



Original Research Paper

Investigation of interactive effect of salinity and ammonia poisoning on some hematology factors and antioxidant capacities in oxidative stress reactions of tilapia (*Oreochromis niloticus*)

Javad Motamedi Tehrani ^{1*}, Rahim Peyghan ¹, Ali Shahriari ¹, Mohammad Razi jalali ¹, Eisa Ebrahimi ²

¹ Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

² Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

Key Words

Ammonia poisoning
Salinity
Tilapia
Hemoglobin
Oxidative stress

Abstract

Introduction: The present study was designed to investigate the interaction effect of acute and subacute ammonia toxication in different salinity levels (0, 4, 8 and 12 g/l) on some hematological factors and oxidative enzymes in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*).

Materials & Methods: To investigate the interactions, 360 fish (57.32±16.7 g) were randomly divided into 12 treatment groups (each with three replicates). At the end of the experiment (96 hour), hemoglobin, hematocrit, red blood cell count, catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH) were measured. According to the results, LC₅₀- 96 hours of NH₃ was 0.86 mg/l.

Result: The results showed that hematocrit, hemoglobin, glutathione, superoxide dismutase and catalase decreased in treatment of acute ammonia poisoning and 0 salinity and treatment of subacute poisoning and 0 salinity compared to treatment 1 (control) (P<0.05). The results showed that increasing salinity levels in treatments improved catalase and superoxide dismutase levels.

Conclusion: In general, the results indicate that ammonia poisoning maybe by producing free radicals has weakened the antioxidant system of fish. Also ammonia toxicity effects were decreased with increasing water salinity, which reduced oxidative stress enzymes.

* Corresponding Author's email: jmotamedi124@gmail.com

Received: 28 August 2020; Reviewed: 4 October 2020; Revised: 6 December 2020; Accepted: 10 January 2021

(DOI): [10.22034/AEJ.2020.251884.2372](https://doi.org/10.22034/AEJ.2020.251884.2372)

مقاله پژوهشی

بررسی اثر تداخلی شوری و مسمومیت آمونیاکی بر بعضی فاکتورهای خونی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در واکنش‌های استرس اکسیداتیو ماهی تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*)

جواد معتمدی‌تهرانی^{۱*}، رحیم پیغان^۱، علی شهریاری^۱، محمد راضی‌جلالی^۱، عیسی ابراهیمی^۲

^۱ گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

^۲ گروه شیلات، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

کلمات کلیدی

مقدمه: پژوهش حاضر به منظور بررسی اثر متقابل مسمومیت حاد و تحت حاد با آمونیاک در سطوح مختلف شوری صفر، ۴، ۸ و ۱۲ گرم در لیتر بر برخی شاخص‌های خون‌شناسی و استرس اکسیداتیو خون ماهی تیلاپیا نیل طراحی شد. **مواد و روش‌ها:** به این منظور، ۳۶۰ قطعه ماهی (۵۷/۱۶±۳۲/۷ گرم) به طور تصادفی در ۱۲ تیمار (هر کدام در سه تکرار) تقسیم شدند. در پایان دوره آزمایش (۹۶ ساعت) مقدار هموگلوبین، هماتوکریت، تعداد گلبول قرمز، میزان آنزیم کاتالاز (CAT)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و گلوکاتیون احیاء (GSH) سرم خون ماهیان اندازه‌گیری شد. **نتایج:** طبق نتایج میزان LC50 در ۹۶ ساعت آمونیاک ۰/۸۶ میلی‌گرم در لیتر بود. نتایج نشان داد که در میزان هماتوکریت، هموگلوبین، گلوکاتیون احیاء، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز کاهش معنی‌داری بین تیمار مسمومیت آمونیاک حاد، شوری صفر و تیمار مسمومیت تحت حاد و شوری صفر نسبت به تیمار شاهد وجود داشت ($P < 0/05$). نتایج نشان داد که افزایش سطوح شوری در تیمارهای تحت آزمایش، باعث کاهش میزان کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز شد ($P < 0/05$). **نتیجه‌گیری و بحث:** به طور کلی نتایج نشان می‌دهد که مسمومیت با آمونیاک احتمالاً با تولید رادیکال‌های آزاد باعث تضعیف سیستم آنتی‌اکسیدانی ماهی تیلاپیا می‌شود. از طرفی افزایش شوری با کاهش سمیت آمونیاکی منجر به کاهش استرس اکسیداتیو شده است.

مقدمه

امروزه یکی از مهم‌ترین نگرانی‌های بشر مسئله افزایش مواد آلاینده در محیط زیست به خصوص منابع آبی است که به صورت فاضلاب، نشن نفت، پساب‌های مواد آلی و معدنی کارخانجات، مواد شیمیایی گوناگون اعم از فلزات که موجب آلودگی منابع آبی جهان به اشکال مختلف می‌شوند. یکی از مهم‌ترین آلاینده‌های محیط‌زیست ترکیبات نیتروژنی هستند. مواد نیتروژن‌دار به طرق مختلف مثل تماس منابع آب با فاضلاب و یا تخلیه آب‌های شستشوی زمین‌های کشاورزی در رودخانه و از همه مهم‌تر اکسیداسیون مواد آلی نیتروژن‌دار نظیر پروتئین‌ها که به کمک باکتری‌های خاص، تولید می‌شود (۱). این افزایش خصوصاً در سیستم‌های تکثیر ماهی و میگو، سیستم‌های فوق متراکم پرورش ماهی با گردش مجدد آب، آکواریوم‌ها و در هنگام انتقال ماهی همواره مطرح بوده است. غلظت ترکیبات نیتروژنی معدنی در سراسر جهان (NO_3^- ، NO_2^- ، NH_4^+) در حال افزایش هستند، که باعث اثرات قابل توجهی در بسیاری از موجودات آبی و در نهایت، موجب کاهش کیفیت آب شیرین، مصب‌ها و اکوسیستم‌های دریایی ساحلی و کاهش کیفیت منابع غذایی می‌شوند (۲). آمونیاک متداول‌ترین آلودگی در آب‌های شیرین است، که می‌تواند از طریق خروج مواد زائد گیاهی، تخریب مواد آلی حاوی نیتروژن، رواناب، کود و منابع صنعتی وارد سیستم‌های آبی طبیعی شود. آمونیاک به‌عنوان یک محصول از کاتابولیسم پروتئین در ماهیان استخوانی، یکی از سمی‌ترین مواد برای اکوسیستم‌ها و ارگانسیم‌های آبی شناخته شده است (۳). و با اثر مستقیم روی رشد موجودات آبی، منجر به کاهش رشد و کاهش مقاومت نسبت به بیماری‌ها و در نهایت تلفات ماهی در سیستم‌های پرورش متراکم می‌شود (۴، ۵، ۶). ماهیان در نقل و انتقال از جایی به جایی می‌توانند در معرض مسمومیت با آمونیاک قرار گیرند و یا کوددهی بیش از حد در استخرهای مزارع و یا وارد شدن فاضلاب‌های شهری و صنعتی در منابع آبی می‌تواند باعث افزایش آمونیاک شود، لذا با توجه به اهمیت نقش آمونیاک در آلودگی آب به اشکال مختلف و امکان ورود این ماده به منابع آبی به طرق مختلف، لزوم بررسی تغییرات داخلی بدن در اثر مسمومیت آمونیاکی محسوس به نظر می‌رسد (۷). دو شکل از آمونیاک در آب تشکیل می‌شود که شامل آمونیاک غیر یونیزه NH_3 و یونیزه NH_4^+ است و میزان نسبی هر کدام بستگی به میزان اسیدیته و دما دارد (۸، ۹). فرم غیر یونیزه آمونیاک برای ماهی بسیار سمی است در حالی که فرم یونیزه آن سمیت بسیار کم‌تری دارد. آمونیاک غیر یونیزه عمدتاً از طریق آبشش‌ها وارد ماهی می‌شود و به آسانی از اپیتلیوم آبشش عبور کند (۱۰). قرار گرفتن ماهی در برابر سطح بالای آمونیاک باعث افزایش تغییرات سریع در سطوح ترکیبات پلازما می‌شود و این امر ممکن است باعث تجمع آمونیاک در بدن ماهی شود (۱۱). عوامل محیطی مختلفی بر میزان سمیت آمونیاک در آبزیان اثر بگذارد. در ماهیان، مهم‌ترین عوامل اسیدیته، دما هستند (۱۲، ۱۳). همچنین فاکتورهای محیطی از قبیل اکسیژن

محلول (۱۴، ۱۵)، دما، اسیدیته، شوری، آمونیاک (۱۶)، فلزات سنگین (۱۷، ۱۸، ۱۹) و سموم دفع آفات (۲۰) می‌توانند با افزایش میزان رادیکال‌های آزاد باعث آسیب‌های اکسیداتیو شوند. آبزیان در برخورد با استرس‌های اکسیداتیو دو دفاع دارند که شامل دفاع آنزیمی اکسیداتیو (گلوتامین سنتتاز: Glutamine synthetase، گلوتامین ردوکتاز: Glutathione reductase، گلوتامین پراکسیداز: Glutathione peroxidase، کاتالاز: Catalase، سوپراکسید دیسموتاز: Superoxide dismutase) و دفاع غیر آنزیمی (گلوتامین، کارتوئیدها، ویتامین C، A و E) می‌شوند (۲۱، ۲۲، ۲۳، ۲۴). تحقیقات نشان می‌دهد که رژیم غذایی آبزیان می‌تواند بر عملکرد دفاع آنتی‌اکسیدانی موثر باشد (۲۵). تولید جهانی ماهی تیلاپیا نیل در سطح آبی‌پروری در سال ۲۰۱۸ بالغ بر ۲ هزار تن تولید جهانی این ماهی بوده است (۲۶). ماهی تیلاپیا به‌خاطر رشد غیر قابل انکار، رشد سریع، امکان پرورش متراکم و کاهش نیاز به تعویض آب در شرایط کمبود کشور ایران، می‌تواند در آینده نه چندان دور به یکی از تولیدات آبی‌پروری در سطح تجاری در ایران تبدیل شود. با توجه به شور شدن بسیاری از آب‌های جاری و تالاب‌ها، امکان نوسانات شوری در استخرهای پرورشی، سیستم‌های متراکم در اثر عدم مدیریت صحیح آب و غذاهای، ورود فاضلاب‌های شهری یا صنعتی و زهکش‌ها وجود دارد که این تداخل بین میزان آمونیاک و شوری ممکن است باعث تغییرات احتمالی در فیزیولوژی و ایجاد استرس و کاهش مقاومت نسبت به بیماری‌ها شود. لذا تحقیق حاضر در سه سطح مسمومیت آمونیاکی (آب بدون آمونیاک، غلظت تحت حد و حد) در چهار سطح شوری صفر، ۴، ۸ و ۱۲ گرم در لیتر به منظور بررسی تاثیر متقابل شوری و آمونیاک بر شاخص‌های مهم خونی و استرس اکسیداتیو ماهی تیلاپیا انجام شد.

مواد و روش‌ها

تهیه ماهی: تعداد ۵۰۰ قطعه ماهی تیلاپیا با میانگین وزن $57/16 \pm 32/7$ گرم و میانگین طول $13/72 \pm 2/6$ سانتی‌متر از یک مرکز تکثیر و پرورش ماهی در شهرستان قم تهیه شد و به‌منظور آداپتاسیون به مدت یک هفته در آکواریوم‌های حاوی آب لوله‌کشی کلرزدايي شده (در شرایط مشابه محیطی و تغذیه‌ای) نگهداری شدند. هم‌چنین تعویض آب، روزانه انجام شد. برای ایجاد غلظت‌های مورد نیاز آمونیاک، از کلرید آمونیوم (NH_4Cl) ساخت شرکت مرک آلمان با خلوص ۹۹٪ مورد استفاده قرار گرفت. هدایت الکتریکی با استفاده از EC متر (شرکت JENWAY مدل ۴۳۱۰) و هم‌چنین اسیدیته با استفاده از pH متر (Metrohm مدل ۷۴۴) اندازه‌گیری شد.

تعیین LC_{50} آمونیاک در ماهی تیلاپیا: برای محاسبه غلظت کشنده آمونیاک، ماهیان در آکواریوم‌های مجزا (هر آکواریوم ۱۰ قطعه)، با غلظت‌های تصاعدی کلرید آمونیوم مجاور شدند. تعویض آب در طول ۹۶ ساعت به صورت روزانه و کامل انجام شد و در هر روز غلظت‌های مورد نظر کلرید آمونیوم به آب تازه اضافه شد. سپس تلفات در طی آزمایشات بررسی و ثبت گردید. بعد از ثبت تلفات، اقدام به تعیین

بدین صورت است، که معرف المن (دی‌تیو- بیس نیتروبنزوتیک‌اسید) با گروه‌های سولفیدیل احیاء (GSH) واکنش داده و تولید کمپلکس رنگی می‌کند. ۱۵ میکرولیتر نمونه با ۲۶۰ میکرولیتر از بافر فسفات با pH=۸ و محتوی ۱ میلی‌مول اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (Ethylene di amin tetraacetic acid =EDTA) مخلوط شده و ۵ میکرولیتر از معرف المن به آن اضافه نموده، سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد و میزان جذب در طول موج ۴۱۲ نانومتر، با استفاده از دستگاه میکروپلیت‌ریدر در مقابل نمونه بلانک قرائت شد. اندازه‌گیری کاتالاز (CAT)، براساس روش Koroluk و همکاران (۳۲) انجام شد. اساس آزمایش به این صورت است که، آمونیوم مولیبدات با پراکسید هیدروژن موجود در محیط تشکیل کمپلکس زرد رنگی می‌دهد که در طول موج ۴۱۰ نانومتر با روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد. در این مطالعه، سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با استفاده از کیت تجاری رندوکس (Randox3) انگلستان، انجام شد. در این روش، گزانتین و گزانتین اکسیداز، تولید رادیکال‌های سوپراکسید می‌کند که این رادیکال‌های آزاد با کروموژن I.N.T واکنش داده و تشکیل رنگ قرمز فورمازان را می‌دهد، بنابراین میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز از طریق مهار این واکنش و جلوگیری از تشکیل رنگ قابل اندازه‌گیری است. بنابراین میزان بازدارندگی (مهار) در طول موج ۵۰۵ نانومتر با استفاده از دستگاه میکروپلیت‌ریدر در زمان‌های صفر و ۳ دقیقه، اندازه‌گیری شد (۳۳).

جدول ۱: تیمار بندی آزمایش

تعداد ماهی	گروه	تیمار
۱۰ قطعه (در سه تکرار)	آب شیرین	تیمار ۱
۱۰ قطعه (در سه تکرار)	آب با شوری ۴ گرم در لیتر	تیمار ۲
۱۰ قطعه (در سه تکرار)	آب با شوری ۸ گرم در لیتر	تیمار ۳
۱۰ قطعه (در سه تکرار)	آب با شوری ۱۲ گرم در لیتر	تیمار ۴
۱۰ قطعه (در سه تکرار)	مسمومیت آمونیاکی حاد (آب شیرین)	تیمار ۵
۱۰ قطعه (در سه تکرار)	مسمومیت آمونیاکی حاد- شوری ۴ گرم در لیتر	تیمار ۶
۱۰ قطعه (در سه تکرار)	مسمومیت آمونیاکی حاد- شوری ۸ گرم در لیتر	تیمار ۷
۱۰ قطعه (در سه تکرار)	مسمومیت آمونیاکی حاد- شوری ۱۲ گرم در لیتر	تیمار ۸
۱۰ قطعه (در سه تکرار)	مسمومیت آمونیاکی تحت حاد (آب شیرین)	تیمار ۹
۱۰ قطعه (در سه تکرار)	مسمومیت آمونیاکی تحت حاد- شوری ۴ گرم در لیتر	تیمار ۱۰
۱۰ قطعه (در سه تکرار)	مسمومیت آمونیاکی تحت حاد- شوری ۸ گرم در لیتر	تیمار ۱۱
۱۰ قطعه (در سه تکرار)	مسمومیت آمونیاکی تحت حاد- شوری ۱۲ گرم در لیتر	تیمار ۱۲

تجزیه و تحلیل آماری: این تحقیق در قالب یک طرح فاکتوریل ۴×۳ انجام شد. به منظور ارزیابی نتایج حاصل از تحقیق ابتدا نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگوروف اسمیرنوف (Kolmogorov-Smirnov) و همگنی واریانس‌ها با استفاده از آزمون لون (Levene) مورد بررسی قرار گرفت نتایج حاصل از این بررسی با استفاده از نرم‌افزار

LC50 در ۹۶ ساعت با استفاده از نرم‌افزار spss و رگرسیون پروبیت شد. در طول دوره آزمایش فاکتور فیزیکی و شیمیایی آب مثل دما، اسیدیته (ثابت نگه‌داشتن اسیدیته با استفاده از هیدروکلریک اسید ۰/۴ نرمال و سدیم هیدروکسید ۰/۴ نرمال)، ثابت نگه‌داشته شد. میزان آمونیاک پس از محاسبه TAN (مجموع آمونیاک یونیزه شده و غیر یونیزه شده) با روش کلدال و استفاده از دما، اسیدیته و نسبت TAN از جدول استاندارد محاسبه شد (۱۳).

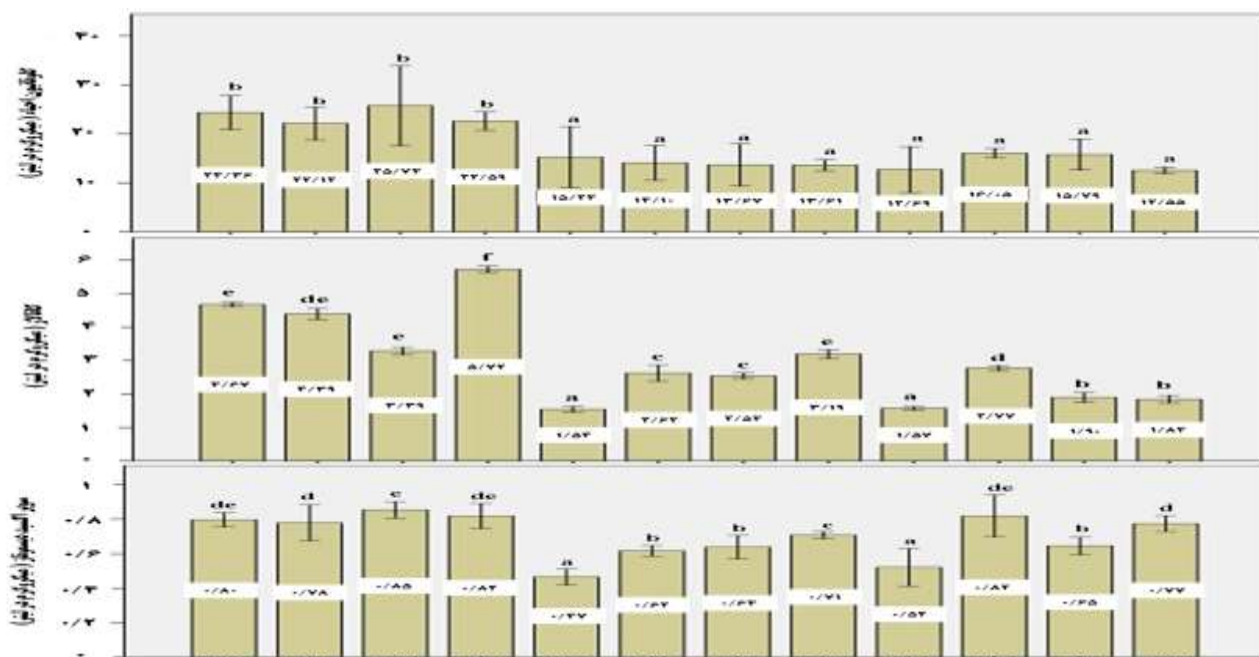
تیمار بندی ماهیان: ماهیان در آکواریوم‌های مجزا، در هر تکرار ۱۰ قطعه ماهی با مسمومیت آمونیاکی حاد (با غلظت ۰/۵۰٪ کشنده در ۹۶ ساعت) و تحت حاد (۰/۳۰٪ غلظت کشنده ۰/۵۰٪ در ۹۶ ساعت) در شوری‌های مختلف طبق جدول ۱ مجاور شدند (۲۷). تعویض آب در طول ۹۶ ساعت به صورت روزانه و کامل انجام شد و در هر روز غلظت‌های مورد نیاز از کلرید آمونیم به آب تازه اضافه شد. قبل از شروع آزمایش در یک مخزن به میزان مورد نیاز آب بافر تهیه شد. به منظور تهیه آب بافر با اسیدیته ثابت مقدار مشخصی از هیدروکلریک اسید ۰/۴ نرمال و سدیم هیدروکسید ۰/۴ نرمال به آب مخزن اضافه شد. نمونه برداری در سه مرحله (ابتدا چهار تیمار اول، چهار تیمار دوم و در نهایت چهار تیمار سوم) انجام گرفت. در طول دوره ۹۶ ساعت، هر روز فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی تیمارها انجام شد. بعد از اتمام هر مرحله آب بافر تازه برای مرحله بعدی تهیه و به مدت یک هفته مقدار اسیدیته آب مخزن اندازه‌گیری شد تا از ثابت بودن اسیدیته اطمینان حاصل شود. **خونگیری از ماهی‌ها:** پس از اتمام دوره آزمایش، از هر تیمار ۶ قطعه ماهی با سرنگ از طریق ورید ساقه دمی خونگیری صورت گرفت. بخشی از نمونه‌های خون در لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد هپارین برای مطالعات خون‌شناسی و بقیه برای مطالعات آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت. سرم‌های جدا شده تا زمان اندازه‌گیری در دمای C° ۸- نگه‌داری شد.

بررسی فاکتورهای خونی: مقدار هموگلوبین هر نمونه خون به وسیله کیت مخصوص و به روش کلرومتریک با طول موج ۵۴۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر، مقدار جذب نور ثبت و غلظت هموگلوبین محاسبه شد (۲۸). جهت اندازه‌گیری هماتوکریت لوله‌های موئینه هپارینه با نمونه‌های خون پر شد و پس از آن با خمیر مخصوص بسته شد و به وسیله سانتریفیوژ میکروهیاتوکریت با سرعت ۷۰۰۰×g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و مقدار حجم سلولی یا هماتوکریت هر نمونه خون محاسبه شد (۲۹). برای شمارش تعداد گلبول قرمز از پیت‌های حباب‌دار (ملانژور) قرمز استفاده شد. تعداد گلبول قرمز با استفاده از لام نوبار بعد از رقیق‌سازی خون منعقد نشده با محلول ریس (رقت ۱/۲۰۰) شمارش شد. از مربع میانی (۵ خانه وسط) لام نوبار برای شمارش گلبول قرمز استفاده شد. تعداد گلبول‌های قرمز در یک میلی‌متر مکعب خون محاسبه شد (۳۰).

شاخص‌های استرس اکسیداتیو: اندازه‌گیری گلوکاتاتیون احیاء (GSH) براساس روش Ellman (۳۱) انجام شد. عملکرد این آزمایش

جدول ۴: اثر تیمارهای تداخلی سطوح مختلف مسمومیت آمونیاک و شوری بر شاخص‌های خون‌شناسی خون ماهی تیلاپیا بعد از ۹۶ ساعت

تیمار	هموگلوبین (گرم در دسی‌لیتر)	هما توکریت (درصد)	گلوبول‌های قرمز ($\times 1000$ سلول در میلی‌متر مکعب)
۱	۱۲/۸۷±۲/۵۹ ^d	۲۶/۳±۵/۴ ^c	۴۶/۹۵۰±۱/۸۵۶ ^{eg}
۲	۱۴/۱۹±۰/۴۳ ^d	۲۷/۶±۳/۵۷ ^c	۴۸/۲۵۰±۳/۵۳۵ ^{ig}
۳	۱۴/۷۵±۰/۴۱ ^d	۲۸/۵±۵/۸۸ ^c	۵۰/۵۰۰±۱/۹۹۲ ^{gh}
۴	۱۴/۴۴±۲/۳۴ ^d	۲۷±۲/۹۴ ^c	۴۹/۲۰۰±۱/۸۳۲ ^{gn}
۵	۵/۰۲±۰/۴۶ ^c	۸/۳۶±۵/۵۱ ^a	۴۲/۰۰۰±۱/۱۵۲ ^a
۶	۴/۰۹±۱/۰۸ ^{dc}	۴/۰۹±۱/۰۸ ^a	۴۴/۳۳۳±۲/۲۰۶ ^{de}
۷	۳/۵±۰/۱۸ ^{dc}	۳/۵±۰/۱۸ ^a	۴۵/۷۹۱±۳/۹۲۳ ^{er}
۸	۳/۳۷±۰/۲۱ ^{dc}	۲/۶۶±۱/۱۴ ^a	۴۱/۵۰۰±۱/۲۶۴ ^d
۹	۱/۷±۰/۴ ^a	۱۸/۵±۶/۲۴ ^d	۱۹/۰۶۲±۱/۸۱۸ ^{dc}
۱۰	۱/۸۶±۰/۴۵ ^a	۲۴±۲/۵۸ ^{dc}	۱۹/۹۳۷±۳/۱۱۱ ^c
۱۱	۲/۸±۱/۳۵ ^{ad}	۲۱/۳۳±۳/۲۱ ^{dc}	۱۶/۶۲۵±۲/۸۴۸ ^d
۱۲	۲/۲۳±۰/۷۲ ^{ad}	۲۲/۳۳±۳/۲۱ ^{dc}	۱۲/۱۸۷±۰/۸۲۶ ^a

وجود حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.05$).شکل ۱: میزان سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوکاتین احیاء سرم خون ماهی تیلاپیا در تیمارهای مختلف آزمایش بعد از یک دوره ۹۶ ساعته (انحراف معیار \pm میانگین)وجود حروف متفاوت در هر نمودار نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($P < 0.05$).

جدول ۵: مقدار p value حاصل از آزمون تجزیه واریانس دوطرفه فاکتورهای استرس اکسیداتیو حاصل از تیمارهای تداخلی مسمومیت آمونیاکی و شوری بر ماهی تیلاپیا

گلوکاتینون احیاء	سوپر اکسید دیسموتاز	کاتالاز	آمونیاک
۰/۰۰۱	۰/۰۰۸	۰/۰۰	آمونیاک
۰/۱۹۷	۰/۰۰	۰/۰۰۲	شوری
۰/۱۶۶	۰/۰۰	۰/۰۰	آمونیاک*شوری

اعداد کم‌تر از $p < 0.05$ معنی‌دار بودن متغیر مورد نظر را نشان می‌دهد.

بحث

دو شکل از آمونیاک در آب تشکیل می‌شود که شامل آمونیاک غیر یونیزه NH_3 و یونیزه NH_4^+ است که مجموع دو ترکیب فوق آمونیاک کل (TAN) را تشکیل می‌دهند و میزان نسبی هر کدام بستگی به

میزان اسیدیته، دما، دی اکسیدکربن، شوری و چته آبی دارد (۹). هرچه میزان دما و اسیدیته زیاد و مقدار شوری کم شود سمیت آمونیاک غیر یونیزه بیش‌تر می‌شود (۱۳). نتایج جدول ۲ مویید این موضوع است که در دما و اسیدیته تقریباً ثابت با افزایش شوری در سطح مسمومیت حاد، تحت حاد و بدون سمومیت با افزایش میزان هدایت الکتریکی (افزایش سطح شوری) میزان آمونیاک غیر یونیزه کاهش می‌یابد. در این تحقیق اثرات سمیت حاد آمونیاک بر ماهی تیلاپیا مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به‌دست آمده برای LC_{50} ۹۶ ساعت نشان داد که با افزوده شدن آمونیاک میزان مرگ و میر بچه ماهیان افزایش یافته است و با افزایش مدت زمان غلظت LC_{50} روند کاهشی داشته است. میزان غلظت کشنده ۵۰ درصد در گونه‌های مختلف، اندازه و شرایط کیفی آب منطقه متفاوت است. به‌طورمثال میزان ۱۷۳

انجام دادند و به این نتیجه رسیدند که میزان گلوبول‌های قرمز در گروهی که آمونیاک تزریق شده بود نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری پیدا کرد (۴۴). Ferreira da Costa و همکاران، روی القاء کوتاه‌مدت نیتريت در ماهی *Colossoma macropomum* بررسی نموده و گزارش دادند که میزان گلوبول‌های قرمز کاهش معنی‌دار را در گروه‌های در معرض نیتريت نشان داده است (۴۵). در مطالعه‌ای که Hedayati و Ghaffari، روی اثر سولفات مس (۰/۰۹ و ۰/۴۹ میلی‌گرم بر لیتر) در ماهی کپور نقره‌ای *Hypophthalmichthys molitrix* به‌مدت ۹۶ ساعت انجام دادند، میزان گلوبول‌های قرمز در گروه‌های در معرض سولفات مس نسبت به گروه شاهد به‌طور معنی‌داری پایین بود (۴۶). کاهش میزان گلوبول‌های قرمز و هماتوکریت، به‌عنوان یک نتیجه کم‌خونی می‌تواند به‌دلایل زیر باشد: کاهش نسبت گلوبول‌های قرمز به پلاسما خون ناشی از ضعیف شدن تنظیم اسمزی و آسیب آبشش (۴۷، ۴۸) و واکنش جبرانی با افزایش حجم حمل‌اکسیژن برای حمایت تبادل گاز، که تغییر در سد خونی-آب به‌دلیل تبادل گاز در لاملائی آبشش را نشان می‌دهد (۴۹). کاهش مقدار هموگلوبین و هماتوکریت، می‌تواند در پی کاهش و اندازه گلوبول‌های قرمز، تخریب گلوبول‌های قرمز، خونریزی داخلی، کم‌خونی و مسمومیت رخ دهد (۵۰). استرس اکسیداتیو تعادل میان اکسیدان‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها را به نفع اکسیدان‌ها به هم زده و این احتمالاً منجر به آسیب سلولی شده که باعث اکسیداسیون مولکول‌های زیستی مانند پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک، لیپیدها و کربوهیدرات می‌شود (۵۱، ۵۲، ۵۳). گلوکاتیون، یکی از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های سلولی است که انواع اکسیژن و متابولیت‌های واکنش‌پذیر را از بین می‌برد و هم‌چنین، می‌تواند نقش یک سوبسترا برای آنزیم‌های گلوکاتیون پراکسیداز ترانسفراز و S-گلوکاتیون که خنثی‌کننده سموم هستند را بازی کند (۵۴). تخلیه گلوکاتیون احیاء در نهایت باعث افزایش پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود، که به آسیب DNA، توقف کامل و کاهش مقاومت در برابر آسیب اکسیداتیو منجر می‌شود (۵۴، ۵۵). نتایج تحقیق حاضر نشان داد (شکل ۱) تیمارهای بدون مسمومیت آمونیاکی (۱، ۲، ۳ و ۴) نسبت به سایر تیمارها با مسمومیت آمونیاک حاد و تحت افزایش معنی‌داری را دارند ($P < 0.05$). احتمالاً به‌خاطر غلظت آمونیاک زیاد باعث ایجاد رادیکال‌های آزاد شده و سیستم آنتی‌اکسیدانی از قبیل گلوکاتیون دچار چالش کرده است. سوپراکسید دیسموتاز اولین خط دفاعی علیه گونه‌های اکسیژنی فعال است و افزایش فعالیت آن نشان‌دهنده افزایش تولید گونه‌های اکسیژنی فعال است (۵۶). این آنزیم با تبدیل رادیکال سوپر اکسید آنیون (O_2^-) به پراکسید هیدروژن (H_2O_2) می‌تواند سلول‌ها را از آسیب ناشی از رادیکال‌های فعال محافظت کند (۵۷). نتایج اندازه‌گیری سوپر اکسید دیسموتاز نشان داد که در بین تیمارهای شوری اختلاف معنی‌داری وجود ندارد ولی در مسمومیت آمونیاکی حاد (تیمار ۵) و تحت حاد (تیمار ۹) نسبت به تیمار شاهد کاهش معنی‌داری دیده شد ($P < 0.05$). احتمالاً دلیل کاهش میزان آنزیم سوپراکسید دیسموتاز،

LC50 آمونیاک در ۹۶ ساعت در کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) ۱۵ گرمی ۰/۹۹ میلی‌گرم در لیتر (۷)، تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) ۶/۳۷ میلی‌گرم در لیتر (۳۴)، قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) یک‌ماهه ۰/۸۴ میلی‌گرم در لیتر (۳۵) اندازه‌گیری شده است. از جمله تغییرات بیوشیمیایی در ماهیانی که در معرض غلظت بیش از حد آمونیاک قرار گرفته‌اند افزایش اسیدیته خون است که باعث اختلال در واکنش‌های آنزیمی غشاء سلول‌های پوششی می‌شود و به‌دلیل حساسیت مغز به این تغییرات می‌تواند عامل ایجاد علائم عصبی شود. آمونیاک باعث افزایش شاخص آدرنالین، نورآدرنالین و کورتیکواستروئیدهای خون است. به‌همین دلیل افزایش آمونیاک می‌تواند باعث کاهش فعالیت سیستم ایمنی، کاهش اینترفرون و کاهش تمایل به غذا شود که خود عاملی برای مستعد شدن ماهی به بیماری‌های مختلف است (۳۶). با توجه به این‌که آبیان مکانیسم‌های متفاوت در مقابل با افزایش آمونیاک دارند، مقدار حساسیت و مقاومت برخی گونه‌ها با هم یکسان نیست. یکی از این مکانیسم‌ها فعالیت آنزیم گلوکاتمین سنتتاز (*glutamine synthetase*) است (۳۷). این آنزیم موجب تبدیل ترکیبات آمونیاکی به گلوکاتمین می‌شود که از ترکیبات غیر سمی برای آبیان است که شدت عملکرد این مکانیسم در گونه‌های مختلف متفاوت است (۳۸). کبد و مغز نقش مهمی را در این مکانیسم بازی می‌کنند و عضلات نیز به‌عنوان جایگاه ذخیره‌ای موقت گلوکاتمین تولید شده در افزایش توان ماهی در مقابل مسمومیت آمونیاکی موثر هستند (۳۷). فاکتورهای خونی در ماهی به‌عنوان نشانه‌های فیزیولوژیکی واکنش به استرس بسیار مفید است (۳۹). نتایج جدول ۴ نشان داد مقدار هموگلوبین و هماتوکریت در تیمار مسمومیت حاد آمونیاک (تیمار ۵) و مسمومیت تحت حاد (تیمار ۹) نسبت به تیمار شاهد کاهش معنی‌داری داشتند ($P < 0.05$) و هم‌چنین افزایش میزان شوری به تنهایی در ۴ تیمار اول اثر معنی‌داری را نشان نداد. طبق نتایج به‌دست آمده (جدول ۴) تعداد گلوبول‌های قرمز در تیمار ۵ و ۹ نسبت به تیمار ۱ (شاهد) کاهش معنی‌داری داشتند ($P < 0.05$) و Thangam و همکاران، مطالعه‌ای را روی اثر سمیت آمونیاک (۱/۰۵ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک) بر میزان هموگلوبین به‌مدت ۳۵ روز در ماهی کپور معمولی با وزن ۵-۶ گرم انجام دادند و کاهش ۱۵ درصدی میزان هموگلوبین را در روز هفتم نسبت به گروه شاهد گزارش کردند (۴۰). هم‌چنین Avilez و همکاران، کاهش میزان هموگلوبین در ماهی *Brycon Cephalus* را در مواجهه با نیتريت محیطی گزارش دادند (۴۱). بیان شده است که علت کاهش هموگلوبین، می‌تواند مربوط به افزایش مصرف اکسیژن و افزایش میزان مت‌هموگلوبین در اثر آسیب به آبشش باشد (۴۲). مقدار هموگلوبین برای ماهی تیلاپیا ۹/۸-۷ گرم در دسی‌لیتر گزارش شده است که این مقدار در شرایط مختلف مثل موقعیت جغرافیایی، شرایط فیزیکی و شیمیایی، رژیم غذایی، شرایط میکروبی می‌تواند متغیر باشد (۴۳). Ren و همکاران، مطالعه‌ای را روی اثر مسمومیت حاد ۹۶ ساعته آمونیاک در ماهی *Carassius auratus*

2. Anusuya Devi, P., Padmavathy, P., Aanand, S. and Aruljothi, K., 2017. Review on water quality parameters in freshwater cage fish culture. *Int. j. appl. res.* 3(5): 114-120.
3. Bhatnagar, A. and Devi, P., 2013. Water quality guidelines for the management of pond fish culture. *International J of Environmental Sciences.* 3(6): 1980-2009.
4. Wang, Y. and Walsh, P.J., 2000. High ammonia tolerance in fishes of the family Batrachoididae (Toadfish and Midshipmen). *Aquatic Toxicol.* 50: 205-219.
5. Colt, J., 2006. Water quality requirements for reuse systems. *Aquacult. Eng.* 34: 143-156.
6. Lemarie, G., Dosdat, A., Coves, D., Dutto, G., Gasset, E. and Person, L.R.J., 2004. Effect of chronic ammonia exposure on growth of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquacult.* 229: 479-491.
7. Naji, T., Khara, H., Rostami, M. and Nasiri Parman, A., 2009. The effect of toxic ammonia on liver tissue of common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Environmental Science and Technology.* 11(1): 131-148. (In Persian)
8. Randall, D.J. and Tsui, T.K.N., 2002. Ammonia toxicity in fish. *Mar. Pollut. Bull.* 45: 17-23.
9. Shingles, A., McKenzie, D.J., Taylor, E.W., Moretti, A., Butler, P.J. and Ceradini, S., 2001. Effects of sublethal ammonia exposure on swimming performance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol.* 204: 2691-2698.
10. Hampson, B.L., 1976. Ammonia concentration in relation to ammonia toxicity during a rainbow trout rearing experiment in a closed freshwater-seawater system. *Aquacult.* 9: 61-70.
11. Person-Le Ruyet, J., Mahe, K., Le Bayon, N. and Delliou, H., 2004. Effects of temperature on growth and metabolism in a Mediterranean population of European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquacult.* 237: 269-280.
12. Augspurger, T., Keller, A.E., Black, M.C., Cope, W.G. and Dwyer, F.J., 2003. Water quality guidance for protection of freshwater mussels (Unionidae) from ammonia exposure. *Environ Toxicol Chem.* 22: 2569-2575.
13. Boyd, C.E. and Tucker, C.S., 2012. Pond aquaculture water quality management. Springer-Verlag New York, USA. 700 p.
14. Parrilla-Taylor, D.P. and Zenteno-Savin, T., 2011. Antioxidant enzyme activities in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to environmental hypoxia and reoxygenation. *Aquacult.* 318: 379-383.
15. Zenteno-Savin, T., Saldierna, R. and Ahuejote-Sandoval, M., 2006. Superoxide radical production in response to environmental hypoxia in cultured shrimp. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 142: 301-308.
16. Hegazi, M.M., Attia, Z.I. and Ashour, O.A., 2010. Oxidative stress and antioxidant enzymes in liver and white muscle of Nile tilapia juveniles in chronic ammonia exposure. *Aquat. Toxicol.* 99: 118-125.
17. Zhang, L., Qiu, L., Wu, H., Liu, X., You, L., Pei, D., Chen, L., Wang, Q. and Zhao, J., 2012. Expression profiles of seven glutathione S-transferase (GST) genes from *Venerupis philippinarum* exposed to heavy metals and benzopyrene. *Comp Biochem Phys C.* 155: 517-527.
18. Ji, C., Wu, H., Zhou, M. and Zhao, J., 2015. Multiple biomarkers of biological effects induced by cadmium in clam *Ruditapes philippinarum*. *Fish Shellfish Immunol.* 44: 430-435.
19. Chang, M., Wang, W.N., Wang, A.L., Tian, T.T., Wang, P., Zheng, Y. and Liu, Y., 2009. Effects of cadmium on respiratory burst, intracellular Ca²⁺ and DNA damage in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 149: 581-586.
20. Ali, M., Mirvaghefi, A., poorbagher, H. and Asadi, F., 2015. Antioxidant role of vitamin C on reducing oxidative stress induced subchronic toxicity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with diazinon. *Journal of Animal Environmental.* 7(1): 73-87. (In Persian)
21. Zhang, L., Liu, X., Chen, L., You, L., Pei, D., Cong, M., Zhao, J., Li, C., Liu, D., Yu, J. and Wu, H., 2011. Transcriptional regulation of seleniomedependent glutathione peroxidase from *Venerupis philippinarum* in response to pathogen and contaminants challenge. *Fish Shellfish Immunol.* 31: 831-837.
22. Yang, C., Liu, S., Zhou, S., Wu, H., Yu, J. and Xia, C., 2011. Allelochemical ethyl 2-methyl acetoacetate (EMA)

افزایش میزان رادیکال‌های فعال اکسیژن تولید شده در اثر آمونیاک و آسیب به سیستم استرس اکسیداتیو یا مصرف این آنزیم در جهت حذف رادیکال‌های سوپراکساید آنیون است (۵۸). طبق نمودار سوپر اکسید دیسموتاز در شکل ۱ با افزایش سطوح شوری در مسمومیت حاد و تحت آمونیاکی مقدار سوپراکسید دیسموتاز افزایش معنی‌داری داشته است که علت این افزایش می‌تواند مربوط به کاهش سمیت آمونیاک غیریونیزه شده با افزایش سطح شوری باشد که می‌تواند میزان رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیوناشی از آمونیاک را کم کند که این کاهش رادیکال‌ها احتمالاً با افزایش میزان سوپر اکسید دیسموتاز نمایان شده است. کاتالاز آنزیمی است که تقریباً در همه موجودات زنده و در اکثر ارگان‌های بدن یافت می‌شود. این آنزیم سبب تبدیل رادیکال‌های آزاد پراکسید هیدروژن (H₂O₂) به آب و اکسیژن می‌شود (۵۹). نتایج اندازه‌گیری آنزیم کاتالاز روند مشابهی به سوپراکسید دیسموتاز را نشان داد (شکل ۱) که دلیل افزایش میزان آنزیم کاتالاز، می‌تواند افزایش مقادیر پراکسید هیدروژن (H₂O₂) حاصل از فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز باشد. Yang و همکاران، در مطالعه‌ی القاء بلند مدت مسمومیت آمونیاکی در ماهی *Carassius auratus* گزارش کردند اختلاف معنی‌داری در میزان آنزیم کاتالاز بافت آبشش در غلظت‌های مختلف آمونیاک وجود دارد (۶۰). Sinha و همکاران، روی دفاع آنتی‌اکسیدانی سه ماهی آب شیرین در مقابل آمونیاک (یک میلی‌مولار به مدت ۰، ۳، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۸۴ و ۱۸۰ ساعت) تحقیق نمودند و به این نتیجه رسیدند که میزان آنزیم کاتالاز موجود در کبد در ماهی حوض و ماهی کپور معمولی به ترتیب از ۲۴ و ۴۸ ساعت تا ۸۴ ساعت افزایش پیدا کرد در حالی که در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان میزان این آنزیم تغییر نکرد (۶۱). با توجه به نتایج این تحقیق ماهی تیلاپیا از گونه‌هایی است که نسبتاً به مسمومیت آمونیاکی مقاوم‌تر است. به دلیل عدم تغییر فاکتورهای خونی با افزایش سطح شوری، بهبود بعضی فاکتورهای دفاع آنتی‌اکسیدانی در مسمومیت‌های آمونیاکی همراه با افزایش شوری و محدودیت منابع آب شیرین این گونه می‌تواند کاندید مناسب برای مطالعات تکمیلی جهت پرورش در آب‌های شور داخلی باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی از پرسنل محترم دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران و دانشکده منابع طبیعی دانشگاه صنعتی اصفهان را دارند که در راستای انجام این تحقیق کمال همکاری را داشتند. در این خصوص از اعطای پژوهانه معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Rao, M., 2011. Impact of phosphorus on water quality. Publication no.SL 275, University of Florida, IFAD Extension.

44. Ren, Q., Li, M., Yuan, L., Song, M., Xing, X., Shi, G., Meng, F. and Wang, R., 2016. Acute ammonia toxicity in crucian carp *Carassius auratus* and effects of aurtarine on hyperammonemia. *Comp Biochem Phys C*. 190: 9-14.
45. Ferreira da Costa, O.T., Jose dos Santos Ferreira, D., Lo Presti Mendonca, F. and Narciso Fernandes, M., 2004. Susceptibility of the Amazonian fish, *Colossoma macropomum* (Serrasalminae), to short-term exposure to nitrite. *Aquacult.* 232: 627-636.
46. Hedayati, A. and Ghaffari, Z., 2013. Evaluation of the effects of exposure to copper sulfate on some eco physiological parameters in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Iranian Journal of Toxicology*. 7(22): 887-893.
47. Morgan, D.P., Stockdale, E.M., Roberts, R.J. and Walter, A.W., 1980. Anemia associated with exposure to lindane. *Arch. Environ. Health*. 35(5): 307-310.
48. Wedemeyer, G.A. and Yasutake, W.T., 1977. Clinical methods for the assessment of the effects of environmental stress on fish health. *Tech Pap Usfws*. 89: 1-18.
49. Jee, J.H., Masroor, F. and Kang, J.C., 2005. Responses of cypermethrin-induced stress in haematological parameters of Korean rockfish, *Sebastes schlegeli* (Hilgendorf). *Aquac. Res.* 36(9): 898-905.
50. Munker, R.E., Hillwe, J.G. and Paquette, R., 2007. *Modern Hematology: Biology and Clinical Management*, 2th ed. Humna Pess Inc, 210-513.
51. Anjana Vaman, V.S., Tinu, S.K., Geetha, C.S., Lissy, K.K. and Mohanan, P.V., 2013. Effect of fibrin glue on antioxidant defense mechanism, oxidative DNA damage and chromosomal aberrations. *Toxicol. Mech. Methods*. 23(7): 500-508.
52. Ye, X., Jiang, R., Zhang, Q., Wang, R., Yang, C., Ma, J. and Du, H., 2016. Increased 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in leukocyte DNA from patients with type 2 diabetes and microangiopathy. *Journal of International Medical Research*. 44(3): 472-482.
53. Hintsala, H.R., Jokinen, E., Haapasari, K.M., Moza, M., Ristimäki, A., Soini, Y., Koivunen, J. and Karihtala, P., 2016. Nrf2/Keap1 pathway and expression of oxidative stress lesions 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and nitrotyrosine in Melanoma. *Anticancer Res.* 36(4): 1497-1506.
54. Nordberg, J. and Arner, E., 2001. Reactive oxygen species, antioxidant and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med.* 31: 1287-1312.
55. Masella, R., Benedetto, R.D., Vari, R., Filesi, C. and Giovannini, C., 2005. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J. Nutr. Biochem.* 16: 577-586.
56. Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R.D., Kumar, R., Seth, C.S. and Gupta, D.K., 2006. Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) involves induction of phytochelatin and antioxidant system in response to its accumulation. *Chemosphere*. 65(6): 1027-1039.
57. Langston, A.L., Hoare, R., Stefansson, M., Fitzgerald, R., Wergeland, H. and Mulcahy, M., 2002. The effect of temperature on non-specific defence parameters of three strains of juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Fish Shellfish Immunol.* 12: 61-76.
58. Vander Oost, R., Beyer, J. and Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13: 57-149.
59. Chelikani, P., Fita, I. and Loewen, P.C., 2004. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell. Mol. Life Sci.* 61: 192-208.
60. Yang, W., Xiang, F., Liang, X. and Yang, Zh., 2011. Toxicity of Ammonia and Its Effects on Oxidative Stress Mechanisms of Juvenile Crucian Carp (*Carassius auratus*). *J. Freshw. Ecol.* 25: 297-302.
61. Sinha, A.K., Abdelgawad, H., Giblen, T., Zinta, G., De Rop, M., Asard, H., Blust, R. and DeBoeck, G., 2014. Anti-oxidative defences are modulated differentially in three fresh water teleosts in response to ammonia-induced oxidative stress. *Plosone*. 9(4): e95319.
- induces oxidative damage and antioxidant responses in *Phaeodactylum tricorutum*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 100: 93-103.
23. Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 101: 13-30.
24. Li, C., Sun, H., Chen, A., Ning, X., Wu, H., Qin, S., Xue, Q. and Zhao, J., 2010. Identification and characterization of an intracellular Cu, Zn superoxide dismutase (icCu/ZnSOD) gene from clam *Venerupis philippinarum*. *Fish Shellfish Immunol.* 28: 499-503.
25. Akbary, P., Baluch Amin, A. and Amini Khoei, Z., 2020. Effect of extract of *Salicornia* sp. plant on liver enzymes activity and antioxidant parameters in grey mullet, *Mugil cephalus* Linnaeus 1758. *Journal of Animal Environmental.* 12(2): 169-176. (In Persian)
26. <http://www.fao.org/fishery/species/3217/en>
27. Molayemraftar, T., Peyghan, R., Razi Jalali, M. and Shahriari, A., 2018. Interactive effect of treatment with copper sulfate and formalin bath with nitrite and ammonia intoxication, on some biochemical parameters of blood serum of common carp. *Iranian Veterinary Journal.* 14(1): 70-80. (In Persian)
28. Drobkin, D.R., 1945. Crystallographic and optical properties of human hemoglobin: a proposal for the standardization of hemoglobin. *Am. J. Med. Sci.* 209: 268-270.
29. Rehulka, J., 2000. Influence of astaxanthin on growth rate, condition and some blood indices of rainbow trout. *Aquacult.* 190: 27-47.
30. Barros, M.M., Lim, C. and Klesius, P.H., 2002. Effect of iron supplementation to Cottonseed meal diets on growth performance of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J. Appl. Aquac.* 10: 65-86.
31. Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82(1): 70-77.
32. Koroluk, M., Ivanova, L., Mayorova, I. and Tokorev, W., 1988. Method of determination of catalase activity. *Lab. Tech.* 1: 16-19.
33. Fridovich, I., 1986. Superoxide dismutases. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 58: 61-97.
34. Banihashemi, A., Khara, H., Pazhand, H. and Rahanandeh, M., 2013. Histopathological effects of ammonia in gills, liver and kidney fingerlings Persian sturgeon. *J Comp Pathol.* 10(3): 983-992. (in Persian)
35. Keturah, A. and Stephen, M., 1990. Effects of Cold Temperature on Toxicity of Ammonia to Bluegill and Fathead Minnows. Center for Aquatic Ecology. Contract Report. 68-01-5832.
36. Jeney, Z.S., Nemcsok, J., Jeney, G. and Olah, J., 1992. Effect of ammonia on adrenalin and noradrenalin in levels in different organs. *Aquacult.* 10(4): 139-148.
37. Wicks, B.J. and Randall, D.J., 2002. The effect of sub lethal ammonia exposure on fed and unfed rainbow trout: the role of glutamine in regulation of ammonia. *Comp. Biochem. Physiol, Part A.* 132(2): 275-285.
38. Gomulka, P., Żarski, D., Kucharczyk, D., Kupren, K., Krejszeff, S. and Targońska, K., 2011. Acute ammonia toxicity during early ontogeny of chub, *Leuciscus cephalus* (Cyprinidae). *Aquat. Living Resour.* 24(2): 211-217.
39. Cataldi, E., Di Marco, P., Mandich, A. and Cataudella, S., 1998. Serum parameters of Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* (Pisces: Acipenseriformes): effects of temperature and stress. *Comp. Biochem.* 121: 351-354.
40. Thangam, Y., Perumayee, M., Jayaprakash, S., Umavathi, S. and Basheer, S.K., 2014. Studies of ammonia toxicity on haematological parameters to freshwater fish *Cyprinus carpio* (common carp). *Int J Curr Microbiol Appl Sci.* 3(1): 535-542.
41. Avilez, I.M., Altran, A.E., Aguiar, U.H. and Moraes, G., 2004. Hematological responses of the Neotropical teleost matrinxã (*Brycon cephalus*) to environmental nitrite. *Comp Biochem Phys C.* 139: 135-139.
42. Tilak, K.S., Veeraiyah, K., Thathaji, P.B. and Butchiram, M.S., 2007. Toxicity studies of Butachlor to the freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch). *J. Environ. Biol.* 28: 485-487.
43. Weiss, D.J. and Wardrop, K.J., 2011. *Schalm's Veterinary Hematology*. John Wiley & Sons, Ames, USA. 1206 p.