شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۷۴، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۰
صفحات ۳۱۳-۲۹۵

تاثیر بکارگیری مخلوط پروبیوتیکی و بایوفلاک بر کیفیت آب، فاکتورهای رشد و ایمنی موکوسی و سرمی ماهی تیلاپیا نیل (*Oreochromis niloticus*) در دو سامانه پرورشی مدار بسته و دارای تعویض آب

قاسم محمدی[۱]، فرهاد کنیه[۱]، غلامرضا رفیعی[۲*]

۱. دانشجو دکتری گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.
۲. استاد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸ /۰۹/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۲/۰۶

چکیده

روش‌ها و سامانه‌های مختلفی برای تولید آبزیان تاکنون طراحی شده‌اندکه مبنای آنها استفاده بهینه از آب و غذای مصرفی برای تغذیه آبزیان بوده است. یکی از این سامانه‌های برتر فناوری بایوفلاک است که با بهره‌گیری از جوامع میکروبی به عنوان زیست‌یار یا پروبیوتیک به بهبود سلامت آبزی، افزایش تراکم، بهبود کیفیت آب و جذب بهتر مواد مغذی ورودی در سیستم پرورشی کمک شایانی کرده است. در این پژوهش، کارایی مخلوط پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس (*Lactobacillus*) و باسیلوس (*Bacillus*) در حفظ کیفیت فیزیکو-شیمیایی آب و بهبود فاکتورهای رشد، ایمنی موکوسی و سرم خون در ماهی تیلاپیا مورد ارزیابی قرار گرفت. چهار تیمار شامل سامانه: ۱- دارای تعویض آب، ۲- دارای تعویض آب به همراه پروبیوتیک، ۳- فناوری بایوفلاک به همراه پروبیوتیک و بدون تعویض آب و ۴- فناوری بایوفلاک بدون تعویض آب و بدون پروبیوتیک، به عنوان سیستم‌های پرورشی در یک دوره ۹۰ روزه مورد بررسی قرار گرفتند. در پایان آزمایش مشخص شد میانگین وزن نهایی، افزایش وزن بدن، نرخ رشد ویژه و ضریب تبدیل غذایی ماهیان پرورشی در تیمارهای بایوفلاک به شکل معناداری در مقایسه با تیمارهای دارای تعویض آب افزایش دارد. در پایان دوره، میانگین غلظت آمونیاک و pH در تیمارهای دارای تعویض آب به شکل معناداری کمتر بود. فاکتورهای پروتئین کل، ایمنوگلوبولین کل و فعالیت پروتئاز، لیزوزیم، آلکالین فسفاتاز کمپلمان و سرم خون (فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و کمپلمان) در تیمارهای حاوی پروبیوتیک بیشترین سطح را نشان دادند. نتایج این پژوهش نشان داد که بکارگیری فناوری بایوفلاک به همراه مخلوط پروبیوتیکی در افزایش رشد ماهی تیلاپیا، کاهش مصرف آب و بهبود ایمنی در موکوس و سرم خون موثر است.

واژگان کلیدی: تیلاپیا، باکتری های هترو تروف، سیستم پرورشی، فناوری بایوفلاک، شاخص‌های ایمنی.

* نویسنده مسئول: غلامرضا رفیعی
Email: ghrafiee@ut.ac.ir

Journal of Fisheries
Vol. 74, No. 2, Summer 2021
pp. 295-313

Efficacy of supplementary diet with a mixture of *Bacillus spp.* and *Lactobacillus spp.* probiotics in enhancing water quality, growth performances, serum and skin mucus parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in two recirculating and exchange water systems

Ghasem Mohammadi[1], Farhad Konieh[1], Gholamreza Rafiee[2*]

1- Ph.D. student, Department of fishery, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj. Iran
2- Professor, Department of fishery, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj. Iran

Received: 09-Dec-2021 Accepted: 25-Feb-2019

Abstract

The efficacy of supplementary diet with a mixture of *Bacillus spp.* and *Lactobacillus spp.* probiotics in enhancing water quality, growth performances, serum and skin mucus parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) was investigated in four treatments: T1- water exchange system without probiotics; T_2, water exchange system with probiotics; T_3, zero-exchange biofloc system with probiotics; T_4, zero-exchange biofloc system without probiotics, for a period of 90 days. At the end of study, the mean final weight, weight gain, specific growth rate, and feed conversion rates were found significantly ($P<0.05$) higher in biofloc-based treatments (T_3 and T_4) versus tanks with water exchange (T_1 and T_2). The mean values of total ammonia nitrogen (TAN) concentrations and pH were significantly lower in tanks with water exchange (T_1 and T_2) compared to biofloc treatments (T_3 and T_4), Meanwhile, probiotic application showed to significantly improve serum immune responses (ACH50 and superoxide dismutase) and skin mucus parameters (total protein, total immunoglobulins, protease activity, lysozyme activity and alkaline phosphatase activity) in both systems. In conclusion, biofloc technology and dietary probiotic administration beneficially enhanced the growth performances as well as serum and skin mucus immune responses of tilapia.

Keywords: Tilapia, Heterotrophic bacteria, Culture system, Biofloc technology, Immune responses

Corresponding author: Gholamreza Rafiee Email: ghrafiee@ut.ac.ir

۱. مقدمه

آبزی‌پروری به عنوان یکی از صنایع تولیدکنندهٔ غذای انسان به سرعت در حال توسعه است. کاهش تأمین آبزیان از طریق صید به دلیل تقاضای روزافزون آبزیان در اثر رشد جمعیت انسانی و افزایش سرانهٔ مصرف ماهی با مشکل روبرو است (Avnimelech, 2015). تجمع ترکیبات نیتروژن‌دار سمی (آمونیاک، نیتریت) از مهمترین مشکلات موجود در سیستم‌های متراکم آبزی‌پروری به شمار می‌رود. از این رو، به منظور حفظ کیفیت آب و کنترل مواد دفعی نیتروژن‌دار در اکثر سیستم‌های آبزی‌پروری، تعویض آبِ استخر پرورشی با آب تازه انجام می‌شود (Avnimelech, 1999). این درحالیست که توسعهٔ صنعت آبزی‌پروری به دلیل ایجاد آلودگی‌های ناشی از تخلیهٔ مواد آلی غنی از نیتروژن به محیط با محدودیت روبرو است (De Schryver *et al*., 2008). مسائل مذکور زمینه را برای توسعهٔ سیستم‌های آبزی‌پروری با حداقل تعویض آب یا بدون تعویض آب ایجاد کرده است (Burford *et al*., 2004).

یکی از سیستم‌های برتر برای تحقق این هدف سیستم بایوفلاک است که در آن اگر کربن و نیتروژن در محلول آبی به خوبی در تعادل باشند، آمونیاک و مواد زائد نیتروژنی به زیتوده باکتریایی تبدیل خواهند شد. با اضافه کردن کربوهیدرات به استخر و افزایش نسبت کربن به نیتروژن، رشد جمعیت باکتری‌های هتروتروف تحریک شده و جذب نیتروژن از طریق تولید پروتئین های میکروبی انجام خواهد شد (Avnimelech, 1999). این افزایش در جذب نیتروژن توسط باکتری‌ها موجب کاهش غلظت آمونیاک حتی سریعتر از فرایند نیتریفیکاسیون است (Hargreaves, 2006). سرعت رشد و تولید زیتوده باکتریایی به ازای واحد بستر برای این باکتری‌ها حدود ۱۰ برابر بیشتر از باکتری‌های نیتریفیکاسیون‌کننده است (Ebeling *et al*., 2006).

استفاده از جوامع میکروبی یکی از گزینه‌های مناسب جهت افزایش سلامت، بهبود کیفیت آب و همچنین موثر در جذب بهترِ مواد مغذی موجود در غذا (Crab *et al*., 2009; Hari *et al*., 2004) توسط آنزیم‌های گوارشی خارجی (Xu and Pan, 2012) برای رشد ماهیان است. Sartiks و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند که اضافه نمودن باسیلوس به همراه ملاس باعث افزایش کیفیت آب و رشد در ماهی کپور معمولی می‌شود. در این راستا، بهبود رشد و کاهش ضریب تبدیل غذایی در گربه ماهی آفریقایی (*Clarias gariepinus*) پرورش‌یافته در سیستم بایوفلاک به همراه *Bacillus cereus* به اثبات رسیده است (Hapsari, 2016).

بیان شده است که پروبیوتیک خارجی بر تشکیل بیوفلاک اثر دارد و منجر به افزایش ایمنی غیراختصاصی و مقاومت در برابر بیماری‌های عفونی در آبزی پرور شی خواهد شد. این موضوع به توسعه یک سیمبیوتیک میکروبی در روده آبزی میزبان و تاثیر مثبت بر روند ایمنی و فیزیولوژی نسبت داده شده است. تاثیر گونه های باسیلوس و لاکتوبا سیلوس بر فاکتورهای رشد، ایمنی و بقا میزبان یکی از این موارد است (Dash *et al*., 2017). پروبیوتیک ها توانایی تولید آنزیم‌های گوارشی را نیز دارند و به سبب بهبود هضم و جذب مواد مغذی (Zhou *et al*., 2009)، افزایش پاسخ ایمنی و مقاومت در برابر پاتوژن‌های بیماریزا می‌شوند (Aly *et al*., 2008; Zhao *et al*., 2012).

دفاع غیراختصاصی مایعات بدن ماهی شامل پروتئازها، لیزین‌ها و آگلوتینین‌های موجود در ترشحات موکوسی، همچنین سایر مواد ضد میکروبی مانند تریپسین، لیزوزیم، آگلوتینین ها، عامل مکمل، پروتئین فاز حاد، آلکالین فسفاتاز و دیگر عوامل لیزکننده در سرم و در موکوس پوست، آبشش‌ها و روده از جمله عواملی محسوب می شوند که به عنوان اولین خط دفاعی در ماهی عمل کرده و مانع از چسبیدن و تثبیت میکروارگانیسم‌ها بر سطوح پوشی خارجی (پوست و آبشش‌ها) و داخلی (مجرای گوارشی) می‌شوند. این مواد به طور غیر اختصاصی از رشد و تکثیر عوامل عفونی بیماریزا مثل باکتری ها، قارچ ها، انگل‌ها و ویروس‌ها جلوگیری می‌کنند. این ترکیبات اغلب از نوع پروتئینی یا گلیکوپروتئین‌اند و ترکیبات مشابه آنها و یا پیش‌ساز آنها در همولنف بی‌مهرگان نیز وجود دارد.

بنابراین، نیاز است عملکرد باکتری‌های هتروترف به همراه باکتری‌های مختلف پروبیوتیک در سامانه‌های مختلف پرورش ماهی بیشتر مورد ارزیابی قرار گیرند. لذا، در این پژوهش، چند سامانه پرورشی شامل فناوری بایوفلاک و باکتری‌های پروبیوتیک و تاثیر آنها بر سیستم ایمنی موکوسی، شاخص‌های رشد ماهی تیلاپیا و کیفیت آب مورد مقایسه قرار گرفتند.

۲. مواد و روش‌ها

۲.۱. طرح آزمایش

این آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی شامل چهار تیمار تحت عنوان سامانه‌های ۱- دارای تعویض آب، ۲- دارای تعویض آب به همراه پروبیوتیک، ۳- فناوری بایوفلاک به همراه پروبیوتیک و ۴- فناوری بایوفلاک بدون پروبیوتیک در یک دوره ۹۰ روزه با سه تکرار مورد بررسی قرار گرفتند. این مطالعه در کارگاه تکثیر و پرورش آبزیان دانشکدهٔ کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران واقع در کرج انجام شد. بچه ماهیان تیلاپیای نیل *Oreochromis niloticus* از کارگاهی در استان قم خریداری و به کارگاه مذکور منتقل گردیدند. بچه ماهیان جهت سازگاری با شرایط کارگاه در یک مخزن دایره‌ای شکل با حجم آبگیری ۱۰۰۰ لیتر به مدت دو هفته ذخیره‌سازی شدند. طی دورهٔ سازگاری، بچه ماهیان با استفاده از غذای تجاری تیلاپیا (شرکت بتا، ایران) و به میزان ۲-۳ درصد وزن بدن در دو نوبت صبح و عصر (ساعت ۹ و ۱۷) تغذیه شدند. تجزیه شیمیایی غذای تجاری مورد نظر در جدول ۱ آورده شده است.

پس از طی دوره سازگاری، تعداد ۱۵ قطعه بچه ماهی در مخازن فایبرگلاس با حجم آبگیری ۲۷۰ لیتر آب ذخیره‌سازی شدند. مخازن با آب کلرزدایی و به خوبی هوادهی‌شدهٔ چاه آبگیری شد. دو ساعت پس از نوبت غذادهی صبح، مقدار ملاس (منبع کربن آلی؛ ۰/۲۵ گرم کربن در هر میلی‌لیتر) لازم برای ایجاد نسبت C/N =۱۲ به مخازن بایوفلاک افزوده شد. مقدار کربن بر اساس فرمول‌های پیشنهادی محاسبه گردید (Avnimelech, 1999; Crab et al., 2012). برای نگهداری دما از بخاری های آکواریومی ۳۰۰ وات (SOBO HS-300، صنایع الکتریکی SOBO، چین) و برای تأمین اکسیژن و اختلاط آب نیز از سنگ‌های هواده متصل به سه کمپرسور هوا (۷۰ لیتر در دقیقه، شرکت Hailea، چین) استفاده شد. آب در تیمارهای دارای تعویض آب (تیمارهای ۱ و ۲) روزانه به میزان ۳۰-۲۰ درصد حجم مخازن تعویض شد، امّا در تیمارهای بایوفلاک (تیمارهای ۳ و ۴) هیچگونه تعویض آبی صورت نگرفت. هر دو هفته یکبار وزن بچه ماهیان با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم اندازه‌گیری و مقدار غذادهی بر اساس آن تنظیم شد.

جدول ۱- ترکیب بیو شیمیایی جیره تجاری مورد استفاده (شرکت بتا، ایران).

ترکیب تقریبی	
ماده خشک (٪)	۹۳
پروتئین*	۳۹
چربی*	۱۵
خاکستر*	۱۰
عصاره عاری از نیتروژن**	۲۹
میزان انرژی (کیلوژول در کیلوگرم)	۳۸۰۰

* بر اساس درصد از وزن خشک

** عصاری عاری از نیتروژن = ماده خشک - (چربی+ پروتئین+ خاکستر)

۲.۲. پروبیوتیک و جیره‌های آزمایشی

مخلوطی تجاری از باکتری های پروبیوتیک شامل لاکتوباسیلوس رامنوسوس[1] باسیلوس سبتیلیس[2] لاکتوباسیلوس پلانتاروم[3] لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس[4] و لاکتوباسیلوس دلبروسکی[5] به صورت پودر لیوفیلیزه از شرکت زیست‌یار وارنا تهیه گردید. برای تغذیه ماهیان تیمارهای ۲ و ۳، مقدار دو گرم (10^8 CFU g^{-1}) از مخلوط پروبیوتیکی مذکور در ۱۰۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی (۰/۹ درصد w/v NaCl) حل و روی یک کیلوگرم غذای تجاری ماهی تیلاپیا (شرکت بتا؛ جدول ۱) اسپری گردید. به این ترتیب جیره‌ای با غلظت باکتریایی 2×10^8 کلونی در کیلوگرم (CFU kg^{-1}) به دست آمد (Son *et al.*, 2009). همچنین، غذای گروه‌های ۱ و ۴ نیز تنها با مقداری برابر از سرم فیزیولوژی (بدون افزودن پروبیوتیک) مخلوط گردید. غذاها تا زمان خشک شدن در دمای اتاق نگهداری شدند و سپس تا زمان استفاده در کیسه‌هایی پلاستیکی در یخچال و تحت دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. فرآیند تشریح شده هر ۱۵ روز یکبار با مواد تازه تکرار گردید.

۲.۳. شاخص‌های رشد

در انتهای دوره، عملکرد ماهیان از طریق بررسی وزن نهایی، نرخ رشد ویژه (SGR)، ضریب تبدیل غذایی (FCR)، افزایش وزن بدن و درصد بازماندگی ارزیابی گردید.

$$\text{نرخ رشد ویژه (SGR)} = \frac{\text{لگاریتم طبیعی وزن اولیه(گرم)} - \text{لگاریتم طبیعی وزن نهایی(گرم)}}{\text{روزهای آزمایش}} \times 100$$

$$\text{ضریب تبدیل غذایی (FCR)} = \frac{\text{مقدار غذای مصرفی(گرم)}}{\text{وزن اولیه(گرم)} - \text{وزن نهایی(گرم)}}$$

$$\text{افزایش وزن بدن} = \text{وزن نهایی به گرم} - \text{وزن اولیه به گرم}$$

$$\text{درصد بازماندگی} = \frac{\text{تعداد ماهی در پایان دوره}}{\text{تعداد کل ماهی در ابتدای دوره}}$$

۲.۴. اندازه‌گیری شاخص‌های فیزیکو-شیمیایی آب

شاخص‌های فیزیکو-شیمیایی آب شاملِ دما و اسیدیته (pH) به صورت روزانه با دستگاه قابل‌حمل Hanna 9811-5 و اکسیژن محلول بوسیله دستگاه Hanna Hi 98193 به طور هفتگی اندازه‌گیری شدند. سطوح آمونیاک و نیتریت نیز به صورت هفتگی به ترتیب بر اساس روش‌های استاندارد (APHA, 1920) و راهنمای روش‌های شیمیایی و بیولوژیک آب دریا (Parson *et al.*, 1984) اندازه‌گیری گردید. حجم فلاک (FV) نیز به صورت هفتگی با قیف‌های ایمهوف اندازه‌گیری شد (Avnimelech, 2007).

۲،۵. جمع آوری موکوس پوست و شاخص‌های ایمنی

برای بدست آوردن موکوس از روش محمدی و همکاران (۲۰۲۰) با اندکی تغییر استفاده شد. به طور خلاصه پس از سپری شدن ۲۴ ساعت از قطع غذادهی، ۱۰ ماهی از هر مخزن خارج و جهت حذف میکروب ها و عوامل خارجی برای مدت کوتاهی درون آب تمیز قرار گرفتند. پس از آن، ماهیان بدون بیهوشی وارد کیسه‌های پلاستیکی شدند و برای مدت ۱-۲ دقیقه درون این کیسه‌ها به آرامی تکان داده شدند (همراه با ۱۰ میلی‌لیتر از سدیم کلرید ۵۰ میلی‌مولار). سپس موکوس جمع آوری‌شده به درون فالکون‌های ۱۵ میلی‌لیتر استریل منتقل گردید. در نهایت نمونه‌های موکوس سانتریفیوژ شد (۱۵۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه، دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) و مایع رویی پس از جداسازی جهت بررسی‌های آنزیمی به درون میکروتیوپ های استریل منتقل و تا زمان ارسال به آزمایشگاه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

میزان پروتئین کل (TP) با استفاده از روش Biuret، که اساس کار آن تشکیل کمپلکس آبی متمایل به بنفش بین یون‌های مس با اتم‌های کربونیل اکسیژن و آمید نیتروژن در شرایط قلیایی است، با استفاده از کیت تجاری

[1] *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 7469)
[2] *Bacillus subtilis* (ATCC 12711)
[3] *Lactobacillus plantarum* (KC426951)
[4] *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 4356)
[5] *Lactobacillus delbrueckii* (ATCC 9649)

شرکت بیونیک و در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای سنجش میزان لیزوزیم سرمی از روش کدورت سنجی[1] و تحلیل تدریجی باکتری‌های گرم مثبت *Micrococcus luteus* حساس به لیزوزیم استفاده شد (Ellis, 1990). به طور خلاصه، ابتدا دو میلی لیتر محلول باکتریایی با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در میلی لیتر از باکتری *Micrococcus lysodeikticus* در بافر سدیم فسفات نمکی (۰/۵ M و pH = ۶/۲) تهیه شد. سپس ۱۰۰ میکرو لیتر از سرم تیلاپیا به محلول باکتریایی فوق اضافه شد. بعد از مخلوط کردن، کاهش کدورت (کاهش جذب) در طول موج ۵۳۰nm نانو متردر دمای اتاق و بعد از ۰/۵ و ۴/۵ دقیقه تعیین شد. لیزوزیم سفیده تخم مرغ نیز به عنوان استاندارد استفاده شد. یک واحد نشان دهنده مقدار لیزوزیمی است که باعث ۰/۰۰۱ کاهش در جذب در هر دقیقه می‌گردد. فعالیت لیزوزیم بر اساس واحد در میلی لیتر موکوس محاسبه شد. فعالیت پروتئازی موکوس بر اساس هیدرولیز آزوکازئین و بر طبق محمدی و همکاران (۲۰۲۰) تعیین شد. به طور خلاصه، حجمی برابر از موکوس با بافر آمونیوم بیکربنات (۱۰۰ Mm، pH = ۷/۸) که حاوی ۰/۷ درصد آزو کازئین (Sigma) بود، درون انکوباتور شیکردار مورد انکوباسیون قرار گرفت (۱۹ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد). پس از آن واکنش با افزودن تری‌کلروا ستیک ا سید ۴/۶ در صد متوقف گردید. سپس مخلوط مواد واکنشی به مدت ۵ دقیقه و با سرعت ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. در نهایت ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی به چاهک‌های میکروپلیت حاوی حجمی برابر از سدیم هیدروکسید ۰/۵ M، افزوده شد. از ترپسین (Sigma) به عنوان کنترل مثبت و از بافر آمونیوم بیکربنات به عنوان کنترل منفی استفاده شد. فعالیت پروتئازی بر اساس افزایش تراکم نوری (OD) نمونه در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. فعالیت کمپلمان ۵۰ (ACH50) نیز بر اساس شکست گلبول‌های قرمز خرگوش (RaRBC) اندازه‌گیری شد (Hajirezaee *et al*., 2019; Yano, 1992).

۲.۶. جمع‌آوری سرم و سنجش‌های ایمونولوژیک

در پایان آزمایش، سه ماهی به طور تصادفی از هر مخزن (۹ ماهی در هر تیمار) نمونه برداری شد، با استفاده از پودر گل میخک (۵۰۰ میلی گرم در لیتر) بیهوش گریدند (Mohammadi *et al*., 2020) و خون با استفاده از یک سرنگ ا ستریل گرفته شد. سپس نمونه خون به لوله های اپندروف منتقل شد و به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد لخته شد. پس از لخته شدن، سرم با ا ستفاده از میکرو سانتریفیوژ یخچال‌دار (۵۰۰۰ × گرم به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد؛ سانتریفیوژ Centrikon H-401، Kontron Instrument، Milano، ایتالیا) از هم جدا شد و تا ۲۰ ساعت در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای اندازه‌گیری فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD) از یک کیت تشخیصی تجاری (CAT No. ZB-SOD-96A، ZellBio GmbH، آلمان) ا ستفاده شد. این کیت از آنیون سوپر اکسید برای تبدیل به پراکسید هیدروژن و اکسیژن در شرایط واکنش آنزیمی استفاده می کند. سرانجام، تشخیص طیف رنگ تولید شده در ۴۲۰ نانومتر انجام شد. فعالیت کمپلمان ۵۰ (ACH50) بر اساس شکست گلبول های قرمز خرگوش (RaRBC) ا ندازه‌گیری شد (Yano, 1992).

۲.۷. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

نرمال بودن و همگنی داده‌ها به ترتیب از طریق ت ست‌های شاپیروویلک[2] و لوین[3] برر سی شد. برای تحلیل داده‌های از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و برای تعیین اختلاف معنادار در میان تیمارها از تست چند دامنهٔ دانکن در سطح پنج درصد ($p<0.05$) بهره برده شد. تجزیه و تحلیل آماری

[1] Turbidometry
[2] Shapiro–Wilk test
[3] Levene's test

داده‌های آزمایش به وسیلهٔ نرم‌افزار SPSS نسخهٔ ۲۲ و ترسیم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل نسخهٔ ۲۰۱۶ انجام شد.

۳. نتایج

۳.۱. رشد

عملکرد ر شد شامل وزن نهایی و افزایش وزن بدن در تیمارهای ۳ و ۴ اختلاف معنی‌داری را نسبت به گروه ۱ نشان دادند ($p<0.05$). ضریب تبدیل غذایی در تیمارهای بدون تعویض آبِ بایوفلاک (تیمار های ۳, ۴) به شکلی معناداری کمتر از ماهیان پرورش یافته در مخازن دارای تعویض آب (تیمارهای ۱ و ۲) بود. تفاوتی از نظر نرخ رشد ویژه میان تیمارهای بایوفلاکی و گروه ۲ مشاهده نشده ($p>0.05$)، اما نرخ ویژه رشد در تیمار ۱ به شکل معناداری از تیمارهای بایوفلاکی کمتر بود. نرخ بازماندگی در میان تیمار ها اختلاف معناداری را نشان نداد.

جدول ۲- میانگین شاخص‌های رشد، بازماندگی و تغذیه در میان تیمارهای مختلف در پایان دوره آزمایش (میانگین ± انحراف معیار).

تیمار	۱	۲	گروه ۳	گروه ۴
وزن نهایی	۳۳/۴۲ ± ۲/۲۶^{a}	۳۶/۹۰±۲/۱۸^{a}	۴۲/۴۵±۰/۶۳^{b}	۴۳/۰۴ ± ۲/۰۳^{b}
افزایش وزن بدن	۲۴/۹۴ ± ۱/۷۳^{a}	۲۸/۰۹±۱/۵۷^{b}	۳۳/۵۹±۰/۵۱^{c}	۳۴/۷۲ ± ۰/۶۴^{c}
نرخ رشد ویژه	۱/۳۴±۰/۳۲^{a}	۱/۵۶±۰/۰۵^{ab}	۱/۷۱±۰/۰۲^{b}	۱/۸۳±۰/۱۴^{b}
ضریب تبدیل غذایی	۱/۴۳±۰/۰۹^{b}	۱/۴۰±۰/۰۱^{b}	۱/۲۶±۰/۰۱^{a}	۱/۲۶±۰/۰۱^{a}
درصد بازماندگی (٪)	۸۸/۸۸±۱۹/۲۴	۹۷/۷۷±۳/۸۴	۹۷/۷۷±۳/۸۴	۱۰۰

-حروف انگلیسی یکسان در بالای اعداد در هر ردیف به معنی عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین تیمارها در سطح ۰/۰۵ است.

۳.۲. کیفیت آب

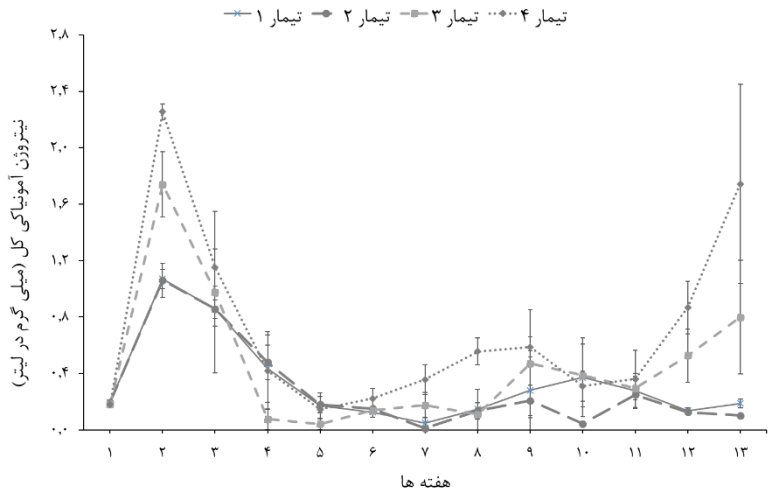
در جدول ۳، میانگین شاخص‌های فیزیکو-شیمیایی آب و در شکل‌های ۱ و ۲ روند تغییرات غلظت آمونیاک کل و نیتریت در طی ۹۰ روز آزمایش ارائه شده است. میانگین د ما در تیمار های ۳ و ۴ از نظر آ ماری ت فاوت داشت ($p<0.05$) اما در سایر تیمارها تفاوتی مشاهده نشد ($p>0.05$). میانگین pH، اکسیژن، آمونیاک کل و نیتریت در بین تیمارهای ۱ و ۲ نسبت به تیمارهای بایوفلاک ۳ و ۴ اختلاف معناداری را نشان داد. به نحوی که pH در تیمارهای دارای تعویض آب (تیمار های,۱ ۲) در مقایسه با تیمارهای حاوی بایوفلاک (تیمار های ۳ و ۴) اختلاف معناداری داشت اما بین تیمار ۱ و ۲ اختلاف معناداری مشاهده نگردید در تیمارهای بایوفلاک (۳ و ۴) نیز اختلاف معنی‌دار نبود ($p>0.05$).

جدول ۳- میانگین شاخص‌های کیفی آب در تیمارهای آزمایش (میانگین ± انحراف معیار) در پایان دوره آزمایش.

تیمار ها(T)	۱	۲	۳	۴
دما (درجه سانتی‌گراد)	۲۸/۱۳ ± ۰/۷۲^{ab}	۲۸/۵۷±۰/۲۶^{ab}	۲۸/۶۹±۰/۲۷^{b}	۲۷/۷۸ ± ۰/۷۵^{a}
pH	۷/۹۹±۰/۰۱^{a}	۸/۰۱±۰/۰۳^{a}	۸/۱۸±۰/۰۲^{b}	۸/۲۲±۰/۰۲^{b}
اکسیژن محلول (میلی‌گرم/لیتر)	۷/۲۲±۰/۱۸	۷/۱۴±۰/۱۶	۷/۲۳±۰/۰۱	۷/۳۰±۰/۰۳
حجم فلاک (میلی‌لیتر در لیتر)	-	-	۲۷/۳۰±۰/۵۹^{b}	۲۶/۸۸±۳/۴۸^{a}
آمونیاک کل (میلی‌گرم در لیتر)	۰/۳۳ ± ۰/۰۱^{a}	۰/۲۹±۰/۰۲^{a}	۰/۴۵±۰/۰۴^{b}	۰/۷ ± ۰/۰۲^{c}
نیتریت (میلی‌گرم در لیتر)	۰/۳۰ ±۰/۱۲^{a}	۰/۱۷±۰/۰۲^{a}	۰/۴۶±۰/۰۳^{b}	۰/۵۴ ± ۰/۰۳^{b}

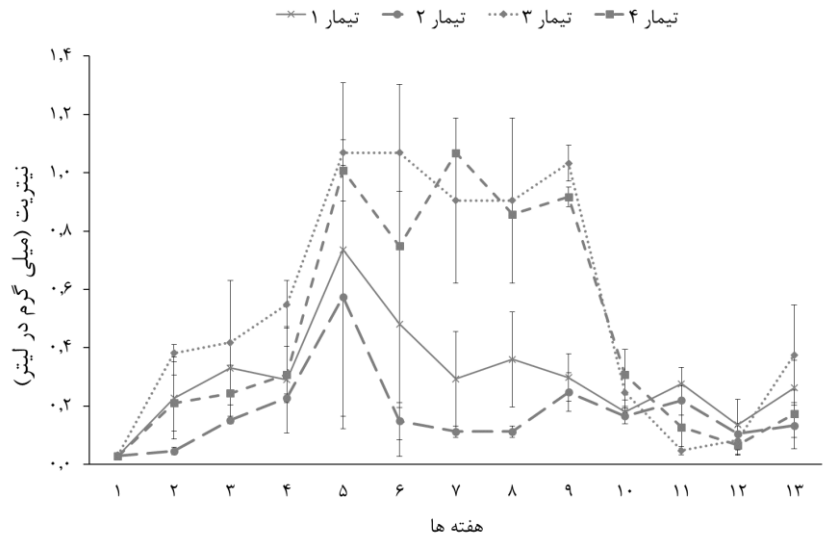
-حروف انگلیسی یکسان در بالای اعداد در هر ستون به معنی عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین تیمارها در سطح ۰/۰۵ است.

آمونیاک کل نیز در بین تیمارها روند متفاوتی را دنبال کرد؛ بدین صورت که در تیمارهای ۱و ۲ اختلاف معناداری نبود، اما آمونیاک کل در تیمار ۴ به طور معناداری بیش از تیمار ۳ بود ($p<0.05$). با این حال، غلظت نیتریت در دو تیمار ۱و ۲ تقریباً یکسان و معنادار نبود. این رابطه نیز برای تیمارهای ۳و ۴ وجود داشت.



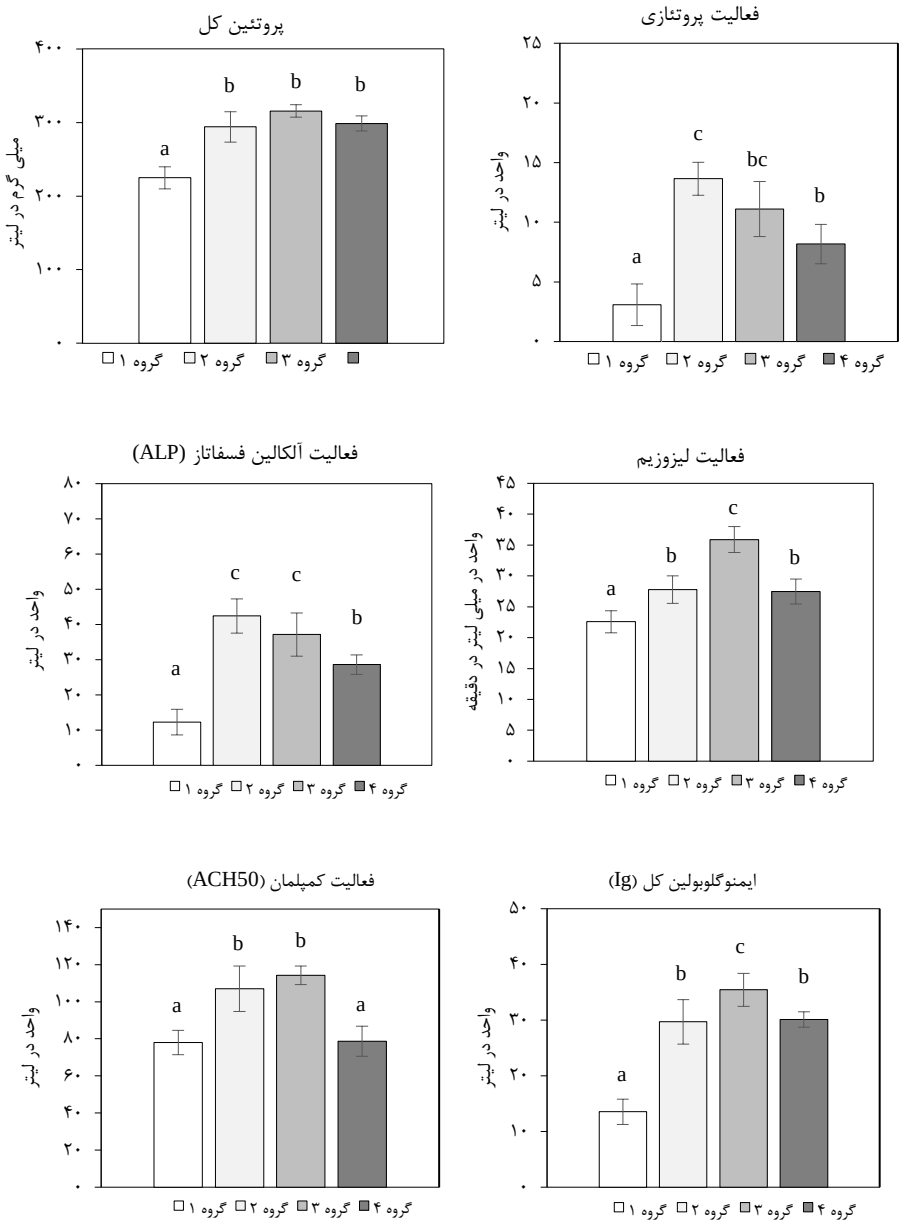
شکل ۱- نمودار مقایسه روند هفتگی تغییرات آمونیاک کل در میان تیمارهای آزمایشی (میانگین±انحراف معیار) درطول دوره آزمایش.

همانگونه که در شکل ۱ ملاحظه می‌شود، غلظت آمونیاک کل در تیمارهای آزمایشی در طی هفته دوم به شکل چشمگیری افزایش داشت و سپس در هفته‌های چهارم و پنج به کمتر از ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کاهش پیدا کرد و عملاً تا انتهای دوره ثابت باقی ماند. در هفته دوم، غلظت آمونیاک کل در مخازن تیمارهای حاوی بایوفلاک (تیمارهای ۳ و ۴) نسبت به مخازن دارای تعویض آب (تیمارهای ۱ و ۲) بیش از دو برابر بیشتر بود و اختلاف معناداری را داشت ($p<0.05$).



شکل ۲- نمودار مقایسه روند هفتگی تغییرات نیتریت در تیمارهای مختلف در طول دوره آزمایش (میانگین±انحراف معیار) در طول دوره آزمایش.

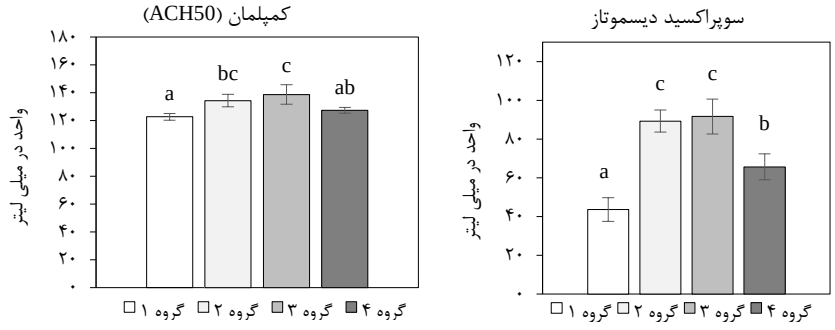
در شکل ۲ نیز افزایش شدید غلظت نیتریت در هفته پنجم در تمامی تیمارهای آزمایشی قابل ملاحظه است. در تیمارهای بایوفلاک (تیمار های ۳ و ۴)، غلظت نیتریت در هفته ششم به شکلی معنادار از غلظت نیتریت در تیمارهای دارای تعویض آب (تیمار های ۱ و ۲) بیشتر بود ($p<0.05$). در مخازن واجدِ تعویض آب، غلظت نیتریت پس از هفته پنجم تا انتهای دوره به کمتر از ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر کاهش پیدا کرد. با این حال، غلظت نیتریت در تیمار بایوفلاک در هفته‌های هفتم و نهم سیر نزولی به خود گرفت و پس از آن تا انتهای دوره نوسانات بسیار کمی داشت و با غلظت نیتریت در تیمارهای دارای تعویض آب اختلاف معناداری نداشت ($p>0.05$).



شکل ۳- نمودار های میانگین میزان پروتئین کل، ایمنوگلوبولین کل و فعالیت پروتئاز، لیزوزیم، آلکالین فسفاتاز و کمپلمان در موکوس پوست تیلاپیا (*O. niloticus*) در تیمارهای دارای تعویض آب (۱)، تعویض آب و پروبیوتیک (۲)، بایوفلاک و پروبیوتیک (۳) و تیمار بایوفلاک (۴).

در شکل ۳، تغییرات فاکتوهای ایمنی موکوسی آورده شده است. در ابتدا اثرات پروبیوتیک بر میزان فعالیت پروتئازی موکوس پوست تیلاپیا نشان داده شده است. همانطورکه در این شکل مشخص است، تیمارهای حاوی پروبیوتیک (تیمار های ۲ و ۳) دارای سطح بالاتری از فعالیت پروتئاز نسبت به تیمارِ تعویض آبِ بدون پروبیوتیک (۱) بودند ($p<0.05$). همچنین وجود فناوری بایوفلاک باعث افزایش معنادار فعالیت پروتئازی نسبت به تیمار دارای تعویض آب شده است ($p<0.05$). اثرات پروبیوتیک و فناوری بایوفلاک بر میزان پروتئین کل موکوس پوست تیلاپیا به گونه‌ای بود که تیمارهای بایوفلاک و پروبیوتیک (تیمار های ۲ ، ۳ و ۴) اختلاف معناداری را نسبت به تیمار واجد تعویض آب (تیمار ۱) از خود نشان دادند ($p<0.05$)؛ در میان تیمارها، بایوفلاک به همراه پروبیوتیک بیشترین میزان پروتئین کل موکوس را دارا بود. همچنین در بین تیمار های دارای تعویض آب (تیمار های ۱ و ۲) نیز اختلاف معنادار مشاهده گردید ($p<0.05$). فعالیت آنزیم لیزوزیم موکوس پوست تیلاپیا در تیمار بایوفلاک به همراه پروبیوتیک (تیمار ۳) بالاتر از سایر تیمارها بود. میان تیمار بایوفلاک و تیمار دارای تعویض آب به همراه پروبیوتیک (تیمارهای ۲ و ۴) اختلاف معناداری مشاهده نشد ($p>0.05$). کمترین میزان فعالیت لیزوزیم مربوط به تیمار دارای تعویض آب بود.

تاثیر پروبیوتیک بر میزان فعالیت آلکالین فسفاتاز موکوس پوست تیلاپیا به نحوی با روند تغییرات فعالیت آنزیم لیزوزیم همپوشانی داشت. در این راستا تیمار دارای تعویض آب به همراه پروبیوتیک و بایوفلاک به همراه پروبیوتیک (تیمار های ۲ و ۳) بالاترین میزان ثبت شده از فعالیت آلکالین فسفاتاز در موکوس را نشان دادند ($p<0.05$). در مورد میزان ایموگولوبین کل در موکوس پوست تیلاپیا بیشترین میزان ثبت شده مربوط به تیمار بایوفلاک به همراه پروبیوتیک (تیمار های ۳) بود. بین تیمارهای پروبیوتیک (تیمار های ۲ و ۴) اختلاف معناداری مشاهده نگردید($p>0.05$). با این وجود تیمار دارای تعویض آب کمترین میزان ایمنوگلوبین را داشت و دارای اختلاف معنی‌دار با سایر تیمارها بود ($p<0.05$). در مورد فعالیت کمپلمان ۵۰ موکوس بین تیمار دارای تعویض آب و تیمار بایوفلاک به همراه پروبیوتیک اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید ($p>0.05$).



شکل ۴-نمودار میامگین میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و کمپلمان (ACH50) در سرم خون تیلاپیا (*O. niloticus*) در تیمارهای واجد تعویض آب (تیمار ۱)، واجد تعویض آب و پروبیوتیک (تیمار ۲)، فناوری بایوفلاک و پروبیوتیک (تیمار ۳) و تیمار فناوری بایوفلاک (تیمار ۴).

شکل ۴ نشان‌دهندهٔ اثرات پروبیوتیک بر میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و کمپلمان در سرم خون تیلاپیا است. همانطورکه در نمودار مشخص است بین تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود دارد، به نحوی که تیمار فناوری بایوفلاک و دارای تعویض آب به همراه پروبیوتیک (به ترتیب تیمارهای ۲ و ۳) بیشترین میزان فعالیت

سوپراکسید دیسموتاز سرم خون را دارا بودند و کمترین آن متعلق به تیمار ۱ بود. در تیمارهای حاوی پروبیوتیک اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($p<0.05$). فعالیت کمپامان ۵۰ سرم خون بین تیمارهای دارای تعویض آب به همراه پروبیوتیک و بایوفلاک اختلاف معنی‌داری نداشت ($p>0.05$). کمترین و بیشترین میزان ثبت شده به ترتیب مربوط به تیمارهای داری تعویض آب و تیمار بایوفلاک به همراه پروبیوتیک بود.

۴. بحث و نتیجه گیری

در آبزی‌پروری، پیشگیری و کنترل بیماری‌ها یکی از مهم‌ترین اهداف است، زیرا بروز بیماری می‌تواند تلفات حیوانی و خسارات مالی شدید را در پی داشته باشد (Romero *et al*., 2012). استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و داروهای شیمیایی نه تنها موجب ایجاد اثرات منفی در جمعیت میکروبی محیط‌های طبیعی و تولید گونه‌های مقاوم جهش یافته می‌شوند (Romero *et al*., 2012)، بلکه وضعیت سلامت ماهیان را نیز با خطر مواجه می‌سازند (Cabello, 2006; origin, and 2006). از این‌رو در سال‌های اخیر از افزودنی‌های میکروبی سازگار با محیط‌زیست به منظور افزایش پاسخ‌های ایمنی و عملکرد رشد ماهیان استفاده می‌شود (Dawood and Koshio, 2016; Guerreiro *et al*., 2016; Song *et al*., 2014). سیستم ایمنی ذاتی ماهیان دربردارنده موانع و ترکیبات دفاعی متنوعی نظیر فلس‌ها و موکوس می‌شود (Magnadóttir, 2006). در مطالعات مشخص گردیده که پروبیوتیک‌ها و پربیوتیک‌ها خاصیت تحریک‌کنندگی پاسخ‌های ایمنی را دارند (De *et al*., 2014; Hoseinifar *et al*., 2015a).

در سامانه های آبزی پروری، میکروب‌ها اهمیت زیادی دارند و بر عملکرد رشد اثرات مطلوبی می‌گذارند. علت این امر تا حدی مربوط به ارتباط مستقیم بیماری‌ها و کیفیت آب با عوامل میکروبی است. اخیراً در آبزی پروری به منظور حفظ شرایط اکولوژیک از پروبیوتیک به جای آنتی‌بیوتیک استفاده می‌شود و فناوری انتقال باکتری به دستگاه گوارش لارو آبزیان یک ضرورت تلقی می‌شود (Skjermo and Vadstein, 1999). میل روزافزونی به کنترل و یا عدم استفاده از مواد ضد میکروبی در صنعت وجود دارد. بنابراین، روش‌های جایگزین جهت تامین یک محیط سالم از لحاظ میکروبی در مخازن پرورشی در مسیر توسعه پرورش آبزیان دارای اهمیت است. نتایج به دست آمده از این پژوهش در طی یک دوره ۹۰ روزه نشان داد که ماهیان پرورش یافته در تیمارهای فناوری بایوفلاک (تیمار های ۳، ۴) از نظر رشد و بازماندگی عملکرد بسیار مناسبی داشتند. بازماندگی در تیمار بایوفلاک و پروبیوتیک و تیمار بایوفلاک به ترتیب ۹۷/۷ و ۱۰۰ بود (جدول ۲). تولید ماهی در تیمارهای بایوفلاک حدود ۶۰۰ گرم بیش از تیمارهای دارای تعویض آب بود. داده‌های یکسانی از تولید ماهی تیلاپیا در تیمارهای بایوفلاک با استفاده از سبوس برنج و گندم به عنوان منبع کربن‌دار قبلا به دست آمده است و همچنین گزارش شده‌که این مقدار می‌تواند بیش از ۵۰۰ گرم در مورد سبوس و ۸۰۰ گرم در مورد گندم در مقایسه با تیمار شاهد دارای تعویض آب باشد (Mansour and Esteban, 2017). در مطالعه‌ای که از گلوگز جهت تحریک تولید بایوفلاک استفاده شده بود، یافت گردید که با افزودن گلوکز به آب می‌توان تولید تیلاپیا را بیش از ۵۰۰ گرم در مقایسه با شاهد افزایش داد (Long *et al*., 2015). علت افزایش میزان رشد در این پژوهش‌ها تولید اضافی غذا در نتیجه تشکیل بایوفلاک در سامانه پرورشی ذکر شده است. پژوهش‌ها نشان می‌دهد که بیش از ۲۹ درصد غذای مصرفی روزانه میگوی وانامی را بایوفلاک‌ها تشکیل می‌دهند (Burford *et al*., 2004). همچنین در مورد تیلاپیا نیز نشان داده شده که بایوفلاک‌ها می‌توانند یک منبع غذایی عمده باشند (Avnimelech, 2007). افزودن باکتری‌های اسید لاکتیک به دستگاه گوارش نیز بر افزایش فرایند تخمیر در روده دخالت دارد، این باکتری ها روی کربوهیدرات‌های پیچیده همچون نشاسته و سلولز تاثیر گذاشته و آنها را به

ترکیبات ساده‌تر تبدیل می کنند. آن ها همچنین ویتامین‌های خانواده B و ویتامین K را تولید کرده و در اختیار میزبان قرار می‌دهند. این موضوع نشان‌دهنده پیچیدگی حاکم بر هر سامانه پرورشی آبزیان است. در اکوسیستم های آبی بین عملکرد میکروارگانیسم‌ها و دیگر واحدهای زنده و نیز عملکرد های فیزیکی مانند جریان آب و فلور میکروبی درون دستگاه گوارش ماهیان و بی مهرگان ارتباط گسترده‌ای وجود دارد (Hansen and Olafsen, 1989).

در این ارتباط مشخص شده است که رشد ماهیان تیلاپیا در استخرهای بایوفلاک با وجود مصرف کمتر تا ۲۰ در غذا نسبت به تیمار تعویض آب بالاتر بوده است (Avnimelech, 2015). نشان داده شد که ماهی تیلاپیا در سیستم مبتنی بر بایوفلاک کمتر به سمت غذاهای دستی هجوم می‌آورد. علت این رفتار به در دسترس بودن فلاک‌های میکروبی در طول شبانه‌روز ربط داده شده است. علاوه بر آن، فلاک‌های میکروبی می‌توانند تا ۵۰ درصد از نیاز پروتئینی ماهیان را تأمین نمایند (Avnimelech, 2007). بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری نمود که تأمین نیازهای تغذیه‌ای و مصرف بایوفلاک‌های غنی از پروتئین می‌تواند علت افزایش رشد و تولید ماهیان در تیمارهای بایوفلاک باشد. همچنین، فناوری بایوفلاک علاوه بر بهبود مصرف غذا، در تامین مواد مغذی ضروری نظیر ویتامین و چربی‌ها و تحریک فعالیت آنزیم‌های گوارشی نیز می تواند موثر باشد (Azim and Little, 2008; Moss *et al*., 2001). در تحقیقی مشخص شد که فعالیت آنزیم آمیلاز روده‌ای در ماهیان پرورشی در تیمارهای بایوفلاک بالاتر است (Xu and Pan, 2012). بنابراین، افزایش فعالیت این آنزیم نیز می‌تواند افزایش هضم و جذب مواد مغذی غذایی و در نتیجه افزایش وزن و نرخ رشد را در پی داشته باشد.

در پژوهش حاضر ضریب تبدیل غذایی تیمارهای بایوفلاک (۱/۲۶) نسبت به تیمارهای دارای تعویض آب (۱/۴۰ و ۱/۴۳) حدود ۱۴ درصد بهبود داشت. در مطالعه‌ای دیگر نیز ضریب تبدیل غذایی برابر با ۱/۴۷ و ۱/۲۰ به ترتیب برای ماهیان (وزن اولیه ۲۴ گرم) پرورش یافته در یک سامانه مداربسته و یک سامانه بایوفلاک به دست آمده است که نتایج آن مطابقت زیادی با پژوهش حاضر دارد (Luo *et al*., 2014). در مطالعه‌ای دیگری، ضریب تبدیل غذایی تیمار بایوفلاک حدود ۱۷ درصد نسبت به تیمار دارای تعویض آب کمتر بوده است (Long *et al*., 2015). در پژوهش حاضر، عدم تعویض آب در تیمارهای بایوفلاک، افزایش مصرف فلاک‌های میکروبی و وجود توام پروبیوتیک و غنی‌سازی تنوع جامعه میکروبی سامانه پرورشی در ثبیت بیشتر نیتروژن غذا در بدن ماهی دخالت داشت که رشد بهتر ماهیان در تیمار بایوفلاک به همراه پروبیوتیک را می‌توان به این موضوعات نسبت داد.

میانگین دما در همه تیمارها بین ۲۷-۲۸ درجه‌سانتی‌گراد بود. این دما در محدوده دمایی مناسب (۳۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد) برای تکامل، رشد و تولیدمثل تیلاپیا است (El-Sayed, 2006). به علاوه، دماهای بالاتر از ۲۰-۲۵ درجه‌سانتی‌گراد دمای ایده‌آل برای یک سامانه پایدار بایوفلاک است (De Schryver *et al*., 2008). غلظت اکسیژن محلول در تمامی تیمارها همواره بالاتر از ۵ میلی‌گرم در لیتر بود که حداقل اکسیژن لازم برای جلوگیری از کاهش مصرف غذا، کاهش نرخ رشد و سلامت ماهیان است (Boyd and Tucker, 1998). در تیمارهای دارای تعویض آب، کاهش شدید و در تیمارهای بایوفلاک کاهش ملایم‌تر pH در دوره آزمایشی مشاهده شد. در پرورش سه ماهۀ بچه‌ماهیان هشت گرمی کپور هندی *Labeo rohita* نیز روند مشابهی ملاحظه گردید (Kamilya *et al*., 2017). کاهش pH را می‌توان به مصرف قلیائیت توسط باکتری‌ها و تولید اسید نسبت داد. کاهش pH در تیمارهای واجد تعویض آب شدیدتر بود، زیرا باکتری‌های نیتریفیکاسیون‌کننده حدود دو برابر بیشتر از باکتری‌ها هتروتروف، که در تیمارهای بایوفلاک با ورودی منبع کربن‌دار (ملاس) تغذیه می شوند، قلیائیت را مصرف می‌کنند (Ebeling *et al*., 2006). نرخ کمتر کاهش pH در تیمارهای بایوفلاک، ثبات بیشتر پارامترهای کیفی را در این گونه سامانه‌ها مورد تأکید قرار می‌دهد.

عدم استفاده از ماده تلقیحی و یا آب دارای بایوفلاک حاصل از دوره‌های قبلی پرورش و یا تهیه‌شده در شرایط آزمایشگاهی از نکات متمایز کننده مطالعه ما نسبت به بسیاری از دیگر مطالعات بود. آب مذکور حاوی جامعه میکروبی تثبیت شده‌ای است که در صورت استفاده در رسیدن سامانه به حالت پایدار و حفظ شرایط کیفی آب و جلوگیری از افزایش شدید مواد سمی نیتروژن‌دار (به ویژه نیتریت) کمک می‌کند (De Oliveira Alves *et al*., 2017). افزایش آمونیاک کل در هفته دوم و سوم را می‌توان به عدم شکل‌گیری باکتری‌های هتروترف (سامانه فناوری بایوفلاک) و نیتریفیکاسیون‌کننده (سامانه معمولی) در حد مورد نیاز سامانه‌های پرورشی نسبت داد. افزایش شدید نیتریت در تیمارهای بایوفلاک در طی هفته های چهارم و پنجم را می‌توان به افزایش باکتری‌های نیتریفیکاسیون‌کننده و افزایش تبدیل آمونیاک به نیتریت مربوط دانست. در این شرایط نسبت بین باکتری‌های نیتریفیکاسیون‌کننده و هتروترف نقش مهمی را در پایداری ترکیبات نیتروژن دار ایفا می‌کند. مصلحت دانسته شده است که نسبت کربن به نیتروژن در این سامانه‌ها بایستی بالاتر از ۱۵ نگهداری شود تا از افزایش ترکیبات نیتروژن‌دار جلوگیری شود (Wang *et al*., 2015). میانگین ترکیبات نیتروژن‌دار در پایان دوره در محدوده ایمن برای پرورش تیلاپیا بود (Mansour and Esteban, 2017; Nhi *et al*., 2018). این موضوع نشان دهندهٔ وجود کلید پایداری سامانه در تنظیم این ترکیبات است.

در این مطالعه پروتئین کل موکوس ماهیان در تیمار دارای تعویض آب به همراه پروبیوتیک نسبت به تیمار دارای تعویض آب بالاتر بود. در تیمارهای دارای تعویض آب، افزایش پروتئین کل را می‌توان به پروبیوتیک مورد مصرف نسبت داد. در مطالعه‌ای بر ماهی قزل‌آلا، افزایش سطح پروتئین موکوس در زمان استفاده از Hilyses[1] مشاهده گردید (Sheikhzadeh *et al*., 2012). در زمان استفاده از پروبیوتیک تجاری *Lactobacillus casei* در جیره ماهی *Poecilopsis gracilis* نیز نتایجی مشابه به دست آمد (Hernandez *et al*., 2010). همچنین مشاهده شد که پروتئین کل موکوس پوست ماهیان پرورش‌یافته در تیمارهای بایوفلاک (تیمارهای ۳و ۴) به شکل معناداری نسبت به تیمارهای دارای تعویض آب (۱ و ۲) بالاتر است ($p<0.05$)، با این وجود تفاوت معناداری بین تیمارهای بایوفلاکی (۳ و ۴) وجود نداشت ($p>0.05$). بنابراین در این تیمارها افزایش پروتئین کل موکوس را می‌توان به جمعیت های باکتریایی طبیعی موجود در مخازن نسبت داد.

آنزیم آلکالین فسفاتاز فعالیت ضد میکروبی داشت و از آنزیم‌های موثر در ایمنی موکوسی ماهیان محسوب می‌شود (Hoseinifar *et al*., 2015b). نتایج آزمایش حاضر نشان داد که فعالیت این آنزیم در زمان استفاده از پروبیوتیک به شکل معناداری افزایش می‌یابد ($p<0.05$). نشان داده شده است که استفاده از پروبیوتیک‌های باسیلوس و لاکتوباسیلوس اثر بیشتری را نسبت به بکارگیری بذر fenugreek بر افزایش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز دارد (Guardiola *et al*., 2017). مشاهده گردید که فعالیت این آنزیم در تیمارهای بایوفلاک بدون پروبیوتیک و همراه با پروبیویک نسبت به تیمار شاهد بالاتر است. پژوهش‌ها نشان می‌دهد که افزایش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در تیمارهای بایوفلاک می‌تواند به تراکم بالای باکتری‌ها در آب پرورشی نسبت داده شود که به حدود 10^{12} سلول در هر میلی‌لیتر نیز می‌رسد (Avnimelech, 2015).

لیزوزیم موجود در موکوس نیز یکی دیگر از عوامل مهم دفاعی پوست ماهیان است. بنابراین، سطح فعالیت آن از شاخص‌های مهم عملکرد ایمنی ذاتی است. این آنزیم در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی عملکرد نابود کنندگی دارد و همچنین در فعال‌سازی سیستم کامپلمان و فاگوسیتوزها نقش دارد. در آزمایش حاضر استفاده از پروبیوتیک، افزایش معنادار فعالیت این آنزیم را در تیمارهای آزمایشی به همراه داشت. در مطالعه‌ای اثر

[1] Fermented S.cerevisia

استفاده از پروبیوتیک‌های *Lactococcus lactis* BFE920 و *Lactobacillus plantarum* FGL0001 بر ایمنی ذاتی ماهی *Paralichthys olivaceus* بررسی گردید و در نهایت مشخص شد که استفاده از پروبیوتیک‌های مذکور باعث افزایش فعالیت آنزیم لیزوزیم خواهد شد (Beck *et al*., 2015). استفاده از آرتمیای غنی‌سازی‌شده با پروبیوتیک *Pediococcus acidilactic* و یا ترکیبی از این پروبیوتیک با فروکتوالیگوساکارید نیز افزایش فعالیت لیزوزیم را در ماهی *Pterophyllum scalare* در پی داشته است (Azimirad *et al*., 2016). افزایش فعالیت لیزوزیم در تیمارهای حاوی پروبیوتیک (تیمار های ۲ و ۳) را می‌توان به این موضوع نسبت داد، گرچه برای اثبات این موضوع به مطالعات بیشتری در این زمینه نیاز است. در این پژوهش، میان تیمار بایوفلاک (۴) و تیمار بایوفلاک به همراه پروبیوتیک (۳) تفاوت معناداری وجود داشت و سطح فعالیت لیزوزیم در تیمار ۴ برابر با تیمار دارای تعویض آب با پروبیوتیک بود. این موضوع می‌تواند نشان‌دهندهٔ تاثیر وجود باکتری‌های پروبیوتیکی موجود در آب مخازن بایوفلاک با شد به نحوی که فلاک میکروبی به تنهایی تحریک بیشتر سیستم ایمنی ذاتی و در نتیجه فعالیت لیزوزیم را به دنبال دارند. برای اثبات این مطلب نیز نیاز به انجام پژوهش‌های بیشتری است.

آنزیم‌های پروتئاز به عنوان پروتئین‌هایی ضد میکروبی به شمار می‌روند، زیرا در تولید پپتیدهای ضد میکروبی دخالت دارند. پروتئازهای سرین و سیستئین موجود را در برابر باکتری ها و پروتوزوا ها (نظیر انگل ها) محافظت می‌نمایند و عوامل تهاجمی را از بین می‌برند (Salles *et al*., 2007). در واقع پروتئازها یا به صورت مستقیم عوامل تهاجمی را پروتولیز می‌نمایند و یا از طریق افزایش لزوجت موکوس، پایداری آن‌ها را تغییر می‌دهند (Cerezuela *et al*., 2016). در پژوهش حاضر، افزایش معنادار ($P<0.05$) فعالیت پروتئازی موکوس ماهیان پرورشی در تیمارهای (۲، ۳ و ۴) نسبت به تیمار شاهد ملاحظه گردید. این موضوع علاوه بر اثرگذاری پروبیوتیک بر افزایش قدرت ایمنی موکوسی، توانایی جمعیت های میکروبی موجود در مخازن بایوفلاک در تحریک و افزایش فعالیت‌های ایمنولوژیک موکوس ماهی تیلاپیا را مورد تأکید قرار می‌دهد. استفاده از پروبیوتیک‌های *Shewanella putrefaciens* و *Bacillus sbtilis* به صورت ترکیبی با عصاره درخت خرما و یا به تنهایی در ماهی *Sparus aurata* افزایش معنادار سطح فعالیت آنزیم پروتئاز را نسبت به تیمارهای شاهد نشان داده است (Cerezuela *et al*., 2016) که با داده‌های این پژوهش همسو است.

مسیر مکملی جایگزین سرمی یا کمپلمان (ACH50) دارای کارکردهایی از جمله کشتار مستقیم پاتوژن‌ها، از بین بردن عوامل بیماری‌زا توسط فاگوسیتوز (Holland and Lambris, 2002)، جذب سلول‌های ایمنی به محل التهاب و فعال‌سازی لکوسیت ها (Dos Santos *et al*., 2001) است. تحقیق حاضر نشان داد که تجویز پروبیوتیک در رژیم غذایی فعالیت بالاتری از ACH50 نسبت به سایر تیمارها را در پی دارد. علاوه بر این، تیمار بایوفلاک به خودی خود باعث افزایش فعالیت ACH50 گردید. مطالعات دیگر نیز اثر مثبت پروبیوتیک‌ها و فلاک‌های میکروبی مختلف را در سطح فعالیت مکمل نشان داده‌اند (Panigrahi *et al*., 2005). افزایش فعالیت ACH50 می‌تواند ناشی از تعامل باکتری‌های پروبیوتیکی و فلاک‌های میکروبی با سلول‌های ارائه‌کنندهٔ آنتی ژن (APC) و سلول‌های اپیتلیالی باشد (Medzhitov, 2007; Rajan *et al*., 2011). نشان داده شده است که این نوع سلول‌ها می توانند سیگنال‌های منتهی به مکانیسم‌های مختلف از جمله فعال‌سازی سیتوکین، کمپلمان و فاگوسیتوز را ترغیب کنند. به عنوان مثال، بیان بیشتر سیتوکین‌های ضد التهابی و همچنین فعالیت بالاتر ACH50 سرم و فاگوسیتوز در هنگام تغذیه تیلاپیا نیل با پروبیوتیک *L. rhamnosus* گزارش شده است (Pirarat *et al*., 2015). گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن (ROS)، از جمله آنیون سوپر اکسید، پراکسید هیدروژن و اکسید نیتریک، عوامل مخرب تولید شده توسط ماکروفاژهای فعال هستند (Abu-Elala *et al*., 2013;

McMillan and Secombes, 1997). افزایش ROS در مکمل‌های پروبیوتیکی (Nayak, 2010) یا استفاده از سیستم بایوفلاک در آبزیان پرورشی گزارش شده است (Kamilya *et al*., 2017; Widanarni *et al*., 2012; Xu and Pan, 2012). با این وجود، تولید بیش از حد ROS می‌تواند به سلول‌های میزبان آسیب برساند و باعث استرس اکسیداتیو شود. سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، آنزیم اصلی آنتی اکسیدانی درگیر در ایمنی ذاتی است و می‌تواند ROS را بیش از حد را مهار کند و آبزی را از آسیب اکسیداتیو محافظت نماید (Wang *et al*., 2015). درمطالعه حاضر، الگوی تغییر در فعالیت SOD در تیمارهای حاوی پروبیوتیک صعودی بود و با تیمار دارای تعویض آب اختلاف معنی‌داری را نشان دادند. همچنین در تیمار بایوفلاک و تیمار دارای تعویض آب اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید. مطالعات قبلی گزارش کرده‌اند که پروبیوتیک در سیستم پرورش با آب معمولی یا سیستم بایوفلاک باعث افزایش قابل توجه فعالیت SOD در آبزی می‌شود (Miao *et al*., 2017; Van Doan *et al*., 2017). این افزایش را می‌توان ناشی از افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی در اثر تولید پلیمرهای ترشحی توسط باکتری‌های پروبیوتیک دانست که خاصیت آنتی اکسیدانی دارند (Castex *et al*., 2009).

با توجه به مسائل زیست محیطی از قبیل کمبود آب، دفع پساب آبزی‌پروری و انتشار مواد مغذی (نیتروژن، فسفر) و عوامل بیماری‌زا به منابع طبیعی آبی و همچنین پایداری اقتصادی و اجتماعی پرورش آبزیان نیاز به توسعه سامانه‌های متراکم با حداقل مصرف آب و راندمان بالای تولید و امنیت‌زیستی بهتر است. نتایج این پژوهش نشان داد که ماهیان پرورش یافته در سامانه بایوفلاک و پروبیوتیک با مصرف فلاک‌های میکروبی از رشد بالاتری نسبت به سامانه واجد تعویض آب برخوردارند و عدم تعویض آب بر بازماندگی آن‌ها تأثیر نامطلوبی ندارد. همچنین نتایج نشان داد کیفیت آب در سامانه بدون تعویض آبِ بایوفلاک در حد قابل قبول و مناسب است و نوسانات pH نیز در آن کمتر است. با توجه به فاکتورهای ایمنی موکوس پوست و سرم خون می‌توان چنین برداشت کرد که سیستم‌های حاوی بایوفلاک و پروبیوتیک حاوی استانداردهای بالایی برای تولید آبزیان‌اند و راه را برای استفاده بهینه از آب و غذای مصرفی و افزایش تراکم آبزیان را فراهم می‌کنند. در پژوهش حاضر مشخص گردید که سامانه بایوفلاک به همراه بکارگیری دو پروبیوتیک مخلوط پروبیوتیکی باسیلوس و لاکتوباسیلوس در یک سامانه مدار بسته پرورش ماهی می‌تواند در پرورش ماهی تیلاپیا مطرح باشد و بهینه‌سازی سامانه‌های پرورشی با دیدگاه بوم سازگان سازی با تکیه بر تنظیم فلور میکروبی مسیری است که می‌تواند حداکثر بهره‌وری را ایجاد نماید.

۵. منابع

References

Abu-Elala, N., Marzouk, M., Moustafa, M., 2013. Use of different Saccharomyces cerevisiae biotic forms as immune-modulator and growth promoter for *Oreochromis niloticus* challenged with some fish pathogens. *International Journal of Veterinary Science and Medicine* 1, 21-29.

Aly, S.M., Ahmed, Y.A.G., Ghareeb, A.A.A., Mohamed, M.F., 2008. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish & shellfish immunology* 25(1-2), 128-136.

American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation and Water Environment Federation, 1920. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. American Public Health Association.

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

Avnimelech, Y., 2007. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. *Aquaculture 264*(1-4), 140-147.

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

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 283*(1-4), 29-35.

Beck, B.R., Kim, D., Jeon, J., Lee, S.M., Kim, H.K., Kim, O.J., Lee, J.I., Suh, B.S., Do, H.K., Lee, K.H., Holzapfel, W.H., 2015. The effects of combined dietary probiotics *Lactococcus lactis* BFE920 and *Lactobacillus plantarum* FGL0001 on innate immunity and disease resistance in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish & shellfish immunology 42*(1), 177-183.

Bendiksen, E.Å., Berg, O.K., Jobling, M., Arnesen, A.M., Måsøval, K., 2003. Digestibility, growth and nutrient utilization of Atlantic salmon parr (*Salmo salar* L.) in relation to temperature, feed fat content and oil source. *Aquaculture 224*(1-4), 283-299.

Boyd, C.E., 1998. Water quality for fish pond. *Aquaculture research and development series*, No 43.

Cabello, F.C., 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental microbiology 8*(7), 1137-1144.

Castex, M., Lemaire, P., Wabete, N., Chim, L., 2009. Effect of dietary probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress status of shrimp *Litopenaeus stylirostris*. *Aquaculture 294*(3-4), 306-313.

Cerezuela, R., Guardiola, F.A., Cuesta, A., Esteban, M.Á., 2016. Enrichment of gilthead seabream (*Sparus aurata L.*) diet with palm fruit extracts and probiotics: effects on skin mucosal immunity. *Fish & shellfish immunology 49*, 100-109.

Crab, R., Defoirdt, T., Bossier, P., Verstraete, W., 2012. Biofloc technology in aquaculture: beneficial effects and future challenges. *Aquaculture 356*, 351-356.

Crab, R., Kochva, M., Verstraete, W., Avnimelech, Y., 2009. Bio-flocs technology application in over-wintering of tilapia. *Aquacultural Engineering 40*(3), 105-112.

Dash, P., Avunje, S., Tandel, R.S., KP, S., Panigrahi, A., 2017. Biocontrol of luminous vibriosis in shrimp aquaculture: a review of current approaches and future perspectives. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture 25*(3), 245-255.

Dawood, M.A. and Koshio, S., 2016. Recent advances in the role of probiotics and prebiotics in carp aquaculture: a review. *Aquaculture 454*, 243-251.

de Oliveira Alves, G.F., Fernandes, A.F.A., de Alvarenga, É.R., Turra, E.M., de Sousa, A.B. and de Alencar Teixeira, E., 2017. Effect of the transfer at different moments of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to the biofloc system in formation. *Aquaculture 479*, 564-570.

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.

De, B.C., Meena, D.K., Behera, B.K., Das, P., Mohapatra, P.D., Sharma, A.P., 2014. Probiotics in fish and shellfish culture: immunomodulatory and ecophysiological responses. *Fish physiology and biochemistry 40*(3), 921-971.

Dos Santos, N.M., Taverne-Thiele, J.J., Barnes, A.C., van Muiswinkel, W.B., Ellis, A.E., Rombout, J.H., 2001. The gill is a major organ for antibody secreting cell production following direct immersion of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) in a *Photobacterium damselae* ssp. piscicida bacterin: an ontogenetic study. *Fish & shellfish immunology 11*(1), 65-74.

Ebeling, J.M., Timmons, M.B., Bisogni, J.J., 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia–nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture 257*(1-4), 346-358.

Ekasari, J. and Maryam, S., 2012. Evaluation of biofloc technology application on water quality and production performance of red tilapia *Oreochromis sp*. cultured at different stocking densities. *Hayati journal of Biosciences 19*(2), 73-80.

Ellis, A.E., 1990. Lysozyme assays. *Techniques in fish immunology*, *1*, pp.101-103.

El-Sayed, A., 1984. FM (2006) Tilapia culture. *Cabi, Massachusetts*.

Guardiola, F.A., Bahi, A., Bakhrouf, A., Esteban, M.A., 2017. Effects of dietary supplementation with fenugreek seeds, alone or in combination with probiotics, on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) skin mucosal immunity. *Fish & shellfish immunology 65*, 169-178.

Guerreiro, I., Couto, A., Machado, M., Castro, C., Pousão-Ferreira, P., Oliva-Teles, A., Enes, P., 2016. Prebiotics effect on immune and hepatic oxidative status and gut morphology of white sea bream (Diplodus sargus). *Fish & shellfish immunology 50*, 168-174.

Hajirezaee, S., Mohammadi, G., Naserabad, S.S., 2019. The protective effects of vitamin C on common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to titanium oxide nanoparticles (TiO2-NPs). *Aquaculture* 518, 734-734.

Hansen, G.H. and Olafsen, J.A., 1989. Bacterial colonization of cod (*Gadus morhua* L.) and halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) eggs in marine aquaculture. *Appl. Environment. Microbiology 55*(6), 1435-1446.

Hapsari, F., 2016. The effect of fermented and non-fermented biofloc inoculated with bacterium Bacillus cereus for catfish (*Clarias gariepinus*) juveniles. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation 9*(2), 334-339.

Hargreaves, J.A., 2006. Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. *Aquacultural engineering 34*(3), 344-363.

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 241*(1-4), 79-194.

Hernandez, L.H.H., Barrera, T.C., Mejia, J.C., Mejia, G.C., Del Carmen, M., Dosta, M., De Lara Andrade, R., Sotres, J.A.M., 2010. Effects of the commercial probiotic Lactobacillus casei on the growth, protein content of skin mucus and stress resistance of juveniles of the Porthole livebearer *Poecilopsis gracilis* (Poecilidae). *Aquaculture Nutrition 16*(4), 407-411.

Holland, M.C.H. and Lambris, J.D., 2002. The complement system in teleosts. *Fish & shellfish immunology 12*(5), 399-420.

Hoseinifar, S.H., Esteban, M.Á., Cuesta, A. and Sun, Y.Z., 2015. Prebiotics and fish immune response: a review of current knowledge and future perspectives. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture 23*(4), 315-328.

Hoseinifar, S.H., Roosta, Z., Hajimoradloo, A., Vakili, F., 2015. The effects of Lactobacillus acidophilus as feed supplement on skin mucosal immune parameters, intestinal microbiota, stress resistance and growth performance of black swordtail (*Xiphophorus helleri*). *Fish & shellfish immunology 42*(2), 533-538.

Kamilya, D., Debbarma, M., Pal, P., Kheti, B., Sarkar, S., 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. *Chemosphere 182*, 8-14.

Long, L., Yang, J., Li, Y., Guan, C., Wu, F., 2015. Effect of biofloc technology on growth, digestive enzyme activity, hematology, and immune response of genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture 448*, 135-141.

Luo, G., Gao, Q., Wang, C., Liu, W., Sun, D., Li, L. and Tan, H., 2014. Growth, digestive activity, welfare, and partial cost-effectiveness of genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in a recirculating aquaculture system and an indoor biofloc system. *Aquaculture 422*, 1-7.

Magnadóttir, B., 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish & shellfish immunology 20*(2), 137-151.

Mansour, A.T. and Esteban, M.Á., 2017. Effects of carbon sources and plant protein levels in a biofloc system on growth performance, and the immune and antioxidant status of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish & shellfish immunology 64*, 202-209.

McMillan, D.N. and Secombes, C.J., 1997. Isolation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestinal intraepithelial lymphocytes (IEL) and measurement of their cytotoxic activity. *Fish & Shellfish Immunology 7*(8), 527-541.

Medzhitov, R., 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, *449*(7164), pp.819-826.

Miao, S., Zhu, J., Zhao, C., Sun, L., Zhang, X., Chen, G., 2017. Effects of C/N ratio control combined with probiotics on the immune response, disease resistance, intestinal microbiota and morphology of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). *Aquaculture 476*, 125-133.

Mohammadi, G., Rashidian, G., Hoseinifar, S.H., Naserabad, S.S. and Van Doan, H., 2020. Ginger (*Zingiber officinale*) extract affects growth performance, body composition, haematology, serum and mucosal immune parameters in common carp (*Cyprinus carpio*). *Fish & Shellfish Immunology*.

Moss, S.M., Divakaran, S., Kim, B.G., 2001. Stimulating effects of pond water on digestive enzyme activity in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquaculture Research 32*(2), 125-131.

Nayak, S.K., 2010. Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish & shellfish immunology 29*(1), 2-14.

Nhi, N.H.Y., Da, C.T., Lundh, T., Lan, T.T., Kiessling, A., 2018. Comparative evaluation of Brewer's yeast as a replacement for fishmeal in diets for tilapia (*Oreochromis niloticus*), reared in clear water or biofloc environments. *Aquaculture 495*, 654-660.

Panigrahi, A., Kiron, V., Puangkaew, J., Kobayashi, T., Satoh, S., Sugita, H., 2005. The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss. Aquaculture 243*(1-4), 241-254.

Parson, R.P., Maita, Y., Lalli, C.M., 1984. A manual for chemical and biological methods in seawater. *Analysis*.

Pirarat, N., Pinpimai, K., Rodkhum, C., Chansue, N., Ooi, E.L., Katagiri, T., Maita, M., 2015. Viability and morphological evaluation of alginate-encapsulated Lactobacillus rhamnosus GG under simulated tilapia gastrointestinal conditions and its effect on growth performance, intestinal morphology and protection against Streptococcus agalactiae. *Animal Feed Science and Technology 207*, 93-103.

Rajan, B., Fernandes, J.M., Caipang, C.M., Kiron, V., Rombout, J.H., Brinchmann, M.F., 2011. Proteome reference map of the skin mucus of Atlantic cod (Gadus morhua) revealing immune competent molecules. *Fish & shellfish immunology 31*(2), 224-231.

Romero, J., Feijoó, C.G., Navarrete, P., 2012. Antibiotics in aquaculture–use, abuse and alternatives. *Health and environment in aquaculture*, *159*.

Salles, C.M.C., Gagliano, P., Leitão, S.A.T., Salles, J.B., Guedes, H.L.M., Cassano, V.P.F., De-Simone, S.G., 2007. Identification and characterization of proteases from skin mucus of tambacu, a Neotropical hybrid fish. *Fish physiology and biochemistry 33*(2), 173.

Sartika, D., Harpeni, E., Diantari, R., 2012. Effect of molasses on the application of probiotic on water quality, growth and survival rate of the common carp (*Cyprinus carpio*). *Jurnal Rekayasa dan Teknologi Budidaya Perairan 1*(1), 57-64.

Sheikhzadeh, N., Heidarieh, M., Pashaki, A.K., Nofouzi, K., Farshbafi, M.A., Akbari, M., 2012. Hilyses®, fermented Saccharomyces cerevisiae, enhances the growth performance and skin non-specific immune parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & shellfish immunology 32*(6), 1083-1087.

Skjermo, J. and Vadstein, O., 1999. Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. *Aquaculture 177*(1-4), 333-343.

Son, V.M., Chang, C.C., Wu, M.C., Guu, Y.K., Chiu, C.H., Cheng, W., 2009. Dietary administration of the probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper *Epinephelus coioides*. *Fish & Shellfish Immunology 26*(5), 691-698.

Song, S.K., Beck, B.R., Kim, D., Park, J., Kim, J., Kim, H.D., Ringø, E., 2014. Prebiotics as immunostimulants in aquaculture: a review. *Fish & shellfish immunology 40*(1), 40-48.

Sørum, H., 2006. Antimicrobial drug resistance in fish pathogens. In *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin . American Society of Microbiology* 213-238

Van Doan, H., Hoseinifar, S.H., Dawood, M.A., Chitmanat, C., Tayyamath, K., 2017. Effects of Cordyceps militaris spent mushroom substrate and *Lactobacillus plantarum* on mucosal, serum immunology and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish & shellfish immunology 70*, 87-94.

Wang, G., Yu, E., Xie, J., Yu, D., Li, Z., Luo, W., Qiu, L., Zheng, Z., 2015. Effect of C/N ratio on water quality in zero-water exchange tanks and the biofloc supplementation in feed on the growth performance of crucian carp, *Carassius auratus*. *Aquaculture 443*, 98-104.

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 356*, 147-152.

Yano, T., 1992. Assays of hemolytic complement activity. *Techniques in fish immunology* 131-141.

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

Zhou, X.X., Wang, Y.B., Li, W.F., 2009. Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. *Aquaculture 287*(3-4), 349-353.