

بررسی نقش زئولیت طبیعی در کاهش مسمومیت با آمونیاک در قزل‌آلای رنگین‌کمان

محمد فرهنگی، ابوالقاسم کمالی و عبدالمجید حاجی مرادلو

گروه شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
تاریخ دریافت: ۸۰/۷/۲۵؛ تاریخ پذیرش: ۸۱/۵/۲۶

چکیده

نقش زئولیت طبیعی در آب شیرین به منظور سنجش کارایی آن در جذب آمونیاک محیط پرورشی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بررسی شد. ماهیانی با وزن ۲۱-۹/۵ گرم (میانگین ۱۵ گرم) در معرض ۴ غلظت مختلف از آمونیاک کل ($\text{NH}_4^+ + \text{NH}_3^+$) از ۱۰-۲۵ میلی‌گرم در لیتر (۲۵ و ۲۰ و ۱۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر) قرار گرفتند. یک گروه ۱۳ تایی هم به عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفت. غلظت کشنده و نیمه کشنده (LC_{50}) در مدت ۲۴ ساعت تعیین شد. تحت شرایط ثابت دما و pH ($\text{pH} = 7.7 - 7.8$ و $T = 16^\circ\text{C}$) غلظت کشنده آمونیاک برابر با ۲۵ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک کل بود (معادل ۰/۴۴ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک غیر یونیزه). کاربرد ۱۵ گرم در لیتر زئولیت توانست تلفات را به صفر برساند. از بافتهای کبد، کلیه و آبشش ماهیانی که در معرض غلظت کشنده آمونیاک و گروه‌هایی که در معرض زئولیت بدون آمونیاک بودند، جهت بررسی آسیب‌شناسی این اندامها مقاطع بافتی تهیه شد. در بررسی‌های آسیب‌شناسی بیشترین ضایعات در آبشش شامل خونریزی، پرخونی، هیپرپلازی، ادم و نکروز سلولهای پوششی بود. در کلیه، ضایعات شامل تخریب مجاری کلیوی، اتساع کپسول بومن، خونریزی و پرخونی بوده و در کبد ضایعات شامل خونریزی، پرخونی و نکروز سلولهای کبدی بود.

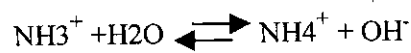
واژه‌های کلیدی: قزل‌آلای رنگین‌کمان، آمونیاک، زئولیت، آبشش، کلیه، کبد



مقدمه

با وجودی که پرورش رو به توسعه ماهی قزل‌آلا در استخرهای بتونی از قدمت زیادی در کشور ما برخوردار می‌باشد، ولی مشخص شده با در نظر گرفتن محدودیت منابع آبی کشور می‌توان از استخرهای خاکی پرورش کپورماهیان و میگو و شالیزارها نیز برای پرورش ماهی قزل‌آلا سود برد. در این راستا حفظ کیفیت آب بعنوان یکی از عوامل مهم در دستیابی به تولید مناسب مطرح است. در این بین آمونیاک، بعنوان ماده حاصل از متابولیسم پروتئین در آبزیان نقش مهمی را در آبی‌پروری دارد. آمونیاک گازی بی‌رنگ و محلول در آب است و می‌تواند به حالت یونیزه درآید که یون آمونیوم (NH_4^+) نامیده می‌شود (۵و۴).

آمونیاک در آب خیلی محلول بوده و افزایش اندک فشار جزئی^۱ آمونیاک می‌تواند افزایش آمونیاک محلول در آب را به همراه داشته باشد (۱). از این رو حذف آمونیاک با هوادهی کار مشکلی است (۱۲ و ۱۴). آمونیاک در آب بصورت زیر با یون آمونیوم در تعادل است:



نسبت بین این دو به pH و دمای آب بستگی دارد. علاوه بر این تابع چرخه روزانه pH و CO_2 است.

با توجه به اهمیت مسمومیت با آمونیاک در آبی‌پروری و مشکلاتی که در تشخیص و رفع این عارضه وجود دارد، بخصوص در مزارع خاکی، شالیزارها، ماشین‌های حمل و نقل ماهی و سیستمهای مدار بسته آب که امکان تعویض آب به حد کافی نیست، لزوم یافتن روشهای جدید تشخیص و پیشگیری که مطابق با امکانات موجود

کشور باشد کمک شایانی به رفع این عارضه خواهد کرد.

استفاده از مواد افزایش‌دهنده کیفیت آب به‌عنوان بخشی از مدیریت آب در آبی‌پروری از دیر باز مطرح بوده است، که شامل انواع مواد شیمیایی، معدنی و بیولوژیک می‌باشد. تاکنون مطالعات زیادی در این رابطه صورت گرفته است (۱، ۶، ۱۲، ۱۴ و ۱۵). یکی از مواد معدنی افزایش‌دهنده کیفیت آب زئولیت^۲ می‌باشد. زئولیت‌ها در واقع کانیهای از جنس سیلیکات آلومینوم با ساختار چهار وجهی (چهار اتم اکسیژن حول یک اتم سیلیسیم) هستند که در آن حفره‌ها و کانالهایی با ابعاد ۱۰-۳ آنگستروم وجود دارد (۸ و ۱۳). در داخل این حفره‌ها به میزان ۲۰-۱۰ درصد آب وجود دارد. وجود این ساختمان در زئولیت به آنها اجازه می‌دهد تبادل کاتیونی را با ظرفیت بین $2/16-4/73 \text{ meq/g}$ داشته باشند (۱۰ و ۱۳). کاتیونهای خارجی قابل تبادل در زئولیت‌ها معمولا Na , K , Ca , Mg می‌باشد که برای زئولیت مورد نظر (کلینوپتیلولیت) این یونها شامل Na و K باشد (۷ و ۸). در بین زئولیت‌های طبیعی تنها ۸ نوع به وفور در رسوبات و به‌میزان اقتصادی یافت می‌شوند که در بین آنها ۲ نوع فیلپسیت^۳ و کلینوپتیلولیت^۴ به‌دلیل تمایل بالا در جذب یون آمونیوم از اهمیت بیشتری در آبی‌پروری برخوردارند (۷، ۱۰ و ۱۱). ترتیب تمایل جذبی در کلینوپتیلولیت بصورت زیر است (۷):

- 2- Zeolite
- 3- Phillipsite
- 4- Clinoptilolites

1- Partial pressure



خاص تولیدکننده آنزیمیت ایران) تهیه گردید. زئولیت‌های مورد بررسی پس از شستشو و رفع آلودگی سطح آن از مواد آلی با استفاده از هاون دستی خرد کرده و به منظور دانه‌بندی متفاوت بعد از چند بار الک کردن با چشمه توری ۲۰-۰/۱۲۵ میلی‌متر، مورد استفاده قرار گرفت. آزمایشها در چند مرحله صورت گرفت:

مرحله اول: در این مرحله جهت تعیین اثر هواده و دانه‌بندی زئولیت در جذب آمونیاک، آزمایشها در طرح کاملاً تصادفی فاکتوریل با ۸ تیمار در ۳ تکرار اجرا شد. در غلظت ۴ میلی‌گرم درلیتر آمونیاک کل مقدار ۴ گرم در لیتر زئولیت با اندازه‌های متفاوت (۲۰ - ۰/۱۲۵ میلی‌متر) بصورت آرد، گرانول و تکه‌ای مورد استفاده قرار گرفت. از سنگ هوا به‌عنوان هواده استفاده گردید. بعد از گذشت ۲۴ ساعت نتایج آزمایش با استفاده از آزمون کمترین اختلاف معنی‌دار (LSD)^۱ مقایسه شدند.

مرحله دوم: در این مرحله ماهیها در ۵ گروه (تیمار) با ۱۳ قطعه ماهی (تکرار) در هر گروه در معرض غلظت‌های مختلف آمونیاک کل (۰، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ میلی‌گرم در لیتر) قرار داده شدند. تعیین این غلظت‌ها براساس یکسری آزمایشهای مقدماتی، برای تعیین غلظت آمونیاک موردنظر بوده است، بطوریکه در غلظت‌های بکار رفته تلفات در ماهیها، از ۱۰۰-۰ درصد مشاهده گردید. یک گروه ۱۳ تایی از ماهیها هم به‌عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شد.

مرحله سوم: در این مرحله برای مشخص کردن اثرات زئولیت در پیشگیری از مسمومیت با

Cs-Rb-NH₄-Ba-Sr-Na-Ca-Fe-Mg-Li

از چپ به راست به ترتیب کم می‌شود

مواد و روشها

ماهی: ماهی‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی ۱۵ گرم (۲۱-۹/۵ گرم) از کارگاه پرورش ماهی منطقه واقع در استان فاضل‌آباد تهیه و در یک استخر (۲۵×۲۰×۰/۸ متر) بصورت جداگانه نگهداری شدند.

شرایط محیطی: آب مورد آزمایش آب کارگاه پرورش ماهی چشمه و رودخانه بود که فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آن (اکسیژن محلول، آمونیاک، درجه حرارت، pH) اندازه‌گیری شد.

مطالعات آزمایشگاهی: آزمایشها با استفاده از روش آب ساکن و در شرایط ثابت دما و pH صورت گرفت (T=۱۶+۱°C و pH=۷/۷-۷/۸). مدت زمان آزمایش برای هر گروه ۲۴ ساعت بود.

برای تعیین غلظت آمونیاک کل پس از تعیین حجم آب (۵۰ لیتر) به ازاء واحد حجم، کلرور آمونیوم (NH₄Cl) ساخت کارخانه Merck (آلمان) به‌صورت وزنی توزین و به آب اضافه گردید. برای حل کردن کلرور آمونیوم در آب آکواریوم، ابتدا آنرا در بشر حل کرده و سپس محلول حاصله به آب اضافه گردید تا محلول یکنواختی بدست آید. بعد از گذشت ۲۴ ساعت میزان آمونیاک کل در ظروف آزمایش توسط دستگاه اسپکتوفتومتر با طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

زئولیت مورد نظر زئولیت طبیعی از نوع کلینوپتیلولیت با ۹۰ درصد خلوص بود که از شرکت افروند توسکا - ایران (شرکت سهامی



1- Least significant difference test



آمونیاک ۵ گروه ۱۰ تایی از ماهیها در معرض غلظت کشنده آمونیاک قرار داده شدند. به هر یک از آکواریومها مقادیر ۲، ۵، ۱۰، ۱۳ و ۱۵ گرم در لیتر زئولیت بصورت آرد اضافه گردید. یک گروه ۱۰ تایی نیز در معرض زئولیت بدون آمونیاک قرار داده شد تا تأثیر زئولیت در جلوگیری از اثرات آسیب شناسی آمونیاک در ماهی برای یک دوره کوتاه مورد بررسی قرار گیرد.

مرحله چهارم: در این مرحله جهت تعیین اثر زئولیت بر خواص فیزیکوشیمیایی آب از مقادیر ۱۵ و ۳۰ گرم در لیتر زئولیت استفاده شد. آزمایشها در ظروف ۲ لیتری در طرح کساملا تصادفی نامتعادل (با تکرارهای نابرابر) با غلظت ۹ میلی گرم در لیتر آمونیاک کل اجرا گردید. طی زمانهای متوالی (۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۴۴ ساعت) فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب نظیر pH، شوری، هدایت الکتریکی (با استفاده از دستگاه واترچکر مدل u-10)، نیتريت، نیترات (با استفاده از دستگاه دیجیتال نیتريت سنج HANNA)، آمونیاک (با استفاده از جذب نوری و دستگاه اسپکتروفوتومتر با طول موج ۴۵۰ نانومتر) و سختی کل (به روش

تیتراسیون با EDTA) اندازه گیری شد (۹ و ۳). نتایج با استفاده از آزمون کمترین اختلاف معنی دار مقایسه شدند.

مطالعات آسیب شناسی: به منظور بررسی ضایعات آسیب شناسی بافتهای آبشش، کبد و کلیه از ماهیهایی که در معرض غلظت کشنده آمونیاک و نمونه هایی که در معرض زئولیت بدون آمونیاک قرار داشتند، نمونه گیری به عمل آمد و نمونه ها در فرمالین ۱۰ درصد ثابت شدند. پس از گذشت دو هفته (به منظور نفوذ ماده تثبیت کننده در بافتهای ماهی) از بافتهای مورد نظر مقاطع بافتی تهیه شد و ضایعات آسیب شناسی آنها مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

مطالعات آزمایشگاهی مرحله اول: بعد از گذشت ۲۴ ساعت میزان آمونیاک در ظروف آزمایش اندازه گیری گردید و نتایج با استفاده از آزمون کمترین اختلاف معنی دار (Lsd) بررسی شدند که در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱ - میانگین و انحراف معیار غلظت آمونیاک کل (mg/l) بعد از گذشت ۲۴ ساعت در گروه های مورد آزمایش تحت شرایط دمایی ۱۶ درجه سانتی گراد و اکسیژن محلول ۵/۶ میلی گرم در لیتر و pH= ۸/۳۷ با غلظت اولیه ۴ میلی گرم در لیتر آمونیاک کل.

گروه اول	گروه دوم	گروه سوم	گروه چهارم	گروه پنجم	گروه ششم	گروه هفتم	گروه هشتم
شاهد	آرد زئولیت	گرانول زئولیت	دانه زئولیت	هواده	هواده	هواده و گرانول	هواده ودانه
۳/۹۵ ^a /۱۲ e	۳/۷۵ ^b /۱۸ ced	۳/۳۲ ^c /۰/۱ bc	۳/۸۳ ^d /۰/۲۲ de	۳/۷۳ ^e /۰/۳۶ cde	۰/۹۸ ^f /۰/۵ a	۱/۸۵ ^g /۰/۵۲ b	۳/۳۸ ^h /۰/۲۹ cd

x حروف a,b,c,d,e بیانگر اختلاف معنی داری (p < 0/05) در بین گروه هاست.

x حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی داری (p > 0/05) در بین گروه هاست.

همانطوریکه در جدول ۱ مشخص شده است زمانی که از هواده و زئولیت بطور تسوأم استفاده می‌شود (گروه‌های ۶، ۷ و ۸)، درمقایسه با گروه‌هایی که از هواده (گروه ۵) و یا زئولیت (۲ و ۴) به‌تنهایی استفاده شده است، اختلاف معنی‌داری ($p < 0/05$) را نسبت به گروه شاهد نشان می‌دهد. همچنین در بین گروه‌های حاوی

زئولیت، گروه ۶ (هواده و آرد زئولیت) اختلاف خیلی معنی‌داری ($p < 0/01$) نسبت به گروه‌های دیگر دارد. این امر نشان می‌دهد ذرات زئولیتی ریزتر دارای جذب بیشتری هستند. مرحله دوم: با افزایش غلظت آمونیاک کل درصد تلفات نیز بهمان نسبت افزایش می‌یابد (جدول ۲)

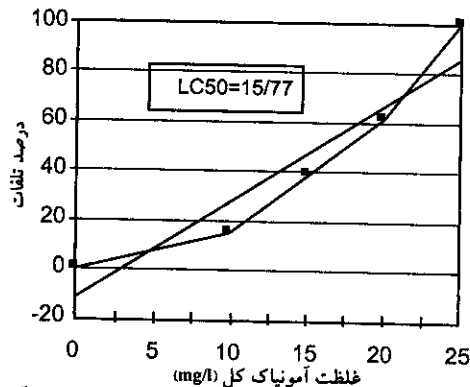
جدول ۲ - نتایج حاصل از قرارگرفتن ماهیها در معرض غلظت‌های مختلف آمونیاک در طی ۲۴ ساعت تحت شرایط دمایی ۱۶+۱ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول ۱۱-۱۰، $pH=7/7-7/8$ ، حجم آب ۵۰ لیتر و تعداد ماهی در هر گروه ۱۳ قطعه.

گروه	غلظت آمونیاک کل (mg/l)	غلظت آمونیاک غیر یونیزه (mg/l)	تعداد تلفات	درصد بقاء %
شاهد	۰	۰	۰	۱۰۰
۱	۱۰	۰/۱۷	۲	۸۶/۴
۲	۱۵	۰/۲۶	۵	۶۱/۵
۳	۲۰	۰/۳۵	۸	۳۸/۴
۴	۲۵	۰/۴۴	۱۳	۰

با رسم منحنی تغییرات تلفات در غلظت‌های مختلف و با استفاده از شیب خط رگرسیون غلظت نیمه‌کشنده آمونیاک (LC50) در ۲۴ ساعت برابر ۱۵/۷۷ میلی‌گرم در لیتر است که با توجه به

دما و pH و با استفاده از فرمول زیر برابر با ۰/۲۸ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک غیر یونیزه می‌باشد (شکل ۱).

$$NH_3 - N = \frac{NH_4 - N}{10^{(10/07 - 0/033T^{oc} - PH) + 1}}$$



شکل ۱ - منحنی خط رگرسیون و تغییرات تلفات ماهی در غلظت‌های مختلف آمونیاک کل (mg/l).



مرحله سوم: با افزایش مقادیر زئولیت به آب در صد بقاء افزایش می‌یابد (جدول ۳).

ساعت به ترتیب برابر ۱۰۰، ۹۰، ۶۰، ۲۰ و ۰ درصد بوده است (جدول ۳).

با اضافه کردن مقادیر زئولیت به آب (۵، ۱۰، ۱۳، ۱۵ و ۲۰ گرم در لیتر) درصد بقاء در ۲۴

جدول ۳- نتایج حاصله از قرارگیری ماهیها در مقابل میزان کشنده آمونیاک کل (mg/l) با آرد زئولیت در طی ۲۴ ساعت تحت شرایط دمایی ۱۶±۱ درجه سانتی گراد، اکسیژن محلول ۱۱-۱۰ میلی گرم در لیتر، pH= ۷/۷-۷/۸، حجم آب ۵۰ لیتر، تعداد ماهی در هر گروه ۱۰ قطعه.

گروه	مقدار زئولیت (g/l)	تعداد تلفات	درصد تلفات %
شاهد	۰	۱۰	۱۰۰
۱	۲	۱۰	۱۰۰
۲	۵	۸	۸۰
۳	۱۰	۴	۴۰
۴	۱۳	۱	۱۰
۵	۱۵	۰	۰

مرحله چهارم: نتایج حاصل از آزمایش این مرحله در جدول ۴ آورده شده است.

جدول ۴ - نتایج حاصل از اندازه گیری فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب در مقابل آرد زئولیت با غلظت اولیه ۹ میلی گرم در لیتر آمونیاک کل (mg/l).

زمان	گروه	PH	مدایت الکتریکی (cm-ms)	شوری (g/l)	نیترات (mg/l)	نیتریت (mg/l)	آمونیاک کل (mg/l)	سختی کل (mg/l)
بعد از گذشت ۲۴ ساعت:	شاهد	۸/۰۵±۰/۰۰	۰/۵۲۵±۰/۰۰	۲±۰/۰۰	۴/۲۵±۰/۰۷	۰/۰۷۵±۰/۰۰۷	۸/۶۵±۰/۳۵	۴۰۰±۰/۰۰
	۱۵ گرم در لیتر آرد زئولیت	۸/۱۲±۰/۰۰	۰/۵۲۵±۰/۰۰۱	۲±۰/۰۰	۴/۲±۰/۰۴	۰/۰۷۳±۰/۰۰۲	۶/۵۸±۰/۳۹	۳۴۵/۳±۱۸/۵۸
	۳۰ گرم در لیتر آرد زئولیت	۸/۱۱±۰/۰۰۷	۰/۵۲۴±۰/۰۰	۲±۰/۰۰	۴/۷±۰/۰۱۴	۰/۰۷۵±۰/۰۰۷	۳/۹۳±۰/۶۷	۳۲۰±۰/۰۰
بعد از گذشت ۴۸ ساعت:	شاهد	۸/۱۳±۰/۰۳	۰/۵۲۴±۰/۰۱۵	۲±۰/۰۰	۴/۵±۰/۰۰	۰/۰۸±۰/۰۰	۸/۸۵±۰/۳۵	۴۰۰±۰/۰۰
	۱۵ گرم در لیتر آرد زئولیت	۸/۲۴±۰/۰۵	۰/۵۳۳±۰/۰۰۲	۲±۰/۰۰	۴/۲±۰/۰۰	۰/۰۶±۰/۰۰۱	۵/۳±۰/۳۰	۳۱۰±۰/۰۰
	۳۰ گرم در لیتر آرد زئولیت	۸/۲۲±۰/۰۰۷	۰/۵۲۹±۰/۰۰۱	۲±۰/۰۰	۳/۹±۰/۰۰	۰/۰۷±۰/۰۰	۲/۹۳±۰/۰۵	۲۸۰±۰/۰۰
بعد از گذشت ۷۲ ساعت:	شاهد	۸/۱۳±۰/۰۰	۰/۵۲۷±۰/۰۰۲	۲±۰/۰۰	۴/۲±۰/۰۰	۰/۰۸±۰/۰۰	۸/۲±۰/۹۹	۳۹۵±۷/۰۷
	۱۵ گرم در لیتر آرد زئولیت	۸/۲۲±۰/۰۰۲	۰/۵۲۷±۰/۰۰۲	۲±۰/۰۰	۳/۸±۰/۰۰	۰/۰۸±۰/۰۰	۵/۰۵±۰/۱۵	۲۷۳/۳±۵/۷۷
	۳۰ گرم در لیتر آرد زئولیت	۸/۲۲±۰/۰۰۷	۰/۵۲۶±۰/۰۰۳	۲±۰/۰۰	۳/۹±۰/۰۰	۰/۰۷±۰/۰۰	۱/۹±۰/۰۰۱	۲۴۵±۷/۰۷
بعد از گذشت ۹۶ ساعت:	شاهد	۸/۲۵±۰/۰۷	۰/۵۴۰±۰/۰۰	۲±۰/۰۰	۴/۴±۰/۰۰	۰/۰۸±۰/۰۰	۸/۵±۰/۹۹	۳۹۵±۱۴/۱۴
	۱۵ گرم در لیتر آرد زئولیت	۸/۴±۰/۰۰۵	۰/۵۶۲±۰/۰۰۶	۲±۰/۰۰	۴/۴±۰/۰۰	۰/۰۷±۰/۰۰	۲/۸۷±۰/۸۲	۲۵۸/۷±۲/۳۱
	۳۰ گرم در لیتر آرد زئولیت	۸/۲۲±۰/۰۰۷	۰/۵۴۱±۰/۰۰۲	۲±۰/۰۰	۴/۳±۰/۰۰	۰/۰۸±۰/۰۰	۲/۶±۰/۰۰۱	۲۳۵±۷/۰۷
بعد از گذشت ۱۴۴ ساعت:	شاهد	۸/۲۹±۰/۰۷۵	۰/۵۳۷±۰/۰۱۵	۲a	۴/۳a	۰/۰۸a	۸/۷±۰/۲۸a	۳۹۵±۷/۷۰a
	۱۵ گرم در لیتر آرد زئولیت	۸/۳۲±۰/۰۲۵	۰/۵۷۳±۰/۰۵b	۲a	۴/۲a	۰/۰۷a	۲/۲۵±۰/۵۲b	۲۷۱/۷±۱۷/۸۶b
	۳۰ گرم در لیتر آرد زئولیت	۸/۳۲±۰/۰۲۵	۰/۵۶۴±۰/۰۱b	۲a	۴/۴a	۰/۰۹a	۳/۶۱±۰/۳۷c	۲۴۰c

x حروف a, b, c در هر ستون بیانگر اختلاف خیلی معنی دار ($p < 0/01$) در بین گروه‌ها می‌باشد.

x حروف a, b در هر ستون بیانگر اختلاف معنی دار ($p < 0/05$) در بین گروه‌ها می‌باشد.

x حروف مشترک در ستون‌ها بیانگر عدم اختلاف معنی دار ($p > 0/05$) در بین گروه‌ها می‌باشد.



همانطوریکه در جدول ۴ مشخص شده است، زئولیت علاوه بر جذب آمونیاک آب، سختی کل آب (مجموع یونهای کلسیم و منیزیم) را نیز کاهش داده است. بعد از گذشت ۱۴۴ ساعت اختلاف معنی‌داری ($p < 0/05$) در فاکتورهای سختی کل و آمونیاک کل و هدایت الکتریکی در بین گروه‌ها دیده شد. در بین سایر فاکتورها اختلاف معنی‌داری ($p > 0/05$) مشاهده نشد (جدول ۴). بعد از گذشت ۹۶ ساعت زئولیت‌ها اشباع گردیده و کارایی خود را از دست دادند (جدول ۴).

مطالعات آسیب شناسی

مشاهدات ظاهری: در ماهیانی که در معرض غلظت ۲۰ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک کل و بالا تر از آن قرار گرفته بودند، بی‌قراری شدید، خم شدن ناگهانی عضلات تنه، باز و بسته شدن سرپوشهای آبششی و دهان، حرکات تشنجی، برخورد با کناره‌های آکواریوم، سعی در بیرون پریدن، بلعیدن هوا از سطح، پرخونی و قرمز شدن آبششها مشاهده گردید.

مشاهدات مقاطع بافتی: در بررسی مقاطع بافتی تهیه شده از آبشش ماهیانی که در معرض غلظت‌های مختلف آمونیاک کل (۲۵، ۲۰، ۱۵ و ۱۰

میلی‌گرم در لیتر) قرار داشتند، عمومی‌ترین ضایعات شامل هیپر پلازی^۱، ادم یا خیز^۲، اتساع لاملاهای ثانویه، پرخونی^۳، خونریزی^۴، نکروز سلولهای پوششی و نفوذ سلولهای آماسی تک هسته‌ای در لابه‌لای رشته‌های آبششی بودند (شکل‌های ۲ و ۳). در گروه شاهد و زئولیت بدون آمونیاک درجات خفیفی از هیپرپلازی رأس رشته‌های آبشش و ادم دیده شد. ضایعات مربوط به کلیه، در ماهیانی که در معرض غلظت‌های مختلف آمونیاک کل قرار داشتند بطور عمده شامل اتساع کپسول بومن، تخریب مجاری کلیوی، خونریزی، پر وجود مقادیر فراوان سلولهای تک هسته‌ای و تغییر شکل سلولهای پوششی لوله‌های کلیوی بوده است (شکل ۴ و ۵). در کلیه ماهیان گروه شاهد ضایعه خاصی مشاهده نشد. عمده‌ترین ضایعات در کبد ماهیانی که در معرض غلظت‌های مختلف آمونیاک کل قرار داشتند، شامل نکروز سلولهای کبدی، نفوذ سلولهای آماسی، خونریزی و پرخونی بوده است (شکل ۶). در گروه‌های شاهد و زئولیت بودن آمونیاک ضایعه‌ای مشاهده نشد.



- 1- Hyperplasia
- 2- Edema
- 3- Hyperemia
- 4- Hemorrhage



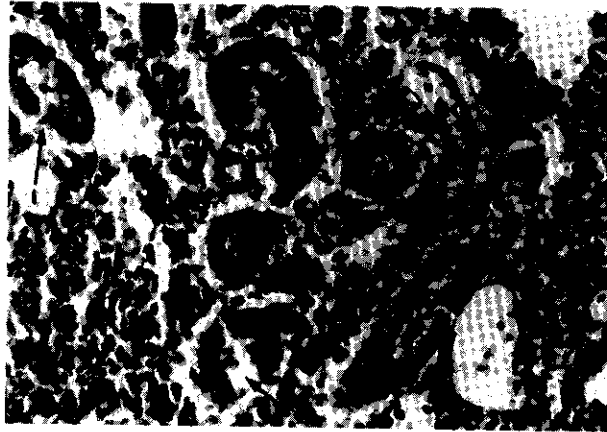
شکل ۲- مقطع بافتی آبشش ماهی در غلظت ۲۰ میلی گرم در لیتر آمونیاک کل (mg/l). نوک پیکان پرخونی را نشان می دهد (بزرگنمایی ۲۰۰×).



شکل ۳- مقطع بافتی آبشش ماهی در غلظت ۲۵ میلی گرم در لیتر آمونیاک کل (mg/l). نوک پیکان ادم را نشان می دهد (بزرگنمایی ۲۰۰×).



شکل ۴- مقطع بافتی کلیه ماهی در غلظت ۲۰ میلی گرم در لیتر آمونیاک کل (mg/l). ۱- حالت پرخونی را نشان می دهد. ۲- وجود رنگدانه های ملانین را نشان می دهد (بزرگنمایی ۲۰۰×).



شکل ۵ - مقطع بافتی کلیه ماهی در غلظت ۲۵ میلی گرم در لیتر آمونیاک کل (mg/l). ۱- تخریب مجاری کلیوی را نشان می دهد. ۲- وجود سلولهای آماسی را نشان می دهد (بزرگنمایی $\times 400$).



شکل ۶ - مقطع بافتی کبد ماهی در غلظت ۲۵ میلی گرم در لیتر آمونیاک کل (mg/l). نوک پیکانها نکروز سلولهای کبیدی را نشان می دهد (بزرگنمایی $\times 400$).

بحث

تحقیقات زیادی در ارتباط با مسمومیت ماهی و میگو با آمونیاک در جهان صورت گرفته که هر کدام جنبه خاصی را مد نظر دارد. آنچه مسلم است افزایش آمونیاک آب سبب بروز تظاهراتی در رفتار و ساختار ماهی می شود که شامل خم شدن عضلات تنه، تحریکات عصبی، پرخونی آبششها، عدم تعادل و شسناي ناموزن، کاهش رشد و در نهایت مرگ ماهی می باشد.

در یک تحقیق نشان داده شده است که هوادهی در خروج آمونیاک نقشی ندارد، بلکه مقاومت ماهی را افزایش می دهد (۱۵). بر اساس آزمایشات صورت گرفته، استفاده از هوادهایی با قدرت ۱۱۱ کیلووات در هکتار فقط می تواند اندکی از غلظت آمونیاک را کاهش دهد به طوری که بعد از گذشت ۲۴ ساعت در دمای ۲۹- ۲۶ و $pH = 7.37$ غلظت آمونیاک کل را از $4/43$ میلی گرم در لیتر به $4/29$ میلی گرم در لیتر برساند.



هر چند کارایی هواده‌ها در pH های بالاتر به مراتب بیشتر است، به‌طوریکه در $pH=9.07$ غلظت آمونیاک را از $4/04$ به $2/74$ می‌رساند (۱۴). همان‌طوریکه در اولین مرحله آزمایش نشان داده شد استفاده از هواده (گروه ۵) اختلاف معنی‌داری ($p>0/05$) را در کاهش غلظت آمونیاک آب نشان نداد (جدول ۱). از آنجا که هواده در روند آزمایشها نخواهد گذاشت، در ادامه از هواده فقط جهت نیازهای تنفسی ماهی استفاده گردید.

با استفاده از شیب خط رگرسیون و منحنی تغییرات مربوط به درصد تلفات در غلظت‌های مختلف آمونیاک میزان LC50 در ۲۴ ساعت برابر $15/77$ میلی‌گرم در لیتر (معادل $0/28$ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک غیر یونیزه) به‌دست آمد (شکل ۱). البته میزان بدست آمده در شرایط آزمایشی ($0/28$ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک غیر یونیزه) در شرایط بهینه از نظر دمایی و pH و بدون وجود سایر عوامل نامساعد محیطی برای ماهی به‌دست آمده است. در محیطهای پرورشی با توجه به اینکه عوامل مضر دیگر از جمله سولفید هیدروژن، متان و همچنین شرایط نامساعد محیطی از جمله کمبود اکسیژن و بالا بودن درجه حرارت نیز ممکن است وجود داشته باشد، لذا این عوامل می‌توانند سمیت آمونیاک را تشدید کنند. بنابراین مقادیر کمتر آمونیاک نیز می‌تواند باعث تلفات در ماهیها شود.

هرچند سن و اندازه ماهی نیز در حساسیت آنها به آمونیاک مؤثر است (۱، ۴، ۵). بعنوان نمونه طی آزمایشی که بر روی اسمولت ماهی آزاد صورت گرفت غلظت نیمه‌کشنده آمونیاک بعد از ۴۸ ساعت برابر $0/34$ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک غیر یونیزه به‌دست آمد (۱۲).

در ارتباط با مرگ و میر ماهیها دلایل متعددی وجود دارد:

تخریب لوله‌های کلیوی و گلو مریها، عمل کلیه را مختل ساخته و سبب مرگ ماهی می‌شود. در اثر آسیبهای آبشش، تنظیم اسمزی ماهی بهم خورده، کاهش اکسیژن رسانی به بافتها صورت گرفته که منجر به اختلالات تنفسی و در نهایت مرگ ماهی می‌شود.

استفاده از مقادیر مختلف زئولیت (۳۰ و ۱۵ گرم در لیتر) در شرایط آزمایشگاهی بعد از گذشت ۱۴۴ ساعت نتوانست غلظت آمونیاک را به صفر برساند و تنها حدود ۸۰ درصد آن را جذب کرد (جدول ۴). هر چه میزان آمونیاک آب بیشتر باشد میزان آمونیاک بیشتری جذب زئولیت می‌شود، ولی با کاهش غلظت آمونیاک کارایی زئولیت در جذب آن کاهش می‌یابد. در ضمن هرچه ذرات زئولیت ریزتر باشد، سطح تماس مولکولها بیشتر شده و سرعت جذب بالا می‌رود، بطوریکه وقتی از آرد زئولیت در مقایسه با گرانول و تکه‌های زئولیت در حضور هواده استفاده شد، بیشترین میزان جذب آمونیاک را شاهد بودیم (جدول ۱). این امر با سایر آزمایشاتی که صورت گرفته مطابقت دارد (۱۴ و ۱۶).

زئولیتها با جذب یونهای کلسیم و منیزیم آب باعث کاهش سختی کل آب می‌شوند، که این امر کارایی زئولیت را در جذب آمونیاک آب کاهش می‌دهد، به‌طوریکه در شرایط این آزمایش استفاده از ۱۵ گرم زئولیت نتوانست سختی کل آب را بعد از گذشت ۱۴۴ ساعت از 400 میلی‌گرم در لیتر کربنات کلسیم به 260 میلی‌گرم در لیتر کربنات کلسیم برساند (جدول ۴).

سختی کل آب که مجموعه‌ای از یونهای کلسیم و منیزیم موجود در آب می‌باشد، علاوه بر اینکه باعث کاهش کارایی زئولیت در جذب یون آمونیوم آب می‌شود، خاصیت تامپونی آب را از بین برده و سبب نوسانات pH در طول شبانه روز در آبهای ساکن می‌گردد. البته باید توجه داشت که تأثیر زئولیت در کاهش سختی آب کمتر از آمونیاک آب است که علت آن را نیز می‌توان در ارتباط با تمایل جذبی بیشتر زئولیت برای یون آمونیوم نسبت به یون کلسیم و منیزیم دانست (۷، ۱۰ و ۱۱).

استفاده از زئولیت بعد از گذشت ۱۴۴ ساعت، هدایت الکتریکی محلول را افزایش داد (جدول ۴). با توجه به اینکه یون خارجی قابل تبادل در زئولیت مورد آزمایش (کلینوپتیلولیت) سدیم می‌باشد، علت آن را می‌توان نتیجه تبادل یون آمونیوم با یون سدیم دانست (۷ و ۸). زئولیت تأثیری در غلظت نیترات و نیتریت نداشت (جدول ۴). همانطوریکه اشاره شد، با توجه به اینکه زئولیت کلینوپتیلولیت از نوع تبادل کاتیونی است، لذا این امر بیانگر آن است که زئولیت مورد استفاده قادر به جذب آنیونها از محیط نیست (۱۰ و ۱۳).

استفاده از زئولیت طبیعی به میزان ۱۵ گرم در لیتر در غلظت کشنده آمونیاک (۲۵ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک کل) توانست تلفات ماهیها را به صفر برساند (جدول ۳). در حالی که برای ماهی کپور در غلظت کشنده (۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک کل) استفاده از ۱۰۰ گرم در لیتر زئولیت کلینوپتیلولیت توانست تلفات ماهیها را بعد از گذشت ۲۴ ساعت به صفر برساند (۱). با مقایسه این دو گونه ماهی (کپور و قزل آلا) مشاهده

می‌شود غلظت کشنده آمونیاک در ۲۴ ساعت برای ماهی قزل آلا (۲۵ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک کل) بسیار کمتر از غلظت کشنده آمونیاک برای ماهی کپور (۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک کل) است، با این وجود مقدار زئولیت بکار برده شده در غلظت کشنده آمونیاک برای ماهی قزل آلا (۱۵ گرم در لیتر) به مراتب بیشتر از مقدار زئولیت بکار برده شده در غلظت کشنده آمونیاک برای ماهی کپور (۱۰ گرم در لیتر) است. این امر حساسیت ماهی قزل آلا را نسبت به آمونیاک در مقایسه با سایر کپور ماهیان نشان می‌دهد.

جدول ۳ کاربرد زئولیت طبیعی را در کاهش آمونیاک و جلوگیری از تلفات در ماهی قزل آلا نشان می‌دهد، هر چند در ماهیهایی که توسط زئولیت زنده مانده‌اند، هنوز درجاتی از خونریزی و هیپرپلازی دیده می‌شود (شکل‌های ۶ و ۷) که می‌تواند در دراز مدت و در طول دوره پرورش اعمال فیزیولوژی جانور را تحت تأثیر قرار دهد و موجب کندی رشد ماهی گردد و یا اینکه بهبود یابد. در هر حال استفاده از زئولیت در آبهای شیرین نتایج مثبتی را نشان می‌دهد (۱، ۱۰ و ۱۴)، بطوریکه زئولیت قادر به جذب ۹۰-۸۰ درصد آمونیاک محیط‌های آب شیرین می‌باشد و پس از آن بعد از گذشت ۹۶ ساعت به حالت اشباع در آمده و کارایی خود را از دست می‌دهد (جدول ۴)، لذا برای احیاء مجدد باید آنها را از محیط آبی خارج ساخت و در یک محلول نمکی (NaCl) شستشو داد تا دوباره به حالت اولیه برگردد (زیرا یون قابل تبادل در زئولیت، Na می‌باشد) (۱، ۷ و ۱۴). بطور کلی استفاده از زئولیت در آبهای شیرین نتایج مثبتی را نشان داده است ولی در آبهای شور کارایی زئولیت به شدت کاهش می‌یابد. با



مطالعه‌ای که بر روی میگوها در آب‌شور صورت گرفت، نشان داده شد که جذب آمونیوم و سایر احیاء آن و همچنین تکرار این روند نوسان متوالی غلظت آمونیوم را می‌شود. همچنین مشخص گردید که استفاده از زئولیت تاثیر مستقیم بر افزایش رشد و درصد بازماندگی میگوها در شرایط آزمایشی مورد مطالعه ندارد (6).

با توجه به یافته‌های به دست آمده در شرایط این آزمایش، استفاده از زئولیت ممکن است در بهبود شرایط زیست محیطی ماهی یا میگو به قرار زیر مؤثر باشد (6):

زئولیت‌ها با ایجاد یک پوشش فیزیکی مناسب در روی مواد آلی بستر از طریق جذب سطحی گازهای سمی مانند سولفید هیدروژن و متان، می‌تواند اثرات مثبتی بر رشد ماهی و میگو داشته

و با جذب یون آمونیوم از محیط آب شیرین، سبب بهبود وضعیت کیفی آب و در نهایت سبب بهبود رشد و بقاء ماهیان می‌گردد. همچنین می‌تواند با جذب یونهای مثبت آب از جمله کلسیم، خصوصیات فیزیوشیمیایی آب را تحت تاثیر قرار دهد، بدون آنکه تأثیری بر بافت‌های ماهی داشته باشد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از زحمات آقایان دکتر رقیمی، دکتر یغمایی، مهندس نعیمی و مهندس خیرآبادی و آقای لطیفی که صمیمانه ما را در اجرای مراحل مختلف انجام این طرح یاری رساندند، تشکر و قدردانی می‌نمایم.

منابع

1. پیغان، ر. ۱۳۷۸. بررسی تجربی مسمومیت حاد با آمونیاک در کپور معمولی بر اساس تغییرات هیستوپاتولوژیک و آنزیمهای سرمی و امکان پیشگیری آن با زئولیت. پایان‌نامه دکتری تخصصی بهداشت و بیماریهای آبزیان. دانشگاه تهران. ۱۰۴ ص.
2. چالکش امیری، م. ۱۳۷۸. اصول تصفیه آب. انتشارات نشر ارکان اصفهان. ۴۴۲ ص.
3. رجیبی، ف. و ح. تقی نصیری. ۱۳۸۰. پرورش ماهی قزل‌آلا در استخرهای خاکی. معاونت تکثیر و پرورش آبزیان. ۲۶ ص.
4. شریف‌روحانی، م. ۱۳۷۴. تشخیص، پیشگیری و درمان بیماریها و مسمومیتهای ماهی، معاونت تکثیر و پرورش آبزیان. انتشارات سبز رویش. ۲۵۶ ص.
5. مشائی، م. ۱۳۷۹. راهنمای تکثیر و پرورش ماهی قزل‌آلا. تهران. انتشارات نور بخش. ۲۵ ص.
6. مکرمی، ق. ۱۳۷۹. کاربرد زئولیت در پرورش میگو. پایان‌نامه کارشناسی ارشد شیلات. دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال. ۱۱۸ ص.
7. Bergero, D., M. Boccignone, and G.B. Palmegiano. 1994. Ammonia removal capacity of European natural zeolite tuffs: Application to aquaculture waste water. *Aqua. and fish. Manag.* 25:813-82.
8. Gottardi, G., and E. Galli. 1985. *Natural zeolite*, 2nd ed. Springer Verlag, Berlin. 409 pp.
9. Greenberg, A. E., A.D. Eaton, and L.S. Clesceri. 1992. *Standard methods for the examination of water and waste water*, 18th ed. Maryannh Franson, American public Health Association, Washington. 1037 pp.



10. Kayabali, K.; H, Kezer. 1998. Testing the ability of bentonite amended natural zeolite (clinoptilolite) to remove heavy metals from liquid waste. J. Environ. Geo. 34: 95-100.
11. Keith, F. 1981. The Encyclopedia of mineralogy, 2-nd ed. Hatchincon Ross is publishing company, Pennsylvania. Chapt (10) 523-530.
12. Knoph, M.B. 1996. Gill ventilation frequency and mortality of Atlantic salmon (*salmo salar*) exposed to high ammonia levels in sea water. Water. Res. oxford. 30: 837-842.
13. Mumpton, F.A., and P.H. Fishman. 1977. The application of natural zeolite animal science and aquaculture. J. Anim. Sci. 45: 1188-1203.
14. Sommai, Ch., and C. Boyd. 1993. Effects of zeolite, formalin, bacteria augmentation, and aeration on total ammonia nitrogen concentration. Aqua. 116: 35-45.
15. Tudor, M., I. Katavic, and J.M. Lucic. 1994. Acute toxicity of ammonia to juvenile sea bass (*Dicentrarchus Labrax*) at different aeration levels. Aqua. 128: 85-95.



Study of natural zeolites efficiency for reduction of ammonia Toxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).

M. Farhangi, A. Kamali and A. Hajimoradloo

Department of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Abstract

The role of natural zeolite efficiency for absorption of ammonia in rainbow trout has been studied. The fish weight were 9.5-21 grams that exposed to four different concentrations of 10-25mg/l (10,15,20,25 mg/l) total ammonia nitrogen. A group of 13 fish considered as control. Lethal and sublethal concentrations of during 24 hours determined. Under stable temperature and pH condition ($T=16\pm 1^{\circ}\text{C}$, $\text{PH}=7.7-7.8$) the lethal concentration of total ammonia nitrogen was 25 mg/l. In lethal concentration of ammonia different amounts of zeolite (2,5,10,13,15 g/l) were used. Application of 15g/l could prevent mortalities. Samples were taken from liver, gill and kidneys of fish (exposed lethal ammonia as groups with only zeolite) and histopathological sections were prepared.

The histopathologic lesions were studied. The major lesions in the gills were hemorrhag, hyperplasia, edema and epithelial cells necrosis.

In the kidney lesions were degenerated tubules of kidney, expansion of Bowman's capsule, hemorrhage and hyperamia. In liver the lesions were hepatocytes necrosis, hemorrhage and hyperamia.

Keywords: Rainbow trout; Ammonia; Zeolite; Gill; Kidney; Liver

۲۰۸

