تاثیر منابع مختلف کربن بر جمعیت باکتریایی و مشخصات بافت‌سنجی روده کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*) درسیستم بیوفلاک

- **سعید اسداله‌نصرآبادی**: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران
- **پریتا کوچنین***: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران
- **نصرالله محبوبی‌صوفیانی**: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران
- **وحید یاوری**: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران
- **سیدامیرحسین جلالی**: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: مهر ١٣٩٦ تاریخ پذیرش: دی ١٣٩٦

چکیده

دراین تحقیق، تاثیر منابع مختلف کربن (ملاس چغندر و پودر تفاله هویج) بر تعداد کل باکتری‌ها و تغییرات بافتی روده ماهی کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*) در سیستم بیوفلاک مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ٢٤٣ قطعه ماهی با میانگین وزنی (١٦/٢±٨/١)گرم تهیه و با تراکم ٩ عدد در هر آکواریوم٥٠ لیتری به‌مدت ٨ هفته تیمار شدند. درمجموع ٩ تیمار آزمایشی شامل تیمار١ (بدون سیستم بیوفلاک با ١٠٠٪ جیره روزانه) و ٨ تیمار در سیستم بیوفلاک شامل تیمار ٢ (١٠٠٪)، تیمار ٣ (٧٥٪)، تیمار ٤ (٥٠٪) و تیمار ٥ (٢٥٪) جیره روزانه + منبع کربنی پودر تفاله هویج و تیمار ٦ (١٠٠٪)، تیمار ٧ (٧٥٪)، تیمار ٨ (٥٠٪)، تیمار ٩ (٢٥٪) جیره روزانه + منبع کربنی ملاس چغندرقند مورد ارزیابی قرار گرفتند. در پایان آزمایش جمعیت باکتریایی روده و محیط پرورشی و نیز مشخصات بافت‌سنجی بررسی شدند. نتایج به‌دست آمده نشان داد که تفاوت معنی‌داری ($p<0/05$) در تعداد باکتری‌های روده و هم‌چنین آب محیط پرورش بین تیمارهای بیوفلاک و تیمار شاهد وجود دارد به‌طوری که بیش‌ترین تعداد باکتری‌های روده در تیمار ٥ (٧/٧±٠/٠٠٨LogCFU/g) و کم‌ترین آن (٦/٠٨±٠/٠١٨LogCFU/g) در تیمار شاهد است و بیش‌ترین تعداد باکتری‌های محیط پرورش در تیمار ٦(٦/١٨±٠/٠٢٣ml LogCFU/)وکم‌ترین در تیمار شاهد(٤/١٨±٠/٠٣LogCFU/ ml) به‌دست آمد. افزایش معنی‌دار ($p<0/05$) طول پرزهای روده در تیمار ٣ مشاهده شد. استفاده از سیستم بیوفلاک و افزودن منبع کربنی سبب تغییر درجمعیت کل باکتری‌های آب‌محیط پرورش، روده‌وتغییراتی ازجمله افزایش طول پرز، سلول‌های‌جامی وسلول‌های لوکوسیت دربافت روده گردید.

کلمات کلیدی: شمارش باکتریایی، بافت‌سنجی روده، کپورمعمولی، بیوفلاک

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: pkochanian@gmail.com

مقدمه

میزان تولید آبزی‌پروری در جهان از ۴۱/۹ میلیون تن در سال ۲۰۰۴ به ۷۳/۸ میلیون تن در سال ۲۰۱۴رسیده است که رشد این صنعت هر ساله در حال افزایش و حدود ۶ درصد در هر سال تخمین زده شده است (FAO، ۲۰۱۶). اگرچه رشد صنعت آبزی‌پروری فواید زیادی مانند ایجاد شغل، بهبود وضعیت اقتصادی و امنیت غذایی و غیره را فراهم می‌کند، اما توسعه آن، نگرانی‌های زیست‌محیطی زیادی ایجاد کرده است (Goldburg و همکاران، ۲۰۰۱). که از جمله آن‌ها می‌توان به آلودگی مواد آلی و تخلیه پساب‌ها با غلظت بالای موادآلی ومواد مغذی و یوتریفیکاسیون محیط‌های آبی اشاره کرد (Piedrahita، ۲۰۰۳). با توجه به کمبود منابع آبی اولین هدف درگسترش آبزی پروری، دوری جستن از افزایش مصرف آب است (Avnimelech، ۲۰۰۹). دومین هدف برای توسعه سیستم‌های آبزی‌پروری پایدار وارد نکردن آسیب به محیط زیست است (Naylor و همکاران، ۲۰۰۰). سومین هدف ساخت سیستم‌هایی است که سود بالاتری برای توسعه اقتصادی و اجتمایی ایجاد کند (Avnimelech، ۲۰۰۹). حیواناتی که در آب پرورش داده می‌شوند معمولاً بیش از ۲۰ تا ۲۵٪ پروتئین موجود در غذا را جذب نمی‌کنند و مابقی با تخلیه در آب به شکل نیتروژن آمونیاکی، غذای باقی‌مانده و مدفوع باعث کاهش کیفیت آب می‌شوند (Grab و همکاران، ۲۰۰۷؛ Piedrahita و همکاران، ۲۰۰۷). غلظت‌بالای‌نیتروژن‌آمونیاکی کل (Total ammonia nitrogen=TAN) در آب پرورش آبزیان هم‌چنین باعث بیماری یا حتی مرگ آن‌ها می‌شود که مانعی جدی برای توسعه صنعت آبزی‌پروری است (Yang و Qiu، ۲۰۰۶). چندین روش برای حل این مشکل و کاهش غلظت TAN در آب پیشنهاد شده است. تکنولوژی بیوفلاک یکی از این تکنولوژی‌های نوین است که می‌تواند در آبزی‌پروری پایدار در آینده و ازطریق بالابردن نسبت C/N درسیستم‌های آبزی‌پروری نقش داشته باشد. افزایش نسبتC/N، جوامع میکروبی در آب را تحریک، کیفیت آب را کنترل و مواد غذایی باقی‌مانده در آب را باز چرخ می‌کند و به‌صورت متناوب به فلاک‌های غذایی تبدیل می‌شوند که خود به‌عنوان غذا برای‌ارگانیزم‌های‌پرورشی قابل‌دسترس خواهدبود (Avnimelech، ۲۰۰۹). به‌طورکلی اساس کار سیستم بیوفلاک به‌کارگیری کربن آلی در کنترل غلظت‌های نیتروژن غیرآلی در سیستم است (Nootong و همکاران ، ۲۰۱۱). منابع کربنی نقش اساسی در شکل‌گیری ترکیبات و ارزش غذایی بیوفلاک بازی می‌کند (Hollender و همکاران ،۲۰۰۲؛ Oehmen همکاران، ۲۰۰۴). سه مزیت اصلی را می‌توان با استفاده از تکنولوژی‌بیوفلاک(BFT=Biofloc technology system)به‌دست‌آورد: ۱- بیوفلاک توانایی موفقیت‌آمیزی در کاهش نیتروژن در سیستم‌های پرورش آبزیان دارد. پژوهشگران اثبات کرده‌اندکه BFT می‌تواندبه‌طور موثری آمونیاک آب استخرهای پرورش ماهی را حذف نماید (De Schryver و Verstraete، ۲۰۰۹). ۲- بیوفلاک‌به‌عنوان‌یک منبع غذای جنبی برای ماهی و میگو تائید شده است (Avnimelech، ۱۹۹۹). علاوه بر این، اندازه بیوفلاک برای ماهیان صافی‌خوار و همه‌چیزخوار مناسب است (Azim و Little، ۲۰۰۸). ۳- باکتری‌های موجود در بیوفلاک بیش‌تر مواد غذایی باقی‌مانده، مدفوع حیوانات پرورشی و مواد متابولیکی ثانویه را مورد استفاده و تجزیه قرار می‌دهند ومنجر به حذف موثر آلاینده‌ها از آب سیستم‌های پرورش می‌شوند. علاوه بر این تکنولوژی بیوفلاک باعث می‌شود تعویض آب به حداقل رسانده شود وکیفیت آب محیط پرورش بهبود پیدا کند. این درحالی است که بیوفلاک تولید شده با هزینه کم خود غنی از پروتئین است و می‌تواند به‌عنوان یک منبع غذا برای موجودات آبزی به خدمت گرفته شود (Crab و همکاران، a و b ۲۰۰۷،۲۰۰۹،۲۰۱۰). تکنولوژی بیوفلاک، در مقایسه با تکنولوژی تصفیه آب مرسوم مورد استفاده در آبزی‌پروری، جایگزین مقرون به‌صرفه است (کاهش هزینه‌های تصفیه آب تا حدود ۳۰٪ هم‌چنین کاهش مصرف غذا و استفاده از غذاهای با میزان پروتئین پایین‌تر) و این روش یک روش پایدار با هزینه کم برای توسعه آبزی‌پروری در آینده محسوب می‌شود (Avnimelech، ۲۰۰۹ ؛ De Schryver و همکاران، ۲۰۰۸). کپور معمولی *Cyprinus carpio* یکی از گونه‌های مهم پرورشی است که در سیستم‌های نیمه گسترده و متراکم در استخرهای خاکی و اخیراً در حوضچه‌های بتونی با تراکم بالا برای تامین تقاضای بازارهای محلی پرورش داده می‌شود. توسعه سیستم‌های متراکم پرورشی نه تنها باعث تجمع مواد آلی بلکه باعث افزایش باقی‌مانده‌های غذایی و نیتروژن غیرآلی سمی در محیط و اخلال در آبزی‌پروری پایدار می‌گردند (Zhao و همکاران، ۲۰۱۳). بنابراین به‌نظر می‌رسد که استفاده از سیستم بیوفلاک بتواند باعث افزایش کیفیت آب، فراهمی بیش‌تر غذا و بهبود عملکرد رشد کپور معمولی شود (Mahanand و همکاران، ۲۰۱۳). منابع کربوهیدراتی متفاوتی مانند گلوکز، آرد کاساوا، پودر سلولز، ملاس، آرد گندم و نشاسته در پژوهش‌های مختلف برای افزایش تولید باکتری‌ها در سیستم‌های متراکم و گسترده به‌کار برده شده است (Avnimelech، ۲۰۰۹، ۱۹۹۹؛ Asaduzzaman و همکاران، ۲۰۰۸؛ Azim

و Little، ۲۰۰۸؛ Varghese، ۲۰۰۷؛ Hari و همکاران، ۲۰۰۴، ۲۰۰۶؛ Burford و همکاران، ۲۰۰۸ و ۲۰۱۰). Vander Oost و همکاران (۲۰۰۳) بیان کردند که شناخت رفتارهای تغذیه‌ای در امر پرورش حائز اهمیت است و به‌علت این‌که تکنولوژی بیوفلاک براساس دستکاری میکروبی داخل سیستم‌های آبزی‌پروری است، بنابراین ذرات بیوفلاک شامل باکتری‌های مفید مانند لاکتوباسیلوس (Anand و همکاران، ۲۰۱۴) و ترکیبات فعال زیستی (bioactive) مانند کارتنوئیدها (Ju و همکاران، ۲۰۰۸) هستند که می‌توانند به‌عنوان پروبیوتیک و خواص تحریک کننده ایمنی شناخته شوند. با این وجود هنوز اثرات بیوفلاک بر بسیاری از جنبه‌های فیزیولوژیکی و فلورمیکروبی ماهی هنوز شناخته نشده است و مستلزم مطالعات بیش‌تری است. هدف از این مطالعه ارزیابی اثرات سیستم بیوفلاک بر تعداد کل باکتریایی محیط پرورشی و روده و ریخت‌شناسی بافت روده کپورمعمولی است.

مواد و روش‌ها

طراحی آزمایش: در این پژوهش، تاثیر منابع مختلف کربن (ملاس چغندر و پودر تفاله هویج) بر تعداد کل باکتری‌ها و مشخصات بافت‌سنجی روده ماهی کپورمعمولی در سیستم بیوفلاک با استفاده از ۹ تیمار آزمایشی (جدول ۱) با سه تکرار مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۲۴۳ قطعه بچه ماهی از مرکز توزیع ماهی در اصفهان تهیه و به‌مدت یک‌ماه با شرایط آزمایشگاه سازگار شدند. در طول زمان سازگاری ماهیان، برای آماده‌سازی استوک بیوفلاک دو مخزن ۳۰۰ لیتری تهیه و با آب خروجی بچه ماهیان در مرحله سازگاری آبگیری شد. برای شکل‌گیری فلاک مقدار ۲۰۰ گرم غذای تجاری کپورمعمولی به‌همراه ۵۰ گرم خاک بستر استخر پرورشی ماهی کپور و یک گرم اوره(۴۶٪) به هر مخزن اضافه گردید. بر طبق محاسبات Avnimelech (۱۹۹۹) برای مصرف هر گرم نیتروژن آمونیاکی توسط باکتری‌های هتروتروف نیاز به ۱۵ گرم کربن آلی است. لذا برای تامین منبع کربن آلی از پودر تفاله هویج خشک شده (به‌مدت ۳ شبانه روز در ۶۰ درجه سانتی‌گراد) و ملاس چغندر تهیه شده از کارخانه قند استفاده شد. میزان کربن پودر تفاله هویج و ملاس چغندر توسط دستگاه آنالیز عنصری CHNSO Analyzer (ElementarVarioEL III)اندازه‌گیری و به‌ترتیب برابر ۴۰٪ و ۳۶٪ به‌دست آمد. براساس نیتروژن آمونیاکی اندازه‌گیری شده در هر مخزن، مقدار پودر تفاله هویج و ملاس چغندرقند مورد نیاز برای هر مخزن جداگانه محاسبه و به آن اضافه شد. مخزن‌ها به‌طور مداوم هوادهی و دمای آن در حد ۲۷ درجه سانتی‌گراد ثابت نگه‌داری گردید. پس از آن، میزان جامدات معلق کل (TSS) برحسب میلی‌گرم در لیتر محاسبه شد. برای اندازه‌گیری این پارامتر ابتدا یک لیتر آب مخزن را درون یک استوانه مدرج ریخته شد و پس از یک ساعت سکون، آب قسمت بالای استوانه سیفون گردید. سپس محتویات باقی‌مانده روی کاغذ صافی واتمن شماره ۴۲ که پیش از این توزین شده است، فیلتر و در آون با درجه حرارت ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳ ساعت قرار داده تا خشک شود. سپس آن را وزن می‌کنند. از اختلاف وزن کاغذ صافی میزان TSS محاسبه می‌گردد (AOAC، ۲۰۰۰). هنگامی‌که میزان TSS در آب مخزن به حدود ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر رسید، استوک اولیه آماده گردید (Kamilya، ۲۰۱۷). پس از طی دوره سازگاری تعداد ۲۴۳ قطعه ماهی با میانگین وزنی ۲/۱±۱۶/۸ گرم و طول کلی ۰/۵±۱۰/۵ سانتی‌متر و با تراکم ۹ عدد در داخل آکواریوم‌های شیشه‌ای ۶۰ لیتری که میزان ۵۰ لیتر از حجم آکواریوم‌ها با ۲۰٪ استوک اولیه (برای تیمارهای T۲ تا T۵ منبع کربنی استوک تفاله هویج و برای تیمارهای T۶ تا T۹ منبع کربنی استوک ملاس چغندر بود) آبگیری شد و مابقی از آب کلرزدایی شده استفاده شد. برای تیمار شاهد T۱ فقط از آب کلرزدایی شده استفاده شد و روزانه ۳۵٪ حجم آب آکواریوم شاهد تعویض گردید. در مجموع ۹ تیمار آزمایشی شامل یک تیمار بدون سیستم بیوفلاک با ۱۰۰٪ جیره روزانه (۳٪ وزن بدن) و ۸ تیمار به‌همراه سیستم بیوفلاک شامل ۴ تیمار (۱۰۰٪، ۷۵٪، ۵۰٪و ۲۵٪ جیره روزانه به‌علاوه منبع کربنی پودر تفاله هویج) و ۴ تیمار (۱۰۰٪، ۷۵٪، ۵۰٪و ۲۵٪ جیره روزانه به‌علاوه منبع کربنی ملاس چغندر قند) مورد استفاده قرار گرفتند. نسبت C/N برای تمامی تیمارهای سیستم بیوفلاک ۱۵ درنظر گرفته شد. غذادهی در دو نوبت (ساعت ۸ صبح و ۴ بعد از ظهر) و با استفاده از غذای FFT ساخت شرکت کیمیاگران با ۳۵٪ پروتئین انجام شد. جهت رشد باکتری‌های هتروترف، به‌ازای هر گرم غذای تجاری در تیمارهای ۲ Tتا T۵، ۱/۶ گرم پودر تفاله هویج و در تیمارهای T۶ تا T۹، ۱/۸ گرم ملاس روزانه یک ساعت بعد از غذادهی به داخل آکواریوم‌ها اضافه گردید (Crab، ۲۰۱۲)(جدول ۱).

شمارش کلی باکتریایی: به‌منظور انجام آزمایشات باکتریایی، سه ماهی از هر تکرار به‌صورت تصادفی انتخاب و آسان‌کشی گردید. سپس سطح بدن ماهی با الکل ۷۰درصد ضدعفونی و با آب اتوکلاو شده شستشو شد. سپس در شرایط کاملاً استریل شکم ماهی برش

جدول۱: تیمارهای آزمایشی طراحی شده در این تحقیق

تیمار	میزان غذای روزانه (درصد)	منبع کربنی	میزان منبع کربنی (گرم/ کیلوگرم ماهی)	میزان غذا دهی (گرم/ کیلوگرم ماهی)	تعویض آب
۱ شاهد (T1)	۱۰۰	-	-	۳۰	روزانه ۳۳٪
۲ (T۲)	۱۰۰	پودر تفاله هویج	۴۸	۳۰	بدون تعویض آب
۳ (T۳)	۷۵	پودر تفاله هویج	۳۶	۲۲/۵	بدون تعویض آب
۴ (T۴)	۵۰	پودر تفاله هویج	۲۴	۱۵	بدون تعویض آب
۵ (T۵)	۲۵	پودر تفاله هویج	۱۲	۷/۵	بدون تعویض آب
۶ (T۶)	۱۰۰	ملاس	۵۴	۳۰	بدون تعویض آب
۷ (T۷)	۷۵	ملاس	۴۰/۵	۲۲/۵	بدون تعویض آب
۸ (T۸)	۵۰	ملاس	۲۷	۱۵	بدون تعویض آب
۹ (T۹)	۲۵	ملاس	۱۳/۵	۷/۵	بدون تعویض آب

داده شد و پس از تخلیه کامل محتویات روده، به اندازه یک گرم از قسمت انتهایی بافت روده توزین و درون یک هاون چینی استریل هموژن گردید و از آن رقت‌های مختلف تهیه شد (Karim، ۲۰۰۸). بدین‌صورت که یک گرم بافت هموژن شده را در ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژیک حل و یک میلی‌لیتر از این محلول را درون لوله دیگر حاوی ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژیک ریخته می‌شود و به‌همین ترتیب رقت‌های مختلف ۱-۱۰تا ۶-۱۰تهیه گردید. یک میلی‌لیتر از هر رقت را با سمپلر در محیط کشت نوترینت آگار به‌صورت سطحی کشت داده و به‌مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور در دمای آب محیط پرورش (۲۸درجه) قرارداده شد. به‌منظور شمارش‌باکتریای آب محیط پرورش یک میلی‌لیتر از آب‌محیط پرورش‌ماهی برای رقیق‌سازی مورداستفاده قرار گرفت و سایر مراحل مشابه روش قبل انجام گرفت. پلت‌های که دارای ۳۰-۳۰۰ کلنی بودند شمارش شدند و تعداد کلنی‌ها در عکس ضریب رقت ضرب و تعداد تقریبی باکتری‌های موجود در یک گرم بافت‌روده‌ماهی (Colony Forming Unit یا CFU /g)و در یک‌میلی‌لیتر آب (CFU /ml) محاسبه گردید (Karim، ۲۰۰۸).

بافت‌شناسی: برای بررسی بافتی ۳ ماهی به‌صورت تصادفی از هر تیمار برداشته شد و پس از برش محوطه شکمی، روده از آن خارج و قطعه‌های به طول یک سانتی‌متر از قسمت انتهای آن جدا گردید. برای تثبیت بافت، نمونه‌ها در فرمالین۱۰٪ قرار داده شدند. پس از مدت زمان ۲۴ ساعت، فرمالین نمونه‌ها تعویض گردید. بعد از طی شدن دوره تثبیت، نمونه‌ها به اندازه نیم‌سانتی‌متر برش و در قالب‌های مخصوص قرارداده شدند و در دستگاه آبگیری بافت جهت آبگیری، شفاف کردن و آغشتگی با پارافین قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها قالب گیری و با دستگاه میکروتوم برش‌های ۷ میکرونی داده شدند. پس از برش، نمونه‌ها در حمام پارافین قرار داده شد تا چروک‌ها صاف شود. سپس هر نمونه روی لام قرارداده شد و پس از آن در آون ۶۰ درجه قرارداده‌شدند تا پارفین مازاد ذوب گردد. سپس با روش هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی صورت گرفت (Noga، ۱۹۹۵).

تجزیه و تحلیل داده‌ها: برای آنالیز اطلاعات از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹استفاده شد. ابتدا نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیرو- ویلک بررسی گردید و سپس توسط آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) با ضریب اطمینان ۹۵٪ و آزمون دانکن جهت مقایسه میانگین‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

بررسی‌نتایج به‌دست‌آمده وجوداختلاف معنی‌داری بین میانگین تعداد باکتری در روده و آب محیط پرورش در تیمارهای سیستم بیوفلاک با همدیگر و تیمار شاهد را نشان داد ($p<۰/۰۵$). بیش‌ترین تعداد باکتری‌های روده در تیمار T5 (۷/۷±۰/۰۰۸LogCFU/g) و کم‌ترین آن در تیمار شاهد (۶/۰۸±۰/۰۱۸LogCFU/g) به‌دست آمد. بیش‌ترین تعداد باکتری‌های آب محیط پرورش در تیمار T6 (۶/۱۸ ±۰/۰۲۳LogCFU/g) و کم‌ترین تعداد در تیمار شاهد (۴/۱۸±۰/۰۳ LogCFU/g) به‌دست آمد (جدول ۲).

جدول ۲: نتایج شمارش تعداد کل باکتری‌های روده ماهی کپور معمولی و آب محیط پرورش (انحراف معیار±میانگین) در تیمارهای مختلف متعاقب ۸ هفته تیماربندی با سطوح مختلف منابع کربنی

تیمار	آب محیط پرورش (LogCFU/ ml)	روده (LogCFU/g)
۱شاهد(T1)	۴/۱۸ ± ۰/۰۳a	۶/۰۸ ±۰/۰۱۸a
(T۲)۲	۵/۸۸ ±۰/۰۱۲bc	۶/۵۳ ±۰/۰۱f
(T۳)۳	۵/۷۴ ±۰/۰۴c	۶/۵ ±۰/۰۰۴c
(T۴)۴	۴/۹۲ ±۰/۰۱۶c	۶/۶ ±۰/۰۰۷b
(T۵)۵	۵/۸۴ ±۰/۰۰۶f	۷/۷ ±۰/۰۰۸e
(T۶)۶	۶/۱۸ ± ۰/۰۲۳b	۶/۴ ±۰/۰۰۳h
(T۷)۷	۵/۹۶ ±۰/۰۱۹c	۶/۵۸ ±۰/۰۱۱g
(T۸)۸	۵/۷۹ ±۰/۰۰۷d	۶/۹۹ ±۰/۰۰۲d
(T۹)۹	۵/۸۹ ±۰/۰۰۳e	۷/۶۴ ±۰/۰۰۷f

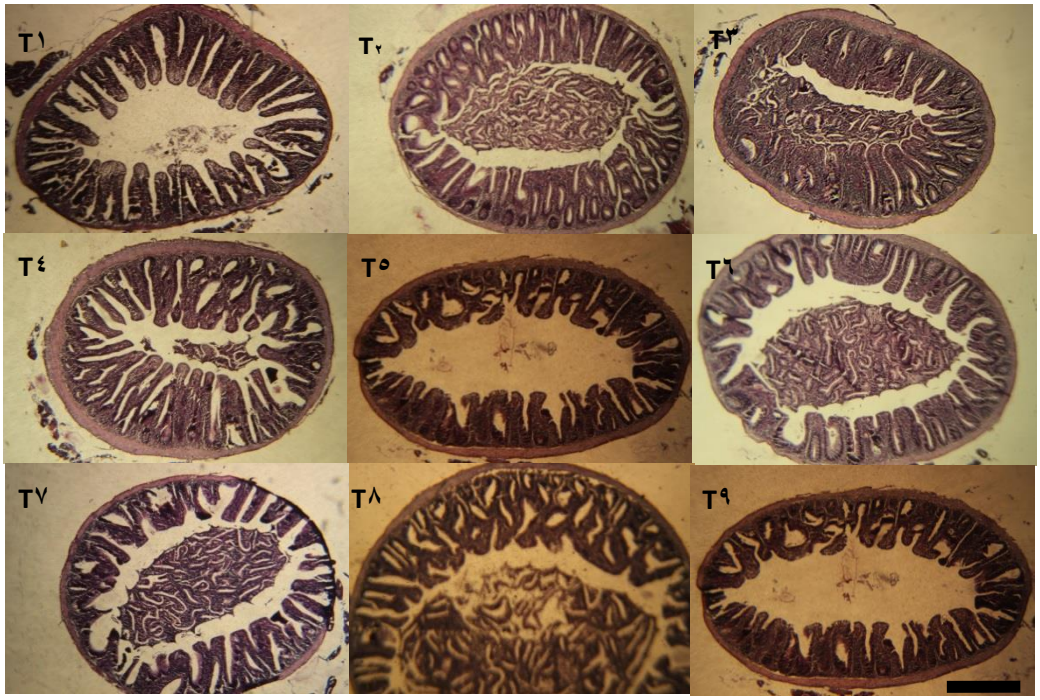
حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها است (p<۰/۰۵)

بررسی‌بافت‌شناسی روده در تیمارهای مورد مطالعه، نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) بین میانگین طول پرز روده در تیمار T۳ و سایر تیمارها هم‌چنین میانگین تعداد سلول‌های جامی و لوکوسیت در تیمارهای T۲، T۳، T۶ و T۷ است (جدول ۳)(شکل‌های ۱ و ۲). نتایج حاصل از بررسی بافت‌شناسی (شکل‌های ۱و ۲) نشان داد که در تیمار (شاهد) T۱ بافت نرمال است، در تیمار T۲ چسبندگی و تفاوتی در طول پرزها نسبت به لام شاهد مشاهده نگردید درحالی‌که التهاب در لامینا پروپریا و هم‌چنین افزایش تعداد سلول‌های جامی شکل و ترشح موکوس مشاهده شد. در تیمار T۳ بلند شدن طول پرزها در مقایسه با شاهد، چسبندگی نسبتاً شدید رأس پرزها به یکدیگر و نفوذ سلول‌های لوکوسیت در لامینا پروپریا مشاهده گردید. افزایش ضخامت لایه عضلانی در مقایسه با شاهد و T۲ قابل توجه است. افزایش تعداد سلول‌های جامی شکل و ترشح موکوس نیز مشاهده شد. در تیمار T۴ و T۵ طول پرز در مقایسه با شاهد کوتاه است. فقط مختصری افزایش تعداد سلول‌های جامی شکل و ترشح موکوس و چسبندگی مختصر پرزها مشاهده گردید. در تیمار T۶ چسبندگی راس پرزها، نفوذ مختصر سلول‌های لوکوسیت در لامینا پروپریا و هم‌چنین افزایش تعداد سلول‌های جامی شکل و ترشح موکوس و ضخیم بودن لایه عضلانی مشاهده گردید. در تیمار T۷ تفاوتی در طول پرزها نسبت به شاهد مشاهده نگردید. چسبندگی رأس پرزها به یکدیگر، نفوذمختصرسلول‌های لوکوسیت در لامینا پروپریا و هم‌چنین افزایش تعداد سلول‌های جامی شکل و ترشح موکوس مشاهده گردید. در تیمار T۸ و T۹ طول پرز در مقایسه با شاهد کوتاه است. فقط مختصری افزایش تعداد سلول‌های جامی شکل و ترشح موکوس و چسبندگی مختصر پرزها مشاهده گردید. افزایش مختصر سلول‌های لوکوسیت در لامینا پروپریا دیده شد.

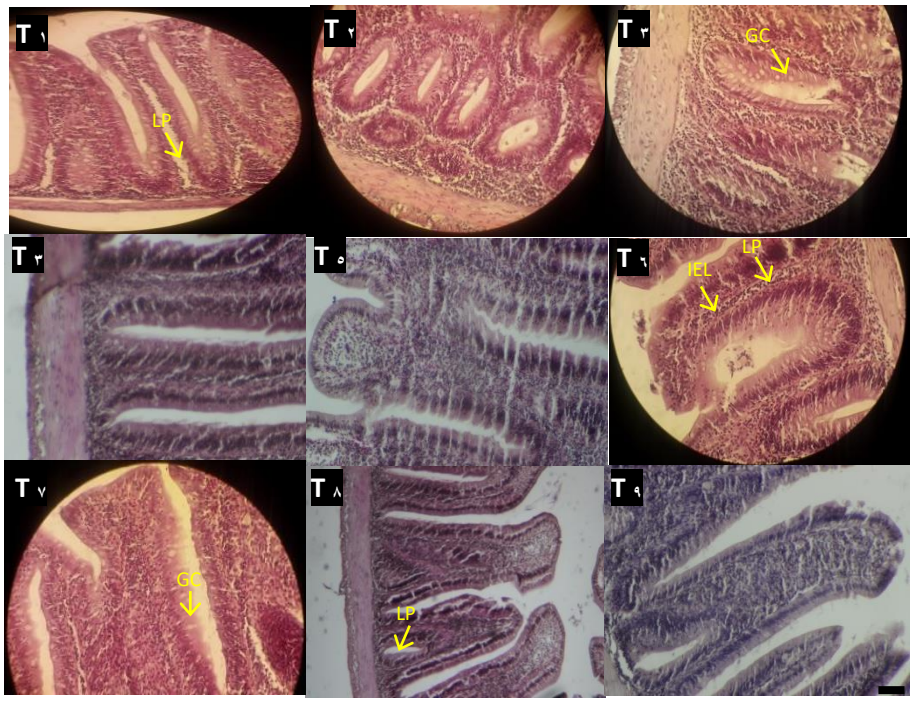
جدول ۳: مقایسه اثر تیمارهای مختلف بر برخی مشخصات بافتی روده، تعداد سلول‌های جامی و سلول‌های لوکوسیت روده کپور معمولی (انحراف معیار ± میانگین)

تیمار	طول پرز (میکرون)	قطرپرز (میکرون)	قطر لایه عضلانی (میکرون)	تعداد سلول‌های جامی (در هر ۱۰۰ میکرون)	تعداد سلول‌های لوکوسیت (در هر ۱۰۰ میکرون)
۱/شاهد(T1)	۵۴۰±۶۹^{ab}	۲۰۰±۱۰^{a}	۶۳/۳± ۱۵/۳^{ab}	۳/۱±۰/۴^{a}	۶/۲±۰/۷^{a}
(T۲)۲	۵۳۵±۶۶/۶ ^{ab}	۱۸۶±۵۷^{a}	۶۶/۶±۳۰/۵^{ab}	۳/۸±۰/۵^{b}	۹/۱±۱/۱^{b}
(T۳)۳	۶۰۶±۴۱/۶^{d}	۱۵۶±۱۲^{a}	۹۰/۰±۱۷/۳^{b}	۳/۷±۰/۴^{b}	۹/۳±۱/۲^{b}
(T۴)۴	۵۶۰±۱۰^{abc}	۱۸۶±۱۵/۳^{a}	۴۶/۶±۰/۰^{a}	۳/۳±۰/۶^{a}	۶/۳±۰/۹^{a}
(T۵)۵	۵۳۰±۱۰^{ab}	۱۷۰±۲۶/۴^{a}	۶۶/۶±۲۵/۱^{ab}	۳/۲±۰/۳^{a}	۶/۴±۰/۸^{a}
(T۶)۶	۵۳۷±۳۲^{ab}	۱۷۳±۲۳^{a}	۸۰/۰± ۱۵/۲^{ab}	۳/۹±۰/۷^{b}	۹/۴±۱/۱^{b}
(T۷)۷	۵۴۰±۵۷ ^{ab}	۱۸۳±۳۵^{a}	۶۳/۳±۵/۷^{ab}	۳/۸±۰/۴^{b}	۷/۳±۱/۰^{a}
(T۸)۸	۵۲۶±۲۵^{a}	۱۶۳± ۱۵/۲^{a}	۶۶/۶±۵/۷^{ab}	۳/۴±۰/۸^{a}	۶/۶±۰/۷^{a}
(T۹)۹	۵۲۰±۱۰^{a}	۱۹۶± ۱۵/۲^{a}	۸۰/۰±۱۷/۳^{ab}	۳/۳±۰/۳^{a}	۶/۴±۰/۸^{a}

حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها است (p<۰/۰۵)



شکل ۱: مقطع عرضی ناحیه انتهایی روده در تیمارهای مورد آزمایش (T1 تا T۹) (رنگ‌آمیزی H&E، بزرگ‌نمایی۴۰×) خط مقیاس برابر ۷۰۰میکرون



شکل ۲: مقطع عرضی ناحیه انتهایی روده در تیمارهای مورد آزمایش (T1تا T۹). سلول‌های جامی (goblet cells)(GC)، لامینا پروپریا (LP) و سلول‌های لوکوسیت بین اپیتلیومی (IEL،intraepithelial leucocyte) (رنگ‌آمیزی H&E، ۴۰۰*) خط مقیاس ۷۰ میکرون

بحث

اساس تکنولوژی بیوفلاک، دستکاری میکروبی سیستم‌های آبزی پروری است. در این تحقیق ثابت شد که منابع کربنی مختلف اثر معنی‌داری‌بر تعداد باکتری‌های آب محیط پرورش و روده ماهی نسبت به گروه شاهد در سیستم پرورش بیوفلاک دارد و با کاهش غذادهی و میزان منبع کربنی، تعداد باکتری‌ها در آب محیط پرورش کاهش یافت. هم‌چنین بیش‌ترین تعداد باکتری در تیمار بیوفلاک با منبع کربنی ملاس به‌دست آمد که حاکی از این است که ملاس به‌راحتی در محیط آبی حل می‌شود و به آسانی کربن را آزاد می‌کند و کربن آزاد شده به‌عنوان منبع انرژی به‌سرعت توسط باکتری‌های هتروتروف مصرف می‌شوند و پاسخ سریع‌تری در مقایسه با کربوهیدرات‌های پیچیده مانند پودر تفاله هویج دارد. تجزیه سریع ملاس سطوح بالایی از کربن را به‌عنوان یک ماده اولیه برای رشد باکتری‌های هتروتروف مورد استفاده در متابولیسم آمونیاک فراهم می‌کند. این امر به نوبه خود سبب بهبود کیفیت آب نیز می‌شود. منابع کربنی اضافه شده به آب در توده‌سازی زیستی (Biofloculation) موثر بودند که نتیجه آن افزایش قابل توجه باکتری‌های هتروتروف بود که به‌طور کامل با نتایج Burford و همکاران (۲۰۰۴) مطابقت دارد. در بسیاری از مطالعات، تکنولوژی بیوفلاک منجر به ایجاد تفاوت معنی‌داری در ترکیب میکروبی آب محیط پرورش شده است (Ferreira و همکاران ۲۰۱۵؛ Tapia Paniagua و همکاران، ۲۰۰۷؛ Anand و همکاران ۲۰۱۳). منابع کربنی خصوصاً سلولزهای گیاهی باعث افزایش جمعیت باکتری‌های هتروتروف و اکسیدکننده آمونیاک در محیط‌های آبی می‌شود (Racz و همکاران ۲۰۱۰). Wei و همکاران (۲۰۱۶) بیان کردند که بیوفلاک‌های مستخرج از منابع مختلف (گلوکز، نشاسته و گلیسرول) احتمالاً سبب ایجاد جوامع میکروبی مختلف می‌شوند. Qin و همکاران (۲۰۱۶) اثبات کردند که تعداد باکتری‌های پروبیوتیک در استخرهای که ماهیان کپور علف‌خوار تغذیه شده با گیاه سورگوم نسبت به استخرهای که ماهیان آن با غذای تجاری تغذیه شدند افزایش پیدا کردند. در مطالعه Saritha(۲۰۰۹) کارایی ۵ منبع کربنی مختلف در پرورش میگوی بزرگ آب شیرین مورد بررسی قرار گرفت. در همه تیمارها منابع کربوهیدراتی به ستون آب اضافه شده و مشاهده شد که حضور مواد آلی کربن‌دار تحریک و توسعه بیوفلاک و باکتری‌ها را در محیط تشدید نموده‌است و افزایش قابل توجهی در شمار باکتری‌های هتروتروف و تولید بیوفلاک‌ها به‌وجود می‌آورد. افزایش تعداد باکتری‌های هتروترف و اکسیدکننده آمونیاک در سیستم بیوفلاک منجر به افزایش راندمان فرآیند کاهش نیتروژن آمونیاکی، بهبود پایداری اکوسیستم و مقاومت در برابر استرس می‌شود (Ebeling و همکاران ۲۰۰۶؛ Briones و Raskin، ۲۰۰۳). Hu و همکاران (۲۰۱۶) تایید کردند که استفاده از ترکیب پروبیوتیک باسیلوس و ملاس به‌عنوان یک منبع کربنی نه تنها تعداد و تنوع جمعیت باکتریایی را افزایش می‌دهند بلکه بطور موثری مانع از رشد پاتوژن‌ها و افزایش شکل‌گیری و تکامل ساختار جمعیت باکتری‌های مفید در آب‌های غنی از بیوفلاک می‌شوند. تحقیق حاضر نیز نشان داد که تعداد باکتری‌های موجود در روده ماهیان پرورش یافته در تیمارهای بیوفلاک با شاهد تفاوت معنی‌داری داشت. فلاک‌ها در سیستم بیوفلاک می‌تواند به‌عنوان ماده غذایی مورد مصرف ماهی قرار گیرد. ساختار این فلاک‌ها از باکتری‌های مفید مانند لاکتوباسیلوس، باسیلوس و مخمرها تشکیل شده‌اند (Anand و همکاران ۲۰۱۴). تغذیه ماهیان از فلاک‌های غذایی باعث افزایش تعداد باکتری‌های روده می‌گردد. در تیمارهایی که درصد غذادهی کم بود بیش‌تر از فلاک‌ها به‌عنوان غذا استفاده می‌کردند و در نتیجه تیمارهای بیوفلاک که درصد غذادهی در آن‌ها کم‌تر بود تعداد باکتری‌ها در آن‌ها بیش‌تر بود. Ringo و همکاران (۱۹۹۴) گزارش نمودند که نوع جیره غذایی نیز بر میکروفلور روده ماهیان آب شیرین و شور پرورشی تاثیر دارد. میزان حضور باکتری‌ها در روده ماهی بازتابی از محل زندگی ماهی و نوع غذای مصرفی آن است. با توجه به نتایج حاصل از افزایش تعداد باکتری در محیط پرورش، تعداد باکتری‌ها در روده نیز افزایش پیدا می‌کنند. De schryver و Vadstein (۲۰۱۴) بر وجود همکاری نزدیک بین میکروبیوتای روده میزبان و میکروبیوتای محیط زندگی موجودات آبزی تاکید کردند. Del'Duca و همکاران (۲۰۱۵) نیز در تحقیقات خود به شباهت زیاد بین جمعیت باکتری‌های موجود در لوله گوارش، آب و رسوبات استخر در تیلاپیای پرورشی اشاره کردند. جمعیت میکروبی در سیستم بیوفلاک با رقابت بر سر غذا و فضا در آب و لوله گوارش مانع ازدیاد پاتوژن‌ها می‌شود (Crab و همکاران، ۲۰۱۰). در مطالعه‌ای که Hpstins و همکاران (۲۰۱۷) روی میگوی وانامی انجام دادند مشاهده کردند که نسبت باکتری ویبریوز به کل میکروارگانیسم‌های روده تیمارهای پروبیوتیک به‌علاوه بیوفلاک پایین‌تر از تیمارهای پرورش در آب عاری از بیوفلاک بود. هم‌چنین Hargreaves (۲۰۱۳) اثبات کرد که بیوفلاک در کنترل بیماری خصوصاً ویبریوز نقش دارد. با توجه به تصاویر میکروسکوپی ارایه شده در اشکال ۱و۲ طول پرزهای بافت روده ماهیان تیمار T۳ و تعداد سلول‌های جامی و سلول‌های

لوکوسیت تیمارهای T۲، T۳، T۶ و T۷ باگروه‌شاهداختلاف معنی‌داری داشت. افزایش سلول‌های جامی باعث افزایش تولید موکوس در روده ماهی می‌شود و تولید موکوس یک مکانیسم مهم برای جلوگیری از ورود پاتوژن‌ها از طریق روده است (Ellis، ۲۰۰۱). علاوه براین، مخاط روده دارای اثرات ضدباکتریایی، محافظت دربرابر موادسمی‌و هم‌چنین به انتقال مواد غذای از لومن به سلول‌های اپیتلیالی روده کمک می‌کند (Simirnov و همکاران، ۲۰۰۵). با توجه به این‌که بخشی از ساختار فلاک‌های مورد تغذیه ماهی، باکتری‌های مفید و مخمرهای تشکیل دهنده فلاک هستند، می‌توان احتمال داد فلور باکتریایی دستگاه گوارش به سمت این میکروارگانیزم‌های مفید پیش رود (Hapsari، ۲۰۱۶؛ Aguilera-Rivera و همکاران، ۲۰۱۴؛ Crabو همکاران، ۲۰۱۰). بنابراین تاثیر سیستم بیوفلاک بر بافت روده را می‌توان با یافته‌های مرتبط با این میکروارگانیزم‌های مفید مقایسه کرد. Abid و همکاران (۲۰۱۳) دریافتند که استفاده از باکتری *Padiococcus acidilacyici* به‌عنوان پروبیوتیک در جیره غذای ماهی سالمون باعث افزایش تعداد سلول‌های جامی، سلول‌های التهابی (لوکوسیت‌ها) و افزایش طول پرز، بهبود عملکرد جذب مواد غذایی و رشد می‌شود. Gisber و همکاران (۲۰۱۳) دریافتند که استفاده از مکمل پروبیوتیکی *Bacillus cereus* در جیره غذایی قزل‌آلای رنگین‌کمان انگشت‌قد باعث افزایش سطح نفوذ لوکوسیت‌ها در لامینا پروپریا از مخاط روده و هم‌چنین افزایش تعداد سلول‌های جامی و طول پرزهای روده می‌شود. Merrifield و همکاران (۲۰۱۰) اثبات کردند که استفاده از مکمل پروبیوتیک *Bactocell* (یک پروبیوتیک تجاری) حاوی باکتری *Padiococcus acidilacyici* در جیره غذایی قزل آلای رنگین‌کمان باغث تغییراتی در مرفولوژی روده می‌گردد. Al Abdulhadi (۲۰۰۵) و Jordanoska و همکاران (۲۰۰۶) عنوان کردند نوع تغذیه نیز روی بافت روده وکبد تاثیر دارد و در صورت هر گونه تغییرات بافتی در روده ماهی سلامت ماهی تحت تاثیر قرار می‌گیرد. افزایش تعداد سلول‌های لنفوئیدی در اپی‌تلیوم روده ماهی با مصرف پروبیوتیک توسط محققین دیگری نیز به‌اثبات رسیده است که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد (Standen و همکاران، ۲۰۱۳، Picchietti و همکاران، ۲۰۰۷و ۲۰۰۹). این تحقیق اثبات کرد که اضافه کردن منابع کربنی مختلف خصوصاً منابع کربوهیدرات‌های‌ساده به آب محیط پرورش در سیستم بیوفلاک جهت پرورش‌ماهی کپور معمولی باعث کاهش مقدار ترکیبات سمی نیتروژن (متعاقب افزایش تعداد باکتری‌های آب محیط پرورش)، افزایش تعداد باکتری‌های مفید در روده، افزایش طول پرز (افزایش سطح جذب)، تعدادسلول‌های جامی (افزایش موکوس) سلول‌های لوکوسیت (از فاکتورهای ایمنی غیراختصاصی) و کاهش مصرف آب می‌گردد. با این وجود بایستی مطالعات بیش‌تری در مورد تاثیر این سیستم در مقابل باکتری‌های پاتوژن انجام پذیرد.

تشکر و قدردانی

از گروه‌شیلات‌و پژوهشکده علوم زیستی دانشگاه صنعتی اصفهان هم‌چنین آقایان‌مهندس‌متقی،مهندس‌عشوری، مهندس‌حاج مصطفی و خانم مهندس موحدی و تمام دوستان و همکارانی که در مراحل مختلف این پژوهش یاری نمودند، تشکر و سپاسگزاری به‌عمل می‌آید.

منابع

۱. **Abid, A.; Davies, S.J.; Wines, P.; Emery, M.; Castex, M.; Gioacchini, G.; Carnevali, O.; Bickerdike, R.; Romero, J. and Merrifield, D.L., 2013.** Dietary symbiotic application modulates Atlantic salmon (*Salmon salar*) intestinal microbial communities and intestinal immunity. Fish Shellfish Immunol. Vol. 22, pp: 1-9.

۲. **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.

۳. **AL Abdulhadi, H.A., 2005.** Some comparative histological studies on alimentary tract of Tilapia fish (*TilaplaspilurusI*) and Sea Bream (*Myliocuvieri*). Egypt J Aquat Res. Vol. 31, No. 1, pp: 387-396.

۴. **Anand, P.S.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.

۵. **Anand, P.S.S.; Kumar, S.; Panigrahi, A.; Ghoshal, T.K.; Dayal, J.S.; Biswas, G.; Sundaray, J.K.; De, D.; Raja, R.A. and Deo, A.D., 2013.** Effects of C: N ratio and substrate integration on periphyton biomass, microbial dynamics and growth of *Penaeus monodon* juveniles. Aquaculture International. Vol. 21, No. 2, pp: 511-524.

۶. **AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1990**. Official Methods of Analysis AOAC, Washington, DC. 1963 P.

۷. **Asaduzzaman, M.; Wahab, M.A.; Verdegem, M.C.J.; Huque, S.; Salam, M.A. and Azim, M.E., 2008.** C/N ratio control and substrate addition for periphyton development jointly enhance freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* production in ponds. Aquaculture. Vol. 280, pp: 117-123.

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

۹. **Avnimelech, Y., 2009.** Biofloc Technology — A Practical Guide Book.The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, United States. 182 P.

۱۰. **Azim, M.E. and Little, D.C., 2008.** The biofloc technology (BFT) in indoor tanks: water quality biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture. Vol. 283, No. 1, pp: 29-35.

۱۱. **Briones, A. and Raskin, L., 2003.** Diversity and dynamics of microbial communities in engineering environments and their implications for process stability. Curr Opin Biotechnol. Vol. 14, pp: 270-276.

۱۲. **Burford, M.A.; Thompson, P.J.; McIntosh, R.P.; Bauman, R.H. and Pearson, D.C., 2004.** The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high intensity, zero exchange system. Aquaculture. Vol. 232, pp: 525-537.

۱۳. **Crab, R.; Defoirdt, T.; Bossier, P. and Verstraete, W., 2012.** Biofloc technology inaquaculture: beneficial effects and future challenges. Aquaculture. pp: 356-357.

۱۴. **Crab, R.; Avnimelech, Y.; Defoirdt, T.; Bossier, P. and Verstraete, W., 2007.** Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. Aquaculture. Vol. 270, pp: 1-14.

۱۵. **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. Aquacult Res. Vol. 41, pp: 559-567.

۱۶. **Crab, R.; Kochva, M.; Verstraete, W. and Avnimelech, Y., 2009.** Bio flocs technology applicationin over-wintering of tilapia. Aquacult. Eng. Vol. 40, pp: 105-112.

۱۷. **Crab, R.; Lambert, A.; Defoirdt, T.; Bossier, P. and Verstraete, W., 2010b.** The application of bioflocs technology to protect brine shrimp (*Artemia franciscana*) from pathogenic *Vibrio harveyi*. **J** Appl Microbiol. Vol. 109, No. 5, pp:1643-1649.

۱۸. **Del'Duca, A.; Cesar, D.E. and Abreu, P.C., 2015.** Bacterial community of pond's water, sediment and in the guts of tilapia (*Oreochromis niloticus*) juveniles characterized by fluorescent in situ hybridization technique. Aquac. Res. Vol. 46, No. 3, pp: 707-715.

۱۹. **De Schryver, P. and Verstraete, W., 2009.** Nitrogen removal fromaquaculture pond water by heterotrophic nitrogen assimilation in lab-scale sequencing batch reactors. Bioresour Technol. Vol. 100, No. 3, pp: 1162-1167.

۲۰. **De Schryver, P. and Vadstein, O., 2014.** Ecological theory as a foundation to control pathogenic invasion in aquaculture. ISME J. pp: 1-9.

۲۱. **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, pp: 346-358.

۲۲. **Ellis, A.E., 2001.** Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. Dev. Comp. Immunol. Vol. 25, pp: 827-839.

۲۳. **Ferreira, G.S.; Bolívar, N.C.; Pereira, S.A.; Guertler, C.; Vieira, F.d.N.; Mouriño, J.L.P. and Seiffert, W.Q., 2015.** Microbial biofloc as source of probiotic bacteria for the culture of *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture. Vol. 448, pp: 273-279.

۲۴. **FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2016**. The State of World Fisheries and Aquaculture, Contributing to food security and nutrition for all. Room. Available at http://www.fao.org. 191 p.

۲۵. **Gisber, E.; Castillo, M.; Skalli, A.; Andree, K.B. and Badiola, I., 2013.** *Bacillus cereus* var. toyoi promotes growth, affects the histological organization and microbiota of the intestinal mucosa in rainbow trout fingerlings. J Animal Sci. Vol. 91, No. 27, pp: 66-74.

۲۶. **Goldburg, R.; Elliot, M. and Naylor, R.L., 2001.** Marine Aquaculture in the United States. Environmental Impacts and Policy Options; Pew Oceans Commission: Arlington, VA.

۲۷. **Hargreaves, J.A., 2013.** Biofloc Production Systems for Aquaculture. 4503. SRAC Publication. pp: 1-12.

۲۸. **Hargreaves, J.A., 2006.** Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. Aquacult. Eng. Vol. 34, pp: 344-363.

۲۹. **Hapsari, F., 2016.** The effect of fermented and non fermented biofloc inoculated with bacterium *Bacillus cereus* for catfish (*Clarias gariepinus*) juveniles. AACL Bioflux. Vol. 9, No. 2, pp: 334-339.

۳۰. **Hari, B.; Kurup, B.M.; Varghese, J.T.; Schrama, J.W. and Verdegem, M.C.J., 2004.** Effects of carbohydrate addition on production in extensive shrimp culture systems. Aquaculture. Vol. 241, pp: 179-194.

۳۱. **Hari, B.; MadhusoodanaKurup, B.; 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, pp: 248-263.

۳۲. **Hpstins, B.; Lara, G.; Decamp, O.; Cersar, E.D. and Jr, W.W., 2017.** Efficacy and variations in bacterial ensity in the gut of *Litopenaeus vannamei* reared in a BFT system and in clear water supplemented with a ommercial probiotic mixture. Aquaculture. Vol. 480, pp: 58-64.

۳۳. **Hollender, J.; van der Krol, D.; Kornberger, L.; Gierden E. and Dott, W., 2002.** Effect of different carbon sources on the enhanced biological phosphorus removal in a sequencing batch reactor. World J. Microbiol. Biotechnol. Vol.18, pp: 355-360.

۳۴. **Hu, X.; Cao, Y.; Wen, G.; Zhang, X.; Xu, Y.; Xu, W.; Xu, Y. and Li, Z., 2016.** Effect of combined use of *Bacillus* and molasses on microbial communities in shrimp cultural enclosure systems. doi:10.1111/are.13101

۳۵. **Jordanoska, L.V. and Kostoski, G., 2006.** Histopathological Analysis of liver in fish in Reservoir Trebenista Natura Croatica. Vol. 14, No. 2, pp: 147-153.

۳۶. **Ju, Z.Y.; Forster, I.; Conquest, L.; Dominy, W.; Kuo, W.C. and Horgen, F.D., 2008.** Determination of microbial community structures of shrimp floc cultures by biomarkers and analysis of floc amino acid profiles Aquacult Res. Vol. 39, pp: 118-133.

۳۷. **Kamilya, D.; Debbarma, M.; Pal, P.; Kheti, B.; Sarkar, S. and Singh, S.T., 2017.** Biofloc technology application in indoor culture of *Labeo rohita* (Hamilton, 1822) fingerlings: The effects on inorganic nitrogen control, growth and immunity. Chimospher. pp: 8-14.

۳۸. **Karim, G., 2003.** Microbial tests in Foods. Univ. of Tehran. 4 th edit. 517 p.

۳۹. **Mahanand, S.S.; Moulick, S. and Srinivasa, R., 2013.** Water quality of Rohu, *Labeorohita*, in a biofloc system. J. Appl. Aquacult. Vol. 25, pp: 121-131.

۴۰. **Merrifield, D.L.; Harper, G.M.; Dimitroglou, A.; Ringø, E. and Davies, S.J., 2010.** Possible influence of probiotic adhesion to intestinal mucosa on the activity and morphology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) enterocytes. Aquac Res. Vol. 46, No. 126, pp: 68-72.

۴۱. **Naylor, R.L.; Goldburg, R.J.; Primavera, J.H.; Kautsky, N.; Beveridge, M.C.M.; Clay, J.; Folke, C.; Lubchenco, J.; Mooney, H. and Troell, M., 2000.** Effect of aquaculture on world fishsupplies. Nature. Vol. 405, pp: 1017-1024.

۴۲. **Noga, E.J., 1995.** Fish Diseases: Diagnosis and Treatment. Mosby Electronic and Walsworth publishing Co. pp: 94-199

۴۳. **Oehmen, A.; Yuan, Z.; Blackall, L.L. and Keller, J., 2004.** Short-term effects of carbon source on the competition of polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms. Water Science and Technology. Vol. 50, pp: 139-144.

۴۴. **Piedrahita, R.H., 2003.** Reducing the potential environmental impact of tank aquacul-ture effluents through intensification and recirculation. Aquaculture. Vol. 226, pp: 35-44.

۴۵. **Picchietti, S.; Mazzini, M.; Taddei, A.R.; Renna, R., Fausto, A.M.; Mulero, V.; Carnevali, O.; Cresci, A. and Abelli, L., 2007.** Effects of administration of probiotic strains on GALT of larval gilthead seabream: immunohistochemical and ultrastructural studies. Fish Shell fish Immunol. Vol. 22, pp: 57-67.

۴۶. **Picchietti, S.; Fausto, A.M.; Randelli, E.; Carnevali, O.; Taddei, A.R.; Buonocore, F.; Scapigliati, G. and Abelli, L.,2009.** Early treatment with *Lactobacillus delbrueckii* strain induces an increase in intestinal T-cells and granulocytes and modulates immune-related genes of larval *Dicentrarchus labrax* (L.). Fish Shellfish Immunol. Vol. 26, pp: 368-76.

۴۷. **Qin, Y.; Hou, J.; Deng, M.; Liu, Q.S.; Wu, C.W.; Ji, Y.J. and He, X.G., 2016.** Bacterial abundance anddiversity in pond water supplied with different feeds. Scientific Reports. Vol. 6, 35232 p.

۴۸. **Racz, L.A.; Datta, T. and Goel, R., 2010.** Effect of organic carbon on ammonia oxidizing bacteria in a mixed culture. Bioresource Technol. Vol. 101, pp: 6454-6460.

۴۹. **Ringo, E. and Strom, E., 1994.** Intestinal microflora of Arcticcharr.Salvelinusalpinus) (L.I.). The gastrointestinal microflora of free-living fish, and theeffect of diet and salinity on Intestinal microflora. Aquacult. Fish. Manage. Vol. 25, pp: 623-629.

۵۰. **Saritha, T., 2009.** Development of innovative low cost larvi culture technologies of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). PhD. Thesis, Cochin University of Science and Technology, India.

۵۱. **Standen, B.T.; Rawling, M.D.; Davies, S.J.; Castex, M. F.; Oey, A.; Gioacchini, G.; Carnevali, O. and Merrifield, D.L.,2013.** Probiotic *Pediococcus cidilactici* modulates both localised intestinal- and peripheral- immunity in tilapia (*Oreochromis niloticus*). Fish Shellfish Immun. Vol. 35, pp: 1097-1104.

۵۲. **Tapia-Paniagua, S.; Lobo, C.; Moreno-Ventas, X.; Banda, I.G.D.L.; Moriñigo, M.A. and Varghese, J.T., 2007.** Carbon/nitrogen ratio optimization and periphyton development on the production and sustainability of *Penaeusmonodon* (fabricius) in extensive culture system. PhD thesis, Cochin University of Science and Technology, Cochin, India.

۵۳. **Vander Oost, R.; Beyer, J. and Vermeulen, N., 2007.** Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environ. Toxicol. Pharmacol. Vol. 68, pp: 603-621.

۵۴. **Wei, Y.F.; Liao, S.A. and Wang, A.L., 2016.** The effect of different carbon sources on the nutritional composition, microbial community and structure of bioflocs. Aquaculture. Vol. 465, pp: 88-93.

۵۵. **Yang, S.P. and Qiu, D.Q., 2006**. Water quality in the high density shrimp culturing ponds. Fisheries Science. Vol. 25, No. 9, pp: 459-462.

۵۶. **Zhao, Z.G.; Xu, Q.Y.; Luo, L.; Yin, J.S. and Wang, C.A., 2013**. Effect ofadding carbon source on growth of fish and water quality inSongpu mirror carp (*Cyprinus specularis* Songpu) pond. J. Northeast Agric. Univ. Vol. 44, pp: 105-112 (in Chinese withEnglish abstract).