

Effects of sodium formaldehyde bisulfite on ammonia detoxification and biological responses in Koi (*Cyprinus rubrofuscus*)

Adibi S.¹; Ramezani M.^{1*}; Kakoolaki S.²; Kazempoor R.³

*dr.mramezani@yahoo.com

1-Department of Science and Environment, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2-Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

3-Department of Aquatic Animal Health and Diseases, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: September 2024

Accepted: July 2025

Published: January 2026



Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Introduction

In fish and other aquatic animal farming systems, ammonia is produced by protein metabolism and bacterial activity on excreta and ingested or unabsorbed nutrients (Zhang and Perschbacher, 2003). Exposure to ammonia can cause many toxic effects on fish, affecting physiological and biochemical functions. Ammonia accumulation in fish tissue causes disruption of the circulatory system and various hematological parameters related to lipid metabolism, the immune defense system, blood coagulation, and molecular transport. Exposure to ammonia also causes tissue damage, including to fish gills, liver, and kidneys, through oxidative damage and physiological toxicity. For this reason, in this study, it was decided to use sodium formaldehyde bisulfite (sodium hydroxymethanesulfonate) to reduce nitrogen compounds in reservoir water and some liver and immune blood indices of koi fish, for example, *Cyprinus rubrofuscus* (Xu *et al.*, 2021). The present study aimed to evaluate the toxic effects of high ammonia (1.5 mg/L) on koi carp and the potential protective role of FBS. Specifically, the objectives were: (1) to assess the impact of severe Sodium formaldehyde bisulfite ($\text{CH}_3\text{NaO}_4\text{S}$; FBS) is widely used to mitigate ammonia toxicity in aquaculture. It functions by chelating free ammonia, reducing its bioavailability and harmful effects. FBS has been approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) for use in edible aquatic species since 1989 and is effective across a broad range of water temperatures, including near-freezing conditions. Its application has been documented in fish, bivalves and crustaceans, making it a versatile and cost-effective solution for ammonia management in diverse aquaculture settings.

Methodology

A total of 360 koi Fish (*Cyprinus rubrofasciatus*) with an average weight of 50 g were randomly assigned to 24 aquaria, following a completely randomized design. Six treatments were established, but this study focuses on the highest ammonia exposure (T4, 1.5 mg/L) and two control groups: a positive control (FBS only) and a negative control (no additives). Each treatment had four replicates with 15 fish per tank. FBS was administered proportionally to ammonia concentration. The experiment continued until 50% mortality occurred in T4. Water quality parameters—including ammonia, nitrite, nitrate, pH, hardness, dissolved oxygen, and temperature—were monitored daily, in line with standard aquaculture management guidelines (Boyd and Tucker, 1998). Fish were sampled at mortality checkpoints; two individuals per tank were collected for hematological, serum, and histopathological analyses. Blood was analyzed for RBC and WBC counts, hemoglobin, hematocrit, lymphocyte percentages, and neutrophil percentages. Serum complement proteins C3 and C4 and enzyme activities including ALT (SGPT), AST, and ALP were measured. Tissue samples from gills, liver, and kidneys were fixed, sectioned, and examined microscopically for histopathological changes. Data were analyzed using one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

Results

Exposure to high ammonia (T4, 1.5 mg/L) caused significant negative impacts on koi rubrofasciatus. Final body weights in T4 were significantly lower than controls, with a negative specific growth rate (SGR) indicating growth suppression. Survival was 100% in +C and -C, but lower in higher ammonia treatment4. Table 1 summarizes biometric differences.

Table 1: Investigating the differences in biometric and growth indices of koi fish

Treatment	Initial weight(grams)	Secondary weight (gram)	Specific growth rate (SGR)	Weight gain (gram) WG	Initial length (cm)	Secondary length (cm)	Survival rate SR
T4	48.58±0.26	48.12±0.45 ^a	-0.032±0.04	46.58±0.0	16.51±0.18 ^{ab}	16.48±0.18	77/98±3/85 ^a
C+	48.26±0.26	48.96±0.14 ^b	0.048±0.016	0.71±0.22	16.7±0.14 ^b	16.9±0.12	100±0 ^c
C-	48.14±0.23	48.71±0.28 ^{ab}	0.039±0.034	0.57±0.49	16.4±0.27 ^{ab}	16.6±0.21	100±0 ^c
<i>p</i> -value	0.199	0.036*	0.045	0.041	0.053	0.064	0/041*

Water quality in treatment T4. The results revealed no significant difference in pH between experimental treatments based on the days of study. the study, the highest and the lowest pH was related to the main treatment3 and negative control treatment, respectively. Also on the sixth day, the highest and the treatment4. Hematological analysis revealed significant stress in T4 fish. Hemoglobin and hematocrit decreased, and RBC and WBC counts were significantly lower than in controls., with C3 and C4 complement proteins elevated, alongside increased ALT, AST, and ALP, indicating hepatic disturbance. Histopathology showed epithelial hyperplasia and lamellar fusion in gills, tubular degeneration in kidneys, and vacuolated hepatocytes in the liver. Positive control fish maintained nearly normal tissue architecture, supporting the protective role of FBS. Overall, T4 ammonia exposure induced multi-level disturbances affecting growth, hematology, serum chemistry, and tissue integrity. FBS mitigated these effects, maintaining better survival, growth, and physiological health.

Discussion and conclusion

High ammonia levels are a significant stressor for koi carp, causing hematological, enzymatic, and histopathological abnormalities. Decreased hemoglobin and hematocrit impair oxygen transport, while elevated liver enzymes indicate metabolic dysfunction. Histopathological changes in the gills, kidney and liver indicate direct tissue damage and confirm the multi-organ toxicity of ammonia (Das *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2020). Research has shown that exposure of fish to nitrite will decrease the amount of immunoglobulin IgM and lysozyme (Ciji and Akhtar, 2020). This is also agrees with the findings of this study (Table4). it was found that the change in the results of some researchers (Garcia *et al.*, 2020) showed that the decrease in MDA levels after exposure of lamprey fish to diesel oil contaminants is likely to indicate a relationship between increased antioxidant protection, MDA metabolism and MDA excretion in water. There was no significant difference between the control and 1 groups in terms of MDA content, but it increased with increasing ammonia content. This indicates that FBS has been able to inhibit the negative effects of ammonia, but this problem has shown itself in groups 3 and 4.

According to the research, it is necessary to conduct additional research on the removal of FBS on other fish, in larger scale and for a longer period of storage. It is obvious that since nitrogenous substances are one of the main problems of aquaculture farms, this additional research can be effective in reducing such toxic substances. Ammonia nitrogen is a common environmental limiting factor in aquaculture that can accumulate rapidly in water and reach toxic concentrations. In most aquatic environments, fish are vulnerable to the toxic effects of high levels of ammonia nitrogen. It has been determined that the toxic effects of ammonia nitrogen on fish are multi-mechanistic. Therefore, the aim of this review is to investigate the various toxic effects of ammonia nitrogen on fish, including oxidative stress, neurotoxicity, tissue damage, and immune response.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment

The authors thank the ornamental fish breeding center for providing experimental fish and laboratory staff for technical assistance with water analysis, blood sampling, and histopathology.

مقاله علمی - پژوهشی:

بررسی اثر فرمالدئید بی سولفیت سدیم (هیدروکسی متانوسولفانات سدیم) در کاهش ترکیبات ازته آب مخازن و بر برخی شاخص‌های خونی، ایمنی و کبدی ماهی کوی (*Cyprinus rubrofuscus*)

سمانه ادیبی^۱، مهدی رمضانی^{۲*}، شاپور کاکولکی^۳، رضا کاظم پور^۳

*Dr.mramezani@yahoo.com

- ۱- گروه علوم و محیط زیست، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
- ۲- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
- ۳- گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ چاپ: دی ۱۴۰۴

تاریخ پذیرش: تیر ۱۴۰۴

تاریخ دریافت: شهریور ۱۴۰۳

چکیده

نیترژن آمونیاکی آلاینده اصلی، مصرف‌کننده اکسیژن و یک عامل محدودکننده محیطی رایج در آبرزی پروری است که می‌تواند به سرعت در آب انباشته شود و به غلظت‌های سمی برسد. ماهی‌ها به‌خصوص ماهی کوی (*Cyprinus rubrofuscus*)، در برابر سمیت ناشی از نیترژن آمونیاکی آسیب‌پذیر هستند. در مطالعه حاضر، اثرات سمی مختلف آمونیاک بر ماهی کوی از جمله شاخص‌های آبی، خونی، کبدی، رشدی و پاسخ ایمنی مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، تعداد ۳۶۰ عدد ماهی کوی با میانگین وزنی ۵۰ گرم به صورت تصادفی در ۲۴ آکواریوم (۱۵ قطعه در هر آکواریوم) قرار داده شدند. و آزمون در ۶ تیمار با چهار تکرار و در هر تکرار ۱۵ عدد ماهی به ازاء هر ۱ ppm آمونیاک تام ۳۱ میلی‌گرم FBS در هر لیتر استفاده شد. آزمون‌ها تا تلف شدن ۵۰ درصد ماهیان ادامه یافت و نمونه‌برداری از روز صفر لغایت روز ۱۴ انجام شد. نتایج بررسی شاخص‌های رشد مربوط به ماهی‌های کوی نشان داد که تفاوت معنی‌داری در گروه‌های مختلف از مقادیر میانگین وزن، درصد بازماندگی و درصد رشد روزانه پس از پایان تحقیق وجود دارد. بررسی شاخص‌های مربوط به آب نشان داد که تفاوت معناداری در میزان سختی آب بین روزهای مورد بررسی مربوط به تیمار چهارم ($p=0/039$) وجود دارد. نتایج مربوط به شاخص‌های خونی مانند (لمفوسیت، نوتروفیل، هِماتوکریت، هموگلوبین، گلبول سفید و گلبول قرمز) نشان داد که تفاوت معناداری در بین تیمار ۴ در شاخص لمفوسیت وجود دارد. همچنین در تیمار موردنظر در شاخص نوتروفیل، هِماتوکریت، هموگلوبین، تعداد گلبول‌های قرمز (RBC) (میلی‌لیتر) و تعداد گلبول‌های سفید خون (WBC) (میلی‌لیتر)، تفاوت معنادار مشاهده شد. بررسی نتایج نشان داد که در تیمار ۴، در شاخص‌های سرمی C3 و C4 (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)، SGPT (واحد بر لیتر) و ALP (واحد بر لیتر)، تفاوت معناداری نسبت به سایر تیمارها مشاهده شد ($p<0.05$). نتایج هیستوپاتولوژی نشان داد که هیپوستوسیت‌ها و سینوزئیدهای کبدی بدون عارضه دیده می‌شوند که نشان از عدم تأثیر آمونیاک به مقدار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر در مواجهه با FBS (۵۵/۱ گرم)، بوده است. نتیجه نهایی این تحقیق نشان داد که FBS به‌تنهایی توانست بیشترین بار آمونیاکی را طی ۶ روز تحقیق و حتی پس از برداشتن کیسه FBS از آکواریوم‌ها برآورد. براساس نتایج حاصله از جدول نیتریت چنین به نظر می‌رسد که FBS توانسته است مقادیر نیتریت ۶ روزه را به میزان قابل ملاحظه‌ای در گروه کنترل مثبت نسبت به گروه کنترل منفی کاهش دهد. عدم تفاوت معنی‌دار بین مقادیر آمونیاک در گروه‌های شاهد مثبت و منفی در روزهای مشابه نمونه‌برداری می‌تواند حاکی از عدم تأثیر FBS بر کاهش نیترات آب در مطالعه حاضر است. براساس نتایج حاصله، هر یک از شاخص‌های خونی، ایمنی و کبدی ماهی کوی در حضور FBS تغییر می‌کند.

لغات کلیدی: ماهی کوی، بی سولفیت سدیم، آمونیاک، آب مخازن، شاخص خونی

*نویسنده مسئول



Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

¹ Serum glutamate pyruvate transaminase (SGPT)

² Alkaline Phosphatase (ALP)

مقدمه

آمونیاک متداول‌ترین عامل آلودگی آب است که می‌تواند از طریق خروج مواد زائد گیاهی، تخریب مواد آلی حاوی نیتروژن، رواناب کود و منابع صنعتی وارد سیستم‌های طبیعی آبی شود (Capkin *et al.*, 2009). ترکیبات نیتروژن (نیتريت، نترات و آمونیاک)، برای ماهی سمی در نظر گرفته می‌شوند، زیرا می‌توانند تغییرات بافت‌شناسی و بیوشیمیایی را افزایش دهند، ظرفیت حمل اکسیژن در خون را کاهش دهند و بر تناسب‌اندام (آمادگی بدن از نظر رشد و شنا)، تأثیر بگذارند. تغییرات به‌اصطلاح جهانی (تغییرات آب و هوایی و کاربری زمین)، می‌تواند این ورود ترکیبات نیتروژنی را از طریق فعالیت‌های انسانی (کشاورزی و انتشار پساب‌هایی مانند فاضلاب خانگی)، تقویت و تشدید کند. ماهی‌ها معمولاً با آلاینده‌های مختلف در تماس هستند و ترکیبی از عوامل محیطی (دما، pH، در دسترس بودن اکسیژن و سختی)، می‌تواند اثرات هم‌افزایی یا متضاد داشته باشد (de Araújo *et al.*, 2021). آبی‌پروری در دو دهه اخیر بیشترین رشد را بین سایر بخش‌های تولید غذا از جمله دام و طیور از خود نشان داده است. براساس گزارش سازمان خوار و بار جهانی (FAO) در بین بیش از ۷۰ سیستم پرورش انواع موجودات زنده تأمین‌کننده غذای جامعه بشری، آبی‌پروری تنها منبعی است که بیشترین انگیزش را برای اشتغال‌زایی و فقرزدایی دارد (FAO, 2012). افزایش فعالیت‌های آبی‌پروری با مشکلاتی نیز همراه است. یکی از مشکلات این فعالیت، پساب آمونیاکی ناشی از فعالیت‌های آبی‌پروری است که باعث یوتریفیکاسیون آب‌های دریافت‌کننده آنها می‌شود. آمونیاک به‌واسطه سمی بودن حتی در غلظت‌های پایین، ممکن است اثرات منفی بر بافت‌ها و شاخص‌های فیزیولوژیک (نرخ رشد، میزان مصرف اکسیژن و مقاومت در برابر بیماری)، در ماهی‌ها داشته باشد. آبی‌پروری طی دهه‌های اخیر رشد فزاینده‌ای داشته است به‌طوری‌که در دهه ۵۰ میلادی، تولید آبیان پرورشی قریب به یک میلیون تن بوده و در سال ۲۰۱۶ این مقدار بیش از ۱۵۰ میلیون تن گزارش گردیده است. یکی از مهم‌ترین مسائل مربوط به پرورش یک‌گونه آبی، شناخت روابط بین شاخص‌های زیستی و غیر زیستی و تأثیر آنها بر رشد و

بازماندگی موجود و تعیین الگوی روابط بین آنهاست (Boyd and Tucker, 1998). با توجه به اهمیت مسمومیت با آمونیاک در آبی‌پروری و مشکلاتی که در تشخیص و رفع این عارضه وجود دارد، لزوم یافتن روش‌های جدید حذف عوامل استرس‌زای ماهی از جمله آمونیاک آزاد با توجه به امکانات موجود کشور احساس می‌گردد.

یکی از مواد شیمیایی رایج برای خنثی‌سازی آمونیاک آزاد فرمالدئید بی‌سولفیت سدیم ($\text{CH}_3\text{NaO}_4\text{S}$) است که قادر است، آمونیاک آب را به‌خود شلاته کرده و از محیط حذف نماید و هم‌زمان مورد تأیید سازمان دارو و غذا آمریکا (FDA). این ترکیب، ارزان است و امکان استفاده آن در هر دمای آبی حتی تا دمای صفر درجه نیز وجود دارد. این ترکیب را سازمان FDA (۱۹۸۹) بر کلیه آبیان خوراکی (در محیط آبی) از جمله ماهی، دوکفه‌ای‌ها و سخت‌پوستان استفاده کرده و تأیید شده است.

شاخص‌های کلیدی مانند تعداد گلبول‌های قرمز و سفید خون، هموگلوبین، همتوکریت، پروتئین‌های کمپلمان سرم و فعالیت‌های آنزیمی، بینش‌های مهمی در مورد پاسخ ماهی به استرس آمونیاک ارائه می‌دهند (Atli and Canli, 2010; Gao *et al.*, 2020).

در سیستم‌های پرورشی ماهیان و سایر آبیان، آمونیاک به واسطه متابولیسم پروتئین و فعالیت‌های باکتریایی بر مواد دفعی و مواد غذایی خورده شده یا جذب نشده، تولید می‌شود (Zhang and Perschbacher, 2003). قرار گرفتن در معرض آمونیاک می‌تواند اثرات سمی بسیاری را برای ماهی ایجاد کند و بر عملکردهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی تأثیر بگذارد. تجمع آمونیاک در بافت ماهی باعث اختلال در سیستم گردش خون

و پارامترهای مختلف هماتولوژیک مرتبط با متابولیسم لیپید، سیستم دفاعی ایمنی، انعقاد خون و انتقال مولکولی میشود. قرار گرفتن در معرض آمونیاک همچنین باعث آسیب بافتی از جمله آبشش ماهی، کبد و کلیه‌ها از طریق آسیب اکسیداتیو و سمیت فیزیولوژیکی میشود. به همین دلیل در این مطالعه تصمیم گرفته شد که جهت کاهش ترکیبات ازته آب مخازن و برخی شاخص‌های خونی کبدي وایمنی ماهی کوی به طور نمونه ماهی کوی *Cyprinus*

غوطه‌ور پرداختند. به رغم محدودیت‌های مورد مشاهده در فرایند نیتروفیکاسیون، نتایج مربوط به حذف نیتروژن کل به میزان ۸۳٪، به دلیل ترکیبی از فرآیندهای مختلف برای از بین بردن نیتروژن انجام شد. (Shengming *et al.*, 2015) به مطالعه حذف آمونیوم از استخرهای آبی‌پروری با استفاده از میکروارگانیس‌م‌های اکسیدکننده آمونیاک بی‌تحرک بیوکسیل موقت پرداختند. نتایج حاکی از آن بود که استفاده از PFC به عنوان یک بیوشکر معلق در استخرهای آبی‌پروری، یک روش عملی و ارزان برای از بین بردن یون آمونیوم در محل است. Khalil و همکاران (۲۰۱۸) به مطالعه حذف آمونیوم از مزارع پرورش ماهی با استفاده از بیوجار حاصل از نی برنج پرداختند و ایزوترم‌ها و مطالعات جنبشی جذب آمونیوم را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که معیار به‌دست آمده از برنج از معادله شبه مرتبه دوم برای سینتیک جذب آمونیوم پیروی می‌کند ($R^2=0/98$). همچنین ایزوترم جذب از مدل فروندلیچ ($R^2=0/99$) و مدل لانگمویر ($R^2=0/98$) پیروی می‌کند. (Kim *et al.*, 2021) به ارزیابی فیزیولوژی خون و پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی و ایمنی ماهی کفشک زیتونی (Olive Flounder) در اثر تغییرات pH در آب پرداختند. پارامترهای فیزیولوژی خون، مانند سطوح هماتوکریت، منیزیم، گلوکز، گلوتامیک اگزالات ترانس آمیناز (GOT)، گلوتامیک پیرووات ترانس آمیناز (GPT) و آلکالین فسفاتاز (ALP) به طور قابل توجهی توسط pH پایین (اسیدی) یا pH بالا (قلیایی) تغییر کردند. مطالعه حاضر، به منظور شناسایی پاسخ‌های ماهیان کوی نسبت به استرس مزمن آمونیاک در آکواریوم انجام شد تا اثرات مخرب آمونیاک و کاهش احتمالی حذف این اثرات با استفاده از فرمالدئید بی‌سولفیت سدیم بر این گونه مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

زمان و محل اجرای تحقیق

از روز اول لغایت روز پنجم مقادیر مختلفی از آمونیاک و FBS در آکواریوم‌ها ریخته شد و سپس یکی از بسته‌های FBS از ۴ آکواریوم هر گروه خارج گردید و در عمل تا روز

rubrofusca از فرمالدئید بی‌سولفیت سدیم هیدروکسی متانوسولفانات سدیم استفاده کنیم (Xu *et al.*, 2021). ماهی کوی (*Cyprinus rubrofusca*)، گونه‌ای از ماهی سیپرینید است و شکل وحشی آن به کوی معروف است. این ماهی در آب‌های شیرین آسیای شرقی، بومی چین، ویتنام و لاؤس از حوضه رودخانه آمو تا سرخ گسترده شده و خارج از محدوده بومی خود معرفی شده است. کوی دارای رنگ‌های روشن و الگوهای متنوع است. ماهی کوی بدنی کشیده دارد و دارای باله پشتی، یک جفت باله سینه‌ای، یک جفت باله لگنی، باله دمی و باله مخرجی است. ماهی کوی در آب و هوای معتدل، آب شیرین و در دمای ۳۰-۸ درجه سانتی‌گراد زندگی می‌کند. رشد نتیجه افزایش وزن و طول است به‌طوری‌که ماهی‌ها بزرگ به‌نظر می‌رسند. افزایش وزن ماهی تحت تأثیر عوامل متعددی از جمله تغذیه خوراک، ویژگی‌های ژنتیکی، شرایط محیطی به‌خصوص شرایط عاری از آفات و بیماری‌هاست. کیفیت آب یکی از عوامل تعیین‌کننده رشد ماهی است. یکی از شرایطی که می‌تواند زندگی ماهیان را مختل کند، pH بسیار پایین (بسیار اسیدی) یا خیلی زیاد (بسیار قلیایی) است. دمای آب عامل مهمی است که باید مورد توجه قرار گیرد زیرا می‌تواند بر میزان متابولیسم بدن ماهی در رشد تأثیر بگذارد. یکی از نیازهای ماهی‌ها برای زنده ماندن، اکسیژن است. میزان اکسیژن محلولی که می‌تواند از نگهداری ماهی کوی پشتیبانی کند، حدود ۳ میلی‌گرم در لیتر است. در ادامه به چندین مورد از مطالعات انجام شده در این زمینه اشاره می‌شود.

Handy و Poxton (۱۹۹۳) بیان نمودند که افزایش سمیت آمونیاک برخلاف آب شیرین در آب شور با کاهش قلیائیت، افزایش می‌یابد. مقدار سمیت برای ماهیان دریائی ۰/۰۹ تا ۳/۳۵ میلی‌گرم در لیتر بسته به دما، pH و گونه آبی متفاوت است.

Seager و همکاران (۱۹۸۸) بیان نمودند که اکثر بافت‌های بیولوژیک نسبت به آمونیاک (بر خلاف آمونیوم یا آمونیاک یونیزه)، نفوذپذیر است. Ramos و همکاران (۲۰۰۷) در مطالعه‌ای به بررسی حذف نیتروژن به روش بیولوژیک و فنل از فاضلاب‌های نمکی صنعتی به‌وسیله راکتور فیلم ثابت

ششم تحقیق، هیچ بخشی از FBS در ۳ آکواریوم باقی مانده جابه جا نگردید.

تهیه ماهی و سازگاری به شرایط آزمایشگاه

بر اساس طرح، تعداد ۲۴ عدد آکواریوم ۱۰۰ لیتری به ابعاد ۴۰×۴۰×۱۰۰ انتخاب شد. برای انجام این تحقیق، تعداد ۳۶۰ عدد ماهی کوی با میانگین وزنی $1/698 \pm 48/48$ گرم و میانگین طولی $16/55 \pm 0/99$ سانتی متر از یک مرکز پرورش ماهیان زینتی در گیلان خریداری شد و پس از انتقال به آزمایشگاه به صورت تصادفی در ۲۴ آکواریوم (۱۵ عدد در هر آکواریوم) تقسیم شدند. برای سازگاری ماهی با شرایط آزمایشگاهی، ماهی‌های خریداری شده دو هفته پیش از شروع آزمون در تانک‌های دارای پمپ هوای مرکزی نگهداری شده و در این مدت دو مرتبه در روز با خوراک تجاری تغذیه شدند. طی آزمایش، دوره نوری با لامپ‌های ۲۵ وات به صورت ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی برای مخزن‌ها تنظیم شد. پس از آبیگری اولیه آکواریوم‌ها، اکسیژن‌رسانی در داخل هر آکواریوم از طریق پمپ مرکزی به طور یکسان در هر ۲۴ تانک صورت گرفت. سپس آکواریوم‌ها ماهی‌دار شدند. ماهیان پس از دو هفته سازگاری

با شرایط کارگاه، از نظر سلامتی و وضع ظاهری بررسی شدند. به منظور خروج فضولات و مواد زاید در دوره آدپتاسیون، آب تانک‌ها هر روز غروب پس از آخرین وعده غذایی سیفون شدند و هفته‌ای یک الی دوبار آب تانک‌ها به میزان ۵۰-۲۵ درصد تعویض گردید.

تغذیه و غذادهی

غذای مورد نیاز هر تانک با توجه به نتایج به دست آمده از زیست‌سنجی هر تانک پرورشی محاسبه و تنظیم گردید. غذادهی در زمان آداپته شدن و آزمایش به اندازه ۵ درصد وزن بدن و مدت دوره آزمایش ۱ ماه، در دو نوبت (ساعات ۹:۰۰، ۱۶:۰۰) با جیره آماده صورت گرفت. در تحقیق حاضر، از جیره غذایی (پروتئین ۵۲ درصد، چربی ۱۲/۵ درصد و فیبر خام ۱/۵ درصد) شرکت ۲۱ بیضاء (شیراز، ایران) با اندازه ۲ میلی‌متر استفاده شد.

تیمارهای آزمایش

آزمایش در ۶ تیمار و با چهار تکرار که به ازاء هر ۱ ppm آمونیاک تام ۳۱ میلی‌گرم FBS در هر لیتر استفاده شد و بصورت ذیل بود:

- T1، مواجهه با آمونیاک در غلظت (میلی گرم در لیتر) ۰/۵ و مقدار ۱/۵۵ گرم FBS به ازاء هر ۱۰۰ لیتر آب
- T2، مواجهه با آمونیاک در غلظت (میلی گرم در لیتر) ۰/۷۵ و مقدار ۲/۳۲۵ گرم FBS به ازاء هر ۱۰۰ لیتر آب
- T3، مواجهه با آمونیاک در غلظت (میلی گرم در لیتر) ۱ و مقدار ۳/۱ گرم FBS به ازاء هر ۱۰۰ لیتر آب
- T4، مواجهه با آمونیاک در غلظت (میلی گرم در لیتر) ۱/۵ و مقدار ۴/۶۵ گرم FBS به ازاء هر ۱۰۰ لیتر آب
- C- که شاهد منفی بوده و هیچ ترکیب افزودنی ندارد.
- C+ به عنوان شاهد مثبت، ۴/۶۵ گرم FBS در ۱۰۰ لیتر آب بود (برای بررسی اثر منفی احتمالی این ترکیب).

شد تا ماهی‌ها با محیط جدید سازگار شوند و سپس کار در روز سوم تحقیق شروع شد. چون به ازاء هر ۱ ppm آمونیاک تام ۳۱ میلی‌گرم FBS در هر لیتر استفاده شد. بنابراین، در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر، مقدار ۱/۵۵ گرم FBS در داخل یک کیسه به آب اضافه شد. به همین ترتیب به تیمارهای ۰/۷۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب میزان ۲/۳۲۵، ۳/۱ گرم و ۴/۶۵ گرم FBS به ازاء هر ۱۰۰ لیتر در

در مطالعه حاضر، ابتدا ۴ غلظت آمونیاک که حداقل احتمال تلفات در ۲ مورد از آنها بر اساس منابع محتمل است، به عنوان تیمارهای مرحله اول تحقیق انتخاب شدند (Watson et al, 2010). در واقع، ۴ تیمار ۰/۵، ۰/۷۵، ۱ و ۱/۵ (میلی‌گرم در لیتر) آمونیاک در ۴ تکرار به گونه‌ای انتخاب شدند که در هر مخزن ماهی ۱۵ ماهی وجود داشته باشد. پس از ذخیره‌سازی ماهی‌ها به مدت دو روز، اجازه داده

آمونیاک کل از روش (EPA Method 8038, 2010) (USEPA/Colorimetric) برای نیترات از روش (USA/Colorimetric) یا (Cadmium Reduction) یا (Method 8507, 2010 USEPA)، برای نیتريت از روش (Colorimetric) یا روش (Electrometric یا ISIRI, 1431, pH Meter)، برای اسیدیتة از (ISIRI, 7476 Conductivity) برای هدایت الکتریکی از (Meter)، برای دما از (BENETECH) (GM1311. Thermometric Probe)، برای اکسیژن محلول از روش (Electrode/Optical DO) (AZ-8403) (Meter) استفاده شد و مقدار آمونیاک غیریونیزه نیز بر اساس آمونیاک محاسبه گردید.

اندازه‌گیری شاخص‌های آب

نمونه‌برداری از همان مخزن نگهداری ماهی انجام شد. آب از اکواریوم ماهی، در دو عمق (سطح و میانه) با ۴ تکرار جمع‌آوری گردید و از هر تکرار دو ماهی نمونه‌برداری شد. اکسیژن محلول موجود با استفاده از دستگاه اکسیژن‌متر مدل (AZ-8403) (میلی گرم در لیتر) اندازه‌گیری شد. اکسیژن‌متر دارای یک الکتروود است که نمونه محلول در آن با غشایی که نسبت به اکسیژن خاصیت تراوایی دارد، نگهداری می‌شود. زمانی که اکسیژن از این غشاء عبور کند، به الکتروود می‌رسد.

برای اندازه‌گیری نیترات و نیتريت محلول در آب از روش کالریمتریک به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد. غلظت نیترات و نیتريت محلول در آب با استفاده به روش رنگ‌سنجی مطابق با استانداردهای (Method 8507, 2010) (USEPA/Colorimetric) (USA/Colorimetric) و (Cadmium Reduction Method)، اندازه‌گیری شد. مقدار سختی کلی آب بیانگر مقادیر یون‌های منیزیم و کلسیم حل‌شده در آب است. در این پژوهش مقدار کلسیم و منیزیم موجود در آب با روش تیتراسیون اندازه‌گیری شد. میزان آمونیاک در آب از طریق روش نسلر و با استفاده از اسپکتروفتومتر تعیین شد. برای اندازه‌گیری میزان آمونیوم در آب نیز ابتدا محلول‌های استاندارد تهیه شد. برای اندازه‌گیری هدایت الکتریکی (EC) از دستگاه هدایت‌سنج

داخل یک کیسه به آب آکواریوم اضافه گردید. به عبارت دیگر، با احتساب ۲ گروه شاهد (اولی شاهد منفی بوده که هیچ ترکیب افزودنی ندارد و دومی به عنوان شاهد مثبت دارای ۴/۶۵ گرم FBS در ۱۰۰ لیتر آب است)؛ ۶ گروه اصلی در ۴ تکرار، ۳۶۰ ماهی مورد نیاز بود. طول زمان تحقیق در این فاز مبتنی بر مدت زمانی بود که ۵۰ درصد ماهی‌ها در مخازن زنده باشند. البته حداکثر مدت زمان موردنظر برای این تحقیق ۱ ماه بود تا بتوان تأثیر غلظت‌های مختلف آمونیاک را بر بافت‌های ماهی مشخص نمود.

بررسی کیفی ماهی‌ها در طول دوره آزمایش

تلفات و تغییر رفتارهای شنا و رنگ ماهی‌ها با گرفتن عکس از آنها، در آکواریوم‌هایی که کیسه از آنها خارج شده یا مواردی که کیسه FBS آنها خارج نشده بود، در روزهای بعدی صورت گرفت. همچنین در ابتدا و در انتهای دوره، ماهی‌ها توزین شده و طول آنها اندازه‌گیری شد.

بررسی کیفی محیط پرورش ماهی‌ها

هوادهی تانک‌ها با استفاده از سنگ هوای متصل به کمپرسور مرکزی انجام شد. به منظور جلوگیری از آلودگی و خارج کردن غذای باقی‌مانده و فضولات، در ابتدا آب تانک‌ها برای کاهش استرس ماهیان، هر روز غروب پس از آخرین وعده غذایی سیفون گردید و سپس آب تانک‌ها هفته‌ای یک الی دوبار به میزان ۵۰-۲۵ درصد تعویض شد. در صورت مشاهده تلفات در حوضچه‌ها، بلافاصله ماهی‌های تلف‌شده خارج گردید. اندازه‌گیری آمونیاک روزانه یک‌بار صورت گرفت و ثبت شد تا مشخص شود چه میزان از آمونیاک بر ماهی تحمیل شده است. آزمایش‌های فیزیکی و شیمیایی آب مانند سختی کل (استاندارد ملی ایران ۸۶۵۲)، آمونیاک کل (استاندارد بین‌المللی ۸۰۳۸)، نیترات (استاندارد بین‌المللی ۸۰۳۹)، نیتريت (استاندارد بین‌المللی ۸۵۰۷)، اسیدیتة (استاندارد ملی ایران ۱۴۱۳۱)، هدایت الکتریکی (استاندارد ایران ۷۴۷۶)، دما، اکسیژن محلول (دستگاه‌های اکسیژن‌متر و pH متر) اندازه‌گیری شد و آمونیاک غیریونیزه نیز از طریق تبدیل آمونیاک تام بدست آمد. برای اندازه‌گیری سختی کل از روش (EDTA Titrimetric) (ISIRI, 8652)، برای

(EC متر)، استفاده شد که عملکرد آن بر مبنای اندازه گیری آنیون ها و کاتیون های موجود در آب است.

اندازه گیری pH

در این پژوهش برای اندازه گیری مقدار pH از دستگاه pH متر دیجیتالی استفاده شد. کار با آن بسیار ساده است به طوری که پس از قرار گرفتن در آب، میزان دقیق pH در صفحه نمایشگر به نمایش درآمد.

اندازه گیری دما

برای اندازه گیری دمای آب از دماسنج آکواریومی استفاده شد. برای تنظیم دمای آب، بخاری روی دمای مشخصی قرار داده شد و پس از چند ساعت، دمای آب قرائت گردید.

مطالعه هماتولوژی

به منظور بررسی شاخص های خونی در انتهای دوره آزمایش بعد از شروع تلفات از هر تکرار و تیمار به صورت تصادفی تعداد ۲ عدد ماهی (در مجموع ۴۸ نمونه) انتخاب شد و از خون آنها نمونه برداری گردید. برای این کار، با استفاده از سرنگ ۲ میلی متری و از طریق سیاهرگ ساقه دمی واقع در پشت باله مخرجی، خون گیری انجام شد. شاخص های خونی شامل تعداد هماتوکریت، هموگلوبین و نوتروفیل اندازه گیری شدند.

اندازه گیری هماتوکریت

برای اندازه گیری هماتوکریت از روش میکروهیاتوکریت همراه با سانتریفیوژ Nuve به مدت ۱۰ دقیقه با ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه استفاده شد. برای محاسبه درصد هماتوکریت خون، بلافاصله پس از خونگیری و پیش از لخته شدن خون، ۲/۳ حجم لوله های موئینه هپارینه با خون همگن شده پر شدند. درصد هماتوکریت هر نمونه خون روی خط کش مخصوص محاسبه گردید.

اندازه گیری هموگلوبین

هموگلوبین (HB) با واحد گرم در دسی لیتر با استفاده از محلول درابکین (سیانومت هموگلوبین) در طول موج ۵۴۰ نانومتر با استفاده از منحنی استاندارد اندازه گیری شده است.

اندازه گیری شاخص های بیوشیمیایی خون آلبومین

در آزمایش تعیین مقدار آلبومین سرم خون با روش فتومتریک، آلبومین موجود در سرم BROMOCRF501، GREAN (در pH اسیدی) یک کمپلکس رنگی سبز - آبی ایجاد کرد که شدت رنگ ایجاد شده متناسب با مقدار آلبومین در نمونه است. به منظور اندازه گیری پروتئین کل (TP)، از کیت های تشخیصی شرکت بیونیک (تهران، ایران) به روش کالریمتریک در طول موج ۵۴۰ نانومتر و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد استفاده شد. سنجش آنزیم لیزوزیم به روش کدورت سنجی (توربیدیمتریک) و به وسیله کیت الیزا با استفاده از لیزوزیم سفیده تخم مرغ به عنوان استاندارد اندازه گیری شد. برای اندازه گیری این شاخص از کیت ZellBio GmbH استفاده شد. این کیت برای سنجش کیفی نمونه های بیولوژیک انسانی و حیوانی به کار می رود. مالون دی آلدئید بر اساس روش کالریمتریک در طول موج ۵۳۵ نانومتر است.

اندازه گیری کمپلکس C3 و C4

برای اندازه گیری شاخص های C3 و C4 از روش ایمونوتوربیدی متری و دستگاه اتوآنالایزر (پرستیژ، ژاپن) استفاده شد. از کیت الیزا (ELISA) یا کیت کمپلمان ماهی (C4)^۱ برای سنجش C3 در نمونه سرم ماهی استفاده شد (ZellBio GmbH، آلمان). از کیت الیزا (ELISA) یا کیت کمپلمان ماهی (C3)^۲ برای سنجش C3 در نمونه سرم ماهی استفاده شد (ZellBio GmbH، آلمان). سوپراکسید دیسموتاز (SOD) کیت سنجش ZellBio GmbH از سوپر اکسید آنیون برای تبدیل به پراکسید هیدروژن و اکسیژن در شرایط واکنش آنزیمی استفاده می کند. در نهایت محصول

^۱ Fish Complement 4 (C4)

^۲ Fish Complement 3 (C3)

درجه سانتی‌گراد انکوبه شده و سپس ۲۵۰ میکرولیتر معرف ۲ به آن اضافه شد. ۱ دقیقه پس از اضافه شدن معرف ۲ و مخلوط شدن محتویات کووت، جذب نوری در ۳۴۰ نانومتر قرائت شد و این کار برای دقیقه ۲ و ۳ نیز تکرار شد تا میزان اختلاف جذب نوری به دست آید. مقدار اختلافات جذب نوری پس از دقیق ۱، ۲ و ۳ با هم جمع شده و بر عدد ۳ تقسیم شد. در نهایت، میانگین حاصله با توجه به اتوانالایزر استاندارد در عدد ۱۹۸۵ ضرب گردید.

آنزیم ALT

سنجش آنزیم ALT نیز با کیت تشخیصی پارس آزمون با روش فتومتریک مطابق با دستورالعمل ریتمن و فرانکل (۱۹۷۵) انجام شد. در ابتدا، نمونه‌ها و معرف‌ها آماده‌سازی شدند. سپس، ۱۰۰ میکرولیتر نمونه و ۱۰۰۰ میکرولیتر معرف ۱ پس از ۵ دقیقه مخلوط شدن با یکدیگر در دمای ۳۷ انکوبه شده و سپس ۲۵۰ میکرولیتر معرف ۲ به آن اضافه شد. ۱ دقیقه پس از اضافه شدن معرف ۲ و مخلوط شدن محتویات کووت، جذب نوری در ۳۴۰ نانومتر قرائت شد و این کار برای دقیقه ۲ و ۳ نیز تکرار شد تا میزان اختلاف جذب نوری به دست آید. مقدار اختلافات جذب نوری پس از دقیق ۱، ۲ و ۳ با هم جمع شده و بر عدد ۳ تقسیم شد. در نهایت، میانگین حاصله با توجه به اتوانالایزر استاندارد در عدد ۱۹۸۵ ضرب گردید.

اندازه‌گیری شاخص‌های رشد

برای تعیین توده زنده، ۱۰۰ درصد ماهیان هر تکرار با ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۱ گرم توزین شد. همچنین با دقت یک میلی‌متر طول کل آنها اندازه‌گیری شده و در فرم‌های مخصوص ثبت شد. ماهیان دو ساعت قبل از غذادهی زیست‌سنجی شدند. اندازه‌گیری شاخص‌های رشد با استفاده از فرمول‌های ذیل (۲ الی ۷) اندازه‌گیری شدند (Hassani et al., 2019):

(۲) افزایش وزن (WG):

$$WG = BW_f - BW_i$$

یک کروموژن رنگی است که نتیجه رنگ‌سنجی در ۴۲۰ نانومتر، قابل اندازه‌گیری است (ZellBio GmbH, آلمان).

سنجش شاخص‌های کبدی

استخراج عصاره آنزیمی بافت کبد (Atli and Canli, 2010)، پروتئین محلول عصاره آنزیمی بافت کبد (Bradford, 1976)، آنزیم‌های (ALP¹, klin et al., 1972، AST² و ALT³) و اسید فسفاتاز (Bessey et al., 1946). انجام شد.

آنزیم ALP

در این مطالعه، برای سنجش آنزیم ALP از روش DGKC (استاندارد انجمن بیوشیمی آلمان) فتومتریک و کیت (Alkaline Phosphatase LS)، استفاده شد. این کیت به وسیله سوبسترای (p-Nitrophenylphosphate) و بافر DEA طراحی شده است. برای سنجش از دو معرف (R1: Buffer Reagent) و (R2: Substrate Reagent) استفاده شد. ابتدا مقدار ۲۰ میکرولیتر از نمونه سرم هیپارینه با مقدار ۱۰۰۰ میکرولیتر از محلول معرف R1 با یکدیگر مخلوط شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و سپس مقدار ۲۵۰ میکرولیتر از معرف R2 اضافه گردید. پس از مخلوط نمودن، مقدار جذب نوری در طول موج ۴۱۰-۴۰۵ نانومتر بعد از یک دقیقه قرائت شد و بلافاصله کورنومتر به کار انداخته شد و دقیقاً پس از ۱، ۲ و ۳ دقیقه، اختلاف جذب نوری در دقیقه قبل تعیین شد. روش محاسبه براساس معادله (۱) است:

$$ALP(U/L) = \Delta A/min \times 3433 \quad (1)$$

آنزیم AST

سنجش آنزیم AST نیز با کیت تشخیصی پارس آزمون با روش فتومتریک مطابق با دستورالعمل ریتمن و فرانکل (۱۹۷۵) انجام شد. در ابتدا، نمونه‌ها و معرف‌ها آماده‌سازی شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر نمونه و ۱۰۰۰ میکرولیتر معرف ۱ پس از ۵ دقیقه مخلوط شدن با یکدیگر، در دمای ۳۷

³ Alanine Aminotransferease (ALT)

¹ Alkaline phosphatase (ALP)

² Aspartate transaminase (AST)

نتایج

شاخص‌های رشد مربوط به ماهی‌های کوی

وزن و مقادیر اولیه طول اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p>0/05$). اما همین نتایج مؤید تفاوت معنی‌داری ($p>0/05$) در گروه‌های مختلف از مقادیر میانگین وزن، درصد بازماندگی و درصد رشد روزانه پس از پایان تحقیق است که به عبارت دیگر، مؤید تأثیر مقادیر مواد مختلف به کار رفته بر شاخص‌های مذکور است. بیشترین میانگین وزن اولیه (گرم) مربوط به تیمار ۴ (۴۸/۵۸) بدون تفاوت معنی‌دار با سایر مشاهده گردید ($p>0/05$). پس از پایان آزمایش تجربی، کمترین مقدار وزن ثانویه (گرم) مربوط به گروه ۴ (۴۸/۱۲) بوده که صرفاً با گروه شاهد مثبت (۴۸/۹۶) اختلاف معنی‌داری نشان داده است ($p>0/05$). به هر حال، این اختلاف در طول کل ماهی در پایان تحقیق مؤثر نبوده است. این در حالی است که مقدار درصد افزایش وزن بدن در گروه شاهد مثبت (۱/۴۷ درصد) و از سایر گروه‌ها به طور قابل توجهی بیشتر است ($p>0/05$). میزان درصد بازماندگی گروه شاهد مثبت که ۴/۶۵ گرم FBS را تجربه کرده است نیز ۱۰۰ درصد بدون تفاوت معنی‌دار با شاهد منفی ۱۰۰ درصد بوده است. بیشترین افزایش وزن بدن (گرم) مربوط به گروه شاهد مثبت (۰/۷۱) و با اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد منفی (۰/۵۷) بوده و نسبت به سایر به طور معنی‌داری بیشتر بوده است (جدول ۱).

۳) درصد افزایش وزن (WG%) :

$$BWI = \frac{BW_f - BW_i}{BW_i} * 100$$

۴) میزان افزایش وزن (GR) :

$$GR = \frac{BW_f - BW_i}{T}$$

۵) نرخ رشد ویژه (SGR) :

$$SGR = \frac{\ln BW_f - \ln BW_i}{T} * 100$$

۶) میانگین رشد روزانه (ADG) :

$$ADG = \frac{W_f - W_i}{W_i * T} * 100$$

۷) درصد بازماندگی (SR) :

$$SR = \frac{Q_f}{Q_i} * 100$$

BW_i = متوسط وزن اولیه بچه‌ماهی (گرم)، BW_f = متوسط وزن نهایی بچه ماهی (گرم)، W_i = میانگین بیوماس اولیه بچه ماهی (گرم)، W_f = میانگین بیوماس نهایی بچه‌ماهی (گرم)، TL = طول کل بچه ماهی (سانتی‌متر)، Q_i = تعداد اولیه بچه ماهی، Q_f = تعداد نهایی بچه ماهی، F = مقدار غذای مصرفی بچه ماهی، T = طول مدت پرورش (روز)

روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از بسته‌های نرم‌افزاری Excel و SPSS 17 انجام شد. مقایسه میانگین تیمارها در قالب طرح کاملاً تصادفی آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA) و به کمک آزمون دانکن انجام شد و وجود یا فقدان اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۵ درصد ($p<0/05$) تعیین گردید.

جدول ۱: بررسی تفاوت شاخص‌های بیومتری و رشدی ماهیان کوی

Table 1: Investigating the differences in biometric and growth indices of koi fish

Treatment	Initial weight(grams)	secondary weight (gram)	Specific growth rate (SGR)	weight gain (gram) WG	Initial length (cm)	Secondary length (cm)	Survival rate SR
T4	48.58±0.26	48.12±0.45 ^a	-0.032±0.04	46.58±0.0	16.51±0.18 ^{ab}	16.48±0.18	77/98±3/85 a
C+	48.26±0.26	48.96±0.14 ^b	0.048±0.016	0.71±0.22	16.7±0.14 ^b	16.9±0.12	100±0 c
C-	48.14±0.23	48.71±0.28 ^{ab}	0.039±0.034	0.57±0.49	16.4±0.27 ^{ab}	16.6±0.21	100±0 c
p-value	0.199	0.036*	0.045	0.041	0.053	0.064	0/041*

تیمار چهارم ($p=0/039$) وجود دارد. شایان ذکر است، در تمامی آکواریوم‌ها میزان یون کلر ۲۳-۱۹ میلی‌گرم در لیتر در نوسان بود. این در حالی بود که نوسان میزان سختی آب

شاخص‌های آب

مطابق با جدول ۲، نتایج بررسی‌ها نشان داد که تفاوت معنی‌داری در میزان سختی آب بین روزهای مورد بررسی

مقدار درصد رشد روزانه در گروه ۴ پایین بود که نشانگر تأثیر منفی آمونیاک در مقادیر بالا و عدم عملکرد مثبت FBS در پیشگیری از آن در این مقادیر است. طی تحقیق، دامنه مقدار نیترات گروه کنترل منفی، بین ۱۲/۵۷ در روز اول الی ۳۴/۳۳ میلی گرم در لیتر در روز ششم در نوسان بوده است. این مقادیر با مقادیر گروه کنترل مثبت در زمان‌های نمونه‌برداری تفاوت معنی‌داری نشان نداد ($p > 0.05$) به‌طوری‌که دامنه مقادیر شاهد مثبت نیز در دامنه ۰/۰۳۳-۱۹/۹۷ طی ۶ روز تحقیق در نوسان بوده و با افزایش زمان همان‌طوری‌که در گروه کنترل منفی مشخص بود، در این گروه نیز مقادیر نیترات افزایش معنی‌داری داشته است ($p > 0.05$).

۲۵۱-۲۲۶ میلی گرم در لیتر در نوسان بود. همچنین در روز اول، بیشترین مقدار آمونیاک بر حسب میلی گرم ازت به ازاء هر لیتر (۱/۶۷) در گروه ۴ و کمترین آن (۰/۰۳) در گروه شاهد مثبت و با تعقیب به‌وسیله گروه شاهد منفی (۰/۸۷) گزارش گردید. هر چند در روز ششم این مقدار کمی افزایش یافت. مقادیر آمونیاک در روزهای اول لغایت ششم در گروه ۴ حاکی از عدم تغییر مقادیر آمونیاک آب مخازن پس از برداشته شدن کیسه FBS دارد. پائین بودن و کاهش میانگین وزنی ماهی‌ها در گروه ۴ می‌تواند نشانه تأثیر منفی آمونیاک در مقادیر بالا باشد به‌طوری‌که FBS نیز به‌خوبی نتوانسته است در کاهش این اثر به طور قابل‌توجهی مؤثر باشد. این تغییر وزنی در هر حال با تغییر طول بدن ماهی همراه نبوده است. منفی بودن رشد روزانه گروه ۴، حاکی از اثرات منفی و مخرب آمونیاک و عدم پیشگیری FBS است.

جدول ۲: بررسی شاخص‌های آب
Table 2: Water related indicators

Parameter	Treatment	First day	Sixth day	p-value
Total hardness (mg.l)	T4	234.33±6.03 ^a	236.67±6.11 ^{ab}	*0.039
	C+	238.33±7.64	243.67±25.97	0.636
	C-	240.67±6.03	251.33±3.21	0.073
	p-value	0.313	0.165	
Ammonia	T4	1.67±0.16D ^{bc}	2.43±0.05C ^c	*0.007
	C+	0.03±0.00A ^a	0.20±0.01A ^a	*0.011
	C-	0.87±0.01B ^a	1.12±0.01B ^b	*0.007
	p-value	*0.006 *0.007	*0.006 *0.007	
Nitrate (mg.l)	T4	33.5±2.02C ^b	4400.±10.15B ^c	*0.012
	C+	13.17±0.91A ^a	3300.±7.55A ^b	*0.01
	C-	12.57±0.55A ^a	34.33±3.06A ^c	*0.006
	p-value	*0.008 *0.034	*0.008 *0.034	
Nitrite (mg.l)	T4	0.51±0.04C ^c	0.69±0.02C ^d	*0.007
	C+	0.06±0.01A ^a	0.04±0.01A ^b	*0.01
	C-	0.15±0.03A ^{Ba}	0.18±0.01B ^a	0.095
	p-value	0.006*	0.008*	
pH	T4	8.19±0.01b ^B	8.13±0.01b	0.048
	C+	8.12±0.09b ^B	8.18±0.02b	0.049
	C-	7.7±0.2a ^A	8.15±0.02b	0.016
	p-value	0.047	0.07	
Electrical conductivity (MS)	T4	920±5ab	931.67±2.89b	*0.021
	C+	934.67±5.03ab	941±7.94b	*0.022
	C-	925±5	935±5	0.127
	p-value	392	218	*0.021
Temperature (C)	T4	19±0	19±0	0.544
	C+	19.67±0.58	19.33±0.58	0.423
	C-	19.33±0.58	19±0	0.487
	p-value	726	787	0.544
Dissolved oxygen (mg.l)	T4	4.4±0.74	4.4±0.68A	0.906
	C+	6.3±1.09	6.4±0.38AB	0.562
	C-	5.9±1.06	7.2±0.25B	0.423
	p-value	0.195 *	0.024	0.906

*در سطح ۰/۰۵ معنادار است.

It is meaningful in 5 percent level

بیشترین مقدار نیترا ت گروه ۴ برابر ۶۴/۶۷ میلی گرم در لیتر در روز سوم است. ($p > 0.05$). چنانچه از روز قبل از شروع مطالعه صرف نظر نمود، کمترین مقدار گروه‌های ۱ الی ۴ به ترتیب ۲۱/۶۳، ۲۵/۲۷، ۳۳/۵۰ و ۳۴/۲ میلی گرم در لیتر ($p > 0.05$) در روز اول تحقیق ثبت شده است.

در گروه شاهد مثبت، مقدار نیتريت به تدریج از روز صفر (۰/۱۵ میلی گرم در لیتر) کم شده و در روز آخر به کمترین مقدار (۰/۰۴ میلی گرم در لیتر) رسیده است ($p > 0.05$). با مقایسه این مقادیر با مقادیر گروه شاهد منفی، چنین به نظر می‌رسد که مقادیر نیتريت گروه شاهد مثبت از مقادیر گروه شاهد منفی حدود یک دوم الی یک چهارم به مراتب کمتر است ($p > 0.05$). مقایسه مقادیر گروه شاهد مثبت با گروه تیمار ۴ نشانگر وجود کمترین مقادیر نیتريت ($p > 0.05$) گروه شاهد مثبت است. این دامنه در گروه ۴ افزایش قابل ملاحظه‌ای پیدا کرده است به طوری که در ۶ روز تحقیق در دامنه ۳۳/۰-۶۹/۰ در گروه ۴ در نوسان بوده است ($p > 0.05$). بر اساس انتظار تا حدودی مقدار نیتريت طی تحقیق روندی افزایشی داشته است ولیکن مقدار آن در روز ششم گروه ۴ (۰/۶۹) میلی گرم در لیتر، بسیار بیشتر از مقدار شاهد منفی (۰/۱۸ میلی گرم در لیتر) و با اختلاف معنی‌دار ($p > 0.05$) ثبت گردیده است. همچنین کمترین میانگین pH مطالعه به ترتیب مربوط به تیمار ۴ (۸/۱۵) و تیمار شاهد منفی (۷/۹) است. در روز ششم مطالعه، کمترین میانگین pH به ترتیب مربوط به تیمار ۴ (۸/۱۳) مشاهده گردید. pH آب در گروه ۴ که FBS به آن اضافه شده، صرفاً در روز اول نسبت به شاهد منفی قلیایی‌تر است ($p > 0.05$). به علاوه، نتایج هدایت الکتریکی (MS) نشان داد که تفاوت معناداری در میزان هدایت الکتریکی بین روزهای مورد بررسی مربوط به تیمار ۴ ($p = 0.021$) و شاهد مثبت ($p = 0.022$) مشاهده گردید. بیشترین و کمترین میانگین هدایت الکتریکی در روز اول بیشترین و کمترین میانگین هدایت الکتریکی به ترتیب مربوط به تیمار شاهد مثبت (۹۳۴/۶۷) و تیمار ۴ (۹۲۰) و در روز ششم مطالعه بیشترین و کمترین میانگین هدایت الکتریکی به ترتیب مربوط به شاهد مثبت (۹۴۱) و تیمار ۴ (۹۳۱/۶۷) مشاهده گردید. علاوه بر این، میانگین هدایت الکتریکی در تیمار ۴ بیشترین

و کمترین مقدار در روز ششم مطالعه (۹۳۱/۶۷)، در تیمار شاهد مثبت بیشترین و کمترین مقدار به ترتیب در روزهای ششم (۹۴۱) و در تیمار شاهد منفی کمترین مقدار در روز اول (۹۳۵) مشاهده گردید.

نتایج دما (درجه سانتی‌گراد) نشان داد که در روز اول بیشترین و کمترین میانگین دما به ترتیب مربوط به تیمار شاهد مثبت (۱۹/۶۷) و تیمار ۴ (۱۹) و در روز ششم مطالعه، کمترین میانگین دما مربوط به تیمار ۴ و شاهد منفی (۱۹/۰) مشاهده گردید. علاوه بر این، میانگین دما در تیمار ۴ بیشترین و کمترین مقدار به ترتیب در روز اول و روز ششم مطالعه (۱۹/۰) و در تیمار شاهد مثبت بیشترین و کمترین مقدار به ترتیب در روز اول مطالعه (۱۹/۶۷) و ششم (۱۹/۳۳) و در تیمار شاهد منفی بیشترین مقدار به ترتیب در روز اول (۱۹/۳۳) مشاهده گردید.

نتایج اکسیژن محلول (میلی گرم بر لیتر) نشان داد که بیشترین و کمترین میانگین اکسیژن محلول (میلی گرم بر لیتر) در روز ششم به ترتیب در تیمار شاهد منفی (۷/۲) و تیمار ۴ (۴/۴) مشاهده گردید.

بررسی تفاوت‌های شاخص‌های خونی تیمار چهارم

بررسی‌ها نشان داد که کمترین درصد میانگین شاخص لمفوسیت در تیمار شاهد منفی (۷۸/۳۳) و تیمار ۲ (۵/۸۳) مشاهده گردید (با تفاوت معنی‌دار از یکدیگر ($p < 0.05$)). همچنین در شاخص نوتروفیل تفاوت معنی‌دار مشاهده شد ($p = 0.007$) که بیشترین و کمترین درصد میانگین شاخص نوتروفیل به ترتیب در تیمار شاهد منفی (۱۶/۳۳) و تیمار ۲ (۱۲/۳۳) مشاهده گردید. نتایج نشان داد که بیشترین و کمترین میانگین شاخص هماتوکریت (درصد) به ترتیب در تیمار شاهد منفی (درصد ۳۵/۲) و تیمار ۴ (درصد ۳۱/۷) مشاهده گردید. کمترین میانگین شاخص هموگلوبین (گرم/دسی لیتر) در تیمار شاهد منفی (۸/۲) و تیمار ۳ (۷/۵) مشاهده گردید. بیشترین و کمترین میانگین شاخص RBC به ترتیب در تیمار شاهد منفی 1.27×10^6 و تیمار ۴ به مقدار 1.14×10^6 مشاهده گردید. بیشترین میانگین شاخص WBC در تیمار شاهد منفی

افزایش می‌یابد که نشان از آسیب بافت کبدی است. این افزایش مشمول AST و ALP نیز شده است که درگیری بافت‌های مختلف (کبد، کلیه و عضلات مخطط) را مد نظر دارد. این نتایج نشانگر آن است که آسیب بافتی قابل‌ملاحظه‌ای در کبد گروه‌های شاهد منفی و شاهد مثبت مشاهده شده است. علاوه بر این تفاوت معناداری در بین تیمارها در شاخص MDA (nmol/ml) که بیشترین کمترین میانگین شاخص MDA (nmol/ml) به ترتیب مربوط به تیمار (۴۳/۳) و شاهد منفی (۶۵/۵) مشاهده گردید هپاتوسیت‌ها و سینوزوئیدهای کبدی بدون عارضه دیده می‌شوند که حاکی از عدم تأثیر آمونیاک به مقدار ۵۰ میلی گرم در لیتر در مواجهه با FBS ۵۵/۱ گرم، بوده است.

تجزیه و تحلیل یافته‌های بافت‌شناسی

نتایج بافت‌شناسی مرضی در بافت‌های مختلف و با توجه به غلظت آمونیاک اضافه شده، تفاوت‌هایی را نشان می‌دهد (شکل‌های ۱ الی ۴).

(۷/۱۱۶×۱۰۳) و تیمار (۳۱۰×۶۳۳/۳) [مشاهده گردید (جدول ۳)].

با توجه به جدول ۴، بیشترین و کمترین میانگین شاخص C3 (میلی گرم بر دسی لیتر) به ترتیب در تیمار ۴ (۹۰/۳) و تیمار شاهد منفی (۶۲/۲) مشاهده گردید. همچنین بیشترین و کمترین میانگین شاخص C4 (میلی گرم بر دسی لیتر) به ترتیب در تیمار ۴ (46/4±1/5ab) و شاهد مثبت (۱۴/۶) مشاهده گردید. بیشترین و کمترین میانگین شاخص ALP (U/I) به ترتیب در تیمار ۴ (۲/۵) و شاهد منفی (۰/۷۷) مشاهده گردید. علاوه بر این بیشترین و کمترین میانگین شاخص SGPT(ALT) (U/I) به ترتیب مربوط به تیمار ۴ (۴۱/۲) و تیمار شاهد مثبت (۶/۸) مشاهده گردید بیشترین و کمترین میانگین شاخص SGOT(ALT) (U/I) به ترتیب مربوط به شاهد منفی (۷/۳۳) و تیمار ۴ (۱۱/۵) مشاهده گردید. در شوک گرمایی ماهی سرماری منقوط (Javed *et al.*, 2016) مقدار ALT از ۴/۳ در گروه کنترل به ۳۲/۴ واحد در لیتر در گروه تیمار و مقدار AST از ۹/۱۸ به ۳۱ واحد در لیتر افزایش یافته است. جدول ۴ همچنین میزان ALT با افزایش آمونیاک

جدول ۳: تفاوت شاخص‌های خونی مندرج در تیمار چهارم

Table 3: Examining the differences in blood parameters

Blood indicators	Treatment four	Positive controls	Negative controls	p-value
Eosinophils (%)	71.5±0.	1±0.6	1±0	0.528
Monocytes(%)	4±0.9	4±0.8	5±0.6	0.239
Lymphocytes (%)	82.7±1.0 ^b	80.3±2.5 ^{ab}	78.3±2.4 ^a	0.017
Neutrophils (%)	12.8±1.5 ^a	14.3±1.4 ^{ab}	16.3±1.8 ^b	0.007
MCHC1 (g.l)	236.3±0.4	236.6±0.5	232.4±0.	0.758
MCH2 (pg.cell)	64.9±1.7	66.5±1.3	65.2±0.7	0.365
MCV3 (FL)	274.8±5.4	281.2±7.5	278.5±2.4	0.26
HCT4 (%)	2±2.731 ^{ab}	5±1.234 ^{ab}	35.2±1.7 ^b	0.026*
Hb5 (g.dl)	7.5±0.4 ^a	18±0.2 ^b	8.2±0.4 ^b	0.006*
RBC6 (10 ⁶). (mm)	.14±0.10441 ^a	0.0046 ± 1.21 ^{ab}	0.27±0.0581 ^b	0.924
WBC7 (10 ³). (mm)	4.016±.47 ^a	5.483±0.70 ^b	7.116±0/32 ^c	0.001*

*در سطح ۰/۰۵ معنادار است.

It is meaningful in 5 percent level

¹Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (میانگین هموگلوبین متوسط گلبول قرمز)

²Mean Corpuscular Hemoglobin (میانگین هموگلوبین هر گلبول قرمز)

³Mean Corpuscular Volume (میانگین حجم گلبول قرمز)

⁴Hematocrit (درصد حجم گلبول قرمز از کل خون)

⁵Hemoglobin (هموگلوبین)

⁶red blood cell (گلبول‌های قرمز خون)

⁷White blood cell (گلبول‌های سفید خون)

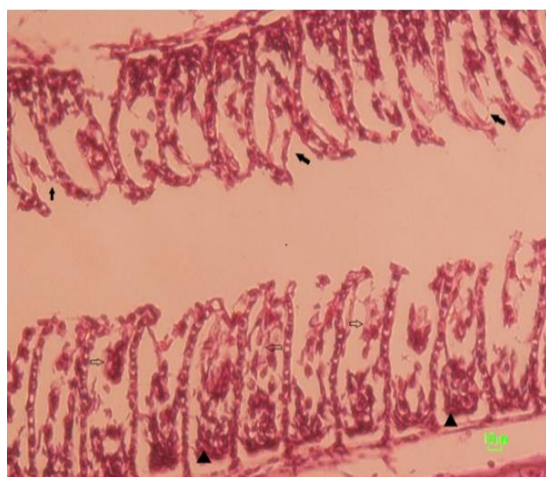
جدول ۴: بررسی تفاوت شاخص‌های سرمی C3 و C4

Table 4: Examining the Serum indicators C3 and C4

Serum indicators	Treatment1	Treatment4	positive witness	negative witness	p-value
C3 (mg.dl)		98.5±5.9ab	68.5±5.9 a	62.2±3.9 b	0.37*
C4 (mg.dl)		46.4±1.5ab	14.6±0.8a	16.9±1.1b	<0.001*
ALT ¹ (U.l)		2.41±0.2d	8.6±0.3a	6.9±0.1 a	<0.001*
AST ² (U.l)		33.7±0.4d	11.8±0.5a	11.5±0.3 a	<0.001*
ALP ³ (U.l)					<0.001*
MDA ⁴ (nmol/ml)	51±3/16 b	2.5±0.6 b	0.83±0.09b	0.77±0.09 c	<0.001*
IgM ^Δ (mg/dl)		47±1/4 b	56/7±2/8 d	65/5±2/7 e	<0.001*
Lysosome Activity (U/ml/min)		57±2/3 c	52/7±3/8 b	66/5±3/3 d	<0.001*
		25 ± 3/16ab	20/8±3/2 a	29/3±1/9 c	

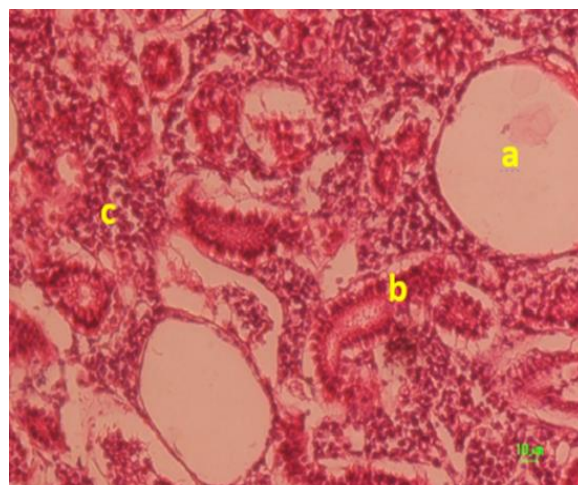
*در سطح ۰/۰۵ معنادار است.

It is meaningful in 5 percent level

¹Alanine Aminotransferase (آلانین آمینوترانسفراز)²Aspartate Aminotransferase (آسپارات آمینوترانسفراز)³Alkaline Phosphatase (آلکالین فسفاتاز)⁴IgM^Δ Malondialdehyde (مالون دی آلدهید)

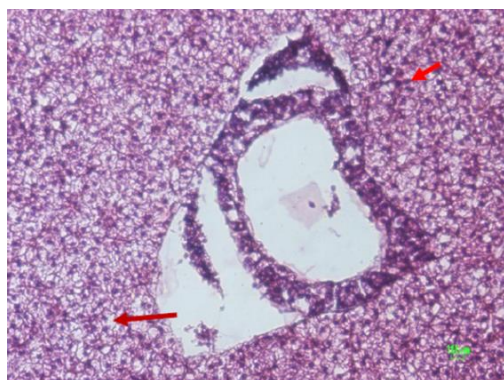
شکل ۲: تیمار ۴. آبشش، هایپرپلازی سلول‌ها در ابتدای رشته‌های ثانویه (مثلث)، به هم ریختگی و کنده شدن سلول‌های هایپرپلازی شده قاعده رشته‌های ثانویه (پیکان خالی)، جداشدگی اپیدرم رشته‌های ثانویه (پیکان‌های توپر). (H&E, Bar= 10 μm)

Figure 2: Treatment 4. The gills, hyperplasia of cells at the base of the secondary filaments (triangle), disarray and tearing of hyperplastic cells at the base of secondary filaments (empty arrow), separation of epidermis of secondary filaments (solid arrows). (H and E, Bar= 10 μm)



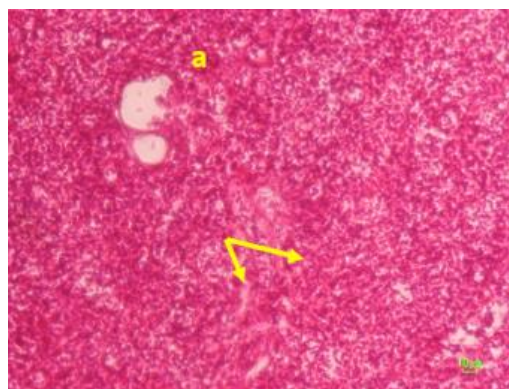
شکل ۱: در تیمار ۴. کلیه، (a) نکروز گلومرول‌ها، (b) نکروز لوله‌های ادراری، (c) نکروز بافت‌های بینابینی دیده می‌شود.

Figure 1: Treatment 4. The kidney. a) necrosis of glomeruli, b) necrosis of urinary tubes, c) necrosis of interstitial tissues can be seen



شکل ۴: تیمار ۴. کبد: دژنراسیون هپاتوسیت‌ها (پیکان کوتاه)، واکوئله شدن شدید هپاتوسیت‌های کبدی (پیکان بلند) دیده می‌شود (H&E, Bar= 10 µm)

Figure 4: Treatment 4. The degeneration of hepatocytes (short arrow), intense vacuolation of liver hepatocytes (long arrow) can be seen (HandE, Bar= 10 µm)



شکل ۳: تیمار ۴. (a) طحال دژنراسیون، (b) نکروز و ازهم گسیختگی (پیکان‌های بلند) بافت طحال دیده می‌شود (HandE, Bar= 10 µm)

Figure 3: Treatment 4. a) The spleen degeneration, b) necrosis and disintegration (long arrows) of spleen tissue can be seen (HandE, Bar= 10 µm).

بحث

سطوح بالای آمونیاک یک عامل استرس‌زای قابل توجه برای کپور کوی است که باعث اختلالات خونی، آنزیمی و هیستوپاتولوژیکی می‌شود، که با گزارش‌های قبلی مطابقت دارد کاهش هموگلوبین و هماتوکریت، انتقال اکسیژن را مختل می‌کند، در حالی که افزایش آنزیم‌های کبدی نشان‌دهنده اختلال متابولیک است. تغییرات هیستوپاتولوژیکی در آبشش‌ها، کلیه و کبد، آسیب مستقیم بافت را نشان می‌دهد و سمیت چند اندامی آمونیاک را تأیید می‌کند (Das et al., 2004; Gao et al., 2020). تحقیقات نشان داده که مواجهه ماهی با نیتريت باعث کاهش مقدار ایمونوگلوبولین IgM و لیزوزیم خواهد شد. (Ciji and Akhtar, 2020) این موضوع با نتایج این تحقیق نیز کاملاً در یک راستا است (جدول ۴)

آمونیاک و آمونیوم حدود ۶۰-۹۰ درصد ماده ازته مترشحه عبوری از آبشش ماهی را شامل می‌شوند و اوره حدود ۹-۲۷ درصد آن را تشکیل می‌دهد. سایر منابع آمونیاکی موجود در آکواریوم یا استخرها ناشی از نیتریفیکاسیون مواد ازته به‌وسیله میکروبه‌هاست (Grommen et al., 2002). مقدار LC50 (غلظت حاد کشنده ۵۰ درصد آمونیاک) (میلی گرم ازته به ازاء هر لیتر آمونیاک محیط

آبی)، برای ماهیان در حال استراحت (۰/۲۰۷) بسیار بیشتر از ماهیان در حال شنا (۰/۳۲) است (Tsui, 2002). این امر نشانگر آن است که به رغم بالا رفتن تراکم ماهی در سیستم‌های پرورشی به دلیل عدم تحرک ماهی، میزان غلظت کشندگی آمونیاک باید بسیار بالاتر باشد. بنابراین، افزایش فعالیت ماهی در مقدار آمونیاک بالا، کشنده‌تر است. در آزمایش‌های رشد ۳۰ روزه با *Topeka shiners* در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد مشخص گردید که غلظت کمترین اثر مشاهده شده (LOEC)^۱ آمونیاک کل برای ماهی *T. shiners* از راسته کپور ماهی شکلان به مقدار ۱۷/۹۳ میلی گرم در لیتر است. برای این ماهی غلظت اثر مشاهده نشده (NOEC)^۲ و غلظت بیشینه سمی قابل پذیرش (MATC)^۳ به ترتیب حدود ۸/۰۵ و ۱۲/۰۱ میلی گرم در لیتر گزارش شده است. این مقادیر در دمای ۱۲/۴ درجه سانتی‌گراد به ترتیب ۶/۶۵ و ۱۰/۰ میلی گرم در لیتر گزارش شده است. در ماهی مینوی سر گنده، MATC در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد در ۳۰ روز مواجهه با آمونیاک، ۲۹/۱۲ میلی گرم در لیتر گزارش شده است (Adelman et al., 2009).

² No observed effect concentration (NOEC)

³ Maximum acceptable toxic concentration (MATC)

¹ Lowest Observed Effect Concentration (LOEC)

آمونیاک در آب استخرها یا آکواریومها معمولاً به دو شکل یونیزه NH_4 و غیر یونیزه NH_3 دیده می شود و منظور از آمونیاک تام مجموع هر دو شکل آن است (Gromman *et al.*, 2002). در مطالعه ای، آمونیاک تام به مقدار ۲ میلی گرم ازت به ازاء هر لیتر در مراحل لاروی ماهی در صورت مواجهه مزمن (مستمر) موجب مسمومیت می گردد (CSP, 2010). به علاوه، بر اساس یک قاعده کلی، میزان حداکثر قابل قبول مواد ازته (آمونیاک کل و نیتريت)، حدود ۱۰ درصد میزان LD50 یا LC50 96 ساعته است (Molayemraftar *et al.*, 2022). بدین ترتیب، مقدار غلظت قابل قبول آمونیاک ۵۱/۲۴ میلی گرم در لیتر در کپور نارس است.

FBS به تنهایی توانست بیشترین بار آمونیاکی را طی ۶ روز تحقیق، حتی پس از برداشتن کیسه FBS از آکواریومها کاهش دهد. نتایج حاصل از گروه شاهد منفی به خوبی نتایج تأثیر FBS را در گروه شاهد مثبت تأیید می کند به طوری که مقادیر شاهد مثبت در روزهای نمونه برداری مختلف از مقادیر شاهد منفی در روزهای مشابه، به طور معنی داری کمتر است که خود نتیجه حذف مناسب آمونیاک به وسیله FBS را نشان می دهد. فقط مقدار آمونیاک تام گروه چهارم، در روزهای پنجم و ششم به طور معنی داری حدود ۱ میلی گرم ازت به ازاء هر لیتر نسبت به روز چهارم افزایش نشان داده است. این نتایج می تواند نقش FBS را به طور کامل در کاهش بار آمونیاکی تأیید نماید.

در تیمار مورد نظر مقدار نیتريت از همان روز اول در محدوده نایمن قرار گرفته است. این مقدار برای گروههای شاهد تا پایان تحقیق وارد محدوده سمی نشده است که عدم ورود مقدار نیتريت گروه شاهد مثبت به محدوده غیر ایمن و عدم تفاوت معنی دار مقادیر هر دو شاهد در روزهای مشابه، حاکی از بی خطر بودن FBS است. نوسانات نیتريت در طول آزمایش که در گروه ۴ مشاهده گردید، می تواند ناشی از تعویض آب و کاهش یا بالا ماندن مقدار باکتریهای نیتروژوموناس و نیتروباکتر، که عهده دار اکسیداسیون مواد ازته موجود در آب هستند، باشد. عدم تفاوت معنی دار بین مقادیر آمونیاک در گروههای شاهد مثبت و شاهد منفی در

روزهای مشابه نمونه برداری می تواند حاکی از عدم تأثیر FBS بر کاهش نیتريت آب در این تحقیق است. بالا بودن پروتئین در این ماهیان می تواند ناشی از نیاز بدن برای ترمیم بافت های آسیب دیده و پاسخ های ایمنی افزایش یافته باشد که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد. نتایج مطالعه حاضر، نشانگر آن است که میزان ALT با افزایش آمونیاک افزایش می یابد که حاکی از آسیب بافت کبدی است. این افزایش مشمول AST و ALP نیز شده است که نشانگر درگیری بافت های مختلف از جمله کبد، کلیه و عضلات مخطط است. در مطالعه Shin و همکاران (۲۰۱۶) بر ماهی صخره ای (*Sebastes schlegelii*) افزایش ۱ میلی گرم در لیتر آمونیاک در آب ماهی ها باعث افزایش مقدار ALT از ۵/۳۷ در گروه کنترل به ۹/۴۷ و باعث افزایش مقدار AST از ۴/۲۱ به ۸/۴۴ واحد گردید البته در مطالعه بر ماهی هامور (گروپر هیبرید) (*Epinephelus fuscoguttatus*) که در معرض غلظت های متفاوت نیتريت نیز انجام شد، میزان ALP تا ۲۰ میلی گرم در لیتر نیتريت حتی تا دو هفته پس از مواجهه تغییری نشان نداد (Kim *et al.*, 2021). در مطالعه Das و همکاران (۲۰۰۴) میزان ALP در مواجهه ماهیان کپور هندی، مریگال، رو هو با غلظت های متفاوت نیتريت در محدوده ۱۱-۱ میلی گرم در لیتر تغییرات معنی داری مشاهده نگردید (Das *et al.*, 2004) که با نتایج مطالعه حاضر حتی در مواجهه با FBS نیز همخوانی ندارد.

سطوح عوامل کمپلمان C3 و C4 در ماهیانی که در معرض ۳ و ۶ میلی مولار نیتريت به مدت ۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت قرار داشتند، در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت که نشان داد، سیستم کمپلمان با قرار گرفتن در معرض نیتريت، فعال می شود. این نتایج نشان می دهد که قرار گرفتن در معرض نیتريت پاسخ ایمنی را تغییر می دهد و باعث سمیت ایمنی و مهار پاسخ ایمنی ذاتی در *T. rubripes* (از بادکنک ماهی ها) می شود (Gao *et al.*, 2020).

نتایج مطالعه حاضر، نشان داد که افزایش آمونیاک تا ۱ میلی گرم در لیتر موجب کاهش کمپلمان های C3 و C4 در تیمار ۴ شد که می تواند ناشی از آسیب بافتی در ماهی های این گروه ناشی از آمونیاک بالا باشد.

- Oreochromis niloticus* to acute and chronic metal (Cd, Cu, Cr, Zn, Fe) exposures. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(8):1884–1889. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2010.09.005
- Bessey, O.A., Lowtery, O.H. and Brock, M.J., 1946.** A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with fivecubic millimeters of serum. *Journal of Biological Chemistry*, 164:321-329.
- Boyd, C.E. and Tucker, C.S., 1998.** Pond aquaculture water quality management. Kluwer Academic Publisher, Massachusetts. 700 P. DOI:10.1007/978-1-4615-5407-3
- Bradford, M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248–254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Capkin, E., Birincioglu, S. and Altinok, Ilhan., 2009.** Histopathological changes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after exposure to sublethal composite nitrogen fertilizers. *Journal of Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(7):1999-2004 DOI: 10.1016/j.ecoenv.2009.05.007
- Das, P., Ayyappan, S., Das, B. and Jena, J., 2004.** Nitrite toxicity in Indian major carps. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 138(1):3–10. DOI:10.1016/j.cca.2004.04.004
- de Araújo, T.P., Brighenti, L.S., dos Santos, H.B., Castro, A.H.F. and Thomé, R.G., 2021.** Toxicidade de compostos nitrogenados em peixes. *Research, Society and Development*, 10(11): e359101119779. DOI:10.33448/rsd-v10i11.19779
- تغییر نتایج برخی محققین نشان داد که کاهش سطوح MDA پس از قرار گرفتن ماهی لامباری (*Astyanax altiparanae*) در معرض آلاینده های روغن دیزل، احتمالاً نشاندهنده ارتباط بین حفاظت آنتی اکسیدانی افزایش یافته، متابولیسم MDA و دفع MDA در آب است (Garcia et al., 2020). در جدول (۴) تغییر محسوسی در بین گروههای شاهد و گروه 1 از بعد مقدار MDA مشاهده نشد ولی با افزایش مقدار آمونیاک برمیزان MDA افزوده شد. این موضوع نشان می دهد FBS توانسته است تا حد زیادی اثرات منفی آمونیاک را مهار کند ولی در گروههای 3 و 4 این مشکل خود را نشان داده است (جدول 4). کاهش هموگلوبین و همتوکریت، انتقال اکسیژن را مختل می کند این کاهش با تغییرات خونی سایر محققین همسو بوده است (shin et al., 2016). تحقیقات نشان داده که مواجهه ماهی با نیتريت باعث کاهش مقدار ایمونوگلوبولین IgM و لیزوزیم خواهد شد (Ciji and Akhtar, 2020) این موضوع با نتایج این تحقیق نیز کاملاً در یک راستا است (جدول ۴).
- ### تشکر و قدردانی
- بدین وسیله از کارکنان مرکز تکثیر ماهیان زینتی استان گیلان (رشت) برای فراهم کردن ماهیان کوی مورد استفاده در این مطالعه و از حمایت ها و امکانات فراهم شده از مؤسسات وابسته که زمینه اجرای آزمایش ها و تحلیل داده ها را فراهم ساختند، صمیمانه تشکر و قدردانی می نمایم.
- ### منابع
- Adelman, I.R., Kusilek, L.I., Koehle, J. and Hess, J., 2009.** Acute and chronic toxicity of ammonia, nitrite, and nitrate to the endangered Topeka shiner (*Notropis topeka*) and fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(10):2216–2223. DOI:10.1897/08-619.S1
- Atli, G. and Canli, M., 2010.** Response of antioxidant system of freshwater fish

- FAO, 2012.** The State of World Fisheries and Aquaculture. 230 P.
DOI:10.1596/978-0-8213-7137-4
- Gao, X.Q., Fei, F., Huo, H.H., Huang, B., Meng, X.S., Zhang, T. and Liu, B.L., 2020.** Impact of nitrite exposure on plasma biochemical parameters and immune-related responses in *Takifugu rubripes*. *Aquatic Toxicology*, 218:105362.
DOI:10.1016/j.aquatox.2019.105362.
- Ciji, A. and Akhtar, M.S., 2020.** Nitrite implications and its management strategies in aquaculture: A review. *Reviews in Aquaculture*, 12(2):878-908.
DOI: 10.1111/raq.12354
- Grommen, R., Van Hauteghem, I., Van Wambeke, M. and Verstraete, W., 2002.** An improved nitrifying enrichment. *Aquaculture*, 211(1-4):115-124. DOI:10.1016/S0044-8486(01)00883-3
- Handy, D. and Poxton, M.G., 1993.** Nitrogen pollution in mariculture. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 3:205-241.
DOI:10.1007/BF00042795
- Hassani, M.H., Yousefi Jourdehi, A., Hosseinpour Zelti, A., Shenavar Masouleh, A. and Bagherzadeh, F., 2019.** Effects of commercial superzist probiotic on growth performance and hematological and immune indices in fingerlings *Acipenser baerii*. *Aquaculture International*, 28:377-387. DOI:10.1007/s10499-019-00468-1
- Khalil, A., Sergeevich, N. and Borisova, V., 2018.** Removal of ammonium from fish farms. *Adsorption Science and Technology*, 36(5-6):1-16. DOI:026361741879
- Jun Hwan, K., Seok Ryel, K., Su Kyoung, K. and HeeWoong, K., 2021.** Effects of pH changes on blood physiology, antioxidant responses and IgM of juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture Reports*, 21: 1-7.
DOI: 10.1016/j.aqrep.2021.100790 .
- Klin, Z. and Klin, U., 1972.** German society for clinical chemistry: Recommendations of the enzyme commission.
<https://www.pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4199309>.
- Molayemraftar, T., Peyghan, R., Razi Jalali, M. and Shahriari, A., 2022.** Single and combined effects of ammonia and nitrite on common carp, *Cyprinus carpio*: Toxicity, hematological parameters, antioxidant defenses, acetylcholinesterase, and acid phosphatase activities. *Aquaculture*, 548:737676.
DOI:10.1016/j.aquaculture.2022.737676
- Xue, S.Q., Lin, J.W., Han, Y. and Han, Y., 2021.** Ammonia stress-induced apoptosis by p53-BAX/BCL-2 signal pathway in hepatopancreas of common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture International*, 29: 1895-1907.
- Zhang, Z. and Perschbacher, P., 2003.** Comparison of the zeolite sodium chabazite and activated charcoal for ammonia control in sealed containers. *Asian Fisheries Science*, 16: 141-145.
- Danielly, G., Daina, L., Danilo Grünig, S. and Eduardo, H.A., 2020.** Decreased malondialdehyde levels in fish (*Astyanax altiparanae*) exposed to diesel: Evidence of metabolism by aldehyde dehydrogenase in the liver and excretion in water. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 190: 110107.
DOI: /10.1016/j.ecoenv.2019.110107
- Craig, J.F., 2015.** Freshwater fisheries ecology. Wiley-Blackwell. 297P. DOI:10.1111/faf.12250
- CSPP (Center for Science in Public Participation), 2010.** A literature review of effects of ammonia on fish. Retrieved from Alaska on 02/01/2023.