بررسی اثر نسبت‌های مختلف کربن- نیتروژن در سیستم پرورش متراکم بایوفلاک بر شاخص‌های رشد و سلامت ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

- **محمدمهدی حق‌پرست‌رادمرد*:** گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز
- **مجتبی علیشاهی:** گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز
- **مسعود قربانپور:** گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز
- **علی شهریاری:** گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۶

چکیده

فن‌آوری بایوفلاک سیستمی است که با تنظیم نسبت کربن و نیتروژن درون آب و افزایش تراکم میکروارگانیزم‌های هتروتروف برای پیشبرد منافع پرورش‌دهنده استفاده می‌شود. در این تحقیق اثر نسبت‌های مختلف کربن به ازت در تکنولوژی پرورش متراکم بایوفلاک بر شاخص‌های رشد و برخی شاخص‌های آسایش ماهی کپور معمولی ارزیابی گردید. به این منظور تعداد ۴۲۰ عدد بچه ماهی کپور معمولی با وزن متوسط (۴۰±۵/۹) گرم به چهار تیمار در سه تکرار تقسیم گردیدند: تیمار اول، دوم و سوم به‌ترتیب به سیستم بایوفلاک با نسبت‌های کربن به ازت ۱:۱۵، ۱:۲۰ و ۱:۲۵ اختصاص داده شد، و تیمار چهارم تیمار شاهد بود. ماهی‌ها به‌مدت ۹۰ روز پرورش داده شدند و به فواصل یک‌ماهه زیست‌سنجی و نمونه‌گیری انجام گرفت. شاخص‌های رشد و برخی شاخص‌های سلامت ماهی شامل: خصوصیات ظاهری شامل رنگ ماهی، آلودگی انگلی و قارچی، بدشکلی‌ها، خصوصیات رفتاری (تنفسی، اشتها و نوع شنا) و ساختارهای بافتی آبشش، کبد، کلیه و پوست پرداخته شد. نتایج نشان دادند که شاخص‌های رشد در تیمارهای بایوفلاک به‌طور معنی‌داری بهتر از تیمار شاهد بود ($p<0/05$). هرچند که شاخص‌های رشد مورد بررسی در بین سه تیمارهای بایوفلاک تفاوت معنی‌داری نداشتند. در بین شاخص‌های سلامت ماهی مورد بررسی نیزتغییرات قابل ملاحظه‌ای در بررسی‌های فوق مشاهده نشد و ماهیان در این شرایط توانستند با سلامت نسبی و قابل قبولی پرورش یابند و هیچ‌گونه ضایعه بافتی و تک‌یاخته‌ای بیماری‌زایی در مطالعات میکروسکوپی مشاهده نشد. به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان سیستم پرورش متراکم با فن‌آوری بایوفلاک را برای برخی گونه‌ها ازجمله کپور معمولی مناسب دانست.

کلمات کلیدی: بایوفلاک، کپورمعمولی، سیستم متراکم، بافت‌شناسی، سلامت ماهی

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: Haghparast_radmard@yahoo.com

مقدمه

یکی از اصول اساسی تکنولوژی بایوفلاک در حقیقت به تکنیک معلق‌سازی فعال[1] برمی‌گردد و در حقیقت حفظ مواد زائد موجود درسیستم و تبدیل آن به بایوفلاک می‌باشد که در نهایت به‌عنوان یک غذای زنده در سیستم پرورشی مورد استفاده قرار می‌گیرد. این کارایی با هوادهی شدید آب و ایجاد تلاطم در ستون آب، اضافه کردن منبع کربنی به‌عنوان سوبسترای آلی بیش‌تر و بهتر صورت می‌گیرد. افزایش نسبت کربن به نیتروژن در سیستم باعث تبدیل نیتروژن معدنی مضر به بایوماس میکروبی خواهد شد و این بایوماس با مواد معلق موجود به‌عنوان تجمع زیستی (بایوفلاک) مورد مصرف گونه پرورشی قرار خواهندگرفت، نسبت کربن به ازت در آب اکثر مزارع پرورشی آبزیان حدود پنج است ولی در نسبت‌های بالای ده امکان رشد و تکثیر باکتری‌های هتروتروف و تشکیل بایوفلاک وجود دارد (Avnimelech و همکاران، ۱۹۸۶؛Hargreaves، ۲۰۰۶). کپورمعمولی یکی از پرطرف‌دارترین ماهی پرورشی در سرتاسر جهان است و از نظر تولید جهانی سومین ماهی پرورشی در جهان می‌باشد (Odegard و همکاران، ۲۰۱۰). پرورش این گونه به‌طور رایج در سیستم‌های نیمه متراکم و متراکم در استخرهای خاکی انجام می‌شود ولی اخیراً پرورش فوق متراکم این گونه با ارزش در برخی کشورها توسعه پیدا کرده است. توسعه سیستم‌های فوق متراکم می‌تواند باعث تجمع سریع مواد آلی، باقی‌مانده غذا و ترکیبات نیتروژنی سمی شود (Zhao وهمکاران، ۲۰۱۳). از این‌رو استفاده از تکنولوژی بایوفلاک می‌تواند برای حذف مواد زائد پرورش متراکم در این گونه ماهی کارامد باشد. هدف اصلی آبزی‌پروری افزایش تولید در و احد سطح در عین حفظ کیفیت تولید و حفظ سلامت ماهی است، لذا فاکتورهای رشد، اصلی‌ترین شاخص در ارزیابی اقتصادی سیستم‌های پرورشی است. رشد ماهی معمولاً با دو شاخص اصلی ضریب رشد ویژه SGR[2] و ضریب تبدیل غذایی FCR[3] ارزیابی می‌گردد. در یک سیستم آبزی‌پروری علاوه بر میزان رشد ماهی در یک دوره زمانی خاص، نسبت وزن ماهی تولیدی به میزان غذای دستی مصرفی بسیار مهم است. یکی دیگر از عوامل مهم که در سیستم‌های مختلف آبزی‌پروری باید به آن توجه داشت آسایش (Welfare) ماهی است. بسیاری از شاخص‌های مهم اقتصادی در آبزی پروری تحت تاثیر آسایش ماهی است. آسایش و سلامت کپور ماهیان تحت تاثیر فاکتورهای مختلف از قبیل: تراکم، بیماری‌ها، شرایط فیزیکوشیمیایی آب، کیفیت جیره غذایی، رژیم نوری، غلظت مواد جامد، ارتعاشات صوتی، شدت جریان و ... قرار می‌گیرد. در پرورش متراکم ماهی یکی از مواردی که باید علاوه بر میزان تولید در واحد سطح درنظر قرار گیرید، آسایش ماهی در سیستم پرورشی است، چراکه حتی در صورت افزایش ظاهری تولید، عدم تامین آسایش ماهی باعث اثرات مضری خواهد شد که به علاوه بر تاثیر در کیفیت محصول نهایی، به‌عنوان تهدیدی برای سلامت ماهی در طولانی مدت خواهد بود. از طرفی مراعات شرایط آسایش ماهی در شرایط پرورش از نظر اخلاق علمی (Ethics) ضروری است (Algers و همکاران، ۲۰۰۹).

یکی از مشکلات پرورش ماهی در سیستم بایوفلاک، تراکم بالای مواد جامد غیرمحلول معلق در سیستم است که کدورت آب را بالا برده و استفاده از این سیستم در برخی گونه‌ها، مثل آزاد ماهیان را محدود می‌کند، گزارشاتی از تاثیر سوء مواد جامد غیرمحلول بر آسایش ماهی به‌ویژه سلامت آبشش‌ها وجود دارد که نتیجه نهایی آن کاهش ظرفیت تنفسی و محدودیت تبادل گازی و عوارض کمبود اکسیژن است (Algers و همکاران، ۲۰۰۸). هرچند گزارشات بسیاری نشان داده‌اند که کپورماهیان تاحد زیادی می‌توانند کدورت بالای ناشی از مواد معلق آب را به خوبی تحمل کنند. با توجه به اهمیت شاخص‌های رشد و نیز آسایش و سلامت ماهی در ارزیابی کارایی سیستم‌های پرورش متراکم ماهی، در این مطالعه به ارزیابی برخی شاخص‌های رشد، شاخص های آسایش و سلامت ماهی در سیستم پرورش پرورش متراکم بایوفلاک با نسبت‌های مختلف کربن به ازت پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

این بررسی به‌مدت۱۲ هفته در سالن تحقیقاتی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز انجام شد، تعداد ۴۲۰ قطعه ماهی کپور معمولی ترجیحاً با وزن متوسط (۵±۴۰/۹) گرم (Mean±SD) از استخرهای پرورشی منطقه خوزستان تامین و پس از یک هفته سازش‌دهی با شرایط آزمایشگاه، با خوراک استاندارد کپور معمولی که دارای پروتئین حدود ۳۲درصد و چربی ۷ درصد (شرکت کیمیا گران- ایران) بود تغذیه شدند. تراکم ذخیره‌سازی اولیه ماهیان براساس منابع حدود ۱۷/۵کیلوگرم و ظرفیت‌نهایی‌حدود ۴۰ کیلوگرم درمترمکعب درنظر گرفته شد، لذا در هر آکواریوم ۱۰۰ لیتری تعداد ۳۵ قطعه ماهی ذخیره‌سازی شد (Bocioc و همکاران، ۲۰۱۱).

۱- AST: activated suspension technique
۲- Specific growth rate
۳- Feed Conversion ratio

راه‌اندازی سیستم بایوفلاک: در این آزمایش ابتدا دو هفته قبل از ماهی‌دارکردن آکواریوم‌ها، آب خروجی یک استخر پرورش کپور ماهیان به‌عنوان منبع اولیه باکتری‌های هتروتروف به آکواریوم‌ها اضافه شد (Sharma و همکاران، ۲۰۱۵). سپس میزان آمونیای کل (TAN)، نیتریت و نیترات در آب با استفاده از روش‌های استاندار APHA (۱۹۸۹) اندازه‌گیری شد. پس از تثبیت شرایط براساس میزان آمونیاک کل آب و براساس فرمول Avnimelech و همکاران (۲۰۱۲) میزبان مناسب ملاس نیشکر برای ایجاد نسبت‌های C:N برابر ۱:۱۵، ۱:۲۰ و ۱:۲۵ محاسبه و بعد از رقیق‌سازی ملاس، به آکواریوم‌ها اضافه گردید. ملاس مورد استفاده، ملاس نیشکر تهیه شده از کارخانه قند شرکت نیشکر هفت تپه بود که ویژگی‌های آن در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱: ترکیبات اصلی ملاس نیشکر

ترکیبات	مقدار (درصد)
آب	۲۰
ساکاروز	۳۲
گلوکز، فروکتوز	۱۴
مواد غیرقندی	۱۰
SIO_2	۰/۵
K_2O	۵/۳
MgO	۰/۱
کربن	۴۹/۵

آب استخر پرورشی و ملاس نیشکر اضافه شده به‌مدت یک هفته شدیداً هوادهی شدند و درنهایت بعد از این‌که میزان آمونیاک کل مخزن به نزدیک صفر رسید و میزان فلاک‌های موجود در سیستم اندازه‌گیری شده با قیف ایمهوف به بیش از ۵ میلی‌لیتر رسید مخازن ماهی‌دار شدند. در طول دوره تحقیق نیز میزان منبع کربنه اضافه شده به هر تیمار براساس میزان خوراک مصرفی و نیز میزان آمونیاک کل و براساس فرمول Avnimelech و همکاران (۲۰۱۲) محاسبه و اضافه گردید.

هم‌چنین تمامی فاکتورهای بیوشیمیایی مهم آب از قبیل اکسیژن، دما، pH ، ترکیبات ازته (NO2، NO3 و NH3) ، کدورت آب، حجم فلاک‌ها (FVI.) به‌طور دوره‌ای و یک‌روز درمیان اندازه‌گیری شدند. غذادهی سه‌بار در روز به‌طور یکسان در همه مخازن به‌ازای بیومس ۳ درصد وزن بدن و براساس اشتها اضافه شد (Craig و Helfrich، ۲۰۰۲).

تیماربندی ماهی‌ها: تیماربندی ماهی‌ها براساس نسبت کربن به نیتروژن در سیستم بایوفلاک انجام گرفت و شامل چهار تیمار بود: تیمار A (تیمار بایوفلاک با میزان ملاس ایجادکننده نسبت کربن به نیتروژن ۱:۱۵)، تیمارB (تیمار بایوفلاک با میزان ملاس ایجادکننده نسبت کربن به نیتروژن ۱:۲۰)، تیمار C (تیمار بایوفلاک با میزان ملاس ایجادکننده نسبت کربن به نیتروژن ۱:۲۵) و تیمار شاهد D (تغذیه شده با خوراک معمولی و تعویض آب ۲۵ درصد روزانه).
تعویض آب در تیمارهای آزمایشی روزانه ۱ تا ۳ درصد بود (تعویض برای نمونه برداری آب، جمع‌آوری فلاک های اضافی و تبخیر (Souza و همکاران، ۲۰۱۴؛ Widanari و همکاران، ۲۰۱۲).

مراحل نمونه‌گیری: زیست‌سنجی و نمونه‌گیری ماهی‌ها در روزهای صفر، ۳۰ ، ۶۰ و ۹۰ تحقیق انجام گرفت و شاخص‌های زیر روی نمونه‌ها بررسی گردید. بررسی ماکروسکوپی و میکروسکوپی پوست باله و بعد از پایان دوره ۹۰ روزه آزمایش برای ارزیابی آسایش و سلامت، ۳ عدد ماهی از هر مخزن، نمونه‌برداری و سپس با ماده بی‌هوش کننده فنوکسی اتانول بی‌هوش شدند و پس از ارزیابی‌های دقیق ماکروسکوپی و میکروسکوپی و هم‌چنین وضعیت ظاهری باله‌ها، پوست و آبشش از نظر رنگ و بدشکلی بررسی شد (Ruyet و همکاران، ۲۰۰۸). درادامه لام مرطوب از آبشش، پوست و باله‌ها تهیه گردید و در زیر میکروسکوپ نوری فاز کنتراست برای وجود انگل و تک یاخته‌های دیگر و یا آلودگی‌های احتمالی مورد مطالعه قرار گرفت.

نمونه‌گیری بافت‌شناسی: نمونه‌های مربوط به مطالعات بافتی در انتهای دوره جمع‌آوری شد و در همه نمونه‌ها و تکرارها از نقاط یکسان از هر ماهی نمونه‌برداری صورت گرفت و بعد به فرمالین بافر ۱۰ درصد منتقل شدند. نمونه‌های برداشته شده پس از ۲۴ ساعت برای اطمینان از فیکس شدن تا زمان آزمایشات مربوطه دوباره در فرمالین بافر تازه قرار داده شدند. برای انجام آزمایشات ابتدا شستشو و آب‌گیری توسط غلظت‌های مختلف الکل از نمونه‌ها به‌روش استاندارد بافت‌شناسی انجام گرفت و سپس توسط گزیلن شفاف سازی انجام شد. بعد از مراحل آب‌گیری نمونه‌ها برای تثبیت شدن و برش‌گیری، توسط پارافین نگه‌داری شدند و در مرحله بعد برش‌های مناسب انجام شد و نمونه‌ها با هماتوکسیلین و ائوزین برطبق روش Bucke (۱۹۷۲) رنگ‌آمیزی شدند و در نهایت با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد ارزیابی قرار گرفتند (Azim و همکاران، ۲۰۰۸).

بررسی شاخص‌های رشد: نمونه‌گیری به‌منظور بررسی شاخص‌های رشد در روزهای صفر، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ انجام شد. شاخص‌های رشد مورد بررسی شامل موارد زیر بود (Salas وهمکاران، ۲۰۱۰):

میزان رشد ویژه[۱]:

وزن نهایی - وزن اولیه / روزهای غذادهی × ۱۰۰

میزان رشد نسبی[۲] :

وزن نهایی - وزن اولیه / وزن اولیه × ۱۰۰

ضریب تبدیل غذایی[۳]:

میزان غذای دریافت شده(گرم) / میزان کل وزن تر کسب شده(گرم)

میزان کارآیی پروتئین[۴]:

میزان وزن تر کسب شده(گرم) / میزان کل پروتئین دریافت شده

درصد میزان بقاء[۵]:

تعداد ماهیان زنده مانده / تعداد ماهیان اولیه × ۱۰۰

میزان رشد روزانه[۶]:

میانگین وزن نهایی - میانگین وزن اولیه/ تعداد روزهای آزمایش (g/d)

فاکتورهای وضعیت[۷]:

وزن (گرم) / [طول(سانتی متر)] ۳

روش تجزیه و تحلیل آماری: اختلاف بین داده‌ها و مقایسه میانگین نمونه‌ها در تیمارهای مختلف با سنجش واریانس دو طرفه[۸] در نرم‌افزار spss نسخه ۲۱، انجام و در صورت وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها، آزمون تکمیلی Tukeys HSD[۹]، برای گروه‌بندی میانگین‌های دارای اختلاف معنی‌دار استفاده شد، و P<۰/۰۵، به‌عنوان معیار معنی‌داربودن نتایج تعیین گردید. ترسیم نمودار در فضای نرم‌افزار Excel، نسخه ۲۰۱۰، انجام گرفت.

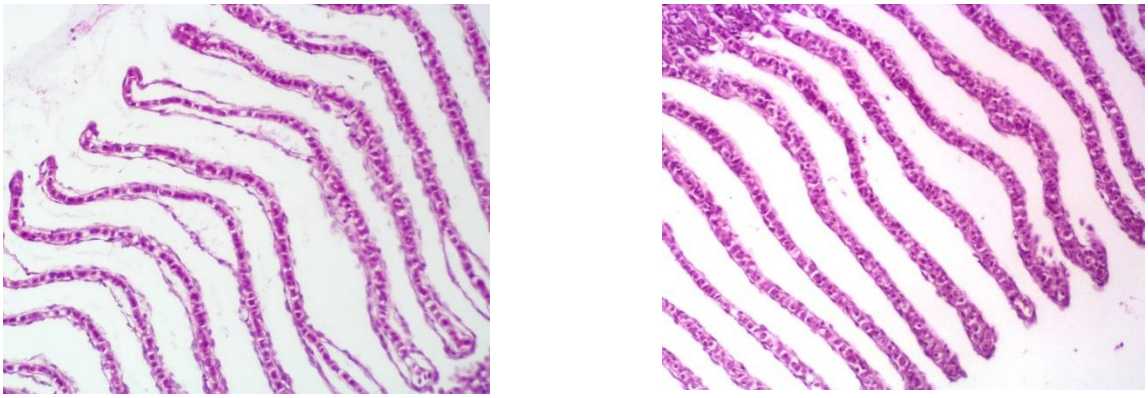
نتایج

در این مطالعه در بررسی‌های ماکروسکوپی از نظر شاخص‌های ظاهری سلامت و پارامترهای رفتاری و فیزیولوژیک ماهی بین تیمارهای مختلف هیچ فاکتور غیرطبیعی مشاهده نشد و تمامی شرایط در همه تیمارها نرمال بودند (شکل ۱). هم‌چنین در بررسی‌های میکروسکوپی که از بافت‌های تازه آبشش و پوست و مخاط صورت گرفت در هیچ کدام از تیمارها عامل انگلی یا قارچی بیماری‌زا مشاهده نشد. در روز صفر و ۳۰ تحقیق در تیمار شاهد آلودگی بسیار مختصر به ترماتودهای مونوژن (داکتلوژیروس و ژیروداکتیلوس) مشاهده شد، ولی در تیمارهای بایوفلاک هیچ‌گونه آلودگی انگلی مشاهده نگردید. در طول کل تحقیق بازماندگی نیز بین همه تیمارها ۱۰۰٪ بود و تلفاتی در تیمارها مشاهده نگردید.

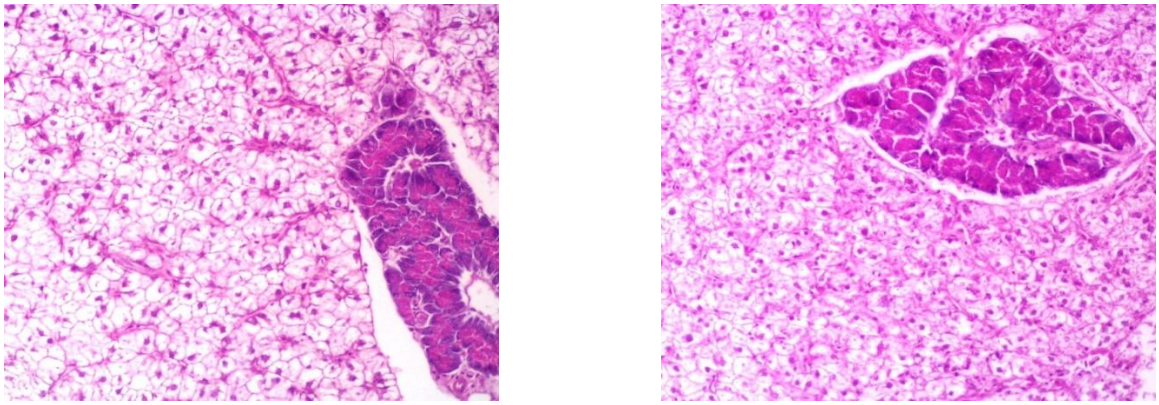
شکل ۱: نمای ظاهری ماهی کپور پرورش یافته در سیستم بایوفلاک (سمت راست) و ماهی پرورش یافته در آب معمولی (سمت چپ)

[۱] Specific growth rate (SGR)
[۲] Relative growth rate (RGR
[۳] Feed Conversion ratio (FCR
[۴] Protein efficiency ratio (PER)
[۵] (SR) Survival rate%
[۶] growth (DWG) Daily weight
[۷] Condition factors (CF)
[۸] Two-Way ANOVA
[۹] Honestly Significant Differences

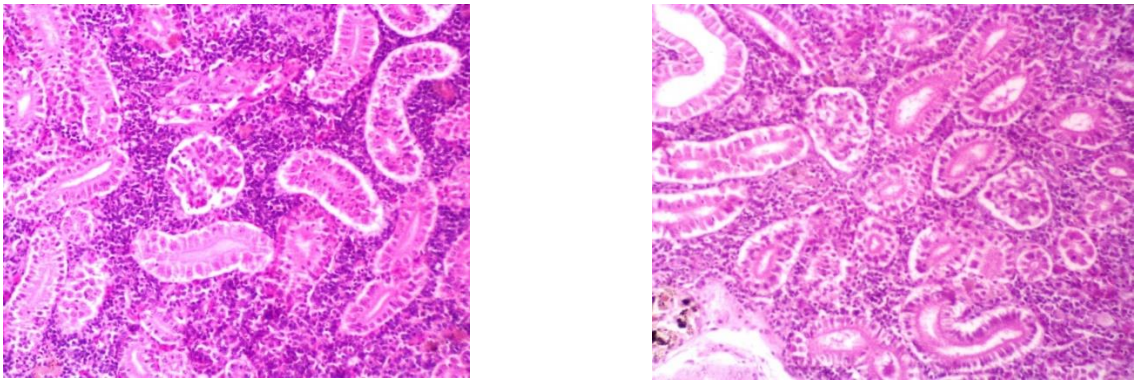
هم‌چنین نتایج حاصل از بررسی هیستوپاتولوژی آبشش در ماهیان تیمارهای بایوفلاک نشان دادند که هیچ آسیب جدی در بین تیمارهای بایوفلاک مشاهده نشد و در تیمار شاهد هم ضایعه خاصی مشاهده نشد (شکل ۲). در بررسی های انجام شده روی بافت کبد هم در هیچ‌کدام از تیمارها آسیب جدی مشاهده نشد و شرایط ماهیان در وضعیت مناسبی قرار داشت (شکل ۳). نتایج حاصل از بررسی کلیه در هر دو تیمار نتایج مشابهی را نشان دادند و در هیچ‌کدام از تکرارها هیچ تغییر حساس و قابل ملاحظه‌ای مشاهده نشد و وضعیت کلیه ماهیان هم در هردو گروه شاهد و بایوفلاک در شرایط مطلوبی قرار داشت (شکل ۴).



شکل ۲ : فیلامنت‌های ثانویه آبشش ماهی کپور سمت راست تیمار شاهد و سمت چپ تیمار بایوفلاک با نسبت کربن به ازت ۲۵ :۱ را نشان می‌دهد. طبق بررسی‌هایی که از تکرارهای مختلف به‌عمل آمد هیچ تغییر قابل توجهی در بین تیمارها وجود نداشت.

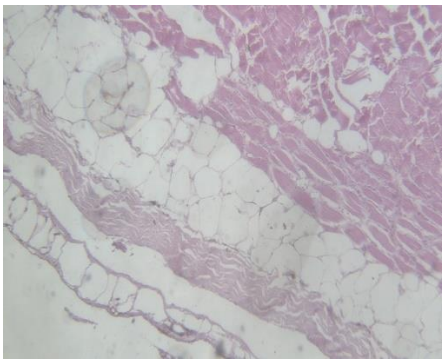


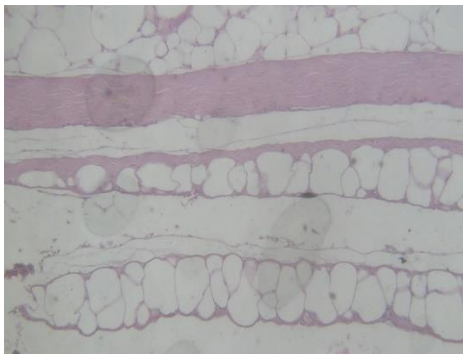
شکل ۳: سلول‌های هپاتوپانکراس ماهی کپور سمت راست تیمار شاهد و سمت چپ تیمار بایوفلاک با تیمار بایوفلاک با نسبت کربن به ازت ۲۵ :۱ را نشان می‌دهد. طبق بررسی‌هایی که از تکرارهای مختلف به‌عمل آمد هیچ تغییر قابل توجهی در بین تیمارها مشاهده نشد.



شکل ۴: بافت کلیه ماهی کپور، سمت راست تیمار شاهد و سمت چپ تیمار بایوفلاک تیمار بایوفلاک با نسبت کربن به ازت ۲۵ :۱. طبق بررسی‌هایی که از تکرارهای مختلف به‌عمل آمد هیچ تغییر قابل توجهی در بین تیمارها مشاهده نشد.

همچنین در بررسی‌های حاصل از پوست هم در هیچ‌کدام از تیمارها ضایعه‌ای مشاهده نشد و وضعیت پوست در شرایط مطلوبی قرار داشت (شکل ۵).





شکل ۵: بافت پوست ماهی کپور، سمت راست تیمار شاهد و سمت چپ تیمار بایوفلاک تیمار بایوفلاک با نسبت کربن به ازت ۲۵ :۱ را نشان می‌دهد. طبق بررسی‌هایی که از تکرارهای مختلف به‌عمل آمد هیچ تغییر قابل توجهی در بین تیمارها مشاهده نشد

جدول ۲: مقایسه شاخص‌های رشد بین تیمارهای مورد بررسی بعد از ۳۰، ۶۰ و ۹۰ روز پرورش در سیستم بایوفلاک (نتایج براساس Means±SD گزارش شده‌اند). حروف کوچک غیرهمنام روی انحراف معیار نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.

شاخص	تیمار	روز ۳۰	روز ۶۰	روز ۹۰
میزان رشد ویژه SGR	A:نسبت C:N برابر ۱۵:۱	۰/۵۴±۰/۰۳۷ ab	۰/۴۶±۰/۰۱ ab	**۰/۳۸±۰/۰۳ ab**
	B: نسبت C:N برابر ۲۰:۱	۰/۶۱±۰/۱۳۳ a	۰/۵۰±۰/۰۱ a	**۰/۴۱±۰/۰۲ a**
	C: نسبت C:N برابر ۲۵:۱	۰/۵۵±۰/۰۶۴ ab	۰/۵۳±۰/۰۳ a	**۰/۳۹±۰/۰۲ ab**
	D: گروه شاهد	۰/۲۵±۰/۱۲ b	۰/۲۸±۰/۰۷ b	**۰/۲۷±۰/۰۲ b**
میزان رشد نسبی RGR	A:نسبت C:N برابر ۱۵:۱	۴۶/۱۶±۳/۷۸ ab	۸۹/۳۵±۴/۹۳ ab	**۱۲۳/۰۵±۱۵/۴ ab**
	B: نسبت C:N برابر ۲۰:۱	۵۴/۵۱±۱۳/۸۸ a	۱۰۰/۴۵±۴/۳ a	**۱۳۵/۰۴±۱۳/۷ a**
	C: نسبت C:N برابر ۲۵:۱	۴۶/۵۹±۶/۴۱ ab	۱۰۹/۳۵±۱۰/۲۳ a	**۱۲۹/۰۱±۱۱/۶ ab**
	D: گروه شاهد	۲۰/۳۸±۱۰/۳ b	۴۸/۷۵±۱۳/۹ b	**۷۶/۲±۹/۵ b**
ضریب تبدیل غذایی FCR	A:نسبت C:N برابر ۱۵:۱	۱/۰۸±۰/۱۲ b	۱/۰۷±۰/۱ b	**۱/۱۴±۰/۲ b**
	B: نسبت C:N برابر ۲۰:۱	۱/۱۳±۰/۵ b	۱/۰۲±۰/۱ b	**۱/۱±۰/۱ b**
	C: نسبت C:N برابر ۲۵:۱	۱/۱۴±۰/۳ b	۰/۹±۰/۱ b	**۱/۱±۰/۱ b**
	D: گروه شاهد	۳/۵±۱/۳a	۲/۳±۰/۸ a	**۱/۷±۰/۵ a**
کارایی پروتئین PER	A:نسبت C:N برابر ۱۵:۱	۲/۹±۰/۳ ab	۲/۹۴±۰/۳ ab	**۲/۸±۰/۵ a**
	B: نسبت C:N برابر ۲۰:۱	۳/۱۰±۰/۷ a	۳/۰۷±۰/۳ a	**۲/۸۶±۰/۳ a**
	C: نسبت C:N برابر ۲۵:۱	۲/۸±۰/۷ ab	۳/۵±۰/۵ a	**۲/۸۸±۰/۴ a**
	D: گروه شاهد	۱/۲±۰/۹ b	۱/۶±۰/۷ b	**۱/۸۷±۰/۰۱ b**
میزان رشد روزانه DWG	A:نسبت C:N برابر ۱۵:۱	۰/۶۳±۰/۰۴ ab	۰/۶۱±۰/۰۴ ab	**۰/۵۵±۰/۰۵ a**
	B: نسبت C:N برابر ۲۰:۱	۰/۶۸±۰/۱۵ a	۰/۶۳±۰/۰۳ a	**۰/۵۶±۰/۰۴ a**
	C: نسبت C:N برابر ۲۵:۱	۰/۶۲±۰/۰۹ ab	۰/۷۲±۰/۰۶ a	**۰/۵۷±۰/۰۵ a**
	D: گروه شاهد	۰/۲۷±۰/۱۲ b	۰/۳۴±۰/۰۸ b	**۰/۳۷±۰/۰۶ b**
فاکتور وضعیت CF	A:نسبت C:N برابر ۱۵:۱	۹۴۹/۲۵±۵۶/۴ a	۱۳۴۱/۳۹±۶۶/۲ a	**۱۶۰۸/۶۱±۱۱۷/۹**
	B: نسبت C:N برابر ۲۰:۱	۹۱۱/۷۲±۹۱/۴ ab	۱۲۷۳/۲۲±۸۱/۲ ab	**۱۴۸۰/۶±۳۳/۲**
	C: نسبت C:N برابر ۲۵:۱	۹۶۳/۰۶±۷۶/۴ a	۱۳۱۷/۰۲±۳۸/۳ a	**۱۵۴۴/۶±۱۳۱/۴**
	D: گروه شاهد	۷۴۷/۶±۳۸/۹ b	۹۵۰/۶±۱۰۴/۳ b	**۱۲۴۱/۲±۱۹۴/۶**

همان‌طورکه در جدول ۲ آورده شده نتایج حاصل از ارزیابی شاخص‌های رشد و کارایی تغذیه نشان دادند که برخی از این شاخص‌ها در تیمارهای بایوفلاک نسبت به گروه شاهد ارتقاء یافتند. ازجمله میزان رشد روزانه که در تیمارهای بایوفلاک با غلظت‌های مختلف منبع کربن و در روزهای ۳۰، ۶۰ و ۹۰ افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد نشان دادند ($p<0/05$). هم‌چنین میزان رشد

ویژه و رشد نسبی هم در تیمارهای بایوفلاک در روزهای ۳۰، ۶۰ و ۹۰ به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از گروه شاهد بود (p<۰/۰۵). در ادامه وضعیت ضریب تبدیل غذایی در تیمارهای بایوفلاک هم در روزهای ۳۰، ۶۰ و ۹۰ نسبت به گروه شاهد بهبود یافت واختلاف معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده شد (p< ۰/۰۵) به‌طوری‌که کم‌ترین میزان ضریب تبدیل غذایی در تیمارهای بایوفلاک بود با میانگین ۱/۱ و بیش‌ترین ضریب تبدیل غذایی در گروه شاهد با میانگین ۲/۳ مشاهده شد. از نظر کارایی پروتئین نتایج نشان دادند که در هر سه روز نمونه‌برداری اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای بایوفلاک با گروه شاهد مشاهده شد (p< ۰/۰۵) و کم‌ترین مقدار کارایی پروتئین مربوط به تیمار شاهد بود. از نظر فاکتور چاقی هم در روزهای ۳۰ و ۶۰ اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای بایوفلاک با گروه شاهد مشاهده شد (p<۰/۰۵) ولی در روز ۹۰ هیچ اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی و گروه کنترل مشاهده نشد (p>۰/۰۵). در نهایت از نظر میزان بقاء هیچ اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد و در همه گروها ۱۰۰ درصد بود (p>۰/۰۵).

بحث

عموماً سطوح بالای مواد جامد معلق در سیستم‌های فوق متراکم یکی از شاخص‌های کاهش آسایش ماهی است که می‌تواند روی رشد و عملکرد تنفس ماهی اثر منفی داشته باشد (Mettam، ۲۰۰۵). هم‌چنین می‌تواند باعث در معرض قرارگیری ماهی در برابر بیماری‌های باکتریایی و انگلی شود (Noble و Summerfelt، ۱۹۹۶). هرچند یک‌سری ضایعات جزئی در آبشش‌های ماهی از هر دو تیمار شاهد و تیمارهای آزمایشی در برخی مطالعات گزارش شده است ولی در مطالعه حاضر هیچ‌ضایعه یا تغییرات غیرطبیعی جدی در تیمارهای بایوفلاک مشاهده نشد. در مشاهداتی که توسط Vincent (۲۰۰۶) در مقایسه سیستم فوق متراکم بازچرخشی (RAS) با بایوفلاک انجام شد نتایج مشابه آزمایش حاضر بود و هیچ تغییر یا ضایعه‌ای در ماهیان پرورش یافته در سیستم بایوفلاک دیده نشد.

ارزیابی آسایش و سلامت ماهی در سیستم‌های متراکم و فوق متراکم از مهم‌ترین شاخص‌های کارایی این سیستم‌ها است و تاثیر آن برروی وضعیت سلامتی، تولیدمثل و رفتار ماهی غیرقابل اغماض است و گزارشات متعددی در این زمینه ارائه شده است (Relic و همکاران، ۲۰۰۹؛ Macintyre و همکاران، ۲۰۰۸؛ Svobodova و همکاران، ۱۹۹۳). از آن‌جایی‌که بسیاری از شاخص‌های کیفی آب مانند کدورت، میزان مواد معلق، تقاضای اکسیژنی، بارآلی و میکروبی آب و کیفیت خوراک در سیستم بایوفلاک و به‌طورکلی درسیستم‌های فوق متراکم دستخوش تغییرات قرار می‌گیرند، لذا مطالعه آسایش و سلامت ماهی در این سیستم‌ها از اهمیت بالایی برخوردار است.

در تحقیق حاضر نیز تفاوت سلامت ماهی تحت تاثیر نسبت‌های مختلف کربن به نیتروژن در سیستم بایوفلاک قرار نگرفت، به‌طوری‌که هیچ‌گونه ضایعه ماکروسکوپی و میکروسکوپی در پوست، آبشش تیمارهای بایوفلاک مشاهده نشد.علی‌رغم این‌که ظاهراً آب در سیستم بایوفلاک کدورت بالایی داشت. در همین راستا و در مطالعه‌ای که Ruyet و همکاران (۲۰۰۸) برروی ارزیابی آسایش و سلامت ماهی قزل‌آلای پرورش یافته در تراکم‌های مختلف انجام دادند نتایج نشان دادند که شرایط باله‌های سینه‌ای و پشتی در همه گروه‌ها در بهترین شرایط بود و هیچ خوردگی، زخم یا بدشکلی در آن‌ها مشاهده نشد که با نتایج بررسی حاضر مطابقت دارد. هم‌چنین Turbull و همکاران (۲۰۰۵) سلامت ماهی سالمون آتلانتیک را ازطریق بررسی شاخص‌های عمومی بدن و شرایط باله‌ها مورد ارزیابی قرار دادند. پارامترهای فیزیولوژیکی و رفتاری مرتبط با سلامت گونه پرورشی و هم‌چنین شرایط عمومی مانند افتادن فلس‌ها، آسیب‌های باله‌ای، نوع شنا و رفتارهای تنفسی در ارزیابی آسایش موجودات آبزی به‌طور گسترده‌ای استفاده می‌شوند (Bagni و همکاران، ۲۰۰۷). ازجمله شاخص‌های رفتاری مورد مطالعه در آسایش و سلامت ماهی رفتارهای حرکتی ماهی می‌باشد مانند فرار کردن از محیط، پرتاب شدن به بیرون، حرکت انفجاری، اسپاسم‌های عضلانی، اتساع مردمک چشم و سایر واکنش‌های محرک خارجی که در مقایسه با یک ماهی با شرایط نرمال قابل تشخیص می‌باشد (Mortan و همکاران، ۱۹۹۰؛ Kristiansen و همکاران، ۲۰۰۴).

از دیگر تغییراتی که می‌توان در شرایط بحرانی و عدم آسایش آبزی به‌آن توجه کرد تغییرات رنگ پوست و چشم (Sutor و Huntingford، ۲۰۰۲) افزایش تعداد حرکات سرپوش آبششی (Handy، ۱۹۹۹) مخاط‌های پوستی، زخم و آسیب‌های پوستی، از دست رفتن شرایط طبیعی بدن مانند تغییرات اسکلتی و بدشکلی و همین‌طور کاهش اشتها (Kramer، ۱۹۸۷)، کاهش تحرک (Vis و همکاران، ۲۰۰۱) می‌باشد.

یکی از مهم‌ترین شاخص‌ها برای سنجش سلامت ماهی، مطالعات بافت‌شناسی اندام‌های حیاتی ماهی است. در آبزیان از آن‌جایی‌که اولین محل تماس فیزیولوژیک بدن آبزی با محیط پیرامون پوست و آبشش‌ها می‌باشند، لذا در مواقعی که فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب دستخوش تغییرات شوند، این بررسی‌ها اهمیت بیش‌تری دارند (Rankin و همکاران، ۱۹۸۲). در همین راستا محققان اظهار داشتند که آبشش‌ها می‌توانند یک مدل خوبی برای بررسی اثرات آلودگی و کیفیت آب باشند (Mckim و Erickson، ۱۹۹۱؛ Mallat، ۱۹۸۵).

آبشش‌ها یک اندام حیاتی برای تبادل گازهای تنفسی و تنظیم اسمولاریته‌بدن آبزی‌می‌باشند(Cengiz،۲۰۰۶).دربسیاری‌از مطالعات انجام شده بر روی آلاینده‌ها و سموم فیلامنت‌های آبششی دستخوش تغییرات شده و اثرات منفی روی آبشش خواهند گذاشت (De Silva و Samayawardhena، ۲۰۰۲). کاهش اکسیژن و افزایش ترکیبات ازته هم ممکن است باعث ایجاد آسیب‌های بافتی شده و به‌دنبال آن کاهش کارایی تنفسی را باعث شوند (Chavan و همکاران، ۲۰۱۴). مراحل مختلف آسیب آبششی می‌تواند از یک هایپرپلازی محدود و برگشت‌پذیر تا نکروز کامل و غیرقابل برگشت سلول‌های تنفسی باشد. در تحقیق حاضر حتی موردی از آسیب‌های اولیه و محدود آبششی در بین تیمارها نیز مشاهده نگردید که گویای وضعیت سلامت مناسب ماهی در سیستم بایوفلاک حتی در نسبت‌های بالای کربن به نیتروژن است.

کبد یکی دیگر از اندام‌های حیاتی بدن است که بیش‌تر در امر سم‌زدایی نقش ایفا می‌نماید (Dutta و همکاران، ۱۹۹۳) و در اکثر مطالعات مربوط به وضعیت سلامت و آسایش ماهی گزینه اصلی است (Rodriguesو Fanta، ۱۹۹۸)ارتباط زیادی‌بین‌شرایط مورفوفیزیولوژی کبد با نوع تغذیه و شرایط پرورش ماهی وجود دارد (Ostaszewska و همکاران، ۲۰۰۵؛ Caballero و همکاران، ۲۰۰۳؛ Robert، ۱۹۸۸). نقش کبد در متابولیسم و ذخیره موادی که از دستگاه گوارش عبور می‌کنند، نیز در ماهی اثبات شده است. عدم بالانس اجزای خوراک و حضور مواد توکسیک باعث آسیب بافتی کبد خواهد شد (Tacon، ۱۹۹۲). رایج‌ترین تغییرات قابل مشاهده در کبد شامل دخیره بافت چربی زیاد در کبد، چرب شدن کبد، تغییر در بافت پارانشیم و ایجاد نکروز می‌باشد (Takashima و Hibiya، ۱۹۸۲). Segner و Juario (۱۹۸۶) نشان دادند که وضعیت بافت‌شناسی کبد در خامه ماهیانی که از غذای زنده (آرتمیا) استفاده کرده بودند به‌طور قابل توجهی بهتر از تیمارهایی بود که از غذای فرموله شده تغذیه کردند. یکی از شاخص‌های‌فعالیت‌متابولیک‌سلول‌های‌کبدی‌پارامترهای‌مورفومتریک هستند که بیش‌تر استفاده می‌شوند و شامل تعداد سلول‌ها، سطح سلول‌های کبدی، سطح هسته سلول‌های کبدی و محتویات چربی و گلیکوژن‌در سیتوپلاسم سلول‌هامی‌باشد(Strussmann و Takashima، ۱۹۸۲). در همین راستا Verreth و همکاران (۱۹۹۴) نشان دادند که تغییرات کبدی در گربه ماهی آفریقایی (*Clarias gariepinus*) تغذیه شده با دو نوع آرتمیای حاوی سطوح بالا و پایین اسیدهای چرب غیراشباع رخ داد. در مطالعه دیگری که توسط Raskovic و همکاران (۲۰۱۳) برروی تاثیر سطوح مختلف پروتئین جیره برروی کیفت آب و آسیب‌های بافتی آبشش و کلیه ماهی قزل‌آلا در سیستم متراکم و با سه منبع آبی مختلف انجام‌شد یافته‌های آن‌ها نشان داد که آبشش‌ها در این سیستم تحت تاثیر تراکم قرار گرفته و ضایعاتی را برای آداپته شدن با شرایط نشان دادند ولی در بررسی کلیه هیچ تغییر جدی که باعث‌کاهش‌سلامت ماهیان شود مشاهده‌نشد و دراین‌موردبایافته‌های حاصل ازبررسی‌حاضر مطابقت دارد. آبشش‌های‌نرمال شامل‌کمان‌های نگه‌دارنده غضروفی و فیلامنت‌ها حاوی لاملاهای اولیه و ثانویه هستند. کلیه‌های طبیعی ماهی نیز شامل نفرون‌های مشخص و هر نفرون حاوی سلول‌های گرد و متوازن مشخصی است. در بررسی انجام شده توسط Gerami و همکاران (۲۰۱۵) که برروی تاثیر سیستم بایوفلاک بر روی کپورمعمولی انجام شد هیچ ضایعات پاتولوژیکی در کبد و آبشش بین تیمار شاهد و بایوفلاک (جایگزینی بایوفلاک با ۷۵ درصد خوراک)مشاهده نشدکه با نتایج این بررسی مطابقت داشت. گزارشاتی از افزایش گابلت سل‌های پوست و مخاطات به‌دنبال استفاده از عصاره‌های گیاهی و مواد محرک ایمنی گزارش شده است (Xueqin و همکاران، ۲۰۱۲؛ Heidarieh و همکاران، ۲۰۱۲). با وجود افزایش قابل توجه بار میکروبی در سیستم بایوفلاک ولی در مطالعه حاضر تفاوتی از نظر ماکروسکوپی و میکروسکوپی در ساختار پوست مشاهده نگردید.

از شاخص‌های دیگر ارزیابی کارایی سیستم‌های پرورش متراکم ماهی، میزان بقای ماهی در سیستم است. در تحقیق جاری میزان بقای ماهی‌ها در تمام نسبت‌های کربن به ازت ۱۰۰٪ بود که با تیمار شاهد تفاوتی نداشت. لذا در این سیستم علی‌رغم افزایش رشد و تولید ماهی، تاثیر منفی بر میزان بقای ماهی مشاهده نگردید. Azim و همکاران (۲۰۰۸) اثر سیستم بایوفلاک بر میزان بازماندگی ماهی تیلاپیا را مثبت گزارش نمودند و یافته‌های آن‌ها با نتایج حاضر مطابقت داشت. در تحقیق دیگری که Emerenciano و همکاران (۲۰۱۰) بر روی بررسی تاثیر فن‌آوری بایوفلاک روی عملکرد رشد و بقاء میگوی صورتی انجام دادند نتایج نشان داد که بیش‌ترین میزان بقاء مربوط به تیمارهایی بودند که در سیستم بایوفلاک و به‌همراه غذای تجاری پرورش یافتند و نتایجی مشابه مطالعه حاضر مشاهده شد. یکی دیگر از مهم‌ترین شاخص‌های ارزیابی کارایی یک سیستم پرورش ماهی بررسی شاخص‌های رشد در سیستم است. در این تحقیق تقریباً تمام شاخص‌های رشد مورد بررسی تحت تاثیر تیمار بایوفلاک قرار گرفت. به‌طوری‌که بیش‌ترین میزان SGR و کم‌ترین میزان FCR در تیمارهای بایوفلاک مشاهده گردید که نسبت به تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری داشتند. عامل اصلی چنین بهبودی در شاخص‌های رشد، تغذیه ماهی از فلاک‌های تولید شده در سیستم می‌باشد که نوعی خوراک زنده و باکیفیت می‌باشد. هم‌چنین در مطالعه‌ای که Mohamed (۲۰۱۰) روی تاثیر بایوفلاک روی رشد و بقای میگوی ببری سبز (*Penaeus semisulcatus*) انجام داد

به این نتیجه‌رسید که ازنظر بقا هیچ اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای پروبیوتیکی با گروه شاهد مشاهده نشد ولی از طرفی میزان جذب غذای دستی در تیمار شاهد کاهش چشمگیری را نشان داد و این مسئله از طریق بررسی و نمونه‌برداری از دستگاه گوارش میگوها به‌دست آمد. آن‌ها بهبود رشد را به‌دلیل جذب بهتر غذا، کاهش استرس و بهبود کیفیت آب بیان کردند. در همین راستا Tacon و همکاران (۱۹۸۷) گزارش کردند که فقدان مواد جاذب غذا می‌تواند از دلایل گرایش کم‌تر آبزیان به مصرف غذای دستی باشد که این مشکل در سیستم بایوفلاک وجود ندارد و این سیستم سرشار از غذای زنده با تنوع فراوان است. نقش سودمند سیستم بایوفلاک در چندین گونه آبزی پرورشی به‌خوبی ثابت شده است (Hari و همکاران، ۲۰۰۶؛ Xu و Pan، ۲۰۱۲). اخیراً در مطالعه‌ای که انجام شده است نتایج و گزارشات نشان دادند که استفاده بایوفلاک به‌عنوان یکی از اجزای جیره میگوی پرورشی وانامی *L. vannamei* باعث بهبود شاخص‌های رشد در این آبزی شده است (Kuhn و همکاران، ۲۰۰۹ و ۲۰۱۰). در بررسی دیگری که برروی تاثیر سیستم بایوفلاک در رشد میگوی *Penaeus monodon* انجام شد نتایج به‌دست آمده نشان دادند که عملکرد رشد و هم‌چنین PER در میگوها افزایش پیدا کرد و کاهش معنی‌داری در ضریب تبدیل غذایی آن‌ها مشاهده شد (Anand و همکاران، ۲۰۱۴). در بررسی انجام شده توسط محققان ثابت شد که بایوفلاک‌ها منبع غنی از خیلی ترکیبات Bioactives (زیست فعال) نظیر کاروتنوئیدها، کلروفیل‌ها، فیتواسترول‌ها، بروموفنول‌ها و آمینوشکرها می‌باشند و در کنار این‌ها دارای ترکیبات محرک ایمنی و ضدمیکروبی هم هستندکه می‌توانند باعث بهبود سلامت و افزایش رشد آبزیان شوند (Ju و همکاران، ۲۰۰۸).

نتایج مطالعه Luo و همکاران (۲۰۱۳) بر روی ماهی تیلاپیا با نتایج بررسی حاضر در یک راستا بود، به‌طوری‌که شاخص‌های رشد در سیستم متراکم پرورش بایوفلاک نسبت به سیستم پرورش مدار بسته بیش‌تر شاخص‌های رشد را تحریک نمود. گزارشات متعددی از بهبود شاخص‌های رشد در سیستم بایوفلاک وجود دارد و نتایج یکسانی با یافته‌های حاضر داشتند (Yuan و همکاران، ۲۰۱۰؛ Little و همکاران، ۲۰۰۸؛ Azim و little، ۲۰۰۸؛ Avnimelech، ۲۰۰۷). هم‌چنین نتایج تحقیق Azim و همکاران (۲۰۰۸) روی اثرات سیستم بایوفلاک بر رشد و بقاء ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) نشان داد که استفاده از سیستم بایوفلاک می‌تواند باعث افزایش معنی‌دار رشد در مقایسه با گروه شاهد شود. هم‌چنین میزان FCR هم به‌طور معنی‌داری در سیستم بایوفلاک پایین‌تر از گروه شاهد بود ولی از نظر بقا هیچ اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشدکه با نتایج به‌دست آمده از مطالعه حاضر منطبق بود.

هم‌چنین مطالعات مشابهی از بهبود رشد و کارایی خوراک و پروتئین در سیستم بایوفلاک وجود دارد (Ray و همکاران، ۲۰۱۱ ؛ Krummer و همکاران، ۲۰۱۱؛Zhao و همکاران، ۲۰۱۲؛ Hari و همکاران، ۲۰۰۴).

یکی از شاخص‌های دیگر ارزیابی سیستم‌های پرورش متراکم ماهی رفتارهای تغذیه‌ای ماهی است، در این تحقیق ماهی‌ها علی‌رغم کدورت بالای آب، با اشتهای زیاد و با ولع خوراک را مصرف کرده و به‌طور مشخص در فواصل غذادهی از فلاک‌های داخل آب استفاده می‌کردند به‌طوری‌که وعده غذا در سیستم بایوفلاک‌باسرعت بیش‌تری نسبت به گروه شاهد مصرف می‌شد. هم‌چنین حضور مستمر فلاک‌ها در روی محتویات و تغییر رنگ مدفوع به‌خوبی در تیمارهای بایوفلاک کاملاً از تیمار شاهد قابل تشخیص بود.

به‌طورکلی می‌توان نتیجه گرفت که در سیستم پرورش متراکم بایوفلاک در ماهی کپور معمولی شاخص‌های آسایش و سلامت ماهی تحت تاثیر قرار نگرفته و از نظر ماکروسکوپی و میکروسکوپی تفاوتی بین اندام‌های حیاتی ماهیان تیمار شاهد و تیمار بایوفلاک مشاهده نگردید. ولی این سیستم تاثیر مثبتی بر شاخص‌های رشد ماهی داشته و تیمار B و C بهترین تیمارها در بهبود شاخص‌های رشد ماهی بودند. لذا استفاده از نسبت ۲۰:۱ و ۲۵:۱ کربن به ازت برای سیستم پرورش متراکم ماهی کپور معمولی قابل توصیه است.

منابع

۱. **Algers, B.; Blokhuis, H.J. and Broom, D.M., 2008.** Animal welfare aspects of husbandry systems for farmed fish Carp. EFSA journal. Vol. 843, pp: 1-28.

۲. **Algers, B.; Blokhuis, H.J.; Bøtner, A.; Broom, D.M.; Costa, P.; Domingo, M.; Greiner, M.; Hartung, J.; Koenen, F.; Müller-Graf, C. and Morton, D.B., 2009.** Scientific opinion of the panel on animal health and welfare on a request from European Commission on general approach to fish welfare and the concept of sentience in fish. The European Food and Safety Authority Journal. Vol. 954, pp: .1-12.

۳. **Azim, M.E.; Little, D.C. and Bron, J.E., 2008.** Microbial protein production in activated suspension tanks manipulating C: N ratio in feed and the implications for fish culture. Bioresource Technology. Vol. 99, pp: 3590-3599.

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

۵. **Anand, P.S.; Kohli, M.P.S.; Kumar, S.; Sundaray, J.K.; Roy, S.D.; 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. Vol. 418, pp:108-115.

۶. **APHA. 1998.** Standard Methods for the Examination of the Water and Wastewater, 22nd edn. American Public Health Association, Washington, DC.

۷. **Avnimelech, Y., 2007.** Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bioflocs technology ponds. Aquaculture. Vol. 264, pp: 140-147.

۸. **Bagni, M.; Civitareale, C.; Priori, A.; Ballerini, A.; Finoia, M.; Brambilla, G. and Marino, G., 2007.** Preslaughter crowding stress and killing procedures affecting quality and welfare in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus aurata*). Aquaculture. Vol. 263, pp: 52-60.

۹. **Bucke, D.A.V.I.D., 1972.** Some histological techniques applicable to fish tissues. In Disease of Fish. Proceeding of Symposium. Vol. 30, pp: 257-301.

۱۰. **Caballero, M.J.; Izquierdo, M.S.; Kjørsvik, E.; Montero, D.; Socorro, J.; Fernández, A.J. and Rosenlund, G., 2003.** Morphological aspects of intestinal cells from gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed diets containing different lipid sources. Aquaculture. Vol. 225, pp: 325-340.

۱۱. **Craig, S. and Helfrich, L.A., 2002.** Understanding Fish Nutrition, Feeds and Feeding (Publication 420–256). Virginia Cooperative Extension, Yorktown (Virginia). 4 p.

۱۲. **Chavan, V.R. and Muley, D.V., 2014.** Effect of heavy metals on liver and gill of fish Cirrhinus mrigala. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. Vol. 3, No. 5, pp: 277-288.

۱۳. **Cengiz, E.I., 2006.** Gill and kidney histopathology in the freshwater fish Cyprinus carpio after acute exposure to deltamethrin. Environmental Toxicology and Pharmacology. Vol. 22, No. 2, pp: 200-204.

۱۴. **De Silva, S.S. and Anderson, T., 1995.** Fish Nutrition in aquaculture. London, UK: Chapman and Hall.

۱۵. **Dutta, H.M.; Adhikari, S.; Singh, N.K.; Roy, P.K. and Munshi, J.S.D., 1993.** Histopathological changes induced by malathion in the liver of a freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). Bulletin of environmental contamination and toxicology. Vol. 51, No. 6, pp: 895-900.

۱۶. **Erickson, R.J., 1985.** An evaluation of mathematical models for the effects of pH and temperature on ammonia toxicity to aquatic organisms. Water Research. Vol. 19, No. 8, pp: 1047-1058.

۱۷. **Emerenciano, M.; Ballester, E.L.C.; Cavalli, R.O. and Wasielesky, W., 2013.** Effect of biofloc technology (BFT) on the early postlarval stage of pink shrimp Farfantepenaeus paulensis: growth performance, floc composition and salinity stress tolerance. Aquac Int. Vol. 19, pp: 891-901.

۱۸. **Hargreaves, J.A., 2006.** Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. Aquacultural Engineering. Vol. 34, pp: 344-363.

۱۹. **Hargreaves, J.A., 2013.** Biofloc Production System for Aquaculture. Southern RegionalAquaculture Center (SRAC) Publication No. 4503.

۲۰. **Handy, R.D. and Depledge, M.H., 1999.** Physiological responses: their measurements and use as environmental biomarkers in ecotoxicology. Ecotoxicology. Vol. 8, pp: 329-349.

۲۱. **Heidarieh, M.; Mirvaghefi, A.R.; Akbari, M.; Farahmand, H.; Sheikhzadeh, N.; Shahbazfar, A.A. and Behgar, M., 2012.** Effect of dietary Ergosan on growth performance, digestive enzymes, intestinal histology, hematological parameters and body composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Physiol. Biochem. Doi 10.1007/s10695-012-9602-8.

۲۲. **Hari, B.; Kurup, B.M.; Varghese, J.T.; Schrama, J.W. and Verdegem, M.C.J., 2006.** The effect of carbohydrate addition on water quality and the nitrogen budget in extensive shrimp culture systems. Aquaculture. Vol. 252, No. 2, pp: 248-263.

۲۳. **Ju, Z.Y.; Forster, I.; Conquest, L.; Dominy, W.; Kuo, W.C. and David Horgen, F., 2008.** Determination of microbial community structures of shrimp floc cultures by biomarkers and analysis of floc amino acid profiles. Aquaculture Research. Vol. 39, No. 2, pp: 118-133.

۲۴. **Kristiansen, T.S.; Ferno, A.; Holm, J.C.; Trivitera, L.; Bakke, S. and Fosseidengen, J.E., 2004.** Swimming behaviour as an indicator of low growth rate and impaired welfare in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) reared at three stocking densities. Aquaculture. Vol. 230, pp: 137-151.

۲۵. **Kramer, D.L., 1987.** Dissolved oxygen and fish behaviour. Environ. Biol. Fish. Vol. 18, pp: 81-92.

۲۶. **Kuhn, D.D.; Lawrence, A.L.; Boardman, G.D.; Patnaik, S.; Marsh, L. and Flick, G.J., 2010.** Evaluation of two types of bioflocs derived from biological treatment of fish effluent as feed ingredients for Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture. Vol. 303, No. 1, pp: 28-33.

۲۷. **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. Vol. 422, pp: 1-7.

۲۸. **MacIntyre, C.M., 2008.** Water quality and welfare assessment on United Kingdom trout farms. Chapter 2. Influences of water quality on the welfare of farmed rainbow trout. PhD thesis. Institute of Aquaculture, University of Stirling, UK.

۲۹. **Morton, D.B., 1990.** Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimentalanimals. Europ. J. Pharmacol. Vol. 183, pp: 1583-1590.

۳۰. **Mettam, J.J.; Oulton, L.J.; McCrohan, C.R. and Sneddon, L.U., 2011.** The efficacy of three types of analgesic drugs in reducing pain in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Applied Animal Behaviour Science. Vol. 133, No. 3, pp: 265-274.

۳۱. **Morton, A.B., 1990.** A quantitative comparison of the behaviour of resident and transient forms of the killer whale

۴۲. **Poleksić, V.; Rašković, B.; Marković, Z.; Dulić, Z.; Stanković, M.; Živić, I. and Lakić, N., 2007.** Effects of different dietary protein sources on intestine and liver morphology of carp yearlings. Proceedings of the 3rd Serbian Congress for Microscopy. Belgrade, Serbia, Serbian Microscopy Society. pp: 237-238.

۴۳. **Ruyet, J.P.; Labbe, L.; Bayon, N.L.; Severe, A. and Roux, A.L., 2008.** Combined effects of water quality and stocking density on welfare and growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat. Vol. 21, pp: 185-195.

۴۴. **Rašković B.; Poleksić V.; Živić I. and Spasić, M., 2010.** Histology of carp (*Cyprinus carpio*, L.) gills and pond water quality in semiintensive production, Bulg. J. Agric. Sci. Vol. 16, pp: 253-262.

۴۵. **Raskovic, B.; Jaric, I.; Koko, V.; Spasic, M.; Dulic, Z. and Markovic, Z., 2013.** Histopathological indicators: a useful fish health monitoring tool in common carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) culture. J.Biol. Vol. 8, pp: 975-985.

۴۶. **Relić, R.; Ćirić, M.; Radenković-Damnjanović, B. and Vučinić, M., 2009.** Kvalitet vode i dobrobit riba. Zbornik radova XX Savetovanja "Dezinfekcija, dezinsekcija i deratizacija u zaštiti zdravlja životinja i ljudi" sa međunarodnim učešćem, Divčibare. pp: 199-206.

۴۷. **Relic, R.; Hristov, S.; Poleksic, V. and Markovic, Z., 2009.** Establishment of fish stress studies within the Center for fishery and applied hydrobiology at the Faculty of agriculture University of Belgrade. In book of abstracts of the Conference Aquaculture Europe. pp: 269-270.

۴۸. **Rankin, J.C. and Bolis, L., 1984.** 6 Hormonal Control of Water Movement Across the Gills. Fish physiology. Vol. 10, pp: 177-201.

۴۹. **Rodrigues, E.D.L. and Fanta, E., 1998.** Liver histopathology of the fish Brachydanio rerio Hamilton Buchman after acute exposure to sublethal levels of the organophosphate Dimethoate 500. Revista Brasileira de Zoologia. Vol. 15, No. 2, pp: 441-450.

۵۰. **Segner, H. and Juario, J.V., 1986.** Histological observations on the rearing of milkfish, Chanos chanos, fry using different diets. Journal of Applied Ichthyology. Vol. 2, pp: 162-172.

۵۱. **Roberts, R.J., 1989.** Fish pathology. Baillière Tindall, London.

۵۲. **Svobodova, Z.; Lloyd, R.; Machova, J. and Vykusova, B., 1993.** Water quality and fish health. EIFAC Technical Paper. No. 54. Rome, FAO. 59 p.

۵۳. **Sutor, H.C. and Huntingford, F.A., 2002.** Eye colour in juvenile Atlantic salmon: effects of social status, aggression and foraging success. J. Fish Biol. Vol. 61, pp: 606-614.

۵۴. **Strüssmann, C.A. and Takashima, F., 1990.** Hepatocyte nuclear size and nutritional condition of larval pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Cuvier et Valenciennes). Journal of Fish Biology. Vol. 36, pp: 59-65.

۵۵. **Sharma, A.; Sharma, K. and Sangotra, R., 2015.** Biofloc culture and its utilisation as feed in limited water exchange off the central British Columbia coast. Reports of the International Whaling Commission Special. Vol. 12, pp: 245-248.

۳۲. **McKim, J.M. and Erickson, R.J., 1991.** Environmental impacts on the physiological mechanisms controlling xenobiotic transfer across fish gills. Physiological zoology. Vol. 64, No. 1, pp: 39-67.

۳۳. **Mohamed, M.E., 2010.** The effect of microbial biofloc on water quality, survival and growth of the green tiger shrimp (*Penaeus semisulcatus*) fed with different crude protein levels. Journal of the Arabian Aquaculture Society. Vol. 5, No. 2, pp: 119-142

۳۴. **Noble, C.; Jones, H.A.C.; Damsgård, B.; Flood, M.J.; Midling, K.Ø.; Roque, A.; Sæther, B.S. and Cottee, S.Y., 2012.** Injuries and deformities in fish: their potential impacts upon aquacultural production and welfare. Fish physiology and biochemistry. Vol. 38, No. 1, pp: 61-83.

۳۵. **Najdgerami, E.H.; Bakhshi, F. and Lakani, F.B., 2015.** 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 physiol biochem. Vol. 10695, No. 15, pp: 151-159.

۳۶. **Ostaszewska, T.; Dabrowski, K.; Czuminska, K.; Olech, W. and Olejniczak, M., 2005.** Rearing of pikeperch larvae using formulated diets-first success with starter feeds. Aquaculture Research. Vol. 36, pp: 1167-1176.

۳۷. **Ottesen, O.H. and Olafsen, J.A., 2000.** Effects on survival and mucous cell proliferation of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., larvae following microflora manipulation. Aquaculture. Vol. 187, pp: 225-228. Doi: 10.1016/S0044-8486(00)00314-8.

۳۸. **Odegard, J.; Olesen, I.; Dixon, P.; Jeney, Z.; Nielsen, H.M.; Way, K.; Joiner, C.; Jeney, G.; Ardó, L.; Rónyai, A. and Gjerde, B., 2010.** Genetic analysis of common carp (*Cyprinus carpio*) strains. II: Resistance to koi herpesvirus and Aeromonas hydrophila and their relationship with pond survival. Aquaculture. Vol. 304, No. 1, pp: 7-13.

۳۹. **Patriche, T.; Patriche, N.; Bocioc, E. and Coada, M.T., 2011.** Serum biochemical parameters of farmed carp (*Cyprinus carpio*). Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation-International Journal of the Bioflux Society (AACL Bioflux). Vol. 4, No. 2.

۴۰. **Pan, L.Q. and Xu, W.J., 2012.** Effects of bioflocs on growth performance, digestive enzyme activity and body composition of juvenile Litopenaeus vannamei in zero-water exchange tanks manipulating C/N ratio in feed. Aquaculture. Vol. 356, pp: 147-152.

۴۱. **Poleksić, V.; Karan, V.; Elezović, I. and Nešković, N., 1995.** Estimation of harmful effects of pesticides on fish: biochemical and histopathological approach. I Regional Symposium: Chemistry and the Environment, Vrnjačka Banja, Serbian Chemical Society, Proceedings. Vol. 1, pp: 487-490.

system for the culture of *labeo rohita*. Journal of international academic research for multidisciplinary. Vol. 2320, Vol. 5083. pp: 1-9.

۵۶. **Souza, D.M.; Martins, Á.C.; Jensen, L., Wasielesky Jr, W., Monserrat, J.M. and Garcia, L.D.O., 2014.** Effect of temperature on antioxidant enzymatic activity in the Pacific white shrimp Litopenaeus vannamei in a BFT (Biofloc technology) system. Marine and Freshwater Behaviour and Physiology. Vol. 47, No. 1, pp: 1-10.

۵۷. **Svobodova, Z.; Blahova, J.; Modra, H. and Velíšek, J., 2009.** The effect of transport on biochemical and haematological indices of common carp (*Cyprinus carpio* L.). Czech J Anim Sci. Vol. 54, No. 11, pp: 510-518.

۵۸. **Turnbull, J.F.; Bell, A.; Adams, C.E.; Bron, J. and Huntingford, F.A., 2005.** Stocking density and welfare of cage farmed Atlantic salmon: application of a multivariate analysis. Aquaculture. Vol. 243, pp: 121-132.

۵۹. **Takashima, F. and Hibiya, T., 1982.** An atlas of fish histology: normal and pathological features. Kodansha, distributed by Fischer, G., Tokyo.

۶۰. **Tacon, A.G.J., 1992.** Nutritional fish pathology: morphological signs of nutrient deficiency and toxicity in farmed fish. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

۶۱. **Vis, H.; Oehlenschlager, J.; Kuhlmann, H.; Munkner, W.; Robb, D.H.F. and Schelvis-Smit, A.A.M., 2001.** Effect of the Commercial and Experimental Slaughter of Eels (*Anguilla Anguilla* L.) on Quality and Welfare. In: S.C. Kestin and P.D. Warriss (eds.) Farmed Fish Quality. Fishing News Books, Oxford, UK. pp: 234-248.

۶۲. **Verreth, J.; Coppoolse, J. and Segner, H., 1994.** The effect of low HUFA-and high HUFA-enriched Artemia, fed at different feeding levels, on growth, survival, tissue fatty acids and liver histology of *Clarias gariepinus* larvae. Aquaculture. Vol. 126, pp: 137-150.

۶۳. **Widanari, A.; Ekasari, J. And Maryam, S., 2012.** Evaluation of Biofloc Technology Application on Water Quality and Production Performance of Red Tilapia *Oreochromis sp* Cultured at Different Stocking Densities. Journal of Biosciences. Vol. 2, pp: 73-80.

۶۴. **Xueqin, J.; Kania, P.W. and Buchmann, K., 2012.** Comparative effects of four feed types on white spot disease susceptibility and skin immune parameters in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J. Fish Dis. Vol. 35, pp: 127-135. doi: 10.1111/j.1365-2761.2011.01329.

۶۵. **Yuan, D.; Yi, Y.; Yakupitiyage, A.; Fitzimmons, K. and Diana, J.S., 2010.** Effects of addition of red tilapia (*Oreochromis* spp.) at different densities and sizes on production, water quality and nutrient recovery of intensive culture of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in cement tanks. Aquaculture. Vol. 298, No. 3, pp: 226-238.

۶۶. **Zhao, P.; Huang, J.; Wang, X.H.; Song, X.L.; Yang, C.H.; Zhang, X.G. and Wang, G.C., 2012.** The application of bioflocs technology in high-intensive, zero exchange farming systems of Marsupenaeus japonicus. Aquaculture. Vol. 354, pp: 97-106.