

## بررسی LC<sub>50</sub> 96 ساعته و ضایعات هیستوپاتولوژیکی نیترات روی بافت

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

آرش جمشیدی<sup>1</sup>، حسین خارا<sup>2</sup>، ذبیح الله پزند<sup>3</sup>

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

2- دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، دانشکده منابع طبیعی، استادیار گروه شیلات، لاهیجان، ایران. h.khara1974@yahoo.com

3- انستیتو بین المللی ماهیان خاویاری، بخش فیزیولوژی، سنگر، رشت، ایران.

تاریخ دریافت: 92/3/29 تاریخ پذیرش: 92/5/17

#### چکیده

زمینه و هدف: گسترش آلودگی‌ها از جمله نیترات در آب‌ها مسمویت 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 آبزبان 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 750، 773، 798، 823 و 850 میلی گرم در لیتر نیترات، میزان LC<sub>10</sub>، LC<sub>50</sub> و LC<sub>90</sub> در طول مدت 24، 48، 72 و 96 ساعت بر اساس دستورالعمل OECD-2002 و به روش ساکن، روی بچه تاسماهی ایرانی با میانگین وزن 2 گرم در مقایسه با تیمار شاهد، اندازه گیری شدند. به منظور ارزیابی اثرات هیستوپاتولوژیکی نیترات در پایان روز چهارم (96 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 مانیتور و دوربین عکاسی و فیلمبرداری مورد مطالعه میکروسکوپی قرار گرفت.

یافته‌ها: میزان LC<sub>10</sub> نیترات در 24، 48، 72 و 96 ساعت برای بچه تاسماهی ایرانی به ترتیب 775/6097، 716/29، 716/9556 و 677/17878 و 669 میلی گرم در لیتر، میزان LC<sub>50</sub> نیترات 909/7434، 825/9397، 793/645 و 764/5538 میلی گرم در لیتر، میزان LC<sub>90</sub> نیترات 1067/074، 952/4265 و 929/076 و 872/728 میلی گرم در لیتر تعیین شد. نتایج نشان داد که در آبشش پدیده‌هایی نظیر پرخونی، تورم لاملای اولیه، هیپرپلازی، چسبندگی لاملای ثانویه، خونریزی و نکروز سلولی پس از طی 96 ساعت مشاهده شد. شدت موارد آسیبی از تیمار 1 به سمت تیمار 5 افزایش یافت. در کبد پس از در معرض بودن عوارضی از قبیل پرخونی، نکروز 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 4 و 5 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، نشأت نفت، پساب‌های مواد آلی و معدنی کارخانجات، مواد شیمیایی گوناگون اعم از فلزات، که بدون هیچ توجهی به آب‌ها می‌گردند و وارد

هم زمان با افزایش رشد جمعیت، صنعت آبرزی 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، آبرزی پروری به صورت مدار بسته و با استفاده از پساب‌های کشاورزی صورت پذیرد. صنعت آبرزی پروری علیرغم این رشد قابل توجه همواره با مشکلاتی روبرو بوده است که از

مرگ و میر و تلفات بچه ماهیان، بالا بردن سرعت رشد و تولید بیشتر (1) 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 96 ساعت در تابستان 92، در 5 تیمار و یک گروه شاهد و در تمامی تیمارها با 3 تکرار، در 18 مخزن فایرگلاس 50 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 220 عدد بچه تاسماهی ایرانی با میانگین سنی 2 ماه و میانگین وزن 1/67 گرم و میانگین طول 7/54 سانتی متر که از مرکز شهید بهشتی تهیه شده جهت آداپتاسیون به وان فایرگلاس در بخش ونیر و این مرکز منتقل و طی 10 روز 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. طبق هماهنگی های به عمل آمده با شرکت کیمیاگران میزان 4 بسته 250 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 (4 روز یا 96 ساعت) طبق متد O.E.C.D صورت می پذیرد. این آزمایشات به صورت استاتیک

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 (1). 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 25 درصد گوشت و 24 درصد خاویار حاصله از آب های ایران متعلق به این ماهی می باشد (5) 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. 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 (15). 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 (7). سوزاندن سوخت های فسیلی با تولید اسیدنیتریک و آمونیاک هوا را آلوده کرده که در نهایت به صورت باران های اسیدی باعث آلودگی سطح زمین می شوند (7). در آب های سطحی مقادیر نیترات اغلب کم (صفر تا 18 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 (7). 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 تولیدکنندگان رسیدن به صرفه اقتصادی، کاهش

انجام می شود، بدین معنی که محلول آزمایش در طی تست تغییر نکرده و ثابت بوده و میزان مرگ و میر ماهی در طی 4 روز به صورت هر 24 ساعت یک بار (۲۴،۴۸،۷۲) 96، ساعت) ثبت و رکوردگیری می گردد (14). با توجه به این که حلالیت نیترات در آب بسیار زیاد است و به راحتی نمی توان آن را از آب خارج کرد (حتی با هوادهای شدید)، بنابراین غلظت نیترات ایجاد شده در آب طی 96 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 آداپتاسیون، به منظور سهولت در بررسی های آماری مخازن به میزان 30 لیتر آبیگری و به مدت چند ساعت هوادهای شده تا به شرایط اکسیژنی مناسب برسند. انجام دو مرحله مقدماتی آزمایش برای تعیین غلظت نهایی که پس از مرحله اولیه به غلظت بین 500 تا 1000، پس از مرحله دوم مقدماتی به غلظت بین 700 تا 900 به دست آمد و سپس غلظت های نهایی بین این اعداد به صورت لگاریتمی محاسبه شد و غلظت های 823، 798، 750، 773 و 850 میلی گرم 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 آبیگری، مخازن به وسیله پرمنگنات پتاسیم و آب نمک غلیظ 70% کاملاً شسته شدند تا محیط عاری از هر گونه آلودگی و بیماری برای ماهیان فراهم گردد. در هر مخزن تعداد 10 عدد بچه ماهی رها گردید. بعد از اضافه نمودن نیترات تمامی فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی مهم آب اندازه گیری شد. به طوری که: نور متناسب با طول روز بین 16-12 ساعت، میزان اکسیژن مخازن از طریق سیستم هوادهای مرکزی بیشتر از 7 میلی گرم در لیتر، درجه حرارت آب درون مخازن حدود 25 درجه سانتی گراد، میزان pH بین 7-8 در طول انجام آزمایش مورد کنترل قرار گرفت. لازم به ذکر است که نیترات پتاسیم  $KNO_3$  در مقادیر تعیین شده

با 2 لیتر آب وان رقیق شده و اضافه گردید. نیترات کل آب مخازن بعد از اضافه نمودن غلظت نیترات پتاسیم توسط دستگاه فوتومتر مورد بررسی قرار گرفتند و غلظت های تعیین شده در محیط آزمایشی هم به مشابه میزان غلظت تعیین شده به دست آمد. در هر 24 ساعت، آکواریوم ها مورد بررسی قرار گرفته و میزان مرگ و میر ثبت گردید. این کار به مدت 96 ساعت (4 روز) و هر روز راس ساعت 11 صبح انجام گرفت. به منظور ارزیابی اثرات هیستوپاتولوژیکی نیترات در پایان روز چهارم (96 ساعت) از بین هر تیمار 3 عدد ماهی به صورت تصادفی صید و از بافت های آبشش، کبد و کلیه آنها جهت تهیه لام های هیستوپاتولوژی نمونه برداری صورت و در محلول بوئن (ثبیت کننده) به مدت 96 ساعت تثبیت گردید. پس از شستشو در آب مقطر درون الکل 80% قرار گرفت. پس از این مراحل مجموعه نمونه ها داخل بسکت (شبکه توری) قرار داده شده و جهت پاساژ به دستگاه اتوتکنیکون منتقل گردیدند (2). در این دستگاه بافت ها در معرض الکل با درصد های بالا قرار گرفته تا آب گیری شوند. سپس بافت ها جهت شفاف سازی در کلروفرم قرار گرفته و پس از گذر مراحل پارافینه کردن با قرار دادن نمونه بافت ها در پارافین خالص نرم و تمیز در انکوباتور 56 درجه سانتی گراد در دو مرحله و هر مرحله به مدت یک ساعت انجام گردید (4). بعد از این مرحله نمونه بافت ها در داخل قالب های ویژه قرار گرفته قالب گیری شدند. نمونه بافت ها جهت تهیه برش های بافتی آماده با استفاده از میکروتوم برش های بافتی به ضخامت 5 میکرون تهیه گردید. نمونه های برش زده شده پس از مرحله پارافین زدایی مورد رنگ آمیزی با هماتوکسیلین - انوزین (8) بر روی لام های ژلاتینی شده قرار گرفته به کمک میکروسکوپ نوری مجهز به مانیتور و دوربین عکاسی و فیلمبرداری مورد مطالعه میکروسکوپی قرار گرفتند. با استفاده از لگاریتم غلظت

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 95 درصد، مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و با تحویل ضرایب a (عدد ثابت) و b (شیب خط) معادله رگرسیون  $y = a + bx$  تشکیل گردید. 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 Probit value = a + b(logC) و با حل معادله و گرفتن Anti Log از logC در معادله، مقایسه غلظت های کشنده LC<sub>10</sub>, LC<sub>50</sub>, LC<sub>90</sub> برای زمان معین 24، 48، 72، 96 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 10 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 (7). 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 (12). 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 ماند به دنبال آن یکسری حرکات تشنجی شدید اتفاق افتاده که نهایتاً منجر به مرگ می شود. پوست ماهی رنگ پریده شده و توسط مقادیر زیادی مخاط پوشیده می شود که در مواجهه

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 24 ساعت برای این ماده محاسبه نموده و در جدول نمودار نمایش داده شدند. نتایج بررسی شده نشان می دهد که با گذشت زمان از 24 تا 96 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. MAC = NOEC = mg/176/4553 بررسی اسلایدهای بافت آبشش بچه تاسماهی ایرانی مورد آزمایش و مقایسه آن با نمونه بافت شاهد این نتیجه را در بر داشت: در تیمار 1 و 2 عوارض پرخونی، هیپرپلازی و چسبندگی رشته های ثانویه (کم) ولی رسوبات هموسدرین (زیاد) مشاهده شد. در تیمار 3 عوارض پرخونی (خیلی زیاد)، خونریزی (زیاد)، چماقی شدن و هیپرپلازی و چسبندگی رشته های ثانویه و نکروز سلولی (کم) مشاهده گردید. در تیمار 4 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 5 عوارض پرخونی و خونریزی و رسوبات هموسدرین (خیلی زیاد)، هیپرپلازی و چماقی شدن و نکروز سلولی و عریض شدن لاملای اولیه (کم) مشاهده شد (شکل 1). به طور کلی در آبشش تاسماهی ایرانی عوارضی از قبیل هیپرپلازی، پرخونی، خونریزی، چسبندگی لاملا، نکروز سلولی و تورم رشته اولیه آبشش

تقریباً سالم بوده و به صورت جزئی مواردی هم چون نکروز سلولی، ملانوماکروفاژ و هیپرتروفی دیده شد. در تیمار 2 و 3 نکروز سلولی (کم)، خونریزی (زیاد)، ملانوماکروفاژ و افزایش فضای ادراری (کم) دیده شد. در تیمار 4 نکروز سلولی و ملانوماکروفاژ (زیاد) و خونریزی و افزایش فضای ادراری (زیاد) دیده شد. در تیمار 5 خونریزی (خیلی زیاد)، پرخونی و نکروز سلولی و ملانوماکروفاژ و افزایش فضای ادراری (زیاد) دیده شد (شکل 3). 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 4 و 5 دیده شد.

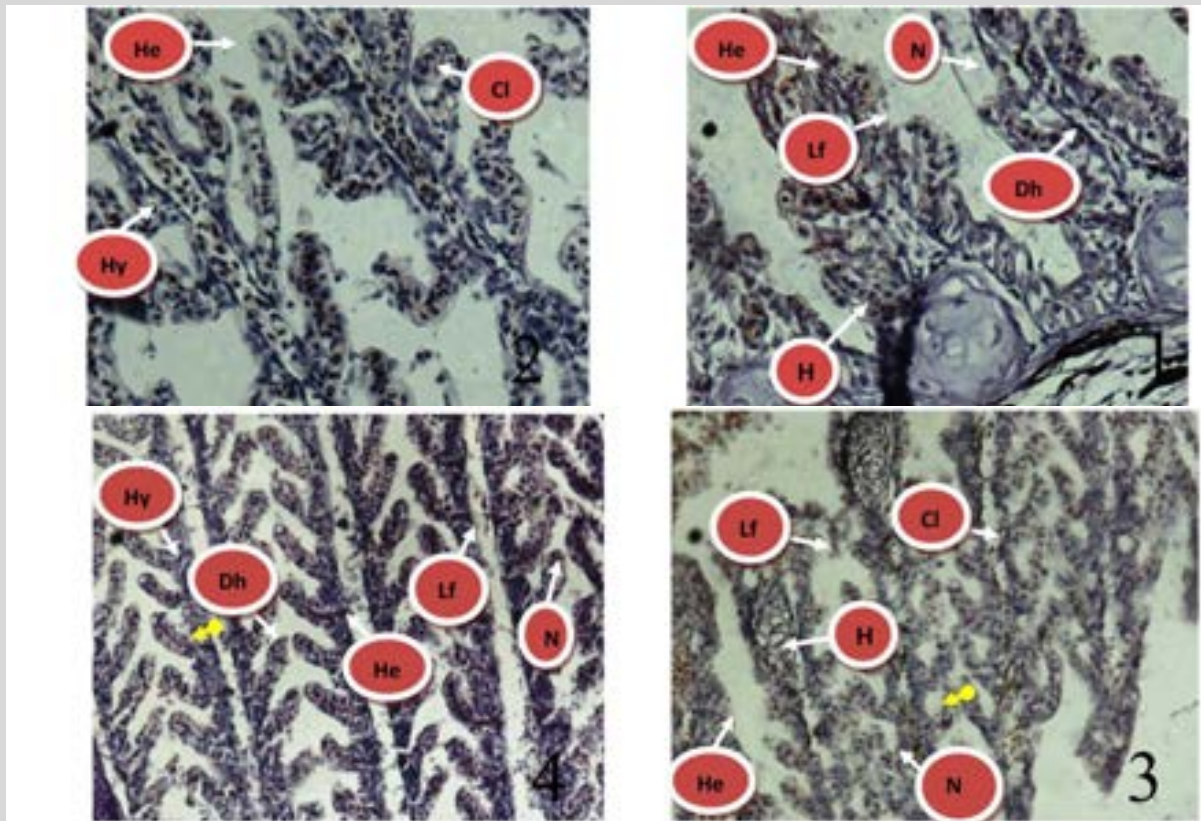
در آن-ها مشاهده گردید ولی شدت این عوارض از تیمار 1 به سمت تیمار 5 بیشتر بوده است. در مطالعه آسیب شناسی کبد تاسماهی ایرانی نتایج زیر به دست آمد: در تیمار 1 و 2 در کبد آتروفی سلولی و رکورد صفراوی (زیاد)، نکروز سلولی (کم) دیده شد. در تیمار 3 رکورد صفراوی و خونریزی و نکروز سلولی (کم) دیده شد. در تیمار 4 خونریزی و سلول های کوپفر و نکروز سلولی (زیاد)، پرخونی و رکورد صفراوی و دژرسانس چربی و آتروفی (کم) دیده شد و در تیمار 5 نکروز سلولی و خونریزی و سلول های کوپفر (کم)، دژرسانس چربی (زیاد) دیده شد (شکل 2). بررسی اسلایدهای بافت کلیه بچه تاسماهی ایرانی مورد آزمایش و مقایسه آن با نمونه بافت شاهد این نتایج را در بر داشت: در تیمار 1 کلیه

جدول 1- مقایسه اثر تیمارهای مختلف نیترا روی مرگ و میر بچه 3-1 گرمی تاسماهی ایرانی (میانگین 3 تکرار) در طی 96 ساعت

تیمار	غلظت نیترات ppm	24 ساعت	48 ساعت	72 ساعت	96 ساعت	تغییرات نسبت به شاهد		
		تعداد تلفات	تعداد تلفات	تعداد تلفات	تعداد تلفات	24 ساعت	48 ساعت	72 ساعت
شاهد	0	0	0	0	0	0	0	0
I	750	0/66	2	3/3	4/66	6/6%	20%	33%
II	773	1	2/66	4/33	5/67	10%	26/6%	43/3%
III	798	1/33	3/66	5	6/33	13/3%	36/6%	50%
IV	823	2/33	5	6	7/66	23/3%	50%	60%
V	850	3	6	7/33	8/66	30%	60%	73/3%

جدول 2- تعیین غلظت های کشنده نیترا در طی 4 روز بر روی تاسماهی ایرانی (میانگین سه تکرار)

زمان LC	24 (ساعت)	48 (ساعت)	72 (ساعت)	96 (ساعت)
10	775/6097	716/2509	677/9556	669/7878
50	909/7434	825/9397	793/645	764/5538
90	1067/074	952/4265	929/076	872/728



شکل 1- مشاهده عوارض خونریزی (He)، نکروز سلولی (N)، عوارض پرخونی (Hy)، هیپرتروفی (H) چسبندگی رشته‌های ثانویه آبشی (Lf)، رسوبات هموسیدرین (Dh) و چماقی شدن رشته‌های ثانویه آبشی (Cl)، عریض شدن لاملا (پیکان برش‌های آبشش در تیمارهای مختلف نیترات (H&E-40x). شماره 1: تیمار 1 و 2، شماره 2: تیمار 3، شماره 3: تیمار 4، شماره 4: تیمار 5

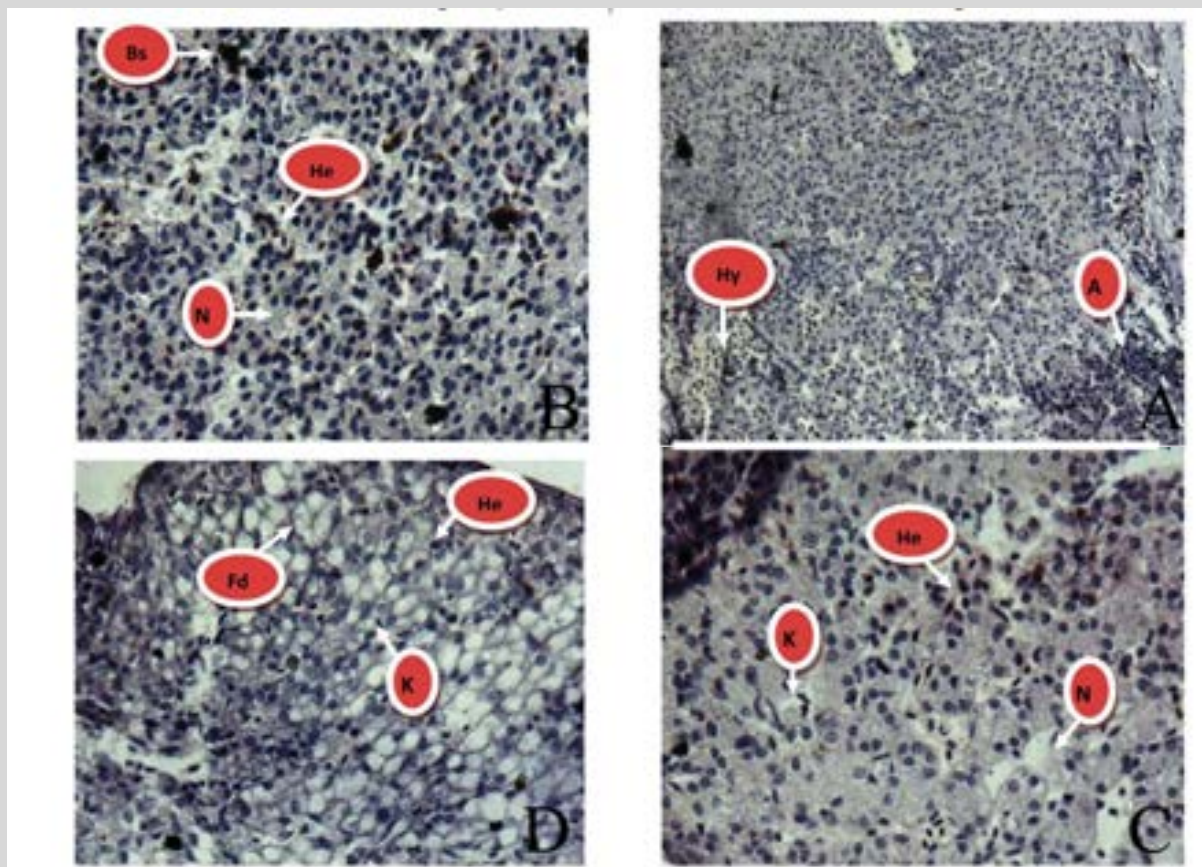
### بحث و نتیجه گیری

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 (96 ساعت) برای 50 درصد از بچه ماهیان 1-3 گرمی تاسماهی ایرانی یا قره برون 764/5538 میلی گرم در لیتر است و حداکثر غلظت مجاز (MAC value) این ماده یا همان غلظت غیر مؤثر (NOEC) برای تاسماهیان ایرانی 76/4553 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،

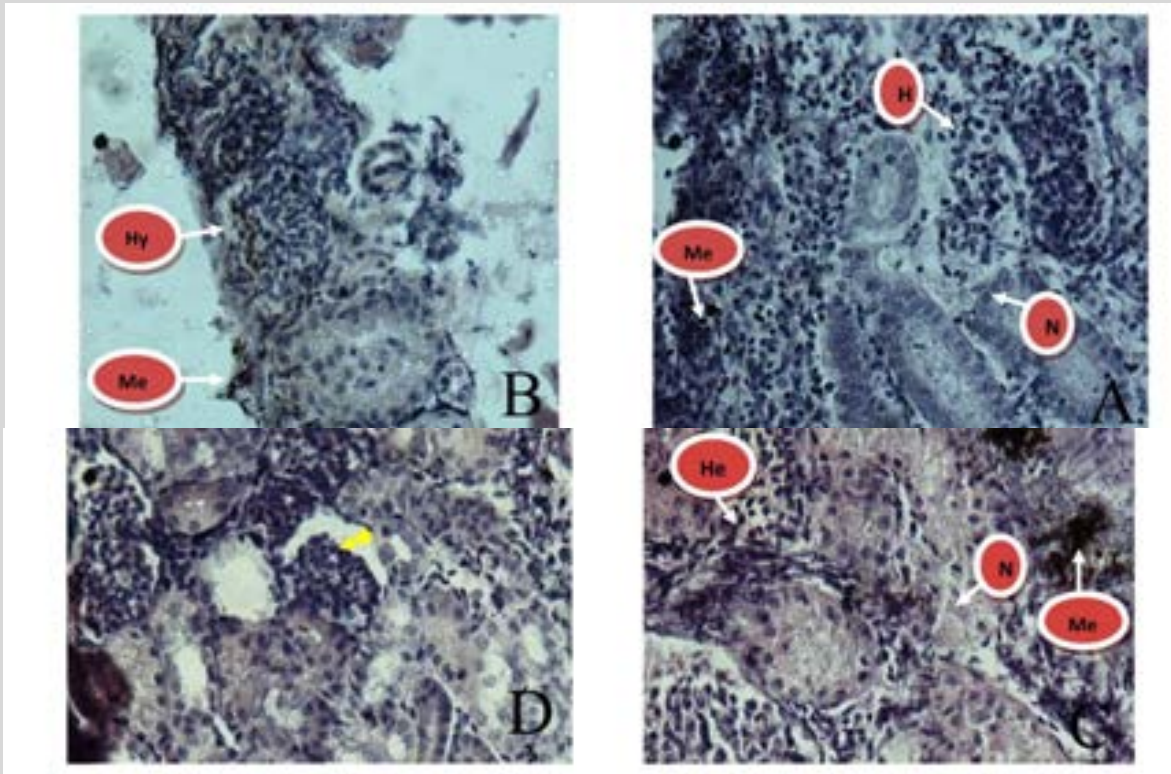
سطوح اکسیژن محلول، شوری، گونه جانوری، سن و اندازه ماهی و تراکم ماهیان و هم چنین میزان تغذیه تغییر می کند (7). اسوبودوا در سال 1991 بیان کرد که ماهیان نسبت به تحریکات و استرس خارجی به شدت واکنش نشان داده و سعی می کنند از سطح آب بیرون بپرند که به نظر می رسد به دلیل عدم تعادل اسمزی باشد و لذا این نظریه با نتایج تحقیق حاضر منطبق است، چون از علائم اولیه مسمویت حاد با نیترات در ماهیان مورد تحقیق بی قراری، نفس نفس زدن در سطح آب، شنا در سطح آب بوده است (12). کنپ و همکاران در سال 1984 (9) 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 1355 و 1310 میلی گرم در لیتر است. 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 می افتد، به دست آید. سپس میزان  $LC_{50}$  در 24 ساعت برای بچه تاسماهی ایرانی 909/7434 میلی گرم در لیتر نیترات کل به دست آمد.

افزایش غلظت نیترات به سطوح بالاتر مهاجرت می نمایند که با نشانه های تیره شدن رنگ پوست بدن، بروز حالات عصبی، بلعیدن هوا از سطح، شنای سریع در غلظت های 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 آبشش ها است. تحقیق فوق مطالب عنوان شده را تایید می کند که ناشی از عدم دفع مواد زائد و عدم جذب اکسیژن از آبشش ها می باشد که در تحقیق کنونی نیز نتایج مشابهی به دست آمد. وستین در سال 1974 (16) گزارش کرده است که  $LC_{50}$  در 96 ساعت مقادیر نیترات آب برای قزل آالی



شکل 2- مشاهده عوارض خونریزی (He)، نکروز سلولی (N)، عوارض پرخونی (Hy)، آتروفی سلولی (A)، مشاهده رکورد صفاوی (Bs)، سلول های کوپفر (K)، دژرسانس چربی (Fd) برش های کبد در تیمار های مختلف نیترات (40x- H&E). A: تیمار 1 و 2، B: تیمار 3، C: تیمار 4، D: تیمار 5



شکل 3- 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 1 و 2: تیمار 3، C: تیمار 4، D: تیمار 5

1423 و 1400 میلی گرم در لیتر به دست آمد که سمیت حاد نیترات بر *I. punctatus* را مستقل از درجه حرارت آب بیان کردند (6). تیلاک و همکاران در سال 2002 (15) با استفاده از سیستم ثابت و مستمر، در 24 ساعت LC<sub>50</sub> میزان 1565 و 1484 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 آبریان 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<sub>2</sub>S، متان) و همچنین شرایط نامساعد از قبیل

این مقدار در مقایسه با حد تحمل ماهی کپور ماهی هندی که میزان LC<sub>50</sub> آن در 24 ساعت 1484 میلی گرم در لیتر نیترات کل به دست آمده بود (12). ویکنز در سال 1976 (17) در بررسی سمیت حاد نیترات بر میگوهای خانواده پنایده میزان LC<sub>50</sub> در 48 ساعت را به اندازه 3400 میلی گرم در لیتر در 28 ppt آب دریا بیان کرد که بیانگر مقاومت بالای میگوها نسبت به تاسماهی ایرانی در مواجهه با نیترات است. کنپ و همکارانش در سال 1973 (9) گزارش داده اند که گربه ماهی کانال *Ictalurus punctatus* قادر به تحمل غلظت نیترات 90 میلی گرم در لیتر بدون تاثیر بر فعالیت رشد و تغذیه پس از قرار گرفتن در طی 164 روز بوده است. ارزیابی سمیت کوتاه مدت نیترات بر ماهیان انگشت قد (50-76 میلی متر طول) از *I. punctatus* در 22، 26 و 30 درجه سانتی گراد، محاسبه 96 ساعت LC<sub>50</sub>، میزان 1355،



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 پساب های زمین های کوددهی شده که وارد رودخانه ها 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 700 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 گونه ای 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 مدار بسته 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 حساس تر کنند. از طرفی در صورتی که ماهی در معرض عوامل نامساعد مختلف از قبیل آلودگی انگلی و سوء مدیریت پرورشی باشد به مسمومیت حساس تر 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. با وجود این که عوامل مختلفی می‌توانند باعث بروز عوارض در کبد و کلیه شوند اما با توجه به این که ماهی های استفاده شده در ابتدای آزمایش به ظاهر سالم بوده و دچار مشکل انگلی نیز نبوده اند، 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 600 میلی گرم در لیتر نیترات برای ماهی سمی بوده و با مرگ و میر همراه

## منابع

- 4-صادقی، م. 1381. بررسی بافت شناسی غده هیپوفیز در ماهی سفید دریای خزر، پایان نامه دکتری عمومی. ش 538، ص 31-42.
- 5-کیوان، ا. 1381. مقدمه ای بر تکنولوژی پرورش ماهیان خاویاری. انتشار دانشگاه آزاد واحد لاهیجان. 270 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.

- 1-اسماعیلی ساری، ع. 1379. مبانی مدیریت کیفی آب در آبرزی پروری، موسسه تحقیقات شیلات ایران. ص 29-33.
- 2-پوستی، ای.، صدیق مردستی، ع. 1378. اطلس بافت شناسی ماهی، موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران. 297 صفحه.
- 3-رجحان، م. 1366. ضروریات بافت شناسی (جامع)، انتشارات چهار تهران. 217 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.



Archive of SID