

"مقاله پژوهشی"

تعیین اثر میزان آب برگشتی بر شاخص‌های رشد و برخی فراسنجه‌های خونی فیل ماهی (*Huso huso*) پرورشی در سیستم آب برگشتی

علی حسین پور زلتی^{۱*}، میر حامد سید حسنی^۱، رضوان الله کاظمی^۱، تورج سهرابی^۱

۱- انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱/۲۵

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۲۲

چکیده

مطالعه حاضر با هدف تعیین تاثیر میزان آب برگشتی بر شاخص‌های رشد و برخی فراسنجه‌های خونی فیل ماهیان پرورشی در سیستم آب برگشتی در قالب یک طرح کاملاً تصادفی شامل ۵۰ درصد آب ورودی و ۵۰ درصد آب برگشتی (R_{50})، ۲۰ درصد آب ورودی و ۸۰ درصد آب برگشتی (R_{80}) و فاقد آب برگشتی (R_0) اجرا گردید. تعداد ۱۸۰ قطعه فیل ماهی پرورشی با میانگین وزنی $(66/68 \pm)$ گرم (۶۱۶۲/۷۱ گرم) انتخاب و در ۹ حوضچه بتنی به مدت ۸ ماه پرورش یافتند. ماهیان به طور ماهانه بیومتری و در پایان دوره پرورش از ماهیان نمونه خون تهیه گردید. در پایان دوره پرورش بیشترین میانگین وزن نهایی $(3/79 \pm 1390/8/15)$ گرم، درصد افزایش وزن بدن $(8/75 \pm)$ ۴/۱۲۹ درصد، نرخ رشد ویژه $(0/02 \pm 0/34)$ گرم و ضریب چاقی $(0/01 \pm 0/72)$ گرم و کمترین ضریب تبدیل غذا $(2/64 \pm 1/13)$ گرم در ماهیان گروه ۸۰ درصد آب برگشتی (R_{80}) مشاهده گردید که دارای اختلاف معنی‌دار با ماهیان گروه فاقد آب برگشتی (R_0) بود ($p < 0.05$). نتایج فراسنجه‌های خونی نشان داد که میزان درصد گلبول‌های سفید و درصد نوتروفیل در تیمار ۸۰ درصد (R_{80}) به طور معنی‌داری از تیمار ۵۰ درصد آب برگشتی (R_{50}) و فاقد آب برگشتی (R_0) به طور معنی‌داری بالاتر بود ($p < 0.05$). با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان پیشنهاد نمود که پرورش فیل ماهیان در دامنه وزنی پروراری تا مرحله پیش مولدین (۱۴ کیلوگرم) با استفاده از سیستم آب برگشتی به نسبت ۲۰ درصد آب ورودی و ۸۰ درصد آب برگشتی نه تنها موجب کاهش رشد و آسیب‌های هماتولوژی نمی‌گردد، بلکه سبب ارتقاء بهره‌وری آب و افزایش راندمان تولید می‌شود.

کلمات کلیدی: فیل ماهی، فراسنجه‌های خونی، سیستم آب برگشتی.

مقدمه

در میان ۵ گونه ماهیان خاویاری موجود در منطقه خزر جنوبی، فیل ماهی بدلیل رشد نسبتاً سریع، امکان تولیدمثل در شرایط اسارت، تامین لارو و بچه ماهی با هزینه کمتر در مقایسه با سایر گونه های خاویاری گونه مناسبی برای پرورش گوشتی به شمار (فلاحکار و همکاران، ۱۳۹۹) و به عنوان گونه اصلی پرورشی در نظر گرفته شده است. در حال حاضر پرورش این ماهی به طور عمده در حوضچه های بتنی با سیستم جریان آب گردش باز انجام می شود (یزدانی ساداتی و همکاران، ۱۳۹۷). تخمین زده می شود که در این روش میزان آب مصرفی در پرورش متراکم ماهیان خاویاری ۱۰ لیتر بر ثانیه، به ازای هر تن تولید و یا به عبارتی مصرف ۳۱۵ مترمکعب آب به منظور تولید یک کیلوگرم گوشت باشد (پورکاظمی و همکاران، ۱۳۸۷). این در حالی است که کشور ایران در زمره کشورهای کم آب است (محمدجانی و یزدانیان، ۱۳۹۳) و مصرف آب در سال های اخیر رشد فزاینده ای داشته و آثار هشداردهنده آن با توجه به کاهش سطح آب زیرزمینی، کاهش سطح دریاچه ها و خشکی مرداب ها آشکارتر شده است (پیکران مانا و همکاران، ۱۳۹۸). از این رو، محققین در صدد کاهش آب مصرفی از طریق باز گردش آن در سیستم پرورش همراه با حفظ کیفیت از طریق ایجاد فیلترهای فیزیکی، شیمیایی و بیوشیمیایی هستند (Hussan et al., 2019). بر این اساس، دو سیستم باز (جریان گذر) و سیستم های آبرزی پروری بازگردشی (RAS) یا دارای آب برگشتی تعریف شده است (Timmons and Losordo, 1994; Summerfelt et al., 2004a, b). در سیستم های پرورشی باز، آب تازه ورودی، تنها یک (یا نهایتاً دو)

مرتبه درون سیستم مورد استفاده قرار می گیرد. در مقابل، در سیستم های بازگردشی، آب درون سیستم گردش نموده و بر حسب طراحی سیستم، درصدی از آب تعویض و تصفیه می شود که بر اساس میزان بازگردش، سطح فن آوری و واحدهای تصفیه ای موجود، دو سیستم بازگردشی نسبی (آب برگشتی) و بازگردشی کامل (مدار بسته) تعریف شده است (Timmons and Losordo, 1994). در یک سیستم بازگردشی کامل (مدار بسته)، تقریباً بیشتر ترکیباتی که توسط ماهی به آب افزوده می شود با انجام تیمارهایی (ترسیب، فیلتراسیون فیزیکی، فیلتر زیستی، ضد عفونی، تهویه و اکسیژن دهی) در واحدهای مجزای تصفیه ای حذف می شود. اما در ایران، به دلیل هزینه های گزاف سرمایه گذاری و پیچیدگی، این تصفیه در ساختار کامل پیاده نمی شود. درواقع، یک سیستم بازگردشی نسبی در ایران شامل واحدهای ترسیب مواد، تصفیه فیزیکی و هوادهی یا اکسیژن دهی است و اگرچه استفاده از سیستم بازگردشی نسبی موجب کاهش ۵۰ درصدی مواد معلق جامد، حذف گازهای مضر و در نهایت کاهش مصرف آب مصرفی تا حد قابل توجهی می گردد (Brinker et al., 2005)، اما به دلیل بازگردش آب در سیستم های بازگردشی نسبی (Timmons and Losordo, 1994; Roque d'Orbcastel et al., 2009)، احتمال دارد حساسیت ماهی را نسبت به عوامل استرسزا و عوامل بیماریزا افزایش و بر مصرف غذا، رشد و سلامت اثر سوء داشته باشد (Ellis et al., 2002; North et al., 2006 a,b). در خصوص بررسی عوامل نامساعد محیطی بر فیزیولوژی ماهی، مطالعات زیادی ثابت کرده است که پروفایل سلول های خونی

یک ماهی پرورشی می‌تواند وضعیت فیزیولوژیک و سلامتی آن ماهی را نشان دهد، به طوری که از شاخص‌های خونی به‌دست آمده همراه با سایر روش‌های تشخیص معمول می‌توان برای شناسایی و ارزیابی شرایطی که باعث استرس و بروز بیماری‌های تا "ثیرگذار بر میزان تولید آبزیان استفاده نمود (Pavlidis et al., 2007) شاخص‌های خون‌شناسی در ماهیان شامل هماتوکریت (Hct)، غلظت هموگلوبین (Hb)، گلبول قرمز (RBC) و گلبول سفید (WBC)، تعداد پلاکت‌ها (PLT)، حجم سلول‌های بسته‌بندی شده (PCV)، حجم متوسط گلبول قرمز (MCV)، وزن متوسط هموگلوبین موجود در یک گلبول قرمز (MCH)، غلظت متوسط هموگلوبین‌های قرمز (MCHC) و میزان رسوب آن می‌باشد (Grant, 2015). این شاخص‌ها نظارت بر وضعیت بهداشتی و درمانی ماهی را در مراحل تولید مثل، شرایط تغذیه، تراکم پرورش (Burgos-Aceves et al., 2010) و بخصوص عوامل استرس‌زای محیطی (تغییرات نیتريت، نیترات، اکسیژن، دی اکسید کربن و مواد جامد معلق) را امکان‌پذیر می‌کنند (Valero et al., 2018).

پرورش ماهی در سیستم‌های بازگردشی طی سال‌های اخیر رو به گسترش بوده ولی اثرات استفاده از آب برگشتی به خوبی مشخص نیست. به‌همین جهت، همیشه نگرانی پیرامون اثرات واقعی استفاده از آب برگشتی بر رشد و سلامت ماهیان پرورشی وجود داشته و تا کنون، مطالعات اندکی در این خصوص صورت گرفته و اطلاعات بسیار ناچیزی پیرامون جنبه‌های متفاوت پاسخ ماهی به آن وجود دارد که از آن جمله می‌توان به مطالعه نکوئی‌فرد و همکاران (۱۳۹۱) در مورد افزایش تولید در واحد سطح مزارع

پرورش ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان با تا "کید بر سیستم‌های هوادهی و تصفیه فیزیکی آب برگشتی، مطالعه معصومی و همکاران (۱۳۹۸) با عنوان اثرات سطوح مختلف عصاره یوکا (عصاره یوکا، پودر ۱۰۰ درصد طبیعی است که به طور کامل از ساقه و برگ گیاه یوکا شیدایگرا استخراج و دارای خواص آنتی‌اکسیدانی می‌باشد) بر عملکرد رشد، ایمنی غیراختصاصی و کیفیت آب محیط پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در سیستم بازگردشی آب و مطالعه زاهدی و همکاران (۱۳۹۸)، در مورد مقایسه پارامترهای رشد، هورمون کورتیزول و بیان ژن‌های مرتبط با استرس و رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در دو سیستم باز و بازگردشی اشاره نمود. در صورتی که مطالعه‌ای در زمینه استفاده از سیستم بازگردشی نسبی آب در پرورش فیل ماهی صورت نپذیرفته است. هدف از تحقیق حاضر، تعیین اثر سطوح و درصدهای مختلف میزان آب برگشتی بر شاخص‌های رشد و خونی در شرایط مشابه مزارع پرورش ماهیان خاویاری بود.

مواد و روش‌ها

پرورش و تغذیه ماهیان

جهت اجرای پروژه از ۱۸۰ عدد فیل ماهی پرورشی با میانگین وزنی $61/68 \pm 6162/71$ گرم استفاده شد. ماهیان پرورشی پس از زیست‌سنجی اولیه در یک طرح کاملاً تصادفی بدون دارا بودن اختلاف معنی‌دار در شاخص وزن در حوضچه‌های بتنی به قطر ۳/۸ متر؛ مساحت ۱۱/۳ متر مربع، عمق آبگیری ۱/۶ متر، حجم آب ۱۶ متر مکعب در سه تیمار آزمایشی به ترتیب گروه شاهد بدون آب برگشتی (R_0)، ۵۰ درصد آب ورودی و ۵۰ درصد آب برگشتی (R_{50}) و ۲۰ درصد

آب ورودی و ۸۰ درصد آب برگشتی (R_{80}) رهاسازی شدند. پرورش و تغذیه ماهیان ۸ ماه ادامه یافت و در طی این مدت با جیره اکستروود (GFS_4) ماهیان خاویاری شرکت فرادانه تغذیه شدند. میزان غذادهی برحسب دمای آب، $0.07 - 0.05$ درصد وزن بدن در دو نوبت صبح و عصر بود. غذادهی با دست انجام شد.

سیستم و شرایط فیزیکی و شیمیایی

اساس و پایه این سیستم در هر یک از حوضچه‌های آزمایشی دو جریان ورودی بود، که یک جریان مربوط به آب تازه و یک جریان دیگر مرتبط با آب برگشتی بود. کل جریان آب برگشتی جهت انجام تبدلات گازی (حذف گازهای مضر و افزایش اکسیژن) و اکسیداسیون و ترسیب احتمالی آهن موجود در آب چاه از برج هوادهی (صافی‌های پلاستیکی سه طبقه) عبور می‌کرد تا به شکل قطرات آب در حوضچه محل تجمع آب تصفیه، جمع‌آوری و از آن‌جا مجدداً وارد چرخه گردش آب شود. تیمار اول با صد درصد آب تازه چاه آبرسانی می‌شد، در تیمار دوم یک لیتر بر ثانیه آب تازه و یک لیتر بر ثانیه آب برگشتی و در هر یک از تکرارهای تیمار سوم 0.04 لیتر بر ثانیه آب تازه و $1/6$ لیتر بر ثانیه آب برگشتی جریان داشت. دبی آب ورودی هر یک از حوضچه‌های پرورشی ۲ لیتر بر ثانیه و تعداد دفعات تعویض آب با توجه به حجم آب هر حوضچه حدود ۱۰ بار در طی شبانه روز (۲۴ ساعت) در نظر گرفته شد. جهت تأمین کل آب برگشتی مورد نیاز پروژه به میزان $8/6$ لیتر بر ثانیه و برقراری جریان آبی مورد نظر از دو عدد الکتروپمپ سه اینچ (برای مکش حاصل از آب های خروجی ۶ حوضچه واقع در مدار آب برگشتی و هدایت آن به محفظه درام فیلتر و

همچنین برای دهش آب تصفیه‌شده از درام فیلتر و ایجاد جریان ورودی آب برگشتی برای حوضچه‌های تحت تیمار آب برگشتی) استفاده شد. از بین شاخص‌های فیزیکی و شیمیایی آب سه مورد، اکسیژن محلول به عنوان پارامتر کلیدی کیفیت آب (North et al., 2006)، دما و pH (Wuertz et al., 2006) انتخاب شدند. دمای آب و pH توسط دستگاه دیجیتال WTW (مدل Weilheim PH 330i ساخت آلمان) و میزان اکسیژن محلول با استفاده از اکسی‌متر دیجیتال WTW (مدل Weilheim PH 330i ساخت آلمان) با دقت 0.01 بطور هفتگی (۳ بار در طول هفته) اندازه‌گیری شد.

جدول ۱: مشخصات جیره غذایی فرادانه (مقدار به درصد)

نوع	پروتئین	چربی	فیبرخام	خاکستر	رطوبت	فسفر
GFS_4	۴۰	۲۰	۳	۱۰	۱۰	$1/3$

زیست سنجی ماهیان

ماهیان بطور ماهانه و ۸ بار بیومتری شدند. ۲۴ ساعت قبل از زیست سنجی غذادهی قطع، آب مخازن به نصف کاهش داده شد و طول و وزن ماهیان پس از بیهوش شدن با پودر گل میخک (150 ppm) (حلاجیان و همکاران، ۱۳۹۰) با استفاده از یک تخته بیومتری با دقت 0.1 سانتیمتر و ترازوی دیجیتال با دقت ۵ گرم محاسبه شد.

محاسبه شاخص‌های رشد بر اساس فرمول‌های زیر محاسبه گردید:

شاخص چاقی (CF) = $100 \times (\text{وزن ماهی} / \text{طول کل})^3$ (Rónyai et al., 1990)

به منظور انجام مطالعات سرولوژی، خون موجود در ویال‌های ایندورف (فاقد ماده ضد انعقاد) توسط دستگاه سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه بمدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و به منظور تعیین شاخص‌های هماتولوژیک نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل شدند. تعداد گلبول‌های قرمز و سفید و شمارش افتراقی گلبول‌های سفید (لنفوسیت، نوتروفیل، مونوسیت و ائوزینوفیل) با استفاده از لام هماسیتومتر نتوبار (Barcellos *et al.*, 2003) اندازه‌گیری شد (کازمی و همکاران، ۱۳۸۹). مقدار هموگلوبین خون به روش کالری‌متریک سیانوهموگلوبین و به وسیله محلول معرف با طول موج ۵۴۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفوتومتر (Jenway, 6505-UCV/VIS, England) و با استفاده از کیت (Pars Azmun, Karaj, Iran) بر حسب گرم در دسی‌لیتر محاسبه شد. حجم متوسط گلبول قرمز (MCV)، غلظت متوسط هموگلوبین (MCH) و میانگین غلظت متوسط هموگلوبین گلبول‌های قرمز (MCHC) بر اساس فرمول‌های زیر محاسبه گردید (Potki *et al.*, 2018).

$$MCV (fl) = (Hct / RBC) \times 10$$

$$MCH (pg \text{ cell}^{-1}) = (Hb / RBC) \times 10$$

$$MCHC (gdL^{-1}) = (Hb / Hct) \times 100$$

تجزیه و تحلیل آماری

به منظور بررسی توزیع نرمال داده‌ها در گروه‌ها و تکرارها جهت تشکیل تیمارها از آزمون Shapiro-Wilk استفاده شد. در صورت نرمال بودن داده‌ها به منظور مقایسه آماری بین گروه‌ها در تیمارها از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه (Oneway ANOVA) و پس از انجام آزمون Test of Homogeneity of Variances جهت مقایسه گروه‌ها با یکدیگر از آزمون

افزایش وزن (WG) (گرم) = وزن نهایی - وزن اولیه (Qinghui *et al.*, 2004)
درصد افزایش وزن بدن (BWI) (درصد) = $100 \times$ (میانگین وزن نهایی - میانگین وزن اولیه) / (میانگین وزن اولیه) (Rónyai *et al.*, 1990)
ضریب رشد ویژه (SGR) (درصد در روز) = $100 \times$ [(لگاریتم وزن نهایی - لگاریتم وزن اولیه) / مدت زمان آزمایش] (Qinghui *et al.*, 2004)
ضریب تبدیل غذایی (FCR) = کل غذای خورده شده (گرم) / افزایش وزن کسب شده (گرم) (Rónyai *et al.*, 1990)

مطالعات خون‌شناسی

خون‌گیری و تهیه سرم

به منظور ارزیابی شاخص‌های خونی و سرمی، در پایان دوره پرورش، نسبت به خون‌گیری از تیمارهای مختلف و گروه شاهد اقدام گردید. بدین منظور از هر تکرار تعداد ۴ عدد ماهی بطور تصادفی انتخاب و خون‌گیری به وسیله سرنگ ۵ سی‌سی از طریق ورید ساقه دمی واقع در پشت باله مخرجی با حداقل میزان دستکاری و استرس انجام گرفت. لازم به توضیح است که در هنگام خون‌گیری از مواد بیهوش‌کننده به علت احتمال تأثیر بر شاخص‌های خونی استفاده نگردید (Torrecillas *et al.*, 2011).

از نمونه‌های خون جمع‌آوری شده، مقدار ۱/۵ سی‌سی برای جداسازی سرم در ویال‌های ایندورف فاقد ماده ضد انعقاد هپارین و ۰/۵ سی‌سی نیز توسط سرنگ‌های آغشته به هپارین در ویال‌های ایندورف ریخته شد.

دانکن استفاده شد. کلیه آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۶ انجام شد و جهت رسم نمودارها از نرم افزار ۲۰۱۰ Excel استفاده شد.

نتایج

شاخص های رشد

نتایج شاخص های رشد در جدول ۱ ارائه شده است. در وزن نهایی اختلاف معنی داری بین تیمارهای آب برگشتی و تیمار فاقد آب برگشتی (R_0) مشاهده گردید، بطوری که بیشترین وزن نهایی (1390.8 ± 15.79 و 1359.49 ± 10.45 گرم) در ماهیان پرورش یافته در آب برگشتی (R_{80}) و (R_{50}) مشاهده شد که اختلاف معنی دار با تیمار فاقد آب برگشتی ($p < 0.05$) داشت. بیشترین درصد افزایش وزن بدن در تیمار ۸۰ درصد (R_{80}) (129.40 ± 8.75) بود که با تیمار ۵۰ درصد (R_{50})

($2/37 \pm 117/85$) فاقد اختلاف معنی دار آماری و با گروه شاهد (R_0) ($5/74 \pm 106/92$) دارای اختلاف معنی دار آماری بود ($p < 0.05$). کمترین و بیشترین ضریب تبدیل غذا به ترتیب در ماهیان تیمار ۸۰ درصد (R_{80}) ($2/22 \pm 0/09$) و گروه شاهد (R_0) ($0/13 \pm 2/64$) مشاهده شد ($p < 0.05$). ماهیان پرورش یافته در مخازنی که دارای ۸۰ درصد تعویض آب بودند (R_{80})، (بیشترین نرخ رشد ویژه $0/34 \pm 0/02$) اختلاف معنی داری نسبت به گروه فاقد تعویض آب (R_0) را دارا بودند ($p < 0.05$). اختلاف معنی داری در این شاخص در دو گروه (R_{80}) و (R_{50}) مشاهده نشد ($p > 0.05$). ضریب چاقی بین تیمارها ($0/72 \pm 0/01$) فاقد اختلاف معنی دار، اما با گروه شاهد ($0/68 \pm 0/006$) دارای اختلاف آماری معنی داری بود ($p < 0.05$).

جدول ۲: شاخص های رشد فیل ماهیان با سطوح و درصد های مختلف آب برگشتی در دوره پرورشی ۸ ماهه

شاخص های رشد	شاهد (R_0)	تیمار ۵۰ درصد (R_{50})	تیمار ۸۰ درصد (R_{80})
وزن اولیه (سانتیمتر)	$6168/33 \pm 46/31$	$6243/70 \pm 132/33$	$6075/14 \pm 163/37$
وزن نهایی (گرم)	$12760/17 \pm 6/62^b$	$13595/49 \pm 10/45^a$	$13908/15 \pm 3/79^a$
طول اولیه (سانتیمتر)	$102/42 \pm 0/42$	$104/02 \pm 0/52$	$102/97 \pm 1/49$
طول نهایی (گرم)	$122/87 \pm 0/51$	$123/64 \pm 0/96$	$123/05 \pm 0/81$
درصد افزایش وزن (گرم)	$106/92 \pm 5/74^b$	$117/85 \pm 2/37^{ab}$	$129/40 \pm 8/75^a$
ضریب تبدیل غذایی	$2/64 \pm 0/13^a$	$2/44 \pm 0/07^{ab}$	$2/22 \pm 0/09^b$
نرخ رشد ویژه	$0/29 \pm 0/01^b$	$0/30 \pm 0/004^{ab}$	$0/34 \pm 0/02^a$
ضریب چاقی	$0/68 \pm 0/006^b$	$0/72 \pm 0/01^a$	$0/72 \pm 0/01^a$

حروف انگلیسی متفاوت در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی دار آماری است ($p < 0.05$).

شاخص های خونی

اختلاف معنی داری در میزان گلبول قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت، MCHC، MCH، MCV در سرم خون ماهیان مشاهده نشد ($p > 0.05$)، میزان لنفوسیت در گروه R_{80} نسبت به دو تیمار دیگر (R_0 و R_{50}) اندکی کاهش

یافت ($P > 0.05$). اما با افزایش تعویض آب میزان گلبول سفید و نوتروفیل افزایش یافت. بیشترین درصد گلبول های سفید و درصد نوتروفیل در تیمار ۸۰ درصد بود که با تیمار ۵۰ درصد و گروه شاهد دارای اختلاف معنی دار بود ($p < 0.05$).

جدول ۳: تغییرات شاخص‌های هماتولوژیک فیل ماهیان با سطوح و درصد‌های مختلف آب برگشتی در دوره پرورشی ۸ ماهه

شاخص‌های رشد	شاهد (R ₀)	تیمار ۵۰ درصد (R ₅₀)	تیمار ۸۰ درصد (R ₈₀)
تعداد گلبول‌های سفید (۱۰ ^۳ میکرولیتر)	۳۴۵۸/۳۰ ± ۶۲/۱۰ ^b	۳۶۶۶/۷۰ ± ۱۳۱/۶۱ ^b	۴۳۷۵ ± ۲۲۱/۹۴ ^a
تعداد گلبول‌های قرمز (۱۰ ^۳ میکرولیتر)	۶۳۶/۷۵ ± ۱۳/۸۶	۶۳۴/۷۵ ± ۱۴/۴۹	۶۳۴/۷۵ ± ۱۱/۸۵
هموگلوبین (گرم بر دسی لیتر)	۶/۳۰ ± ۰/۱۳	۶/۴۱ ± ۰/۱۵	۶/۴۰ ± ۰/۱۱
هماتوکریت (درصد)	۲۷/۳۳ ± ۰/۵۹	۲۷/۵ ± ۰/۶۳	۲۷/۲۵ ± ۰/۵۴
MCV (فمتولیت)	۴۲۷/۴۲ ± ۳/۵۳	۴۳۲/۹۲ ± ۲/۷۴	۴۲۸/۹۲ ± ۲/۶۹
MCH (پیکوگرم در سلول)	۹۸/۳۳ ± ۰/۸۶	۱۰۰/۵۰ ± ۰/۷۶	۱۰۰/۳۳ ± ۰/۷۶
MCHC (گرم بر دسی لیتر)	۲۳/۰۸ ± ۰/۰۹	۲۳/۲۸ ± ۰/۰۷	۲۳/۵۴ ± ۰/۱۰
لنفوسیت (درصد)	۸۳/۲۵ ± ۰/۴۵	۸۰/۵۸ ± ۰/۸۵	۷۸/۶۷ ± ۰/۷۳
نوتروفیل (درصد)	۱۲/۲۵ ± ۰/۳۰ ^c	۱۴/۰۸ ± ۰/۵۴ ^b	۱۵/۵۸ ± ۰/۴۷ ^a
مونوسیت (درصد)	۴/۱۷ ± ۰/۲۷	۴/۴۲ ± ۰/۳۶	۴/۹۲ ± ۰/۳۱
اوتوزینوفیل (درصد)	۰/۳۳ ± ۰/۱۴	۰/۹۲ ± ۰/۲۳	۰/۸۳ ± ۰/۲۴

حروف انگلیسی متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری است ($p < 0.05$)

بحث

نتایج مقایسه شاخص‌های رشد فیل ماهیان نشان داد که در پایان دوره پرورش اختلاف معنی‌داری در شاخص‌های رشد در میان تیمارهای مختلف مشاهده نشد و حتی برخی شاخص‌های رشد به طور معنی‌داری در تیمار ۸۰ درصد از گروه شاهد بیشتر بود. در صورتی که عدم کارایی در سیستم‌های آب برگشتی موجب کاهش اکسیژن و افزایش آمونیاک (یکی از خطرناک‌ترین ترکیبات و ضایعات نیتروژنی برای ماهیان) می‌شود (Murray et al., 2014). فراهم آوردن اکسیژن محلول برای ماهی در پرورش متراکم امری الزامی است، زیرا غلظت‌های پایین اکسیژن موجب بی‌اشتهایی، استرس تنفسی، کمبود اکسیژن بافت و در نهایت مرگ می‌گردد. براساس فرضیه Pauly (۱۹۸۱) زمانی که موجودی اکسیژن برای نیازهای اکسیژنی کافی نباشد ماهی خورن غذا را متوقف می‌کند و در کمبود اکسیژن یا هیپوکسی کاهش مصرف غذا می‌تواند راهی برای کاهش مصرف انرژی و کاهش نیاز به اکسیژن باشد

(Van Dam and Pauly, 1995) و در نهایت با کاهش

تغذیه سلامت ماهی را تحت تأثیر قرار داده و در درازمدت موجب مرگ می‌گردد (Wu, 2002). هر چند آزمایشات انجام شده در خصوص توانایی تحمل اکسیژن فیل ماهی نشان داده است که این ماهی در مدت ۸ هفته آزمایش توانایی بالایی برای مقابله با شرایط اکسیژنی کم دارد (باقرزاده و همکاران، ۱۳۹۴)، اما پرورش طولانی مدت ماهیان خاویاری با شرایط کمبود اکسیژن موجب کاهش رشد و احیاناً مرگ و میر آنها می‌گردد (Maxime et al., 1995). معمولاً در سیستم RAS بازیافت اکسیژن آب برگشتی از طریق گذراندن آن از بیوفیلتر جهت حذف گازهای مضر و ضد عفونی با اشعه ماورای بنفش (UV)، تزریق اکسیژن خالص و ترکیبی از هر دو انجام می‌شود (Goddek et al., 2019)، اما در سیستم طراحی شده در آزمایش حاضر آب خروجی از مخازن پرورش وارد درام فیلتر شده، در آن مواد فیزیکی و بالای ۸۰ میکرون فیلتر و در مرحله بعد جهت تبادل گازی وارد برج هواده و در انتها

تزریق اکسیژن روی آن انجام می گرفت. نتایج حاصل از بررسی میزان اکسیژن محلول در تیمارهای ۵۰ درصد آب ورودی و ۵۰ درصد آب برگشتی (R_{50})، ۲۰ درصد آب ورودی و ۸۰ درصد آب برگشتی (R_{80}) و فاقد آب برگشتی (R_0) نشان از آن داشت که مقادیر اکسیژن در این تیمارها در محدوده ۷ تا ۸ میلی گرم در لیتر قرار داشت که حد مطلوبی برای ماهیان خاویاری به شمار می آید (Hochleithner, 1993). آمونیاک یکی از خطرناک ترین ترکیبات و ضایعات نیتروژنی برای ماهیان است. سمیت آمونیاک بستگی به مقدار آمونیاک غیر یونیزه در آب داشته و وابسته به pH، درجه حرارت و شوری آن است. در محیط های طبیعی آمونیاک در روند رشد ماهیان خللی ایجاد نمی کند چون در توده آب پراکنده و حل می گردد و از سمیت آن در آب های طبیعی و اسیدی ($pH > 9$) کاسته می شود (Barton, 1996). اما در سیستم های پرورش متراکم در فرایند تغذیه نیتروژن بصورت زوائد متابولیتی وارد آب حوضچه های پرورش ماهی شده و در چرخه باکتریایی، نیتروژن اسیدهای آمینه، معدنی شده و به آمونیاک تبدیل می شوند (Dima et al., 2009). مطالعاتی نشان داده است که افزایش آمونیاک آب و به تبع آن کاهش pH در سیستم های آب برگشتی منجر به بروز استرس و افزایش دی اکسید کربن در خون (hypercapnia) گونه های ماهی خاردار اروپایی (*Dicentrarchus labrax*) (Lemarie et al., 2000)، تاسماهی سفید (*Acipenser transmontanus*) (Crocker and Cech, 1996) و کاهش رشد در ماهی کاد (*Gadus morhua*) می گردد. واکنش اولیه ماهی به افزایش آمونیاک در آب ایجاد استرس است (Wedemeyer, 1996). شواهدی در دست است که

مصرف غذا در قزل آلاهی رنگین کمان در هنگام افزایش غلظت آمونیاک کاهش می یابد (Wicks and Randall, 2002) که باعث کاهش و یا توقف مصرف غذا می شود. در مراحل بعد افزایش آمونیاک می تواند کشنده بوده و موجب کاهش روند رشد گردد، به طوری که در شرایط محصور اگر میزان آمونیاک به ۲ میلی گرم برسد موجب کاهش رشد و در صورت رسیدن به ۶/۵ میلی گرم در لیتر می تواند موجب بروز سمیت در ماهی گردد (Hellawell, 1986). این در حالی است که ضریب تبدیل غذا در ماهیان پرورش یافته در مخازن ۸۰ درصد آب برگشتی در مقایسه با مخازن فاقد آب برگشتی به طور معنی داری بالاتر بود که نشان دهنده خود پالاندگی مناسب فیلترهای مکانیکی از طریق گذراندن آن از درام فیلتر، برج هواده و تزریق اکسیژن به آن بود.

با وجود تمام این موارد نکوئی فرد و همکاران (۱۳۹۱) در تحقیقی به بررسی تاثیر استفاده مجدد از آب برگشتی بر شاخص های رشد و بازماندگی ماهی قزل آلاهی رنگین کمان (*Onchorhynchus mykiss*) پرداخته و به این نتیجه رسیدند که افزایش درصد جایگزینی آب در جریان استخرهای پرورش ماهی قزل آلاهی رنگین کمان با آب برگشتی سبب افزایش معنی دار در ضریب تبدیل غذایی، کاهش معنی دار در میزان بازماندگی و ضریب چاقی، افزایش معنی دار در میزان تلفات و در نهایت کاهش تولید می گردد. برگشت آب ورودی در سیستم بازگردشی در مطالعه زاهدی و همکاران (۱۳۹۸)، موجب کاهش ۶/۵ درصد وزن کل ماهیان طی دوره ۶۰ روزه شد. همچنین اگر چه طی مطالعه ۷۷ روزه روی قزل آلاهی رنگین کمان، تغییرات معنی داری در وزن کل طی بازه

زمانی ۱ تا ۵۶ روز آزمایش بین دو سیستم باز و بازگردشی کامل مشاهده نشد، اما در بازه زمانی ۵۷ تا ۷۷ روز، ۱۷ درصد وزن ماهی در تیمار باز کاهش یافت (Roque d'Orbcastel et al., 2009 a,b). که آن را به افزایش استرس ناشی از تغییر در پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب (آمونیاک و pH آب) نسبت دادند، در صورتی که به عقیده نگارندگان مقاله حاضر تفاوت‌های فردی گونه‌ای را نباید از نظر بدور داشت. مطالعات Raffatnezhad و همکاران (۲۰۰۸) نشان داد که فیل ماهی پرورش یافته در تراکم بالا و شرایط نامساعد محیطی بر تاسماهی دریایچه‌ای (*Acipenser fluvescens*) که در تراکم‌های بالا دچار تلفات سنگین می‌شود برتری داشته و بر این نکته اذعان داشت که رشد پارامتر مناسبی در عکس العمل ماهی به شرایط نامساعد محیطی به شمار می‌آید (Salmon and Armstrong, 2002) و می‌تواند به عنوان یک شاخص در استرس‌های اجتماعی و محیطی به کار رود (Bolasina et al., 2006). به نظر می‌رسد که فیل ماهی در یک سیستم بازگردشی نسبی شامل واحدهای ترسیب مواد، تصفیه فیزیکی و هوادهی یا اکسیژن‌دهی از رشد مناسبی برخوردار است و یا می‌تواند خود را با شرایط موجود سازگار نموده و به رشد بالاتر و ضریب تبدیل غذایی بهتر دست یابد.

نتایج به دست آمده از شاخص‌های خونی موید نتایج به دست آمده از شاخص‌های رشد ماهی در این آزمایش است. شمارش افتراقی گلبول‌های سفید (لنفوسیت، مونوسیت، ائوزینوفیل و نوتروفیل) تغییرات معنی‌داری را بین تیمارها و گروه شاهد نشان نداد. تعداد گلبول‌های قرمز، میزان هموگلوبین، درصد هماتوکریت و شاخص‌های وابسته به گلبول قرمز (MCH، MCV و

MCHC) در بین تیمارها و گروه شاهد تغییرات معنی‌داری نداشت که بیانگر واکنش‌های نرمال و طبیعی و پاسخ‌های مثبت فیزیولوژیک این شاخص‌های خونی در شرایط متفاوت محیطی است که با افزایش درصد آب برگشتی تغییرات معنی‌داری در آنها بوجود نیامده است. این پارامترها تحت‌تاثیر عوامل فیزیولوژیک (Luskova, 1995) و عوامل خارجی (Shama and Shi, 1985) دچار تغییر می‌شوند، ولی در این مطالعه برغم پیدایش شرایط محیطی غیرهمسان (افزایش درصد و میزان آب برگشتی) در شرایط ثبات و پایداری قرار داشتند که این وضعیت مناسب را شاید بتوان به قدرت بالای سازگاری این گونه مقاوم در برابر شرایط سخت محیطی، سن، وزن و اندازه ماهی نسبت داد.

اما درصد گلبول‌های سفید و درصد نوتروفیل در تیمار ۸۰ درصد (R_{80}) به طور معنی‌داری از تیمار ۵۰ درصد آب برگشتی (R_{50}) و فاقد آب برگشتی (R_0) بالاتر بود. Akinwande و همکاران (۲۰۰۴) اظهار داشتند که افزایش تعداد گلبول‌های سفید ماهی یا حیوانات تابعی از ایمنی و مقاومت حیوانات در برابر بیماری یا بیماری‌های آسیب‌پذیر است، به‌طوری که افزایش گلبول‌های سفید در این آزمایش می‌تواند به‌عنوان یک واکنش در ارتقای سیستم ایمنی غیراختصاصی قلمداد شود که موجب افزایش مقاومت ماهی در مقابل عوامل استرس‌زا و بیماری‌ها (Firouzbakhsh et al., 2011) و یک پاسخ فیزیولوژیک به استرس آبی ماهی به‌شمار آید که در ادامه پرورش ماهی با اقدامات مدیریتی از قبیل سیفوناژ بیشتر روزانه، قطع یا کاهش غذادهی و اعمال مدیریت بهداشتی سیستم دوباره به حالت پایداری خواهد رسید.

بعنوان نتیجه گیری کلی شاید بتوان اذعان کرد که بدلیل تعویض نسبتا مناسب آب در طی شبانه روز (حدود ۱۰ بار)، نرمال بودن بودن تراکم نهایی (۲۵ کیلوگرم در متر مربع) و وزن زی توده نهایی، سبب پیدایش شرایط جدی استرس زای محیطی تا پایان دوره پرورشی حتی در سطح ۸۰ درصد آب برگشتی نشده و می توان نتیجه گرفت استفاده از آب برگشتی به مقدار ۸۰ درصد، برای پرورش فیل ماهیان از وزن ۶ تا ۱۴ کیلوگرم بدون کاهش معنی دار در رشد و تغییرات فراسنجه های خونی امکان پذیر است.

سپاسگزاری

نگارندگان مراتب سپاس خود را از آقایان علی هوشیار، آرش شهباری، مجید مرواری و غلام نجفی که پرورش و تغذیه ماهیان را بر عهده داشتند ابراز می دارند.

منابع

۱. باقرزاده لاکانی، ف.، ستاری، م.، کاظمی، ر.، یزدانی ساداتی، م.ح.، پوردهقانی، م.، عشوری، ق.، ۱۳۹۴. اثرات هیپوکسی، نورموکسی و هیپوکسی بر فاکتورهای هماتولوژی و پارامترهای بیوشیمیایی خون دو گروه وزنی از فیل ماهی پرورشی. مجله اقیانوس شناسی، ۲۲(۲)، ۵۹-۶۸.
۲. پور کاظمی، م.، بهمنی، م.، پرند آور، م.، مهدی نژاد، ک.، توکلی، م.، محسنی، م.، کاظمی، ر.، شناور ماسوله، ع.، نوروز فشخامی، م.ر.، زارع گشتی، ق.، ۱۳۸۷. برنامه محصولی ماهیان خاویاری، موسسه تحقیقات شیلات ایران، ۳۳۴ صفحه.

۳. پیکران مانا، ن.، یوسفی جوردهی، ا.، بهمنی، م.، عبدالملکی، ش.، جلیل پور، ج.، پزند، ج.، علیزاده، م.، سهرابی، ت.، فلاح شجاعی، م.، عاشوری، ع.، حسین نیا، آ.، اصغری، آ.، رضاخواه، ف.، ترکمانی، ح.، ۱۳۹۸. مولدسازی فیل ماهی (*Huso huso*) پرورشی با استفاده از آب لب شور دریای خزر در حوضچه های بتونی. دو فصلنامه ترویجی ماهیان خاویاری، ۳(۲)، ۹-۲۳.

۴. حلاجیان، ع.، کاظمی، ر.، یوسفی، آ.، اثر پودر گل میخک بر مدت زمان بیهوشی و بازگشت از بیهوشی در فیلمای پرورشی ۴ ساله (*Huso huso*). مجله شیلات دانشگاه آزاد اسلامی واحد آزادشهر، ۵(۲)، ۱۳۳-۱۴۰.

۵. فلاحتکار، ب.، رازگردانی شرایی، ع.، پوراسدی، م.، رضوی صیاد، آ.، مکتت خواه، ب.، رحمتی، م.، عفت پناه، آ.، ۱۳۹۹. اثر توام دوره نوری و زمان غذادهی بر عملکرد رشد فیلمای (*Huso huso*). نشریه علمی توسعه آبرزی پروری، ۲(۱۴)، ۸۳-۹۳.

۶. زاهدی، س.، اکبرزاده، آ.، مهرزاد، ج.، نوری، آ.، هرسیچ، م.، ۱۳۹۸. مقایسه پارامترهای رشد، هورمون کورتیزول و بیان ژنهای مرتبط با استرس و رشد ماهی قزل الای رنگین کمان (*Onchorhynchus mykiss*) در دو سیستم باز و گردشی. نشریه پژوهش های ماهی شناسی کاربردی، ۳(۷)، ۱۲۴-۱۰۹.

۷. نکویی فرد، ع.، مناف فر، ر.، مطلبی، ع.، شریفیان، م.، ۱۳۹۱. توانایی بسترهای مختلف نشست باکتریایی تصفیه آب در سیستم های مدار بسته آبریان، مجله علمی شیلات ایران، ۳(۲۱)، ۱۲۴-۱۳۶.

14. Bolasina, S., Pérez, A., Yamashita, Y., 2006. Digestive enzyme activity during ontogenetic development and effect of starvation in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 252, 503–515.
15. Brinker, A., Koppe, W., Rosch, R., 2005. Optimized effluent treatment by stabilized trout feces. *Aquaculture*, 249, 125-144.
16. Burgos-Aceves, M.A., Campos-Ramos, R., Guerrero-Tortolero, D.A., 2010. Description of peripheral blood cells and differential blood analysis of captive female and male leopard grouper (*Mycteroperca rosacea*) as an approach for diagnosing diseases. *Fish Physiology and Biochemistry*, 36, 1263-1269.
17. Crocker, C.E., Cech, J. R., 1996. The effects of hypercapnia on the growth of juvenile white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Aquaculture*, 147, 293–299.
18. Dima, R. C., Patriche, N., Marilena T., Magdalena, T., Desimira M. D., 2009. Physico-chemical limitative factors for growth and development in sterlet (*Acipenser ruthenus* linnaeus, 1758) in extensively system. *lucrări științifice Zootehnie și Biotehnologii*, 42, Timisoara.
19. 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.
20. Firouzbakhsh, F., Khales, M.K., Jani-Khalili, K., 2011. Effects of a probiotic, protexin, on the growth performance and hematological parameters in the Oscar (*Astronotus ocellatus*) fingerlings. *Fish Physiology and Biochemistry*, 37, 833-842.
21. Goddek, S., J., Joycc, A., Kotzen, B., 2019. Aquaponics food production systems. In: Brunel, G.M (Eds). *Aquaponics: Closing the Cycle on Limited Water, Land and Nutrient Resources*. Switzerland, Springer publishing. 619p.
22. Grant, K.R., 2015. Fish hematology and associated disorders. *Clinical North American Exotic Animal Practice*, 18, 83-103.
۸. یزدانی ساداتی، م.ح.، سید حسنی، م.ح.، شکوریان، م.، کاظمی، ر.، حسین پورزلفتی، ع.، ۱۳۹۷. مقایسه شاخص‌های رشد پیش مولدین فیل ماهی به منظور تولید گوشت، پرورش یافته در محیط استخرهای بتنی و استخرهای خاکی. نشریه توسعه آبرزی پروری، ۱ (۱۲). ۹۹-۱۱۱.
۹. محمد جانی، ا.، یزدانیان، ن.، ۱۳۹۳. تحلیل وضعیت بحران آب در کشور و الزامات مدیریت آن. فصلنامه روند، ۶۵ (۲۱). ۱۱۷-۱۴۴.
۱۰. معصومی، س.ح.، آدینه، ح.، هرسیج، م.، جعفریان، ح.، قلی پور کنعانی، ح.، ۱۳۹۸. اثرات سطوح مختلف عصاره یوکا (*Yucca schidigera*) بر عملکرد رشد، ایمنی غیر اختصاصی و کیفیت آب محیط پرورش ماهی قزل‌الای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در سیستم باز گردشی، نشریه علوم آبرزی پروری ایران، ۷ (۱). ۸۰-۶۸.
11. Akinwande, A.A., Moody, F.O., Sogbesan, O.A., Ugwumba, A.A.A., Ovie, S.O., 2004. Haematological response of *Heterobranchius longifilis* fed varying dietary protein levels. *Proceeding of the 19 th Annual Conference of the Fisheries Society of Nigeria, Ilorin*, 29 th rd Nov – 3 December 2004 715.
12. Barcellos, L.J., Kreutz, L.C., Rodrigues, L.B., Fioreze, I., Quevedo, R.M., Cericato, L., Soso, A.B., Fagundes, M., Lacerda, L., Terra, S., 2004. Haematological and biochemical characteristics of male jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard Pimelodidae): changes after acute stress. *Aquaculture research*, 34, 1456-1469.
13. Barton, B.A., Peter, R.E., Paulencu, C.R., 1980. Plasma cortisol levels of fingerling rainbow trout (*Salmo gairdneri*) at rest, and subjected to handling, confinement, transport, and stocking. *Canadian Journal of fish Aquaculture Science*, 37, 805-811.

33. Potki, N., Falahatkar, B., Alizadeh, A., 2018. Growth, hematological and biochemical indices of common carp (*Cyprinus carpio*) fed diets containing corn gluten meal. *Aquaculture International*, 26, 1573-1586.
34. Qinghui, A., Kangsen, M., Chunxiao, Z., Qingyuan, D., Beiping, T., Zhiguo, L., 2004. Effect of dietary vitamin C on growth immune response of Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*). *Aquaculture*, 242, 489-500.
35. Roque d'orbcastel, E., Person-Le Ruyet, J., Le Bayon, N., Blancheton, J.P., 2009b. Comparative growth and welfare in rainbow trout reared in recirculating and flow through rearing systems. *Aquaculture Engineering*, 40, 79-86.
36. Rónyai, A., Ruttkay, A., Varadi, L., Peteri, A., 1990. Growth of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri* B.) and that of its both hybrids with the sterlet (*Acipenser ruthenus* L.) in recycling system. In *Acipenser Premier Colloque International Sur l'esturgeon*, Bordeaux, CEMAGREF (pp. 423-427).
37. Rafatnezhad, S. B., Falahatkar, M., Tolouei, M., 2008. Effects of stocking density on hematological parameters, growth and fin erosion of great sturgeon (*Huso huso*) juveniles. *Aquaculture Research*, 39, 1506-1513.
38. Roque d'Orbcastel, E., Person-Le-Ruyet, J., Le Bayon, N., Blancheton, J.P., 2009a. Comparative growth and welfare in rainbow trout reared in re-circulating and flow through rearing systems. *Aquacultural Engineering*, 40 (2), 79-86.
39. Roque d'orbcastel, E., Blancheton, J.P., Aubin, J., 2009b. Towards environmentally sustainable aquaculture: comparison between two trout farming systems using Life Cycle Assessment. *Aquacultural Engineering*, 40(3), 113-119
40. Sloman, K.A., Armstrong, J.D., 2002. Physiological effects of dominance hierarchies: laboratory artifact's or natural phenomena. *Journal of Fish Biology*, 61, 1-23.
41. Shama, T. J., Shi, B.D., 1985. Effects of asphyxiation on some hematology values of
23. Hellawell, J.M., 1986. *Biological Indicator of Freshwater Pollution and Environmental Management*, Elsevier Applied Science Publishers, London, 509pp.
24. Hochleithner, M., Gessner, J., 1999. *The Sturgeon and Paddlefishes (Acipenseriformes) of the world*, Biology and Aquaculture. Aqua Tech Publications, 212 pp.
25. Hussan, J., Adhikari, S., Das, A., Hoque, F., Pillai, B.R., 2019. Fish culture without water. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 7, 39-48.
26. Lemarié, G., Dutto, G., Le Roux, A., Lemoalle, J., Maxime, V., Person-Le Ruyet, J., 2000. Long-term effects of pH and carbon dioxide on growth and feed efficiency in European seabass. In: Flos, R et al. (Ed.) *Responsible Aquaculture in the New Millennium: abstracts of contributions presented at the international Conference AQUA 2000*, Nice, France, May 2-6, EAS Special Publication, 208: pp: 384.
27. Luskova, V., 1995. Determination of normal values in fish. *Acta university carolinae Biological*, 39, 191-200.
28. Maxime, V., Nonnotte, G., Peyraud, C., Williot, P., Truchot, J.P., 1995. Circulatory and respiratory effects of hypoxic stress in the Siberian sturgeon. *Respiration Physiology*, 100, 203-212.
29. Murray, F., Bostock, J., Fletcher, M., 2014. Review of RAS technologies and their commercial application. Final report. Available at <http://www.hie.co.uk>.
30. North B.P., Turnbull J.F., Ellis T., Porter M.J., Migaud, H., Bron, J., Bromage, N.R., 2006b. The impact of stocking density on the welfare of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 255, 466-479.
31. Pauly, D., 1981. The relationship between gill surface area and growth performance in fish: a generalization of von Bertalan theory of growth. *Berichte der Deutschchen Wissenschaftlichen Kommission fur Meeresforschung*, 28, 251- 282.
32. Pavlidis, M., Futter, W.C., Kathario, P., Divanach, P., 2007. Blood cells of six Mediterranean mariculture fish species. *Journal of Applied Ichthyology*, 23, 70-73.

50. Wu, R. S.S., 2002. Hypoxia. from molecular responses to ecosystem response. Marine Pollution Bulletin 45, 35-45.

Noemacheilus capicula. International Journal Acud Ichthyology Modinagar, 6, 1-2, India.

42. Summerfelt, S.T., Wilton, G., Roberts, D., Savage, T., Fonkalsrud, K., 2004a. Developments in recirculating systems for arctic char culture in North America. Aquaculture Engineering, 30, 31-71.

43. Summerfelt, S.T., Davidson, J.T., Waldrop, T., Tsukuda, S., Bebak-Williams, J., 2004b. A partial reuse system for coldwater aquaculture. Aquaculture Engineering, 31, 157-181.

44. Timmons, M.B., Losordo, T.M., 1994. Aquaculture Water Reuse Systems: Engineering, Design and Management. Elsevier, Amsterdam, the Netherlands. 348p.

45. Torrecillas, S., Makol, A., Caballero, M.J., Montero, D., Robaina, L., Real, F., Sweetman, J., Tort, L. and Izquierdo, M.S., 2007. Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. Fish and Shellfish Immunology, 23(5), 969-981.

46. Valero, Y., Mokrani, D., Chaves-Pozo, E., Arizcun, M., Oumouna, M., Meseguer, J., Esteban, M.Á., Cuesta, A., 2018. Vaccination with UV-inactivated nodavirus partly protects European sea bass against infection, while inducing few changes in immunity. Development Comparative Immunology, 86, 171-179.

47. Van Dam, A.A., Pauly, D., 1995. Simulation of the effect of oxygen on food consumption and growth of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture research, 26, 427-440.

48. Wedemeyer, G.A., 1996. Interactions with water quality conditions in physiology of fish in intensive culture systems. Chapman and Hall, New York, 302 p.

49. Wicks, B.J., Randall, D.J., 2002. The effect of sub-lethal ammonia exposure on fed and unfed rainbow trout: the role of glutamine in regulation of ammonia. Comparative Biochemistry and Physiology, 132, 275-285.