استفاده از زئولیت غنی شده در افزایش نرخ بقاء بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در آزمایش مسمومیت با آمونیاک با تاکید بر بهبود شرایط محیط‌زیست

- **محمدفرهنگی :** گروه منابع طبیعی دانشگاه گنبدکاووس، صندوق پستی: ۱۶۳
- **ماهان سلمرودی*:** دانشکده منابع طبیعی دانشگاه گیلان، صومعه سرا، صندوق پستی: ۱۱٤٤

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۰ تاریخ پذیرش: دی ۱۳۹۰

چکیده

اثرات زئولیت غنی شده بر افزایش نرخ بقاء بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با تاکید بر حفظ شرایط محیط‌زیست در آزمایش مسمومیت با آمونیاک مورد بررسی قرار گرفت. آزمایشات تحت شرایط آزمایشگاه به مدت ۲٤ ساعت اجرا شد. بچه ماهیان مورد آزمایش با میانگین (± انحراف معیار) وزنی ٤±٥۲ گرم و طول ۳±۲۱ سانتیمتر انتخاب شده بودند. تحت شرایط ثابت، ۱۵ عدد ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در معرض غلظت کشنده آمونیاک کل ($N\text{-}NH_4$) قرار گرفتند. به منظور غنی‌سازی، زئولیت‌ها قبل از استفاده بطور مکرر درمعرض محلول ۱۰ درصد نمک طعام و درجه حرارت ۹۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند. در غلظت کشنده آموناک (۲۵ میلی‌گرم در لیتر) مقادیر ۱، ۳، ۵، ۷ و ۸ گرم در لیتر از زئولیت غنی شده استفاده شد. نتایج حاصل از آزمایش اختلاف معنی‌داری را دربین گروه‌های آزمایشی نشان داد ($P<0.05$). کاربرد ۸ گرم در لیتر زئولیت غنی شده توانست از تلفات ماهی جلوگیری کند. علائم رفتاری ماهیان در طول آزمایش مورد بررسی قرار گرفت. به منظور بررسی اثرات آسیب‌شناسی، از آبشش ماهیان مقاطع بافتی تهیه شد. ضایعات مشاهده شده در آبشش ماهیان شامل: پرخونی، خونریزی، ادم و نکروز سلولهای پوششی بود.

کلمات کلیدی: آمونیاک، آبشش، زئولیت غنی شده، مسمومیت، قزل‌آلای رنگین کمان، *Oncorhynchus mykiss*

*پست الکترونیکی نویسنده مسئول: s.farhangi@yahoo.com

مقدمه

در سالهای اخیر مصرف ماهی در اکثر کشورها به میزان قابل توجهی افزایش یافته است و تکثیر و پرورش ماهی بعنوان منبع پروتئینی بصورت یک تجارت مهم در اکثر کشورها صورت می‌گیرد، بطوریکه صید ماهی و آبزی‌پروری حدود ۱۰۶ میلیون تن غذای جهان را تامین می‌کند که از این میزان ۴۳ درصد متعلق به آبزی‌پروری است (۷). ماهی قزل‌آلای رنگین کمان از گونه‌های با ارزش و مهم سردآبی کشور می‌باشد. بدلیل شرایط خاص زیستی و حساسیت بالای ماهی در امر پرورش، حفظ و بهبود کیفیت آب بعنوان محیط زیست ماهی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. بطور کلی ماهیان نسبت به عوامل محیط آبی که در آن زیست می‌کند مانند pH، O_2، NH_4 و دیگر عوامل بیوشیمیایی و بیولوژیکی، بسیار حساس می‌باشند و ضرورت دارد که این عوامل در یک حد مشخص و معینی ثابت بماند. در بین عوامل شیمیایی آب، آمونیاک گازی است سمی، بی‌رنگ و بی‌بو که به شدت در آب محلول می‌باشد (۱). وجود این گاز در سیستم‌های پرورشی باعث بروز تلفات شدید می‌گردد. روشهای مختلفی برای حذف آمونیاک وجود دارد. از جمله این روشها می‌توان به رزین اشاره کرد.

یکی از رزین‌های متداول در آبزی‌پروری، زئولیت‌ها می‌باشد. زئولیت‌ها از طریق تبادل یونی قادر به حذف آمونیاک می‌باشد (۶). در ساختار زئولیت‌ها دو دسته یون دیده می‌شود. این یونها شامل یونهای ساختمانی (Si, Al) و یونهای متحرک (Na^+, K^+) می‌باشد. یونهای متحرک موجود در ساختار زئولیت‌ها قابلیت جابجایی با یونهای مثبت آب از جمله آمونیاک را دارند (۱۵). خصوصیات جذب زئولیت‌ها بستگی به خصوصیات فیزیکی و شیمیایی ساختار آن دارد. نسبت Si/Al و نوع کاتیون‌ها موجود در ساختار زئولیت نقش عمده‌ای در جذب کاتیونهای آب دارند (۵). اخیراً کاربرد زئولیت‌های مصنوعی در دترژنت‌ها، فرآیندهای هسته‌ای و کم و بیش در استخرهای پرورش ماهی رایج شده است. اگر چه آنها پتانسیل بالایی در تصفیه فاضلاب‌ها دارند (۱۰ و ۱۱). درخصوص استفاده از زئولیت‌های طبیعی بر حفظ کیفیت محیط زیست و آزمایشات مسمومیت با عناصر سمی مطالعات مختلفی صورت گرفته است (۲ و ۴). با این وجود تاکنون گزارشی از کاربرد زئولیت‌های مصنوعی در این خصوص وجود ندارد. آنچه که در زئولیت‌های مصنوعی مشاهده می‌شود، درجه خلوص آن است (۳). یکی از روشهای موثر برای بالا بردن کارآیی زئولیت‌های طبیعی خالص‌سازی آن است (۳).

این تحقیق بمنظور غنی‌سازی زئولیت طبیعی کلینوپتیلولیت و بررسی کارآیی آن در افزایش نرخ بقاء ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در آزمایش مسمومیت با آمونیاک بمنظور حفظ شرایط محیطزیست ماهی صورت گرفته است.

مواد و روشها

آزمایشات در مرکز پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) قره یازی در شهرستان رامسر تحت شرایط آزمایشگاهی انجام شد. آزمایشات به روش آب ساکن (Static Method) در مدت ۲۴ ساعت در غلظت کشنده آمونیاک کل ($N\text{-}NH_4$) برای ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) صورت گرفت. بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با وزن متوسط (± انحراف معیار) ۴±۵۲ گرم و طول متوسط (± انحراف معیار) ۳±۲۱ سانتیمتر در معرض غلظت کشنده آمونیاک کل (۲۵ میلی‌گرم در لیتر) قرار گرفتند. غلظت کشنده براساس آزمایشات گزارش شده توسط فرهنگی و همکاران (۱۳۸۱) تعیین گردید، بطوریکه در این غلظت ۱۰۰ درصد تلفات در ماهیان مشاهده شد. شرایط آزمایش در طول مدت آزمایشات ثابت بود (دما ۰/۵±۲۰ درجه سانتیگراد، اکسیژن ppm ۹ و pH برابر با ۸/۴).

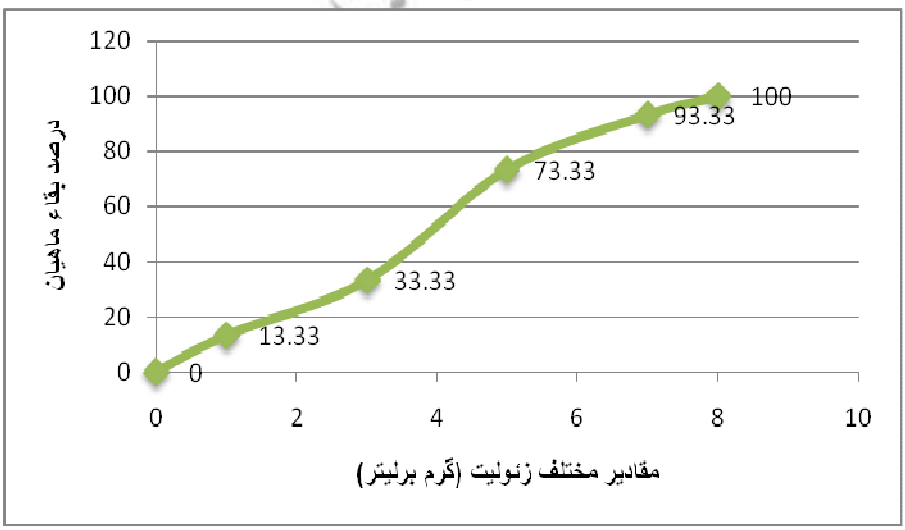
برای تعیین غلظت کشنده آمونیاک از نمک کلرید آمونیاک (NH4-Cl) ساخت شرکت مرک آلمان استفاده شد. اندازه‌گیری آمونیاک کل به روش کلریمتر (Hach DR/890, USA) در هر ۴ ساعت صورت گرفت. ۱۵ عدد بچه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در تشت‌های آزمایش با حجم ۳۵ لیتر قرار گرفتند. در این آزمایشات از سنگ هوا بعنوان هواده استفاده گردید. در غلظت کشنده آمونیاک (۲۵ میلی‌گرم در لیتر) از مقادیر مخلتف ۱، ۳، ۵، ۷ و ۸ گرم در لیتر زئولیت غنی شده با سه تکرار استفاده شد. هر تکرار شامل ۱۵ عدد بچه ماهی بود. یک گروه ۱۵تایی از ماهیان بعنوان شاهد در نظرگرفته شد. زئولیت غنی شده مورد استفاده از نوع زئولیت کلینوپتیلولیت (Clinoptilolite) بود. زئولیت‌ها قبل از استفاده، به تکرار (۳ بار متوالی) در محلول نمک ۱۰ درجه و درجه حرارت ۹۰ درجه

سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند (۹). تمام رفتارهای ماهی در طول آزمایش ثبت گردید. به منظور بررسی ضایعات ناشی از مسمومیت با آمونیاک و زئولیت مقاطع بافتی از آبشش ماهیان به روش مرسوم رنگ‌آمیزی (هماتوکسیلین- ائوزین) تهیه گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها به روش ANOVA و در نرم‌افزار Minitab14 صورت گرفت. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن (Duncan) استفاده شد.

نتایج

در غلظت کشنده آمونیاک کل ۱۰۰ درصد تلفات بعد از ۲۴ ساعت مشاهده گردید. بیشترین نرخ مرگ و میر ماهیان در غلظت کشنده آمونیاک در ساعت اولیه آزمایش بود. درگروه شاهد هیچگونه تلفاتی دیده نشد. در غلظت کشنده آمونیاک کل رفتارهای ظاهری مسمومیت با آمونیاک بصورت بلعیدن هوا از سطح، سعی در بیرون پریدن از آب، تشنجات عصبی شدید، باز و بسته شدن سریع سرپوشهای آبشش، پرخونی در آبششها و در نهایت مرگ ماهی مشاهده شد. استفاده از مقادیر مختلف زئولیت غنی شده در غلظت کشنده آمونیاک سبب کاهش تلفات ماهی گردید. آزمایشات نشان داد، افزایش مقادیر زئولیت غنی شده سبب افزایش نرخ بقاء ماهیان در بین گروهها گردید. با استفاده از ۸ گرم در لیتر زئولیت غنی شده هیچگونه تلفاتی مشاهده نشد (نمودار ۱). نرخ بقاء ماهیان در معرض مقادیر مختلف زئولیت غنی شده بترتیب صفر، ۱۳/۳۳، ۳۳/۳۳، ۷۳/۳۳، ۹۳/۳۳ و ۱۰۰ بدست آمد (جدول ۱). نتایج حاصل از آزمایش اختلاف معنی‌داری را در بین گروهها نشان داد ($P<0.05$) (نمودار ۲). بیشترین جذب آمونیاک در طی ۲۴ ساعت، توسط زئولیت غنی شده ۴ ساعت پس از انجام آزمایش صورت گرفت (نمودار ۳). کاهش میزان آموناک ۴ ساعت پس از آزمایش از ۲۵ میلی‌گرم در لیتر به ۹، ۱۱، ۱۳ و ۱۷ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد.

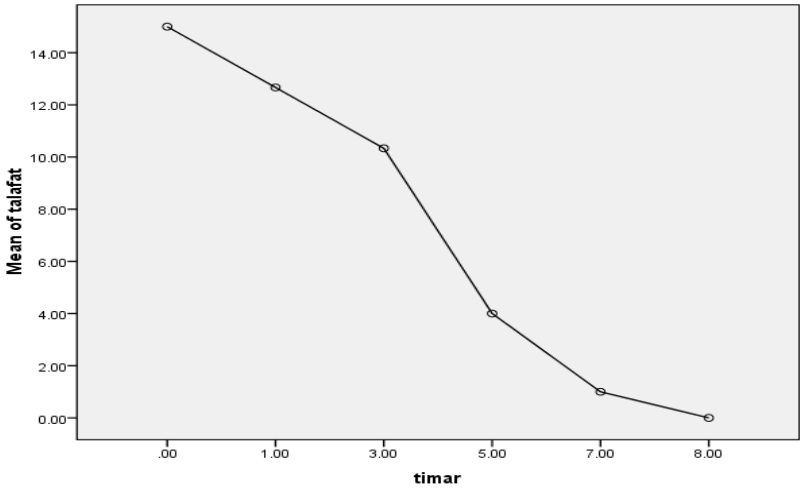
در بررسی مقاطع بافتی آبشش ماهیان در غلظت کشنده آمونیاک بیشترین ضایعات شامل هیپرپلازی راس رشته‌های آبشش (Hyperplasia)، پرخونی (Hyperemia)، خونریزی (Hemorrhage) و ادم (Edema) بدست آمد (اشکال ۱، ۲ و ۳). در ماهیانی که در معرض زئولیت غنی شده قرار داشتند هیچگونه ضایعه‌ای مشاهده نشد.



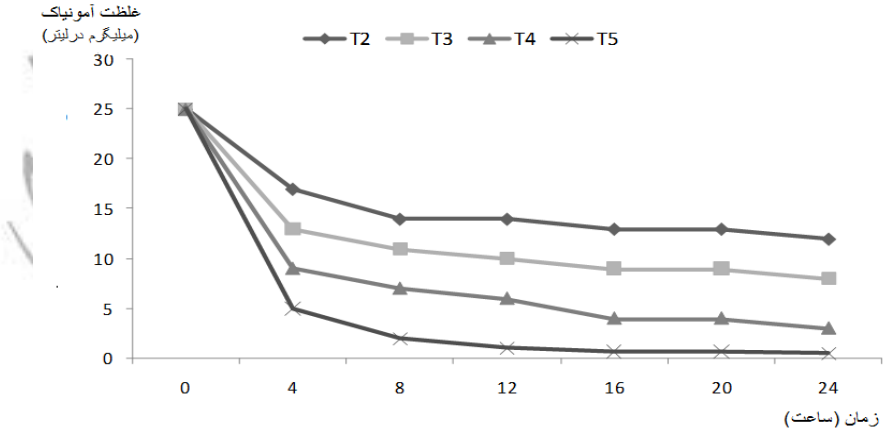
نمودار ۱: درصد بقاء ماهیان در مقادیر مخلتف زئولیت غنی شده

جدول ۱: درصد بقاء و درصد تلفات ماهی در مقادیر مختلف زئولیت غنی شده تحت شرایط با ۱۵ عدد ماهی در هرتیمار (دما ۰/۵±۲۰ درجه سانتیگراد، اکسیژن ppm ۹ و pH برابر با ۸/٤)

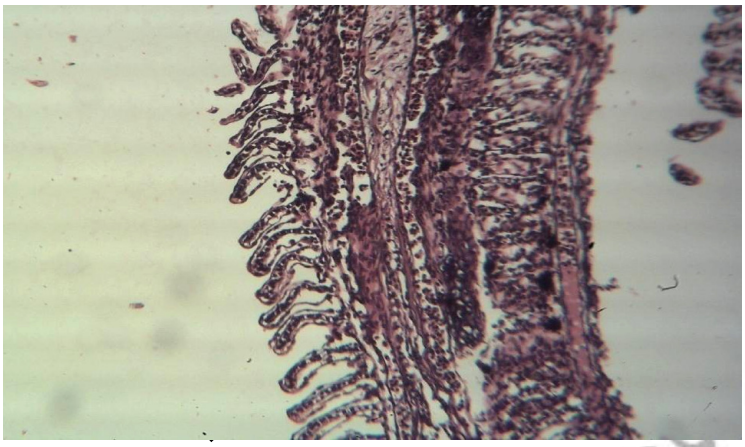
مقادیر زئولیت غنی شده	تعداد تلفات	درصد تلفات	تعداد بقاء	درصد بقاء
---	۱۵	۱۰۰	---	---
۱	۱۳	۸٦/٦٦	۲	۱۳/۳۳
۳	۱۰	٦٦/٦٦	۵	۳۳/۳۳
۵	٤	۲٦/٦٦	۱۱	۷۳/۳۳
۷	۱	٦/٦٦	۱٤	۹۳/۳۳
۸	---	---	۱۵	۱۰۰



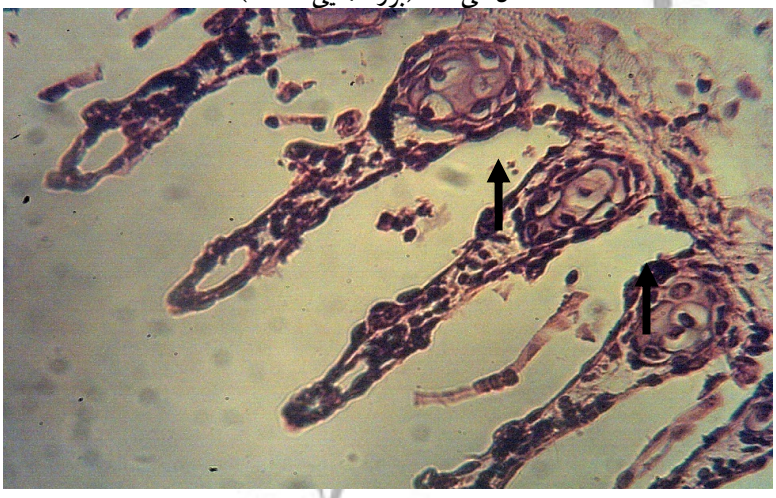
نمودار ۲: منحنی اختلاف معنی‌دار (Means Plots) در بین گروهها مورد آزمایش در آزمون دانکن



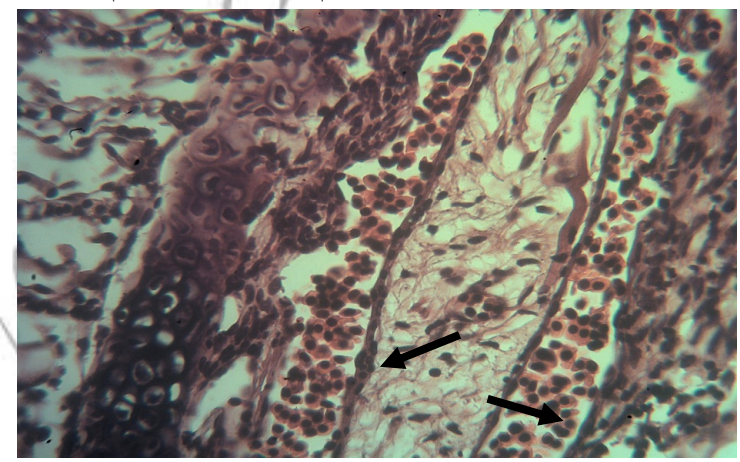
نمودار ۳: کاهش غلظت‌های آمونیاک کل طی آزمایشات



شکل ۱: آبشش ماهیان در معرض غلظت کشنده آمونیاک کل (۲۵ میلی‌گرم درلیتر). نوک پیکان اتساع لاملاهای ثانویه آبشش را نشان می‌دهد (بزرگنمایی ۲۰۰×)



شکل ۲: آبشش ماهیان در معرض غلظت کشنده آمونیاک کل (۲۵ میلی‌گرم در لیتر). نوک پیکان ادم را نشان می‌دهد (بزرگنمایی ۲۰۰×)



شکل ۳: آبشش ماهیان در معرض غلظت کشنده آمونیاک کل (۲۵ میلی‌گرم درلیتر). نوک پیکان پرخونی را نشان می‌دهد (بزرگنمایی ٤۰۰×)

بحث

آزمایشات به منظور بررسی کارآیی زئولیت غنی شده در افزایش نرخ بقاء بچه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در مدت ۲۴ ساعت انجام گرفت. درخصوص آزمایش مسمومیت با آمونیاک بر ماهی قزل‌آلای رنگین کمان گزارشات گوناگونی وجود دارد (۱، ۴، ۱۲، ۱۴ و ۱۷). براساس گزارشات صورت گرفته توسط فرهنگی و همکاران (۱۳۸۱) در آزمایشات مسمومیت حاد با آمونیاک، غلظت کشنده آمونیاک کل را برای ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در مدت ۲۴ ساعت برابر با ۲۵ میلی‌گرم در لیتر گزارش دادند. بر همین اساس غلظت کشنده آمونیاک برابر ۲۵ میلی‌گرم در لیتر در مدت ۲۴ ساعت در نظر گرفته شد، بطوریکه در همین غلظت ۱۰۰ درصد تلفات ماهی مشاهده گردید. اصولاً تعیین غلظت کشنده عناصر مختلف وابسته به فاکتورهای گوناگونی از جمله سن، جنس، گونه و فاکتورهای محیطی می‌باشد (۱۶). استفاده از نمک کلرید آمونیاک سبب بروز علائمی در ماهیان گردید. آزمایشات نشان داد در غلظت کشنده آمونیاک اولین علائم با تشنجات عصبی شدید در ماهی ظاهر می‌شود. آبشش‌ها با سرعت زیاد باز و بسته شده و ماهیان سعی در بیرون پریدن از آب دارند. سپس ماهیان به سطح آمده و به بلعیدن هوا اقدام می‌کنند. آزمایشات انجام شده توسط پیغان (۱۳۷۸)؛ فرهنگی و همکاران (۱۳۸۱) و Knoph (۱۹۹۶) موید این امر است. این علائم بیانگر نقش سمی آمونیاک و استرس ناشی از مسمومیت با آمونیاک است (۸). هر چند مسمومیت با آمونیاک به شکل غیر یونیزه ($N\text{-}NH_3$) بسیار شدیدتر از مسمومیت با یون آمونیوم ($N\text{-}NH_4$) می‌باشد. درخصوص استفاده از زئولیت در جلوگیری از تلفات ماهی در ایران گزارشات مختلفی وجود دارد (۲ و ۴).

استفاده از زئولیت‌های غنی شده در آزمایش حاضر،کاهش ۶۵ درصد غلظت آمونیاک را در مدت ۴ ساعت اولیه آزمایش نشان داد. بطوریکه غلظت کشنده آمونیاک از ۲۵ میلی‌گرم در لیتر به ۵ میلی‌گرم در لیتر کاهش یافت. در مقایسه با آزمایش انجام شده توسط فرهنگی و همکاران (۱۳۸۱) با زئولیت طبیعی، نقش موثر زئولیت غنی شده ثابت می‌گردد، بطوریکه کاهش غلظت کشنده آمونیاک (۲۵ میلی‌گرم در لیتر) در آزمایشات انجام شده با زئولیت طبیعی در مدت ۸-۷ ساعت پس از انجام آزمایشات صورت گرفت. Miladinovica و Weatherleyb (۲۰۰۸) تحت شرایط آزمایشگاهی نشان دادند استفاده از فرآیند تبادل یونی می‌تواند سبب کاهش ۹۰ درصد غلظت آمونیاک در مدت ۳۸ دقیقه گردد. بطوریکه غلظت آمونیاک از ۲۷ میلی‌گرم در لیتر به ۳ میلی‌گرم در لیتر بدون حضور ماهی رسید. آزمایشات نشان داد که با افزایش مقادیر زئولیت غنی شده در غلظت کشنده، درصد بقاء ماهی نیز افزایش یافت (جدول ۱). بطوریکه کاربرد ۸ گرم در لیتر زئولیت غنی شده سبب جذب بیش از ۹۰ درصد غلظت کشنده آمونیاک (۲۵ میلی‌گرم درلیتر) گردیده و از ۱۰۰ درصد تلفات ماهی جلوگیری نمود. اگرچه این میزان زئولیت در آزمایش حاضر (۸ گرم در لیتر) معادل نصف مقدار بکار گرفته شده توسط فرهنگی و همکاران (۱۳۸۱) در استفاده از زئولیت طبیعی می‌باشد، با این حال پس از گذشت ۲۴ ساعت غلظت آمونیاک به صفر نرسید. این امر ثابت می‌کند اگر چه حرارت‌دهی مکرر و اشباع سازی زئولیت در محلول نمک کارایی زئولیت را بالا می‌برد، با این حال قادر نبود آمونیاک را بطور کامل از محیط جذب کند.

آزمایشات بافت‌شناسی نشان داد که استفاده از زئولیت‌ها در کاهش مسمومیت و تلفات ناشی از آن بسیار موثر است. در ماهیانی که در معرض زئولیت قرار داشتند، هیچگونه ضایعه‌ای مشاهده نشد. این امر کارآیی کامل زئولیت را در جلوگیری از تلفات ماهی در مسمومیت با آمونیاک نشان می‌دهد. پیغان (۱۳۷۸) و فرهنگی و همکاران (۱۳۸۱) در آزمایشات خود نشان دادند، ماهیانی که در معرض غلظت کشنده آمونیاک و زئولیت قرار داشتند هیچگونه ضایعه‌ای مشاهده نشد. آنچه که از آزمایش حاضر برمی‌آید فرآیند غنی‌سازی زئولیت‌های طبیعی قبل از

بکارگیری، اثر بخشی بهتر را نشان می‌دهد.

منابع

۱-اسووبودا، ز.د. و ویکوسووا ، ب.، ۱۹۹۱. تشخیص، پیشگیری و درمان بیماریها و مسمومیت‌های ماهی. ترجمه: مصطفی شریف روحانی، ۱۳۷۴. معاونت تکثیر و پرورش آبزیان . انتشارات سبز رویش . ۲۵۶ صفحه.

۲-پیغان، ر.، ۱۳۷۸. بررسی تجربی مسمومیت حاد با آمونیاک در کپور معمولی براساس تغییرات هیستوپاتولوژیک و آنزیم‌های سرمی و امکان پیشگیری آن با زئولیت. پایان نامه دکتری تخصصی بهداشت و بیماریهای آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران، اهواز. ۱۰۴ صفحه.

۳-چالکش امیری، م.، ۱۳۷۸. اصول تصفیه آب. انتشارات نشر اردکان اصفهان . ۴۴۲ صفحه.

۴-فرهنگی، م.؛ کمالی، ا. و حاجی مرادلو، ع.م.، ۱۳۸۱. بررسی نقش زئولیت طبیعی درکاهش مسمومیت با آمونیاک در قزل‌آلای رنگین کمان. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، سال دهم، شماره ۲، صفحات ۱۹۵ تا ۲۰۳.

5-Ackley, M.W.; Rege, S.U. and Saxena, H., 2003. Application of natural zeolites in the purification and separation of gases. Microporous and Mesoporous Materials, 61:25–42.

6-Boranic, M., 2001. The effect of the zeolite clinoptilolite on serum chemistry and hematopoiesis in mice. Food Chem. Toxicol., Vol. 39, No. 7, pp.717-727.

7-FAO, 2007. The state of word fisheries and aquaculture. FAO Fisheries and Aquaculture Department. Rome, Italy. 180P.

8-Frias Espericueta, MG. 1999. Acute toxicity of ammonia to juvenile shrimp *penaeus vannamei* Boon. Bull. Envier. Cont. Toxicol., 62:646-652.

9-Huang, H.; Xiaoa, X.; Yana, B. and Yanga, L., 2010. Ammonium removal from aqueous solutions by using natural Chinese (Chende) zeolite as adsorbent. J. Hazardous Materials, Vol. 175, No. 1-3, pp.247-252.

10-James, R.; Sampath, K. and Selvanami, P., 2000. Effect of ion-exchanging agent, zeolite on removal of copper in water and improvement of growth in *Oreochromis mossambicus*. Asian Fish. Sci., 13:317-325.

11-Keith, F., 1981. The encyclopedia of mineralogy. Hutchinson Ross Publishing Company. USA. pp.523-530.

12-Knoph, M.B., 1996. Gill ventilation frequency and mortality of Atlantic salmon (*salmo salar)* exposed to higher ammonia levels in seawater. Water Res., Oxford, London, UK., 30:837-842.

13-Miladinovica, N. and Weatherleyb, L.R., 2008. Intensification of ammonia removal in a combined ion-exchange and nitrification column. Chem. Eng. J., Vol. 135, No. 1-2, pp.15-24.

14-Muir, J.F., 1982. *In*: (J.C. Chen ed., 1992), Recirculated water system in aquaculture. pp.249-260.

15-Mumpto, F.A. and Fishman, P.H., 1977. The application of natural zeolites in animal science and aquaculture. J. Anim. Sci., 45:1188-1203.

16-Sajid, A. and Javed, M., 2006. Studies on acute toxicity of metals to the fish *Catla catla.* Pakistan J. Biol. Sci., Vol. 9, No 9, pp.1807-1811.

17-Thurston, R.V., Russo, R.J., Luedtke, R.J., Smith, C.E., Meyn, E.L., Chakoumalos, C., Wang, K.C. and Brown, D., 1984. Chronic toxicity of ammonia to rainbow trout. Trans. Amer. Fish Soc. 113:56–73.

فصلنامه علمی - پژوهشی محیط زیست جانوری

Using enriched-zeolite to increase survival rate of rainbow trout fingerlings (*Oncorhynchus mykiss*) in toxicity test with ammonia in emphasis to improve environmental conditions

- **Mohammad Farhangi*:** Faculty members of Gonbad University
- **Mahan Salamroodi:** Department of Fisheries and Natural Resources of Guilan University, Sowmeh Sara, Iran

Receive: August 2011 Accepted: January 2012

Keywords: Ammonia, Gill, Enriched-zeolite, Toxicity, Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*

Abstract

The experiment was done during 24 hours in laboratory conditions. Fifteen fishes with mean weight of 52±4g and total length of 21±3cm exposed to lethal concentration of total ammonia (N-NH_4) under stable conditions. For zeolite enrichment, zeolites frequently were exposed to solution of 10% NaCl and temperature of 90ºC for 30 minute. In lethal concentration of ammonia (25mg/l), amount of 1, 3, 5, 7, 8g/l enriched–zeolite was used. The results showed, there was significant difference between treatments ($P<0.05$). Using 8g/l enriched–zeolite could prevent mortality of fishes. Behavioral symptoms were investigated during tests. Samples were taken from gill of fishes and histopathological sections were prepared. The major lesions in the gills were hemorrhage, hyperplasia, edema and epithelial cells necrosis.

*Corresponding author's email: s.farhangi@yahoo.com