



Screening of sturgeon farm wastewater bacteria for microbial treatment of ammonia, nitrite, and nitrate of wastewater on a laboratory scale

Mehran Avakh Keysami¹, Masoud Sattari², Hojatullah Zamani³, Mohsen Pourasadi⁴

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

²Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Sowme Sara, Iran.

³Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran.

⁴Assistant Professor, Aquatics and Fisheries Research Department, Gilan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran.

Abstract

Background & Objectives: This study was conducted to screen the bacterial flora of sturgeon aquaculture wastewater for the purpose of treating ammonia, nitrite and nitrate in wastewater.

Materials & methods: Antibacterial activity tests were performed using three methods: well diffusion, disc and cross-streak method. Antibacterial activity was also investigated under the influence of different pH, salinity, temperature and time. A mixture of dominant bacteria isolated in nutrient broth medium was prepared and then their purification performance was evaluated by small-scale experiments (inside a laboratory Erlenmeyer flask) and then inside small aquariums under aerated and non-aerated conditions at times 0, 6, 12, 15 and 24 hours.

Results: The results showed that four wastewater isolated bacteria (*Bacillus licheniformis*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter winogradskyi*) have antagonistic activity against fish pathogens. The candidate species showed significant inhibitory effect against the pathogen in the disk diffusion method with a 20 mm inhibition zone diameter. Adding 10 ml of the candidate species to *Aeromonas* minimized its population in 12 hours. Optimal growth and production of antibacterial compounds were observed at pH 8 and temperatures of 37 and 30 degrees Celsius. The results of treatment of different concentrations of ammonia nitrite and nitrate in Erlenmeyer and aquarium water with different concentrations of the candidate species for 24 hours showed that there was a statistically significant difference between the water quality of the treatment groups and the control.

Conclusion: Accordingly, the candidate species obtained can be used in the treatment of wastewater from sturgeon farms.

Keywords: Screening, Wastewater, Bacterial Flora, *Huso huso*.

Received: 9 July 2025

Revised: 30 July 2025

Accepted: 1 September 2025

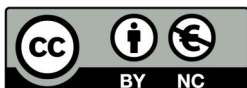
Correspondence to: Mehran Avakh Keysami

Tel: +98 9111500864

E-mail: dr.keysami@gmail.com

Journal of Microbial World 2025, 18 (2): 141 - 155

DOI: <https://doi.org/10.82363/jmw.2025.1216664>



Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.



غربالگری باکتری‌های پساب مزارع پرورش ماهیان خاویاری به منظور تصفیه میکربی آمونیاک، نیتريت و نیترات پساب در مقیاس آزمایشگاهی

مهران آوخ کیسمی^{۱*}، مسعود ستاری^۲، حجت‌الله زمانی^۳، محسن پوراسدی^۴

^۱ دانشیار، بخش تحقیقات شیلات و آبزیان، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گیلان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران.
^۲ استاد، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
^۳ دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
^۴ استادیار، بخش تحقیقات شیلات و آبزیان، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گیلان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: این تحقیق به منظور غربالگری فلور باکتریایی پساب پرورش ماهیان خاویاری به منظور تصفیه آمونیاک، نیتريت و نیترات پساب انجام گردید.

مواد و روش‌ها: آزمون فعالیت‌های ضدباکتریایی با سه روش انتشار در چاهک، دیسک و روش متقاطع انجام گرفت. همچنین فعالیت ضدباکتریایی تحت تاثیر pH، شوری، دما و زمان‌های مختلف بررسی گردید. مخلوطی از باکتری‌های غالب جدا شده در محیط نوترینت براث تهیه شده و سپس عملکرد تصفیه‌کنندگی آن‌ها، با آزمایش در مقیاس کوچک، (داخل ارلن آزمایشگاهی) و سپس داخل آکواریوم‌های کوچک در شرایط هوادهی و بدون هوادهی در زمان‌های ۶۰، ۱۲، ۱۵ و ۲۴ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. **یافته‌ها:** نتایج نشان داد چهار باکتری تصفیه‌گر پساب (*Corynebacterium ammoniagenes*، *Bacillus licheniformis*، *Nitrosomonas europaea* و *Nitrobacter winogradskyi*) فعالیت آنتاگونیستی در مقابل پاتوژن‌های ماهی دارند. جدایه‌ها اثر ممانعت‌کنندگی معنی‌داری در برابر پاتوژن در روش انتشار در دیسک با قطر بازدارندگی ۲۰ میلی‌متر نشان دادند. افزودن ۱۰ میلی‌لیتر از جدایه‌ها به *آئروموناس* جمعیت آن را در ۱۲ ساعت به حداقل رساند. رشد مطلوب و تولید ترکیبات ضدباکتریایی نمونه مورد نظر در pH=۸ و دمای ۳۷ و ۳۰ درجه سلسیوس دیده شد. نتایج تیمار غلظت‌های مختلف آمونیاک، نیتريت و نیترات آب ارلن و آکواریوم با غلظت‌های مختلف از جدایه‌ها در ۲۴ ساعت نشان داد بین کیفیت آب گروه‌های تیمار و شاهد اختلاف معنی‌دار آماری وجود دارد.

نتیجه‌گیری: بر این اساس جدایه‌های به‌دست‌آمده می‌تواند در تصفیه پساب مزارع پرورش خاویاری به‌کار گرفته شود.

کلمات کلیدی: غربالگری، پساب، فلور باکتریایی، فیل ماهی.

پذیرش مقاله: ۱۴۰۴/۶/۱۰

ویرایش مقاله: ۱۴۰۴/۵/۸

دریافت مقاله: ۱۴۰۴/۴/۱۸

مقدمه

محیط طبیعی آزاد می‌شوند، نگرانی‌های عمده‌ای را به وجود آورده‌اند که نه تنها به تجمع این مواد در پیکره آبزیان منجر گردیده، بلکه در مسیر انتقال خود به غذای انسانی نیز رسیده‌اند (۱). تولید تجاری ماهیان خاویاری مبتنی بر استفاده از سطح بالایی از تغذیه حاوی پروتئین است. در فرآیند گوارش چربی

آلاینده‌های شیمیایی، دارویی، مواد آلی و حتی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی که در اثر خروجی‌های آب مزارع پرورش ماهی به

(* آدرس برای مکاتبه: بخش تحقیقات شیلات و آبزیان، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گیلان، سازمان تحقیقات، رشت، ایران.
تلفن: ۰۹۱۱۵۰۰۸۶۴
پست الکترونیک: dr.keysami@gmail.com



پروبیوتیک، موجب از بین رفتن آلودگی‌ها و بهبود فاکتورهای کیفی آب می‌گردد. در برخی کشورها، توسعه پایدار آبی‌پروری با به‌کارگیری این باکتری‌ها رو به گسترش بوده که به‌ویژه باکتری‌هایی مانند باسیلوس (*Bacillus spp.*)، نیتروباکتر و نیتروزوموناس می‌توان نام برد (۱۰).

تأثیر مثبت بعضی از باکتری‌ها بر آبزیان پرورشی با دیدگاه‌های متفاوتی نظیر بهینه‌سازی پارامترهای فیزیکی و شیمیایی محیط پرورشی آن‌ها، پیشگیری و مبارزه با عوامل بیماری‌زا و همچنین ارتقای عملکرد رشد آبزیان پرورشی، در تحقیقات بی‌شماری توسط محققان شیلاتی تأیید شده است (۱۱). استفاده از میکروارگانیسم‌های مفید در صنایع آبی‌پروری به‌منظور مدیریت بیماری‌ها برای درمان و حتی پیشگیری بسیار جدی گرفته شده است و حتی ارجحیت بیشتری از آنتی‌بیوتیک‌ها و ضدعفونی‌کننده‌ها یافته است (۱۲).

فلور باکتریایی مفیدی وجود دارند که کیفیت آب مزرعه پرورش ماهی را بهبود بخشیده و در رقابت فلور باکتریایی بیماری‌زا را حذف می‌نماید (۱۳). از نظر اکولوژیکی با توجه به تغییرات اقلیمی و کاهش منابع آبی مورد نیاز، مطالعه و بهره‌گیری از سیستم‌های نوین در پرورش ماهیان خاویاری برای استفاده مجدد از پساب برای آبی‌پروری مورد تأکید مجامع علمی قرار گرفته است (۱۲). این پژوهش با هدف بررسی تأثیر باکتری‌های منتخب تصفیه‌گر پساب به‌عنوان عوامل طبیعی موجود در محیط زیست ماهی خاویاری بر میزان حذف آمونیاک، نیتريت و نیترات با غربالگری تعدادی از فلور باکتریایی آب و رسوب پساب استخرهای پرورش ماهیان خاویاری به‌منظور استفاده در بهبود کیفیت فیزیکی و شیمیایی پساب استخرهای پرورش ماهیان خاویاری انجام گردید.

مواد و روش‌ها

این تحقیق از اردیبهشت تا آذر ۱۴۰۲ در مرکز آموزش علوم شیلاتی میرزاکوچک خان گیلان انجام شد. مواد مورد استفاده در این مطالعه شامل محیط‌های کشت باکتریایی مورد نیاز مانند TCBS (Thiosulfate Citrate Bile salts Sucrose Agar)،

و کربوهیدرات، آب و دی‌اکسید کربن، و در هضم پروتئین و ترکیبات نیتروژنی عمدتاً آمونیاک به‌عنوان مواد زائد تولید می‌شوند (۲). از مشکلات اساسی آبی‌پروری متراکم و به‌ویژه سیستم‌های بسته، افزایش آمونیاک و نیتريت حاصل از فعالیت‌های مختلف آبی‌پروری در محیط پرورشی است. در محیط زیست آبی، آمونیاک به دو شکل آمونیاک یونیزه شده NH_4^+ و آمونیاک غیریونیزه NH_3 وجود دارد (۲). از این رو، تدابیری باید ایجاد کرد که آمونیاک و نیتريت تولیدی حذف و یا میزان سمیت آن‌ها در آب به کمترین حدی برسد که آسیبی به آبزیان وارد نکند (۳-۵).

روش‌های مختلفی برای تصفیه و کاهش سطح آمونیاک و نیتريت در محیط‌های پرورش آبی‌پروری وجود دارد. در روش زیستی، فیلترهای زیستی با ارائه سطوح اتصال فراوان جوامع میکروبی مرکب از باکتری‌های هتروتروف طراحی می‌شوند. نیتریفیکاسیون به‌طور خلاصه شامل اکسیداسیون هوازی در تبدیل آمونیوم به نیتريت و سپس، نیترات است. این واکنش در دو مرحله به‌وسیله باکتری‌های اکسید کننده آمونیوم مانند نیتروزوموناس (*Nitrosomonas*) و نیتروباکتر (*Nitrobacter*) صورت می‌گیرد (۷۶). میزان گاز آمونیاک در محیط پرورش ماهیان خاویاری با توجه به زمان طولانی دوره پرورش، در مقادیر کم نیز سبب اثرات نامساعد بر شرایط فیزیولوژیک طبیعی و نهایتاً عوارض مختلف، کاهش رشد، کیفیت گوشت و خاویار تولیدی می‌شود. فلور باکتریایی قادرند تا از طریق بهبود وضعیت محیط زندگی، اتصال به آب و رسوب استخرها و کلنی‌سازی در آن، رقابت در مصرف مواد مغذی، تولید ترکیبات مفید (آنزیم‌ها، ویتامین‌ها، اسیدهای چرب و غیره)، تولید ترکیبات آنتاگونیستی و تحریک سیستم ایمنی به حفظ سلامتی موجود و ایجاد فلور روده‌ای متعادل کمک نمایند (۸). استفاده از آن‌ها در آبی‌پروری موجب بهینه‌سازی تعادل جمعیت میکروبی آب و رسوب استخرهای پرورشی شده و تأثیرات بسیار مطلوبی را بر رشد و بقاء آن‌ها ایجاد می‌نماید (۹).

همچنین، اصلاح زیستی محیط‌های آبی به‌منظور بهینه‌سازی منابع آبی ازجمله اهدافی است که حضور برخی باکتری‌های

۳۰-۲۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند، به جز پلیت مک‌کانکی که در ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌گذاری شد (۱۴). رشد باکتری با کدر شدن محیط مایع و ظهور پرگنه بر روی محیط کشت جامد مشخص گردید. نمونه‌های رشد یافته پس از کشت مجدد خالص‌سازی شده و براساس جدول آزمون‌های شیمیایی اقدام به بررسی و مطالعه خواص آن‌ها نموده و تا حد گونه شناسایی گردیدند (۱۵).

ب) بررسی فعالیت‌های ضدباکتریایی گروه‌های اصلی جداسازی شده: قبل از هر آزمون، کشت‌ها در TSB فعال شدند و سپس در TSA به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس رشد کردند. چند گونه باکتریایی *Vibrio parahaemolyticus*, *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* از مرکز آموزش علوم و صنایع شیلاتی میرزاکوچک خان تهیه و در این تحقیق به عنوان پاتوژن ماهی مورد استفاده قرار گرفتند. آزمایش فعالیت‌های ضدباکتریایی در شرایط آزمایشگاهی (*in vitro*)، با سه روش ضدباکتریایی که شامل انتشار در چاهک (Well diffusion)، انتشار در دیسک (Disc diffusion) و روش متقاطع (Cross streak method) بود انجام گرفت (۱۶). بعد از این مرحله نمونه‌هایی که با هر سه روش بیشترین فعالیت آنتاگونیستی را نشان دادند برای ارزیابی تصفیه کنندگی پساب مخزن پرورش ماهی خاویاری در نظر گرفته شدند (۱۶).

ج) اثر شرایط رشد روی فعالیت تصفیه‌کنندگی جدایه‌ها: اثر pH، نمک، دما و زمان روی فعالیت ضدباکتریایی جدایه‌ها مطالعه شد. با افزودن اسید کلریدریک، محیط TSB استریل با pH ۴، ۵، ۶، ۷، ۸ و ۹ تهیه گردید و با ۰/۱ میلی‌لیتر از کشت ۱۸ ساعته از جدایه‌های پروبیوتیک به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و در سه تکرار در انکوباتور پرورش یافت. محیط‌های TSB مشابه با غلظت‌های ۰، ۱، ۲، ۳ و ۴ درصد کلرید سدیم آماده شد، سپس جدایه‌های پروبیوتیک به آن‌ها تلقیح و در انکوباتور پرورش یافتند. همچنین ۱۲ لوله آزمایش محتوی محیط مایع TSB با جدایه‌های پروبیوتیک در دماهای

(Tryptic Soy Agar) TSA، (Tryptic Soy Broth) TSB، (Triple Sugar Iron agar) TSI، (Nutrient agar) NA، (MacConkey agar) MCA، (Nutrient broth) NB و (Peptone Water) PW. دیگر مواد مورد نیاز به‌منظور انجام آزمون‌های بیوشیمیایی، مورفولوژیکی و نرم‌افزاری باکتری‌شناسی از آزمایشگاه میکروبیولوژی مرکز آموزش علوم شیلاتی میرزاکوچک خان، آزمایشگاه آب‌و خاک شالیزار نوین و آزمایشگاه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه پوترای مالزی تأمین گردید. دوازده گونه از نمونه‌های باکتریایی که از آب و رسوب پساب استخرهای پرورش فیل ماهی (*Huso huso*) جداسازی شده بود سودوموناس آئروجینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*)، باسیلوس لیچنی‌فرمیس (*Bacillus licheniformis*)، نیتروزوموناس آئروپیه (*Nitrosomonas europaea*)، کورینه‌باکتریوم آمونیائزنز (*Corynebacterium ammoniagenes*)، نیتروباکتر وینوگرادسکی (*Nitrobacter winogradskyi*)، باسیلوس سابتیلیس (*Bacillus subtilis*)، آئروموناس هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*)، میکروکوکوس (*Micrococcus* sp.)، آلکالی‌ژنز (*Alcaligenes* sp.) و اسیدوراکس (*Acidovorax* sp.) بودند. به‌عنوان جدایه‌های تصفیه‌گر پساب در این تحقیق در نظر گرفته شد.

الف) کشت میکروبی: برای تهیه کشت میکروبی، نمونه‌های کشت مایع جدایه‌های تصفیه‌گر پساب با سرم فیزیولوژی رقیق‌سازی شدند. ۰/۱ میلی‌لیتر از هر رقت در سه تکرار روی پلیت‌ها کشت گردید. چند نوع محیط باکتری‌شناسی برای ایزوله اولیه (جداسازی) و شمارش کلی باکتری‌ها (تعیین TPC) انتخاب شدند. NA، TSA برای باکتری‌های هتروتروفیک هوازی، TSA برای باکتری‌های هتروتروفیک غیرانتخابی، MC برای انتروباکتریاسه (*Enterobacteriaceae*)، TCBS برای جنس ویبریو و آئروموناس و محیط جداکننده سودوموناس (*Pseudomonas* Agar) برای جداسازی سودوموناس، آب پپتونه، NB و TSA برای کشت اولیه باکتری‌ها و انبوه‌سازی آماده، سپس همه پلیت‌ها به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای

برای بررسی فرآیند تجزیه آمونیاک، نیتريت و نیتترات در شرایط آزمایشگاهی، مخلوطی از باکتری‌های شاخص جدا شده، در محیط‌های کشت مایع نوترینت برات تهیه شد و سپس مقدار ۵٪ از آن‌ها به محیط پایه معدنی حاوی نیتترات سدیم (۲/۵ و ۳ میلی‌گرم بر لیتر)، نیتريت سدیم (۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر) و کلرید آمونیوم ۰/۰۷ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) انتقال یافت و روند تجزیه میکروبی با احتساب دوتکرار، در pH مختلف ۸/۵ و ۹ و با دو روش (استفاده از هواده و عدم هواده) در زمان‌های ۰، ۶، ۱۲، ۱۸ و ۲۴ ساعت ارزیابی شدند (۱۴ و ۱۵).

و) غربالگری اثر تصفیه‌کنندگی ترکیب جدایه‌های تحت غلظت‌های مختلف کشت در آکواریوم: پس از نتیجه‌گیری در مرحله آزمایشگاهی، ۵ لیتر از آب تازه ذخیره‌شده مرکز شهید بهشتی در حوضچه‌ها به داخل آکواریوم‌های (۳۰×۴۰×۵۰) سانتی‌متر ریخته شده و با اندازه‌گیری عوامل کیفی آب، نیتترات سدیم به مقدار ۳ و نیتريت سدیم به مقدار ۰/۲ و کلرید آمونیوم به مقدار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر به داخل آکواریوم‌ها اضافه شد. در قالب دو روش استفاده از هواده و عدم استفاده از هواده، تیمارهای حاوی ترکیب باکتریایی با همان فرمولاسیون ارائه‌شده (در مقیاس آزمایشگاهی با ارلن‌های حاوی محیط کشت)، در داخل آکواریوم‌ها، تلقیح و در زمان‌های ۰، ۶، ۱۲، ۱۸ و ۲۴ ساعت آزمایش شدند.

ز) اندازه‌گیری فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب و پساب مخازن: فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب مخازن آزمایشی از جمله اکسیژن، دما، pH آب و پساب قبل و بعد از آزمایش بررسی و ثبت شدند. اندازه‌گیری برخی خصوصیات کیفی آب و پساب همانند pH، اکسیژن و دما، توسط pH متر (Oximeter مدل WTW ساخت آلمان) انجام شد. برای اندازه‌گیری ترکیبات ازته مثل N-NO₂, N-NO₃, N-NH₃ از دستگاه‌های نیتريت و نیتترات-سنج هانا، مدل‌های HI708 و HI733 ساخت تایوان و از دستگاه‌های آمونیاک سنج هانا (HI93715) و اسپکتروفتومتر مدل 6105 UV/Vis ساخت JENWAY انگلستان استفاده شد.

۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور پرورش و سانتی‌فیوژ گردید (Behdad, Type: BH-1200). روماند محصول سانتی‌فیوژ شده سلول باکتری‌ها برای مطالعه فعالیت ضدباکتریایی جمع‌آوری شد. از کشت‌های پرورش داده شده در دمای ۳۰ درجه سلسیوس در فاصله‌های زمانی ۶، ۱۲، ۲۴، ۳۰، ۳۶، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از گرمخانه‌گذاری به منظور بررسی ارتباط میان مرحله رشد جدایه‌ها و تولید ترکیبات ضدباکتریایی نمونه‌برداری گردید (۱۶).

د) شرایط رشد روی فعالیت پروبیوتیکی جدایه‌ها: اثر pH شوری، دما و زمان روی فعالیت ضد باکتریایی جدایه پروبیوتیک مطالعه گردید. محیط TSB استریل با pH مختلف ۴، ۵، ۶، ۷، ۸ و ۹ تنظیم شد و با ۰/۱ میلی‌لیتر از کشت کهنه ۱۸ ساعته از جدایه‌های پروبیوتیک به مدت ۲۴ ساعت در ۳۰ درجه سلسیوس و در سه تکرار گرمخانه‌گذاری شد. محیط‌های TSB مشابه با ۰٪، ۱٪، ۲٪، ۳٪ و ۴٪ کلرید سدیم آماده و جدایه‌ها تلقیح و گرماگذاری شدند. ۱۲ عدد لوله آزمایش TSB با جدایه‌های پروبیوتیک در ۳۰، ۲۰، ۱۰ و ۳۷ سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شد و روماند سانتی‌فیوژ، سلول‌های باکتری رشد یافته، برای مطالعه فعالیت ضد باکتریایی فراهم شد. از کشت گرماگذاری شده در ۳۰ درجه سلسیوس نمونه‌ها در زمان‌های ۶، ۱۲، ۲۴، ۳۰، ۳۶، ۴۸ و ۷۲ ساعت برای مطالعه ارتباط میان میزان رشد و فعالیت ضد باکتریایی مشخص گردید.

ه) غربالگری اثر تصفیه‌کنندگی ترکیب جدایه‌ها به منظور تجزیه آمونیاک، نیتريت و نیتترات: این باکتری‌ها در محیط مایع نوترینت برات پرورش داده شد و روی محیط جامد نوترینت آگار نگهداری شد. کشت‌ها در دمای ۳۲ درجه سلسیوس و در ارلن ۲ لیتری در شیکر انکوباتور پرورش داده شد و سپس در زمان ۱۵ دقیقه در ۴۰۰۰ دور سانتی‌فیوژ گردید و در سرم فیزیولوژی (NSS; NaCl 8.5 g L)، ۳ بار شستشو و در درجه حرارت یخچال تا زمان مصرف نگهداری گردید. کشت ۲۴ ساعته باکتری با غلظت ۱۰^{۱۳} سلول در میلی‌لیتر، آماده گردید (۱۷).

روش را نشان می‌دهد. نتایج سه روش ضدباکتریایی که شامل انتشار در چاهک، انتشار در دیسک و روش متقاطع نشان‌دهنده آن بود که ۵ جدایه پالایش گر پساب (باسیلوس لیچنی‌فرمیس، نیتروزوموناس آئروپیه، کورینه‌باکتریوم آمونیازنز و نیتروباکتر وینوگرادسکی، باسیلوس سابتیلیس) اثر ضدباکتریایی با همدیگر نداشته، اما هر چهار گونه باکتری انتخابی همگی فعالیت آنتاگونیستی مقابل پاتوژن را نشان دادند. ترکیب باکتریایی مورد استفاده جهت تصفیه پساب مخازن پرورش فیل ماهی در برابر برخی گونه‌های پاتوژن در هر سه روش، تولید هاله منع رشد داشتند (اثر مثبت) اما در مقابل تعدادی از پاتوژن‌ها در برخی روش‌های به‌کار رفته موثر نبوده و هاله منع رشد مشاهده نشد. ب) تاثیر روماند سانتریفیوژ مخلوط باکتری‌های منتخب تصفیه پساب روی سلول‌های آئروموناس: براساس نتایج جدول ۲ با افزودن ۱۰ میلی‌لیتر از روماند سانتریفیوژ مخلوط جدایه‌ها به پاتوژن آئروموناس، در نرمال سالین استریل، موجب سرکوبی یاخته‌های آئروموناس از $10^7 \times 86/2$ CFU/mL به $10^1 \times 3/2$ CFU/mL در فاصله ۱۲ تا ۲۴ ساعت گردید. اما با استفاده حجم کمتر از ۱۰ میلی‌تر از هر سه نوع باکتری، موجب سرکوبی مقدار کمتر یاخته‌های آئروموناس هیدروفیلا

ح) آنالیز آماری: برای بررسی توزیع نرمال میانگین داده‌های متغیرهای کیفیت آب، میانگین تعداد باکتری‌های گرم مثبت و منفی در گروه‌ها و تکرارها برای تشکیل تیمارها از آزمون Shapiro-Wilk استفاده شد. در صورت نرمال بودن داده‌ها برای مقایسه آماری بین گروه‌ها در تیمارها از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (Way ANOVA One) و پس از انجام آزمون Test of Homogeneity of Variances برای مقایسه گروه‌ها با یکدیگر از آزمون دانکن استفاده شد. تمامی آنالیزهای آماری و تجزیه و تحلیل داده‌ها، با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۶ انجام شده و برای ترسیم جداول و نمودارها از نرم‌افزار Excel ۲۰۱۰ استفاده شد. آزمون‌های Duncan و LSD برای ارزیابی یکسان بودن واریانس‌ها و از تست ANOVA یک‌طرفه و دوطرفه برای بررسی تغییرات معنی‌دار بین تیمارهای مختلف استفاده شد (۱۹).

یافته‌ها

الف) غربالگری فعالیت‌های ضد باکتریایی جدایه‌ها: جدول ۱ اثرات ضد باکتریایی گروه‌های شناسایی شده بر روی باکتری‌های پاتوژن آئروموناس، اشریشیا کلی، ویبریو و سالمونلا در سه

جدول ۱: اثرات ضد باکتریایی جدایه‌ها پالایشگر پساب علیه باکتری‌های پاتوژن رشد یافته روی TSA.

Candidates	<i>Aeromonas hydrophila</i>			<i>Vibrio Parahaemolyticus</i>			<i>Escherichia coli</i>			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Salmonella sp.</i>			<i>Vibrio cholerae</i>		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<i>Corynebacterium</i>	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
<i>Nitrococusr</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+
<i>Entrobacteriaceae</i>	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
<i>Aeromonas</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Micrococcus</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
<i>Alcaigenes</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
<i>Staphylococcus</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
<i>Acidovorax</i>	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
<i>Nitrobacter</i>	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
<i>Pseudomonas</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+
<i>Bacillus</i>	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-
<i>Nitrozomonas</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+

جدول ۴ آمده است. چنانچه رشد در دمای ۱۰ درجه وجود ندارد و در دمای ۲۰ درجه حداقل است. حداکثر رشد باکتریایی

در دمای ۳۰ درجه سلسیوس مشاهده شد.

محیط کشت TSB با NaCl ۰٪ برای رشد ترکیب باکتریایی اپتیموم (۱۹ میلی‌متر) بود و برای TSB با ۱٪ NaCl، رشد باسیلوس متوسط (۵/۱۵ میلی‌متر)، در TSB با ۲٪ NaCl، رشد ترکیب باکتریایی حداقل (۷/۵ میلی‌متر) بود و نهایتاً در TSB حاوی NaCl ۳٪ و ۴٪، هیچ‌گونه رشد و فعالیت ضدباکتریایی مشاهده نگردید.

جدول ۳: اثر pH روی رشد مخلوط باکتری‌های منتخب تصفیه پساب و تولید ترکیبات ضد باکتریایی.

pH	رشد	ناحیه عدم رشد (mm)		
		۱۲ ساعت	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت
۴	—	۰	۰	۰
۵	—	۰	۰	۰
۶	+	۰	۰	۸
۷	++	۰	۱۱	۱۲
۸	+++	۰	۱۴	۱۶
۹	+	۰	۰	۹/۵

+ : رشد کم ++ : رشد متوسط +++ : رشد عالی

جدول ۴: اثر دما و شوری روی رشد مخلوط باکتری‌های منتخب تصفیه پساب و تولید ترکیبات ضد باکتریایی.

درجه حرارت انکوباسیون (°C)	رشد	ناحیه عدم رشد (mm)		
		۱۲h	۲۴h	۴۸h
۱۰	—	۰	۰	۰
۲۰	+	۶/۵	۷	۵/۵
۲۷	++	۱۵/۵	۱۷	۱۴
۳۰	+++	۱۶	۱۷	۱۴

درصد غلظت

نمک

۰	+++	۱۶	۱۹	۱۰
۱	++	۷	۱۵/۵	۵/۵
۲	+	۶	۷/۵	۳
۳	—	۰	۰	۰
۴	—	۰	۰	۰

شده و یا اثر ممانعت کننده کمتری روی این عامل پاتوژن نشان داد.

جدول ۲: تاثیر رومانند سانتیریفیوژ مخلوط باکتری‌های منتخب تصفیه پساب روی سلول‌های آئروموناس.

باکتری‌های منتخب تصفیه پساب	حجم رومانند سانتیریفیوژ (ml)	تعداد/ml آئروموناس هیدروفیلا		
		۲۴ ساعت	۱۲ ساعت	۰ ساعت
مخلوط گونه‌های باسیلوس، کورینه باکتریوم و نیتروزوموناس	۰	$4/12 \times 10^6$	$5/66 \times 10^6$	$3/62 \times 10^7$
مخلوط گونه‌های باسیلوس، کورینه باکتریوم و نیتروزوموناس	۱	$1/22 \times 10^5$	$3/62 \times 10^5$	$2/36 \times 10^7$
مخلوط گونه‌های باسیلوس، کورینه باکتریوم و نیتروزوموناس	۵	$2/98 \times 10^3$	$2/82 \times 10^5$	$1/52 \times 10^7$
مخلوط گونه‌های باسیلوس، کورینه باکتریوم و نیتروزوموناس	۱۰	$3/2 \times 10^1$	$2/31 \times 10^3$	$2/86 \times 10^7$

ج) اثر pH روی رشد مخلوط باکتری‌های منتخب تصفیه پساب و تولید ترکیبات ضد باکتریایی: رشد ترکیب باکتریایی در pH مختلف ۶ و ۷ و ۸ و ۹ به میزان متفاوت مشاهده شد ولی اپتیمم رشد در pH = ۸ دیده شد، رشد باکتری‌ها در محدوده pH مختلف ۶ و ۹ بوده درحالی‌که هیچ رشدی در pH مختلف ۴ و ۵ مشاهده نگردید. همچنین ماکزیمم ناحیه منع رشد توسط ترکیب باکتریایی در pH برابر ۸، (طی ۲۴ تا ۴۸ ساعت به میزان ۱۴ تا ۱۶ میلی‌متر) در مقابل آئروموناس هیدروفیلا به‌دست آمد، درحالی‌که ناحیه منع رشد در pH مختلف ۶ و ۹ به‌ترتیب ۸ و ۹/۵ میلی‌متر در طی ۴۸ ساعت مشاهده گردید (جدول ۳).

د) اثر دما و شوری روی رشد ترکیب باکتریایی و تولید ترکیبات ضد باکتریایی: نتایج آزمایش اثر دما و غلظت NaCl محیط کشت روی ترکیبات ضد باکتریایی به‌وسیله ترکیب باکتریایی در

جدول ۶: میانگین نیترات، نیتريت سدیم و کلرید آمونیوم در حضور مخلوط باکتری‌های منتخب تصفیه پساب در دو pH ۸/۵ و ۹ از زمان ۰ تا ۲۴ ساعت در مقیاس آزمایشگاهی (ارلن) توسط هواده.

پارامتر	غلظت (ppm)	pH	زمان (ساعت)				
			۰	۶	۱۲	۱۸	۲۴
نیترات	۲/۵	۸/۵	۲/۵	۱/۲۴	۱/۲	۰/۸۱	۰/۵۲
	۹	۲/۵	۱/۳۵	۱/۳۷	۱/۰۷	۰/۹۳	
سدیم	۳	۸/۵	۳	۲/۶۳	۲/۲۳	۱/۶۵	۱/۰۶
	۹	۳	۲/۵	۲/۴	۱/۳۴	۱/۲۱	
نیتريت	۰/۱	۸/۵	۰/۱	۰/۱۵	۰/۲	۰/۱۶	۰/۱۳
	۹	۰/۱	۰/۱۳	۰/۱۹	۰/۱۵	۰/۱۰	
سدیم	۰/۲	۸/۵	۰/۲	۰/۲۴	۰/۲۵	۰/۲۱	۰/۱۸
	۹	۰/۲	۰/۲۲	۰/۲۲	۰/۱۹	۰/۱۷	
کلرید	۰/۰۷	۸/۵	۰/۰۷	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۴	۰/۰۲
	۹	۰/۰۷	۰/۰۴۵	۰/۰۴۲	۰/۰۳۶	۰/۰۱	
آمونیم	۰/۱	۸/۵	۰/۱	۰/۱	۰/۰۸۵	۰/۰۷۷	۰/۰۲۵
	۹	۰/۱	۰/۰۹	۰/۰۹	۰/۰۸۵	۰/۰۵۴	

جدول ۷: میانگین نیترات و نیتريت سدیم و کلرید آمونیوم در حضور مخلوط باکتری‌های منتخب تصفیه پساب در دو pH (۸/۵ و ۹) از زمان ۰ تا ۲۴ ساعت در مقیاس آزمایشگاهی (ارلن) بدون هواده.

پارامتر	غلظت (ppm)	pH	زمان (ساعت)				
			۰	۶	۱۲	۱۸	۲۴
نیترات	۲/۵	۸/۵	۲/۵	۱/۱۱	۱/۰۲	۰/۸۵	۰/۱۱
	۹	۲/۵	۱/۱۱	۱/۱۱	۱/۰۱	۰/۹۵	۰/۲۵
سدیم	۳	۸/۵	۳	۲/۳۲	۲/۳	۱/۵۶	۱/۰۴
	۹	۳	۲/۵	۲/۳۵	۲/۳۵	۱/۹۵	۱/۴۳
نیتريت	۰/۱	۸/۵	۰/۱	۰/۱۲	۰/۱۳	۰/۱۰	۰/۰۸۵
	۹	۰/۱	۰/۱۳	۰/۱۵	۰/۱۱	۰/۰۸۵	
سدیم	۰/۲	۸/۵	۰/۲	۰/۲۲	۰/۱۷	۰/۱۱	۰/۰۸
	۹	۰/۲	۰/۲۲	۰/۱۸	۰/۱۳	۰/۰۸۵	
کلرید	۰/۰۷	۸/۵	۰/۰۷	۰/۰۷	۰/۰۶	۰/۰۵	۰/۰۴
	۹	۰/۰۷	۰/۰۶۵	۰/۰۶۳	۰/۰۵۱	۰/۰۵۱	۰/۰۵۱
آمونیم	۰/۱	۸/۵	۰/۱	۰/۰۹۱	۰/۰۸۵	۰/۰۷۷	۰/۰۶۳
	۹	۰/۱	۰/۰۹۳	۰/۰۸۱	۰/۰۵۲	۰/۰۳۲	

ساعت دارای اختلاف معنی‌دار بود ($P < 0.05$). اما به‌طور مقایسه‌ای در دو pH متفاوت این کاهش معنی‌دار نبود ($P > 0.05$). نتایج نشان داد که هرچند میزان تجزیه در

۵) اثر تداوم گرمخانه‌گذاری روی تولید ترکیبات ضد باکتریایی و تراکم باکتری‌ها: نتایج ثبت شده در جدول ۵ نشان می‌دهد که با تداوم دوره گرمخانه‌گذاری بیشینه میزان تراکم باکتریایی در ۳۰ ساعت به دست آمده $7/35 \times 10^9$ CFU/mL و همچنین بیشینه فعالیت ضد باکتری (ناحیه عدم رشد ۱۶ میلی‌متر) هم در همین مدت زمان طی دوره گرمخانه‌گذاری دیده می‌شود و با تداوم طول دوره تا ۷۲ ساعت فاز ایستایی را نشان می‌دهد.

جدول ۵: اثر تداوم گرمخانه‌گذاری روی تولید ترکیبات ضد باکتریایی و تراکم باکتری‌ها.

مدت زمان انکوباسیون (h)	ناحیه منع رشد (mm)	تعداد باکتری‌ها (CFU/ml)
۰	۰	$1/16 \times 10^5$
۶	۰	$2/16 \times 10^6$
۱۲	۱۳	$3/21 \times 10^8$
۲۴	۱۵	$2/18 \times 10^9$
۳۰	۱۶	$7/35 \times 10^9$
۳۶	۱۶	$2/16 \times 10^9$
۴۸	۱۶	$1/96 \times 10^9$
۷۲	۱۶	$2/11 \times 10^8$

و) آزمون‌های غربالگری تصفیه‌کنندگی جداییه‌ها: نتایج آزمون‌های تجزیه میکروبی آمونیاک و نیتريت و نیترات در مقیاس محیط کشت (ارلن) آزمایشگاهی و مقیاس آکواریوم و با احتساب تیمارهای مختلف در جداول ۶، ۷ و ۸ بیان گردید. در این آزمون از تیمارهای مختلفی استفاده شده است. به دنبال استفاده از فاکتورهای شیمیایی که به صورت املاح معدنی به محیط اضافه شده و در زمان‌های مختلف و در دو pH متفاوت، با هوادهی و بدون هوادهی از نظر تجزیه باکتریایی ارزیابی شده‌اند. به لحاظ کنترل عوامل مختلف در محیط کشت و به حداقل رساندن عوامل مهارکننده رشد باکتری، باگذشت زمان املاح معدنی اضافه شده، کاهش بیشتر و مستمری را در دو PH ۸/۵ و ۹ هم با هوادهی و هم بدون هوادهی، نشان داد. تغییرات کاهش فاکتورهای نیترات و کلرید آمونیوم در فاز آزمایشگاهی (داخل ارلن) و در آکواریوم در زمان‌های ۰ و ۲۴

بحث

با افزایش جمعیت، توسعه صنعت آبی‌پروری به‌عنوان یکی از منابع مهم تولید مواد غذایی و پروتئین حیوانی ضروری است. رشد صنعت آبی‌پروری، آلودگی‌های زیست‌محیطی را در سال‌های اخیر به دنبال داشته است. از این رو توجه به مدیریت و نوع روش پرورش آبزیان که با محیط‌زیست سازگار باشد، کاملاً ضروری است. توسعه فن‌آوری پالایش پساب مزارع پرورشی، نه فقط برای رشد این صنعت، بلکه برای مدیریت پساب‌های آبی‌پروری جهت دستیابی به محیط‌زیست پایدار دارای اهمیت فراوانی هست (۲۰). بحران جهانی کمبود آب شیرین، تمامی اشکال حیات را مورد تهدید قرار داده است. و در سال‌های اخیر، به دلیل رشد مصارف انسانی، فعالیت‌های بشری و تغییرات اقلیمی رو به تشدید بوده است (۱۸). از منظر آبی‌پروری نیز، اهمیت کمیت و کیفیت آب بر تمامی جنبه‌های زیست‌شناسی ماهی همچون بقا، رشد و سلامت و همچنین، ظرفیت تولید مزارع پرورش ماهی به‌طور گسترده‌ای توسط متخصصان و فعالان بخش تأیید شده است (۱۸).

تونگ‌پنگ و همکاران (۲۰۲۰) ۱۶۹ گونه باکتری عمده‌تر ترکیبی از باسیل‌های گرم مثبت را در ماهی حوض (*Carassius auratus*) گزارش کردند (۲۱). آن‌ها با بررسی پنج گونه از باکتری‌های جداسازی شده که فعالیت آنتاگونیست بالا داشتند گونه *Bacillus thuringiensis* را به‌عنوان پالایش‌گر پساب مطلوب در مبارزه با طیف گسترده‌ای از عوامل آسیب‌زای ماهی و مقاوم به عوامل زیست‌محیطی نامناسب از قبیل pH پایین و دمای بالا گزارش کردند.

بر اساس نظر هریرا و همکاران (۲۰۲۳) ترکیب فلور میکروبی لوله گوارش ماهی به نوع غذا، مورفولوژی لوله گوارش، ظرفیت هضم و رفتارهای فیزیولوژیک ماهی بستگی دارد (۲۲).

باکتری‌های روده‌ای آبزیان با فلور باکتریایی محیط‌زیست شان به واسطه تغذیه آن‌ها تحت تأثیر قرار می‌گیرد (۲۳، ۲۴، ۲۵). از آنجاکه زیستگاه ماهی در آب و رسوبات استخر است، جمعیت غالب باکتری‌های زیستگاه گوارش ماهی

شرایط هوازی بهتر انجام‌شده ولی تجزیه و تحلیل آماری حاکی از آن است که روند تجزیه در دو روش، فاقد اختلاف معنی‌دار بود.

جدول ۸: میانگین نیترات و نیتريت سدیم و کلرید آمونیوم (mg/l) در حضور مخلوط باکتری‌های منتخب تصفیه پساب.

پارامتر	پمپ هواده	زمان (ساعت)				
		۰	۶	۱۲	۱۸	۲۴
نیترات سدیم	+	۳/۱۷	۳/۲۵	۲/۳۶	۲/۰۴	۱/۹۳
نیتريت سدیم	+	۰/۲۲	۰/۴۳	۰/۳۵	۰/۳۱	۰/۱۶
کلرید آمونیم	+	۰/۱۲	۰/۱۳	۰/۰۹۲	۰/۰۸۳	۰/۰۴۲
نیترات سدیم	-	۳/۱۶	۳/۰۴	۲/۵۳	۱/۴۳	۱/۱۱
نیتريت سدیم	-	۰/۲۲	۰/۴۶	۰/۳۸	۰/۲۷	۰/۱۷
کلرید آمونیم	-	۰/۱۱	۰/۱۵	۰/۱۱	۰/۰۹۶	۰/۰۸۵

در تهیه تیمارهای مختلف در آکواریوم، از آب استخر استفاده شده و املاح معدنی آمونیاک، نیترات و نیتريت با غلظت مشخص به آن اضافه شد. با کشت و تلقیح ترکیب جدایه‌ها، در این آکواریوم‌ها مشخص گردید که به هنگام استفاده از هواده، غلظت نیترات سدیم، نیتريت سدیم و کلرید آمونیوم از ۳/۱۷ و ۰/۲ و ۰/۱ به ۱/۹۳ و ۰/۱۶ و ۰/۰۴۲ میلی‌گرم در لیتر و بدون هواده از ۳/۱۶ و ۰/۲ و ۰/۱ به ۱/۱۱، ۰/۱۸ و ۰/۰۸۳ میلی‌گرم بر لیتر کاهش یافته است. نتایج نشان داد که فاکتورهای اضافه‌شده، به آکواریوم کاهش داشته و میزان کاهش در شرایط هوازی بیشتر مشاهده می‌شود. اما در تجزیه و تحلیل آماری اختلاف معنی‌داری بین دو سازگان دیده نمی‌شود ($P > 0.05$). تغییرات میزان کلرید آمونیوم و نیترات نیز در آکواریوم بین حالت‌های هوازی و بی‌هوازی در مقایسه با هم معنی‌دار نبود.

(difficidin) و اکسی‌دیفی‌سین (oxydifficidin) را تولید می‌کند که در برابر طیف وسیعی از باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی مؤثر است و حتی از آنتی‌بیوتیک‌های معمول از قبیل باسیلومایسین (bacillomycin)، باسیلین (bacillin) و باسیتراکسین (bacitracin) قوی‌تر است. بروز حداکثر فعالیت ضد باکتریایی درون محیط کشت زمانی است که یاخته‌های باکتریایی به فاز ایستایی رشد می‌رسند و بیشینه فعالیت ضد باکتریایی در فاز ایستایی نشان‌دهنده این است که فاکتورهای ضد باکتریایی متابولیک ثانویه هستند (۳۸).

از آنجا که *آئروموناس* و *ویبریو* دو مشکل بزرگ در مزارع آبی‌پروری هستند (۳۹)، بیشینه تولید فاکتورهای ضد باکتریایی در اسیدیته ۸، دمای ۲۷ درجه و شوری ۰٪ مشاهده شده است که همچنین این ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، اپتیموم (اسیدیته، دما و شوری) برای رشد ماهی خاویاری در شرایط پرورشی شمال کشور است (۴۰)، بنابراین امکان استفاده از این‌گونه در شرایط پرورشی وجود دارد زیرا باکتری‌های با فعالیت آنتاگونیستی در شرایط آزمایشگاهی دارای پتانسیل کاربردی به‌عنوان عوامل کنترل بیولوژیک *آئروموناس* و *ویبریو* محسوب می‌شوند (۷).

به هنگام افزایش آمونیاک، نیتريت، سولفید هیدروژن و متان در محیط‌های آبی، میکروارگانیسم‌های موجود قادر به کاهش آن‌ها در کوتاه مدت نیستند و از طرفی تکثیر میکروارگانیسم‌های هتروتروف تجزیه‌کننده مواد آلی، باعث افزایش شرایط بی‌هوازی می‌شوند. به دنبال آن، کمبود اکسیژن به وجود می‌آید که دارای اثرات سوء بر آبزیان مختلف است (۴). به منظور تقویت میکروارگانیسم‌های طبیعی آب، از باکتری‌های مفید تحت عنوان پروبیوتیک استفاده می‌شود که این باکتری‌ها باعث افزایش تجزیه مواد آلی، کاهش غلظت نیتروژن و فسفر، افزایش اکسیژن محلول، کاهش H_2S و سیانوباکتری‌ها می‌شوند. همچنین کنترل آمونیاک و نیتريت موجب جلوگیری از مسمومیت و شیوع بیماری و افزایش بقا و در نتیجه افزایش تولید می‌شود. لال و همکاران (۲۰۲۴) در استفاده از میکروارگانیسم‌ها به منظور کاهش آلاینده‌های مختلف از جمله

فلور باکتریایی آب و رسوبات استخر پرورش ماهی است (۲۴، ۲۶، ۲۷-۳۰). به عبارت دیگر، انواع مشابه باکتری‌هایی که از دستگاه گوارش ماهی و آب محیط پرورش آن‌ها جداسازی شده و فلور میکروبی ماهی را تشکیل می‌دهد از طریق تغذیه وارد دستگاه گوارش ماهی شده‌اند (۲۶ و ۲۹) و جریان آب تأثیر محیط اطراف را روی فلور میکروبی آبزیان افزایش می‌دهد (۲ و ۳۱). حتی اگر تعداد زیادی از باکتری‌های جداسازی شده بیماری‌زا نشان داده باشند (۵ و ۳۳) اما آن‌ها پاتوژن اولیه نیستند (۱۰ و ۳۴) و در درون و سطح بدن آبزیان و در آب دریا، مصب‌ها و محیط‌های آب شیرین به‌عنوان قسمتی از میکروفلورای طبیعی بدن آبزیان محسوب می‌شوند (۲۲) و شاید در شرایط بروز استرس و تحلیل دستگاه ایمنی بدن آبزیان بیماری‌زایی نمایند (۳۵، ۳۴، ۱۴ و ۳۶).

نتایج مربوط به روش‌های انتشار در چاهک، انتشار در دیسک و روش متقاطع نشان داد که گونه‌های *باسیلوس*، *کورینه‌باکتریوم*، *نیتروزوموناس* و *نیتروباکتر* در برابر باکتری‌های پاتوژن مورد مطالعه، با ایجاد هاله منع رشد، خاصیت ضد باکتریایی از خود نشان دادند با نتایج تحقیقات متعددی همخوانی دارد (۳۰، ۲۸ و ۳۲).

فعالیت ضد باکتریایی *باسیلوس* مقابل شماری از پاتوژن‌ها از قبیل *سالمونلا*، *ویبریو*، *آئروموناس* و *اشریشیا* در مطالعات دیگر گزارش شده است. گائو و همکاران (۲۰۱۷) یک‌گونه از *باسیلوس* را جداسازی کردند که نسبت به ۶۳٪ از باکتری‌های جداسازی شده روده ماهی فعالیت ضد باکتریایی نشان داد. نتایج این مطالعه نیز دربرگیرنده تولید یک ناحیه وسیع هاله منع رشد مقابل باکتری پاتوژن آزمایش شده بود، و *آئروموناس* درون سرم نرمال‌سالین در اثر افزودن بخش مایع از سانتریفیوژ گونه *باسیلوس* در مدت ۱۲-۲۴ ساعت کاملاً کشته شد (۱۷). لذا می‌توان حدس زد که *باسیلوس* ترکیبات ضد باکتریایی خارج یاخته‌ای تولید می‌کند. این یافته توسط گزارش‌هایی که *باسیلوس* را به‌عنوان تولیدکننده طیف وسیعی از ترکیبات ضد باکتریایی و ضد جلبکی معرفی می‌کند، تأیید شده است (۳۷). *باسیلوس*، آنتی‌بیوتیک‌های جدیدی از قبیل دیفی‌سین

در دما و pH مختلف مختلف قادر به رشد و تکثیر می‌باشند ولی هر باکتری دارای اپتیمم دما و اپتیمم pH برای رشد است (۴۵). باکتری‌های جداسازی شده در این تحقیق در غربالگری قادر به رشد در pH ۶ تا ۹ بوده و باعث تقویت رشد باکتری‌های نیتریفیه کننده شده و در فرآیند دنتریفیکاسیون دخالت دارند و در شرایط هوازی و بی‌هوازی قادر به رشد هستند. باکتری‌ها براساس نیاز به اکسیژن به گروه‌های مختلفی تقسیم‌بندی شده‌اند که می‌توان به هوازی اجباری، هوازی اختیاری، بی‌هوازی اختیاری، بی‌هوازی اجباری اشاره نمود. در انتخاب باکتری‌های تجزیه‌کننده بایستی دقت نمود و بیشتر از باکتری‌هایی استفاده کرد که در شرایط بی‌هوازی اختیاری قادر به فعالیت باشند به همین دلیل به منظور اکسیداسیون آمونیاک و نیترات در شرایط آزمایشگاهی، از دو سازگان (سیستم) هواده و عدم استفاده از هواده در این تحقیق بهره گرفته شد (۷ و ۴۴). نتایج نشان داد که هرچند میزان تجزیه در شرایط هوازی بهتر انجام گرفته ولی با این وجود نتایج تجزیه و تحلیل آماری حاکی از آن است که روند تجزیه در دو سازگان، فاقد اختلاف معنی‌دار بوده است. این امر به دلیل توانایی رشد باکتری‌های جداسازی شده در حالت‌های هوازی و بی‌هوازی است. تغییرات میزان آمونیاک و نیترات در آکواریوم بین حالت‌های هوازی و بی‌هوازی معنی‌دار نبوده و علت آن نیز پراکنش باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی اختیاری بوده که جزء فلور نرمال آب بوده و در هر دو حالت هوازی و بی‌هوازی دارای فعالیت هستند (۲۸ و ۴۳). این امر مؤید این است که باکتری‌های انتخاب شده در حضور باکتری‌های طبیعی استخر قادر به فعالیت بوده و به عبارت دیگر با اثرهم افزایی یکدیگر باعث کاهش گازهای سمی استخر می‌شوند (۷، ۱۸ و ۴۴).

نتیجه‌گیری

شناخت ترکیب، تراکم و همچنین فعالیت جمعیت‌های مختلف باکتریایی موجود در اکوسیستم‌های آبی برای بهینه‌سازی شرایط فیزیکوشیمیایی پساب، افزایش جمعیت گونه‌های خاص باکتریایی و فعالیت‌های بیوشیمیایی آن‌ها از روش‌های زیستی

آمونیاک و نیتريت باید به عوامل مختلف از جمله pH، نوع میکروارگانیسم، غلظت و روش مورد استفاده، دما و سیستم هواده توجه کرد، زیرا عوامل ایجاد شده در ارتباط مستقیم با افزایش و یا کاهش واکنش‌های تجزیه‌ای هستند (۴۱). در این پژوهش برای بهبود کیفیت آب و پساب مخازن پرورش فیل ماهیان و همچنین افزایش شاخص‌های رشد در بچه‌فیل ماهیان مورد پرورش از گونه‌های مختلف باکتری‌ها شامل باسیلوس لیچنی‌فرمیس، نیتروزوموناس آئروپیه، کورینه‌باکتریوم آمونیاژنز و نیتروباکتر وینوگرادسکی و باسیلوس ساب‌تیلیس استفاده شد. در فرآیند دنتریفیکاسیون آمونیاک از طریق نیتروزوموناس به نیتريت تبدیل می‌شود. علاوه بر نیتروزوموناس برخی از باکتری‌ها مثل باسیلوس قادر به انجام این واکنش هستند و در برخی از بسته‌های پروبیوتیک بجای نیتروزوموناس از برخی سویه‌های باسیلوس و سودوموناس نیز استفاده می‌کنند (۳). نیتريت تولید شده در ادامه فرآیند دنتریفیکاسیون توسط نیتروباکتر به نیترات تبدیل می‌شود و یا حتی توسط برخی از باکتری‌ها می‌تواند به N₂ تبدیل شود. غلظت مورد استفاده باکتری‌ها بستگی به هدف مورد نظر و نوع فرآیند متفاوت است. چنان که در مطالعات مربوط به تجزیه زیستی، ضریبی از ۱۰^۸ است که به مقدار ۵ درصد به محیط پایه اضافه می‌شود (۴۲). غلظت پیش‌بینی شده و مورد استفاده در واقع مشابه تراکم باکتری‌های طبیعی استخر پرورش ماهی بوده و فاقد عوارض جانبی و بیماری‌زایی برای آبزیان است. معرفی و حضور این باکتری‌ها، موجب رشد، تکثیر و تقویت باکتری‌های مفید شده و باعث بهینه کردن محیط پرورش آبزی می‌شود (۲۰).

ترکیب باکتریایی مورد استفاده برای پالایش پساب و بهبود کیفیت آب باید هم در شرایط هوازی و هم در شرایط بی‌هوازی قادر به تجزیه آمونیاک، نیتريت و نیترات باشند (۷ و ۴۳). در مطالعه دیگری گزارش شد هنگامی که باکتری‌های فتوسنتتیک نظیر سودوموناس آئروژینوزا به آب مزرعه پرورش ماهی اضافه شد باعث حذف H₂S و آمونیاک شده، با تعدیل pH کیفیت آب را بهبود بخشید (۴۳). باکتری‌ها بسته به جنس

مدیریت کیفی آب است و در مقایسه با روش‌های غیرزیستی مانند استفاده از مواد شیمیایی همانند ازن، کلر، عوامل اکسید کننده، شلاته کننده و غیرفعال کننده و روش‌های فیزیکی مانند فیلتراسیون، هوادهی و گرما دارای محاسن و معایب متفاوتی است (۴۵). در صورت انجام تحقیقات تکمیلی در مقیاس کارگاه و مزرعه پیرامون این موضوع و آموزش آبی‌پروران و تامین لوازم مورد نیاز، استفاده از ترکیب باکتریایی تصفیه‌گر پساب به لحاظ ارزان و ساده بودن تکنیک مورد استفاده و عدم وجود عوارض و خطرات احتمالی مفید و موثر است.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

تشکر و قدردانی

این تحقیق بخشی از پایان‌نامه دکتری تخصصی بوم شناسی آبیان در دانشکده منابع طبیعی دانشگاه گیلان بود که در واحد آموزش علوم و صنایع شیلاتی میرزا کوچک خان اجرا گردید. بدین وسیله از همکاری و مساعدت کارکنان و سایر متصدیان آن واحد ها تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

وجود ندارد.

References

1. Pękala-Safińska A. Contemporary threats of bacterial infections in freshwater fish. Journal of veterinary research. 2018; 62(3): 261–267.
2. Kolarevic J, Baeverfjord G, Takle H, Ytteborg E, Reiten BK, Nergård S, Terjesen BF. Performance and welfare of Atlantic salmon smolt reared in recirculating or flow through aquaculture systems. Aquaculture. 2014; 432:15-25.
3. Neissi A, Rafiee G, Rahimi S, Farahmand H, Pandit S, Mijakovic I. Enriched microbial communities for ammonium and nitrite removal from recirculating aquaculture systems. Chemosphere. 2022 May 1;295:133811; 295:133811.
4. Bronzi P, Chebanov M, Michaels JT, Wei Q, Rosenthal H, Gessner J. Sturgeon meat and caviar production: Global update 2017. Journal of Applied Ichthyology. 2019; 35(1):257-66.
5. Zommiti M, Chikindas ML, Ferchichi M. Probiotics—live biotherapeutics: a story of success, limitations, and future prospects—not only for humans. Probiotics and antimicrobial proteins. 2020; 12(3):1266-89.
6. Robles-Porchas GR, Gollas-Galván T, Martínez-Porchas M, Martínez-Cordova LR, Miranda-Baeza A, Vargas-Albores F. The nitrification process for nitrogen removal in biofloc system aquaculture. Reviews in Aquaculture. 2020;12(4):2228-49.
7. Kolb SA, O'Loughlin EJ, Gsell TC. Characterization of phthalate-degrading bacteria from Asian carp microbiomes and riverine sediments. International Biodeterioration & Biodegradation. 2019; 143: 104727.
8. Talukdar S, Ringø E, Ghosh K. Extracellular tannase-producing bacteria detected in the digestive tracts of freshwater fishes (Actinopterygii: Cyprinidae and Cichlidae). Acta Ichthyologica Et Piscatoria. 2016; 46(3): 201-210. DOI:10.3750/AIP2016.46.3.04.
9. Frozza A, Fiorini A, Vendruscolo EC, Rosado FR, Konrad D, Rodrigues MC, Ballester EL. Probiotics in the rearing of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879) in a biofloc system. Aquaculture Research. 2021;52(9):4269-77.
10. Dutta D, Banerjee S, Mukherjee A, Ghosh K. Potential gut adherent probiotic bacteria isolated from rohu, *Labeo rohita* (Actinopterygii: Cypriniformes: Cyprinidae): Characterisation, exo-enzyme production, pathogen inhibition, cell surface hydrophobicity, and bio-film formation. Acta Ichthyologica et Piscatoria. 2018; 48:221-33.
11. Yegane H, Kazemi R, Shenavar Masoule A, SayedHassani H, Yousefi Jourdehi A, Ali hosseinpour Zelti A, Ghorbani Vaghei R. The effect of native probiotic on growth rate and some hematological and immune indices in *Huso huso* fingerling. Journal of Aquaculture Development. 2021; 15(1):125-36.
12. Ghafarnejad Moghadam F, Shondi M, Haddadi A, Amozgar MA. The Effect of Altitude on the Diversity and Abundance of Bacterial Populations in Soil Samples from Qale Kazem Khan Mountain, Lake Urmia. " Quarterly Journal of Microbial world.) .281-271 :(53) 4 ;2023 in Persian). <https://doi.org/10.30495/jmw.2022.1966410.2033>.
13. Monghit-Camarin MA, Cruz-Lacierda ER, Pakingking Jr R, Cuvin-Aralar ML, Traifalgar RF, Añasco NC, Austin F, Lawrence M. Bacterial microbiota of hatchery-reared freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879). Asian Fish. Sci. 2020; 33:241-8.
14. Garrity GM, Brenner DJ, Krieg NR, Staley JR, Manual BS. Systematic bacteriology. The Proteobacteria, Part C: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria, Bergey's Manual Trust, Department of Microbiology and Molecular Genetics. 2005;2.
15. Ziyarti M, Avakh Keysami M, Kafilzadeh F. Isolation and identification of microflora from rearing ponds and the digestive tract of western white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and their evaluation as probiotics. Journal of Microbial world. 2012; 5(3-4 (13)): 122-131. (in Persian).

16. Gao XY, Liu Y, Miao LL, Li EW, Sun GX, Liu Y, Liu ZP. Characterization and mechanism of anti-Aeromonas salmonicida activity of a marine probiotic strain, *Bacillus velezensis* V4. Applied microbiology and biotechnology. 2017; 101(9):3759-68.
17. Ghosh K, Banerjee S, Moon UM, Khan HA, Dutta D. Evaluation of gut associated extracellular enzyme-producing and pathogen inhibitory microbial community as potential probiotics in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. International Journal of Aquaculture. 2017; 7.
18. Daniel WW, Cross CL. Biostatistics: a foundation for analysis in the health sciences. John Wiley & Sons; 2018 Nov 13.
19. Pourasadi M, Sattari M, Avakh keysami M, Zamani H. Microbial treatment of effluent from elephantfish (*Huso huso*) breeding tanks under the influence of different concentrations of a mixture of *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Nitrosomonas* and *Nitrobacter* bacteria in the water circulation system. Aquatic Physiology and Biotechnology, 2025; 12(4): 39-56. (in Persian).
20. Tung Pang S, Ransangan J, Hatai K. Isolation, Identification and Preliminary Characterization of Candidate Probiotic Bacteria from the Intestine of Domesticated Goldfish (*Carassius auratus*). Journal of fisheries and environment. 2020; 44 (2): 39-52.
21. Herrera M, Heras J, Catabay C, Connor K, German D. Dietary-induced changes in the hindgut microbiome and metabolism of a marine herbivorous fish. Physiology. 2023;38(S1):5733889.
22. Keysami M A, Mohammadpour M, Saad CR. 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. 2012; 20: 499-511.
23. Huang Q, Sham RC, Deng Y, Mao Y, Wang C, Zhang T, Leung KM. Diversity of gut microbiomes in marine fishes is shaped by host-related factors. Molecular ecology. 2020; 29(24):5019-34.
24. Avakh Keysami M. Mohammadpour A, Rehanandeh M, Zoghi-Shalmani A. Isolation and identification of bacterial populations from water and sediment of silver carp breeding ponds. Journal of Microbial world. 2025; 17(4): 300-312(in Persian).
25. Ray AK, Ghosh K, Ringø E. Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: a review. Aquaculture Nutrition. 2012; 5: 465-492. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2012.00943.x>.
26. Ibrahim MD. Evolution of probiotics in aquatic world: Potential effects, the current status in Egypt and recent prospectives. Journal of advanced research. 2015; 6(6):765-91.
27. Keysami MA, Zoughi Shalmani A, Zahmatkesh Kumleh A, Karimi A. Screening of bacterial flora isolated from the gastrointestinal tract of silver carp broodstocks (*Hypophthalmichthys molitrix*) as probiotics. Journal of Animal Environment. 2022; 14(1): 285-292. (in Persian).
28. Hanol Bektas Z. Identification and probiotic properties of lactic acid bacterial isolated from freshwater fish. Iranian Journal of Fisheries Sciences. 2020; 19(4):1795-807.
29. Keysami M A, Mohammadpour M, Saad CR. 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. 2012; 20: 499-511.
30. Kafilzadeh F, Mirzaei N, Kargar M. Isolation and identification of mercury-resistant bacteria from water and sediments of the Kur River. Journal of Microbial world. 2008; 1(1), 43-49. (in Persian).
31. Epikmen, Erkmén T., Hamdi Avci, T. Tansel Tanrikul, S. Serap Birincioğlu, and Ahmet Aydoğan. "Pathological and microbiological investigations of naturally infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with *Flavobacterium psychrophilum*." (2020): 172-178.

32. Keysami M. A., Zoughi Shalmani A, Zahmatkesh Kumleh A, Karimi A. Isolation and identification of bacterial flora of the digestive tract of silver carp broodstock. Quarterly Journal of Animal Ecology, 2022; 14(4): 173-180. (in Persian).
33. Ye L, Amberg J, Chapman D. Gaikowski M, Liu WT. Fish gut microbiota analysis differentiates physiology and behaviour of invasive Asian carp and indigenous American fish. The ISME Journal. 2014; 8: 541–551.
34. Pang ST, Ransangan J, Hatai K. Isolation, identification and preliminary characterization of candidate probiotic bacteria from the intestine of domesticated goldfish (*Carassius auratus*). Journal of fisheries and environment. 2020; 44(2):39-52.
35. Zhao S, Hu N, Chen Z, Zhao B, Liang Y. Bioremediation of reclaimed wastewater used as landscape water by using the denitrifying bacterium *Bacillus cereus*. Bulletin of environmental contamination and toxicology. 2009; 83:337-40.
36. Karthik M, Bhavan PS, Manjula T. Growth promoting potential and colonization ability of probiotics (*Bacillus coagulans* and *Bacillus subtilis*) on the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* post-Larvae. Insights in Biology and Medicine. 2018;2:7-18.
37. Shi F, Huang Y, Yang M, Lu Z, Li Y, Zhan F, Lin L, Qin Z. Antibiotic-induced alternations in gut microflora are associated with the suppression of immune-related pathways in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). Frontiers in Immunology. 2022; 13:970125.
38. Avakh Keysami M, Akbari Kashli A, Abdollah Pourbiriya H, Avakh Keysami M. Investigation of the effect of *Micrococcus luteus* bacteria on growth efficiency, digestibility and bacterial load of the digestive tract of common carp (*Cyprinus carpio*, L). Wetland Ecobiology. 2024; 16(60): 1-14. (in Persian).
39. Sicuro B. The future of caviar production on the light of social changes: a new dawn for caviar?. Reviews in Aquaculture. 2019;11(1):204-19.
40. Lal J, Vaishnav A, Deb S, Gautam P, Pavankalyan M, Kumari K, Verma DK. Re-Circulatory Aquaculture Systems: A Pathway to Sustainable Fish Farming. Archives of Current Research International. 2024; 24(5): 799-810.
41. Todorov SD, Lima JM, Bucheli JE, Popov IV, Tiwari SK, Chikindas ML. Probiotics for aquaculture: Hope, truth, and reality. Probiotics and Antimicrobial Proteins. 2024; 16(6):2007-20.
42. von Ahnen M, Pedersen LF, Pedersen PB, Dalsgaard J. Degradation of urea, ammonia and nitrite in moving bed biofilters operated at different feed loadings. Aquacultural engineering. 2015; 69:50-9.
43. Pandey PK, Kumar VS. Biofilm in aquaculture production. In Advances in fisheries biotechnology 2022 (pp. 401-422). Singapore: Springer Nature Singapore.
44. Teitge F, Peppler C, Steinhagen D, Jung-Schroers V. Water disinfection by ozonation has advantages over UV irradiation in a brackish water recirculation aquaculture system for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Journal of fish diseases. 2020;43(10):1259-85.