كمي كردن پاسخ‌هاي رفتار دسته جمعي ماهي رزي بارب (***Puntius barbus***) به تغييرات حاد كاهش دما با استفاده ازتصاوير كامپيوتري

محبوبه بابايي نايبج[۱]، محمدعلي نعمت اللهي*[۱]، محمد لايقي[۲]، رضا آقايي زاده ظروفي[۳] و قاسم شهدوست[۴]

[۱]گروه شيلات، دانشكده منابع طبيعي، دانشگاه تهران، كرج، ايران

[۲]گروه علوم و صنايع چوب و كاغذ، دانشكده منابع طبيعي، دانشگاه تهران، كرج، ايران

[۳]دانشكده مهندسي برق و كامپيوتر، دانشگاه تهران، تهران، ايران

[۴]گروه برق و الكترونيك، دانشگاه آزاد واحد تهران جنوب، تهران، ايران

(تاريخ دريافت: ۱۳۸۹/۹/۴ ، تاريخ تصويب: ۱۳۹۰/۱۱/۳)

چكيده

هدف از اين مطالعه كمي كردن پاسخ‌هاي رفتاري يک دسته از ماهيان رزي بارب (*Puntius barbus*) در مواجهه با استرس حاد كاهش دما با استفاده از سيستم بينايي كامپيوتر است. تعداد چهار اكواريوم با تراكم ۳۰ قطعه ماهي به صورت دوتايي جهت مطالعه ماهيان در شرايط استرس در مقايسه با شرايط نرمال مورد استفاده قرار گرفت. فعاليت شنا و برخي از پارامترهاي ژئومتريک دسته، مانند ميانگين محل قرارگيري مركز جرم دسته و فاصله آن در جهت محورهاي Z،Y،X و تحرک و تراكم دسته ماهيان، بوسيله شاخص PMP با ۱۰ دقيقه فيلمبرداري از دو منظر در دو شرايط نرمال و استرس به طور پيوسته ارزيابي و مورد محاسبه قرار گرفت. سپس شاخص‌هاي بيان شده در شرايط استرس حاد كاهش درجه حرارت (ورود آب سرد ۸ درجه سانتي‌گراد به مدت ۱۰ دقيقه) با شرايط نرمال مقايسه گرديد. تعداد شش قطعه ماهي براي اندازه‌گيري هورمون كورتيزول نيز بلافاصله بعد از اتمام آزمايش، نمونه برداري شد. نتايج بررسي‌ها نشان داد كه در هنگام ورود آب سرد با دماي ۸ درجه سانتيگراد، موقعيت ميانگين مركز جرم دسته ماهيان در راستاي محورهاي Z،Y،X، نوسانات شديدي نسبت به حالت نرمال و دماي ثابت دارد كه در ارتباط با جمع شدن دسته ماهيان در مناطق خروجي آب كه دماي بالاتري داشت، مي‌باشد. شاخص PMP نيز تجمع دسته ماهيان را در محل خروج آب نشان داد. همچنين ميانگين سرعت شناي دسته ماهيان نيز نسبت به حالت نرمال كاهش داشت ($P<0.05$). اين تغييرات رفتاري در دسته ماهيان با افزايش مقدار هورمون كورتيزول كه شاخص فيزيولوژيک استرس مي‌باشد ($P<0.05$)، همراه بود. تاييد نتايج رفتار با نتايج هورمون كورتيزول مويد اين است كه ميتوان بدون دستكاري و خونگيري، با مشاهده و آناليز كامپيوتري رفتار بوسيله نرم افزار تهيه شده، از شرايط طبيعي و احيانا غير طبيعي ماهي مطلع شد.

واژه هاي كليدي: بينايي كامپيوتر، رفتار دسته جمعي، كورتيزول، ماهي رزي بارب

* نويسنده مسئول: تلفن: ۰۲۶ -۳۲۲۴۵۹۰۹ فاكس: ۰۲۶ -۳۲۲۴۵۹۰۹ E-mail: malahi@ut.ac.ir

مقدمه

در آبزي‌پروري ارزيابي رفاه براي تضمين شرايط پرورشي بهينه و براي بهبود بخشيدن كيفيت زندگي ماهيان پرورشي لازم است (Duarte *et al*., 2008). بنابراين آشكار شدن شرايط استرس در سيستم‌هاي پرورشي ماهيان براي كاهش زيان‌هاي ناشي از استرس در توليد، مهم و ضروري مي‌باشد (Barton and Iwama, 1991). استرس با شرايط محيطي متغيري از قبيل كاهش سطح اكسيژن (Kramer *et al., 1982*) و تغييرات ناگهاني در دما ويا عوامل آلوده‌كننده محيطي و غيره مرتبط مي‌باشد (Israeli and Kimmel, 1996). بيشتر تغييرات محيطي و فيزيولوژيكي منجر به تغيير در رفتار ماهي مي‌شود. بنابراين رفتار ماهي تحت شرايط پرورشي اطلاعات مهمي را براي آبزي‌پرورها ايجاد مي‌كند (Kristiansen *et al*., 2004; Mcfarlane, *et al*., 2004). روشهاي پايش و كمي كردن پاسخهاي رفتاري پتانسيل زيادي براي ارزيابي استرس، بيماري‌ها و آلودگي آبها با مواد سمي دارد (Nogita *et al*., 1998; Kane *et al*., 2004). استرس ناشي از تغييرات درجه حرارت به معناي بروز هر گونه تغييرات دمايي است كه منجر به ايجاد اختلالات قابل توجهي در عملكردهاي طبيعي ماهيان و كاهش بقاي آنها مي‌شود (Askarian and Kousha, 2006). استرس با تحريک محور هيپوتالاموس- هيپوفيز- اينتررنال[1] ، موجب ايجاد پاسخ اوليه كه نتيجه آن ترشح كاتاكولآمين‌ها و كورتيزول است مي شود.

همچنين موجب ايجاد پاسخ‌هاي ثانويه كه شامل بروز اختلالاتي در تنظيم اسمزي و يوني، پروسه‌هاي متابوليک، رشد، توليد مثل و تغييرات رفتاري و غيره است، ميگردد (Elliot, 1981). شوک سرما مي تواند بعنوان يک عامل استرس زا در ماهيان عمل كند. مطالعات انجام شده در گذشته روي استفاده از شوک سرما موجب افزايش كورتيزول و تحريک پاسخ به استرس شده است. انجام شوک سرما مي تواند به روشهاي مختلف مورد استفاده قرار گيرد. مثلا اين روش مي تواند با انتقال ماهي از يک آكواريوم گرم به آكواريوم سرد انجام گيرد (LeMorvan-Rocher *et al*., 1995; Franklin *et al*., 1990). البته اين روش ممكن است موجب استرس اضافي دستكاري نيز بشود. در سال ۲۰۰۰ ,.Tanck *et al* نيز با ورود آب سرد با دماهاي ۷ و ۹ و ۱۱ درجه سانتيگراد شوک سرما را به ماهي كپور معمولي وارد و پاسخ استرس را بررسي كرد.

اثر فيزيولوژيک مهم ديگري كه حتي در شكل خفيف سرمازدگي ديده مي‌شود، مهار ايمني اعم از مايعي يا ياخته‌اي است كه مي تواند ماهي را در مقابل بيماريهاي عفوني غيرمقاوم كند. بنابراين با توجه به اثرات زيان‌بار ناشي از استرس، آشكار شدن زود هنگام چنين شرايطي مي‌تواند زيان‌هاي ناشي از آن را در امر توليد كاهش دهد. مطالعات رفتاري به طور معمول بر اساس مشاهده مستقيم است (Stradmeyer, 1989; Brannas and Alanara, 1993; Reig *et al*., 2003). ولي اين تكنيک چندين عيب دارد:

اين كار به مهارت‌هاي شخصي و شرايط محيطي كه مطالعه در آنجا انجام مي‌گيرد بستگي دارد. همچنين دروني و ذاتي بودن رفتار مسئله است و پارامتري كردن و كمي كردن آن با اين روش مشكل بوده و كاري پرزحمت و وقت گير است.

علي‌رغم نقص‌هاي موجود، آناليز حركات و كمي كردن حركت در ۲۰ سال گذشته پيشرفتهايي داشت كه با بهبود يافتن پردازشگرهاي كامپيوتري و روش عكاسي‌هاي ديجيتالي اين پيشرفت‌ها ادامه دارد. در نتيجه همراه با توسعه تكنولوژي براي كمي كردن مشاهدات رفتاري، تست‌هاي مربوط به رفتار بطور قابل قبولي براي ارزيابي و سنجش خطرها (Kondaiah and Murty, 1994) بهبود يافتند.

در دهه‌هاي گذشته براي كمي كردن اطلاعات حركتي ماهي روش‌هاي متنوعي كاربرد داشته است. روشي كه در اين مطالعه استفاده شده است، روش بينايي كامپيوتر مي‌باشد. اين تكنيک يک روش اتوماتيكي را بدون تهاجم

[1] HPI

به ماهي و بدون خونگيري از ماهيان بطور موثر و با هزينه كم براي ثبت كردن پارامترهاي رفتاري فراهم مي‌كند (Xu *et al*., 2006).

در اين مطالعه، رفتار دسته جمعي و رفتار حركتي ماهياني كه تحت شرايط استرس كاهش دما قرار گرفتند با حالت نرمالش به وسيله تصاوير كامپيوتري مورد مقايسه قرار گرفتند و ماهي رزي بارب به دليل داشتن رفتار حركتي دسته جمعي[۲] به عنوان مدلي براي مطالعه اين رفتار انتخاب شد. برخي از شاخص‌هاي تغييرات رفتاري ماهيان، بطور كمي و بوسيله برنامه پردازش تصوير محاسبه گرديد. همچنين نمونه‌گيري از ماهيان براي اندازه‌گيري هورمون كورتيزول كه اثبات كننده وجود شرايط استرس از ديدگاه فيزيولوژيک است، انجام شد و مقادير آن قبل و بعد از اعمال استرس اندازه گيري گرديد.

مواد و روش‌ها

ماهي و سيستم آزمايشگاهي

ماهي رزي بارب (*Puntius barbus*)، حدودا پنج ماهه، با ميانگين وزني۳-۱/۵ گرم و طول ۶-۴ سانتيمتر، از هر دو جنس تهيه گرديد و در سه اكواريوم با ابعاد ۴۰×۳۰×۷۰ و با تراكم يكسان، به ميزان ۳۰ قطعه در هر اكواريوم قرار گرفتند. تراكم دسته ماهيان در اين اكواريوم‌ها به حدي بود كه دسته ماهيان شناي آزاد داشته باشند و محدوديت فضا وجود نداشته باشد. ماهيان دو اكواريوم براي تكرار شرايط آزمايش در نظر گرفته شدند. مرحله سازگاري ماهيان براي انجام آزمايش، به مدت دو هفته بود. ماهيان در طي اين مدت، روزانه دو بار با پلت خشک و يک بار با كرم شيرونوميد منجمد تغذيه شدند. پارامترهاي كيفي آب شامل: دما (۲۵-۲۰ درجه سانتي‌گراد) و Ph (۷/۵-۸/۵) و اكسيژن محلول (۶/۵-۷/۵) بود كه در طي اين مدت حفظ شد و آب اكواريوم‌ها براي جلوگيري از تجمع مواد دفعي و افزايش آمونياک، روزي يكبار سيفون شد. هوادهي در آكواريوم‌ها، براي حفظ شرايط بهينه، با استفاده از سنگ‌هاي هواده كه در گوشه آكواريوم‌ها و در زير بخاري قرار گرفته بودند در طول مدت شبانه روز انجام شد. فتوپريود در اين شرايط ۱۲ ساعت روشنايي و ۱۲ ساعت تاريكي در طي مدت شبانه روز بود.

انجام تصويربرداري در شرايط نرمال و شرايط تحت استرس

يک روز قبل از انجام آزمايش،پايش رفتار دسته جمعي ماهيان براي ثبت پارامترهاي رفتاري بيان شده در شرايط نرمال و بدون استرس انجام شد. اين كار با استفاده از دو دوربين CCD [۳] با مشخصات زير انجام گرفت :

Sony, DSC- W35, MPEG movie, Kodak, C743, MPEG movie

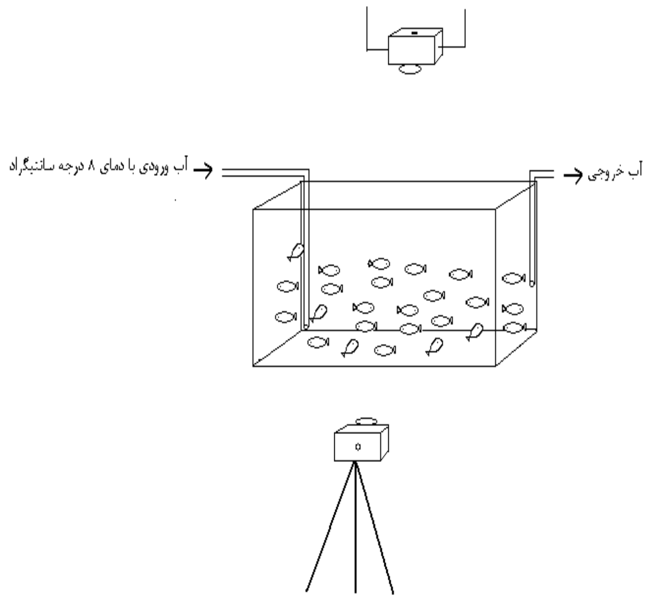
كه با فاصله تقريبا ۱۲۰ سانتي متردر روبروی اكواريوم و ۱۱۰ سانتي متر در بالاي اكواريوم نصب شدند و به طور همزمان به مدت ۱۰ دقيقه فيلمبرداري از دو منظر بالا و روبرو انجام شد. اين طرز قرارگيري دوربين‌ها براي به دست آوردن اطلاعات سه بعدي لازم است. در طي اين مدت براي جلوگيري از خطا در پردازش تصوير، سيستم هوادهي در اكواريوم قطع شد و سنگ‌هاي هواده از اكواريوم خارج شدند. دما هم در طي اين مدت ۲۳ درجه سانتي گراد بود، كه دماي معمول براي زيست اين ماهيان است. به طور مشابه فيلمبرداري از اكواريوم‌هاي بعدي هم انجام شد و همه تصاوير گرفته شده با فرمت PRG، ثبت شدند.

در روز آزمايش هم به مدت ۱۰ دقيقه فيلم‌برداري در شرايط استرس انجام گرفت كه غذادهي در اين مرحله يكبار انجام شد تا ماهيان استرس ناشي از گرسنگي را نداشته باشند. دوربين‌ها با همان فاصله قبلي نصب شدند و شرايط استرس را ثبت كردند. استرس ناشي از تغييرات حاد دمايي در طي اين مدت به ماهيان وارد شد كه براي انجام اين كار آبي با همان كيفيت آب اكواريوم كه با استفاده از يخ بدون كلر به دماي ۸ درجه رسيده بود تهيه گرديد و از گوشه سمت چپ اكواريوم با استفاده از پمپ و

[۲] Schooling

[۳] charge coupled devices

شلنگي به قطر ۱ سانتي متر، جريان آب به آرامي از کـف اکواريوم وارد شد و از گوشه سمت راست اکواريوم، آب بـا استفاده از شلنگ ديگر بـا همـان قطـر و از فاصـله کمـي بالاتر از کف با سرعت مشابه و به طور ثقلي خارج شد. بـه طوريکه سطح آب اکواريوم در طي مـدت آزمـايش ثابـت بود.



شکل ۱- طراحي سيستم پايش در شرايط آزمايش

سرعت تعويض آب ۳ سانتي متر مکعب در ثانيه بود و تا اندازه‌اي در نظر گرفته شد که استرس کمتري در ارتباط با شدت جريان در بين ماهيان ايجاد شود. همچنين در پايان آزمايش دماي آب خروجي در قسمت بالاي اکواريوم تقريبا به ۱۰ درجه سانتي گراد رسيد. در اين مرحله نيز سنگ‌هاي هواده از اکواريوم براي جلوگيري از خطا خارج شدند (شکل ۱).

فيلم‌برداري در طي اين مدت به طور همزمان از دو منظـر بالا و روبرو انجام شد و کـل شـرايط آزمـايش ثبـت شـد. سپس فيلم‌هاي ثبـت شـده در شـرايط نرمـال و شـرايط استرس با استفاده از برنامه پردازش تصوير که بـراي ايـن هدف نوشته شـده بـود پـردازش گرديـد و شـاخص‌هـاي رفتاري بيان شـده در شـرايط نرمـال و شـرايط اسـترس برحسب پيکسل بيان شد و داده‌هـا بـراي بيـان اخـتلاف معني‌دار از نظر آماري در دو شرايط مختلـف دمـايي وارد نرم افزار SPSS شده و از نظر آماري بـا آزمـون t بـا هـم مقايسه شدند.

سنجش ميزان هورمون کورتيزول

يک روز قبل از انجام آزمايش، نمونه‌گيري از ماهيان براي سنجش ميزان هورمون کورتيزول، در شرايط نرمال، انجام گرفت و تعداد ۶ قطعه ماهي از اکواريوم‌ها به طور تصادفي براي انجام آزمايش در نظرگرفته شدند. بعد از اتمام آزمايش نيز بلافاصله نمونه‌گيري از تعداد ۶ قطعه ماهي ديگر براي سنجش ميزان اين هورمون در شرايط استرس، انجام شد. چون امکان خونگيري از ماهيان به دليل سايز کوچک وجود نداشت، مقدار اين هورمون در وزن لاشه ماهيان (قسمت تنه به همراه امعا و احشاء) محاسبه شد. براي اين منظور، ماهيان در محلول پودر گل ميخک با دوز بالا بيهوش شده و به فريزر ۲۰- تا زمان انجام آناليز

براي سنجش مقدار كورتيزول، منتقل شدند. براي انجام آناليز، نمونه مايع ميان بافتي از ماهيان تهيه گرديد. براي اين كار ابتدا سر و باله دمي اين ماهيان جدا شده و قسمت تنه به همراه امعاء و احشاء در هاون كوبيده شده به طوريكه مخلوط يكنواخت و تقريبا هوموژني از بافت ماهي به دست آمد. سپس مقدار ۱۰۰ ميلي گرم از اين بافت در ۱ ميلي ليتر محلول بافر[4] PBS قرار داده شد و براي تكرار آزمايش از هر ماهي دو نمونه گرفته شد تا كل ميزان كورتيزول آزاد شده در بافت بدون خطا محاسبه شود . بعد از آن نمونه ها با دور ۳۰۰۰ و به مدت ۱۵ دقيقه سانتريفيوژ شدند و محلول فوقاني جهت سنجش ميزان هورمون كورتيزول به آزمايشگاه منتقل شد.

در آزمايشگاه با استفاده از روش ELISA مقدار اين هورمون در وزن لاشه ماهيان معين شد.

نتايج

محاسبه پارامترهاي رفتاري

پارامترهاي رفتاري دسته ماهيان با استفاده از برنامه سي پلاس C^{++} كه يک زبان بين المللي (Borland International) است، و يک بخش Grabber كه با نرم افزار Delphi بانسخه 1.0.0.1 نوشته شده بود، محاسبه گرديد. ابتدا تصاوير گرفته شده با فرمت PRG به IBM كامپيوتر منتقل شده و سپس با استفاده از اين برنامه فيلم‌هاي گرفته شده با نرخ 0.1 فريم بر ثانيه پردازش شدند. در مرحله اول بايد تصوير ماهي از زمينه تصوير جدا شده و تشخيص داده شوند. براي تشخيص ماهي‌ها در اكوريوم بايد تصاوير با استفاده از رنگ‌هاي قرمز و سبز كدبندي شوند كه در اين برنامه از كانال رنگ قرمز در تصاوير گرفته شده از بالا و ازكانال رنگ سبز در تصاوير روبرو استفاده شد.

براي انجام مرحله ساخت تصوير دودويي شده[5] (تصوير سياه و سفيد) اختلاف تصوير زمينه (تصوير اكواريوم بدون ماهي يا تصوير اكواريوم به همراه آب) با هر فريم محاسبه گرديد كه تصوير باينري شده از اين طريق به دست آمد:

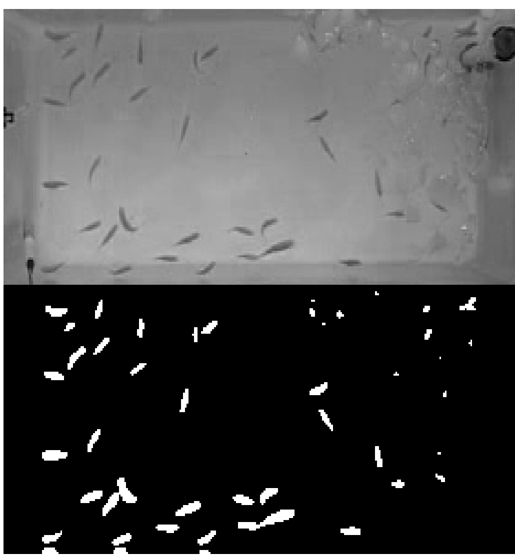
I= image 0
B= Back ground image
Binary image = [I- B]

در اين حالت هر ماهي از تصوير استخراج مي‌شود كه به صورت نقاط سفيد متصل به هم نشان داده مي‌شوند. مطابق شكل (۱-۳)

سپس با الگوريتم شمارش نقاط متصل به هم تعداد ماهي‌ها شمارش شده و موقعيت مركز جرم دسته در راستاي ديواره‌هاي اكواريوم كه به عنوان محورهاي X , Y, Z در نظر گرفته شدند، با استفاده از فرمول زير به دست آمد. (Israeli and Kimmel, 1996)

فرمول ۱:

$$\mathbf{CX} = \frac{\mathbf{1}}{N}\sum_{i=1}^{n} \mathbf{Ai\ Xi}$$



شكل ۲- تصوير **Binary** شده از ماهيان اكواريوم كه به صورت نقاط سفيد مشخص هستند.

كه در اين فرمول CX مركز جرم دسته ماهي در راستاي محور X و N تعداد كل ماهي‌ها در زمينه تصوير و Ai ناحيه project هر ماهي و Xi مركز جرم يک ماهي در راستاي محور X مي‌باشد. همچنين در اين آزمايش گوشه سمت راست اكواريوم، ضلع پايين ديواره جلوي آن به عنوان مبدا مختصات و نقطه صفر مي باشد و ديواره‌هاي

---

[4] Phosphate Buffered Saline
[5] Binarization

اكواريوم در راستاي محور X كه ديواره طولي اكواريوم است بين صفر تا ۴۷۰ پيكسل و در راستاي محور Y كه ارتفاع اكواريوم است ۱۴۰ پيكسل و در راستاي محور Z كه عرض اكواريوم است ۲۰۰ پيكسل، در نظر گرفته شد. اين شاخص در شرايط با دماي نرمال و همچنين در كل شرايط آزمايش به دست آمد. تحرک و تراكم دسته ماهيان نيز بوسيله شاخص PMP ارزيابي شد كه به طور جداگانه براي هر دوربين از ۶۰ فريمFj = (j=1, 60) متوالي گرفته شده در فواصل زماني يک ثانيه محاسبه مي‌شود كه بوسيله برنامه پردازش تصوير به دست مي آيد. در واقع تغيير در سطح خاكستري پيكسل بين دو فريم متوالي ناشي از حركت ماهي است و بيان‌كننده ميانگين تحرک در دسته ماهيان مي‌باشد.

اين شاخص با فرمول زير به دست مي‌آيد. (Israeli and Kimmel, 1996)

فرمول ۲:

$$PMP = \frac{1}{8}\sum_{j=2}^{60} |Fj - Fj-1|$$

كه در اين فرمول Fj ماتريس ۵۱۲ × ۵۱۲ مقادير سطح خاكستري تصوير است. محاسبه PMP[6] در واقع تصويري است كه در آن سطح خاكستري هر كدام از پيكسل‌ها نشان‌دهنده ميانگين تحرک[7] در آن مي‌باشد و تجمع نقاط سفيد، نواحي در تانک را نشان مي‌دهد كه ماهي ترجيح مي‌دهد در آن قسمت بماند. همچنين افزايش يا كاهش در كثرت يا فراواني نقاط سفيد مي تواند افزايش يا كاهش در ميانگين سرعت شناي دسته ماهيان را نشان دهد. اين شاخص در شرايط نرمال، همچنين در فواصل زماني ۱ دقيقه در كل مدت آزمايش به دست آمد.

ميانگين موقعيت مركز جرم دسته ماهيان در راستاي محورهاي X,Y,Z:

نتايج ميانگين موقعيت مركز جرم دسته ماهيان در راستاي محور هاي X,Y,Z، مطابق با اشكال ۳، ۴ و ۵ ارايه گرديد. مطابق با شكل ۳ كه تغيير مركز جرم در راستاي محور X و در واقع حركت دسته ماهيان در طول اكواريوم را نشان مي‌دهد، مشاهده شد كه ماهيان رزي بارب در دماي نرمال زيستشان در كل نواحي اكواريوم پراكنده‌اند به طوريكه مركز جرم دسته ماهيان در راستاي اين محور تقريبا در وسط اكواريوم قرار مي‌گيرد (ميانگين موقعيت مركز جرم در اين شرايط ۲۴۳/۸ پيكسل محاسبه شد). در حاليكه در طول مدت آزمايش به خصوص از دقيقه ۳ پس از ورود جريان آب سرد، ميانگين مركز جرم دسته به طور معني‌داري (P<0.05) كاهش را نشان مي‌دهد (ميانگين موقعيت مركز جرم دسته ۱۷۸/۸پيكسل مي‌باشد) كه نشان‌دهنده اين مطلب است كه مركز جرم دسته ماهيان به مبدا مختصات يعني سمت راست اكواريوم نزديک شده است.

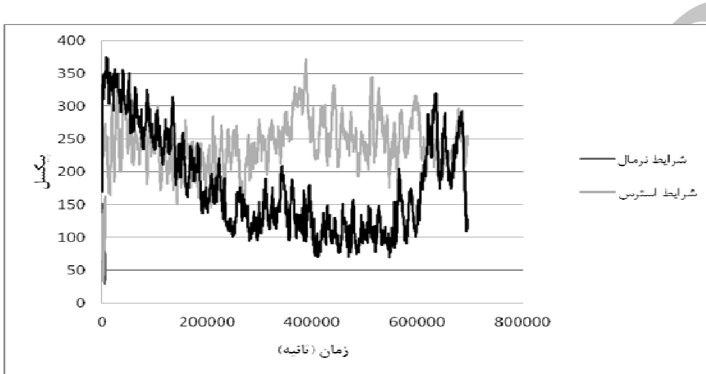
تغييرات در راستاي محور Y، مطابق با شكل ۴ ارايه شد. اين نمودار نشان مي دهد كه ماهيان رزي بارب در دماي معمول، غالبا در مناطق مياني اكواريوم جاي مي گيرند به طوريكه ميانگين مركز جرم دسته در راستاي اين محور ۷۶ پيكسل در حاليكه در شرايط ورود آب سرد در طي مدت آزمايش مركز جرم دسته ماهيان به طور معني‌داري به مناطق بالاتر (۹۸ پيكسل) و سطح اكواريوم، كه مناطق گرمتري نسبت به كف اكواريوم كه آب سرد وارد مي شد، منتقل شد (P<0.05) .

تغييرات در راستاي محور Z، مطابق با شكل ۵، نشان مي‌دهد كه ميانگين موقعيت مركز جرم دسته در شرايط با دماي نرمال كه ۸۶ پيكسل است به مبدا مختصات كه ديواره جلو اكواريوم كه رو به دوربين است نزديكتر مي‌باشد. ولي در شرايط آزمايش و خصوصا از ۳ دقيقه پس از ورود آب سرد ميانگين مركز جرم دسته به طور معني‌داري از مبدا مختصات دور شده(۱۰۳ پيكسل) و به ديواره پشتي اكواريوم در محل خروج آب نزديكتر شده است كه نزديک محل خروجي آب است (P<0.05).

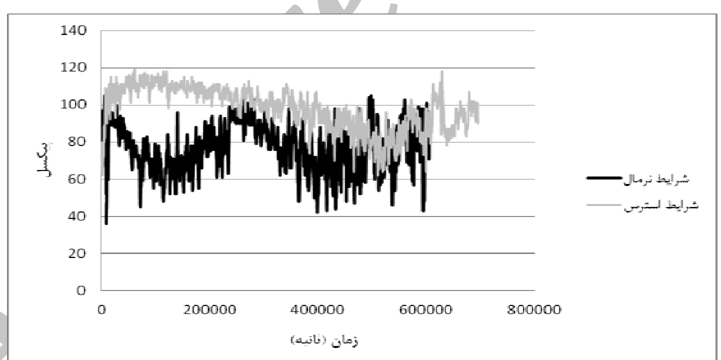
[6] projected mobility picture
[7] mobility

شاخص PMP

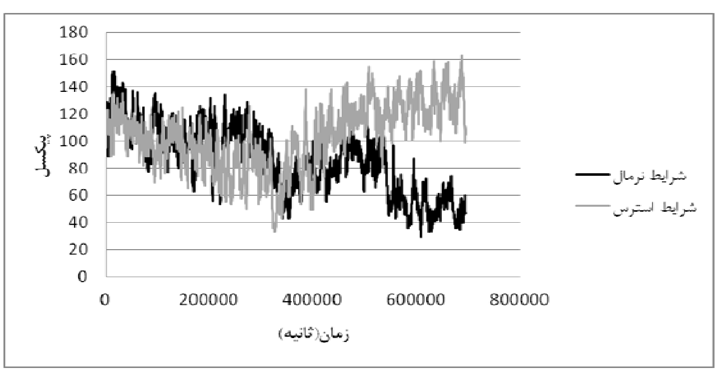
تغييرات شاخص PMP مطابق با شكل هاي ۶ و ۷ ارايه شد و محلي را كه ماهيان در شرايط با نرمال و شرايط آزمايش ترجيح مي‌دهند در آنجا بمانند، مشخص شد. تغييرات شاخص PMP در دقايق ۳و ۵و ۸ همچنين نشان داد كه ماهيان بلافاصله بعد از درک شرايط استرس، شروع به اجتناب از منبع آن و ترک اين قسمت از اكواريوم كردند، به طوريكه حركت دسته ماهيان بيشتر اطراف قسمت خروجي آب بود كه دماي نسبتا بالاتري در مقايسه با ساير قسمت‌هاي اكواريوم داشت و همچنين پراكندگي كه در شرايط نرمال داشتند از بين رفته بود و حالت تجمعي دسته بيشتر شد.



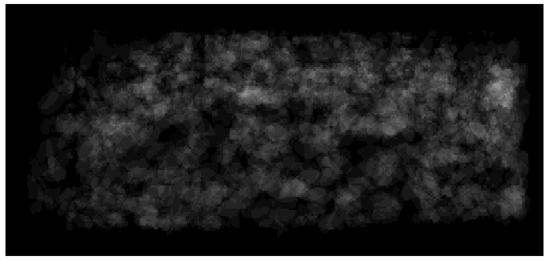
شكل ۳- تغييرات ميانگين فاصله مركز جرم دسته ماهيان در راستاي محور **X** در شرايط نرمال و در كل مدت زمان آزمايش بر حسب پيكسل



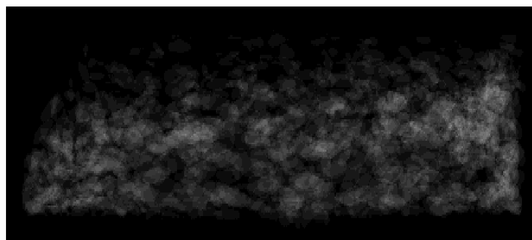
شكل ۴- تغييرات ميانگين فاصله مركز جرم دسته ماهيان در راستاي محور **Y** در شرايطنرمال و در كل مدت زمان آزمايش بر حسب پيكسل



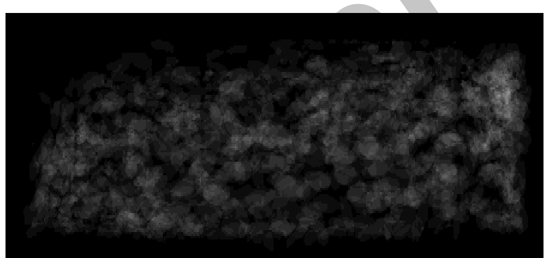
شكل ۵- تغييرات ميانگين فاصله مركز جرم دسته ماهيان در راستاي محور **Z** در شرايط نرمال و در كل مدت زمان آزمايش بر حسب پيكسل



دقیقه ۳



دقیقه ۵



دقیقه ۸

شکل ۶- شاخص **PMP** از دوربین روبرو در دقایق ۳ و ۵ و ۸ در شرایط با دماي نرمال. تراکم نقاط سفید دسته ماهیان را نشان مي دهد.

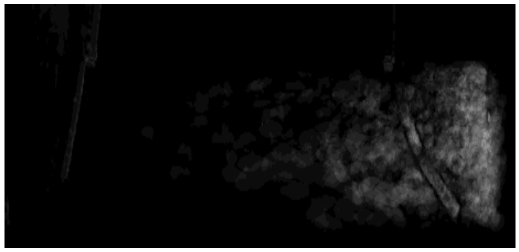
تغییر در میانگین سرعت شناي دسته ماهیان

تغییرات شاخص PMP، تغییر در حرکت دسته ماهیان در طي مدت آزمایش را نشان مي‌دهد که نتایج بیان‌کننده این موضوع است که تمایل به حالت تجمعي در دسته افزایش داشته است به طوریکه تراکم نقاط سفید در زمینه خاکستري تصویر که نشان دهنده تراکم ماهیان است، بیشتر شده است، بنابراین با بیشتر شدن تراکم ماهیان و تجمع آنها در یک گوشه اکواریوم، فراواني نقاط سفید در این حالت نسبت به حالت نرمال کمتر شده است (اشکال ۶ و۷) که نشان‌دهنده کاهش سرعت شناي دسته ماهیان تحت شرایط استرس است.

هورمون کورتیزول

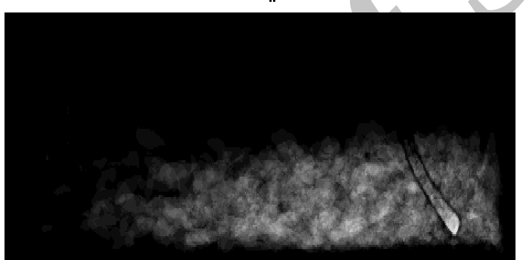
اندازه‌گیري هورمون کورتیزول در وزن لاشه ماهیان رزي بارب نشان داد که در ماهیان تحت استرس مقدار این هورمون ۱۰ دقیقه بعد از اعمال استرس به.آکواریوم به طور معني‌داري افزایش داشته است (P<0.05) (شکل۸).

نتایج اندازه‌گیري هورمون کورتیزول نشان داد که مقدار این هورمون در شرایط استرس افزایش داشته است که وجود شرایط استرس را از دیدگاه فیزیولوژیک اثبات مي‌کند.



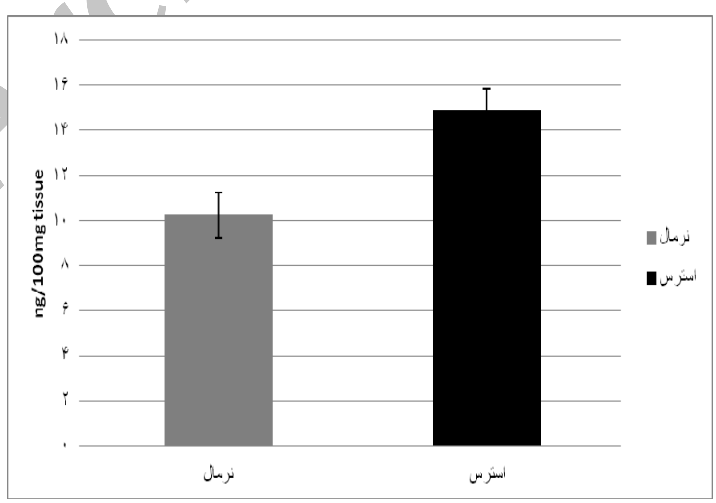
دقیقه ۳

دقیقه ۵



دقیقه ۸

شکل ۷- شاخص **PMP** از دوربین روبرو دقیقه ۳و ۵و ۸ در شرایط استرس. تراکم نقاط سفید دسته ماهیان را نشان مي دهد.



شکل ۸- میانگین مقدار هورمون کورتیزول در شرایط نرمال دمایي و شرایط استرس حاد دما بر حسب نانو گرم در هر ۱۰۰ میلي گرم بافت ماهی رزی بارب. اختلاف معنيدار در ماهیان تحت تاثیر استرس (**P<0.05**).

بحث

این مطالعه نشان مي‌دهد که سیستم بینایي کامپیوتر مي‌تواند به عنوان یک تکنیک قابل اطمینان و معتبر براي پایش پارامترهاي رفتاري یک دسته از ماهي تحت شرایط استرس باشد. همچنین این تکنیک این پتانسیل را دارد که به عنوان یک ابزار معمول براي ثبت پارامترهاي رفتاري شود. مزیت مهم استفاده از این سیستم جمع‌آوري داده بدون دستکاري و آشفته کردن ماهیان است. عاملي که در چنین تکنیکي باعث ایجاد خطا در محاسبات مي شود هم پوشاني ماهیان با یکدیگر مي‌باشد که با گذاشتن دو دوربین و فیلم‌برداري از دو زاویه، همانطور که در این مطالعه انجام شد، میتوان از ایجاد چنین خطاهایي تا حد ممکن جلوگیري کرد و موقعیت دسته ماهیان را در سه بعد به دست آورد. برنامه کامپیوتري پردازش تصویر که براي این مطالعه طراحي شده است داراي قابلیت اندازه گیري شاخص هاي رفتاري در شرایط استرس هاي مختلف نیز مي باشد و برخلاف مطالعات قبلي (Xu *et al*., 2006) که برنامه پردازش تصویر براي کمي کردن پارامترهاي رفتاري را با نرم افزار Matlab 6.5 طراحي کردند، برنامه پردازش تصویر تهیه شده در این مطالعه با نرم افزار Delphi طراحي شد که نرم افزاري با ورژن جدیدتر در این مطالعات مي باشد و داراي سرعت بیشتري در پردازش تصویر نسبت به نرم افزار Matlab است به طوریکه تصاویر را با نرخ ۰/۱ فریم بر ثانیه پردازش مي کند و دقت بالاتري نسبت به برنامه اي که با نرم افزار Matlab نوشته شده است دارد.

در ارتباط با کمي‌کردن پاسخ‌هاي رفتار دسته جمعي ماهیان در مواجهه با استرس حاد کاهش درجه حرارت تا به حال مطالعه اي گزارش نشده است. مطالعه (Israeli & Kimmel, 1996) تغییرات در رفتار دسته جمعي ماهي گلدفیش (*Carassius auratus*) را در یک تانک با استفاده از سیستم بینایي کامپیوتر تحت شرایط کمبود اکسیژن نشان مي دهد، این مطالعه نشان داد که میانگین مرکز جرم دسته ماهیان در هنگام مواجهه با استرس حاد کاهش اکسیژن محلول در راستاي محورهاي X,Y,Z، نوسانات شدیدي دارد که در ارتباط با پراکنده شدن و جمع شدن دسته ماهیان است. این نتایج که به طور معني‌داري با شرایط اکسیژني مطلوب اختلاف داشت نشان مي‌دهد که ماهیان براي مقابله با این عامل استرس، به مناطق بالاتر اکواریوم که اکسیژن بیشتري داشت انتقال یافتند. این رفتار حرکت به سمت بالاي دسته ماهیاني که تحت استرس حاد کاهش اکسیژن محلول قرار گرفته بودند گزارش شد (Schwan and Lamberti, 1986; Xu *et al*., 2006). نتایج مطالعه ما نیز حرکت به سمت بالاي اکواریوم را نشان داد که علت آن بالاتر بودن دماي آب در این نواحي مي باشد.

شاخص PMP هم در این مطالعه تغییر در رفتار حرکتي را نشان مي‌دهد (اشکال ۶ و۷). این شاخص در طي مدت آزمایش در دقایق ۳ و ۵ و ۸ بدست آمد و تغییرات آن در شرایط نرمال و استرس نشان داده شد. در مطالعه Israeli and Kimmel, 1996 نیز این شاخص در شرایط نرمال و شرایط استرس کاهش اکسیژن محلول به دست آمد و کاهش میانگین سرعت شناي دسته تحت شرایط این استرسور به صورت کاهش فراواني نقاط سفید در تصویر PMP نسبت به حالت نرمال نشان داده شد که از هر دو دوربین بالا و روبرو به طور جداگانه بدست آمد. تغییر در سرعت شنا از طریق شاخص PMP نیز در مطالعات مختلفي گزارش شده است که کاهش سرعت شنا را از طریق کاهش فراواني نقاط سفید در تصاویر PMP نشان دادند (Hubbs *et al*., 1967; Cichocki, 1977; Metcalfe and Butler, 1984).

در این مطالعه نیز این اثر در ارتباط با استرسور حاد جریان آب سرد دیده شده است و با توجه به کاهش فراواني نقاط سفید در تصاویر PMP درحالت استرس نسبت به حالت نرمال، سرعت شناي دسته نسبت به حالت نرمال و دماي ثابت کاهش داشته است که علت آن تجمع دسته ماهیان در یک گوشه اکواریوم و محدود شدن مناطقي از اکواریوم مي‌باشد که دماي بالاتري نسبت به نواحي دیگر آن دارد. در نتیجه فعالیت شناي دسته ماهیان محدودتر شده و ابعاد دسته ماهیان در این

شرايط نسبت به حالت نرمال كمتر شده اسـت و ماهيـان در فضاي محدودتري قادر به شنا كردن بودند و بنـابراين سرعت شنا تحت اين شرايط كاهش يافت.

با توجه به نتايج به دست آمده از تحقيق، ميزان هورمون كورتيزول در ماهيان استرس ديده نسبت به ماهيان شاهد و نرمال افزايش داشته است كه اين افزايش از نظر آماري نيز معني‌دار بوده است. به طوريكه ميانگين مقدار اين هورمون در شرايط نرمال ۱۰/۲۵ نانوگرم در ۱۰۰ ميلي گرم بافت، و در شرايط استرس اين مقدار ۱۴/۸۶ نانوگرم در ۱۰۰ميلي گرم بافت محاسبه شد كه حاكي از واكنش فيزيولوژيكي ماهيان در شرايط استرس مي‌باشد. چنانچه يادآور مي‌شود كه مهمترين ويژگي پاسخ به استرس در ماهيان فعال شدن محور HPI است كه منجر به ترشح هورمون كورتيزول مي‌شود. با توجه به آزمايشات انجام شده توسط(Barton and Wendelaar Bonga, 1997 ;Iwama, 1991) ميزان تغييرات كورتيزول به طور معمول به عنوان يک نشانگر از ميزان استرس تجربه شده توسط ماهي مي‌باشد.

مطالعه‌اي راجع به اثر استرس كاهش دما روي تغيير مقدار كورتيزول ماهي كپور كه گونه ماهي مورد مطالعه از اين خانواده مي باشد، نتايج مشابهي را نشان مي دهد (Tanck *et al.*, 2000). همچنين اثرات وابسته به دما روي ترشح ميزان هورمون كورتيزول در گربه ماهي كانالي (*Ictalurus punctatus*) كه مانند خانواده كپور ماهيان از دسته ماهيان گرمابي مي‌باشند، نشان داد كه ماهياني كه با دماهاي پايين تر از حد مجاز زندگي‌شان تحريک شده‌اند افزايش مقدار هورمون كورتيزول به طور معني‌داري بالاتر از زماني بوده است كه با افزايش دما تحريک شده‌اند (Strange, 1980; Davis *et al*., 1984).

نتايج مطالعه ما نيز افزايش مقدار اين هورمون را همانطور كه بيان شد در زمان استرس حاد كاهش دما نشان داد كه با نتايج اين مطالعه كه افزايش معني‌دار مقدار هورمون كورتيزول را در شرايط كاهش دما نشان مي‌دهد مطابقت دارد.

بنابراين مشخص شد كه علت اين تغيير در رفتار ماهيان عامل استرس زاي جريان آب سرد بوده است كه از ديدگاه فيزيولوژيک نيز باعث افزايش در مقدار هورمون كورتيزول شده است.

همانطور كه عنوان شد عامل استرس‌زاي ايجاد شده در اين مطالعه جريان آب سرد بوده است و از آنجاييكه اين ماهيان در آب ساكن زيست مي‌كنند خود جريان آب نيز مي‌تواند به عنوان عامل استرس‌زا مطرح شود. اين موضوع جاي بحث دارد كه علت تغيير رفتار دسته ماهيان و همچنين بالا رفتن مقدار هورمون كورتيزول استروسور جريان بوده است و يا استرسور دما باعث اين تغيير رفتار شده است. اين استرسورها به طور جداگانه نيز مي‌توانند در مطالعه ديگري مطرح شده و اثر آنها بررسي شود ولي از ديد نگارنده چون جريان آب در اين مطالعه كم و ناچيز بود مي تواند قابل اغماض باشد و استرسور سرما به عنوان عامل اصلي تغيير رفتار دسته ماهيان و بالا رفتن مقدار هورمون كورتيزول درنظر گرفته شود.

References

- Askarian M. and Kousha A.(2006). Collection of fish and aquatic animals Physiology; stress. Islamic Azad University Savad kooh Branch. pp 446 (In Persian).
- Barton, B.A., Iwama, G.K., 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annu. Rev. Fish Dis*. 1, 3– 26.
- Brännas, E., A. Alanärä., 1993. Monitoring the feeding activity of individual fish with a demand feeding system. *J. Fish Biol*. 42: 209-215.
- Cichocki, F. 1977. Tidal cycling and parental behavior of the cichlid fish, *Biotodoma cupido*. *Environ. Biol. Fish* 1, 159-69.
- Davis, K.B., Suttle, M.A., Parker, N.C., 1984. Biotic and abiotic influences on corticosteroid hormone rhythms in channel catfish. *Trans. Am. Fish Soc*. 113, 414–421.

- Duarte, S., Reig, L., Oca, J., 2009, Measurement of sole activity by digital image analysis, *Aquacult. Eng.* 1, 41.22-27
- Elliot, J.M., 1981. Some aspects of thermal stress on freshwater teleosts. In:Pickering, A.D.(Ed.), stress and fish, *Academic press*, London. pp: 209-245.
- Franklin, C. E., Davison, W. & Foster, M. E. 1990. Evaluation of the physiological responses of quinnat and sockeye salmon to acute stressors and sampling procedures. *New Zealand Natural Sciences* 17, 29-38
- Hubbs, C., Baird, R.C. & Gerald, J.W. 1967. Effects of dissolved oxygen concentration and light intensity on activity cycles of fishes inhabiting warm springs. *Am. Midl. Nat*. 77, 104-15.
- Israeli, D., Kimmel, E., 1996. Monitoring the behavior of hypoxia-stressed *(Carassius auratus*) using computer vision. *Aquacult. Eng.* 15, 423 – 440.
- Kane, A.S., Salierno, J.D., Gipson, G.T., Molteno, T.C.A., Hunter, C., 2004. A video-based movement analysis system to quantify behavioral stress responses of fish.*Water Res.* 38(18): 3993-4001.
- Kramer, D.L. & McClure, M. 1982. Aquatic surface respiration, a widespread adaptation to hypoxia in tropical freshwater fishes. *Environ.Biol. Fish* 7, 47-55.
- Kristiansen, T.S., Ferno, A., Holm, J.C., Privitera, L., Bakke, S., Fosseidengen, J.E., 2004. Swimming behaviour as an indicator of low growth rate and impaired welfare in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) reared at three stocking densities. *Aquacult*. 230, 137–151.
- Kondaiah, K., Murty, A.S., 1994. Avoidance behavior test as an alternative to acute toxicity test. Bull. Environ. *Contam. Toxicol*. 53, 836–843.
- Le Morvan-Rocher, C., Troutead, D., Deschaux, P., 1995. Effects of temperature on carp leukocyte mitogen-induced proliferation and non-specific cytotoxic activity. *Dev. Comp. Immunol.* 19, pp. 87–95.
- McFarlane, W.J., Cubitt, K.F., Williams, H., Rowsell, D., Moccia, R., Gosine, R., McKinley, R.S., 2004. Can feeding status and stress level be assessed by analyzing patterns of muscle activity in free swimming rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquacult*. 239, 467–484.
- Metcalfe, J.D. & Butler, P.J. 1984. Changes in activity and ventilation in response to hypoxia in unrestrained, unoperated dogfish *(Scyliorhinus canicula* L.). *Exp. Biol*. 108, 411-8.
- Nogita, S., Baba, K., Yahagi, H., Watanabe, S., Mori, S., 1988.Acute Toxicant Warning System Based on a Fish Movement Analysis by Use of Al Concept. Artificial Intelligence for Industrial Applications. IEEE AI '88, *Proceedings of the International Workshop, Hitachi, Japan* p. 273-276.
- Reig, L., Ginovart, M., Flos, R.,2003. Modification of the feeding behaviour of sole (*Solea solea*) 429 through the addition of a commercial flavour as an alternative to betaine. *Aquat. Living Resour*. 16, 370-379.
- Schwan, T.G. & Lamberti, G.A. 1986. Influence of oxygen concentration on the respiratory behaviour of tilapia *(Sarothrodon afcalicus grahami)* in Lake Nakuru, Kenya, Africa. J. *Ecol. 24, 199-202.*
- Stradmeyer, L., 1989. A behavioural method to test feeding responses of fish to pelleted diets. *Aquacult*., 79: 303-310.
- Strange, R.J., 1980. Acclimation temperature influences cortisol and glucose concentrations in stressed channel catfish. *Trans. Am. Fish. Soc*. 109, 193- 303.
- Tanck, M.W.T., Booms, G.H.R., Eding, E.H., Wendelaar Bonga, S.E., Komen, J., 2000. Cold shocks: A stressor for common carp. *J.fish Biol*. 57, 881-894.
- Wendelaar-Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev*. 77, 591- 625.
- Xu, J, Liu, Y, Cui, S, Miao, X., 2006. Behavioral responses of tilapia (*Oreochromis niloticus*) to acute fluctuations in dissolved oxygen levels as monitored by computer vision. *Aquacult. Eng*. 35, 207-217.

Quantification of Schooling Behavioral Responses of Rosy Barb (*Puntius barbus*) to Acute Decrease Temperature Fluctuations Using Computer Vision

M. Babaei naiij[1], M.A. Nematollahi[*1], M. Layeghi[2], R. Aghaii zadeh[3] and G. Shahdoost[4]
[1]Dept. of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, I.R. Iran
[2]Dept. of Wood and Paper Science and Technology, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, I.R. Iran
[3]School of Electrical and Computer Engineering, University of Tehran, I.R. Iran
[4]Dept. of Electric and Electronic, Islamic Azad University of Tehran, South unit, I.R. Iran
(Received: 24/11/2010, Accepted: 22/01/2012)

Abstract
In order to quantify of schooling behavioral responses of Rosy barb (*Puntius barbus*) subjected to acute decreasing temperature stress monitored by computer- vision system. Four aquaria as duplicate with a density of 30 fish per unit were used for rearing of fish in normal and stress conditions. Some geometric schooling parameters such as average location of center gravity school and distance of coordinate axels X, Y, Z and average of swim speed were used for calculating. Additionally mobility and density of fish school were evaluated by the 'Projected Mobility Picture' (PMP) index. Expressed indices for normal temperature condition were compared with acute stress of low temperature. Cortisol was measured from whole body with sampling 6 fish before and after stress. The results showed that schooling behavioral was changed by entering, $8^{\circ C}$ water, and expressed indices were different significantly. While average location of center gravity school and distance of coordinate axels X, Y, Z showed intensity fluctuations in all three directions was correlated with spreading and contracting of the school. PMP index showed an accumulation of the school in the outlet area. The average of swim speed of fish school decreased under stress conditions compared to normal conditions ($P<0.05$). Cortisol levels increased significantly after stress which support behavior parameters ($P< 0.05$).

Keywords: Fish schooling behavior, Image processing, Cortisol hormone, Rosy barb

*Corresponding author: Tel: +982632245909 Fax: +982632245909 E-mail: malahi@ut.ac.ir