



دانشگاه گنبد کاووس

نشریه "پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی"

دوره هفتم، شماره سوم، پاییز ۹۸

<http://jair.gonbad.ac.ir>

## مقایسه پارامترهای رشد، هورمون کورتیزول و بیان ژن‌های مرتبط با استرس و رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) در دو سیستم باز و

### بازگردشی

سعید زاهدی<sup>۱</sup>، آرش اکبرزاده<sup>۲\*</sup>، جلیل مهرزاد<sup>۳</sup>، احمد نوری<sup>۴</sup>، محمد هرسیج<sup>۵</sup>  
<sup>۱</sup>دانش‌آموخته دکتری گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران  
<sup>۲</sup>دانشیار گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران  
<sup>۳</sup>دانشیار گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران  
<sup>۴</sup>استادیار گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران  
<sup>۵</sup>استادیار گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبدکاووس، گنبدکاووس، ایران  
 تاریخ ارسال: ۹۶/۱۰/۲۱؛ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۲۵

#### چکیده

پرورش ماهی در سیستم‌های بازگردشی طی سالهای اخیر رو به گسترش بوده ولی اثرات استفاده از آب برگشتی به خوبی مشخص نیست. هدف از این مطالعه، مقایسه عملکرد رشد، استرس و بیان ژنهای ماهیچه‌ای مرتبط با استرس و رشد قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) در دو سیستم باز و بازگردشی است. به این منظور، قزل‌آلای جوان تمام ماده با تراکم نگهداری ۴۴ کیلوگرم بر مترمربع و تراکم بارگذاری ۱ لیتر بر دقیقه به ازای هر کیلوگرم ماهی در دو سیستم باز (۱۰۰٪ آب تازه ورودی) و بازگردشی (با کاهش ۶۶٪ آب تازه ورودی و جایگزینی آب برگشتی) به مدت ۶۰ روز مورد مطالعه قرار گرفت. غلظت آمونیاک کل در سیستم بازگردشی نسبت به سیستم باز افزایش معنی‌داری نشان داد. نتایج، کاهش معنی‌دار وزن کل ماهیان را در سیستم بازگردشی و به میزان ۶/۵٪ در مقایسه با تیمار سیستم باز نشان داد. در تیمار بازگردشی، طول کل، چنگالی و استاندارد و همچنین، نرخ رشد ویژه، کاهش و ضریب چاقی، افزایش داشت که این اختلافها از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. ضریب تبدیل غذایی افزایش معنی‌داری را در سیستم بازگردشی نسبی نشان داد. مواجهه با آب برگشتی، افزایش مقادیر هورمون کورتیزول خون و بیان ماهیچه‌ای ژن پروتئین شوک حرارتی (HSP70) را

\*نویسنده مسئول:

در تیمار بازگردشی نسبت به تیمار باز موجب شد. هیچ اختلاف معنی‌داری در بیان ماهیچه‌ای ژن‌های فاکتور رشد شبه انسولینی ۱ (IGF-1) و زنجیره سنگین میوزین (MHC) مشاهده نشد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که استفاده از آب برگشتی کاهش اندک برخی از عملکردهای رشد و افزایش میزان استرس ماهی را موجب می‌شود و این کاهش رشد، مجزا از تغییر در بیان ژنهای مرتبط با رشد ماهیچه‌ای بررسی شده در این مطالعه است.

واژه‌های کلیدی: *O. mykiss*، سیستم باز، سیستم بازگردشی، HSP70، IGF-1، MHC

#### مقدمه

بحران جهانی کمبود آب شیرین، تمامی اشکال حیاتی را مورد تهدید قرار داده است و در سال‌های اخیر، به جهت رشد مصارف انسانی، فعالیت‌های بشری و تغییرات اقلیمی رو به تشدید بوده است. از منظر آبی‌پروری نیز، اهمیت کمیت و کیفیت آب بر تمامی جنبه‌های زیست‌شناسی ماهی همچون بقاء، رشد و سلامت و همچنین، ظرفیت حامل مزارع پرورش ماهی به‌طور گسترده‌ای توسط متخصصین و فعالان بخش مورد تأیید قرار گرفته است (Ellis *et al.*, 2002; Blancheton *et al.*, 2007).

فن‌آوری سیستم‌های آبی‌پروری بازگردشی (RAS)<sup>۱</sup>، در سال‌های اخیر رشد و توسعه چشمگیری در جهان به‌ویژه کشورهای توسعه یافته داشته است. در این نوع از سیستم‌ها، فقط درصد اندکی از آب موجود تعویض می‌شود و مابقی آب مورد نیاز، از تصفیه و بازگردش فاضلاب خروجی از استخرها تأمین می‌شود (Timmons and Losordo, 1994). در حالی که در سیستم باز، آب ورودی فقط یک مرتبه از داخل استخرها عبور داده می‌شود. سیستم‌های بازگردشی ظرفیت‌های جدیدی را با کاهش نیازمندی به آب تازه ورودی، ارتقاء امنیت زیستی کارگاه و سلامت ماهیان و نیز تولید سازگار با محیط زیست ایجاد کرده است (Roque d'Orbcastel *et al.*, 2009 a,b; Summerfelt *et al.*, 2004 a,b). توسعه این شیوه پرورشی کاملاً منطبق با خشک‌سالی‌های اخیر کشور و در نتیجه کاهش دبی منابع آبی، آلودگی روز افزون آب‌های جاری، ضرورت حفظ محیط زیست و افزایش توجیه اقتصادی مزارع پرورش ماهی می‌باشد.

در سیستم بازگردشی، ظرفیت تولیدی به ازای واحد سطح بایستی بالا باشد که مستلزم تراکم نگهداری<sup>۲</sup> بالا در مخازن یا استخرهای پرورشی می‌باشد تا هزینه‌های سرمایه‌ای بالای مرتبط با طراحی و ساخت چنین تأسیساتی جبران شود (Roque d'Orbcastel *et al.*, 2009a,b). تراکم نگهداری

1- Recirculating aquaculture systems (RAS)

2- Stocking density

به‌صورت زی‌توده به ازای واحد حجم آب تعریف می‌شود. همچنین، حفظ شرایط رشدی بهینه در سیستم بازگردشی امری ضروری است چراکه سود خالص تا حد زیادی به زی‌توده تولیدی وابسته بوده که عملکردی از سرعت رشد ماهی و تراکم نگهداری می‌باشد (Andrade *et al.*, 2015). از طرف دیگر، افزایش تراکم نگهداری، به‌عنوان یک عامل استرس‌زای مزمن، باعث ایجاد استرس، کاهش رشد و کاهش کیفیت آب همچون کاهش اکسیژن و تجمع مدفوع ماهیان، آمونیاک، دی‌اکسید کربن، نیتريت و متابولیت‌های باکتری‌ها می‌شود (Timmons and Losordo, 1994; Roque d'Orbcastel *et al.*, 2009a,b). بازگردش آب در سیستم‌های بازگردشی نیز، باعث کاهش کیفیت آب سیستم می‌شود. کاهش کیفیت آب تولید استرس نموده و حساسیت ماهیان نسبت به بیماری‌ها را می‌افزاید و بر مصرف غذا، رشد و سلامت ماهیان اثر سوء دارد (Ellis *et al.*, 2002; North *et al.*, 2006a,b).

در یک سیستم بازگردشی کامل (مدار بسته)، تقریباً بیشتر ترکیباتی که توسط ماهی به آب افزوده می‌شود با انجام تیمارهایی (ترسیب، فیلتراسیون فیزیکی، فیلتر زیستی، ضد عفونی، تهویه و اکسیژن‌دهی) در واحدهای مجزای تصفیه‌ای حذف می‌شود. اما در ایران، به‌دلیل هزینه‌های سرمایه‌ای بالا و پیچیدگی، این سیستم‌ها به‌طور کامل اجرا نمی‌شود و در واقع، یک سیستم بازگردشی نسبی<sup>۱</sup> شامل واحدهای ترسیب مواد، تصفیه فیزیکی و هوادهای یا اکسیژن‌دهی وجود دارد. مطالعه پاسخ ماهیان به عوامل استرس‌زا و تغییرات شرایط محیطی در سطح ژن‌ها، اطلاعات دقیق‌تری را نسبت به دیگر مطالعات به‌دست می‌دهد. انجام این نوع از مطالعات در سطح بیان ژن‌های مرتبط با رشد مهم است به‌ویژه در بافت ماهیچه سفید که هدف اصلی در آبی‌پروری است (Videler, 2011). پروتئین‌های شوک حرارتی<sup>۲</sup> (HSPs) خانواده‌ای از پروتئین‌های سلولی با حفاظت بسیار بالا هستند و در بین آنها، HSP70 عضو تأثیرگذاری است که بسیاری از اعمال مختلف سلولی همچون ترمیم و انهدام پروتئین‌های تغییرشکل یافته یا تخریب‌شده را برعهده دارد (Basu *et al.*, 2002) و از آسیب یا آتروفی ماهیچه‌ای در پاسخ به عوامل استرس‌زای محیطی جلوگیری می‌کند (Iwama *et al.*, 2004). به‌علاوه، فاکتورهای رشد شبه انسولینی<sup>۳</sup> (IGFs) نقش کلیدی در رشد و نمو تمامی مهره‌داران همچون ماهیان برعهده دارند و مسیر هشداری IGF به‌ویژه IGF-1 برای تنظیم رشد و نمو ماهیچه‌ای و حفظ هموستازی بافت‌های ماهیچه‌ای بالغین بسیار مهم است (Duan *et al.*, 2010). مطالعه‌ای که روی بیان ژن بچه‌ماهیان کفشک سنگال (*Solea senegalensis*) انجام شد، کاهش بیان ژن IGF-1 را در کبد و HSP70 را در کبد و کلیه طی ۶۰ روز نگهداری در تراکم بالا نشان داد (Salas-Leiton *et al.*, 2010).

1. Partial RAS
2. Heat shock proteins
3. Insulin-like growth factors (IGFs)

همچنین میوزین<sup>۱</sup> (شامل دو زیرواحد زنجیره سنگین (MHC)<sup>۲</sup> و ۴ زیرواحد زنجیره سبک (MLC)<sup>۳</sup>) به‌عنوان فراوانترین و مهمترین عضو ساختاری عضله اسکلتی تلقی می‌شود و امروزه به‌عنوان شاخص مناسبی برای مطالعات رشدی به‌ویژه رشد عضله در ماهیان معرفی شده است (Overturf and Hardy, 2001).

گزارشاتی وجود دارد که قزل‌آلای پرورش یافته در سیستم‌های بازگردشی نسبی، کاهش رشد و حساسیت به بیماری را در مقایسه با ماهیان پرورش‌یافته در سیستم باز از خود نشان می‌دهند. با توجه به ضرورت حرکت به سمت سیستم‌هایی با تولید و فن‌آوری بالاتر و دغدغه‌های بسیاری از تولیدکنندگان پیرامون اثرات مبهم استفاده از آب برگشتی بر رشد و سلامت ماهی، این مطالعه به بررسی اثر استفاده از آب برگشتی بر استرس و رشد در سن پرورشی می‌پردازد که به‌طور عمده همراه با تجربه تراکم‌های بالاتر می‌باشد. هدف از تحقیق حاضر، مقایسه یک سیستم بازگردشی نسبی با کاهش ۶۶٪ آب تازه ورودی و جایگزینی آب برگشتی به جای آن (دو بار بازگردش آب) با یک سیستم باز با تراکم پرورشی و تراکم بارگذاری یکسان در محیط کارگاهی بر برخی از پارامترهای رشد، هورمون کورتیزول (به‌عنوان شاخص استرس) و بیان ژن‌های ماهیچه‌ای مرتبط با استرس (HSP70) و رشد (IGF-1 و MHC) در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

در ابتدا، تخم چشم‌زده تمام ماده قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) از شرکت آکوالند فرانسه در تیرماه سال ۱۳۹۵ خریداری شده و به کارگاه حدواسط صدف<sup>۲</sup> (شهرستان کاشمر) منتقل گردید. پس از تفریح تخم‌ها تا وزن یک گرم در محیط سرپوشیده نگهداری شدند. بچه‌ماهیان حاصله به استخرهای آبراه‌ای مرکز در محیط باز منتقل و تا مرحله جوانی ( $270 \pm 8$  گرم) نگهداری و ماهیان در بهمن ماه سال ۱۳۹۵ جهت انجام آزمایش اصلی به مرکز حدواسط و پرورش قزل‌آلای رنگین‌کمان صدف<sup>۱</sup> واقع در شهرستان تربت حیدریه منتقل شدند. پس از انجام آداپتاسیون مقدماتی، ماهیان در استخرهای هشت ضلعی مرکز با تراکم تقریبی ۱۲ کیلوگرم در مترمربع ذخیره‌سازی شدند. طی بازه‌های زمانی آداپتاسیون و آزمایش، ماهیان به مقدار ۱/۳٪ زی‌توده و دو بار در روز با خوراک اکستروود قزل‌آلای رنگین‌کمان (اسکرتینگ، ایتالیا)، به‌صورت دستی تغذیه شدند.

1. Myosin
2. Myosin heavy chain (MHC)
3. Myosin light chain (MLC)
4. Loading density

استخرهای مذکور از جنس سیمان، با حجم کل  $4/5$  مترمکعب، نسبت قطر به عمق  $3$  به  $1$ ، جریان گردشی منطبق بر عقربه‌های ساعت و یک لوله زهکش به صورت مرکزی بودند که فقط به میزان  $2500$  لیتر آبیگیری شدند (عمق  $0/7$  متر). پس از حدود  $4$  هفته آداپتاسیون و در روز شروع آزمایش، ماهیان (میانگین وزنی  $10 \pm 4/5$  گرم و میانگین طول  $1/1 \pm 33/1$  سانتی‌متر) به دو نوع سیستم از نوع باز و بازگردشی نسبی با استخرهای هشت ضلعی مشابه مرحله آداپتاسیون، منتقل و با تراکم یکسان  $40$  کیلوگرم بر مترمکعب و تراکم بارگذاری مشابه  $1$  لیتر بر دقیقه به ازای هر کیلوگرم ماهی، زمان ماند هیدرولوژیکی  $20$  دقیقه و در سه تکرار ذخیره‌سازی شدند.

آب ورودی هر دو سیستم از آب چشمه (درجه حرارت  $13/5$  درجه سانتی‌گراد، پی‌اچ  $7/2$  و هدایت الکتریکی  $700$  میکروموس بر سانتی‌متر) کارگاه تأمین می‌گردید که قبل ورود به سوله، در حوضچه ذخیره آب، توسط دو دستگاه اسپلش تحت هوادهی و تهویه قرار می‌گرفت. در سیستم باز، آب ورودی پس از خروج از استخر، به زهکش اصلی منتقل می‌شد. در سیستم دوم یا سیستم بازگردشی نسبی، آب ورودی به هر استخر به میزان  $66\%$  کاهش و بجای آن، برای ثابت نگهداشتن تراکم بارگذاری، از آب برگشتی خود همان استخرها استفاده می‌شد.

در این سیستم آب خروجی، قبل از بازچرخش و ورود مجدد به همان استخرها، به ترتیب وارد حوضچه ترسیب، واحد فیلتراسیون مکانیکی (میکرواسکرین فیلتر  $100$  میکرونی) و استخر هوادهی (توسط دیفیوزر) شده و پس از پمپاژ روی برجک هوادهی به داخل استخر پمپاژ مجدد می‌شد. در داخل استخرهای هر دو سیستم نیز هوادهی توسط سنگ هوا متصل به پمپ دمنده هوا انجام می‌شد. تراکم نگهداری مورد آزمون پس از رسیدن به  $44$  کیلوگرم بر مترمربع حفظ گردید که نزدیک به بیشینه تراکم‌های استخرهای فاقد اکسیژن‌دهی در کشور می‌باشد. به منظور حفظ تراکم، تعداد معینی از ماهیان به طور هفتگی و با انجام زیست‌سنجی از استخرها خارج می‌شدند. آزمایش به مدت دو ماه پس از انتقال به سیستم باز و بازگردشی نسبی ادامه یافت.

طی مدت آزمایش، پارامترهای فیزیوشیمیایی آب خروجی استخرهای هر دو سیستم به طور مرتب و براساس جدول زمانی مدنظر اندازه‌گیری می‌شدند که عبارت بودند از: درجه حرارت به صورت  $4$  بار طی روز با استفاده از دماسنج دیجیتال (China)، اکسیژن محلول به طور روزانه با استفاده از اکسی‌متر (YSI 550, YSI inc, USA)، پی‌اچ به طور روزانه با استفاده از مولتی‌متر (AZ instrument, Taiwan)، آمونیاک با استفاده از دستگاه رنگ‌سنج مدل HI700، یک روز در میان (Hanna instrument, USA) و هدایت الکتریکی هر دو هفته یکبار با استفاده از مولتی‌متر (AZ instrument, Taiwan).

مرگ و میر ماهیان به طور روزانه ثبت می‌گردید. نمونه‌برداری از ماهیان با قطع غذای  $24$  ساعته در روز  $60$  ام از آغاز آزمایش، در ساعت  $9$  صبح با برداشت تصادفی  $2$  عدد ماهی از هر تکرار ( $6$  ماهی با

ازای هر تیمار) توسط تور دستی انجام شد. پس از بیهوش نمودن ماهیان توسط محلول ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پودر گل میخک، ماهیان از نظر طول (کل، چنگالی و استاندارد) و وزن زیست‌سنجی شدند و خونگیری از سیاهرگ دمی به میزانی نزدیک به دو سی‌سی انجام گرفت که فوراً داخل لوله محتوی ماده ضد انعقاد ریخته شده و جهت انجام سانتریفیوژ به آزمایشگاه خصوصی دامپزشکی در تربت حیدریه منتقل شد. سانتریفیوژ نمونه‌های خون به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰ انجام شد و پلاسما حاصله برای سنجش هورمون کورتیزول پلاسما با استفاده از کیت الایزا مورد استفاده قرار گرفت (Diagnostics Biochem Canada Inc, Ontario, Canada). همچنین، یک قطعه کوچکی (یک گرم) از عضله سفید سمت چپ بدن استحصال شده که پس از شست و شو با سرم فیزیولوژیک انسانی، داخل میکروتیوب عاری از آران‌آز - دی‌ان‌آز گذاشته شده و در تانک ازت منجمد گردید. نمونه‌های بافت ماهیچه تا زمان استخراج آران‌آز برای بررسی بیان ژن در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پارامترهای مرتبط با رشد و تغذیه براساس فرمول‌های زیر مورد محاسبه قرار گرفتند:

$100 \times \text{تعداد اولیه ماهیان} / \text{تعداد نهایی ماهیان} = \text{نرخ بقا}$

$100 \times \text{تعداد روزهای پرورش} / (\text{لگاریتم طبیعی وزن اولیه} - \text{لگاریتم طبیعی وزن نهایی}) = \text{نرخ رشد ویژه}$

$100 \times \text{طول چنگالی}^3 / \text{وزن کل} = \text{ضریب چاقی فولتون}$

$\text{تفاضل وزن نهایی و وزن اولیه} / \text{غذای مصرف شده} = \text{ضریب تبدیل غذایی}$

استخراج آران‌آز از ۵۰ میلی‌گرم بافت عضله سفید منجمد با استفاده از کیت استخراج و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد (NucleoSpin Machery-Nagel). برای حذف آلودگی احتمالی با دی‌ان‌آز، تیمار با آنزیم DNase I انجام شد (NucleoSpin). کیفیت و کمیت آران‌آز تخلیص شده به ترتیب با انجام الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد و اندازه‌گیری نسبت جذب در ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر با دستگاه نانودراپ مورد بررسی قرار گرفت (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

برای ساخت دی‌ان‌آز مکمل، ۲ میکروگرم از RNA استخراجی به‌عنوان الگو با استفاده از کیت مربوطه (Thermo scientific, USA) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده به cDNA تبدیل و در  $^{\circ}\text{C}$  ۲۰ - نگهداری شد. طراحی آغازگر مناسب برای هر ژن مدنظر براساس توالیهای موجود برای قزل‌آلای رنگین‌کمان (ژن‌های هدف HSP70، IGF-1 و MHC و ژن مرجع بتا‌کتین) در بانک ژن NCBI و با استفاده از نرم افزار پرایمر ۳ (نسخه ۴) صورت پذیرفت و با انجام بلاست مورد تأیید قرار گرفت (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>). (جدول ۱). آغازگرهای مورد نظر توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی ساخته شدند. PCR کمی با استفاده از مسترمیکس (5×HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix) (Qiagen, Germany) و آغازگرهای مذکور انجام شد. PCR کمی شامل مرحله واسرشت‌سازی اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و

مقایسه پارامترهای رشد، هورمون کورتیزول و بیان ژن‌های مرتبط با استرس و رشد ماهی قزل‌آلا...

سپس انجام ۴۰ چرخه تکثیر شامل واسرشت‌سازی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، اتصال در ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه و بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه و یک مرحله توقف انجام شد.

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده برای مطالعه PCR کمی در بررسی بیان ژن‌های مرتبط با استرس و رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*)

پیشرو (۳ → ۵)	پسرو (۳ → ۵)	ژن
TGTGTCTCCTGTACCCACACC	GCCTCTCTCTCCACACACAAAC	IGF-I
GAACAAATCCTTCAACCCAGAG	TTGAAGTAGGCAGGGACTGTG	HSP70
CCAGCACATGTCTAAGTTCAGG	TCTGAGCTTGGTTGACCTGAGTC	MHC
CTTGACGCCTTAAGTCTTGTC	GGCACCTAATCACCTCTGAC	β-ACT

- توالی‌های آغازگرهای پیشرو و پسرو برای ژنهای HSP70، IGF-1، MHC و بتا‌کتین در قزل‌آلای رنگین‌کمان.

قرائت میزان نور فلئورسانس در انتهای هر چرخه توسط دستگاه ریل تایم انجام می‌شد. میزان بیان ژن در دستگاه به صورت سی‌تی<sup>۱</sup> ثبت شد. منحنی استاندارد برای ژن‌های هدف و رفرنس بر پایه مقادیر مشخص از دی‌ان‌ای کامل در رقت‌های مختلف ۱:۱۰، ۱:۲۰، ۱:۵۰ و ۱:۲۰۰ رسم شد. سپس راندمان PCR بر مبنای رابطه  $E\% = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$  (Radonić *et al.*, 2004). برای آنالیز مقدار بیان نسبی ژنهای هدف مورد نظر نسبت به ژن مرجع بتا‌کتین از رابطه  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak and Schmittgen, 2001) استفاده شد که در این رابطه ژن کالیبراتور  $\Delta Ct$  - ژن هدف  $\Delta Ct$  و  $\Delta\Delta Ct = Ct_{\text{هدف}} - Ct_{\text{مرجع}}$  بود.

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. میانگین داده‌های حاصله برای نمونه‌های آب و فاکتورهای مورد مطالعه با استفاده از آزمون t-student مورد مقایسه قرار گرفت. داده‌های آزمایش به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد نشان داده شده‌اند. برای پردازش داده‌ها از نرم‌افزار اکسل و جهت انجام آنالیز و مقایسه میانگین‌ها از نرم‌افزار SPSS<sub>16</sub> استفاده شد.

## نتایج

میانگین فاکتورهای فیزیوشیمیایی اندازه‌گیری شده آب استخرهای پرورشی در دو سیستم باز و بازگردشی در جدول ۲ ذکر شده است. همانطور که ملاحظه می‌شود به جز میزان آمونیاک کل و آمونیاک غیر یونیزه، اختلاف معنی‌دار دیگری در هیچ‌کدام از فاکتورهای اندازه‌گیری شده طی دوره

1- Cycle of threshold

آزمایش مشاهده نشد ( $p > 0/05$ ). میانگین اکسیژن خروجی هر دو سیستم بالای ۸/۵ میلی‌گرم بر لیتر بود.

جدول ۲- میانگین ۶۰ روزه فاکتورهای فیزیوشیمیایی آب استخرهای هشت ضلعی در دو سیستم باز و بازگردشی بررسی پارامترهای رشد، هورمون کورتیزول و بیان ژن‌های مرتبط با استرس و رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*)

سیستم بازگردشی	سیستم باز	فاکتور
۱۴ ± ۰/۴	۱۴ ± ۰/۳	درجه حرارت (درجه سانتی‌گراد)
۷/۶ ± ۵/۰	۷/۷ ± ۰/۵	اکسیژن محلول (میلی‌گرم بر لیتر)
۷/۱ ± ۰/۲	۷/۲ ± ۱/۰	پی‌اچ
* ۰/۶۵ ± ۰/۰۲	۰/۲۲ ± ۰/۰۲	آمونیاک کل (میلی‌گرم بر لیتر)
* ۰/۰۰۱ ± ۰/۰۰۲	۰/۰۰۰۹ ± ۰/۰۰۰۲	آمونیاک غیر یونیزه (میلی‌گرم بر لیتر)
۶۸۰ ± ۱۸	۷۰۰ ± ۱۵	هدایت الکتریکی (میکروموس بر سانتی‌متر)

دادهای ارائه شده میانگین ± خطای استاندارد می‌باشد. غلظت آمونیاک یونیزه نشده با استفاده از معادله مربوطه برحسب مقادیر پی‌اچ و درجه حرارت محاسبه گردید (Johansson and Wedborg, 1980).

مرگ و میر ماهیان طی مدت ۶۰ روزه آزمایش در سیستم باز و بازگردشی نسبی به ترتیب ۲/۵ و ۳/۵ درصد بود. پارامترهای مرتبط با رشد ماهیان در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج حاصله کاهش معنی‌دار وزن کل ماهیان را در تیمار بازگردشی نسبت به تیمار باز نشان می‌دهد، به طوری که وزن کل به میزان ۶/۵٪ در پایان آزمایش کاهش نشان داد ( $p < 0/05$ ). نتایج حاصل از زیست‌سنجی طول، به طور میانگین کاهش ۰/۷۹ سانتی‌متری طول کل، چنگالی و استاندارد را در تیمار بازگردشی نسبت به تیمار باز نشان داد ولی این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود ( $p > 0/05$ ). همچنین، در پایان نمونه‌برداری، درصد نرخ رشد ویژه فاقد اختلاف معنی‌دار در تیمار باز و بازگردشی و به ترتیب ۰/۷۵ و ۰/۶۸ بود. ضریب چاقی فولتون تغییر معنی‌داری را در تیمار بازگردشی در مقایسه با تیمار باز نشان نداد. در مقابل، ضریب تبدیل غذایی در تیمار باز چرخشی افزایش معنی‌داری را نشان داد ( $p < 0/05$ ، جدول ۳).

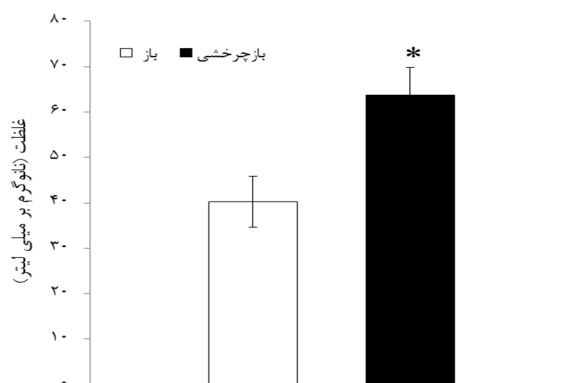
مقایسه پارامترهای رشد، هورمون کورتیزول و بیان ژن‌های مرتبط با استرس و رشد ماهی قزل‌آلا...

جدول ۳- وزن اولیه و نهایی (گرم)، طول اولیه و نهایی کل، چنگالی و استاندارد (سانتی‌متر)، نرخ رشد ویژه، ضریب چاقی فولتون و ضریب تبدیل غذایی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) جوان در دو سیستم باز و بازگردشی نسبی

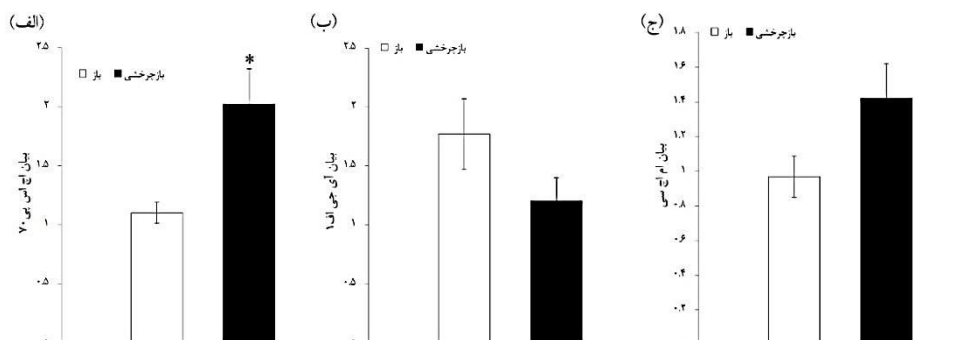
سیستم	وزن نهایی	طول کل نهایی	طول چنگالی نهایی	طول استاندارد نهایی	درصد نرخ رشد ویژه	ضریب چاقی فولتون	ضریب تبدیل غذایی
باز	7/6±635/15 <sup>a</sup>	0/25±38/4	0/27±37/2	0/24±35/6	0/03±0/76	0/02±1/23	1/15 <sup>a</sup>
بازگردشی نسبی	8/7±593/5 <sup>b</sup>	0/31±37/6	0/15±37/01	0/31±34/8	0/03±0/68	0/02±1/24	1/21 <sup>b</sup>

داده‌های ارائه شده میانگین ± انحراف از معیار می باشد.

نتایج حاصل از آزمایش افزایش معنی‌دار مقادیر هورمون کورتیزول پلازما را در تیمار بازپرختی نسبت به تیمار باز در روز نمونه‌برداری نشان داد ( $p < 0/05$ ، شکل ۱). نتایج حاصل از بررسی بیان سه ژن مرتبط با استرس و رشد در عضله سفید ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در شکل ۲ نشان داده شده است. بیان ژن HSP70 ماهیچه سفید طی ۶۰ روز نگهداری ماهیان در تراکم ۴۴ کیلوگرم بر مترمربع در سیستم بازگردشی مورد آزمون، افزایش معنی‌داری را نسبت به تیمار باز نشان داد به طوری که مقادیر mRNA به میزان ۸۳/۷٪ افزایش داشت ( $p < 0/05$ ، شکل ۲ الف). مقادیر بیان ژن IGF-1 در تیمار بازگردشی نسبت به تیمار باز کاهش یافت ولی نتایج حاصل از آزمون t اختلاف معنی‌داری را در بین دو تیمار آزمایشی نشان نداد ( $p > 0/05$ ، شکل ۲ ب). در پایان، مقادیر بیان ژن MHC ماهیچه‌ای در تیمار بازگردشی نسبی در مقایسه با تیمار باز فاقد اختلاف معنی‌داری بود ( $p > 0/05$ ، شکل ۲ ج).



شکل ۱- تغییرات مقادیر کورتیزول پلازما (میانگین ± خطای استاندارد، n=5-6) در قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) جوان طی دوره ۶۰ روزه مواجهه با تراکم نگهداری ۴۴ کیلوگرم بر مترمربع و تراکم بارگذاری مشابه در دو سیستم باز و بازگردشی نسبی (علامت \* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین دو تیمار در روز نمونه‌برداری می‌باشد) ( $p < 0/05$ ).



شکل ۲- بیان mRNA ژن HSP70 (الف)، IGF-1 (ب) و MHC (ج) عضله سفید (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد، n=۵-۶) قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) جوان طی دوره ۶۰ روزه مواجهه با تراکم نگهداری ۴۴ کیلوگرم بر مترمربع و تراکم بارگذاری مشابه در دو سیستم باز و بازگردشی نسبی (علامت \* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین دو تیمار در روز نمونه‌برداری می‌باشد ( $p < 0.05$ )).

### بحث و نتیجه‌گیری

اگرچه یکی از استراتژی‌های مفید در جهت افزایش تولید ماهی به ازای مقدار آب ورودی، بازچرخش آب است ولی افزایش ذرات جامد، زائادات متابولیکی و عوامل بیماری‌زا باعث کاهش کیفیت آب می‌شود (Piedrahita, 2003). فاکتورهای فیزیوشیمیایی آب سنجش شده در هر دو سیستم این تحقیق، در محدوده مجاز توصیه‌شده برای قزل‌آلای رنگین‌کمان قرار داشت که مرگ و میر پایین و عدم بروز بیماری تا حدی مؤید این مطلب می‌باشد. از طرفی، برگشت آب در سیستم بازگردشی این مطالعه، موجب کدورت بیشتر آب و همچنین جرم‌گرفتنی بیشتر آستر سیمانی داخل استخرها شده بود. به‌رغم افزایش مقادیر آمونیاک کل در سیستم بازگردشی طراحی شده، غلظت آن در ساعت نمونه‌برداری در ۹۰٪ سنجش‌ها به بالاتر از حد مجاز از حد مجاز یک میلی‌گرم بر لیتر نرسید. نمونه‌برداری مربوطه در ساعت ۱۱ صبح و تقریباً ۲ ساعت پس از وعده غذایی صبح انجام پذیرفت چراکه نرخ ترشح آمونیاک در ۲ تا ۱۱ ساعت پس از خوراک‌دهی افزایش می‌یابد (Gelineau *et al.*, 1998). برای آزادماهیان، محدوده سالم آمونیاک غیریونیزه ۰/۰۰۲ تا ۰/۰۲۵ و برای آمونیاک کل ۱/۵-۱ میلی‌گرم بر لیتر می‌باشد (Colt, 2006). عدم وجود فیلتر زیستی در سیستم بازگردشی نسبی می‌تواند دلیل افزایش غلظت آمونیاک کل آب حاصل از متابولیسم ماهیان باشد.

برگشت ۲۰٪ آب ورودی در سیستم بازگردشی این مطالعه، موجب کاهش ۶/۵٪ وزن کل ماهیان طی دوره ۶۰ روزه شد ولی تغییر معنی‌داری در طول‌های مورد اندازه‌گیری مشاهده نگردید. طی مطالعه ۷۷ روزه روی قزل‌آلای رنگین‌کمان، تغییرات معنی‌داری در وزن کل طی بازه زمانی ۱ تا ۵۶

روز آزمایش بین دو سیستم باز و بازگردشی کامل مشاهده نشد هرچند در بازه زمانی ۵۷ تا ۷۷ روز، کاهش ۱۷٪ وزن در تیمار باز در مقایسه با تیمار بازگردشی کامل مشاهده شد (Roque d'Orbcastel *et al.*, 2009a,b). همچنین، اختلافی در عملکردهای رشد اسمولت‌های ماهی آزاد اقیانوس اطلس (*Salmo salar*) بین دو سیستم باز و بازگردشی کامل طی مدت نگهداری در آب شیرین و پس از ۴ ماه انتقال به قفس‌های دریایی مشاهده نشد (Kolarevic *et al.*, 2014). برخلاف مطالعه حاضر، در سیستم‌های بازگردشی کامل مذکور، تغییر معنی‌داری در غلظت آمونیاک آب به جهت استفاده از فیلترزیستی بین تیمارهای بازگردشی و باز وجود نداشت. واکنش اولیه ماهی به افزایش آمونیاک آب ایجاد پاسخ استرسی است که باعث کاهش یا توقف مصرف غذا می‌شود (Wendelaar Bonga, 1997). مصرف غذا کاهش معنی‌داری را در قزل‌آلای رنگین‌کمان و توربوت حین افزایش غلظت‌های آمونیاک آب نشان می‌دهد (Wicks and Randall, 2002; Person-Le Ruyet *et al.*, 1997). کاهش وزن (۶/۵٪) بدون تغییر معنی‌دار طول ماهیان نشان‌دهنده حفظ پتانسیل رشد طولی در سیستم بازگردشی نسبی و لاغرتر بودن ماهیان است. در نتیجه، کاهش وزن کل در سیستم بازگردشی حاضر، احتمالاً ناشی از اختلالات تغذیه‌ای به جهت تجربه کاهش کیفیت آب ناشی از غلظت‌هایی بالاتر آمونیاک، ذرات معلق و احتمالاً سایر متابولیت‌های تولید شده توسط ماهیان می‌باشد. حین مطالعه، مشاهده گردید که وعده غذایی در تیمار باز در مقایسه با بازگردشی در زمان کمتری مصرف می‌شد و حتی در چند مورد مصرف خوراک اکستروود به میزان ۶۵٪ زی‌توده بویژه در وعده غذایی عصر، با سرعت کمتری انجام می‌شد که حتی باگذشت ۱۰ دقیقه از ساعت غذایی، مقدار اندکی از خوراک روی سطح آب شناور بود.

در این مطالعه، مقادیر هورمون کورتیزول پلاسما، به‌عنوان پاسخ استرسی غیراختصاصی، در تیمار بازگردشی نسبی نسبت به تیمار باز افزایش نشان داد. افزایش کورتیزول، شاخص پاسخ به استرس وارده در ماهیان است (Wu *et al.*, 2007) که غالباً پس از گذشت چند ساعت تا چند روز به سطوح اولیه تقلیل می‌یابد (Zahedi *et al.*, 2013 and 2014). اما در سیستم بازگردشی، کورتیزول حتی پس از گذشت ۲ ماه هنوز بالاتر بود که نشان‌دهنده حفظ پاسخ استرسی در ماهیان یا پاسخ به تغییرات جدید محیطی است. افزایش کاهش کیفیت آب با گذشت زمان به جهت تصفیه ناقص آب در سیستم‌های بازگردشی نسبی می‌تواند دلیلی برای حفظ مقادیر کورتیزولی در دراز مدت باشد. لازم به ذکر است که تنها برخی از مهمترین فاکتورهای آب در اینجا مورد بررسی قرار گرفت و تغییر بسیاری از فاکتورهای کیفی آب و همچنین متابولیت‌های تولیدی ماهیان طی بازگردش آب محتمل است که می‌تواند دلیلی بر تداوم پاسخ استرسی مشاهده شده باشد. با این وجود، افزایش دراز مدت کورتیزول را می‌توان مرتبط با مکانیزم سرکوب ایمنی در ماهیان دانست (Veillette and Young, 2004).

مقایسه دو سیستم باز و بازچرخشی در سطح بیان ژن‌های ماهیچه‌ای برای نخستین بار در این مطالعه انجام شد تا درک بهتری از مکانیزم‌های دخیل در تغییر رشد به دست دهد که به جز افزایش بیان ژن HSP70 به‌عنوان نشانگر استرس در تیمار بازگردشی نسبی، تغییری در مقادیر mRNA سایر ژن‌های مرتبط با رشد ماهیچه‌ای مشاهده نگردید. تراکم‌های نگهداری بالا بیان HSP70 را در دو سطح mRNA (Gornati *et al.*, 2004) و پروتئین (Küçükbay *et al.*, 2009) القاء می‌کند. باتوجه به تراکم نگهداری و بازگذاری، سرعت آب و زمان ماند هیدرولیکی یکسان در دو تیمار این مطالعه، افزایش بیان نسبی HSP70 ماهیچه‌ای، مرتبط با تغییر فاکتورهای کیفی دانسته می‌شود که ایجاد شرایط استرسی را برای قزل‌آلای جوان نموده است. افزایش بیان HSP70 مرتبط با حفاظت و ترمیم پروتئین‌های ماهیچه‌ای است (Locke *et al.*, 1991; Kilgore *et al.*, 1998). این افزایش بیان HSP70 همخوان با افزایش مقادیر کورتیزول پلاسما، بخوبی نشان‌دهنده ایجاد شرایط استرسی در سیستم بازگردشی نسبی با گذشت زمان است که همچنین، می‌تواند در نهایت به‌صورت پاسخ‌های ثالثیه استرسی همچون نقصان ایمنی تجلی یابد (Yarahmadi *et al.*, 2016). باتوجه به افزایش حساسیت ماهیان نسبت به عوامل بیماری‌زا در شرایط مواجهه با استرس مزمن از یک طرف و مشاهده حساسیت بالاتر ماهیان به عوامل بیماری‌زا در سیستم‌های بازگردشی از طرف دیگر، نقش HSP70 و کورتیزول در وساطت ایمنی طی این شرایط استرسی مزمن نایستی از نظر دور نگهداشته شود.

کاهش رشد و بیان ژن IGF-1 طی استرس طولانی‌مدت و همچنین گرسنگی در قزل‌آلای رنگین‌کمان گزارش شده است (Montserrat *et al.*, 2007). همچنین، اثر عوامل استرس‌زای محیطی و فیزیکی بر عملکردهای رشدی و محور هورمون رشد-IGF-1 اثر دارد (Wilkinson *et al.*, 2006). تأخیر رشد ناشی از اثر گلوکوکورتیکوئیدهای مثل کورتیزول مرتبط با کاهش مستقیم بیان IGF-1 است (Wood *et al.*, 2005). بیان ژن MHC تغییرات معنی‌داری را در دو تیمار باز و بازگردشی نسبی نشان نداد. در مقابل، مطالعه‌ای روی کفشک نیک (*Paralichthys adspersus*) نشان داد که استرس اعمال شده به‌صورت افزایش تراکم نگهداری باعث تغییر بیان MHC ماهیچه‌ای می‌شود (Valenzuela *et al.*, 2017). در مطالعه حاضر، به‌رغم افزایش معنی‌دار کورتیزول پلاسما در تیمار بازگردشی نسبی، کاهش بیان IGF-1 و MHC ماهیچه‌ای مشاهده نشد که نشان‌دهنده این است که استرس حاصله از این میزان از برگشت آب، در حدی نبود که تغییر بیان ژن IGF-1 و MHC را موجب شود که همخوان با رشد قندی یکسان ماهیان تا پایان آزمایش است.

سیستم بازگردشی نسبی طراحی شده به‌رغم صرفه‌جویی ۶۶٪ در نیازمندی به آب تازه، کاهش اندک (۶/۵٪) وزن کل ماهیان را احتمالاً به جهت کاهش کیفیت آب و کاهش راندمان تبدیل غذایی موجب می‌شود. بازگردش آب موجب تغییر فاکتورهای استرسی (هورمون کورتیزول و ژن HSP70)

گردید که باتوجه با نقش آنها در پاسخ‌های ایمنی، می‌تواند دلیلی برای افزایش حساسیت ماهیان در برابر بیماری‌ها در سیستم‌های بازگردشی باشد. از دیدگاه مدیریت تولید، کاهش رشد مشاهده شده در سیستم‌های بازگردشی نسبی بایستی همراه با افزایش تولید و بهره‌وری ناشی از بازگردش آب (با توجه به محدودیت‌های آبی بیشتر مزارع سردآبی کشور) دیده شود و بر این اساس تصمیم‌گیری‌های نهایی برای تولید در مقیاس تجاری صورت پذیرد.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از جناب آقایان دکتر بهزاد محمدی و مهندس شاهولی (آزمایشگاه دامپزشکی ثامن)، دکتر محسن نواری، دکتر یاسر سلحشور و محسن‌زاده (دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه)، مهندس محمدرضا مهدی‌زاده و مهندس خسرو شیرقاضی (شیلات خراسان رضوی) و مهندس محمدرضا عباسپور (جهادکشاورزی تربت حیدریه) به جهت مساعدت‌هایی که جهت انجام این تحقیق نمودند، ابراز می‌دارند. همچنین از آقایان عرفان زاهدی و امیرعباس هادوی و پرسنل زحمتکش مزارع صدف ۱ و ۲ آقایان رضاییان، فرزانه، پرهیزگار و قلی‌زاده برای کمک‌های بی‌دریغشان صمیمانه تشکر می‌گردد.

### منابع

- Andrade T., Afonso A., Pérez-Jiménez A., Oliva-Teles A., de las Heras V., Mancera J.M., Serradeiro R., Costas B. 2015. Evaluation of different stocking densities in a Senegalese sole (*Solea senegalensis*) farm: implications for growth, humoral immune parameters and oxidative status. *Aquaculture*, 438: 6-11.
- Basu N., Todgham A.E., Ackerman P.A., Bibeau M.R., Nakano K., Schulte P.M., Iwama G.K. 2002. Heat shock protein genes and their functional significance in fish. *Gene*, 295(2): 173-183.
- Blancheton J.P., Piedrahita R., Eding E.H., Lemarie G., Bergheim A., Fivelstad S., Roque d'orbcastel E. 2007. Intensification of land-based aquaculture production in single pass and reuse systems. In: Bergheim A (Eds.). *Aquacultural Engineering and Environment*. Research Signpost, India, pp: 21-47.
- Colt J. 2006. Water quality requirements for reuse systems. *Aquacultural Engineering*, 34: 143-156.
- Duan C., Ren H., Gao S. 2010. Insulin-like growth factors (IGFs), IGF receptors, and IGF-binding proteins: roles in skeletal muscle growth and differentiation. *General and Comparative Endocrinology*, 167(3): 344-351.

- 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(3): 493-531.
- Gelineau A., Medale F., Boujard T. 1998. Effect of feeding time on postprandial nitrogen excretion and energy expenditure in rainbow trout. *Journal of Fish Biology*, 52: 655-664.
- Gornati R., Papis E., Rimoldi S., Terova G., Saroglia M., Bernardini G. 2004. Rearing density influences the expression of stress-related genes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Gene*, 341: 111-118.
- Iwama G.K., Afonso L.O.B., Todgham A., Ackerman P., Nakano K. 2004. Are hsp90s suitable for indicating stressed states in fish? *Journal of Experimental Biology*, 207: 15-19.
- Johansson O., Wedborg M. 1980. The ammonia-ammonium equilibrium in seawater at temperatures between 5 and 25°C. *Journal of Solution Chemistry*, 9(1): 37-44.
- Kilgore J.L., Musch T.I., Ross C.R. 1998. Physical activity, muscle, and the HSP70 response. *Canadian Journal of Applied Physiology*, 23(3): 245-260.
- Kolarevic J., Baeverfjord G., Takle H., Ytteborg E., Reiten B.K.M., Nergård S., Terjesen B.F. 2014. Performance and welfare of Atlantic salmon smolt reared in recirculating or flow through aquaculture systems. *Aquaculture*, 432: 15-25.
- Küçükbay F.Z., Yazlak H., Karaca I., Sahin N., Tuzcu M., Cakmak M.N., Sahin K. 2009. The effects of dietary organic or inorganic selenium in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under crowding conditions. *Aquaculture Nutrition*, 15(6): 569-576.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 25(4): 402-408.
- Locke M., Noble E.G., Atkinson B.G. 1991. Inducible isoform of HSP70 is constitutively expressed in a muscle fiber type specific pattern. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 261(5): 774-779.
- Montserrat N., Gabillard J.C., Capilla E., Navarro M.I., Gutiérrez J. 2007. Role of insulin, insulin-like growth factors, and muscle regulatory factors in the compensatory growth of the trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology*, 150(3): 462-472.
- North B.P., Ellis T., Turnbull J.F., Davis J., Bromage N.R. 2006a. Stocking density practices of commercial UK rainbow trout farms. *Aquaculture*, 259(1): 260-267.
- 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(1): 466-479.
- Overturf K., Hardy R.W. 2001. Myosin expression levels in trout muscle: a new method for monitoring specific growth rates for rainbow trout *Oncorhynchus*

- mykiss* (Walbaum) on varied planes of nutrition. *Aquaculture Research*, 32(4): 315-322.
- Person-Le Ruyet J., Galland R., Le Roux A., Chartois H. 1997. Chronic ammonia toxicity in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, 154: 155-171.
- Piedrahita R. 2003. Reducing the potential environmental impact of tank aquaculture effluents through intensification and recirculation. *Aquaculture*, 226: 35-44.
- Radonić A., Thulke S., Mackay I.M., Landt O., Siegert W., Nitsche A. 2004. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313(4): 856-862.
- Roque d'orbcastel E., Blancheton J.P., Belaud A. 2009a. Water quality and rainbow trout performance in a Danish Model Farm recirculating system: Comparison with a flow through system. *Aquacultural Engineering*, 40(2): 135-143.
- 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. *Aquacultural Engineering*, 40(2): 79-86.
- Salas-Leiton E., Anguis V., Martín-Antonio B., Crespo D., Planas J.V., Infante C., Cañavate J.P., Manchado M. 2010. Effects of stocking density and feed ration on growth and gene expression in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*): potential effects on the immune response. *Fish and Shellfish Immunology*, 28(2): 296-302.
- Summerfelt S.T., Davidson J.W., Waldrop T.B., Tsukuda S.M., Bebak-Williams J. 2004a. A partial-reuse system for coldwater aquaculture. *Aquacultural Engineering*, 31: 157-181.
- Summerfelt S.T., Wilton G., Roberts D., Rimmer T., Fonkalsrud K. 2004b. Developments in recirculating systems for Arctic char culture in North America. *Aquacultural Engineering*, 30: 31-71.
- Timmons M.B., Losordo T.M. 1994. *Aquaculture Water Reuse Systems: Engineering, Design and Management*. Elsevier, Amsterdam, the Netherlands. 348P.
- Valenzuela C.A., Zuloaga R., Mercado L., Einarsdottir I.E., Bjornsson B.T., Valdes J.A., Molina A. 2017. Chronic stress inhibits growth and induces proteolytic mechanisms through two different non-overlapping pathways in the skeletal muscle of a teleost fish. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 314: 102-113.
- Veillette P.A., Young G. 2004. Temporal changes in intestinal Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase activity and in vitro responsiveness to cortisol in juvenile Chinook salmon. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 138: 297-303.

- Videler J.J. 2011. An opinion paper: emphasis on white muscle development and growth to improve farmed fish flesh quality. *Fish Physiology and Biochemistry*, 37(2): 337-343.
- Wendelaar Bonga S.E. 1997. The stress response in fish. *Physiological Reviews*, 77: 591-625.
- Wicks B.J., Randall D.J. 2002. The effect of feeding and fasting on ammonia toxicity in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquatic Toxicology*, 59(1): 71-82.
- Wilkinson R.J., Porter M., Woolcott H., Longland R., Carragher J.F. 2006. Effects of aquaculture related stressors and nutritional restriction on circulating growth factors (GH, IGF-I and IGF-II) in Atlantic salmon and rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 145(2): 214-224.
- Wood A.W., Duan C., Bern H.A. 2005. Insulin-like growth factor signaling in fish. *International Review of Cytology*, 243: 215-285.
- Wu S.M., Shih M.J., Ho Y.C. 2007. Toxicological stress response and cadmium distribution in hybrid tilapia (*Oreochromis sp.*) upon cadmium exposure. *Comparative Biochemical Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 145: 218-226.
- Yarahmadi P., Miandare H.K., Fayaz S., Caipang C.M.A. 2016. Increased stocking density causes changes in expression of selected stress-and immune-related genes, humoral innate immune parameters and stress responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology*, 48: 43-53.
- Zahedi S., Mirvaghefi A., Rafati M., Mehrpoosh M. 2013. Cadmium accumulation and biochemical parameters in juvenile Persian sturgeon, *Acipenser persicus*, upon sublethal cadmium exposure. *Comparative Clinical Pathology*, 22(5): 805-813.
- Zahedi S., Mirvaghefi A., Rafati M., Rafiee G., Mojazi Amiri B., Hedayati M., Makhdoomi C., Zarei Dangesaraki M. 2014. The effect of sub-lethal exposure to copper and the time course of recovery in clean water on biochemical changes in juvenile fish (*Acipenser persicus*). *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 47(4): 253-264.