شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۷۶، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۲
صفحات ۲۷۸-۲۶۵

اثر دستکاری نسبت کربن به نیتروژن (C/N) بر عملکرد رشد، پاسخ ایمنی و شاخص استرس ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در مواجه حاد با استرس آمونیاک در سیستم بیوفلاک

بهزاد قولجائی[۱]، حسین آدینه[۲]*، محمد هرسیج[۳]، سیده آیناز شیرنگی[۴]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گلستان، ایران
۲. استادیار گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گلستان، ایران
۳. دانشیار گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گلستان، ایران
۴. استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه و فنی و مهندسی، دانشگاه گنبد کاووس، گلستان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۱۵

چکیده

فناوری بیوفلاک یک فناوری جدید است که می‌تواند تولید آبزی‌پروری را بهبود بخشد و اهداف آبزی‌پروری پایدار را دنبال کند. در این آزمایش چهار سطح نسبت C/N بر کیفیت آب، عملکرد رشد، پاسخ ایمنی ماهی کپور معمولی (وزن اولیه ۰/۵۳±۱۱/۷۵ گرم) پرورش یافته در شرایط بیوفلاک بررسی شد. چهار سطح از نسبت‌های C/N، با استفاده از افزودن منبع کربن (شکر) ۱۰، ۱۵ و ۲۰ و شاهد بدون افزودن کربن (گروه شاهد با ۵۰-۴۰ درصد تعویض آب روزانه) از تیمارهای آزمایشی تشکیل شد. پس از ۸ هفته، ماهیان به‌مدت ۶ ساعت تحت استرس آمونیاک حاد (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) قرار گرفتند. قبل و بعد از مواجه با آمونیاک شاخص‌های استرس مانند گلوکز و کورتیزول سنجش و مورد مقایسهٔ آماری قرار گرفتند. غلظت نیتروژن آمونیاکی کل (TAN) در C10 به‌طور معنی‌داری بالاتر بود. رشد ماهی در C15 به‌طور معنی‌داری بیشتر بود در حالی‌که ضریب تبدیل غذایی از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نداشت. فعالیت‌های ایمونوگلوبولین، لیزوزیم و ACH50 سرم در گروه‌های C/N به‌طور معنی‌داری بالاتر از شاهد بود. شاخص‌های استرس (گلوکز و کورتیزول) قبل از قرار گرفتن در معرض تغییر معنی‌داری نشان ندادند، در حالی‌که پس از استرس آمونیاکی، سطح آن‌ها در همهٔ گروه‌ها افزایش یافت و بالاترین سطح در گروه شاهد مشاهده شد. به‌طور کلی، محیط بیوفلاک (دستکاری C/N) اثر ضد استرس داشته و پرورش ماهی کپور معمولی در سیستم بیوفلاک با کمترین مقدار تعویض آب توصیه می‌شود.

کلیدواژه‌ها: ماهی کپور، بیوفلاک، آمونیاک، نشانگرهای استرس

* نویسنده مسئول: حسین آدینه
Email: adineh.h@gonbad.ac.ir

Journal of Fisheries
Vol. 76, No. 2, Summer 2023
pp. 265-278

Effect of carbon and nitrogen ratio (C:N) manipulation on growth performance, immune response and stress index of common carp (*Cyprinus carpio*) acute exposure to ammonia stress in biofloc system

Behzad Qoljaei[1], Hossein Adineh[2*], Mohammad Hersij[3], Seyedah Ainaz Shirangi[4]

1. M.Sc. Student of Fisheries, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavos University, Golestan, Iran
2. Assistant Professor of Fisheries Department, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavos University, Golestan, Iran
3. Associate Professor of Fisheries Department, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavos University, Golestan, Iran
4. Assistant Professor of Biology Department, Faculty of Basic and Technical and Engineering Sciences, Gonbad Kavos University, Golestan, Iran

Received: 10-Jan-2023 **Accepted: 06-Mar-2023**

Abstract

Biofloc is a novel technology that can improve aquaculture production and also pursue sustainable aquaculture goals. In this experiment, the impact of the different C/N ratios on water quality, growth performance and immune response of *Cyprinus carpio* (initial weight; 11.75±0.53g) reared under biofloc conditions were investigated. Four levels of C/N ratios, using the addition of a carbon source (sugar), 10, 15 and 20 and the control without adding carbon (Control group with 40-50% daily water exchange) were consisted of the experimental treatments. After 8 weeks, fish were subjected to acute ammonia stress (0.5mg/L) for 6 hrs. Stress indicators such as glucose and cortisol were measured and statistically compared before and after exposure to ammonia. Total ammonia nitrogen (TAN) concentration was significantly higher in C10. The growth of fish was significantly higher in C15 while the feed conversion ratio had no statistically significant difference. Serum immunoglobulin, lysozyme, ACH50 activities were significantly higher in the C/N groups than in the control. Stress indicators (glucose and cortisol) showed no significant change before exposure, while after ammonia stress, their levels increased in all groups and the highest level was observed in the control group. Overall, biofloc (C/N manipulation) had an anti-stress effect, and the culture of common carp in the biofloc system with the lowest daily water exchange could be recommended.

Keywords: Common carp, Biofloc, Ammonia, Stress biomarkers

∗ Corresponding author: Hossein Adineh Email: adineh.h@gonbad.ac.ir

۱. مقدمه

بروز استرس در محیط پرورش ماهی منجر به واکنش فیزیولوژیکی در جهت حفظ بقاء می‌شود. اولین پاسخ ماهی در برابر استرس نیز تحریک محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-فوق کلیه و ترشح هورمون آدرنوکورتیکوئید و در نتیجه آزاد شدن کاتکول آمین‌ها به داخل خون در جهت افزایش سطح کورتیزول خون می‌باشد (Barton, 2002). یکی از عوامل استرس‌زا در محیط پرورش آبزیان وجود ترکیبات نیتروژنی مانند آمونیاک کل (TAN) است که به دو شکل مولکولی یا غیریونیزه (NH_3) و فرم یونیزه یا آمونیوم (NH_4^+) مشاهده می‌شود (Mugnier *et al*., 2008). مواد نیتروژنی از طریق اکسیداسیون مواد آلی نیتروژن‌دار نظیر پروتئین‌ها، تجزیهٔ فضولات و آمونیاک دفعی ماهیان تولید می‌شوند که تحت تأثیر مستقیم درجه حرارت، pH و دی‌اکسید کربن قرار می‌گیرند (Boyd and Tucker, 2012).

بیوفلاک روش افزایش کیفیت آب از طریق افزودن کربن است که در صورت تنظیم و متعادل‌سازی در محدودهٔ ۱۰ تا ۲۰ (Asaduzzaman *et al*., 2008) می‌تواند منجر رشد باکتری‌های هتروتروف و تبدیل عناصر نیتروژن‌دار به پروتئین میکروبی شود که به‌عنوان غذای ماهی مورد استفاده قرار می‌گیرد (De Schryver *et al*., 2008). در این سیستم پرورشی، باکتری‌های نیتریفیکاسیونی نیز آمونیاک سمی را به ترکیبات نسبتاً سمی نیتراتی تبدیل می‌کنند و باکتری‌های هتروتروفیک به‌طور مستقیم نیتروژن آمونیاکی را به‌طور مستقیم هضم و بدین‌صورت حذف آمونیاک از آب انجام می‌شود (Browdy *et al*., 2012). به‌منظور حفظ و ازدیاد جمعیت باکتری‌های هتروتروفیک بایستی منابع کربن که به‌عنوان غذای باکتری‌ها محسوب می‌شود به‌مقدار کافی در آب وجود داشته باشد. در محیط بیوفلاک از منابع کربنی استفاده می‌شود که دارای هزینهٔ کم، قابلیت دسترسی آسان، قابلیت تجزیهٔ زیستی و کارایی هضم بالا توسط باکتری‌ها داشته باشند از این‌رو ملاس، گلیسرول، ساکارزو و آرد محصولات گیاهی (گندم، جو، ذرت، برنج) معرفی می‌گردند (Asaduzzaman *et al*., 2008; Adineh *et al*., 2019).

از گونه‌های کاندیدی برای پرورش در سیستم بیوفلاک می‌توان به میگوهای آب شور و شیرین، ماهی تیلاپیا، ماهی کپور اشاره کرد. ماهی کپور معمولی با نام علمی (*Cyprinus carpio* L., 1758) جزء ماهیان اقتصادی در ایران محسوب می‌شود. این گونه به‌علت دارا بودن رژیم غذایی همه‌چیزخواری و کفزی‌خواری، تحمل نوسانات دمایی و اکسیژن، به‌عنوان گونهٔ مهم اقتصادی در سیستم بیوفلاک پرورش داده می‌شود. از آنجا که نسبت C/N نقش کلیدی در تحریک رشد زیست‌تودهٔ باکتریایی هتروتروفی در سیستم بیوفلاک دارد (Avnimelech, 1999). در حالی‌که بیشتر تحقیقات گزارش شده در سیستم بیوفلاک بر انتخاب منابع کربن و نسبت C/N متمرکز شده است، اثرات احتمالی فلاک تولید شده بر سمیت کوتاه مدت آمونیاک هنوز به‌درستی درک نشده است. با توجه به این واقعیت که ماهیان پرورش یافته در سیستم بیوفلاک بستگی به کارآمدی جمعیت میکروبی به‌طور مداوم در معرض سطوح بالای آمونیاک قرار دارند، بنابراین هدف از اجرای این پژوهش، بررسی واکنش فیزیولوژیکی سیستم ایمنی ماهی کپور معمولی در برابر استرس حاد آمونیاک در سیستم بیوفلاک با نسبت‌های مختلف کربن به نیتروژن (C/N) بود.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

ماهی کپور معمولی با میانگین وزن ۰/۵۳± ۱۱/۷۵ گرم تهیه و جهت سازگاری با شرایط محیط نگهداری به آزمایشگاه شیلات دانشگاه گنبد کاووس انتقال یافت. ۱۰ روز بعد از سازگاری، مجموع ۲۱۶ قطعه ماهی در ۴ گروه آزمایشی (هر یک با ۳ تکرار) جایابی و به‌مدت ۸ هفته نگهداری شدند.

۲.۲. محیط حاوی فلاک میکروبی

برای ایجاد محیط حاوی فلاک به‌منظور پرورش ماهی کپور معمولی، ماهیان در همهٔ مخازن روزانه به‌میزان

به‌میزان ۲/۵ درصد وزن بدن با غذای فرموله شده توسط نرم‌افزار جیره‌نویسی UFFDA حاوی ۳۰ درصد پروتئین تغذیه شدند (جدول ۱). به‌منظور تنظیم کربن در محیط بیوفلاک به‌صورت روزانه از منبع کربنی شکر (۹۹ درصد کربن) استفاده گردید (Adineh *et al*., 2019). برای تسریع در افزایش باکتری‌های نیتروفایر و تولید فلاک در کمترین زمان از شکر استفاده شد (Hargreaves, 2013). در این پژوهش ماهیان در سه گروه آزمایشی با نسبت‌های کربن به نیتروژن (C/N) به‌ترتیب ۱۰، ۱۵ و ۲۰ در سیستم بیوفلاک و یک تیمار شاهد بدون فلاک (آب تمیز) به‌مدت ۵۶ روز نگهداری شدند (Haghparast *et al*., 2020). برای محاسبهٔ مقدار نیتروژن از رابطهٔ ۳۵ =۶/۲۵× N استفاده شد. براساس مقدار نیتروژن محاسباتی به‌دست آمده برای تیمارهای آزمایشی به‌ترتیب ۱۰، ۱۵ و ۲۰ برابر منبع کربنی (شکر) استفاده شد (Adineh *et al*., 2019). مقادیر تبخیر ناشی از گرمای محیط آزمایشگاه در تیمارهای آزمایشی بیوفلاکی با افزودن آب تمیز جبران شد.تعویض آب روزانه تیمارهای بیوفلاک حدود ۴ درصد و تعویض آب روزانه تیمار شاهد بدون فلاک به‌مقدار ۵۰-۴۰ درصد انجام شد.

جدول ۱- اجزای تشکیل‌دهنده و آنالیز تقریبی جیرهٔ فرموله شده

اقلام غذایی	گرم بر کیلوگرم غذا	آنالیز تقریبی غذا	درصد
پودر ماهی	۱۱۰	مادهٔ خشک	۸۵/۸۷
پودر گوشت	۸۰	پروتئین (٪)	۳۰/۳۷
کنجالهٔ سویا	۲۳۰	چربی	۴/۹۰
آرد گندم	۴۶۹	خاکستر	۴/۷۶
پودر ذرت	۷۵		
روغن ماهی	۷		
روغن سویا	۷		
لیزین	۷		
متیونین	۵		
مکمل ویتامینه	۵		
مکمل معدنی	۵		

۳.۲. کیفیت آب

پارامترهای کیفی آب مانند درجه حرارت آب، شوری، میزان اکسیژن محلول و هدایت الکتریکی توسط دستگاه پرتابل (Hach, D40 model, USA) کیفیت‌سنج آب اندازه‌گیری شد. میزان pH آب با استفاده از pH متر سنجش (PH متر مدل ۸۲۷ کمپانی متروم سوئیس) و قلیائیت به روش تیتراسیون و غلظت آمونیاک کل، نیترات و فسفات با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر براساس استاندارد آزمایشگاه سنجش شد (APHA, 1998). حجم فلاک توسط قیف ایمهوف مشاهده و ثبت گردید.

۴.۲. شاخص‌های رشد و تغذیه

پایان آزمایش با اندازه‌گیری وزن ماهی توسط ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۱ و طول کل ماهی به‌وسیله تخته زیست‌سنجی با دقت ۰/۱ سانتی‌متر و بکارگیری فرمول‌های زیر برخی از شاخص‌های رشد و تغذیه محاسبه گردید (Adineh *et al*., 2021):

افزایش وزن (WG, g) =
میانگین وزن نهایی (گرم)- میانگین وزن اولیه (گرم)

ضریب رشد ویژه ($SGR, \%.day^{-1}$) =
((ln وزن نهایی (گرم)-ln وزن اولیه (گرم))/مدت‌زمان پرورش (روز))× ۱۰۰

= ضریب چاقی (CF)
(وزن نهایی (گرم)/توان سوم طول کل ماهی (سانتی‌متر))× ۱۰۰

= ضریب تبدیل غذایی (FCR)
[مقدار غذای مصرف‌شده (گرم)/(وزن نهایی (گرم)-وزن اولیه (گرم))]

= کارایی تبدیل غذا (FCE, %)
(وزن به‌دست آمده (گرم)/مقدار غذای مصرف شده (گرم))× ۱۰۰

۵.۲. استرس آمونیاک

پس از ۵۶ روز دورهٔ نگهداری ماهی کپور در تیمارهای مختلف کربن به نیتروژن (C/N)، ماهیان در همهٔ تیمارها (۹ ماهی از هر تکرار) براساس مقادیر دما و pH در معرض ۵ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک غیریونیزه حاد به‌مدت ۶ ساعت قرار گرفتند (Taheri Mirghaed *et al*., 2019; Yousefi *et al*., 2020; Ahmadifar *et al*., 2022).

۶.۲. سنجش فاکتورهای ایمنی و شاخص‌های استرس

در این آزمایش، به‌منظور سنجش برخی از پارامترهای ایمنی و استرس ماهی کپور معمولی در سیستم بیوفلاک، تعداد ۳ قطعه ماهی به‌طور تصادفی از هر تکرار صید و پس از بیهوشی با استفاده از سرنگ ۲ سی‌سی از ورید ساقهٔ دمی عمل خون‌گیری انجام شد. برای جداسازی سرم، لوله‌های سرولوژی فاقد مادهٔ ضد انعقاد در دستگاه سانتریفیوژ یخچال‌دار با سرعت ۵۰۰۰ دور در ثانیه به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتیریفوژ شد و تا زمان شروع آزمایشات سرم خون در دمای ۸۰- درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند (Adineh *et al*., 2021).

میزان ایمنوگلوبولین کل توسط کیت مخصوص به روش کدورت‌سنجی و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد. برای تعیین میزان فعالیت لیزوزیم سرم از روش ارائه‌شده توسط Ellis (۱۹۹۰) استفاده شد. مقدار ۲۵ میکرولیتر از نمونه به پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای شکل الایزا افزوده شد. سپس مقدار ۱۷۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی میکروکوکوس لیزودیکتیکوس (*Micrococcus Lysodeikticus*) در غلظت ۰/۰۲ میلی‌گرم در لیتر در ۰/۵ مولار بافر فسفات با pH ۶/۲ اضافه شد. با استفاده از دستگاه الایزاریدر Bio-Tek آمریکا جذب نوری اولیه در طول‌موج ۵۳۰ nm قرائت و پس از یک‌ساعت نگهداری در دمای اتاق، مجدداً جذب نوری اندازه‌گیری شد. هر واحد از فعالیت لیزوزیم براساس کاهش جذب (۰/۰۰۱ در دقیقه) تعیین شد. فعالیت مکمل alternative (ACH_{50}) به روش Sunyer و Tort (۱۹۹۵) تعیین شد، بدین‌منظور فعالیت مکمل بر اساس همولیز گلبول‌های قرمز خرگوش اندازه‌گیری گردید. گلبول‌های قرمز خرگوش سه مرتبه با بافر اتیلن گلیکول تترا استیک اسید-منیزیوم-ژلاتین ورنال شسته شده و تعداد سلول‌های آن به کمک لام نئوبار در هر میلی‌لیتر بافر ۲×۱۰^{۸} سلول در میلی‌لیتر تنظیم شد. ابتدا جذب نوری لیز ۱۰۰ درصد گلبول‌های قرمز خرگوش با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون فوق به ۳/۴ میلی‌لیتر آب مقطر تعیین و سپس نمونه‌های سرم ۱۰۰ برابر با بافر فوق، رقیق شده و حجم‌های متفاوتی از آن در لولهٔ آزمایش استریل تهیه و حجم همش لوله‌ها به کمک بافر به ۲۵۰ میکرولیتر رسانده شد. سرانجام به لوله‌ها ۱۰۰ میکرولیتر گلبول قرمز خرگوش اضافه و مخلوط فوق در دمای ۲۰ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۹۰ دقیقه قرار داده شده و در پایان به هر کدام از لوله‌ها ۳/۱۵ میلی‌لیتر محلول ۰/۸۵ درصد کلرید سدیم افزوده می‌شود. سپس لوله‌ها در ۱۶۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد سانتریفیوژ شده و جذب نوری محلول رویی در طول موج ۴۱۴ نانومتر قرائت گردید. قبل و بعد از استرس آمونیاک مقادیر گلوکز و کورتیزول سرم خون به روش ذیل آنالیز شد. غلظت گلوکز با استفاده از کیت تشخیصی شرکت پارس آزمون براساس دستورالعمل شرکت سازنده و با استفاده از دستگاه آنالیزور بیوشیمیایی خودکار اندازه‌گیری شد (Borges *et al*., 2004). غلظت کورتیزول سرم با استفاده از کیت آزمایشگاهی به روش ELISA تعیین شد.

۷.۲. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

ابتدا نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون Shapiro-Wilk بررسی خواهد شد. برای مقایسهٔ آماری میانگین تیمارها از آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و برای بررسی وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین تیمارهای مختلف آزمایشی از روش دانکن در سطح اطمینان ۰/۰۵ استفاده می‌شود ($P<0/05$). برای بررسی اثر متقابل نسبت کربن به نیتروژن (قبل استرس) و بعد از مواجهه با آمونیاک (بعد از استرس) از آنالیز واریانس دوطرفه (Two-way ANOVA) استفاده می‌گردد. رسم نمودار و تجزیه و تحلیل داده‌ها در محیط ویندوز به‌ترتیب با استفاده از نرم‌افزار Excel نسخهٔ ۲۰۱۶ و SPSS نسخهٔ ۱۶ انجام خواهد شد.

۳. نتایج

نتایج آنالیز کیفیت آب ماهی کپور پروش یافته با سطوح مختلف کربن به نیتروژن در مقایسه با تیمار شاهد در جدول ۲ ارائه شده است. غلظت اکسیژن محلول، شوری و pH بین تیمارهای بیوفلاکی در مقایسه با تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار آماری داشتند ($P<0/05$)، درحالی‌که نسبت‌های کربن به نیتروژن بر مقادیر فاکتورهای ذکر شده تأثیر معنی‌داری نداشتند ($P<0/05$). مقدار آمونیاک کل در تیمار C10 در مقایسه با دیگر تیمارهای آزمایشی افزایش معنی‌دار آماری داشت ($P<0/05$). نیترات در تیمار شاهد آب تمیز C0 در مقایسه با تیمارهای بیوفلاک افزایش معنی‌دار آماری داشت ($P<0/05$). در تیمارهای بیوفلاک با نسبت‌های ۱۵ و ۲۰ کربن به نیتروژن (C15 و C20) نیز حجم فلاک افزایش آماری نشان داد ($P<0/05$).

جدول ۲- نتایج سنجش کیفیت آب (میانگین±انحراف معیار) محیط بیوفلاک حاوی سطوح ۱۰، ۱۵ و ۲۰ نسبت کربن به نیتروژن (C/N) در مقایسه با تیمار شاهد آب تمیز

	C0	C10	C15	C20
درجه حرارت (سانتی‌گراد)	۲۳/۹۲ ±۰/۰۷^{b}	۲۴/۷۲ ±۰/۲۴^{a}	۲۴/۳۱ ±۰/۳۷^{ab}	۲۴/۲۳ ±۰/۳۹^{ab}
اکسیژن (میلی‌گرم در لیتر)	۶/۳۱ ±۰/۲۳^{a}	۵/۹۶ ±۰/۲۸^{ab}	۶/۱۰ ±۰/۱۹^{ab}	۵/۷۸ ±۰/۳۰^{b}
شوری (گرم در لیتر)	۰/۴۱ ±۰/۰۱۰^{b}	۰/۴۵ ±۰/۰۱۷^{a}	۰/۴۵ ±۰/۰۲۰^{a}	۰/۴۶ ±۰/۰۱۰^{a}
pH	۷/۳۸ ±۰/۰۸^{b}	۷/۸۷ ±۰/۱۱^{a}	۷/۶۹ ±۰/۱۰^{a}	۷/۶۵ ±۰/۱۴^{a}
آمونیاک (میلی‌گرم در لیتر)	۰/۱۹ ±۰/۰۰۷^{c}	۱/۱۳ ±۰/۰۱۰^{a}	۰/۸۱ ±۰/۰۹۲^{b}	۰/۹۵ ±۰/۰۸۳^{b}
نیترات (میلی‌گرم در لیتر)	۲/۹۰ ±۰/۱۷^{b}	۸/۲۲ ±۰/۹۴^{a}	۹/۱۶ ±۱/۱۵^{a}	۹/۶۵ ±۰/۹۹^{a}
حجم فلاک (میلی‌لیتر در لیتر)	۲/۱۰ ±۰/۱۴^{c}	۱۲/۲۰ ±۱/۱۷^{b}	۱۶/۱۰ ±۰/۹۶^{a}	۱۷/۱۳ ±۲/۲۰^{a}
فسفات (میلی‌گرم در لیتر)	۰/۱۴ ±۰/۰۱۱^{a}	۰/۷۵ ±۰/۰۵۸^{b}	۰/۸۷ ±۰/۰۸۳^{b}	۱/۰۰ ±۰/۰۸۹^{a}
کل مواد جامد معلق (میلی‌گرم در لیتر)	۴۱۹/۷۷ ±۴۰/۹۰^{b}	۵۰۲/۰۰ ±۳۴/۸۲^{a}	۴۹۳/۳۹ ±۳۳/۳۰^{a}	۵۰۶/۸۵ ±۲۸/۱۵^{a}
قلیائیت (میلی‌گرم در لیتر کربنات کلسیم)	۲۹۵/۸۰ ±۱۷/۰۰^{b}	۳۶۸/۵۲ ±۳۱/۷۹^{a}	۳۸۳/۲۷ ±۳۰/۲۰^{a}	۳۸۰/۰۰ ±۳۴/۶۴^{a}
هدایت الکتریکی (میکروزیمنس بر سانتی‌متر)	۸۷۲/۰۰ ±۵۰/۲۶^{b}	۱۰۶۴/۰ ±۱۲۶/۴۵^{a}	۱۰۵۵/۷ ±۱۰۰/۳۲^{a}	۱۰۴۸/۴ ±۶۷/۷۹^{a}

حروف انگلیسی غیر مشابه در هر ردیف نشان‌دهندهٔ وجود اختلاف معنی‌دار آماری بین تیمارهای آزمایشی است ($P<0/05$).
تیمارهای آزمایشی شاهد آب تمیز (C0)، نسبت‌های کربن به نیتروژن ۱۰، ۱۵ و ۲۰ به‌ترتیب (C10، C15 و C20)

پارامترهای رشد و تغذیهٔ ماهی کپور پرورش یافته با نسبت کربن به نیتروژن ۱۰، ۱۵ و ۲۰ در مقایسه با تیمار شاهد بدون کربن در جدول ۳ ارائه شده است. در زمان شروع آزمایش وزن اولیه ۰/۵۳± ۱۱/۷۵ گرم بدون اختلاف معنی‌دار بود ($P>0/05$). اگرچه بین تیمارهای مختلف آزمایشی اختلاف معنی‌دار آماری وجود نداشت

($P>۰/۰۵$)، اما بیشترین آن در تیمار C15 مشاهده شد. نرخ رشد ویژه در تیمارهای C10 و C15 در مقایسه با دیگر تیمارها افزایش نشان داد. ضریب چاقی بین تیمارهای بیوفلاک حاوی نسبت‌های مختلف کربن به نیتروژن و تیمار شاهد بدون کربن، اختلاف معنی‌دار آماری نداشت ($P>۰/۰۵$). بهره‌وری غذایی مانند ضریب تبدیل غذایی و کارایی تبدیل غذا در تیمارهای مختلف آزمایشی حاوی سطوح ۰، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ اختلاف معنی‌دار آماری نداشت ($P>۰/۰۵$).

جدول ۳- عملکرد رشدو تغذیه (میانگین±انحراف معیار) ماهی کپور معمولی پرورش یافته در سطوح مختلف کربن به نیتروژن (C:N) به‌مدت ۵۶ روز

	C0	C10	C15	C20
وزن اولیه (گرم)	۱۱/۹۲ ±۰/۵۶	۱۱/۵۴ ±۰/۴۷	۱۱/۴۶ ±۰/۵۷	۱۲/۱۰ ±۰/۵۵
وزن نهایی (گرم)	۱۹/۶۵ ±۱/۲۶^{ab}	۲۰/۲۱ ±۱/۲۳^{ab}	۲۰/۵۴ ±۱/۱۳^{a}	۱۸/۶۸ ±۰/۹۲^{b}
افزایش وزن (درصد)	۶۵/۲۷ ±۱۴/۳۳	۷۵/۶۳ ±۱۶/۱۸	۷۹/۱۵ ±۶/۱۷	۶۲/۴۹ ±۸/۴۵
نرخ رشد ویژه (درصد/روز)	۰/۸۹ ±۰/۱۵^{ab}	۰/۹۹ ±۰/۱۶^{a}	۱/۰۴ ±۰/۰۶^{a}	۰/۷۷ ±۰/۱۴^{b}
ضریب چاقی	۱/۴۹ ±۰/۰۴	۱/۵۲ ±۰/۰۳	۱/۵۵ ±۰/۱۱	۱/۴۵ ±۰/۰۸
ضریب تبدیل غذایی	۱/۷۳ ±۰/۳۳	۱/۴۹ ±۰/۲۷	۱/۴۰ ±۰/۱۰	۱/۷۴ ±۰/۲۱
کارایی تبدیل غذا (درصد)	۵۹/۱۷ ±۱۰/۶۴	۶۸/۹۳ ±۱۲/۳۱	۷۱/۳۰ ±۵/۵۵	۵۸/۰۷ ±۶/۹۱

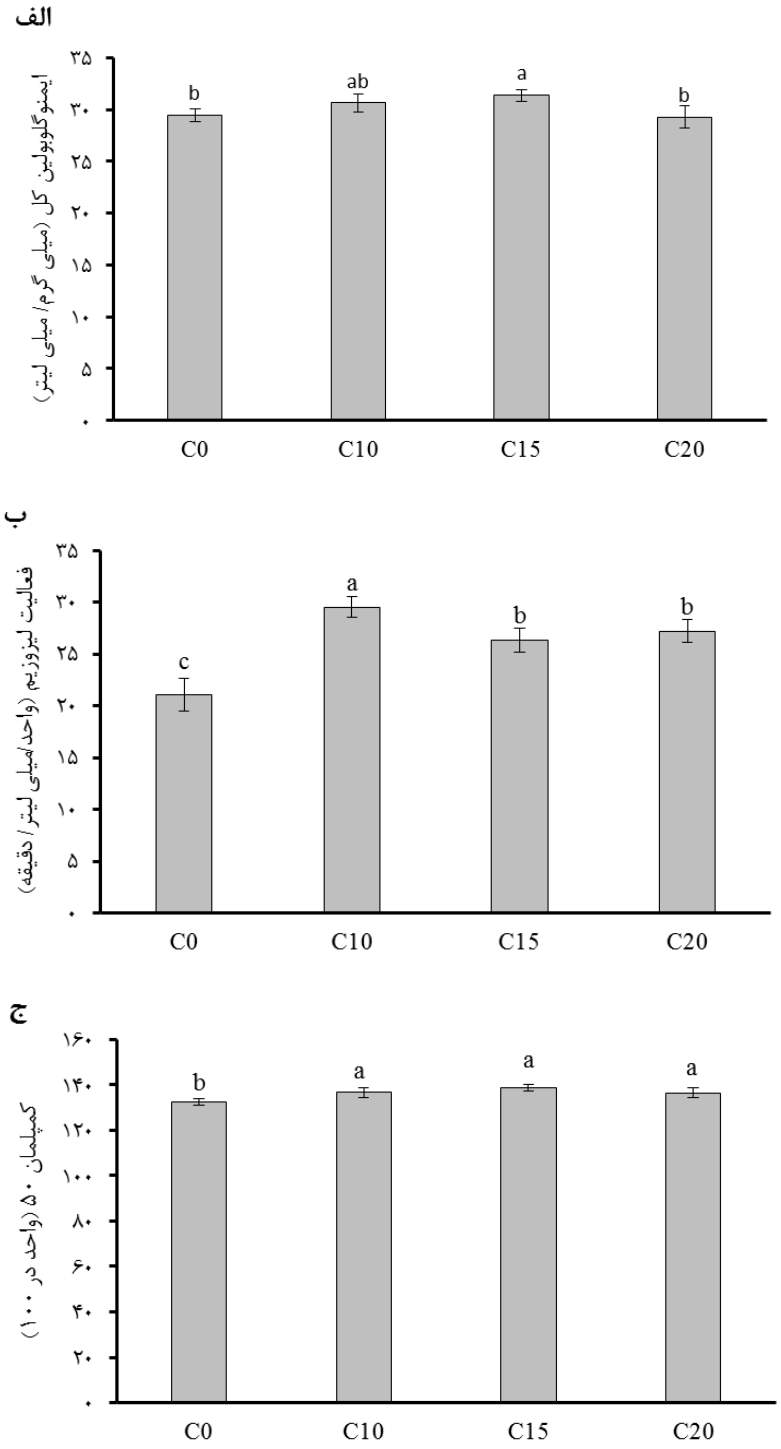
حروف انگلیسی غیر مشابه در هر ردیف نشان‌دهندهٔ از وجود اختلاف معنی‌دار آماری بین تیمارهای آزمایشی است ($P<۰/۰۵$).
تیمارهای آزمایشی شاهد آب تمیز (C0)، نسبت‌های کربن به نیتروژن ۱۰، ۱۵ و ۲۰ بترتیب (C10، C15 و C20)

آنالیز پارامترهای ایمنی سرم خون ماهی کپور پروش‌یافته با نسبت‌های مختلف کربن به نیتروژن در سیستم بیوفلاک در شکل ۱ ارائه شده است. مقایسهٔ آماری میانگین غلظت ایمنوگلوبولین کل بین تیمارهای آزمایشی نشان از افزایش معنی‌دار آماری ایمنوگلوبولین کل در تیمار C15 بود ($P<۰/۰۵$). فعالیت لیزوزیم در تیمارهای آزمایشی تفاوت آماری داشت ($P<۰/۰۵$)، به‌طوری‌که بیشترین آن در تیمار C10 و کمترین مقدار آن در تیمار C0 به‌دست آمد. فعالیت کمپلمان ۵۰ بین تیمار CO با دیگر تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌دار آماری داشت ($P<۰/۰۵$)، درحالی‌که نسبت‌های مختلف کربن به نیتروژن بر مقادیر کمپلمان ۵۰ اثر معنی‌داری نداشت ($P>۰/۰۵$).

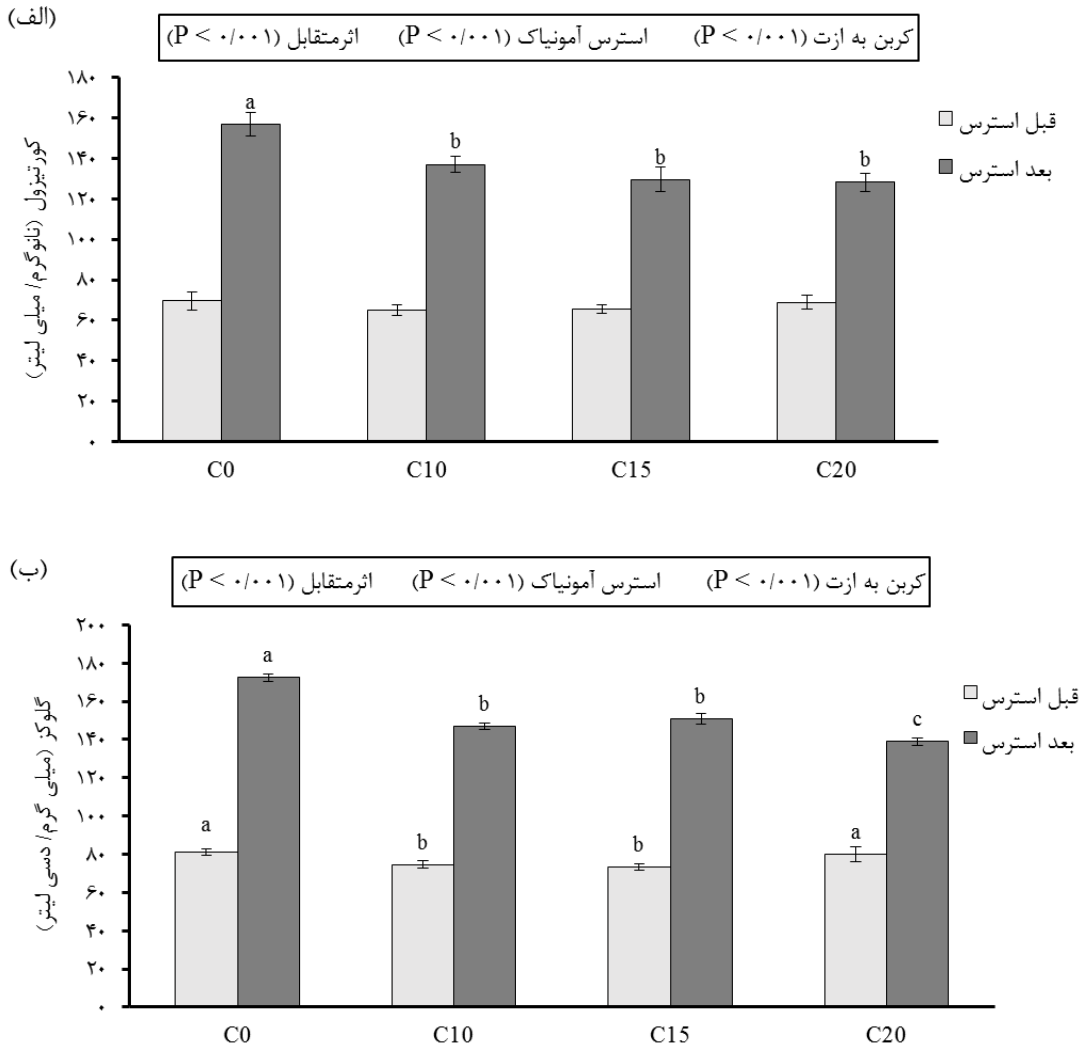
مقادیر شاخص‌های استرس مانند کورتیزول (الف) و گلوکز (ب) سرم خون ماهی کپور معمولی پروش‌یافته در نسبت‌های مختلف کربن به نیتروژن سیستم بیوفلاک در شکل ۲ ارائه شده است. نتایج به‌دست آمده از آنالیز واریانس یک‌طرفه غلظت کورتیزول سرم خون ماهی با نسبت‌های مختلف کربن به نیتروژن نشان داد که غلظت این فاکتور بین تیمارهای آزمایشی تفاوت آماری وجود ندارد ($P>۰/۰۵$)، در حالی‌که بعد از استرس با آمونیاک مقایسهٔ میانگین‌ها نشان از افزایش معنی‌دار آماری غلظت کورتیزول در تیمار شاهد آب تمیز در مقایسه با تیمارهای بیوفلاک بود ($P<۰/۰۵$). آنالیز واریانس دوطرفه نشان داد که به‌طور مجزا نسبت‌های کربن به نیتروژن (C/N) و استرس آمونیاک می‌تواند بر غلظت کورتیزول سرم خون اثر معنی‌دار داشته باشد ($P<۰/۰۵$). همچنین دو عامل نسبت کربن به نیتروژن (C/N) و استرس آمونیاک بر مقادیر کورتیزول به‌طور همزمان اثرمتقابل دارند ($P<۰/۰۵$).

نتایج به‌دست آمده از تجزیه واریانس یک‌طرفه غلظت گلوکز سرم خون ماهی پس از ۵۶ روز نگهداری ماهی با نسبت‌های مختلف کربن به نیتروژن ۰ (شاهد آب تمیز)، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ اختلاف آماری معنی‌داری داشت ($P<۰/۰۵$). مقادیر گلوکز بعد از استرس با آمونیاک افزایش نشان داد ($P<۰/۰۵$)، به‌طوری‌که بیشترین مقدار آن در

تیمار شاهد به‌دست آمد. آنالیز واریانس دوطرفه نشان داد که به‌طور مجزا نسبت‌های کربن به نیتروژن (C/N) و استرس آمونیاک می‌تواند بر غلظت گلوکز سرم خون اثر معنی‌دار داشته باشد ($P<۰/۰۵$). همچنین دو عامل نسبت کربن به نیتروژن (C/N) و استرس آمونیاک بر مقادیر کورتیزول به‌طور همزمان اثرمتقابل دارند ($P<۰/۰۵$).



شکل ۱- مقادیر ایمنوگلوبولین کل (الف)، فعالیت لیزوزیم (ب) و فعالیت کمپلمان ۵۰ (ج) سرم خون ماهی پرورش‌یافته در محیط بیوفلاک با نسبت‌های کربن به نیتروژن ۱۰، ۱۵ و ۲۰ به‌ترتیب (C10، C15 و C20) در مقایسه با تیمار شاهد آب تمیز (C0). (حروف انگلیسی غیر مشابه بر روی هر ستون نشان‌دهندهٔ تفاوت معنی‌دار آماری بین تیمارهای آزمایشی است (P<۰/۰۵))



شکل ۲- مقادیر کورتیزول (الف) و گلوکز (ب) سرم خون ماهی پرورش‌یافته در محیط بیوفلاک با نسبت‌های کربن و نیتروژن ۱۰، ۱۵ و ۲۰ به‌ترتیب (C10، C15 و C20) در مقایسه با تیمار شاهد آب تمیز (C0) (حروف انگلیسی غیر مشابه بر روی هر ستون نشان‌دهندهٔ تفاوت معنی‌دار آماری بین تیمارهای آزمایشی است (P <۰/۰۵))

۴. بحث و نتیجه‌گیری نهایی

بکارگیری تکنولوژی بیوفلاک به‌منظور تولید پایدار در صنعت آبزی‌پروری حائز اهمیت می‌باشد. در این سیستم مازاد مواد نیتروژنی توسط باکتری‌های هتروتروفیک مصرف‌شده و آمونیاک از محیط خارج می‌گردد (به‌عبارتی تولید فلاک زیستی اتفاق می‌افتد) بنابراین برای ازدیاد و کنترل جمعیت باکتریایی بایستی نسبت کربن به نیتروژن (C/N) در سطح بالا حفظ شود تا کیفیت آب در حد مطلوب برای پرورش باقی ماند (Avnimelech, 2007; Emerenciano *et al*., 2012). نتایج مطالعهٔ حاضر در ارتباط با کیفیت آب نشان داد که با افزایش تعویض آب در تیمار شاهد در مقایسه با تیمارهای بیوفلاکی با محدودیت تعویض آب، مقادیر غلظت اکسیژن کاهش و مقادیر شوری و pH افزایش معنی‌دار آماری داشت. در همین راستا، Azimi و همکاران (۲۰۱۷) گزارش دادند که بکارگیری که نسبت کربن به نیتروژن ۱۵ به ۱ در

سیستم بیوفلاک برای پرورش ماهی کپور معمولی می‌تواند باعث بهبود کیفیت آب و همچنین کاهش مصرف آب گردد.

غلظت آمونیاک کل در تیمارهای بیوفلاک C15 و C20 در مقایسه با تیمار C10 کاهش معنی‌دار آماری داشت. این نتایج نشان می‌دهد که باکتری‌های نیتروفایر در تیمارهای با مقادیر نسبت کربن به نیتروژن ۱۵ و ۲۰ در مقایسه با تیمار ۱۰ فعالیت بیشتری دارند و این بدین معناست که باکتری‌های هتروتروف که در اثر افزایش نسبت C:N تشکیل می‌شوند، می‌توانند نیتروژن آمونیاکی را از آب جذب کنند که به نوبهٔ خود باعث افزایش بیشتر تشکیل بیوفلوک می‌شود (De Schryver *et al*., 2008; Avnimelech, 2009). مشابه با نتایج ما، گزارش شده است که کیفیت آب محیط پرورش گربه ماهی آفریقایی (*Clarias gariepinus*) در نسبت کربن به نیتروژن ۱۵ (C/N15) در مقایسه با دیگر نسبت‌های ۱۰، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ با استفاده از از منبع کربن ملاس بهبود یافت (Bakar *et al*., 2015). همچنین براساس نتایج به‌دست آمده از بررسی اثرات نسبت کربن به نیتروژن (C/N) به‌میزان ۱۱، ۱۵، ۱۹، ۲۳ و شاهد برابر ۷ (بدون افزودن کربوهیدرات) در غذای ماهی کپور سرگنده (*Aristichtys nobilis*)، کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) و کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در سیستم بیوفلاک با حداقل تبادل آب مشخص شد که با افزایش نسبت C/N کیفیت آب محیط پرورش بهبود یافت (Zhao *et al*., 2014). در تیمارهای بیوفلاک با نسبت‌های مختلف کربن به نیتروژن مقادیر غلظت نیترات افزایش معنی‌دار آماری در مقایسه با تیمار شاهد آب تمیز داشت که این افزایش در نتیجه عملکرد مناسب فرآیند نیتریفیکاسیون در تیمارهای بیوفلاکی دانست (Azim and Little, 2008). در مطالعهٔ حاضر کاهش غلظت فسفات در تیمارهای بیوفلاکی C10 و C15 در مقایسه با دیگر تیمارهای آزمایشی کاهش معنی‌دار آماری داشت که این کاهش می‌تواند به‌دلیل جذب فسفات توسط باکتری های هتروتروف در محیط بیوفلاک باشد (Ray and Lotz, 2014).

بیوفلوک منبع تغذیه‌ای خوبی از پروتئین‌ها، لیپیدها، ویتامین‌ها، مواد معدنی، فسفر و پروبیوتیک‌ها برای ماهی‌های پرورشی هستند (Avnimelech, 2007; De Schryver *et al*., 2008). علاوه بر این، بیوفلاک دارای برخی از ترکیبات فعال زیستی مانند کاروتنوئیدها، فیتواستروئیدها، آنزیم‌های میکروبی و آنزیم‌های گوارشی درون‌زا است که می‌تواند هضم غذا را بهبود بخشیده و در نتیجه جذب غذا را افزایش دهد (Najdegerami *et al*., 2016; Adineeh *et al*., 2019). در پژوهش حاضر وزن نهایی ماهی کپور معمولی در تیمار C15 در مقایسه با دیگر تیمارهای آزمایشی افزایش داشت اما اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد. اگرچه در این آزمایش از نظر معیارهای رشد و تغذیه تفاوت معنی‌دار آماری بین تیمارهای بیوفلاکی و تیمار شاهد مشاهده نشد اما یکی از نکات برجسته در این تحقیق کاهش مقدار مصرف آب در تیمارهای بیوفلاکی می‌باشد بنابراین باوجود کاهش تعویض آب در تیمارهای با نسبت‌های مختلف کربن به نیتروژن اما عملکرد رشد وضعیت مطلوبی داشت. همسو با نتایج به‌دست آمده نیز بهبود عملکرد رشد و تغذیه در ماهی کپور معمولی پرورش یافته در محیط بیوفلاک (Haghparast *et al*., 2020; Minabi *et al*., 2020; Adineh *et al*., 2022; Azimi *et al*., 2022; Najdegerami and Tukmechi, 2022) گزارش شده است.

سنجش شاخص‌های ایمنی یکی از راه‌های ارزیابی سلامت آبزیان است. از آنجا که محیط بیوفلاک به‌عنوان یک حاوی فلاک میکروبی و ضد استرس برای ماهی کپور معمولی معرفی شده است (Adineh *et al*., 2019). در مطالعهٔ حاضر، تغییرات نسبت کربن به نیتروژن در محیط بیوفلاک بر مقادیر غلظت فاکتورهای ایمنی سرم خون ماهی کپور تأثیر معنی‌داری نداشت بلکه نتایج نشان داد که پرورش ماهی در محیط بیوفلاک می‌تواند باعث بهبود سیستم ایمنی در مقایسه با تیمار شاهد با آب تمیز شود. در محیط بیوفلاک علاوه بر وجود ترکیبات فعال زیستی به‌عنوان تقویت‌کنندهٔ سیستم ایمنی ماهی، وجود فلاک

باعث شده تا کدورت در محیط زیست به‌وجود آمده و ماهی استتار شود، این امر به آبزی کمک می‌کند تا از دسترس و دید در امان بوده و این خود منجر به حس آرامش و درنتیجه ارتقاء سطح ایمنی در ماهی می‌شود. از سویی، اگر چه تعویض آب باعث تمیز شدن و افزایش اکسیژن آب می‌گردد اما تغییرات دمایی آب که حاصل از تعویض آب زیاد (۴۰ تا ۵۰ درصد) است باعث شده تا ماهی انرژی بیشتری برای برقرار تعادل دمایی مصرف کند بنابراین ممکن است بر پاسخ ایمنی در ماهی اثرات منفی و معکوسی داشته باشد.

آمونیاک به‌عنوان یک ترکیب نیتروژنی سمی که محصول نهایی شکسته شدن پروتئین غذایی آبزیان است، از طریق آبشش‌ها و مدفوع به محیط آبی ترشح می‌شود (Robert *et al*., 1992) و به‌عنوان عامل مضر و بازدارنده در سیستم‌های پرورش آبزیان محسوب می‌گردد (Mirghaed *et al*., 2019). باید توجه داشت که وجود آمونیاک در محیط آبی آبزیان اثرات فیزیولوژیک منفی از جمله کاهش نرخ رشد از طریق کاهش مصرف و کارایی غذا، ذخیرهٔ انرژی، تعادل یونی، اکسیداتیو، تعادل هورمونی، آسیب آبشش، افزایش بیماری داشته (Dosdat *et al*., 2003; Kim *et al*., 2017؛ Sinha *et al*., 2016, 2014) و تجمع زیاد آن ارتباط نزدیکی با استرس اکسیداتیو در ماهی دارد که منجر به تولید رادیکال‌های آزاد می‌گردد (Hegazi *et al*., 2010). گاهی اوقات سطوح آمونیاک به‌دلیل حذف یک گروه آمینه از پروتئین های متابولیک که ۷۰ تا ۹۵ درصد از کل نیتروژن دفع شده را تشکیل می‌دهد، به سطح قابل توجهی در محیط بیوفلاک می رسد (Debbarma *et al*., 2021) که علاوه بر تضعیف سیستم ایمنی ماهی باعث کاهش رشد و مرگ و میر می‌گردد (Mangang and Pandey, 2021).

در این تحقیق، پایان دورهٔ پرورش برای بررسی شاخص‌های استرس، ماهیان نگهداری شده در نسبت‌های مختلف کربن به نیتروژن تحت استرس حاد ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک به‌مدت ۶ ساعت قرار گرفتند. نتایج به‌دست آمده نشان داد که غلظت کورتیزول در تیمارهای مختلف آزمایشی با نسبت‌های مختلف کربن به نیتروژن تفاوت معنی‌دار آماری نداشتند در حالی‌که پس از اعمال استرس آمونیاکی مقادیر کورتیزول در تیمار شاهد در مقایسه با تیمارهای بیوفلاکی افزایش یافت. همسو با نتایج ما گزارش دادند که سیستم بیوفلاک اثر حفاظتی قوی بر پاسخ التهابی ناشی از آمونیاک در محیط پرورش ماهی *Rhynchocypris lagowski* ایجاد می‌کند بنابراین بهترین تیمار برای مقاومت در برابر تنش آمونیاک بکارگیری نسبت ۲۰:۱ کربن به نیتروژن است (Yu *et al*., 2020a). همچنین به‌طور مشابه مشخص شده است که نگهداری ماهی پابدا (*Ompok bimaculatus*) در سیستم بیوفلاک با نسبت C/N (۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵) و سپس قرارگیری در معرض استرس حاد آمونیاک، نه تنها باعث تضعیف سیستم ایمنی نشده بلکه در شرایط C/N20 در مقایسه با دیگر تیمارهای آزمایشی، فلاک‌های میکروبی اثرات حفاظتی در برابر استرس حاد آمونیاک داشته‌اند (Debbarma *et al*., 2021). مشابه مطالعهٔ حاضر، نیز اثر مواجهه حاد با آمونیاک و تغییر در سیستم بیوفلاک بر آنزیم گوارشی، پاسخ التهابی، استرس اکسیداتیو و شاخص‌های ایمنی ماهی *R. lagowski* نشان داد که سیستم بیوفلاک نه تنها می‌تواند عملکرد رشد، فعالیت آنزیم‌های گوارشی و تقویت وضعیت آنتی اکسیدانی را افزایش دهد بلکه پاسخ ایمنی را ارتقا داده و توانایی مقاومت در برابر استرس آمونیاک را بهبود می‌بخشد (Yu *et al*., 2020b). ارزیابی شاخص‌های استرس ماهی کپور در نتیجه دستکاری نسبت کربن به نیتروژن حاکی از آن است که در سیستم بیوفلوک (به‌ویژه نسبت کربن به نیتروژن C/N = 20) شاخص‌های استرس مانند کورتیزول و گلوکز و همچنین پارامترهای ایمنی در وضعیت مناسب‌تری هستند (Haghparast *et al*., 2020)، از این‌رو در تحقیق حاضر نیز وضعیت ایمنی و وضعیت شاخص‌های استرس در تیمارهای بیوفلاک با نسبت‌های کربن به نیتروژن مختلف در مقایسه با تیمار شاهد با آب تمیز بهتر بود.

۵. نتیجه‌گیری نهایی

به‌طور کلی بر اساس نتایج به‌دست آمده می‌توان بیان کرد در تیمار شاهد به‌دلیل تعویض آب بیشتر (۴۰ درصد) مقادیر آمونیاک کمتر از تیمارهای بیوفلاک بود. بهترین عملکرد رشد و تغذیه در تیمارهای C10 و C15 به‌دست آمد. پاسخ ایمنی در تیمارهای بیوفلاک با سطوح مختلف کربن به ازت (دستکاری C/N) در مقایسه با تیمار شاهد افزایش داشت. اگرچه مقادیر شاخص‌های استرس پایان دورهٔ نگهداری در سیستم بیوفلاک اختلاف آماری نداشتند اما بعد از استرس حاد آمونیاک مقادیر آنها در تیمار شاهد افزایش معنی‌داری داشت.

۶. منابع

References

Adineh, H., Naderi, M., Hamidi, M.K., Harsij, M., 2019. Biofloc technology improves growth, innate immune responses, oxidative status, and resistance to acute stress in common carp (*Cyprinus carpio*) under high stocking density. *Fish and Shellfish Immunology* 95, 440-448.

Adineh, H., Naderi, M., Jafaryan, H., Khademi Hamidi, M., Yousefi, M., Ahmadifar, E., 2023. Interactive effects of stocking density and dietary protein level on some growth parameters, hematology and immune response of juvenile common carp (*Cyprinus carpio*) to *Aeromonas hydrophila* in modern biofloc System. *Journal of Aquatic Physiology and Biotechnology* 10(4), 95-121 (In Persian).

Adineh, H., Naderi, M., Jafaryan, H., Khademi Hamidi, M., Yousefi, M., Ahmadifar, E., 2022. Effect of Stocking Density and Dietary Protein Level in Biofloc System on the Growth, Digestive and Antioxidant Enzyme Activities, Health, and Resistance to Acute Crowding Stress in Juvenile Common Carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture Nutrition*, doi.org/10.1155/2022/9344478.

Adineh, H., Naderi, M., Yousefi, M., Khademi Hamidi, M., Ahmadifar, E., Hoseini, S.M., 2021. Dietary licorice (*Glycyrrhiza glabra*) improves growth, lipid metabolism, antioxidant and immune responses, and resistance to crowding stress in common carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture Nutrition* 27(2), 417-426.

Ahmadifar, E., Kalhor, N., Yousefi, M., Adineh, H., Moghadam, M.S., Sheikhzadeh, N., Moonmanee, T., Hoseinifar, S.H., Van Doan, H., 2022. Effects of dietary *Plantago ovata* seed extract administration on growth performance and immune function of common carp (*Cyprinus carpio*) fingerling exposed to ammonia toxicity. *Veterinary Research Communications*47, 731–744.

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

Asaduzzaman, M., Wahab, M.A., Verdegem, M.C.J., Huque, S., Salam, M.A., Azim, M.E., 2008. C/N ratio control and substrate addition for periphyton development jointly enhance freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* production in ponds. *Aquaculture* 280(1-4), 117-123.

Avnimelech, Y., 1999. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture* 176 (3-4), 227-235.

Avnimelech, Y., 2007. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bioflocs technology ponds. *Aquaculture* 264(1), 140-147.

Avnimelech, Y., 2009. Biofloc technology: a practical guide book. World Aquaculture Society.

Azim, M.E., 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* 283(1-4), 29-35.

Azimi, A., Jafaryan, H., Harsij, M., Gholipour, H., Patimar, R., 2017. Effect of C/N different ratios on water quality parameters and growth performance of common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings in biofloc system. *Journal of Aquaculture Development* 10(4), 75-89. (In Persian)

Azimi, A., Shekarabi, S.P.H., Paknejad, H., Harsij, M., Khorshidi, Z., Zolfaghari, M., Zakariaee, H., 2022. Various carbon/nitrogen ratios in a biofloc-based rearing system of common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings: Effect on growth performance, immune response, and serum biochemistry. *Aquaculture* 548, 737622.

Bakar, N.S.A., Nasir, N.M., Lananan, F., Hamid, S.H.A., Lam, S.S., Jusoh, A., 2015. Optimization of C/N ratios for nutrient removal in aquaculture system culturing African catfish, (*Clarias gariepinus*) utilizing Bioflocs Technology. *International Biodeterioration and Biodegradation* 102, 100-106.

Barton, B.A., 2002. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteriods. *Integrative and omparative, Biology* 42(3), 517-525.

Borges, A., Scotti, L.V., Siqueira, D.R., Jurinitz, D.F., Wassermann, G.F., 2004. Hematologic and serum biochemical values for jundia (*Rhamdia quelen*). *Fish Physiology and Biochemistry* 30, 21-25.

Boyd, C.E., Tucker, C.S., 2012. Pond aquaculture water quality management. Springer-Verlag New York. 700 p.

Browdy, C.L., Ray, A.J. Leffler, W., Avnimelech, Y., 2012. Biofloc-based aquaculture systems. In: Aquaculture Production Systems. Eds. Tidwell, J., John Wiley and Sons, Inc, pp: 278-307.

De Schryver, P., Crab, R., Defoirdt, T., Boon, N., Verstraete, W., 2008. The basics of bio-flocs technology: the added value for aquaculture. *Aquaculture* 277(3-4), 125-137.

Debbarma, R., Biswas, P., Singh, S.K., 2021. An integrated biomarker approach to assess the welfare status of *Ompok bimaculatus* (Pabda) in biofloc system with altered C/N ratio and subjected to acute ammonia stress. *Aquaculture* 545, 737184.

Dosdat, A., Ruyet, J.P., Coves, D., Dutto, G., Gasset, E., Roux, A., Lemarie, G., 2003. Effect of chronic exposure to ammonia on growth: food utilization and metabolism of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquatic Living Resource*s 16(6), 509-520.

Ellis, A.E., 1990. Lysozyme assays. In: Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Robertson, B.S., Van Muiswinkel, publication. pp: 101-103.

Emerenciano, M., Ballester, E.L.C., Cavalli, R.O., Wasielesky, W., 2012. Biofloc technology application as a food source in a limited water exchange nursery system for pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817). *Aquaculture Research* 43(3), 447-457.

Haghparast, M. M., Alishahi, M., Ghorbanpour, M., Shahriari, A., 2020. Evaluation of hemato-immunological parameters and stress indicators of common carp (*Cyprinus carpio*) in different C/N ratio of biofloc system. *Aquaculture International* 28(6), 2191-2206.

Hargreaves, J.A., 2013. Biofloc Production Systems for Aquaculture, pp: 1-11.

Hegazi, M.M., Attia, Z.I., Ashour, O.A., 2010. Oxidative stress and antioxidant enzymes in liver and white muscle of Nile tilapia juveniles in chronic ammonia exposure. *Aquatic Toxicology* 99(2), 118-125.

Kim, J.H., Park, H.J., Hwang, I.K., Han, J.M., Kim, D.H., Oh, C.W., Kang, J.C., 2017. Alterations of growth performance, hematological parameters, and plasma constituents in the sablefish, *Anoplopoma fimbria* depending on ammonia concentrations. *Fisheries and Aquatic Sciences* 20, 1-6.

Mangang, Y.A., Pandey, P.K., 2021. Hemato-biochemical responses and histopathological alterations in the gill and kidney tissues of *Osteobrama belangeri* (Valenciennes, 1844) exposed to different sub-lethal unionized ammonia. *Aquaculture* 542, 736887.

Minabi, K., Sourinejad, I., Alizadeh, M., Ghatrami, E.R., Khanjani, M.H., 2020. Effects of different carbon to nitrogen ratios in the biofloc system on water quality, growth, and body composition of common carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings. *Aquaculture International* 28, 1883-1898.

Mirghaed, A.T., Fayaz, S., Hoseini, S.M., 2019. Effects of dietary 1, 8-cineole supplementation on serum stress and antioxidant markers of common carp (*Cyprinus carpio*) acutely exposed to ambient ammonia. *Aquaculture* 509, 8-15.

Mugnier, C., Zipper, E., Goarant, C., Lemonnier, H., 2008. Combined effect of exposure to ammonia and hypoxia on the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* survival and physiological response in relation to molt stage. *Aquaculture* 274 (2-4), 398-407.

Najdegerami, E. H., Tukmechi, A., 2022. Poly-β-hydroxybutyrate concentration, microbial enzymes activity, and nutritional value in biofloc system using different carbon sources and C/N ratios in common carp, *Cyprinus carpio* culture. *Journal of the World Aquaculture Society*, doi.org/10.1111/jwas.12922

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

Ray, A.J., Lotz, J.M., 2014. Comparing a chemoautotrophic-based biofloc system and three heterotrophic-based systems receiving different carbohydrate sources. *Aquacultural Engineering* 63, 54-61.

Robert, M., Crosby, D.M., Brunson, M.W., 1992. Ammonia in Fish Ponds. Southern Regional Aquaculture Center Publication, No. 463.

Sinha, A.K., AbdElgawad, H., Giblen, T., Zinta, G., De Rop, M., Asard, H., Blust, R., De Boeck, G., 2014. Anti-oxidative defences are modulated differentially in three freshwater teleosts in response to ammonia-induced oxidative stress. *PLoS One* 9(4), 95319.

Sinha, A.K., Kapotwe, M., Dabi, S.B., da Silva Montes, C., Shrivastava, J., Blust, R., De Boeck, G., 2016. Differential modulation of ammonia excretion, Rhesus glycoproteins and ion-regulation in common carp (*Cyprinus carpio*) following individual and combined exposure to water borne copper and ammonia. *Aquatic Toxicology* 170, 129-141.

Sunyer, J.O., Tort, L., 1995. Natural hemolytic and bactericidal activities of sea bream *Sparus aurata* serum are affected by the alternative complement pathway. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 45(3-4), 333-345.

Taheri Mirghaed, A., Fayaz, S., Hoseini, S.M., 2019. Effects of dietary 1, 8-cineole supplementation on serum stress and antioxidant markers of common carp (*Cyprinus carpio*) acutely exposed to ambient ammonia. *Aquaculture* 509, 8-15.

Yousefi, M., Vatnikov, Y.A., Kulikov, E.V., Plushikov, V.G., Drukovsky, S.G., Hoseinifar, S.H., 2020. The protective effects of dietary garlic on common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to ambient ammonia toxicity. *Aquaculture* 526, 735400.

Yu, Z., Quan, Y.N., Huang, Z.Q., Wang, H. H., Wu, L.F., 2020a. Monitoring oxidative stress, immune response, Nrf2/NF-κB signaling molecules of *Rhynchocypris lagowski* living in BFT system and exposed to waterborne ammonia. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 205, 111161.

Yu, Z., Wu, X.Q., Zheng, L.J., Dai, Z.Y., Wu, L.F., 2020b. Effect of acute exposure to ammonia and BFT alterations on *Rhynchocypris lagowski*: Digestive enzyme, inflammation response, oxidative stress and immunological parameters. *Environmental toxicology and pharmacology* 78, 103380.

Zhao, Z., Xu, Q., Luo, L., Wang, C., Li, J., Wang, L., 2014. Effect of feed C/N ratio promoted bioflocs on water quality and production performance of bottom and filter feeder carp in minimum-water exchanged pond polyculture system. *Aquaculture* 434, 442-448.