Second Scientific Conference on Modern Technologies in Oil Refining In 14-16/5/2013

Laboratory Study for Histopathological Effects Propduced from Exposure of Common Carp Fish Cyprinus Carpio L. of Al-Dora Refinery Waste

Sarab R.M
Minstry of Science and Technology
E mail: hadeerviolet @yahoo.com
Majida S.A.,
Ministry of Agricultur
Ghadaa A.H
Minstry of Science and Technology
Russul B.H
Minstry of Science and Technology

ABSTRACT

The pathological effect due to effect of petroleum hydrocarbon on common carp Cyprinus carpio and then reflected indirectly on human health was studied. Seven groupsof fish were exposed to seven different concentrations (0.04,0.08,0.12,0.16,0.20,0.24,0.28)ml\100ml consequences , the eighth group was left as control group (without addition) The fish was observed for 72 hours to detect the non killed concentration (LC_0),the concentration kill half (LC_{50}) and concentration killed to all (LC_{100}) (0.20,0.24,0.28)ml/100ml respectively . A group of fish was exposed acutely to the concentration (0.20) that does not killed. The fish carried to another aquarium contain tap water and watched for seven days after that we take tissue sections from the exposure fish organs (liver, intestine , muscles, gills, brain, kidney).The samples was diagnosed Histopathologically, The Results showed an appearance of pathological signs represented by nervous signs, abnormal swimming produce by toxic effect on the central nervous system and histopathological changes represented by congestion of blood vessels, perivascular inflammatory cuffing chronic type in addition to vaculation of the cell and single cell necrosis in some of them .

Key words: Histopathological Effects, Common Carp Fish, Refinery Waste

دراسة مختبرية للتأثيرات المرضية النسجية الناتجة من تعرض اسماك الكارب الاعتيادي Cyprinus carpio L. لفضلات مصفى الدورة

الخلاصة

تمت دراسة التأثيرات المرضية النسجية الناتجة عن تعرض اسماك الكارب الاعتيادي لمركبات الهيدروكربون وبالتالي انعكاسها بصورة غير مباشرة على صحة الإنسان.حيث تم تعريض سبعة مجاميع من أسماك الكارب الاعتيادي إلى تراكيز مختلفة من الفضلات(0.18, 0.12, 0.08, 0.04

https://doi.org/10.30684/etj.2013.83725
2412-0758/University of Technology-Iraq, Baghdad, Iraq
This is an open access article under the CC BY 4.0 license http://creativecommons.org/licenses/by/4.0

0.28, 0.24, 0.20,) مل/100مل وتركت المجموعة الثامنة كسيطرة وتمت متابعة الأسماك لمدة 72 ساعة لتحديد التركيزغير القاتل و التركيز القاتل لنصف العدد والتركيز القاتل لكل العدد(0.28 0.20, 0.24,) مل /100مل على التوالي، وتم تعريض مجموعة من الأسماك للتركيز غير القاتل تعرضا حادا لمدة 72 ساعة ,ثم نقلت الاسماك الى احواض ماء نظيفة وتمت مراقبتها لمدة 7 ايام بعد ذلك حضرت مقاطع نسجية من أعضاء الأسماك المعرضة (كبد,امعاء,عضلات,غلاصم دماغ,كلية) , حيث تم تشخيص النماذج النسجية مرضيا , وبينت النتائج ظهور أعراض مرضية ظاهرية تمثلت بعلامات تهيج عصبي و سباحة الأسماك بصورة غير طبيعية نتيجة تأثير المادة السامة على الجهاز العصبي المركزي فضلا عن تغيرات نسجية مرضية تمثلت باحتقان الأوعية الدموية و إحاطتها بتكففات التهابية من النوع المزمن وتفجي الخلايا مع تنخر مفرد في البعض منها .

الكلمات المرشدة : التاثيرات النسجية المرضية , سمك الكارب الاعتيادي ,فضلات المصفى

المقدمة

تؤكد النتائج ان لمركبات الهيدروكاربون تأثير مرضي على اعضاء الجسم عند التعرض لتراكيز قليلة منها وبالاخص الكبد لانه العضو الرئيسي لايض السموم تعد المصافي النفطية احد مصادر التلوث حيث تعد مصادر البترول اكثر سمية للمحيط المائى [1] , وهنالك عدة بحوث اجريت حول تأثير الهيدروكربونات النفطية على الاحياء المائية [2].

ان التعرض للمركبات الهيدروكربونية و مشتقاتها تحدث اعراض سمية مختلفة في الحيوانات المختبرية حيث تعمل الهيدروكربونااات النفطية كوسيط لتوليد الجذور الحرة في الاسماك [3]. و في دراسات اجريت على الاسماك الذهبية *Carassius auratus* لوحظ زيادة في الدفاعات المضادة للاكسدة Antioxidant defences في الحيوانات بعد تعرضها لتراكيز مختلفة من الهيدروكربونات النفطية [4] و اثبت بعض الباحثين ان حدوث تحطيم الاعضاء و الانسجة له علاقة بتعرض الاسماك لمشتقات النفط [5] و هنالك بعض الدراسات اكدت تغيرات في المعايير الفسلجية للاسماك المتعرضة لهذه المركبات [6] و تعتبر الاسماك اكثر عرضة للسموم الخارجية في الماء و الرواسب و ايضا حساسة لاي اختلاف في نوعية الماء.

تتعرض الأسماك إلى الهيدروكربونات النفطية من خلال عدة مسالك منها الغلاصم و الجلد و القناة الهضمية , و تعد الغلاصم من أهم و اخطر المسالك للتلوث لان وظيفتها التنفس و التنظيم الازموزي و التوازن الحامضي و افراز الفضلات النتروجينية وهي اكثر الاعضاء تماسا مع البيئة الخارجية وان اي تغيير في الشكل الخارجي للغلاصم يعتبر مؤشر حيوي لتقييم التلوث [7] (و هذه التغيرات تعتبر حماية و تكيف للكائنات الحية ضد المواد السامة الخارجية.

تشير الدلائل الحياتية إلى إن الكائنات ليس لها القدرة على الاستجابة لتغيرات الملوثات البيئية و من الممكن تراكم هذه المكونات في داخل أنسجتها للوصول إلى درجة معينة تتناسب وارتباط الكائن مع البيئة. حيث تحتوي الأجزاء الذائبة بالماء على المركبات العضوية و غير العضوية فمركبات الهيدروكربون العطرية (PAHs) و التي تكون موجودة بمستويات واطئة ولكنها تؤدي إلى تلوث البيئة وتصبح خطرة عليه [8] وان الأجزاء الصغيرة الذائبة في الماء من النفط الخام تبقى لفترات طويلة في المحيط المائي وبالتالي تصل إلى الإنسان . وتؤثر على نسبة الأوكسجين في دم الاسماك و الذي تحصل عليه من الطبقة السطحية للماء [9] وان تاثير هضم جرعة مفردة من النفط الخام تؤدي الى اضطراب في التنظيم الايوني وقلة بالاوكسجين (Hypoxemia) وهذا يؤثر على نسبة الهيموكلوبين [10],و يتوقع حدوث عدة استجابات كيموحيوية و فسيولوجية وسلوكية للاسماك المتعرضة لمستويات دون القاتلة لمركبات الهيدروكربون [9] وهذه الاستجابة تعتمد على نوع الحيوان و مراحل حياته [11]. يعد الكبد المصنع الرئيسي للبروتينات ، وجد بان الكبد يصنع ما بين (**120 - 300**) ملغم / كغم في اليوم الواحد ، و ان نصف هذه الكمية المصنعة تقريبا موجودة في البلازما .كما ان الالبومين يصنع في بعض polysoms للخلايا الكبدية ومن ثم ينقل خارج الخلية مرورا بالجيبانيات و القنوات اللمفاوية [12] و بما ان الكبد يعاني من تغيرات مرضية تسبب قلة معنوية في

البروتينات الكلية المكونة لخلايا الدم). ان تحطم الكبد هو احد الاعراض الواضحة للتسمم بالهيدروكاربونات ، بمرور الوقت هذا التحطم يتطور الى سرطان الكبد و تسمى ايضا Hepatobiliary tumor او hepatocellular carcinoma بدأ الباحثون بالتحري عن اسباب هذه السرطانات، هنالك شك في تاثير مركبات الهيدروكربون على إنتاج إنزيمات الكبد و هذه تحفز نمو سرطان الكبد وأسباب أخرى تنتج سرطان الكبد.

تشير بعض الدراسات الى ان مركبات الهيدروكربون تتداخل مع ملوثات غذاء معروفة مثل nitrosamine الذي يتكون بعد استهلاك اللحوم المحفوظة تحديدا لتكوين السرطان . نواتج ايض مركبات الهيدروكربون تقتل الخلايا الكبدية مباشرة وتؤدي الى تغير عملية تحويل الدهون في مجرى الدم و تتداخل مع المستقبلات الكيميائية المهمة في الخلايا . كل هذه ممكن ان تؤدي الى ظهور وتطور السرطان [13].

هدف الدراسة لمعرفة التأثيرات المرضية النسجية التي تسببها فضلات مصفى الدورة في حال تعرض الاسماك لها.

المواد و طرائق العمل

أولاً : أسماك التجربة

استخدمت (**150**) سمكة من اسماك الكارب الاعتيادي *Cyprinus carpio* من مفاقس في منطقة المدائن من مفاقس في منطقة المدائن الخالية من الإصابات الطفيلية الخارجية أو أي أعراض مرضية أخرى بأعمار اقل من سنة, و معدل أوزان (**50-100**) غم ومعدل أطوال الكلية (**10-15**) سم حيث وزعت الأسماك بصورة عشوائية على ثمانية مجاميع بواقع ثمانية اسماك في كل مجموعة على أحواض زجاجية معقمة بأبعاد (**60×30×60**) وضع في كل حوض (**36**) لتر من ماء الحنفيةTap water, وجهزت بالأوكسجين بواسطة مضخات هوائية و كانت كمية الأوكسجين التي قيست بواسطة جهاز oxygen meter بحدود (**7.5**) ملغم/لتر و قيس الأس الهيدروجيني **PH** للماء و كان (**7.5**) بمقياسPH meter وثبتت درجة حرارة الماء طيلة فترة التجربة (**30±2**) م°,تركت الاسماك للتأقلم Adaptation لمدة أسبوعين حيث غذيت خلال هذه المدة على أعلاف اصطناعية خاصة بالأسماك جهزت من قبل قسم الأسماك في الدائرة الزراعية/وزارة العلوم والتكنولوجيا.

ثانياً : فضلات مصفى الدورة

استخدمت الفضلات التي تطرح الى نهر دجلة وجلبت من شركة مصافي الوسط في الدورة.

ثالثاً : المحاليل الكيميائية المستخدمة

1- محلول الفورمالين الدارئ المتعادل بتركيز (**10**)%.

2- محاليل الكحول الاثيلي و بتراكيز (**70 , 80 , 90, 95 , 100**) % لتحضير الشرائح النسجية .

3- الزايلول : للتمرير النسجي.

4- شمع البارافين : للتمرير النسجي.

5- صبغة الايوسين و الهيماتوكسلين لصبغ الشرائح النسجية المرضية.

رابعاً : تأثير فضلات المصفى في الأسماك من خلال إجراء التجارب الآتية

قياس التركيز المميت الوسطي medium lethal concentration **:** تم تحديد التركيز غير المميت والتركيز المميت الوسطي و التركيز المميت الكلي للفضلات , و ذلك بتعريض اسماك الكارب الاعتيادي إلى تراكيز مختلفة من الفضلات و لمدة (**72**) ساعة، حيث تم تقسيم الأسماك إلى سبع مجاميع كل مجموعة تضم ثماني اسماك كارب اعتيادي فضلا عن مجموعة السيطرة (بدون إضافة

فضلات المصفى) وضعت في الأحواض المحضرة سابقا و الحاوية على **(36)** لتر من ماء خالي من الكلور و فيما يلي التخافيف التي استخدمت لتحديد التخفيف المميت الوسطي الجدول **(1)** .

جدول (1) تخافيف الفضلات المأخوذة من المصفى.

رقم التخفيف	حجم الفضلات (ml)	حجم الماء (ml)	الحجم النهائي (ml)
1	0.04	99.96	**100**
2	0.08	99.92	**100**
3	0.12	99.88	**100**
4	0.16	99.84	**100**
5	0.20	99.80	**100**
6	0.24	99.76	**100**
7	0.28	99.72	**100**
8	0.00	100.00	**100**

سادساً : دراسة التأثيرات السمية الحادة

قسمت الأسماك إلى مجموعتين كل مجموعة تضم **(8)** اسماك عرضت المجموعة الأولى للتركيز **(0.20)** مل من الفضلات في **(100)** مل من الماء , و تركت المجموعة الثانية كمجموعة سيطرة خضعت الأسماك المتعرضة خلال هذه الفترة لملاحظة:

1. الأعراض السريرية الظاهرية .
2. التغيرات المرضية العيانية و النسجية.

بعد مرور 72 ساعة من التعرض نقلت الاسماك الى حوض ماء نظيف و بعد أسبوع جمعت نماذج من الأعضاء وتم حفظها في محلول الفورمالين الدارئ (**10**)% وأخذت مقاطع نسيجية من مجموعة التعرض للتركيز السمي غير القاتل **(0.20)** مل/100مل وتم تثبيت و تحضير الشرائح النسيجية من خلال تمريرها بعدة مراحل استغرقت **(24)** ساعة شملت مرحلة سحب الماء بواسطة عدة تراكيز من الكحول الاثيلي ثم وضعت في مرحلة الترويق بواسطة محلول الزايلين ثم غمرت بالشمع لتتشبع و بعدها طمرت بالبارافين لحين التقطيع و قطعت بجهاز المشراح microtome بسمك **(4-7)** ميكرون ثم وضعت هذه المقاطع على شرائح زجاجية و ثبتت بالحرارة ثم صبغت بالصبغة الروتينية الهيماتوكسلين و الايوسين و جففت و غطيت بغطاء الشرائح الزجاجية التي ثبتت بمادة كندا بلسم [14] ثم فحصت بالمجهر الضوئي على قوة تكبير بلغت40x .

النتائج و المناقشة

أولاً : الأعراض السريرية الظاهرية

ظهرت الأعراض السريرية على الأسماك بعد تعرضها للتراكيز(0.20,0.24,0.28) مل/100مل فبعد مرور **(30)** دقيقة من التعرض للفضلات بدات الأسماك بسباحة غير منتظمة مع فرط تحفيز و زيادة حركة الغلاصم فضلا عن صعود و نزول الأسماك و بالتالي استقرارها في قعر الحوض و استمر هذا الاضطراب لحين انتهاء مدة التعرض **(72)** ساعة وبعد نقلها إلى احواض ماء نظيف استعادت الأسماك نشاطها(السباحة طبيعية) و لكنهااستمرت تعاني من علامات الخمول و السباحة في قعر الحوض و عدم الاستجابة للمؤثرات الخارجية كما لوحظ زيادة إفراز المواد المخاطية على الجلد في اليوم الأول من التعرض الجدول (2).

جدول (2) يبين نسبة الهلاكات في اسماك التعرض.

مجموعة	عدد الأسماك	التخفيف	النافقة او الهالكة	غير النافقة او الهالكة	نسبة الهلاك%
(1)	**8**	الأول	-	8	%0
(2)	**8**	الثاني	-	8	%0
(3)	**8**	الثالث	-	8	%0
(4)	**8**	الرابع	-	8	%0
(5)	**8**	الخامس	-	8	%0
(6)	**8**	السادس	4	4	%50
(7)	**8**	السابع	8	-	%100

ثانياً : التغيرات المرضية العيانية و النسجية لاعضاء الاسماك

- التغيرات المرضية العيانية: لا توجد تغيرات مرضية عيانية.
- التغيرات المرضية النسيجية:

العضو	التغيرات المرضية العيانية	التشخيص المرضي النسجي
الكبد	لا توجد	احتقان الأوعية الدموية وإحاطتها بتكففات التهابية من النوع المزمن , وتفجي **vaculation** الخلايا الكبدية مع تنخرمفرد في البعض منها . تكاثر خلايا كفر كما في الشكل(1) التشخيص المرضي: التهاب الكبد **hepatitis** .
البنكرياس	لا توجد	احتقان الأوعية الدموية مع وجود مناطق نخرية مرتشحة بالخلايا الالتهابية ولاسيما النوع المزمن(البلاعم الكبيرة واللمفاوية و البلازما) ،تواجد خلايا **mast cell** التشخيص المرضي **chronic pancreatitis**.
الامعاء	لا توجد	فرط تنسج الزغابات المعوية كنتيجة لارتشاحها بالخلايا الالتهابية المزمنة ,زيادة الخلايا الكاسية في الطبقة المخاطي كما في الشكل(2) التشخيص المرضي:التهاب الأمعاء **chronic enteritis**
الغلاصم	لا توجد	تثخن في الأمشاط الغلصمية نتيجة ارتشاحها بالخلايا الالتهابية(اللمفية ,البلازما والبلاعم الكبيرة) مع فقدان شعيراتها الغلصمية واحتقان أوعيتها الدموية وحصول فرط تنسج الصفائح الغلصمية كما في الشكل(3) . التشخيص المرضي : **hyperplasia**.
الدماغ	لا توجد	تغيرات تنكسية في العصبونات **neurons** تمثلت بزيادة حمضة الهيولي وتغلظ الانوية **pyknotic** مع احتقان الأوعية الدموية كما في الشكل(5).
الكلية	لا توجد	انكماش في الكبيبات الكلوية و انفصال الظهارة من الغشاء القاعدة , توسع في محفظة بومان مع تضخم في الكبيبات وضيق بالنبيبات الكلوية Glomerulonephritis كما في الشكل (4).

ظهور الحركات غير الطبيعية على الأسماك حصلت من تأثير مركبات الهيدروكربون على الجهاز العصبي المركزي لحدوث تغيرات مرضية في خلايا الدماغ و كذلك حصول قلة في استهلاك الأوكسجين لذلك حاولت الأسماك الصعود إلى السطح وهذا يتوافق مع ما وجده [15].

واما التغيرات الحاصلة في الغلاصم من تثخن في الأمشاط الغلصمية فكانت نتيجة ارتشاحها بالخلايا الالتهابية , وأما فقدان الشعيرات ناتج من تأثير المادة السامة أثناء مرورها على الأمشاط الغلصمية و حصول فرط الدم كان سببه الاستجابة الالتهابية و الذي ينتج عنه توسع الأوعية الشعيرية و زيادة نفاذيتها [17,16]و قد لوحظ ايضا فرط التنسج من قبل [5].

أما الكبد فالتغيرات المرضية التي ظهرت حصلت نتيجة حصول تأيض للمادة السامة في خلايا الكبد والذي اثر على الخلايا و بذلك حصل تنخر و تفجي الخلايا الكبدية و خاصة في منطقة الباحة البالية المحتوية على الوريد البابي لكونها من المناطق القريبة للضرر على الخلايا و يعزى التفجي الحاصل في الخلايا الكبدية الى زيادة في المكونات الدهنية الكبدية في الاسماك المتعرضة للهيدروكربونات النفطية [18].

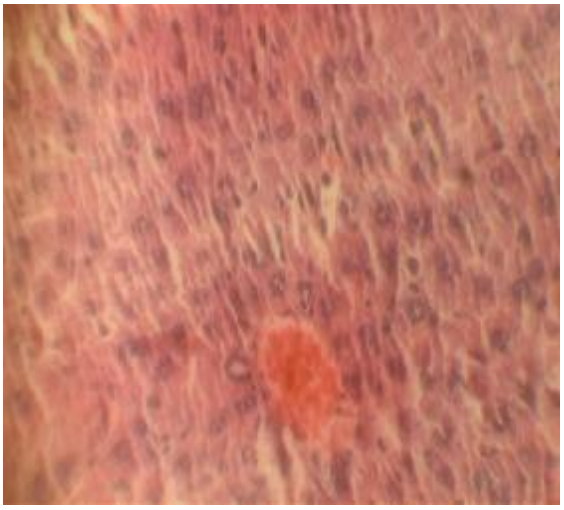
اما في الأمعاء لوحظ فرط تنسج الزغابات المعوية و هذا يعزى إلى سمية الفضلات و تخرش بطانة الأمعاء مؤدية إلى زيادة عدد و أحجام الخلايا الكاسية Goblet cell في الطبقة المخاطية كوسيلة دفاعية لتقليل تأثير المادة السامة على بطانة الأمعاء و قد لاحظ [19] وجود اجسام اشتمالية خلوية غير منتظمة Irregular cellular inclusions في الخلايا العموديةColumnar cells للظهارة المخاطية المعوية و التغيرات السايتوبلازمية للخلايا القاعدية المخاطية المعوية .

كذلك ظهرت تغيرات تنكسية degenerative changes في الكلية تمثلت بموه الخلايا المبطنة للنبيبات الكلويةhydronephrosis مما أدى إلى ضيق تجاويفها , حيث إن موه الخلايا ناجم عن عرقلة المبيد لتنظيم ايون الصوديوم و البوتاسيوم لخلايا الكلية مما أدى إلى قلة الإرواء الكلوي المتسبب عن قلة الأوكسجين و الطاقة [20] . ان الانكماش في النبيبات الكلوية و انفصال الظهارة من الغشاء القاعدة , ادى الى فقدان وظيفة النبيبات الكلوية في الاسماك المتعرضة للهيدروكربونات [21] اما التوسع في محفظة بومان و التضخم في الكبيبات فقد لوحظ من [22] ايضا .

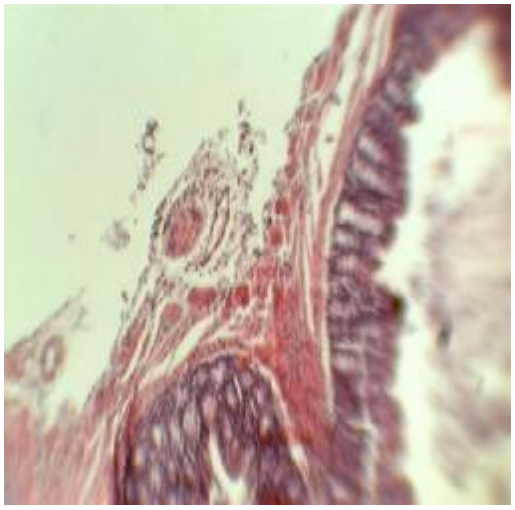
الاستنتاجات

1-تؤكد النتائج حصول تغيرات مرضية نسجية للاسماك عند تعرضها لتراكيز قليلة من فضلات المصفى وهذا قد ينعكس على صحة الانسان عند تناوله لهذه الاسماك الملوثة لان هذه الملوثات قد تتراكم في انسجة الاسماك بأستمرار التعرض لها.

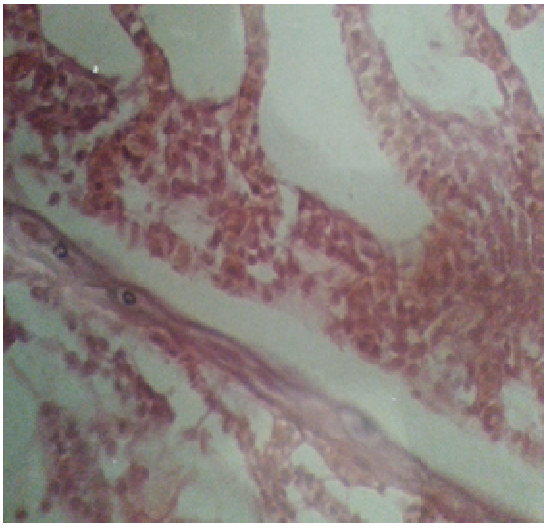
2-ان الافات والتغيرات المرضية التي ظهرت على الغلاصم تحصل كأستجابة مباشرة او غير مباشرة عند التعرض لاي ملوث وتعتمد نسية التحطم على المساحة السطحية للغلاصم المتعرضة وعلى نوع التحطم وبالتالي يؤثر على تنفس الاسماك مما قد يؤثر على اعدادها.



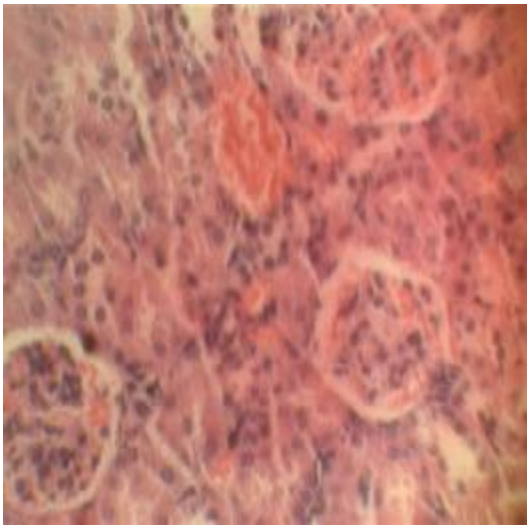
صورة رقم (1) مقطع للكبد يلاحظ تغلض انوية الخلايا الكبدية و احتقان الاوردة المركزية و ارتشاح الخلايا الكبدية بخلايا كوفر تكبير 40X صبغة H&E



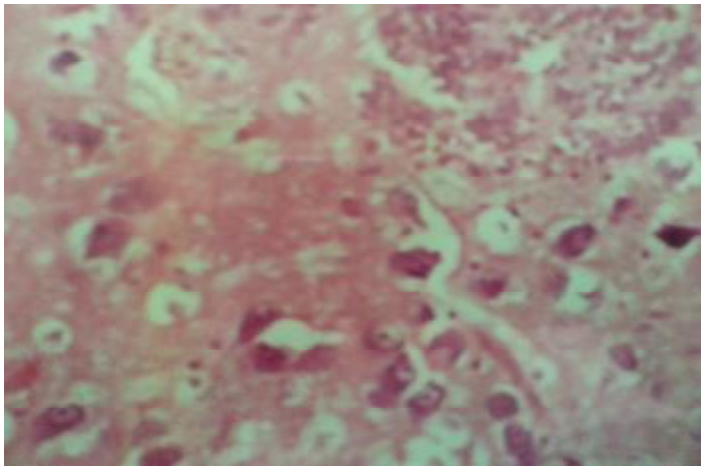
صورة (2) مقطع نسجي في الامعاء يلاحظ انتعاف الطبقة المخاطية مع زيادة في عدد الخلايا الكأسية



صورة (3) مقطع في نسيج الغلاصم يبين حدوث اندماج للصفائح الغلصمية نتيجة لحصول فرط تنسج قوة التكبير X40 صبغة H&E



صورة (4) مقطع لنسيج الكلية يلاحظ توسع محفظة بومان و احتقان الاوعية الشعرية الكبيبية مع ظهور الكلأ تكبير 40X صبغة H&E



يبين الشكل (5) مقطع في نسيج الدماغ يبين حصول تغيرات تنكسية في العصبونات وزيادة حمضة الهيولي وحدوث تغلظ انوية الخلايا قوة التكبير 40x الصبغة H&E

المصادر

[1].Pacheco, M. and Santos, M.A. "Biotransformation, endocrine, andgenetic responses of *Anguilla anguilla* L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters". Ecotoxicol.Environ. Saf. 49, 64–75, 2001.

[2].Pollino, C.A. and Holdway, D.A., "Hydrocarbon-induced changes to metabolic and detoxification enzymes of the Australian crimson-spotted rainbow fish (Melanotania fluviatilis)". Environ. Toxicol. 18,21–28,2003

[3].Achuba, F.I., Osakwe, S.A. "Petroleum-induced free radical toxicityin African catfish (Clarias gariepinus)". Fish Physiol. Biochem. 29, 97–103., 2003.

[4].Zang, J.F., Wang, X.R., Guo, H.I., Wu, J.C., Xue, Y.Q. "Effects of water-soluble fraction of diesel oil on the antioxidant defense of the gold fish, *Carassius auratus*". Ecotoxicol. Environ. Saf. 58, 110–116, 2004.

[5].Khan, R.A. "Health of flatfish from localities in Placentia Bay", 2003.

[6].Simonato, J.D., Albinati, A.C.L., Martinez, C.B.R. "Effects of the water soluble fraction of diesel fuel oil on some functional parameters of the neotropical freshwater fish Prochilodus lineatus Valenciennes". Bull. Environ. Contam. Toxicol. 76, 505–511, 2006.

[7].Schwaiger, J., Wanke, R., Adam, S., Pawert, M., Honnen, W.,Triebskorn, R.. "The use of histopathological indicators toevaluate contaminant-related stress in fish. J. Aquat. Ecosys". Stress Recov. 6, 75–86, 1997.

[8].Hodson, P.V., Maj, M.K., Efler, S., Burnison, B.K., Van Heiningen, A.R.P., Girard, R., and Carey, J.H. "MFO induction in fish by spent cookink liquors from kraft pulp mills". Env. Toxicol. Chem. 16, 908-916, 1997.

[9].Val, A.L., Almeida-Val, V.M.F. Effects of crude oil on respiratory aspects of some fish species of the Amazon. In: Val, A.L., Almeida-Val, V.M.F. (Eds.), Biology Of Tropical Fish, INPA, Manaus, pp. 277-291, 1999.

[10].Brauner, C.J., Ballantyne, C.L., Vijayan, M.M., Val, A.L. Crude oil affects air-breathing frequency, blood phosphate levels and ion regulation in an air-breathing teleost fish, Hoplosternum littorale. Comp. Biochem. Physiol. 123C, 127-134, 1999.

[11].Stephens, S.M., A.Y.A. Alkindi, C.P. Waring, and J.A. Brown. "Corticosteroid and thyroid responses of larval and juvenile turbot exposed to the water-soluble fraction of crude oil". J. Fish. Biol., 50: 953-964, 1997.

[12].Lin, C. and Chang.J. "Electron microscopy of albumin synthesis". Science, 190: 465-467, 1975.

[13].Anderson, R.L."Toxicokinetics of fenvalerate on Swiss Rat". J.Assoc. of Anal-Chem., 65:685-689, 1989.

[14].Luna, L.G. Manual Of Histopathological Staining Methods Of The Armed Forces Institute Of Pathology .3rd (ed). U.S.A McCrow Hill Book.Newfoundland, contaminated with petroleum and PCBs. Arch.Environ. Contam. Toxicol. 44, 485–492, 1968**.**

[15].Van Waarde, G; Van Thillart and kesbeke, F. "Anaerobic Energy Metabdism of the European Eel, *Anguilla Anguilla"*. Journal of Comparative physiology., 149 : 469-475, 1983**.**

[16].Schwarz, L.P. "Effect of sublethal Concentration of Diazinion on growth rate and histopathological changes". J. Nutr ., 27:446-462, 2002**.**

[17].Handy, R.D.; Abd- EL Samei , H.A. ; Bayomy , M.F. ; Mahran, A.M., Abdeen, A.M. and EL-Elaimy, E.A. "Chronic Diazinion exposure : Pathologies of spleen,Thymus,blood cell, and Lymph nodes are modulated by dietary protein or Lipid in the mouse", 2002**.**

[18].Khan, R.A. and Kiceniuk, J. "Histopathological effects of crude oil on Atlantic cod following chronic exposure Can". J. Zool. 62: 2038-2043, 1984.

[19].Hawkes, J.W., Gryger, E.H. and Olson, O.P. "Effects of petroleum hydrocarbons and chlorinated biphenyls on the morphology of the intestine of chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*". Environ. Res. 23: 149-161, 1980.

[20].Roberts, R.J. Fish pathology, Baillier Tindall. London, 318PP, 1978**.**

[21].Solangi, M.A." Histopathological changes in two estuarine fishes exposed to crude oil and its water soluble fractions". Ph D dessertation. Univ. Southern Mississippi, 1980.

[22].Haensly, W.E., Neff, J.M., Sharp, J.R., Morris, A.C., Bedgood, M.F. and Boem, P.D. "Histopathology of Pleuronectes platessa L". from Aber Wrac'h and Aber Benoit, Brittany, France: long-term effects of the Amoco Cadiz crude oil spill. J. Fish Diseases 5: 365-391, 1982.