

مقاله پژوهشی

اثرات متقابل تراکم ذخیره‌سازی و سطح پروتئین جیره بر برخی شاخص‌های رشد، خون‌شناسی و پاسخ ایمنی بچه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) به باکتری *Aeromonas hydrophila* در سیستم نوین بیوفلاک

حسین آدینه<sup>۱\*</sup>، مهدی نادری<sup>۲</sup>، حجت‌الله جعفریان<sup>۳</sup>، محمد خادمی حمیدی<sup>۴</sup>، مرتضی یوسفی<sup>۵</sup>، احسان احمدی‌فر<sup>۶</sup>

تاریخ پذیرش: فروردین ۱۴۰۱

تاریخ دریافت: اسفند ۱۴۰۰

چکیده

در مطالعه حاضر تاثیر تراکم و سطح پروتئین جیره بر رشد، خون‌شناسی، ایمنی و مقاومت در برابر باکتری *Aeromonas hydrophila* در ماهی کپور معمولی تحت شرایط بیوفلاک به مدت ۶۰ روز بررسی شد. بچه ماهیان کپور (۱۲/۰۹±۰/۹۹ گرم) در ۱۵ مخزن در طرح فاکتوریل ۲×۲ متشکل از دو تراکم و دو سطح پروتئین در سیستم بیوفلاک شامل تراکم متوسط ذخیره‌سازی (۱۰ کیلوگرم در متر مکعب) با ۲۵ و ۳۵ درصد پروتئین (MD25 و MD35) و تراکم بالای ذخیره‌سازی (۲۰ کیلوگرم در متر مکعب) با ۲۵ و ۳۵ درصد پروتئین (HD25 و HD35) ذخیره شدند. ماهیان گروه شاهد در آب تمیز با تراکم متوسط (۱۰ کیلوگرم در متر مکعب) و پروتئین ۳۵ درصد بودند. در گروه MD35 رشد ماهیان به طور معنی‌داری بیشتر و ضریب تبدیل غذایی در مقایسه با گروه‌های دیگر کمتر بود. گلبول‌های سفید، مقادیر هموگلوبین و هماتوکریت کاهش و نسبت گلبول‌های قرمز در ماهیان پرورش یافته در گروه MD35 افزایش یافت. مقادیر ایمونوگلوبولین M، کمیلمان و فعالیت باکتری‌کشی سرم ماهی در گروه MD35 به طور معنی‌داری بیشتر از گروه‌های دیگر بود. بر اساس نتایج حاضر توصیه می‌شود پرورش ماهی کپور معمولی در سیستم بیوفلاک با تراکم ۱۰ کیلوگرم در متر مکعب انجام پذیرد. همچنین سیستم بیوفلاک می‌تواند تا ۱۰ درصد کاهش پروتئین را در جیره غذایی در گروه تراکم متوسط جبران کند.

**واژگان کلیدی:** بیوفلاک، تراکم، پروتئین جیره، *Aeromonas hydrophila*، ماهی کپور معمولی.

۱- استادیار گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران.

۲- دکتری شیلات، سازمان شیلات ایران، بهبهان، ایران.

۳- دانشیار گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گلستان، ایران.

۴- کارشناس ارشد شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گلستان، ایران.

۵- دانشیار گروه دامپزشکی، موسسه کشاورزی و فناوری، دانشگاه رودن، مسکو، روسیه.

۶- استادیار گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

\* نویسنده مسئول: [adineh.h@gonbad.ac.ir](mailto:adineh.h@gonbad.ac.ir)

DOI: 10.22124/japb.2022.21823.1459

## مقدمه

آبزیان داشته باشد (Xu et al., 2012) که منجر به افزایش بهره‌وری تغذیه و رشد شود (Azim and Little, 2008; Liu et al., 2018). بنابراین، یکی از مهم‌ترین اهداف به کارگیری سیستم بیوفلاک برای پرورش آبزیان، کاهش هزینه غذا و تغذیه با جایگزینی پروتئین میکروبی تولید شده در این سیستم است. از این رو، در این محیط می‌توان مقدار غذای مصرفی را تا حد امکان برای ماهی و میگو کاهش داد و یا به عبارتی فلاک میکروبی را جایگزین غذای تجاری کرد (آدینه و هرسیج، ۱۳۹۷؛ آدینه و همکاران، ۱۴۰۰).

در سیستم‌های نوین به منظور افزایش تولید در واحد سطح نیز تراکم ذخیره‌سازی و پرورش به صورت متراکم و فوق متراکم برنامه‌ریزی می‌شود. تراکم ذخیره‌سازی به طور مستقیم مرتبط با آسایش ماهی و بازده پرورش است و می‌تواند یک شاخص تعیین کننده در بازده اقتصادی تولید باشد (Andrade et al., 2015). بنابراین تراکم پرورش یکی از شاخص‌های کلیدی در افزایش بهره‌وری و سودآوری در مزارع پرورش تلقی می‌شود.

افزایش بیش از حد دامنه تحمل ماهی نسبت به تراکم ذخیره‌سازی باعث تداخل در

یکی از معیارهای بسیار مهم در توسعه صنعت آبزی‌پروری به کارگیری تکنولوژی‌های نوین در راستای افزایش تولید است. تکنولوژی بیوفلاک به عنوان یکی از ابزارهای توسعه آبزی‌پروری می‌تواند به طور همزمان بر شرایط محیطی و اقتصادی اثرگذار باشد (Crab et al., 2012). اساس کار تکنولوژی بیوفلاک، تبدیل ضایعات نیتروژنی به زیست‌توده میکروبی (بیوفلاک) است که در محیط پرورش به عنوان منبع غذایی مورد استفاده ماهی قرار می‌گیرد (De Schryver et al., 2008; Avnimelech, 2009). فلاک‌های میکروبی به طور مداوم در محیط پرورش، پروتئین (اسیدهای آمینه ضروری)، اسیدهای چرب اشباع نشده، ویتامین‌ها و مواد معدنی را تامین می‌کنند (Azim and Little, 2008; De Schryver et al., 2008). با توجه به این که حدود ۶۰ درصد از هزینه‌های تولید و پرورش مربوط به غذا و تغذیه است، بنابراین یکی از مسائل قابل توجه در پرورش آبزیان، استفاده از پروتئین‌های میکروبی و کاهش مدت زمان تولید در جهت کاهش هزینه‌ها و بالا بردن بازده تولید است. در این راستا استفاده از بیوفلاک می‌تواند تاثیرات مفیدی بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی در

می‌تواند به عنوان یکی از منابع تامین پروتئین مورد نیاز جوامع انسانی نقش مهمی را در این باره ایفا کند (Balcazar et al., 2006). ماهی کپور معمولی به دلیل رشد سریع، آسانی پرورش و بازده غذایی بالا تقریباً در تمام مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری جهان پرورش داده می‌شود (Tokur et al., 2006). تولید جهانی این گونه در سال ۲۰۱۸ به ۴/۱۸۹ میلیون تن رسید (FAO, 2020). کشور ایران از ۵۲۶۷۲۹ تن تولید کل آبزیان در حدود ۲۱۲۷۷۵ تن تولید ماهیان گرمابی را به خود اختصاص داده است (سازمان شیلات ایران، ۱۳۹۸).

یکی از بیماری‌های باکتریایی شایع و فرصت‌طلب که تحت تاثیر شرایط استرس‌زا مانند افزایش تراکم ذخیره‌سازی ازدیاد پیدا می‌کند ابتلا به باکتری *Aeromonas hydrophila* است. محیط‌های آبی به عنوان منبع اصلی باکتری‌های *Aeromonas* مورد توجه هستند و ماهی را به عنوان منبع اصلی این باکتری‌ها معرفی می‌کنند (Swaminathan et al., 2004). از آنجایی که ماهی کپور معمولی توانایی تحمل تراکم بالای پرورش را دارد و تراکم ذخیره‌سازی تاثیر عمیقی بر سوخت و ساز بدن و استرس می‌گذارد (Braun et al., 2010) بنابراین هدف از این مطالعه بررسی اثرات تراکم

فعالیت آنزیم‌های متابولیک و آنتی‌اکسیدانی شده و عدم کنترل آن می‌تواند موجب استرس در محیط پرورش آبزیان شود (Aksakal et al., 2011). استرس محیطی ناشی از تراکم می‌تواند بر کارایی تولید و عملکرد سیستم ایمنی اثرگذار باشد (North et al., 2006). بر اساس گزارش‌های منتشر شده در سیستم بیوفلاک می‌توان تراکم ذخیره‌سازی را افزایش داد و تعداد ماهی را بیش از سیستم‌های معمولی پیش‌بینی کرد (Fauji et al., 2018; Liu et al., 2018) که این نشان از شرایط بدون استرس محیط بیوفلاک دارد (Adineh et al., 2019). اما توجه به شرایط تولید و کنترل فلاک نیز حائز اهمیت است.

در محیط بیوفلاک گونه‌هایی که رژیم غذایی همه‌چیزخواری و کفزی‌خواری دارند و گرمادوست و تراکم‌پذیری هستند انتخاب مناسبی برای نگهداری و پرورش هستند. ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) از مهم‌ترین گونه‌های در حال پرورش در دنیا محسوب می‌شود که به علت توجیه اقتصادی در اغلب کشورها از اهمیت پرورشی ویژه‌ای برخوردار است. امروزه با توجه به روند رو به رشد جمعیت جهان و نیاز انسان‌ها به دستیابی به منابع پروتئینی متنوع و سالم، صنعت آبزی‌پروری

چغندر قند با ۴۰ درصد کربن) استفاده شد (Avnimelech, 2009). از خاک رس پس از عبور از الک ۲۵۰ میکرونی به دلیل داشتن بار الکتریکی برای چسبیدن ذرات به یکدیگر و کمک در تشکیل بیوفلاک استفاده شد (Crab et al., 2012). برای تسریع در تشکیل بیوفلاک به مدت ۱۴ روز نیز دمای آب بالای ۲۲ درجه سانتی‌گراد، هوادهی شدید برای جلوگیری از رسوب مواد و تاریکی محیط برای تکثیر باکتری‌های نیتروبیوسکوپ فراهم شد (آدینه و هرسیچ، ۱۳۹۷). هنگامی که مقدار جامدات معلق کل در آب (TSS) به حدود ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر رسید (Najdegerami et al., 2016)، هوادهی قطع و استوک بیوفلاک تشکیل شده از توری با چشمه ۱۰ میکرومتر عبور داده شد. به هر مخزن در گروه آزمایشی بیوفلاک مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر در لیتر از استوک اولیه بیوفلاک تزریق شد (Xu and Pan, 2013). در طول دوره آزمایش برای اثبات وجود توده فلاک و موجودات ریز میکروسکوپی از آب محیط پرورش ماهی نمونه‌برداری و با استریومیکروسکوپ مجهز به دوربین دیجیتال (Nikon, ECLIPSE-E100، ژاپن) عکس تهیه شد (شکل ۱).

ذخیره‌سازی و پروتئین جیره غذایی بر رشد، فراسنجه‌های خونی و پاسخ ایمنی بچه ماهی کپور معمولی به باکتری *Aeromonas hydrophila* در سیستم بیوفلاک بوده است.

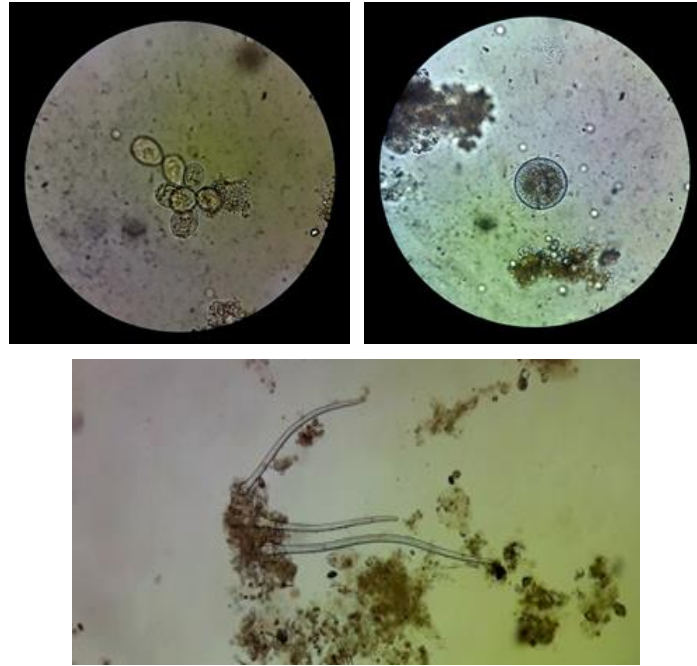
## مواد و روش‌ها

### تهیه ماهی کپور و شرایط آزمایشگاه

مجموع ۱۲۵۰ قطعه بچه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) از مزرعه پرورش ماهی گرمابی نوازنده (ساری، مازندران) تهیه و به آزمایشگاه آبی‌پروری دانشگاه گنبد (گنبد کاووس، گلستان) انتقال یافت. ماهیان به مدت ۱۴ روز با شرایط آزمایشگاهی سازگاری شدند. ۱۰۵۰ قطعه ماهی با میانگین وزنی  $12/09 \pm 0/99$  گرم به طور تصادفی در ۱۵ مخزن با حجم آبیگری ۶۰ لیتر توزیع شدند.

### آماده‌سازی اولیه فلاک

برای آماده‌سازی اولیه فلاک از دو مخزن مدور با حجم آبیگری ۴۰ لیتر (۲۰ لیتر آب مزرعه پرورش ماهی و ۲۰ لیتر آب معمولی) استفاده شد. برای تولید فلاک به مخازن مواد تامین کننده ازت (غذای ماهی با ۳۵ درصد پروتئین) و مواد تامین کننده کربن (ملاس



شکل ۱: بیوفلاک و موجودات ریز میکروسکوپی در محیط پرورش ماهی

#### تهیه جیره غذایی ماهی

درصد) از چرخ گوشت عبور داده شده تا رشته‌های غذایی تهیه و سپس در آون در محدوده دمایی ۵۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد. غذای ساخته شده پس از خرد شدن به اندازه دهان ماهی بسته‌بندی و در یخچال نگهداری شد. آنالیز تقریبی جیره غذایی بر اساس استاندارد AOAC (۲۰۰۵) انجام شد. برای سنجش ماده خشک، با قرار دادن نمونه‌ها در کوره در دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ ساعت اندازه‌گیری شد.

برای تهیه جیره غذایی پایه اقلام غذایی تهیه شد. جیره‌ها با استفاده از نرم‌افزار جیره‌نویسی UFFDA در دو سطح پروتئین ۲۵ و ۳۵ درصد با مقادیر مشابه انرژی تنظیم شدند (جدول ۱). بعد از تهیه اقلام غذایی، ابتدا مواد اولیه آسیاب و سپس توسط الک ۱۰۰ میکرونی عبور داده شد تا مواد به صورت پودری و همگن شود. برای تهیه خمیر از آب استریل استفاده شد. خمیر آماده شده در دو گروه مجزا (پروتئین ۲۵ و ۳۵

جدول ۱: اجزای تشکیل دهنده و ترکیب تقریبی جیره‌های آزمایشی

پروتئین ۲۵٪	پروتئین ۳۵٪	
اجزای جیره (گرم در کیلوگرم جیره)		
۷۰	۱۰۰	پودر ماهی
۱۳۰	۲۰۰	پودر گوشت
۱۲۰	۲۳۰	کنجاله سویا
۲۷۰	۳۴۹	آرد گندم
۳۷۹	۹۰	پودر ذرت
۷	۷	روغن ماهی
۷	۷	روغن سویا
۷	۷	لیزین
۵	۵	متیونین
۲/۵	۲/۵	مکمل ویتامینه
۲/۵	۲/۵	مکمل معدنی
آنالیز تقریبی جیره		
۴۰۴۷/۳۱۵	۴۰۵۲/۹۹۰	انرژی (kcal/Kg)
۲۴/۸۹	۳۵/۱۲	پروتئین (%)
۵/۶۳	۵/۱۰	چربی (%)
۸۶/۲۳	۸۶/۰۸	ماده خشک (%)
۲/۵۵	۲/۳۴	فیبر (%)
۵/۷۸	۴/۲۰	خاکستر (%)

پروتئین خام (۶/۲۵ × ازت) بعد از هضم اسیدی به روش کجلدال و میزان چربی جیره از طریق استخراج با دی اتیل اتر به روش سوکسله سنجش شد.

طرح آزمایش ماهیان در یک طرح کاملاً تصادفی ۲×۲ در ۴ تیمار آزمایش با ۲ سطح پروتئین (۲۵ و ۳۵ درصد) و ۲ سطح تراکم (۱۰ و ۲۰ کیلوگرم در متر مکعب) در سیستم بیوفلاک و ۱ تیمار شاهد

### عملکرد رشد و تغذیه

در پایان ۶۰ روز دوره پرورش با اندازه‌گیری وزن کل با ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۱ و طول کل با استفاده از تخته زیست‌سنجی با دقت ۰/۱ سانتی‌متر، شاخص‌های رشد و تغذیه ماهی کپور معمولی شامل افزایش وزن (WG)، ضریب تبدیل غذایی (FCR) و کارایی تبدیل غذا (FCE) بر اساس رابط‌های ۱ تا ۳ محاسبه شد (Adineh et al., 2021).

رابطه ۱:

$$WG (g) = W_f - W_i$$

$W_i$ : وزن اولیه (گرم)؛  $W_f$ : وزن نهایی (گرم).

رابطه ۲:

$$FCR = F / (WG)$$

F: غذای مصرف شده (گرم)؛ WG: افزایش وزن (گرم).

رابطه ۳:

$$FCE (\%) = (WG / F) \times 100$$

WG: وزن به دست آمده (گرم)؛ F: غذای مصرف شده (گرم).

### نمونه‌برداری از خون

بعد از دوره پرورش ماهی در سیستم بیوفلاک، به مدت ۲۴ ساعت غذادهی قطع شد. سپس ماهیان با پودر گل میخک (۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بیهوش و نمونه‌گیری خون به

در آب تمیز بدون بیوفلاک شامل: تیمار تراکم متوسط (۱۰ کیلوگرم در متر مکعب) با ۳۵ درصد پروتئین جیره (MD35)، تیمار تراکم متوسط با ۲۵ درصد پروتئین جیره (MD25)، تیمار تراکم زیاد (۲۰ کیلوگرم در متر مکعب) با ۳۵ درصد پروتئین جیره (HD35) و تیمار تراکم زیاد با ۲۵ درصد پروتئین جیره (HD25) و همچنین تیمار شاهد بدون بیوفلاک با تراکم متوسط ۱۰ کیلوگرم در متر مکعب و پروتئین ۳۵ درصد جیره قرار گرفتند (هر تیمار با سه تکرار).

برای تنظیم نسبت کربن به ازت برابر ۱۵ به ۱ در تیمارهای ۳۵ درصد و ۲۵ درصد پروتئین به شرح زیر عمل شد (Crab et al., 2012): بر اساس معادله  $[N \times 6 / 25 = 35]$ ، مقدار ازت در ۱۰۰ گرم غذا با ۳۵ درصد پروتئین برابر ۵/۶ گرم محاسبه شد. از آنجایی که نسبت کربن ۱۵ برابر است و مقدار کربن موجود در ملاس ۴۰ درصد است بنابراین نیاز به ۲۱۰ گرم ملاس بود [گرم  $210 = 2/5 \times 40 \times 15 = 84$ ]. بر اساس معادله بالا برای تیمار با ۲۵ درصد پروتئین نیاز به ۱۵۰ گرم ملاس بود [گرم  $150 = 2/5 \times 40 \times 15 = 60$ ]. در طول دوره آزمایش حجم فلاک توسط ظروف مخروطی مدرج ایمهوف سنجش و کنترل شد.

خوانده شد (Rehulka, 2000). غلظت هموگلوبین (Hb) به روش سیانومت هموگلوبین تعیین شد. بدین منظور مقدار ۲۰ میکرولیتر خون منعقد نشده با ۵ میلی لیتر محلول درابکین مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در محیط تاریک قرار داده شد، سپس به وسیله اسپکتوفوتومتر در طول موج ۵۴۰ نانومتر مقدار جذب خوانده شد و سرانجام به وسیله منحنی استاندارد دی که قبلاً تهیه شده بود و بر اساس رابطه ۴ مقدار هموگلوبین نمونه مورد نظر محاسبه شد (Goldenfarb et al., 1971).

رابطه ۴:

$$\text{Hb (g/dL)} = (\text{A}_{\text{Hb}} / \text{A}_{\text{S}}) \times \text{C}_{\text{S}}$$

$\text{A}_{\text{Hb}}$ : جذب نمونه؛  $\text{A}_{\text{S}}$ : جذب استاندارد؛  $\text{C}_{\text{S}}$ : غلظت هموگلوبین استاندارد (گرم در دسی لیتر).

محاسبه ضرایب گلبولی شامل متوسط حجم گلبول قرمز (MCV)، متوسط هموگلوبین در هر گلبول قرمز (MCH) و غلظت متوسط هموگلوبین گلبول قرمز (MCHC) از طریق رابطه‌های ۵ تا ۷ انجام شد (Lee et al., 1998).

رابطه ۵:

$$\text{MCV (fL)} = [\text{Hct} / \text{RBC (per million)}] \times 10$$

رابطه ۶:

$$\text{MCH (pg)} = [\text{Hb} / \text{RBC (per million)}] \times 10$$

طور تصادفی از ۴ ماهی از هر وان (۱۲ ماهی از هر تیمار) و با استفاده از سرنگ از سیاهرگ ساقه دمی ماهی انجام شد. ۰/۵ میلی لیتر خون به داخل ویال آغشته به ماده ضدانعقاد خون (هپارینه) برای بررسی شاخص‌های خون‌شناسی و ۱/۵ میلی لیتر خون غیرهپارینه درون میکروتیوب‌های استریل قرار گرفت و با استفاده از سانتریفیوژ یخچال‌دار به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سرم خون جداسازی شد تا سنجش برخی شاخص‌های متابولیکی سرم خون انجام شود.

شاخص‌های خون‌شناسی

گلبول‌های قرمز (RBC) با کمک محلول رقیق کننده Lewis و لام نئوبار شمارش شد. گلبول‌های سفید (WBC) به کمک محلول رقیق کننده Lewis به همراه ۰/۱ گرم برلیانت کریزل بلو (Brilliant crystal blue) و لام نئوبار شمارش شد. از روش میکروهماتوکریت برای تعیین درصد هماتوکریت (Hct) استفاده شد. بدین منظور دو سوم لوله هماتوکریت از خون منعقد نشده پر شد و لوله‌های هماتوکریت در داخل دستگاه سانتریفیوژ (Nuve، ترکیه) قرار گرفت و پس از ۳ دقیقه با دور ۱۴۰۰ به وسیله صفحه مدرج مخصوص مقدار هماتوکریت



رابطه ۷:

$$\text{MCHC (\%)} = (\text{Hb / Hct}) \times 100$$

به منظور شمارش افتراقی گلبول‌های سفید (نوتروفیل، لنفوسیت و منوسیت) گسترش خونی روی لام‌های شیشه‌ای معمولی تهیه و به روش گیمسا رنگ‌آمیزی شد و نتایج بر حسب درصد به دست آمد (Pathiratne and Rajapakshe, 1998).

#### پاسخ ایمنی ماهی کپور

میزان پروتئین کل و آلبومین سرم با استفاده از کیت‌های تشخیصی (پارس آزمون، ایران) بر اساس دستور العمل شرکت سازنده و به روش رنگ‌سنجی تعیین شد. فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) در سرم با استفاده از کیت‌های تشخیصی (پارس آزمون، ایران) و با دستگاه آنالیزور بیوشیمیایی خودکار تعیین شد. سطح ایمونوگلوبولین M (IgM) سرم از طریق (Enzyme-linked) ELISA (Immunosorbent Assay) و به روش Reyes-Becerril و همکاران (۲۰۰۸) تعیین شد. ایمونوگلوبولین M موجود در نمونه سرم با آنتی‌بادی‌های ضد ایمونوگلوبولین M در محلول تشکیل کمپلکس می‌دهند و باعث کدر شدن محلول می‌شود. میزان کدورت ایجاد شده با

مقدار ایمونوگلوبولین M رابطه مستقیم دارد. فعالیت مکمل Alternative (ACH50) به روش Sunyer و Tort (۱۹۹۵) تعیین شد. بدین منظور فعالیت مکمل بر اساس همولیز گلبول‌های قرمز خرگوش اندازه‌گیری شد. گلبول‌های قرمز خرگوش سه مرتبه با بافر اتیلن گلیکول تترا استیک اسید- منیزیم- ژلاتین ورنال شسته شد و تعداد سلول‌های آن به کمک لام نئوبار در هر میلی‌لیتر بافر  $2 \times 10^8$  سلول در میلی‌لیتر تنظیم شد. ابتدا جذب نوری لیز ۱۰۰ درصد گلبول‌های قرمز خرگوش با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون فوق به  $3/4$  میلی‌لیتر آب مقطر تعیین و سپس نمونه‌های سرم ۱۰۰ برابر با بافر بالا، رقیق شده و حجم‌های متفاوتی از آن در لوله آزمایش استریل تهیه و حجم همه لوله‌ها به کمک بافر به ۲۵۰ میکرولیتر رسانده شد. سرانجام به همه لوله‌ها ۱۰۰ میکرولیتر گلبول قرمز خرگوش اضافه و مخلوط بالا در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه قرار داده شد. در پایان به هر کدام از لوله‌ها  $3/15$  میلی‌لیتر محلول  $0/85$  درصد کلرید سدیم افزوده شد. سپس لوله‌ها در ۱۶۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند و جذب نوری محلول رویی در طول موج ۴۱۴ نانومتر خوانده شد. حجمی از

ترکیب شد و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با حرکت ملایم انکوبه شد. سپس ۵ میکرولیتر از مخلوط سرم و باکتری در محیط کشت TSA در سه تکرار کشت داده شد. محیط‌های کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و سپس به کمک دستگاه کلونی کانتر تعداد کلونی باکتریایی رشد یافته در روی محیط کشت شمارش شد. نتایج به صورت متوسط تعداد باکتری شمارش شده در هر سه تکرار برای هر نمونه گزارش شد.

#### تجزیه و تحلیل‌های آماری

ابتدا نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون Shapiro-Wilk بررسی شد. سپس مقایسه میانگین داده‌های بین تیمارهای آزمایشی (انحراف معیار  $\pm$  میانگین) با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و پس‌آزمون چند دامنه دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد ( $P < 0.05$ ) انجام شد. از آزمون تحلیل واریانس دوطرفه (Two-way ANOVA) برای بررسی اثر متقابل پروتئین جیره و تراکم پرورش بر تغییرات شاخص‌های خون‌شناسی، ایمنی و سنجش قدرت باکتری‌کشی سرم خون استفاده شد. تحلیل‌های

سرم که سبب ۵۰ درصد همولیز می‌شد (k)، تعیین شد و برای محاسبه فعالیت مکمل ( $ACH_{50}$ ) نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفت (رابطه ۸).

رابطه ۸:

$$ACH_{50} (U/mL) = k \times 0.5$$

#### فعالیت ضدباکتریایی سرم

بررسی قدرت باکتری‌کشی سرم از روش گزارش شده توسط Kajita و همکاران (۱۹۹۰) و همچنین Barnes و همکاران (۲۰۰۳) با کمی اصلاح استفاده شد، بدین منظور ابتدا کشت باکتری *Aeromonas hydrophila* در محیط TBS به مدت ۴۸ ساعت انجام شد و سپس سلول‌های باکتریایی توسط دستگاه سانتریفوژ در دامنه ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه جمع‌آوری و با افزودن مقداری بافر فسفات سدیم استریل به آنها جذب نوری سوسپانسیون به دست آمده در طول موج ۵۴۶ نانومتر برابر ۱ تنظیم شد. سپس تعداد باکتری به میزان  $10^5$  باکتری در میلی‌لیتر در ژلاتین وروئال بافر استریل (حاوی ۰/۵ میلی‌مول در میلی‌لیتر یون کلسیم و ۰/۱۵ میلی‌مول در میلی‌لیتر یون منیزیم با pH ۷/۵) تنظیم شد. سوسپانسیون باکتریایی به دست آمده به نسبت ۱:۱ با سرم

آماري با استفاده از نرم‌افزار IBM SPSS Statistics نسخه ۲۳ انجام شد. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Microsoft Office Excel 2016 استفاده شد.

### نتایج

#### عملکرد رشد و تغذیه

نتایج ارزیابی وزن نهایی، افزایش وزن و ضریب تبدیل غذایی ماهی کپور تغذیه شده با تیمارهای MD35 و HD25 مشاهده شد. کمترین و بیشترین ضریب تبدیل غذایی به ترتیب در تیمارهای MD35 و HD25 مشاهده شد.

جدول ۲: شاخص‌های رشد و تغذیه ماهی کپور معمولی پرورش یافته با دو سطح تراکم و پروتئین در محیط بیوفلاک (میانگین  $\pm$  انحراف معیار)

وزن نهایی (گرم)	افزایش وزن (گرم)	ضریب تبدیل غذایی	کارایی تبدیل غذا	
آزمون یک‌طرفه				
شاهد	۲۶/۷۱ $\pm$ ۱/۸۶ <sup>b</sup>	۱۴/۶۸ $\pm$ ۲/۲۰ <sup>b</sup>	۱/۷۷ $\pm$ ۰/۳۱ <sup>bc</sup>	۵۸/۰۵ $\pm$ ۱۰/۲۰ <sup>b</sup>
MD35	۲۹/۲۱ $\pm$ ۲/۲۸ <sup>a</sup>	۱۶/۷۹ $\pm$ ۲/۱۲ <sup>a</sup>	۱/۵۴ $\pm$ ۰/۱۹ <sup>d</sup>	۶۵/۹۴ $\pm$ ۸/۴۶ <sup>a</sup>
MD25	۲۷/۴۷ $\pm$ ۱/۸۲ <sup>b</sup>	۱۵/۱۲ $\pm$ ۲/۱۰ <sup>b</sup>	۱/۷۱ $\pm$ ۰/۲۷ <sup>cd</sup>	۵۹/۵۷ $\pm$ ۸/۵۹ <sup>b</sup>
HD35	۲۲/۹۰ $\pm$ ۲/۰۱ <sup>c</sup>	۱۰/۹۰ $\pm$ ۲/۲۰ <sup>c</sup>	۱/۹۳ $\pm$ ۰/۵۲ <sup>b</sup>	۵۴/۹۰ $\pm$ ۱۳/۰۱ <sup>b</sup>
HD25	۲۰/۳۹ $\pm$ ۱/۸۵ <sup>d</sup>	۸/۴۵ $\pm$ ۱/۹۰ <sup>d</sup>	۲/۲۴ $\pm$ ۰/۶۳ <sup>a</sup>	۴۷/۸۶ $\pm$ ۱۲/۵۱ <sup>c</sup>
آزمون دوطرفه				
D	P < ۰/۰۰۱	P < ۰/۰۰۱	P < ۰/۰۰۱	P < ۰/۰۰۱
P	P < ۰/۰۰۱	P < ۰/۰۰۱	P = ۰/۰۰۳	P < ۰/۰۰۱
D×P	NS	NS	NS	NS

حروف غیرمشابه در هر ستون نشان از وجود اختلاف آماری است (P < ۰/۰۰۵). MD35: تراکم متوسط با ۳۵ درصد پروتئین؛ MD25: تراکم متوسط با ۲۵ درصد پروتئین؛ HD35: تراکم زیاد با ۳۵ درصد پروتئین؛ HD25: تراکم زیاد با ۲۵ درصد پروتئین؛ D: تراکم؛ P: پروتئین؛ D×P: اثر متقابل؛ NS: عدم وجود اختلاف معنی‌دار آماری (P > ۰/۰۰۵).

به طور کلی آزمون تحلیل واریانس دوطرفه نشان داد که دو عامل تراکم و پروتئین به صورت مجزا بر شاخص‌های رشد و تغذیه تاثیر معنی‌دار آماری داشتند در حالی که این دو عامل نتوانستند بر شاخص‌های رشد و تغذیه اثر متقابل داشته باشند.

#### شاخص‌های خون‌شناسی

نتایج به دست آمده از شاخص‌های خون‌شناسی ماهی کپور معمولی پرورش یافته در سیستم بیوفلاک در جدول ۳ آورده شده است ( $P < 0/05$ ). تعداد گلبول‌های سفید بین تیمارهای مختلف آزمایشی اختلاف آماری معنی‌داری داشت، به طوری که بیشترین آن در تیمار HD35 و کمترین آن در تیمارهای MD35 و MD25 به دست آمد ( $P < 0/05$ ). گلبول‌های سفید تحت تاثیر تراکم ذخیره‌سازی و پروتئین جیره قرار گرفت و اثر متقابل نیز مشاهده شد. گلبول‌های قرمز کاهش معنی‌دار آماری در تیمار HD25 داشت در حالی که در تیمارهای دیگر آزمایشی تفاوت آماری نداشت. تراکم و پروتئین به طور مجزا بر گلبول‌های قرمز اثر معنی‌داری داشتند، اما این دو عامل به طور

همزمان بر گلبول‌های قرمز اثر متقابل نداشت. هموگلوبین، هماتوکریت و متوسط حجم گلبول قرمز (MCV) کاهش معنی‌دار آماری در تیمار MD35 داشت، اما در دیگر تیمارهای آزمایشی اختلاف آماری مشاهده نشد. بین دو عامل تراکم و پروتئین غذا تنها تراکم ذخیره‌سازی توانست تاثیر معنی‌دار آماری بر این شاخص‌ها داشته باشد. بیشترین غلظت متوسط هموگلوبین گلبول قرمز (MCHC) در تیمار شاهد به دست آمد. درصد نوتروفیل‌ها بین تیمارهای آزمایشی اختلاف آماری معنی‌داری داشت به طوری که بیشترین آن در تیمار HD35 به دست آمد ( $P < 0/05$ ). دو عامل تراکم و پروتئین غذا به طور مجزا بر درصد نوتروفیل تاثیر معنی‌دار آماری داشت، همچنین اثر متقابل این دو عامل بر درصد نوتروفیل نیز به دست آمد. درصد مونوسیت‌ها در تیمار HD25 در مقایسه با دیگر تیمارهای آزمایشی کاهش معنی‌دار آماری داشت. دو عامل تراکم و پروتئین غذا تنها به طور مجزا بر درصد لنفوسیت‌ها و درصد مونوسیت‌ها اثرات معنی‌دار آماری داشتند، در حالی که اثر متقابل مشاهده نشد.

جدول ۳: شاخص‌های خون‌شناسی ماهی کپور معمولی در سیستم بیوفلاک تحت تاثیر تراکم ذخیره‌سازی و پروتئین جیره غذایی (میانگین  $\pm$  انحراف معیار)

آزمون دوطرفه			تیمارهای آزمایشی				شاخص	
D×P	P	D	HD25	HD35	MD25	MD35		شاهد
P<۰/۰۰۱	P<۰/۰۰۱	P<۰/۰۰۱	۵/۴۰±۰/۲۰ <sup>b</sup>	۷/۱۳±۰/۲۵ <sup>a</sup>	۴/۱۳±۰/۲۰ <sup>d</sup>	۳/۹۰±۰/۱۰ <sup>d</sup>	۴/۹۶±۰/۱۵ <sup>c</sup>	WBC (×10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )
NS	P=۰/۰۴۳	P=۰/۰۰۴	۱/۱۲±۰/۰۵ <sup>b</sup>	۱/۳۰±۰/۱۰ <sup>a</sup>	۱/۳۷±۰/۰۴ <sup>a</sup>	۱/۴۰±۰/۰۸ <sup>a</sup>	۱/۳۱±۰/۰۹ <sup>a</sup>	RBC (×10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )
P=۰/۰۴۳	NS	P=۰/۰۲۸	۶/۸۰±۰/۷۰ <sup>a</sup>	۷/۲۹±۰/۶۸ <sup>a</sup>	۶/۷۰±۰/۷۰ <sup>a</sup>	۵/۵۰±۰/۲۰ <sup>b</sup>	۷/۴۳±۰/۱۵ <sup>a</sup>	(g/dL) Hb
P=۰/۰۱۵	NS	P=۰/۰۱۴	۳۲/۵۱±۲/۶۷ <sup>a</sup>	۳۵/۳۶±۲/۶۰ <sup>a</sup>	۳۲/۴۵±۲/۳۴ <sup>a</sup>	۲۷/۲۰±۱/۲۰ <sup>b</sup>	۳۴/۱۸±۱/۱۱ <sup>a</sup>	(%) Hct
NS	NS	P=۰/۰۰۷	۲۴۸/۰۰±۱/۷۳ <sup>a</sup>	۲۴۸/۴۰±۳/۸۳ <sup>a</sup>	۲۴۲/۳۸±۳/۱۶ <sup>ab</sup>	۲۴۱/۰۲±۳/۴۴ <sup>b</sup>	۲۴۷/۳۷±۳/۸۱ <sup>a</sup>	(fL) MCV
NS	NS	P=۰/۰۵۵	۵۲/۲۵±۱/۶۵ <sup>ab</sup>	۵۱/۵۵±۱/۶۹ <sup>abc</sup>	۵۰/۴۰±۲/۱۱ <sup>bc</sup>	۴۹/۱۵±۰/۷۷ <sup>c</sup>	۵۴/۰۶±۱/۰۰ <sup>a</sup>	(pg) MCH
NS	NS	NS	۲۱/۰۰±۰/۷۰ <sup>b</sup>	۲۰/۷۳±۰/۴۰ <sup>b</sup>	۲۰/۸۰±۰/۵۵ <sup>b</sup>	۲۰/۳۱±۰/۳۴ <sup>b</sup>	۲۱/۸۶±۰/۲۰ <sup>a</sup>	MCHC (g/dL)
P=۰/۰۵۱	P=۰/۰۶۶	P<۰/۰۰۱	۱۷/۴۳±۲/۱۳ <sup>b</sup>	۲۱/۰۶±۰/۹۰ <sup>a</sup>	۱۳/۲۴±۱/۳۷ <sup>c</sup>	۱۳/۱۰±۰/۹۰ <sup>c</sup>	۱۴/۷۸±۲/۶۸ <sup>bc</sup>	نوتروفیل (%)
NS	P=۰/۰۰۹	P<۰/۰۰۱	۷۲/۹۳±۲/۶۹ <sup>c</sup>	۷۷/۴۶±۱/۴۷ <sup>b</sup>	۸۱/۴۸±۰/۶۷ <sup>a</sup>	۸۳/۶۷±۱/۳۱ <sup>a</sup>	۸۰/۴۲±۱/۹۵ <sup>ab</sup>	لنفوسیت (%)
NS	P=۰/۰۰۶	P=۰/۰۴۹	۳/۴۶±۰/۵۰ <sup>b</sup>	۵/۶۱±۰/۵۳ <sup>a</sup>	۵/۰۰±۱/۰۰ <sup>a</sup>	۶/۰۹±۰/۸۶ <sup>a</sup>	۴/۷۵±۰/۴۲ <sup>a</sup>	مونوسیت (%)

حروف غیرمشابه در هر ردیف نشان از وجود اختلاف آماری است (P<۰/۰۵). MD35: تراکم متوسط با ۳۵ درصد پروتئین؛ HD25: تراکم متوسط با ۲۵ درصد پروتئین؛ HD35: تراکم زیاد با ۳۵ درصد پروتئین؛ HD25: تراکم زیاد با ۲۵ درصد پروتئین؛ D: تراکم؛ P: پروتئین؛ D×P: اثر متقابل؛ WBC: گلبول سفید؛ RBC: گلبول قرمز؛ Hb: هموگلوبین؛ Hct: هماتوکریت؛ MCV: متوسط حجم گلبول قرمز؛ MCH: متوسط هموگلوبین در هر گلبول قرمز؛ MCHC: غلظت متوسط هموگلوبین در گلبول قرمز؛ NS: عدم وجود اختلاف معنی‌دار آماری (P>۰/۰۵).

### شاخص‌های ایمنی سرم خون

تفاوت آماری معنی‌دار داشت، به طوری که بیشترین مقدار آنها در تیمار MD35 به دست آمد (P<۰/۰۵). دو عامل تراکم و پروتئین به طور مجزا بر مقادیر این شاخص‌ها اثر معنی‌داری داشت. همچنین اثر متقابل این دو عامل به طور همزمان بر پروتئین کل، آلومین و گلوبولین

سنجش شاخص‌های ایمنی سرم خون ماهی کپور معمولی پرورش یافته در دو سطح تراکم و پروتئین در سیستم بیوفلاک به مدت ۶۰ روز در جدول ۴ ارائه شده است. مقدار پروتئین کل، آلومین و گلوبولین بین تیمارهای آزمایشی

مشاهده شد. غلظت آنزیم آلکالین فسفاتاز بین تیمارهای مختلف آزمایشی تفاوت آماری معنی‌دار نداشت ( $P > 0.05$ ). دو عامل تراکم و پروتئین به صورت مجزا و همزمان بر غلظت این آنزیم اثر معنی‌داری داشت. ایمونوگلوبولین M سرم خون اختلاف آماری معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی داشت، به طوری که بیشترین و کمترین آن به ترتیب در تیمارهای MD35 و HD25 به دست آمد ( $P < 0.05$ ). فعالیت کمپلمان در تیمار MD35 افزایش معنی‌دار آماری داشت در حالی که فعالیت این شاخص در تیمار HD25 کاهش یافت ( $P < 0.05$ ). اگرچه شاخص‌های ایمونوگلوبولین M و فعالیت کمپلمان تحت تاثیر مجزای تراکم ذخیره‌سازی و پروتئین غذا قرار داشت، اما اثر متقابل مشاهده نشد.

جدول ۴: میانگین شاخص‌های ایمنی سرم خون ماهی کپور معمولی در سیستم بیوفلاک تحت تاثیر تراکم ذخیره‌سازی و پروتئین جیره غذایی (میانگین  $\pm$  انحراف معیار)

شاخص	تیمارهای آزمایشی							آزمون دوطرفه
	شاهد	MD35	MD25	HD35	HD25	D	P	
پروتئین کل (g/dL)	۴/۰۷ $\pm$ ۰/۰۵ <sup>b</sup>	۴/۲۱ $\pm$ ۰/۰۵ <sup>۲a</sup>	۳/۵۷ $\pm$ ۰/۰۴ <sup>۳c</sup>	۳/۴۰ $\pm$ ۰/۰۴ <sup>۳d</sup>	۳/۲۲ $\pm$ ۰/۰۲ <sup>۶c</sup>	$P < 0.001$	$P < 0.001$	
آلبومین (g/dL)	۱/۴۱ $\pm$ ۰/۰۲ <sup>۶a</sup>	۱/۳۹ $\pm$ ۰/۰۵ <sup>۵a</sup>	۱/۲۵ $\pm$ ۰/۰۳ <sup>۶b</sup>	۱/۲۴ $\pm$ ۰/۰۳ <sup>۴b</sup>	۱/۲۳ $\pm$ ۰/۰۲ <sup>۶b</sup>	$P = 0.022$	$P = 0.011$	
گلوبولین (g/dL)	۲/۶۶ $\pm$ ۰/۰۶ <sup>۰b</sup>	۲/۸۲ $\pm$ ۰/۰۵ <sup>۵a</sup>	۲/۳۲ $\pm$ ۰/۰۷ <sup>۵c</sup>	۲/۱۶ $\pm$ ۰/۰۱ <sup>۰d</sup>	۱/۹۹ $\pm$ ۰/۰۲ <sup>۶c</sup>	$P < 0.001$	$P < 0.001$	
ALP (U/L)	۱۳۷/۹۸ $\pm$ ۳/۳۱	۱۰۵/۲۲ $\pm$ ۴/۳۸	۱۵۶/۱۸ $\pm$ ۴/۸۷	۱۶۰/۷۶ $\pm$ ۱/۰۷	۱۹۷/۷۶ $\pm$ ۱/۴۳	$P = 0.007$	$P < 0.001$	
IgM (mg/dL)	۵۲/۳۹ $\pm$ ۰/۶۹ <sup>b</sup>	۵۴/۲۴ $\pm$ ۰/۸۵ <sup>a</sup>	۴۸/۴۸ $\pm$ ۱/۲۸ <sup>c</sup>	۴۷/۴۲ $\pm$ ۱/۰۵ <sup>c</sup>	۴۲/۱۵ $\pm$ ۰/۷۳ <sup>d</sup>	NS	$P < 0.001$	
فعالیت کمپلمان (U/%)	۱۲۷/۶۵ $\pm$ ۰/۴۵ <sup>c</sup>	۱۳۲/۵۹ $\pm$ ۰/۸۲ <sup>a</sup>	۱۳۰/۰۹ $\pm$ ۱/۴۴ <sup>b</sup>	۱۲۶/۳۵ $\pm$ ۰/۸۷ <sup>c</sup>	۱۲۳/۶۸ $\pm$ ۰/۵۲ <sup>d</sup>	NS	$P = 0.002$	

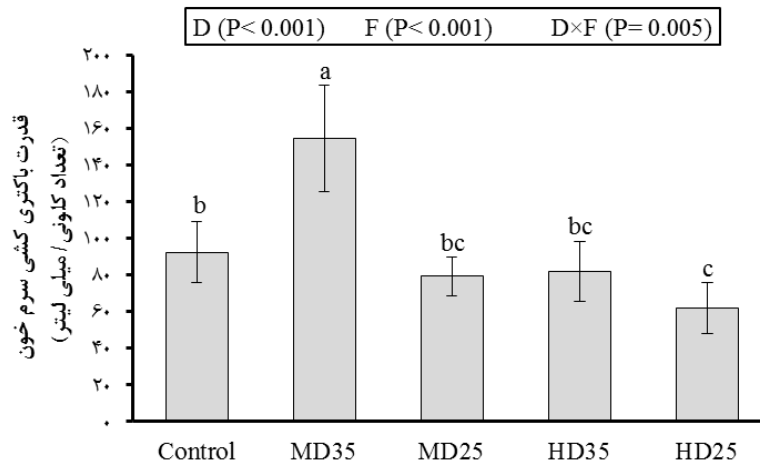
حروف غیرمشابه در هر ردیف نشان از وجود اختلاف آماری است ( $P < 0.05$ ). MD35: تراکم متوسط با ۳۵ درصد پروتئین؛ MD25: تراکم متوسط با ۲۵ درصد پروتئین؛ HD35: تراکم زیاد با ۳۵ درصد پروتئین؛ HD25: تراکم زیاد با ۲۵ درصد پروتئین؛ D: تراکم؛ P: پروتئین؛ D×P: اثر متقابل؛ ALP: آلکالین فسفاتاز؛ IgM: ایمونوگلوبولین M؛ NS: عدم وجود اختلاف معنی‌دار آماری ( $P > 0.05$ ).

### قدرت باکتری‌کشی سرم خون

### بحث

نتایج به دست آمده از سنجش قدرت باکتری‌کشی سرم خون ماهی کپور معمولی تحت تاثیر دو سطح از تراکم ذخیره‌سازی و دو سطح از پروتئین جیره غذایی در شکل ۲ نشان داده شده است. خاصیت باکتری‌کشی سرم خون در تیمار MD35 در مقایسه با دیگر تیمارهای آزمایشی و تیمار شاهد افزایش معنی‌دار آماری داشت در حالی که کمترین مقدار این شاخص در تیمار HD25 به دست آمد ( $P < 0.05$ ).

در سال‌های اخیر تکنولوژی بیوفلاک به عنوان تکنولوژی نوین در صنعت آبزی‌پروری در جهان و ایران در حال توسعه است. بیوفلاک منبع غنی از ترکیبات فعال زیستی مانند کلروفیل‌ها، کاروتنوئیدها، فیتوستول‌ها، بروموفنل‌ها، قندهای آمین‌دار (Ju et al., 2008) و ترکیبات ضدباکتری (Crab et al., 2010) است که بر عملکرد رشد و شاخص‌های ایمنی اثرات مثبتی دارد (Adineh et al., 2019).



شکل ۲: قدرت باکتری‌کشی سرم خون ماهی کپور معمولی (میانگین  $\pm$  انحراف معیار). حروف لاتین غیر مشابه روی نمودار نشانه وجود اختلاف معنی‌دار آماری است ( $P < 0.05$ ). Control: تیمار شاهد؛ MD35: تراکم متوسط با ۳۵ درصد پروتئین؛ MD25: تراکم متوسط با ۲۵ درصد پروتئین؛ HD35: تراکم زیاد با ۳۵ درصد پروتئین؛ HD25: تراکم زیاد با ۲۵ درصد پروتئین؛ D: تراکم؛ P: پروتئین؛ D x P: اثر متقابل.

۳۵ به ۲۵ درصد و افزایش تراکم ذخیره‌سازی از ۱۰ به ۲۰ کیلوگرم در متر مکعب منجر به کاهش رشد و بهره‌وری غذایی شد.

گزارش شده است که برخی از ترکیبات فعال زیستی در بیوفلاک قادر به بهبود وضعیت سلامت فیزیولوژیک موجودات پرورشی هستند و ممکن است به عنوان محرک کننده ایمنی عمل کند (Zhao et al., 2013). ویژگی‌های خون‌شناسی ماهیان یکی از مهم‌ترین شواهد فیزیولوژیکی و منعکس کننده ارتباط ویژگی‌های محیط آبی و سلامتی ماهیان باشد. تغییر در شاخص‌های خونی ماهیان در مواجهه با شرایط زیست‌محیطی، پاسخی است بر استرس‌های محیطی و می‌تواند به عنوان یکی از شاخص‌های مهم زیستی مطرح باشد (Ross and Ross, 2008). یکی از شاخص‌های خونی مناسب در تشخیص تنش‌های محیطی در ماهیان، بررسی ویژگی‌های سلول‌های خونی (تعداد، شکل و ترکیب) آنها است (Llorente et al., 2002).

در این مطالعه سنجش شاخص‌های خونی ماهی کپور نشان از وجود اختلاف معنی‌دار آماری بین تیمارها از نظر نسبت گلبول‌های سفید، گلبول‌های قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت بود. بیشترین نسبت گلبول‌های

یکی از راهکارهای اساسی برای افزایش میزان سوددهی در فعالیتهای آبی‌پروری به دست آوردن رشد مطلوب است که در نتیجه مدیریت تغذیه و غذایی کسب می‌شود (Wang et al., 2009). در این مطالعه، بیشترین وزن نهایی و افزایش وزن در تیمار MD35 به دست آمد در حالی که ماهیان در تیمار HD25 کمترین میزان رشد را داشتند. بیوفلاک می‌تواند به طور مستمر توسط ماهی به عنوان یک منبع غذایی با کیفیت خوب مصرف شود (Widanarni et al., 2012). در پژوهش حاضر، کمترین و بیشترین ضریب تبدیل غذایی به ترتیب در تیمارهای MD35 و HD25 مشاهده شد که در نتیجه کاهش پروتئین جیره غذایی و افزایش تراکم ذخیره‌سازی بود. Adineh و همکاران (۲۰۱۹) گزارش دادند که تراکم ماهی کپور معمولی در سیستم بیوفلاک را می‌توان از ۶ به ۱۲ کیلوگرم بر متر مکعب افزایش داد. علاوه بر این محمودی خوش‌دره‌گی و همکاران (۱۳۹۸) گزارش دادند که در سیستم بیوفلاک می‌توان سطح پروتئین جیره غذایی ماهی کپور معمولی را از ۳۵ درصد به ۲۷ درصد کاهش داد که نشان از کمک بیوفلاک به سلامت فیزیولوژیک ماهی است. در مطالعه حاضر با اعمال همزمان کاهش پروتئین جیره غذایی از



سفید در تیمارهای با تراکم بالا به دست آمد. همچنین آزمون تحلیل واریانس دوطرفه نشان داد که دو عامل تراکم و پروتئین غذا به صورت مجزا و با هم بر گلبول‌های سفید اثر متقابل داشتند. افزایش گلبول‌های سفید نشان از وجود استرس در محیط است که در شرایط استرس مزمن بروز می‌کند و به آن پدیده لکوسیتوزیس گفته می‌شود (Benfey and Biron, 2000). در زمان بروز استرس (تراکم) ترشح کورتیکواستروئیدها منجر به کاهش فعالیت لنفوسیت‌ها و افزایش نوتروفیل‌ها می‌شود (Zare et al., 2012). در مطالعه حاضر کاهش درصد لنفوسیت‌ها و افزایش درصد نوتروفیل‌ها به ترتیب در تیمارهای HD25 و HD35 تحت تاثیر تراکم بالای ذخیره‌سازی در سیستم بیوفلاک به دست آمد. در مطالعه انجام شده درباره اثرات تراکم ذخیره‌سازی ماهی کوی (*Cyprinus carpio var. Koi*)، اگرچه نسبت گلبول‌های سفید بین تیمارهای مختلف تراکم ذخیره‌سازی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت، اما بیشترین درصد لنفوسیت در تیمارهای ۲۰۰ و ۳۰۰ قطعه در متر مکعب به دست آمد (بهره‌مند و سلیمانی‌راد، ۱۳۹۶). تاثیر محیط بیوفلاک بر شاخص‌های خون‌شناسی نشان داده که فلاک بر شاخص‌های هموگلوبین، هماتوکریت، گلبول‌های قرمز و گلبول‌های سفید ماهی تیلاپیا اثرات معنی‌داری نداشت که این نتایج نشان می‌دهد که سیستم بیوفلاک تاثیر منفی بر شرایط زیستی این ماهی ندارد (Long et al., 2015). اثرات تراکم ذخیره‌سازی بر تغییرات خون‌شناختی گربه‌ماهی نقره‌ای (*Rhamdia quelen*) پرورش یافته در سیستم بیوفلاک نشان داد که تراکم ۱۰، ۲۰ و ۳۰ گرم در لیتر بر شاخص‌های هماتوکریت و هموگلوبین تاثیر معنی‌دار نداشت و نسبت گلبول‌های قرمز در تراکم ۲۰ گرم در لیتر به بیشترین حد خود رسید (Battisti et al., 2020). همچنین نتایج به دست آمده از سه سطح تراکم ذخیره‌سازی ۲۰، ۴۰ و ۶۰ ماهی تیلاپیا در متر مکعب با میانگین وزنی  $5.0/47 \pm 0.5$  گرم نشان داد که گلبول‌های قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت خون ماهی پرورش یافته با تراکم بالا در سیستم بیوفلاک کاهش یافت (Zaki et al., 2020).

جامعه باکتریایی تشکیل شده در سیستم بیوفلاک منبع خوبی از بسیاری از ترکیبات آلی و ضدباکتریایی است و همچنین شامل بسیاری از اجزای سلولی و متابولیت‌های فعال است که تاثیر بالقوه‌ای بر ایمنی ماهی دارند (Wei et al., 2016; Balzaretto et al., 2017). اگرچه سیستم بیوفلاک به عنوان یک محیط

بیوفلاک باعث بهبود پاسخ ایمنی و افزایش غلظت ایمونوگلوبولین M، فعالیت کمپلمان، پروتئین کل و گلوبولین شد (Ebrahimi et al., 2020). به کارگیری سطوح ۲۵، ۳۰ و ۳۵ درصد پروتئین در غذای بچه ماهی کپور معمولی در سیستم بیوفلاک منجر به افزایش عددی مقادیر پروتئین کل، آلبومین، گلوبولین در تیمارهای سطح بالای پروتئین در محیط بیوفلاک در مقایسه با شاهد بدون فلاک شد. بنابراین، با توجه به فعالیت لیزوزیم و کمپلمان استفاده از نسبت بهینه کربن به ازت ۱۵ با پروتئین ۳۰ درصد روش مناسبی برای تولید بچه ماهی کپور معمولی در مراحل اولیه زندگی در سیستم بیوفلاک است (عالی‌محمودی و محمدی آذرم، ۱۴۰۰). در سیستم بیوفلاک، تراکم ذخیره‌سازی ماهی را می‌توان بیشتر از سیستم‌های معمولی افزایش داد (Fauji et al., 2018; Liu et al., 2018)، اما توجه به تراکم بهینه می‌تواند در واکنش سیستم ایمنی و بهبود شرایط فیزیولوژیکی آبی‌زی حائز اهمیت باشد. در بررسی حاضر، نتایج نشان داد که تراکم بهینه خیره‌سازی بچه ماهی کپور معمولی در سیستم بیوفلاک ۱۰ کیلوگرم در متر مکعب است و مقادیر پروتئین جیره غذایی می‌تواند اثرات مستقیمی بر پاسخ ایمنی داشته باشد. همسو با

ضداسترس معرفی شده است (Adineh et al., 2019)، اما توجه به شرایط مناسب زیستی و تغذیه‌ای آبزیان مانند تراکم ذخیره‌سازی و مقدار پروتئین جیره غذایی در چنین سیستمی بسیار حائز اهمیت است، چرا که این عوامل می‌توانند اثرات مستقیمی بر فیزیولوژی آبزیان در محیط بیوفلاک داشته باشد. ارزیابی شاخص‌های بیوشیمی خون می‌تواند در کنترل وضعیت فیزیولوژیک و واکنش سیستم ایمنی ماهی موثر باشد (Maita, 2007). در مطالعه حاضر بیشترین مقدار غلظت پروتئین، گلوبولین، آلکالین فسفاتاز، ایمونوگلوبولین M و فعالیت کمپلمان سرم خون در تیمار تراکم متوسط با سطح بالای پروتئین (MD35) به دست آمد. پروتئین در جیره غذایی یکی از حیاتی‌ترین مواد تشکیل‌دهنده است که تنظیم سطح مناسب آن برای آبی‌زی از اهمیت خاصی برخوردار است. در پرورش بچه ماهی کپور معمولی محدوده طبیعی پروتئین ۳۵ تا ۴۰ درصد است تا تمام نیازهای ماهی برای انجام فعالیت‌های متابولیکی و فرآیندهای فیزیولوژیکی محیا شود (Ebrahimi et al., 2020). در این راستا، گزارش شده است که سطح بالای پروتئین (۳۰ درصد) در جیره غذایی ماهی کپور با میانگین  $30/5 \pm 3/1$  گرم پرورش یافته در سیستم

مطالعه حاضر، گزارش شده است که افزایش تراکم به میزان ۱۲ کیلوگرم در متر مکعب باعث افزایش سطح فعالیت کمپلمان در سیستم بیوفلاک در مقایسه با سیستم معمول پرورش شد و این تراکم برای ذخیره‌سازی بچه ماهی کپور معمولی توصیه می‌شود (Adineh et al., 2019).

افزایش تراکم و ایجاد برهم‌کنش بین ماهیان می‌تواند سبب بروز استرس مزمن، تغییر ترکیبات بیوشیمیایی خون و تضعیف سیستم ایمنی ماهی شده که در این حالت ماهی مستعد ابتلا به عفونت‌ها و بیماری‌های مختلف در محیط زیست می‌شود (Tort, 2011; Heras et al., 2015). سیستم بیوفلاک با داشتن برخی از ترکیبات زیست‌فعال قادر به بهبود وضعیت سلامتی فیزیولوژیکی موجودات پرورشی می‌شود و به عنوان تحریک کننده ایمنی عمل می‌کند (Xu and Pan, 2013). بنابراین، می‌توان اظهار داشت که این محیط پتانسیل بالایی برای کنترل و مدیریت بیماری در پرورش متراکم کپور معمولی دارد (Bakhshi et al., 2018). در مطالعه حاضر بیشترین و کمترین قدرت باکتری‌کشی سرم خون به ترتیب در تیمارهای MD35 و HD25 به دست آمد. در مطالعه‌ای با بررسی قدرت باکتری‌کشی

*Aeromonas hydrophila* مشخص شد که پرورش ماهی تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*) در تیمارهای بیوفلاک در مقایسه با شاهد دارای قدرت باکتری‌کشی بیشتری است (Elayaraja et al., 2020). همچنین در پژوهش انجام شده بر تاثیر نسبت‌های مختلف کربن به ازت و پروتئین غذا بر قدرت باکتری‌کشی مشخص شده است که تیمار شاهد در مقایسه با تیمارهای بیوفلاکی دارای خاصیت باکتری‌کشی کمتر است (عالی‌محمودی و محمدی آذر، ۱۴۰۰). مطالعات نشان می‌دهد ماهیانی که در سیستم بیوفلاک به تنهایی و یا همراه با افزودنی‌های مختلف به غذا و آب پرورش یافته‌اند، در مقایسه با سیستم‌های معمولی دارای سیستم ایمنی و قدرت باکتری‌کشی بهتری هستند (Kishawy et al., 2020; Mohammadi et al., 2021).

به طور کلی نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که پرورش بچه ماهی کپور معمولی با میانگین وزن اولیه  $12/09 \pm 0/99$  گرم در سیستم بیوفلاک با سطح ۳۵ درصد پروتئین و تراکم ذخیره‌سازی ۱۰ کیلوگرم در متر مکعب در مقایسه با دیگر تیمارهای آزمایشی مناسب‌تر است. همچنین بیوفلاک به عنوان منبع پروتئین می‌تواند تا ۱۰ درصد کاهش پروتئین در جیره

کشور، معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری انجام شده است. همچنین این طرح در جلسه ۱۴۷ شورای پژوهشی دانشگاه گنبد کاووس مورد تصویب قرار گرفته است. از همه همکارانی که در اجرای این طرح ما را یاری نمودند تقدیر و تشکر می‌نماییم.

غذایی ماهی کپور را در تیمارهای با تراکم متوسط در مقایسه با تیمار شاهد جبران کند.

### تشکر و قدردانی

این طرح به شماره ۹۸۰۲۳۰۹۸ با حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران

## منابع

- آدینه ح. و هرسیج م. ۱۳۹۷. تاثیر سطوح مختلف بیوفلاک بر کیفیت آب، عملکرد رشد و بازماندگی پست لارو میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*). مجله تحقیقات دامپزشکی، ۷۳(۴): ۴۰۱-۳۹۳.
- آدینه ح.، جعفریان ح.، خادمی حمیدی م.، کریم تبار ف. ز. و صداقت ز. ۱۴۰۰. تاثیر کاهش نرخ غذادهی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) بر عملکرد رشد و تغذیه، شاخص‌های بیوشیمیایی خون و کیفیت آب در سیستم بیوفلاک در مقایسه با آب تمیز. شیلات، ۷۴(۳): ۴۶۶-۴۵۳.
- بهره‌مند م. و سلیمانی‌راد آ. ۱۳۹۶. تاثیر تراکم ذخیره‌سازی بر عملکرد رشد، ایمنی و استرس در ماهی کوی (*Cyprinus carpio* var. *Koi*) در ماهی‌شناسی (Linnaeus, 1758). نشریه علمی بوم‌شناسی آبزیان، ۲۰(۴): ۱۰-۲۰.
- Adineh H., Naderi M., Hamidi M. K. and 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.
- Aksakal E., Ekinçi D., Erdogan O., Beydemir S., Alim Z. and Ceyhun S.B. 2011. Increasing stocking density causes inhibition of metabolic-antioxidant enzymes and elevates mRNA levels of heat improves growth, lipid metabolism, antioxidant and immune responses, and resistance to crowding stress in common carp, *Cyprinus carpio*. Aquaculture Nutrition, 27(2): 417-426.
- Adineh H., Naderi M., Yousefi M., Khademi Hamidi M., Ahmadifar E. and Hoseini S.M. 2021. Dietary licorice (*Glycyrrhiza glabra*)

- shock protein 70 in rainbow trout. *Livestock Science*, 141: 69–75.
- Andrade T., Afonso A., Perez-Jimenez A., Oliva-Teles A., De Las Heras V., Mancera J.M. and Costas B. 2015.** Evaluation of different stocking densities in a Senegalese sole (*Solea senegalensis*) farm: Implications for growth, humoral immune parameters and oxidative status. *Aquaculture*, 438: 6–11.
- AOAC. 2005.** Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists International, USA.
- Avnimelech Y. 2009.** Biofloc Technology. A Practical Guide Book. The World Aquaculture Society, USA. 182P.
- 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.
- Bakhshi F.H., Najdegerami E., Manaffar R., Tokmechi A., Rahmani Farah K. and Shalizar Jalali A. 2018.** Growth performance, haematology, antioxidant status, immune response and histology of common carp (*Cyprinus carpio* L.) fed biofloc grown on different carbon sources. *Aquaculture Research*, 49(1): 393–403.
- Balcazar J.L., De Blas I., Ruiz-Zarzuela I., Cunningham D., Vendrell D. and Muzquiz J.L. 2006.** The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, 114: 173–186.
- Balzaretti S., Taverniti V., Guglielmetti S., Fiore W., Minuzzo M., Ngo H.N. and Laws A.P. 2017.** A novel rhamnase-rich hetero-exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus paracasei* DG activates THP-1 human monocytic cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(3): 1–2 (02702-16).
- Barnes A.C., Young F.M., Horne M.T. and Ellis A.E. 2003.** *Streptococcus iniae*: Serological differences, presence of capsule and resistance to immune serum killing. *Diseases of Aquatic Organisms*, 53(3): 241–247.
- Battisti E.K., Rabaioli A., Uczay J., Sutili F.J. and Lazzari R. 2020.** Effect of stocking density on growth, hematological and biochemical parameters and antioxidant status of silver catfish (*Rhamdia quelen*) cultured in a biofloc system. *Aquaculture*, 524: 1–32 (735213).
- Benfey T.J. and Biron M. 2000.** Acute stress response in triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Aquaculture*, 184(1-2): 167–176.

- Braun N., De Lima R.L., Baldisserotto B., Dafre A.L. and De Oliveira Nuner A.P. 2010.** Growth, biochemical and physiological responses of *Salminus brasiliensis* with different stocking densities and handling. *Aquaculture*, 301(1-4): 22–30.
- Crab R., Chielens B., Wille M., Bossier P. and Verstraete W. 2010.** The effect of different carbon sources on the nutritional value of bioflocs, a feed for *Macrobrachium rosenbergii* postlarvae. *Aquaculture Research*, 41(4): 559–567.
- Crab R., Defoirdt T., Bossier P. and Verstraete W. 2012.** Biofloc technology in aquaculture: Beneficial effects and future challenges. *Aquaculture*, 356-357: 351–356.
- De Schryver P., Crab R., Defoirdt T., Boon N. and Verstraete W. 2008.** The basics of bioflocs technology: The added value for aquaculture. *Aquaculture*, 277: 125–137.
- Ebrahimi A., Akrami R., Najdegerami E.H., Ghiasvand Z. and Koohsari H. 2020.** Effects of different protein levels and carbon sources on water quality, antioxidant status and performance of common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles raised in biofloc based system. *Aquaculture*, 516: 1–9 (734639).
- Elayaraja S., Mabrok M., Algammal A., Sabitha E., Rajeswari M.V., Zagorsek K. and Rodkhum C. 2020.** Potential influence of jaggery-based biofloc technology at different C: N ratios on water quality, growth performance, innate immunity, immune-related genes expression profiles, and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 107: 118–128.
- FAO. 2020.** FAO Yearbook of Fishery and Aquaculture Statistics. Food and Agriculture Organization, Italy. 111P.
- Fauji H., Budiardi T. and Ekasari J. 2018.** Growth performance and robustness of African *Catfish Clarias gariepinus* (Burchell) in biofloc-based nursery production with different stocking densities. *Aquaculture Research*, 49(3): 1339–1346.
- Goldenfarb P.B., Bowyer F.P., Hall E. and Brosious E. 1971.** Reproducibility in the hematology laboratory: The microhematocrit determination. *American Journal of Clinical Pathology*, 56(1): 35–39.
- Heras V.D., Martos-Sitcha J.A., Yufera M., Mancera J.M. and Martinez-Rodriguez G. 2015.** Influence of stocking density on growth, metabolism and stress of thicklip grey mullet (*Chelon*

- labrosus*) juveniles. *Aquaculture*, 448: 29–37.
- Ju Z.Y., Forster I., Conquest L. and Dominy W. 2008.** Enhanced growth effects on shrimp, *Litopenaeus vannamei* from inclusion of whole shrimp flocc or flocc fractions to a formulated diet. *Aquaculture Nutrition*, 14: 533–543.
- Kajita Y., Sakai M., Atsuta S. and Kobayash M. 1990.** The immunomodulatory effects of levamisole on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Pathology*, 25(2): 93–98.
- Kishawy A.T., Sewid A.H., Nada H.S., Kamel M.A., El-Mandrawy S.A., Abdelhakim T. and Ibrahim D. 2020.** Mannan-oligosaccharides as a carbon source in Biofloc boost dietary plant protein and water quality, growth, immunity and *Aeromonas hydrophila* resistance in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Animals*, 10(10): 1–24 (1724).
- Lee R.G., Foerster J., Jukens J., Paraskevas F., Greer J.P. and Rodgers G.M. 1998.** *Wintrobe's Clinical Hematology*. Lippincott Williams and Wilkins, USA. 2312P.
- Liu G., Ye Z., Liu D., Zhao J., Sivaramasamy E., Deng Y. and Zhu S. 2018.** Influence of stocking density on growth, digestive enzyme activities, immune responses, antioxidant of *Oreochromis niloticus* fingerlings in biofloc systems. *Fish and Shellfish Immunology*, 81: 416–422.
- Llorente M.T., Martos A. and Castano A. 2002.** Detection of cytogenetic alterations and blood cell changes in natural populations of carp. *Ecotoxicology*, 11(1): 27–34.
- Long L., Yang J., Li Y., Guan C. and 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.
- Maita M. 2007.** Fish health assessment. P: 10–34. In: Nakagawa H., Sato M. and Gatlin D.M. (Eds.). *Dietary Supplements for the Health and Quality of Cultured Fish*. CAB International, UK.
- Mohammadi G., Rafiee G., Tavabe K.R., Abdel-Latif H.M. and Dawood M.A. 2021.** The enrichment of diet with beneficial bacteria (single-or multi-strain) in biofloc system enhanced the water quality, growth performance, immune responses, and disease resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 539: 736640.



- Najdegerami E.H., Bakhshi F. and 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(2): 457–465.
- North B.P., Ellis T., Turnbull J.F., Davis J. and Bromage N.R. 2006.** Stocking density practices of commercial UK rainbow trout farms. *Aquaculture*, 259(1-4): 260–267.
- Pathiratne A. and Rajapakshe W. 1998.** Hematological changes associated with the epizootic ulcerative syndrome in the Asian cichlid fish, *Etroplus suratensis*. *Asian Fisheries Science*, 11: 203–212.
- Rehulka J. 2000.** Influence of astaxanthin on growth rate, condition, and some blood indices of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 190(1-2): 27–47.
- Reyes-Becerril M., Tovar-Ramirez D., Ascencio-Valle F., Civera-Cerecedo R., Gracia-Lopez V. and Barbosa-Solomieu V. 2008.** Effects of dietary live yeast *Debaryomyces hansenii* on the immune and antioxidant system in juvenile leopard grouper *Mycteroperca rosacea* exposed to stress. *Aquaculture*, 280: 39–44.
- Ross L.G. and Ross B. 2008.** Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals. John Wiley and Sons, USA. 222P.
- Sunyer J.O. and 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: 333–345.
- Swaminathan T.R., Rathore G., Abidi R. and Kapoor D. 2004.** Detection of *Aeromonas hydrophila* by polymerase chain reaction. *Indian Journal of Fisheries*, 51(2): 251–254.
- Tokur B., Ozkutuk S., Atici E., Ozyurt G. and Ozyurt C.E. 2006.** Chemical and sensory quality changes of fish fingers, made from mirror carp (*Cyprinus carpio* L., 1758), during frozen storage (-18 C). *Food Chemistry*, 99(2): 335–341.
- Tort L. 2011.** Stress and immune modulation in fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 35: 1366–1375.
- Wang N., Xu X. and Kestemont P. 2009.** Effect of temperature and feeding frequency on growth performances, feed efficiency and body composition of pikeperch juveniles (*Sander lucioperca*). *Aquaculture*, 289: 70–73.
- Wei Y., Liao S.A. and Wang A.L. 2016.** The effect of different carbon

- sources on the nutritional composition, microbial community and structure of bioflocs. *Aquaculture*, 465: 88–93.
- Widanarni W., 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.
- Xu W.J. and Pan L.Q. 2013.** Enhancement of immune response and antioxidant status of *Litopenaeus vannamei* juvenile in biofloc-based culture tanks manipulating high C/N ratio of feed input. *Aquaculture*, 412: 117–124.
- Xu W.J., Pan L.Q., Zhao D.H. and Huang J. 2012.** Preliminary investigation into the contribution of bioflocs on protein nutrition of *Litopenaeus vannamei* fed with different dietary protein levels in zero-water exchange culture tanks. *Aquaculture*, 350: 147–153.
- Zaki M.A., Alabssawy A.N., Nour A.E.A.M., El Basuini M.F., Dawood M.A., Alkahtani S. and Abdel-Daim M.M. 2020.** The impact of stocking density and dietary carbon sources on the growth, oxidative status and stress markers of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared under biofloc conditions. *Aquaculture Reports*, 16: 1–8 (10022).
- Zare R., Bahmani M., Yavari V., Kazemi R., Fazeli N., Poordehghany M. and Mohamadian T. 2012.** Effects of rearing density on leukocytes and plasma cortisol level of Siberian sturgeons (*Acipenser baerii*). *Iranian Veterinary Journal*, 8(2): 22–32.
- Zhao Z.G., Xu Q.Y., Luo L., Yin J.S. and Wang C.A. 2013.** Effect of adding carbon source on growth of fish and water quality in Songpu mirror carp (*Cyprinus specularis* Songpu) pond. *Journal of Northeast Agricultural University*, 44: 105–112.



Research Paper

**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**

Hossien Adineh<sup>1\*</sup>, Mahdi Naderi<sup>2</sup>, Hojatallah Jafaryan<sup>3</sup>,  
Mohammad Khademi Hamidi<sup>4</sup>, Morteza Yousefi<sup>5</sup>, Ehsan Ahmadifar<sup>6</sup>

Received: March 2022

Accepted: April 2022

**Abstract**

The present study investigated the impact of stocking density and dietary protein level on the growth, hematology, immunity and resistance against *Aeromonas hydrophila* in common carp reared under biofloc conditions for 60 days. Fish (12.09±0.99g) were stocked into 15 tanks in a 2×2 factorial design consisting of two stocking densities and two protein levels in biofloc system include: moderate stocking density (10kg.m<sup>-3</sup>) with 25 and 35% protein (MD25 and MD35) and high stocking density (20kg.m<sup>-3</sup>) with 25 and 35% protein (HD25 and HD35). The control group of fish was in clean water with moderate density (10kg.m<sup>-3</sup>) and 35% protein. The growth of fish was significantly higher and the FCR was lower in MD35 group, when compared to other groups. WBC, hemoglobin and hematocrit values were reduced while red blood cell count increased in fish reared in MD35 group. IgM, ACH<sub>50</sub> and bactericidal activity of fish serum were significantly higher in MD35 group than other groups. Based on the present results, it is recommended to culture of common carp in the biofloc system with stocking density of 10 kg.m<sup>-3</sup>. As well as, the biofloc system can compensate for up to a 10% reduction in the diet in MD group.

**Key words:** *Biofloc*, *Density*, *Dietary Protein*, *Aeromonas hydrophila*, *Cyprinus carpio*.

1- Assistant Professor in Department of Fisheries Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran.

2- Ph.D. in Fisheries, Iran Fisheries Organization, Behbahan, Iran.

3- Associate Professor in Department of Fisheries Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran.

4- M.Sc. in Fisheries, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran.

5- Associate Professor in Department of Veterinary Medicine, Agrarian and Technological Institute, RUDN University, Moscow, Russia.

6- Assistant Professor in Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Zabol, Zabol, Iran.

\*Corresponding Author: [adineh.h@gonbad.ac.ir](mailto:adineh.h@gonbad.ac.ir)

DOI: 10.22124/japb.2022.21823.1459