University of Tehran

Journal of Fisheries

Home Page: https://jfisheries.ut.ac.ir

Online ISSN: 2423-7809

Isolation and Identification of probiotic yeasts and *Bacillus species* from the gastrointestinal tract of juvenile Beluga Sturgeon (*Huso huso*)

Mehdi Dehghan[1] | Hojatollah Jafaryan[2*] ✉ | Mehran Habibi Rezaei[3] | Mohammad Ali Amoozegar[4] |

1. Department of Fisheries, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran. Email: mehdi.dehghani@gmail.com
2. Department of Fisheries, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Golestan, Iran. Email: hojat.jafaryan@gmail.com
3. Department of Biology, Faculty of Biology, University of Tehran, Tehran, Iran. Email: mhabibirezaei@gmail.com
4. Department of Biology, Faculty of Biology, University of Tehran, Tehran, Iran. Email: amoozegar@ut.ac.ir

ARTICLE INFO

Article type:
Research Article

Article History:
Received: 31 July 2025
Revised: 14 December 2025
Accepted: 28 January 2026
Published online: 20 February 2026

Keywords:
Biochemical tests,
Beluga sturgeon,
Bacillus,
DNA amplification,
PCR.

ABSTRACT

The present study aimed to develop a comprehensive protocol for the optimal isolation and identification of indigenous probiotics from the gastrointestinal tract of aquatic species. To this end, intestinal mucus samples were collected from four periods of the gastrointestinal tract of juvenile beluga sturgeons (*Huso huso*) with an average weight of 89.9±19.2 g and an average length of 12.78±1.24 cm. After preliminary preparation, the samples were cultured on appropriate media. The isolated strains were then identified based on morphological and physiological characteristics, DNA amplification, gene sequencing, and phylogenetic data analysis. According to the results, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* were isolated and identified from the intestinal samples of the juvenile fish. Overall, the developed protocols demonstrated efficiency for the isolation and selection of probiotic strains, suggesting their potential applicability to other aquatic species as well.

Cite this article: Dehghan, M., Jafaryan, H., Habibi Rezaei, M., Amoozegar, M.A. (2026). Isolation and identification of probiotic yeasts and *Bacillus species* from the gastrointestinal tract of juvenile Beluga Sturgeon (*Huso huso*). *Journal of Fisheries*, 79 (1), 17-25. DOI: http//doi.org/10.22059/jfisheries.2026.394100.1457

© The Author(s) **Publisher:** University of Tehran Press.
DOI: http//doi.org/10.22059/jfisheries.2026.394100.1457

دانشگاه تهران

شیلات، مجله منابع طبیعی ایران

سایت نشریه: https://jfisheries.ut.ac.ir

شاپا الکترونیکی: ۷۸۰۹-۲۴۲۳

جداسازی و شناسایی مخمر و باسیلوس‌های پروبیوتیکی از دستگاه گوارش فیل ماهی (*Huso huso*) انگشت‌قد

مهدی دهقان[۱] | حجت‌الله جعفریان[۲*] | مهران حبیبی رضایی[۳] | محمد علی آموزگار[۴]

۱. گروه شیلات، دانشکدهٔ کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران. رایانامه: mehdi.dehghani@gmail.com

۲. گروه شیلات، دانشکدهٔ کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران. رایانامه: hojat.jafaryan@gmail.com

۳. گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ زیست‌شناسی، دانشگاه تهران، تهران، ایران. رایانامه: mhabibirezaei@gmail.com

۴. گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ زیست‌شناسی، دانشگاه تهران، تهران، ایران. رایانامه: amoozegar@ut.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
پژوهشی

تاریخ‌های مقاله:
تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۵/۰۹
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۹/۲۳
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۱/۰۸
تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۱۲/۰۱

کلیدواژه:
تست‌های بیوشیمیایی،
فنوتیپ‌سازی DNA،
فیل ماهی،
Bacillus،
PCR.

چکیده

هدف از اجرای تحقیق حاضر تدوین یک دستورالعمل جامع برای جداسازی و شناسایی بهینهٔ پروبیوتیک‌های بومی از دستگاه گوارش آبزیان بود. برای این منظور، نمونه موکوس روده طی ۴ مرحله از دستگاه گوارش بچه فیل‌ماهیان انگشت‌قد (*Huso huso*) با میانگین وزنی ۲/۱۹± ۹/۸۹ گرم و میانگین طولی ۱/۲۴±۱۲/۷۸ سانتی‌متر تهیه شد. نمونه‌ها پس از آماده‌سازی‌های اولیه توسط محیط کشت مناسب کشت داده شدند. سپس بر پایهٔ مشخصات مرفولوژیکی، فیزیولوژیکی، فنوتیپ‌سازی DNA، توالی ژنی و آنالیز داده‌های فیلوژنتیکی شناسایی سویه‌ها انجام شد. براساس نتایج به‌دست آمده پروبیوتیک‌های *Bacillus lichenniformis*، *Bacillus subtilis* و مخمر *Saccharomyces cerevisiae* از رودهٔ بچه ماهیان جداسازی و شناسایی گردید. در مجموع براساس نتایج به‌دست آمده دستورالعمل‌های ارائه شده برای جداسازی و انتخاب پروبیوتیک‌ها از کارایی لازم برخوردار بودند و می‌توان از آنها در پرورش سایر آبزیان نیز استفاده کرد.

استناد: دهقان؛ مهدی، جعفریان؛ حجت‌الله، حبیبی رضایی؛ مهران، آموزگار؛ محمدعلی (۱۴۰۵). جداسازی و شناسایی مخمر و باسیلوس‌های پروبیوتیکی از دستگاه گوارش فیل‌ماهی (*Huso huso*) انگشت‌قد. *نشریهٔ شیلات، مجله منابع طبیعی ایران*، ۷۹ (۱)، ۲۵-۱۷. DOI: http//doi.org/10.22059/jfisheries.2026.394100.1457

© نویسندگان.

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.
DOI: http//doi.org/10.22059/jfisheries.2026.394100.1457

۱. مقدمه

نقش آبزی‌پروری در پاسخ به کمبود تغذیهٔ جهانی در سال‌های اخیر نمود بیشتری یافته است، این صنعت به‌عنوان یکی از نظام‌های تولید غذا در جهان به‌سرعت در حال رشد است و مقادیر زیادی از تولیدات کنونی را از سوی کشورهای در حال توسعه تشکیل می‌دهند. بخش آبزی‌پروری در کنار رشد قابل توجهی که طی سال‌های گذشته داشته؛ همواره با مشکلاتی از جمله کمبود آب و زمین، کاهش کیفیت آب، شیوع بیماری‌ها و غیره نیز مواجه بوده است (Lin, 1995; Subasinghe, 1997)، برای برطرف کردن این مشکلات همواره راه‌حل‌هایی از جمله استفاده از داروهای پادزیست (آنتی‌بیوتیک‌ها) نیز ارائه شده که موفقیت چندانی به‌همراه نداشته است (Lauzon *et al*., 2008). با گذشت سال‌ها، استفاده از این داروها مشکلات عدیده‌ای از جمله مقاوم شدن عوامل بیماری‌زا، مسائل زیست‌محیطی و انسانی را به‌وجود آوردند (Schar *et al*., 2021; Milijasevic *et al*., Pepi & Focardi, 2021; 2024).

رویکردی جامع‌تر برای مدیریت سلامت در آبزی‌پروری در نظر گرفتن حیوان پرورشی و محیط اطراف آن به‌صورت یکپارچه است (Lorgen-Ritchie *et al*., 2023). شواهد نشان می‌دهد که جوامع میکروبی هم در داخل و هم محیط اطراف موجودات آبزی می‌توانند به‌طور مستقیم در بهره‌وری از نظر رشد، مقاومت در برابر بیماری و رفاه حیوان نقش داشته باشند (Perry *et al*., 2020; Rajeev *et al*., 2021; Dai *et al*., 2022; Niu *et al*., 2023; Zhang *et al*., 2024).

در دهه‌های اخیر، استفاده از پروبیوتیک‌ها به‌عنوان راه‌حلی جایگزین برای مقابله با مشکلات میکروبی و بهبود سلامت میزبان در آبزی‌پروری گسترش یافته است (El-Bab *et al*., 2022; Rawling *et al*., 2023; Padeniya *et al*., 2025). این راهکار شامل استفادهٔ هدفمند از باکتری‌های مفید برای بهبود ترکیب میکروبی دستگاه گوارش میزبان و ارتقای عملکرد آن است (Ringo and Birkbeck, 1999).

با این حال، فرآیند بومی‌سازی پروبیوتیک‌ها در آبزی‌پروری هنوز با چالش‌های مواجه است. در این میان، جداسازی و استفاده از سویه‌های بومی از دستگاه گوارش آبزیان، یکی از رویکردهای مؤثر در توسعهٔ راهکارهای بومی و مؤثر در آبزی‌پروری به‌شمار می‌رود. به‌عنوان مثال، Bairagi و همکاران (۲۰۰۴) سویه‌های *Bacillus subtilis* و *Bacillus circulans* استخراج شده از دستگاه گوارش ماهیان کپور و تیلاپیا را در جیرهٔ غذایی ماهی روهو (*Labeo rohita*) به‌کار گرفتند. همچنین Makridis و همکاران (۲۰۰۱) نیز از طریق تلقیح سویه‌های *Vibrio* جداشده از رودهٔ ماهی هالیبوت (*Hippoglossus hipoglossus*)، موفق به مقابله با پاتوژن‌های *Vibrio* شدند.

با توجه به نبود اطلاعات کافی در خصوص شناسایی و جداسازی باکتری‌های مفید از محیط‌های پرورشی آبزیان، هدف از اجرای این مطالعه، تدوین یک دستورالعمل جامع برای جداسازی و شناسایی بهینهٔ پروبیوتیک‌های بومی از دستگاه گوارش بچه‌ماهیان انگشت‌قد فیل‌ماهی (*Huso huso*) بود.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱. جداسازی سویه‌های باکتریایی

به‌منظور جداسازی سویه‌های باکتریایی از دستگاه گوارش بچه فیل‌ماهیان (*H. huso*) انگشت‌قد به ظاهر سالم با میانگین وزنی ۹/۸۹±۲/۱۹ گرم، میانگین طولی ۱۲/۷۸±۱/۲۴ سانتی‌متر و میانگین وزنی روده ۱/۳۵±۰/۷۰ گرم در چهار نوبت نمونه‌برداری شدند. در همین ارتباط، بچه‌ماهیان پس از ۲۴ ساعت گرسنگی سریعاً به آزمایشگاه منتقل و از طریق ضربه به سر کشته شدند. جهت استریل کردن به‌مدت یک دقیقه در بنزالکونیوم کلراید ۱ درصد و سپس با آب مقطر استریل شستشو شدند. شکم بچه‌ماهیان با استفاده از تیغ جراحی استریل باز شد. نمونه‌های روده پس از جداسازی درون هاون چینی استریل هموژن گردید. سپس رقت‌های سریالی در دامنهٔ 10^{-1} تا 10^{-8} با استفاده از محلول نمکی نرمال استریل (۰/۸۷ w/v Nacl درصد) تهیه شد. حدود ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های تهیه شده به محیط کشت تریپتیک سوی آگار و آگار خوندار منتقل شد. پلت‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور با دمای ۳۵ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفتند. پرگنه‌های تشکیل شده مجدداً در محیط کشت آگار خوندار به‌صورت خالص کشت شدند.

۲-۲. شناسایی سویه‌های باکتریایی کاندید

ابتدا میکروارگانیسم‌های موجود در دستگاه گوارش نمونه‌های منتخب استخراج شدند. سپس با بهره‌گیری از برخی مشخصات فنوتیپی از جمله شکل باکتری، نوع پرگنه، واکنش رنگ‌پذیری به گرم، تست‌های بیوشیمیایی استاندارد طبق رفرنس Koneman از جمله واکنش کاتالاز، اکسیداز، تخمیر گلوکز، آرابینوز، ساکاروز، مانیتول، اتولیز سیترات، اتولیز نیترات، واکنش اندول، تست وی پی- ام آر، حرکت باکتری، تولید گاز هیدروژن، تست اتولیز ژلاتین، ارنتین، لیزین و تولید گاز در گلوکز، شناسایی ژنتیکی سویه‌ها از طریق استخراج DNA و مشخص کردن توالی ژنوم آنها و مقایسه و شناسایی آنها توسط بانک جهانی ژن (NCBI)، سویه‌های باسیلوسی کاندید جداسازی شدند. سپس در محیط کشت تریپتیک سوی براث، به‌صورت خالص کشت داده شدند (Sneath and Peter, 1986).

۲-۳. جداسازی سویه‌های مخمری

پس از تهیهٔ هموژن از دستگاه گوارش بچه‌ماهیان و ایجاد رقت‌های متوالی حدوداً ۱۰۰ میکرولیتر به پلت حاوی محیط PDA منتقل شدند. به‌مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۵ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه شدند. پرگنه‌های تشکیل شده مجدداً در محیط کشت PDA به‌صورت خالص کشت داده شدند.

۲-۴. شناسایی سویه‌های مخمری کاندید

برای تأیید حضور کلنی‌های مخمری آزمایش مستقیم میکروسکوپی انجام شد. برای این منظور، مقداری از کلنی با یک قطره لاکتوفنو کاتن بلو روی لام مخلوط شد، سپس یک لامل روی آن قرار داده شد و با عدسی ۱۰× و سپس ۴۰× بررسی شد. پس از تأیید نتایج کلنی‌های روی پلت شمارش شد. براساس شباهت رنگ، اندازه و سایر مشخصات یک کلنی از از بین کلنی‌های مشابه برای آزمایش‌های تکمیلی روی محیط کشت PDA کشت داده شد. همچنین سویه‌های مخمر کاندید توسط روش‌های بیوشیمیایی نیز با استفاده از کیت تشخیص مخمر RapID™ مورد شناسایی قرار گرفتند.

۳. یافته‌های پژوهش

نتایج شناسایی بیوشیمیایی باکتری‌های جنس *Bacillus* در جدول ۱ نشان داده شده است. بر پایهٔ این داده های به‌دست آمده، دو گونهٔ باکتریایی *Bacillus licheniformis* و*Bacillus subtilis* جداسازی و شناسایی شدند که هر دو به‌عنوان زیست‌یارهای مؤثر در بهبود عملکرد و سلامت آبزیان شناخته می‌شوند.

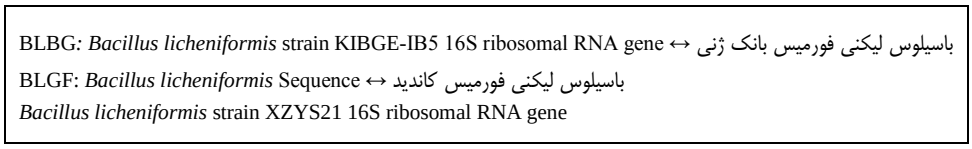
جدول ۱- انواع تست بیوشیمیایی باکتریایی طبق استاندارد جدول Koneman

تست	Ox	Cat	Gr	Glu	Ara	Suc	Man	Cit	Nit
B. *lichen*	−	+	+	+	+	−	+	+	+
B. *subtilis*	−	+	+	+	+	+	+	+	+
تست	Ind	VP	MR	Mot	H_2S	Gel	Arg	Lys	Gas (in Glu)
B. *lichen*	−	+	−	+	−	+	−	+	−
B. *subtilis*	−	+	−	+	−	+	−	+	−

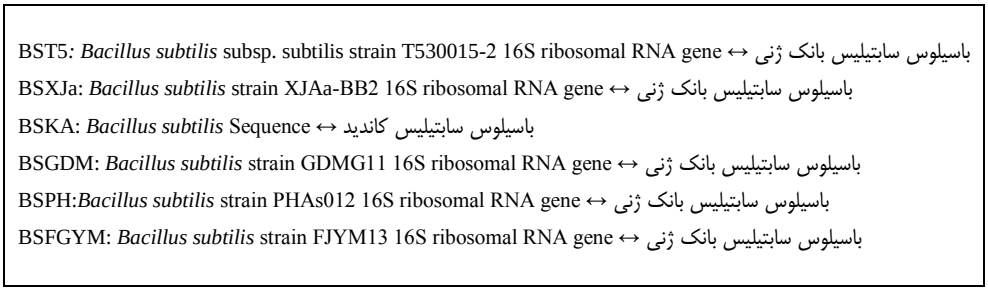
نکته: در جدول فوق، علامت "+" نشان‌دهندهٔ تست مثبت و "−" نشان‌دهندهٔ تست منفی است؛Ox : تست اکسیداز؛ Cat: تست کاتالاز؛ Gr: رنگ‌آمیزی گرم؛ Glu: تست گلوکز؛ Ara: تست آرابینوز؛ Suc: تست ساکاروز؛ Man: تست مانیتول؛ Cit: تست سیترات؛ Nit: تست نیترات؛ Ind: تست ایندول؛ VP: تست وگس–پروسکائر؛ MR: تست متیل رد؛ Mot: تست تحرک؛ H_2S: تست سولفید هیدروژن؛ Gel: تست هیدرولیز ژلاتین؛ Arg: تست آرژنین؛ Lys: تست لیزین؛ Gas (in Glu): تست تولید گاز در گلوکز

نتایج شناسایی ژنتیکی باکتری‌های باسیلوسی در شکل‌های ۱ و ۲ ارائه شده است. براساس نتایج، سویه‌های باکتریایی کاندیدای جداسازی‌شده از دستگاه گوارش فیل‌ماهی، در درخت فیلوژنتیک در شاخه‌ای مشترک با سویه‌های مرجع موجود در بانک‌های ژنی

قرار گرفت که نشان‌دهندهٔ شباهت بالای توالی ژنومی آن‌هاست. نتایج شناسایی بیوشیمیایی مخمر *S. cerevisiae* در جدول ۲ ارائه شده است.



شکل ۱- درخت فیلوژنی برای شناسایی *B. licheniformis*



شکل ۲- درخت فیلوژنیک برای شناسایی *B. subtilis*

جدول ۲- تست‌های بیوشیمیایی برای شناسایی مخمر (Rapid™ Yeast Plus Panels)

تست	Glu	Mal	Suc	Tre	Raf	Lip	Naga	α-Glu	β-Glu
S. cerevisiae	+	-/v	+	-	+	-	-	+	+
تست	Onpg	α-Gal	β-Fuc	Phs	Pcho	Ure	Prp	His	Lgy
S. cerevisiae	-	-	-	-	-	-	-	+/v	+/v

نکته: در جدول فوق، علامت "+" نشان‌دهندهٔ تست مثبت، "−" نشان‌دهندهٔ تست منفی و "v" نشان‌دهندهٔ واکنش متغیر است؛ Glu: گلوکز، Mal: مالتوز،Suc: ساکاروز،Tre: ترهالوز،Raf: رافینوز، Lip: لیپاز،Naga: ان-استیل بتا-گلوکزامینیداز،α-Glu: آلفا-گلوکوزیداز،β-Glu: بتا-گلوکوزیداز، Onpg: بتا-گالاکتوزیداز، α-Gal: آلفا-گالاکتوزیداز، β-Fuc: بتا-فوکوسیداز،Phs: فسفاتاز،Pcho : ترکیبات پلی‌هیدروکسی،Ure: اوره‌آز،Pro: پرولین،Hist: هیستیدین،Lgy: ال-گلوتامیک اسید

۴. بحث و نتیجه‌گیری نهایی

اجرای مدیریت میکروبی از طریق به‌کارگیری پروبیوتیک‌ها می‌تواند موجب افزایش بازدهی رشد و تقلیل هزینه‌های پرورشی گردد (Yanbo and Zirong, 2006). استفاده از باکتری‌های انتخابی برای رشد و بهبود مناسب جمعیت میکروبی میزبان از جمله ایده‌های جدیدی است که از طریق دستکاری جمعیت باکتریایی در آبزیان انجام می‌گیرد. این باکتری‌ها از یک سو درصد بقاء آبزیان را افزایش داده و از طرفی با بهینه‌سازی قابلیت هضم و جذب ترکیبات مغذی، باعث افزایش کارآیی تغذیه و ارتقاء عملکرد رشد آنها می‌شوند. بنابراین، به‌کارگیری این میکروارگانیسم‌ها می‌تواند در افزایش عملکرد و کاهش هزینه‌های تغذیه‌ای آبزیان پرورشی بسیار مفید واقع گردد. در واقع مدیریت نوین میکروبی تکنیکی همسو با ساختارهای بوم‌شناختی است که تا حد زیادی منجر به بهینه‌سازی عملیات پرورش شده و کاهش هزینه‌ها و افزایش تولید را به‌همراه دارد. بنابراین به‌کارگیری باکتری‌های پروبیوتیکی غیربومی که به‌صورت محصولات تجاری عرضه می‌شوند، استفاده از گونه‌های بومی ایزوله شده از دستگاه گوارش آبزیان می‌تواند در راستای اصول بوم‌شناختی موجب توسعهٔ صنعت آبزی‌پروری کشورمان گردد.

به‌نظر می‌رسد بسیاری از ناکامی‌ها در جداسازی و شناسایی پروبیوتیک‌ها به انتخاب نامناسب میکروارگانیزم‌ها مربوط باشد، که این امر به این دلیل است که در آبزی‌پروری عمدتاً انتخاب سویه‌های پروبیوتیکی یک فرآیند تجربی بر پایهٔ مدارک محدود علمی است (Verschuere *et al*., 2000). بنابراین طراحی یک دستورالعمل، مرحله‌ای جهت انتخاب سویه‌های پروبیوتیکی بومی برای هر

گروه از آبزیان ضروری است. البته باید با توجه به هدفی که از مصرف پروبیوتیک‌ها دنبال می‌شود، برخی آزمایش‌ها و معیارهای انتخابی اهمیت بیشتری خواهند داشت (Fuller, 2000). برای دستیابی به نتایج بهتر، همان‌گونه که در مطالعهٔ حاضر نیز صورت پذیرفت جداسازی پروبیوتیک‌های بالقوه از میزبان یا از محیط اطراف آن در اولویت قرار می‌گیرد (Verschuere *et al*., 2000). با رعایت این موارد احتمال به‌دست آوردن باکتری‌ها با اثرات مثبت پروبیوتیکی و همچنین پایداری در محیط و دستگاه گوارش افزایش یابد.

دستگاه گوارش آبزیان به‌عنوان زیستگاه اکولوژیکی مؤثری برای استقرار و تکثیر میکروارگانیسم‌ها شناخته می‌شود؛ به‌گونه‌ای که تراکم این موجودات در روده، به‌مراتب بیشتر از غلظت آنها در محیط‌های پیرامون آبزیان است (Austin and Austin, 1993). یکی از سویه‌هایی که به‌وفور در دستگاه گوارش آبزیان حضور دارد باسیلوس‌ها هستند. این سویه‌ها عمدتاً از طریق وجود خصوصیاتی از جمله هوازی اختیاری، میله‌ای شکل و کاتالاز مثبت، از دیگر باکتری‌های به فرم اسپوردار شناخته می‌شوند (Logan and Vos, 2015; Murray *et al*., 2015).

Bacillus subtilis به‌وسیلهٔ واکنش‌های بیوشیمیایی، ریخت‌شناسی تک‌سلولی میله‌ای شکل و اسپورهای بیضوی شکل از دیگر اعضاء جنس باسیلوس متمایز می‌شود (Luhur *et al*., 2020; Errington and Aart, 2020). محققینی از جمله Kumar و همکاران (۲۰۰۶) معتقدند که این سویه جزء باکتری‌های بومی دستگاه گوارش ماهی نبوده ولی از دستگاه گوارش ماهیان ساحلی (Sugita *et al*., 1998)، میگوها (Sharmila *et al*., 1996)، دوکفه‌ای‌ها (Sugita, 1981)، استخرهای پرورش میگو (Vaseeharan and Ramasamy, 2003) و لارو میگوهای پرورشی (Rengpipat *et al*., 1998) جداسازی شده است.

اغلب باسیلوس‌ها آنتی‌بیوتیک‌هایی نظیر دیفیسیدین، اکسی دیفیسیدین، باکیتراسین، پلی‌میکسین، سابتیلین، مایکوباسیلین، باسیلین، گرامایسین و یا باسیلومایسین–ب را تولید کرده و در شرایط آزمایشگاهی و نیز داخل بدن موجود زنده، خاصیت آنتاگونستکی با باکتری‌های پاتوژن را دارند (Korzybski *et al*., 1978; Zimmerman *et al*., 1987).

تأثیر پروبیوتیک‌های جداسازی شده از دستگاه گوارش در خصوص ارتقاء معیارهای رشد و افزایش بقاء در آبزیان در تحقیق‌های زیادی به اثبات رسیده است (Kandeepan, 2015; Thankappan *et al*., 2015; Merrifield and Carnevali, 2014; Muthukumar and Kandeepan, 2015; Reda *et al*., 2018; Kavitha *et al*., 2018; Alonso *et al*., 2019; Kuebutornye *et al*., 2020; Torres-Maravilla *et al*., 2024). به‌عنوان مثال، سویه‌های جدا شده از دستگاه گوارش ماهیان خاویاری در مقایسه با استفاده از زیست‌یارهای تجاری از عملکرد بهتری برخوردار ند (Jafaryan *et al*., 2011). همسوی با این نتایج Gosh و همکاران (۲۰۰۴) نیز تأیید کردند که *B. circulans* ایزوله شده از رودهٔ ماهی روهو (*L. rohita*)، تاثیر معنی‌داری در رشد بچه ماهیان داشت. استفاده از باکتری *Lactobacillus fructivorans* ایزوله شده از دستگاه گوارش ماهی سیم (*Sparus aurata*) و *L. plantarum* ایزوله شده از مدفوع انسان توانست طی غنی‌سازی با موفقیت به ناپلی رویتفر (*Brachionus plicatilis*) الحاق شده و طی تغذیه، باعث افزایش رشد و بقاء در این ماهی گردد (Carnevali *et al*., 2004).

غلظت‌های مختلفی از *B. circulans* ایزوله شده از رودهٔ ماهی روهو به‌صورت مکمل تاثیرات مثبت و معنی‌داری بر رشد این گونه داشت. طبق گزارش این محققین باسیلوس‌های جدا شده از رودهٔ ماهیان پرورشی عملکرد بهتری را در مقایسه با باسیلوس‌های تجاری دارند (Ghosh *et al*., 2002). در تحقیقی دیگر Jafaryan و همکاران (۲۰۱۱) نیز گزارش دادند که استفاده از باسیلوس‌های جدا شده از دستگاه گوارش فیل‌ماهیان بهترین نتیجه را در قبال رشد بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) نسبت به پروبیوتیک‌های تجاری داشتند. در همین ارتباط Balcazar و همکاران (۲۰۰۷) بیان داشتند که تفاوت‌های عملکرد باکتری‌های پروبیوتیکی به مواردی نظیر ژنتیک، تغذیه و عوامل محیطی می‌تواند بستگی داشته باشد.

۵. نتیجه‌گیری نهایی

در مجموع براساس نتایج به‌دست آمده به‌نظر می‌رسد که دستورالعمل ارائه شده برای جداسازی و شناسایی پروبیوتیک‌ها جهت استفاده در آبزی‌پروری از کارایی لازم برخوردار است و می‌توان از این دستورالعمل برای سایر آبزیان نیز استفاده نمود. از دیگر مزایای این رویکرد آن است که در صورت شناسایی‌نشدن سویه‌های پروبیوتیک مناسب برای یک گونهٔ خاص در پایان فرآیند،

می‌توان بر پایهٔ داده‌های به‌دست‌آمده، سویه‌های پروبیوتیک بالقوه‌ای را برای سایر آبزیان مانند آرتمیا و دیگر سخت‌پوستان پیشنهاد کرد. این ویژگی زمینه را برای بررسی و مقایسهٔ هدفمندتر فراهم می‌کند تا بتوان وجه تمایز این روش را در انتخاب گزینشی ذخیرهٔ اولیه؛ به‌ویژه با تمرکز بر باکتری‌های جنس *Bacillus* و مخمرهای تغذیه‌ای مفید نظیر *Saccharomyces cerevisiae*؛ بر پایهٔ داده‌ها و مطالعات پیشین برجسته ساخت.

تشکر و قدردانی

از حمایت‌های مادی دانشگاه گنبدکاووس در راستای اجرای تحقیق حاضر قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ تضاد منافعی در رابطه با نویسندگی و یا انتشار این مقاله ندارند.

References

Alonso, S., Carmen Castro, M., Berdasco, M., de la Banda, I. G., Moreno-Ventas, X., de Rojas, A.H., 2019. Isolation and partial characterization of lactic acid bacteria from the gut microbiota of marine fishes for potential application as probiotics in aquaculture. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 11(2), 569-579. DOI: 10.1007/S12602-018-9439-2

Austin, B., Austin, D.A., 1993. Bacterial Fish Pathogens: Diseases in Farmed and Wild Fish. Ellis-Horwood Ltd., Chichester, UK, pp. 112-117.

Bairagi, A., Sarkar Ghosh, K., Sen, S.K., Ray, A.K., 2004. Evaluation of the nutritive value of *Leucaena leucocephala* leaf meal, inoculated with fish intestinal bacteria Bacillus subtilis and Bacillus circulans in formulated diets for rohu, *Labeo rohita* (Hamilton) fingerlings. *Aquaculture Research* 35(5), 436–446. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2004.01028.x

Carnevali, O., Zamponi, M.C., Sulpizio, R., Rollo, A., Nardi, M., Orpianesi, C., Cresci, A., 2004. Administration of probiotic strain to improve sea bream wellness during development. *Aquaculture International* 12, 377-386. DOI: 10.1023/B:AQUI.0000042141.85977.bb

Dai, W., Dong, Y., Ye, J., Xue, Q., Lin, Z., 2022. Gut microbiome composition likely affects the growth of razor clam *Sinonovacula constricta*. *Aquaculture* 550, 737847. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2021.737847

Del'Duca, A., Cesar, D. E., Diniz, C.G., Abreu, P.C. 2013. Evaluation of the presence and efficiency of potential probiotic bacteria in the gut of tilapia (Oreochromis niloticus) using the fluorescent in situ hybridization technique. *Aquaculture* 388, 115-121. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2013.01.019

El-Bab, A.F.F., Saghir, S.A., El-Naser, I.A.A., El-Kheir, S.M.A., Abdel-Kader, M.F., Alruhaimi, R.S., El-Raghi, A.A., 2022. The effect of dietary Saccharomyces cerevisiae on growth performance, oxidative status, and immune response of sea bream (*Sparus aurata*). Life 12(7), 1013. DOI: 10.3390/life12071013

Errington, J., van der Aart, L.T., 2020. Microbe Profile: Bacillus subtilis: model organism for cellular development, and industrial workhorse. *Microbiology* 166(5), 425-427. DOI: 10.1099/mic.0.000922

Fuller, R., 1992. History and development of probiotics. Probiotics: The Scientific Basis 1, 1-8. DOI: 10.1007/978-94-011-2364-8_1

Ghosh, K., Sen, S., Ray, A., 2002. Growth and survival of rohu, *Labeo rohita* (Hamilton, 1822) spawn feed diets fermented with intestinal bacterium, *Bacillus circulans*. *Acta Ichthyologica et Piscatoria* 32(2), 83-92.

Jafaryan, H., Soltani, M., Taati, M., Nazarpour, A., Morovat, R., 2011. The comparison of performance of isolated sturgeon gut Bacillus (*Acipenser persicus* and *Huso huso*) with commercial microbial products on growth and survival of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae. *Journal of Veterinary Research* 66(1), 39–84. (In Persian)

Kavitha, M., Raja, M., & Perumal, P., 2018. Evaluation of probiotic potential of Bacillus spp. isolated from the digestive tract of freshwater fish *Labeo calbasu* (Hamilton, 1822). *Aquaculture Reports* 11, 59-69. DOI: 10.1016/j.aqrep.2018.07.001

Korzybski, T., Kowszyk-Gindifer, Z., Kurylowicz, W., 1978. Antibiotics isolated from the genus Bacillus (*Bacillaceae*). Antibiotic-origin, nature and properties. *American Society for Microbiology, Washington, DC* 3, 1529-1661.

Kuebutornye, F. K., Lu, Y., Abarike, E. D., Wang, Z., Li, Y., Sakyi, M.E., 2020). In vitro assessment of the probiotic characteristics of three Bacillus species from the gut of Nile tilapia, Oreochromis niloticus. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 12(2), 412-424. DOI: 10.1007/s12602-019-09562-5

Kumar, R., Mukherjee, S.C., Prasad, K.P., Pal, A.K., 2006. Evaluation of Bacillus subtilis as a probiotic to Indian major carp *Labeo rohita* (Ham.). *Aquaculture Research* 37(12), 1215-1221. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2006.01551.x

Logan, N.A., Vos, P.D., 2015. Bacillus. In: Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria, 1–163. DOI: 10.1002/9781118960608.gbm00530

Lorgen-Ritchie, M., Uren Webster, T., McMurtrie, J., Bass, D., Tyler, C.R., Rowley, A., Martin, S.A., 2023. Microbiomes in the context of developing sustainable intensified aquaculture. *Frontiers in Microbiology* 14, 1200997. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1200997

Luhur, J., Chan, H., Kachappilly, B., Mohamed, A., Morlot, C., Awad, M., Rodrigues, C.D., 2020. A dynamic, ring-forming MucB/RseB-like protein influences spore shape in *Bacillus subtilis*. *PLoS Genetics* 16(12), e1009246. DOI: 10.1371/journal.pgen.1009246

Makridis, P., Bergh, Ø., Skjermo, J., Vadstein, O., 2001. Addition of bacteria bioencapsulated in *Artemia metanauplii* to a rearing system for halibut larvae. *Aquaculture International* 9, 225-235. DOI: 10.1023/A:1016815929846

Merrifield, D. L., & Carnevali, O. (2014). Probiotic modulation of the gut microbiota of fish. *Aquaculture Nutrition: Gut health, probiotics and prebiotics*, 185-222. DOI: 10.1002/9781118897263.ch8

Milijasevic, M., Veskovic-Moracanin, S., Milijasevic, J.B., Petrovic, J., Nastasijevic, I., 2024. Antimicrobial resistance in aquaculture: risk mitigation within the One Health context. *Foods* 13(15), 2448. DOI: 10.3390/foods13152448

Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Pfaller, M.A., 2015. Medical Microbiology E-Book. Elsevier Health Sciences.

Muthukumar, P., Kandeepan, C., 2015. Isolation, identification and characterization of probiotic organisms from intestine of fresh water fishes. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 4(3), 2319-7706.

Niu, S., Zhang, K., Li, Z., Xie, J., Wang, G., Li, H., Gong, W., 2023. Analysis of the structure and function of microbial community in late-stage of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) farming ponds. *Aquaculture Reports* 30, 101556. DOI: 10.1016/j.aqrep.2023.101556

Padeniya, U.M., Davis, D.A., Wells, D.E., Harrison, C.E., LaFrentz, B. R., Beck, B.H., Roy, L.A., Farmer, M., Bruce, T.J., 2025. Influence of dietary fermented yeast products (*Saccharomyces cerevisiae*) on performance, health and microbiome of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and the influence of discharge water in the production of romaine lettuce (*Lactuca sativa*). *Animal Feed Science and Technology* 325, 116348. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2025.116348

Pepi, M., Focardi, S., 2021. Antibiotic-resistant bacteria in aquaculture and climate change: A challenge for health in the Mediterranean area. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 18(11), 5723. DOI: 10.3390/ijerph18115723

Perry, W.B., Lindsay, E., Payne, C.J., Brodie, C., Kazlauskaite, R., 2020. The role of the gut microbiome in sustainable teleost aquaculture. *Proceedings of the Royal Society B* 287(1926), 20200184. DOI: 10.1098/rspb.2020.0184

Rad, F., Köksal, G., Kindir, M., 2003. Growth performance and food conversion ratio of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt) at different daily feeding rates. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences* 27(5), 1085-1090.

Rajeev, R., Adithya, K.K., Kiran, G.S., Selvin, J., 2021. Healthy microbiome: a key to successful and sustainable shrimp aquaculture. *Reviews in Aquaculture* 13(1), 238-258. DOI: 10.1111/raq.12471

Rawling, M., Schiavone, M., Apper, E., Merrifield, D.L., Castex, M., Leclercq, E., Foey, A., 2023. Yeast cell wall extracts from Saccharomyces cerevisiae varying in structure and composition differentially shape the innate immunity and mucosal tissue responses of the intestine of zebrafish (*Danio rerio*). *Frontiers in Immunology* 14, 1158390. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1158390

Reda, R. M., Selim, K. M., El-Sayed, H.M., El-Hady, M.A., 2018. In vitro selection and identification of potential probiotics isolated from the gastrointestinal tract of Nile tilapia, Oreochromis niloticus. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 10(4), 692-703. DOI: 10.1007/s12602-017-9314-6

Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyatiratitivorakul, S., Menasveta, P., 1998. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp Penaeus monodon survival and growth. *Aquaculture* 167(3-4), 301-313. DOI: 10.1016/S0044-8486(98)00305-6

Ringø, E., Birkbeck, T.H., 1999. Intestinal microflora of fish larvae and fry. *Aquaculture Research* 30(2), 73-93.

Schar, D., Zhao, C., Wang, Y., Larsson, D.J., Gilbert, M., Van Boeckel, T.P., 2021. Twenty-year trends in antimicrobial resistance from aquaculture and fisheries in Asia. *Nature Communications* 12(1), 5384. DOI: 10.1038/s41467-021-25655-8

Sharmila, R., Abraham, T.J., Sundararaj, V., 1996. Bacterial flora of semi-intensive pond-reared *Penaeus indicus* (H. Milne Edwards) and the environment. *Journal of Aquaculture in the Tropics* 11, 193-203.

Sugita, H., 1981. Bacterial flora of coastal bivalves. *Nippon Suisan Gakkaishi* 47, 655-661.

Sugita, H., Hirose, Y., Matsuo, N., Deguchi, Y., 1998. Production of the antibacterial substance by *Bacillus* sp. strain NM 12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish. *Aquaculture* 165(3–4), 269-280. DOI: 10.1016/S0044-8486(98)00267-1

Thankappan, B., Ramesh, D., Ramkumar, S., Natarajaseenivasan, K., Anbarasu, K., 2015. Characterization of Bacillus spp. from the gastrointestinal tract of Labeo rohita—towards to identify novel probiotics against fish pathogens. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 175(1), 340-353. DOI: 10.1007/s12010-014-1270-y

Torres-Maravilla, E., Parra, M., Maisey, K., Vargas, R.A., Cabezas-Cruz, A., Gonzalez, A., Tello, M., Bermúdez-Humarán, L.G., 2024. Importance of probiotics in fish aquaculture: towards the identification and design of novel probiotics. Microorganisms, 12(3), 626. DOI: 10.3390/microorganisms12030626

Vaseeharan, B., Ramasamy, P., 2003. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by Bacillus subtilis BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp Penaeus monodon. *Letters in Applied Microbiology* 36(2), 83-87. DOI: 10.1046/j.1472-765X.2003.01255.x

Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W., 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64(4), 655–671. DOI: 10.1128/mmbr.64.4.655-671.2000

Yanbo, W., 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. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2005.09.003

Zhang, X., Hua, J., Song, Z., Li, K., 2024. A review: Marine aquaculture impacts marine microbial communities. *AIMS Microbiology* 10(2), 239. DOI: 10.3934/microbiol.2024012

Zimmerman, S.B., Schwartz, C.D., Monaghan, R.L., Pelak, B.A., Weissberger, B., Gilfillan, E.C., Stapley, E.O., 1987. Difficidin and Oxydifficidin: Novel broad spectrum antibacterial antibiotics produced by *Bacillus subtilis* I. Production, taxonomy and antibacterial activity. *The Journal of Antibiotics* 40(12), 1677-1681. DOI: 10.7164/antibiotics.40.1677