تعیین غلظت کشنده آمونیاک (LC50 96h, N-NH4)و تاثیر آن بر وضعیت هیستوپاتولوژی آبشش، کلیه و کبد بچه ماهی ازون برون (*Acipenser stellates*)

الهام السادات بنی هاشمی [1] ؛ حسین خارا [2] * ؛ ذبیح اله پژند [3] ؛ محمد رهاننده [1]

h.khara1974@yahoo.com

1- مرکز آموزش علمی کاربردی میرزا کوچک خان گیلان- رشت صندوق پستی ۱۱۱۱۱-۴۳۳۷۱.

۲-گروه شیلات، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران، صندوق پستی ۱۶۱۶.

۳-انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری- رشت صندوق پستی۳۴۶۴-۴۱۶۳۵.

تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۱ تاریخ پذیرش: مهر۱۳۹۳

چکیده

افزایش آمونیاک آب یکی از مشکلات عمده در آبزی پروری است که میزان و اثرات آن هنوز به درستی مشخص نشده است. هدف از این پژوهش،تعیین غلظت کشنده آمونیاک و اثر سمیت حاد آن بر روی سه بافت آبشش، کبد و کلیه بچه ماهی ازون برون از گونه های با ارزش ماهیان خاویاری با میانگین وزنی ۳ گرم در شرایط آزمایشگاهی است. آزمایشات در ۷ تیمار و سه تکرار و با تعداد ۱۰ عدد ماهی با روش آب ساکن به مدت ۹۶ ساعت اجرا شدند. ماهی ها در معرض غلظت‌های مختلفی از آمونیاک کل با مقادیر۵، ۷/۶،۷۶/۲۳، ۱۲/۹،۰۴/۶۶ و ۱۵میلی گرم در لیتر، قرار گرفتند. ابتدا میزان LC_{50} آمونیاک در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت به دست آمد که به ترتیب۱۴/۰۲۴۹ ، ۱۰/۲۱۶۴ ،۷/۱۵۳۱ و ۶/۰۳۵۳ میلی گرم در لیتر آمونیاک کل محاسبه گردید. پس از استخراج مقادیر LC_{50} یک سطح پایین (low) که ۲۵٪ غلظت LC_{50} و یک سطح بالا (High) که ۷۵٪ غلظت LC_{50} بوده را انتخاب و آزمایش مجدد با ۴ تیمار و ۳ تکرار انجام پذیرفت که دامنه غلظت‌های این ماده ۱/۵۰۸ ،۳/۰۱۷ و ۴/۵۲۶ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک کل بود. سپس ضایعات احتمالی میکروسکوپی و هیستوپاتولوژیک بافت آبشش، کبد و کلیه این گونه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصله نشان داد که در آبشش پس از قرارگیری در مجاورت با آمونیاک پدیده‌هایی نظیر پرخونی،هیپرپلازی،چسبندگی لاملای ثانویه،تورم لاملای اولیه،خونریزی و نکروز سلولی و در کبد عوارضی از قبیل پرخونی، رکورد صفراوی، نکروز سلولی و آتروفی سلولی و در کلیه عوارضی چون پرخونی، دژنرسانس بافت بینابینی، نکروز سلولی، اتساع فضای بومن، هموسیدرین در تیمارها مشاهده شد. بطور کلی بیشترین صدمات مربوطه در آبشش این ماهیان مشاهده شده است.

کلمات کلیدی: ازون برون ، آمونیاک، هیستوپاتولوژی،غلظت کشندگی.

*نویسنده مسئول

www.SID.ir

۱.مقدمه

ماهیان خاویاری از جمله ازون برون (*Acipenser stellatuspallas*,1877) از نظر اقتصادی اهمیت بسیار زیادی در کشور ما دارند. این ماهی از راسته *Acipenseriformes* و از خانواده *Acipenseridae* می-باشد(۷). جمعیت ماهیان خاویاری دریاچه خزر به دلیل بهره-برداری بیش از حد، از بین رفتن زیستگاه‌ها و آلودگی‌های شیمیایی بسیار کاهش یافته‌است. درسال ۱۹۸۰، سطوح بالایی از تومور، گامتوژنز و رشد و نموگنادی غیرنرمال و اختلال در مورف وژنز اندام‌های ماهیان خاویاری دریاچه خزر مشاهده شده‌است(۸). ممکن است چرخه زندگی ماهیان خاویاری تحت تأثیر تجمع زیستی آلوده‌کننده‌ها آسیب ببیند. این ماهیان به علت کفزی بودن و تغذیه از بستر دریا، غالبا در تماس با رسوباتی هستندکه می‌توانند شامل آلوده کننده‌های آبگریز جذب رسوب شونده باشند. علاوه بر این ماهیان خاویاری، جانورانی با طول عمر زیاد در شرایط طبیعی هستند (هرچند در شرایط امروزی به دلیل صید بیرویه میانگین عمر آن‌ها کمتر از بیست سال است). که دوره رسیدن به بلوغ جنسی در آن‌ها ۳۰-۵ سال است و بعد از اولین بلوغ جنسی، بلوغ و تخمریزی هر ۴-۲ سال یکبار انجام میگیرد(۱۱). این ویژگی‌ها به ماهیان خاویاری، برای تجمع مواد آلی پایدار و آلودگی‌های غیر آلی در بافت‌هایشان، پتانسیل بالایی میدهد. تقریباً تمام ماهیان خاویاری به دلیل تأثیر ترکیبی صید بی‌رویه و تخریب زیستگاه‌ها به عنوان گونه‌های در معرض خطر و یا تهدید قرار دارند(۲۲). با این وجود عوامل آلوده‌کننده فیزیکی و میکروبی را میتوان با صرف هزینه و بکارگرفتن تکنیک‌های ساده از میان برداشت ولی برطرفس ساختن آلودگی‌های شیمیایی در غالب موارد وقت‌گیر، مشکل، پرهزینه و گاه غیرممکن است. احتمالاً اثرات ایجاد شده، اثری مستقیم یا غیرمستقیم بر حیات انسان، موجودات زنده، اجتماعات حیوانی و اینگونه موارد دارد. یکی از مهمترین آلاینده های محیط زیست ترکیبات نیتروژنی می باشد که مهمترین و خطرناکترین آنها آمونیاک می باشد. به طور کلی در تقسیم بندی آلاینده های آب وجود نیتریت ، نیترات و آمونیاک دلالت بر وجود آلاینده های شیمیایی معدنی در داخل آب دارد. نیتروژن به شکل یون آمونیوم از ترکیبات موجود در برکه های پرورش ماهی است . نیتروژن آمونیاکی در محیط آب به شکل آمونیاک یا یون آمونیوم موجود است . درصد توزیع آمونیاک به pH بستگی دارد و در pH محدود ۸ ، یون آمونیوم یون غالب می باشد که درصد توزیع آمونیاک ۵/۴ درصد است (۱۹).

هنگامی که آمونیاک وارد آب می شود یونهای هیدروژن موجود در آب بلافاصله واکنش نشان می دهند و آن را به حالت تعادل مخلوطی از یون آمونیوم(NH_4^+) که الزاما غیرسمی است و NH_3 غیر یونیزه که سمی است تبدیل می کنند (۵).

$$NH_4^+ + OH^- \longleftrightarrow NH_3 + H^+ + OH^-$$

آمونیاک درآب خیلی محلول بوده و افزایش اندک فشار جزئی آمونیاک می تواند افزایش آمونیاک محلول در آب را به همراه داشته باشد(۳) از این رو حذف آمونیاک با هوادهی کار مشکلی است (۲۴). آمونیاک در آب به صورت زیر با یون آمونیوم در تعادل است:

$$NH_4^+ + OH^- \rightleftharpoons NH_3 + H_2O$$

نسبت بین این دو به pH و دمای آب بستگی دارد. علاوه بر این تابع چرخه روزانه pH و CO_2 است. ضمنا ماهیان دو ماده سمی مهم را در آب دفع می‌کنند که شامل دی اکسیدکربن و آمونیاک است. آمونیاک عمده ترین ترکیب نیتروژنی دفعی (۹۰-۶۰ درصد) ماهیان است. بقیه مواد دفعی ازته شامل اوره، اسید اوریک و کراتین می‌باشد (۱۷).

لذا با توجه به نقش آمونیاک در آلودگی آب به اشکال مختلف و امکان ورود این ماده به منابع آبی به طرق مختلف ، تحقیق

Archive of SID

www.SID.ir

حاضر در زمینه تعیین شدت کشنده بودن آمونیاک و تاثیر حاد آن بر روی بچه ماهی ازون برون و همچنین تاثیر این ماده سمی بر روی سه بافت آبشش ، کبد و کلیه آنها صورت گرفت .علت انتخاب این سه بافت بر این مبنا بود که آبشش محل جذب و دفع آمونیاک بوده ، کبد در متابولیسم و دفع آمونیاک نقش اصلی را ایفا می‌کند و کلیه ها که به دلیل داشتن شبکه مویرگی خاص ، تمام خون عضلات را دریافت می‌کنند.(در اغلب ماهی-ها ، یک بستر مویرگی سوم به نام سیستم باب کبدی یا سیستم باب کلیوی وجود دارد.) خون سیاهرگی در بازگشت از عضلات تنه ، معده و روده‌ها به قلب از کلیه ها و کبد می‌گذرد(سیاهرگهای باب کبدی و کلیوی)که در معرض کمبود اکسیژن تغییرات فاحشی را دارند.

بدین ترتیب در آبی که بطور طبیعی میزان مواد معدنی آن کم است ، دخالت مکانیسم تبادل یونی آبشش در دفع آمونیاک خون از طریق تبادل آن با یون Na^+ موجود در آب ،ضامن سلامتی عمومی ماهیان است زیرا تصور بر این است که غلظت Na^+محیط (آب) جهت انجام تبادل یون NH_4^+ خون ماهی با Na^+ آب در آبشش‌ها ، بسیار پایین بوده است(۱۲). بخش اعظم آمونیاک در کبد ماهی تولید می‌شود و در خون به شکل غیرسمی (گلوتامین) در می‌آید و به آبشش‌ها منتقل می شود که بعد بطور سریع و به صورت NH_3^+ به داخل آب انتشار می‌یابد. در صورتیکه pH آب قلیایی تر از خون باشد و غلظت آمونیاک محلول آن بیشتر باشد مانع از جریان یافتن آمونیاک از خون به سمت خارج آب می شود. در ماهیان دریایی ، ادرار تولید شده توسط کلیه ها به دلیل جریان رو به خارج آب در اثر اختلاف فشار اسمزی ، بسیار کم است و میزان دفع آمونیاک از کلیه ها در مقابل آبشش‌ها که بخش عمده ای از آمونیاک را دفع می-کنند، ناچیز است(۵).چندین ساعت پس از تماس ماهی با آمونیاک مسمویت ظاهر گشته و منجر به بیماری نکروز آبششی می‌گردد. دفع ترکیبات ازته (آمونیاک) از طریق آبشش متاثر از pH آب و آمونیاک موجود در آب می باشد.به طوریکه با افزایش pH آب ، دفع آمونیاک از خون متوقف می‌شود، بدون آنکه این ممانعت از طریق کلیه برطرف گردد (۲).

در سال ۱۳۸۶ نصیری بررسی اثر آمونیاک بر بافت‌های آبشش و کبد ماهی کپور معمولی بررسی نمودند و بر اساس نتایج این تحقیق عنوان نمودند با افزایش سمیت آمونیاک در آب ادم افزایش می یابد که عوارض آن کاهش سطح تبادل اکسیژن است، افزایش موکوس در سطح پوست و هپاتوسیت های که در آن پدیده پیکنوزه شدن هسته‌ها و کاریولیز به وضوح قابل بررسی نمودند(۶).

مطالعات Herbert و Shurbe در سال ۱۹۶۵ بر روی قزل-آلای رنگین‌کمان نشان می‌دهد که سمیت آمونیاک در آب‌های شور به مراتب کمتر از آب‌های شیرین می‌باشد. غلظت‌های کم-اکسیژن نیز منجر به افزایش سمیت آمونیاک برای ماهیان می گردد. Maetz در سال ۱۹۷۲ عنوان نمود که ۹۵ درصد از آمونیاک غیریونیزه از طریق آبشش‌ها دفع می شود. بعلاوه مقداری آمونیاک یونیزه شده نیز جهت تبادل با یون سدیم از طریق آبشش‌ها دفع می‌گردد (۳۶).

مطالعات انجام شده بر روی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) نشان می‌دهد که ۷۰ درصد از ترکیبات ازته در این ماهی به صورت اوره دفع می گردد، در حالیکه بررسی‌های انجام شده بر روی ماهی آزاد ساک آی *Onchorhyncus nerca* این میزان را ۱۵/۵ درصد نشان می‌دهد (۴۲).

Colt و Tchobanoglous در سال ۱۹۷۹، Meade در سال ۱۹۸۵، حد مجاز آمونیاک در پرورش ماهی NH_3-N/L ۰/۰۱۲۵ میلیگرم و Thomas و Piedrahita در سال ۱۹۹۸ و *Pillay* در سال ۱۹۹۰ حداکثر میزان آمونیاک مجاز در استخرهای پرورش ماهی (pH=۷) ۰/۰۲ میلی گرم به لیتر عنوان نموده است (۳۷).

Archive of SID

Barimo و Patrick در سال ۲۰۰۵ اثرات حاد و مزمن آمونیاک را در مراحل اولیه زندگی ماهی دهان‌گشاد دریایی خلیج فارس، *Opsanusbeta* نشان دادند که سمیت حاد آمونیاک LC_{50}- *96h* برای جنین و لارو این ماهی به ترتیب ۶۳.۶ و ۵.۴۵ میلی مول-NL-۱ آمونیاک کل (TAmm)، بود بنابراین در مراحل ابتدایی زندگی مقاومتر است (۱۰).

Randall و Ip .K در سال ۲۰۰۶ با بررسی گاز آمونیاک بعنوان یک گاز تنفسی در محیط پرورش ماهی نشان دادند که ماهیان قادر به سنتز اوره و دفع آن از طریق کلیه می باشند. فرم غیریونیزه آمونیاک در کبد تولید و از طریق انتشار وارد جریان خون و از طریق آبشش‌ها دفع میگردد. اسیدی شدن آب در اطراف ماهی با استفاده از دی اکسید کربن و دفع اسید موجب افزایش دفع آمونیاک و به منزله "سم زدایی آمونیاک از محیط زیست" است.برخی گونه‌های هوا تنفسی می تواند آمونیاک غیر یونیزه را از طریق تبخیر دفع کنند. مغز برخی از ماهی می تواند سطوح بسیار بالاتری از آمونیاک را نسبت به حیوانات دیگر تحمل کند(۳۳).

Milne و همکارانش در سال ۱۹۹۹ اثرات کوتاه مدت در معرض پالسهای آمونیاک بر ماهی را مورد بررسی قرار داد. ماهی در معرض مکرر، به خصوص در معرض دز بالاتر آمونیاک، بیشتر باعث تخریب رشد، وضعیت آبشش، وزن و هماتوکریت می شود. نتایج حاصل از این مطالعه تایید می کند که مدت و دوره بازگشت رویدادهای آلودگی گذرا بحرانی هستند (۲۹).

OttoPaust و همکاران در سال ۲۰۱۱ اثر قرار گرفتن در معرض غلظتهای کم آمونیاک بر روی رشد، بازده، تبدیل غذا و فیزیولوژی خون در نوجوانان نوعی ماهی پهن بزرگ اقیانوس اطلس (*Hippoglossus hippoglossus*) را نشان دادند بطوریکه بر عملکرد رشد بی‌تاثیر و برروی فاکتورهای دیگر تاثیر قابل توجهی داشت (۳۲). در ماهیان کپور نیز غلظت‌های بالای آمونیاک منجر به افزایش سطوح گلوکز خون بین ۶۰-۳۰ درصد می گردد. بعلاوه بروز آسیب‌هایی در رشته های آبششی و افزایش تعداد حرکات در این ماهیان مشاهده گردید.

در پرورش نیمه متراکم هم در مواردی از قبیل کوددهی بیش از حد، ورود فاضلاب‌های شهری و صنعتی، آلودگی آب به آمونیاک ممکن است باعث تلفات شدید ماهیان شود. در ارتباط با ضایعات پاتولوژیک آمونیاک در ماهی و تاثیرات آمونیاک بر آنزیم های سرمی و فاکتورهای خونی ماهی نیز تحقیقاتی صورت گرفته است. آمونیاک در غلظت‌های بالا باعث ایجاد تغییرات پاتولوژیک در آبشش‌ها و اندام‌های داخلی و خون ماهی شده است. سلول‌های بدن دارای آنزیم های مختلفی می باشند که در متابولیسم و فعالیت‌های اختصاصی آن سلول‌ها نقش دارند. هنگامی که سلول‌ها دچار ضایعه شدند، غشاء سلولی آنها قادر به نگهداری این آنزیم ها نخواهد بود، لذا این آنزیم ها به مایع میان بافتی و از آنجا به خون وارد می‌شوند. بنابراین سنجش آنزیم های فوق در سرم می توند نشانگر وجود ضایعات بافتی باشد (۲۱).

ضمنا هدف از این تحقیق، مشخص نمودن حداکثر غلظت مجاز آمونیاک است که به طرق مختلف وارد استخرها می‌شود تا جایی که اعداد به دست آمده در این تحقیق قابل به کارگیری در مزارع پرورش ماهی باشد.

۲.مواد و روشها

تحقیق حاضر در تابستان ۱۳۹۱در انسیتیتو بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان در استان گیلان صورت گرفت.آزمایشات در۷ تیمار و ۳ تکرار به همراه گروه شاهد و براساس روش OECD و به صورت ساکن (Static Method) در مدت ۹۶ ساعت اجرا شد (۴۱). ۱۲۰ بچه ماهی

Archive of SID

ازون برون با میانگین وزنی ۳ گرم در مخازن فایبرگلاس با حجم ۲۵ لیتری آب نگهداری شدند. در طول مدت آزمایش میانگین دما ۰/۰۳۴۶۹±۲۳/۳۷۳۹ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول در آب۰/۲۰۱۱±۶/۴۶۰۴ میلی گرم در لیتر، pH آب ۰/۰۲۱۳۱±۷/۷۰۷۲ و سختی ۱۸۹ میلی گرم در لیتر کربنات کلسیم ثابت نگه داشته شد. در محدوده ۵-۱۵ میلی گرم در لیتر فواصل بین ۷ تیمار مورد آزمایش برای هر کدام از بچه ماهیان را مشخص شد بطوریکه تیمار یک بعنوان شاهد و بقیه تیمارها در معرض مقادیر مختلف آمونیاک به ترتیب غلظت‌های ۵ ، ۶/۲۳، ۷/۷۶، ۹/۶۶ ، ۱۲/۰۴ و ۱۵ میلی گرم به ازاء هر لیتر آب قرار گرفتند.

مقدار غلظتی که ماهیان در تماس با آن قرار گرفتند به عنوان نمونه پس از چند سری آزمایش به دست آمد به نحوی که ابتدا ماهیان تحت تاثیر غلظت کم آمونیاکت ازیاد قرار گرفتند و با توجه به تلفات صددرصد ماهیان و غلظتی که هیچ تلفاتی در آن مشاهده نشد انتخاب گردید. درهر۲۴ ساعت، مخازن مورد بررسی قرار گرفته و میزان مرگ‌ومیر ثبت میگردید. این کار به مدت ۹۶ ساعت (۴روز) و هر روز راس ساعت ۹ صبح انجام گرفت و علائم ظاهری مسمومیت حاد با آمونیاک در ماهی ثبت گردید.

میزان LC_{10}، LC_{50} و LC_{90} با استفاده از روش آماری Probit Analysis محاسبه گردید. لازم به ذکر است که حداکثر غلظت مجاز M.A.C Value از تقسیمLC_{50} بر عدد ۱۰ حاصل می گردد (۲۹).

به منظور بررسی ضایعات احتمالی میکروسکوپی و هیستوپاتولوژیک مسمویت حاد با آمونیاک، پس از استخراج مقادیر LC_{50} یک سطح پایین (low) که ۲۵٪ غلظت LC_{50} می باشد و یک سطح بالا (High) که ۷۵٪ غلظت LC_{50} بوده را انتخاب و در هر دز تعداد ۳۰ عدد ماهی (۳تیمار در هر تیمار ۳ تکرار) را به مدت یک هفته در محلول آمونیاک قرار دادیم، پس از پایان این مراحل از هر تیمار تعدادی ماهی بصورت تصادفی جهت ارزیابی هیستوپاتولوژیک برداشت شد. سپس نمونه‌های بافتی در آزمایشگاه پس از طی مراحل پاساژ بافت،آماده برشگیری و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین شد ونهایتاً از لامهای تهیه شده توسط میکروسکوپ دوربین‌دار عکسبرداری گردید.

لازم به ذکر است که آمونیاک مورد استفاده در طی این تحقیق به صورت محلول بوده‌است و برای رسیدن به غلظت‌های موردنیاز در آب مخازن باید حجم صحیح و غلظت مورد استفاده را بدست آورد.

۳.نتایج

پس از آزمایش تعیین LC_{50} تعداد ماهیان مرده در هر غلظت، شمارش و در جدولی ثبت گردید (جداول ۱ و ۲)

بر این اساس میزان LC_{50} با استفاده از نمودارهای تعیین LC_{50} برای بچه تاسماهی ایرانی (نمودارهای ۱، ۲، ۳، ۴) برای هر دوره زمانی به دست آمد (جدول۳).

بررسی اسلایدهای تهیه شده از بافت آبشش بچه ماهیان ازون برون مورد آزمایش و مقایسه آن با نمونه بافت شاهد این نتیجه را دربرداشت که در غلظت‌های ۵ و۶/۲۳ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک کل پدیده های پرخونی، هیپرپلازی، چسبندگی رشته های آبششی ثانویه (شکل ۵)، در غلظت ۷/۷۶ میلی گرم در لیتر آمونیاک کل عوارضی چون پرخونی، خونریزی (زیاد)، هیپرپلازی، چسبندگی رشته های آبششی ثانویه (کم) و نکروز سلولی، در غلظت ۹/۶۶ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک کل پرخونی(خیلی زیاد)، نکروز سلولی، هیپرپلازی و چسبندگی رشته های آبششی ثانویه (زیاد)، تحلیل رفتن رشته های اولیه (زیاد) و گرزی شدن(کم)(شکل۶)، در غلظت ۱۲/۰۴ میلی گرم در لیتر آمونیاک کل پرخونی(خیلی زیاد)، خونریزی، هیپرپلازی، چسبندگی رشته های آبششی ثانویه (زیاد)، تورم

Archive of SID

www.SID.ir

رشته های اولیه (زیاد) و نکروز سلولی و در غلظت ۱۵ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک کل پرخونی، هیپرپلازی، چسبندگی (زیاد) و نکروز سلولی مشاهده گردید. بطور کلی در آبشش ازون برون عوارضی از قبیل هیپرپلازی، پرخونی، خونریزی، چسبندگی لاملا، نکروزسلولی و تورم رشته اولیه آبشش مشاهده گردید ولی شدت این عوارض از تیمار ۱ به سمت تیمار ۶ بیشتر بوده است.

در بررسی اسلایدهای تهیه شده از بافت کبد بچه ماهیان ازون برون عوارضی از قبیل پرخونی، رکورد صفراوی، نکروز سلولی ، دژنرسانس چربی، تورم ابری و آتروفی سلولی در کبد این ماهیان مشاهده شده ولی شدت آنها در هر تیمار متفاوت و حتی در تیماری ممکن است یکی از عوارض گفته شده دیده نشود. بطورکلی کبد این ماهیان سالم و عارضه خیلی کمتری نسبت به آبشش ها داشته و بیشترین صدمات مربوطه در آبشش این ماهیان مشاهده شده است. در تیمار۱ و ۲ (غلظت ۵ و ۶/۲۳ میلی گرم در لیتر آمونیاک) پرخونی و رکود صفراوی(زیاد) و خونریزی(کم) ،در تیمار ۳ (غلظت ۷/۷۶ میلی گرم در لیتر آمونیاک)پرخونی و رکود صفراوی(نسبت به تیمار ۲ کمتر) آتروفی سلولی، نکروز سلولی(کم) و خونریزی، در تیمار ۴ (غلظت ۹/۶۶ میلی گرم در لیتر آمونیاک)پرخونی و رکود صفراوی(نسبت به تیمار ۳ کمتر)، نکروز سلولی(زیاد) و آتروفی سلولی و دژنرسانس چربی (کم)، در تیمار ۵ (غلظت ۱۲/۰۴ میلی گرم در لیتر آمونیاک) پرخونی و رکود صفراوی و نکروز سلولی(کم) و خونریزی (زیاد)(شکل۷)و در تیمار۶ (غلظت ۱۵ میلی گرم در لیتر آمونیاک) نکروز سلولی و خونریزی (زیاد) و تورم ابری (کم) مشاهده گردید(۸).

در بررسی اسلایدهای تهیه شده از بافت کلیه بچه ماهیان ازون برون عوارضی چون پرخونی، نکروز سلولی، اتساع فضای بومن، هموسیدرین در تیمارها دیده شده است. این عوارض در تیمارهای مختلف متفاوت بوده بطوریکه از تیمار ۱ به سمت تیمار ۶ افزایش یافته است (شکل ۹ و ۱۰).

آزمایشات مجدد با مقادیر ٪۲۵-٪۵۰-٪۷۵ غلظت LC_{50} به دست آمده طی ۳ تیمار و در هر کدام با ۳ تکرار بر روی بچه ماهیان ازون برون صورت گرفت که در طی بررسی اسلایدهای تهیه شده از بافت آبشش، کبد و کلیه در سه تیمار مورد آزمایش و مقایسه آن با نمونه بافت شاهد این نتیجه را دربرداشت که در غلظت ۱/۵۰۸ و ۳/۰۱۷ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک کل عوارضی همچون پرخونی، هیپرپلازی و چسبندگی لاملای ثانویه در غلظت ۴/۵۲۶ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک کل پدیده های پرخونی، هیپرپلازی، چسبندگی لاملای ثانویه و نکروز سلولی در آبشش مشاهده گردید.

طی بررسی اسلایدهای تهیه شده از بافت کبد عواضی چون پرخونی، رکود صفراوی و خونریزی در تیمار ۱ و ۲ (غلظت ۱/۵۰۸ و ۳/۰۱۷ میلی گرم در لیتر آمونیاک کل) و به غیر از عوارض یاد شده نکروز سلولی در تیمار ۳ (غلظت۴/۵۲۶ میلی گرم در لیتر آمونیاک کل) مشاهده گردید و طی بررسی اسلایدهای تهیه شده از بافت کلیه عوارضی چون اتساع فضای بومن، پرخونی و نکروز سلولی در تیمارها مشاهده گردید بطوریکه شدت این عوارض از تیمار ۱ به سمت تیمار ۳ بیشتر بوده است.

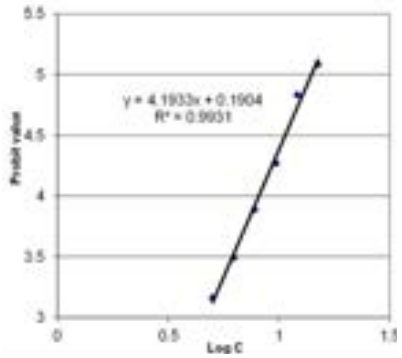
لازم به ذکر است که با توجه به آزمایش های انجام شده، نمودارهای تعیین LC_{50} با استفاده از برنامه های نرم افزاری SPSS و روش تحلیل آماری Probit Analysis رسم گردید و مورد تجزیه وتحلیل قرار گرفت.

همچنین حداکثر غلظت مجاز (MATC)، (NOEC) و (LOEC) به ترتیب با توجه به مقدار LC_{50} برای بچه ماهیان ازون برون ۰/۶، ۰/۶ و ۳/۴ میلی‌گرم در لیتر تعیین شد.

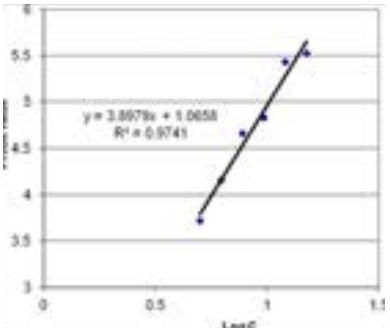
www.SID.ir
Archive of SID

جدول ۱- مقایسه اثر تیمارهای مختلف آمونیاک روی مرگ و میر بچه ماهیان ۳ گرمی ازون برون(میانگین ۳ تکرار) در طی ۹٦ ساعت

تیمار	غلظت Ppm	۲۴ ساعت تعداد تلفات	۴۸ ساعت تعداد تلفات	۷۲ ساعت تعداد تلفات	۹۶ ساعت تعداد تلفات
شاهد	۰	۰	۰	۰	۰
I	۵	۰/۳۳	۱	۲/۳۳	۳/۳۳
II	۶/۲۳	۰/۶۶	۲	۴	۵/۳۳
III	۷/۷۶	۱/۳۳	۳/۶۶	۵/۶۶	۶/۶۶
IV	۹/۶۶	۲/۳۳	۴/۳۳	۷/۳۳	۸/۶۶
V	۱۲/۰۴	۴/۳۳	۶/۶۶	۸/۳۳	۹/۶۶
VI	۱۵	۵/۳۳	۷	۹/۳۳	۹/۶۶

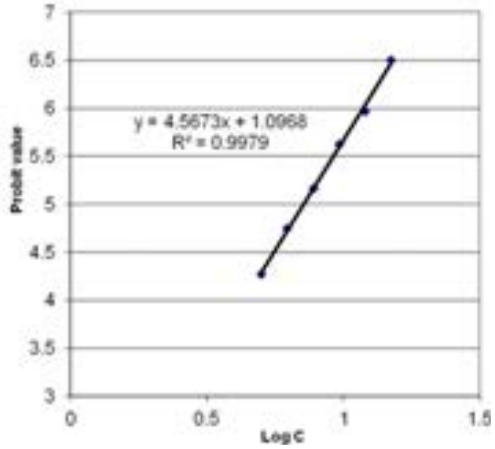


شکل۱- معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگی لگاریتم غلظت و *probit value* تاثیر آمونیاک در ازون برون در ٢٤ ساعت (میانگین سه تکرار)

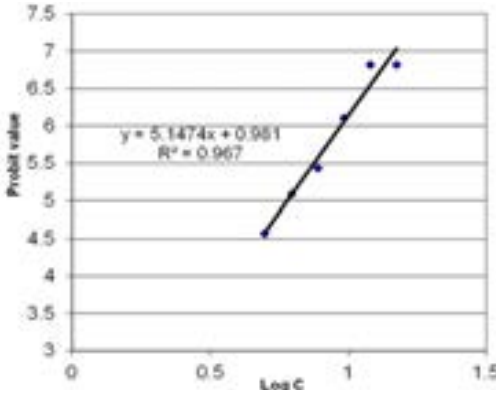


شکل۲- معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگی لگاریتم غلظت و *robit value* تاثیر آمونیاک در ازون برون در ٤٨ ساعت (میانگین سه تکرار)

www.SID.ir



شکل۳- معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگی لگاریتم غلظت و *probit value* تاثیر آمونیاک در ازون برون در ۷۲ ساعت (میانگین سه تکرار)

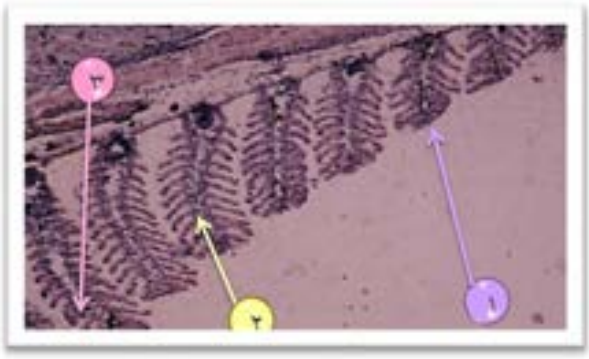


شکل٤- معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگی لگاریتم غلظت و *probit value* تاثیر آمونیاک در ازون برون در ۹٦ ساعت (میانگین سه تکرار)

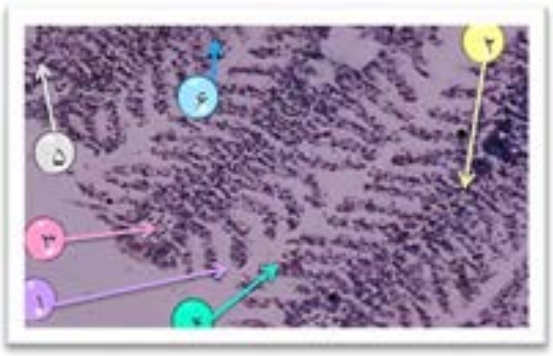
جدول ۲- مقادیر LC_{50} آمونیاک در گونه ازون برون

ردیف	زمان (ساعت)	میزان LC50 (PPM) ازون برون
۱	۲٤	۱٤/۰۲٤۹
۲	٤۸	۱۰/۲۱٦٤
۳	۷۲	۷/۱۵۳۱
٤	۹٦	٦/۰۳۵۳

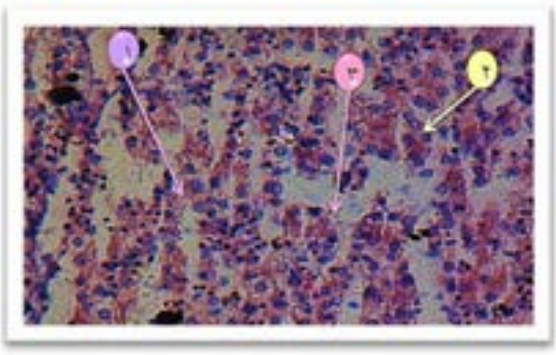
www.SID.ir



شکل۵- مشاهده چسبندگی رشته های آبششی ثانویه ۱، پرخونی۲و هیپرپلازی۳ در آبشش ازون برون در غلظت ۵ و ۶/۲۳ میلی گرم در لیتر
(H&E ،x۱۰)

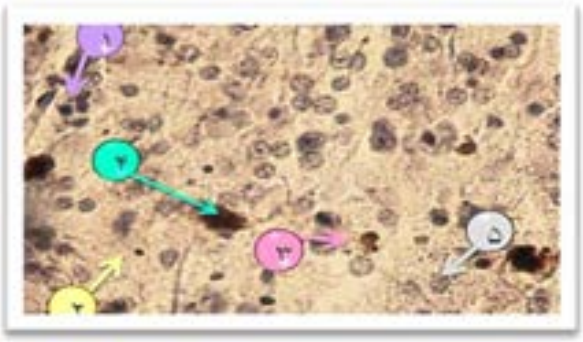


شکل٦-مشاهده هیپرپلازی۱، تحلیل رشته های آبششی اولیه۲، پرخونی۳، گرزی شدن٤، چسبندگی رشته های آبششی ثانویه٥ و نکروز سلولی ٦ در آبشش ازون برون در غلظت ۹/٦٦ میلی گرم در لیتر (H&E ،x٤٠)

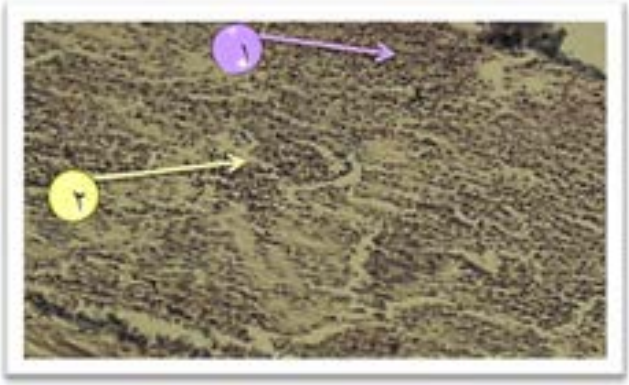


شکل۷- نکروز سلولی۱، خونریزی۲ و تورم ابری۳ در کبد ازون برون در غلظت ۱۵میلی گرم در لیتر (H&E ،x٤٠)

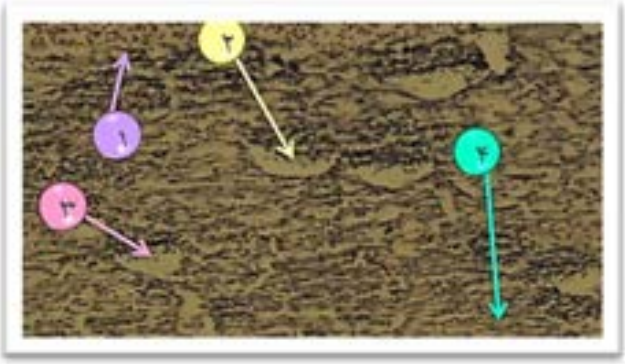
www.SID.ir



شکل۸-پرخونی۱، تورم ابری۲، خونریزی۳، رکود صفراوی٤ و نکروز سلولی٥ در کبد ازون برون در غلظت ٤/٥٢ میلی گرم در لیتر (H&E ،x٤٠)



شکل۹- مشاهده پرخونی۱ و اتساع فضای بومن۲ در کلیه ازون برون در غلظت ۹/٦٦ میلی گرم در لیتر (x۲۰، H&E)



شکل ۱۰- مشاهده پرخونی۱، اتساع فضای بومن۲، نکروز گلومرول۳ و نکروز سلولی٤ در کلیه ازون برون در غلظت ۱۲/۰٤ میلی‌گرم در لیتر (H&E ،x۲۰)

www.SID.ir

٤.بحث

به منظور تعیین غلظت نیمه کشنده و کشنده آمونیاک و بررسی آسیب شناسی مسمومیت حاد با آمونیاک($N\text{-}NH_4$ 96h) در بچه ماهی ازون برون این تحقیق اجرا شد. تا کنون اطلاعاتی در خصوص سمیت با آمونیاک در بچه ماهیان خاویاری گزارش نشده است. از اینرو افزایش و حفظ ذخایر تاسماهیان و بهبود درصد بقا ماهیان جوان که حساسیت بالاتری نسبت به آمونیاک دارند، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

حلالیت آمونیاک در آب بالا است، لذا هوادهی در خروج آمونیاک آب نقش چندانی ندارد(۲۸). لذا در آزمایشات از سیستم هوادهی مرکزی به عنوان هواده به منظور تامین بخشی از نیاز های تنفسی ماهی استفاده گردید. غلظت آمونیاک شدیدا تحت تاثیر دما و pH و مواردی دیگر از قبیل سطوح اکسیژن محلول، شوری، گونه جانوری، سن و سایز ماهی است(۴). علاوه بر آن تابعی از چرخه روزانه pH و CO_2 است (۱۵).

در مطالعات مختلفی به بررسی تاثیر آمونیاک بر رفتار گونه های مختلف ماهیان پرداخته شده است. اولین علائم مسمویت حاد با آمونیاک در ماهی شامل بی قراری، افزایش سرعت تنفس و آمدن ماهی به سطح آب می باشد در این حالت سرعت تنفس به تدریج بیشتر شده و حالت غیر منظم پیدا کرده و حالت تشنجی به دنبال دارد. ماهی نسبت به تحریکات خارجی به شدت واکنش نشان داده و سعی می کند از سطح آب بیرون بپرد (۳۹). بروز این حالت در نتیجه بروز آسیب در آبشش‌ها، کاهش فعالیت‌های تحرکی در غلظت کم آمونیاک، کاهش اشتها (آثار مخرب در رشد)، تیره شدن رنگ پوست بدن، بروز حالات عصبی، بلعیدن هوا از سطح، شنای سریع در غلظت‌هایی بالای آمونیاک، شدت تنفس و باز و بسته شدن سریع سرپوش آبششی و نهایتا مرگ ماهی است (۳، ۱۸ و ۲۴). تحقیق فوق مطالب عنوان شده را تایید می کند.

باریمو و پاتریک در سال ۲۰۰۵ اثرات حاد و مزمن آمونیاک را در مراحل اولیه زندگی ماهی دهان گشاد دریایی خلیج فارس، *Opsanus beta* نشان دادند که سمیت حاد آمونیاک LC_{50}-96h برای جنین و لارو این ماهی به ترتیب ۶۳/۶ و۵/۴۵ میلی مول-NL-۱ آمونیاک کل (TAmm)، بود بنابراین در مراحل ابتدایی زندگی مقاومتر است (۱۰). این گونه با افزایش سن تحملش در مقابل سمیت آمونیاک کاهش می یابد که میتواند بدلیل جایگاه، نحوه زندگی لاروی و متابولیسم کم جنین نسبت به لارو این گونه باشد (۱۰).

سازمان حفاظت محیط زیست در سال ۱۹۷۶و EIFAC در سال ۱۹۷۰ حداقل و حداکثر مجاز غلظت آمونیاک را به ترتیب ۰/۰۱۶ میلی‌گرم بر لیتر و ۰/۰۲۱ میلی گرم بر لیتر در طولانی مدت معرفی نموده است (۳۷). اسماعیل ساری حد قابل تحمل آمونیاک برای کپور ماهیان۲ppm و برای آزاد ماهیان ۰/۲ppm عنوان کرد (۱). مویر سطح آمونیاک غیر یونیزه که باعث کاهش رشد می‌شود به ترتیب برای قزل آلای رنگین کمان، خورشید ماهی، ماهی پهن توربوت و مار ماهی اروپائی ۰/۱۰۳، ۰/۰۶۶، ۰/۱ و ۰/۱۲ میلی‌گرم در لیتر بیان داشت (۳۱).

با توجه با اینکه حلالیت NH_3 در آب بسیار زیاد است و به راحتی نمی‌توان آن را از آب خارج کرد (حتی با هوادهی شدید)، بنابراین غلظت آمونیاک ایجاد شده در آب طی ۲۴ ساعت تقریبا ثابت است. بهمین دلیل روش آب ساکن بعنوان یک روش استاندارد برای ایجاد مسمویت حاد در ماهی مورد استفاده قرار گرفت. برای محاسبه LC_{50} ابتدا یک بررسی اولیه صورت گرفت تا محدوده ای که در آن تلفات اتفاق می افتد، بدست آید. سپس میزان LC_{50} در ۲۴ ساعت برای بچه ماهی ازون برون ۱۴/۰۲ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک کل بدست آمد. این مقدار در مقایسه با حد تحمل ماهی کپور که میزان LC_{50} آن در ۲۴ ساعت ۲۳/۴ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک کل بدست

Archive of SID

www.SID.ir

آمده بود(۷) بسیار پایین است که نشانگر تحمل نسبتا پایین ازون برون به مسمویت با آمونیاک نسبت به ماهیان گرمابی است. همچنین غلظت نیمه کشنده آمونیاک غیر یونیزه برای آزاد ماهیان در ۲۴ ساعت بین ۰/۸-۰/۵ میلی گرم در لیتر عنوان شد(۴) که نشانگر تحمل نسبتا پایین آزاد ماهیان نسبت به ازون برون است. با توجه به مقدار غلظت نیمه کشنده آمونیاک در تحقیق حاضر می توان عنوان نمود که ازون برون نسبت به آزاد ماهی ها مقاوم تر و نسبت به ماهیان گرمابی حساس تر هستند.

میزان LC_{50} هیچگاه یک مقدار ثابت مطلق نبوده به این دلیل که فاکتورهای زیادی نظیر اختلافات فردی، سنی، جنسی، وزنی، عوامل محیطی، ویژگیهای آب، نحوه تجویز و سایر فاکتورهای دیگر در تعیین LC_{50} مؤثر هستند(۱۳) و با توجه به اینکه سمیت آمونیاک در ماهیها تابع فاکتورهای زیست محیطی از قبیل pH، دما، ثابت یونیزاسیون آب، چرخه روزانهpH و دی اکسید کربن و فاکتورهای بیولوژیک همانند تاریخچه حیات و سن ماهیان و همچنین می تواند به مقدار، مدت زمان و گونه و اندازه ماهی ارتباط داشته باشد، لذا در شرایط مختلف حضور آمونیاک، نتایج متفاوتی را می تواند نشان دهد (۱۵).

در شرایط پرورشی عوامل نامساعد محیط از قبیل کمبود اکسیژن محلول، افزایش درجه حرارت، وجود مواد سمی(متان و سولفید هیدروژن) می تواند سمیت آمونیاک را تشدید کند.این تحقیق حساسیت گونه های مختلف ماهی را در برابر آمونیاک در شرایط بهینه نشان می دهد.

براون در سال ۱۹۶۸ کاهش دما به زیر ۳ درجه سانتیگراد را کاهش سرعت سم زدایی در ماهیان برای آمونیاک غیریونیزه دانست. Miron و همکارانش در سال۲۰۰۸ LC_{50}-96h، آمونیاک غیریونیزه برای گربه ماهی نقره ای در pH برابر با ۶، ۷/۵ و ۸/۲ به ترتیب ۲/۰۹، ۱/۴۵ و ۰/۴۴ بدست آورد (۳۰)، بنابراین با افزایش pH مقاومت ماهی کاهش می یابد.

Wang و Walsh در سال ۱۹۹۹ و LC_{50}- 96h سه گونه ماهی از خانواده وزغ ماهیان *Batrachoididae*، ماهی دهان گشاد دریایی خلیج فارس (*Opsanus beta*) ، ماهی دهان گشاد اویستر دریایی (*Opsanustau*) و ماهی دهان گشاد ساده باله دریایی (*Porichthys notatus*) به ترتیب ۹/۷۵، ۱۹/۷۲و ۶ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک کل محاسبه شد. بنابراین حساسیت گونه‌های یک خانواده به آمونیاک متفاوت است (۴۳).

جنی در سال ۱۹۹۲ با مطالعه روی کپور ماهیان در غلظتهای مختلف آمونیاک عوارضی چون پرخونی و خونریزی آبششها را ملاحظه نمود (۲۳). نوف در سال ۱۹۹۶با مطالعه روی اسمولت ماهی آزاد نشان داد در غلظتهای بالای آمونیاک شنای سریع و ناموزون، تهویه کند آبششی و تشنجات عصبی رخ می‌دهد. آسیب به آبشش‌ها در غلظتهای مختلف آمونیاک سبب کاهش انتقال اکسیژن به خون و بافتها میگردد که در نهایت منجر به مرگ ماهی میشود (۲۴). تشنجات عصبی شدید ماهیان در آزمایش، شاید به همین دلیل است. بروز هایپرپلازی در بافت آبششها نیز توسط Larmoyeux و Pier در سال ۱۹۷۳، به علت قرار گرفتن طولانی مدت در غلظت‌های کمتر از حد کشنده حاد گزارش گردید (۲۵).

عوارض دیده شده در آبشش ماهی در واقع یک پاسخ عمومی به تحریکات جهت محافظت یا سازش می باشد. این عوارض بر تبادلات گازی و تنفس تأثیر گذاشته و در حالات شدیدتر می تواند منجر به اتصال تیغه های مجاور به یکدیگر و جلوگیری از تبادلات گاز شده و در نهایت منجربه مرگ شود (۹ و ۱۰). وقتی آبشش بمدت طولانی در معرض آلاینده های محیطی قرار گیرد، دچارتخریب و بروز عوارض مختلف بافتی می گردد (۳۵). این عوارض بافتی موجب حساسیت ماهی نسبت به بیماری های ثانویه و بصورت بالقوه مرگ ومیر ماهیان می شود (۲۰).

www.SID.ir
Archive of SID

در مسمومیت مزمن ماهی با آمونیاک(مقدار پایین تر از حد کشنده)، در بافت پوششی آبشش ها ازدیاد سلولی(ضایعات آبششی)، کاهش میزان رشد و درصد بقای ماهیان، حساسیت به عوامل عفونی، ضایعات کبدی و کلیوی مشاهده می‌شود (۱۹ و ۳۸).

میلن و همکارانش در سال ۱۹۹۹ اثرات کوتاه مدت در معرض پالس‌های آمونیاک بر ماهی را مورد بررسی قرار داد. در معرض مداوم دزهای بالای آمونیاک، مواردی از قبیل اختلال در رشد، آبشش، وزن و هماتوکریت بیشتر در ماهیان دیده شد (۲۹).

Wlasow وهمکاران در سال۱۹۹۰ نشان دادند قرار گرفتن کپور معمولی در معرض غلظت‌های کم آمونیاک در مدت ۵ هفته منجر به بروز اختلالاتی در ترکیب خون و بافتهای خونساز به ویژه راس کلیه و طحال ماهیان میشود. تخریب لوله های کلیوی و گلومرولها باعث مختل شدن عملکرد کلیه می شود (۴۴) که در این تحقیق ملاحظه شد.

Fergason در سال ۱۹۸۹ (۱۸) و Soderber در سال ۱۹۸۵ (۳۸) نشان دادند در مسمویت مزمن با آمونیاک (مقدار پایینتر از حد کشنده) میزان رشد و درصد بقا کاهش یافته و ماهی نسبت به عوامل عفونی حساس‌تر می‌شود. این حالات معمولا با ضایعات آبششی، کبدی و کلیوی همراه است.

آمونیاک باعث استرس در ماهی می شود که سبب افزایش آدرنالین، نورآدرنالین و کورتیکواستروئیدها می شود (۲۳).

مرگ ماهی ها در مسمویت حاد با آمونیاک را میتوان بدلیل بهم خوردن تعادل اسمزی بدن ماهی در اثر آسیب‌های کلیوی و آبششی(۱۶)، کاهش قابلیت حمل اکسیژن توسط خون (۱۶)، کاهش ورود اکسیژن به بدن ماهی در اثر آسیب‌های آبششی (۱۶) و اختلال در متابولیسم سلول‌های مغزی (اختلالات عصبی) (۳۷). این آسیب‌ها در اثر اختلال در خواص الکتروشیمیایی غشای سلول‌های عصبی و تاثیر آمونیاک بر نروترنسمیترها و فعالیت‌های بیوشیمیایی مغز است (۳۸).

زئولیت‌ها در واقع یک نوع رزین معدنی از سنگ‌های طبیعی هستند که قادرند کاتیونهای موجود در محیط از جمله آمونیاک را گرفته و یون سدیم آزاد کنند، بدون آنکه تغییری در ساختمان آنها ایجاد شود. تحقیق حاضر می‌تواند در تعیین میزان زئولیت لازم برای کاهش مسمومیت با آمونیاک و حذف آمونیاک در مراکز پرورش ماهی خاویاری بسیار مناسب باشد (۳).

سپاسگزاری

از استاد محترم جناب آقای مهندس محمد حسین طلوعی که مجدانه و صمیمانه اینجانب را راهنمایی نموده اند سپاسگزار وممنونم.

از جناب آقای مهندس علی حلاجیان که در انجام این پروژه مرا راهنمایی و کمک کردند تشکر و قدردانی می نمایم.

منابع

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

۲.اسماعیلی ساری،ع.۱۳۸۳. هیدروشیمی بنیان آبزی پروری. انتشارات اصلانی. اول،ص ۳۵-۶۰.

۳.پیغان، ر. ۱۳۷۸. بررسی تجربی مسمویت حاد با آمونیاک در کپور معمولی براساس تغییرات هیستوپاتولوژیک و آنزیمهای سرمی و امکان پیشگیری آن با زئولیت. پایان نامه دکتر تخصصی بهداشت و بیماریهای آبزیان. دانشکده دامپزشکی. ص ۱۰۴.

۴.شریف روحانی،م. ۱۳۷۴.تشخیص، پیشگیری و درمان بیماریها و مسمویت های ماهی. معاونت تکثیر و پرورش آبزیان انتشارات سبز رویش. ۲۵۶ صفحه.

Archive of SID

www.SID.ir

۵.مشائی ، م . ع . ۱۳۷۹. تاثیر نیتریت در استخرهای پرورش ماهی . فصلنامه آبزی پرور . تهران سال هشتم. شماره ۳۱ . ص ۶ تا ۹.

۶.نصیری،ا.۱۳۸۶.بررسی اثر سمیت آمونیاک بر بافتهای آبشش و کبد ماهی کپور معمولی. پایان نامه کارشناسی ارشد به راهنمایی سرکار خانم طاهره ناجی. ص ۱۸.

۷.وثوقی، غ، مستجیر ب. ۱۳۷۳. ماهیان آب شیرین. انتشارات دانشگاه تهران.ص۱۲۱-۹۳.

8.Altuf_yev, Yu.V., A.A. Romanov and N.N.Sheveleva. 1992. Histology of the striatedmuscle tissue and liver in Caspian Sea sturgeons.J. Ichthyol., 32: 100–116.

9.Altufiev, YU. 1997. Morphplunctional abnormalities in some organs and tissues of the Caspian sturgeon (Acipenseridae) 3rd ISS, 97.

10.Barimo,F& Patrick, J.2005.The effects of acute and chronic ammonia exposure during early life stages of the gulf toadfish, Opsanus beta. August2005.pp225-237.

11.Billard, R. and G. Lecointer .2001. Biology and conversation of sturgeon and paddlefish. Rev. Biol. Fisher., 10: 355-392.

12.Bradley and rourke,1984,Investigation of hepatic cytosolic proteins during parr-smolt transformation of Atlantic salmon (*Salmo salar*) ,November 1989, Pages 1-14.

13.Broderius, S.J., Drummond, R.A.,Fiandt, J.T., &Russom, C.L.(in press)Toxicity of ammonia to smallmouthbass, Micropterusdolomieui, asrelated to pH. Environ. Toxicol.Chem.. vol.9.No.4:pp228-234.

14. Chen, J.C., 1992. Effects of ammonia on growth and molting of penaeusjaponicus juveniles. Aquaculture 104:249-260.

15.Chen, J.C., 1992. Effects of ammonia on growthand molting of penaeusjaponicus juveniles.Aquaculture, 104:249-260.

16.Colt,J&Tchobanoglous,G.1979. Chronic exposure of cannel cat fish, Ictaluruspunctatus,to ammonia: effect of growth and survival.Aquaculture.15.353-372.

17.Evans, D.H. 1993. The physiology of fishes. CRC Press Inc. Pp: 379-425.

18.Fergason, H. w. 1989. Systemic pathology in fish. Lowa state university press publication. 429-430.

19.Hargreaves, J. A., Tucker, C. S., 2004. Managing Ammonia in Fish Ponds, SRACpublication no.4603,pp1-4.

20.Haaparanta, A., Voltenen, E.T. &Hoffman, R.W.1997. Gill anomalies of perch and roach from four lakes differing in water quality.J.Fish.Biol.50:575-591.

21.Israeli-Weinstein, D. and Kimmel, E. 1998. Behavioral response of carp (*Cyprinuus carpio*) to ammonia stress Aquqcalture 165. P: 81-93.

22.IUCN; IUCN Red List of Threatened Animals.Gland, Switzerland: IUCN. 1996; 70: 235-236.

23.Jeney,Z.S.&Nemcsok,J.&Jeney,G.&Olah,J . 1992. Acute effect of sublethal ammonia concentrations on common carp.1:effect of ammonia on adrenalin and and noradrenalin in levels in different organs. Aquaculture. vol.10. No.4.pp139-148.

24.Knoph, M.B. 1996. Gill ventilation frequency and mortality of Atlanticsalmon(*salmo salar*) exposed to high ammonia levels in saewater. Water esearch, 30:837-842.

25.Larmoyeux, J.D. and R.G. Piper. 1973. Effects of water reuse on rainbow trout in hatcheries. Prog. Fish-Cult. 35(l): 2-8.

26.Maetz, J. 1972. Branchial sodium exchange and ammonia excretion in the goldfish Carrassius auratus. Effects of ammonia-loading and temperature changes. J. Exp. Biol. 56, 601-620.

Archive of SID

www.SID.ir

27.Maetz, J. 1972. Branchial sodium exchange and ammonia excretion in the goldfish Carrassius auratus. Effects of ammonia-loading and temperature changes. J. Exp. Biol. 56, 601-620.
28.Maladen, T. 1994. Acute toxicity of ammonia to juvenile seabass (*Dicentrachus labrax*) at different aeration levels. Aquaculture. 128: 85-95.
29.Milne,I.; Seager,J.; Mallett,M & Sims,I. 2000. Effects of short-term plused ammonia exposure on fish. April 2000.pp2929-2936.
30. Miron,S.; Moraes,B.; a, Becker,A,; Crestani,M.;Spanevello,S.;
Loro,L.&Baldisserotto,B. 2008. Ammonia and pH effects on some metabolic parameters and gill histology of silver catfish, Rhamdiaquelen (Heptapteridae). February 2008.pp192-196.
31.Muir, J.F. 1982. Recirculated water system in aquaculture.Aquaculture. 104: 249-260.
32.Otto Paust, L.; Foss, A .&Imsland,K. 2011. Effects of chronic and periodic exposure to ammonia on growth, food conversion efficiency and blood physiology in juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossusL.*). March 2011.pp400-406.
33.Randall,D& K. Ip,Y.2006. Ammonia as a respiratory gas in water and air-breathing fishes. April 2006.pp219-225.
34.Romanov, A.A. and N.N. Sheveleva. 1993. Disruption of gonadogenesis in Caspian sturgeons. J. Ichthyol., 33: 127-133.
35.Schlenk,D.&Benson,W.H. 2001.Target organ toxicity in marine and fresh water teleosts.Taylor & Fransis:1-90
36.Smart, G.R. 1981.Aspects of water quality producing stress in intensive fish culture. In: Pickering, A.D. (Ed), Stress and fish, Academic press, London, pp: 276-293.
37.Smart,G.R. 1981.Aspects of water quality producing stress in intensive fish culture. In: pickering, A.D.(Ed), Stress and fish,Academic press, London, pp:276-293.
38.Soderberg, G.R.W. 1985.Histopathology of rainbow trout, salmo gairdneri.
39.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.
40.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.
41.T.R.C. 1984. OECD Guidelines for testing of chemicals section 2. Effects on bioticsystems. Pp.1-39.
42.Thomas, S.L. and piedrahita, R.H. 1998. Apparent ammunia-nitrogen production rates of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) in commercial aquaculture systems. Aquaculture Engineering 17, pp: 45-55.
43.Wang,Y& Walsh,P. November1999.High ammonia tolerance in fishes of the family Batrachoididae (Toadfish and Midshipmen).1999.pp205-219.
44.Wlasow,T.&Dobrowska,H.&Ziomek,E. 1990. Haematology of carp in acute intoxication with ammonia. Pol.Arch.Hydrobiol.37.3.419-428.

Archive of SID

www.SID.ir