



## مقاله پژوهشی

تأثیر سطوح متفاوت پروتئین و منابع مختلف کربن بر برخی شاخص‌های ایمنی  
موکوس، آنزیم‌های کبد و جمعیت باکتری اسید لاکتیک بچه ماهی کپور معمولی  
(*Cyprinus carpio*) در سیستم بیوفلوک

علیرضا ابراهیمی<sup>۱</sup>، رضا اکرمی<sup>۲\*</sup>، ابراهیم حسین نجدگرامی<sup>۳</sup>، زهرا غیاثوند<sup>۴</sup>، هادی کوهساری<sup>۵</sup>

تاریخ دریافت: خرداد ۹۸

تاریخ پذیرش: مهر ۹۸

## چکیده

آزمایشی ۸ هفته‌ای به منظور بررسی تأثیر سطوح متفاوت پروتئین و منابع مختلف کربنی و بر شاخص ایمنی موکوس، آنزیم‌های کبدی و باکتری اسید لاکتیک روده در پرورش متراکم بچه ماهیان کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در سیستم بیوفلوک انجام گرفت. ماهیان با جیره‌های حاوی ۲۰ یا ۳۰ درصد پروتئین شامل دو گروه در آب شفاف بدون بیوفلوک، دو گروه بیوفلوک با اضافه کردن ملاس، دو گروه بیوفلوک با اضافه کردن سبوس برنج و دو گروه بیوفلوک با افزودن مخلوط ملاس و سبوس برنج تغذیه شدند. در پایان دوره شاخص‌های ایمنی موکوس (لیزوزیم و ایمونوگلوبولین)، آنزیم‌های کبدی (ALT، AST، LDH، ALP) و تراکم باکتری اسید لاکتیک روده سنجش شد. نتایج نشان داد ماهیان در کل تیمارهای بیوفلوک و تغذیه شده با پروتئین ۳۰ درصد بهبود معنی‌داری در شاخص ایمنی داشتند ( $P < 0.05$ ). فعالیت آنزیم‌های کبدی و تراکم باکتری اسید لاکتیک به طور معناداری در تیمار بیوفلوک ملاس و مخلوط ملاس و سبوس و با پروتئین ۳۰ درصد نسبت به گروه شاهد بهبود یافت ( $P < 0.05$ ). در مجموع، افزودن مخلوط سبوس برنج و ملاس به عنوان منبع کربنی و در سطح ۳۰ درصد پروتئین جیره در پرورش متراکم بچه ماهیان کپور معمولی به روش بیوفلوک می‌تواند باعث بهبود شاخص‌های ایمنی، کبدی و جمعیت باکتری اسید لاکتیک روده شود.

واژگان کلیدی: پروتئین، ایمنی، آنزیم کبدی، اسید لاکتیک، بیوفلوک، کپور معمولی.

۱- دانشجوی دکتری شیلات، گروه شیلات، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران.

۲- دانشیار گروه شیلات، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران.

۳- دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

۴- استادیار گروه شیلات، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران.

۵- استادیار گروه میکروبیولوژی، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران.

\* نویسنده مسئول: [akrami.aqua@gmail.com](mailto:akrami.aqua@gmail.com)

## مقدمه

باعث کاهش نیاز به تعویض آب و از طریق تولید پروتئین میکروبی قابل مصرف منجر به کاهش ضریب تبدیل غذایی و متعاقب آن کاهش هزینه تولید می‌شود. این تکنیک بر اساس دستکاری میکروبی در سیستم است که با افزودن کربوهیدرات اضافی جمعیت باکتری‌های هتروتروف افزایش می‌یابد و باعث بهبود کیفیت آب می‌شود. انتظار می‌رود میکروب‌ها مواد زاید مزارع پرورشی (شامل غذای خورده نشده، مدفوع و ترشحات) را مصرف، بازیافت و به زی‌توده باکتریایی تبدیل کنند.

برای انتخاب نوع منبع کربن، دسترسی و قابلیت هضم کربوهیدرات، محتوای پروتئین و اثربخشی هزینه باید در نظر گرفته شود. کربوهیدرات‌های پیچیده اغلب حاوی پروتئین هستند و به همین دلیل، هنگام محاسبه کربوهیدرات مورد نیاز مقدار پروتئین برای حفظ نسبت بالای کربن به نیتروژن (C:N ۲۰-۱۵) باید مد نظر قرار گیرد (Avnimelech, 2009). مواد آلی کربنی باید به شکل حل شده یا پودر درآیند تا میزان رسوب را کاهش دهند و به میزان بیشتری برای باکتری‌ها در دسترس باشند (Emerenciano et al., 2012). در حقیقت نسبت بالای کربن به نیتروژن باعث

در پرورش متراکم هزینه غذا حدود بیش از ۵۰ درصد کل هزینه تولید را شامل می‌شود که تاثیر قابل توجهی بر سودآوری دارد. (Son et al., 2011). با توجه به این نکته که فقط ۲۰ تا ۳۰ درصد نیتروژن موجود در غذا توسط آبی‌پرورشی جذب شده، مازاد آن (۸۰-۷۰ درصد) به صورت نیتروژن و مدفوع در محیط زیست آبی‌رها می‌شود (Schryver et al, 2008) که خود منجر به وخیم شدن کیفیت آب و در نتیجه بروز استرس و بیماری می‌شود. ولی با وجود محدود بودن منابع آبی باید دنبال رویکردها و تکنیک‌های نوین و با صرفه در جهت پرورش متراکم آبیان بود. یکی از این تکنیک‌ها که در سال‌های اخیر بسیار موثر واقع شده، تکنولوژی بیوفلوک (Biofloc Technology: BFT) است. این توده زیستی شامل ترکیب ناهمگنی از جمعیت میکروارگانیسم‌ها و حاوی توده‌های باکتری‌های رشته‌ای، ذرات کلونیدی، ذرات معلق، پلیمرهای آلی، کاتیون‌ها و سلول‌های مرده است که روی هم فلوک‌ها را تشکیل می‌دهند (Avnimelech, 2009). فناوری تولید بیوفلوک روشی برای تجزیه پسماندهای آلی به وسیله میکروارگانیسم‌ها و تولید توده‌های بیوفلوک است. بیوفلوک با حفظ کیفیت آب

سطوح حد واسط اکسیژن محلول، تحمل پذیرش ایجاد رسوب در آب، تحمل ترکیبات نیتروژنه، مهیا بودن سیستم فیلترکنندگی ماهی، سازگاری دستگاه گوارش به جذب ذرات میکروبی، عادت همه چیزخواری و تغذیه از توده‌های زیستی (باکتری و میکروارگانیسم) است (Burford et al., 2004).

کپور معمولی یکی از گونه‌های مهم گرمابی پرورشی در ایران است که با توجه به کمبود منابع آبی در کشور، پرورش متراکم آن در سیستم بیوفلورک می‌تواند ضمن صرفه‌جویی در مصرف آب و غذا باعث افزایش تولید و رفع نیاز پروتئینی جامعه شود. همچنین بیوفلورک می‌تواند به عنوان مکمل خوراکی برای بهبود ارزش غذایی خوراک گونه‌های پرورشی استفاده شود. فرآیند بیوفلورک، غذایی با محتوای بالای پروتئینی که به آسانی قابل جذب باشد تولید می‌کند چون که ترکیب مغذی بیوفلورک حدود ۳۸-۴۰ درصد پروتئین دارد (Rajkumar et al., 2016).

با استفاده از سیستم بیوفلورک می‌توان ۴۰ تا ۵۰ درصد هزینه‌های غذا را از طریق جایگزین کردن بیوفلورک به عنوان منبع پروتئینی ارزان، کاهش داد (Ekasari et al., 2014). همچنین بیوفلورک به علت وجود ارگانیسیم‌های زنده که

غیرفعال شدن نیتروژن آمونیاکی کل توسط زی‌توده باکتریایی و افزایش زی‌توده میکروارگانیسم‌ها می‌شود. این جذب نیتروژن توسط باکتری‌های هتروتروف خیلی سریع‌تر از نیتریفیکاسیون باعث کاهش و حذف نیتروژن سمی در آب می‌شود (Avnimelech, 1999). در سیستم بیوفلورک از دو گزینه غذای مصرف نشده و موجودات زنده میکروسکوپی استفاده شده، ترکیب غذایی جدیدی تولید می‌شود (Jatoba et al., 2014).

ذرات بیوفلورک حاوی باکتری‌های مفیدی مانند *Bacillus* و *Lactobacillus*، ترکیبات زیست‌فعال (کاروتنوئید) (Anand et al., 2014)، مواد مغذی (پروتئین، چربی، کربوهیدرات، اسید آمینه، اسید چرب) و معدنی (منگنز، روی، مس، سدیم، منیزیم، برم و پتاسیم) هستند (Maica et al., 2012) که این ترکیبات به عنوان پروبیوتیک و محرک‌های ایمنی شناخته شده‌اند. علاوه بر این باکتری‌های موجود در ذرات معلق بیوفلورک مواد مغذی اضافی و آنزیم‌های گوارشی خارجی تولید و رشد و بقا را تحریک می‌کنند (Wang et al., 2015). برخی ویژگی‌های ضروری برای رشد بهینه آبی از جمله ماهی کپور در سیستم بیوفلورک شامل مقاومت به تراکم بالا، تحمل

از یک هفته سازش‌دهی با شرایط آزمایش، با خوراک استاندارد کپور معمولی (فراذانه، ایران) حاوی ۳۵ درصد پروتئین و ۸ درصد چربی تغذیه شدند. تراکم ذخیره‌سازی اولیه ماهیان بر اساس ۴/۵ کیلوگرم در مترمکعب در نظر گرفته شد و بنابراین در هر تانک با حجم مفید ۲۰۰ لیتر آب تعداد ۳۰ قطعه ماهی ذخیره‌سازی شد.

#### ایجاد سیستم بیوفلوک

ابتدا دو هفته قبل از ماهی‌دار کردن مخازن، آب خروجی یک استخر پرورش کپورماهیان به عنوان منبع اولیه باکتری‌های هتروتروف به مخازن پرورشی اضافه شد. سپس میزان آمونیاک کل (TAN) با استفاده از روش‌های استاندارد اندازه‌گیری شد. پس از تثبیت شرایط بر اساس میزان آمونیاک کل (TAN) آب و بر اساس فرمول Avnimelech (۱۹۹۹) منابع کربنی شامل ملاس نیشکر، سبوس برنج و مخلوط نسبت وزنی یکسان ملاس نیشکر و سبوس برنج (به دلیل ارزان و در دسترس بودن) با نسبت مناسب با C:N معادل ۲۰ محاسبه و بعد از رقیق‌سازی، به مخازن اضافه شد. آب استخر اضافه شده و منابع کربنی افزوده شده به مخازن به مدت یک هفته هوادهی شدید شدند و در نهایت بعد از این که میزان آمونیاک در حد

حاوی مواد ضروری برای رشد بهینه آبزیان است، به عنوان یک منبع انرژی نیز عمل می‌کند (Crab et al., 2010). نیاز پروتئینی کپور معمولی بسته به مراحل زیستی آن ۳۸-۳۰ درصد است. از طرفی سیستم‌های پرورشی معمولاً به دلیل تراکم بالای ذخیره‌سازی به غذای غنی از پروتئین متکی هستند که باعث تجمع نیتروژن در استخر می‌شود. بنابراین تنظیم سطح بهینه آن در جیره آبزیان برای مراحل مختلف رشد بسیار حایز اهمیت است. از این رو، مطالعه حاضر با هدف اثر کاهش سطح پروتئین به میزان ۱۰ تا ۱۵ درصد در جیره، تعیین سطح مناسب پروتئین و افزودن منابع کربنی ملاس و سبوس برنج در سیستم بیوفلوک بر فعالیت برخی شاخص‌های ایمنی موکوس، آنزیم‌های کبدی و جمعیت باکتری اسیدلاکتیک روده بچه ماهیان کپور معمولی برای دستیابی به سلامت فیزیولوژیک انجام شد.

#### مواد و روش‌ها

##### تهیه و نگهداری ماهیان

مطالعه حاضر در مرکز تکثیر و پرورش ماهیان استخوانی سیجوال بندر ترکمن انجام شد. بچه ماهیان کپور با وزن  $3 \pm 30$  گرم از استخرهای پرورشی استان گلستان تامین و پس

**فرمولاسیون و تنظیم جیره‌های غذایی**

بر مبنای پروتئین ۲۰ و ۳۰ درصد با استفاده از اجزای غذایی در دسترس و با روش‌های مرسوم و نرم‌افزار UFFDA انجام گرفت (جدول ۱). غذایی به میزان ۳ درصد وزن بدن و سه بار در روز انجام شد. تعویض آب در تیمار شاهد روزانه به میزان ۳۰ درصد حجم مخزن و در مخازن آزمایشی ۳ درصد فقط به منظور جبران تبخیر، نمونه‌برداری آب و جمع‌آوری فلوک‌های اضافی انجام شد.

**تیمار بندی ماهیان**

بر اساس دو سطح ۲۰ و ۳۰ درصد پروتئین در جیره، ۸ گروه تغذیه‌ای شامل ۲ گروه در آب تازه و قابل تعویض بدون اضافه کردن منبع کربنی، ۲ گروه بیوفلوک با اضافه کردن منبع کربنی ملاس نیشکر (۴۰ درصد کربن)، ۲ گروه بیوفلوک با اضافه کردن منبع کربنی سبوس برنج (۳۰ درصد کربن) و ۲ گروه بیوفلوک دیگر نیز با افزودن مخلوط ملاس نیشکر و سبوس برنج با نسبت وزنی یکسان به عنوان منبع کربنی در سه تکرار به صورت فاکتوریل (۳×۸) طراحی شد.

صفر و فلوک‌های اندازه‌گیری شده توسط کیف ایمهوف در سیستم به بیش از ۳۰۰ میلی‌گرم در هر لیتر رسید (Azim and Little, 2008)، مخازن ماهی‌دار شد. در طول دوره پرورش نیز منابع کربنی مورد نیاز، برای تنظیم نسبت ۲۰ به ۱ کربن به نیتروژن، بر اساس روش Avnimelech (1999)، روزانه محاسبه و در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب هر مخزن به طور جداگانه حل شد و سپس به همان مخزن پس از وعده دوم غذایی اضافه شد (عباس‌زاده و همکاران، ۱۳۹۶). میزان کربن مورد نیاز هر تیمار، بر مبنای این که ۷۵ درصد نیتروژن مصرفی در جیره غذایی از طریق دفع متابولیکی ماهی و به صورت غذای خورده نشده به آب دفع می‌شود، با وارد کردن غلظت‌های مختلفی از کربن به مخازن پرورشی تغییر کرد. از این رو، در طول دوره پرورش مقدار منبع کربنی (Cs) طبق معادله Schryver و همکاران (۲۰۰۸) بر حسب مقدار پروتئین جیره متفاوت بود (رابطه ۱).

رابطه ۱:

$$Cs (g/m^3) = X \times Y \times P \times K \times 20$$

X: تراکم (گرم در مترمکعب)؛ Y: مقدار غذا بر حسب درصد وزن بدن (گرم)؛ P: مقدار پروتئین غذا (درصد)؛ K: مقدار نیتروژن غذا.

جدول ۱: اجزا و ترکیب تقریبی جیره‌های آزمایشی

پروتئین ۳۰٪	پروتئین ۲۰٪	
		اجزای جیره (درصد)
۲۳	۱۰	پودر ماهی
۲۱	۱۳	آرد سویا
۲۲	۳۳	آرد ذرت
۲۶	۳۸	آرد گندم
۱	۱	مکمل معدنی
۱	۱	مکمل ویتامینی
۴	۴	روغن آفتابگردان
		ترکیب تقریبی جیره (درصد ماده خشک)
۳۰/۱	۲۰/۳	پروتئین خام
۸	۷	چربی
۱۰/۴	۷	خاکستر
۳/۴	۳/۱	فیبر
۳۱/۱	۴۶	عصاره عاری از ازت
۸۳	۸۳/۴	ماده خشک
۳/۷۵	۳/۷۱	انرژی خام (kcal/g)
۸۰	۵۳/۹	نسبت پروتئین به انرژی (mgCP/kcal)

۲ دقیقه ماهی‌ها از کیسه خارج شدند. موکوس جمع‌آوری شده به لوله‌های سانتریفیوژ ۱۵ میلی‌لیتری منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ (Hermel، آلمان) شدند. سوپرناتانت به دست آمده برای تعیین میزان لیزوزیم به میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شد. برای تعیین میزان لیزوزیم از روش ارائه شده توسط Sahoo

سنجش شاخص‌های ایمنی موکوس پوست جمع‌آوری موکوس به روش Ross و همکاران (۲۰۰۰) انجام شد. از هر مخزن ۳ قطعه ماهی به صورت تصادفی نمونه‌برداری و پس از بیهوشی با ۵ میلی‌گرم در لیتر پودر گل میخک به صورت جداگانه درون کیسه‌های پلی‌اتیلینی (زیپ پلاست) حاوی ۱۰ میلی‌لیتر سدیم کلرید ۵۰ میلی‌مولار قرار گرفتند. پس از

طور تصادفی انتخاب شد و پس از باز کردن شکم آن‌ها قسمت مربوطه (یک سوم انتهایی روده) جدا و محتویات آن در پلیت‌های استریل تخلیه شد. سپس با استفاده از سرم فیزیولوژی از آن‌ها سریال رقت (از  $10^{-1}$  تا  $10^{-4}$ ) تهیه شد. ۱۰۰ میکرولیتر از هر یک از رقت‌های تهیه شده به یک پلیت استریل منتقل و به آن محیط کشت MRS آگار افزوده شد. در نهایت پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. بعد از اتمام زمان انکوباسیون و ظهور کلنی‌ها روی محیط کشت، کلنی‌ها شمارش و تعداد آن‌ها محاسبه شد (Mahious et al., 2006).

#### تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

طرح کلی این پژوهش در قالب طرح فاکتوریل انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها از طریق آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و به منظور بررسی اثرات متقابل بین سطوح پروتئین غذایی و منابع مختلف کربن از آزمون تحلیل واریانس دوطرفه و مقایسه میانگین بین تیمارها بر اساس پس‌آزمون دانکن استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۸) انجام شد.

(۲۰۰۶) استفاده شد (Sahoo, 2006). به منظور تعیین غلظت ایمونوگلوبولین کل (Total IgM) از کیت (پارس آزمون، ایران) و دستگاه اتوآنالایزر (Eurolyser، اتریش) استفاده شد.

#### سنجش آنزیم‌های کبدی

بدین منظور، ۲۴ ساعت قبل از خون‌گیری تغذیه ماهیان قطع و سپس از سیاهرگ ساقه دمی ۴۸ عدد ماهی (۲ ماهی از هر تکرار) خون‌گیری شد. نمونه‌های خون به دست آمده به لوله‌های سرولوژی فاقد ماده ضدانعقاد منتقل و سپس با استفاده از سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه سرم جدا شد و در میکروتیوب تخلیه و در نهایت به آزمایشگاه منتقل شد. سنجش آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) و لاکتات دهیدروژناز (LDH) به روش رنگ‌سنجی کینتیک و آلکالین فسفاتاز (AP) با استفاده از دستگاه اتوآنالایزر (Eppendorf, EPOS، آلمان) و کیت تجاری (پارس آزمون، ایران) اندازه‌گیری شد (Shahsavani et al., 2008).

#### بررسی تراکم لاکتوباسیل روده

برای تعیین باکتری‌های اسید لاکتیک موجود در محتویات انتهایی روده بچه ماهیان، در پایان دوره پرورش ۲ قطعه ماهی از هر تکرار به

## نتایج

بالاترین میزان آن‌ها در تیمار بیوفلوک مخلوط ملاس و سبوس برنج و پروتئین ۳۰ درصد به دست آمد.

فعالیت آنزیم‌های کبدی در تیمارهای حاوی بیوفلوک ایجاد شده توسط منابع مختلف کربنی و تحت سطوح مختلف پروتئین در جدول شماره ۳ نشان داده شده است.

شاخص‌های هومورال ایمنی غیراختصاصی موکوس پوست شامل فعالیت لیزوزیم و ایمونوگلوبولین کل به طور معنی‌داری در تیمارهای بیوفلوک با پروتئین ۳۰ درصد بهبود یافتند ( $P < 0.05$ ؛ جدول ۲). اثر متقابل معنادار در میزان شاخص‌های ایمنی مشهود بود و

جدول ۲: شاخص‌های ایمنی موکوس پوست بچه ماهیان کپور معمولی پرورش یافته در مخازن بیوفلوک به مدت ۸ هفته (میانگین  $\pm$  انحراف معیار)

تیمارها	فعالیت لیزوزیم (U/mL)	ایمونوگلوبولین کل (mg/dL)
منبع کربنی		
شاهد	$30.9 \pm 1.7^a$	$7.5 \pm 1.1^a$
سبوس برنج	$31.1 \pm 1.2^a$	$8.1 \pm 1.4^b$
ملاس نیشکر	$34.9 \pm 0.6^b$	$8.3 \pm 1.7^b$
ملاس نیشکر + سبوس برنج	$36.1 \pm 0.9^b$	$8.8 \pm 1.2^b$
سطوح پروتئین		
۲۰٪	$31.1 \pm 1.4^A$	$7.1 \pm 1.3^A$
۳۰٪	$37.1 \pm 1.9^B$	$8.9 \pm 1.1^B$
سطح معنی‌داری تحلیل واریانس دوطرفه		
پروتئین	**	**
منبع کربن	**	*
منبع کربن $\times$ پروتئین	*	*

حروف متفاوت در هر ستون (a, b و c برای منابع کربنی) و (A و B برای سطوح پروتئین) اختلاف معنی‌دار را نشان می‌دهند. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .



جدول ۳: فعالیت آنزیم‌های کبدی بچه ماهیان کپور معمولی پرورش یافته در مخازن بیوفلوک به مدت ۸ هفته (میانگین  $\pm$  انحراف معیار)

تیماها	(U/L) ALP	(U/L) AST	(U/L) ALT	(U/L) LDH
منبع کربنی				
شاهد	۶۳۵ $\pm$ ۵/۰ <sup>b</sup>	۲۵۲ $\pm$ ۳ <sup>b</sup>	۱۸۴/۰ $\pm$ ۱/۲	۷۶۰ $\pm$ ۵/۲ <sup>a</sup>
سبوس برنج	۶۲۵ $\pm$ ۳/۰ <sup>b</sup>	۲۵۵ $\pm$ ۴ <sup>b</sup>	۱۸۳/۶ $\pm$ ۲/۰	۷۷۸ $\pm$ ۱۰/۰ <sup>b</sup>
ملاس نیشکر	۶۳۴ $\pm$ ۶/۴ <sup>b</sup>	۲۳۳ $\pm$ ۶ <sup>a</sup>	۱۷۸/۵ $\pm$ ۱/۵	۷۵۲ $\pm$ ۳/۰ <sup>a</sup>
ملاس نیشکر + سبوس برنج	۶۰۲ $\pm$ ۴/۴ <sup>a</sup>	۲۲۵ $\pm$ ۲ <sup>a</sup>	۱۷۳/۶ $\pm$ ۱/۱	۷۵۰ $\pm$ ۴/۱ <sup>a</sup>
سطوح پروتئین				
۲۰٪	۶۲۹ $\pm$ ۹/۵	۲۴۳ $\pm$ ۶/۲	۱۷۹/۰ $\pm$ ۲/۵	۷۷۰ $\pm$ ۱۱/۷ <sup>A</sup>
۳۰٪	۶۱۹ $\pm$ ۷/۰	۲۳۹ $\pm$ ۸/۳	۱۸۳/۲ $\pm$ ۲/۰	۷۵۰ $\pm$ ۵/۴ <sup>B</sup>
سطح معنی‌داری تحلیل واریانس دو طرفه				
پروتئین	NS	NS	NS	**
منبع کربن	*	**	NS	**
منبع کربن $\times$ پروتئین	NS	NS	NS	*

حروف متفاوت در هر ستون (a, b, c برای منابع کربنی) و (A و B برای سطوح پروتئین) اختلاف معنی‌دار را نشان می‌دهند. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; NS: بی‌معنی.

معنادار نبود ( $P > 0.05$ ). بیشترین میزان فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH) در تیمار بیوفلوک سبوس برنج ثبت شد ( $P < 0.01$ ). سطوح بالاتر پروتئین به طور معناداری موجب بهبود فعالیت این آنزیم شد ( $P < 0.01$ ). نتایج تحلیل واریانس دوطرفه اثر متقابل معنادار منابع مختلف کربنی و سطوح متفاوت پروتئینی را در فعالیت این آنزیم نشان داد ( $P < 0.05$ )؛ جدول (۳).

فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) و آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) در تیمار بیوفلوک ملاس و مخلوط ملاس و سبوس برنج نسبت به ماهیان گروه شاهد به طور معناداری کمتر بود ( $P < 0.05$ )؛ جدول (۳). در سطوح بالاتر پروتئین نیز فعالیت این دو آنزیم بهبود یافت اگرچه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ). اثر متقابل منبع کربن و میزان پروتئین بر میزان فعالیت این دو آنزیم نیز

نتایج بررسی و شمارش باکتری‌های اسید لاکتیک در جدول شماره ۴ نشان می‌دهد تیمارهای بیوفلوک ایجاد شده توسط منابع مختلف کربنی توام با سطوح بالاتر پروتئین، بیشترین رشد باکتری‌های اسید لاکتیک را در مقایسه با گروه شاهد داشتند و تفاوت معناداری

بین تیمارها مشاهده شد ( $P < 0.05$ ). بیشترین تراکم باکتری‌های اسید لاکتیک روده به طور معناداری در ماهیان پرورش یافته در تیمار بیوفلوک حاوی مخلوط سبوس برنج و ملاس به دست آمد ( $P < 0.01$ ).

جدول ۴: شمارش باکتری اسید لاکتیک روده بچه ماهیان کپور معمولی پرورش یافته در مخازن بیوفلوک به مدت ۸ هفته (میانگین  $\pm$  انحراف معیار)

تعداد باکتری (log CFU/g)	تیمارها
	منبع کربنی
$3.6 \pm 0.1^c$	شاهد
$4.5 \pm 0.2^b$	سبوس برنج
$5.1 \pm 0.1^a$	ملاس نیشکر
$5.2 \pm 0.1^a$	ملاس نیشکر + سبوس برنج
	سطوح پروتئین
$4.3 \pm 0.3^B$	۲۰٪
$4.8 \pm 0.3^A$	۳۰٪
	سطح معنی‌داری تحلیل واریانس دوطرفه
*	پروتئین
**	منبع کربن
NS	منبع کربن $\times$ پروتئین

حروف متفاوت در هر ستون (a, b و c برای منابع کربنی) و (A و B برای سطوح پروتئین) اختلاف معنی‌دار را نشان می‌دهند. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; NS: بی‌معنی.

al., 2016). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که جیره‌های با مقدار پروتئین خیلی کم می‌توانند پاسخ ایمنی در ماهی کپور معمولی را تضعیف کند. گزارش شده است در شرایط بیوفلوک پاسخ ایمنی در سطوح بالاتر پروتئین بهتر است و ممکن است به پروتئین بازیافت شده از بیوفلوک که به عنوان یک مکمل پروتئینی و منبع ماکرونوترینت عمل می‌کند، مربوط باشد (Panigrahi et al., 2019).

بر اساس مطالعات متعدد انجام شده، با توجه به رشد سوبیه‌های پروبیوتیکی متعدد در سیستم بیوفلوک، عدم تعویض آب و همچنین پایدار بودن سیستم بیوفلاک، استفاده از این سیستم به صورت مستقیم و غیرمستقیم بر سطح ایمنی آبی اثرگذار خواهد بود. پتانسیل فلوک‌های میکروبی به عنوان یک منبع پروتئینی در پاسخ ایمنی ماهیان و میگو در چندین مطالعه گزارش شده است (Xu and Pan, 2014; Mansour and Esteban, 2017). به عنوان مثال Xu و Pan (۲۰۱۴) پاسخ ایمنی میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*) را به سطح پروتئین جیره در سیستم بیوفلوک بررسی کردند و نتایج آن‌ها نشان داد کاهش میزان پروتئین از ۳۵ به ۲۵ درصد تاثیری بر وضعیت ایمنی نگذاشت که نشان دهنده سهم بالقوه

اثر بیوفلوک تولید شده توسط ملاس و مخلوط سبوس برنج و ملاس در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ۳۰ درصد پروتئین در مقایسه با ماهیان پرورش یافته در مخزن دارای تعویض آب (شاهد) به طور معناداری بیشتر بود ( $P < 0.05$ ). نتایج تحلیل واریانس دوطرفه حاکی از نبود اثر متقابل معنادار منابع مختلف کربنی و پروتئینی بر تراکم باکتری‌های اسیدلاکتیک روده بود ( $P > 0.05$ ).

### بحث

فناوری بیوفلوک به واسطه تبدیل ضایعات به فلوک‌های میکروبی یک منبع غذایی اضافی برای آبزیان فراهم می‌کند به همین دلیل، سطح مناسب پروتئین در رژیم غذایی آبزیان در این سیستم می‌تواند متفاوت از سیستم‌های متعارف باشد. نتایج این مطالعه اثرات مثبت پرورش متراکم به روش بیوفلوک بر فعالیت شاخص‌های ایمنی موکوس پوست، آنزیم‌های کبدی و تراکم باکتری‌های اسید لاکتیک روده را در بچه ماهی کپور معمولی در سیستم با حداقل تعویض آب تایید کرد.

سیستم ایمنی به عنوان یک مکانیسم فیزیولوژیک اصلی برای بهبود پاسخ آبزیان به تنش‌های محیطی عمل می‌کند (Verma et

ایمنی را تحریک می‌کند (Crab et al., 2009; Xu and Pan, 2014). Bakhshi و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کردند منابع مختلف کربنی بر شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی (پروتئین تام و ایمنوگلوبولین کل) بچه ماهی کپور در سیستم بیوفلوک اثرگذار بودند و بیشترین پاسخ ایمنی در بیوفلوک نشاسته ذرت مشاهده شد، ولی تفاوت معناداری را در لیزوزیم و کمپلمان مشاهده نکردند. Verma و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی ماهیان انگشت‌قد روهو (*Labeo rohita*) متاثر از سیستم بیوفلوک بود. در بررسی حاضر نیز منابع کربنی بر پاسخ ایمنی بچه ماهیان انگشت‌قد کپور تاثیرگذار بودند و بیشترین مقدار این شاخص در تیمار مخلوط سبوس برنج و ملاس مشاهده شد. به نظر می‌رسد ساختار ساده ملاس به واسطه فندهای محلول و قابل تخمیر آن و سطح وسیع برای رشد باکتری‌های هتروتروفیک در سبوس برنج نیز در این رخداد تاثیرگذار بوده باشد.

آنزیم‌های کبدی می‌توانند اطلاعاتی در مورد عملکرد و نارسایی کبد بدهند و افزایش سطح این آنزیم‌ها حاکی از نشت سلولی، نشانگر آسیب ساختار و اختلال عملکرد غشاهای سلولی در کبد است (Drotman and Lawhan, 1978).

فلوک‌های میکروبی در تغذیه و وضعیت سلامتی میگوی وانامی بود. Mansour و Esteban (۲۰۱۷) اثر پروتئین گیاهی (۲۰ و ۳۰ درصد) را در رژیم غذایی ماهی تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*) با دو منبع کربن (محصول جانبی سبوس گندم و سبوس برنج) بررسی و کاهش معنی‌داری را در شاخص‌های ایمونولوژیک بچه ماهیان گزارش کردند. این نتایج با یافته‌های مطالعه حاضر موافق است که نشان می‌دهد کاهش میزان پروتئین در رژیم غذایی از ۳۰ به ۲۰ درصد، به طور قابل توجهی باعث تضعیف شاخص‌های ایمنی در بچه ماهی کپور معمولی شد. اثر فلوک‌های میکروبی بر پاسخ ایمنی در مطالعات مختلف گزارش شده است. بر اساس این نتایج، فلوک‌های میکروبی منبع خوبی از ترکیبات زیست‌فعال مانند اسیدهای چرب کوتاه زنجیره، کلروفیل، فیتواسترول، قند آمینو، بروموفنول، کاروتنوئیدها و ترکیبات ضدباکتریایی مانند پلی‌بتا‌هیدروکسی‌بوتیرات هستند که می‌توانند بر پاسخ ایمنی تاثیر مثبت داشته باشند. همچنین گزارش شده است که بیوفلوک به واسطه حضور دیواره سلولی میکروبی متشکل از پپتیدوگلیکان‌ها، لیپوپلی‌ساکاریدها و بتا-۱،۳-گلوکان با فعال کردن مکانیسم دفاع غیراختصاصی، سیستم

ترکیب شیمیایی و توانایی ذخیره ترکیبات زیست فعال (مانند پلیمرها، کاروتنوئیدها، فیتوسترولها و آنزیمهای خارج سلولی) دارد (Zhao et al., 2016). بیوفلوکها غنی از پروبیوتیک و ترکیبات زیست فعال هستند که نقش مهمی در بهبود رشد و سلامت آبزیان برعهده دارند. کیفیت بیوفلوک مستقل از کیفیت خوراک مورد استفاده است. ترکیب جیره و اندازه فلوک به عنوان یک شاخص برای گونه‌های همه چیزخوار در نظر گرفته می‌شود. ارزش غذایی بیوفلوک برای آبزیان به عوامل مختلفی مانند غذای ترجیحی، قابلیت هضم و جذب غذا و تراکم ذرات معلق شده بستگی دارد (Hargreaves, 2006).

بسیاری از آنزیمها مانند آسپارات آمینوترانسفراز (AST) و آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) در متابولیسم اسیدهای آمینه درون هپاتوپانکراس دخیل هستند (Pan et al., 2003). Anand و همکاران (۲۰۱۴) با افزودن سطوح مختلف بیوفلوک خشک شده (۰، ۴، ۸ و ۱۲ درصد) به جیره پایه بچه میگوی ببری سیاه (*Penaeus monodon*) تفاوت معنی داری را در سطح آنزیمهای متابولیکی مانند ملات دهیدروژناز (MDH)، آسپارات آمینوترانسفراز

در بررسی حاضر، تیمارهای بیوفلوک بر عملکرد آنزیمهای کبدی تاثیر گذاشتند به طوری که فعالیت این آنزیمها در ماهیان پرورش یافته در مخزن بیوفلوک حاوی مخلوط سیوس برنج و ملاس و پروتئین ۳۰ درصد در مقایسه با ماهیان پرورش یافته در سیستم دارای تعویض آب، عملکرد بهتری داشت که شاید به دلیل وضعیت تغذیه‌ای خوب و انرژی اضافی ناشی از این تیمار باشد. همچنین بهبود فعالیت آنزیمهای کبدی ممکن است به دلیل کاهش تولید متابولیت‌های سمی به دنبال تولید بیوفلوک در سیستم دارای حداقل تعویض آب باشد که به واسطه اضافه کردن منبع کربن آلی به سیستم ایجاد شده بود. منبع کربنی مورد استفاده برای تحریک تشکیل بیوفلوک یک عامل تعیین کننده تولید در آبی‌پروری محسوب می‌شود و از سویی مهم‌ترین شاخص تعیین کننده ترکیب شیمیایی بیوفلوک است (Zhao et al., 2016). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که سیوس برنج در مقایسه با تولید سریع بیوفلوک توسط ملاس نرخ ثابتی داشت. بنابراین، ترکیب سیوس برنج و ملاس توانست در بهینه‌سازی سیستم بیوفلوک موثرتر واقع شود. اثر منبع کربن بر رشد گونه‌های پرورشی بستگی به برخی از ویژگی‌های بیوفلوک تولید شده مانند حجم آن،

عوامل مختلفی مانند نور مستقیم خورشید، محیط کشت، منبع کربن، شوری و نوع سیستم آبی‌پروری بر ترکیب میکروبی بیوفلوک تاثیر می‌گذارند. علاوه بر عوامل محیطی، اندازه ذرات می‌تواند در فرآیند نیتریفیکاسیون دخیل باشد چون که فلوک‌های کوچک‌تر کارایی کمتری در اکسیداسیون آمونیاک و نیتريت دارند (Anand et al., 2014). نتایج مطالعه حاضر نشان داد تراکم باکتری اسید لاکتیک روده در بچه ماهی کپور معمولی متاثر از میزان پروتئین و منابع کربنی مورد استفاده بوده است. به طوری که در تیمار بیوفلوک حاوی ملاس و مخلوط ملاس و سبوس برنج و در سطح ۳۰ درصد پروتئین جمعیت لاکتوباسیل روده افزایش داشت. در این مطالعه، ملاس و مخلوط ملاس و سبوس برنج کارایی بیشتری نسبت به سبوس برنج (کربوهیدرات پیچیده) در افزایش تراکم لاکتوباسیل روده داشتند. احتمالاً منبع کربنی ملاس و مخلوط ملاس و سبوس برنج در مقایسه با سبوس برنج راحت‌تر در محیط پرورشی حل می‌شوند و به سرعت کربن را آزاد می‌کنند. آن‌ها بلافاصله توسط باکتری‌ها مصرف می‌شوند و در مقایسه با کربوهیدرات‌های پیچیده مانند سبوس برنج، سلولز و نشاسته که به آرامی توسط باکتری‌ها تجزیه می‌شوند پاسخ سریع‌تری دارند.

و آلانین آمینوترانسفراز در مقایسه با گروه شاهد مشاهده نکردند.

مطالعاتی درباره استفاده از ترکیبات زیست‌فعال بر فعالیت آنزیم‌های کبدی ماهی کپور معمولی انجام شده است. افزودن پودر پیاز در سطح ۰/۵ درصد به جیره ماهی کپور باعث کاهش معنی‌دار در فعالیت آنزیم‌های ALT و ALP شد (اکرمی و شاملوفر، ۱۳۹۶). افزودن ترکیب زیست‌فعال پوست سیر به جیره بچه ماهی کپور معمولی تفاوت معنی‌داری را در میزان آنزیم‌های کبدی به دنبال نداشت (چیت‌ساز و اکرمی، ۱۳۹۵). صحرایی و همکاران (۱۳۹۶) افزایشی را در میزان آنزیم‌های کبدی به واسطه افزودن سطوح مختلف نانوذرات اکسید آهن و روی به جیره ماهی کپور معمولی گزارش کردند. افزودن پودر تفاله گوجه فرنگی به جیره ماهی کپور موجب تغییر AST و LDH کبد شد ولی میزان ALP و ALT تغییر نیافت (نویدپور آقچه مشهد و همکاران، ۱۳۹۴). در مجموع با توجه به کاهش سطوح آنزیم‌های متابولیک در گروه‌های بیوفلوک می‌توان اظهار کرد افزودن منابع مختلف کربنی در سیستم بدون تعویض آب منجر به آسیب‌های کبدی ماهیان کپور معمولی پرورشی در سیستم متراکم نشده است.

عنوان پتانسیل پروبیوتیکی، منبع مناسبی برای پرورش آبزیان است (Azim and Little, 2008). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در تیمارهای بیوفلوک به دلیل عدم تعویض روزانه آب و به دنبال آن افزایش فلوک‌ها، ماهی کپور توانست از فلوک‌های تولید شده تغذیه کند. باید خاطر نشان کرد در پرورش به روش بیوفلوک، آمونیاک توسط باکتری‌های هتروتروف موجود در سیستم مصرف می‌شود و برقراری این تعادل از طریق تحریک باکتری‌های هتروتروف با اضافه کردن منبع کربن آلی اتفاق می‌افتد. البته زی‌توده و ترکیب جوامع میکروبی در طول زمان تحت شرایط بیوفلوک تغییر کرده و تحت تاثیر شرایط محیطی قرار می‌گیرند.

ملاس به طور گسترده و موفقیت‌آمیزی به عنوان محرک افزایش رشد باکتری‌ها در استخرهای پرورش میگو استفاده شده است که احتمالاً به خاطر قیمت پایین آن است (Martinez-Cordova et al., 2014). Wasielky و همکاران (۲۰۱۳) استفاده از ملاس را در تشکیل بیوفلوک در سیستم بدون تعویض آب در مرحله نوزادی میگوی وانامی برای کنترل آمونیاک پیشنهاد کردند. Emerenciano و همکاران (۲۰۱۲) از سیوس برنج و ملاس در مرحله نوزادی میگوی

بنابراین، کربوهیدرات‌های ساده (ملاس و شکر) باید به طور مداوم به مخزن اضافه شود تا فعالیت مطلوب باکتری‌های هتروتروف حفظ و از افزایش ترکیب نیتروژن غیرآلی جلوگیری شود. تجزیه سریع‌تر ملاس و مخلوط آن با سیوس برنج ممکن است سطوح بالاتر کربن را به عنوان یک بستر غذایی برای باکتری‌های هتروتروف که برای متابولیسم آمونیاک استفاده می‌شوند، فراهم آورد و به این ترتیب کیفیت آب را بهبود بخشند. سرعت تجزیه منبع کربن مورد استفاده در مخازن پرورشی در کاهش میزان غلظت آمونیاک موثر است (Hossein Khanjani et al., 2017). همچنین احتمال می‌رود وجود باکتری‌های مفید مانند *Bacillus* و *Lactobacillus* در بیوفلوک‌های خورده شده ممکن است کلونیزه شدن آن‌ها را در دستگاه گوارش بهبود بخشد که منجر به فعالیت بهتر آنزیم‌های گوارشی و مکانیسم ایمنی می‌شود (Kumar et al., 2017). تولید بیوفلوک و جوامع میکروارگانیسمی متصل به آن به احتمال زیاد به کیفیت مواد اضافه شده، نسبت کربن به نیتروژن و قابلیت دسترسی زیستی نیز بستگی دارد. در پرورش به روش بیوفلوک حضور گروه‌های مختلف باکتریایی به ویژه گونه‌های اسید لاکتیک بیانگر آن است که این سیستم به

پرورش میگوی سفید غربی (وانامی) و اضافه کردن مواد آلی کرین دار (سبوس و آرد گندم، ملاس)، می توان تراکم باکتری های هتروتروف و توسعه فلوک را افزایش داد و از فلوک تولیدی به عنوان استوک باکتری های موثر در سیستم بدون تعویض آب استفاده کرد. عباس زاده و همکاران (۱۳۹۶) گزارش کردند استفاده از منابع قندی مختلف شامل ملاس و شیره ضایعات خرما در سطوح مختلف پروتئین جیره سبب افزایش تعداد باکتری های هتروتروف در تیمارهای بیوفلوک نسبت به شاهد شد. در راستای یافته پژوهش حاضر، حق پرست رادمرد و همکاران (۱۳۹۷) افزایش قابل توجه تعداد باکتری های کل و اسید لاکتیک را در روده ماهیان کپور با استفاده از فناوری بیوفلوک و در نسبت کرین به نیتروژن ۲۰ گزارش کردند. Kumar و همکاران (۲۰۱۷) در آزمایشی اثر دو سطح پروتئین (۳۲ و ۴۰ درصد) و دو منبع مختلف کرین (آرد برنج و ملاس) را در میگوی ببری سیاه بررسی و گزارش کردند بیشترین تعداد *Bacillus* و *Lactobacillus* به ترتیب در تیمار ملاس همراه با ۳۲ درصد پروتئین و آرد برنج همراه با ۳۲ درصد پروتئین به دست آمد. Green و همکاران (۲۰۱۹) گزارش کردند استفاده مداوم کرین آلی خارجی با نسبت بالای

*Farfantepenaeus paulensis* استفاده کردند. Serra و همکاران (۲۰۱۵) از ملاس نیشکر، سبوس برنج و دکستروز به عنوان منبع کرین در مرحله نوزادی و پروراری میگوی وانامی در سیستم بیوفلوک استفاده کردند. در بررسی که Mahanand و همکاران (۲۰۱۳) و حق پرست رادمرد و همکاران (۱۳۹۷) روی ریخت شناسی اجزای بیوفلوک با استفاده از میکروسکوپ الکترونی انجام دادند، مشاهده کردند که دامنه وسیعی از میکروارگانیسم ها از باکتری های باسیلی شکل تا تک یاخته ای های مختلف در سیستم وجود دارد که با بررسی های انجام شده در مطالعه حاضر که منجر به افزایش جمعیت باکتری های اسید لاکتیک در روده ماهی کپور شد مشابهت دارد. در بررسی که برخی پژوهشگران در پروفایل میکروبی سیستم بیوفلوک انجام دادند مشاهده کردند که سیانوباکتری های رشته ای می توانند در این سیستم با برخی دیگر از ارگانیسم ها رقابت کنند و تاثیر بازدارندگی در رشد و تکثیر باکتری های دیگر بگذارند (Hargreaves, 2006) و شاید در بررسی حاضر کاهش تراکم باکتری های اسید لاکتیک در تیمار سبوس برنج به این عامل مرتبط باشد. خانجانی و همکاران (۱۳۹۵) دریافتند که در سیستم بدون تعویض آب



C/N مورد توجه باکتری‌های هتروتروف در سیستم بیوفلوک است در حالی که نسبت پایین C/N مطلوب باکتری‌های نیتریفیکه است. به طور کلی با توجه به شاخص‌های مورد بررسی در مطالعه حاضر می‌توان نتیجه گرفت فلوک‌های میکروبی نمی‌توانند کاهش ۱۰ درصد پروتئین خام در جیره را جبران کنند ولی پرورش متراکم ماهی کپور معمولی به روش بیوفلوک همراه با منبع کربنی مخلوط ملاس نیشکر و سبوس برنج و در سطح ۳۰ درصد پروتئین در مخزن قابل انجام است. با توجه به نقش مفید تکنولوژی بیوفلوک در بهبود کیفیت آب که باعث کاهش هزینه‌های آب (تا ۳۰ درصد) می‌شود، مطالعات بیشتر در مورد منابع ارزان‌تر کربوهیدرات مانند آرد ذرت، آرد برنج، نشاسته سیب زمینی، فرآورده‌های جانبی عمل‌آوری شده نیشکر و دیگر محصولات فرعی کشاورزی برای رشد و تحریک بیوفلوک در این سیستم‌های لازم است. همچنین ترکیب بیوشیمیایی فلوک‌های تولید شده برای استفاده در خوراک نیز باید در تیمارهای با منابع کربوهیدراتی مختلف مورد تجزیه و تحلیل قرار گیرد.

## منابع

- اکرمی ر. و شاملوفر م. ۱۳۹۶. اثر تغذیه‌ای پودر پیاز بر برخی فراسنجه‌های ایمنی، بیوشیمی و برخی آنزیم‌های سرم خون ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). نشریه توسعه آبزی‌پروری، ۱۱(۴): ۱-۱۲.
- چیت‌ساز ح. و اکرمی ر. ۱۳۹۵. تاثیر سطوح مختلف پوست سیر بر فعالیت برخی آنزیم‌های کبدی در کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). نخستین همایش ملی گیاهان دارویی معطر و ادویه‌ای. دانشگاه گنبدکاووس، گنبدکاووس. ص: ۲۶-۲۳.
- حق پرست رادمرد م.م.، علیشاهی م.، قربانپور م. و شهریاری ع. ۱۳۹۷. مقایسه کیفیت پرورش آب در سیستم پرورش متراکم ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) به روش بیوفلاک با سطوح مختلف ملاس نیشکر. مجله دامپزشکی ایران، ۱۴(۳): ۴۰-۲۸.
- خانجانی م.ح.، سجادی م.م.، علیزاده م. و سوری‌نژاد ا. ۱۳۹۵. تولید و ارزیابی بیوفلوک به منظور بکارگیری در سیستم پرورشی بدون ماهی‌شناسی کاربردی، ۳(۴): ۱۱۴-۱۰۱.
- تعووض آب. نشریه توسعه آبزی‌پروری، ۱۰(۱): ۳۳-۴۲.
- صحرائی ح.، هدایتی س.ع.ا.، مریوانی ل. و رضایی خ. ۱۳۹۶. بررسی تغییرات بافت عضله و آنزیم‌های کبدی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) تغذیه شده با نانوذرات اکسید آهن و روی. پژوهش ماهی‌شناسی کاربردی، ۵(۲): ۹۶-۷۹.
- عباس‌زاده ا.، یآوری و.، حسینی س.ج. و نفیسی بهابادی م. ۱۳۹۶. تاثیر منابع مختلف کربنی (ملاس و شیره ضایعات خرما) بر کیفیت آب، عملکرد رشد و ترکیبات بدن میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) در سیستم بایوفلاک. مجله بوم‌شناسی آبزیان، ۶(۴): ۳۸-۲۱.
- نویدپور آقچه مشهد ف.، میردار هریجانی ج.، قرایی ا. و راهداری ع. ۱۳۹۴. تاثیر سطوح مختلف پودر تفاله گوجه فرنگی بر فاکتورهای بیوشیمیایی خون و شاخص‌های رشد در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). پژوهش ماهی‌شناسی کاربردی، ۳(۴): ۱۱۴-۱۰۱.
- Anand P.S.S., Kohli M.P.S., Kumar S., Sundaray J.K., Dam Roy S., Venkateshwarlu G., Sinha A. and Pailan G.H. 2014. Effect of dietary supplementation of biofloc on growth performance and digestive enzyme activities in *Penaeus monodon*. Aquaculture, 418: 108–115.
- Avnimelech Y. 1999. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. Aquaculture, 176: 227–235.

- Avnimelech Y. 2009.** Biofloc Technology, A Practical Guide Book. The World Aquaculture Society, USA. 182P.
- Azim M.E. and Little D.C. 2008.** The biofloc technology (BFT) in indoor tanks: Water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture, 283: 29–35.
- Bakhshi F., Najdegerami E.H., Manaffar R., Tukmechi A. and Rahmani Farahe K. 2018.** Use of different carbon sources for the biofloc system during the grow-out culture of common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings. Aquaculture, 484: 259–267.
- Burford M., Thompsona P.J., McIntoshb R.P., Baumanb R.H. and Pearson D.C. 2004.** The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity, zero-exchange system. Aquaculture, 232: 525–537.
- Crab R., Chielens B., Wille M., Bossier P. and Verstraete W. 2010.** The effect of different carbon sources on the nutritional value of bioflocs, a feed for *Macrobrachium rosenbergii* postlarvae. Aquaculture Research, 41: 559–567.
- Crab R., Kochva M., Verstraete W. and Avnimelech Y. 2009.** Bioflocs technology application in over-wintering of tilapia. Aquacultural Engineering, 40: 105–112.
- Drotman R. and Lawhan G. 1978.** Serum enzymes are indications of chemical induced liver damage. Drug and Chemical Toxicology, 1: 163–171.
- Ekasari J., Angela D., Waluyo S.H., Bachtiar T., Surawidjaja E.H., Bossier P. and De Schryver P. 2014.** The size of biofloc determines the nutritional composition and the nitrogen recovery by aquaculture animals. Aquaculture, 426: 105–111.
- Emerenciano M., Ballester E.L.C., Cavalli R.O. and Wasielesky W. 2012.** Biofloc technology application as a food source in a limited water exchange nursery system for Pink shrimp (*Farfantepenaeus brasiliensis*). Aquaculture Research, 43: 447–457.
- Green B.W., Rawles S.D., Schrader K.K., Gaylord T.G. and McEntire M.E. 2019.** Effects of dietary protein content on hybrid tilapia (*Oreochromis aureus* × *O. niloticus*) performance, common microbial off-flavor compounds, and water quality dynamics in an outdoor biofloc technology production system. Aquaculture, 503: 571–582.
- Hargreaves J.A. 2006.** Photosynthetic suspended-growth

- systems in aquaculture. *Aquacultural Engineering*, 34: 344–363.
- Hossein Khanjani M., Sajjadi M.M., Alizadeh A. and Sourinejad I. 2017.** Nursery performance of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultivated in a biofloc system: The effect of adding different carbon sources. *Aquaculture Research*, 48: 1491–1501.
- Jatoba A., Correa Da Silva B.C., Da Silva J.S., Nascimento Vieira F., Mourino J.L.P. and Quadros Seiffert W. 2014.** Protein levels for *Litopenaeus vannamei* in semi-intensive and biofloc systems. *Aquaculture*, 432: 365–371.
- Kumar S., Anand P.S.S., De D., Deo A.D., Ghoshal T.L., Sundaray J.K., Ponniah A.G., Jithendran K.P., Raja R.A., Biswas G. and Lalitha N. 2017.** Effects of biofloc under different carbon sources and protein levels on water quality, growth performance and immune responses in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture Research*, 48: 1168–1182.
- Mahanand S.S., Moulick S. and Rao P.S. 2013.** Water quality and growth of rohu (*Labeo rohita*) in a biofloc system. *Journal of Applied Aquaculture*, 25: 121–131.
- Mahious A.S., Gatesoupe F.J., Hervi M., Metailler R. and Ollevier F. 2006.** Effect of dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture International*, 14: 219–229.
- Maica P.F., De Borba M.R. and Wasielesky W. Jr. 2012.** Effect of low salinity on microbial floc composition and performance of *Litopenaeus vannamei* juveniles reared in a zero-water-exchange superintensive system. *Aquaculture Research*, 43: 361–370.
- Mansour A.T. and Esteban M.A. 2017.** Effects of carbon sources and plant protein levels in a biofloc system on growth performance, and the immune and antioxidant status of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 64: 202–209.
- Martinez-Cordova L.R., Emerenciano E., Miranda-Baeza A. and Martinez-Porchas M. 2014.** Microbial based systems for aquaculture of fish and shrimp: An updated review. *Reviews in Aquaculture*, 6: 1–18.
- Pan C.H., Chien Y.H. and Hunter B. 2003.** The resistance to ammonia stress of *Penaeus monodon* Fabricius juvenile fed diets supplemented with astaxanthin. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 297: 107–118.
- Panigrahi A., Sundaram M., Saranya C., Swain S., Dash R.R.**

- and Dayal J.S. 2019. Carbohydrate sources differentially influence growth performances, microbial dynamics and immunomodulation in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under biofloc system. *Fish and Shellfish Immunology*, 86: 1207–1216.
- Rajkumar M., Pandey P.K., Aravind R., Vennila A., Bharti V. and Purushothaman C.S. 2016. Effect of different biofloc system on water quality, biofloc composition and growth performance in *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*, 47(11): 3432–3444.
- Ross N.W., Firth K.J., Wang A., Burka J.F. and Jojnson S.C. 2000. Changes in hydrolytic enzyme activities of Atlantic salmon (*Salmo salar*) skin mucus due to infection with the salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) and cortisol implantation. *Disease of Aquatic Organisms*, 41: 43–51.
- Sahoo P.K. 2006. Immune competent organs in teleosts. P: 1–12. In: Swain P., Sahoo P.K. and Ayyappan S. (Eds.). *Fish and Shellfish Immunology: An Introduction*. Narendra Publishing House, India.
- Schryver P.D., Crab R., Defoirdt T., Boon N. and Verstaete W. 2008. The basic of bio-floc technology: The added value for aquaculture. *Aquaculture*, 255: 125–137.
- Serra F.P., Gaona C.A.P., Furtado P.S., Poersch L.H. and Wasielesky W. Jr. 2015. Use of different carbon sources for the biofloc system adopted during the nursery and grow-out culture of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture International*, 23: 1325–1339.
- Shahsavani D., Mohri M. and Gholipour Kanani H. 2008. Determination of normal values of some blood serum enzymes in *Acipenser stellatus* Pallas. *Fish Physiology and Biochemistry*, 36(1): 39–43.
- Son V.N., Phuong N.T., Hai T.N. and Yakupitiyage A. 2011. Production and economic efficiencies of intensive black tiger prawn (*Penaeus monodon*) culture during different cropping seasons in the Mekong delta, Vietnam. *Aquaculture International*, 19: 555–566.
- Verma A., Rani A.B., Rathore G., Saharan N. and Gora A.H. 2016. Growth, non-specific immunity and disease resistance of *Labeo rohita* against *Aeromonas hydrophila* in biofloc systems using different carbon sources. *Aquaculture*, 457: 61–67.
- Wang G., Yu E., Xie J., Yu D., Li Z., Luo W., Qiu L. and Zheng Z. 2015. Effect of C/N ratio on water quality in zero-water exchange tanks and the biofloc supplementation in feed on the

- growth performance of crucian carp (*Carassius auratus*). *Aquaculture*, 443: 98–104.
- Wasielisky W. Jr., Froes C., Foes G., Krummenauer D., Lara G. and Poersch L. 2013.** Nursery of *Litopenaeus vannamei* reared in a biofloc system: The effect of stocking densities and compensatory growth. *Journal of Shellfish Research*, 32: 799–806.
- Xu W.J. and Pan L.Q. 2014.** Dietary protein level and C/N ratio manipulation in zero-exchange culture of *Litopenaeus vannamei*: Evaluation of inorganic nitrogen control, biofloc composition and shrimp performance. *Aquaculture Research*, 45: 1842–1851.
- Zhao D., Pan L., Huang F., Wang C. and Xu W. 2016.** Effects of different carbon sources on bioactive compound production of biofloc, immune response, antioxidant level, and growth performance of *Litopenaeus vannamei* in zero-water exchange culture tanks. *Journal of World Aquaculture Society*, 47: 566–576.



Research Paper

**Effect of protein levels and different carbon sources on mucus immune parameters, hepatic enzymes activity and *Lactobacillus* loading in biofloc system of common carp (*Cyprinus carpio*) juvenile**

Ali Reza Ebrahimi<sup>1</sup>, Reza Akrami<sup>2\*</sup>, Ebrahim Hosein Najdegerami<sup>3</sup>, Zahra Ghiasvand<sup>4</sup>, Hadi Koohsari<sup>5</sup>

Received: June 2019

Accepted: October 2019

**Abstract**

An 8-week experiment was conducted to evaluate the effect of different carbon sources and protein levels on mucus immune parameters, hepatic enzymes and intestine lactic acid bacteria loading in biofloc system of common carp (*Cyprinus carpio*) juvenile in intensive culture. Fish fed the feed containing 20 or 30% crude protein including two groups in clear water conditions with no biofloc, two biofloc groups given a molasses as additional carbon source (M), two biofloc groups given rice bran (RB) and two biofloc groups given mixture of molasses + rice bran at equal weight ratio (M+RB). At the end of trial, mucus immune parameters (lysozyme activity and total immunoglobulin), hepatic enzymes (LDH, AST, ALT, ALP) and intestine lactic acid bacteria loading were investigated. The results showed that significant improvements in immune parameters were observed in fish fed 30% dietary protein and reared in biofloc condition ( $P < 0.05$ ). Hepatic enzymes and lactic acid bacteria loading significantly improved in fish fed 30% dietary protein and reared in M and M+RB biofloc than control group ( $P < 0.05$ ). In conclusion, using mixture of M+RB as carbon source associated higher protein can be improved immune response, metabolic enzyme and lactobacillus loading in intensive farming of common carp.

**Key words:** *Protein, Immunity, Hepatic Enzyme, Lactic Acid, Biofloc, Cyprinus carpio.*

1- Ph.D. Student in Fisheries, Department of Fisheries, Azadshahr Branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Iran.

2- Associate Professor in Department of Fisheries, Azadshahr Branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Iran.

3- Associate Professor in Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Iran.

4- Assistant Professor in Department of Fisheries, Azadshahr Branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Iran.

5- Assistant Professor in Department of Microbiology, Azadshahr Branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Iran.

\*Corresponding Author: [akrami.aqua@gmail.com](mailto:akrami.aqua@gmail.com)