مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال ششم، شماره چهارم، پیاپی بیست و چهارم، بهار ۱۳۹۷ (۸۴-۷۵)

اثرات تراکم ذخیره‌سازی بر برخی شاخص‌های خونی و بیوشیمیایی سرم در ماهی کاراس طلایی *Carassius auratus*

هاشم خندان بارانی[1*]، محمدرضا حیدری[2]

۱. مربی، پژوهشکده تالاب بین‌المللی هامون، گروه پژوهشی شیلات، دانشگاه زابل

۲. کارشناس ارشد، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات، دانشگاه زابل

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۷/۱۷ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۲/۲۴)

چکیده

در مطالعه حاضر، اثر تراکم بر روی برخی شاخص‌های خون (گلبول‌های قرمز و سفید) و بیوشیمیایی سرم (گلوکز، تری‌گلیسیرید، کلسترول، پروتئین کل، متابولیت‌ها، آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز، آسپارتات آمینوترانسفراز، آلکالین فسفاتاز و هورمون کورتیزول) در ماهی کاراس طلایی (*Carassius auratus*) مورد بررسی قرار گرفت. بر این اساس، ماهیان کاراس با میانگین وزنی ۱۸±۲۰۰ گرم به مدت ۳۰ روز در دو تیمار با سطح تراکم کم (تیمار ۱، $10Kg/m^3$) و تراکم زیاد (تیمار ۲، $45\ Kg/m^3$) و سه تکرار به ازای هر تیمار به‌طور تصادفی در ۶ مخزن قرار گرفتند. ماهیان در شرایط تراکم زیاد به‌طور معنی‌داری میزان بیشتری از کورتیزول، گلوکز و آلکالین فسفاتاز (به‌ترتیب ۰/۹±۳۶ ng/dl، ۵/۲±۸۳/۱ mg/dl و ۸/۱±۹۳/۲ U/L) را نسبت به ماهیان تحت تراکم کم (به ترتیب ۰/۴±۲۳/۳ ng/dl، ۳/۲±۵۲/۴mg/dl و ۶/±۶۱/۲ U/L) نشان دادند؛ در حالی‌که میزان تری‌گلیسیرید در اثر افزایش تراکم به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (P<۰/۰۵). تأثیر تراکم بر میزان پروتئین کل پلاسما، کلسترول، آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز، منیزیم، فسفر و کلسیم معنی‌دار نبود. در ارتباط با سلول‌های خون نیز تعداد گلبول‌های قرمز در ماهیان تیمار ۲ به‌طور معنی‌داری بیشتر از ماهیان تیمار ۱ بود (P<۰/۰۵). تعداد گلبول‌های سفید در ماهیان تیمار ۲ کمتر بود، ولی این تفاوت معنی‌دار نبود. به‌طور کلی، نتایج این مطالعه نشان داد که تراکم زیاد در ماهی کاراس طلایی مانند بسیاری از ماهیان پرورشی دیگر باعث ایجاد استرس مزمن می‌شود و نتیجه آن تغییر میزان برخی شاخص‌ها بویژه کورتیزول، گلوکز، آنزیم آلکالین فسفاتاز و گلبول‌های قرمز بود.

واژه‌های کلیدی: استرس محیطی، خون‌شناسی، شاخص‌های بیوشیمیایی، کاراس طلایی.

*نویسنده مسئول: هاشم خندان بارانی
E-mail: hashem.barani@UOZ.ac.ir

The Effects of Stocking Density on Blood and Serum Biochemical Indices of Goldfish *Carassius auratus*

Hashem Khandan Barani[1*], Mohammad Reza Heydari[2]

1. Instructor, International Hamoon Wetland Research Institute, University of Zabol, Iran
2. M. A. in Fishery, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Zabol, Iran

(Receuved: Oct. 8, 2016 - Accepted: May 14, 2018)

Abstract

In this study the effect of stocking density on some hematological (Red and white blood cells) and serum biochemical parameters (Glucose, triglycerides, cholesterol, total protein, inorganic phosphorus, calcium and magnesium, enzymes alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, and alkaline phosphatase and cortisol) of *Carassius auratus* was investigated. Fish with average weight 200±18 g were stocked randomly into 6 tanks with triplicate in two treatments for a 30-day period and were submitted to different stocking densities: low density (T_1, 10 kg/m^3) and high density (T_2, 45 kg/m^3). At the end of the trial, Fish from each group were selected and their blood was collected and the following parameters were analyzed. Fish held at high density showed significant higher levels of cortisol, glucose and alkaline phosphatase (23±0.4 ng/dl, 52±3.2 mg/dl and 93.2±8.1U/L, respectively) compared with those held at low density (36±0.9 ng/dl, 83±5.2 mg/dl and 61.2±6.3U/L, respectively), while the levels of triglycerides significantly decreased with increasing density (P<0.05). Stocking density had no significant effect on total protein, cholesterol, aspartate aminotransferase, inorganic phosphorus, calcium and magnesium. In the case of blood cells, the level of red blood cells was significantly higher in fish maintained at high density compared with low density (P<0.05).The number of white blood cells was lower in the second treatment than the first one but it was not significant. Overall, the results show that high stocking density caused chronic stress in gold fish like many other farmed fish and consequently changed the levels of some indices, especially cortisol, glucose, alkaline phosphatase and red blood cells.

Keywords: Environmental Stress, Hematology, Biochemical Indices, *Carassius Auratus.*

مقدمه

استرس با توجه به برنامه‌های تولیدی و مدیریتی رایج در پرورش آبزیان، همواره به‌عنوان یکی از چالش‌های اجتناب‌ناپذیر در صنعت آبزی‌پروری محسوب می‌شود (Wendelaar, 1997; Ashley, 2007). در سیستم‌های پرورشی ماهی ممکن است شرایط استرس‌زا تداوم داشته باشد که تهدیدی برای سلامت ماهیان و همچنین میزان تولید خواهد بود (Barcellos *et al*., 2011). پاسخ اولیه به استرس در ماهیان با عمل محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- کلیه (HPI axis) و افزایش میزان هورمون‌های کورتیکواستروئیدی (عمدتاً کورتیزول) و کاتکولامین‌ها مشخص می‌شود (Barton, 2002). این هورمون‌ها باعث بروز پاسخ‌های ثانویه در جانور می‌شوند که از طریق افزایش سطح گلوکز خون مشخص می‌شود و در واقع، گلوکز (انرژی) لازم را برای هموستازی بافت‌ها فراهم می‌کند. همچنین در برخی مواقع، پاسخ‌های نوع سوم باعث تغییر رشد، رفتار و مقاومت جانور در برابر بیماری‌ها در شرایط استرس می‌شوند (Barton, 2002).

تراکم ذخیره‌سازی یک عامل مهم در آبزی‌پروری محسوب می‌شود؛ زیرا به‌طور مستقیم بر سلامت ماهیان و همچنین میزان تولید و بازده اقتصادی مؤثر است. افزایش تراکم در مزارع پرورش ماهی یک راه برای استفاده از حداکثر فضا به منظور تولید بیشترین میزان ماهی و همچنین غلبه بر مشکل کمبود زمین است (North *et al*., 2006). اما در عین حال، تراکم نامناسب می‌تواند به‌عنوان یک عامل استرس‌زا در پرورش ماهیان عمل کند (Ellis *et al*., 2002; North *et al*., 2006). تراکم ذخیره‌سازی از جنبه ایجاد استرس مزمن مورد توجه بوده و عامل بسیاری از تغییرات بیوشیمیایی و فیزیولوژیک در ماهیان است (Riche *et al*., 2013; Liu *et al*., 2016). مطالعات متعددی اثر تراکم را بر رشد، رفتار، سیستم ایمنی، متابولیسم و شاخص‌های بیوشیمیایی ماهیان مختلف نشان داده‌اند (Herrera *et al*., 2012; Li *et al*., 2012; Vargas-Chacoff *et al*., 2014 Ardiansyah & Fotedar, 2016; Liu *et al*., 2016; Calabrese *et al*., 2017). با توجه به تنوع پاسخ‌های ماهیان، به نظر می‌رسد که اثر تراکم برای هر گونه اختصاصی بوده و به عوامل مختلفی همچون حساسیت گونه به تراکم، منابع انرژی در دسترس و مدت زمان تداوم شرایط استرس‌زا بستگی دارد.

شاخص‌های خون می‌توانند اطلاعات بسیار مفیدی را در ارتباط با وضعیت فیزیولوژیک و سلامت ماهیان فراهم کنند (Velmurugan *et al*., 2008; Hoseini *et al*., 2014; Peres *et al*., 2014). اثر استرس بر تغییر شاخص‌های خون نیز نشان داده شده است (El-Khaldi, 2010). همچنین مطالعات قبلی تأثیر تراکم ذخیره‌سازی را بر شاخص‌های خون شامل گلبول‌های قرمز، سفید و پارامترهای بیوشیمیایی سرم در گونه‌های مختلف ماهیان از قبیل قزل‌آلای رنگین‌کمان، تاس ماهی سیبری، گربه ماهی آفریقایی، فیل ماهی و تیلاپیا مورد بررسی قرار داده و ارتباط تغییر این شاخص‌ها را تحت تأثیر تراکم در این ماهیان نشان داده‌اند (Kebus *et al*., 1992; Hasanalipour *et al*., 2013; Kpundeh *et al*., 2014; Alimahmoudi *et al*., 2015; Ajani *et al*., 2015). بنابراین، شاخص‌های خون می‌توانند به‌عنوان یک روش سریع، غیر کشنده و ارزان برای تشخیص وجود هر گونه استرس که اثرات منفی بر تولید آبزی دارند به کار روند (Tavares-Dias & Moraes, 2007).

ماهی کاراس طلایی (*Carassius auratus*) یک گونه از ماهیان آب شیرین و متعلق به خانواده کپورماهیان است. این گونه همه‌چیزخوار بوده و در برخی از کشورهای آسیایی و اروپایی از جمله چین به‌طور وسیعی پراکنش داشته و پرورش داده می‌شود. اما در کشور ما کمتر مورد توجه قرار گرفته است؛ حال آنکه افزایش تنوع گونه‌ای ماهیان پرورشی یکی از راه‌های افزایش تولید در واحد سطح است و تحقیقات

مختلفی برای معرفی گونه‌های ماهیان بومی و غیربومی در استخرهای ماهیان گرم آبی ضروری است. با توجه به اهمیت تراکم در سلامت ماهیان و از طرف دیگر نبودن اطلاعات کافی در مورد این گونه در کشور ما، مطالعه حاضر با هدف ارزیابی اثر تراکم تحت شرایط کم و زیاد بر روی برخی شاخص‌های خونی (تعداد گلبول‌های قرمز و سفید) و بیوشیمیایی سرم (گلوکز، پروتئین کل، تری گلیسیرید، کلسترول، کورتیزول، آنزیم‌های ALT، ALP، AST و ترکیبات متابولیک شامل فسفر غیرآلی، کلسیم و منیزیم) در ماهی کاراس طلایی انجام شد تا شاخص های خون با پتانسیل تشخیصی نسبت به تراکم ذخیره‌سازی در این ماهی مهم پرورشی مشخص شود.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر در پژوهشکده تالاب بین‌المللی هامون (دانشگاه زابل) انجام شد. برای انجام این آزمایش، از ۶۰ قطعه ماهی کاراس طلایی با میانگین وزن ۱۸±۲۰۰ گرم استفاده شد. ماهیان برای سازگاری با شرایط جدید و رفع استرس به مدت دو هفته در آزمایشگاه نگهداری شدند. در طول دوره آزمایش ماهیان دو بار در روز تا حد سیری با استفاده از غذای تجاری (شامل ۳۰٪ پروتئین، ۹٪ چربی، ۱۱٪ خاکستر و ۱۰٪ رطوبت) غذادهی شدند. به منظور تأمین کیفیت آب روزانه میزان ۳۰ درصد از حجم مخازن با آب کلرزدایی شده، جایگزین شد. همچنین در طول این مدت، ماهیان از نظر سلامتی مورد بررسی قرار گرفته و سلامتی آنها مورد تأیید قرار گرفت. پس از پایان دوره سازگاری، ماهیان به‌طور تصادفی در ۶ مخزن در دو تیمار (هر تیمار با سه تکرار) با سطح تراکم مختلف قرار گرفتند. برای تیمار ۱ تراکم کم (۱۰ کیلوگرم در متر مکعب) به‌عنوان تراکم پایه و تیمار ۲ تراکم زیاد (۴۵ کیلوگرم در متر مکعب) در نظر گرفته شد و ماهیان به‌مدت ۳۰ روز در این شرایط نگهداری شدند (Yarahmadi *et al.*, 2015). در طول دوره آزمایش سنجش شاخص‌های فیزیکوشیمیایی آب شامل دما، اکسیژن محلول به‌صورت روزانه انجام شده و pH و آمونیاک غیر یونیزه به صورت هفته‌ای اندازه‌گیری شدند و به‌ترتیب ۱±۲۳/۵ درجه سانتی‌گراد، ۰/۳±۷/۵ میلی‌گرم بر لیتر، ۰/۱۹±۷/۸ و کمتر از ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر ثبت شد. این عوامل برای هر دو تیمار در حد یکسان حفظ شد.

نمونه‌گیری

در پایان دوره آزمایش، از هر گروه به‌طور تصادفی ۹ قطعه ماهی (۳ قطعه از هر تکرار) به منظور خون‌گیری انتخاب شدند. خون‌گیری از ماهیان با استفاده از سرنگ‌های تزریقی از ساقه دمی صورت گرفت. نمونه‌های خون برای بررسی شاخص‌های خونی به لوله‌های هپارینه و برای تهیه سرم به لوله‌های غیرهپارینه منتقل شدند. سپس سرم خون با انجام سانتریفوژ (۴۶۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه) استحصال شد و تا زمان استفاده در دمای ۸۰- درجه نگهداری شدند.

سنجش شاخص‌های خونی

تعداد گلبول‌های قرمز و سفید خون پس از رقیق‌سازی با محلول بافر فسفات و با استفاده از لام نئوبار در زیر میکروسکوپ نوری شمارش شد (Sarder *et al.*, 2001).

آنالیز شاخص‌های بیوشیمیایی سرم

سرم خون ماهیان برای سنجش گلوکز، تری گلیسیرید، کلسترول، پروتئین کل، الکترولیت‌ها (فسفر غیرآلی، کلسیم و منیزیم)، آنزیم‌های متابولیک شامل آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) و آلکالین فسفاتاز (ALP) و هورمون کورتیزول مورد آنالیز قرار گرفت. میزان الکترولیت‌ها، گلوکز (روش گلوکز اکسیداز)، کلسترول (کلسترول اکسیداز) و تری‌گلیسیرید (گلیسرول-۳- فسفات

اکسیداز)، پروتئین کل (بیورت)، آمینوترانسفراز و آسپارتات آمینوترانسفراز (روش IFCCL) و آلکالین فسفاتاز (روش DGKC) با استفاده از کیت‌های تجاری شرکت پارس آزمون و به وسیله اتوآنالایزر (Selectra-PRO model, Netherlands) سنجش شد (MacKenzie, 1988; Shahsavani *et al.*, 2010). میزان هورمون کورتیزول به روش رادیوایمونواسی و با استفاده از کیت تجاری (Immunotech, France) سنجش شد.

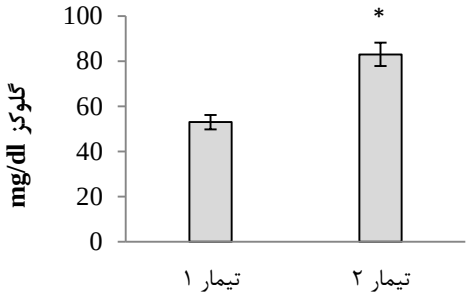
تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

ابتدا همگن بودن داده‌ها با آزمون کولموگروف–اسمیرنوف بررسی و پس از اطمینان از همگن بودن، تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون T-test انجام شد و P<۰/۰۵ به عنوان مرز استنتاج آماری در نظر گرفته شد. برای انجام کلیه آنالیزهای آماری فوق از نرم‌افزار SPSS(16) استفاده شد.

نتایج

شاخص‌های بیوشیمیایی

تغییرات میزان کورتیزول و گلوکز در مطالعه حاضر به ترتیب در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است. بین دو گروه از نظر این دو شاخص تفاوت معنی‌دار وجود داشت (p<۰/۰۵)؛ به طوری که بالاترین میزان کورتیزول (۳۶±۰/۹ng/dl) و گلوکز (۸۳±۵/۲mg/dl) در تیمار ۲ (تحت تراکم زیاد) مشاهده شد.



شکل ۱. میزان گلوکز در تیمار ۱ (تراکم ذخیره‌سازی کم) و تیمار ۲ (تراکم ذخیره‌سازی زیاد). علامت ستاره نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین دو تیمار است.

نتایج مربوط به دیگر شاخص‌های بیوشیمیایی سرم شامل پروتئین کل، تری گلیسیرید، کلسترول، آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز (AST)، آلکالین فسفاتاز (ALP) و برخی الکترولیت‌ها نیز در جدول ۱ آورده شده است. از نظر پروتئین کل، کلسترول، آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) و الکترولیت‌ها بین دو تیمار تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. اما در تیمار ۲ میزان تری‌گلیسیرید به‌طور معنی‌داری کمتر (mg/dl ۱۹/۷±۱/۲) و میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز (U/l ۹۳/۲±۸/۱) به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمار ۱ بود (P<۰/۰۵). میزان آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (ALT) برای بسیاری از ماهیان قابل تشخیص نبود و در جدول ذکر نشده است.

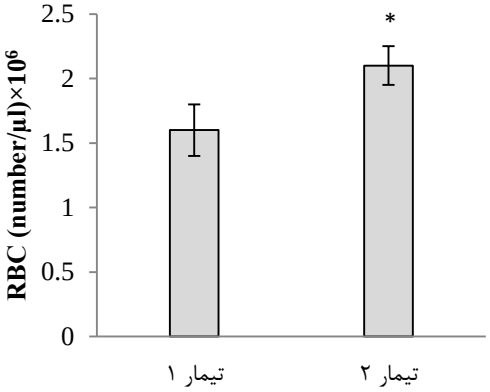
جدول ۱. تغییرات میانگین میزان شاخص‌های بیوشیمیایی سرم در ماهی کاراس طلایی تحت شرایط تراکم ذخیره‌سازی متفاوت

	تیمار ۱ (تراکم پایین)	تیمار ۲ (تراکم زیاد)
پروتئین کل (g/dl)	۳/۲±۰/۱^{a}	۳/۴±۰/۲^{a}
کلسترول (mg/dl)	۱۹۴/۲±۲۶/۸^{a}	۲۰۷/۵±۳۳/۲^{a}
تری گلیسیرید (mg/dl)	۳۸/۷±۴/۹^{b}	۱۹/۷±۱/۲^{a}
آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) (U/L)	۳۱۷/۷±۵۱/۲^{a}	۳۳۲/۷±۳۹/۲^{a}
آلکالین فسفاتاز (ALP) (U/L)	۶۱/۲±۶/۳^{a}	۹۳/۲±۸/۱^{b}
کلسیم (mg/dl)	۱۱/۲±۰/۸^{a}	۱۰/۴±۰/۵^{a}
فسفر (mg/dl)	۴/۷±۰/۴^{a}	۵/۳±۰/۶^{a}
منیزیوم (mg/dl)	۲/۵±۰/۲^{a}	۲/۷±۰/۱^{a}

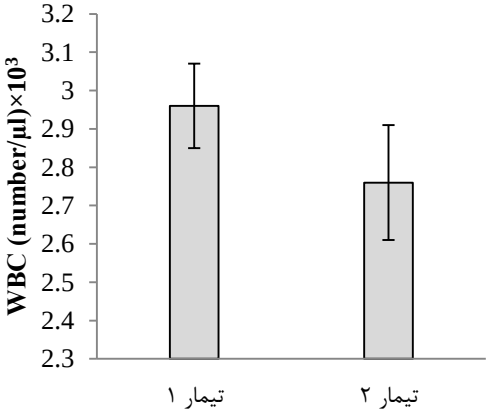
* حروف متفاوت در یک ردیف، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین دو تیمار است.

شاخص‌های خونی

نتایج مربوط به تغییرات شاخص‌های خونی شامل تعداد گلبول‌های قرمز و سفید به ترتیب در شکل‌های ۳ و ۴ نشان داده شده است. تفاوت بین دو گروه از نظر گلبول‌های قرمز معنی‌دار بود (P<۰/۰۵)؛ به‌طوری که میزان بالاتر این شاخص در گروه تیمار ۲ ثبت شد. از نظر تعداد گلبول‌های سفید، اگر چه کمترین میزان برای گروه تحت تراکم زیاد مشاهده شد، ولی این تفاوت معنی‌دار نبود.



شکل ۲. تعداد گلبول‌های قرمز در تیمار ۱ (تراکم ذخیره‌سازی کم) و تیمار ۲ (تراکم ذخیره‌سازی زیاد). علامت ستاره نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین دو تیمار است.



شکل۳. تعداد گلبول‌های سفید در تیمار ۱ (تراکم ذخیره‌سازی کم) و تیمار ۲ (تراکم ذخیره‌سازی زیاد).

بحث و نتیجه‌گیری

تراکم ذخیره‌سازی در فعالیت‌های آبزی‌پروری، یک عامل بسیار مهم محسوب می‌شود؛ زیرا میزان تراکم در حد نامناسب منجر به ایجاد استرس می‌شود که رفتار و فیزیولوژی ماهیان را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Ellist *et al.*, 2002). در مطالعه حاضر، میزان کورتیزول در ماهیان تیمار ۲ (ماهیان با تراکم زیاد) به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمار یک (ماهیان با تراکم کم) بود که این امر نشان‌دهنده قرار داشتن ماهیان تحت استرس در شرایط تراکم زیاد است. کورتیکواستروئیدها بویژه کورتیزول هورمون‌هایی هستند که در پاسخ اولیه به عوامل استرس‌زا ترشح می‌شوند و در واقع، با تلاش جانور برای انطباق با شرایط استرس در ارتباط هستند. کورتیزول در اثر فعالیت محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-کلیه آزاد می‌شود (Mommsen *et al.*, 1999). هنگامی که ماهی تحت شرایط استرس قرار می‌گیرد، هیپوتالاموس فاکتور آزاده کننده کورتیکوتروپین (CRF) به داخل جریان خون رها می‌کند. این پلی‌پپتید باعث تحریک ترشح هورمون آدرنوکوتیکوتروپیک (ACTH) از قسمت خلفی غده هیپوفیز شده که در نهایت، این هورمون با تأثیر بر بافت کلیوی باعث ترشح کورتیزول می‌شود (Mommsen *et al.*, 1999). پاسخ عمده کورتیزول به عامل استرس‌زا برای دادن انرژی به طرف آن دسته از فعالیت‌های فیزیولوژیک است که در تنظیم مجدد هموستاز بدن بعد از استرس مؤثر هستند و این عمل، باعث کند شدن روند رشد در جانور می‌شود (Geven *et al.*, 2006). افزایش میزان کورتیزول تحت تأثیر افزایش تراکم در آزاد ماهی اطلس (۷۵ کیلوگرم در متر مکعب) (Calabrese *et al.*, 2017)، ماهی باراماندی (۱۸/۷۵ کیلوگرم در متر مکعب) (Ardiansyah & Fotedar, 2016)، قزل‌آلای رنگین‌کمان (۴۵ کیلوگرم در متر مکعب) (Yarahmadi *et al.*, 2015)، باس دریایی اروپایی (۳۶ کیلوگرم در مترمکعب) (Lupatsch *et al.*, 2010) و تاس ماهی آمور (۱/۸۷ کیلوگرم در متر مکعب) (Li *et al.*, 2012) نیز گزارش شده است که با مطالعه حاضر همخوانی دارد. این در حالی است که در فیل ماهی (Rafatnezhad *et al.*, 2008) و تاس ماهی سیبری (Hasanalipour *et al.*, 2013) عدم تأثیرگذاری معنی‌دار تراکم بر میزان کورتیزول نشان داده شده است. این تناقض مشاهده‌شده بین گونه‌های مختلف در پاسخ به تراکم می‌تواند به علت تفاوت در پاسخ فیزیولوژیک به استرس و ویژگی‌های زیستی هر گونه باشد (Ortuno *et al.*, 2002).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان گلوکز ماهیان تحت تراکم زیاد به‌طور معنی‌داری بالاتر از ماهیان با تراکم کم بود. پاسخ به استرس میزان

سوخت و ساز را در جانوران (از جمله ماهیان) به منظور فراهم آوردن میزان بیشتری ATP افزایش می‌دهد. گلوکز، کربوهیدراتی است که نقش مهمی در تولید انرژی زیستی از طریق تبدیل به انرژی شیمیایی (ATP) در جانوران ایفا می‌کند. هنگامی که ماهی در شرایط استرس‌زا قرار می‌گیرد، سلول‌های کرومافین هورمون‌های کاتکولامین (آدرنالین و نورو آدرنالین) به گردش خون آزاد می‌کنند. (Reid *et al*., 1998; Pankhurst, 2011). این هورمون‌های استرس در کنار کورتیزول از طریق فعال کردن فرایندهای گلوکونئوژنز (بویژه در کبد و توسط کورتیزول) و گلیکوژنولیز باعث افزایش میزان گلوکز پلاسما می‌شوند تا با افزایش تقاضای انرژی در شرایط استرس‌زا مقابله کنند (Iwama *et al*. 1999; Nelson & Cox, 2005). همچنین یافته‌های Pickering *et al*. (1989) نشان داد که ترشح کاتکولامین‌ها در شرایط استرس در ابتدا مانع ترشح انسولین شده و سپس میزان گلوکز پلاسما را افزایش می‌دهند. مطالعات قبلی نیز افزایش گلوکز را در شرایط استرس در گونه‌های مختلف ماهیان گزارش کرده‌اند (Monteiro *et al*., 2005; Hoseini & Nodeh, 2013). بر این اساس، می‌توان افزایش نیاز به انرژی برای مقابله با شرایط استرس حاصل از تراکم زیاد را در این مطالعه عامل افزایش گلوکز سرم دانست.

میزان پروتئین کل، تری‌گلیسیرید، کلسترول و الکترولیت‌های سرم (منیزیم، فسفر و کلسیم) اطلاعات مهمی را در ارتباط با متابولیسم ماهیان فراهم می‌کنند (Kerr, 2008; Peres *et al*., 2013). در این مطالعه، تفاوت معنی‌داری از نظر میزان پروتئین کل پلاسما،کلسترول و الکترولیت‌ها بین دو گروه مشاهده نشد، اما میزان تری‌گلیسیرید در ماهیان تحت تراکم زیاد به‌طور معنی‌داری کمتر از ماهیان با تراکم کم بود. این یافته با توجه به مکانیسم‌های توضیح داده شده در ادامه قابل توجیه است.

تری‌گلسیریدها یک گروه مهم از چربی‌ها بوده و از منابع مهم تأمین انرژی در شرایط استرس در ماهیان به حساب می‌آیند. کورتیزول از طریق تحریک فرایند لیپولیز در متابولیسم چربی‌ها نقش دارد. لیپولیز در فراهم کردن اسیدهای چرب به‌عنوان سوبسترای گلیسرول برای گلوکونئوژنز مؤثر است (Mommsen *et al*., 1999). کلسترول نیز پیش ساز هورمون‌های استروئیدی همچون کورتیزول است. افزایش کلسترول تحت شرایط استرس به علت نیاز به آن برای سنتز کورتیزول نسبت داده شده است (Bolasina, 2006). همچنین میزان پروتئین کل سرم هم ممکن است به‌عنوان منبع انرژی در شرایط استرس در ماهیان مورد استفاده قرار گیرد (Almeida *et al*., 2005). اگرچه در مطالعات مختلف، نتایج متفاوتی در مورد میزان پروتئین خون شامل کاهش (Sadhu *et al*., 2014)، افزایش (Montero *et al*., 1999) و یا ثبات (Caipang *et al*., 2009) در شرایط استرس (تراکم زیاد) گزارش شده است. مطالعات پیشنهاد کرده‌اند که تغییرات فیزیولوژیک ماهیان تحت شرایط استرس، ویژگی‌های زیستی هر گونه، منابع انرژی در دسترس می‌توانند اثرات متفاوتی بر استفاده از منابع انرژی در بدن ماهیان داشته باشند.

استرس باعث اختلال در تعادل اسمزی خون در ماهیان می‌شود. استرس نیاز به اکسیژن را افزایش داده و از این طریق باعث افزایش نفوذپذیری آبشش‌ها می‌شود که نتیجه آن در ماهیان آب شیرین کاهش الکترولیت‌ها است (Wendelaar Bonga, 1997). در این مطالعه، عدم تغییر میزان الکترولیت‌ها ممکن است با جذب این عناصر به میزان کافی از غذا و یا آب توسط ماهی در ارتباط باشد (Lall, 2002; Press *et al*., 2014).

در مطالعه حاضر، افزایش میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) در ماهیان تحت تراکم زیاد احتمالاً به علت حساسیت لیزوزومی در اثر استرس است. آنزیم‌های هیدرولیتیک مانند آلکالین فسفاتاز به‌عنوان شاخص بالقوه استرس در هنگام دفاع در مقابل پاتوژن‌ها و یا بهبود زخم‌های سطح بدن ماهی به

اثبات رسیده است (Ross, 2000). Caipang *et al.* (2009) و Sadhu *et al.* (2014) نیز افزایش فعالیت آلکالین فسفاتاز را تحت تأثیر تراکم زیاد گزارش کرده‌اند که مطابق با مطالعه حاضر است. با این حال هنوز نقش این آنزیم هیدرولیتیک در شرایط استرس ناشی از تراکم ناشناخته باقی مانده است.

از اثرات مهم دیگر تراکم زیاد در این مطالعه، افزایش تعداد گلبول‌های قرمز و کاهش تعداد گلبول‌های سفید در ماهیان تحت تراکم زیاد بود. مطالعات قبلی نیز این نتایج را تأیید می‌کنند (Montero *et al.*, 1999; Ajani *et al.*, 2015; Aalimahmoudi *et al.*, 2015). گلبول‌های قرمز مسئول حمل اکسیژن هستند و افزایش آنها در واقع یک سازگاری برای افزایش ظرفیت حمل اکسیژن در زمان افزایش تقاضا برای اکسیژن تحت شرایط استرس است. لذا احتمالاً افزایش تعداد گلبول‌های قرمز در ماهیان با تراکم زیاد در این مطالعه در پاسخ به تقاضای بافت‌ها برای دریافت اکسیژن بیشتر صورت گرفته است.

لکوسیتوپنی یا کاهش کلی تعداد گلبول‌های سفید یک پاسخ غیراختصاصی در ماهیان به استرس‌های محیطی است. ثابت شده است که ترشح هورمون‌های کورتیکواستروئیدی از قبیل کورتیزول اثرات تضعیف‌کننده بر سیستم ایمنی ماهیان دارند (Binuramesh & Michael, 2011). به‌عنوان مثال، کاهش طول عمر لنفوسیت‌ها و تسریع مرگ برنامه‌ریزی شده آنها تحت تأثیر کورتیزول در ماهیان به اثبات رسیده است (Espelid *et al.*, 1996; Verburg van Kemenade *et al.*, 1999). لذا افزایش کورتیزول در اثر استرس ناشی از تراکم زیاد در این مطالعه را می‌توان عامل کاهش تعداد گلبول‌های سفید معرفی کرد.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که نگهداری ماهی کاراس طلایی در تراکم ۴۵ کیلوگرم در متر مکعب برای این گونه استرس‌زا بوده و میزان کورتیزول را در این ماهی به‌طور معنی‌داری افزایش می‌دهد. همچنین میزان گلوکز، آنزیم آلکالین فسفاتاز و تعداد گلبول‌های قرمز در این تراکم نسبت به ماهیان نگهداری شده در تراکم ۱۰ کیلوگرم در متر مکعب به‌طور معنی‌داری افزایش نشان می‌دهد که نشان‌دهنده نیاز بیشتر ماهی به صرف انرژی برای مقابله با شرایط استرس‌زا در این تراکم است. به‌طور کلی ماهیان قرار گرفته در تراکم پایین، وضعیت فیزیولوژیک بهتری را نسبت به تراکم زیاد نشان دادند. همچنین در میان پارامترهای اندازه‌گیری‌شده در این مطالعه، میزان کورتیزول، گلوکز، تری‌گلیسیرید، آنزیم آلکالین فسفاتاز و تعداد گلبول‌های قرمز به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر تراکم زیاد قرار گرفتند و لذا پتانسیل استفاده به‌عنوان شاخص استرس در شرایط تراکم زیاد را در کاراس طلایی دارند. در طرف مقابل فسفر، کلسیم، منیزیم، کلسترول، پروتئین کل سرم و آنزیم آسپارات آمینوترانسفراز که تحت تأثیر تراکم قرار نگرفتند، به‌عنوان شاخص نشان‌دهنده استرس تراکم در این گونه مفید نیستند. پاسخ بیوشیمیایی ماهی کاراس طلایی در این مطالعه با برخی گونه‌های پرورشی دیگر تفاوت‌هایی را نشان می‌دهد که این حالت، حاکی از اثر اختصاصی تراکم ذخیره‌سازی بر عملکردهای فیزیولوژیک هر گونه است.

REFERENCES

Aalimahmoudi, M.; Salehipour Bavarsad, S.; Moghdani, S. (2015). Effect of different stocking densities on haematological and biochemical parameters of great sturgeon juveniles (*Huso huso* Linnaeus, 1758). Res. Opin. Anim. Vet. Sci; 5: 348-352.

Ajani, E.K; Setufe, S.B.; Oyebola, O.O. (2015). Effects of stocking density on haematological functions of juvenile African catfish (*Clarias gariepinus*) fed varying crud protein levels. Afr. J. Food Sci.; 9: 65-69.

Almeida, J.S.; Meletti, P.C.; Martinez,

C.B. (2005). Acute effects of biochemical parameters of the neotropical fish Prochilodus lineatus. Comp Biochem Physiol; 140: 356-363.

Ardiansyah, Fotedar, R. (2016). Water quality, growth and stress responses of juvenile barramundi (*Lates calcarifer* Bloch), reared at four different densities in integrated recirculating aquaculture systems. Aquaculture; 458: 113-120.

Ashley, PJ. (2007). Fish welfare: current issues in aquaculture. Appl Anim Behav Sci; 104: 199-235.

Barcellos, L.J.G.; Volpato, G.L.; Barreto, R.E.; Coldebella, I.; Ferreira, D. (2011). Chemical communication of handling in fish. Physiol. Behav. 103, 372-375

Barton, B.A. (2002). Stress in fish: a diversity of response with particular reference to changes in circulating corticosteroids. Integr Comp Biol; 42: 517-525.

Binuramesh, R.; Michael, D. (2011) Diel variations in selected serum immune parameters in *Oreochromis mossambicus*. Fish Shellfish Immunol; 30: 824-829

Bolasina, S.; Tagawa, M.; Yamashita, Y.; Tanaka, M. (2006). Effect of stocking density on growth, digestive enzyme activity and cortisol level in larvae and juveniles of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Aquaculture; 259: 432-443.

Caipang, C.M.E.; Brinchmann, M.F.; Kiron, V. (2009). Short-term crowding stress in Atlantic cod, *Gadus morhua* L. modulates the humoral immune response. Aquaculture; 295: 110-115.

Calabrese, S.; Nilsen, T.O.; Kolarevic, J.; Ebbesson, L.O.E.; Pedrosa, C.; Fivelstad, S.; Hosfeld, C.; Stefansson, S.O.; Terjesen, B.F.; Takle, H.; Martins, C.I.M.; Sveier, H.; Mathisen, F.; Imsland, AK.; Handeland, SD. (2017). Stocking density limits for post- molt Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) with emphasis on production performance and welfare. Aquaculture; 468: 363-370.

El-Khaldi, A.T.F. (2010). Effect of different stress factors on some physiological parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Sau J of Biol Science; 17: 241-246.

Ellis, T.; North, B.; Scott, AP.; Bromage, N.R.; Porter, M.; Gadd, D. (2002). The relationships between stocking density and welfare in farmed rainbow trout. Fish Biol; 61: 493-531.

Espelid, S.; Lokken GB.; Steiro, K.; Bogwald, J. (1996). Effects of cortisol and stress on the immune system in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Fish Shellfish Immunol; 6: 95-100.

Geven, E.J.W.; Verkaar, F.; Flik, G.; Klaren, P.H.M. (2006). Experimental hyperthyroidismand central mediators of stress axis and thyroid axis activity in common carp (*Cyprinus carpio* L.). J. Mol. Endocrinol; 37: 443-452.

Hasanalipour, A.; Eagderi, S.; Poorbagher, H.; Bahmani, M. (2013). Effects of stocking density on blood cortisol, glucose and cholesterol levels of immature Siberian Sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt, 1869). Turk J Fish Aquat Sci; 13: 01-06.

Herrera, M.; Ruiz-Jarabo, I.; Hachero, I.; Vargas-Chacoff, L.; Amo, A.; Mancera, J.M. (2012). Stocking density affects growth and metabolic parameters in the brill (*Scophthalmus rhombus*). Aquac. Int; 20: 1041-1052.

Hoseini, S.M.; Nodeh, A.J. (2013). Changes in blood biochemistry of common carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus), following exposure to different concentrations of clove solution. Comp Clin Pathol; 22: 9-13.

Hoseini, S.M.; Yousefi, M.; Rajabiesterabadi, H.; Paktinat, M. (2014). Effect of short-term (0–72 h) fasting on serum biochemical characteristics in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Appl Ichthyol; 30: 569-573.

Iwama, G.K.; Vijayan, M.M.; Forsyth, R.B.; Ackerman, P.A. (1999). Heat

shock proteins and physiological stress in fish. Am Zool, 39: 901-909.

Kebus, M.J.; Collins, M.T.; Brownfield, M.S.; Amundson, C.H.; Kayes, T.B.; Malison, J.A. (1992). Effects of rearing density on the stress response and growth of rainbow trout. J. Aquat Anim Health; 4: 1-6.

Kpundeh, M.D.K.; He, J.; Qiang, J.; Hong, Y.; Xu, P. (2014). Stocking densities and zero culture-water exchange can modulate growth and hemato- immunological functions in juvenile GIFT strain Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). Inte J life Scien Res, 2: 114-126.

Kerr, M.G. (2008). Veterinary laboratory medicine: Clinical biochemistry and haematology. 2nd Edition. Blackwell Science Ltd, London, 368 pp.

Lall, S.P. (2002). The minerals. In: Fish nutrition, 3rd edn. J. E. Halver and R. W. Hardy (Eds). Academic Press, London, pp. 259-308.

Li, D.; Liu, Z.; Xie, C. (2012). Effect of stocking density on growth and serum concentrations of thyroid hormones and cortisol in Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). Fish Physiol Biochem; 38: 511-520.

Liu, B.; Jia, R.; Han, C.; Huang, B.; Lei, J. (2016). Effects of stocking density on antioxidant status, metabolism and immune response in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). Comp Biochem Physiol; 190: 1-8.

Lupatsch, I.; Santos, G.; Schrama, J.; Verreth, JAJ. (2010). Effect of stocking density and feeding level on energy expenditure and stress responsiveness in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture; 298: 245-250.

MacKenzie, D.S. (1988) Thyroid function in red drum. Contrib. Mar. Sci. Supp. 30: 139-146.

Mommsen, TP.; Vijayan, MM.; Moon, TW. (1999). Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. Rev. Fish Biol; 9: 211-268.

Monteiro, S.M.; Mancera, J.M.; Fontainhas-Fernandes, A.; Sousa, M. (2005). Copper induced alterations of biochemical parameters in the gill and plasma of (*Oreochromis niloticus*). Comp Biochem Physiol C; 141: 375-383.

Montero, D.; Izquierdo, M.; Tort, L. (1999). High stocking density produces crowding stress altering some physiological and biochemical parameters in gilthead seabream, *Sparus aurata*, juveniles. Fish Physiol Biochem; 20: 53-60.

Nelson, D.L.; Cox, M.M. (2005). Lehninger Principles of Biochemistry. 4th ed.; WH Freeman and Co. New York. 1013p.

North, B.P.; Turnbull, J.F.; Ellis, T.; Porter, M.J.; Migaud, H.; Bron, J.; Bromage, N.R. (2006). The impact of stocking density on the welfare of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture; 255: 466-479.

Ortuno, J.; Angeles Esteban, M.; Meseguer, J. (2002) Lack of effect of combining different stressors on innate immune responses of sea bream (*Sparus aurata* L.). Vet Immunol Immunopathol; 84: 17-27.

Pankhurst, N.W. (2011). The endocrinology of stress in fish: an environmental perspective. Gen Comp Endocrinol; 170: 265-275.

Pickering, A.D.; Pottinger, T.G. (1989). Stress responses and disease resistance in salmonid fish: effects of chronic elevation of plasma cortisol. Fish Physiol Biochem; 7: 253-258.

Peres H.; Santos, S.; Oliva-Teles, A. (2013). Selected plasma biochemistry parameters in gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. Appl Ichthyol; 29: 630-636.

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

Rafatnezhad, S.; Falahatkar, B.; Tolouei

Gilani, M.H. (2008). Effects of stocking density on haematological parameters, growth and fin erosion of great sturgeon (*Huso huso*) juveniles. Aquacult Res; 39: 1506-1513.

Reid, SG.; Bernier, NJ.; Perry, SF. (1998). The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release. Comp Biochem Physiol C, 120: 1-27.

Riche, M.; Weirich, CR.; Wills, PS. (2013). Stocking density effects on production characteristics and body composition of market size cobia, *Rachycentron canadum*, reared in recirculating aquaculture systems. J. World Aquacult. Soc.; 44: 259-266.

Ross, N.W.; Firth, K.J.; Wang, A.; Burka, J.F.; Johnson, S.C. (2000). Changes in hydrolytic enzyme activities of naive Atlantic salmon *Salmo salar* skin mucus due to infection with the salmon louse Lepeophtheirus salmonis and cortisol implantation. Dis Aquat Organ; 41: 43-51

Sadhu, N.; Sharma, S.R.K.; Joseph, S.; Dube, P.; Philipose, K.K. (2014). Chronic stress due to high stocking density in open sea cage farming induces variation in biochemical and immunological functions in Asian seabass (*Lates calcarifer*, Bloch). Fish Physiol Biochem; 40: 1105-1113.

Sarder, M.R.I.; Thompson, K.D.; Penman, D.J.; McAndrew, B.J. (2001) Immune responses of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) clones: I. non-specific responses. Dev Comp Immunol; 25: 37-6.

Shahsavani, D .; Mohri, M.; Kanani, H.G. (2010). Determination of normal values of some blood serum enzymes in *Acipenser stellatus* Pallas. Fish Physiol Biochem; 36, 39-43.

Tavares-Dias, M.; Moraes, FR. (2007). Haematological and biochemical reference intervals for farmed channel catfish. Fish Biolo; 71: 383-388.

Vargas-Chacoff, L.; Martinez, D.; Oyarzun, R.; Nualart, D.; Olavarria, V.; Yanez, A.; Bertran, C.; Ruiz-Jarabo, I.; Mancera, J.M. (2014). Combined effects of high stocking density and Piscirickettsia salmonis treatment on the immune system, metabolism and osmoregulatory responses of the Sub-Antarctic Notothenioid fish Eleginops maclovinus. Fish Shellfish Immunol; 40: 424-434.

Velmurugan, B.; Selvanayagam, M.; Cengiz, EI.; Uysal, E. (2008). Levels of transaminases, alkaline phosphatase, and protein in tissues of *Clarias gariepienus* fingerlings exposed to sublethal concentrations of cadmium chloride. Environ Toxicol; 23: 672-678.

Verburg van Kemenade, B.M.; Nowak, B.; Engelsma, M.Y.; Wyets, F.A. (1999). Differential effects of cortisol on apoptosis and proliferation of carp lymphocytes from head kidney, spleen and blood. Fish Shellfish Immunol, 9: 405-415.

Wendelaar, B.S.E. (1997). The stress response in fish. Physiology Review; 77: 591-625.

Yarahmadi, P.; Kolangi Miandare, H.; Hoseinifar, S.H.; Gheysvandi, N.; Akbarzadeh, A. (2015). The effects of stocking density on hemato-immunological and serum biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquac. Int; 23: 55-63.