

اثر بخشی باکتری *Micrococcus luteus* بر ضریب هضم پذیری، پارامترهای رشد، بازماندگی و بار باکتریایی آب و دستگاه گوارش بچه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

چکیده

این تحقیق به منظور بررسی تأثیر باکتری *Micrococcus luteus* بر کارایی رشد، هضم‌پذیری و بار باکتریایی دستگاه گوارش بچه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در مرکز آموزش علوم و صنایع شیلاتی میرزا کوچک خان و مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان استخوانی شهید انصاری گیلان در خلال ماه‌های اردیبهشت تا مرداد ۱۴۰۲ انجام شد. در این آزمایش *M. luteus* جدا شده از دستگاه گوارش ماهی کپور معمولی به غذای تجاری پلت ۳۰۰ قطعه بچه ماهی کپور معمولی ($28/0 \pm 2/87$) به مدت ۸ هفته به صورت یک طرح کاملاً تصادفی در ۵ تیمار و ۳ تکرار (۲۰ قطعه ماهی در هر تانک) استفاده شد. با مخلوط کردن غذای ماهی در سوسپانسیون *M. luteus* ۳، نوع جیره با غلظت‌های مختلف *M. luteus* در غذا شامل: 10^4 ، 10^5 ، 10^6 و 10^7 سلول در گرم غذا، به عنوان تیمارهای ۱، ۲، ۳، ۴ و شاهد بدون باکتری تهیه شد. بعد از ۵۶ روز غذادهی با سطوح مختلف باکتری *M. luteus* در جیره بچه ماهیان کپور معمولی مقادیر باعث افزایش مقدار درصد افزایش وزن، شاخص رشد ویژه، هضم پذیری پروتئین و افزایش میزان هضم پذیری چربی نسبت به شاهد گردید ($P < 0/05$). برای ضریب تبدیل غذایی اختلاف معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد در تیمارهای ۱، ۲ و ۳ مشاهده شد ($P < 0/05$) و تیمار T4 با تیمار شاهد فاقد اختلاف معنی‌دار بود ($P > 0/05$). بر اساس نتایج به دست آمده بهترین عملکرد شاخص‌های رشد در تیمارهای تغذیه شده با سطح 10^6 باکتری *M. luteus* در جیره غذایی مشاهده گردید. افزایش باکتری *M. luteus* در جیره غذایی بیش از 10^6 عملکرد فاکتورهای رشد نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار آماری نشان نداد ($P < 0/05$). بین تعداد باکتری‌های گرم مثبت و باکتری‌های گرم منفی موجود در دستگاه گوارش و آب تانک‌های پرورش نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار بود ($P < 0/05$). تجزیه و تحلیل نتایج حاصل، فواید استفاده از پروبیوتیک *M. luteus* در جیره غذایی بچه ماهیان کپور معمولی را در برخی موارد نشان داد. *M. luteus* معمولاً برای ماهی بیماری‌زا نیست. از این رو استفاده از این پروبیوتیک در پرورش ماهی کپور معمولی جهت افزایش تولید قابل پیشنهاد است.

واژگان کلیدی: کپور معمولی، *M. Luteus*، شاخص‌های رشد، هضم پذیری، بار باکتریایی.

مقدمه

پروبیوتیک‌ها، میکروارگانیسم‌های زنده مطلوب یا متابولیت آنها است که معمولاً به عنوان مکمل‌های غذایی در مزارع پرورش آبزیان استفاده می‌شوند. پروبیوتیک به عنوان میکروارگانیسم‌های زنده شامل بسیاری از مخمرها و باکتری‌ها تعریف می‌شوند که در صورت تجویز به مقدار کافی می‌توانند رشد و سلامت میزبان را افزایش دهند (Anderson et al., 1979; Balcázar et al., 2006). در مزارع پرورش آبزیان (نرمتنان، سخت‌پوستان، ماهی) برای بهتر کردن کیفیت محیط‌زیست آبی و برای معرفی میکروفلورهای مفید به لوله گوارش از پروبیوتیک‌ها استفاده می‌شود. استفاده از پروبیوتیک‌ها در آبی‌پروری به عنوان فعالیتی دوستدار محیط‌زیست در حال افزایش است (Gatesoupe, 1999). از نظر تغذیه‌ای، مهم‌ترین مکانیسم پروبیوتیک‌ها در لوله گوارش ماهی بهبود جذب غذا با تولید آنزیم‌های خارج سلولی و ویتامین‌ها است. تأثیر مهم دیگر پروبیوتیک‌ها کاهش میزان بروز و دوره بیماری‌ها، تقویت سیستم ایمنی و فعالیت‌های ضد ویروسی است (Austin et al., 1995). از طرف دیگر بیماری‌های ماهی، به‌ویژه عفونت‌های باکتریایی، مشکل عمده‌ای است که

مهران آوخ کیسمی^{۱*}

علیرضا اکبری^۱

حمید عبدالله پور بی ری^۲

مریم آوخ کیسمی^۳

۱. بخش تحقیقات شیلات و آبزیان، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گیلان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران.

۲. گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تالش.

۳. بخش تحقیقات گروه آموزشی علوم تجربی، اداره کل آموزش و پرورش استان گیلان، پردیس آموزشی بنت‌الهدی صدر، رشت، ایران.

* نویسنده مسئول مکاتبات

dr.keysami@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۲/۱۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۳/۳۱

این مقاله برگرفته از طرح تحقیقاتی می‌باشد.

صنعت پرورش ماهی با آن مواجه است که در حال حاضر با افزایش سالانه حدود ۱۲ درصد به سرعت در حال رشد است (Abd El- Rhman et al., 2009; Garibaldi, 2012). گروه باکتری‌های متحرک *Aeromonas*، به ویژه *Aeromonas hydrophila* انواع گسترده‌ای از گونه‌های ماهی‌های آب شیرین و گاهی اوقات ماهی‌های دریایی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Austin et al., 1995). ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) یک گونه مهم برای آبی‌پروری آب شیرین است و بهبود مدیریت پرورش با افزایش مقاومت این گونه در برابر بیماری‌ها چالش بزرگی است که پرورش‌دهندگان ماهی با آن مواجه هستند. پیشگیری و درمان بیماری با آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند باعث ظهور میکروارگانیسم‌های مقاوم به دارو شود و بقایای آنتی‌بیوتیک‌ها را در ماهی و محیط به جا بگذارد (Yahav et al., 2019). علاوه بر این، شیمی‌درمانی ممکن است میکرو فلور طبیعی در دستگاه گوارش را که برای ماهی مفید است، از بین ببرد (Al-Dohail et al., 2009; Ali, 2000; 2010). بنابراین، راهکار جایگزین برای استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها، استفاده از پروبیوتیک است (Anderson et al., 2006; Balcázar et al., 1979). افزودن پروبیوتیک باعث کاهش هزینه‌های پرورش کپور معمولی شد (Yahav et al., 2019). سویه‌های میکروبی از قبیل *Streptococcus faecium* و مخمر *Saccharomyces cerevisiae* و *Pseudomonas*، *Corynebacterium divergens*، *Lactobacillus* sp. و *Streptococcus thermophilus* و *fluorescens* به عنوان پرو بیوتیک در آبی‌پروری استفاده می‌شوند. آنها بیماری‌زا نیستند، غیر سمی‌اند و می‌توانند در روده و احشا بقا داشته باشند و در شرایط انبار کردن به مدت طولانی زنده بمانند. امروزه استفاده از پروبیوتیک‌ها به دلیل بهبود تعادل میکروبی روده، هضم و جذب بهتر مواد غذایی در دستگاه گوارش و بهره‌وری بیشتر از مواد غذایی استفاده شده و کاهش هزینه و افزایش درآمد در دام‌پروری‌ها، مرغداری‌ها و مراکز آبی‌پروری رو به افزایش است (Vine et al., 2006). از پروبیوتیک‌ها به عنوان محرک رشد و جهت تحریک سیستم ایمنی استفاده می‌شود (Ali, 2000). در میگوی *Penaeus monodon* استفاده از پروبیوتیک، توازن میکروب‌های روده‌ای را بهبود بخشید و با بهتر کردن جذب غذایی و فعالیت آنزیم‌های گوارشی، منجر به بهبود رشد گردید (Surajit Das et al., 2006). بطور مشابه آن آرتمیای غنی شده با *Lactobacillus* منجر به رشد و بازماندگی بهتر در میگوی آب شیرین *Macrobrachium rosenbergii* شد (Babitha et al., 2006). مهم این است که نمونه انتخابی برای پروبیوتیک سودمند و بی‌خطر برای میزبان باشد. پروبیوتیک‌ها یا میکروارگانیسم‌های زنده به عنوان راه‌حلی مطمئن و طبیعی برای کنترل اکوسیستم‌های میکروبیولوژیکی محسوب می‌شوند (Watson et al., 2008). استفاده از باکتری‌ها برای پیشگیری از بیماری‌ها بهترین جایگزین استفاده از آنتی‌بیوتیک‌هایی نظیر اریترومایسین و فلورامفیکل است (Aubin et al., 2005). هدف همیشگی تولید آبزیان به حداکثر رساندن کارایی و بازده تولید برای حداکثر سوددهی است. جیره غذایی حاوی پروبیوتیک‌ها نه تنها مواد مغذی ضروری را تأمین می‌کند، بلکه می‌تواند یکی از بهترین راهکارها برای حفظ سلامت آبزیان پرورشی و افزایش مقاومت آن‌ها به استرس و عوامل بیماری‌زا باشد. همچنین عملکرد پروبیوتیک‌ها در بهبود محیط آبی از طریق کاهش باکتری‌های بیماری‌زا است (Vine et al., 2006). تحقیقات زیادی در خصوص کاربرد باکتری‌های پروبیوتیک در آبی‌پروری صورت گرفته و برخی از عملکردهای اثبات شده در خصوص این باکتری‌ها شامل دفع رقابتی برای سایر باکتری‌ها و همین‌طور بازدارنده‌های پروبیوتیکی برای جلوگیری از کلنی شدن باکتری‌های بیماری‌زا در لوله گوارشی میزبان از طریق ترشح ترکیبات بازدارنده، رشد دیگر باکتری‌ها و یا رقابت برای غذا و مکان و تحریک سیستم ایمنی میزبان در جهت تحمل بهتر محرک‌های محیطی و رشد را می‌توان ذکر کرد (VidyaLaxme et al., 2014). افزودن پروبیوتیک‌ها به جیره غذایی ماهی باعث ایجاد تعادل میکروبی روده، ساختن ترکیبات مفید از جمله ویتامین‌ها و برخی از آنزیم‌ها، تحریک و افزایش کارایی سیستم ایمنی، افزایش فعالیت‌های گوارشی و آنزیمی و به دنبال آن افزایش رشد و توسعه سطوح غذایی می‌شود (Verschuere et al., 2000; Kim and Austin, 2006). برجسته‌ترین اعضای باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتريا هستند که معمولاً با محصولات لبنی تخمیر شده مرتبط هستند. سایر موارد عبارت‌اند از *Escherichia coli*، *M. luteus*

Bacillus Coagulans, *Enterococcus durans*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, (Gatesoupe, 1999; Hoseinifar et al., 2015; Aubin et al., 2005).

M. luteus جداشده از دستگاه گوارش *Oreochromis niloticus* ظاهراً سالم، برای *O. Niloticus* بی‌خطر بود و اثر آنتاگونیستی علیه باکتری بیماری‌زا *Aeromonas hydrophila* که عامل سپتی سمی *Aeromonas* در ماهیان آب شیرین داشت (Brunt and Austin, 2005). به‌طور کلی، باکتری *M. luteus* به دلیل ویژگی‌هایی که دارد به‌طور متعدد برای تخمیرهای مختلف مواد غذایی مورد استفاده قرار گرفته است و حتی در پیشگیری از رشد باکتری‌های مضر، کمک می‌کند (Ali, 2010; Aly et al., 2005; Kesarcodei-Watson et al., 2008; Khattab et al., 2005). بسیاری از باکتری‌ها (باسیل‌ها، باکتری‌های اسیدلاکتیک و سودومونادها) به‌عنوان پروبیوتیک برای حیوانات آبزی ارزیابی شده‌اند (Brunt et al., 2007; Balcázar et al., 2006; Carnevali et al., 2000; Dimitroglou et al., 2009; Drabkin, 1945; Ferguson et al., 2010; Fuller, 1989; Hoseinifar et al., 2013). بنابراین از آنجا که جستجو برای میکروارگانیسم‌های جدیدی که به‌عنوان پروبیوتیک مورد استفاده قرار گیرند از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. بنابراین، مطالعه حاضر به‌منظور بررسی تأثیر باکتری *M. luteus* بر کارایی رشد، هضم‌پذیری و بار باکتریایی دستگاه گوارش و درصد بقاء بچه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در مرکز آموزش علوم و صنایع شیلاتی میرزا کوچک خان و مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان استخوانی شهید انصاری گیلان در خلال ماه‌های اردیبهشت تا مرداد ۱۴۰۲ انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق *M. luteus* جداشده از دستگاه گوارش ماهی کپور معمولی به غذای تجاری پلت ۳۰۰ قطعه بچه ماهی کپور معمولی ($2/87 \pm 2/018$) به مدت ۸ هفته به‌صورت یک طرح کاملاً تصادفی در ۵ تیمار و ۳ تکرار (۲۰ قطعه ماهی در هر تانک) استفاده شد. غذای تجاری مورد استفاده در این آزمایش از شرکت آتا تهیه گردید. باکتری پروبیوتیک مورد استفاده در این آزمایش از آزمایشگاه مرکز میرزا کوچک خان که قبلاً به روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی شناسایی گردیده بود، تهیه شد. این فرآورده میکروبی، *M. luttius* بود و کشت‌های باکتریایی در محیط کشت (TSA) در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت پرورش داده شد و پس از آن تعداد پرگنه‌های تشکیل‌شده در هر ظرف پتری شمارش و تعداد به ازای هر میلی‌لیتر تعیین گردید (Rengpipat et al., 1989). از هر یک از سوسپانسیون‌های تهیه‌شده با سمپلر برداشته و پس از اضافه نمودن آب مقطر و ۴ غلظت از باکتری 10^4 ، 10^5 ، 10^6 ، 10^7 سلول در گرم غذا به‌عنوان تیمارهای ۱، ۲، ۳ و ۴ و شاهد بدون باکتری تهیه شد. ریزپوشانی باکتری‌ها با آلژینات سدیم در شرایط استریل و به روش امولسیون انجام شد. برای این منظور ابتدا باکتری‌های کشت داده شده در محیط کشت‌های نوترینت براث به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و رسوب حاصله سه مرتبه با سرم فیزیولوژی استریل شستشو داده شد. رسوب بدست آمده در انتهای لوله‌های سانتریفیوژ در محلول PBS بصورت سوسپانسیون درآمد و به کمک لوله‌های استاندارد مک‌فارلند با غلظت $8/1 \times 10^8$ باکتری زنده در هر میلی‌لیتر تنظیم گردید. سپس یک قسمت از سوسپانسیون باکتریایی با چهار قسمت سدیم آلژینات مخلوط گردید. یک قسمت از مخلوط فوق به صورت قطره چکان به ۵ قسمت از روغن نباتی حاوی ۲ درصد توئین ۸۰ اضافه شد و با همزن مغناطیسی به طور یکنواخت مخلوط گردید. بعد از ۱۰ دقیقه یک امولسیون کدر یکنواخت ایجاد شد و سپس کلرید کلسیم ($0/1$ مولار) به آرامی و با سرعت ۲۰ میلی‌لیتر در ثانیه به آن اضافه شد، تا زمانیکه امولسیون آب و روغن از هم قابل تفکیک گردید. بعد از ۱۰ دقیقه کپسول‌ها تشکیل شدند و سپس با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و از هم جدا شد و با آب مقطر مورد شستشو قرار گرفت. سپس فاز روغن با یک سرنگ از فاز آبی حاوی کپسول‌های آلژینات سدیم جدا گردید (Sheu et al., 1993; Mortazavian et al., 2007; Rokka and Rantamaki, 2010).

جیره‌های تهیه شده به خوبی با این غلظت‌ها هم‌زده شده و سپس در آون با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در مدت ۵ ساعت خشک گردید و با ۱۰ درصد رطوبت بر اساس برنامه زمان‌بندی غذایی در اختیار لاروها قرار گرفت (Keysami et al., 2012). جیره بچه ماهیان کپور معمولی در تیمار شاهد با استفاده از فرآیند ذکر شده ساخته شد، ولی به آن‌ها *M. luteus* پروبیوتیکی اضافه نگردید.

بچه ماهی‌های کپور معمولی به منظور سازگاری با شرایط آزمایش به مدت ۳ روز ۳ وعده در روز با غذای پلت (کارخانه آتا) غذادهی شده و در شرایط آزمایش نگهداری شدند. طی دوره آزمایش، تلفات به طور روزانه شمارش و ثبت شد.

میزان غذادهی ۳-۵ درصد وزن بدن بچه ماهیان در نظر گرفته شد. میزان غذادهی به طور روزانه با توجه به میزان مصرف غذا در مخازن تنظیم گردید. میزان غذای در نظر گرفته شده به ۲ قسمت تقسیم شده و ۲ بار در روز در ساعت‌های ۸ صبح به میزان ۵۰ درصد و ۱۵ ظهر به میزان ۵۰ درصد، به بچه ماهیان داده شد. در خلال آزمایش، مخازن با جریان آب یکسان هوادهی گردیدند. روشنایی به صورت ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی برای مخازن در نظر گرفته شد. هر دو هفته یک بار بچه ماهیان توزین و تلفات ثبت گردید. بالاترین غلظت در نظر گرفته شده برای این بود که معمولاً به نظر می‌رسید که غلظت‌های بیشتر مؤثرتر باشد و از طرف دیگر در هنگام کاربرد غذا در آب بخشی از آن در آب حل شده و از دست می‌رفت (Nikoskelainen et al., 2001). پس از اتمام دوره پرورش ماهیان موجود در هر تیمار شمارش و با استفاده از فرمول زیر درصد بازماندگی هر یک از تیمارها و تکرارها محاسبه شد.

$$100 \times \text{تعداد ماهی در ابتدای دوره} / \text{تعداد ماهی در پایان دوره} = \text{درصد بقاء ماهی (\%)}$$

متغیرهای رشد بچه ماهی‌ها با استفاده از فرمول‌های زیر به دست آمد (Felix and Sudharsan, 2004):

وزن نهایی به گرم = افزایش وزن به گرم - وزن آغازی به گرم

$$(\%) \text{ درصد افزایش وزن} = (\text{وزن آغازی به گرم}) - (\text{وزن نهایی به گرم}) / \text{وزن آغازی به گرم} \times 100$$

$$(\%) \text{ ضریب رشد ویژه} = (\text{لگاریتم نپری وزن اولیه} - \text{لگاریتم نپری وزن نهایی}) / \text{طول دوره پرورش} \times 100$$

$$\text{وزن تر (گرم)} / \text{غذای خشک مصرفی (گرم)} = \text{ضریب تبدیل غذا}$$

کیفیت آب به طور روزانه اندازه‌گیری شد. درجه حرارت و pH به وسیله یک دستگاه pH متر و درجه حرارت‌سنج YSI اندازه‌گیری گردید. اکسیژن محلول نیز با اکسیژن متر YSI، مدل ۵V (USA) و آمونیاک با استفاده از آمونیاک‌سنج هانا، (HI ۹۳۷۱۵ Taiwan) اندازه‌گیری گردید. در پایان تحقیق به طور تصادفی ۳ ماهی از هر تکرار برای اندازه‌گیری ترکیب بیوشیمیایی لاشه و جیره‌ها انتخاب شده و به آزمایشگاه فرآوری آبزیان مرکز آموزش میرزا کوچک خان منتقل گردید. سه ماهی مربوط به یک تانک، همگن شده و پس از آن نمونه‌های کوچک‌تر برای اندازه‌گیری پارامترهای شیمیایی لاشه انتخاب شد. مقدار رطوبت نمونه از قرار دادن میزان مشخصی از نمونه در داخل آون با دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به وزن ثابت تعیین گردید. خاکستر با استفاده از کوره الکتریکی در دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ ساعت و مقدار پروتئین خام با روش کج‌لدال انجام شد. اندازه‌گیری چربی کل به کمک دستگاه سوکسله نیمه‌خودکار (Bakhshi, تهران، ایران) و با استفاده از اتر به عنوان حلال انجام گردید. کلیه اندازه‌گیری‌ها بر اساس استاندارد (AOAC, 2005) انجام شد. به منظور تعیین قابلیت هضم مواد مغذی جیره‌ها توسط ماهی در انتهای دوره پرورش به مدت یک هفته ماهیان با جیره محتوی ۰/۶ درصد مارکر در دو نوبت در ساعات ۸ صبح و ۱۴ بعد از ظهر مورد تغذیه قرار گرفتند که حدود ساعت ۱۲ و ۱۶ مدفوع ماهیان در هر تکرار به صورت جداگانه به صورت سیفون کردن جمع‌آوری شد و توسط آون در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت خشک گردید. بلافاصله در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای انجام آزمایش‌ها بعدی منجمد شد. روش غیرمستقیم تعیین هضم پذیری با استفاده از مارکر اکسید کروم بود که با روش فرمول زیر انجام گردید.

$$(\text{مواد مغذی جیره} / \text{مواد مغذی مدفوع} \times \text{غلظت اکسید کروم مدفوع} / \text{غلظت اکسید کروم جیره}) - 1 = \text{ضریب هضم پذیری ظاهری}$$

تعیین مواد مغذی (ماده خشک، پروتئین خام و چربی خام) نمونه‌های خشک شده مدفوع و جیره‌های آزمایشی (محتوی مارکر اکسید کروم) با استفاده از روش استاندارد (AOAC, 2005) انجام شد. اندازه‌گیری اکسید کروم موجود در مدفوع و جیره‌ها پس از هضم خاکستر نمونه‌ها و تبدیل اکسید کروم به اسید کرومیک با استفاده از جذب فتومتری با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد (Fenton et al., 1979).

به منظور بررسی تغییرات در تشکیل پرگنه‌های باکتریایی در انتهای دوره نمونه‌برداری انجام شد. برای انجام این آزمایش، ابتدا دو روز قبل از نمونه‌برداری تغذیه ماهیان قطع شده و در ادامه از هر تکرار ۳ عدد ماهی به طور تصادفی گرفته شد. از هر کدام از آکواریوم‌ها نمونه آب و ۳ عدد ماهی نمونه‌برداری شده و از روده و معده آن‌ها برای کشت و شمارش باکتریایی نمونه‌برداری گردید. شمارش باکتریایی با تهیه رقت‌های سریالی در محلول نرمال سالین (۸/۵ گرم در لیتر نمک طعام) در ۱۰ رقت و سپس در نوترینت آگار TSA پخش گردید. بعد از ۲۴ تا ۴۸ ساعت از پرورش کشت باکتریایی در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد پرگنه‌های رشد یافته شمارش و ثبت گردیدند (Hosseinifar et al., 2011). شمارش توسط دستگاه کلنی‌کانت و شناسایی مجدد باکتری جداسازی شده به روش‌های شیمیایی و مولکولی انجام گرفت (Keysami and Mohammadpour, 2013). به منظور آنالیز آماری داده‌های متغیرهای رشد ماهی و باکتری، کیفیت آب، شمارش باکتریایی بین تکرارها و تیمارها ابتدا با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov نرمال بودن پراکنش داده‌ها مشخص شد و سپس با استفاده از آزمون One way ANOVA وجود یا عدم وجود اختلاف بین تیمارها مورد بررسی قرار گرفت. سطح معنی‌دار بودن در سطح (P ≤ ۰/۰۵) قابل قبول در نظر گرفته شد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام شد (SPSS, Inc. USA).

نتایج

نتایج بدست آمده از بررسی متغیرهای فیزیکوشیمیایی آب بین تیمارها و تکرارها اختلاف معنی‌دار نبود. متغیرهای فیزیکوشیمیایی درجه حرارت، اکسیژن محلول، pH و آمونیاک به ترتیب در محدوده ۳۰-۲۶ درجه سانتی‌گراد، ۸/۷-۷/۳ میلی‌گرم در لیتر، ۷/۲۷-۷/۲ و ۰/۰۲-۰/۱۱ میلی‌گرم در لیتر به دست آمد (جدول ۱).

جدول ۱: ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آب مخازن پرورش بچه ماهی کپور معمولی با استفاده از جیره تیمار و شاهد.

داده‌ها میانگین ۳ تکرار در هر تیمار می‌باشند (میانگین ± انحراف معیار)

متغیر	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴
دما (درجه سانتی‌گراد)					
صبح	۲۶/۵۷±۰/۲۵ ^a	۲۶/۸۳±۰/۲۵ ^a	۲۶/۶۷±۰/۲۳ ^a	۲۶/۷۷±۰/۲۱ ^a	۲۶/۸۷±۰/۱۵ ^a
عصر	۳۰/۶۷±۰/۳۳ ^a	۳۰/۸±۰/۳۵ ^a	۳۰/۱±۰/۲۲ ^a	۳۰/۳±۰/۲۲ ^a	۳۰/۱±۰/۱۵ ^a
اکسیژن محلول (میلی‌گرم بر لیتر)					
صبح	۶/۷±۰/۲۹ ^a	۶/۷±۰/۳۶ ^a	۶/۷±۰/۰۶ ^a	۶/۷±۰/۱۶ ^a	۶/۷±۰/۰۰ ^a
عصر	۷/۱±۰/۰۶ ^a	۶/۹±۰/۰۴ ^a	۷/۰±۰/۰۱ ^a	۷/۰±۰/۰۲ ^a	۷/۰±۰/۰۳ ^a
pH					
صبح	۷/۲±۰/۱ ^a	۷/۲۲±۰/۳۱ ^a	۷/۲۲±۰/۳۵ ^a	۷/۲۲±۰/۳۵ ^a	۷/۲۲±۰/۳۵ ^a
عصر	۸/۰۷±۰/۰۶ ^a	۸±۰/۳۸ ^a	۸±۰/۲۸ ^a	۸±۰/۲۸ ^a	۸±۰/۲۸ ^a
آمونیاک (میلی‌گرم بر لیتر)					
صبح	۰/۰۱۲±۰/۰۰۴ ^a	۰/۰۱۲±۰/۰۰۴ ^a	۰/۰۱۲±۰/۰۰۴ ^a	۰/۰۱۲±۰/۰۰۴ ^a	۰/۰۱۲±۰/۰۰۴ ^a
عصر	۰/۰۱±۰/۰۰۵	۰/۰۱۳±۰/۰۰۵	۰/۰۱±۰/۰۰۵	۰/۰۱±۰/۰۰۵	۰/۰۱±۰/۰۰۵

حروف همسان لاتین در هر ردیف نشانه عدم اختلاف معنی‌دار است (P > ۰/۰۵).

نتایج به دست آمده نرمال بوده و در محدوده کیفیت مناسب پرورش بچه ماهی کپور معمولی بود (Abdel-Tawwab et al., 2008). بین کیفیت آب گروه‌های تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار مشاهده نگردید و بین کیفیت آب تیمارهای مختلف نیز اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده

نشد ($P > 0.05$). نتایج ۵۶ روز غذادهی با غذای حاوی باسیلوس سابیتیلیس اختلاف معنی‌دار آماری را در افزایش وزن، ضریب رشد ویژه و ضریب تبدیل غذایی بین تیمارها و شاهد نشان داد (جدول ۲). نتایج بررسی درصد بقاء بچه ماهی کپور معمولی تحت تغذیه با تیمار حاوی *M. luteus* و شاهد حاوی در مدت ۸ هفته پرورش اختلاف معنی‌دار آماری در افزایش درصد بقاء بچه ماهی‌ها نسبت به شاهد نشان داد ($P < 0.05$).

جدول ۲: جدول نتایج شاخص‌های رشد و درصد بقاء بچه ماهیان کپور معمولی تغذیه‌شده با غلظت‌های مختلف باکتری *M. luteus* در ۴ تیمار و ۱ شاهد. داده‌ها میانگین ۳ تکرار در هر تیمار است (میانگین $\pm$ انحراف معیار)

تیمارها	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴
وزن اولیه (گرم)	$28/37 \pm 2/54^b$	$28/55 \pm 3/163^a$	$28/018 \pm 2/87^b$	$28/38 \pm 2/7^a$	$28/266 \pm 3/07^b$
وزن نهایی (گرم)	$44/78 \pm 6/09^a$	$48/21 \pm 5/96^a$	$51/75 \pm 5/56^a$	$49/92 \pm 6/61^b$	$48/22 \pm 4/41^b$
میانگین افزایش وزن (گرم)	$36/61 \pm 8/71^a$	$10/09 \pm 39/05$	$10/73 \pm 39/83^b$	$12/29 \pm 42/57^b$	$8/98 \pm 39/32^b$
درصد افزایش وزن (%)	$65/63 \pm 2/87^a$	$75/55 \pm 2/69^a$	$82/16 \pm 3/91^b$	$97/22 \pm 3/75^a$	$69/19 \pm 2/36^a$
شاخص رشد ویژه (%)	$0/823 \pm 0/25^b$	$0/924 \pm 0/215^b$	$0/973 \pm 0/272^b$	$0/115 \pm 0/254^a$	$0/854 \pm 0/218^b$
ضریب تبدیل غذا	$2/25 \pm 0/12^a$	$0/85 \pm 1/86^a$	$0/03 \pm 1/871^b$	$0/88 \pm 1/67^b$	$0/01 \pm 2/05^a$
کارایی پروتئین (%)	$0/632 \pm 0/807^a$	$0/369 \pm 0/841^a$	$0/429 \pm 0/919^a$	$0/784 \pm 1/358^b$	$0/367 \pm 0/868^a$
درصد بقاء (%)	$85/0 \pm 3/17^a$	$97/1 \pm 3/39^b$	$97/1 \pm 5/19^b$	$96/1 \pm 5/21^b$	$95/1 \pm 3/11^b$

حروف غیر همسان لاتین در هر ردیف نشانه اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.05$)

میزان پروتئین خام در دامنه $16/63\% - 17/13\%$ بود. همچنین میزان چربی خام در محدوده $7/51\% - 8/01\%$ متغیر بود. مقدار خاکستر در محدوده $14/13 - 14/81$ و مقدار رطوبت بین $75/03 - 75/6$ بود (جدول ۳). با توجه به نتایج حاصله می‌توان عنوان کرد که اضافه نمودن باکتری *M. luteus* تأثیر اندکی در میزان پروتئین لاشه بچه ماهیان کپور داشته که باعث افزایش حدود یک درصدی در میزان پروتئین لاشه گردیده است و با بررسی میزان چربی در لاشه بچه ماهیان کپور کاهش مشاهده گردید، ولی این مقدار در خلال دو ماه اختلاف معنی‌داری نبوده و در مورد رطوبت و خاکستر لاشه نیز این اختلاف معنی‌دار نبوده است. به طور کلی نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌دار آماری بین ترکیب بیوشیمیایی لاشه بچه کپور معمولی تیمارها و شاهد در خلال ۶۰ روز غذادهی وجود نداشت ($P > 0.05$).

جدول ۳: جدول ترکیب بیوشیمیایی لاشه بچه ماهیان کپور معمولی بر اساس وزن خشک (میانگین $\pm$ انحراف معیار) تحت تأثیر تغذیه با جیره‌های با غلظت مختلف باکتری *M. luteus* و شاهد.

متغیر	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴
پروتئین خام	$16/63 \pm 3/35^a$	$16/67 \pm 4/47^a$	$16/71 \pm 0/9^a$	$17/48 \pm 9/49^a$	$17/12 \pm 9/19^a$
چربی خام	$1/8 \pm 2/22^b$	$1/7 \pm 85/17^a$	$1/7 \pm 65/12^a$	$1/7 \pm 5/06^b$	$1/7 \pm 6/09^a$
خاکستر	$14/55 \pm 4/48^a$	$14/81 \pm 5/51^a$	$14/13 \pm 1/11^a$	$14/22 \pm 2/28^a$	$14/43 \pm 2/29^a$
رطوبت	$75/33 \pm 0/9^a$	$75/23^a \pm 1/4$	$75/6 \pm 44/44^a$	$75/03 \pm 32/32^a$	$75/06 \pm 7/07^a$

حروف همسان لاتین در هر ردیف نشانه عدم اختلاف معنی‌دار است ($P > 0.05$).

کمترین مقدار پروتئین جیره های مورد استفاده ۳۳/۹۳ در جیره شاهد بدون باکتری *M. luteus* بود و حداکثر مقدار پروتئین در تیمار ۴ مشاهده گردید و حداقل چربی خام موجود در جیره نیز در جیره شاهد به میزان ۱۰/۷۹ و حداکثر آن در تیمار ۴ به مقدار ۱۰/۹۴ مشاهده شد (جدول ۴). با این وجود عدم وجود تفاوت معنی دار بین ترکیبات بیوشیمیایی تیمارها و شاهد به معنی عدم تاثیر باکتری *M. luteus* در مقدار پروتئین و چربی جیره بود.

جدول ۴: ترکیبات بیوشیمیایی جیره های تهیه شده از غلظت های باکتری *M. luteus* (میانگین $\pm$ انحراف معیار). همه

داده های میانگین ۳ تکرار در هر تیمار هستند

متغیر	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴
پروتئین خام	$a_{0.15 \pm 33/93}$	$a_{0.12 \pm 34/07}$	$a_{0.12 \pm 34/12}$	$a_{0.17 \pm 34/19}$	$a_{0.05 \pm 34/20}$
چربی خام	$a_{0.13 \pm 10/79}$	$a_{0.31 \pm 10/8}$	$a_{0.06 \pm 10/85}$	$a_{0.52 \pm 10/9}$	$a_{0.46 \pm 10/94}$
خاکستر	$a_{0.08 \pm 7/21}$	$a_{0.23 \pm 7/2}$	$a_{0.16 \pm 7/28}$	$a_{0.26 \pm 7/38}$	$a_{0.27 \pm 7/36}$

حروف همسان لاتین در هر ردیف نشانه عدم اختلاف معنی دار است ($P > 0/05$).

با بررسی نتایج حاصله از تعیین پروتئین مصرفی و چربی غذای مصرفی و مقدار خاکستر غذای مصرفی، بیشترین مقدار پروتئین مصرفی در تیمار ۳ که داری بیشترین مقدار رشد بود، مشاهده گردید (۸۶/۱) و کمترین مقدار هضم پذیری نیز در تیمار شاهد که بدون باکتری *M. luteus* بود مشاهده شد (جدول ۵). به نظر می رسد که افزایش مقدار باکتری *M. luteus* تا میزان 10^6 سلول در گرم غذا باعث افزایش مقدار پروتئین مصرفی در جیره گردید و با افزایش این مقدار از 10^6 سلول در گرم غذا، مقدار هضم پذیری پروتئین مصرفی کاهش می یابد. بیشترین مقدار هضم پذیری چربی غذا در غذای فاقد *M. Luteus* یعنی تیمار شاهد مشاهده گردید و کمترین مقدار هضم پذیری چربی در تیمار ۳ مشاهده شد. به نظر می رسد که افزایش باکتری *M. luteus* تا سطح 10^6 سلول در گرم غذای بچه ماهیان کپور معمولی باعث کاهش جذب چربی و افزایش جذب پروتئین می گردد.

جدول ۵: جدول هضم پذیری کل برای غذای مصرفی بچه ماهیان کپور تغذیه شده با غلظت های مختلف *M. luteus*

در غذا (میانگین $\pm$ انحراف معیار). همه داده ها میانگین ۳ تکرار در هر تیمار هستند.

متغیر	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴
پروتئین مصرفی	$a_{1/57 \pm 78/95}$	$b_{2/71 \pm 81/2}$	$b_{2/89 \pm 83/41}$	$b_{3/1 \pm 86/1}$	$a_{3/02 \pm 80/25}$
چربی غذا	$a_{1/77 \pm 92/2}$	$a_{0/18 \pm 91/6}$	$a_{0/06 \pm 91/18}$	$1/13 \pm 90/63$	$a_{0/71 \pm 91/01}$
خاکستر	$a_{1/6 \pm 74/8}$	$a_{1/5 \pm 75}$	$a_{2/1 \pm 75/9}$	$a_{1/6 \pm 75/1}$	$a_{1/9 \pm 75/7}$

حروف غیر همسان لاتین در هر ردیف نشانه اختلاف معنی دار است ($P < 0/05$)

نتایج شمارش باکتری از دستگاه گوارش و آب مخازن پرورشی در گروه های تیمار و شاهد در جداول ۶ و ۷ گزارش گردید.

جدول ۶: لگاریتم تعداد باکتری‌های کل و باکتری‌های گرم مثبت و منفی شمارش شده از دستگاه گوارش کپور معمولی تغذیه شده با غلظت‌های مختلف باکتری *M. luteus* در ۲ تیمار و شاهد (جیره بدون باکتری *M. luteus*).

متغیر	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴
لگاریتم شمارش باکتری‌های کل (سلول در میلی لیتر)	^a ۷/۸	^a ۷/۹	^a ۷/۹	^a ۷/۹	^a ۷/۹
لگاریتم باکتری‌های گرم مثبت شمارش شده (سلول در میلی لیتر)	^a ۱	^b ۷/۴	^b ۷/۴	^b ۷/۵	^b ۷/۵
لگاریتم باکتری‌های گرم منفی شمارش شده (سلول در میلی لیتر)	^a ۵/۹	^b ۲/۰۵	^b ۲/۰۳	^b ۲/۰۱	^b ۲/۰۱

حروف غیر همسان لاتین در هر ردیف نشانه اختلاف معنی دار است ($P < 0.05$).

نتایج بررسی تعداد باکتری‌های موجود در دستگاه گوارش بچه ماهیان کپور نشان داد که تعداد کل باکتری‌ها در همه تیمارها ثابت و تفاوت آن‌ها در تعداد باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بود. بیشترین تعداد باکتری‌های گرم مثبت در تیمارهای ۳ و ۴ مشاهده گردید. کمترین تعداد باکتری‌های گرم مثبت و بیشترین تعداد باکتری‌های گرم منفی نیز در تیمار شاهد و کمترین تعداد باکتری‌های گرم منفی در تیمارهای ۳ و ۴ مشاهده شد. افزایش مقدار باکتری *M. luteus* در جیره غذایی بچه ماهیان کپور معمولی باعث افزایش تعداد باکتری‌های گرم مثبت در دستگاه گوارش گردید.

جدول ۷: لگاریتم تعداد باکتری‌های کل و باکتری‌های گرم مثبت و منفی شمارش شده از مخزن آب کپور معمولی تغذیه شده با غلظت‌های مختلف باکتری *M. luteus* در ۲ تیمار و شاهد جیره بدون *M. luteus*.

متغیر	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴
لگاریتم شمارش باکتری‌های کل (سلول در میلی لیتر)	^a ۵/۹	^a ۵/۹	^a ۵/۹	^a ۵/۹	^a ۶/۰
لگاریتم باکتری‌های گرم مثبت شمارش شده (سلول در میلی لیتر)	^a ۱	^b ۵/۰۱	^b ۴/۰۹	^b ۵/۵	^b ۴/۵
لگاریتم باکتری‌های گرم منفی شمارش شده (سلول در میلی لیتر)	^a ۵/۳	^b ۲/۳	^b ۲/۲	^b ۲/۰۱	^b ۳/۰۱

حروف غیر همسان لاتین در هر ردیف نشانه اختلاف معنی دار است ($P < 0.05$).

آب وان‌هایی که بچه ماهیان کپور معمولی با جیره‌های حاوی باکتری *M. luteus* تغذیه شده بودند و یا جیره آن‌ها فاقد باکتری *M. luteus* بود تعداد باکتری‌های کل در مخازن باهم برابر و اختلاف آن‌ها در تعداد باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت بود. در مخازنی که در جیره غذایی آن‌ها در صد باکتری *M. luteus* بالاتر بود، تعداد باکتری‌های گرم مثبت بیشتر گردید. تیمار شاهد که جیره غذایی بچه ماهیان کپور آن‌ها فاقد باکتری *M. luteus* بود تعداد باکتری‌های گرم منفی در آن‌ها به حداکثر رسیده بود. با نتایج بدست آمده به نظر می‌رسد که افزایش مقدار باکتری *M. luteus* در جیره غذایی باعث افزایش تعداد باکتری‌های گرم مثبت در آب مخازن پرورش گردید.

بحث و نتیجه‌گیری

خاصیت پروبیوتیکی *M. luteus* از افزایش وزن و ضریب تبدیل غذایی مناسب‌تری که در تیمارها نسبت به شاهد بدست آمد به اثبات می‌رسد. *M. luteus* در تجزیه مواد آلی در سیستم‌های آبی نقش دارد که ممکن است به چرخه مواد مغذی کمک کند و نیز می‌تواند کیفیت آب را افزایش داده و محیط سالم‌تری را برای کپور معمولی ایجاد کند. گونه‌های خاصی از این باکتری می‌توانند مواد محرک رشد تولید یا باکتری‌های بیماری‌زا را کنترل کنند و به طور بالقوه برای ماهی‌ها در اکوسیستم آنها مفید باشند. *M. luteus* معمولاً برای ماهی بیماری‌زا نیست. تأثیر *M. luteus* در افزایش وزن و درصد بقا از راه تغذیه‌ای است. بدین ترتیب که این باکتری‌ها ترکیبات سمی و غیر تغذیه‌ای جیره را هضم می‌کنند و سپس میزبان می‌تواند همه غذا را جذب کند (Balcazar, 2004; Gullian et al., 2004).

M. luteus انواع مختلفی از پروتئاز و سایر انواع آنزیم‌ها را تولید می‌کند که می‌تواند انواع مواد آلی و مواد غذایی را تجزیه نموده و به مواد مغذی قابل جذب تبدیل کند. از طرف دیگر *M. luteus* با تولید مواد آنتی باکتریال و رقابت در جذب املاح غذایی و حتی با ازدیاد و تجمع باکتری‌های بیماری‌زا در دستگاه گوارش لارو جلوگیری می‌کند (Wang et al., 2000). در این تحقیق جیره با سطح 10^6 سلول در گرم غذا به طور معنی‌داری از سایر سطوح *M. luteus* در تیمارها و شاهد اثربخش‌تر بود. اثربخشی پروبیوتیک در سطح 10^6 توسط مطالعات متعددی تأیید گردید (Tookmehchi et al., 2012; Reid et al., 2003, keysami et al., 2021). تأثیر کمتر در سطح بالاتر *M. luteus* در تیمار ۲، قبلاً در تحقیق Panigrahi و همکاران (۲۰۰۴) تأیید گردیده بود که در آن اثربخشی پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس، وقتی که غلظت باکتری بالاتر رفت، کاهش پیدا کرد. همچنین در تحقیق Nikoskelainen و همکاران (۲۰۰۱) تأیید گردیده بود که در آن اثربخشی پروبیوتیکی باسیلوس، وقتی که غلظت باسیلوس بالاتر رفت کاهش یافت. رشد کمتر در غلظت بالاتر پروبیوتیک می‌تواند به جنبه‌های محیط‌زیستی آبی مربوط باشد، زیرا افزایش غلظت باکتری در آب استرس‌زا بوده و میزان تغذیه لارو را کاهش می‌دهد. این مطالعه نشان داد که غلظت پروبیوتیک به‌منظور جلوگیری از مصرف میزان بالا و در نتیجه کاهش اثربخشی و افزایش هزینه تولید باید به‌خوبی و با دقت بکار برود (Nikoskelainen et al., 2004; keysami et al., 2012). نتایج شمارش باکتری‌ها در لاشه بچه ماهی‌های کپور معمولی و آب مخازن پرورش اختلاف معنی‌داری را بین باکتری‌های تیمارها و شاهد نشان داد ($P < 0.05$). تراکم باکتری‌های گرم منفی در گروه شاهد از گروه‌های تیمار بالاتر بود، این شاید بدین دلیل باشد که *M. luteus* به مقدار زیادی مواد آنتی‌باکتریال و ترکیبات آنتی‌بیوتیکی در محیط پرورش خود رهاسازی می‌کند (Sugita et al., 2002; Austin et al., 1995).

M. luteus تولید آنتی‌بیوتیک‌هایی می‌کند که می‌تواند طیف وسیعی از باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی را از بین ببرد (VidyaLaxme et al., 2014). *M. luteus* همچنین تولید بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های معمول همچون باکتریوسین می‌کند (Sugita et al., 2002). بنابراین به نظر می‌رسد که باکتری‌های گرم منفی در تیمارها به‌وسیله باکتری‌های *M. luteus* کشته شده و جایگزین شده باشد (McLoughlin et al., 2019; Nwachukwu et al., 2024). افزایش تراکم *M. luteus* در لاشه بچه ماهی‌ها و آب مخازن پرورش تیمار در این تحقیق می‌تواند نشان دهنده تجمع و جاگیری *M. luteus* در بدن بچه ماهی‌ها و آب مخازن باشد. به نظر می‌رسد باکتری‌هایی که بتوانند در دستگاه گوارش بچه‌ماهی‌ها غالب شوند و تجمع یابند شاید گزینه خوبی برای حذف باکتری‌های بیماری‌زا از دستگاه گوارش آبی و شروع فعالیت پروبیوتیکی باشند (Dimitroglou et al., 2009). بنابراین باکتری استفاده‌شده در این تحقیق (*M. luteus*) دارای خواص مفید تغذیه‌ای و بهداشتی در افزایش کنترل رشد و عوامل بیماری‌زای دستگاه گوارش لارو کپور معمولی دارد و می‌تواند در پرورش این گونه، مورد استفاده قرار گیرد. پس از اولین استفاده از پروبیوتیک‌ها در آبی‌پروری، محققان زیادی تأثیر مثبت این مواد بر رشد آبزیان را تأیید نموده‌اند (Lara-Flores et al., 2003). باکتری‌های موجود در دستگاه گوارش بخشی از مواد غذایی را تجزیه می‌کنند و پس از این فرایند، مواد فعال مانند آنزیم، اسیدهای آمینه و ویتامین‌ها تولید خواهند شد (Moriarty et al., 1990). با این حال، نتایج کاملاً متفاوت و متضادی در رابطه با کارایی استفاده از انواع مختلف پروبیوتیک‌ها حاصل شده است که بیانگر لزوم ادامه انجام تحقیقات بر روی اثرات انواع پروبیوتیک‌ها در گونه‌های مختلف است. نتایج حاصل از آنالیز آماری داده‌های این تحقیق نشان داد که استفاده از پروبیوتیک *M. luteus* تأثیر معنی‌داری بر درصد رشد بچه ماهی کپور معمولی داشت. نتایج حاضر نشان داد که گروه‌های تیمار تغذیه‌شده با این پروبیوتیک درصد رشد بیشتری نسبت به گروه شاهد داشتند. بنابراین استفاده از این پروبیوتیک به عنوان مکمل غذایی کپور ماهیان در حال رشد می‌تواند برافزایش رشد و بهره‌وری پرورش تأثیرگذار باشد. تأثیرگذاری *M. luteus* بر ضریب رشد گونه‌های دیگر آبزیان به اثبات رسیده است (Hoseinifar et al., 2015). استفاده از پروبیوتیک‌های مناسب، بهبود توازن باکتری‌های گوارشی را باعث می‌شود. بنابراین منجر به بهبود جذب غذا (Fuller, 1989) و فعالیت آنزیم‌های گوارشی (Carnevali et al., 2006) و کاهش مشکلات باکتری‌های بیماری‌زا در دستگاه گوارش می‌شود (Al-Dohail et al., 2010; Ali, 2000; Ali, 2009). افزودن پروبیوتیک در صورت تلقیح به مقدار کافی می‌تواند رشد و سلامت میزبان را افزایش دهد (Anderson et al., 2006; Abd El-Rhman et al., 2009). نتایج نشان داد که استفاده از پروبیوتیک در جیره غذایی ماهی می‌تواند برافزایش رشد و بهره‌وری پرورش تأثیرگذار باشد.

M. luteus در تجزیه مواد آلی در سیستم‌های آبی نقش دارد که ممکن است به چرخه مواد مغذی کمک کند. این موضوع می‌تواند کیفیت آب را افزایش داده و محیط سالم‌تری را برای کپور معمولی ایجاد کند. گونه‌های خاصی از میکروکوکوس می‌توانند مواد محرک رشد تولید کنند یا باکتری‌های بیماری‌زا را مهار کنند و به طور بالقوه برای ماهی‌ها در اکوسیستم آنها مفید باشند. *M. luteus* معمولاً برای ماهی بیماری‌زا نیست و برآیند این خواص در کاهش استرس آبزی پرورشی موثر است (Balcazar, 2004; Nwachukwu *et al.*, 2019; Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008). *M. luteus* انواع مختلفی از پروتاز و سایر انواع آنزیم‌ها را تولید می‌کند که می‌تواند انواع مواد آلی و مواد غذایی را تجزیه نموده و به مواد مغذی قابل جذب تبدیل کند. از طرف دیگر *M. luteus* با تولید مواد آنتی‌باکتریال و رقابت در جذب املاح غذایی با ازدیاد و تجمع باکتری‌های پاتوژن در دستگاه گوارش لارو جلوگیری می‌کند (Irianto and Austin, 2002; Wang *et al.*, 2007). بالاتر بودن درصد بقاء بچه ماهیان کپور معمولی در این تحقیق شاید به این دلیل باشد که جیره غذایی حاوی پروبیوتیک‌ها نه تنها مواد مغذی ضروری را تأمین می‌کند، بلکه می‌تواند یکی از بهترین راهکارها برای حفظ سلامت آبزیان پرورشی و افزایش مقاومت آن‌ها به استرس و عوامل بیماری‌زا باشد (Lara-Flores *et al.*, 2003). همچنین عملکرد پروبیوتیک‌ها در بهبود محیط آبی از طریق کاهش باکتری‌های بیماری‌زا است (Joborn *et al.*, 1997). اثرات مثبت پروبیوتیک‌ها در آبزیان پرورشی، با دیدگاه متفاوتی نظیر بهینه‌سازی پارامترهای فیزیکی و شیمیایی محیط پرورشی آن‌ها، پیشگیری از ابتلا و مبارزه با عوامل بیماری‌زا و همچنین ارتقاء پارامترهای خونی و ایمنی و در نتیجه افزایش درصد بقاء آبزیان پرورشی در تحقیقات بی‌شماری توسط محققین شیلاتی تأیید شده است (Brunt *et al.*, 2007; Balcázar *et al.*, 2006; Carnevali *et al.*, 2000; Dimitroglou *et al.*, 2009; Drabkin, 1945; Ferguson *et al.*, 2010; Hoseinifar *et al.*, 2013). *M. luteus* در تجزیه مواد آلی در سیستم‌های آبی نقش دارد که ممکن است به چرخه مواد مغذی کمک کند. این می‌تواند کیفیت آب را افزایش داده و محیط سالم‌تری را برای کپور معمولی ایجاد کند. *M. luteus* معمولاً برای ماهی بیماری‌زا نیست. از این رو گونه باکتری *M. luteus* جدا شده از دستگاه گوارش این ماهی می‌تواند به عنوان پروبیوتیک در پرورش بچه ماهی کپور معمولی بکار رود. بدین ترتیب که می‌توان این باکتری را با غلظت 10^6 سلول در گرم غذا، در غذای بچه ماهی کپور معمولی بکار برد و رشد و درصد بقاء بچه ماهی کپور معمولی را بهبود بخشید.

سپاسگزاری

در انجام این تحقیق از همکاری و مساعدت کارکنان آزمایشگاه مرکز آموزش علوم و صنایع شیلاتی میرزا کوچک خان و کارگاه تکثیر و پرورش شهید انصاری و دانشگاه آزاد اسلامی واحد تالش بهره‌مند گردیده‌ایم که بدین وسیله قدردانی می‌گردد.

منابع

- Abdi, R.D., Gillespie, B.E., Ivey, S., Pighetti, G.M., Almeida, R.A. and Kerro Dego, O., 2021. Antimicrobial resistance of major bacterial pathogens from dairy cows with high somatic cell count and clinical mastitis. *Animals*, 11(1):131. doi.org/10.3390/ani11010131
- Aattouri, N., Bouras, M., Tome, D., Marcos, A. and Lemonnier, D., 2002. Oral ingestion of lactic-acid bacteria by rats increases lymphocyte proliferation and interferon- γ production. *British Journal of Nutrition*, 87(4): 367-373.
- Abd El-Rhman, A. M., Khattab, Y. A. and Shalaby, A. M., 2009. *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 27(2): 175-180.
- Al-Dohail, M. A., Hashim, R. and Aliyu-Paiko, M., 2009. Effects of the probiotic, *Lactobacillus acidophilus*, on the growth performance, haematology parameters and immunoglobulin concentration in African Catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell 1822) fingerling. *Aquaculture Research*, 40(14): 1642-1652.
- Ali, A., 2000. Probiotics in fish farming. Evaluation of a bacterial mixture. Rapport-Sveriges Lantbruksuniversitet, Vattenbruksinstitutionen (Sweden), 19.
- Ali, F. H. M., 2010. Probiotics feed supplement" to improve quality of broiler chicken carcasses. *World Journal of Dairy and Food Sciences*, 5: 93-99.

- Aly, S. M., Ahmed, Y. A. G., Ghareeb, A. A. A. and Mohamed, M. F., 2008. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish and shellfish immunology*, 25(1-2): 128-136.
- Anderson, D. P., Roberson, B. S. and Dixon, O. W., 1979. Plaque-forming cells and humoral antibody in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) induced by immersion in a *Yersinia ruckeri* O-antigen preparation. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 36(6): 636-639.
- Aubin, J., Gatesoupe, F. J., Labbé, L. and Lebrun, L., 2005. Trial of probiotics to prevent the vertebral column compression syndrome in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquaculture Research*, 36: 758-767.
- Austin, B., Stuckey, L. F., Robertson, P. A. W., Effendi, I. and Griffith, D. R. W., 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *Journal of Fish Diseases*, 18: 93-96.
- Balcázar, J. L., De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D. and Múzquiz, J. L., 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary microbiology*, 114(3-4): 173-186.
- Brunt, J. and Austin, B., 2005. Use of a probiotic to control lactococcosis and streptococcosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of fish diseases*, 28(12): 693-701.
- Brunt, J., Newaj-Fyzul, A. and Austin, B., 2007. The development of probiotics for the control of multiple bacterial diseases of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 30(10): 573-579.
- Carnevali, O., de Vivo, L., Sulpizio, R., Gioacchini, G., Olivotto, I., Silvi, S. and Cresci, A., 2006. Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. *Aquaculture*, 258(1-4): 430-438.
- Dimitroglou, A., Merrifield, D. L., Moate, R., Davies, S. J., Spring, P., Sweetman, J. and Bradley, G., 2009. Dietary mannan oligosaccharide supplementation modulates intestinal microbial ecology and improves gut morphology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of animal science*, 87(10): 3226-3234.
- Ferguson, R. M., Merrifield, D. L., Harper, G. M., Rawling, M. D., Mustafa, S., Picchietti, S. and Davies, S. J., 2010. The effect of *Pediococcus acidilactici* on the gut microbiota and immune status of on-growing red tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of applied microbiology*, 109(3): 851-862.
- Fuller, R., 1989. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Microbiology*, 66(5): 365-378.
- Garibaldi, L., 2012. The FAO global capture production database: a six-decade effort to catch the trend. *Marine Policy*, 36(3): 760-768.
- Gatesoupe, F. J., 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 1: 147-165.
- Hoseinifar, S. H., Khalili, M., Rostami, H. K. and Esteban, M. Á., 2013. Dietary galactooligosaccharide affects intestinal microbiota, stress resistance, and performance of Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry. *Fish and Shellfish Immunology*, 35(5): 1416-1420.
- Hoseinifar, S. H., Roosta, Z., Hajimoradloo, A. and Vakili, F., 2015. The effects of *Lactobacillus acidophilus* as feed supplement on skin mucosal immune parameters, intestinal microbiota, stress resistance and growth performance of black swordtail (*Xiphophorus helleri*). *Fish and shellfish immunology*, 42(2): 533-538.
- Houston, A. H. and Cyr, D., 1974. Thermoacclimatory variation in the haemoglobin systems of goldfish (*Carassius auratus*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of Experimental Biology*, 61(2): 455-461.
- Irianto, A. and Austin, B., 2002. Probiotics in aquaculture. *Journal of fish diseases*, 25(11): 633-642. doi.org/10.1046/j.1365-2761.2002.00422.
- Joborn, A., Olsson, J. C., Westerdahl, A., Conway, P. L. and Kjelleberg, S., 1997. Colonization in the fish intestinal tract and production of inhibitory substances in intestinal mucus and faecal extracts by *Carnobacterium* sp. strain K1. *Journal of Fish Diseases*, 20: 383-392.
- Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M. J. and Gibson, L., 2008. Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, 274(1): 1-14.
- Keysami, M. A., Mohammadpour, M. and Saad, C.R., 2012. Probiotic activity of *Bacillus subtilis* in juvenile fresh water prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) at different methods of administration to the feed. *Journal of Aquaculture International*, 20: 499-511. doi: 10.1007/s10499-011-9481-5
- 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: 553-562. doi 10, 1007/s10499-012-9588-3.8.
- Keysami, M. A., Shalmani, A. Z. and Mojdehi, M. A., 2021. Effectiveness of *Bacillus subtilis* on growth and survival of common carp larva in non-earthen ponds. *Journal of Animal Environment*, 13(3): 261-268.
- Khattab, Y. A., Shalaby, A. M. and Abdel-Rhman, A., 2005. Use of probiotic bacteria as growth promoters, anti-bacterial and their effects on physiological parameters of *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 28: 74-81.
- Kim, D. H. and Austin, B., 2006. Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. *Fish and shellfish immunology*, 21(5): 513-524.

- Lara-Flores, M., Olvera-Novoa, M. A., Guzmán-Méndez, B. E. and López-Madrid, W., 2003. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 216(1-4): 193-201.
- Lee, J. S., Cheng, H., Damte, D., Lee, S. J., Kim, J. C., Rhee, M. H. and Park, S. C., 2013. Effects of dietary supplementation of *Lactobacillus pentosus* PL11 on the growth performance, Immune and antioxidant systems of Japanese eel *Anguilla japonica* challenged with *Edwardsiella tarda*. *Fish and Shellfish Immunology*, 34: 756-761.
- McLoughlin, I. J., Voss, A. L., Hale, J. D. and Jain, R., 2024. Cosmetic efficacy of the topical probiotic *Micrococcus luteus* Q24 in healthy human adults. *Cosmetics*, 11(4): 122.
- Mazurkiewicz, J., Przybyl, A., Sip, A. and Grajek, W., 2007. Effect of *Carnobacterium divergens* and *Enterococcus hirae* as probiotic bacteria in feed for common carp, *Cyprinus carpio* L. *Fisheries and Aquatic Life*, 15(2): 79-92.
- Moriarty, D. J. W., 1990. Interactions of microorganisms and aquatic animals, particularly the nutritional role of the gut flora. *Microbiology in poecilotheirs*, pp.217-222.
- Mortazavian, A., Seyed Hadi, R., Mohammad Reza, E. and Sara, S., 2007. Principles and methods of microencapsulation of Probiotic microorganisms. *Iranian Journal of biotechnology*, 5(1): 1-18.
- Nwachukwu, U., George-Okafor, U., Ozoani, U. and Ojiagu, N., 2019. Assessment of probiotic potentials of *Lactobacillus plantarum* CS and *Micrococcus luteus* CS from fermented milled corn-soybean waste-meal. *Scientific African*, 6: e00183.
- Oyetayo, V. O. and Oyetayo, F. L., 2005. Potential of probiotics as biotherapeutic agents targeting the innate immune system. *African Journal of biotechnology*, 4(2): 123-127.
- Panigrahi, A., Kiron, V., Kobayashi, T., Puangkaew, J., Satoh, S. and Sugita, H., 2004. Immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. *Veterinary immunology and immunopathology*, 102(4): 379-388.
- Ranzani-Paiva, M. J. T., Ishikawa, C. M., Eiras, A. C. D., Silveira, V. R. D., 2004. Effects of an experimental challenge with *Mycobacterium marinum* on the blood parameters of Nile tilapia, (*Oreochromis niloticus*) (Linnaeus,1757). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 6: 945-953.
- Reid, G., Sanders, M.E., Gaskins, H.R., Gibson, G.R., Mercenier, A., Rastall, R., Roberfroid, M., Rowland, I., Cherbut, C. and Klaenhammer, T.R., 2003. New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. *Journal of clinical gastroenterology*, 37(2): 105-118.
- Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitvorakul, S. and Menasaveta, P., 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (Bacillus S11). *Aquaculture*, 4: 271-288.
- Rokka, S. and Rantamaki, P., 2010. Protecting probiotic bacteria by microencapsulation. Challenges for Industrial applications. *European food Research and Technology*, 231(1): 1-12.
- Sugita, H., Miyajima, C. and Deguchi, Y., 1991. The vitamin B12-producing ability of the intestinal microflora of freshwater fish. *Aquaculture*, 92: 267-276.
- Sun, Y. Z., Yang, H. L., Ma, R. L. and Lin, W. Y., 2010. Probiotic applications of two dominant gut Bacillus strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper *Epinephelus coioides*. *Fish and Shellfish Immunology*, 29(5): 803-809.
- Ta'ati, R., Soltani, M., Bahmani, M. and Zamini, A. A., 2011. Growth performance, carcass composition, and immunophysiological indices in juvenile great sturgeon (*Huso huso*) fed on commercial prebiotic, Immunoster. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 10(2): 324-335.
- Talas, Z. S. and Gulhan, M. F., 2009. Effects of various propolis concentrations on biochemical and hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72: 1994-1998.
- Tookmehchi, A., Shamsi, H., Meshkini, S., Delshad, R. and Ghasemi Moghanjoei, A., 2012. Dietary administration of vitamin C and *Lactobacillus rhamnosus* in combination enhanced the growth and innate immune response of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 21(3): 13-22. doi: 10.22092/ISFJ.2017.110067
- Vazquez, J. A., González, M., and Murado, M. A., 2005. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. *Aquaculture*, 4: 149-161.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P. and Verstraete, W., 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and molecular biology reviews*, 64: 655-671.
- VidyaLaxme, B., Rovetto, A., Grau, R. and Agrawal, R., 2014. Synergistic effects of probiotic *Leuconostoc mesenteroides* and *Bacillus subtilis* in malted ragi (*Eleusine corocana*) food for antagonistic activity against *V. cholerae* and other beneficial properties. *Journal of food science and technology*, 51: 3072-3082. doi: 10.1007/s13197-012-0834-5.

- Vine, N.G., Leukes, W.D. and Kaiser, H., 2006.** Probiotics in marine larviculture. FEMS microbiology reviews, 30(3): 404-427. doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00017.
- Wang, Y. B., 2007.** Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. Aquaculture, 1: 259-264.
- Weston, D. P., 1996.** Environmental considerations in the use of antibacterial drugs in aquaculture, pp.140-165.
- Yahav, D., Franceschini, E., Koppel, F., Turjeman, A., Babich, T., Bitterman, R., Neuberger, A., Ghanem-Zoubi, N., Santoro, A., Eliakim-Raz, N. and Pertzov, B., 2019.** Seven versus 14 days of antibiotic therapy for uncomplicated gram-negative bacteremia: a noninferiority randomized controlled trial. Clinical Infectious Diseases, 69(7): 1091-1098.050. doi: 10.1093/cid/ciy1054.
- Yanbo, W. and Zirong, X., 2006.** Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. Animal feed science and technology, 127(3-4):283-292.

The Effectiveness of *Micrococcus luteus* on Digestibility Coefficient, Growth Parameters, Survival, and Bacterial Load in Water and the Digestive Tract of Common Carp (*Cyprinus carpio*) Fry

Mehran Avakh Keysami^{1*}

Alireza Akbari¹

Hamid Abdullah Pour Beria²

Maryam Avakh Keasami³

1. Department of Fisheries and Aquatics, Mirzakocheh Khan Fisheries Sciences and Industries Training Unit, Agricultural Research, Education and Extension Organization Rasht, Iran.

2. Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries, Islamic Azad University, Talash branch.

3. Research Department of Experimental Sciences Education, General Directorate of Education, Gilan Province, Bint Al-Hoda Sadr Educational Campus, Rasht, Iran.

*Corresponding author:

dr.keysami@gmail.com

Received date: May/01/2025

Reception date: June/21/2025

Abstract

This study investigated the effect of *Micrococcus luteus* on growth performance, digestibility, and bacterial load in the digestive tract of common carp (*Cyprinus carpio*) fry. The research was conducted from May to August 2023 at the Mirza Kuchak Khan Fisheries Science and Industry Training Center and the Shahid Ansari Guilan Bonefish Propagation and Restoration Center. In this experiment, *M. luteus*, isolated from the digestive tract of common carp, was incorporated into commercial pellet feed for 300 common carp fry (28.018 ± 2.87 g) over an 8-week period. The study followed a completely randomized design with 5 treatments and 3 replicates (20 fish per tank). Five dietary treatments were prepared by mixing fish feed with *M. luteus* suspensions at different concentrations: 10^4 , 10^5 , 10^6 , and 10^7 cells per gram of feed, designated as treatments T1, T2, T3, and T4, respectively, along with a control group without bacteria. After 56 days of feeding with different levels of *M. luteus* in the diet, common carp fry showed a significant increase in percentage weight gain, specific growth rate, protein digestibility, and fat digestibility compared to the control group ($P < 0.05$). For the feed conversion ratio, significant differences were observed in treatments T1, T2, and T3 compared to the control group ($P < 0.05$), while treatment T4 did not show a significant difference from the control ($P > 0.05$). Based on the results, the best performance in growth indices was observed in the treatments fed with 10^6 cells of *M. luteus* per gram of feed. Increasing *M. luteus* concentration in the diet beyond 10^6 cells did not result in a statistically significant difference in growth factors compared to the control group ($P > 0.05$). Significant differences were also observed in the numbers of Gram-positive and Gram-negative bacteria in the digestive tract and tank water compared to the control group ($P < 0.05$).

Keywords: Common carp, *M. luteus*, growth indices, digestibility, bacterial load.