

فصل اول

مقدمه

۱- مقدمه

موجودات آبی به ویژه ماهی ها یکی از منابع مهم تأمین غذای جوامع بشری و سایر موجودات وابسته به زنجیره های غذایی دریا هستند. از اینرو سالم بودن این منابع، حائز اهمیت است. افزایش جمعیت مناطق شهری در نواحی ساحلی و توسعه بخش های مختلف صنایع، موجب آلودگی پهنه های آبی شده که نتیجه آن به مخاطره انداختن حیات موجودات از جمله ماهیان می باشد. آلاینده ها کیفیت آب را تغییر می دهند و سبب بروز مشکلات بسیاری مانند انواع بیماری ها و تغییرات ساختاری در بافت ها و اندام های ماهی ها می شوند (Chang *et al*, 1998). در میان انواع مختلف آلاینده ها، مشتقات نفتی (هیدروکربن ها) یکی از مهم ترین آلاینده های محیط های آبی محسوب می شوند (Pacheco & Santos, 2001) که می توانند به دلیل سمیت و تجمع در بافت های مختلف بدن آبزیان، مشکلات عمده ای ایجاد کنند. سالانه تقریباً ۵ میلیون تن نفت خام از منابع مختلف وارد محیط های دریایی می شود (Kennedy & Farrell, 2005). طبق محاسبات انجام شده کل نفت ورودی به دریای خزر ۱۲۲۳۵۰ تن در سال می باشد (CEP, 2001)، که به نظر می رسد در سال های اخیر بدلیل اکتشافات و بهره برداری های صورت گرفته بیشتر باشد. سالانه مقدار زیادی نفت در اثر تردد رو به افزایش نفتکش ها و گسترش حمل و نقل دریایی، توسعه روز افزون فعالیت های اکتشاف و حفاری توسط کشورهای حاشیه، خصوصاً آذربایجان و قزاقستان، استقرار پالایشگاه های نفت و ... وارد دریا می گردد.

مطالعات آسیب شناسی بافت های^۱ ماهی های در معرض آلودگی قرار گرفته نیز یکی از روش های کاربردی و معمول تعیین اثرات آلاینده بر جانور می باشد که به درک واکنش های زیستی رخ داده در اثر تماس با آلاینده کمک می کند (Heath *et al*, 1987; Cormier *et al*, 1995; Schwaiger *et al*, 1997; Martinez *et al*, 2004). این تکنیک مطالعاتی، به عنوان شاخص زیستی برای تعیین سلامتی ماهی در معرض آلاینده، هم در مطالعات آزمایشگاهی (Simonto *et al*, 2008; Thophon *et al*, 2003; Akaishi *et al*, 2004; Gabriel *et al*, 2007; al, 2008) و هم مطالعات میدانی (Hinton & ; Teh *et al*, 1997; Schwaiger *et al*, 1997; Khan, 2003; Camargo & Martinez, 2007) استفاده شده است. هدف تحقیقات آسیب شناسی بافتی، علاوه بر ارزیابی اثرات سمی، شناخت تغییرات و آسیب های ناشی از استرس های محیطی و آلودگی ها می باشد (Teh *et al*, 1997).

¹ Histopathology

ماهی سفید (*Rutilus kutum*)، از خانواده کپور ماهیان، از جمله مهم ترین ماهیان استخوانی اقتصادی سواحل و رودخانه های حاشیه جنوبی دریای خزر می باشد که ذخایر آن به دلیل عدم توجه می تواند در معرض خطر قرار گیرد. به منظور بازسازی ذخایر این ماهی سالانه بیش از ۲۵۰ میلیون قطعه بچه ماهی ۱-۲ گرمی توسط سازمان شیلات ایران در کارگاه های تکثیر، تولید و به رودخانه ها رهاسازی می شوند (سالنامه آماری شیلات ایران، ۱۳۹۰). با وجود انجام تحقیقاتی در خصوص تأثیر آلودگی فاز محلول نفت خام بر ماهیان (Kennedy & Farrell, 2005; Simonto *et al*, 2008) ; Prasad, 1991; Stephens *et al*, 2000; Rudolph *et al*, 2001; Akaisha *et al*, 2004 تحقیقات بسیار اندکی در چند سال اخیر روی اثر این آلاینده بر ماهیان خزر و از جمله ماهی سفید صورت گرفته است. در این پژوهش تأثیرات ناشی از مواجه شدن بچه ماهیان سفید با آب آلوده به درجات مشخصی از فاز محلول نفت خام، بر کورتیزول، آنزیم لاکتات دهیدروژناز و نیز آسیب های احتمالی بر بافت آبشش و همچنین میزان زنده مانی بچه ماهیان پس از انتقال به آب سالم و بدون آلودگی، مورد بررسی قرار گرفته است. کورتیزول کورتیکوستروئید مهم در ماهیان است و سنجش میزان آن در پلاسما و بافت بعنوان شاخص برای درجه استرس وارده به ماهیان مورد استفاده قرار می گیرد (Barton & Iwama, 1997; Wendlaar Bonga, 1991) و آنزیم لاکتات دهیدروژناز نیز بطور وسیعی در مطالعات اکوتوکسیسیته مورد ارزیابی قرار می گیرد تا آسیب های ارگان ها، سلول ها و بافت ها تشخیص داده شود (Diamantino *et al*, 2001). از طرفی بافت های آبشش و کبد شاخص های خوبی برای ارزیابی سمیت هیدروکربن های نفتی می باشند (Brand *et al*, 2001). آبشش ها بسیار حساس می باشند و بسیار سریع به آلودگی آب که توسط نفت و سوخت ماشین باشد پاسخ می دهند (Akaishi *et al*, 2004). بررسی شدت آسیب های وارده به بافتها و آنزیم های بدن این موجود در مواجهه با آلاینده های خاص می تواند به منظور ایجاد تمهیداتی برای افزایش بقای این بچه ماهیان در هنگام رهاسازی به محیط طبیعی مورد استفاده قرار گیرد.

۱-۱- هدف کلی

(۱) تعیین اثرات فاز محلول در آب نفت خام بر تغییرات فیزیولوژیک و بافت آبشش بچه ماهی سفید در زمان های مختلف

۲-۱- اهداف اختصاصی

(۱) بررسی تغییرات برخی شاخص های فیزیولوژیک در زمان های مختلف در بچه ماهیان سفید در معرض قرار گرفته با فاز محلول در آب نفت خام (کورتیزول و لاکتات دهیدروژناز)

۲) بررسی بافت آبشش بچه ماهیان در معرض فاز محلول در آب نفت خام

۳) بررسی هورمون کورتیزول و آنزیم لاکتات دهیدروژناز در بچه ماهی سفید بعد از انتقال به آب تازه و بدون آلودگی

۴) بررسی بافت آبشش ماهیان بعد از انتقال به آب بدون آلودگی

۳-۱- ضرورت انجام تحقیق

اگرچه مطالعات گوناگون، تأثیر آلودگی های نفتی بر آبزیان را مورد بررسی قرار داده اند، این امر تاکنون به طور اختصاصی در ماهیان استخوانی دریای خزر صورت نگرفته است. با توجه به ارزش اقتصادی ماهی سفید و کاهش ذخایر آن از سویی و وجود صدها چاه نفت در کشورهای حاشیه دریای خزر و استحصال های جدید نفت با سیستم های قدیمی و بدون بهره گیری از تکنولوژی جدید از سوی دیگر، انجام این تحقیق گامی در جهت مشخص کردن میزان تأثیر هیدروکربن های نفتی بر بقای این آبی با ارزش خواهد بود.

۴-۱- فرضیه ها

۱) فاز محلول در آب نفت خام بر تغییرات پارامترهای فیزیولوژیک کورتیزول و آنزیم لاکتات دهیدروژناز تأثیر گذار است.

۲) فاز محلول در آب نفت خام بر بافت آبشش تأثیر گذار است.

۳) قرار گرفتن بچه ماهیان آلوده شده با فاز محلول در آب نفت خام با آب تازه فاقد آلودگی بر بقای آنها تأثیر مثبت دارد.

فصل دوم

کلیات و مروری بر منابع

۲- کلیات

۲-۱- نفت خام

نفت خام ترکیبی از هیدروکربن های آلیفاتیک^۱، آروماتیک^۲ و آلیسیکلیک^۳ است. همچنین دارای مقادیر محدودی از ترکیبات غیرآلی و گازهاست (OSPAR, 2000). خصوصیات فیزیکی و شیمیایی نفت خام بسیار متفاوت و متغیر است. انواع نفت خام بسیار متنوع بوده و هر یک دارای شاخصه های خاص خود است. بنابراین انواع آن می توانند رفتارها و ویژگی های متفاوتی را از خود نشان دهند (CONCAWE, 2001). نفت دارای ترکیبات با دامنه وسیعی از هیدروکربن های بسیار کوچک تا بزرگ است. ترکیبات کوتاه زنجیره نفت خام می توانند در آب حل شده و یا به صورت گاز از محیط خارج شوند. هیدروکربن های دارای زنجیره متوسط بر روی سطح آب پخش شده و یک لایه هیدروکربنی بر روی آن ایجاد می کنند. ترکیبات با زنجیره بلند یا بر روی سطح آب توده های شناور را تشکیل داده و یا بر روی سطح بستر رسوب می کنند (API, 2003).

۲-۲- آلودگی نفتی

هیدروکربن های نفتی مهمترین آلاینده های مصب ها و نواحی ساحلی هستند (Connel & Miller, 1981). نفت می تواند برای موجودات زنده هر دو محیط آبی دریایی و آب شیرین بسیار آلاینده و خطرناک باشد. حتی غلظت های پایین نفت خام می تواند در محیط های آبی کشنده باشد. این امر به خاطر خصوصیات اجزای تشکیل دهنده نفت است. بخش عمده ترکیبات سازنده نفت خام هیدروکربن های غیر قطبی هستند. این هیدروکربن ها به راحتی می توانند در غشاء دو لایه سلولی حل شده و از آن عبور کنند و به درون سلول های زنده راه یابند (Peterson, 1994; Di Toro *et al*, 2000).

فاز محلول^۴ در آب نفت خام، بیشترین برخورد و اثر را بر روی محیط آبی و موجودات آبی دارد زیرا در تقابل مستقیم با آنهاست. در صورتی که سایر قسمت های آن دارای تماس و اثر محدودی بر آب و موجودات است (API, 2003). معمولاً سمیت حاد^۵ نفت خام به فاز محلول در آب و به طور خاص هیدروکربن های آلیفاتیک و آلیسیکلیک آن نسبت داده می شود. همچنین هیدروکربن های چند حلقه ای^۶ نیز به صورت معنی دار در سمیت حاد نفت در محیط آبی تأثیر دارند (API, 2003; Reynaud & Deschaux, 2006). فاز محلول نفت خام ترکیب بسیار

¹ Aliphatic

² Aromatic

³ Alicyclic

⁴ Water soluble fraction (WSF)

⁵ Acute toxicity

⁶ Polyaromatic hydrocarbons (PAHs)

فرآر و مخلوطی سمی از هیدروکربن های ساده، هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای، فنل^۱ و ترکیبات هتروسیکلیک^۲ دارای نیتروژن و سولفور می باشد (Akaisha et al, 2004).

هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای، از اجزای نفت خام، دسته ای از آلاینده های رایج و فراوان در محیط هستند که جهش زا و سرطان زا بوده و از سوختن ناقص مواد آلی مخصوصاً سوخت های فسیلی و از تخلیه نفت و مشتقاتش در محیط، آزاد می شوند (Tolosa et al, 2004). آلودگی نفتی در محیط آبی می تواند موجب مرگ و میر زیادی در گونه های غیر متحرک یا با تحرک کم، مانند زئوپلانکتون ها، بی مهرگان و یا لارو و تخم ماهی ها گردد اما به احتمال زیاد اثر فراوانی بر گونه های متحرک بالغ نمی گذارد. در حالیکه ماهی های نوجوان به آلودگی بسیار حساس بوده و آسیب پذیر هستند (Heras et al, 1992; API, 2003; Kennedy & Farrell, 2005). برخی مطالعات نشان داده است که ماهیانی نظیر مینو^۳ از خانواده کپور ماهیان می توانند هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای را از محیط های آلوده جذب کرده و آنها را به سطوح غذایی بالاتر منتقل کنند (Dede & Kaglo, 2001).

فاز محلول در آب هیدروکربن های نفتی، بوسیله ریختن نفت و یا تخلیه فاضلاب های صنعتی، تولید می شوند که مسبب سمیت و سرطانزایی نفت خام در موجودات زنده آبی می باشند (Lavarias et al, 2007). این ترکیبات اثرات حادی بر ماهیان استخوانی داشته و اثرات آنها بر مراحل لاروی و جوانی ماهیان شامل تغییرات ظاهری، بافتی و آسیب های ژنتیکی گزارش شده است (Carls et al, 1999).

۲-۳- آلودگی نفتی دریای خزر

دریای خزر با حدود ۳۷۸۴۰۰ کیلومتر مربع وسعت و ۶۳۹۷ کیلومتر خط ساحلی بزرگترین دریاچه دنیا است (سرافراز و اکبریان، ۱۳۸۴). حوضه دریای خزر و کشورهای پیرامون این دریاچه بزرگ بسیار نفت خیز هستند و سالانه مقدار زیادی از این نفت برداشت می شود (Effimoff, 2000). از اینرو مقدار زیادی نفت خام و فرآورده های نفتی از طریق آب رودخانه ها، بویژه ولگا و یا عملیات برداشت و انتقال نفت در بستر دریای خزر، وارد محیط آن می گردد (Karpinsky, 1992). با وجود آنکه اغلب منابع نفتی آذربایجان و حدوداً ۳۰ تا ۴۰٪ کل منابع نفتی قزاقستان و ترکمنستان در مناطق دور از ساحل قرار دارند و کشور ایران تولید نفت و گاز طبیعی در دریای خزر ندارد اما این کشورها و به خصوص ایران در مجموع نقش مهمی در انتقال نفت و گاز و صادرات آنها نسبت به سایر کشورهای حاشیه دریای خزر دارند (Tolosa et al, 2004).

¹ Phenol

² Heterocyclic

³ *Alburnoides bipunctatus*

فعالیت های نفتی فراوان کشور آذربایجان در این حوضه نیز تأثیر عمده ای در افزایش آلودگی نفتی دریای خزر دارد (Dumont, 1995). در شبه جزیره آبخوران آذربایجان بیش از یک قرن است که به واسطه تولیدات نفتی و احداث خط لوله انتقال نفت بیش از ۱۰۰۰۰ هکتار از این زمین ها به شدت آلوده شده است. علاوه بر آن، شرکت صنعتی سامگایت^۱ و پالایشگاه نفت و پتروشیمی مستقر در باکو بزرگترین منابع ساحلی آلوده کننده دریای خزر می باشد (Tolosa et al, 2004). این منابع آلاینده ساحلی به همراه حوزه های نفتی دور از ساحل، ترافیک نفت کش ها و انتقال نفت توسط خطوط لوله سبب تولید بیشترین مقدار سموم و نشت نفت به دریای خزر هستند (Dumont, 1998). رودخانه های حوزه جنوبی دریای خزر به واسطه تراکم جمعیت و بالا بودن فعالیت های انسانی و صنعتی، تردد کشتی ها و قایق های صیادی و همچنین انتقال آلودگی های خشکی از طریق شسته شدن توسط باران و تخلیه آنها به رودخانه ها، محتوی آلودگی بالایی می باشند. علاوه بر آن، در نمونه های آب مناطق مختلف حوزه خزر، ترکیبات فنولی، ترکیبات نفتی و دیگر آلاینده ها یافت شده است (Dahl & Kuralbayeva, 2001). طبق نتایج حاصل از گشت تحقیقاتی مؤسسه تحقیقات شیلات ایران در پائیز ۱۳۸۲، هیدروکربن های چند حلقه ای در آب همه ایستگاه های حوزه جنوبی دریای خزر با غلظت های متفاوتی مشاهده گردیده است (هاشمیان، ۱۳۸۵). خزر به عنوان یک دریاچه دارای هیچ راه خروجی برای آب نیست و این امر اکوسیستم آن را بسیار آسیب پذیر می نماید (سرافراز و اکبریان، ۱۳۸۴)، بنابراین آلاینده ها نیز به علت نداشتن راه خروج، قابلیت تجمع و افزایش غلظت بالایی در آن دارند و به تبع آن آثار مخرب بیشتری را بر روی محیط و جانداران خزر دارند (Abilov et al, 1999).

۲-۴- فاکتور های فیزیولوژیک

به منظور بقا و زنده ماندن ماهی، سیستم های فیزیولوژیک آن باید قادر باشد در برابر تغییرات طبیعی در وضعیت های متفاوت شیمیایی، فیزیکی و زیست شناختی محیط آب ایستادگی نماید. دارا بودن یک درک پایه از فیزیولوژی واکنش در برابر استرس و تغییرات محیطی که ماهی از طریق این واکنش می تواند خود را با آنها تطبیق دهد کمک می کند تا بتوان شرایط محیطی که برای ماهی ایجاد استرس می کنند را شناسایی و به روشهای مناسب جهت تخفیف این عوامل بر ماهی و بهبود وضعیت سلامت عمومی و شرایط فیزیولوژیک ماهی دست یافت (Wedemeyer, 1996). در صورت روبرو شدن ماهی با عوامل استرس زای حاد یا مزمن که از حد ظرفیت تطابقی ماهی فراتر باشد احتمال بقای ماهی کاهش می یابد. از طرفی ممکن است استرس کمتر از حد کشنده^۲ نیز در صورت مزمن شدن، به دلیل مصرف مورد نیاز برای جبران آن از نظر فیزیولوژی، سلامتی ماهی را تضعیف نماید (Barton & Iwama, 1991). تغییرات فیزیولوژیک که در جریان تلاش ماهی

¹ Sumgait

² sublethal

برای جبران اثرات عوامل استرس زای اجتناب ناپذیر به وقوع می پیوندند از بسیاری جهات شبیه تغییرات ایجاد شده در جانوران عالی هستند (Wedemeyer et al, 1990).

در پاسخ به یک عامل استرس زا که از آن جمله می توان به آلودگی های ناشی از نفت خام اشاره کرد، بخش تالاموسی مغز، هیپوفیز را به منظور آزاد کردن هورمون Adrenocorticotropic (ACTH) تحریک می کند. این هورمون از طریق گردش خون به بخش قدامی کلیه می رسد و در آنجا سلول های بین کلیوی را به منظور تولید کورتیزول و سایر هورمون های کورتیکوستروئیدی تحریک می کند. سیستم عصبی سمپاتیک، بافت کرومافین بخش قدامی کلیه را برای تولید هورمون های کتکول آمینی شامل آدرنالین تحریک می کند. هر دو دسته هورمون های فوق تغییرات قلبی عروقی نظیر افزایش جریان خون و فشار خون، افزایش مصرف اکسیژن و همچنین تغییرات شیمی خون نظیر افزایش میزان گلوکز را آغاز می کنند. همانطور که بیان شد، اهمیت عملی واکنش در برابر استرس، افزایش احتمال بقای ماهی در مواجهه با تغییرات فیزیکی، شیمیایی یا زیست شناختی است. بنابراین، تغییرات فیزیولوژیک در ابتدا در جهت سازش هستند. به این صورت که به حفظ ثبات ترکیب خون کمک می کنند. برای مثال، افزایش میزان قند خون¹ ایجاد شده توسط فعالیت هورمون های آدرنالین و سایر هورمون های کتکول آمین ترشح شده در طی واکنش هشدار، در جهت تأمین انرژی مورد نیاز برای واکنش نزاع و یا ترس می باشد. منبع اولیه بالارفتن میزان قند خون، گلیکوژن کبدی است که به سرعت از کبد به خون تخلیه می شوند. در صورتی که تغییر ایجاد شده و قرار گرفتن ماهی تحت آن شرایط، پایدار باشد کورتیزول تولید می شود و افزایش قند خون مشاهده خواهد شد که این افزایش قند می تواند به دلایل مختلفی از جمله توسط فرایند گلیکونئوژنیز در کبد، کاهش یا توقف جذب قند از محیط و یا تغییر نحوه عمل سایر هورمون های مربوط به قند خون ایجاد می شود. در صورتیکه فعالیت های شدید عضلانی رخ دهد ممکن است میزان اسید لاکتیک ایجاد شده به حدی باشد که باعث تخلیه شدن ذخایر قلبیایی خون و متعاقباً منجر به ایجاد اسیدوز متابولیک و تضعیف تنفس شود (Wedemeyer, 1996).

آنزیم لاکتات دهیدروژناز در تمام سلول های بدن یافت شده و بعنوان بخشی از مسیر گلیکولیز فعالیت دارد. افزایش مقدار آنزیم مذکور شاخصی برای تعیین میزان شدت آسیب بافتی است. این آنزیم باعث کاتالیز واکنش تبدیل لاکتات به پیرووات می شود که گام مهمی در تولید انرژی درون سلولی است. آنزیم فوق درون سلولی بوده لذا با مرگ سلولی در اثر استرس های شدید محیطی از جمله مواجهه با آلودگی های محیطی آزاد گشته و میزان آن افزایش می یابد (McPherson & Pincus, 2007).

¹ hyperglycemia

قرار دادن ماهیان در دوره های کوتاه مدت در معرض غلظت‌های زیرگشونده این آلاینده ها نیز سبب بهم ریختن هموستازی و وارد شدن استرس بر سیستم فیزیولوژیک می شود (Kennedy & Farrell, 2005). در شرایط آزمایشگاهی، آلاینده های مختلف باعث ایجاد آسیب های بافتی مشخصی در اندام های ماهی می شوند که با تعیین این نوع آسیب ها می توان از آنها به عنوان نشانگر زیستی به منظور بررسی وجود آلاینده ها در اکوسیستم های طبیعی استفاده کرد (Oliveria et al, 2002).

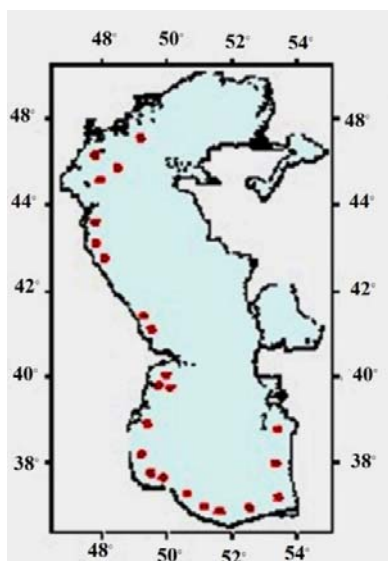
از بین اندام‌های حیاتی ماهیان، آبشش ها اهمیت زیادی در تنفس، تنظیم اسمزی، تعادل اسید- باز و دفع نیتروژن زائد دارند (Simonato et al, 2008). تغییر در ساختار این اندام به عنوان اصلی ترین پاسخ در مقابل استرس های شیمیایی مطرح می باشد (Heuvel, 2000). تحقیقات اندک انجام گرفته در زمینه تأثیر آلودگی هیدروکربنهای نفتی بر بافت آبشش ماهیان (Nero et al, ; Gabrial et al, 2007; Simonato et al, 2008; Bhattacharya et al, 2008; Dede & Rudolph et al, 2001; Khan, 2003; Martinez et al, 2004; Akaishi et al, 2004; 2006 Prasad, ; Teh et al, 1997; Khan, 1998; Heuvel et al, 2000; Stephens et al, 2000; Kalgo, 2001 Engelhardt et al, 1981 ; Haensly, 1982; 1988, 1991) حساسیت و آسیب پذیری بالای این بافت را در مواجهه با هیدروکربنهای نفتی به کمک تکنیک های مختلف ثابت کرده است. بنابراین می توان از آبشش ها به عنوان شاخص حساس نسبت به ترکیبات آلی در اکوسیستم ها استفاده نمود (Oliveria et al, 2002).

۲-۵- ماهی سفید

ماهی سفید با نام علمی *Rutilus kutum*، از خانواده کپور ماهیان^۱ است که تنها در دریای خزر دیده می شود (Heyrati et al, 2007; Doraafshan & Paykan, 2006). این گونه مهم ترین ماهی استخوانی خزر بوده و از نظر شیلاتی دارای مقبولیت بالایی است و جمعیت های آن در قسمت های نزدیک ساحل، از رودخانه اترک تا قسمت جنوبی دریای خزر پراکنده اند (Valipour & Khanipour, 2008).

بیشترین تراکم و میزان صید ماهی سفید در طی سالیان متمادی مربوط به حدفاصل رودخانه های کورا در جمهوری آذربایجان و رودخانه سفیدرود در ایران بوده است ولی در طی ۲۵ سال گذشته و پس از رهاسازی انبوه بچه ماهیان سفید در تمامی سواحل ایرانی دریای خزر، پراکنش آن نسبت به گذشته با تغییراتی مواجه بوده و تراکم آن در سواحل استان های مازندران و گلستان نیز بیشتر گردیده است اما ذخایر این ماهی در منطقه گیلان به مراتب بیشتر از مازندران است (رضوی صیاد، ۱۳۷۴).

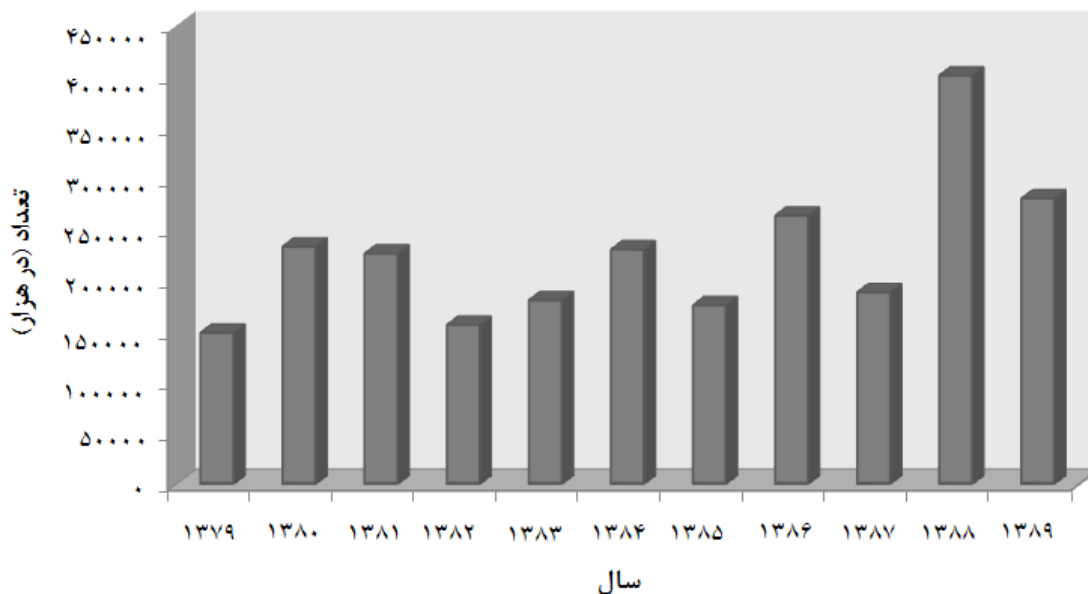
^۱ Cyprinidae



شکل ۲-۱: نقاط: محدوده پراکنش ماهی سفید در دریای خزر

<http://WWW.caspianenvironment.org>

حداکثر تخم ریزی در ماه فروردین و زمانی که دمای آب در حدود ۱۳-۱۵ درجه سانتی گراد است، دیده می شود (Berg, 1946). مهاجرت ماهی سفید به رودخانه های جنوبی دریای خزر جهت تخم ریزی در بهمن و اسفند ماه رخ می دهد (Afraei Bandpei *et al*, 2008). ماهی سفید از نظر رژیم غذایی جزء ماهیان همه چیزخوار بوده ولی بر خلاف سایر ماهیان همه چیزخوار به دلیل کوتاه بودن طول روده دارای طیف غذایی محدودی می باشد. این ماهی به عنوان غذای آغازین از انواع پلانکتون های گیاهی، جانوری و لارو حشرات استفاده نموده ولی پس از رسیدن به وزن بالاتر و در مراحل پس از مهاجرت به دریا، عمدتاً از صدف های دو کفه ای تغذیه می نماید (رضوی صیاد، ۱۳۷۴). نرخ رشد آن بالا بوده و از نرم تنان، خرچنگ ها، میگوها و سایر ارگانیزم ها تغذیه می کند (Askerov *et al*, 2003؛ عبدلی و نادری، ۱۳۸۷). ماهی سفید از نظر طول به ۷۱ سانتی متر و از نظر وزن به ۴ کیلوگرم می رسد. این ماهی در دریای خزر تا ۱۰ سال عمر می کند و نرها در ۲-۳ و ماده ها در ۳-۴ سالگی بالغ می شوند (Valipour & Khanipour, 2008).



نمودار ۲-۲: میزان رهاسازی بچه ماهیان سفید به منظور بازسازی ذخایر

۲-۶- مرور منابع

۲-۶-۱- مرور منابع در داخل کشور (ایران)

اهمیت شناخت اثر آلاینده های محیطی از جمله هیدروکربنهای نفتی خصوصاً در مراحل اولیه رشد و نمو ماهیان سبب شده است تا تحقیقات قابل ملاحظه ای در این زمینه صورت گیرد.

در ایران مطالعه ای در رابطه با تأثیر فاز محلول در آب نفت خام بر روی کورتیزول و آنزیم لاکتات دهیدروژناز آبزبان صورت نگرفته و همچنین مطالعات بسیار محدودی در ارتباط با آسیب شناسی بافت آبشش در مواجهه ماهیان انجام شده است.

شاهسونی و موثقی (۱۳۸۲) با بررسی بالینی و آسیب شناسی بافت آبشش در مسمومیت تجربی با نفت سفید در ماهی حوض (*Carassius auratus*) عنوان نمودند علایم بالینی در گروه های آزمایشی شامل عدم تعادل، بی اشتها، افزایش ترشحات موکوسی، زخم های سطحی و یبوست بوده و در ماهیان گروه شاهد هیچگونه تغییری مشاهده نکردند. بعد از کالبدگشایی و تهیه مقاطع بافتی از آبشش، در بررسی های هیستوپاتولوژیک، ضایعاتی شامل پرخونی، خونریزی، نفوذ سلول های آماسی تک هسته ای و نکروز تیغه های آبششی را گزارش نمودند.

شریف پور و همکاران (۱۳۸۷) با بررسی پاتولوژیک برخی اندامهای مهم ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) با تأکید بر آلاینده ها، تورم، هیپرتروفی و هیپرپلازی، چسبیدن رشته‌های ثانویه به یکدیگر، پرخونی، خونریزی و نکروز را در آبشش، پرخونی عروق، اتساع و پرخونی سینوزوئیدهای کبدی، هیپرتروفی، دژنراسیون و واکوئوله شدن هیپاتوسیتها و نیز نکروز را در بافت کبد و دژنراسانس و نکروز لوله‌های ادراری، بزرگ شدن گلوامرولها و کاهش فضای کپسول بومن را از مهمترین علائم میکروسکوپیکی کلیه عنوان نمودند.

در مطالعه ای که توسط شریف پور و همکاران (۱۳۹۰) انجام شد، تغییرات پاتولوژیک مواجهه با فاز محلول نفت خام در آبشش شامل لخته شدن خون در لاملای اولیه و ثانویه، ادم شدید در غشاء پایه لاملای ثانویه، هیپرتروفی سلول های اپی تلیال لاملای ثانویه، وجود رنگدانه ملانین در آبشش، شروع هایپرپلازی در بین لاملاهای ثانویه و کاهش قطر لاملاهای ثانویه مشاهده شد. این مطالعه نشان داد که فاز محلول نفت خام در آب سبب آسیب های جدی به آبشش بچه ماهی سفید می شود.

۲-۶-۲- مرور منابع در خارج از کشور

در تحقیقی که Englehardt و همکاران (۱۹۸۱) در رابطه با تأثیر نفت خام از طریق تزریق بر روی قزل آالی رنگین کمان (*Onchorhynchus mykiss*) انجام دادند تجزیه اپی تلیال، اختلال (غیر نرمال بودن) در سلول های کلراید و هم جوشی لاملاهای ثانویه آبششی و نشت قطراتی از نفت بین لاملاها را مشاهده نمودند.

Haensly (۱۹۸۲) با مطالعه روی کفشک ماهی (*Pleuronectes platessa*) در معرض نشت نفت Amoco cadiz در آبهای ساحلی فرانسه، ناهنجاری‌های هیستوپاتولوژیک در آبشش، کلیه و تخمدان را گزارش نمود.

Mallatt (۱۹۸۵)، نکروز سلول های آبشش ماهی طلایی قرار گرفته در معرض نفت را مشاهده نمود.

Ernst و همکاران (۱۹۸۷، ۱۹۸۹) نتیجه گرفتند که جذب سریع (چند دقیقه) و تصفیه نسبتاً سریع (چند روز) هیدروکربن ها در میگوی ماکروبراکیوم (*Macrobrachium borellii*)، اسکالوپ دریایی (*Placopecten magellanicus*) و ماهی کاد (*Gadus morhua*) صورت می گیرد.

Rice و Thomas (۱۹۸۷) در رویارویی ماهی آزاد کوهو (*Oncorhynchus kisutch*) با نفت خام بعد از ۴۸ ساعت، افزایش در کورتیزول پلازما را گزارش نمودند.

Davison و همکاران (۱۹۹۲) بیان کردند که در رویارویی ماهیان با نفت خام مقدار زیادی موکوس از آبشش ها ترشح می شود.

McCormick (۱۹۹۵) بیان نمود که نفت خام سبب افزایش کورتیزول بدن شده که این کورتیزول، فعالیت سلول های کلراید را افزایش داده و سبب تحریک فعالیت Na^+/K^+ ATPase می شود.

Stephens و همکاران (۱۹۹۶) لارو گونه ای کفشک ماهی زمستانه (*Scophthalmus maximus*) را تحت تأثیر چند غلظت نفت قرار دادند و پس از ۱۲ ساعت در آنها تورم و چین خوردگی در آبشش مشاهده نمودند.

Teh و همکاران (۱۹۹۷) نشان دادند که آلودگی های نفتی در جمعیت ماهیان شکارچی آب شیرین باعث تکثیر سلولهای اپیتلیال پایه و سلولهای موکوسی آبشش می شوند.

Thomas و همکاران (۱۹۹۷) نتیجه گرفتند که رویارویی ماهیان استخوانی با غلظت های تحت حد نفت خام باعث افزایش کورتیزول پلاسما، لاکتات و غلظت گلوکز می شود.

Khan (۱۹۹۸)، در آبشش کفشک ماهی زمستانه ساکن در نزدیکی پالایشگاه نفت، هایپرپلازی در لاملاها و فضای بین لاملاها و همچنین جدا شدن اپیتلیال را مشاهده کرد و عنوان نمود که این آسیبها مربوط به نشت نفت می باشد.

Birtwell و همکاران (۱۹۹۹) تخم های ماهی آزاد گوژپشت را به مدت ۱۰ روز تحت تأثیر فاز محلول در آب نفت خام اسلوپ شمالی آلاسکا^۱ قرار داده و لاروهای حاصل را در محیط طبیعی رهاسازی کردند. پس از ۱ تا ۳ سال دوباره آنها را صید نموده و مورد بررسی قرار دادند. هیچگونه رابطه معنی داری در میزان رشد و سلامت عمومی آنها و نفت خام در مقایسه با گروه شاهد مشاهده نشد.

Gagnon و همکاران (۱۹۹۹) در تحقیقی ماهی آزاد اقیانوس اطلس را در طول ۴ روز در معرض نفت خام با غلظت کم قرار دادند و عدم فعالیت آنزیم سیترات سینتاز و لاکتات دهیدروژناز را دیدند در حالیکه فعالیت آنزیم سیتوکروم C اکسیداز بدون تغییر باقی ماند. سپس به مدت ۸ روز در آب تمیز قرار دادند و مشاهده کردند که فعالیت این آنزیم کمتر از مقداری است که قبل از مواجهه با نفت بود.

Estephens و همکاران (۲۰۰۰) اظهار نمودند که در مواجهه بچه سپرماهیان با غلظت های مختلف نفت به مدت شش هفته میزان کورتیزول کل بدن این ماهیان در مقایسه با نمونه های شاهد بطور معنی داری افزایش یافت.

¹ Alaskan north slop

Vanden Heuvel و همکارانش (۲۰۰۰) بیان نمودند که افزایش موکوس در آبشش ماهیانی که در معرض نفت خام قرار گرفتند سبب افزایش فاصله در طول لاملاهای ثانویه شده که این امر قابلیت تبادل گازی در آبشش را افزایش می دهد. Kaglo و Dede (۲۰۰۱) با قرار دادن تیلایپا (*Oreochromis niloticus*) در معرض LC50 فاز محلول در آب گازوئیل به مدت ۹۶ ساعت، افزایش طول، هایپرپلازی و ادغام لاملاها را در آبشش گزارش کردند.

Rudolph و همکاران (۲۰۰۱)، با بررسی اثر هیدروکربنهای نفتی بر روی قزل آلی رنگین کمان عوارضی همچون جدا شدن اپیتلیال از غشاء پایه و برهم خوردگی ساختار رشته ها و تیغه های آبششی و هایپرتروفی لاملاها را در آبشش و تغییرات سلولی همچون از دست دادن شکل سلولهای هیپاتوسیت در کبد را ثبت نمودند.

Khan (۲۰۰۳)، در مطالعه ای مشابه بر روی کفشک ماهیهای ساکن در محیطهای آلوده با هیدروکربن های پلی آروماتیک (PAHs)، هایپرپلازی و هایپرتروفی روی اپیتلیوم لاملاهای آبشش مشاهده کرد که نتیجه آن افزایش تولیدات موکوسی است.

Georgiades و همکاران (۲۰۰۳) بیان کردند که ستاره دریایی ۱۱ بازوی استرالیایی (*Coscinaxterias muricata*) به مدت ۴ روز در معرض نفت خام قرار داشت و سپس به آب سالم و بدون آلودگی منتقل شدند و بعد از ۱۴ روز، بهبودی کاملاً مشهود بود.

Long و همکاران (۲۰۰۳) تحقیقی بر روی یک نوع نرم تن (*Mytilus edulis planulatus*) انجام دادند و به این نتیجه دست یافتند که در رویارویی حاد این نرم تن با فاز محلول نفت خام میزان فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز در آبشش افزایش یافت.

Pollino & Holdway (2003) دریافتند که بعد از ماهی رنگین کمان استرالیایی (*Melanotaenus fluviatilis*) ماهیان با فاز محلول نفت خام، ماهیان به مدت ۱۴ روز به آب بدون آلودگی منتقل شدند و میزان فعالیت LDH در این ماهیان به میزان ماهیان شاهد کاهش یافت.

Chambers و همکاران (۲۰۰۴) تغییرات اندکی در فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز در کفال مخطط (*Mugil cephalus* Linnaeus) به سبب رویارویی با نفت خام دیدند.

Lavaris و همکاران (۲۰۰۴) در مطالعه ای، *Macrobrachium borellii* را که در معرض غلظت کشنده نفت خام به مدت ۹۶ ساعت قرار داشت، بعد از ۱۰ روز در معرض آب تمیز و تازه قرار دادند و مشاهده کردند که هیدروکربن ها به سرعت و در عرض ۱۲ ساعت اول افت پیدا کردند.

Martinez و همکاران (۲۰۰۴) با مطالعهٔ آبشش *Prochilodus lineatus* در معرض WSD¹ وقوع تغییرات هیستولوژیک مانند جدا شدن اپیتلیال و آنیورسم (اتساع عروق) در آبشش را مشاهده کردند.

Cohen و همکاران (۲۰۰۵) دریافتند که در رویارویی باس استرالیایی (*Macquaria novemauleata*) با فاز محلول نفت خام میزان فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز در بافت آبشش، کبد و ماهیچه سفید در این افزایش یافت. Kennedy و همکاران (۲۰۰۵) بیان نمودند در بچه ماهیان هرینگ اقیانوس آرام (*Clupea pallasii*) که بطور حاد و مزمن در معرض نفت خام بودند، افزایش در کورتیزول، لاکتات و گلوکز پلاسما دیده شد.

Nero و همکاران (۲۰۰۵) بعد از ۳ هفته رویارویی سوف زرد (*Perca flavescens*) و ماهی طلایی (*Carassius auratus*) با نفت خام، تغییرات هیستولوژی در آبشش شامل نکروز سلول های اپی تلیال و افزایش موکوس این سلول مشاهده کردند. آنها اظهار نمودند که خساراتی نظیر ادم لاملاها در ماهی طلایی که در معرض غلظت های بالای آلودگی نفت خام بودند بیشتر بود.

Kennedy و Farrell (۲۰۰۵) افزایش در کورتیزول، لاکتات و گلوکز پلاسما در رویارویی هرینگ اقیانوس آرام (*Clupea pallasii*) با نفت خام مشاهده نمودند.

Nero و همکاران (۲۰۰۶) در مطالعه ای بر روی سوف زرد و ماهی طلایی قرار گرفته در معرض آبهای متأثر از رسوبات نفتی، کاهش طول و افزایش ضخامت لاملاهای آبشش و همچنین نکروز و تجمع ماکروفاژها را در کبد مشاهده نمودند.

Camargo و Martinez (۲۰۰۷) با مطالعه بر روی (*Prochilodus lineatus*) ساکن در رودخانه های شهری، آسیبهایی شامل جدا شدن اپیتلیال، هایپرپلازی و هایپرتروفی روی اپیتلیوم لاملاها، چسبندگی لاملاهای ثانویه و آنیورسم در آبشش، بزرگ شدن گلومرول، کاهش فضای بومن، انسداد مجاری توبولی، تورم ابری و دژنراسیون قطره‌ای هیالین در کلیه، هایپرتروفی سلولهای اپیتلیال کبدی، دژنره شدن سیتوپلاسم و هسته، تراکم ملانوماکروفاژها، تجمع صفرا و نکروز کبدی در کبد را مشاهده نمودند.

Gabriel و همکاران (۲۰۰۷) با مطالعه آبشش گربه ماهی آفریقای (*Clarias gariepinus*) در معرض تولیدات نفتی پالایشگاه، عوارضی همچون هایپرتروفی، خمیدگی، تورم و همجوشی لاملاها، تورم در بیشتر رشته ها و تیغه های آبششی، پر خون شدن رگهای آبشش و پر خونی درون لاملاها را ثبت نمودند.

Simonato و همکاران (۲۰۰۸)، با مطالعه بر روی *Prochilodus lineatus* در معرض قرار گرفته با گازوئیل، در شرایط آزمایشگاهی به مدت ۶، ۲۴ و ۹۶ ساعت، آسیبهایی همچون هایپرپلازی و هایپرتروفی اپیتلیوم آبششی، پر خونی در

¹ Water_soluble of diseal oil

تیغه های آبششی، جدا شدن اپیتلیال از غشاء پایه تیغه های آبششی، همجوشی و به هم چسبیدگی تیغه های آبششی و برهم خوردن ساختار کلی لاملاها را در آبشش و هایپرتروفی هسته، بی نظمی و بی قاعدگی در شکل هسته سلولهای هیپاتوسیت، هایپرتروفی و تورم سلولهای هیپاتوسیت، آتروفی سلولهای کبدی، تجمع ملانوماکروفاژها، آتروفی هسته، پارگی و از هم گسیختگی سلولهای کبدی را در کبد، مشاهده کردند.

Rodrigues و همکاران (۲۰۱۰)، در رویارویی *Pejerrey* (*Odontesthes argentinensis*) با نفت، آبششها، لاملاهای ثانویه و مری، هایپرپلازی اپی تلبال و در کبد، انبساط سینوس های کبدی، توسعه غیر نرمال سلول های کبدی و انحطاط سلول های کبدی تک هسته ای و دو هسته ای مشاهده کردند.

Abdel-tawwab و Sharaf (۲۰۱۱) بیان نمودند که در رویارویی تیلاپیا با گازوئیل و سپس انتقال این ماهیان به آب تمیز و بدون آلودگی میزان کورتیزول پلاسما بطور آهسته شروع به کاهش نمود و بعد از دو هفته میزان آن ثابت شد.

در مروری به پژوهش های مرتبط با آلودگی نفتی می توان اهمیت مطالعات آسیب شناسی را در ردیابی و اثر سنجی اینگونه آلودگی ها نتیجه گرفت. این موضوع در منابع منتشر شده در دهه اخیر در ایران و سایر کشورها کم و بیش مورد توجه بوده و با در نظر گرفتن گسترش صنایع نفتی و فعالیت های انسانی در محیط های آبی در آینده اهمیت بیشتری نیز خواهد یافت.

فصل سوم

مواد و روش ها

۳- مواد و روش ها

۳-۱- ماهی و شرایط نگهداری

بچه ماهیان سفید (*Rutilus kutum*) حاصل از تکثیر در تیرماه ۱۳۸۹ از کارگاه تکثیر و باز سازی ذخایر ماهیان دریایی شادروان دکتر یوسف پور سیاهکل تهیه و به کارگاه تکثیر و پرورش دانشکده منابع طبیعی دانشگاه گیلان واقع در صومعه سرا منتقل شدند. بچه ماهیان به مدت یک هفته به منظور سازگاری با شرایط آزمایشگاه در آکواریوم های ۱۰۰ لیتری با ابعاد ۳۰×۵۰×۷۰ سانتی متر پر شده از آب دریا نگهداری شدند (آب با دمای ۱۸-۱۷ درجه سانتیگراد و دوره نوری ۱۲L:۱۲D ساعت). در این مدت غذادهی به صورت ۲ بار در روز (در ساعت ۹ صبح و ۳ بعداز ظهر) بوده و از غذای تجاری قزل آلا (پروتئین: ۵۰٪، چربی: ۱۳٪، خاکستر: ۱۲٪، رطوبت: ۱۰-۱۲٪، کالری: ۳۷۰۰ kcal/kg، قطر کرامبل: ۰/۵-۰/۹ mm) استفاده شد. بچه ماهیانی که در این پژوهش مورد آزمایش قرار گرفتند دارای میانگین طولی ۴/۲۲ ± ۰/۱۷ cm و میانگین وزنی ۰/۷۷ ± ۰/۰۶ g بودند.

۳-۲ - شاخص های کیفی آب

در دوره نگهداری بچه ماهی ها و زمان آزمایش ها دما، شوری، pH (با دستگاه دیجیتالی WTW مدل pH 340i/set، آلمان) و اکسیژن محلول آب (با دستگاه های دیجیتالی WTW مدل Oxi 340i/set، آلمان) اندازه گیری شد. حداقل، حداکثر و میانگین شاخص های اندازه گیری شده به شرح جدول ۱-۳ بود.

جدول ۱-۳: مشخصات کیفی آب مورد استفاده در آزمایش (میانگین ± S.E)

شاخص (واحد)	حداقل	حداکثر	میانگین
شوری آب (در هزار)	۸	۹	۸/۵ ± ۰/۱۴
pH	۷/۵	۸/۴	۷/۹ ± ۰/۱۲
اکسیژن محلول (میلی گرم در لیتر)	۶	۸/۳	۷/۱۵ ± ۰/۲۱
دمای آب (درجه سانتی گراد)	۱۶	۱۹	۱۷/۵ ± ۰/۲۶

۳-۳- خواص فیزیکوشیمیایی نفت خام مورد استفاده

در تمامی آزمایش ها از نفت خام با خواص فیزیکی و شیمیایی^۱ به این شرح: گرانروی ویژه^۲ در دمای ۱۵/۶ درجه سانتی گراد = ۰/۸۶۰۵، گرانروی آبی^۳ = ۳۲/۹، میزان نمک = ۷/۰ lb/1000bbbl، دمای ذوب = ۲۴°C- سولفور کل = ۱/۴۸۰ Wt% که از پالایشگاه تهران تهیه شده بود، بعنوان منبع نفت خام استفاده شد.

در بخش تعیین غلظت هیدروکربن های حل شده در محلول مادر مورد استفاده در آزمایش ها از پرکلریک اسید استفاده شد.

۳-۴- روش تهیه فاز محلول نفت خام (WSF)

فاز محلول نفت خام نیز طبق روش Anderson و همکاران (۱۹۷۴) تهیه شد. برای این منظور نفت خام و آب با نسبت ۱ به ۹ در یک ظرف شیشه ای ریخته شده و به مدت ۲۳ ساعت بوسیله دستگاه شیکر مخلوط شدند. سپس به مدت ۱ ساعت به صورت ساکن قرار داده شدند تا فاز محلول آن جدا شود. در نهایت بخش زیرین که همان محلول WSF بود استخراج و جداسازی گردید و بعنوان محلول مادر در آزمایش ها مورد استفاده قرار گرفت.

۳-۵- تیمارها و طراحی آزمایش

مراحل آزمایش شامل دو مرحله ارزیابی برخی فاکتورهای فیزیولوژیک بچه ماهیان قرار گرفته در معرض فاز محلول نفت خام و سپس ارزیابی همان فاکتورها در بچه ماهیان انتقال یافته به آب بدون آلودگی می باشد.

آزمایش ها روی گروهی از بچه ماهیان سفید که به صورت تصادفی انتخاب شده بودند، انجام شد. ۲۴ ساعت قبل از شروع آزمایش غذا دهی به ماهی ها متوقف شد.

۳-۵-۱- مرحله اول : تیمارهای در معرض قرار گرفته با فاز محلول نفت خام

در مرحله اول تعداد ۹ آکواریوم با ابعاد ۵۰ × ۳۰ × ۷۰ انتخاب و در هر یک به ترتیب ۷۰ لیتر محلول WSF با غلظت های ۰/۱۷ و ۳/۴ ppm (به ترتیب معادل ۱۰ و ۵۰ درصد میانه غلظت کشنده فاز محلول در آب نفت خام) محاسبه شده به روش نیمه پایدار^۱ (ابراهیم

¹ Physico-chemical indexes

² Special gravity

³ American Petroleum Institute