

ارزیابی تغییرات بیان ژن کاتاپسین L و فاکتورهای رشد در میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) تحت تاثیر بایوفلاک‌های متفاوت

- اکبر عباس‌زاده*: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران
- وحید یاوری: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران
- سیدجواد حسینی: گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران
- محمود نفیسی‌بهبادی: پژوهشکده خلیج فارس، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران

تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۶

چکیده

کاتاپسین‌ها جزء اصلی سیستم پروتئولیتیک لیزوزومی و مسئول تجزیه پروتئین‌های داخل سلولی هستند. هدف این تحقیق ارزیابی تغییرات میزان بیان ژن کاتاپسین L (CTSL) و فاکتورهای رشد در میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) تحت تاثیر بایوفلاک‌های متفاوت با استفاده از سطوح مختلف پروتئینی بود. چهار تیمار بایوفلاک مشتمل بر بایوفلاک خرما+جیره با پروتئین ۲۵٪ (P۲۵)، بایوفلاک ملاس+جیره با پروتئین ۲۵٪ (M۲۵)، بایوفلاک خرما+جیره با پروتئین ۱۵٪ (P۱۵) و بایوفلاک ملاس+جیره با پروتئین ۱۵٪ (M۱۵) و یک تیمار شاهد بدون بایوفلاک (۳۸٪ پروتئین) با ۳ تکرار بود. در یک دوره ۳۵ روزه ۳۵ قطعه میگوی جوان (0.37 ± 0.33 گرم) به‌طور تصادفی در ۱۵ مخزن ۳۰۰ لیتری (تراکم ۱۷۵ قطعه در متر مکعب) ذخیره‌سازی گردید. به‌منظور برآورد تاثیر بایوفلاک بر میزان بیان ژن کاتاپسین L (CTSL) در هپاتوپانکراس میگو از تکنیک Real time PCR و از ژن Beta actin به‌عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. در تمام تیمارهای بایوفلاک نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری در میزان بیان ژن CTSL مشاهده گردید ($P < 0.05$)، هرچند که تیمار P۲۵ بالاترین میزان بیان را نشان داد ($P > 0.05$). هم‌چنین بالاترین میزان پارامترهای رشد (وزن به‌دست آمده، ضریب تبدیل غذایی مطلوب، نرخ رشد و بازماندگی) در میگوهای تیمار P۲۵ و کم‌ترین آن‌ها در تیمار شاهد دیده شد ($P < 0.05$). نتایج نشان داد میزان بیان ژن CTSL با تغییر منابع کربنی یا میزان پروتئین جیره در بین تیمارهای بایوفلاک، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند ($P > 0.05$). به‌نظر می‌رسد فناوری بایوفلاک با اثرات مثبت خود بر گوارش و ایمنی، سبب افزایش بیان ژن CTSL در این گونه شده است.

کلمات کلیدی: میگوی وانامی، ژنتیک، بایوفلاک، شیره خرما، ملاس، رشد



مقدمه

میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) با تولید بیش از ۳/۵ میلیون تن در دنیا مقام نخست تولیدات میگو و سایر سخت پوستان را به خود اختصاص داده است (FAO, ۲۰۱۶). یکی از روش‌های نوین در پرورش آبزیان استفاده از تکنولوژی بایوفلاک (Biofloc) است که سبب توسعه پایدار صنعت پرورش میگو، افزایش تولید در واحد سطح و با کاهش چشم‌گیر خروج پساب سبب بهبود محیط زیست می‌گردد. این تکنولوژی که نام دیگر آن سیستم پرورش بدون تعویض آب (Zero Exchange Water) است، شامل محیطی می‌باشد که در آن باکتری‌های هتروتروف (مثل *Enterobacter* و *Clostridium*)، ریز جلبک‌ها، زئوپلانکتون‌های غذایی، نماتودها، قارچ‌ها، آغازیان، کوبه پودها و روتیفرها، مواد دفعی حاصل از آبزیان پرورشی، غذای خورده نشده و بقایای جانوری-گیاهی را تجزیه و به مواد غذایی قابل استفاده تبدیل می‌کنند (Ekasari و همکاران، ۲۰۱۴). تاثیرات مثبت بایوفلاک در بهبود رشد میگو به اثبات رسیده است. Schweitzer و همکاران (۲۰۱۳) به استفاده از بایوفلاک در پرورش میگوی سفید غربی در تراکم‌های مختلف پرداخته و اثرات آن را بر فعالیت میکروب‌ها، کیفیت آب و میزان تولید مثبت ارزیابی نمودند. Jatoba و همکاران (۲۰۱۴) سطوح مختلف پروتئین در سیستم‌های بایوفلاک و نیمه متراکم را برای پرورش میگوی سفید غربی مطالعه و میگوهای پرورش یافته در تیمارهای بایوفلاک را دارای پارامترهای رشد بهتری ارزیابی نمودند. Anand و همکاران (۲۰۱۴) به بررسی اثر جایگزینی پودر بایوفلاک با پودر ماهی در جیره و تاثیر آن بر پارامترهای رشد و فعالیت آنزیم‌های هضمی در میگوی مونودون پرداخت. آنان علاوه بر جیره شاهد (بایوفلاک صفر)، جیره‌هایی با میزان ۴، ۸ و ۱۲٪ پودر بایوفلاک ساخته و با موفقیت آزمایش نمودند. هم‌چنین برخی از محققین بر روی بهره‌برداری از بایوفلاک جهت ارتقای فاکتورهای رشد و کاهش هزینه غذا در ماهی (Polia و همکاران، ۲۰۱۵) و میگو (Zokaeifar و همکاران، ۲۰۱۲) پژوهش‌هایی انجام و نتایج آن را مثبت ارزیابی نموده‌اند. در داخل کشور نیز Khanjani و همکاران (۲۰۱۶) تاثیر نسبت‌های مختلف غذایی و منابع مختلف کربنی را بر کیفیت آب و عملکرد رشد پست‌لاروهای میگوی سفید غربی بررسی نمودند. هم‌چنین Najdegerami و همکاران (۲۰۱۵) تاثیر بایوفلاک را بر روی پارامترهای رشد، آنزیم‌های گوارشی و بافت کپورماهیان انگشت‌قد مثبت ارزیابی نمودند. عظیمی و همکاران (۱۳۹۵) مطالعه‌ای به‌منظور

بررسی اثرات سطوح مختلف کربوهیدرات روی شکل‌گیری بایوفلاک، وضعیت نیتروژن و فسفات، مصرف غذایی و عملکرد رشد کپور معمولی در سیستم بایوفلاک انجام و تاثیرات مثبتی در پارامترهای کیفی آب، کاهش ضریب تبدیل غذایی، افزایش رشد ماهی و کاهش مقدار مصرف آب مشاهده نمودند. بایوفلاک سبب افزایش رشد، کاهش ضریب تبدیل غذایی و بهبود ایمنی می‌شود (Pan و Xu، ۲۰۱۲). در مطالعات گذشته کربوهیدرات‌های مختلفی از جمله: ملاس، شکر، نشاسته، گلیسرول، استات، کازاوا، پودر ذرت، آرد گندم به‌عنوان منبع کربنی استفاده شده است (Khanjani و همکاران، ۲۰۱۷؛ Crab و همکاران، ۲۰۱۲؛ Lotz و Ray، ۲۰۱۴). تا کنون گزارشی درخصوص استفاده از شیره خرما به‌منظور تامین کربن مورد نیاز سیستم بایوفلاک در دنیا ارائه نشده است. کاتاپسین L (CTSL) یکی از شناخته‌ترین پروتئازهای لیزوزومی سیستمین در جانوران می‌باشد که به‌همراه کاتاپسین B، H و S به فوق خانواده پاپاین (papain) از پروتئازهای سیستمین (سیستئین) تعلق دارند. کاتاپسین‌ها در پروتئولیز لیزوزومی پروتئین‌های داخلی و درون سلولی اهمیت زیادی دارند. کاتاپسین‌های H، B، S و L پروتئازهای مونومری با وزن مولکولی کمتر از ۳۰ کیلو دالتون هستند (Le Boulay و همکاران، ۱۹۹۶). این آنزیم‌ها نقش مهمی در تنظیم مراحل زندگی جانداران دارند (Grath، ۱۹۹۹). یازده نوع کاتاپسین شناخته شده است که کاتاپسین L جزء اصلی سیستم پروتئولیتیک لیزوزومی است. کاتاپسین هم‌چنین در پروتئین‌های بین‌سلولی تغییر یافته و به‌عنوان مرده‌خوار (Scavenger) در سلول‌ها جهت حذف پروتئین‌های ناخواسته و سلول‌های سرطانی عمل می‌کند (Glenn و همکاران، ۲۰۰۵). آن‌ها نقش فیزیولوژیک متنوعی در مقابل آنتی‌ژن دارند و سبب بلوغ پیتیدازهای خارج سلولی نیز می‌شوند. برخی از مطالعات حاکی از نقش مهم کاتاپسین L (CTSL) در هضم غذا در سخت‌پوستان است (Leung و Hu، ۲۰۰۷). در سخت‌پوستان این ژن از غده‌های گوارشی مثل هیپاتوپانکراس در میگوی سفید غربی جداسازی شده و میزان بیان آن در جانوران بزرگ‌تر، افزایش نشان داده است. یکی از بهترین ژن‌های شاخص مورد استفاده برای مقایسه میزان رشد و افزایش وزن در میگوی سفید غربی، کاتاپسین L می‌باشد که عمدتاً در هیپاتوپانکراس بیان می‌گردد (Jung و همکاران، ۲۰۱۳). Le Boulay و همکاران (۱۹۹۶) میزان بیان پروتئین‌های کاتاپسین L را در هیپاتوپانکراس میگوی سفید غربی در طول مرحله پوست‌اندازی مورد مطالعه قرار داده و آن را در این فرآیند تاثیرگذار دانسته‌اند. Glenn و همکاران (۲۰۰۵) بر روی تعداد SNP (Single

۲۵ درصد (P۲۵)، تیمار ۴: پرورش میگوی سفید غربی با استفاده از بایوفلاک ملاس + غذای میگو با پروتئین ۱۵ درصد (M۱۵)، تیمار ۵: پرورش میگوی سفید غربی با استفاده از بایوفلاک خرما + غذای میگو با پروتئین ۱۵ درصد (P۲۵). سپس مخازن با آب دریای فیلتر شده (شنی) برای حذف ذرات بزرگ و موجودات مزاحم تا ۲۰۰ لیتر پر شده و جهت تسریع در تشکیل بایوفلاک به هر مخزن دو لیتر (۰/۱) از استوک بایوفلاک اضافه شد. میگوهای جوان به وزن $5/37 \pm 0/33$ گرم از مزرعه پرورشی دلوار به سالن منتقل و پس از ضدعفونی و گذراندن دوره قرنطینه (۷۲ ساعت) به طور تصادفی در ۱۵ مخزن ذخیره سازی شدند که شامل ۶ مخزن بایوفلاک خرما، ۶ مخزن بایوفلاک ملاس و ۳ مخزن شاهد حاوی آب فیلتر شده دریا بدون بایوفلاک بود. در مخازن شاهد، تعویض آب به صورت مرسوم و روزانه ۵۰٪ آن با آب فیلتر شده تعویض گردید. غذادهی در سه نوبت (ساعات ۸، ۱۴ و ۲۲) و به میزان ۴ درصد وزن کل بدن انجام گرفت (Liu و همکاران، ۲۰۱۴). برای هر ۱۰۰ گرم غذا در تیمار ۲۵٪ و ۱۵٪ پروتئین، به ترتیب ۱۴۴ و ۸۶ گرم از شیره خرما و ملاس بعد از وعده دوم غذایی (ساعت ۱۴) اضافه گردید. پارامترهای فیزیوشیمیایی آب و نوسانات آن‌ها شامل: اکسیژن، دما، پی‌اچ، شوری و نور روزانه ثبت شدند. پارامترهای رشد مطابق روش‌های مرسوم در تیمارهای مختلف سنجیده شد. شاخص‌های آمونیاک، نیتريت و نیترات در تیمارهای مختلف با استفاده از کیت، روش نسلیزاسیون و اسپکتروفتومتر مدل ۲۱۵۰ Unico و با دستورالعمل‌های مربوطه اندازه‌گیری شدند (Standard Methods, ۲۰۰۵).

جدول ۱: آنالیز تقریبی ترکیبات قندی مورد استفاده

| ترکیبات % | ملاس | شیره خرما |
|------------|------------------|------------------|
| ماده خشک | $62/27 \pm 0/48$ | $64/45 \pm 0/33$ |
| پروتئین | $9/17 \pm 0/12$ | $4/85 \pm 0/05$ |
| چربی | $1/24 \pm 0/03$ | $2/8 \pm 0/04$ |
| کربوهیدرات | $74/34 \pm 0/11$ | $79/31 \pm 0/23$ |
| فیبر | $0/53 \pm 0/04$ | $0/75 \pm 0/07$ |
| خاکستر | $14/7 \pm 0/14$ | $12/26 \pm 0/09$ |

به منظور ارزیابی میزان بیان ژن CTSL در بافت هیپاتوپانکراس از آزمون PCR در زمان حقیقی (Real time PCR)، روش مقایسه‌ای $Ct\Delta\Delta$ (دستگاه Rotor-Gene, RG-۳۰۰، ساخت کشور استرالیا) استفاده شد. روش آزمون براساس کاربرد رنگ سایبرگرین انجام شد. در این مطالعه از ژن Beta actin به عنوان ژن کنترل داخلی (خانه گردان) استفاده و

nucleotide polymorphisms) در ژن کاتاپسین در میگوی سفید غربی تحقیق نموده و تعداد آن را در میگوی سفید غربی و مونودون یک عدد ذکر نمودند. Aoki و همکاران (۲۰۰۳) خصوصیات آنزیمی و مولکولی پروتئین‌های کاتاپسین را در میگوی شمالی *Pandalus borealis* مورد مطالعه قرار دادند. Leung و Hu (۲۰۰۶) ارتباط هضم غذا و میزان بیان ژن کاتاپسین در هیپاتوپانکراس میگوی سفید غربی را مطالعه نموده است. پژوهش حاضر به منظور ارزیابی تغییرات بیان ژن کاتاپسین و فاکتورهای رشد در میگوی سفید غربی تحت تاثیر بایوفلاک‌های مختلف انجام شده و برای اولین بار در دنیا از شیره ضایعات خرما برای تامین منبع کربوهیدرات بایوفلاک استفاده گردید.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در تابستان ۱۳۹۴ در دانشکده کشاورزی دانشگاه خلیج فارس بوشهر در مدت ۵ هفته، با رژیم نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی انجام و پرورش میگو در مخازن حاوی بایوفلاک و بدون بایوفلاک (شاهد) مقایسه گردید. به منظور تقویت فعالیت باکتری‌های هتروتروف جهت تشکیل بایوفلاک، نسبت کربن به نیتروژن در سیستم بین ۱۵ تا ۲۰ در نظر گرفته شد (Avnimelech, ۱۹۹۹). برای این منظور از کربوهیدرات‌های ملاس و شیره ضایعات خرما استفاده گردید (جدول ۱). در این تحقیق از ۵ تیمار و ۳ تکرار و در مجموع ۱۵ مخزن فایبرگلاس ۳۰۰ لیتری (پس از ضدعفونی با کلر) استفاده شد که هر کدام تا ۲۰۰ لیتر از آب پر شده بودند. تعداد ۳ مخزن برای تیمار شاهد، ۶ مخزن برای بایوفلاک خرما و ۶ مخزن برای بایوفلاک ملاس به کار رفت. با احتساب تراکم ۱۲۰ قطعه میگو در متر مربع (۱۷۵ قطعه در متر مکعب)، در هر یک از مخازن ۳۵ قطعه میگو ذخیره سازی گردید. برای تغذیه میگوها از سه نوع جیره با پروتئین‌های متفاوت (۱۵، ۲۵ و ۳۸٪) استفاده گردید. در تهیه جیره‌های آزمایش از نرم‌افزار (Copy right 1999, release 6.1, USA) Lindo استفاده گردید و اجزای آن از شرکت هووراش بوشهر تهیه گردید (عباس زاده و همکاران، ۱۳۹۶). تیمارها عبارت بودند از:

تیمار ۱ (شاهد): پرورش میگوی سفید غربی با استفاده از غذای میگو با پروتئین ۳۸ درصد و بدون بایوفلاک (Control)، تیمار ۲: پرورش میگوی سفید غربی با استفاده از بایوفلاک ملاس + غذای میگو با پروتئین ۲۵ درصد (M۲۵)، تیمار ۳: پرورش میگوی سفید غربی با استفاده از بایوفلاک خرما + غذای میگو با پروتئین



(Yang و Cesar, 2007). توالی آغازگرها در جدول ۲ مشخص شده است. قابل ذکر است که سنتز تمامی آغازگرهای این تحقیق، توسط شرکت سیناکلون انجام گرفت. نمونه گیری از هیپاتوپانکراس میگوها در هر تکرار (مجموعاً ۳ قطعه میگو از هر تیمار) پس از ۳۵ روز تغذیه با جیره های آزمایشی صورت گرفت. نمونه های هیپاتوپانکراس تهیه شده تا زمان انجام آزمایشات در فلاکس نیتروژن مایع (دمای منفی ۱۷۶ درجه سانتی گراد) قرار گرفت.

با توجه به بیان ثابت آن، میزان بیان ژن CTSL در بافت هیپاتوپانکراس میگوهای تیمارهای آزمایشی ارزیابی گردیدند. میزان بیان ژن CTSL بر اساس بیان نسبی نسبت به نمونه های شاهد و نرمال شده در مقایسه با ژن بتا کتین اندازه گرفته شد. این شدت بیان میزان افزایش را در مقایسه با نمونه های شاهد که ۱ می باشد، به صورت چند برابر شدن نشان می دهد. آغازگر (Primer) اختصاصی ژن Cathepsin L (۱۳۲ bp, AN: AF300705.2) و ژن Beta actin (۱۳۷ bp, AN: X99730.1) به عنوان ژن کنترل درونی (خانه گردان) در این مطالعه استفاده گردید

جدول ۲: توالی پرایمرهای استفاده شده در این تحقیق (Qian و همکاران، ۲۰۱۴؛*Zhao و همکاران، ۲۰۱۵)**.

| Reverse primer | Forward primer | Gene |
|---------------------------|----------------------------|--------------|
| ۵- GTTCTTGACCAGCCAGTAG -3 | ۵- GCCGTCCTCCAGTTCTA -3 | CTSL* |
| ۵- GGAATGAGGGCTGGAACAGG-3 | ۵- TGGACTTCGAGCAGGAGATG -3 | Beta actin** |

DNA با استفاده از جفت آغازگرها (بتا کتین و کاتپسین) و RNA به عنوان الگو انجام گرفت. شرایط تهیه محلول واکنش زنجیره ای پلی مرز با حجم کلی ۲۵ میلی لیتر شامل: ۲/۵ میکرو لیتر بافر واکنش زنجیره ای پلی مرز، ۱/۵ میکرو لیتر MgCl₂ (۵۰ mM)، ۱ میکرو لیتر از مخلوط dNTP (۱۰ mM)، ۱ میکرو لیتر از هر یک از الیگونوکلوئید (آغازگرها) و ۰/۳ میکرو لیتر Taq DNA (سیناژن) انجام شد. جزئیات برنامه چرخه حرارتی در دستگاه مستر سایکلر به ترتیب ذیل بود: واسرشت اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، تعداد چرخه حرارتی کل ۳۵ دور با برنامه واسرشت سازی، اتصال و تکثیر به ترتیب ۲۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی گراد، ۳۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی گراد، ۴۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد و تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انجام گرفتند. سپس ترکیبات مخصوص واکنش PCR در زمان حقیقی شامل ۶/۲۵ میکرو لیتر ۲XSybr Mix، ۰/۵ میکرو لیتر هر کدام از آغازگرها، ۰/۱ میکرو لیتر Taq Polymerase، ۰/۵ میکرو لیتر از cDNA Template، ۴/۶۵ میکرو لیتر آب عاری از DNase در چاهک های مخصوص ۰/۱ میلی لیتری در پوش دار مخصوص که حاوی نمونه مورد نظر بودند، افزوده شدند. جزئیات برنامه چرخه حرارتی در دستگاه Rotor-Gene، RG-۳۰۰۰ به ترتیب ذیل بود: واسرشت اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه، تعداد چرخه حرارتی کل ۴۰ دور با دمای واسرشت سازی، اتصال و تکثیر به ترتیب ۱۵ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی گراد، ۳۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی گراد، ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد و تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه.

سپس RNA بافت هیپاتوپانکراس تیمارهای آزمایشی با استفاده از کیت (-plus) RNXTM سیناژن طبق دستور شرکت سازنده استخراج شد. آزمون تعیین کیفیت و کمیت RNA استخراج شده با محاسبه دانسیته نوری D260/OD280 با استفاده از اسپکتروفتومتر انجام شد. بعد از استخراج RNA، برای سنتز DNA معکوس از روی آن، ابتدا مخلوطی شامل یک میکروگرم Primer Random (10 pmol) و Hexamers، RNA و ddH₂O تا حجم ۱۰ میکرو لیتر در یک میکروتیوب استریل روی یخ آماده شد. پس از سانتریفیوژ کوتاه (۱ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ g)، به مدت ۵ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از این مرحله میکروتیوب حاوی مخلوط فوق روی یخ قرار داده شد و مخلوطی شامل ۱x Reaction buffer، ۱x RNAase (100 U) inhibitor، ۰/۴ mM dNTP mix، ۲۰۰ U M-MuLV و ddH₂O تا حجم ۲۰ میکرو لیتر به آن اضافه شد. نمونه فوق پس از مخلوط کردن و سانتریفیوژ کوتاه (۱ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ g)، برای مدت ۶۰ دقیقه در ۴۲ درجه حرارت ۴۲ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس واکنش با استفاده از تیمار نمونه در ۷۰ درجه حرارت ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه متوقف و cDNA حاصل در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید. cDNA ساخته شده در واکنش های PCR استاندارد مورد استفاده قرار گرفت. جهت آزمایش آغازگرهای CTSL و Beta actin مورد استفاده، ابتدا یک PCR معمولی با استفاده از کتابخانه cDNA ساخته شده از بافت های هیپاتوپانکراس به عنوان الگو طراحی و واکنش PCR استاندارد با استفاده از دستگاه گراداینت مستر سایکلر، (Mastercycler, eppendorf, Germany) انجام شد. هم چنین تست کنترل برای آلودگی



نتایج

شوری در دامنه ۳۶-۳۶/۵ قسمت در هزار، دما بین ۳۰/۳-۲۹/۵ درجه، پی‌اچ ۷/۸-۸/۰۱ و اکسیژن ۶-۵/۰۲ میلی‌گرم در لیتر قرار داشت. میگوهار روزانه به میزان ۰/۴٪ وزنشان (ساعات ۸، ۱۴ و ۲۲) غذاهای شدند. بیش‌ترین میزان آمونیاک و نیتريت در مخزن شاهد و کم‌ترین آن‌ها در تیمار P15 اندازه‌گیری شد (عباس‌زاده و همکاران، ۱۳۹۶). عملکرد فاکتورهای رشد در جدول ۳ آمده است. بیش‌ترین افزایش وزن در تیمار P25 (۷/۲۷±۰/۵۱) گرم و کم‌ترین آن در تیمار شاهد (۵/۰±۹۶/۱۴) گرم به دست آمده است و در بقیه تیمارها نیز اختلاف معنی‌دار بود (P<۰/۰۵).

رابطه $\Delta\Delta CT = 2 - (\Delta CT_{\text{target gene}} - \Delta CT_{\text{reference gene}})$ برای کمی‌سازی داده‌های Real time-PCR، مورد استفاده قرار گرفت (Rasmussen, ۲۰۰۱).
 $\Delta\Delta CT = (CT_{\text{target gene}} - CT_{\text{reference gene}})$ in treated group - $(CT_{\text{target gene}} - CT_{\text{reference gene}})$ in control group.
 ژن هدف (Target) در این جا CTSL یا رفرنس نیز Beta actin بود. تیمارهای با یوفلاک و control group تیمار شاهد بود. تحقیق حاضر در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تیمار تغذیه‌ای متفاوت و ۳ تکرار اجرا گردید. پس از استخراج داده‌ها و اطمینان از نرمال بودن آن‌ها (با استفاده از آزمون کولموگراف-اسمیرنوف)، مقایسه صفات مورد آزمایش از طریق تجزیه واریانس و مقایسه میانگین آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵٪ انجام گردید. برای انجام آنالیزهای فوق از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۷ استفاده گردید.

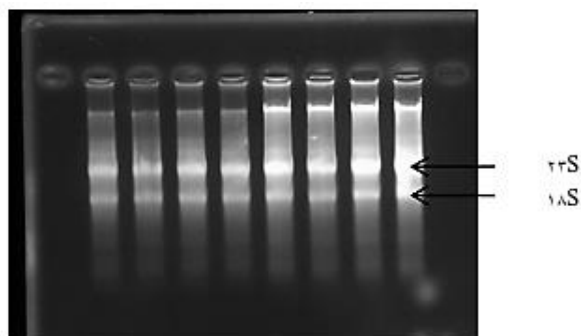
جدول ۳: عملکرد رشد در تیمارهای مختلف در طول ۳۵ روز (میانگین ± انحراف از معیار)

| شاخص | M15 | P25 | M15 | P15 | فاکتور |
|-----------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| وزن نهایی (گرم) | ۱۰/۸۹±۰/۳۷ ^a | ۱۲/۲۷±۰/۳۶ ^{bc} | ۱۲/۹۳±۰/۴۹ ^c | ۱۱/۵۸±۰/۵۶ ^{ab} | ۱۲/۰۲±۰/۹۵ ^{bc} |
| افزایش وزن (گرم) | ۵/۹۶±۰/۱۴ ^a | ۶/۷۹±۰/۲۴ ^{ab} | ۷/۲۷±۰/۵۱ ^b | ۶/۰۷±۰/۲۶ ^a | ۶/۷۵±۰/۸۱ ^{ab} |
| نرخ رشد (گرم/هفته) | ۱/۱۹±۰/۰۳ ^a | ۱/۳۶±۰/۰۴ ^{ab} | ۱/۴۵±۰/۰۱ ^b | ۱/۲۱±۰/۰۵ ^a | ۱/۳۵±۰/۰۱۶ ^{ab} |
| بازماندگی (درصد) | ۸۰±۲/۸۶ ^a | ۸۳/۸۱±۳/۳۰ ^{ab} | ۸۶/۶۷±۴/۳۶ ^b | ۸۲/۸۶±۲/۸۶ ^{ab} | ۸۳/۸۱±۱/۶۵ ^{ab} |
| شاخص وزن بدن (درصد) | ۱۲۰/۹۸±۳/۱۴ ^{ab} | ۱۲۴/۱۶±۱۱/۹۲ ^{ab} | ۱۲۸/۴۳±۱۰/۸۴ ^b | ۱۰۹/۹۶±۱/۱۴ ^a | ۱۲۸/۰۷±۱۱/۸۲ ^b |
| وزن به دست آمده (گرم) | ۱۶۶/۸۶±۲/۳۴ ^a | ۲۰۳/۳۶±۱/۹۹ ^b | ۲۲۹/۸۲±۱۲/۲۲ ^c | ۱۷۶±۱۲/۱۱ ^a | ۲۰۲/۲۳±۱۹/۸۴ ^b |
| ضریب رشد ویژه | ۲/۲۷±۰/۰۴ ^{ab} | ۲/۳۰±۰/۱۵ ^{ab} | ۲/۳۶±۰/۱۴ ^b | ۲/۱۲±۰/۰۱ ^a | ۲/۳۵±۰/۱۵ ^b |
| ضریب تبدیل غذایی | ۱/۸۴±۰/۲۱ ^b | ۱/۵±۰/۱۴ ^a | ۱/۳۲±۰/۰۹ ^a | ۱/۹±۰/۱۴ ^b | ۱/۴۷±۰/۱۲ ^a |

در هر ردیف میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشابه فاقد تفاوت معنی‌دار هستند (p>۰/۰۵).

P25: بایوفلاک خرما + جیره با پروتئین ۲۵٪، P15: بایوفلاک خرما + جیره با پروتئین ۱۵٪، M15: بایوفلاک ملاس + جیره با پروتئین ۱۵٪ و تیمار شاهد (۳۸٪ پروتئین بدون حضور بایوفلاک).

الکتروفورز را بر روی ژل آگارز ۲ درصد نشان می‌دهد. به منظور تایید تکثیر اختصاصی ژن و مناسب بودن آغازگرهای طراحی شده برای اندازه‌گیری بیان ژن کاتاپسین، ابتدا واکنش PCR بر روی cDNA ساخته شده از هیپاتوپانکراس میگوی سفیدرغی انجام گردید (شکل ۲).

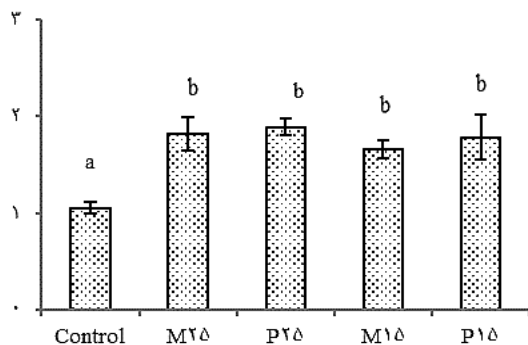


شکل ۱: الکتروفورز نمونه RNA استخراج شده

هم‌چنین بیش‌ترین نرخ رشد (۱/۰±۴۵/۱)، بیش‌ترین درصد بازماندگی (۸۶/۶۷±۴/۳۶) و وزن به دست آمده (۲۲۹/۸۲±۱۲/۲۲) در تیمار P25 و کم‌ترین آن‌ها در تیمار شاهد به ترتیب برای نرخ رشد (۱/۰±۱۹/۰۳)، درصد بازماندگی (۸۰/۸۶±۲/۳۴) و وزن به دست آمده (۱۲۸/۱۰±۴۳/۸۴) محاسبه شد. بیش‌ترین درصد شاخص وزن بدن (۱۲۸/۰۷±۱۱/۸۲) در تیمار P25 و کم‌ترین آن (۱۰۹/۹۶±۱/۱۴) در تیمار M15 به دست آمده است. بیش‌ترین ضریب رشد ویژه در تیمار P25 (۲/۳۶±۰/۱۴) و کم‌ترین آن در تیمار M15 (۲/۱۲±۰/۰۱) محاسبه شد. کم‌ترین ضریب تبدیل غذایی در تیمار P25 (۱/۳۲±۰/۰۹) و بیش‌ترین آن در تیمار شاهد (۱/۰±۸۴/۲۱) سنجش گردید. موفقیت آنالیز PCR که بر اساس RNA است، وابسته به خلوص، کیفیت و کمیت مناسب RNA استخراج شده است. با الکتروفورز RNA باندهای مشخص ۲۲۵ و ۱۸۵ (RNA ریبوزومی) بر روی ژل آگارز مشاهده گردید. شکل ۱ نتایج



میزان پروتئین جیره در بین تیمارهای مختلف بایوفلاک، اختلاف معنی داری را نشان ندادند. در عین حال بالاترین میزان بیان متعلق به تیمار P25 بود ($P > 0.05$).

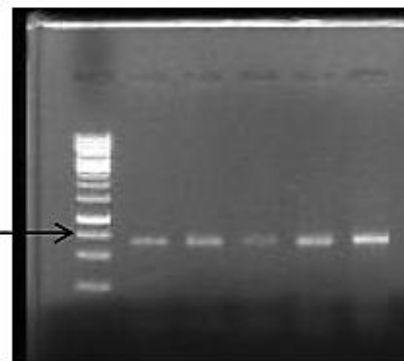


شکل ۴: مقایسه بیان نسبی ژن کاتاپسین در هیپاتوپانکراس میگو در تیمارهای مختلف آزمایشی (نرمال شده در مقایسه با ژن بتا اکتین به عنوان کنترل داخلی)

(بر حسب چند برابر شاهد) گروه‌های دارای حداقل یک حرف مشابه فاقد اختلاف معنی دار هستند ($P > 0.05$). P25: بایوفلاک خرما + جیره با پروتئین ۲۵٪، M25: بایوفلاک ملاس + جیره با پروتئین ۲۵٪، P15: بایوفلاک خرما + جیره با پروتئین ۱۵٪، M15: بایوفلاک ملاس + جیره با پروتئین ۱۵٪ و تیمار شاهد (۳۸٪ پروتئین بدون حضور بایوفلاک).

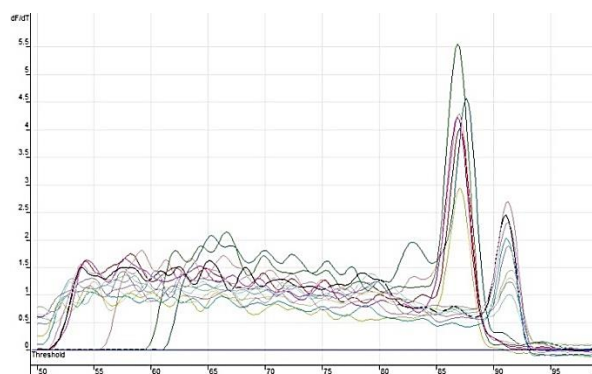
بحث

میگوی سفید غربی از گونه‌های مناسب برای رشد در محیط بایوفلاک است (Correiaa و همکاران، ۲۰۱۴). اختلاف معنی داری بین پارامترهای فیزیولوژیکی آب (دما، شوری، پی‌اچ و رژیم نوری) در بین تیمارهای مختلف دیده نشد (عباسزاده و همکاران، ۱۳۹۶). بیشترین میزان وزن نهایی، افزایش وزن، نرخ رشد (گرم در هفته)، نرخ بازماندگی، شاخص وزن بدن و افزایش بایومس مربوط به تیمار بایوفلاک خرما با پروتئین جیره ۲۵٪ (P25) و کمترین آن‌ها در تیمار شاهد ثبت گردید که دارای اختلاف معنی داری بودند. براساس تحقیقات دیگران (Krummenauer و همکاران، ۲۰۱۴؛ Samocha و همکاران، ۲۰۰۷) نیز بایوفلاک حاوی مواد افزاینده رشد بوده و سبب افزایش بازماندگی و کاهش ضریب تبدیل غذایی می شود. به دلیل فقدان مواد قندی و از آنجایی که باکتری‌های هتروتروف در تیمار شاهد در کمترین تعداد وجود دارند، بنابراین قادر به نیتریفیکاسیون نبوده و بالاترین میزان آمونیاک در آن دیده شد. کمترین میزان



شکل ۲: بیان ژن کاتاپسین در هیپاتوپانکراس میگو (PCR) از نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۲ درصد

پس از پایان تکثیر در Real Time-PCR برای اطمینان از تکثیر اختصاصی و تایید واکنش PCR از طریق منحنی ذوب، برنامه ذوب از ۵۰ درجه به ۹۹ درجه سانتی‌گراد برای دستگاه تنظیم شد و منحنی ذوب برای نمونه توسط دستگاه ترسیم گردید. شکل ۳ نشان‌دهنده منحنی ذوب برای هر دو نمونه بتا اکتین و کاتاپسین است که محور X ها افزایش درجه حرارت و محور Y ها میزان کاهش تشعشع دریافتی (Emission) را نشان می‌دهند.



شکل ۳: منحنی ذوب ژن کاتاپسین و بتا اکتین

(وجود یک قله نشان‌دهنده انجام صحیح واکنش PCR بوده و ثابت می‌کند محصول حاصل یک تک‌بند می‌باشد).

میزان بیان ژن CTSL در میگوهای تیمارهای بایوفلاک پس از ۳۵ روز تغذیه، با میگوهای تیمار شاهد مقایسه شدند (شکل ۴). طبق این نتایج در تمام تیمارهای بایوفلاک افزایش معنی داری در میزان بیان ژن کاتاپسین L در مقایسه با تیمار شاهد مشاهده گردید ($P < 0.05$). با این وجود میزان بیان این ژن با تغییر منابع کربنی یا

را در میگوی سفید غربی با رشد مرتبط دانسته‌اند. استفاده از بایوفلاک سبب افزایش رشد، بهبود ایمنی و کاهش استرس می‌گردد. در برخی مطالعات ثابت شده است وقتی میگوی وانامی تحت استرس‌هایی مانند شوری و سرما قرار بگیرد سطح فعالیت فاگوسیتوز و میزان بیان ژن کاتاپسین در آن‌ها کاهش می‌یابد (Zhao و همکاران، ۲۰۱۵). در این مطالعه تیمار P25 (بایوفلاک با منبع کربنی شیره خرما) با بهترین عملکرد رشد دارای بیشترین میزان بیان ژن کاتاپسین بود. شیره خرما دارای میزان زیادی ویتامین (ویتامین آ، اسیداسکوربیک و آلفا توکوفرول)، مواد معدنی، چربی، پروتئین، رنگدانه، فلاونوئید، فنل، آنتوسیانین و دیگر مواد افزایشنده رشد است که سبب کاهش استرس نیز می‌گردند (Boudries و همکاران، ۲۰۰۷؛ Biglari و همکاران، ۲۰۰۸؛ Allaith، ۲۰۰۸). علاوه بر این تاثیر ارگانسیم‌های موجود در بایوفلاک در افزایش رشد و ایمنی میگو در تحقیقات دیگر به اثبات رسیده است (Zhang و همکاران، ۲۰۱۳). قند موجود در شیره خرما بر خلاف ملاس بیشترین از قندهای ساده‌ای چون گلوکز و فروکتوز و کم‌تر از ساکارز تشکیل شده است که باعث می‌شود باکتری‌ها و آغازیان آن را آسان‌تر مورد استفاده قرار داده و جمعیت خود را سریع‌تر افزایش دهند (Al Farsi و Lee، ۲۰۰۸). این موجودات تک‌سلولی و سایر آغازیان تغذیه کننده از آن‌ها غذایی مفید برای میگو بوده و تاثیر زیادی در رشد، ایمنی و کاهش استرس در میگو دارند. به نظر می‌رسد بایوفلاک سبب کاهش استرس و افزایش ترشح کاتاپسین در این میگو شده است.

کاتاپسین دارای بالاترین میزان رونویسی در هیاتوپانکراس است (Hu و Leung، ۲۰۰۶). مطالعات اخیر حاکی از نقش مهم کاتاپسین L به عنوان مرده‌خواری (Scavenger) و هضم در سخت‌پوستان می‌باشد (Turk و همکاران، ۲۰۰۰). شیره خرما دارای خواص ضدسرطانی، محافظ دستگاه گوارش، کبد، سیستم عصبی و کاهنده چربی خون است (Rania و همکاران، ۲۰۱۴). به نظر می‌رسد شیره خرما با اثرات مثبت خود بر اندام‌های گوارشی و از جمله هیاتوپانکراس زمینه ترشح بیش‌تر کاتاپسین را فراهم آورده است. خانواده کاتاپسین سبب از بین بردن باکتری‌ها و ویروس‌های مضر گردیده و از این طریق سبب ایمنی بهتر و افزایش رشد می‌گردد (Robalino و همکاران، ۲۰۰۷). افزایش ایمنی در محیط بایوفلاک در مطالعات اخیر به اثبات رسیده است (Krummenauer و همکاران، ۲۰۱۴). افزایش میزان بیان ژن و بهبود رشد در تیمارهای بایوفلاک ممکن است با این امر مرتبط باشد. کاتاپسین L هم‌چنین از طریق apoptosis نقش مهمی در پوست‌اندازی دارد (Le Boulay و همکاران، ۱۹۹۶). کاتاپسین در

پروتئین، وجود مواد قندی و ارجحیت مواد قندی شیره خرما نسبت به ملاس برای رشد باکتری‌های هتروتروف، سبب حذف آمونیاک و حداقل شدن آن در تیمار بایوفلاک خرما (P15) گردید. به نظر می‌رسد کاهش ترکیبات مضر از طی سبب کاهش استرس، تغذیه بهتر و رشد بیش‌تر در تیمارهای بایوفلاک می‌گردد. بهبود پارامترهای رشد در تیمارهای دارای بایوفلاک احتمالاً به دلیل کاهش ترکیبات مضر آمونیاکی آب و استرس کم‌تر (Gao و همکاران، ۲۰۱۲)، ترکیبات محرک ایمنی، وجود غذای زنده گیاهی و جانوری و ترکیبات غذایی مفید دیگر در قالب بایوفلاک می‌باشد (Jatoba و همکاران، ۲۰۱۴). برخی آزمایشات موفقیت سیستم بایوفلاک را با پروتئین ۱۰٪ نیز بیان کرده‌اند (Ballester و همکاران، ۲۰۱۰). از آنجایی که میزان رشد و بازماندگی در تیمارهای بایوفلاک در این تحقیق از شاهد بیش‌تر بود، می‌توان نتیجه گرفت که بایوفلاک نه تنها کمبود پروتئین جیره را جبران می‌کند بلکه باعث بهبود ایمنی و در نتیجه افزایش بازماندگی نیز می‌گردند (Pan و Xu، ۲۰۱۳). در پستانداران نیز، کاتاپسین در بسیاری از بافت‌ها وجود دارد. در بافت‌های ریه، کبد، کلیه و طحال مقدار زیادی کاتاپسین بیان می‌شود که نه تنها قادر به تخریب پروتئین داخل سلولی است بلکه در رشد سلول نیز دخالت دارد (Doughty و Gruenstein، ۱۹۸۷). نتایج این تحقیق نشان داد که در تمام تیمارهای بایوفلاک افزایش معنی‌داری در میزان بیان ژن کاتاپسین نسبت به تیمار شاهد رخ داده است. این افزایش بیان فارغ از میزان پروتئین جیره‌های متفاوت در تیمارهای مختلف بایوفلاک رخ داده است. با توجه به نقش کاتاپسین در هضم پروتئین‌ها به نظر می‌رسد میزان پروتئین دریافتی در تیمارهای بایوفلاک بیش‌تر از شاهد بوده که میزان بیش‌تری آنزیم ترشح شده است. هم‌چنین با توجه به میزان بیش‌تر پروتئین در جیره شاهد (۳۸٪) می‌توان گفت میزان نهایی پروتئین دریافتی خالص توسط میگو در تیمارهای بایوفلاک (با وجود کم‌تر بودن میزان پروتئین در جیره آن‌ها) بیش‌تر بوده است. در دسترس بودن دائمی فلاک‌های میکربی می‌تواند دلیل دیگری بر این امر باشد. زیرا میگو در تیمارهای بایوفلاک قادر است به‌طور مداوم از فلاک‌ها (که عمدتاً از آغازیان، جلبک‌ها، باکتری‌ها و زئوپلانکتون‌ها با میزان پروتئین بالا تشکیل شده‌اند و خصوصیات مفید غذای زنده را در مقایسه با جیره دستی دارند) تغذیه نماید، پروتئین جذب نماید و لزوماً کاتاپسین برای هضم آن ترشح گردد و این در حالی است که غذای دستی در تیمار شاهد فقط ۳ وعده در شبانه روز در اختیار میگوهای این تیمار قرار گرفته بود. Glenn و همکاران (۲۰۰۵) افزایش میزان بیان ژن کاتاپسین



- growth performance and digestive enzyme activities in *Penaeus monodon*. Aquaculture. Vol. 418-419, pp: 108-115.
۶. **Aoki, H.; Ahsan, M.N. and Watabe, S., 2003.** Molecular cloning and characterization of cathepsin B from the hepatopancreas of northern shrimp *Pandalus borealis*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B. Vol. 134, pp: 681-694.
۷. **Avnimelech, Y., 1999.** Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. Aquaculture. Vol. 176, pp: 227-235.
۸. **Ballester, E.L.C.; Abreu, P.C.; Cavalli, R.O.; Emerenciano, M.; Abreu, L. and Wasielesky, W.Jr., 2010.** Effect of practical diets with different protein levels on the performance of *Farfantepenaeus paulensis* juveniles nursed in a zero exchange suspended microbial flocs intensive system. Aquaculture Nutrition. Vol. 16, pp: 163-172.
۹. **Biglari, F.; AlKarkhi, A.F.M. and Azhar, M.E., 2008.** Antioxidant activity and phenolic content of various date palm (*Phoenix dactylifera*) fruits from Iran. Food Chemistry. Vol. 107, No. 4, pp: 1636-1641.
۱۰. **Boudries, H.; Kefalas, P. and Me'ndez, O., 2007.** Carotenoid composition of Algerian date varieties (*Phoenix dactylifera*) at different edible maturation stages. Food Chemistry. Vol. 101, pp: 1372-1377.
۱۱. **Cesar, J.R.O. and Yang, J. 2007.** Expression Patterns of Ubiquitin, Heat Shock Protein 70, α -Actin and β -Actin Over the Molt Cycle in the Abdominal Muscle of Marine Shrimp *Litopenaeus vannamei*. Molecular reproduction and development. Vol. 74, pp: 554-559.
۱۲. **Correia, E.; Wilkenfeld, J.; Morris, T.; Weic, L.; Prangnell, D. and Samocho, T., 2014.** Intensive nursery production of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* using two commercial feeds with high and low protein content in a biofloc-dominated system. Aquacultural Engineering. Vol. 59, pp: 48-54.
۱۳. **Crab, R.; Defoirdt, T.; Bossier, P. and Verstraete, W., 2012.** Biofloc technology in aquaculture: beneficial effects and future challenges. Aquaculture. Vol. 356-357, pp: 351-356.
۱۴. **Doughty, M.J. and Gruenstein, E.I., 1987.** Cell growth and substrate effects on characteristics of a lysosomal enzyme (cathepsin C) in Duchenne muscular dystrophy fibroblasts. Biochemistry and Cell Biology. Vol. 65, No. 7, pp: 617-625.
۱۵. **Ekasari, J.; Angela, D.; HadiWaluyo, S.; Bachtiar, T.; Surawidjaja, E.H.; Bossier, P. and De Schryver, P., 2014.** The size of biofloc determines the nutritional composition and the nitrogen recovery by aquaculture animals. Aquaculture. Vol. 426, PP: 105-111.

معدۀ، رودۀ، چشم، ماهیچۀ، تخمدان، تخم، هسته اووسیت و اسپرم میگو نیز یافت می‌شود که دارای اثرات فیزیولوژیک مهم دیگری غیر از گوارش می‌باشند. میزان بیان آن در هپاتوپانکراس ۱۰ برابر بافت‌های دیگر است. این آنزیم در معدۀ، رودۀ و تخمدان به‌صورت پیش‌آنزیم و در هپاتوپانکراس به‌صورت بالغ دیده می‌شود (Hu) و همکاران، (۲۰۰۶). میگو برای رشد به پوست‌اندازی نیاز دارد و از آنجایی که در تیمارهای بایوفلاک با افزایش ترشح کاتاپسین این فرآیند تسهیل و تسریع شده است، می‌تواند دلیلی دیگر بر افزایش رشد در این تیمارها باشد.

نتایج این مطالعه نشان داد بایوفلاک مستقیماً با تاثیر بر رشد و ایمنی میگو و غیرمستقیم با افزایش بیان ژن کاتاپسین سبب اثر هم‌افزایی (Synergy) و بهبود پارامترهای رشد گردیده است. با توجه به قیمت ارزان‌تر شیرۀ ضایعات خرما و ترکیبات مفیدتر آن نسبت به ملاس، برای استفاده در تکنولوژی بایوفلاک ارجحیت دارد. بهتر است در مطالعات آتی از شیرۀ ارقام مختلف خرما، نسبت‌های متفاوت کربن به نیتروژن و منابع کربنی بومی و ارزان دیگر نیز استفاده و با هم مقایسه شوند.

منابع

۱. **عباس‌زاده، ا.؛ یآوری، و.؛ حسینی، ج. و نفیسی، م.، ۱۳۹۶.** تاثیر منابع مختلف کربنی (ملاس و شیرۀ ضایعات خرما) بر کیفیت آب، عملکرد رشد و ترکیبات بدن میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) در سیستم بایوفلاک. مجله بوم‌شناسی آبزیان. دوره ۶، شماره ۴، صفحات ۲۱ تا ۳۸.
۲. **عظیمی، ع.؛ جعفریان، ح.؛ هرسیج، م.؛ قلی‌پور، ح. و پاتیمار، ر. ۱۳۹۵.** تاثیر نسبت‌های مختلف کربن به نیتروژن بر پارامترهای آب و عملکرد رشد بچه ماهیان کپور معمولی در سیستم بایوفلاک. نشریه توسعه آبی‌پروری. دوره ۴، شماره ۴، صفحات ۷۵ تا ۸۹.
۳. **Al Farsi, M.A. and Lee, C.Y., 2008.** Nutritional and functional properties of dates: a review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. Vol. 48, pp: 877-887.
۴. **Allaith, A., 2008.** Antioxidant activity of Bahraini date palm (*Phoenix dactylifera* L.) fruit of various cultivars. International Journal of Food Science and Technology. Vol. 43, pp: 1033-1040.
۵. **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



- intermolt cycle. Journal of comparative physiol part B. Vol. 166, pp: 310-318.
۲۷. **Liu, L.; Hu, Z.; Dai, X. and Avnimelech, Y., 2014.** Effects of addition of maize starch on the yield, water quality and formation of bioflocs in an integrated shrimp culture system. Aquaculture. Vol. 418-419, pp: 79-86.
۲۸. **Najdegerami, E.; Bakhshi, F. and Bagherzadeh Lakani, F., 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 Physiology and Biochemistry. Vol. 42, No. 2, pp: 457-465.
۲۹. **Polia, M.; Schweitzer, R. and Pires de Oliveira, A., 2015.** The use of biofloc technology in a South American catfish (*Rhamdia quelen*) hatchery: Effect of suspended solids in the performance of larvae. Aquacultural Engineering. Vol. 66, pp: 17-21.
۳۰. **Qian, Z.; He, S.; Liu, T.; Liu, L.; Hou, F.; Liu, Q.; Wang, X.; Mi, X.; Wang, p. and Liu, X., 2014.** Identification of ecdysteroid signaling late-response genes from different tissues of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Comparative Biochemistry and Physiology Part A. Vol. 172, pp: 10-30.
۳۱. **Rania, M.A.; Aisha, S.M.; Mohamed, M.E. and Isam, A.M., 2014.** Chemical composition, antioxidant capacity, and mineral extractability of Sudanese date palm (*Phoenix dactylifera* L.) fruits. Food Science & Nutrition. Vol. 5, pp: 478-489.
۳۲. **Rasmussen, R., 2001.** Quantification on the Light Cyclor. In: Meuer, S., Witter, C., Nakagawa, K. (Eds.), Rapid Cyclor Real-time PCR, Methods and Applications. Springer Press, Heidelberg, pp: 21-34.
۳۳. **Ray, A.J. and Lotz, J.M., 2014.** Comparing a chemoautotrophic-based biofloc system and three heterotrophic-based systems receiving different carbohydrate sources. Aquacultural Engineering. Vol. 63, pp: 54-61.
۳۴. **Robalino, J.; Almeida, J.S.; McKillen, D.; Colglazier, J.; Trent, H.F.; Chen, Y.A.; Peck, M.E.T.; Browdy, C.L.; Chapman, R.W.; Warr, G.W. and Gross, P.S., 2007.** Insights into the immune transcriptome of the shrimp *Litopenaeus vannamei*: tissue-specific expression profiles and transcriptomic responses to immune challenge. Physiological Genomics. Vol. 29, pp: 44-56.
۳۵. **Samocho, T.M.; Patnaik, S.; Speed, M.; Ali, A.M.; Burger, J.M.; Almeida, R.V.; Ayub, Z.; Harisanto, M.; Horowitz, A. and Brock, D.L., 2007.** Use of molasses as carbon source in limited discharge nursery and grow-out
۱۶. **FAO. 2016.** The state of the world fisheries and aquaculture. FAO Fisheries Department, Food and Agriculture Organization of the United Nations, publishing Management Service, Rome, Italy. <http://www.fao.org>
۱۷. **Gao, L.; Shan, H.W.; Zhang, T.W.; Bao, W.Z. and Ma, S.J., 2012.** Effects of carbohydrate addition on *Litopenaeus vannamei* intensive culture in a zero-water exchange system. Aquaculture. Vol. 342, pp: 89-96.
۱۸. **Glenn, K.; Grapes, L.; Suwanasopee, T.; Harris, D.; Li, Y.; Wilson, K. and Rothschild, M., 2005.** SNP analysis of AMY2 and CTSL genes in *Litopenaeus vannamei* and *Penaeus monodon* shrimp. International Society for Animal Genetics. Vol. 36, pp: 235-236.
۱۹. **Grath, M., 1999.** The lysosomal cysteine proteinases. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure. Vol. 28, pp: 181-204.
۲۰. **Hu, K. and Leung, P., 2007.** Food digestion by cathepsin L and digestion-related rapid cell differentiation in shrimp hepatopancreas. Comparative Biochemistry and Physiology. Vol. 146, pp: 69-80.
۲۱. **Hu, K.J. and Leung, P.C., 2006.** Complete, precise, and innocuous loss of multiple introns in the currently intronless, active cathepsin L-like genes, and inference from this event. Molecular Phylogenetics and Evolution. Vol. 38, pp: 685-696.
۲۲. **Jatoba, A.; Corrêa da Silva, B.; Souza da Silva, J.; Nascimento Vieira, F.; Pedreira Mourão, J.; Quadros Seiffert, W. and Massucci Toledo, T., 2014.** Protein levels for *Litopenaeus vannamei* in semi-intensive and biofloc systems. Aquaculture. Vol. 432, pp: 365-371.
۲۳. **Jung, H.; Lyons, R.; Hurwood, D. and Mather, P., 2013.** Genes and growth performance in crustacean species: a review of relevant genomic studies in crustaceans and other taxa. Reviews in Aquaculture. Vol. 5, pp: 77-110.
۲۴. **Khanjani, M.H.; Sajjadi, M.M.; Alizadeh, M. and Sourinejad, I., 2017.** Nursery performance of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) cultivated in a biofloc system: the effect of adding different carbon sources. Aquaculture Research. Vol. 47, pp: 1491-1501.
۲۵. **Krummenauer, D.; Samocho, T.; Poersch, L.; Lara, G. and Wasielesky, W.Jr., 2014.** The reuse of water on the culture of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in BFT system. Journal of the World Aquaculture Society. Vol. 45, No. 1, pp: 3-14.
۲۶. **Le Boulay, C.; Wormhoudt, A. and Sellos, D., 1996.** Cloning and expression of cathepsin L-like proteinases in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus vannamei* during the



- systems for *Litopenaeus vannamei*. Aquacultural Engineering. Vol. 36, pp: 184-191.
۳۶. **Schveitzer, R.; Arantes, R.; Costódio, P.F.S.; Santo, C.M.D.E.; Arana, L.V.; Seiffert, W.Q. and Andreatta, E.R., 2013.** Effect of different biofloc levels on microbial activity, water quality and performance of *Litopenaeus vannamei* in a tank system operated with no water exchange. Aquacultural Engineering. Vol. 56, pp: 59-70.
۳۷. **Standard methods for the examination of water and waste water. 2005.** American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation.
۳۸. **Turk, B.; Turk, D. and Turk, V., 2000.** Lysosomal cysteine protease: more than scavengers. Biochimica et Biophysica Acta. Vol. 1477, pp: 98-111.
۳۹. **Xu, W.J. and Pan, L.Q., 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.
۴۰. **Xu, W.J. and Pan, L.Q., 2013.** Enhancement of immune response and antioxidant status of *Litopenaeus vannamei* juvenile in biofloc-based culture tanks manipulating high C/N ratio of feed input. Aquaculture. Vol. 412-413, pp: 117-124.
۴۱. **Zhang, J.; Liu, Y.J.; Tian, L.X.; Yang, H.J.; Ling, G.Y.; Yue, Y.R. and Xu, D.H., 2013.** Effects of dietary astaxanthin on growth, antioxidant capacity and gene expression in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Nutrition laboratory, Institute of Aquatic Economical Animals, School of Life Science, Sun Yat-sen University, Guangzhou, China.
۴۲. **Zhao, Q.; Pan, L.; Ren, Q. and Hu, D., 2015.** Digital gene expression analysis in hemocytes of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* in response to low salinity stress. Fish & Shellfish Immunology. Vol. 42, pp: 400-407.
۴۳. **Zokaefar, H.; Luis Balcázar, J.; Roos Saad, C.; Salleh Kamarudin, M.; Sijam, K.; Arshad, A. and Nejat, N., 2012.** Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 33, pp: 683-689.

