

## اثرات هیستوپاتولوژیکی آمونیاک در آبشش، کبد و کلیه بچه تاسماهی

### ایرانی *Acipenser persicus*

الهام السادات بنی‌هاشمی<sup>\*</sup>، حسین خارا<sup>۱</sup>، ذبیح‌اله پزند<sup>۲</sup>، محمد رهاننده<sup>۳</sup>

دلیل افزایش غلظت و تاثیر سریع آمونیاک بر روی اندامها می‌باشد. این پژوهش در زمینه تعیین شدت کشنده آمونیاک و بررسی مسمومیت حاد با آمونیاک (N-NH<sub>4</sub>96h) در بچه تاسماهی ایرانی *Acipenser persicus* و همچنین تاثیر این ماده سمی بر روی بافت آبشش، کبد و کلیه در غلظت‌های بالا و زیر LC<sub>50</sub> صورت گرفت.  
**واژگان کلیدی:** تاسماهی ایرانی، آمونیاک، آسیب‌شناسی، غلظت کشنده

#### چکیده

یکی از مهمترین آلاینده‌های محیط زیست ترکیبات نیتروژنی می‌باشد که مهمترین خطرناک‌ترین آنها آمونیاک می‌باشد. به طور کلی در تقسیم‌بندی آلاینده‌های آب وجود نیتريت، نترات و آمونیاک دلالت بر وجود آلاینده‌های شیمیایی معدنی در داخل آب دارد. در این پژوهش اثر سمیت حاد آمونیاک برای بچه تاسماهی ایرانی با میانگین وزنی ۳ گرم در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. آزمایشات در ۷ تیمار و سه تکرار و با تعداد ۱۰ قطعه ماهی با روش آب ساکن به مدت ۹۶ ساعت اجرا شد. ماهی‌ها هر معرض غلظت‌های مختلفی از آمونیاک که برای بچه تاسماهی ایرانی با مقادیر ۰، ۰۰۷، ۰۰۵، ۰۰۳، ۰۰۱، ۰۰۰۵، ۰۰۰۲۵ و ۰۰۰۱۲۵ میلی گرم در لیتر، قرار گرفتند. ابتدا میزان LC<sub>50</sub> آمونیاک در زمانهای ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت به دست آمد که برای بچه تاسماهی ایرانی به ترتیب ۱۲/۶۰، ۸/۸۲، ۸/۰۰ و ۶/۳۷ میلی گرم در لیتر آمونیاک کل محاسبه گردید. بعلاوه قرار گرفتن طولانی مدت ماهیان در غلظت‌های کمتر از LC<sub>50</sub> پس از استخراج مقادیر LC<sub>50</sub> یک سطح پایین (low) که ۲۵٪ غلظت LC<sub>50</sub> و یک سطح بالا (High) که ۷۵٪ غلظت LC<sub>50</sub> بوده را انتخاب و آزمایش مجدد با ۳ تیمار و یک گروه شاهد با ۳ تکرار انجام پذیرفت که دامنه غلظت‌های این ماده ۱/۵۹، ۳/۱۸ و ۴/۷۷ میلی گرم در لیتر آمونیاک کل بود. سپس جراحات احتمالی هیستوپاتولوژیکی آبشش، کبد و کلیه نمونه‌های مورد بررسی در این گونه ماهیان خاویاری مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دهنده نظیر پرخونی، هیپرپلازی، چسبندگی تیغه‌های ثانویه، تورم تیغه‌های اولیه، خونریزی و نکروز سلولی در آبشش، پرخونی، احتباس صفراوی، نکروز سلولی و آتروفی هپاتوسیت‌ها در کبد و پرخونی، التهاب بافت بینابینی، نکروز سلولی، اتساع فضای بومن، هموسیدروزیس در کلیه در غلظت‌های بالای LC<sub>50</sub> و پرخونی، هیپرپلازی، چسبندگی تیغه‌های ثانویه، تورم تیغه‌های اولیه، خونریزی و نکروز سلولی در آبشش، پرخونی، احتباس صفراوی و نکروز سلولی در کبد و پرخونی، التهاب بافت بینابینی، نکروز سلولی، اتساع فضای بومن، هموسیدروزیس در کلیه در غلظت‌های پایین LC<sub>50</sub> بود. بطور کلی بیشترین صدمات مربوطه در آبشش این ماهیان مشاهده شده است. جراحات آبشش بر تبادلات گازی و تنفس تاثیر گذاشته و در حالات شدیدتر می‌تواند منجر به اتصال تیغه‌های مجاور به یکدیگر و جلوگیری از تبادلات گاز شده و در نهایت منجر به مرگ شود. نتایج نشان می‌دهد که تخریب هیستوپاتولوژیکی آبشش، کبد و کلیه با افزایش غلظت آمونیاک در طی زمان ارتباط مستقیم دارد. در این پژوهش شدت عوارض ایجاد شده در غلظت‌های تعیین LC<sub>50</sub> بیشتر و متفاوت از شدت عوارض غلظت‌های زیر LC<sub>50</sub>، در هر تیمار بود که به

#### مقدمه

تاسماهی ایرانی با قره برون متعلق به خانواده تاسماهیان از راسته تاسماهی شکلان می‌باشند. این ماهیان از گونه‌های با ارزش شیلاتی می‌باشد که متأسفانه با وجود آلودگی آب و از بین رفتن جایگاه‌های تخم ریزی، نسل این ماهیان در حال انقراض است. سالانه هزینه‌های هنگفتی صرف ازدیاد نسل این ماهیان می‌گردد. روند تخریب ذخایر موجود تاسماهیان دریای خزر به دلایل مختلف از جمله تخریب رودخانه‌های محل زیست و تکثیر طبیعی این ماهیان، ورود بیش از حد آلاینده‌ها به دریا و صید بدون نظارت همچنان ادامه دارد (۱). امروزه یکی از مهمترین نگرانی‌های بشر مسئله افزایش مواد آلاینده در محیط زیست به خصوص آب‌ها می‌باشد که به صورت فاضلاب، نشت نفت، پساب‌ها یا مواد آلی و معدنی کارخانجات، موادشیمیایی گوناگون اعم از فلزات و شبه فلزات بوده و می‌باشد که موجب افزایش آلودگی ذخایر آب‌های مورد نیاز آبرزی پروری در سطح دنیا به اشکال مختلف می‌شوند. این مواد سمی به طرق مختلف وارد آب شده و آن را آلوده می‌کنند، این در حالی است که منابع آب محدود ولی رشد جمعیت به طور

\* کارشناس ارشد، آزمایشگاه مرکز آموزش میرزا کوچک خان، گیلان، رشت، ایران

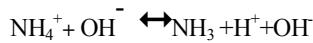
(Elham.banihashemi@Gmail.com)

۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، لاهیجان، ایران

۳- انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری- رشت، ایران

۴- مرکز آموزش علمی کاربردی میرزا کوچک خان گیلان- رشت، ایران

میشود. نسبت این دو ترکیب وابسته به درجه حرارت، pH ثابت یونیزاسیون آب، چرخه روزانه pH و دی اکسید کربن می‌باشد که در این میان pH از اهمیت ویژه ای و ثابت یونیزاسیون از اهمیت کمتری برخوردار است، بطوریکه با افزایش pH آب از مقدار آمونیم کاسته شده و بر آمونیاک افزوده می‌گردد.



همانطور که از این رابطه مشخص است تبدیل آمونیاک به آمونیم با تولید یون هیدروکسید (عامل OH) همراه است که در زمان افزایش pH واکنش می‌باید به سمت مصرف آن پیش رود و در نتیجه واکنش به سمت تولید آمونیاک حرکت می‌کند (۱۶).

ماهیان دو ماده سمی مهم را در آب دفع می‌کنند که شامل دی اکسیدکربن و آمونیاک است. آمونیاک عمده‌ترین ترکیب نیتروژنی دفعی (۶۰-۹۰ درصد) ماهیان است. بقیه مواد دفعی ازته شامل اوره، اسید اوریک و کراتین می‌باشد (۵). این ترکیب سمی اثرات مستقیم بر رشد و افزایش بیماری‌ها و نهایتاً مرگ و میر موجودات آبی دارد. با توجه به اینکه بچه ماهیان خاویاری اغلب در هنگام نقل و انتقال ازجایی به جای دیگر میتوانند در معرض مسمومیت با آمونیاک قرار گیرند و یا کوددهی بیش از حد در استخرهای مزارع و یا وارد شدن فاضلاب‌های شهری و صنعتی در آب‌ها می‌تواند باعث افزایش آمونیاک بشود.

هدف از این تحقیق، مشخص نمودن حداکثر غلظت مجاز آمونیاک است که به طرق مختلف وارد استخرها می‌شود تا جایی که اعداد به دست آمده در این تحقیق قابل به کارگیری در مزارع پرورش ماهی باشد.

### مواد و روش کار

تحقیق حاضر در تابستان ۱۳۹۱ در انستیتو بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان در استان گیلان صورت گرفت. آزمایشات در ۷ تیمار و ۳ تکرار به همراه گروه شاهد و

تصادفی درحال افزایش است و همین منابع محدود به وسیله آلوده‌کننده‌های مختلف فیزیکی شیمیایی و بیولوژیک آلوده می‌گردد. گرچه عوامل آلوده کننده فیزیکی و میکروبی را می‌توان باصرف هزینه و بکار گرفتن تکنیک‌های ساده از میان برداشت ولی برطرف ساختن آلودگی‌های شیمیایی در غالب موارد وقت‌گیر، مشکل، پرهزینه و گاه غیرممکن است. یک آلوده کننده به عنوان عاملی تعریف می‌شود که تغییرات غیرقابل قبول و پیش بینی نشده‌ای را در محیط اطراف ایجاد نموده و باعث اختلال در روند استاندارد طبیعی گردد. احتمالاً اثرات ایجاد شده اثری مستقیم یا غیرمستقیم بر حیات انسان، موجودات زنده، اجتماعات حیوانی و اینگونه موارد دارد. اثرات آلودگی بر محیطی که انسان زندگی می‌کند دامنه تخریب بسیار محسوس و چشمگیری دارد و می‌تواند از نابود شدن خطوط ساحلی که تفریحگاه انسان به شمار می‌رود تا غیرقابل شرب شدن آب و خطرات بهداشتی برای سلامت انسان‌ها بسیار شدید ادامه یابد (۲۰ و ۱۳).

مواد نیتروژن دار به طرق مختلف نظیر تماس منابع آب با فاضلاب و یا تخلیه آب‌های شستشوی زمین‌های کشاورزی در رودخانه و از همه مهمتر اکسیداسیون مواد آلی نیتروژن دار نظیر پروتئین‌ها که به کمک باکترهای خاص انجام می‌پذیرد، تولید می‌شود. افزایش آمونیاک آب، یکی از مشکلات عمده در آبی پروری است. این افزایش خصوصاً در سیستمهای تکثیر ماهی و میگو، سیستم‌های فوق متراکم پرورش ماهی یا گردش مجدد آب، آکواریوم‌ها و در هنگام انتقال ماهی همواره مطرح بوده است (۱۹ و ۱۶).

آمونیاک در آب به دو شکل موجود است، شکل یونی که  $\text{NH}_4^+$  است و برای ماهی خطرناک نمی‌باشد و شکل مولکولی که  $\text{NH}_3$  بوده و به راحتی از طریق پدیده انتشار از آبشش ماهی جذب شده و از طریق خون خود را به کلیه اندام‌ها می‌رساند و بسیار کشنده است.

آمونیاک کل (TA) به مجموع آمونیاک یونیزه شده (آمونیم  $\text{NH}_4^+$ ) (IA) و آمونیاک غیریونیزه ( $\text{NH}_3$ ) (UIA) اطلاق

تعداد ۳۰ قطعه ماهی (۳ تیمار در هر تیمار ۳ تکرار) را به مدت یک هفته در محلول آمونیاک قرار دادیم، پس از پایان این مراحل از هر تیمار تعدادی ماهی بصورت تصادفی جهت ارزیابی هیستوپاتولوژیک برداشت شد (۱۶). نمونه های بافتی آبشش، کبد و کلیه پس از فیکس شدن در محلول بوئن در آزمایشگاه پس از طی مراحل پاساژ بافتها در دستگاه اتوتکنیکون برای آماده سازی بافت، برشگیری و با هماتوکسیلین انوزین رنگ آمیزی شد و مورد بررسی قرار گرفت.

لازم به ذکر است که آمونیاک مورد استفاده در طی این تحقیق به صورت محلول بود و برای رسیدن به غلظت های مورد نیاز محاسبه میزان حجم محلولی که به هر آکواریوم اضافه می شد، تعیین گردید.

### نتایج

در غلظت های بالا و زیر  $LC_{50}$  اولین نشانه های مسمومیت با آمونیاک شامل نارامی و افزایش تنفس بوده و ماهیان نزدیک به سطح آب جمع شده و هوا را می بلعیدند و نارامی آنها توام با حرکات سریع بیشتر شد، تنفس نامنظم گردیده و با یک مرحله فعالیت شدید ادامه می یافت. نهایتاً، ماهیان کمی از سطح آب بیرون پریده و عضلاتشان، تکان خورده و به نظر می رسید عضلات آنها منقبض شده است. آبشش ها شدیداً پر خون شده و حاوی مقادیر قابل توجهی مخاط بودند. اندامهای داخلی بدن پر خون و متورم به نظر می رسید و نهایتاً سطح بدن رنگ پریده گردیده و ماهی می مرد.

پس از آزمایش تعیین  $LC_{50}$  تعداد ماهیان مرده در هر غلظت، شمارش و در جدولی ثبت گردید (جداول ۱ و ۲). بر این اساس میزان  $LC_{50}$  با استفاده از نمودارهای تعیین  $LC_{50}$  برای بچه تاسماهی ایرانی (نمودارهای ۱، ۲، ۳ و ۴) برای هر دوره زمانی به دست آمد.

نتایج هیستوپاتولوژی آبشش ماهیان شاهد و مقایسه آن با بافت آبشش ماهیانی که تحت تاثیر غلظت های مختلف

براساس روش OECD و به صورت ساکن (Method Static) در مدت ۹۶ ساعت اجرا شد. ۱۲۰ عدد از بچه تاسماهی ایرانی با میانگین وزنی ۱-۳ گرم در مخازن فایبرگلاس با حجم ۲۵ لیتری آب نگهداری شدند. در طول مدت آزمایش میانگین دما  $23/28 \pm 0/037$  درجه سانتی گراد، اکسیژن محلول در آب  $6/46 \pm 0/188$  میلی گرم در لیتر، pH آب  $7/88 \pm 0/063$  و سختی ۱۸۹ میلی گرم در لیتر کربنات کلسیم برای بچه تاسماهی ایرانی ثابت نگه داشته شد. در دوزهای مختلف آمونیاک ۲۵-۵ میلی گرم در لیتر فواصل بین ۷ تیمار مورد آزمایش برای هر کدام از بچه ماهیان را مشخص شد. بطوریکه تیمار یک بعنوان شاهد و بقیه تیمارها در معرض دوزهای مختلف آمونیاک به ترتیب غلظت های ۰، ۷، ۵، ۹، ۱۳/۲، ۱۸، ۲۵ میلی گرم به ازاء هر لیتر آب برای بچه تاسماهیان ایرانی قرار گرفتند. مقدار غلظتی که ماهیان در تماس با آن قرار گرفتند به عنوان نمونه پس از چند سری آزمایش به دست آمد به نحوی که ابتدا ماهیان تحت تاثیر غلظت کم آمونیاک تا زیاد قرار گرفتند و با توجه به تلفات صدها درصد ماهیان و غلظتی که هیچ تلفاتی در آن مشاهده نشد انتخاب گردید. در هر ۲۴ ساعت، آکواریومها مورد بررسی قرار گرفته و میزان مرگ و میر ثبت گردید. این کار به مدت ۹۶ ساعت (۴ روز) و هر روز راس ساعت ۹ صبح انجام گرفت و علائم ظاهری مسمومیت حاد با آمونیاک در ماهی ثبت گردید. میزان  $LC_{10}$ ،  $LC_{50}$  و  $LC_{90}$  با استفاده از روش آماری Probit Analysis محاسبه گردید. لازم به ذکر است که حداکثر غلظت مجاز M.A.C Value از تقسیم  $LC_{50}$  بر عدد ۱۰، حداقل غلظت مؤثر (LOEC) مساوی با  $LC_{10}$  96-hour و غلظت غیرمؤثر (NOEC) مساوی با حداکثر غلظت مجاز (MAC value) حاصل می گردد (۱۸).

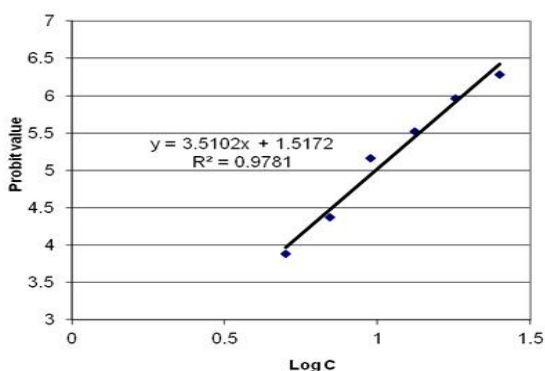
به منظور بررسی ضایعات احتمالی میکروسکوپی و هیستوپاتولوژیک با آمونیاک، پس از استخراج مقادیر  $LC_{50}$  یک سطح پایین (low) که ۲۵٪ غلظت  $LC_{50}$  می باشد و یک سطح بالا (High) که ۷۵٪ غلظت  $LC_{50}$  بوده را انتخاب و در هر دز

آمونیاک کل قرار داشتند نشان دهنده ضایعات هیستوپاتولوژیکی در آبشش بود، بطوریکه بچه تاسماهیان ایرانی که در غلظت‌های ۵ و ۷ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک کل پدیده‌های نکروز سلولی (کم)، هیپرپلازی، چسبندگی تیغه‌های ثانویه و پرخونی و در غلظت ۹/۵ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک کل علاوه بر موارد ذکر شده تورم لایه اولیه (زیاد)، و خونریزی (کم) مشاهده شد و در غلظت‌های ۱۳/۲ و ۱۸ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک کل پرخونی و نکروز سلولی و هیپرپلازی و چسبندگی رشته‌های آبششی ثانویه (زیاد) در غلظت ۲۵ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک کل پرخونی، هیپرپلازی و چسبندگی (زیاد) مشاهده گردید (نگاره‌های ۱ و ۲). نتایج هیستوپاتولوژی کبد ماهیان شاهد و مقایسه آن با بافت کبد ماهیانی که تحت تاثیر غلظت‌های مختلف آمونیاک کل قرار داشتند. ضایعات پرخونی، احتباس صفراوی در تیمار ۱ و ۲ و در غلظت ۹/۵ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک کل علاوه بر موارد ذکر شده نکروز سلولی مشاهده شد و در غلظت‌های ۱۳/۲، ۱۸ و ۲۵ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک کل خونریزی و آتروفی سلولی مشاهده گردید (نگاره‌های ۳ و ۴). در بررسی اسلایدهای تهیه شده از بافت کلیه بچه تاسماهیان ایرانی و مقایسه آن با بافت شاهد ضایعات پاتولوژیکی چون پرخونی، دژنراسانس بافت بینابینی، نکروز سلولی، اتساع فضای بومن، هموسیدروزیس در تیمارها دیده شده است و بیشترین عارضه در تیمارهای ۵ و ۶ دیده شده است (نگاره ۵). بطور کلی در آبشش تاسماهی ایرانی ضایعات پاتولوژیکی از قبیل هیپرپلازی، پرخونی، خونریزی، چسبندگی لاملا، نکروز سلولی و تورم تیغه اولیه آبشش در آنها مشاهده گردید ولی شدت این عوارض از تیمار ۱ به سمت تیمار ۶ بیشتر بوده است. آزمایشات مجدد با دزهای ۰/۲۵، ۰/۵۰ و ۰/۷۵ غلظت  $LC_{50}$  به دست آمده طی ۳ تیمار و در هر کدام با ۳ تکرار بر روی بچه تاسماهی ایرانی صورت گرفت که در طی بررسی اسلایدهای تهیه شده از بافت آبشش، کبد و کلیه در سه تیمار مورد آزمایش

و مقایسه آن با نمونه بافت شاهد این نتیجه را دربرداشت که در غلظت ۱/۵۹ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک کل عوارضی همچون پرخونی، هیپرپلازی، چسبندگی تیغه‌های ثانویه و نکروز سلولی و در غلظت‌های ۳/۱۸ و ۴/۷۷ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک کل پدیده‌های پرخونی، هیپرپلازی، چسبندگی تیغه‌های ثانویه، نکروز سلولی، تورم رشته‌های اولیه و خونریزی در آبشش مشاهده گردید. طی بررسی اسلایدهای تهیه شده از بافت کبد عواضی چون پرخونی، احتباس صفراوی در تیمار ۱ و ۲ و به غیر از عوارض یاد شده نکروز سلولی در تیمار ۳ مشاهده گردید و طی بررسی اسلایدهای تهیه شده از بافت کلیه عوارضی چون اتساع فضای بومن، پرخونی، نکروز سلولی، نکروز گلومرول و التهاب بافت بینابینی در تیمار ۱ و ۲ و به جز عوارض یاد شده هموسیدروزیس در تیمار ۳ مشاهده گردید. پس از ثبت تلفات، با استفاده از جدول Probit value اثر تیمارهای مختلف آمونیاک روی مرگ و میر بچه ماهیان مقایسه و با استفاده از خط رگرسیون و ضرایب خاص آن مقادیر  $LC_{10}$ ،  $LC_{50}$  و  $LC_{90}$  در هر ۲۴ ساعت برای این ماده محاسبه نموده و در جدول و نمودار نمایش داده شد (جدول ۱ و نمودارهای ۱، ۲، ۳ و ۴). لازم به ذکر است که با توجه به آزمایش‌های انجام شده، نمودارهای تعیین  $LC_{50}$  با استفاده از برنامه‌های نرم افزاری SPSS و روش تحلیل آماری Probit Analysis رسم گردید و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. همچنین حداکثر غلظت مجاز (MATC)، (NOEC) و (LOEC) به ترتیب با توجه به مقدار  $LC_{50}$  برای بچه تاس ماهی ایرانی ۰/۶۳، ۰/۶۳ و ۳/۶۲ میلی‌گرم در لیتر تعیین شد. بدین ترتیب حداکثر غلظت مجاز و حداقل غلظت مؤثر در شرایط بهینه برای بچه تاسماهی ایرانی در مزارع پرورشی تعیین گردید.

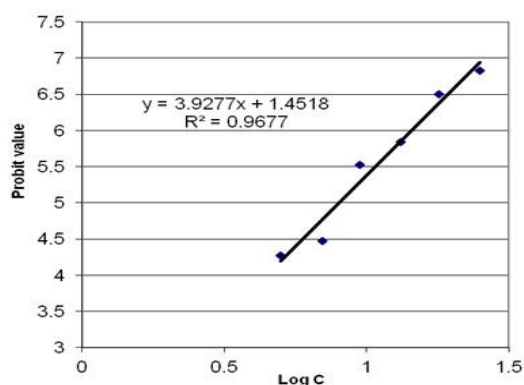
جدول ۱- مقایسه اثر تیمارهای مختلف آمونیاک روی مرگ و میر بچه ماهیان ۱-۳ گرمی تاسماهی ایرانی (میانگین ۳ تکرار) در طی ۹۶ ساعت

تیمار	غلظت ppm	۲۴ ساعت تعداد تلفات	۴۸ ساعت تعداد تلفات	۷۲ ساعت تعداد تلفات	۹۶ ساعت تعداد تلفات
شاهد	۰	۰	۰	۰	۰
I	۵	۰/۳۳	۱/۳۳	۲/۳۳	۴/۳۳
II	۷	۱/۶۶	۲/۶۶	۳	۵/۳۳
III	۹/۵	۴	۵/۶۶	۷	۷/۶۶
IV	۱۳/۲	۶	۷	۸	۹/۳۳
V	۱۸	۷/۳۳	۸/۳۳	۹/۳۳	۹/۶۶
VI	۲۵	۸/۳۳	۹	۹/۶۶	۱۰

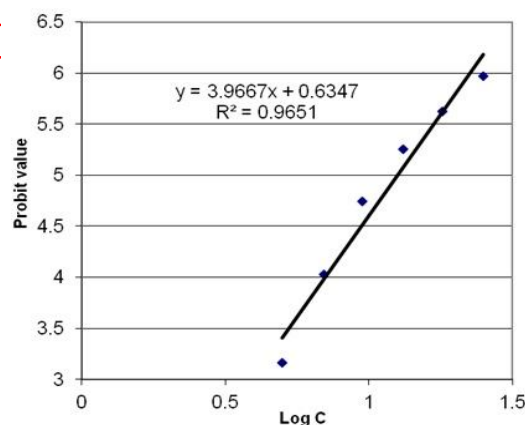


نمودار لگاریتم غلظت - Probit value نشان دهنده ارتباط بین غلظت ماده مصرفی با تلفات می‌باشد، بطوریکه هر چه ضریب همبستگی ( $R^2$ ) به عدد ۱ نزدیکتر باشد ارتباط غلظت ماده و مرگ و میر بچه ماهیان بیشتر است. در بچه تاسماهیان ایرانی ارتباط بین مرگ و میر و غلظت آمونیاک در ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت با شدت نسبتاً زیادی مشاهده شد بطوریکه با افزایش غلظت میزان تلفات افزایش پیدا می‌کند.

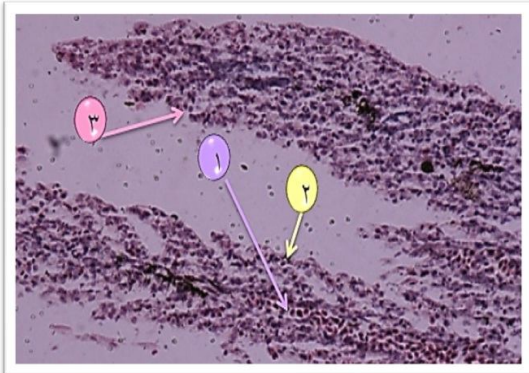
نمودار ۲- معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگی لگاریتم غلظت و Probit value تاثیر آمونیاک در تاسماهی ایرانی در ۴۸ ساعت (میانگین سه تکرار)



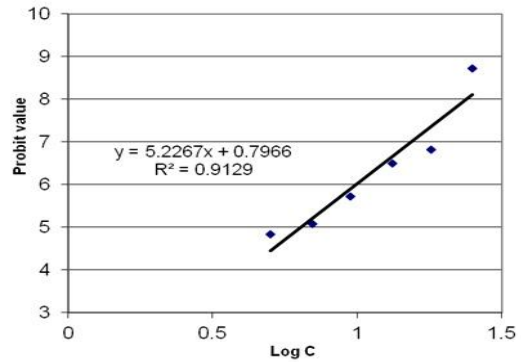
نمودار ۳- معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگی لگاریتم غلظت و Probit value تاثیر آمونیاک در تاسماهی ایرانی در ۷۲ ساعت (میانگین سه تکرار)



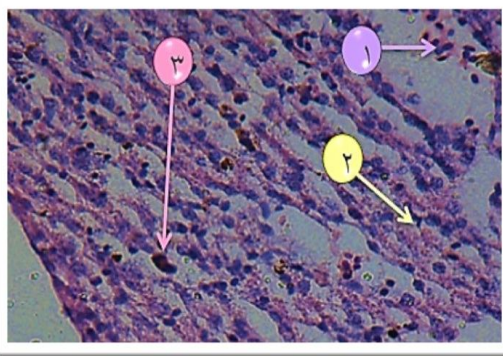
نمودار ۱- معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگی لگاریتم غلظت و Probit value تاثیر آمونیاک در تاسماهی ایرانی در ۲۴ ساعت (میانگین سه تکرار)



نگاره ۲- مشاهده پرخونی ۱، هیپرپلازی ۲ و چسبندگی تیغه‌های ثانویه ۳ در آبشش تاسماهی ایرانی در غلظت ۲۵ میلی گرم در لیتر (x۴۰، H&E)



نمودار ۴- معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگی لگاریتم غلظت و probit value تاثیر آمونیاک در تاسماهی ایرانی در ۹۶ ساعت (میانگین سه تکرار)

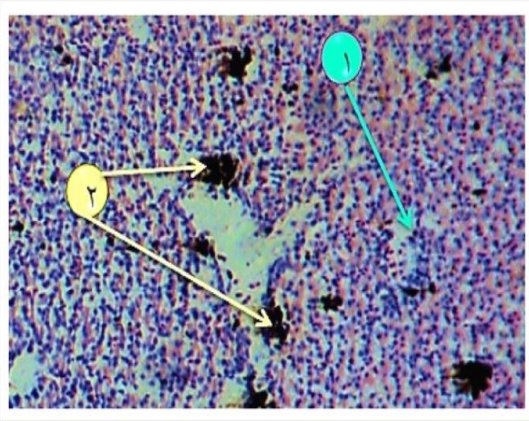


نگاره ۳- پرخونی ۱، نکروز سلولی ۲ و احتباس صفراوی ۳ در کبد تاسماهی ایرانی در غلظت ۹/۵ میلی گرم در لیتر (x۴۰، H&E)

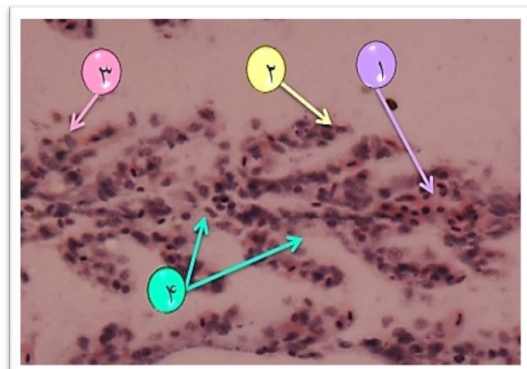
جدول ۲- مقادیر LC50 آمونیاک در گونه تاسماهی ایرانی

ردیف	زمان (ساعت)	میزان LC50 (ppm)
۱	۲۴	۱۲/۶۰
۲	۴۸	۹/۸۲
۳	۷۲	۸/۰۰
۴	۹۶	۶/۳۷

نتایج در مورد این ماده نشان می دهد که با گذشت زمان از ۲۴ تا ۹۶ ساعت LC10، LC50 و LC90 کاهش می یابد بنابراین مقاومت ماهی‌ها در مدت زمان کوتاه بالاتر است و ماهیها غلظت بالاتری را می توانند تحمل کنند و با گذشت زمان مقاومت کاهش می یابد.



نگاره ۴- پرخونی ۱، احتباس صفراوی ۲ در کبد تاسماهی ایرانی در غلظت ۱/۵۹ میلی گرم در لیتر (x۱۰، H&E)



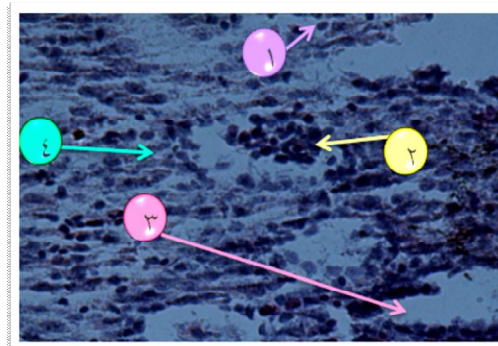
نگاره ۱- مشاهده پرخونی ۱، هیپرپلازی ۲، چسبندگی لاملای ثانویه ۳ و نکروز سلولی ۴ در آبشش تاسماهی ایرانی در غلظت ۵ و ۷ میلی گرم در لیتر (x۴۰، H&E)

آبششها، کاهش فعالیت‌های تحرکی در غلظت کم آمونیاک، کاهش اشتها (آثار مخرب در رشد)، تیره شدن رنگ پوست بدن، بروز حالات عصبی، بلعیدن هوا از سطح، شنای سریع در غلظت‌هایی بالای آمونیاک، شدت تنفس و باز و بسته شدن سریع سرپوش آبششی و نهایتاً مرگ ماهی است (۱۱ و ۶، ۱). تحقیق فوق مطالب عنوان شده را تایید می‌کند.

سازمان حفاظت محیط زیست (۱۹۷۶) و EIFAC (۱۹۷۰) (EUROPEAN INLAND FISHERIES ADVISORY COMMISSION) حداقل و حداکثر مجاز غلظت آمونیاک را به ترتیب ۰/۰۱۶ میلی گرم بر لیتر و ۰/۰۲۱ میلی گرم بر لیتر در طولانی مدت معرفی نموده است (۱۶). سطح آمونیاک غیر

یونیزه که باعث کاهش رشد می‌شود به ترتیب برای قزل آلی رنگین کمان، خورشید ماهی، ماهی پهن توربوت و مار ماهی اروپائی ۰/۱۰، ۰/۰۶، ۰/۱ و ۰/۱۲ میلی گرم در لیتر بوده و غلظت نیمه کشنده آمونیاک غیر یونیزه برای آزاد ماهیان در ۲۴ ساعت بین ۰/۵-۰/۸ میلی گرم در لیتر می‌باشد (۱۲). نصیری و همکاران (۱۳۸۶) غلظت نیمه کشنده آمونیاک غیر یونیزه برای کپور معمولی در ۲۴ ساعت بین ۲/۲۰ میلی گرم در لیتر عنوان کردند (۳). با استفاده از منحنی تغییرات درصد تلفات در غلظت‌های مختلف آمونیاک و معادله خط رگرسیون غلظت نیمه کشنده در ۲۴ ساعت برای بچه تاسماهی ایرانی ۱۲/۳۰ میلی گرم در لیتر آمونیاک کل بدست آمد. این تحقیق حساسیت گونه‌های مختلف ماهی را در برابر آمونیاک در شرایط بهینه نشان می‌دهد. در شرایط پرورشی عوامل نامساعد محیط از قبیل کمبود اکسیژن محلول، افزایش درجه حرارت، وجود مواد سمی (متان و سولفید هیدروژن) می‌تواند سمیت آمونیاک را تشدید کند.

Otto Paust و همکاران در سال ۲۰۱۱ اثر قرار گرفتن در معرض غلظت‌های کم آمونیاک بر روی رشد، بازده، تبدیل غذا و فیزیولوژی خون در نوجوانان نوعی ماهی پهن بزرگ اقیانوس اطلس (*Hippoglossus hippoglossus* L.) را نشان دادند، بطوری



نگاره ۵- مشاهده پرخونی ۱، نکروز گلوبروول ۲، اتساع فضای بومن ۳، نکروز سلولی ۴ در کلیه تاسماهی ایرانی در غلظت ۷ میلی گرم در لیتر (H&E, x۴۰)

### بحث

به منظور تعیین غلظت نیمه کشنده و کشنده آمونیاک و بررسی آسیب‌شناسی مسمومیت حاد با آمونیاک (N-NH<sub>3</sub> 96h) در بچه تاسماهی ایرانی این تحقیق اجرا شد. تاکنون اطلاعاتی در خصوص سمیت با آمونیاک در بچه ماهیان خاویاری گزارش نشده است. از اینرو افزایش و حفظ ذخایر تاسماهیان و بهبود درصد بقا ماهیان جوان که حساسیت بالاتری نسبت به آمونیاک دارند، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

حلالیت آمونیاک در آب بالا است، لذا هوادهی در خروج آمونیاک آب نقش چندانی ندارد (۱۶). لذا در آزمایشات از سنگ هوا به عنوان هواده به منظور تامین بخشی از نیازهای تنفسی ماهی استفاده گردید. غلظت آمونیاک شدیداً تحت تاثیر دما و pH و مواردی دیگر از قبیل سطوح اکسیژن محلول، شوری، گونه جانوری، سن و سایز ماهی است (۱). علاوه بر آن تابعی از چرخه روزانه pH و CO<sub>2</sub> است (۵).

در مطالعات مختلفی به بررسی تاثیر آمونیاک بر رفتار گونه‌های مختلف ماهیان پرداخته شده است. بطور کلی بعد از وارد شدن استرس ناشی از حضور آمونیاک در محیط گله‌های ماهیان به سمت اعماق متمایل و پراکنش آنها به طور چشمگیری کاهش می‌یابد، سپس با افزایش غلظت آمونیاک به اعماق بالاتر مهاجرت می‌نمایند. بروز این حالت در نتیجه بروز آسیب در

که بر عملکرد رشد بی‌تاثیر و بر روی فاکتورهای دیگر تاثیر قابل توجهی داشت (۱۴).

Brown (۱۹۶۸) عنوان نمود که کاهش دما به زیر ۳ درجه سانتیگراد منجر به افزایش حساسیت ماهیان به آمونیاک غیر یونیزه می‌گردد و بظن می‌رسد علت وقوع این پدیده کاهش سرعت تاثیر آمونیاک در ماهیان است (۱۶). با اندازه‌گیری پارامترهای خون و انجام مطالعات قبلی بر روی ماهی اقیانوس اطلس مشاهده شده است، که عمده اختلالات فیزیولوژیکی ناشی از دو سطح آمونیاک پس از مصرف غذا است (۹ و ۸). کاهش رشد به دلیل قرار گرفتن در معرض سطح زیر کشته آمونیاک در مطالعات متعدد در ماهی دریایی مشاهده شده است، و این مطالعات نشان داده است که همبستگی نزدیک بین سطوح قرار گرفتن در معرض آمونیاک و مصرف غذا وجود دارد (۱۵ و ۷). تحقیقات Person-Le Ruyet (۱۹۹۷) و همکاران بر روی ماهیان سیم دریایی، توپروت دریایی نشان می‌دهد که در فاصله رسیدن این ماهیان از ۶ گرم به ۱۶۰ گرم، حساسیت آنها نسبت به آمونیاک تغییر نکرده و وابسته به اندازه ماهی نمی‌باشد (۱۵).

Wang & Walsh در سال ۱۹۹۹ تحمل آمونیاک را در ماهی خانواده Batrachoididae (Toadfish and Midshipmen) مورد بررسی قرار داد و  $LC_{50} = 96h$  سه گونه ماهی از خانواده Batrachoididae، ماهی دهان گشاد دریایی خلیج فارس (Opsanus beta)، ماهی دهان گشاد دریایی صدف (Opsanus tau) و plainfin midshipman (Porichthys notatus) به ترتیب ۹/۷۵، ۱۹/۷۲ و ۶ میلی گرم در لیتر آمونیاک کل محاسبه شد (۲۰). Miron و همکارانش در سال ۲۰۰۸ اثرات آمونیاک و PH و بر برخی از پارامترهای متابولیک و بافت شناسی آبشش گربه ماهی نقره‌ای، Rhamdiaquelen (Heptapteridae) را مورد بررسی قرار دادند.  $96h-LC_{50}$  آمونیاک غیر یونیزه در pHهای ۶/۰، ۷/۵ و ۸/۲ به ترتیب  $0/44$  (CI  $0/49-0/38$ )،  $1/45$  (CI  $1/25-1/65$ ) و  $2/09$  (CI  $1/85-2/36$ )، بدست آمد.

قرار گرفتن در معرض آمونیاک باعث تغییرات دژنراتیو بافت اپیتلیوم آبشش مانند چسبیدن تیغه‌ها و ادم در مقایسه با گروه شاهد در pHهای مختلف شد (۱۳). نصیری و همکاران (۱۳۸۶) سمیت آمونیاک بر بافتهای آبشش و کبد ماهی کپور معمولی را بررسی نمودند (۳). فرهنگ (۱۳۸۷) میزان غلظت نیمه کشنده آمونیاک غیر یونیزه در ۲۴ ساعت را برای قزل‌آلای رنگین کمان  $0/28$  میلی گرم در لیتر بیان کرد (۲). میزان غلظت نیمه کشنده آمونیاک برای تاسماهی ایرانی (۲۶ گرمی) و فیل ماهی (۴۶ گرمی) در مدت ۹۶ ساعت  $pH=8/2$  و دمای ۲۶ درجه سانتیگراد) به ترتیب  $18/65$  و  $29/22$  میلی گرم در لیتر آمونیاک کل عنوان شد (۵). بدین صورت سن ماهی در حساسیت آن به آمونیاک در تاسماهیان موثر است، بطوریکه  $LC_{50} = 96h$  با افزایش سن تاسماهیان، افزایش می‌یابد و بچه ماهیان از بزرگترها حساس‌تر می‌باشند. همینطور فاکتورهای زیست محیطی (دما، pH، اکسیژن، دی اکسید کربن و ...) قادر به تحت تاثیر قرار دادن سمیت آمونیاک و حساسیت ماهیان نسبت به آن است.

Jeney (۱۹۹۲) سمیت آمونیاک بر بافتهای آبشش در کپور ماهیان را بررسی و عوارضی چون پرخونی و خونریزی در آبششها را ملاحظه نمود (۱۰). Knoph (۱۹۹۶) با مطالعه روی ماهی اسمولت در غلظت‌های بالای آمونیاک ششای سریع و ناموزون، تهویه کند آبششی و تشنجات عصبی که نهایت منجر به مرگ ماهی میشود را مشاهده نمود. آسیب به آبششها در غلظت‌های مختلف آمونیاک سبب کاهش انتقال اکسیژن به خون و بافت‌ها می‌گردد که نهایتاً منجر به مرگ می‌شود (۱۱). تشنجات عصبی شدید ماهیان در آزمایش، شاید به همین دلیل است. بروز هایپرپلازی در بافت آبششها نیز توسط Larmoyeux و Pier (۱۹۷۳)، بعلت قرار گرفتن طولانی مدت در غلظت‌های کمتر از حد کشنده حاد گزارش گردید (۱۷).



آبششی (۴) و اختلال در متابولیسم سلولهای مغزی (اختلالات عصبی) (۱۶).

این آسیبها در اثر اختلال در خواص الکتروشیمیایی غشای سلولهای عصبی و تاثیر آمونیاک بر نروترانسمیترها و فعالیتهای بیوشیمیایی مغز است.

آمونیاک می تواند فعالیت های بیوشیمیایی مغز را مختل کند از جمله تغییرات بیوشیمیایی ایجاد شده در ماهیان افزایش pH خون ماهی بود که باعث اختلال در واکنش های آنزیمی غشاء می شود که به دلیل حساسیت مغز به این تغییرات می تواند عامل ایجاد علائم عصبی باشد (۴).

ژئولیتها در واقع یک نوع رزین معدنی از سنگ های طبیعی هستند که قادرند کاتیون های موجود در محیط از جمله آمونیاک را گرفته و یون سدیم آزاد کنند. تحقیق حاضر می تواند در تعیین میزان ژئولیت لازم برای کاهش مسمومیت با آمونیاک و حذف آمونیاک در مراکز پرورش ماهی خاویاری بسیار مناسب باشد. در آب های لب شور و شور مقدار مورد نیاز به شدت افزایش می یابد و طبق تحقیقات قبلی مقدار ۲ گرم در لیتر ژئولیت در آب شیرین توانسته است غلظت آمونیاک را از دو گرم در لیتر به ۱/۷۶ میلی گرم در لیتر برساند در صورتیکه در شوری ۳۲ گرم در لیتر فقط ۰/۰۸ میلی گرم در لیتر آن را کاهش داده است. دلیل آن اینست که هر چه شوری بیشتر شد کاتیون های بیشتری وجود دارند که با یون آمونیوم در اتصال به ژئولیت رقابت می کنند.

### تشکر و سپاسگزاری

از استاد محترم جناب آقای مهندس محمدحسین طلوعی که مجادانه و صمیمانه اینجانب را راهنمایی نموده اند سپاسگزار و ممنونم.  
از جناب آقای مهندس علی حلاجیان که در انجام این پروژه مرا راهنمایی و کمک کردند تشکر و قدردانی می نمایم.

در مسمومیت مزمن ماهی با آمونیاک (مقدار پایین تر از حد کشنده)، در بافت پوششی آبششها ازدیاد سلولی (ضایعات آبششی)، کاهش میزان رشد و درصد بقای ماهیان، حساسیت به عوامل عفونی، ضایعات کبدی و کلیوی مشاهده می شود (۹).  
Milne و همکارانش در سال ۱۹۹۹ اثرات کوتاه مدت در معرض پالسهای آمونیاک بر ماهی را مورد بررسی قرار داد. در معرض مداوم دزهای بالای آمونیاک، مواردی از قبیل اختلال در رشد، آبشش، وزن و هماتوکریت بیشتر در ماهیان دیده شد (۱۲).

Walson و همکاران (۱۹۹۰) نشان دادند قرار گرفتن کپور معمولی در معرض غلظت های کم آمونیاک در مدت ۵ هفته منجر به بروز اختلالاتی در ترکیب خون و بافتهای خونساز به ویژه راس کلیه و طحال ماهیان می شود. تخریب لوله های کلیوی و گلومرولها باعث مختل شدن عملکرد کلیه می شود (۱۰ و ۱۱).

آمونیاک باعث استرس در ماهی می شود که سبب افزایش آدرنالین، نورآدرنالین و کورتیکواستروئیدها می شود. به همین دلیل آمونیاک می تواند باعث کاهش ایمنی، کاهش تولید اینترفرون و کاهش تمایل ماهی به غذا شود که خود عاملی برای مستعد شدن ماهی به بیماری های مختلف است. وجود آمونیاک، بیماری کولومنا پس را تشدید می کند، این حالت می تواند به دلیل کاهش ایمنی ماهی و ضایعات آبششی ناشی از مسمومیت با آمونیاک باشد (۱۰).

بطور کلی در ارتباط با علت مرگ ماهی ها در مسمومیت حاد با آمونیاک تا کنون دلایل ذیل ارائه شده است:

بهم خوردن تعادل اسمزی بدن ماهی در اثر آسیب های کلیوی و آبششی. یون آمونیوم در رقابت با سدیم جذب آن را کاهش می دهد. از طرفی نفوذ پذیری آبششها به آب افزایش می یابد. آسیب های کلیوی نیز بدلیل ضایعات گلومرولها و لوله های کلیوی می باشد (۴)، کاهش قابلیت حمل اکسیژن توسط خون (۱۶)، کاهش ورود اکسیژن به بدن ماهی در اثر آسیب های

## فهرست منابع

- ammonia on adrenalinand and noradrenalin in levels indifferent organs. *Aquaculture*. 10(4):139-148.
11. Knoph, M.B. (1996): Gill ventilation frequency and mortality of Atlanticsalmon (salmosalar) exposed to high ammonia levels in saewater. *Water esearch*, 30:837-842.
  12. Milne, I., Seager, J., Mallett, M., Sims, I. (2000): Effects of short-term plused ammonia exposure on fish. *April*. p:2929-2936.
  13. Miron, S., Moraes, B., a, Becker, A., Crestani, M., Spanevello, S., Loro, L., Baldisserotto, B. (2008): Ammonia and pH effects on some metabolic parameters and gill histology of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Heptapteridae). *February*.pp:192-196.
  14. Otto Paust, L., Foss, A., Imstrand, K. (2011): Effects of chronic and periodic exposure to ammonia on growth, food conversion efficiency and blood physiology in juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.).pp:400-406.
  15. Person-Le Ruyet, J., Galland, R., Le Roux, A., Chartois, H., (1997):Chronic ammonia toxicity in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 154:155-171.
  16. Smart, G.R. (1981): Aspects of water quality producing stress in intensive fish culture. In: Pickering A.D. (Ed), *Stress and fish*, Academic press, London, pp: 276-293.
  17. Soderberg, G.R.W.(1985):Histopathology of rainbow trout,salmogairdneri.pp:95-99.
  18. USEPA. (1985): Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms. 3rd Ed. Environmental Protection Agency, Environmental Monitoring and Support Laboratory, Cincinnati, OH. EPA-600/4- 85/013.
  19. Wang, Y., Walsh, P. (1999): High ammonia tolerance in fishes of the family Batrachoididae (Toadfish and Midshipmen). *November*.pp:205-219.
  20. Wlasow, T., Dobrowska, H., Ziomek, E. (1990): Haematology of carp in acute intoxication with ammonia. *Pol. Arch. Hydrobiol.* 37(3):419-428.
  ۱. پورکاظمی، م.(۱۳۷۶): نگرشی بر وضعیت تاسماهیان دریای خزر و چگونگی حفظ ذخایر آن، مجله علمی شیلات، شماره ۳، سال ششم، پائیز ۷۶: ۱۳-۲۲.
  ۲. فرهنگ، م.(۱۳۸۹): تعیین غلظت نیمه کشنده آمونیاک در ماهی قره برون و فیل ماهی تحت شرایط آزمایشگاهی، فصلنامه محیط زیست جانوری، سال دوم، شماره ۳: ۳۱-۳۶.
  ۳. نصیری، ا.(۱۳۸۶): بررسی اثر سمیت آمونیاک بر بافت‌های آبشش و کبد ماهی کپور معمولی، پایان نامه کارشناسی ارشد به راهنمایی سرکار خانم طاهره ناجی، ۱۸.
  4. Colt, J. (2006): Water quality requirements for reuse systems. *Aquacult, Eng.* 34. p:143-156.
  5. Evans, D.H. (1993): The physiology of fishes. CRC Press Inc. p: 379-425.
  6. Farhangi, M. (2010): In vitro, determination of sub-lethal concentration of UN ionized ammonianitrogen (N-NH<sub>3</sub>) on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). 2nd International Congress on Aquatic Animal Health Management and Disease, October, Tehran, Iran. p: 26-27.
  7. Foss, A., Evensen, T.H., Vollen, T., Qiestad, V. (2003): Effects of chronic ammonia exposure on growth and food conversion efficiency in juvenile spotted wolffish. *Aquaculture* 228:215-224.
  8. Gústavsson, A., Imstrand, A.K., Gunnarsson, S., Foss, A., Árnason, J., Jónsson, A., Smáradóttir, H., Arnarson, I., Thorarensen, H. (2010): Growth dynamics and blood physiology of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) in relation to photoperiod and salinity. *Aquac. Int.* 18: 433-445.
  9. Imstrand, A.K., Gústavsson, A., Gunnarsson, S., Foss, A., Árnason, J., Arnarson, I., Jónsson, A.F., Smáradóttir, H., Thorarensen, H. (2008): Effects of reduced salinities on growth, feed conversion efficiency and blood physiology of juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture* 274: 254-259.
  10. Jeney, Z.S., Nemcsok, J., Jeney, G., Olah, J. (1992): Acute effect of sublethalammonia concentrations on common carp. 1: effect of