فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال سیزدهم، شماره چهارم، زمستان ۱۴۰۴

مقاله پژوهشی

ارزیابی فعالیت پروبیوتیکی فلور باکتریایی جداسازی شده از آب و رسوب استخرهای مولدین ماهی کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*)

مهران آوخ کیسمی[1]*، علی محمدپور[2]، محمد رهاننده[3]، افشار ذوقی شلمانی[3]

DOI: 10.22124/japb.2025.30430.1569
تاریخ دریافت: فروردین ۱۴۰۴ تاریخ پذیرش: مهر ۱۴۰۴

چکیده

این مطالعه با هدف ارزیابی نمونه‌های باکتریایی آب و رسوب استخرهای مولدین ماهی کپور نقره‌ای شامل *Bacillus subtilis*، *Escherichia coli*، *Aeromonas hydrophila*، *Corynebacterium ammoniagenes*، *Staphylococcus aureus*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Micrococcus luteus* و Unidentified به عنوان پروبیوتیک انجام شد. فعالیت‌های ضدباکتریایی، با روش‌های انتشار در چاهک، انتشار در دیسک و روش متقاطع تحت تاثیر pH، نمک، دما و زمان‌های مختلف بررسی شد. اثربخشی ۹۶ ساعته سوسپانسیون سه گونه منتخب پروبیوتیک و باکتری بیماری‌زای *A. hydrophila* روی درصد مرگ و میر لارو ماهی کپور نقره‌ای (10^5 و 10^7 سلول در میلی‌لیتر) و شاهد بدون باکتری در ارلن یک لیتری و اثربخشی ۲۸ روزه باکتری انتخاب شده روی کیفیت آب پرورش و شاخص‌های رشد بچه‌ماهیان کپور نقره‌ای در گروه‌های تیمار و شاهد بررسی شد. نتایج نشان داد سه گونه *Bacillus subtilis*، *Corynebacterium ammoniagenes* و *Micrococcus luteus* فعالیت ضدباکتریایی در مقابل عوامل بیماری‌زا داشتند. رشد مطلوب و تولید ترکیبات ضدباکتریایی *Bacillus* منتخب با اثر ممانعت کنندگی و کشندگی معنی‌دار در برابر باکتری بیماری‌زای *Aeromonas* در pH ۸ و دمای ۳۷ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد دیده شد. درصد بقا بین تیمارها و شاهد در تیمار ۹۶ ساعته بچه‌ماهیان با گروه‌های باکتریایی منتخب معنی‌دار بود ($P<0/05$). بین کیفیت آب و شاخص‌های رشد بچه ماهیان کپور نقره‌ای گروه‌های تیمار و شاهد پس از ۲۸ روز تیمار با *B. subtilis* منتخب در آکواریوم، اختلاف معنی‌دار مشاهده شد ($P<0/05$). بر اساس این نتایج، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که گونه *B. subtilis* منتخب می‌تواند به عنوان عامل بهبود کیفیت آب و رشد ماهی در پرورش ماهی کپور نقره‌ای عمل کند.

واژگان کلیدی: *ارزیابی پروبیوتیک، آب، رسوب، فلور باکتریایی، کپور نقره‌ای.*

۱- دانشیار گروه آموزش شیلات و آبزیان، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گیلان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران.
۲- کارشناس ارشد بخش تحقیقات زیست محیطی، اداره کل محیط زیست استان گیلان، سازمان حفاظت محیط زیست کشور، رشت، ایران.
۳- استادیار گروه آموزش شیلات و آبزیان، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گیلان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران.
* نویسنده مسئول: dr.keysami@gmail.com

مقدمه

آبزی‌پروری از چندین دهه گذشته به سرعت به یک صنعت پویا و رو به رشد تبدیل شده است. همگام با افزایش آبزی‌پروری، چالش‌هایی مانند شیوع بیماری‌های ویروسی، باکتریایی، قارچی و انگلی، ناشی از کاهش کیفیت آب پرورش ماهی در اثر آلودگی‌ها و تراکم بالای ماهی پرورشی، به زیان‌های اقتصادی کلانی در این صنعت منجر شده است. مهم‌ترین معضل بهداشتی و بیماری‌های ماهی کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) پرورشی عوامل عفونی باکتریایی هستند. بیماری‌های عفونی یکی از عوامل مهم خسارات اقتصادی در صنعت پرورش آبزیان به‌ویژه ماهی کپور نقره‌ای به دلیل روش تغذیه پالیده‌خواری آن، محسوب می‌شود (Cecilia et al., 2018). از طرفی همین باکتری‌های آب و رسوب استخرهای پرورش در نتیجه روش تغذیه پالیده‌خواری ماهی کپور نقره‌ای به دستگاه گوارش آن وارد می‌شود و در دستگاه گوارش از عوامل دفاعی مهم در برابر باکتری‌های بیماری‌زا است (Behera et al., 2018).

در حال حاضر غالبا برای رفع چالش بیماری‌های عفونی باکتریایی آبزیان از آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده می‌کنند. استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در آبزی‌پروری مسبب ضررهای فراوانی است. از جمله این ضررها می‌توان به بالا رفتن هزینه تولید، انباشتگی در محیط و در نتیجه آلوده کردن محیط، انباشتگی در بدن آبزی و در نهایت ایجاد سویه‌های مقاوم در بدن میزبان اشاره کرد (Moslehi et al., 2013). آلاینده‌های شیمیایی، دارویی، مواد آلی و حتی ژن‌های مقاوم شده به آنتی‌بیوتیک‌ها که در اثر خروجی‌های آب مزارع پرورشی به محیط طبیعی آزاد می‌شوند، نگرانی‌های عمده‌ای را به وجود آورده‌اند که نه‌تنها به تجمع این مواد در پیکره آبزیان منجر شده، بلکه در مسیر انتقال خود به غذای انسانی نیز رسیده‌اند (Irianto and Austin, 2002). کاربرد بیش از اندازه آنتی‌بیوتیک در آبزی‌پروری می‌تواند باعث مقاوم‌سازی باکتری‌های آسیب‌زا شده و از این رو می‌تواند برای سلامت انسان مخاطره‌آمیز باشد (Sharifuzzaman and Austin, 2017). علاوه بر موارد یاد شده، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها، واکسن‌ها و مواد شیمیایی سبب استرس زیاد در آبزیان می‌شود. این موارد باعث شد تا دانشمندان در پی یافتن جایگزینی مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها باشند. پروبیوتیک‌ها می‌توانند به عنوان جایگزینی مناسب برای

آنتی‌بیوتیک‌ها مطرح شوند. استفاده از پروبیوتیک‌ها به عنوان یکی از دستاوردهای مثبت پژوهشگران است که برای بیماری‌های آبزیان، به صورت طبیعی و زیستی استفاده می‌شود (Moslehi et al., 2013). پروبیوتیک‌ها قادر هستند از طریق بهبود وضعیت محیط زندگی، اتصال به آب و رسوب استخرهای و کلنی‌سازی در آن، رقابت در مصرف مواد مغذی، تولید ترکیبات مفید (آنزیم‌ها، ویتامین‌ها، اسیدهای چرب و غیره)، تولید ترکیبات آنتاگونیستی و تحریک سیستم ایمنی به حفظ سلامتی جاندار و ایجاد فلور روده‌ای متعادل کمک کند (Irianto and Austin, 2002). مصرف آنها در جیره‌های غذایی آبزیان پرورشی موجب بهینه‌سازی تعادل جمعیت میکروبی آب و رسوب استخرهای پرورشی شده و تاثیر مطلوبی بر رشد و بقای آنها ایجاد می‌کند (Yegane et al., 2021).

اصلاح زیستی محیط‌های آبی به منظور بهینه‌سازی منابع آبی از جمله اهدافی است که حضور برخی باکتری‌های پروبیوتیک، موجب از بین رفتن آلودگی‌ها و بهبود عوامل کیفی آب می‌شود. در برخی کشورها، توسعه پایدار آبزی‌پروری با به کارگیری این باکتری‌ها رو به گسترش است و باکتری‌هایی مانند *Bacillus* sp.، *Nitrobacter* sp. و *Nitrosomonas* sp. قابل استفاده هستند (Pourasadi et al., 2025).

بیشترین تلاش‌ها در آبزی‌پروری پایدار، در ارتباط با راهبردهای تغذیه‌ای و بهینه‌سازی ترکیب‌های غذایی برای گونه‌های مهم ماهیان تجاری قابل پرورش است. این مطالعات در جهت افزایش کارآیی ترکیبات مغذی مانند پروتئین‌ها و چربی‌ها و افزایش قابلیت هضم آنها است (Azewedo et al., 2004). در این باره میکروارگانیزم‌هایی مانند مخمر *Saccharomyces cerevisiae* و باکتری‌های گرم مثبت (*Lactobacillus* sp. و *Bacillus* sp.) و باکتری‌های گرم منفی (*Aeromonas* sp. و *Vibrio* sp.) به عنوان مکمل‌های میکروبی در جیره‌های ماهیان، نتایج مطلوبی را در افزایش کارآیی تغذیه و عملکرد تولید آنها داشته است (Irianto and Austin, 2002).

تاثیر مثبت پروبیوتیک‌ها بر آبزیان پرورشی با دیدگاه‌های متفاوتی مانند بهینه‌سازی متغیرهای فیزیکی و شیمیایی محیط پرورشی آنها، پیشگیری و مبارزه با عوامل بیماری‌زا و همچنین ارتقای عملکرد رشد آبزیان پرورشی، در مطالعات بی‌شماری توسط پژوهشگران شیلاتی تایید شده است. استفاده از

میکروارگانیزم‌های مفید در صنایع آبزی‌پروری به منظور مدیریت بیماری‌ها امروزه به کل روش‌های درمانی و حتی پیشگیری بسیار جدی گرفته شده است که در برخی کشورهای دوستدار محیط زیست برتری بیشتری از آنتی‌بیوتیک‌ها و ضدعفونی‌کننده‌ها یافته است (Irianto and Austin, 2002).

فلور باکتریایی مفیدی وجود دارد که ضریب هضم و جذب غذا و کیفیت آب مزرعه پرورشی را بهبود می‌بخشد و در رقابت با باکتری‌های بیماری‌زا آنها را حذف می‌کند. با مدیریت فلور باکتریایی آبزی می‌توان با افزایش ضریب هضم و جذب غذا، ضریب تبدیل غذا را بهبود داده و هزینه غذای مصرفی را تقلیل می‌دهد (Sugita et al., 2002). پروبیوتیک‌ها باعث افزایش اشتها، مصرف غذا، رشد ماهی و بهبود کیفیت گوشت آن می‌شوند (Borch et al., 2015). از این رو، پیوسته پژوهشگران و پرورش‌دهندگان در پی یافتن راهکارهای نوین و بهتر برای بالا بردن اثربخشی پروبیوتیک در آبزی‌پروری هستند. در سال‌های اخیر استفاده از پروبیوتیک‌ها در تکثیر و پرورش آبزیان بسیار مورد توجه قرار گرفته است و تاکنون در آزمایش‌ها و پژوهش‌های گوناگون، اثربخشی پروبیوتیک‌ها بررسی شده و نتایج خوبی به همراه داشته است (Askarian, 2007). در سال‌های اخیر به نقش و اهمیت پروبیوتیک‌های برگرفته از میکروفلور یک گونه و تاثیر آن بر شاخص‌های رشد و ایمنی همان گونه مورد توجه قرار گرفته است. Yasemi و همکاران (۲۰۱۲) به بررسی باکتری‌های پروبیوتیکی در قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) پرداختند. Hanol Bektas و همکاران (۲۰۲۰) ۲۵ نوع باکتری تولیدکننده اسیدلاکتیک برای تولید پروبیوتیک را از ماهیان آب شیرین دریاچه Egirdir ترکیه جداسازی کردند. Tung Pang و همکاران (۲۰۲۰) ۱۶۹ گونه باکتری را از روده ماهی حوض (*Carassius auratus*) جداسازی کردند. Yaganeh و همکاران (۲۰۲۱) در استفاده از پروبیوتیک بومی ماهیان خاویاری و تاثیر آن بر افزایش رشد و سیستم ایمنی بدن فیل‌ماهی (*Huso huso*) به نتایج مثبتی دست یافتند. از طرف دیگر یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده آبزی‌پروری، صدمات و آثار سوئی است که از مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد ضدعفونی‌کننده است که برای مبارزه با بیماری‌ها استفاده می‌شود. اما برعکس، افزودنی‌های غذایی مانند محرک‌های ایمنی و پروبیوتیک‌ها آبزی‌پروری سالم و پایدار است (Keysami et al., 2012).

با توجه به این‌که برخی از پرورش‌دهندگان ماهی کپور نقره‌ای از پروبیوتیک غیربومی در مدیریت تولید استفاده می‌کنند، انجام این مطالعه می‌تواند زمینه‌ای مناسب را برای تولید پروبیوتیک بومی ایجاد کند تا برای کنترل بیماری‌های باکتریایی و افزایش رشد و بقای ماهی از آن استفاده شود. هدف از این پژوهش غربال‌گری تعدادی از فلور باکتریایی آب و رسوبات استخرهای مولدین کپور نقره‌ای به عنوان پروبیوتیک بود.

مواد و روش‌ها

این پژوهش از اردیبهشت تا آذر ۱۴۰۲ در مرکز آموزش علوم شیلاتی میرزاکوچک خان گیلان انجام شد. هفت گونه از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی که از آب و رسوب استخرهای مولدین ماهی کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) توسط Avakh Keysami و همکاران (۲۰۲۵) جداسازی شده بود (*Bacillus subtilis*، *Escherichia coli*، *Aeromonas hydrophila*، *Corynebacterium ammoniagenes*، *Staphylococcus aureus*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Micrococcus luteus* و Unidentified) به عنوان باکتری‌های منتخب پروبیوتیک در این مطالعه در نظر گرفته شد.

کشت میکروبی

برای تهیه کشت میکروبی نمونه‌ها، کشت مایع باکتری‌های منتخب پروبیوتیک با سرم فیزیولوژی (۸/۵ گرم در لیتر NaCl) رقیق‌سازی شد. ۰/۱ میلی‌لیتر از هر رقت در سه تکرار روی پلیت‌های محیط کشت، کشت شد. چند نوع محیط باکتری‌شناسی برای کشت اولیه شامل NA TSA برای باکتری‌های هتروتروفیک هوازی، TSA برای باکتری‌های هتروتروفیک غیرانتخابی، MC برای آنتروباکتریاسه (Enterobacteriaceae)، TCBS برای جنس‌های *Vibrio* و *Aeromonas* و محیط جداکننده *Pseudomonas* (PA) برای جداسازی *Pseudomonas*، آب پپتونه، NB و TSB برای کشت اولیه باکتری‌ها آماده شد. سپس همه پلیت‌ها به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۰-۲۷ درجه سانتی‌گراد پرورش داده شد. پلیت مک‌کانکی آگار در ۳۷ درجه سانتی‌گراد پرورش داده شد (Anderson et al., 1989). رشد باکتری با کدر شدن محیط مایع و ظهور کلونی بر روی محیط کشت جامد مشخص شد.

به منظور انبوه‌سازی باکتری‌های منتخب در محیط کشت مایع نوترینت براث (TSB) پرورش و روی محیط کشت جامد (TSA) نگهداری شدند. برای هر آزمایش به صورت جداگانه هر باکتری در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد و در ارلن ۱ لیتری در شیکر انکوباتور پرورش داده شد. تعیین تراکم باکتری‌ها (سلول در میلی‌لیتر) برای آزمایش‌ها به صورت جداگانه با استفاده از لوله‌های مک‌فارلند و خواندن غلظت جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (6105 Jenway، انگلستان) انجام گرفت (Sugita et al., 2002; Pourasadi et al., 2025).

بررسی فعالیت‌های ضدباکتریایی گروه‌های اصلی جداسازی شده

شش گونه از باکتری‌های بیماری‌زا شامل *Vibrio parahaemolyticus*، *Aeromonas hydrophila*، *E. coli*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Salmonella* sp. و *Vibrio cholerae* از دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه و در این پژوهش به عنوان عامل بیماری‌زا مورد استفاده قرار گرفتند. آزمایش فعالیت‌های ضدباکتریایی در شرایط آزمایشگاهی (in-vitro)، با سه روش ضدباکتریایی انتشار در چاهک (Well Diffusion)، انتشار در دیسک (Disc Diffusion) و روش متقاطع (Cross Streak Method) انجام گرفت (Pourasadi et al., 2025). بعد از این مرحله نمونه‌هایی که با هر سه روش بیشترین فعالیت ضدباکتریایی را نشان دادند به منظور شناسایی قطعی تا حد گونه به دانشگاه پوترای مالزی ارسال شده و به وسیله کیت و نرم‌افزار بیولوگ (Biolog، آمریکا) در حد گونه شناسایی محدود شدند (Avakh Keysami et al., 2025).

اثر شرایط رشد روی فعالیت پروبیوتیکی نمونه‌های منتخب

اثر pH، نمک، دما و زمان روی فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های منتخب پروبیوتیک مطالعه شد. با افزودن اسید کلریدریک و هیدروکسید سدیم، محیط TSB استریل با pH ۴، ۵، ۶، ۷، ۸ و ۹ تهیه شد و با ۰/۱ میلی‌لیتر از کشت ۱۸ ساعته از منتخب پروبیوتیک به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و در سه تکرار در انکوباتور پرورش یافت. محیط‌های TSB مشابه با غلظت‌های ۰، ۱، ۲، ۳ و ۴ درصد کلرید سدیم آماده شد، سپس نمونه‌های منتخب پروبیوتیک به آنها تلقیح شد و در انکوباتور پرورش یافتند. همچنین ۱۲

لوله آزمایش محتوی محیط مایع TSB با پروبیوتیک‌های منتخب در دماهای ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور پرورش و با ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ (BH-1200، بهداد، ایران) شد. بخش مایع از محصول سانتریفیوژ شده سلول باکتری‌ها برای مطالعه فعالیت ضدباکتریایی جمع‌آوری شد. از کشت‌های پرورش داده شده در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد (دمای اپتیمم رشد در این پژوهش) در فاصله‌های زمانی ۶، ۱۲، ۲۴، ۳۰، ۳۶، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از انکوباسیون به منظور بررسی ارتباط میان مرحله رشد باکتری منتخب و تولید ترکیبات ضدباکتریایی نمونه‌برداری شد (Keysami et al., 2005).

تاثیر ترکیب سوسپانسیون سه گونه منتخب پروبیوتیک با باکتری بیماری‌زای *Aeromonas hydrophila* روی درصد مرگ و میر لارو ماهی کپور نقره‌ای در شرایط آزمایشگاهی

در این مرحله سه گونه از باکتری‌های منتخب که دارای بیشترین خاصیت ضدباکتریایی علیه باکتری *A. hydrophila* بودند به همراه باکتری پاتوژن *A. hydrophila* به عنوان شاهد منفی به روش Sugita و همکاران (۲۰۰۲) در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد و در ارلن ۲ لیتری در محیط مایع NB در شیکرانکوباتور پرورش داده شد و کشت ۲۴ ساعته باکتری‌ها با غلظت 10^{13} سلول در میلی‌لیتر، آماده شد.

هشت نوع تیمار تهیه شده با غلظت‌های مختلف باکتری‌های منتخب (10^{5} و 10^{7} سلول در میلی‌لیتر) و یک شاهد بدون باکتری در آب ارلن یک لیتری شامل لارو ماهی کپور نقره‌ای آماده شد (Keysami and Mohamadpour, 2013). این تیمارها به ترتیب با عنوان‌های T1، T2، T3، T4، T5، T6، T7، T8 و C (شاهد) نام‌گذاری شدند. در مجموع ۲۰۰ لارو ماهی کپور نقره‌ای از کارگاه تکثیر تعاونی ۱۲ رشت تهیه و در ۱۸ ارلن شیشه‌ای یک لیتری به میزان ۱۰ لارو در هر ارلن ذخیره‌سازی شدند. لاروها با ترازوی دیجیتال (A2005، GMBH GOTTING، Sartorius، آلمان) با حساسیت ۰/۰۰۱ گرم وزن شدند. وزن متوسط لاروها در شروع آزمایش ۰/۰۰۳±۰/۰۲ گرم بود. لاروها به منظور سازگاری با شرایط آزمایش به مدت ۶ ساعت در شرایط آزمایشگاه نگهداری شدند. غلظت‌های مختلف باکتری‌های منتخب (10^{5} و 10^{7} سلول در میلی‌لیتر) بر اساس مطالعات قبلی به آب ارلن حاوی لاروها اضافه شد (Meunpol

et al., 2003; Keysami et al., 2007). در خلال آزمایش ارلن‌ها با پمپ هوای آکواریومی هوادهی شدند. روشنایی به صورت ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی با نور لامپ مهتابی برای ارلن‌ها در نظر گرفته شد. در مدت ۹۶ ساعت هیچ نوع غذادهی و تعویض آب صورت نگرفت. نمونه‌های تلف شده در فواصل زمانی ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بعد از شروع آزمایش جمع‌آوری و شمارش شدند و درصد مرگ و میر (M) از رابطه ۱ محاسبه شد.

رابطه ۱:

$$M\,(\%) = (N_D / N_T) \times 100$$

N_D: تعداد لاروهای تلف شده؛ N_T: تعداد کل لاروها در ارلن.

بررسی شرایط رشد روی فعالیت پروبیوتیکی نمونه منتخب

به منظور بررسی اثر pH، شوری، دما و زمان روی فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های منتخب پروبیوتیک محیط TSB استریل با pHهای ۴، ۵، ۶، ۷، ۸ و ۹ آماده شد و با ۰/۱ میلی‌لیتر از کشت ۱۸ ساعته از نمونه‌های منتخب پروبیوتیک به مدت ۲۴ ساعت در ۳۰ درجه سانتی‌گراد و در سه تکرار انکوبه شد. محیط‌های TSB مشابه با ۰، ۱، ۲، ۳ و ۴ درصد کلرید سدیم آماده و باکتری‌های منتخب تلقیح و انکوبه شدند. ۱۲ عدد لوله آزمایش TSB با نمونه‌های منتخب پروبیوتیک در ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد و بخش مایع از سانتریفیوژ سلول‌های باکتری رشد یافته، برای بررسی فعالیت ضدباکتریایی فراهم شد. از کشت انکوبه شده در ۳۰ درجه سانتی‌گراد نمونه‌ها در زمان‌های ۶، ۱۲، ۲۴، ۳۰، ۳۶، ۴۸ و ۷۲ ساعت ارتباط میان میزان رشد و فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های منتخب مشخص شد (Meunpol et al., 2003; Keysami et al., 2007).

یک گونه *B. subtilis* که از محیط پرورش ماهیان مولد کپور نقره‌ای جداسازی شده و دارای بیشترین خاصیت ضدباکتریایی علیه باکتری‌های *A. hydrophila* بر اساس روش انتشار در دیسک بود، برای استفاده در این بخش در نظر گرفته شد (Sugita et al., 2002).

ارزیابی تاثیر *Bacillus subtilis* روی کیفیت فیزیکوشیمیایی آب، رشد و درصد بقای بچه‌ماهی‌های کپور نقره‌ای در آکواریوم

بدین منظور یک گونه *B. subtilis* که پس از گذراندن مراحل غربالگری آزمایشگاهی به عنوان نمونه منتخب پروبیوتیک در نظر

گرفته شده بود، در سه تیمار بر اساس غلظت *B. subtilis* در آب آکواریوم شامل ۵×۱۰^{۵} (T1)، ۵×۱۰^{۶} (T2) و ۵×۱۰^{۷} (T3) سلول در میلی‌لیتر و شاهد (C) بدون *Bacillus* در یک طرح کاملا تصادفی با سه تکرار به کار گرفته شد. غلظت‌های مختلف *B. subtilis* بر اساس مطالعات قبلی به آب آکواریوم بچه‌ماهیان اضافه شد (Meunpol et al., 2003; Keysami et al., 2007). در این مرحله ۴۸۰ بچه‌ماهی از کارگاه تکثیر تهیه و جداگانه با ترازوی دیجیتال با حساسیت ۰/۰۱ گرم وزن شد و در ۱۲ آکواریوم ۶۰ لیتری به ابعاد ۳۰×۳۰×۶۰ سانتی‌متر به میزان ۴۰ بچه‌ماهی در هر آکواریوم ذخیره‌سازی شد. وزن متوسط ماهی‌ها در شروع آزمایش گروه شاهد ۲/۱۴±۲۱/۱۸ گرم بود. وزن متوسط ماهی‌ها در تیمارها که *B. subtilis* به آنها اضافه شد ۳/۸۶±۲۱/۲۳ گرم بود که با میانگین وزنی گروه شاهد اختلاف معنی‌دار نداشت. بچه‌ماهی‌ها به منظور سازگاری با شرایط آزمایش به مدت یک هفته ۳ وعده در روز با آب غنی شده استخر پرورش ماهی غذادهی شده و در شرایط آزمایش نگهداری شدند. بچه‌ماهی‌ها با آب غنی‌شده استخر پرورش ماهی به مدت ۲۸ روز تغذیه شدند. آکواریوم‌های شاهد و تیمار با پمپ هوای آکواریمی به طور یکسان هوادهی شدند. هر هفته یک بار بستر آکواریوم‌ها تمیز شده و همزمان ۱۰۰-۵۰ درصد آب آکواریوم‌ها نیز تعویض شد و سپس باکتری آکواریوم‌ها تجدید شد. هر ۲ هفته یک بار وزن ۱۰ بچه‌ماهی نمونه‌برداری شده از آکواریوم‌ها اندازه‌گیری شد. درصد بقای بچه‌ماهی‌ها با جمع‌آوری تلفات آکواریوم‌ها و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آب آکواریوم‌های پرورش بچه‌ماهی کپور نقره‌ای شامل دما و pH با pHمتر (WTW، آلمان)، اکسیژن محلول با اکسی‌متر (YSI ،V5، آمریکا) و آمونیاک (NH_3) با آمونیاک‌سنج (93715HI، هانا، تایوان) به طور روزانه دو بار (صبح و عصر) برآورد شد. در پایان دوره پرورش با اطلاعات به دست آمده از وزن ماهیان، شاخص‌های رشد شامل افزایش وزن (WG)، افزایش وزن بدن (BWI)، ضریب رشد ویژه (SGR) و درصد بقای (SR) بچه‌ماهی‌ها بر اساس رابطه‌های ۲ تا ۵ محاسبه شد (Keysami et al., 2012).

رابطه ۲:

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

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

رابطه ۳:

$$BWI\ (\%) = [(W_f - W_i) / W_i] \times 100$$

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

رابطه ۴:

$$SGR\ (\%/day) = [(LnW_f - LnW_i) / t] \times 100$$

W_i: وزن اولیه (گرم)؛ W_f: وزن نهایی (گرم)؛ t: زمان آزمایش (روز).

رابطه ۵:

$$SR\ (\%) = (N_i / N_f) \times 100$$

N_i: تعداد ماهیان در ابتدای دوره؛ N_f: تعداد ماهیان در انتهای دوره.

تجزیه وتحلیل داده‌ها

داده‌های درصد بقای لاروها در تیمارها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و پس‌آزمون دانکن و ارتباط بین متغیرهای فعالیت ضدباکتریایی، مدت زمان آنکوباسیون و تعداد سلول‌های باکتری با رگرسیون خطی در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P<0/05$) در نرم‌افزار SPSS 20 ارزیابی شد (Sokal and Rohlf, 1995). نتایج به دست آمده بر اساس میانگین ± انحراف معیار ارائه شد.

نتایج

نتایج غربالگری پروبیوتیکی

نتایج روش‌های غربالگری انتشار در چاهک، انتشار در دیسک و روش متقاطع نشان داد که فقط سه نمونه منتخب پروبیوتیک (*B. subtilis*، *C. ammoniagenes* و *M. luteus*) فعالیت ضدباکتریایی در مقابل باکتری بیماری‌زا داشتند (جدول ۱).

جدول ۱: اثرات ضدباکتریایی پروبیوتیک‌های منتخب علیه باکتری‌های بیماری‌زای رشد یافته روی محیط کشت TSA در روش‌های مختلف بررسی فعالیت‌های ضدباکتریایی شامل انتشار در چاهک، انتشار در دیسک و روش متقاطع

پروبیوتیک‌های منتخب	*Vibrio cholerae*			*Salmonela* sp.			*Pseudomonas aeruginosa*			*Escherichia coli*			*Vibrio parahaemolyticus*			*Aeromonas hydrophila*		
	۱	۲	۳	۱	۲	۳	۱	۲	۳	۱	۲	۳	۱	۲	۳	۱	۲	۳
Aeromonas	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Entrobacteriaceae	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	–	–	–
Micrococcus	+	+	+	–	+	–	–	+	–	+	+	–	+	+	+	+	+	+
Corynebacterium	+	+	–	+	–	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	–
Staphylococcus	–	–	–	+	+	+	–	–	–	–	–	–	+	–	–	+	+	+
Pseudomonas	+	+	+	+	–	–	+	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–
***Bacillus* sp.**	–	+	+	–	+	+	–	–	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+
Unidentified	+	+	+	–	–	–	–	+	–	–	–	–	+	–	–	+	+	+

۱: انتشار در چاهک؛ ۲: انتشار در دیسک؛ ۳: روش متقاطع؛ +: تاثیر مثبت؛ -: تاثیر منفی.

باکتری *B. subtilis* اثر ممانعت‌کنندگی معنی‌داری را برای باکتری بیماری‌زای *A. hydrophila* در هر دو روش انتشار در چاهک و انتشار در دیسک نشان داد. در روش انتشار در چاهک قطر ناحیه ممانعت‌کنندگی ۱۷ میلی‌متر بود، در حالی که در روش انتشار در دیسک قطر ناحیه ممانعت‌کنندگی ۲۰ میلی‌متر به دست آمد.

گونه‌های *B. subtilis*، *M. luteus* و *C. ammoniagenes* با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و نرم‌افزار بیولوگ شناسایی شدند. تاثیر بخش مایع، از سانتریفیوژ باکتری‌های *B. subtilis*، *C. ammoniagenes* و *M. luteus* روی سلول‌های *A. hydrophila* در سرم فیزیولوژی استریل در جدول ۲ آورده شده است. افزودن ۱۰ میلی‌لیتر از بخش مایع گونه *B. subtilis* به عوامل بیماری‌زا ($۱۰^{۷}$ سلول در میلی‌لیتر) در سرم فیزیولوژی استریل، منجر به سرکوبی کامل آنها در ۱۲ ساعت شد. افزودن مقدار کمتر به *A. hydrophila* هیچ اثر ممانعت‌کننده‌ای نداشت.

اثر pHهای مختلف روی رشد *B. subtilis* در جدول ۳ نشان داده شده است. اپتیموم رشد در pH ۸ ثبت شد. این مقدار بیشترین اثر ممانعت‌کنندگی را از رشد *A. hydrophila* داشت. کمترین میزان رشد باکتریایی در pH ۶ و ۹ مشاهده شد. رشد باکتریایی در pH ۴ و ۵ مشاهده نشد. ناحیه منع رشد در pH ۶ و ۹ به ترتیب ۸ و ۹/۵ میلی‌متر بود (جدول ۳).

بررسی اثر دما روی تولید ترکیبات ضدباکتریایی به وسیله *B. subtilis* نشان داد که رشد در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد کمترین بود به طوری که تولید ترکیب ضدباکتریایی وجود نداشت. در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد رشد کم بود، اما تولید ترکیبات ضدباکتریایی به میزان کمی وجود داشت. بیشترین رشد باکتریایی در دمای ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد (جدول ۴).

نتایج به دست آمده از اثر غلظت NaCl محیط کشت، روی تولید ترکیبات ضدباکتریایی نشان داد که TSB با NaCl ۱ درصد، با ۱۹ میلی‌متر ناحیه منع رشد، اپتیموم بود. ناحیه منع رشد برای TSB با ۲ درصد و ۰ درصد NaCl، ۱۶/۵ میلی‌متر بود. کمترین رشد در TSB حاوی ۳ و ۴ درصد NaCl مشاهده شد. هیچ فعالیت ضدباکتریایی در این غلظت‌ها مشاهده نشد (جدول ۴).

جدول ۲: تاثیر بخش مایع به دست آمده از سانتریفیوژ سه گونه باکتری منتخب روی باکتری *Aeromonas hydrophila* (۱۰^۷cells/mL) در سرم فیزیولوژی استریل (میانگین ± انحراف معیار؛ سه تکرار)

پروبیوتیک‌های منتخب	حجم بخش مایع سانتریفیوژ شده (mL)	شمارش باکتری *A. hydrophila* (cells/mL±۱۰)		
		۰h	۱۲h	۲۴h
Bacillus subtilis	۰	۳/۶۲×۱۰^۷	۵/۶۶×۱۰^۶ [b]	۴/۱۲×۱۰^۶
	۱	۱/۵۳×۱۰^۷	۳/۶۰×۱۰^۷ [a]	۴/۳۱×۱۰^۷
	۵	۲/۳۶×۱۰^۷	۳/۶۲×۱۰^۵ [a]	۱/۲۲×۱۰^۵
	۱۰	۲/۸۶×۱۰^۷	۲/۳۱×۱۰^۳ [a]	۳/۲×۱۰^۱
Corynebacterium ammoniagenes	۰	۳/۵۲×۱۰^۷	۶/۵۶×۱۰^۵ [b]	۳/۹۸×۱۰^۶
	۱	۳/۶۲×۱۰^۶	۱/۳۹×۱۰^۷ [a]	۱/۶۱×۱۰^۶
	۵	۲/۱۶×۱۰^۷	۱/۱۳×۱۰^۶ [a]	۳/۶۲×۱۰^۵
	۱۰	۱/۵۲×۱۰^۷	۲/۸۲×۱۰^۵ [a]	۲/۹۸×۱۰^۳
Micrococcus luteus	۰	۲/۵۲×۱۰^۷	۷/۵۶×۱۰^۵ [b]	۱/۹۸×۱۰^۵
	۱	۱/۵۳×۱۰^۷	۳/۳۵×۱۰^۶ [a]	۲/۵۱×۱۰^۶
	۵	۲/۲۵×۱۰^۷	۲/۱۳×۱۰^۶ [a]	۲/۵۲×۱۰^۴
	۱۰	۲/۲۹×۱۰^۷	۳/۶۲×۱۰^۵ [a]	۳/۹۲×۱۰^۴

حروف ناهمسان در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار آماری است (P<۰/۰۵).

جدول ۳: اثر pH روی رشد *Bacillus subtilis* و تولید ترکیبات ضدباکتریایی علیه *Aeromonas hydrophila* (میانگین ± انحراف معیار؛ سه تکرار)

pH	رشد	ناحیه ممانعت از رشد *A. hydrophila* (mm±۱)		
		۱۲h	۲۴h	۴۸h
۴	–	۰	۰	۰
۵	–	۰	۰	۰
۶	+	۰	۰	۸/۰ [a]
۷	++	۰	۱۱/۰ [a]	۱۲/۰ [c]
۸	+++	۰	۱۴/۰ [b]	۱۶/۰ [d]
۹	+	۰	۰	۹/۵±۱ [b]

+: رشد کم؛ ++: رشد متوسط؛ +++: رشد زیاد.

حروف ناهمسان در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار آماری است (P<۰/۰۵).

جدول ۴: اثر دما و شوری روی رشد *Bacillus subtilis* و تولید ترکیبات ضدباکتریایی علیه *Aeromonas hydrophila* (میانگین ± انحراف معیار؛ سه تکرار)

تیمارها	رشد	ناحیه ممانعت از رشد *A. hydrophila* (mm±۱)		
		۱۲h	۲۴h	۴۸h
تیمارهای دمایی (°C)				
۱۰	+	۰	۰	۰
۲۰	+	۵/۵ ^{a}	۷/۰ ^{b}	۶/۵ ^{b}
۳۰	+++	۱۵/۵ ^{b}	۱۷/۰ ^{c}	۱۴/۰ ^{a}
۳۷	+++	۱۶/۰ ^{b}	۱۷/۰ ^{c}	۱۴/۰ ^{a}
تیمارهای شوری (٪)				
۰	+++	۱۰/۰ ^{a}	۱۵/۵ ^{b}	۱۶/۱۵ ^{b}
۱	+++	۱۰/۰ ^{a}	۱۶/۰ ^{b}	۱۹/۰ ^{c}
۲	++	۹/۰ ^{a}	۱۴/۰ ^{b}	۱۶/۵ ^{c}
۳	+	۰	۰	۰
۴	–	۰	۰	۰

+: رشد کم؛ ++: رشد متوسط؛ +++: رشد زیاد.

حروف ناهمسان در هر ردیف بیانگر اختلاف معنی‌دار آماری است (P<۰/۰۵).

تداوم انکوباسیون و بیشترین فعالیت ضدباکتریایی فقط در ۳۰ ساعت، در ۳۰ درجه سانتی‌گراد و در pH ۸ مشاهده شد و بیشتر از این مدت، تغییری در ناحیه ممانعت از رشد مشاهده نشد (جدول ۵).

با بررسی اثربخشی سوسپانسیون سه گونه پروبیوتیک منتخب و باکتری بیماری‌زای *A. hydrophila* روی درصد مرگ و میر لارو ماهی کپور نقره‌ای در شرایط آزمایشگاهی در خلال ۹۶ ساعت، نتایج نشان داد که *B. subtilis* تاثیر معنی‌داری روی درصد بقای مرحله لاروی داشت (P<۰/۰۵؛ جدول ۶). اگرچه بین درصد بقای گروه‌های تیمار و شاهد اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده شد، اما بین درصد بقای تیمارهای غلظت‌های مختلف *B. subtilis* اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

جدول ۵: اثر تداوم انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد، شوری ۱ درصد و pH ۸ روی تولید ترکیبات ضدباکتریایی علیه *Aeromonas hydrophila* (میانگین ± انحراف معیار؛ سه تکرار)

مدت زمان انکوباسیون (h)	ناحیه ممانعت از رشد (mm±۱)	شمارش باکتری (cells/mL±۱۰)
۰	۰ a	۱/۱۶×۱۰^۵
۶	۰ a	۲/۱۶×۱۰^۶
۱۲	۱۳ b	۳/۲۱×۱۰^۸
۲۴	۱۵ b	۲/۱۸×۱۰^۹
۳۰	۱۶ b	۷/۳۵×۱۰^۹
۳۶	۱۶ b	۲/۱۶×۱۰^۹
۴۸	۱۶ b	۱/۹۶×۱۰^۹
۷۲	۱۶ b	۲/۱۱×۱۰^۸

حروف ناهمسان بیانگر اختلاف معنی‌دار آماری است (P<۰/۰۵).

جدول ۶: اثربخشی سوسپانسیون سه گونه باکتری منتخب روی درصد مرگ و میر ناشی از باکتری بیماری‌زای *Aeromonas hydrophila* در لارو ماهی کپور نقره‌ای در شرایط آزمایشگاهی در مدت ۹۶ ساعت (میانگین ± انحراف معیار؛ سه تکرار)

تیمارها	تعداد تلفات لاروها (±۱۰/۱)				
	۱۲h	۲۴h	۴۸h	۷۲h	۹۶h
شاهد (cells/mL)	۰/۱۰ a	۲/۱۰ a	۳/۱۰ a	۶/۱۰ b	۱۰/۱۰ c
Bacillus subtilis (۵×۱۰^۵cells/mL)	۰/۱۰ a	۱/۱۰ a	۲/۱۰ a	۳/۱۰ a	۴/۱۰ b
Bacillus subtilis (۵×۱۰^۷cells/mL)	۰/۱۰ a	۲/۱۰ a	۲/۱۰ a	۲/۱۰ a	۴/۱۰ b
Aeromonas hydrophila (۵×۱۰^۵cells/mL)	۶/۱۰ b	۱۰/۱۰ c	–	–	–
Aeromonas hydrophila (۵×۱۰^۷cells/mL)	۱۰/۱۰ c	۱۰/۱۰ c	–	–	–
Corynebacterium ammoniagenes (۵×۱۰^۵cells/mL)	۶/۱۰ b	۱۰/۱۰ c	–	–	–
Corynebacterium ammoniagenes (۵×۱۰^۷cells/mL)	۱۰/۱۰ c	–	–	–	–
Micrococcus luteus (۵×۱۰^۵cells/mL)	۶/۱۰ b	۱۰/۱۰ c	–	–	–
Micrococcus luteus (۵×۱۰^۷cells/mL)	۱۰/۱۰ c	–	–	–	–

حروف ناهمسان در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار آماری است (P<۰/۰۵).

رابطه تعداد سلول باکتری و فعالیت پروبیوتیکی نشان داد که با افزایش سلول‌های باکتری، اثربخشی پروبیوتیکی آن بیشتر شد. گونه‌های منتخب دیگر اگرچه در مراحل قبلی غربالگری پروبیوتیک منتخب بودند، اما ایجاد تلفات در لاروها نشان داد که عملکرد مشابه باکتری بیماری‌زای *A. hydrophila* داشتند و قابل انتخاب برای مراحل دیگر غربالگری پروبیوتیک نبودند (جدول ۶).

متغیرهای فیزیکوشیمیایی مثل درجه حرارت، اکسیژن محلول، pH و آمونیاک به ترتیب در محدوده ۳۰-۲۶ درجه سانتی‌گراد، ۷/۱-۵/۳ میلی‌گرم در لیتر، ۸/۴-۷/۵ و ۰/۰۲-۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر به دست آمد (جدول ۷). نتایج به دست آمده نرمال و در محدوده کیفیت مناسب برای پرورش بچه‌ماهی کپور نقره‌ای بود (Keysami et al., 2022).

جدول ۷: ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آب آکواریوم‌های پرورش بچه ماهی کپور نقره‌ای با استفاده از غلظت‌های مختلف *Bacillus subtilis* (میانگین ± انحراف معیار؛ سه تکرار)

متغیر	C	T1	T2	T3
دما (°C)				
صبح	۲۶/۵۷±۰/۲۵^{a}	۲۶/۷۷±۰/۲۱^{a}	۲۶/۶۷±۰/۲۳^{a}	۲۶/۸۳±۰/۲۵^{a}
عصر	۲۹/۶۷±۰/۳۲^{a}	۲۹/۳۰±۰/۲۲^{a}	۲۹/۱۰±۰/۲۲^{a}	۲۹/۸۰±۰/۳۵^{a}
اکسیژن محلول (mg/L)				
صبح	۵/۷±۰/۲۹^{a}	۵/۶±۰/۱۶^{a}	۵/۴±۰/۰۶^{a}	۵/۷±۰/۳۶^{a}
عصر	۷/۱±۰/۰۶^{a}	۷/۰±۰/۰۲^{a}	۷/۰±۰/۰۱^{a}	۶/۹±۰/۴۰^{a}
pH				
صبح	۷/۹۰±۰/۱۰^{a}	۸/۰۲±۰/۳۵^{a}	۷/۲۲±۰/۳۵^{b}	۷/۲۲±۰/۳۱^{b}
عصر	۸/۰۷±۰/۰۶^{a}	۸/۱۰±۰/۲۸^{a}	۷/۵۰±۰/۲۸^{b}	۷/۵۰±۰/۳۸^{b}
آمونیاک (mg/L)				
صبح	۰/۰۲۲±۰/۰۰۴^{a}	۰/۰۲۰±۰/۰۰۴^{a}	۰/۰۱۰±۰/۰۰۴^{b}	۰/۰۱۲±۰/۰۰۴^{b}
عصر	۰/۰۵۰±۰/۰۰۵^{a}	۰/۰۳۰±۰/۰۰۵^{a}	۰/۰۱۰±۰/۰۰۵^{a}	۰/۰۱۳±۰/۰۰۵^{a}

تیمارها بر اساس غلظت *B. subtilis*: C: شاهد (بدون *B. subtilis*)؛ T1: ۵×۱۰^{۶}cells/mL؛ T2: ۵×۱۰^{۷}cells/mL؛ T3: ۵×۱۰^{۸}cells/mL.

حروف ناهمسان در هر ردیف نشانه اختلاف معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

باکتری *B. subtilis* تاثیر معنی‌داری روی کیفیت فیزیکوشیمیایی آب پرورش این گونه داشت (P<۰/۰۵). بین کیفیت آب گروه‌های تیمار و شاهد اختلاف معنی‌دار مشاهده شد و بین کیفیت آب تیمارهای مختلف نیز اختلاف معنی‌دار مشاهده شد (P<۰/۰۵). نتایج ۲۸ روز تیمار با *B. subtilis* اختلاف معنی‌دار آماری را در افزایش شاخص‌های رشد و درصد بقا بین تیمارها و شاهد نشان داد (P<۰/۰۵؛ جدول ۸).

بحث

بررسی فعالیت‌های ضدباکتریایی گروه‌های اصلی جداسازی شده به روش‌های انتشار در چاهک و دیسک و روش متقاطع نشان داد که باکتری‌های *Bacillus*، *Micrococcus* و *Corynebacterium* با ایجاد هاله منع رشد، در برابر باکتری‌های بیماری‌زا خاصیت ضدباکتریایی نشان دادند. فعالیت ضدباکتریایی گونه *B. subtilis* جداسازی شده در این مطالعه در برابر باکتری‌های بیماری‌زای *A. hydrophila*، *E. coli*، *Vibrio parahaemolyticus*، *P. aeruginosa*، *Salmonella* sp. و *Vibrio cholerae* در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است (Sugita et al., 1998).

جدول ۸: نتایج شاخص‌های رشد بچه ماهیان کپور نقره‌ای پرورش داده شده با استفاده از غلظت‌های مختلف باکتری *Bacillus subtilis* در دوره چهار هفته‌ای آزمایش (میانگین ± انحراف معیار؛ سه تکرار)

تیمارها	C	T1	T2	T3
وزن اولیه (g)	۲۱/۱۸±۲/۱۴ a	۲۱/۱۵±۲/۱۷ a	۲۱/۲۸±۲/۱۷ a	۲۱/۲۲±۲/۷۰ a
وزن نهایی (g)	۵۶/۷۸±۵/۱۵ a	۶۱/۲۱±۲/۱۷ b	۶۳/۷۵±۲/۳۰ b	۶۵/۲۲±۱/۶۰ b
درصد افزایش وزن (٪)	۱۶۸/۰۸±۳/۹ a	۱۸۹/۴۱±۲/۳ b	۱۹۹/۵۸±۱/۲ b	۲۰۱/۲۵±۲/۷ b
شاخص رشد ویژه (٪/day)	۳/۵۲±۰/۳۸ a	۳/۸۰±۰/۱۱ b	۳/۹۳±۰/۲۷ b	۳/۹۷±۰/۱۵ b
درصد بقا (٪)	۹۳/۳۰±۰/۰۳ a	۹۶/۶۶±۰/۰۹ b	۱۰۰/۰۰±۰/۰۰ b	۹۶/۶۶±۰/۰۸ b

تیمارها بر اساس غلظت *B. subtilis*: C: شاهد (بدون *B. subtilis*)؛ T1: ۵×۱۰^{۶}cells/mL؛ T2: ۵×۱۰^{۶}cells/mL؛ T3: ۵×۱۰^{۷}cells/mL.

حروف ناهمسان در هر ردیف نشانه اختلاف معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

نتایج به دست آمده در این مطالعه دربرگیرنده تولید فعالیت ضدباکتریایی مقابل باکتری‌های بیماری‌زای آزمایش شده بود و این مورد که جمعیت *A. hydrophila* در ۱۲ ساعت در اثر افزودن بخش مایع از سانتریفیوژ *B. subtilis*، به کمترین مقدار رسید را شاید بتوان به تولید ترکیبات ضدباکتریایی خارج سلولی *B. subtilis* نسبت داد. فعالیت‌های آنتاگونیستی نتیجه تولیدات خارج سلولی مانند آنزیم، موکوس‌های ترکیبی و هورمون‌ها توسط باکتری است که رشد دیگر میکروارگانیزم‌ها را از طریق ایجاد رقابت غذایی و فضا محدود می‌کند (Hagi and Hoshino, 2009). این یافته به وسیله گزارش‌هایی که *B. subtilis* را به عنوان تولیدکننده طیف وسیعی از ترکیبات ضدباکتریایی و ضدجلبکی معرفی کرده‌اند، تایید شده است (Alexander, 1977; Katz and Demain, 1977). بروز فعالیت ضدباکتریایی در محیط کشت زمانی اتفاق افتاد که سلول‌ها به فاز ایستایی رشد رسیده بودند، به عبارت دیگر بیشترین فعالیت در فاز ایستایی را ناشی از عوامل ضدباکتریایی یا متابولیت ثانویه این باکتری‌ها می‌دانند (Ibrahem, 2015). Tung Pang و همکاران (۲۰۲۰) ۱۶۹ گونه باکتری را از روده ماهی حوض جداسازی کردند. آنها با بررسی پنج گونه از باکتری‌های جداسازی شده که فعالیت ضدباکتریایی بالا داشتند گونه *Bacillus thuringiensis* را به عنوان پروبیوتیک مطلوب در مبارزه با طیف گسترده‌ای از عوامل آسیب‌زای ماهی و مقاوم به عوامل زیست‌محیطی نامناسب مانند pH پایین و دمای بالا گزارش کردند (Tung Pang et al., 2020).

در این مطالعه بیشترین تولید عوامل ضدباکتریایی در pH ۸، دماهای ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شوری ۱ درصد مشاهده شد. این ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی به عنوان اپتیموم pH، دما و شوری برای رشد این ماهی در شرایط پرورشی در نظر گرفته شده است (Keysami et al., 2022). بنابراین امکان استفاده از این گونه باکتری در شرایط پرورشی وجود دارد، زیرا باکتری‌های با فعالیت ضدباکتریایی در شرایط آزمایشگاهی، دارای پتانسیل کاربردی به عنوان پروبیوتیک محسوب می‌شوند (Maeda et al., 1997). به علاوه *A. hydrophila* که یک باکتری بیماری‌زای فرصت‌طلب در محیط‌های آبزی‌پروری است (Hoa et al., 2000)، در این مطالعه با گونه منتخب به دست آمده کنترل شد.

فعالیت ضدباکتریایی *B. subtilis* در برابر باکتری‌های بیماری‌زای *Salmonella*، *Vibrio*،

Aeromonas و *E. coli* در مطالعه Sugita و همکاران (۱۹۹۸) نیز گزارش شده است. Sugita و همکاران (۱۹۹۸) یک گونه از *B. subtilis* را جداسازی کردند که نسبت به ۶۳ درصد از باکتری‌های جداسازی شده از روده ماهیان ساحلی ژاپن فعالیت ضدباکتریایی نشان داد. نتایج مطالعه حاضر نیز در برگیرنده تولید یک ناحیه وسیع هاله منع رشد مقابل باکتری بیماری‌زای آزمایش شده بود و *A. hydrophila* (10^7cells/mL) در سرم فیزیولوژی استریل (۸/۵ گرم در لیتر NaCl) در اثر افزودن بخش مایع از سانتریفیوژ *B. subtilis* در مدت ۱۲ ساعت کشته شد. بنابراین، می‌توان حدس زد که *B. subtilis* ترکیبات ضدباکتریایی خارج سلولی تولید می‌کند. این یافته به وسیله گزارش‌هایی که *B. subtilis* را به عنوان تولیدکننده طیف وسیعی از ترکیبات ضدباکتریایی و ضدجلبکی معرفی کرده است، تایید می‌شود (Meunpol et al., 2003). باکتری *B. subtilis*، آنتی بیوتیک‌های جدیدی مانند دیفی‌سی‌دین (Difficidin) و اکسی‌دیفی‌سی‌دین (Oxydifficidin) را تولید می‌کند که در برابر طیف وسیعی از باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی موثر است (Zimmerman et al., 1987; Gullian and Rodriquez, 2002). بروز بیشترین فعالیت ضدباکتریایی درون محیط کشت زمانی است که سلول‌های باکتریایی به فاز ایستایی رشد می‌رسند و بیشترین فعالیت ضدباکتریایی در فاز ایستایی نشان‌دهنده این است که عوامل ضدباکتریایی متابولیت ثانویه هستند (Gullian and Rodriquez, 2002). همچنین گزارش شده است که افزودن باکتری‌های آنتاگونیستیک به آب در کاهش بیماری‌ها موثر است و تعداد باکتری‌های بیماری‌زا را کاهش می‌دهد (Austin et al., 1995).

خاصیت پروبیوتیکی *B. subtilis* از اختلاف معنی‌دار تغییرات فیزیکوشیمیایی (pH و آمونیاک) تیمارهای T1 و T2 با تیمار شاهد در این مطالعه به اثبات رسید. همچنین نتایج ۲۸ روز تیمار با *B. subtilis* اختلاف معنی‌دار آماری را در افزایش رشد و درصد بقا بین تیمارها و شاهد نشان داد. تاثیر *B. subtilis* در افزایش رشد و درصد بقای لارو در این مطالعه می‌تواند از راه تغذیه مستقیم گونه مورد نظر توسط لارو ماهی کپور نقره‌ای و حتی از راه اثر تغذیه‌ای غیرمستقیم باشد (Lalloo et al., 2007; Keysami et al., 2007). بدین‌ترتیب که این باکتری‌ها ترکیبات سمی و غیرتغذیه‌ای محیط را هضم می‌کنند، از طرفی *B. subtilis*

آنزیم‌های پروتئاز مختلفی را تولید می‌کند که می‌تواند انواع مواد آلی و مواد غذایی را تجزیه کرده و به مواد مغذی قابل جذب تبدیل کند (Parry et al., 1983; Gullian and Rodriquez, 2002; Keysami and Mohammadpour, 2013). از سوی دیگر این باکتری با تولید مواد ضدباکتریایی مثل دیفی‌سی‌دین و اکسی‌دیفی‌سی‌دین و رقابت در جذب املاح غذایی، از ازدیاد و تجمع باکتری‌های بیماری‌زا در آب و رسوب استخرهای ماهی جلوگیری می‌کند (Gullian and Rodriquez, 2002).

در مجموع، افزایش شاخص‌های رشد و درصد بقا در تیمارهای با غلظت ۵×۱۰^{۶} و ۵×۱۰^{۷} سلول در میلی‌لیتر *B. subtilis* نسبت به تیمار شاهد می‌تواند موید خاصیت پروبیوتیکی گونه جداسازی شده در این مطالعه باشد. به علاوه *B. subtilis* خالص‌سازی شده در این مطالعه می‌تواند ضمن داشتن خواص ضدباکتریایی، شرایط فیزیکوشیمیایی آب محیط پرورش ماهی کپور نقره‌ای را نیز بهبود ببخشداز این رو، نظر به این که این نتایج در شرایط آزمایشگاهی و کارگاهی به دست آمده است در صورت تایید در آزمون‌های میدانی می‌تواند به عنوان پروبیوتیک در پرورش ماهی کپور نقره‌ای مورد استفاده قرار بگیرد.

تشکر و قدردانی

در انجام این پژوهش از همکاری و مساعدت ریاست و کارکنان آزمایشگاه‌ها در مرکز آموزش علوم و صنایع شیلاتی میرزاکوچک‌خان گیلان، مرکز تکثیر و پرورش ماهی کپور نقره‌ای در شهرستان رشت بهره‌مند گردیده‌ایم که بدین‌وسیله صمیمانه قدردانی می‌گردد.

منابع

Alexander M. 1977. Introduction to Soil Microbiology. John Wiley and Sons, USA. 418P.

Anderson I.G., Shmsudin M.N. and Nash G. 1989. A preliminary study on the aerobic heterophic bacterial flora in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, hatcheries in Malaysia. Aquaculture, 81: 213–223. doi: 10.1016/0044-8486(89)90147-6

Askarian F. 2007. Study on lactic acid bacteria as probiotics in gastrointestinal tracts of beluga (*Huso huso*). International Workshop on Fish Larviculture, Urmia University, Iran. 135P.

Austin B., Stuckey L.F., Robertson P.A.W., Effendi J. and Griffith D.R.W. 1995. A probiotic reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. Journal of Fish Diseases, 18: 93–96. doi: 10.1111/ j.1365-2761.1995.tb01271.x

Avakh Keysami M., Mohammadpour A., Rehanandeh M. and Zoghi Shalmani A. 2025. Isolation and identification of bacterial populations from water and sediment of silver carp broodstock ponds. World of Microbes, 61(17): 300–311. [In Persian].

Azewedo P.A., Leeson S., Cho C.Y. and Bureau D.P. 2004. Growth and feed utilization of size rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) reared in fresh water: Diet and species effects, and responses over time. Aquaculture Nutrition, 10: 401–411.

Behera B.K., Bera A.K., Paria P., Das A. and Parida P.K. 2018. Identification and pathogenicity of *Plesiomonas shigelloides* in silver carp. Aquaculture, 493(1): 314–318. doi: 10.1016/j.aquaculture.2018. 04.063

Borch K., Pederson I.E. and Hogmo R.O. 2015. The use of probiotics in fish feed for intensive aquaculture to promote healthy guts. International Scholars Journal, 3: 264–273.

Cecilia B., Daniela R. and Mioara C. 2018. Research on bacterial disease in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.), farmed in pond. International Multidisciplinary Scientific GeoConference, 18(6-2): 505–515. doi: 10.5593/sgem2018/6.2/S25.067

Gullian M. and Rodriquez J. 2002. Selection of probiotic bacteria and study of their immuno stimulatory qualities of probiotic bacteria. Global Aquaculture Advocate, 5: 52–54. doi: 10.1016/j.aquaculture.20 03.09.013

Hagi T. and Hoshino T. 2009. Screening and characterization of

potential probioticlactic acid bacteria from cultured common carp intestine. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 73: 1479–1483. doi: 10.1271/bbb.80746

Hanol Bektas Z., Ucar F.B. and Giray B. 2020. Identification and probiotic properties of lactic acid bacterial isolated from freshwater fish. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 19(4): 1795–1807. doi: 10.22092/ijfs.2018.118938

Hoa T.T.T., Oanh O.T.H. and Phuong N.T. 2000. Study on diseases in giant fresh water prawn (A review). Proceeding of the 2000 Annual Workshop of JIRCAS, Mekong Delta Project, JIRCAS and Can Tho University, Vietnam. P: 184–191.

Ibrahem M.D. 2015. Evolution of probiotics in aquatic world: Potential effects, the current status in Egypt and recent prospective. Journal of Advanced Research, 6: 765–791. doi: 10.1016/j.jare.2013.12.004

Irianto A. and Austin B. 2002. Probiotics in aquaculture. Journal of Fish Disease, 25: 633–642. doi: 10.1046/j.1365-2761.2002.00422.x

Katz E. and Demain A.C. 1977. The peptide antibiotics of *Bacillus*: Chemistry, biogenesis, and possible function. Bacteriology Review, 41: 449–474.

Keysami M.A. and Mohammadpour M. 2013. Effect of *Bacillus subtilis* on *Aeromonas hydrophila* infection resistance in juvenile freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (De man). Aquaculture International, 21(3): 553–562. doi: 10.1007/s10499-012-9588-3

Keysami M.A., Saad C.R. and Mohamadpour M. 2012. Probiotic activity of *Bacillus subtilis* in juvenile freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) at different methods of administration to the feed. Aquaculture International, 20: 499–511. doi: 10.1007/s10499-011-9481-5

Keysami M.A., Saad C.R., Daud H.M., Sijam K. and Alimon A.R. 2005. Comparison probiotic ability of three putative bacteria in juvenile *Macrobrachium rosenbergii* based on in vitro bacteria growth characteristics. Malaysian Journal of Animal Science, 11(1): 61–71.

Keysami M.A., Saad C.R., Daud HM., Sijam K. and Alimon A.R. 2007. Effect of *Bacillus subtilis* on growth development and survival of larva *Macrobracum rosenbergii* (de Man). Aquaculture Nutrition, 13: 131–136. doi: 10.1111/j.1365-2095.2007.00463.x

Keysami M.A., Zoughi Shalmani A., Zahmatkesh Kumleh A. and Karimi A. 2022. Screening of bacterial flora isolated from the

gastrointestinal tract of silver carp broodstocks (*Hypophthalmichthys molitrix*) as probiotics. Journal of Animal Environment, 14(1): 285–292.

Lalloo R., Ramchuran S., Ramduth D., Gorgens J. and Gardiner N. 2007. Isolation and selection of *Bacillus* spp. as potential biological agents for enhancement of water quality in culture of ornamental fish. Journal of Applied Microbiology, 103: 1471–1479. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03360.x

Maeda M., Nogami K., Kanematsu M. and Hirayama K. 1997. The concept of biological control methods in aquaculture. Hydrobiologia, 358: 285–290.

Meunpol O., Lopinyosiri K. and Menasveta P. 2003. The effects of ozone and probiotics on the survival of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Aquaculture, 220: 437–448. doi: 10.1016/S0044-8486(02)00586-0

Moslehi F., Sattari M., Khuskholgh M., Shenavar Masoule A. and Abbas Alizadeh A. 2013. The effect of *Pediococcus pentosaceus* as a probiotic on growth and immune factors of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). Journal of Fisheries Science and Technology, 3(4): 81–92. [In Persian]. doi: 10.1080/10454438.2017.1363112

Parry J.M., Turnbull P.C.B. and Gibson J.R. 1983. A Colour Atlas of *Bacillus* Species. Wolfe Medical Publications, UK. 186P.

Pourasadi M., Sattari M., Avakh Keysami M. and Zamani H. 2025. Microbial treatment of effluent from beluga (*Huso huso*) breeding tanks under the influence of different concentrations of a mixture of *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Nitrosomonas* and *Nitrobacter* bacteria in the water circulation system. Aquatic Physiology and Biotechnology, 12(4): 39–56.

Sharifuzzaman S.M. and Austin B. 2017. Probiotics for disease control in aquaculture. P: 189–222. In: Austin B. and Newaj-Fyzul A. (Eds.). Diagnosis and Control of Diseases of Fish and Shellfish. John Wiley and Sons, UK. doi: 10.1002/9781119152125.ch8

Sokal R.R. and Rohlf F.J. 1995. The Principles and Practice of Statistics in Biological Research. Freeman, USA. 658P.

Sugita H., Hirose Y., Matsue N. and Degudri Y. 1998. Production of antibacterial substance by *Bacillus* spp. strain NM12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish. Aquaculture, 165: 269–280.

Sugita H., Okamo R., Suzuki Y., Iwai D., Mizukami M., Akiyama N. and Matsuura S. 2002. Antibacterial abilities of intestinal

bacteria from larval and juvenile Japanese flounder against fish pathogens. Fish Sciences, 68: 1004–1011. doi: 10.1046/j.1444-2906.2002.00525.x

Tung Pang S., Ransangan J. and Hatai K. 2020. Isolation, identification and preliminary characterization of candidate probiotic bacteria from the intestine of domesticated goldfish (*Carassius auratus*). Journal of Fisheries and Environment, 44(2): 39–52.

Yasemi M., Esmaeili A.H., Feizei Z., Ghaemmaghami S. and Alinejad S. 2012. Identifying bacterial flora of rainbow trout brood stocks (*Oncorhynchus mykiss*) and its assumed importance from probiotical view. Journal of Animal Environment, 4(2): 45–50. [In Persian].

Yegane H., Kazemi R., Shenavar Masoule A., Sayed Hassani H., Yousefi Jourdehi A., Hosseinpour Zelti A. and Ghorbani Vagheai R. 2021. The effect of native probiotic on growth rate and some hematological and immune indices in *Huso huso* fingerling. Journal of Aquaculture Development, 15(1): 125–136. [In Persian]. doi: 10.52547/aqudev.15.1.125

Zimmerman S.B., Schwartz C.D., Monaghan R.L., Pleak B.A., Weissberger B., Gilfillan E.C., Mochales S., Hernandes S., Currie S.A., Tejera E. and Stapley E.O. 1987. Difficidin and oxydifficidin: Novel broad spectrum antibacterial antibacterics produced by *Bacillus subtilis*. Journal of Antibacterics, 40(12): 1677–1681. doi: 10.7164/antibiotics.40.1677

Aquatic Physiology and Biotechnology

Vol. 13, No. 4, Winter 2026

Research Paper

Assessment of bacterial flora probiotics activity isolated from the water and sediments of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) broodstocks ponds

Mehran Avakh Keysami[1]*, Ali Mohammadpour[2], Mohammad Rahanandeh[3], Afshar Zoughi Shalmani[3]

DOI: 10.22124/japb.2025.30430.1569

Received: April 2025 Accepted: October 2025

Abstract

This study was conducted to screen water and sediments bacterial flora of silver carp broodstock including *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus*, *Aeromonas hydrophila*, and Unidentified as probiotics. Antibacterial activities were conducted by using disc diffusion, well diffusion and cross streak methods under the influence of different pH, salt, temperature and time duration. The 96h effectiveness of a suspension of three probiotic candidate species and the pathogenic bacterium *A. hydrophila* was investigated on the mortality rate of silver carp larvae with different concentrations of candidate bacteria (10^5 and 10^7 cells/mL) and a control without bacteria in a flask (1L). Also, effectiveness of selected bacteria was investigated on the water quality and survival rate of silver carp fry in the treatment and control groups during 28 days. The three probiotics candidates *Bacillus*, *Corynebacterium* and *Micrococcus* were shown to have antibacterial activity against pathogenic bacteria. The optimal growth and antibacterial bio-components production of selected *B. subtilis* with inhibitory and lethal effectiveness characteristics against *A. hydrophila* were found at pH 8 and temperature 30 and 37°C. There were significant differences between treatments and control groups in larva mortality rates during 96h exposure to different concentrations of candidate bacteria ($P<0.05$). There were significant differences in water quality and growth indices between treatments and control groups during 28 days exposure to selected *B. subtilis* in aquaria ($P<0.05$). From this, we can conclude that the candidate *B. subtilis* can be used to improve water quality and growth of silver carp culture.

Key words: *Probiotics Assessment, Water, Sediments, Bacterial Flora,* Hypophthalmichthys molitrix.

1- Associate Professor in Aquatics and Fisheries Department, Guilan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran.

2- M.Sc. in Environmental Research Department, Guilan Environmental General Office of Environment, Iranian Environment Organization, Rasht, Iran.

3- Assistant Professor in Aquatics and Fisheries Department, Guilan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran.

*Corresponding Author: dr.keysami@gmail.com