Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics

Online ISSN: 2345-427X
Print ISSN: 2345-4288

The effect of microbiome containing *Nitrosomonas oligotropha* and *Nitrobacter winogradskyi* bacteria on the breeding of rainbow trout (*Onhorhynchus mykiss*)

Alireza Neissi[*1] | Gholamreza Rafiee[2] | Gholamreza Shahhosseini[3]

1. Corresponding Author, Assistant Prof., Dept. of Veterinary Animal Sciences, Nuclear Agricultural School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Atomic Energy Organization, Karaj, Iran. E-mail: aneissi@aeoi.org.ir
2. Professor, Dept. of Fisheries Sciences, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: grafiee@ut.ac.ir
3. Associate Prof., Dept. of Veterinary Animal Sciences, Nuclear Agricultural School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Atomic Energy Organization, Karaj, Iran. E-mail: gshahhosseini@aeoi.org.ir

Article Info

Article type:
Full Length Research Paper

Article history:
Received: 01.29.2022
Revised: 02.28.2022
Accepted: 03.14.2022

Keywords:
Ammonium and nitrite oxidizing bacteria,
Hematology and immunology indices,
Microbiome,
Rainbow trout,
Stress indices

ABSTRACT

The aim of this study was to use a microbiome enriched with ammonia and nitrite oxidizing bacteria in the rainbow trout RAS system. A bacterial microbiome containing *Nitrosomonas oligotropha* and *Nitrobacter winogradskyi* (PAN) was added to a rainbow trout culture system (50 g) in the Aquatic Laboratory of the Fisheries Department of the University of Tehran and its effect on hematological parameters (hemoglobulin, hematocrit, erythrocytes, white blood cells, MCV, MCHC, lymphocytes, monocytes, and neutrophils) and stress (cortisol and glucose) as well as water quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in a completely randomized design. In this experiment, a negative control (NC) group was also included for comparison with the experimental group. The results showed that by using PAN microbiome, the concentration of ammonia and nitrite produced was significantly reduced and as a result, this led to a reduction in stress and a reduction in immune suppression and improved growth. Therefore, the use of this bacterial group in improving the breeding system of rainbow trout is suggested by the rainbow trout breeding system.

Cite this article: Neissi, Alireza, Rafiee, Gholamreza, Shahhosseini, Gholamreza. 2022. The effect of microbiome containing *Nitrosomonas oligotropha* and *Nitrobacter winogradskyi* bacteria on the breeding of rainbow trout (*Onhorhynchus mykiss*). *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 11 (1), 81-95.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/japu.2022.19897.1630
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان

شاپا آنلاین: ۲۳۴۵-۴۲۷X
شاپا چاپی: ۲۳۴۵-۴۲۸۸

اثر میکروبیوم حاوی باکتری‌های *Nitrosomonas oligotropha* و *Nitrobacter winogradskyi* بر پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onhorhynchus mykiss*)

علیرضا نیسی*[۱] | غلامرضا رفیعی[۲] | غلامرضا شاه‌حسینی[۳]

۱. نویسنده مسئول، استادیار گروه دامپزشکی علوم دامی، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی، کرج- ایران. رایانامه: aneissi@aeoi.org.ir

۲. استاد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: grafiee@ut.ac.ir

۳. دانشیار گروه دامپزشکی علوم دامی، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی، کرج- ایران. رایانامه: gshahhosseini@aeoi.org.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۰۹
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۰/۱۲/۰۹
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۲۳

واژه‌های کلیدی:
استرس،
باکتری‌های تجزیه‌کننده آمونیوم و نیتریت،
شاخص‌های خون‌شناسی و ایمنی‌شناسی،
قزل‌آلای رنگین‌کمان،
میکروبیوم

چکیده

هدف از انجام این پژوهش، به‌کارگیری میکروبیوم غنی‌سازی‌شده با باکتری‌های تجزیه‌کننده آمونیاک و نیتریت در سیستم مداربسته قزل‌آلای رنگین‌کمان بود. مجموعه باکتریایی (PAN) حاوی *Nitrosomonas oligotropha* و *Nitrobacter winogradskyi* در یک سیستم مداربسته پرورش ماهی قزل‌آلا (۵۰ گرم) در آزمایشگاه آبزیان گروه شیلات دانشگاه تهران اضافه شد و اثر آن روی شاخص‌های خون‌شناسی (هموگلوبولین، هماتوکریت، گلبول قرمز، گلبول سفید، MCV، MCHC، لنفوسیت، مونوسیت و نوتروفیل)، ایمنی‌شناسی (لیزوزیم، ایمنوگلوبولین، کمپلمان و انفجار تنفسی) و شاخص‌های سنجش استرس (هورمون کورتیزول و گلوکز) و کیفیت آب پرورشی بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onhorhynchus mykiss*) در قالب یک طرح کاملاً تصادفی مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایش یک گروه کنترل منفی (NC) نیز برای مقایسه با گروه آزمایشی در نظر گرفته شد. نتایج نشان داد که با به‌کارگیری میکروبیوم PAN غلظت آمونیاک و نیتریت تولید شده به‌طور معنی‌داری کاهش و در نتیجه این منجر به کاهش استرس و کاهش سرکوب سیستم ایمنی و بهبود رشد شده است. بنابراین استفاده از این گروه باکتریایی در بهبود سیستم پرورشی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان برای سیستم پرورش قزل‌آلای رنگین‌کمان پیشنهاد می‌شود.

استناد: نیسی، علیرضا، رفیعی، غلامرضا، شاه‌حسینی، غلامرضا (۱۴۰۱). اثر میکروبیوم حاوی باکتری‌های *Nitrosomonas oligotropha* و *Nitrobacter winogradskyi* بر پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onhorhynchus mykiss*). *نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان*، ۱۱ (۱)، ۹۵-۸۱.

DOI: 10.22069/japu.2022.19897.1630

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

مقدمه

صنعت آبزی‌پروری در آب‌های داخلی یکی از پرمصرف‌ترین صنایع از نظر استفاده از منابع آبی است، (کلباسی و همکاران، ۲۰۱۳؛ عبدالله‌زاده و سالاری، ۲۰۱۳) و به نظر می‌رسد تعطیلی و یا تغییر کاربری بسیاری از کارگاه‌های پرورشی به دلیل عدم توان تأمین آب مصرفی در آینده نزدیک، چندان دور از انتظار نباشد، بنابراین نیاز به کاهش مصرف آب و استفاده مجدد از آن با یکسری اصلاحات در این بخش امری بسیار ضروری است. بدین سبب، پرورش ماهیان آب شیرین در یک سیستم مدار بسته از اهمیت زیادی برخوردار است (دکامپ و همکاران، ۲۰۰۲؛ رفیعی و سعد، ۲۰۱۰).

با توجه به این‌که معمولاً نیتروژن در پساب ناشی از آبزی‌پروری به شکل نیتروژن آلی یا یون‌هایی مانند NH_3^+-N، NO_2-N و NO_3-N موجود است (ریژان و ریورا، ۱۹۹۰). بنابراین استفاده مجدد از آب حاوی غلظت بالایی از این ترکیبات بالاخص NH_3^+-N و نیتریت برای پرورش ماهیان نامطلوب است (مالون و فیفر، ۲۰۰۶).

نیتریفیکاسیون فرآیندی است که در آن طی یک پروسه بیولوژیکی دو مرحله‌ای آمونیاک و نیتریت پساب با میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده آمونیاک (AOB) و نیتریت (NOB) حذف می‌شوند (فوسل و همکاران، ۲۰۰۷؛ چریر و همکاران، ۲۰۱۰؛ استفان و همکاران، ۱۹۹۶).

در سیستم‌های آبزی‌پروری گردشی (RASs) آب پس از اصلاحات مجدداً مورد استفاده قرار می‌گیرد (رزنتال و همکاران، ۱۹۸۶). این سیستم از اجزای مختلفی تشکیل شده است، که بخش بیوفیلترها بر مبنای فعالیت میکروارگانیسم‌ها است، که در میان آن‌ها باکتری‌های تجزیه‌کننده آمونیاک و نیتریت دارای اهمیت زیادتری هستند (کوهن، ۲۰۰۱).

از طرفی دمای رشد مناسب برای اغلب این میکروارگانیسم‌ها ۲۸ درجه سانتی‌گراد است (علوی و همکاران، ۲۰۰۷). از طرف دیگر ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onhorhynchus mykiss*) یکی از گونه‌های مهم سردابی است. بنابراین این میکروارگانیسم‌ها در سیستم‌های مدار بسته سردابی کارایی لازم را ندارند (اراکاوا و همکاران، ۲۰۰۸؛ تاوتاوو و همکاران، ۲۰۱۵). بنابراین تجزیه و حذف این ماده مضر از سیستم پرورش قزل‌آلای رنگین‌کمان در دمای پایین امری ضروری است.

دمای نگهداری یکی از مهم‌ترین پارامترهای تنظیم‌کننده فعالیت میکروارگانیسم‌ها است. به دلیل تأثیر دما در تمام واکنش‌های سلولی، سازگاری با نوسانات دما احتمالاً شایع‌ترین پاسخ است (بری و فوجدینگ، ۱۹۹۷). با این‌حال، حساسیت سلول به استرس سرمایی بستگی به عوامل متعددی از جمله درجه حرارت، سرعت کاهش دما، محیط کشت و مدت زمان نگهداری دارد. رشد میکروارگانیسم‌ها در دمای پایین می‌تواند با تعدادی از تغییرات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی شرح داده شود (راسل، ۲۰۰۲). باکتری‌های سرمادوست میکروارگانیسم‌هایی هستند که می‌توانند در دمای صفر درجه سانتی‌گراد، دمای مطلوب ۱۵ درجه سانتی‌گراد یا کم‌تر و درجه حرارت حداکثر ۲۰ درجه سانتی‌گراد رشد کنند (پریکات و ییلدینگ، ۱۹۹۰). سازگاری به تغییرات محیطی می‌تواند در راستای کمک به ارگانیسم‌ها در تنش‌های محیطی صورت گیرد. پس از کاهش دما، یک توقف موقت رشد سلولی به مدت ۳ تا ۶ ساعت اتفاق می‌افتد که این دوره فاز انطباق است. در مرحله تکامل، تولید اکثر پروتئین‌ها به جز پروتئین‌های قابل‌تحرک در سرما متوقف می‌شود (پولیسی، ۲۰۰۳). پس از مرحله تکامل، سلول‌ها با دمای پایین سازگار شده و رشد را از سر می‌گیرند، اما بیان پروتئین‌های

تولید شده در برابر سرما با سرعت بیش‌تری کاهش می‌یابد و سنتز پروتئین‌ها دوباره شروع می‌شود (فاتار، ۲۰۰٤).

دمای رشد مناسب برای اغلب گونه‌های AOB و NOBها ۲۸ درجه سانتی‌گراد است (علوی و همکاران، ۲۰۰۷) و با کاهش دما تعداد میکروارگانیسم‌های اکسیدکننده آمونیاک کاهش می‌یابد (علوی و همکاران، ۲۰۰۷). از این‌رو استفاده از سویه‌های باکتری‌های AOB و NOB مقاوم به سرما تا حد زیادی به حل این مشکل کمک می‌شود.

غنی‌سازی یا enrichment استفاده از محیط کشت‌های اختصاصی برای رشد یک و یا چند گروه میکروارگانیسم خاص نسبت به دیگر میکروارگانیسم‌ها است و با این روش غلظت نمونه میکروارگانیسم‌های موردنظر افزایش می‌یابد (چن و همکاران، ۲۰۰۵). این کار معمولاً با استفاده از مواد مغذی یا شرایط محیطی اپتیمم میکروارگانیسم مورد نظر انجام شده، به صورتی که رشد میکروارگانیسم موردنظر در رقابت با سایرین افزایش می‌یابد (کامیلوا و همکاران، ۲۰۰۵)، از غنی‌سازی برای افزایش کمی میروارگانیسم مورد نظر به سطوح قابل تشخیص استفاده می‌شود. این امر امکان استفاده از میکروارگانیسم‌ها برای اهداف مختلف را فراهم می‌آورد. غلظت بالای نمک برای هالوفیل‌ها (والرا و همکاران، ۱۹۸۰)، درجه حرارت بالا برای ترموفیل‌ها (استامز و همکاران ۱۹۹۲). براث یون سلنیت برای جداسازی گونه‌های سالمونلا (احمد، ۲۰۰۷) و محیط قلیایی پپتون برای کشت ویبریو استفاده می‌شود (لسمانا و همکاران، ۱۹۸۵). در مطالعه‌ای غنی‌سازی انتخابی از باکتری‌های اکسیدکننده نیتریت با موفقیت از ۹ خاک با دمای انکوباسیون ٤، ۱۰ و ۱۷ درجه سانتی‌گراد با استفاده از نیتریت ۰/۳ میلی‌مولار انجام شد (علوی و همکاران، ۲۰۰۷). هم‌چنین در پژوهشی دیگر از مجموعه باکتریایی نیتریفیکانت تجاری برای برای تقویت فرایند نیتریفیکاسیون در استخرهای آبزی‌پروری و آکواریوم‌ها استفاده شد. تأثیر دو مجموعه باکتریایی تجاری مختلف برای کاهش آمونیاک در واحدهای حمل و نقل ماهی زینتی زبرا استفاده شد. نتایج نشان داد که استفاده از این باکتری‌ها هنگام حمل و نقل می‌تواند با مهار تجمع آمونیاک کیفیت آب را به شدت بهبود بخشد (اناسیری و همکاران، ۲۰۱۱).

با توجه به کاهش فعالیت میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده آمونیاک و نیتریت و از طرفی افزایش غلظت آمونیوم و نیتریت در فصل‌های سرد سال، بازده پرورش ناشی از سمیت این ترکیبات افزایش می‌یابد، بنابراین هدف از انجام این پژوهش استفاده از مجموعه باکتری‌های غنی‌سازی شده تجزیه‌کننده آمونیاک و نیتریت مقاوم به سرما جهت بهبود کارایی پرورشی در یک سیستم مدار بسته قزل‌آلای رنگین‌کمان بود.

مواد و روش‌ها

غنی‌سازی مجموعه باکتریایی تجزیه‌کننده آمونیاک و نیتریت: در پاییز ۱۳۹۸، ۲ مجموعه باکتریایی غنی‌سازی‌شده با حدود ۲۲ درصد باکتری‌های *Nitrosomonas oligotropha* و حدود ٦/۲ درصد *Nitrobacter winogradskyi* مقاوم به سرما که با همکاری دانشگاه چالمرز سوئد غنی‌سازی‌شده بود (نیسی و همکاران، ۲۰۲۲)، به دانشکده شیلات دانشگاه تهران منتقل شد. در آزمایشگاه شیلات گروه شیلات دانشگاه تهران ۱۰ میلی‌لیتر از مجموعه غنی‌سازی‌شده با باکتری تجزیه‌کننده آمونیاک (*N. oligotropha*) به فلاسک‌های حاوی ٤۷۰ میلی‌لیتر از محیط کشت اختصاصی حاوی آمونیاک (Na_2HPO_4 13.5, KH2PO4 0.7, $MgSO_4.7H_2O$ 0.5, $FeCl_3.6H_2O$ 0.014, 0.1, $NaHCO_3$ $CaCl_2.2H_2O$ 0.18, $(NH_4)_2SO_4$ 0.5 گرم در لیتر و pH ۷/۲) و ۱۰ میلی لیتر از مجموعه غنی‌سازی شده

باکتری تجزیه‌کننده نیتریت *N. winogradskyi* به فلاسک‌های حاوی ٤٧٠ میلی‌لیتر از محیط کشت اختصاصی حاوی نیتریت (٠/٠٧ گرم $CaCO_3$، ٥ گرم NaCl، ٠/٥ گرم $MgSO_4.7\ H_2O$، ١/٥ گرم KH_2PO_4، ٠/٠١ مولار HCl، ٣٣/٨ میلی¬گرم $MnSO_4.H_2O$، ٤٩/٤ میلی‌گرم H_3BO_3، ٤٣/١ میلی‌گرم $ZnSO_4.7H_2O$، ٣٧/١ میلی¬گرم $(NH_4)\ 6Mo7O_{24}$، ٩٧٣ میلی‌گرم $FeSO_4.7H_2O$، ٢٥ میلی‌گرم $CuSO_4.5H_2O$، ٢ گرم $NaNO_2$، pH، ٨/٤) اضافه شد و در آن‌ها با درب‌های کتانی و کل بطری با فویل آلومینیومی (به‌علت عدم نور گریز بودن باکتری‌های اتوتروف تجزیه‌کننده آمونیاک و نیتریت) پوشانده شد و به انکوباتور شیکر دمای ١٥ درجه سانتی‌گراد با دور rpm١٧٠ منتقل شدند.

پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان: ٦٠ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان از نظر ظاهری سالم و فاقد هیچ‌گونه علائم بیماری و با میانگین وزن (٦٥/٨٩±٥٠/٣گرم) تهیه شدند و به آزمایشگاه آبزیان گروه شیلات دانشگاه تهران منتقل شدند. پس از یک هفته سازگاری تعداد ١٠ قطعه ماهی به ٦ مخزن ١٠٠٠ لیتری پرورش ماهی فایبرگلاس که هر کدام دارای یک سیستم تصفیه مجزا بود در قالب یک طرح کاملاً تصادفی منتقل شدند. آب از طریق پمپ کف مخزن از بالای هر مخزن به فیلتر حاوی ماسه شسته شده، پشم شیشه و ذرات اسفنجی ٢ سانتی مترمربع، منتقل و پس از تصفیه به داخل همان مخزن برگردانده می‌شد. هم‌چنین از یک سیستم هوادهی مرکزی برای هوادهی همه مخازن استفاده می‌شد. در مرحله بعد مجموعه‌های باکتریایی NO و NW انتخاب با نسبت ٢/٥ به ١ با هم مخلوط شدند (PAN) و به تعداد ٨×١٠^{٩} CFU در میلی‌لیتر به مخازن پرورشی منتقل شدند (ایروین و بیکر، ٢٠٠٧). یک گروه شاهد به‌عنوان گروه کنترل منفی بدون اضافه کردن باکتری به مخزن در نظر گرفته شد. دما ١٥ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول در شروع پژوهش ٩ ppm و pH ٦/٩ بود. تغذیه با خوراک تجاری به صورت روزانه و دو بار در روز صورت می‌گرفت. آمونیوم، نیتریت و نیترات به مدت ٩ روز در هر یک از این سیستم‌ها بررسی شد. هم‌چنین در طی این مدت میزان مرگ و میر هر واحد آزمایشی، در گروه‌های مختلف آزمایشی بررسی و محاسبه شد.

شاخص‌های خون‌شناسی و ایمنی‌شناسی: در انتهای دوره پرورشی (٩ روز) بعد از ٢٤ ساعت گرسنگی ٣ عدد ماهی مربوط به هریک از واحدهای آزمایشی به‌صورت کاملاً تصادفی صید شد. ابتدا ماهی‌ها با استفاده از پودر گل میخک بیهوش و کاملاً خشک شدند. خون‌گیری با استفاده از سرنگ هپارینه از ساقه دمی صورت گرفت. سپس به‌منظور جداسازی پلاسما نمونه‌های خون در rpm ٦٠٠٠ به مدت ٨ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پلاسما جداسازی شده با این روش تهیه و تا زمان سنجش پارامترهای مورد نظر، در دمای ٨٠- ^{o}C نگه‌داری شد.

پارامترهای شیمیایی (تری‌گلیسیرید، پروتئین، کلسترول و آلبومین و گلوکز پارس آزمون بر اساس دستورالعمل شرکت)، ایمنی‌شناسی (لیزوزیم، ایمنوگلوبولین، کمپلمان و انفجار تنفسی) (چانگ و سکومبز، ١٩٨٨؛ نیسی و همکاران، ١٣٩٤) و استرس (کورتیزول، اوج آزماپلاست بر اساس دستورالعمل شرکت) ماهی‌های هر واحد آزمایشی با روش اسپکتوفتومتری مورد سنجش قرار گرفت.

برای مطالعات خون‌شناسی، هم‌زمان با خون‌گیری گسترش خونی تهیه شده و پس از خشک شدن در معرض هوا توسط متانول تثبیت و درگیمسای ١٠ درصد به‌مدت ٤٥ دقیقه غوطه‌ور و رنگ‌آمیزی شد. از لام‌های تهیه شده در این مرحله برای شمارش افتراقی گلبول‌های سفید (لنفوسیت، مونوسیت،

نوتروفیل، ائوزینوفیل) استفاده گردید. هم‌چنین میزان هماتوکریت و هموگلوبولین در همه گروه‌های آزمایشی اندازه‌گیری شد. شاخص‌های خون‌شناسی شامل هموگلوبولین (کیت سنجش هموگلوبولین با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر، شرکت بهار افشان)، هماتوکریت (با استفاده از میکروسانتریفیوژ)، تعداد گلبول‌های قرمز و سفید (با استفاده از لام نئوبار) و سر آخر شاخص‌های MCV، MCH، MCHC با استفاده از رابطه‌های زیر اندازه‌گیری شدند (لی و همکاران، ۱۹۸۸).

$$\mathrm{MCV} = \mathrm{Ht} \times \frac{1000}{\mathrm{RBC}}$$

$$\mathrm{MCH} = \mathrm{Hb} \times \frac{10}{\mathrm{RBC}}$$

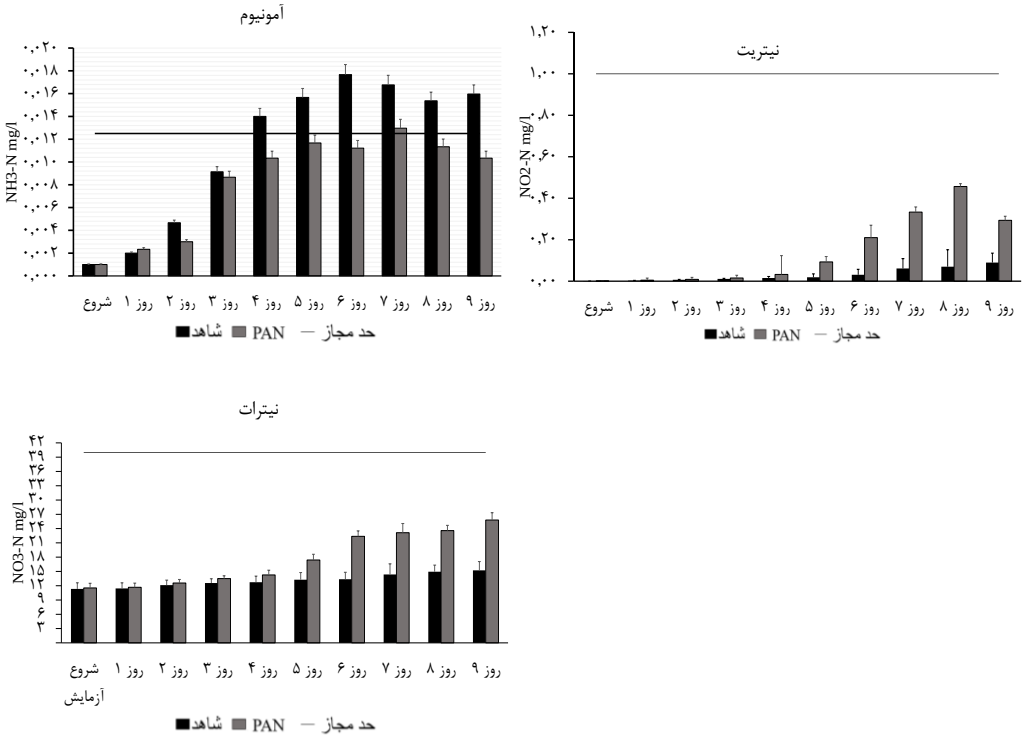
$$\mathrm{MCHC} = \frac{\mathrm{Hb}}{\mathrm{Ht}}$$

آنالیز آماری: نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگراف اسمیرنف بررسی شد. داده‌های درصدی پیش از انجام آنالیزها با آرک سین تبدیل شدند. برای مقایسه میانگین داده‌ها از تجزیه واریانس یک‌طرفه آنووا انجام و سطح معنی‌دار بودن در بین تیمارها از طریق آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد انجام گردید. تجزیه و تحلیل آماری به‌وسیله نرم‌افزار آماری SPSS ۱۷ در محیط ویندوز انجام شد و برای ترسیم نمودارها از نرم‌افزار اکسل، در محیط ویندوز استفاده شد.

نتایج

کیفیت آب پرورشی: نتایج این پژوهش نشان داد که روند میزان افزایش آمونیوم از روز اول تا روز ۸ ام آزمایش افزایشی می‌باشد. هم‌چنین این شاخص در تیمار آزمایشی که مجموعه باکتریایی PAN اضافه شده بود روند افزایشی نشان داد ولی این افزایش کمی ملایم‌تر از گروه شاهد بود. در واقع عملکرد گروه PAN برای حذف آمونیوم تولید شده از گروه کنترل منفی بیش‌تر بود که این به‌نظر می‌رسد به‌علت تأثیر مجموعه حاوی باکتری *Nirosomonas* می‌باشد (شکل ۱).

نتایج روند بسیار افزایشی نیتریت را در تیمار آزمایشی در مقایسه با گروه شاهد نشان داد. ولی این افزایش در هیچ‌کدام از گروه‌های شاهد و تیمار آزمایشی به نقطه بحرانی نرسید. افزایش میزان نیتریت در تیمار آزمایشی نشانه عملکرد مناسب مجموعه باکتریایی AOB بود (شکل ۱). نتایج نشان می‌دهد میزان نیترات در هر ۲ گروه میزان افزایشی بوده است. ولی این افزایش در تیمار آزمایشی حاوی مجموعه باکتریایی دارای افزایش بیش‌تری بود که این روند با توجه به این‌که این گروه دارای مجموعه باکتریایی که حاوی باکتری‌های تجزیه‌کننده نیتریت است منطقی به‌نظر می‌رسد (شکل ۱). نتایج این پژوهش اثبات کرد که استفاده از مجموعه‌های باکتریایی تجزیه‌کننده آمونیاک و نیتریت منجر به عملکرد مناسب در حذف آمونیاک و نیتریت شده است (شکل ۱). سایر شاخص‌های کیفی آب از جمله اکسیژن محلول، pH و دما بین گروه‌های مختلف اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (جدول ۱).



شکل ۱- غلظت روزانه آمونیوم، نیتریت و نیترات آب در گروه‌های مختلف آزمایشی (PAN و شاهد) در سیستم پرورشی قزل‌آلای رنگین‌کمان در طی دوره پرورش ۹ روز.

جدول ۱- میانگین شاخص‌های کیفی (اکسیژن محلول، pH، دما) آب در گروه‌های مختلف آزمایشی (PAN و شاهد یا کنترل منفی) در سیستم پرورشی قزل‌آلای رنگین‌کمان در دوره پرورش ۹ روز.

	دما (°C)	pH	اکسیژن محلول ($mg\ l^{-1}$)
شاهد	۱/۱۷±۱٤/۱۵	۰/۰۹±٦/۸۵	۲/۱۲±۸/٦۵
PAN	۱/۰۹±۱٤/۲۰	۰/۱۲±٦/٦۵	۲/۳۹±۸/۲۲

افزایش وزن و بقا: نتایج این پژوهش نشان داد که میزان افزایش وزن در طی ۹ روز در گروه PAN بیش‌تر از گروه شاهد بود که این میزان از نظر آماری معنی‌دار بود. میزان بازماندگی مربوط به گروه PAN بیش‌تر از شاهد بود (جدول ۲).

جدول ۲- وزن ابتدایی، وزن نهایی و بازماندگی در گروه‌های مختلف آزمایشی PAN و شاهد یا کنترل منفی (در سیستم پرورشی قزل‌آلای رنگین‌کمان).

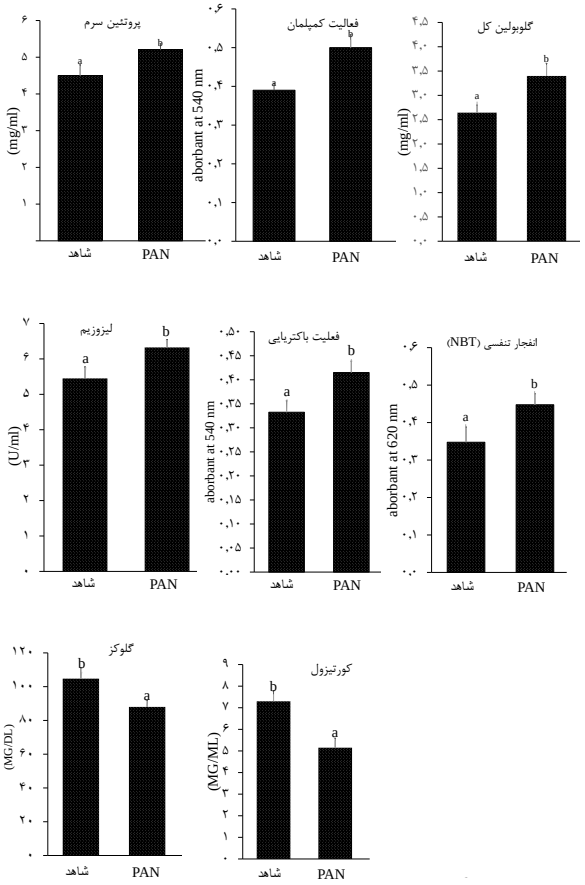
	بازماندگی	وزن نهایی	وزن ابتدایی	درصد افزایش وزن	شاخص ویژه رشد
شاهد	٦/۲۱±۷۲/۲۵[a]	٦/۳۹±۵۷/۷۵[a]	۳/۸۹±۵۰/٦۵	۵/٤۱±۱٤/۰۱۷	۰/۱۵±۱/٤۵
PAN	۵/۲۹±۹۷/۵[b]	۲/٦۲±٦٤/۲۵[b]	۳/۸۹±۵۰/٦۵	٦/٦۷±۲٦/۸۵	۰/۲۱±۲/٦٤

شاخص‌های خونی: نتایج شاخص‌های خونی نشان داد که هموگلوبولین، MCV، درصد MCHC و هماتوکریت در گروه شاهد از گروه آزمایشی بیش‌تر بود. گلبول قرمز و سفید اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (جدول ۳). نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین درصد گلبول‌های سفید در خون ماهی‌های گروه‌های مختلف وجود ندارد. میزان لنفوسیت، مونوسیت، و نوتروفیل در بین گروه‌های مختلف اختلافی نشان نداد. ائوزینوفیل در هیچ یک از گروه‌های مختلف ملاحظه نشد (جدول ۳).

جدول ۳- شاخص‌های خون‌شناسی در گروه PAN و کنترل منفی در سیستم پرورشی قزل‌آلای رنگین‌کمان.

	هموگلوبولین	هماتوکریت	گلبول قرمز * (10^6/µl)	گلبول سفید (µl)	MCV (fl)	درصد MCHC	درصد لنفوسیت	درصد مونوسیت	درصد نوتروفیل
شاهد	۲/۲۱±۶۳/۷۵^b	۱/۲۹±۴۰/۵^b	۰/۰۳±۱/۲۴	۱۸۸/۲۴±۷۲۵۴/۲۵^a	۱۲/۵۹±۳۱۸/۶۸^b	۱/۴۵±۵۱/۴۱^b	۳/۵۶±۸۲/۸۲	۰/۱۲±۳/۵۶	۰/۴۳±۱۳/۴۱
PAN	۱/۱±۵۹/۵^a	۰/۵±۳۷/۲۵^a	۰/۰۴±۱/۲۳	۱۲۸/۴۹±۷۳۵۹^b	۱۱/۷۷±۳۰۲/۵۰^a	۱/۷۵±۴۸/۳۱^a	۳/۴۰±۸۲/۶	۰/۲۱±۳/۴۰	۰/۵۲±۱۴/۰۰

شاخص‌های بیوشیمیایی، ایمنی‌شناسی و استرس: پروتئین کل پلاسما در گروه شاهد کم‌تر بود که این به نسبت گروه‌های دیگر از نظر آماری معنی‌دار بود. نتایج نشان می‌دهد که میزان پروتئین پلاسما در طی آزمایش به نسبت شروع این آزمایش کاهش یافته است که کم‌ترین میزان کاهش مربوط به گروه PAN است. این گروه در رابطه با شاخص پروتئین پلاسما در انتهای آزمایش تفاوت معنی‌داری با ابتدای آزمایش نداشت. بیش‌ترین فعالیت کمپلمان مربوط به گروه PAN بود. کم‌ترین میزان این شاخص مربوط به گروه شاهد بود. فعالیت کمپلمان در گروه PAN نسبت به ابتدای آزمایش اختلاف آماری نشان نداد. نتایج نشان داد که گلوبولین کل در گروه PAN نسبت به شاهد بیش‌تر بود. بیش‌ترین میزان این شاخص مربوط به شروع آزمایش بود که اختلاف آماری معنی‌داری با گروه PAN نداشت. میزان لیزوزیم در گروه شاهد نسبت به گروه دیگر کم‌ترین میزان را نشان داد. فعالیت باکتریایی در گروه شاهد کم‌ترین میزان را نشان داد. بیش‌ترین و کم‌ترین میزان اختلاف آماری معنی‌دار به‌ترتیب مربوط به شروع آزمایش و گروه شاهد بودند. بین ابتدای آزمایش و گروه PAN این شاخص کاهش یافته بود ولی اختلاف آماری معنی‌داری بین این دو گروه ملاحظه نشد. شاخص انفجار تنفسی (NBT) در گروه شاهد کم‌ترین میزان را نشان داد. بیش‌ترین میزان معنی‌دار مربوط به شروع آزمایش و کم‌ترین آن مربوط گروه شاهد بود. بین ابتدای آزمایش و گروه PAN این شاخص کاهش یافته بود ولی اختلاف آماری معنی‌داری بین این دو گروه ملاحظه نشد. گلوکز بیش‌ترین میزان را در گروه شاهد نشان داد و کم‌ترین این شاخص مربوط به شروع آزمایش بود. کم‌ترین میزان این شاخص مربوط به گروه شاهد و PAN بود که بین این ۲ گروه اختلاف آماری معنی‌داری ملاحظه نشد. کورتیزول نیز در گروه شاهد بیش‌ترین میزان را نشان داد.



شکل ۲- شاخص‌های بیوشیمیایی، ایمنی‌شناسی و استرس در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تحت تیمار با میکروبیوم باکتریایی غنی‌سازی‌شده با باکتری‌های AOB و NOB.

بحث

منابع استرس محیطی را می‌توان به‌طور گسترده‌ای به حاد (غلظت زیاد) و مزمن (مدت زمان طولانی، غلظت کم) تقسیم کرد. در استرس مزمن، هنگامی که سطح کورتیزول بالا می‌رود، انرژی بدن از طریق افزایش گلوکز بالا رفته و ایمنی ذاتی سرکوب می‌شود (ترورت، ۲۰۱۱) استرسورها مانند آمونیوم و نیتریت باعث ایجاد شوک سیستمیک می‌شوند (ترورت، ۲۰۱۱).

آمونیاک منجر به کاهش رشد، فرسایش بافت (کلیه، آبشش و پوست) و دژنراسیون، سرکوب سیستم ایمنی بدن و مرگ و میر زیاد ماهی شده و در نتیجه منجر به تجمع مقادیر زیاد آمونیاک در مایعات بدن موجودات آبزی می‌گردد (دینگ و همکاران، ۲۰۱۷). بنابراین ضروری است که گزینه‌های طبیعی‌تر، پایدار و محیطی بی‌خطر برای کمک به کاهش استرس و بیماری آن شناسایی شوند. در این پژوهش در بین آمونیوم نیتریت و نیترات دز آمونیوم در بین گروه‌های آزمایشی بیش‌تر از بقیه بود، که این غلظت در گروه شاهد بیش‌تر از گروه دیگرا بود. در واقع می‌توان بیان کرد که در مطالعه حاضر، گروه‌های مختلف تحت استرس محیطی آمونیوم بودند.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که در پایان آزمایش سطح گلوکز و کورتیزول در تیمار آزمایشی PAN پایین‌تر از گروه کنترل بود. این نتیجه نشان

می‌دهد که ماهی در گروه تحت تیمار آزمایشی PAN تنش محیطی کم‌تری را تجربه کرده است. با توجه به این‌که رشد پاتوژن‌های فرصت‌طلب در شرایط استرس افزایش می‌یابد (سگنر و همکاران، ۲۰۱۲). که این به‌طور معمول می‌تواند منجر به پاسخ سیستم ایمنی بدن گردد. بنابراین، پاسخ ایمنی ذاتی گروه‌های تحت تیمار در مقایسه با گروه کنترل بررسی شد. نتایج نشان داد که در پایان آزمایش کل پروتئین پلاسما، گلوبولین کل، فعالیت مکمل، لیزوزیم، فعالیت انفجار تنفسی و فعالیت باکتریایی در گروه کنترل کم‌تر از گروه PAN بود، که این تأییدکننده این موضوع است که گروه تحت تیمار میکروبیوم PAN تحت استرس کم‌تری بوده است.

آمونیاک یکی از آلاینده‌های مهم زیست‌محیطی در پرورش ماهی به‌خصوص در سیستم‌های مداربسته است، (رویت و همکاران، ۱۹۹۵). از نظر پارامترهای کیفیت آب که بر سلامت ماهی تأثیر می‌گذارد، آمونیاک مهم‌ترین است، به‌خصوص در سیستم‌های پرورشی متراکم، می‌تواند باعث استرس شدید شود (راما و مانجابات، ۲۰۱٤). این ماده می‌تواند از منابع مختلفی مانند فاضلاب، پسماندهای صنعتی، رواناب کشاورزی و تجزیه پسماندهای بیولوژیکی وارد بدنه آب شود (راندال و سویی، ۲۰۰۲؛ سینا و همکاران ۲۰۱۲). هم‌چنین تجمع آمونیاک در آب ممکن است ناشی از تجزیه باکتریایی مواد غذایی باقی‌مانده باشد (لانگ و همکاران، ۱۹۸۷).

آمونیاک غیریونیزه به دلیل حلالیت در لیپیدها، به‌راحتی می‌تواند در غشاهای آبشش تجمع یابد (بنیل و اوزول، ۲۰۰۸؛ سووبودا، ۱۹۹۳؛ لین و چن، ۲۰۰۱) و باعث غلظت بسیار بالای آن در مایعات بدن شود (ادی، ۲۰۰۵). علاوه بر این، افزایش غلظت آمونیاک در آب مخازن پرورشی می‌تواند باعث برهم خوردن تنظیم اسمزی، کاهش رشد ماهی، تخریب بافت و دژنراسیون، افزایش کورتیزول و سرانجام سرکوب سیستم ایمنی و مرگ و میر بالا گردد (بنلی و همکاران، ۲۰۰۸؛ لی و همکاران، ۲۰۱٤).

با توجه به این‌که مقدار بالای آمونیاک از نظر فیزیولوژیکی برای آبزیان مضر است (بنلی و همکاران، ۲۰۰۸؛ لی و همکاران، ۲۰۱٤)، و با افزایش غلظت اکسیژن فعال (ROS) می‌تواند باعث ایجاد استرس اکسیداتیو در ارگانیسم‌ها شود (مورتی و همکاران، ۲۰۰۱). تولید بیش از حد ROS می‌تواند به مولکول‌های زیستی مهم، مانند DNA، پروتئین‌ها و لیپیدها آسیب وارد کند و یک زنجیره‌ای از حوادث را آغاز کند و عملکرد سلول را مختل کند (سوزوکی و همکاران، ۲۰۰۲). افزایش استرس فراتر از توانایی سلول‌ها برای مقابله با آن‌ها ممکن است منجر به اختلال در سیگنال‌دهی سلول، آسیب گسترده به DNA و آپوپتوز سلول شود (چاندرا و همکاران، ۲۰۰۰؛ گائو و همکاران، ۲۰۱۳). آسیب DNA و فعال شدن P53 متعاقباً منجر به مرگ سلول‌های آپوپتوز از طریق یک مسیر هسته‌ای می‌شود (لوئیزو و همکاران، ۲۰۱۳).

گزارش شده است که استرس آمونیاک می‌تواند به‌طور مستقیم باعث آسیب DNA و آپوپتوز در سلول‌ها شود (سوزوکی و همکاران، ۲۰۰۲). با این‌حال، تحت فشارهای محیطی، در مقادیر اندک، آمونیاک باعث ایجاد استرس و صدمه به آبشش و تعادل بین تولید ROS و در نتیجه اختلال دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌شود (راما و مانجابت، ۲۰۱٤). در مطالعه‌ای سطح ROS پس از قرار گرفتن در معرض آمونیاک به‌طور قابل‌توجهی افزایش یافت، که این نشان می‌دهد که افزایش تعداد سلول‌های آپوپتوتیک پس از قرار گرفتن در معرض آمونیاک با تولید بیش از حد ROS مرتبط است (چنگ و همکاران، ۲۰۱۵). در پژوهش حاضر با افزایش آمونیاک در تیمار شاهد

استرس افزایش و این منجر به سرکوب سیستم ایمنی شده که به‌نظر می‌آید افزایش استرس ناشی از بهم خوردن سیستم اسمزی در نتیجه تخریب آبشش با بالا بودن مقدار آمونیاک بوده است. با توجه به این‌که بافت آبشش و سایر بافت‌های مهم در تنظیم اسمزی در این مطالعه مورد بررسی قرار نگرفته است بنابراین برای اثبات این موضوع نیاز به بررسی بیش‌تر می‌باشد.

نتایج پژوهشگران نشان می‌دهد که سطح گلوکز و لاکتات در پلاسما به‌شدت تحت‌تأثیر استرس آمونیوم است (کویی و همکاران، ۲۰۱۷)، این موضوع نشان می‌دهد با افزایش مصرف کربوهیدرات‌ها به دلیل افزایش تقاضای انرژی در سطوح بالای آمونیاک رخ می‌دهد که این با میزان افزایش بیش‌تر گلوکز در گروه شاهد پژوهش حاضر همخوانی دارد. در مطالعه‌ای، هموگلوبین در گربه‌ماهی در معرض ماهی آمونیاک کم نسبت به آمونیاک بالا کم‌تر بود (لی و همکاران، ۲۰۱٤). از آن‌جا که سمیت آمونیاک ممکن است باعث افزایش سریع ROS شود و منجر به آسیب سلول‌های خون شود (لماری و همکاران، ۲۰۰٤) و در نتیجه افزایش هموگلوبولین اتفاق می‌یافتد که این با افزایش برخی شاخص‌های خون‌شناسی این پژوهش در گروه شاهد همپوشانی دارد. آمونیاک می‌تواند بر سیستم ایمونولوژیک و بافت‌شناسی تأثیر داشته باشد (جانسون و همکاران، ۲۰۰۰؛ رمانو و زنگ، ۲۰۱۰). که این تأثیرات می‌تواند بر پاسخ‌های ایمنی و پیشرفت بیماری‌ها ارتباط نزدیکی داشته باشد (الیس و همکاران ۲۰۱۱؛ رمانو و زنگ، ۲۰۱۰).

پژوهشگران گزارش دادند که قرار گرفتن میگوی بزرگ آب شیرین *Macrobrachium rosenbergii* در معرض آمونیاک بالا منجر به افزایش حساسیت به دو انتروکوکوس (چنگ و چن، ۲۰۰۲) و لاکتوکوکوس گراویه (چنگ و همکاران، ۲۰۰۳)، به‌علت کاهش پاسخ‌های ایمنی می‌شود. در واقع در این پژوهش با استفاده از باکتری‌های اتوتروف تجزیه‌کننده آمونیوم و نیتریت میزان استرس و سیستم ایمنی در وضعیت بهتری در مقایسه گروه شاهد قرار داشت، که به‌نظر می‌رسد این به‌دلیل کاهش آمونیاک در گروه آزمایشی است.

ماهی‌هایی که به مرور زمان در معرض غلظت کم آمونیاک قرار دارند، مستعد ابتلا به عفونت‌های باکتریایی هستند، و رشد ضعیفی دارند و تحمل لازم را ندارند و مقادیر زیاد آمونیاک باعث استرس شدید و منجر به اختلال در تنظیم فشار خون، آسیب به کلیه‌ها و اپیتلیوم شاخه‌ای (مید، ۱۹۸۵). کاهش رشد به‌دلیل قرار گرفتن در معرض غلظت بالای آمونیاک در چندین گونه ماهی wolffish خالخالی (فروس و همکاران، ۲۰۰۳)، ماهی turbot (فاس و همکاران، ۲۰۰۹) و هالیبوت (پاست و همکاران، ۲۰۱۱) گزارش شده است، نتایج این پژوهش‌ها با رشد پایین در گروه شاهد در مقایسه با گروه اتوتروف با مقدار کم‌تر آمونیاک همپوشانی دارد.

هنگامی که ماهی در معرض غلظت بالای آمونیاک قرار دارد، تعدادی از عوامل سرکوب‌کننده سیستم ایمنی ایجاد می‌شود و به جریان خون رها می‌شود (کیم و همکاران، ۲۰۱۵؛ موک و پیترز، ۱۹۹۰). این به‌طور معمول منجر به کاهش لنفوسیت‌ها و فاگوسیت‌ها و پاسخ ایمنی می‌شود (موک و پیترز، ۱۹۹۰). در مطالعه‌ای، روی گربه‌ماهی فعالیت لیزوزیم، شاخص فاگوسیتیک، انفجار تنفسی و میزان کل ایمونوگلوبولین ماهی در معرض غلظت بالای آمونیاک کم‌تر از ماهی‌های در معرض آمونیاک کم بود (لی و همکاران، ۲۰۱٤)، هم‌چنین همین اتفاق در یافته های مربوط به تیلاپیا *Oreochromis niloticus* افتاد (چن و همکاران، ۲۰۱۱). در مطالعه فوق نیز سرکوب سیستم ایمنی در گروه با غلظت بالای آمونیاک در مقایسه با گروه PAN اتفاق افتاده بود که با پژوهش‌های بالا همپوشانی دارد.

با توجه به تلفات و بررسی می‌توان نتیجه‌گیری کرد که در نتیجه به‌کارگیری میکروبیوم PAN غلظت آمونیاک کاهش و در نتیجه این منجر به کاهش استرس و کاهش سرکوب سیستم ایمنی در مقایسه با گروه شاهد شده است. این شرایط باعث می‌شود که بدن انرژی خود را بیش‌تر صرف رشد کند به‌طوری‌که اگرچه مدت زمان پرورش کوتاه بود ولی استفاده از میکروبیوم PAN اثر خوبی روی شاخص‌های رشد داشت. بنابراین با توجه نقش کاهش آمونیاک با استفاده از این گروه باکتریایی در بهبود سیستم پرورشی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان استفاده از این میکروبیوم و یا میکروبیوم‌های مشابه برای سیستم پرورش قزل‌آلای رنگین‌کمان پیشنهاد می‌شود.

منابع

Alawi, M., Lipski, A., Sanders, T., and Spieck, E. 2007. Cultivation of a novel cold-adapted nitrite oxidizing betaproteobacterium from the Siberian Arctic. ISME J. 1: 3. 256-264.

Benli, A.Ç.K., Köksal, G., and Özkul, A. 2008. Sublethal ammonia exposure of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.): effects on gill, liver and kidney histology. Chemosphere. 72: 9. 1355-1358.

Berry, E.D., and Foegeding, P.M. 1997. Cold temperature adaptation and growth of microorganisms. J. Food Prot. 60: 12. 1583-1594.

Chandra, J., Samali, A., and Orrenius, S. 2000. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. Free Radical Biology and Medicine. 29: 3-4. 323-333.

Chen, J., Zhang, X., Hu, G., Qu, J., Fan, L., and Song, C. 2011. The immune response of GIFT Oreochromis niloticus and its susceptibility to Streptococcus iniae under stress in different ammonia. Ecology and Environmental Sciences. 20: 4. 629-634.

Chen, Y.S., Yanagida, F., and Shinohara, T. 2005. Isolation and identification of lactic acid bacteria from soil using an enrichment procedure. Letters in applied microbiology. 40: 3. 195-200.

Cheng, C.H., Yang, F.F., Ling, R.Z., Liao, S.A., Miao, Y.T., Ye, C.X., and Wang, A.L. 2015. Effects of ammonia exposure on apoptosis, oxidative stress and immune response in pufferfish (*Takifugu obscurus*). Aquatic toxicology. 164: 61-71.

Cheng, W., and Chen, J.C. 2002. The virulence of Enterococcus to freshwater prawn Macrobrachium rosenbergii and its immune resistance under ammonia stress. Fish & shellfish immunology. 12: 2. 97-109.

Cheng, W., Chen, S.M., Wang, F.I., Hsu, P.I., Liu, C.H., and Chen, J.C. 2003. Effects of temperature, pH, salinity and ammonia on the phagocytic activity and clearance efficiency of giant freshwater prawn Macrobrachium rosenbergii to Lactococcus garvieae. Aquaculture. 219: 1-4. 111-121.

Chung, S., and Secombes, C. 1988. Analysis of events occurring within teleost macrophages during the respiratory burst. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 89: 3. 539-544.

Cohen, Y. 2001. Biofiltration–the treatment of fluids by microorganisms immobilized into the filter bedding material: a review. Bioresource technology. 77: 3. 257-274.

Cui, Y., Ren, X., Li, J., Zhai, Q., Feng, Y., Xu, Y., and Ma, L. 2017. Effects of ammonia-N stress on metabolic and immune function via the neuroendocrine system in Litopenaeus vannamei. Fish & shellfish immunology. 64: 270-275.

Decamp, O., Conquest, L., Forster, I., and Tacon, A. 2002. The nutrition and feeding of marine shrimp within zero-water exchange aquaculture production systems: role of eukaryotic microorganisms. In: World Aquaculture Society: Microbial approaches to aquatic

nutrition within environmentally sound aquaculture production systems.

Ding, Z., Kong, Y., Zhang, Y., Li, J., Cao, F., Zhou, J., and Ye, J. 2017. Effect of feeding frequency on growth, body composition, antioxidant status and mRNA expression of immunodependent genes before or after ammonia-N stress in juvenile oriental river prawn, Macrobrachium nipponense. Fish & shellfish immunology. 68: 428-434.

Eddy, F. 2005. Ammonia in estuaries and effects on fish. J. Fish Biol. 67: 6. 1495-1513.

Ellis, R., Parry, H., Spicer, J., Hutchinson, T., Pipe, R., and Widdicombe, S. 2011. Immunological function in marine invertebrates: responses to environmental perturbation. Fish & shellfish immunology. 30: 6. 1209-1222.

Foesel, B.U., Gieseke, A., Schwermer, C., Stief, P., Koch, L., Cytryn, E., ... Drake, H.L. 2007. Nitrosomonas Nm143-like ammonia oxidizers and Nitrospira marina-like nitrite oxidizers dominate the nitrifier community in a marine aquaculture biofilm. FEMS microbiology ecology. 63: 2. 192-204.

Foss, A., Evensen, T.H., Vollen, T., and Øiestad, V. 2003. Effects of chronic ammonia exposure on growth and food conversion efficiency in juvenile spotted wolffish. Aquaculture. 228: 1-4. 215-224.

Foss, A., Imsland, A.K., Roth, B., Schram, E., and Stefansson, S.O. 2009. Effects of chronic and periodic exposure to ammonia on growth and blood physiology in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). Aquaculture. 296: 1-2. 45-50.

Gao, D., Zhang, X., Zhu, C., Wang, Y., and Min, W. 2013. Cadmium triggers kidney cell apoptosis of purse red common carp (Cyprinus carpio) without caspase-8 activation. Developmental & Comparative Immunology. 41: 4. 728-737.

Hegazi, M.M., Attia, Z.I., and Ashour, O.A. 2010. Oxidative stress and antioxidant enzymes in liver and white muscle of Nile tilapia juveniles in chronic ammonia exposure. Aquatic toxicology. 99: 2. 118-125.

Johansson, M.W., Keyser, P., Sritunyalucksana, K., and Söderhäll, K. 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. Aquaculture. 191: 1-3. 45-52.

Kalbassi, M.R., Abdollahzadeh, E., and Salari-Joo, H. 2013. A review on aquaculture development in Iran. Ecopersia. 1: 2. 159-178.

Kim, S.H., Kim, J.H., Park, M.A., Hwang, S.D., and Kang, J.C. 2015. The toxic effects of ammonia exposure on antioxidant and immune responses in Rockfish, Sebastes schlegelii during thermal stress. Environmental toxicology and pharmacology. 40: 3. 954-959.

Lang, T., Peters, G., Hoffmann, R., and Meyer, E. 1987. Experimental investigations on the toxicity of ammonia: effects on ventilation frequency, growth, epidermal mucous cells, and gill structure of rainbow trout Salmo gairdneri. Diseases of aquatic organisms (3).

Lemarié, G., Dosdat, A., Coves, D., Dutto, G., Gasset, E., and Person-Le Ruyet, J. 2004. Effect of chronic ammonia exposure on growth of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. Aquaculture. 229: 1-4. 479-491.

Li, B., Irvin, S., and Baker, K. 2007. The variation of nitrifying bacterial population sizes in a sequencing batch reactor (SBR) treating low, mid, high concentrated synthetic wastewater. J. Environ. Engin. Sci. 6: 6. 651-663.

Li, M., Yu, N., Qin, J. G., Li, E., Du, Z., and Chen, L. 2014. Effects of ammonia stress, dietary linseed oil and Edwardsiella ictaluri challenge on juvenile darkbarbel catfish Pelteobagrus vachelli. Fish & shellfish immunology. 38: 1. 158-165.

Lin, Y.C., and Chen, J.C. 2001. Acute toxicity of ammonia on Litopenaeus vannamei Boone juveniles at different salinity levels. J. Exp. Marin. Biol. Ecol. 259: 1. 109-119.

Luzio, A., Monteiro, S.M., Fontaínhas-Fernandes, A.A., Pinto-Carnide, O., Matos, M., and Coimbra, A.M. 2013. Copper induced upregulation of

apoptosis related genes in zebrafish (*Danio rerio*) gill. Aquatic toxicology. 128: 183-189.

Malone, R.F., and Pfeiffer, T.J. 2006. Rating fixed film nitrifying biofilters used in recirculating aquaculture systems. Aquacultural Engineering. 34: 3. 389-402.

Meade, J.W. 1985. Allowable ammonia for fish culture. The Progressive Fish-Culturist. 47: 3. 135-145.

Möck, A., and Peters, G. 1990. Lysozyme activity in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum), stressed by handling, transport and water pollution. J. Fish Biol. 37: 6. 873-885.

Murthy, C.R., Rama Rao, K., Bai, G., and Norenberg, M.D. 2001. Ammonia-induced production of free radicals in primary cultures of rat astrocytes. J. Neurosci. Res. 66: 2. 282-288.

Neissi, A., Rafiee, G., Nematollahi, M., and Razavi, S.H. 2015. The impact of diet containing canthaxanthin extracted from *Dietzia natronolimnaea* -HS1 bacteria on growth and non-specific immune responses improvement of Green Terror, *Aequidens rivulatus* (Günther, 1860). J. Appl. Ichthyol. Res. 3: 3. 95-106.

Neissi, A., Rafiee, G., Rahimi, S., Farahmand, H., Pandit, S., and Mijakovic, I. 2022. Enriched Microbial Communities for Ammonium and Nitrite Removal from Recirculating Aquaculture Systems. Chemosphere, accepted.

Paust, L.O., Foss, A., and Imsland, A.K. 2011. Effects of chronic and periodic exposure to ammonia on growth, food conversion efficiency and blood physiology in juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). Aquaculture. 315: 3-4. 400-406.

Person-Le Ruyet, J., Chartois, H., and Quemener, L. 1995. Comparative acute ammonia toxicity in marine fish and plasma ammonia response. Aquaculture. 136: 1-2. 181-194.

Phadtare, S. 2004. Recent developments in bacterial cold-shock response. Current issues in molecular biology. 6: 2. 125-136.

Pinto, W., Aragão, C., Soares, F., Dinis, M. T., and Conceição, L.E. 2007. Growth, stress response and free amino acid levels in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858) chronically exposed to exogenous ammonia. Aquaculture research. 38: 11. 1198-1204.

Polissi, A., De Laurentis, W., Zangrossi, S., Briani, F., Longhi, V., Pesole, G., and Dehò, G. 2003. Changes in Escherichia coli transcriptome during acclimatization at low temperature. Research in microbiology. 154: 8. 573-580.

Prescott, J.F., and Yielding, K.M. 1990. In vitro susceptibility of selected veterinary bacterial pathogens to ciprofloxacin, enrofloxacin and norfloxacin. Can. J. Vet. Res. 54: 1. 195.

Rafiee, G., and Saad, C.R. 2010. The effect of natural zeolite (clinoptiolite) on aquaponic production of red tilapia (*Oreochromis* sp.) and lettuce (*Lactuca sativa* var. Longifolia), and improvement of water quality. J. Agric. Sci. Technol. 8: 313-322.

Rama, S., and Manjabhat, S.N. 2014. Protective effect of shrimp carotenoids against ammonia stress in common carp, Cyprinus carpio. Ecotoxicology and environmental safety. 107: 207-213.

Randall, D.J., and Tsui, T. 2002. Ammonia toxicity in fish. Marine pollution bulletin. 45: 1-12. 17-23.

Romano, N., and Zeng, C. 2010. Changes to the histological gill structure and haemolymph composition of early blue swimmer crab Portunus pelagicus juveniles during elevated ammonia-N exposure and the post-exposure recovery. Aquaculture research. 41: 4. 468-480.

Rosenthal, H., Castell, J.D., Chiba, K., Forster, J.R.M., Hilge, V., Hogendoorn, H., ... Wickins, J. 1986. Flow-through and recirculation systems. EIFAC. 100.

Russell, N.J. 2002. Bacterial membranes: the effects of chill storage and food processing. An overview. Inter. J. Food Microbiol. 79(1): 27-34 .

Schreier, H.J., Mirzoyan, N., and Saito, K. 2010. Microbial diversity of biological filters in recirculating aquaculture systems. Current opinion in biotechnology. 21: 3. 318-325.

Segner, H., Sundh, H., Buchmann, K., Douxfils, J., Sundell, K.S., Mathieu, C., ... Vaughan, L. 2012. Health of farmed fish: its relation to fish welfare and its utility as welfare indicator. Fish physiology and biochemistry. 38: 1. 85-105.

Sinha, A.K., Liew, H.J., Diricx, M., Kumar, V., Darras, V.M., Blust, R., and De Boeck, G. 2012. Combined effects of high environmental ammonia, starvation and exercise on hormonal and ion-regulatory response in goldfish (*Carassius auratus* L.). Aquatic toxicology. 114: 153-164.

Stephen, J.R., McCaig, A.E., Smith, Z., Prosser, J.I., and Embley, T.M. 1996. Molecular diversity of soil and marine 16S rRNA gene sequences related to beta-subgroup ammonia-oxidizing bacteria. Applied and Environmental Microbiology. 62: 11. 4147-4154.

Suzuki, H., Yanaka, A., Shibahara, T., Matsui, H., Nakahara, A., Tanaka, N., ... Uchiyama, Y. 2002. Ammonia-induced apoptosis is accelerated at higher pH in gastric surface mucous cells. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. 283: 4. G986-G995.

Svobodová, Z. 1993. Water quality and fish health: Food & Agriculture Org.

Taotao, Z., Dong, L., Huiping, Z., Shuibo, X., Wenxin, Q., Yingjiu, L., and Jie, Z. 2015. Nitrogen removal efficiency and microbial community analysis of ANAMMOX biofilter at ambient temperature. Water Science and Technology. 71: 5. 725-733.

Tort, L. 2011. Stress and immune modulation in fish. Developmental & Comparative Immunology. 35: 12. 1366-1375.

Urakawa, H., Tajima, Y., Numata, Y., and Tsuneda, S. 2008. Low temperature decreases the phylogenetic diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in aquarium biofiltration systems. Appl. Environ. Microbiol. 74: 3. 894-900.

van Rijn, J., and Rivera, G. 1990. Aerobic and anaerobic biofiltration in an aquaculture unit-nitrite accumulation as a result of nitrification and denitrification. Aquacultural Engineering. 9: 4. 217-234.

Zhang, H., Shao, D., Wu, Y., Cai, C., Hu, C., Shou, X., ... Jia, X. 2012. Apoptotic responses of Carassius auratus lymphocytes to nodularin exposure in vitro. Fish & shellfish immunology. 33: 6. 1229-1237.