



تأثیر تراکم ذخیره‌سازی بر عملکرد رشد، ایمنی و استرس در ماهی کوی *Cyprinus carpio* var. Koi (Linnaeus, 1758)

مرتضی بهره‌مند*، آسیه سلیمانی راد

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، باشگاه پژوهشگران و نخبگان جوان، کرج

نوع مقاله:	چکیده
پژوهشی	
تاریخچه مقاله:	
دریافت: ۹۵/۰۸/۱۵	
اصلاح: ۹۵/۰۹/۱۴	
پذیرش: ۹۵/۱۰/۱۰	
کلمات کلیدی:	
استرس	
ایمنی	
تراکم ذخیره‌سازی	
ماهی کوی	

به‌منظور تعیین تراکم ذخیره‌سازی بهینه در پرورش ماهی کوی (*Cyprinus carpio* var. Koi)، تعداد ۲۴۰۰ قطعه بچه‌ماهی ($1/28 \pm 0/11$ گرم) در پنج تیمار (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ قطعه در مترمکعب) به مدت ۱۱ هفته، پرورش داده شده، عملکرد رشد، بقاء، تغذیه و پارامترهای خونی آن‌ها ارزیابی شد. بین سه تیمار اول، از لحاظ افزایش وزن، ضریب رشد ویژه، ضریب تبدیل غذایی، تلفات و پارامترهای خونی، تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($p > 0/05$). کم‌ترین میزان وزن به دست آمده و بالاترین میزان تلفات در تیمارهای ۵ و ۴ مشاهده شد. بین تیمارها از نظر تعداد گلبول قرمز و سفید، هموگلوبین، هماتوکریت و پروتئین کل اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد ($p > 0/05$). بالاترین میزان ایمونوگلوبولین، هورمون کورتیزول و گلوکز، در تیمار ۵ و ۴ مشاهده شد ($p < 0/05$). با افزایش میزان تراکم از ۵۰ به ۳۰۰ قطعه در مترمکعب، در میزان لنفوسیت، کاهش و در میزان نوتروفیل، افزایش مشاهده شد. بالاترین میزان هورمون کورتیزول ($173/97 \pm 1/47$ نانوگرم در میلی‌لیتر)، متعلق به تیمار ۵ بود که در روز ۷ مشاهده شد. براساس نتایج به دست آمده، افزایش تراکم به بیش از ۱۵۰ قطعه در مترمکعب، منجر به کاهش رشد و بروز شرایط استرس‌زا در ماهی کوی می‌شود. بنابراین بهترین تراکم ذخیره‌سازی در این آزمایش، ۱۵۰ قطعه ماهی در مترمکعب محاسبه شد.

مقدمه

در دو دهه اخیر تحقیق بر روی تراکم ذخیره‌سازی بهینه در پرورش آبزیان در بین محققین از جایگاه ویژه‌ای برخوردار بوده است (Turnbull *et al.*, 2005)، که دلیل این امر، اهمیت آن در بهبود مدیریت آبزی‌پروری در ارتباط با رفاه آبزی می‌باشد. اگرچه تا کنون مطالعاتی در این زمینه صورت گرفته است، اما دستیابی به اطلاعاتی که در بردارنده بهترین تراکم ذخیره‌سازی برای تک‌تک گونه‌های پرورشی (خوراکی یا آکواریومی) باشد، دشوار یا تقریباً غیرممکن است، چرا که تراکم بهینه تحت تأثیر موارد بسیاری همچون سیستم‌های مختلف پرورش، گونه آبزی، سن آبزی، شرایط فیزیکی‌وشیمیایی محیط پرورش و غیره می‌باشد (Ellis *et al.*, 2002; Samad *et al.*, 2014).

تراکم ذخیره‌سازی عموماً به عنوان مقدار وزن ماهی در واحد حجم آب (Ellis, 2001)، یا تعداد ماهی ذخیره شده در شروع فرآیند پرورش (Ruane *et al.*, 2002) شناخته می‌شود. مسئله تراکم می‌تواند بر بسیاری از مسائل، از جمله عملکرد رشد،

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: bahremand.m@ut.ac.ir

فیزیولوژی و رفتار ماهی، فعالیت‌های تغذیه‌ای، متابولیسم، مسائل هورمونی و فعالیت‌های ایمنولوژیک تأثیرگذار باشد (Samad *et al.*, 2014; Yin *et al.*, 1995; Kebus *et al.*, 1992). میزان رشد ماهی، یکی از شاخص‌های مهم فیزیولوژیکی در ارتباط با بحث تراکم می‌باشد (Tawwab *et al.*, 2005). میزان و سرعت رشد بدن آبی‌زی رونده ثابت و پایداری را در طول مراحل مختلف زندگی ماهی نداشته و عوامل متعددی از جمله پارامترهای محیطی و ژنتیکی در این رابطه تأثیرگذار می‌باشند (Sloman and Armstrong, 2002). اثر تراکم ذخیره‌سازی در همه ماهی‌ها یکسان نیست، به نحوی که برخی از ماهی‌ها مانند کفشک‌ماهی (*Solea senegalensis*) (Andrade *et al.*, 2015)، چار قطبی (*Salvelinus alpinus*) (Jorgensen *et al.*, 1993) و هالیبوت (*Hippoglossus hippoglossus*) (Bjornsson, 1994) نسبت به تراکم‌های بالا اثر مثبت و برخی دیگر مانند سیم سر طلایی (*Sparus auratus*) (Montero *et al.*, 1999) و باس دریایی (*Dicentrarchus labrax*) (Gornati *et al.*, 2004)، اثر منفی نشان می‌دهند. تأثیر منفی تراکم بر عملکرد رشد، عمدتاً به دلیل بروز استرس ناشی از آن در ماهی و در نتیجه کاهش تغذیه و نرخ رشد می‌باشد (Samad *et al.*, 2014). از مهم‌ترین دلایل بروز استرس در این رابطه می‌توان به روابط متقابل بین ماهیان، رقابت بر سر منابع غذایی و فضای مورد نیاز، اشاره نمود (Kristiansen *et al.*, 2004).

ارزیابی سلول‌های خونی، بیوشیمی خون و هورمون‌ها، می‌تواند در تشخیص بیماری‌ها و کنترل وضعیت فیزیولوژیک ماهی موثر باشد (Stoskopf, 1993; Maita, 2007). در همین ارتباط، افزایش هورمون کورتیزول به عنوان اصلی‌ترین پاسخ هورمونی به عوامل استرس‌زا شناخته شده و کاربرد بسیار زیادی به عنوان شاخص پاسخ به استرس دارد (Barton and Iwama, 1991; Ross and Ross, 2008). تراکم بیش از حد، یکی از عوامل استرس‌زای مزمن در آبی‌زی پروری می‌باشد که می‌تواند سبب افزایش ادامه‌دار در سطوح کورتیزول و گلوکز پلاسما شود (Pickering and Pottinger, 1989)، که در نهایت اثرات مخرب در سلامت آبی‌زی خواهد داشت (Barton and Iwama, 1991). استرس ممکن است به افزایش حساسیت نسبت به بیماری‌ها، کاهش رشد و نواقص تولید مثلی منجر شود که به نظر می‌رسد همگی آن‌ها به دلیل ترشح کورتیزول می‌باشد (Pickering, 1992).

ویژگی‌های خون‌شناسی ماهیان یکی از مهم‌ترین شواهد فیزیولوژیک و منعکس‌کننده ارتباط خصوصیات محیطی و سلامتی ماهیان می‌باشد. تغییر در پارامترهای خونی ماهیان در مواجهه با شرایط زیست محیطی، پاسخی است بر استرس‌های محیطی و می‌تواند به عنوان یکی از شاخص‌های مهم زیستی مطرح باشد (Ross and Ross, 2008; Wendelaar Bonga, 1997). یکی از شاخص‌های خونی مناسب در تشخیص تنش‌های محیطی در ماهیان، بررسی خصوصیات سلول‌های خونی (تعداد، شکل، و ترکیب) آن‌ها می‌باشد (Liorente *et al.*, 2002). یکی از مهم‌ترین پروتئین‌های محلول در پلاسما ایمنوگلوبولین‌ها هستند که نقش اساسی در ایمنی ایفا می‌نمایند (Boshra and Sunyer, 2006). بسیاری از محرک‌های ایمنی، همچون استرس، باعث افزایش فعالیت ایمنوگلوبولین‌ها در سرم خون ماهیان می‌شوند (Montero *et al.*, 1999).

ماهی کوی (*Cyprinus carpio var. Koi*) وارسته رنگی کپور معمولی بوده و امروز در زمره زیباترین و ارزشمندترین ماهیان زینتی قرار دارد (Bahreman *et al.*, 2016). منشأ این ماهی شرق آسیا (و به طور خاص ژاپن) می‌باشد (Hickling *et al.*, 2007). این ماهی در دهه اخیر علاقمندان بسیاری در ایران پیدا کرده و از این رو تکثیر و پرورش آن در کشور، روز به روز در حال افزایش می‌باشد. یکی از مهم‌ترین مشکلاتی که پرورش‌دهندگان ماهیان زینتی با آن رو به رو هستند، مسئله کمبود فضا برای پرورش می‌باشد (Jha and Barat, 2005; Ebadzadeh *et al.*, 2015). جهت افزایش بازده تولید در شرایط پرورش گونه‌های مختلف آبی‌زیان، افزایش تراکم ذخیره‌سازی می‌تواند به عنوان یکی از روش‌های موثر در جبران مشکل کمبود فضا یا زمین محسوب گردد. به همین دلیل آبی‌زی‌پروران عمدتاً ترجیح می‌دهند تا به منظور دستیابی به حداکثر تولید، آبی‌زی خود را در بالاترین تراکم ممکن پرورش دهند (Samad *et al.*, 2014). بر اساس گزارش Asano و همکاران (۲۰۰۳)، ماهی کوی در شیوه سنتی پرورش در مناطقی از هاوایی، در تراکمی تا حد ۲۵۰ قطعه در هر مترمکعب پرورش داده می‌شود، که البته نیمی از این ماهی‌ها در طی دوره پرورش از بین می‌روند. بنابراین دانستن تراکم بهینه به عنوان یکی از جنبه‌های مهم و ضروری پرورش مطرح می‌باشد، چراکه نقش اساسی در تبدیل آبی‌زی‌پروری به یک فرآیند اقتصادی پایدار و سودآور دارد (Rafatnezhad *et al.*, 2008).

با توجه به اهمیت این مسئله و ارتباط مستقیم آن با میزان تولید و از آن جا که تاکنون مطالعه‌ای در ارتباط با تأثیر تراکم ذخیره‌سازی بر ماهی کوی انجام نشده است، هدف از پژوهش حاضر ارزیابی اثرات ۵ تراکم ذخیره‌سازی (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ قطعه بچه ماهی کوی در هر ۱۰۰۰ لیتر آب محیط پرورش) بر عملکرد رشد (افزایش وزن، درصد افزایش وزن، ضریب رشد ویژه و ضریب تبدیل غذایی)، درصد تلفات و همچنین سنجش میزان ایمنی و استرس (گلوبول قرمز، هموگلوبین، همتاکریت، گلوبول سفید (لنفوسیت، نوتروفیل، ائوزینوفیل، مونوسیت و بازوفیل)، پروتئین کل، ایمونوگلوبولین، هورمون کورتیزول و گلوکز خون) و در انتها معرفی میزان تراکم بهینه پرورش در این ماهی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

به‌منظور انجام آزمایش، تعداد ۲۶۰۰ قطعه بچه ماهی کوی (*Cyprinus carpio* var. Koi) با میانگین وزن $1/05 \pm 0/10$ گرم از یکی کارگاه‌های تکثیر محلی شهرستان مشهد تهیه و به محل آزمایش منتقل گردید. پس از سازگاری اولیه بچه‌ماهیان با شرایط دمایی کارگاه و عادت‌دهی آن‌ها با جیره مورد استفاده در آزمایش به مدت یک هفته، تعداد ۲۴۰۰ عدد بچه‌ماهی پس از زیست‌سنجی و اندازه‌گیری طول ($18/19 \pm 0/37$ میلی‌متر) و وزن ($1/28 \pm 0/11$ گرم)، بر اساس تیمارهای آزمایش، در ۱۵ حوضچه فایبرگلاس (هر یک با ظرفیت آب‌گیری ۱۰۰۰ لیتر) ذخیره‌سازی شدند. طرح آزمایشی مورد استفاده در پژوهش حاضر، طرح کاملاً تصادفی و شامل پنج تیمار (تیمارهای ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵، به ترتیب با تراکم‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ قطعه بچه ماهی در هر مترمکعب) و هر یک در ۳ تکرار بود. تمامی شرایط فیزیکیوشیمیایی آب مخازن (از جمله دما، میزان اکسیژن، pH و ...) در طول دوره ۱۱ هفته‌ای آزمایش، به‌صورت روزانه کنترل و در سطح بهینه نگهداری شد. جدول ۱ نشان‌دهنده شرایط فیزیکیوشیمیایی آب مخازن در طول دوره آزمایش می‌باشد.

جدول ۱. شرایط فیزیکیوشیمیایی آب مخازن در طول دوره آزمایش

پارامتر	میزان
دمای آب (درجه سانتی‌گراد)	25 ± 1
pH	$7/5 \pm 0/4$
اکسیژن محلول (mg/l)	$6/8 \pm 0/5$
نیتريت (mg/l)	$< 0/08$
نیترات (mg/l)	< 15

در طول دوره آزمایش، غذادهی روزانه به بچه‌ماهیان در سه نوبت (ساعات ۸، ۱۲ و ۱۸) و به میزان ۵ درصد وزن بدن انجام گرفت (Takeuchi *et al.*, 2002). پس از هر بار غذادهی، بلافاصله غذای مصرف نشده سیفون شد. جیره مورد استفاده در این پژوهش، پلت اکسترود EX-SFC (ساخت شرکت چین، ایران)، با میزان پروتئین خام ۳۸ درصد، چربی خام ۱۰ درصد، فیبر ۴/۵ درصد، رطوبت کمتر از ۱۰ درصد و انرژی خام ۴۱۰۰ کیلوکالری بر کیلوگرم بود. پارامترهای رشد (افزایش وزن، درصد افزایش وزن و ضریب رشد ویژه)، درصد تلفات و ضریب تبدیل غذایی، به شرح زیر مورد ارزیابی قرار گرفت (Rafatnezhad *et al.*, 2008).

وزن اولیه (گرم) - وزن نهایی (گرم) = افزایش وزن بدن (گرم)

$100 \times \frac{\text{وزن اولیه (گرم)}}{\text{وزن اولیه (گرم) - وزن نهایی (گرم)}} = \text{درصد افزایش وزن بدن}$

$100 \times \frac{\text{طول دوره آزمایش (لگاریتم طبیعی وزن اولیه - لگاریتم طبیعی وزن نهایی)}}{\text{نرخ رشد ویژه (درصد در روز)}}$

افزایش وزن ماهی (گرم) / غذای خورده شده (گرم) = ضریب تبدیل غذایی

$100 \times \frac{\text{تعداد ماهیان در ابتدای دوره}}{\text{تعداد ماهیان تلف شده در طول دوره}} = \text{درصد تلفات}$

در پایان دوره ۷۷ روزه آزمایش، ماهی‌ها به مدت ۲۴ ساعت گرسنه نگه داشته شدند. به‌منظور خون‌گیری از بچه‌ماهیان از هر یک از تکرارهای آزمایشی تعداد ۱۰ عدد بچه‌ماهی به صورت تصادفی انتخاب و خون‌گیری، پس از بی‌هوشی ماهی (با ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر پودر گل میخک) با برش ساقه دمی صورت گرفت. بخشی از نمونه‌های خون گرفته شده از هر تیمار به منظور سنجش پارامترهای خونی به تیوب‌های هپارینه و بخش دیگر برای جداسازی سرم به تیوب‌های غیرهپارینه منتقل شد. نمونه‌های خون تا مرحله سانتریفیوژ (۳۰۰۰ دور در دقیقه، به مدت ۱۰ دقیقه) در یخ قرار داده شد (Rafatnezhad *et al.*, 2008). نمونه‌های سرم تا انجام آنالیزهای بعدی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. شمارس تعداد گلبول‌های قرمز و سفید (لنفوسیت، نوتروفیل، ائوزینوفیل، مونوسیت و بازوفیل) با استفاده از روش هموسیتومتر نئوبار (Stoskopf, 1993)، میزان هماتوکریت خون با استفاده از روش میکروهماتوکریت (Rehulka *et al.*, 2011) و میزان هموگلوبین با استفاده از کیت و دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۴۰ نانومتر (Blaxhall and Daisley, 1973)، مورد سنجش قرار گرفت. اندازه‌گیری میزان پروتئین کل سرم به روش بیوره^۱ و در طول موج ۵۴۰ نانومتر (Lawrence, 1986) و آنالیز میزان ایمونوگلوبولین به شیوه نفلومتری (Naseri *et al.*, 2013) انجام شد. سنجش مقدار هورمون کورتیزول توسط کیت تجاری (Immunotech، فرانسه)، بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده و به روش رادیو ایمونواسی^۲ صورت پذیرفت (White and Fletcher, 1984). میزان هورمون کورتیزول علاوه بر پایان دوره آزمایش، در بازه‌های زمانی ۷ روزه نیز به همین شیوه مورد سنجش قرار گرفت. اندازه‌گیری میزان گلوکز به شیوه کالریمتری و با استفاده از کیت تجاری (پارس آزمون، ایران) انجام شد (Bayunova *et al.*, 2002).

به‌منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها، در ابتدا نرمال بودن داده‌ها به وسیله آزمون Shapiro-Wilk مورد ارزیابی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل بر روی داده‌های مربوط به تغییرات معیارهای رشد و پارامترهای خونی ماهیان از طریق آزمون تجزیه واریانس یک طرفه (ANOVA) و مقایسه میانگین بین تیمارها با استفاده از آزمون چنددانه‌ای دانکن انجام شد (Zar, 2010). در ابتدا اطلاعات خام در محیط Microsoft Excel 2010 مورد پردازش و سپس وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ مورد سنجش قرار گرفت.

نتایج

به طور کلی، بر اساس نتایج حاصل از مقایسه پارامترهای مربوط به عملکرد رشد و تغذیه در این مطالعه، می‌توان تیمارهای پنج‌گانه آزمایش را به دو دسته مجزا تقسیم نمود که با یکدیگر تفاوت معنی‌دار داشتند ($p < 0.05$). دسته اول که رشد و تغذیه بهتری از خود نشان دادند، تیمارهای ۱، ۲ و ۳ (یعنی تراکم‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ قطعه بچه ماهی در هر مترمکعب) بودند. دسته دوم، یعنی تیمارهای ۴ و ۵ (تراکم‌های ۲۰۰ و ۳۰۰ قطعه بچه ماهی در هر مترمکعب)، از نظر رشد و تغذیه در جایگاه پایین‌تری قرار داشتند. با افزایش تراکم از ۵۰ به ۳۰۰ قطعه بچه ماهی در مترمکعب، میزان رشد روند نزولی نشان داد. بیشترین و کم‌ترین میزان افزایش وزن بدن و ضریب رشد ویژه، به ترتیب در تیمارهای ۱ و ۵ مشاهده شد. پایین‌ترین میزان شاخص ضریب تبدیل غذایی نیز در تیمار ۱ اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل همچنین نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای ۱، ۲ و ۳ با دو تیمار ۴ و ۵ از نظر درصد تلفات بود. بین تیمار ۴ و ۵ نیز اختلاف معنی‌دار مشاهده شد. پایین‌ترین میزان تلفات در تیمارهای ۱، ۲ و ۳ اندازه‌گیری ($p > 0.05$) و بیشترین میزان آن نیز در تیمار ۵ ثبت شد (جدول ۲).

نتایج حاصل از آنالیز پارامترهای خونی ماهیان کوی نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها از نظر تعداد گلبول قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت و تعداد گلبول سفید بود ($p > 0.05$). البته با افزایش تراکم، در تعداد گلبول قرمز و میزان هموگلوبین افزایش نسبی و در تعداد گلبول سفید، کاهش نسبی مشاهده شد. بیشترین تعداد گلبول قرمز و بالاترین میزان هموگلوبین در تیمار ۵ ثبت شد. تیمار ۱ بیشترین تعداد گلبول سفید را به خود اختصاص داد. نتایج حاصل همچنین نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در میزان پروتئین کل سرم خون ماهیان کوی بین تیمارهای مختلف آزمایش بود ($p > 0.05$). البته با افزایش تراکم در میزان پروتئین کل نیز افزایش مشاهده شد. بین تیمارها اختلاف معنی‌دار در میزان

¹ Biuret

² Radioimmunoassay

ایمونوگلوبولین مشاهده شد، به نحوی که می‌توان تیمارهای پنج گانه آزمایش را به دو دسته مجزا تقسیم نمود. دسته اول، تیمارهای ۱، ۲ و ۳، کم‌ترین میزان ایمونوگلوبولین و دسته دوم، تیمارهای ۴ و ۵، بیشترین میزان ایمونوگلوبولین را نشان دادند ($p < 0.05$). در مورد میزان هورمون کورتیزول نیز همین نتیجه بین تیمارها مشاهده شد، به این نحو که کم‌ترین میزان این هورمون در تیمارهای ۱، ۲ و ۳ و بیشترین میزان آن در دو تیمار دیگر ثبت شد ($p < 0.05$). بین سه تیمار اول از نظر میزان هورمون کورتیزول اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد. سنجش میزان گلوکز سرم خون ماهیان کوی نشان داد که به جز تیمار ۲ و ۳، بین سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار وجود داشت (جدول ۳).

جدول ۲. مقایسه پارامترهای مربوط به عملکرد رشد و بقا در تیمارهای مختلف آزمایش

پارامتر	تیمار ۱ (۵۰)	تیمار ۲ (۱۰۰)	تیمار ۳ (۱۵۰)	تیمار ۴ (۲۰۰)	تیمار ۵ (۳۰۰)
افزایش وزن (گرم)	۶/۹۶±۰/۱۱ ^a	۶/۸۰±۰/۱۱ ^a	۶/۶۲±۰/۱۶ ^a	۵/۶۷±۰/۳۸ ^b	۵/۲۰±۰/۴۹ ^b
درصد افزایش وزن (درصد)	۵۴۲/۶۶±۴۸/۴۱ ^a	۵۳۶/۲۳±۵۷/۸۱ ^a	۵۱۲/۶۰±۳۱/۲۵ ^a	۴۴۵/۸۹±۶/۱۸ ^b	۴۱۰/۳۸±۱۸/۳۸ ^b
ضریب رشد ویژه (درصد در روز)	۲/۴۸±۰/۱۰ ^a	۲/۴۶±۰/۱۱ ^a	۲/۴۲±۰/۰۷ ^a	۲/۲۶±۰/۰۲ ^b	۲/۱۷±۰/۰۵ ^b
ضریب تبدیل غذایی	۲/۱۶±۰/۰۳ ^a	۲/۲۱±۰/۰۴ ^a	۲/۲۷±۰/۰۵ ^a	۲/۶۵±۰/۱۷ ^b	۲/۹۰±۰/۲۶ ^b
تلفات (درصد)	۲/۰۰±۰/۰۰ ^a	۲/۶۷±۰/۵۸ ^a	۳/۵۵±۰/۳۹ ^a	۹/۶۷±۱/۵۳ ^b	۱۳/۳۳±۱/۶۷ ^c

* اعدادی که با حروف یکسان نشان داده شده اند تفاوت معنی‌دار ندارند ($p > 0.05$).

جدول ۳. مقایسه پارامترهای خونی در تیمارهای مختلف آزمایش

پارامتر	تیمار ۱ (۵۰)	تیمار ۲ (۱۰۰)	تیمار ۳ (۱۵۰)	تیمار ۴ (۲۰۰)	تیمار ۵ (۳۰۰)
گلبول قرمز (تعداد/ mm^3)	۹۱۸۶۰۰±۴۲۷۹ ^a	۹۲۲۴۳۳±۲۵۱۰ ^a	۹۲۳۴۳۳±۲۵۱۶ ^a	۹۲۵۶۰۰±۳۰۸۰ ^a	۹۲۶۰۰۰±۲۲۸۶ ^a
گلبول سفید (تعداد/ mm^3)	۱۲۳۸۰±۵۰۷ ^a	۱۲۳۴۳±۶۶۲ ^a	۱۲۲۰۳±۵۰۰ ^a	۱۲۱۷۰±۴۴۲ ^a	۱۲۱۰۶±۳۱۰ ^a
هموگلوبین (g/dl)	۹/۳۲±۰/۰۲ ^a	۹/۳۳±۰/۰۲ ^a	۹/۳۵±۰/۰۳ ^a	۹/۳۶±۰/۰۲ ^a	۹/۳۷±۰/۰۱ ^a
هماتوکریت (%)	۳۰/۰۰±۱/۰۰ ^a	۳۱/۳۳±۱/۵۳ ^a	۳۱/۰۰±۰/۰۰ ^a	۳۰/۳۳±۰/۵۸ ^a	۳۰/۶۷±۰/۵۸ ^a
پروتئین کل (g/dl)	۳/۲۰±۰/۰۶ ^a	۳/۳۳±۰/۰۵ ^a	۳/۴۸±۰/۰۳ ^a	۳/۶۴±۰/۰۵ ^a	۳/۸۶±۰/۰۳ ^a
ایمونوگلوبولین (mg/dl)	۲۰/۸۰±۰/۳۰ ^a	۲۱/۹۰±۰/۳۵ ^a	۲۲/۳۷±۰/۲۵ ^a	۳۰/۳۳±۰/۴۹ ^b	۳۰/۷۰±۰/۲۶ ^b
کورتیزول (ng/ml)	۴۹/۱۷±۱/۸۲ ^a	۵۸/۵۰±۰/۷۵ ^a	۶۹/۱۰±۰/۶۹ ^a	۱۱۶/۸۳±۰/۷۱ ^b	۱۲۷/۹۷±۱/۳۳ ^b
گلوکز (mg/dl)	۶۱/۶۷±۱/۰۲ ^a	۷۰/۸۳±۱/۰۷ ^b	۷۷/۹۳±۰/۶۵ ^b	۹۷/۲۷±۰/۹۱ ^c	۱۰۸/۷۷±۱/۸۰ ^d

* اعدادی که با حروف یکسان نشان داده شده اند تفاوت معنی‌دار ندارند ($p > 0.05$).

مقایسه شمارش افتراقی گلبول‌های سفید بین تیمارهای مختلف نشان داد که تنها در میزان لنفوسیت و نوتروفیل، بین تیمار ۴ و ۵ با سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار وجود داشت (جدول ۴). با افزایش میزان تراکم ذخیره‌سازی از ۵۰ به ۳۰۰ قطعه در مترمکعب، در میزان لنفوسیت، کاهش و در میزان نوتروفیل، افزایش مشاهده شد. کم‌ترین میزان لنفوسیت ($73/27 \pm 0/12$) در تیمار ۵ اندازه‌گیری شد. در نتایج حاصل از شمارش افتراقی گلبول‌های سفید، اختلاف معنی‌داری در بین تیمارها از نظر درصد ائوزینوفیل، مونوسیت و بازوفیل مشاهده نشد ($p > 0.05$).

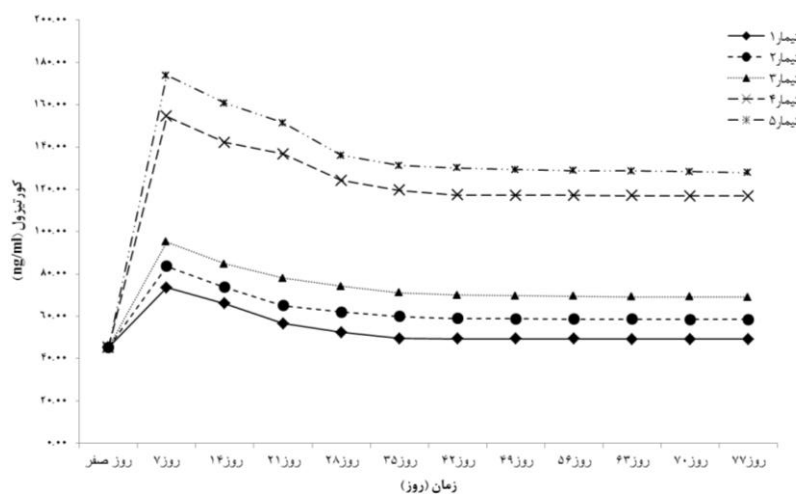
نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان هورمون کورتیزول در ابتدای آزمایش و پیش از جابه‌جا کردن ماهی‌ها نشان داد که میزان این هورمون در حالت طبیعی در بچه‌ماهیان کوی $45/33 \pm 1/07$ نانوگرم در میلی‌لیتر بود. به علاوه، بالاترین میزان هورمون کورتیزول، بدون در نظر گرفتن فاکتور تراکم، در هفته اول آزمایش مشاهده شد (شکل ۱). روند کاهش کورتیزول از هفته دوم شروع و تا انتهای آزمایش ادامه داشت. بالاترین میزان هورمون کورتیزول ثبت شده در این آزمایش ($173/97 \pm 1/47$) نانوگرم در میلی‌لیتر، متعلق به تیمار ۵ بود که در روز ۷ مشاهده شد. همچنان که در شکل ۱ نیز نشان داده شده است، روند تغییرات هورمون کورتیزول در سه تیمار اول (تراکم‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ قطعه بچه‌ماهی در هر مترمکعب) مشابه یکدیگر بود و در

انتهای آزمایش به مقادیری نزدیک به مقدار اولیه خود بازگشت (جدول ۳). اما در دو تیمار ۴ و ۵، مقدار این هورمون در انتهای آزمایش به ترتیب ۲/۵۸ و ۲/۸۲ برابر مقادیر ابتدایی آزمایش بود.

جدول ۴. مقایسه شمارش افتراقی گلبول‌های سفید، در تیمارهای مختلف آزمایش

تیمار	تیمار ۱ (۵۰)	تیمار ۲ (۱۰۰)	تیمار ۳ (۱۵۰)	تیمار ۴ (۲۰۰)	تیمار ۵ (۳۰۰)
پارامتر					
لنفوسیت (/.)	۷۷/۴۳±۰/۱۲ ^b	۷۷/۴۰±۰/۱۰ ^b	۷۷/۰۰±۰/۱۰ ^b	۷۴/۰۷±۰/۲۱ ^a	۷۳/۲۷±۰/۱۲ ^a
نوتروفیل (/.)	۱۸/۸۷±۰/۲۵ ^a	۱۸/۸۷±۰/۱۵ ^a	۱۹/۰۰±۰/۱۰ ^a	۲۱/۳۰±۰/۱۶ ^b	۲۱/۳۳±۰/۰۶ ^b
ائوزینوفیل (/.)	۲/۳±۰/۱۰ ^a	۲/۳۳±۰/۱۵ ^a	۲/۵±۰/۱۰ ^a	۲/۸۷±۰/۱۲ ^a	۳/۰۰±۰/۱۰ ^a
مونوسیت (/.)	۰/۷۰±۰/۲۰ ^a	۰/۷۳±۰/۱۵ ^a	۰/۸۳±۰/۱۲ ^a	۱/۰۰±۰/۱۰ ^a	۱/۱۰±۰/۱۰ ^a
بازوفیل (/.)	۰/۷۰±۰/۲۰ ^a	۰/۶۷±۰/۲۱ ^a	۰/۶۷±۰/۲۵ ^a	۰/۷۷±۰/۲۵ ^a	۱/۰۰±۰/۱۰ ^a

* اعدادی که با حروف یکسان نشان داده شده اند تفاوت معنی‌دار ندارند ($p > 0.05$).



شکل ۱. مقایسه تغییرات هورمون کورتیزول با گذشت زمان در تیمارهای مختلف آزمایش

بحث

در مطالعه حاضر با افزایش تراکم از ۵۰ به ۳۰۰ قطعه بچه ماهی در مترمکعب، عملکرد رشد روند نزولی نشان داد. نرخ رشد در یک گونه ماهی به پارامترهای متعددی بستگی دارد، اما پارامتر اصلی در این رابطه، دسترسی به غذای کافی می‌باشد. در بسیاری از مطالعات نشان داده شده است که رشد گونه‌های مختلف آبی، پدیده‌ای وابسته به تراکم بوده و رابطه‌ای معکوس بین تراکم ذخیره‌سازی و اندازه ماهی تولید شده وجود دارد (Gress *et al.*, 1996; Irwin *et al.*, 1999; Metusalach *et al.*, 1999; Sharma and Chakrabarti, 1999). تراکم عامل اصلی استرس در ماهی نیست بلکه رقابت بر سر غذا و مکان در تراکم‌های بالا عامل استرس است (Boujard *et al.*, 2002). در تراکم‌های بالاتر استرس ناشی از رقابت بر سر غذا افزایش می‌یابد که یکی از عمده‌ترین دلایل کاهش رشد در ماهی است. تحت شرایط استرس، ماهی به انرژی بیشتری نیاز دارد تا صرف فرایندهای هموستاتیک کند (Schreck, 1982). به عبارت دیگر، انرژی بیشتر از رشد، صرف استرس می‌شود (Moradyan *et al.*, 2012). از آن‌جا که در این مطالعه کلیه عوامل مؤثر بر رشد نظیر نوع جیره، دفعات و میزان غذایی و همچنین پارامترهای فیزیوشیمیایی آب برای همه تیمارها یکسان بود، بنابراین می‌توان گفت که اختلاف رشد مشاهده شده به طور عمده به تراکم‌های ذخیره‌سازی متفاوت ماهی مربوط می‌شود. Imanpour و همکاران (۲۰۰۹)، نشان دادند که با افزایش تراکم ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) به بیش از ۴۵۰ قطعه ماهی در هر هکتار استخر شاخص‌های رشد ماهی در طولانی‌مدت کاهش معنی‌دار نشان می‌دهند. Biswas و همکاران (۲۰۰۶)، نیز گزارش نمودند که بهترین میزان تراکم ذخیره‌سازی به منظور پرورش طولانی‌مدت ماهی کپور معمولی در استخرهای خاکی و رساندن آن به اندازه بازاری، تعداد ۱۶ عدد ماهی معادل ۲۱۰ گرم در هر مترمکعب، می‌باشد. Jha و Barat (۲۰۰۵) گزارش نمودند که بهترین میزان تراکم در

پرورش ماهی کوی در استخرهای سیمانی به منظور دستیابی به حداکثر رشد و رسیدن به اندازه بازاری، ۳۰۰ عدد به ازای هر مترمکعب می‌باشد و با افزایش تراکم از این میزان عملکرد رشد ماهیان کاهش معنی‌دار نشان می‌دهد. از جمله دلایل احتمالی اختلاف در میزان تراکم بهینه تعیین شده در این مطالعه و پژوهش حاضر می‌توان به تفاوت در نوع نژاد مورد استفاده، اندازه ماهی در ابتدای آزمایش، تفاوت در نوع جیره مورد استفاده و تفاوت در پارامترهای فیزیکی‌وشیمیایی محیط پرورش، اشاره نمود. McKenzie و همکاران (۲۰۱۲) نیز با مطالعه بر روی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) به این نتیجه رسیدند که با افزایش تراکم، گرفتن غذا و رشد دچار نقصان می‌شود.

در پرورش آبزیان، یکی از مهم‌ترین عوامل نشان‌دهنده بازده اقتصادی، ضریب تبدیل غذا می‌باشد و چون عوامل مؤثر بر ضریب تبدیل غذایی، مثل میزان و دفعات غذاهای، درجه حرارت آب و نوع جیره در کلیه تیمارها یکسان بود، بنابراین به نظر می‌رسد که میزان تراکم نقش تعیین‌کننده‌ای در اختلافات ایجاد شده در بین تیمارها از این نظر ایفا می‌کند. همچنین شاید بتوان از جمله مهم‌ترین اثرات استرس بر روی رشد ماهیان را کاهش مصرف غذا در آن‌ها دانست. Ellis و همکاران (۲۰۰۲)، نشان دادند که بین ضریب تبدیل غذا و تراکم ذخیره‌سازی در قزل‌آلای رنگین‌کمان نسبت مستقیم وجود دارد. به عبارتی، با افزایش تراکم، میزان ضریب تبدیل غذایی نیز افزایش می‌یابد که این مسئله برای پرورش‌دهنده مطلوب نیست. نتایج مطالعه حاضر نیز مؤید این مسئله می‌باشد.

نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که تراکم‌های بالاتر از ۱۵۰ قطعه بچه ماهی کوی در هر مترمکعب، می‌تواند سبب بروز تلفاتی در حدود ۹ تا ۱۵ درصد شود. عوامل متعددی می‌تواند در این زمینه مؤثر باشند که کاهش دسترسی به غذا و به تبع آن کاهش رشد (Bilen *et al.*, 2015)، کمبود اکسیژن و برهم‌کنش‌های بین ماهیان، مهم‌ترین عوامل به نظر می‌رسند. چرا که ماهی را ضعیف و مستعد ابتلا به عفونت‌ها و بیماری‌های مختلف می‌نماید (Tort, 2011). ضمن آن که بروز استرس‌های مزمن ناشی از تراکم، می‌تواند با تغییر پارامترهای بیوشیمیایی خون (Heras *et al.*, 2015)، سبب به هم خوردن تعادل زیستی بدن آبی و در نتیجه افزایش تلفات گردد.

آنالیز پارامترهای خونی بچه‌ماهیان کوی نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها از نظر تعداد گلبول قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت و تعداد گلبول سفید بود. البته با افزایش تراکم ذخیره‌سازی، در تعداد گلبول‌های سفید روند کاهشی مشاهده شد. مطالعات مؤید این مسئله می‌باشند که گلبول‌های سفید در ماهیانی که تحت تاثیر تنش قرار گرفته‌اند، معمولاً کاهش می‌یابد (Balabanova *et al.*, 2009; Witeska, 2005; Ellsaesser and Clem, 1986). مطالعات مختلف نشان داده است که لکوسیتوپنی (یا کاهش کلی تعداد لکوسیت‌ها) یک پاسخ غیراختصاصی به تنش‌های محیطی می‌باشد که هورمون‌های کورتیکواستروئیدی به طور غیرمستقیم در این فرایند نقش دارند (Mazon *et al.*, 2002). کاهش تعداد گلبول‌های سفید تحت تاثیر تنش‌های محیطی پیش از این در مورد فیل ماهی (*Huso huso*) (Rafatnezhad *et al.*, 2008)، کپور معمولی (Balabanova *et al.*, 2009) و تیلاپای نیل (*Oreochromis niloticus*) (Martines-Porchas *et al.*, 2009) گزارش شده است. Andrade و همکاران (۲۰۱۵) در مطالعه خود نشان دادند که افزایش تراکم تاثیری بر میزان هماتوکریت خون کفشک ماهی *Solea senegalensis* ندارد، که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد. Rafatnezhad و همکاران (۲۰۰۸)، بیان کردند افزایش تراکم تاثیری بر تعداد گلبول‌های قرمز و غلظت هموگلوبین خون فیل ماهی ندارد، که مشابه با نتایج این پژوهش می‌باشد.

نتایج حاصل از شمارش افتراقی گلبول‌های سفید خون ماهیان کوی نشان داد که با افزایش میزان تراکم ذخیره‌سازی از ۵۰ به ۳۰۰ قطعه بچه ماهی در هر مترمکعب، در میزان لنفوسیت، کاهش و در میزان نوتروفیل، افزایش رخ می‌دهد. مطالعات نشان داده‌اند که ترشح کورتیزول تحت تاثیر تنش، طول عمر لنفوسیت‌ها را کاهش داده، مرگ برنامه‌ریزی شده آن‌ها را تسریع کرده (Wyets *et al.*, 1998; Wendelaar Bonga, 1997) و تکثیر آن‌ها را کاهش می‌دهد (Espelid *et al.*, 1996). از این رو کاهش تعداد و فعالیت لنفوسیت‌ها، صرف نظر از عامل مسبب آن، وقوع تنش را نشان می‌دهد (Witeska, 2005). افزایش میزان نوتروفیل‌ها نیز ممکن است ناشی از تاثیر هورمون کورتیزول باشد. مطالعات نشان داده‌اند که نوتروفیل‌ها و لنفوسیت‌ها نقش مهمی در ایجاد فعالیت‌های سیستم ایمنی بدن ایفا می‌نمایند و کورتیکواستروئیدها تاثیر زیادی بر نوسان تعداد این سلول‌ها دارند، به طوری که در زمان بروز تنش و ترشح کورتیکواستروئیدهایی نظیر کورتیزول با پدیده کاهش لنفوسیت‌ها و افزایش

نوتروفیل‌ها مواجه می‌شویم که این تغییرات با نوسانات سطوح کورتیزول خون دقیقاً مطابقت دارد (Zare *et al.*, 2012). Balabanova و همکاران (۲۰۰۹) با بررسی تأثیر تنش ناشی از تزریق هورمون کورتیزول در ماهی کپور، با کاهش تعداد لنفوسیت‌ها و افزایش تعداد نوتروفیل‌ها مواجه شدند. آن‌ها به این نتیجه رسیدند که طی فرایند تمایز سلول‌های هماتوپویتیکی مسئول ساخت اجزاء سیستم ایمنی، مسیر تولید سلول‌های لنفوئید متوقف شده و مسیر تولید سلول‌های میلوئید فعال می‌شود که این امر احتمالاً به دلیل اختلال در سنتز سیتوکیناز توسط سلول‌های بافت لنفومیلوئید که مسئول فرایندهای تمایز، واکنش‌های بین سلولی و شکل‌گیری سیستم ایمنی همورال و سلولی هستند، می‌باشد (Zare *et al.*, 2012; Witeska, 2005). دامنه میزان پروتئین کل در خون ماهیان استخوانی بین ۸-۲ گرم در دسی‌لیتر متغیر است (Overturf *et al.*, 2003). Ruane و همکاران (۲۰۰۲) گزارش نمودند که تراکم ذخیره‌سازی در کپور معمولی بر افزایش غلظت پروتئین کل اثر معنی‌داری ندارد، که با نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت دارد. افزایش فعالیت ایمونوگلوبولین‌ها و کمپلمان‌ها در سرم خون ماهیان می‌تواند نشان‌دهنده افزایش میزان استرس در آن‌ها باشد (Montero *et al.*, 1999). Fevolden و همکاران در سال ۲۰۰۲ نشان دادند که تراکم ذخیره‌سازی در قزل‌آلای رنگین‌کمان اثر افزایشی بر ایمونوگلوبولین‌ها دارد، که با نتایج مطالعه حاضر نیز مطابقت دارد. بروز استرس ناشی از افزایش تراکم، علاوه بر تأثیر مستقیم بر افزایش فعالیت‌های ایمنی، سبب افزایش خطر بروز برخی بیماری‌های ناشی از برهم‌کنش‌های متقابل در ماهیان (نظیر انواع بیماری‌های قارچی) می‌شود. بروز چنین بیماری‌هایی نیز می‌تواند سبب افزایش غلظت ایمونوگلوبولین‌ها شود (Fevolden *et al.*, 2002; Iguchi *et al.*, 2003).

مطالعات نشان داده‌اند که یکی از شناخته شده‌ترین پاسخ‌های تنش در ماهیان، افزایش سطوح کورتیزول و گلوکز خون می‌باشد (Barton, 2002; Ortuno *et al.*, 2002). Ruane و همکاران (۲۰۰۲) نشان دادند که میزان هورمون کورتیزول در کپور معمولی پرورش یافته در تراکم‌های بالا، بیش از میزان این هورمون در ماهیان نگهداری شده در تراکم‌های پایین، افزایش می‌یابد. Andrade و همکاران (۲۰۱۵)، در مطالعه خود نشان دادند که افزایش تراکم تأثیری بر میزان کورتیزول و گلوکز پلاسما کفشک‌ماهی *Solea senegalensis* ندارد که بر خلاف نتایج این مطالعه می‌باشد. Ruane و همکاران (۲۰۰۲) با مطالعه بر روی کپور معمولی و Rafatnezhad و همکاران (۲۰۰۸)، با مطالعه بر روی فیل‌ماهی، بیان نمودند که افزایش تراکم تأثیری بر میزان گلوکز خون ندارد، که بر خلاف نتایج این مطالعه می‌باشد. یکی از دلایل احتمالی عدم تطابق این نتایج، تفاوت در گونه‌های مورد آزمایش است، چرا که برخی از گونه‌ها (خصوصاً انواع کفشک‌ماهی‌ها) قادرند تراکم‌های بسیار بالا را تحمل نموده و حتی در تراکم‌های بالاتر رشد بهتری داشته باشند. برخی مطالعات نشان‌دهنده کاهش مقادیر هورمون کورتیزول با گذشت زمان و طولانی شدن عامل استرس‌زا می‌باشند (Kjartansson *et al.*, 1988; Procarione *et al.*, 1999; Rafatnezhad *et al.*, 2008)، اما در این مطالعه مشخص شد که در تراکم‌های بالا (۲۰۰ و ۳۰۰ قطعه بچه ماهی در مترمکعب)، میزان کورتیزول در پایان آزمایش هیچ‌گاه به مقادیر اولیه خود باز نمی‌گردد. O'Neill (۱۹۸۱)، گزارش نمود که افزایش میزان هورمون کورتیزول ناشی از تراکم در ماهی کپور معمولی بعد از هشت روز به حداکثر می‌رسد، به گونه‌ای که میزان آن در تراکم‌های بالا ۴ برابر بیشتر از تراکم‌های پایین می‌باشد. این نتایج با یافته‌های پژوهش حاضر که حداکثر میزان کورتیزول را پس از روز هفتم در خون ماهیان نشان داد، مطابقت دارد.

نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که افزایش تراکم بچه‌ماهیان کوی تا ۱۵۰ قطعه در هر مترمکعب آب محیط پرورش تأثیر معنی‌داری بر شاخص‌های رشد و بقاء، تغذیه، ایمنی و استرس ماهی نداشت. اما با افزایش میزان تراکم از حد یاد شده، عملکرد رشد و تغذیه کاهش، تلفات ماهیان افزایش و میزان ایمونوگلوبولین، کورتیزول، گلوکز و ترکیب گلبول‌های سفید خون دچار تغییر شد. بنابراین، با توجه به پارامترهای مذکور، تراکم ۱۵۰ قطعه ماهی در هر مترمکعب به عنوان تراکم بهینه پرورش بچه‌ماهیان کوی پیشنهاد می‌شود.

منابع

Andrade, T., Afonso, A., Perez-Jimenez, A., Oliva-Teles, A., de las Heras, V., Mancera, J.M., Serradeiro, R., Costas, B. 2015. Evaluation of different stocking densities in a Senegalese sole (*Solea senegalensis*) farm: Implications for growth, humoral immune parameters and oxidative status. *Aquaculture*. 438: 6-11.

- Asano, L., Ako, H., Shimizu, E., Tamaru, C.S. 2003. Limited water exchange systems for freshwater ornamental fish. *Aquaculture Research*. 34: 937-941.
- Bahremand, M., Kamrani, E., Rashidian, G., Soleimanirad, A. 2016. Effects of dietary prebiotic Immunogen on the compensatory growth and some hematological parameters in koi carp (*Cyprinus carpio* var. Koi), after starvation period. *Journal of Aquatic Ecology*. 6(2): 1-11. (in Persian).
- Balabanova, L.V., Mikryakov, D.V., Mikryakov, V.R. 2009. Response of common carp (*Cyprinus carpio* L.) leucocytes to hormone-induced stress. *Inland Water Biology*. 2(1): 86-88.
- Barton, B.A. 2002. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology*. 42: 517-525.
- Barton, B.A., Iwama, G.K. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases*. 1: 3-26.
- Bayunova, L., Barannikova, I., Semenkov, T. 2002. Sturgeon stress reactions in aquaculture. *Journal of Applied Ichthyology*. 18: 397-404.
- Bilen, S., Bilen, A.M., Önal, U. 2015. The effects of oxygen supplementation on growth and survival of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in different stocking densities. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. 14(3): 538-545.
- Biswas, J.K., Sarkar, D., Chakraborty, P., Bhakta, J.N., Jana, B.B. 2006. Density dependent ambient ammonium as the key factor for optimization of stocking density of common carp in small holding tanks. *Aquaculture*. 261: 952-959.
- Bjornsson, B. 1994. Effects of stocking density on growth rate of halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) reared in large circular tanks for three years. *Aquaculture*. 123: 259-270.
- Blaxhall, P.C., Daisley, K.W. 1973. Routine haematological methods for use with fish bloods. *Journal of Fish Biology*. 5: 771-781.
- Boshra, H.L.J., Sunyer, J.O. 2006. Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish and Shellfish Immunology*. 20: 239-262.
- Boujard, T., Labbe, L., Auperin, B. 2002. Feeding behaviour, energy expenditure and growth of rainbow trout in relation to stocking density and food accessibility. *Aquaculture Research*. 33(15): 1233-1242.
- Ebadzadeh, H.M., Ahmadi, K., Mohamadnia Afroozi, Sh., Abbastaghani, R., Moradi Eslami, A., Abbasi, M., Yari, Sh. 2015. Agricultural statistics in 2014. Volume II. Ministry of Agriculture-Jahad, Planning and Economic Department, Center of Information and Communication Technology. Tehran. 379 p. (in Persian).
- Ellis, T. 2001. What is stocking density. *Trout News*. CEFAS. 32: 35-37.
- Ellis, T., North, B., Scott, A.P., Bromage, N.R., Porter, M., Gadd, D. 2002. The relationships between stocking density and welfare in farmed rainbow trout. *Journal of Fish Biology*. 61: 493-531.
- Ellsaesser, C.F., Clem, L.W. 1986. Haematological and immunological changes in channel catfish stressed by handling and transport. *Journal of Fish Biology*. 28: 511-521.
- Espelid, S., Lokken, G.B., Steiro, K., Bogwald, J. 1996. Effects of cortisol and stress on the immune system in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish and Shellfish Immunology*. 6: 95-110.
- Fevolden, S.E., Roed, K.H., Fjalestad, K.T. 2002. Selection response of cortisol and lysozyme in rainbow trout and correlation to growth. *Aquaculture*. 205(1-2): 61-75.
- Gornati, R., Papis, E., Rimoldi, S., Terova, G., Saroglia, M., Bernardini, G. 2004. Rearing density influences the expression of stress-related genes in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Gene*. 341: 111-118.
- Gress, P., Lim, P., Belaud, A. 1996. Effect of initial stocking density of larval pikes *Esox lucius* L. 1758 on survival, growth and daily food consumption (zooplankton, chaoboridae) in intensive culture. *Bulletin de la Pisciculture Francaise*. 343: 153-174.
- Heras, V.D., Martos-Sitcha, J.A., Yufer, M., Mancera, J.M., Martinez-Rodriguez, G. 2015. Influence of stocking density on growth, metabolism and stress of thicklip grey mullet (*Chelon labrosus*) juveniles. *Aquaculture*. 448: 29-37.
- Hickling, S., Martin, M.T., Brewster, B. 2007. The essential book of koi: A complete guide to keeping and care. TFH Publications Inc., New Jersey. 256 pp.

- Iguchi, K., Ogawa, K., Nagae, M., Ito, F. 2003. The influence of rearing density on stress response and disease susceptibility of ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Aquaculture*. 220: 515-523.
- Imanpour, M.R., Ahmadi, A.R., Kordjazi, M. 2009. Effect of different stocking densities on survival and growth performance in cultured common carp (*Cyprinus carpio*). *Iranian Scientific Fisheries Journal*. 18(3): 1-10. (in Persian).
- Irwin, S., O'Halloran, J., FitzGerald, R.D. 1999. Stocking density, growth and growth variation in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* (Rafinesque). *Aquaculture*. 178: 77-88.
- Jha, P., Barat, S. 2005. The Effect of stocking density on growth, survival rate, and number of marketable fish produced of Koi carps, *Cyprinus carpio* vr. Koi in concrete tanks. *Journal of Applied Aquaculture*. 17(3): 89-102.
- Jorgensen, E.H., Christiansen, J.S., Jobling, M. 1993. Effects of stocking density on food intake, growth performance and oxygen consumption in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Aquaculture*. 110: 191-204.
- Kebus, M.J., Collins, M.T., Brownfield, M.S., Amundson, C.H., Kayes, T.B., Malison, J.A. 1992. Effects of rearing density on stress response and growth of rainbow trout. *Journal of Aquatic Animal Health*. 4: 1-6.
- Kjartansson, H., Fivelstad, S., Thomassen, J.M., Smith, M.J. 1988. Effects of different stocking densities on physiological parameters and growth of adult Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) reared in circular tanks. *Aquaculture*. 73: 261-274.
- Kristiansen, T.S., Fernö, A., Holm, J.C., Privitera, L., Bakke, S., Fosseidengen, J. E. 2004. Swimming behavior as an indicator of low growth rate and impaired welfare in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) reared at three stocking densities. *Aquaculture*. 230: 137-151.
- Lawrence, M.S. 1986. Amino acids and proteins. In: Tietz, N.W (ed.). *Textbook of clinical chemistry*. Philadelphia, USA, WB Saunders. pp. 519-618.
- Liorente, M.T., Martos, A., Castano, A. 2002. Detection of cytogenetic alterations and blood cell changes in natural populations of carp. *Ecotoxicology*. 11: 27-34.
- Maita, M. 2007. Fish health assessment. In: Nakagawa, H., Sato, M., Gatlin, D.M. (eds.). *Dietary supplements for the health and quality of cultured fish*. CAB International, Cambridge, UK. pp. 10-34.
- Martines-Porchas, M., Martines-Cordova, L.R., Ramos-Enriquez, R. 2009. Cortisol and glucose: reliable indicators of fish stress? *Pan American Journal of Aquatic Sciences*. 4(2): 158-178.
- Mazon, A.F., Monteiro, E.A.S., Pinteiro, G.H., Fernandes, M.N. 2002. Hematological and physiological changes induced by short-term exposure to copper in the freshwater fish (*Prochilodus scrofa*). *Brazilian Journal of Biology*. 62(4A): 621-631.
- McKenzie, D.J., Höglund, E., Dupont-Prinet, A., Larsen, B.K., Skov, P.V., Pedersen, P.B., Jokumsen, A. 2012. Effects of stocking density and sustained aerobic exercise on growth, energetics and welfare of rainbow trout. *Aquaculture*. 338-341: 216-222.
- Metusalach, J., Brown, A., Shahidi, F. 1999. Effects of stocking density on composition and performance of reared arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 8: 39-57.
- Montero, D., Izquierdo, M.S., Tort, L., Robaina, L., Vergara, J.M. 1999. High stocking density produces crowding stress altering some physiological and biochemical parameters in gilthead seabream, *Sparus auratus*, juveniles. *Fish Physiology and Biochemistry*. 20: 53-60.
- Moradyan, H., Karimi, H., Gandomkar, H.A., Sahraeian, M.R., Ertefaat, S., Sahafi, H.H. 2012. The effect of stocking density on growth parameters and survival rate of trout alevins (*Oncorhynchus mykiss*). *World Journal of Fish and Marine Sciences*. 4(5): 480-485.
- Naseri, S., Khara, H., Shakoori, M. 2013. Effects of probiotics and Fe ion on the growth and survival and body composition of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) fry. *Journal of Applied Animal Research*. 41: 318-325.
- O'Neill, J.G. 1981. Heavy metals and the humoral response of freshwater teleosts. In: Pickering, A.D. (ed). *Stress and fish*. Academic Press, London. pp. 328-329.
- Ortuno, J., Esteban, A., Meseguer, J. 2002. Lack of effect of combining different stressors on innate responses of sea bream (*Sparus aurata* L.). *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 84: 17-27.

- Overturf, K., Casten, M.T., LaPatra, S.L., Rexroad, C., Hardy, R.W. 2003. Comparison of growth performance, immunological response and genetic diversity of five strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 217(1-4): 93-106.
- Pickering, A.D. 1992. Rainbow trout husbandry: management of the stress response. *Aquaculture*. 100(1-3): 125-139.
- Pickering, A.D., Pottinger, T.G. 1989. Stress responses and disease resistance in Salmonid fish: effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiology and Biochemistry*. 7: 253-258.
- Procarione, L.S., Barry, T.P., Malison, J.A. 1999. Effect of high rearing density and loading rates on the growth and stress response of juvenile rainbow trout. *North American Journal of Aquaculture*. 61: 91-96.
- Rafatnezhad, S., Falahatkar, B., Gilani, M.H.T. 2008. Effects of stocking density on haematological parameters, growth and fin erosion of great sturgeon (*Huso huso*) juveniles. *Aquaculture Research*. 39:1506-1513.
- Rehulka, J., Minarik, B., Cink, D., Zalak, J. 2011. Prebiotic effect of fructooligosaccharide on growth and physiological state of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*. 5: 227-235.
- Ross, L.G., Ross, B. 2008. Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals. 3rd edition. 222 p.
- Ruane, N.M., Carballo, E.C., Komen, J. 2002. Increasing stocking density influences the acute physiological stress response of Common carp *Cyprinus carpio* (L). *Aquaculture Research*. 33: 777-784.
- Samad, A.P.A., Hua, N.F., Chou, L.M. 2014. Effects of stocking density on growth and feed utilization of grouper (*Epinephelus coioides*) reared in recirculation and flow-through water system. *African Journal of Agricultural Research*. 9(9): 812-822.
- Schreck, C.B. 1982. Stress and rearing of salmonids. *Aquaculture*. 8: 319-326.
- Sharma, J.G., Chakrabarti, R. 1999. Larval rearing of common carp *Cyprinus carpio*: A comparison between natural and artificial diets under three stocking densities. *Journal of the World Aquaculture Society*. 30: 490-495.
- Sloman, K.A., Armstrong, J.D. 2002. Physiological effects of dominance hierarchies: Laboratory artifacts' or natural phenomena? *Journal of Fish Biology*. 61: 1-23.
- Stoskopf, M.K. 1993. *Fish Medicine*. W.B. Saunders Co. Philadelphia. pp. 113-131.
- Takeuchi, T., Satoh, S., Kiron, V. 2002. Common carp. In: Webster, C.D., Lim, C. (eds.). *Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture*. CABI Publishing. pp. 245-261.
- Tawwab, M.A., Mousa, M., Sharaf, S., Ahmad, M. 2005. Effect of crowding stress on some physiological functions of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* fed different dietary protein levels. *International Journal of Zoological Research*. 1: 141-147.
- Tort, L. 2011. Stress and immune modulation in fish. *Developmental and Comparative Immunology*. 35: 1366-1375.
- Turnbull, J., Alisdair, B., Colin, A., James, B., Felicity, H. 2005. Stocking density and welfare of cage farmed Atlantic salmon: Application of multivariate analysis. *Aquaculture*. 243:121-132.
- Wendelaar Bonga, S.E. 1997. The stress response in fish. *Physiology Review*. 77: 591-625.
- White, A., Fletcher, T.C. 1984. Radioimmunoassay of serum cortisol in the plaice (*Pleuronectes platessa* L.). *General Comparative Endocrinology*. 53: 410-417.
- Witeska, M. 2005. Stress in fish hematological and immunological effect of heavy metals. *Electronic Journal of Ichthyology*. 1: 35-41.
- Wyets, F.A.A., Flikt, G., Verburg van Kemenade, B.M.L. 1998. Cortisol inhibits apoptosis in carp neutrophilic granulocytes. *Developmental and Comparative Immunology*. 22: 563-572.
- Yin, Z., Lam, T.J., Sin, Y.M. 1995. The effects of crowding stress on the non-specific immune response in Fancy carp (*Cyprinus carpio* L). *Fish and Shellfish Immunology*. 5: 519-529.
- Zar, J.H. 2010. *Biostatistical analysis*. 5th edition. Pearson, New Jersey, USA. 960 p.
- Zare, R., Bahmani, M., Yavari, V., Kazemi, R., Fazeli, N., Poordehghany, M., Mohamadian, T. 2012. Effects of rearing density on leukocytes and plasma cortisol level of Siberian sturgeons (*Acipenser baerii*). *Iranian Veterinary Journal*. 8(2): 22-32. (in Persian).