ارزیابی اثرات استرس‌های ناشی از آمونیاک روی فاکتورهای خونی، فاکتورهای استرس و بافت آبشش ماهی سوروم (*Heros severus* Heckel, 1840)

احمد ترمه یوسفی[۱]، حسین خارا[۲] و محدثه احمدنژاد[۳]*

[۱] رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، پردیس علوم و تحقیقات گیلان، گروه شیلات

[۲] لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، گروه شیلات

[۳] بندرانزلی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، پژوهشکده آبزی پروری آب های داخلی

تاریخ دریافت: ۹۶/۷/۷ تاریخ پذیرش: ۹۷/۲/۳۱

چکیده

افزایش آمونیاک آب می‌تواند بعنوان یک عامل استرس‌زای شیمیایی باعث پاسخ‌های فیزیولوژیک غیراختصاصی در ماهی گردد. این بررسی با هدف تعیین مقدار مجاز آمونیاک و تاثیر آن بر شاخص‌های خونی، شاخص استرس و بافت آبشش ماهی سوروم (*Heros severus*) انجام شد. برای این‌منظور یک گروه شاهد و پنج تیمار آمونیاک (۰/۱، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۸ و۱/۲ میلی‌گرم در لیتر) در سه تکرار انتخاب شدند. ۱۸۰ قطعه ماهی به‌مدت ۱۲ ساعت در مخازن ۵۰ لیتری حاوی مقادیر مختلف آمونیاک قرار گرفتند. پس از خونگیری از ماهیان، فاکتورهای خونی و شاخص‌های استرس اندازه‌گیری شدند. همچنین از بافت آبشش ماهیان نمونه-برداری و بافت شناسی بعمل آمد. نتایج نشان داد که گلبول سفید در تیمار ۳ به اوج خود رسید ($p<0.05$). کمترین گلبول قرمز خون در تیمار ۵ دیده شد ($p<0.05$). علیرغم افزایش آمونیاک مقادیر هموگلوبین، هماتوکریت، MCV، MCH، MCHC، مونوسیت و ائوزینوفیل فاقد اختلاف معنی‌دار آماری بودند ($p>0.05$). کورتیزول در دو تیمار اول افزایش یافت اما در سه تیمار بعدی کاهش یافت و گلوکز نیز در تیمار اول به کمترین مقدار رسید و در سایر تیمارها افزایش قابل توجهی نشان داد ($p<0.05$). بیشترین آسیب بافتی در تیمار ۵ با عوارضی مانند هایپرتروفی سلول‌های اپیتلیوم لاملا، چسبندگی لاملاها، جدا شدن و برآمدگی اپیتلیوم لاملا، نکروز شدید در اپیتلیوم لاملا و فیلامنت و نکروز و تخریب دستگاه پیلار مشاهده شد. بنابراین بهتر است مقدار آمونیاک موجود در آب جهت پرورش ماهی سوروم از مقدار ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر تجاوز ننماید.

واژه های کلیدی: آمونیاک، آبشش، شاخص‌های خونی، کورتیزول، گلوکز، ماهی سوروم (*Heros severus*).

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۱۱۳۹۳۶۲۹ ، پست الکترونیکی: m_ahmadnezhad@yahoo.com

مقدمه

ماهی سوروم (*Heros severus* Heckel, 1840) از گونه-های آب شیرین است که پرورش و نگهداری آن آسان می‌باشد. امروزه یکی از مهم‌ترین دغدغه‌های بشریت مسئله افزایش مواد آلاینده در محیط زیست بخصوص آب‌ها است (۵۷ و ۶۶). از مهم‌ترین آلاینده‌ها می‌توان به ترکیبات نیتروژنی اشاره کرد که خطرناک‌ترین آن آمونیاک می‌باشد. نیتروژن آمونیاکی در محیط آب به شکل آمونیاک یا یون آمونیوم موجود است. درصد توزیع آمونیاک به pH بستگی دارد و در pH محدوده ۸، یون آمونیوم یون غالب می‌باشد (۳۴).

ازت یکی از مهم‌ترین عوامل زیستی است که در استخر-های پرورش ماهی یافت می‌شود. مقدار بیش از ۰/۵ میلی-گرم در لیتر آمونیاک ممکن است سبب مرگ و میر و تلفات زیاد شود (۱۶). آمونیاک عمده‌ترین محصول دفعی

ماهی است که توسط آبشش و کلیه دفع می‌شود که البته آبشش بیشترین نقش را عهده‌دار است. آمونیاک کل به مجموع آمونیاک یونیزه شده (آمونیوم NH_4^+) و آمونیاک غیریونیزه (NH_3) اطلاق می‌شود که سمیت آمونیاک غیر یونیزه بیشتر از نوع یونیزه آن است. نسبت این دو ترکیب وابسته به pH، دمای آب و ثابت یونیزاسیون آب، چرخه روزانه pH و دی‌اکسیدکربن می‌باشد که در این میان pH از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، بطوریکه با افزایش pH آب از مقدار آمونیوم کاسته شده و بر آمونیاک افزوده می‌گردد. این پدیده تعادلی بصورت زیر می‌باشد (۳۸).

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

همانطورکه از این رابطه مشخص است تبدیل آمونیاک به آمونیوم با تولید یون هیدروکسید (عامل OH) همراه است که در زمان افزایش pH واکنش به سمت تولید آمونیاک حرکت می‌کند (۱۳). در ماهیان آب شیرین قسمت اعظم آمونیاک از طریق آبشش اما در ماهیان آب شور علاوه‌بر آبشش و کلیه درصدی هم از طریق پوست دفع می‌شود (۲۷).

خون بافتی سیال است که سایر بافت‌ها را به یکدیگر مرتبط می‌سازد (۱۱). بررسی روی فاکتورهای خونی و سرمی ماهیان نشان‌دهنده ارتباط آن‌ها با شرایط محیطی، تغذیه‌ای و سن می‌باشد (۱۲). شناخت فاکتورهای خونی هم سبب شناخت فیزیولوژی آبزی و هم شاخص مهم هر گونه است (۱۷ و ۲۲). در نتیجه افزایش تراکم ماهی در سطح، عوامل استرس‌زای زیادی بر ماهی تاثیر می‌گذارند (۴۱). ماهیان پس از مواجهه با استرس به روش‌های متفاوتی هومئوستازی بدن خود را حفظ می‌کنند که ترشح هورمون کورتیزول یکی از این روش‌هاست (۱۹). اندازه‌گیری کورتیزول پلاسما معمولا بعنوان شاخص پاسخ اولیه استرس مورد ارزیابی قرار می‌گیرد (۱۸). چون آبشش ماهیان نقش بسیاری در مکانیسم‌های تنظیم یونی برعهده دارد (۱۴) بعنوان یک اندام تنظیم یونی مهم و همچنین بعنوان اندام مبادله‌کننده گازهای تنفسی اصلی استفاده می‌شود (۶۲). داشتن نواحی سطحی وسیع و تبادل گازی بسیار کارآمد از ویژگی آبشش‌ها می‌باشد (۶۵). ماهیان در موارد لزوم با افزایش تیغه‌ها و نزدیک‌تر کردن فاصله بین آن‌ها و افزایش طول تیغه‌ها، ناحیه سطحی آبشش‌ها را جهت دریافت اکسیژن بیشتر افزایش می‌دهند (۲۳).

تاکنون مطالعه‌ای درباره اثرات آمونیاک روی ماهی سوروم صورت نگرفته است ولی مطالعات متنوعی در زمینه آسیب‌های بافتی و استرس‌های محیطی و اثر آن‌ها روی فاکتورهای هماتولوژیکی خون صورت پذیرفته که مهم‌ترین آن‌ها بررسی اثرات آسیب‌شناسی آمونیاک در آبشش، کبد و کلیه بچه تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*)(۲) و بررسی غلظت کشنده آمونیاک و تاثیر آن بر وضعیت هیستوپاتولوژی آبشش، کلیه و کبد بچه ماهی ازون برون (*Acipenser stellatus*) می‌باشد (۳).

تحقیق حاضر با هدف تعیین مقدار مجاز آمونیاک و تاثیر آن بر روند تغییرات شاخص‌های خونی، استرسی و بافت آبشش ماهی سوروم به‌انجام رسید.

مواد و روشها

این آزمایش در تابستان ۱۳۹۴ در کارگاه تکثیر و پرورش مهندس رفعتی انجام شد. ۱۸۰ عدد ماهی با وزن اولیه ۸±۰/۵ گرم در ۱۸ عدد آکواریوم ۵۰ لیتری (آب چاه) به مدت ۱۲ ساعت مورد آزمایش قرار گرفتند. بعد از سورت‌بندی، ماهیان با شرایط جدید محیطی سازگار شدند. دو روز قبل از شروع آزمایش غذادهی قطع شد. محدوده کشندگی با استفاده از منابع مشابه و بصورت آزمون و خطا تعیین شد، بطوریکه این محدوده ۰/۱ تا ۱/۲ میلی‌گرم در هر لیتر آب بدست آمد (جدول ۱).

تعداد ۳ ماهی از هر تیمار (هر تکرار یک ماهی) جهت خونگیری انتخاب شد. نمونه‌برداری از خون ماهیان بطور تصادفی انجام گردید.

جدول ۱- تیماربندی تحقیق و دوزهای مختلف آمونیاک استفاده شده در تیمار ماهیان سوروم

شماره گروه آزمایشی	نام گروه آزمایشی	میزان دوز آمونیاک (میلی‌لیتر در هر لیتر)
۱	شاهد	-
۲	تیمار ۱	۰/۱
۳	تیمار ۲	۰/۲
۴	تیمار ۳	۰/۴
۵	تیمار ۴	۰/۸
۶	تیمار ۵	۱/۲

ابتدا ماهیان با عصاره گل میخک بیهوش شده و خونگیری با کمک سرنگ انسولین از رگ‌های ناحیه دمی انجام گرفت (۳۱). از هر تکرار سه نمونه خون به میزان ۲ سی-سی برداشت شد. پس از منعقد شدن نمونه‌ها، آن‌ها با سرعت ۳۵۰۰ دور در ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند (۴۶). شاخص‌های خونی بلافاصله پس از خونگیری و انتقال به آزمایشگاه بررسی شدند. گلبول سفید و قرمز بوسیله یک پیپت ملانژور سفید برای گلبول سفید و یک پیپت ملانژور قرمز برای گلبول قرمز انجام شد و شمارش با استفاده از محلول رقیق‌کننده ریس و لام نئوبار پیشرفته صورت گرفت. سپس گلبول‌های قرمز با لنز ۴۰ و گلبول‌های سفید با لنز ۲۰ میکروسکوپ نوری نیکون مدل E600 شمارش شدند (۳۹).

۱۰۰۰۰ × (تعداد گلبول قرمز در ۵ مربع کوچک) X = تعداد گلبول قرمز در میلی‌متر مکعب خون

۵۰ × (تعداد گلبول سفید در ۴ مربع کوچک) X = تعداد گلبول سفید در میلی‌متر مکعب خون

مقدار هموگلوبین هر نمونه خون به روش کالریمتریک سیانوهموگلوبین بوسیله محلول معرف و با استفاده از اسپکتروفتومتر (مدل UV/VIS- ۶۵۰۵، شرکت Jenway، ساخت انگلیس) با طول موج ۵۴۰ نانومتر انجام شد (۳۹) که این کار با استفاده از کیت پارس آزمون ساخت ایران، بر حسب گرم در دسی‌لیتر محاسبه شد. برای تعیین درصد هماتوکریت از روش میکروهماتوکریت استفاده شد. لوله‌ها در داخل میکروسانتریفوژ (مدل D-78532 Tuttlingen ساخت شرکت Hettrich آلمان) قرار داده شد و به مدت زمان ۷ دقیقه با دور ۷۰۰۰ سانتریفوژ گردید (۳۵). پس از اندازه‌گیری فاکتورهای خونی با استفاده از اعداد بدست آمده و روابط ریاضی شاخص‌های خونی زیر محاسبه گردید (۳۹):

$$\text{M.C.V} = \frac{\text{HCT}(\%) \times 10}{\text{RBC / million}}$$

$$\text{M.C.H} = \frac{\text{Hb(gr\%)} \times 10}{\text{RBC / million}}$$

$$\text{M.C.H.C} = \frac{\text{Hb} \times 100}{\text{HCT}}$$

تشخیص افتراقی گلبول‌های سفید بوسیله متانول ۹۶٪ و محلول ۱۰٪ گیمسا (ساخت شرکت Merck آلمان) جهت رنگ‌آمیزی و شمارش انواع گلبول‌های سفید نظیر نوتروفیل، لنفوسیت، مونوسیت و ائوزینوفیل به روش زیگزاگ با استفاده از دستگاه شمارنده دستی انجام شد (۳۹).

اندازه گیری کورتیزول با واحد نانو گرم در میلی لیتر با روش رادیو ایمونواسی(Radioimmunoassay) و با استفاده از کیت هورمونی (125I RIA Kit) شرکت ایمونوتک (Immunotech) ساخت کشور فرانسه انجام شد (۵۱). اندازه گیری گلوکز براساس واکنش رنگ سنجی با اتوانالایزر Biotecnica ساخت ایتالیا و با واحد (میلی گرم بر دسی لیتر) سنجش شد. از کالیبراتور و کنترل های تجارتی برای صحت و دقت روش فوق استفاده شد.

بمنظور ارزیابی اثرات آسیب‌شناسی آبشش ماهیان، از بین هر تیمار چهار عدد ماهی بصورت تصادفی صید و از بافت‌های آبشش آن‌ها جهت تهیه لام نمونه‌برداری صورت گرفت و در محلول بوئن به مدت ۲۴ ساعت فیکس شدند. سپس نمونه‌های فیکس شده توسط اتانول با درجات ۵۰،

۷۰، ۸۰ ، ۹۶ و الکل ۱-بوتانل آبگیری شده و در مرحله بعدی عمل شفاف‌سازی (جایگزینی کلروفرم به‌جای الکل و جذب چربی بافت) صورت گرفت. پس از شفاف نمودن، نمونه‌های بافت آبششی بوسیله پارافین مذاب پارافینه و قالب‌گیری شدند (۴ و ۷). با استفاده از میکروتوم از قالب‌های پارافینه حاوی بافت آبشش برش‌های بافتی به ضخامت ۷ میکرون (۲۱) تهیه و برش‌های بافتی به روش ائوزین-هماتوکسیلین رنگ‌آمیزی شدند (۳۷). نمونه بافت‌ها پس از رنگ‌آمیزی بوسیله میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین و متصل به کامپیوتر مورد مطالعه قرار گرفتند (۸).

برای تجزیه و تحلیل کلیه داده‌ها از نرم‌افزار SPSS 18 و برای رسم نمودارها از برنامه Excel 2013 استفاده گردید. داده‌ها ابتدا جهت اطمینان از نرمال بودن با آزمون (Shapiro-wilk) بررسی شدند. سپس توزیع داده‌های مورد بررسی با استفاده از آزمون واریانس یکطرفه (Oneway ANOVA) در سطح اطمینان ۹۵٪ ابتدا اختلاف کلی بین میانگین‌ها مشخص و سپس با آزمون (Duncan) گروه‌ها از یکدیگر تفکیک گردیدند.

نتایج

نتایج حاصل از تاثیر مقادیر مختلف آمونیاک روی ماهی سوروم نشان داد که با افزایش مقادیر آمونیاک در تیمار ۰/۴ mg/l و بمنظور مقابله با شرایط نامساعد تعداد گلبول-های سفید به اوج خود می‌رسند. ضمن اینکه در تیمارهای ۰/۸ mg/l و ۱/۲ mg/l به دلیل افزایش دوز آمونیاک و تشدید شرایط نامساعد مقدار گلبول‌های سفید روند کاهشی به خود می‌گیرد. در مجموع این تغییرات موجب اختلاف‌های معنی‌داری بین تیمارهای تحت تاثیر آمونیاک، بویژه در دوزهای بالاتر با شاهد می‌شود. بطوریکه براساس آزمون آنالیز واریانس یکطرفه و آزمون دانکن اختلاف‌های آماری معنی‌دار هستند ($p<0.05$). افزودن مقادیر مختلف آمونیاک موجب کاهش تعداد گلبول‌های قرمز خون ماهی سوروم شد. بطوریکه بیشترین کاهش گلبول‌های قرمز خون در تیمار ۱/۲ mg/l دیده شد. از طرفی براساس آزمون واریانس یکطرفه و دانکن این تفاوت‌ها معنی‌دار بودند ($p<0.05$). میزان هموگلوبین نیز روند کاهشی داشت اما مقدار آن با شاهد اختلاف معنی‌دار آماری نشان نداد ($p>0.05$). کمترین مقدار هماتوکریت در تیمار ۱/۲ mg/l دیده شد که معنی‌دار نبود ($p>0.05$). میزان MCV در دو تیمار اول نسبت به تیمار شاهد تقریبا ثابت بود و در سه تیمار آخر ابتدا میزان آن افزایش و سپس کاهش یافت ولی در مجموع بین تیمارها اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نشد ($p>0.05$). سطح تغییرات در MCH و MCHC، نیز بدون اختلاف معنی دار آماری بود ($p>0.05$). میزان نوتروفیل در دو تیمار اول دارای تغییرات جزئی و کاهشی بود ولی در تیمارهای بعدی با افزایش دوزهای آمونیاک میزان نوتروفیل نیز افزایش یافت بطوریکه تیمارهای ۰/۸ mg/l و ۱/۲ mg/l نسبت به تیمار ۰/۲ mg/l بطور معنی‌داری بالاتر بودند ($p<0.05$)، اما میزان نوتروفیل در هریک از تیمارها نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی دار وجود نداشت ($p>0.05$). میزان لنفوسیت ابتدا روند افزایشی داشت ولی از تیمار ۰/۲ mg/l تا تیمار ۱/۲ mg/l این روند معکوس و کاهشی گشت. در مورد میزان لنفوسیت نیز، در هریک از تیمارها نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی دار وجود نداشت ($p>0.05$). در حالیکه تیمار ۴ و ۵ نسبت به تیمار دوم کاهش معنی‌دار داشتند ($p<0.05$). درمورد مونوسیت، بین تیمارها اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نگردید ($p>0.05$). همچنین میزان ائوزینوفیل در مجموع کم و ناچیز بود. ضمن اینکه در دو تیمار ۰/۲ mg/l و ۱/۲ mg/l این فاکتور مشاهده نشد و بین تیمارهای مورد بررسی اختلاف معنی‌دار آماری وجود نداشت ($p>0.05$). اطلاعات مربوط به اثر آمونیاک روی فاکتورهای خونی در جدول ۲ قابل مشاهده است.

جدول ۲- نتایج اثر دوزهای مختلف آمونیاک روی فاکتورهای خونی ماهی سوروم

تیمار / پارامترها	شاهد (۰ میلی‌گرم بر لیتر)	تیمار ۱ (۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر)	تیمار ۲ (۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر)	تیمار ۳ (۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر)	تیمار ۴ (۰/۸ میلی‌گرم بر لیتر)	تیمار ۵ (۱/۲ میلی‌گرم بر لیتر)
گلبول سفید	۱۷۶۶۶/۷±۲۵۱۶/۶^{a}	۲۳۳۳۳/۳±۷۵۰۵/۶^{ab}	۱۸۶۶۶/۷±۳۵۱۱/۹^{a}	۳۴۰۰۰/۱±۷۲۱۱^{c}	۲۹۶۶۶/۷±۴۱۶۳/۳^{bc}	۲۵۳۳۳/۳±۴۵۰۹/۳^{abc}
گلبول قرمز	۱۵۰۳۳۳۳/۳±۵۰۳۳۲/۲^{d}	۱۴۹۳۳۳۳/۳±۷۵۰۵۵/۵^{cd}	۱۳۹۶۶۶۶/۷±۱۱۵۴۷^{bc}	۱۳۳۰۰۰۰/۹±۹۴۳۵۸۸^{ab}	۱۴۲۶۶۶۶/۷±۵۶۸۶۲/۴^{bcd}	۱۲۹۳۳۳۳/۳±۶۴۲۹۱^{a}
هموگلوبین	۵/۹۰±۰/۰۲	۵/۳±۰/۲۵	۵/۴۰±۰/۲۰	۵/۵۳±۰/۶۴	۵/۶۰±۰/۴۶	۵/۱۰±۰/۲۶
هماتوکریت	۲۴±۱	۲۳/۶±۱/۵۳	۲۲±۱	۲۳±۲/۶۵	۲۳/۳±۲/۰۸	۲۰/۷±۱/۵۳
MCV	۱۶۱/۴±۳/۶	۱۵۸/۳۳±۳/۰۶	۱۵۷/۳۳±۶/۰۳	۱۷۲/۳۳±۱۴/۸۴	۱۶۳/۹±۰/۶۴	۱۵۹/۳۳±۴/۵۱
MCH	۳۹±۰	۳۸±۰	۳۸±۱	۴۱/۳±۰/۴۶	۳۹/۱±۰/۷۳	۳۹±۰
MCHC	۲۴±۰	۲۴/۳±۰/۵۸	۲۴±۰	۲۳/۷±۰/۵۸	۲۳/۶۷±۰/۵۸	۲۴/۳±۰/۵۸
نوتروفیل	۳۰±۱^{ab}	۳۰±۲/۶۵^{ab}	۲۷/۳۳±۳/۲۲^{a}	۳۰/۳۳±۲/۵۲^{ab}	۳۴±۲^{b}	۳۳±۱^{b}
لنفوسیت	۶۵±۲/۶۵^{ab}	۶۴/۶±۳/۲۲^{ab}	۶۹/۷±۴/۰۴^{b}	۶۵/۳±۳/۵۱^{ab}	۶۱±۲^{a}	۶۲/۶±۱/۱۶^{a}
مونوسیت	۴/۳۳±۱/۱۶	۵±۱	۳±۱	۴±۱	۴/۶۷±۰/۵۸	۴/۳۳±۱/۵۳
ائوزینوفیل	۰/۶۷±۰/۵۸	۰/۳۳±۰/۵۸	۰±۰	۰/۳۳±۰/۵۸	۰/۳۳±۰/۵۸	۰±۰

وجود حروف لاتین نامشابه در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارها است ($P<0.05$). وجود حروف مشابه و نیز عدم وجود حروف لاتین، نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در یک ردیف می‌باشد ($P>0.05$).

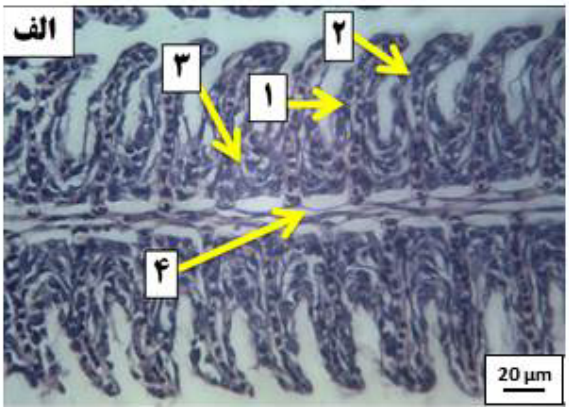
پس از ۱۲ ساعت قرارگرفتن ماهی سوروم در دوزهای مختلف آمونیاک مقادیر کورتیزول ابتدا در دو تیمار اول نسبت به شاهد افزایش یافت اما در سه تیمار بعدی مقدار آن کاهش داشت. در مجموع باتوجه به آزمون واریانس یکطرفه انجام گرفته بین تیمارهای مورد بررسی از نظر میزان کورتیزول اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نشد ($p>0.05$). با افزایش مقادیر آمونیاک، مقدار گلوکز به‌غیر از تیمار ۰/۱ mg/l که کمترین مقدار آمونیاک را به خود اختصاص داده بود، در سایر تیمارها پس از ۱۲ ساعت افزایش قابل توجهی پیدا کرد. بطوریکه با توجه به آزمون آنالیز واریانس یکطرفه و تست تکمیلی دانکن، اختلاف معنی‌دار آماری با تیمار شاهد و تیمار ۰/۱ mg/l داشتند ($p<0.05$). اطلاعات مربوط به اثر آمونیاک روی فاکتورهای استرس در جدول ۳ قابل مشاهده است.

در بررسی اسلایدهای تهیه شده از بافت آبشش، عوارضی مانند جدا شدن اپیتلیال لاملا، هایپرتروفی، تخریب اپیتلیال و تحلیل و تخریب دستگاه پیلار و پرخونی لاملا مشاهد گردید ولی شدت آن‌ها در هر تیمار ممکن است متفاوت باشد. بطورکلی بیشترین عارضه در تیمار ۱/۲ mg/l مشاهده‌شد.

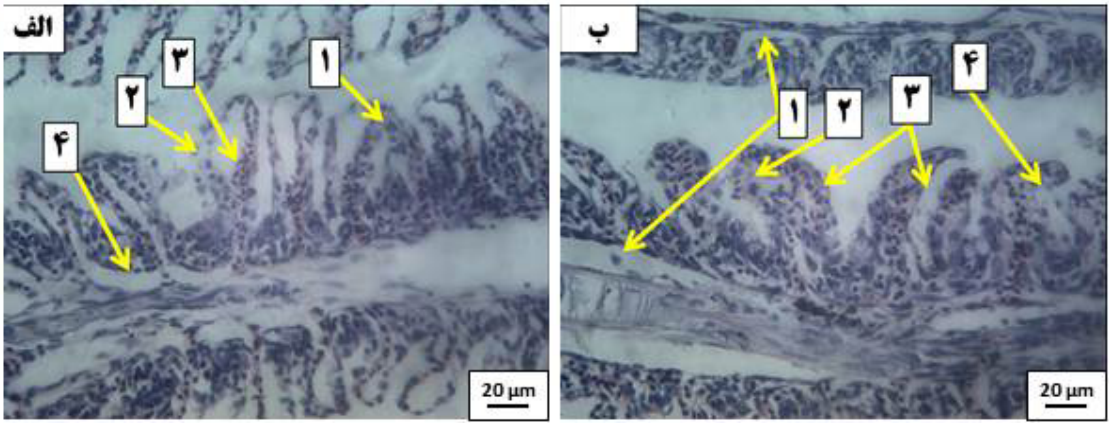
جدول ۳- نتایج اثر دوزهای مختلف آمونیاک روی فاکتورهای استرس ماهی سوروم

تیمار / پارامترها	شاهد (۰ میلی‌گرم بر لیتر)	تیمار ۱ (۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر)	تیمار ۲ (۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر)	تیمار ۳ (۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر)	تیمار ۴ (۰/۸ میلی‌گرم بر لیتر)	تیمار ۵ (۱/۲ میلی‌گرم بر لیتر)
کورتیزول	۷۲/۶۷±۱۴/۴۷	۸۸/۳۳±۷/۶۴	۹۸/۳۳±۶/۸۱	۹۲±۲۰/۲۲	۹۲/۶۷±۳/۵۱	۸۴/۶۷±۲/۵۲
گلوکز	۴۹±۴/۳۶^{a}	۶۰±۷^{a}	۹۶±۱۵/۷۲^{b}	۹۳/۳۳±۸/۰۸^{b}	۹۴/۳۳±۱۱/۹۳^{b}	۹۸/۶۷±۷/۵۷^{b}

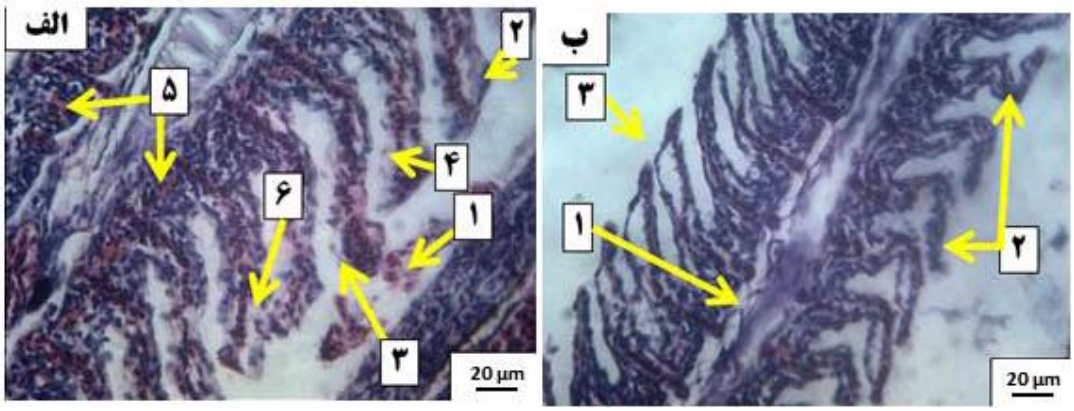
وجود حروف لاتین نامشابه در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($P<0.05$). وجود حروف مشابه و نیز عدم وجود حروف لاتین، نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در یک ردیف می‌باشد ($P>0.05$).



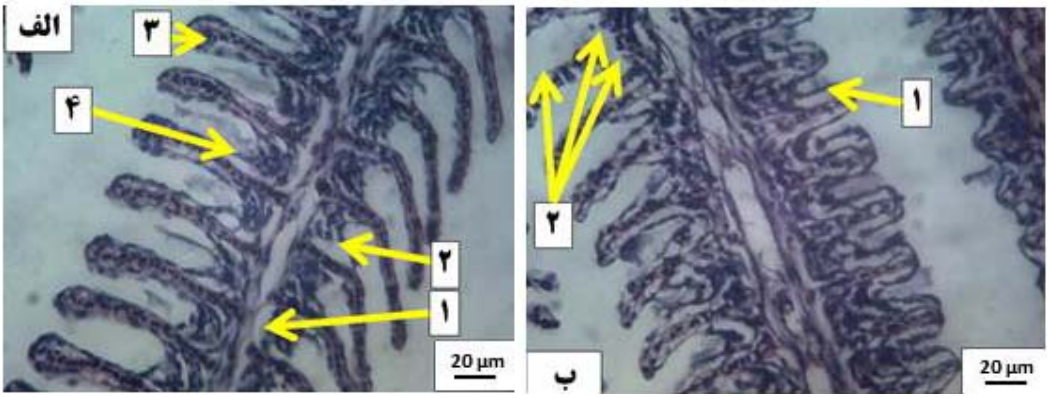
شکل ۱- مقطع آبشش ماهی سوروم در گروه شاهد (رنگ‌آمیزی ائوزین–هماتوکسیلین). الف. مقطع آبشش سالم (۱- لاملا، ۲- اپیتلیوم لاملا، ۳- فیلامنت، ۴- غضروف میانی).



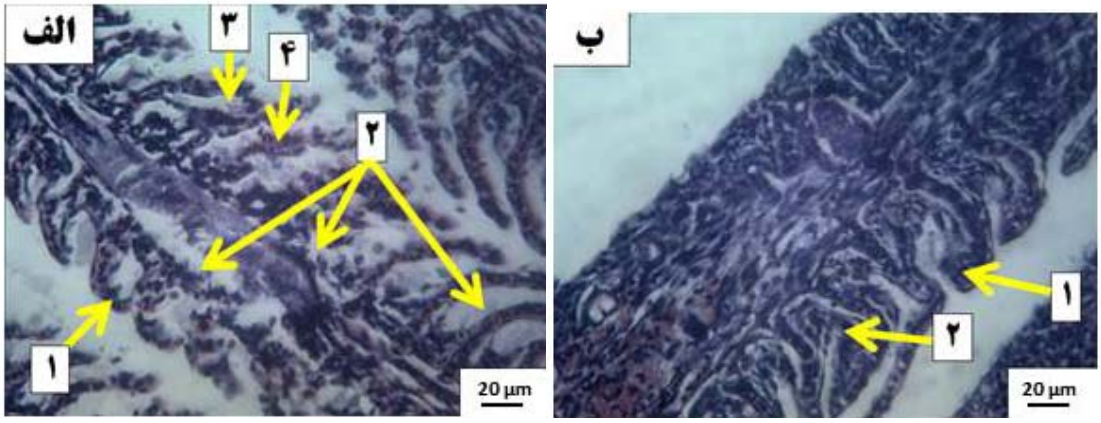
شکل ۲- مقطع آبشش ماهی سوروم در تیمار ۱. وجود آسیب در بخش‌های وسیعی از بافت آبشش (رنگ‌آمیزی ائوزین–هماتوکسیلین). الف. ۱- چسبیدگی لاملاها، ۲- هایپرتروفی در سلول‌های اپیتلیوم لاملا و جداشدن اپیتلیوم لاملایی، ۳- تخریب دستگاه پیلار و پرخونی در لاملا، ۴- جدا شدن و بالا آمدن بافت پوششی فیلامت، ب. ۱- جدا شدن و بالا آمدن بافت پوششی فیلامت، ۲- هایپرتروفی در سلول‌های اپیتلیوم لاملا، ۳- تخریب دستگاه پیلار و پرخونی (آنوریسم یا تلانژیکتازی) در لاملا، ۴- تغییر شکل و خمیدگی نوک لاملا.



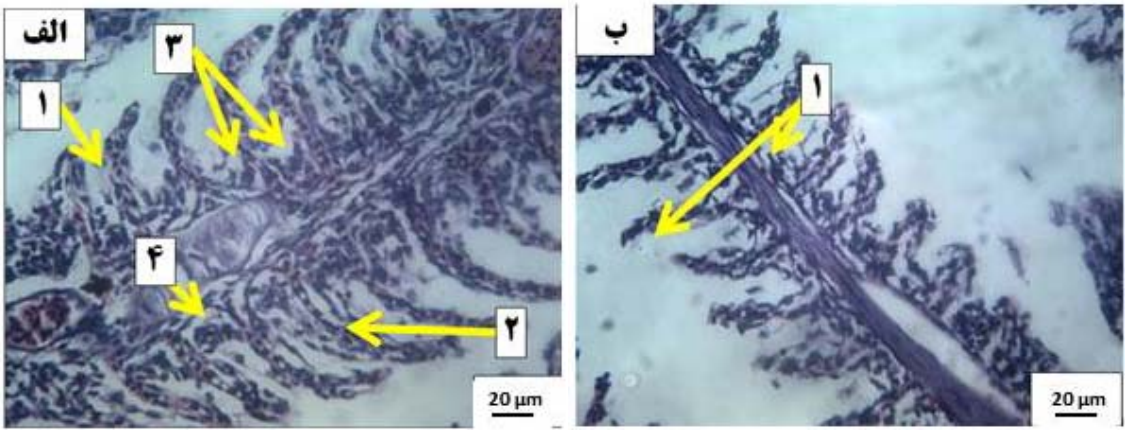
شکل ۳- مقطع آبشش ماهی سوروم در تیمار ۲. وجود آسیب در بخش‌های وسیعی از بافت آبشش و خونریزی (رنگ‌آمیزی ائوزین– هماتوکسیلین). الف. ۱- خونریزی، ۲- هایپرتروفی در سلول‌های اپیتلیوم لاملا، ۳- تخریب دستگاه پیلار و پرخونی در لاملا و آنوریسم و گرزی شدن نوک لاملا، ۴- نکروز سلول اپیتلیال لاملا، ۵- خونریزی در بافت پوششی فیلامنت، ۶- جداشدن اپیتلیوم لاملایی، ب. ۱- جدا شدن و بالا آمدن بافت پوششی فیلامت، ۲- تغییر شکل و خمیدگی لاملا، ۳- جداشدن اپیتلیوم لاملایی.



شکل ۴- مقطع آبشش ماهی سوروم در تیمار ۳. وجود آسیب در بخش‌های وسیعی از بافت آبشش (رنگ‌آمیزی ائوزین-هماتوکسیلین). الف. ۱- جدا شدن و بالا آمدن بافت پوششی فیلامت، ۲- تحلیل در بافت پوششی فیلامنت، ۳- پیچ خوردگی نوک لاملا، ۴- جداشدن اپیتلیوم لاملایی، ب. ۱- جدا شدن و بالا آمدن بافت اپیتلیوم لاملا، ۲- نکروز در اپیتلیوم لاملاو فیلامنت.



شکل ۵- مقطع آبشش ماهی سوروم در تیمار ۴. وجود آسیب در بخش‌های وسیعی از بافت آبشش (رنگ‌آمیزی ائوزین-هماتوکسیلین). الف. ۱- خم شدگی و تخریب لاملا، ۲- نکروز در اپیتلیوم لاملا و فیلامنت، ۳- چسبندگی لاملاها، ۴- تخریب دستگاه پیلار و پرخونی در لاملا، ب. ۱- پیچ خوردگی نوک لاملا، ۲- هایپرپلازی اپیتلیوم لاملا.



شکل ۶- مقطع آبشش ماهی سوروم در تیمار ۵. وجود آسیب در بخش‌های وسیعی از بافت آبشش (رنگ‌آمیزی ائوزین-هماتوکسیلین). الف. ۱- هایپرتروفی سلول‌های اپیتلیوم لاملا، ۲- چسبندگی لاملاها، ۳- جداشدن و برآمدگی اپیتلیوم لاملا، ۴- نکروز در اپیتلیوم فیلامنت، ب. ۱- نکروز شدید در اپیتلیوم لاملا و فیلامنت و نکروز و تخریب دستگاه پیلار.

بحث و نتیجه گیری

این بررسی با هدف تعیین اثرات دوزهای مختلف آمونیاک روی فاکتورهای خونی، استرس و بافت آبشش ماهی سوروم انجام شده است تا بتوان با مشاهده تغییرات مختلف، مقدار مجاز آمونیاک را در پرورش ماهی سوروم تعیین نمود.

غلظت آمونیاک شدیدا تحت تاثیر دما، pH و مواردی دیگر از قبیل سطوح اکسیژن محلول، شوری، گونه جانوری، سن و اندازه ماهی است (۵). افزایش غلظت آمونیاک سبب آسیب آبششی، کاهش تحرک، کاهش اشتها و رشد، تیرگی پوست، حالات عصبی، بلعیدن هوا از سطح آب، تسریع در تنفس و باز و بسته شدن سرپوش آبششی و نهایتا مرگ ماهی می‌شود (۲۸ و ۴۰).

نتایج حاصل از اندازه‌گیری فاکتورهای خونی مشخص نمود که مواجهه با مقادیر مختلف آمونیاک در ماهی سوروم موجب تغییر در مقادیر گلبول سفید خون شده و این وضعیت با افزایش مقادیر آمونیاک در تیمار ۰/۴ mg/l و بمنظور مقابله با شرایط نامساعد به اوج خود می‌رسد. همچنین در تیمارهای بعدی به دلیل افزایش دوز آمونیاک و تشدید شرایط نامساعد مقدار گلبول‌های سفید روند کاهشی به خود می‌گیرد. افزودن مقادیر مختلف آمونیاک موجب کاهش تعداد گلبول‌های قرمز خون ماهی سوروم شد. هموگلوبین و هماتوکریت همانند گلبول قرمز با افزایش آمونیاک روند کاهشی جزئی از خود نشان دادند.

آنالیز خون‌شناسی و شیمی بالینی، اگرچه اغلب در امور پزشکی ماهی استفاده نمی‌شود، می‌تواند اطلاعات تشخیصی قابل توجهی را ارائه دهد (۶۴). گلبول قرمز بعنوان یک شاخص مهم و رایج در تعیین سلامت و بیماری ماهیان مورد استفاده قرار می‌گیرد (۳۶). مطالعات هماتولوژی انجام شده در مورد اثرات تغذیه‌ای (۵۲)، بیماری‌های عفونی (۵۳) و آلاینده‌ها (۵۴) بیان می‌کنند که گلبول‌های قرمز شاخصی مهم و قابل اعتماد از منابع مختلف استرس هستند (۴۹). همچنین معمولاً گلبول‌های سفید در سیستم ایمنی دخالت داشته و در موارد التهابی تعداد و درصد انواع آن‌ها دستخوش تغییر می‌شود (۲۵). با قرار دادن ماهی کپور معمولی در معرض ۱/۷۸ میلی‌گرم آمونیاک مولکولی، کاهش شدید گلبول‌های سفید خون، کاهش لنفوسیت‌ها و کاهش خفیف ائوزینوفیل مشاهده گردید (۶۶). مطالعه روی ماهی کپور نشان داد که اگرچه غلظت ۰/۲ mg/l آمونیاک تاثیری در بازماندگی ماهیان نداشت، اما با توجه به شاخص‌های خونی می‌توان گفت این میزان آمونیاک منجر به کم‌خونی شده است (۶۰). این کم‌خونی ممکن است در اثر عوامل مختلف چون عوامل عفونی، موارد مسمومیت با جیوه و عوامل استرس زا بخصوص کمبود اکسیژن مشاهده شود (۲۶). مطالعه روی ماهی کلمه خزری (*Rutilus caspicus*) نشان داد که با افزایش غلظت آمونیاک مقادیر هماتوکریت و هموگلوبین کاهش یافت. همچنین عدم تغییر سایر پارامترهای خونی در مواجهه با غلظت‌های مختلف آمونیاک می‌تواند به این علت باشد که غلظت‌های حاد آمونیاک در بچه ماهیان کلمه در طی ۳۰ روز مواجهه، شرایط التهابی ایجاد نمی‌کند. این امر بدین معنی نیست که مواجهه طولانی‌تر منجر به تضعیف سیستم ایمنی نشود (۱۵). قرار دادن ماهیان جوان نوعی ماهی پهن بزرگ اقیانوس اطلس (*Hippoglossus hippoglossus*) در معرض غلظت‌های کم آمونیاک نشان داد که این مقادیر بر عملکرد رشد بی‌تاثیر ولی روی فیزیولوژی خون تاثیر قابل توجهی داشت (۴۷).

آمونیاک کل متشکل از آمونیاک یونیزه‌شده (آمونیوم NH_4^+) و آمونیاک غیریونیزه (NH_3) است که سمیت آمونیاک غیر-یونیزه (NH_3) بیشتر از نوع یونیزه آن است و اکثر غشاء-های زیستی نسبت به NH_3 نفوذپذیرند، درحالیکه نسبت به فرم یونیزه یعنی یون آمونیوم، غیرقابل‌نفوذ می‌باشند (۵۰). هنگامیکه غلظت NH_3 در آب افزایش می‌یابد، به-

دلیل آنکه می‌تواند ازطریق غشاء سلولی انتشار یافته، وارد سلول‌ها شود و همچنین چون دفع آن از بدن ماهی کاهش می‌یابد، در نتیجه سطح آمونیاک در پلاسمای خون بالا می-رود. بالارفتن سطح آمونیاک خون سبب افزایش مصرف اکسیژن توسط بافت‌ها، تخریب آبشش و کاهش توانایی خون برای نقل و انتقال اکسیژن در بدن می‌شود.

گزارشاتی مبنی‌بر کاهش تعداد گلبول‌های قرمز، گلبول‌های سفید، هموگلوبین و هماتوکریت در مواجهه با سموم فلزات سنگین وجود دارد. کاهش معنی‌دار در تعداد اریتروسیت‌ها و لکوسیت‌های خون گربه‌ماهی پس از ۲۴ ساعت مواجهه با غلظت‌های افزایشی نیکل در آب مشاهده‌شد (۵۸). در تحقیق مذکور، علت کاهش اریتروسیت‌های خون، افزایش هورمون استرس به‌هنگام قرارگیری درمعرض نیکل عنوان شد. در تحقیق دیگری که تاثیر غلظت‌های تحت کشندگی سرب بر گونه *Colisa fasciatus* بررسی‌شد، آنمی همولیتیک به علت تخریب اریتروسیت‌ها همراه با کاهش هموگلوبین، هماتوکریت و تعداد اریتروسیت‌ها گزارش شد (۵۹). همچنین Thangam و همکاران (۲۰۱۴) در مطالعه‌شان بر-روی سمیت آمونیاک بر پارامترهای خونی کپور معمولی آب‌شیرین گزارش‌نمودند که تعداد گلبول‌های قرمز و سفید این ماهی در طی ۷ الی ۳۵ روز قرارگرفتن درمعرض غلظت تحت کشنده آمونیاک بطور معنی‌داری کاهش‌یافتند. آنها کاهش اریتروست‌ها را به علت کم‌خونی ناشی از مهار اریتروپوئیتین در اندام‌های خونساز بیان‌نمودند، عاملی که می‌تواند بعنوان یک علت احتمالی برای کاهش گلبول قرمز در مطالعه حاضر نیز درنظر گرفته شود (۶۳).

McLeay و Gordon (۱۹۹۷) گزارش نمودند که تغییر در تعداد لکوسیت‌ها در مواجهه با سموم، شاخص حساس-تری نسبت به اریتروسیت‌ها می‌باشد (۴۲ و ۵۶). در *Channa punctatus* که به‌مدت طولانی در معرض دوزهای کشنده و تحت کشنده روی قرار داده شده بودند، افزایش معنی‌دار در WBC گزارش شد (۵۶). تغییر در WBCدر پاسخ به استرس در بسیاری از ماهی‌ها گزارش شده است. گاه این تغییر بصورت افزایش در تعداد WBC (۴۳) و گاه بصورت کاهش در تعداد آنها در شرایط تحت استرس گزارش شده است (۶۱). تغییر در تعداد لکوسیت-ها پس از قرارگرفتن درمعرض آلاینده‌ها ممکن است به کاهش ایمنی غیراختصاصی در ماهی مربوط باشد (۴۴). اگرچه پاسخ به تاثیرات محیطی بسته به نوع و شدت استرس فرق می‌کند، اما اغلب منجر به لکوپنی یا همان کاهش در تعداد لکوسیت‌ها می‌شوند. در مطالعه حاضر از غلظت ۰/۱ تا ۰/۴ ابتدا افزایش در WBC مشاهده شد ولی با بیشتر شدن دوز آمونیاک و به‌دلیل افزایش‌یافتن فرم غیر-یونیزه آن در آب، ماهی‌ها تحت سمیت بیشتری از آن قرار گرفته و لکوپنی پدیدارشد که شبیه به پاسخ سایر جانوران درمقابل استرس‌های شدید می‌باشد.

علت اینکه در مطالعه حاضر تعداد گلبول قرمز کاهش معنی‌دار داشت اما کاهش هموگلوبین و سایر فاکتورهای خونی مرتبط با گلبول های قرمز معنی‌دار نبودند می‌تواند به‌علت کم خونی همولیتیک ناشی از قرار گرفتن در معرض آمونیاک باشد که درنتیجه آن گلبول های قرمز خون همولیز شده اما پروتئین ها و لاشه گلبول های قرمز همولیز شده در خون وجود دارند.

نتایج حاصل از تحقیق حاضر بیان‌نمود که بعد از ۱۲ ساعت قرار گرفتن ماهی در آمونیاک در تیمارهای ابتدایی فاکتورهای استرس دستخوش تغییراتی گردید. بطوریکه کورتیزول در دو تیمار اول افزایش و سپس در سه تیمار بعدی کاهش‌یافت اما همچنان در همه تیمارها بالاتر از کورتیزول شاهد قرار داشت. گلوکز نیز در تیمار اول به کمترین مقدار خود رسید و در سایر تیمارها افزایش قابل توجهی از خود نشان داد.

مطالعات مختلف نشان‌دهنده ارتباط بین مقدار گلوکز و کورتیزول و استرس‌های محیطی می‌باشد (۹، ۱۰ و ۲۴).

سطوح کورتیزول و گلوکز شاخص‌های کلی استرس در ماهیان هستند (۴۵ و ۱۰). غلظت کورتیزول ازجمله شاخص‌های مناسب در ارزیابی پاسخ ماهیان نسبت به استرس محسوب می‌گردد (۳۰ و ۴۸). همچنین تغییر در میزان گلوکز خون می‌تواند نشانه‌ای از استرس و یا آلودگی‌های محیطی باشد (۱). بروز استرس در ماهیان می‌تواند موجب پاسخ‌های فیزیولوژیکی و تغییراتی در ترکیبات خون در نتیجه افزایش میزان گلوکز خون شود (۱۰). تغییرات در این ترکیب می‌تواند بعنوان پارامتری مهم برای ارزیابی سلامت ماهی مورد استفاده قرار گیرد (۲۰).

آبشش‌ها دارای حجم بالایی از خون می‌باشند و تماس بسیار نزدیکی با آب دارند، در نتیجه تحت تاثیر عوامل و محرک‌های گوناگون محلول یا معلق در آب ازجمله فلزات سنگین قرار گرفته و به شدت آسیب‌پذیر می‌باشند و در مطالعه حاضر تاثیرات عوارضی چون جدا شدن اپیتلیال لاملا، هایپرتروفی، تخریب اپیتلیال و تحلیل و تخریب دستگاه پیلار و پرخونی لاملا مشاهده گردید. بطورکلی بیشترین عارضه در تیمار ۱/۲ mg/l همراه با عوارضی مانند هایپرتروفی سلول‌های اپیتلیوم لاملا، چسبندگی لاملاها، جدا شدن و برآمدگی اپیتلیوم لاملا، نکروز در اپیتلیوم فیلامنت، نکروز شدید در اپیتلیوم لاملا و فیلامنت و نکروز و تخریب دستگاه پیلار دیده شد.

چنانچه میزان آمونیاک در آب جزئی باشد فقط باعث تحریک شدن پوست و آبشش می‌شود و در غلظت بالا منجر به هایپرپلازی آبشش می‌شود که این حالت همواره با ضخیم شدن لاملاها و انبوه شدن آن‌ها همراه است که این امر موجب کاهش سطح تبادلات گازی شده و عمل گرفتن اکسیژن توسط ماهی کاهش می‌یابد. در حالت شدیدتر ممکن است ازدیاد سلولی ادامه پیدا کند تا حدی که خود رشته‌ها نیز به هم متصل شوند. ضایعات دیگری که در آبشش‌ها دیده شده شامل ازدیاد حجم سلول‌های پوششی، اتساع عروق لاملای ثانویه (آنوریسم یا تلانژیکتازی) و خوردگی بافت پوششی آبشش‌ها می‌باشد (۶۰). در مسمویت مزمن با آمونیاک (مقدار پایین‌تر از حد کشنده) معمولاً میزان رشد و درصد بقا کاهش یافته و ماهیان نسبت به عوامل عفونی حساس‌تر می‌شوند. این حالات معمولا با ضایعات آبششی همراه است (۲۹). مطالعه روی بچه تاسماهی ایرانی نشان داد که بیشترین صدمات در آبشش این ماهیان مشاهده شد. جراحات آبشش بر تبادلات گازی و تنفس تأثیر گذاشته و در حالات شدیدتر می‌تواند منجر به اتصال تیغه‌های مجاور به یکدیگر و جلوگیری از تبادلات گازی شده و در نهایت منجر به مرگ شود. نتایج نشان می‌دهد که تخریب آبشش، کبد و کلیه با افزایش غلظت آمونیاک در طی زمان ارتباط مستقیم دارد (۲). بچه ماهیان ازون برون پس از قرارگیری در مجاورت با آمونیاک عوارضی نظیر پرخونی، هایپرپلازی، چسبندگی لاملای ثانویه، تورم لاملای اولیه، خونریزی و نکروز سلولی را در آبشش، پرخونی، رکود صفراوی، نکروز سلولی و آتروفی سلولی را در کبد و پرخونی، دژنرسانس بافت بینابینی، نکروز سلولی، اتساع فضای بومن و هموسیدرین را در کلیه بروز دادند. بطورکلی بیشترین صدمات مربوطه در آبشش این ماهیان دیده شد (۳).

در نتیجه‌گیری کلی می‌توان ذکر نمود که افزایش دوز آمونیاک تغییرات قابل توجهی در تعداد اریتروسیت ها، لکوسیت ها و بویژه نوتروفیل‌ها، میزان گلوکز و نیز تخریب عمده در بافت آبشش ایجاد نمود. سایر شاخص‌های خونی و کورتیزول نیز با زیاد شدن آمونیاک دستخوش تغییراتی شدند اما معنی‌دار نبودند. این تغییرات نسبت به گروه شاهد را می‌توان به‌دلیل کوتاه بودن مدت زمان مواجهه سازی با آمونیاک بیان نمود که احتمالا با قرار گیری طولانی مدت در این شرایط تغییرات بارزتر خواهند بود. کاهش شدید گلبول های قرمز خون احتمالا به علت مهار اریتروپوئیتین در اندام‌های خونساز و نیز به دلیل عارضه پرخونی و خونریزی در بافت آبشش می‌باشد. در دوزهای پایین‌تر، سیستم ایمنی غیر اختصاصی بمنظور

مقابله با شرایط حاد ایجاد شده توسط سم آمونیاک، تعداد زیادی گلبول سفید به خون رهاسازی نمود، اما با بالا رفتن دوز و افزایش سمیت، کاهش تعداد لکوسیت ها رخ داد که می تواند به علت تخریب اندام های خون ساز یعنی کلیه و طحال باشد. در عین حال بمنظور یافتن علت تغییرات ایجاد شده در خون، هورمون کورتیزول و بافت آبشش پس از مواجه شدن با دوزهای مختلف آمونیاک تحقیقات دقیق-تر و وسیعتری در آینده نیاز است. با توجه به نتایج بدست آمده توصیه می شود که مقدار آمونیاک موجود در آب جهت پرورش ماهی سوروم نباید از مقدار ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر تجاوز نماید.

سپاسگزاری

بدینوسیله نگارندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از همکاری صمیمانه تمامی دوستانی که در به ثمر نشستن این تحقیق تلاش نموده‌اند ابراز می‌دارند.

منابع

۱. ابراهیمی، م. ح.، ایمان‌پور، م. ر. و عدلو، م. ن. ۱۳۹۰. اثرات دما بر رشد، بازماندگی و بعضی فاکتورهای خونی در ماهی گورامی عظیم‌الجثه (*Osphronemus goramy* Lacepede, 1801). مجله زیست‌شناسی ایران، جلد ۲۴، شماره ۵، ۶۵۴- ۶۴۸.

۲. بنی‌هاشمی، ا. ا.، خارا، ح.، پژند، ذ. و رهاننده، م. ۱۳۹۲. اثرات هیستوپاتولوژیکی آمونیاک در آبشش، کبد و کلیه بچه تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*). پاتوبیولوژی مقایسه‌ای، علمی-پژوهشی، سال دهم، شماره ۳، ۹۹۲-۹۸۳.

۳. بنی‌هاشمی، ا. ا.، خارا، ح.، پژند، ذ. و رهاننده، م. ۱۳۹۳. تعیین غلظت کشنده آمونیاک (LC_{50} 96h, N-NH_4) و تاثیر آن بر وضعیت هیستوپاتولوژی آبشش، کلیه و کبد بچه ماهی ازون برون (*Acipenser stellatus*). مجله آبزیان و شیلات، سال پنجم، شماره ۱۹، ۲۵-۱۱.

۴. بهمنی، م. و کاظمی، ر. ۱۳۷۷. مطالعه بافت‌شناسی روی گناد تاس ماهیان پرورشی جوان. مجله علمی شیلات ایران، شماره ۱، صفحات ۱۶-۱.

۵. پورکاظمی، م. ۱۳۷۶. نگرشی بر وضعیت تاسماهیان دریای خزر و چگونگی حفظ ذخایر آن. مجله علمی شیلات، شماره ۳، سال ششم، ۲۲-۱۳.

۶. پوستی، ا. و صدیق‌مروستی، م. ۱۳۷۸. اطلس بافت‌شناسی ماهی-اشکال طبیعی و آسیب‌شناسی. تالیف تاکاشی هایبا، انتشارات دانشگاه تهران، ۳۳۱ صفحه.

۷. پوستی، ا.، ادیب‌مرادی، م. و فضیلی، آ. ۱۳۸۲. بافت‌شناسی مقایسه‌ای و تکنیک‌های بافت‌شناسی. انتشارات دانشگاه تهران، ۵۴۶ صفحه.

۸. حلاجیان، ع.، کاظمی، ر.، محسنی، م.، دژندیان، س.، یوسفی-جوردهی، آ.، بهمنی، م.، پوردهقانی، م.، یزدانی، م. ع. و یگانه، ه. ۱۳۹۰. تکه برداری به روش جراحی و مطالعه بافت‌شناسی گناد تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) پرورشی. مجله تحقیقات دامپزشکی، شماره ۳، ۲۳۳-۲۲۹.

۹. خورشیدی، ش. ۱۳۹۳. اثرات تنش‌های طولانی مدت دما روی برخی فاکتورهای خونی و هیستوپاتولوژیک آبشش قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). پایان نامهٔ کارشناسی ارشد رشتهٔ تکثیر و پرورش آبزیان. دانشگاه آزاد اسلامی، پردیس علوم و تحقیقات گیلان. ۷۸ صفحه.

۱۰. ذوالفقاری، م. و ابمان پور، م. ر. ۱۳۹۱. اثر رنگ نور و موسیقی بر کورتیزول و گلوکز خون بعنوان شاخص های استرس در ماهی قرمز (*Carassius auratus*). مجله زیست شناسی ایران، جلد ۲۵، شماره ۴، ۵۴۷-۵۳۶.

۱۱. ستاری، م. ۱۳۸۱. ماهی‌شناسی (۱): تشریح و فیزیولوژی. انتشارات نقش مهر. ۶۵۹ صفحه.

۱۲. شاهسونی، د.، مهری، م. و تقوایی‌مقدم، ا. ۱۳۸۶. تعیین مقادیر برخی از سرم خون فیل ماهی. مجله تحقیقات دامپزشکی، دوره ۶۲، شماره ۳، ۱۲۹-۱۲۷.

۱۳. فخارزاده، م. ا.، احمدی. م. و کرجالیان. م. ر. ۱۳۸۸. سیستم‌های فوق متراکم پرورش ماهیان خاویاری. انتشارات فرهنگ و قلم، ۴۶-۴۴.

۱۴. کوهکن، ا. ۱۳۹۵. آسیب‌شناسی بافت آبشش ماهی بنی (*Barbus sharpeyi*) در مواجهه با سطوح مختلف شوری. پاتوبیولوژی مقایسه‌ای، علمی پژوهشی، سال سیزدهم، شماره ۱، ۱۸۶۲-۱۸۵۵.

۱۵. مازندرانی، م.، سوداگر، م. و ذکریایی، ح. ۱۳۹۴. اثر مواجهه طولانی مدت غلظت های تحت کشنده آمونیاک غیریونیزه بر شاخص های رشد و خون شناسی بچه ماهیان کلمه خزری‌های

رشد و خون‌شناسی بچه ماهیان کلمه خزری (*Rutilus caspicus*). نشریه پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی، دوره سوم، شماره اول، ۶۳-۵۳.

۱۶. مشائی، م. ع. ۱۳۸۸. فیزیولوژی ماهی در سیستم‌های پرورش متراکم. مولف گری آ. ودمیر. انتشارات دریاسر، ۳۰۲ صفحه.

17. Abdel-Tawwab, M., Mousa, M. A. A., Sharaf, S. M. and Ahmad, M. H. 2005. Effect of Crowding Stress on Some Physiological Functions of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) Fed Different Dietary Protein Levels. International Journal of Zoological Research, 1(1): 41-47.

18. Abreu, J. S., Sanabria-Ochoa, A. I., Goncalves, F. D. and Urbinati, E. C. 2008. Stress responses of juvenile Matrinxa (*Brycon amazonicus*) after transport in a closed system under different loading densities. Ciencia Rural, 38(5): 1413-1417.

19. Acerete, L., Balasch, J. C., Espinosa, E., Josa, A. and Tort, L. 2004. Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviayilis*) Subjected to stress by transport and handling. Aquaculture, 237: 167-178.

20. Affonso, E. G., Silva, E. C., Tavares-Dias, M., Menezes, G. C., Carvalho, S. M., Nunes, E. S. S., Ituassu, D. R., Roubach, R., Ono, E. A., Fim, J. D. I. and Marcon, J. L. 2007. Effect of high level of dietary vitamin C on the blood responses of matrinxa (*Brycon amazonicus*). Comparative Biochemistry and physiology, 147: 383-388.

21. Akhundov, M. M. and Fedorov, K. Ye. 1995. Effect of exogenous estradiol on ovarian development in juvenile starlet (*Acipenser ruthenus*). Journal of Ichthyology, 33: 109-120.

22. Bahmani, M., Kazemi, R. and Donskaya, P. 2001. A comparative study of some hematological features in young reared sturgeons (*Acipenser persicus* and *Huso huso*). Fish Physiology and Biochemistry, 24: 135-140.

23. Bowden, A. J., Gardiner, N. M., Couturier, C. S., Stecyk, J. A., Nilsson, G. E., Munday, P. L. and Rummer, J. L. 2014. Alterations in gill structure in tropical reef fishes as a result of elevated temperatures. Comparative Biochemistry and Physiology, 175: 64-71.

24. Chen, G. R., Sun, L. T., Lee, Y. H. and Chang, C. F. 1995. Characteristics of blood in common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to low temperatures. Journal of Applied Aquaculture, 5: 21-31.

25. Clauss, T. M., Dove, A. D. M. and Arnold, J. E. 2008: Hematologic Disorders of Fish. Veterinary Clinic of North America Exotic Animal Practice, 11(3): 445-462.

26. Elahee, K. B. and 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 Safety, 68(3): 361-371.

27. Evans, D. H., Claiborne, J. B. and Currie, S. 2013. The physiology of fishes. CRC press. Fourth edition, 491 P.

28. 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, Tehran, Iran, 26-27.

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

30. Fevolden, S. E., Røed, K. H. and Fjalestad, K. T. 2002. Selection response of cortisol and lysozyme in rainbow trout and correlation to growth. Aquaculture, 205: 61–75.

31. Grant, K. R. 2015. Fish hematology and associated disorders. Clinics in Lab Medicine, 35: 681–701.

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

33. Hao, L., Chen, L., Hao, J. and Zhong, M. 2013. Bioaccumulation and sub-acute toxicity of zinc nanoparticles in juvenile carp (*Cyprinus carpio*): A comparative study with its bulk counterparts. Ecotoxicology Environmental Safety, 91: 52–60.

34. Hargreaves, J. A. and Tucker, C. S. 2004. Managing Ammonia in Fish Ponds. SRAC publication, no. 4603, pp1-4.

35. Houston, A. H. and Cry, D. 1974. Thermoacclimatory variation in hemoglobin system of gold fish and rainbow trout. Journal of experimental biology, 61: 445-461.

36. Houston, A. H. and Rupert. R. 1997. Immediate response of hemoglobin system of goldfish (*Cyprinus auratus*) to temperature change. Canadian journal of Zoology, 54: 1731-1741.

37. Hung, S. S. O., Groff, J. M., Lutes, P. B. and Kofifiynn-Aikins, F. 1990. Hepatic and intestinal histology of juvenile white sturgeon feed different carbohydrates. Aquaculture, 87: 349-360.

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

39. Klontz, G. W. 1994. Fish Hematology. P: 121–132. In: Stolen, J. S., Fletcher, T. C., Rowley, A. F., Kelikoff, T. C., Kaattari, S. L. and Smith, S. A. (Eds.). Techniques in Fish Immunology. SOS Publications.

40. Knoph, M. B. 1996. Gill ventilation frequency and mortality of Atlantic salmon (*salmo salar*) exposed to high ammonia levels in seawater. Water research, 30: 837-842.

41. Li, P., Lewis, D. H. and Gatlin, D. M. 2004. Dietary oligonucleotides from yeast RNA influence immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops*× *Morone saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. Fish and Shellfish immunology, 16(5): 561-569.

42. McLeay, D. J. and Gordon, M. R. 1977. Leucocrit: a simple hematological technique for measuring acute stress in salmonids fish including stressful concentrations of pulp mill effluent. Journal of Fisheries Research Board of Canada, 34: 2164-2175.

43. Nussey, g., van vuren, J. H. J. and du Preez. H. H. 2002. The effect of copper and zinc at neutral and acidic PH on the general hematology and osmoregulation of *Oreochromis mossambicus*. African Journal of Aquatic Science, 27: 61-84.

44. Oliveria Ribeiro, H., Santos, T. M., Ramalho-Santos, J. and Pereira, M. L. 2006. Histopathological effects of hexavalent chromium in mouse kidney. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 76: 977-983.

45. Pacheco, M. and Santos, M. A. 2001. Biotransformation, endocrine, and genetic responses of *Anguilla Anguilla* L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. Ecotoxicology Environmental Safety, 49: 64–75.

46. Panigrahi, A., Kiron, V., Puangkaew, J., Kobayashi, T., Statoh, S. and Sugita, H. 2005. The Viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 243: 241-254.

47. Paust, L. O., Foss, A. and Imsland, A. K. 2011. Effects of chronic and periodic exposure to ammonia on growth, food conversion efficiency and blood physiology in juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). Aquaculture, 315: 400-406.

48. Pottinger, T. G. and Carrick, T. R. 2002. Stress responsiveness affects dominant – subordinate relationships in rainbow trout. Hormones and Behavior, 40: 419-427.

49. Rainza-Paiva, M. J. T., Ishikawa, C. M., Das Eiras, A. A. and Felizardo, N. N. 2000. Hematological analysis of Chara, *Pseudoplatystoma fasciatum* in captivity. Aqua 2000. Responsible aquaculture in the new millennium. Nice, France. May 2-6 2000. European Aquaculture Society. Special Publications., 28: 590 pp.

50. Randall, D. J. and Tsui, T. K. 2002. Ammonia toxicity in fish. Marine Pollution Bulletin, 45 (1-12):17-23.

51. Redding, J. M., Schreck, C. B., Birks, E. K. and Ewing, R. D. 1984. Cortisol and its effect on plasma thyroid hormone and electrolyte concentrations in freshwater and during seawater acclimation in yearling coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. General and Comparative Endocrinology, 56: 146–155.

52. Rehulka, J. 2000. Influence of astaxanthin on growth rate, condition and some blood indices of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture, 190: 27-47.

53. Rehulka, J. 2002. Aeromonas causes severe skin lesions in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Clinical pathology, hematology and biochemistry. Acta Veterinaria Brno, 71: 351-360.

54. Rehulka, J. 2002. Effect of polychlorinated biphenyls Delor 103 on some hematological and biochemical indices of the blood plasma of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). In: The second PCB workshop. Recent Advances in the Environmental Toxicology and Health Effects of PCBs. Brno, Czech Republic, 2002 May 07-11. Book of Abstracts, p. 36.

55. Schlenk, D. and Benson, W. H. 2001. Target organ toxicity in marine and fresh water teleosts. Taylor and Fransis, 1-90.

56. Sen, G., Behara, M.K. and Patel, P. 1992. Effect of zinc on hemato-biochemical parameters of *Channa punctatus*. Journal of ecotoxicology and environmental monitoring, 2(2): 89-982.

57. 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.

58. Sobecka, E. 2001. Changes in the iron leveling the organs and tissues of wells catfish, Silurs *glanis* L., Caused by nickel. Acta Ichthyologica et Piscatoria, 31(2): 127-143.

59. Srivastava, A. K. and Agarwal, S. J. 1979. Hematological anomalies in a freshwater teleost, *Colisa fasciatus*, on acute exposure to cobalt. Acta pharmacologica et toxicologica, 44: 197-199.

60. Stoskopf, M. K. 1993. Fish Medicine. Philadelphia: W. B. Saunders Co, 882 p.

61. Svobodova, Z., Machhova, J., Kroupova, H., Smutna, M. and Groch, L. 2007. Ammonia autointoxication of common carp, case studies. Aquaculture International, 15: 227-286.

62. Takabe, S., Teranishi, K., Takaki, S., Kusakabe, M., Hirose, S., Kaneko, T. and Hyodo, S. 2012. Morphological and functional characterization of a novel Na^+/K^+-ATPase-immunoreactive, follicle-like structure on the gill septum of Japanese banded houndshark, *Triakis scyllium*. Cell and Tissue Research, 348: 141-153.

63. Thangam, Y., Perumayee, M., Jayaprakash, S., Umavathi, S. and Basheer, S. K. 2014. Studies of Ammonia Toxicity on Hematological parameters to Freshwater Fish *Cyprinus carpio* (Common carp). International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 3(12): 535-542.

64. Van Vuren, J. H. J. 1986. The effects of toxicants on the hematology of *Labeo umbratus* (Teleostei; cyprinidae). Comparative Biochemistry and Physiology, 83: 155-159.

65. Wang, P., Lin, C., Hwang, L., Huang, C., Lee, T. and Hwang, P. 2013. Differential responses in gills of euryhaline tilapia, *Oreochromis mossambicus*, to various hyperosmotic shocks. Comparative Biochemistry and Physiology, 152: 544-551.

66. Wlasow, T., Dabrowska, H. and Ziomek, E. 1990. Hematology of carp in acute intoxication with ammonia. Polskie Archiwum Hydrobiologii, 37(3): 419-428.

Evaluation of the effects of ammonia-induced stress on hematologic, stress factors and histology of gill in Banded Cichlid (*Heros severus*)

Termeh Yousefi A.[1], Khara H.[2] and Ahmadnezhad M.[3]

[1] **Fisheries Dept., Guilan Science and Research Branch, Islamic Azad University, Rasht, I.R. of Iran**

[2] **Fisheries Dept., Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, I.R. of Iran**

[3] **Inland Waters Aquaculture Research Center, Iranian Fisheries Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Anzali, I.R. of Iran**

Abstract

As a chemical stressor, increasing ammonia concentration in water can causes non-specific physiological responses in fish. The present research was done to determine the suitable amount of ammonia and its effects on hematologic, stress factors and histology of gill in banded cichlid (*Heros severus*). For this purpose, 1 control group and 5 treatments of ammonia (0.1, 0.2, 0.4, 0.8, and 1.2 mg/l) with three replicates were selected. 180 specimens were transported to different concentrations of ammonia in 50-liter tanks for 12 hours. After blood sampling, hematologic and stress factors were measured. In addition, their gill tissues were sampled. The results showed that white blood cells reached its peak in Treatment 3 ($P<0.05$). The lowest red blood cells were observed in Treatment 5 ($P<0.05$). When concentration of ammonia was increased, the amount of HB, Htc, MCV, MCH, MCHC, Monocytes and eosinophils didn't have significant difference ($P>0.05$). The results showed that cortisol increased in the first two treatments and then decreased in the next three treatments. In addition, glucose reached its minimum level in the first treatment and then showed a significant increase in other treatments ($P<0.05$). The most tissue damages were observed in Treatment 5 along with hypertrophy of lamella epithelial cells, adhesion of lamellae, lamella detachment and bulging, filament epithelium necrosis, severe necrosis in the lamella and filament epithelial, and necrosis and demolition of pillar cells. Therefore, it is better for banded cichlid to the amount of ammonia does not increase more than 0.1 mg/l.

Key words: Ammonia, Gill, Hematologic indices, Cortisol, Glucose, Banded cichlid (*Heros severus*)