فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال هشتم، شماره دوم، تابستان ۱۳۹۹

مقاله پژوهشی

نقش باکتری‌های پروبیوتیک تجاری (*Bacillus subtilis* و *Bacillus coagulans*) و باکتری هالوفیل (*Bacillus* sp.) جداسازی شده از دریاچه ارومیه در بهبود کیفی آب، تولید بیوفلوک و ارزش غذایی آن با استفاده از منابع مختلف کربنی

الهه حسن نتاج نیازی[۱]*، ناصر آق[۲]، فرزانه نوری[۳]، بهروز آتشبار[۳]، گیلبرت ون استپن[۴]

تاریخ دریافت: تیر ۹۸ تاریخ پذیرش: آبان ۹۸

چکیده

در مطالعه حاضر نقش باکتری‌های پروبیوتیک و هالوفیل در سیستم بیوفلوک با منابع مختلف کربنی نشاسته ذرت، (تیمارهای ۱ و ۴)، ملاس چغندر قند (تیمارهای ۲ و ۵)، سبوس برنج (تیمارهای ۳ و ۶) با ویتاس نیشکر (در تمامی تیمارها) در حضور پروبیوتیک تجاری (*Bacillus subtilis* و *Bacillus coagulans*) (تیمارهای ۱، ۲ و ۳) و ترکیب آن با باکتری هالوفیل *Bacillus* sp. (تیمارهای ۴، ۵ و ۶) در شوری ۵±۶۰ گرم در لیتر طی ۴۲ روز مورد بررسی قرار گرفت. کمترین مقدار نیتریت و نیترات در تیمار ۶ و کمترین میزان آمونیاک در تیمار ۱ ثبت شد. تیمارهای ۲ و ۵ بیشترین حجم فلوک (۴۱-۴۸ mL/L) را تولید کردند. به لحاظ ارزش غذایی، تیمارهای ۲، ۳، ۵ و ۶ به طور معنی‌داری بالاترین پروتئین (۲۵-۲۰ درصد) و مواد معدنی و ۸۰-۷۵ درصد) را داشتند، ولی تیمارهای ۱ و ۴ به طور معنی‌داری بالاترین کربوهیدرات (۶۴ درصد) را داشتند. سنجش اسیدهای چرب بیوفلوک نشان دادند که تیمارهای ۲ و ۵ بالاترین مقدار PUFA n-3 (۳۲ درصد) را داشتند و تیمارهای ۳ و ۶ به طور معنی‌داری بالاترین مقدار اسیدهای چرب MUFA (۲۵-۲۲ درصد) را به خود اختصاص دادند. نتایج مطالعه حاضر نشان داد منابع مختلف کربنی اثر معنی‌داری بر کیفیت بیوفلوک داشتند، اما استفاده از پروبیوتیک به صورت مجزا و ترکیبی با باکتری هالوفیل تاثیر معنی‌داری بر کیفیت بیوفلوک نداشت.

واژگان کلیدی: *باسیلوس، بیوفلوک، کیفیت آب، ارزش غذایی، پروبیوتیک.*

۱- دانشجوی دکتری تکثیر و پرورش آبزیان، پژوهشکده آرتمیا و آبزی‌پروری، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
۲- دانشیار پژوهشکده آرتمیا و آبزی‌پروری، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
۳- استادیار پژوهشکده آرتمیا و آبزی‌پروری، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
۴- استاد مرکز رفرنس آرتمیا، دانشگاه گنت، گنت، بلژیک.
* نویسنده مسئول: e.hasannataj@urmia.ac.ir

مقدمه

استفاده بیش از حد از داروهای ضدباکتریایی، حشره‌کش‌ها و مواد ضدعفونی کننده در آبزی‌پروری موجب شکل‌گیری گونه‌های میکروبی مقاوم و در نتیجه بروز نگرانی شده است (Esiobu et al., 2002). از این رو، استفاده از پروبیوتیک‌ها در پرورش آبزیان به دلیل اهمیت آن‌ها در محافظت آبزی در برابر عوامل بیماری‌زا، افزایش سلامت آبزی به واسطه ترشح آنزیم‌های گوارشی و عناصر مغذی و بهبود کیفیت آب و خاک در حال افزایش است (Defoirdt et al., 2011). *Bacillus* spp. به صورت گسترده به عنوان پروبیوتیک به کار می‌روند، زیرا آن‌ها به طور طبیعی در محیط یافت می‌شوند و دارای مکانیسم‌های مختلفی برای رقابت با میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا هستند. علاوه بر این، *Bacillus*ها سلامت آبزی و کیفیت آب را بهبود می‌بخشند و می‌توانند تغییرات pH، دما و شوری را تحمل کنند (Decamp et al., 2008). امروزه برخی باکتری‌های هالوفیل (نمک دوست) نیز به عنوان پروبیوتیک در آبزی‌پروری استفاده می‌شوند (Sekar and Packyam, 2014) که دارای فوایدی از جمله تولید متابولیت‌های ثانویه مانند باکتریوسین، لیپوپپتیدهای ضدباکتریایی و غیره هستند و به دلیل سمیت پایین و قابلیت تبدیل زیستی بالا توجه قابل ملاحظه‌ای را به عنوان مواد کنترل کننده زیستی به خود جلب کرده‌اند (Oliveira and Pijoan, 2004).

فناوری بیوفلوک، انقلاب آبی نوینی در صنعت آبزی‌پروری به شمار می‌رود که بر پایه تولید دایمی میکروارگانیسم‌ها در آب استوار است و عملکردهای مهمی از جمله ۱) حفظ کیفیت آب به واسطه جذب ترکیبات نیتروژنی و تولید پروتئین میکروبی در آب (Lopez-Elias et al., 2015)، ۲) بهبود تغذیه (Arias-Moscoso et al., 2018) از طریق کاهش ضریب تبدیل غذایی و کاهش هزینه‌های غذا و ۳) بهبود سلامت آبزیان پرورشی (Emerenciano et al., 2017)، دارد. اهمیت غذایی باکتری‌ها به واسطه مصرف مستقیم آن‌ها (Avnimelech, 2007)، نه تنها به عنوان منبع کربنی (Wylie and Currie, 1991) و پروتئینی بلکه به عنوان منبعی از عناصر مغذی ضروری دیگر مانند ویتامین‌های ب-کمپلکس و اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه امگا ۳ (Nichols, 2003) گزارش شده است. به علاوه، ترکیب بیوشیمیایی چندین گونه باکتریایی نشان می‌دهد که باکتری‌ها حاوی ۴۹-۲۹ درصد

وزن خشک پروتئین، ۱۱/۲-۲/۵ درصد کربوهیدرات و ۶-۴ درصد چربی و نیز تمامی اسیدهای آمینه ضروری هستند (Brown et al., 1996).

انتخاب منبع کربنی آلی تا حد زیادی ترکیب بیوشیمیایی بیوفلوک را تعیین می‌کند (Oehmen et al., 2004) و قیمت منابع مختلف کربنی عامل تعیین کننده اصلی در انتخاب منبع کربنی است (Salehizadeh and Van Loosdrecht, 2004). بنابراین، در سیستم‌های بیوفلوک، بهتر است از منابع کربنی‌ای استفاده شود که به عنوان فرآورده‌های جانبی کم ارزش محسوب می‌شوند (Dube et al., 2007). گلوکز، گلیسرول، استات، ساکارز، ملاس، آرد تاپیوکا و آرد برنج (Avnimelech, 2017) از جمله کربوهیدرات‌هایی هستند که تاکنون به عنوان منبع کربنی در سیستم‌های بیوفلوک به کار رفته‌اند.

در سال‌های اخیر، مطالعاتی برای ارزیابی کاربرد پروبیوتیک‌ها در ارتقای کیفی فناوری بیوفلوک در سیستم‌های پرورش ماهی و میگو صورت گرفته است. در مطالعه‌ای روی ماهی *Clarias gariepinus* در سیستم بیوفلوک با استفاده از *Bacillus* sp.، رشد بهتر با بیوفلوک و پروبیوتیک مشاهده شد (Hapsari, 2016). در مطالعه‌ای دیگر (Krummenauer et al., 2014)، پروبیوتیک تجاری به سیستم بیوفلوک میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*) آلوده به باکتری *Vibrio parahaemolyticus* اضافه شد که نتایج حاکی از کنترل این باکتری و افزایش درصد بازماندگی با پروبیوتیک بود. همچنین، مطالعات دیگری انجام شده‌اند که حاکی از عملکرد مثبت به کارگیری پروبیوتیک‌ها در سیستم بیوفلوک بودند (Hu et al., 2016; Miao et al., 2017). در مطالعه دیگری، استفاده از هالوباسیلوس‌ها (*Bacillus* sp.) به عنوان پروبیوتیک منجر به بهبود سلامت و رشد میگوی *Penaeus monodon* شد (Sekar and Packyam, 2014). همچنین، باکتری *Alkalibacterium* sp. و آرکی باکتر *Halobacterium* sp. (Jiao et al., 2014) و هالوفیل (Lopes-dos-Santos et al., 2019) در تغذیه آرتمیا مورد استفاده قرار گرفته‌اند. با این حال، در برخی مطالعات زمانی که پروبیوتیک تجاری در پرورش میگو در سیستم بیوفلوک استفاده شد، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (De Paiva Maia et al., 2016). با وجود مطالعاتی که در زمینه پروبیوتیک در سیستم‌های بیوفلوک انجام شده

است، هنوز کارایی باکتری‌های پروبیوتیک نامشخص است.

تاکنون مطالعات چندانی درباره استفاده از پروبیوتیک‌های تجاری *Bacillus subtilis* و *Bacillus coagulans* و نیز باکتری هالوفیل *Bacillus* sp. در سیستم بیوفلوک در شوری بالا صورت نگرفته است. از این رو، در مطالعه حاضر به بررسی تاثیر باکتری‌های پروبیوتیک تجاری در سیستم بیوفلوک به صورت جدا و ترکیبی با باکتری هالوفیل جدا شده از دریاچه ارومیه بر بهبود کیفی آب، تولید فلوک و ارزش غذایی آن با استفاده از منابع مختلف کربنی پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر در یک دوره ۴۲ روزه در پژوهشکده آرتمیا و آبزی‌پروری دانشگاه ارومیه انجام پذیرفت. در این آزمایش، منابع مختلف کربنی شامل نشاسته ذرت، ملاس چغندر قند و سبوس برنج (۹۰ درصد) به صورت مکمل با ویتاس (۱۰ درصد) در حضور باکتری‌های پروبیوتیک (*Bacillus subtilis* و *Bacillus coagulans*) به صورت مجزا و ترکیبی با باکتری‌های هالوفیل (*Bacillus* sp.) برای تولید فلوک و ارزش غذایی آن در ۶ تیمار طبق جدول ۱ مورد سنجش قرار گرفتند. باکتری‌ها با تراکم‌های ذکر شده در جدول ۱ به سیستم بیوفلوک معرفی شدند (Avnimelech, 2007). در تمام تیمارها آمونیوم سولفات به عنوان منبع نیتروژنی مورد استفاده قرار گرفت و نسبت کربن به نیتروژن ۱۵ حفظ شد. شرایط شوری ۵±۶۰ گرم در لیتر، دما ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی برای تولید بیوفلوک اعمال شد.

جدول ۱: ترکیب تیمارهای آزمایشی

تیمار	ترکیب
تیمار ۱	نشاسته ذرت (۹۰٪) + ویتاس (۱۰٪) + پروبیوتیک (10^7 CFU/mL)
تیمار ۲	ملاس چغندرقند (۹۰٪) + ویتاس (۱۰٪) + پروبیوتیک (10^7 CFU/mL)
تیمار ۳	سبوس برنج (۹۰٪) + ویتاس (۱۰٪) + پروبیوتیک (10^7 CFU/mL)
تیمار ۴	نشاسته ذرت (۹۰٪) + ویتاس (۱۰٪) + پروبیوتیک و هالوفیل (هر کدام $0/5\times10^7$ CFU/mL)
تیمار ۵	ملاس چغندرقند (۹۰٪) + ویتاس (۱۰٪) + پروبیوتیک و هالوفیل (هر کدام $0/5\times10^7$ CFU/mL)
تیمار ۶	سبوس برنج (۹۰٪) + ویتاس (۱۰٪) + پروبیوتیک و هالوفیل (هر کدام $0/5\times10^7$ CFU/mL)

تولید فلوک در زوک‌های شیشه‌ای مخروطی با حجم آبگیری ۵ لیتر در سه تکرار انجام پذیرفت.

در پژوهش حاضر، شاخص‌های فیزیکوشیمیایی آب شامل pH، دما، اکسیژن محلول (Dissolved Oxygen) به صورت روزانه، شوری هفته‌ای دو مرتبه و نیتروژن آمونیاکی (NH_3-N)، نیتریتی (NO_2-N) و نیتراتی (NO_3-N)، کل ذرات معلق (TSS)، حجم فلوک (FV) و ذرات معلق فرار (VSS) به صورت هفتگی سنجش و ثبت شدند. در پایان آزمایش، ارزش غذایی فلوک شامل چربی کل، اسیدهای چرب، پروتئین، خاکستر و درصد رطوبت بررسی شد.

سنجش منابع کربنی

سنجش منابع کربنی توسط دستگاه CHN آنالایزر (Costech، آمریکا) در آزمایشگاه شیمی دانشگاه شهید بهشتی صورت پذیرفت که نتایج آن در جدول ۲ ارائه شده است.

راه‌اندازی سیستم بیوفلوک

ابتدا زوک‌های ۷ لیتری به مقدار ۵ لیتر با آب شور ۶۰ گرم در لیتر آب‌گیری شدند و هوادهی آن‌ها با شدت از ته زوک‌ها انجام شد. سپس منابع کربنی بر اساس روش Avnimelech (۱۹۹۹) با نسبت کربن به نیتروژن ۱۵ محاسبه و به سیستم اضافه شدند. در ادامه، باکتری‌ها نیز بر اساس تیمارها بعد از آماده‌سازی به سیستم معرفی شدند. لازم به ذکر است که معرفی باکتری‌ها به سیستم هر دو هفته تجدید و تبخیر آب در زوک‌ها با استفاده از آب کلرزدایی شده جبران شد.

جدول ۲: سنجش منابع کربنی (میانگین ± انحراف معیار، n=۳)

منابع کربنی	کربن (درصد)	ماده خشک (درصد)
نشاسته ذرت	۴۰/۱۷±۰/۰۳	۹۷/۷۵±۰/۶۰
سبوس برنج	۴۲/۰۴±۰/۰۷	۹۸/۳۱±۰/۸۶
ملاس چغندرقند	۳۹/۰۵±۰/۰۷	۷۹/۱۶±۱/۰۵
ویناس نیشکر	۳۴/۱۹±۰/۰۸	۶۲/۳۸±۰/۳۱

آماده‌سازی باکتری‌های پروبیوتیک و هالوفیل

به این منظور، ابتدا باکتری‌های هالوفیل *Bacillus* sp. (که توسط نویسندگان مطالعه حاضر از دریاچه ارومیه جداسازی شده و توسط دانشگاه گنت بلژیک توالی یابی و شناسایی شد (Agh et al., Unpublished data) و پروبیوتیک *Bacillus subtilis* و *Bacillus coagulans* (پارسی لاکت، ایران) روی محیط کشت مایع (Halophilic Culture Medium: CM60) (Yuangao et al., 2015) حاوی عصاره مخمر (۱۰ گرم در لیتر) و پپتون (۷/۵ گرم در لیتر) در شوری ۶۰ گرم در لیتر کشت داده شدند و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور شیکردار (N-biotech، کره جنوبی) (۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۱۵۰ دور در دقیقه) انکوبه شدند. بعد از ۴۸ ساعت، باکتری‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (Sigma، آلمان) شدند و بعد از شست و شو با آب دریای اتوکلاو شده، باکتری‌ها بر اساس مک‌فارلند به تراکم مورد نظر رسیدند. سپس به سیستم اضافه شدند.

سنجش شاخص‌های کیفی آب

دما، اکسیژن محلول و pH توسط مولتی‌متر (3630، IDS، آلمان) هر روز صبح ثبت شدند. شوری توسط شوری‌سنج (رفرکتومتر دستی، Atago، ژاپن) سنجش شد. نیتروژن نیتریتی (NO_2-N) و نیتراتی (NO_3-N) با استفاده از فتومتر پالین تست (7500، Palintest، انگلستان) و نیتروژن آمونیاکی (NH_3-N) توسط اسپکتروفتومتر (Hack DR 2000، Nessler، آمریکا) اندازه‌گیری شدند (APHA, 1989). برای اندازه‌گیری حجم فلوک (Floc Volume: FV)، ذرات معلق کل (Total Suspended Solids: TSS) و ذرات معلق فرار (Volatile Suspended Solids: VSS)، ۲۵۰ میلی‌لیتر نمونه از هر زوک به استوانه مدرج منتقل شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت تا ذرات رسوب کنند. به این ترتیب حجم فلوک یاداشت و محلول رویی دور ریخته شد و بعد از دو بار شست و شو با آب مقطر برای حذف نمک، فلوک در آون تحت دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت قرار گرفت. فلوک‌ها بعد از خشک شدن، به مدت ۳۰ دقیقه در دسیکاتور قرار داده شدند و در نهایت وزن خشک فلوک ثبت شد. بعد از اندازه‌گیری ذرات معلق کل، مواد باقی مانده به مدت ۴ ساعت در کوره در دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و به این ترتیب مقدار ذرات معلق فرار به دست آمد (APHA, 1989).

سنجش تقریبی بیوفلوک

در پایان آزمایش، هوادهی زوک‌ها متوقف شد و فلوک‌ها توسط سانتریفیوژ با ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه، برداشت شدند. در آخر برای حذف نمک، فلوک‌ها دو مرتبه با آب مقطر شست و شو داده شدند. برای تعیین رطوبت، نمونه‌ها در فویل آلومینیومی با وزن مشخص در آون تحت دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد تا زمانی که به وزن ثابت برسند، قرار داده شدند. مقدار خاکستر با قرار دادن مقدار مشخصی از نمونه خشک در کوره با دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۴ ساعت اندازه‌گیری شد. مقدار چربی توسط سوکسله و مقدار پروتئین با روش Lowry و همکاران (۱۹۵۱) به صورت درصد وزن خشک فلوک سنجش شدند. مقدار کربوهیدرات (CH) بر حسب درصد وزن خشک بر اساس رابطه ۱ محاسبه شد (Manush et al., 2005).

رابطه ۱:

$$CH\ (\%DW) = 100 - (P + L + A)$$

P: پروتئین خام (درصد وزن خشک)؛ L: چربی (درصد وزن خشک)؛ A: خاکستر (درصد وزن خشک).

آنالیز تقریبی پروفیل اسیدهای چرب بیوفلوک

ترکیب اسیدهای چرب بیوفلوک در پایان آزمایش توسط کروماتوگرافی گازی تعیین شد. به این منظور، متیل استرهای اسیدهای چرب (Fatty Acid Methyl Esters) با روش اصلاح شده Lepage و Roy (۱۹۸۴) آماده‌سازی شدند. این روش بر اساس مقدار وزن خشک نمونه بین ۱۰۰ تا ۱۵۰ میلی‌گرم بدون نیاز به استخراج اولیه چربی کل است. متیل استرهای اسیدهای چرب توسط هگزان استخراج شدند. بعد از تبخیر حلال، متیل استرها برای تزریق با حل کردن در ایزواکتان به مقدار ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آماده شدند. تعیین کمی توسط کروماتوگراف گازی (7890A، Agilent، آمریکا) مجهز به یک اتوسمپلر و یک تزریق کننده روی ستون قابل برنامه‌ریزی صورت پذیرفت. محاسبات در کامپیوتر توسط نرم‌افزار Agilent ChemStation (Agilent، آمریکا) انجام شد.

سنجش بار باکتریایی کل و *Vibrio*

برای سنجش بار باکتریایی در تیمارهای تحت آزمایش، ابتدا از هر تکرار مقدار ۲ میلی‌لیتر نمونه حاوی آب و فلوک به میکروتیوب منتقل شد. بعد از تهیه رقت‌های سریالی، مقدار

۱۰۰ میکرولیتر از آخرین رقت برداشته شد و روی محیط کشت CM60 (۷/۵ گرم در لیتر پپتون، ۱۰ گرم در لیتر عصاره مخمر، ۱۵ گرم در لیتر آگار باکتریولوژیکی) در شوری ۶۰ گرم در لیتر کشت داده شد (Yuangao et al., 2015). بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کلنی‌ها شمارش شدند. کشت باکتری‌های *Vibrio* روی محیط کشت اختصاصی TCBS Agar (Thiosulphate Citrate Bile Salts Sucrose) صورت پذیرفت که به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده شدند و بعد از ظهور کلنی‌ها و با تغییر رنگ محیط کشت از سبز به زرد شمارش شدند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

مطالعه حاضر در قالب طرح کاملا تصادفی صورت پذیرفت. تمامی داده‌ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس دو طرفه (Two-way ANOVA) و یک‌طرفه (One-way ANOVA) بررسی شدند. سپس، برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون توکی در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد. سنجش‌های مذکور در محیط نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ اجرا شدند.

نتایج

نتایج مطالعه حاضر نشان داد شاخص‌های فیزیکی آب طی دوره آزمایش تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مختلف نشان ندادند (جدول ۳).

جدول ۳: شاخص‌های فیزیکی آب طی ۴۲ روز آزمایش (میانگین ± انحراف معیار، n=۳)

شاخص‌ها	تیمارها					
	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴	تیمار ۵	تیمار ۶
دما (ºC)	۲۸/۹۳±۰/۳۷	۲۸/۹۲±۰/۳۹	۲۸/۹۰±۰/۳۹	۲۸/۸۳±۰/۳۹	۲۸/۹۰±۰/۳۸	۲۸/۹۵±۰/۴۳
pH	۸/۴۵±۰/۰۷	۸/۴۵±۰/۰۵	۸/۳۸±۰/۱۱	۸/۳۸±۰/۱۰	۸/۴۶±۰/۰۸	۸/۴۹±۰/۰۶
اکسیژن محلول (mg/L)	۶/۳۹±۰/۰۷	۶/۳۴±۰/۰۸	۶/۰۵±۰/۲۸	۶/۱۰±۰/۲۴	۶/۲۳±۰/۱۳	۶/۲۸±۰/۱۱
شوری (g/L)	۶۲/۸۹±۱/۰۸	۶۳/۴۴±۱/۰۰	۶۲/۹۱±۱/۰۶	۶۳/۲۴±۰/۸۴	۶۲/۲۲±۱/۱۰	۶۱/۸۱±۰/۸۵

اختلاف معنی‌داری بین تیمارها وجود نداشت (P>۰/۰۵).

شاخص‌های کیفی آب مانند نیتریت، نیترات و آمونیاک تفاوت معنی‌داری بین تیمارها نشان دادند (جدول ۴).

در پایان دوره آزمایش، مقدار آمونیاک در تیمارهای ۱ و ۴ پایین‌تر از ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر، در تیمارهای ۳ و ۶ در محدوده ۵-۴/۵ میلی‌گرم در لیتر و در تیمارهای ۲ و ۵ بین ۲۲/۵-۲۰/۷۹ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد (جدول ۴).

جدول ۴: شاخص‌های کیفی آب طی ۴۲ روز آزمایش (میانگین ± انحراف معیار، n=۳)

شاخص‌ها	روزها	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴	تیمار ۵	تیمار ۶
NO_2-N (mg/L)	۷	۱/۱۸±۰/۰۳ ab	۱/۲۷±۰/۰۳ a	۱/۱۷±۰/۰۷ ab	۱/۱۶±۰/۱۲ ab	۱/۲۷±۰/۰۷ a	۱/۰۱±۰/۰۶ b
	۱۴	۱/۰۱±۰/۰۶ a	۱/۰۱±۰/۰۶ a	۱/۰۱±۰/۰۶ a	۱/۰۱±۰/۰۶ a	۱/۰۱±۰/۰۶ a	۱/۰۱±۰/۰۶ a
	۲۱	۱/۱۰±۰/۰۲ b	۲/۸۶±۰/۲۶ a	۰/۱۶±۰/۲۶ c	۱/۰۸±۰/۲۰ b	۲/۴۴±۰/۴۲ a	۰/۲۴±۰/۰۶ c
	۲۸	۰/۹۳±۰/۲۰ cd	۲/۹۲±۰/۲۰ a	۰/۴۰±۰/۲۳ d	۱/۰۱±۰/۲۰ c	۲/۳۳±۰/۳۲ b	۰/۴۶±۰/۰۶ cd
	۳۵	۰/۷۳±۰/۵۵ b	۲/۷۷±۰/۲۵ a	۰/۲۴±۰/۱۳ b	۰/۷۶±۰/۵۵ b	۲/۵۴±۰/۲۸ a	۰/۲۰±۰/۰۳ b
	۴۲	۰/۸۱±۰/۵۲ b	۲/۰۷±۰/۶۷ a	۰/۴۲±۰/۱۰ b	۰/۷۵±۰/۴۳ b	۲/۳۳±۰/۳۹ a	۰/۳۴±۰/۰۴ b
NO_3-N (mg/L)	۱	۰/۱۷±۰/۰۰ a	۰/۱۷±۰/۰۰ a	۰/۱۷±۰/۰۰ a	۰/۱۷±۰/۰۰ a	۰/۱۷±۰/۰۰ a	۰/۱۷±۰/۰۰ a
	۷	۲/۲۵±۰/۱۶ ab	۲/۴۵±۰/۰۳ a	۱/۹۵±۰/۰۵ c	۲/۲۷±۰/۲۰ ab	۲/۲۷±۰/۲۰ a	۱/۹۵±۰/۰۹ c
	۱۴	۲/۵۶±۰/۴۱ ab	۳/۳۰±۰/۱۴ a	۱/۱۰±۰/۶۹ c	۲/۵۸±۰/۶۸ ab	۳/۰۶±۰/۲۹ a	۱/۴۸±۰/۴۳ bc
	۲۱	۲/۲۶±۰/۱۸ b	۲/۲۶±۰/۱۸ a	۱/۰۲±۰/۶۱ c	۲/۱۱±۰/۳۴ b	۳/۵۸±۰/۱۵ a	۰/۸۱±۰/۵۲ c
	۲۸	۲/۲۵±۱/۱۸ ab	۳/۹۶±۰/۱۸ a	۱/۱۹±۰/۸۲ b	۱/۱۹±۰/۸۲ ab	۳/۹۸±۰/۳۰ a	۱/۴۳±۰/۱۵ b
	۳۵	۱/۶۱±۱/۳۹ b	۴/۳۲±۰/۲۷ a	۰/۷۲±۰/۶۱ b	۱/۵۵±۱/۳۶ b	۴/۴۸±۰/۴۵ a	۰/۵۶±۰/۲۴ b
	۴۲	۲/۵۲±۲/۱۵ b	۶/۱۸±۰/۴۵ a	۱/۳۱±۰/۵۳ b	۲/۶۲±۲/۰۴ b	۶/۷۲±۰/۵۵ a	۱/۲۰±۰/۴۱ b
NH_3-N (mg/L)	۱	۲/۵۷±۰/۰۴ a	۲/۵۷±۰/۰۴ a	۲/۵۷±۰/۰۴ a	۲/۵۷±۰/۰۴ a	۲/۵۷±۰/۰۴ a	۲/۵۷±۰/۰۴ a
	۷	۲/۴۵±۰/۰۵ c	۵/۳۶±۰/۲۰ ab	۵/۰۹±۰/۰۵ ab	۲/۵۱±۰/۱۸ c	۵/۶۲±۰/۴۱ a	۵/۰۶±۰/۰۴ b
	۱۴	۱/۸۲±۰/۷۳ b	۳/۹۷±۰/۰۵ a	۴/۱۷±۰/۲۹ a	۲/۵۹±۰/۵۵ b	۳/۷۰±۰/۱۱ a	۴/۲۲±۰/۰۴ a
	۲۱	۴/۰۶±۰/۳۴ b	۱۶/۴۵±۳/۳۴ a	۴/۶۱±۰/۳۵ b	۳/۶۶±۱/۲۶ b	۱۴/۱۰±۰/۶۱ a	۴/۲۰±۰/۲۹ b
	۲۸	۱/۶۲±۰/۵۱ c	۱۰/۸۱±۰/۳۲ a	۷/۷۹±۰/۹۶ b	۳/۰۳±۰/۳۹ c	۱۰/۳۰±۰/۱۵ a	۷/۰۴±۰/۵۵ b
	۳۵	۱/۶۴±۰/۳۸ c	۱۴/۶۹±۰/۶۰ a	۵/۰۴±۰/۱۲ b	۲/۱۲±۰/۲۵ c	۱۳/۴۲±۰/۸۶ a	۴/۷۲±۰/۶۴ b
	۴۲	۱/۴۱±۰/۱۹ c	۲۲/۵۵±۰/۸۱ a	۴/۴۶±۱/۲۹ b	۱/۴۵±۰/۲۳ c	۲۰/۷۹±۱/۳۹ a	۵/۰۰±۰/۲۲ b

حروف غیرمشابه در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($P<۰/۰۵$).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد منابع مختلف کربنی بر حجم فلوک (FV)، کل ذرات معلق (TSS) و ذرات معلق فرار (VSS) اثر معنی‌داری داشت، به طوری که تیمارهای ۲ و ۵ و تیمارهای ۱ و ۴ به ترتیب بیشترین (۴۸-۴۱ میلی‌لیتر در لیتر) و کمترین حجم فلوک (۱۸-۱۷ میلی‌لیتر در لیتر) را تولید کردند. به علاوه، کمترین و بیشترین مقدار TSS و VSS به ترتیب مربوط به تیمارهای ۲ و ۵ (به ترتیب ۶۱۵-۵۴۰ و ۲۸۰-۳۱۳ میلی‌گرم در لیتر) و تیمارهای ۱ و ۴ (به ترتیب ۱۱۱۱-۱۰۷۳و ۹۰۶-۸۸۶ میلی‌گرم در لیتر) بود که اختلاف معنی‌داری با هم داشتند (جدول ۵).

جدول ۵: ارزیابی کل ذرات معلق (TSS)، ذرات معلق فرار (VSS) و حجم فلوک (FV) طی ۴۲ روز آزمایش (میانگین ± انحراف معیار، n=۳)

شاخص‌ها	روزها	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴	تیمار ۵	تیمار ۶
TSS (mg/L)	۷	۱۰۵/۱۷±۱۹/۸۶ a	۶۲/۱۷±۳۶/۷۳ a	۹۸/۳۳±۴۱/۵۵ a	۸۰/۶۷±۴۸/۰۲ a	۹۰/۳۳±۱۹/۹۶ a	۱۲۱/۰۰±۳/۰۴ a
	۱۴	۱۷۶/۶۷±۱۶/۰۷ ab	۱۲۵/۰۰±۲۱/۷۹ b	۲۴۶/۶۷±۵۸/۵۹ a	۱۷۸/۳۳±۷۸/۴۸ ab	۱۴۵/۰۰±۳۱/۲۲ ab	۲۶۳/۳۳±۱۴/۴۳ a
	۲۱	۷۱۸/۳۳±۳۷/۵۳ a	۲۹۰/۰۰±۲۵/۹۸ c	۶۳۰/۰۰±۵۶/۳۵ ab	۷۴۳/۳۳±۱۶۴/۸۰ a	۴۱۰/۰۰±۱۷۳/۲۱ bc	۵۵۸/۳۳±۵۹/۲۳ abc
	۲۸	۱۱۴۵/۰۰±۱۲۸/۴۲ a	۴۷۰/۰۰±۴۷/۷۰ e	۸۶۳/۳۳±۷۰/۰۶ bc	۱۰۱۱/۶۷±۱۲۳/۴۲ ab	۴۸۸/۳۳±۳۴/۰۳ de	۷۳۱/۶۷±۱۱۶/۷۶ cd
	۳۵	۱۱۲۶/۶۷±۱۰۹/۱۳ a	۴۹۶/۶۷±۵۲/۹۹ c	۹۰۳/۳۳±۶۸/۰۷ ab	۱۰۵۵/۰۰±۱۸۰/۲۸ ab	۵۲۳/۳۳±۵۲/۵۲ c	۸۵۳/۳۳±۶۸/۰۷ b
	۴۲	۱۱۱۱/۶۷±۱۸۷/۱۷ a	۵۴۰/۰۰±۲۱/۷۹ c	۹۰۳/۳۳±۵۲/۰۴ ab	۱۰۷۳/۳۳±۲۱۲/۸۶ a	۶۱۵/۰۰±۳۵/۰۰ bc	۸۶۶/۶۷±۶۰/۰۷ abc
VSS (mg/L)	۷	۹۱/۶۷±۵/۴۸ a	۴۱/۵۰±۷/۴۷ a	۷۱/۵۰±۳۰/۳۲ a	۷۳/۸۳±۳۲/۲۵ a	۴۸/۳۳±۱۲/۴۲ a	۸۹/۵۰±۳/۱۲ a
	۱۴	۱۲۸/۳۳±۲۰/۸۲ ab	۹۱/۶۷±۱۶/۰۷ ab	۱۷۰/۰۰±۱۵/۰۰ a	۱۳۵/۰۰±۶۷/۶۴ ab	۶۳/۳۳±۲۳/۶۳ b	۱۷۰/۰۰±۱۳/۲۳ a
	۲۱	۷۰۰/۰۰±۲۵/۰۰ a	۲۱۱/۶۷±۱۲/۵۸ c	۴۹/۶۷±۷۴/۸۹ b	۷۱۵/۰۰±۱۱۲/۶۹ a	۲۷۰/۰۰±۴۵/۰۰ c	۴۴۶/۶۷±۳۵/۱۲ b
	۲۸	۹۸۰/۰۰±۶۶/۱۴ a	۲۶۱/۶۷±۳۲/۵۳ c	۶۷۸/۳۳±۷۴/۸۹ b	۸۸۵/۰۰±۸۵/۴۴ a	۲۵۰/۰۰±۴۹/۲۴ c	۵۶۶/۶۷±۶۶/۵۸ b
	۳۵	۹۲۵/۰۰±۱۰۷/۵۹ a	۲۴۸/۳۳±۴۳/۱۱ d	۶۷۰/۰۰±۴۴/۴۴ bc	۸۷۱/۶۷±۱۶۴/۳۴ ab	۲۸۳/۳۳±۲۵/۱۷ d	۶۲۰/۰۰±۶۰/۰۰ c
	۴۲	۹۰۱/۶۷±۱۷۷/۸۶ a	۲۸۰/۰۰±۲۱/۷۹ b	۶۷۶/۶۷±۴۱/۹۳ a	۸۸۶/۶۷±۲۳۰/۸۹ a	۳۱۳/۳۳±۲۴/۶۶ b	۶۵۵/۰۰±۶۱/۴۴ a
FV (mL/L)	۷	۸/۶۷±۰/۷۶ ab	۸/۰۰±۰/۵۰ ab	۶/۵۰±۲/۱۸ b	۷/۳۳±۱/۵۳ ab	۱۰/۳۳±۰/۷۶ a	۷/۰۰±۰/۸۷ ab
	۱۴	۱۲/۳۳±۱/۲۶ bc	۱۶/۱۷±۱/۱۵ ab	۱۳/۰۰±۱/۸۰ abc	۱۰/۸۳±۱/۰۴ c	۱۷/۳۳±۲/۷۵ a	۱۳/۰۰±۱/۰۴ abc
	۲۱	۱۶/۸۳±۲/۸۴ bc	۲۶/۰۰±۳/۰۴ ab	۲۷/۶۷±۲/۳۱ a	۱۴/۱۷±۰/۲۹ b	۲۶/۶۷±۷/۲۳ ab	۲۶/۳۳±۲/۳۱ ab
	۲۸	۱۸/۵۰±۳/۶۱ bc	۲۱/۰۰±۳/۴۶ bc	۳۳/۸۳±۲/۰۸ a	۱۴/۱۷±۰/۷۶ c	۲۱/۸۳±۲/۷۵ b	۲۹/۰۰±۱/۷۳ a
	۳۵	۱۷/۶۷±۲/۵۲ b	۲۱/۱۷±۳/۳۳ b	۳۲/۸۳±۴/۶۵ ab	۱۵/۵۰±۱/۸۰ b	۲۳/۵۰±۴/۹۲ bc	۳۳/۱۷±۲/۲۵ a
	۴۲	۱۷/۳۳±۱/۰۴ c	۴۱/۵۰±۶/۰۰ ab	۳۴/۱۷±۴/۵۴ b	۱۸/۰۰±۱/۷۳ c	۴۸/۱۷±۵/۹۲ a	۳۴/۶۷ ±۰/۲۹ b

حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($P<۰/۰۵$).

در پایان دوره آزمایش، بیشترین بار باکتریایی کل مربوط به تیمارهای ۲ و ۵ بود که تفاوت معنی‌داری با تیمارهای دیگر داشت. باکتری‌های ویبریوتیک تنها در تیمارهای ۳ و ۶ مشاهده شدند که دارای اختلاف معنی‌داری با هم بودند (جدول ۶).

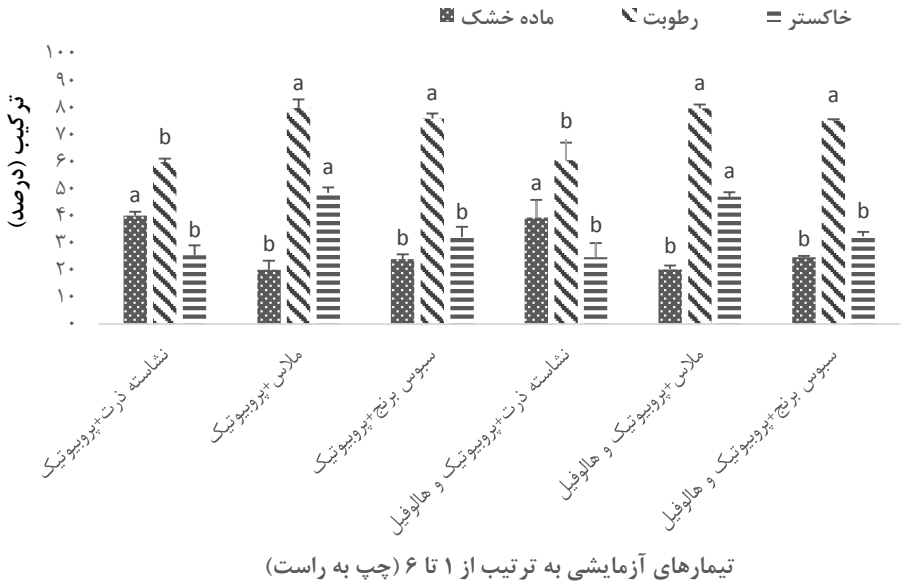
تیمارهای ۱ و ۴ بالاترین درصد ماده خشک (۴۰-۳۹ درصد) و کمترین درصد رطوبت (۶۰ درصد) و ماده معدنی (۲۵-۲۴ درصد) را داشتند، در حالی که، تیمارهای ۲ و ۵ به طور معنی‌داری بالاترین درصد رطوبت (۸۰ درصد) و ماده معدنی (۴۸-۴۷ درصد) را نشان دادند (شکل ۱).

جدول ۶: سنجش بار باکتریایی کل و *Vibrio* طی ۴۲ روز آزمایش (میانگین ± انحراف معیار، n=۳)

شاخص‌ها	روزها	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴	تیمار ۵	تیمار ۶
بار باکتریایی کل ($\times 10^5$ CFU/mL)	۲۱	۴۱/۲۰±۸/۲۳ ^{b}	۳/۲۸±۰/۴۳ ^{c}	۸۴/۷۰±۱۶/۳۰ ^{a}	۴۸/۰۰±۱۶/۲۳ ^{b}	۳/۴۷±۱/۵۷ ^{c}	۳/۲۱±۰/۳۷ ^{b}
	۳۵	۰/۵۲±۰/۲۸ ^{b}	۱/۳۶±۰/۱۵ ^{b}	۵/۵۱±۰/۴۴ ^{a}	۰/۶۸±۰/۴۳ ^{b}	۱/۲۸±۰/۴۸ ^{b}	۷/۳۵±۱/۹۸ ^{a}
	۴۲	۱۲/۹۵±۷/۲۹ ^{b}	۱۸۰/۰۰±۱۰/۰۰ ^{a}	۳۱/۵۳±۱۳/۱۱ ^{b}	۳/۰۳±۰/۰۰ ^{b}	۱۶۷/۵۰±۱۷/۵۰ ^{a}	۱۷/۴۰±۱۰/۱۷ ^{b}
Vibrio ($\times 10^4$ CFU/mL)	۲۱	-	-	۰/۷۱±۰/۶۵ ^{a}	-	-	۰/۳۷±۰/۰۱ ^{a}
	۳۵	-	-	۳/۰۲±۰/۰۸ ^{a}	-	-	۱/۲۲±۰/۳۸ ^{b}
	۴۲	-	-	۰/۲۳±۰/۰۵ ^{b}	-	-	۰/۳۳±۰/۰۵ ^{a}

- : تعداد کلنی‌ها کمتر از ۲۰ بود، از این رو گزارش نشدند.

حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($P<0/05$).

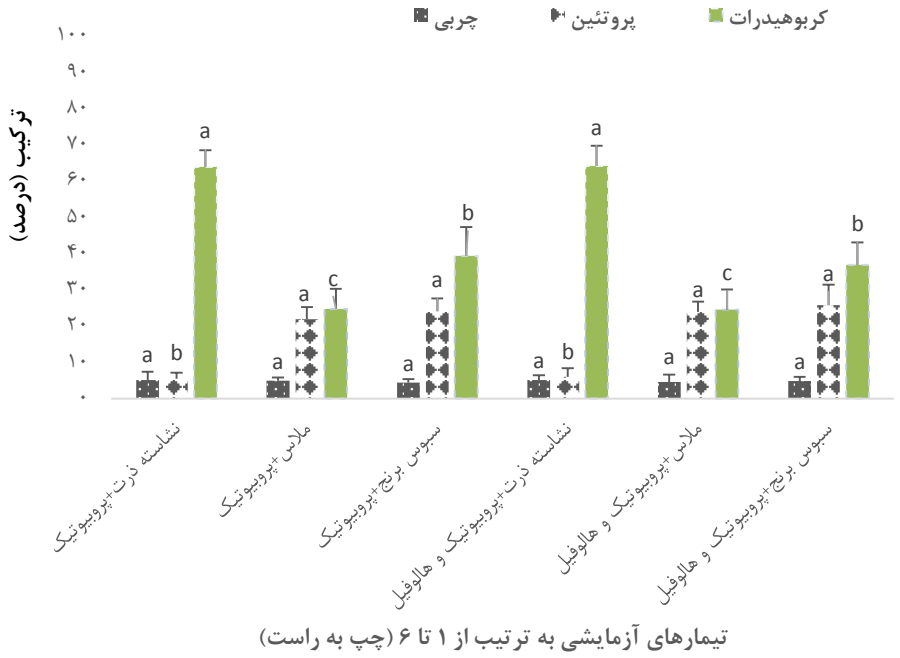


شکل ۱: سنجش بیوشیمیایی فلوک‌های تولید شده در روز ۴۲ آزمایش (میانگین ± انحراف معیار). حرف متفاوت در هر شاخص نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵).

درصد چربی فلوک (حدود ۵ درصد) در تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری نشان نداد. بیشترین درصد پروتئین (۲۶-۲۱ درصد) مربوط به تیمارهای ۲، ۳، ۵ و ۶ و بالاترین مقدار کربوهیدرات (۶۴ درصد) نیز مربوط به تیمارهای ۱ و ۴ بود (شکل ۲). نتایج مطالعه حاضر نشان داد منابع مختلف کربنی مورد استفاده در این مطالعه بر شاخص‌های ارزیابی شده تاثیر معنی‌داری گذاشتند ولی باکتری‌های هالوفیل تاثیر معنی‌داری بر آن‌ها نداشتند.

به لحاظ پروفیل اسیدهای چرب، تیمارهای ۲ و ۵ دارای کمترین (۲۶-۲۳ درصد) و تیمارهای ۱، ۳، ۴ و ۶ دارای بالاترین (۴۵-۳۶ درصد) مقدار اسیدهای چرب اشباع (Saturated Fatty Acids: SFA) بودند. اسیدهای چرب غیراشباع یگانه (Mono Unsaturated Fatty Acids: MUFA) در تیمارهای ۳ و ۶ (۲۵-۲۲ درصد) نسبت به تیمارهای دیگر به طورمعنی‌داری در بالاترین مقدار قرار داشت. اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه امگا-۶ (Poly Unsaturated Fatty

Acids n-6: PUFA n-6) اختلاف معنی‌داری بین تیمارها نشان نداد، ولی مقدار اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه امگا-۳ (PUFA n-3) به طور معنی‌داری در تیمارهای ۲ و ۵ بیشتر از تیمارهای دیگر بود. تیمارهای ۳ و ۶ به طور معنی‌داری بالاترین مقدار آراشیدونیک اسید (Arachidonic Acids: ARA) ولی کمترین مقدار دوکوزا هگزانوئیک اسید (Docosahexaenoic Acid: DHA) را نسبت به تیمارهای دیگر به خود اختصاص دادند (جدول ۷).



شکل ۲: سنجش بیوشیمیایی فلوک‌های تولید شده در روز ۴۲ آزمایش (میانگین ± انحراف معیار). حرف متفاوت در هر شاخص نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵).

جدول ۷: اسیدهای چرب بیوفلوک (میانگین ± انحراف معیار، n=۳)

اسیدهای چرب (٪)	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴	تیمار ۵	تیمار ۶
C14:0	۶/۲۵±۱/۰۶ ab	۵/۲۵±۰/۵۷ ab	۷/۲۸±۲/۰۷ ab	۷/۲۵±۲/۹۵ ab	۴/۱۹±۰/۶۴ b	۹/۰۴±۰/۳۲ a
C14:1n5	۴/۳۰±۰/۶۳ a	۳/۴۸±۰/۱۹ a	۳/۲۲±۰/۳۴ a	۳/۹۴±۰/۵۲ a	۳/۳۳±۰/۵۲ a	۳/۴۶±۰/۸۸ a
C16:0	۳۲/۳۸±۶/۵۵ a	۱۴/۸۴±۱/۸۲ b	۱۳/۰۱±۱/۷۸ b	۳۲/۱۲±۳/۳۹ a	۱۳/۷۶±۱/۲۸ b	۱۵/۰۸±۳/۱۸ b
C16:1n-7	۰/۰۵±۰/۰۸ c	۰/۸۴±۰/۸۵ abc	۱/۶۳±۰/۱۰ a	۰/۲۱±۰/۱۸ c	۰/۸۸±۰/۴۲ abc	۱/۳۸±۰/۵۵ ab
C18:0	۵/۴۹±۰/۳۲ a	۴/۴۴±۰/۴۳ ab	۲/۸۱±۰/۶۹ c	۵/۲۱±۰/۵۹ ab	۴/۲۴±۰/۰۸ b	۲/۵۰±۰/۱۹ c
C18:1n-9	۰/۶۳±۰/۴۳ c	۲/۳۲±۱/۴۳ c	۸/۱۷±۲/۰۹ a	۲/۶۸±۳/۱۸ bc	۲/۰۷±۰/۳۴ c	۷/۵۴±۲/۰۰ ab
C18:1n-7	۰/۴۶±۰/۴۶ b	۴/۸۴±۳/۴۹ ab	۸/۴۳±۰/۲۳ a	۱/۹۴±۱/۳۴ b	۴/۳۰±۴/۰۲ ab	۵/۱۰±۱/۳۵ ab
C18:2n-6 cis (LA)	۱/۳۴±۰/۵۸ a	۱/۲۹±۰/۳۷ a	۳/۱۱±۰/۷۲a	۳/۹۵±۴/۵۳ a	۰/۵۵±۰/۲۵ a	۳/۸۰±۱/۴۶ a
C18:3n-3 (ALA)	۲/۱۵±۲/۷۷ a	۰/۲۲±۰/۲۱ a	۱/۵۲±۱/۳۳ a	۰/۲۵±۰/۰۴ a	۰/۱۰±۰/۰۶ a	۱/۳۲±۰/۱۴ a
C18:4n-3	۶/۰۷±۲/۴۵ b	۱۵/۰۸±۰/۹۴ a	۳/۱۱±۰/۹۶ b	۶/۳۰±۲/۴۲ b	۱۴/۰۸±۳/۱۷ a	۴/۶۳±۱/۲۷ b
C20:0	۰/۶۵±۰/۰۲ bc	۰/۴۳±۰/۰۷ c	۱/۵۸±۰/۹۲ ab	۰/۶۷±۰/۱۷ bc	۰/۳۳±۰/۰۱ c	۱/۸۷±۰/۲۳ a
C20:1n-9	۰/۶۰±۰/۴۳ a	۰/۵۷±۰/۳۴ a	۲/۶۶±۰/۶۷ a	۰/۱۷±۰/۰۵ a	۰/۶۲±۰/۷۴ a	۳/۸۲±۳/۷۴ a
C20:2n-6	۰/۶۸±۰/۱۲ b	۱/۵۰±۰/۴۸ a	۰/۶۱±۰/۱۵ b	۰/۵۸±۰/۲۵ b	۲/۰۳±۰/۸۶ a	۰/۵۷±۰/۱۱ b
C20:4n-6 (ARA)	۰/۰۲±۰/۰۳ b	۰/۱۳±۰/۱۳ b	۰/۶۱±۰/۱۴ a	۰/۰۶±۰/۱۰ b	۰/۱۰±۰/۰۸ b	۰/۵۷±۰/۱۳ a
C20:3n-3	۲/۱۲±۳/۳۷ a	۰/۲۸±۰/۱۹ a	۰/۴۸±۰/۱۳ a	۰/۱۱±۰/۰۴ a	۰/۱۷±۰/۱۲ a	۱/۵۸±۱/۹۴ a
C20:5n-3 (EPA)	۰/۲۵±۰/۰۷ b	۰/۷۱±۰/۱۰ ab	۰/۵۶±۰/۳۴ ab	۰/۲۳±۰/۰۸ b	۱/۰۶±۰/۴۸ a	۰/۶۹±۰/۳۵ ab
C22:0	۰/۱۵±۰/۱۲ b	۰/۹۹±۰/۳۹ b	۴/۸۲±۱/۸۹ a	۰/۱۹±۰/۰۶ b	۰/۵۶±۰/۴۵ b	۶/۴۵±۰/۸۰ a
C22:1n-9	۰/۶۰±۰/۲۰ ab	۰/۱۷±۰/۰۶ c	۰/۵۴±۰/۲۳ abc	۰/۶۲±۰/۰۸ a	۰/۲۱±۰/۰۶ bc	۰/۷۱±۰/۱۶ a
C22:6n-3 (DHA)	۱۴/۹۲±۳/۳۴ a	۱۶/۴۲±۲/۰۵ a	۴/۹۴±۰/۸۰ b	۱۲/۲۲±۵/۸۳ ab	۱۶/۷۲±۰/۵۵ a	۴/۶۳±۰/۵۸ b
C24:0	۰/۳۲±۰/۳۲ b	۰/۳۳±۰/۱۹ b	۷/۳۷±۲/۶۵ a	۰/۰۲±۰/۰۴ b	۰/۳۸±۰/۱۳ b	۴/۸۳±۰/۸۸ a
C24:1n-9	۰/۳۸±۰/۲۳ a	۰/۲۱±۰/۱۹ a	۰/۵۷±۰/۷۴ a	۰/۱۱±۰/۰۹ a	۰/۲۶±۰/۲۵ a	۰/۲۵±۰/۴۳ a
Sum SFA	۴۵/۲۴±۷/۶۳ a	۲۶/۲۸±۲/۳۰ bc	۳۶/۸۷±۲/۸۱ ab	۴۵/۴۶±۵/۹۹ a	۲۳/۴۷±۱/۳۶ c	۳۹/۷۶±۲/۶۰ a
Sum MUFA	۶/۶۱±۱/۲۲ c	۱۲/۴۲±۶/۰۶ bc	۲۵/۲۲±۱/۴۰ a	۹/۶۷±۴/۴۸ c	۱۱/۶۶±۴/۴۲ c	۲۲/۲۵±۱/۳۳ ab
PUFA n-3	۲۲/۳۷±۳/۰۶ b	۳۲/۴۹±۲/۵۲ a	۹/۰۹±۰/۴۳ c	۱۲/۸۲±۵/۹۱ c	۳۲/۰۲±۳/۰۶ a	۱۰/۹۲±۰/۹۲ c
PUFA n-6	۲/۰۳±۰/۷۲ a	۲/۹۲±۰/۳۵ a	۴/۳۴±۰/۷۵ a	۴/۵۹±۴/۸۷ a	۲/۶۸±۰/۷۱ a	۴/۹۴±۱/۵۸ a
Sum PUFA	۱۹/۳۳±۰/۸۰ a	۲۰/۳۳±۱/۹۵ a	۱۰/۳۲±۰/۶۹ c	۱۷/۱۵±۲/۴۸ ab	۲۰/۶۲±۰/۷۷ a	۱۱/۸۴±۳/۴۴ bc

SFA: اسیدهای چرب اشباع (Saturated Fatty Acids)؛ MUFA: اسیدهای چرب غیراشباع یگانه (Mono Unsaturated Fatty Acids)؛ PUFA: اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه (Poly Unsaturated Fatty Acid)؛ EPA: ایکوزا پنتانوئیک اسید (Eicosapentaenoic Acid)؛ DHA: دوکوزا هگزانوئیک اسید (Docosahexaenoic Acid).

حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵).

بحث

مطالعه حاضر نشان داد که منابع مختلف کربنی به طور معنی‌داری بر کیفیت بیوفلوک اثر گذاشت ولی استفاده از باکتری هالوفیل در سیستم بیوفلوک تاثیری بر کیفیت بیوفلوک نداشت. شاخص‌های فیزیکی آب شامل pH (۸/۶-۸)، دما (۳۰-۲۸ درجه سانتی‌گراد) و اکسیژن محلول (بالای ۴ میلی‌گرم در لیتر) طی دوره آزمایش ثابت بود و در محدوده مناسب تولید فلوک قرار داشت (Emerenciano et al., 2017). تاثیر کربوهیدرات‌های ساده نسبت به کربوهیدرات‌های پیچیده به عنوان منبع کربنی در سیستم‌های بیوفلوک مطالعه شده است که نشان دهنده حذف سریع‌تر آمونیاک توسط قندهای ساده و حذف آهسته‌تر آمونیاک توسط کربوهیدرات‌های پیچیده‌تر است، چرا که کربوهیدرات‌های پیچیده‌تر به زمان بیشتری برای تجزیه به قندهای ساده نیاز دارند (Avnimelech, 2012). Wei و همکارانش (۲۰۱۶) تاثیر منابع مختلف کربنی مانند گلوکز، گلیسرول و نشاسته را در سیستم بیوفلوک مورد بررسی قرار دادند و مقادیر بالای آمونیاک در بیوفلوک نشاسته را به پیچیده‌تر بودن این منبع کربنی نسبت دادند که درست عکس یافته‌های مطالعه حاضر بود. در این مطالعه، بیوفلوک نشاسته ذرت و سبوس برنج نسبت به بیوفلوک ملاس چغندر قند عملکرد بهتری در حذف آمونیاک در سیستم بیوفلوک نشان دادند. علت این تفاوت ممکن است به دلیل اختلاف شوری در دو مطالعه (شوری ۵ گرم در لیتر در مقابل ۶۰ گرم در لیتر) باشد که عملکرد باکتری‌ها را تحت تاثیر قرار داده است. مطالعات کیفی آب در سیستم‌های بیوفلوک نشان می‌دهد که کاهش مقدار آمونیاک آب به علت تولید سلول‌های جدید توسط باکتری‌های هتروتروف و نیتریفایرهای شیمیواتوتروف است (Hargreaves, 2006). به علاوه، حضور نیترات و عدم تجمع نیتریت در سیستم بیوفلوک حاکی از فعالیت باکتری‌های اکسید کننده نیتریت و در نتیجه وقوع فرآیند نیتریفیکاسیون در تیمارهای این مطالعه است که با مطالعات قبلی در سیستم‌های بیوفلوک مطابقت دارد (Lopez-Elias et al., 2015; Arias-Moscoso et al., 2018). همچنین، در مطالعه حاضر، مقدار نیتریت در بیوفلوک نشاسته ذرت و سبوس برنج کمتر از ۱ میلی‌گرم در لیتر و مقدار نیترات در کلیه تیمارها کمتر از ۷ میلی‌گرم در لیتر بود که کمتر از محدوده بحرانی تحمل آبزیان دریایی نسبت به نیتریت و نیترات (به ترتیب ۲ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر) است (Spotte, 1979).

Deng و همکاران (۲۰۱۸) تاثیر منابع مختلف کربنی بر کیفیت آب، جمعیت میکروبی و ساختار سیستم بیوفلوک را بررسی کردند و غلظت آمونیاک، نیترات و نیتریت در بیوفلوک نشاسته را به ترتیب ۲/۴ و ۲۰ و ۰/۴۹ میلی‌گرم در لیتر گزارش کردند که در تطابق با یافته‌های مطالعه حاضر بود. به علاوه، Ray و Lotz در سال ۲۰۱۴ منابع مختلف کربنی مانند ملاس، ساکارز و گلیسرول را در سیستم‌های بیوفلوک ارزیابی کردند و مقدار آمونیاک، نیتریت و نیترات کمتر از ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر را در بیوفلوک ملاس گزارش کردند که مخالف نتایج مطالعه حاضر بود. علت این اختلاف ممکن است به دلیل تفاوت نسبت کربن به نیتروژن بین دو مطالعه باشد که در مطالعه حاضر ۱۵ ولی در مطالعه Ray و Lotz (۲۰۱۴) ۲۲ بود. نتایج مطالعه حاضر همسو با نتایج Arias-Moscoso و همکارانش (۲۰۱۸) بود که اثرات استفاده از چند پروبیوتیک تجاری در سیستم بیوفلوک را بررسی کردند و مقدار آمونیاک، نیتریت و نیترات را به ترتیب ۱/۶۱-۱/۴۹، ۵/۶۳-۴/۴۵ و ۱۸/۷۷-۱۷/۷۷ میلی‌گرم در لیتر گزارش کردند. به علاوه، نتایج مطالعه حاضر با یافته‌های Gomes Vilani و همکاران (۲۰۱۶) همسو بود که نشان دادند بیوفلوک سبوس برنج در کاهش میزان آمونیاک عملکرد بهتری داشت. در مطالعات بسیاری از ملاس به عنوان منبع کربنی در سیستم بیوفلوک استفاده شده است و نتایج آن‌ها حاکی از عملکرد خوب آن در کاهش نیتروژن آب بود (Effendy et al., 2016; Nurhatijah et al., 2016; Santhana Kumar et al., 2018) که در تضاد با نتایج مطالعه حاضر بود. علت این امر ممکن است شوری بالای آب در مطالعه حاضر باشد که ممکن است منجر به عملکرد ضعیف باکتری در استفاده از این منبع کربنی و در نتیجه عملکرد منفی آن در کاهش نیتروژن آب شده باشد (Xu et al., 2012).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد منابع مختلف کربنی اثر معنی‌داری بر حجم فلوک (FV)، کل ذرات معلق (TSS) و ذرات معلق فرار (VSS) داشت ولی استفاده از باکتری هالوفیل در سیستم بیوفلوک اثر معنی‌داری بر شاخص‌های مذکور نداشت. در این مطالعه، بیوفلوک ملاس چغندر قند و نشاسته ذرت به ترتیب بیشترین و کمترین حجم فلوک را تولید کردند که در محدوده مناسب برای پرورش ماهی (۴۰-۱ میلی‌لیتر در لیتر) و میگو (۱۵-۲ میلی‌لیتر در لیتر) (Avnimelech et al., 1989) بود. به علاوه، کمترین و بیشترین مقدار TSS و VSS

به ترتیب مربوط به بیوفلوک ملاس چغندر قند و نشاسته ذرت بود که اختلاف معنی‌داری با هم داشتند. حجم بالای فلوک و مقدار کم TSS و VSS در بیوفلوک ملاس چغندر قند به دلیل تخلخل بالای آن است که سنجش درصد رطوبت بیوفلوک در این تیمار (حدود ۸۰ درصد) درستی این امر را اثبات می‌کند. به علاوه، مشاهدات چشمی این مطالعه سرعت بالای ته‌نشین شدن بیوفلوک‌های تولید شده توسط نشاسته ذرت را نشان داد که به علت وزن نسبتا بالای این فلوک‌ها و درنتیجه TSS بالای این تیمارها بود. نتایج مطالعه حاضر با یافته‌های Ekasari و همکاران (۲۰۱۴) که مقدار TSS را در روز ۲۱ بین ۲۰۰ تا ۵۸۰ میلی‌گرم در لیتر بیان کردند، همخوانی داشت. به علاوه، با توجه به این که هدف آن‌ها سعی در حفظ مواد معلق تا ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر برای پرورش تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) بود، با افزایش مواد معلق اقدام به رقیق‌سازی آن می‌کردند (Ekasari et al., 2014)، حال آن که هدف مطالعه حاضر بررسی منابع مختلف کربنی و استفاده از باکتری هالوفیل برای تولید بیوفلوک در یک دوره ۴۲ روزه بود. Ray و Lotz در سال ۲۰۱۴، سیستم بیوفلوک بر پایه شیمیواتوتروف و هتروتروف با استفاده از منابع مختلف کربنی مانند ملاس، گلیسرول و ساکارز را طی یک دوره ۷۵ روزه بررسی کردند و مقدار TSS و VSS را به ترتیب بین ۱۳۲۵-۱۲۵ و ۹۵۰-۸۵ میلی‌گرم در لیتر گزارش کردند که در راستای نتایج مطالعه حاضر بود. در مطالعه‌ای دیگر، تغذیه تیلاپیای موزامبیک (*Oreochromis mossambicus*) با فلوک‌های میکروبی توسط Avnimelech (۲۰۰۷) بررسی شد که مقدار TSS فلوک را ۶۴۳ میلی‌گرم در لیتر گزارش کرد که همسو با تیمارهای ۲ و ۵ مطالعه حاضر بود، ولی حجم فلوک را بین ۲۴/۳-۱۰/۷۹ میلی‌لیتر در لیتر گزارش کرد که در محدوده تیمارهای ۱ و ۴ مطالعه حاضر بود. علت این اختلاف را می‌توان به تفاوت شرایط آزمایش مانند مدت زمان آزمایش، نوع منبع کربنی مورد استفاده و نسبت کربن به نیتروژن نسبت داد.

میکروارگانسیم‌های موجود در سیستم‌های بیوفلوک نقش مهمی در تامین عناصر مغذی مانند چربی، پروتئین، کربوهیدرات و مواد معدنی ایفا می‌کنند که همانند جیره‌های فرموله شده برای رشد آبزیان پرورشی قابل استفاده هستند (Emerenciano et al., 2013). استفاده از منابع مختلف کربنی در سیستم بیوفلوک، کیفیت فلوک را تحت تاثیر قرار می‌دهد، چرا که باکتری‌های هتروتروف از این

منابع کربنی برای تامین انرژی مورد نیاز خود و در نتیجه تولید پروتئین میکروبی استفاده می‌کنند (Deng et al., 2018). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که نوع منبع کربنی بر ارزش غذایی فلوک اثر گذاشت ولی استفاده از باکتری‌های هالوفیل در سیستم بیوفلوک اثر معنی‌داری بر ترکیب بیوشیمیایی فلوک نداشت (P>۰/۰۵).

در این مطالعه، بیوفلوک ملاس چغندر قند و سبوس برنج حاوی بیشترین پروتئین و بیوفلوک نشاسته ذرت حاوی بیشترین کربوهیدرات بودند و تفاوت معنی‌داری به لحاظ مقدار چربی کل بین تیمارها مشاهده نشد. این نتایج در تطابق با یافته‌های Ekasari و همکاران (۲۰۱۰) بود که ارزش غذایی بیوفلوک را با استفاده از منابع مختلف کربنی در شوری ۳۰ گرم در لیتر بررسی کردند و میزان پروتئین را بین ۴۲-۱۸ درصد گزارش کردند و مقدار چربی بین ۱۲-۵ درصد بود که تنها با نتایج به دست آمده از بیوفلوک نشاسته ذرت در مطالعه حاضر همخوانی داشت. همچنین، نتایج مطالعه حاضر در تضاد با مطالعاتی است که در آن‌ها محدوده چربی خام بیوفلوک تولید شده در آب دریا بین ۲/۶-۱/۲ درصد گزارش شده است (Tacon et al., 2002; Ju et al., 2008). Ekasari و همکاران (۲۰۱۴) ارزش غذایی بیوفلوک را بررسی کردند و مقدار پروتئین را ۲۷/۸-۱۷/۲ درصد بیان کردند که با یافته‌های مطالعه حاضر همخوانی داشت. تاثیر باکتری و جلبک بر ارزش غذایی بیوفلوک توسط Pacheco-Vega و همکاران (۲۰۱۸) مطالعه و در پایان دوره آزمایش مقادیر پروتئین ۳۰-۲۵ درصد، کربوهیدرات ۱۵ درصد و ماده معدنی حدود ۵۰-۴۵ درصد گزارش شد که با نتایج مطالعه حاضر همسو بود. به علاوه، نتایج این مطالعه با یافته‌های Santhana Kumar و همکاران (۲۰۱۸) که مقدار پروتئین، چربی و ماده معدنی فلوک را به ترتیب ۲۳/۱۹، ۴ و ۳۰/۳۸ درصد بیان کردند، در تطابق بود. مطالعه حاضر به لحاظ مقدار ماده معدنی نیز با مطالعات Ekasari و همکاران (۲۰۱۰) (۱۲-۷ درصد) و Ju و همکاران (۲۰۰۸) و Tacon و همکاران (۲۰۰۲) (۳۲-۷ درصد) همخوانی داشت. Tacon و همکارانش در سال ۲۰۰۲ بیان کردند که مقادیر بالای ماده معدنی در بیوفلوک احتمالا به دلیل وجود اکسیدهای نامحلول اسیدی و مخلوطی از دیاتومه‌ها است. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که بیوفلوک‌ها منبع خوبی از مواد معدنی ضروری و عناصر کمیاب نیز هستند. با این حال مقدار زیاد ماده معدنی در بیوفلوک

منجر به کاهش قابلیت هضم عناصر مغذی دیگر می‌شود که کاهش رشد آبزی را در پی خواهد داشت (Wei et al., 2016). مقادیر بالای کربوهیدرات در بیوفلوک نشاسته ذرت را نسبت به تیمارهای دیگر می‌توان به قابلیت انحلال پایین نشاسته نسبت داد که در فلوک‌ها وجود داشتند.

مطالعه حاضر نشان داد نوع منبع کربنی اثر معنی‌داری بر پروفیل اسیدهای چرب بیوفلوک داشت، اما باکتری هالوفیل تاثیر معنی‌داری بر پروفیل اسیدهای چرب بیوفلوک‌های تولید شده نداشت. در این مطالعه، مقدار کل اسیدهای چرب اشباع (SFA) بیوفلوک بین ۴۵-۲۳ درصد و مقدار MUFA کل بین ۲۵-۶ درصد بود و با نتایج مطالعه Azim و همکاران (۲۰۰۸) که کل اسیدهای چرب اشباع بیوفلوک آرد گندم را ۳۵-۳۰ درصد گزارش کردند، مطابقت داشت. در مطالعه‌ای دیگر، Ekasari و همکاران (۲۰۱۰) مقدار اسیدهای چرب اشباع و MUFA بیوفلوک گلوکز را به ترتیب ۱۱/۵۳ و ۱۶/۹۹ درصد و گلیسرول را ۱۷/۸ و ۱۲/۵درصد بیان کردند که به لحاظ مقدار MUFA کل در محدوده مطالعه حاضر بود. مقدار PUFA n-3 و PUFA n-6 بیوفلوک در مطالعه حاضر به ترتیب بین ۳۲- ۹ درصد و ۵- ۲ درصد بود که مقدار PUFA n-3 در محدوده یافته‌های Ekasari و همکاران (۲۰۱۰) بود ولی میزان PUFA n-6 (۲۲- ۱۲ درصد) بیشتر از آن بود. ترکیب PUFA در بیوفلوک‌ها نشان داد که C18:4n-3 و C22:6n-3 (DHA) بیشترین مقدار PUFA در این آزمایش بودند که مغایر با یافته‌های Ekasari و همکارانش (۲۰۱۰) که اسیدچرب C18:2n-6 را عمده‌ترین اسیدچرب غیراشباع در بیوفلوک معرفی کردند، بود. به علاوه، این پژوهشگران دریافتند که بیوفلوک تولید شده در آب شور با گلوکز و گلیسرول به عنوان منبع کربنی دارای مقادیر بالایی DHA است (Ekasari et al., 2010) که کمتر از مقادیر مطالعه حاضر بود. مطالعات نشان دادند که برخی گونه‌های باکتری‌های آب شیرین و دریایی قادر به ساختن اسیدهای چرب PUFA هستند (Satomi et al., 2003). بیوفلوک تولید شده در ملاس چغندر قند و نشاسته ذرت دارای مقادیر بالاتری اسیدهای چرب PUFA نسبت به بیوفلوک سبوس برنج بود که علت آن کاملا شناخته شده نیست. Kaneda (۱۹۷۷) بیان کرد که مقدار اسیدهای چرب باکتری‌ها تحت تاثیر مرحله رشد و تامین سوبسترا (اسیدهای چرب کوتاه زنجیره) و آنزیم های غیراشباع‌سازی (Desaturating Enzymes)

است. سلول‌ها در مرحله تصاعدی نسبت به مرحله رشد اسیدهای چرب بیشتری ذخیره می‌کنند. همچنین مقدار اسیدهای چرب غیراشباع در باکتری‌ها به دما بستگی دارد که در دمای پایین، باکتری‌ها مقادیر بیشتری اسیدهای چرب غیراشباع تولید می‌کنند (Kaneda, 1977; Russell and Nichols, 1999). مطالعات نشان داده‌اند که مقادیر PUFA در میکروارگانیسم‌های مختلف متفاوت است (Russell and Nichols, 1999; Burja and Radianingtyas, 2007). این امر بیان می‌کند که تفاوت مقدار PUFA در بیوفلوک ممکن است تحت تاثیر ترکیب جمعیتی میکروارگانیسم‌های بیوفلوک باشد که احتمالا تحت تاثیر شوری و منبع کربنی مورد استفاده است.

تنوع جوامع میکروبی در سیستم بیوفلوک و نیز استفاده از منابع مختلف کربنی (Van Den Hende et al., 2016) در کنار عوامل دیگری مانند شرایط پرورش مثل دما، شوری، شدت نور، فتوپریود، دسترسی به مواد مغذی، کیفیت آب و غیره (Martinez-Cordova et al., 2014) از عوامل موثر بر ترکیب بیوشیمیایی بیوفلوک (پروتئین، چربی، مواد معدنی، اسیدهای چرب و غیره) هستند که تفاوت نتایج مطالعه حاضر با یافته‌های پژوهشگران دیگر را توجیه می‌کند.

نتایج این مطالعه نشان داد بیوفلوک ملاس چغندر قند به طور معنی‌داری دارای بیشترین بار باکتریایی کل در پایان دوره آزمایش بود ولی اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای دیگر مشاهده نشد. جمعیت میکروبی بالای بیوفلوک ملاس چغندر قند ممکن است به دلیل استفاده از مقادیر بالاتر این منبع کربنی در سیستم بیوفلوک باشد (Avnimelech, 1999). زیرا همان طور که در نتایج مطالعه حاضر اشاره شد بیوفلوک ملاس چغندر قند عملکرد ضعیفی در کاهش نیتروژن آب داشت و با توجه به افزایش مقدار نیتروژن آب، مقدار استفاده از این منبع کربنی افزایش یافت. بنابراین، در نتیجه این افزایش، بار میکروبی سیستم نسبت به تیمارهای دیگر افزایش بیشتری یافت. با این حال، نتایج مطالعه حاضر از این رو با مطالعات Santhana Kumar و همکاران (۲۰۱۸) همخوانی داشت که بار باکتریایی کل را در محدوده ۳/۴×۱۰^{۲}-۱/۵۴×۱۰^{۴}CFU/mL گزارش کردند. به علاوه، نتایج مطالعه حاضر در تطابق با نتایج Michaud و همکاران (۲۰۰۶) بود که بار باکتریایی کل در سیستم بیوفلوک را در محدوده ۲/۳×۱۰^{۵}-۷/۷×۱۰^{۵}CFU/mL گزارش کردند،

ولی در تضاد با نتایج Arias-Moscoso و همکاران (۲۰۱۸) بود که بار باکتریایی کل در سیستم بیوفلوک را ۳۸/۲×۱۰^۶ تا ۶۵/۳×۱۰^۶CFU/mL گزارش کردند. در مطالعه حاضر، باکتری‌های *Vibrio* تنها در تیمارهای سبوس برنج مشاهده شدند و در پایان دوره آزمایش در محدوده ۰/۲۳×۱۰^۴ تا ۰/۳۳×۱۰^۴CFU/mL بودند که در تطابق با مطالعه Santhana Kumar و همکاران (۲۰۱۸) بود. به علاوه، نتایج مطالعه حاضر با مطالعات Pacheco-Vega و همکاران (۲۰۱۸) نیز همخوانی داشت که در روز ۴۴ تراکم باکتری‌های ویبریو را بین صفر تا ۱۷/۳×۱۰^۳CFU/mL گزارش کردند. زمانی که تعادل جوامع میکروبی به هم می‌خورد باکتری‌های شبیه *Vibrio* به میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای فرصت‌طلب تبدیل می‌شوند. ولی سیستم بیوفلوک به دلیل عملکرد رقابتی باکتری‌های هتروتروف با جمعیت *Vibrio* بر سر فضا و مواد مغذی و نیز ایجاد اختلال در ارتباط سلول به سلول باکتری‌های *Vibrio* (Crab et al., 2010; Emerenciano et al., 2017) مانع افزایش تراکم *Vibrio*ها و در نتیجه بیماری‌زایی می‌شود که در نتایج مطالعه حاضر نیز قابل مشاهده است.

به دلیل ارزش غذایی بالای بیوفلوک‌های به دست آمده از سبوس برنج و عملکرد متوسط آن در کنترل کیفی آب و نیز قیمت پایین آن به عنوان محصول جانبی در کشاورزی، سبوس برنج به عنوان بهترین منبع کربنی در این مطالعه در نظر گرفته شد. به علاوه، استفاده از باکتری هالوفیل به صورت ترکیب با پروبیوتیک تاثیر معنی‌داری بر شاخص‌های کیفی آب، تولید فلوک و ارزش غذایی آن نداشت، که ممکن است به دلیل استفاده از غلظت نامناسب و یا بهینه نبودن شرایط رشد این باکتری باشد. با این حال استفاده از باکتری پروبیوتیک تجاری (*Bacillus subtilis* و *B.coagoulans*، Parsilact، ایران) در سیستم بیوفلوک در ترکیب با سبوس برنج به عنوان منبع کربنی می‌تواند غذای خوبی را برای آبزیان پرورشی تامین کند. نتایج به دست آمده از این مطالعه می‌تواند در پرورش آرتمیا و میگو مورد استفاده قرار گیرد. همچنین، پیشنهاد می‌شود با توجه به اهمیت باکتری‌های هالوفیل، استفاده از آن‌ها به صورت تنها در سیستم بیوفلوک و در شوری‌های مختلف و در غلظت‌های مختلف مورد مطالعه قرار گیرد.

منابع

APHA. 1989. Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, Washington. 164P.

Arias-Moscoso J.L., Espinoza-Barron L.G., Miranda-Baeza A., Rivas-Vega M.E. and Nieves-Soto M. 2018. Effect of commercial probiotics addition in a biofloc shrimp farm during the nursery phase in zero water exchange. Aquaculture Reports, 11: 47–52.

Avnimelech Y. 1999. Carbonrnitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. Aquaculture, 176: 227–235.

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

Avnimelech Y. 2012. Biofloc Technology: A Practical Guide Book. World Aquaculture Scociety, USA. 272P.

Avnimelech Y. 2017. Adapting biofloc technology for use in small adapting biofloc technology for use in small-scale ponds with vertical substrate. World Aquaculture, 2017: 54–58.

Avnimelech Y., Mokady S. and Schroeder G.L. 1989. Circulated ponds as efficient bioreactors for single cell protein production. Israeli Journal of Aquaculture, 41(2): 58–66.

Azim M.E., Little D.C. and Bron J.E. 2008. Microbial protein production in activated suspension tanks manipulating C:N ratio in feed and the implications for fish culture. Bioresource Technology, 99: 3590–3599.

Brown M.R., Barrett S.M., Volkman J.K., Nearhos S.P., Nell J.A. and Allan G.L. 1996. Biochemical composition of new yeasts and bacteria evaluated as food for bivalve aquaculture. Aquaculture, 143(3–4): 341–360.

Burja A.M. and Radianingtyas H. 2007. Nutraceuticals and functional foods from marine microbes: An introduction to a diverse group of natural products isolated from marine macroalgae, microalgae, bacteria, fungi, and cyanobacteria. P: 367–404. In: Barrow C. and Shahidi F. (Eds.). Marine Nutraceuticals and Functional Foods. CRC Press, Taylor and Francis Group, UK.

Crab R., Lambert A., Defoirdt T., Bossier P. and Verstraete W. 2010. The application of bioflocs technology to protect brine shrimp (*Artemia franciscana*) from pathogenic *Vibrio harveyi*. Journal of Applied Microbiology, 109(5): 1643–1649.

De Paiva Maia E., Alves Modesto G., Otavio Brito L., Olivera Galvez A. and Vasconcelos Gesteira T.C. 2016. Intensive culture system of *Litopenaeus vannamei* in commercial ponds with zero water exchange and addition of molasses and probiotics. Revista de Biologia Marina y Oceanografia, 51(1): 61–67.

Decamp O., Moriarty D.J.W. and Lavens P. 2008. Probiotics for shrimp larviculture: Review of field data from Asia and Latin America. Aquaculture Research, 39(4): 334–338.

Defoirdt T., Sorgeloos P. and Bossier P. 2011. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. Current Opinion in Microbiology, 14(3): 251–258.

Deng M., Chen J., Gou J., Hou J., Li D. and He X. 2018. The effect of different carbon sources on water quality, microbial community and structure of biofloc systems. Aquaculture, 482: 103–110.

Dube M.A., Tremblay A.Y. and Liu J. 2007. Biodiesel production using a membrane reactor. Bioresource Technology, 98: 639–647.

Effendy I., Al Deen S. and Chithambaran S. 2016. Semi intensive and semi biofloc methods for the culture of Indian white prawn, *Fenneropenaeus indicus* in high-density polyethylene liner ponds. Hayati Journal of Biosciences, 23: 106–110.

Ekasari J., Angela D., Waluyo S.H., Bachtiar T., Surawidjaja E.H., Bossier P. and De Schryver P. 2014. The size of biofloc determines the nutritional composition and the nitrogen recovery by aquaculture animals. Aquaculture, 426-427: 105–111.

Ekasari J., Crab R. and Verstraete W. 2010. Primary nutritional content of bio-flocs cultured with different organic carbon sources and salinity. Hayati Journal of Biosciences, 17(3): 125–130.

Emerenciano M., Gaxiola G. and Cuzo G. 2013. Biofloc Technology (BFT): A Review for Aquaculture Application and Animal Food Industry. P: 301–327. In: Matovic M.D. (Ed.). Biomass Now-Cultivation and Utilization. IntechOpen, UK.

Emerenciano M.G.C., Martinez-Cordova L.R., Martinez-Porchas M. and Miranda-Baeza A. 2017. Biofloc Technology (BFT): A Tool for Water Quality Management in Aquaculture. P: 91–109. In: Tutu H. (Ed.). IntechOpen, UK.

Esiobu N., Armenta L. and Ike J. 2002. Antibiotic resistance in soil and water environments. International Journal of Environmental Health Research, 12: 133–144.

Gomes Vilani F., Schveitzer R., Da Fonseca Arantes R., Do Nascimento Vieira F., Manoel Do Espirito Santo C. and Quadros Seiffert W. 2016. Strategies for water preparation in a biofloc system: Effects of carbon source and fertilization dose on water quality and shrimp performance. Aquacultural Engineering, 74: 70–75.

Hapsari F. 2016. The effect of fermented and non fermented biofloc inoculated with bacterium *Bacillus cereus* for catfish (*Clarias gariepinus*) juveniles. AACL Bioflux, 9(2): 334–339.

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

Hu X., Cao Y., Wen G., Zhang X., Xu Y., Xu W., Li Z. 2016. Effect of combined use of *Bacillus* and molasses on microbial communities in shrimp cultural enclosure systems. Aquaculture Research, 48(6): 2691–2705.

Jiao W., Liying S. and Yuangao D. 2014. Effects of Bioflocs on Artemia Growth and Water Quality. Acta Geologica Sinica, 88: 111–113.

Ju Z.Y., Forster I., Conquest L., Dominy W., Kuo W.C. and Horgen F.D. 2008. Determination of microbial community structures of shrimp floc cultures by biomarkers and analysis of floc amino acid profiles. Aquaculture Research, 39: 118–133.

Kaneda T. 1977. Fatty acids of the genus *Bacillus*: An example of branched-chain preference. American Society for Microbiology, 41(2): 391–418.

Krummenauer D., Poersch L., Romano L.A., Gabriele R.L., Encarnacao P. and Wilson Wasielesky J.R. 2014. The Effect of probiotics in a *Litopenaeus vannamei* biofloc culture system infected with *Vibrio parahaemolyticus*. Journal of Applied Aquaculture, 26(4): 370–379.

Lepage G. and Roy C.C. 1984. Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. Journal of Lipid Research, 25(12): 1391–1396.

Lopes-dos-Santos R.M.A., Groot R., Liying S., Bossier P. and Van Stappen G. 2019. Halophilic bacteria as a food source for the brine shrimp *Artemia*. Aquaculture, 17: 633–659.

Lopez-Elias J.A., Moreno-Arias A., Miranda-Baeza A., Martinez-Cordova L.R., Rivas-Vega M.E. and Marquez-Rios E. 2015. Proximate composition of bioflocs in culture systems containing hybrid red tilapia fed diets with

varying levels of vegetable meal inclusion. North American Journal of Aquaculture, 77(1): 102–109.

Lowry O., Rosebrough J., Lewis A. and Randal R. 1951. Medicion de proteinas con el reactivo de fenol Folin. The Journal of Biological Chemistry, 193(1): 265–275.

Manush S.M., Pal A.K., Das T. and Mukherjee S.C. 2005. Dietary high protein and vitamin C mitigate stress due to chelate claw ablation in *Macrobrachium rosenbergii* males. Comparative Biochemistry and Physiology A, 142(1): 10–18.

Martinez-Cordova L.R., Emerenciano M., Miranda-Baeza A. and Martinez-Porchas M. 2014. Microbial-based systems for aquaculture of fish and shrimp: An updated review. Reviews in Aquaculture, 6: 1–18.

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

Michaud L., Blancheton J.P., Bruni V. and Piedrahita R. 2006. Effect of particulate organic carbon on heterotrophic bacterial populations and nitrification efficiency in biological filters. Aquacultural Engineering, 34(3): 224–233.

Nichols D.S. 2003. Prokaryotes and the input of polyunsaturated fatty acids to the marine food web. FEMS Microbiology Letters, 219(1): 1–7.

Nurhatijah N., Muchlisin Z.A., Sarong M.A. and Supriatna A. 2016. Application of biofloc to maintain the water quality in culture system of the tiger prawn (*Penaeus monodon*). AACL Bioflux, 9(4): 923–928.

Oehmen A., Yuan Z. and Blackall L.L. 2004. Short-term effect of carbon source on the competition of polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms short-term effects of carbon source on the competition of polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating orga. Water Science and Technology, 50: 139–144.

Oliveira S. and Pijoan C. 2004. *Haemophilus parasuis*: New trends on diagnosis, epidemiology and control. Veterinary Microbiology, 99(1): 1–12.

Pacheco-Vega J.M., Cadena-Roa M.A., Leyva-Flores J.A., Zavala-Leal O.I., Perez-Bravo E. and Ruiz-Velazco J.M.J. 2018. Effect of isolated bacteria and microalgae on the biofloc characteristics in the

Pacific white shrimp culture. Aquaculture Reports, 11: 24–30.

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

Russell N.J. and Nichols D.S. 1999. Polyunsaturated fatty acids in marine bacteria- A dogma rewritten. Microbiology, 145: 767–779.

Salehizadeh H. and Van Loosdrecht M.C.M. 2004. Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture : Recent trends and biotechnological importance. Biotechnology Advances, 22: 261–279.

Santhana Kumar V., Pandey P.K., Anand T., Bhuvaneswari G.R., Dhinakaran A. and Kumar S. 2018. Biofloc improves water, effluent quality and growth parameters of *Penaeus vannamei* in an intensive culture system. Journal of Environmental Management, 215: 206–215.

Satomi M., Oikawa H. and Yano Y. 2003. Note *Shewanella marinintestina* sp. nov., *Shewanella schlegeliana* sp. nov. and *Shewanella sairae* sp. marine bacteria isolated from sea-animal intestines. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53: 491–499.

Sekar A. and Packyam M. 2014. Screening, identification and antagonistic activity of halo stable *Bacillus* sp. Mk22 used as probiotic in *Penaeus monodon* Fabricius, 1798. African Journal of Food Science, 8(1): 48–53.

Spotte S. 1979. Seawater Aquariums: the Captive Environment. Wiley, USA. 413P.

Tacon A.G.J., Cody J.J., Conquest L.D., Divakaran S., Forster I.P. and Decamp O.E. 2002. Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. Aquaculture Nutrition, 8: 121–137.

Van Den Hende S., Claessens L., De Muylder E., Boon N. and Vervaeren H. 2016. Microalgal bacterial flocs originating from aquaculture wastewater treatment as diet ingredient for *Litopenaeus vannamei* (Boone). Aquaculture Research, 47(4): 1075–1089.

Wei Y., Liao S.A. and Wang A. 2016. The effect of different carbon sources on the nutritional composition, microbial community and structure of bioflocs. Aquaculture, 465: 88–93.

Wylie J.L. and Currie D.J. 1991. The relative importance of bacteria and algae as food sources for

crustacean zooplankton. Limnology and Oceanography, 36(4): 708–728.

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, 350-353: 147–153.

Yuangao D., Gaochao X. and Liying S. 2015. Isolation and characterization of halophilic bacteria and archaea from salt ponds in Hangu Saltworks, Tianjin, China. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 33(4): 862–868.

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 8, No. 2, Summer 2020

Research Paper

The role of commercial probiotic (*Bacillus subtilis* and *Bacillus coagulans*) and halophilic (*Bacillus* sp.) bacteria isolated from Urmia Lake on water quality improvement, biofloc production and composition using different carbon sources

Elaheh Hasan Nataj Niazi[1]*, Naser Agh[2], Farzaneh Noori[3], Behrooz Atashbar[3], Gilbert Van Stappen[4]

Received: July 2019 Accepted: November 2019

Abstract

In this study, the role of probiotic and halophilic bacteria were studied in biofloc system using different carbon sources including corn starch (treatments 1 and 4), beetroot molasses (treatments 2 and 5), rice-bran (treatments 3 and 6), with sugar cane vinasses (used in all treatments) at presence of commercial probiotics (*Bacillus subtilis* and *Bacillus coagulans*) (treatments 1, 2 and 3) and combination of probiotics and halophylic bacteria (treatments 4, 5 and 6) at salinity of 60±5g/L during 42 days. Minimum concentrations of nitrite and nitrate were recorded in treatment 6 and lowest ammonia in treatment 1. The highest floc volume were produced in treatments 2 and 5 (41-48mL/L). In terms of nutritional value, significantly higher protein (20-25%) and ash (75-80%) were detected in treatments 2, 3, 5 and 6. But significantly higher carbohydrate (64%) was detected in treatments 1 and 4. Fatty acid analysis of the bioflocs showed that treatments 2 and 5 had highest PUFA n-3 (32%) and treatments 3 and 6 had significantly higher MUFA (22-25%). Results of this research showed that different carbon sources had significant effect on biofloc quality, but the use of probiotics separately or in combination with halophilic bacteria had no significant effect on biofloc quality.

Key words: Bacillus, *Biofloc, Water Quality, Nutritional Value, Probiotic*.

1- Ph.D. Student in Aquaculture, Artemia and Aquaculture Research Institute, Urmia University, Urmia, Iran.
2- Associate Professor in Artemia and Aquaculture Research Institute, Urmia University, Urmia, Iran.
3- Assistant Professor in Artemia and Aquaculture Research Institute, Urmia University, Urmia, Iran.
4- Professor in Artemia Reference Center, Ghent University, Ghent, Belgium.

*Corresponding Author: e.hasannataj@urmia.ac.ir