



تأثیر افزودن نمک‌های معدنی به سازگان مداربسته پرورش ماهی: بررسی کیفیت آب، عملکرد رشد و برخی شاخص‌های بیوشیمیایی و ایمنی ماهی سیکلید آفریقایی (*Labidochromis lividus*)

مهرداد سرخیل^{*}، امید صفری، سعید زاهدی

گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

نوع مقاله:

چکیده

پژوهشی

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۹۹/۰۸/۱۰

اصلاح: ۹۹/۱۰/۲۱

پذیرش: ۱۴۰۰/۰۱/۱۸

کلمات کلیدی:

سازگان مداربسته

شاخص ایمنی

سیکلید آفریقایی

عملکرد رشد

متابولیسم آمونیاک

کیفیت آب

در این پژوهش اثرات راه‌اندازی سازگان مداربسته و افزودن هم‌زمان نمک‌های معدنی کلراید آمونیوم و نیتريت سدیم هر سه روز یک مرتبه به میزان ۵ میلی‌گرم در لیتر به مدت چهار هفته قبل از رهاسازی ماهی بر کارایی فیلتر زیستی در حذف آمونیاک کل آب، عملکرد رشد، فعالیت آنزیم‌های دخیل در متابولیسم آمونیاک و همچنین فعالیت شاخص‌های ایمنی موکوس پوست ماهی سیکلید آفریقایی (*Labidochromis lividus*) در قالب سه تیمار و سه تکرار بررسی شد. واحد آزمایش یک سازگان مداربسته با ظرفیت ۲۰۰ لیتر آب بود و ۲۰ قطعه ماهی با میانگین وزن $3/06 \pm 0/07$ گرم در آن رهاسازی و به مدت سی روز پرورش داده شدند. نتایج آزمایش نشان داد که غلظت آمونیاک کل آب در تیمارهای ۲ و ۳ به طور معنی‌داری کمتر از تیمار شاهد بود ($P < 0.05$). غلظت نیترات آب در انتهای آزمایش در تیمارهای ۲ و ۳ بیشتر از تیمار شاهد بود ($P < 0.05$). بیشترین شاخص‌های عملکرد رشد ماهی شامل وزن نهایی، افزایش وزن بدن، نرخ رشد ویژه، شاخص رشد روزانه و ضریب افزایش وزن بدن به ترتیب در تیمارهای ۳، ۲ و ۱ شاهد مشاهده شد ($P < 0.05$). نتایج این تحقیق نشان داد که راه‌اندازی سازگان مداربسته به همراه افزودن نمک‌های معدنی قبل از رهاسازی ماهیان می‌تواند یک روش مؤثر در بهبود کارایی عملکرد فیلتر زیستی در تبدیل آمونیاک آب به نیترات و عملکرد رشد ماهیان باشد.

مقدمه

امروزه در سطح جهانی تکثیر و پرورش ماهیان زینتی به عنوان یک فعالیت پربازده اقتصادی در صنعت آبی‌پروری در حال رشد و گسترش است (Jaleel *et al.*, 2015). تجارت ماهیان زینتی بیش از ۱۵ بلیون دلار در سطح جهانی برآورد شده و بیش از ۱۲۵ کشور در این تجارت دخیل هستند (Satam *et al.*, 2018; Raja *et al.*, 2019). افزایش تقاضا برای ماهیان زینتی می‌تواند با استفاده از سیستم‌های پرورشی متراکم و فوق متراکم برطرف شود. در این سیستم‌های پرورشی غلظت ترکیبات نیتروژنی و فسفوری به‌طور دائم افزایش می‌یابند که به‌طور نامساعد بر کیفیت آب و در نهایت سلامتی ماهیان و میزان تولید تأثیرگذار خواهند بود.

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: sarkheil@um.ac.ir

در ماهیان، محصول نهایی متابولیسم ترکیبات آلی نیتروژنی به صورت آمونیاک است که در محیط آبی تمایل زیادی به یونیزه شدن دارد. این ترکیب به دو شکل مولکولی یا آمونیاک (NH_3) و فرم یونیزه یا آمونیوم (NH_4^+) قابل مشاهده است و همواره امکان تبدیل این دو شکل به یکدیگر تحت شرایط محیطی وجود دارد؛ به طوری که افزایش دما و پی-اچ شکل‌گیری آمونیاک از آمونیوم را افزایش می‌دهد (Purwono *et al.*, 2017). آمونیاک مولکولی بر خلاف آمونیوم به دلیل قابلیت نفوذپذیری بسیار بالا از طریق اپیتلیوم آبشش ماهیان و اثرات سمی بر سیستم عصبی و دستگاه گردش خون به شدت مسمومیت‌زا بوده و در مقادیر حاد از کشندگی بالایی برخوردار است (Shingles *et al.*, 2001). درعین حال، مقادیر تحت حاد و غیرکشنده این ماده اگرچه ایجاد تلفات نمی‌کند اما قادر است عملکرد رشد و تولیدمثل ماهیان را به شدت تحت تأثیر قرار دهد (Lemarie *et al.*, 2004; Colt, 2006). از دیگر اثرات افزایش آمونیاک آب می‌توان به آسیب به بافت آبشش‌ها، تشدید حساسیت و واکنش به عوامل بیماری‌زا، اختلال در عملکرد شنای ماهیان، تغییر میزان فاکتورهای متابولیک، هورمون‌ها (مانند کورتیزول) و فعالیت آنزیم‌ها اشاره نمود (Wright, 1995; Silberman *et al.*, 2002; Lemarie *et al.*, 2004; Moraes *et al.*, 2004). در محیط‌های آبی که غلظت آمونیاک بالاست و یا مقدار پی-اچ آب افزایش می‌یابد، شیب انتشار آمونیاک از خون به محیط آب ممکن است حذف و یا معکوس گردد که منجر به جذب آمونیاک از محیط آب می‌شود (Randall and Tsui, 2002; Wilkie, 2002). ماهیان استخوانی در چنین شرایطی می‌توانند از طریق یک یا چند استراتژی از جمله تبدیل آمونیاک به ترکیباتی با سمیت کمتر مانند اسید آمینه‌های غیرضروری نظیر گلوتامت، گلوتامین و یا اوره با این مسئله مقابله نمایند. در این امر آنزیم‌های فعال در متابولیسم آمونیاک نظیر گلوتامت دهیدروژناز و گلوتامین سنتتاز و آنزیم‌های چرخه اوره مانند اورنتین کربامیل ترانسفراز دخیل هستند (McKenzie *et al.*, 1999; Moraes *et al.*, 2004; Sanderson *et al.*, 2010). پرورش ماهی در سازگان مداربسته (RAS)^۱ یکی از روش‌های افزایش تولید در صنعت آبزی‌پروری محسوب می‌شود (Pulkkinen *et al.*, 2018). از مهم‌ترین مزایای این سیستم پرورشی می‌توان به حداکثر میزان تولید با منابع محدود آب و زمین، امکان کنترل پارامترهای فیزیکی-شیمیایی آب و کاهش تخلیه پساب مزارع پرورشی به محیط زیست اشاره نمود. با این وجود، مشکلاتی از قبیل کارایی عملکرد فیلترهای زیستی در حفظ کیفیت آب و مدیریت تجمع مواد جامد باعث محدودیت استفاده از این سازگان‌ها شده است (Badiola *et al.*, 2012). آمونیاک آب در بخش فیلتر زیستی این سیستم‌ها در طی فرآیند نیتریفیکاسیون توسط باکتری‌های نیتريت ساز (مانند نیتروزوموناس) و نیترات‌ساز (مانند نیتروباکتر) در شرایط هوازی به ترتیب به نیتريت و نیترات تبدیل می‌گردد (Lawson, 1995). بنابراین، کارایی فیلترهای زیستی عامل کلیدی و مهم در یک سیستم مداربسته‌ی پرورش ماهی به حساب می‌آیند. فیلترهای زیستی معمولاً برای کل فرآیند تبدیل آمونیاک به نیترات به ۳۰ الی ۱۰۰ روز زمان نیاز دارند (Mével and Chomraux, 1981; Perfettini and Bianchi, 1990). روش‌های مختلفی جهت افزایش کارایی و کاهش زمان راه‌اندازی فیلترهای زیستی در منابع علمی ذکر شده است که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به اضافه نمودن آب یا مصالح مرطوب از یک فیلتر زیستی فعال، افزودن مواد تلقیحی حاوی باکتری‌های زنده و افزودن محلول‌های غیرآلی آمونیاک و نیتريت اشاره نمود (Bower and Turner, 1984; Kuhn *et al.*, 2010; Pulkkinen *et al.*, 2018). برخی مطالعات نشان داده است که جمعیت باکتری‌های تلقیح شده ممکن است متفاوت از جمعیت باکتری‌های طبیعی فیلتر زیستی بوده و باعث کاهش کارایی فیلترها گردد (Pulkkinen *et al.*, 2018). نتایج مطالعه افزودن غلظت‌های مختلف نمک‌های معدنی کلراید آمونیوم و نیتريت سدیم در زمان‌های متفاوت به عنوان منبع انرژی برای رشد باکتری‌های دخیل در فرآیند نیتریفیکاسیون نشان داد که با افزایش غلظت نمک‌ها و زمان، تعداد و تراکم باکتری‌ها به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد (Saifullah *et al.*, 2014).

ماهیان خانواده سیکلید (*Cichlidae*) از معروف‌ترین و محبوب‌ترین ماهیان زینتی بوده و بسیار متنوع هستند و نسبت به کیفیت نامناسب آب تحمل کمی دارند (Amini Chermahini and Nazemroaya, 2010). گونه سیکلید آفریقایی (*Labidochromis lividus*) یکی از گونه‌های رایج پرورشی در کارگاه‌های تکثیر و پرورش ماهیان زینتی در ایران بوده و از

¹ Recirculating aquaculture system

بازارپسندی مناسبی نیز برخوردار است. بنابراین، در این مطالعه اثرات راه‌اندازی سازگان مداربسته و افزودن هم‌زمان دو نمک معدنی کلراید آمونیوم (NH_4Cl) و نیتريت سدیم (NaNO_2) قبل از رهاسازی ماهی بر کارایی فیلتر زیستی در حذف آمونیاک کل (TAN) از آب محیط پرورش ماهی سیکلید آفریقایی (*L. lividus*) مورد بررسی قرار گرفت. میزان بازماندگی و عملکرد رشد ماهیان، میزان فعالیت آنزیم‌های دخیل در متابولیسم آمونیاک و چرخه اوره در بافت‌های کبد و ماهیچه ماهی و همچنین تغییرات شاخص‌های ایمنی موکوس پوست ماهیان پرورش یافته در تیمارهای مختلف آزمایش مورد سنجش قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

طرح آزمایش

در این تحقیق از ۳ تیمار مختلف با ۳ تکرار در قالب یک طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. تیمارهای آزمایش شامل: ۱- راه‌اندازی سازگان مداربسته (گردش آب) هم‌زمان با رهاسازی ماهی و بدون افزودن نمک‌های معدنی (شاهد). ۲- راه‌اندازی سازگان مداربسته به مدت ۴ هفته بدون افزودن نمک‌های معدنی و سپس رهاسازی ماهی. ۳- راه‌اندازی سازگان مداربسته با افزودن نمک‌های معدنی کلراید آمونیوم و نیتريت سدیم و سپس رهاسازی ماهی بود. این تحقیق در آزمایشگاه آبزیان دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد.

معرفی سازگان مداربسته

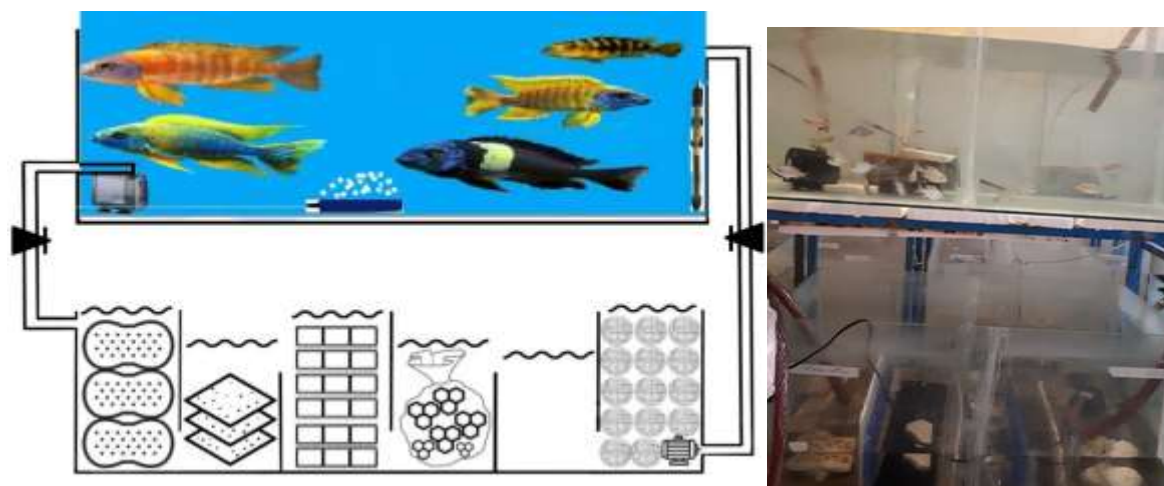
واحد آزمایش مورد استفاده یک سازگان مداربسته (گردش آب) با ظرفیت ۲۰۰ لیتر آب بود. اجزاء این سازگان مداربسته شامل: ۱- آکواریوم شیشه‌ای به ابعاد $100 \times 40 \times 40$ سانتی‌متر جهت نصب فیلترها. ۲- آکواریوم شیشه‌ای به ابعاد $100 \times 40 \times 35$ سانتی‌متر جهت پرورش ماهی. ۳- پمپ برگشت آب (مدل RS-4000). ۴- بخاری آکواریوم. ۵- سنگ هوادهی. ۶- شیرهای تنظیم میزان جریان آب. ۷- شلنگ‌های رابط پلاستیکی. ۸- اتصالات برق بود. فیلترهای مورد استفاده جهت تصفیه فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی آب به ترتیب شامل: ۱- ابر و پد اسفنجی. ۲- نوار فیلم عکاسی و زغال فعال (۵۰۰ گرم). ۳- بیوبال (قطعات کروی پلاستیکی منفذدار، ۱۰۰ قطعه با قطر ۴ سانتی‌متر، معادل $0/16$ متر مربع) بود که جریان آب به صورت سینوسی از بین فیلترها عبور می‌کرد (شکل ۱).

راه‌اندازی سازگان مداربسته

در ابتدا آکواریوم‌های شیشه‌ای مورد استفاده جهت پرورش ماهی و نصب فیلترها به ترتیب با ۱۲۰ و ۸۰ لیتر آب کلرزدايي شده آگیری شدند. آب ذخیره شده در آکواریوم پرورش ماهی به میزان ۶ لیتر در دقیقه با استفاده از یک پمپ آب به آکواریوم حاوی فیلترها انتقال داده شد. آب ورودی به صورت سینوسی به ترتیب از لایه‌های ابری، پدهای اسفنجی، فیلم، زغال فعال و بیوبال‌ها عبور و توسط یک پمپ برگشت آب به آکواریوم حاوی ماهی برگشت داده شد. ذرات جامد درشت توسط لایه‌های ابری و پدهای اسفنجی و ذرات ریزتر توسط فیلم‌های مورد استفاده از آب حذف شدند. زغال فعال جهت ضدعفونی و حذف مواد آلی آب مورد استفاده قرار گرفت. بیوبال‌ها به عنوان بستر استقرار باکتری‌های فرآیند نیتريفیکاسیون به صورت غوطه‌ور در داخل آب قرار گرفتند. میزان جریان آب با استفاده از شیرهای تعبیه شده تنظیم گردید. آب آکواریوم حاوی ماهی از طریق یک سیستم هوادهی مرکزی با استفاده از یک هوادهی سیفونی ۸۵ وات هوادهی شد.

شرح آزمایش

در تیمار ۳ آزمایش، پس از آگیری آکواریوم‌ها و راه‌اندازی سازگان مداربسته، هر یک از نمک‌های کلراید آمونیوم (NH_4Cl) و نیتريت سدیم (NaNO_2 ; Merck) هر ۳ روز یک مرتبه به میزان ۵ میلی‌گرم در لیتر (Pulkkinen *et al.*, 2018) به



شکل ۱. شکل شماتیک سازگان مدار بسته پرورش ماهی سیکلید آفریقایی (*Labidochromis lividus*). ترتیب قرارگیری فیلترها در آکواریوم پایین به ترتیب از چپ به راست شامل لایه ابر، پد اسفنجی، نوار فیلم، زغال فعال و بیوبال می باشد.

مدت ۴ هفته به محیط آب اضافه شدند. در تیمار ۲ آزمایش، سازگان مدار بسته بدون افزودن نمک‌های معدنی به مدت ۴ هفته راه‌اندازی شد. در مرحله بعد، ۲۰۰ قطعه ماهی انگشت قد سیکلید آفریقایی (*L. lividus*) از یک مزرعه تکثیر و پرورش ماهیان زینتی واقع در شهر مشهد، استان خراسان رضوی خریداری شده و به آزمایشگاه آبزیان انتقال داده شدند. ماهیان در یک مخزن ۳۰۰ لیتری جهت سازگاری با شرایط آزمایشگاه به مدت دو هفته نگهداری شدند. ماهیان روزانه با غذای تجاری (Salvea 9015F, BioMar®, France) به میزان ۳/۵ درصد وزن بدن تغذیه شدند. ترکیب شیمیایی غذای استفاده شده شامل ۴۲٪ پروتئین، ۲۸٪ چربی، ۲۰/۹٪ کربوهیدرات و ۶/۱٪ خاکستر بود. سپس ۲۰ قطعه ماهی با میانگین وزن $3/06 \pm 0/07$ گرم و میانگین طول $4/96 \pm 0/29$ سانتی‌متر به هر یک از واحدهای آزمایش معرفی شدند. هم‌زمان با رهاسازی ماهی در تیمارهای ۲ و ۳ آزمایش، سازگان مدار بسته در تیمار ۱ (شاهد) نیز راه‌اندازی و ۲۰ قطعه ماهی در آن رهاسازی شد. ماهیان در تمامی تیمارهای آزمایش روزانه سه نوبت (ساعت‌های ۸، ۱۲ و ۱۶) با غذای تجاری در حد مصرف اختیاری غذا برای مدت ۳۰ روز تغذیه شدند. روزانه ۵ درصد آب هر یک از واحدهای آزمایش با آب تازه کلرزدایی شده تعویض و همچنین آب تبخیر شده با آب مقطر دو بار تقطیر جبران شد.

سنجش پارامترهای فیزیکی - شیمیایی آب

نمونه‌برداری از آب هر یک از واحدهای آزمایش در روزهای ۰، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ آزمایش (بعد از مرحله ماهی دار کردن) جهت اندازه‌گیری غلظت آمونیاک کل (TAN) و نیترات آب به ترتیب با روش‌های نسلر و احیاء کادمیوم با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر (DR 5000™ model, HACH Co., USA) در طول موج‌های ۴۲۵ و ۵۰۰ نانومتر سنجش شدند. پارامترهای فیزیکی - شیمیایی آب شامل درجه حرارت روزانه، پی - اچ و هدایت الکتریکی (EC) هر پنج روز یک مرتبه با استفاده از دستگاه پرتال (Model AZ-860) اندازه‌گیری شدند. میانگین درجه حرارت آب در تیمارهای مختلف آزمایش بین ۲۷/۹۲ - ۲۵/۴۴ درجه سانتی‌گراد متغیر بود.

سنجش شاخص‌های رشد و بازماندگی ماهی

در انتهای دوره آزمایش، ماهیان آکواریوم‌ها با استفاده از پودر گل میخک (۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بی‌هوش شده و طول و وزن کل آن‌ها به طور انفرادی به ترتیب با استفاده از کولیس با دقت ۰/۱ میلی‌متر و ترازوی دیجیتالی (مدل AND GR-202, Japan) با دقت ۰/۰۰۱ گرم اندازه‌گیری شدند. شاخص‌های رشد و بازماندگی ماهیان با استفاده از روابط ذیل محاسبه شدند:

وزن به دست آمده = وزن انتهایی (گرم) - وزن اولیه (گرم)

ضریب تبدیل غذایی = {مقدار غذای مصرف شده (گرم) / افزایش وزن بدن (گرم)}

ضریب رشد ویژه % = $\{Ln \text{ وزن نهایی} - Ln \text{ وزن اولیه}\} / \text{زمان} \times 100$

ضریب چاقی % = $\{وزن نهایی (گرم) / طول نهایی^3 (سانتی متر)\} \times 100$

شاخص رشد روزانه = $\{وزن نهایی (گرم) - وزن اولیه (گرم)\} / \text{زمان}$

ضریب افزایش وزن = $\{وزن نهایی (گرم) - وزن اولیه (گرم)\} / \text{وزن اولیه} \times 100$

میزان بازماندگی = $\{تعداد نهایی / تعداد اولیه\} \times 100$

سنجش آنزیم‌ها در بافت کبد و ماهیچه

در انتهای دوره آزمایش، فعالیت آنزیم‌های دخیل در متابولیسم آمونیاک و چرخه اوره در بافت‌های کبد و ماهیچه ماهیان نمونه‌برداری شده اندازه‌گیری شد. بدین منظور، ۵ قطعه ماهی از هر تکرار به طور تصادفی نمونه‌برداری شده و با پودر گل میخک (۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بی‌هوش گردیدند. بافت‌های کبد و ماهیچه هر یک به مقدار ۱ گرم از ماهیان جدا شده و با بافر نمکی فسفات (PBS; pH 7.4) شستشو داده شده و با استفاده از یک هموژنایزر شیشه‌ای در حضور محلول PBS سرد شده همگن شدند. بافت‌های همگن شده به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور $10000 \times g$ سانتریفیوژ شدند و سوپرناتانت به دست آمده برای سنجش آنزیم‌ها در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

آنزیم گلوتامات دهیدروژناز با کمک روش رنگ‌سنجی بر اساس اکسیداسیون گلوتامات با استفاده از کیت سنجش (ساخت شرکت Scien Cell) در طول موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه اسپکتوفتومتر (DR 5000TM model, HACH Co., USA) اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم گلوتامین سنتتاز با روش رنگ‌سنجی بر اساس تولید ماده گاما-گلوتامیل هیدروکسامیک اسید در طول موج ۵۳۰ نانومتر سنجش شد (Shanker and Anderson, 1985). میزان آنزیم اورنتین کربامیل ترانسفراز در بافت‌های کبد و ماهیچه از طریق سنجش سیترولین به عنوان محصول نهایی آنزیم از طریق رنگ‌سنجی در طول موج ۴۶۴ نانومتر اندازه‌گیری شد (Morales et al., 2004).

سنجش شاخص‌های ایمنی موکوس پوست

در انتهای دوره آزمایش، نمونه‌های موکوس پوست ماهی بر طبق روش ارائه شده توسط Subramanian و همکاران (2007) جهت سنجش شاخص‌های ایمنی جمع‌آوری شد. جهت انجام این کار، ماهیان برای مدت زمان ۲۴ ساعت قطع غذاهای شدند و ۳ ماهی به طور تصادفی از هر یک از تکرارها نمونه‌برداری شد. ماهیان نمونه‌برداری شده با پودر گل میخک (۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بی‌هوش شدند و هر ماهی در داخل یک کیسه پلی‌اتیلنی (زیپ پلاست) حاوی ۵ میلی‌لیتر محلول نمک کلراید سدیم (NaCl; 50 Mm; Merck, Germany) قرار داده شد. سپس ماهی در داخل کیسه پلاستیکی برای مدت زمان ۱ دقیقه تکان داده شد تا موکوس پوست جمع‌آوری شود. هر یک از نمونه‌های موکوس به داخل یک لوله فالكون استریل ۱۵ میلی‌لیتری انتقال داده شدند و برای مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور $15000 \times g$ سانتریفیوژ شدند. در انتها، سوپرناتانت به دست آمده برای سنجش شاخص‌های ایمنی در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

شاخص ایمنوگلوبین توسط روش ارائه شده توسط Siwicki و همکاران (1994) اندازه‌گیری شد. در این روش، محتوای پروتئین کل هر یک از نمونه‌های موکوس پوست بر طبق روش استاندارد اندازه‌گیری شد (Lowry et al., 1951). سپس، مولکول‌های

ایمنوگلوبین توسط محلول ۱۲٪ پلی اتیلن گلیکول رسوب داده شدند و مقدار پروتئین کل نمونه موکوس مجدداً اندازه‌گیری شد. تفاوت بین دو مقدار پروتئین اندازه‌گیری شده به عنوان مقدار ایمنوگلوبین موکوس پوست در نظر گرفته شد.

مقدار آنزیم لیزوزیم در موکوس پوست با استفاده از باکتری گرم مثبت *Micrococcus lysodeikticus* به عنوان سوبسترا سنجش شد (Kumari et al., 2006). در این روش، ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری *M. lysodeikticus* (Sigma, USA) تهیه شده در داخل پلت‌های ۹۶ چاله ریخته شد و ۵۰ میکرولیتر از نمونه موکوس پوست به هر یک از چاله‌ها اضافه شد. سپس، پلت‌ها برای مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. میزان جذب نوری هر یک از نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر (DR 5000™ model, HACH Co., USA) در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت شد. بعد از مدت زمان ۵۰ دقیقه، مقدار جذب نوری نمونه‌ها برای مرتبه دوم سنجش شد. تغییر در مقدار جذب نوری محاسبه شده و فعالیت آنزیم لیزوزیم به صورت U/میلی‌لیتر بیان شد.

فعالیت مسیر فرعی کمپلمان (ACH50) موکوس پوست از طریق روش ارائه شده توسط Yano (1992) سنجش شد. جهت انجام این کار، نمونه‌های موکوس پوست در دامنه ۵۰ تا ۲۵۰ میکرولیتر رقیق شده و در داخل لوله‌های فالکون ریخته شده و حجم هر یک از لوله‌ها با افزودن بافر باربیتال (barbital Buffer) در حضور بافر اتیلن گلیکول تترا استیک اسید (EGTA)-منیزیم (Mg^{2+}) به ۲۵۰ میکرولیتر افزایش یافت. سپس، ۱۰۰ میکرولیتر از گلوبول‌های قرمز خرگوش (RaRBC) به هر یک از لوله‌ها ریخته شده و برای مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. در ادامه به هر یک از لوله‌ها ۳/۱۵ میلی‌لیتر محلول کلراید سدیم (NaCl) اضافه شد و برای مدت ۵ دقیقه در دور $1600 \times g$ سانتریفیوژ شدند. جذب نوری سوپرناتانت به دست آمده در طول موج ۴۱۴ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر (DR 5000™ model, HACH CO., USA) قرائت شد. حجمی از موکوس پوست که سبب ۵۰ درصد همولیز شود، عبارت است از فعالیت کمپلمان نمونه که از رابطه زیر برای محاسبه آن استفاده شد:

$$\text{ACH50 (U/ml)} = \frac{\Delta K}{\Delta K} \times (\text{فاکتور رقت})$$

در رابطه فوق K حجم موکوس پوست بر حسب میلی‌لیتر و ۰/۵ عدد ثابت می‌باشد.

تجزیه و تحلیل آماری

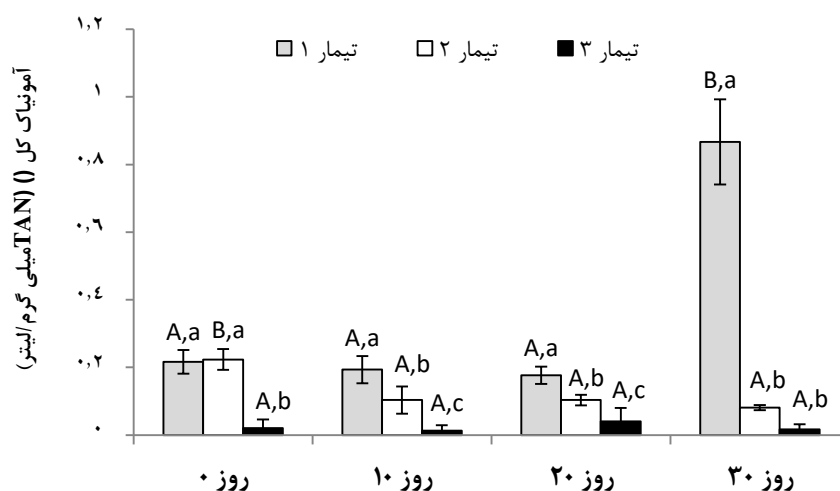
تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS (version. 19) صورت گرفت. ابتدا داده‌ها از نظر نرمال بودن با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شدند. سپس مقایسه میانگین‌ها بین تیمارهای مختلف با استفاده از آزمون تجزیه واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و اختلاف میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن (Duncan multiple range test) در سطح اطمینان ۹۵ درصد بررسی شد. مقایسه میانگین متغیرها در زمان‌های مختلف در هر یک از تیمارهای آزمایش با استفاده از آزمون تجزیه واریانس یک طرفه با نمونه‌های تکراری (ANOVA with repeated measure) صورت گرفت. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شدند.

نتایج

تغییرات پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب

تغییرات میزان آمونیاک کل (TAN) آب در تیمارها و زمان‌های مختلف آزمایش در شکل ۲ نشان داده شده است. میزان آمونیاک کل آب در تیمار ۱ (شاهد) از روز نخست آزمایش تا روز ۲۰ ام آزمایش به طور معنی‌داری تغییر نکرد ($P > 0.05$)، ولی این میزان در روز ۳۰ ام آزمایش به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0.05$). مقدار آمونیاک کل آب در تیمار ۲، در طی ۱۰ روز اول آزمایش به طور معنی‌داری کاهش یافت ($P < 0.05$)، ولی این مقدار تا پایان دوره آزمایش به طور معنی‌داری تغییر نکرد.

($P>0.05$). میزان آمونیاک کل آب در تیمار ۳ در مدت زمان ۳۰ روز آزمایش به طور معنی‌داری تغییر نکرد ($P>0.05$). مقایسه میزان آمونیاک کل آب در بین تیمارهای مختلف آزمایش نشان داد که این میزان در روز نخست آزمایش در تیمار ۳ به طور معنی‌داری کمتر از سایر تیمارها بود ($P<0.05$). مقدار آمونیاک کل آب در روز ۱۰ و ۲۰ آزمایش در تیمارهای ۲ و ۳ به طور معنی‌داری در مقایسه با تیمار ۱ کمتر بود و کمترین میزان آن در تیمار ۳ مشاهده شد ($P<0.05$). مقدار آمونیاک کل آب در روز ۳۰ ام آزمایش در تیمارهای ۲ و ۳ به طور معنی‌داری در مقایسه با تیمار ۱ کاهش یافت ($P<0.05$).



شکل ۲. تغییرات آمونیاک کل (TAN) آب در تیمارها و زمان‌های مختلف آزمایش (۳۰ روز). حروف انگلیسی بزرگ و کوچک متفاوت بر روی ستون‌ها به ترتیب نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در بین میانگین‌ها در روزهای متفاوت هر یک از تیمارها و در بین میانگین‌های تیمارهای مختلف در هر یک از زمان‌های آزمایش می‌باشد (میانگین \pm انحراف معیار، $P<0.05$, ANOVA).

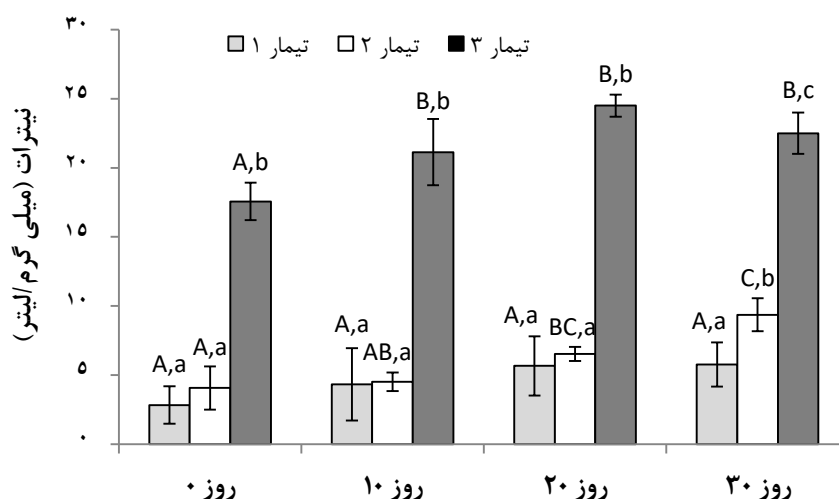
تغییرات میزان نیترات آب در تیمارها و زمان‌های مختلف آزمایش در شکل ۳ ارائه شده است. میزان نیترات آب در تیمار ۱ (شاهد) در مدت زمان آزمایش به طور معنی‌داری تغییر نکرد ($P>0.05$). مقدار نیترات آب در تیمار ۲ در مدت زمان ۱۰ روز نخست آزمایش به طور معنی‌داری تغییر نیافت ($P>0.05$), ولی این میزان در روز ۲۰ و ۳۰ آزمایش در مقایسه با روز نخست آزمایش به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P<0.05$). میزان نیترات آب در تیمار ۳ در طی ۱۰ روز اول آزمایش به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P<0.05$), ولی این مقدار تا روز ۳۰ ام آزمایش به طور معنی‌داری تغییر نکرد ($P>0.05$). مقایسه میزان نیترات آب در بین تیمارهای مختلف نشان داد که این مقدار در روزهای ۰، ۱۰ و ۲۰ آزمایش در تیمار ۳ در مقایسه با سایر تیمارها بیشتر بود ($P<0.05$). مقدار نیترات آب در روز ۳۰ ام آزمایش در تیمار ۲ و ۳ به طور معنی‌داری بیشتر از تیمار ۱ بود و بیشترین میزان آن در تیمار ۳ مشاهده شد ($P<0.05$).

تغییرات میزان پی-اچ و هدایت الکتریکی آب در تیمارهای مختلف آزمایش در مدت زمان ۳۰ روز در شکل ۴ نشان داده شده است. میزان پی-اچ آب در تیمارهای ۱، ۲ و ۳ آزمایش به ترتیب بین ۸/۳۱-۸/۵۶، ۸/۳۵-۸/۴۵ و ۸/۹۳-۸/۹۳ متغیر بود. میزان پی-اچ آب در تمام تیمارها از روز نخست تا انتهای آزمایش یک روند کاهشی را نشان داد. مقدار هدایت الکتریکی آب در تیمارهای ۱، ۲ و ۳ به ترتیب بین ۹۹۵-۹۲۵/۶۶، ۱۰۳۸-۹۵۵ و ۱۱۶۷-۱۰۸۹ میکروزیمنس بر سانتی‌متر متغیر بود. روند تغییرات هدایت الکتریکی آب در تیمارهای مختلف افزایشی بود.

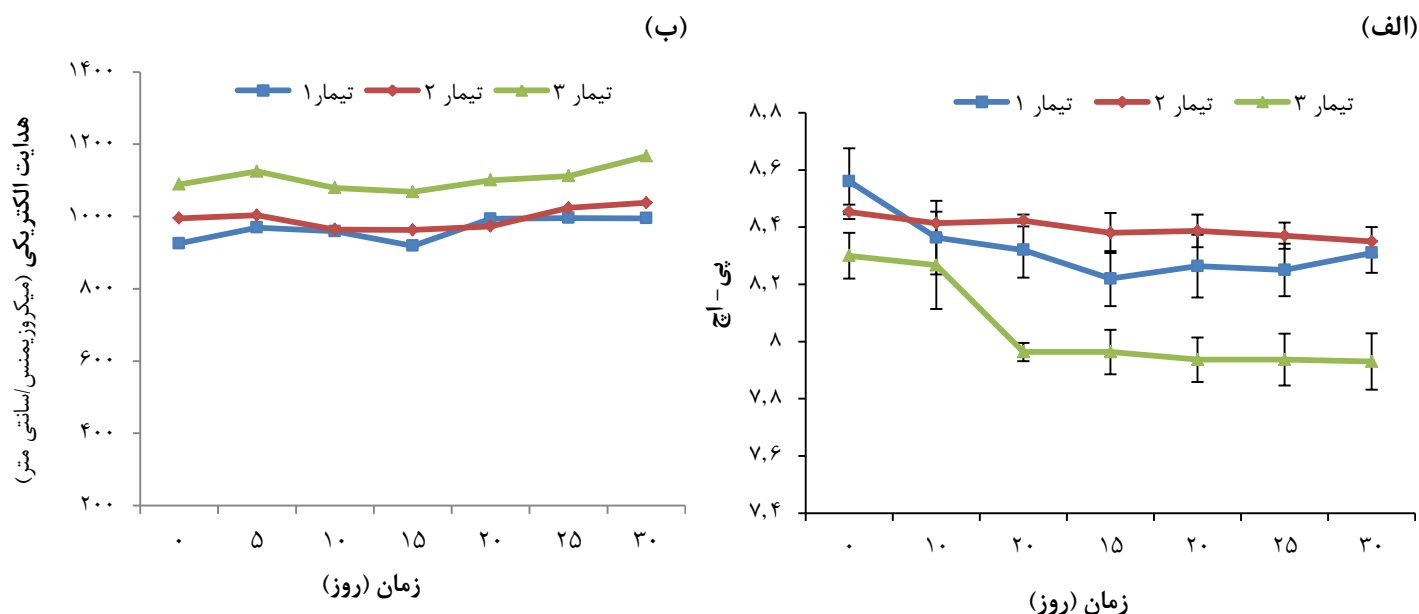
شاخص‌های عملکرد رشد و بازماندگی ماهی

شاخص‌های عملکرد رشد و میزان بازماندگی ماهی سیکلید آفریقای (L. lividus) پرورش یافته در سازگان‌های مداربسته تیمارهای مختلف آزمایش برای مدت ۳۰ روز در جدول ۱ نشان داده شده است. وزن و طول اولیه ماهیان در تیمارهای مختلف آزمایش یکسان بوده و اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P>0.05$). طول نهایی ماهیان در تیمارهای ۲ و ۳ به طور معنی‌داری

بیشتر از تیمار ۱ (شاهد) بود ($P < 0.05$) ولی اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای ۲ و ۳ مشاهده نشد ($P > 0.05$). ضریب تبدیل غذایی در تیمار ۱ به طور معنی‌داری بیشتر از تیمارهای ۲ و ۳ بود ($P < 0.05$). شاخص‌های وزن نهایی، افزایش وزن بدن، نرخ رشد ویژه، شاخص رشد روزانه و ضریب افزایش وزن در تیمارهای ۲ و ۳ به طور معنی‌داری بیشتر از تیمار ۱ بود ($P < 0.05$). بیشترین میزان این شاخص‌ها در تیمار ۳ مشاهده شد ($P < 0.05$). شاخص فاکتور وضعیت و میزان بازماندگی ماهیان در همه تیمارها یکسان بود و اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0.05$).



شکل ۳. تغییرات نیترات آب در تیمارها و زمان‌های مختلف آزمایش (۳۰ روز). حروف انگلیسی بزرگ و کوچک متفاوت بر روی ستون‌ها به ترتیب نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در بین میانگین‌ها در روزهای متفاوت هر یک از تیمارها و در بین میانگین‌های تیمارهای مختلف در هر یک از زمان‌های آزمایش می‌باشد (میانگین \pm انحراف معیار، ANOVA، $P < 0.05$).



شکل ۴. روند تغییرات پی-اچ (الف) و هدایت الکتریکی (ب) آب در تیمارهای مختلف آزمایش در مدت زمان ۳۰ روز (میانگین \pm انحراف معیار).

جدول ۱. شاخص‌های عملکرد رشد و بازماندگی ماهی سیکلید آفریقایی (*L. lividus*) پرورش یافته در تیمارهای مختلف در مدت زمان ۳۰ روز آزمایش (میانگین \pm انحراف معیار، ANOVA, $P < 0.05$).

شاخص	تیمارها		
	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳
طول اولیه (سانتی‌متر)	۵/۱۰±۰/۱۷ ^a	۴/۸۰±۰/۵۲ ^a	۵/۰۰±۰/۲۰ ^a
طول نهایی (سانتی‌متر)	۵/۹۵±۰/۱۵ ^a	۶/۳۵±۰/۰۵ ^b	۶/۵۰±۰/۱۰ ^b
وزن اولیه (گرم)	۳/۰۹±۰/۰۹ ^a	۳/۰۴±۰/۰۶ ^a	۳/۰۷±۰/۰۷ ^a
وزن نهایی (گرم)	۵/۰۰±۰/۱۰ ^a	۵/۴۸±۰/۱۵ ^b	۶/۰۰±۰/۱۱ ^c
افزایش وزن بدن (گرم)	۱/۹۱±۰/۱۶ ^a	۲/۴۴±۰/۲۱ ^b	۲/۹۲±۰/۰۶ ^c
ضریب تبدیل غذایی	۱/۸۴±۰/۱۶ ^b	۱/۴۳±۰/۱۲ ^a	۱/۱۹±۰/۰۲ ^a
نرخ رشد ویژه (%)	۱/۶۰±۰/۱۴ ^a	۱/۹۶±۰/۱۵ ^b	۲/۲۳±۰/۰۴ ^c
فاکتور وضعیت	۲/۳۹±۰/۱۷ ^a	۲/۱۵±۰/۰۹ ^a	۲/۱۹±۰/۱۳ ^a
شاخص رشد روزانه (گرم)	۰/۰۶۳±۰/۰۰۵ ^a	۰/۰۸۱±۰/۰۰۷ ^b	۰/۰۰۹۷±۰/۰۰۲ ^c
ضریب افزایش وزن (%)	۶۱/۹۳±۶/۸۴ ^a	۸۰/۵۹±۸/۵۰ ^b	۹۵/۲۴±۲/۵۴ ^c
بازماندگی (%)	۱۰۰±۰/۰۰	۱۰۰±۰/۰۰	۱۰۰±۰/۰۰

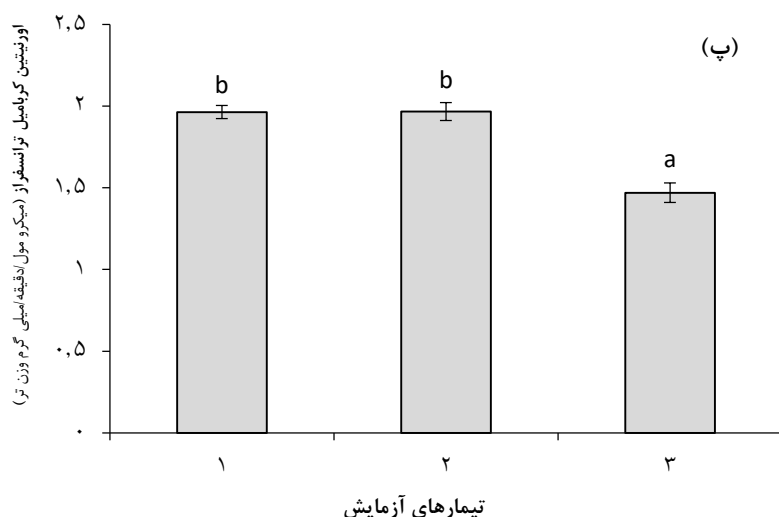
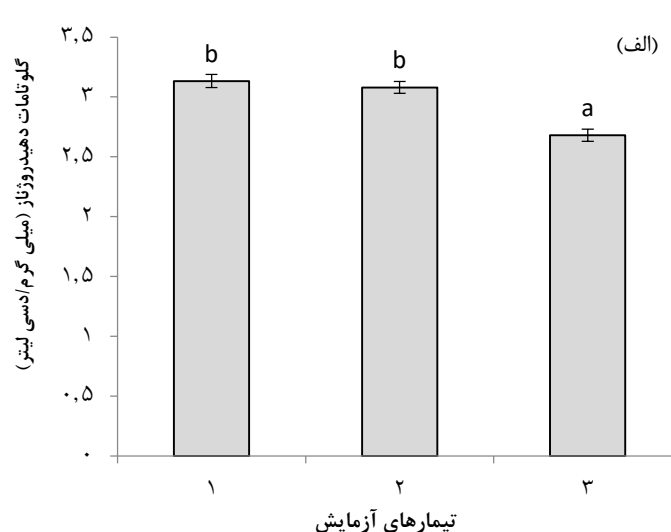
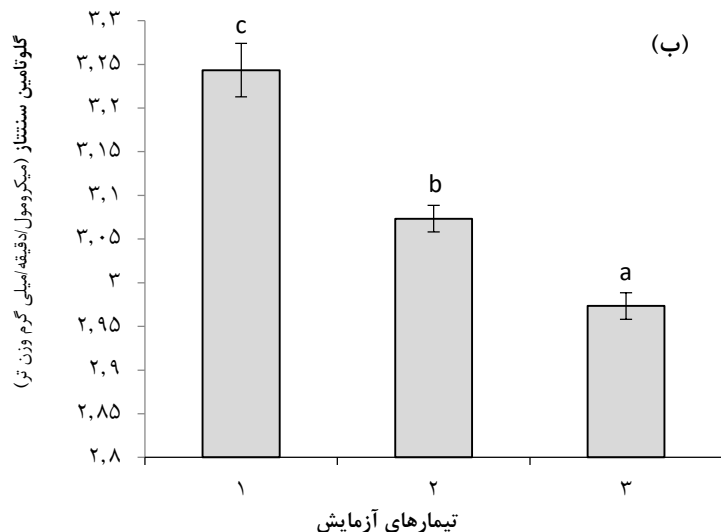
بررسی آنزیم‌های دخیل در متابولیسم آمونیاک

تغییرات میزان آنزیم‌های دخیل در متابولیسم آمونیاک و چرخه اوره در بافت کبد ماهی سیکلید آفریقایی (*L. lividus*) پرورش یافته در تیمارهای مختلف برای مدت ۳۰ روز در شکل ۵ نشان داده شده است. میانگین میزان آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در تیمارهای ۱ و ۲ به طور معنی‌داری بیشتر از میانگین میزان این آنزیم در تیمار ۳ بود ($P < 0.05$) (شکل ۵ الف). میانگین میزان آنزیم گلوتامین سنتتاز در تیمارهای ۱ و ۲ به طور معنی‌داری در مقایسه با تیمار ۳ افزایش یافت و بیشترین میزان این آنزیم در تیمار ۱ مشاهده شد ($P < 0.05$) (شکل ۵ ب). میانگین میزان آنزیم اورنتین کربامیل ترانسفراز در تیمارهای ۱ و ۲ به طور معنی‌داری بیشتر از میانگین میزان این آنزیم در تیمار ۳ بود ($P < 0.05$) (شکل ۵ پ).

بررسی تغییرات میزان آنزیم‌های دخیل در متابولیسم آمونیاک در بافت ماهیچه ماهی سیکلید آفریقایی (*L. lividus*) در تیمارهای مختلف آزمایش نشان داد که میانگین مقدار آنزیم‌های گلوتامات دهیدروژناز، گلوتامین سنتتاز و اورنتین کربامیل ترانسفراز در تیمارهای ۱ و ۲ به طور معنی‌داری بیشتر از مقدار میانگین این آنزیم‌ها در تیمار ۳ بود و بیشترین میزان میانگین این آنزیم‌ها در تیمار ۱ مشاهده شد ($P < 0.05$) (شکل ۶ الف-پ).

جدول ۲. تغییرات شاخص‌های ایمنی موکوس پوست ماهی سیکلید آفریقایی (*L. lividus*) پرورش یافته در تیمارهای مختلف در مدت زمان ۳۰ روز آزمایش (میانگین \pm انحراف معیار، ANOVA, $P < 0.05$).

شاخص	تیمارها		
	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳
ایمنوگلوبین کل (U/میلی لیتر)	۱/۷۹±۰/۰۳ ^a	۱/۹۶±۰/۰۱ ^b	۲/۱۵±۰/۰۳ ^c
لیزوزیم (U/میلی لیتر)	۱/۳۵±۰/۰۳ ^a	۱/۵۷±۰/۰۱ ^b	۱/۷۷±۰/۰۱ ^c
کمپلمان (ACH50) (U/میلی لیتر)	۲/۷۹±۰/۰۴ ^a	۲/۹۷±۰/۰۱ ^b	۳/۱۵±۰/۰۲ ^c



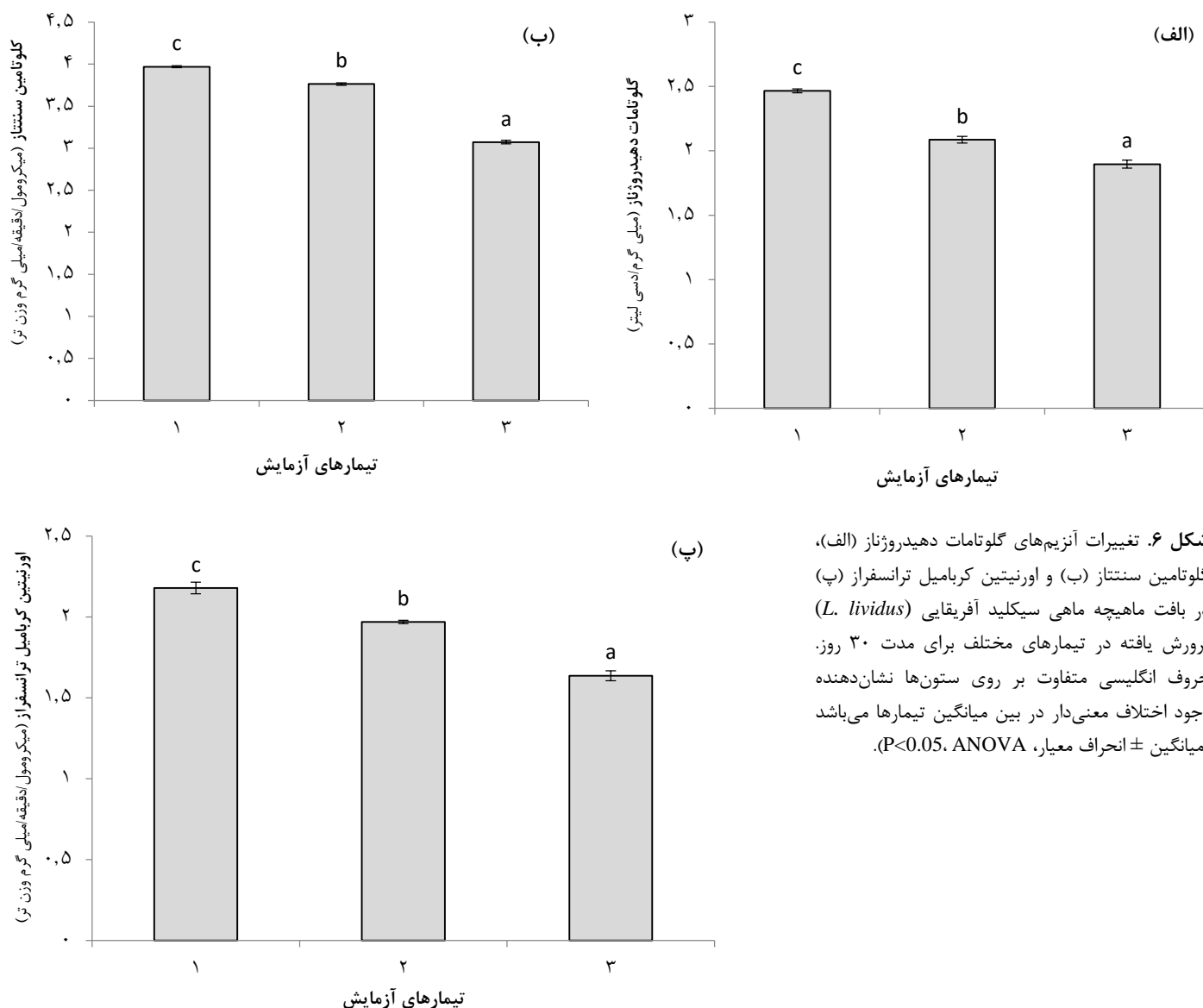
شکل ۵. تغییرات آنزیم‌های گلوتامات دهیدروژناز (الف)، گلوتامین سنتتاز (ب) و اوزنیتین کرپامیل ترانسفراز (پ) در بافت کبد ماهی سیکلید آفریقای (L. lividus) پرورش یافته در تیمارهای مختلف برای مدت ۳۰ روز. حروف انگلیسی متفاوت بر روی ستون‌ها نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در بین میانگین تیمارها می‌باشد (میانگین \pm انحراف معیار، $P < 0.05$, ANOVA).

بررسی شاخص‌های ایمنی موکوس پوست

تغییرات میزان شاخص‌های ایمنی موکوس پوست ماهی سیکلید آفریقای (L. lividus) پرورش یافته در تیمارهای مختلف آزمایش در جدول ۲ ارائه شده است. نتایج تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که میزان میانگین شاخص‌های ایمنوگلوبین کل، لیزوزیم و کمپلمان در انتهای دوره آزمایش در تیمار ۲ و ۳ به طور معنی‌داری در مقایسه با تیمار ۱ (شاهد) افزایش یافت و بیشترین میزان میانگین این شاخص‌ها در تیمار ۳ مشاهده شد ($P < 0.05$).

بحث

ترکیبات نیتروژنی به ویژه آمونیاک غیریونیزه (NH_3) از مهم‌ترین عوامل محدودکننده تولید در سیستم‌های پرورش متراکم و فوق متراکم آبزیان محسوب می‌شوند. امروزه از روش‌های مختلفی برای حذف ترکیبات نیتروژنی از محیط آب پرورش آبزیان استفاده می‌شود که از مهم‌ترین این روش‌ها می‌توان به استفاده از فیلترهای زیستی در سازگان‌های مدار بسته اشاره نمود. حذف آمونیاک و تبدیل آن به نیتريت و نیترات در فیلترهای زیستی به ترتیب توسط باکتری‌های نیتريت ساز (مانند نیتروزوموناس) و نیترات‌ساز (مانند نیتروباکترها) در شرایط هوازی صورت می‌گیرد (Lawson, 1995). بنابراین، کارایی فیلترهای زیستی در موفقیت عملکرد یک سازگان مدار بسته بسیار حائز اهمیت می‌باشد. در مطالعه حاضر اثرات افزودن



شکل ۶. تغییرات آنزیم‌های گلوتمات دهیدروژناز (الف)، گلوتمابین سنتناز (ب) و اورنیتین کرپامیل ترانسفراز (پ) در بافت ماهیچه ماهی سیکلید آفریقایی (*L. lividus*) پرورش یافته در تیمارهای مختلف برای مدت ۳۰ روز. حروف انگلیسی متفاوت بر روی ستون‌ها نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در بین میانگین تیمارها می‌باشد (میانگین \pm انحراف معیار، ANOVA, $P < 0.05$).

هم‌زمان نمک‌های معدنی کلراید آمونیوم و نیتريت سدیم و راه‌اندازی سازگان مداربسته به مدت ۴ هفته قبل از رهاسازی ماهیان بر کارایی فیلتر زیستی در کاهش آمونیاک کل آب بررسی شد. در تیمار ۱ آزمایش (شاهد) که از نمک‌های معدنی استفاده نشده بود و فاقد زمان راه‌اندازی قبل از رهاسازی ماهیان بود، میزان آمونیاک کل آب از روز نخست رهاسازی ماهیان تا زمان انتهای آزمایش به طور معنی‌داری افزایش یافت، همچنین در این تیمار میزان نیترات آب در طول مدت آزمایش به طور معنی‌داری تغییر نکرد که نشان‌دهنده عدم کارایی فیلتر زیستی در تبدیل آمونیاک کل آب به نیترات می‌باشد. در تیمارهای ۲ و ۳ که از نمک‌های معدنی و زمان راه‌اندازی ۴ هفته‌ای سازگان مداربسته استفاده شد، مقدار آمونیاک کل آب به طور معنی‌داری در مقایسه با تیمار ۱ کاهش یافته و همچنین مقدار نیترات آب در این تیمارها افزایش یافت. این نتایج نشان می‌دهد که افزودن نمک‌های معدنی و زمان راه‌اندازی ۴ هفته‌ای قبل از رهاسازی ماهیان به طور مؤثری موجب افزایش کارایی عملکرد فیلتر زیستی در تبدیل آمونیاک کل به نیترات گردیده است. Pulkkinen و همکاران (۲۰۱۸) بیان کردند که راه‌اندازی و افزودن هم‌زمان نمک‌های کلراید آمونیوم و نیتريت سدیم برای مدت زمان سه هفته به آب سازگان مداربسته قبل از معرفی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) منجر به افزایش فعالیت نیتریفیکاسیون و غلظت نیترات آب شد.

مقایسه مقدار آمونیاک کل آب در تیمارهای ۲ و ۳ نشان داد که این میزان در روزهای صفر، ۱۰ و ۲۰ آزمایش در تیمار ۳ کمتر از تیمار ۲ بوده و همچنین مقدار نیترات آب در تیمار ۳ بیشتر از تیمار ۲ بود. این نتایج نشان می‌دهد که افزودن نمک‌های

معدنی می‌تواند سرعت رشد باکتری‌های عامل نیتروبیفیکاسیون را در فیلتر زیستی افزایش داده و در نهایت موجب بهبود کارایی فیلتر زیستی گردد. باکتری‌های عامل نیتروبیفیکاسیون دارای سرعت رشد پایینی هستند و فعالیت این باکتری‌ها می‌تواند با افزودن مواد معدنی مورد نیاز آن‌ها تسریع شود (Peng and Zhu, 2006). در راه‌اندازی عادی سازگان مدار بسته، باکتری‌های اتوتروف باید برای استقرار در سطح مصالح فیلترهای زیستی با باکتری‌های هتروتروف رقابت نمایند. با افزودن یک محلول آمونیاک غیرآلی باکتری‌های نیتروزوموناس قبل از باکتری‌های هتروتروف بر روی سطح مصالح مستقر می‌شوند. باکتری‌های نیتروباکتر در شرایط عادی حداقل یک دوره زمانی ۱۴-۱۰ روزه را نیاز دارند تا بتوانند نیتريت را به نیترات تبدیل نمایند، اما با افزودن نیتريت هم‌زمان با آمونیاک، این باکتری‌ها به اندازه کافی نیتريت در اختیار خواهند داشت که بتوانند بلافاصله شروع به فعالیت نمایند (Lawson, 1995). مقدار آمونیاک کل آب در روز ۳۰ ام آزمایش در تیمارهای ۲ و ۳ یکسان بود و تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد که نشان می‌دهد راه‌اندازی سازگان مدار بسته قبل از رهاسازی ماهیان بدون افزودن نمک‌های معدنی نیازمند زمان بیشتری در مقایسه با افزودن نمک‌های معدنی بوده تا بتواند باعث کاهش آمونیاک آب گردد.

بررسی شاخص‌های عملکرد رشد ماهی سیکلید آفریقایی شامل وزن نهایی، افزایش وزن بدن، نرخ رشد ویژه، شاخص رشد روزانه و ضریب افزایش وزن بدن در تیمارهای مختلف نشان داد که این شاخص‌ها به ترتیب در تیمارهای ۳، ۲ و ۱ بیشتر بود. همچنین شاخص ضریب تبدیل غذایی ماهیان در تیمارهای ۲ و ۳ در مقایسه با تیمار ۱ کاهش یافت. بهبود عملکرد رشد ماهیان سیکلید آفریقایی می‌تواند تحت تأثیر غلظت آمونیاک کل آب در این تیمارها باشد، به طوری که غلظت آمونیاک کل در تیمارهای ۱، ۲ و ۳ به ترتیب بین ۰/۸۶-۰/۱۷، ۰/۲۲-۰/۰۸۱ و ۰/۰۴-۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر متغیر بود. غلظت‌های زیر حد کشندگی آمونیاک می‌تواند باعث کاهش رشد و مقاومت در برابر بیماری و افزایش ضریب تبدیل غذایی در ماهیان گردد (Kuttchantran, 2013). در مطالعه‌ای رشد ماهی تیلاپپای نیل (*Oreochromis niloticus*) در مواجهه با غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر کلراید آمونیوم برای مدت زمان ۹۶ ساعت کاهش یافت که احتمالاً به دلیل کاهش اشتها و دریافت غذا توسط ماهی می‌باشد (Zeitoun et al., 2016). افزایش غلظت آمونیاک آب ممکن است منجر به بروز استرس در ماهی گردد که این مسئله می‌تواند باعث افزایش مصرف انرژی و در نهایت کاهش رشد ماهی گردد (Rusmussen and Korsgaard, 1996; Harris et al., 1998).

فرم آمونیاک غیریونیزه (NH_3) برای بسیاری از گونه‌های آبی بسیار سمی است (Moraes et al., 2004). یکی از روش‌های مقابله با سمیت آمونیاک در موجودات آبی تولید گلوتامین از گلوامت می‌باشد (Walsh, 1997; McKenzie et al., 1999). یون آمونیوم از طریق فعالیت آنزیم گلوامت دهیدروژناز به گلوامت تبدیل می‌شود. در مرحله بعد، یون آمونیوم دیگری به گلوامت اضافه شده و از طریق فعالیت آنزیم گلوامین سنتتاز به گلوامین تبدیل می‌گردد (Walsh and Mommsen, 2001; Wright et al., 2007). Veauvy و همکاران (2005) بیان نمودند که سنتز آنزیم گلوامین سنتتاز برای پاسخ به استرس ناشی از آمونیاک حیاتی می‌باشد. در مطالعه‌ای بیان ژن و فعالیت آنزیم گلوامین سنتتاز در بافت‌های مغز و کبد ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*O. mykiss*) در معرض غلظت ۷۶۰ میکرومول در لیتر کلراید آمونیوم در مقایسه با ماهیان گروه شاهد بیش از دو برابر افزایش یافت (Wright et al., 2007). در مطالعه حاضر میزان فعالیت آنزیم‌های گلوامت دهیدروژناز و گلوامین سنتتاز در بافت‌های کبد و ماهیچه ماهیان پرورش یافته در تیمارهای ۱ و ۲ در مقایسه با تیمار ۳ بیشتر بود که می‌تواند به دلیل افزایش غلظت آمونیاک کل آب در این تیمارها باشد. در واقع ماهی سیکلید آفریقایی از طریق افزایش سنتز این آنزیم‌ها از اثرات سمیت آمونیاک آب جلوگیری نموده است؛ به طوری که میزان بازماندگی ماهیان در این تیمارها ۱۰۰٪ بوده و تلفاتی مشاهده نشد. یکی دیگر از استراتژی‌های آبزیان برای سمیت زدایی آمونیاک سنتز اوره از گلوامین و اسپاراتات از طریق فعالیت آنزیم‌های چرخه اوره می‌باشد. آنزیم اورنیتین کربامیل ترانسفراز یکی از آنزیم‌های چرخه اوره است که فعالیت این آنزیم در بافت‌های کبد و ماهیچه برخی از ماهیان نظیر قزل‌آلای رنگین کمان (*O. mykiss*) و باس دریایی (*Micropterus salmoides*) گزارش شده است (Terjesen et al., 2000). در مطالعه حاضر فعالیت آنزیم اورنیتین

کربامیل ترانسفرز در بافت‌های کبد و ماهیچه ماهی سیکلید آفریقایی در تیمارهای ۱ و ۲ در مقایسه با میزان این آنزیم در تیمار ۳ افزایش یافت که می‌تواند دلالت بر نقش این آنزیم در مکانیسم سمیت زدایی آمونیاک باشد.

ایمنی موکوسی اولین مرحله از سیستم دفاعی بر علیه عوامل عفونت‌زا در موجودات آبی می‌باشد (Rombout *et al.*, 2011; Woof and Mestecky, 2005). ترکیبات متعددی با خاصیت ضد میکروبی نظیر لیزوزیم، کمپلمان، ایمنوگلوبین و پپتیدهای ضد میکروبی در موکوس ماهیان شناسایی شده است (Whyte, 2007; Palaksha *et al.*, 2008). آمونیاک می‌تواند سیستم ایمنی ماهیان و سخت پوستان را تحت تأثیر قرار دهد (Yue *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2013). فعالیت شاخص‌های ایمنوگلوبین و کمپلمان سرم خون گونه کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در معرض غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک غیر یونیزه کاهش یافت (Taheri Mirghaed *et al.*, 2018). Li و همکاران (2013) نیز گزارش نمودند که مواجهه گونه گربه‌ماهی (*Pelteobagrus vachelli*) با غلظت ۵/۷ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک کل منجر به کاهش شاخص‌های لیزوزیم و ایمنوگلوبین کل سرم خون شد. اطلاعات چندانی در خصوص اثرات آمونیاک آب بر شاخص‌های ایمنی موکوس پوست گونه‌های آبی در منابع علمی وجود ندارد. در مطالعه حاضر فعالیت شاخص‌های ایمنوگلوبین، لیزوزیم و کمپلمان موکوس پوست ماهی سیکلید آفریقایی در معرض غلظت‌های آمونیاک کل آب ۰/۱۷-۰/۸۶ و ۰/۸۱-۰/۲۲ میلی‌گرم در لیتر (به ترتیب در تیمارهای ۱ و ۲) در مقایسه با ماهیان در معرض غلظت آمونیاک کل آب ۰/۱-۰/۰۴ میلی‌گرم در لیتر (تیمار ۳) کاهش یافت.

با توجه به نتایج این تحقیق می‌توان بیان نمود که افزودن نمک‌های معدنی کلراید آمونیوم و نیتريت سدیم به مدت چهار هفته به آب در گردش یک سازگان مدار بسته قبل از رهاسازی ماهیان سیکلید آفریقایی به طور مؤثری از افزایش غلظت آمونیاک کل آب در طول مدت زمان پرورش ماهی جلوگیری نمود و همچنین شاخص‌های عملکرد رشد و فعالیت شاخص‌های ایمنی موکوس پوست ماهیان پرورش یافته در این سازگان مدار بسته بهبود یافت. بنابراین راه‌اندازی سازگان مدار بسته قبل از رهاسازی ماهیان به همراه افزودن نمک‌های معدنی می‌تواند یک روش مؤثر در بهبود کارایی عملکرد فیلترهای زیستی در تبدیل آمونیاک آب به نیترات باشد که در نهایت می‌تواند باعث افزایش بازماندگی، رشد و تولید ماهیان گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از همکاری کارشناسان محترم آزمایشگاه‌های دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست دانشگاه فردوسی مشهد در اجرای این تحقیق تقدیر و تشکر می‌نمایند. تحقیق نویسنده مسئول از حمایت مالی دانشگاه فردوسی مشهد (۲/۵۲۸۸۸) برخوردار بوده است.

منابع

- Amini Chermahini, M., Nazemroaya, S. 2010. The complete guide of saltwater and freshwater's aquarium. 1st edition. Academic Center for Education, Culture and Research of Isfahan. 486 p. (in Persian)
- Badiola, M., Mendiola, D., Bostock, J. 2012. Recirculating aquaculture systems (RAS) analysis: Main issues on management and future challenges. *Aquaculture Engineering*. 51: 26-35.
- Bower, C.E., Turner, D.T. 1984. Evaluation of two commercial nitrification accelerators in closed seawater culture systems. *Aquaculture*. 41: 155-159.
- Colt, J. 2006. Water quality requirements for reuse systems. *Aquacultural Engineering*. 34: 143-156.
- Harris, J.O., Maguire, G.B., Edward, S., Hindrum, S.M. 1998. Effects of ammonia on the growth rate and oxygen consumption of juvenile greenlip abalone, *Haliotis laevigata* Donovan. *Aquaculture*. 160(3-4): 259-272.
- Jaleel, M.A., Musthafa, M.S., Ali, A.J., Mohamed, M.J., Kumar, M.S.A., Natarajan, V., Thiagarajan, G. 2015. Studies on the growth performance and immune response of koi carp fingerlings (*Cyprinus carpio koi*) fed with azomite. *Journal of Biology and Nature*. 4: 160-169.

- Kuhn, D.D., Drahos, D.D., Marsh, L., Flick, G.J. 2010. Evaluation of nitrifying bacteria product to improve nitrification efficacy in recirculating aquaculture systems. *Aquacultural Engineering*. 43: 78-82.
- Kumari, J., Sahoo, P.K., Swain, T., Sahoo, S.K., Sahu, A.K., Mohanty, B.R. 2006. Seasonal variation in the innate immune parameters of the Asian catfish *Clarias batrachus*. *Aquaculture*. 252: 121-127.
- Kuttchantran, M. 2013. Managing ammonia in fish ponds. Aquatic animal health unit, Universiti Putra Malaysia, Malaysia.
- Lawson, T.B. 1995. *Fundamentals of Aquacultural Engineering*. 1st edition. Chapman and Hall. 364 p.
- Lemarie, G., Dosdat, A., Coves, D., Dutto, G., Gasset, E., Ruyet, J.P.G. 2004. Effect of chronic ammonia exposure on growth of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*. 229: 479-491.
- Li, M., Chen, L., Qin, J.G., Li, E., Yu, Na., Du, Z. 2013. Growth performance, antioxidant status and immune response in darkbarbel catfish *Pelteobagrus vachelli* fed different PUFA/vitamin E dietary levels and exposed to high or low ammonia. *Aquaculture*. 406-407: 18-27.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193(1): 265-275.
- McKenzie, D.J., Piraccini, G., Felskie, A., Romano, P., Bronzi, P., Bolis, C.L. 1999. Effects of plasma total ammonia content and pH on urea excretion in Nile tilapia. *Physiological and Biochemical Zoology*. 72(1): 116-125.
- Mevel, G., Chamroux, S. 1981. A study of nitrification in the presence of prawns (*Peneaux japonicas*) in marine closed systems. *Aquaculture*. 123: 29-43.
- Taheri Mirghaed, A., Fayaz, S., Hoseini, S.M. 2018. Dietary 1,8-cinole affects serum enzymatic activities and immunological characteristics in common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to ambient ammonia. *Aquaculture Research*. 50: 146-153.
- Moraes, G., Polez, V.L.P., Wama, G.K. 2004. Biochemical responses of two erythrinidae fish to environmental ammonia. *Brazilian Journal of Biology*. 64(1): 95-102.
- Palaksha, K.J., Shin, G.W., Kim, Y.R., Jung, T.S. 2008. Evaluation of non-specific immune components from the skin mucus of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish and Shellfish Immunology*. 24(4): 479-488.
- Peng, Y., Zhu, G. 2006. Biological nitrogen removal with nitrification and denitrification via nitrite pathway. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 73: 15-26.
- Perfettini, J., Bianchi, M. 1990. The comparison of two simple protocols designed to initiate and stimulate ammonia oxidation in closed aquaculture systems. *Aquaculture*. 88: 179-188.
- Pulkkinen, J.T., Kiuru, T., Aalto, S.L., Koskela, J., Vielma, J. 2018. Startup and effects of relative water renewal rate on water quality and growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in a unique RAS research platform. *Aquacultural Engineering*. 82: 38-45.
- Purwono, P., Rezagama, A., Hibbaan, M., Budihardjo, M.A. 2017. Ammonia-nitrogen (NH₃-N) and ammonium-nitrogen (NH₄⁺-N) equilibrium on the process of removing nitrogen by using tubular plastic media. *Journal of Materials and Environmental Science*. 8: 4915-4922.
- Raja, K., Aanand, P., Padmavathy, S., Sampathkumar, J.S. 2019. Present and future market trends of Indian ornamental fish sector. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*. 7(2): 06-15.
- Randall, D.J., Tsui, T.K.N. 2002. Ammonia toxicity in fish. *Marine Pollution Bulletin*. 45: 17-23.
- Rombout, J.H.W.M., Abelli, L., Picchiatti, S., Scapigliati, G., Kiron, V. 2011. Teleost intestinal immunology. *Fish and Shellfish Immunology*. 31(5): 616-626.
- Rusmussen, R.S., Korsgaard, B. 1996. The effect of external ammonia on growth and food utilization of juvenile turbot, *Scophthalmus maximus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 205 (1-2): 35-48.
- Saifullah, S., Nirmala, K., Rusmana, I. 2014. The use of ammonium chloride and sodium nitrite to avoid new tank syndrome effect. *Proceeding of International Conference of Aquaculture Indonesia (ICAI)*.

- Sanderson, L.A., Wright, P.A., Robinson, J.W., Ballantyne, J.S., Bernier, N.J. 2010. Inhibition of glutamine synthetase during ammonia exposure in rainbow trout indicates a high reserve capacity to prevent brain ammonia toxicity. *The Journal of Experimental Biology*. 213: 2343-2353.
- Satam, S.B., Sawant, N.H., Ghughuskar, M.M., Sahastrabudde, V.D., Naik, V.V., Pagarkar, A.U. 2018. Ornamental fisheries: a new avenue to supplement farm income. *Advanced Agricultural Research & Technology Journal*. II (2): 193-197.
- Shanker, R.A., Anderson, P.M. 1985. Purification and properties of glutamine synthetase from the liver of *Squalus acanthias*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 239: 248-259.
- Shingles, A., McKenzie, D.J., Taylor, E.W., Moretti, A., Butler, P.J., Cerandi, S. 2001. Effects of sub-lethal ammonia exposure on swimming performance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Biology*. 204: 2691-2698.
- Silberman, D.M., Wald, M., Genaro, A.M. 2002. Effects of chronic mild stress on lymphocyte proliferative response. Participation of serum thyroid hormones and corticosterone. *International Immunopharmacology*. 2: 487-497.
- Siwicki, A.K., Anderson, D.P., Rumsey, G.L. 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 41: 125-139.
- Subramanian, S., MacKinnon, S.L., Ross, N.W. 2007. A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 148(3): 256-263.
- Terjesen, B.F., Rønnestad, I., Norberg, B., Anderson, P.M. 2000. Detection and basic properties of carbamoyl phosphate synthetase III during teleost ontogeny: a case study in the Atlantic halibut. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 126B: 521-535.
- Veauvy, C.M., McDonald, M.D., Van Audekerke, J., Vanhoutte, G., Van Camp, N., Van der Linden, A., Walsh, P. J. 2005. Ammonia affects brain nitrogen metabolism but not hydration status in the Gulf toadfish (*Opsanus beta*). *Aquatic Toxicology*. 74: 32-46.
- Walsh, P.J. 1997. Evolution and regulation of urea synthesis and ureotely in Batrachoidid fishes. *A Review of Physiology*. 59: 299-323.
- Walsh, P.J., Mommsen, T.P. 2001. Evolutionary considerations of nitrogen metabolism and excretion. In: Wright, P., Anderson, P. (eds.). *Nitrogen Excretion, Fish Physiology*. 20. San Diego: Academic Press. pp. 1-30.
- Wilkie, M.P. 2002. Ammonia excretion and urea handling by fish gills: present understanding and future research challenges. *Journal of Experimental Zoology*. 293: 284-301.
- Woof, J.M., Mestecky, J. 2005. Mucosal immunoglobulins. *Immunological Reviews*. 206: 64-82.
- Wright, P.A. 1995. Review: Nitrogen excretion: three end products, many physiological roles. *Journal of Experimental Biology*. 198: 273-281.
- Wright, P.A., Steele, S.L., Huitema, A., Bernier, N.J. 2007. Induction of four glutamine synthetase genes in brain of rainbow trout in response to elevated environmental ammonia. *The Journal of Experimental Biology*. 210: 2905-2911.
- Whyte, S.K. 2007. The innate immune response of finfish—a review of current knowledge. *Fish and Shellfish Immunology*. 23(6): 1127-1151.
- Yano, T. 1992. Assays of hemolytic complement activity. In: Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P. (eds.). *Techniques in fish immunology*, Fair Haven, New Jersey: SOS. V. 2. pp. 131-141.
- Yue, F., Pan, L.Q., Xie, P., Zheng, D., Li, J. 2010. Immune responses and expression of immune-related genes in swimming crab *Portunus trituberculatus* exposed to elevated ambient ammonia-N stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 157: 246-251.
- Zeitoun, M.M., EL-Azrak, K.E.M., Zaki, M.A., Nemat-Allah, B.R., Mehana, E.E. 2016. Effects of ammonia toxicity on growth performance, cortisol, glucose and hematological response of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aceh Journal of Animal Science*. 1(1): 21-28.