



## اثرات مواجهه مزمن با آمونیاک غیر کشنده بر شاخص‌های رشد و بافت شناسی آبشش و کلیه در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

محمد مازندرانی<sup>۱</sup>، غلامرضا درویشی<sup>۲</sup>، اشکان زرگر<sup>۳</sup>، اشکان زرگری<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گلستان، ایران  
<sup>۲</sup> موسسه تحقیقات علوم شیلاتی ایران، مرکز تحقیقات ذخایر آبزیان داخلی گرگان، گلستان، ایران  
<sup>۳</sup> گروه بهداشت و بیماری‌های، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران  
<sup>۴</sup> دانش‌آموخته دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گلستان، ایران

تاریخ دریافت: ۲۷ شهریور ماه ۱۴۰۰، تاریخ پذیرش: ۳۰ آبان ۱۴۰۰



[10.22059/jvr.2018.258925.2800](https://doi.org/10.22059/jvr.2018.258925.2800)



[20.1001.1.20082525.1400.76.4.7.1](https://doi.org/10.1001.1.20082525.1400.76.4.7.1)

### چکیده

**زمینه مطالعه:** تجمع آمونیاک در مزارع ماهیان گرمابی می‌تواند منجر به تلفات و یا کاهش تولید و کاهش عملکردی سیستم ایمنی شود.

**هدف:** در مطالعه حاضر اثرات مواجهه مزمن با آمونیاک مولکولی ( $\text{NH}_3$ ) غیر کشنده بر شاخص‌های رشد و همچنین آسیب‌های بافتی آبشش و کلیه در یک دوره آزمایشی ۳۰ روزه در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) مورد بررسی قرار گرفته است.

**روش کار:** ۱۸۰ ماهی با میانگین وزنی  $4/5 \pm 0/5$  گرم در ۶ تانک تقسیم شدند. در این راستا یک گروه شاهد و یک گروه تیمار (هر گروه شامل سه تکرار) در نظر گرفته شد. ماهیان گروه تیمار به مدت ۳۰ روز با غلظت  $0/1$  میلی‌گرم/لیتر آمونیاک غیر یونیزه ( $\text{NH}_3$ ) مورد مواجهه قرار گرفتند. وضعیت شاخص‌های رشد و آسیب‌شناسی آبشش و کلیه پس از یک ماه مواجهه با آمونیاک مورد ارزیابی قرار گرفت.

**نتایج:** مواجهه با  $0/1$  میلی‌گرم/لیتر آمونیاک مولکولی منجر به کاهش معنی‌دار در شاخص‌های رشد کپور معمولی گردید. همچنین در بررسی آبشش‌ها، ادم و جداشدگی اپیتلوم پوششی و هایپرپلازی لاملاهای ثانویه در گروه تیمار مشاهده گردید. در بررسی بافت کلیه دژنره شدن و نکروز توبول‌های کلیوی، احتقان و افزایش مراکز ملانوماکروفاژ از علائم عمده در ماهیان گروه تیمار بوده است.

**نتیجه‌گیری نهایی:** اگرچه مواجهه با  $0/1$  میلی‌گرم/لیتر آمونیاک مولکولی منجر به مرگ و میر در ماهی کپور معمولی نمی‌شود اما قادر به ایجاد عوارض و مشکلات جانبی از جمله کاهش رشد و آسیب‌های بافتی در آبشش و کلیه می‌باشد. لذا برای رسیدن به تولید بالاتر باید سطوح تحت کشنده آمونیاک نیز در مزارع کپور معمولی در نظر گرفته شود.

**کلمات کلیدی:** آمونیاک، بافت شناسی، مواجهه طولانی مدت، شاخص‌های رشد، کپور معمولی

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.

**نویسنده مسئول:** محمد مازندرانی، گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گلستان، ایران  
 پست الکترونیکی: [mazandarani@gau.ac.ir](mailto:mazandarani@gau.ac.ir)

### مقدمه

به حساب می‌آید که در بین مصرف کنندگان مقبولیت بالایی دارد و در سیستم پرورش ماهیان گرمابی کشور مورد پرورش قرار می‌گیرد، در سیستم پرورش این ماهیان در کشور به دلایل مختلف از جمله عدم اعمال مدیریت صحیح در مزارع پرورشی، در دسترس نبودن منابع آب کافی و همچنین در استخرهای زمستان گذرانی تعویض آب

کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) یکی از گونه‌های ماهیان آب شیرین می‌باشد که به دلیل سهولت در پرورش، مقاومت بالاتر در برابر تغییرات محیطی نسبت به سایر گونه‌ها و همچنین سرعت رشد بالا و استفاده از خوراک ارزان قیمت در جهان به صورت وسیع پرورش داده می‌شود (۷). این ماهی در ایران نیز یکی از گونه‌های با ارزش اقتصادی

رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و همچنین مطالعه Zhang و همکاران در سال ۲۰۱۹ بر روی ماهی سیم دریایی (*Megalobrama amblycephala*) اشاره کرد (۱،۲،۱۴،۱۸،۲۵).

با توجه به شرایط حاضر در ایران، وقوع کم‌آبی امکان تعویض آب استخرها را با محدودیت روبه‌رو ساخته است. به دلیل کم بودن تعویض آب و بالا بودن تراکم ماهی‌ها در استخرهای پرورشی نسبت به محیط‌های طبیعی، بالا بودن میزان سطح آمونیاک در آب استخرهای پرورشی امری رایج می‌باشد. برای جلوگیری از بروز خسارت‌های اقتصادی اعمال مدیریت دقیق و همه جانبه حائز اهمیت می‌باشد. جهت انجام این امر آگاهی از علائم کلینیکی در مرحله ابتدایی امری انکار ناپذیر است تا در صورت ایجاد تغییر در پارامترهای فیزیوشیمیایی آب از جمله افزایش سطح ترکیب‌های سمی مانند آمونیاک اقدام‌های کلیدی اعمال گردد. در این راستا مطالعه حاضر به بررسی تأثیر مزمن آمونیاک بر روی ماهی کپور معمولی و علائم ایجاد شده در مواجهه با آمونیاک مولکولی می‌پردازد.

### مواد و روش کار

**تهیه بچه ماهیان و شرایط پرورشی:** جهت ارزیابی اثرات مزمن آمونیاک غیر کشنده در مطالعه حاضر تعداد ۱۸۰ عدد ماهی کپور معمولی با میانگین وزن  $4/5 \pm 0/5$  گرم به مدت ۲ هفته جهت سازگاری با شرایط محیط مطالعه در یک مخزن ۵۰۰ لیتری نگهداری شدند و در طی این مدت خوراک‌دهی با غذای تجاری بیومار (BioMar-France) ۱ ساعت بعد از تعویض روزانه ۵۰ درصد آب به مقدار ۳ درصد وزن زیست توده در دو وعده انجام گرفت. سپس برای بررسی اثرات مزمن آمونیاک، ماهیان با  $0/1$  میلی‌گرم/لیتر مورد مواجهه قرار گرفتند. در این راستا ماهی‌ها با الگوی تصادفی به گروه شاهد و گروه تیمار، هر کدام با سه تکرار تقسیم بندی شدند و تعداد ۹۰ عدد ماهی به هر گروه اختصاص یافت.

**تیمارها و تهیه محلول آمونیاک:** ماهی‌های گروه تیمار به مدت ۳۰ روز با دوز مزمن  $0/1$  میلی‌گرم بر لیتر آمونیاک مولکولی مورد مواجهه قرار گرفتند. به منظور آماده‌سازی آمونیاک مولکولی از کلرید آمونیوم ( $NH_4Cl$ ) شرکت مرک (Merck Co. Germany) پس از محاسبه آمونیوم و فرم مولکولی آن (آمونیاک) استفاده گردید. گروه شاهد نیز در مدتی مشابه اما بدون مواجهه با آمونیاک مولکولی مورد پرورش قرار گرفتند. در این گروه متوسط سطح آمونیاک  $0/005$  میلی‌گرم بر لیتر اندازه‌گیری شد. در طول مطالعه متوسط درجه حرارت آب، اکسیژن محلول و سختی کل به ترتیب به مقدار  $26 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد،  $1 \pm 6/2$  میلی‌گرم در لیتر و  $3 \pm 186/4$  میلی‌گرم

مناسب صورت نمی‌گیرد، لذا برخی فاکتورهای کیفی آب دست خوش تغییرات شدند که اگرچه ممکن است کشنده نباشند اما به‌صورت مزمن می‌تواند منجر به بروز استرس و آسیب به ماهی‌ها و کاهش فاکتورهای رشد و تولید شود، یکی از این فاکتورها مواد نیتروژن‌داری هستند که ممکن است تحت شرایط خاصی در صورت تجمع به‌صورت حاد یا مزمن مشکلاتی را ایجاد کنند (۱۹).

آمونیاک اصلی‌ترین محصول متابولیسم ترکیب‌های نیتروژن‌دار مانند پروتئین در ماهی‌ها و همچنین محصول فرعی تجزیه باکتریایی مواد آلی نیتروژن‌دار در آب می‌باشد، آمونیاک سمی‌ترین ماده دفعی نیتروژن‌دار بوده و به صورت غیر یونیزه در شرایط خاص شدیداً در ماهیان کشنده است. این ماده در آب به دو صورت آمونیاک یونیزه  $NH_3$  و آمونیاک غیر یونیزه  $NH_4$  یافت می‌شود که نسبت این دو بستگی به شرایط محیط دارد. آمونیاک غیر یونیزه بسیار سمی‌تر از آمونیاک یونیزه است و با بالا رفتن درجه حرارت و pH نسبت  $NH_4$  به  $NH_3$  افزایش یافته و با بالا رفتن شوری این نسبت کاهش می‌یابد. علاوه بر این، در شرایط استرس‌زا از جمله هیپوکسی در محیط سمیت  $NH_3$  بیشتر می‌شود (۳). در سیستم‌های بسته و استخرهایی با تراکم بالا، مسمومیت با آمونیاک به علت کافی نبودن جمعیت باکتری‌های تجزیه‌کننده آمونیاک و در نتیجه کاهش تبدیل‌های زیستی، افزایش می‌یابد. سمیت آمونیاک به عواملی از قبیل گونه و سن ماهی، میزان آمونیاک غیر یونیزه، مدت زمان در معرض قرار گرفتن ماهی با آمونیاک، تراکم ذخیره‌سازی ماهی در استخر و دیگر فاکتورهای کیفی آب بستگی دارد (۶،۹،۱۵). مواجهه با غلظت‌های سمی غیر کشنده آمونیاک منجر به تغییرات تحت کلینیکی در پارامترهای بیوشیمیایی و کاهش عملکرد و کاهش ایمنی ماهیان می‌گردد (۲۲). در مقادیر سمی‌تر این ماده قادر به بروز علائمی همچون آسیب به اپیتلیوم پوست، روده، سیستم اعصاب مرکزی، کبد و آبشش ماهی می‌گردد (۱۶،۲۲). همچنین افزایش آمونیاک رفتار شنای ماهیان را نیز به دلایل مختلف تغییر می‌دهد (۱۰). وقتی ماهی‌ها در معرض غلظت‌های غیر کشنده آمونیاک قرار می‌گیرند، ممکن است علائمی همچون کاهش پارامترهای رشد و افزایش حساسیت به بیماری‌ها را از خود نشان دهند؛ مطالعات متعددی بر روی اثرات آمونیاک با غلظت‌های تحت حاد در ماه‌های مختلف صورت گرفته است. در این رابطه می‌توان به مطالعه Paust و همکاران در سال ۲۰۱۱ روی هالیبوت (*Hippoglossus hippoglossus*)، مطالعات El-Husseiny و همکاران در سال ۲۰۰۸ و El-Shafai و همکاران در سال ۲۰۰۴ بر روی تیلاپپای نیل (*Oreochromis niloticus*)، مطالعه Shingles و همکاران در سال ۲۰۰۱ بر روی قزل‌آلای

جهت انجام مطالعه‌های هیستوپاتولوژی، ماهی‌ها توسط محلول ۱۰۰ میلی‌گرم/لیتر از یوجینول بیهوش شده و پس از کالبدگشایی محوطه شکمی و سرپوش آبششی، علائم غیرطبیعی در آبشش‌ها و اندام‌های داخلی ثبت گردید، سپس از کلیه و آبشش ماهی‌ها نمونه‌برداری صورت گرفت. نمونه‌های بافت آبشش و کلیه به ظرف‌های حاوی فرمالین ۱۰ درصد منتقل شدند و پس از گذشت ۱۲ ساعت فرمالین مذکور تعویض گردید. سپس طبق روش استاندارد مراحل آبیگری و پارافینه کردن نمونه‌های بافتی انجام شد و مقاطع ۵ میکرومتری از بافت‌ها تهیه و روی لام چسبانده شد و در انتها با استفاده از رنگ همتاکسیلین - اتوزین رنگ‌آمیزی مقاطع بافتی صورت گرفت (۱۷). مقاطع بافتی آماده شده با کمک میکروسکوپ نوری (Nikon ECLIPSE E100) با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ تا ۴۰۰ برابر مطالعه شدند.

**آنالیزهای آماری:** جهت انجام آنالیزهای آماری داده‌ها از نرم افزار SPSS18 و Excel (Microsoft office) استفاده شد. تحلیل داده‌ها با کمک آنالیز واریانس یک‌طرفه و برای بررسی معنی‌دار بودن میانگین‌ها از آزمون دانکن استفاده شد. نتایج نهایی به‌صورت میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد گزارش شدند.

## نتایج

**بازماندگی و مشاهدات هیستوپاتولوژی:** در مطالعه حاضر مواجهه با دوز مزمن ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک تلفاتی در ماهی‌های گروه تیمار شده با آمونیاک به همراه نداشت و در گروه شاهد نیز هیچ تلفاتی مشاهده نشد. به عبارت دیگر نرخ بازماندگی ۱۰۰ درصد ثبت شد.

در لیتر ثبت گردید. برای کنترل سطح آمونیاک بعد از افزودن آن به آب، دما و pH اندازه‌گیری شد. در این راستا از محلول ۰/۱ نرمال KOH برای تثبیت pH آب در حدود ۸/۲ استفاده شد و با کمک بخاری‌های اتوماتیک دمای آب در حدود  $26 \pm 1$  درجه سانتی‌گراد ثابت نگه داشته شد. محلول آمونیاک مورد نیاز برای هر تیمار به‌صورت روزانه تهیه و تعویض آب حداقل ۲ ساعت بعد از آماده سازی محلول آمونیاک انجام شد. با در نظر گرفتن مقدار pH و دما، میزان آمونیاک یونیزه شده و آمونیاک مولکولی با استفاده از جدول استاندارد ارائه شده توسط Emerson و همکاران در سال ۱۹۷۵ محاسبه گردید (۳).

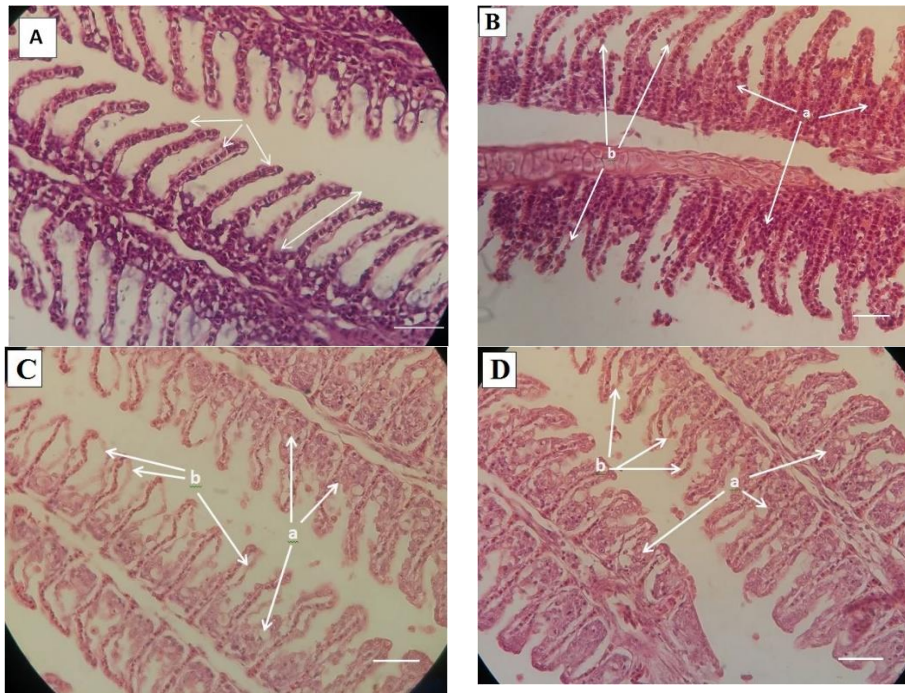
**شاخص‌های رشد:** آنالیز شاخص‌های رشد بر اساس زیست‌سنجی در پایان دوره با بیومتری ۲۰ عدد ماهی از هر تانک طبق الگوی تصادفی محاسبه شد. برای این کار ابتدا ماهی‌هایی که به‌طور تصادفی نمونه‌برداری شده بودند، با کمک ۱۰۰ میلی‌گرم/لیتر یوجینول (Sigma Co. USA) بیهوش گردیدند و سپس به‌صورت انفرادی با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۱ گرم توزین شدند. در این بررسی طول ماهیان توسط خط‌کش با دقت ۱ میلی‌متر ثبت گردید. شاخص‌های رشد از قبیل افزایش وزن بدن (WG)، نرخ رشد ویژه (SGR)، نرخ رشد روزانه (GR)، درصد افزایش وزن (%BWI)، عامل وضعیت (CF) و درصد بازماندگی (SR) براساس معادله‌های ریاضی که توسط Turchini و همکاران در سال ۲۰۰۳ ارائه شده است، محاسبه شدند (۲۰).

جهت ثبت علائم کلینیکی در طی دوره، ماهی‌ها به‌صورت روزانه مورد بررسی و مشاهده قرار گرفتند تا در صورت بروز تلفات، علائم کلینیکی و رفتارهای غیر طبیعی در آن‌ها ثبت گردد. در پایان دوره،

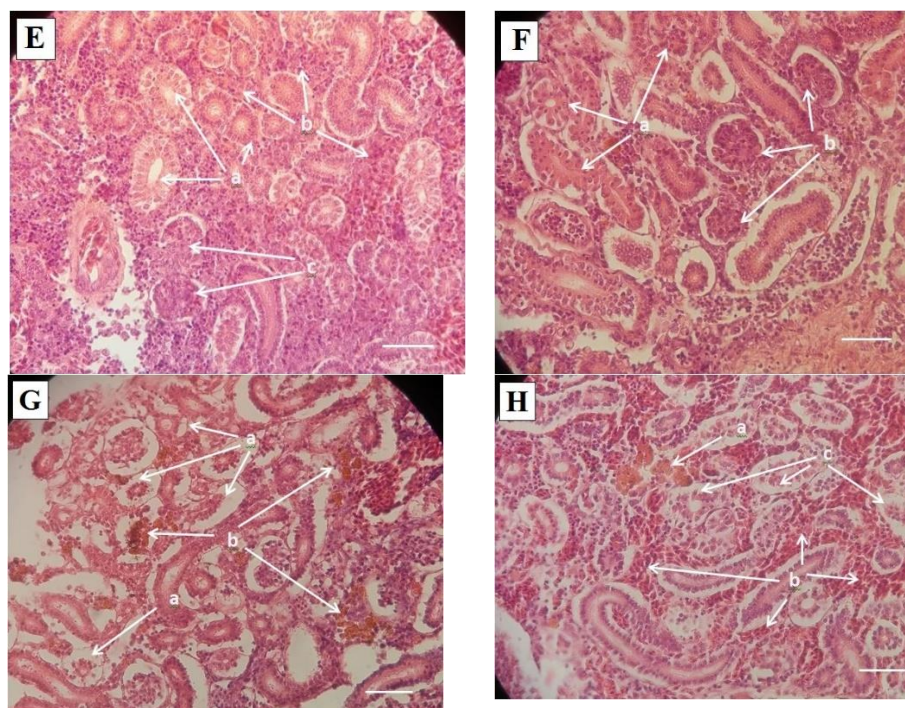
**جدول ۱.** شاخص‌های رشد در ماهیان مواجهه شده با دوز مزمن آمونیاک مولکولی (۰/۱ میلی‌گرم/لیتر) در یک دوره ۳۰ روزه پرورش در ماهی کپور معمولی (*C. carpio*).

متغیر	گروه کنترل	گروه مواجهه شده با آمونیاک
وزن اولیه (سانتی‌متر)	۴/۳۷ $\pm$ ۰/۳۲ <sup>a</sup>	۴/۲۸ $\pm$ ۰/۳۶ <sup>a</sup>
طول اولیه (سانتی‌متر)	۶/۶ $\pm$ ۰/۴۶ <sup>a</sup>	۶/۲ $\pm$ ۰/۴۲ <sup>a</sup>
وزن نهایی (گرم)	۶/۴۹ $\pm$ ۰/۲۱ <sup>a</sup>	۵/۴ $\pm$ ۰/۲۴ <sup>b</sup>
طول نهایی (گرم)	۷/۳۲ $\pm$ ۰/۲۱ <sup>a</sup>	۷ $\pm$ ۰/۳۹ <sup>b</sup>
افزایش وزن (گرم)	۲/۱۲ $\pm$ ۰/۲۸ <sup>a</sup>	۱/۱۲ $\pm$ ۰/۴۷ <sup>b</sup>
ضریب رشد ویژه (درصد در روز)	۱/۳۲ $\pm$ ۰/۲۱ <sup>a</sup>	۰/۷۸ $\pm$ ۰/۳۴ <sup>b</sup>
درصد افزایش رشد	۴۹/۰۶ $\pm$ ۹/۴۳ <sup>a</sup>	۲۷/۰۴ $\pm$ ۱۲/۸۵ <sup>b</sup>
ضریب چاقی	۱/۶۶ $\pm$ ۰/۱۴ <sup>a</sup>	۱/۶ $\pm$ ۰/۲۶ <sup>a</sup>
بازماندگی (درصد)	۱۰۰ <sup>a</sup>	۱۰۰ <sup>a</sup>

\* حروف انگلیسی متفاوت در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد ( $P < 0/05$ ).



**تصویر ۱.** بررسی آسیب‌شناسی بافت آبشش ماهی‌های مواجه شده با غلظت تحت کشنده مزمن آمونیاک. A: آبشش نرمال ماهیان گروه شاهد؛ لاملاهای ثانویه نرمال B، C و D: ماهیان مواجهه شده با ۰/۱ میلی‌گرم/لیتر آمونیاک مولکولی: هایپرپلازی لاملاهای ثانویه (a)، جداشدگی اپیتلیوم پوششی لاملاهای ثانویه (b). رنگ آمیزی هماتوکسیلین - اتوزین. بزرگنمایی ۴۰۰×.



**تصویر ۲.** بررسی آسیب‌شناسی بافت کلیه ماهی‌های مواجه شده با غلظت تحت کشنده مزمن آمونیاک. E: کلیه نرمال در ماهی‌های گروه شاهد- توبول‌های کلیوی نرمال (a)، بافت بینابینی کلیه (b)، گلوبومرول‌های کلیوی (c). F: کلیه نرمال در ماهی‌های گروه شاهد- توبول‌های کلیوی نرمال (a)، گلوبومرول کلیوی (b). G: ماهیان مواجهه شده با ۰/۱ میلی‌گرم/لیتر آمونیاک مولکولی، دژنره شدن و نکروز گسترده توبول‌های کلیوی (a)، رسوب هموسیدرین و ملانوماکروفازها (b). H: ماهیان مواجهه شده با ۰/۱ میلی‌گرم/لیتر آمونیاک مولکولی، رسوب هموسیدرین (a)، انسداد و پرخونی در بافت بینابینی کلیه (b)، دژنره شدن و شروع روند نکروز توبول‌های کلیوی (c). رنگ آمیزی هماتوکسیلین - اتوزین. بزرگنمایی ۴۰۰×.

حذف ۱۰۰ درصد آمونیاک و همچنین ثابت نگه داشتن آن در حد کمتر از آستانه آسیب‌رسان بدون شک امری بسیار مشکل است. ماهی‌ها ممکن است به دو روش نسبت به تحمل مقادیر بسیار ناچیز آمونیاک آداپت شوند، یکی از این راه‌ها ساخت گلوتامات با افزایش سنتز گلوتامین و جذب  $\text{NH}_3$  است (۲۱). راه دیگر خنثی کردن خاصیت سمی آمونیاک با تبدیل آن به اوره است که در گونه‌های دریایی مانند کوسه‌ها دیده می‌شود (۲۳). با وجود چنین مکانیسم‌های کارآمدی، ماهی‌ها به ندرت توانایی تحمل غلظت‌های بالای آمونیاک را دارند و اگر این غلظت‌ها موجب تلفات نشود، می‌تواند منجر به بروز استرس، کاهش رشد و سطح پارامترهای ایمنی و همین‌طور باعث ایجاد آسیب به بافت‌های مختلف بدن ماهی‌ها شود. در مطالعه حاضر مواجهه طولانی مدت با ۰/۱ میلی‌گرم/لیتر اگرچه منجر به تلفات در ماهیان کپور معمولی نگردید اما باعث آسیب‌های بافتی واضح در آبشش و کلیه و نیز کاهش رشد گردید. به‌طور کلی غلظت غیرکشنده و امن آمونیاک مولکولی برای گونه‌های مختلف ماهیان بین ۰/۲-۰/۵ میلی‌گرم/لیتر عنوان شده است (۸،۲۰). اما ظاهراً اگرچه این غلظت باعث تلفات نمی‌شود ولی ممکن است منجر به ضعف سیستم ایمنی و نیز کاهش بازدهی تولید شود؛ به عبارت دیگر تأثیر غلظت‌های تحت حد آمونیاک بسته به شرایط مختلف می‌تواند بسیار متفاوت باشد. به عنوان مثال نتایج مطالعه Lemarie و همکاران در سال ۲۰۰۴ بر روی باس دریایی (*Dicentrarchus labrax*) نشان داد غلظت‌های مزمن ۰/۲۴ و ۰/۲۶ میلی‌گرم در لیتر، فاکتورهای رشد را تحت تأثیر قرار نمی‌دهد (۱۲). همچنین در مطالعه دیگری که توسط Le Ruyet و همکاران در سال ۱۹۹۸ بر روی ماهیان توربوت (*Scophthalmus maximus*) و سیم دریایی (*Pagrus pagrus*) انجام شد نتایج مشابهی برای غلظت مزمن ۰/۱۸ و ۰/۱۱ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک به همراه داشت (۱۱). اما Foss و همکاران در سال ۲۰۰۴ گزارش کردند که غلظت ۰/۱۷ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک و غلظت‌های بالاتر منجر به کاهش معنی‌دار رشد در ماهی کاد (*Gadus morhua*) طی ۹۶ روز پرورش می‌شود (۴). غلظت ۰/۳۲ و ۰/۶۸ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک به مدت ۴۲ روز تأثیری بر فاکتورهای رشد در ماهی *Strongylocentrotus droebachiensis* نداشت ولی رشد گنادها به‌صورت معنی‌دار کاهش یافت و افزایش مرگ و میر را به همراه داشت (۱۹). در مطالعه Zhang و همکاران در سال ۲۰۱۹ مواجهه با آمونیاک مزمن به مدت ۹ هفته در ماهیان سیم جوان (*Megalobrama amblycephala*) منجر به کاهش پارامترهای

در بررسی‌های میکروسکوپی مقاطع بافتی با استفاده از میکروسکوپ نوری، غلظت مزمن آمونیاک منجر به ایجاد ادم و جدا شدن اپیتلیوم پوششی لاملاهای ثانویه گردید. به علاوه هایپرپلازی در لاملاها از علائم تیپیک در این گروه بود (تصویر ۱). همچنین مقاطع تهیه شده از بافت آبشش ماهی‌های گروه شاهد هیچ‌گونه آسیبی را نشان نداد (تصویر ۱).

علی‌رغم مشاهده نشدن آسیب به بافت کلیه در ماهی‌های گروه شاهد (تصویر ۲)، مشاهده میکروسکوپی مقاطع تهیه شده از کلیه ماهی‌های تیمار شده با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک بیانگر نکروز گسترده در توبول‌های کلیوی، پر خونی و انسداد در بافت بینابینی کلیه و نیز رسوب هموسیدرین و تجمع ملانوماکروفاژها ناشی از تأثیر دوز تحت حد آمونیاک بود (تصویر ۲).

#### سنجش شاخص‌های رشد: بر اساس نتایج حاصل از بررسی

شاخص‌های رشد در ماهی‌های کپور معمولی در مطالعه حاضر، پس از گذشت ۳۰ روز و در پایان دوره آزمایش طول و وزن نهایی، اختلاف وزن، درصد رشد و ضریب رشد ویژه در گروه شاهد در مقایسه با گروه تیمار شده با دوز تحت حد آمونیاک اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ( $P < 0/05$ ). به عبارت دیگر شاخص‌های رشد ذکر شده در ماهی‌های گروه شاهد در مقایسه با ماهیان گروه تیمار به‌طور معنی‌داری بالاتر ثبت گردید (جدول ۱). همچنین اگر چه نتایج حاصل شده از محاسبه شاخص ضریب چاقی در ماهی‌های گروه شاهد بیش‌تر از ماهی‌های گروه تیمار شده با آمونیاک محاسبه شد، اما این اختلاف معنی‌دار نبود ( $P > 0/05$ ).

#### بحث

آمونیاک در اثر کاتابولیسم پروتئین تولید می‌شود که خاصیت سمی داشته و می‌تواند در دوزهای بالا منجر به بروز تلفات سنگین شود. افزایش سطح این ترکیب در مزارع پرورش ماهی که امکان تعویض آب در آن‌ها وجود ندارد یا به مقدار کم در آن‌ها تعویض آب انجام می‌گیرد به‌طور شایع دیده می‌شود. تجمع آمونیاک خصوصاً بعد از سم‌پاشی استخرها به دلیل کاهش جمعیت فیتوپلانکتون‌ها به‌عنوان مصرف‌کننده ترکیب‌های نیتروژن‌دار و همچنین استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها به دلیل از بین بردن باکتری‌های تجزیه‌کننده ترکیب‌های ازته مانند نیتروزوموناس و نیتروباکترها (باکتری‌های دخیل در نیتریفیکاسیون) روی می‌دهد (۵،۲۴). چنانچه مدیریت صحیح در استخرهای پرورشی صورت بگیرد مواجهه با غلظت کشنده آمونیاک کاهش می‌یابد، با این حال

دارد. در یک مطالعه جداگانه که توسط Mazandarani و همکاران در سال ۲۰۱۵ صورت گرفت مواجهه طولانی مدت با غلظت ۰/۲ میلی گرم/لیتر در ماهی کلمه خزری باعث کاهش معنی دار در شاخص‌های رشد گردید، همچنین ماهیان مواجهه شده با غلظت آمونیاک مذکور پس از ۱ ماه دچار کم‌خونی ماکروسیتیک هایپوکرومیک شدند (۱۳). در مطالعه حاضر نیز این مواجهه باعث عوارض بافتی واضح در کلیه و آبشش و تأثیرات منفی بر شاخص رشد بوده است. به همین دلیل در شرایط کم آبی کشور، می‌توان گفت یکی از عواملی که بر روی بازدهی تولید تأثیرگذار است افزایش آمونیاک مولکولی استخرها در غلظت‌های غیر کشنده اما آسیب‌رسان می‌باشد. لذا پیشنهاد می‌شود برای رسیدن به بازدهی بالاتر در مزارع گرمابی کپور معمولی و همچنین جلوگیری از وارد شدن خسارت‌های اقتصادی و ممانعت از هدر رفت هزینه‌ها، مقدار آمونیاک آب مزارع پرورشی در پایین‌ترین سطح ممکن و بسیار کمتر از ۰/۱ میلی گرم در لیتر کنترل شود. هرچند برای رسیدن به حداقل غلظت آسیب‌رسان به بافت‌ها بررسی‌های بیشتری نیاز است.

### سپاسگزاری

نویسندگان مطالعه حاضر وظیفه خود می‌دانند مراتب قدردانی خود را نسبت کارکنان مرکز تحقیقات شیلات گرگان که در اجرای این مطالعه ما را یاری نمودند، اعلام نمایند.

### تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

تولید، افزایش آنزیم‌های دخیل در استرس اکسیداتیو و نیز آسیب‌های بافتی به آبشش و روده‌ها ثبت گردید (۲۵). همچنین در مطالعه Wang و همکاران در سال ۲۰۱۷ مواجهه با آمونیاک مزمن منجر به آسیب‌های بافت‌شناسی کبد و آبشش در کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*)، کپور سرگنده (*Aristichthys nobilis*) و ماهی قرمز (*Carassius auratus*) گردید (۲۲). نتایج مطالعه حاضر نیز نشان‌دهنده حساس بودن ماهی کپور معمولی به پرورش در محیطی با غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر آمونیاک در دوره‌های مواجهه بیش از ۱ ماه می‌باشد به گونه‌ای که می‌تواند آسیب‌های واضح در بافت‌های کلیه و کبد ایجاد کند. با توجه به این‌که دو عضو آبشش و کلیه اصلی‌ترین وظیفه را در تنظیم اسمزی ماهی به عهده دارند، وجود آمونیاک در مقادیر تحت حد ممکن است تداخل در تنظیم فشار اسمزی خون را به همراه داشته باشد، که نیازمند به تحقیق و مطالعه بیشتر است.

شرایط اقلیمی در کشور به گونه‌ای می‌باشد که در اکثر نقاط با مشکل کم‌آبی روبرو است به همین دلیل در مزارع پرورش گرمابی در کشور پس از آب‌گیری استخرها تا پایان دوره پرورش به ندرت تعویض آب صورت می‌گیرد و گاهی اوقات این مزارع در طی سال تنها یک بار آب‌گیری می‌شوند، لذا افزایش آمونیاک کل و مولکولی در این مزارع حداقل در حدی بالاتر از غلظت مجاز دور از ذهن نمی‌باشد. به عبارت دیگر اگرچه شرایط مسمومیت حاد با آمونیاک در این استخرها مشاهده نمی‌شود اما مواجهه به سطوح ۰/۱ میلی گرم/لیتر و حتی بالاتر در این شرایط رخ می‌دهد که این غلظت‌ها معمولاً بر روی بازدهی و حتی سلامت ماهیان تأثیر منفی

## References

1. El-Husseiny, O.M., El Din, G., Abdul-Aziz, M., Mabroke, R.S. (2008). Effect of mixed protein schedules combined with choline and betaine on the growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquac Res, 39, 291-300. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01896.x>
2. El-Shafai, S.A., El-Gohary, F.A., Nasr, F.A., van der Steen, N.P., Gijzen, H.J. (2004). Chronic ammonia toxicity to duckweed-fed tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture, 232, 117-127. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00516-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00516-7)
3. Emerson, K., Russo, R.C., Lund, R.E., Thurston, R.V. (1975). Aqueous ammonia equilibrium calculations: effect of pH and temperature. Can J Fish Aquat Sci, 32, 2379-2383. <https://doi.org/10.1139/f75-274>
4. Foss, A., Siikavuopio, S.I., Sæther, B.S., Evensen, T.H. (2004). Effect of chronic ammonia exposure on growth in juvenile Atlantic cod. Aquaculture, 237, 179-189. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.03.013>
5. Grenni, P., Ancona, V., Caracciolo, A.B. (2018). Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. Microchem J, 136, 25-39. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.02.006>
6. Guan, B., Hu, W., Zhang, T., Duan, M., Li, D., Wang, Y., Zhu, Z. (2010). Acute and chronic un-ionized ammonia toxicity to 'all-fish' growth hormone transgenic common carp (*Cyprinus carpio* L.). Chin Sci Bull, 55, 4032-4036. <https://doi.org/10.1007/s11434-010-4165-5>
7. Guler, G.O., Kiztanir, B., Aktumsek, A., Citil, O.B., Ozparlak, H. (2008). Determination of the seasonal changes on total fatty acid composition and  $\omega3/\omega6$  ratios of carp (*Cyprinus carpio* L.) muscle lipids in Beysehir Lake (Turkey). Food Chem, 108, 689-694. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.080>

8. Handy, R.D., Poxton, M.G. (1993). Nitrogen pollution in mariculture: toxicity and excretion of nitrogenous compounds by marine fish. *Rev Fish Biol Fish*, 3, 205-241. <https://doi.org/10.1007/BF00043929>
9. Hued, A.C., Caruso, M.N., Wunderlin, D.A., Bistoni, M.A. (2006). Field and in vitro evaluation of ammonia toxicity on native fish species of the central region of Argentina. *Bull Environ Contam Toxicol*, 76, 984-991. <https://doi.org/10.1007/s00128-006-1015-x>
10. Jeney, Z., Nemcsok, J., Jeney, G., Olah, J. (1992). Acute effect of sublethal ammonia concentrations on common carp (*Cyprinus carpio* L.). I. Effect of ammonia on adrenaline and noradrenaline levels in different organs. *Aquaculture*, 104, 139-148. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(92\)90144-A](https://doi.org/10.1016/0044-8486(92)90144-A)
11. Le Ruyet, J.P., Boeuf, G., Infante, J.Z., Helgason, S., Le Roux, A. (1998). Short-term physiological changes in turbot and seabream juveniles exposed to exogenous ammonia. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 119, 511-518. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(97\)00458-3](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(97)00458-3)
12. Lemarie, G., Dosdat, A., Coves, D., Dutto, G., Gasset, E., Person-Le Ruyet, J. (2004). Effect of chronic ammonia exposure on growth of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*, 229, 479-491. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00392-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00392-2)
13. Mazandarani, M., Soudagar, M., Zakariaei, H. (2015). Long time exposure effects of sub-lethal unionized ammonia concentration on growth and hematologic indices of Caspian roach, *Rutilus caspicus*, fingerlings. *JAIR*, 3, 53-64. (in Persian)
14. Paust, L.O., Foss, A., 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. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.03.008>
15. Peyghan, R., Takamy, G.A. (2002). Histopathological, serum enzyme, cholesterol and urea changes in experimental acute toxicity of ammonia in common carp *Cyprinus carpio* and use of natural zeolite for prevention. *Aquac Intern*, 10, 317-325. <https://doi.org/10.1023/A:1022408529458>
16. Randall, D.J., Tsui, T.K.N. (2002). Ammonia toxicity in fish. *Mar Pollut Bull*, 45(1-12), 17-23. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00227-8](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00227-8)
17. Robert, R.J. (2012) *Fish Pathology*. (4<sup>th</sup> ed.) Wiley-Blackwell, UK. 590 p.
18. Shingles, A., McKenzie, D.J., Taylor, E.W., Moretti, A., Butler, P.J., Ceradini, S. (2001). Effects of sublethal ammonia exposure on swimming performance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol*, 204, 2691-2698. <https://doi.org/10.1242/jeb.204.15.2691>
19. Siikavuopio, S.I., Dale, T., Foss, A., Mortensen, A. (2004). Effects of chronic ammonia exposure on gonad growth and survival in green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Aquaculture*, 242, 313-320. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.08.042>
20. Turchini, G.M., Mentasti, T., Frøyland, L., Orban, E., Caprino, F., Moretti, V.M., Valfré, F. (2003). Effects of alternative dietary lipid sources on performance, tissue chemical composition, mitochondrial fatty acid oxidation capabilities and sensory characteristics in brown trout (*Salmo trutta* L.). *Aquaculture*, 225, 251-267. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00294-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00294-1)
21. Wang, Y., Walsh, P.J. (2000). High ammonia tolerance in fishes of the family Batrachoididae (Toadfish and Midshipmen). *Aquat Toxicol*, 50, 205-219. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(99\)00101-0](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(99)00101-0)
22. Wang, H.J., Xiao, X.Ch., Wang, H.Z., Li, Y., Yu, Q., Liang, X.M., Feng, W.S., Shao, J.Ch., Rybicki, M., Jungmann, D., Jeppesen, J. (2017). Effects of high ammonia concentrations on three cyprinid fish: Acute and whole-ecosystem chronic tests. *Sci Total Environ*, 598, 900-909. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.070>
23. Wood, C.M. (1993). Ammonia and urea metabolism and excretion. In: *The Physiology of Fishes*. Evans, D.H. (ed.). Boca Raton press. Florida, USA. p. 379-425.
24. Xing, B.S., Jin, R.C. (2018). Inhibitory effects of heavy metals and antibiotics on nitrifying bacterial activities in mature partial nitritation. *Chemosphere*, 200, 437-445. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.02.132>
25. Zhang, W., Xia, S., Zhu, J., Miao, L., Ren, M., Lin, Y., Ge, X., Sun, Sh. (2019). Growth performance, physiological response and histology changes of juvenile blunt snout bream (0 exposed to chronic ammonia. *Aquaculture*, 506, 424-436. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.03.072>



## The Effects of Chronic Sub-Lethal Ammonia Exposure on Growth Indices and Histological Analysis of Gill and Kidney in Common Carp (*Cyprinus carpio*)

Mohammad Mazandarani<sup>1</sup>, Gholamreza Darvishi<sup>2</sup>, Ashkan Zargar<sup>3</sup>, Aashkan Zargari<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Department of Fisheries and Environmental Sciences, University of Agricultural Sciences and Natural Resources Gorgan, Golestan, Iran

<sup>2</sup> Inland Waters Aquatic Stocks Research Center, Iranian Fisheries Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization Gorgan, Golestan, Iran

<sup>3</sup> Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

<sup>4</sup> Graduated from the Faculty of Agricultural Sciences and Natural Resources Gorgan, Golestan, Iran

doi [10.22059/jvr.2018.258925.2800](https://doi.org/10.22059/jvr.2018.258925.2800)

Received: 18 September 2021, Accepted: 21 November 2021

### Abstract

**BACKGROUND:** Ammonia accumulation in warm-water fish pond can lead to mortality or reduction in growth and body immune indices.

**OBJECTIVES:** The present study aimed to investigate the effects of chronic sub-lethal unionized ammonia (NH<sub>3</sub>) on growth indices and gill and kidney histopathology 1, after a 30 – day trial in common carp (*Cyprinus carpio*).

**METHODS:** Herein, 180 fish with an average weight of 4.5±0.5 g were divided into six tanks. Two groups, including one control group and one treatment group (with three replicates for each one), were considered. The treatment fish were exposed to 0.1 mg/l on un-ionized ammonia (NH<sub>3</sub>) for 30 consecutive days. Following one -month, ammonia exposure growth indices and histological analysis of gill and kidney were investigated.

**RESULTS:** The results showed that exposure to 0.1 mg/l of NH<sub>3</sub> led to a significant reduction in growth indices. Additionally, edema and epithelial lifting with hyperplasia in the second lamella were detected in the gill of the treatment group. The kidney was characterized by focal renal tubules degeneration and necrosis, congestion, and increase in the melano-macrophage centers.

**CONCLUSIONS:** Although chronic exposure to 0.1 mg/l of unionized ammonia was not found to cause mortality in common carp, it could have some side effects, such as a decline in growth indices and histopathological effects in kidney and gill tissues. Thus, for higher production, sublethal levels of ammonia should also be taken into account in common carp ponds.

**Keywords:** Ammonia, Histology, Growth indices, Long time exposure, Common carp

Copyright © 2020. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Corresponding author's email: mazandarani@gau.ac.ir Tel/Fax: 017-32427040

### How to cite this article:

Mazandarani, M., Darvishi, G., Zargar, A., Zargari, A. (2022). The Effects of Chronic Sub-Lethal Ammonia Exposure on Growth Indices and Histological Analysis of Gill and Kidney in Common Carp (*Cyprinus carpio*). J Vet Res, 76(4), 442-449. <https://doi.org/10.22059/jvr.2018.258925.2800>

### Figure Legends and Table Captions

**Table 1.** Comparison of the growth parameters of the control and the treatment groups with chronic sub-lethal ammonia after 30-days of exposure in common carp (*C. carpio*).

**Figures 1.** Gill histopathology analysis in common carp exposed to chronic sub lethal ammonia.

**Figures 2.** Kidney histopathology analysis in common carp exposed to chronic sub lethal ammonia.