(DOI): 10.22034/AEJ.2020.131119

افزایش کیفت آب محیط پرورش با به‌کارگیری باکتری‌های *Dyadobacter* sp. (no. 68) و *Janthinobacterium* sp. (no. 100) و مقایسه شاخص‌های خون‌شناسی در یک سازگان پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

- **علیرضا نیسی**: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
- **غلامرضا رفیعی***: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
- **حمید فرحمند**: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
- **شادی رحیمی**: گروه زیست شناسی و مهندسی زیست شناسی دانشگاه صنعتی چالمرز، گوتنبرگ، سوئد
- **ایوان میاکوویچ**: گروه زیست شناسی و مهندسی زیست شناسی دانشگاه صنعتی چالمرز، گوتنبرگ، سوئد

تاریخ دریافت: آذر ١٣٩٨ تاریخ پذیرش: اسفند ١٣٩٨

چکیده

باکتری‌های تجزیه‌کننده آمونیاک و نیتریت می‌توانند منجر به افزایش کارایی سیستم مدار بسته پرورش ماهی گردند. باکتری‌های هتروترف تجزیه‌کننده آمونیاک و نیتریت در کنار گونه‌های اتوتروف از اهمیت زیادی برخوردارند. هدف از انجام این پژوهش، بررسی استفاده از دو سویه باکتری تجزیه‌کننده آمونیاک (*Dyadobacter* sp. (no. 68) و نیتریت (*Janthinobacterium* sp. (no. 100 در سیستم پرورش قزل‌آلای رنگین کمان بود. این دو نوع باکتری با رقت ۸×۱۰۹ cfu (A) در میلی‌لیتر به‌میزان ۱۰۰۰ میلی‌لیتر به مخازن ٤٠٠ لیتری حاوی ٥٠ قطعه قزل‌آلای رنگین‌کمان ۳/۸۹±۰/٦٥ گرمی منتقل شدند، یک تیمار نیز به‌عنوان گروه شاهد (C) درنظر گرفته شد (تعداد=۳). پس از ١٠ روز شاخص‌های خون‌شناسی و کیفی آب در سیستم پرورشی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد میزان غلظت آمونیاک غیریونیزه در گروه آزمایشی حاوی این دو نوع باکتری کم‌تر و نیتریت و نیترات در این گروه بیش‌تر از گروه شاهد بود. هم‌چنین شاخص‌های خون‌شناسی در گروه A نسبت به شروع آزمایش، تغییرات زیادی نداشت، این درحالی بود که در گروه شاهد شاخص‌های خون‌شناسی کاهش یافت. با توجه به آزمایش‌های اخیر نتیجه‌گیری می‌شود می‌توان از باکتری *Dyadobacter* sp. (no. 68) و *Janthinobacterium* sp. (no.100) جهت کاهش آمونیاک غیریونیزه و نیتریت در سیستم پرورش قزل‌آلای رنگین‌کمان استفاده کرد. هم‌چنین این سویه ها با توجه به کاهش آمونیاک غیریونیزه و نیتریت در محیط پرورشی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌تواند منجر به افزایش بازده پرورشی با بهبود کیفیت محیط پرورشی با تاثیر روی شرایط فیزیولوژیک ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان شوند.

کلمات کلیدی: قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، *Dyadobacter* sp. (no. 68)، *Janthinobacterium* sp. (no. 100)، شاخص‌های خون‌شناسی، آمونیاک غیریونیزه ، نیتریت

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: ghrafiee@ut.ac.ir

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.131119

مقدمه

آبزی‌پروری یکی از پرمصرف‌ترین صنایع از نظر استفاده از منابع آبی محسوب می‌شود (Kalbassi و همکاران، ۲۰۱۳) یکی از راه‌های کاهش مصرف آب در این بخش پرورش ماهیان با کمک روش‌های مدرن شامل سیستم‌های باحداقل تعویض آب (Zere exchange water) یا به‌عبارتی مداربسته اهمیت زیادی دارد (Decamp و همکاران، ۲۰۰۲؛ Rafiee و Saad، ۲۰۱۰). در این ارتباط فرایند نیتریفیکاسیون میکروبی را شامل می‌شوند (Stephen و همکاران، ۱۹۹۶) که گونه‌های مختلفی از میکروارگانیسم‌ها در آن نقش دارند و با عملکرد متفاوت در حذف آمونیاک و نیتریت دخیل‌اند. نیتریفیکاسیون به دو شکل با باکتری‌های اتوتروفیک و هتروتروفیک انجام می‌شود(Chenو همکاران، ۲۰۱۶؛ Chen و Ni، ۲۰۱۲؛ Robertson و همکاران، ۱۹۸۹). عنوان شده است که هر دو گروه دارای ارتباط بوده و اکسیداسیون آمونیاک ونیتریت‌هوازی با سرعت بیش‌تری در حضور هتروتروف‌ها انجام می‌شود (Su و همکاران، ۲۰۰۶). موجودات آبزی در معرض نوسانات، گازهای محیطی، آلاینده‌ها و سموم هستند و چنین چالش‌های زیست‌محیطی می‌تواند منجر به تعدادی از تغییرات شود که برای سلامتی مضر باشند. این عوامل قادر به ایجاد پاسخ‌های استرس فیزیولوژیکی هستند (Ackerman و همکاران، ۲۰۰۶). آمونیاک و نیتریت ازجمله عوامل استرس‌زای محیطی در آبزیان محسوب می‌شوند (Ackerman و همکاران، ۲۰۰۶؛ Kroupova و همکاران، ۲۰۰۵؛ Lewis Jr و Morris، ۱۹۸۶). ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onhorhynchus mykis*) یکی از گونه‌های اصلی پرورشی سردابی در بخش وسیعی از دنیا است (FAO، ۲۰۱۱). در سیستم مداربسته پرورش این گونه ماهی بیوفیلترها بخش مهمی از سیستم پرورشی را تشکیل می‌دهند که در تبدیل ترکیبات مضری مانند آمونیاک به نیتریت و نیتریت به نیترات با استفاده از میکروارگانیسم‌ها نقش دارند (Cohen، ۲۰۰۱). موجودات آبزی در معرض نوسانات، گازهای محیطی، آلاینده‌ها و سموم هستند و چنین چالش‌های زیست محیطی می‌تواند منجر به تعدادی از تغییرات شود که برای سلامتی مضر باشند. عوامل استرس‌زا محیطی خارجی قادر به ایجاد پاسخ‌های استرس فیزیولوژیکی هستندو بسیاری ازاین پاسخ‌ها قادر به تأثیرگذاری بر نتیجه یک برخورد پاتوژن بعدی هستند. یکی از این تأثیرات روی سیستم خون‌شناسی ماهیان است. بنابراین، نیاز است که این فرایندها مورد بررسی قرار گیرد. لذا، هدف از این پژوهش به‌کارگیری باکتری‌های هتروتروف تجزیه‌کننده آمونیاک ونیتریت جهت بهبود شرایط پرورشی و بررسی فیزیولوژیکی در اثرات آن در خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بود.

مواد و روش‌ها

پرورش قزل‌آلای رنگین‌کمان: باکتری‌های تجزیه‌کننده آمونیاک *Dyadobacter* sp. (no. 68) و تجزیه‌کننده نیتریت *Janthinobacterium* sp. (no. 100) انتخاب شدند (Neissi و همکاران، ۲۰۲۰) و با رقت ۸× ۱۰۹ cfu در میلی‌لیتر به‌میزان ۱۰۰۰ میلی‌لیتر به مخازن ۴۰۰ لیتری حاوی ۵۰ قطعه قزل‌آلای رنگین‌کمان ۳/۸۹±۵۰/۶۵ گرمی منتقل شدند. پرورش ماهی قزل‌آلا و آزمایشات مربوط به خون‌شناسی در دانشگاه گوتنبرگ انجام شد. آب سیستم مدار بسته کارگاه به مخازن اضافه و ورودی قطع شد، سپس ماهی و مجموعه‌های باکتریایی به هر مخازن اضافه شد (n=۳ برای هر تیمار). یک گروه شاهد به‌عنوان گروه شاهد منفی بدون اضافه کردن باکتری به مخزن انتخاب شد. آمونیوم به‌مدت ۱۰ روز بررسی شد. تغذیه به صورت ۱ بار در روز با غذای تجاری صورت گرفت. آب از زیر هر مخزن از طریق پمپ کف مخزن به فیلتر حاوی ماسه شسته شده، پشم شیشه و ذرات اسفنجی ۲ سانتی‌متر مربع، منتقل می‌شود و پس از تصفیه، داخل مخزن برگردانده شد.

شاخص‌های خون‌شناسی: در انتهای دوره پرورشی بعد از ۲۴ ساعت گرسنگی از ۳ عدد ماهی مربوط به هریک از واحدهای آزمایشی به‌صورت کاملاً تصادفی نمونه‌برداری شد بدین‌منظور ابتدا ماهی‌ها با استفاده از benzocaine بی‌هوش (Dawson و همکاران، ۱۹۷۷)و کاملاً خشک شدند. خونگیری با استفاده از سرنگ هپارینه از ساقه دمی صورت گرفت. از کلیه نمونه‌ها هم‌زمان با خونگیری گسترش خونی تهیه شده و پس از خشک شدن در معرض هوا توسط متانول تثبیت و در گیمسای ۱۰ درصد به‌مدت ۴۵ دقیقه غوطه‌ور و رنگ‌آمیزی شد. از لام‌های تهیه شده در این مرحله برای شمارش افتراقی گلبول‌های سفید (لنفوسیت، مونوسیت، نوتروفیل، ائوزینوفیل) استفاده گردید. هم‌چنین میزان هماتوکریت و هموگلوبولین نیز در کلیه گروه‌های آزمایشی اندازه‌گیری شد.شاخص‌های خون‌شناسی شامل هموگلوبولین (کیت سنجش هموگلوبولین با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر)، هماتوکریت (با استفاده از میکروسانتریفیوژ)، تعداد گلبول‌های قرمز و تعداد گلبول‌های سفید (با استفاده از لام نئوبار) و سر آخر شاخص‌های MCV، MCH، MCHC با استفاده از فرمول‌های زیر اندازه‌گیری شد (Campbell و Hesser، ۱۹۶۰؛ Grant، ۲۰۱۵؛ Murru, ۱۹۹۰):

$$MCV = Ht \times \frac{1000}{RBC}$$

$$MCH = Hb \times \frac{10}{RBC}$$

$$MCHC = \frac{Hb}{Ht}$$

روش تعیین آنالیز آماری: نرمال‌بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگراف اسمیرنف بررسی شد. داده‌های درصدی پیش از

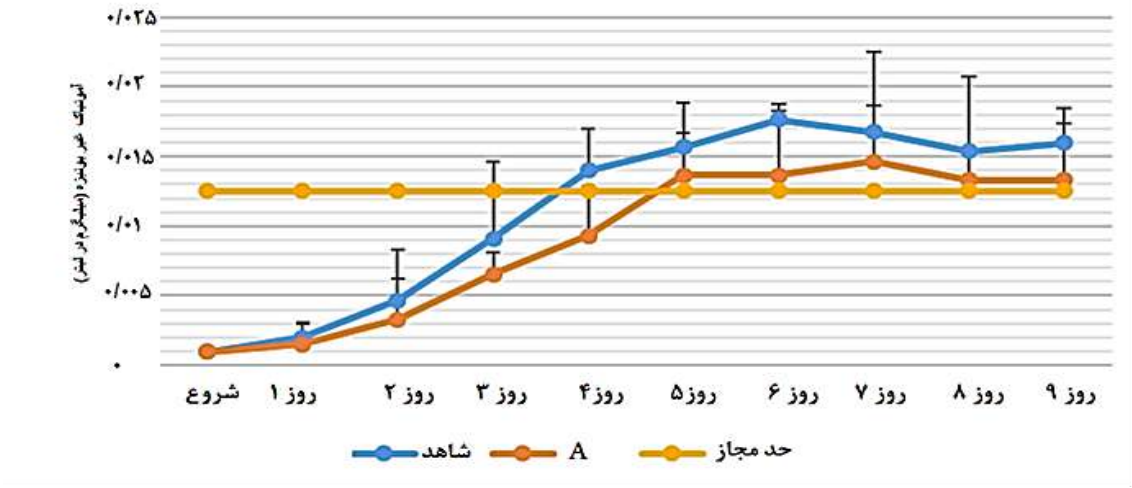
(DOI): 10.22034/AEJ.2020.131119

انجام آنالیزها با (Arc sin) تبدیل شدند. برای مقایسه میانگین داده‌ها از تجزیه واریانس یک‌طرفه (ONE-WAY-ANOVA) انجام و سطح معنی‌دار بودن در بین تیمارها از طریق آزمون Tukey در سطح احتمال ۵ درصد انجام گردید. تجزیه و تحلیل آماری به‌وسیله نرم‌افزار SPSS ۱۷ در محیط ویندوز انجام شد و برای ترسیم نمودارها از نرم‌افزار Excel ۲۰۰۷ در محیط ویندوز استفاده شد.

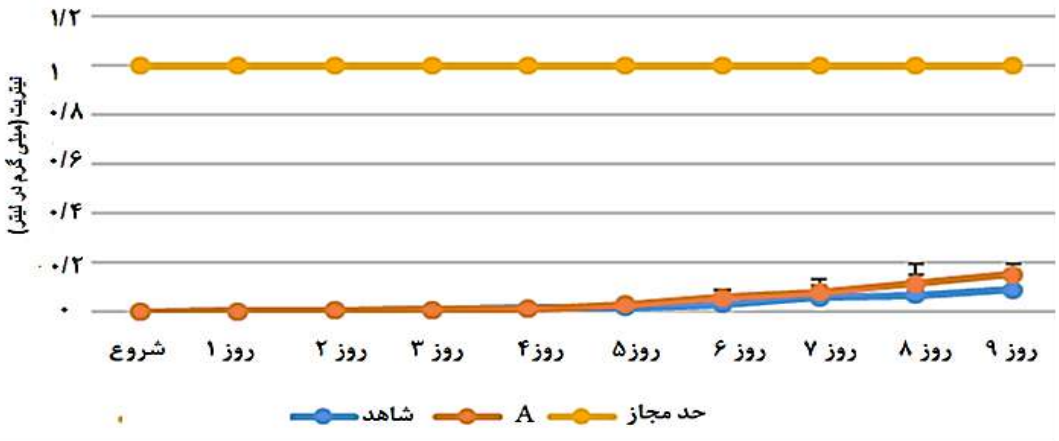
نتایج

حذف آمونیوم و نیتریت در آب پرورشی قزل الای رنگین کمان

کیفیت آب پرورشی: میزان آمونیک غیر یونیزه در گروه شاهد به‌طور معنی داری دارای میزان بیش‌تری بود (P<۰/۰۵). میزان آمونیک غیریونیزه در گروه A افزایش یافت ولی این افزایش به نسبت گروه شاهد کم‌تر بود. کاهش آمونیوم در مقایسه با تیمار شاهد در گروه A نشان داد که دارای عملکرد مناسبی برای حذف آمونیک غیریونیزه تولیدشده است(شکل ۱). این نتایج، حاکی از یک روند افزایشی نیتریت در تیمار آزمایشی در مقایسه با گروه شاهد بود. این امر را می‌توان به تکثیر باکتری تجزیه‌کننده آمونیاک نسبت داد. ولی این افزایش در هیچ‌کدام از گروه‌های شاهد و تیمار آزمایشی به نقطه بحرانی نرسید. گروه A افزایش میزان نیتریت را به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد نشان می‌دهد (P<۰/۰۵)(شکل ۲). میزان نیترات در هر دو گروه روند افزایشی داشت (P<۰/۰۵). این مقدار به‌طور معنی‌داری درگروه A در مقایسه با گروه شاهد بیش‌تر بود (P<۰/۰۵) (شکل ۳). سایر شاخص‌های کیفی آب ازجمله اکسیژن‌محلول، pH و دما بین گروه‌های مختلف اختلاف معنی‌داری را نشان نداد.

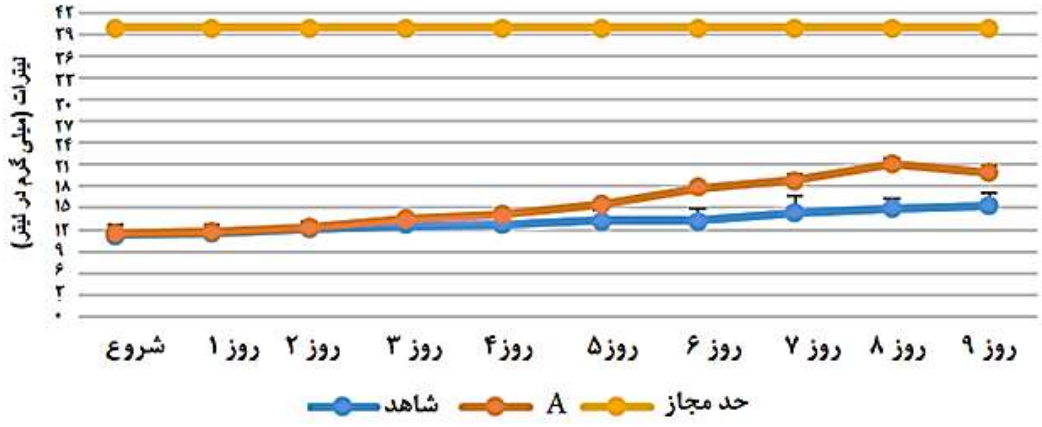


شکل۱: تأثیر باکتری‌های هتروتروف A روی آمونیوم در سیستم پرورشی قزل‌آلای رنگین‌کمان



شکل ۲: تأثیر باکتری‌های هتروتروف A روی نیتریت در سیستم پرورشی قزل‌آلای رنگین‌کمان

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.131119



شکل۳: تأثیر باکتری‌های هتروتروف A روی نیترات در سیستم پرورشی قزل‌آلای رنگین‌کمان

جدول ۱: شاخص‌های کیفی آب شامل (اکسیژن محلول، pH و دما) طی دوره پرورشی ۱۰ روزه در تیمارهای مختلف آزمایشی

	دما (درجه سانتی‌گراد)	pH	اکسیژن محلول (میلی‌گرم بر لیتر)
شاهد	۱۴/۱۵±۱/۱۷ [a]	۶/۲۵±۰/۱۷ [a]	۸/۶۵±۲/۱۲
A	۱۴/۱۵±۱/۱۷ [b]	۶/۸۵±۰/۱۷ [b]	۸/۴۵±۳/۱۹

جدول مقادیر میانگین±SD را نشان می‌دهد. مقادیر در یک ستون مشابه با حروف مختلف تفاوت معنی‌داری دارند (P<۰/۰۵).

شاخص‌های خونی: شاخص‌های خونی هموگلوبولین، MCV، MCHC٪ و هماتوکریت در گروه شاهد از گروه آزمایشی بیش‌تر بود (P<۰/۰۵). گلبول قرمز اختلاف معنی‌داری را در بین گروه‌های مختلف نشان نداد (P>۰/۰۵) . این نتایج نشان داد که گلبول‌های سفید در گروه شاهد کم‌تر از گروه آزمایشی است (P<۰/۰۵). میزان لنفوسیت، مونوسیت و نوتروفیل در بین گروه‌های مختلف اختلاف نداشت (P>۰/۰۵). تغییراتی در شاخص‌های خون‌شناسی در تیمار شاهد در طول دوره آزمایش مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

جدول۲: شاخص‌های خون‌شناسی ماهی در گروه‌های مختلف آزمایش در پایان آزمایش

	هموگلوبولین	هماتوکریت	گلبول قرمز* (میلیون در میکرولیتر)	گلبول سفید (میکرولیتر)	MCV (فمتولیتر)	MCHC ٪	لنفوسیت ٪	مونوسیت ٪	نوتروفیل ٪
شروع	۵۸/۲±۲/۳[a]	۳۷±۲/۷۱[a]	۱/۲۲±۰/۰۲۴	۷۴۸۱/۱±۳۷/۲۳[b]	۳۰۳/۱۲±۸/۲۱[a]	۴۶/۹۰±۲/۱۲[a]	۸۱/۹۴±۳/۴۰	۳/۳۲±۰/۱۹	۱۲/۹۶±۰/۴۱
شاهد	۶۳/۷۵±۲/ ۲۱[b]	۴۰/۵±۱/۲۹[b]	۱/۲۴±۰/۰۳	۷۲۵۴/۲۵±۱۸۸/۲۴[a]	۳۱۸/۶۸±۱۲/۵۹[b]	۵۱/۴۱±۱/ ۴۵[b]	۸۲/۸۲±۳/۵۶	۳/۵۶±۰/۱۲	۱۳/۴۱±۰/۴۳
A	۵۹/۵±۱/۵[a]	۳۸±۱/۸۱[a]	۱/۲۵±۰/۰۱۴	۷۴۵۹/۵±۴۸/۲۳[b]	۳۰۴/۰۴±۸/۲۳[a]	۴۷/۶۰±۱/۱۵[a]	۸۳/۹۴±۲/۹۰	۳/۱۲±۰/۳۹	۱۳/۰۶±۰/۵۰

جدول مقادیر میانگین±SD را نشان می‌دهد. مقادیر در یک ستون مشابه با حروف مختلف تفاوت معنی‌داری دارند (P<۰/۰۵).

بحث

برخی از گونه‌های باکتری‌های هتروتروفیک قادر به تجزیه ذرات دارای منبع کربن به کربن آلی محلول (DOC) هستند (Martínez-Córdova و همکاران، ۲۰۱۵). در فیلترهای بیولوژیکی در اثر تجزیه مواد آلی کربن محلول برای رشد باکتری‌های هتروتروفیک به‌وجود می‌آید(Franco-Nava، ۲۰۰۳؛ رفیعی، ۱۳۹۶).باکتری‌های هتروتروف موثر در نیتریفیکاسیون در اثر افزایش کربن آلی محلول فعالیت و رشدشان افزایش می‌یابد (Martínez-Córdova و همکاران، ۲۰۱۵). این شرایط که در یک سیستم مداربسته پرورش آبزیان می‌تواند اتفاق بیافتد، برای فعالیت باکتری‌های هتروتروفیک موثر در نیتریبکاسیون در این‌سیستم‌مناسب است.در این‌تحقیق از ۲ سویه‌باکتری هتروتروف موثر در نیترفیبکاسیون در یک سیستم آبزی‌پروری استفاده شد. با توجه به نتایج این بخش باکتری‌های تجزیه‌کننده آمونیاک و نیتریت در گروه آزمایشی A دارای کارایی مناسبی برای حذف آمونیاک و فرایند نیتریفیکاسیون هتروتروف بودند. *Dyadobacter* دارای کلونی به رنگ زرد، شکل سلول‌ها میله‌ای دراز زنجیره‌ای دارای قابلییت تخمیر، دارای قابلیت رشد روی پپتون، فعالیت لیپاز منفی،

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.131119

گلوکز مثبت، ساکارز روکتوز و مالتوز منفی، آرابینوز، گالاکتوز و زیلوز مثبت، ژلاتیناز و اورئاز منفی است (Chaturvedi و همکاران، ۲۰۰۵). این گونه روی محیط‌کشت در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد در مدت ۳ روز توانایی رشد دارد. رشد این گونه بین ۳۷-۱۰ درجه و pH ۶-۸ اتفاق می‌افتد (Chaturvedi و همکاران، ۲۰۰۵). در مطالعات قبلی ارتباط جنس باکتری *Dyadobacter* با نیتریفیکاسیون و دنیتریفیکاسیون پیدا شده است (Allen، ۲۰۱۴)، پژوهش‌ها نشان داده است که گونه‌های دیگر از جنس *Dyadobacter* به نام‌های *Dyadobacter fermentans* و *Dyadobacter soli MJ2* دارای توانایی استفاده از آمونیوم را دارند (Photphisutthiphong و Vatanyoopaisarn، ۲۰۱۹). در مطالعه دیگری *Dyadobacter fermentans* به‌عنوان گونه دنیتریفیکانت معرفی شده که ژن NosZII در این فعالیت نقش دارد (Domeignoz-Horta و همکاران، ۲۰۱۶). مکانیسم این‌که گونه جداسازی شده در این مطالعه چگونه در حذف آمونیاک غیریونیزه تأثیر دارد هنوز پیدا نشده و نیاز به بررسی بیش‌تری دارد. با توجه به ارتباط پیدا شده بین نقش جنس‌های نزدیک به جنس به‌کار برده شده در این پژوهش در تجزیه آمونیاک در مقایسه با نتایج این آزمایش می‌توان نتیجه گرفت که کاهش آمونیاک غیریونیزه ناشی از عملکرد مثبت این سویه در سیستم پرورش قزل‌آلای رنگین‌کمان بوده است.

جنس باکتری *Janthinobacterium* از بسیاری از منابع آبی و خاکی مختلف تا کنون جداسازی شده است (Kim و همکاران، ۲۰۱۲؛ Shoemaker و همکاران، ۲۰۱۵؛ Smith و همکاران، ۲۰۱۶). این جنس دارای کلونی‌های رنگی از نارنجی تا بنفش به قطر ۳-۲ میلی‌متر است. این جنس بهترین رشدش در ۱۵ درجه سانتی‌گراد است و می‌تواند تا دمای دو درجه سانتی‌گراد رشد کند. بهترین pH برای این جنس ۶/۸ بیان شده است. در این جنس تخمیر وجود ندارد کاتالاز و اکسیداز مثبت، ایندول منفی، گلوکز مثبت ولی لاکتوز منفی است (Shivaji و همکاران، ۱۹۹۱). با توجه به ارتباط پیدا شده بین تأثیر جنس‌های نزدیک جنس به‌کار برده شده در این آزمایش درحذف نیتریت و نتایج این آزمایش می‌توان نتیجه گرفت که افزایش نیترات در این گروه ناشی از عملکرد مثبت این سویه در سیستم پرورش قزل‌آلای رنگین کمان بوده است. آلاینده‌های زیست‌محیطی در آبزی‌پروری از مهم‌ترین نگرانی‌ها در مصرف آب تلقی می‌شود، در آبزی‌پروری غلظت آمونیوم مهم‌ترین عامل محدودیت تراکم و مصرف مجدد آب محسوب می‌شود (Liang و همکاران، ۲۰۱۶). این ماده به‌عنوان محصول اصلی تولید سایر ترکیبات نیتروژن نیز محسوب می‌شود که ناشی از سوخت و ساز پروتیین‌ها در بدن آبزیان است. تجزیه مواد آلی توسط میکرو ارگانیزم‌ها نیز در تولید آن نقش دارند (Ren و همکاران، ۲۰۱۵). کاهش رشد، فرسایش بافت (کلیه، آبشش و پوست) و دژنراسیون، سرکوب سیستم ایمنی بدن و مرگ و میر زیاد ماهی ممکن است در نتیجه تجمع مقادیر زیاد آمونیاک در مایعات بدن موجودات آبزی به‌وجود آید (Ding و همکاران، ۲۰۱۷). بنابراین، ضروری است که گزینه‌های طبیعی‌تر، پایدار و محیطی بی‌خطر برای کمک به کاهش استرس و بیماری‌های ناشی از افزایش ترکیبات نیتروژن‌دار به‌خصوص آمونیاک شناسایی شوند. در این تحقیق غلظت آمونیاک غیریونیزه در گروه شاهد بیش‌تر گروه آزمایشی بود.

این تحقیق نشان داد که استفاده از این گروه باکتری‌ها منجر به بهبود سیستم پرورشی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان خواهد شد و توانایی کاهش استرس محیطی با ارزیابی شاخص‌های خون‌شناسی دارد. با توجه به این‌که سویه‌های به‌کار برده‌شده در این تحقیق دارای توانایی حذف آمونیاک غیریونیزه و نیتریت را در مقایسه با گروه شاهد نشان دادند. به‌کارگیری این باکتری‌ها در سیستم پررشی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان قابل توصیه است.

منابع

۱. **رفیعی، غ.، ۱۳۹۶.** تنظیم نسبت‌های مختلف کربن به نیتروژن ورودی به سازگان مدار بسته پرورش از طریق غذا و ملاس برای تولید بیوفلاک و بررسی شاخص‌های رشد ماهی فیتوفاگ و کیفیت آب. مجله محیط زیست جانوری. دوره ۱۰، شماره ۳، صفحات ۱۹۹ تا ۲۰۶.

2. **Ackerman, P.A.; Wicks, B.J.; Iwama, G.K. and Randall, D.J., 2006**. Low Levels of Environmental Ammonia Increase Susceptibility to Disease in Chinook Salmon Smolts. Physiological and Biochemical Zoology. Vol. 79, pp: 695-707.

3. **Allen, M.A., 2014.** Analysis of a Bacterial Nitrification Community in Lake Superior Enrichment Cultures. Bowling Green State University.

4. **Campbell, T. and Murru, F., 1990**. An Introduction to Fish Hematology. Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian. Vol. 12, pp: 525-532.

5. **Chaturvedi, P.; Reddy, G. and Shivaji, S., 2005**. Dyadobacter Hamtensis Sp. Nov., from Hamta Glacier, Located in the Himalayas, India. International journal of systematic and evolutionary microbiology. Vol. 55, pp: 2113-2117.

6. **Chen, J.; Han, Y.; Wang, Y.; Gong, B.; Zhou, J. and Qing, X., 2016**. Start-up and Microbial Communities of a Simultaneous Nitrogen Removal System for High Salinity and High Nitrogen Organic Wastewater Via Heterotrophic Nitrification. Bioresource technology. Vol. 216, pp: 196-202.

7. **Chen, Q. and Ni, J., 2012**. Ammonium Removal by Agrobacterium Sp. Lad9 Capable of Heterotrophic Nitrification–Aerobic Denitrification. Journal of bioscience and bioengineering. Vol. 113, pp: 619-623.

8. **Clark, C. and Schmidt, E., 1966**. Effect of Mixed Culture on Nitrosomonas Europaea Simulated by Uptake and Utilization of Pyruvate. Journal of bacteriology. Vol. 91, pp: 367-373.

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.131119

Various Organic Waste Substrates. Agriculture and Natural Resources. Vol. 53, pp: 89-98.

26. **Rafiee, G. and Saad, C.R., 2010**. The Effect of Natural Zeolite (Clinoptiolite) on Aquaponic Production of Red Tilapia (*Oreochromis* sp.) and Lettuce (*Lactuca Sativa* Var. Longifolia), and Improvement of Water Quality. Journal of Agricultural Science and Technology. Vol. 8, pp: 313-322.

27. **Ren, H.; Li, J.; Li, J.; Liu, P.; Liang, Z. and Wu, J., 2015.** Transcript Profiles of Mitochondrial and Cytoplasmic Manganese Superoxide Dismutases in Exopalaemon Carinicauda under Ammonia Stress. Chinese Journal of Oceanology and Limnology. Vol. 33, pp: 714-724.

28. **Robertson, L.; Cornelisse, R.; De Vos, P.; Hadioetomo, R. and Kuenen, J., 1989**. Aerobic Denitrification in Various Heterotrophic Nitrifiers. Antonie van Leeuwenhoek. Vol. 56, pp: 289-299.

29. **Soivio, A.; Nyholm, K. and Huhti, M., 1977**. Effects of Anaesthesia with Ms 222, Neutralized Ms 222 and Benzocaine on the Blood Constituents of Rainbow Trout, *Salmo Gairdneri*. Journal of Fish Biology. Vol. 10, pp: 91-101.

30. **Su, J.J.; Yeh, K.S. and Tseng, P.W., 2006**. A Strain of Pseudomonas Sp. Isolated from Piggery Wastewater Treatment Systems with Heterotrophic Nitrification Capability in Taiwan. Current microbiology. Vol. 53, pp: 77-81.

31. **Stephen, J.R.; McCaig, A.E.; Smith, Z.; Prosser, J.I. and Embley, T.M., 1996**. Molecular Diversity of Soil and Marine 16s Rrna Gene Sequences Related to Beta-Subgroup Ammonia-Oxidizing Bacteria. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 62, pp: 4147-4154.

32. **Shivaji, S.; Ray, M.; Kumar, G.S.; Reddy, G.; Saisree, L. and Wynn-Williams, D., 1991**. Identification of Janthinobacterium Lividum from the Soils of the Islands of Scotia Ridge and from Antarctic Peninsula. Polar biology. Vol. 11, pp: 267-271.

33. **Shoemaker, W.R.; Muscarella, M.E. and Lennon, J.T., 2015**. Genome Sequence of the Soil Bacterium *Janthinobacterium* sp. Kbs0711. Genome Announc. Vol. 3, pp: 615-689.

34. **Smith, H.J.; Foreman, C.M.; Akiyama, T.; Franklin, M.J.; Devitt, N.P. and Ramaraj, T., 2016**. Genome Sequence of *Janthinobacterium* sp. Cg23_2, a Violacein Producing Isolate from an Antarctic Supraglacial Stream. Genome Announc. Vol. 4, pp: 1415-1468.

9. **Cohen, Y., 2001**. Biofiltration–the Treatment of Fluids by Microorganisms Immobilized into the Filter Bedding Material: A Review. Bioresource technology. Vol. 77, pp: 257-274.

10. **Dawson, V.K., 1979.** Ethyl-P-Aminobenzoate (Benzocaine): Efficacy as an Anesthetic for Five Species of Freshwater Fish: Department of the Interior, Fish and Wildlife Service.

11. **Decamp, O.; Conquest, L.; Forster, I. and Tacon, A., 2002**. The Nutrition and Feeding of Marine Shrimp within Zero-Water Exchange Aquaculture Production Systems: Role of Eukaryotic Microorganisms. Mirage. pp: 79-86.

12. **Ding, Z.; Kong, Y.; Zhang, Y.; Li, J.; Cao, F.; Zhou, J. and Ye, J., 2017**. Effect of Feeding Frequency on Growth, Body Composition, Antioxidant Status and Mrna Expression of Immunodependent Genes before or after Ammonia-N Stress in Juvenile Oriental River Prawn, Macrobrachium Nipponense. Fish & shellfish immunology. Vol. 68, pp: 428-434.

13. **Domeignoz-Horta, L.A.; Putz, M.; Spor, A.; Bru, D.; Breuil, M.-C.; Hallin, S. and Philippot, L., 2016**. Non Denitrifying Nitrous Oxide-Reducing Bacteria-an Effective N2o Sink in Soil. Soil biology and Biochemistry. Vol. 103, pp: 376-379.

14. **FAO. 2011.** Cultured Aquatic Species Information Programme *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792): Fisheries and Aquaculture Department.

15. **Franco-Nava, M., 2003.** Origine, Devenir Et Contrôle De La Matière Particulaire Dans Les Élevages De Poissons Marins En Système Recyclé. Thèse de Doctorat Halieutique, Ensa Rennes.

16. **Grant, K.R., 2015**. Fish Hematology and Associated Disorders. Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice. Vol. 18, pp: 83-103.

17. **Hesser, E.F., 1960**. Methods for Routine Fish Hematology. The Progressive Fish-Culturist. Vol. 22, pp: 164-171.

18. **Kalbassi, M.R.; Abdollahzadeh, E. and Salari-Joo, H., 2013.** A Review on Aquaculture Development in Iran. Ecopersia. Vol. 1, pp: 159-178.

19. **Kim, S.J.; Shin, S.C.; Hong, S.G.; Lee, Y.M.; Lee, H.; Lee, J.; Choi, I.G. and Park, H., 2012**. Genome Sequence of *Janthinobacterium* sp. Strain Pamc 25724, Isolated from Alpine Glacier Cryoconite.

20. **Kroupova, H.; Machova, J. and Svobodova, Z., 2005.** Nitrite Influence on Fish: A Review. Veterinarni Medicina Praha. Vol. 50, pp: 461.

21. **Lewis Jr, W.M. and Morris, D.P., 1986**. Toxicity of Nitrite to Fish: A Review. Transactions of the American fisheries society. Vol. 115, pp: 183-195.

22. **Liang, Z.; Liu, R.; Zhao, D.; Wang, L.; Sun, M.; Wang, M. and Song, L., 2016**. Ammonia Exposure Induces Oxidative Stress, Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Hepatopancreas of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus Vannamei*). Fish & shellfish immunology. Vol. 54, pp: 523-528.

23. **Martínez-Córdova, L.R.; Emerenciano, M.; Miranda Baeza, A. and Martínez-Porchas, M., 2015.** Microbial Based Systems for Aquaculture of Fish and Shrimp: An Updated Review. Reviews in Aquaculture. Vol. 7, pp: 131-148.

24. **Neissi, A.; Rafiee, G.; Farahmand, H.; Rahimi, S. and Mijakovic, I., 2020**. Cold-Resistant Heterotrophic Ammonium and Nitrite Removing Bacteria Improve Conditions for Aquaculture of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Microbial Ecology. Unpublished.

25. **Photphisutthiphong, Y. and Vatanyoopaisarn, S., 2019.** Dyadobacter and Sphingobacterium Isolated from Herbivore Manure in Thailand and Their Cellulolytic Activity in

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.131119

Improvement of waterborne using *Dyadobacter* sp. (No. 68) and *Janthinobacterium* sp. (No. 100) bacteria and comparing the hematological indices in a recirculating rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) culture system

- **Alireza Neissi:** Department of Fisheries Sciences, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
- **Gholamreza Rafiee*:** Department of Fisheries Sciences, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
- **Hamid Farahmand:** Department of Fisheries Sciences, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
- **Shadi Rahimi:** Chalmers University of Technology, Division of Systems and Synthetic Biology, Department of Biology and Biological Engineering, Gothenburg, Sweden
- **Ivan Mijakovic:** Chalmers University of Technology, Division of Systems and Synthetic Biology, Department of Biology and Biological Engineering, Gothenburg, Sweden

Received: November 2019 Accepted: February 2020

Key words: Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Dyadobacter* sp. (no. 68), *Janthinobacterium* sp. (no. 100), Hematological indicators, Ammonium, Nitrite

Abstract

Targeted use of ammonia and nitrite degrading bacteria could increase the efficiency of the closed recirculating fish culture systems. Ammonia and nitrite assimilation by heterotrophic bacteria are important along with autotrophic species. The purpose of this study was to investigate the use of two strains of nitrifying bacteria *Dyadobacter* sp. (no. 68) and of *Janthinobacterium* sp. (no. 100) in the rainbow trout breeding system. These two types of bacteria with a dilution of 8×10^9 cfu (A) in a 1000 ml container transferred into 400 liter fish or experimental tanks containing 50 pieces Trout 50.65±3.89 g, also one treatment was considered as control group [n=3] (C). After 10 days, hematological and qualitative indices of water in rainbow trout were investigated. The results showed that the concentration of ammonia in the experimental group containing these two types of bacteria was lower and the nitrite and nitrate in this group were higher than the control group. The hematological indices in the control group did not show any significant changes from baseline, whereas in the control group hematological indices decreased. It was concluded that *Dyadobacter* sp. (no. 68), *Janthinobacterium* sp. (No. 100) were usable to assimilate ammonia and nitrite in the rainbow trout system. Finally, it can be concluded that the use of these two strains could have a positive effect on improving the quality of the environment and consequently on physiological conditions in the rainbow trout system.

* Corresponding Author's email: ghrafiee@ut.ac.ir