شیلات، مجله منابع طبیعی ایران

دوره ۷۰، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۶

صفحات ۴۰۶-۳۹۶

بررسی سطوح مختلف پتانسیل اکسیداسیون احیای (ORP) آب بر پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب، شاخص‌های خون‌شناسی و هورمون کورتیزول ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

مریم یاور[۱]، کامران رضایی توابع*[۲]، لعبت تقوی[۳]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی محیط زیست، دانشکدهٔ منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.

۲. استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران.

۳. عضو هیآت علمی گروه علوم و مهندسی محیط زیست، دانشکدهٔ منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۲ تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۱۲/۲۸

چکیده

مطالعه پتانسیل اکسیداسیون احیایی (ORP) آب یک شاخص فیزیکوشیمیایی است که تحت تأثیر مجموعهٔ مواد اکسیدکننده و احیاءکننده در آب می‌باشد. این شاخص علاوه بر این‌که بسیاری از پارامترهای کیفی آب را تحت تأثیر قرار می‌دهد، خود به تنهایی بیان‌گر شرایط عمومی کیفی آب نیز می‌باشد. با توجه به اهمیت و اثرات این شاخص بر سلامت زیستی آبزیان، تحقیق حاضر با هدف بررسی تأثیر سطوح مختلف ORP آب بر شاخص‌های خون‌شناسی، هورمون کورتیزول ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) و فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب شامل COD، BOD، TOC، نیترات و فسفات انجام گرفت. برای انجام این تحقیق، تعداد ۷۲ قطعه ماهی کپور معمولی با وزن متوسط ۶۰±۵ گرم در ۴ تیمار ORP با سطوح ۲۵۰-۲۰۰ (تیمار شاهد)، ۳۰۰-۲۵۰ (تیمار اول)، ۳۵۰-۳۰۰ (تیمار دوم)، ۴۰۰-۳۵۰ (تیمار سوم) میلی‌ولت و با سه تکرار در مخازن ۷۰ لیتری به مدت چهار هفته قرار گرفتند. در طول تحقیق، سطوح مختلف ORP در تیمارهای مختلف با اُزون‌دهی توسط دستگاه اُزون‌ساز به‌صورت روزانه تنظیم و اندازه‌گیری ORP نیز با دستگاه ORPمتر دیجیتال انجام گردید. بر اساس نتایج، با افزایش سطح ORP در تیمارها، میزان هورمون کورتیزول خون ماهیان در تیمارهای اُزون‌دهی شده افزایش یافته و تفاوت معنی‌داری ($P\leq$۰/۰۵) با تیمار شاهد نشان دادند و بیشترین تلفات (۴۲٪) مربوط به تیمار دوم و سوم بود. نتایج فاکتورهای کیفی آب نشان داد که با افزایش سطح ORP، فاکتورهای BOD، COD و نیترات به‌طور معنی‌داری کاهش یافتند، اما افزایش سطح ORP تأثیر معنی‌داری بر شاخص‌های فسفات و TOC نشان نداد. همچنین، با افزایش سطح ORP، نتایج شاخص‌های خون‌شناسی، افزایش معنی‌داری بین تیمارهای تحقیق در شاخص‌های گلبول سفید (WBC)، گلبول قرمز (RBC)، متوسط حجم گلبولی (MCV) و نوتروفیل نشان دادند. شاخص‌های متوسط هموگلوبین گلبولی (MCH)، هماتوکریت (HCT)، هموگلوبین (HB)، غلظت متوسط هموگلوبین گلبول قرمز (MCHC) و مونوسیت تفاوت معنی‌داری بین تیمارها نشان ندادند. به‌طور لی نتایج تحقیق نشان داد که دامنهٔ ORP در محدودهٔ ۲۵۰ تا ۳۰۰ میلی‌ولت نه تنها اثر منفی بر ماهیان و تلفات آنها ندارد، بلکه با بهبود شاخص‌های کیفی آب شرایط را برای زیست ماهیان نیز بهتر می‌کند.

واژگان کلیدی: **پتانسیل اکسیداسیون و احیا، شاخص‌های خون‌شناسی، هورمون کورتیزول، اَزون‌دهی.**

* نویسنده مسئول: تلفن: ۹۸۲۶۳۲۲۲۳۰۴۴+ ایمیل: krtavabe@ut.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

۱. مقدمه

پتانسیل اکسیداسیون احیایی (ORP = Oxidation Reduction Potential) آب بیان‌گر سهم مواد اکسید کننده نسبت به مواد احیا کننده در آب است و بر این اساس زمانی که مواد اکسیدکننده در محیط بیشتر باشد، این پارامتر مثبت و وقتی که مواد احیا کننده در محیط بیشتر باشد، منفی است. این پارامتر علاوه بر این‌که بسیاری از پارامترهای کیفی آب را تحت تأثیر قرار می‌دهد، خود به تنهایی بیان‌گر شرایط عمومی کیفی آب نیز می‌باشد. واحد آن میلی ولت (mv) بوده و دامنهٔ معمول آن در آب‌های طبیعی از ۱۰۰۰+ تا ۱۰۰۰- ممکن است تغییر کند؛ سطح مثبت بیانگر شرایط هوازی و سطح منفی بیان‌گر شرایط بی‌هوازی در آب می‌باشد (Rozati *et al.*, 2014). در حقیقت سطح ORP نشان دهنده وجود اکسیژن و سایر مواد اکسید کننده در آب است. سطح این شاخص در آب‌های طبیعی تا حدود زیادی تحت تأثیر عواملی مانند دما، pH، شوری، غلظت اکسیژن محلول و اکسید کننده‌های حلال در آب مثل اُزن قرار دارد (Tango and Gagnon, 2003; Liu *et al.*, 2009; Summerfelt *et al.*, 2009). بیشتر مطالعات انجام شده در این زمینه، ORP را به‌عنوان یک شاخص ساده برای ارزیابی میزان اُزون‌دهی در مخازن نگهداری آبزیان معرفی کرده است (Buchan *et al.*, 2005; Summerfelt *et al.*, 2009) و با وجود اهمیت این شاخص در آب‌ها و اکوسیستم‌های طبیعی، تاکنون مطالعات بسیار کمی در خصوص اثرات ORP بر موجودات زیستی صورت گرفته است. شرایط زیست مساعد، هموستازی و ایزواسموتیک بدن آبزیان تحت تأثیر مواد محلول در آب بوده و وجود سطح بالای مواد اکسیدکننده و مواد اکسیدشونده می‌توان اثراد حاد و استرسی بر موجودات زیستی داشته باشند و در این شرایط، آبزیان طی فرایندی جهت پاسخ به استرس، تطابق‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی را در مواجهه با استرس از خود نشان می‌دهند که باعث کاهش اثر عامل استرس‌زا می‌شود (Koeypudsa and Jongjareanjai, 2011).

امروزه در مباحث مختلف زیست‌محیطی و آبزی‌پروری، اُزن به‌عنوان یک مادهٔ اکسیدکنندهٔ قوی کاربرد زیادی داشته و برای ضد عفونی، کاهش بار آلی فاضلاب، تصفیه آب و کنترل باکتری‌ها استفاده می‌شود (Buchan *et al.*, 2006; Summerfelt *et al.*, 2009). اُزن به علت داشتن نیمه عمر پایین و پایین بودن عوارض زیست محیطی، به‌عنوان یکی از مناسب‌ترین مواد ضدعفونی کننده کاربردهای مفید و متعددی در آبزی‌پروری دارد (Monzavi, 2008) و از آن‌جایی که بسیاری از آلاینده‌های موجود در آب مورد استفاده برای آبزی‌پروری، به‌راحتی اکسید می‌شوند، اُزن می‌تواند در برنامه‌های کنترل کیفیت آب اعم از حذف مواد جامد، کاهش نیتریت و تجزیهٔ مواد آلی و کنترل بار باکتریایی استفاده شود (Chen *et al.*, 1993). فرایند اُزن‌دهی همچنین اثرات قابل توجهی بر کل مواد جامد معلق (TSS)، رنگ، BOD و سایر ترکیبات معدنی آب و فاضلاب دارد (Davidson *et al.*, 2011). علی‌رغم اثرات مثبت و مزایای اُزن‌دهی در مباحث بهبود کیفی آب، در صورتی‌که شدت اُزن‌دهی زیاد باشد به‌عنوان یک عامل استرس‌زا اثرات منفی بر سیستم‌های زیستی و فیزیولوژیکی آبزیان خواهد داشت.

تغییر در پارامترهای خون‌شناسی و هورمون استرسی کورتیزول از جمله واکنش‌هایی است که موجود در پاسخ به عامل استرس‌زا از خود بروز می‌دهد (Rozati *et al.*, 2014). تغییرات کیفیت آب، آلاینده‌ها، فاکتورهای محیطی، شرایط فیزیولوژیکی خود آبزیان و میزان تراکم آنها در واحد حجم هر کدام می‌توانند عاملی برای ایجاد استرس در آبزیان باشند (Koeypudsa and Jongjareanjai, 2011). استرس با مختل کردن تعادل سیستم هموستاز داخلی بدن آبزیان باعث ایجاد اثرات مخرب در رفتار، رشد، تولید مثل، عملکرد سیستم ایمنی و مقاومت در برابر بیماری‌ها در آبزیان می‌شود (Tanck *et al.*, 2000; Goos and Consten, 2002; Chen *et al.*, 2004; Morales *et al.*, 2005). اثر تغییرات فاکتورهای محیطی بر شاخص‌های خونی آبزیان ممکن است در یک محدوده به‌صورت افزایشی و در محدوده دیگر به صورت کاهشی باشد که این وضعیت به دامنهٔ بهینهٔ زیست مساعد آبزیان و خصوصیات تطابقی آن‌ها بستگی دارد (Morgan and Iwama, 1991). بررسی فاکتورهای خون‌شناسی و هوورمونی

Archive of SID

www.SID.ir

شاخص‌هایی جهت ارزیابی سلامت زیستی آبزیان می‌باشد (Chen *et al.*, 2004) که می‌توانند در بررسی اثرات استرسی اُزن‌دهی و سطح بالای ORP مورد استفاده قرار گیرند. بر اساس یافته‌های Lee و همکاران (۲۰۱۴) مکانیسم فیزیولوژیکی و بیولوژیکی اثرگذاری ORP بر آبزیان بطور دقیق مطالعه نشده است و نیاز به تحقیقات بیشتری دارد. بنابراین، با توجه به اهمیت و اثرات شاخص ORP بر سلامت زیستی آبزیان، گسترش کپورماهیان در منابع و اکوسیستم‌های مختلف آبی ارزش اقتصادی و پرورشی کپورماهیان، گونهٔ کپور معمولی به عنوان ماهی مدل زیستی انتخاب گردید و سطوح مختلف ORP آب بر شاخص‌های خون‌شناسی و هورمون کورتیزول آن و همچنین فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب مورد بررسی قرار گرفت.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. تهیهٔ ماهیان موردنیاز تحقیق و طراحی آزمایش

تعداد ۷۲ قطعه ماهی کپور معمولی با وزن متوسط ۵±۶۰ گرم از مرکز تکثیر و پرورش بهنمیر واقع در بابلسر تهیه و به آزمایشگاه شیخ بهایی واقع در واحد علوم تحقیقات تهران دانشگاه آزاد اسلامی منتقل گردید. بعد از گذراندن دوره سازگاری به‌مدت یک هفته ماهیان با تراکم ۶ قطعه در هر مخزن در معرض ۴ تیمار ORP با سطوح ۲۵۰-۲۰۰ (تیمار شاهد)، ۳۰۰-۲۵۰ (تیمار اول)، ۳۵۰-۳۰۰ (تیمار دوم) و ۴۰۰-۳۵۰ (تیمار سوم) میلی‌ولت و با سه تکرار در مخازن ۷۰ لیتری به‌مدت چهار هفته قرار گرفتند. برای تنظیم سطوح ORP از یک دستگاه مولد اُزن با خروجی ۵۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. در طول دورهٔ آزمایش، ماهیان روزانه به مقدار حدود ۳ درصد زی‌توده بدن و دو بار با غذای کپورماهیان تهیه شده از شرکت فرادانهٔ شهرکرد غذادهی شدند. میانگین دمای تیمارها در طول دورهٔ آزمایش ۲±۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد بود و تلفات ماهیان نیز روزانه ارزیابی و ثبت گردید.

۲.۲. خون‌گیری از ماهیان و آنالیز فاکتورهای بیوشیمیایی خون

در پایان آزمایش، از هر تیمار سه قطعه ماهی به صورت تصادفی انتخاب و خون‌گیری (سیاهرگ ساقه دمی) شدند. تغذیه ماهیان ۲۴ ساعت قبل از خون‌گیری قطع شد و سپس ماهیان در محلول پودر گل میخک به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر بیهوش و خون‌گیری از سیاهرگ ساقه دمی آن‌ها با استفاده از سرنگ ۲/۵ میلی‌متری به میزان ۱/۵ سی‌سی انجام شد (Torrecillas *et al.*, 2011). از نمونه‌های خون جمع‌آوری شده، یک میلی‌لیتر برای جداسازی سرم به میکروتیوب‌های فاقد ماده ضد انعقاد هپارین و ۰/۵ میلی‌لیتر به ویال حاوی ماده ضد انعقاد هپارین منتقل شدند. بلافاصله برای جداسازی سرم، نمونه‌های موجود در میکروتیوب فاقد ماده ضد انعقاد هپارینبه مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس با استفاده از سمپلر، قسمت رویی (سرم) به میکروتیوب‌های دیگر منتقل شدند. در انتها، میکروتیوب‌ها و ویال با پارافیلم پوشانده شده و نمونه‌های حاوی پلاسما در دمای $-4^{\circ}C$ و نمونه‌های موجود در ویال تا زمان بررسی در دمای $+4^{\circ}C$ (دمای یخچال) قرار داده شدند. شاخص‌های بیوشیمیایی خون شامل هماتوکریت، (Hct) هموگلوبین (Hb)، تعداد گلبول‌های قرمز (RBC)، تعداد گلبول‌های سفید (WBC)، متوسط هموگلوبین گلبولی (MCH)، حجم متوسط گلبولی (MCV) و غلظت متوسط هموگلوبین داخل گلبول قرمز (MCHC) آنالیز و اندازه‌گیری شدند (Henry, 1996). گلبول قرمز با محلول Lewis و لام نئوبار شمارش گردید و گلبول سفید نیز به کمک محلول Lewis به کمک ملانژور و لام نئوبار شمارش گردید. هموگلوبین با واحد گرم در دسی‌لیتر با استفاده از محلول درابکین در طول موج ۵۴۰ نانومتر با استفاده از منحنی استاندارد اندازه‌گیری شد. هماتوکریت با سانتریفیوژ مدل Nuve در دور ۱۴۰۰۰rpm اندازه‌گیری و تشخیص افتراقی با رنگ آمیزی گیمسا انجام گرفت. شاخص‌های MCV، MCH و MCHC به ترتیب طبق فرمول‌های ۱، ۲ و ۳ محاسبه شدند (Henry, 1996).

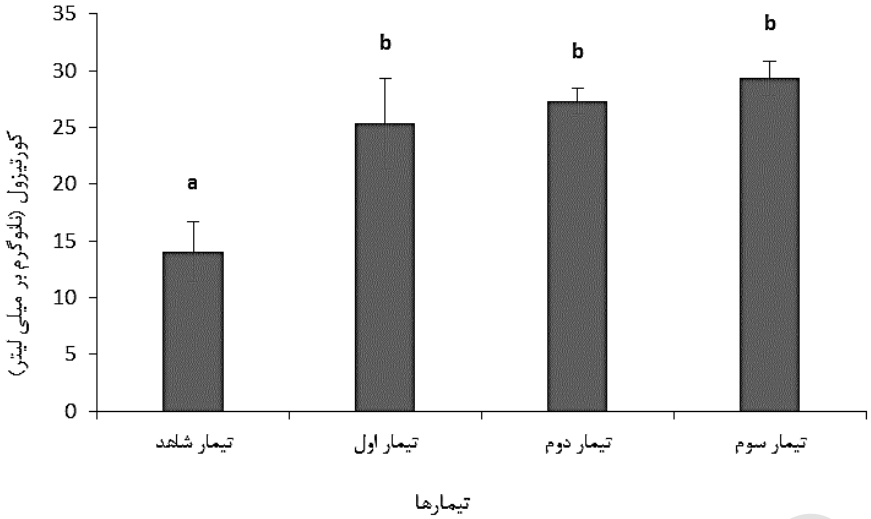
فرمول ۱:

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

فرمول ۲:

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- تغییرات (میانگین± انحراف معیار) هورمون کورتیزول (نانوگرم بر میلی لیتر) در خون ماهیان کپور معمولی در تیمارهای مختلف ORP. حروف متفاوت اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد را نشان می‌دهد.

MCH (pg) = [Hb/RBC (per million)]×10

فرمول ۳:

MCHC (%) = (Hb/HCT)×100

۳.۲. اندازه‌گیری هورمون کورتیزول خون

اندازه‌گیری هورمون کورتیزول خون از روش رادیوایمونواسی با استفاده از دستگاه گاما کانتر مدل L.K.B ساخت کشور فنلاند و با به کارگیری کیت‌های هورمونی ایمونوتک ساخت کشور فرانسه انجام گردید. برای این منظور ابتدا ۱۰ میکرولیتر از پلاسما و ۵۰۰ میکرولیتر از هورمون کورتیزول نشان‌دار به میکروتیوب‌های موجود در کیت اضافه و سپس میکروتیوب‌ها پس از ورتکس شدن، به‌مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند. پس از آن، محتویات میکروتیوب‌ها خالی شده و پس از خشک شدن میکروتیوب‌ها، مقدار تشعشعات گامای آن‌ها در دستگاه گاما کانتر اندازه‌گیری گردید.

۴.۲. اندازه‌گیری پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب مخازن

جهت اندازه‌گیری فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب شامل COD، BOD، TOC، نیترات و فسفات از تمام مخازن نمونه‌گیری انجام شد. برای اندازه‌گیری BOD از دستگاه BOD متر دیجیتال شرکت هانا کشور رومانی مدل HI98193 استفاده شد. برای اندازه گیری COD، ۱۲عدد ویال COD به تعداد نمونه آب و یک ویال شاهد تهیه گردید. به هر ویال ۲ سی سی نمونه + ۱/۵ سی‌سی دی کرومات سدیم + ۳/۵ سی‌سی اسید سولفوریک و سولفات‌نقره اضافه شد. سپس درب ویال‌ها بسته شده و در دستگاه راکتور COD مدل DRB200 کمپانی Hach (۱۵۰درجه به مدت ۲ ساعت) قرار داده شدند و بعد از خنک شدن نمونه ها در دستگاه اسپکتروفتومتری روی طول موج ۶۰۰ نانومتر قرائت گردید. اندازه‌گیری فاکتور TOC نیز با دستگاه TOCمتر مدل SGE ANATOC کشور ژاپن انجام شد. اندازه‌گیری نیترات و فسفات نیز به روش اسپکتروفتومتری بوسیله دستگاه اسپکتروفتو متر ساخت شرکت Hach مدل Dr500 انجام گرفت.

۵.۲. تجزیه و تحلیل داده‌ها

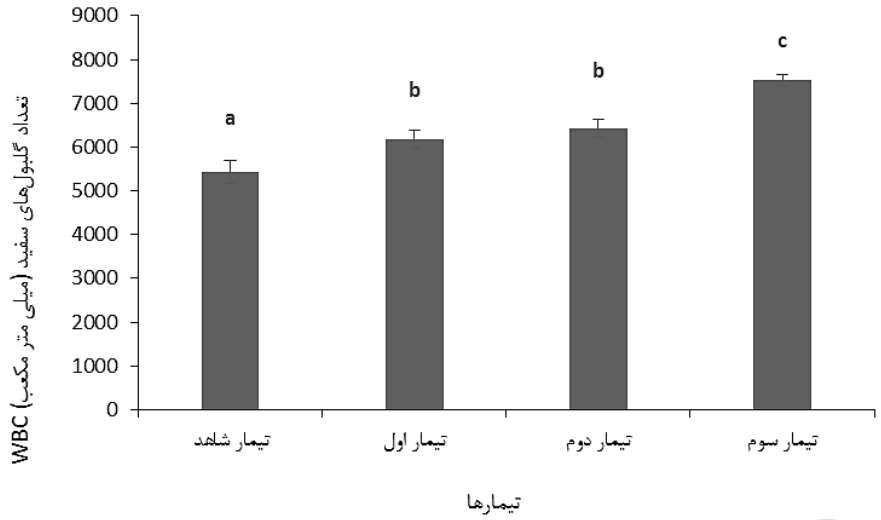
قبل از انجام آنالیز واریانس، نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Shapiro-Wilk بررسی شد. داده‌ها با استفاده از تجزیه واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) مورد آنالیز قرار گرفت. مقایسه میانگین تیمارهای مختلف (با سطح معنی‌داری $P<۰/۰۵$) با آزمون دانکن و با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ انجام شد.

۳. نتایج

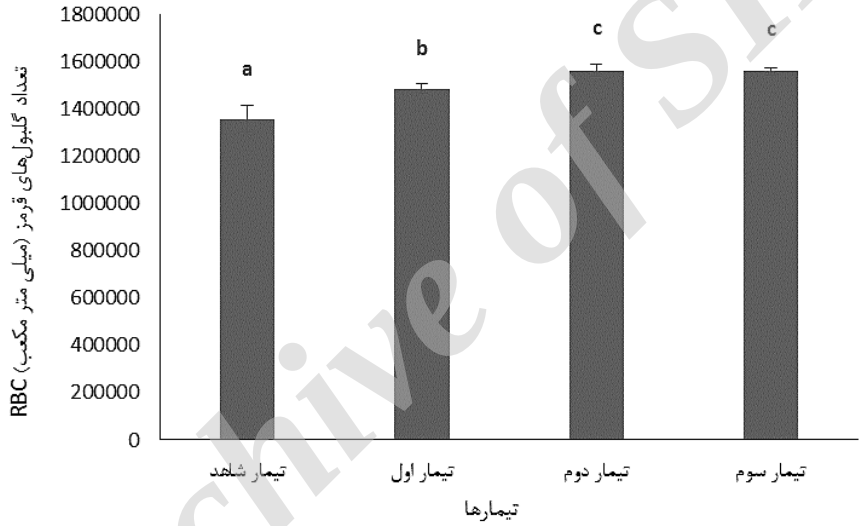
نتایج هورمون کورتیزول خون ماهیان نشان داد

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۲- تغییرات میانگین (میانگین± انحراف معیار) تعداد گلبول‌های سفید خون ماهی کپور معمولی در سطوح مختلف ORP. حروف متفاوت اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد را نشان می‌دهد.



شکل ۳ - تغییرات میانگین (میانگین± انحراف معیار) تعداد گلبول‌های قرمز خون ماهی کپور معمولی در سطوح مختلف ORP. حروف متفاوت اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد را نشان می‌دهد.

که سه تیمار آزمایشی تفاوت معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) با تیمار شاهد هستند (شکل ۱). میزان حداکثری و حداقلی هورمون کورتیزول خون به‌ترتیب مربوط به تیمارهای سوم و شاهد بود. در طول دوره آزمایش به مدت چهار هفته ماهیان در مواجهه با سطوح مختلف ORP بودند، تیمار شاهد و تیمار اول، هیچ تلفاتی نداشتند ولی تیمار دوم و سوم دارای ۴۲ درصد تلفات تا پایان دورهٔ تحقیق بودند.

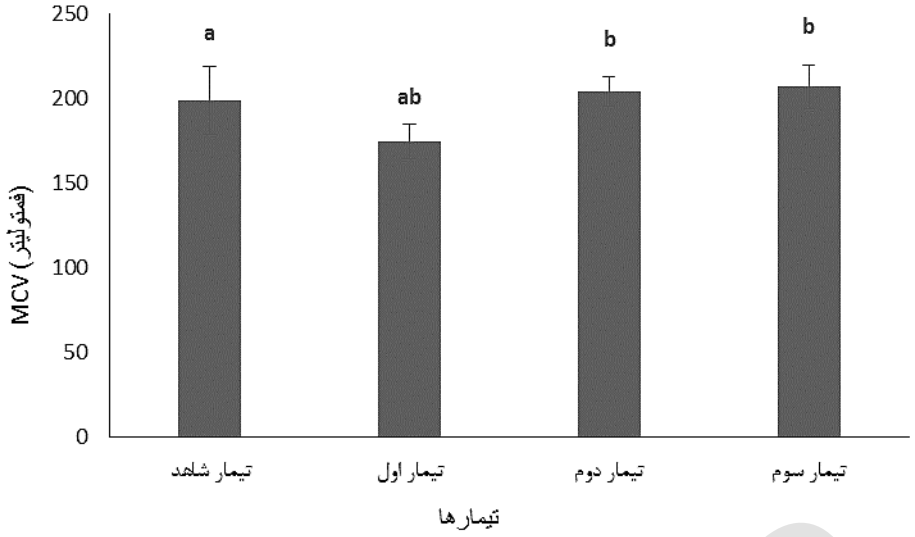
بر اساس نتایج شاخص‌های خون‌شناسی، تعداد گلبول‌های سفید در تیمار سوم تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها نشان داد. تعداد گلبول‌های قرمز، حجم متوسط گلبولی و نوتروفیل تفاوت معنی‌داری را در بین تیمار دوم و سوم نشان ندادند.

همچنین سایر شاخص‌های خون‌شناسی نشان داد که مقادیر هموگلوبین، MCHC و مونوسیت تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای آزمایش ندارند، اما در مورد شاخص هماتوکریت، تیمار دوم و سوم تفاوت معنی داری با دو تیمار دیگر داشته و در مورد MCH تیمار شاهد با سه تیمار آزمایشی تفاوت معنی‌دار نشان داد ($P<۰/۰۵$) (شکل‌های ۲-۵ و جدول ۱).

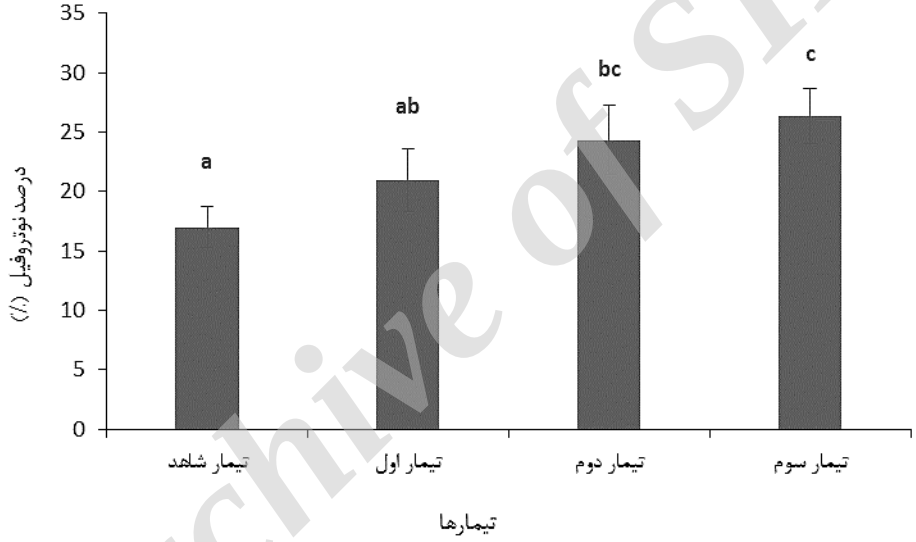
آنالیز فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب شامل پارامترهای COD و BOD نشان داد که با افزایش سطح ORP میزان این دو فاکتور به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد (شکل‌های ۶ و ۷) که بیانگر

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۴ - تغییرات میانگین (میانگین± انحراف معیار) حجم متوسط گلبولی خون (فمتولیتر) ماهی کپور معمولی در سطوح مختلف ORP. حروف متفاوت اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد را نشان می‌دهد.



شکل ۵ - تغییرات میانگین (میانگین± انحراف معیار) درصد نوتروفیل خون ماهی کپور معمولی در سطوح مختلف ORP. حروف متفاوت اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد را نشان می‌دهد.

جدول ۱- میانگین (میانگین± انحراف معیار) میزان متوسط هموگلوبین گلبولی (MCH)، هماتوکریت (HCT)، هموگلوبین (HB)، غلظت متوسط هموگلوبین داخل گلبول قرمز (MCHC) و مونوسیت در ماهی کپور معمولی. حروف متفاوت در هر ردیف اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد را نشان می‌دهد.

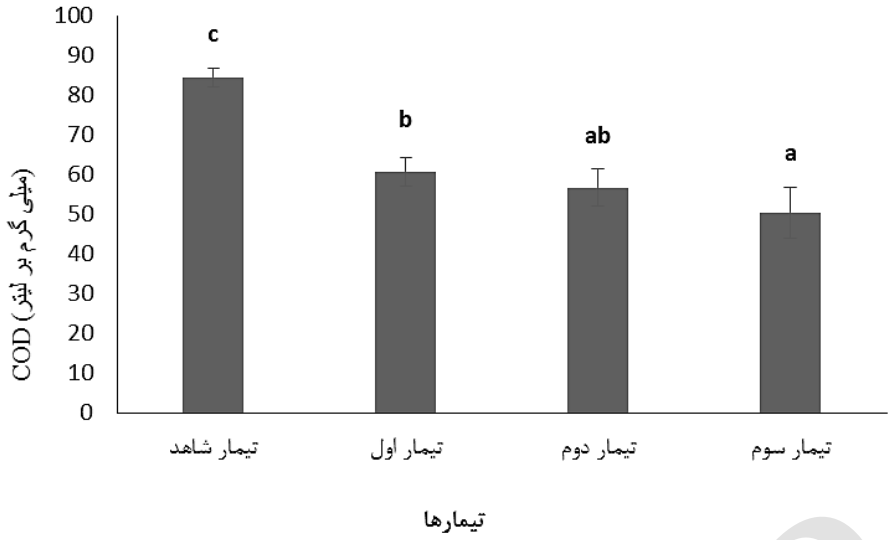
پارامترها (واحد)	تیمار اول(شاهد)	تیمار دوم	تیمار سوم	تیمار چهارم
هموگلوبین (گرم بر دسی لیتر)	۸/۵±۱/۲	۷/۸±۰/۶۳	۸/۱±۰/۲۸	۸/۳±۰/۵۶
هماتوکریت (٪)	$۲۷/۰±۱/۷^{a}$	$۲۶/۰±۱/۷^{a}$	$۳۲/۰±۱/۰^{b}$	$۳۲/۳±۲/۰۸^{b}$
MCH (پیکوگرم)	$۶۲/۳±۶/۴^{b}$	$۵۳/۰±۴/۳^{a}$	$۵۲/۰±۱/۰^{a}$	$۵۳/۶±۳/۷^{a}$
MCHC (٪)	۳۱/۷±۶/۱	۳۰/۳±۲/۱	۲۵/۴±۱/۱	۲۶/۰±۳/۴
مونوسیت (٪)	۴/۶±۰/۵۷	۵/۰±۱/۰	۶/۳±۰/۵۷	۶/۳±۱/۵

اکسیداسیون موادآلی و مواد شیمیایی توسط اُزون می‌باشد.

نتایج حاصل از آنالیز پارامترهای TOC ، نیترات و فسفات در جدول ۲ آورده شده است. مقادیر نیترات در تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری با تیمارهای اُزون‌دهی شده نشان داد، در حالی‌که دو پارامتر فسفات

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۶ - تغییرات میانگین (میانگین± انحراف معیار) میزان COD آب مخازن در سطوح مختلف ORP. حروف متفاوت اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد را نشان می‌دهد.

شکل ۷ - تغییرات میانگین (میانگین± انحراف معیار) میزان BOD آب مخازن در سطوح مختلف ORP. حروف غیر مشابه اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد را نشان می‌دهد.

جدول ۲ - میانگین (میانگین± انحراف معیار) میزان نیترات (NO_3)، فسفات (PO_4) و کربن آلی کل (TOC) در آب مخازن ماهیان کپور تیمار شده با سطوح مختلف ORP. حروف متفاوت اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد را نشان می‌دهد.

پارامترها (میلی گرم بر لیتر)	تیمار اول (شاهد)	تیمار دوم	تیمار سوم	تیمار چهارم
نیترات	۱۲/۳±۱/۵^{b}	۷/۰±۱/۷^{a}	۵/۶±۱/۵^{a}	۵/۰±۲/۶^{a}
فسفات	۱/۴±۰/۲۵	۱/۱±۰/۳۷	۱/۲±۰/۴۹	۱/۱±۰/۲۰۸
کربن آلی کل(TOC)	۱۱/۰±۱/۷	۱۰/۳±۳/۲	۱۰/۰±۴/۳	۹/۰±۲/۶

و کربن آلی کل تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای تحقیق نشان ندادند (جدول ۲).

۴. بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به اهمیت و اثرات مواد اکسیدکننده و احیا کننده در آب بر سلامت زیستی آبزیان، تحقیق حاضر با هدف بررسی تأثیر سطوح مختلف ORP آب با استفاده از اُزون‌دهی، بر شاخص‌های خون‌شناسی، هورمون کورتیزول ماهی کپور معمولی و فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب انجام گرفت. پارامترهای خونی به طور گسترده‌ای برای ارزیابی وضعیت سلامت زیستی

Archive of SID

www.SID.ir

آبزیان مورد استفاده قرار می‌گیرند (Saravanan *et al.*, 2011). از طرفی نیز هورمون کورتیزول به‌عنوان هورمون استرسی برای سنجش قدرت تحمل تغییرات و استرس‌ها در شرایط اکولوژیکی و محیطی در آبزیان مطرح است و شرایط زیستی و محتویات بیوشیمیایی خون آن را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Bullis, 1993). بر اساس نتایج به‌دست آمده، تیمار شاهد کمترین استرس و هورمون کورتیزول را نشان داد، و متعاقب آن در طول دورهٔ آزمایش تلفاتی را نشان ندادند. استرس می‌تواند ناشی از عوامل مختلف محیطی و آلاینده‌ها باشد که در اثر آن تغییرات زیادی در سطح هورمون‌ها، پروتئین‌ها، قند، کلسترول و دیگر ترکیبات بیوشیمیایی خون ایجاد می‌شود (Bahmani *et al.*, 2001). سطح هورمون کورتیزول پلاسما به‌طور معمول به‌عنوان شاخصی از میزان تحمل استرس بر ماهی استفاده می‌شود (Barton, 2002). در مطالعه حاضر، با افزایش سطح ORP میزان هورمون کورتیزول در ماهی کپور معمولی روند افزایشی داشت و بیان‌گر واکنش فیزیولوژیکی ماهیان نسبت به شرایط استرس‌زای اُزون‌دهی می‌باشد. در شرایط استرس، هورمون (ACTH = Adrenocorticotropic Hormone) مترشحه از غدهٔ هیپوتالاموس به قسمت قدامی کلیه وارد و با تحریک سلول‌های بخش فوق کلیوی سبب ترشح هورمون کورتیزول می‌شود (Kubilay and Ulukay, 2002). بیشتر انرژی موجود در موجود زنده از تغییرات کربوهیدرات است که در شرایط استرسی افزایش می‌یابد تا تقاضای انرژی برای مقابله با استرس را تأمین کند و به همین دلیل غلظت گلوکز خون با سطوح استرس آبزیان ارتباط مستقیمی دارد (Endo *et al.*, 2006). آزمایشات Lee و همکاران (۲۰۱۴) نشان داد که ORP حدود ۳۲۰-۳۰۰ میلی ولت باعث تغییر در گلوکز خون و غلظت پروتئین پلاسما و در نتیجه ایجاد استرس در این ماهیان می‌گردد و همچنین آنها بیان کردند که ORP بیشتر از ۳۲۰ میلی ولت باعث افزایش مرگ و میر ماهی باس دریایی می‌شود و برای این ماهی سطح ORP فراتر از محدودهٔ ۳۲۰ میلی‌ولت ایجاد واکنش‌های استرسی می‌کند (Li *et al.*, 2014).

فاکتورهای خونی نیز در آبزیان به‌عنوان نشانگرهای فیزیولوژیکی واکنش به استرس استفاده می‌شوند (Cataldi *et al.*, 1998) هماتوکریت خون به‌عنوان یکی از مهم‌ترین شاخص‌ها در تعیین سلامت و بیماری ماهیان مورد استفاده قرار می‌گیرد (Houston and Rupert, 1997). یافته‌های Benfey و Biron (۲۰۰۰) نشان داد که بررسی‌های هماتولوژیک می‌تواند اطلاعات ارزشمندی را در رابطه با حد تحمل جانوران در برابر عوامل استرس‌زا ارائه نماید. روند تغییرات گلبول‌های قرمز از روی هماتوکریت ارزیابی می‌گردد، همچنین هموگلوبین خود شاخص مناسبی جهت تعیین پدیده غلیظ شدن و یا رقیق شدن خون در زمان رویارویی ماهیان با استرس حاد می‌باشد. علت افزایش هموگلوبین یا هماتوکریت در طول استرس می‌تواند ناشی از عواملی نظیر کاهش حجم پلاسما، تورم گلبول‌های قرمز و آزاد شدن تعداد بیشتری اریتروسیت در خون از بافت‌های خون‌ساز باشد و تغییر هر یک از شاخص‌های فوق منجر به تغییر هماتوکریت می‌شود (Benfey and Biron, 2000). نتایج تحقیق حاضر، تغییرات سطح هورمون کورتیزول را با تغییرات سطوح مختلف ORP و اُزون‌دهی نشان داد که بیان‌گر مواجهه ماهیان با مقدار بالای اُزن در تیمارهای دوم و سوم در یک شرایط استرسی است. از طرفی با توجه به این‌که لکوسیتوزیس صورت گرفته و تعداد گلبول‌های سفید افزایش یافته است، می‌توان نتیجه گرفت که شرایط استرسی در تیمار اول حاد نبوده است، اما در تیمار دوم و سوم به‌خاطر ایجاد تلفات حاد بوده است. همچنین نتایج نشان داد که با افزایش سطح ORP، میزان گلبول قرمز، حجم متوسط گلبولی و درصد نوتروفیل افزایش یافته است. با توجه به موارد گفته شده این افزایش ناشی از قرار گیری در یک شرایط تنش‌زا و استرسی بوده است. شاخص‌های MCH، MCV و MCHC که تابعی از تعداد گلبول‌های قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین هستند، با تغییر در مقدار این فاکتورها تغییر می‌یابند که در این بین میزان MCV با بالا رفتن سطح ORP افزایش یافت که نشان دهنده بزرگتر شدن سلول‌ها نسبت به سایر تیمارها است. به عبارت دیگر می‌توان این‌گونه بیان داشت که با افزایش سرعت تکثیر سلول‌ها، گلبول‌ها با اندازهٔ بزرگتری به داخل خون آزاد شده‌اند. به‌طور معمول در صورت مواجهه جاندار با شرایط استرس ابتدا تعداد گلبول‌های سفید

Archive of SID

www.SID.ir

افزایش می‌یابد، اما در صورت رویارویی جاندار با شرایط استرس‌های حاد، به‌طور معمول تعداد آن‌ها کاهش می‌یابد که به این حالت لکوپنیا گویند (Benfey and Biron, 2000).

یکی از مؤثرترین روش‌های مورد استفاده برای معدنی کردن مواد آلی آب و تصفیهٔ فاضلاب استفاده از مواد شیمیایی با قدرت اکسیداسیونی بالا می‌باشد. در مورد استفاده از این مواد اکسیدکننده، سطح استفاده از آنها بایستی در حدی باشد که با تأثیرگذاری بر شرایط کیفی آب خود ایجاد آلودگی نکرده و بر موجودات آبزی اثرات استرسی و منفی نداشته باشند (Zhian, 2008) اُزن یک ترکیب اکسیدکننده قوی بوده و ترکیبات آلی را به وسیله اکسیداسیون مستقیم و یا از طریق رادیکال های هیدروکسیل و یا ترکیبی از این رو فرآیند اکسید می نماید و نیز یک ضد عفونی کننده بسیار انعطاف‌پذیر است و با اکسید کردن و حذف مواد خطرناک و مضر مانند فنل‌ها، نیترات، آمین ها، سیانیدها و سموم کشاورزی و همچنین کاهش BOD و COD در تصفیه و ضدعفونی آب و فاضلاب بسیار کارآمد می‌باشد (Corbitt, 1999; Monzavi, 2008). برای اکسیداسیون هر ماده‌ای در آب و فاضلاب، به مقداری اکسیژن نیاز است و از این‌رو هرچه قدر مقدار مواد اکسیدشونده بیشتر باشد، مقدار اکسیژن بیشتری برای انجام اکسیداسیون لازم خواهد بود. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که با افزایش سطح اُزون‌دهی و ORP مقادیر پارامترهای COD و BOD به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. BOD نیز مقدار اکسیژن لازم برای ثبات بیولوژیکی و COD مقدار اکسیژن لازم برای ثبات شیمیایی آب و فاضلاب است و BOD بالا نشان دهنده غلظت بالای مواد آلی و COD بالا بیان‌گر غلظت بالای مواد شیمیایی محلول در آب و فاضلاب است (Monzavi, 2008). عمدهٔ آنیون‌های مضر در سیستم‌های پرورش آبزیان را ترکیبات نیتروژن‌دار به خود اختصاص می‌دهند و محصول نهایی دفع در ماهیان آب شیرین، آمونیاک است که توسط باکتری‌های اکسیدکننده آمونیاک به نیتریت و سپس نیترات تبدیل می‌شود (Bunting, 2004). نیترات محصول نهایی تجزیه باکتریایی است که باید به طریقی از سیستم حذف شود، زیرا تجمع آن در آب و در شرایط دما و pH می‌تواند منجر به تولید ترکیبات سمی‌تر شود که دارای سمیتی به مراتب بالاتر از نیترات هستند. در تحقیق حاضر با افزایش سطح ORP، میزان نیترات به شدت اکسید شده و کاهش می‌یابد در حالی که تغییرات سطوح ORP تأثیری بر پارامترهایی نظیر فسفات و کربن آلی کل نداشتند. از اثرات نامطلوب این ترکیبات بر آبزیان و محیط زیست آنها می‌توان بـه کاهش میزان اکسیژن در دسترس برای آبزی، تخریب تجهیزات و ادوات در سیستم های مدار بسته و برخی بیماری‌های محیطی در آبزیان می‌باشد (Chen *et al.*,1993). به‌طور کلی نتایج تحقیق حاضر نشان داد که دامنهٔ ORP در محدودهٔ ۲۵۰ تا ۳۰۰ میلی‌ولت (تیمار شاهد و تیمار اول) نه تنها اثر منفی بر ماهیان و تلفات آنها ندارد، بلکه با بهبود شاخص‌های کیفی آب شرایط را برای زیست ماهیان نیز بهتر می‌کند.

References

Bahmani, M., Kazemi, R., Donskaya, P., 2001. A comparative study of some hematological features in young reared sturgeons (*Acipenser persicus* and *Huso huso*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 24, 135-140.

Barton, B.A., 2002. Stress in Fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids1. *Integrative and Comparative Biology*, 42, 517-525.

Benfey, T.C., Biron, M., 2000. Acute stress response in triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Aquaculture*, 184, 167-176.

Buchan, K.A.H., Martin-Robichaud, D.J., Benfey, T.J., 2005. Measurement of dissolved ozone in sea water: A comparison of methods. *Aquaculture Engineering*, 33, 225-231.

Buchan, K.A.H., Martin-Robichaud, D.J., Benfey, T.J., MacKinnon, A.M., Boston, L., 2006. The efficacy of ozonated seawater for surface disinfection of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) eggs against piscine nodavirus. *Aquaculture Engineering*, 35, 102-107.

Bullis, R.A., 1993. Clinical pathology of temperate freshwater and estuarie fish. In: Fish Medicine, Stoskopf, 232-239.

Archive of SID

www.SID.ir

Bunting, S.W., 2004. Wastewater aquaculture: perpetuating vulnerability or opportunity to enhance poor livelihoods. *Aquatic Resources Culture Development*, 1, 51-75.

Cataldi, E., Di-Marco, P., Mandich, A., Cataudella, S., 1998. Serum parameters of Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* (Pisces: Acipenseriformes): effects of temperature and stress. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 121, 351-354.

Chen, C., Wooster, G.A., Bowser, P.R., 2004. Comparative blood chemistry and histopathology of tilapia infected with *Vibrio vulnificus* or *Streptococcus iniae* or exposed to carbon tetrachloride, gentamicin or copper sulfate. Aquaculture 239, 421-443.

Chen, S., Timmons, M.B., Aneshansley, D.J., Bisogni, J.J., 1993. Suspended solids characteristics from recirculating aquaculture systems and design implications. Aquaculture 112, 143-155.

Corbitt, R.A., 1999. Standard handbook of environmental engineering, 2nd Ed., McGraw-Hill, New York. 328 p.

Davidson, J., Good, C., Welsh, C., Summerfelt, S., 2011. The effects of ozone and water exchange rates on water quality and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* performance in replicated water recirculating systems. *Aquaculture Engineering*, 44, 80-96.

Endo, H., Yonemori, Y., Musiya, K., Maita, M., Shibuya, T., Ren, H., Hayashi, T., Mitsubayashi, K., 2006. A needle-type optical enzyme sensor system for determining glucose levels in fish blood. *Analytica Chimica Acta*, 22, 573-574

Goos, H.J.T., Consten, D., 2002. Stress adaptation, cortisol and pubertal development in the male common carp, *Cyprinus carpio*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 197, 105-116.

Henry, J.B., 1996. Clinical diagnosis and management by laboratory methods. W.B. Saunders Company. 1556 p.

Houston, A.H., Rupert, R., 1997. Immediate response of hemoglobin system of gold fish (*Cyprinus auratus*) to temperature change. *Canadian Journal of Zoology*, 54, 1731-1741.

Koeypudsa, W., Jongjareanjai, M., 2011. Impact of water temperature and sodium chloride (NaCl) on stress indicators of hybrid catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell x *C. macrocephalus*, Gunther). *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 33, 369-374.

Kubilay, A., Ulukay, G., 2002. The effect of acute stress on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Turkish Journal of Zoology*, 26, 249-254.

Li, X., Blancheton, J.P., Liu, Y., Triplet, S., Michaud, L., 2014. Effect of oxidation–reduction potential on performance of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in recirculating aquaculture systems. *Aquaculture International*, 22, 1263-1282.

Liu, X.Q., Wang, J., Zhang, D., Li, Y.T., 2009. Grey relational analysis on the relation between marine environmental factors and oxidation-reduction potential. C*hinese Journal of Oceanology and Limnology*, 27, 583-586.

Monzavi, M., 2008, Wastewater Treatment, University of Tehran Press, Tehran. 390 p.

Morales, A.E., Cardenete, G., Abellan, E., Garcia-Rejon, L., 2005. Stress related physiological responses to handling in common dentex (*Dentex dentex* Linnaeus, 1758). *Aquaculture Research*, 36, 33-40.

Morgan, L.D., Iwama, G.K., 1991. Effects of salinity on growth, metabolism and ion regulation in juvenile rainbow and steelhead trout (*Oncorhynchus myskiss*) and fall Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 48, 2083-2094.

Rozati, S.A., Haghi, N., Avarjeh, S., 2014. Hematological changes by temperature and salinity stresses in common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal Physiology and Biotechnology Aquaculture*, 2, 54-63.

Saravanan, M., Prabhu-Kumar, K., Ramesh, M., 2011. Hematological and biochemical responses of freshwater teleost fish *Cyprinus carpio* (Actinopterygii: Cypriniformes) during acute and chronic sub lethal exposure to lindane. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 100, 206-211.

Summerfelt, S.T., Sharrer, M.J., Tsukuda, S.M., Gearheart, M., 2009. Process requirements for achieving full-flow disinfection of recirculating water using ozonation and UV irradiation. *Aquaculture Engineering*, 40, 17-27.

Tanck, M.W.T., Booms, G.H.R., Eding, E.H., Bonga, S.E., Komen, J., 2000. Cold shocks: a stressor for common carp. *Journal of Fish Biology*, 57, 881-894.

Tango, M.S., Gagnon, G.A., 2003. Impact of ozonation on water quality in marine recirculation systems. *Aquaculture Engineering*, 29, 125-137.

Torrecillas, S., Makol, A., Caballero, M.J., Montero, D., Gines, R., Sweetman, J., Zquierdo, M.S., 2011. Improved feed utilization, intestinal mucus production and immune parameters in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides (MOS). *Aquaculture Nutrition*, 17, 223-233

Zhian, H., 2008. Usage of ozonation on water treatment. *Human and Environment Journal*, 7, 19-33.

Archive of SID

www.SID.ir