اثر باکتری های نیتروزوموناس و نیتروباکتر درحذف آمونیاک و فراسنجه‌های خونی و سرمی فیل ماهی (*Huso huso*)

اعظم محمد صالحی[۱]، ابراهیم رجب زاده قطرمی*[۱]، مهدی سلطانی[۲]، محمد رشنو[۳و۴]

*rajabzadeh48@gmail.com

۱- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم وفنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران
۲- گروه بهداشت وبیماریهای آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۳- گروه ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.
۴- مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۹۷

چکیده

در سیستم پرورش آبزیان خاویاری با تراکم بالا، حفظ تعادل پارامترهای محیط پرورش در سلامت فیزیولوژیک و رشد ماهیان خاویاری از مهم ترین عوامل چالش برانگیز می باشند. فراسنجه های خون شناسی شاخص های مفیدی هستند که به منظور ارزیابی شرایط فیزیولوژیک ماهیان خاویاری در پاسخ به استرس، آلاینده‌ها و تغییرات فیزیولوژیک و اکولوژیک بکار می‌روند. این تحقیق با هدف اثر باکتریهای نیتروزوموناس و نیتروباکتر بر میزان حذف آمونیاک و شاخص های خونی و سرم فیل‌ماهی (*Huso huso*) در یک طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار با تراکم های یکسان از هر دو باکتری (۰، 10^{1}، 10^{3}، 10^{5}) در ۱۰۰ میلی لیتر با سه تکرار با استفاده از ۱۲۰ قطعه فیل ماهی خاویاری با میانگین وزنی ۲۰۰±۸۰۰ گرم و طول ۲±۵۵ سانتیمتر در ۱۲ تانک فایبرگلاس (۴۰۰۰ لیتری هر تکرار ۱۰ ماهی) به مدت ۱۲ هفته و نیز دو هفته سازگاری اولیه در شهرستان دزفول در استان خوزستان انجام گرفت. بر اساس نتایج بیشترین میزان آمونیاک در تیمار یک (شاهد) با اختلاف معنی‌دار ($p\leq ۰/۰۵$) با تیمار ۳ و عدم اختلاف معنی دار با سایر تیمارها ثبت گردید. میزان آمونیاک در بین ساعات اندازه‌گیری شده در هر تیمار فاقد اختلاف معنی دار ($p\geq ۰/۰۵$) بود. از بین فراسنجه های خونی فقط نوتروفیل در تیمارها دارای اختلاف معنی‌دار ($p\leq ۰/۰۵$) بود. فراسنجه های سرمی خون آسپارتات آمینوترانسفراز (AST)، الکالین ترانسفراز (ALP، کراتین فسفاتاز (CP)، پروتئین کل و آلانین آمینوترانسفراز (ALT) تیمارها با هم اختلاف معنی‌داری نداشت ($p\geq ۰/۰۵$). فراسنجه لاکتیک دهیدورژناز (LDH) تیمار شاهد با سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار داشت ($p\leq ۰/۰۵$). باکتری‌های نیتروزوموناس و نیتروباکتر دارای اثر مثبت بر حذف آمونیاک از آب محیط پرورشی و عدم اثر منفی بر شرایط فیزیولوژیک فراسنجه‌های خونی فیل ماهی خاویاری بودند.

لغات کلیدی: باکتریهای نیتروزوموناس و نیتروباکتر، آمونیاک، فراسنجه های خونی و سرمی، فیل ماهی

*نویسنده مسئول

مقدمه

ماهیان خاویاری از جمله با ارزش ترین ماهیان جهان هستند که در زمان‌های گذشته در سرتاسر نیمکره شمالی زمین پراکنش داشتند، اما به دلیل از بین رفتن زیستگاه‌ها، تغییرات زیست محیطی و آلودگی‌های حاصل از فاضلاب های صنعتی، کشاورزی و نفتی و صید بی‌رویه انسان‌ها در معرض خطر قرار گرفته‌اند (Mohseni *et al.*, 2006). روش اصلی پرورش ماهیان خاویاری، پرورش در حوضچه‌های خاکی بوده است، اما به دلیل شرایط کمبود آب در کشور، سیستم های بسته و گردشی از بهترین روش‌های تولید تجاری محسوب می‌شوند. تولید تجاری ماهیان خاویاری شامل استفاده از سطح بالایی از تغذیه حاوی پروتئین می باشد. در فرآیند گوارش چربی و کربوهیدرات، آب و دی‌اکسیدکربن به عنوان مواد زائد تولید می‌گردد و در هضم پروتئین، بازده ترکیبات نیتروژنی بویژه آمونیاک می‌باشد (Falahatkar *et al.*, 2009). آمونیاک یکی از ضایعات نیتروژنی است که از کاتابولیسم آمینواسیدها تولید می‌شود (Ruyet *et al.*, 2002). در محیط زیست آبی آمونیاک به دو شکل آمونیاک غیریونیزه (NH_3) و آمونیاک یونیزه شده (NH_4^+) وجود دارد (Ruyet *et al.*, 2002). اثر سمی آمونیاک غیر یونیزه در محیط آبی بر غشاء آبششی ماهیان می‌باشد (Sinha *et al.*, 2012). افزایش آمونیاک موجب کاهش رشد، نکروز بافتی و سرکوب ایمنی و در خون و بافت سبب مسمومیت و نهایتاً مرگ و میر بالا در آبزیان می‌شود (Li and Gatlin, 2006). روش‌های مختلفی برای از بین بردن و کاهش سطح آمونیاک در محیط های آبزی وجود دارد. در روش بیولوژیک، فیلترهای بیولوژیک با ارائه سطح اتصال فراوان جوامع میکروبی مرکب از نیتروزوموناس و نیتروباکتر در استخرهای پرورش طراحی شده‌اند (Hollocher *et al.*, 1981). نیتریفیکاسیون شامل اکسید هوازی در تبدیل آمونیوم به نیترات می‌باشد. این واکنش بوسیله دو باکتری اختصاصی اکسید کننده آمونیوم نیتروزوموناس و نیتروباکتر صورت می‌گیرد (Hollocher *et al.*, 1981). میزان گاز آمونیاک در محیط آبی ماهی خاویاری با توجه زمان طولانی پرورش در مقادیر کم نیز سبب اثرات نامساعد بر شرایط فیزیولوژیک طبیعی و نهایتاً عوارض مختلف و کاهش رشد و کیفیت گوشت و خاویار تولیدی می‌گردد. استفاده از یافته‌های خون‌شناسی در تشخیص بیماری‌ها امری غیرقابل انکار است که از دهه ۸۰ میلادی به بعد در مورد آبزیان کاربرد زیادی یافته است، بطوریکه با استفاده از الگوهای خونی بویژه در ماهیان خاویاری و مقایسه آن با الگوی طبیعی آن گونه تا حدودی می‌توان به وجود آثار برخی بیماری‌ها پی برد و راهکار مناسب برای درمان آن یافت (Asadi *et al.*, 2006). این تحقیق از سویی، با هدف بررسی تاثیر تراکم باکتری‌های اکسید کننده آمونیوم شامل نیتروزوموناس و نیتروباکتر به عنوان عوامل طبیعی موجود در محیط زیست ماهی بر میزان حذف آمونیاک و از سوی دیگر، اثر آنها بر شاخص‌های خونی و سرمی فیل ماهیان پرورشی انجام شد.

مواد و روش کار

این تحقیق در تابستان سال ۱۳۹۶ در مزرعه پرورش ماهی حنطوش زاده در شهرستان دزفول بر ۱۲۰ قطعه فیل ماهی با میانگین وزنی ۲۰۰±۸۰۰ گرم و طول ۲±۵۵ سانتیمتر از همین مرکز که تولید سال ۱۳۹۵ بودند، با یک طرح کاملاً تصادفی در چهار تیمار (هر تیمار حاوی ۱۰ ماهی) حاوی باکتری‌های نیتروباکتر و نیتروزوموناس با میزان (۰، 10^1، 10^3، 10^5) مطابق با میزان تراکم حداقل و حداکثر از باکتری در ۱۰۰ میلی لیتر با سه تکرار صورت گرفت. باکتری‌های نیتروباکتر و نیتروزوموناس قبل از اجرای آزمایش بوسیله محیط کشت‌های اختصاصی Nitrosomonas medium and modified Stanier medium از محیط آب پرورش فیل ماهی در مزرعه جداسازی و توسط تست های اختصاصی و بیوشیمیایی تعیین گردیدند (Peng and Zhu, 2006). جهت کشت انبوه باکتری‌ها برای افزودن به تیمارها در تراکم‌های مختلف از محیط کشت‌های اختصاصی مایع با کشت از باکتریهای نیتروزوموناس و نیتروباکتر با قرار دادن بر دستگاه تکانه هواده در انکوباتور ۲۵ درجه سانتی‌گراد استفاده گردید. تعیین تراکم‌های مختلف با استفاده از

لوله‌های مک‌فارلند و نیز قرائت غلظت جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل۲۸۰۰ DR (ساخت داخل کشور) انجام گردید و برحسب هر تراکم در تیمار محیط کشت حاوی باکتریهای نیتروزوموناس و نیتروباکتر بر اساس غلظت‌های تعیین شده به تانک‌های پرورشی اضافه گردید. تغذیه ماهیان با جیره استاندارد شرکت COPENS هلند، مخصوص سیستم‌های مدار بسته ماهیان خاویاری با سایز ۴/۵ میلی‌متر و ترکیب شیمیایی ۴۶ درصد پروتئین، ۶/۱ درصد فیبر، ۱۲ درصد چربی و ۱/۶ درصد خاکستر انجام گردید. غذادهی در سه نوبت در ساعت‌های ۸ صبح، ۴ بعدازظهر و ۱۲ شب با توجه به شرایط محیطی نظیر اکسیژن و دما به صورت روزانه و ۱ درصد وزن بدن ماهیان با دستورالعمل شرکت سازنده غذا انجام گردید. شرایط فیزیکی وشیمیایی آب تانک های پرورش طی دوره، شامل دمای ۲±۲۴ درجه سانتی‌گراد، سختی۱۸۰ میلی‌گرم کربنات کلسیم، محدوده pH، ۸- ۷/۸ و اکسیژن محلول ۶-۵ میلی‌گرم در لیتر با هوادهی دائم بود. کلیه فراسنجه‌ها توسط سنجشگر پرتابل HQ40d مدل HACH (ساخت چین تحت لیسانس آمریکا) روزانه در ۲ نوبت سنجش گردیدند. میزان تعویض آب روزانه تانک های پرورشی طوری تنظیم شد که در طول دوره نگهداری هر سه روز یک بار آب تانک‌ها کامل تعویض و در عین حال میزان تراکم باکتری‌ها در هر تانک تغییر نکند (روزانه تراکم باکتری‌ها بررسی و در صورت نیاز از ذخیره باکتری‌ها به تیمارها برحسب نوع تراکم اضافه می‌شد). میزان آمونیاک تانک‌های پرورشی روزانه در ۳ نوبت یک ساعت قبل از غذا دهی، یک ساعت و ۵ ساعت پس از غذادهی به طور تصادفی در نوبت صبح یا بعد از ظهر توسط کیت اندازه گیری آمونیاک *Aquapa* ساخت مرکز دانش بنیان دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر و دارای استاندارد کشور استرالیا اندازه گیری می‌گردید (Weon *et al*., 2004). پس از دوره ۱۰۰ روزه آزمایش، از هر تیمار تعداد ۵ ماهی به طور تصادفی انتخاب و خون گیری از باله مخرجی ماهیان با سرنگ ۲ سی سی انجام و نمونه‌های خون در لوله‌های هپارینه و غیر هپارینه نگهداری شدند. شمارش تعداد گلبول‌های قرمز (RBC)، تعداد کل گلبول‌های سفید (WBC)، غلظت هموگلوبین (Hb) و درصد (HcT) هماتوکریت با روش توصیه شده توسط Noga (۲۰۱۰) برای محاسبه اندیس‌های خونی شامل حجم متوسط گلبولی (MCV)، غلظت هموگلوبین داخل گلبولی (MCHC) و وزن هموگلوبین داخل گلبولی(MCH)، از روابط ارائه شده توسط Lee و همکاران (۱۹۹۸) استفاده شد. اندازه‌گیری فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم خون شامل آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز (AST)، آلانین آمینوترانسفراز(ALT) ، آلکالین ترانسفراز (ALP)، لاکتات دهیدروژناز (LDH)، کراتین فسفاتاز (CP) پروتئین کل با استفاده دستگاه اتوآنالایزر (Eppenddrof, EPOS) ساخت کشور آلمان، طبق دستورالعمل شرکت سازنده و با استفاده از کیت‌های آزمایشگاهی انجام شد. پس از اندازه‌گیری فاکتورهای به صورت میانگین (Mean±SD)، ابتدا نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف ـ اسمیرنوف بررسی شد. سپس در صورت نرمال بودن برای مقایسه بین تیمارهای آزمایشی از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA One-way) در سطح اطمینان ۹۵ (p<۰/۰۵) استفاده شد. جهت مقایسه میانگینها از آزمون دانکن استفاده گردید. آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS22 انجام شد.

نتایج

میانگین میزان آمونیاک در هر تیمار در نوبت‌های اندازه‌گیری شده در جدول ۱ ارائه شده است . بیشترین میزان آمونیاک در تیمار شاهد با اختلاف معنی‌دار($p<0.05$) با تیمار۳ و عدم اختلاف معنی‌دار با سایر تیمارها ثبت گردید. میزان آمونیاک در بین ساعات اندازه‌گیری شده در هر تیمار فاقد اختلاف معنی‌دار ($p>0.5$) بود.

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری فراسنجه‌های خونی در جدول ۲ ارائه شده است. از بین کلیه فراسنجه‌های خونی در تیمارها فقط نوتروفیل دارای اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) بود و بقیه فاقد اختلاف معنی‌دار بودند.

جدول ۱: میانگین آمونیاک تانک های پرورش فیل ماهی در دوره ۱۲ هفته ای در تراکم های مختلف باکتری

Table 1: Mean of Ammonia in Tanks *Huso huso* breeding during 12 weeks period at different densities of bacteria.

تیمارهای مورد مطالعه / آمونیاک	تیمار ۱ (شاهد) بدون باکتری	تیمار ۲ (10^1) cfu۱۰۰/ ml	تیمار ۳ (10^3) cfu/ ۱۰۰ ml	تیمار۴ (10^5) cfu /۱۰۰ml
یک ساعت قبل از غذا	۰/۳۴±۰/۰۷^a	۰/۲۹±۰/۰۶^a	۰/۱۵±۰/۰۶^b	۰/۳۱±۰/۰۵^a
یک ساعت بعد از غذا	۰/۳۶±۰/۰۵^a	۰/۳۱±۰/۰۷^a	۰/۱۵±۰/۰۶^b	۰/۳۳±۰/۰۶^a
۵ ساعت بعد از غذا	۰/۴۱±۰/۰۷^a	۰/۳۵±۰/۰۷^a	۰/۱۶±۰/۰۶^b	۰/۳۶±۰/۰۶^a

حروف غیر مشابه نشان دهنده از اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در هر ردیف است ($p<۰/۰۵$)

جدول۲: میانگین فراسنجه های خونی فیل ماهی در دوره پرورش ۱۲ هفته ای در تراکم های مختلف باکتری

Table 2: Mean of *Huso huso* blood parameters during 12 weeks breeding in different bacterial densities.

تیمارهای مورد مطالعه / فراسنجه های خونی	تیمار ۱ (شاهد) بدون باکتری	تیمار ۲ (10^1) cfu۱۰۰/ ml	تیمار ۳ (10^3) cfu/ ۱۰۰ ml	تیمار۴ (10^5) cfu /۱۰۰ml
هماتوکریت(درصد)	۲۹±۲/۶۰^a	۲۵/۶±۲/۰۷^a	۲۶/۸±۳/۹۶ ^{a}	۲۶/۶±۱/۶۷^a
هموگلوبین (گرم در دسی لیتر)	۵/۳۶±۰/۴۹^a	۵/۲۶±۰/۴۱^a	۵/۱۰±۰/۸۶^a	۵/۵۸±۰/۳۲ ^{a}
گلبول قرمز(میلی لیتر مکعب)	۱۶۷/۶۶±۳۳/۲۹^a	۱۶۶/۸±۲۱/۳۵^a	۱۷۰/۶±۹/۳۷^a	۱۷۵/۲±۳۶/۲۳^a
گلبول سفید(میلی لیتر مکعب)	۴۲±۱۲^a	۴۸/۴±۰/۶۲^a	۳۹/۶±۱۶/۹۳^a	۶۴/۸±۱۹/۵۲^a
MCV (fl)	۱/۸۰±۰/۶۱^a	۱/۵۴±۰/۱۳^a	۱/۴۸±۰/۱۷^a	۱/۵۶±۰/۳۱^a
MCH (پیکوگرم)	۰/۳۳±۰/۱۰^a	۰/۳۱±۰/۰۲^a	۰/۲۸±۰/۰۳^a	۰/۳۲±۰/۰۵^a
MCHC (گرم در دسی لیتر)	۱/۸۵±۰/۱۲^a	۲/۰۶±۰/۱۹^a	۱/۹۰±۰/۰۹^a	۲/۱۰±۰/۰۷^a
لنفوسیت (درصد)	۷۹/۶۶±۱۸/۷۷^a	۷۷/۶±۷/۱۹^a	۷۳±۱۶/۴۴^a	۷۸/۴±۸/۰۸^a
نوتروفیل (درصد)	۹±۵/۲۸^{ab}	۷/۴±۲/۲۷^{ab}	۱۸/۸±۱۰/۷۶ ^{b}	۴/۲±۰/۴۴^a
مونوسیت (درصد)	۰/۶۶±۱/۱۵^a	۰/۶±۱/۳۴^a	۰/۸±۱/۳۰^a	۰/۲±۰/۴۴^a
ائوزوفیل (درصد)	۱۰/۶±۵/۶۸^a	۸/۴±۹/۷۸^a	۷/۴±۴/۳۳^a	۱۵/۲±۶/۷۲^a

حروف غیر مشابه نشان دهنده از اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در هر ردیف است ($p< ۰/۰۵$).

میانگین میزان هموگلوبین، گلبول سفید و متوسط غلظت هموگلوبین ذره‌ای (MCHC) در تیمار ۴ دارای بیشترین مقدار بودند. بالاترین میزان هماتوکریت، لنفوسیت، متوسط حجم گلبول قرمز (MCV) و متوسط هموگلوبین ذره ای (MCH) در تیمار ۱ (شاهد) بدست آمد. در تیمار ۳ میزان گلبول قرمز، نوتروفیل و مونوسیت نسبت به سایر تیمارهای مورد مطالعه بالاترین مقادیر بود. در مورد ائوزوفیل‌ها نیز بیشترین میزان در تیمار ۴ مشاهده شد.

در جدول ۳ فراسنجه‌های سرمی خون ماهیان فراسنجه‌های آسپارتات آمینوترانسفراز (AST)، الکالین ترانسفراز (ALP)، کراتین فسفاتاز (CP) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT) تیمارها با هم اختلاف معنی‌دار نبود ($p>۰/۰۵$). در فراسنجه LDH تیمار شاهد با سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار داشت ($p<۰/۰۵$). میزان پروتئین کل نیزدر تیمارها با یکدیگر اختلاف معنی‌دار نداشتند ($p>۰/۰۵$).

جدول ۳: میانگین فراسنجه های سرمی فیل ماهی در دوره پرورش ۱۲ هفته ای در تراکم های مختلف باکتری

Table 3: Mean of *Huso huso* serum during 12 weeks breeding period at different densities of bacteria.

تیمارهای مورد مطالعه / فراسنجه های سرمی	تیمار ۱ (شاهد) بدون باکتری	تیمار ۲ (10^1) cfu۱۰۰/ ml	تیمار ۳ (10^3) cfu/ ۱۰۰ ml	تیمار۴ (10^5) cfu /۱۰۰ml
آسپارتات آمینوترانسفراز (AST)(IU/L)	۲۹۵/۵۸±۱۳۶/۱۱^a	۵۸±۴۱۰/۰۷ ^{a}	۳۷۹/۳۳±۳۳/۸۳ ^{a}	۳۹۸/۱۶±۴۰/۳۶ ^{a}
آلانین آمینوترانسفراز (ALT)(IU/L)	۶۱۲/۳۵±۵۲/۳۲ ^{a}	۴۱±۶۷۱/۱۹ ^{a}	۶۲۵/۳۶±۲۶/۴۷ ^{a}	۶۴۲/۱۵±۱۲/۱۲ ^{a}
آلکالین ترانسفراز (ALP)(IU/L)	۱۰۳۴/۱۸۲±۱۵۷/۸۹ ^{a}	۷۶۴/۱۵۷±۱۲۸/۲۷ ^{a}	۷۲۰/۲۰۲±۲۱۹/۰۸ ^{a}	۹۴۱/۸۳±۲۲/۸۰ ^{a}
لاکتات دهیدروژناز (LDH)(IU/L)	۵۷۲/۱۷۶±۷۲/۲۹ ^{b}	۱۲۵۹/۳۵۸±۱۱/۵ ^{a}	۱۷۶۰/۶۶۱±۲۳/۰۸ ^{a}	۱۴۵۴/۳۱۰±۲۲/۸۰ ^{a}
کراتین فسفاتاز (CP)(IU/L)	۳۳۳/۶۶±۲۳/۱۸ ^{a}	۳۳۵/۷۵±۳۱/۸۱ ^{a}	۳۵۱/۳۳±۴۶/۰۹ ^{a}	۳۸۴/۲۵±۴۶/۷۱ ^{a}
کل پروتیئن (g/dl)	۲/۰±۱/۸۹ ^{a}	۲/۰±۶۶/۵۶ ^{a}	۲/۰±۴۵/۲۴ ^{a}	۲/۰±۴۲/۴۲ ^{a}

حروف غیر مشابه نشان دهنده از اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در هر ردیف است ($p< ۰/۰۵$)

بحث

از مشکلات اساسی آبزی‌پروری متراکم و بویژه سیستم‌های بسته، افزایش آمونیاک حاصل از فعالیت‌های مختلف آبزی در محیط پرورشی می‌باشد و لذا، تدابیری باید ایجاد کرد که آمونیاک تولیدی حذف یا در آب به کمترین میزانی برسد که آسیبی به آبزیان وارد نکند (Rafatnezhad *et al*., 2008). به طور کلی، میزان سمیت آمونیاک برای ارگانیسم‌های آبی تحت تأثیر سن، اندازه و وضعیت سلامتی آن گونه می‌باشد. خصوصیات فیزیکی وشیمیایی از قبیل کیفیت، دما، pH، اکسیژن محلول، کدورت آب، نوع و میزان گیاهان آبی، غلظت و ترکیب مواد شیمیایی و تراکم و همگی بر نتیجه آزمایش‌های سمیت تأثیرگذار هستند (Nwani *et al*., 2010). در این تحقیق مشخص گردید که باکتری‌های نیتروفیکاسیون نیتروزوموناس و نیتروباکتر بر میزان حذف آمونیاک با تراکم $۱۰^{۳}$ در ۱۰۰ میلی لیتر نسبت به سایر تراکم‌های مورد استفاده با اختلاف معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) کارایی داشتند و در عین حال اثر سوء بر فراسنجه‌های خونی و سرمی فیل ماهی نداشتند. شاخص‌های خونی، فراسنجه‌های بسیار مهمی جهت ارزیابی خصوصیات فیزیولوژیک ماهی هستند. تغییرات آنها به گونه ماهی، سن، دوره رسیدگی جنسی و بیماری‌ها بستگی دارد (Rafatnezhad *et al*., 2008). مهمترین فراسنجه‌های خون‌شناسی شامل گلبول قرمز (RBC)، گلبول سفید (WBC)، هماتوکریت (Hct)، متوسط حجم گلبولی (MCV)، متوسط هموگلوبین گلبولی (MCHC)، متوسط غلظت هموگلوبین گلبول ها (MCHC) و شمارش افتراقی گلبول‌های سفید شامل لنفوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها می‌باشند (Bani and Haghi, 2011). اندازه‌گیری فراسنجه‌های خونی در تشخیص کم خونی، مسمومیت‌ها، بیماری‌های عفونی و کمبود مواد غذایی، ارزیابی خصوصیات فیزیولوژیک ماهی کاربردهای فراوانی دارد (Fazio *et al*., 2003) همچنین خصوصیات هماتولوژی در ماهیان می‌تواند شاخصی از شرایط طبیعی و غیرطبیعی محیط باشد و در گونه‌های مختلف ماهیان به عنوان یک شاخص مهم ماهی شناسی مد نظر قرار گیرد (Kumar, 2003). در این تحقیق بین کلیه فراسنجه‌های خونی بجز نوتروفیل شامل هماتوکریت، هموگلوبین، گلبول سفید، گلبول قرمز، متوسط حجم گلبول قرمز (MCV)، متوسط هموگلوبین ذره‌ای (MCH) و متوسط غلظت هموگلوبین ذره‌ای (MCHC)، مونوسیت و ائوزوفیل بین تیمار ۱ (شاهد) با سایر تیمارهای مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$). شاخص‌های خونی در ماهیان می تواند متاثر از مواردی چون نوع گونه پرورشی، اندازه، سن، وضعیت فیزیولوژیک، شرایط محیطی و رژیم غذایی باشد. هماتوکریت، گلبول قرمز و هموگلوبین خون نشانگرهای عمومی سلامت ماهی هستند و به بیان ناهنجاری‌های حاصل از محرک‌های ایمنی کمک می‌کنند (Ahmadifar *et al*., 2011). عوامل متعددی بر فاکتورهای خونی ماهیان مؤثر است که شامل عوامل محیطی مانند استرس‌های مختلف محیطی از جمله دما، شوری، فاکتورهای شیمیایی آب، رسیدگی جنسی و میزان سموم مختلف از قبیل آمونیاک می‌باشند (Hrubec *et al*., 1997). مطالعات زیادی در مورد تغییرات ناشی از سن یا اندازه فراسنجه‌های خونی و بیوشیمیایی در ماهیان انجام شده است که بیانگر شاخص‌های بیان‌کننده اثرات استرس محیطی بر این فراسنجه‌ها می‌باشد (Hrubec *et al*.,1996). در بررسی حاضر بیشترین میزان گلبول‌های سفید به لنفوسیت تعلق داشت و در بین تیمارها درصد لنفوسیت فاقد اختلاف معنی‌دار ($p\geq۰/۰۵$) و نوتروفیل در بین تیمارهای $۱۰^{۳}$ و $۱۰^{۵}$ اختلاف معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) نشان داد. نوتروفیل‌ها در برخی عفونت‌های حاد باکتریایی میزان آنها افزایش می‌یابد، اما در این تحقیق تغییرات نوترفیل در تیمار ۴ از کاهش برخوردار بود و بین سایر تیمارها نیز با شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید که گویای عدم اثر روند عفونت زایی باکتری‌های مورد استفاده در تحقیق می باشد (Ahmadifar *et al*., 2011). گلبول سفید در فیل ماهیان تیمار ۴ بالاترین تعداد را نشان داد ($p<۰/۰۵$). گلبول‌های سفید یکی از اجزاء مهم دفاع غیر اختصاصی هستند که در خون، اندام‌های لنفاوی و برخی بافت‌های دیگر حضور دارند و دارای فعالیت بیگانه خواری و تولید آنتی‌بادی می‌باشند،

اما همیشه افزایش تعداد آنها با افزایش محافظت از عوامل عفونی همسو نمی‌باشد(Knowles *et al.*, 2006) . افزایش تعداد گلبول‌های سفید در این مطالعه در نتیجه اثر تراکم باکتری احتمالاً به دلیل تحریک دستگاه ایمنی می‌باشد و مکانیسم عملکرد این تراکم بدین صورت است که آنها به گیرنده‌های شبه لکتین در لوکوسیت‌ها باند می‌شوند و تکثیر ماکروفاژها را افزایش می‌دهند. میزان گلبول سفید به صورت قابل توجهی بین گونه‌ها متفاوت است و در پاسخ به استرس افزایش می‌یابد (Sakomoto *et al.*, 2001). آنزیم‌های آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) و آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) در بافت‌های مختلفی نظیر کبد، قلب، ماهیچه‌های اسکلتی، کلیه، پانکراس، طحال، گلبول‌های قرمز و آبشش ماهیان یافت می‌شوند. همچنین آلکالین فسفاتاز (ALP) آنزیمی است که در اپیتلیوم مجاری صفراوی، سلولهای کبدی و در مخاط روده و کلیه ها یافت می‌شود. این آنزیم‌ها غالباً در داخل میتوکندری سلول‌ها بویژه در سلولهای کبدی قرار دارند. لذا، هر گونه آسیب خفیف، التهاب یا نکروز سلول‌های کبد موجب آزاد شدن این آنزیم ها و افزایش سطح آنها در پلاسما می‌گردد. همچنین این آنزیم‌ها جزء آنزیم‌های با اهمیت در بررسی وضعیت سلامتی ماهیان هستند. لذا، کاهش سطح فعالیت این آنزیم در پلاسمای ماهیان تحت تأثیر قرار گرفته، در این مطالعه می‌تواند حاکی از سلامتی بافت‌های فیل ماهیان بویژه بافت کبد باشد (Asadi *et al.*, 2006). در تحقیق حاضر کاهش معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) در میزان ترشح آنزیم‌های کبدی آلانین آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز مشاهده نشد. همچنین در میزان آنزیم آسپاراتات آمینو ترانسفراز کاهش نسبی مشاهده شد که این کاهش از نظر آماری معنی دار نبود**.** کاهش یا عدم افزایش در میزان آنزیم های مذکور می‌تواند دلیلی بر عملکرد مناسب کبد و شرایط مناسب تغذیه باشد (Hrubec *et al.*, 1997; 1996).

در نتیجه گیری کلی از تحقیق حاضر، تراکم $۱۰^{۳}$ باکتری های نیتروفیکاسیون نیتروزوموناس و نیتروباکتر علاوه بر کاهش میزان قابل ملاحظه‌ای از گاز آمونیاک و تقلیل آن در حد مجاز یا کمتر در محیط آب پرورشی فیل ماهی بود. همچنین این تراکم فاقد اثرات منفی بر تمام فراسنجه‌های خونی و سرمی فیل ماهی اندازه‌گیری شده در طول دوره تحقیق بود.

منابع

Ahmadifar, E., Akrami, R., Ghelichi, A. and Mohammadi Zarejabad, A., 2011. Effects of different dietary prebiotic insulin levels on blood serum enzymes, hematologic, and biochemical parameters of great sturgeon (*Huso huso*) juveniles. *Comparative Clinical Pathology*, 20: 447-451.

Asadi, F., Halajian, A., Pourkabir, M., Asadian, P. and Jadidizadeh, F., 2006. Serum biochemical parameters of *Huso huso*. Comparative Clincal Pathology, 15:245–248. DOI 10.1007/s00580-006-0632-4

Bani, A. and Haghi Vayghan, A., 2011. Temporal variations in haematological and biochemical indices of the Caspian kutum (*Rutilus frisii kutum*). *Ichthyology Research*, 58: 126-133.

Falahatkar, B., Poursaeid, S., Shakoorian, M. and Barton, B., 2009. Responses to handling and confinement stressors in juvenile great sturgeon *Huso huso*. *Journal of Fish Biology*, 75(4):784–796. DOI:10.1111/j.1095-8649.2009.02334.*x*

Fazio, F., Marafioti, S., Arfuso, F., Piccione, G. and Faggio, C., 2003. Comparative study of the biochemical and haematological parameters of four wild Tyrrhenian fish species. *Veterinarni Medicina*, 58(11): 576–58.

Hollocher, T.C., Tate, M.E. and Nicholas, D.J.D., 1981. Oxidation of ammonia by Nitrosomonas europaea. *Journal of Biological Chemistry*, 256:10834– 10836.

Hrubec, T.C., Robertson, J.L. and Smith, S.A., 1997. Effects of ammonia and nitrate concentration on hematologic and serum biochemical profiles of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*). *American Journal of Veterinary Research*, 58:131-136.

Hrubec, T.C., Smith, S.A. and Robertson, J.L., 1996. Comparison of hematological reference intervals between culture system and type of hybrid striped bass. *American Journal of Veterinary Research*, 57: 618-623.

Knowles, S., Hrubec, T.C., Smith, S.A. and Bakal, R.S., 2006. Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured shortnose sturgeon (*Acipenser brevirostrum*). *Veterinary Clinical Pathology*, 35: 434-44.

Kumar, A., 2003. Aquatic Environment and toxicology ،Environment Biology Research unit. P.S.K. university ،Dumaka – 814101-laglaret ،K.F., Bardach ،J.E.R.R.Miller, 1962. *Ichthyology*, NO4,135-139.

Lee, R.G., Foerster, J., Jukens, A., Paraskevas, F., Greer, J.P. and Rodgers, G.M., 1998. Wintrobe's Clinical Hematology (10st Ed.) Lippincott Williams and Wilkins, New York, USA. 284P.

Li, P. and Gatlin, D.M., 2006. Nucleotide nutrition in fish: current knowledge and future applications. *Aquaculture*, 251: 141–152.

Mohseni, M., Pourkazemi, M., Bahmani, M., Falahatkar, B., Pourali, H.R. and Salehpour, M., 2006. Effects of feedin grate and frequency on growth performance of yearling great sturgeon, *Huso huso*. *Journal of Applied Ichthyology*, 26(1): 278–282. DOI:10.1111/j.1439-0426.2007.00968.x

Nwani, C.D., Nagpure, N.S., Kumar, R., Kushwaha, B., Kumar, P. and Lakra, W.S., 2010. Lethal concentration and toxicity stress of Carbosulfan, Glyphosate and Atrazine to freshwater air breathing fish *Channa punctatus* (Bloch). *International Aquatic Research*, 2: 105-111.

Noga, E.J., 2010. Fish Disease: Diagnosis and Treatment (2nd ed.) A Black Well Publishing Company, North Carolina, USA. 571P.

Peng, Y. and Zhu, G., 2006. Biological nitrogen removal with nitrification and denitrification via nitrite pathway *Apply Microbiol Biotechnolnology*, 73: 1. 15-26

Rafatnezhad, S., Falahatkar, B. and Tolouei Gilani, MH., 2008. Effects of stocking density on haematological parameters, growth and fin erosion of great sturgeon (*Huso huso*) juveniles. *Aquaculture Research*, 39(14): 1506–1513. DOI:10.1111/j.1365-2109.2008.02020.x

Ruyet, P.L.J., Chartois, H. and Quemener, L., 2002. Comparative acute ammonia

toxicity in marine fish and plasma ammonia response. *Aquaculture*, 136(1-2):42-57.

Sakomoto, K., Lewbart, G.A. and Smith, T.M., 2001. Blood chemistry values of juvenile Red pacu (*Piaractus brachypomus*).*Veterinary Clincal Pathology*, 30:50–52.

Sinha, A.K., Liew, H.J., Diricx, M. and Blust, R., 2012. The interactive effects of ammonia exposure, nutritional status and exercise on metabolic and physiological responses in goldfish (*Carassius auratus L.*). *Aquatic Toxicology*, 109:33–46.

Weon, S.Y., Lee, S.I. and Koopman, B., 2004. Effect of temperature and dissolved oxygen on biological nitrification at high ammonia concentrations. *Environmental Technology*, 25, 1211-1219.

Effects of Nitrosomonas and Nitrobacter in removal of ammonia, haematology and serum biochemical parameters of *Huso huso*

Mohammad Salehi A.[1]; Rajabzadeh Ghatrami E.[1]*; Soltani M.[2]; Rashno M.[3,4]

*rajabzadeh48@gmail.com

1-Department of Fisheries, Khorramshahr University of Marine Scince and Technology, Khorramshahr, Iran
2-Tehran University, Tehran, Iran
3-Department of Immunology, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
4-Cellular and Molecular Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

Abstract

Hematological parameters are useful indicators for assessing the physiological conditions of Sturgeon in response to stress, pollutants and physiological and ecological changes. The aim of this study was to investigate the effects of nitrosomonase and nitrobacter in removing ammonia and on blood and serum indices of *Huso huso* .Four treatments were designed with densities of bacteria (0, 10^1, 10^3, 10^5) in 100 ml with three replications were performed using 120 sturgeon fish with an average weight of 200 ± 800 g and a length of 55±2 cm in 12 fiberglass tanks (4000 liters per each 10 fish) for 12 weeks and two weeks of initial compatibility. Based on the results, the highest amount of ammonia was observed in treatment 1 (control) with significant difference ($p\leq0.05$) with treatment 3 and no significant difference with other treatments. Ammonia levels were not significantly different ($p\geq0.05$) between the hours measured in each treatment. Among the blood parameters, only neutrophil was significantly different in treatments ($p\leq0.05$). Serum blood parameters such as aspartate aminotransferase (AST), alkaline transferase (ALP), keratin phosphatase (CP), total protein and alanine aminotransferase (ALT) were not significantly different ($p\geq0.05$). Lactic dehydrogenase (LDH) had a significant difference with other treatments ($p<0.05$). Nitrosommunos and nitrobacter had a positive effect to remove ammonia from the water of the culture environment and had no negative effect on the physiological conditions of sturgeon (*huso huso*) blood parameters.

Keywords: Nitrosomonas and Nitrobacter, Ammonia, Haematology and Serum biochemical parameters, *Huso huso*

*Corresponding author