تعیین غلظت نیمه کشنده آمونیاک (LC_{50} 96h, $N\text{-}NH_4$) در ماهی قره‌برون (*Acipenser persicus*) و فیل ماهی (*Huso huso*) تحت شرایط آزمایشگاهی

• **محمد فرهنگی:** گروه منابع طبیعی دانشگاه گنبد، صندوق پستی: ۱۶۳

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۸۹ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۸۹

چکیده:

به منظورتعیین غلظت نیمه‌کشنده آمونیاک ($N\text{-}NH_4$, 96h) در ماهی قره‌برون و فیل ماهی آزمایشاتی اجرا گردید که در آن ۱۲ عدد بچه ماهی قره برون با میانگین وزنی ۲۶ گرم (۳±۲۶ گرم) و ۱۵ عدد فیل‌ماهی با میانگین وزنی ٤٦ گرم (٥±٤٦) در معرض غلظت‌های مختلفی از آمونیاک کل ($N\text{-}NH_4$) قرار گرفتند. آزمایشات در دو مرحله و به روش آب ساکن به مدت ۹٦ ساعت اجرا شد. یک گروه هم بعنوان شاهد در نظر گرفته شد. تحت شرایط ثابت دما و pH، غلظت آمونیاک کل ($N\text{-}NH_4$) بترتیب برابر ۳۵ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر برای قره‌برون و فیل‌ماهی بدست آمد. با استفاده از شیب خط رگرسیون و منحنی درصد تلفات غلظت نیمه‌کشنده آمونیاک کل در مدت ۹٦ ساعت بترتیب برابر با ۱۸/٦٥ و ۲۹/۲۲ برای قره‌برون و فیل ماهی بدست آمد. نتایج حاصل از آزمایشات اختلاف معنی‌داری را در بین گروهها نشان داد ($P<0.05$). مطالعات آسیب‌شناسی بافت‌های تهیه شده از آبشش ماهیانی که در معرض غلظت کشنده آمونیاک کل قرار داشتند، بیانگر پرخونی، خونریزی، هیپرپلازی راس رشته‌های آبششی بود. نتایج حاصل از آزمایش نشان داد تخریب بافت آبششی در ماهی قره‌برون نسبت به فیل ماهی از شدت کمتری برخوردار بود.

لغات کلیدی: آسیب‌شناسی، آمونیاک، غلظت کشنده، فیل ماهی، قره برون

مقدمه

ماهی قره‌برون یا تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) و فیل‌ماهی یا بلوگا (*Huso huso*) متعلق به خانواده تاسماهیان (Acipenseridae) از راسته تاسماهی شکلان (Acipenseriforms) می‌باشد. این ماهیان از گونه‌های با ارزش شیلاتی می‌باشند که متاسفانه با وجود آلودگی آب و از بین رفتن جایگاههای تخمریزی، نسل این ماهیان در حال انقراض است. سالانه هزینه‌های هنگفتی صرف ازدیاد نسل این ماهیان می‌گردد. شاید یکی از مشکلات عمده بر سر راه تکثیر این ماهیان عدم کنترل کیفیت آب می‌باشد. ماهیان دو ماده سمی را در آب دفع می‌کنند که شامل دی اکسیدکربن (CO_2) و آمونیاک (NH_4) است (۵). این ترکیب سمی اثرات مستقیمی بر رشد و افزایش بیماریها و نهایتاً مرگ و میر موجودات آبزی دارد (۴). با توجه به اهمیت مسمومیت ماهی با آمونیاک و تلفات ناشی از آن در سیستم‌های پرورشی، لزوم یافتن روشی جهت بهبود تلفات ماهی ضروری بنظر می‌رسد. هدف از این تحقیق تعیین غلظت نیمه کشنده و کشنده آمونیاک و بررسی مسمومیت حاد با آمونیاک ($N\text{-}NH_4$, 96h) در ماهی قره‌برون (*Acipenser persicus*) و فیل‌ماهی (*Huso huso*) می‌باشد.

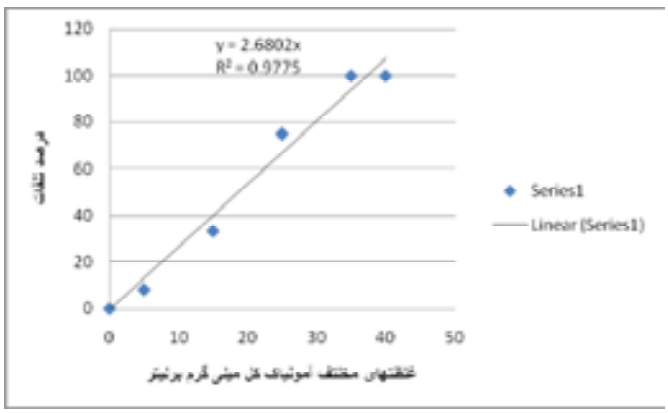
*پست الکترونیکی نویسندهٔ مسئول: s.farhangi@yahoo.com

مواد و روش کار

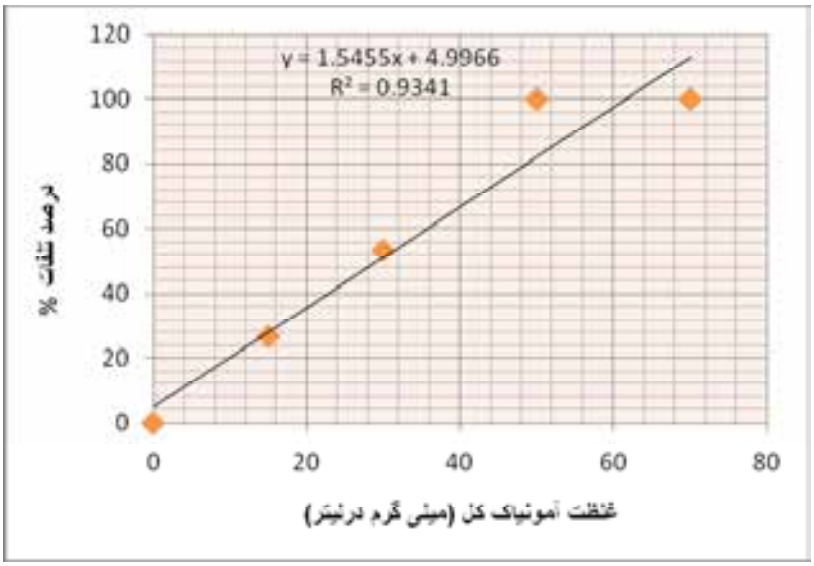
تحقیق حاضر در کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید مرجانی آق‌قلا واقع در استان گلستان صورت گرفت. آزمایشات به روش آب ساکن (Static Method) در مدت ۹۶ ساعت تحت شرایط آزمایشگاهی (*In vitro*) در دو مرحله اجرا شد. ۱۲ عدد از بچه ماهی قره‌برون با میانگین وزنی ۲۶ گرم (۳±۲۶ گرم) و ۱۵ عدد فیل‌ماهی با میانگین وزنی ۴۶ گرم (۵±۴۶) در ظروف آزمایش با حجم ۳۵ لیتر آب نگهداری شدند. شرایط آزمایش (pH = ۸/۲ و دمای ۲۶ درجه سانتیگراد) در طول مدت اجرا ثابت در نظر گرفته شد. از سنگ هوا بعنوان هواده در آزمایشات استفاده شد. غلظت‌هایی از آمونیاک کل ($N\text{-}NH_4$) برای قره‌برون (صفر، ۵، ۱۵، ۲۵ و ۳۵ میلی‌گرم در لیتر) و فیل‌ماهی (صفر، ۱۵، ۳۰، ۵۰ و ۳۵ میلی‌گرم در لیتر) در نظر گرفته شد. غلظت نیمه کشنده آمونیاک کل بعد از ۹۶ ساعت (LC_{50} 96h) بدست آمد. علائم ظاهری مسمومیت حاد با آمونیاک در ماهی ثبت گردید. به منظور بررسی اثرات مسمومیت حاد با آمونیاک از آبشش ماهیانی که در معرض غلظت کشنده آمونیاک کل قرار داشتند، مقاطع بافتی تهیه شد. آزمایشات با استفاده از طرح کاملاً تصادفی متعادل اجرا و در نرم‌افزار Minitab 14 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج

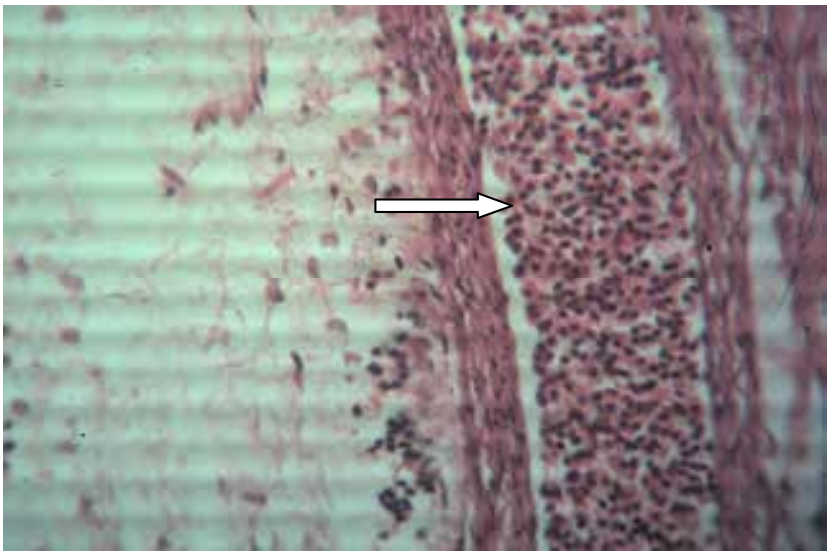
در غلظت‌های ۳۵، ۲۵، ۱۵، ۵، ۰ میلی‌گرم بر لیتر آمونیاک کل ($N\text{-}NH_4$) درصد تلفات برای قره‌برون بترتیب برابر با ۱۰۰ و ۷۵/۰۰، ۳۳/۳۳، ۸/۳۳ و صفر بدست آمد (نمودار ۱). همچنین در غلظت‌های ۷۵ و ۵۰، ۳۰، ۱۵ و صفر میلی‌گرم در لیتر آمونیاک کل درصد تلفات برای فیل‌ماهی بترتیب برابر با ۱۰۰ و ۱۰۰، ۵۳/۳۳، ۲۶/۶۶ و صفر بدست آمد (نمودار ۲). آزمایشات نشان داد با افزایش مقادیر آمونیاک به آب، نرخ مرگ و میر بطور معنی‌داری افزایش می‌یابد ($P<0.05$) . تحت شرایط ثابت دما و pH غلظت کشنده آمونیاک بعد از ۹۶ ساعت بترتیب برابر با ۳۵ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر برای قره‌برون و فیل‌ماهی بدست آمد. با استفاده از منحنی درصد تلفات ماهی در غلظت‌های مختلف آمونیاک کل و شیب خط رگرسیون غلظت نیمه کشنده آمونیاک (Sub-lethal Concentration) بترتیب برابر با ۱۸/۶۵ و ۲۹/۲۲ میلی‌گرم بر لیتر برای قره‌برون و فیل‌ماهی بود (نمودارهای ۱ و ۲). نتایج حاصل از آزمایشات نشان داد، بیشترین درصد تلفات ماهی با اضافه کردن آمونیاک به آب در ساعات اولیه رخ داد. درگروه شاهد تلفاتی مشاهده نشد. علائم ظاهری مسمومیت حاد با آمونیاک در هر دو گروه از ماهیان شامل تشنجات عصبی، شنای وارونه، به سطح آمدن ماهی و بلعیدن هوا از سطح آب می‌باشد. مطالعات آسیب‌شناسی آبشش ماهیانی که در معرض غلظت کشنده آمونیاک کل قرار داشتند، نشان داد بیشترین ضایعات شامل پرخونی (Hyperemia)، خونریزی (Hemorrhage)، ادم (Edema) بود (اشکال ۳، ۴، ۵ و ۶).



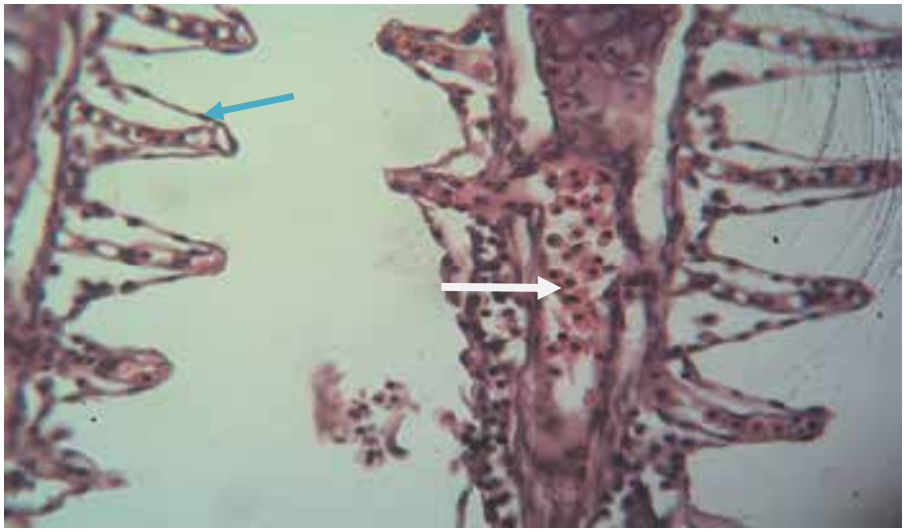
نمودار ۱: منحنی خط رگرسیون درصد تلفات ماهی در غلظت‌های مختلف آمونیاک کل (میلی‌گرم در لیتر) در ماهی قره‌برون



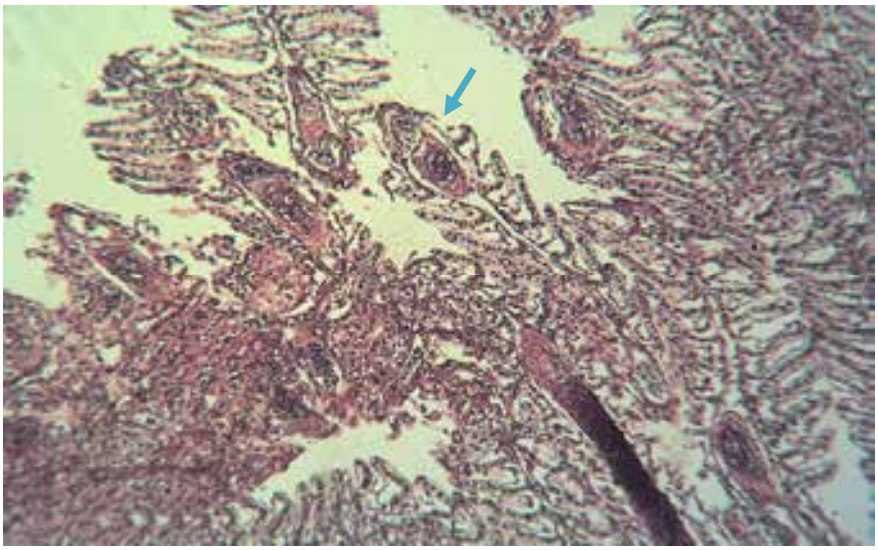
نمودار ۲: منحنی خط رگرسیون درصد تلفات ماهی در غلظت‌های مختلف آمونیاک کل (میلی‌گرم در لیتر) در فیل‌ماهی



شکل ۱: آبشش ماهی قره‌برون در غلظت کشنده آمونیاک
پیکان پرخونی را نشان می‌دهد (H & E ×٤٠٠)



شکل ۲ : آبشش ماهی قره‌برون در غلظت کشنده آمونیاک.
نوک پیکان سمت راست خونریزی و پیکان سمت چپ ادم را نشان می‌دهد (H & E ×٤٠٠)



شکل ۳: آبشش فیل ماهی درغلظت کشنده آمونیاک. نوک پیکان چماrای شدن راس رشته‌های آبشش را نشان می‌دهد
(H & E ×۲۰۰)

شکل ٤: آبشش تهیه شده از فیل‌ماهی در غلظت کشنده آمونیاک.
نوک پیکان چماقی شدن راس رشته‌های آبشش را نشان می‌دهد (H & E ×۲۰۰)

بحث

مطالعه حاضر به منظور بررسی کارآیی زئولیت کلینوپتیلولیت در کاهش تلفات ناشی از مسمومیت حاد با آمونیاک ($N\text{-}NH_4$, 96h) در ماهی قره‌برون (*Acipenser persicus*) و فیل‌ماهی (*Huso huso*) اجرا شد. تاکنون اطلاعاتی درخصوص سمیت با آمونیاک در ماهیان خاویاری گزارش نشده است. از آنجا که ماهیان خاویاری از اهمیت ویژه‌ای برای کشور برخوردارند و سالانه هزینه‌های هنگفتی برای افزایش ذخایر تاسماهیان دریای خزر صورت می‌گیرد، بهبود درصد بقاء ماهیان بسیار اهمیت دارد.

مطالعات مختلف علائم مسمومیت با آمونیاک را در انواع گونه‌های ماهیان بصورت تشنجات عصبی، بلیعدن هوا از سطح، بیرون پریدن ماهی از آب، افزایش شدت تنفس و باز و بسته شدن سریع سرپوش‌های آبششی، به عمق رفتن ماهی و نهایتاً مرگ ماهی بیان می‌کند (۱، ۶ و ۷). آزمایشات فوق نیز صحت مطالب گفته شده را تایید می‌کند. بطوریکه با افزودن کلرید آمونیوم به ظروف آزمایشی، علائم مسمومیت بویژه در ساعات اولیه به چشم خورد. تحقیقات مختلف نشان می‌دهد، غلظت‌های کشنده آمونیاک برای انواع ماهیان وابسته به گونه، سن و فاکتورهای محیطی است. غلظت کشنده بدست آمده در این تحقیق برای ماهی قره‌برون ۳۵ میلی‌گرم در لیتر و فیل‌ماهی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر در مقایسه با غلظت بدست آمده برای ماهی کپور ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر و ماهی قزل‌آلا ۲۵ میلی‌گرم در لیتر تحت شرایط آزمایشگاهی مختلف بیانگر این امراست (۱ و ۶).

آزمایشات مختلف و تحقیق حاضر نشان داد، بیشترین درصد تلفات در ساعات اولیه آزمایش رخ داد. با وجود آنکه ماهیان از وزن یکسانی برخودار بودند، شاید دلیل این امر را بتوان به ساختار ژنتیکی والدین نسبت داد (۱). در حقیقت آمونیاک گازی سمی و استرس‌زا است. سمیت آمونیاک نتیجه وجود مولکول آمونیاک غیریونیزه است ($N\text{-}NH_3$). این مولکول قادر است به راحتی از اجزاء سلولی عبور کند (۴). میزان آمونیاک غیریونیزه و آمویناک یونیزه تابعی از درجه حرارت و pH است. علاوه برآن تابعی از چرخه روزانه pH و دی اکسیدکربن است (۳). تحت شرایط قلیایی میزان آمونیاک غیریونیزه بتدریج افزایش می‌یابد. دلایل مختلفی برای مرگ و میر ماهیان می‌توان بیان کرد.

تخریب لوله‌های کلیوی و گلومرل‌ها که عمل کلیه را مختل می‌سازد (۶). از طرفی با توجه به تمایل ویژه آمونیاک به مغز، می‌توان دلیل تشنجات عصبی را در مختل شدن فعالیتهای بیوشیمیایی مغز بیان نمود (۲). در بررسی‌های بعمل آمده از آبشش تهیه شده از ماهیانی که در معرض غلظت کشنده آمونیاک کل قرار داشتند، ضایعات مسمومیت بصورت پرخونی، خونریزی، ادم و هیپرپلازی در راس رشته‌های آبشش بوضوح دیده می‌شد. هر چند باید توجه داشت که در سیستم‌های پرورش ماهی عوامل مختلفی مانند متان، سولفید هیدروژن، کمبود اکسیژن و دی اکسید کربن سمیت آمونیاک را تشدید می‌کنند. غلظت بدست آمده در این آزمایش در شرایط بهینه می‌باشد. بنابراین در طبیعت و تحت شرایط پرورشی مقادیر کمتری از آمونیاک می‌تواند باعث تلفات شدید در ماهی شود.

منابع

۱-پیغان، ر.، ۱۳۷۸. بررسی تجربی مسمومیت حاد با آمونیاک در کپور معمولی براساس تغییرات هیستوپاتولوژیک و آنزیمهای سرمی و امکان پیشگیری آن با زئولیت. پایان‌نامه دکتری تخصصی بهداشت و بیماریهای آبزیان، دانشکده دامپزشکی. ۱۰۴ صفحه.

۲-شریف‌روحانی، م.، ۱۳۷۴. تشخیص، پیشگیری و درمان بیماریها و مسمومیتهای ماهی. معاونت تکثیر و پرورش آبزیان. انتشارات سبز رویش. ۲۵۶ صفحه.

1-Chen, J.C., 1992. Effects of ammonia on growth and molting of *penaeus japonicus* juveniles. Aquaculture, 104:249-260.

2-Colt, J., 2006. Water quality requirements for reuse systems. Aquacultures Engineering, 34:143-156.

3-Eshchar, M.; Lahav, O.; Mozes, N.; Peduel, A. and Ron, B., 2006. Intensive fish culture at high ammonia and low pH. Aquaculture, 255:301-313.

4-Farhangi, M., 2010. *In vitro*, determination of sub-lethal concentration of UN–ionized ammonia nitrogen ($N\text{-}NH_3$) on rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss)*. 2nd International Congress on Aquatic Animal Health Management and Disease, October, 26-27, 2010, Tehran, Iran.

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