



دانشگاه گنبد کاووس

نشریه "پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی"

دوره سوم، شماره اول، بهار ۹۴

<http://jair.gonbad.ac.ir>

## اثر مواجهه طولانی مدت غلظت‌های تحت کشنده آمونیاک غیر یونیزه بر شاخص‌های رشد و خون‌شناسی بچه‌ماهیان کلمه خزری (*Rutilus caspicus* (Yakovlev, 1870)

محمد مازندرانی<sup>\*</sup>، محمد سوداگر<sup>۱</sup> و حمیده ذکریایی<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup>استادیار گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران  
<sup>۲</sup>دانشیار گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران  
 دانش آموخته کارشناسی ارشد شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ ارسال: ۹۴/۳/۱۱ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۴/۵/۶

### چکیده

تجمع آمونیاک در استخرهای خاکی همواره یکی از مشکلات پرورش ماهی بوده که اجتناب ناپذیر است. در این تحقیق حساسیت ماهی کلمه به مواجهه مزمن با دوز تحت کشنده آمونیاک مولکولی مورد بررسی قرار گرفته است. به این منظور دو گروه تیمار و یک گروه شاهد (هر کدام در ۳ تکرار) در نظر گرفته شد. ماهیان در گروه‌های آزمایش به ترتیب با غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۰۲ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک مولکولی (NH<sub>3</sub>) در یک دوره ۱ ماهه پرورش مورد مواجهه قرار داده شدند. هیچ مواجهه‌ای با آمونیاک در ماهیان گروه شاهد صورت نگرفت. بر اساس نتایج این بررسی مقادیر فاکتورهای رشد در ماهیان مواجهه شده با غلظت ۰/۲ mg/l به طور معنی‌داری در مقایسه با ماهیان گروه شاهد و مواجهه شده با دوز ۰/۰۲ mg/l پایین‌تر محاسبه گردید (p ≤ ۰/۰۵). در بررسی‌های خون‌شناسی نیز مقادیر هموگلوبین، هماتوکریت، MCH و MCHC برای ماهیان مواجهه شده با غلظت ۰/۲ mg/l آمونیاک غیر یونیزه پایین‌تر از سایر گروه‌ها ثبت گردید. در عین حال مقادیر MCV خون در این ماهیان بالاتر از خون ماهیان گروه شاهد و مواجهه شده با غلظت ۰/۲ mg/l آمونیاک بود. بر اساس نتایج بررسی حاضر مقدار ۰/۲ mg/l آمونیاک مولکولی اگرچه منجر به تلفات در ماهی کلمه نمی‌شود اما برای فاکتورهای رشد و خون‌شناسی ماهی مذکور می‌تواند غلظت آسیب‌رسان تلقی شود. در عین حال مواجهه طولانی مدت با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک مولکولی تأثیری بر فاکتورهای رشد و خون‌شناسی بچه-ماهیان کلمه نداشته است.

واژه‌های کلیدی: *R. caspicus*، استخر خاکی، آمونیاک، مواجهه تحت حاد

<sup>\*</sup>نویسنده مسئول: [mazandarani@gau.ac.ir](mailto:mazandarani@gau.ac.ir)

## مقدمه

محصول نهایی متابولیسم ترکیبات آلی نیتروژنه در ماهیان و بسیاری از موجودات به صورت آمونیاک است که در محیط آبی تمایل زیادی به یونیزه شدن دارد. این ترکیب به دو صورت شکل مولکولی یا آمونیاک ( $\text{NH}_3$ ) و فرم یونیزه یا آمونیوم قابل مشاهده است و همواره امکان تبدیل این دو شکل به یکدیگر تحت شرایط محیطی وجود دارد. بدین صورت که با افزایش دما و pH میزان شکل‌گیری آمونیاک از آمونیوم افزایش می‌یابد (Robert *et al.*, 1997). آمونیاک مولکولی بر خلاف آمونیوم به دلیل قابلیت نفوذپذیری بسیار بالا از طریق اپیتلیوم آبشش ماهیان و اثرات سمی بر سیستم عصبی و دستگاه گردش خون به شدت مسمومیت‌زا است و در مقادیر حاد از کشندگی بالایی برخوردار است (Shingles, 2001). در استخرهای پرورشی ماهیان معمولاً ورود و خروج آب تحت کنترل بوده و در بسیاری موارد به دلایل مختلف (از جمله کمبود منابع آبی در دسترس و یا کنترل آلودگی‌های انگلی و...) با محدودیت‌هایی همراه است. در نتیجه شرایط مواجهه با غلظت آسیبرسان آمونیاک معمولاً در استخرهای پرورش متراکم با مدیریت نامناسب و یا استخرهای با عدم تعویض آب قابل مشاهده است (Wickins and Lee, 2002; Colt and Armstrong, 1981; Motnikar *et al.*, 1998). فرآوانی در رابطه با اثرات مسمومیت حاد با آمونیاک در ماهیان مختلف صورت گرفته است که نشان دهنده عوارض بسیار شدید بر رشد و بازماندگی ماهیان گوناگون است که بر اساس این بررسی‌ها میزان حساسیت ماهیان مختلف به این ماده سمی نیز بسیار متفاوت گزارش شده است (Ruffier *et al.*, 1991; Handy and Poxton, 1993; Wajsbro *et al.*, 1991). در عین حال مقادیر تحت حاد و غیر کشنده این ماده اگر چه ایجاد تلفات نمی‌کند اما قادر است فاکتورهای رشد و یا تولیدمثلی ماهیان را به شدت تحت تأثیر قرار دهد (Lemarie *et al.*, 2004). در یک سیستم پرورش آبزیان احتمال مواجهه در ماهیان با غلظت‌های تحت کشنده بسیار محتمل‌تر از غلظت‌های کشنده است به خصوص در شرایطی که تعویض آب به‌خوبی صورت نپذیرد. در بررسی‌های متعدد حد مجاز غیر آسیبرسان آمونیاک برای ماهیان مختلف در دامنه گسترده‌ای بین ۰/۲ تا ۰/۰۰۵ میلی‌گرم در لیتر عنوان شده است (Handy and Poxton, 1993; Ruffier *et al.*, 1981). در عین حال گزارشاتی در برخی ماهیان وجود دارد که بر اساس آن اگر چه مواجهه طولانی مدت با غلظت‌های بسیار پایین آمونیاک منجر به آسیب‌های بافتی و کاهش رشد نگردیده است اما در فاکتورهای رشد گنبدی اثرات منفی داشته است (Siikavuopio *et al.*, 2004). بنابراین دانستن میزان حساسیت ماهیان به آمونیاک در سیستم پرورش به‌خصوص در پرورش متراکم، در مدیریت هرچه بهتر پرورش بسیار ضروری است.

ماهی کلمه (*R. caspicus*) یکی از ماهیان با ارزش اقتصادی دریای خزر است که در سال‌های اخیر روند صید آن از دریا به شدت کاهش یافته است. به همین دلیل سازمان شیلات ایران سالیانه اقدام به

تکثیر مصنوعی مولدین و پرورش بچه‌ماهیان این گونه تا مرحله انگشت قد و رهاسازی در رودخانه‌های منتهی به دریا می‌نماید (Iranian Fisheries Statistical Yearbook, 2013). در عین حال محبوبیت فراوان این ماهی در بین مصرف‌کنندگان در سال‌های اخیر سبب گردید تا پرورش تجاری این ماهیان در استخرهای خاکی نیز مورد بررسی و استقبال قرار گیرد (Piri *et al.*, 2013). با توجه به کمبود منابع آبی در ایران، استخرهای خاکی ماهیان گرمابی در کشور معمولاً در طی سال پس از آب‌گیری ابتدایی تعویض آب اندکی صورت می‌گیرد. به همین دلیل احتمال تجمع آمونیاک در این استخرها اجتناب ناپذیر است. با توجه به اینکه پرورش تجاری ماهی کلمه در استخرهای خاکی بسیار نو پا است و اطلاعاتی از وضعیت حساسیت این ماهیان به آمونیاک محیط و اثرات آن بر فاکتورهای رشد و پرورش در دست نیست، لذا در این بررسی وضعیت اثرات مزمن آمونیاک بر فاکتورهای رشد و پارامترهای خون‌شناسی در یک دوره ۳۰ روزه پرورش مورد بررسی قرار گرفته است.

## مواد و روش‌ها

**تهیه بچه ماهی و طرح آزمایش:** به منظور بررسی اثرات مواجهه مزمن آمونیاک تعداد ۲۷۰ ماهی بچه‌ماهی کلمه حاصل از مولدین دریایی با میانگین وزنی  $5/1 \pm 1$  گرمی در نظر گرفته شد. ماهیان مذکور در ۹ تانک فایبرگلاس با حجم آب ۳۰۰ لیتر تقسیم شدند (۳۰ ماهی در هر تانک). به منظور سازش ماهیان با شرایط جدید، به مدت ۲ هفته با غذای تجاری (Biomar Co – France) مورد تغذیه قرار گرفتند. غذادهی به میزان ۳٪ بیوماس ماهیان و دو بار در روز صورت گرفت. این آزمایش با یک گروه شاهد و دو گروه تیمار هر کدام در سه تکرار انجام شد. ماهیان دو گروه تیمار به مدت ۳۰ روز به ترتیب با غلظت‌های مزمن ۰/۲ و ۰/۰۲ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک مولکولی مورد پرورش قرار گرفتند. جهت انتخاب غلظت مزمن ابتدا در یک آزمایش اولیه، میزان حساسیت ماهیان به آمونیاک محاسبه گردید و ۱۰ درصد غلظت میانه کشنده آمونیاک غیر یونیزه برای بچه ماهیان کلمه در حدود  $0/2 \text{ mg/l}$  تعیین شد. در گروه شاهد هیچ مواجهه‌ای با آمونیاک مولکولی صورت نگرفته و آمونیاک آب گروه شاهد در طی دوره پرورش ۰/۰۰۵ میلی‌گرم در لیتر اندازه‌گیری شد. در طی دوره آزمایش دمای آب پرورش  $26 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول  $(\text{mg/l}) 6/2 \pm 1$  و سختی کل  $(\text{mg/l}) 271 \pm 3$  ثبت گردید. به منظور مواجهه با آمونیاک از محلول کلرید آمونیوم ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) محصول شرکت مرک (Merk Co., Germany) استفاده شد. پس از اضافه نمودن آمونیاک به آب، دما و pH در شرایط ثابت تثبیت گردید به منظور کنترل pH از محلول KOH یک دهم نرمال استفاده شد و pH در حدود ۸ ثابت گردید. محلول آمونیاک مورد نیاز برای هر تیمار به صورت روزانه آماده شده و حداقل ۲ ساعت بعد از آماده‌سازی تعویض آب صورت پذیرفت. پس از محاسبه دقیق آمونیاک کل با در نظر گرفتن دما و pH

بر اساس جدول استاندارد توضیح داده شده توسط امرسون و همکاران (Emerson *et al.*, 1975)، میزان آمونیاک یونیزه شده و آمونیاک مولکولی به‌طور دقیق محاسبه گردید. تعویض کامل آب تمام و نیروها به‌صورت روزانه و پس از غذادهی عصرگاهی انجام گرفت. همزمان در گروه‌های تیمار میزان غلظت آمونیاک محاسبه و آماده گردید.

**آنالیز شاخص‌های رشد:** شاخص‌های رشد بر اساس زیست‌سنجی پایان دوره محاسبه شد. به این منظور در پایان دوره آزمایش، از هر تانک ۲۰ ماهی به‌طور کاملاً تصادفی مورد ارزیابی قرار گرفت. ماهیان مذکور توسط محلول ۱۰۰ ppm یوجینول (Sigma Co. USA) بیهوش شدند، برای اندازه‌گیری وزن از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۱ گرم و برای اندازه‌گیری طول ماهیان از خط‌کش با دقت ۱ میلی‌متر استفاده شد.

براساس اطلاعات ثبت شده شاخص‌های رشد شامل: افزایش وزن بدن (WG)، نرخ رشد ویژه (SGR)، نرخ رشد روزانه (GR)، درصد افزایش وزن (%BWI)، عامل وضعیت (CF)، ضریب تبدیل غذایی (FCR) و درصد بازماندگی (SR) براساس معادلات ریاضی زیر محاسبه شدند (Turchini *et al.*, 2003).

$$WG \text{ (weight gain, \%)} = 100 \times (BW_f - BW_i) / BW_i$$

$$SGR \text{ (specific growth rate, \% day}^{-1}\text{)} = 100 \times (\ln(BW_f) - \ln(BW_i)) / T$$

$$GR \text{ (growth rate)} = (BW_f - BW_i) / T$$

$$\%BWI \text{ (body weight index)} = (BW_f - BW_i) / BW_i \times 100$$

$$CF \text{ (condition factor)} = (BW / L^3) \times 100$$

$$FCR \text{ (feed conversion rate)} = \text{g feed intake} / (BW_f - BW_i)$$

$$SR \text{ (survival rate)} = N_2 / N_1 \times 100$$

در این روابط  $BW_i$  = وزن ابتدایی (گرم)،  $BW_f$  = وزن نهایی (گرم)،  $T$  = زمان پرورش (روز)،  $L$  = طول کل (سانتی‌متر)،  $N_2$  = تعداد ماهیان زنده پایان دوره،  $N_1$  = تعداد ماهیان زنده ابتدای دوره در نظر گرفته شد.

**بررسی‌های خون‌شناسی:** جهت بررسی خون‌شناسی ماهیان تحت مطالعه، در پایان دوره توسط محلول ۱۰۰ ppm یوجینول (Sigma Co. USA) بیهوشی و خون‌گیری صورت گرفت. به این منظور از سرنگ آغشته شده هیپارین با سرسوزن شماره (gage) ۲۵ استفاده شده و خون‌گیری از ساقه دمی ماهیان انجام گرفت و ماهیان پس از خون‌گیری جهت ریکاوری به ونیروهای ۳۰۰ لیتری منتقل شدند. نمونه‌های خون بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه برای اندازه‌گیری تعداد گلبول‌های قرمز (RBC) و تعداد گلبول‌های سفید (WBC) از لام نئوبار استفاده شد. نمونه‌های خون به نسبت ۱۰۰ برابر با محلول دیس (Deice) رقیق شده و بر اساس روش استاندارد روتین شمارش سلولی صورت پذیرفت (Dacie and Lewis, 2001). هماتوکریت توسط روش استاندارد میکروهماتوکریت انجام شده و به‌صورت درصد بیان شد. مقدار هموگلوبین در این آزمایش توسط روش سیانومت هموگلوبین و با کیت

تجاری پارس آزمون اندازه‌گیری شد (Blaxhall and Daisley, 1973). اندیس‌های خونی حجم متوسط گلبولی (MCV)، وزن هموگلوبین داخل گلبولی (MCH) و غلظت هموگلوبین داخل گلبولی (MCHC) بر اساس روش دایس و لويس (Dacie and Lewis, 2001) محاسبه گردید. جهت شمارش افتراقی گلبول‌های سفید، نمونه‌ها پس از تهیه گسترش خونی و فیکس کردن با متانول توسط رنگ گیمسا رنگ‌آمیزی شدند و افتراق سلولی بر اساس ساختار و شکل سلولی صورت گرفت (Rowley, 1990).  
**آنالیزهای آماری:** جهت بررسی آماری نتایج نهایی از نرم افزارهای SPSS18 و Excel استفاده شد. پس از بررسی‌های آماری نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد بیان گردید. در آنالیز داده‌ها جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون آماری آنوای یک‌طرفه و تست دانکن استفاده شد.

### نتایج

همان‌گونه که در جدول ۱ آمده است اختلاف معنی‌داری در بازماندگی ماهیان گروه تیمار و شاهد مشاهده نشد. بر اساس نتایج این مطالعه، اگرچه آمونیاک مزمن بر بازماندگی ماهیان تحت پرورش تأثیری نداشته اما در تیمار مواجهه شده با ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک مولکولی (تیمار ۲)، فاکتورهای رشد به‌طور معنی‌داری کمتر از تیمار مواجهه شده با غلظت ۰/۰۲ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک مولکولی (تیمار ۱) و گروه شاهد ثبت گردید، اما در عین حال مواجهه با آمونیاک مولکولی در غلظت ۰/۰۲ میلی‌گرم در لیتر در مقایسه با گروه شاهد هیچ تأثیری در تمامی فاکتورهای رشد مورد مطالعه نداشت (جدول ۱). در این بررسی در رشد طولی ماهیان گروه‌های تیمار و شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد اما این اختلاف در میزان وزن‌گیری ماهیان گروه تیمار ۱ در مقایسه با ماهیان گروه شاهد و تیمار ۲ معنی‌دار بود. در نتیجه فاکتور وضعیت (CF) نیز در ماهیان گروه تیمار ۱ پایین‌تر از گروه‌های شاهد و تیمار ۲ ثبت شد. همچنین در این بررسی ضریب تبدیل غذایی (FCR) به‌طور معنی‌داری در ماهیان تیمار ۱ بالاتر از ماهیان گروه تیمار ۲ و شاهد اندازه‌گیری شد در عین حال این فاکتور در ماهیان گروه شاهد و تیمار ۲ دارای اختلاف معنی‌دار نبود. همچنین درصد افزایش وزن بدن، افزایش وزن روزانه و ضریب رشد ویژه به‌طور معنی‌داری در تیمار ۱ پایین‌تر از ماهیان تیمار ۲ و گروه شاهد بود اما در مقادیر فاکتورهای یاد شده در ماهیان گروه شاهد و تیمار ۲ اختلاف معنی‌دار مشاهده نگردید (جدول ۱).

جدول ۱: مقایسه مقادیر فاکتورهای رشد در مواجهه مزمن با غلظت‌های مختلف آمونیاک مولکولی در یک دوره ۳۰ روزه پرورش در ماهی کلمه خزری (*R. caspicus*)

گروه کنترل	گروه مواجهه شده با غلظت ۰/۲ (mg/l) آمونیاک	گروه مواجهه شده با غلظت ۰/۲۰ (mg/l) آمونیاک
۵/۷۹ ± ۰/۴۷ <sup>a</sup>	۵/۶۵ ± ۰/۳۶ <sup>a</sup>	۵/۶۳ ± ۰/۳۴ <sup>a</sup>
۸/۲۸ ± ۰/۶۳ <sup>a</sup>	۷/۴۱ ± ۰/۹۵ <sup>b</sup>	۸/۲۹ ± ۰/۸۷ <sup>a</sup>
۹/۲۵ ± ۰/۵۰ <sup>a</sup>	۹/۲۱ ± ۰/۶۳ <sup>a</sup>	۹/۲۲ ± ۰/۵۳ <sup>a</sup>
۱۰/۵۴ ± ۱/۰۷ <sup>a</sup>	۱۰/۴۷ ± ۰/۵۸ <sup>a</sup>	۱۰/۵۸ ± ۰/۹۱ <sup>a</sup>
۲/۴۸ ± ۰/۷۴ <sup>a</sup>	۱/۷۷ ± ۰/۸۶ <sup>b</sup>	۲/۶۳ ± ۰/۹۸ <sup>a</sup>
۴۲/۹۷ ± ۱۲/۴۳ <sup>a</sup>	۳۱/۵۷ ± ۱۵/۵۷ <sup>b</sup>	۴۷/۲۷ ± ۱۹/۲۸ <sup>a</sup>
۰/۰۸۲ ± ۰/۰۲۵ <sup>a</sup>	۰/۰۵۹ ± ۰/۰۲۹ <sup>b</sup>	۰/۰۸۸ ± ۰/۰۳۳ <sup>a</sup>
۱/۱۹ ± ۰/۰۵ <sup>a</sup>	۰/۹۱۳ ± ۰/۰۶ <sup>b</sup>	۱/۲۶ ± ۰/۰۷ <sup>a</sup>
۰/۷۳ ± ۰/۱۵ <sup>a</sup>	۰/۶۵ ± ۰/۰۹ <sup>b</sup>	۰/۷۱ ± ۰/۱۲ <sup>ab</sup>
۱/۸۲ ± ۰/۱۱ <sup>a</sup>	۲/۹۴ ± ۰/۲۱ <sup>b</sup>	۱/۷۳ ± ۰/۲۳ <sup>a</sup>
۹۸/۸۷ ± ۱/۹۶ <sup>a</sup>	۹۶/۶۶ ± ۳/۳۳ <sup>a</sup>	۱۰۰ <sup>a</sup>

حروف غیر مشابه لاتین در هر ردیف نشانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌هاست ( $p \leq 0.05$ ).

نتایج حاصل از بررسی‌های خون‌شناسی ماهیان گروه شاهد و ماهیان مواجهه شده با غلظت‌های مختلف تحت حاد در جدول ۲ آمده است. بر اساس این نتایج در تعداد گلبول‌های قرمز (RBC) و گلبول‌های سفید (WBC) گروه‌های مختلف مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۲). همچنین در مقادیر درصد لنفوسیت، نوترفیل، مونوسیت و ائوزینوفیل در گروه شاهد و گروه‌های تیمار نیز اختلاف معنی‌دار مشاهده نگردید. در این بررسی مقادیر اندیس‌های خونی MCV، MCH، MCHC در ماهیان گروه تیمار ۱ در مقایسه با ماهیان گروه شاهد و تیمار ۲ پایین‌تر بوده است، اما هیچ اختلاف معنی‌داری در پارامترهای خون‌شناسی مورد مطالعه در ماهیان گروه شاهد و ماهیان مواجهه شده با غلظت ۰/۲۰ mg/l آمونیاک مولکولی مشاهده نشد. در این مطالعه بیشترین میزان هماتوکریت خون در ماهیان گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه شاهد مشاهده شد به گونه‌ای که این مقادیر در بین دو گروه تیمار مورد مطالعه دارای اختلاف معنی‌دار نبوده است (جدول ۲). کمترین میزان هموگلوبین در ماهیان گروه تیمار ۱ اندازه‌گیری شد در حالی که در مقادیر هموگلوبین ماهیان گروه تیمار ۲ و گروه شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

اثر مواجهه طولانی مدت غلظت‌های تحت کشنده آمونیاک غیر یونیزه بر شاخص‌های....

جدول ۲: مقایسه مقادیر فاکتورهای مختلف خون‌شناسی در مواجهه مزمن با غلظت‌های مختلف آمونیاک مولکولی در یک دوره ۳۰ روزه پرورش در ماهی کلمه خزری (*R. caspicus*)

شاهد	گروه مواجهه شده با غلظت ۰/۰۲ (mg/l) آمونیاک	گروه مواجهه شده با غلظت ۰/۲ (mg/l) آمونیاک
تعداد گلبول قرمز، RBC (تعداد ۱۰ <sup>۶</sup> سلول / میلی‌متر مکعب)	۱/۳۰ ± ۰/۵ <sup>a</sup>	۱/۳۲ ± ۰/۳ <sup>a</sup>
تعداد گلبول سفید، WBC (تعداد ۱۰ <sup>۳</sup> / میلی‌متر مکعب)	۲۱/۱ ± ۴/۴ <sup>a</sup>	۲۳/۶ ± ۶/۳ <sup>a</sup>
هموگلوبین، Hb (میلی‌گرم)	۷/۴۴ ± ۰/۸۴ <sup>a</sup>	۷/۶۶ ± ۱/۳۹ <sup>a</sup>
هماتوکریت، Hct (%)	۲۲/۶۴ ± ۱/۸۶ <sup>a</sup>	۲۳/۲۷ ± ۲/۳۵ <sup>ab</sup>
MCV (فمولیتر)	۱۷۴/۲۰ ± ۱۷/۹۵ <sup>a</sup>	۱۷۶/۶۰ ± ۱۸/۸۷ <sup>a</sup>
MCH (پیکوگرم)	۵۷/۴۱ ± ۸/۳۴ <sup>a</sup>	۵۸/۱۲ ± ۳/۹۵ <sup>a</sup>
MCHC (%)	۳۳/۱۸ ± ۵/۲۵ <sup>a</sup>	۳۳/۲۳ ± ۴/۰۴ <sup>a</sup>
لنفوسیت (%)	۸۱/۲۵ ± ۳/۷۲ <sup>a</sup>	۷۹/۷۱ ± ۴/۱۲ <sup>a</sup>
نوتروفیل (%)	۱۱/۷۱ ± ۲/۲۳ <sup>a</sup>	۱۴/۲۲ ± ۳/۱۸ <sup>a</sup>
منوسیت (%)	۵/۳۴ ± ۰/۹۸ <sup>a</sup>	۴/۶۹ ± ۱/۱۱ <sup>a</sup>
ائوزینوفیل (%)	۱/۶۹ ± ۰/۸۳ <sup>a</sup>	۱/۳۷ ± ۰/۹۳ <sup>a</sup>

حروف غیر مشابه لاتین در هر ردیف نشانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌هاست (p < ۰/۰۵).

### بحث و نتیجه‌گیری

همان‌گونه که عنوان گردید آمونیاک یکی از مواد دفعی کاتابولیسیم پروتئین در ماهیان و برخی ارگانیسیم‌های آبزی بوده و در سیستم پرورش گرمابی و مزارع بدون تعویض آب مداوم، تجمع آن در استخرها امری اجتناب‌ناپذیر است. به‌عنوان مثال در فصل زمستان به‌دلیل کاهش جمعیت جلبک‌ها و گیاهان استخرها (که جاذب آمونیوم هستند) و نیز کاهش فعالیت باکتری‌هایی که در پدیده نیتریفیکاسیون نقش دارند، آمونیاک در استخرها تجمع می‌یابد (Robert *et al.*, 1997). معمولاً مزارع پرورش ماهی به‌گونه‌ای مدیریت می‌شود که مواجهه با غلظت حاد آمونیاک به ندرت رخ دهد اما کنترل میزان آمونیاک در حد پایین‌تر از آستانه آسیب‌رسان آن بسیار مشکل بوده و نیاز به مدیریت بسیار دقیق و آگاهی بالایی دارد. ماهیان قادرند آمونیاک محیط را تا حدی تحمل کنند و خود را با شرایط وفق دهند. این آداپتاسیون معمولاً به دو شکل حادث می‌شود، یکی افزایش سنتز گلوتامین که با جذب NH<sub>3</sub> تبدیل به گلوتامات می‌شود (Wang and Walsh, 2000) و دیگر، غیر سمی کردن آمونیاک و تبدیل آن به اوره که در بسیاری از گونه‌های دریایی قابل مشاهده است (Wood, 1993). اما توانایی تحمل آمونیاک ماهیان بالا نیست و به‌طور کلی گزارشات متعددی بیانگر این نکته است که غلظت تحت حاد اگر چه منجر به تلفات در ماهیان هم نشود، در مواجهه طولانی مدت منجر به آسیب به بافت

آبشش و افزایش حساسیت به پاتوژن‌ها و ضعف سیستم ایمنی ماهی می‌گردد (Flis, 1968). در عین حال حساسیت به غلظت‌های تحت حد آمونیاک نیز در ماهیان مختلف بسیار متفاوت گزارش شده است. به‌عنوان مثال در یک بررسی فاکتورهای رشد ماهی باس دریایی (*Dicentrarchus labrax*)، در مواجهه مزمن با غلظت‌های تحت حد ۰/۲۴ و ۰/۲۶ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک تحت تأثیر قرار نگرفتند (Lemarie et al., 2004). در بررسی دیگری مواجهه با غلظت مزمن ۰/۱۱-۰/۱۸ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک تأثیری بر فاکتورهای رشد ماهی توربوت (*Scophthalmus maximus*) و سیم دریایی (*Pagrus pagrus*) نداشت (Person-Le Ruyet et al., 1998). در بررسی فوس و همکاران (Foss et al., 2004) مواجهه با غلظت مزمن ۰/۱۷ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک و بالاتر به‌طور معنی‌داری منجر به کاهش رشد در ماهی *Gadus morhua* در طی ۹۶ روز پرورش گردید. اما در مطالعه‌ای دیگر مواجهه با غلظت مزمن ۰/۳۲ و ۰/۶۸ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک به‌مدت ۴۲ روز پرورش در ماهی *Strongylocentrotus droebachiensis* بر فاکتورهای رشد و دریافت غذا تأثیری نداشت اما به‌طور معنی‌داری باعث کاهش رشد گنادها و افزایش مرگ و میر در ماهیان تحت مواجهه گردید (Siikavuopio et al., 2004).

در بررسی حاضر مواجهه طولانی مدت با غلظت ۰/۰۲ mg/l آمونیاک در مقایسه با گروه شاهد تأثیری بر فاکتورهای رشد، فاکتورهای خونی و بازماندگی ماهیان کلمه نداشت، اما مواجهه با غلظت ۰/۲ mg/l آمونیاک در یک دوره ۳۰ روزه پرورش منجر به کاهش معنی‌دار در فاکتورهای رشد این ماهی گردید که به نوعی نشان از حساسیت نسبتاً بالای این ماهی به غلظت تحت حد و مزمن آمونیاک دارد.

فاکتورهای MCV، MCH و MCHC از شاخص‌هایی هستند که در تفسیر سلول‌های خونی بسیار کاربرد دارند. در بررسی حاضر در تعداد گلبول‌های قرمز خون در ماهیان گروه‌های مختلف اختلافی مشاهده نشد. اما MCV ماهیان مواجهه شده با غلظت ۰/۲ mg/l آمونیاک بالاتر از سایر گروه‌ها اندازه‌گیری شد که نشان دهنده افزایش حجم سلولی است. در عین حال کاهش مقادیر MCH و MCHC در ماهیان تیمار مذکور پایین‌تر از مقادیر محاسبه شده در گروه شاهد و ماهیان گروه مواجهه شده با غلظت ۰/۰۲ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک بوده است. بر مبنای این نتایج می‌توان گفت در ماهیان گروه تیمار ۱ ماهیان دچار کم‌خونی شده‌اند. به عبارت دیگر اگرچه غلظت ۰/۲ mg/l آمونیاک تأثیری در بازماندگی ماهیان نداشت، اما با توجه به شاخص‌های خونی می‌توان گفت این میزان آمونیاک منجر به کم‌خونی ماکروسیتیک هایپوکرومیک در ماهی کپور شده است (Stoskopf, 1993). کم‌خونی از نوع ماکروسیتیک هایپوکرومیک ماهیان ممکن است در اثر عوامل مختلف از جمله عوامل عفونی، موارد مسمومیت با جیوه و عوامل استرس‌زا به‌خصوص کمبود اکسیژن مشاهده شود (Elahee and Bhagwant, 2007). در عین حال تعداد گلبول‌های سفید و درصد انواع آنها در تیمارهای مختلف و گروه شاهد تفاوت معنی‌داری ثبت نگردید. معمولاً این گلبول‌ها در سیستم ایمنی دخالت داشته و در

موارد التهابی تعداد و درصد انواع آنها دستخوش تغییر می‌شوند (Clauss *et al.*, 2008). عدم تغییر این پارامترها شاید به این دلیل باشد که در غلظت‌های تحت حاد آمونیاک در بچه‌ماهیان کلمه در ۳۰ روز مواجهه شرایط التهابی ایجاد نمی‌کند و شاید به همین دلیل هم میزان بازماندگی ماهیان در سه گروه مورد بررسی یکسان و بالا ثبت گردید. اما این امر بدین معنی نیست که مواجهه طولانی‌تر منجر به تضعیف سیستم ایمنی نشود. به عبارت دیگر شاید مواجهه طولانی‌تر از ۳۰ روز با غلظت‌های مورد ارزیابی در این بررسی منجر به تغییر در تعداد و درصد انواع گلبول‌های سفید در ماهی کلمه شود که این امر نیاز به بررسی بیشتر و دقیق‌تر دارد. بر اساس نتایج این بررسی میزان آمونیاک در حد  $1 \text{ mg/l}$  ۰/۲ هیچ تأثیر منفی بر شاخص‌های رشد و پارامترهای خونی نداشته است. در نهایت با توجه به اینکه پرورش بازاری ماهی کلمه در استخرهای حاکی در حال توسعه است، لذا دانستن حد آسیب‌رسان آمونیاک در استخرهای مورد پرورش برای این ماهی می‌تواند بسیار مفید باشد. نتایج فاکتورهای رشد و شاخص‌های خونی همگی حاکی از این واقعیت هستند که مواجهه تحت حاد آمونیاک به‌شدت بر سلامت و رشد بچه ماهیان کلمه تأثیر منفی دارد. لذا برای دستیابی به بهترین راندمان رشد در پرورش این ماهی پیشنهاد می‌شود در کنار در نظر گرفتن مسائل مورد نیاز در مدیریت پرورش، میزان آمونیاک مولکولی آب پرورش پایین‌تر از ۰/۲ میلی‌گرم درلیتر کنترل شود.

#### منابع

- Blaxhall P.C., Daisley K.W. 1973. Routine haematological methods for used with fish blood. *Journal of Fish Biology*, 5(6): 771-781.
- Clauss T.M., Dove A.D.M., Arnold J.E. 2008: Hematologic Disorders of Fish. *Veterinary Clinic of North America Exotic Animal Practice*, 11(3): 445-462.
- Colt J.E., Armstrong D.A. 1981. Nitrogen toxicity to crustaceans, fish, molluscs. *Bioengineering Symposium for Fish Culture Publication*, 1: 34-47.
- Dacie J.V., Lewis S.M. 2001. *Practical Hematology*. 9<sup>th</sup>, ed. Churchill Livingstone, London. 633 p.
- Elahee K.B., Bhagwant S. 2007. Hematological and gill histopathological parameters of three tropical fish species from a polluted lagoon on the west coast of Mauritius. *Ecotoxicology Environmental Safty*, 68(3): 361-371.
- Emerson K., Russo R.C., Lund R.E., Thurston R.V. 1975. Aqueous ammonia equilibrium calculations: effect of pH and temperature. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 32(12): 2379-2383.
- Flis J. 1968. Anatomicrohistopathological changes induced in carp *Cyprinus carpio* by ammonia water, Effects of sub-toxic concentrations. *Acta Hydrobiologia*, 10: 225-233.

- Foss A., Siikavuopio S.I., Saether B.S., Evensen T.H. 2004. Effect of chronic ammonia exposure on growth in juvenile Atlantic Cod. *Aquaculture*, 237(1-4): 179–189.
- Handy R.D., Poxton M.G. 1993. Nitrogen pollution in mariculture: toxicity and excretion of nitrogenous compounds by marine fish. *Fish Biology and Fisheries*, 3(3): 205-241.
- Lemarie G., Dosdat A., Cove D., Dutto G., Gasset E., Person-Le Ruyet J. 2004. Effect of chronic ammonia exposure on growth of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*, 229(1-4): 479–491.
- Motnikar S., Marsan R., Tetreault F. 1998. Conditioning green sea urchins in tanks: water quality tolerance limits. *Bulletin of the Aquaculture Association of Canada*, 98(2): 96-98.
- Person-Le Ruyet J., Boeuf G., Zambonino-Infante J., Helgason S., Le Roux A. 1998. Short term physiological changes in turbot and seabream juveniles exposed to exogenous ammonia. *Comparative Biochemistry Physiology*, 119(1): 511–518.
- Piri H., Yelghi S., Sharifian M. 2013. Examination of reared roach (*Rutilus rutilus caspicus*) in earthen ponds with different densities in freshwater. *Iranian Journal of Fisheries*, 22: 171-173. (In Persian).
- Robert M., Crosby D.M., Brunson M.W. 1997. Ammonia in Fish Ponds. Southern Regional Aquaculture Center Publication, No. 463.
- Rowley A.F. 1990. Collection, separation and identification of fish leukocytes. In: van Muiswinkel WB (ed) *Techniques in fish immunology-I*. SOS Publications, Fair Haven, NJ, pp: 113–136.
- Ruffier P.J., Boyle W.C., Kleinschmidt J.K. 1981. Short-term acute bioassays to evaluate ammonia toxicity and effluent standards. *Journal of Water Pollution Control Federation*, 53(3): 367-377.
- Shingles A., McKenzie D.J., Taylor E.W., Moretti A., Butler P. J., Ceradini S. 2001. Effects of sublethal ammonia exposure on swimming performance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Biology*, 204(15): 2691–2698.
- Siikavuopio S.I., Trine D.A. Foss, A.M., 2004. Effects of chronic ammonia exposure on gonad growth and survival in green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Aquaculture*, 242: 313–320.
- Statistical Year book of Iran Fisheries Organization, 2002-2012. 2013. 1: 63p. (In Persian).
- Stoskopf M.K. 1993. *Fish Medicine*. W.B. Saunders Co. Philadelphia. 882 p.
- Turchini G.M., Mentasti T., Froyland L., Orban E., Caprino F., Moretti V.M., Valfre F. 2003. Effects of alternative dietary lipid sources on performance, tissue chemical composition, mitochondrial fatty acid oxidation capabilities and sensory characteristics in brown trout. *Aquaculture*, 225(1-4): 251-267.

- Wajsbrot N., Gasith A., Krom M.D., Popper D.M. 1991. Acute toxicity of ammonia to juvenile gilthead seabream *Sparus aurata* under reduced oxygen levels. *Aquaculture*, 92(3-4): 277-288.
- Wang, Y., Walsh, P.J., 2000. High ammonia tolerance in fish of the family Batrachoididae (Toad fish and Midshipmen). *Aquatic Toxicology*, 50(3): 205–219.
- Wickins J.F., Lee D.O.C. 2002. *Crustacean Farming, Ranching and Culture*. 2<sup>th</sup> edition. Blackwell Science, 464 p.
- Wood C.M. 1993. Ammonia and urea metabolism and excretion. In: Evans, D.H. (Ed.), *The Physiology of Fishes*. Boca Raton, FL, USA, pp: 379–425.

