تأثیر نیترات سدیم و فسفات پتاسیم در تحریک زیستی تولید پروبیوتیک بومی *Bacillus subtilis* در دستگاه گوارش بچه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

مهران آوخ کیسمی [1*]
مریم اصغری [1]
مریم آوخ کیسمی [2]
مهرداد ملکی [1]
محسن پوراسدی [1]

۱. گروه شیلات و آبزیان، واحد علوم و صنایع شیلاتی میرزاکوچک خان گیلان، سازمان تحقیقات ، آموزش و ترویج کشاورزی.
۲. بخش تحقیقات گروه آموزشی علوم تجربی، اداره کل آموزش‌وپرورش استان گیلان، پردیس آموزشی بنت‌الهدی صدر، رشت، ایران.

* **نویسنده مسئول مکاتبات**
dr.keysami@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۱/۲۷
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۴/۰۸

چکیده

یکی از باکتری‌های پروبیوتیک *Bacillus subtilis* است. قابلیت زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در صورت مصرف، در مرحله انتقال از طریق دستگاه گوارش میزبان و در مراحل ساخت پروبیوتیک در کارخانه و انبارداری آن پایین می‌آید و این‌یک محدودیت در استفاده از پروبیوتیک در آبزی‌پروری می‌باشد. بنابراین، این تحقیق به‌منظور تحریک تولید باکتری *B.Subtilis* بومی در دستگاه گوارش بچه ماهی کپور معمولی و اثربخشی آن روی درصد بقاء و رشد بچه ماهی اجرا گردید. تحریک تولید *B.Subtilis* با تغییر میزان منابع نیتروژن، فسفات و کربن، از منابع نیترات سدیم ، فسفات پتاسیم و ملاس چغندرقند هرکدام به‌ترتیب در سه سطح ۰/۷۵، ۱/۵ و ۳ گرم در لیتر $NaNO_3$ و میزان ۰/۰۲ ، ۰/۰۴ و ۰/۰۸ گرم در لیتر K_2HPO_4 در محلول آبی شبیه‌سازی‌شده معده ماهی حاوی ۵ درصد ملاس انجام شد. نتایج نشان داد بهترین ترکیب برای تولید این باکتری با داشتن ۳ گرم نیترات و ۰/۰۲ گرم فسفات در محلول شبیه‌سازی‌شده معده ماهی حاوی ۵ درصد ملاس چغندر بود. با این ترکیب پری‌بیوتیک بیشترین میزان تولید باکتری *B.Subtilis* حاصل گردید. همچنین با اضافه نمودن ۱ درصد از این ترکیب پری‌بیوتیک به غذای پلت بچه ماهیان کپور، اختلاف معنی‌دار آماری در رشد بچه ماهیان تیمار نسبت به بچه ماهیان شاهد مشاهده گردید ($P<0/05$). بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری نمود که ترکیب به‌دست‌آمده در این تحقیق می‌تواند به‌عنوان یک پری‌بیوتیک در تحریک زیستی تولید *B.Subtilis* در دستگاه گوارش بچه ماهیان کپور معمولی به کار برود.

واژگان کلیدی: تحریک زیستی، *B.Subtilis*، بچه ماهی کپور معمولی، پری‌بیوتیک

مقدمه

در سال‌های اخیر آبزی‌پروری از سریع الرشدترین بخش‌های تولید مواد غذایی بوده و از چندین دهه گذشته به‌سرعت یک سیستم پویا و روبه‌رشد تبدیل‌شده است. ولی در کنار این رشد قابل‌توجه همواره با مشکلاتی روبه‌رو بوده است. ازجمله آن می‌توان به تغییرات کیفیت آب، شیوع بیماری‌ها و مشکلات تغذیه‌ای اشاره کرد به‌گونه‌ای که شیوع بیماری به‌عنوان مشکل عمده آبزی‌پروری، توسعه اقتصادی این بخش را در بسیاری از کشورها تحت‌تأثیر قرار داده است. همواره راه‌حل‌هایی نیز برای برطرف کردن این مشکلات ارائه‌شده است که موفقیت چندانی نداشته‌اند. تحقیقات نشان داده که برخی آنتی‌بیوتیک‌ها باعث تضعیف سیستم ایمنی آبزیان می‌شوند و آن‌ها را در برابر بیماری‌های ویروسی، انگلی ضربه‌پذیرتر می‌سازند. این موارد باعث وضع قوانین در راستای استفاده کمتر از آنتی‌بیوتیک شده‌است. این سیاست‌ها بر صنعت آبزی‌پروری تأثیر گذاشته و توجه به ایجاد راهبردهای جایگزین کنترل بیماری‌ها را بیشتر نموده‌است. استفاده از فناوری‌های نوین در افزایش بهره‌وری و کاهش هزینه تولید ازجمله موارد مهم در آبزی‌پروری پایدار است (Olsen *et al.*, 2001).

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2026-08-27]

بیشترین تلاش در آبزی‌پروری پایدار در ارتباط با استراتژی‌های تغذیه و بهینه‌سازی ترکیبات غذایی برای گونه‌های مهم ماهیان تجاری قابل پرورش می‌باشد. این راهکارهای جایگزین استفاده از آنتی‌بیوتیک در جهت افزایش کارایی ترکیبات مغذی نظیر پروتئین، چربی و افزایش قابلیت هضم آن‌ها می‌باشد. پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که در صورت مصرف در مقادیر توصیه‌شده اثرات مفیدی بر قابلیت هضم غذا و سلامت میزبان ایجاد می‌کنند(Hill *et al.,* 2014). یکی از ویژگی‌های ضروری یک پروبیوتیک، رسیدن زنده و فعال به دستگاه گوارش است (Binda *et al.,* 2020). پروبیوتیک معمولی شامل باکتری‌های اسیدلاکتیک ، مانند سویه‌های خاص متعلق به جنس‌های *Lactobacillus*، *Streptococcus* و *Bifidobacterium* می‌باشند (Lemme-Dumit *et al.,* 2018). خواص مفید باکتری‌های اسیدلاکتیک بر روی انسان دارای برخی محدودیت‌های مربوط به پایداری باکتری‌های اسیدلاکتیک و حساسیت به عوامل استرس‌زای محیطی (مانند تغییرات دما، کم‌آبی، و محیط متخاصم روده است (Duary *et al.,* 2011*; Botta et al.,* 2014*;* Gomathi *et al.,* 2014).

سایر انواع باکتری‌های پروبیوتیک که با موفقیت بر این نگرانی‌ها غلبه می‌کنند، توسط باکتری‌های تشکیل‌دهنده اسپور از جنس باسیلوس (*B.coagulans, B.Subtilis* و *B.licheniformis*) گزارش گردیده‌اند (Piewngam Sanders, 2003; Hanifi *et al.,* 2015 *et al*., 2018;). این باسیل‌های پروبیوتیک دارای توانایی تشکیل هاگ‌های مقاوم هستند که از آن‌ها در برابر شرایط محیطی خصمانه محافظت می‌کند و قابلیت حیات خود را به‌عنوان پروبیوتیک حفظ می‌کند (Binda *et al*., 2020). گزارش‌های متعددی سازگاری بین باکتری‌های اسیدلاکتیک و باسیل‌ها را با تمرکز بر باکتری‌های اسیدلاکتیک نشان داده‌اند (Yahav *et al.,* 2019).

پس از معرفی پروبیوتیک و مشخص شدن وجود باکتری‌های مفید در دستگاه گوارش، تحقیقات بسیاری در این زمینه انجام‌شده و هم‌اکنون نیز این روند ادامه دارد. اما باوجود مشکلات و تردیدهایی در خصوص غیرقابل تضمین بودن زنده ماندن پروبیوتیک‌ها در دستگاه گوارش و توانایی عمل در شرایط حاکم بر آن و کاهش بقا سویه‌های پروبیوتیکی در طی مراحل عمل‌آوری، ساخت جیره‌های غذایی و ذخیره‌سازی آن‌ها از محدودیت‌های استفاده از پروبیوتیک‌ها در آبزی‌پروری می‌باشد. هم‌چنین امکان رقابت پروبیوتیک معرفی‌شده با برخی میکرو فلور روده و توانایی تثبیت و تشکیل کلنی در دستگاه گوارش موجب شد تا محققین به فکر ارائه راهکاری جدید در این راستا برآیند (Sanders, 2003). بعدها تحقیقات انجام‌شده روی جانوران نشان داد که بین عملکرد روده و سلامتی جانوران ارتباط نزدیکی وجود دارد. انجام تمامی موارد فوق منجر به ارائه ایده جدیدی به نام پری‌بیوتیک گردید. پری‌بیوتیک عناصر غذایی (عمدتاً کربوهیدرات) غیرقابل‌هضمی هستند که از طریق تحریک رشد یا فعال کردن یک یا تعداد محدودی از گونه‌های باکتریایی که در روده وجود دارند اثرات سودمندی بر میزبان داشته و سلامتی آن را بهبود می‌بخشد. پروبیوتیک‌ها کربوهیدرات‌هایی هستند که می‌توان آن‌ها را بر اساس اندازه مولکولی یا درجه پلیمیرزاسیون دسته‌بندی نمود (Roberfroid, 2007). بر اساس ویژگی‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی کربوهیدرات‌ها می‌توان آن‌ها را به انواع قابل‌هضم و غیرقابل‌هضم دسته‌بندی کرد. مفهوم الگیوساکارید های غیرقابل‌هضم از این ناشی می‌شود که پیوند گلیکوزی آن‌ها در مقابل آنزیم‌های هضم‌کننده جانوری غیرقابل‌هضم می‌شوند (Babbar *et al.,* 2016). ملاس به‌عنوان منبع ترکیبات غیرقابل‌هضم و باقابلیت تخمیر می‌باشد که می‌تواند باعث رشد و تکثیر باکتری‌های مفید شود. ارزش غذایی ملاس نیشکر از نظر تغذیه‌ای قابل‌توجه است. ملاس نیشکر سطوح کالری، مواد معدنی ضروری، پتاسیم، کلسیم، منیزیم، گوگرد، کلرید، آهن و ویتامین بیوتین دارد (Leo, 1983). سطح پایین پروتئین و سطح بسیار کم فسفر، فیبر، ویتامین‌های محلول در چربی، و مواد معدنی کمیاب آن را مناسب برای رشد و تکثیر باکتری‌های مفید نموده‌است کربوهیدرات قابل‌هضم (ازجمله قندها)، عوامل اصلی انرژی قابل‌هضم برای باکتری‌ها در ملاس هستند (Primera-Campos *et al.,* 2020). قندها (گلوکز، فروکتوز و ساکارز) منبع اصلی کربوهیدراتی باکتری‌ها می‌باشد از طرف دیگر، منبع کربوهیدرات مصرفی در غذای ماهی با توجه به نوع پلی‌ساکارید آن آثار متفاوتی بر کارکرد دستگاه گوارش و به‌دنبال آن بر رشد گونه دارد (Aderolu *et al.,* 2013).

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2026-08-27]

الیگوساکاریدها نوعی کربوهیدرات هستند که از چندین منوساکارید یا قند ساده که به‌کمک یک زنجیره طولانی به یکدیگر متصل شده‌اند؛ تشکیل‌شده است. این کربوهیدرات‌ها به‌عنوان پری‌بیوتیک در بدن عمل می‌کنند و توسط باکتری‌های مفید موجود در روده تخمیر شده و موجب بهبود وضعیت میکروبیوم روده می‌شوند. الیگوفروکتوز، گالاکتوالیگوساکاریدها، مالتوتریوز و لاکتوز ازجمله فراوان‌ترین الیگوساکارید موجود در طبیعت هستند. بهبود عملکرد سیستم ایمنی، کاهش سطح کلسترول و تری‌گلیسیرید، افزایش سلامت سیستم هضم، بهبود کنترل قند خون و بهبود روند کاهش وزن همگی ازجمله مهم‌ترین خواص الیگوساکاریدها محسوب می‌شوند (Valdés *et al.,* 2013).

الگیوساکارید های غیرقابل‌هضم شامل مخلوطی از الیگومرهایی با طول زنجیره متفاوت بوده و بر اساس درجه پلیمریزاسیون مشخص می‌شود. این کربوهیدرات‌ها عموماً از ۲ تا ۲۰ واحد منوساکارید تشکیل‌شده‌اند که به هیدرولیز آنزیم‌های هضم‌کننده مقاوم بوده ولی مورد مصرف باکتری‌ها در روده قرار می‌گیرند (Vogt *et al.,* 2015).

تخمیر این مواد، باعث تولید اسیدهای چرب زنجیره کوتاه و گاز شده و باعث افزایش انرژی متابولیکی و رشد و تکثیر این باکتری می‌گردد. به‌طورکلی پروبیوتیک باعث بهبود تعادل میکرو فلور روده و افزایش مکانیسم دفاعی میزبان می‌شوند(Valdés *et al.,* 2013). ازجمله تأثیرات پری‌بیوتیکی که می‌توان در مورد ماهی بیان نمود تأثیر الیگوفروکتوز اینولین روی لارو کفشک و تاس ماهی سیبری اشاره کرد (Mahious *et al*., 2006). اما به‌طورکلی پری‌بیوتیک‌ها ترکیباتی غیرقابل‌هضم یا با هضم پذیری کم هستند که در برابر آنزیم‌های گوارشی در روده بزرگ به‌صورت انتخابی تکثیر و یا فعالیت جمعیت خاصی از باکتری‌ها را تحریک می‌کنند (Keysami *et al.,* 2012). پری‌بیوتیک‌ها رشد پروبیوتیک‌ها را در دستگاه گوارشی تقویت می‌کنند و در معده و روده کوچک هضم و جذب نمی‌شوند و به‌عنوان غذا باعث رشد پرو بیوتیک در روده بزرگ می‌شوند. پری‌بیوتیک‌ها باید رشد و بقای پروبیوتیک‌ها را با تأثیر بر رشد و متابولیسم پروبیوتیک و استارترها تحت‌تأثیر قرار دهند. پری‌بیوتیک‌ها کربوهیدرات‌های غیرقابل‌هضم شامل لاکتوز، اینولین و دسته‌ای از الیگوساکاریدهایی هستند که منبع قابل تخمیر از کربوهیدرات‌ها را برای باکتری‌های مفید در روده بزرگ ذخیره می‌کنند (Roberfroid, 2007). پری‌بیوتیک‌ها در عبور از روده کوچک کاملاً هضم نمی‌شوند و به‌عنوان کربوهیدرات‌های قابل تخمیر باکتری‌های روده‌ای به روده بزرگ می‌رسند. این تحقیق به‌منظور تحریک تولید باکتری *B.Subtilis* بومی در دستگاه گوارش بچه ماهی کپور معمولی و اثربخشی آن روی درصد بقاء و رشد آن به‌مدت ۴ ماه از اردیبهشت تا مرداد سال ۱۴۰۰ در مرکز آموزش عالی میرزا کوچک خان گیلان انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

برای انجام این پروژه ابتدا جدایه‌های باکتری *B.Subtilis* که از مرکز آموزش میرزا کوچک خان هدیه گردیده بود در محیط کشت نوترینت آگار و نوترینت براث کشت گردید (Tookmehchi *et al.,* 2012). برای تهیه کشت خالص با بررسی پلیت‌های کشت داده‌شده در زیر هود لامینار کلنی‌های پدیدار شده به‌وسیله لوپ استریل برداشته شده و در پلیت‌های دیگری به‌روش چهار نقطه‌ای کشت گردید، سپس نمونه‌های رشد داده‌شده به‌روش شیمیایی و مولکولی مورد شناسایی قرار گرفتند. شناسایی باکتری جداسازی شده با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی تا حد جنس و برای شناسایی گونه *B.subtilis* از کیت و نرم‌افزار Biolog, Microlog, USA استفاده گردید.

باهدف افزایش تعداد سلول باکتری *B.Subtilis* میزان منابع نیتروژن ($NaNO_3$) و فسفات (K_2HPO_4) در محلول شبیه‌سازی‌شده شرایط فیزیکوشیمیایی معده ماهی حاوی ۵ درصد ملاس چغندرقند تغییر داده شد. جهت تهیه شیره معده ابتدا محلول الکترولیت حاوی ۲۳/۶ گرم در لیتر کلرور سدیم، ۲/۲۹ گرم در لیتر کلرور پتاسیم، ۰/۲۲۹ گرم در لیتر کلرور کلسیم و ۱/۲ گرم در لیتر بیکربنات سدیم به‌شکل استریل تهیه و pH آن به‌وسیله اسید کلریدریک نرمال تا ۲±۰/۲ کاهش داده شد. در حین انجام آزمایش، آنزیم پپسین تا غلظت نهایی ۰/۳ درصد به آن افزوده گردید (Zhang *et al.,* 2016). میزان $NaNO_3$ و K_2HPO_4 موردنیاز برای کشت آزمایشگاهی این باکتری‌ها به‌طورمعمول به‌ترتیب ۱/۵ و ۰/۰۴ گرم در لیتر بود. برای بررسی اثرات دو عامل بر میزان تولید این باکتری مقدار این ترکیبات نصف و دو برابر گردید و تأثیر این مقادیر بر تولید سلول باکتری‌ها به‌صورت طرح فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا گردید.

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2026-08-27]

بدین‌منظور این باکتری در محلول شبیه‌سازی‌شده معده ماهی حاوی ۵ درصد ملاس چغندرقند استریل با مقادیر ۰/۷۵ ، ۱/۵ و ۳ گرم $NaNO_3$ و مقادیر ۰/۰۲ و ۰/۰۴ و ۰/۰۸ گرم فسفات در شرایط دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد کشت گردیدند. در ۱۸ ارلن ۱۰۰۰ سی‌سی، محیط کشت داخل ارلن ها بعد از حل شدن کامل این مواد، اتوکلاو گردید تا محیط کشت آماده‌شده استریل گردد. سپس باکتری *B.subtilis* در مرحله رشد لگاریتمی به ارلن های حاوی محیط کشت استریل منتقل نموده و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با چرخش ۱۰۰ دور در دقیقه در شیکر انکوباتور، رشد داده شد. جهت افزایش سرعت رشد و ممانعت از ورود زودهنگام آن به مرحله مرگ، هوادهی به‌وسیله پمپ هوای با فیلتر ۰/۲ میکرون انجام گردید. بعد از ۲۴ تا ۴۸ ساعت از رشد، باکتری *B.subtilis* مورد شمارش و شناسایی قرار گرفت. درنهایت تأثیر بهترین ترکیب به‌دست‌آمده بر روی افزایش تراکم نمونه *B.subtilis* در شرایط آزمایشگاهی اندازه‌گیری گردید.

جدول ۱: طرح آزمایش و غلظت‌های مصرفی کودهای فسفات و نیترات در تیمارها در محلول شبیه‌سازی‌شده شرایط فیزیکوشیمیایی معده ماهی حاوی ۵ درصد ملاس چغندرقند (g / L)

$NaNO_3$ (گرم)	K_2HPO_4 (گرم) ۰/۰۲	۰/۰۴	۰/۰۸
۰/۷۵	۰/۷۵+۰/۰۲	۰/۷۵+۰/۰۴	۰/۷۵+۰/۰۸
۱/۵۰	۱/۵۰+۰/۰۲	۱/۵۰+۰/۰۴	۱/۵۰+۰/۰۸
۳/۰۰	۳/۰۰+۰/۰۲	۳/۰۰+۰/۰۴	۳/۰۰+۰/۰۸

سپس به‌منظور بررسی تأثیر این ترکیب شیمیایی در تراکم و تنوع فلور باکتریایی دستگاه گوارش بچه ماهی کپور معمولی و بررسی تأثیر ترکیب به‌دست‌آمده روی درصد بقا و رشد بچه ماهی کپور معمولی بعد از مصرف غذای حاوی این ترکیب پروبیوتیکی در شرایط کارگاهی بهترین ترکیب به‌دست‌آمده به غذای تجاری بچه ماهی کپور معمولی (آتا، تبریز) اضافه گردید.

بعد از تعیین شدن میزان اپتیموم نیترات و فسفات برای تولید *B.subtilis* با ریختن ۳ گرم نیترات و ۰/۰۲ گرم فسفات در محلول ۵ درصد ملاس چغندرقند، اثربخشی پروبیوتیک *B.subtilis* به دست‌آمده در افزایش رشد و درصد بقا بچه ماهی کپور معمولی با ۲ گروه تیمار و شاهد با سه تکرار به‌صورت طرح کاملاً تصادفی در ۶ مخزن آکواریوم ۶۰ لیتری به‌مدت ۴ هفته بررسی گردید. تعداد ۱۸۰ قطعه بچه ماهی کپور معمولی با میانگین وزن اولیه ۹۸۷ میلی‌گرم و میانگین طول اولیه ۳/۹ سانتی‌متر با تراکم ۵ عدد در لیتر (۳۰ عدد در هر آکواریوم) در ۶ آکواریوم ذخیره‌سازی گردید.

جیره آزمایش با اضافه نمودن ترکیب کود انتخاب‌شده تیمار ۱ (۳ گرم نیترات و ۰/۰۲ گرم فسفات در محلول ۵ درصد ملاس چغندرقند) به غذای پلت تجاری بچه ماهی کپور معمولی، به‌روش مخلوط نمودن غذای پلت بچه ماهی کپور معمولی با ترکیب کود انتخاب‌شده تیمار ۱ (۳ گرم نیترات و ۰/۰۲ گرم فسفات در محلول ۵ درصد ملاس چغندرقند) و سپس خشک‌کردن در آون با درجه‌حرارت ۵۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ ساعت آماده گردید (Keysami *et al.*, 2012). سپس جیره آماده‌شده در بسته‌های ۷ گرمی در کیسه‌های پلاستیکی بسته‌بندی گردیده و در یخچال نگه‌داری گردید. غذای جیره شاهد نیز با مخلوط کردن غذای تجاری در آب‌مقطر خالص و خشک‌کردن آماده گردید.

غذادهی بر اساس ۱۰ درصد از وزن بدن بچه ماهی‌ها در نظر گرفته شد. غذا دو بار در روز در ساعت ۸ صبح و ۲ بعدازظهر به بچه ماهی‌ها داده شد. بستر آکواریوم‌ها در هفته یک‌بار تمیز شده و هم‌زمان ۱۰۰–۵۰ درصد آب آکواریوم تعویض گردید و در خلال آزمایش، آکواریوم‌ها با پمپ آکواریومی به‌طور یکسان هوادهی گردیدند. کیفیت آب به‌طور روزانه اندازه‌گیری شد. درجه‌حرارت و pH به‌وسیله 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 آمونیاک سنج هانا، (HI ۹۳۷۱۵, Taiwan) اندازه‌گیری گردید.

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2026-08-27]

هر ۱۰ روز ۱ بار وزن و طول ۱۰ بچه ماهی از هر آکواریوم نمونه‌برداری گردیده و تلفات آکواریوم‌ها به‌طور روزانه برآورد گردید. پس از اتمام دوره پرورش ماهیان موجود در هر تیمار شمارش و با استفاده از فرمول زیر درصد بازماندگی و پارامترهای رشد بچه ماهی‌ها در هر یک از تیمارها و تکرارها محاسبه شد (Felix and Sudharsan, 2004).

افزایش وزن به گرم = وزن نهایی به گرم – وزن آغازی به گرم

درصدافزایش وزن (درصد) = ((وزن نهایی(گرم) – وزن اولیه) (گرم) \ وزن اولیه) (گرم) × ۱۰۰

ضریب رشد ویژه (درصد) = ((لگاریتم نپری وزن نهایی – لگاریتم نپری وزن اولیه) \مدت زمان پرورش) × ۱۰۰

درصد بازماندگی (درصد) = (تعداد ماهیان در انتهای دوره پرورش \ تعداد ماهیان در ابتدای دوره پرورش) × ۱۰۰

به‌منظور بررسی تغییرات در تشکیل کلنی باکتریایی در انتهای دوره نمونه‌برداری انجام شد. برای انجام این آزمایش، ابتدا دو روز قبل از نمونه‌برداری تغذیه ماهیان قطع‌شده و در ادامه از هر تکرار ۳ عدد ماهی به‌طور تصادفی گرفته شد. از هرکدام 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 غلظت و سپس در نوترینت آگار TSA پخش گردید. بعد از ۲۴ تا ۴۸ ساعت از پرورش کشت باکتریایی در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد پر گنه‌های رشد یافته شمارش و ثبت گردیدند (Hosseinifar *et al.,* 2011). شمارش توسط دستگاه کلنی کانتر و شناسایی مجدد باکتری جداسازی شده به‌روش‌های شیمیایی و مولکولی انجام گرفت (Keysami and Mohammadpour, 2013). به‌منظور 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 آنالیز واریانس دوطرفه برای تیمارهای تحریک زیستی (Two way ANOVA) و آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (one way ANOVA) وجود یا عدم وجود اختلاف بین تیمارهای متغیرهای رشد و شمارش باکتری‌ها در شرایط کارگاهی موردبررسی قرار گرفت (Irianto and Austin, 2002). معنی‌دار بودن در سطح (P <۰/۰۵) قابل‌قبول درنظرگرفته شد. تجزیه‌وتحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS شماره ۲۲ انجام شد (SPSS, Inc., USA).

نتایج

نتایج شمارش باکتری در گروه‌های تیمار و شاهد در شرایط آزمایشگاهی در جدول ۲ بیان گردیده‌است. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده در جدول ۲ مشخص گردید که در بهینه‌سازی منبع نیتروژن و فسفات برای تحریک زیستی *B.subtilis* شرایط ترکیب کودهای شیمیایی تیمار ۱ با داشتن ۳ گرم نیترات و ۰/۰۲ گرم فسفات برای افزایش رشد این باکتری، به‌صورت معنی‌داری از بقیه متفاوت بود (P <۰/۰۵). بنابراین تیمار ۱ با ۳ گرم نیترات و ۰/۰۲ گرم فسفات در محلول ۵ درصد ملاس چغندرقند برای اضافه نمودن به غذای بچه ماهی‌ها در مرحله بررسی متغیرهای رشد آن‌ها انتخاب گردید.

جدول ۲: میانگین شمارش تعداد پرگنه باکتری *B. Subtilis* در تیمارهای آزمایشی ساخته‌شده با ترکیب‌های متفاوت نیترات و فسفات در محلول شبیه‌سازی‌شده شرایط فیزیکوشیمیایی معده ماهی حاوی ۵ درصد ملاس چغندرقند در شرایط آزمایشگاهی (میانگین± انحراف‌معیار)

		$NaNO_3$ (گرم)		
		۰/۷۵ گرم	۱/۵ گرم	۳ گرم
K_2HPO_4 (گرم)	۰/۰۲	۲۵۷ ±۲^{a}	۲۳۷ ±۶^{a}	۳۰۰ ±۳^{b}
	۰/۰۴	۳۲±۲^{a}	۳۸±۳^{a}	۳۶±۶^{a}
	۰/۰۸	۲۹±۲^{a}	۲۲±۲^{a}	۲۹ ±۲^{a}

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

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2026-08-27]

در آنالیز آماری نتایج به‌دست‌آمده از بررسی متغیرهای فیزیکو شیمیایی آب بین تیمارها و تکرارها اختلاف معنی‌دار نبود (P >۰ / ۰ ۵). متغیرهای فیزیکوشیمیایی درجه‌حرارت (c°)، اکسیژن محلول (میلی‌گرم در لیتر)، pH و آمونیاک به‌ترتیب در محدوده ۳۰-۲۶ درجه سانتی‌گراد، ۸/۷- ۷/۳ میلی‌گرم در لیتر و ۰/۰۱۳- ۰/۰۱۱ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمد (جدول ۳).

جدول ۳: ویژگی‌های فیزیکو شیمیایی آب مخازن پرورش بچه ماهی کپور معمولی با استفاده از جیره تیمار و شاهد. داده‌ها میانگین ۳ تکرار در هر تیمار می‌باشند (میانگین± انحراف‌معیار)

متغیر	زمان	شاهد	تیمار
دما	صبح	۲۶/۵۷±۰/۲۵[a]	۲۶/۸۷±۰/۲۵[a]
(°C)	عصر	۲۹/۶۷±۰/۳۲[a]	۳۰/۸±۰/۳۵[a]
اکسیژن محلول	صبح	۵/۷±۰/۲۹[a]	۵/۷±۰/۳۶[a]
(mg/l)	عصر	۷/۱±۰/۰۶[a]	۶/۹±۰/۴[a]
pH	صبح	۷/۲±۰/۱[a]	۷/۲۲±۰/۳۱[a]
	عصر	۸/۰۷±۰/۰۶[a]	۸±۰/۳۸[a]
آمونیاک	صبح	۰/۰۱۲±۰/۰۰۴[a]	۰/۰۱۲±۰/۰۰۴[a]
(mg/l)	عصر	۰/۰۱±۰/۰۰۵	۰/۰۱۳±۰/۰۰۵

حروف غیر همسان لاتین در هر ردیف نشانه اختلاف معنی‌دار است (P >۰ / ۰ ۵).

نتایج بررسی متغیرهای رشد و درصد بقاء بچه ماهی کپور معمولی تحت تغذیه با تیمار حاوی ۳ گرم نیترات و ۰/۰۲ گرم فسفات در محلول ۵ درصد ملاس و شاهد حاوی محلول ۵ درصد ملاس بدون ترکیب کودشیمیایی در مدت ۴ هفته پرورش در جدول ۴ تلخیص گردیده‌است. تیمار حاوی ۳ گرم نیترات و ۰/۰۲ گرم فسفات در محلول ۵ درصد ملاس، اختلاف معنی‌دار آماری در افزایش رشد و درصد بقاء بچه ماهی‌ها نسبت به شاهد نشان داد (P <۰/۰۵).

جدول ۴: نتایج بررسی متغیرهای رشد و درصد بقاء بچه ماهی کپور معمولی تحت تغذیه با تیمار حاوی ۳ گرم نیترات و ۰/۰۲ گرم فسفات در محلول ۵ درصد ملاس و شاهد حاوی محلول ۵ درصد ملاس بدون ترکیب کودشیمیایی در مدت ۴ هفته پرورش. داده‌ها میانگین ۳ تکرار در هر تیمار است (میانگین± انحراف‌معیار)

شاخص رشد	شاهد	تیمار
میانگین وزن اولیه (mg)	۱/۳±۰۸۳/۹۳[a]	۱/۰±۰۹۸/۸۵[a]
میانگین وزن نهایی(mg)	۲/۲±۲۹۴/۹۱[a]	±۰۴۸/۳/۶۹[b]
میانگین افزایش وزن بدن(mg)	۱/۷±۲۱۱/۳۳[a]	۱/۴±۹۵/۴۵[b]
درصد افزایش وزن(%)	۱۱۱/۸±۸۹۱/۴۲[a]	۱۷۷/۴±۵۹/۷۳[b]
ضریب رشد ویژه SGR	۰/۰±۷۹/۰۴۷[a]	۰/۰±۹۳/۰۱۷[b]
درصد بقاء(%)	۹۳/۰±۳/۹۷[a]	۹۷/۱±۵/۱۹[b]

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

جدول ۵: لگاریتم تعداد باکتری‌های کل، باسیلوس و باکتری‌های گرم منفی شمارش‌شده از دستگاه گوارش بچه ماهی تغذیه‌شده با جیره تیمار حاوی ۳ گرم نیترات و ۰/۰۲ گرم فسفات در محلول ۵ درصد ملاس و شاهد حاوی محلول ۵ درصد ملاس بدون ترکیب کودشیمیایی در مدت ۸ روز پرورش. داده‌های میانگین ۳ تکرار در هر تیمار است (میانگین± انحراف‌معیار)

شاخص	زمان (روز)	شاهد	تیمار
لگاریتم شمارش باکتری‌های کل (CFU/g)	۰	۲/۶	۲/۶
	۲	۳/۹	۵/۷
	۴	۴/۷	۵/۹
	۶	۵/۳	۶/۳
	۸	۷/۸[a]	۷/۸[a]
لگاریتم باسیلوس شمارش‌شده	۰	۱	۱

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2026-08-27]

(CFU/g)	۲	۱	۲/۸
	۴	۱	۴/۶
	۶	۱	۶/۱
	۸	۱[b]	۷/۴[a]
لگاریتم باکتری‌های گرم منفی شمارش‌شده (CFU/g)	۰	۲/۶	۲/۶
	۲	۳/۴	۲/۰۱
	۴	۴/۳	۲/۰۲
	۶	۴/۹	۲/۰۳
	۸	۵/۹[b]	۲/۰۳[a]

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

میانگین کل باکتری‌های دستگاه گوارش بچه ماهی‌ها ($۲/۶\times۱۰^{۷}$ ± ۶/۳) سلول در میلی‌لیتر به‌دست آمد. تراکم باسیلوس در مخازن تیمار به ($۲/۰۲\times۱۰^{۷}$ ± ۲/۵) افزایش پیدا کرد. تراکم باسیلوس در گروه شاهد افزایش نداشت. تراکم باکتری‌های گرم منفی در گروه‌های تیمار درخلال ۲۸ روز غذادهی به ($۱/۱\pm۰/۳۳\times۱۰^{۲}$) سلول در میلی‌لیتر پیدا کرد ولی میانگین تراکم باکتری‌های گرم منفی در مخازن شاهد ($۱/۰۲\times۱۰^{۵}$ ±۴) سلول در میلی‌لیتر افزایش پیدا کرد.

بحث و نتیجه‌گیری

در استفاده از کودهای شیمیایی به منظور بهینه‌سازی منبع نیتروژن و فسفات محیط کشت باکتری *B.subtilis* بهترین شرایط برای افزایش میزان رشد این باکتری در تیمار حاوی ۳ گرم نیترات و ۰/۰۲ گرم فسفات در محلول شبیه‌سازی‌شده شرایط فیزیکوشیمیایی معده ماهی حاوی ۵ درصد ملاس چغندرقند به‌دست آمد. نتایج به‌دست‌آمده از بهینه‌سازی محیط کشت باسیلوس سابتیلس نشان داد که با کاهش میزان فسفات و افزایش میزان نیترات میزان تکثیر این باکتری افزایش می‌یابد. نتایج ۲۸ روز غذادهی با غذای حاوی ترکیب کودشیمیایی نیترات و پتاس نیز اختلاف معنی‌دار آماری را در افزایش وزن تیمار و شاهد نشان داد. علاوه بر این نتایج شمارش باکتری‌ها در دستگاه گوارش بچه ماهیان اختلاف معنی‌دار این باکتری را در تیمار و شاهد نشان داد (P <۰/۰۵). خاصیت پروبیوتیکی باکتری *B.subtilis* از اختلاف معنی‌دار به‌دست‌آمده در افزایش وزن تیمار نسبت به شاهد به اثبات رسید و اختلاف معنی‌دار شمارش باکتریایی دستگاه گوارش بچه ماهی و آب محیط پرورش تیمار و شاهد ارتباط آن را با افزایش *B.subtilis* یعنی خاصیت پری‌بیوتیکی ترکیب ساخته‌شده به اثبات می‌رساند. افزایش تراکم باکتری *B.subtilis* در دستگاه گوارش بچه ماهیان در این تحقیق می‌تواند نشان‌دهنده تجمع و جایگزینی باکتری *B.subtilis* در دستگاه گوارش بچه ماهیان باشد و باکتری‌هایی که بتوانند در دستگاه گوارش غالب شده و تجمع یابند شاید گزینه خوبی برای حذف باکتری‌های بیماری‌زا از دستگاه گوارش آبزی و شروع فعالیت پروبیوتیکی باشند. با توجه به معنی‌دار شدن تراکم باکتری *B.subtilis* در دستگاه گوارش نمونه‌های تیمار نسبت به نمونه‌های شاهد به نظر می‌رسد که نمونه‌ی ترکیب کود شیمیایی ساخته‌شده به‌عنوان پری‌بیوتیک از طریق مکانیسم افزایش سلول پروبیوتیک و در نتیجه از طریق مکانیسم عمل پروبیوتیک‌ها می‌تواند باعث ایجاد تغییرات معنی‌دار در رشد و درصد بقاء آبزی موردنظر گردد (FAO/WHO, 2004). مدیریت تولید گونه‌های خاصی از فیتوپلانکتون‌ها در استخرهای پرورش میگو با ایجاد تغییر در ترکیب کودهای شیمیایی قبلاً گزارش گردیده‌بود. همچنین مدیریت تولید *B.licheniformis* برای تجزیه آلودگی‌های نفتی انجام شد (Suthar *et al.,* 2019). در گزارشی با بهینه سازی محیط کشت *B.subtilis* به تولید انبوه ویتامین K برداخته شد (Mahdinia *et al.,* 2018). نتایج به‌دست آمده در این تحقیق نیز مرتبط با اثرات پری‌بیوتیک بر بازماندگی گونه‌ای خاص بوده و ارتباط مستقیمی با توانایی میکروفلور باکتریایی دستگاه گوارش آبزی برای تخمیر پروی‌بیوتیک اختصاصی خود دارد (Vine *et al*., 2006). نتایج متفاوت به‌دست‌آمده در میزان بازماندگی آبزیان در اثر استفاده از سطوح مختلف پری‌بیوتیک‌ها را می‌توان به شرایط محیط پرورش، کمیت و کیفیت غذا، اختلاف رژیم غذایی، نوع گونه پرورشی، اندازه و سن نسبت داد (Irianto and Austin,

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2026-08-27]

2002). از طرف دیگر قابلیت تخمیر نیز به طول زنجیره و درجه پلیمریزاسیون بستگی دارد. تأثیر *B.subtilis* در افزایش درصد بقاء در این تحقیق می‌تواند از راه تغذیه مستقیم گونه مورد نظر توسط بچه ماهی کپور و حتی از راه اثر تغذیه‌ای غیرمستقیم باشد. بدین ترتیب که این باکتری‌ها ترکیبات سمی و غیر تغذیه‌ای محیط را جذب و 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 قابل‌جذب تبدیل کند. باکتری‌های *Bacillus* sp. که از ماهی کپور معمولی جداشده بود دارای فعالیت‌های سلولولیتیک، آمیلولیتیک، لیپولیتیک و پروتئولیتیک قابل‌توجهی بود (Bairagi *et al.,* 2002). پروبیوتیک‌ها همراه با جذب مواد غذایی بر فرآیندهای گوارشی تأثیر بسیار خوبی دارند (Irianto and Austin, 2002). افزایش هضم ماده مغذی غیرقابل‌هضم را می‌توان به دسترسی آسان اگزوآنزیم‌های تولید شده توسط پروبیوتیک‌ها، همان‌طور که توسط Vine و همکاران، (۲۰۰۶) گزارش‌شده نسبت داد.

از طرف دیگر *B.Subtilis* با تولید مواد آنتی باکتریال و رقابت در جذب املاح غذایی و حتی از ازدیاد و تجمع باکتری‌های پاتوژن در دستگاه گوارش ماهی جلوگیری می‌کند. به‌علاوه *B.subtilis* تولید آنتی‌بیوتیک‌هایی مثل دیفی سی دین (Dificidin) و اکسی دیفی سی دین (Oxi dificidin) می‌کند که می‌تواند طیف وسیعی از باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی را از بین ببرد. محققین زیادی نتایج مثبتی از تأثیر انواع پروبیوتیک‌های مختلف بر عملکرد رشد آبزیان ارائه داده‌اند (Mahdinia *et al.,* 2018; Irianto and Austin, 2002). گزارش گردید که پری‌بیوتیک‌های الیگو فروکتوز و اینولین اثرات معنی‌دار مثبتی بر عملکرد رشد و مصرف جیره ماهی آزاد (*Salvelinus alpinus* L.) و تاس ماهی (*Acipenser sttellatus*) داشتند (Olsen *et al.,* 2005; Iri *et al*., 2015). تأثیر اینولین الیگو ساکارید و لاکتو سوکروز به‌عنوان پری‌بیوتیک روی رشد ماهی کفشک (*Psetta maxima*) در سطح ۰/۰۲ مطالعه گردید و نتیجه‌گیری شد که میانگین وزن نهایی و ضریب رشد ویژه در گروه تغذیه‌شده با الیگو فروکتوز نسبت به سایر گروه‌ها بالاتر بود (Mahious *et al.,* 2006). اثرات مثبت پری‌بیوتیک بر برخی فاکتورهای رشد در سخت‌پوستان (*Litopenaeus vannamei*) نیز موردبررسی قرار گرفته است (Zhou *et al*., 2007). علاوه بر این سطوح مشابه پری‌بیوتیک اینولین استفاده‌شده در جیره فیل‌ماهی هیچ اثر معنی‌داری بر بازماندگی بچه فیل‌ماهی نداشت (Hoseinifar *et al.,* 2011) و حتی سطوح مختلف پری‌بیوتیک مانان الیگوساکارید اثرات نامطلوب بر بازماندگی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) داشت (Hedayati and Darabi Tabar, 2018). اما در تحقیق دیگری الیگو فروکتوز به‌طور معنی‌داری بازماندگی بچه فیل‌ماهی را تحت‌تأثیر قرارداد و بازماندگی در تیمار ۰/۰۲ بیشتر از تیمار صفر و ۰/۰۳ الیگو فروکتوز بود. مکانیسم اثر پری‌بیوتیک‌ها نیز از طریق افزایش کلنی باکتری‌های پروبیوتیکی مختلف و در نتیجه عملکرد ان باکتری‌های پروبیوتیکی می‌باشد (Hoseinifar *et al.,* 2011). نتایج به‌دست‌آمده افزایش تراکم *B.subtilis* در دستگاه گوارش و آب محیط پرورش بچه ماهی کپور در این تحقیق نیز با نتایج Hoseinifar و همکاران (۲۰۱۱) همخوانی دارد.

علاوه بر این گزارش گردید که در اثر استفاده از پری‌بیوتیک تعداد لنفوسیت‌ها در شمارش تفریقی ۰/۰۱ اینولین به‌طور معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها بوده درحالی‌که این روند در مورد سایر گلبول‌های سفید قابل‌بررسی نبود. (Hedayati and Darabi Tabar, 2018) افزایش گلبول‌های سفید و به خصوص لنفوسیت‌ها در تیمار الیگو فروکتوز ۰/۰۱ مؤید اثرات مطلوب پری‌بیوتیک الیگو فروکتوز بر ایمنی غیراختصاصی ماهی اوزون‌برون بود. در بررسی تأثیر سطوح مختلف مانان الیگوساکارید در جیره سی‌بأس اروپایی، در ماهی تغذیه‌شده با پری‌بیوتیک مانان الیگوساکارید میزان رشد و مقاومت در برابر عفونت باکتریایی و تحریک سیستم ایمنی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. نقش منابع کربوهیدراتی در جیره غذایی آبزیان به‌دلیل افزایش سهم مواد گیاهی جیره و اثرات آن بر فرایندهای میکروبی، فیزیکی و شیمیایی شیره گوارشی توجه زیادی را در سال‌های اخیر به خود جلب کرده است (Zhang *et al.,* 2016). تغییر شرایط فیزیکی و شیمیایی شیره گوارشی، سرعت حرکت مواد و یا تأثیر بر فلور میکروبی دستگاه گوارش تحت‌تأثیر منابع مختلف کربوهیدراتی می‌تواند بر فرآیند هضم و جذب و کارایی رشد ماهی مؤثر باشد (Baccarin and Pezzato, 2001). وجود ملاس چغندرقند در جیره که قسمت عمده آن از فیبر می‌باشد می‌تواند فرایند هضم و جذب مواد مغذی را با افزایش برخی باکتری‌ها در دستگاه گوارش تحت‌تأثیر قرار دهد (Slavin, 2013).

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2026-08-27]

استفاده هم‌زمان از پری‌بیوتیک‌ها و پروبیوتیک‌ها در فرمولاسیون مواد غذایی هم زیستی ایجاد می‌کند که می‌تواند اثرات مفیدی مانند اثر ضد سرطانی، ضد حساسیت، ضد میکروبی، محرک سیستم ایمنی و تقویت سیستم گوارش را برای میزبان به‌همراه داشته‌باشد (Slavin, 2013; Lemme-Dumit *et al*., 2018). فیبر به عنوان سوبسترا، غذای میکروارگانیسم‌های مفید است و به‌عنوان پری‌بیوتیک عمل می‌کند که می‌تواند سلامت میزبان را بهبود بخشد و الیگوساکاریدها شناخته‌شده‌ترین پری‌بیوتیک‌ها هستند (Chawla, 2010). پریبیوتیک‌ها به‌عنوان مواد غذایی غیرقابل‌هضم که با تحریک رشد یا افزایش فعالیت باکتری‌ها در روده بزرگ تأثیر مفیدی بر روی میزبان می‌گذارند و باعث بهبود سلامت میزبان می‌گردند تعریف می‌شوند. اگرچه تمام پری‌بیوتیک‌ها فیبر هستند، اما همه فیبرها پری‌بیوتیک نیستند. برای طبقه‌بندی مواد غذایی به‌عنوان پری‌بیوتیک، این مواد غذایی باید مقاوم به اسیدیته معده بوده و توسط آنزیم‌های پستانداران، هیدرولیز نشوند. هم‌چنین مقاوم در برابر جذب در دستگاه گوارش باشند و توسط میکروفلور روده تخمیر و توانایی تحریک باکتری‌های مفید روده را داشته‌باشند (Abdi *et al.,* 2021). روده با بیش از ۱۰۰۰ گونه مختلف باکتری، از مهم‌ترین اندام‌های گوارشی و مؤثر در ایمنی است که پری‌بیوتیک‌ها نقش مهمی در تغییر و بهبود میکرو فلور روده دارند. محیط روده به‌دلیل زمان انتقال آهسته، وجود مواد مغذی و pH مطلوب، برای رشد باکتری‌ها مناسب است که با تغییر رژیم غذایی می‌توان جمعیت باکتری‌های مفید روده را افزایش داد و باعث بهبود سلامتی فرد شد. همان‌طور که گفته شد تمام پری‌بیوتیک‌ها ترکیبات کربوهیدراتی هستند که در برابر هضم در روده کوچک مقاوم هستند و به روده بزرگ می‌رسند. الیگوساکاریدها، اینولین، الیگوفروکتوز، لاکتوز و نشاسته مقاوم با تحریک باکتری‌های مفید به‌عنوان پری‌بیوتیک عمل می‌کنند و پس از تخمیر میکروبی با تولید اسید چرب کوتاه زنجیره به‌ویژه استات، پروپیونات و بوتیرات و تأثیر بر فیزیولوژی میزبان باعث سلامتی و رشد می‌گردند (Slavin, 2013; Rezende *et al.,* 2021). بر اساس نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق، ترکیب کودهای شیمیایی و ملاس به دست آمده می‌تواند به‌عنوان پری‌بیوتیک در پرورش بچه ماهی کپور معمولی به کار گرفته شود. بدین ترتیب که می‌توان این ترکیب را به غذای بچه ماهی کپور معمولی اضافه نموده و با تحریک تولید باکتری *B.Subtilis* بومی در دستگاه گوارش آن رشد و درصد بقاء بچه ماهی کپور معمولی را بهبود بخشید.

سپاسگزاری

نویسندگان در انجام تحقیق و نگارش این مقاله از همکاری و مساعدت کارکنان آزمایشگاه میکروبیولوژی و کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان واحد آموزش عالی علوم شیلاتی میرزا کوچک خان، بهره‌مند گردیده‌اند که بدین‌وسیله 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), p.131. doi.org/10.3390/ani11010131

Aderolu A.Z., Aarode O.O. and Bello R.A. 2013. Inclusion effect of graded levels of molases in the diet of *Clarias gariepinus* juvenile. International Journal of Fisheries and Aquatic Studies, 5(7): 172-176. doi: 10.5897/IJFA11.055

Babbar N., Dejonghe W., Gatti M., Sforza S. and Elst K. 2016. Pectic oligosaccharides from agricultural by-products: production, characterization and health benefits. Critical Reviews in Biotechnology, 36(4):594-606. doi: 10.3109/07388551.2014.996732.

Baccarin A.E. and Pezzato L.E. 2001. Effects of molasses yeast in diets of Nile tilapia. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 36: 549-556.

Bairagi A., Ghosh K.S., Sen S.K. and Ray A.K. 2002. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. Aquaculture International, 10: 109-121. doi: 10.1023/A: 1021355406412

Binda S., Hill C., Johansen E., Obis D., Pot B., Sanders M.E., Tremblay A. and Ouwehand A.C. 2020. Criteria to qualify microorganisms as "probiotic" in foods and dietary supplements. Frontiers in microbiology, 11: p.1662. doi.org/10.3389/fmicb.2020.01662

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2026-08-27]

Botta C., Langerholc T., Cencič A. and Cocolin L. 2014. In vitro selection and characterization of new probiotic candidates from table olive microbiota. PLoS One, 9(4): p.e94457. doi: 10.1371/journal.pone.0094457

Chawla R.P.G.R. and Patil G.R. 2010. Soluble dietary fiber. Comprehensive reviews in food science and food safety, 9(2): 178-196. doi: 10.1111/j.1541-4337.2009. 00099.x

Duary R.K., Rajput Y.S., Batish V.K. and Grover S. 2011. Assessing the adhesion of putative indigenous probiotic *lactobacilli* to human colonic epithelial cells. Indian Journal of Medical Research, 134(5):.664-671. doi: 10.4103/0971-5916.90992

Hanifi A., Culpepper T., Mai V., Anand A., Ford A.L., Ukhanova M., Christman M., Tompkins T.A. and Dahl W.J. 2015. Evaluation of *Bacillus subtilis* R0179 on gastrointestinal viability and general wellness: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial in healthy adults. Beneficial microbes, 6(1):19-28. doi: 10.3920/BM2014.0031

Hedayati M. and Darabi Tabar F. 2018. Investigating the effect of oral addition of isomalto-oligosaccharide on the tissue damage of common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to vertimac insecticide. Journal of Plasma and Biomarkers, 11(4): 87-99. doi: 10.1017/S0007114514002037.

Hill C., Guarner F., Reid G., Gibson G.R., Merenstein D.J., Pot B., Morelli L., Canani R.B., Flint H.J., Salminen S. and Calder P.C. 2014. Activity of cecropin P1 and FA-LL-37 against urogenital microflora. Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology, 11(8), p.506. doi: 10.1038/nrgastro.2014.66

Hoseinifar S.H., Mirvaghefi A., Mojazi Amiri B., Rostami H.K. and Merrifield D.L. 2011. The effects of oligofructose on growth performance, survival and autochthonous intestinal microbiota of beluga (*Huso huso*) juveniles. Aquaculture Nutrition, 17(5): 498-504. doi.org/10.1111/j.1365-2095.2010. 00828.x

Hoseinifar S.H., Zare P. and Merrifield D.L. 2010. The effects of inulin on growth factors and survival of the Indian white shrimp larvae and postlarvae (*Fenneropenaeus indicus*). Aquaculture Research, 41(9). doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010. 02485.x

Hosseiny M. and Sedaghati M. 2023. Production and Characterization of Milk Dessert Supplemented with Date Seed Powder. Iranian Journal of Chemistry Engineering. Research Article, *42*(9). doi:10.30492/IJCCE.2023.560928.5551

Iri Y., Hafezieh M., Haghpanah A., Rostami H.K., Ghareve B., Kor A.V., Kor N.M. and Lakzaie F. 2015. An assessment the effect of Fructo-oligosaccharide on growth performance, survival and hematological factors in sturgeon juvenile (*Acipenser sttellatus*). Iranian Scientific Fisheries Journal, 24(1): 97-107. Doi:10.22092/ISFJ.2014.103098

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.x

FAO/WHO Expert Committee on Food Additives and World Health Organization. 2004. Evaluation of certain food additives and contaminants: sixty-first report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (Vol. 61). World Health Organization.

Gomathi S., Sasikumar P., Anbazhagan K., Sasikumar S., Kavitha, M., Selvi M.S. and Selvam G.S. 2014. Screening of indigenous oxalate degrading lactic acid bacteria from human faeces and South Indian fermented foods: assessment of probiotic potential. The Scientific World Journal, 2014(1): p.648059. doi: 10.1155/2014/648059.

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. Jounal 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.

Lemme-Dumit J.M., Polti M.A., Perdigón G. and Galdeano C.M. 2018. Probiotic bacteria cell walls stimulate the activity of the intestinal epithelial cells and macrophage functionality. Beneficial microbes, 9(1): 153-164. doi: 10.3920/BM2016.0220.

Leo V.C. 1983. Molasses in Animal Nutrition. In: Molasses: General Consideration. National Feed Ingredient Association, West Des Moines, Iowa, P. 11.

Mahdinia E., Demirci A. and Berenjian A. 2018. Optimization of *Bacillus subtilis* natto growth parameters in glycerol-based medium for vitamin K (Menaquinone-7) production in biofilm reactors. Bioprocess and biosystems engineering, 41: 195-204. doi: 10.1007/s00449-017-1857-0.

Mahious A.S., Gatesoupe F.J., Hervi M., Metailler R. and Ollevier F. 2006. Effect of dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning turbot, *Psetta maxima* (Linnaeus, C. 1758). Aquaculture International, 14: 219-229. doi: 10.1007/s10499-005-9003-4

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2026-08-27]

Martin H.A., Pedraza-Reyes M., Yasbin R.E. and Robleto E.A. 2012. Transcriptional de-repression and Mfd are mutagenic in stressed *Bacillus subtilis* cells. Journal of molecular microbiology and biotechnology, 21(1-2): 45-58. doi: 10.1159/000332751

Olsen R.E., Myklebust R., Kryvi H., Mayhew T.M. and Ringø E. 2001. Damaging effect of dietary inulin on intestinal enterocytes in Arctic charr (*Salvelinus alpinus L.*). Aquaculture Research, 32(11). doi: 10.1046/j.1365-2109.2001. 00626.x

Piewngam P., Zheng Y., Nguyen T.H., Dickey S.W., Joo H.S., Villaruz A.E., Glose K.A., Fisher E.L., Hunt R.L., Li B. and Chiou J. 2018. Pathogen elimination by probiotic *Bacillus* via signalling interference. Nature, 562(7728): 532-537. doi: 10.1038/s41586-018-0616-y

Primera-Campos F., Nouel-Borges G.E. and Sánchez-Blanco R. 2020. Intake and digestibility of rations with distillery yeasts byproducts, molasses and ammoniated sugar cane tops in lambs in total confinement. Revista colombiana de ciencia animal recia 12(1):5-14. doi:10.24188/recia. v12.n1.2020.731.

Rezende E.S.V., Lima G.C. and Naves M.M.V. 2021. Dietary fibers as beneficial microbiota modulators: A proposed classification by prebiotic categories. Nutrition, 89: p.111217. doi: 10.1016/j.nut.2021.111217

Roberfroid M. 2007. Prebiotics: The concept revisited1. The Journal of nutrition, 137(3): 830S-837S. doi: 10.1093/jn/137.3.830S.

Sanders M.E. 2003. Probiotics: considerations for human health. Nutrition reviews, 61(3): 91-99. doi: 10.1301/nr.2003.marr.91-99.

Slavin J. 2013. Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. Nutrients, 5(4): 1417-1435. doi: 10.3390/nu5041417.

Suthar H., Hingurao K., Desai A. and Nerurkar A. 2019. Selective plugging strategy based microbial enhanced oil recovery using *Bacillus licheniformis* TT33. Journal of Microbiology and Biotechnology, 19: 1230–1237. doi: 10.4014/jmb.0904.04043

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

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.

Zhang N., Luo G., Tan H., Liu W. and Hou Z. 2016. Growth, digestive enzymeactivity and welfare of tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in abiofloc-based system with polyβhydroxybutyric as a carbon source. Aquaculture, 464: 710-717. doi: 10.1016/j.aquaculture.2016.08.013

Zhou Z.G., Ding Z.K. and Huiyuan L.V. 2007. Effects of dietary short-chain fructooligosaccharides on intestinal microflora, survival, and growth performance of juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei.* World Aquaculture Socciety 38(2): 296–301. doi: 10.1111/j.1749-7345.2007. 00099.x

Valdés L., Gullón P., Salazar N., Rios-Covián D., González-Muñoz M.J., Parajó J.C., Ruas-Madiedo P., Gueimonde M. and Reyes-Gavilán C.G. 2013. Population dynamics of some relevant intestinal microbial groups in human fecal batch cultures with added fermentable xylooligosaccharides obtained from rice husks. BioResources, 8(2): 2429-2441. doi: 10.15376/biores.8.2.2429-2441

VidyaLaxme B., Rovetto A., Grau R. and Agrawal R. 2014. Synergistic effects of probiotic *Leuconostoc mesenteroides* and *Bacillus subtilis* in malted ragi (Eleucine 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.x

Vogt L., Meyer D., Pullens G., Faas M., Smelt M., Venema K., Ramasamy U., Schols H.A. and De Vos P. 2015. Immunological properties of inulin-type fructans. Critical reviews in food science and nutrition, 55(3): 414-436. doi: 10.1080/10408398.2012.656772.

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2026-08-27]

Effect of chemical fertilizers for indigenous bio stimulation of *Bacillus subtilis* production in the digestive tract of common carp fry (*Cyprinus carpio*)

Mehran Avakh Keysami[1]*
Maryam Asghari[1]
Maryam Avakh Keysami [2]
Mehrdad Malaki[1]
Mohsen Pourasadi[1]

1. Department of Fisheries and Aquatics, Mirzakochek Khan Fisheries Sciences and Industries Training Unit, Agricultural Research, Education and Extension Organization Rasht, Iran.
2. Research Department of Sciences Education, General Directorate of Education, Gilan Province, Bint Al-Hoda Sadr Educational Campus, Rasht, Iran.

***Corresponding author:**
dr.keysami@gmail.com

Received date: April/16/2025
Reception date: June/29/2025

Abstract

One of the probiotic bacteria is *Bacillus subtilis*. probiotic bacteria, when consumed, during transit through the host's digestive tract and during the stages of probiotic manufacturing and storage, the viability of this bacterium decreases which is a limitation in the use of probiotics in aquaculture. So, this study was conducted to stimulate the production of indigenous *B. subtilis* bacteria in the digestive tract of common carp fry and its effectiveness on the survival and growth performance of fry. Stimulation of *B. subtilis* production was carried out by changing the amount of nitrogen, phosphate and carbon sources, from the sources of chemical fertilizers and sugar beet molasses, each at three levels, respectively, 0.75, 1.5, 3 g/L $NaNO_3$ and 0.02, 0.40, 0.08 g/L K_2HPO_4 in an aqueous solution of 5% molasses. The effect of these values on the production rate of *B. subtilis* bacteria was investigated in laboratory conditions with the physicochemical characteristics of bile pH and simulated conditions of the digestive tract and stomach of fry. The results showed that the best combination for the production of this bacteria was with 3 grams of nitrate and 0.02 grams of phosphate in a 5% solution of beet molasses. With this prebiotic combination the highest production rate of *B. subtilis* bacteria was achieved. Also, by mixing 1% of this prebiotic compound to the pellet feed of carp fry, a statistically significant difference was observed in the growth of treated fry compared to control fry ($P < 0.05$). Therefore, it can be concluded that the compound obtained in this study can be used as a prebiotic in bio stimulating the production of *B. subtilis* in the digestive tract of carp fry.

Keywords: bio stimulating, prebiotic, *Bacillus subtilis, Cyprinus carpio*

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2026-08-27]