فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۴۰، جلد ۱۱، شماره ۱، زمستان۹۶، صفحه ۱ تا۱۲

بررسی(LC_{50} 96 h) و ضایعات هیستوپاتولوژیکی نیتریت روی بافت های آبشش، کبد و کلیه تاسماهی ازون برون(*Acipenser stellatus*)

سعید قلی پور[۱]، **حسین خارا**[۱]، ذبیح الله پژند[۲]
۱- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران.**h.khara1974@yahoo.com**
۲- موسسه تحقیقات بین‌المللی تاس‌ماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج جهاد کشاورزی، رشت، ایران .

تاریخ دریافت:۹۵/۶/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۶/۸/۲۰

چکیده

زمینه و هدف: افزایش نیتریت آب یکی از مشکلات عمده در آبزی پروری است. این افزایش خصوصاً در سیستم‌های تکثیر ماهی و میگو، سیستم های فوق متراکم ماهی یا گردش مجدد آب، آکواریوم ها و در هنگام انتقال ماهی همواره مطرح بوده ولی میزان و اثرات آن تاکنون به درستی مشخص نشده است. با توجه به اهمیت نقش نیتریت در آلودگی آب به اشکال مختلف و امکان ورود این ماده به منابع آبی به طرق مختلف، هدف از تحقیق حاضر تعیین غلظت کشنده نیتریت و تاثیرات حاد آن بر روی سه بافت آبشش، کبد و کلیه گونه ای از ماهیان خاویاری(ازون برون) می باشد.

روش کار: برای این منظور ابتدا میزان LC_{10}، LC_{50} و LC_{90} در مدت ۲٤، ٤٨، ۷۲ و ۹٦ ساعت ماده سمی نیتریت هنگامی که بچه تاسماهی ازون برون(با وزن ۱ تا ۳ گرمی) در معرض آن قرار گرفت در مقایسه با گروه شاهد، اندازه گیری گردید. این آزمایش با ٥ تیمار و یک گروه شاهد که هر کدام دارای۳ تکراربودند، انجام پذیرفت و در نهایت میزان LC_{10} نیتریت ۲٤، ٤٨، ۷۲ و ۹٦ ساعت گونه ازون برون به ترتیب ۱۱۸/۹٥٦، ۸۷/۲۳۸۳، ۸۲/۹۱٦۹ و ۷٤/۳۰۱٦ میلی گرم در لیتر، میزان LC_{50} نیتریت ۲۸۷/۱۹۹، ۱٦٤/۲۲۳، ۱۳٤/٤٦۳ و ۱۱٥/۳٤٤میلی گرم در لیتر و LC_{90} نیتریت ٦۹۳/۳۹۳، ۳۰۹/۱٤٤، ۲۱۸/۰٥٤٤ و ۱۷۹/۰٥۸۷ میلی گرم در لیتر می‌باشد. در طول مدت آزمایش میانگین دما۰/۰۳٦۲٤± ۲۸/۳۳۰۷ درجه سانتی گراد، اکسیژن محلول در آب۰/۱۹۳۱ ± ٦/٤۷٤۳ میلی گرم در لیتر، pH آب۰/۰۱۹٥۰ ± ۷/٦٥٦ محاسبه گردید. بعد از ۹٦ ساعت ضایعات احتمالی میکروسکوپی بافت آبشش، کبد و کلیه که در مجاورت با نیتریت قرار داشتند، مورد بررسی بافت شناسی قرار گرفت.

یافته‌ها: میزان LC_{10}، LC_{50} و LC_{90} ازون برون ۱۰۰، ۱۱۹، ۱٤۱، ۱٦۸ و ۲۰۰ میلی گرم در لیتر نیتریت به دست آمد. نتایج حاصله نشان داد که در آبشش بچه تاسماهی ازون برون پس از قرارگیری در مجاورت با نیتریت پس از ۹٦ ساعت پدیده هایی نظیر پرخونی، هیپرپلازی، چسبندگی لاملای ثانویه، تورم لاملای اولیه، هموسدرین؛ خون ریزی و نکروز سلولی مشاهده شد. به طور کلی شدت موارد آسیبی در تیمارها از تیمار۱ به سمت تیمار٤ بیشتر بود. در کبد بچه تاسماهی ازون برون عوارضی از قبیل پرخونی، رکورد صفراوی، دژنرسانس چربی؛ نکروزسلولی و آتروفی سلولی مشاهده شده، ولی شدت آن ها در هر تیمار متفاوت و حتی در تیماری ممکن است یکی از عوارض گفته شده دیده نشود. به طورکلی کبد این ماهیان سالم و عارضه خیلی کمتری نسبت به آبشش ها داشته و بیشترین صدمات مربوطه در آبشش این ماهیان مشاهده شده است. در کلیه بچه تاسماهی ازون برون عوارضی چون پرخونی، نکروز سلولی مشاهده گردید. این عوارض در تیمارهای مختلف متفاوت بوده، به طوری که از تیمار ۱ به سمت تیمار ٤ افزایش یافته است.

واژه‌های کلیدی: ازون برون، کبد، کلیه، نیتریت، سمیت حاد.

مقدمه

هم زمان با افزایش رشد جمعیت، صنعت آبزی پروری اهمیت زیادی یافته و هزاران مرکز تکثیر و پرورش انواع ماهی در جهان شکل گرفته است. اما کمبود منابع آبی و استفاده بهینه از این منابع، سبب آبزی پروری به صورت مداربسته با استفاده از پساب-های کشاورزی شده است. صنعت آبزی پروری علیرغم این رشد قابل توجه همواره با مشکلاتی عمده

از جمله مرگ و میر ماهیان پرورشی به سبب کاهش کیفیت آب و به وجود آمدن شرایط استرس زا روبرو می باشد. یکی از نگرانی های جهانی افزایش بیش از حد مواد آلاینده و سمی در محیط آبی است که به صورت فاضلاب، نشت نفت، پساب‌های مواد آلی و معدنی کارخانجات، مواد شیمیایی گوناگون اعم از فلزات که بدون هیچ توجهی به درون آب‌ها رها گردیده و وارد زنجیره غذایی اکوسیستم های آبی شده و مشکل آفرین می شوند. در تمام موارد انسان نقش مستقیم و غیر مستقیم را در آن ایفا می کند(۱). ماهیان خاویاری از جمله منابع زیستی ارزشمند ملی، منطقه ای و بین المللی هستند. در این میان ماهی ازون برون جایگاه ویژه ای دارد که بر اساس(*Internatinal Union for Conservation of Nature and Natural Rosource*)*IUCN* در خطر انقراض و به عنوان گونه آسیب پذیر خزر یاد شده که برای جلوگیری از کاهش نسل و انقراض نیاز به تحقیق بنیادی و کاربردی در این زمینه است. نیتریت یکی از ترکیب نیتروژنه ازت دار در طبیعت از تجزیه مواد آلی ازت دار به دست می آید. این ماده در اثر تجزیه پروتئین‌ها(نیتروژن آلی)، یون آمونیوم(*NH4+*) طی فرآیند بیولوژیکی نیتریفیکاسیون (*nitrification*)حاصل شده است. این ترکیب که یک فرآیند دومرحله‌ای می‌باشد، ابتدا توسط باکتری های نیتروزومانس به نیتریت(*NO2–*) و سپس توسط نیتروباکترها نیتریت به نیترات(*NO3–*) اکسید می‌شود نیتریت ناپایدار بوده و سریعاً اکسید و تبدیل به نیترات می‌شود. نیتریت به علت ناپایدار بودن بسیار سمی‌تر از نیترات می‌باشد.نیتریت ماده‌ای است که آب‌های زیرزمینی و سطحی را به طور گسترده آلوده می‌کند(۲۳). تجمع نیتریت در محیط می‌تواند ناشی از هرزآب های کشاورزی به علت مصرف بیش از حد کودهای نیتراته حاوی این ماده و انتشار ان درآب، آن را آلوده می‌کنند یا آلودگی‌های نقطه‌ای از فاضلاب‌های انسانی که به درستی دفع و فراوری نشده است باشد(۱۰). سوزاندن سوخت‌های فسیلی با تولید اسیدنیتریک و آمونیاک هوا را آلوده کرده و در نهایت به صورت باران های اسیدی باعث آلودگی سطح زمین می شوند(۱۰). در آب های سطحی مقادیر نیتریت اغلب کمتر از حد مجاز می باشد، اما تخلیه حجم انبوهی از فاضلاب ها و زهاب های کشاورزی و یا جاری شدن شیرابه های زباله گاهی غلظت نیتریت را در آب های سطحی تا چندین برابر افزایش می-دهند(۱۰). در راستای تحقیق حاضر می توان به این فرضیه اشاره نمود که غلظت کشندگی نیتریت روی بچه تاسماهی ایرانی در حد پایین بوده و سمیت حاد نیتریت روی بافت های کبد و کلیه اثر سوء ندارد. از آن جا که در بسیاری موارد مرگ و میر در سیستم های مداربسته و زمان حمل و نقل ماهیان و استخرهای آبگیری شده با پساب کشاورزی در شرایط هوازی ناشناخته است، از اهداف تولیدکنندگان رسیدن به صرفه اقتصادی، کاهش مرگ و میر وتلفات بچه ماهیان، بالا بردن سرعت رشد و تولید بیشتر است(۱)، به بررسی نیترات که آلاینده ای ناشناخته است پرداخته شده است.از آن جا که نیتریت در تمام آب ها وجود دارد هدف از تحقیق حاضر، تعیین میزان غلظت کشندگی این ماده بر بچه تاسماهی ازون برون ،دستیابی به حد سمیت نیتریت بر روی بافت های آبشش کبد و کلیه بچه تاسماهی ازون برون و دستیابی به دستورالعمل اجرایی میزان بهینه نیتریت در حوضچه های پرورشی بچه تاسماهی ازون برون می باشد.

مواد و روش ها

این تحقیق طی دو هفته و مرحله نهایی آزمایش سمیت طی ۹۶ ساعت در تابستان ۹۲ در ۵ تیمار و یک گروه شاهد و در تمامی تیمارها با ۳ تکرار، در ۱۸

مخزن فایبرگلاس ۵۰ لیتری، در مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر آبزیان شهید دکتر بهشتی سنگر و با شرایط دمایی، pH، شوری، سختی، *DO* و نوری یکسان اجرا شد. تعداد ۲۲۰ عدد بچه تاسماهی ایرانی با میانگین سنی ۲ ماه که از مرکز شهید بهشتی تهیه شده جهت آداپتاسیون به وان فایبرگلاس در بخش و نیرو این مرکز منتقل و طی ۱۰روز با دافنی و گاماروس مورد تغذیه قرار گرفتند. طی مدت آداپتاسیون هیچ گونه مرگ و میری مشاهده نشد و دو روز قبل از شروع آزمایش غذادهی به ماهیان مورد آزمایش قطع گردید. تعداد یک بسته ۵۰۰ گرمی از نیتریت سدیم ساخت شرکت *MERK* آلمان جهت تهیه غلظت نیتریت تهیه شد. آزمایشات این تحقیق برای تعیین سمیت حاد سموم بر روی ماهیان در کوتاه مدت(۴ روز یا ۹۶ ساعت) طبق متد *O.E.C.D* صورت پذیرفت. این آزمایشات به صورت استاتیک انجام می شود، بدین معنی که محلول آزمایش درطی تست تغییر نکرده و ثابت بوده و میزان مرگ و میر ماهی در طی ۴ روز به صورت هر ۲۴ ساعت یک بار(۹۶،۷۲،۴۸،۲۴ساعت) ثبت و رکوردگیری می گردد(۲۲). با توجه به این که حلالیت نیتریت در آب بسیار زیاد و بسیار ناپایدار می باشد و در مجاورت اکسیژن به سرعت تبدیل به نیترات می گردد. به همین دلیل روش آب ساکن به عنوان یک روش استاندارد برای ایجاد مسمویت حاد در ماهی مورد استفاده قرار گرفت. پس از آداپتاسیون، به منظور سهولت در بررسی های آماری مخازن به میزان ۳۰ لیتر آبگیری و به مدت چند ساعت هوادهی شده تا به شرایط اکسیژنی مناسب برسند و پس از آن و پیش از مرحله تهیه غلظت های مورد نیاز هوادهی قطع گردید. تعیین غلظت نهایی پس از دو مرحله آزمایش مقدماتی به غلظت نهایی صورت پذیرفت و در نهایت غلظت-های نهایی بین این اعداد به صورت لگاریتمی محاسبه و غلظت های۱۰۰، ۱۱۹، ۱۴۱، ۱۶۸ و ۲۰۰ میلی گرم به ازاء هر لیتر آب برای بچه تاسماهیان ازون برون در این محدوده به دست آمد. تست سمیت به روش ساکن به اجرا درآمد. قبل از آبگیری، مخازن به وسیله پرمنگنات پتاسیم و آب نمک غلیظ ۷۰٪ کاملاً شسته شدند تا محیط عاری از هر گونه آلودگی و بیماری برای ماهیان فراهم گردد. هر مخزن به میزان ۳۰ لیتر آبگیری و پس از چند ساعت هوادهی بچه تاسماهیان ایرانی به مخازن منتقل شدند، به طوری که در هر مخزن تعداد ۱۰عدد بچه ماهی رهاسازی و بعد از اضافه نمودن نیتریت تمامی فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی مهم آب تعیین گردید. به طوری که: ۱- نور متناسب با طول روز بین ۱۶-۱۲ ساعت تنظیم گردید. ۲- درجه حرارت آب درون مخازن در حد مناسبی یعنی حدود ۲۵ درجه سانتی گراد ثابت نگه داشته شد. ۳-میزان pH بین ۷-۸ در طول انجام آزمایش مورد کنترل قرار گرفت. لازم به ذکر است که نیتریت سدیم در مقادیر تعیین شده با ۲ لیتر آب وان رقیق شده و اضافه گردید. نیتریت آب مخازن بعد از اضافه نمودن غلظت نیتریت سدیم توسط دستگاه فتومتر مورد بررسی قرار گرفتند و غلظت های تعیین شده در محیط آزمایشی هم به مشابه میزان غلظت تعیین شده به دست آمد. در هر ۲۴ساعت، آکواریوم ها مورد بررسی قرار گرفته و میزان مرگ و میر ثبت گردید. این کار به مدت ۹۶ ساعت(۴روز) و هر روز راس ساعت ۱۱صبح انجام گرفت. به منظور ارزیابی اثرات هیستوپاتولوژیکی نیتریت در پایان روز چهارم(۹۶ساعت) از بین هرتیمار ۳عدد ماهی به صورت تصادفی صید و از بافت های آبشش؛ کبد و کلیه آن ها جهت تهیه لام های هیستوپاتولوژی نمونه برداری صورت گرفت. سپس بافت های جدا سازی شده در محلول بوئن(تثبیت کننده) به مدت ۹۶ ساعت غوطه ورگردید. سپس نمونه ها ازمحلول بوئن خارج و

به مدت ۲تا ۳ ساعت بافت ها درون آب مقطر قرار گرفته و برای آبگیری به الکل ۸۰٪ منتقل و جهت پاساژ به دستگاه اتوتکنیکون منتقل گردیدند(۲)، (۵). بعد از این مراحل برش های بافتی به ضخامت ۵ میکرون تهیه و پس از مرحله پارافین زدایی با هماتوکسیلین- ائوزین رنگ آمیزی گردید(۱۱). با استفاده از لگاریتم غلظت های بکار رفته به روش *Probit analysis* که به وسیله *EPA* آمریکا برای تجزیه و تحلیل داده های مرگ و میر ناشی از مسمومیت مزمن و حاد ماهیان و سایر آبزیان در آب های جاری وساکن طراحی شده است با سطح اطمینان ۹۵درصد، مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و با معادله رگرسیون غلظت های کشنده(LC_{10}, LC_{50}, LC_{90}) برای زمان معین ۲۴،۴۸،۷۲،۹۶ ساعت به دست آمد. LC_{50} غلظت نیتراتی است که باعث مرگ و میر نیمی از جمعیت باشد. سپس حداکثر غلظت مجاز(*MAC*) با تقسیم نمودن LC_{50} بر ۱۰ محاسبه شد.

نتایج

پس از ثبت تلفات، با استفاده از جدول *Probit value* اثر غلظت های نیترات روی مرگ و میر مقایسه و با استفاده از خط رگرسیون و ضرایب خاص آن مقادیر LC_{10}، LC_{50} و LC_{90} در هر۲۴ساعت برای این ماده محاسبه و درجدول۱ و۲ نمایش داده شدند.

جدول ۱- مقایسه اثر تیمارهای مختلف نیتریت بر روی میزان مرگ و میر بچه ماهی ۳-۱ گرمی تاسماهی ازون برون(میانگین ۳ تکرار) در طی ۹۶ ساعت

تیمار	غلظت نیترات ppm	۲٤ ساعت	٤۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹٦ ساعت	تغییرات نسبت به شاهد		
		تعداد تلفات	تعداد تلفات	تعداد تلفات	تعداد تلفات	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
شاهد	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
I	۱۰۰	۱	۱/۶۶۶	۲/۶۶۶	۴	-۱۰	-۱۶/۶۶	-۲۶/۶۶	-۴۰
II	۱۱۹	۱/۳۳	۲/۶۶	۳/۶۶	۵/۳۳۳	-۱۳/۳۳	-۲۶/۶۶	-۳۶/۶۶	-۵۳/۳۳
III	۱۴۱	۲/۳۳	۳/۳۳	۴/۶۶	۶/۳۳	-۲۳/۳۳	-۳۳/۳۳	-۴۶/۶۶	-۶۳/۳۳
IV	۱۶۸	۳/۶۶	۵/۳۳	۶/۶۶	۸/۳۳	-۳۶/۶۶	-۵۳/۳۳	-۶۶/۶۶	-۸۳/۳۳
V	۲۰۰	۴	۶/۶۶	۹	۱۰	-۴۰	-۶۶/۶۶	-۹۰	-۱۰۰

جدول ۲- تعیین غلظت های کشنده نیترات در طی ٤ روز بر روی بچه تاسماهی ازون برون(میانگین سه تکرار)

زمانLC	۲٤ ساعت	٤۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹٦ ساعت
۱۰	۱۱۸/۶۵۹۵	۸۷/۲۳۸۳۴	۸۲/۹۱۶۹۹	۷۴/۷۴۳۰۱۶۶
۵۰	۲۸۷/۱۹۹۷	۱۶۴/۲۲۳	۱۳۴/۴۶۳۴	۱۱۵/۳۴۴۵
۹۰	۶۹۳/۳۹۳۴	۳۰۹/۱۴۴	۲۱۸/۰۵۴۴	۱۷۹/۰۵۸۷

نتایج بررسی شده نشان می دهد که با گذشت زمان از ۲۴ تا ۹۶ ساعت LC_{10}، LC_{50} و LC_{90} کاهش می-یابد. به این معنی که مقاومت ماهی در مدت زمان کوتاه بالاتر است و ماهی غلظت بالاتری را می تواند تحمل کند و با گذشت زمان مقاومت کاهش می یابد. هم چنین مقدار MAC و NOEC حداکثر غلظت مجاز که در بعضی مراجع برابر غلظتی است که هیچ نوع عوارض سمی از آن ماده مشخص مشاهده نمی گردد برای بچه تاسماهیان ازون برون به صورت زیر به دست آمد.

MAC Value = NOEC = ۱۱/۵۳ mg/l

نتایج آسیب شناسی آبشش تاسماهی ازون برون

تیمار شاهد: پرخونی و خون ریزی به مقدار خیلی کم مشاهده گردید. در تیمار ۱: هیپرپلازی و چسبندگی رشته های ثانویه و پرخونی و رسوبات هموسدرین و خون ریزی و عریض شدن لاملای اولیه و چماقی شدن و نکروز سلولی به مقدار کم مشاهده شد. در تیمار ۲ و ۳ : پرخونی(زیاد)، هیپرپلازی و چسبندگی رشته های ثانویه و رسوبات هموسدرین و خون ریزی و نکروز سلولی(کم) مشاهده گردید. تیمار ۴: پرخونی و خون ریزی(زیاد)، هیپرپلازی و چسبندگی رشته های ثانویه و نکروز سلولی(کم) مشاهده شد. تیمار ۵: پرخونی و خونریزی(زیاد)، هیپرپلازی و چسبندگی رشته های ثانویه و نکروز سلولی و عریض شدن لاملا مشاهده گردید(شکل ۱).

نتایج آسیب شناسی کبد بچه تاسماهی ازون برون

تیمار ۱: آتروفی سلولی (کم) نکروز سلولی و رکورد صفراوی و خونریزی (زیاد) دیده شد.

تیمار۲: و پرخونی و آتروفی سلولی و رکورد صفراوی و خونریزی(کم) و نکروز سلولی و دژنرسانس چربی(زیاد) دیده شد

تیمار۳: پرخونی و آتروفی سلولی و رکورد صفراوی و سلول های کوپفر(زیاد)، خونریزی و نکروز سلولی (کم) دیده شد

تیمار۴ و ۵: عوارض پرخونی و آتروفی سلولی و رکورد صفراوی و سلول های کوپفر(زیاد)، خونریزی و نکروز سلولی (کم) دیده شد(شکل ۲).

نتایج بافت کلیه بچه تاسماهی ایرانی ازون برون

تیمار۱: کلیه تقریباً سالم بود و مواردی هم چون نکروز سلولی و خونریزی مشاهده شد.

تیمار ۲: نکروز سلولی و پرخونی و خونریزی (زیاد)دیده شد.

تیمار ۳: عوارض آن همانند تیمار ۲ بوده با شدت عارضه کمی بیشتر بوده است

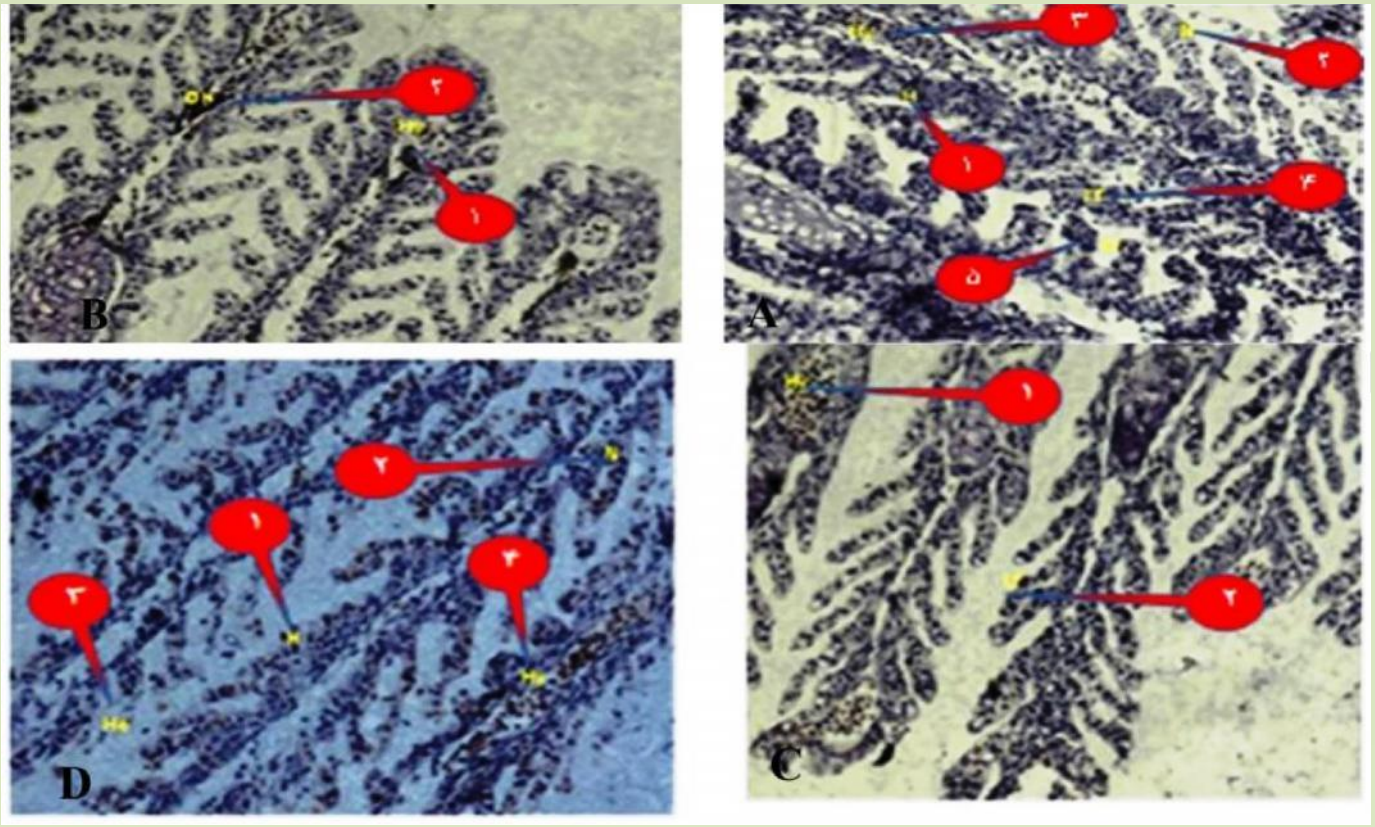
تیمار۴: نکروز سلولی(خیلی زیاد) ملانوماکروفاژ و خونریزی(خیلی زیاد) مشاهده شد.

تیمار ۵: نتایج مشابه تیمار ۴ با شدت بیشتر مشاهده شد.

به طور کلی در کلیه تاسماهی ازون برون عوارضی چون پرخونی و خونریزی، ملانو ماکروفاژ، افزایش فضای ادراری و هیپرتروفی در تیمارها مشاهده گردید و بیشترین عارضه در تیمارهای ۴ و ۵ دیده شد(شکل ۳).

بحث و نتیجه گیری

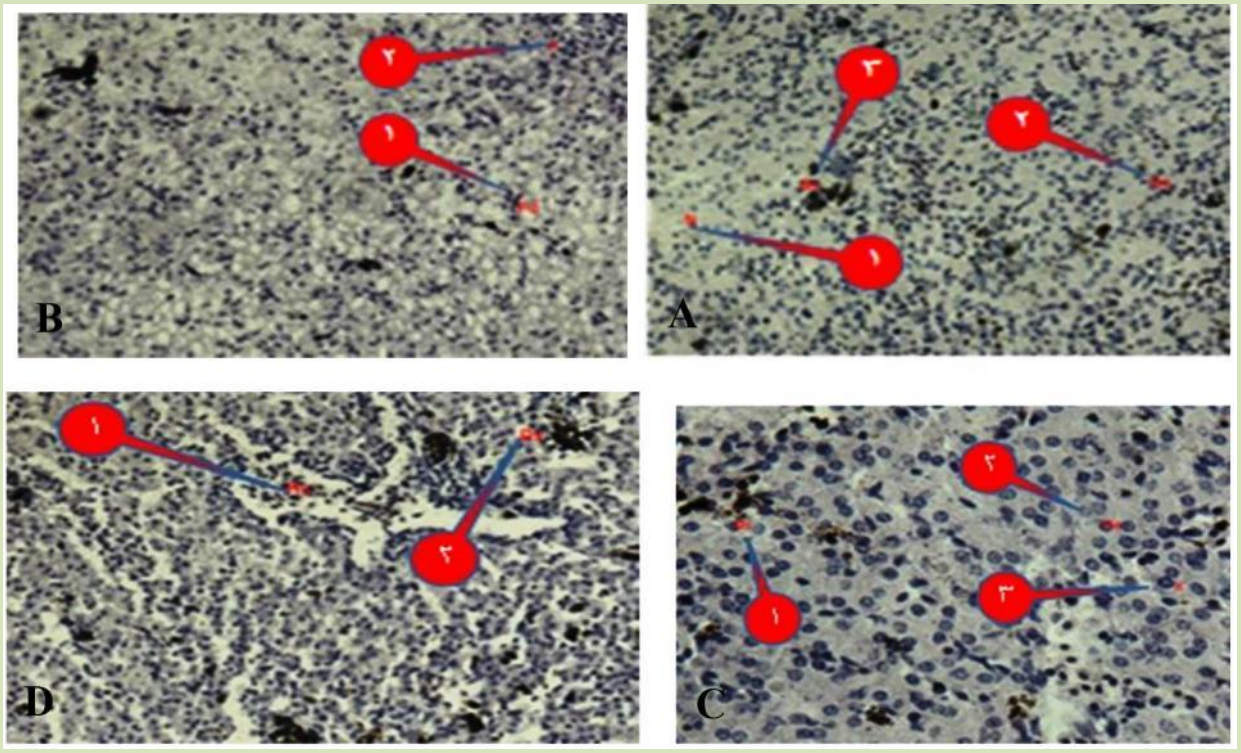
مطالعه پارامترهای خونی و تعیین مقادیر طبیعی آن-ها اساس نتایج ب دست آمده از آزمایشات و بازگشت به فرضیات تحقیق تعیین سمیت حاد نیتریت روی گونه ازون برون مشخص گردید که میزان غلظت کشنده نیتریت در طی چهار روز متوالی (۹۶ ساعت) برای ۵۰ درصد از بچه ماهیان ۳-۱ گرمی ازون برون ۱۱۵/۳۴۴۵ میلی گرم در لیتر است. بر این اساس می توان نتیجه گرفت که حداکثر غلظت مجاز(MAC value) این ماده که به عبارتی غلظت غیر مؤثر(NOEC) نیز خوانده می شود. برای ازون برون۱۱/۵۳ میلی گرم در لیتر می-باشد. حداقل غلظت مؤثر(LOEC)نیتریت که به 96h-LC_{10} اطلاق می گردد برای ازون برون۷۴/۳ میلی گرم در لیتر تعیین گردید. ماهیان اغلب در هنگام نقل و انتقال از جایی به جای دیگر می توانند در معرض مسمویت با نیتریت قرار گیرند. از طرفی کوددهی بیش از حد و وارد شدن فاضلابهای شهری، صنعتی و کشاورزی نیز می تواند باعث افزایش نیتریت آب شوند. برای بررسی تجربی مسمویت با نیتریت از روش ایجاد مسمویت حاد در آب ساکن استفاده شد



شکل ۱- اثر تیمارهای مختلف نیتریت بر بافت آبشش ماهی ازون برون

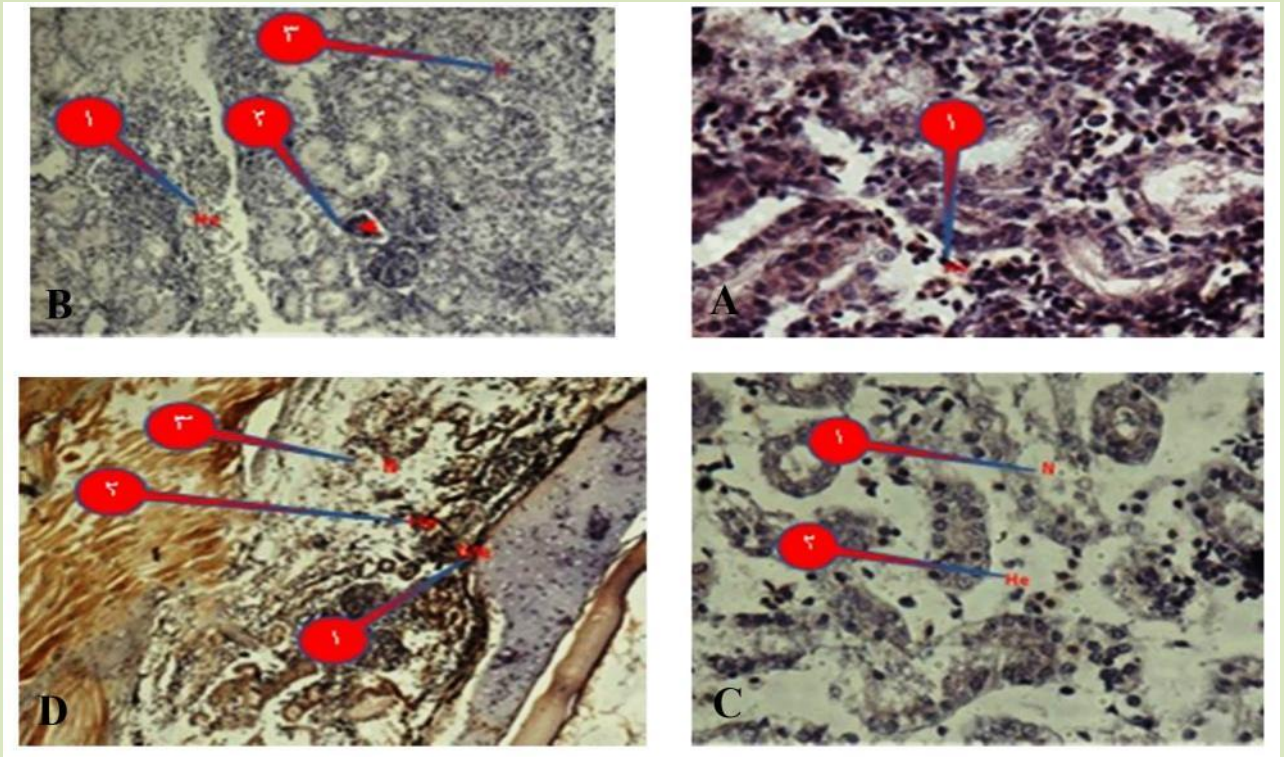
A(تیمار ۱): مشاهده عوارض پرخونی(۱)، نکروز سلولی(۲)، هیپرپلازی (۳)وچسبندگی رشته های ثانویه (۴)و چماقی شدن(۵). **B**(تیمار ۲): مشاهده عوارض پرخونی(۱)، عریض شدن لاملا (۲) و رسوبانت هموسدرین. **C**(تیمار ۴): مشاهده عوارض پرخونی(۱)، چسبنگی رشته های ثانویه آبششی (۲). **D**(تیمار ۳): مشاهده عوارض پرخونی(۱)، نکروز سلولی(۲)، عرض شدن لاملا (۳) و هیپرپلازی (۴)

بدین صورت که تعویض آب در طی دوره آزمایش صورت نگرفت. برای ایجاد غلظت نیتریت مورد نظر نیز از نمک نیتریت سدیم استفاده شد که در زمینه تعیین غلظت مورد نیاز در مخازن میزان نیتریت سدیم مورد نیاز محاسبه و به مخازن اضافه گردید و به منظور جلوگیری از تبدیل نیتریت به نیترات هوادهی قطع و میزان نیتریت محلول به صورت روزانه مورد سنجش قرار گرفت. میزان غلظت ترکیبات ازته(آمونیاک) شدیداً تحت تاثیر دما و pH و مواردی دیگر از قبیل سطوح اکسیژن محلول، شوری، گونه جانوری، سن و سایز ماهی است(۴). اولین علائم مسمویت حاد با نیتریت در ماهی شامل بی قراری، افزایش سرعت تنفس و آمدن ماهی به سطح آب می باشد در این حالت سرعت تنفس به تدریج بیشتر و حالت غیر منظم پیدا نموده که حالت تشنجی به دنبال دارد. ماهی نسبت به تحریکات خارجی به شدت واکنش نشان داده و سعی می کند از سطح آب بپرد. در این حالت انقباضات و اسپاسم های عضلانی اتفاق افتاده و نهایتاً ماهی به پهلو می افتد و دهان و سرپوش آبششی به دلیل اسپاسم شدید باز می مانند.



شکل ۲-اثر تیمارهای مختلف نیتریت بر بافت کبد ماهی ازون برون

A(تیمار ۱): مشاهده نکروز سلولی(۱) ، خونریزی (۲) و رکورد صفراوی(۳). **B**(تیمار ۲): مشاهده دژرنسانس چربی (۲) ، آتروفی سلولی (۲). **C**(تیمار ۳): مشاهده رکورد صفراوی(۱) ، خونریزی (۲) و سلول کوپفر (۳). **D**(تیمار ۴): مشاهده ، پرخونی (۱) و رکورد صفراوی (۲).



شکل ۳-اثر تیمارهای مختلف نیتریت بر بافت کلیه ماهی ازون برون

A(تیمار ۱): مشاهده ، خونریزی (۱). **B**(تیمار ۲): مشاهده ، پر خونی (۱) ، افزایش فضای ادراری (نوک پیکان) و نکروز سلولی. **C**(تیمار ۳): تیمار ۳: مشاهده نکروز سلولی (۱) و خونریزی (۲) . **D**(تیمار ۴): مشاهده ملانوماکروفاژ (۱) و خونریزی (۲) و نکروز سلولی (۳)

معمولاً ماهی یک حالت گذار از بهبودی را به دنبال آن نشان می دهد که مدت زیادی به طول نمی انجامد و به دنبال آن یکسری حرکات تشنجی شدید اتفاق افتاده و نهایتاً منجر به مرگ می‌شود. پوست ماهی رنگ پریده شده و توسط مقادیر زیادی مخاط پوشیده می شود. گاهی خونریزی های روی پوست به خصوص در ناحیه اسکات ها دیده می‌شود. آبشش ها به شدت پرخون بوده و ممکن است خونریزی در آن ها مشاهده شود. ترشح مخاط بر روی آبشش ها نیز افزایش پیدا می کند. با توجه به این که حلالیت نیتریت در آب بسیار زیاد است و به راحتی می‌توان با هوادهی شدیدآن را از آب خارج نمود غلظت نیتریت ایجاد شده در آب طی هر ۲۴ ساعت مورد سنجش انجام و به همین دلیل روش آب ساکن به عنوان یک روش استاندارد برای ایجاد مسمویت حاد در ماهی مورد استفاده قرار گرفت.یون نیتریت به دلیل قابلیت بالا ترکیب با هموگلوبین از طریق انتشار و جذب غیر فعال توسط آبشش ماهی ها جذب شده ومی‌تواند سبب مسمویت ماهی گردد. نیز باعث ضایعاتی نظیر بالا رفتن مصرف O_2، خرابی آبشش ها، کاهش توانایی خون در حمل O_2، تغییرات در بافت های کلیه، طحال، تیروئید و غیره شود.آبشش ها که محل تبادل گازی و یونی جهت تنفس و تنظیم اسمزی تاسماهیان می باشند،ازجایگاه ویژه ای در سلامت آن ها برخوردارند، زیرا جهت جریان خون در مویرگ ها بر خلاف جهت جریان آب تنفسی است که در بین تیغه‌های آبشش قرار دارند. این سیستم در تعویض گازهای تنفسی بسیار مؤثر است(۶). آبشش ها کمان های موازی هستند که روی کمان های آبششی تیغه‌های اولیه نیز تیغه های آبششی ثانویه زیادی در امتداد هر دو طرف تیغه های اولیه آبشش قرار گرفته اند. بافت پوششی تیغه های اولیه دارای سلول های موکوسی و سلول های کلراید زیادی بوده،که برحسب گونه ماهی و شرایط محیطی متفاوت می باشد. آبشش اندام اصلی تنفس ماهی ها بوده و مستقیماً در معرض عوامل محیطی است و مصونیت بسیار کمی، به جز وجود درپوش استخوانی(اپرکولوم) دارد و به سرعت به محرک های مختلف پاسخ می دهد و مستعدآسیب‌های فیزیکی و شیمیایی است، بنابراین وقتی آبشش به مدت طولانی درمعرض آلاینده های محیطی قرار گیرد، دچارتخریب و بروز عوارض مختلف بافتی می گردد(۱۶). این عوارض بافتی موجب حساسیت ماهی نسبت به بیماری های ثانویه و به صورت بالقوه مرگ و میر ماهیان می شود(۹). محرک های مختلف ممکن است سبب ایجاد عوارض تقریباً یکسان شوند و تخریب ساختاری آبشش می تواند پاسخی عمومی به استرس ایجاد شده با سموم(۱۵) یا پاسخ های ویژه انگلی(۹) باشد. به طورکلی تخریب آبشش بر اثر تحریکات شیمیایی شامل:

(۱)عوارض اثرمستقیم مواد سمی، مثل نکروز و جدایی اپی تلیوم از غشای پایه

(۲)عوارض دفاعی در مقابل موادسمی، از قبیل اتصال تیغه های ثانویه و هیپرپلازی اپیتلیوم است(۱۶).

چنان چه میزان نیتریت در آب جزئی باشد فقط باعث تحریک شدن پوست و آبشش می شود و در غلظت بالا منجر به هیپرپلازی آبشش می شود که این حالت همواره با ضخیم شدن لاملاها و انبوه شدن آنهاست و این امر موجب کاهش سطح تبادلات گازی شده و عمل گرفتن اکسیژن توسط ماهی کاهش می-یابد. در حالت شدیدتر ممکن است ازدیاد سلولی ادامه پیدا کند تا حدی که خود رشته ها نیز به هم متصل شوند. ضایعات دیگری که در آبشش ها دیده شده شامل ازدیاد حجم سلول های پوششی، خیز، اتساع عروق لاملای ثانویه(آنوریسم یا تلانژیکتازی) و خوردگی بافت پوششی آبشش ها است(۱۹، ۱۸).

مکانیسم ایجاد ضایعات حاد احتمالاً افزایش pH خون ماهی است که باعث اختلال در واکنش های آنزیمی غشاء سلول های پوششی می شود و به دلیل حساسیت مغز به این تغییرات می تواند عامل ایجاد علائم عصبی باشد(۱۸). هم چنین نیتریت باعث ایجاد استرس در ماهی می گردد که سبب افزایش آدرنالین، نورآدرنالین و کورتیکواستروئیدها می گردد به همین دلیل افزایش نیتریت 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 مختلفی گردد(۱۳). میزان آنزیم ALT و AST در خون ماهی در اثر مسمویت حاد با نیتریت افزایش یافته که نشان دهنده آسیب به غشاء سلولی بافت های داخلی می‌باشد. حدس زده می شود که بالا رفتن این آنزیم ها در خون به دلیل ضایعات کبد، آبشش و کلیه ها باشد(۱۳). دلایل انتخاب این سه بافت برای بررسی پاتولوژی نیز به همین دلیل است زیرا ضایعات پاتولوژیکی ناشی از مسمویت با نیتریت در ماهی های مختلف غالباً مختص به این سه بافت بوده است(آبشش محل جذب نیتریت است، کبد نیز در متابولیسم و دفع نقش اصلی را ایفا می کند و کلیه نیز در دفع نقش دارد(۸). لذا با توجه به این مطالب تأثیر این مواد بعد از ۹۶ ساعت و همین طور آزمایشات مجدد با دوزهای ۲۵٪- ۵۰٪-۷۵٪ غلظت LC_{50} موردبررسی قرار گرفت. هر چند ضایعات مشاهده شده اختصاصی نیستند و عوامل مختلفی می توانند باعث این گونه ضایعات شوند اما با توجه به این که ماهی ها به ظاهر سالم بودند و دچار مشکل انگلی نیز نبوده اند، از طرفی این ضایعات در گروه شاهد نیز مشاهده نگردید، بنابراین می توان نتیجه گرفت مسمویت حاد با نیتریت می تواند باعث ضایعات حاد در آبشش ها، کبد و کلیه ها شود. ضایعات آبششی ماهیان تلف شده خیلی شدید بوده است بنابراین اختلال در گرفتن اکسیژن توسط آبشش-ها می تواند عامل اولیه تلفات باشد. ضایعات کلیوی نیز احتمالاً در به هم زدن تعادل اسمزی بدن موثر بوده و به طور کلی در ارتباط با علت مرگ ماهی ها در مسمویت حاد با نیتریت تا کنون پنج دلیل ذیل ارائه شده است:

۱-ترکیب با هموگلوبین و ایجاد بیماری مت هموگلوبین و کاهش قابلیت حمل اکسیژن توسط خون(۱۷).

۲-آسیب به بافت های آبشش؛ کبد و کلیه در اثر عدم رسیدن اکسیژن کافی به سلول ها

۳-به هم خوردن تعادل اسمزی بدن ماهی در اثر آسیب های کلیوی و آبششی.

۴-کاهش ورود اکسیژن به بدن ماهی در اثر آسیب های آبششی(۷).

۵-اختلال در متابولیسم سلول های مغزی(اختلالات عصبی)(۱۷).

این آسیب ها در اثر اختلال در خواص الکتروشیمیایی غشای سلول های عصبی و تاثیر نیتریت بر فعالیت های بیوشیمیایی مغز است. تحقیقات محدودی در ارتباط با مسمویت ماهی با نیتریت در جهان صورت گرفته است که هر کدام جنبه خاصی را مد نظر قرار داده است با این حال اطلاعات محدودی در مورد مسمویت با نیتریت در ماهیان خاویاری وجود دارد و تحقیقی در رابطه با اثرات سمی نیتریت بر بافت های آبشش، کبد و کلیه بچه تاسماهی ازون برون تا کنون صورت نگرفته است. دربررسی مسمومیت ماهی، با سیستم چرخشی آب، در تاسیسات آبزی پروری ماهی تیلاپیا در اثر ماندن در آب آلوده به نیتریت دچار آسیب شد(۲۰)، که نتایج به دست آمده در این تحقیق نیز سمیت نیتریت در ازون برون را تایید می نماید. در بررسی اثر سمیت حاد نیتریت روی تاس ماهی های سیبری(*Acipenser baeri*, brandt) یک

ساله وتعیین غلظت کشنده، تغییرات خون شناسی وانباشتگی نیتریت در بافت های انتخابی انجام شد، غلظت کشنده نیتریت ۱۳۰mg.l تشخیص داده شد(۱۲) ،که نتایج حاصله از این تحقیق نیز غلظت کشنده نیتریت در بچه ماهی ازون برون ۱۱۵/۳۴۴ میلی گرم در لیتر به دست آمد و تقریباً در یک حد بوده و دلیل اختلاف آن ناشی از عوامل محیطی و اختلاف سن آن باشد. طی بررسی به عمل آمده اثر نیتریت بر ماهیان نیتریت به عنوان یک یون رقابتی در فرآیند تنفس وارد و با هموگلوبین ترکیب و سبب ایجاد بیماری مت هموگلوبین و تجمع نیتریت در خون ماهی باعث اختلال در حمل ونقل اکسیژن می شود(۲۰). سهم زیادی از آبشش تحت تاثیر نیتریت قرار گرفته باعث اشکال در تنفس؛ عملکرد غدد درون ریز؛ قلب؛ عروق؛ دیگر اختلالات فیزیولوژیکی و نهایتاً مرگ ماهی می-گردد. که نتایج بدست آمده در این تحقیق نیز سمیت نیتریت در ازون برون و ایجاد آسیب جدی به آبشش را تایید می نماید. با مقایسه نتایج بررسی اثر آمونیاک، نیتریت و نیترات در مورد محتوی هموگلوبین و اکسیژن مورد مصرف ماهی های آب شیرین،کپور(*Linnaeus*)(۲۴) و هم چنین بررسی مسمومیت با نیتریت یا بیماری خون قهوه ای بیماری در گربه ماهی کانالی می توان به این نتیجه رسید که میزان غلظت سمیت حاد نیتریت در بچه ماهی ازون برون کمتر از ماهی کپور و گربه ماهی کانالی بوده و نسبت به این دو گونه در مقابل سمیت نیتریت حساس تر است(۱۴). با انجام این پروژه این نتیجه به دست آمد که در شرایط مساعد؛ دما؛pH و اکسیژن ثابت میزان LC_{50} نیتریت ۲۴، ۴۸، ۷۲ و۹۶ ساعت گونه تاسماهی ازون برون ۲۸۷/۱۹۹، ۱۶۴/۲۲۳، ۱۳۴/۴۶۳ و ۱۱۵/۳۴۴ میلی گرم در لیتر بود. در نتیجه میزان بالاتر از ۷۴/۳ میلی گرم در لیتر سمی بوده و با مرگ و میر همراه خواهد بود. البته این میزان افزایش غلظت نیتریت در استخرهای پرورشی معمولاً در هنگام ورود حاوی آب کود و سموم کشاورزی و یا کمبود اکسیژن و تجزیه مواد حاوی ترکیبات ازته نظیر باقی مانده غذا و آمونیاک دفعی، در آکواریوم ها، و یا در زمان نقل و انتقال ماهیان با تراکم بالا که تعویض آب ندارند و یا در زمان کاهش شدید اکسیژن رخ می دهد. بر اساس نتایج به دست آمده از آزمایشات و بازگشت به فرضیات تحقیق تعیین سمیت حاد نیتریت روی گونه ازون برون مشخص گردید که میزان غلظت کشنده نیتریت در طی چهار روز متوالی(۹۶ ساعت) برای ۵۰ درصد از بچه ماهیان ۳-۱ گرمی ازون برون ۱۱۵/۳۴۴۵ میلی گرم در لیتر است. بر این اساس می توان نتیجه گرفت که حداکثر غلظت مجاز MAC value) این ماده که به عبارتی غلظت غیر مؤثر (NOEC) نیز خوانده می شود . برای ازون برون۱۱/۵۳ میلی گرم در لیتر می باشد. حداقل غلظت مؤثر(LOEC) نیتریت که به 96h-LC_{10} اطلاق می گردد برای ازون برون۷۴/۳ میلی گرم در لیتر تعیین گردید. در نهایت به این نتیجه دست یافتیم که با توجه به مقدار غلظت نیمه کشنده نیتریت در این تحقیق می توان عنوان نمود که تاسماهی ازون برون گونه ای حساس به نیتریت است و میزان غلظت سمیت حاد نیتریت در بچه ماهی ازون برون کمتر از ماهی کپور و گربه ماهی کانالی بوده و نسبت به این دو گونه در مقابل سمیت نیتریت حساس تر است. بنابراین در استخر های پرورشی مداربسته بچه تاسماهی ازون برون میزان نیترات باید اندازه گیری شود و بیشتر از حد مجاز اعلام شده در این تحقیق نشود تا از مرگ خاموش ماهیان جلوگیری شود.

منابع

۱–اسماعیلی ساری، ع. ۱۳۷۹. مبانی مدیریت کیفی آب در آبزی پروری، موسسه تحقیقات شیلات ایران، ص ۲۹–۳۳.

۲–پوستی، ا.، صدیق مردستی، ع. ۱۳۷۸. اطلس بافت شناسی ماهی، موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، ۲۹۷ صفحه.

۳–رجحان، م. ص. ۱۳۸۷. ضروریات بافت شناسی (جامع ۱)، انتشارات چهر، تهران. ۳۳۶ صفحه.

٤–شریف روحانی، م. ۱۳۷۴. تشخیص، پیشگیری و درمان بیماری ها و مسمومیت های ماهی، چاپ اول، انتشارات معاونت تکثیر و پرورش آبزیان، سازمان شیلات ایران، صفحات: ۲۵۵–۲۴۱.

۵–صادقی، م. ۱۳۸۱. بررسی بافت شناسی غده هیپوفیز در ماهی سفید دریای خزر، پایان نامه دکتری عمومی، ص ۳۱–۴۲

6.Altufiev, YU. (1997). Morpho plunctional abnormalities in some organs and tissues of the *Caspian sturgeon* (Acipenseridae) 3rd ISS, 97.

7.Colt, J., Tchobanoglous, G. (1976). Evalution of the short-term toxicity of nitrogenous compounds to channel catfish, lctalurus punctatus. Aquaculture , 15; 353-372.

8.Evans, D.H. (1993). Ionic and osmotic regulatin. In: Evans, D.H.(ED), the physiology of fish. CRC press, Boca Raton, FL, 315-341.

9.Haaparanta, A., Voltenen, E.T., Hoffman, R.W. (1997). Gill anomalies of perch and roach from four lakes differing in water quality. J.Fish.Biol, 50; 575-591.

10. Hamlin, H. J. (2005). Nitrate toxicity in Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*). Aquaculture, 253;688 –693.

11. Hung, S. S. O., Groff, J. M., Lutes, P. B., Kofifiynn-Aikins, F. (1990). Hepatic and intestinal histology of juvenile white sturgeon feed different carbohydrates. Aquaculture, 87; 349-360.

12. Hurtas, M., Gisbert E., Rodriguez A., Cardona, L., Williot P., Castello-Orvay, F. (2002). Acute exposure of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) yearlings to nitrite: median-lethal concentration(LC50) determination, haematological changes and nitrite accumulation in selected tissues, Aquatic Toxicology, 57(4); 257–266.

13. Jeney, Z.S. , Nemcsok, J., Jeney, G. (1992). Acute effect of sublethal ammonia concentration on common carp.1: effect of ammonia on adrenalin and noradrenalin in levels in different organs. Aquaculture, 104;139-148.

14. Jesse, A. (2008). Chappell. nitrite poisoning or "brown blood" disease-a preventable problem. Extension Fisheries Specialist, 45-54.

15. Mallat, J. (1985). Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: A statistical review.Canadian Journal of Fisheries and Aquqtic Science, 42; 630-635.

16. Schlenk, D., Benson, W.H. (2001). Target organ toxicity in marine and fresh water teleosts.Taylor & Fransis,1-90.

17. Smart, G.R. (1976). The effect of ammonia exposure on gill structure of the rainbow trout, salmo gairderi. Journal of Fish Biology, 8; 471-475.

18. Soderberg, G.R.W. (1985). Histopathology of *Rainbow trout*, *Salmo gairdneri*.

19. Stoskopf, M.K. (1993). Fish medicine.W.B.Saunders company, 182-184.

20. 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.

21. Svobodova, Z., Vykusova, B. (1991). Diagnostic, prevention and therapy of fish diseases and intoxications. Manual of International Training Course of Fresh Water Diseases and Intoxication,167-203.

22.TCR, (2002). O.E.C.D guideline for testing of chemicals, section 2. Effects on biotic systems, 1-39.

23. Tilak, K. S., Lakshmi, S. J., Susan, T. A. (2002). The toxicity of ammonia, nitrite and nitrate to the fish, *Catla catla*(Hamilton). J. Environ. Biol; 23; 147–149.

24. Tilak, K.S., Veeraiah K., Milton P., Raju J. (2007). Effects of ammonia, nitrite andnitrate on hemoglobin content and oxygen consumption of freshwater fish, *Cyprinuscarpio*. Journal of Environmental Biology, 28(1); 45-47.

Study of (LC50 96 h) and Histopathological Lesions of Nitrate in the Gill, Liver and Kidney Tissues of *Acipenser stelltus*

S. Gholipour[1], **H. Khara**[1], Z. Pzhnd[2]

1. Department of Aquaculture, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran.

h.khara1974@yahoo.com

2. Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), International Sturgeon Research Institute, Rasht, Iran.

Received:2016.13. 9 **Accepted: 2017. 11.11**

Abstract

Inroduction & Objective: Rising water nitrite one of the major problems in aquaculture. This rising always has been raised particularly in fish and shrimp reproduction systems, fish super-dense systems or water re-circulating, aquariums and during fish transferring. But its amount and impacts haven't been truly determined yet. So, according to the important role of nitrite in water pollution in different forms and its possible penetration into water sources in different ways, the aim of this research is to determine nitritelethal concentration and its acute effects on three gill, liver and kidney tissues of one types of sturgeon; (*A. stellatus*).

Materials and Methods: For this purpose, first the amount of LC10, LC50 and LC90 in 24, 48, 72 and 96 hours for toxic ammonia when baby *A. stellatus* (Weight 2 to 3 g) were faced with it compared with control group, was measured. So that for *A. stellatus*100, 119, 141, 168 and 200 mg in nitrite liter was obtained. This test was done by 5 cares and one control group which each had 3 repetitions, finally the amount of nitrite LC10 24, 72, 48 and 96 hours in *A.stellatus* type was 118.965, 87.2383, 82.91699 and 72/30166mg in liter, the amount of nitrite LC50 287.119, 164.233, 134.463 and 115.344 mg in liter and nitrite LC90 693.393, 309.144, 218.0544 and 179.0587 mg in liter respectively. During test hour average temperature for *A. stellatus* was obtained28.3307 ±0.03624centigrade degree, dissolved oxygen in water 6.4743± 0.1931 mg in liter and water PH 7.6556 ± 0.01950. Then, after 96 hours microscopic probable waste of gill, liver and kidney tissues that were in the presence of ammonia, were examined. After providing levels, microscopic study was done on them from the view point of histopathology.

Results: For this purpose, first the amount of LC10, LC50 and LC90 in 24, 48, 72 and 96 hours for toxic ammonia when baby *A. stellatus* (Weight 2 to 3 g) were faced with it compared with control group, was measured. So that for *A. stellatus*100, 119, 141, 168 and 200 mg in nitrite liter was obtained. This test was done by 5 cares and one control group which each had 3 repetitions, finally the amount of nitrite LC10 24, 72, 48 and 96 hours in *A.stellatus* type was 118.965, 87.2383, 82.91699 and 72.30166mg in liter, the amount of nitrite LC50 287.119, 164.233, 134.463 and 115.344 mg in liter and nitrite LC90 693.393, 309.144, 218.0544 and 179.0587 mg in liter respectively. During test hour average temperature for *A. stellatus* was obtained28.3307 ±0.03624centigrade degree, dissolved oxygen in water 6.4743± 0.1931 mg in liter and water pH 7.6556 ± 0.01950. Then, after 96 hours microscopic probable waste of gill, liver and kidney tissues that were in the presence of ammonia, were examined. After providing levels, microscopic study was done on them from the view point of histopathology.

Key word: *A.persicus, A. stellatus*, Ammonia, Acute toxicity.