بررسی اثر متقابل درمان با سولفات مس و فرمالین و مسمومیت با نیتریت و آمونیاک بر برخی شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون ماهی کپور معمولی

طراوت ملایم‌رفتار[۱*]، رحیم پیغان[۲]، محمد راضی‌جلالی[۲] و علی شهریاری[۳]

تاریخ دریافت: ۹۵/۸/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۲/۲۱

چکیده

پژوهش حاضر با هدف ارزیابی اثر متقابل درمان با سولفات مس و فرمالین با مسمومیت نیتریت و آمونیاک بر برخی شاخص‌های بیوشیمیای سرم خون ماهی کپور معمولی طراحی گردید. در این مطالعه، تعداد ۴۰۰ قطعه ماهی کپور معمولی برای تعیین غلظت کشنده‌ی نیتریت و آمونیاک و ۳۶۰ قطعه ماهی برای بررسی اثرات متقابل دارو و مسمومیت استفاده شدند. جهت بررسی اثرات متقابل، ماهی‌ها به طور تصادفی در ۱۲ گروه (هر گروه شامل ۳۰ قطعه ماهی) و ۳ تکرار تقسیم شدند. طول مدت آزمایش ۹۶ ساعت بود. در پایان آزمایش پروتئین تام، گلوکز، کلسترول، AST، ALT، ALP و LDH سرم خون ماهیان اندازه‌گیری گردید. طبق نتایج به دست آمده، میزان LC_{50} در ۹۶ ساعت برای آمونیاک و نیتریت به ترتیب ۱۰۲/۴۵ و ۵۱۲/۴۶ میلی‌گرم در لیتر به دست آمد. در بررسی تیمارها، اختلاف معنی‌داری در میزان گلوکز، کلسترول، AST، ALT و HDL بین گروه‌ها مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). اما در میزان پروتئین تام و ALP اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$). تمام ماهیان تیمار آمونیاک +نیتریت +سولفات مس در ۹۶ ساعت، در چند ساعت اول از شروع آزمایش دچار تلفات شدند. میزان کلسترول در تیمار آمونیاک و تیمار آمونیاک +نیتریت کاهش معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها نشان داد ($P<۰/۰۵$). در سنجش آنزیم‌های سرمی، بیش‌ترین تغییرات در تیمار آمونیاک +نیتریت +سولفات مس مشاهده گردید. به طور کلی نتایج نشان می‌دهد که وجود نیتریت و آمونیاک در آب همزمان با درمان با فرمالین و سولفات مس، می‌تواند باعث تلفات یا افزایش معنی‌دار برخی آنزیم‌ها مثل AST، ALT و LDH شود.

کلمات کلیدی: آمونیاک، نیتریت، شاخص‌های بیوشیمیایی، کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

مقدمه

امروزه با افزایش کاربرد بسیاری از ترکیبات شیمیایی در بخش‌های کشاورزی و صنعتی در دنیا، ضروری است که تکنیک‌های محاسبه و تعیین مقادیر سمیت این گونه ترکیبات نیز توسعه یابد. در مرحله‌ی نخست، سمیت حاد این مواد روی جلبک‌ها، ماهی‌ها و دیگر موجودات زنده باید مورد ارزیابی قرار بگیرد تا خطرات ناشی از مواجهه با آن‌ها مشخص شوند . اگرچه، آزمایش‌های مسمومیت روی آبزیانی که در ابتدای زنجیره‌ی غذایی اکوسیستم‌های آبی هستند از جمله، بی‌مهرگانی همچون کلادوسرها، روتیفر و گروه‌های دیگر انجام گرفته است، اما چگونگی تاثیر مواد سمی بر این موجودات به ماهی‌ها قابل تعمیم نیست زیرا که، ماهی‌ها در حلقه‌های بالاتر زنجیره و هرم غذایی قرار می‌گیرند و تأثیرات مخرب این ترکیبات را بهتر نمایان می‌سازند (Bukowska 2006, Castano et al. 1996). غلظت ترکیبات نیتروژنی معدنی (NO_3^-، NO_2^-، NH_4^+) که در زمین و آب‌ها در حال افزایش در سراسر جهان هستند، باعث اثرات قابل توجهی در بسیاری از موجودات آبزی و در نهایت، موجب کاهش کیفیت آب

[۱*] دانش‌آموخته دکتری بهداشت آبزیان، دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز E-mail: taravat.fishery@gmail.com (نویسنده‌ی مسئول)

[۲] استاد، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز

[۳] دانشیار، گروه علوم پایه، دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز

شیرین، مصب‌ها و اکوسیستم‌های دریایی ساحلی می‌شوند (Meybeck et al. 1989, Camargo and Ward 1992). آمونیاک متداول‌ترین آلودگی آب است که می‌تواند از طریق خروج مواد زائد گیاهی، تخریب مواد آلی حاوی نیتروژن، رواناب کود و منابع صنعتی وارد سیستم‌های آبزی طبیعی شود. آمونیاک همچنین مواد زائد اصلی در ماهیان استخوانی است و به عنوان یک محصول از کاتابولیسم پروتئین تولید می‌شود (Randall and Wrigh 1987). آمونیاک همچنین یکی از سمی‌ترین مواد برای اکوسیستم‌ها و ارگانیسم‌های آبزی است و به نظر می‌رسد اثر مستقیم روی رشد موجودات آبزی داشته (Colt 2006) و باعث کاهش رشد و کاهش مقاومت نسبت به بیماری‌ها (Lemarie et al. 2004) یا حتی باعث تلفات ماهی در سیستم‌های پرورش متراکم می‌شود (Wang and Walsh 2000). نیتریت محصول میانی تشکیل شده توسط نیتریفیکاسیون باکتریایی آمونیاک است که در بین سایر مواد نیتروژنی در آب‌های طبیعی غالب نمی‌باشد (Kroupova et al. 2008). نیتریت موجود در آب با کلراید موجود در مبدل کلراید-بیکربنات حاضر در غشای رأسی سلول‌های کلراید آبشش ماهی، رقابت می‌کند. نیتریت همچنین با کلراید برای انتقال از میان غشای گلبول قرمز که منجر به اکسایش هموگلوبین به مت-هموگلوبین می‌شود، رقابت دارد (Jensen 2003). فلز مس به صورت سولفات مس (CuSo4) در طبیعت وجود دارد که به طور عمده جهت کنترل جلبک‌ها در آبزی پروری و نیز درمان عفونت‌های باکتریایی استفاده می‌شود (Griffin and Mitchell 2007, Isani et al. 2013). البته ذکر این نکته قابل توجه است که pH و سختی آب دو عامل اصلی در میزان سمیت فلز مس هستند (Howarth and Sprague 1978). حمام ماهی‌های بیمار با سولفات مس و فرمالین، از روش‌های متداول در آبزی پروری می-باشد. همان طور که اشاره شد، این دو ماده‌ی شیمیایی به دلیل خاصیت ضدعفونی کنندگی که دارند باعث مرگ انگل‌ها و عوامل عفونی دیگر از جمله باکتری‌ها می‌شوند. با این حال بر بافت‌های سطحی ماهی، خصوصاً آبشش‌ها نیز اثرات نامطلوب داشته و باعث آسیب به این بافت‌ها می‌شوند (Peyghan and Azary Takamy 2002). این آسیب‌ها سبب اختلال در جذب اکسیژن توسط ماهی بیمار شده و در صورت وجود شرایط کمبود اکسیژن ممکن است باعث مرگ ماهی شوند. در ماهی که در شرایط مسمومیت با نیتریت قرار دارد احتمالاً درمان با سولفات مس و یا فرمالین می‌تواند باعث وخیم‌تر شدن شرایط شود. طبق تحقیقات صورت گرفته ترکیبات سمی به راحتی می‌توانند به سیستم گردش خون ماهیان وارد شوند، چرا که، ماهیان در محیط‌های آبی آلوده به سموم به طور دائمی غوطه‌ور هستند و اندام‌های بدن به ویژه اندام‌های تنفسی در مدت زمانی طولانی در معرض مستقیم سم قرار می‌گیرند (Satheeshkumar et al. 2010). همچنین، پاسخ به عوامل آلوده‌کننده به صورت تغییر در میزان فعالیت برخی آنزیم‌ها انعکاس پیدا می-نماید که این تغییرات می‌تواند به عنوان علامت هشدار زود هنگام از آلودگی آب مورد استفاده قرار گیرند (Wieser and Hinterleitner 1980). بسیاری از تحقیقات انجام شده در مورد تأثیر داروهای شیمیایی مورد استفاده در آبزی‌پروری از جمله فرمالین و سولفات مس، در شرایط آب لوله‌کشی (بدون وجود نیتریت و آمونیاک) انجام شده است. در حالی که در شرایط طبیعی آکواریوم و یا پرورش، مقادیر قابل توجهی آمونیاک و نیتریت ممکن است در آب وجود داشته باشد. بنابراین هدف از انجام این تحقیق مطالعه‌ی اثرات متقابل درمان با سولفات مس و فرمالین در حضور مقادیر غیرکشنده‌ی نیتریت و آمونیاک در ماهی کپور معمولی بوده است. جهت ارزیابی تأثیرات از محاسبه‌ی تعداد تلفات و آنزیم‌های کبدی، کلسترول، پروتئین و گلوکز سرم استفاده شده است.

مواد و روش کار

تعداد ۷۶۰ قطعه ماهی کپور معمولی، با میانگین وزنی ۵/۸±۴۰/۵۱ گرم از یکی از مزارع پرورش ماهی شهرستان

اهواز تهیه و به آزمایشگاه تحقیقاتی بخش بهداشت آبزیان دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، منتقل شدند. ماهی‌ها به منظور تطابق با شرایط آزمایشگاه، به مدت یک هفته در آکواریوم‌های تمیز و کاملاً ضد عفونی شده با حجم ۳۰۰ لیتر نگهداری شدند. جهت هوادهی و تأمین اکسیژن در هر یک از آکواریوم‌ها ۳ عدد سنگ هوا که به منبع هواده متصل بود، نصب گردید و تنها در نوبت‌های غذادهی، هوادهی موقتاً قطع و سپس مجدداً برقرار می‌شد. در طول مدت آزمایش (۹۶ ساعت) غذادهی انجام نشد. در این تحقیق از آب لوله‌کشی شهری کلرزدایی شده استفاده گردید. در طی مدت نگهداری فاکتورهای شیمیایی آب برای همه گروه‌ها یکسان و به قرار زیر بوده است (جدول ۱):

جدول ۱: فاکتورهای شیمیایی آب لوله‌کشی شهری کلرزدایی شده

آمونیاک	نیتریت	نیترات	سختی کل	pH	شوری کل	دما
۰/۱ppm	۰/۰۲ppm	۵ppm	۱۸۰ppm	۸/۴–۸	۱/۲ppt	۲۸–۲۶C^0

جهت اندازه‌گیری فاکتورهای فیزیکوشیمایی آب از دستگاه کالری متر هک (مدل ۸۹، شرکت Hach، کشور آمریکا) و pH متر مدل متروهم (مدل ۷۸۱، Metrohm، کشور سوئیس) استفاده شد. تعویض آب به میزان ۲۰ درصد حجم آب هر ۴۸ ساعت، یک بار انجام می‌شد. غذادهی ماهی‌ها در طول مدت سازگاری به میزان ۲ درصد وزن بدن، در دو نوبت با غذای کنسانتره تجاری، انجام شد.

تعداد ۴۰۰ قطعه ماهی کپور برای تعیین LC_{50} ۹۶ ساعت استفاده شدند. برای این کار ماهی‌ها در آکواریوم‌های مجزا، در گروه‌های ۱۰ تایی با غلظت‌های تصاعدی از نیتریت سدیم و کلرید آمونیم (مرک آلمان) (۱۶۰،۱۴۰،۱۳۰،۱۲۰،۱۱۰،۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر برای آمونیاک و ۴۵۰، ۵۰۰، ۵۳۰، ۵۵۰، ۵۶۰، ۶۰۰ میلی‌گرم بر لیتر برای نیتریت) مجاور شدند. کلرید آمونیوم (جهت ایجاد مسمومیت آمونیاک) و نیتریت سدیم (جهت ایجاد مسمومیت نیتریت) مورد استفاده قرار گرفت. ماهی‌ها در هر ۹۶ ساعت (۴ روز) مورد بررسی قرار گرفتند و غلظت آمونیاک و نیتریت نیز به طور روزانه مجدداً تنظیم می‌گردید. میزان مرگ و میر در هر ۲۴ ساعت ثبت گردیده و در نهایت LC_{50} ۹۶ ساعته دو ماده مورد نظر با استفاده از نرم افزار Probit تعیین گردید.

تعداد ۳۶۰ قطعه ماهی کپور معمولی برای انجام آزمایشات استفاده شد. برای این کار ماهی‌ها در آکواریوم‌های مجزا، در گروه‌های ۱۰ تایی (۱۲ تیمار و هر تیمار دارای ۳ تکرار) با غلظت‌هایی از نیتریت سدیم، کلرید آمونیم، و دوز درمانی فرمالین و سولفات مس ($CuSO_4.5H_2O$) مجاور شدند (جدول ۲). تعویض کامل آب و تهیه‌ی مجدد غلظت‌ها به صورت روزانه انجام می‌شد و در هر روز غلظت‌های مورد نظر نیتریت سدیم و کلرید آمونیم به آب تازه اضافه می‌شد. در طول دوره‌ی آزمایش، pH و دیگر فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب اندازه‌گیری می‌شد.

جدول ۲: تیماربندی ماهی‌ها

تیمار	غلظت‌های استفاده شده
تیمار ۱	۳۰ ٪ غلظت LC_{50} نیتریت در ۹۶ ساعت
تیمار ۲	۳۰ ٪ غلظت LC_{50} آمونیاک در ۹۶ ساعت
تیمار ۳	غلظت درمانی (۱ میلی گرم در لیتر سولفات مس) در ۲۴ ساعت
تیمار ۴	غلظت درمانی (۱:۶۰۰۰۰) فرمالین در ۲۴ ساعت
تیمار ۵	غلظت درمانی فرمالین + ۳۰ ٪ غلظت LC_{50} نیتریت در ۹۶ ساعت
تیمار ۶	غلظت درمانی فرمالین + ۳۰ ٪ غلظت LC_{50} آمونیاک در ۹۶ ساعت
تیمار ۷	غلظت درمانی سولفات مس + ۳۰ ٪ غلظت LC_{50} نیتریت در ۹۶ ساعت
تیمار ۸	غلظت درمانی سولفات مس + ۳۰ ٪ غلظت LC_{50} آمونیاک در ۹۶ ساعت
تیمار ۹	۳۰ ٪ غلظت LC_{50} آمونیاک+۳۰ ٪ غلظت LC_{50} نیتریت در ۹۶ ساعت
تیمار ۱۰	۳۰ ٪ غلظت LC_{50} آمونیاک + ۳۰ ٪ غلظت LC_{50} نیتریت + غلظت درمانی فرمالین در ۹۶ ساعت
تیمار ۱۱	۳۰ ٪ غلظت LC_{50} آمونیاک + ۳۰ ٪ غلظت LC_{50} نیتریت + غلظت درمانی سولفات مس در ۹۶ ساعت
شاهد	آب لوله کشی کلرزدایی شده

خون‌گیری در زمان ۹۶ ساعت از شروع در معرض قرارگیری، با سرنگ یک بار مصرف و از طریق ورید ساقه‌ی دمی (۵ قطعه ماهی از هر تکرار، در مجموع ۱۵ قطعه در هر تیمار) انجام شد. به منظور انجام خون‌گیری، تمام ماهی‌ها با استفاده از ماده‌ی بیهوشی۲- فنوکسی اتانول بیهوش شدند. سپس سرم با استفاده از سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای $20^{\circ}C$ با دور ۳۰۰۰rpm جدا گردید. سرم‌های جدا شده تا زمان اندازه‌گیری در دمای $-20^{\circ}C$ نگهداری شد.

کلیه‌ی آزمایش‌های بیوشیمیایی سرم خون شامل گلوکز، کلسترول، پروتئین تام و آنزیم‌های کبدی شامل لاکتات دهیدروژناز (LDH)، آلکالین فسفاتاز (ALP)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) با استفاده از دستگاه اتو آنالایزر مدل BT -۱۵۰۰ ساخت کشور ایتالیا و کیت‌های تجاری شرکت پارس آزمون در آزمایشگاه کلینیکال پاتولوژی دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه چمران اهواز انجام گردید.

تعیین سمیت حاد آمونیاک و نیتریت در بچه ماهی کپور معمولی در کوتاه مدت (۴ روز یا ۹۶ ساعت) طبق روش متداول O.E.C.D با استفاده از نرم‌افزار Probit انجام گردید (Finney 1971). در پایان نتایج حاصل از این بررسی با استفاده از نرم‌افزار SPSS-17 مورد مقایسه و تجزیه و تحلیل قرار گرفت. داده‌های مورد بررسی با استفاده از تجزیه واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) و پس آزمون توکی در سطح اطمینان ۹۵ درصد مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج

تعیین غلظت کشنده‌ی آمونیاک و نیتریت

نتایج بررسی سمیت حاد آمونیاک و نیتریت در بچه ماهی کپور معمولی نشان داد که میزان LC_{50} در ۹۶ ساعت آمونیاک و نیتریت به ترتیب ۱۰۲/۴۵ و ۵۱۲/۴۶ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد.

بررسی اثرات متقابل مسمومیت و درمان

جهت بررسی اثرات متقابل نیتریت و آمونیاک ابتدا تحمل ماهیان نسبت به وجود همزمان دارو و ماده‌ی سمی مورد توجه قرار گرفت.

تمام ماهیان تیمار ۱۱ (۳۰ درصد غلظت LC50 آمونیاک + ۳۰ درصد غلظت LC50 نیتریت + غلظت درمانی سولفات مس در ۹۶ ساعت) در چند ساعت اول از شروع آزمایش دچار تلفات شدند و آزمایش برای این تیمار دوباره تکرار شده و خون‌گیری قبل از تلف شدن ماهیان صورت گرفت. در بقیه‌ی گروه‌ها هیچ گونه تلفاتی مشاهده نشد. اثر متقابل درمان با سولفات مس و فرمالین با مسمومیت نیتریت و آمونیاک بر میزان پروتئین تام، گلوکز و کلسترول سرم خون ماهی کپور معمولی در جدول ۳ ارائه شده است. نتایج نشان داد میزان پروتئین تام بین گروه شاهد و تیمارهای مختلف آزمایش، تفاوت معنی‌داری نداشته است ($P>0/05$). اما اختلاف معنی-داری بین گروه شاهد و تیمارهای ۱، ۲، ۳، ۹، ۱۰ و ۱۱ در میزان گلوکز مشاهده شد ($P<0/05$). همچنین میزان کلسترول در تیمار ۲ (آمونیاک به تنهایی) و تیمار ۹ (آمونیاک + نیتریت) کاهش معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها نشان داد ($P<0/05$). نتایج حاصل از اثرات متقابل درمان با سولفات مس و فرمالین با مسمومیت نیتریت و آمونیاک بر سنجش‌های آنزیم‌های کبدی سرم در جدول ۴ ارائه شده است. در سنجش آنزیم‌های سرمی، بیش‌ترین تغییرات در تیمار ۱۱ (آمونیاک + نیتریت + سولفات مس) مشاهده گردید. میزان آنزیم ALP با وجود افزایش در بیش‌تر تیمارها نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ($P>0/05$). همچنین میزان AST با وجود افزایش در بیش‌تر تیمارها نسبت به گروه شاهد تنها در تیمارهای ۵ و ۱۱تفاوت معنی‌داری را نشان داد ($P<0/05$). میزان ALT نیز با وجود افزایش در بیش‌تر تیمارها نسبت به گروه شاهد تنها در تیمارهای ۱۰ و ۱۱ تفاوت معنی‌داری را نشان داد ($P<0/05$). در پایان آزمایش، میزان LDH در تیمارهای مختلف آزمایش نسبت به گروه شاهد افزایش یافت اما این افزایش تنها در تیمارهای ۵، ۷ و ۱۰ معنی‌دار بود ($P<0/05$).

جدول ۳: اثر تیمارهای مختلف سولفات مس، فرمالین، نیتریت و آمونیاک بر شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون ماهی کپور معمولی بعد از ۹۶ ساعت

پارامترها	پروتئین تام (گرم بر دسی‌لیتر)	گلوکز (میلی‌گرم بر دسی لیتر)	کلسترول (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)
تیمار ۱	۲/۸۳±۰/۰۵ ^{a}	۷۸/۳۳±۴/ ۲۲ ^{cd}	۲۵۵/۳۳±۱۵/۷۵ ^{a}
تیمار ۲	۲/۲۶±۰/۰۵ ^{a}	۱۴۸/۳۳±۴/۹۲ ^{a}	۸۶±۱۳/۴۱ ^{g}
تیمار ۳	۲/۶±۰/۰۸ ^{a}	۷۵/۳۳±۴/ ۹۲ ^{d}	۲۴۹/۶۶±۵/۹۵ ^{a}
تیمار ۴	۲/۴۶±۰/۱۳ ^{a}	۱۱۶/۳۳±۱۰/ ۷۴ ^{b}	۲۳۰/۶۶±۱۵/۰ ^{ab}
تیمار ۵	۲/۹۶±۰/۳۱ ^{a}	۷۹±۴/ ۴۷ ^{cd}	۲۳۳/۶۶±۱۱/۵۳ ^{ab}
تیمار ۶	۲/۴۳±۰/۳۷ ^{a}	۸۶/۳۳±۱۱/ ۸۷ ^{bcd}	۱۰۸/۶۶±۱۲/۰۱ ^{fg}
تیمار ۷	۲/۷۶±۰/۱۳ ^{a}	۸۶±۱۰/ ۳۱ ^{bcd}	۱۸۳/۶۶±۱۰/۳۱ ^{cd}
تیمار ۸	۲/۲۶±۰/۱۳ ^{a}	۱۱۲/۳۳±۱۱/ ۹۱ ^{b}	۱۳۱/۶۶±۸/۳۱ ^{f}
تیمار ۹	۲/۵۶±۰/۱۸ ^{a}	۱۵۵/۶۶±۱۳/۹۲ ^{a}	۷۸±۶/۷۵ ^{g}
تیمار ۱۰	۲/۶±۰/۲۶ ^{a}	۶۹/۶۶±۸/ ۳۱ ^{d}	۲۱۲±۶/۹۸ ^{bc}
تیمار ۱۱	۲/۷±۰/۹۶ ^{a}	۱۶۸±۱۳/۱۷ ^{a}	۱۳۶/۶۶±۱۲/۲ ^{ef}
شاهد	۲/۸۶±۰/۱۳ ^{a}	۱۰۶/۶۶±۷/۶ ^{bc}	۱۷۳/۶۶±۱۳/۴۲ ^{de}

حروف انگلیسی غیرمشابه در هر ردیف نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

جدول ۴: اثر تیمارهای مختلف سولفات مس، فرمالین، نیتریت و آمونیاک بر آنزیم‌های کبدی سرم خون ماهی کپور معمولی بعد از ۹۶ ساعت

پارامترها	AST (iu/l)	ALT (iu/l)	ALP (iu/l)	LDH (iu/l)
تیمار ۱	۱۷۲±۱۳/۷۶ ab	۶/۶۶±۱/۳۶ abc	۹۶/۶۶±۱۶/۵ a	۴۵۱±۴۳/۶ c
تیمار ۲	۱۹۲/۳۳±۲۲/۹۸ ab	۷±۲/۳۶ abc	۸۳/۶۶±۲/۷۳ a	۴۳۶±۶۱/۸ c
تیمار ۳	۱۸۹±۵۱/۳۵ ab	۵/۶۶±۳/۶۱ abc	۱۳۵±۵۸/۱۳ a	۴۳۱±۹۷/۵ c
تیمار ۴	۱۶۵/۳۳±۴۲/۲۴ ab	۵±۳/۲۲ bc	۱۵۲/۶۶±۱۴/۴۸ a	۴۸۳±۹۲/۶ c
تیمار ۵	۲۳۲/۶۶±۱۰/۵۹ a	۵/۳۳±۲/۷۳ bc	۱۳۱/۶۶±۶۹/۸۱ a	۸۶۲±۳۲/۸ ab
تیمار ۶	۱۵۲/۳±۱۸/۹۸ ab	۶/۳±۴/۴۱ abc	۱۱۰±۲۶/۱۲ a	۵۷۹±۶۳/۲ bc
تیمار ۷	۲۲۰±۱۶/۵ ab	۵/۳±۳/۱۴ bc	۱۱۹/۳۳±۲۳/۳۲ a	۹۷۶±۷۸/۹ a
تیمار ۸	۱۶۴/۳±۳۳/۶۱ ab	۷±۲/۶۸ abc	۷۸/۶۶±۱۴/۳۷ a	۴۲۲±۹۲/۲ c
تیمار ۹	۱۶۷/۳۳±۲۳/۸۲ ab	۹±۳/۵۷ abc	۱۶۱/۶۶±۵۸/۵۲ a	۴۶۷±۷۴/۸ c
تیمار ۱۰	۲۰۵±۲۰/۱۵ ab	۱۵/۶۶±۴/۵ a	۱۵۳/۶۶±۳۴/۵۱ a	۸۵۴±۶۹/۴ ab
تیمار ۱۱	۲۳۵/۶±۲۶/۸۵ a	۱۵±۲/۳۶ ab	۷۸/۳۳±۱۹/۷ a	۵۷۹±۸۲/۴ bc
شاهد	۱۳۸/۶۶±۲۶/۴۱ b	۲/۶۶±۱/۳۶ c	۸۳/۶۶±۸/۱۱ a	۳۹۲±۷۳/۸ c

حروف انگلیسی غیرمشابه در هر ردیف نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

بحث

در سنجش آنزیم‌های سرمی، بیش‌ترین تغییرات در تیمار ۱۱ (آمونیاک + نیتریت + سولفات مس) مشاهده گردید. با توجه به اینکه در این تیمار تلفات مشاهده گردید و برای ماهیان غیرقابل تحمل بود، افزایش آنزیم‌ها قابل پیش بینی بود. احتمالاً با وجود مت هموگلوبینی ناشی از نیتریت و مسمومیت ناشی از آمونیاک، سولفات مس با آسیب به آبشش و انعقاد موکوس آبشش، باعث خفگی ماهی‌ها شده است که این ضایعات باعث افزایش آنزیم‌های سرمی نیز شده است. سنجش میزان فعالیت آنزیم‌های مایعات زیستی، ما را با نحوه‌ی کارکرد بافت‌ها و اعضای مختلف آشنا می‌کند. امروزه با پیشرفت آنالیز فاکتورهای بیوشیمیایی سرم خون، درک بهتری از وضعیت فیزیولوژیک و سلامتی آبزیان به دست آمده است. ولی برخلاف حیوانات خشکی‌زی، به دلیل متغیر بودن این پارامترها و تنوع بالای گونه‌های آبزیان، اثرات فیزیولوژیک فاکتورهای بیوشیمیایی خون در آبزیان چندان شناخته شده نمی‌باشد (Peres et al. 2014) . بررسی عوامل بیوشیمیایی می‌تواند نقش مهمی در تشخیص بیماری‌های عفونی، خونی و مسمومیت‌های آبزیان داشته باشد. پروتئین خون از اساسی‌ترین اجزای متابولیسم در آبزیان است و غلظت کل پروتئین موجود در پلاسمای خون به عنوان یک شاخص بالینی در سنجش میزان سلامتی، استرس و وضعیت بدنی ارگانیسم‌های آبزی به کار برده می‌شود و سنجش مقدار پروتئین خون می‌تواند آسیب‌های سلولی را پیش‌بینی کند (Riche 2007). در پژوهش حاضر تغییراتی در میزان پروتئین کل بین تیمارهای مختلف و گروه شاهد ملاحظه گردید به طوری که در بیش‌تر تیمارها کاهش این پارامتر مشاهده شد اما این اختلاف‌ها معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). نتایج نشان داد، میزان پروتئین تام خون ماهی از ثبات خوبی برخوردار است و تحت تأثیر مسمومیت و درمان قرار نگرفته است. عدم وجود اختلاف معنی‌دار در آزمایش حاضر شاید به

این دلیل باشد که ماهی نیاز به زمان بیش‌تری جهت پاسخ‌گویی به استرس‌های محیطی دارد. بیش‌ترین بخش پروتئین سرم در کبد سنتز می‌شود که می‌تواند به عنوان شاخص عملکرد کبد استفاده شود. کاهش پروتئین کل ویژگی بارز بسیاری از بیماری‌ها است و ممکن است به دلیل بیماری کبدی، کاهش جذب یا ناشی از دفع پروتئین رخ دهد (Bernet et al. 2001, Das et al. 2004). Das و همکاران در سال ۲۰۰۴ اثر مسمومیت ۹۶ ساعته نیتریت بر ماهی *Labeo rohita* را بررسی کردند و در پایان آزمایش اختلاف معنی‌داری را در میزان پروتئین کل مشاهده نکردند. آن‌ها همچنین بیان کردند که کاهش میزان پروتئین سرم ممکن است به علت افزایش دفع پروتئین خون از طریق کلیه باشد. به طور کلی تغییر در میزان پروتئین کل خون به عنوان یک شاخص اختصاصی مطرح نیست ولی می‌تواند بیان‌گر یک تغییر متابولیک و یا آسیب‌شناسی باشد (Densmore et al. 2001). نتایج حاصل از آنالیز واریانس یک طرفه اختلاف معنی‌داری را بین گروه شاهد و تیمارهای ۱، ۲، ۳، ۹، ۱۰ و ۱۱ در میزان گلوکز نشان می‌دهد. همچنین در مطالعه‌ای که توسط Metwally و Wafeek در سال ۲۰۱۴ روی مسمومیت آمونیاک در ماهی تیلاپیای نیل انجام گرفت اختلاف معنی‌داری در میزان گلوکز در تیمارهای تحت مسمومیت با ۲، ۴ و میلی‌گرم بر لیتر آمونیاک نسبت به گروه شاهد مشاهده شد ولی در تیمار تحت مسمومیت با ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر آمونیاک اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. برخی از محققین افزایش معنی‌داری در میزان گلوکز خون ماهیانی که با یک عامل استرس‌زا در مدت ۲ تا ۲۴ ساعت مواجه شدند، مشاهده کردند (Vijayan et al. 1997). همچنین برخی دیگر از محققین مشاهده کردند که افزایش میزان گلوکز خون بعد از ۲۴ ساعت رفع شد (Small 2004). DAS و همکاران در سال ۲۰۰۴ مطالعه‌ای را روی مسمومیت ۹۶ ساعته نیتریت در ماهی *Labeo rohita* انجام دادند و مشاهده نمودند که میزان گلوکز سرم خون در پایان آزمایش در تیمارهای تحت مسمومیت با نیتریت (۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم بر لیتر) نسبت به گروه شاهد کاهش یافته است. در مطالعه‌ای که توسط Tarkhani و Imanpoor در سال ۲۰۱۲ روی پاسخ به استرس ناشی از فرمالین در ماهی انجام شد، در پایان ۲۴ ساعت اختلاف معنی‌داری را در میزان گلوکز سرم خون در تیمار مواجه با فرمالین نسبت به گروه شاهد مشاهده نشد که مشابه نتاج مطالعه‌ی حاضر می‌باشد. گلوکز اصلی‌ترین ماده‌ی به دست آمده از سوخت و ساز مواد کربوهیدراتی می‌باشد (Zhou et al. 2009). از سوی دیگر، دلیل افزایش غلظت گلوکز می‌تواند به دلیل فرآیند گلکونئوژنزیز باشد، بدین صورت که در شرایط نامساعد و تحت استرس (داخلی یا خارجی) هورمون‌های کاتکول آمین، آدرنالین و نورآدرنالین توسط سلول‌های کرومافین به خون ترشح می‌شوند. این هورمون‌ها به همراه کورتیزول سبب می‌شوند که ماهی با انجام واکنش‌های بیوشیمیایی گلیکوژنولیز، گلیکوژن بافت را به گلوکز تبدیل کرده و وارد جریان خون کنند تا انرژی مورد نیاز سلول‌ها طی فرآیند استرس فراهم شود (Saravanan et al. 2011). همچنین یکی دیگر از علل تغییر در غلظت گلوکز به دلیل بروز آسیب به کلیه‌ها می‌باشد (Agrahari et al. 2007). به طور کلی گلوکز خون شاخصی متغیر است که به میزان بسیار زیادی تحت تأثیر دستکاری و حمل و نقل، استرس محیطی، تغییرات فصلی وضعیت تغذیه‌ای و بلوغ جنسی قرار دارد (Khanna and Singh 1971). همچنین مطالعات محققین نشان داده است که گلوکز خون ماهیان دارای تفاوت‌های زیادی بین گونه‌های مختلف و حتی بین افراد یک گونه است (Navarro and Gutierrez 1995). در پایان آزمایش، نتایج حاصل از آنالیز واریانس یک طرفه اختلاف معنی‌داری بین گروه شاهد و تیمارهای مختلف به جز تیمارهای ۷ و ۱۱در میزان کلسترول سرم خون ماهی کپور معمولی مشاهده شد ($P<0/05$). این اختلاف در بعضی تیمارها به صورت افزایش و در برخی تیمارها به صورت کاهش مشاهده شد. در مطالعه‌ای که توسط Metwally و Wafeek در سال ۲۰۱۴ روی اثر مسمومیت آمونیاک در

ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) انجام شد، میزان کلسترول سرم در تیمارهای مواجه با ۲، ۴، ۸ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر آمونیاک در طی مدت ۱۴ روز نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافت. سطوح غلظت تریگلیسرید و کلسترول به عنوان شاخص‌های اصلی وضعیت سلامت ماهیان استخوانی عالی مطرح می‌باشد به طوری که تغییر در غلظت کلسترول بیان‌گر سوخت و ساز در کبد است. افزایش بیش از حد کلسترول بیان‌گر بی‌نظمی سوخت و ساز چربی و لیپوپروتئین به ویژه تخریب کارایی فیزیولوژیک کبد است (Zhou et al. 2009). علاوه بر این، کلسترول ترکیبی ضروری برای ساختار غشای سلولی است. همچنین استرس باعث تولید کورتیکواستروئیدها شده و منجر به افزایش عملکرد غده‌ی تیروئید می‌شود و طی پرکاری تیروئید کاتابولیسم کلسترول نیز بالا رفته و این امر می‌تواند دلیل افزایش غیرنرمال سطح کلسترول خون ماهیان باشد (Gill and Pant 1983). از جمله فاکتورهای بیوشیمیایی مهم، آنزیم‌های کبدی ALT و AST هستند که از سنجش آن‌ها به عنوان یک شاخص آزمایشگاهی استاندارد جهت بررسی اختلالات کبدی در موجودات استفاده می‌شود. این آنزیم‌ها، اساساً داخل سلولی هستند و در بسیاری از اندام‌های مختلف دیگر ماهی نیز یافت می‌شوند با توجه به این که در حالت طبیعی، مقادیر این آنزیم‌ها در داخل سلول بیش‌تر از خارج سلول است، بنابراین افزایش مقادیر جزئی آن‌ها در محیط خارج سلول اعم از مایع بین سلولی و پلاسما به عنوان یک اندیکاتور حساس، بیان‌گر وقوع آسیب سلولی در مواجهه با انواع آلاینده‌های وارد شده به بدن موجود زنده خواهد بود (Parma et al. 2007). قسمت عمده‌ی این آنزیم‌ها در داخل سلول‌های کبدی و در میتوکندری هپاتوسیت‌ها قرار دارند. بنابراین هرگونه آسیب خفیف، التهاب یا نکروز سلول‌های کبد موجب آزاد شدن این آنزیم‌ها و افزایش سطح آن در پلاسما می‌گردد. علاوه بر بروز اختلالات کبدی، وقوع آسیب‌های شدید و بروز اختلالات در عضلات اسکلتی، نارسایی و اختلالات قلبی نیز منجر به افزایش سطح این آنزیم در پلاسما می‌گردد (Banaee et al. 2008). در پژوهش حاضر، میزان AST با وجود افزایش در بیش‌تر تیمارها نسبت به گروه شاهد تنها در تیمارهای ۵ و ۱۱ تفاوت معنی‌داری را نشان داد و میزان ALT نیز با وجود افزایش در بیش‌تر تیمارها نسبت به گروه شاهد تنها در تیمارهای ۱۰ و ۱۱ به طور معنی‌داری بیش‌تر بود. در ماهیان استخوانی آب شیرین، ALT و AST نقش مهمی در سم‌زدایی آمونیاک بازی می‌کند (D'Apollonia and Anderson 1980). از نظر فیزیولوژیکی، سطح آمونیاک سمی در ارگانیسم، به وسیله‌ی افزایش فعالیت ALT و AST خنثی می‌شود (Nemcsok et al. 1982). Jeney و همکاران در سال ۱۹۹۲ افزایش میزان ALT و AST پلاسما در ماهی کپور معمولی که به مدت ۴ روز در معرض آمونیاک بود را مشاهده کردند. در مطالعه‌ای که توسط Peyghan و Azary Takamy در سال ۲۰۰۲ روی اثر مسمومیت حاد آمونیاک در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) انجام گرفت، در پایان آزمایش اختلاف معنی‌داری در میزان ALT و AST در تیمارهای مختلف نسبت به گروه شاهد مشاهده نشد. در مطالعه‌ای که توسط Latif و همکاران در سال ۲۰۱۴ روی مسمومیت ۹۶ ساعته سولفات مس در ماهی *Labeo rohita* انجام شد، در پایان آزمایش میزان ALT و AST در تیمارهای تحت مسمومیت نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری بیش‌تر بود. در تحقیق حاضر، میزان آنزیم ALP با وجود افزایش در بیش‌تر تیمارها نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (P>۰/۰۵). در مطالعه‌ای که توسط Peyghan و Azary Takamy در سال ۲۰۰۲ روی اثر مسمومیت حاد آمونیاک در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) انجام شد، میزان ALP در تیمارهای مواجه با آمونیاک نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافت. Latif و همکاران در سال ۲۰۱۴ اثر مسمومیت ۹۶ ساعته سولفات مس بر ماهی *Labeo rohita* را بررسی کردند و در پایان

آزمایش تفاوت معنی‌داری در میزان ALP در تیمارهای تحت مسمومیت نسبت به گروه شاهد مشاهده نکردند. آنزیم ALP در تمامی بافت‌های ماهی‌ها یافت می‌شود (Agrahari and Gopal 2009) . این آنزیم همچنین در اپیتلیوم مجاری صفراوی، سلول‌های کبدی و نیز در مخاط روده و کلیه‌ها نیز وجود دارد. لذا سطح این آنزیم در زمانی که انسداد مجاری صفراوی داخل و خارج کبدی، سیروزی و اختلالات کبدی رخ می‌دهد، به شدت افزایش می‌یابد (Banaee et al. 2008, Racicot et al. 1975). علت معنی‌دار نبودن اختلاف آنزیم LP بین گروه‌ها، احتمالاً مقادیر یا شدت آسیب در دوزهای اعمال شده جهت افزایش آن‌ها در سرم خون قابل بحث است؛ به طوری که شدت آسیب وارده به سلول‌ها در حدی نبوده که نشت آن‌ها به سرم خون همانند سایر آنزیم‌ها صورت گیرد. میزان LDH در تیمارهای مختلف آزمایش نسبت به گروه شاهد افزایش یافت اما این افزایش تنها در تیمارهای ۵، ۷ و ۱۰ معنی‌دار بود. همچنین در مطالعه‌ای که توسط Metwally و Wafeek در سال ۲۰۱۴ روی اثر مسمومیت آمونیاک در ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) انجام شد، میزان LDH سرم در تیمارهای مواجه با آمونیاک نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافت. آنزیم LDH در سیتوپلاسم تمام سلول‌های بدن ماهی‌ها به ویژه در بافت عضله اسکلتی، قلب، کبد و کلیه یافت می‌شود و در اثر بروز هرگونه آسیب به غشای سلولی، آزاد شده و سطح آن در خون افزایش می‌یابد. در شرایطی که ماهی‌ها در معرض یک عامل استرس‌زا قرار می‌گیرند، روند کاتابولیسم گلیکوژن و تغییر گلوکز به سمت تشکیل لاکتات در عضلات پیش می‌رود و این امر می‌تواند افزایش سطح این آنزیم را در پی داشته باشد (Velíšek et al. 2006). به طور کلی، کبد یکی از مهم‌ترین بافت‌های بدن آبزی است که با قرار گرفتن ماهی در معرض آلاینده‌ها دچار آسیب شده و اختلال در عملکرد آنزیم‌های آن در چنین شرایطی امری بدیهی است (Agrahari et al. 2007). بنابراین به نظر می‌رسد افزایش آنزیم‌های LDH، ALT، AST و ALP می‌تواند به دلیل آسیب‌دیدگی بافت کبد و اختلال در عملکرد این بافت باشد. از طرف دیگر، بر اساس مطالعات محققین، عوامل محیطی (فصل، شوری، درجه‌ی حرارت و تراکم)، عوامل فیزیولوژیکی (گونه‌ی ماهی، سن، جنس و وضعیت تغذیه‌ای)، زمان نمونه‌برداری، چگونگی تهیه‌ی نمونه، دقت و حساسیت روش‌های اندازه‌گیری می‌توانند بر فعالیت پارامترهای بیوشیمیایی خون تأثیرگذار باشند و تفاوت در نتایج تحقیقات صورت گرفته را سبب شود (Verdegem et al. 1997). تغییر سطح این آنزیم‌ها، می‌تواند به عنوان یک شاخص کلینیکی در تشخیص و تایید غیرمستقیم آسیب وارده به بافت‌های مختلف بدن به ویژه در پی مسمومیت با مواد، مورد استفاده قرار گیرد. به طور کلی نتایج نشان می‌دهد که وجود نیتریت و آمونیاک در آب همزمان با درمان با فرمالین و سولفات مس، می‌تواند باعث تلفات یا افزایش معنی‌دار برخی آنزیم‌ها مثل AST، ALT و LDH شود. با این حال، با توجه به کمبود اطلاعات و تحقیقات کافی در زمینه‌ی اثرات متقابل درمان با سولفات مس و فرمالین با مسمومیت نیتریت و آمونیاک بر آنزیم‌های کبدی و فاکتورهای بیوشیمیایی سرم خون و مکانیسم‌های درگیر در پاسخ آنزیم‌های کبدی و فاکتورهای بیوشیمیایی سرم خون به این اثرات، انجام تحقیقات بیش‌تری در این زمینه ضروری به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب پایان‌نامه و با استفاده از امکانات دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز انجام گردید، در این خصوص از اعطای پژوهانه‌ی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

Agrahari, S. and Gopal, K. (2009). Fluctuations of certain biochemical constituents and markers enzymes as a consequence of monocrotophos toxicity in the edible freshwater fish, *Channa punctatus*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 94: 5-9.

Agrahari, S.; Pandey, K.C. and Gopal, K. (2007). Biochemical alteration induced by monocrotophos in the blood plasma of Wsh, *Channa punctatus* (Bloch). Pesticide Biochemistry and Physiology, 88: 268-272.

Banaee, M.; Mirvagefei, R.; Rafei, G. and Majazi Amiri, B. (2008). Effect of sub-lethal diazinon concentrations on blood plasma biochemistry. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2: 189-198.

Bernet, D.; Schmidt, H.; Wahli, T. and Burkhardt-Holm, P. (2001). Effluent from a sewage treatment works causes changes in serum chemistry of brown trout (*Salmo trutta* L.). Ecotoxicology and Environmental Safety, 48: 140-147.

Bukowska, B. (2006). Toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid molecular mechanisms. Polish Journal of Environmental Studies, 15(3): 365-374.

Camargo, J.A. and Ward, J.V. (1992). Short-term toxicity of sodium nitrate ($NaNO_3$) to nontarget freshwater invertebrates. Chemosphere, 24: 23-28.

Castano. A.; Cantarino. M.J.; Castillo, P. and Tarazona, J.V. (1996). Correlation between the RTG-2 cytotoxicity test EC50 and in vivo LC50 rainbow trout bioassay. Chemosphere, 32(11): 2141-2157.

Colt, J. (2006). Water quality requirements for reuse systems. Aquacult Engineering, 34: 143-156.

D'Apollonia, S. and Anderson, P.D. (1980). Optimal assay conditions for serum and liver glutamate oxaloacetate transaminase, glutamate pyruvate transaminase, and sorbitol dehyddrogenase from the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 37, 163-169.

Das, P.C.; Ayyappan, S. and Jena, J.K. (2004). Acute toxicity of ammonia and its sub-lethal effect on selected hematological and enzymatic parameters of mrigal, *Cirrhinus mrigala*. Aquaculture Research, 35: 134-143.

Densmore, C.L.; Blazer, V.S.; Waldrop, T. and Pooler, P.S. (2001). Effects of whirling disease on selected hematological parameters in rainbow trout. Journal of Wildlife Diseases, 37: 375-378.

Gill, T.S. and Pant, J.C. (1983). Cadmium toxicity: Inducement of changes in blood and tissue metabolites in fish. Toxicology Letters, 18: 195-200.

Griffin, B.R. and Mitchell, A.J. (2007). Susceptibility of channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), to *Edwardsiella ictaluri* challenge following copper sulphate exposure. Journal of Fish Diseases, 30: 581-585.

Howarth, R.S. and Sprague, J.B. (1978). Copper lethality to rainbow trout in waters of various hardness and pH. Water Research, 12: 455-462.

Isani, G.; Letizia Falcioni, M.; Barucca, G.; Sekar, D.; Andreani, G.; Carpenè, E. and Falcioni, G. (2013). Comparative toxicity of CuO nanoparticles and $CuSO_4$ in rainbow trout. Ecotoxicology and Environmental Safety, 97: 40-46.

Jeney, G.; Nemcsok, J.; Jeney, Z.S. and Olah, J. (1992). Acute effect of sublethal ammonia concentrations on common carp (*Cyprinus carpio L.*). 2. Effect of ammonia on blood plasma transaminases GOT, GPT, G1DH enzyme activity, and ATP value. Aquaculture, 104: 149-156.

Jensen, F.B. (2003). Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. Comparative Biochemistry and Physiology, 135: 9-24.

Khanna, S.S. and Singh, T. (1971). Studies on the blood glucose level in *Channa punctatus* (Bloch.). Acta Zoologica, 52: 97-101.

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

Latif, A.; Khalid, M. and Ali M. (2014). Evaluation of toxic stress of copper sulphate and lead nitrate on hematological and serum biochemical characteristics of freshwater cyprinid (*Labeo rohita*). International Journal of Current Engineering and Technology, 4(1): 366-372.

Lemarie, G.; Dosdat, A.; Coves, D.; Dutto, G.; Gasset, E. and Person, L.R.J. (2004). Effect of chronic ammonia exposure on growth of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. Aquaculture, 229: 479-491.

Metwally, M.A.A. and Wafeek, M. (2014). Effect of ammonia toxicity on carbohydrate metabolism in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). World Journal of Fish and Marine Sciences, 6 (3): 252-261.

Meybeck, M.; Chapman, D.V. and Helmer, R. (1989). Global freshwater quality: a firstassessment. World Health Organization and United Nations Environmental Program. Blackwell, Oxford, P: 306.

Navarro, I. and Gutiérrez, J. (1995). Fasting and starvation. In: Hochachka P.W., Mommsen T. (Eds.) Biochemistry and Molecular Biology of Fishes. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, Pp: 393-434.

Nemcsok, J.; Gyore, K.; Olah, J. and Boros, L. (1982). Effect of NH_3 on blood glucose level, GOT, GPT, LDH enzyme activity and respiration of three fish species. Aquacultura Hungarica, 3, 63-68.

Parma, M.J.; Loteste, A.; Campana, M. and Bacchetta, C. (2007). Changes of hematological parameters in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae) exposed to sublethal concentration of cypermethrin. Journal of Environmental Biology, 28(1): 147-149.

Peres, H.; Santos, S. and Oliva-Teles, A. (2014). Blood chemistry profile as indicator of nutritional status in European seabass (*Dicentrarchus labrax*). Fish Physiology and Biochemistry, 40: 1339-1347.

Peyghan, R. and Azary Takamy, G. (2002). Histopathological, serum enzyme, cholesterol and urea changes in experimental acute toxicity of ammonia in common carp (*Cyprinus carpio*) and use of natural zeolite for prevention. Aquaculture International, 10: 317-325.

Racicot, J.G.; Gaudet, M. and Leray, C. (1975). Blood and liver enzymes in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) with emphasis on their diagnostic use: study of CCl4 toxicity and a case of Aeromonas infection. Journal of Fish Biology, 7: 825-835.

Randall, D.J. and Wright, P.A. (1987). Ammonia distribution and excretion in fish. Fish Physiology and Biochemistry, 3: 107-120.

Riche, M. (2007). Analaysis of refractometry for determining total plasma in hybrid striped bass (*Morone chrysops* * *M. saxatilis*) at various salinities. Aquaculture, 264: 279-284.

Saravanan, M.; Kumar, K.P. and Ramesh, M. (2011). Haematological and biochemical responses of freshwater teleost fish *Cyprinus carpio* (Actinopterygii: Cypriniformes) during acute chronic sublethal exposure to lindane. Pesticide Biochemistry and Physiology, 100: 206-211.

Satheeshkumar, P.; Ananthan, G.; Senthilkumar, D. and Jeevanantham, K. (2010). Comparative investigation on hematological and biochemical studies on wild marine teleost fishes from Vellar estuary, southeast coast of India. Comparative Clinical Pathology, 10: 1091-1095.

Small, B.C. (2004). Effect of isoeugenol sedation on plasma coritsol, glucose, and lactate dynamics in channel catfish *Ictalurus punctatus* exposed to three stressors. Aquaculture, 238: 469-481.

Tarkhani, R. and Imanpoor, M.R. (2012). Stress response of *Carassius auratus* to salt and formaldehyde exposure. World Journal of Fish and Marine Sciences, 4 (5): 486-488.

Velíšek, J.; Dobšíková, R.; Svobodova, Z.; Modra, H. and Luskova, V. (2006). Effect of deltamethrin on the biochemical profile of common carp (*Cyprinus carpio* L.). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 76: 992-998.

Verdegem, M.C.J.; Hilbrands, A.D. and Boon, J.H. (1997). Influence of salinity and dietary composition on blood parameter values of hybrid red tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaevs) *Oreochromis mossambicus* (Peters). Aquaculture Research, 28: 453-459.

Vijayan, M.M.; Pereira, C.; Grau, E.G. and Iwama, G.K. (1997). Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: the role of cortisol. Comparative Biochemistry and Physiology, 116: 89-95.

Wang, Y. and Walsh, P.J. (2000). High ammonia tolerance in fishes of the family Batrachoididae (Toadfish and Midshipmen). Aquatic Toxicology, 50: 205-219.

Wieser, W. and Hinterleitner, S. (1980). Serum enzymes in Rainbow trout as tool in the diagnosis of water quality. Bullettin of Environmental Contamination and Toxicology, 25: 188.

Zhou, W.; Wang, G.; Han, Z.; Yao, W. and Zhu, W. (2009). Metabolism of flaxseed lignans in the rumen and its impact on ruminal metabolism and flora. Animal Feed Science and Technology, 150: 18-26.

Interactive effect of treatment with copper sulfate and formalin bath with nitrite and ammonia intoxication, on some biochemical parameters of blood serum of common carp

Molayemraftar, T.[1]; Peyghan, R.[2]; Razi jalali, M.[2] and Shahriari, A.[3]

Received: 31.10.2016 Accepted: 11.03.2017

Abstract

This study was performed in order to investigate the effect of treatment with copper sulfate and formalin bath in toxication with nitrite and ammonia, on some biochemical parameters of blood serum of common carp. In this study, 400 common carp were used to determine the lethal concentration of nitrite and ammonia and 360 fishes were used to investigate the interactions between drugs and poisoning. To investigate the interaction effects, fishrs were divided randomly to 12 treatments (each group contained 30 samples) and 3 replicates. The duration of the experiment was 96 hours. At the end of the experiment, total protein, glucose, cholesterol, AST, ALT, ALP and HDL were measured in blood serum. According to the results, the LC_{50} at 96 hours for ammonia and nitrite, were obtained 102.45 and 512.46 mg/l respectively. In the study of treatments, significant differences was observed in glucose, cholesterol, AST, ALT and HDL ($p<0.05$). But, no significant difference was observed in total protein and ALP ($p>0.05$). All the fish of ammonium + nitrite + copper sulfate treatment in 96 hours were experiencing mortality in the first few hours of the start of the experiment. The results showed that total protein between different treatments and control groups, had not significant difference ($p>0.05$). The measurement of serum enzymes, most changes were observed in the treatment of ammonia + nitrite + copper sulfate. Wholly, results indicate that the presence of nitrite and ammonia in water and treatment with formalin and copper sulfate at the same time, can cause mortality or a significant increase of some enzymes such as AST, ALT and LDH.

Key words: Ammonia, Nitrite, Biochemical parameters, Common carp

1- PhD Graduated of Fish Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

2- Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

3- Associate Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Corresponding Author: Molayemraftar, T., E-mail: taravat.fishery@gmail.com