Journal of Scientific Research, 4, 219-221.
22. Kartikeyan, S., Navaneetha, A., 2011. Degradation of Phenol and m-cresol in aqueous Solutions using Indigenously Developed Microwave-Ultraviolet Reactor. Journal of scientific and Industrial Research, 70, 71-76.
23. Kicheniuk, J.W., Khan, R.A., 1981. Effect of petroleum hydrocarbons on Atlantic cod *Gardus* following chronic exposure. Canadian Journal of Zoology, 65(3), 490-494.
24. Kori-Siakpere, O., 2000. Petroleum induced alterations in the African catfish, *Clarias gariepinus* (Teugels 1984): II. Growth factors. Nigerian Journal of Science and Environment, 2, 87-92
25. Lanouette, K.H., 1997. Treatment of phenolic wastes. Chem. Eng. (Deskbook Issue), 17, 99-106.
26. Linsebigler, A.L., Lu, G., Yates, J.T., 1995. Photocatalysis on TiO<sub>2</sub> surfaces: principles, mechanisms, and selected results. Chemical Reviews, 95, 735-758.
27. Mallatt, J., 1985., Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 42, 630– 648.
28. Martinez, C. B. R., Nagae, M. Y., Zaia, C. T. B. V., Zaia, D. A. M., 2004. Morphological and physiological acute effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. Brazilian Journal of Biology, 64 (4), 797-807.
29. Mazon, A., Cerqueira, C., Fernandes, M., 2002. Gill cellular changes induced by copper exposure in the South American tropical freshwater fish *Prochilodus scrofa*. Environmental research, 88, 52-63.
30. Misra, C.K., Kumar Das, B., Mukherjee, S.C., Pattnaik, P., 2006. Effect of long term administration of dietary  $\beta$ -glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings. Aquaculture, 255, 82- 94.
31. Moradyan, H., Karimi, H., Gandomkar, H.A., Sahraeian, M.R., Ertefaat, S., Sahafi. H.H., 2012. The Effect of Stocking Density on Growth Parameters and Survival Rate of Trout Alevins (*Oncorhynchus mykiss*). World Journal of Fish and Marine Sciences, 4(5), 480-485.

- effluent. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 32(2), 127-133.
52. Slamborová, I., Zajícová, V., Karpíšková, J., Exnar, P., Stibor, I., 2013. New type of protective hybrid and nanocomposite hybrid coatings containing silver and copper with an excellent antibacterial effect especially against MRSA. *Journal of Materials Science and Engineering*, 33, 265-273.
  53. Smith, R.L., Cameron, J.A., 1979. Effect of water soluble fraction of Prudhoe Bay crude oil on embryonic development of Pacific herring. *Transactions of the American Fisheries Society*, 108, 70 - 75.
  54. Teh, S.J., Deng, X., Deng, D.F., Teh, F.C., Hung, S.S., Fan, T.W., Liu, J., Higashi, R.M., 2004. Chronic effects of dietary selenium on juvenile Sacramento splittail (*Pogonichthys macrolepidotus*). *Environmental Science and Technology*, 38, 6085-6093.
  55. Tintos, A., Gesto, M., Miguez, J.M., Soengas, J.L., 2007. Naphthalene treatment alters liver intermediary metabolism and levels of steroid hormones in plasma of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66, 139-147.
  56. Wang, X., Kim, K.W., Bai, S.C., 2003. Comparison of L-ascorbyl-2- monophosphate-Ca with L-ascorbyl- 2-monophosphate-Na/Ca on growth and tissue ascorbic acid concentration in Korean rockfish (*Sebastes schlegeli*). *Aquaculture*, 225, 387-395.
  57. Watanabea, T., Nakajima, A., Wang, R., Minabe, M., Koizumia, S., Fujishima, A., Hashimoto, A., 1999. Photocatalytic activity and photoinduced hydrophilicity of titanium dioxide coated glass. *Journal of Thin Solid Films*, 351, 260-263.
  58. Xie, R., Shang, J., Wu, P., 2007. Quaternary Oxides and Catalysts Containing Quaternary Oxides, US patent 20070190765A1, Aug. 16. to diesel oil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 69(1), 12-20.
  44. Roncarati, A., Melotti, P., Dees, A., Mordenti, O., Angellotti, L., 2006. Welfare status of cultured seabass (*Dicentrarchus labrax* L.) and seabream (*Sparus aurata* L.) assessed by blood parameters and tissue characteristics. *Journal of Applied Ichthyology*, 22, 225-234.
  45. Saborido-Rey, F., Domínguez-Petit, R., Tomás, J., Morales-Nin, B., Alonso-Fernández, A., 2007. Growth of juvenile turbot in response to food pellets contaminated by fuel oil from the tanker 'Prestige'. *Marine Ecology Progress Series*, 345, 271-279.
  46. Santos, T.C.A., Ngan, P.V., Gomes, V., Passos, M.J.A.C.R., Campos, D.Y.F., 2011. Histological alterations in the gills of *Trachinotus carolinus* (Carangidae). *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 6(2), 109-120.
  47. Schereck, C.B., 1982. Stress and rearing of salmonids. *Aquaculture*, 8, 319-326.
  48. Schwaiger, J., Wanke, R., Adam, S., Pawert, M., Honnen, W., Triebeskorn, R., 1997. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, 6, 75-86.
  49. Sharaf, S. M., Abdel-Tawwab, Y., 2011. Ecophysiological impact of commercial petroleum fuels on Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. In L. P. Liu, and F. Kelvin (Eds.), *Proceedings of 9th International Symposium on Tilapia in Aquaculture*, (pp. 28-38).
  50. Simonata, J., Guedes, C., Martinez, C., 2008. Biochemical, physiological and histological changes in neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 69, 112-120.
  51. Singh, N., Singh, J., 2002. An enzymatic method for removal of phenol from industrial