

تغییرات آنزیم‌های گوارشی و آسیب‌شناسی بافت روده و کلیه بچه ماهی ازون‌برون (*Acipenser stellatus*) (Pallas, 1811) در تقابل غلظت‌های مختلف آمونیاک و شوری

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی تغییرات آنزیم‌های گوارشی و آسیب‌شناسی بافت روده و کلیه بچه ماهی ازون‌برون (*Acipenser stellatus*) بود. این تحقیق در سال ۱۳۹۹ در ایستگاه تحقیقات تاس ماهیان گیلان (چابکسر) و در دو مرحله انجام گرفت. مرحله اول غلظت کشندگی (LC50 96h) آمونیاک (کلرید آمونیوم، NH₄Cl) در شوری‌های مختلف (۰، ۴، ۸ و ۱۲ گرم در لیتر) تعیین شد. در مرحله دوم بعد از به دست آمدن مقادیر غلظت کشندگی آمونیاک، بچه ماهیان ازون‌برون (به تعداد ۲۴۰ قطعه، میانگین وزن ۱۷/۲۳±۱۵/۲۳ گرم، میانگین طول ۱۷±۱/۹۵ سانتی‌متر) به مدت ۴ روز در معرض نصف (۵۰ درصد) این مقادیر (۳/۷۱، ۴/۱۲، ۴/۸۰ و ۵/۱۱ میلی‌گرم در لیتر) در همان میزان شوری‌ها (۸ تیمار، هر یک با ۳ تکرار) قرار گرفتند. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت آمونیاک در سطوح مختلف شوری (۰، ۴، ۸ و ۱۲ گرم در لیتر)، توان و تحمل بچه ماهیان ازون‌برون (*Acipenser stellatus*) افزایش یافت که نشان‌دهنده کاهش سمیت آمونیاک در بچه ماهیان ازون‌برون (*Acipenser stellatus*) بود. در گروه‌های شوری به‌صورت مجزا با افزایش شوری میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی کاهش یافت ($P>0/05$). با افزایش شوری و آمونیاک در گروه‌های ترکیبی (۵۰ درصد غلظت کشندگی آمونیاک و شوری) میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی آمیلاز و پروتئاز افزایش و فعالیت لیپاز کاهش یافت ($P>0/05$). در بافت کلیه تخریب سلول‌های توبول، تحلیل هسته سلول، نکروز در گلومرول و بزرگ شدن فضای بومن از جمله موارد شایع آسیب‌شناسی بافتی بود. ضمن اینکه این آسیب‌ها در تیمار ۸ (شوری ۱۲ گرم در لیتر و ۵۰ درصد غلظت کشندگی (LC50 96h) آمونیاک: ۵/۱۱ میلی‌گرم در لیتر هم‌زمان با افزایش شوری و وجود آمونیاک شدیدتر بود. با افزایش شوری و توام با آمونیاک عوارض هیستوپاتولوژیک مختلف مانند تخریب در لایه زیر مخاط، صاف شدن سطح پرز روده، تغییر شکل در لامینا پروپریا و از بین رفتن سلول‌های اپیتلیال استوانه‌ای پرز روده بیشتر مشاهده شد. بیشترین تخریب بافت روده ماهی ازون‌برون (*A. stellatus*) در سطوح بالای شوری و آمونیاک دیده شد. نتایج کلی نشان داد که اگرچه با افزایش شوری سمیت آمونیاک در ماهی کاهش یافت، ولی آسیب‌های بافتی (روده و کلیه) و تغییرات آنزیم‌های گوارشی روده با افزایش شوری در تیمارهای در معرض آمونیاک بسیار مشهود بود.

واژگان کلیدی: آمونیاک، شوری، آنزیم‌های روده، آسیب روده و کلیه، ازون‌برون، *Acipenser stellatus*

مقدمه

گونه ازون‌برون (*Acipenser stellatus*) یکی از باارزش‌ترین ماهیان تجاری دریای خزر محسوب می‌شود که برای تخم‌ریزی به رودخانه‌های حوضه جنوبی دریای خزر از جمله رودخانه سفیدرود مهاجرت می‌کند. امروزه به دلیل برداشت بی‌رویه، سدسازی بر روی رودخانه‌ها، آلودگی شهری

آمنه منصورقنای^۱

حسین خارا^{۲*}

حبیب وهابزاده رودسری^۳

ذبیح اله پژند^۴

محدثه احمدنژاد^۵

۱. دانشجوی دکتری رشته تکثیر و پرورش آبزیان، گروه شیلات، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران.

۲. دانشیار گروه شیلات، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران.

۳. استادیار گروه شیلات، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران.

۴. موسسه تحقیقات بین‌المللی تاس ماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران.

۵. پژوهشگر آبزی‌پروری آب‌های داخلی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندر انزلی، ایران.

*مسئول مکاتبات:

h.khara1974@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۱۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۱۸

این مقاله پژوهشی و برگرفته از رساله دکتری است.

و کشاورزی، تجارت غیرقانونی ماهیان خاویاری، افزایش تقاضا برای خاویار و تخریب زیستگاه آن در معرض خطر انقراض قرار گرفته است (Speer et al., 2000)؛ بنابراین تکثیر و پرورش مصنوعی تاس ماهیان روش بسیار مهمی برای بازسازی جمعیت‌های این ماهیان است. با توجه به پرورش این ماهیان توسط پرورش‌دهندگان (تأمین گوشت و خاویار) و مراکز تکثیر و بازسازی ذخایر (جهت رهاسازی به رودخانه‌های منتهی به دریا) به نظر می‌رسد آلودگی‌های شیمیایی از جمله آمونیاک در رودخانه‌های محل رهاسازی و در سیستم‌های پرورش در زمان پرورش یکی از مهم‌ترین عوامل قابل‌توجه و اثرگذار بر روی ماهیان می‌باشد (Agusa et al., 2004). آمونیاک می‌تواند در محیط‌های آبی و سیستم‌های آبی‌پروری متمرکز شود و باعث مشکلات رایج کیفیت آب شود. غلظت بالای آمونیاک می‌تواند موجب کاهش رشد ماهی یا حتی مرگ آن شود. در محیط آبی شکل غیر یونیزه ($\text{NH}_3\text{-N}$) آمونیاک برای آبزیان بسیار سمی می‌باشد ولی شکل یونیزه شده ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) غیر سمی در نظر گرفته می‌شود، زیرا نمی‌تواند از غشای سلولی عبور کند. $\text{NH}_3\text{-N}$ که به غشای سلولی نفوذ می‌کند، عملکرد سلولی را از بین می‌برد و باعث مرگ در ماهی می‌شود (Jeney et al., 1992; Kir and Sunar, 2018). غالبیت NH_3 به pH، دما و شوری بستگی دارد. علاوه بر اثرات سمی آمونیاک، شوری هم یکی از مهم‌ترین متغیرهای محیطی دیگر است که باید موردتوجه قرار گیرد (Kir and Sunar, 2018). تأثیرات شوری بر آمونیاک خون کمتر موردبررسی قرار گرفته است. شوری میزان Na^+ محیط را تعیین می‌کند و این امر بر پمپ $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ تأثیر می‌گذارد، از طرفی نفوذپذیری غشاء پلاسمایی آبشش‌ها نیز در شوری‌های مختلف تغییر می‌کند (Evans, 1993). سطح بالای شوری تحمل اکثر موجودات آبی نسبت به آمونیاک را افزایش می‌دهد (Saroglia et al., 1981; Kir and Oz, 2015). گزارش شده است که با افزایش شوری، اثر سمی نیتريت بر روی ماهی کاهش می‌یابد (Barbieri et al., 2011; Kir and Sunar, 2018; Kir et al., 2019). در بررسی وضعیت سلامت فیزیولوژیک ماهی، آسیب‌شناسی بافتی به‌عنوان یک ابزار پاراکلینیکی از اهمیت به‌سزایی برخوردار است همچنین این مطالعات می‌تواند در بسیاری از زمینه‌های تحقیقاتی آبی‌پروری و پرورش ماهی و در عرصه سم‌شناسی و پایش زیستی به‌عنوان شاخص مناسب برای نشان دادن تغییرات آسیب‌شناسی و فیزیولوژیک به‌شمار رود (Vale, 1998; Soldatov, 2005). با توجه به اینکه یکی از عوامل فیزیولوژیک مؤثر در موفقیت رهاسازی ماهیان، توانایی تنظیم اسمزی توسط بچه ماهیان در زمان رهاسازی و نیز در هنگام انتقال از محل رهاسازی به دریا است. تنظیم اسمزی شامل تبادلات پمپ یونی در آبشش‌ها و سایر اندام‌های تنظیم اسمزی نظیر روده و کلیه می‌باشد (Marshall Singer, 2002). در نتیجه آلودگی‌هایی شیمیایی آب نظیر آمونیاک ممکن است باعث آسیب بافت‌های کلیه و روده و به هم خوردن تنظیم اسمزی در ماهیان شود. مطالعاتی در خصوص آسیب‌های بافت روده و کلیه در ماهیان بعد از قرار گرفتن در معرض آمونیاک توسط برخی از محققان گزارش شده است (بنی‌هاشمی و همکاران، ۱۳۹۲؛ مازندرانی و همکاران، ۱۳۹۵؛ Rodrigues et al., 2014; Duan et al., 2018). بررسی فعالیت آنزیم‌های دستگاه گوارش می‌تواند در مطالعات سم‌شناسی حائز اهمیت باشد (Gunes and Yerli, 2011; Prabhu and Poulouse, 2012). تغییرات در فعالیت‌های آنزیم‌های گوارش روده در آب شیرین و در سطوح مختلف شوری بعد از قرار گرفتن در معرض آمونیاک در ماهیان مشاهده شده است (Zhang et al., 2011; Xu et al., 2011; Chunming et al., 2019). از این‌رو، در مطالعه حاضر برای اولین بار اثرات آمونیاک در سطوح مختلف شوری بر فعالیت آنزیم‌های روده‌ای (پروتئاز، لیپاز و آمیلاز) و آسیب‌های وارده به روده و کلیه در بچه ماهی ازون برون (*A. stellatus*) در زمان پرورش (تأمین گوشت و خاویار) و رهاسازی مورد مطالعه قرار گرفته است تا اطلاعات مناسبی با توجه به بازسازی ذخایر و پرورش این ماهی فراهم شود تا بتوان کیفیت پرورش و رهاسازی را با توجه به وجود آمونیاک در محل رهاسازی و سیستم‌های پرورشی، بهبود بخشید. در این راستا با توجه به موارد بیان‌شده در بالا هیچ اطلاعاتی در مورد اثر سمیت آمونیاک در تقابل با شوری‌های مختلف در محیط‌های پرورشی و محل رهاسازی ماهی اوزون برون وجود ندارد. هدف از این تحقیق دستیابی به میزان استاندارد فاکتورهای آمونیاک در شوری‌های مختلف، بررسی سمیت آمونیاک در مقادیر مختلف شوری و همچنین اثرات سمیت آمونیاک بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی روده (پروتئاز، لیپاز و آمیلاز) و آسیب‌های وارده به روده و کلیه در بچه ماهی ازون برون (*A. stellatus*) در زمان پرورشی و رهاسازی بچه ماهیان ازون برون (*A. stellatus*) می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در ایستگاه تحقیقات تاس ماهیان گیلان (چابکسر) در پاییز سال ۱۳۹۹ انجام شد. برای انجام آزمایشات ۷۲۰ قطعه بچه ماهی ازون برون (*A. stellatus*) انتخاب شدند. قبل از انجام مراحل آزمایشی، بچه ماهیان به مدت ۴ هفته در شوری‌های ۰، ۴، ۸ و ۱۲ گرم در لیتر سازگار شده بودند. آزمایش در دو مرحله انجام گرفت:

مرحله ۱: تعیین غلظت کشنده (LC50-96h) آمونیاک در سطوح مختلف شوری در بچه ماهی ازون برون (*Acipenser stellatus*): در این مرحله ۴۸۰ بچه ماهی ازون برون (*A. stellatus*) ($1/19 \pm 12/8$ گرم و $1/84 \pm 14/56$ سانتی‌متر) در آزمایشات سنجش سمیت حاد برای تعیین غلظت متوسط کشنده (LC50) آمونیاک تحت شرایط آزمایش تجدید نیمه استاتیک، طبق روش OECD مورد استفاده قرار گرفتند. از کلرید آمونیوم ($\text{NH}_4^+ \text{Cl}^-$) ۹۸ درصد (ساخت شرکت Merck آلمان) برای تهیه غلظت‌های مختلف آمونیاک استفاده شد. ۱۰ قطعه بچه ماهی ازون برون در ۴۸ مخزن (با حجم ۴۰ لیتری هر کدام حاوی دو عدد سنگ هوا) با ۱۶ تیمار با سه تکرار به مدت ۹۶ ساعت به‌طور تصادفی در معرض آمونیاک (۳، ۲۰ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر) در شوری‌های مختلف (۰، ۴، ۸ و ۱۲ گرم در لیتر) قرار گرفتند (جدول ۱). بچه ماهیان در این مدت برای جلوگیری از اثرات نامطلوب فضولات و خوراک تغذیه نشدند. میزان مرگ‌ومیر در ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از مواجهه محاسبه شد. بر اساس آزمون آنالیز پروبیت (Finney 1971)، LC50 ۹۶ ساعته آمونیاک در شوری ۰، ۴، ۸ و ۱۲ گرم در لیتر به ترتیب ۰/۶۰، ۸/۲۴، ۷/۴۲ و ۱۰/۲۲ میلی‌گرم در لیتر به دست آمد. روزانه ۷۵ درصد آب با افزودن محلول کلرید آمونیوم تجدید شد.

جدول ۱: تعیین غلظت LC50 ۹۶ ساعته آمونیاک در سطوح مختلف شوری در بچه ماهی ازون برون (*Acipenser stellatus*) (سال ۱۳۹۹).

شماره تیمار	تیمار	شماره تیمار	تیمار
۱	شوری ۰ (گرم در لیتر) + بدون آمونیاک	۹	شوری ۰ (گرم در لیتر) + آمونیاک ۲۰ (میلی‌گرم در لیتر)
۲	شوری ۴ (گرم در لیتر) + بدون آمونیاک	۱۰	شوری ۴ (گرم در لیتر) + آمونیاک ۲۰ (میلی‌گرم در لیتر)
۳	شوری ۸ (گرم در لیتر) + بدون آمونیاک	۱۱	شوری ۸ (گرم در لیتر) + آمونیاک ۲۰ (میلی‌گرم در لیتر)
۴	شوری ۱۲ (گرم در لیتر) + بدون آمونیاک	۱۲	شوری ۱۲ (گرم در لیتر) + آمونیاک ۲۰ (میلی‌گرم در لیتر)
۵	شوری ۰ (گرم در لیتر) + آمونیاک ۳ (میلی‌گرم در لیتر)	۱۳	شوری ۰ (گرم در لیتر) + آمونیاک ۵۰ (میلی‌گرم در لیتر)
۶	شوری ۴ (گرم در لیتر) + آمونیاک ۳ (میلی‌گرم در لیتر)	۱۴	شوری ۴ (گرم در لیتر) + آمونیاک ۵۰ (میلی‌گرم در لیتر)
۷	شوری ۸ (گرم در لیتر) + آمونیاک ۳ (میلی‌گرم در لیتر)	۱۵	شوری ۸ (گرم در لیتر) + آمونیاک ۵۰ (میلی‌گرم در لیتر)
۸	شوری ۱۲ (گرم در لیتر) + آمونیاک ۳ (میلی‌گرم در لیتر)	۱۶	شوری ۱۲ (گرم در لیتر) + آمونیاک ۵۰ (میلی‌گرم در لیتر)

مرحله ۲: آزمایش اثرات نصف (۵۰ درصد) LC50-96h آمونیاک در سطوح مختلف شوری در بچه ماهی ازون برون (*Acipenser stellatus*): در این مرحله، تعداد ۲۴۰ قطعه بچه ماهی ازون برون ($15/2 \pm 23/17$ گرم و $17/95 \pm 1$ سانتی‌متر) در یک طرح کاملاً تصادفی در ۸ گروه تیمار (۲۴ مخزن ۶۰ لیتری با حجم آب ۴۰ لیتر حاوی دو عدد سنگ هوا، هر مخزن ۱۰ قطعه بچه ماهی) تقسیم شدند برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد. این مرحله از آزمایش تحت شرایط آزمایش تجدید نیمه استاتیک انجام شد و ۷۵ درصد آب روزانه با افزودن محلول کلرید آمونیوم ($\text{NH}_4^+ \text{Cl}^-$) تجدید شد (جدول ۲). در طول آزمایش ۴ روزه، پارامترهای کیفیت آب به شرح زیر تنظیم شد: دما: $16/5 \pm 0/51$ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول $81/11 \pm 7$ میلی‌گرم در لیتر و $12/04 \pm \text{pH}$ ، اکسیژن و دما با استفاده از دستگاه چند پارامتر (HACH ساخت آلمان) و شوری با استفاده از رفراکتومتر (مدل آتاگو S/mill – E ophthalmometer ساخت ژاپن) اندازه‌گیری شد. پس از ۹۶ ساعت گرسنگی، بچه ماهی‌ها با مخلوط ۰/۵ گرم پودر میخک در یک لیتر آب بی‌هوش شدند (رهبر و همکاران، ۱۳۹۸). سپس از هر تکرار ۱ قطعه بچه ماهی به‌طور تصادفی

برای بررسی‌های هیستوپاتولوژیک و ۳ قطعه بچه ماهی برای سنجش فعالیت آنزیم گوارشی روده انتخاب شدند. اندازه‌گیری آنزیم‌های گوارشی در آزمایشگاه ویرومد رشت و بررسی‌های بافت‌شناسی در پژوهشکده آبی‌پروری آب‌های داخلی بندرانزلی انجام گرفت.

جدول ۲: تیمارهای شوری و آمونیاک در سطوح مختلف شوری در بچه ماهی ازون برون (*Acipenser stellatus*) (سال ۱۳۹۹).

شماره تیمار	کنترل	شماره تیمار	در معرض
۱	شوری ۰ (گرم در لیتر) + آمونیاک ۰ (میلی گرم بر لیتر)	۵	شوری ۰ (گرم در لیتر) + نصف (۵۰٪) از LC50 96h آمونیاک (۳/۷۱ میلی گرم در لیتر)
۲	شوری ۴ (گرم در لیتر) + آمونیاک ۰ (میلی گرم بر لیتر)	۶	شوری ۴ (گرم در لیتر) + نصف (۵۰٪) از LC50 96h آمونیاک (۴/۱۲ میلی گرم در لیتر)
۳	شوری ۸ (گرم در لیتر) + آمونیاک ۰ (میلی گرم بر لیتر)	۷	شوری ۸ (گرم در لیتر) + نصف (۵۰٪) از LC50 96h آمونیاک (۴/۸۰ میلی گرم در لیتر)
۴	شوری ۱۲ (گرم در لیتر) + آمونیاک ۰ (میلی گرم بر لیتر)	۸	شوری ۱۲ (گرم در لیتر) + نصف (۵۰٪) از LC50 96h آمونیاک (۵/۱۱ میلی گرم در لیتر)

برای سنجش فعالیت آنزیم‌های گوارشی، در پایان روز چهارم از هر تکرار سه قطعه بچه ماهی به‌طور تصادفی انتخاب شد و پس از بیهوشی، روی یخ و تحت شرایط استریل روده آن‌ها جدا و در ازلت مایع منجمد شد و سپس در فریزر ۹۰- درجه سانتی‌گراد تا شروع آزمایش نگهداری شد. برای استخراج عصاره آنزیمی از روش Harpaz و همکاران (۱۹۹۴) استفاده شد. بر اساس این روش، روده ماهیان با نسبت وزنی حجمی ۱ به ۵ و با استفاده از بافر هموژنات سرد حاوی Tris-HCl ۵۰ میلی مولار، CaCl_2 20 میلی مولار و KCl ۵۰ میلی مولار، pH ۸/۵ (به مدت ۳۰ ثانیه در کنار یخ با استفاده از همزنایزر Wiggen, D500، آلمان) هموژن شد. در ادامه نمونه هموژن شده به مدت ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۷۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (Hermle, Z36HK، آلمان) شد. سپس مایع رویی با استفاده از میکروسپنر جمع‌آوری شد و برای سنجش آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت (رهبر و همکاران، ۱۳۹۸).

سنجش آنزیم لپاز با استفاده از هیدرولیز p-Nitrophenyl myristate به‌عنوان سوبسترا در متوکسی اتانول ۰/۲۵ میلی مولار، Sodium Cholate ۵ میلی مولار و Tris-HCl ۰/۲۵ میلی مولار در pH ۹ انجام شد. فعالیت اختصاصی لپاز برابر با آزادسازی یک میکرومول پارا - نیتروفل در یک دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد است که در ۴۰۰ نانومتر خوانده شد (Iijima et al., 1998). فعالیت آنزیم آمیلاز بر اساس روش (Bernfeld, 1955) و با استفاده از سوبسترای نشاسته سنجش شد. نشاسته تحت تأثیر آنزیم تجزیه‌شده، مالتوز تولید می‌کند که از طریق رنگ‌سنجی و تغییر شدت رنگ در معرف دی‌نیترو سالیسیلیک اسید قابل سنجش است. سنجش فعالیت آنزیم پروتئاز بر اساس روش Anson (۱۹۳۸) و با استفاده از سوبسترای پودر هموگلوبین انجام شد. میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی بر مبنای U/mg protein محاسبه شد. برای سنجش میزان پروتئین کل نمونه‌ها از روش Bradford (۱۹۷۶) استفاده شد.

بافت‌های روده و کلیه تثبیت‌شده در بوئن (یک قطعه ماهی از هر تکرار) پس از ۴۹ ساعت به اتانول ۷۰ درصد منتقل و شستشو شد. سپس آب‌گیری با سری افزایشی الکل اتانول (۷۰، ۸۰ و ۹۶ درصد) و الکل ۱ - بوتانول انجام شد. نمونه‌ها برای شفاف‌سازی به مدت ۳ ساعت در کلروفرم قرار داده شدند. به‌منظور پارافینه کردن، در داخل آون (دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد) در پارافین مایع قرار گرفته، سپس با پارافین قالب‌گیری شدند. از قالب‌های پارافینه با استفاده از دستگاه میکروتوم دوار (Leitz, ۱۵۱۲، آلمان) برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرون تهیه و پس از قرار دادن بر روی

لام، به مدت ۳۰ دقیقه در آن (۳۷ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شد تا پارافین اضافه از روی بافت حذف شود. نمونه‌ها پس از پارافین زدایی توسط گزین و جایگزینی آن با سری کاهشی اتانول (۱۰۰، ۹۰ و ۷۰) آبدی مجدد شدند و با استفاده از محلول‌های هماتوکسیلین و ائوژین (H&E) رنگ‌آمیزی شدند. بافت‌های تهیه‌شده مجدداً برای خشک شدن در آن (۳۷ درجه سانتی‌گراد) گذاشته شدند. در مرحله آخر لامل‌ها با چسب سیتولوژی بر روی لام‌های تهیه‌شده چسبانده شدند (Fanta et al., 2003). مقاطع بافت توسط میکروسکوپ نوری (ایتالیا، BIO2T, Photonic, BEL, مجهز به دوربین دیجیتال در آزمایشگاه فیزیولوژی آبزیان پژوهشکده آبی‌پروری آب‌های داخلی (بندر انزلی) مطالعه و عکس‌برداری شدند.

برای تجزیه و تحلیل فعالیت آنزیم‌های گوارشی از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۲ استفاده شد. در ابتدا نرمال بودن داده‌ها با آزمون (شاپیرو – ویلک) مورد آزمون قرار گرفت. به دلیل نرمال بودن توزیع داده‌ها، برای مقایسه میانگین داده‌ها بین تیمارهای مختلف از آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و برای جداسازی گروه‌های همگن از آزمون توکی در سطح احتمال ۹۵٪ استفاده شده است.

نتایج

LC50 آمونیاک (NH_4^+CL^-) اندازه‌گیری شده در نمونه‌ها در جدول ۳ ارائه شده است. مقادیر LC50 در هر شوری با گذشت زمان (از ۲۴ تا ۹۶ ساعت) کاهش یافت. نتایج نشان داد که غلظت نیمه کشنده از ۷/۴۲ (میلی‌گرم در لیتر) در شوری ۰ (گرم در لیتر) به ۱۰/۲۲ (میلی‌گرم در لیتر) در شوری ۱۲ (گرم در لیتر) پس از ۹۶ ساعت افزایش یافت (جدول ۳).

جدول ۳: غلظت کشنده (LC50 96h) آمونیاک در بچه ماهیان اوزون برون (*Acipenser stellatus*) در سطوح مختلف شوری (سال ۱۳۹۹).

غلظت آمونیاک (میلی‌گرم در لیتر) با اطمینان ۹۵٪					نصف (۵۰٪) غلظت کشنده (LC50 96h) آمونیاک در شوری‌های مختلف (میلی‌گرم در لیتر)
زمان	۲۴ h	۴۸ h	۷۲ h	۹۶ h	شوری (گرم در لیتر)
۰	۱۹/۱۳	۱۸/۳۱	۱۷/۰۹	۷/۴۲	۳/۷۱
۴	۳۳/۶۶	۳۰/۸۵	۱۰/۲۳	۸/۲۴	۴/۱۲
۸	۲۵	۲۵/۰۵	۲۵/۰۵	۹/۶۰	۴/۸۰
۱۲	۹۵/۸۳	۹۵/۸۳	۳۰/۸۵	۱۰/۲۲	۵/۱۱

آنزیم‌های گوارشی روده در بچه ماهیان اوزون برون در جدول ۴ آورده شده است. فعالیت آنزیم‌های گوارشی آمیلاز، لیپاز و آلکالین پروتئاز با افزایش شوری در تیمارهای بدون آمونیاک از تیمار ۱ تا ۴ کاهش یافت. فعالیت آنزیم‌های آمیلاز و پروتئاز با افزایش شوری و آمونیاک در تیمارهای در معرض از تیمار ۵ تا ۷ کاهش و مجدد در تیمار ۸ (شوری ۱۲ گرم در لیتر + نصف (۵۰ درصد) غلظت کشندگی (LC50 96h) آمونیاک؛ ۵/۱۱ میلی‌گرم در لیتر) به اوج خود رسید و آنزیم لیپاز هم از تیمار ۵ تا ۸ روند کاهشی داشت. حداکثر میزان فعالیت آنزیم لیپاز در تیمار ۵ مشاهده شد ($P < 0.05$) (جدول ۴).

جدول ۴: آنزیم‌های گوارشی روده بچه ماهیان ازون برون (*Acipenser stellatus*) در سطوح مختلف شوری و نصف (۵۰٪) غلظت کشنده (LC50 96h) آمونیاک (سال ۱۳۹۹).

تیمار	آمیلاز (واحد در هر میلی گرم پروتئین/دقیقه)	لیپاز (واحد در هر میلی گرم پروتئین/دقیقه)	آلکالین پروتئاز (واحد در هر میلی گرم پروتئین/دقیقه)
۱	۱۰/۶۵ ± ۰/۰۹ ^c	۱/۷۹ ± ۰/۰۴۲ ^b	۳/۸۶ ± ۰/۰۶۲ ^{bc}
۲	۱۱/۷۳ ± ۰/۰۷ ^{de}	۱/۹۰ ± ۰/۰۵۶ ^{bc}	۴/۶۶ ± ۰/۰۶۲ ^d
۳	۱۱/۹۵ ± ۰/۱۵ ^e	۲/۲۷ ± ۰/۰۴۶ ^d	۴/۷۲ ± ۰/۰۸۶ ^d
۴	۹/۶۹ ± ۰/۰۸ ^a	۱/۹۰ ± ۰/۰۲۶ ^{bc}	۳/۱۷ ± ۰/۰۵۶ ^a
۵	۱۱/۶۰ ± ۰/۰۹ ^d	۲/۳۶ ± ۰/۰۶۷ ^d	۴/۶۵ ± ۰/۰۶۰ ^d
۶	۱۰/۰۱ ± ۰/۱۱ ^b	۱/۷۷ ± ۰/۰۴۶ ^{ab}	۳/۹۸ ± ۰/۰۶۱ ^c
۷	۹/۶۹ ± ۰/۱۲ ^a	۱/۶۳ ± ۰/۰۳۱ ^a	۳/۷۱ ± ۰/۰۵۵ ^b
۸	۱۳/۰۹ ± ۰/۰۷ ^f	۱/۹۶ ± ۰/۰۶۰ ^c	۵/۳۶ ± ۰/۰۵۶ ^e

*حروف لاتین غیرمشترک، نشان‌دهنده اختلاف بین تیمارها است ($P < 0.05$).

آسیب‌شناسی بافت‌های کلیه و روده در بچه ماهی ازون برون در جدول ۵ ارائه شده است.

جدول ۵: عوارض بافتی کلیه بچه ماهی ازون برون (*Acipenser stellatus*) در سطوح مختلف شوری و نصف (۵۰٪) غلظت کشنده (LC50 96h) آمونیاک (سال ۱۳۹۹).

آسیب بافت کلیه	تیمار							
	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸
تخریب سلول‌های توبول	+	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++
تحلیل هسته سلول	+	++	++	+++	+	++	++	+++
پیکنوز هسته سلول	+	++	++	++	+	++	++	+++
کاریورکسی (تجزیه) هسته سلول	+	++	++	++	+	++	++	+++
نکروز سلول‌های اپیتلیال توبول	+	++	++	+++	++	++	+++	+++
دژنراسانس واکوئلی	+	-	-	-	-	-	-	-
انسداد لومن لوله کلیوی	+	+	+	+	+	+	+	+
آتروفی لوله‌های کلیوی	-	-	+	+	++	++	++	+++
نکروز در بافت بینابینی خون‌ساز	+	+	+	+	++	++	++	++
نکروز سلول‌های کپسول بومن	-	-	+	+	++	++	+++	+++
نکروز در گلومرول	-	-	-	+	+++	++	+++	+++
بزرگ شدن فضای بومن	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++
خونریزی	+	+	+	+	++	++	++	++

* - بدون آسیب بافتی؛ + کمتر از ۲۵٪؛ ++ کمتر از ۷۵٪؛ +++ بیش از ۷۵٪.

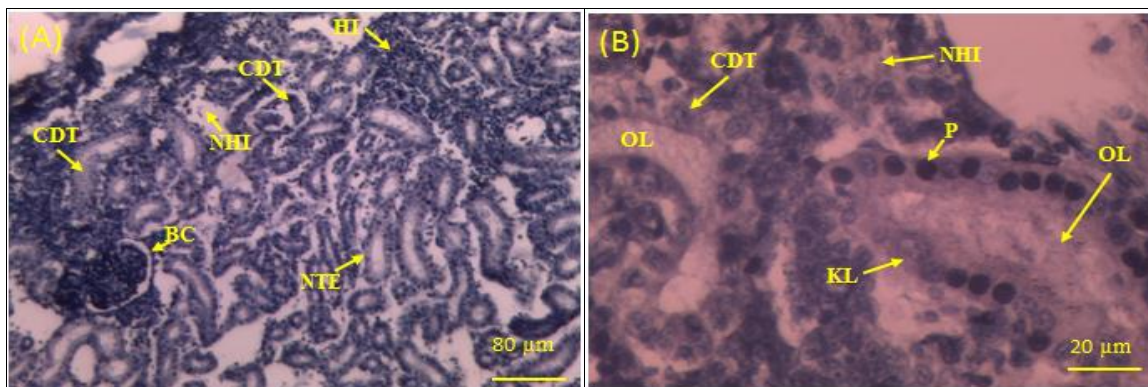
در جدول ۶ عوارض بافتی روده بچه ماهی ازون برون آورده شده است. جدول ۵ مشاهدات آسیب‌شناسی بافت کلیه تیمارهای مختلف را در بچه ماهی ازون برون به‌طور خلاصه نشان می‌دهد. بر اساس این جدول شدت آسیب با افزایش شوری و آمونیاک در تیمارهای در تقابل افزایش یافت. در تیمارهای شوری و آمونیاک برخی از تغییرات مانند تخریب سلول‌های توبول، تحلیل هسته سلول، پیکنوز سلول، کاریورکسی (تجزیه) هسته

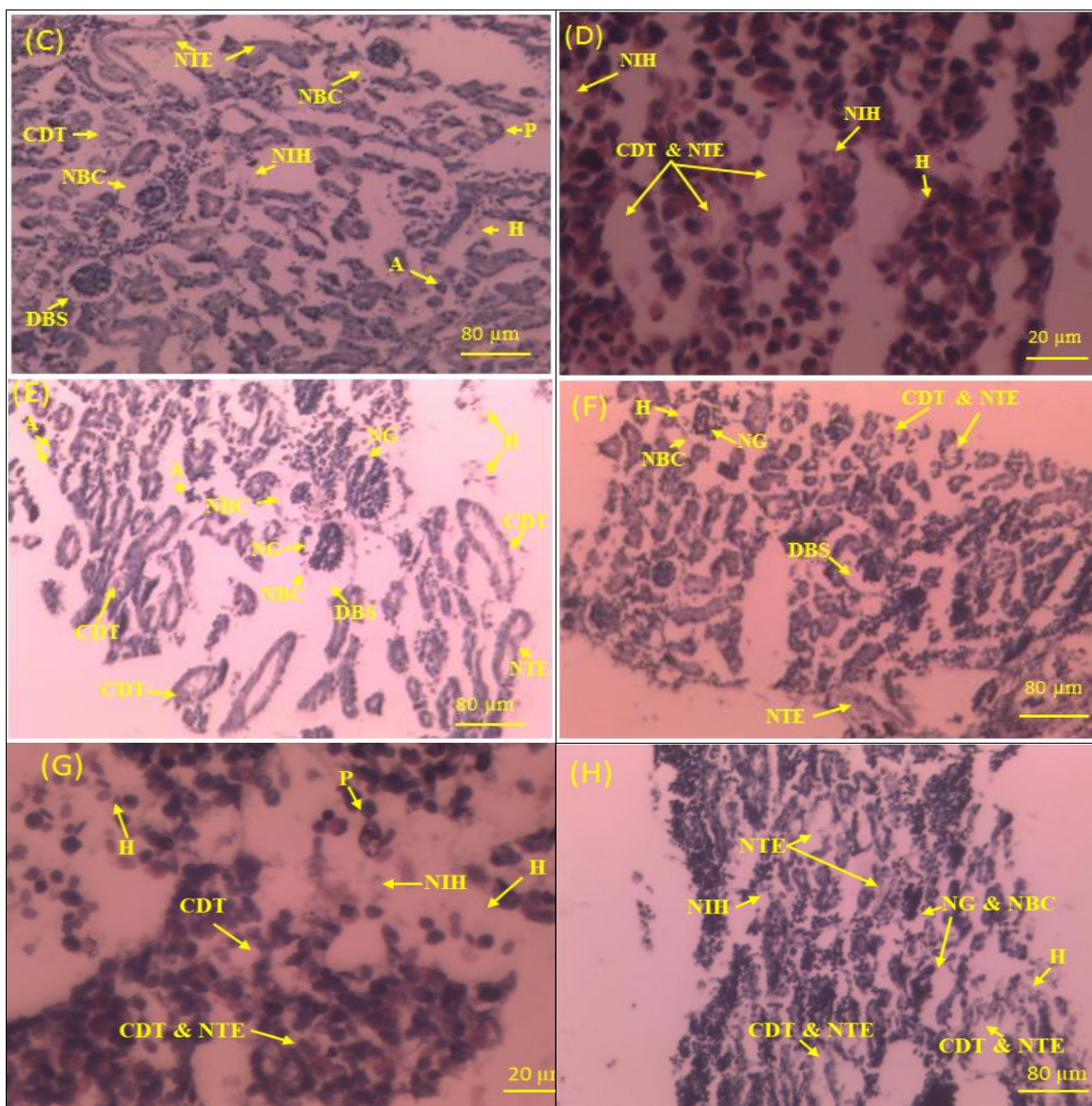
سلول، نکروز سلول‌های اپیتلیال تبول، دژنراسانس واکوئلی، انسداد لومن لوله کلیوی، آتروفی لوله‌های کلیوی، نکروز در بافت بینابینی خون‌ساز، نکروز سلول‌های کپسول بومن، نکروز در گلومرول، بزرگ شدن فضای بومن، خونریزی، بافت خون‌ساز بینابینی، گلبول قرمز خون مشاهده شد (جدول ۵، شکل ۱). جدول ۶ مشاهدات آسیب‌شناسی بافت روده تیمارهای مختلف را در بچه ماهی ازون‌برون به‌طور خلاصه نشان می‌دهد. طبق این جدول شدت آسیب‌هایی وارده بر بافت روده در تیمارهای تقابل بیشتر مشاهده شد. در تیمارهای شوری و آمونیاک برخی از تغییرات مانند از بین رفتن سلول‌های اپیتلیال استوانه‌ای پرز روده، تغییر شکل سلول‌های اپیتلیال استوانه‌ای پرز روده، تغییر شکل در لامینا پروپریا، از بین رفتن ریزپرزها، به هم چسبیدگی یا جوش خوردن پرزهای روده، تخریب در لایه زیر مخاط، نکروز سلولی ناحیه عضلانی، آسیب لایه سروز، هایپرترفی سلول‌های جامی، صاف شدن سطح پرز روده مشاهده شد (شکل ۱). نتیجه نشان داد که شدت تغییرات و آسیب‌های بافت روده و کلیه در تیمارهای در معرض شوری بدون آمونیاک با افزایش شوری افزایش یافت. ولی شدت این تغییرات و آسیب‌ها در تیمارهای در معرض آمونیاک خیلی بیشتر از تیمارهای کنترل (شوری بدون آمونیاک) بود (شکل ۱ و ۲، جدول ۵ و ۶).

جدول ۶: عوارض بافتی روده بچه ماهی ازون‌برون (*Acipenser stellatus*) در سطوح مختلف شوری و نصف (۵۰٪) غلظت کشنده (LC50 96h) آمونیاک (سال ۱۳۹۹).

تیمار								آسیب بافت روده
۸	۷	۶	۵	۴	۳	۲	۱	
+++	++	++	+	+	+	+	+	از بین رفتن سلول‌های اپیتلیال استوانه‌ای پرز روده
+++	++	-	+	++	+	+	+	تغییر شکل سلول‌های اپیتلیال استوانه‌ای پرز روده
+++	+++	+++	++	++	+	+	+	تغییر شکل در لامینا پروپریا
+++	-	++	+	+	+	+	+	از بین رفتن ریزپرزها
-	-	-	+++	+	+++	+++	++	به هم چسبیدگی یا جوش خوردن پرزهای روده
+++	+++	+++	+	++	-	+	++	تخریب در لایه زیر مخاط
+	+++	+	+	++	+	+	+	نکروز سلولی ناحیه عضلانی
-	+++	+	+	+	+	+	++	آسیب لایه سروز
+++	-	-	-	-	-	-	-	آسیب لایه سروز
-	-	-	+	+	-	-	-	هایپرترفی سلول‌های جامی

*:- بدون آسیب بافتی؛ +: کمتر از ۲۵٪؛ ++: کمتر از ۷۵٪؛ +++: بیش از ۷۵٪.

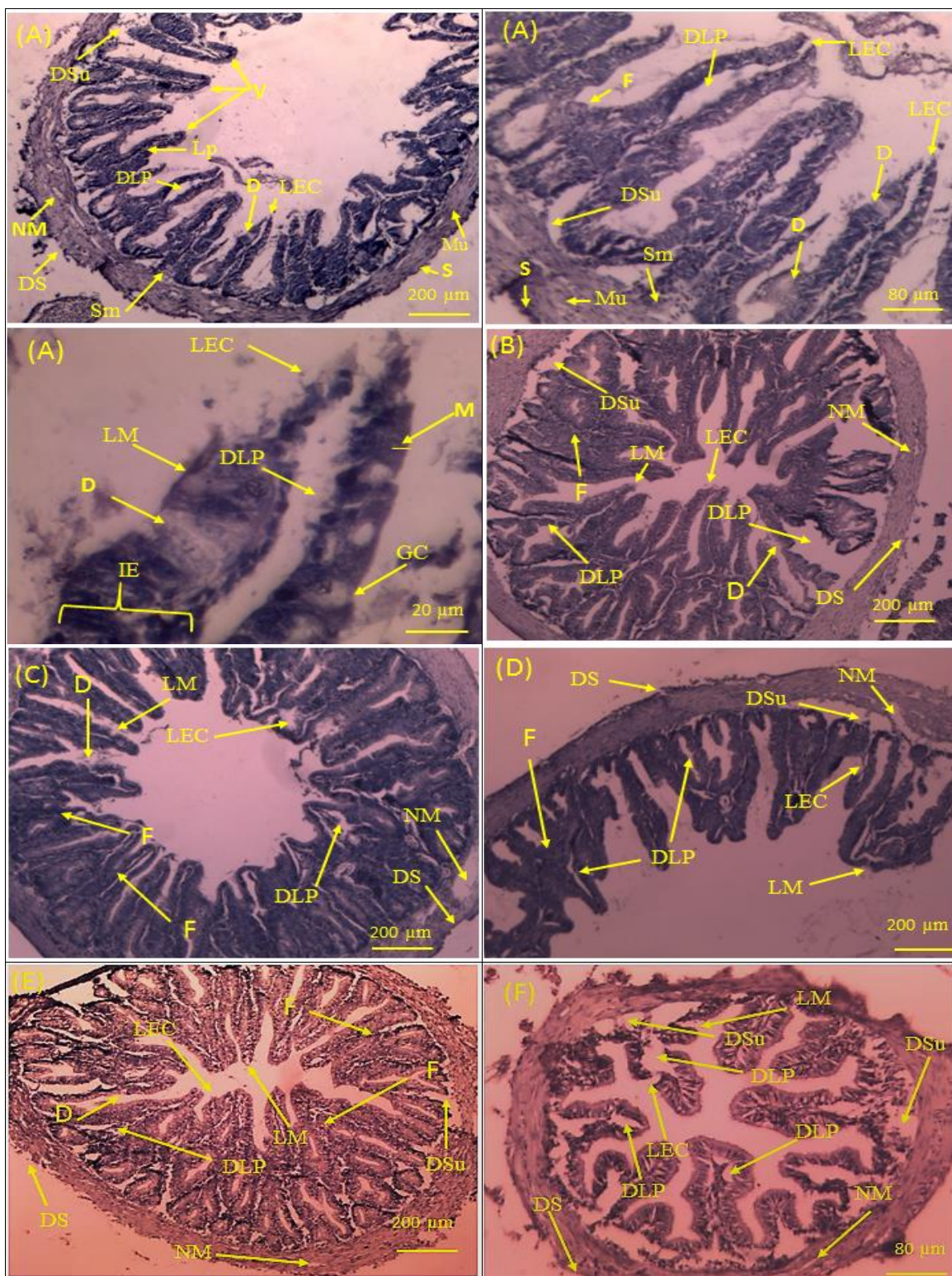


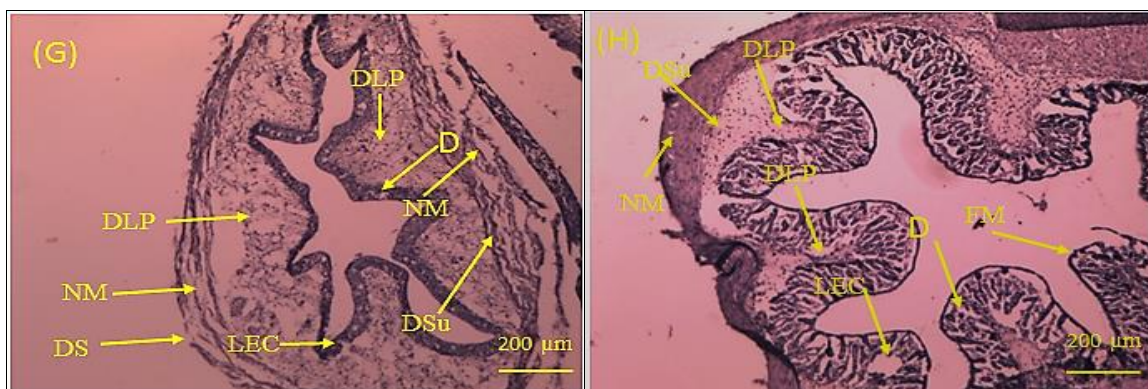


شکل ۱: تصویر میکروسکوپی از مقطع بافت کلیه اوزون‌برون (*Acipenser stellatus*) در سطوح مختلف شوری و نصف (۵۰ درصد) LC50- 96h آمونیاک.

(VD) تخریب سلول‌های توبول، (KI) تحلیل هسته سلول، (P) پیکنوز سلول، (Kr) کارپورکسی (تجزیه) هسته سلول، (NTE) نکروز سلول‌های اپیتلیال توبول، (A) آنروفی لوله کلیوی، (OL) انسداد لومن لوله کلیوی، (NHI) نکروز در بافت بینابینی خون‌ساز، (NBC) نکروز سلول‌های کپسول بومن، (NG) دژنراسی واکوتلی، (H) خونریزی، (HI) بافت خون‌ساز بینابینی، (RBC) گلبول قرمز خون. A.H&E: تیمار ۱، B: تیمار ۲، C: تیمار ۳، D: تیمار ۴، E: تیمار ۵، F: تیمار ۶، (G): تیمار ۷ و H: تیمار ۸ (سال ۱۳۹۹، ایستگاه تحقیقات تاس ماهیان گیلان (چابکسر)).

در شکل ۲ تصویر میکروسکوپی از مقطع بافت روده اوزون‌برون در سطوح مختلف شوری و نصف (۵۰ درصد) LC50 96h آمونیاک آورده شده است.





شکل ۲: تصویر میکروسکوپی از مقطع بافت روده اوزون‌برون (*Acipenser stellatus*) در سطوح مختلف شوری و نصف (۵۰ درصد) LC50 96h آمونیاک (سال ۱۳۹۹، ایستگاه تحقیقات تاس ماهیان گیلان (چابکسر)).

(S) لایه سروزی، (Mu) لایه عضلانی، (Sm) لایه زیر مخاطی، (V) پرز روده، (Lp) لامینا پروپریا، (IE) لایه اپیتلیوم یک پرز روده شامل سلول اپیتلیال استوانه‌ای، (GC) سلول جامی، (M) ریزپرز یا حاشیه مسواکی پرز روده، (LEC) از بین رفتن سلول‌های اپیتلیال استوانه‌ای پرز روده، (D) تغییر شکل سلول‌های اپیتلیال استوانه‌ای پرز روده، (DLP) تغییر شکل در لامینا پروپریا، (LM) از بین رفتن ریزپرزها، (F) به هم چسبیدگی یا جوش خوردن پرزهای روده، (DSu) تخریب در لایه زیر مخاط، (NM) نکروز سلولی ناحیه عضلانی، (DS) آسیب لایه سروزی، (HG) هایپرترفی سلول‌های جامی، (FM) صاف شدن سطح پرز روده. A.H&E: تیمار ۱، B: تیمار ۲، C: تیمار ۳، D: تیمار ۴، E: تیمار ۵، F: تیمار ۶، G: تیمار ۷ و H: تیمار ۸

بحث و نتیجه‌گیری

غلظت کشنده متوسط (LC50-96h) سطحی از فعالیت شیمیایی آبی در محیط است که باعث مرگ ۵۰ درصد در جمعیت در معرض قرار می‌شود (Boudou and Ribeyre, 1997). یافته‌ها نشان داد که با افزایش غلظت شوری و آمونیاک، تحمل بچه ماهیان خاویاری افزایش و سمیت آمونیاک کاهش یافت. مشابه نتایج ما در ماهی *Rachycentron canadum* (Barbieri and Doi, 2012)، *Sparus aurata* (Kir and Sunar, 2018) و *Dicentrarchus labrax* (Kir et al., 2019) گزارش شده است.

میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی به فرا سنج‌های مختلفی مانند ویژگی‌های ذاتی آنزیم، میزان تولید ترشح آن وابسته است (Yan et al., 1996). آلاینده‌ها به احتمال زیاد از طریق تعامل مستقیم یا غیرمستقیم با پروتئین‌ها میزان فعالیت آنزیم‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهند. علاوه بر اثر مستقیم بر ویژگی‌های هیدرولیتیک آنزیم‌ها، ممکن است به صورت غیرمستقیم و با اثرات سمی خود بر ساخت و یا مکانیسم ترشح آن‌ها و سرانجام فعالیت زیستی آن‌ها تأثیر بگذارند. همچنین ممکن است منجر به مرگ سلولی بافت گوارشی گردند (Prabhu and Poulouse, 2012). نتیجه این تحقیق نشان داد که در تیمارهای بدون آمونیاک با افزایش شوری فعالیت آنزیم‌های گوارشی به شدت مهار شد. از طرفی فعالیت آمیلاز و پروتئاز در ابتدا با افزایش مقادیر آمونیاک و شوری کاهش و مجدد در آخرین تیمار (تیمار ۸: شوری ۱۲ + نصف (۵۰ درصد) غلظت کشندگی LC50 96h) آمونیاک؛ ۵/۱۱ میلی گرم در لیتر) که بالاترین سطح شوری و آمونیاک را داشت افزایش یافت. کاهش آنزیم‌های گوارشی در ابتدا ممکن است به دلیل استرس اکسیداتیو ناشی از قرار گرفتن در معرض آمونیاک باشد که یکپارچگی پرزهای روده را مختل کرده و باعث التهاب روده می‌شود (Ip and Chew, 2010). علت افزایش پروتئاز و آمیلاز در تیمار آخر می‌تواند اثر hormesis سمیت آمونیاک در روده ماهی باشد (Schram et al., 2010). همچنین از دیگر علت‌های افزایش این آنزیم‌ها در روده ممکن است برای جبران انرژی مصرفی مورد نیاز در زمان استرس محیطی مورد استفاده قرار گرفته تا نیاز انرژی ناشی از متابولیسم استرس را برآورده سازد (Shenping Cao et al., 2021) فعالیت لیپاز که وظیفه اصلی آن هضم چربی‌ها و لیپیدها به منظور حفظ عملکرد سالم کیسه صفرا است با افزایش شوری و آمونیاک کاهش معنی‌داری را نشان

داد ($P > 0.05$). این ممکن است نشان دهد که قرار گرفتن در معرض طولانی‌مدت آمونیاک ممکن است بر جذب کربوهیدرات‌ها در بچه ماهیان ازون‌برون تأثیر گذاشته باشد. آنزیم‌های گوارشی نقش مهمی در مقاومت در برابر سمیت آمونیاک در ماهی دارند که می‌توانند از طریق تنظیم فعالیت پروتئین یا فراوانی، استرس را خنثی کنند (Zhang et al., 2011؛ Xu et al., 2011). تحقیقات نشان داده است که استرس آمونیاک می‌تواند بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی در *Scortum barcoo* (Zhang et al., 2011)، در *Ctenopharyngodon idella* (Cao et al., 2021)، خرچنگ *Portunus trituberculatus* (Xu et al., 2011)، *Corbicula fluminea* (Zhang et al., 2020) و *Rhynchocypris lagowski* (Yu et al., 2020) تأثیر بگذارد. Chunming و همکاران (۲۰۱۹) گزارش کردند که استرس آمونیاک NH_4^+-N بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی *Babylonia areolate* تأثیر معنی‌دار دارد.

کلیه یکی از ارگان‌های اصلی اثرات سمی است. در این تحقیق در کلیه ماهیان ازون‌برون در شوری و آمونیاک اثرات سویی از لحاظ هیستوپاتولوژیکی داشتند. به‌طوری‌که تخریب سلول‌های توبول، تحلیل هسته سلول، نکروز در گلومرول و بزرگ شدن فضای بومن از جمله موارد شایع بود. ضمن اینکه در تیمار ۸ هم‌زمان با افزایش شوری و وجود آمونیاک این موارد شدیدتر بود. به‌طوری‌که چنین تغییرات هیستوپاتولوژیکی در کلیه در ماهی سر قهوه‌ای (*Channa punctatus*) ناشی از سطوح مزمن غیر کشنده آمونیاک مشاهده شده است (Banerjee and Bhattacharya, 1995). بنی‌هاشمی و همکاران (۱۳۹۲) نیز در کلیه ماهی ازون‌برون تحت تأثیر غلظت نیمه کشندگی آمونیاک در آب شیرین، عوارضی چون پرخونی، دژنراسان بافت بینابینی، نکروز سلولی، اتساع فضای بومن، هموسیدرین در تیمارها مشاهده کردند. در ماهی کلمه خزری (*Rutilus caspicus*) در مواجهه کوتاه‌مدت با غلظت‌های کشنده آمونیاک غیر یونیزه نکروز گسترده در توبول‌های کلیوی مشاهده شد (مازندرانی و همکاران، ۱۳۹۵). Rodrigues و همکاران (۲۰۱۴) به این نتیجه رسیدند که اثرات هیستوپاتولوژیک غلظت‌های مختلف آمونیاک غیر یونیزه ($NH_3 - N$) و TA-N در ۹۶ ساعت در کلیه‌ها در دلقک ماهی (*Premnas biaculeatus*) با افزایش غلظت آمونیاک شدیدتر بودند، به‌طوری‌که کلیه‌های ماهی‌هایی که در معرض غلظت‌های مساوی یا بالاتر از ۲۰ میلی‌گرم در لیتر $NH_3 - N$ قرار داشتند، سینوزوئیدهای بزرگ‌شده و در همان غلظت آمونیاک، هایپرمی و ورم لوله‌ای و آسیب غشای پایه در لکه رتیکولین، نکروز لوله‌ای تولیدشده توسط ادم مشاهده شد. آنچه مسلم است این که کلیه به‌عنوان اصلی‌ترین اندام دفعی در محیط‌های متفاوت آب شیرین و شور تحت تأثیر عوامل آلاینده منجمله آمونیاک قرار می‌گیرد. روده نقش مهمی در جذب و متابولیسم بسیاری از آلاینده‌ها دارد (Yuen et al., 2010). طبق نتایج ما بیشترین تخریب بافت روده ماهی ازون‌برون در تیمارهای ۷ و ۸ دیده شد. نتایج نشان داد که شوری به‌تنهایی اثرات کمی روی بافت داشت، اما با افزایش شوری و توام با آمونیاک عوارض هیستوپاتولوژیک مختلف مانند تخریب در لایه زیر مخاط، صاف شدن سطح پرز روده، تغییر شکل در لامینا پروپریا و از بین رفتن سلول‌های اپیتلیال استوانه‌ای پرز روده بیشتر مشاهده شد. مشابه این نتایج در روده ماهی *Channa punctatus* (Banerjee and Bhattacharya, 1995)، صدف آسیایی (*Corbicula fluminea*) (Zhang et al., 2021)، *Ctenopharyngodon idellus* (Peng et al., 2020) و تحت تأثیر آمونیاک گزارش شده است. همچنین مطالعه دیگری نشان داد که قرار گرفتن میگوهای سفید (*Litopenaeus vannamei*) در معرض آمونیاک موجب آسیب به بافت مخاط روده می‌شود. به‌طوری‌که باعث شد اپی‌تلیوم از غشای پایه برداشته و به هم چسبیده شود. همچنین بیشتر سلول‌های اپیتلیال نکروزه گردند (Duan et al., 2018). همه این بررسی‌ها تأکید می‌کنند که آمونیاک در مقادیر بالا و در درازمدت موجب آسیب بافت روده آبزیان می‌شود.

در پایان این بخش از آزمایش (۹۶ ساعت قرار گرفتن در معرض)، هیچ مرگی در تیمارهای مختلف رخ نداد. نتایج نشان داد که با افزایش شوری، غلظت آمونیاک نیز افزایش یافت؛ بنابراین نشان داد که تحمل ماهی در برابر افزایش غلظت آمونیاک افزایش یافته است. با افزایش شوری، حساسیت ماهی به سمیت آمونیاک کاهش یافت. آمونیاک در غلظت‌های بالا باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های گوارشی در بافت روده و اثرات مخرب بر روی کلیه شد و در بافت‌های روده هم بیشترین آسیب در شوری ۱۲ گرم در لیتر و ترکیب با آمونیاک مشاهده شد. در نتیجه، اگرچه سمیت

آمونیاک در بچه ماهیان ازون برون (*A. stellatus*) با افزایش شوری کاهش یافت، اما آسیب‌های بافتی (کلیه و روده)، تغییرات در فعالیت آنزیم‌ها گوارشی مشاهده شد. همچنین با توجه به غلظت آمونیاک در شوری‌های مختلف در این مطالعه، این امکان را فراهم می‌آورد که پرورش‌دهندگان ماهیان خاویاری و سازمان تحقیقات شیلات ایران (IFRO) می‌توان از نتایج این مطالعه برای بهبود پرورش و انتخاب بهترین نقطه برای رهاسازی (دریا و رودخانه) جهت بازسازی و احیای جمعیت وحشی بچه ماهیان ازون برون (*A. stellatus*) استفاده نمایند.

سپاسگزاری

از ریاست محترم موسسه تحقیقات بین‌المللی تاس ماهیان دریای خزر، ریاست محترم ایستگاه تحقیقات تاس ماهیان گیلان، ریاست محترم پژوهشگاه آبی‌پروری آب‌های داخلی (بندر انزلی) و همچنین کارشناسان آن مجموعه کمال تشکر را داریم.

منابع

- بنی هاشمی، ا.، خارا، ح.، پژند، ذ. و رهانده، م.، ۱۳۹۲. اثرات هیستوپاتولوژیکی آمونیاک در آبشش، کبد و کلیه بچه تاس ماهی ایرانی *Acipenser persicus*. مقایسه‌ای ایران، ۱۰ (۳ (۴۲)): صفحات ۹۹۲-۹۸۳.
- رهبر، م.، ستاری، م.، علاف نویریان، ح.، احمدنژاد، م.، خارا، ح. و صفری، ر.، ۲۰۱۹. اثر سم مالاتیون بر فعالیت برخی از آنزیم‌های گوارشی و آسیب‌شناسی بافت روده در بچه تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus* Borodin, 1987). فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان، جلد ۷ (۲): صفحات ۱۲۸-۱۰۷.
- مازندرانی، م.، سوداگر، م. و کلنگی میاندره، ح.، ۱۳۹۵. مواجهه کوتاه‌مدت با غلظت‌های کشنده (سطوح بالا) آمونیاک غیریونیزه در ماهی کلمه خزری (*Rutilus caspicus*). توسعه آبی‌پروری، ۱۰ (۲): صفحات ۱۲۶-۱۱۹.
- Agusa, T., Kunito, T., Tanabe, S., Pourkazemi, M. and Aubrey, D. G., 2004. Concentrations of trace elements in muscle of sturgeons in the Caspian Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 49: 789-800.
- Banerjee, S. and Bhattacharya, S., 1995. Histopathological changes induced by chronic nonlethal levels of elsan, mercury, and ammonia in the small intestine of *Channa punctatus* (Bloch). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 31: 62-68.
- Barbieri, E. and Doi, S., 2011. Acute toxicity of ammonia on juvenile cobia (*Rachycentron canadum*, Linnaeus, 1766) according to the salinity. *Aquaculture International*, 20: 373-382. 10.1007/s10499-011-9467-3.
- Bernfeld, P., 1955. Amylases α and β . P: 149-157. In: Colowick P. and Kaplan N.O. (Eds.). *Methods in Enzymology*, Vol. 1. Academic Press, USA.
- Boudou, A. and Ribeyre, F., 1997. Aquatic ecotoxicology: from the ecosystem to the cellular and molecular levels. *Environmental health perspectives*, 105(1): 21-35.
- Bradford, M. 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.
- Cao, S., Zhao, D., Huang, R., Xiao, Y., Xu, W., Liu, X., Gui, Y., Li, S., Xu, J., Tang, J. and Qu, F., 2021. The influence of acute ammonia stress on intestinal oxidative stress, histology, digestive enzymatic activities and PepT1 activity of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Aquaculture Reports*, 20:100722.
- ChunMing, T., Wang, Z., Gang, Y., KaiChang, W., Rui, Y., WeiGeng, Q., Xu, Ch. and Yue, Zh., 2019. Effects of ammonia-N stress on activities of lysozyme and three digestive enzymes of *Babylonia areolata* [J]. *South China Fisheries Science*, 15(3): 120-125.
- Duan, Y., Liu, Q., Wang, Y., Zhang, J. And Xiong, D., 2018. Impairment of the intestine barrier function in *Litopenaeus vannamei* exposed to ammonia and nitrite stress. *Fish and Shellfish Immunology*, 78: 279-288.

- Evans, D. H., 1993.** Ionic and osmotic regulatin. In: Evans, D.H. (ED), the physiology of fish. CRC press, Boca Raton, FL. Pp: 315-341.
- Fanta, E., Rios, F.S., Romao, S., Vianna, A. and Freiburger, S., 2003.** Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54: 119–130.
- Finney, D. J., 1971.** Probit Analysis. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Frias-Espericueta, M. G., Harfush-Melendez, M., Osuna-Lopez, J. I. and Paez-Osuna, F., 1999.** Acute toxicity of ammonia to juvenile shrimp *Penaeus vannamei* Boone. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 62: 646–652.
- Gunes, E. and Yerli, S. V., 2011.** Effects of deltamethrin on lipase activity in guppies (*Poecilia reticulata*) introduction deltamethrin is an insecticide belonging to the pyrethroid family. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 11: 473 –476.
- Harpaz, S., Eshel, A. and Lindner, P., 1994.** Effect of 1-propanol on the activity of intestinal proteolytic enzymes of the European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Agriculture Food Chemistry*, 42: 49–52.
- Iijima, N., Tanaka, S. and Ota, Y., 1998.** Purification and characterization of bile salt-activated lipase from the hepatopancreas of red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 18: 59–69.
- Ip, Y. K. and Chew, S. F., 2010.** Ammonia production, excretion, toxicity, and defense in fish: a review. *Frontiers in physiology*, 1: 134.
- Jeney, G., Nemesok, J., Jeney, Z. and Olah, J., 1992.** Acute effect of sub-lethal ammonia concentrations on common carp (*Cyprinus carpio* L.): II. Effect of ammonia on blood plasma transaminases GOT, GPT, GIDH enzyme activity and ATP value. *Aquaculture*, 104:149–156.
- Kir, M. and Sunar, M. C., 2018.** **Acute Toxicity of Ammonia and Nitrite to Sea Bream, *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758), in Relation to Salinity.** *Journal of the World Aquaculture Society*, 49(3): 516-522.
- Kir, M., Sunar, M. and Gök, M., 2019.** **Acute ammonia toxicity and the interactive effects of ammonia and salinity on the standard metabolism of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*).** *Aquaculture*, 511: 734273.
- Liu, Y., Hu, J., Zhou, Sh., Yang, R., Qin, J., Ma, Zh. and Yang, Q., 2018.** Effect of Acute Ammonia Stress on Antioxidant Enzymes and Digestive Enzymes in Barramundi Lates calcarifer Larvae. *Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh*.
- Marshall, W. S. and Singer, T. D., 2002.** Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in teleost fish. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1566:16– 27.
- Peng, K.S., Wu, N., Cui, Z. W., Zhang, X. Y., Lu, X. B., Wang, Z. X. and Zhang, Y. A., 2020.** Effect of the complete replacement of dietary fish meal by soybean meal on histopathology and immune response of the hindgut in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Veterinary immunology and immunopathology*, 221, 110009.
- Pourkazemi, M. and Aubrey, D. G., 2004.** Concentrations of trace elements in muscle of sturgeons in the Caspian Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 49: 789–800.
- Prabhu, S. and Poulouse, E. K., 2012.** Silver nanoparticles: Mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International Nano Letters*, 2(32): 1–10.
- Rodrigues, R., Romano, L., Schwarz, M., Delbos, B. and Sampaio, L., 2014.** Acute tolerance and histopathological effects of ammonia on juvenile maroon clownfish *Premnas biaculeatus* (Block 1790). *Aquaculture Research*, 45. 10.1111/are.12054.
- Schram, E., Roques, J. A., Abbink, W., Spanings, T., De Vries, P., Bierman, S., van de Vis, H. and Flik, G., 2010.** The impact of elevated water ammonia concentration on physiology, growth and feed intake of African catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquaculture*, 306: 108–115.
- Shenping Cao, S., Cao Dafang Zhao, D., Zhao Rong Huang, R., Huang Yangbo Xiao, Y., Xiao Wenqian Xu, W., Xu Xunxin Liu, X., Liu Yang Gui, Y., Gui Shitao Li, S., Li Jiahui Xu, J., Xu Jianzhou Tang, J., Tang Fufa Qu, F., Qu Zhen Liu, Z. and Liu Shaojun Liu, S., 2021.** The influence of acute ammonia stress on intestinal

oxidative stress, histology, digestive enzymatic activities and PepT1 activity of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Aquaculture reports, 20: 100722.

Soldatov, A. A., 2005. Peculiarities of organization and functioning of the fish red blood system. Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology, 41(3): 272–281.

Speer, L., Lauck, L., Pikitch, E., Boa, S., Dropkin, L. and Spruill, V., 2000. Roe to ruin: the decline of sturgeon in the Caspian Sea and the road to recovery. Available at: <http://www.seaweb.org>. Cited Dec 2000.

Vale, J. A., 1998. Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning. Toxicology Letters, 102-103: 649–652.

Yan, T., Teo, L. H. and Sin, Y. M., 1996. Effects of metals on α -amylase activity in the digestive gland of the green mussel, *Perna viridis* L. Bulletin of environmental contamination and toxicology, 56: 677-682.

Yu, Z., Wu, X. Q., Zheng, L. J., Dai, Z. Y. and Wu, L. F., 2020. Effect of acute exposure to ammonia and BFT alterations on *Rhynchocypris lagowski*: Digestive enzyme, inflammation response, oxidative stress and immunological parameters. Environmental toxicology and pharmacology, 78: 103380.

Yuen Ip, K., Chew, S. F., 2010. Ammonia production, excretion, toxicity, and defense in fish: a review. Front Physiol, 4: 1,134.

Zhang, L. G., An, L., Sun, D. and Fu, P. S., 2011. Effects of salinity on digestive enzyme activities of juvenile Jade Perch *Scortum barcoo*. Chinese Journal of Fisheries, 24: 21-24.

Zhang, T., Yan, Z., Zheng, X., Wang, S., Fan, J. and Liu, Z., 2020. Effects of acute ammonia toxicity on oxidative stress, DNA damage and apoptosis in digestive gland and gill of Asian clam (*Corbicula fluminea*). Fish & Shellfish Immunology, 99: 514-525.

Zhang, T., Zhang, Y., Xu, J., Yan, Z., Sun, Q., Huang, Y., Wang, S., Li, S. and Sun, B., 2021. Toxic effects of ammonia on the intestine of the Asian clam (*Corbicula fluminea*). Environol Pollution, 15:287:117617.