

## مواجهه کوتاه مدت با غلظت‌های کشنده (سطوح بالا) آمونیاک غیر یونیزه در ماهی کلمه خزری *Rutilus caspicus*

محمد مازندرانی\*<sup>۱</sup>، محمد سوداگر<sup>۱</sup>، حامد کلنگی میاندره<sup>۱</sup>

۱- گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران، صندوق پستی: ۳۸۶

تاریخ دریافت: ۱ دی ۱۳۹۴

تاریخ پذیرش: ۴ اردیبهشت ۱۳۹۵

### چکیده

با توجه به اینکه اطلاعات دقیقی در رابطه با میزان حساسیت ماهی کلمه خزری (*Rutilus caspicus*) نسبت به آمونیاک محیط در دست نبود در این بررسی میزان کشندگی و علائم کلینیکی ماهی کلمه در مواجهه حاد با آمونیاک غیر یونیزه مورد مطالعه قرار گرفت. به این منظور تعداد ۱۸۰ بچه ماهی کلمه با میانگین وزنی  $1 \pm 6/5$  گرم مورد مطالعه قرار گرفت. ماهیان در ۱۸ آکواریوم تقسیم شده (۱۰ ماهی در هر آکواریوم) و به منظور سازگاری با شرایط دو هفته مورد پرورش قرار گرفتند. پس از آداپتاسیون ماهیان به ۵ گروه تیمار و یک گروه شاهد با سه تکرار برای هر گروه تقسیم شدند. ماهیان گروه تیمار با غلظت‌های ۲/۵، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک کل، معادل ۰/۳۴، ۰/۶۶، ۱/۳۲، ۱/۹۸ و ۲/۶۶ (میلی‌گرم در لیتر) آمونیاک مولکولی مورد مواجهه قرار گرفتند. ماهیان گروه شاهد نیز با آمونیاک مواجهه داده نشدند. بر اساس نتایج میزان دوز کشندگی میانه ( $LC_{50}$ ) برای ۹۶ ساعت در بچه ماهیان معادل ۱/۶۲ (میلی‌گرم در لیتر) محاسبه گردید. در این بررسی، پرخونی در بافت کلیه‌ها و خونریزی در قاعده چشم‌ها در ماهیان گروه تیمار از عمده‌ترین علائم کلینیکی بود. در بررسی بافت شناسی پرخونی کبد، ادم و جدا شدگی اپیتلوم لاملاهای ثانویه در بافت آبشش و نکروز گسترده در توبول‌های کلیوی از عمده‌ترین علائم در گروه تیمار بود. در گروه شاهد در طی آزمایش هیچ گونه تلفات و علائم غیر طبیعی بافت‌شناسی و کلینیکی ثبت نگردید. بر اساس نتایج تحقیق حاضر حداکثر غلظت تحت کشنده آمونیاک غیر یونیزه در محیط پرورش بچه ماهیان کلمه خزری ۰/۱۶۲ میلی‌گرم در لیتر تعیین گردید.

**کلمات کلیدی:** آمونیاک، کلمه خزری، تغییرات بافت شناسی،  $LC_{50}$ .

\* عهده‌دار مکاتبات (✉)، mazandarani@gau.ac.ir

## مقدمه

ماهی کلمه خزری (*Rutilus caspicus*) از جمله ماهیان با ارزش دریای خزر محسوب می شود که در بین مصرف کنندگان از مقبولیت بالایی برخوردار است. متأسفانه در سالهای اخیر صید این ماهیان از دریا به شدت کاهش یافته است. به همین دلیل سالیانه میلیون‌ها بچه ماهی کلمه به منظور بازسازی ذخایر این ماهیان با ارزش توسط سازمان شیلات ایران تولید شده و پس از پرورش در استخرهای خاکی و رسیدن به وزن انگشت‌قد به دریا رهاسازی می گردد. اما ظاهراً به دلایل مختلف این بازسازی نیز روند کاهش صید را جبران نکرده است. به دلیل مقبولیت بالای این ماهی در بین مصرف کنندگان، در سالهای اخیر پرورش بازاری این ماهی در استخرهای خاکی نیز مورد توجه و بررسی قرار گرفته است (پیری و همکاران، ۱۳۹۲). در ایران بدلیل کم آبی، در استخرهای خاکی پرورش در رابطه با ماهیان گرمابی، تعویض آب بسیار اندکی صورت می گیرد، که در چنین محیط‌هایی یکی از عوامل آسیب‌رسان و بازدارنده رشد افزایش آمونیاک در محیط پرورش است (El-Shafai *et al.*, 2004; Siikavuopio *et al.*, 2004). به‌طور کلی در مزارعی که تعویض آب صورت نمی‌گیرد و نیز در مزارع پرورش متراکم ماهیان عمدتاً افزایش آمونیاک محیط محصول نهایی کاتابولیسم پروتئین‌هایی است که توسط میکروارگانیسم‌ها و ماهیان مصرف می‌شوند (Heisler, 1997; Wilkie, 1990). معمولاً در چنین شرایطی افزایش آمونیاک محیط امری اجتناب‌ناپذیر است زیرا تجمع آمونیاک ناشی از کاتابولیسم پروتئین در این محیط‌ها بسیار بالا است (Guan *et al.*, 2010; Person- Le Ruyet *et al.*, 1997). از طرفی افزایش

آمونیاک مولکولی در محیط پرورش می‌تواند بر روی عملکرد رشد و تولید مثل ماهی بسته به میزان حساسیت ماهی و شرایط محیطی تاثیرگذار بوده و در نهایت منجر به مسمومیت شود، که در این راستا حساسیت ماهیان نسبت به آمونیاک بسته به گونه ماهی، سن و شرایط محیطی بسیار متفاوت گزارش شده است (Guan *et al.*, 2010; Karasu Benlu and Koksali, 2005; Hued *et al.*, 2006; Peyghan and Azary Takamy, 2002). در ایران نیز این رابطه در ماهیان پرورشی مطالعاتی صورت گرفته است که از آن جمله می‌توان به بررسی مسمومیت آمونیاکی در تاسماهی ایرانی (بنی‌هاشمی و همکاران ۱۳۹۲) و کپور معمولی (ناجی و همکاران، ۱۳۸۸) در کشور اشاره نمود. اما در رابطه با میزان حساسیت کلمه خزری نسبت به آمونیاک مطالعات بسیار ناچیز است. برای مدیریت بهتر پرورش یکی از فاکتورهای مهم اطلاع داشتن از میزان حساسیت گونه مورد پرورش نسبت به شرایط فیزیکوشیمیایی است. لذا با توجه به نبودن اطلاعات کافی در رابطه با میزان حساسیت ماهی کلمه به آمونیاک مولکولی و نیز با توجه به رویکرد و استقبال از پرورش این ماهیان در استخرهای خاکی و احتمال افزایش تجمع آمونیاک در محیط‌های پرورش در شرایط ایران، در این مطالعه میزان حساسیت این ماهیان به آمونیاک مولکولی مورد بررسی قرار گرفته است.

## مواد و روش‌ها

### آدپتاسیون و پرورش ماهیان

به منظور انجام آزمایش تعداد ۱۸۰ بچه ماهی کلمه با میانگین وزنی  $1 \pm 0.6/5$  گرمی از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید مرجانی واقع در استان

تکرار بر اساس دستورالعمل (2006) O.E.C.D بصور ساکن (استاتیک) در نظر گرفته شد. به این منظور ماهیان به ۱۸ آکواریوم با ابعاد  $30 \times 50$  سانتی‌متر با ارتفاع آبگیری ۴۰ سانتی‌متر با تراکم ۱۰ عدد ماهی (در هر آکواریوم) منتقل شدند و به مدت ۲ هفته (به منظور سازگار شدن با شرایط محیط) مورد پرورش قرار گرفتند. سپس ماهیان گروه تیمار در معرض دوزهای مختلف آمونیاک با غلظت‌های ۲/۵، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ (میلی‌گرم در لیتر) آمونیاک کل قرار گرفتند. که میزان آمونیاک مولکولی در این بررسی به ترتیب ۰/۳۴، ۰/۶۶، ۱/۳۲، ۱/۹۸ و ۲/۶۶ (میلی‌گرم در لیتر) محاسبه گردید. در ماهیان گروه شاهد هیچ‌گونه مواجهه با آمونیاک صورت نگرفت. در طی دوره آزمایش میزان مرگ و میر ماهیان هر ۶ ساعت ثبت گردیده و در نهایت غلظت کشنده میانه ( $LC_{50}$ ) برای ۹۶ ساعت مواجهه محاسبه شد.

## ثبت علائم بالینی و بررسی‌های

### بافت‌شناسی

جهت ثبت علائم بالینی و کلینیکی در طی دوره آزمایش ماهیان بصورت روزانه پایش شده و تلفات و علائم کلینیکی و رفتارشناسی ماهیان ثبت گردید. در عین حال از ماهیان تازه تلف شده بلافاصله نمونه‌برداری شد، محوطه شکمی ماهیان باز شده و علائم کلینیکی غیر طبیعی در محوطه بطنی ثبت گردید. به منظور بررسی بافت‌شناسی از بافت‌های آبشش، کلیه و کبد ماهیان در حال مرگ و یا تازه تلف شده نمونه‌برداری صورت پذیرفت. نمونه‌ها در فرمالین ۱۰٪ فیکس شده و پس از ۱۲ ساعت فرمالین نمونه‌ها مجدداً تعویض گردید. نمونه‌های بافتی در پروسسور

گلستان تهیه و توسط کیسه‌های پلاستیکی حاوی اکسیژن به محل انجام آزمایش منتقل گردید.

پس از انتقال ماهیان به محل آزمایش، ماهیان به تانک‌های ونیرو با ابعاد  $1/5 \times 1/5$  متر با ارتفاع آب ۴۰ سانتی‌متر منتقل شدند. و تا زمان تیمار بندی به منظور انجام آزمایش مورد پرورش قرار گرفتند. ماهیان در این شرایط به مدت ۲ هفته با غذای تجاری بیومار (BioMar - France) مورد پرورش قرار گرفتند. غذادهی به میزان ۳ در صد بیوماس ماهیان و دوبار در روز صورت گرفت. در طی دوره آزمایش دمای آب پرورش  $1 \pm 26$  درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول  $1 \pm 6/2$  (میلی‌گرم در لیتر) و سختی کل  $3 \pm 271$  (میلی‌گرم در لیتر) ثبت گردید.

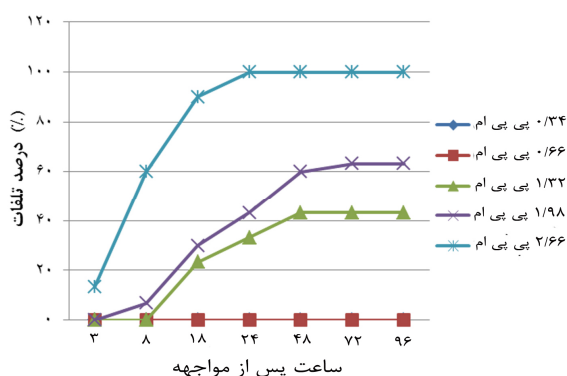
## آماده‌سازی آمونیاک

به منظور مواجهه با آمونیاک از محلول کلرید آمونیوم ( $NH_4Cl$ ) محصول شرکت Merk co, Germany استفاده گردید. پس از اضافه نمودن آمونیاک به آب دما و pH در شرایط ثابت ثبت گردید به منظور کنترل pH از محلول KOH یک دهم نرمال استفاده شد و pH در حد ۸/۴ ثابت گردید. محلول آمونیاک مورد نیاز برای هر تیمار بصورت روزانه آماده و تعویض گردید، و با در نظر گرفتن دما و pH بر اساس جدول استاندارد میزان آمونیاک یونیزه شده و آمونیاک مولکولی بر اساس روش توضیح داده شده توسط Emerson و همکاران (۱۹۷۵) محاسبه و تعیین گردید.

## نحوه مواجهه و تعیین غلظت کشنده آمونیاک

به منظور تعیین دوز میانه کشنده آمونیاک ( $LC_{50}$ ) در ماهی کلمه ۵ گروه تیمار و یک گروه شاهد در ۳

میلی گرم در لیتر آمونیاک غیر یونیزه ۸ ساعت پس از مواجهه آغاز گردید و در ۷۲ ساعت پس از مواجهه به ۷۱/۵٪ رسید و تا پایان ۹۶ ساعت پس از مواجهه این درصد تلفات ثابت ماند. در تیمار مواجهه شده با ۲/۶۶ میلی گرم/لیتر آمونیاک ۱۰۰٪ ماهیان در طی ۲۴ ساعت مواجهه تلف شدند. در این بررسی میزان  $LC_{50}$  برای ۹۶ ساعت مواجهه با آمونیاک مولکولی در بچه ماهیان کلمه ۱/۶۲ میلی گرم/لیتر محاسبه گردید.



شکل ۱: درصد تلفات بچه ماهیان کلمه مواجهه شده با سطوح متفاوت آمونیاک مولکولی (۰/۳۴، ۰/۶۶، ۱/۳۲، ۱/۹۸، ۲/۶۶ میلی گرم در لیتر)

### تغییرات رفتاری

ماهیان در تیمار مواجهه شده با تیمار ۲/۶۶ میلی گرم در لیتر آمونیاک مولکولی اولین گروهی بودند که علائم غیرطبیعی از خود نشان دادند به طوری که در ۱ ساعت اول پس از مواجهه حالات عصبی و شنای بی هدف از خود نشان دادند سپس از حرکت ایستاده و در کف آکواریوم ساکن شدند بعد از آن شنای نامتعادل، به پهلو شنا کردن و عدم توانایی در نگه داشتن تعادل در ماهیان مشاهده شد و ۶ ساعت پس از مواجهه علائم تلفات در این گروه آغاز گردید و در طی ۸ ساعت اول پس از مواجهه ۶۱/۹٪ از ماهیان تلف شدند. در سایر تیمارها نیز

بافتی پس از آنگیری در الکل اتانول پارافینه شده، و مقاطع ۵ میکرونی از بافتها تهیه گردید. پس از چسباندن مقاطع بر روی لام از روش استاندارد و معمول هماتوکسیلین و ائوزین برای رنگ آمیزی نمونهها استفاده شد (Roberts, 2012). نمونهها با میکروسکوپ نوری  $\times 1000$  مورد مطالعه قرار گرفتند.

### تجزیه و تحلیل آماری

این آزمون در قالب یک طرح کاملاً تصادفی انجام شد و در پایان جهت آنالیز آماری دادهها جهت مقایسه میانگینها از آزمون دانکن و نرم افزار SPSS18 و Excel استفاده شد و نیز میزان دوز میانه کشنده ( $LC_{50}$ ) با کمک برنامه Probit محاسبه و تعیین گردید.

### نتایج

#### درصد بازماندگی

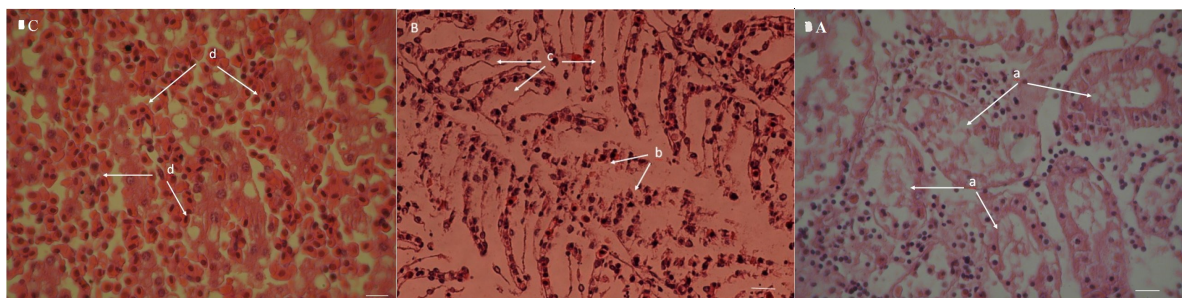
وضعیت تلفات بچه ماهیان کلمه قرار گرفته تحت معرض سطوح متفاوت آمونیاک مولکولی (۰/۳۴، ۰/۶۶، ۱/۳۲، ۱/۹۸، ۲/۶۶ میلی گرم در لیتر) طی ۹۶ ساعت در شکل ۱ نشان داده شده است. در این بررسی هیچ گونه تلفاتی در تیمارهای مواجهه شده با ۰/۳۴ و ۰/۶۶ میلی گرم/لیتر آمونیاک مولکولی در طی ۹۶ ساعت مواجهه مشاهده نگردید. در تیمار مواجهه شده با ۱/۳۲ میلی گرم در لیتر آمونیاک غیر یونیزه ۱۸ ساعت پس از مواجهه ۲۳/۸٪ تلفات ثبت گردید. روند تلفات تا ۴۸ ساعت پس از مواجهه ادامه داشت و به ۴۲/۸٪ رسید و سپس تا پایان ۹۶ ساعت پس از مواجهه میزان تلفات ثابت ماند و هیچ تلفات جدیدی مشاهده نگردید. تلفات در ماهیان تیمار مواجهه شده با ۱/۳۲

شنای عصبی و بی‌قراری در ۵ ساعت اول ثبت گردید. ماهیان دارای شنای معمولی و سریع بوده و تحریک‌پذیر نسبت به محرک‌های خارجی بسیار بالا رفته بودند. در تیمار ۱/۹۸ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک بعد از گذشت ۸ تا ۱۲ ساعت، عدم تعادل و شنای نامنظم به همراه شنای نامتعادل به پهلو شنا کردن در برخی نمونه‌ها ثبت گردید. در تیمار ۴ و ۵ (مواجهه با ۰/۳۴ و ۰/۶۶ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک غیریونیزه) شنای ماهیان کند شده، به کف مخزن متمایل شده و پس از ۲۴ ساعت کاملاً در کف ساکن شدند. بی‌حالی و کف نشینی از علائم عمده پس از ۲۴ ساعت مواجهه بود و تا پایان آزمایش تلفاتی در این تیمارها مشاهده نشد. افزایش سرعت سرپوش آبخشی، تنفس غیرمنظم، بی‌قراری و پرش به بیرون از تغییرات مشاهده شده در ماهیانی بود که با دوز بالا با آمونیاک مواجهه داده شدند (تیمارهای ۱ تا ۳)، که نهایتاً منجر به مرگ می‌گردید.

### بررسی‌های کلینیکی و آسیب‌شناسی بافتی

عمده‌ترین علامت کلینیکی در ماهیان تازه تلف شده خونریزی‌های نقطه‌ای در قاعده پایینی چشم

ماهیان بود (شکل ۳). در تیمار مواجهه داده شده با ۲/۶۶ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک، ماهیانی که در ۸ ساعت اول پس از مواجهه تلف شدند، پر خونی در بافت کلیه‌ها عمده‌ترین علامت قابل مشاهده بود. پس از ۱۲ ساعت این خونریزی‌ها بیشتر و تپیک‌تر گردید (شکل ۳). در ماهیانی که بعد از حدود ۳۰ ساعت پس از مواجهه تلف شدند علائم پر خونی در آبشش و دستگاه گوارش چندان قابل مشاهده نبود. در بررسی میکروسکوپی مقاطع بافتی در ماهیان تلف شده در ۸ ساعت اول پر خونی شدید و ادم خفیف در ناحیه آبشش قابل رویت بود. در نمونه‌هایی بعد از ۲۴ ساعت مواجهه تلف شده بودند ادم و جداشدگی اپیتلیوم شدید تر بود و از پر خونی و احتقان آبشش‌ها کاسته شده بود و در مواردی نیز نکروز لاملاهای ثانویه ثبت گردید (شکل ۲). در بررسی نمونه‌های کبد ماهیان تلف شده علائم عمده شامل پر خونی در سینوزوئیدهای کبدی بود (شکل ۲). در بررسی مقاطع کلیوی نکروز گسترده در توبول‌های کلیوی از علائم تپیک در ماهیان گروه تیمار بود (شکل ۲).



شکل ۲: بررسی میکروسکوپی بافت‌های کلیه، آبشش و کبد در ماهیان گروه تیمار مواجهه شده با دوز حاد آمونیاک مولکولی: (A) نکروز گسترده در توبول‌های کلیوی (a) - (B) نکروز لاملاهای ثانویه در بافت آبشش (b)، جدا شدگی گسترده اپیتلیوم لاملاهای ثانویه (ادم) در بافت آبشش (c) - (C) پر خونی در سینوزوئیدهای کبدی (d)



شکل ۳: بررسی علایم کلینیکی و کالبد گشایی در ماهیان مواجهه شده با آمونیاک مولکولی: عدم مشاهده عارضه غیر طبیعی در گروه شاهد (A)، خونریزی در قاعده چشم‌ها در گروه‌های تیمار (B) و پرخونی در کلیه‌ها (C)

### بحث

آمونیاک محلول در محیط‌های آبی معمولاً به دو صورت یونیزه و غیر یونیزه قابل مشاهده است. آمونیاک غیر یونیزه بدلیل قابلیت نفوذپذیری بیشتر از طریق اپیتلیوم موجودات آبرزی از سمیت بالاتری برخوردار است که در صورت تجمع منجر به مسمومیت در ماهیان خواهد شد ( Shingles, 2001; USEPA, 1999). ماهی کلمه توانایی زیستن در رودخانه‌های آب شیرین و محیط‌های لب شور مانند دریای خزر را دارا است. معمولاً احتمال مواجهه با دوز سمی آمونیاک در دریا بسیار اندک است اما در سیستم پرورش احتمال بالا رفتن آمونیاک در استخرهای پرورش متراکم و بخصوص در محیط‌هایی که تعویض آب کمتری دارند بالا است. یکی از راه‌های بررسی میزان حساسیت ماهیان مختلف نسبت به آمونیاک تعیین دوز کشنده میانه در مواجهه حاد است که در این زمینه بررسی‌های متعددی در ماهیان مختلف صورت گرفته است. به عنوان مثال در بررسی Person - Le Royet و همکاران (۱۹۹۵) میزان  $LC_{50}$  در طی ۹۶ ساعت برای ماهی باس دریایی (*Dicentrarchus labrax*)، سیم دریایی (*Sparus aurata*) و توربوت (*Scophthalmus maximus*) به ترتیب ۱/۷۹، ۲/۷۳

و ۳/۳۲ میلی گرم در لیتر تعیین گردید در این بررسی باس دریایی نسبت به دو گونه دیگر از حساسیت بالاتری برخوردار بود. در بررسی دیگری میزان  $LC_{50}$  در ۹۶ ساعت برای ماهیان کوچک‌تر و انگشت قد سیم دریایی ۱/۲۷ میلی گرم در لیتر تعیین گردید، این میزان در بچه ماهیان لاروی قزل‌آلای رنگین کمان ۰/۳۲ میلی گرم در لیتر محاسبه شد ( Wajsbro et al., 1991). Ruffier و همکاران (۱۹۸۱) غلظت کشنده میانه آمونیاک غیر یونیزه در گربه ماهی (*Ictalurus punctatus*) را ۳/۱ میلی گرم در لیتر گزارش نمودند. در این بررسی‌ها میزان حساسیت در ماهیان کوچک‌تر بیشتر از ماهیان بزرگ‌تر گزارش شده است. همچنین غلظت میانه کشنده آمونیاک در طی ۹۶ ساعت برای ماهی کپور معمولی بین ۲/۱۶ تا ۲/۳۳ میلی گرم در لیتر ثبت گردید ( Guan et al., 2010). در بررسی جداگانه‌ای این میزان در طی ۹۶ ساعت مواجهه برای کپور ماهیان ۰/۹۹ میلی گرم در لیتر گزارش گردید (ناجی و همکاران، ۱۳۸۸). غلظت میانه کشنده در طی ۴۸ ساعت مواجهه با آمونیاک غیر یونیزه برای بچه ماهیان انگشت قد و لاروی ماهی تیلاپیا به ترتیب ۷/۴ و ۱ میلی گرم در لیتر اندازه‌گیری شد ( Karasu Benlu and Koksall, 2005). در بررسی Hued و همکاران (۲۰۰۶) این

نیز امکان تعویض مداوم آب استخرها در بسیاری موارد امکان‌پذیر نیست، لذا در چنین شرایطی افزایش آمونیاک محیط‌های پرورشی امری اجتناب‌ناپذیر است. که این شرایط برای ماهیان کلمه چنانچه در استخرهای پرورش خاکی پرورش داده شوند نیز رخ خواهد داد. در بررسی حاضر آسیب‌های شدیدی در بافت‌های کلیه و آبشش ماهیان مواجهه شده با آمونیاک مشاهده گردید که با توجه به غلظت ماده مذکور، این نتایج نشان‌دهنده حساسیت نسبتاً بالای بچه ماهی کلمه نسبت به آمونیاک غیر یونیزه است. در این بررسی حداکثر غلظت مجاز برای آب پرورش این ماهیان در سختی آب ۲۷۱ میلی‌گرم در لیتر و دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد بر اساس ۱۰ درصد میزان LC<sub>50</sub> به میزان ۰/۱۶۲ میلی‌گرم در لیتر محاسبه گردید. به عبارت دیگر بر اساس نتایج تحقیق حاضر حداکثر غلظت غیر کشنده آمونیاک غیر یونیزه در بچه ماهیان کلمه خزری ۰/۱۶۲ میلی‌گرم در لیتر تعیین می‌گردد که در مدیریت بهداشتی مزارع پرورش این ماهیان همواره باید مد نظر گرفته شود.

### سپاسگزاری

در اینجا بر خود لازم می‌دانیم از زحمات کلیه کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند سپاسگزاری نماییم.

### منابع

۱. بنی هاشمی، ا.، خارا، ح.، پزند، ذ.، رهاننده، م.، ۱۳۹۲. اثرات هیستوپاتولوژیکی آمونیاک در آبشش، کبد و کلیه بچه تاسماهی ایرانی *Acipenser persicus*. مجله پاتوبیولوژی مقایسه‌ای، (۳)، ۹۹۲-۹۸۳.

میزان در طی ۲۴ ساعت برای سه گونه از ماهیان بومی آرژانتین (*Bryconamericus iheringi*، *Jenynsia multidentata*، *Trichomycterus corduvense*) بین ۱ تا ۴/۵ میلی‌گرم در لیتر محاسبه شد. در بررسی بنی هاشمی و همکاران (۱۳۹۲) غلظت میانه کشنده آمونیاک غیر یونیزه در طی ۹۶ ساعت مواجهه برای بچه تاسماهیان ایرانی ۶/۴ میلی‌گرم در لیتر گزارش گردید. همان‌گونه که اشاره گردید در گزارشات متعدد حساسیت‌های متعددی در گونه‌های مختلف دریایی و پرورشی بسته به گونه ماهی، سن و اندازه ماهی ثبت گردیده است. به‌طور کلی آستانه امن آمونیاک مولکولی برای ماهیان بین ۰/۲ - ۰/۰۵ میلی‌گرم/لیتر عنوان شده است (Handy and Poxton, 1993; Ruffier et al., 1981). البته شایان ذکر است این غلظت‌های پیشنهادی برای زنده‌مانی ماهیان پیشنهاد می‌شود و در گزارشات متعددی نشان داده شده است که مواجهه تحت حاد طولانی مدت غلظت‌های مذکور اگر چه باعث تلفات در ماهیان تحت بررسی نمی‌شود اما بر فاکتورهای رشد و تولید مثلی تأثیرات منفی داشته است (Wickins and Lee, 2002; Colt and Amstrong, 1981). در بسیاری موارد کنترل تجمع آمونیاک مولکولی در محیط‌های زیست ماهیان بسیار مشکل و گاهاً مقرون به صرفه نیست، و با توجه به متفاوت بودن حساسیت ماهیان مختلف نسبت به آمونیاک، داشتن اطلاعات از میزان این حساسیت برای هر گونه با توجه به سن و شرایط پرورش می‌تواند بسیار مفید باشد. از طرفی به دلیل کم‌آبی در کشور مزارع پرورش ماهیان گرمابی عملاً یک بار در سال آب‌گیری می‌شوند و در طی دوره پرورش

12. OECD. 2006. Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. OECD series on testing and assessment, 23, 53 P.
13. Person-Le Ruyet, J., Chartois, H., Quemener, L., 1995. Comparative acute ammonia toxicity in marine fish and plasma ammonia response. *Aquaculture*, 136, 181-194.
14. Person-Le Ruyet, J., Boeuf, G., Infante, J.Z., Helgason, S., Le Roux, A., 1997. Short-term physiological changes in turbot and seabream juveniles exposed to exogenous ammonia. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 119, 511-518.
15. Peyghan, R., Azary Takamy, G. 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. *Aquaculture International*, 10, 317-325.
16. Roberts, R.J., 2012. *Fish pathology*. 4<sup>th</sup> edition, Wiley-Blackwell, UK. 590 P.
17. Ruffier, P.J., Boyle, W.C., Kleinschmidt, J.K., 1981. Short-term acute bioassays to evaluate ammonia toxicity and effluent standards. *Journal of Water Pollution Control Federation*, 53, 367-377.
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*). *Journal of Experimental Biology*, 204, 2691-2698.
19. Siikavuopio, S.I., Foss, T.D.A., Mortensen, A., 2004. Effects of chronic ammonia exposure on gonad growth and survival in green sea urchin *locentrotus droebachiensis*. *Aquaculture*, 242, 313-320.
20. USEPA., 1999. Update of ambient water quality criteria for ammonia- technical version-EPA-823-F-99-024. USEPA, Washington DC, USA, 1999.
21. Wajsbrodt, N., Gasith, A., Krom, M.D., Popper, D.M., 1991. Acute toxicity of ammonia to juvenile gilthead seabream *Sparus aurata* under reduced oxygen levels. *Aquaculture*, 92, 277-288.
22. Wickins, J.F., Lee, D.O.C., 2002. *Crustacean Farming, Ranching and Culture*. 2<sup>th</sup> edition. Blackwell Science, 464 P. ISBN: 978-0-632-05464-0.
23. Wilkie, M.P., 1997. Mechanisms of ammonia excretion across fish gills. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 118, 39-50.
۲. پیری، ح.، یلقی، س.، شریفیان، م.، ۱۳۹۲. بررسی پرورش ماهی کلمه (*Rutilus rutilus caspicus*) در استخرهای خاکی با تراکم‌های مختلف در آب شیرین. *مجله شیلات ایران*، ۲۲(۱)، ۱۷۳-۱۷۱.
۳. ناجی، ط.، خارا، ح.، رستمی، م.، نصیری برمان، ا.، ۱۳۸۸. بررسی اثر سمیت آمونیاک بر بافت کبد ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). *مجله علوم و تکنولوژی محیط زیست*، ۱۱(۱)، ۱۴۸-۱۳۲.
4. Colt, J.E., Armstrong, D.A., 1981. Nitrogen toxicity to crustaceans, fish, molluscs. *Bioengineering Symposium for Fish Culture*, Publication, 1, 34-47.
5. El-Shafai, S.A., El-Gohary, FA., 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.
6. Emerson, K., Russo, R.C., Lund, R.E., Thurston, R.V., 1975. Aqueous ammonia equilibrium calculations: effect of pH and temperature. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 32, 2379-2383.
7. Guan, B., Hu, W., Zhang, T. L., Duan, M., Li, D.L., Wang, Y.P., Zhu, Z.Y., 2010. Acute and chronic un-ionized ammonia toxicity to 'all-fish' growth hormone transgenic common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Chinese Science Bulletin*, 55, 4032-4036.
8. Handy, R.D., Poxton, M.G., 1993. Nitrogen pollution in mariculture: toxicity and excretion of nitrogenous compounds by marine fish. *Fish Biology and Fisheries*, 3, 205-241.
9. Heisler, N., 1990. Mechanisms of ammonia elimination in fishes. In: Trochot, J.P., Lahlou, B. (Eds.), *Animal Nutrition and Transport Processes*, 6, 137-151.
10. 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. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 76, 984-991.
11. Karasu Benlu, A.C., Koksall, G., 2005. The acute toxicity of ammonia on tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) larvae and fingerlings. *Turkish Journal of Veterinary Animal Sciences*, 29, 339-344.