

علائم بالینی و اثرات آسیب شناسی مسمومیت حاد با آمونیاک در قزل آلی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

*محمد فرهنگی^۱ و عبدالمجید حاجی مرادلو^۲

^۱عضو هیات علمی دانشکده کشاورزی گنبد دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،

^۲عضو هیات علمی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

Email: ffarhangi@yahoo.com

چکیده

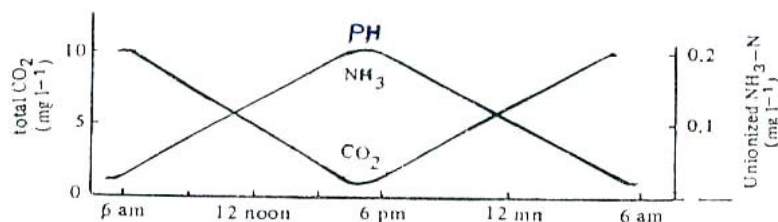
آسیب شناسی اثرات مسمومیت حاد با آمونیاک در ماهی قزل آلی رنگین کمان در مدت ۲۴ ساعت و در محدوده زمانی ۱۳۸۰/۲/۱۵ الی ۱۳۸۰/۲/۳۰ در گارگاه پرورش ماهی استان از توابع استان گلستان بررسی گردید. آزمایش های با استفاده از روش آب ساکن (Static method) اجرا شد. ماهیان در گروه های ۱۳ تایی با میانگین وزنی ۱۵ گرم در معرض غلظت های مختلفی از آمونیاک کل ($N-NH_4$) قرار گرفتند. غلظت کشنده آمونیاک (Lethal concentration) در مدت ۲۴ ساعت برابر ۲۵ میلی گرم در لیتر آمونیاک کل به دست آمد. بیشترین تلفات ماهی (۷۰-۸۰ درصد) در ساعات اولیه رخ داد. در ماهیانی که در معرض غلظت های بالای آمونیاک کل (> 15 میلی گرم در لیتر) قرار داشتند حرکات تشنجی شدید، عدم تعادل و شنای به پهلو، خم شدن ناگهانی عضلات تنه و بازماندن سرپوش های آبششی مشاهده شد. در مطالعات میکروسکوپی بافت های کلیه، کبد و آبشش ماهیان ضایعاتی به شکل پرخونی، خونریزی، نکروز سلولی و نفوذ سلول های آماسی تک هسته ای مشاهده گردید.

واژه های کلیدی: آسیب شناسی، مسمومیت حاد، آمونیاک، قزل آلی رنگین کمان، *Oncorhynchus mykiss*.

مقدمه

است. نسبت بین این دو متغیر تابع pH و درجه حرارت آب و چرخه روزانه pH و CO_2 است (شکل ۱). بیشینه غلظت آمونیاک در بعد از ظهر وقتی که میزان CO_2 در حد کمینه خود و pH بیشترین میزان روزانه را دارد، دیده می شود. عوامل مختلفی از جمله pH، آمونیاک آب و شوری بر دفع آمونیاک از آبشش ها تأثیر دارد.

آمونیاک (NH_3^+) عمده ترین ترکیب نیتروژنی دفعی ماهیان است که حدود ۶۰-۹۰ درصد آن را تشکیل می دهد. بقیه مواد شامل اوره، اسید اوریک و کراتین است (۴) آمونیاک در آب بایون آمونیوم (NH_4^+) در تعادل



شکل ۱- نوسان روزانه دی اکسید کربن و آمونیاک آزاد (Chen, 1988 به نقل از مکرمی، ۱۳۷۹)

مطالعات نشان داده است که میزان دفع آمونیاک برای آزاد ماهیان بالغ به ازای هر کیلوگرم از وزن ماهی برابر $0.13-0.37$ میلی گرم در دقیقه می باشد (۳). عموماً اوج دفع آمونیاک در بعد از ظهر چندساعت بعد از قطع غذا است. به طوری که در مطالعات به عمل آمده نرخ دفع آمونیاک برای هر کیلوگرم غذای خورده شده برای ماهیان آزاد برابر $20-12$ گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن بوده است (۳). تاکنون مطالعات زیادی در خصوص مسمومیت با آمونیاک در گونه های مختلف ماهی و میگو صورت گرفته است (۳، ۵، ۶، ۷، ۸ و ۹) با اندازه گیری مقادیر آمونیاک کل ($N-NH_4$)، درجه حرارت و pH می توان با استفاده از رابطه زیر میزان آمونیاک غیره یونیزه ($N-NH_3$) را به دست آورد (۱).

$$N-NH_3 = N-NH_4 / 10^{(10.7 - 0.33 T - pH)} + 1 \quad (1)$$

محدودیت منابع آبی کشور و همچنین نیاز روز افزون پرورش ماهی باعث گردیده تا سیستم های پرورشی متراکم و فوق متراکم پرورش قزل آلا گسترش یابد. در این راستا حفظ کیفیت آب و از همه مهمتر آمونیاک از اهمیت بیشتری برخوردار است. تولید آمونیاک در پرورش متراکم و فوق متراکم و همچنین حمل و نقل ماهی همواره سبب بروز مشکلاتی برای پرورش دهندگان می باشد. با توجه به اهمیت آمونیاک در پرورش ماهی خصوصاً در محیط های آبی با جریان کم آب، دانستن غلظت کشنده و نیمه کشنده آمونیاک برای ماهی قزل آلا بعنوان شاخص ماهیان پرورشی سردآبی در شرایط موجود می تواند نقش تعیین کننده ای در بهبود شرایط محیطی داشته باشد. با توجه به اینکه آزمایش های مختلفی بر روی ماهی آزاد صورت گرفته بنظر می رسد تاکنون چنین آزمایشی بر روی ماهی قزل آلا صورت نگرفته باشد. لذا این آزمایش بمنظور تعیین غلظت کشنده آمونیاک (*Lethal concentration*) برای ماهی قزل آلا و بررسی اثرات آن بر رفتار و ساختار سلولی این گونه از ماهی و مقایسه آن با انواع ماهیان آزاد صورت گرفته است.

مواد و روش ها

آزمایش های در دو مرحله صورت گرفت. ابتدا به منظور تعیین غلظت کشنده آمونیاک آزمایشاتی در مرکز پرورش ماهی سردآبی واقع در استان از توابع استان گلستان به مدت دو هفته اجرا گردید. تعداد ۱۵۰ قطعه بچه ماهی قزل آلا رنگین کمان با میانگین وزنی ۱۵ گرم از کارگاه پرورش ماهی مورد نظر تهیه و در یک استخر جداگانه نگهداری شدند. پس از اطمینان از سلامت ماهی ها، در گروه ای ۱۳ تایی جهت آزمایش به آکواریوم های ۵۰ لیتری انتقال داده شدند. مطالعات با استفاده از روش آب ساکن (*Static method*) در مدت ۲۴ ساعت اجرا گردید. در مدت آزمایش درصد تلفات و علائم مسمومیت ثبت گردید. در تمام آکواریوم ها از سنگ هوا به عنوان هواده استفاده گردید. برای تولید آمونیاک از کلرید آمونیوم (NH_4Cl) ساخت کارخانه *Merck* آلمان استفاده گردید و سپس به ازای واحد حجم توزین و به آب اضافه شد. ماهی ها در معرض غلظت های مختلف آمونیاک کل (۲۵، ۲۰، ۱۵، ۱۰ و ۰ میلی گرم در لیتر) قرار داده شدند. در مرحله بعد بمنظور بررسی اثرات آسیب شناسی ناشی از مسمومیت با آمونیاک از بافت های کبد، کلیه و آبشش ماهیانی که در معرض غلظت های مختلف آمونیاک قرار داشتند نمونه گیری به عمل آمد. از نمونه ها پس از تثبیت در فرمالین ۱۰ درصد در آزمایشگاه پاتو بیولوژی (دکتر عزیزاده - گرگان) مقاطع بافتی به روش مرسوم تهیه و با استفاده از روش هماتوکسیلین-ائوزین (*Haematoxyllin-Eosin*) رنگ آمیزی گردید. نمونه ها جهت مطالعه بیشتر به آزمایشگاه دانشگاه علوم کشاورزی گرگان انتقال داده شد.

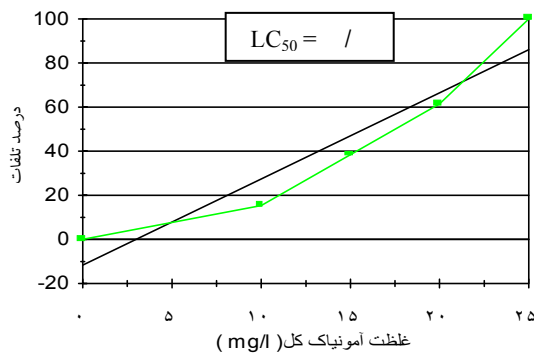
نتایج

در غلظت های ۲۵، ۲۰، ۱۵، ۱۰ و ۰ میلی گرم در لیتر آمونیاک کل درصد تلفات در ۲۴ ساعت به ترتیب برابر ۱۰۰ و $86/4$ ، $61/5$ ، $38/4$ ، ۰ بوده است (شکل ۲). با افزایش غلظت آمونیاک در آب درصد تلفات به همان نسبت افزایش می یابد، به طوری که بعد از گذشت ۲۴ ساعت در غلظت ۲۵ میلی گرم در لیتر آمونیاک کل درصد

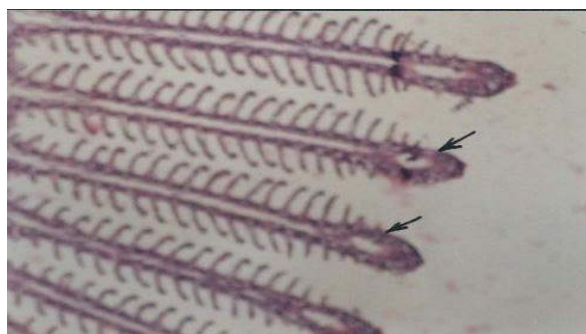
آبششی (Hyperplasia)، ادم یاخیز (Edema)، اتساع لاملایهای ثانویه، پرخونی و خونریزی (Hemorrhage and Hyperemia)، نکروز (Necrosis) سلولهای آبششی و نفوذ سلولهای آماسی (Infiltration) تک هسته‌ای در لابه لای رشته‌های آبششی بوده است. در گروه شاهد نیز درجات خفیفی از هیپرپلازی راس رشته‌های آبششی دیده شد، که می‌تواند بیانگر نوعی ضایعه آبششی در این ماهیان قبل از این بررسی بوده و یا این که تأثیر ماده تثبیت‌کننده (فرمالین) بر سلولهای آبششی باشد (شکل‌های ۵، ۴ و ۳). ضایعات مربوطه به کلیه، عمدتاً شامل اتساع کپسول بومن، تخریب مجاری کلیوی، خونریزی و پرخونی، تغییر شکل سلولهای پوششی مجاری کلیوی، وجود مقادیر فراوان سلولهای تک هسته‌ای بود (شکل‌های ۶ و ۷). در کبد نیز ضایعات بیشتر شامل خونریزی، پرخونی و نکروز سلولهای کبدی بود (شکل‌های ۸ و ۹). در کلیه و کبد ماهیان گروه شاهد ضایعه‌ای مشاهده نشد.

تلفات ۱۰۰ درصد بود. با رسم منحنی تغییرات تلفات در غلظت‌های مختلف آمونیاک و با استفاده از شیب خط رگرسیون غلظت نیمه کشنده آمونیاک LC_{50} (Sublethal concentration) در ۲۴ ساعت برابر ۱۵/۷۷ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک کل ($N-NH_4$) به دست آمد. این میزان با توجه به دما و pH ثابت به ترتیب $10^{\circ}C$ و $T=16$ و $pH=7/7-7/8$ و با استفاده از رابطه بین آمونیاک کل و آمونیاک غیر یونیزه (فرمول ۱) معادل ۰/۲۸ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک غیر یونیزه ($N-NH_3$) می‌باشد (شکل ۲).

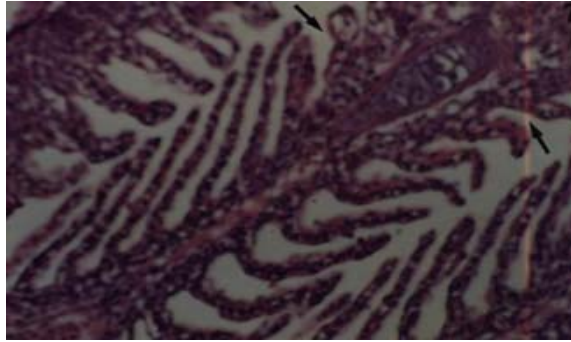
در مطالعات بالینی در ماهیانی که در معرض غلظت‌های بالای آمونیاک کل قرار داشتند، علائم ظاهری شامل بی‌قراری شدید، خم شدن عضلات تنه، باز و بسته شدن شدید سرپوش‌های آبششی و حفره دهان، حرکات تشنجی و برخورد با کناره‌های آکواریوم، بلعیدن هوا از سطح آب و قرمز شدن آبشش‌ها بوده است. در بررسی‌های میکروسکوپی مقاطع بافتی ضایعات آبشش شامل درجات مختلفی از هیپرپلازی راس رشته‌های



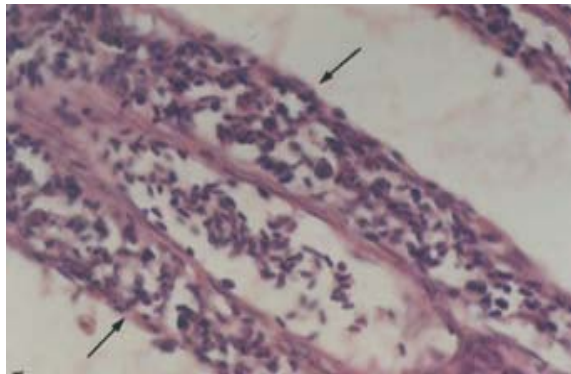
شکل ۲- منحنی خط رگرسیون و تغییرات تلفات ماهی در غلظت‌های مختلف آمونیاک کل (میلی‌گرم در لیتر)



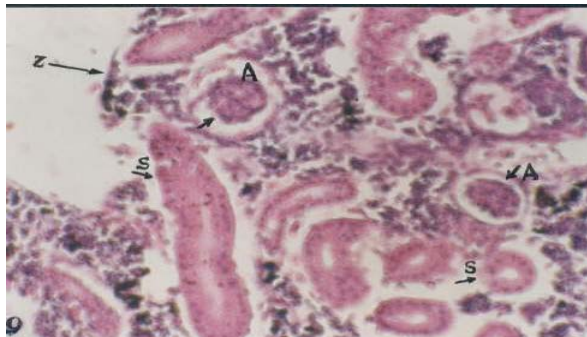
شکل ۳- مقطع بافتی آبشش ماهیانی که در معرض غلظت کشنده آمونیاک کل قرار داشتند. نوک پیکان‌ها هیپر پلازی راس رشته‌های آبششی را نشان می‌دهد (بزرگ‌نمایی $\times 100$) (رنگ آمیزی H&E)



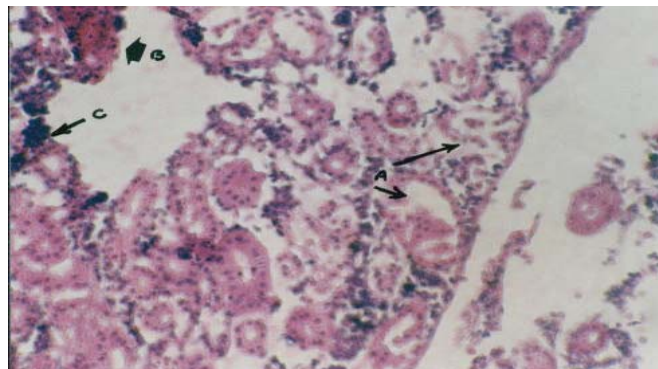
شکل ۴- آبشش ماهیانی که در معرض غلظت کشنده آمونیاک کل قرار داشتند. - نوک پیکانها چماغی شدن رأس رشته‌های آبشش را نشان می‌دهد (بزرگ‌نمایی $\times 400$) (رنگ آمیزی H&E)



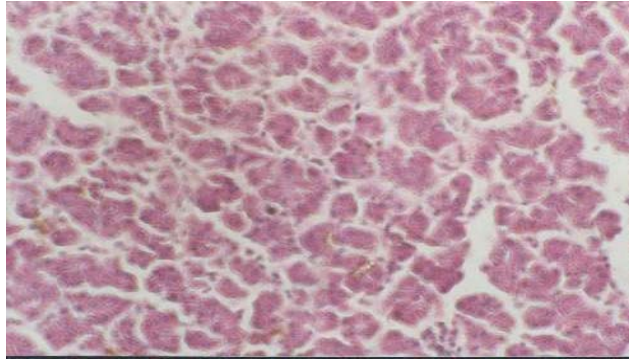
شکل ۵- مقطع بافتی آبشش ماهیانی که در معرض غلظت کشنده آمونیاک کل قرار داشتند. نوک پیکانها وجود سلول‌های آماسی را نشان می‌دهد (بزرگ‌نمایی $\times 400$) (رنگ آمیزی H&E)



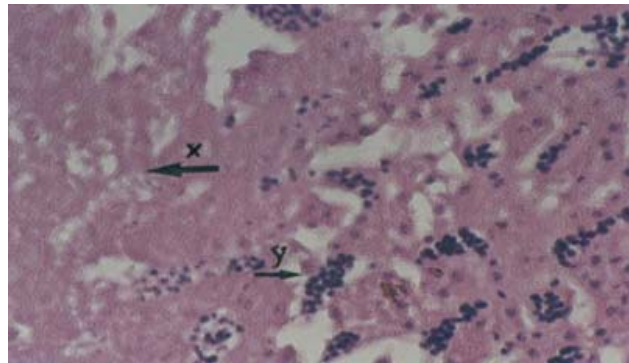
شکل ۶- مقطع بافتی کلیه ماهیان گروه شاهد. A- گلوبول‌ها را نشان می‌دهد. S- مجاری کلیوی را نشان می‌دهد. Z- ملانو ماکرو فاژها را نشان می‌دهد (بزرگ‌نمایی $\times 200$) (رنگ آمیزی H&E)



شکل ۷- مقطع بافتی کلیه ماهیانی که در معرض غلظت کشنده آمونیاک کل قرار داشتند. A- تخریب مجاری کلیوی را نشان می‌دهد. B- پرخونی را نشان می‌دهد. C- ملانو ماکروفاژها را نشان می‌دهد (بزرگ‌نمایی $\times 200$) (رنگ آمیزی H&E)



شکل ۸- مقطع بافتی کبد ماهیان گروه شاهد. نوک پیکان سلول‌های کبدی را نشان می‌دهد (بزرگ‌نمایی $\times 200$) (رنگ‌آمیزی H&E)



شکل ۹- مقطع بافتی کبد ماهیانی که در معرض غلظت کشنده آمونیاک کل قرار داشتند. X- منطقه تخریب سلول‌های کبدی را نشان می‌دهد.

Y- وجود سلول‌های آماسی را نشان می‌دهد (بزرگ‌نمایی $\times 200$) (رنگ‌آمیزی H&E)

نشان می‌دهند. در آزمایش مورد نظر بیشترین تلفات در همان ساعات اولیه رخ داد که متعلق به ماهیان کوچک بود. این امر با یافته‌های Ruyet و همکارانش (۱۹۹۷) مطابقت دارد. آنها با مطالعه بر روی ماهی Turbot نشان دادند، هرچه ماهی بزرگ‌تر باشد تحملش در مقابل سمیت آمونیاک بیشتر است. Muir (۱۹۸۲) سطوحی از آمونیاک غیر یونیزه را که باعث کاهش رشد انواع ماهیان می‌شود برای قزل آلا 0.103 میلی‌گرم در لیتر، خورشید ماهی (Sole sp.) برابر 0.066 میلی‌گرم در لیتر، ماهی پهن (Turbot) برابر با 0.1 میلی‌گرم در لیتر و مارماهی اروپایی برابر با 0.12 میلی‌گرم در لیتر بیان داشت. این امر حساسیت گونه‌های مختلف ماهی را در برابر آمونیاک نشان می‌دهد. آنچه مسلم است غلظت به‌دست آمده در شرایط بهینه برای ماهی بوده است. در شرایط پرورشی همواره عوامل نامساعد محیطی از قبیل کمبود اکسیژن محلول، افزایش درجه حرارت، وجود مواد سمی از قبیل متان و سولفید هیدروژن می‌تواند سمیت آمونیاک را تشدید کند. بنابراین غلظت کشنده آمونیاک در محیط‌های

بحث

با توجه به اینکه حلالیت آمونیاک در آب بالاست لذا هوادهی در خروج آمونیاک آب نقش چندانی ندارد (۸). هوادهی سبب افزایش مقاومت ماهی شده و می‌تواند فرآیند نیتریفیکاسیون را تشدید کند. به طوری که هر چه میزان اکسیژن محلول کم شود حساسیت ماهی به مواد سمی افزایش می‌یابد. مطالعات نرخ سمیت آمونیاک محلول، روی و مس را برای قزل آالی رنگین کمان در کمتر از ۶۰ درصد حالت اشباعی اکسیژن محلول نشان می‌دهد (۸). لذا در آزمایش‌های از سنگ هوا به‌عنوان هواده به‌منظور تأمین بخشی از نیازهای تنفسی ماهی استفاده گردید. غلظت آمونیاک شدیداً تحت تأثیر pH و درجه حرارت می‌باشد. اثر pH به مراتب بیشتر از درجه حرارت می‌باشد. هر چه pH افزایش یابد سمیت آمونیاک شدید می‌شود. علاوه بر pH و درجه حرارت عواملی چون سطوح اکسیژن محلول، شوری، گونه جانوری و سن و اندازه ماهی نیز بر سمیت آمونیاک تأثیر دارد. به طوری که ماهیان بزرگ‌تر مقاومت بیشتری از خود

پرورشی می‌تواند با مقادیر کمتری رخ دهد. افزایش آمونیاک آب سبب بروز تظاهراتی در رفتار و ساختار سلولی ماهی می‌شود. اولین علائم مسمومیت با آمونیاک در ماهی شامل بی‌قراری، افزایش سرعت تنفس، آمدن ماهی به سطح آب، بلعیدن هوا از سطح آب و عصبانیت شدید می‌باشد. ماهی سعی می‌کند از سطح آب بیرون بپرد، انقباضات شدید و اسپاسم‌های عضلانی رخ داده و نهایتاً ماهی به پهلو می‌افتد. دهان و سرپوش‌های آبششی به دلیل اسپاسم‌های شدید کاملاً باز می‌ماند. نتیجه به دست آمده در این مطالعه با مطالعات مطالعات Jeney (۱۹۹۲)، Knoph (۱۹۹۶) و Thorud Knoph (۱۹۹۶) مطابقت دارد. Knop (۱۹۹۶) با مطالعه بر روی اسمولت‌های ماهی آزاد نشان داد در غلظت‌های بالای آمونیاک در ماهی شنای وحشت آمیز و ناموزون، تهویه کند آبششی و تشنجات عصبی رخ داده که در نهایت منجر به مرگ ماهی می‌شود jency (۱۹۹۲). نیز با مطالعه بر روی ماهی کپور نشان دادند در اثر مسمومیت با آمونیاک آبشش‌ها بشدت پر خون شده و خونریزی در آنها دیده می‌شود. دلایل متعددی وجود دارد که می‌تواند سبب مرگ و میر ماهی‌ها شود. آمونیاک به آبشش‌ها آسیب می‌رساند همین امر سبب

کاهش انتقال اکسیژن به خون و بافت‌ها می‌گردد، در نتیجه شدت تنفس افزایش می‌یابد. آمونیاک همچنین تمایل ویژه‌ای به مغز دارد و می‌تواند فعالیت‌های بیوشیمیایی مغز را مختل کند (۱). تشنجات عصبی در ماهی نیز شاید به همین دلیل است. همچنین تخریب لوله‌های کلیوی و گلومرول‌ها می‌تواند عمل کلیه را مختل سازد. به هر حال روش‌های مختلفی را جهت کاهش غلظت آمونیاک و جلوگیری از تلفات ناشی از آن در ماهی می‌توان بیان داشت. از جمله تعویض آب، استفاده از هوا ده‌های قوی، تنظیم تراکم و تغذیه اصولی. یکی از روش‌های پیشنهادی استفاده از ترکیبات معدنی همچون زئولیت‌ها می‌باشد که بر اساس تبادل یونی عمل می‌کند. آزمایش فوق می‌تواند در تعیین میزان زئولیت لازم برای کاهش آمونیاک نقش تعیین‌کننده‌ای داشته باشد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از کلیه عزیزانی که صادقانه مرا در این طرح یاری رساندند، آقایان دکتر کمالی، دکتر رقیمی، دکتر عزیزاده و آقای لطیفی کمال تشکر و قدردانی را دارم.

منابع

- ۱- شریف روحانی، م. ۱۳۷۴. تشخیص، پیشگیری و درمان بیماری‌ها و مسمومیت‌های ماهی. معاونت تکثیر و پرورش آبزیان، انتشارات سبز رویش. ۲۵۶ صفحه.
- ۲- مکرمی، ق. ۱۳۷۹. بررسی کاربرد زئولیت طبیعی در پرورش میگو. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال. ۱۱۸ص.
3. Bergheim, A., and Seymour, E.A. 1991. Measurements of oxygen consumption and ammonia excretion of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in commercial-scale, single-pass freshwater and sea water landbased culture systems. *Aquaculture Engineering*. 10:251-267.
4. Evans, D.H. 1993. *The physiology of fishes*. CRC Press Inc. pp 379-425.
5. Jeney, Z.S. 1992. Acute effect of sublethal ammonia concentrations on common carp. 1: Effect of ammonia on adrenalin and noradrenalin levels in different organs. *Aquaculture*. 104:139-148.
6. Knoph, M.B. 1996. Gill ventilation frequency and mortality of Atlantic salmon (*Salmo salar*) exposed to high ammonia levels in seawater. *Water Research Oxford*. 30:837-842.
7. Knoph, M.B., and Thorud, K. 1996. Toxicity of ammonia to Atlantic salmon (*Salmo salar*) in seawater effects on plasma osmolality, ion, ammonia, urea and glucose levels and hematologic parameters. *Comparative Biochemistry and physiology*. 11:375-3.
8. Maladen, T. 1994. Acute toxicity of ammonia to juvenile seabass (*Dicentrarchus labrax*) at different aeration levels. *Aquaculture*. 128: 85-95.
9. Muir, J.F. 1982. Recirculated water system in aquaculture. In: Chen J.C. and Kou Y.Z. 1992. Effects of ammonia on growth and molting of *Penaeus japonicus* juveniles. *Aquaculture*. 104:249-260.
10. Ruyet, J.P.L., Glland, R., and Roux, A.L.E. 1997. Chronic ammonia toxicity in juvenile turbot. (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*. 154:155-171.

Clinical signs and histopathology of acute toxicity of ammonia in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

***M. Farhangi¹ and A.M. Hajimoradlou²**

¹Faculty member Dept. of Agricultural Gonbad, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, ²Faculty member of Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
Email: f.farhangi@yahoo.com

Abstract

The histopathological effect of acute toxicity of ammonia on rainbow trout was studied during 24 hours at time zones 2001/May/5-2001/May/20 in Alostan fish culture center, Golestan, Iran. Experiments were done by static water method. Thirteen groups of fish with the average weight of 15g were encountered with different concentrations of total ammonia. Lethal concentration of ammonia during 24 hours was 25 mg/l. The maximum mortalities occurred in early time of experiment (70-80%). High ammonia levels (>15mg/l) induce convulsion, ataxia, bending of body muscle and opened operculum. In microscopic studies tissues of kidney, liver and gills showed hyperemia, hemorrhagic cell necrosis and influx of inflammatory cells.

Keywords: Histopathology; Ammonia; Acute toxicity; Rainbow trout; *Oncorhynchus mykiss*.