مقاله کامل علمی- پژوهشی

بهره‌برداری و پرورش آبزیان
جلد دهم، شماره سوم، پاییز ۱۴۰۰
۱-۱۳
http://japu.gau.ac.ir
DOI: 10.22069/japu.2021.19297.1595

اثر نسبت‌های مختلف کربن به ازت و پروتئین غذا بر ایمنی بچه‌ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در سیستم بایوفلاک

مزدک عالی محمودی[۱] و حمید محمدی آذرم[۲*]

[۱]دانش‌آموخته دکتری گروه تکثیر و پرورش شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، خوزستان، ایران،

[۲]دانشیار گروه تکثیر و پرورش شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، خوزستان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۱۶؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۰۸

چکیده

هدف این مطالعه بررسی نحوه اثرگذاری نسبت‌های مختلف کربن به ازت و روش انجام آن به جهت پرورش بچه‌ماهی کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*) در سیستم بایوفلاک از طریق شاخص‌های ایمنی بود. بنابراین تعداد ۷۵۰ عدد بچه‌ماهی با میانگین وزن اولیه ۰/۰۵±۱۷ گرم انتخاب و به طور کاملاً تصادفی میان ۳۰ عدد تانک فایبرگلاس با حجم تقریبی ۲۵۰ لیتر آب تقسیم شدند. تیمارهای مورد استفاده شامل سه سطح کربن به نیتروژن با سطوح مختلف ۱۵، ۲۰ و ۲۵ و سه سطح پروتئینی جیره شامل ۲۵ درصد، ۳۰ درصد و ۳۵ درصد با سه تکرار در طی یک دوره ۵۶ روزه در نظر گرفته شدند. هم‌چنین یک گروه شاهد در سیستم مرسوم همراه با تعویض آب با سطح پروتئین ۳۵ درصد تغذیه شد. بر اساس نتایج به‌دست آمده مقدار پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین در تیمارهای بایوفلاک افزایش عددی را همراه با سطح بالای درصد پروتئین جیره در نسبت‌های مختلف کربن به ازت در مقایسه با تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری نشان داد ($P<0/05$). هم‌چنین کم‌ترین میزان پروتئین کل و آلبومین سرم خون در تیمار شاهد بود. از طرفی کم‌ترین میزان فعالیت لیزوزیم، کمپلمان و قدرت باکتری‌کشی در تیمار شاهد مشاهد شد که به طور معنی‌داری کم‌تر از تیمار بایوفلاک با سطح پروتئین ۳۰ درصد و نسبت کربن به ازت ۱۵ بود ($P<0/05$). در نتیجه استفاده از نسبت بهینه کربن به ازت ۱۵ با پروتئین ۳۰ درصد با توجه به فعالیت لیزوزیم و کمپلمان روش مناسبی برای تولید بچه‌ماهیان کپور معمولی در مراحل اول زندگی در این سیستم است.

واژه‌های کلیدی: باکتری هتروتروف، بایوفلاک، سرم خون، سیستم ایمنی، کپور معمولی

* مسئول مکاتبه: azarmhamid@gmai.com

مقدمه

در طی دو دهه گذشته، پرورش آبزیان با رشد سالانه در حدود ۸ درصد، سریع‌ترین و با ثبات‌ترین نرخ رشد را در تولید پروتئین‌های جانوری در جهان دارا بوده است. جهان و به‌خصوص کشورمان ایران، امروزه با چالش‌های گوناگونی همانند کمبود منابع آب شیرین و تخریب محیط زیست و از بین رفتن تالاب‌ها و دریاچه‌ها و سایر منابع آبی مواجه است. هم‌چنین بر اساس گزارش سازمان خواروبار و کشاورزی ملل متحد، صید جهانی آبزیان به حدی است که با شیوه‌های کنونی مدیریت ذخایر، نمی‌توان انتظار تولید بیش‌تری داشت (فائو، ۲۰۱۸). بر اساس آخرین آمار ارائه شده توسط فائو در سال ۲۰۱۸ میلادی، میزان کل تولید آبزیان (صید و آبزی‌پروری) در سال ۲۰۱۶ میلادی ۱۷۰/۹ میلیون تن بوده، که حدود ۸۰ میلیون تن آن مربوط به جانوران آبزی و ۳۰/۱ میلیون تن مربوط به گیاهان آبزی بوده است.

بنابراین برای مقابله با این چالش‌ها باید روش‌های نوین دیگری را نیز در آبزی‌پروری به اجرا گذاشت که یکی از این روش‌ها که از سال ۲۰۰۰ میلادی مورد استفاده قرار گرفته است روش بایوفلاک می‌باشد، که این روش مبتنی بر حداقل تعویض آب و تولید حداکثری در واحد سطح است (آونیملچ، ۲۰۰۹). فناوری بایوفلاک یک تکنیک مدیریت و حفظ کیفیت آب از طریق افزودن میزان کربن آلی به سیستم آبزی‌پروری، از طریق یک منبع کربن خارجی است. این جذب نیتروژن توسط افزایش رشد باکتری هتروتروف و کاهش غلظت آمونیوم با سرعت بیش‌تری نسبت به نیتریفیکاسیون صورت می‌گیرد (هارگریوز، ۲۰۰۶). هم‌چنین این سیستم می‌تواند پروتئینی را با هزینه کم تولید کند که به مصرف آبزی برسد (کرب و همکاران، ۲۰۱۰a، ۲۰۰۹، ۲۰۰۷) که به‌دنبال آن می‌تواند هزینه تولید را در آبزی‌پروری به مراتب کم‌تر کند (دشریور و همکاران، ۲۰۰۸؛ آونیلمچ، ۲۰۰۹).

از نکات مؤثر در شکل‌گیری مؤثر سیستم بایوفلاک می‌توان به هوادهی یا اکسیژن‌رسانی کافی برای تامین نیاز اکسیژنی ماهیان و باکتری‌های هتروتروف، تامین نسبت مناسب کربن به ازت جهت شکل‌گیری مناسب فلاک‌ها در سیستم بایوفلاک و کنترل مقدار مواد دفعی و زهکشی آن اشاره کرد (ری و همکاران، ۲۰۱۰a). هم‌چنین بنا به گزارش‌های آونیلمچ (۲۰۱۲)، دو روش جهت متعادل کردن یا حفظ نسبت کربن به ازت به‌کار می‌رود. در روش اول از جیره غذایی با پروتئین پایین و کربوهیدرات بالا استفاده می‌شود، که بر اساس مطالعات مزدک عالی محمودی و محمدی آذرم (۲۰۱۹) استفاده از جیره‌هایی با پروتئین پایین و کربوهیدرات بالا حاوی نسبت کربن به ازت ۱۵ روش مناسبی جهت پرورش ماهی کپور معمولی تا عرضه به بازار به‌شمار می‌رود. در روش دوم از جیره غذایی با پروتئین بالا و اضافه کردن منبع کربوهیدراتی مانند ملاس به درون آب استفاده می‌شود. از این‌رو تعیین نسبت بهینه کربن به ازت و روش ایجاد آن با توجه به نوع گونه پرورشی، مرحله زندگی آبزی و هدف آبزی‌پرور دارای اهمیت است.

در نهایت چنان‌چه تعادل بهینه بین کربن و نیتروژن در استخر پرورشی برقرار گردد، آمونیوم به‌طرز مناسبی همراه ضایعات نیتروژنی آلی استخر به زیست‌توده باکتریایی هتروتروف تبدیل خواهند شد (اشنایدر و همکاران، ۲۰۰۵) که در نتیجه جذب نیتروژن از طریق تولید پروتئین میکروبی انجام می‌گیرد (آونیلمچ، ۱۹۹۹). علاوه بر این ماهیان از وضعیت سلامتی و رشد مناسبی نیز به جهت فلاک‌های شکل گرفته در سیستم برخوردار می‌شوند.

سیستم بایوفلاک غالباً جهت پرورش میگوی سفید هندی (*Litopenaeus vannamei*) و ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) به دلیل مقاومت بالا به شرایط کدورت مورد استفاده قرار گرفته است. اما نتایج پژوهش‌های پژوهشگران نشان می‌دهد که ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) نیز به عنوان یکی از گونه‌های مهم اقتصادی و با مقاومت بالا دارای قابلیت پرورش درون سیستم بایوفلاک می‌باشد (نجد گرامی و همکاران، ۲۰۱٦؛ بخشی و همکاران، ۲۰۱۸؛ آدینه و همکاران، ۲۰۱۹). بنابراین از آن‌جایی‌که هم اکنون این گونه به‌صورت جهانی، غالباً در سیستم نیمه‌متراکم و درون استخرهای خاکی پرورش داده می‌شوند، نیاز به تخلیه پساب در محیط و هم‌چنین آب فراوان دارد. در نتیجه به‌نظر می‌رسد این تکنولوژی می‌تواند روش مناسبی به جهت توسعه پایدار صنعت پرورش ماهی کپور معمولی به صورت متراکم باشد.

در نتیجه پژوهش حاضر به بررسی تعیین نسبت بهینه کربن به ازت و روش ایجاد آن از طریق به‌کارگیری جیره‌های غذایی با سطوح مختلف پروتئین با هدف افزایش سطح ایمنی در مرحله اولیه زندگی ماهیان کپور معمولی پرورش یافته درون سیستم بایوفلاک پرداخته است.

مواد و روش‌ها

تهیه بچه ماهی و نحوه انجام آزمایش: به‌منظور انجام این پژوهش بچه‌ماهیان سالم کپور معمولی از مرکز معتبر پرورش ماهیان گرمابی شهدای شلمچه خرمشهر خریداری شده و با استفاده از مخازن مخصوص حمل ماهی، با اعمال حداقل استرس به محل انجام پژوهش (آزمایشگاه خیس دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر) منتقل شدند. ماهیان جهت ایجاد شرایط آداپتاسیون، از لحاظ علائم ظاهری وجود بیماری مورد بررسی قرار گرفته و پس از حمام در آب نمک ۱ درصد، به مدت دو هفته، به‌منظور رفع هر گونه استرس ناشی از حمل و نقل و سازگاری به شرایط پرورشی نگهداری شدند. ماهیان روزانه در سه نوبت به میزان ۳ درصد وزن بدن تغذیه می‌شدند. خوراک تجاری کپورماهیان پرورشی (شرکت کیمیاگران تغذیه، شهرکرد، ایران) در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱). میزان پروتئین جیره مورد استفاده برای ماهیان تیمار شاهد (سیستم معمولی یا سنتی) ۳۵ درصد و میزان پروتئین جیره مورد استفاده برای ماهیان در تیمارهای بایوفلاک به‌ترتیب ۲۵، ۳۰ و ۳۵ درصد بود (آونیلمچ، ۲۰۱۲). جیره‌های آزمایشی تا زمان استفاده جهت تغذیه ماهیان در یخچال نگهداری شدند. پس از آبگیری تانک‌های پرورشی، در فاز ابتدایی و قبل از ذخیره‌سازی بچه‌ماهی برای تشکیل بایوفلاک، از مواد مختلف شامل خوراک تجاری کپورماهیان با ۳۵ درصد پروتئین، ملاس به‌عنوان منبع کربوهیدرات و کود اوره ٤٦ درصد، آرد و سبوس گندم و هم‌چنین خاک رس که پس از نرم شدن و عبور از الک با شماره چشمه ۲۷۰ (ذراتی به اندازه ۵۳ میکرون و کم‌تر را عبور می‌دهد) جهت چسبیدن بهتر ذرات به یکدیگر و کمک به تشکیل فلاک (به دلیل بار الکتریکی) استفاده شد (کرب و همکاران، ۲۰۱۲). هوادهی کافی به‌منظور تأمین اکسیژن مورد نیاز و چرخش آب در تانک تشکیل بایوفلاک انجام شد. هم‌چنین برای تحریک و توسعه بیش‌تر بایوفلاک در طول دوره آزمایش، منبع کربوهیدراتی ملاس با ۵۰ درصد کربن با توجه به نسبت‌های مورد نظر آزمایشی به تانک‌های پرورش کپور معمولی اضافه شد. بنابراین تیمارهای آزمایشی با در نظر گرفتن سه تکرار برای هر تیمار در طی یک دوره ٥٦ روزه به‌شرح زیر مورد مطالعه قرار گرفت.

۱) **تیمار شاهد:** تغذیه با جیره کنسانتره تجاری معمولی با سطح پروتئینی ۳۵ درصد (سیستم معمولی یا سنتی)

۲) **تیمار اول (C/N۱۵ P۲۵)**: جیره غذایی کنسانتره فرموله شده با پروتئین ۲۵ درصد و نسبت کربن به نیتروژن ۱۵

۳) **تیمار دوم (C/N۲۰ P۲۵)**: جیره غذایی کنسانتره فرموله شده با پروتئین ۲۵ درصد و نسبت کربن به نیتروژن ۲۰

٤) **تیمار سوم (C/N۲۵ P۲۵)**: جیره غذایی کنسانتره فرموله شده با پروتئین ۲۵ درصد و نسبت کربن به نیتروژن ۲۵

۵) **تیمار چهارم (C/N۱۵ P۳۰)**: جیره غذایی کنسانتره فرموله شده با پروتئین ۳۰ درصد و نسبت کربن به نیتروژن ۱۵

٦) **تیمار پنجم (C/N۲۰ P۳۰)**: جیره غذایی کنسانتره فرموله شده با پروتئین ۳۰ درصد و نسبت کربن به نیتروژن ۲۰

۷) **تیمار ششم (C/N۲۵ P۳۰)**: جیره غذایی کنسانتره فرموله شده با پروتئین ۳۰ درصد و نسبت کربن به نیتروژن ۲۵

۸) **تیمار هفتم (C/N۱۵ P۳۵)**: جیره غذایی کنسانتره فرموله شده با پروتئین ۳۵ درصد و نسبت کربن به نیتروژن ۱۵

۹) **تیمار هشتم (C/N۲۰ P۳۵)**: جیره غذایی کنسانتره فرموله شده با پروتئین ۳۵ درصد و نسبت کربن به نیتروژن ۲۰

۱۰) **تیمار نهم (C/N۲۵ P۳۵)**: جیره غذایی کنسانتره فرموله شده با پروتئین ۳۵ درصد و نسبت کربن به نیتروژن ۲۵

در تانک‌های تیمار شاهد، میزان تعویض آب به روش متداول پرورش متراکم کپورماهیان و هر سه روز ۲۵ درصد صورت گرفت.

جدول ۱- ترکیبات شیمیایی غذای تجاری کپور ماهی معمولی، شرکت کیمیاگران تغذیه.

آنالیز جیره	پروتئین (درصد)		
	۲۵	۳۰	۳۵
کربوهیدرات (درصد)	٤۵	٤۰	۳۵
چربی خام (درصد)	٦	٦	۷
فیبرخام (درصد)	۸	۸	۷
خاکستر (درصد)	۱۰	۱۰	۱۰
رطوبت (درصد)	۱۰	۱۰	۱۰

نمونه‌گیری جهت سنجش پارامترهای ایمنی خون: در انتهای دوره آزمایش، ماهیان به مدت ٢٤ ساعت قطع غذادهی شدند، سپس با پودر گل میخک (۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بیهوش شده و خونگیری انجام شد. در این آزمایش به منظور سنجش پارامترهای ایمنی شامل میزان پروتئین کل سرم کمپلمان کل، لیزوزیم سرم و قدرت باکتری‌کشی سرم، تعداد ۸ عدد ماهی از هر تانک به‌صورت تصادفی صید گردید. خونگیری از سیاهرگ وریدی در قسمت انتهای باله مخرجی، با استفاده از سرنگ ۵ سی‌سی معمولی انجام شد. جهت

اجتناب از افزایش کورتیزول ناشی از دستکاری طی نمونه‌برداری در زمانی کم‌تر از ۳ دقیقه انجام شد. نمونه‌های خون با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس سرم با استفاده از سمپلر جداسازی شده و تا زمان انجام سنجش‌های آزمایشگاهی در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

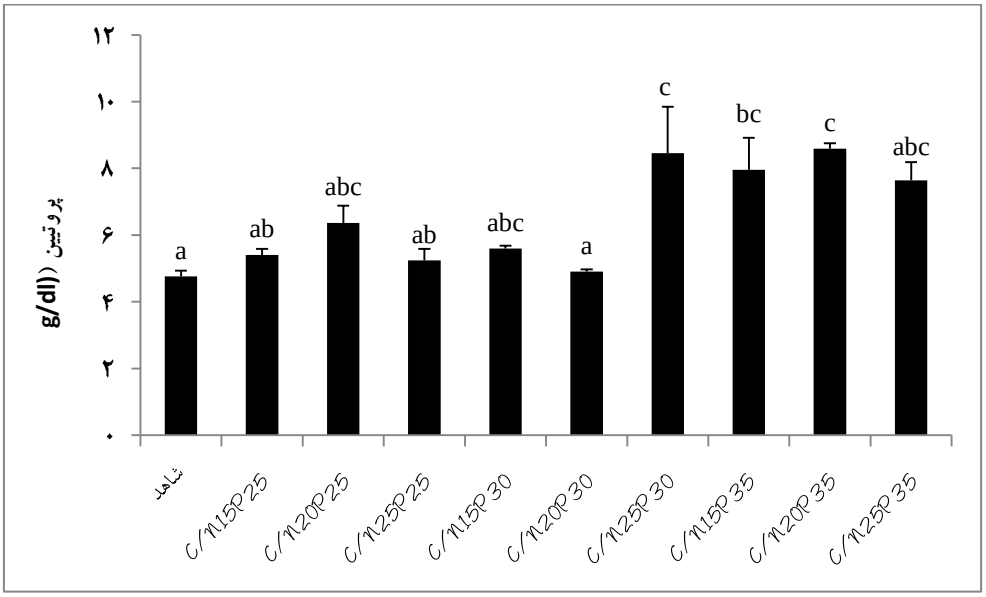
سنجش‌های پارامترهای ایمنی سرم در ماهیان پرورشی: پروتئین خون با روش بیورت با واحد گرم بر دسی‌لیتر با استفاده از کیت پارس آزمون به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری گردید. اندازه‌گیری آلبومین سرم براساس روش برموکرزول‌گرین صورت گرفت. در این روش، آلبومین سرم به‌طور انتخابی با برموکرزول‌گرین (BCG) تشکیل یک کمپلکس سبز مایل به آبی می‌دهد که شدت رنگ آن با غلظت آلبومین موجود در نمونه سرم در ارتباط می‌باشد. شدت جذب نور در طول موج ٦٣٠ نانومتر اندازه‌گیری و بر حسب میزان جذب نوری و سطح آلبومین استاندارد و بر اساس فرمول ارائه شده در کاتالوگ کیت محاسبه شد. استاندارد آلبومین نیز به‌صورت جداگانه تهیه گردید (جانسون و همکاران، ۱۹۹۹). جهت اندازه‌گیری فعالیت کمپلمان از آزمایش همولیز در ژل آگارز استفاده شد (براتا، ۱۹۹۳). برای این‌کار ابتدا آگارز ۱/۵ درصد در بافر فسفات (pH=۷/۲ حاوی ۰/۵ میلی‌مول کلرید منیزیم و ۱/۵ میلی‌مول کلرید کلسیم) تهیه شد. مقدار ۱×۱۰^{۸} گلبول قرمز خرگوش شسته شده با بافر فسفات در دمای ۵۰ تا ۵۵ درجه سانتی‌گراد به آگارز اضافه شد. مخلوط آگارز حاوی گلبول‌های قرمز خرگوش داخل پلیت‌ها توزیع گردید. پلیت‌ها به مدت یک شب در یخچال ٤ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و سپس حفرات به قطر ۳ میلی‌متر و با فاصله ۲ سانتی‌متر از هم در آگار ایجاد شد و در هر گوده میزان ۲۰ میکرولیتر از سرم نمونه ریخته شد. پلیت‌ها در محیط مرطوب و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٤٨ ساعت انکوبه شده و پس از آن قطر هاله لیز گلبولی با خط‌کش مخصوص به‌عنوان واحد فعالیت در میلی‌لیتر سرم خون اندازه‌گیری شد. هم‌چنین برای اندازه‌گیری میزان فعالیت لیزوزیم سرم از روش کدورت‌سنجی که توسط الیس (۱۹۹۰) و نایاک (۲۰۱۰)، توصیه شده است، استفاده گردید. برای این‌کار در ابتدا ۱۵ میکرولیتر سرم با ۱۳۵ میکرولیتر از سوسپانسیون ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر باکتری (*Micrococcus lysodeikticus*) (سیگما) در بافر ۰/۰۲ مولار سدیم سیترات (pH=۵/۸) در گوده‌های میکروپلیت تخت مخلوط گردید و جذب نوری آن در دمای اتاق در زمان‌های صفر و ٦ دقیقه بعد از مخلوط‌سازی در طول موج ٤٥٠ نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان فعالیت لیزوزیم سرم با توجه به منحنی استاندارد مربوط به لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ سیگما تعیین گردید. میزان میزان گلوبولین تام سرم از تفریق میزان آلبومین از پروتئین تام سرم محاسبه شد (جانسون و همکاران، ۱۹۹۹). برای اندازه‌گیری قدرت باکتری‌کشی سرم از روش توصیه شده توسط کاجیتا و همکاران (۱۹۹۰)، با کمی تغییرات استفاده گردید. برای این‌کار ابتدا باکتری (*Aeromonas hydrophila*) به‌مدت ٦ ساعت در محیط TSB کشت داده شد و سپس از آن رقت ۲×۱۰^{-۵} تهیه گردید. نمونه‌های سرمی نیز به نسبت ۱:۳ با بافر فسفات رقیق گردیدند. سوسپانسیون باکتریایی حاصل در میکروتیوب‌های استریل به نسبت ۱:۱ با سرم رقیق شده مخلوط شد و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با حرکت ملایم انکوبه گردید. علاوه بر نمونه‌های فعال، آزمایش با سرم غیرفعال شده (سرم قرار گرفته حرارت دیده در دمای ٦٥ درجه سانتی‌گراد به مدت نیم‌ساعت) نیز انجام شد، سپس ۱۰ میکرولیتر از مخلوط سرم و باکتری در محیط کشت TSA کشت

شد. تمامی مراحل در زیر هود و کنار شعله انجام گرفت. محیط‌ها به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید و سپس به کمک دستگاه کلونی‌کانتر تعداد پرگنه باکتریایی رشد یافته در روی محیط کشت شمارش گردید.

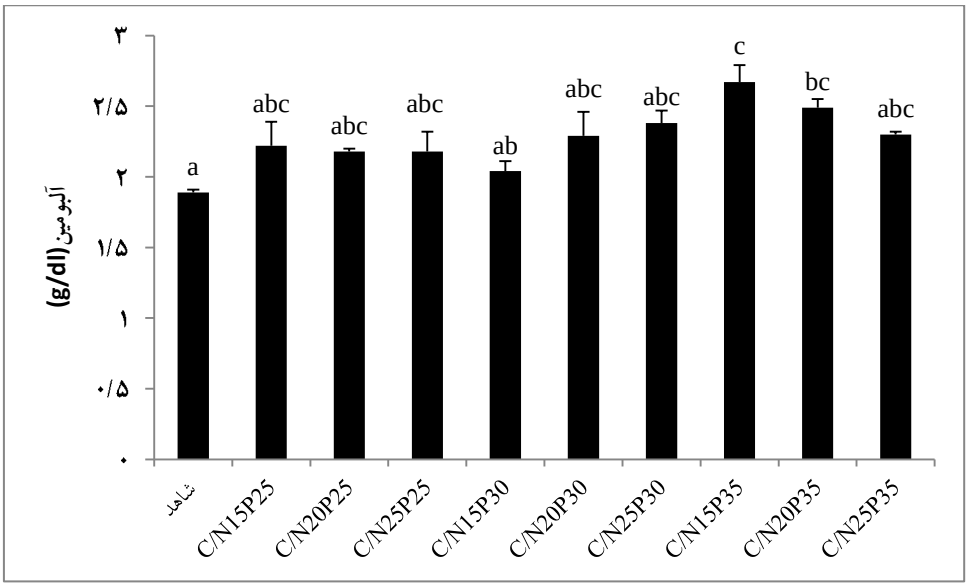
تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: طرح کلی این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی برنامه‌ریزی و اجرا گردید. ثبت کلی داده‌های جمع‌آوری‌شده در هر مرحله و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل (۲۰۱۳)، انجام شد. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار اس پی اس اس- ۱۹ استفاده شد. نتایج آزمایش‌های خون به وسیله آزمون واریانس یک طرفه بررسی شد. آزمون توکی به عنوان مرحله نهایی جهت مقایسه میانگین تیمارها استفاده شد. تمام آنالیزهای آماری در سطح معنی‌دار ۹۵ درصد (P<۰/۰۵) صورت گرفته و تغییر میانگین داده‌ها به‌صورت میانگین خطای استاندارد نشان داده شد.

نتایج

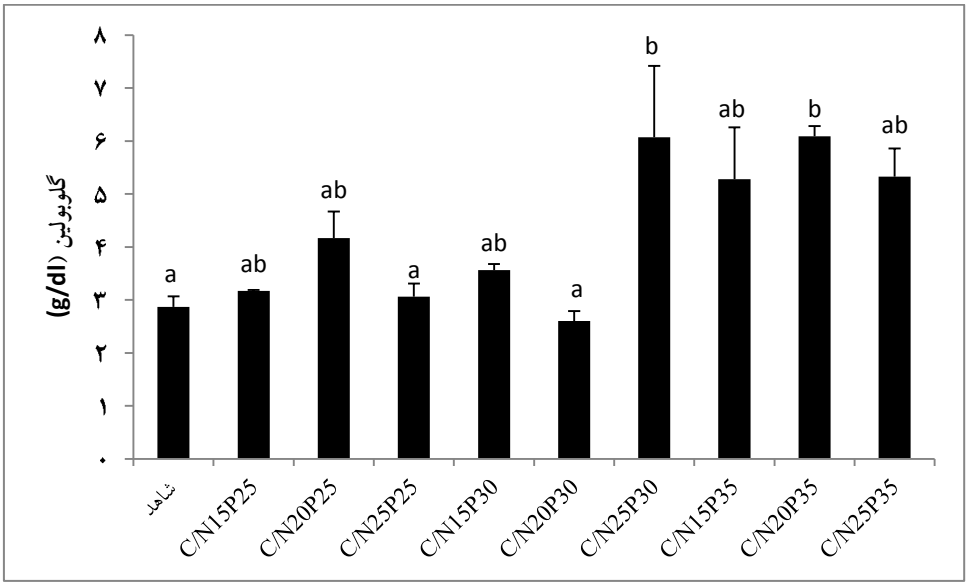
با توجه به شکل ۱، کم‌ترین میزان پروتئین کل سرم خون در تیمار شاهد (٤/۷٦±۰/۱۷) گرم بر دسی‌لیتر که با تیمار حاوی پروتئین ۳۵ درصد با نسبت کربن به ازت ۲۰ (۸/۵۹±۰/۱٦) و تیمار حاوی پروتئین ۳۰ درصد با نسبت کربن به ازت ۲۵ (۸/٤٦±۱/۳۹) به‌طور معنی‌داری اختلاف داشت (P<۰/۰۵). با توجه به شکل ۲، کم‌ترین میزان آلبومین سرم خون در تیمار شاهد (۱/۸۹±۰/۰۲) گرم بر دسی‌لیتر و بیش‌ترین میزان آن (۲/٦۷±۰/۱۲) گرم بر دسی‌لیتر در تیمار با پروتئین ۳۵ درصد با نسبت کربن به ازت ۱۵ می‌باشد که با تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار وجود دارد (P<۰/۰۵). با توجه به شکل ۳ بیش‌ترین میزان گلوبولین (٦/۰۹±۰/۱٦) گرم بر دسی‌لیتر در تیمار با پروتئین ۳۵ درصد با نسبت کربن به ازت ۲۰ بود که با تیمار شاهد (۲/۸۷±۰/۲۰) گرم بر دسی‌لیتر دارای اختلاف معنی‌دار بود (P<۰/۰۵).



شکل ۱- پروتئین سرم ماهی کپور معمولی در نسبت‌های مختلف کربن به ازت و پروتئین مختلف در سیستم بایوفلاک (میانگین ± خطای استاندارد). حروف انگلیسی کوچک غیرمشابه در هر ستون، بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.



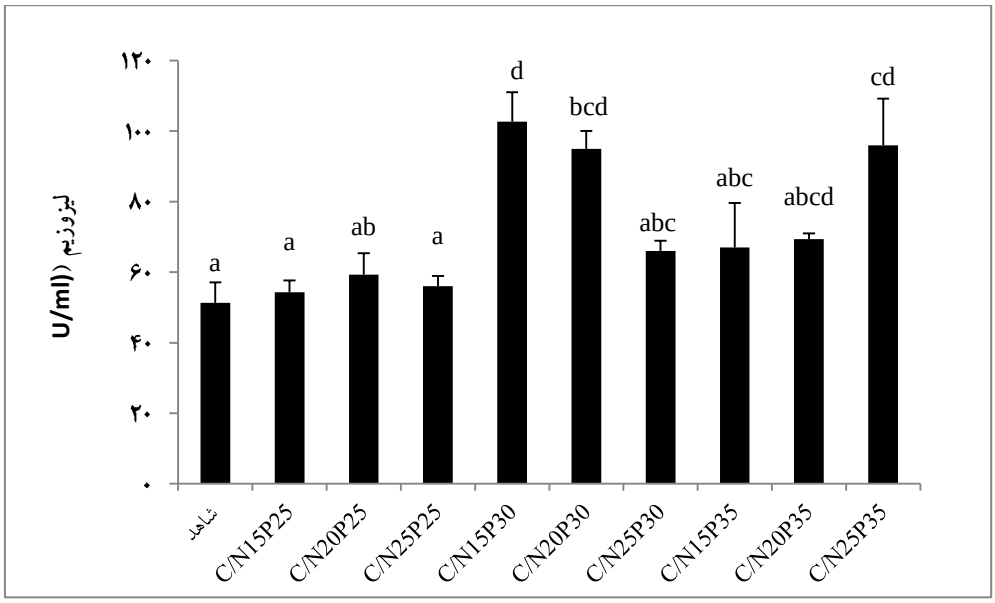
شکل ۲- آلبومین سرم ماهی کپور معمولی در نسبت‌های مختلف کربن به ازت و پروتئین مختلف در سیستم بایوفلاک (میانگین ± خطای استاندارد). حروف انگلیسی کوچک غیرمشابه در هر ستون، بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.



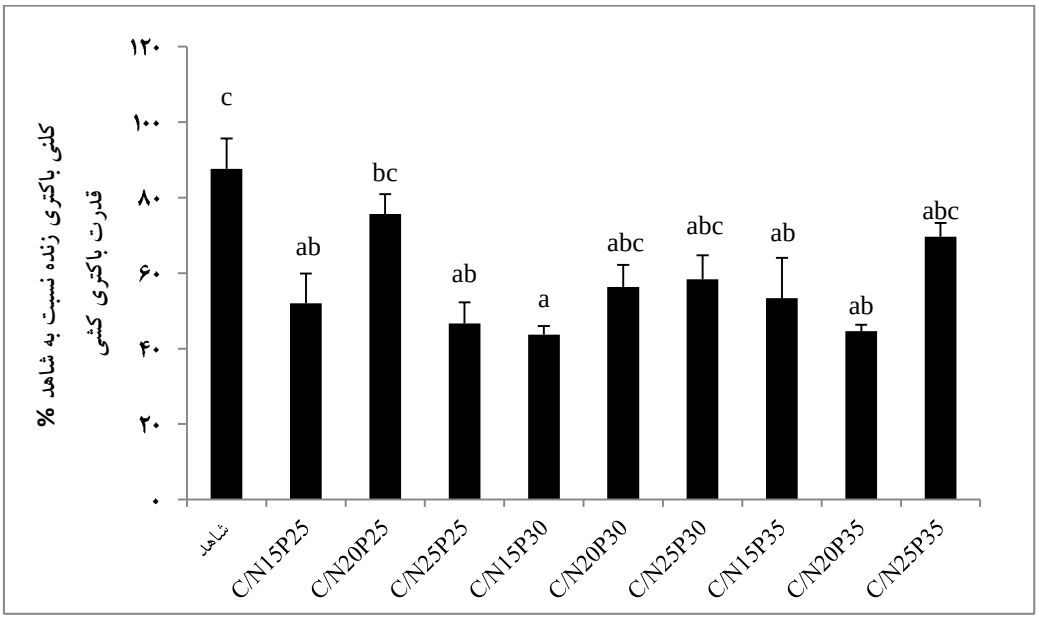
شکل ۳- گلوبولین سرم ماهی کپور معمولی در نسبت‌های مختلف کربن به ازت و پروتئین مختلف در سیستم بایوفلاک (میانگین ± خطای استاندارد). حروف انگلیسی کوچک غیرمشابه در هر ستون، بیانگر اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۵ است.

با توجه به شکل ٤، بالاترین سطح فعالیت لیزوزیم سرم خون ماهیان در تیمارهایی با پروتئین ۳۰ درصد و نسبت کربن به ازت ۱۵ (۱۰۲/٦٦±۸/۳۳)، پروتئین ۳۰ درصد با نسبت کربن به ازت ۲۰ (۹۵/۰۰±۵/۰۰) و پروتئین ۳۵ درصد با نسبت کربن به ازت ۲۵ (۹٦/۰۰±۱۳/۲۲) واحد در میلی‌لیتر به‌دست آمد که با تیمار شاهد (۵۱/۳۳±۵/۷) واحد در میلی‌لیتر دارای اختلاف معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). هم‌چنین بر اساس شکل ۵ کم‌ترین کلنی باکتری زنده شمارش شده (٤۳/٦٦±۲/۳۳) در ارتباط با قدرت باکتری‌کشی سرم خون ماهیان در تیمار با پروتئین ۳۰ درصد و نسبت کربن به ازت ۱۵ بود که با تیمار

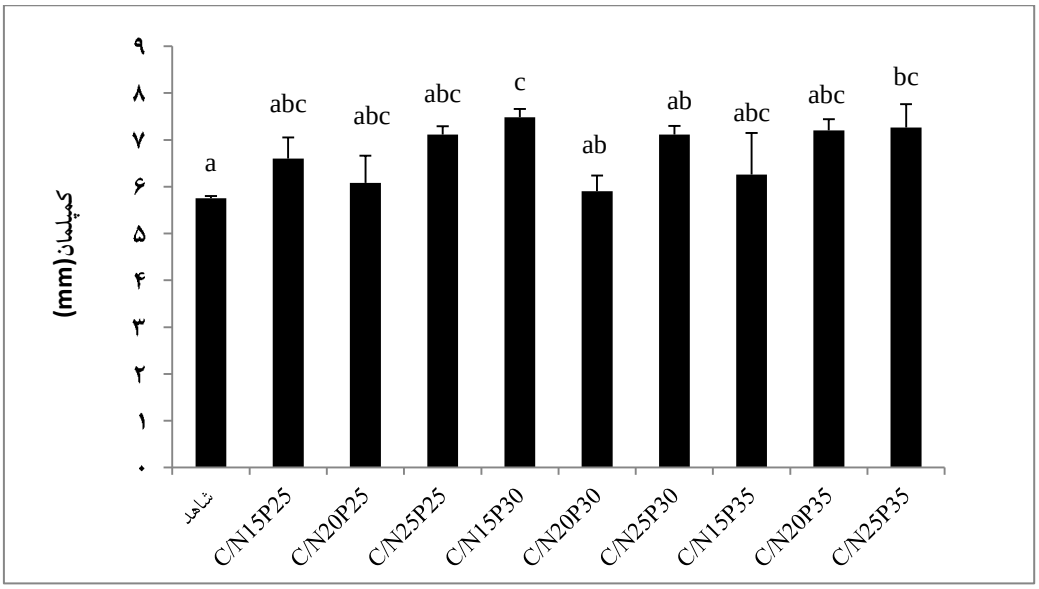
شاهد (۸۷/۶۶±۱۳/۸۷) دارای اختلاف معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). در نهایت با توجه به شکل ٦، کم‌ترین میزان فعالیت کمپلمان کل سرم خون ماهیان (قطر هاله لیز شده بر حسب میلی‌متر) در تیمار شاهد (۵/۷۵±۰/۰۵) بود که با تیمارهای حاوی پروتئین ۳۰ درصد با نسبت کربن به ازت ۱۵ (۷/۴۸±۰/۳۲) و تیمار حاوی پروتئین ۳۵ با نسبت کربن به ازت ۲۵ (۷/۲۶±۳/۶۶) دارای اختلاف معنی‌دار بود (P<۰/۰۵).



شکل ٤- لیزوزیم سرم ماهی کپور معمولی در نسبت‌های مختلف کربن به ازت و پروتئین مختلف در سیستم بایوفلاک (میانگین ± خطای استاندارد). حروف انگلیسی کوچک غیرمشابه در هر ستون، بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.



شکل ۵- قدرت باکتری‌کشی سرم ماهی کپور معمولی در نسبت‌های مختلف کربن به ازت و پروتئین مختلف در سیستم بایوفلاک (میانگین ± خطای استاندارد). حروف انگلیسی کوچک غیرمشابه در هر ستون، بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.



شکل ٦- فعالیت کمپلمان بر اساس قطر هاله در ماهی کپور معمولی در نسبت‌های مختلف کربن به ازت و پروتئین مختلف در سیستم بایوفلاک (میانگین ± خطای استاندارد). حروف انگلیسی کوچک غیرمشابه در هر ستون، بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

بحث و نتیجه‌گیری

پروتئین کل سرم خون حاوی پپتیدهای آنتی‌باکتریال و ایمونوگلوبین‌ها است که به‌عنوان یک شاخص بالینی در سنجش میزان سلامتی، استرس و وضعیت بدنی ارگانیسم‌های آبزیان به‌کار برده می‌شود (کرب، ۲۰۱۰؛ بونگلوان و همکاران، ۲۰۰٤). آلبومین نیز از مهم‌ترین پروتئین‌های پلاسمای خون است که در کبد سنتز می‌گردد و هر گونه آسیب و فشار بر کبد مقدار آلبومین را کاهش می‌دهد (تانتی و همکاران، ۲۰۰۹). در مطالعه حاضر میزان پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین در تیمارهای بایوفلاک افزایش عددی را همراه با افزایش درصد مقدار پروتئین جیره غذایی به ۳۰ الی ۳۵ درصد در نسبت‌های مختلف کربن به ازت نسبت به تیمار شاهد (روش مرسوم پرورشی) نشان داد. در مطالعه هیسانو و همکاران (۲۰۲۱)، عنوان شده است که میزان پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین در ماهی تیلاپیای نیل در سیستم‌های بیوفلاک بواسطه افزایش بار مواد آلی و باکتریایی، به‌طور مضاعفی افزایش می‌یابد که در واقع یک پاسخ ایمنی عمومی می‌باشد. چنین روندی در مطالعه حاضر برقرار بود. مطالعه احمد و همکاران (۲۰۱٦) بر روی کپور ماهی روهو در سیستم بیوفلاک، نشان از افزایش معنی‌دار پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین به‌عنوان پارمترهای ایمنی غیراختصاصی داشت. هم‌چنین در مطابق با نتایج حاضر، اثرات ایمنی مثبت و بالا رفتن سطوح پروتئین و گلوبولین آبزیان در سیستم بایوفلاک در مطالعات پیشین پژوهشگران گزارش شده است (ورما و همکاران، ۲۰۱٦؛ لانگ و همکاران، ۲۰۱۵؛ کرب و همکاران، ۲۰۱۰؛ آدینه و همکاران، ۲۰۱۹).

مکانیسم اثرگذاری بر شاخص‌های ایمنی از طریق فلاک‌های میکروبی در سیستم بایوفلاک می‌باشد. به‌دلیل این‌که فلاک‌ها منبع بسیار غنی از ترکیبات ارگانیک مانند کاروتنوئیدها، کلروفیل‌ها، بروموفنول، گلوکوزامین، فیتواسترول‌ها و مواد با تأثیر مثبت بر پارامترهای ایمنی از جمله پروتئین کل و گلوبولین است (کرب و همکاران، ۲۰۱۰؛ اکسیو و همکاران، ۲۰۱۳؛ نجدگرامی و همکاران، ۲۰۱٦).

لیزوزیم یکی از اجزای مهم سیستم ایمنی غیراختصاصی بوده و باعث تخریب جدار باکتری‌ها، افزایش فعالیت بیگانه‌خواری و فعال‌سازی سیستم کمپلمان در ماهیان می‌گردد (آدینه و همکاران، ۲۰۱۹). فعالیت لیزوزیم نیز در تیمارهای بایوفلاک با افزایش سطح پروتئین به ۳۰ و نسبت کربن به ازت ۱۵ الی ۲۰ و هم‌چنین سطح پروتئین ۳۵ درصد و نسبت کربن به ازت ۲۵ نسبت به تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری بیش‌تر بود. نتایج مطالعه لو و همکاران (۲۰۱٤) و لانگ و همکاران (۲۰۱۵) نشان داد که فناوری بایوفلاک می‌تواند فعالیت لیزوزیم را در ماهی تیلاپیای نیل را بهبود بخشد. در مطالعه زانگ و همکاران (۲۰۱۸) که در سیستم بایوفلاک و بر روی ماهی کپور گیبل (*Carassius auratus gibelio*) صورت گرفته، نتایج بیانگر افزایش لیزوزیم سرم خون در تیمارهای بایوفلاک نسبت به شاهد بوده که با نتایج مطالعه حاضر کاملاً مطابقت دارد.

کمپلمان‌ها نیز از مهم‌ترین عوامل دفاعی هستند که از حدود ۳۵ پروتئین محلول در پلاسما تشکیل شده‌اند که نقش کلیدی در ایمنی ماهیان دارد. بنابراین در مطالعه حاضر، مقدار فعالیت کمپلمان سرم در جیره‌هایی با سطح پروتئین ۳۰ درصد و نسبت کربن به ازت ۱۵ و هم‌چنین پروتئین ۳۵ درصد و نسبت کربن به ازت ۲۵ تفاوت آماری با شاهد نشان دارد که از طرفی در بین خود فاقد تفاوت معنی‌داری بودند. در مطالعه ابراهیمی و همکاران (۲۰۲۰)، افزایش معنی‌دار کمپلمان در ماهیان کپور معمولی پرورش یافته در سیستم بیوفلاک مشاهده شد. علاوه بر این، بهبود معنی‌دار کمپلمان و فعالیت لیزوزیم در ماهیان تیلاپیای نیل پرورش یافته در سیستم بایوفلاک گزارش شده است (منصور و استبان، ۲۰۱۷).

از طرفی مشاهده شد که درصد قدرت باکتری کشی در تمامی تیمارهای بیوفلاک نسبت به شاهد افزایش داشته است که در این بین بیش‌ترین قدرت باکتری‌کشی در تیمار با پروتئین ۳۰ درصد و نسبت کربن به ازت ۱۵ بوده است که با سایر تیمارهای بایوفلاک نیز تفاوت نداشته است. در مطالعه خانجانی و شریفی‌نیا (۲۰۲۰)، بیان شده است که بایوفلاک منجر به افزایش فعالیت ضد میکروبی در ماهیان پرورش یافته می‌شود.

مکانسیم اثرگذاری بر فعالیت لیزوزیم، کمپلمان و قدرت باکتری‌کشی نیز تحت‌تأثیر محرک‌های ایمنی است. محرک‌های ایمنی همانند پپتیدوگلیکان، بتاگلوکان و لیپوپلی ساکاریدهای در دیواره باکتری‌های موجود در محیط بایوفلاک به وفور وجود دارند و می‌توانند نقش پری‌بیوتیکی را در سیستم بر عهده گیرند (کرب و همکاران، ۲۰۱۰a). بنابراین در این خصوص بیان شده است که فلاک‌های میکروبی، فعالیت کمپلمان سرم و فعالیت لیزوزیم، هم‌چنین فعالیت بیگانه‌خواری و تولید آنیون سوپراکسید را از سلول‌های بیگانه‌خوار رأس همه کپور معمولی را افزایش دهند (آدینه و همکاران، ۲۰۱۹). هم‌چنین دشریور و همکاران (۲۰۰۸)، عنوان کردند، ترکیب خاصی به نام پلی بتا هیدروکسی بوتیرات (PHB) در بایوفلاک موجود که باعث تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیر با کارایی پروبیوتیکی و خصوصیات آنتی‌باکتریال و آنتی‌میکروبیال می‌شوند (کرب و همکاران، ۲۰۱۰a).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج به‌دست آمده در این مطالعه نشان داد که پرورش ماهی کپور در سیستم بایوفلاک و عدم تعویض آب در طول دوره پرورش امکان‌پذیر بوده است. هم‌چنین با توجه به فعالیت لیزوزیم و کمپلمان به عنوان اجزای مهم سیستم ایمنی غیراختصاصی، استفاده از پروتئین ۳۰ درصد با نسبت کربن به ازت ۱۵ در سیستم بیوفلاک توصیه می‌شود.

هم‌چنین بر اساس نتایج مطالعه حاضر چنان‌چه قصد استفاده از سیستم بیوفلاک برای تولید بچه‌ماهی و فروش آن باشد، بهتر است از جیره‌هایی با پروتئین بالا و اضافه کردن جداگانه کربوهیدرات به درون آب استفاده کرد، به‌دلیل این‌که شاخص‌های ایمنی ماهیان با این روش افزایش چشمگیرتری دارد که برای افزایش زنده‌مانی در مراحل اولیه پرورش ماهی تا زمان انگشت‌قدی که از نقاط بحرانی این صنعت می‌باشد، ضروری است.

سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از نتایج طرح تحقیقاتی اجرا شده با شماره قرارداد ۹-۹۶/ ابلاغ مورخ ۹۵/۱۰/۵ از محل اعتبارات دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر می‌باشد.

منابع

Adineh, H., Naderi, M., Khademi Hamidi, M., and Harsij, M. 2019. Biofloc technology improves growth, innate immune responses, oxidative status, and resistance to acute stress in common carp (*Cyprinus carpio*) under high stocking density. Fish and Shellfish Immunology. 95: 440-448. https://doi. org/ 10.1016/ j.fsi.2019.10.057.

Ahmad, H.I., Verma, A.K., Babitha Rani, A.M., 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.

Aalimahmoudi, M., and Mohammadiazarm. H. 2019. Dietary protein level and carbon/nitrogen ratio manipulation in bioflocs rearing of *Cyprinus carpio* juvenile: Evaluation of growth performance, some blood biochemical and water parameters. Aquaculture. 513: 734408.

Avnimelech, Y. 1999. Carbon and nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. Aquaculture. 176: 227-235.

Avnimelech, Y. 2012. Biofloc Technology - A Practical Guide Book. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, United States. 272p.

Bakhshi, F., Najdegerami, E.H., Manaffar, R., Tukmechi, A., and Farah, R.K. 2018. Use of different carbon sources for the biofloc system during the grow-out culture of common carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings. Aquqculture. 484: 259-267.

Brata, O. 1993. Veterinary Clinical Immunology laboratory, Bar- Lab Inc, 2: 3. 24-25.

Bunglavan, S., Garg, A., Dass, R., and Shrivastava, S. 2014. Effect of supplementation of different levels of selenium as nanoparticles/sodium selenite on blood biochemical profile and humoral immunity in male Wistar rats. Veterinary World. 7: 1075-1081.

Crab, R., Defoirdt, T., Bossir, P., and Verstraete, W. 2007. Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. Aquaculture. 270: 1-14.

Crab, R., Kochva, M., Verstraete, W., and Avnimelech, Y. 2009. Bioflocs technology application in over-wintering of tilapia. Aquaculture Engineering. 40: 105-112.

Crab, R., Chielens, B., Wille, M., Bossier, P., and Verstraete, W. 2010a. The effect of different carbon sources on the nutritional value of bioflocs, a feed for (*Macrobrachium rosenbergii*) postlarvae. Aquaculture Research. 41: 559-567.

De Schryver, P., Crab, R., Defoirdt, T., Boon, N., and Verstraete, W. 2008. The basics of bioflocs technology: the added value for aquaculture. Aquaculture. 277: 125-137.

Ebrahimi, A., Akrami, R., Najdegerami, E.H., Ghiasvand, Z., and Koohsari, H. 2020. Effects of different protein levels and carbon sources on water quality, antioxidant status and performance of common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles raised in biofloc based system. Aquaculture, 516: 639-734.

Ellis, A.E. 1990. Lysozyme assay. In: Stolen, J.S., Fletcher, D.P., Anderson, B.S., Robertson, B.S. (Eds.), Techniques in Fish Immunology. SOS Publication, Fair Haven, NJ, Pp: 101-103.

FAO. 2018. The state of world Fisheries and aquaculture (SOFIA) FAO Fisheries and Aquaculture organization of the united nations Rome, Italy.

Hisano, H., Barbosa, P.T.L., Hayd, L.A., and Mattioli, C.C. 2021. Comparative study of growth, feed efficiency, and hematological profile of Nile tilapia fingerlings in biofloc technology and recirculating aquaculture system. Tropical Animal Health and Production. 53: 60.

Hargreaves, J.A. 2006. Photosynthetic suspended-growth system in aquaculture. Aquacultural engineering. 34: 6. 344-63.

Johnson, A.M., Rohlfs, E.M., and Silverman, L.M. 1999. Proteins. In: Burtis, C.A. and Ashwood, E.R., Editors. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3rd edition. Philadelphia: W.B Saunders Company. Pp: 477-540.

Kajita, Y., Sakai, M., Atsuta, S., and Kobayash, M. 1990. The immunonodulatory effects of levamisole on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Fish Pathology. 25: 93-98.

Khanjani, M.H., and Sharifinia, M. 2020. Biofloc technology as a promising tool to improve aquaculture production. Reviews in aquaculture, 12: 3. 1836-1850.

Long, L., Yang, J., Li, Y., Guan, C., and Wu, F. 2015. Effect of biofloc technology on growth, digestive enzyme activity, hematology, and immune response of genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture. 448: 135-141.

Luo, G., GAO, Q., Wang, C., Liu, W., Sun, D., Li, L., and Tan, H. 2014. Growth, digestive activity, welfare, and partial cost-effectiveness of genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in a recirculating aquaculture system and an indoor biofloc system. Aquaculture. 422: 1-7.

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.

Nayak, S.K. 2010. Role of gastrointestinal microbiota in fish. Aquaculture Research. 41: 1553-1573.

Najdegerami, E., Bakhshi, F., and Bagherzadeh Lakani, F. 2016. Effects of biofloc on growth performance, digestive enzyme activities and liver histology of common carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings in zero-water exchange system, Fish Physiology and Biochemistry. 42: 2. 457-465.

Ray, A.J., Lewis, B.L., Browdy, C.L., and Leffler, J.W. 2010a. Suspended Solids Removal To Improve Shrimp (*Litopenaeus Vannamei*) Production And An Evaluation Of A Plant-Based Feed In Minimal-Exchange, Superintensive Culture Systems. Aquaculture. 299: 89-98.

Schneider, O., Sereti, V., Eding, E.H., and Verreth, J.A.J. 2005. Analysis of nutrient flows in integrated intensive aquaculture systems. Aquaculture Engineering. 32: 379-401.

Tanți, M. 2009. Normal serum biochemical parameters of juvenile stages great sturgeon. Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies Institute for Research and Development in Aquatic Ecology, Fishing and Aquaculture (I.C.D.E.A.P.A Galati, Romania, in period 2007-2 009, 67(1-2) /2009Print ISSN 1843-5262; Electronic ISSN 1843-536X.

Verma, A.K., Babitha Rani, A.M., 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.

Xu, W.J., and Pan, L.Q. 2013. Enhancement of immune response and antioxidant status of (*Litopenaeus vannamei*) juvenile in biofloc-based culture tanks manipulating high C/N ratio of feed input. Aquaculture. 412-413: 117-124.

Zhang, M., Li, Y., Xu, D.H., Qiao, G., Zhang, J., Qi, Z., and Li, Q. 2018. Effect of different water biofloc contents on the growth and immune response of gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) cultured in zero water exchange and no feed addition system. Aquaculture Research. 49: 4: 1647-1656.