

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، دانشکده 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 هیأت علمی گروه علوم و مهندسی محیط زیست، دانشکده 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 مجموعه مواد اکسیدکننده و احیاءکننده در آب می‌باشد. این شاخص علاوه بر این که 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 60 ± 5 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 آزون‌دهی توسط دستگاه آزون‌ساز به صورت روزانه تنظیم و اندازه‌گیری ORP نیز با دستگاه ORP متر دیجیتال انجام گردید. بر اساس نتایج، با افزایش سطح ORP در تیمارها، میزان هورمون کورتیزول خون ماهیان در تیمارهای آزون‌دهی شده افزایش یافته و تفاوت معنی‌داری ($P \leq 0.05$) 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 COD، BOD و نیترات به طور 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 کلی نتایج تحقیق نشان داد که دامنه ORP در محدوده 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 احیاء، شاخص‌های خون‌شناسی، هورمون کورتیزول، آزون‌دهی.

۱. مقدمه

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). آزن به علت داشتن نیمه عمر پایین و پایین بودن عوارض زیست محیطی، به‌عنوان یکی از مناسب‌ترین مواد ضد عفونی کننده کاربردهای مفید و متعددی در آبی‌پروری دارد (Monzavi, 2008) و از آن جایی که بسیاری از آلاینده‌های موجود در آب مورد استفاده برای آبی‌پروری، به‌راحتی اکسید می‌شوند، آزن می‌تواند در برنامه‌های کنترل کیفیت آب اعم از حذف مواد جامد، کاهش نیتريت و تجزیه مواد آلی و کنترل بار باکتریایی استفاده شود (Chen *et al.*, 1993). فرایند آزندی 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 آزندی در مباحث بهبود کیفیت آب، در صورتی که شدت آزندی 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 کاهش باشد که این وضعیت به دامنه بهینه زیست مساعد آبزیان و خصوصیات تطابقی آنها بستگی دارد (Morgan and Iwama, 1991). بررسی فاکتورهای خون‌شناسی و هورمونی

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 اکسید کننده در محیط بیشتر باشد، این پارامتر مثبت و وقتی که مواد احیا کننده در محیط بیشتر باشد، منفی است. این پارامتر علاوه بر این که 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 دامنه 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 آزن 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 آزون‌دهی 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 اکسید کننده و مواد اکسید شونده می‌توان اثرات 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 زیست محیطی و آبی‌پروری، آزن به‌عنوان یک ماده اکسید کننده قوی

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 هپارین به 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 پارافیلیم پوشانده شده و نمونه‌های حاوی پلاسما در دمای 4°C - و نمونه‌های موجود در ویال تا زمان بررسی در دمای 4°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 ۱۴۰۰ rpm 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:

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

فرمول ۲:

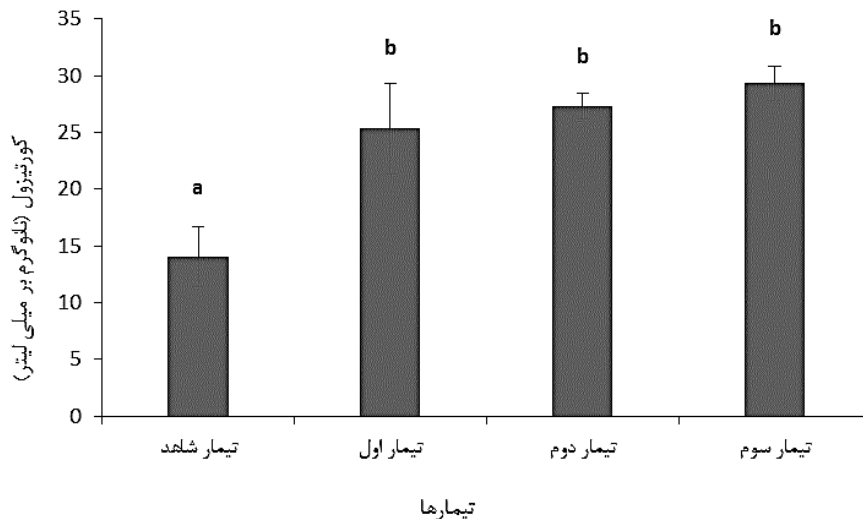
شاخص‌هایی جهت ارزیابی سلامت زیستی آبزیان می‌باشد (Chen *et al.*, 2004) که می‌توانند در بررسی اثرات استرسی آزن‌دهی و سطح بالای ORP مورد استفاده قرار گیرند. بر اساس یافته‌های Lee و همکاران (۲۰۱۴) مکانیسم فیزیولوژیکی و بیولوژیکی اثرگذاری ORP بر آبزیان بطور دقیق مطالعه نشده است و نیاز به تحقیقات بیشتری دارد. 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، گونه کپور معمولی به عنوان ماهی مدل زیستی انتخاب گردید و سطوح مختلف ORP آب بر شاخص‌های خون‌شناسی و هورمون کورتیزول آن و همچنین فاکتورهای فیزیوشیمیایی آب مورد بررسی قرار گرفت.

۲. مواد و روش‌ها

۲.۱. تهیه ماهیان مورد نیاز تحقیق و طراحی آزمایش

تعداد ۷۲ قطعه ماهی کپور معمولی با وزن متوسط 5 ± 6 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 به مدت یک هفته ماهیان با تراکم ۶ قطعه در هر مخزن در معرض ۴ تیمار ORP با سطوح ۲۵۰-۳۰۰ (تیمار شاهد)، ۳۰۰-۳۵۰ (تیمار اول)، ۳۵۰-۴۰۰ (تیمار دوم) و ۴۰۰-۴۵۰ (تیمار سوم) میلی‌ولت و با سه تکرار در مخازن ۷۰ لیتری به مدت چهار هفته قرار گرفتند. برای تنظیم سطوح ORP از یک دستگاه مولد آزن با خروجی ۵۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. در طول دوره آزمایش، ماهیان روزانه به مقدار حدود ۳ درصد زی-توده بدن و دو بار با غذای کپورماهیان تهیه شده از شرکت فرادانه شهرکرد غذادهی شدند. میانگین دمای تیمارها در طول دوره آزمایش 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد بود و تلفات ماهیان نیز روزانه ارزیابی و ثبت گردید.

۲.۲. خون‌گیری از ماهیان و آنالیز فاکتورهای



شکل ۱- تغییرات (میانگین \pm انحراف معیار) هورمون کورتیزول (نانوگرم بر میلی لیتر) در خون ماهیان کپور معمولی در تیمارهای مختلف ORP. حروف متفاوت اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد را نشان می دهد.

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

۵.۲. تجزیه و تحلیل داده ها

قبل از انجام آنالیز واریانس، نرمال بودن داده ها با استفاده از آزمون Shapiro-Wilk بررسی شد. داده ها با استفاده از تجزیه واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) مورد آنالیز قرار گرفت. مقایسه میانگین تیمارهای مختلف (با سطح معنی داری $P < 0.05$) با آزمون دانکن و با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ انجام شد.

۳. نتایج

نتایج هورمون کورتیزول خون ماهیان نشان داد

$$MCH \text{ (pg)} = [\text{Hb/RBC (per million)}] \times 10$$

فرمول ۳:

$$MCHC \text{ (\%)} = (\text{Hb/HCT}) \times 100$$

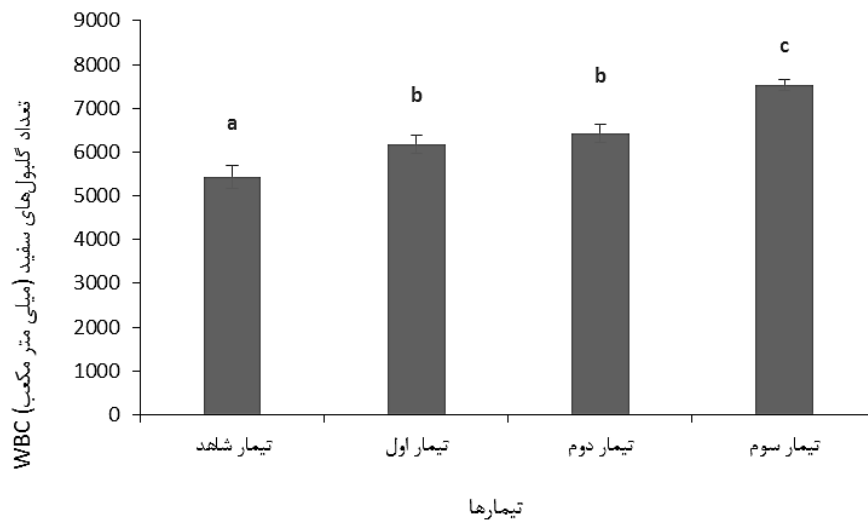
۳.۲. اندازه گیری هورمون کورتیزول خون

اندازه گیری هورمون کورتیزول خون از روش رادیوایمونواسی با استفاده از دستگاه گاما کانتر مدل L.K.B ساخت کشور فنلاند و با به کارگیری کیت های هورمونی ایمونوتک ساخت کشور فرانسه انجام گردید. برای این منظور ابتدا ۱۰ میکرولیتر از پلاسما و ۵۰۰ میکرولیتر از هورمون کورتیزول نشان دار به میکروتیوب های موجود در کیت اضافه و سپس میکروتیوب ها پس از ورتکس شدن، به مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند. پس از آن، محتویات میکروتیوب ها خالی شده و پس از خشک شدن میکروتیوب ها، مقدار تشعشعات گامای آن ها در دستگاه گاما کانتر اندازه گیری گردید.

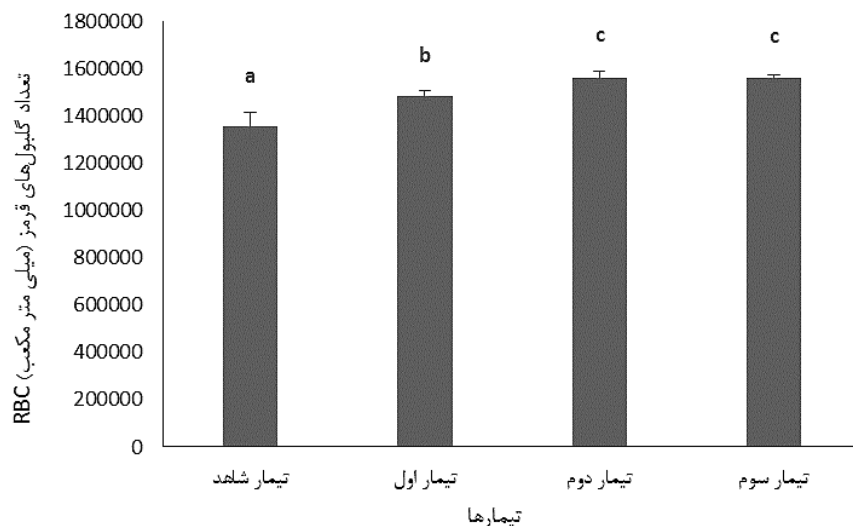
۴.۲. اندازه گیری پارامترهای فیزیکی و شیمیایی

آب مخازن

جهت اندازه گیری فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب شامل COD، BOD، TOC، نیترات و فسفات از تمام مخازن نمونه گیری انجام شد. برای اندازه گیری BOD از دستگاه BOD متر دیجیتال شرکت هانا کشور رومانی مدل HI98193 استفاده شد. برای اندازه



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



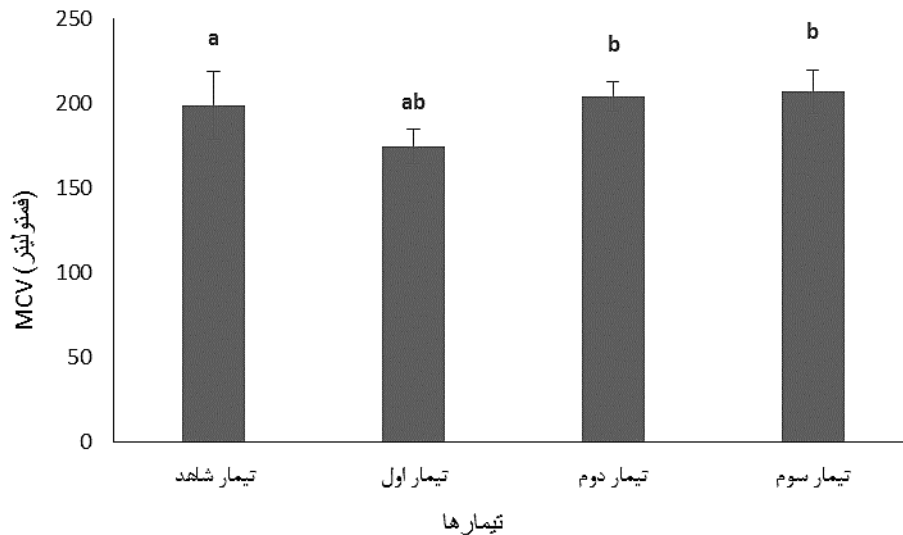
شکل ۳- تغییرات میانگین (میانگین \pm انحراف معیار) تعداد گلبول‌های قرمز خون ماهی کپور معمولی در سطوح مختلف ORP. حروف متفاوت اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد را نشان می‌دهد.

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 معنی‌داری با دو تیمار دیگر داشته و در مورد MCH تیمار شاهد با سه تیمار آزمایشی تفاوت معنی‌دار نشان داد ($P < 0.05$) (شکل‌های ۲-۵ و جدول ۱).

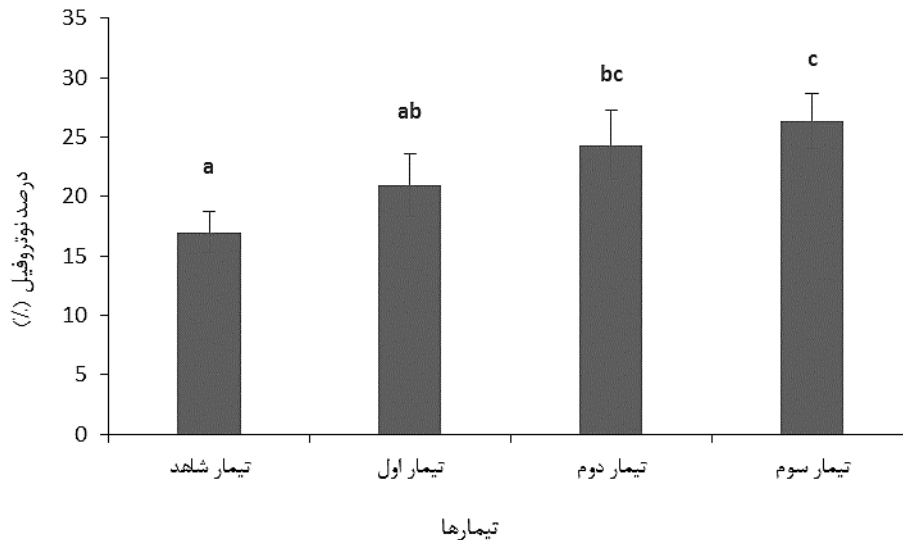
آنالیز فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب شامل پارامترهای COD و BOD نشان داد که با افزایش سطح ORP میزان این دو فاکتور به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد (شکل‌های ۶ و ۷) که بیانگر

که سه تیمار آزمایشی تفاوت معنی‌داری ($P < 0.05$) با تیمار شاهد هستند (شکل ۱). میزان حداکثری و حداقلی هورمون کورتیزول خون به ترتیب 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 دوره 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



شکل ۴ - تغییرات میانگین (میانگین \pm انحراف معیار) حجم متوسط گلبولی خون (فمتولیتتر) ماهی کپور معمولی در سطوح مختلف ORP. حروف متفاوت اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد را نشان می دهد.



شکل ۵ - تغییرات میانگین (میانگین \pm انحراف معیار) درصد نوتروفیل خون ماهی کپور معمولی در سطوح مختلف ORP. حروف متفاوت اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد را نشان می دهد.

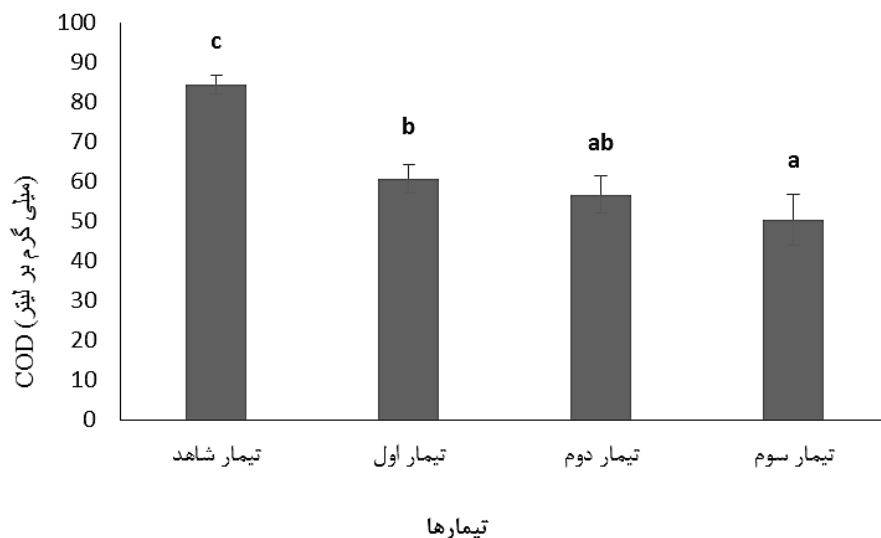
جدول ۱- میانگین (میانگین \pm انحراف معیار) میزان متوسط هموگلوبین گلبولی (MCH)، هماتوکریت (HCT)، هموگلوبین (HB)، غلظت متوسط هموگلوبین داخل گلبول قرمز (MCHC) و مونوسیت در ماهی کپور معمولی. حروف متفاوت در هر ردیف اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد را نشان می دهد.

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

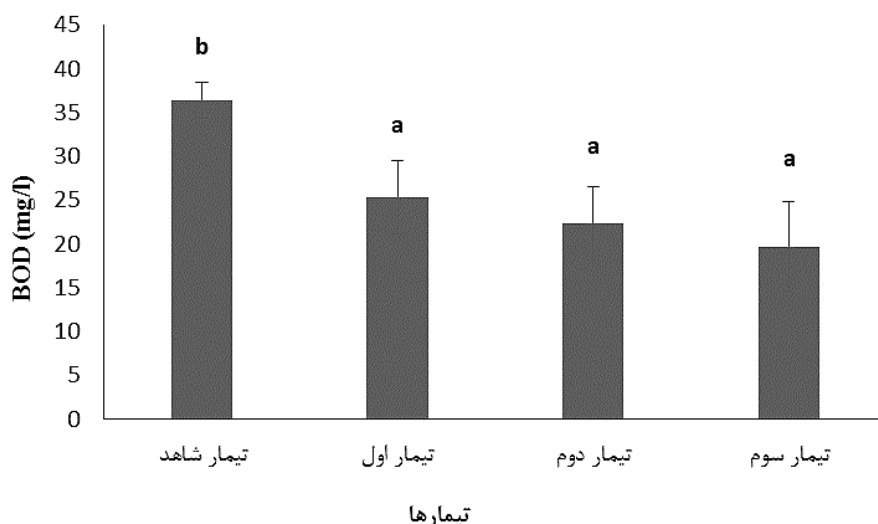
و فسفات در جدول ۲ آورده شده است. مقادیر نیترات در تیمار شاهد اختلاف معنی داری با تیمارهای آزون دهی شده نشان داد، در حالی که دو پارامتر فسفات

اکسیداسیون مواد آلی و مواد شیمیایی توسط آزون می باشد.

نتایج حاصل از آنالیز پارامترهای TOC، نیترات



شکل ۶ - تغییرات میانگین (میانگین \pm انحراف معیار) میزان COD آب مخازن در سطوح مختلف ORP. حروف متفاوت اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد را نشان می دهد.



شکل ۷ - تغییرات میانگین (میانگین \pm انحراف معیار) میزان BOD آب مخازن در سطوح مختلف ORP. حروف غیر مشابه اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد را نشان می دهد.

جدول ۲ - میانگین (میانگین \pm 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 معنی دار در سطح ۵ درصد را نشان می دهد.

پارامترها (میلی گرم بر لیتر)	تیمار اول (شاهد)	تیمار دوم	تیمار سوم	تیمار چهارم
نیترات	$12/3 \pm 1/5^b$	$7/0 \pm 1/7^a$	$5/6 \pm 1/5^a$	$5/0 \pm 2/6^a$
فسفات	$1/4 \pm 0/25$	$1/1 \pm 0/37$	$1/2 \pm 0/49$	$1/1 \pm 0/208$
کربن آلی کل (TOC)	$11/0 \pm 1/7$	$10/3 \pm 3/2$	$10/0 \pm 4/3$	$9/0 \pm 2/6$

کننده در آب بر سلامت زیستی آبزیان، تحقیق حاضر با هدف بررسی تأثیر سطوح مختلف ORP آب با استفاده از آزمون‌دهی، بر شاخص‌های خون‌شناسی، هورمون کورتیزول ماهی کپور معمولی و فاکتورهای فیزیوشیمیایی آب انجام گرفت. پارامترهای خونی به طور گسترده‌ای برای ارزیابی وضعیت سلامت زیستی

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

۴. بحث و نتیجه گیری

با توجه به اهمیت و اثرات مواد اکسیدکننده و احیای

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 روبارویی 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 آزون‌دهی نشان داد که بیان‌گر مواجهه ماهیان با مقدار بالای آزن در تیمارهای دوم و سوم در یک شرایط استرسی است. از طرفی با توجه به این که 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 اندازه بزرگتری به داخل خون آزاد شده‌اند. به‌طور معمول در صورت مواجهه جاندار با شرایط استرس ابتدا تعداد گلبول‌های سفید

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 دوره 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 آزون‌دهی می‌باشد. در شرایط استرس، هورمون (ACTH = Adrenocorticotropic Hormone) مترشح از غده 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 میلی‌ولت 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 میلی‌ولت باعث افزایش مرگ و میر ماهی باس دریایی می‌شود و برای این ماهی سطح ORP فراتر از محدوده ۳۲۰ میلی‌ولت ایجاد واکنش‌های استرسی می‌کند (Li *et al.*, 2014).

فاکتورهای خونی نیز در آبزیان به‌عنوان نشانگرهای فیزیولوژیکی واکنش به استرس استفاده

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). عمده 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 نیتريت 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 سمی تر 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 به 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 دامنه ORP در محدوده 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 corticosteroids. *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 estuarine fish. In: *Fish Medicine*, Stoskopf, 232-239.

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 تصفیه 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 آبی اثرات استرسی و منفی نداشته باشند (Zhian, 2008). آزن یک ترکیب اکسیدکننده قوی بوده و ترکیبات آلی را به وسیله اکسیداسیون مستقیم و یا از طریق رادیکال‌های هیدروکسیل و یا ترکیبی از این رو فرآیند اکسید می‌نماید و نیز یک ضد عفونی کننده بسیار انعطاف‌پذیر است و با اکسید کردن و حذف مواد خطرناک و مضر مانند فنل‌ها، نیترات، آمین‌ها، سیانیدها و سموم کشاورزی و همچنین کاهش BOD و COD در تصفیه و ضد عفونی 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 این رو 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 آزون‌دهی و ORP مقادیر پارامترهای COD و BOD به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. BOD نیز مقدار اکسیژن لازم برای ثبات بیولوژیکی و COD مقدار

- 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. *Chinese 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 mykiss*) 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.
- Torreillas, 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.