

## تعیین میزان غلظت کشنده و تغییرات رفتاری در مسمومیت حاد با آمونیاک و

### نیتريت در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

طراوت ملایم رفتار<sup>۱</sup>، رحیم بیغان<sup>۲</sup>، محمد راضی جلالی<sup>۳</sup>، علی شهرياری<sup>۴</sup>

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران. taravat.fishery@gmail.com

۲- استاد، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران.

۳- استاد، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران.

۴- دانشیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۴/۶/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۵/۸/۱۵

#### چکیده

زمینه و هدف: وجود ترکیبات نیتروژنی در مقادیر بیشتر از حد مجاز، می تواند باعث مسمومیت حاد در آبزیان شود. هدف از این تحقیق تعیین غلظت کشنده در مسمومیت حاد آمونیاک و نیتريت در ماهی کپور معمولی و بررسی تغییرات رفتاری ماهی ها در مواجهه با این دو ماده بوده است.

روش کار: تعداد ۴۰۰ قطعه بچه ماهی کپور معمولی با میانگین وزنی  $40/51 \pm 0/8$  گرم به طور تصادفی در ۶ غلظت مختلف (۱۰۰، ۱۱۰، ۱۲۰، ۱۳۰، ۱۴۰، ۱۶۰ mg/l) آمونیاک و (۵۰۰، ۴۵۰، ۳۰۰، ۵۵۰، ۶۰۰ mg/l) نیتريت قرار داده شد. تلفات و تغییرات رفتاری تا ۹۶ ساعت ثبت شده و نهایتاً  $LC_{50}$  ۹۶ ساعته آمونیاک و نیتريت در این ماهی تعیین گردید.

یافته ها: میزان  $LC_{50}$  در ۹۶ ساعت آمونیاک و نیتريت به ترتیب  $102/45$  و  $512/46$  میلی گرم در لیتر به دست آمد. حداکثر غلظت قابل قبول (MAC) آمونیاک و نیتريت در بچه ماهی کپور به ترتیب  $10/24$  و  $51/24$  میلی گرم در لیتر مشخص گردید.

نتیجه گیری: نتایج به دست آمده نشان داد که با افزوده شدن آمونیاک و نیتريت تا غلظت مورد مطالعه، میزان مرگ و میر ماهیان به صورت تصاعدی افزایش می یابد و مقادیر به دست آمده نیز نسبت به کارهای مشابهی که در سختی و شوری های پایین تر آب صورت گرفته است، غلظت کشنده ۵۰٪ بیشتر بوده است. به عبارت دیگر به نظر می رسد در شرایط استان خوزستان احتمال تلفات ناشی از آمونیاک و نیتريت به مراتب کمتر از دیگر مناطق باشد.

واژه های کلیدی: آمونیاک، سمیت، کپور معمولی، نیتريت،  $LC_{50}$ .

#### مقدمه

(۲۱). علاوه بر این، ورودی های آنتروپوژنیک نیتروژن ذره ای و نیتروژن آلی به محیط زیست، می تواند باعث آلودگی نیتروژنی غیر آلی شود (۴۰، ۲۷). غلظت ترکیبات نیتروژنی معدنی ( $NO_3^-$ ،  $NO_2^-$ ،  $NH_4^+$ ) که در زمین و سطح آب ها در حال افزایش در سراسر جهان هستند، باعث اثرات قابل توجهی در بسیاری از موجودات آبی و در نهایت، موجب تخریب آب شیرین، مصب ها و اکوسیستم های دریایی ساحلی می شوند (۳۹، ۲۸، ۲۶، ۸). متداول ترین آلودگی آب آمونیاک است، که می

بشر در طول دو قرن گذشته و به ویژه در طول پنج دهه ی اخیر، به طور قابل ملاحظه ای با افزایش در دسترس بودن و انتقال نیتروژن در طول مناطق زیادی از زمین، چرخه ی جهانی نیتروژن را تغییر داد (۴۹، ۲۱، ۱۷). در نتیجه علاوه بر منابع طبیعی، نیتروژن غیر آلی می تواند از طریق منابع نقطه ای و غیر نقطه ای به دست آمده از فعالیت های انسانی وارد اکوسیستم های آبی می شود. منابع غیر نقطه ای عموماً مهم تر از منابع نقطه ای هستند، چراکه آن ها بزرگ تر بوده و کنترلشان مشکل تر می باشد (۲۷)،

و Crayfish به دلیل تبدیل رنگدانه‌ی حمل اکسیژن به شکل‌هایی که قادر به حمل اکسیژن نیست، باعث هیپوکسی و در نهایت مرگ می‌شود. در ماهی، ورود نیتريت به گلبول‌های قرمز خون با اکسایش اتم آهن (تبدیل  $Fe^{+2}$  به  $Fe^{+3}$ ) همراه است در نتیجه باعث تبدیل هموگلوبین کاربردی به مت‌هموگلوبین می‌شود که به دلیل پایداری بالایی که در مقابل جدا شدن دارد قادر نیست اکسیژن را به بافت‌های بدن آزاد کند (۴۴، ۳۹، ۲۵، ۲۲، ۱۴، ۹). با توجه به اهمیت نقش آمونیاک و نیتريت در آلودگی آب به اشکال مختلف و امکان ورود این مواد به منابع آبی به طرق مختلف، مطالعه حاضر در نظر دارد سمیت حاد آمونیاک، نیتريت و تاثیرات آن‌ها بر تغییرات رفتاری و تلفات ماهیان کپور معمولی را بررسی نماید.

## مواد و روش‌ها

### تهیه و نگهداری ماهی

تعداد ۴۰۰ قطعه ماهی کپور معمولی، با میانگین وزنی  $40/51 \pm 5/8$  گرم از مزارع پرورش ماهی شهرستان اهواز تهیه و به آزمایشگاه تحقیقاتی بخش بهداشت آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، منتقل شدند. ماهی‌ها به منظور تطابق با شرایط آزمایشگاه، به مدت یک هفته در آکواریوم‌های تمیز و کاملاً ضد عفونی شده با حجم ۳۰۰ لیتر نگهداری شدند. جهت هوادهی و تأمین اکسیژن در هر یک از آکواریوم‌ها یک عدد سنگ هوا که به منبع هواده متصل بود، نصب گردید و تنها در نوبت‌های غذادهی، هوادهی موقتاً قطع و سپس مجدداً برقرار می‌شد. در این تحقیق از آب لوله کشی شهری کلرزدایی شده استفاده گردید. فاکتورهای شیمیایی آب برای همه گروه‌ها یکسان و به قرار زیر بوده است (جدول شماره ۱): جهت اندازه‌گیری فاکتورهای فیزیکی شیمیایی آب از دستگاه کالریتر هک (مدل ۸۹، شرکت Hach، کشور آمریکا) و pH متر مدل

تواند از طریق خروج مواد زائد گیاهی، تخریب مواد آلی حاوی نیتروژن، رواناب کود و منابع صنعتی وارد سیستم های آبرزی طبیعی شود. آمونیاک مواد زائد اصلی در ماهیان استخوانی است و به عنوان یک محصول از کاتابولیسم پروتئین تولید می‌شود (۳۴). این ماده یکی از سمی‌ترین مواد برای اکوسیستم‌ها و ارگانیسم‌های آبرزی است و به نظر می‌رسد اثر مستقیم روی رشد موجودات آبرزی داشته (۱۰) و باعث کاهش رشد و کاهش مقاومت نسبت به بیماری‌ها (۲۴) یا حتی باعث تلفات ماهی در سیستم‌های پرورش متراکم می‌شود (۵۰). دو شکل از آمونیاک در آب شامل آمونیاک غیر یونیزه  $NH_3$  و یونیزه  $NH_4^+$  می‌باشد و میزان نسبی هر کدام بستگی به میزان pH، دما و شوری دارد (۷). فرم غیر یونیزه آمونیاک برای ماهی بسیار سمی است در حالی که فرم یونیزه آن سمیت بسیار کمتری دارد (۱۹). نیتريت محصول میانی تشکیل شده توسط نیتریفیکاسیون باکتریایی آمونیاک است که در بین سایر مواد نیتروژنی آب‌های طبیعی غالب نمی‌باشد (۲۳). نیتريت موجود در آب با کلراید موجود در مبدل کلراید-بی کربنات حاضر در غشای رأسی سلول‌های کلراید آبشش ماهی، برای انتقال از میان غشاء گلبول قرمز که منجر به اکسایش هموگلوبین به مت‌هموگلوبین می‌شود، رقابت می‌کند (۲۲). علاوه بر این مانند آمونیاک غیر یونیزه،  $HNO_2$  می‌تواند با مسمومیت برای نیتروزوموناس و نیتروباکتر، باعث مهار فرآیند نیتریفیکاسیون شود (۳۹، ۴). این مهار می‌تواند باعث افزایش تجمع  $NO_2^-$  علاوه بر  $HNO_2$  در محیط‌های آبی و تشدید مسمومیت برای باکتری‌ها و آبزیان شود (۳۹). با این وجود، به دلیل این که غلظت  $NO_2$  در اکوسیستم‌های آبی معمولاً بسیار بالاتر از غلظت  $HNO_2$  است، یون‌های نیتريت مسئول اصلی برای سمی بودن نیتريت برای آبزیان در نظر گرفته می‌شود. کار اصلی مسمومیت نیتريت در آبزیان به خصوص ماهی

ازای هر لیتر آب قرار گرفتند و یک گروه به عنوان شاهد در نظر گرفته شد (فاقد آمونیاک و نیتريت). ماهی‌ها در هر ۹۶ ساعت (۴ روز) مورد بررسی قرار گرفت و میزان مرگ و میر در هر ۲۴ ساعت ثبت گردید (۶). در تمام مدت آزمایش درجه حرارت ثابت در نظر گرفته شد. ماهی‌ها در طول آزمایش مورد تغذیه قرار نگرفتند و ماهی‌های مرده در طول این بررسی بلافاصله از آب خارج شدند.

### تحلیل آماری

آزمایش‌ها برای تعیین سمیت حاد آمونیاک و نیتريت بر بچه ماهی کپور معمولی در کوتاه مدت (۴ روز یا ۹۶ ساعت) طبق روش متداول O.E.C.D صورت پذیرفت. پس از ثبت تلفات اقدام به تعیین  $LC_{50}$ ، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعته با استفاده از نرم افزار Probit گردید (۱۶) و حداکثر غلظت مجاز با تقسیم نمودن غلظت کشنده ۹۶ ساعته آمونیاک و نیتريت بر عدد ده محاسبه گردید (۱۳).

### نتایج

نتایج بررسی سمیت حاد آمونیاک و نیتريت در بچه ماهی کپور معمولی در جدول‌های شماره ۲ تا ۷ به طور خلاصه آورده شده است. پس از انجام آزمایش تعیین  $LC_{50}$  تعداد ماهیان تلف شده در هر غلظت شمارش و ثبت گردید (جدول ۲ و ۳). در طول دوره سازگاری ماهی‌ها، در گروه شاهد هیچ گونه تلفاتی مشاهده نشد. یافته‌ها نشان داد که  $LC_{50}$  ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعته آمونیاک، به ترتیب برابر ۳۸۴/۹۴، ۳۰۸/۵۱، ۲۴۶/۱۰ و ۲۰۴/۸۴ میلی گرم در لیتر و  $LC_{50}$  ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعته نیتريت، به ترتیب برابر ۳۸۴/۹۴، ۳۰۸/۵۱، ۲۴۶/۱۰ و ۲۰۴/۸۴ میلی گرم در لیتر بود. با افزایش زمان در معرض قرار گرفتن آمونیاک و نیتريت، میزان سمیت افزایش یافته است. از آن جا که حداکثر غلظت قابل قبول (MAC) برابر ۱۰٪ میزان  $LC_{50}$  ۹۶ ساعته می‌باشد، لذا حداکثر غلظت قابل قبول آمونیاک و نیتريت در بچه

متروهم (مدل ۷۸۱، Metrohm، کشور سوئیس) استفاده شد. تعویض آب به میزان ۲۰٪ حجم آب هر ۴۸ ساعت، یک بار انجام گردید. غذادهی ماهی‌ها در طول مدت سازگاری به میزان ۲٪ وزن بدن، در دو نوبت با غذای کنسانتره تجاری، انجام شد.

### گروه بندی ماهی‌ها و ایجاد مسمومیت تجربی

یک روز قبل از شروع آزمایش غذادهی قطع گردید. در طول زمان سازگاری مرگ و میری مشاهده نشد. قبل از راه اندازی آزمایش، آکواریوم‌ها به وسیله مواد ضد عفونی کننده کاملاً شسته شدند تا محیط عاری از هر گونه آلودگی و بیماری و برای ماهیان مناسب باشد. سپس این آکواریوم‌های ۱۰۰ لیتری با میزان آبی به حجم ۳۰ لیتر پر شدند. میزان اکسیژن آکواریوم‌ها از طریق پمپ‌های هواده کاملاً کنترل گردید. کلرید آمونیم و نیتريت سدیم مورد استفاده در این آزمایش از نمایندگی رسمی شرکت مرک آلمان خریداری شد. ابتدا اقدام به انجام آزمایشات مقدماتی در سطح کوچک برای به دست آوردن حدود غلظت کشنده آمونیاک و نیتريت در بچه ماهی کپور انجام و بر اساس این اطلاعات ۶ غلظت هر یک از این دو ماده در نظر گرفته شد، به طوری که غلظت ایجاد کننده ۱۰۰٪ تلفات و غلظت غیر کشنده در بین این غلظت‌ها قرار گیرد. به نحوی که ابتدا ماه‌ها تحت تاثیر غلظت کم آمونیاک (۱۰۰) تا زیاد (۱۶۰) و غلظت کم نیتريت (۴۵۰) تا زیاد (۶۰۰) قرار گرفتند و سپس با توجه به تلفات صد درصد ماهی‌ها در ۱۶۰ میلی گرم در لیتر آمونیاک و ۶۰۰ میلی گرم در لیتر نیتريت، غلظت‌ها انتخاب گردید. سپس ماهی‌های مورد آزمایش پس از طی دوره سازگاری، در گروه‌های ۱۰ تایی در ۳ تکرار تقسیم شدند. آکواریوم‌ها در معرض دوزهای مختلف آمونیاک و نیتريت به ترتیب غلظت‌های ۱۰۰، ۱۱۰، ۱۲۰، ۱۳۰، ۱۴۰، ۱۶۰ میلی گرم آمونیاک و ۴۵۰، ۵۰۰، ۵۳۰، ۵۵۰، ۵۶۰ و ۶۰۰ میلی گرم نیتريت به

به تحریکات خارجی به شدت واکنش نشان داده و سعی می کردند از آب به بیرون بپرند. انقباضات و اسپاسم های عضلانی اتفاق افتاده و نهایتاً ماهی به پهلو افتاده و دهان و سرپوش های آبششی به دلیل اسپاسم شدید باز می ماندند. سپس ماهی ها یک حالت گذرا از بهبودی را نشان می دادند که مدت زیادی به طول نمی انجامید و به دنبال آن یک سری حرکات تشنجی شدید اتفاق افتاده که نهایتاً منجر به مرگ می گردید. پوست ماهی رنگ پریده بود و توسط مقادیر زیادی مخاط پوشیده می شد. گاهی خونریزی هایی روی پوست مشاهده می گردید (شکل ۱ و ۲).

ماهی کپور به ترتیب ۱۰/۲۴ و ۵۱/۲۴ میلی گرم در لیتر مشخص گردید. نتایج به دست آمده برای LC<sub>50</sub> در مدت ۹۶ ساعت نشان داد که با افزوده شدن سموم تا غلظت مورد مطالعه، میزان مرگ و میر ماهیان افزایش یافت. به علاوه با افزایش ساعات آزمایش میزان غلظت کمتری از سموم لازم است تا ۵۰ درصد از جمعیت ماهیان تلف شوند. ماهیان کپور معمولی در این آزمایش، بر اثر مسمومیت با آمونیاک و نیتريت یک سری تغییرات رفتاری از خود نشان دادند. سرعت تنفس در آنها به تدریج بیشتر شده و حالت غیر منظم پیدا کرده بود و به دنبال آن ماهی ها حالت تشنج پیدا کردند. ماهی ها نسبت

جدول ۱- فاکتورهای شیمیایی آب لوله کشی شهری کلردایی

دما	شوری کل	pH	سختی کل	نترات	نیتريت	آمونیاک
۲۸-۲۶ C <sup>0</sup>	۱/۲ ppt	۸/۴-۸	۱۸۰ ppm	۵ ppm	۰/۰۲ ppm	۰/۱ ppm

جدول ۲- درصد تلفات ماهی کپور معمولی در طول مواجهه با غلظت های مختلف آمونیاک

درصد تلفات				غلظت آمونیاک
۹۶ ساعت	۷۲ ساعت	۴۸ ساعت	۲۴ ساعت	
۰	۰	۰	۰	شاهد
۳۰	۲۰	۰	۰	۱۰۰
۹۰	۹۰	۸۰	۳۰	۱۱۰
۹۰	۹۰	۷۰	۲۰	۱۲۰
۹۰	۹۰	۶۰	۱۰	۱۳۰
۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۷۰	۱۴۰
۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۰	۱۶۰

جدول ۳- درصد تلفات ماهی کپور معمولی در طول مواجهه با دوزهای مختلف نیتريت

درصد تلفات				غلظت نیتريت
۹۶ ساعت	۷۲ ساعت	۴۸ ساعت	۲۴ ساعت	
۰	۰	۰	۰	شاهد
۱۰	۰	۰	۰	۴۵۰
۳۰	۰	۰	۰	۵۰۰
۷۰	۷۰	۲۰	۱۰	۵۳۰
۸۰	۸۰	۲۰	۱۰	۵۵۰
۸۰	۷۰	۳۰	۱۰	۵۶۰
۱۰۰	۱۰۰	۸۰	۲۰	۶۰۰

جدول ۴- غلظت ایجاد کننده نسبت های مختلف تلفات ( $LC_{99}$  تا  $LC_1$ ) بعد از مواجهه با آمونیاک در دوره های زمانی متفاوت

غلظت ایجاد کننده	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
$LC_1$	۹۱/۵۸	۸۸/۴۴	۸۰/۲۸	۷۵/۹۴
$LC_5$	۱۰۲/۶۱	۸۹/۵۹	۸۶/۷۴	۸۲/۹۰
$LC_{10}$	۱۰۹/۰۲	۹۴/۲۶	۹۰/۳۹	۸۶/۸۷
$LC_{15}$	۱۱۳/۵۸	۹۷/۵۵	۹۲/۹۴	۸۹/۶۶
$LC_{50}$	۱۳۵/۰۲	۱۱۲/۷۸	۱۰۴/۵۵	۱۰۲/۴۵
$LC_{85}$	۱۶۰/۵۱	۱۳۰/۳۸	۱۱۷/۶۱	۱۱۷/۰۸
$LC_{90}$	۱۶۷/۲۱	۱۳۴/۹۳	۱۲۰/۹۳	۱۲۰/۸۳
$LC_{95}$	۱۷۷/۶۶	۱۴۱/۹۷	۱۲۶/۰۲	۱۲۶/۶۲
$LC_{99}$	۱۹۹/۰۵	۱۵۶/۱۸	۱۳۶/۱۶	۱۳۸/۲۲

جدول ۵- غلظت ایجاد کننده نسبت های مختلف تلفات ( $LC_{99}$  تا  $LC_1$ ) بعد از مواجهه با نیتريت در دوره های زمانی متفاوت

غلظت ایجاد کننده	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
$LC_1$	۴۷۸/۳۴	۴۳۶/۲۷	۴۷۶/۶۰	۴۲۰/۲۶۵
$LC_5$	۵۲۷/۸۷	۴۹۲/۱۱	۴۹۲/۲۹	۴۴۵/۴۰۴
$LC_{10}$	۵۵۶/۳۳	۵۴۴/۷۴	۵۰۰/۸۷	۴۵۹/۴۱۷
$LC_{15}$	۵۷۶/۴۰	۵۴۷/۹۷	۵۰۶/۷۴	۴۶۹/۱۲۳
$LC_{50}$	۶۶۹/۵۷	۶۵۸/۱۳	۵۳۲/۳۴	۵۱۲/۴۶۵
$LC_{85}$	۷۷۷/۸۱	۷۹۰/۴۳	۵۵۹/۲۲	۵۵۹/۸۱۰
$LC_{90}$	۸۰۵/۸۶	۸۲۵/۴۳	۵۶۵/۷۸	۵۷۱/۶۳۷
$LC_{95}$	۸۴۹/۳۲	۸۸۰/۱۷	۵۷۵/۶۳	۵۸۹/۶۲۲
$LC_{99}$	۹۳۷/۲۶	۹۹۲/۸۳	۵۹۴/۵۹	۶۲۴/۸۹۲

جدول ۶- غلظت ایجاد کننده ۵۰٪ تلفات و حد بالایی و حد پایینی این غلظت (با احتمال ۰/۰۵) آمونیاک در ماهی کپور معمولی بعد از ۹۶ ساعت

سمیت آمونیاک	غلظت	حد پایین	حد بالا
$LC_1$	۷۵/۹۴	۴۱/۲۹	۸۸/۳۷
$LC_5$	۸۲/۹۰	۵۱/۷۰	۹۳/۵۲
$LC_{10}$	۸۶/۸۷	۵۸/۲۵	۹۶/۴۴
$LC_{15}$	۸۹/۶۶	۶۳/۱۰	۹۸/۵۱
$LC_{50}$	۱۰۲/۴۵	۸۷/۶۰	۱۰۸/۸۷
$LC_{85}$	۱۱۷/۰۸	۱۱۰/۴۵	۱۳۲/۶۸
$LC_{90}$	۱۲۰/۸۳	۱۱۳/۶۳	۱۴۲/۵۰
$LC_{95}$	۱۲۶/۶۲	۱۱۷/۹۸	۱۵۹/۴۶
$LC_{99}$	۱۳۸/۲۲	۱۲۵/۵۱	۱۹۸/۶۰

جدول ۷- غلظت ایجادکننده ۵۰٪ تلفات و حد بالایی و حد پایینی این غلظت (با احتمال ۰/۰۵) نیتريت در ماهی کپور معمولی بعد از ۹۶ ساعت

حد بالا	حد پایین	غلظت	سمیت نیتريت
۴۵۳/۳۱	۳۴۶/۴۴	۴۲۰/۲۶	LC <sub>1</sub>
۴۷۲/۵۹	۳۸۴/۷۲	۴۴۵/۴۰	LC <sub>5</sub>
۴۸۳/۴۵	۴۰۶/۶۲	۴۵۹/۴۱	LC <sub>10</sub>
۴۹۱/۱۰	۴۲۱/۹۴	۴۶۹/۱۲	LC <sub>15</sub>
۵۲۹/۷۰	۴۸۸/۷۸	۵۱۲/۴۶	LC <sub>50</sub>
۵۹۸/۵۰	۵۴۰/۵۳	۵۵۹/۸۱	LC <sub>85</sub>
۶۱۹/۹۵	۵۵۰/۰۶	۵۷۱/۶۳	LC <sub>90</sub>
۶۵۴/۲۰	۵۶۳/۵۹	۵۸۹/۶۲	LC <sub>95</sub>
۷۲۵/۴۸	۵۸۸/۳۷	۶۲۴/۸۹	LC <sub>99</sub>



شکل ۱- بچه ماهی کپور در مواجهه با مسمومیت حاد آمونیاک (a) بچه ماهی کپور در مواجهه با مسمومیت حاد نیتريت (آبشش ها تیره و ترشح موکوس در سطح بدن، بدن رنگ پریده و پوشیده از موکوس) (b) بچه ماهی سالم

### بحث و نتیجه گیری

کشنده آمونیاک و نیتريت در طی ۹۶ ساعت برای ۵۰٪ از بچه ماهیان کپور به ترتیب ۱۰۲/۴۵ میلی گرم در لیتر آمونیاک و ۵۱۲/۴۶ میلی گرم در لیتر نیتريت بود. تاکنون مطالعه چندانی در مورد اثر مسمومیت حاد آمونیاک و نیتريت بر ماهیان ایران صورت نگرفته و تنها می توان به مطالعه‌ی ناجی و همکاران در سال ۱۳۸۸ (۱) اشاره کرد که سمیت حاد آمونیاک را در کپور معمولی بررسی کردند. در مطالعه آن‌ها میزان LC<sub>50</sub> ۹۶ ساعته آمونیاک ۱۴/۱۶ میلی گرم در لیتر آمونیاک گزارش شد. به طور کلی میزان سمیت مواد شیمیایی برای ارگانسیم‌های آبی تحت تأثیر سن، اندازه و وضعیت سلامتی آن گونه می‌باشد. خصوصیات فیزیولوژیکی از قبیل کیفیت، دما، pH، اکسیژن محلول و کدورت آب، نوع و میزان

یکی از مشکلات اساسی آبرزی پروری، یافتن غلظتی از آمونیاک و نیتريت می‌باشد که برای آبرزی خطرناک نباشد و ایجاد محیطی است که با وجود این سموم در آب کمترین آسیب را به آبرزیان وارد کند. در این تحقیق اثرات سمیت حاد آمونیاک و نیتريت بر ماهی کپور معمولی پرورشی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده برای LC<sub>50</sub> در مدت چهار روز متوالی (۹۶ ساعت) نشان داد که با افزوده شدن آمونیاک و نیتريت تا غلظت مورد مطالعه، میزان مرگ و میر بچه ماهیان کپور افزایش یافته است. علاوه بر این، با افزایش ساعات آزمایش میزان غلظت کمتری از آمونیاک و نیتريت لازم است تا ۵۰٪ از جمعیت ماهیان تلف شود. میزان غلظت

می‌شود (۳۳) و این امر ممکن است باعث تجمع آمونیاک در سطوح سمی در بدن ماهی شود (۳۵). عمل سمی آمونیاک غیر یونیزه در حیوانات آبی، به خصوص در ماهی، ممکن است به علت یک یا چند عامل زیر باشد:

۱- با آسیب به اپی تلیوم آبشش باعث خفگی ماهی شود.

۲- با تحریک گلیکولیز و سرکوب چرخه کربس، باعث اسیدوز پیش رونده و کاهش ظرفیت حمل اکسیژن خون می‌شود.

۳- با جدا شدن اتصال فسفوریلاسیون اکسیداتیو، باعث مهار تولید ATP و تخلیه ATP در منطقه بازیلر مغز می‌شود.

۴- با اختلال در عروق خونی و اسمورگلو توری باعث اختلال در کار کلیه و کبد می‌شود.

۵- با سرکوب سیستم ایمنی بدن باعث افزایش حساسیت نسبت به بیماری‌های باکتریایی و انگلی می‌شود (۴۷، ۳۹، ۳۷، ۵، ۳، ۲).

مخلوط آمونیاک و دیگر آلاینده‌های شیمیایی مانند مس، سیانید، فنل، روی و کلر (با تشکیل کلر آمین معدنی) ممکن است باعث افزایش سمیت یا حتی منجر به ایجاد اثرات سینرژیک شود (۳۹، ۳، ۲). به طور مشابه در Crayfish ورود نیتريت به پلاسماي خون با اکسیداسیون اتم مس (تبدیل  $Cu^+$  به  $Cu^{2+}$ ) همراه است در نتیجه هموسیانین به مت‌هموسیانین تبدیل شده که نمی‌تواند به طور برگشت پذیری به مولکول اکسیژن متصل شود (۴۴، ۲۲، ۹). نیتريت می‌تواند با اتصال به دیگر آنزیم‌های حاوی آهن در بدن، باعث اختلال در متابولیسم ماهی و کاهش ایمنی شود (۵۱). علاوه بر این، اثرات سمی زیر در مسمومیت با نیتريت در ماهی و Crayfish یافت شده است: (۲۵، ۲۲، ۲۰، ۱۴)

۱. با کاهش سطح کلر داخل سلولی و خارج سلولی باعث عدم تعادل شدید الکترولیت‌ها می‌شود.

گیاهان آبی، غلظت و ترکیب مواد شیمیایی همگی روی نتیجه‌ی آزمایشات سمیت تأثیر گذار هستند (۲۹). چندین عامل محیطی می‌تواند بر سمیت آمونیاک روی آبزیان اثر بگذارد. علت بالا بودن میزان  $LC_{50}$  ۹۶ ساعته آمونیاک در پژوهش ما احتمالاً به علت بالاتر بودن شوری آب می‌باشد. در مطالعه‌ای که توسط Rodrigues و همکاران (۳۸) روی سمیت حاد و تحت حاد آمونیاک و نیتريت در ماهی *Rachycentron canadum* انجام دادند، میزان  $LC_{50}$  ۹۶ ساعته آمونیاک را در این گونه ۱۳ ppm  $NH_3-N$  گزارش کردند. در پژوهشی که Peyghan و Azary Takami (۳۲) بر سمیت حاد آمونیاک در ماهی کپور معمولی انجام دادند، میزان  $LC_{50}$ -24h آمونیاک را ۱۲۳ میلی گرم بر لیتر آمونیاک کل گزارش کردند. چندین عامل محیطی می‌تواند بر سمیت آمونیاک روی آبزیان اثر بگذارد که در ماهیان، مهم‌ترین عوامل pH، دما، اکسیژن محلول، شوری و کلسیم می‌باشد (۴۷، ۳۹، ۳۷، ۵، ۳، ۲). در این آزمایش، ماهیان کپور معمولی بر اثر مسمومیت با آمونیاک و نیتريت یک سری تغییرات رفتاری از جمله افزایش سرعت تنفس، حرکات تشنجی، افزایش ترشح موکوس و تغییر رنگ از خود نشان دادند. در مطالعه‌ای که توسط Thangam (۴۵) بر مسمومیت حاد و تحت حاد نیتريت در ماهی *Cirrhinus mrigala* انجام شد، علائمی از قبیل بی‌قراری، شنای غیر طبیعی، از دست دادن تعادل، ترشح فراوان موکوس در سراسر بدن ماهی، از دست دادن فلس، شناوری به شکل وارونه، حرکت سریع سرپوش-های آبششی، بلعیدن هوا، خفگی و حرکات تشنجی قبل از مرگ مشاهده شد. در مسمومیت مزمن با آمونیاک، معمولاً میزان رشد و درصد بقاء ماهیان کاهش می‌یابد و ماهی‌ها نسبت به عوامل عفونت‌زا حساس‌تر می‌شوند (۴۱). قرار گرفتن ماهی در برابر سطح بالای آمونیاک باعث افزایش سریع در سطوح ترکیبات پلاسما



نیتريت به دست آمد.  $LC_{50}$  ۹۶ ساعته نیتريت در کپور معمولی ۱۰/۴ میلی گرم بر لیتر نیتريت (۴۲)، در قزل آلاهی رنگین کمان ۲۰ میلی گرم بر لیتر نیتريت (۴۶) تخمین زده شد. تفاوت‌های موجود در میزان سمیت‌های حاد در یک گونه به علت تفاوت در اندازه، سن و شرایط آزمایش موجود مورد آزمایش می‌باشد. تفاوت در سمیت حاد حتی می‌تواند به علت تغییرات در کیفیت آب و آزمایش باشد (۳۶). سمیت نیتريت به غیر از نوع گونه به عوامل مختلفی بستگی دارد که مهم ترین آن‌ها شیمی آب به ویژه غلظت کلراید می‌باشد (۲۵، ۴۳). معمولاً، نیتريت در ماهیان آب شیرین در مقایسه با ماهیان آب شور سمی‌تر است (۲۲، ۱۸) بنابراین، در ماهیان آب شیرین انتظار می‌رود  $LC_{50}$  پایین تری مشاهده شود. به طور کلی نتایج به دست آمده برای  $LC_{50}$  در مدت ۹۶ ساعت نشان داد که با افزوده شدن آمونیاک و نیتريت تا غلظت مورد مطالعه، میزان مرگ و میر ماهیان افزایش یافت. با توجه به نتایج به دست آمده، به نظر می‌رسد در ماهی کپور معمولی و در شرایط آب و هوایی استان خوزستان، احتمال تلفات ناشی از آمونیاک و نیتريت به مراتب کمتر از دیگر مناطق باشد. این موضوع را می‌توان به بالا بودن نسبی شوری آب منطقه و سختی قابل توجه آب آن نسبت داد. شاید به همین دلیل است که علیرغم پرورش وسیع ماهیان گرمابی در استان، مسمومیت به مواد نیتروژنی در ماهیان استان خوزستان تا کنون گزارش نشده است.

### تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب پایان نامه و با استفاده از امکانات دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز انجام گردید، در این خصوص از اعطای پژوهانه معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز تشکر و قدردانی می‌گردد.

۲. با تخلیه  $K^+$  داخل سلولی و بالا بردن سطوح  $K^+$  خارج سلولی، بر پتانسیل غشاء، انتقال عصبی، انقباضات عضله‌ی اسکلتی و عملکرد قلب اثر می‌گذارد.
  ۳. ترکیبات N-nitroso جهش زا و سرطان زا هستند.
  ۴. با آسیب به میتوکندری در سلول‌های کبدی باعث کمبود اکسیژن بافت‌ها می‌شود.
  ۵. با سرکوب سیستم ایمنی باعث کاهش مقاومت نسبت به بیماری‌های باکتریایی و انگلی می‌شود.
- به طور کلی، افزایش بیش از حد سطوح نیتريت در سیستم‌های پرورشی می‌تواند باعث کاهش رشد (۱۱)، بسیاری از مشکلات فیزیولوژیکی (۱۲)، اختلال در تنظیم یون‌ها و فرآیندهای دفعی، اختلالات قلبی و عروقی (۲۲)، افزایش حساسیت به بیماری و مرگ و میر احتمالی شود (۴۳). در مطالعه‌ای که توسط Ekwe و همکاران (۱۵) روی ۳ گونه ماهی گربه ماهی آفریقایی (*Clarias gariepinus*)، تیلاپای نیل (*Oreochromis niloticus*) و پایک رودخانه‌ای آفریقایی (*Hepsetus odoe*) انجام شد، مسمومیت ۹۶ ساعته نیتريت در این ماهی‌ها به ترتیب  $7/1 \pm 1/9$ ،  $16/2 \pm 2/3$  و  $140/2 \pm 0/1$  میلی گرم نیتريت بر لیتر به دست آمد. Palachek و Tomasso (۳۰) مسمومیت ۹۶ ساعته نیتريت را در ماهی *Pimpephales promellas* با وزن  $3/1$  گرم  $43/1 \pm 2/7$  میلی گرم بر لیتر نیتريت به دست آوردند. Yusoff و همکاران (۵۲)  $LC_{50}$  ۹۶ ساعته نیتريت را در ماهی *Puntius gonionotus*  $7/91$  میلی گرم بر لیتر نیتريت گزارش کردند. در مطالعه‌ای که توسط Thangam (۴۵) روی مسمومیت نیتريت در کپور بزرگ هندی (*Cirrhinus mrigala*) انجام شد،  $LC_{50}$  ۲۴ و ۹۶ ساعته نیتريت به ترتیب  $28/31$  و  $19/95$  میلی گرم بر لیتر



and cytoprotective functions in the marine teleost *Sparus sarba*. *Aquat Toxicol*, 82; 85-93.

13. Di Giulio, R.T., Hinton, D.E. (2008). The toxicology of fishes. Taylor & Francis, 19-884.

14. Eddy, F.B., Williams, E.M. (1987). Nitrite and freshwater fish. *Chem Ecol*, 3; 1-38.

15. Ekwe, O.O., Nwakpa J.N., Nweze, B.O. (2012). Biochemical effects of nitrite on met hemoglobin and plasma nitrite concentration in three tropical freshwater fishes. *OJAS*, 5(1); 25-31.

16. Finney, D. J. (1971). Probit analysis. Cambridge. England. Cambridge University Press,.

17. Galloway, J.N., Cowling, E.B. (2002). Reactive nitrogen and the world: 200 years of change. *Ambio*, 31; 64-71.

18. Grosell, M., Jensen, F.B. (2000). Uptake and effects of nitrite in the marine teleost fish *platichthys flesus*. *Aquat Toxicol*, 50; 97-107.

19. Hampson, B.L. (1976). Ammonia concentration in relation to ammonia toxicity during a rainbow trout rearing experiment in a closed freshwater-seawater system. *Aquaculture*, 9; 61-70.

20. Harris, R.R., Coley, S. (1991). The effects of nitrite on chloride regulation in the crayfish *Pacifastacus leniusculus* Dana (*Crustacea Decapoda*). *J Comp Physiol*, 161; 199-206.

21. Howarth, R.W., Anderson, D., Cloern, J., Elfring, C., Hopkinson, C., Lapointe, B. (2000). Nutrient pollution of coastal rivers, bays, and seas. *Issues in Ecology*, 7; 1-15.

22. Jensen, F.B. (2003). Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. *Comp Biochem Physiol*, 135; 9-24.

23. Kroupova, H., Machova, J., Piackova, V., Blahova, J., Dobsikova, R., Novotny, L., Svobodova, Z. (2008). Effects of subchronic nitrite exposure on rainbow trout (*Onocorhynchus mykiss*). *Ecotoxicol Environ Safety*, 71; 813-820.

۱-ناجی، ط.، خارا، ح.، رستمی، م.، نصیری پرمان، ا. ۱۳۸۸. بررسی اثر سمیت آمونیاک بر بافت کبد ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). علوم و تکنولوژی محیط زیست. دوره یازدهم. شماره یک. ص ۱۳۱-۱۴۸.

2. Adams, N., Bealing, D. (1994). Organic pollution: biochemical oxygen demand and ammonia. In: Calow P, editor. Handbook of ecotoxicology, vol. 2. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 264-85.

3. Alabaster, J.S., Lloyd, R. (1982). Water Quality criteria for freshwater fish. Butterworth-Heinemann Ltd. 2<sup>nd</sup> edition. London; 384 p.

4. Anthonisen, A.C., Loehr, R.C., Prakasam, T.B.S., Srinath, E.G. (1976). Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *J Water Pollut Control Fed*, 48; 835-52.

5. Augspurger, T., Keller, A.E., Black, M.C., Cope, W.G., Dwyer, F.J. (2003). Water quality guidance for protection of freshwater mussels (*Unionidae*) from ammonia exposure. *Environ Toxicol Chem*, 22; 69-75.

6. Boudou, A., Ribeyre, F. (1997). Aquatic ecotoxicology: From the ecosystem to the cellular and molecular levels. *Environ Health Perspect*, 105; 21-35.

7. Bower, C.E., Bidwell, J.P. (1978). Ionization of ammonia in seawater - effects of temperature, pH, and salinity. *J Fish Res Board Can*, 35; 1012-1016.

8. Camargo, J.A., Ward, J.V. (1992). Short-term toxicity of sodium nitrate (NaNO<sub>3</sub>) to nontarget freshwater invertebrates. *Chemosphere*, 24; 23-8.

9. Chen, J.C., Chen, S.F. (1992). Accumulation of nitrite in the haemolymph of *Penaeus monodon* exposed to ambient nitrite. *Comp Biochem Physiol*, 103C; 477-81.

10. Colt, J. (2006). Water quality requirements for reuse systems. *Aquacult Eng*, 34; 143-156.

11. Colt, J., Ludwig, R., Tchobanoglous, G., Cech, J.J. (1981). The effect of nitrite on the short-term growth and survival of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture*, 24; 111-122.

12. Deane, E.E., Woo, N.Y. (2007). Impact of nitrite exposure on endocrine, osmoregulatory

24. Lemarie, G., Dosdat, A., Coves, D., Dutto, G., Gasset, E. and Person, L. R. J. (2004). Effect of chronic ammonia exposure on growth of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*, 229; 479-491.
25. Lewis, W.M., Morris, D.P. (1986). Toxicity of nitrite to fish: a review. *Trans Am Fish Soc*, 115; 183-95.
26. Meybeck, M., Chapman, D.V., Helmer, R. (1989). Global freshwater quality: a first assessment. World Health Organization and United Nations Environmental Program. Blackwell. Oxford;
27. National Research Council. Clean coastal waters: understanding and reducing the effects of nutrient pollution. Washington, DC: National Academic Press; 2000.
28. Neilson, B., Cronin, L, editors. (1981). Estuaries and nutrients. Clifton (NJ): Humana;
29. Nwani, C.D., Nagpure, N.S., Kumar, R., Kushwaha, B., Kumar, P., Lakra, W.S. (2010). Lethal concentration and toxicity stress of Carbosulfan, Glyphosate and Atrazine to fresh water air breathing fish *Channa punctatus* (Bloch). *Int Aquat Res*, 2; 105-111.
30. Palachek, R.M., Tomasso, J.R. (1984). Nitrite toxicity to fathead minnows: effect of fish weight. *Bull Environ Contam Toxicol*, 32; 238-242.
31. Patrick Saoud, I., Naamani, S., Ghanawi, J., Nasser, N. (2014). Effects of acute and chronic nitrite exposure on rabbitfish *Siganus rivulatus* growth, hematological parameters, and gill histology. *J Aquac Res Dev*, 5; 263.
32. Peyghan, R., Azary Takamy, G. (2002). Histopathological, serum enzyme, cholesterol and urea changes in experimental acute toxicity of ammonia in common carp (*Cyprinus carpio*) and use of natural zeolite for prevention. *Aquac Int*, 10; 317-325.
33. Person-Le Ruyet, J., Mahe, K., Le Bayon, N., Delliou, H. (2004). Effects of temperature on growth and metabolism in a Mediterranean population of European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, 237; 269-280.
34. Randall, D.J., Wright, P.A. (1987). Ammonia distribution and excretion in fish. *Fish Physiol Biochem*, 3; 107-120.
35. Rasmussen, R.S., Korsgaard, B. (1998). Ammonia and urea in plasma of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) in response to external ammonia. *Comp Biochem Physiol*, 120, 163-168.
36. Rathore, R.R., Khangarot, B.S. (2002). Effect of temperature on the sensitivity of sludge worm *Tubifex tubifex* (Muller) to selected heavy metals. *Ecotoxicol Environ Saf*, 53; 27-36.
37. Richardson, J. (1997). Acute ammonia toxicity for eight New Zealand indigenous freshwater species. *New Zeal J Mar Fresh*, 31; 185-90.
38. Rodrigues, R.V., Schwarz, M.H., Delbos, B.C., Sampaio, L.A. (2007). Acute toxicity and sublethal effects of ammonia and nitrite for juvenile cobia *Rachycentron canadum*. *Aquaculture*, 271; 553-557.
39. Russo, R.C. (1985). Ammonia, nitrite and nitrate. In: Rand GM, Petrocelli SR, editors. Fundamentals of aquatic toxicology. Washington DC: Hemisphere Publishing Corporation; 455-71.
40. Smil, V. (2001). Enriching the earth. Cambridge: The MIT Press,.
41. Soderberg, G.R.W. (1985). Histopathology of rainbow trout, *salmo gairdneri*. P. 95-99.
42. Solbe, J.F., de, L.G. (1981). Environmental studies for freshwater life. department of environment. water research centre. Stevenage. UK (FT 0163C).
43. Svobodova, Z., Machova, J., Poleszczuk, G., Huda, J., Hamackova, J., Kroupova, H. (2005). Nitrite poisoning of fish in aquaculture facilities with water-recirculating systems: three case studies. *Acta Vet Brun*, 74; 129-137.
44. Tahon, J.P., Van Hoof, D., Vinckier, C., Witters, R., De Ley, M., Lontie, R. (1988). The reaction of nitrite with the haemocyanin of *Astacus leptodactylus*. *Biochem J*, 249; 891-6.
45. Thangam, Y. (2014). Effect of acute and sublethal toxicity of nitrite to fresh water fish *Cirrhinus mrigala*. *IJSER*, 5; 789-795.
46. Thurston, R.V., Russo, R.C., Emerson, K. (1977). Acute toxicity of nitrite to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Effects of pH, nitrite species, and anion species. *Can J Fish Aquat Sci*, 38(4); 387-393.

47. Tomasso, J.R., Davis, K.B., Parker, N.C. (1980). Plasma corticosteroid and electrolyte dynamics of hybrid striped bass (white bass X striped bass) during netting and hauling. Proc. World Mariculture Society, 11; 303-310.
48. Tomasso, J.R., Simco, B.A., Davis, K.B. (1979). Chloride inhibition of nitrite-induced methemoglobinemia in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). J Fish Res Board Can, 36; 1141-4.
49. Vitousek, P.M., Aber, J.D., Howarth, R.W., Likens, G.E., Matson, P.A., Schindler, D.W. (1997). Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. Ecol Appl, 7; 737-50.
50. Wang, Y., Walsh, P.J. (2000). High ammonia tolerance in fishes of the family Batrachoididae (Toadfish and Midshipmen). Aquat Toxicol, 50; 205-219.
51. Woo, P.T.K. (Ed.). (2006). Fish Diseases and Disorders, Volume 1: Protozoan and Metazoan Infections, 2nd edition. Oxfordshire. U.K. CABI Publishing;
52. Yusoff, F. M. Law, A.T., Goh Y.J., Subasiatghe, R. (1998). Effects of nitrite and pH on a tropical fish fry, *Puntius gonionotus* (Bleeker). Pertanika J Trop Agric Sci, 21(1); 29 - 36.



# Determination of Lethal Concentration in Acute Toxicity of Ammonia and Nitrite in Common Carp (*Cyprinus carpio*)

**T. Molayemraftar**<sup>1</sup>, R. Peyghan<sup>2</sup>, M. Razijalali<sup>3</sup>, A. Shahryari<sup>4</sup>

1. PhD student, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine shahid Chamran University of Ahvaz. Iran. [taravat.fishery@gmail.com](mailto:taravat.fishery@gmail.com)

2. Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine shahid Chamran University of Ahvaz. Iran.

3. Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine shahid Chamran University of Ahvaz. Iran.

4. Associate Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine shahid Chamran University of Ahvaz. Iran.

**Received: 2015.5.9**

**Accepted: 2016.5. 11**

## Abstract

**Introduction & Objective:** Nitrogenous compounds can be toxic to aquatic animals. The objective of this study was to evaluate the acute toxicity of ammonia and nitrite and behavioral changes to common carp fingerlings in exposed to the two materials.

**Methods and material:** Four hundred fingerlings with average weight of  $40.51 \pm 5.8$  g were randomly selected and were then exposed to ammonia and nitrite in 6 treatments (100, 110, 120, 130, 140, 160 mg/l ammonia and 450, 500, 530, 550, 560, 600 mg/l nitrite). Mortality and behavioral changes were observed during 96 h, Finally  $LC_{50-96}$  h of ammonia and nitrite for these 6 treatments were estimated.

**Results:**  $LC_{50-96}$  h for ammonia and nitrite was estimated at 102.45 and 512.46 mg/l respectively. The maximum acceptable concentration (MAC) of ammonia and nitrite were determined 10/24 and 51/24 mg/L respectively, in the common carp fry.

**Conclusion:** The results for the  $LC_{50}$  in 96 h showed that with increasing concentrations of ammonia and nitrite, the mortality increased. However in comparison with other investigations that have been done in lower water hardness and salinities, the  $LC_{50}$  was higher. Therefore it may be concluded that ammonia and nitrite toxicity in Khuzestan condition may have lower risk of happening.

**Keywords:** Ammonia, Toxicity, Common carp, Nitrite,  $LC_{50}$ .