فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال دهم، شماره اول، بهار ۱۴۰۱

مقاله پژوهشی

اثر تقابل نیتریت با شوری‌های مختلف روی برخی شاخص‌های خونی، ایمنی و استرس در بچه ماهی اوزون‌برون (*Acipenser stellatus*)

آمنه منصورقناعی[۱]، حسین خارا[۲]*، حبیب وهاب‌زاده[۳]، ذبیح‌اله پژند[۴]، محدثه احمدنژاد[۵]

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۴۰۰ تاریخ پذیرش: تیر ۱۴۰۰

چکیده

این بررسی با هدف تعیین اثر نیتریت در شوری‌های مختلف روی برخی شاخص‌های خونی، ایمنی و استرس در بچه ماهی اوزون‌برون (*Acipenser stellatus*) در دو مرحله انجام شد. در مرحله اول غلظت نیمه کشندگی (LC_{50} 96h) نیتریت (نیتریت سدیم) در شوری‌های مختلف (۰، ۴، ۸ و ۱۲ گرم در لیتر) تعیین شد (به ترتیب ۷۵/۱۱، ۹۳/۵۴، ۲۴۱/۶۰ و ۳۵۳/۱۵ میلی‌گرم در لیتر). در مرحله دوم بعد از به دست آمدن مقادیر غلظت نیمه کشندگی نیتریت، بچه ماهیان اوزون‌برون (به تعداد ۲۴۰ قطعه، میانگین وزن ۲/۱۷±۱۵/۲۳ گرم، میانگین طول ۱/۹۵±۱۷ سانتی‌متر) به مدت ۴ روز در معرض نصف (۵۰ درصد) غلظت نیمه کشنده (LC_{50} 96h) نیتریت (۳۷/۵۶، ۴۶/۷۷، ۱۲۰/۸۰و ۱۷۶/۵۷۹ میلی‌گرم در لیتر) در همان میزان شوری‌ها قرار گرفتند (۸ تیمار، هریک با سه تکرار). نتایج نشان داد که بیشترین میزان گلبول سفید و نوتروفیل مربوط به تیمار ۷، تعداد گلبول‌های قرمز، هموگلوبین، MCV و هماتوکریت مربوط به تیمار ۵ و ائوزینوفیل مربوط به تیمار ۸ مشاهده شد ($P<0/05$). بیشترین میزان IgM و ایمونوگلوبولین کل در تیمار ۸ و لیزوزیم در تیمار ۷، کورتیزول و گلوکز در تیمار ۴ و لاکتات در تیمار ۳ مشاهده شد ($P<0/05$). در نتیجه افزایش شوری باعث افزایش تحمل بچه ماهیان، کاهش شاخص‌های استرس و افزایس شاخص‌های ایمنی در خون بچه ماهیان اوزون‌برون در غلظت‌های بالاتر نیتریت شد. که نشان دهنده کاهش اثرات نیتریت بود. اما شوری نتوانست اثرات سمی نیتریت را بر روی شاخص‌های خونی بچه ماهیان ازون برون کاهش دهد.

واژگان کلیدی: *ازون‌برون، نیتریت، شوری، شاخص‌های خونی.*

۱- دانشجوی دکتری تکثیر و پرورش آبزیان، گروه شیلات، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران.
۲- دانشیار گروه شیلات، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران.
۳- استادیار گروه شیلات، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران.
۴- استادیار موسسه تحقیقات بین المللی تاس‌ماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، رشت، ایران.
۵- استادیار پژوهشکده آبزی‌پروری آب‌های داخلی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، بندرانزلی، ایران.
* نویسنده مسئول: h.khara1974@yahoo.com

مقدمه

آلودگی آب با نیتریت می‌تواند منشا آلی یا معدنی داشته باشد. نشت فاضلاب‌های صنعتی و شهری، چاه‌های جاذب فاضلاب‌های خانگی، تخلیه غیربهداشتی فاضلاب درسطح زمین، دفع غیربهداشتی کودهای حیوانی و استفاده بی‌رویه از کودهای نیتروژنی در مزارع از مهم‌ترین منابع آلوده‌کننده محیط هستند. گسترش این آلودگی‌ها در آب‌ها مسمویت حاد یا نیمه حادی را در ماهیان ایجاد می‌کند، که در کوتاه‌مدت و بلندمدت بسته به نوع آلاینده و غلظت آن باعث ایجاد اختلال در فعالیت‌های فیزیولوژی و عملکرد سیستم‌های بدن آبزیان و حتی مرگ آنان می‌شود (Lawson, 1995). نیتریت (NO_2-N) فرم یونیزه شده اسید نیتروژن (HNO_2) است که می‌تواند به اندازه NH_3-N کشنده باشد. سطح نیتریت یا به طور کلی آب مناسب برای ماهیان خاویاری آبی است که فاقد آمونیاک (۰/۰ میلی‌گرم در لیتر) نیتریت کمتر از ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر، نیترات کمتر از ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر، pH ۹-۷، اکسیژن بیشتر از ۶ میلی‌گرم در لیتر و دمای آب کمتر از ۲۸ درجه سانتی‌گراد باشد (Quick and White, 2007).

پرورش آبزیان در آبهای شور و لب‌شور سهم قابل‌توجهی از آبزی‌پروری جهانی را به خود اختصاص می‌دهد. در این بین تاثیر شوری بر نیتریت کمتر مورد بررسی قرار گرفته است. حضور سدیم و کلرید سدیم در آب باعث کاهش سمیت نیتریت در ماهیان آب شیرین می‌شود. با توجه به این که فرآیند تبادل در آبشش ماهیان آب شیرین با جذب کلر (جذب کلر با دفع OH^- و HCO_3^-) همراه است. در ماهیان آب شیرین نیتریت با یون کلر (CL^-) در فرآیند CL^-/HCO_3^- در آبشش‌ها برای جذب رقابت دارد و در این فرآیند می‌تواند جایگزین کلر شود. اما اگر کلر در آب زیاد باشد سمیت نیتریت کاهش می‌یابد (Ramesh, 2007). بررسی‌ها نشان داده است که سمیت نیتریت در ماهیان آب شور خیلی کمتر از ماهیان آب شیرین است، با این حال سمیت با HNO_2 در ماهیان دریایی هرچند با سمیت پایین هم گزارش شده است (Schlenk and Benson, 2001).

در مزارع پرورشی میزان نیتریت متاثر از رژیم غذایی ماهی، نحوه تغذیه، سیستم پرورشی (خاکی، سیمانی و فایبرگلاس)، آب پرورشی (چاه، رودخانه، شور، لب شور و غیره)، تجزیه و فساد مواد آلی، بقایای غذا، مدفوع، ادرار و تنفس ماهی است (آذری تاکامی، ۱۳۹۷). به طوری که از جمله مشکلات سیستم‌های پرورش

مداربسته، بروز مشکلاتی در بیوفیلترها و عدم اکسیداسیون آمونیاک است که طی واکنش‌هایی به نیترات و نیتریت تبدیل می‌شود. به علاوه عدم دسترسی به آب کافی و همچنین اکسیژن کافی در سیستم‌های پرورشی متراکم از جمله علل افزایش نیتریت موجود در آب است (Person-Le Ruyet et al., 1995; Rasmussen and Korsgaard, 1996). با توجه به موارد بالا سلول‌های خونی از اولین سلول‌هایی هستند که تحت تاثیر آلودگی‌های آب قرار می‌گیرند (Sadauskas-Henrique et al., 2011). متغیرهای خون و بیوشیمیایی در اندازه‌گیری اثرات آلودگی آب در ماهی به نشانگرهای زیستی امیدوار کننده تبدیل شده‌اند، زیرا شاخص‌های خونی به مقادیر پایین آلاینده‌ها پاسخ می‌دهند. شاخص‌های خونی به عنوان نشانگرهای زیستی فیزیولوژیکی کل بدن در نظر گرفته می‌شوند. بنابراین از این رو در تشخیص وضعیت ساختاری و عملکردی ماهیان در معرض آلاینده‌های محیطی مهم هستند (Seriani et al., 2011).

اوزون‌برون (*Acipenser stellatus*) یکی از گونه‌های مهم ماهیان خاویاری است که در حوضه دریای سیاه، آزوف و خزر زیست می‌کند (کیوان، ۱۳۷۳). در حال حاضر ذخایر این ماهی در دریای خزر به شدت رو به کاهش است (Chebanov and Billard, 2001). به طوری که طبق ضوابط جدید IUCN از سال ۱۹۹۶، این ماهی در لیست قرمز جانوران قرار گرفته است (Birstein,1996). این روند رو به کاهش ناشی از عواملی چون صید بی‌رویه، صید غیرمجاز، تجمع آلاینده‌ها، سدسازی بر روی رودخانه‌ها و محدود شدن آب‌های جاری است که موجب جلوگیری از مهاجرت و تولیدمثل این ماهیان می‌شود (Dettlaff et al., 1993). در استان گیلان یکی از محل‌های رهاسازی بچه ماهی اوزون‌برون رودخانه سفیدرود است. این رودخانه در مجاورت اراضی کشاورزی مصرف کننده انواع کودهای شیمیایی، معدنی و سموم قرار دارد. از این رو، در زمان پرورش و رهاسازی بچه ماهایان امکان رویارویی با نیتریت وجود دارد. گزارش‌های متعدد نشان می‌دهد که نیتریت در آب شیرین و در تقابل با شوری‌های مختلف روی سمیت نیتریت و شاخص‌های خونی در ماهیان اثر می‌گذارد. از جمله این گزارش‌ها می‌توان به مطالعات صورت گرفته در میگوی سرخ (*Penaeus penicillatus*) (Chen and Lin, 1991)، ماهی کفال (*Mugil platanus*) (Sampaio et al.,2002)، میگوی پاسفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) (Lin and Chen, 2001)، ماهی شانک طلایی

(*Sparus aurata*) (Kir andSunar, 2018)، چاقوماهی دلقک (*Chitalaornata*) (Le et al., 2018)، گربه‌ماهی سرزرد (*Pelteobagrus fulvidraco*) (Zhang et al., 2020)، قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) (Kroupova et al., 2008)، ماهی فلاندر ژاپنی (*Paralichthys olivaceus*) (Kim et al.,) 2018)، تایگر پافر (Tiger Puffer، *Takifugu rubripes*) (Gao et al., 2020)، کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) (Williams et al., 1997)، تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) (Cogun et al., 2017)، کپور هندی مریگال (*Cirrhinus mrigala*) (Das et al., 2004)، سپرماهی (*Scophthalmus maximus*) (Jia et al., 2015) و میگوی پاسفید غربی (Wang et al., 2018) اشاره کرد. این در حالی است که در مورد اثرات نیتریت در شوری‌های مختلف روی ماهیان، بویژه ماهیان خاویاری گزارشی وجود ندارد. از طرفی با توجه به رهاسازی مستقیم بچه ماهیان برای بازسازی ذخایر به آب لب‌شور دریا (به دلیل تلفات زیاد ناشی از جریان سریع آب، گل آلود بودن رودخانه و وارد شدن ضربه، کم آبی به دلیل خشکسالی و آلودگی‌های شیمیایی) می‌تواند مورد بهره‌برداری سازمان مسئول و متولی بازسازی ذخایر این گونه با ارزش با داشتن استانداردهای نیتریت در محل رهاسازی در شوری‌های مختلف مورد توجه قرار گیرد. همچنین با توجه به کمبود آب شیرین در ایران، گرایش پرورش‌دهندگان به پرورش این ماهیان در آب شور و لب‌شور بویژه در نوار ساحلی به روش متراکم و فوق متراکم برای سودآوری بیشتر، در حال افزایش است. در همین راستا نتایج این مطالعه می‌تواند به عنوان یک دستور العمل جامع در اختیار پرورش‌دهندگان ماهیان خاویاری کشور قرار گیرد. بنابراین هدف از این مطالعه بررسی اثرات نیتریت روی برخی شاخص های خونی، ایمنی و استرس در بچه ماهی اوزون‌برون است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در تابستان ۱۳۹۹ و در ایستگاه تحقیقات تاس‌ماهیان گیلان واقع در ساحل روستای چایجان شهر چابکسر (وابسته به موسسه تحقیقات بین المللی تاس‌ماهیان دریای خزر) انجام گرفت. برای این مطالعه از ۷۲۰ قطعه بچه ماهی اوزون‌برون ۷ تا ۸ گرمی استفاده شد. قبل از شروع آزمایش بچه ماهیان اوزون‌برون به مدت یک ماه در شوری‌های پیش

بینی شده این پژوهش (۰ (آب چاه)، ۴ (مخلوط آب دریای خزر و چاه)، ۸ (مخلوط آب دریای خزر و چاه) و ۱۲ (آب دریای خزر) گرم در لیتر) برای سازگاری نگهداری‌شدند. بعد از پایان سازگاری، آزمایش در دو مرحله انجام شد.

مرحله اول: تعیین غلظت نیمه کشندگی نیتریت در شوری‌های مختلف

برای تعیین غلظت نیمه کشندگی (LC_{50} 96h) نیتریت، از ۴۸۰ قطعه بچه ماهی اوزون‌برون با میانگین وزن ۱/۹۱±۱۲/۸۱ گرم و میانگین طول کل ۱/۸۴±۱۴/۵۶ سانتی‌متر استفاده شد. بچه ماهیان داخل مخازن پلاستیکی ۶۰ لیتری در ۱۶ تیمار مختلف نیتریت و شوری قرار گرفتند (جدول ۱). میانگین شاخص‌های فیزیکوشیمیایی آب در تیمارهای مختلف شامل pH ۰/۱۳±۸/۰۴، اکسیژن محلول ۰/۱۷±۷/۶۷ میلی‌گرم در لیتر و دمای آب ۰/۳۹±۲۱/۳۷ درجه سانتی‌گراد بود. شاخص‌های pH، اکسیژن و دما با دستگاه مولتی پارامتر (HACH، آلمان) و شوری با دستگاه شوری سنج چشمی (S/mill-E، Atago، ژاپن) اندازه‌گیری شدند. دوره نوری هم شامل ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی بود.

جدول ۱: تیمارهای تعیین غلظت کشنده نیتریت در شوری‌های مختلف

شماره تیمار	نام تیمار	شماره تیمار	نام تیمار
۱ (C)*	** S_0N_0	۹	S_4N_{150}
۲ (C)	S_4N_0	۱۰	S_4N_{220}
۳ (C)	S_8N_0	۱۱	S_8N_{100}
۴ (C)	$S_{12}N_0$	۱۲	S_8N_{150}
۵	S_0N_{100}	۱۳	S_8N_{220}
۶	S_0N_{150}	۱۴	$S_{12}N_{100}$
۷	S_0N_{220}	۱۵	$S_{12}N_{150}$
۸	S_4N_{100}	۱۶	$S_{12}N_{220}$

*: تیمارهای که با حرف «C» مشخص شده‌اند، تیمارهای شاهد و بدون نتیریت هستند.

**: نام‌گذاری تیمارها بر اساس S_nN_m انجام شده است که در آن «S» نماد شوری، «n» نشان دهنده مقدار شوری (گرم در لیتر)، «N» نماد نیتریت و «m» نشان دهنده مقدار نیتریت (میلی‌گرم در لیتر) است.

غلظت‌های نیتریت مورد استفاده در این مرحله شامل مقادیر ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۲۰ میلی‌گرم در لیتر بلور نیتریت سدیم ($NaNO_2$) ۹۸ درصد (Merck، آلمان) بود (قلی‌پور و همکاران، ۱۳۹۵). این آزمایش طبق روش OECD (TRC, 1984) به مدت ۹۶ ساعت (۴ روز) به طول انجامید. تلفات در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بررسی و ثبت شد. بعد از کسب نتایج نهایی، اطلاعات به دست آمده بر طبق روش آماری Probit Analysis (USEPA, 1985) Program Version 1.5 با سطح اطمینان ۹۵ درصد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و مقادیر LC_{50} طی ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت تعیین شد (جدول ۲) (Finney, 1971).

مرحله دوم: آزمایش بررسی اثرات نصف غلظت نیمه کشنده نیتریت در شوری‌های مختلف

در مرحله دوم از ۲۴۰ قطعه بچه ماهی اوزون‌برون با میانگین وزن ۲/۱۷±۱۵/۲۳ گرم و میانگین طول کل ۱/۹۵±۱۷ سانتی‌متر استفاده شد. بچه ماهیان در ۸ تیمار (هر یک با سه تکرار) با مقادیر مختلف شوری (صفر، ۴، ۸ و ۱۲ گرم در لیتر) به اضافه نصف (۵۰ درصد) غلظت نیمه کشندگی (LC_{50} 96h) نیتریت و تیمارهای شاهد (بدون نیترت) تقسیم‌بندی شدند (جدول۳). طول مدت این مرحله ۴ روز بود. میانگین شاخص‌های فیزیکوشیمیایی آب در تیمارهای مختلف شامل pH ۸/۰۴±۰/۱۲، اکسیژن محلول ۷/۸۱±۰/۱۱ میلی‌گرم در لیتر و دمای آب ۱۶/۵±۰/۵۲ درجه‌سانتی‌گراد بود.

جدول ۲: مقادیر غلظت نیمه کشنده (LC_{50} 96h) و نصف (۵۰ درصد) غلظت نیمه کشنده (LC_{50} 96h) نیتریت در شوری‌های مختلف برای بچه ماهیان ازون‌برون

شوری (گرم در لیتر)	غلظت LC_{50} 96h نیتریت (میلی‌گرم درلیتر)	۵۰٪ غلظت LC_{50} 96h نیتریت (میلی‌گرم درلیتر)
۰	۷۵/۱۱	۳۷/۵۶
۴	۹۳/۵۴	۴۶/۷۷
۸	۲۴۱/۶۰	۱۲۰/۸۰
۱۲	۳۵۳/۱۶	۱۷۶/۵۸

جدول ۳: مشخصات تیمارهای نیتریت در شوری‌های مختلف

شماره تیمار	مشخصات تیمار
۱	شوری صفر گرم در لیتر، بدون نیتریت (شاهد)
۲	شوری ۴ گرم در لیتر، بدون نیتریت (شاهد)
۳	شوری ۸ گرم در لیتر، بدون نیتریت (شاهد)
۴	شوری ۱۲ گرم در لیتر، بدون نیتریت (شاهد)
۵	شوری صفر گرم در لیتر + نصف (۵۰٪) غلظت نیمه کشنده (LC_{50} 96h) نیتریت
۶	شوری ۴ گرم در لیتر + نصف (۵۰٪) غلظت نیمه کشنده (LC_{50} 96h) نیتریت
۷	شوری ۸ گرم در لیتر + نصف (۵۰٪) غلظت نیمه کشنده (LC_{50} 96h) نیتریت
۸	شوری ۱۲ گرم در لیتر + نصف (۵۰٪) غلظت نیمه کشنده (LC_{50} 96h) نیتریت

دوره نوری هم شامل ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی بود. نتایج آزمایشگاهی، مقادیر کلسیم (Ca)، سدیم (Na)، کلر آزاد (CL^-) و بی‌کربنات (HCO_3^-) در آب به ترتیب در شوری صفر گرم در لیتر ۵۶/۶۷، ۷۰، ۰/۰۹ و ۱۲۱/۶میلی‌گرم در لیتر، در شوری ۴ گرم در لیتر ۲۱۶/۶۷، ۲۱۲، ۰/۰۱ و ۳۶ میلی‌گرم در لیتر، در شوری ۸ گرم در لیتر ۱۱۶۶/۶۷، ۳۵۲، ۰/۰۶ و ۱۵۶ میلی‌گرم در لیتر و در شوری ۱۲ گرم در لیتر ۱۵۴۱/۶۷، ۷۷۲، ۰/۰۴ و ۱۳۶ میلی‌گرم در لیتر بود. مقادیر کلسیم و بی‌کربنات با استفاده از روش تیتراسیون (ISO 6058, 1984)، سدیم با روش اسپکترومتری جذب اتمی (Atomic Absorption Spectrometry: AAS) (ISO 9964-1, 1993) و کلر آزاد (CL^-) با روش Mercuric Thiocyanate (شماره DOC316.53.01017، روش شماره ۸۱۱۳، شرکت Hach، آمریکا) اندازه‌گیری شد. روزانه ۷۵ درصد آب مخازن تعویض و غلظت نیتریت در تیمارها دوباره تنظیم می‌شد.

خون‌گیری و بررسی شاخص‌ها خونی

پس از ۴ روز از بچه ماهیان اوزون‌برون خون‌گیری به عمل آمد. به این ترتیب که به طور تصادفی در هر تیمار از ۹ قطعه بچه ماهی به وسیله سرنگ انسولین هپارینه از سیاهرگ دمی (Caudal Vasculature) خون‌گیری شد. ۰/۵ میلی‌لیتر خون برای بررسی CBC در لوله‌های حاوی هپارین و ۱/۵ میلی‌لیتر خون داخل

لوله‌های اپندورف غیرهپارینه برای انجام مطالعات سرم‌شناسی ریخته شد. خون موجود در لوله‌های اپندورف فاقد ماده ضدانعقاد هپارین، با ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (Labofuge 200، Heraeus Sepatech، ژاپن) شد. سپس سرم جدا و با سمپلر در اپندورف‌های تازه ریخته شد. در نهایت نمونه‌ها در یک کلمن حاوی یخ خشک و به دور از تکان‌های شدید به آزمایشگاه ارسال شدند. تمام آزمایش‌های خون‌شناسی در آزمایشگاه ویرومد (رشت) انجام پذیرفت. در آزمایشگاه تعداد گلبول‌های قرمز، هماتوکریت، غلظت هموگلوبین، حجم متوسط گلبولی (MCV)، غلظت متوسط هموگلوبین در گلبول قرمز (MCH)، غلظت متوسط هموگلوبین گلبول‌های قرمز (MCHC)، تعداد گلبول‌های سفید و شمارش افتراقی گلبول سفید بر اساس روش‌های استاندارد انجام گرفت (Gao et al., 2007).

شاخص‌های ایمنی‌خون

برای اندازه‌گیری ایمونوگلوبولین M از کیت تشخیصی (Fish Immunoglobulin M ELISA، آمریکا) و روش Turbidometric استفاده شد. سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الایزاریدر (Rs232، Biotek، آمریکا) خوانده شد. از آب مقطر به عنوان بلانک استفاده شد (سقا و سروش‌نیا، ۱۳۸۲؛ Khoshbavar-Rostami et al., 2006). ایمونوگلوبین کل بر اساس روش توصیف شده توسط Siwicki و Anderson (۱۹۹۳) اندازه‌گیری شد. به طور خلاصه، ابتدا پروتئین کل نمونه‌های سرم بر اساس روش بیوره (Biuret) تعیین شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از هر نمونه سرم با ۰/۱ میلی‌لیتر محلول پلی‌اتیلن گلیکول ۱۲ درصد (Sigma-Aldrich، آمریکا) مخلوط و به مدت ۲ ساعت انکوبه شد تا مولکول‌های ایمونوگلوبولین پایین بیایند. رسوب ایمونوگلوبولین با سانتریفیوژ (5415R، Eppendorf، آلمان) در ۵۰۰۰g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد حذف شد. کل پروتئین باقی مانده در مایع رویی دوباره به روش بیوره اندازه‌گیری شد. مقدار کل ایمونوگلوبولین (IgM) بر اساس رابطه ۱ محاسبه شد (Siwicki and Anderson, 1993).

رابطه ۱:

$$IgM\ (mg/mL) = P_T - P_{PFG}$$

P_T: پروتئین کل در نمونه سرم (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)؛ P_{PEG}: پروتئین کل پس از تیمار سرم با پلی‌اتیلن گلیکول (میلی‌گرم در میلی‌لیتر).

سطح لیزوزیم در نمونه‌های خون با استفاده از روش کدورت سنجی مطابق با روش توصیف شده توسط Ellis (۱۹۹۰) با تغییرات جزئی تعیین‌شد. در نهایت جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۳۰ نانومتر توسط دستگاه الایزاریدر (RS232، BioTek، آمریکا) خوانده شد.

شاخص‌های استرس

کورتیزول با استفاده از کیت تشخیص آزمایشگاهی (Monobind، Lake Forest، آمریکا) اندازه‌گیری شد و جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزاریدر خوانده شد (Tintos et al., 2006). سنجش گلوکز به روش Colorimetric با استفاده از کیت آزمایشگاهی (پارس آزمون، ایران) و دستگاه الایزاریدر در طول موج ۵۴۶ نانومتر و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد (Bayunova et al., 2002). لاکتات از طریق روش Colorimetric با استفاده از کیت Lactate LS (Ziestchim Diagnostics، ایران) و دستگاه فتومتر (AE-600، EMRA، ژاپن) در طول موج ۶۰۰ نانومتر سنجیده شد (Acerete et al., 2004).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تعیین غلظت نیمه کشندگی (LC_{50} 96h) با استفاده از لگاریتم غلظت‌های به کار رفته به روش Probit Value، طراحی شده به وسیله EPA آمریکا که برای تجزیه و تحلیل داده‌های مرگ و میر ناشی از مسمومیت مزمن و حاد ماهیان و آبزیان دیگر در آبهای جاری و ساکن به کار می‌رود، در سطح اطمینان ۹۵ درصد انجام گرفت و با رگرسیون، غلظت‌های نیمه کشنده برای ۹۶ ساعت به دست آمد. برای شاخص‌های خونی، ایمنی و استرس ابتدا نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون (شاپیرو- ویلک) بررسی شد. زمانی که توزیع داده‌ها نرمال بود، برای مقایسه میانگین داده‌ها بین تیمارهای مختلف از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و برای جداسازی گروه‌های همگن از پس‌آزمون توکی در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P<۰/۰۵$) و زمانی که داده‌ها دارای توزیع نرمال نبودند از آزمون کروسکال- والیس و من- ویتنی استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل کلیه داده‌ها از نرم‌افزار SPSS 22 و برای رسم نمودارها از برنامه Microsoft Excel 2013 استفاده شد.

نتایج

با توجه به جدول ۴، شاخص‌های خونی ماهی اوزون‌برون در تیمارهای مختلف شامل تیمارهای شوری بدون نیتریت (شاهد) و تیمارهای شوری به همراه نصف (۵۰ درصد) غلظت نیمه کشنده (LC_{50} 96h) نیتریت دارای تفاوت‌هایی بود. به این ترتیب که در تعداد گلبول‌های سفید و قرمز، هموگلوبین، MCV و هماتوکریت طبق آزمون واریانس یک‌طرفه و توکی و نوتروفیل و ائوزینوفیل طبق آزمون کروسکال-والیس و من-ویتنی اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($P<0/05$).

جدول ۴: شاخص‌های خونی بچه ماهی اوزون‌برون در نصف (۵۰ درصد) غلظت نیمه کشنده (LC_{50} 96h) نیتریت با شوری‌های مختلف (میانگین ± انحراف معیار)

تیمار / شاخص	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸
WBC (mm^{-3})	۴۲۳۳/۳۳ ±۲۰۸/۲ ^{ab}	۴۵۶۶/۶۷ ±۱۵۲/۷ ^{bc}	۵۱۰۰/۰۰ ±۲۶۴/۶ ^{bcd}	۴۸۰۰/۰۰ ±۳۰۰ ^{bcd}	۳۵۶۶/۶۷ ±۴۱۶/۳ ^{a}	۵۳۶۶/۶۷ ±۳۵۱/۲ ^{cd}	۵۵۳۳/۳۳ ±۳۵۱/۲ ^{d}	۵۲۶۶/۶۷ ±۴۵۰/۹ ^{cd}
(٪) **Neu**	۱۳/۰۰ ±۱/۰۰ ^{ab}	۱۴/۳۳ ±۱/۵۳ ^{ab}	۱۴/۶۷ ±۱/۵۰ ^{ab}	۱۲/۰۰ ±۱/۰۰ ^{a}	۱۰/۶۷ ±۱/۱۵ ^{a}	۱۲/۶۷ ±۱/۵۳ ^{ab}	۱۶/۶۷ ±۲/۵۲ ^{b}	۱۱/۳۳ ±۱/۱۵ ^{a}
(٪) **Lym**	۸۳/۰۰ ±۳/۶۱ ^{a}	۷۹/۳۳ ±۲/۰۸ ^{a}	۷۸/۶۷ ±۳/۵۱ ^{a}	۸۰/۶۷ ±۱/۵۳ ^{a}	۸۴/۰۰ ±۴/۵۸ ^{a}	۷۹/۶۷ ±۴/۵۱ ^{a}	۸۰/۳۳ ±۴/۵۱ ^{a}	۸۰/۰۰ ±۲/۶۵ ^{a}
(٪) **Mon**	۴/۳۳ ±۰/۵۸ ^{a}	۵/۰۰ ±۱/۰۰ ^{a}	۵/۶۷ ±۰/۵۸ ^{a}	۴/۶۷ ±۰/۵۸ ^{a}	۵/۳۳ ±۱/۵۳ ^{a}	۵/۶۷ ±۰/۵۸ ^{a}	۵/۰۰ ±۲/۰۰ ^{a}	۵/۰۰ ±۱/۰۰ ^{a}
(٪) **Eos**	۰ ± ۰ ^{a}	۰ ± ۰ ^{a}	۱ ± ۰ ^{b}	۰ ± ۰ ^{a}	۱ ± ۰ ^{b}	۱ ± ۰ ^{b}	۱ ± ۰ ^{b}	۲ ± ۰ ^{c}
RBC (mm^{-3})	۵۸۲۳۳۳/۳ ±۳۰۵۵/۱ ^{b}	۵۶۹۳۳۳/۳ ±۱۴۰۱۱/۹ ^{b}	۵۹۷۰۰۰/۰ ±۱۴۱۰۶/۷ ^{b}	۵۱۵۶۶۶/۷ ±۹۷۱۲/۵ ^{a}	۶۵۵۶۶۶/۷ ±۱۲۶۶۲/۳ ^{c}	۵۱۲۳۳۳/۳ ±۱۱۲۳۹/۸ ^{a}	۵۱۳۰۰۰/۰ ±۲۰۴۲۰/۶ ^{a}	۵۶۱۰۰۰/۰ ±۱۰۵۳۵/۷ ^{b}
(g/dL) **Hb**	۴/۳۰ ±۰/۲۰ ^{a}	۴/۴۷ ±۰/۲۵ ^{a}	۴/۴۰ ±۰/۱۰ ^{a}	۴/۰۳ ±۰/۳۵ ^{a}	۵/۴۷ ±۰/۴۲ ^{b}	۴/۲۷ ±۰/۲۵ ^{a}	۴/۳۳ ±۰/۲۵ ^{a}	۴/۴۳ ±۰/۴۰ ^{a}
(٪) **Hct**	۲۵/۰۰ ±۱/۰۰ ^{ab}	۲۵/۶۷ ±۲/۰۸ ^{ab}	۲۵/۰۰ ±۱/۰۰ ^{ab}	۲۱/۰۰ ±۱/۷۳ ^{a}	۲۹/۰۰ ±۴/۰۰ ^{b}	۲۲/۳۳ ±۲/۵۲ ^{ab}	۲۱/۳۳ ±۳/۵۱ ^{a}	۲۴/۶۷ ±۱/۵۳ ^{ab}
MCH (pg)	۷۵/۳۳ ±۲/۰۸ ^{a}	۷۷/۶۳ ±۲/۳۱ ^{a}	۷۳/۸۰ ±۲/۶۰ ^{a}	۷۸/۵۰ ±۳/۱۰ ^{a}	۷۹/۳۰ ±۳/۶۴ ^{a}	۸۱/۶۰ ±۴/۵۰ ^{a}	۸۲/۱۰ ±۴/۶۵ ^{a}	۷۷/۳۷ ±۴/۶۱ ^{a}
MCHC (g/dL)	۱۹/۳۳ ±۲/۰۸ ^{a}	۱۸/۰۳ ±۱/۴۸ ^{a}	۱۷/۳۷ ±۱/۰۷ ^{a}	۱۸/۲۷ ±۰/۹۴ ^{a}	۱۸/۶۰ ±۳/۲۰ ^{a}	۱۹/۲۳ ±۲/۹۵ ^{a}	۲۰/۰۳ ±۲/۵۵ ^{a}	۱۸/۴۳ ±۱/۸۰ ^{a}
MCV (fL)	۴۲۷/۶۷ ±۷/۵۱ ^{ab}	۴۲۷/۰۰ ±۶/۵۶ ^{ab}	۴۱۹/۶۷ ±۵/۰۳ ^{a}	۴۲۴/۰۰ ±۳/۶۱ ^{ab}	۴۴۰/۰۰ ±۷/۰۰ ^{b}	۴۲۵/۰۰ ±۸/۱۸ ^{ab}	۴۳۲/۶۷ ±۷/۰۲ ^{ab}	۴۲۸/۳۳ ±۵/۵۱ ^{ab}

WBC: تعداد گلبول سفید؛ Neu: نوتروفیل؛Lym: لنفوسیت؛ Mon: مونوسیت؛ Eos: ائوزینوفیل؛ RBC: تعداد گلبول قرمز؛ Hb: هموگلوبین؛ Hct: هماتوکریت.

حروف لاتین غیر مشترک، نشان دهنده وجود اختلاف بین تیمارها است ($P<0/05$).

شاخص‌های MCH، MCHC و لنفوسیت اختلاف معنی‌دار آماری نشان ندادند (P>۰/۰۵). بر اساس نتایج، بیشترین مقدار گلبول سفید و نوتروفیل در تیمار ۷، گلبول قرمز، هموگلوبین، MCV و هماتوکریت در تیمار ۵ و ائوزینوفیل در تیمار ۸ دیده شد.

با توجه به جدول ۵، شاخص‌های ایمنی در بچه ماهیان اوزون‌برون در تیمارهای مختلف (تیمارهای شوری بدون نیتریت (شاهد) و تیمارهای شوری به همراه نصف (۵۰ درصد) غلظت نیمه کشنده (LC_{50} 96h) نیتریت) بر اساس آزمون واریانس یک‌طرفه و توکی دارای تفاوت‌های معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). به طوری که بیشترین مقدار IgM و ایمونوگلوبولین کل در تیمار ۸ و بیشترین مقدار لیزوزیم در تیمار ۷ مشاهده شد (جدول ۵).

بر اساس نتایج به دست آمده شاخص‌های استرس نیز در بچه ماهیان اوزون‌برون در تیمارهای مختلف (تیمارهای شوری بدون نیتریت (شاهد) و تیمارهای شوری به همراه نصف (۵۰ درصد) غلظت نیمه کشنده (LC_{50} 96h) نیتریت) طبق آزمون واریانس یک‌طرفه و توکی دارای اختلاف معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). به طوری که بیشترین مقدار کورتیزول و گلوکز در تیمار ۴ و بیشترین مقدار لاکتات در تیمار ۳ مشاهده شد (جدول ۶).

جدول ۵: شاخص‌های ایمنی بچه ماهی اوزون‌برون در نصف (۵۰ درصد) غلظت نیمه کشنده (LC_{50} 96h) نیتریت با شوری‌های مختلف (میانگین ±انحراف معیار)

تیمار	IgM (mg/dL)	لیزوزیم (U/mL/min)	ایمونوگلوبولین کل (mg/mL)
۱	۴۷/۶۷ ± ۲/۵۲ ab	۲۹/۰۰ ± ۲/۰۰ bc	۱۵/۵۳ ± ۰/۸۳ b
۲	۴۵/۰۰ ± ۳/۶۱ ab	۳۲/۳۳ ± ۲/۰۸ cd	۱۲/۰۷ ± ۰/۷۸ a
۳	۴۳/۳۳ ± ۳/۰۶ ab	۲۹/۳۳ ± ۰/۵۸ bc	۱۲/۳۳ ± ۰/۷۶ a
۴	۴۱/۶۷ ± ۳/۲۱ a	۲۴/۶۷ ± ۱/۵۳ ab	۱۰/۶۷ ± ۰/۴۲ a
۵	۴۲/۳۳ ± ۳/۰۶ a	۲۲/۳۳ ± ۲/۵۲ a	۱۲/۳۰ ± ۰/۶۶ a
۶	۴۵/۰۰ ± ۳/۶۱ ab	۳۱/۰۰ ± ۳/۰۰ bc	۱۶/۵۷ ± ۱/۱۲ bc
۷	۵۲/۰۰ ± ۳/۰۰ bc	۳۷/۶۷ ± ۳/۰۶ d	۱۷/۷۰ ± ۰/۹۲ bc
۸	۵۸/۶۷ ± ۳/۵۱ c	۳۴/۳۳ ± ۲/۵۲ cd	۱۸/۵۳ ± ۰/۸۵ c

حروف لاتین غیر مشترک، نشان دهنده وجود اختلاف بین تیمارها است (P<۰/۰۵).

جدول ۶: شاخص‌های استرس بچه ماهی اوزون‌برون در نصف (۵۰ درصد) غلظت نیمه کشنده (LC_{50} 96h) نیتریت با شوری‌های مختلف (میانگین ±انحراف معیار)

تیمار	کورتیزول (ng/mL)	گلوکز (mg/dL)	لاکتات (mg/dL)
۱	۲۸/۰۰ ± ۲/۰۰ ^{b}	۵۵/۰۰ ± ۳/۶۱ ^{c}	۲۳/۷۳ ± ۱/۵۶ ^{bcd}
۲	۳۰/۰۰ ± ۲/۶۵ ^{bc}	۵۲/۰۰ ± ۲/۶۵ ^{bc}	۲۰/۱۷ ± ۱/۷۲ ^{ab}
۳	۳۱/۶۷ ± ۱/۵۳ ^{bcd}	۵۰/۶۷ ± ۴/۰۴ ^{bc}	۲۷/۹۷ ± ۱/۱۱ ^{d}
۴	۳۶/۳۳ ± ۲/۰۸ ^{d}	۵۹/۶۷ ± ۵/۰۳ ^{c}	۲۷/۲۳ ± ۱/۱۲ ^{d}
۵	۲۷/۶۷ ± ۲/۵۲ ^{b}	۵۶/۳۳ ± ۳/۰۶ ^{c}	۲۶/۲۳ ± ۱/۴۰ ^{d}
۶	۳۵/۰۰ ± ۱/۷۳ ^{cd}	۵۴/۰۰ ± ۳/۶۱ ^{c}	۲۵/۴۰ ± ۲/۳۰ ^{cd}
۷	۲۱/۰۰ ± ۲/۶۵ ^{a}	۴۰/۳۳ ± ۳/۰۶ ^{a}	۲۱/۱۷ ± ۱/۸۲ ^{abc}
۸	۱۸/۳۳ ± ۲/۰۸ ^{a}	۴۳/۶۷ ± ۳/۵۱ ^{ab}	۱۹/۱۳ ± ۱/۴۶ ^{a}

حروف لاتین غیر مشترک، نشان دهنده وجود اختلاف بین تیمارها است ($P<۰/۰۵$).

بحث

در مرحله اول (تعیین غلظت نیمه کشندگی (LC_{50} 96h) نیتریت سدیم ($NaNO_2$) نتایج نشان داد که در بچه ماهیان اوزون‌برون با افزایش شوری میزان غلظت کشندگی نیتریت هم افزایش یافت. به این ترتیب که میزان نیتریت در شوری صفر گرم در لیتر برابر ۱۸/۷۸ میلی‌گرم در لیتر، در شوری ۴ گرم در لیتر برابر ۲۴/۳۱۵ میلی‌گرم در لیتر، در شوری ۸ گرم در لیتر برابر ۵۳/۸۷۵ میلی‌گرم در لیتر و در شوری ۱۲ گرم در لیتر برابر ۹۳/۱۸۷۵ میلی‌گرم در لیتر بود. این نتیجه بیان کننده آن است که توانایی و تحمل ماهیان در برابر افزایش غلظت نیتریت با افزایش شوری بیشتر شد. این نتایج با نتایج به دست آمده از اثرات سمیت نیتریت روی ماهی آزاد اقیانوس اطلس، *Salmo salar* (Alabaster et al., 1979)، میگوی پاسفید غربی (Lin and Chen, 2001)، ماهی براق طلایی، *Notemigonus crysoleucas* (Sink, 2010)، ماهی سوکلا، *Rachycentron canadum* (Barbieri and Doi, 2011) و ماهی باس اروپایی، *Dicentrarchus labrax* (Kir et al., 2019) مطابقت داشت.

گزارشی درباره شاخص‌های خونی، ایمنی و استرس در ترکیب شوری‌های مختلف با نیترت

یافت نشد، ولی گزارش‌های متعددی درباره اثرات نیتریت روی این شاخص‌ها در ماهیان آب شور و شیرین به صورت جداگانه یافت شد که در ادامه آمده است.

افزایش و کاهش تعداد گلبول‌های سفید یکی از نشانه‌های افزایش استرس در بچه ماهیان در معرض نیتریت است. به طوری که بین تعداد گلبول‌های قرمز، مقدار هموگلوبین و درصد هماتوکریت خون ارتباط مستقیم وجود دارد (کاظمی و همکاران، ۱۳۹۱؛ Garcia et al., 2007). افزایش میزان شاخص‌های MCV، MCH و MCHC به عنوان نشانه‌ای از بی‌نظمی و اختلال در فعالیت اندام‌های خونساز مانند طحال و کبد و بروز مسمومیت تلقی می‌شود (Munker et al., 2007)، تغییر یا عدم تغییر در مقادیر شاخص‌های یاد شده، بیانگر شرایط مناسب یا نامناسب اندام‌های حیاتی ماهی است. واکنش‌های التهابی و واکنش‌های ناشی از فعالیت‌های گرانولوسیت‌ها، مونوسیت‌ها و لنفوسیت‌ها ساز و کارهای دفاع ایمنی غیراختصاصی سلولی را در ماهیان تشکیل می‌دهند که در پاسخ به شرایط مختلفی به وقوع می‌پیوند. در این مطالعه شاخص‌های خونی در تیمارهای شوری بدون نیتریت (شاهد) و تیمارهای شوری با نصف (۵۰ درصد) غلظت نیمه کشنده (LC_{50} 96h) نیتریت کاهش یافتند. نتایج نشان داد که شوری تاثیری در کاهش اثرات نیتریت روی شاخص‌های خونی در بچه ماهیان ازون برون نداشت. با توجه به این که افزایش غلظت نیتریت باعث کاهش اکسیژن به دلیل تبدیل هموگلوبین به مت‌هموگلوبین می‌شود (Vedel et al., 1998) که این عوامل می‌توانند منجر به شرایط هیپوکسی (کم اکسیژنی) شوند و بر سیستم تنفسی ماهی تاثیر بگذارند (Iftikar et al., 2010). وقوع هیپوکسی ممکن است منجر به افزایش یا کاهش ظرفیت اتصال هموگلوبین به اکسیژن در گلبول قرمز شود (Witeska et al., 2006). کاهش تعداد گلبول‌های قرمز نشان دهنده کاهش میزان هموگلوبین به دلیل افزایش حذف گلبول‌های قرمز ناکارآمد است (Stormer et al., 1996). از طرفی حذف گلبول‌های قرمز ناکارآمد ممکن است باعث کاهش تعداد گلبول قرمز شوند. دلیل کاهش گلبول‌های سفید هم امکان دارد مسدود یا سرکوب شدن بافت‌های Leukopoietic باشد (Nussey et al., 2002). گزارش‌های نشان داده است که در ماهی تیلاپیای نیل تحت تاثیر نیتریت، بیشترین افزایش شاخص‌های خون در هماتوکریت و گلبول‌های سفید (به ترتیب ۶۶ و ۲۵ درصد)

مشاهده شد، اما هموگلوبین و تعداد گلبول‌های قرمز به ترتیب به میزان ۵۳ و ۱۵ درصد در تمام غلظت‌ها روند کاهشی داشت (P<۰/۰۵) (Cogun et al., 2017). در ماهی کپور هندی مریگال (*Cirrhinus mrigala*) در غلظت زیرکشندگی با افزایش غلظت نیتریت و دوره قرار گرفتن در معرض آن، باعث کاهش تدریجی تعداد گلبول‌های قرمز، هموگلوبین و پروتئین سرم شد. کاهش یا افزایش لنفوسیت‌ها به غلظت نیتریت و طول دوره در معرض قرار گرفتن بستگی داشت. ضمن این که در تمام شاخص‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (Das et al., 2004). در چاقوماهی دلقک (*Chitala ornate*) افزایش قابل توجهی در میزان هموگلوبین و گلبول‌های سفید در مقادیر مختلف نیتریت وجود داشت، در حالی که شاخص‌های خونی دیگر در تیمار نیتریت ۴ میلی‌گرم در لیتر کاهشی بود (Le et al., 2018). در گربه ماهی سرزرد (*Pelteobagrus fulvidraco*) کاهش قابل توجهی در تعداد گلبول‌های قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت در بالاترین تیمار نیتریت مشاهده شد (Zhang et al., 2020). نتایج نشان داد که مسمومیت با نیتریت می‌تواند منجر به تخریب خون (با کاهش گلبول‌های قرمز و هموگلوبین و افزایش مت‌هموگلوبین و گلبول‌های سفید) و عدم تعادل یون (کاهش Na^+ و Cl^- و افزایش K^+) شود. اما در مطالعه‌ای دیگر، در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) شاخص‌های گلبول قرمز، MCV، MHC و MCHC در تیمارهای در معرض نیتریت با شاهد تفاوتی نداشتند (Kroupova et al., 2008).

یون NO_2^- جهت حمل و نقل یون‌های کلرید در مبدل HCO_3^-/Cl^- (واقع در قسمت اپیکال سلول‌های آبشش) رقابت می‌کند، سپس افزایش شوری از تاثیر مستقیم NO_2^- بر روی شاخص‌های خونی می‌کاهد (Tomasso, 2012) . اما در این مطالعه با افزایش شوری این پاسخ کاهش نیافت. حدس بر این است که علاوه بر اثرات سمی نیتریت، شوری هم ممکن است فراوانی گلبول‌های قرمز را با توجه به افزایش فشار اسمزی ناشی از افزایش شوری، کاهش دهد (Martinez-Alvarez et al., 2002). در مطالعه حاضر، اگرچه ممکن است افزایش شوری بر کاهش سمیت نیتریت بر روی بچه ماهیان تاثیر داشته باشد، ولی در این مطالعه هیچ تاثیری در کاهش سمیت نیتریت در شاخص‌های خونی بچه ماهیان ازون‌برون مشاهده نشد.

سیستم ایمنی در ماهی به عنوان خط دفاعی در برابر عوامل بیماری‌زا مطرح است (Qstegaard et al., 2009). بخشی از ایمنی داخلی به وسیله ایمونوگلوبولین‌ها ایجاد می‌شود (سلطانی، ۱۳۸۷). میزان فعالیت لیزوزیم، شاخص مناسبی برای ارزیابی توانایی ماهیان در بروز پاسخ‌های ایمنی ذاتی نسبت به عوامل استرس‌زا محسوب می‌شود (Kim and Austin, 2006). با توجه به نتایج مرحله دوم، سطح IgM، لیزوزیم و ایمونوگلوبین کل در تیمارهای شوری بدون نیتریت، از شوری ۰ تا ۱۲ گرم در لیتر، کاهش یافت ولی وقتی بچه ماهیان در معرض نیتریت، در شوری‌های مختلف قرار گرفتند میزان این سه شاخص به طور معنی‌داری افزایش یافت. به طوریی که بیشترین میزان این سه شاخص در تیمارهای ۷ و ۸ مشاهده شد. با توجه به این که از شوری ممکن است در گونه‌های مهم آبزی‌پروری به عنوان ابزاری برای کاهش آلودگی نیتریت استفاده شود (Ramirez-Rochin et al., 2017)، در نتیجه در این مطالعه احتمالا شوری باعث کاهش سمیت در ماهی و افزایش سطح ایمونوگلوبین‌های IgM و ایمونوگلوبین کل سرم خون شده، موجب تحریک و افزایش سیستم ایمنی در بچه ماهیان ازون برون شده است.

در بررسی صورت گرفته در ماهی فلاندر ژاپنی (*Paralichthys olivaceus*) پاسخ‌های ایمنی مانند مقدار لیزوزیم پلاسما و IgM در معرض نیتریت و آب دریا به طور قابل توجهی افزایش داشتند (Kim et al., 2018). Wang و همکاران در سال ۲۰۱۸ بیان کردند که سیستم‌های ایمنی ماهی نسبت به استرس محیطی حساس هستند و تغییرات گسترده ایمنی به عنوان شاخص‌های قابل اطمینان عوامل استرس‌زا در نظر گرفته می‌شود. Gao و همکاران در سال ۲۰۲۰ بیان کردند که با افزایش نیتریت در ماهی تایگر پافر (*Takifugu rubripes*) میزان شاخص‌های ایمنی به طور قابل توجهی کاهش یافت. در مطالعه‌ای دیگر Zhang و همکاران در سال ۲۰۲۰ چنین نتیجه‌ای را در گربه‌ماهی سرزرد قرار گرفته در معرض نیتریت (در آب شیرین) به دست آوردند.

پس از قرارگیری ماهی در معرض استرس، گلوکوکورتیکوییدها و کاتکول‌آمین‌ها در بدن آزاد و وارد جریان خون می‌شوند. کاتکول‌آمین‌ها و کورتیزول سبب تغییرات بیوشیمیایی و فیزیولوژیک مانند افزایش گلوکز خون، کاهش گلیکوژن و کاتابولیسم پروتئین‌های پلاسما می‌شوند (Chowdhury and Joy, 2000). افزایش کاتیکول‌آمین‌ها باعث افزایش سرعت

گلیکولیز و به دنبال آن افزایش تجمع لاکتات در خون می‌شود (Vandewalle et al., 1987). در این مطالعه، در تیمارهای شاهد (شوری بدون نیتریت) با افزایش شوری شاخص‌های استرس افزایش یافت، ولی در تیمارهای در تقابل (شوری با نصف (۵۰ درصد) غلظت نیمه کشنده (LC_{50} 96h) نیتریت) شاخص‌های کورتیزول، گلوکز و لاکتات کاهش یافت ($P<0/05$). در نتیجه شوری باعث کاهش اثرات نیتریت در شاخص‌های استرس در خون بچه ماهیان ازون‌برون شد. علت این کاهش امکان دارد رقابت NO_2^- در محل حمل و نقل یون‌های کلرید در مبدل HCO_3^-/Cl^- (واقع در قسمت اپیکال سلول‌های آبشش) باشد، سپس افزایش شوری تاثیر مستقیم NO_2^- بر روی کورتیزول را در خون کاهش داده است. مشابه این مطالعه در میگوی پا سفید غربی (Wang et al., 2018) گزارش شده است.

در مطالعه‌ای، Williams و همکاران در سال ۱۹۹۷ بیان کردند که میزان لاکتات در ماهی کپور قرار گرفته در معرض نیتریت به مدت زمان ۴۸ ساعت، بیش از ۱۰ برابر افزایش یافت. آنها مطرح کردند زمانی که کپور در معرض نیتریت (۹۶ ساعت) قرار گرفت مت‌هموگلوبینمی شدید ایجاد شد که باعث کاهش اکسیژن موجود شد. در نتیجه برای جبران کمبود اکسیژن، مصرف اکسیژن را در معرض نیتریت کاهش داد که باعث کاهش سوخت و ساز بدن شد و برای جلوگیری از کسری قریب الوقوع انرژی ناشی از نارسایی متابولیسم هوازی در معرض نیتریت ، ماهی کپور به تولید انرژی بی‌هوازی روی آورد در این صورت لاکتات را افزایش داد (Williams et al., 1997). Jia و همکاران (۲۰۱۵) گزارش دادن که قرارگیری سپرماهی (*Scophthalmus maximus*) در معرض نیتریت حاد بعد از ۲۴ و ۹۶ ساعت باعث افزایش سطح کورتیزول شد. در نتیجه آنها مطرح کردند که تصور می‌شود تشکیل مت‌هموگلوبین منجر به هیپوکسی بافت می‌شود که باعث ایجاد استرس قابل توجه و تغییرات نشانگرهای استرس از جمله کورتیزول و گلوکز می‌شود (Jia et al., 2015). این پدیده همچنین، در ماهی کپور هندی مریگال (Das et al., 2004)، سپرماهی (*Scophthalmus maximus*) (Jia et al., 2015) و میگوی پاسفید غربی (Wang et al., 2018) گزارش شده است.

در مجموع، می‌توان گفت که شوری تحمل بچه ماهیان اوزون‌برون به غلظت‌های بالاتر نیتریت را افزایش داد و همچنین شوری

نتوانست اثرات سمی نیتریت را بر روی شاخص‌های خونی در بچه ماهیان ازون‌برون کاهش دهد. ولی افزایش شوری در تیمارهای در تقابل (شوری با نصف (۵۰ درصد) غلظت نیمه کشنده (LC50 96h) نیتریت) باعث کاهش شاخص‌های استرس و افزایش شاخص‌های ایمنی در خون بچه ماهیان ازون‌برون شد که بیانگر کاهش اثرات سمی نیتریت است.

تشکر و قدردانی

از ریاست محترم موسسه تحقیقات بین المللی تاس‌ماهیان دریای خزر، ریاست محترم ایستگاه تحقیقات تاس‌ماهیان گیلان و همچنین کارشناسان آن مجموعه کمال تشکر را داریم.

منابع

آذری تاکامی ق. ۱۳۹۷. تکثیر و پرورش تاس‌ماهیان (ماهیان خاویاری). انتشارات دانشگاه تهران. ۴۲۴ص.

سقا ح. ر. و سروش‌نیا م. ۱۳۸۲. کتاب جامع تجهیزات فرآورده‌های آزمایشگاهی. انتشارات کتاب میر. ۲۶۸۷ ص.

سلطانی م. ۱۳۸۷. ایمنی‌شناسی ماهیان و سخت‌پوستان. موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران. ۲۶۴ص.

قلی‌پور س.، خارا ح. و پژند ذ. ۱۳۹۵. بررسی (LC_{50} 96h) و ضایعات هیستوپاتولوژیکی نیتریت روی بافت‌های آبشش، کبد و کلیه تاس‌ماهی ازون برون (*Acipenser stellatus*). فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری، ۱۱(۱): ۱۲-۱.

کاظمی ر.، یوسفی جوردهی ا.، پوردهقانی م.، حلاجیان ع.، شناور ماسوله ع.، جلیل‌پور ج. و یارمحمدی م. ۱۳۹۱. بررسی مقایسه‌ای شاخص‌های خونی مولدین وحشی تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*). مجله بهره‌برداری و پرورش آبزیان، ۱(۳): ۴۴-۲۹.

کیوان ا. ۱۳۷۳. گزارش ده گانه فنی- کاربردی به برادران دکتر رسول لاهیجانیان مدیریت عامل شیلات و معاونت محترم وزارت جهاد سازندگی ایران از دومین سمپوزیوم بین المللی ماهیان خاویاری درباره تکثیر و پرورش تمام دوره‌ای ماهیان خاویاری و دورگه‌های حاصل از بلوگا و استرلیاد بنام بستر، متشکه از ۷ تا ۱۳ سپتامبر ۱۹۹۳ مسکو- کاستروما. ۱۵۰ص.

Acerete L., Balasch J.C., Espinosa E., Josa A. and Tort L. 2004. Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) subjected to stress by transport and handling. Aquaculture, 237: 167–178.

Alabaster J.S., Shurben D.G. and Knowles G. 1979. The effect of dissolved oxygen and salinity on the toxicity of ammonia to smolts of salmon, *Salmo salar* L. Journal of Fish Biology, 15: 705–712.

Barbieri E. and Doi S. 2011. Acute toxicity of ammonia on juvenile cobia (*Rachycentron canadum*, Linnaeus, 1766) according to the salinity. Aquaculture International, 20: 373–382.

Bayunova L., Barannikova I. and Semenkova T. 2002. Sturgeon stress reactions in aquaculture. Journal of Applied Ichthyology, 18: 397–404.

Birstein V.J. 1996. Sturgeons may soon disappear from the Caspian Sea. Russian Conservation News, 7: 15–16.

Chebanov M. and Billard R. 2001. The culture of sturgeon in Russia: Production of juveniles for

stocking and meat for human consumption. Aquatic Living Resources, 14(6): 375–381.

Chen J.C. and Lin C.Y. 1991. Lethal effects of ammonia and nitrite on *Penaeus penicillatus* juveniles at two salinity levels. Comparative Biochemistry and Physiology (C): 100(3): 477–482.

Chowdhury I. and Joy K.P. 2000. Effects of administration of testosterone on some biochemical correlation in seminal vesicle of Bloch (*Heteropneustes fossilis*) during preparatory phase: A study correlating changes in plasma testosterone level and testis activity. Indian Journal of Experimental Biology, 38: 713–719.

Cogun H.Y., Firidin G., Aytekin T., Firat O., Firat O., Temiz O., Varkal H.S. and Kargin F. 2017. Acute toxicity of nitrite on some biochemical, hematological and antioxidant parameters in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L, 1758). Fresenius Environmental Bulletin, 26(2): 1712–1719.

Das P.C., Ayyappan S., Jena J.K. and Das B.K. 2004. Nitrite toxicity in *Cirrhinus mrigala* (Ham.): Acute toxicity and sub-lethal effect on selected haematological parameters. Aquaculture, 235: 633–644.

Dettlaff T.A., Ginsburg A.S. and Schmalhausen O.I. 1993. Sturgeon fishes, development. Ellis A.E. lysozyme assay. P: 101–103. In: Stolen J.S., Fletcher D.P., Anderson B.S. and Robertson B.S. (Eds.). Techniques in Fish Immunology. SOS Publication, USA.

Ellis A.E. 1990. Lysozyme assay. In: P: 101–103. Stolen J.S., Fletcher D.P., Anderson B.S. and Robertson B.S. (Eds.). Techniques in Fish Immunology. SOS Publication, USA.

Gao X.Q., Fei F., Huo H.H., Huang B., Meng S.X., Zhang T. and Liu B.L. 2020. Impact of nitrite exposure on plasma biochemical parameters and immune-related responses in *Takifugu rubripes*. Aquatic Toxicology, 218: 1–8 (105362).

Gao Z., Wang W., Abbas K., Zhou X., Yang Y., Diana J.S., Wang H., Wang H., Li Y. and Sun Y. 2007. Haematological characterization of loach *Misgurnus anguillicaudatus*: A comparison among diploid, triploid and tetraploid specimens. Comparative Biochemistry and Physiology, 147(4): 1001–1008.

Garcia V., Catala-Gregori P., Hernandez F., Megias M.D. and Madrid J. 2007. Effect of formic acid and plant extracts on growth, nutrient digestibility, intestine mucosa morphology, and meat yield of broilers. Journal of

Applied Poultry Research, 16: 555–562.

Iftikar F.I., Matey V. and Wood C.M. 2010. The ionoregulatory responses to hypoxia in the freshwater rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Physiological and Biochemical Zoology, 83(2): 343–355.

ISO 6058. 1984. Water quality- Detemination of calcium content- EDTA titrimetric method. American National Standards Institute. 24P.

ISO 9964-1. 1993. Water quality- Determination of sodium and potassium- Part 1: Determination of sodium by atomic absorption spectrometry. American National Standards Institute. 24P.

Jia R., Han C., Lei J.L., Liu B.L., Huang B., Huo H.H. and Yin S.T. 2015. Effects of nitrite exposure on haematological parameters, oxidative stress and apoptosis in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). Aquatic Toxicology, 169: 1–9.

Khoshbavar-Rostami H., Soltani M. and Hassan H. 2006. Immune response of great sturgeon (*Huso huso*) subjected to long-term exposure to sublethal concentration of the organophosphate, diazinon. Aquaculture, 256: 88–94.

Kim D. and Austin B. 2006. Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. Fish and Shellfish Immunology, 21: 513–524.

Kim J.H., Kim J.Y., Lim L.J., Kim S., Choi H. and H.Y. 2018. Effects of waterborne nitrite on hematological parameters and stress indicators in olive flounders, *Paralichthys olivaceus*, raised in bio-floc and seawater. Chemosphere, 209: 28–34.

Kir M. and Sunar M.C. 2018. Acute toxicity of ammonia and nitrite to sea bream, *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758), in relation to salinity. Journal of the World Aquaculture Society, 49(3): 516–522.

Kir M., Sunar M. and Gok M. 2019. Acute ammonia toxicity and the interactive effects of ammonia and salinity on the standard metabolism of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture, 511: 1–6 (734273).

Kroupova H., Machova J., Piackova V., Blahova J., Dobsikova R., Novotny L. and Svobodova Z. 2008. Effects of subchronic nitrite exposure on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Ecotoxicology and Environmental Safety, 71(3): 813–820.

Lawson T.B. 1995. Fundamentals of Aquacultural Engineering. Chapman and Hall, USA. 364P.

Le T.H.G., Nguyen T.P., Nguyen T.T.V., Do T.T.H. and Pham

N.N. 2018. Effects of nitrite exposure on haematological parameters and growth in clown knifefish (*Chitala ornata*, Gray 1831). Can Tho University Journal of Science, 54(2): 1–8.

Lin Y.C. and Chen J.C. 2001. Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei* Boone juveniles at different salinity levels. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 259(1): 109–119.

Martinez-Alvarez R.M., Hidalgo M.C., Domezain A., Morales A.E., Garcia-Gallego M. and Sanz A. 2002. Physiological changes of sturgeon *Acipenser naccarii* caused by increasing environmental salinity. Journal of Experimental Biology, 205: 3699–3706.

Munker R., Hillwe E., Glass J. and Paquette R. 2007. Modern Hematology: Biology and Clinical Management. Humana Press, USA. 498P.

Nussey G., Van Vuren J.H.J. and Du Preez H.H. 2002. The effect of copper and zinc at neutral and acidic pH on the general haematology and osmoregulation of *Oreochromis mossambicus*. African Journal of Aquatic Science, 27(1): 61–84.

Person-Le Ruyet J., Chartois H. and Quemener L. 1995. Comparative acute ammonia toxicity in marine fish and plasma ammonia response. Aquacalture, 136(1-2): 81–194.

Qstegaard A.E., Martin S.A.M., Wang T., Stet R.J.M and Secombes C.J. 2009. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) possess multiple novel immunoglobulin-like transcripts containing either an ITAM or ITIMs. Developmental and Comparative Immunology, 33: 525–532.

Quick G. and White T. 2007. The good sturgeon guide in association with sturgeon for garden ponds. Retrieved Jun 15, 2022, from www.pond-life.me.uk.

Ramesh C.G. 2007. Veterinary Toxicology, Basic and Clinical Principles. Academic Press, USA. 1238P.

Ramirez-Rochin J., Frias-Espericueta M.G., Fierro-Sanudo J.F., Alarcon-Silvas S.G., Fregoso-Lopez M.G. and Paez-Osuna F. 2017. Acute toxicity of nitrite on white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles in low-salinity water. Aquaculture Research, 48: 2337–2343.

Rasmussen R.S. and Korsgaard B. 1996. The effect of external ammonia on growth and ood utilization of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 205(1-2): 35–48.

Sadauskas-Henrique H., Sakuragui M.M., Paulino M.G. and Fernandes M.N. 2011. Using condition factor and blood variable biomarkers in fish to assess water quality. Environmental Monitoring and Assessment, 181(1-4): 29–42.

Sampaio L.A., Wasielesky W., Miranda-Filho K.C. 2002. Effect of salinity on acute toxicity of ammonia and nitrite to juvenile *Mugil platanus*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 68(5): 668–674.

Schlenk D. and Benson W.H. 2001. Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts. CRC Press, USA. 382P.

Seriani R., Abessa D.M.S., Kirschbaum A.A., Pereira C.D.S., Romano P. and Paiva M.J.T. 2011. Relationship between water toxicity and hematological changes on *Oreochromis niloticus*. Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology, 15(2): 47–53.

Sink T.D. 2010. Influence of pH, salinity, calcium, and ammonia source on acute ammonia toxicity to golden shiners, *Notemigonus crysoleucas*. Journal of the World Aquaculture Society, 41: 411–420.

Siwicki A.K. and Anderson D.P. 1993. Nonspecific defence mechanisms assay in fish: II. Potential killing activity of neutrophils and macrophages, lysozyme activity in serum and organs. P: 105–111. In: Siwicki A.K., Anderson D.P. and Waluga J. (Eds.). Fish Disease Diagnosis and Prevention Methods. FAO-Project, Poland.

Stormer J., Jensen F.B. and Rankin J.C. 1996. Uptake of nitrite, nitrate, and bromide in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effects on ionic balance. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 53: 1943–1950.

Tintos A., Miguez J.M., Mancera J.M. and Soengas J.L. 2006. Development of a microtitre plate indirect ELISA for measuring cortisol in teleosts, and evaluation of stress responses in rainbow trout and gilthead sea bream. Journal of Fish Biology, 68: 251–263.

Tomasso J.R. 2012. Environmental nitrite and aquaculture: A perspective. Aquaculture International, 20: 1107–1116.

TRC. 1984. Effects on biotic systems. O.E.C.D Guidline for Testing of Chemicals, Section 2. P: 1–39.

USEPA. 1985. Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms. Environmental Protection Agency, EPA, USA. 266P.

Vandewalle H., Peres G. and Monod H. 1987. Standard anaerobic exercise test. Sports Medicine, 4: 268–289.

Vedel N.E., Korsgaard B. and Jensen F.B. 1998. Isolated and combined exposure to ammonia and nitrite in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects on electrolyte status, blood respiratory properties and brain glutamine/ glutamate concentrations. Aquatic Toxicology, 41(4): 325–342.

Wang J., Tang H., Zhang X., Xue X., Zhu X., Chen Y. and Yang Z. 2018. Mitigation of nitrite toxicity by increased salinity is associated with multiple physiological responses: A case study using an economically important model species, the juvenile obscure puffer (*Takifugu obscurus*), Environmental Pollution, 232: 137–145.

Williams E.M., Nelson J.A. and Heisler N. 1997. Cardio-respiratory function in carp exposed to environmental nitrite. Journal of Fish Biology, 50: 137–149.

Witeska M., Jezierska B. and Wolnieki J. 2006. Respiratory and hematological response of tench, *Tinca tinca* (L.) to a short-term cadmium exposure. Aquaculture International, 14: 141–152.

Zhang M., Yin X., Li M., Wanga R., Qiana Y. and Hongc M. 2020. Effect of nitrite exposure on haematological status, oxidative stress, immune response and apoptosis in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). Comparative Biochemistry and Physiology (C), 238: 1–8.

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 10, No. 1, Spring 2022

Research Paper

Effects of interaction between nitrite and different salinities on some blood, immunity, and stress indices in juveniles of stellate (*Acipenser stellatus*)

Ameneh Mansorghanai[1], Hossein Khara[2]*, Habib Vahabzadeh[3], Zabihollah Pajand[4], Mohaddeseh Ahmadnezhad[5]

Received: May 2021 Accepted: July 2021

Abstract

This study aimed to investigate the effects of interaction between nitrite and different salinities on blood, immunity, and stress parameters in juveniles of stellate (*Acipenser stellatus*) in two stages. In the first stage, the lethal concentration (LC_{50} 96h) of nitrite in different salinities (0, 4, 8, and 12g/L) to juveniles of stellate was determined. In the second stage, 240 juveniles of stellate (with a mean weight and length of 15.23±2.17g and 17±1.96cm) were exposed to half (50%) of LC_{50} 96h (37.56, 46.77, 120.80, and 176.579mg/L) under the same salinities for 4 days (8 treatments, triplicate). The results showed that the highest mean of white blood cells and neutrophils was in Treatment 7, the highest mean of red blood cells, hemoglobin, MCV and hematocrit was related to treatment 5 and the highest mean of eosinophil belonged to Treatment 8 ($P<0.05$). Moreover, the highest IgM and total immunoglobulin, lysozyme, cortisol and glucose, and lactate was found in treatments 8, 7, 4, and 3, respectively ($P<0.05$). The increased nitrite concentration in subjects exposed to salinity plus half of the LC_{50} 96h of nitrite significantly increased the tolerance and immunity parameters and reduced the stress level of subjects. This indicates that salinity could reduce the toxicity of nitrite to subjects. Blood indices also considerably changed in subjects exposed to the same conditions. It can be hence concluded that saline or brackish water (mixed with freshwater, 0 to 12g/L) plus half of the LC_{50} 96h of nitrite is suitable for the culture of stellate juveniles.

Key words: *Stellate, Nitrite, Salinity, Blood Parameters.*

1- Ph.D. in Fisheries, Fisheries Department, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran.
2- Associate Professor in Fisheries Department, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran.
3- Assistant Professor in Fisheries Department, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran.
4- Assistant Professor in International Sturgeon Research Institute of the Caspian Sea, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran.
5- Assistant Professor in National Inland Water Aquaculture Institute, Iranian Fisheries Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Anzali, Iran.

*Corresponding Author: h.khara1974@yahoo.com