

## بررسی LC<sub>50</sub> ۹۶ ساعته و ضایعات هیستوپاتولوژیکی نیترات روی بافت

### آبشش، کبد و کلیه تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*)

آرش جمشیدی<sup>۱</sup>، حسین خارا<sup>۲</sup>، ذبیح الله پزند<sup>۳</sup>

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، دانشکده منابع طبیعی، دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه شیلات، لاهیجان، ایران.

۲- دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، دانشکده منابع طبیعی، استادیار گروه شیلات، لاهیجان، ایران. [h.khara1974@yahoo.com](mailto:h.khara1974@yahoo.com)

۳- انستیتو بین المللی ماهیان خاویاری بخش فیزیولوژی، سنقر، رشت، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۲/۳/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۲/۵/۱۷

#### چکیده

زمینه و هدف: گسترش آلودگی‌ها از جمله نیترات در آب‌ها مسمومیت حاد یا نیمه حاد را در ماهیان خصوصاً بچه ماهیان ایجاد می‌کند و در کوتاه مدت و بلندمدت بسته به غلظت آن باعث ایجاد اختلال در فعالیت‌های فیزیولوژیکی و مرگ و میر ناشناخته می‌شود. اغلب آبیان پرورشی تحت تأثیر این آلودگی‌ها، سیستم ایمنی‌شان به خطر می‌افتد. هدف از این تحقیق تعیین سطح مجاز نیترات در آب و تأثیرات حاد آن بر بافت آبشش، کبد و کلیه گونه ماهی خاویاری (تاسماهی ایرانی) است.

روش کار: به این منظور بعد از آزمایشات تعیین غلظت مقدماتی نیترات، تیمارهای ۷۵۰، ۷۷۳، ۷۹۸، ۸۲۳، ۸۵۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات، میزان LC<sub>10</sub>، LC<sub>50</sub> و LC<sub>90</sub> در طول مدت ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بر اساس دستورالعمل OECD-2002 و به روش ساکن، روی بچه تاسماهی ایرانی با میانگین وزن ۳ گرم در مقایسه با تیمار شاهد، اندازه گیری شدند. به منظور ارزیابی اثرات هیستوپاتولوژیکی نیترات در پایان روز چهارم (۹۶ ساعت) بافت‌های آبشش، کبد و کلیه نمونه برداری در محلول بوئن تثبیت گردید. نمونه‌های تثبیت شده پس مراحل قالب گیری، برش و رنگ آمیزی با هماتوکسیلین-انوزین با میکروسکوپ نوری مجهز به ماتیور و دوربین عکاسی و فیلمبرداری مورد مطالعه میکروسکوپی قرار گرفت.

یافته‌ها: میزان LC<sub>10</sub> نیترات در ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت برای بچه تاسماهی ایرانی به ترتیب ۶۰۹۷/۷۷۵، ۲۹/۷۱۶، ۹۵۵۶/۶۷۷ و ۷۸۷۸/۶۶۹ میلی‌گرم در لیتر، میزان LC<sub>50</sub> نیترات ۹۰۹/۷۴۳۴، ۸۲۵/۹۳۹۷، ۷۹۳/۶۴۵ و ۷۶۴/۵۵۳۸ میلی‌گرم در لیتر، میزان LC<sub>90</sub> نیترات ۹۰۶۷/۰۷۴، ۹۵۲/۴۲۶۵، ۹۲۹/۰۷۶ و ۸۷۲/۷۲۸ میلی‌گرم در لیتر تعیین شد. نتایج نشان داد که در آبشش پدیده‌هایی نظیر پرخونی، تورم لاملای اولیه، هیپرلازی، چسبندگی لاملای ثانویه، خون‌ریزی و تکروز سلولی پس از طی ۹۶ ساعت مشاهده شد. شدت موارد آسیبی از تیمار ۱ به سمت تیمار ۵ افزایش یافت. در کبد پس از در معرض بودن عوارضی از قبیل پرخونی، تکروز سلولی، رکورد صفراوی و آتروفی سلولی مشاهده شد، ولی شدت آن‌ها در هر تیمار متنوع بود. در کلیه نیز عوارضی چون پرخونی و خون‌ریزی، ملانوماکروفاژ، افزایش فضای ادراری و هیپرتروفی در تیمارها مشاهده گردید و بیشترین عارضه در تیمارهای ۴ و ۵ دیده شد. نتیجه گیری: بنابر تحقیق حاضر تاسماهی ایرانی گونه حساس به نیترات بوده و در پرورش باید به غلظت نیترات توجه شود که بالاتر از حد مجاز نرسد.

واژه‌های کلیدی: تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*)، نیترات، سمیت حاد، هیستوپاتولوژی بافت‌های آبشش، کبد، کلیه.

#### مقدمه

عمده مشکلات مرگ و میر ماهیان پرورشی به سبب کاهش کیفیت آب و به وجود آمدن شرایط استرس زا می‌باشد. یکی از مشکلات افزایش بیش از حد مواد آلاینده و سمی در محیط آبی می‌باشد که به صورت فاضلاب، نشتر نفت، پساب‌های مواد آلی و معدنی کارخانجات، مواد شیمیایی گوناگون اعم از فلزات، که بدون هیچ توجهی به آب‌ها رها می‌گردند و وارد

هم زمان با افزایش رشد جمعیت، صنعت آبی پروری اهمیت زیادی یافته و هزاران مرکز تکثیر و پرورش انواع ماهی در جهان شکل گرفته است. اما به علت کمبود منابع آبی و استفاده بهینه از این منابع، آبی پروری به صورت مدار بسته و با استفاده از پساب‌های کشاورزی صورت پذیرد. صنعت آبی پروری علیرغم این رشد قابل توجه همواره با مشکلاتی روبرو بوده است که از

رسیدن به صرفه اقتصادی، کاهش مرگ و میر و تلفات بچه ماهیان، بالا بردن سرعت رشد و تولید بیشتر (۱) به بررسی نیترات که آلاینده ای ناشناخته است در این مطالعه پرداخته شده است. در راستای تحقیق حاضر می توان به این فرضیه اشاره کرد که غلظت کشندگی نیترات روی بچه تاسماهی ایرانی در حد پایین است و سمیت حاد نیترات روی بافت های کبد و کلیه اثر سوء ندارد. از آنجا که نیترات در تمام آب ها وجود دارد هدف از تحقیق حاضر، تعیین میزان غلظت کشندگی این ماده بر بچه تاسماهی ایرانی، دستیابی به حد سمیت نیترات بر روی بافت های کبد و کلیه بچه تاسماهی ایرانی و دستیابی به دستورالعمل اجرایی میزان بهینه نیترات در حوضچه های پرورشی بچه تاسماهی ایرانی 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 سنقر و با شرایط دمایی، pH، شوری، سختی، DO و نوری یکسان اجرا شد. تعداد ۲۲۰ عدد بچه تاسماهی ایرانی با میانگین سنی ۲ ماه و میانگین وزن ۱/۶۷ گرم و میانگین طول ۷/۵۴ سانتی متر که از مرکز شهید بهشتی تهیه شده جهت آدپتاسیون به وان فایبرگلاس در بخش ونیرو این مرکز منتقل و طی ۱۰ روز با دافی و گاماروس مورد تغذیه قرار گرفتند. طی مدت آدپتاسیون هیچ گونه مرگ و میری مشاهده نشد و دو روز قبل از شروع آزمایش غذایی به ماهیان مورد آزمایش قطع گردید. طبق هماهنگی های به عمل آمده با شرکت کیمیاگران میزان ۴ بسته ۲۵۰ گرمی از نیترات پتاسیم KNO<sub>3</sub> از این شرکت تهیه شد. آزمایشات این تحقیق برای تعیین سمیت حاد سموم بر روی ماهیان در کوتاه مدت (۴روز یا ۹۶ ساعت) طبق متد O.E.C.D

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 نماید (۱). ماهیان خاویاری از جمله منابع زیستی ارزشمند ملی، منطقه ای و بین المللی هستند. در این میان ماهی قره برون جایگاه ویژه ای دارد و به طور میانگین ۲۵ درصد گوشت و ۲۴ درصد خاویار حاصله از آب های ایران متعلق به این ماهی می باشد که بر اساس گزارشات IUCN (International Union for Conservation of Nature and Natural Resource) در خطر انقراض و به عنوان گونه آسیب پذیر خزر یاد شده و برای جلوگیری از کاهش نسل و انقراض، نیاز به تحقیق بنیادی و کاربردی در این زمینه است (۵). نیترات (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) آنیونی معدنی است که در نتیجه اکسیداسیون نیتروژن عنصری پدید آمده و در تمام محیط آبی وجود دارد. نیترات ماده ای است که آب های زیرزمینی و سطحی را به طور گسترده آلوده می کند (۱۵). تجمع نیترات در محیط می تواند ناشی از هرز آب های کشاورزی که به علت مصرف بیش از حد کودهای نیترا ته حاوی این ماده که به طور انتشار آب را آلوده می کنند یا آلودگی های نقطه ای از فاضلاب های انسانی که به درستی دفع و فراوری نشده است باشد (۷). سوزاندن سوخت های فسیلی با تولید اسید نیتریک و آمونیاک هوا را آلوده کرده که در نهایت به صورت باران های اسیدی باعث آلودگی سطح زمین می شوند (۷). در آب های سطحی مقادیر نیترات اغلب کم (صفر تا ۱۸ میلی گرم در لیتر) اما تخلیه حجم انبوهی از فاضلاب ها و زهاب های کشاورزی و یا جاری شدن شیرابه های زباله گاهی غلظت نیترات را در آب های سطحی تا چندین برابر افزایش می دهند (۷). از آن جا که در بسیاری موارد مرگ و میر در سیستم های مدار بسته و زمان حمل و نقل ماهیان و استخرهای آبگیری شده با پساب کشاورزی در شرایط هوایی ناشناخته است و از اهداف تولید کنندگان

ذکر است که نیترات پتاسیم  $KNO_3$  در مقادیر تعیین شده با ۲ لیتر آب وان رقیق شده و اضافه گردید. نیترات کل آب مخازن بعد از اضافه نمودن غلظت نیترات پتاسیم توسط دستگاه فتومتر مورد بررسی قرار گرفتند و غلظت‌های تعیین شده در محیط آزمایشی هم به مشابه میزان غلظت تعیین شده به دست آمد. در هر ۲۴ ساعت، آکواریوم‌ها مورد بررسی قرار گرفته و میزان مرگ و میر ثبت گردید. این کار به مدت ۹۶ ساعت (۴روز) و هر روز راس ساعت ۱۱ صبح انجام گرفت. به منظور ارزیابی اثرات هیستوپاتولوژیکی نیترات در پایان روز چهارم (۹۶ساعت) از بین هر تیمار ۳ عدد ماهی به صورت تصادفی صید و از بافت‌های آبشش، کبد و کلیه آن‌ها جهت تهیه لام‌های هیستوپاتولوژی نمونه برداری صورت و در محلول بوئن (تثبیت کننده) به مدت ۹۶ ساعت تثبیت گردید. پس از شستشو در آب مقطر درون الکل ۸۰٪ قرار گرفت. پس از این مراحل مجموعه نمونه‌ها داخل بسکت (شبکه توری) قرار داده شده و جهت پاساژ به دستگاه اتوتکنیکون منتقل گردیدند (۲،۱۰). در این دستگاه بافت‌ها در معرض الکل با درصد‌های بالا قرار گرفته تا آب‌گیری شوند. سپس بافت‌ها جهت شفاف سازی در کلروفرم قرار گرفته و پس از گذر مراحل پارافینه کردن با قرار دادن نمونه بافت‌ها در پارافین خالص نرم و تمیز در انکوباتور ۵۶ درجه سانتی‌گراد در دو مرحله و هر مرحله به مدت یک ساعت انجام گردید (۴). بعد از این مرحله نمونه بافت‌ها در داخل قالب‌های ویژه قرار گرفته قالب‌گیری شدند. نمونه بافت‌ها جهت تهیه برش‌های بافتی آماده با استفاده از میکروتوم برش‌های بافتی به ضخامت ۵ میکرون تهیه گردید. نمونه‌های برش زده شده پس از مرحله پارافین زدایی مورد رنگ آمیزی با هماتوکسیلین- ائوزین بر روی لام‌های ژلاتینی شده قرار گرفته به کمک میکروسکوپ نوری مجهز به مانیتور و دوربین عکاسی و

صورت می‌پذیرد. این آزمایشات به صورت استاتیک انجام می‌شود، بدین معنی که محلول آزمایش در طی تست تغییر نکرده و ثابت بوده و میزان مرگ و میر ماهی در طی ۴ روز به صورت هر ۲۴ ساعت یک بار (۲۴،۴۸،۷۲) (۹۶ساعت) ثبت و رکوردگیری می‌گردد (۱۴). با توجه به این که حلالیت نیترات در آب بسیار زیاد است و به راحتی نمی‌توان آن را از آب خارج کرد (حتی با هوادهی شدید)، بنابراین غلظت نیترات ایجاد شده در آب طی ۹۶ ساعت تقریباً ثابت است. به همین دلیل روش آب ساکن به عنوان یک روش استاندارد برای ایجاد مسمویت حاد در ماهی مورد استفاده قرار گرفت. پس از آدپتاسیون، به منظور سهولت در بررسی‌های آماری مخازن به میزان ۳۰ لیتر آبگیری و به مدت چند ساعت هوادهی شده تا به شرایط اکسیژنی مناسب برسند. انجام دو مرحله مقدماتی آزمایش برای تعیین غلظت نهایی که پس از مرحله اولیه به غلظت بین ۵۰۰ تا ۱۰۰۰، پس از مرحله دوم مقدماتی به غلظت بین ۷۰۰ تا ۹۰۰ به دست آمد و سپس غلظت‌های نهایی بین این اعداد به صورت لگاریتمی محاسبه شد و غلظت‌های ۷۵۰، ۷۷۳، ۷۹۸، ۸۲۳ و ۸۵۰ میلی‌گرم به ازاء هر لیتر آب بچه تاسماهیان ایرانی در این محدوده به دست آمد. تست سمیت به روش ساکن به اجرا درآمد که 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. در هر مخزن تعداد ۱۰ عدد بچه ماهی رها گردید. بعد از اضافه نمودن نیترات تمامی فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی مهم آب اندازه‌گیری شد. به طوری که: نور متناسب با طول روز بین ۱۶-۱۲ ساعت، میزان اکسیژن مخازن از طریق سیستم هوادهی مرکزی بیشتر از ۷ میلی‌گرم در لیتر، درجه حرارت آب درون مخازن حدود ۲۵ درجه سانتی‌گراد، میزان pH بین ۷-۸ در طول انجام آزمایش مورد کنترل قرار گرفت. لازم به

فیلمبرداری مورد مطالعه میکروسکوپی قرار گرفتند (۸). با های به کار 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 ۹۵ درصد، مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و با تحصیل ضرایب a (عدد ثابت) و b (شیب خط) معادله رگرسیون  $y = a + bx$  تشکیل گردید (۱۳). سپس برای حل معادله و تعیین غلظت های کشنده (LC<sub>10</sub>, LC<sub>50</sub>, LC<sub>90</sub>) عدد پروبیت آن از جدول ANOVA برداشته شده و به جای y در معادله قرار گرفت  $\text{Probit value} = a + b(\log C)$  و با حل معادله و گرفتن Anti Log از  $\log C$  در معادله، مقایسه غلظت های کشنده LC<sub>10</sub>, LC<sub>50</sub>, LC<sub>90</sub> برای زمان معین ۲۴،۴۸،۷۲،۹۶ ساعت به دست آمد. LC<sub>50</sub> غلظت نیتراتی است که باعث مرگ و میر نیمی از جمعیت باشد. سپس حداکثر غلظت مجاز (MAC) با تقسیم نمودن LC<sub>50</sub> بر ۱۰ محاسبه شد.

### نتایج

وجود نیترات بالا باعث ایجاد استرس در ماهیان و شنای نامنظم، افزایش آدرنالین، نورآدرنالین، کاهش ایمنی و کاهش تمایل ماهی به غذا می شود، که خود عاملی برای مستعد شدن ماهی به بیماری های مختلف می گردد (۷). گاهی خونریزی های روی پوست به خصوص در ناحیه اسکات ها دیده می شود. آبشش ها به شدت پر خون بوده و ممکن است خونریزی در آن ها مشاهده شود. ترشح مخاط بر روی آبشش ها نیز افزایش پیدا می کند که به دلیل تجمع خون در بافت آبشش است (۱۲). در این حالت انقباضات و اسپاسم های عضلانی اتفاق افتاده و نهایتاً ماهی به پهلو می افتد و دهان و سرپوش آبششی در بعضی از ماهیان به دلیل اسپاسم شدید باز می مانند به دنبال آن یکسری حرکات تشنجی شدید اتفاق افتاده که نهایتاً

استفاده از لگاریتم غلظت منجر به مرگ می شود. پوست ماهی رنگ پریده شده و توسط مقادیر زیادی مخاط پوشیده می شود که در مواجه شدن با سم بروز پیدا می کند. 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<sub>10</sub>, LC<sub>50</sub> و LC<sub>90</sub> در هر ۲۴ ساعت برای این ماده محاسبه نموده و در جدول و نمودار نمایش داده شدند. نتایج بررسی شده نشان می دهد که با گذشت زمان از ۲۴ تا ۹۶ ساعت LC<sub>10</sub>, LC<sub>50</sub> و LC<sub>90</sub> 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 حداکثر غلظت مجاز (حداکثر غلظت مجاز که در بعضی مراجع برابر غلظتی است که هیچ نوع عوارض سمی از آن ماده مشخص مشاهده نمی گردد) (MAC) و غلظت غیر مؤثر (NOEC) برای بچه تاسماهیان ایرانی به صورت زیر به دست آمد.  $\text{Value} = \text{NOEC} = \text{mg/l} \times 1/6/4553$  بررسی اسلایدهای بافت آبشش بچه تاسماهی ایرانی مورد آزمایش و مقایسه آن با نمونه بافت شاهد این نتیجه را در بر داشت: در تیمار ۱ و ۲ عوارض پرخونی، هیپرپلازی و چسبندگی رشته های ثانویه (کم) ولی رسوبات هموسدرین (زیاد) مشاهده شد. در تیمار ۳ عوارض پرخونی (خیلی زیاد)، خونریزی (زیاد)، چماقی شدن و هیپرپلازی و چسبندگی رشته های ثانویه و نکروز سلولی (کم) مشاهده گردید. در تیمار ۴ عوارض پرخونی و خونریزی (خیلی زیاد)، چماقی شدن و هیپرپلازی و چسبندگی رشته های ثانویه و عریض شدن لاملای اولیه (کم) مشاهده گردید. در تیمار ۵ عوارض پرخونی و خونریزی و رسوبات هموسدرین (خیلی زیاد)، هیپرپلازی و چماقی شدن و نکروز سلولی و عریض شدن لاملای اولیه (کم) مشاهده

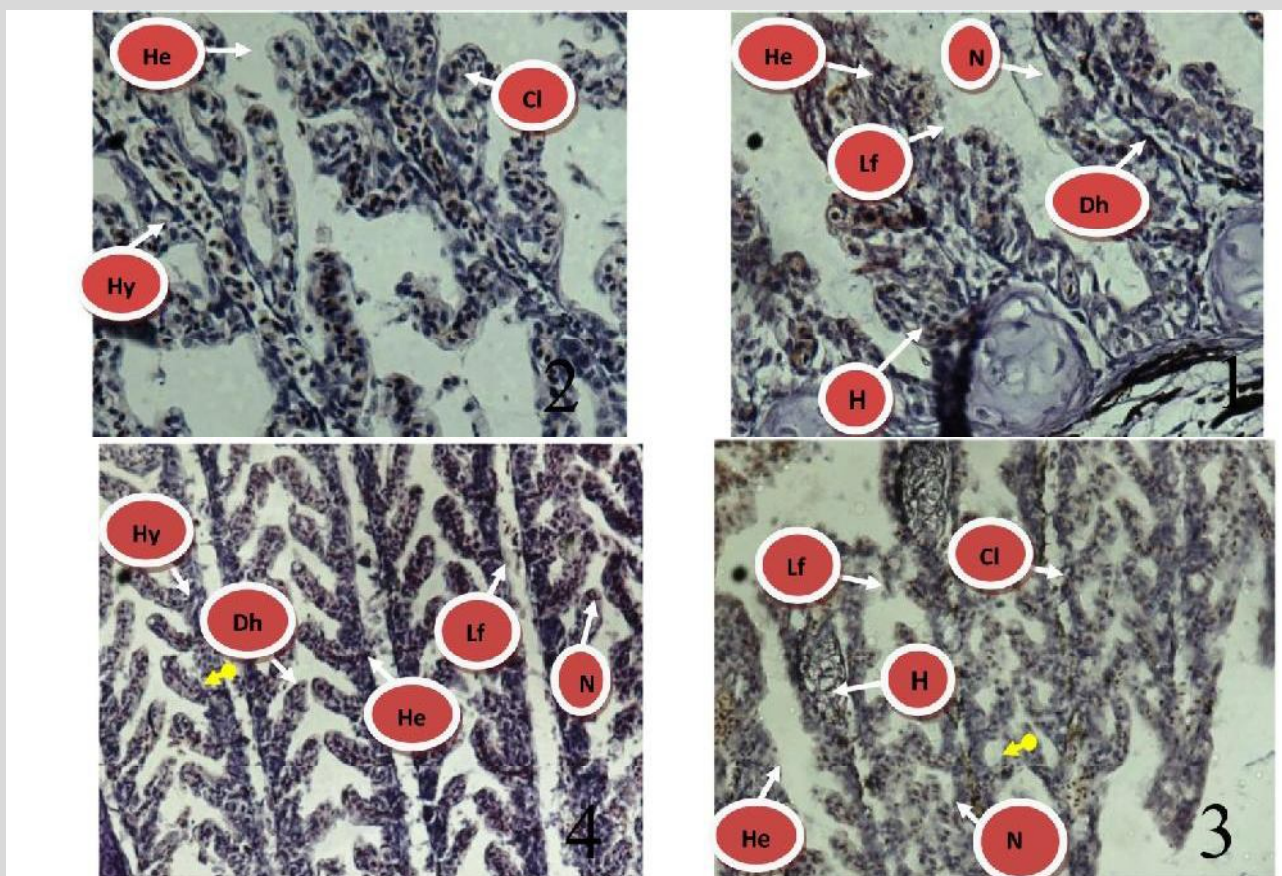
بچه تاسماهی ایرانی مورد آزمایش و مقایسه آن با نمونه بافت شاهد این نتایج را در بر داشت: در تیمار ۱ کلیه تقریباً سالم بوده و به صورت جزئی مواردی هم چون نکروز سلولی، ملانوماکروفاژ و هیپرتروفی دیده شد. در تیمار ۲ و ۳ نکروز سلولی (کم)، خونریزی (زیاد)، ملانو ماکروفاژ و افزایش فضای ادراری (کم) دیده شد. در تیمار ۴ نکروز سلولی و ملانوماکروفاژ (زیاد) و خونریزی و افزایش فضای ادراری (زیاد) دیده شد. در تیمار ۵ خونریزی (خیلی زیاد)، پرخونی و نکروز سلولی و ملانوماکروفاژ و افزایش فضای ادراری (زیاد) دیده شد (شکل ۳). به طور کلی در کلیه تاسماهی ایرانی عوارضی چون پرخونی و خونریزی، ملانوماکروفاژ، افزایش فضای ادراری و هیپرتروفی در تیمارها مشاهده گردیده و بیشترین عارضه در تیمارهای ۴ و ۵ دیده شد. جدول ۱- مقایسه اثر تیمارهای مختلف نیترا ت روی مرگ و میر بچه ۳-۱ گرمی تاسماهی ایرانی (میانگین ۳ تکرار) در طی ۹۶ ساعت

شد (شکل ۱). به طور کلی در آبشش تاسماهی ایرانی عوارضی از قبیل هیپرپلازی، پرخونی، خونریزی، چسبندگی لاملا، نکروز سلولی و تورم رشته اولیه آبشش در آن-ها مشاهده گردید ولی شدت این عوارض از تیمار ۱ به سمت تیمار ۵ بیشتر بوده است. در مطالعه آسیب شناسی کبد تاسماهی ایرانی نتایج زیر به دست آمد: در تیمار ۱ و ۲ در کبد آتروفی سلولی و رکورد صفراوی (زیاد)، نکروز سلولی (کم) دیده شد. در تیمار ۳ رکورد صفراوی و خونریزی و نکروز سلولی (کم) دیده شد. در تیمار ۴ خونریزی و سلول های کوپفر و نکروز سلولی (زیاد)، پرخونی و رکورد صفراوی و تجزیه چربی و آتروفی (کم) دیده شد و در تیمار ۵ نکروز سلولی و خونریزی و سلول های کوپفر (کم)، تجزیه چربی (زیاد) دیده شد (شکل ۲). بررسی اسلایدهای بافت کلیه

تیمار	غلظت نیترا ت ppm	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت	تغییرات نسبت به شاهد				
		تعداد تلفات	تعداد تلفات	تعداد تلفات	تعداد تلفات	تعداد تلفات	تعداد تلفات	تعداد تلفات	تعداد تلفات	
شاهد	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
I	۷۵۰	۰/۶۶	۲	۳/۳	۴/۶۶	٪۶/۶	٪۲۰	٪۳۳	٪۴۶/۶	
II	۷۷۳	۱	۲/۶۶	۴/۳۳	۵/۶۷	٪۱۰	٪۲۶/۶	٪۴۳/۳	٪۵۶/۷	
III	۷۹۸	۱/۳۳	۳/۶۶	۵	۶/۳۳	٪۱۳/۳	٪۳۶/۶	٪۵۰	٪۶۳/۳	
IV	۸۲۳	۲/۳۳	۵	۶	۷/۶۶	٪۲۳/۳	٪۵۰	٪۶۰	٪۷۶/۶	
V	۸۵۰	۳	۶	۷/۳۳	۸/۶۶	٪۳۰	٪۶۰	٪۷۳/۳	٪۸۶/۶	

جدول ۲- تعیین غلظت های کشنده نیترا ت در طی ۴ روز بر روی تاسماهی ایرانی (میانگین سه تکرار)

زمان LC	۲۴ (ساعت)	۴۸ (ساعت)	۷۲ (ساعت)	۹۶ (ساعت)
۱۰	۷۷۵/۶۰۹۷	۷۱۶/۲۵۰۹	۶۷۷/۹۵۵۶	۶۶۹/۸۸۷۸
۵۰	۹۰۹/۷۴۳۴	۸۲۵/۹۳۹۷	۷۹۳/۶۴۵	۷۶۴/۵۵۳۸
۹۰	۱۰۶۷/۰۷۴	۹۵۲/۴۲۶۵	۹۲۹/۰۷۶	۸۷۲/۸۲۸



شکل ۱- مشاهده عوارض خونریزی (He)، تکروز سلولی (N)، عوارض پرخونی (Hy)، هیپرتروفی (H)، چسبندگی رشته‌های ثانویه آبششی (Lf)، رسوبات هموسیدرین (Dh) و جمافی شدن رشته‌های ثانویه آبششی (Cl)، عریض شدن لاملا (پیکان برش‌های آبشش در تیمارهای مختلف نیترات (H&E-40x)). شماره ۱: تیمار ۱ و ۲، شماره ۲: تیمار ۳، شماره ۳: تیمار ۴، شماره ۴: تیمار ۵

### بحث و نتیجه گیری

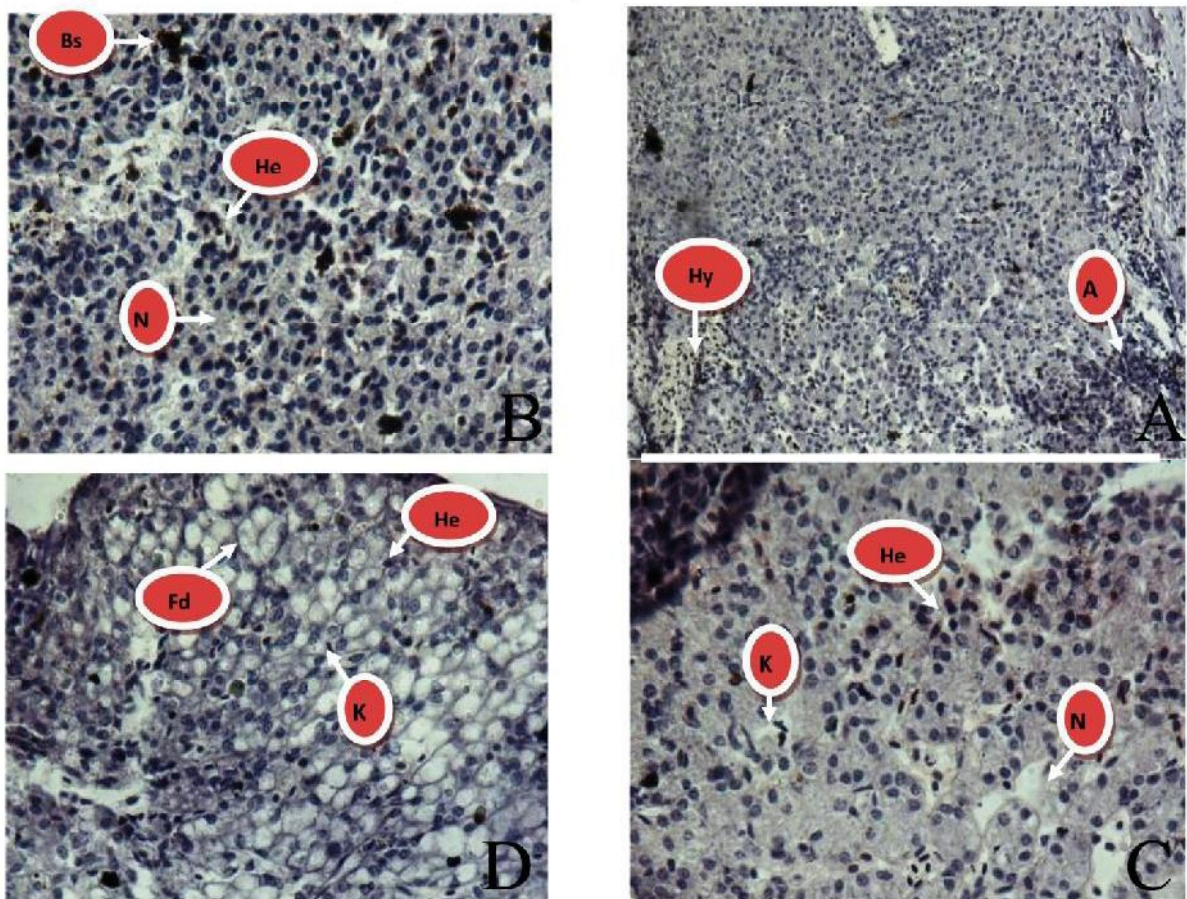
بر اساس نتایج به دست آمده و بازگشت به فرضیات تحقیق تعیین سمیت حاد نیترات روی گونه تاسماهی ایرانی مشخص شد که میزان غلظت کشنده نیترات طی مدت چهار روز متوالی (۹۶ ساعت) برای ۵۰ درصد از بچه ماهیان ۱-۳ گرمی تاسماهی ایرانی یا قره برون ۷۶۴/۵۵۳۸ میلی گرم در لیتر است و حداکثر غلظت مجاز (MAC value) این ماده یا همان غلظت غیر مؤثر (NOEC) برای تاسماهیان ایرانی ۷۶/۴۵۵۳ میلی گرم در لیتر می باشد. حلالیت نیترات در آب بالا است، لذا هوادهی در خروج نیترات آب نقش ندارد. بنابراین در مراحل مختلف آزمایش از سیستم هوادهی مرکزی به عنوان هواده به منظور ثابت نگه داشتن نیازهای تنفسی ماهیان استفاده گردید. این غلظت در آب تحت تاثیر pH

سطوح اکسیژن محلول، شوری، گونه جانوری، سن و اندازه ماهی و تراکم ماهیان و هم چنین میزان تغذیه تغییر می کند (۷، ۱۱). اسو بودوا در سال ۱۹۹۱ بیان کرد که ماهیان نسبت به تحریکات و استرس خارجی به شدت واکنش نشان داده و سعی می کنند از سطح آب بیرون بپرند که به نظر می رسد به دلیل عدم تعادل اسمزی باشد و لذا این نظریه با نتایج تحقیق حاضر منطبق است، چون از علائم اولیه مسمویت حاد با نیترات در ماهیان مورد تحقیق بی‌قراری، نفس نفس زدن در سطح آب، شنا در سطح آب بوده است (۱۲). کنگ و همکاران در سال ۱۹۸۴ (۹) گزارش داده‌اند که گربه ماهی کانال *Ictalurus punctatus* به‌طور کلی بعد از وارد شدن استرس ناشی از افزایش نیترات در محیط ماهیان به سمت کف متمایل و پراکنش آن‌ها کاهش می یابد، سپس با

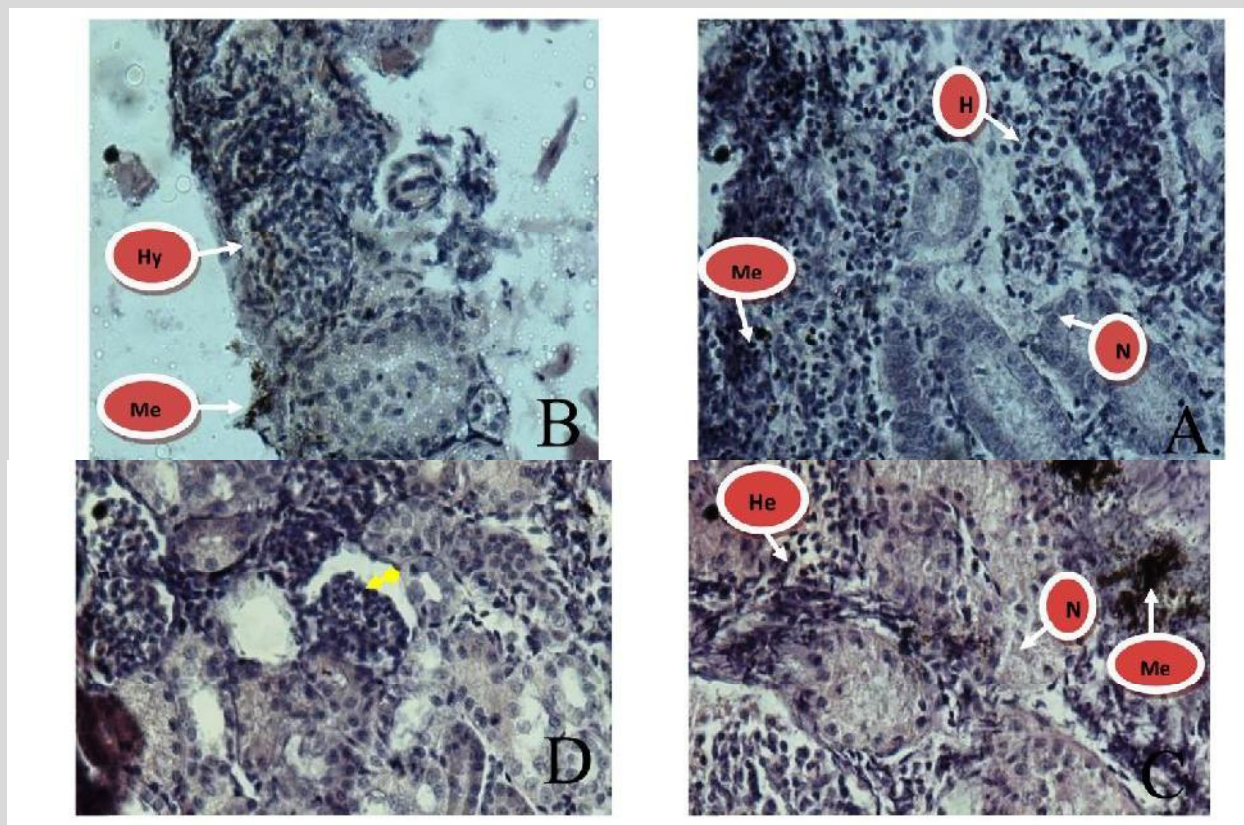


رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss* و ماهی آزاد چینوک *Oncorhynchus tshawytscha* به میزان ۱۳۵۵ و ۱۳۱۰ میلی‌گرم در لیتر است (۱۶). قرار گرفتن در معرض نیترات در این بررسی باعث تخریب بافت اپیتلیوم آبشش مانند همجوشی لاملا و ادم در مقایسه با گروه شاهد مختلف گردید که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. برای محاسبه  $LC_{50}$  ابتدا یک بررسی اولیه صورت گرفت تا محدوده‌ای که در آن تلفات اولیه اتفاق می‌افتد، به دست آید. سپس میزان  $LC_{50}$  در ۲۴ ساعت برای بچه تاسماهی ایرانی ۹۰۹/۷۴۳۴ میلی‌گرم در لیتر نیترات کل به دست آمد.

افزایش غلظت نیترات به سطوح بالاتر مهاجرت می‌نماید که با نشانه‌های تیره شدن رنگ پوست بدن، بروز حالات عصبی، بلعیدن هوا از سطح، شنای سریع در غلظت‌های بالای نیترات، شدت تنفس، باز و بسته شدن سریع سرپوش آبششی و نهایتاً مرگ ماهی همراه است. بروز این حالات در نتیجه آسیب وارده بر آبشش‌ها است. تحقیق فوق مطالب عنوان شده را تایید می‌کند که ناشی از عدم دفع مواد زائد و عدم جذب اکسیژن از آبشش‌ها می‌باشد که در تحقیق کنونی نیز نتایج مشابهی به دست آمد. وستین در سال ۱۹۷۴ (۱۶) گزارش کرده است که  $LC_{50}$  در ۹۶ ساعت مقادیر نیترات آب برای قزل‌آلای



شکل ۲- مشاهده عوارض خونریزی (He)، تکرور سلولی (N)، عوارض پرخونی (Hy)، آتروفی سلولی (A)، مشاهده رکورد صفاوی (Bs)، سلول‌های کوپفر (K)، دژرسانس چربی (Fd) برش‌های کبد در تیمارهای مختلف نیترات (H&E-40x). A: تیمار ۱ و ۲، B: تیمار ۳، C: تیمار ۴، D: تیمار ۵



شکل ۳- مشاهده عوارض خونریزی (He)، نکروز سلولی (N)، هیپرتروفی (H) و ملانوماکروفاژها (Me)، عوارض پرخونی (Hy)، افزایش فضای ادراری (پیکان) برش های کلیه در تیمار های مختلف نیترات (H&E- 40x). A: تیمار ۱ و ۲، B: تیمار ۳، C: تیمار ۴، D: تیمار ۵

۱۴۲۳ و ۱۴۰۰ میلی گرم در لیتر به دست آمد که سمیت حاد نیترات بر *I. punctatus* را مستقل از درجه حرارت آب بیان کردند (۶). تیلاک و همکاران در سال ۲۰۰۲ (۱۵) با استفاده از سیستم ثابت و مستمر، در ۲۴ ساعت  $LC_{50}$  میزان ۱۴۸۴ و ۱۵۶۵ میلی گرم در لیتر برای کپور بزرگ هند *Catla catla* بیان کردند که نسبت به تاسماهی ایرانی مقاوم تر است. لازم به ذکر است که تحقیقات گوناگون مطالعه شده حساسیت گونه های مختلف آبزیان را در برابر نیترات در شرایط بهینه نشان می دهد، بدین معنی که در صورت مساعد و اپتیمال بودن شرایط زیست محیطی، توان ماهیان در تحمل غلظت های بالای نیترات در کوتاه مدت افزایش می یابد. در شرایط پرورشی ممکن است مقادیر کمتر نیترات نیز باعث تلفات شود، زیرا بعضی فاکتورهای دیگر مانند مواد محلول و سمی (از قبیل  $H_2S$ ، متان) و همچنین شرایط نامساعد از قبیل

این مقدار در مقایسه با حد تحمل ماهی کپور ماهی هندی که میزان  $LC_{50}$  آن در ۲۴ ساعت ۱۴۸۴ میلی گرم در لیتر نیترات کل به دست آمده بود (۱۲). ویکنز در سال ۱۹۷۶ (۱۷) در بررسی سمیت حاد نیترات بر میگوهای خانواده پنایده میزان  $LC_{50}$  در ۴۸ ساعت را به اندازه ۳۴۰۰ میلی گرم در لیتر در ۲۸ ppt آب دریا بیان کرد که بیانگر مقاومت بالای میگوها نسبت به تاسماهی ایرانی در مواجهه با نیترات است. کنپ و همکارانش در سال ۱۹۷۳ (۹) گزارش داده اند که گربه ماهی کانال *Ictalurus punctatus* قادر به تحمل غلظت نیترات ۹۰ میلی گرم در لیتر بدون تاثیر بر فعالیت رشد و تغذیه پس از قرار گرفتن در طی ۱۶۴ روز بوده است. ارزیابی سمیت کوتاه مدت نیترات بر ماهیان انگشت قد (۵۰-۷۶ میلی متر طول) از *I. punctatus* در ۲۲، ۲۶ و ۳۰ درجه سانتی گراد، محاسبه ۹۶ ساعت  $LC_{50}$  میزان ۱۳۵۵،



خواهد بود. البته این میزان غلظت بسیار بالا بوده و امکان به این حد رسیدن غلظت نیترات در استخرهای پرورشی، در آکواریوم‌ها، و در زمان نقل و انتقال ماهیان با تراکم بالا که تعویض آب ندارند و هوادهی صورت می‌پذیرد و هم‌چنین اگر از پساب‌های زمین‌های کوددهی شده که وارد رودخانه‌ها می‌شوند به عنوان منبع آبی استفاده شود نیز می‌تواند حاوی میزان بالای نیترات بوده و مشکل ساز باشد. با مراجعه به فرضیات تحقیق و نتایج حاصله نتیجه گیری شد که غلظت کشندگی نیترات روی بچه تاسماهی ایرانی در حد پایین و حدود ۷۰۰ میلی گرم در لیتر است و سمیت حاد نیترات روی بافت آبشش اثر سوء شدید دارد که منجر به عدم تنفس و روی بافت کبد اثر تخریبی و بر ساختار کلیه اثر سوء شدید دارد که منجر به عدم دفع مواد زائد بدن و هم‌چنین عدم تنظیم اسمزی و سرانجام مرگ ماهی می‌شود. در نهایت با توجه به مقدار غلظت نیمه کشنده نیترات در این تحقیق می‌توان عنوان نمود که تاسماهی ایرانی گونه‌ای حساس به نیترات است و نسبت به تاس ماهی سیبری و آزاد ماهیان و نسبت به ماهیان گرمابی و میگوها حساس تر هستند. بنابراین در استخرهای پرورشی مداربسته تاسماهی ایرانی میزان نیترات باید اندازه گیری شود و بیشتر از حد مجاز اعلام شده در این تحقیق نشود تا از مرگ خاموش ماهیان جلوگیری شود.

بالا بودن دمای آب یا کمبود اکسیژن محلول می‌توانند اثرات نیترات را تشدید کنند و ماهی را نسبت به اثرات نیترات حساس‌تر کنند. از طرفی در صورتی که ماهی در معرض عوامل نامساعد مختلف از قبیل آلودگی انگلی و سوء مدیریت پرورشی باشد به مسمومیت حساس‌تر است بنابراین می‌توان عنوان نمود فاکتورهای بیولوژیک (مانند گونه ماهی و سن ماهیان) و فاکتورهای زیست محیطی (دما، pH، اکسیژن، دی اکسید کربن و غیره) قادر به تحت تاثیر قرار دادن سمیت نیترات و حساسیت ماهیان نسبت به آن است (۱۷). با وجود این که عوامل مختلفی می‌توانند باعث بروز عوارض در کبد و کلیه شوند اما با توجه به این که ماهی‌های استفاده شده در ابتدای آزمایش به ظاهر سالم بوده و دچار مشکل انگلی نیز نبوده‌اند، از طرفی این ضایعات در گروه شاهد نیز مشاهده نگردید و تلفاتی در گروه شاهد مشاهده نشد بنابراین نتیجه گرفته می‌شود مسمومیت حاد با نیترات می‌تواند باعث ضایعات حاد در کبد و کلیه ماهیان شود. ضایعات در کلیه ماهیان تلف شده بسیار شدید بوده و در کبد نسبتاً عوارض کمتری مشاهده شد. بنابر این اختلال در دفع مواد زائد و عدم تعادل اسمزی مناسب می‌تواند عامل اصلی تلفات بچه ماهیان باشد. با انجام این پروژه این نتیجه به دست آمد که در شرایط مساعد و دما و pH و اکسیژن ثابت میزان بالاتر از ۶۰۰ میلی گرم در لیتر نیترات برای ماهی سمی بوده و با مرگ و میر همراه

## منابع

۴- صادقی، م. ۱۳۸۱. بررسی بافت شناسی غده هیپوفیز در ماهی سفید دریای خزر، پایان نامه دکتری عمومی. ش ۵۳۸، ص ۳۱-۴۲.

۵- کیوان، ا. ۱۳۸۱. مقدمه‌ای بر تکنولوژی پرورش ماهیان خاویاری. انتشار دانشگاه آزاد واحد لاهیجان. ۲۷۰ صفحه.

6. Colt, J., Tchobanoglous, G. (1976). Evaluation of the short-term toxicity of nitrogenous compounds to channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture*, 15; 353-372.

۱- اسماعیلی ساری، ع. ۱۳۷۹. مبانی مدیریت کیفی آب در آبی‌پروری، موسسه تحقیقات شیلات ایران. ص ۲۹-۳۳.

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

۳- رجحان، م. ۱۳۶۶. ضروریات بافت شناسی (جامع‌۱)، انتشارات چهر. تهران ۲۱۷ صفحه.

7.Hamlin, H.J. (2005). Nitrate toxicity in Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*). *Aquaculture*, 253 (2006); 688 –693.

8.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.

9.Knepp, G.L., Arkin, G.F. (1973). Ammonia toxicity levels and nitrate tolerance of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Prog. Fish-Cult*, 35; 221–224.

10.Roberts, R. J. (2001). *Fish pathology*. Saunders, London 472p.

11.Rubin, A.J., Elmaraghy, G.A. (1977). Studies on the toxicity of ammonia, nitrate and their mixture to guppy fry. *Water Res*, 11; 927–935.

12.Svobodova, Z., Vykusova, B. (1991). Diagnostic, prevention and therapy of fish

diseasesw and intoxications. *Manual of international training course of fresh water diseases and intoxication*, 167-203.

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

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

15.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.

16.Westin, D.T. (1974). Nitrate and nitrite toxicity to Salmonid fishes. *Prog. Fish-Cult*, 36; 86–89.

17.Wickins, J. F. (1976). The tolerance of warm-water shrimps to recirculated water. *Aquaculture*, 9.

