فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال نهم، شماره اول، بهار ۱۴۰۰

مقاله پژوهشی

ارزیابی تغییرات اکسیژنی بر بقا، برخی شاخص‌های استرس و خون‌شناسی- ایمنی بچه ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*)

شقایق رضاخانی[۱]، فلورا محمدی‌زاده[۲]، حسین خارا[۳]*، امیر هوشنگ بحری[۴]، محدثه احمدنژاد[۵]

تاریخ دریافت: تیر ۹۹ تاریخ پذیرش: مهر ۹۹

چکیده

ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) یکی از با ارزش‌ترین ماهیان دریای خزر است و بازارپسندی، شکل ظاهری و طعم گوشت آن سبب شده تا از ارزش بالایی برخوردار باشد. این مطالعه به منظور تعیین اثر تنش‌های اکسیژنی روی بقا، برخی شاخص‌های خونی، ایمنی و استرس بچه ماهی آزاد دریای خزر انجام شد. از این رو، ۲۱۰ قطعه بچه ماهی آزاد (۱۰±۵۰ گرم) به طور کاملا تصادفی انتخاب شدند و در وان‌های مجهز به هواده و کپسول اکسیژن قرار گرفتند. ماهیان در سه تیمار هیپوکسی (۲ تا ۳ میلی‌گرم در لیتر اکسیژن)، شاهد یا نرموکسی (۷ تا ۸ میلی‌گرم در لیتر اکسیژن) و هیپراکسی (۱۲ تا ۱۴ میلی‌گرم در لیتر اکسیژن) با سه تکرار تقسیم شدند. خون‌گیری در دو نوبت ۱۲ و ۲۴ ساعت انجام گرفت. نتایج نشان داد که در تیمارهای مختلف اکسیژنی بچه ماهیان آزاد فاقد هر گونه تلفات بودند. اثر اکسیژن نشان داد که تعداد گلبول‌های سفید و قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت، نوتروفیل، لمفوسیت، کورتیزول، گلوکز، لاکتات، لیزوزیم، ایمنوگلوبین کل، IgM، آلبومین و پروتئین کل دارای اختلاف معنی‌دار بودند (P<۰/۰۵). در کل، سطح اکسیژنی ۷ تا ۸ میلی‌گرم در لیتر، مطلوب‌ترین شرایط برای پرورش بچه ماهی آزاد دریای خزر بود. چرا که مناسب‌ترین مقادیر شاخص‌ها بیشتر در این گروه مشاهده شد که با تیمارهای دیگر اختلاف معنی‌داری را نشان داد.

واژگان کلیدی: *ماهی آزاد دریای خزر*، Salmo trutta caspius، *تنش اکسیژنی، شاخص‌های خونی، ایمنی، استرس.*

۱- دانشجوی دکتری شیلات، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، واحد بندر عباس، دانشگاه آزاد اسلامی، بندر عباس، ایران.
۲- دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، واحد بندر عباس، دانشگاه آزاد اسلامی، بندر عباس، ایران.
۳- دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران.
۴- استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، واحد بندر عباس، دانشگاه آزاد اسلامی، بندر عباس، ایران.
۵- استادیار بخش فیزیولوژی، پژوهشکده آبزی‌پروری آب‌های داخلی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندر انزلی، ایران.
* نویسنده مسئول: h.khara1974@yahoo.com

مقدمه

با توجه به رشد رو به افزایش جمعیت جهان و نیاز انسان به پروتئین سالم، آبزی‌پروری از جمله راه‌هایی است که نقش اساسی را در تامین پروتئین مورد نیاز ایفا می‌کند (Bell and Sargent, 2003). به طور کلی، ماهیان در محیط‌هایی بسته مانند استخر و قفس پرورش داده می‌شوند که لازمه بالا بردن میزان تولید در این محیط‌ها افزایش تراکم در سطح است که خود سبب می‌شود تا عوامل استرس‌زای فراوانی بر ماهیان اثر بگذارند (Li et al., 2004). اثرات حاصل از پساب‌های کشاورزی، شهری و صنعتی تخلیه شده در منابع آبی طبیعی می‌تواند منجر به تلفات سنگین ماهیان شود که این تلفات ممکن است به علت هیپوکسی، مواد آلی فراوان، نمک‌های معدنی و فلزات سنگین باشد (Zaghloul et al., 2007).

مهم‌ترین شاخص کیفی آب در آبزی‌پروری اکسیژن محلول است و تولید موفق ماهی به مدیریت خوب اکسیژن بستگی دارد (Timmons et al., 2002). قرار گرفتن ماهیان در معرض هیپوکسی یا هیپراکسی احتمالا باعث بروز آسیب‌هایی در ماهی می‌شود که می‌تواند رشد و تولید زیست توده را کاهش دهد. در زمان هیپوکسی، مقادیر اکسیژن محلول در آب تا حدی که برای موجود زنده مضر است کاهش می‌یابد (اعدلیان، ۱۳۸۸). این پدیده در محیط‌های آبی بسیار شایع است و اغلب در اواخر تابستان یا زمستان به رخ می‌دهد. شدت پدیده هیپوکسی با افزایش دمای آب بیشتر می‌شود (Parker, 2013). هیپوکسی حتی در کوتاه مدت نیز برای ماهیان مضر یا کشنده است (Terova et al., 2008). علاوه بر این، قرارگیری در معرض پدیده هیپراکسی سبب کاهش تهویه آبشش و افزایش فشار جزئی CO_2 در خون و در ادامه اسیدوز تنفسی می‌شود (Heisler, 1993). این احتمال وجود دارد که اسیدوز تنفسی طی چند روز جبران شود، اما زمانی که ماهی در کوتاه مدت در معرض پدیده هیپراکسی قرار گیرد صدماتی در سلول‌های اکسایشی آبشش ایجاد می‌شود (Brauner et al., 2000).

خون یکی از بافت‌های حیاتی بدن است که نسبت به تغییرات بسیار حساس است (Stoskopf, 1993). شاخص‌های خونی و سرمی گونه‌های مختلف ماهیان یکسان نیست (شاهسونی و همکاران، ۱۳۸۶) و تحت تاثیر عوامل مختلفی قرار می‌گیرد (Radu et al., 2009; Patriche et al., 2011). برخی از

شاخص‌ها مانند مقادیر گلبول قرمز و هموگلوبین، درصد هماتوکریت و میزان گلوکز و کورتیزول نشان دهنده پاسخ‌های ثانویه موجود زنده به محرک‌های خارجی هستند (Vosylien, 1996).

آزاد ماهیان از مهم‌ترین گونه‌های پرورشی ماهیان در سراسر دنیا هستند (Lee and Donaldson, 2001). ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) از با ارزش‌ترین ماهیان دریای خزر است. بسیاری از عوامل مانند آلودگی دریا و منابع آبی، از بین رفتن زیستگاه و مناطق تخمریزی، موانع موجود در مسیر مهاجرت و در زمان تخمریزی، رهاسازی فاضلاب شهری به آب رودخانه‌ها و وجود صیادان غیرمجاز باعث شده تا بقای نسل این ماهی با خطر مواجه شود (Mohagheghi Samarin et al., 2010)، به طوری که میزان ذخایر و صید این گونه به شدت در سال‌های اخیر کاهش یافته است (Hajirezaee et al., 2010; Habibi et al., 2013).

تاکنون مطالعاتی درباره تنش‌های اکسیژنی در آبزیان گوناگون انجام شده است که می‌توان به مطالعه اعدلیان (۱۳۸۸) روی اثر هیپوکسی بر ساختار آبشش ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)، پورغلام (۱۳۹۲) روی اثرات سطوح مختلف ویتامین C بر تنش‌های اکسیژنی و دمایی بچه تاس‌ماهی سیبری (*Acipenser baerii*)، باقرزاده لاکانی و همکاران (۱۳۹۴) روی اثرات هیپوکسی، نورموکسی و هیپراکسی روی شاخص‌های خون‌شناختی و بیوشیمیایی خون در دو گروه وزنی فیل‌ماهی (*Huso huso*) پرورشی، باقرزاده لاکانی و همکاران (۱۳۹۵) روی اثرات سطوح مختلف اکسیژن بر بافت طحال در دو گروه وزنی فیل‌ماهی، Matey و همکاران (۲۰۰۸) روی تاثیر هیپوکسی بر ریخت‌شناسی آبشش و وضعیت تنظیم یونی در کپور بدون فلس دریاچه چینگهای (*Gymnocypris przewalskii*) و Bagherzadeh Lakani و همکاران (۲۰۱۳) روی اثرات شرایط هیپوکسی، نورموکسی و هیپراکسی روی آسیب‌شناسی بافتی در دو گروه وزنی فیل ماهی اشاره کرد. این مطالعات نشان می‌دهند که تغییرات اکسیژنی بالاتر و پایین‌تر از حد مجاز می‌تواند بر شاخص‌های خونی، استرس و ایمنی تاثیر منفی داشته باشد.

پژوهش حاضر با هدف تعیین اثر تنش‌های اکسیژنی روی بقا، شاخص‌های خونی، شاخص‌های ایمنی و استرس ماهی آزاد دریای خزر و تعیین بهترین مقدار اکسیژن که کمترین

آسیب را بر جای بگذارد انجام شد. از آن جایی که این ماهی از لحاظ اکسیژنی بسیار حساس است، ضرورت این پژوهش دو چندان می‌شود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

این مطالعه در مرکز تکثیر و پرورش آزاد ماهیان شهید باهنر کلاردشت روی ۲۱۰ قطعه بچه ماهی آزاد دریای خزر *Salmo trutta caspius* (۱۰±۵۰ گرم) انجام شد که این ماهیان حاصل تکثیر مصنوعی در همین مرکز بودند. پس از آن که ۲ عدد تراف و ۲۱ عدد سینی تراف در کنار هم قرار داده شدند، آب مورد نیاز از منبع آب مجموعه تامین شد. تنظیم اکسیژن نیز با استفاده از هواده و کپسول اکسیژن انجام شد. برای تیمارهای دارای اکسیژن کم هوادهی قطع و برای تیمارهای حاوی اکسیژن بالا هوادهی زیاد شد. پس از این که وان‌ها آماده و اکسیژن آب به حد مورد نظر رسید ماهیان به تراف‌ها انتقال داده شدند.

این پژوهش در قالب یک طرح تصادفی انجام شد و شامل ۳ تیمار بود که هر تیمار سه تکرار داشت. تیمارها شامل تیمار ۱ یا هیپوکسی: ۲ تا ۳ میلی‌گرم در لیتر اکسیژن، تیمار ۲ یا نرموکسی: ۷ تا ۸ میلی‌گرم در لیتر اکسیژن (شاهد) و تیمار ۳ یا هیپراکسی: ۱۲ تا ۱۴ میلی‌گرم در لیتر اکسیژن بودند که مطابق با روش مورد استفاده در مطالعات مشابه دیگر انجام پذیرفت (Brett and Groves, 1979; Boyd, 1982; Jobling, 1995; Buentello et al., 2000). در هر تیمار ۳۰ عدد ماهی (هر تکرار ۱۰ عدد) گنجانده شد. علاوه بر این، شاخص‌های فیزیکی و شیمیایی آب مانند اکسیژن و دما (۸ تا ۱۰ درجه سانتی گراد) با استفاده از دستگاه اکسی‌متر (ProfiLine Oxi 3210، WTW، آلمان) سه بار در روز و pH (۷/۳۵) با استفاده از دستگاه pHمتر (pH 330i، WTW، آلمان) یک بار در روز اندازه‌گیری شد.

خون‌گیری و تهیه سرم

خون‌گیری در سه تکرار در زمان‌های ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از آغاز تیمار (به منظور ارزیابی بهترین زمان) انجام شد (خورشیدی و همکاران، ۱۳۹۶). به این ترتیب که پس از بیهوش شدن ماهیان توسط پودر گل میخک (۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر)، سه ماهی از هر تکرار از طریق قطع ساقه دمی خون‌گیری شد.

برای تهیه سرم ۱ میلی‌لیتر از خون جمع‌آوری شده از ماهیان (کاظمی و همکاران، ۱۳۸۹) برای دو ساعت در دمای معمولی اتاق

قرار داده شد تا عمل انعقاد انجام گیرد. سپس، نمونه‌ها توسط سانتریفیوژ (EBA200، Hettich، آلمان) با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه جداسازی شدند (Panigrahi et al., 2005). نمونه‌های سرم تا انجام آزمایش‌های بعدی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد فریزر نگهداری شدند.

اندازه‌گیری شاخص‌های خونی و بیوشیمیایی خون

پس از جمع‌آوری تمام نمونه‌ها شاخص‌های خونی، ایمنی و استرس اندازه‌گیری شدند. برای شمارش تعداد گلبول‌های سفید (WBC) و قرمز (RBC) به ترتیب از پیپت‌های ملانژور سفید و قرمز، محلول رقیق کننده لوییس و لام نئوبار پیشرفته استفاده شد و تعداد گلبول‌ها از رابطه‌های ۱ و ۲ محاسبه شد (Klontz, 1994).

رابطه ۱:

$$RBC\ (1/mm^{-3}) = \Sigma R_i \times 10000$$

ΣR_i: تعداد گلبول‌های قرمز شمارش شده در پنج خانه متوسط از خانه بزرگ مرکزی لام نئوبار.

رابطه ۲:

$$WBC\ (mm^{-3}) = \Sigma W_i \times 50$$

ΣW_i: تعداد گلبول‌های سفید شمارش شده در چهار خانه بزرگ لام نئوبار.

مقدار هموگلوبین (Hb) با استفاده از روش سیان مت هموگلوبین یا سیانید هموگلوبین به وسیله کیت هموگلوبینومتری (پارس‌آزمون، ایران) و اسپکتروفتومتر (6505-UV/VIS، Jenway، انگلستان) در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای تعیین درصد هماتوکریت (Hct) از روش میکروهماتوکریت استفاده شد. به این ترتیب که نمونه‌های خون موجود در لوله‌های مویین در میکروسانتریفوژ (Hettrich ،Tuttlingen D-78532، آلمان) به مدت ۵ دقیقه در ۷۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند.

پس از سنجش مقدار گلبول‌های قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت، با استفاده از اعداد به دست آمده شاخص‌های MCV، MCH و MCHC از رابطه‌های ۳ تا ۵ محاسبه شدند (Klontz, 1994).

رابطه ۳:

$$MCV\ (fL) = [Hct / RBC\ (per\ million)] \times 10$$

رابطه ۴:

$$MCH\ (pg) = [Hb / RBC\ (per\ million)] \times 10$$

رابطه ۵:

$$MCHC\ (\%) = (Hb / Hct) \times 100$$

به منظور تشخیص افتراقی گلبول‌های سفید و شمارش نوتروفیل‌ها، بازوفیل‌ها، ائوزینوفیل‌ها، لمفوسیت‌ها و مونوسیت‌ها، گسترش‌های خونی تهیه شده با استفاده از متانول ۹۶ درصد تثبیت و با محلول گیمسا (Merck، آلمان) ۱۰ درصد رنگ‌آمیزی شد. شمارش انواع گلبول‌های سفید به روش زیگزاگ و با کمک دستگاه شمارنده دستی صورت گرفت (Klontz, 1994).

سطوح کورتیزول سرم به روش RIA (Rotllant et al., 2001) و با توجه به واکنش رقابتی بین آنتی‌ژن نشان‌دار شده با ید ۱۲۵ با آنتی‌ژن پلاسما برای اتصال به آنتی‌بادی فاز جامد، با استفاده از کیت (Immunotech، فرانسه) و دستگاه گاماکانتر (LKB، فنلاند) تعیین شد. سطوح لاکتات سرم با استفاده از روش رنگ‌سنجی آنزیمی با کیت (Sigma، آمریکا) و دستگاه ELISA Reader (Stat fax-2100، Awareness، آمریکا) سنجیده شد (Acerete et al., 2004). سطوح گلوکز سرم با استفاده از کیت (Glucose C2-test، ژاپن) بر پایه روش آنزیمی به کمک Mutarotase و گلوکزاکسیداز تعیین شد (Kubokawa et al., 1999). برای محاسبه غلظت ایمنوگلوبین کل سرم از روش Biuret استفاده شد. به این ترتیب که ۰/۱ میلی‌لیتر نمونه سرم با ۰/۱ میلی‌لیتر محلول پلی‌اتیلن گلیکول (10000 MW، Sigma Chemical، آمریکا) ۳۲ درصد مخلوط شد. پس از ۲ ساعت، رسوب ایمنوگلوبین توسط سانتریفیوژ (5415R، Eppendorf، آلمان) در ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۷ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد جداسازی شد. پروتئین کل در مایع رویی اندازه‌گیری و مقدار ایمنوگلوبین کل (Ig_T) مطابق رابطه ۶ محاسبه شد (Amar et al., 2000).

رابطه ۶:

$$Ig_T\ (mg/mL) = P_T - P_{PEG}$$

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

سنجش ایمنوگلوبین M (IgM) سرم به وسیله دستگاه ELISA Reader انجام شد (Ellis, 1977). برای سنجش سطوح لیزوزیم، ۱/۷۵ میلی‌لیتر سرم با استفاده از سوسپانسیون باکتری *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma، آمریکا)، به روش طیف‌سنجی و به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۷۰ نانومتر انجام شد (Ellis, 1977).

سنجش پروتئین کل با توجه به روش توصیف شده توسط Henry (۱۹۷۴) و سنجش

آلبومین با توجه به روش توصیف شده توسط Wotton و Freeman (۱۹۷۴) انجام شد. همچنین، مقادیر پروتئین کل از رابطه ۷ و مقادیر آلبومین از رابطه ۸ محاسبه شد.

رابطه ۷:

$$P_T\,(g/dL) = P_{St} \times (OD_S / OD_{St})$$

P_{St}: مقدار پروتئین کل در استاندارد (گرم در دسی‌لیتر)؛ OD_S: جذب نوری نمونه؛ OD_{St}: جذب نوری استاندارد.

رابطه ۸:

$$A\,(g/dL) = (OD_S / OD_{St}) \times C_C$$

OD_S: جذب نوری نمونه؛ OD_{St}: جذب نوری استاندارد؛ C_C: غلظت (گرم در دسی‌لیتر).

تجزیه و تحلیل آماری

به منظور انجام محاسبات آماری از نرم‌افزار SPSS 18 استفاده شد. پس از اطمینان از نرمال بودن داده‌ها، از آزمون تحلیل واریانس (ANOVA) دوطرفه برای تجزیه و تحلیل داده‌ها و برای بررسی میانگین‌ها از پس‌آزمون توکی در سطح اطمینان ۹۵ درصد (P<۰/۰۵) استفاده شد.

نتایج

بچه ماهیان آزاد دریای خزر در تیمارهای مختلف اکسیژنی تلفاتی نداشتند.

با توجه به نتایج آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و پس‌آزمون توکی بین تیمارهای اکسیژنی مختلف از نظر میانگین گلبول سفید، نوتروفیل، لمفوسیت، کورتیزول، گلوکز، لاکتات، ایمنوگلوبین کل و IgM در هر دو بازه زمانی ۱۲ و ۲۴ ساعت و از نظر میانگین گلبول قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت، لیزوزیم، آلبومین و پروتئین کل در بازه زمانی ۱۲ ساعت اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده شد (P<۰/۰۵)، اما در بازه زمانی ۲۴ ساعت اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نشد (P>۰/۰۵). همچنین، از نظر میانگین MCV، MCH، MCHC و ائوزینوفیل اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نشد (P>۰/۰۵). علاوه بر این، با ثابت بودن میزان اکسیژن، از نظر میانگین گلبول سفید در تیمارهای هیپوکسی، شاهد یا نرموکسی و هیپراکسی بین دو بازه زمانی ۱۲ و ۲۴ ساعت اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده شد (P<۰/۰۵). ضمن این که با ثابت بودن میزان اکسیژن، از نظر میانگین گلبول قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت، MCH، کورتیزول و لاکتات در تیمار هیپوکسی، از نظر میانگین آلبومین در تیمار شاهد یا نرموکسی، از نظر میانگین لمفوسیت و IgM در تیمار هیپراکسی و از نظر میانگین گلوکز، ایمنوگلوبین کل و پروتئین کل

در تیمارهای هیپوکسی و هیپراکسی بین دو بازه زمانی ۱۲ و ۲۴ ساعت اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده شد (P<۰/۰۵). اما در تیمارهای دیگر تفاوت‌ها معنی‌دار نبودند (P>۰/۰۵). همچنین، با ثابت بودن میزان اکسیژن، از نظر میانگین MCV، MCHC، نوتروفیل، ائوزینوفیل و لیزوزیم در تیمارهای هیپوکسی، شاهد یا نرموکسی و هیپراکسی بین دو بازه زمانی ۱۲ و ۲۴ ساعت اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

از نظر شاخص‌های خونی در ۱۲ ساعت، بیشترین مقدار گلبول قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت و کمترین مقدار لمفوسیت در تیمار هیپوکسی، کمترین مقدار گلبول سفید، نوتروفیل و مونوسیت در تیمار شاهد یا نرموکسی و بیشترین مقدار MCV، MCH و MCHC و کمترین مقدار ائوزینوفیل در تیمار هیپراکسی مشاهده شد. همچنین، از نظر شاخص‌های خونی در ۲۴ ساعت، بیشترین مقدار MCH و MCHC در تیمار هیپوکسی، بیشترین مقدار گلبول قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت و کمترین مقدار گلبول سفید و نوتروفیل در تیمار شاهد یا نرموکسی و بیشترین مقدار MCV و کمترین مقدار لمفوسیت در تیمار هیپراکسی مشاهده شد. کمترین مقدار مونوسیت نیز در تیمار هیپوکسی و شاهد یا نرموکسی وجود داشت و مقدار ائوزینوفیل در هر سه تیمار هیپوکسی، شاهد یا نرموکسی و هیپراکسی یکسان بود (جدول ۱).

از نظر شاخص‌های ایمنی در ۱۲ ساعت، بیشترین مقدار آلبومین و پروتئین کل در تیمار هیپوکسی و بیشترین مقدار لیزوزیم، IgM و ایمنوگلوبین کل در تیمار شاهد یا نرموکسی مشاهده شد. همچنین، از نظر شاخص‌های ایمنی در ۲۴ ساعت، بیشترین مقدار آلبومین و پروتئین کل در تیمار هیپوکسی و بیشترین مقدار لیزوزیم، IgM و ایمنوگلوبین کل در تیمار شاهد یا نرموکسی مشاهده شد (جدول ۲).

از نظر شاخص‌های استرس در ۱۲ ساعت، کمترین مقدار کورتیزول، گلوکز و لاکتات در تیمار شاهد یا نرموکسی مشاهده شد. همچنین، از نظر شاخص‌های استرس در ۲۴ ساعت، کمترین مقدار کورتیزول، گلوکز و لاکتات در تیمار شاهد یا نرموکسی مشاهده شد (جدول ۳).

جدول ۱: روند تغییرات شاخص‌های خونی بچه ماهی آزاد دریای خزر طی ۱۲ و ۲۴ ساعت در تیمارهای اکسیژنی مختلف (میانگین ± انحراف معیار)

تیمار / شاخص‌ها	تیمار هیپوکسی (اکسیژن ۲mg/L-۳)		تیمار شاهد (نرموکسی) (اکسیژن ۷mg/L-۸)		تیمار هیپراکسی (اکسیژن ۱۲mg/L-۱۴)	
	۱۲ ساعت	۲۴ ساعت	۱۲ ساعت	۲۴ ساعت	۱۲ ساعت	۲۴ ساعت
WBC (mm^{-3})	۱۱۶۳۳ ۱۲۹±^{Bb}	۸۷۶۷ ۳۲۸±^{Ab}	۶۵۰۰ ۳۰۰±^{Aa}	۷۴۰۰ ۳۶۱±^{Ba}	۱۱۶۶۷ ۸۶۲±^{Bb}	۹۹۰۰ ۲۶۴±^{Ac}
RBC (mm^{-3})	۱۲۵۳۳۳۳ ۴۱۶۳۳±^{Bb}	۹۸۳۶۶۷ ۳۵۷۶۶±^{Aa}	۱۰۷۶۶۶۷ ۴۷۶۲۵±^{Aa}	۱۰۴۴۶۶۷ ۵۹۳۷۵±^{Aa}	۱۰۰۹۰۰۰ ۵۴۷۸۱±^{Aa}	۹۵۸۳۳۳ ۳۴۰۳۴±^{Aa}
Hb (g/dL)	۹/۸۳ ۰±/۲۹^{Bb}	۸/۱۳ ۰±/۲۷^{Aa}	۸/۵۷ ۰±/۶۵^{Aa}	۸/۳۷ ۰±/۳۵^{Aa}	۸/۱۰ ۰±/۳۰^{Aa}	۷/۹۳ ۰±/۳۸^{Aa}
Hct (٪)	۵۵/۳۳ ۲±/۰۸^{Bb}	۴۴/۳۳ ۳±/۰۳^{Aa}	۴۷/۳۳ ۳±/۸۷^{Aa}	۴۶/۳۳ ۱±/۵۳^{Aa}	۴۴/۶۷ ۱±/۵۳^{Aa}	۴۳/۶۷ ۱±/۵۳^{Aa}
MCV (fL)	۴۴۱/۰۰ ۵±/۰۸^{Aa}	۴۵۰/۶۷ ۳±/۵۸^{Aa}	۴۳۹/۰۰ ۲±/۶۵^{Aa}	۴۴۳/۳۳ ۱۰±/۲۶^{Aa}	۴۴۳/۰۰ ۱۱±/۷۹^{Aa}	۴۵۵/۳۳ ۲±/۰۸^{Aa}
MCH (pg)	۷۸/۳۳ ۱±/۵۳^{Aa}	۸۲/۶۷ ۲±/۰۸^{Ba}	۷۹/۰۰ ۰±/۵۵^{Aa}	۷۹/۶۷ ۱±/۵۳^{Aa}	۸۰/۰۰ ۱±/۷۳^{Aa}	۸۲/۳۳ ۰±/۸۲^{Aa}
MCHC (٪)	۱۷/۳۳ ۰±/۵۸^{Aa}	۱۸/۳۳ ۰±/۵۸^{Aa}	۱۷/۶۷ ۰±/۵۸^{Aa}	۱۷/۶۷ ۰±/۶۸^{Aa}	۱۸/۰۰ ۰±/۰۰^{Aa}	۱۷/۶۷ ۰±/۶۸^{Aa}
نوتروفیل (٪)	۲۵/۳۳ ۲±/۵۲^{Ab}	۲۱/۶۷ ۱±/۸۷^{Ab}	۱۳/۶۷ ۱±/۱۶^{Aa}	۱۶/۶۷ ۱±/۵۳^{Aa}	۲۳/۶۷ ۱±/۴۱^{Ab}	۲۵/۶۷ ۲±/۵۲^{Ab}
لمفوسیت (٪)	۶۸/۳۳ ۰±/۵۸^{Aa}	۷۳/۳۳ ۰±/۹۹^{Ab}	۸۲/۶۷ ۰±/۵۸^{Ab}	۷۸/۳۳ ۲±/۸۹^{Ac}	۷۱/۶۷ ۱±/۸۳^{Ba}	۶۸/۳۳ ۳±/۷۹^{Aa}
مونوسیت (٪)	۵/۱±۶۷/۵۳^{Aa}	۴/۱±۰۰/۰۰^{Aa}	۳/۱±۰۰/۰۰^{Aa}	۴/۱±۰۰/۰۰^{Aa}	۴/۰±۶۷/۹۶^{Aa}	۵/۱±۰۰/۰۰^{Aa}
ائوزینوفیل (٪)	۰/۰±۶۷/۵۸^{Aa}	۱/۱±۰۰/۰۰^{Aa}	۰/۰±۶۷/۵۸^{Aa}	۱/۱±۰۰/۰۰^{Aa}	۰/۰±۰۰/۰۰^{Aa}	۱/۱±۰۰/۰۰^{Aa}

حروف بزرگ انگلیسی بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار در هر تیمار (اکسیژن) بین ۱۲ و ۲۴ ساعت و حروف کوچک انگلیسی بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار در هر تیمار (ساعت) بین اکسیژن‌دهی‌های مختلف است ($P<۰/۰۵$).

جدول ۲: روند تغییرات شاخص‌های ایمنی بچه ماهی آزاد دریای خزر طی ۱۲ و ۲۴ ساعت در تیمارهای اکسیژنی مختلف (میانگین ± انحراف معیار)

تیمار / شاخص‌ها	تیمار هیپوکسی (اکسیژن ۲mg/L-۳)		تیمار شاهد (نرموکسی) (اکسیژن ۷mg/L-۸)		تیمار هیپراکسی (اکسیژن ۱۲mg/L-۱۴)	
	۱۲ ساعت	۲۴ ساعت	۱۲ ساعت	۲۴ ساعت	۱۲ ساعت	۲۴ ساعت
لیزوزیم (U/mL/min)	۱۸/۳±۳۳/۱۶^{Aab}	۲۴/۴±۰۰/۲۲^{Aa}	۲۵/۳±۰۰/۰۰^{Ab}	۲۷/۶±۳۳/۵۱^{Aa}	۱۶/۳±۳۳/۰۶^{Aa}	۲۲/۴±۰۰/۳۶^{Aa}
IgM (mg/dL)	۲۳/۲±۳۳/۳۸^{Aa}	۲۷/۴±۶۷/۵۲^{Bab}	۳۸/۳±۳۳/۰۶^{Bb}	۲۹/۲±۶۷/۰۸^{Ab}	۲۲/۲±۰۰/۶۵^{Aa}	۲۲/۳±۳۳/۲۱^{Aa}
ایمنوگلوبین کل (mg/dL)	۳۳/۰±۰۳/۹۶^{Aa}	۳۴/۰±۹۰/۸۵^{Bb}	۳۴/۰±۷۳/۶۸^{Ab}	۳۵/۰±۷۷/۹۶^{Ab}	۳۰/۰±۷۷/۶۴^{Ac}	۳۲/۰±۸۳/۳۵^{Ba}
آلبومین (g/dL)	۲/۰±۱۷/۰۵^{Ab}	۲/۰±۲۵/۰۴^{Aa}	۱/۰±۹۹/۰۵^{Aa}	۲/۰±۱۴/۰۶^{Ba}	۲/۰±۰۲/۰۸^{Aab}	۲/۰±۱۶/۰۳^{Aa}
پروتئین کل (g/dL)	۷/۰±۱۸/۰۶^{Aa}	۷/۰±۶۸/۱۹^{Bb}	۶/۰±۹۶/۱۲^{Aa}	۷/۰±۱۶/۲۰^{Aa}	۶/۰±۹۹/۰۴^{Aa}	۷/۰±۴۲/۰۵^{Bab}

حروف بزرگ انگلیسی بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار در هر تیمار (اکسیژن) بین ۱۲ و ۲۴ ساعت و حروف کوچک انگلیسی بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار در هر تیمار (ساعت) بین اکسیژن‌دهی‌های مختلف است (P<۰/۰۵).

جدول ۳: روند تغییرات شاخص‌های استرس بچه ماهی آزاد دریای خزر طی ۱۲ و ۲۴ ساعت در تیمارهای اکسیژنی مختلف (میانگین ± انحراف معیار)

تیمار / شاخص‌ها	تیمار هیپوکسی (اکسیژن ۲mg/L-۳)		تیمار شاهد (نرموکسی) (اکسیژن ۷mg/L-۸)		تیمار هیپراکسی (اکسیژن ۱۲mg/L-۱۴)	
	۱۲ ساعت	۲۴ ساعت	۱۲ ساعت	۲۴ ساعت	۱۲ ساعت	۲۴ ساعت
کورتیزول (ng/mL)	۴۰/۰۰ ۱۱±/۱۲^{Ab}	۴۷/۳۳ ۳±/۲۲^{Ba}	۲۶/۰۰ ۵±/۲۹^{Aa}	۲۶/۳۳ ۲±/۰۸^{Aa}	۶۴/۶۷ ۳±/۰۶^{Ac}	۷۷/۰۰ ۱۶±/۳۷^{Ab}
گلوکز (mg/dL)	۹۴/۳۳ ۱۱±/۰۸^{Ab}	۱۱۶/۰۰ ۱۲±/۴۲^{Bb}	۴۳/۶۷ ۴±/۰۴^{Aa}	۴۵/۳۳ ۲±/۰۸^{Aa}	۱۰۵/۰۰ ۱۰±/۸۲^{Ab}	۱۴۳/۳۳ ۱۲±/۷۴^{Bc}
لاکتات (mg/dL)	۴۵/۳±۰۰/۶۱^{Ab}	۵۷/۵±۶۷/۵۱^{Bb}	۳۱/۱±۰۰/۰۰^{Aa}	۳۵/۳±۳۳/۵۱^{Aa}	۵۴/۴±۶۷/۹۳^{Ac}	۷۳/۱۰±۰۰/۵۸^{Ab}

حروف بزرگ انگلیسی بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار در هر تیمار (اکسیژن) بین ۱۲ و ۲۴ ساعت و حروف کوچک انگلیسی بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار در هر تیمار (ساعت) بین اکسیژن‌دهی‌های مختلف است (P<۰/۰۵).

بحث

این پژوهش با هدف بررسی اثر تنش‌های اکسیژنی بر بقا، برخی شاخص‌های خونی-ایمنی و استرس بچه ماهی آزاد دریای خزر انجام شد. مهم‌ترین شاخص کیفی آب در آبزی‌پروری اکسیژن محلول است و اساسی‌ترین عامل حیاتی برای موجودات آبزی (اسماعیلی ساری، ۱۳۸۳) و عاملی بحرانی در پرورش ماهی است (تکریمی، ۱۳۸۶). به طور کلی، عوامل استرس‌زا می‌توانند به طور مستقیم به صورت مرگ ماهی یا غیرمستقیم از طریق مهار سیستم ایمنی تاثیر بگذارند، بنابراین امکان حمله عوامل بیماری‌زا و بروز بیماری را فراهم می‌کنند (Mariana and Badr, 2019).

در مطالعه حاضر، بچه ماهیان آزاد هیچ گونه تلفاتی نداشتند. مطالعه روی فیل‌ماهیان پرورشی نیز نشان دهنده بازماندگی ۱۰۰ درصد در تمام تیمارهای اکسیژنی بود (باقرزاده لاکانی و همکاران، ۱۳۹۱).

ارزیابی شاخص‌های خونی و بیوشیمیایی اطلاعات ارزشمندی را درباره سلامت بسیاری از جانوران از جمله ماهیان ارائه می‌دهد (Bani and Haghi-Vayghan, 2011). شاخص‌های بیوشیمیایی خون می‌تواند نشان دهنده مواردی مانند تشخیص آسیب سلولی ناشی از قرار گرفتن در معرض ماده سمی، آلودگی توسط عوامل بیماری‌زا، دستکاری، بررسی اثر رژیم غذایی بر عملکرد کبد، عملکرد تنظیم اسمزی و تنظیم یونی، اثرات جنس و چرخه بلوغ و پاسخ به عوامل تنش‌زا باشد (Tavares-Dias and Moraes, 2010).

اندازه‌گیری اثر اکسیژن بر شاخص‌های خونی اختلاف معنی‌داری را در تعداد گلبول‌های سفید و قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت، نوتروفیل، لمفوسیت، کورتیزول، گلوکز، لاکتات، لیزوزیم، ایمنوگلوبین کل، IgM، آلبومین و پروتئین کل نشان داد. کمترین تعداد گلبول سفید در تیمار شاهد یا نرموکسی (اکسیژن ۷ تا ۸ میلی‌گرم در لیتر) مشاهده شد که با تیمارهای دیگر اختلاف معنی‌داری داشت و در دو بازه زمانی ۱۲ و ۲۴ ساعت، روند کاهشی و افزایشی منظمی وجود نداشت. در مطالعه روی گروه‌های وزنی مختلف فیل‌ماهی، اگرچه بیشترین تعداد گلبول سفید در تیمار نرموکسی ماهیان با اندازه کوچک و تیمار هیپراکسی ماهیان با اندازه بزرگ وجود داشت، اما هیچ گونه اختلاف معنی‌داری در بین تیمارهای اکسیژنی مختلف مشاهده نشد (باقرزاده لاکانی و همکاران، ۱۳۹۴). بالاترین تعداد گلبول قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت در تیمار هیپوکسی (۲ تا ۳ میلی‌گرم در لیتر

اکسیژن) مشاهده شد و در دو بازه زمانی ۱۲ و ۲۴ ساعت، با گذشت مدت زمان بیشتر (۲۴ ساعت)، مقادیر از روند افزایشی و کاهشی منظمی برخوردار نبودند. باقرزاده لاکانی و همکاران (۱۳۹۴) با مطالعه اثرات هیپوکسی، نورموکسی و هیپراکسی بر شاخص‌های خونی و بیوشیمیایی سرم دو گروه وزنی از فیل‌ماهی پرورشی بیان کردند که بیشترین مقادیر گلبول قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت در تیمار هیپوکسی و پس از آن در تیمار نرموکسی وجود داشت و با کاهش میزان اکسیژن، تعداد گلبول‌های قرمز و میزان هماتوکریت و هموگلوبین افزایش یافت که با نتیجه مطالعه حاضر مطابقت دارد. در مطالعه دیگری، تورم ۱۰ درصدی گلبول‌های قرمز در کپور معمولی که در معرض هیپوکسی بودند، گزارش شده است (Weber and Lykkeboe, 1978). ماهیانی که در شرایط اکسیژن پایین قرار می‌گیرند، امکان دارد هموگلوبین بیشتری در گلبول قرمز و مقادیر بیشتری گلبول قرمز در خون خود داشته باشند و بنابراین از ظرفیت حمل اکسیژن بیشتری توسط خون بهره‌مند شوند (Fraser et al., 2006). افزایش هماتوکریت و هموگلوبین خون در ماهیان مختلف، دلایل متفاوتی داشته، از پاسخ‌های ابتدایی در ماهیان محسوب می‌شود و در واقع به ماهیان اجازه می‌دهد تا از اکسیژن محیط حداکثر استفاده را کند. احتمال دارد که افزایش هماتوکریت حین استرس به دلیل کاهش حجم پلاسما، متورم شدن گلبول‌های قرمز یا رها شدن مقادیر بیشتری گلبول قرمز از بافت‌های خونساز به درون خون باشد (Swift, 1982). در مورد گلبول‌های سفید نیز، کمترین مقادیر نوتروفیل و بالاترین مقادیر لمفوسیت در تیمار نرموکسی مشاهده شد. همچنین گذر زمان نشان دهنده اختلاف آماری در هیچ یک از شاخص‌های یاد شده نبود. باقرزاده لاکانی و همکاران (۱۳۹۴) با مطالعه دو گروه وزنی فیل‌ماهی بیان کردند که کمترین مقادیر نوتروفیل در تیمار هیپوکسی و نرموکسی بود که تا حدودی با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد ولی مقادیر لمفوسیت دارای اختلاف آماری نبود. نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین تیمارها از نظر مقدار کورتیزول، گلوکز و لاکتات وجود داشت و کمترین مقادیر در تیمار نرموکسی مشاهده شد. باقرزاده لاکانی و همکاران (۱۳۹۴) با مطالعه دو گروه وزنی فیل‌ماهی پرورشی بیان کردند که در هیچ یک از دو گروه وزنی اختلاف معنی‌داری در میزان گلوکز در تیمارهای مختلف اکسیژن مشاهده نشد. گلوکز یکی از منابع مهم تامین

کننده انرژی در بافت‌های مختلف بدن است. کورتیزول و کاتکول آمین‌ها سبب افزایش تولید گلوکز در ماهیان می‌شوند و به طور کلی، هیپوکسی از جمله عوامل استرس‌زایی است که سبب آزاد شدن هورمون‌های استرس مانند آدرنالین، نورآدرنالین (Boutilier et al., 1987) و کورتیزول (Van Raaij et al., 1996) می‌شود. مطالعه روی دو گروه وزنی فیل‌ماهی پرورشی نشان داد که هیچ یک از دو گروه وزنی اختلاف معنی‌داری از نظر مقادیر کورتیزول در تیمارهای مختلف اکسیژنی نداشتند. با این حال، مقادیر کورتیزول در تیمار نرموکسی کمتر بود (باقرزاده لاکانی و همکاران، ۱۳۹۴). مطالعه Maxime و همکاران (۱۹۹۵) روی تاس‌ماهی سیبری نشان داد که هیپوکسی شدید باعث استرس و افزایش سطوح کاتکول آمین و کورتیزول شد. بیشترین مقدار لیزوزیم، IgM و ایمنوگلوبین کل در تیمار نرموکسی مشاهده شد که با تیمارهای دیگر اختلاف معنی‌داری داشت و در دو بازه زمانی ۱۲ و ۲۴ ساعت، با گذشت مدت زمان بیشتر (۲۴ ساعت)، مقادیر از روند افزایشی و کاهشی منظمی برخوردار نبودند. بررسی اثر مقادیر مختلف اکسیژن بر شاخص‌های ایمنی مانند لیزوزیم پلاسما و فعالیت پراکسیداز ماهی *Solea senegalensis* هیچ تغییر قابل توجهی نشان نداد (Malheiro, 2015). کمترین مقدار آلبومین و پروتئین کل در تیمار نرموکسی مشاهده شد که با تیمارهای دیگر اختلاف معنی‌داری داشت. باقرزاده لاکانی و همکاران (۱۳۹۴) با مطالعه فیل‌ماهی پرورشی بیان کردند که سطوح مختلف اکسیژن تاثیر معنی‌داری بر مقادیر پروتئین کل و اسمولالیته ندارد.

با توجه به نتایج به دست آمده از اثرات تنش‌های اکسیژنی بر شاخص‌های خونی، ایمنی و استرس بچه ماهی آزاد دریای خزر می‌توان بیان کرد که سطح اکسیژنی شاهد یا نرموکسی (۷ تا ۸ میلی‌گرم در لیتر) مطلوب‌ترین شرایط برای پرورش بچه ماهی آزاد دریای خزر است. چرا که مناسب‌ترین مقادیر شاخص‌های خونی، ایمنی و استرس (با کمترین اثر منفی) بیشتر در این گروه مشاهده شد که با تیمارهای دیگر اختلاف معنی‌داری را نشان داد. با این حال، با توجه به مطالعات دیگر می‌توان بیان کرد که گونه ماهی، اندازه ماهی، مدت زمان در معرض قرار گرفتن، محیط، فیزیولوژی ماهی و غیره روی نوع اثرگذاری شاخص‌ها موثر است و استرس سبب تغییراتی در شاخص‌های خونی می‌شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نگارندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از همکاری صمیمانه مسئولین مرکز تکثیر و پرورش ماهیان سردآبی شهید باهنر کلاردشت که در به ثمر نشستن این پژوهش تلاش کرده‌اند، ابراز می‌دارند.

منابع

اسماعیلی ساری ع. ۱۳۸۳. هیدروشیمی بنیان آبزی‌پروری. انتشارات اصلانی. ۲۷۶ص.

اعدلیان ن. ۱۳۸۸. اثر هیپوکسی بر ساختار آبشش ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه گیلان. ۴۶ص.

باقرزاده لاکانی ف.، ستاری م.، شریف پور ع.، کاظمی ر. و حلاجیان ع. ۱۳۹۵. اثرات سطوح مختلف اکسیژن بر بافت طحال در دو گروه وزنی فیل‌ماهی (*Huso huso*). نشریه توسعه آبزی‌پروری، ۱۰(۲): ۳۰-۲۱.

باقرزاده لاکانی ف.، ستاری م.، کاظمی ر.، یزدانی ساداتی م.ع.، پوردهقانی م. و عشوری ق. ۱۳۹۴. اثرات هیپوکسی، نورموکسی و هایپراکسی بر فاکتورهای هماتولوژی و پارامترهای بیوشیمیایی خون دو گروه وزنی از فیل‌ماهی (*Huso huso*) پرورشی. اقیانوس‌شناسی، ۶(۲۲): ۶۸-۵۹.

باقرزاده لاکانی ف.، ستاری م.، یزدانی ساداتی م.ع.، کاظمی ر. و جعفرزاده ا. ۱۳۹۱. اثرات سطوح مختلف اکسیژن بر رشد و ترکیب عضله در دو گروه وزنی از فیل‌ماهیان (*Huso huso*) پرورشی. مجله علوم و فنون دریایی، ۱۱(۹): ۲۴-۱۳.

پورغلام ی. ۱۳۹۲. اثرات سطوح مختلف ویتامین C روی تنش‌های اکسیژنی و دمایی بچه تاس‌ماهی سیبری (*Acipenser baerii*). پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی. ۱۱۸ص.

تکریمی س.م. ۱۳۸۶. اکولوژی دریایی. انتشارات موسسه آموزش عالی علمی-کاربردی. ۲۰۹ص.

خورشیدی ش.، خارا ح و احمدنژاد م. ۱۳۹۶. اثرات تنش‌های دمایی روی برخی فاکتورهای خونی، شاخص‌های استرس و هیستوپاتولوژیک آبشش قزل‌آلای رنگین‌کمان. مجله محیط زیست جانوری، ۹(۳): ۲۳۲-۲۱۹.

شاهسونی د.، مهری م. و تقوایی مقدم ا. ۱۳۸۶. تعیین مقادیر برخی از آنزیم‌های سرم خون فیل‌ماهی. مجله تحقیقات دامپزشکی، ۶۲(۳): ۱۲۹-۱۲۷.

کاظمی ر.، پوردهقانی م.، یوسفی جوردهی ا.، یارمحمدی م. و نصری تجن م. ۱۳۸۹. فیزیولوژی دستگاه گردش خون آبزیان و فنون کاربردی خون‌شناسی ماهیان. انتشارات بازرگان. ۱۹۴ص.

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

Amar E.C., Kiron V., Satoh S., Okamoto N. and Watanabe T.

2000. Effects of dietary b-carotene on the immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fisheries Sciences, 66: 1068–1075.

Bagherzadeh Lakani F., Sattari M., Sharifpour I. and Kazemi R. 2013. Effect of hypoxia, normoxia and hyperoxia conditions on gill histopathology in two weight groups of beluga (*Huso huso*). Caspian Journal of Environmental Sciences, 11(1): 77–84.

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

Bell J.G. and Sargent J.R. 2003. Arachidonic acid in aquaculture feeds: Current status and future opportunities. Aquaculture, 218: 491–499.

Boutilier R.G., Dobson G., Hoeger U. and Randall J. 1987. Acute exposure to graded levels of hypoxia in rainbow trout (*Salmo gairdneri*): Metabolic and respiratory adaptations. Respiratory Physiology, 71: 69–82.

Boyd C.E. 1982. Water quality management for pond fish culture. Elsevier Scientific Publishing Company, Netherlands. 318P.

Brauner C.J., Seidelin M., Madsen S.S. and Jensen F.B. 2000. Effects of freshwater hyperoxia and hypercapnia and their influences on subsequent seawater transfer in Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 57: 2054–2064.

Brett J.R. and Groves T.D.D. 1979. Physiological energetics. P: 279–352. In: Hoar W.S., Randall D.J. and Brett J.R. (Eds.). Fish Physiology. Academic Press, USA.

Buentello J.A., Gatlin D.M. and Neill W.H. 2000. Effects of water temperature and dissolved oxygen on daily feed consumption, feed utilization and growth of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Aquaculture, 182: 339–352.

Ellis A.E. 1977. The leucocytes of fish: A review. Journal of Fish Biology, 11: 453–491.

Fraser J., Vieira De Mello L., Ward D., Rees H.H., Williams D.R., Fang Y., Brass A., Gracey A.Y. and Cossins A.R. 2006. Hypoxia-inducible myoglobin expression in nonmuscle tissues. Proceedings of the National Academy of Sciences, 103(8): 2977–2981.

Habibi E., Kalbassi M.R., Hosseini S.J. and Qasemi S.A. 2013. Feasibility of identification of fall and spring migrating Caspian trout (*Salmo trutta caspius*) by using AFLP molecular marker. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 13: 241–248.

Hajirezaee S., Mojazi Amiri B. and Mirvaghefi A.R. 2010. Relationships between the chemical properties of seminal fluid and the sperm motility characteristics of Caspian brown trout, *Salmo trutta caspius* (a critically endangered salmonid fish). Research Journal of Fisheries and Hydrobiology, 5(1): 27–31.

Heisler N. 1993. Acid-base regulation in response to changes of the environment: Characteristics and capacity. P: 207–230. In: Rankin J.C. and Jensen F.B. (Eds.). Fish Ecophysiology. Chapman and Hall, USA.

Henry R.J. 1974. Clinical Chemistry: Principles and Technics. Harper and Row, USA. 1629P.

Jobling M. 1995. Environmental biology of fishes. Chapman and Hall Fish and Fisheries Series, 16: 1–35.

Klontz G.W. 1994. Fish hematology. P: 121–132. In: Stolen J.S., Fletcher T.C., Rowley A.F., Klikoff T.C., Kaattari S.L. and Smith S.A. (Eds.). Techniques in Fish Immunology. SOS Publications, USA.

Kubokawa K., Watanabe T., Yoshioka M. and Iwata M. 1999. Effects of acute stress on plasma cortisol, sex steroid hormone and glucose levels in male and female sockeye salmon during the breeding season. Aquaculture, 172: 335–349.

Lee C.S. and Donaldson E.M. 2001. General discussion on "Reproductive biotechnology in finfish aquaculture. Aquaculture, 197(1): 303–320.

Li P., Lewis D.H. and Gatlin D.M. 2004. Dietary oligonucleotides from yeast RNA influence immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. Fish and Shellfish Immunology, 16(5): 561–569.

Malheiro D.B.T. 2015. Effects of oxygen availability on hematological parameters, immune status, gill histomorphology and gene expression of Senegalese sole (*Solea senegalensis*): The role of acute hyperoxia. M.Sc. Thesis, Universidade do Porto, Portugal. 51P.

Mariana S. and Badr G. 2019. Impact of heat stress on the immune response of fishes. Survey in Fisheries Sciences, 5(2): 149–159.

Matey V., Richards J.G., Wang Y., Wood C.M., Rogers J., Davies R., Murray B.W., Chen X.Q., Du J. and Brauner C.J. 2008. The effect of hypoxia on gill morphology and ionoregulatory status in the Lake Qinghai scaleless carp, *Gymnocypris przewalskii*. The

Journal of Experimental Biology, 211: 1063–1074.

Maxime V., Nonnotte G., Peyraud C., Williot P. and Truchot J.P. 1995. Circulatory and respiratory effects of a hypoxic stress in the Siberian sturgeon. Respiration Physiology, 100: 203–212.

Mohagheghi Samarin A., Mojazi Amiri B., Bahre Kazemi M., Soltani M., Matinfar A., Abtahi B. and Pusti I. 2010. Biochemical and histological studies of over-ripened oocyte in the Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*) to determine biomarkers for egg quality. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 9(1): 33–48.

Panigrahi A., Kiron V., Puangkaew J., Kobayashi T., Statoh S. and Sugita H. 2005. The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 243: 241–254.

Parker T.M. 2013. Effects of the interaction of environmental factors (hypoxia and ammonia) on fish. M.Sc. Thesis, The Ohio State University, USA. 72P.

Patriche T., Patriche N., Bocioc E. and Coada M.T. 2011. Serum biochemical parameters of farmed carp (*Cyprinus carpio*). Aquaculture, Aquarium, Conservation and Legislation-International Journal of the Bioflux Society, 4: 137–140.

Radu D., Oprea L., Bucur C., Costache M. and Oprea D. 2009. Characteristics of haematological parameters for carp culture and Koi (*Cyprinus carpio* Linneaus, 1758) reared in an intensive system. Journal of Animal Science and Biotechnology, 66: 1–2.

Rotllant J., Balm P.H.M., Perez-Sanchez J., Wendelaar-Bonga S.E. and Tort L. 2001. Pituitary and interrenal function in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L., Teleostei) after handling and confinement stress. General and Comparative Endocrinology, 121: 333–342.

Stoskopf M.K. 1993. Fish Medicine. Saunders Company, Philadelphia. 882P.

Swift D.J. 1982. Changes in selected blood component concentrations of rainbow trout, *Salmo gairdneri*, following the blocking of the cortisol stress response with betamethasone and subsequent exposure to phenol or hypoxia. Journal of Fish Biology, 21: 269–277.

Tavares-Dias M. and Moraes F.R. 2010. Biochemical parameters for *Piaractus mesopotamicus*, *Colossoma macropomum* (Characidae) and hybrid Tambacu (*P. mesopotamicus* × *C. macropomum*). Ciencia Animal

Brasileira Goiania, 11(2): 363–368.

Terova G., Rimoldi S., Cora S., Bernardini G., Gornati R. and Saroglia M. 2008. Acute and chronic hypoxia affects HIF-1α mRNA levels in Sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture, 279: 150–159.

Timmons M.B., Ebeling J.M., Wheaton F.W., Summerfelt S.T. and Vinci B.J. 2002. Recirculating Aquaculture Systems. Cayuga Aqua Ventures Llc, USA. 769P.

Van Raaij M.T.M., Van Den Thillart G., Vianen G.J., Pit D.S.S., Balm P.H.M. and Steffens A.B. 1996. Substrate mobilization and hormonal changes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during stepwise decreasing oxygen levels. Netherlands Journal of Zoology, 51: 33–50.

Vosylien M.Z. 1996. Hmatological parameters of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during short-term exposure to copper. Ecology, 3: 12–18.

Weber R.E. and Lykkeboe G. 1978. Respiratory adaptations in carp blood, Influence of hypoxia, red cell organic phosphatase, divalent cation and CO_2 on hemoglobinoxygen affinity. Journal of Comparative Physiology, 128: 127–137.

Wotton I. and Freeman H. 1974. Microanalysis in Medicinal Biochemical. Churchill Livingstone, UK. 1982P.

Zaghloul K.H., Hanna M.I. and Zaki M.M. 2007. Assessment and control of nitrite toxicity in *Clarias gariepinus*. Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries, 11(3): 1047–1068.

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 9, No. 1, Spring 2021

Research Paper

Evaluation of oxygen changes on survival, some stress indices and hematological and immunological factors in Caspian Sea salmon (*Salmo trutta caspius*)

Shaghayegh Rezakhani[1], Flora Mohammadizadeh[2], Hossein Khara[3]*, Amir Hooshang Bahri[4], Mohaddeseh Ahmadnezhad[5]

Received: July 2020 Accepted: October 2020

Abstract

Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*) is one of the most valuable fishes in the Caspian Sea and has great value due to its marketability, appearance and taste of meat. This study was carried out to determine the effects of oxygen changes on survival, some stress indices and hematological and immunological factors in Caspian Sea salmon (*Salmo trutta caspius*). 210 fish (50±10g) were randomly selected and placed in tanks with aerator and oxygen capsule. Fish were divided in 3 treatments with 3 replications including treatment hypoxia (2-3 mg/L oxygen), treatment control or normoxia (7-8 mg/L oxygen) and treatment hyperoxia (12-14 mg/L oxygen). Blood sampling were performed for 12 and 24 hours. The results showed that fish had no mortality in the different oxygen treatments. The effect of oxygen showed that there were significant differences in WBC, RBC, hemoglobin, hematocrit, neutrophil, lymphocyte, cortisol, glucose, lactate, lysozyme, total immunoglobulin, IgM, albumin, and total protein ($P<0.05$). In general, 7-8 mg/L oxygen is the most favorable condition for Caspian brown trout. Because the most appropriate values of factors were observed more in this group, which showed a significant difference with other treatments.

Key words: *Caspian Brown Trout*, Salmo trutta caspius, *Oxygen Stress, Hematological Factors, Immunity, Stress*.

1- Ph.D. Student in Fisheries, Department of Fisheries, Natural Resources Faculty, Bandar Abbas Branch, Islamic Azad University, Bandar Abbas, Iran.
2- Associate Professor in Department of Fisheries, Natural Resources Faculty, Bandar Abbas Branch, Islamic Azad University, Bandar Abbas, Iran.
3- Associate Professor in Department of Fisheries, Natural Resources Faculty, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran.
4- Assistant Professor in Department of Fisheries, Natural Resources Faculty, Bandar Abbas Branch, Islamic Azad University, Bandar Abbas, Iran.
5- Assistant Professor in Physiology Department, Inland Water Aquaculture Center, Iranian Fisheries Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Anzali, Iran.

*Corresponding Author: h.khara1974@yahoo.com