



مقاله پژوهشی

تغییرات فیزیولوژیکی خون ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) نگهداری شده با تراکم‌های مختلف در سیستم بیوفلاک همراه با استرس حاد هیپوکسی

زهرا جغتایی^۱، حسین آدینه^{۲*}، محمد هرسیج^۲، سیده آیناز شیرنگی^۳

تاریخ دریافت: شهریور ۱۴۰۲ DOI: 10.22124/japb.2023.25520.1513 تاریخ پذیرش: آبان ۱۴۰۲

چکیده

ماهی کپور معمولی با تراکم ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ کیلوگرم در متر مکعب (به ترتیب D1، D2، D3 و D4) در محیط بیوفلاک همراه با استرس هیپوکسی حاد به منظور بررسی واکنش فیزیولوژیکی ماهیان ذخیره‌سازی شد. در مرحله اول ماهیان در شرایط بیوفلاک به مدت ۲۸ روز نگهداری و سپس در مرحله دوم آزمایش ماهیان به طور مجزا در ۱۲ مخزن با حجم آب ۲۵ لیتر (۴ تیمار × ۳ تکرار) با شرایط یکسان زیستی تقسیم شدند و فقط تراکم ذخیره‌سازی ماهی متغیر بود. افزایش تراکم در تیمار D4 به طور معنی‌داری تعداد گلبول‌های سفید و قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت را افزایش داد، اما لنفوسیت و آنزیم‌های کبدی کاهش یافت ($P < 0/05$). تراکم ذخیره‌سازی به طور معنی‌داری باعث افزایش ایمونوگلوبولین کل، لیزوزیم و کمپلمان ۵۰ در تیمارهای D1 و D2 (۶ و ۱۲ کیلوگرم در متر مکعب) شد ($P < 0/05$). شاخص استرس افزایش معنی‌داری در تیمارهای D3 و D4 داشت ($P < 0/05$). تراکم ذخیره‌سازی در تیمارهای D1 و D2 به طور معنی‌داری آنزیم سوپراکسید دیسموتاز را افزایش و آنزیم مالون‌دی‌آلدئید را کاهش داد ($P < 0/05$). به طور کلی برای کنترل استرس هیپوکسی در محیط بیوفلاک، تراکم ذخیره‌سازی بین ۶ تا ۱۲ کیلوگرم در متر مکعب توصیه می‌شود تا بتوان بین یک تا دو ساعت مشکل را حل کرد.

واژگان کلیدی: محیط فلاک، تراکم ذخیره‌سازی، ماهی کپور معمولی، کمبود اکسیژن.

- ۱- کارشناس ارشد شیلات، گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران.
- ۲- دانشیار گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران.
- ۳- استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه و فنی مهندسی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران.

* نویسنده مسئول: adineh.h@gonbad.ac.ir

مقدمه

هورمون‌ها، متابولیسم انرژی، تغییرات اسمزی و خون‌شناختی است (Tawwab et al., 2005). وجود استرس‌هایی با منشأ بیرونی و درونی باعث پاسخ‌های نورواندوکراین (پاسخ‌های عصبی-هورمونی) شده که باعث افزایش مقادیر کورتیکواستروئیدها و کاتکول آمین‌ها می‌شود (Pickering, 1993). از این رو، پاسخ به استرس باعث تغییرات میزان غلظت کورتیزول، گلوکز، هماتوکریت، پروتئین کل پلاسما یا سرم خون ماهی می‌شود (Trenzado et al., 2006).

تکنولوژی بیوفلاک به عنوان سیستم بهینه بازیافت آب و غذا (Aghabarari et al., 2023a; Adineh et al., 2021)، یکی از سیستم‌های پرورشی با کمترین میزان استرس برای آبزیان از جمله ماهی کپور معمولی شناخته شده است (Adineh et al., 2019)، اما توجه به شاخص‌های محیطی مانند دما، حجم فلاک، دوره نوری، اکسیژن محلول و شاخص‌های کیفی آب مانند آمونیاک، نیترات، نیتريت، فسفات، pH و غیره و همچنین تنظیم نسبت کربن به نیتروژن حائز اهمیت است. از این رو، عدم کنترل این عوامل بویژه غلظت اکسیژن محلول و ایجاد هیپوکسی می‌تواند منجر به بروز استرس

نیاز انسان‌ها در جهان به پروتئین بویژه محصولات شیلاتی باعث شده است تا گسترش تکنولوژی‌های جدید در صنعت آبی‌پروری روندی افزایشی داشته باشد. یکی از تکنیک‌های نوین که در سال‌های اخیر مورد توجه پژوهشگران در سراسر جهان قرار گرفته است تکنولوژی بیوفلاک است، اما توجه به عوامل محدود کننده و استرس‌زا مانند تراکم ذخیره‌سازی ماهی و میزان غلظت اکسیژن محلول در آب در توسعه این فناوری بسیار حائز اهمیت است (Adineh et al., 2019; Saberi et al., 2022).

تراکم ذخیره‌سازی ماهی به عنوان یک عامل تعیین کننده در میزان تولید در سیستم پرورش تحت تاثیر تغییرات فیزیولوژیکی است. تراکم بهینه ذخیره‌سازی و نگهداری ماهی باعث بهبود کیفیت محیط پرورش و بهبود سیستم ایمنی می‌شود (Braun et al., 2010). استرس‌های ناشی از تراکم و تکنیک نگهداری آبی می‌تواند بر قابلیت رشد و عملکرد ایمنی موثر باشد (North et al., 2006). ماهی از طریق بسیاری از تغییرات فیزیولوژیکی برای حفظ هومئوستازی به عوامل استرسی واکنش می‌دهد که این پاسخ‌ها شامل ترشح

طور رایج در سیستم‌های نیمه متراکم در استخرهای خاکی انجام می‌شود، اما در سال‌های اخیر پرورش این گونه به طور متراکم و فوق متراکم در سیستم بیوفلاک به منظور کاهش مصرف و بار آلودگی آب، کاهش هزینه غذا، بهبود ایمنی زیستی و افزایش توان فیزیولوژیکی ماهی در کشورهای پیشرفته و توسعه یافته است (Avnimelech and Kochba, 2009).

مطالعات متعددی به صورت مجزا درباره تغییرات فیزیولوژیکی آبزیان در برابر استرس تراکم و هیپوکسی انجام شده است که می‌توان به اثرات تراکم ذخیره‌سازی ۳/۲۹، ۴/۸۴، ۷/۱۴ و ۸/۵۶ کیلوگرم در متر مربع ماهی کفشک (Seo and Park, 2022)، اثر متقابل تراکم (۱، ۱/۵ و ۲ کیلوگرم در متر مربع) و نرخ غذایی (۱، ۲ و ۳ درصد) بر شاخص‌های رشد و شاخص‌های خونی در فیل ماهی (*Huso huso*) (Ahmadi et al., 2019)، اثرات متقابل تراکم پرورش (۳، ۵ و ۱۰ کیلوگرم در متر مکعب) و تجویز خوراکی عصاره پوست انار با غلظت ۶۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم برای ماهی کپور معمولی (Mohammadian et al., 2022)، اثرات تنش‌های اکسیژنی هیپوکسی (۲ تا ۳ میلی‌گرم در لیتر اکسیژن)، هیپراکسی (۱۲ تا ۱۴ میلی‌گرم در لیتر

شود. کاهش اکسیژن محلول در یک سیستم آبی با غلظت ۱ تا ۳۰ درصد حالت اشباعی نیز هیپوکسی نامیده می‌شود. بیشتر ماهیان نمی‌توانند در محیط با اکسیژن کمتر از ۳۰ درصد اشباع زندگی کنند (Parker, 2013).

یکی از مهم‌ترین شاخص‌های کیفی آب در آبی‌پروری، در دسترس بودن اکسیژن کافی در آب پرورش ماهی است که منجر به موفقیت در تولید می‌شود (Timmons et al., 2002; Mallya, 2007). در صورت قطع شدن سیستم هوادهی و بروز حالت هیپوکسی برای ماهی در سیستم بیوفلاک دو عامل کمبود اکسیژن و رسوب فلاک در آبشش ماهی منجر به تلفات زود هنگام می‌شود. استرس‌ها می‌توانند تحت تاثیر شرایط محیطی، زیستی و مدیریتی کارگاه به وجود آمده و تاثیرات منفی بر فعالیت و سلامت ماهی بگذارند. از این رو، تراکم ذخیره‌سازی و کنترل شرایط زیستی آبزیان از جمله سیستم اکسیژن‌رسانی در سیستم بیوفلاک بسیار حائز اهمیت است.

ماهی کپور معمولی با نام علمی *Cyprinus carpio* به دلیل مقاومت در برابر تغییرات زیست محیطی و رژیم غذایی همه‌چیزخواری و کفزی‌خواری گزینه مناسبی برای پرورش در سیستم‌های بیوفلاک است. پرورش این گونه به

بیوفلاک (Shourbela et al., 2021)، اثرات فناوری بیوفلاک بر عملکرد فیزیولوژیکی ماهی کپور معمولی و مقاومت در برابر استرس بالای تراکم ذخیره‌سازی (Adineh et al., 2019) و بررسی استرس هیپوکسی مزمن (۲ تا ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر به مدت ۳۶ ساعت) و استرس حاد (۰/۱۳ تا ۰/۱۷ میلی‌گرم در لیتر به مدت ۱/۵ ساعت) بر سیستم ایمنی و پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی ماهی کپور معمولی پرورشی در سیستم بیوفلاک (Sabeti et al., 2022) انجام شده است. بنابراین به طور کلی با توجه به نتایج به دست آمده مشخص شده است که تراکم ذخیره‌سازی آبزیان را در محیط بیوفلاک می‌توان افزایش داد، اما در صورت بروز شرایط هیپوکسی شرایط زیستی برای آبزیان مختل می‌شود و تراکم‌پذیری کاهش می‌یابد.

در سیستم بیوفلاک در صورت قطع هوادهی و بروز مشکل تنفسی، تراکم ذخیره‌سازی یکی از عوامل اصلی در زمان شروع تلفات است و از آنجایی که تاکنون پژوهشی در ارتباط با تاثیر تراکم ذخیره‌سازی بر تغییرات فیزیولوژیکی ماهی کپور معمولی تحت استرس حاد هیپوکسی در سیستم بیوفلاک انجام نشده است، بنابراین هدف از این مطالعه بررسی تاثیر تراکم ذخیره‌سازی بر تغییرات خونی و پاسخ

اکسیژن) و نرموکسی (۷ تا ۸ میلی‌گرم در لیتر اکسیژن) بر برخی شاخص‌های خونی، ایمنی بچه ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) (Rezakhani et al., 2021)، بررسی اثرات سطوح مختلف غلظت اکسیژن هیپوکسی (۲ تا ۳ میلی‌گرم در لیتر)، نرموکسی (۵ تا ۶ میلی‌گرم در لیتر) و هیپراکسی (۹ تا ۱۰ میلی‌گرم در لیتر) بر شاخص‌های خونی و بیوشیمیایی فیل ماهی (Bagherzadeh et al., 2015, 2016) اشاره کرد که به طور کلی بر اساس سنجش شاخص‌های رشد و ایمنی می‌توان اظهار داشت که در شرایط هیپوکسی آبزیان دچار کاهش توان فیزیولوژیکی می‌شوند و در تراکم پایین و متوسط عملکرد بهتری در مقایسه با تراکم بالای ذخیره‌سازی دارند.

در محیط بیوفلاک نیز مطالعاتی همچون تاثیر تراکم ذخیره‌سازی (۱۰ و ۲۰ کیلوگرم در متر مکعب) و سطح پروتئین (۲۵ و ۳۵ درصد) جیره غذایی بر تغییرات فیزیولوژیکی در برابر استرس حاد تراکم (۸۰ کیلو در متر مکعب) ماهی کپور معمولی در سیستم بیوفلاک (Adineh et al., 2022)، تراکم پرورش کم (۱۴۰ ماهی در متر مکعب) و زیاد (۲۸۰ ماهی در متر مکعب) ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) در تیمارهای

ایمنی ماهی کپور معمولی تحت استرس حاد هیپوکسی در سیستم بیوفلاک بود.

برای سازگاری ماهی با شرایط آزمایش (بیوفلاک) نگهداری شد. در طول دوره نگهداری برای تولید فلاک در مخزن علاوه بر استفاده از غذا با ۳۲ درصد پروتئین برای تامین نیتروژن آب، از شکر به عنوان منبع کربنی برای تامین کربن استفاده شد.

برای آماده‌سازی جیره پایه اقلام غذایی مانند پودر ماهی، کنجاله سویا، آرد گندم، پودر ذرت، سیوس برنج، روغن ماهی، روغن سویا، فسفات کلسیم، ژلاتین، مکمل ویتامینه و مکمل معدنی تهیه و توسط نرم‌افزار جیره‌نویسی UFFDA تنظیم شد (جدول ۱).

مواد و روش‌ها

شرایط نگهداری ماهی کپور در محیط بیوفلاک

تعداد ۵۰۰ قطعه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) با میانگین وزن $14/06 \pm 0/52$ گرم از مزرعه پرورش ماهی گرمابی نوازنده (ساری، مازندران) تهیه و به آزمایشگاه آبی‌پروری دانشگاه گنبد کاووس انتقال یافت. ماهیان به مدت ۲۸ روز در دو مخزن با حجم آبیگری ۳۰۰ لیتر حاوی بیوفلاک

جدول ۱: اجزای تشکیل‌دهنده و ترکیب تقریبی جیره با ۳۲ درصد پروتئین

مقدار (درصد)	ترکیب تقریبی جیره	مقدار (گرم در کیلوگرم)	اقلام غذایی
۹۰/۰۱	ماده خشک	۱۱۰	پودر ماهی
۳۲/۰۱	پروتئین	۴۰۰	کنجاله سویا
۶/۱۹	چربی	۳۱۰	آرد گندم
۵/۷۱	خاکستر	۹۲	پودر ذرت
۴۰۱۶/۸۵	انرژی (کیلوکالری در کیلوگرم)	۵۰	سیوس برنج
		۱۰	روغن ماهی
		۹	روغن سویا
		۱۰	فسفات کلسیم
		۴	ژلاتین
		۲/۵	مکمل ویتامینه
		۲/۵	مکمل معدنی

پیش‌آزمون استرس در محیط بیوفلاک (تراکم ذخیره‌سازی همراه با هیپوکسی حاد)

در پژوهش حاضر به منظور تعیین زمان شروع بحران (حرکت ماهی به سطح آب و سپس شروع مرگ و میر) برای ماهی کپور معمولی نگهداری شده در محیط بیوفلاک، ماهیان در ۴ تیمار (هر یک با ۲ تکرار) با تراکم ذخیره‌سازی ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ کیلوگرم در متر مکعب و همگی تحت استرس هیپوکسی حاد در مخازن ۲۵ لیتری قرار داده شدند. شرایط نگهداری ماهی‌ها در همه تیمارها یکسان و فقط تراکم ذخیره‌سازی متغییر بود. شرایط یکسان نگهداری در محیط بیوفلاک شامل میانگین وزن $18/6 \pm 0/77$ گرم ماهیان، نسبت کربن به نیتروژن ۱۵ (C:N15)، حجم فلاک در حدود ۱۵ میلی‌گرم در لیتر (اندازه‌گیری با قیف ایمهوف)، قطع کامل هوادهی و اعمال هیپوکسی و دمای آب $26/09 \pm 0/32$ درجه سانتی‌گراد بود. در آزمایش اصلی قبل از شروع مرگ و میر از ماهیان نمونه‌برداری انجام شد.

طرح آزمایش

پس از انجام پیش‌آزمون زمان شروع مرگ و میر ماهیان در تراکم‌های ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ کیلوگرم در متر مکعب مشخص شد. برای اجرای

بعد از تهیه اقلام غذایی، ابتدا مواد اولیه آسیاب و سپس توسط الک ۱۰۰ میکرونی عبور داده شد تا مواد به صورت پودری و همگن شوند. خمیر آماده شده از چرخ گوشت عبور داده شد تا رشته‌های غذایی تهیه و سپس خشک شد. غذای ساخته شده پس از خورد شدن به اندازه دهان ماهی بسته‌بندی و در یخچال نگهداری شد. نسبت کربن به نیتروژن در محدوده ۱۵ (C:N15) محاسبه شد.

شاخص‌های کیفیت آب همچون دما، pH و غلظت اکسیژن محلول توسط دستگاه پورتابل کیفیت‌سنج آب (Hach, HQ40d, آمریکا) اندازه‌گیری شد.

قلیائیت آب به روش تیتراسیون و غلظت فسفات، آمونیاک کل (TAN)، نیترات و نیتريت توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (Libra S22, Beckman, انگلستان) بر اساس استاندارد آزمایشگاهی سنجش شد (APHA, 1998). هوادهی در همه بخش‌های استخر ذخیره به طور مداوم انجام گرفت. ماهیان روزانه با سه وعده در زمان‌های ۷ صبح، ۱۳ ظهر و ۱۹ شب به میزان ۲/۵ درصد وزن بدن تغذیه شدند. در طول دوره نگهداری میانگین میزان تعویض آب در حدود ۵ درصد بود (Qoljajei et al., 2023).

پلاسمای با کمک سانتریفیوژ با دور ۵۰۰۰ در مدت ۱۰ دقیقه از خون جداسازی و تا زمان انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. شاخص‌های خون‌شناسی شامل تعداد گلبول‌های سفید (WBC) و قرمز (RBC) با استفاده از لام هموسیتومتر نئوبار، درصد هماتوکریت (Hct) به روش استاندارد میکروهماتوکریت و غلظت هموگلوبین (Hb) به روش سیات‌مت هموگلوبین اندازه‌گیری شد (Feldman et al., 2000). محاسبه شاخص گلبولی MCV، MCH و MCHC از رابطه‌های ۱ تا ۳ انجام شد (Borges et al., 2004).

رابطه ۱:

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

رابطه ۲:

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

رابطه ۳:

$$MCHC (g/dL) = (Hb / Hct) \times 100$$

به منظور شمارش افتراقی گلبول‌های سفید (نوتروفیل، لنفوسیت و منوسیت) گسترش خونی روی لام‌های شیشه‌ای معمولی تهیه و به روش گیمسا رنگ‌آمیزی شد و درصد هر گروه

آزمایش در همه تیمارها شرایط نگهداری ماهیان همانند شرایط پیش‌آزمون یکسان تنظیم شد و فقط تراکم ذخیره‌سازی متغیر بود. به این منظور، برای چهار تیمار (هر یک با سه تکرار) با حجم آبگیری ۲۵ لیتر حاوی فلاک، تراکم ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ کیلوگرم در متر مکعب به ترتیب D1، D2، D3 و D4 در نظر گرفته شد. با حرکت ماهی‌ها به سطح آب و شروع تلفات ماهی در هر تیمار، نمونه‌برداری از پلاسمای انجام شد. در زمان انجام استرس هیپوکسی حاد در محیط بیوفلاک به منظور جلوگیری از تغییر در کیفیت آب و شاخص‌های خونی، غذادهی ماهیان قطع شد.

نمونه‌برداری و سنجش شاخص‌های خونی

در زمان اجرای استرس هیپوکسی، غذادهی ماهیان قطع شد. بعد از استرس هیپوکسی، به منظور سنجش شاخص‌های خون‌شناسی، متابولیکی، ایمنی و آنتی‌اکسیدانی پلاسمای خون ماهی کپور معمولی در تراکم‌های مختلف در شرایط بیوفلاک همراه با استرس هیپوکسی، نمونه‌های پلاسمای خون از ۳ ماهی از هر مخزن (۹ ماهی از هر تیمار) به طور مجزا با استفاده از سرنگ هپارینه (۱۰ میکرولیتر به ازای ۰/۵ میلی‌لیتر خون) از ساقه دمی ماهی گرفته شد.

تعیین شد. به این منظور، فعالیت مکمل بر اساس همولیز گلبول‌های قرمز خرگوش اندازه‌گیری شد. گلبول‌های قرمز خرگوش سه مرتبه با بافر اتیلن گلیکول تترا استیک اسید-منیزیوم-ژلاتین ورنال شسته شد و تعداد سلول‌های آن به کمک لام نئوبار 2×10^8 سلول در میلی‌لیتر تنظیم شد. ابتدا جذب نوری لیز ۱۰۰ درصد گلبول‌های قرمز خرگوش با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون بالا به $3/4$ میلی‌لیتر آب مقطر تعیین شد. سپس نمونه‌های پلاسما ۱۰۰ برابر با بافر رقیق شده، حجم‌های متفاوتی از آن در لوله آزمایش استریل تهیه شد و حجم همه لوله‌ها به کمک بافر به ۲۵۰ میکرولیتر رسانده شد. سرانجام به همه لوله‌ها ۱۰۰ میکرولیتر گلبول قرمز خرگوش اضافه و مخلوط به دست آمده در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه قرار داده شد. در پایان به هر کدام از لوله‌ها $3/15$ میلی‌لیتر محلول $0/185$ درصد کلرید سدیم افزوده شد. سپس لوله‌ها در ۱۶۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند و جذب نوری محلول رویی در طول موج ۴۱۴ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد.

غلظت کورتیزول با استفاده از کیت آزمایشگاهی (Monobind، آمریکا) به روش

از گلبول‌های سفید محاسبه شد (Pathiratne and Rajapakse, 1998).

پروتئین کل، آلبومین، گلوکز، لاکتات، فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP)، آسپارات آمینوترانسفراز (AST) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT) پلاسماي خون با استفاده از کیت تشخیصی (پارس آزمون، ایران) بر اساس دستور العمل شرکت سازنده و میزان ایمنوگلوبولین کل به روش کدورت‌سنجی با دستگاه اسپکتروفتومتر (Erma, AE-600P، ژاپن) اندازه‌گیری شد.

برای تعیین میزان فعالیت لیزوزیم پلاسما از روش ارائه شده توسط Ellis (۱۹۹۰) استفاده شد. به این ترتیب که مقدار ۲۵ میکرولیتر پلاسما به پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای الیزا افزوده شد. سپس مقدار ۱۷۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی *Micrococcus lysodeikticus* در غلظت $0/02$ میلی‌گرم در لیتر در $0/5$ مولار بافر فسفات با pH $6/2$ اضافه شد. با استفاده از دستگاه الیزاریدر (Bio-Tech، آمریکا) جذب نوری اولیه در طول موج ۵۳۰ نانومتر خوانده شد و پس از یک ساعت نگهداری در دمای اتاق، دوباره جذب نوری اندازه‌گیری شد. هر واحد از فعالیت لیزوزیم بر اساس کاهش جذب ($0/001$ در دقیقه) تعیین شد. فعالیت کمپلمان 50 (ACH₅₀) به روش Sunyer و Tort (۱۹۹۵)

نتایج

بر اساس نتایج به دست آمده از پیش‌آزمون، زمان بحران برای ماهی کپور معمولی با تراکم ذخیره‌سازی ۶ کیلوگرم در متر مکعب یک ساعت و سی دقیقه، ۱۲ کیلوگرم در متر مکعب یک ساعت و بیست دقیقه، ۲۴ کیلوگرم در متر مکعب سی و هفت دقیقه و ۴۸ کیلوگرم در متر مکعب پانزده دقیقه به دست آمد. در مرحله اول آزمایش و طی ۲۸ روز نگهداری ماهی کپور معمولی در محیط بیوفلاک، مقادیر شاخص‌های کیفیت آب برای pH 7.91 ± 0.09 ، آمونیاک کل 0.69 ± 0.14 میلی‌گرم در لیتر، نیترات 2.16 ± 0.20 میلی‌گرم در لیتر، نیتريت 0.07 ± 0.01 میلی‌گرم در لیتر، فسفات 0.29 ± 0.02 میلی‌گرم در لیتر و قلیائیت 307.87 ± 17.34 میلی‌گرم در لیتر کربنات کلسیم به دست آمد.

در مرحله دوم آزمایش، ماهیان کپور در شرایط یکسان زیستی بودند و فقط تراکم ذخیره‌سازی ماهی تغییر یافت. نتایج نشان داد تعداد گلبول‌های سفید در تیمار D4 افزایش معنی‌داری داشت ($P < 0.05$)، در حالی که بین دیگر تیمارهای آزمایشی اختلافی مشاهده نشد ($P > 0.05$). تعداد گلبول‌های قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت در تیمارهای D3 و D4 در مقایسه

الایزا تعیین شد. برای سنجش آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، ابتدا در حضور هیدروژن پراکسید (H_2O_2) فرآیند اتواکسیداسیون پیروگالول بررسی شد. در طی این فرآیند از سطح آنزیم سوپراکسید دیسموتاز موجود در پلاسما کاسته شد، سپس سنجش با دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۴۲۰ نانومتر انجام شد (Marklund and Marklund, 1974). فعالیت مالنون دی‌آلدئید بر اساس روش استاندارد در طول موج ۵۳۵ نانومتر سنجش شد (Baluchnejadmojarad et al., 2010).

تجزیه و تحلیل آماری

ابتدا نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون Shapiro-Wilk بررسی شد. میانگین داده‌ها بین تیمارهای آزمایشی با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و توسط پس‌آزمون چند دامنه دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P < 0.05$) تجزیه و تحلیل شد. تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار IBM SPSS Statistics نسخه ۱۶ انجام شد. برای رسم نمودارها از نرم افزار Microsoft Excel 2016 استفاده شد. نتایج به صورت (میانگین \pm انحراف معیار) ارائه شده است.

با دیگر تیمارهای آزمایشی تفاوت معنی‌داری داشت ($P < 0.05$). اندازه شاخص‌های گلبولی MCV، MCH و MCHC در تیمارهای D3 و D4 افزایش معنی‌داری داشت ($P < 0.05$). نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها بین تیمارهای با سطوح مختلف تراکم اختلاف معنی‌داری داشت ($P < 0.05$)، به طوری که بیشترین و کمترین درصد از آنها به ترتیب در تیمارهای D4 و D1 به دست آمد. بیشترین درصد لنفوسیت‌ها در تیمار D1 و کمترین درصد آن در تیمار D4 مشاهده شد (جدول ۱).

غلظت پروتئین کل و آلبومین پلاسما، خون ماهی کپور در تیمارهای D3 و D4 کاهش معنی‌دار آماری در مقایسه با دیگر تیمارهای آزمایشی داشت ($P < 0.05$; جدول ۲).

جدول ۱: شاخص‌های خون‌شناسی ماهی کپور معمولی تحت استرس تراکم ذخیره‌سازی در محیط بیوفلاک همراه با شرایط هیپوکسی حاد (میانگین \pm انحراف معیار)

تیمارهای آزمایشی				شاخص
D4	D3	D2	D1	
۴/۴۱ \pm ۰/۱۰ ^a	۳/۳۰ \pm ۰/۳۰ ^b	۳/۰۷ \pm ۰/۲۵ ^b	۲/۹۵ \pm ۰/۲۰ ^b	گلبول سفید ($\times 10^3/\text{mm}^3$)
۱/۶۷ \pm ۰/۰۳۶ ^a	۱/۶۹ \pm ۰/۰۱۰ ^a	۱/۵۸ \pm ۰/۰۴۰ ^b	۱/۴۷ \pm ۰/۰۳۶ ^c	گلبول قرمز ($\times 10^6/\text{mm}^3$)
۷/۲۳ \pm ۰/۰۶ ^a	۷/۳۵ \pm ۰/۱۵ ^a	۶/۸۵ \pm ۰/۲۱ ^b	۶/۲۹ \pm ۰/۲۰ ^c	هموگلوبین (g/dL)
۳۴/۷۹ \pm ۰/۵۰ ^a	۳۴/۵۸ \pm ۰/۴۰ ^a	۳۰/۰۵ \pm ۰/۹۷ ^b	۲۹/۴۱ \pm ۱/۵۴ ^b	هماتوکریت (%)
۲۰۶/۸۶ \pm ۲/۹۰ ^a	۲۰۲/۱۵ \pm ۱/۶۱ ^b	۱۸۹/۷۰ \pm ۱/۴۷ ^d	۱۹۶/۴۶ \pm ۱/۳۶ ^c	MCV (fL)
۴۳/۰۵ \pm ۰/۱۵ ^a	۴۳/۲۰ \pm ۰/۶۵ ^a	۴۱/۲۵ \pm ۰/۳۲ ^b	۴۱/۴۶ \pm ۰/۷۵ ^b	MCH (pg)
۲۲/۵۱ \pm ۰/۳۵ ^a	۲۲/۳۰ \pm ۰/۱۰ ^a	۲۱/۳۲ \pm ۰/۰۹ ^b	۲۱/۶۲ \pm ۰/۰۷ ^b	MCHC (g/dL)
۱۶/۰۹ \pm ۱/۰۵ ^a	۱۲/۶۱ \pm ۰/۳۷ ^b	۹/۵۸ \pm ۰/۶۹ ^c	۸/۳۰ \pm ۰/۲۰ ^d	نوتروفیل (%)
۸۲/۵۰ \pm ۰/۵۰ ^c	۸۳/۱۵ \pm ۰/۲۷ ^c	۸۶/۰۰ \pm ۱/۰۰ ^b	۸۸/۲۶ \pm ۱/۷۶ ^a	لنفوسیت (%)
۵/۴۸ \pm ۰/۵۴ ^a	۳/۹۴ \pm ۰/۱۵ ^b	۳/۶۲ \pm ۱/۲۳ ^b	۲/۱۴ \pm ۰/۵۰ ^c	مونوسیت (%)

حروف غیرمشابه در هر ردیف نشانه اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای آزمایشی است ($P < 0.05$). D1: تراکم ۶ کیلوگرم در متر مکعب؛ D2: تراکم ۱۲ کیلوگرم در متر مکعب؛ D3: تراکم ۲۴ کیلوگرم در متر مکعب؛ D4: تراکم ۴۸ کیلوگرم در متر مکعب.

جدول ۲: شاخص‌های بیوشیمیایی پلاسمای خون ماهی کپور معمولی تحت استرس تراکم ذخیره‌سازی در محیط بیوفلاک همراه با شرایط هیپوکسی حاد (میانگین \pm انحراف معیار)

تیمارهای آزمایشی				شاخص
D4	D3	D2	D1	
۲/۱۷ \pm ۰/۰۸ ^c	۲/۵۵ \pm ۰/۰۵ ^b	۳/۲۰ \pm ۰/۰۸ ^a	۳/۲۷ \pm ۰/۰۶ ^a	پروتئین (g/dL)
۱/۲۲ \pm ۰/۰۳ ^b	۱/۲۴ \pm ۰/۰۲ ^{ab}	۱/۲۷ \pm ۰/۰۱ ^{ab}	۱/۲۹ \pm ۰/۰۲ ^a	آلبومین (g/dL)
۲۵۴/۱۹ \pm ۵/۳۷ ^a	۲۵۸/۷۵ \pm ۵/۱۱ ^a	۲۳۱/۰۷ \pm ۳/۱۴ ^b	۱۵۷/۲۳ \pm ۵/۷۸ ^c	ALP (U/L)
۳۱/۳۶ \pm ۱/۸۸ ^a	۲۸/۸۹ \pm ۱/۴۵ ^a	۲۵/۱۱ \pm ۱/۳۳ ^b	۲۲/۷۹ \pm ۱/۶۲ ^b	ALT (U/L)
۴۸۰/۸۰ \pm ۴/۰۱ ^a	۴۲۲/۲۲ \pm ۴/۹۸ ^b	۳۲۰/۰۰ \pm ۳/۹۰ ^c	۲۴۶/۶۷ \pm ۶/۴۹ ^d	AST (U/L)

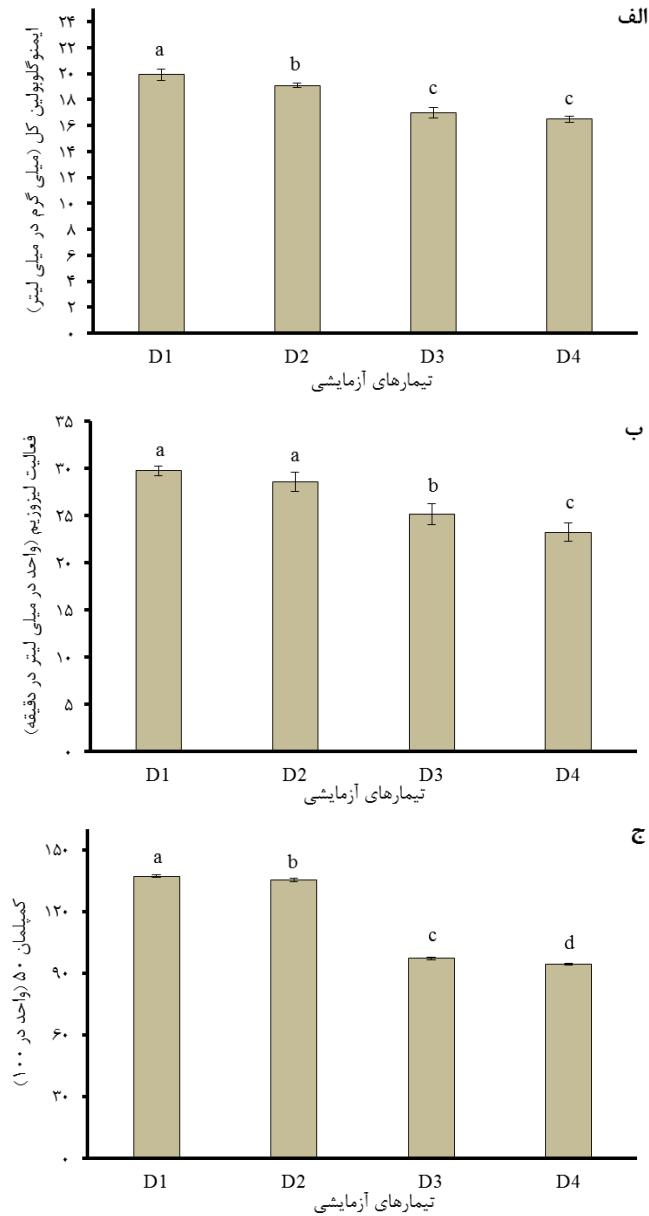
حروف غیرمشابه در هر ردیف نشانه اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای آزمایشی است ($P < 0.05$). D1: تراکم ۶ کیلوگرم در متر مکعب؛ D2: تراکم ۱۲ کیلوگرم در متر مکعب؛ D3: تراکم ۲۴ کیلوگرم در متر مکعب؛ D4: تراکم ۴۸ کیلوگرم در متر مکعب.

تیمارهای D1 و D2 افزایش معنی‌داری داشت ($P < 0.05$)، در حالی که کمترین آن در تیمار D4 به دست آمد (شکل ۱-ب). غلظت کمپلمان ۵۰ بین تیمارهای آزمایشی تفاوت معنی‌داری داشت ($P < 0.05$)، به طوری که بیشترین و کمترین آن به ترتیب در تیمارهای D1 و D4 به دست آمد (شکل ۱-ج).

مقادیر شاخص‌های استرس پلاسمای خون ماهی کپور معمولی تحت استرس تراکم ذخیره‌سازی در محیط بیوفلاک همراه با شرایط هیپوکسی حاد در شکل ۲ آمده است.

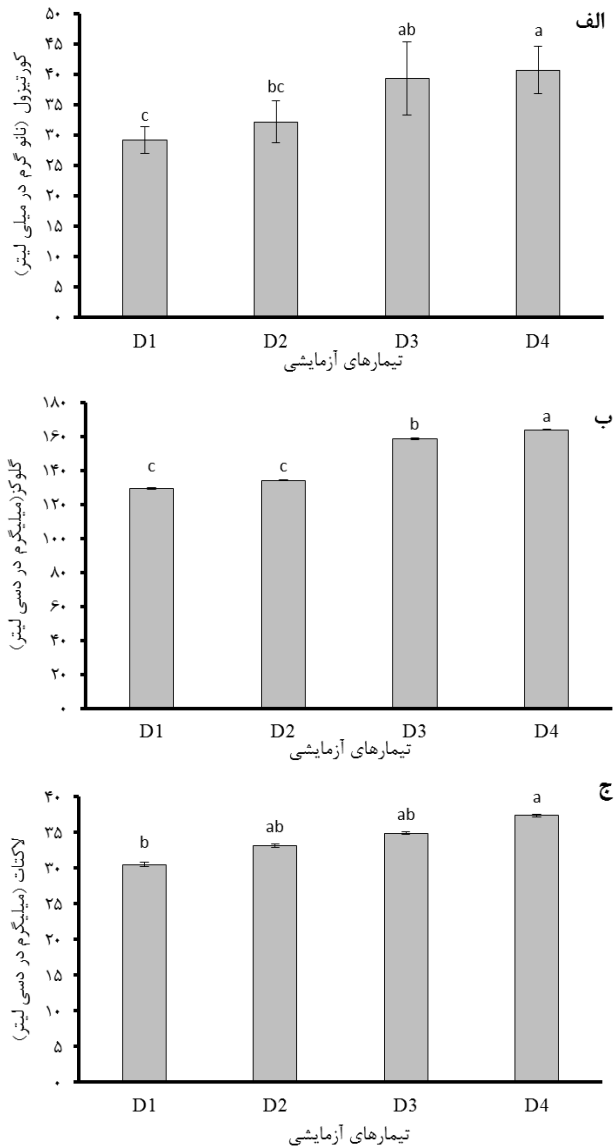
غلظت آنزیم‌های کبدی ALP، ALT و AST در تیمارهای D3 و D4 در مقایسه با دیگر تیمارها افزایش معنی‌داری داشت ($P < 0.05$)؛ (جدول ۲).

مقادیر شاخص‌های ایمنی پلاسمای خون ماهی کپور معمولی تحت استرس تراکم ذخیره‌سازی در محیط بیوفلاک همراه با شرایط هیپوکسی حاد در شکل ۱ آورده شده است. ایمنوگلوبولین کل در تیمار D1 بیشترین و در تیمارهای D3 و D4 به کمترین مقدار خود رسید (شکل ۱-الف). فعالیت لیزوزیم در



شکل ۱: پاسخ ایمنی پلاسمای خون ماهی کپور معمولی تحت استرس تراکم ذخیره‌سازی در محیط بیوفلاک همراه با شرایط هیپوکسی حاد (میانگین \pm انحراف معیار). الف) غلظت ایمنوگلوبولین کل. ب) فعالیت لیزوزیم. ج) کمپلمان ۵۰. حروف غیرمشابه بر روی ستون‌ها نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای آزمایشی

است ($P < 0/05$). D1: تراکم ۶ کیلوگرم در متر مکعب؛ D2: تراکم ۱۲ کیلوگرم در متر مکعب؛ D3: تراکم ۲۴ کیلوگرم در متر مکعب؛ D4: تراکم ۴۸ کیلوگرم در متر مکعب.



شکل ۲: مقادیر شاخص‌های استرس پلاسمای خون ماهی کپور معمولی تحت استرس تراکم ذخیره‌سازی در محیط بیوفلاک همراه با شرایط هیپوکسی حاد (میانگین \pm انحراف معیار). الف) کورتیزول. ب) گلوکز. ج)

لاکتات. حروف غیرمشابه بر روی ستون‌ها نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای آزمایشی است ($P < 0.05$). D1: تراکم ۶ کیلوگرم در متر مکعب؛ D2: تراکم ۱۲ کیلوگرم در متر مکعب؛ D3: تراکم ۲۴ کیلوگرم در متر مکعب؛ D4: تراکم ۴۸ کیلوگرم در متر مکعب.

غلظت کورتیزول پلاسمای خون در تیمار

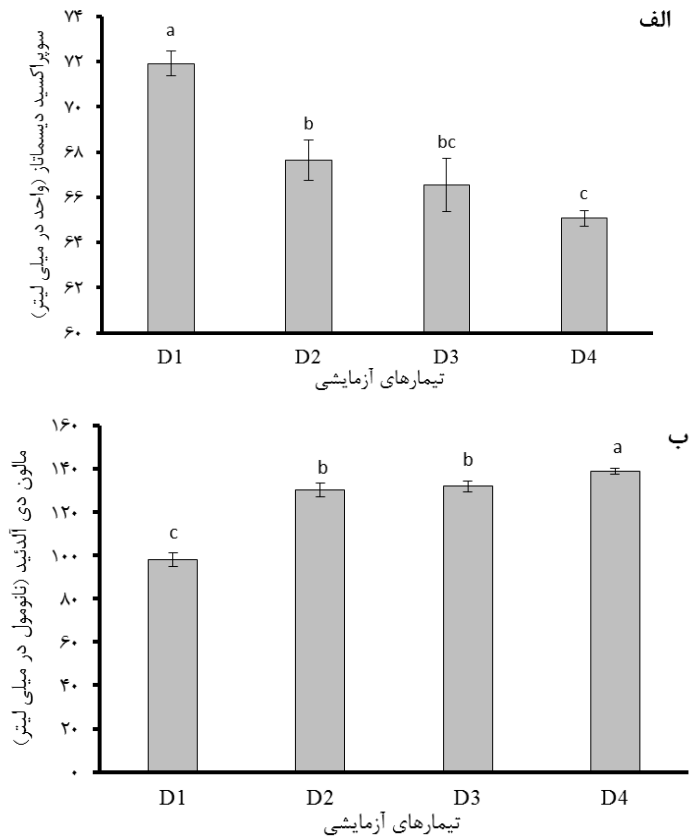
D4 با تراکم ذخیره‌سازی ۴۸ کیلوگرم در مترمکعب افزایش معنی‌داری داشت ($P < 0.05$) و کمترین آن در تیمار D1 با تراکم ذخیره‌سازی ۶ کیلوگرم در متر مکعب به دست آمد (شکل ۲-الف). غلظت گلوکز و لاکتات بین تیمارهای مختلف آزمایشی تفاوت معنی‌داری داشت ($P < 0.05$)، به طوری که بیشترین و کمترین آنها به ترتیب در تیمارهای D1 و D4 مشاهده شد (شکل ۱-ب و ج).

غلظت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی پلاسمای

خون ماهی کپور معمولی تحت استرس تراکم ذخیره‌سازی در محیط بیوفلاک همراه با شرایط هیپوکسی حاد در شکل ۳ آمده است. آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در تیمار D1 افزایش معنی‌دار آماری داشت ($P < 0.05$)، در حالی که کمترین آن در تیمار D4 به دست آمد (شکل ۳-الف). آنزیم مالون دی‌آلدئید بین تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌دار داشت ($P < 0.05$)، به طوری که بیشترین و کمترین آن به ترتیب در تیمارهای D1 و D4 مشاهده شد (شکل ۳-ب).

بحث

تکنولوژی بیوفلاک به عنوان یک سیستم آبی‌پروری دوست‌دار محیط زیست و بر پایه رشد میکروارگانیسم‌ها در محیط پرورش با حفظ کیفیت آب و تغذیه استوار است (Emerenciano et al., 2013). در پژوهش حاضر، قبل از شروع آزمایش اصلی ماهی کپور معمولی به مدت ۲۸ روز در شرایط زیستی بیوفلاک نگهداری شد. برای تولید و تکثیر فلاک‌های میکروبی دمای آب باید در محدوده ۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد باشد، در این پژوهش نیز دمای آب ۲۶/۰۹ درجه سانتی‌گراد بود. در مخازن بیوفلاک نگهداری ماهی کپور معمولی ترکیبات نیتروژنی در محدوده استاندارد بود که می‌تواند به دلیل حضور باکتری‌های نیتروفایر در محیط فلاک باشد (Azim and Little, 2008). همچنین، باکتری‌های هتروتروف در سیستم بیوفلاک می‌توانند غلظت آمونیاک کل و نیتريت را در مقادیر ایمن برای ماهی حفظ کنند.



شکل ۳: مقادیر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی پلاسماي خون ماهی کپور معمولی تحت استرس تراکم ذخیره‌سازی در محیط بیوفلاک همراه با شرایط هیپوکسی حاد (میانگین \pm انحراف معیار). الف) آنزیم سوپراکسید دیسمتاز. ب) مالون دی‌آلدئید. حروف غیرمشابه بر روی ستون‌ها نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای آزمایشی است ($P < 0.05$). D1: تراکم ۶ کیلوگرم در متر مکعب؛ D2: تراکم ۱۲ کیلوگرم در متر مکعب؛ D3: تراکم ۲۴ کیلوگرم در متر مکعب؛ D4: تراکم ۴۸ کیلوگرم در متر مکعب.

افزایش تراکم ذخیره‌سازی در سیستم‌های تجاری پرورش ماهی است و تعیین تراکم بیوفلاک با توجه به شرایط و نحو تولید فلاک مناسب برای توسعه پایداری صنعت آبی‌پروری می‌تواند متفاوت باشد. تراکم ذخایر یک عامل کلیدی در تعیین بهره‌وری و سوددهی مزارع (Rafatnezhad et al., 2008).

نتیجه انقباض طحال است (Witeska, 2005). بر اساس گزارش‌های منتشر شده تراکم ذخیره‌سازی ماهی کپور در محیط بیوفلاک را می‌توان از ۶ به ۱۲ کیلوگرم در متر مکعب افزایش داد (Adineh et al., 2019) که این به خاطر وجود ترکیبات زیست‌فعال همچون کلروفیل‌ها، کارتنوئیدها، فیتوستول‌ها، بروموفنل‌ها، قندهای آمین‌دار و ترکیبات ضدباکتریایی در محیط بیوفلاک است که منجر به تقویت سیستم ایمنی و وضعیت آنتی‌اکسیدانی آبزیان می‌شود (Ju et al., 2008; Crab et al., 2010; Adineh et al., 2019; Menaga et al., 2019). در همین راستا، تاثیر تراکم ذخیره‌سازی (۱۰ و ۲۰ کیلوگرم در متر مکعب) و سطح پروتئین (۲۵ و ۳۵ درصد) جیره غذایی بر تغییرات فیزیولوژیکی در برابر استرس حاد تراکم (۸۰ کیلوگرم در متر مکعب) ماهی کپور معمولی در سیستم بیوفلاک نشان داد که شرایط زیستی ماهی کپور در محیط بیوفلاک با تراکم متوسط ۱۰ کیلوگرم در متر مکعب می‌تواند بر پاسخ ایمنی و استرسی اثرات مثبت داشته باشد (Adineh et al., 2022). علاوه بر این با توجه به نتایج به دست آمده از سنجش شاخص‌های ایمنی و بیوشیمیایی سرم خون ماهی کپور معمولی

در این مطالعه اثرات تراکم ذخیره‌سازی بر تغییرات شاخص‌های خونی پلاسما ماهی کپور معمولی تحت استرس حاد هیپوکسی در سیستم بیوفلاک مورد بررسی قرار گرفت. در اغلب ماهیان، از شاخص‌های خون‌شناسی به عنوان شاخص‌های استرس استفاده می‌شود چرا که زمانی که ماهی در معرض استرس حاد یا مزمن قرار می‌گیرد تغییرات عمده‌ای در شاخص‌های خون‌شناختی به وجود می‌آید. در ماهی‌های تحت استرس، اغلب افزایش تعداد گلبول‌های قرمز و غلظت هموگلوبین و هماتوکریت مشاهده می‌شود (Dobsikova et al., 2009). نتایج به دست آمده از شاخص‌های خون‌شناسی نشان از افزایش معنی‌دار تعداد گلبول‌های قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت، MCH و MCHC در تیمارهای D3 و D4 با تراکم‌های ۲۴ و ۴۸ کیلوگرم در متر مکعب در محیط بیوفلاک همراه با استرس هیپوکسی داشت. در موقعیت استرس‌زا افزایش درصد هماتوکریت و غلظت هموگلوبین در پاسخ به تقاضای متابولیکی بالاتر منجر به افزایش ظرفیت حمل اکسیژن توسط خون و در نتیجه تامین نیاز اکسیژنی بافت‌های اصلی می‌شود. افزایش سریع تعداد گلبول‌های قرمز (که باعث افزایش حتی ۲۵ درصدی هماتوکریت می‌شود)

با میانگین وزن $17/10 \pm 0/3$ گرم در محیط بیوفلاک، بهترین تراکم ذخیره‌سازی این گونه ۲۵۰ قطعه ماهی در متر مکعب گزارش شده است (Nazarpour and Mohammadiazarm, 2023). همچنین نتایج بررسی وضعیت سلامت ماهی تیلاپیای نیل پرورش یافته در محیط بیوفلاک بدون تبادل آب نشان داد که پرورش این گونه با تراکم ۱۳ کیلوگرم در متر مکعب به عنوان تراکم بهینه در چنین شرایطی محسوب می‌شود (Manduca et al., 2020). اگرچه وجود برخی از ترکیبات زیست‌فعال در محیط بیوفلاک باعث بهبود وضعیت سلامتی فیزیولوژیکی موجودات پرورشی می‌شود و ممکن است به عنوان تحرک‌کننده ایمنی عمل کند (Zhao et al., 2013)، اما تراکم ذخیره‌سازی ارتباط مستقیم با حجم فلاک، مقدار غذای مصرفی، دمای آب، اکسیژن محلول و سازگاری آبی با شرایط زیستی دارد. یکی از عوامل محدودکننده توسعه سیستم بیوفلاک بروز استرس هیپوکسی به صورت مزمن و یا حاد است. استرس هیپوکسی می‌تواند هومئوستاز فیزیولوژیکی را که فرآیند پیچیده‌ای از تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در ماهی برای مقابله با شرایط استرس است، مختل کند (Terova et al., 2008). بنابراین

کمبود اکسیژن باعث اختلالات فیزیولوژیکی می‌شود (Kvamme et al., 2013; Abdel-Tawwab et al., 2015). علاوه بر این، استرس هیپوکسی در محیط بیوفلاک باعث رسوب فلاک در کف مخازن و آبشش ماهیان شده که باعث ایجاد شرایط نامطلوب زیستی و در نتیجه مرگ و میر دسته جمعی ماهیان می‌شود که بر این اساس زمان شروع تلفات ماهی در شرایط هیپوکسی در سیستم معمولی پرورش ۱ تا ۲ ساعت (Wawrowski et al., 2011) و برای ماهی کپور تحت استرس هیپوکسی در محیط بیوفلاک با تراکم ۱۵ کیلوگرم در متر مکعب حدود یک ساعت و سی دقیقه (۱/۵ ساعت) به دست آمده است (Saber et al., 2022).

سنجش شاخص‌های بیوشیمیایی و بررسی پاسخ ایمنی و وضعیت اکسیداتیو در بسیاری از جانوران از جمله ماهیان می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در ارتباط با وضعیت سلامت آنها در شرایط زیستی مختلف ارائه دهد (Bani and Hagh Vayghan, 2011). نتایج به دست آمده از سنجش شاخص‌های بیوشیمیایی و ایمنی پلاسمای خون ماهی کپور نشان از کاهش غلظت پروتئین کل، آلبومین، ایمونوگلوبین کل، لیزوزیم، کمپلمان ۵۰ و افزایش آنزیم‌های کبدی (ALT, AST و ALP) در تیمارهای D3 و D4

به ترتیب با تراکم ۲۴ و ۴۸ کیلوگرم داشت. باکتری‌ها، محصولات باکتریایی، کربوهیدرات‌ها و عوامل تغذیه‌ای نقش کلیدی را در تحریک سیستم ایمنی در شرایط عادی پرورش دارند (Dawood, 2021)، بنابراین وجود این میگرورگان‌ها در محیط بیوفلاک می‌تواند به افزایش ایمنی کمک کند (Crab et al., 2010). از این رو، گزارش شده است که به کارگیری سیستم بیوفلاک باعث بهبود شرایط فیزیولوژیکی همچون شاخص‌های خون‌شناسی و پاسخ ایمنی فیل ماهی می‌شود (Aghabarai et al., 2023). اگرچه در این مطالعه ماهیان در بیوفلاک از شرایط زیستی مناسبی برخوردار بودند، اما قرارگیری ماهی‌ها در معرض استرس حاد هیپوکسی باعث شد که ماهیان در تراکم‌های بالای ذخیره‌سازی در مقایسه با تیمارهای با تراکم کم و متوسط از نظر فیزیولوژیکی دچار نقص در سیستم ایمنی شوند. در ارتباط با اثر تراکم ذخیره‌سازی بر واکنش ایمنی ماهی کپور در سیستم نوین بیوفلاک، گزارش شده است که پرورش این ماهی با تراکم ذخیره‌سازی ۱۰ کیلوگرم در متر مکعب باعث بهبود غلظت پروتئین، آلبومین، ایمنوگلوبولین و فعالیت کمپلمان ۵۰ شد (Adineh et al., 2023b). به طور مشابه، کاهش پاسخ ایمنی با افزایش بیش از حد سطح تراکم در سیستم بیوفلاک در ماهی‌های کپور معمولی (Adineh et al., 2019; 2022; Nazarpour and Mohammadiazarm, 2023) و تپلاپای نیل (Zaki et al., 2020; Shourbela et al., 2021) ثبت شد. میزان هورمون کورتیزول و تغییرات در متابولیسم کربوهیدرات‌ها مانند گلوکز می‌تواند به عنوان شاخص عمومی استرس مورد استفاده قرار گیرد. در ماهی‌ها کورتیزول از بافت بین‌کلیوی توسط فاکتور آزاد کننده کورتیکوتروپین (CRF) ترشح می‌شود. سنجش شاخص‌های استرس همچون گلوکز و کورتیزول می‌تواند در تشخیص وجود استرس در محیط پرورش کمک شایانی کند (Kuhlwein et al., 2014). غلظت کورتیزول، گلوکز و لاکتات در تیمار ۴۸ کیلوگرم در متر مکعب (D4) در مقایسه با دیگر تیمارهای آزمایشی در محیط بیوفلاک افزایش معنی‌داری داشت. با توجه با این که محیط بیوفلاک به عنوان یک محیط ضد استرس برای پرورش ماهی کپور معمولی معرفی شده است، اما افزایش بیش از حد تراکم ذخیره‌سازی و همچنین وجود شرایط هیپوکسی به صورت مجزا و یا همزمان منجر به افزایش شاخص‌های استرس همچون سطح کورتیزول و گلوکز می‌شود. در مطالعه‌ای گزارش شد که

غلظت کورتیزول و گلوکز سرم خون ماهی تیلاپپای نیل با میانگین وزن اولیه $5/15 \pm 1/12$ گرم در تمام تیمارهای بیوفلاک در هر دو تراکم پرورش کم (۱۴۰ ماهی در متر مکعب) و زیاد (۲۸۰ ماهی در متر مکعب) کمتر از گروه شاهد بدون فلاک بود (Shourbela et al., 2021). بنابراین این نتایج نشان می‌دهد که محیط بیوفلاک مشکل مرتبط با استرس را برای افزایش تراکم پرورش ماهی ایجاد نمی‌کند، اما باید در نظر داشت مشخص شدن تراکم بهینه برای هر گونه با توجه به شرایط زیستی متفاوت است.

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی اغلب به عنوان شاخصی برای استرس اکسیداتیو ناشی از وجود عوامل بیماری‌زا و اختلالات محیطی استفاده می‌شوند، از این رو می‌توانند انعکاس دهنده وضعیت سلامت جانوران باشند (Barreto and Volpato, 2006; Xu and Pan, 2013). مطالعات متعددی نشان می‌دهد که استفاده از سیستم بیوفلاک باعث بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در آبزیان بویژه ماهی کپور معمولی می‌شود (Adineh et al., 2019, 2022; Ebrahimi et al., 2020; Haghparast et al., 2020; Abiri et al., 2022). در مطالعه حاضر، بیشترین مقدار آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و مالون دی‌آلدئید در تیمار با تراکم ذخیره‌سازی ۶ کیلوگرم در متر مکعب (D1) به دست آمد. با افزایش سطح تراکم در محیط بیوفلاک در شرایط بروز هیپوکسی حاد ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ماهی کپور کاهش می‌یابد. همسو با نتایج مطالعه حاضر، گزارش شده است که استرس هیپوکسی باعث کاهش سطح فعالیت ایمنی و آنتی‌اکسیدانی ماهی کپور معمولی در محیط بیوفلاک (Saber et al., 2022), ماهی تیلاپپای نیل (Abdel-Tawwab et al., 2014), گربه‌ماهی زرد دورگه (*Pelteobagrus fulvidraco* × *Pelteobagrus vachelli*) (Dagoudo et al., 2021), ماهی مینوی آمور (*Phoxinus lagowskii*) (Yang et al., 2021) و افزایش معنی‌دار سطح کورتیزول، گلوکز و تعداد گلبول‌های قرمز خون تاس‌ماهی ژاپنی (*Acipenser schrenckii*) (Ni et al., 2014) و ماهی دم زرد (*Seriola lalandi*) (Evans et al., 2003) و همچنین افزایش غلظت مالون‌دی‌آلدئید در گربه‌ماهی زرد (*Pelteobagrus fulvidraco*) جوان (Wang et al., 2021) می‌شود.

در مجموع، زمانی که ماهی کپور معمولی در محیط بیوفلاک نگهداری می‌شود چنانچه به هر

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه گنبد کاووس انجام شده است. از همه همکارانی که در اجرای این پژوهش ما را یاری نمودند کمال تشکر و قدردانی را داریم.

دلیل سیستم اکسیژن رسانی قطع شود و شرایط هیپوکسی حاد رخ دهد، تراکم ذخیره سازی می تواند به عنوان عامل تاثیرگذار بر واکنش های فیزیولوژیکی، میزان مقاومت ماهی را در برابر استرس نشان دهد. با افزایش تراکم ذخیره سازی در محیط بیوفلاک زمان شروع مرگ و میر ماهی کپور معمولی تغییر یافته و از ۱۲۰ دقیقه به ۳۰ دقیقه کاهش می یابد.

منابع

- Abdel-Tawwab M., Hagrass A.E., Elbaghdady H.M. and Monier M.N. 2015.** Effects of dissolved oxygen and fish size on Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.): Growth performance, whole-body composition, and innate immunity. *Aquaculture International*, 23: 1261–1274. doi: 10.1007/s10499-015-9882-y
- Abdel-Tawwab M., Hagrass A.E., Elbaghdady H.M. and Monier M.N. 2014.** Dissolved oxygen level and stocking density effects on growth, feed utilization, physiology, and innate immunity of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of Applied Aquaculture*, 26: 340–355. doi: 10.1080/10454438.2014.959830
- Abiri S.A., Chitsaz H., Najdegerami E.H., Akrami R. and Jalali A.S. 2022.** Influence of wheat and rice bran fermentation on water quality, growth performance, and health status of Common carp (*Cyprinus carpio* L.) juveniles in a biofloc-based system. *Aquaculture*, 555: 738168. doi: 10.1016/j.aquaculture.2022.738168
- Adineh H., Naderi M., Hamidi M. K. and Harsij M. 2019.** Biofloc technology improves growth, innate immune responses, oxidative status, and resistance to acute stress in common carp (*Cyprinus carpio*) under high stocking density. *Fish and Shellfish Immunology*, 95: 440–448. doi: 10.1016/j.fsi.2019.10.057
- Adineh H., Naderi M., Harsij M., Shirangi S.A., Yousefi M. and Hoseinifar S.H. 2023a.** Interactive effects of culture systems (biofloc and clear water) and dietary protein levels on growth, digestive activity, mucosal immune responses, antioxidant status, and resistance against salinity stress in the Caspian roach (*Rutilus caspicus*) fry. *Aquaculture*, 570: 739418. doi: 10.1016/j.aquaculture.2023.739418
- Adineh H., Naderi M., Jafaryan H., Khademi Hamidi M., Yousefi M. and Ahmadifar E. 2023b.** Interactive effects of stocking density and dietary protein level on some growth parameters, hematology and immune response of juvenile common carp (*Cyprinus carpio*) to *Aeromonas hydrophila* in modern biofloc system. *Aquatic Physiology and Biotechnology*, 10(4): 95–121. doi: 10.22124/japb.2022.21823.1459
- Adineh H., Naderi M., Jafaryan H., Khademi Hamidi M., Yousefi M. and Ahmadifar E. 2022.** Effect of stocking density and dietary protein level in biofloc system on the growth, digestive and antioxidant enzyme activities, health, and resistance to acute crowding stress in juvenile

- common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture Nutrition*, 2022: 1–12 (9344478). doi: 10.1155/2022/9344478
- Aghabarai M., Abdali S. and Yousefi Jourdehi A. 2023.** The effect of biofloc system performance on some hemological and immunological indices in beluga (*Huso huso*). *Journal of Aquaculture Development*, 17(3): 21–34. doi: 10.22034/17.3.21
- Aghabarari M., Abdali S. and Yousefi Jourdehi A. 2021.** The effect of biofloc system on water quality, growth and hematological indices of juvenile great sturgeon (*Huso huso*). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 20(5): 1467–1482. doi: 10.22092/ijfs.2021.125140
- Ahmadi Z., Akrami R. and Kharkan Ghamsari M. 2019.** Effect of stocking density and feeding rate on growth, hematological parameters and water quality in rearing of juvenile beluga (*Huso huso*). *Journal of Applied Ichthyological Research*, 6(3): 115–128.
- APHA. 1998.** Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association (APHA), USA. 541P.
- Avnimelech Y. and Kochba M. 2009.** Evaluation of nitrogen uptake and excretion by tilapia in biofloc tanks, using N-15 tracing. *Aquaculture*, 287: 163–168. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.10.009
- Azim M.E. and Little D.C. 2008.** The biofloc technology (BFT) in indoor tanks: Water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 283(1-4): 29–35. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.06.036
- Bagherzadeh Lakani F., Sattari M., Kazemi R., Yazdani Sadati M.A., Pourdehghani M. and Ashouri G. 2015.** Effects of hypoxia, normoxia and hyperoxia on hematological and biochemical parameters of two weight classes in farmed great sturgeon (*Huso huso*). *Journal of Oceanography*, 6(22): 59–68.
- Bagherzadeh Lakani F., Sattari M., Sharifpour I., Kazemi R. and Hallajian A. 2016.** Effects of different oxygen levels on the spleen in two weight groups of beluga (*Huso huso*). *Journal of Aquaculture Development*, 10(2): 21–30.
- Baluchnejadmojarad T., Roghani M. and Mafakheri M. 2010.** Neuroprotective effect of silymarin in 6-hydroxydopamine hemiparkinsonian rat: Involvement of estrogen receptors and oxidative stress. *Neuroscience Letters*, 480(3): 206–210. doi: 10.1016/j.neulet.2010.06.038
- 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. doi: 10.1007/s10228-010-0199-6
- Barreto R.E. and Volpato G.L. 2006.** Stress responses of the fish Nile tilapia subjected to electroshock and social stressors. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 39: 1605–1612. doi: 10.1590/S0100-879X2006001200012
- Borges A., Scotti L.V., Siqueira D.R., Jurinitz D.F. and Wassermann G.F. 2004.** Hematologic and serum biochemical values for jundia (*Rhamdia quelen*). Fish Physiology and Biochemistry, 30: 21–25. doi: 10.1007/s10695-004-5000-1
- Braun N., Lima De Lima R., Baldisserotto B., Dafre A.L. and Pires De Oliveira Nuner A. 2010.** Growth, biochemical and physiological responses of *Salminus brasiliensis* with different stocking densities and handling. Aquaculture, 301: 22–30. doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.01.022
- Crab R., Chielens B., Wille M., Bossier P. and Verstraete W. 2010.** The effect of different carbon sources on the nutritional value of bioflocs, a feed for *Macrobrachium rosenbergii* postlarvae. Aquaculture Research, 41(4): 559–567. doi: 10.1111/j.1365-2109.2009.02353.x
- Dagoudo M., Qiang J., Bao J.W., Tao Y.F., Zhu H.J., Tumukunde E.M. and Xu P. 2021.** Effects of acute hypoxia stress on hemato-biochemical parameters, oxidative resistance ability, and immune responses of hybrid yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco* × *P. vachelli*) juveniles. Aquaculture International, 29(5): 2181–2196. doi: 10.1007/s10499-021-00742-1
- Dawood M.A. 2021.** Nutritional immunity of fish intestines: Important insights for sustainable aquaculture. Reviews in Aquaculture, 13(1): 642–663. doi: 10.1111/raq.12492
- Dobsikova R., Svobodova Z., Blahova J., Modra H. and Velisek J. 2009.** The effect of transport on biochemical and haematological indices of common carp (*Cyprinus carpio* L.). Czech Journal of Animal Science, 54(11): 510–518. doi: 10.17221/52/2009-CJAS
- Ebrahimi A., Akrami R., Najdegerami E.H., Ghiasvand Z. and Koohsari H. 2020.** Effects of different protein levels and carbon sources on water quality, antioxidant status and performance of common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles raised in biofloc based system. Aquaculture, 516: 1–9 (734639). doi: 10.1016/j.aquaculture.2019.734639
- Ellis A.E. 1990.** Lysozyme assays. P: 101–103. In: Stolen J.S., Fletcher

- T.C., Anderson D.P., Robertson B.S., Van Muiswinkel W.B. (Eds.). *Techniques in Fish Immunology*. SOS Publications, USA.
- Emerenciano M., Gaxiola G. and Cuzon G. 2013.** Biofloc Technology: A review for aquaculture application and animal food industry. *Biomass Now-Cultivation and Utilization*, 12: 301–328. doi: 10.5772/53902
- Evans J.J., Shoemaker C.A. and Klesius P.H. 2003.** Effects of sublethal dissolved oxygen stress on blood glucose and susceptibility to *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 15: 202–208. doi: 10.1577/H03-024
- Feldman B.F., Zinkl J.G. and Jian N.C. 2000.** *Schalm's Veterinary Hematology*. Lippincott Williams and Wilkins Publication, USA. 1393P. doi: 10.1002/9781119500537
- Haghparast M.M., Alishahi M., Ghorbanpour M. and Shahriari A. 2020.** Evaluation of hemato-immunological parameters and stress indicators of common carp (*Cyprinus carpio*) in different C/N ratio of biofloc system. *Aquaculture International*, 28(6): 2191–2206. doi: 10.1007/s10499-020-00578-1
- Ju Z.Y., Forster I., Conquest L. and Dominy W. 2008.** Enhanced growth effects on shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from inclusion of whole shrimp flocculent fractions to a formulated diet. *Aquaculture Nutrition*, 14(6): 533–543. doi: 10.1111/j.1365-2095.2007.00559.x
- Kuhlwein H., Merrifield D.L., Rawling M.D., Foey A.D. and Davies S.J. 2014.** Effects of dietary β -(1,3)(1,6)-D-glucan supplementation on growth performance, intestinal morphology and haemato-immunological profile of mirror carp (*Cyprinus carpio* L.). *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 98(2): 279–289. doi: 10.1111/jpn.12078
- Kvamme B.O., Gadan K., Finne-Fridell F., Niklasson L., Sundh H., Sundell K., Taranger G.L. and Evensen O. 2013.** Modulation of innate immune responses in Atlantic salmon by chronic hypoxia-induced stress. *Fish and Shellfish Immunology*, 34: 55–65. doi: 10.1016/j.fsi.2012.10.006
- Mallya Y.J. 2007.** The effects of dissolved oxygen on fish growth in aquaculture. Final Project. Fisheries Training Programme, The United Nations University, Iceland. 30P.
- Manduca L.G., Da Silva M.A., De Alvarenga E.R., De Oliveira Alves G.F., De Araujo Fernandes A.F., Assumpcao A.F. and Turra E.M. 2020.** Effects of a zero exchange biofloc system on the growth performance and health of Nile tilapia at different stocking

- densities. *Aquaculture*, 521: 1–38 (735064). doi: 10.1016/j.aquaculture.2020.735064
- Marklund S. and Marklund G. 1974.** Involvement of the superoxyde anion radical in the auto oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxyde dismutase. *European Journal of Biochemistry*, 47: 469–474. doi: 10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x
- Menaga M., Felix S., Charulatha M., Gopalakannan A. and Panigrahi A. 2019.** Effect of in-situ and ex-situ biofloc on immune response of genetically improved farmed tilapia. *Fish and Shellfish Immunology*, 92: 698–705. doi: 10.1016/j.fsi.2019.06.031
- Mohammadian T., Mashjoor S., Lotfi S., Bakhshi H. and Ghanei-Motlagh R. 2022.** Mutual effect of culture density and diet administration of pomegranate peel (*Punica granatum* L.) extracts on biochemical and antioxidant parameters of common carp (*Cyprinus carpio*) blood serum. *Journal of Fisheries Science and Technology*, 11(3): 240–254.
- Nazarpour S. and Mohammadiazarm H. 2023.** Optimizing stocking density in biofloc culture of juvenile common carp (*Cyprinus carpio*) using growth and immunobiochemical indices as indicators. *Aquaculture Studies*, 23(6): 1–7 (AQUAST1223). doi: 10.4194/AQUAST1223
- Ni M., Wen H., Li J., Chi M., Ren Y., Song Z. and Ding H. 2014.** Two HSPs gene from juvenile Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*): cloning, characterization and expression pattern to crowding and hypoxia stress. *Fish Physiology and Biochemistry*, 40(6): 1801–1816. doi: 10.1007/s10695-014-9969-9
- North B.P., Ellis T., Turnbull J.F., Davis J. and Bromage N.R. 2006.** Stocking density practices of commercial UK rainbow trout farms. *Aquaculture*, 259(1-4), 260–267. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.05.043
- 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.
- Pathiratne A. and Rajapakshe W. 1998.** Hematological changes associated with the epizootic ulcerative syndrome in the Asian cichlid fish, *Etroplus suratensis*. *Asian Fisheries Science*, 11: 203–212.
- Pickering A.D. 1993.** Growth and stress in fish production. *Aquaculture*, 111: 51–63. doi: 10.1016/B978-0-444-81527-9.50010-5
- Qoljarei B., Adineh H., Harsij M. and Shirangi S.A. 2023.** Effect of carbon and nitrogen ratio (C:N) manipulation on growth performance, immune response and stress index of common carp

- (*Cyprinus carpio*) acute exposure to ammonia stress in biofloc system. *Journal of Fisheries*, 76(2): 265–278. doi: 10.22059/jfisheries.2023.353714.1365
- Rafatnezhad S., Falahatkar B. and Tolouei Gilani M.H. 2008.** Effects of stocking density on haematological parameters, growth and fin erosion of great sturgeon (*Huso huso*) juveniles. *Aquaculture Research*, 39(14): 1506–1513. doi: 10.1111/j.1365-2109.2008.02020.x
- Rezakhani S., Mohammadizadeh F., Khara H., Hooshang Bahri A. and Ahmadnezhad M. 2021.** Evaluation of oxygen changes on survival, some stress indices and hematological and immunological factors in Caspian Sea salmon (*Salmo trutta caspius*). *Aquatic Physiology and Biotechnology*, 9(1): 77–96. doi: 10.22124/japb.2021.17139.1388
- Saberi M., Adineh H., Harsij M., Jafaryan H. and Patimar R. 2022.** Evaluation of chronic and acute hypoxia stress on the immune and antioxidant system of common carp in biofloc system. *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 11(2): 49–61. doi: 10.22069/japu.2022.20047.1641
- Seo J. and Park J. 2022.** Does stocking density affect growth performance and hematological parameters of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* in a recirculating aquaculture system? *Animals*, 13(1): 1–12 (44). doi: 10.3390/ani13010044
- Shourbela R.M., Khatab S.A., Hassan M.M., Van Doan H. and Dawood M.A. 2021.** The effect of stocking density and carbon sources on the oxidative status, and nonspecific immunity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared under biofloc conditions. *Animals*, 11(1): 1–13 (184). doi: 10.3390/ani11010184
- Sunyer J.O. and Tort L. 1995.** Natural hemolytic and bactericidal activities of sea bream *Sparus aurata* serum are affected by the alternative complement pathway. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 45: 333–345. doi: 10.1016/0165-2427(94)05430-Z
- Tawwab M.A., Mousa M., Sharaf S. and Ahmad M. 2005.** Effect of crowding stress on some physiological functions of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) fed different dietary protein levels. *International Journal of Zoology Research*, 1(1): 41–47. doi: 10.5555/20073105537
- Terova G., Rimoldi S., Cora S., Bernardini G., Gornati R. and Saroglia M. 2008.** Acute and chronic hypoxia affects HIF-1 α mRNA levels in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 279: 150–159. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.03.041
- Timmons M.B., Ebeling J.M., Wheaton F.W., Summerfelt S.T.**

- and Vinci B.J. 2002.** Recirculating Aquaculture Systems. Cayuga Aqua Ventures, USA. 769P.
- Trenzado C., Morales A. and Higuera M. 2006.** Physiological effects of crowding in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, selected for low and high stress responsiveness. *Aquaculture*, 258: 583–593. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.03.045
- Wang M., Wu F., Xie S. and Zhang L. 2021.** Acute hypoxia and reoxygenation: Effect on oxidative stress and hypoxia signal transduction in the juvenile yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Aquaculture*, 531: 1–10 (735903). doi: 10.1016/j.aquaculture.2020.735903
- Wawrowski A., Gerlach F., Hankeln T. and Burmester T. 2011.** Changes of globin expression in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*) in response to acute and chronic hypoxia. *Journal of Comparative Physiology (B)*, 181(2): 199–208. doi: 10.1007/s00360-010-0518-2
- Witeska M. 2005.** Stress in fish hematological and immunological effects of heavy metals. *Electronic Journal of Ichthyology*, 1(1): 35–41.
- Xu W.J. and Pan L.Q. 2013.** Enhancement of immune response and antioxidant status of *Litopenaeus vannamei* juvenile in biofloc-based culture tanks manipulating high C/N ratio of feed input. *Aquaculture*, 412: 117–124. doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.07.017
- Yang Y., Wang Z., Wang J., Lyu F., Xu K. and Mu W. 2021.** Histopathological, hematological, and biochemical changes in high-latitude fish *Phoxinus lagowskii* exposed to hypoxia. *Fish Physiology and Biochemistry*, 47(4): 919–938. doi: 10.1007/s10695-021-00947-4
- Zaki M.A., Alabssawy A.N., Nour A.E.A.M., El Basuini M.F., Dawood M.A., Alkahtani S. and Abdel-Daim M.M. 2020.** The impact of stocking density and dietary carbon sources on the growth, oxidative status and stress markers of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared under biofloc conditions. *Aquaculture Reports*, 16: 1–8 (100282). doi: 10.1016/j.aqrep.2020.100282
- Zhao Z.G., Xu Q.Y., Luo L., Yin J.S. and Wang C.A. 2013.** Effect of adding carbon source on growth of fish and water quality in Songpu mirror carp (*Cyprinus specularis* Songpu) pond. *Journal of Northeast Agricultural University*, 44: 105–112. doi: 10.19720/j.cnki.isn.1005-9369.2013.09.020



Research Paper

Physiological changes in blood of common carp (*Cyprinus carpio*) kept with different densities in biofloc system with acute hypoxia stress

Zahra Joghatai¹, Hossein Adineh^{1*}, Mohammad Harsij¹, Seyedeh Ainaz Shirangi²

Received: September 2023 DOI:10.22124/japb.2023.25520.1513 Accepted: November 2023

Abstract

Common carp (*Cyprinus carpio*) with densities of 6, 12, 24 and 48kg/m³ (D1, D2, D3 and D4, respectively) were stocked in biofloc environment with acute hypoxia stress in order to investigate the physiological response of fish. At the first stage, the fish were kept in biofloc conditions for 28 days, and then in the second stage of the experiment, the fish were separately divided in 12 tanks with a water volume of 25 liters (4 treatments × 3 replicates) with the same biological conditions, and the only variable was the stocking density of fish. Increasing stocking density in D4 treatment significantly increased WBC, RBC, hemoglobin and hematocrit, but decreased lymphocytes and liver enzymes (P<0.05). Stocking density significantly increased total Immunoglobulin, lysozyme and ACH50 were observed in D1 and D2 treatments (6 and 12k/m³) (P<0.05). The stress index had a significant increase in D3 and D4 treatments (P<0.05). Stocking density in D1 and D2 treatments significantly increased superoxide dismutase enzyme and decreased malondialdehyde enzyme (P<0.05). In general, the storage density between 6 and 12kg/m³ is recommended to control the hypoxia stress in the biofloc environment, so that the problem can be solved within one to two hours.

Key words: *Floc Environment, Stocking Density, Common Carp, Hypoxia.*

1- M.Sc. in Fisheries, Department of Fisheries, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran.

2- Associate Professor in Department of Fisheries, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran.

3- Assistant Professor in Department of Biology, Faculty of Basic Sciences and Engineering, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran.

*Corresponding Author: adineh.h@gonbad.ac.ir