پرورش آرتمیا فرانسیسکانا (*Artemia franciscana*) تحت سیستم مداربسته با استفاده از فناوری بیوفلاک و اثرات آن بر عملکرد رشد و تولیدمثلی آرتمیا و بار باکتریایی آب

- **بهرنگ دانشخواه***: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان، ایران
- **محمد سوداگر**: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان، ایران
- **ناص آق**: گروه شیلات، پژوهشکده آرتمیا و آبزی‌پروری، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
- **ون استپن**: آزمایشگاه مرجع مرکزی آبزی‌پروری و آرتمیا، دانشگاه گنت، گنت، بلژیک

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹۷

چکیده

این آزمایش در یک سیستم مداربسته انجام شد. بیوفلاک در یک مخزن ۷ لیتری تولید شده و توسط پمپ به‌مقدار مساوی به سه مخزن مجزا پمپ و سه مخزن پرورش به‌عنوان سه تکرار درنظر گرفته و آزمایش تغذیه‌ای آرتمیا با ۳ تیمار تحت عنوان تیمارهای غذای زیر به‌مدت ۲۱ روز انجام گرفت. تیمار ۱: بیوفلاک ایجاد شده با ملاس+جلبک دونالیلا (۵٪ نیاز غذایی آرتمیا)، تیمار ۲: بیوفلاک ایجاد شده با رافینات+جلبک دونالیلا (۵٪ نیاز غذایی آرتمیا)، تیمار۳: (شاهد): تغذیه با سبوس برنج و مخمر+جلبک دونالیلا. در این آزمایش حجم فلاک، شمارش بار باکتریایی، رشد آرتمیا ، بقا و تولیدمثل آرتمیا در تیمارهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت. طبق نتایج، رافینات توانست در طول دوره آزمایشی به‌طور معنی‌داری روند تولید بیوفلاک را نسبت به تیمار ملاس افزایش دهد، ملاس به‌طور معنی‌داری باعث افزایش تعداد باکتری‌های هتروتروفیک و افزایش بار قارچی سیستم شد، رشد در تیمارهای تغذیه شده نسبت به شاهد، کاهش معنی‌دار داشت ($P<0/05$)، هم‌آوری نیز در تیمار ملاس نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌دار داشت. با توجه به نتایج حاصله ملاس و رافینات به‌عنوان منبع کربن می‌توانند باعث تولید آرتمیا با کیفیت قابل قیاس با آرتمیای پرورش یافته با غذای تجاری را با هزینه کم‌تر تولید کنند، البته طبق یافته‌های تحقیق رافینات به‌دلیل نسبت کربن به ازت کم نمی‌تواند پیشنهاد خوبی جهت استفاده به‌عنوان تنها منبع کربن باشد.

کلمات کلیدی: بایوفلاک، آرتمیا، رافینات، ملاس، بار باکتریایی آب

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: hojat.earthquake@gmail.com

مقدمه

باتوجه به رشد روزافزون جمعیت نیازهای پروتئینی نیز افزایش یافته است. ماهی همواره در سبد غذایی خانواده‌ها از جایگاه ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. میزان تولید آبزی‌پروری از ۴۱/۹میلیون تن در سال ۲۰۰۴ به ۷۳/۸ میلیون تن در سال ۲۰۱۴ رسید که رشد این صنعت حدود ۶ درصد در هر سال بود (FAO، ۲۰۱۴). اگرچه رشد صنعت آبزی‌پروری فواید زیادی مانند ایجاد شغل، بهبود اقتصادی و امنیت غذایی و...را فراهم کرد، اما توسعه سریع آن، نگرانی‌های زیست‌محیطی زیادی را ایجاد کرده است (Naylor و همکاران، ۲۰۰۱) که ازجمله آن‌ها می‌توان به آلودگی موادآلی و غیرآلی و نیتریفیکاسیون (تخلیه پساب‌ها با غلظت بالای مواد آلی و مواد مغذی) (Piedrahita، ۲۰۰۳) اشاره کرد. در یک سیستم آبزی‌پروری به‌طور میانگین ۲۵ درصد (۱۱تا ۳۶درصد) از نیتروژن مصرف شده می‌تواند به بیوماس ماهی تبدیل شود (Logan و همکاران، ۱۹۹۸)، باقی‌مانده نیز به شکل آمونیاک و نیتروژن آلی در مدفوع و غذای نخورده شده از دست می‌رود (Avnimelech و Ritvo، ۲۰۰۳). تجمع آمونیاک در سیستم آبزی‌پروری برای ماهی سمی است. لذا غلظت بالای آمونیاک می‌تواند باعث افزایش تلفات، کاهش رشد و باعث انواع اختلالات فیزیولوژیکی در ماهی گردد (Torres-Beristain و همکاران، ۲۰۰۶) در بیش‌تر موارد، سطح قابل قبول آمونیاک غیریونیزه در سیستم آبزی‌پروری حدود ۰/۰۲۵ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد (Chen وهمکاران، ۲۰۰۶). نیتروژن آمونیاکی کل و نیترات هر دو می‌توانند به‌وسیله باکتری‌های هتروتروفیک مصرف شوند (Avnimelech،۱۹۹۹). Schneider و همکاران (۲۰۰۵) گزارش کردند که در سیستم‌های آبزی‌پروری، باکتری‌های هتروتروفیک،۷ درصد از نیتروژن غذا را مصرف می‌کنند. البته باقی‌مانده نیتروژن از طریق تبادل آب حذف می‌شود. تبادل آب روشی موثر و گسترده برای حفظ کیفیت آب می‌باشد که میزان تبادل از ۲۵۰ ٪ در روز برای سیستم‌های آبزی‌پروری گسترده تا ۲ الی ۱۰ درصد در روز برای سیستم آبزی‌پروری متراکم متغیر است (Ebeling و همکاران،۲۰۰۶). کنترل مواد دفعی نیتروژنی در بیش‌تر سیستم‌های متراکم نیاز به تبادل آب مکرر دارد که منجر به مشکلات زیست‌محیطی می‌گردد و هزینه بالایی را برای پمپ کردن آب نیاز دارد (Avnimelech، ۱۹۹۹). به‌طورکلی دو تکنولوژی جدید، برای کاهش مصرف آب در آبزی‌پروری پیشنهاد شده است: سیستم باز گردشی آب، تکنولوژی بیوفلاک.

بیوفلاک: تکنولوژی بیوفلاک به‌عنوان یک سیستم آبزی‌پروری دوست‌دار محیط‌زیست و بر پایه رشد میکروارگانیسم در محیط پرورش استوار است و به‌خاطر تبادل کم آب یا عدم تبادل آب و استفاده دوباره از آب، مانع از مشکلات زیست‌محیطی می‌شود. تکنولوژی بیوفلاک، تکنیک افزایش کیفیت آب از طریق افزودن کربن زیاد به سیستم آبزی‌پروری است که با منبع کربن خارجی یا با مقدار کربن غذا تامین می‌گردد. اگر کربن و نیتروژن در آب به‌شکل خوبی تنظیم و متعادل گردد، آمونیاک به‌علاوه مواد دفعی آلی نیتروژن‌دار به بیوماس باکتریایی تبدیل خواهند شد (Schneider و همکاران، ۲۰۰۵). به‌طورکلی، منبع کربن به‌عنوان یک سوبسترا برای عملکرد سیستم‌های بیوفلاکی و تولید سلول‌های پروتئینی میکروبی عمل می‌کند (Avnimelech، ۱۹۹۹).

آرتمیا فرانسیسکانا: نقش بارز آرتمیا در توسعه صنعت آبزی‌پروری حقیقتی انکارناپذیر است چنان‌که از نظر آبزی‌پروری، سهولت دسترسی، قابلیت نگه‌داری به‌مدت طولانی، سهولت حمل و نقل، آسان بودن روند پرورش، سهولت ضدعفونی سیست‌ها، متفاوت بودن اندازه و اشکال آن و قابلیت استفاده از آن به‌عنوان حامل مناسب ویتامین‌ها، رنگدانه‌ها، موادشیمیایی، آنتی‌بیوتیک‌ها، واکسن‌ها و هورمون‌ها، شاخص‌ترین عواملی هستند که موجب انتخاب آرتمیا به‌عنوان غذای آبزیان می‌گردد و از نظر آبزیان نیز، آرتمیا یک طعمه بسیار راحت، قابل دید، لذیذ، قابل هضم، مغذی و عاری از عوامل بیماری‌زاست (Léger و همکاران، ۱۹۸۷). علاوه بر این، تحقیقات نشان می‌دهند که آرتمیا میزان بازماندگی و رشد را در کلیه آبزیان پرورشی افزایش می‌دهد. در ضمن، آمیلاز و تریپسین موجود در آرتمیا در گوارش مواد غذایی درون لوله گوارشی ماهیان و سخت‌پوستان شرکت می‌کند. تولید انبوه آرتمیا به‌خصوص برای گونه‌های باارزشی مانند آرتمیا فراسیسکانا (*Artemia franciscana*) در انواع سیستم‌ها شامل استخرهای خاکی و بتنی، سیستم‌های محصور در تانک و سیستم مداربسته سبب کاهش فشار صید آن از طبیعت و هم‌چنین تامین تقاضای روزافزون آن می‌شود (Lavens و Sorgeloos، ۱۹۸۶). برای افزایش میزان تولید آرتمیا در کلیه سیستم‌های پرورشی فوق‌الذکر بایست توجه ویژه به تاثیر عوامل مهم محیطی و تغذیه‌ای داشت.

رافینات: رافینات پسماند مایع باقی‌مانده از پروسه شکرزدایی از ملاس چغندر قند بوده و فراهم‌کننده یک منبع غنی از انرژی و پروتئین برای دام و احشام مانند گاو و گوسفند می‌باشد. رافینات دارای مقدار انرژی کم‌تری نسبت به ملاس می‌باشد اما دارای مقادیر بالاتر پروتئین و پتاسیم می‌باشد که به‌دلیل دقت بیش‌تر حمل آن آسان‌تر می‌باشد. رافینات معمولاً در مخازن دارای گرم‌کن حمل می‌شوند.

کاربردها: رافینات به‌عنوان افزودنی مایع به غذای حیوانات به‌منظور افزایش ارزش غذایی، به‌عنوان پایه‌ای برای انواع ویتامین و مواد معدنی استفاده می‌شود. شکر باقی‌مانده در رافینات حتی بعد از فرایند شکرزدایی می‌تواند بهبود دهنده پلیت‌پذیری بسیاری از غذاهای جامد و مایع باشد. رافینات یک جایگزین مناسب به‌جای ملاس و دوستدار محیط زیست می‌باشد (منبع سایت رسمی شرکت Midwest agricommdities company).

ملاس: ملاس (beet molasses) چغندرقند یک شیرین‌کننده است که به‌عنوان یک محصول جانبی از فرایند ساخت قند تشکیل می‌شود.

ملاس انواع مختلفی دارد که نوع black strap معمول‌ترین شکل ملاس است و شامل بسیاری از ویتامین‌ها و موادمعدنی می‌باشد. ملاس چغندر قندبه‌عنوان یک منبع غنی از ساکارز است. ملاس چغندر قند به‌عنوان یک محصول خوش‌طعم و سرشار از انرژی برای نشخوارکنندگان است که در ایران تولید این محصول ۴۸۰ هزار تن در سال است (Soder و همکاران، ۲۰۱۰).

سبوس برنج: برنج، دومین غله تولیدی در جهان است و در حال حاضر در بیش از ۱۱۰ کشور با شرایط اقلیمی متفاوت رشد می‌کند. سبوس برنج، محصول جانبی یا فرعی، طی آسیاب کردن برنج می‌باشد که در گذشته به‌دلیل سرعت بالای فسادآن به‌طور محدود مورد استفاده بوده است. سبوس برنج دارای رنگ زرد مایل به قهوه‌ای روشن یا تیره و بافت نسبتاً نرمی نسبت به پوسته برنج است و در مرحله سفید کردن (pulishing) از برنج قهوه‌ای جدا می‌شود (اخوت، ۱۳۸۷).

مخمر: مخمر یک قارچ میکروسکوپی است. در طبیعت در همه‌جا یافت می‌شود و قادرست قندها را به الکل و گاز دی‌اکسیدکربن و ترکیبات معطر تبدیل کند (Kurtzman، ۲۰۰۶)، مخمرها chemoorganotrophs، به‌عنوان آن‌ها از ترکیبات آلی به‌عنوان منبع انرژی استفاده می‌کنند و نیازی به نور خورشید برای رشد ندارند. کربن به‌طور عمده از قندهای هگزوز مانند گلوکز و فروکتوز یا disaccharides مانند ساکارز و مالتوز به‌دست می‌آید. برخی از گونه‌ها می‌توانند قندهای پنتوز را مانند ریبوز سنتز کنند (Barnett، ۱۹۷۵).

جلبک دونیلا: جنس دونالیلا متعلق به رده Chlorophyceae، راسته Volvocales و شاخه Chlorophyta می‌باشد. قبل از این جلبک را در خانواده Polyblepharidaceae و برخی به‌علت شباهت آن با جلبک Chlamydomonas آن‌را در خانواده Chlamydomonadaceae قرار داده‌اند. ریزجلبک Dunaliella salina، مقاوم‌ترین موجود یوکاریوتی نسبت به شوری است که در بسیاری از محیط‌های حاوی نمک نظیر دریاچه‌ها و مرداب‌های آب‌شور یافت می‌شود. میزان شوری جهت رشد مناسب دونالیلاسالینا بین ۳ مولار (۱۷۴ مولار) است، ولی نقاط بحرانی شوری را ۰/۵ مولار (۲۹ مولار) و ۵ مولار (۲۹۰ مولار) ذکر نموده‌اند (Trenkenshu و همکاران، ۲۰۰۵). گونه‌های دونالیلادر اکوسیستم‌های آبی ایران نیز با توجه به خصوصیات فیزیکوشیمیایی مختلف آن‌ها به‌طور گسترده پراکنده شده‌اند (زارعی، ۱۳۹۰). بیش‌ترین اهمیت دونالیلا سالینا به دلیل قابلیت زیاد آن در جمع‌آوری سطوح مختلف بتاکاروتن است (Guevara و همکاران، ۲۰۰۵). این ویژگی دونالیلا سالینا به قابلیت رشد این جلبک در محیط‌های ایزوله‌ای چون دریاچه‌های هایپرسالین و دریاچه‌های نمک وابسته است (González و همکاران، ۲۰۰۱). برخی از سویه‌ها بیش از ۱۴٪ از وزن خشک خود را بتاکاروتن ذخیره می‌کنند (Raja و همکاران، ۲۰۰۷). علاوه بر این‌که بتاکاروتن تولید شده در دونالیلا سالینا نشان‌دهنده قابلیت انعطاف‌پذیری زیاد این جلبک است و احتمالاً این ویژگی در اثر جهش‌های زیادی حاصل شده است. به این دلیل جدا کردن سویه جهش یافته از سویه طبیعی جلبک دونالیلا سالینا روش بهینه‌ای است که مقدار بتاکاروتن تولیدی از این جلبک را بهبود می‌بخشد (Phadwal و همکاران، ۲۰۰۳).

مواد و روش‌ها

در این مرحله از آزمایش، تولید بیوفلوک با منابع مختلف کربنی تحت تیمارهای زیر صورت خواهد گرفت نسبت کربن به نیتروژن در تمامی تیمارها ثابت و برابر ۱۵ خواهد بود (Lulijwa و همکاران، ۲۰۱۳) و آمونیوم نیترات جهت تامین منبع نیتروژنی این سیستم مورد استفاده قرار می‌گیرد و از ملاس و رافینات به‌عنوان منابع کربن استفاده خواهد شد. به‌علاوه، تمامی تیمارها در آب با شوری ۸۰ ppt اجرا می‌شوند. باکتری‌های هالوفیل جداسازی شده از دریاچه ارومیه با تراکم ۱۰۰۰ cfu در هر میلی‌لیتر جهت تحریک بار میکروبی سیستم استفاده می‌شود. تیمار ۱: ملاس+ باکتری هالوفیل تیمار، ۲: رافینات+باکتری هالوفیل در این مرحله فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب، شمارش باکتریایی، آنالیز چربی، پروتئین، خاکستر، اسیدهای چرب بیوفلوک مورد سنجش قرار خواهند گرفت. در مرحله دوم از آزمایش، بیوفالک ایجاد شده از مرحله قبل جهت بررسی رشد و تولیدمثل آرتمیا در محیط بیوفلوک موردارزیابی قرار می‌گیرد که تیمارهای این مرحله به‌شرح زیر می‌باشند. در این مرحله تیمارها با شوری ۸۰ ppt و تراکم ۲ عدد ناپلی در هر میلی‌لیتر انجام می‌شوند (Naegel، ۱۹۹۹). گروه ۱: پرورش آرتمیا فرانسیسکانا (*A. franciscana*) در سیستم بیوفلوک تحت تیمارهای غذایی: تیمار ۱: بیوفالک ایجاد شده با ملاس+جلبک دونالیلا ۵٪ نیاز غذایی آرتمیا، تیمار ۲: بیوفالک ایجاد شده با رافینات+جلبک دونالیلا ۵٪ نیاز غذایی آرتمیا، تیمار ۳ (شاهد): تغذیه با سبوس برنج و مخمر+ جلبک دونالیلا. در این مرحله فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب، شمارش باکتریایی، آنالیز چربی، پروتئین، خاکستر، اسیدهای چرب آرتمیا و بیوفلوک و عملکرد تولیدمثلی و رشد آرتمیا مورد سنجش قرار گرفتند.

تولید بیوفلوک: راه‌اندازی سیستم بیوفلوک ابتدا زوک‌های شیشه‌ای با حجم ۷ لیتر با استفاده از آب با شوری ۸۰ ppt (تنظیم شوری با استفاده از نمک خاتون صورت خواهد گرفت) پر خواهند شد. سپس با استفاده از بخاری آکواریم، دمای زوک‌ها را تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد (Sui و همکاران، ۲۰۱۳) تنظیم خواهیم کرد. در واقع زوک‌های شیشه‌ای در آکواریوم تعبیه شده‌اند و با قرار دادن بخاری در این محیط دمای آب زوک‌ها قابل تنظیم خواهد بود. جهت رشد و توسعه بیوفلوک و ایجاد محیطی که آرتمیا نیز قابلیت رشد در آن را داشته باشد، TSS

محیط ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (Sui و همکاران، ۲۰۱۳) درنظر گرفته شد. در نهایت جهت راه‌اندازی سیستم بیوفلوک پس از افزودن منابع کربن و نیتروژن به محیط، هوادهی به‌واسطه پیپت متصل به پمپ هوا صورت گرفت. زمانی‌که غلظت ترکیبات زائد نیتروژن‌دار محیط به صفر رسید، پس از رسوب‌دادن توده بیوفلوک در زوک‌های پرورشی، نمونه‌ها در ۵۰۰۰ rpm به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و جهت انجام آنالیزهای مربوطه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد (بخشی و همکاران، ۱۳۹۵). TSS مورد نظر نیز با استفاده از بالانس کردن منابع کربن (ملاس و رافینات) و هم‌چنین نیتروژن (آمونیوم نیترات) تأمین شد. مقدار کربن مورد نیاز در روز طبق روش (Avnimelech، ۲۰۰۷) محاسبه می‌شود. علاوه بر این در این مرحله از آزمایش، نسبت کربن به‌نیتروژن در تمامی تیمارها ثابت و برابر ۱۵ حفظ شد (Lulijwa و همکاران، ۲۰۱۳). طول دوره این مرحله از آزمایش ۲۱ روز بود. جهت تقویت بار باکتریایی سیستم از باکتری‌های هالوفیل در همه تیمارها مورد استفاده قرار گرفت. باکتری‌های مورد استفاده در این مطالعه، باکتری‌های هالوفیل دریاچه ارومیه بود. طراحی سیستم مدار بسته پرورش آرتمیا با تکنولوژی بیوفلوک این سیستم متشکل از تانک مولد بیوفلوک و تانک‌های پرورش آرتمیا بود (شکل ۱). بیوفلوک در تانک تامین بیوفلوک تولیدشده، سپس توسط پمپ به تانک‌های پرورش (۳ تانک برای هر تیمار) پمپاژ شد. مقدار پمپاژ توسط شیر به‌صورت دستی تنظیم شد. شرایط تخم‌گشایی سیست آرتمیا و تراکم ذخیره سازی شرایط تفریخ تخم‌گشایی طبق روش (Van Stappen،) بود: شوری ۳۵ گرم در لیتر، روشنایی ثابت و هوادهی، دمای ۲۸-۲۵ درجه سانتی‌گراد. سپس ناپلی‌های تفریخ یافته بعد از شمارش به زوک‌های شیشه‌ای با حجم یک لیتر) حجم قابل استفاده ۸۰۰ سی‌سی(منتقل شدند. تراکم ذخیره‌سازی یک عدد در ۲ سی‌سی آب بود (Naegel، ۱۹۹۹). شرایط غذادهی جلبک دونالیلا و سبوس برنج بعد از آماده سازی جهت تغذیه آرتمیا براساس جدول غذادهی (Coutteau و همکاران، ۱۹۹۲) به‌صورت روزانه مورد استفاده قرار گرفتند. بررسی حجم بیوفلوک به‌منظور تعیین حجم فلوک، هر ۲ روز در ساعت ۱۰ صبح مقدار ۱۰۰ سی‌سی آب از هر تانک برداشته و در فالکون ریخته شد و ۱۵ دقیقه بعد از آن حجم فلوک ته ظرف محاسبه گردید. بررسی رشد و بازماندگی آرتمیا در این سیستم تا پایان روز ۱۷ پرورش انجام شد. هم‌چنین زیست‌سنجی نیز در روزهای ۸، ۱۱، ۱۴ و پایان روز ۱۷ با گرفتن ۱۰ نمونه از هر تکرار تیمارها انجام گرفت و سپس از تثبیت در محلول لوگول، در یک دستگاه لوپ مجهز به استریو میکروسکوپ رسام‌و سپس در یک دستگاه دیجیتایزر برحسب میلی‌متر بیان گردید. هم‌چنین در پایان روز ۱۷ مقادیر بازماندگی در تمام تکرارهای هر تیمار با انجام شمارش آرتمیاهای زنده در واحد حجم انجام شد. سپس ۳۰ جفت مولد از هر تیمار جهت بررسی پارامترهای تولیدمثلی) تولید سیست و ناپلی (به فالکون‌های ۵۰ سی‌سی منتقل شدند و میزان تولید سیست با ناپلی از طریق شمارش روزانه در هر فالکون تا زمانی‌که آرتمیای ماده زنده هست انجام گرفت (Boone و Baas-Becking، ۱۹۳۱).

بررسی بار باکتریایی: جهت شمارش باکتریایی از روش گسترش در پلیت استفاده شد. نمونه‌های آب از همه تانک‌ها و هر هفته تهیه شد. برای شمارش تعداد کل، ۱ میلی‌لیتر از آب تانک برداشت و به صورت رقت‌های سریالی ۱ به ۱۰ رقیق و با استفاده از نرمال سالین فیزیولوژی استریل تا مقدار 10^{-5} رقیق شد. سپس از هر رقت در پلیت‌های حاوی Trypton soy agar (TSA, Merck) با ۳ درصد وزنی حجمی نمک برای شمارش هتروتروف کل، Thiosulfate citrate bile salt sucrose agar (TCBS, MERCK) جهت شمارش ویبریو، Bacillus sereus agar (BBL, USA) براساس شمارش باسیلوس و از Sabouraud dextrose agar (SDA, MERCK) برای شمارش قارچ استفاده شد. سپس پلیت‌ها در دمای ۲۹ درجه به‌مدت ۴۸ ساعت جهت شمارش باکتریایی و به‌مدت ۷ روز جهت شمارش قارچ درون انکوباتور قرار گرفته و تعداد کلنی براساس Colony Forming Units (CFU) به‌دست آمد. تعداد کلنی‌ها در میلی‌متر با استفاده از تعداد آن‌ها ضرب در فاکتور رقت به‌دست آمد. (Anand و همکاران، ۲۰۱۴)

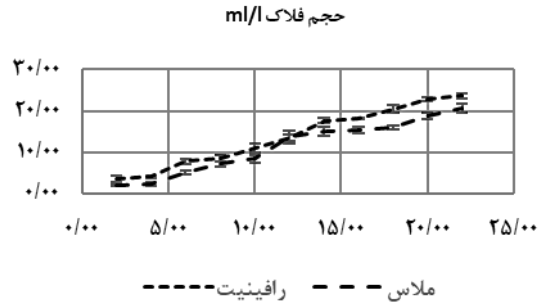
روش تجزیه و تحلیلی داده‌ها: برای تجزیه و تحلیل کلیه داده‌ها از نرم‌افزار SPSS۱۶ برای رسم نمودارها از برنامه Excel۲۰۱۶ استفاده گردید. این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. در ابتدا نرمال بودن داده‌ها با آزمون (شاپیرو ویلک) تست شد در صورت نرمال بودن توزیع داده‌ها، برای مقایسه میانگین داده‌ها بین تیمارهای مختلف از آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و برای جداسازی گروه‌های همگن از آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵٪ استفاده شد.

نتایج

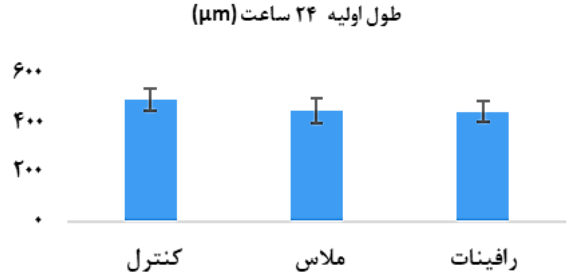
حجم فلاک: روند تولید فلاک تولیدی در سه تکرار در (شکل ۱) به‌عنوان روند عملکرد کشت آورده شده است، همان‌طورکه مشخص است حجم فلاک تولیدی در تیمار رافینات بالاتر از تیمار تغذیه شده با منبع کربن ملاس بود.

رشد: اثرات گروه‌های مختلف آزمایشی بر شاخص‌های رشد آرتمیافرانسیسکانا درشکل‌های ۲ و ۳ آمده است.برطبق نتایج آزمایش میزان طول نهایی تیمارهای تغذیه شده با بیوفلاک تشکیلی از ملاس و رافینات نسبت به گروه شاهد (تغذیه شده با جلبک دونالیلا و مخمر) واجد اختلاف معنی‌دار بوده‌اند ($p<0/05$).

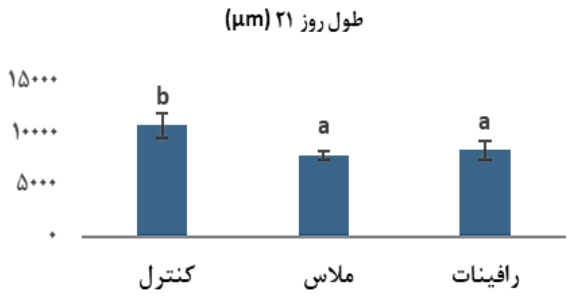
بقا: اثرات گروه‌های مختلف آزمایشی بر بقای آرتمیا فرانسیسکانا در شکل ۴ آمده است. برطبق نتایج آزمایش میزان بقا در تیمارهای تغذیه شده با بیوفلاک تشکیلی از ملاس و رافینات نسبت به گروه شاهد (تغذیه شده با جلبک دونالیلا و مخمر) فاقد اختلاف معنی‌دار بوده‌اند ($p>0/05$).



شکل۱ : حجم فلاک حاصله از ملاس و رافینات



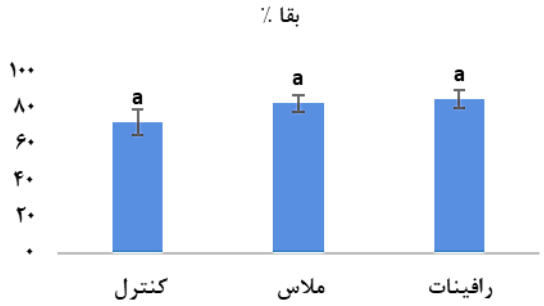
شکل ۲: طول اولیه آرتمیا (۲۴ ساعت پس از هچ)



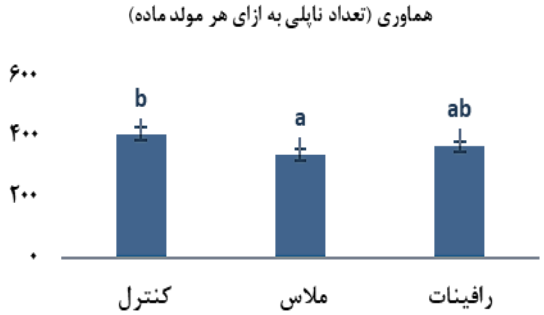
شکل ۳: طول نهایی آرتمیا (۲۱ روز پس از هچ)

بقا: اثرات گروه‌های مختلف آزمایشی بر بقای آرتمیا فرانسیسکانا در شکل ۴ آمده است. برطبق نتایج آزمایش میزان بقا در تیمارهای تغذیه شده با بیوفلاک تشکیلی از ملاس و رافینات نسبت به گروه شاهد (تغذیه شده با جلبک دونالیلا و مخمر) فاقد اختلاف معنی‌دار بوده‌اند ($p>0/05$).

بار باکتریایی آب: تعداد باکتری‌های هتروتروف و قارچ‌ها، در تیمار ملاس به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از تیمار رافینات بود ($P<0/05$).



شکل ۴: بقای آرتمیای پرورش یافته با بیوفلاک حاصله از ملاس و رافینات (۱۷ روز)



شکل ۵: هماوری آرتمیای پرورش یافته با بیوفلاک حاصله از ملاس و رافینات به ازای هر مولد ماده

جدول۱: تغییرات بار باکتریایی و قارچی در تیمارهای آزمایشی بر حسب کلنی در میلی‌لیتر (تمام اعداد مضربی از ۱۰۴ هستند)

تیمار	تعداد کل باکتری هتروتروف	ویبریو	باسیلوس	قارچ
ملاس	۲۹۸,۶۶±۵۷,۰^{b}	۱۰۷±۲۵,۸۶^{a}	۱۶۲,۳۳±۹۰,۱۶^{a}	۴,۳۳±۰,۵۷^{b}
رافینات	۱۹۱,۶۶±۸,۰۸^{a}	۱۴۱,۶۶±۳۸,۱۳^{a}	۱۴۷±۸۹,۷۱^{a}	۲,۶۶±۰,۵۷^{a}

بحث

رشد: تغذیه آرتمیا از بیوفلاک در راستای ارتقای آبزی‌پروری پایدار به‌عنوان تکنیکی جهت کاهش بار نیتروژن محسوب می‌شود. (Avnimelech و همکاران، ۲۰۰۷)، هم‌چنین تغذیه آرتمیا از بیوفلاک می‌تواند ریسک ورود برخی گونه‌های بیماری‌زای باکتریایی خصوصاً باکتری‌های ویبرو را در مزارع پرورش ماهی که از غذای زنده آرتمیا و یا بیومس استفاده می‌کنند کاهش دهد (Crab و همکاران، ۲۰۱۰)، با این که تیمارهای تغذیه با بیوفلاک رشد کم‌تری از تیمار شاهد نشان دادند ولی به‌طور هم‌زمان درصد بقا در تیمارهای تغذیه‌ای با ملاس و رافینات افزایش یافت اما اثر معنی‌داری در سطح اطمینان ۹۵ درصد مشاهده نشد ($P>0/05$)، که این مورد را می‌توان به ورود باکتری‌های تثبیت نیتروژن به سیستم و کاهش بار نیتروژنی نسبت داد. (Crab،

۲۰۰۷؛ Crab، ۲۰۱۰). درخصوص بقای به‌دست آمده در تیمارهای مختلف مطابقت با نتایج Naegel و همکاران (۱۹۹۹) و با غذای تجاری نستوم (Nestum) (غذای مخصوص لارو) در *A. Fransiscana* به‌دست آمد. خوراک‌های شامل میکروجلبک‌ها و یا مواد غذایی فاقد تحرک برای‌رسیدن به خوراک مناسب برای آرتمیا باید توسعه یابند (Naegel، ۱۹۹۹؛ Mason، ۱۹۶۳)، در این مطالعه تلاش شد که از بیوفلاک که باعث کاهش هزینه‌های تولیدی و هم‌چنین دارای پتانسیل رشد و بقای مناسبی برای آرتمیا بود استفاده شود، طبق نتایج به‌دست آمده درخصوص حجم بیوفلاک تیمار رافینات مقدار بیش‌تری فلاک تولید کرد. اگرچه طبق نتایج به‌دست آمده بیش‌ترین رشد در تیمار شاهد به‌دست آمد، ولی نمی‌توان از کاهش قابل ملاحظه هزینه تولید که در صنعت آبزی‌پروری غذای تجاری معمولا حداقل ۵۰ درصد هزینه تولید را به‌خود اختصاص می‌دهد صرف نظر کرد(Bender، ۲۰۰۴).هم‌چنین از نظر ارزش غذایی آرتمیای تولیدی در تیمارهای تغذیه شده فاقد اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد بودند، بیش‌تر گونه‌های آبزی نیاز به ۵۰-۲۰ درصد پروتئین در رژیم غذایی دارند (Tacon، ۱۹۸۷) که با توجه به نتایج حاصله از آنالیز بیوفلاک، بیوفلاک تولیدی با توجه به منابع موجود حتی می‌تواند در پرورش برخی گونه‌های تجاری میگو نیز مورد استفاده قرار گیرد (Hossain و Paul، ۲۰۰۷).

بررسی بار باکتریایی آب: برخی از محققین (مانند Aguilera و همکاران، ۲۰۱۴) دریافتند که باکتری‌های مفیدی چون برخی گونه‌های ویبریو با شرکت در مهوستازی سبب افزایش بقا شده و از طغیان باتری‌های بیماری‌زای فرصت‌طلبی چون Photobacterium damselae جلوگیری می‌کند. افزایش معنی‌دار در تعداد کل باکتری‌های هتروتروف در مطالعات قبلی بیش‌تر با افزایش منبع کربنی صورت می‌گرفت (Burford و همکاران، ۲۰۰۳؛ Avnimelech، ۲۰۰۹)، در مطالعه حاضر برای تعداد کل باکتری‌ها مقادیر ۵۶۸×۱۰^{۴} و $۴۸۰/۳۳\times۱۰^{۴}$ به‌ترتیب در تیمارهای ملاس و رافینات به‌دست آمد که بررسی‌های پیشین بیش‌تر در شوری‌های کم‌تر حدود ppt ۳۵ نتایجی بیش‌تر به‌دست‌آورده‌بودند(Burford و همکاران، ۲۰۰۳).برخی مطالعات نظیر (Irasema و همکاران، ۲۰۱۵) مقدار ۸۱۶×۱۰^{۴} و برخی‌مانند (Anand و همکاران، ۲۰۱۴) تعداد کل ویبریو را ۲۴۰×۱۰^{۴} کلنی در میلی‌لیتر و تعداد باسیلوس را ۳۴۵×۱۰^{۴} کلنی در میلی‌لیتر در انتهای دوره ذکر نموده‌اند. تفاوت‌ها بین مقادیر می‌تواند به فاکتورهای فیزیکو شیمیایی آب،گونه پرورشی و نوع ماده‌قندی‌مرتبط باشد(Avnimelech، ۲۰۰۹). مقادیر بیش‌تر در تیمار ملاس می‌تواند به‌دلیل فرآیند پالایش ثانویه در رافینات باشد که باعث کاهش منابع غنی ویتامین‌ها و دیگر مواد ضروری‌جهت‌رشدباکتری‌ها در تیمار رافینات باشد (Vayalil، ۲۰۱۲)

.

منابع

۱. **اخوت، م.، ۱۳۷۸**. شناسایی ارقام برنج ایران، کاشت، داشت و برداشت برنج، نشر علوم کشاورزی. صفحات ۱۲۰ تا ۱۴۱.

۲. **زارعی‌دارکی، ب.، ۱۳۹۰**. جلبک‌های اکوسیستم‌های آبی ایران. انتشارات پیام علوی. ۳۲۳ صفحه.

۳. **Aguilera-Rivera, D.; Prieto-Davó, A.; Escalante, K.; Chávez, C., Cuzon, G. and Gaxiola, G., 2014**. Probiotic effect of FLOC on Vibrios in the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture. Vol. 424, pp: 215-219.

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

۵. **Avnimelech, Y., 2007**. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. Aquaculture. Vol. 264, No. 1-4, pp: 140-147.

۶. **Avnimelech, Y., 2012**. Biofloc Technology-a Practical Guide Book. 2nd ed. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, United States. Birmingham, Birmingham magazine. pp: 249-271.

۷. **Avnimelech, Y. and Ritvo, G., 2003.** Shrimp and fish pond soils: processes and management. Aquaculture. Vol. 220, No. 1-4, pp: 549-567.

۸. **Barnett, J.A., 1975**. The entry of D-ribose into some yeasts of the genus Pichia. Microbiology. Vol. 90, No. 1, pp: 1-12.

۹. **Bender, J.; Lee, R.; Sheppard, M.; Brinkley, K.; Phillips, P.; Yeboah, Y. and Wah, R.C., 2004**. A waste effluent treatment system based on microbial mats for black sea bass Centropristis striata recycled water mariculture. Aquacultural engineering. Vol. 31, No. 1-2, pp: 73-82.

۱۰. **Boone, E. and Baas-Becking, L.G.M., 1931**. Salt effects on eggs and nauplii of *Artemia salina* L. The Journal of general physiology. Vol. 14, No. 6, pp: 753-763.

۱۱. **Boone, E., 1931.** experimental intensive culture. Italian Journal of Animal Science. Vol. 14, pp: 332-337. DOI: 10.4081/ijas.2015.3726

۱۲. **Burford, M.A.; Thompson, P.J.; McIntosh, R.P.; Bauman, R.H. and Pearson, D.C., 2003**. Nutrient and microbial dynamics in high-intensity, zero-exchange shrimp ponds in Belize. Aquaculture. Vol. 219, pp: 393-411.

۱۳. **Crab, R.; Avnimelech, Y.; Defoirdt, T.; Bossier, P. and Verstraete, W., 2007**. Nitrogen removal techniques in

aquaculture for a sustainable production. Aquaculture. Vol. 270, No. 1-4, pp: 1-14.

۱۴. **Chen, S.; Ling, J. and Blancheton, J.P., 2006**. Nitrification kinetics of biofilm as affected by water quality factors. Aquacultural engineering. Vol. 34, No. 3, pp: 179-197.

۱۵. **Coutteau, P.; Brendonck, L.; Lavens, P. and Sorgeloos, P., 1992**. The use of manipulated baker's yeast as an algal substitute for the laboratory culture of Anostraca. Hydrobiologia. Vol. 234, No. 1, pp: 25-32.

۱۶. **Ebeling, J.M.; Timmons, M.B. and Bisogni, J.J., 2006.** Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia–nitrogen in aquaculture systems. Aquaculture. Vol. 257, No. 1-4, pp: 346-358.

۱۷. **Ekasari, J.; Crab, R. and Verstraete, W., 2010.** Primary nutritional content of bio-flocs cultured with different organic carbon sources and salinity. Hayati Journal of Biosciences. Vol. 17, No. 3, pp: 125-130.

۱۸. **González, M.A.; Coleman, A.W.; Gómez, P.I. and Montoya, R., 2001**. Phylogenetic relationship among various strains of *Dunaliella* (Chlorophyceae) based on nuclear ITS rDNA sequences. Journal of Phycology. Vol. 37, No. 4, pp: 604-611.

۱۹. **Guevara, M.; Lodeiros, C.; Gómez, O.; Lemus, N.; Núñez, P.; Romero, L., Vásquez, A. and Rosales, N., 2005**: Carotenogénesis de cinco cepas del alga *Dunaliella* sp. (Chlorophyceae) aisladas de lagunas hipersalinas de Venezuela. Revista de Biología Tropical. Vol. 53, No. 5-4, pp: 331-337.

۲۰. **Hossain, M.A. and Paul, L., 2007**. Low-cost diet for monoculture of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii* de Man) in Bangladesh. Aquaculture Research. Vol. 38, No. 3, pp: 232-238.

۲۱. **Irasema, E.L.; Domenico, V.; Juan, M.A.N.; María, R.P.M.; Víctor, H.E. and Emilio, R.B., 2015.** Effects of biofloc promotion on water quality, growth, biomass yield and heterotrophic community in *Litopenaeus vannamei*.

۲۲. **Jin, W. and Wankat, P.C., 2007**. Hybrid simulated moving bed processes for the purification of p-xylene. Separation Science and Technology. Vol. 42, No. 4, pp: 669-700.

۲۳. **Logan, W.T.; Bartlett, S.L.; Logan, Walter T.; Bartlett, B. and Stephen, L., 1998**. Water treatment with large numbers of non-pathogenic bacteria to improve yield of aquatic animals. U.S. Patent. Vol. 5, pp: 155-746.

۲۴. **Lulijwa, R.; Van Stappen, G. and Nguyen, V.H., 2013**. Effect of carbon/nitrogen ratio ma nipulation in feed supplements on Artemia production and water quality in solar salt ponds in the Mekong Delta, Vietnam. Aquaculture Reserch. pp: 1-7.

۲۵. **Mason, D.T., 1963.** The growth response of Artemia salina (L.) to various feeding regimes. Journal of Crustaceana. Vol. 5, pp: 138-150.

۲۶. **Moffitt, C.M. and Cajas-Cano, L., 2014**. Blue growth: the 2014 FAO state of world fisheries and aquaculture. Fisheries. Vol. 39, No. 11, pp: 552-553.

۲۷. **Naegel, L.C., 1999**. Controlled production of Artemia biomass using an inert commercial diet, compared with the microalgae Chaetoceros. Aquacultural engineering. Vol. 21, No. 1, pp: 49-59.

۲۸. **Naylor, R.L.; Naylor, R.J.; Primavera, J.H.; Kautsky, N.; Beveridge, M.C.; Clay, J.; Folke, C.; Lubchenco, J.; Mooney, H. and Troell, M., 2000**. Effect of aquaculture on world fish supplies. Nature. Vol. 405, No. 6790, 1017 p.

۲۹. **Phadwal, K. and Singh, P.K., 2003**. Isolation and characterization of an indigenous isolate of *Dunaliella* sp. for β-carotene and glycerol production from a hypersaline lake in India. Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms. Vol. 43, No. 5, pp: 423-429.

۳۰. **Piedrahita, R.H., 2003**. Reducing the potential environmental impact of tank aquaculture effluents through intensification and recirculation. Aquaculture. Vol. 226, No. 1-4, pp: 35-44.

۳۱. **Raja, R.; Hemaiswarya, S. and Rengasamy, R., 2007**. Exploitation of *Dunaliella* for β-carotene production. Applied Microbiology and Biotechnology. Vol. 74, No. 3, pp: 517-523.

۳۲. **Schneider, O., 2005.** Analysis of nutrient flows in integrated intensive aquaculture systems. Aquacultural Engineering, Oxford. Vol. 32, No. 3-4, pp: 379-401.

۳۳. **Sorgeloos, P.; Lavens, P.; Leger, P.; Tackaert, W. and Versichele, D., 1986**. Manual for the culture and use of brine shrimp Artemia in aquaculture.

۳۴. **Soder, K.J.; Hoffman, K. and Brito, A.F., 2010**. Effect of molasses, corn meal, or a combination of molasses plus corn

meal on ruminal fermentation of orchardgrass pasture during continuous culture fermentation. The Professional Animal Scientist. Vol. 26, No. 2, pp: 167-174.

۳۵. **Sui, L.Y.; Wang, J.; Nguyen, V.H.; Sorgeloos, P.; Bossier, P. and Van Stappen, G., 2013.** Increased carbon and nitrogen supplementation in Artemia culture ponds results in higher cyst yields. Aquaculture international. Vol. 21, No. 6, pp: 1343-1354.

۳۶. **Tacon, A.G.J., 1987**. The nutrition and feeding of farmed fish and shrimp. A training manual 1 - The essential nutrients. FAO, Rome.

۳۷. **Torres-Beristain, B.; Verdegem, M.; Kerepeczki, E. and Verreth, J., 2006**. Decomposition of high protein aquaculture feed under variable oxic conditions. Water research. Vol. 40, No. 7, pp: 1341-1350.

۳۸. **Trenkenshu, R.P.; Gevorgiz, R.G. and Borovkov, A.B., 2005**. The experience of industrial cultivation *Dunaliella salina*. Sevastopol. pp: 90-97.

۳۹. **Van Stappen, G., 1996**. Use of cysts. In Manual on the production and use of live food for aquaculture. Vol. 361, pp: 107-136.

۴۰. **Vayalil, P., 2012**. Critical reviews in food science and nutrition, date fruits (*Phoenix dactylifera* Linn): An emerging medicinal food. Department of Pathology, University of Alabama.