دانشگاه آزاد اسلامی

واحد علوم و تحقیقات

رساله دکتری رشته شیلات (*Ph.D*)

موضوع

بررسی اثرات استفاده از پروبایوتیکهای حاصل از فلور باکتریایی دستگاه گوارش بر شاخصهای رشد دوگونه فیل ماهی(*Huso Huso*) و تاسماهی ایرانی(*Acipnser persicus*)

استاد راهنما

دکتر عباس متین فر

استادان مشاور

دکتر محمود بهمنی

دکتر کاوه جعفری خورشیدی

نگارنده

فاطمه عسکریان

سال تحصیلی ۱۳۸۷- ۱۳۸۶

فهرست مطالب

۱-۴-۲-۳- شوری ۲۶

فهرست جدول ها

عنوان	صفحه

فهرست نمودارها

عنوان **صفحه**

فهرست شکل ها

چکیده

در این بررسی ابتدا اقدام به جدا سازی باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک از دستگاه گوارش دو گونه فیل ماهی و تاسماهی ایرانی گردید و پس از انجام عملیات خالص سازی ، شنا سایی نمونه های جدا سازی شده با استفاده از روش PCR صورت پذیرفت. سپس نمونه غالب باکتری جداسازی شده در فرم لیوفیلیزه و مقادیر متفاوت جهت تغذیه لاروها از آغاز تغذیه فعال مورد با استفاده قرار گرفته و شاخصهای رشد ،روند تکامل دستگاه گوارش از طیق مطالعات آنزیماتیک و بافت شناسی و درصد بقای هر گونه در مرحله پرورش لاروی مورد بررسی واقع گردید.

نتایج این بررسی نشان می دهد، چهار گونه از باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک مشتمل بر ***Lactobacillus curvatus*****،** *Lactococcus lactis* ، *Streptococcus sp* و *Lac.raffinolactis*

از دستگاه گوارش فیل ماهی جداسازی گردیدند که ***Lb. curvatus*** ($۶/۳×۱۰^{۲}$) نمونه غالب و بعلاوه دو گونه ***Leuconostoc mesenteroides*** و ***Enterococcus seriolicida*** نیز از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی جداسازی گردید که ***Le. Mesenteroides*** ($۴/۶۳×۱۰^{۲}$)نمونه غالب تعیین گردید . دو گونه غالب در فرم لیوفیلیزه بعنوان پروبیوتیک بمنظور پرورش لاروهای فیل ماهی و تاسماهی ایرانی استفاده گردیده و به همراه تغذیه لاروها با تعداد $۲×۱۰^{۹}$ CFU/gr غذا ، $۵×۱۰^{۹}$ CFU/gr غذا و $۹×۱۰^{۹}$ CFU/gr غذا به آب محیط پرورش افزوده گردیدند.

حداکثر میزان شاخصهای رشد، درصد بقا و فعالیت آنزیم های دستگاه گوارش مشتمل بر لیپاز، آمیلاز و پروتئاز در لارو فیل ماهی متعلق به تیمار ی است که دریافت کننده حداکثر تعداد ***Lb. curvatus*** جداسازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی ($۹×۱۰^{۹}$ CFU/gr غذا) و حداقل میزان شاخصهای رشد و فعالیتهای آنزیمهای دستگاه گوارش متعلق به تیماری است که گیرنده کمترین تعداد ***Le. Mesenteroides*** جداسازی شده از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی ($۹×۱۰^{۹}$ CFU/gr غذا) می باشد.

حداکثر میزان شاخصهای رشد، درصد بقا و فعالیت آنزیم های دستگاه گوارش مشتمل بر لیپاز، آمیلاز و پروتئاز در لارو تاس ماهی متعلق به تیمار ی است که گیرنده کمترین تعداد ***Le. Mesenteroides*** جداسازی شده از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی ($۲×۱۰^{۹}$ CFU/gr غذا) و حداقل میزان شاخصهای رشد و فعالیتهای آنزیمهای دستگاه گوارش متعلق به تیماری است که دریافت کننده حداکثر تعداد ***Lb. curvatus*** جداسازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی ($۹×۱۰^{۹}$ CFU/gr غذا)می باشد.

بررسی روند رشد دستگاه گوارش در لارو این ماهیان از طریق مطالعات بافت شناسی مبین این مطلب می باشد که اگرچه تفاوت معنی داری بین تیمارهای در یافت کننده پروبیوتیک و تیمار شاهد مشاهده نگردید اما اندازه کبد در تیمارهای دریافت کننده ***Le. Mesenteroides*** به تنهایی و یا بصورت مختلط با ***Lb. curvatus*** در فیل ماهی و در تیمارهای دریافت کننده ***Lb. curvatus*** به تنهایی و یا بصورت مختلط با ***Le. Mesenteroides*** درتاسماهی ایرانی بصورت معنی داری افزایش یافت.

از جمله مهمترین دستاوردهای این بررسی اثبات تاثیرات مثبت ناشی از کاربرد باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک جداسازی شده از دستگاه گوارش به عنوان پروبیوتیک در پرورش لارو ماهیان خاویاری می باشد بگونه ای که باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک غالب بدست آمده در این بررسی می تواند بعنوان پروبیوتیک اختصاصی در پرورش دو گونه اررزشمند فیل ماهی و تاسماهی ایرانی مورد استفاده قرار گیرد.

مقدمه

دریای خزر از مهمترین حوضه های آبی می باشد که۹۰ ٪ تولید ماهیان خاویاری جهان را به خود اختصاص داده است (پورکاظمی،۱۳۷۶ ؛ مقیم ، ۱۳۷۱). فیل ماهی و تاسماهی ایرانی ازجمله مهمترین ماهیان دریای خزر محسوب می گردندکه بدلیل فعالیت های انسانی ذخایرآنها کاهش یافته ومرغوبترین نوع خاواررا بخوداختصاص داده اند (بهمنی،۱۳۸۰). برخی کارشناسان معتقدند ماهیان خاویاری مخصوصا فیل ماهی در شرایط کنونی تقریبا قادر به تولیدمثل طبیعی نبوده وبقای آن کاملاً وابسته به تکثیر مصنوعی و رهاسازی این ماهیان در دریا است (اسپیر و همکاران ، ۲۰۰۰). از این رو بدلیل اهمیت تاسماهیان از بعد اقتصادی،کیفیت مطلوب گوشت وخاویار ، کاهش شدید ذخایر طبیعی آنها بسیاری ازمحققین در کشورهای در حال توسعه و توسعه یافته اقدام به پرورش تاسماهیان درمحیط های محصور نموده اند.بگونه ایکه از اواسط قرن بیستم همزمان آمریکای شمالی،آلمان و روسیه اقدام به پرورش این ماهیان نموده اند(Williot et al.,2001).در این راستا پرورش ماهیان خاویاری بویژه فیل ماهی بدلیل برخورداری ازسرعت رشد بالا و کاهش چشمگیر ذخایر این ماهیان از جایگاه ویژه ای برخوردار باشد (کیوان ، ۱۳۸۲؛محسنی وهمکاران، ۱۳۷۹) و در سال های اخیر توجه زیادی به پرورش این ماهیان در محیط های مصنوعی گردیده است و پروژه های متعددی در این راستا صورت گرفته و یا در دست انجام است (محسنی وهمکاران ،۱۳۸۱ ؛ پورعلی فشمی وهمکاران ، ۱۳۸۱) .

پروبیوتیکها باکتریهای مفید و بی خطری می با شند که دارای تاثیر مثبتی بر روی بقا، رشد و افزایش ایمنی جانور میزبان خود داشته و بصورت مستقیم و غیر مستقیم منجر به افزایش مقاومت میزبان خود در برابر عوامل بیما ریزا می گر دند. در این راستا گونه های متفاوت باکتری های تولید کننده اسید لاکتیک از جایگاه ویژه ای بر خور دار است.این باکتری ها بصورت غالب در دستگاه گوارش ماهیان وجود نداشته و استفاده از انواع غیر بیماریزای آن به عنوان پروبیوتیک نه تنها می تواند منجر به افزایش مقاومت ماهیان در برابر عوامل بیماریزای گرم مثبت گردد بلکه می تواند به عنوان یکی از مهمترین فاکتورهای موثر بر رشد و تقویت کننده سیستم ایمنی محسوب گردد (Ringo and Gatesoupe, 1998) .

اگرچه بررسی های متعددی در دنیا برروی از پروبیوتیک جداسازی شده از دستگاه گوارش آبزیان در مراحل متفاوت پرورش گونه های مختلف بویژه آزادماهیان (Robertson et al., 2000; Nikoskelainen et al., 2003)و حتی برخی از گونه های ماهیان دریایی (Tovar-Ramı´reza et al., 2004; Li et al., 2004) و گونه های متفاوت میگو های پرورشی (Gomez-Gil et al., 2002 ; Meunpol et al., 2003 ;Gulliana et al., 2004)صورت گرفته است ، اما مطالعات انجام شده در ارتباط با ماهیان خاویاری در دنیا و حتی داخل کشور بسیارمحدود می باشد و در هیچ کدام از تحقیقات صورت گرفته درکشور بر روی گونه های متفاوت آبزیان مشتمل بر ماهیان گرمابی،سردآبی و میگوی سفید هندی به جداسازی پروبیوتیک از دستگاه گوارش و استفاده از پرو بایوتیک اختصاصی هر گونه پرداخته نشده و به این مهم توجهی نگردیده است و تنها از پروبایو تیکهای آماده که با نامهای متفاوت تجاری در بازار موجود است، استفاده گردیده است .

با توجه به اثرات مثبت تاثیر پربیوتیکها و بویژه باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک در افزایش میزان تولید و بازده اقتصادی در آبزی پروری و از سوی دیگر جایگاه پرورش تاسماهیان در ایران و دنیا این پروژه برای تخستین بار بر روی ماهیان خاویاری صورت پذیرفت. در این بررسی ابتدا اقدام به جدا سازی باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک از دستگاه گوارش دو گونه فیل ماهی و تاسماهی ایرانی گردید و پس از انجام عملیات خالص سازی ، شنا سایی نمونه های جدا سازی شده با استفاده از روش PCR صورت پذیرفت. سپس لاروهای این دو گونه در مرحله تغذیه فعال با استفاده از مقادیر متفاوت باکتریهای جداسازی شده به صورت لیوفیلیزه تغذیه شده و شاخصهای رشد ، سیستم ایمنی ، روند تکامل دستگاه گوارش و درصد بقای هر گونه در مرحله پرورش لاروی مورد بررسی واقع گردید. بنظر می رسد که نتایج حاصل از این بررسی کاربرد وسیعی در تبیین ناشناخته های پرورش مصنوعی این گونه با ارزش و ایجاد دیدگاه های نوین در شرایط پرورشی خواهد داشت .

فصل اوّل

کلیات

۱-۱-سابقه تحقیق

۱-۱-۱-تحقیقات انجام شده در کشور

به دلیل ارزش کلان اقتصادی تاسـماهیان ، از دیر بـاز توجـه زایـد الوصــفی معطـوف بـه بهـره بـرداری ، تکثیروپرورش وبازسازی ذخایر آنها نموده است. سازماندهی تکثیـر مصـنوعی تاسـماهیان در ایـران بـرای نخستین بار درسال ۱۹۱٦ میلادی توسط Derjvain در رودخانه سفیدرود وسپس توسط وی درسال ۱۹۳۲ انجام گـرفت . آغاز فعالیت رسمی تکثیر و پـرورش ماهیان خاویـاری در ایـران بـه سـال ۱۳۵۰ در مجتمـع تکثیروپرورش ماهیان خاویاری سدسنگر(شهید بهشتی)برمی گـردد. بـه طـوری کـه در سـال ۱۳۵۱ حـدود ۱,٦۰۰,۰۰۰ عدد بچه ماهی خاویاری به رودخانه سفیدرود رهاسازی گردید (بهمنی ، ۱۳۷۸) .

از جمله مهمترین بررسیهای صورت گرفته بـر روی اسـتفاده از پروبیوتیـک در پـرورش ماهیـان خاویـاری میتوان به غنی سازی ناپلی آرتمیا با استفاده از پروتکسین و تاثیر آن بر روی لارو تاسـماهی ایرانـی توسـط شناور و همکاران (۲۰۰۷) اشاره نمود.پروتکسین یک نام تجاری برای نوعی از پروبیوتیک اختصاصی طیور می باشد که بصورت پودری شکل بوده و مخلوطی از انواع باکتریهای غیر بیماریزا بـویژه باکتریهـای تولیـد کننـده اسـید لاکتیـک مشـتمل بـر *Lactobacillus plantanarum , L. . rhamnosus delbrueckii, L*

L. acidophilus, Bifidobacterium bifidum, Enterococcus faecium, Aspergillus oryzae

*Streptococcus salivarius,*و همچنین باکتری *Candida pintolopesii* می باشد. نتایج حاصـل از این بررسی بیانگر عدم تاثیر این ترکیب بر روی رشد و بقای لارو تاسماهی ایرانی می باشـد و مهمتـرین علت بروز این امر اختصاصی نبودن این محصول بیان گردیده است.

از دیگر برسیهای صورت گرفته میتوان به استفاده از پروبیوتیک *Bacillus* بر روی ضریب تبدیل غذایی و میزان مواد مغذی موجود در لاشه لارو فیل ماهی بو سیله جعفریان و مختومی (۲۰۰۷)اشاره نمود .نتایج حاصل از این تحقیق بیانگر تاثیر مثبت این باکتری بر روی مواد مغذی موجود در لاشه و کاهش میزان تغذیه و ضریب تبدیل غذایی در لارو این گونه می باشد.

ازجمله دیگرتحقیقات بعمل آمده در ارتباط با کاربرد پرو با یو تیک برروی سایر گونه های آبزیان در کشور محدود به موارد زیر است :

تکثیر باکتریهای باسیلوس به عنوان پروبیوتیک بر رشد، بازماندگی و تغییرات آنزیمهای گوارشی مراحل لاروی میگوی سفید هندی *Penaeus indicus* بوسیله ضیایی (۱۳۸۲) ؛ گزارش نهایی طرح تحقیقاتی بررسی امکان تولید خوراک میکروبی (پروبیوتیک) جهت تغذیه میگوی هندی توسط نافچی و همکاران (۱۳۸۲)؛ تاثیر باکتریهای ***Bacillus subtilis*** و ***B.licheniformis*** به عنوان پروبیوتیک بر رشد و بازماندگی مراحل لاروی و پست لاروی میگوی سفید هندی *Penaeus indicus* توسط واقفی و همکاران (۱۳۸۳)؛ گزارش نهایی طرح تحقیقاتی تولید پروبیوتیک باکتریایی به منظور بهینه‌سازی استخرهای پرورش ماهیان گرمابی با تاکید بر کاهش آمونیاک، نیترات و SH_2 بوسیله صفری و همکاران (۱۳۸۳)؛ تاثیر پروبیوتیک پروتکسین بر رشد و زنده‌مانی مرحله لاروی قزل‌آلای رنگین کمان بوسیله محمدی آذری (۱۳۸٤) ؛ بررسی مقایسه‌ای فاکتورهای رشد و بازماندگی بر اثر افزودن پروبیوتیک تپاکس "Thepax" در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در مرحله رشد توسط تقوی (۱۳۸٤)؛ غنی‌سازی گونه آرتمیا ارومینا با پروبیوتیک مخمری (تپاکس) ، بررسی پایداری آرتمیا غنی‌سازی شده در دوره‌های مختلف غنی‌سازی وانکوباسیون سرد بوسیله فاضلی (۱۳۸٤) و اثرات کاربرد پروبیوتیک باسیلوس بر روی روند رشد، بقا و فلور میکروبی دستگاه گوارش ماهیان نورس قزل آلا بوسیله باقری و همکاران (۲۰۰۷) اشاره نمود.

همچنین مطالعات پراکنده ای نبز بر روی کاربر پروبایو تیکها در پرورش طیور و نقش گونه های مختلف باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک در مواد غذایی اشاره نمود که مهمترین این تحقیقات عبا رتند از :

پروبیوتیک ، جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک بوسیله رشیدی قادر (۱۳۷۲)؛ تاثیر پروبیوتیک بر ساختمان روده جوجه‌های گوشتی توسط کریمی (۱۳۸۱)؛ مقایسه اثر پروبیوتیک و آنتی بیوتیک بر عملکرد و سیستم ایمنی جوجه‌های گوشتی بوسیله رحیمی و همکاران(۱۳۸۲)؛ مطالعه امکان تولید یکی از فرآورده‌های پروبیوتیکی شیر در ایران با استفاده از کشت کمکی لاکتوباسیلوس کازئی بوسیله میرزائی (۱۳۸۲)؛ مدلسازی تجربی سینتیک پایداری پروبیوتیک حاوی گونه میکروبی *Pediococcus acidilactici* توسط بهبهانی (۱۳۸٤) جداسازی، شناسایی و انتخاب باکتری‌های اسید لاکتیک مناسب برای تولید پروبیوتیک در تغذیه جوجه‌های

گوشتی توسط کریمی ترشیزی (۱۳۸٤)؛ بررسی اثرات استفاده از پروبیوتیک بر عملکرد و خصوصیات کیفی تخم‌مرغ مرغهای مادر گوشتی بوسیله شهسواری (۱۳۸۵)؛ بررسی تاثیر لاکتوباسیل های جداشده از مواد غذایی بر هلیکوباکترپیلوری بوسیله خسروی خراشاد و همکاران (۱۳۸۵) ؛ بررسی اثرات بازدارندگی لاکتوباسیلوس بر علیه هلیکوباکتر پیلوری در شرایط گرادیان گلوکز و اکسیژن در سیستم ژلی تثبیت شده توسط عبد الهی و رضا زاده زراندی (۱۳۸۵)؛ بررسی امکان تولید و نگهداری نوشیدنی تخمیری پروبیوتیک با استفاده از کشت باکتریایی گرمادوست و میاندوست بوسیله طاهری (۱۳۸۵)؛ مقایسه اثر پروبیوتیک‌های تجاری موجود در ایران بر عملکرد و مرفولوژی روده کوچک جوجه‌های گوشتی توسط سلیمانی (۱۳۸۵)؛ اثر توام آنزیم، پردبیوتیک و آنتی‌بیوتیک بر عملکرد و قابلیت هضم مواد مغذی جوجه‌های گوشتی بوسیله فاضلی نسب (۱۳۸۵) و بررسی خصوصیات پروبیوتیکی سه جدایه باکتری‌های اسیدلاکتیک در شرایط *invivo , invitro* توسط قیامی پور (۱۳۸۵)می باشند.

۱-۱-۲-تحقیقات انجام شده در دیگر کشورها

طبق نظر هرودوت مورخ بزرگ یونانی تاسماهیان از ۲۵۰۰ سال قبل صید و عمل آوری می شدند . همچنین درمورد تاسماهیان دریای خزر و بهره برداری از آنها نویسندگان عرب ازجملهEbne Fake و سیاحان اروپایی ازجمله Markopolo وبعدها درقرن هفدهمOlearyدر آثارخود اشاره نموده اند. مدارکی دال بر پرورش استرلیاد ازقرن دوازدهم در روسیه وجود دارد وروسها از قرن پانزده و شانزده میلادی صید ماهیان خاویاری را در رودخانه ولگا وانشعابات آن انجام می دادند . صید و بهره برداری ازتاسماهیان در آذربایجان پس از الحاق به شوروی سابق ازسال ۱۸۱۳ میلادی آغازشد (بهمنی ، ۱۳۷٦). پرورش ماهیان خاویاری در نیمکره شمالی همزمان با ترویج پرورش سایر گونه ها بعد از دستیابی به تکنیکهای مصنوعی تکثیرو پرورش قزل آلای رنگین کمان، در سال ۱۸۵۰بوسیله Remy وGehain درفرانسه مورد توجه بیشتری قرارگرفت. این درحالی است که مطالعات مربوط به بیوتکنیک پرورش ماهیان خاویاری ازسال۱۹۷۱ میلادی در مؤسسه تحقیقاتی سیمنوف آغاز و اولین نتایج درسال ۱۹۷۹ بدست آمده است که شوروی سابق نقش بسیار مهمی را در این راستا ایفا می نماید (Chebanov and Billard , 2001) .

روسها برای نخستین بار در جهان موفق به تکثیر تاسماهیان درسال ۱۸٦۹ گردیدند. این عمل بوسیله Ovsjannikovصورت گرفت . وی موفق به تکثیرمصنوعی مولدین استرلیاد *Acipenser ruthenus* صیدشده از رود ولگا و پرورش لاروهای آنها گردید. Berg نیز درسال۱۸۹۸ گزارشهایی مبنی بر تکثیرمصنوعی استرلیاد را ارائه داده است . Borodin (۱۸۹۸) نیز مطالعاتی را در زمینه تکثیر مصنوعی

اسـترلیاد و تاسماهی سیبری (*A. baeri*) انجام داده و برای نخستین بار اعلام نمود که استفاده از سیلت منجربه رفع چسبندگی تخم های تازه لقاح یافته می گردد . Derjavin (۱۹۱۲) نیز مؤسسه مـاهی شناسـی باکورا تأسیس نموده ومطالعات خود را درزمینه تکثیرماهیان خاویاری آغازنمود. Gerbil’skij وهمکـاران (۱۹٤۱)موفق به تحریک اوولاسـیون درماهیان خاویاری با استفاده از تزریـق هیپـوفیز گردیدنـد. مطالعـات متعددی نیز در ارتباط با تکثیرمصنوعی این ماهیان درسال های بعدصورت گـرفت. Gaevskaya (۱۹٤۱) به بررسی استفاده از موجودات پلانکـتونـی و سیسـتم مناسب جهت پـرورش سـخت پوسـتان بـه منظـور تغذیه تاسماهیان انگشت قد پرداخت. درنهایت روسها موفق به ارائه تکنولوژی پـرورش ماهیـان خاویـاری گشتند. نتایج مطالعـات آنهـا بوسـیله Stroganov(۱۹٦۸) در کتـابی عنـوان گردیـد (Chebanov and Billard , 2001) .

از اواسط قرن نوزدهم همزمان با روسها، آلمان و آمریکای نیز شمالی اقـدام بـه انجـام مطالعـاتی در زمینـه پرورش ماهیان خاویاری نمودند. پرورش ماهیان خاویـاری درکشـورهای غربـی از سـال ۱۹۸۰ بـه منظـور جلوگیری از انقراض نسل برخی ازگونه هاوبازسازی ذخایر آنهـا درنتیجـه صـیدبی رویه،شـیوع آلودگیهـا، احداث سدها و دلایل مشابه آغاز گردید و در این راستا دو گونه تاسماهی آدریاتیک *A. nacarii* در ایتالیا وتاسماهی اروپایی *A. sturio* درفرانسه بیشتر موردتوجه واقع شدند.مطالعات متعددی نیـز از آن سـال هـا تاکنون جهت توسعه پرورش ماهیان خاویاری و بهبود روش های مناسب صورت گرفته اسـت (Williot et al. , 2001) .

تحقیقات صورت گرفته بر روی استفاده از پروبیوتیکها در آبزی پروری در جهان در مراحـل اولیـه توسـعه خود بوده و بصورت جدی از سال ۱۹۹۰ آغاز گردید. در اوایل قرن بیسـتم Metchnikoff’s (Fuller, 1992) طی مطالعاتی برای اولین بار بررسی کاربرد پروبیوتیکها را آغاز نمود. او ایـن مـواد را میکروبهـای بلعیده شده جهت افزایش میزان سلامتی موجودات نام برد. این تعریف به اندازه ای جامع و روشن عنوان گردید که همچنین به عنوان مواد غیر زنـده کـه در تعـادل میکروبـی روده دخیـل هسـتند توسـط Parker (۱۹۷٤) و پس از آن Fuller(۱۹۸۹) بیان گردید. این مواد با بهبود تعـادل میکروبـی دسـتگاه گـوارش بـه عنوان مکمل غذایی میکروبی تاثیر سودمندی بر روی حیوان میزبان میگـذارد .ایـن تئـوری هـا در ابتـدا در مزارع پرورشی پستانداران ، طیور ، خوک و حتی انسان از زمانیکه اولین تحقیقات در این زمینه بطور عملی انجام گرفت، کاربردی گردیـد (Gomez-Gil et al., 2000). پروبیوتیکهـا امـروزه همچنـین در مـزارع پرورش آبزیان هم مورد استفاده قرار میگیرند و بنابر این تعریف آن بایستی مورد تجدید نظـر قـرار گیـرد. درارتباط با کاربرد پروبیوتیکها در پرورش آبزیان نه تنها دستگاه گوارش نقش مهمی را ایفا می نماید بلکـه شرایط فیزیکو- شیمیایی آب اطراف نیز از اهمیـت زیـادی برخـوردار اسـت. Gatesoupe (۱۹۹۹) بیـان

داشته است که پروبیوتیکها سلولهایی میکروبی هستند که با روشهای مختلفی به دستگاه گوارش وارد میشوند و بمنظور بهبود وضعیت سلامت جاندار در این قسمت کلونیزه شده و زنده می مانند. Gram و همکاران (۱۹۹۹) تعریف مشابهی را بیان نمودند با این تفاوت که محدودیت در ارتباط با اصلاح وضعیت روده را حذف نموده و بیان داشتند پرو بایوتیکها عبارتند از مکملهای زنده میکروبی که بصورت کاملا موثر و سودمندی وضعیت سلامت میزبان را از طریق بهبود و اصلاح تعادل میکروبی تحت تاثیر خود قرار می دهند.

مهمترین گروههای پروبیوتیک که بصورت گسترده در پرورش میگو ،خرچنگ و ماهیان مورد استاده قرار میگیرند شامل *Vibrio* , *Bacillus*، *باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک* بویژه *Lactobacillus* , و *Pseudomonas* می باشند و در اغلب آنها اثرات سودبخشی چون افزایش رشد ، درصد بقا ، تقویت سیستم ایمنی و تسریع تکامل دستگاه گوارش مشاهده گردیده است (Gatesoupe, 1999 and Gomez-Gil et al., 2000).

بررسی های بسیار متعدد و متنوعی بر روی کاربرد پرو بایو تیکها در آبزیان در مراحل مختلف سنی صورت پذیرفته است که علی رغم مطالعات صورت گرفته در داخل کشور ، در اکثر تحقیقات خارج از کشور اقدام به جدا سازی پروبایو تیکها بویژه گونه های مختلف با کتری های تو لید کننده اسید لا کتیک از دستگاه گوارش آبزیان گردیده است. مهمترین برسیهای صورت گرفته در سالهای بین ۲۰۰۰ الی ۲۰۰۷ عبارتند از :

در بررسی انجام شده بوسیله Robertson و همکاران (۲۰۰۰) بر روی آزادماهیان شامل دو گونه ماهی آزاد آتلانتیک *Salmo salar* و قزل آلای رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss*، باکتری *Carnobacterium sp.* از دستگاه گوراش این ماهی جدا ، کشت داده شده و به جیره غذایی این دو گونه در مقادیر متفاوت افزوده شد. نتایج ان بررسی حاکی از افزایش رشد و بقای لاروهای این دو گونه و افزایش مقاومت آنها در برابر حضور باکتریها یی ذیل گردیده است که عبارتند از:

Aeromonas salmonicida , *A . hydrophil* , *Vibrio anguillarum* , *Streptococcus milleri*

Flavobacterium psychrophilum و *Photobacterium damselae subsp. piscicida* می باشند. بعلاوه نتایج این بررسی حاکی از عدم تغییر فلور باکتریهای غالب در دستگاه گوارش این دو گونه در مراحل مختلف زیست است.

Gomez-Gil و همکاران (۲۰۰۲) نشان دادند با توجه بـه اهمیـت نقـش جلبـک *Cheatocerose* در تغذیه میگوهای خانواده پنائیده در مرحله پروتوزوآ ، حضور پروبیوتیـک باکتریـایی بـا نـام علمـی *Vibrio alginolyticus* قادر به بهبود و افزایش رشد این جلبک خواهد بود .

Nikoskelainen و همکـاران (۲۰۰۳) اثـرات سـود بخـش ناشـی از کـاربرد پروبیوتیـک باکتریـایی *Lactobacillus rhamnosu* در دوزهای متفاوت بصورت خوراکی برای ماهی قزل آلای رنگین کمـان را در تقویت سیستم ایمنی و رشد این گونه مشاهده نمودند.

تحقیقات Meunpol و همکاران(۲۰۰۳) بر روی میگوی مونودون *Penaeus monodon* نشان مـی دهد استفاده همزمان از دو پروبیوتیک باکتریایی شامل Vibrio وBacillus در جیره غذایی به همراه وار کردن ازن به آب منجر به افزایش رشد و بقا در این گونه می گردد.

مطالعات انجام شده بوسیله Tovar-Ramı´reza و همکاران (۲۰۰٤) بر روی لاروهای بـاس دریـایی*x* *Dicentrarchus labra* بیانگر تاثیر مثبـت اسـتفاده از مخمـر *Debaryomyces hansenii*بصـورت زنده برر وی تسریع روند تکامل دستگاه گوارش این گونه است .

بررسیهای Gulliana و همکاران (۲۰۰٤) بر روی *Penaeus vannamei* نشان میدهد که استفاده از پروبیوتیکهای باکتریایی شامل *Vibrio* و *Bacillus* در تغذیه آنها نه تنها منجر به افزایش رشد در آنهـا میگردد بلکه در تقویت سیستم ایمنی آنها نیز نقش عمدهای را دارا می باشد و این امر در مورد *Bacillus* بیشتر صادق است.

مطالعات Li و همکاران (۲۰۰٤) بر روی هیبرید باس مخطط که از آمیزش دو گونه بترتیب با نامهای علمی مشتمل بر *Morone chrysops* × *M.saxatlis* (میانگین وزنی ۹۰ گرم) حاکی از افزایش رشـد ،مقاومت در برابر استرسهای مدیریتی و تقویت سیستم ایمنی در نتیجه استفاده از مخمر در رژیم غذایی این گونه میباشد

۱-۲-تاسماهیان دریای خزر

۱-۲-۱-وضعیت تاسماهیان دریای خزر

ماهیان خاویاری ازقدیمی ترین مهره داران روی زمین هستندکه ازحدود۲۵۰ میلیون سال پیش تاکنون می زیسته اندو به لحاظ قدمت به آنها فسیل های زنده اطلاق می شود (Birstein , 1993). طبق بررسیها

بیشترین صید ماهیان خاویاری از اوائل قرن بیستم گزارش گردیده است (بهمنی ، ۱۳۷۸) .اما در اواسط دهه۱۹۴۰-۱۹۳۰ به علت شرایط نامساعد آب وهوایی مانندکاهش میزان بارندگی و پایین آمدن سطح آب ازیک سو و افزایش روند دخالت بشر(Anthropogenic)در اکوسیستم های طبیعی تاسماهیان مانند صید بی رویه (بهمنی ، ۱۳۷۸ ؛ حسینی ، ۱۳۷۷ ؛ برادران طهوری ، ۱۳۷۷) و ایجاد منابع آلوده کننده درنتیجه عملیات مربوط به استخراج و پالایش نفت و گاز تردد کشتی ها و تخلیه موادزائد به آب ، استخراج معادن موجود درسواحل دریا ، تخلیه فاضلابهای شهری و زباله به دریا ، تخلیه پساب ناشی از فعالیت صنایع مجاور سواحل به دریا ، فعالیتهای کشاورزی (کودهای شیمیایی، سموم و آفت کشها) ، نشت مواد رادیواکتیو (بهمنی ، ۱۳۷۵)و مواردی مانند احداث سدها (مقیم ، ۱۳۷۱ ؛ حسینی ، ۱۳۷۷ ؛ برادران طهوری ، ۱۳۷۷) ورود نوعی شانه دار در سال های اخیر به دریای خزر و تغذیه از تخم این ماهیان و رقابت غذایی با آنها (اسماعیلی ساری ، ۱۳۸۰) و ایجاد تأسیسات هیدرولیک (مقیم ، ۱۳۷۱) تأثیرات زیادی را در روند مهاجرت ، تغذیه ، تولیدمثل و درنهایت صید آنها داشته و منجربه کاهش چشمگیر ذخایر این ماهیان گردیده است (بهمنی ، ۱۳۷۸) .

ماهیان خاویاری دریای خزر شامل ازون برون *Acipenser stellatus*، تاسماهی روسی *A. gueldenstaedti* ، تاسماهی ایرانی *A. persicus*، شیپ *A. nudiventris*، فیل ماهی *Huso huso* و تاسماهی رودخانه ای (ولگا) یا استرلیاد *A. ruthenus* می باشند (بهمنی ، ۱۳۸۰ ؛ حسینی ، ۱۳۷۷ ؛ عبداللهی ، ۱۳۷۷) .

۱-۲-۲-بررسی ساختار زیستی و اهمیت فیل ماهی دریای خزر :

جنس فیل ماهی*Huso* Brandt ، ۱۸٦۵ شامل گونه های زیر است(کیوان ، ۱۳۸۲ ؛ بهمنی،۱۳۷٦و ۱۳۷۷):

۱-فیل ماهی دریای خزر *Huso huso* (Linne), 1758 ، بلوگا (روسی) ، مورون (رومانی)

۲-فیل ماهی آمور *Huso dauricus* (Georgi),1775 ، کالوگا (روسی)، سین خوآن یو (چینی)

فیل ماهی از بزرگترین ماهیان دریای خزر محسوب می گردد که طولی برابر ۵ متر و وزن این ماهی به ۱۵۰۰-۱۰۰۰ کیلوگرم و سن آن تا۱۰۰ سال نیز می رسد(وثوقی و مستجیر ، ۱۳۷٦ ؛ بهمنی ، ۱۳۸۰) .

این گونه در دریای سیاه، آزوف ، آدریاتیک ، شرق دریای مدیترانـه و در دریـای خـزر زنـدگی مـی نمایـد (محسنی ، ۱۳۷۷ ؛ اسـپیر و همکاران ، ۲۰۰۰) .براساس گزارش نهایی کاراتای و اوسایرین(۱۹۷۱)جمعیت فیل ماهی دریای خزر خودبه سه جمعیت فـرعی فیـل ماهی کـورا (جنـوب دریـای خـزر)، فیـل مـاهی اورال و فیـل ماهی ولگـا تقسیم می شود (محسنی ، ۱۳۷۷ ؛ اسداللهی ، ۱۳۷۲) . تفاوت فیل ماهی کـورا بـا فیل ماهی ولگا تنها از نظر رسـیدگی جنسی دیرترو بـاروری کمتـرو دیررسـی آنهـا اسـت.نتایج حاصـل از بررسی های مورفوبیولوژیک یکساله برروی فیل ماهیان صیدشـده در سـواحل ایـران نشـان مـی دهـد کـه مشخصـات آنها با مشـخصـات جمعیت های جنـوبی دریای خزر (جمعیـت کـورا) بیشـتر تطـابق دارد (عقیلی نژاد ، ۱۳۷۳) .خاویار فیل ماهی بومی خزر ، سیاه و آزوف ازمرغوب ترین نوع خاویار محسوب مـی گـردد و سـهم قابل توجهی را در بازارهای جهانی به خود اختصاص داده است (اسپیر و همکـاران ، ۲۰۰۰) . بررسی های اخیر نیز حاکـی از کاهش چشمگیر جمعیت فیل ماهی در طول ۲۰ سال گذشته بوده و صید بی رویه ازجمله مهمترین علل کاهش جمعیت ماهیـان خاویـاری خـزر عنـوان گردیـده اسـت امـا کـاهش مکانهای تخم ریزی و آلودگی نیز نقش مهمی را در ایـن راسـتا ایفـا مـی نماینـد . در سـال۲۰۰۰ مـیلادی گزارشاتی بوسیله کارشناسان شـیلات روسیه مبنی بر عدم وجود مولدین ماهی جهـت تکثیرمصـنوعی آنهـا ارائه گـردیده است. کارشناسان عقیده دارند که درشـرایط موجود فیل ماهی دریای خزر قادر بـه تولیـدمثل طبیـعی نبوده و بقاء آن به صورت کامل وابسته به تکثیرمصنوعی ورهاسازی این ماهیان در دریا است(اسپیر وهمکاران ، ۲۰۰۰).براساس برآوردهای انجام شده حدود ۹۱/۵ درصد فیل ماهیان موجود در دریـای خـزر حاصل از تکثیر مصنوعی می باشند (برادران طهوری ، ۱۳۷۷) .

۱-۲-۳-بررسی ساختار زیستی و اهمیت تا سماهی ایرانی در دریای خزر :

تاسماهی ایرانی از خانواده Acpenseridae و این خانواده دارای ۵ جنس (یک جنس فسیل) و ۲٦ گونه می باشد. از جمله مهمترین جنسهای این خانواده ***Huso*** و ***Acipenser*** است که جـنس ***Acipenser*** دارای ۱۸ گونه می باشد و ***Acipenser persicus*** یا تاسماهی ایرانـی (قـره بـرون) یکـی از مهمتـرین جنسهای این خانواده در در یای خزر است. این گونه خود دارای دو زیـر گونـه مـی باشـد کـه عبارتنـد از (بهمنی، ۱۳۷۷) :

۱- *Acipenser persicus persicus*

پراکنش : دریای خزر، رودخانه های کورا، ولگا، سولاک، سامور، اورال، سفید رود، گرگان رود

۲- *Acipenser persicus colchicus*

پراکنش : ناحیه شرقی دریای سیاه ، قفقاز، رودخانه ریونی، سواحل آنا تولی

تاسماهی ایرانی مخصوص سواحل جنوبی در یای خزر بوده و در قسمتهای شمالی آن بندرت دیده می شود. تولید مثل این ماهی در رودخانه های سفید رود، لارو در بابل، سرخرود، گرگان رود، تجن رود و کورا در آذربایجان می باشد . تخمریزی و تولید مثل این ماهی از اواسط اردیبهشت تا اواسط خرداد ماه در دمای ١٦ تا ١٧ درجه انجام می پذیرد (وثوقی و مستجیر، ١٣٧٣). متاسفانه نسل این ماهی که یکی از ارزشمند ترین گونه ماهیان خاویاری می باشد و خاویار آن بعد از خاویار فیل ماهی از درجه با لای مرغوبیت برخوردار می باشد رو به زوال است از این رو کارگاههای تکثیر و پرورش مصنوعی ماهیان خاویاری احداث و سالانه اقدام به رهاسازی بچه ماهیان انگشت قد این گونه می نمایند (پورکاظمی، ١٣٧٧).

١-٣-مطالعه کاربرد پروبایوتیک در ماهیان

مطالعات صورت گرفته در ارتباط با کاربرد پروبیوتیک ها در آبزی پروری در مراحل اولیه خود قرار داشته و نیاز به تحقیقات گسترده تری علی رغم بررسیهای متعدد و متنوع صورت گرفته در دهه اخیر دراین زمینه ا حساس می گردد. بنظر میرسد شیوع بیماریهای مختلف با کتریایی و بروز مرگ و میر یکی از مهمترین مشکلات پرورش آبزیان در مرحله لاروی محسوب می گردد (Wyban and Sweeney, 1991; Grisez and Ollevier,1995) .

در سالهای اخیر با استفاده از پروبیوتیکها، انواع محرکهای سیستم ایمنی و عملیات واکسیناسیون مبادرت به رفع این مشکل نمو ده اند. در این راستا پروبیوتیکها از جایگاه ویژه ای برخوردارند که در ذیل به بررسی آن می پردازیم.

١-٣-١-تعریف پرو بایوتیک

در اوایل قرن بیستم Metchnikoff's (Fuller, 1992) طی مطالعاتی برای اولین بار بررسی کاربرد پروبیوتیکها را آغاز نمود. او این مواد را میکروبهای بلعیده شده جهت افزایش میزان سلامتی موجودات نام برد(Fuller, 1992). در این راستا برای نخستین بار این دانشمند پیشنهاد نمود تا باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک بمنظور ممانعت از فعالیت باکتری های بیماریزا و مخرب به روده انسان وارد گردد. این تعریف به اندازه ای جامع و روشن ارائه شد که همچنین به مواد غیر زنده ای که در تعادل میکروبی روده دخیل هستند توسط Parker (١٩٧٤) و پس از آن Fuller(١٩٨٩) نیز پروبیوتیک اطلاق گردید. این مواد با بهبود تعادل میکروبی دستگاه گوارش به عنوان مکمل غذایی میکروبی تاثیر سودمندی بر روی حیوان میزبان میگذارد .این تئوری ها در ابتدا در مزارع پرورشی پستانداران ، طیور و حتی انسان از زمانیکه اولین تحقیقات در این زمینه بطور عملی انجام گرفت، کاربردی گردید (Gomez-Gil et al., 2000).

پروبیوتیکها نخستین بار در مزارع پرورش آبزیان بوسیله Kozasa (۱۹۸۶)مورد استفاده واقع گردید و کاربرد آنها درمزارع پرورش ماهی در سالهای اخیر افزایش چشمگیری رانشان می دهد. درارتباط با کاربرد پروبیوتیکها در پرورش آبزیان نه تنها دستگاه گوارش نقش مهمی را ایفا می نماید بلکه شرایط فیزیکو- شیمیایی آب اطراف نیز از اهمیت زیادی برخوردار است. Tannock (1997) بیان داشته است که پروبیوتیکها سلولهایی میکروبی هستند که با روشهای مختلفی به دستگاه گوارش وارد میشوند و بمنظور بهبود وضعیت سلامت جاندار در این قسمت کلونیزه شده و زنده می مانند. Gram و همکاران (۱۹۹۹) تعریف مشابهی را بیان نمودند با این تفاوت که محدودیت در ارتباط با اصلاح وضعیت روده را حذف نموده و بیان داشتند پرو بایوتیکها عبارتند از مکملهای زنده میکروبی که بصورت کاملا موثر و سودمندی وضعیت سلامت میزبان را از طریق بهبود و اصلاح تعادل میکروبی تحت تاثیر خود قرار می دهند.

بر اساس بررسیهای صورت گرفته، پروبیوتیکها نمی توانند از جمله عوامل کنترل کننده بیولوژیک محسوب گردنند چرا که کنترل بیولوژیک عبارت از استفاده از دشمنان طبیعی یک جاندار مضر، بمنظور کاهش آسیب های ایجاد شده بوسیله آن می باشد . این در حالی است که پروبیوتیکها میکرو ارگانیسم های مضر و یا عوامل بیماریزا را مورد حمله قرار نداده و تنها منجر به کاهش آسیب های ایجاده بوسیله این عوامل در میزبان از طریق رقابت، تولید سوبسترا بمنظور ممانعت از رشد این عوامل و یا اتصال به آنها می گردد. بنا بر این تعریف ، پروبایو تیکها نمی توانند از جمله عوامل محرک رشد و یا تسریع کننده رشد محسوب شده و تنها یک فاکتور بهبود دهنده وضعیت سلامت آبزی محسوب می گردند که از این طریق قادر به اعمال تاثیر مثبت بر روی رشد و سیستم ایمنی بدن می باشند (Gomez-Gil et al., 2000) .

۱-۳-۲-اهمیت استفاده از پرو بیوتیک در آبزی پروری :

نحوه استفاده از پروبیوتیک در آبزیان و موجودات خشکی زی کاملا بعلت تفاوتهای فیزیولوژیک متفاوت می باشد. بعنوان مثال انسانها و سایر موجودات خشکی زی مراحل رشد و نمو جنینی خود را در مایع آمنیوتیک طی می نمایند در حالیکه لاور ماهیان و اکثر موجودات آبزی در مراحل اولیه انتوژنیک به محیط زیست خارج از بدن راه می یابند و به علت آغاز تغذیه در زمانی که هنوز صورت کامل دستگاه گوارش و سیستم ایمنی تکامل لازم را پیدا ننموده اند ، لاروها در معرض آسیب جدی به فلور میکروبی موجود در دستگاه گوارش بویژه روده قراردارند (Vadstein, 1997). از این رو استفاده از پرو بیوتیکها بویژه در مرحله لاروی توصیه می گردد (Gatesoupe, 1999).

فلور میکروبی موجود در دستگاه گوارش موجودات خشکی زی و انسانها تقریبا ثابت می باشد (Moriarty, 1990) . این در حالی است که در آبزیان بعلت خونسرد بودن و تبعیت دمای بدن از دمای

آب محیط اطراف فلور میکروبی دستگاه گوارش دائما در حال تغییر می باشد(Lèsel, 1990) . نه تنها تغییرات دما ، تغییرات شوری نیز قادر به تغییر فلور میکروبی موجود در دستگاه گوارش آبزیان بویژه در مرحله لاروی می باشند (Ringø and Strøm, 1994) . بعلاوه در کنار شرایط زیست محیطی، نوع غذای در یافتی بوسیله آبزیان نیز قادر به تغییر فلور میکروبی دستگاه گوارش آنها خواهد بود(Gatesoupe, 1999) و این مسئله در مرحله لاروی و نوجوانی ماهیان باثبات رسیده است (Ringø et al., 1995). بگونه ای که تاثیر باکتر یهایی که از طریق غذای زنده به بدن لاروها در مراحل نخست تغذیه و اغاز تغذیه فعال وارد می شوند کاملا مشهود می باشد (Munro et al., 1993; Bergh et al., 1994). بنابر این استفاده از باکتریهایی که آنتاگونیسم با عوامل بیماریزا باشند ، از قابلیت کلونیزه شدن در روده برخوردار بوده و موجب بهبود وضعیت سلامت جاندار گردند، بعنوان پروبیوتیک محسوب گردیده و منجر به تغییرمناسب فلور میکروبی دستگاه گوارش ماهی خواهد شد. این امر در نهایت منجر به افزایش تولید و افزایش مقاومت ماهیان و سایر آبزیان پرورشی در برابر استرسهای رایج در آبزی پروری، در شرایط پرورش مصنوعی ماهیان می گردد(Gatesoupe, 1999).

در این راستا گونه های متفاوت باکتری های تولید کننده مهمترین گروههای پروبیوتیک که بصورت گسترده در پرورش میگو ،خرچنگ و مورد استاده قرار میگیرند شامل *Vibrio* , *Bacillus*، *باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک* بویژه *Lactobacillus* و *Pseudomonas* می باشند و در اغلب آنها اثرات سودبخشی چون افزایش رشد ، درصد بقا ، تقویت سیستم ایمنی و تسریع تکامل دستگاه گوارش مشاهده گردیده است(Gatesoupe, 1999 and Gomez-Gil et al., 2000).

اسید لاکتیک از جایگاه ویژه ای بر خور دار است.ین باکتری ها بصورت غالب در دستگاه گوارش ماهیان وجود نداشته و استفاده از انواع غیر بیماریزای آن به عنوان پروبیوتیک نه می تواند منجر به افزایش مقاومت ماهیان در برابر عوامل بیماریزای گرم مثبت گردد بلکه می تواند به عنوان یکی از مهمترین فاکتورهای موثر بر رشد و تقویت کننده سیستم ایمنی محسوب می گردد (Ringo and Gatesoupe, 1998).

بنابر این با توجه به اهمیت و جایگاه باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک به بررسی نقش این باکتریها به عنوان پروبیو تیکها در سلامت ماهیان می پردازیم.

۱-٤-باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک

باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک (Lactic acid bacteria) یا LAB جزو باکتریهای گرم مثبت، غیر متحرک و بدون قابلیت تولید اسپور هستند که تولید اسید لاکتیک در آنها به عنوان محصول نهایی و منحصر به فرد متابولیسم حاصل از تخمیر میباشد (RingØ and Gatesoupe, 1998).

اعضای این گروه شامل هر دو شکل میله ای (لاکتو باسیلها و کارنوباکتریوم ها) و مدور یا کوکسی (استرپتو کوکوس) که عمدتا کاتالاز منفی و فاقد سیتوکروم هستند. خصوصیات این باکتریها در جدول شماره ۱-۱ ارائه گردیده است.

جدول ۱-۱- مطالعه خصوصیات پایه در باکتری های تولید کننده اسید لاکتیک

نام جنس	محصول نهایی تخمیر	شکل سلول	آرایش سلولها
Streptococcus	همولاکتیک	کوکسی	جفت/زنجیره ای
Leuconostoc	هترولاکتیک	کوکسی	جفت/زنجیره ای
Pediococcus	همولاکتیک	کوکسی	تتراد/ کلاستر
Aerococcus	همولاکتیک	کوکسی	تتراد/ کلاستر
Enterococcus	همولاکتیک	کوکسی	جفت/زنجیره ای
Vagococcus	همولاکتیک	کوکسی / میله ای شکل	جفت/زنجیره ای
Lactobacillus	هترولاکتیک/ همولاکتیک	میله ا ی شکل	جفت/زنجیره ای
Carnobacterium	هترولاکتیک	میله ای شکل	جفت/زنجیره ای

این باکتری ها دارای نیازهای تغذیه ای اختصاصی بوده و نیازمند به انواع کربوهیدراتها، اسیدهای آمینه، پپتید ها، مشتقات اسید نوکلئیک و ویتامین می باشند. گونه های مختلف باکتریهایLAB برا ی رشد در محیطهای مختلف سازگار گردیده و عمدتا در دستگاه گوارش موجودات خونگرم (مانند موش، خوک، نشخوار کنندگان و انسان) (Finegold et al., 1983; Tannock, 1988) ، شیر و سایر محصولات

لبنی(Sharp, 1981)، محصولات دریایی (Mauguin and Novel, 1994) و سطح برخی از گیاهان(Keddie, 1959) یافت می گردند. این باکتری ها عمدتا در تولید و نگهداری برخی از مواد غذایی مانند پنیر، گوشت، ماست و سیلاژ نقش مهمی را ایفا می نمایند. نقش این باکتریها در دستگاه گوارش موجودات خونگرم بصورت گسترده ای مورد بررسی واقع گردید است

(Goldin, 1986; Sissons, 1989; Gorbach, 1990; Goldin and Gorbach, 1992).

علی رغم وجود اطلاعات ارزشمند ی که در زمینه نقش و اهمیت این باکتری ها در موجودات خونگرم، تنها در مطالعات معدود و اندکی به حضور طبیعی این باکتریها در دستگاه گوارش و بویژه روده ماهیان اشاره گردیده است (Jonsson and Conway, 1992 , RingØ and Gatesoupe, 1998) . مطالعات معدودی بر روی گونه های لاکتو باسیلوس جداسازی شده از دستگاه گوارش آزاد ماهیان صورت پذیرفته است . اما ضرورت انجام مطالعات گسترده بر روی دیگر باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک و دیگر گونه های بیماریزا ی این گروه موجود در اندامهای داخلی دستگاه گوارش در گونه های مختلف آبزیان پرورشی احساس می گردد (RingØ et al., 1995).

مطالعه فاکتورهای تاثیر گذار بر سطوح جمعیت باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک در دستگاه گوارش آبزیان تجاری پرورشی از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است. بنابر این در این بخش به بررسی اهمیت و جایگاه این با کتریها در بحث آبزی پروری پرداخته میشود.

۱-٤-۱- حضور باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک در دستگاه گوارش ماهیان در مراحل مختلف

۱-٤-۱-۱- مراحل لاروی

روده لارو ماهیان تا قبل از خروج از تخم کاملااستریل میباشد اما پس از تخمگشایی ماهی، تماس لارو با محیط اطراف و غذای مصرفی منجر به کلونیزه شدن موفقیت آمیز طبیعی گونه های میکروبی موجود در روده می گردد.تعادل فلور میکروبی موجود در روده لارو ، تحت تاثیر فاکتورهای متنوعی شامل غذا ، فیزیولوژی حیوانی و فاکتورهای ایمنولوژیک می باشد. و وجود فلور میکروبی طبیعی روده در کنار آنزیمهای گوارشی به عنوان سدی دفاعی در برابر هجوم عوامل بیماریزامحسوب می گردد

(Muroga et al., 1987; Hansen et al 1992; Munro et al., 1994; Ringø et al., 1996).

دستگاه گوارش ماهیان بصورت لوله ای ساده گسترش یافته است که ابتدا در مجاورت کیسه زرده قرار داشته و سپس آنرا کاملا احاطه می نماید. در طول هفته اول زندگی، لوله گوارشی بصورت لوله طویل و پیچیده در آمده و برای انجام وظایف ویژه ای آماده می شود. عملیات پرولیفراسیون سلولهای روده

بصورت گسترده ای در طول روزهای اول زندگی انجام شده اما پس از آن فقط در نواحی که پایه چین خوردگیهای تولید کننده موکوس را تشکیل میدهند ، انجام می گیرد (Rombout et al., 1984).

عملکرد و آناتومی دستگاه گوارش در طول مراحل لاروی تثبیت گردیده اما در مرحله دگردیسی با تغییرات چشمگیر عملکرد دستگاه های گوارشی، بویژه در زمان بروز تغییر در رژیم غذایی مواجه میگردد.عموما از حیث عددی باکتریهای گرم مثبت که باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک این گروه میباشند جزو فلور میکروبی غالب دستگاه گوارش حیوانات خونگرم در مراحل اولیه زندگی میباشند. این در حالی است که ، علی رغم اهمیت با کتریهای تولید کننده اسید لاکتیک، تنها در سه مورد از تحقیقات انجام شده ، اقدام به جداسازی این گروه از باکتریها از دستگاه گوارش لارو ماهیان گردیده (Strøm and Olsen, 1990; Strøm and Ringø, 1993) و تحقیقات صورت گرفته تنها بر روی ماهی کاد، *Gadus morhua* ، صورت پذیرفته است. علت این مسئله ، وجود فاکتورهای محدود کننده مشتمل بر میزان درجه حرارت ،

مدت زمان انکوباسیون وعدم وجود گلوکوز در محیط کشت می باشد. در بین فاکتورهای اشاره شده، مدت زمان انکوباسیون و عدم حضور گلوکوز جزو مهمترین فاکتورهای بحرانی محدود کننده در امر جداسازی این گروه از باکتریها می باشند چراکه کربوهیدرانها از جمله مهمترین منابع تامین انرژی برای این گروه از باکتریها میباشند(Brock and Madigan, 199) و میزان قند موجود در محیط کشت این باکتریها از جمله مهمترین فاکتور های محدود کننده رشد آنها می باشد (RingØ and Gatesoupe, 1998) .

بنابر این با توجه به تحقیقات محدود صورت گرفته بر روی جدا سازی باکتری های تولید کننده اسید لاکتیک از دستگاه گوارش لارو ماهیان ، ضرورت انجام تحقیق در این زمینه احساس می گردد.

۱-٤-۱-۲- مرحله نوجوانی و جوانی

در این بخش ابتدا توضیح کوتاهی در ارتباط با آناتومی دستگاه گوارش ماهیان بمنظور درک بهتر عملکرد این دستگاه ارائه می شود. دستگاه گوارش ماهیان شامل مری ، معده ، زوائد پیلوریک ، روده باریک و راست روده میباشد. این دستگاه از یک مجرای عضلانی که بوسیله غشا موکوسی پوشیده شده ، تشکیل می گردد و بر اساس عملکرد بخشهای مختلف ، تفاوتهایی در قسمتهای مختلف این دستگاه مشاهده می گردد.

مری عموما کوتاه و انبساط پذیر بوده و قادر به فروبردن طعمه های نسبتا بزرگ است. جمعیت باکتریایی موجود در مری در مطالعه ای بر روی ماهی قزل آلای رنگین کمان، *Oncorhynchus mykiss*، مورد

بررسی واقع گردید و میزان جمعیت باکتریایی موجود در این بخش 3×10^5 به ازای هر گرم از وزن تر بدست آمد (Austin and Al-Zahrani, 1988) . طول روده متاثر از نوع رژیم غذایی ماهیان می باشد. معده در برخی از ماهیان وجود ندارد اما در صورت وجود دارای شکل و اندازه متفاوت می باشد. معمولا شکل معده در اکثر ماهیان U شکل بوده به جز در آزاد ماهیان، سفید ماهی و شگ ماهیان که به شکل J و در مارماهیان Y شکل می باشد (Suyehiro, 1942). مطالعات انجام شده بر روی معده نشان می دهد که میزان جمعیت باکتریایی موجود در معده ماهیان متاثر از pH معده می باشد بگونه ای که در آزاد ماهیان جوان در pH بین ۳/۵ تا ٤/۵ میزان جمعیت باکتریایی معده 2×10^4 تا 2×10^5 گزارش گردید (Ash, 1980). محققین باکتریهای متنوعی را از معده ازاد ماهی چار (*Salvelinus alpinus*) جدا نمودند ولی باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک تنها ۱۰ درصد جمعیت میکروارگانیسمهای دستگاه گوارش را تشکیل میدهد (Austin and Al-Zahrani, 1988; Ringø, 1993) .

تخریب باکتریهای بلعیده شده در دستگاه گوارش ناشی از ترشح اسید در معده وصفرا در روده ها می باشد.

برخلاف مهره داران عالی، در اکثر ماهیان زوائد پیلوریک در محل اتصال معده به روده وجود دارد. و تعداد زوائد پیلوریک از ویژگیهای سیستماتیک ماهیان به شمار می آید. به علاوه در ماهیان فاقد معده ، زوائد پیلوریک مشاهده نمی گردد. pH داخلی این زوائد و فضای داخلی روده به ترتیب برابر ۷ و ۷/۵ میباشد. به علت مرفولوژی پیچیده ، مطالعات میکروبیوی محدودی بر روی این ناحیه از دستگاه گوارش صورت پذیرفته است و در اکثر مطالعات میکروبی اانجام شده، جمعیت باکتریایی این بخش با سایر نواحی گوارشی مشتمل بر قسمتهای مری، معده (Trust and Sparrow, 1974) و روده (Gildberg et al., 1997) مخلوط گردیده است و بر پایه مطالعات صورت گرفته ، حضور باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک در زوائد پیلوریک مشاهده نگردید. این زوائد از نقطه نظر هضم وجذب چربیها اهمیت زیادی دارد (Olsen and Ringø,1997).

در مطالعات اخیر انجام شده بر روی جمعیت میکروبی دستگاه گوارش گونه های مختلف ماهیان، میزان چسبندگی سوشهای مختلف باکتریایی در بخشهای مختلف دستگاه گوارش مورد بررسی واقع شد. نتایج این بررسیها بیانگر افزایش چشمگیر تعداد باکتریهای هوازی هترو تروف در دستگاه گوارش می باشد. البته در برخی از این بررسیها نتایج کاملا معکوسی بدست آمد به گونه ای که در مطالعات انجام شده بوسیله Ringøو Strøm (1994) بر روی آزاد ماهی چار قطبی وحشی، تعداد باکتریهای موجود در روده کوچک و بزرگ کاملا ثابت بوده و در برخی کاهش چشمگیری را نشان می دهد

۱-٤-۲- فاکتورهای تاثیر گذار بر روی میزان باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک در دستگاه گوارش

باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک که بصورت طبیعی در دستگاه گوارش ماهیان وجود داشته و جزء فلور طبیعی این بخش محسوب می گردند، دارای قدرت بقا در دا خل این اندام و توانایی چسبندگی به سلولهای اپیتلیال سطحی روده را برخوردار باشند. تحقیقات گسترده ای بر روی دستکاری فلور میکروبی طبیعی دستگاه گوارش ماهیان بمنظور دستیابی به یک فلور ایده آل میکروبی به روشها ی مختلف صورت پذیرفته است که مهمترین روش ، روش خوراکی یا دهانی می باشد (Durand, 1982; Ducluzeau,1988; Van Nevel and Demeyer, 1988). در این روش از ترکیبات غیر زنده ای مانند آنتی بیوتیکها، یونوفورها، ترکیبات بازدارنده تولید متان، اسید های چرب فرار و فیبرها اشاره نمود (Fonty et al., 1993). نتایج مطالعات صورت گرفته حاکی از این مطلب است که برخی از باکتریهای گروه LAB، پس از افزودن به جیره غذایی، قادر به کلونیزه شدن در دستگاه گوارش ماهیان می باشند اما بلافاصله یا چند روز پس از قطع افزودن این باکتری ها به جیره غذایی ، دیگر با تراکم پیشین در دستگاه گوارش ماهیان یافت نمی شوند (Lidbeck and Nord, 1993) . در ذیل به بررسی فاکتورهای موثر بر تراکم این باکتریها در دستگاه گوارش می پردازیم.

۱-٤-۲-۱- اسید ها ی چرب غیر اشباع

اسیدهای چرب بلند زنجیره ، بویژه اسیدهای چرب غیر اشباع دارای اثرات سمی بر روی بسیاری از گونه های باکتریها بویژه باکتریهای سلولولتیک و متانوژنیک می باشد (Maczulak et al., 1981; Prins et al., 1972) اما در برخی باکتریها ، وجود مقادیر اندک اسید های چرب غیر اشباع بعنوان فاکتور موثر رشد محسوب می گردد (Pollock, 1949; Nieman, 1954) و در مطالعات محد ودی به بررسی تاثیر اسید های چرب غیر اشباع بر روی فلور میکروبی دستگاه گوارش ماهیان پرداخته شده است در برخی گونه ها افزایش ا سیدهای چرب غیر اشباع بصورت منفرد، منجر به کاهش و یا از بین رفتن جمعیت باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک و در موارد نادری ترکیب انواع مختلف اسید های چرب غیر اشباع منجر به افزایش جمعیت این گروه از باکتریها می گردد . بنظر می رسد مهمترین علت بروز این امر، تحت تاثیر قرار دادن مکانهای اتصال باکتریها ی تولید کننده اسید لاکتیک موجود در دیواره روده از طریق تغییر ترکیب اسیدهای چرب موجود در این قسمت می باشد (Ringø and Gatesoupe, 1998) .

۱-٤-۲-۲- رقابت غذایی

در زمانیکه وجود یک ماده مغذی به هر دلیلی در محیط داخلی دستگاه گوارش کاهش یابد ، احتمال تغییر فلور میکروبی طبیعی این اندام نیز افزایش می یابد و مهمترین علت آن رقابت باکتریها جهت دستیابی به ابن

ماده مغذی می باشد. در این راستا باکتریهای LAB و میله ای شکل بویژه لاکتوباسیلوسها و کارنوباکتریوم ها بعلت عدم توانائی در تولید آنزیمهای مخرب خارج سلولی چندان مورد توجه قرار نمی گیرند اما باکتریهایی که قادر به هضم ملکولهای پیچیده بمنظور دستیابی به مواد مغذی خاص می باشند از اهمیت ویژه ای برخوردارند(Ringø and Gatesoupe, 1998) .

۱-٤-۲-۳- شوری

مطالعا ت محدود صورت گرفته بیانگر تاثیر شوری بر روی فلور میکروبی طبیعی دستگاه گوارش ماهیان و به تبع جمعیت باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک می باشد و تنها در یک بررسی بر روی ماهی آزاد چار بوسیله RingØو StrØm در سال ۱۹۹٤ به این مسئله پرداخته شده است. نتایج حاصل از این بررسی بیانگر کاهش جمعیت لاکتوباسیلوس ها و کارنو باکتریوم ها میباشد. این در حالی بود که جمعیت باکتریهای LAB کوکسی شکل بویژه *Leuconostoc* و *Streptococcus* تقریبا ثابت مانده و تغییری در تعداد آنها حاصل نگردید.

۱-٤-۲-٤- استرس

پرورش ماهیان درسیستم های متراکم ومحیط های مصنوعی منجربه قرارگرفتن آنها درمعرض فاکتورهای استرس زا و بیماریزای مختلفی گردیده است ، که در شرایط طبیعی مشابه این حالت برای آنها ایجاد نمی گردد(Donaldson ,1981 ; Nolan et al.,1999; Faulkner ,1997;Fevolden et al., 2002 ; Weil et al.,2001) .

در سال های اخیر با توجه به شدت بروز پاسخ ماهیان نسبت به عوامل استرس زا ، اقدام به بهگزینی ماهیان به منظور اهلی سازی واستفاده از انواع محرکهای سیستم ایمنی و پروبیوتیکهای طبیعی نموده(عسکریان و کوشا، ۱۳۸۵) و بررسی ها نشان می دهد ماهیانی که ازحساسیت کمتری نسبت به عامل استرس زا برخوردار بوده وبا شدت کمتری به آن واکنش نشان می دهنداز رشد بیشتردرشرایط استرس زای کارگاههای پرورشی برخوردار بوده و این امر منجربه افزایش تولیدو بازده اقتصادی برای پرورش دهندگان خواهدشد(Nolan et al., 1999 ; Tanck et al.,2002 ; Pottinger and Carrick, 1999; Mc Cormick et al., 1998) .

براساس بررسی های بعمل آمده، استرس درآبزی پروری رامی توان به گروه های مختلف تقسیم بندی نمود . Wedemeyer این تقسیم بندی را براساس منشأ تولید استرس در آبزی پروری ارائه نموده است ، که

شامل موارد ذیل است (بهمنی ، ۱۳۷۸؛ عسکریان و کوشا، ۱۳۸۵) :

۱-استرس های بیولوژیک : درنتیجه حضور سایرماهیان، میکروارگانیزم های بیماریزا، انگلهای داخلی و خارجی ایجاد می شوند .

۲-استرس های شیمیایی : در اثر نوسان موادشیمیایی، مواد آلاینده ، نیتروژن و مواد دفعی متابولیت ها ایجاد می شوند .

۳-استرس های فیزیکی : شامل نوسانات درجه حرارت، pH ، گازهای محلول ، تغییرات شدت و یا رژیم های نوری ، فشار و صدا ایجاد می شود .

٤-استرس های مدیریتی : که در مراکز تکثیرو پرورش ماهی درنتیجه ضعف مدیریت نظیر روش های حمل و نقل ، نگهداری ، تراکم ، دستکاری ، اعمال جراحی ، تغذیه نامناسب و .... ایجاد می شوند .

محور هیپوتالاموس – هیپوفیز – اینترنال (Hypothalamus Pituitary Interrenal) یا HPI در ماهیان مهمترین محور فیزیولوژیک مرتبط با استرس می باشد که درنتیجه ظهور عوامل استرس زا فعال شده ومنجربه ترشح کورتیکواستروئیدهای مهمی نظیرکورتیزول می گرددو این امر درتمام ماهیان استخوانی به اثبات رسیده است(عسکریان و کوشا، ۱۳۸۵; Stratholt et al.,1997 ؛ Donaldson, 1981). درماهیان این محورمسیرهای هورمونی[هورمون آزاد کننده کورتیکوتروپین هیپوتالامیک (CRH)، آدرنوکورتیکوتروپین هیپوفیزی (ACTH)وکورتیکواستروئیدهای اینترنال] بایکسری حلقه های فیزیکی تنظیمی، درسطوح مختلف فعالیت می نمایند . تقریباً اکثر عوامل استرس زای زیست محیطی قادربه تحریک محور(HPI) می باشند (بهمنی ، ۱۳۷۸؛ عسکریان و کوشا، ۱۳۸۵) .

بروز انواع استرسهای مختلف فیزیکی، شیمیایی، مدیریتی و بیولوژیک منجر به تغییر و بر هم خوردن تعادل و فلور طبیعی باکتریای دستگاه گوارش ماهیان و بویژه باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک در نتیجه آزاد سازی هورمون کورتیزول و سایر هورمونهای مرتبط ا استرس می گردد. مطالعات صورت گرفته در جانداران خونگرم حاکی از کاهش جمعیت لاکتوباسیلوس ها و کارنو باکتریوم ها در زمان بروز استرس های مزمن و تغییر پراکنش و تراکم سایر گونه های باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک در بخشهای مختلف دستگاه گوارش می باشد (عسکریان و کوشا، ۱۳۸۵; Tannock, 1988; Tannock, 1997) . در این شرایط حضور پروبیوتیکها در داخل اندامهای گوارشی بویژه روده به عنوان فاکتوری ارزشمند، منجر به ایجاد

تعادل میکروبی مناسب در این اندام می گردد و دربررسیهای اندکی به این مهم پرداخته شده است. نتایج این تحقیقات حاکی از افزایش قابل توجه تعدد باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک بیماریزا در زمان بروز استرس های مزمن در ماهیان و کاهش جمعیت سوشهای مفید و غیر بیماریزا در آنها است. این در حالی است که عکس این حالت در برخی از گونه های ماهیان در زمان بروز استرس های حاد مشاهده گردیده و بنظر می رسد علت آن تلاش جاندار بمنظور حفظ توازن شرایط فیزیولوژیک بدن آبزی در مراحل نخستین بروز استرس میباشد (RingØ et al., 1997) .

۱-٤-۳- اهمیت باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک به عنوان پروبیوتیکها

اگرچه اکثر گونه های باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک غیر بیماریزا می باشند اما برخی از سوشهای آنها بعنوان فاکتور بیماریزا در آبزیان محسوب می گردند که در جدول ۱-۲ ارائه گردیده است.

باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک ، در فلور میکروبی طبیعی روده ماهیان بر خلاف موجودات خونگرم بصورت غالب وجود ندارند اگرچه برخی از سوشهای باکتریهای این گروه در داخل روده کلونیزه شده اند . در مطالعات صورت گرفته، تلاش زیادی بر روی افزایش مصنوعی جمعیت باکتریهای این گروه از طریق خوراکی نموده اند. مهمترین تاثیر کاربرد این باکتریها بعنوان پروبیوتیکها ، استفاده از آنها بمنظور افزایش مقاومت ماهیان در برابر عوامل بیماریزای گرم مثبت می باشد. این باکتریها از طریق ایجاد رقابت غذایی با باکتریهای بیماریزا منجر به از بین رفتن آنها می گردند (Klassen et al., 1990; Ringø et al., 1997).

از جمله دیگر تاثیرات مثبت این باکتریها ، نقش آنها در تقویت سیستم ایمنی ماهیان است و این امر در موجودات خشکی زی باثبات رسیده است. این باکتریها قادر به تحریک پاسخ های غیر اختصاصی ایمنی در ماهیان و سایر موجودات از طریق افزایش فعالیت ماکروفاژها ، تولید ایمنو گلوبولین ها و فعالیت آنزیمهای لیزوزیم می گردند. بعلاوه اثرات ضد سرطان در آنها نیز باثبات رسیده است. همچنین اثرات مثبت آنها بر روی رشد گونه های مختلف ماهیان قابل توجه می باشد (RingØ and Gatesoupe, 1998).

جدول ۱-۲- باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک بیماریزا در ماهیان

(RingØ and Gatesoupe, 1998).

نوع باکتری	گونه ماهی	گونه های گزارش شده

Str. Difficile *Str. faecalis* subsp.*liquefaciens* *Str. shiloi* / *Str. Iniae*a *Str. milleri* group *Str. parauberis* *Str. shiloi*	*Plecoglosus altivelis* *Paralichthys olivaceus* *Fundulus grandis* *Siganus canaliculatus*. Salmonidae *Tilapia* spp. *Ictalurus nebulosus* *Scophthalmus maximus* *Cyprinus carpio* *Mugil cephalus* *Seriola quinqueradiata*.	*Streptococcus* sp.
Lactococcus garvieae *Lac. piscium*	*Onchorhynchus mykiss* *Seriola quinqueradiata*.	*Lactococcus*
_	*Scophthalmus maximus* *Onchorhynchus mykiss*	*Enterococcus-like* *Enterococcus* sp.
C. piscicola	*Morone saxatilis* *Ictalurus nebulosus* *Onchorhynchus*	*Carnobacterium* sp.

	mykiss	
Vagococcus salmoninarum	Salmonidae	*Vagococcus* sp.
–	*Onchorhynchus mykiss* *Salmo salar*	*Lactobacillus* sp.

در ارتباط با مکانیسم این باکتریها بمنظور اتصال و ادامه حیات در دستگاه گوارش ماهیان و سایر موجودات چندین فاکتور از اهمیت بسزایی بر خوردار می باشند که عبارتند از :

۱- *توانایی کلونیزه شدن در دستگاه گوارش* :

کلونیزه شدن باکتری در یک اندام زما نی حاصل می گردد که میزان تکثیر باکتری در آن اندام بمراتب بیشتر از مرگ و میر آن باشد (Conway, 1996) . این امر در ارتباط با باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک در آبزیان و همچنین موجودات خشکی زی باثبات رسیده است

. (RingØ and Gatesoupe, 1998)

۲- *قابلیت چسبندگی به موکوس :*

اولین گام در پروسه کلونیزه شدن، قابلیت چسبندگی باکتری به اندام مورد نظر می باشد. از این رو گونه هایی از باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک بعنوان پرو بایوتیک باید انتخاب گردند که از قابلیت چسبندگی به لایه اپیتلیال دستگاه گوارش بر خوردار باشند. مطالعات صورت گرفته بر روی جانوارن خونگرم بیانگر این مطلب می باشد که هر یک از گو نه های این باکتری ها دارای میزبان اختصاصی بوده و قادر به کلونیزه شدن در دستگاه گوارش هر جانداری نمی باشند. بگونه ای که LAB جداسازی شده از دستگاه گوارش موش قادر به کلونیزه شدن در دستگاه مرغ نمی باشد . علت بروز این امر ارتباط متقابل لکتین ها با گلیکو پروتئینها و گلیکولیپیدها می باشد که لکتین ها از سلولهای باکتریایی، اپیتلیال و یا رژیم غذایی میزبان مشتق شده و در برخی موارد سطح سلولهای اپیتلیال روده را می

پوشانند و قادر به اتصال به کربوهیدراتهای اختصاصی موجود بر روی سلولهای سطحی اپیتلیال روده و یا باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک می باشند (Tannok, 1997).

این پدیده در ماهیان مورد بررسی واقع نگردیده است اما رقابت باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک بعنوان پروبیوتیک با عوامل پاتوژن بمنظور اتصال به گیرنده های اختصاصی موجود در دستگاه گوارش میزبان در ماهیان باثبات رسیده است (RingØ and Gatesoupe, 1998).

۳- فعالیت های آنتاگونیستیک

کلونیزه شدن باکتریهایی که قادر به تولید اسید لاکتیک در دستگاه گوارش می باشند بعنوان پروبیوتیک، منجر به ممانعت از تکثیر باکتریهای فاسدکننده در این مکان میگردد. در نتیجه این امر از بروز بیماریهایی که از طریق، سموم ایجاد شده بوسیله باکتریهای پروتئولتیک در میزبان تولید می گردد، جلوگیری می گردد. بعلاوه این باکتریها قادر به تولید ترکیباتی پپتیدی خواهند بود که مانع از رشد سایر میکرو ارگانیزمها می گردند و به این تر کیبات اصطلاحا باکتریو سایدال اطلاق می گردد (Bruno and Montville, 1993).

۱-۵- سیستم ایمنی در ماهیان

مطالعه سیستم ایمنی درماهیان به صورت قابل توجهی درسالهای اخیر افزایش یافته است و بررسی ها نشان می دهند که سیستم ایمنی درماهیان استخوانی، شباهت زیادی با پستانداران دارد. بعلاوه پرورش ماهیان بصورت متراکم منجربه افزایش احتمال ابتلای آنهابه بیماریهای عفونی در تمام مراحل پرورش می شود. از این رو مطالعه سیستم ایمنی در ماهیان به حفظ سلامت آنها در طول دورهٔ پرورش کمک می کند. دربین گروه های مختلف ماهیان، مطالعه بر روی ایمنولوژی ماهیان استخوانی به دلیل اهمیت اقتصادی و منبع غذایی بودن از اهمیت والایی برخوردار است (Bernstein et al., 1998; Scapigliati, 2002).

ایمنی در ماهیان همانند سایر مهره داران به دو صورت ایمنی ذاتی Innate Immunity یا ایمنی غیراختصاصی و ایمنی اختصاصی Specific Immunity یا ایمنی تطبیقی Adaptive Immunity ظاهرمی شود(کوشا و عسکریان، ۱۳۸۵; Fast et al., 2002; Rotllant et al., 1997) سیستم ایمنی اختصاصی شامل لنفوسیت ها و فراورده های آنها مانند آنتی بادی می باشد .

آنتی بادی ها گلوبولین هایی هستند که ساخت آنها بواسطه ورود و یا مواجهه جاندار با آنتی ژن القا شده و با آنتی ژن های اختصاصی واکنش می دهد و آنتی ژن نیز عبارت از مواد بیگانه ای می باشند که قادربه

القای ایمنی اختصاصی می باشند. لنفوسیت ها نیز ازجمله مراکز مکانیزم های دفاعی اختصاصی بوده و این سلول ها در بروز پاسخ های ایمنی اختصاصی اعم از سلولار و همورال و خاطره ایمنولوژیک نقـش مهمـی را به عهده دارند ، به طوری که در صورت مواجه شدن با یک عامل بیماری زا با شدت بیشـتر و در فاصـله زمانی کوتاهتر وارد عمل می شوند (Ellis , 1981 ; Stoskopf,1993 Roberts,2001). پاسـخهای ایمنی اختصاصی براساس اجزاء شرکت کننده درپاسخ به دوگروه زیرتقسیم بندی مـی شـوند (Abbas et al., 2000 ؛ Roberts,2001 ؛ Joshi and Osama,2002) :

۱-پاسخ های ایمنی همورال که با واسطه ملکول هایی در خـون شـکل مـی گیرنـد کـه مسـئول شناسـایی اختصاصی آنتی ژنها و انهدام آنها می باشند و همانگونه که قبلاً نیز اشاره شد آنتی بادی نام دارند ؛ بروز این پاسخ ها با واسطه لمفوسیتهای B انجام می گردد .

۲- پاسخ های ایمنی سلولار یا با واسطه سلولی که با واسطه لنفوسیتهای T ایجاد می گیرد .

ایمنی ذاتی که بعنوان ایمنی طبیعی نیز در ماهیان شناخته می شود دارای دو خصوصیت مهم مـی باشـد کـه شامل توانایی محدود آن در تمییز میکروبهای مختلف و دیگری ماهیت تکراری و بدون تنوع آن می باشـد. بدین معنا که در برابر اکثر عوامل عفونی به شـکل واحـد و یکنـواختی رفتـار مـی کنـد (Abbas et al., 2000). اجزاء اصلی سیستم ایمنی ذاتی در ماهیان شامل سدهای فیزیکی و شـیمیایی، پروتئینهـای خـون (سیستم کمپلمان، پروتئینهای واکنشی C ، اینترفرونها)، سلولهای کشنده طبیعـی و سـلول هـای فاگوسـیت کننده (ماکروفاژها) می باشند که در بحث سدهای فیزیکی و شیمیایی لیزوزیم ها از اهمیت و جایگاه ویژه ای برخوردار بوده و بعنوان یکی از شاخصهای استرس (Fast et al., 2002) محسوب می گردند .

باتوجه به نقش مهم لیزوزیم ها در ایمنی ذاتی، در ذیل به بررسی آنها می پردازیم.

۱-۵-۱- سدهای فیزیکی و شیمیایی با تاکید بر نقش لیزوزیم

سدهای فیزیکی و شیمیایی در ماهیان شامل(Stoskopf, 1993; Roberts, 2001):

الف- لایه حفاظتی پوستی – شامل : پوست، فلس ها، موکوس، اپی درمیس و درمیس

ب- لایه های حفاظتی آبششها – شامل : اپی تلیـوم هـای آبششـی و سـلول هـای فاگوسـتیک موجـود در مویرگهای آبششی

ج – لایه های حفاظتی دستگاه گوارش– شامل : سیستم روده، معده، pH پایین و حضور آنزیم های مترشحه گوارشی

موکوس به عنوان پوششی بر روی اپیدرم پوست، اولین سد دفاعی در زمان مواجهه ماهیان با عوامل بیماری زا محسوب می گردد (Fast et al., 2002). بعلاوه نه تنها در پوست ، بلکه در روی سطح آبششها و روده ماهیان نیز حضور دارد. آنزیم هایی مانند لیزوزیم، آلکالین فسفاتاز و سایر آنزیم های پروتئینی آنتی باکتریال مانند سرین، پروتئازها و متالوپروتئازها در داخل موکوس قراردارندو نقش مهمی را در ایمنی ذاتی ایفاء می نمایند. در بین آنزیم های نام برده لیزوزیم از اهمیت زیادی برخوردار می باشد(Roberts, 2001).

درداخل مایعات بدن مانند موکوس ، آب میان بافتی و .. مواد قابل انحلالی وجود دارند که دارای عملکردهای دفاعی بواسطه جلوگیری از رشد میکروارگانیسم ها یا خنثی سازی آنزیم ها برحسب نوع پاتوژن می باشند که برحسب نوع عملکردشان به گروه های زیر تقسیم شده و به عنوان فاکتورهای ایمنی غیر اختصاصی معروفند(عسکریان و کوشا، ۱۳۸۵) :

۱–فاکتورهای باز دارنده رشد

۲–فاکتورهای باز دارنده تولید آنزیم یا توکسین بوسیله عامل بیماری زا

۳–لیزین ها

٤–آگلوتنین ها و رسوب گذارها

با توجه به اهمیت نقش لیزوزیم در این راستا لیزین ها از اهمیت ویژه ای برخوردارند.چراکه لیزین ها متشکل از آنزیم هایی می باشند که این آنزیم ها به تنهایی ویا به همراه سایر آنزیم ها منجربه لیز شدن سلول های پاتوژن می گردند و شامل پروتئین های کمپلمان و لیزوزیم ها می باشند. (عسکریان و کوشا، ۱۳۸۵).لیزوزیم قادر به شکستن باندهای گلیکوسیدیک موجود در لایه پپتیدوگلیکان موجود در دیوارهٔ سلولی باکتری ها بوده و در نتیجه منجربه آزاد شدن و مرگ پروتوپلاست می گردد. به عبارتی دیگر پلیمرهای کمپلکس اسیدهای آمینه و قندهای موجود در دیوارهٔ سلولی را هیدرولیز می نماید (Fast et al., 2002) برخی از باکتری ها قادرند مستقیماً بوسیله لیزوزیم لیز شوند، اما در بسیاری موارد غشاء دیوارهٔ سلولی باکتریها ابتدا مورد حمله کپلمان واقع شده تا لیزوزیم اثرات خود را القا نماید (Roberts, 2001; Fevolden et al., 2002) و ازجمله فاکتورهای مؤثر بر ضدباکتری های گرم منفی و مثبت در ماهیان محسوب می گردند(Demers and Bayne, 1997; Fast et al., 2002). بعلاوه مطالعات حاکی از

افزایش تراکم این آنزیم در بافتهایی است که در معرض بیشتر بروز عفونت می باشند(Fast et al., 2002)

. میزان لیزوزیم موجود در خون و بافت نیز فاکتوری مناسب جهت ارزیابی توانائی ماهیان در بروز پاسخ های ایمنی ذاتی نسبت به عوامل استرس زا محسوب شده و در ماهیان بسیار فعالتر از مهره داران عالیتر است (Roberts, 2001). بگونه ای که مطالعات Fevolden و Roed (۱۹۹۳) نشان می دهد که در شرایط خاص فعالیت لیزوزیم در مقایسه با کورتیزول شاخص مناسبتری در ارزیابی پاسخ ماهیان نسبت به استرس محسوب می گردد. به طور معمول استرسهای حاد منجربه افزایش فعالیت این آنزیم و استرس های مزمن منجربه کاهش فعالیت آن می گردند (Demers and Bayne, 1997) همچنین این آنزیم علاوه بر موکوس و سرم در تخمک و سلول های فاگوستیک نیز حضور داشته است (Roberts, 2001) و توانایی از بین بردن اکثر عوامل بیماری زا را در شرایط طبیعی در ماهیان عهده دار است(Fast et al., 2002)

. آلکالین فسفاتاز نیز به عنوان یک آنزیم لیزوزومی دارای نقش حفاظتی در ماهیان در طول مدت مراحل اولیه بهبود زخم هایشان دارا است. بعلاوه، افزایش آن درطول مدت بروز استرس و آلودگیهای آنگلی در گونه های مختلف ماهیان از جمله ماهی کپور و ماهی آزاداقیانوس اطلس گزارش شده است(Fast et al., 2002). آنزیم پروتئاز نیز از جمله دیگر فاکتورهایی است که در موکوس موجود در روده ماهیان وجود داشته و نقش مهمی را در سیستم ایمنی ذاتی ماهیان ایفا می نماید. تریپسین از جمله پروتئازهایی است که از موکوس قزل آلا خالص سازی شده است و دارای اثرات کشنده باکتریایی، برضد باکتری های گرم منفی است و در موکوس سلول های ترشحی اپیدرمیس ماهی آزاد نیز گزارش شده است . هنوز نحوهٔ ورود آنزیمهایی مانند لیزوزیم، آلکالین فسفاتاز و یا انواع پروتئازها به موکوس مشخص نگردیده است و دو نظریه در این راستا وجود دارد (Fast et al., 2002) :

۱–این آنزیم از سلول های اپیدرمی به داخل موکوس ترشح می شوند.

۲–این آنزیم ها به سلول های هدف یعنی سلول های موکوس لایه اپیدرمیس از طریق سرم خون انتقال می یابند.

فصل دوّم

مواد و روش کار

۲-۱-محل انجام پروژه

کلیه مراحل اجرایی این پروژه در انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان (رشت) مهر ماه ۱۳۸۵تا پایان تیرماه ۱۳۸٦ در دو بخش بهداشت و بیماریها و همچنین فیزیولوژی و بیوشیمی صورت گرفت .مرحله انجام لیوفیلیزه سوشهای باکتری جداسازی شده در مجموعه تحقیقاتی عصر انقلاب واقع در شهریار ، انجام مطالعات آنزیمی در انستستو پاستور و تشخیص گونه با استفاده از روشهای ژنتیکی در مرکز تحقیقات ملی پونا واقع در هند صورت پذیرفت.

۲-۲- انتخاب ماهیان مورد نظر بمنظور جداسازی باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک بعنوان پروبیوتیک از دستگاه گوارش

بدین منظور از۱۰ قطعه فیل ماهی پرورشی و ۱۰ قطعه تاسماهی پرورشی که در محوده وزنی ۹۰ تا زیر یک کیلو گرم قرار داشتند (جدول۲-۱) و از نظر ظاهری از سلامت لازم برخوردار بودند استفاده گردید . به منظور انجام بیومتری از تخته بیومتری با دقت ۰/۱ سانتیمتر و ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم استفاده می گردید پیش از انجام بیومتری به منظور کاهش استرس تحمیلی به ماهیان از ۱۲ ساعت قبل از

انجام بیومتری غذادهی به آنها قطع گردید و ماهیان با استفاده از تریکائین متانوسولفونات(MS-222 7.0 pH , به میزان ۲۰۰میلی گرم درلیتر بیهوش گردیدنـد (Carey and Mc Cormick , 1998) . بعـد از انجـام بیومتری اولیه ، سطح خارجی بدن ماهی در زیر هود لامیناربا استفاده از ا لکل ۷۰ درصد ضد عفونی گردیده و در سطح شکمی ماهی برشی از مخرج به سمت سر ایجاد گردید (شکل ۲-۱) .

شکل۲-۱- نحوه ایجاد برش در سطح شکمی فیل ماهی و تاسماهی ایرانی

جدول ۲-۱- میانگین وزنی نمونه های مورد بررسی در فیل ماهی و تاسماهی ایرانی

(تعداد نمونه ها در هر محدوده وزنی ۳ عدد)

محدوده وزنی (گرم)	فیل ماهی (گرم)	تاسماهی ایرانی (گرم)
۹۰-۱۰۰	۹۱±۲/۰۱	۹۵±۱/۱
۱۰۰-۲۰۰	۱٤۹±۱/۳٤	۱۳۸±۱/۲۳
۲۰۰-۳۰۰	۲٤۳±۲/٤۱	۲۲۷±۱/۲۳
۳۰۰-٤۰۰	۳۱۰±۱/٥٤	۳۱۲±۱/۷٦
٤۰۰-٥۰۰	٤۲۱±۲/۳۱	٤۳۱±۱/۳٤
٥۰۰-٦۰۰	٥۲٤±۱/۹۸	٥۱۱±۲/۰٦
٦۰۰-۷۰۰	٦٤٥±۲/۰۳	٦۳۳±۱/٤٥

۷۰۰–۸۰۰	۷٦۷±۱/۸۹	۷٤۱±۱/٥٦
۸۰۰ –۹۰۰	۸۷٥±۲/۱۸	۸۳۱±۱/۷۲
۹۰۰ –۱۰۰۰	۹۷۸±۱/۸٦	۹٦۱±۱/۷۲

۲-۳- نحوه آماده سازی محلول ذخیره و رقتهای متفاوت

پس از خارج نمودن کامل دستگاه گوارش ازداخل بدن ماهیان ، این بخش به چهار قسمت مشتمل بر مری، معده، روده بزرگ و روده کوچک تقسیم گردید (شکل ۲– ۲). این جهار قسمت از یکدیگر جدا گردیده و هربخش در محیط کاملا استریل بصورت جداگانه تشریح و با استفاده از سرم فیزیولوژی استریل بصورت جداگانه چندین بار در داخل پلیت استریل شستشو داده و محتویات پلیت را به داخل شیشه در سنباده ای انتقال و بدین ترتیب محلول ذخیره تهیه گردید.

شکل۲-۲- نحوه تقسیم بندی دستگاه گوارش در فیل ماهی و تاسماهی ایرانی

سپس با استفاده از محلول ذخیره هر بخش، تهیه رقت های متوالی $۱۰^{-۱}$ و $۱۰^{-۲}$ آغاز گردید. بدین منظور برای هر قسمت از دستگاه گوارش ۲ لوله آزمایش استریل آماده و در هر یک بمیزان ۹ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل افزوده شده و ۱ میلی لیتر از محلول ذخیره، که محتویات آن را برای پخش یکنواخت تکان داده شد ، با استفاده از پیپت استریل برداشته و به لوله شماره ۱ افزوده و رقت $۱۰^{-۱}$ تهیه می گردد. سپس ۱ میلی لیتر از محتویات لوله شماره ۱ را به لوله شماره ۲ انتقال داده و بدین ترتیب رقت $۱۰^{-۲}$ را نیز آماده میگردد(Pollock, 2002).

۲-٤- نحوه تهیه محیط کشت

بمنظور انجام کشت و جدا سازی باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک، از دو محیط کشت MRS آگار (آلمان، Merck) و Triptic soy agar (TSA) (آلمان، Merck) غنی شده با ۵ درصد گلوکز با فرمول شیمیایی { D(+) -Glucose monohydrate } (آلمان، Riedel-dehaën) استفاده گردید .

(Hagi et al., 2004) . بمنظور تهیه MRS و TSAG بترتیب ٦٨/٢ گرم و ٤٠ گرم به همراه ٥ گرم گلوکز را در یک لیتر آب مقطر حل نموده و پس از اندازه گیری pH محیطهای کشت ، در داخل دستگاه اتوکلاو بمنظور انجام عملیات استریلیزاسیون قرار داده شدند. پس پایان کار اتوکلاو و سرد شدن محیط های کشت، به داخل پلیت های استریل (انرژی اتمی، ایران) منتقل گردیدند و پلیت ها پس از علامتگذاری برای نگهداری طولانی مدت به داخل یخچال انتقال داده شدند

۲-۵-نحوهٔ انجام کشت هوازی

بدین منظور برای هر قسمت از دستگاه گوارش، ۹ پلیت MRS و ۹ پلیت TSAG برای کشت در نظر گرفته شده و از٦ پلیت (۳ پلیت MRS و ۳ پلیت TSAG) برای کشت از محلول ذخیره، ٦ پلیت برای کشت از رقت 10^{-1} و ٦ پلیت برای کشت از رقت 10^{-2} ااستفاده گردید و با استفاده از پیپت استریل، ۰/۱ میلی لیتر از محلول ذخیره و رقت ها به به پلیت ها انتقال و با استفاده از فیلدو پلاتین استریل اقدام به کشت با روش خطی گردید و نمونه ها در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد برای مدت ٤٨ ساعت در داخل انکوبا تور نگهداری گردیدند (RingØ and Gatesoupe, 1998; Hagi et al., 2004).

۲-٦- نحوهٔ انجام کشت اولیه بیهوازی

در این حالت مشابه کشت هوازی ، برای هر قسمت از دستگاه گوارش، ۹ پلیت MRS و ۹ پلیت TSAGبرای کشت در نظر گرفته شده و از٦ پلیت (۳ پلیت MRS و ۳ پلیت TSAG) برای کشت از محلول ذخیره، ٦ پلیت برای کشت از رقت 10^{-1} و ٦ پلیت برای کشت از رقت 10^{-2} استفاده گردید و با استفاده از پیپت استریل، ۰/۱ میلی لیتر از محلول ذخیره و رقت ها به به پلیت ها منتقل و با استفاده از فیلدو پلاتین استریل اقدام به کشت با روش خطی گردید. سپس نمونه ها به داخل جار بیهوازی منتقل و در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد برای مدت ٤٨ ساعت در داخل انکوبا تور نگهداری گردیدند

. (RingØ et al., 1997)

۲-۷- نحوهٔ شمارش کلنی ها و تقسیم بندی آنها

پس از انجام کشت اولیه ، تمامی پلیت ها از نظر رشد باکتری مورد بررسـی قـرار گرفتـه و بمنظـور انجـام شمارش و تهیه کشت خالص، کلونیها بر اساس رنگ، شکل و اندازه مورد بررسی واقع شدند. فاکتورهـای مورد بررسی عبارت بودند از (Cappuccino and Sherman ,1998):

۱- **اندازه کلو نیها** : بصورت نوک سنجاقی، کوچک، متوسط و بزرگ

۲- **ایجاد رنگدانه و رنگ کلونیها**

۳- **شکل** : مدور، نا منظم و ریزوئید

٤- **مشخصات کناره کلونی:** کناره کامل، قطعه قطعه شده، مضرس، دندانه دار، رشته ای شکل

٥- **ارتفاع کلونی:** پهن، خوابیده، محدب و قپه دارپس از انجام این مرحله کلونیهای یکسان با رنگهای یکسان بر روی سطح خارجی پلیت علامت گذاری گردیده و اقدام به شمارش آنها گردیده و تعداد هر یک در جداول مربوطه ثبت شد که نمونه جدول در ذیل ارائه می گردد.

جدول ۲-۲- جداول ثبت تعداد کلونیهای شمارش شده در کشت مرحله نخست

نام ماهی :	تعداد کلونی ۱ و مشخصات	تعداد کلونی۲ و مشخصات	تعداد کلونی ۳و مشخصات	تعداد کلونی٤ و مشخصات
نوع محیط کشت:				
تاریخ کشت:				
شرایط کشت:				
رقت:				
مشخصات پلیت:				
تکرار:				

سپس با استفاده از فرمول مربوطه تعداد کلو نیها در هر میلی لیتر تعیین و در جدول ثبت گردید. فرمول مـر بوطه عبارت است از (Pollock et al., 2002):

a = تعداد کلونی شمارش شده در پلیت

= ۱ /۱۰ /۱۰۰ فاکتور رقت

۰/۱ = میزان محلول افزوده شده به محیط کشت

۱۰× فاکتور رقت × a= تعداد کلونی در یک میلی لیترCFU/ gr of GI

۲-۸-نحوه تهیه کشت خالص

برای مطالعه و بررسی خواص فیزیو لوژیکی و سرو لژیکی باکتری ها و انجام مطالعات مختلف بیو شیمایی بر روی آنها اقدام به تهیه کشت خالص از کلونی های غیر همسان و شمارش شده گردید (Cappuccino and Sherman , 1998). بدین منظور، اقدام به بر داشتن کلو نیها با استفاده از آنس استریل بر روی محیط های کشت مربوطه نموده و مشخصات کلو نیها بر روی هر پلیت نوشته گردید. در هنگام انتقال ، احتیاط لازم بمنظور عدم اختلاط کلونیهای مجاور با یکدیگر صورت گرفته و نمو نه ها در مدت ۲٤ ساعت در انکو باتور ۳۰ درجه سانتیگراد در شرایط نخستین کشت خود (هوازی/بیهوازی) قرار داده شدند.

۲-۹- تستهای انجام شده براساس کلید Bergey

بمنظور تشخیص باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک در حد گونه از تستهای مختلف بیوشیمیایی براساس کلید Bergey استفاده گردید(Holt et al., 1997) .بدین منظور انجام رنگ آمیزی گرم، تستهای کاتالاز، اکسیداز، احیاء نیترات، استفاده از محیط کشت اکسیداسیون- تخمیر (O-F)، و بررسی حرکت باکتریها با استفاده از محیط کشت SIM صورت پذیرفت که توضیحات جامعتری در این راستا در بخش ضمیمه ارائه گردیده است.

ازجمله دیگر آزمایشهای تکمیلی انجام شده می توان به کشت باکتریها در محیطهای اولیه خود مشتمل بر MRS یا TSAG در شرایط هوازی و بیهوازی در دماهای ۱۰ و ٤٥ درجه سانتیگراد ، pH =۹/٦ (رساندن pH محیط کشت به ۹/٦)و نمک ٦/٥ درصد (افزودن نمک به محیط کشت) اشاره نمود.

مهمترین جنسهای با کتریهای تولید کننده اسید لاکتیک شامل *Aerococcus* ، *Enterococcus*، *Lactococcus*، *Leuconostoc* ، *Pediococcus* ، *Streptococcus* ، *Lactobacilus* و *Carnobacterium* اشاره نمود . مهمترین روش جهت شنا سایی این باکتریها تا حد گونه از کلید شناسایی Bergey استفاده می گردد که از مهمترین منابع میکرو بیو لوژی می باشد. در جدول ۲-٤ این کلید ارا ئه گر دیده است. در ابتدا راهنمای جدول ارائه می گردد.

راهنمای جدول ۲-۳- کلید شناسایی باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک بر اساس Bergey

[1]در برخی موارد دارای کاتالاز ضعیف ویا واکنش سودوکاتالاز می باشد و مهمترین نشانه آن تولید لکه های سبز در Blood agar است.

[1] در برخی موارد دارای واکنش سودوکاتالاز است.

[3]در گونه های متفاوت این جنس متفاوت است.

[4] در زمان ایجاد زنجیره های بلند بصورت میله ای شکل با انتهای مدور دیده می شوند.

[5]برخی گونه ها در محیط کشت هوازی محتوی خون قادر به تولید سیتوکروم می باشند.

جدول ۲-۳- کلید شناسایی باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک بر اساس کلید Bergey (Holt et al., 1997)

رشد (درجه سانتیگراد	محیط رشد (درصد)	حضور یا عدم	مهمترین محصول

نام باکتری	شکل غالب	تحرک پذیری	۴۵	(۱۰	pH ۹/۶	نمک ۶/۵	bile 40	کاتالاز اکسیداز ↓نیترات	حضور سیتوکروم	تخمیر بیهوازی (مصرف کربوهیدرات)
Aerococcus	تتراد/ جفت (کروی)	–	–	+	+	+	+	–[1] – –	–	اسید بدون گاز
Enterococcus	جفت/زنجیرکوتاه (کروی/ بیضی)	بخش عمده + (تاژک)	+	+	+	+	+	–[2] – – (اکثرا)	نامشخص	لاکتات (اسید بدون گاز)
Lactococcus	جفت/زنجیرکوتاه (کروی/ بیضی)	–	–	+	–	–	متفاوت[3]	– – –	نامشخص	لاکتات (اسید بدون گاز)
Leuconostoc	جفت/زنجیر (کروی/	–	–	+	نامشخص	بخش عمده +	نامشخص	– – –	–	لاکتات و اتانول

	بیضی)[4]									(اسید بدون گاز)
Pediococcus	تتراد/ جفت (کروی)	–	متفاوت	نامشخص	متفاوت[3]	متفاوت[3]	متفاوت[3]	– – –	–	لاکتات (اسید بدون گاز)
Streptococcus	جفت/زنجیر (کروی/ بیضی)	–	متفاوت[3]	متفاوت[3]	متفاوت[3]	متفاوت[3]	متفاوت[3]	– –	–[5]	لاکتات (اسید بدون گاز)
Lactobacilus	میله ای شکل و بلندو گاهی کوکسی–باسیل	– بندرت متحرک	هوازی یا بیهوازی اختیاری هستند.					– - -	–	لاکتات اما گاهی اتانول و استات و دی اکسید کربن
Carnobacterium	میله ای شکل و بلندو باریک (جفت/ تک/ زنجیر)	متفاوت[3]	این باکتریها بی هوازی اختیاری میباشند.رشد در دمای ۱۰ و عدم رشد در دمای ٤٥. مهمترین اسد چرب اولئیک است.					– – –	–	لاکتات

۲–۱۰– شناسایی گونه ای به روش ملکولی

شناسایی ملکولی باکتریها ی جداسازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی و تاسماهی ایرانی در در مرکز تحقیقات ملی پونا واقع در هند صورت پذیرفت. کلونیهای باکتریها مورد نظر در داخل یخ و از طریق لوله های استریل درب دار، در روی محیط کشتهای مربوطه به مرکز فوق انتقال یافتند.

سپس در روی دو محیط کشت MRS و TSA+G در پلیت و در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد کشت داده داده شدند. سپس ۲۰ کلونی از هر یک از سوشهای مورد نظر برداشته شده و در ۵۰ µl آب مقطر حل و مستقیما جهت انجام PCR مورد استفاده واقع شد. بمنظور انجام عملیات PCR از دستگاه iCycler

(Bio-Rad, Canada) و تک (Taq) Takara Ex (Takara Bio, Otsu, Japan) استفاده گردید. بدین منظور ۱ µl ازسوسپانسون باکتری و آب مقطر، ۲ µl از بافر Ex Taq ×۱۰ ، ۲ µl مخلوط dNTP ، ۰/۸ µl از هر یک از پرایمرهای مورد استفاده (10 pmol/µl)، ۰/۱ µl از Ex Taq پلیمراز و ۱۳/۳ µl آب مقطر با یکدیگر مخلوط شدند. پرایمرهای مورد استفاده در این بررسی مشتمل بر پرایمرهای اختصاصی باکتریها (16S rRNA) با توالی (10F) -'5 AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' منطبق با توالی مناطق ۸ تا ۲۷ژن 16S rRNA در باکتری شاخص با نام علمی *Escherichia coli* و همچنین توالی مناطق ۱٤۹۲ تا ۱۵۱۰ همین ژن در باکتری فوق الذکر (1500R،'5'-GGTTACCTTACGACTT-3) تعیین گردیدند.

نمونه ها در دمای۹۵ درجه سانتیگراد برای ۹ دقیقه حرارت داده شده و سپس زمان بندی حرارتی به منظور آماده سازی پرایمرها صورت پذیرفت. عملیات خالص سازی محصولات بدست آمده از فرایند PCR با استفاده از کیت Gene Clean III (Qbiogene, Montreal, Canada) صورت پذیرفت. سپس قطعات خالص سازی شده با استفاده از دستگاه سکانس با نام CEQ2000 Dye Terminator Cycle ، کیت Quick Start و دستگاه آنالایزر CEQ2000XL DNA مورد بررسی واقع شده و در حدود ٤۰۰base آن مورد مطالعه قرار گرفت.لازم بذکر است که پرایمر مورد استفاده در عملیات PCR (10 F) به عنوان پرایمر سکانس هم مورد بررسی واقع شد. سپس سکانس های بدست آمده برای بررسی بیشتر به مرکز ملی اطلاعات بیو تکنولوژی فرستاده شدند. بمنظور تعیین سکانس کامل 16S rRNA ٥ پرایمر دیگر به عنوان پرایمر سکانس مورد بررسی واقع شدند که عبارتند از :

1- 500R (5'-GTATTACCGCGGCTGCTGCTGG-3')

2-800R (5'-CATCGTTTACGGCGTGGAC-3')

3-1100R (5'–TTGCGCTCGTTGCGGGACT-3'),

4-1400R (5'-ACGGGCGGTGTGTACAAG-3'),

5-1000F (5'-GTCCCGCAACGAGCGCAAC-3')

لازم بـذکر مـی باشـد کـه *Leuconostoc mesenteroides* از دسـتگاه گـوارش تاسـماهی ایرانـی و *Lactobacillus curvatus* از دستگاه گوارش فیل ماهی جدا گردید و عملیات لیوفیلیزاسیون بـرروی این سو یه ها صورت پذیرفت. بعلاوه ۲ سوش دیگر از باکتریهای تولیدکننده اسید لاکتیک بیمـاریزا نیـز از دستگاه گوارش این ماهیان جداسازی گردید

۲-۱۱- لیو فیلیزه کردن باکتریهای تولید کننده اسـید لاکتیـک جداسـازی شـده از دسـتگاه گـوارش تاسماهیان

پس از جدا سازی سوشهای مورد نظر از باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک، قدم بعد آماده نمودن نمونه ها جهت افزودن باکتریها به غذا می باشد و بهترین روش برای استفاده از این باکتریها به عنوان پروبـایو تیـک لیو فیلیزه نمودن نمونه ها می باشد که این بخش از پروژه در مجتمع تحقیقاتی انقلاب صورت پذیرفت. بـا استفاده از روش لیوفیلیزاسیون می توان باکتریها و ویروسها را خشک نموده و برای مدتها نگهداری نمود.

در این روش محیط های کشت را بطور سریع در خلاء منجمد نموده و سپس آآنها را از طریق تصعید یـخ، خشک می نمایند. عمل تصعید در اتمسفر و در فشار پائین انجام می گیردو از خشک کننده هـای شـیمیایی خاص بدین منظور استفاده می گردد.مواد خشک کننده را تحت شرایط خلاء یا تحت گازی ماننـد نیتـروژن بداخل آمپولهایی انتقال می دهند و از آنها در محل تاریک در دمای ٤ درجه سانتیگراد نگهداری می کنند . در برخی موارد هم از روش حجمی برای خشک نمودن مقادیر باکتری استفاده می نمایند. عمل انجمـاد در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد صورت می پذیرد از موا د مختلفی بر حسب نوع با کتری برای لیو فیلیزه نمودن استفاده می نمایند و بر اساس بررسیهای صورت گرفته یکی از بهترین مواد برای لیوفیلیزه باکتریهای تولیـد کننده اسید لاکتیک شیر خشک بدون چربی (skimmed milk) و پلی ساکارید های مختلـف مـی باشـد (Trsic-Milanovi et al., 2001). در این تحقیق از شیر خشک به عنوان ماده افزودنی که کمترین تاثیر سوء را بر روی بقای باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک دارد ، استفاده گردید.

۲-۱۲- پرورش لاروها

در این بررسی از۲۷ عدد تانکهای شیشه ای ۲۰ لیتری مجهز به هواده و سیستم تصفیه آب روزانـه بمنظـور پرورش لارو ها استفاده گردید. لاروها در حدود ۵ روز پیش از آغاز تغذیه فعال به داخل تانکها با تراکم ۲۰ عدد در هر لیتر به داخل تانکها انتقال یا فتند (شکل ۲-۳).

لاروهای فیل ماهی با میانگین وزنی ۰۳/ ۱±۵۰/۱۰ میلی گرم و طولی ۹ / ۰±۱۳/۰۰ سانتیمتر از گارگاه تکثیر و پرورش شهید مرجانی گرگان به انستیتو بین المللی ماهیان خاویاری رشت انتقال یافته و پس از انجام آداپتاسیون به داخل تانکهای اشاره شده با تراکم مذکور انتقال یافتند. در طول دوره پرورش ، فاکتورهای فیزیکو شیمیایی بصورت روزانه با استفاده از دستگاه دیجیتالی توسط ترمو-اکسی- pH مترثبت گردیده و تمام تیمارها از شرایط یکسان برخوردار بودند. میانگین دما ، pH و اکسیژن برابر با ۱۵ درجه سانتیگراد، ۷/۱و ppm ۸/٦ گزارش گردید.

لاروهای تاسماهی ایرانی با میانگین وزنی ۰٦/ ۲±۴۰/۳۰ میلی گرم و طولی ۹ / ۰±۱۲/۰۱ سانتیمتر از گارگاه تکثیر و پرورش شهید بهشتی به انستیتو بین المللی ماهیان خاویاری رشت انتقال یافته و پس از انجام آداپتاسیون به داخل تانکهای اشاره شده با تراکم مذکور انتقال یافتند. مشابه دوره پرورش لاروی فیل ماهی، فاکتورهای فیزیکو شیمیایی بصورت روزانه اندازه گیری گردیده و میانگین دما ، pH و اکسیژن برابر با ۱۷ درجه سانتیگراد، ۷/۱و ppm ۸/۱ گزارش گردید.

شکل ۲-۳- تانکهای شیشه ای ۲۰ لیتری مورد استفاده در پرورش لاروها

۲-۱۳- تقسیم بندی تیمارها

در این بررسی ۹ تیمار و سه تکرار برای هر تبمار در نظر گرفته شده و تراکم لاروها در هر تیمار حدود ۳۰۰ قطعه در نظر گرفته شد. تیمارها بر اساس تعداد پروبیو تیک موجود در جیره غذایی خود تقسیم بندی گردیدند (جدول ۲-۵ و ۲-٦) و نه تنها از پروبیوتیک اختصاصی جدا سازی شده از دستگاه گوارش هر گونه در تغذیه ماهیان استفاده گردید بلکه بمنظور بررسی بیشتر از پرو بایوتیک اختصاصی گونه دیگر نیز

بمنظور تغذیه بکار برده شد.پروبیوتیکها بصورت پودر در زمان تغذیه لاروها به آب افزوده می گردیـد. در جدول زیر تقسیم بندی تیمارها بر اساس نوع تغذیه ارائه گردیده است.

جدول۲-٤- تیمارهای مورد استفاده در پرورش لاروهای فیل ماهی

نوع تیمار	تیمار۱	تیمار۲	تیمار۳	تیمار٤	تیمار٥	تیمار٦	تیمار۷	تیمار ۸	تیمار۹
	A	**A**	**A**	**B**	**B**	**B**	**A+B**	**A+B**	**A+B**
نوع گونه باکتری و تعداد افزوده شده به آب بازای هر گرم از غذا (CFU/gr$_{food}$)	۲×۱۰^۹	٥×۱۰^۹	۹×۱۰^۹	۲×۱۰^۹	٥×۱۰^۹	۹×۱۰^۹	۲×۱۰^۹ + ۲×۱۰^۹	٥×۱۰^۹ + ٥×۱۰^۹	۹×۱۰^۹ + ۹×۱۰^۹

A. *Lactobacillus curvatus*

B. *Leuconostoc mesenteroides*

جدول۲-٥- تیمارهای مورد استفاده در پرورش لاروهای تاسماهی ایرانی

نوع تیمار	تیمار۱	تیمار۲	تیمار۳	تیمار٤	تیمار٥	تیمار٦	تیمار۷	تیمار ۸	تیمار۹

نوع گونه باکتری و تعداد افزوده شده به آب بازای هر گرم از غذا (CFU/gr_{food})	**A**	**A**	**A**	**B**	**B**	**B**	**A+B**	**A+B**	**A+B**
	۲×۱۰^{۹}	۵×۱۰^{۹}	۹×۱۰^{۹}	۲×۱۰^{۹}	۵×۱۰^{۹}	۹×۱۰^{۹}	۲×۱۰^{۹} + ۲×۱۰^{۹}	۵×۱۰^{۹} + ۵×۱۰^{۹}	۹×۱۰^{۹} + ۹×۱۰^{۹}

A. *Lactobacillus curvatus*

B. *Leuconostoc mesenteroides*

۲-۱٤- عملیات زیست سنجی

در طول دوره ۲۱ روزه پرورش لاروی هر دوگونه، عملیات بیومتری هر ۵ روز یکبار انجام می گردید و از ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم و خط کش با دقت ۰/۱ سانتیمتر بدین منظور استفاده می گردید.

مراحل زیست سنجی شامل اندازه گیری دقیق وزن (W) ، طول کل (TL) ، طول چنگالی(FL) و طول استاندارد (SL) بوده و بصورت میانگین از هر تیمار ۱۵ عدد لارو بصورت تصادفی انتخاب می گردید. عملیات زیست سنجی در ابتدای صبح و پیش از آغاز غذادهی بر روی لاروها صورت می پذیرفت و پس از انجام بیو متری لاروها به سرعت به داخل تانکها انتقال داده می شدند.

۲-۱۵- نحوه محاسبه شاخص های رشد

۲-۱۵-۱-فاکتور وضعیت(چاقی)یا شاخص سنجش(Condition Factor)

براساس پیشنهاد Hile (۱۹۳٦) و Backman (۱۹٤۸) از فرمول زیر جهت تعیین فاکتور وضعیت (K or CF or PI) استفاده می گردد (Ojolick et al.,1995) :

W = وزن مرطوب ماهی (گرم)

$$K\% = (\underline{\ W\ }) \times 10^{2}$$

L = طول چنگالی (سانتیمتر)

۲-۱۵-۲-ضریب تبدیل غذایی (FCR : Feed Conversion Ratio)

میزان افزایش وزن بدن / میزان غذای مصرف شده = FCR

وزن اولیه (W_1)- وزن ثانویه (W_2) = میزان افزایش وزن بدن

در رابطه فوق میزان غذای مصرف شده و میزان وزن بدن برحسب گرم می باشند(Kissil et al. , 2001).

۲-۱۵-۳-سرعت رشد (GR : Growth rate)

رشد روزانه هر تانک برحسب گرم مطابق روش زیر محاسبه می شود :

$$GR = W_2 - W_1 / t_2 - t_1$$

W_1 میزان وزن اولیه برحسب گرم در زمان t_1 برحسب روز و W_2 میزان وزن ثانویه برحسب گرم در زمان t_2 برحسب روز است . به عبارت دیگر سرعت رشد نسبت میزان وزن اضافه شده به تعداد روزهای پرورش می باشد (Kissil et al. , 2001) .

۲-۱۵-٤-ضریب رشد ویژه (SGR : Specific Growth Rate)

میزان SGR برحسب درصد از طریق فرمول زیر محاسبه می گردد :

$$SGR = (\ln W_2 - \ln W_1) / (t_2 - t_1)$$

در رابطه فوق W_1 وزن اولیه در زمان t_1 و W_2وزن ثانویه در زمان t_2 می باشندو میزان وزن برحسب گرم ومیزان زمان برحسب روز درنظرگرفته می شود(Kissil et al. , 2001).

۲- ١٦- نحوه بررسی آنزیمهای دستگاه گوارش

بمنظور اندازه گیری آنزیمهای دستگاه گوارش مشتمل بر لیپاز، آمیلاز و پروتئاز، لاروها در انتهای دوره پرورش بصورت زنده به آزمایشگاه انتقال یافته و از هر تیمار بصورت میانگین ۵۰ نمونه انتخاب گردید. میزان تلفات در زمان انتقال حدود ۱۰ درصد تخمین زده شد.

۲-١٦-۱- عملیات هموژنیزاسیون و اندازه گیری پروتئین

بلافاصله پس از انتقال لاروها به آزمایشگاه ، سر و دم نمونه های زنده باقیمانده قطع گردیده و نمونه ها جهت هموژنیزه شدن به دستگاه هموژنایزر الکتریکی (Heidolph Instrument, Germani) انتقال

یافتند. عملیات هموژنیزه شدن در داخل یخ صورت پذیرفت و ۱ گرم از لاروهای مورد نظر به ۹ میلی لیتر از بافر افزوده شدند. بافر مورد نظر مشتمل بر ۱۰۰ mM بافر Tris–HCl به همراه ۰/۱ mM ترکیب EDTA و ۰/۱ درصد triton X-100 (pH 7.8) استفاده گردید .فرایند سانتریفوژ (Kontron) مجوعه بافر و بافت در ۳۰۰۰ گاژ ، دمای ٤ درجه سانتیگراد و مدت ۳۰ دقیقه صورت پذیرفت. پس از انجام عملیات سانتریفوژ ۱ میلیلیتر از ترکیب مورد نظر جداسازی شده و در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد تا زمان انجام آنالیز نگهداری گردیدند. لازم بذکر است که اندازه گیری میزان پروتئین با روش Bradford (1976) و استفاده از آلبومین سرم گاوی صورت پذیرفت .

۲- ١٦ - ۲- اندازه گیری آنزیم پروتئاز

میزان پروتئاز موجود محلول هموژنبزه تهیه شده با استفاده از روش casein-hydrolysis (Walter, 1984) تعیین گردید. در این روش از pH های متفاوتی که بیشتر از pH دستگاه گوارش می باشند، استفاده گردید. بافرهای مورد استفاده در این روش مشتمل بر M ۰/۱ KCl–HCl (pH 1.5)، ۰/۲ M Glycine–HCl (pH 3)، ۰/۱ M سیترات – ۰/۲ M فسفات (pH 4.0 and 7.0)، ۰/۱ M Tris–HCl (pH 8.5 and 9.0) و همچنین ۰/۱ M Glycine –NaOH (pH 10.0) با pH های مختلف می باشند. جهت انجام واکنش آنزیماتیک ۱ درصد (w/v) کازئین به ۰/۲۵ میلی لیتر آب ، ۰/۲۵ میلی لیتر بافر و ۰/۱ میلی لیتر از عصاره هموژنیزه شده افزوده شده و بمدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری گردید. سپس واکنش مذبور با افزودن ۰/٦ میلی لیتر Trichloroacetic acid به میزان ۸ درصد (w/v) به مخلوط فوق متوقف گردیده و برای مدت ۱ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد نگهداری شد و برای مدت ۱۰ دقیقه در ۱۸۰۰ گاژ سانتریفیوژ شدند. در انتها میزان آنزیم پروتئاز با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل RA–۱۰۰۰ ، شرکتTechnicon ، ساخت آمریکا) در جذب نوری ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری گردید و از L-tyrosine به عنوان محلول استاندارد استفاده گردید و میزان یک واحد از فعالیت پرو تئولتیک محلول فوق، بر اساس مقدار آنزیمی که قادر به آزاد سازی ۱ میلی مول از تیروزین در مدت ۱ دقیقه می باشد، تعیین گردید.

۲- ١٦- ۳- اندازه گیری آنزیم آمیلاز

میزان آمیلاز موجود محلول هموژنبزه تهیه شده با استفاده از روش starch -hydrolysis (Robyt and Whelan, 1968) تعیین گردید. جهت انجام واکنش آنزیماتیک ۲ درصد (w/v) محلول نشاسته(۰/۱۲۵میلی لیتر) بافر M ۰/۱ سیترات – فسفات (۰/۱۲۵میلی لیتر) در pH 7.5 و ۰/۰۵ میلی لیتر از عصاره هموژنیزه شده افزوده شده و بمدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری گردید. در

انتها میزان آنزیم آمیلاز با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل ۱۰۰۰–RA ، شرکتTechnicon ، ساخت آمریکا) در جذب نوری ٦۰۰ نانومتر اندازه گیری گردید. و از مالتوز به عنوان محلول استاندارد استفاده گردید و میزان یک واحد از فعالیت آنزیم آمیلاز محلول فوق، بر اساس مقدار آنزیمی که قادر به آزاد سازی ۱ میلی مول ازمالتوز در مدت ۱ دقیقه می باشد، تعیین گردید.

۲– ١٦ – ٤– اندازه گیری آنزیم لیپاز

میزان لیپاز موجود محلول هموژنبزه تهیه شده با استفاده از روش تبدیل تری آکیل گلیسرول، دی آکیل گلیسرول و منو آکیل گلیسرول به اسیدهای چرب آزاد (Bier, 1955) تعیین گردید. بمنظور تهیه امولسیون مورد نیاز، اقدام به آماده نمودن محلول ۱درصد پلی وینیل الکل با استفاده از آب مقطر نموده و سپس ۵ میلی لیتر اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال را به محلول فوق افزوده و برای مدت ۱ ساعت در دمای ۷۵ تا ۸۵ درجه سانتیگراد حرارت می دهیم. پس از اتمام حرارت دهی محلول مذکور، آنرا سرد و فیلتر نموده و با استفاده از NaOH ۰/۱ نرمال pH محلول را به ۸ می رسانیم. سپس به مخلوط فوق، روغن زیتون افزوده و مخلوط را برای مدت ۵ دقیقه در دستگاه امولسی فایر قرار می دهند. پس از افزودن بافرها و الکل– استن مورد نیاز از (Sigma L3126) Porcin type-II pancreatic lipase به عنوان محلول استاندارد استفاده می نمایند. میزان یک واحد از فعالیت آنزیم لیپاز عبارت است از هیدرولیز ۱ میکرواکی والان اسید های چرب از تری آکیل گلیسرول در مدت ۱ ساعت، در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و pH برابر با ۷/۷.

۲– ١٦ – ۵– اندازه گیری آنزیم آلکالین فسفاتاز

از روش کینتیک (Kinetic)به منظور تعیین مقادیر آلکالین فسفاتاز استفاده گردید. براساس مطالعات Klin (۱۹۷۰،۱۹۷۲) آلکالین فسفاتاز بر طبق واکنش زیر بر روی سوبسترای آبی رنگ ٤–نیتروفنیل اثر کرده و آن را به ٤–نیتروفنل زرد تبدیل می نماید . تغییرات جذب نوری متناسب با فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز است .

$$\text{P-Nitrophenylphosphate} + H_2O \xrightarrow{\textbf{ALP}} \text{P-Nitrophenol+Phosphate}$$

ALP : Alkaline Phosphatase

در این تحقیق از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل ۱۰۰۰–RA ، شرکت Technicon ، ساخت کشور آمریکا) استفاده گردید

۲-۱۷- اندازه گیری لیزوزیم

اندازه گیری فعالیت آنزیم لیزوزیم به عنوان یکی از شاخصهای مهم ایمنی ذاتی با استفاده ازمحلول هموژنیزه و روش جذب نوری صورت پذیرفت (Fast et al., 2002) . بدین منظور ابتدا نمونه های هموژنیزه شده بصورت پودر با استفاده از عمل لیوفیلیزه در آمده و به محلول ٤٠ میلی مول NaPi (pH 6.5) افزوده گردیدند. در این زمان یک سوسپانسیون ایجاد گردید که مخلوط نام برده به پلیت های ٩٦ قسمتی که هر قسمت محتوی میکروب گرم مثبت *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma) بودند، افزوده گردید. سپس پلیت های مذبور برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۰ دجه سانتیگراد انکوبه شدند. در این تحقیق از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل RA-۱۰۰۰ ، شرکت Technicon ، ساخت کشور آمریکا) استفاده گردید و تغییرات جذب نوری متناسب با فعالیت آنزیم لیزوزیم است .

اندازه گیری میزان پروتئین با روش Bradford (1976) و استفاده از آلبومین سرم گاوی صورت پذیرفت .

۲-۱۸- بررسی فلور میکروبی دستگاه گوارش لارو بمنظور بررسی کلونیزه شدن باکتری مذکور

بدین منظور در دو مرحله زمانی ابتدا و انتهای دوره پرورش ، نمونه برداری بصورت تصادفی از تمام تیمارها و در سه تکرار با حداقل ۱۵ لارو از هر تیمار صورت پذیرفت. بدین منظور نمونه ها سه بار توسط سرم فیزیو لوژی ۹ درصد شستشو داده شده و بمدت ۱۵ دقیقه در محلول ۰/۰۱ درصد بتادین (۱ میلی لیتر بتادین در ۱ لیتر آب مقطر) قرار می گیرند. در ادامه مجددا سه بار توسط سرم فیزیو لوژی استریل شستشو را انجام داده و سپس در ۵ میلی لیتر از سرم فیزیو لوژی استریل هموژنیزه می گردند. ۰/۱ میلی لیتر از رقتهای مختلف محلول هموژن بر روی محیط کشت TSA و MRS به روش کشت خطی تلقیح شده و پلیتها برای مدت ٢٤ تا ٤٨ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. در انتها ویژگیهای بیوشیمیایی کلنی ها بررسی و با خواص پروبیو تیکهای مورد استفاده مقایسه و مورد شمارش قرار گرفتند. لازم بذکر است که آب محیط پرورش لاروها در هر تیمار، همزمان با کشت لاروها در رقتهای مختلف کشت داده شده و تعداد کلنی ها به ازای هر لیتر آب محاسبه گردید.

۲- ۱۹- مطالعات بافت شناسی

بدین منظور دو مرحله زمانی ابتدا و انتهای دوره پرورش ، نمونه برداری بصورت تصادفی از تمام تیمارها و در سه تکرار با حداقل ۱۵ لارو از هر تیمار صورت پذیرفته و مطالعات بافت شناسی بر روی آنها بمنظور بررسی تکامل دستگاه گوارش، در کنار بررسیهای آنزیمی انجام گردید. بدین منظور لاروها مستقیما به

محلول بوئن منتقل وبه مدت ٢٤ ساعت در محلول فیکس کننده بوئن قرار گرفتند . سپس از محلـول فـوق خارج و توسط الکل اتانول با درجات مختلف و کلروفرم به روش زیر آبگیری و شفاف شدند :

آب مقطر به مدت ۳۰ دقیقه ، الکل اتـانول ٥٠° ،° ٧٠ و° ٨٠ بـه مـدت ۳۰ دقیقـه ، الکـل اتـانول ° ٩٦ در دومرحله هر یک به مدت۳۰ دقیقه ، ۱–بوتانل در دو مرحله و هر مرحله به مدت ۱ ساعت ، کلروفرم در دو مرحله و هر یک به مدت نیم ساعت . پس از شـفاف نمـودن نمـونه ها بـه مـدت ۱۲ سـاعت در مخلـوط پارافین وکلروفرم در دمای°۳۷ در داخل دستگاه انکوباتور(مدل دنا، شرکت دنا، ساخت ایران) وبـه مـدت۲ ساعت در پارافین خالص در دمای°٦٠ در انکوباتور(مدل Inculab ساخت ایران، شرکت دنا) قرار گرفتند . درنهایت بوسیله پارافین مذاب پارافینه و قالب گیری گردیدند(کاظمی وبهمنی،۱۳۷۷) . سپس برش هـایی به ضخامت ۷ میکرون (کاظمی و همکاران ، ۱۳۸۲) بوسیله میکروتوم (مدل Leitz 1512 ، ساخت کشور آلمان)تهیه و برش های بافتی حاصـل بـه روش هماتوکسـیلین–ائـوزین (H&E) رنـگ آمیـزی گردیدنـد (Hung et al. , 1990) . نمونه های بافتی پس از رنگ آمیزی بوسـیله میکروسـکوپ نـوری مجهـز بـه رایانه (مدل Nikon E600 ، ساخت کشور ژاپن) مورد مطالعه واقع شدند .

۲–۲۰– آنالیزهای آماری

۱–استفاده از آمار توصیفی به منظور بررسی و بدسـت آوردن اقـلام آمـاری (حـداقل ، حـداکثر، میـانگین ، انحراف معیار ، واریانس ، خطای استاندارد میانگین) مربوط بـه شـاخص هـای آنزیماتیـک و پارامترهـای مـرفومتـریک .

۲–استفاده از آمار توصیفی بمنظور بررسی آمار مربوط به شاخصهای خـونی و پارامترهـای مرفومتریـک در تیمارهای مختلف .

۳–استفاده از آزمون تجزیه واریانس یکطرفه براساس شاخصهای مورد بررسی بمنظور معرفی اختلاف معنی دار در سطح خطای پنج درصد بین تیمارها .

٤–استفاده از آزمون چند دامنه توکـی برای معرفی گـروههای همگـن و غیرهمگـن به لـحاظ تفاوت معنـی دار پارامترهای مورد بررسی در مراحل مختلف نمونه برداری و بیومتری .

۲–۲۱– نرم افزارهای مورد استفاده

۱–استفاده از نرم افزار Quatropro به منظور تهیه بانک اطلاعاتی و محاسبه شاخصهای رشد .

۲–استفاده از نرم افزار Excell جهت تهیه نمودارها همراه error bar .

۳–استفاده از نرم افـزار SPSS (version11.5 & MiniTab13) جهـت تجـــزیه و تحلیـــل و انجـام آزمون های آماری .

۲–٦–جدول : شاخص ها و روش های مورد مطالعه

ردیف	شاخص مورد بررسی	روش مطالعه / سوبسترا مورد استفاد جهت اندازه گیری	واحد سنجش
الف–اجزای زیست سنجی (به منظور محاسبهٔ شاخصهای رشد شامل CF,GR,FCR,SGR)			
۱	طول کل	بیومتری	میلی متر
۲	طول چنگالی	بیومتری	میلی متر
۳	طول استاندارد	بیومتری	میلی متر
٤	وزن	توزین	گرم
ب – ارزیابی اثرات پروبیوتیک بر روی سیستم ایمنی ذاتی و استرس از طریق مطالعه آنزیم لیزوزیم			
٥	لیزوزیم	اسپکتروفتومتر	U/mg protein
ج- فاکتورهای مورد اندازه گیری از دستگاه گوارش			
آنزیمهای لوزامعده ای			
٦	پروتئاز	هیدرولیز کازئین/اسپکتروفتومتر	U/mg protein
۷	لیپاز	تولید اسیدهای چرب آزاد	U/mg protein

۸	آمیلاز	هیدرولیز نشاسته/اسپکتروفتومتر	U/mg protein
آنزیم روده ای و کبدی			
۹	آلکالین فسفاتازو	کینتیک/اسپکتروفتومتر	U/mg protein
مطالعات بافت شناسی			
۱۰	تکامل دستگاه گوارش لارو		رنگ آمیزی با روش H&E و مطالعه با میکروسکوپ نوری
تشخیص باکتریها در حد جنس و گونه با استفاده از کلید شناسایی Bergey و مطالعات ملکولی PCR			
روشهای آماری مورد استفاده			
نرم افزارهای Quatropro , SPSS , Excell			

فصل سوم

نتایج

۳-۱-نتایج حاصل از مطالعات میکروبیولوژی دستگاه گوارش فیل ماهی و تاسماهی

۳-۱-۱- نتایج حاصل از شمارش تعداد کل (Total Viable Count: TVB) باکتریهای موجـود در دستگاه گوارش

بر اساس جدول شماره ۳-۱ حداقل تعداد باکتریهای شمارش شده از دستگاه گوارش فیـل مـاهی در اوزان متفاوت، متعلق به محدوده وزنی ۱۰۰-۹۰ گرم به میزان $۱۲/۶۱\times۱۰^{۴}$ CFU/ gr of GI و حداکثر تعـداد باکتری از محدوده وزنی ۶۰۰-۵۰۰ گـرم و بـه تعـداد برابـر بـا $۱۴/۷۶\times۱۰^{۴}$ CFU/ gr of GI گـزارش گردید. مطالعات آماری صورت گرفته بر روی تعداد کل باکتریهای شمارش شده در این گونه بیـانگر عـدم وجود اختلاف معنی دار بین محدوده های وزنی۱۰۰ تا ۱۰۰۰گرم مـی باشـد.اما اخـتلاف معنـی داری بـین محدوده وزنی ۹۰ تا ۱۰۰ گرم با سایر اوزان مشاهده گردید ($P<0.05$).

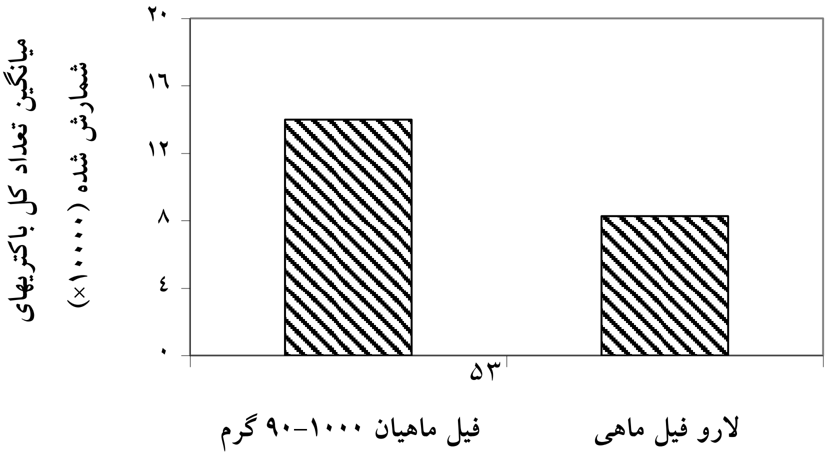
جدول ۳-۱- تعداد کل باکتریهای جداسازی شده (CFU/ gr of GI) از دستگاه گوارش فیل ماهی در محدوده های متفاوت وزنی تحت شرایط هوازی و بیهوازی

محدوده وزنی (گرم)	میانگین وزن (گرم)	تعداد کل باکتریهای جداسازی شده (CFU/ gr of GI)

٩٠-١٠٠	٩١±٢/٠١	١٢/٦١ × ١٠^{٤}
١٠٠-٢٠٠	١٤٩±١/٣٤	١٣/٥٢×١٠^{٤}
٢٠٠-٣٠٠	٢٤٣±٢/٤١	١٣/٧٨×١٠^{٤}
٣٠٠-٤٠٠	٣١٠±١/٥٤	١٤/٧٥×١٠^{٤}
٤٠٠-٥٠٠	٤٢١±٢/٣١	١٤/٦٨×١٠^{٤}
٥٠٠-٦٠٠	٥٢٤±١/٩٨	١٤/٧٦×١٠^{٤}
٦٠٠-٧٠٠	٦٤٥±٢/٠٣	١٤/١٤×١٠^{٤}
٧٠٠-٨٠٠	٧٦٧±١/٨٩	١٤/٢١×١٠^{٤}
٨٠٠ -٩٠٠	٨٧٥±٢/١٨	١٤/٢٣×١٠^{٤}
٩٠٠ -١٠٠٠	٩٧٨±١/٨٦	١٣/٣٣×١٠^{٤}
میانگین تعداد کل باکتریهای جداسازی شده		١٣/٩٩×١٠^{٤}
لاروی (میلی گرم)	٥٠±١/٧٢	٨/٢×١٠^{٤}

❊ GI مخفف Gastro Intestinal Tract است.

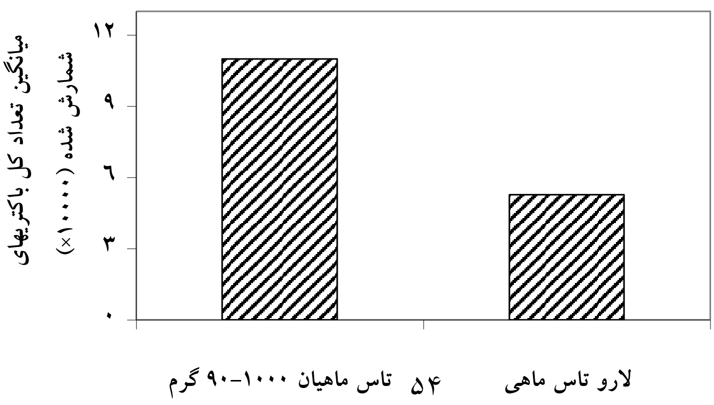
بر اساس جدول ٣-١ و نمودار ٣-١نتایج حاصل از شمارش تعداد کل باکتریهای موجود در اندامهای داخلی لاروهای فیل ماهی (CFU/ gr of GI ٨/٢×١٠^{٤})بیانگرپایین بودن معنی دار تعداد کل باکتریهای شمارش شده در آنها در مقایسه با محدوده های وزنی بین ٩٠ تا ١٠٠٠ گرم با میانگین برابر با CFU/ gr of GI ١٣/٩٩×١٠^{٤} می باشد*(P<0.05)*.



نمودار ۳-۱- میانگین تعداد کل باکتریهای(CFU/ gr of GI) شمارش شده در لارو فیل ماهی(n=۳۰) و محدوده وزنی ۱۰۰۰-۹۰ گرم(n=۱۰)

بر اساس جدول شماره ۳-۲ حداقل تعداد باکتریهای شمارش شده از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی در اوزان متفاوت، متعلق به محدوده وزنی ۱۰۰-۹۰ گرم به میزان CFU/ gr of GI ۸/۶۱×۱۰^{4} و حداکثر تعداد باکتری از محدوده وزنی ۸۰۰-۷۰۰ گرم و به تعداد برابر با CFU/ gr of GI ۱۲/۱۲×۱۰^{4} گزارش گردید. مطالعات آماری صورت گرفته بر روی تعداد کل باکتریهای شمارش شده در این گونه بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار بین محدوده های وزنی۱۰۰ تا ۱۰۰۰گرم می باشد.اما اختلاف معنی داری بین محدوده وزنی ۹۰ تا ۱۰۰ گرم با سایر اوزان مشاهده گردید ($P<0.05$).

نتایج حاصل از شمارش تعداد کل باکتریهای موجود در اندامهای داخلی لاروهای تاسماهی ایرانی (CFU/ gr of GI ۵/۲×۱۰^{4}) بر اساس جدول ۳-۲ و نمودار ۳-۲ بیانگرپایین بودن معنی دار تعداد کل باکتریهای شمارش شده در آنها در مقایسه با محدوده های وزنی بین ۹۰ تا ۱۰۰۰ گرم با میانگین تعدادی برابر با CFU/ gr of GI ۱۰/۹۹×۱۰^{4} می باشد($P<0.05$).



نمودار ۳-۲- میانگین تعداد کل باکتریهای(CFU/ gr of GI) شمارش شده در لارو تاسماهی ایرانی(n=۳۰) و محدوده وزنی ۱۰۰۰-۹۰ گرم (n=۱۰)

جدول ۳-۲- تعداد کل باکتریهای جداسازی شده (CFU/ gr of GI) از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی در محدوده های متفاوت وزنی تحت شرایط هوازی و بیهوازی

محدوده وزنی (گرم)	میانگین وزن (گرم)	تعداد کل باکتریهای جداسازی شده (CFU/ gr of GI)
۹۰-۱۰۰	۹۵±۱/۱	۸/۶۱ × $۱۰^{۴}$
۱۰۰-۲۰۰	۱۳۸±۱/۲۳	۱۰/۵۲×$۱۰^{۴}$
۲۰۰-۳۰۰	۲۲۷±۱/۲۳	۱۰/۷۸×$۱۰^{۴}$
۳۰۰-۴۰۰	۳۱۲±۱/۷۶	۱۱/۷۵×$۱۰^{۴}$
۴۰۰-۵۰۰	۴۳۱±۱/۳۴	۱۱/۶۸×$۱۰^{۴}$
۵۰۰-۶۰۰	۵۱۱±۲/۰۶	۱۱/۷۶×$۱۰^{۴}$
۶۰۰-۷۰۰	۶۳۳±۱/۴۵	۱۱/۱۴×$۱۰^{۴}$
۷۰۰-۸۰۰	۷۴۱±۱/۵۶	۱۲/۱۲×$۱۰^{۴}$
۸۰۰ -۹۰۰	۸۳۱±۱/۷۲	۱۱/۲۳×$۱۰^{۴}$

۹۰۰ -۱۰۰۰	۹٦۱±۱/۷۲	$۱۰/۳۳\times۱۰^{٤}$
میانگین تعداد کل باکتریهای جداسازی شده		$۱۰/۹۹\times۱۰^{٤}$
لاروی (میلی گرم)	٤۰±۲/٤۲	$٥/۲\times ۱۰^{٤}$

مقایسه جداول ۳-۱ و ۳-۲ بیانگر وجود اختلاف معنـی دار در ارتبـاط بـا میـانگین تعـداد کـل باکتریهـای شمارش شده در اوزان مختلف بـا مرحلـه لاروی در دو گونـه فیـل مـاهی و تاسـماهی ایرانـی مـی باشـد ($P<0.05$). بعلاوه میانگین تعداد باکتریهای شمارش شده در محدوده وزنی ۱۰۰۰-۹۰ گـرم و لاروی در تاسماهی ایرانی بصورت معنی داری در مقایسه با فیل ماهی کمتر است

۳-۱-۲- نتایج حاصل از شمارش باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیـک (**Lactic Acid** Bacteria: **LAB**) موجود در دستگاه گوارش

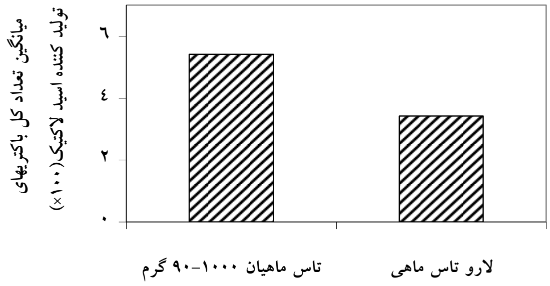
بر اساس جدول ۳-۳ حداقل تعداد باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک جداسازی شده از دسـتگاه گـوارش فیل ماهی و تاسماهی ایرانی در اوزان متفاوت به ترتیب، متعلق به محدوده وزنـی ۱۰۰-۹۰ گـرم بـه میـزان $٦/٥٦\times۱۰^{۲}$ CFU/ gr of GI و $٤/۰٦\times۱۰^{۲}$ CFU/ gr of GI و حداکثر تعداد LAB متعلق به محدوده وزنـی ۸۰۰-۷۰۰ گـرم و بـه تعـداد $۸/٥٤\times۱۰^{۲}$ CFU/ gr of GI در فیـل مـاهی و CFU/ gr of GI $٦/۰٤\times۱۰^{۲}$ در تاسماهی ایرانی گزارش گردید.مطالعات آماری صورت گرفته بر روی تعدادLAB شـمارش شده در این گونه بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار بین محدوده های وزنی۱۰۰ تا ۱۰۰۰گـرم در هـر دو گونه می باشد اما اختلاف معنی داری بین محدوده وزنی ۹۰ تا ۱۰۰ گـرم در هـر دو گونـه بـا سـایر اوزان مشاهده گردید ($P<0.05$).

مطالعه میانگین تعداد باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک شمارش شده در هر دو گونه بیانگر وجـــــود اختلاف معنی دار بین تاسماهی ایرانی و فیل ماهی بوده و تعدادباکتریهای مذکور به صورت معنـی داری در فیل ماهی بیشتر از تاسماهی ایرانی می باشد ($P<0.05$) . نتایج حاصل از شمارش باکتریهای تولید کننـده اسید لاکتیک موجود در اندامهای داخلی لاروهای تاسماهی ایرانـی ($۳/٤\times۱۰^{۲}$ CFU/ gr of GI) بـر اساس جدول ۳-۳ و نمودار ۳-۳ بیانگرپایین بودن معنی دار تعداد کل باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیـک در آنها در مقایسه با محدوده های وزنی بین ۹۰ تا ۱۰۰۰ گرم با میانگین تعدادی برابر با CFU/ gr of GI $٥/٤\times۱۰^{۲}$ می باشد($P<0.05$).

جدول ۳-۳- تعداد کل باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک جداسازی شده (CFU/ gr of GI) از دستگاه گوارش فیل ماهی و تاسماهی ایرانی در محدوده های متفاوت وزنی تحت شرایط هوازی و بیهوازی

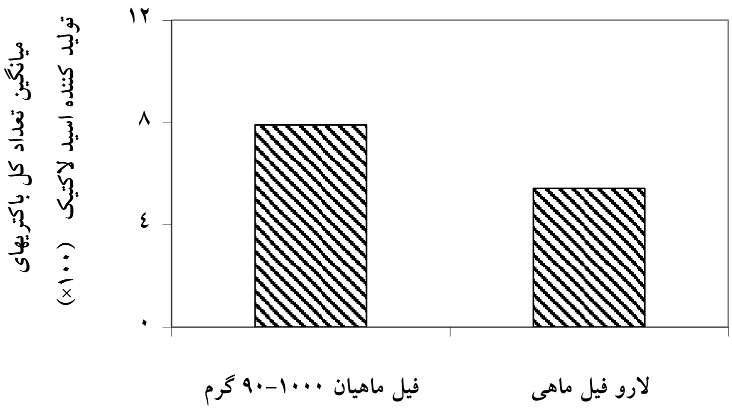
محدوده وزنی (گرم)	فیل ماهی (CFU/ gr of GI)	تاسماهی ایرانی (CFU/ gr of GI)
۹۰-۱۰۰	٦/٥٦×۱۰^{۲}	٤/۰٦×۱۰^{۲}
۱۰۰-۲۰۰	۷/٦٤×۱۰^{۲}	٥/۱٤×۱۰^{۲}
۲۰۰-۳۰۰	۷/۷۸×۱۰^{۲}	٥/۲۸×۱۰^{۲}
۳۰۰-٤۰۰	۸/۳۳×۱۰^{۲}	٥/۸۳×۱۰^{۲}
٤۰۰-٥۰۰	۸/۲۹×۱۰^{۲}	٥/۷۹×۱۰^{۲}
٥۰۰-٦۰۰	۸/۳٤×۱	٥/۸٤×۱۰^{۲}
٦۰۰-۷۰۰	۷/۹۹×۱۰^{۲}	٥/٤۹×۱۰^{۲}
۷۰۰-۸۰۰	۸/٥٤×۱۰^{۲}	٦/۰٤×۱۰^{۲}
۸۰۰ -۹۰۰	۸/۰٤×۱۰^{۲}	٥/٥٤×۱۰^{۲}
۹۰۰ -۱۰۰۰	۷/٥۳×۱۰^{۲}	٥/۰۳×۱۰^{۲}
میانگین	**۷/۹۰×۱۰^{۲}**	**٥/٤۰×۱۰^{۲}**
لارو	٥/٤٥×۱۰^{۲}	۳/٤۰×۱۰^{۲}

مشابه همین نتایج در لارو فیل ماهی نیز مشاهده می گردد (نمودار ۳-٤). مطالعه میانگین تعداد باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک شمارش شده در هر دو گونه در محله لاروی، بیانگر وجود اختلاف معنی دار بین تاسماهی ایرانی و فیل ماهی بوده و تعدادباکتریهای مذکور به صورت معنـی داری در فیـل مـاهی بیشـتر از تاسماهی ایرانی می باشد ($P<0.05$).



نمودار ۳-۳- میانگین تعداد کل باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک (CFU/ gr of GI) شمارش شده در لارو تاسماهی ایرانی(n=۳۰) و محدوده وزنی ۱۰۰۰-۹۰ گرم (n=۱۰)

مقایسه میانگین تعداد باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک (جدول ۳-۳)با میانگین تعداد کل باکتریهای جداسازی و شمارش شده در شرایط هوازی و بیهوازی در فیل ماهی (جدول ۳-۱) و تاسماهی ایرانی (جدول ۳-۲) نشان میدهد که باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک در فیل ماهی ٪ ۰/۵۶ و در تاسماهی ایرانی ٪ ۰/۴۹ از تعداد کل باکتریها را به خود اختصاص داده است. این در حالی است باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک در لارو فیل ماهی ٪ ۰/۶۶ و در تاسماهی ایرانی ٪۰/۶۱ از تعداد کل باکتریها را در بر گرفته است. بنا بر نتایج ارائه شده باکتریهای اسید لاکتیک در مرحله لاروی درصد بیشتری از تعداد کل باکتریها را به خود اختصاص می دهند.



نمودار ۳-٤- میانگین تعداد کل باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک(CFU/ gr of GI) شمارش شده در لارو فیل ماهی(n=۳۰) و محدوده وزنی ۹۰-۱۰۰۰ گرم (n=۱۰)

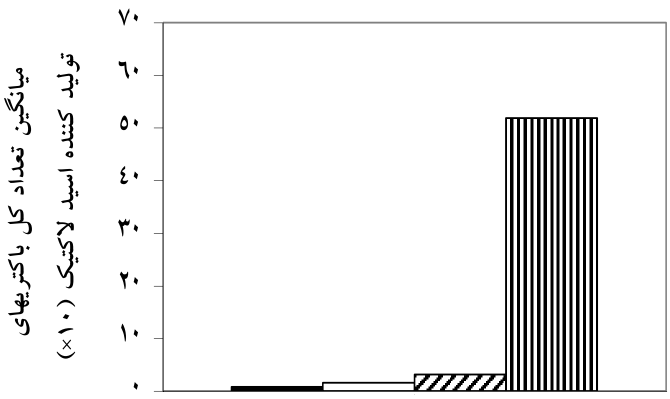
۳-۱-۳- نتایج حاصل از جداسازی تعداد باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک موجود در بخشهای مختلف دستگاه گوارش

همانگونه که در فصل دوم توضیح داده شد برای جداسازی و استخراج باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک دستگاه گوارش در ماهیان ۹۰-۱۰۰۰ گرم به چهار قسمت مشتمل بر مری، معده، بخش ابتدای روده و قسمت انتهایی روده تقسیم گردیده و اقدام به کشت ، شمارش باکتریها و جداسازی آنها گردید. بر اساس جدول شماره۳-٤ و نمودارهای ۳-۵ و ۳-٦ ، بیشترین تعداد LAB شمارش شده در دو گونه فیل ماهی و تاسماهی ایرانی به ترتیب، متعلق به بخش انتهایی روده با تعداد CFU/ gr of GI $۳/۸۰\times۱۰^{۲}$ و CFU/ gr of GI $۵/۸۰\times۱۰^{۲}$ میباشد. آنالیزهای آماری انجام شده حاکی از وجود اختلاف معنی دار بین این بخش از روده با سایر بخشهای دستگاه گوارش در هر دو گونه می باشد ($P<0.05$).

جدول۳-٤- میانگین تعداد باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک (CFU/ gr of GI) جداسازی شده از بخشهای مختلف دستگاه گوارش در فیل ماهی(n=۱۰) و تاسماهی ایرانی(n=۱۰)

بخشهای مختلف دستگاه گوارش	مری			معده			بخش ابتدای روده			بخش انتهای روده		
	میانگین	حداکثر	حداقل	میانگین	حداکثر	حداقل	میانگین	حداکثر	حداقل	میانگین	حداکثر	حداقل
فیل ماهی	$۰/۹٤\times۱۰^{۲}$			$۲/۸\times۱۰^{۲}$			$۰/۳۲\times۱۰^{۲}$			$۳/۸\times۱۰^{۲}$		

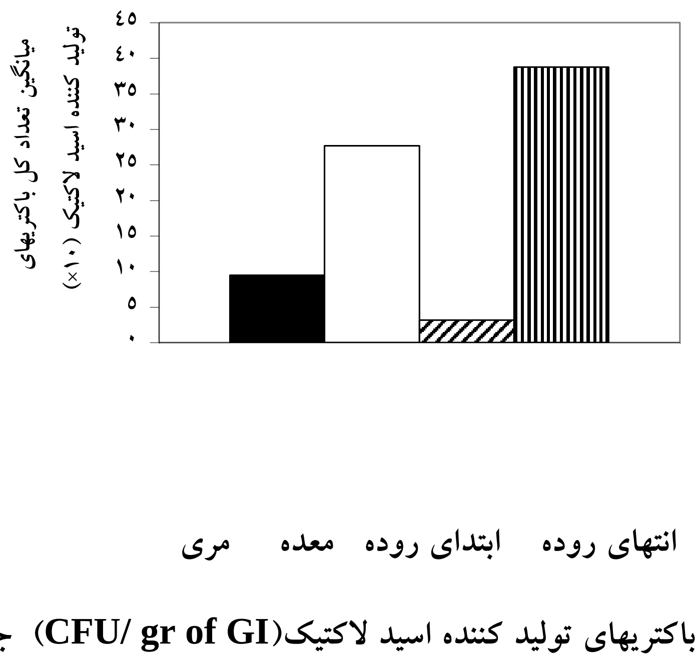
	٤/۱۸×$۱۰^{۲}$	۳/۲×$۱۰^{۲}$	۰/۳٤×$۱۰^{۲}$	۰/۲٦×$۱۰^{۲}$	۲/۹۹×$۱۰^{۲}$	۲/۲۹×$۱۰^{۲}$	۱/۰۲×$۱۰^{۲}$	۰/۷۸×$۱۰^{۲}$
تاسماهی ایرانی	۵/۱۹×$۱۰^{۲}$		۰/۲۱×$۱۰^{۲}$		۰/۵٤×۱۰		۰/۲۷×۱۰	
	۳/۸۳×$۱۰^{۲}$	۵/۸۰×$۱۰^{۲}$	۰/۲٦×$۱۰^{۲}$	۰/۲٤×$۱۰^{۲}$	۰/٦۰×۱۰	۰/٤۰×۱۰	۰/۳۰×۱۰	۰/۲۰×۱۰



انتهای روده ابتدای روده معده مری

نمودار۳-۵- میانگین تعداد باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک(CFU/ gr of GI) جداسازی شده از بخشهای مختلف دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی ۱۰۰۰-۹۰ گرم (n=۱۰)

طبق جدول شماره۳-٤ و نمودارهای ۳-٥ و ۳-٦ ، کمترین تعداد LAB شمارش شده در دو گونه تاسماهی ایرانی و فیل ماهی به ترتیب، متعلق به بخش ابتدای روده با تعداد CFU/ gr of GI $۰/۳۲×۱۰^{۲}$ و CFU/ gr of GI $۰/۲۱×۱۰^{۲}$ میباشد .بررسیهای آماری صورت گرفته نیز بیانگر وجود اختلاف معنی دار بین این بخش از روده با سایر بخشهای دستگاه گوارش در فیل ماهی و تاسماهی ایرانی است ($P<0.05$). همچنین دو بخش مری و معده نیز در هر دو گونه دارای اختلاف معنی داری با یکدیگر می باشند ($P<0.05$) .



نمودار۳-٦- میانگین تعداد باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک(CFU/ gr of GI) جداسازی شده از بخشهای مختلف دستگاه گوارش فیل ماهی ۱۰۰۰-۹۰ گرم (n=۱۰)

در حدود ۹۶ درصد از باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک در تاسماهی ایرانی و ۴۸/۱۰ درصد در فیل ماهی در بخش انتهای روده قرار داشته و این قسمت مهمترین بخش جهت جداسازی باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک به عنوان پروبیوتیک می باشد.

۳-۱-۴- بررسی گونه های باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک جداسازی شده از بخشهای مختلف دستگاه گوارش

تعداد و نوع گونه های باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک در دو گونه فیل ماهی و تاسماهی ایرانی با استفاده از روش PCR مورد بررسی واقع گردید. بر اساس جدول شماره ۳-۵ *Lactobacillus curvatus* و *Streptococcus sp.* به ترتیب حداکثر (۶/۳۰×۱۰^{۲} CFU/ gr of GI) و حداقل (۲/۳×۱۰ CFU/ gr of GI)باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک را در فیل ماهیان ۹۰ تا ۱۰۰۰ گرم را به خود اختصاص می دهند (نمودار۳-۷). این در حالی است که از لارو فیل ماهیان *Streptococcus sp.* جداسازی نگردید و *Lactococcus lactis* و *Lactobacillus curvatus* به ترتیب حداقل (۱/۶۰×۱۰ CFU/ gr of GI) و حداکثر(۴/۳۳×۱۰^{۲} CFU/ gr of GI) LAB در لارو فیل ماهی را به خود اختصاص می دهد.

جدول۳-۵- نوع و میانگین تعداد گونه های باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک (CFU/ gr of GI) جداسازی شده از دستگاه گوارش لارو فیل ماهی (n=۳۰) و محدوده وزنی ۱۰۰۰- ۹۰ گرم(n=۱۰)

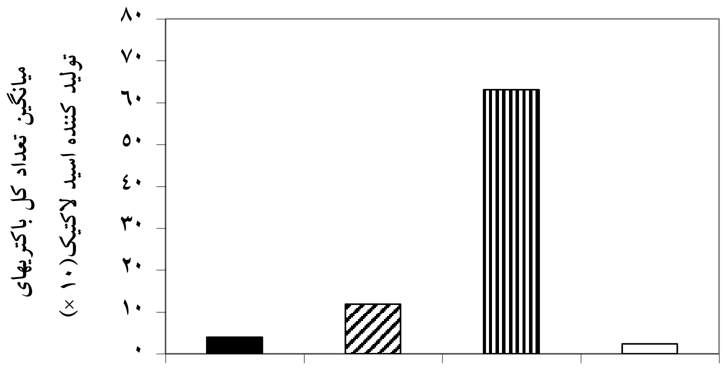
نام گونه	*Lactococcus lactis*	*Lactococcus raffinolactis*	*Lactobacillus curvatus*	*Streptococcus sp.*
شماره شوس (Strain number)	ATCC 19257^{T}	NCDO 617^{T}	YMRS3$_{a}$	JCM 8735^{T}
شماره توالی	M58836	X54261	AY204891	AB012306

(Accession No.)				
درصد تشابه توالی٪	۹۸–۹۹	۹۸–۹۹	۹۸–۹۹	۹۹–۱۰۰
۹۰–۱۰۰۰ گرم	۳/۹×۱۰	۱/۲×۱۰^{۲}	۶/۳۰×۱۰^{۲}	۲/۳×۱۰
لارو	۱/۶×۱۰	۹/۲×۱۰	٤/۳۳×۱۰^{۲}	–

آنالیزهای آماری صورت گرفته نشان می دهد که اختلاف معنی داری در سطح خطای ۵ درصد در ارتباط با میانگین تعداد *Lactobacillus curvatus* با سایر باکتریهای موجود در دستگاه گوارش فیل ماهیان ۹۰ تا ۱۰۰۰ گرم وجود دارد ($P<0.05$) . مشابه چنین حالتی در ارتباط با باکتری *L. raffinolactis* بـا سـایر باکتریها نیز مشاهده می گردد ($P<0.05$). از نظر آماری اختلاف معنی داری در سطح خطای ۵ درصد بین میانگین تعداد باکتری *Streptococcus sp.* با بـا**کتـری** *L. lactis* گـزارش نگردیـد ($P>0.05$) امـا اختلاف معنی داری بین این باکتری با دو باکتری دیگر بدست آمد ($P<0.05$).

آنالیزهای آماری صورت گرفته نشان می دهد که اختلاف معنی داری در سطح خطای ۵ درصد در ارتباط با میانگین تعداد *Lactobacillus curvatus* با سایر باکتریهای موجـود در لارو فیـل ماهیـان وجـود دارد ($P<0.05$) . مشابه چنین حالتی در ارتباط با باکتری *L. raffinolactis* و *L. lactis* با یکدیگر مشاهده می گردد ($P<0.05$).

مقایسه میانگین تعداد گونه های نامبرده با میانگین تعداد کل باکتریهای تولید کننـده اسـید لاکتیـک در فیـل ماهی در محدوده وزنی ۹۰ تا ۱۰۰۰ گرم نشان می دهد کـه گونـه هـای *Lactobacillus curvatus* ، *Lactococcus raffinolacti*، *L. lactis* و *Streptococcus sp.* به ترتیـب ۷۹/۷٤ درصد، ۱۵/۱۸ درصد، ٤/۹۳ درصد و ۲/۹۱ درصد از کل باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک را در بر مـی گیرند این در حالی است که در مرحله لاروی نیز به ترتیب ۷۹/۹ درصد، ۱۷/۱ درصد و ۲/۹ درصـد را بـه خود اختصاص داده است اما *Streptococcus sp.* جداسازی نگردید.

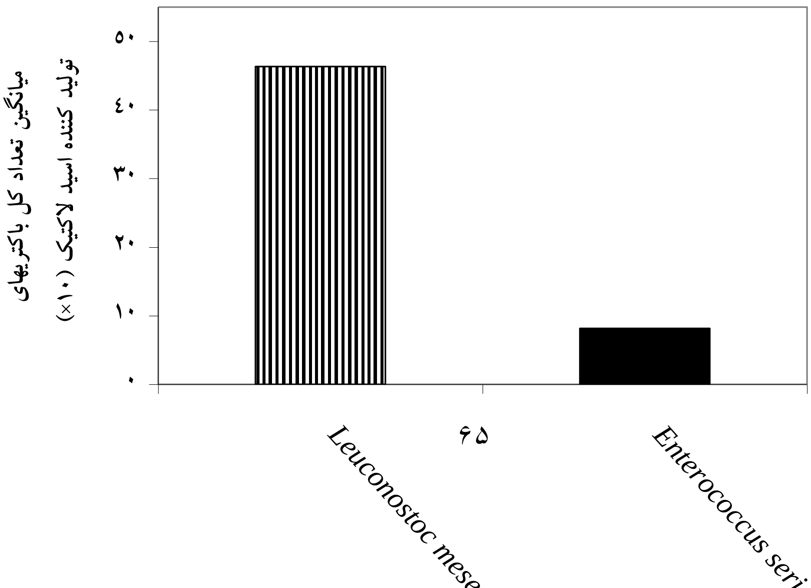


نمودار ۳-۷- نوع و میانگین تعداد گونه های باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک (CFU/ gr of GI) جداسازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی در محدوده وزنی ۱۰۰۰- ۹۰ گرم(n=۱۰)

بر اساس جدول ۳-٦ باکتری *Leuconostoc mesenteroides* در تاسماهی ایرانی هم در محدوده وزنی ۹۰ تا ۱۰۰۰ گرم (نمودار۳-۸) و هم در مرحله لاروی، بالاترین تعداد باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک را به خود اختصاص داده است و در محدوده وزنی ۹۰ تا ۱۰۰۰ گرم ۸۷/۷۵ درصد و در مرحله لاروی ۷٤/٤۰ درصد از کل باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک را در بر میگیرد. بررسیهای آماری صورت گرفته حاکی از وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای پنج درصد، بین میانگین تعداد دو باکتری *Leuconostoc mesenteroides* و *Enterococcus seriolicida* با یگدیگر در مرحله لاروی و همچنین محدوده وزنی ۹۰ تا ۱۰۰۰ گرم می باشد

جدول۳-٦- نوع و میانگین تعداد گونه های باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک (CFU/ gr of GI) جداسازی شده از دستگاه گوارش لاروتاسماهی (n=۳۰) و محدوده وزنی ۱۰۰۰- ۹۰ گرم(n=۱۰)

نام گونه	*Leuconostoc mesenteroides*	*Enterococcus seriolicida*
شماره شوس **(Strain number)**	NRIC 1539^{T}	ATCC 49156^{T}
شماره توالی **(Accession No.)**	AB023246	AJ387923
درصد تشابه توالی٪	۹۸–۹۹	۹۸–۹۹
۹۰–۱۰۰۰ گرم	۴/۶۳×۱۰^{۲}	۸/۱×۱۰
لارو	۲/۴۱×۱۰^{۲}	۴/۹×۱۰



نمودار ۳-۸- میانگین تعداد گونه های باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک (CFU/ gr of GI) جداسازی شده از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی در محدوده وزنی ۱۰۰۰- ۹۰ گرم(n=۱۰)

.

۳-۲- تاثیر استفاده از باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک جداسازی شده از دستگاه گوارش (*Lactobacillus curvatus* و *Leuconostoc mesenteroides*) بعنوان پروبیوتیک بر روی شاخصهای رشد لارو فیل ماهی و تاسماهی ایرانی

۳-۲-۱- تاثیر *Lb. curvatus* و *Leu. mesenteroides* بر روی شاخصهای رشددر لارو فیل ماهی

همانگونه که در فصل دوم اشاره گردید لارو فیل ماهیان در محدوده وزنی ۵۰ میلی گرم به داخل تانکهای پرورش وارد گردیدند و پس از پایان دوره پرورش لاروی، به مدت دو هفته نیز در وانهای ۵۰۰ لیتری پرورش می یافتند. در تمام دوره پرورش لاروی از باکتریهای فوق با تعداد متفاوت استفاده می گردید اما استفاده از این باکتریها در زمان انتقال به وانهای ۵۰۰ لیتری قطع گردید. در ذیل به بررسی هر یک از فاکتورهای فوق می پردازیم.

در ذیل در ابتدا راهنمای استفاده از جداول که اطلاعاتی در ارتباط با طبقـه بنـدی تیمارهـا بـر اسـاس نـوع پروبیوتیک مصرفی ارائه گردیده است.

جدول ۳–۷- راهنمای استفاده از جداول ۳–۸ تا ۳–۲۹ در بخش نتایج

نوع تیمار	**تیمار۱**	**تیمار۲**	**تیمار۳**	**تیمار٤**	**تیمار٥**	**تیمار٦**	**تیمار۷**	**تیمار ۸**	**تیمار۹**
	A	**A**	**A**	**B**	**B**	**B**	**A+B**	**A+B**	**A+B**
نوع گونه باکتری و تعداد افزوده شده به آب بازای هر گرم از غذا (CFU/gr$_{food}$)	۲×۱۰^{۹}	٥×۱۰^{۹}	۹×۱۰^{۹}	۲×۱۰^{۹}	٥×۱۰^{۹}	۹×۱۰^{۹}	۲×۱۰^{۹} + ۲×۱۰^{۹}	٥×۱۰^{۹} + ٥×۱۰^{۹}	۹×۱۰^{۹} + ۹×۱۰^{۹}

A. *Leuconostoc mesenteroides* **B.** *Lactobacillus curvatus*

۳–۲–۱–۱- تاثیر *Lb. curvatus* و *Leu. mesenteroides* بر روی میانگین وزن لارو فیل ماهی

بر اساس جدول ۳–۸ حداکثر میزان وزن در مراحل مختلف بیو متری متعلق به تیمار ۳ و حداقل متعلق به تیمار ٦ می باشد که تیمار ۳ دریافت کننده حداکثر تعداد *Lactobacillus curvatus* جداسازی شـده از دستگاه گوارش فیل ماهی (۹×۱۰^{۹} CFU/gr$_{غذا}$) و تیمار ٦ در یافت کننده حداکثر تعداد *Leuconostoc mesenteroides* جداسازی شده از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی (۹×۱۰^{۹} CFU/gr$_{غذا}$) می باشد.

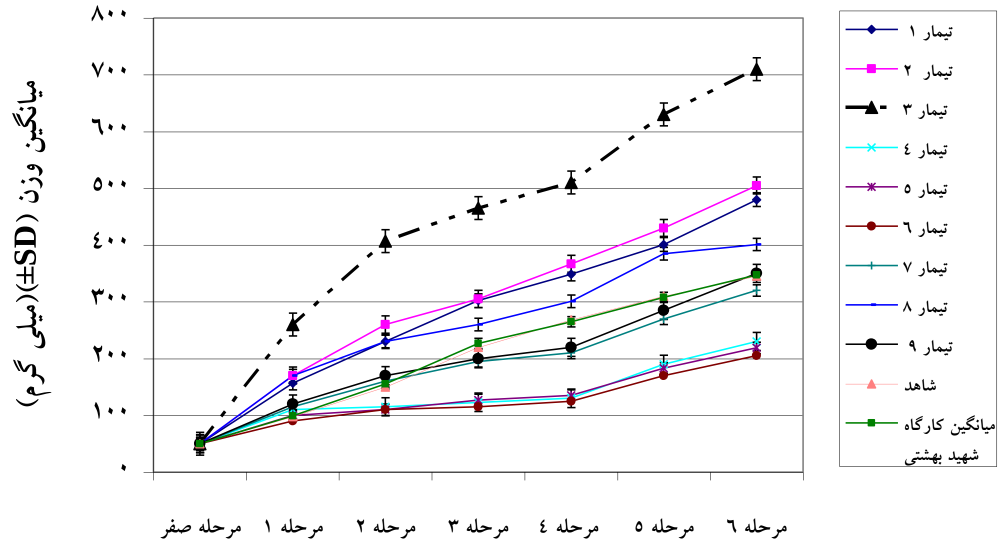
مطالعات آماری انجام شده حاکی از وجود اختلاف معنی دار بـین تیمارهـای ۳ و ٦ بـا یکـدیگر در سـطح خطای ٥ درصد می باشد.

جدول ۳-۷- میانگین تغییرات وزن (میلی گرم)(SD±) لارو فیل ماهی در مراحل مختلف پرورش (n=۳٦۰ در هر تیمار)

مرحله / تیمار	مرحله صفر (آغاز تغذیه فعال/ ١٤ روز پس از هچ)	مرحله۱ (۱۹ روز پس از هچ)	مرحله ۲ (٢٤ روز پس از هچ)	مرحله ۳ (۲۹ روز پس از هچ)	مرحله ٤ (۳٤ روز پس از هچ)	مرحله ٥ (یکهفته پس از ورود به سالن پرورش)	مرحله ٦ (دو هفته پس از ورود به سالن پرورش)
تیمار ۱	٥۰±۲	۱٥۷±۳	۲۳۰±٤	۳۰۲±۲	۳٤۸±۲	٤۰۱±٥	٤۸۰±۱
تیمار ۲	٥۰±۳	۱۷۰±۳	۲٦۰±۳	۳۰٥±۳	۳٦۷±۳	٤۳۰±۳	٥۰٥±۳
تیمار ۳	٥۰±٤	۲٦۰±٤	٤۰۷±٤	٤٦٥±٤	٥۱۰±٤	٦۳۰±٤	۷۱۰±٤
تیمار ٤	٥۰±۲	۱۱۰±۲	۱۱٥±۲	۱۲۳±۳	۱۳۰±۲	۱۹۰±۲	۲۳۰±۲
تیمار ٥	٥۰±۲	۱۰۰±٤	۱۱۰±٤	۱۲۷±۲	۱۳٥±٤	۱۸۳±٤	۲۱۹±٤
تیمار ٦	٥۰±۳	۹۰±۳	۱۱۰±۳	۱۱٥±۳	۱۲٥±۳	۱۷۰±۳	۲۰٥±۳
تیمار ۷	٥۰±٥	۱۱٥±٥	۱٦۰±٥	۱۹٥±٥	۲۱۰±٥	۲۷۰±٥	۳۲۰±٥
تیمار ۸	٥۰±۳	۱۷۰±۳	۲۳۰±۳	۲٦۰±۳	۳۰۱±۳	۳۸٥±۳	٤۰۱±۳
تیمار ۹	٥۰±٤	۱۲۰±٤	۱۷۰±٤	۲۰۰±٤	۲۲۰±۳	۲۸٥±٤	۳٥۰±٤
شاهد	٥۰±۲	۹۸±۲	۱٥۰±۲	۲۲۰±۲	۲٦۸±٤	۳۱۰±۲	۳٤٥±۲

کارگاه	۵۰±۳	۹۹±۳	۱۵۵±۳	۲۲۷±۳	۲٦۵±۲	۳۰۸±۳	۳٤۷±۳

بر اساس نمودار۳–۹ سه تیمار ۳، ۲ و ۱ به ترتیب بیشترین میانگین وزن را در انتهای دوره پـرورش و طـول دوره پرورش (جدول ۳–۸) به خود اختصاص داده است. این در حالی است که باکتری *Lactobacillus curvatus* جداسازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی بر اساس مقادیر تعیین شده به همراه جیره غذایی به آب این ماهیان ، افزوده می گردید. بعلاوه بررسیهای آماری صورت گرفته اخـتلاف معنـی دار ایـن سـه تیمار با یکدیگر و با سایر تیمارها را نشان میدهد ($P<0.05$).



نمودار۳–۹– میانگین تغییرات وزن (±SD) لارو فیل ماهی در طول دوره پرورش در مراحل متفاوت عملیات

زیست سنجی

بر اساس نمودار۳–۹ سه تیمار ٦، ۵ و ٤ به ترتیب کمترین میانگین وزن را در انتهـای دوره پـررش و طـول دوره پرورش (جدول ۳–۷) به خود اختصاص داده است. این در حالی است که در این تیمارهـا، لارو فیـل ماهیان از باکتری *Leuconostoc mesenteroides* جداسازی شده از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانـی بر اساس مقادیر تعیین شده به همراه جیره غذایی به آب افزوده می گردید. بعلاوه بررسیهای آماری صورت

گرفته اختلاف معنی دار این سه تیمار را با سایر تیمارها را نشان میدهد ($P<0.05$) اما عدم اختلاف معنی دار

بین این تیمارها با یکدیگر مشاهده گردید و تنها استثناء وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ۵ درصد بین تیمار ٤ و تیمار ٦ با یکدیگر می باشد. بر اساس جدول ۳-۸ با افزایش تعداد باکتری *Leu. mesenteroides* دریافتی بوسیله فیل ماهیان میزان وزن آنها کاهش می یابد. این در حالی است که در سه تیمار ۱، ۲ و ۳ با افزایش تعداد باکتری *Lb. curvatus* دریافتی بوسیله لارو فیل ماهی میزان وزنشان افزایش می یابد. مطابق با جدول ۳-۸، در سه تیمار ۷، ۸ و ۹ که به صورت توام از هر دو باکتری *Lb. curvatus* و *Leu. mesenteroides* برای تغذیه لارو فیل ماهیان استفاده گردید بیشترین میزان وزن

در انتهای دوره به ترتیب متعلق به ۸ ، ۹ و ۷ می باشد. بررسیهای آماری انجام شده حاکی از وجود اختلاف معنی دار بین تیمار ۸ با دو تیمار دیگر در سطح خطای ۵ درصد و تیمار ۷ با تیمار ۹ می باشد ($P<0.05$). همچنین اختلاف معنی داری بین این سه تیمار با سایر تیمارها مشاهده گردید ($P<0.05$).

مطالعات آماری صورت گرفته حاکی از عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ۵ درصد بین تیمار شاهد با کارگاه شهید بهشتی و این دو تیمار با تیمار ۹ می باشد ($P>0.05$).

۳-۲-۱-۲- تاثیر *Lactobacillus curvatus* و *Leuconostoc mesenteroides* بر روی میانگین طول لارو فیل ماهی

بر اساس جدول ۳-۹ حداکثر میزان طول در مراحل مختلف بیو متری متعلق به تیمار ۳ و حداقل متعلق به تیمار ٦ می باشد این در حالی است که تیمار ۳ دریافت کننده حداکثر تعداد *Lactobacillus curvatus* جداسازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی (9×10^9 CFU/gr غذا) و تیمار ۳ در یافت کننده حداکثر تعداد *Leuconostoc mesenteroides* جداسازی شده از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی (9×10^9 CFU/gr غذا) می باشد. مشابه این نتیجه در بررسی فاکتور وزن نیز مشاهده گردید.مطالعات آماری انجام شده حاکی از وجود اختلاف معنی دار بین ۳ و ٦ با یکدیگر در سطح خطای ۵ درصد می باشد. بعلاوه اختلاف این دو تیمار با سایر تیمارها نیز مشخص گردید($P<0.05$) .

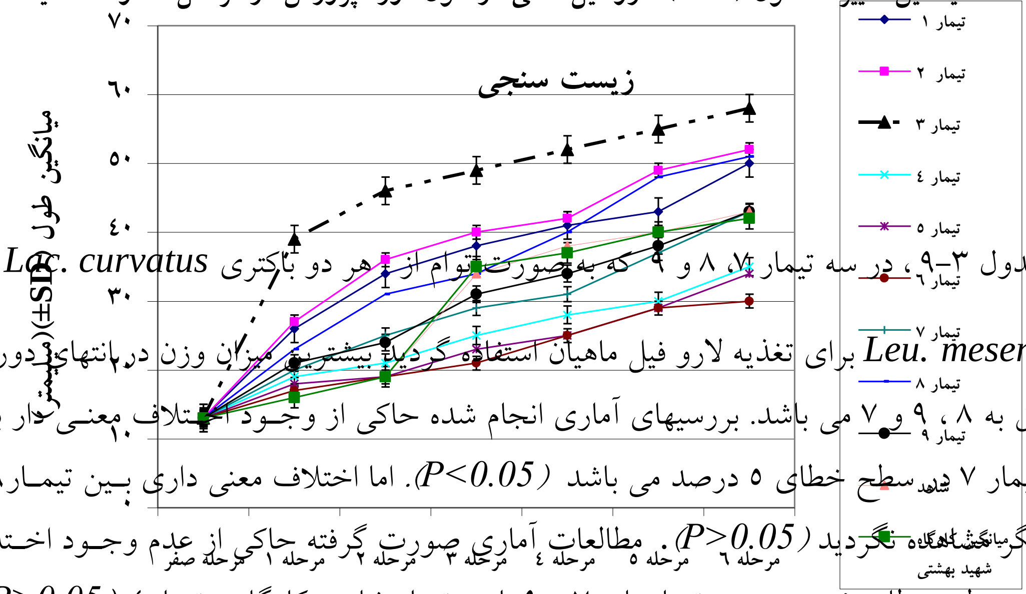
بر اساس نمودار۳-۱۰ سه تیمار ۳، ۲ و ۱ به ترتیب بیشترین میانگین طول را در انتهای دوره پررش و طول دوره پرورش (جدول ۳-۹) به خود اختصاص داده است. این در حالی است که باکتری *Lactobacillus curvatus* جداسازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی بر اساس مقادیر تعیین شده به همراه جیره غذایی به آب این ماهیان ، افزوده می گردید. بعلاوه بررسیهای آماری صورت گرفته اختلاف معنی دار تیمار ۳ با

تیمارهای ۱ و ۲ در سطح خطای ۵ درصد $(P<0.05)$ می باشد، اما اختلاف معنی داری بین تیمار ۲ و ۳ با یکدیگر مشاهده نگردید$(P>0.05)$. بعلاوه اختلاف معنی داری بین تیمارها ۱، ۲ و ۳ با سایر تیمارها

در سطح خطای ۵ درصد مشخص گردید $(P<0.05)$ این در حالی است تنها استثناء در مورد دو تیمار ۲ و ۱ می باشد که اختلاف معنی داری بین این دو تیمار با تیمار۸ مشاهده نشد.

مطابق با نمودار۳-۱۰ سه تیمار ٦، ٥ و ٤ به ترتیب کمترین میانگین وزن را در انتهای دوره پرورش و طول دوره پرورش (جدول ۳-۹) به خود اختصاص داده است. این در حالی است که در این تیمارها، لارو فیل ماهیان از باکتری *Leuconostoc mesenteroides* جداسازی شده از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی بر اساس مقادیر تعیین شده به همراه جیره غذایی به آب افزوده می گردید. مشابه این حالت در ارتباط با فاکتور وزن نیز مشاهده گردید. بررسیهای آماری صورت گرفته اختلاف معنی دار این سه تیمار را با سایر تیمارها را در سطح خطای ۵ درصد بجز تیمارهای شاهد و کارگاه و همچنین بین تیمار ٤ با تیمارهای ۷ و ۹ را نشان میدهد $(P<0.05)$. همچنین در مورد تیمار ٦، اختلاف آماری معنی داری بین این تیمار با تیمارهای ٤ و ٥ مشاهده نگردید$(P>0.05)$.

نمودار۳-۱۰- میانگین تغییرات طول $(\pm SD)$ لارو فیل ماهی در طول دوره پرورش در مراحل متفاوت عملیات



بر اساس جدول ۳-۹، در سه تیمار ۷، ۸ و ۹ که به صورت توام از هر دو باکتری *Lac. curvatus* و *Leu. mesenteroides* برای تغذیه لارو فیل ماهیان استفاده گردید بیشترین میزان وزن در انتهای دوره به ترتیب متعلق به ۸ ، ۹ و ۷ می باشد. بررسیهای آماری انجام شده حاکی از وجود اختلاف معنی دار بین تیمار ۸ با تیمار ۷ در سطح خطای ۵ درصد می باشد $(P<0.05)$. اما اختلاف معنی داری بین تیمار۹ با دو تیمار دیگر مشاهده نگردید $(P>0.05)$. مطالعات آماری صورت گرفته حاکی از عدم وجود اختلاف معنی د ار در سطح خطای ۵ درصد بین تیمارهای ۷ و ۹ با دو تیمار شاهد، کارگاه و تیمار٤ $(P>0.05)$ و اختلاف معنی دار این دو تیمار با سایر تیمارها است $(P<0.05)$. بعلاوه تفاوت معنی داری بین تیمار ۸ با سایر تیمارها بجز تیمار این تیمار با تیمارهای ۱ و ۲ مشاهده گردید$(P<0.05)$. مطالعات آماری صورت گرفته حاکی از عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ۵ درصد بین تیمار شاهد با کارگاه می باشد $(P>0.05)$.

جدول ۳-۹- میانگین تغییرات طول (میلیمتر)(SD±) لارو فیل ماهی در مراحل مختلف پرورش

(n=۳٦۰ در هر تیمار)

تیمار / مرحله	مرحله صفر (آغاز تغذیه فعال/ ۱٤ روز پس از هچ)	مرحله۱ (۱۹ روز پس از هچ)	مرحله ۲ (۲٤ روز پس از هچ)	مرحله ۳ (۲۹ روز پس از هچ)	مرحله ٤ (۳٤ روز پس از هچ)	مرحله ٥ (یکهفته پس از ورود به سالن پرورش)	مرحله ٦ (دو هفته پس از ورود به سالن پرورش)
تیمار ۱	۱۳±۱	۲٦±۱	۳٤±۱	۳۸±۲	٤۱±۲	٤۳±۲	٥۰±۱
تیمار ۲	۱۳±۲	۲۷±۲	۳٦±۱	٤۰±۳	٤۲±۱	٤۹±۳	٥۲±۳
تیمار ۳	۱۳±۱	۳۹±۱	٤٦±۱	٤۹±۲	٥۲±۳	٥٥±٤	٥۸±۳
تیمار ٤	۱۳±۱	۱۹±۱	۲۱±۲	۲٥±۱	۲۸±۲	۳۰±۲	۳٥±۲
تیمار ٥	۱۳±۱	۱۸±۱	۱۹±۱	۲۳±۲	۲٥±۲	۲۹±۱	۳٤±۲
تیمار ٦	۱۳±۲	۱۷±۲	۱۹±۱	۲۱±۱	۲٥±۱	۲۹±۲	۳۰±۱
تیمار ۷	۱۳±۳	۲۰±٥	۲٥±۲	۲۹±۲	۳۱±۲	۳۷±۲	٤۳±۳
تیمار ۸	۱۳±۱	۲۳±۳	۳۱±۳	۳٤±۳	٤۰±۳	٤۸±۳	٥۱±۳
تیمار ۹	۱۳±۲	۲۱±۱	۲٤±۱	۳۱±۲	۳٤±۲	۳۸±۱	٤۳±۲
شاهد	۱۳±۳	۱۷±۲	۱۹±۲	۳٤±۲	۳۸±۱	٤۰±۲	٤۳±۳
کارگاه	۱۳±۱	۱۷±۳	۱۹±۲	۳٥±۳	۳۷±۲	٤۰±۱	٤۲±۳

۳-۲-۱-۳- تاثیر *Lactobacillus curvatus* و *Leuconostoc mesenteroides* بر روی ضریب رشد ویژه در لارو فیل ماهی

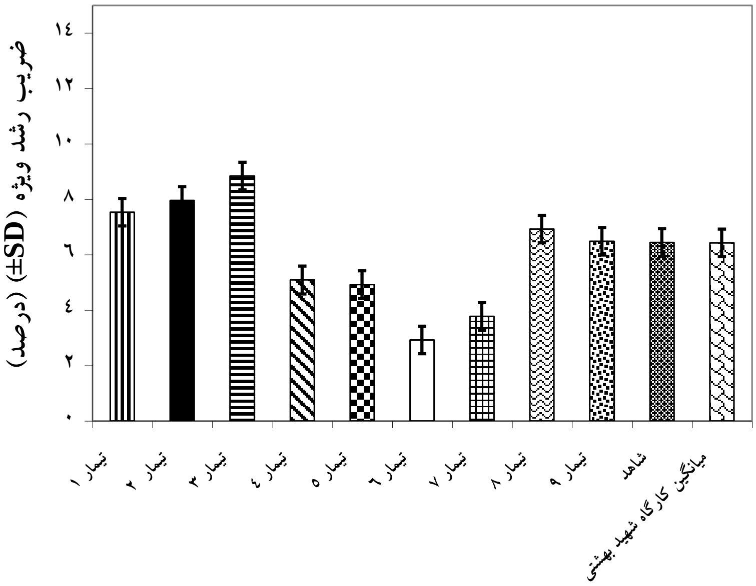
بر اساس جدول ۳-۱۰ حداکثر میزان ضریب رشد ویژه متعلق به تیمار ۳ (۸/۸۵±۰/۱۲ درصد)و حداقل متعلق به تیمار ٦ (۲/۹۹±۰/۳۱) می باشد این در حالی است که تیمار ۳ دریافت کننده حداکثر تعداد *Lactobacillus curvatus* جداسازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی (۹×۱۰^۹ CFU/gr غذا) و تیمار ٦ در یافت کننده حداکثر تعداد *Leuconostoc mesenteroides* جداسازی شده از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی (۹×۱۰^۹ CFU/gr غذا) می باشد. مشابه این نتیجه در بررسی فاکتور وزن و طول نیز مشاهده گردید.مطالعات آماری انجام شده حاکی از وجود اختلاف معنی دار بین تیمارهای ۳ و ٦ با یکدیگر در سطح خطای ۵ درصد می باشد ($P<0.05$).

بررسی نمودار۳-۱۱ و جدول ۳-۱۰ نشان می دهد که سه تیمار ۳، ۲ و ۱ به ترتیب بیشترین میانگین ضریب رشد ویژه را در طول دوره پرورش به خود اختصاص داده است. این در حالی است که باکتری *Lactobacillus curvatus* جداسازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی بر اساس مقادیر تعیین شده به همراه جیره غذایی به آب این ماهیان ، افزوده می گردید. بررسیهای آماری صورت گرفته بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار بین تیمارهای ۱ ، ۲ و ۳ در سطح خطای ۵ درصد با یکدیگر می باشد ($P>0.05$). مطالعات صورت گرفته بیانگر ، وجود اختلاف معنی دار بین تیمارهای ۱ و ۲، در سطح خطای ۵ درصد با تیمارهای ٤، ۵ و ٦ مشخص گردید ($P<0.05$). بعلاوه تیمار ۳ نیز دارای اختلاف معنی دار در سطح خطای ۵ درصد با سایر تیمارها بجز تیمارهای ۱ ، ۲ (قبلا اشاره گردید) و ۸ می باشد ($P<0.05$).

طبق نمودار۳-۱۱ سه تیمار ٦، ۵ و ٤ به ترتیب کمترین میانگین ضریب رشد ویژه را در طول دوره پرورش (جدول ۳-۱۰) به خود اختصاص داده است. این در حالی است که در این تیمارها، لارو فیل ماهیان از باکتری *Leuconostoc mesenteroides* جداسازی شده از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی بر اساس مقادیر تعیین شده به همراه جیره غذایی به آب افزوده می گردید. مشابه این حالت در ارتباط با فاکتور وزن و طول نیز مشاهده گردید. بررسیهای آماری صورت گرفته اختلاف معنی دار این سه تیمار را با سایر تیمارها ، در سطح خطای ۵ درصد را نشان میدهد ($P<0.05$) بعلاوه ، عدم اختلاف معنی دار این تیمارها با یکدیگر نیز مشاهده گردید ($P>0.05$) .

بنا بر نتایج ارائه شده می توان نتیجه گیری نمود با افزایش تعداد باکتری *Leuconostoc mesenteroides* دریافتی بوسیله فیل ماهیان میزان ضریب رشد ویژه آنها نیز کاهش می یابد. این در

حالی است که در سه تیمـار ۱، ۲ و ۳ بـا افـزایش تعـداد بـاکتری ***Lactobacillus curvatus*** دریـافتی بوسیله لارو فیل ماهی میزان ضریب رشد ویژه آنها نیز افزایش می یابد.



نمودار۳-۱۱- میانگین تغییرات ضریب رشد ویژه (±SD) لارو فیل ماهی در طول دوره پرورش در مراحل متفاوت عملیات زیست سنجی

مطابق با جدول ۳-۱۰ ، در سه تیمار ۷، ۸ و ۹ که به صورت توام از هر دو باکتری *Lac. curvatus* و *Leu. mesenteroides* برای تغذیه لارو فیل ماهیان استفاده گردید . بیشترین میزان ضریب رشد ویژه در انتهای دوره به ترتیب متعلق به ۸ ، ۹ و ۷ می باشد. بررسـیهای آمـاری انجـام شـده حـاکی ازعـدم وجـود اختلاف معنی دار بین تیمار های نامبرده در سطح خطای ٥ درصد با یکدیگر می باشد ($P>0.05$).

مطالعات آماری صورت گرفته بیانگر وجود اختلاف معنی د ار در سطح خطای ٥ درصد بین تیمارهای ۷ و ۹ با دو تیمار ۳ و ٦ می باشد ($P<0.05$). بعلاوه تفاوت معنی داری بین تیمـار ۸ بـا تیمارهـای ٤ ، ٥ و ٦

مشاهده گردید (*P<0.05*). از سوی دیگر بین تیمار شاهد و کارگاه تفاوت معنی داری مشاهده نشد (*P>0.05*).

جدول ۳–۱۰– میانگین ضریب رشد ویژه (٪)(±SD**) لارو فیل ماهی در مراحل مختلف پرورش**

(n=۳۶۰ در هر تیمار)

مرحله / تیمار	مرحله صفر– مرحله ۱ (۱۴ تا ۱۹ روز پس از هچ)	مرحله۱– مرحله ۲ (۱۹ تا ۲۴ روز پس از هچ)	مرحله ۲–مرحله ۳ (۲۴ تا ۲۹ روز پس از هچ)	مرحله ۳– مرحله ۴ (۲۹ تا ۳۴روز پس از هچ)	مرحله٤– مرحله ٥ (انتهای پرورش لارو تا ۱ هفته از ورود به سالن)	مرحله ٥–مرحله ٦ (۱ تا ۲ هفته پس از ورود به سالن پرورش)	میانگین در طول دوره (درصد)
تیمار ۱	۲۲/۸۹±۰/٤	۷/٦۳±۰/۱۲	٥/٤٤±۰/۲۱	۲/۸۷±۰/۰۱	۲/۷۹±۰/۱۰	۳/٥۹±۰/۲	±۰/۲۱ ۷/٥٤
تیمار ۲	۲٤/٤۹±۰/۸	۸/٤۹±۰/۰۳	۲/۱۹±۰/۰۳	۳/۷۰±۰/۰۳	۳/۱٦±۰/۰۲	۳/۲۳±۰/۲	±۰/۲۰ ۷/۷۱
تیمار ۳	۳۳/۰۱±۱/۲	۸/۹٦±۱/۱	۳٦/٦±۰/۰۲	۱/۸٤±۰/۰۱	٤/۲۲±۰/۰۲	۲/۳۲±۰/۱	±۰/۱۲ ۸/۸٥
تیمار ٤	۱٥/۸۷±۸/٦	۰/۹۸±۰/۰۳	۱/۱۹±۰/۲٦	۱/۰۲±۰/۱٥	۷/۳۳±۰/۹۱	۳/۸۰±۰/۳	±۰/۱۱ ٥/۰۸
تیما	۱۳/۸٦±۱/٦	۱/۹۰±۰/۰۷	۲/۸۷±۰/۰۹	۱/۲۲±۰/۰۳	٦/۰۸±۰/۱٥	۳/٥۹±۰/۲	±۰/۱٥

تیمار ۵							٤/۹۲
تیمار ٦	۱۱/۷۷±۰/۵	٤/۰۱±۰/۱۲	۰/۸۸±۰/۰۲	۱/٦٦±۰/۰٤	٤/۱۵±۰/۱۲	۳/۷٤±۰/۵	۲/۹۹±۰/۳۱
تیمار ۷	۱٦/۷۲±۱/۱	٦/٦۱±۰/۲٤	۳/۹۵±۰/۱۱	۱/٤۸±۰/۰۳	۵/۰۲±۰/۱۰	۳/۳۹±۰/۱	۳/۷۵±۰/۱۸
تیمار ۸	۲۳/٤۹±۰/۸	٦/۰٤±۰/۳۹	۲/٤۵±۰/۰۳	۲/۹۲±۰/۰۳	٤/۹۲±۰/۰٤	۰/۸۱±۰/۰	٦/۹٤±۰/۱٦
تیمار ۹	۱۷/۵٤±۰/۹	٦/۹٦±۰/۱۲	۳/۲۵±۰/۰۷	۱/۹۰±۰/۰۳	۵/۱۷±۰/۰۸	٤/۱۰±۰/۱	٦/٤۹±۰/۳۰
شاهد	۱۳/٤٦±۰/٤	۸/٦٤±۰/۲۳	۷/٦٦±۰/۰۸	۳/۹٤±۰/۰۳	۲/۹۱±۰/۲۰	۲/۱۳±۰/۱	٦/٤٤±۰/۵۱
کارگاه	۱۳/٦۷±۰/۵	۸/۹٦±۰/۱٤	۷/٦۳±۰/۱۲	۳/۰۹±۰/۰۳	۳/۰۰±۰/۰۳	۲/۳۸±۲/۲	٦/٤٦±۰/٦۰

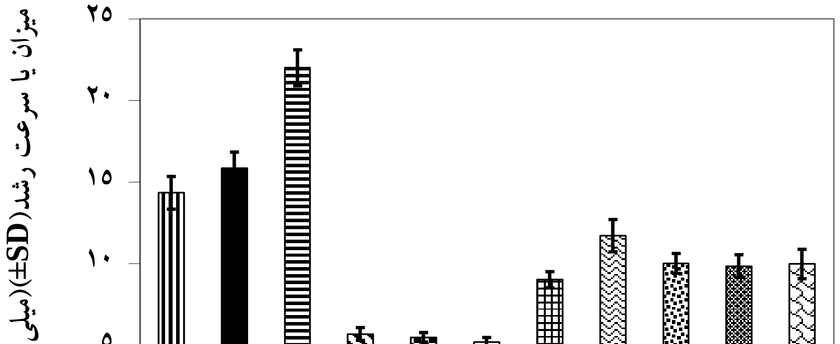
بررسی دقیقتر جدول نشان می دهد که بیشترین میزان ضریب رشد ویژه متعلق به مرحله نخست پرورش لاروی و یا فاصله بین آغاز تغذیه فعال یا مرحله صفر تا ۵ روز بعد یعنی ۱۹ روز پس از هچ در تمام تیمارها می باشد که اختلاف معنی داری بین این مرحله با سایر مراحل در تمام تیمارها مشهود است. در این مرحله از پرورش لاروی بیشترین میزان ضریب رشد ویژه نیز به ترتیب متعلق به تیمارهای ۳ ، ۲ و ۱ می باشد و در بین این سه تیمار، تیمار ۳ حد اکثر میزان ضریب رشد ویژه (۳۳/۰۱±۱/۲ درصد) را نه تنها در این مرحله از پرورش لاروی، بلکه در سایر مراحل نیز به خود اختصاص داده است. میزان ضریب رشد ویژه در این تیمار، در مرحله مذکور، در حدود ۲/۵ برابر تیمار شاهد می باشد. . لازم بذکر است که میانگین ضریب رشد ویژه این تیمار در طول دوره در حدود ۱/۳ برابر تیمار شاهد می باشد. بنا بر مطالب عنوان شده می توان تیمار ۳ را به عنوان برترین تیمار و فاصله بین آغاز تغذیه فعال (۱٤ روز پس از هچ) تا ۱۹ روز پس از هچ موثرترین زمان جهت کاربرد پروبیوتیک معرفی نمود

۳-۲-۱-٤- تاثیر *Lactobacillus curvatus* و *Leuconostoc mesenteroides* بر روی سرعت رشد در لارو فیل ماهی

بر اساس جدول ۳-۱۱ حداکثر میزان سرعت رشد متعلق به تیمار ۳ (۲±۲۲/۰۰ میلی گرم/روز)و حداقل متعلق به تیمار ٦ (۰/۱۹±٥/٦٨ میلی گرم/روز) می باشد این در حالی است که تیمار ۳ دریافت کننده حداکثر تعداد *Lactobacillus curvatus* جداسازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی (CFU/gr غذا $۹×۱۰^{۹}$) و تیمار ٦ در یافت کننده حداکثر تعداد *Leuconostoc mesenteroides* جداسازی شده از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی (CFU/gr غذا $۹×۱۰^{۹}$) می باشد. مشابه این نتیجه در بررسی فاکتور وزن، طول و ضریب رشد ویژه نیز مشاهده گردید.مطالعات آماری انجام شده حاکی از وجود اختلاف معنی دار بین دوتیمار ۳ و ٦ با یکدیگر در سطح خطای ٥ درصد می باشد ($P<0.05$).

بر اساس نمودار۳-۱۲ و جدول ۳-۱۱ ، سه تیمار ۳، ۲ و ۱ به ترتیب بیشترین میانگین سرعت رشد را در انتهای دوره پررش و طول دوره پرورش را به خود اختصاص داده است. این در حالی است که باکتری *Lactobacillus curvatus* جداسازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی بر اساس مقادیر تعیین شده به همراه جیره غذایی به آب محیط پرورش این ماهیان در زمان غذادهی افزوده می گردید. بررسیهای آماری صورت گرفته بیانگر وجود اختلاف معنی دار بین تیمار ۳ با تیمارهای ۱ و ۲ در سطح خطای ٥ درصد با یکدیگر می باشد ($P<0.05$). این در حالی است که عدم وجود اختلاف معنی دار بین تیمار ۱ با تیمار ۲، در سطح خطای ٥ درصد به اثبات رسید. ($P>0.05$). بعلاوه ۳ تیمار نامبرده دارای اختلاف معنی دار در سطح خطای ٥ درصد با سایر تیمارها می باشند ($P<0.05$) و تنها استثناء عدم وجود اختلاف معنی دار بین دو تیمار ۱ و ۲ با تیمار ۸ می باشد($P>0.05$).

مطابق با نمودار۳- ۱۲ و جدول ۳-۱۱ سه تیمار ٦، ٥ و ٤ به ترتیب کمترین میانگین سرعت رشد را در در طول دوره پرورش به خود اختصاص داده است. این در حالی است که در این تیمارها، لارو فیل ماهیان از باکتری *Leuconostoc mesenteroides* جداسازی شده از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی بر اساس مقادیر تعیین شده به همراه جیره غذایی به آب افزوده می گردید. مشابه این حالت در ارتباط با فاکتور وزن ، طول و ضریب رشد ویژه نیز مشاهده گردید. بررسیهای آماری صورت گرفته اختلاف معنی دار این سه تیمار را با سایر تیمارها را در سطح خطای ٥ درصد را نشان میدهد ($P<0.05$) بعلاوه ، عدم اختلاف معنی دار این تیمارها با یکدیگر نیز مشاهده گردید ($P>0.05$) .



نمودار۳-۱۲- میانگین تغییرات سرعت رشد (SD±) لارو فیل ماهی در طول دوره پرورش در مراحل متفاوت عملیات زیست سنجی

بر اساس جدول ۳-۱۱ ، در سه تیمار ۷، ۸ و ۹ که به صورت توام از هر دو باکتری ***Lac. curvatus*** و *Leu. mesenteroides* برای تغذیه لارو فیل ماهیان استفاده گردید . بیشترین میانگین سرعت رشد در طول دوره به ترتیب متعلق به ۸ ، ۹ و ۷ می باشد. بررسیهای آماری انجام شده حاکی ازعدم وجود اختلاف معنی دار بین تیمار های نامبرده در سطح خطای ۵ درصد با یکدیگر می باشد ($P>0.05$). مطالعات آماری صورت گرفته بیانگر وجود اختلاف معنی د ار در سطح خطای ۵ درصد بین تیمارهای مذکور با تیمارهای ٤ ، ٥ ، ٦ و ۳ می باشد. ($P<0.05$). از سوی دیگر بین تیمار شاهد و کارگاه تفاوت معنی داری مشاهده نشد ($P>0.05$).

جدول ٣-١١- میانگین سرعت رشد (میلی گرم/روز)(±SD) لارو فیل ماهی در مراحل مختلف پرورش

(n=٣٦٠ در هر تیمار)

مرحله / تیمار	مرحله صفر- مرحله١ (١٤ تا ١٩ روز پس از هچ)	مرحله١- مرحله ٢ (١٩ تا ٢٤ روز پس از هچ)	مرحله ٢-مرحله ٣ (٢٤ تا ٢٩ روز پس از هچ)	مرحله ٣- مرحله ٤ (٢٩ تا ٣٤روز پس از هچ)	مرحله٤- مرحله ٥ (انتهای پرورش لارو تا ١ هفته از ورود به سالن)	مرحله ٥-مرحله ٦ (١ تا ٢ هفته پس از ورود به سالن پرورش)	میانگین در طول دوره (میلی گرم/روز)
تیمار ١	٢١/٤±٢	١٤/٦±٢	١٤/٤±٠/٤١	٩/٣٧±٠/١	١٠/٤٩±٠/٩	١٥/٩±٠/٨	١٤/٣٤±١
تیمار ٢	٢٤/٠±٣	١٨/٠٠±٣	٩/٠٠±٠/٣	١٢/٤±١	١٢/٦±٠/٨	١٥/٢٣±١	١٥/١٦±١/٢
تیمار ٣	٤٢/٠±٤	٢٩/٤±٢	١١/٦±١	٩/٨٤±٠/٨	٢٤/٠٢±١	١٦/٣٢±١	٢٢/٠٠±٢
تیمار ٤	١٣/٠±٢	١/٠٠±١	١/٦٩±٠/١	١/٤±٠/٤	٩/٣٣±٠/٩١	٨/٨٠±٠/٣	٥/٦٨±٠/٣
تیمار ٥	٩/٧±١	٢/٦٠±٣/٣	٣/٩٧±١	١/٦±١/٠٣	٩/٦٨±٠/٩	٧/٥±٠/٩	٥/٤±٠/٩

تیمار ۶	۸/۰۰±۰/۷	۴/۸±۲/۵	۲/۲±۱/۳	۲/۲۶±۰/۹	۹/۱۵±۰/۹	۷/۳±۰/۸	۵/۱±۰/۱۹
تیمار ۷	۱۳/۰۰±۱	۹/۰۰±۲	۷/۰۰±۱/۷	۳/۰۸±۰/۲	۱۲/۰۲±۱	۱۰/۹±۰/۱	۹/۱۹±۱/۰۱
تیمار ۸	۲۴/۰۰±۳	۱۲/۰۰±۱	۶/۰۰±۰/۹	۸/۰۲±۰/۹	۱۶/۹۲±۱	۳/۲۱±۰/۲	۱۱/۷±۱
تیمار ۹	۱۴/۰۰±۱	۱۰/۰۰±۱	۶/۰۰±۰/۹	۴/۰۰±۰/۵	۱۳/۱۷±۰/۸	۱۳/۱۰±۱	۱۰/۴±۰/۵۱
شاهد	۹/۶±۰/۵	۱۰/۰۰±۰/۵	۱۴/۰۰±۰/۴	۹/۶±۰/۶	۸/۰۱±۰/۲۰	۷/۱۳±۰/۹	۹/۸±۰/۶۰
کارگاه	۹/۷±۰/۵	۸/۹۶±۰/۴	۱۴/۰۰±۰/۵	۸/۹±۰/۶	۷/۰۰±۰/۳	۷/۶±۰/۷	۹/۹۷±۰/۷۰

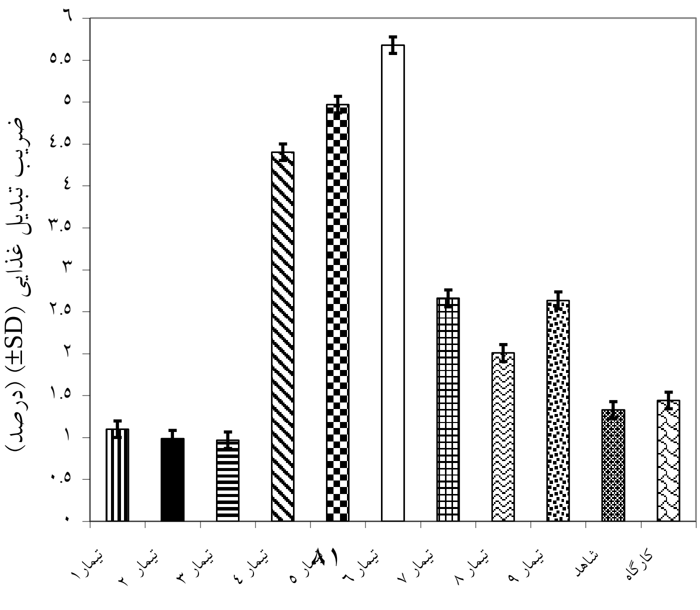
بررسی دقیقتر جدول نشان می دهد که بیشترین میزان سرعت رشد متعلق به مرحله نخست پرورش لاروی و یا فاصله بین آغاز تغذیه فعال یا مرحله صفر تا ۵ روز بعد یعنی ۱۹ روز پس از هچ در تمام تیمارها می باشد که اختلاف معنی داری بین این مرحله با سایر مراحل در تمام تیمارها مشهود است. در این مرحله از پرورش لاروی بیشترین میزان سرعت رشد نیز به ترتیب متعلق به تیمارهای ۳ ، ۲ و ۱ می باشد و در بین این سه تیمار، تیمار ۳ حد اکثر میزان سرعت رشد (۴±۰۰/ ۴۲ میلی گرم/ روز) را نه تنها در این مرحله از پرورش لاروی، بلکه در سایر مراحل نیز به خود اختصاص داده است. میزان سرعت رشد تیمار۳ در این مرحله در حدود ۴ برابر تیمار شاهد می باشد. لازم بذکر است که میانگین سرعت رشد این تیمار در طول دوره در حدود ۲/۳ برابر تیمار شاهد می باشد.

بنا بر مطالب عنوان شده می توان تیمار ۳ را به عنوان برترین تیمار و فاصله بین آغاز تغذیه فعال (۱۴ روز پس از هچ) تا ۱۹ روز پس از هچ موثرترین زمان جهت کاربرد پروبیوتیک معرفی نمود.

۳-۲-۱-۵- تاثیر *Lactobacillus curvatus* و *Leuconostoc mesenteroides* بر روی ضریب تبدیل غذایی در لارو فیل ماهی

بر اساس جدول ۳-۱۲ حداکثر میزان ضریب تبدیل غذایی متعلق به تیمار ٦ (۰/۱۹±٥/٦۰ درصد)و حداقل متعلق به تیمار ۳ (۰/۰۲±۰/۹٦ درصد) می باشد این در حالی است که تیمار ۳ دریافت کننده حداکثر تعداد *Lactobacillus curvatus* جداسازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی (غذا CFU/gr $۹×۱۰^{۹}$) و تیمار ٦ در یافت کننده حداکثر تعداد *Leuconostoc mesenteroides* جداسازی شده از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی (غذا CFU/gr $۹×۱۰^{۹}$) می باشد. عکس این نتیجه در بررسی فاکتور وزن، طول ، ضریب رشد ویژه و سرعت رشد مشاهده گردید. مطالعات آماری انجام شده حاکی از وجود اختلاف معنی دار بین دوتیمار ۳ و ٦ با یکدیگر در سطح خطای ٥ درصد می باشد ($P<0.05$).

بر اساس نمودار۳-۱۳ و جدول ۳-۱۲ ، سه تیمار ۳، ۲ و ۱ به ترتیب کمترین میانگین ضریب تبدیل غذایی را در انتهای دوره پررش و طول دوره پرورش را به خود اختصاص داده است. این در حالی است که باکتری *Lactobacillus curvatus* جداسازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی با تعداد مختلف به همراه جیره غذایی به آب این ماهیان ، افزوده می گردید. بررسیهای آماری صورت گرفته بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ٥ درصد بین تیمارهای مذکور با یکدیگر می باشند ($P>0.05$). بعلاوه تفاوت آماری معنی دار در سطح خطای ٥ درصد بین تیمارهای ۱، ۲ و ۳ با سایر تیمارها مشخص گردید ($P<0.05$).مطابق با نمودار۳- ۱۳ و جدول ۳-۱۲ سه تیمار ٦، ٥ و ٤ به ترتیب بیشترین میانگین ضریب تبدیل غذایی را در در طول دوره پرورش به خود اختصاص داده است. این در حالی است که در این تیمارها، لارو فیل ماهیان از باکتری *Leuconostoc mesenteroides* جداسازی شده از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی با تعداد مختلف به همراه جیره غذایی به آب افزوده می گردید عکس این نتیجه در بررسی فاکتور وزن، طول ، ضریب رشد ویژه و سرعت رشد نیز مشاهده گردید. بررسیهای آماری صورت گرفته اختلاف معنی دار این سه تیمار را با سایر تیمارها در سطح خطای ٥ درصد نشان میدهد ($P<0.05$) بعلاوه ، عدم اختلاف معنی دار این تیمارها با یکدیگر نیز مشاهده گردید ($P>0.05$) .



نمودار۳-۱۳- میانگین تغییرات ضریب تبدیل غذایی (SD±) لارو فیل ماهی در طول دوره پرورش در مراحل متفاوت عملیات زیست سنجی

بر اساس نتایج عنوان شده می توان نتیجه گیری نمود، با افزایش تعداد باکتری *Leuconostoc mesenteroides* دریافتی بوسیله فیل ماهیان میزان ضریب تبدیل غذایی در لاروها افزایش می یابد. این در حالی است که در سه تیمار ۱، ۲ و ۳ با افزایش تعداد باکتری *Lactobacillus curvatus* دریافتی بوسیله لارو فیل ماهی میزان ضریب تبدیل غذایی در لاروها کاهش می یابد.

جدول ۳-۱۲- میانگین ضریب تبدیل غذایی (درصد)(SD±) لارو فیل ماهی در دوره پرورش

(n=۳۶۰ در هر تیمار)

مرحله / تیمار	مرحله صفر– مرحله ۱ (۱۴ تا ۱۹ روز پس از هچ)	مرحله۱– مرحله ۲ (۱۹ تا ۲۴ روز پس از هچ)	مرحله ۲–مرحله ۳ (۲۴ تا ۲۹ روز پس از هچ)	مرحله ۳– مرحله ۴ (۲۹ تا ۳۴روز پس از هچ)	مرحله۴– مرحله ۵ (انتهای پرورش لارو تا ۱ هفته از ورود به سالن)	مرحله ۵–مرحله ۶ (۱ تا ۲ هفته پس از ورود به سالن پرورش)	میانگین در طول دوره (درصد)

تیمار ١	٠/٧١±٠/٠٣	٠/٩٣±٠/٠٥	١/٥٩±٠/١٢	١/٦ ±٠/١	١/٤٩±٠/٩	٠/٨±٠/٠٨	١/١٠±٠/١
تیمار ٢	٠/٦٠±٠/٠١	٠/٧٦±٠/٠٧	١/٤٤±٠/٣	١/٢١±٠/٤	٠/٨٦±٠/٠٨	٠/٨٤±٠/٠٨	٠/٩٨±٠/٠٢
تیمار ٣	٠/٤٨±٠/٠٢	٠/٥٥±٠/٠١	١/٥٥±٠/٣	١/٣٨±٠/٢	١/١٨±٠/١	٠/٨٦±٠/٠٨	٠/٩٦±٠/٠٢
تیمار ٤	٣/٢١±٠/٥	٥/٥±٠/٦	٥/٧±٠/١	٦/٤±٠/٤	٣/٤±٠/٢	٢/٣٠±٠/١	٤/٤٠±٠/٩
تیمار ٥	٤/٢٥±٠/٩	٤/٧٥±٠/٧	٦/٢١±٠/٧	٨/٤±٠/٩	٣/٧±٠/١	٢/٤٠±٠/٢	٤/٩±٠/٩
تیمار ٦	٤/٩٥±٠/٥	٥/٢٥±٠/٧	٧/٨١±٠/٦	٧/٣±٠/٨	٤/١±٠/٤	٣/٧±٠/٦	٥/٦±٠/١٩
تیمار ٧	٢/١٠±٠/٢	٢/٣٠±٠/٣	٣/٩±٠/٧	٣/٦±٠/٢	٢/١٢±٠/٤	١/٩±٠/١	٢/٦٩±٠/١
تیمار ٨	١/٤٣±٠/٤	١/٥٣±٠/٣	٢/٨١±٠/٩	٢/٨٥±٠/٩	١/٨٢±٠/٣	١/٦١±٠/٢	٢/٠٠±٠/٣
تیمار ٩	٢/٨٠±٠/٥	٣/٠٠±٠/٦	٢/١٧±٠/٩	٣/٢٣±٠/٥	٢/٧٧±٠/٣	١/٨١±٠/١	٢/٦٣±٠/٥١
شاهد	١/٥±٠/٥	١/٣٠±٠/٥	١/٢٠±٠/٤	١/٤±٠/٦	١/٣١±٠/٢٠	١/٢±٠/٤	١/٣٢±٠/٦٠
کارگاه	١/٥٧±٠/٥	١/٤٦±٠/٤	١/٣٠±٠/٥	١/٣٥±٠/٦	١/٩٨±٠/٣	١/٠٣±٠/٧	١/٤٧±٠/٧٠

بر اساس جدول ۳-۱۲ ، در سه تیمار ۷، ۸ و ۹ که به صورت توام از هر دو باکتری *Lac. curvatus* و *Leu. mesenteroides* برای تغذیه لارو فیل ماهیان استفاده گردید .کمترین میانگین ضریب تبدیل غذایی در طول دوره به ترتیب متعلق به ۸ ، ۹ و ۷ می باشد. بررسیهای آماری انجام شده حاکی ازعدم وجود اختلاف معنی دار بین تیمار های نامبرده در سطح خطای ۵ درصد با یکدیگر می باشد ($P>0.05$).

این در حالی است که اختلاف معنی د ار در سطح خطای ۵ درصد بین تیمارهای مذکور با سایر تیمارها باثبات رسید ($P<0.05$).

مطالعات آماری صورت گرفته نیز حاکی از عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ۵ درصد بین تیمار شاهد با کارگاه می باشد ($P>0.05$) و مقادیر ضریب تبدیل غذایی در این دو تیمار در مقایسه با تیمارهایی که به تنهایی و یابصورت مختلط از باکتری *Leuconostoc mesenteroides* استفاده می نمایند، کمتر است.

۳-۲-۲- تاثیر *Lactobacillus curvatus* و *Leuconostoc mesenteroides* بر روی شاخصهای رشددر لارو تاسماهی ایرانی

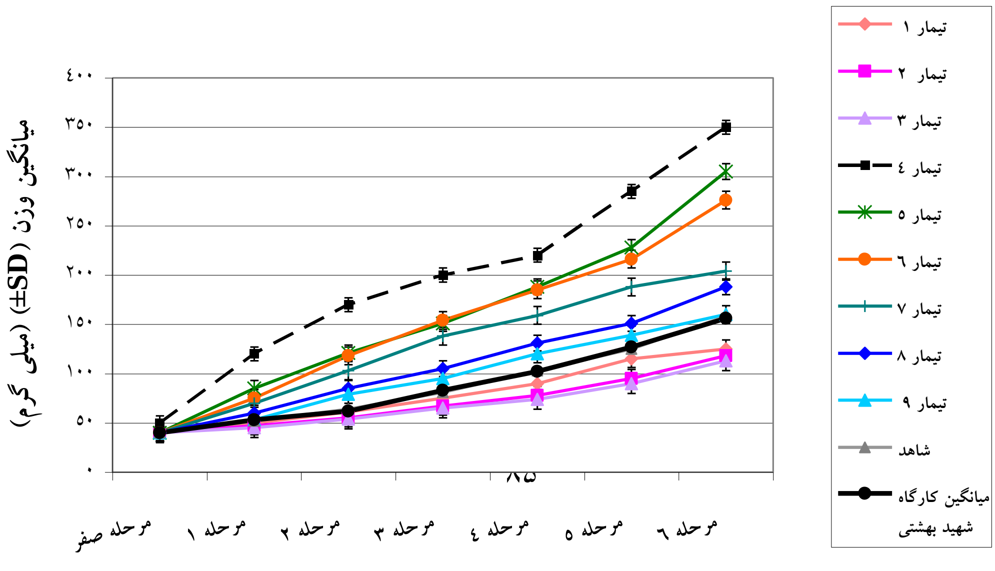
۳-۲-۲-۱- تاثیر *Lb. curvatus* و *Leu. mesenteroides* بر روی میانگین وزن لارو تاسماهی ایرانی

بر اساس جدول ۳-۱۳ و نمودار ۳-۱٤ حداکثر میزان وزن در مراحل مختلف بیو متری متعلق به تیمار ٤ و حداقل متعلق به تیمار ۳ می باشد که تیمار ۳ دریافت کننده حداکثر تعداد *Lactobacillus curvatus* جداسازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی (۹×۱۰^۹ CFU/gr غذا) و تیمار ٤ در یافت کننده حداقل تعداد *Leuconostoc mesenteroides* جداسازی شده از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی (۲×۱۰^۹ CFU/gr غذا) می باشد. مطالعات آماری انجام شده حاکی از وجود اختلاف معنی دار بین ۳ و ٤ با یکدیگر در سطح خطای ۵ درصد می باشد

مطالعه بیشترنمودار۳- ۱٤ و جدول ۳- ۱۳ نشان می دهد که سه تیمار ۳، ۲ و ۱ به ترتیب کمترین میانگین وزن را در طول دوره پررش به خود اختصاص داده است. این در حالی است که باکتری *Lactobacillus curvatus* جداسازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی با تعداد مختلف به همراه جیره

غذایی به آب این ماهیان ، افزوده می گردید. بررسیهای آماری صورت گرفته بیانگر عدم اختلاف معنی دار این سه تیمار با یکدیگر می باشد ($P>0.05$). بعلاوه وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ٥ درصد بین تیمارهای ١، ٢ و ٣ با سایر تیمارها بجز تیمارهای کارگاه و شاهد باثبات رسید ($P<0.05$).

بر اساس نمودار٣-١٤ و جدول ٣- ١٣ ، سه تیمار ٤، ٥ و ٦ به ترتیب بیشترین میانگین وزن را در طول دوره پرورش به خود اختصاص داده است. این در حالی است که در این تیمارها، لارو تاسماهی از باکتری *Leuconostoc mesenteroides* جداسازی شده از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی با تعداد مختلف به همراه جیره غذایی به آب افزوده می گردید و تیماری که کمترین تعداد باکتری مذکور را در جیره غذایی خود دریافت می دارد (٢×١٠[٩] CFU/gr غذا) دارای بالاترین میزان رشد می باشد . بعلاوه بررسیهای آماری صورت گرفته اختلاف معنی دار این سه تیمار را با سایر تیمارها در سطح خطای ٥ درصد نشان میدهد ($P<0.05$). عدم اختلاف معنی دار بین تیمار٥ و ٦ با یکدیگر مشاهده گردید ($P>0.05$) اما وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ٥ درصد بین تیمار٥ و ٦ با تیمار ٤ باثبات رسید ($P<0.05$).



نمودار۳-۱۴- میانگین تغییرات وزن (±SD) لارو تاسماهی در طول دوره پرورش در مراحل متفاوت عملیات

زیست سنجی

جدول ۳-۱۳- میانگین وزن (میلی گرم)(±SD) لارو تاسماهی ایرانی در دوره پرورش (n=۳۶۰ در هر تیمار)

مرحله / تیمار	مرحله صفر (آغاز تغذیه فعال/ ۱۴ روز پس از هچ)	مرحله۱ (۱۹ روز پس از هچ)	مرحله ۲ (۲۴ روز پس از هچ)	مرحله ۳ (۲۹ روز پس از هچ)	مرحله ٤ (۳٤ روز پس از هچ)	مرحله ۵ (یکهفته پس از ورود به سالن پرورش)	مرحله ٦ (دو هفته پس از ورود به سالن پرورش)
تیمار ۱	٤٠±۱/۱	٤۹/۳۳±۱/۲	٦٠/٦±٠/٥٧	٧٦/٥±٠/٧	۹٠/۳۳±۱/۱	۱۱٤±٠/٦	۱۲٥±٠/٨
تیمار ۲	٤٠±٠/٥۲	٤٧/٦٦±۱/۱	٥٨/٠٠±۱/۱	٦٦/٦±٠/٥	٧٨/۳۳±٠/٥	٧٨±٠/٥	۱۱٧±۱/۱
تیمار ۳	٤٠±٠/٥۳	٤٤/۲٥±٠/۲	٥۳/٦±٠/٥٧	٦٥/٥±٠/٦	٧۳/۳۳±٠/٥۱	۹٠±٠/٥	۱۱۳±٠/۹

تیمار ٤	٤٠±٠/٥٢	١١٩/٠±١/١	١٦٩/٠±٢/٢	١٩٩±٠/٦	٢١٩/٣±٠/٧٠	٢٨٩±٠/٧	٣٤٩±٠/٥
تیمار ٥	٤٠±٠/٥٢	٨٤/٧٥±٠/٧	١٢١/١±٠/٧	١٥٠±٠/٩	١٨٧/٧±١/١	٢٢٨±١/٢	٣٠٥±٠/٩
تیمار٦	٤٠±٠/٥٣	٧٥/٢٥±٠/٩	١١٧/٣±٠/٦	١٥٤±١/٨	١٨٥/١±٢/٤	٢١٥±٢/٦	٢٧٦±١/١٩
تیمار ٧	٤٠±٠/٥٢	٧٠/٣٠±١/٣	١٠٢/٩±٠/٧	١٣٨±٢/٢	١٥٩/١٢±١/٤	١٨٧±٢/١	٢٠٤±٢/١
تیمار ٨	٤٠±٠/٥٧	٥٩/٥٣±٠/٣	٨٤/٨١±٠/٩	١٠٤±١/٩	١٣١/٨٢±١/٣	١٥١±٢/٢	١٨٧±١/٣
تیمار ٩	٤٠±٠/٥٥	٥٣/٠٠±٠/٦	٧٧/١٧±٢/٩	٩٤/٣±١/٥	١٢٠/٧٧±٢/٣	١٣٩±١/١	١٦٠±٢/٥١
شاهد	٤٠±٠/٥٥	٥٢/٣٠±٠/٥	٦٢/٢٠±١/٤	٨٢/٤±١/٦	١٠١/٣١±٢/٢٠	١٢٦±١/٤	١٥٥±١/٦٠
کارگاه	٤٠±٠/٥٨	٦٤/٤٦±١/٤	٨٨/٣٠±٢/٥	١١٠±١/٦	١٣١/٩٨±٢/٣	١٥٩±٢/٧	١٩٥±٢/٧٠

بـر اسـاس جـدول ٣-١٤ باکـاهش تعـداد بـاکتری ***Leuconostoc mesenteroides*** دریـافتی بوسـیله تاسماهیان میزان وزن آنها افزایش می یابد. این در حالی است که در سه تیمار ۱، ۲ و ۳ بـا افـزایش تعـداد باکتری ***Lactobacillus curvatus*** دریافتی بوسیله لاروتاسماهی ایرانی ،با کاهش چشمگیر وزن لاروها مواجه می گردیم.

در سه تیمار ۷، ۸ و ۹ که به صورت توام از هر دو باکتری ***Lac. curvatus*** و ***Leu. mesenteroides***

برای تغذیه لارو فیل ماهیان استفاده گردید بیشترین میزان وزن در انتهای دوره به ترتیب متعلق به ۷ ، ۸ و ۹ می باشد. بررسیهای آماری انجام شده حاکی از وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ۵ درصد بین تیمار ۷ با تیمار ۹ می باشد ($P<0.05$). اما اختلاف معنی داری بین تیمار ۸ با تیمارهای ۷ و ۹ مشاهده نگردید ($P>0.05$). اختلاف معنی داری در سطح خطای ۵ درصد، بین این سه تیمار بـا سـایر تیمارهـا مشـاهده

گردید ($P<0.05$). تنها در مورد تیمارهای ۸ و ۹ اختلاف معنی داری با تیمارهای شاهد و کارگاه مشاهده نگردید ($P>0.05$).

مطالعات آماری صورت گرفته بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ۵ درصد بین تیمار شاهد با کارگاه شهید بهشتی می باشد ($P>0.05$)

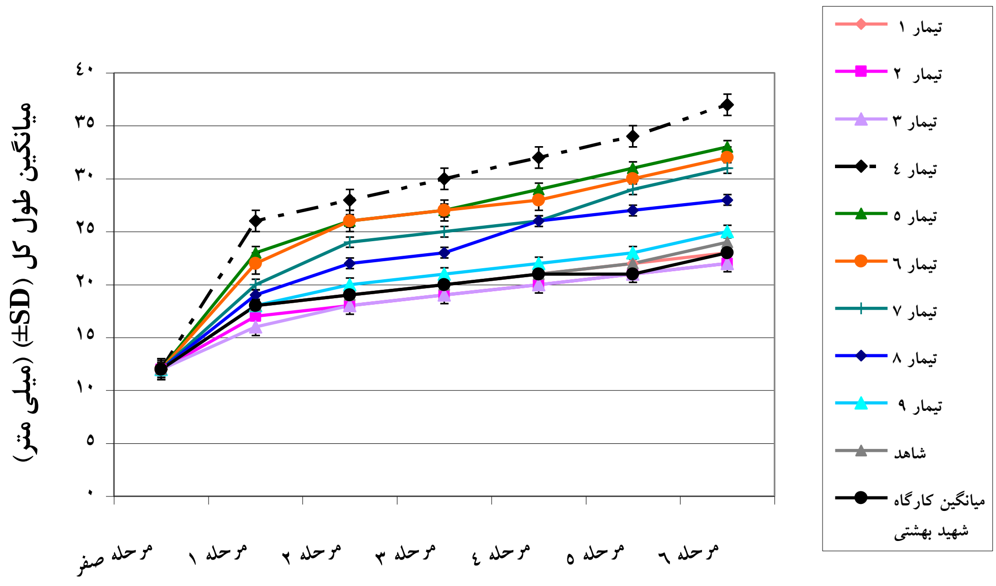
۳-۲-۲-۲- تاثیر *Lactobacillus curvatus* و *Leuconostoc mesenteroides* بر روی میانگین طول لارو تاسماهی ایرانی

بر اساس جدول ۳-۱٤ حداکثر میزان طول در مراحل مختلف بیو متری متعلق به تیمار ٤ و حداقل متعلق به تیمار ۳ می باشد این در حالی است که تیمار ۳ دریافت کننده حداکثر تعداد *Lb. curvatus* جداسازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی (9×10^9 CFU/gr غذا) و تیمار ٤ در یافت کننده حداکثر تعداد *Leu. mesenteroides* جداسازی شده از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی (2×10^9 CFU/gr غذا) می باشد. مشابه این نتیجه در بررسی فاکتور وزن نیز مشاهده گردید.مطالعات آماری انجام شده حاکی از وجود اختلاف معنی دار بین ۳ و ٤ با یکدیگر در سطح خطای ۵ درصد می باشد ($P<0.05$) .

مروری بر روی نمودار۳-۱۵ و جدول ۳-۱٤ نشان می دهد، سه تیمار ۳، ۲ و ۱ به ترتیب کمترین میانگین طول را در طول دوره پرورش به خود اختصاص داده است. این در حالی است که باکتری *Lb. curvatus* جداسازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی با تعداد مختلف به همراه جیره غذایی به آب این ماهیان ، افزوده می گردید. بررسیهای آماری صورت گرفته عدم اختلاف معنی دار بین تیمارهای مذکور با یکدیگر را در سطح خطای ه درصد ($P>0.05$) نشان می دهد. مطالعات انجام شده بیانگر وجود اختلاف معنی دار تیمارهای ۱ ، ۲ و ۳ با سایر تیمارها بجز تیمارهای ۹ ، شاهد و کارگاه می باشد. ($P<0.05$).

مطابق با نمودار۳-۱۵ سه تیمار ٤، ۵ و ٦ به ترتیب بیشترین میانگین طول را در طول دوره پرورش (جدول ۳-۱٤) به خود اختصاص داده است. این در حالی است که در این تیمارها، لاروتاسماهیان از باکتری *Leuconostoc mesenteroides* جداسازی شده از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی که با تعداد مختلف به همراه جیره غذایی به آب افزوده می گردید، استفاده می نمودند. مشابه این حالت در ارتباط با فاکتور وزن نیز مشاهده گردید. بررسیهای آماری صورت گرفته بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ۵ درصد بین تیمارها با یکدیگر می باشد ($P>0.05$). تفاوت معنی داری در سطح خطای ۵ درصد بین تیمارهای ٤ ، ۵ و ٦ با سایر تیمارها بجز تیمار ۷ مشخص گردید ($P<0.05$) بنا بر نتایج ارائه شده و بر اساس جدول ۳-۱٤ با کاهش تعداد باکتری *Leu. mesenteroides* دریافتی بوسیله تاسماهیان میزان

طول آنها افزایش می یابد. این در حالی است که در سه تیمار ۱، ۲ و ۳ با افزایش تعداد باکتری *Lb. curvatus* دریافتی بوسیله لارو تاسماهی میزان طول آنها کاهش می یابد.



نمودار۳-۱۵- میانگین تغییرات طول (±SD) لارو تاسماهی ایرانی در طول دوره پرورش در مراحل متفاوت عملیات

زیست سنجی

بر اساس جدول ۳- ١٤، در سه تیمار ۷، ۸ و ۹ که به صورت توام از هر دو باکتری *Lb. curvatus* و *Leu. mesenteroides* برای تغذیه لارو فیل ماهیان استفاده گردید بیشترین میزان طول در انتهای دوره به ترتیب متعلق به تیمارهای ۷ ، ۸ و ۹ می باشد. بررسیهای آماری انجام شده حاکی از عدم وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها با یکدیگر در سطح خطای ۵ درصد می باشد ($P > 0.05$). بعلاوه اختلاف معنی داری در سطح خطای ۵ درصد بین تیمارهای مذکور با سایر تیمارها مشاهده گردید ($P<0.05$). اگرچه در مورد تیمار ۷ اختلاف آماری معنی داری بین این تیمار با تیمارهای ٤ ، ٥ و ٦ و تیمار ۹ با تیمارهای شاهد و کارگاه مشاهده نگردید ($P>0.05$).

جدول ۳-۱٤- میانگین تغییرات طول (میلیمتر)(±SD) لارو تاسماهی در مراحل مختلف پرورش

(n=۳٦۰ در هر تیمار)

مرحله / تیمار	مرحله صفر (آغاز تغذیه فعال/ ۱٤ روز پس از هچ)	مرحله۱ (۱۹ روز پس از هچ)	مرحله ۲ (۲٤ روز پس از هچ)	مرحله ۳ (۲۹ روز پس از هچ)	مرحله ٤ (۳٤ روز پس از هچ)	مرحله ٥ (یکهفته پس از ورود به سالن پرورش)	مرحله ٦ (دو هفته پس از ورود به سالن پرورش)
تیمار ۱	۱۲±۱	۱۸±۱	۱۹±۱	۲۰±۲	۲۰±۲	۲۲±۲	۲۳±۱
تیمار ۲	۱۲±۲	۱۷±۲	۱۸±۱	۱۹±۳	۲۰±۱	۲۰±۱	۲۲±۳
تیمار ۳	۱۲±۱	۱٦±۱	۱۸±۱	۱۹±۲	۲۰±۳	۲۰±۳	۲۲±۳
تیمار ٤	۱۲±۱	۲٦±۱	۲۸±۲	۳۰±۱	۳۱±۲	۳٤±۲	۳۷±۲
تیمار ٥	۱۲±۱	۲۳±۱	۲٦±۱	۲۷±۲	۲۹±۲	۳۱±۲	۳۳±۲
تیمار٦	۱۲±۲	۲۲±۲	۲٦±۱	۲۷±۱	۲۸±۱	۳۰±۱	۳۲±۱
تیمار ۷	۱۲±۳	۲۰±٥	۲٤±۲	۲٥±۲	۲٦±۲	۲۹±۲	۳۰±۳
تیمار ۸	۱۲±۱	۱۹±۳	۲۲±۳	۲۳±۳	۲٦±۳	۲۷±۳	۲۸±۳
تیمار ۹	۱۲±۲	۱۸±۱	۲۰±۱	۲۱±۲	۲۲±۲	۲۳±۲	۲٥±۲
شاهد	۱۲±۳	۱۸±۲	۱۹±۲	۲۰±۲	۲۱±۱	۲۲±۱	۲٤±۳
کارگاه	۱۲±۱	۱۸±۳	۱۹±۲	۲۰±۳	۲۱±۲	۲۱±۲	۲۳±۳

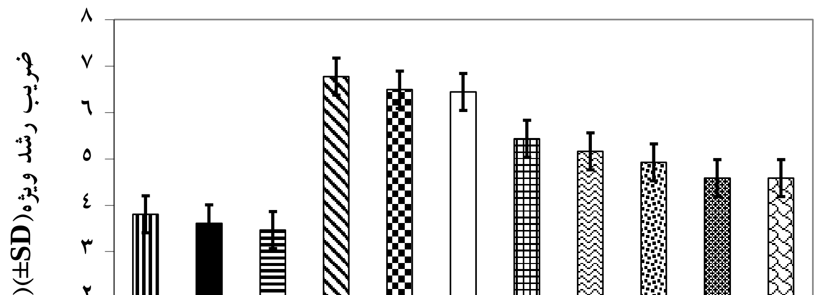
۳-۲-۲-۳- تاثیر *Lactobacillus curvatus* و *Leuconostoc mesenteroides* بر روی ضریب رشد ویژه در لارو تاسماهی ایرانی

بر اساس جدول ۳- ۱۵ حداکثر میزان ضریب رشد ویژه متعلق به تیمار ٤ (۰/۱۲±٦/۷۷درصد)و حداقل متعلق به تیمار ۳ (۰/۱۱±۳/۷۵) می باشد این در حالی است که تیمار ۳ دریافت کننده حداکثر تعداد *Lactobacillus curvatus* جداسازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی (غذا CFU/gr ۹×۱۰^۹) و تیمار ٦ در یافت کننده حداقل تعداد *Leuconostoc mesenteroides* جداسازی شده از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی (غذا CFU/gr ۲×۱۰^۹) می باشد. مشابه این نتیجه در بررسی فاکتور وزن و طول نیز مشاهده گردید.مطالعات آماری انجام شده حاکی از وجود اختلاف معنی دار بین ۳ و ٤ با یکدیگر در سطح خطای ۵ درصد می باشد ($P<0.05$).

برررسی نمودار۳- ١٦ و جدول ۳- ۱۵ نشان می دهد که سه تیمار ۳، ۲ و ۱ به ترتیب کمترین میانگین ضریب رشد ویژه را در طول دوره پرورش به خود اختصاص داده است. این در حالی است که باکتری *Lactobacillus curvatus* جداسازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی با تعداد مختلف به همراه جیره غذایی به آب این ماهیان ، افزوده می گردید. بررسیهای آماری صورت گرفته بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار بین تیمارهای ۱ ، ۲ و ۳ در سطح خطای ۵ درصد با یکدیگر ($P>0.05$) می باشد. مطالعات صورت گرفته بیانگر ، وجود اختلاف معنی دار بین تیمارهای نامبره در سطح خطای ۵ درصد با سایر تیمارها می باشد ($P<0.05$).

طبق نمودار۳- ١٦ و جدول ۳- ۱۵ سه تیمار ٤، ۵ و ٦ به ترتیب بیشترین میانگین ضریب رشد ویژه را در طول دوره پرورش به خود اختصاص داده است. این در حالی است که در این تیمارها، لاروتاسماهیان از باکتری *Leuconostoc mesenteroides* جداسازی شده از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی بر اساس مقادیر تعیین شده به همراه جیره غذایی به آب افزوده می گردید. مشابه این حالت در ارتباط با فاکتور وزن و طول نیز مشاهده گردید. بررسیهای آماری صورت گرفته اختلاف معنی دار این سه تیمار را با سایر تیمارها در سطح خطای ۵ درصد نشان میدهد ($P<0.05$) بعلاوه ، عدم اختلاف معنی دار این تیمارها با یکدیگر نیز مشاهده گردید ($P>0.05$) .

بنا بر نتایج ارائه شده می توان نتیجه گیری نمود با کاهش تعداد باکتری *Leuconostoc mesenteroides* دریافتی بوسیله تاسماهیان میزان ضریب رشد ویژه آنها نیز افزایش می یابد. این در حالی است که در سه تیمار ۱، ۲ و ۳ با افزایش تعداد باکتری *Lactobacillus curvatus* دریافتی بوسیله لارو تاسماهی میزان ضریب رشد ویژه آنها کاهش می یابد.



نمودار۳- ۱۶- میانگین تغییرات ضریب رشد ویژه (SD±) لارو تاسماهی ایرانی در طول دوره پرورش در مراحل متفاوت عملیات زیست سنجی

مطابق با جدول ۳- ۱۵ ، در سه تیمار ۷، ۸ و ۹ ،که به صورت توام از هر دو باکتری ***Lb. curvatus*** و *Leu. mesenteroides* برای تغذیه لارو فیل ماهیان استفاده گردید، بیشترین میزان ضریب رشد ویژه در انتهای دوره به ترتیب متعلق به ۷ ، ۸ و ۹ می باشد. بررسیهای آماری انجام شده حاکی ازعدم وجود اختلاف معنی دار بین دو تیمار ۷ و ۸ در سطح خطای ۵ درصد با یکدیگر می باشد ($P>0.05$) این در حالی است که تیمارهای ۷ و ۸ دارای اختلاف معنی داری با تیمار ۹ می باشند ($P<0.05$).

مطالعات آماری صورت گرفته بیانگر وجود اختلاف معنی د ار در سطح خطای ۵ درصد بین سه تیمار مورد نظر با سایر تیمارها می باشد ($P<0.05$) و تنها استثناء عدم وجود اختلاف معنی دار بین تیمار ۹ با تیمارهای شاهد و کارگاه است ($P>0.05$).مطالعات آماری صورت گرفته حاکی از عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ۵ درصد بین تیمار شاهد با کارگاه می باشد ($P>0.05$).

جدول ۳-۱۵- میانگین ضریب رشد ویژه (٪)(SD±) لارو تاسماهی در مراحل مختلف پرورش

(n=۳٦٠ در هر تیمار)

مرحله / تیمار	مرحله صفر– مرحله ۱ (۱۴ تا ۱۹ روز پس از هچ)	مرحله۱– مرحله ۲ (۱۹ تا ۲۴ روز پس از هچ)	مرحله ۲–مرحله ۳ (۲۴ تا ۲۹ روز پس از هچ)	مرحله ۳– مرحله ۴ (۲۹ تا ۳۴روز پس از هچ)	مرحله۴– مرحله ۵ (انتهای پرورش لارو تا ۱ هفته از ورود به سالن)	مرحله ۵–مرحله ۶ (۱ تا ۲ هفته پس از ورود به سالن پرورش)	میانگین در طول دوره (درصد)
تیما ر ۱	۴/۴۶±۰/۴	/۹۸±۰/۱۲ ۳	/۱۳±۰/۳۲ ۴	۳/۶۴±۰/۱۰	۴/۹۰±۰/۲	۱/۶±۰/۲۱	۳/۷۹±۰/۲۱
تیما ر ۲	۳/۲±۰/۸	/۱۲±۰/۰۳ ۳	/۹۵±۰/۶۳ ۳	۳/۰۶±۰/۳۲	۳/۹۳±۰/۲	۴/۳±۰/۲۰	۳/۶۰±۰/۲۰
تیما ر ۳	۲/۳۵±۰/۲	۳/۶۴±۰/۹	/۷۰±۰/۴۱ ۳	۲/۵۹±۰/۷۲	۳/۹۱±۰/۱	۴/۵±۰/۱۲	۳/۴۶±۰/۱۲
تیما ر ۴	/۰۷±۲/۶ ۲۲	/۹۸±۰/۹۳ ۶	/۲۵±۰/۴۱ ۳	۱/۹۰±۰/۲۱	۵/۱۷±۰/۳	۴/۱±۰/۱۱	۶/۷۷±۰/۱۱
تیما ر ۵	/۰۸±۱/۶ ۱۵	/۰۸±۰/۹۷ ۷	/۴۲±۰/۱۵ ۴	۴/۳۸±۰/۱۵	۳/۸۶±۰/۲	۵/۸±۰/۱۵	۶/۴۸±۰/۱۵
تیما ر۶	/۶۴±۱/۵ ۱۲	۹/۰۹±۰/۹	/۳۲±۰/۵۳ ۵	۳/۶۵±۰/۱۲	۳/۰۹±۰/۵	۴/۹±۰/۳۱	۶/۴۳±۰/۳۱
تیما	/۱۶±۱/۱ ۱۱	/۷۵±۰/۹۴ ۷	/۹۹±۰/۱۸ ۴	۵/۸۳±۰/۶۴	۲/۸۲±۰/۱۰	۳/۳۰±۰/۱	۵/۴۳±۰/۱۸

ر ۷							
تیمار ۸	۸/۱۷±۰/۸	/۹۹±۰/۳۹ ۶	/۲۳±۰/۵۳ ۴	۴/۴۳±۰/۲۴	۲/۸۴±۰/۵	۴/۳±۰/۱۶	۵/۱۵±۰/۱۶
تیمار ۹	۵/۶۱±۰/۹	/۹۱±۰/۱۲ ۷	/۷۷±۰/۱۳ ۳	۴/۶۷±۰/۴۸	۲/۹۲±۰/۱	۲/۸±۰/۳۰	۴/۹۲±۰/۳۰
شاهد	۵/۵۰±۰/۴	/۰۸±۰/۵۱ ۵	/۷۴±۰/۵۳ ۴	۴/۸۱±۰/۲۰	۳/۸۶±۰/۱	۵/۱±۰/۵۱	۴/۵۷±۰/۵۱
کارگاه	۵/۶۲±۰/۵	/۱۶±۰/۱۴ ۳	/۷۷±۰/۴۳ ۵	۴/۱۷±۰/۴۳	۴/۳۸±۰/۷	۴/۱±۰/۶۰	۴/۵۸±۰/۶۰

بررسی دقیقتر جدول و مطالعه میزان ضریب رشد در مراحل متفاوت پرورش در سه تیمار ۴ ، ۵ و ۶ نشان می دهد که بیشترین میزان ضریب رشد ویژه متعلق به مرحله نخست پرورش لاروی و یا فاصله بین آغاز تغذیه فعال یا مرحله صفر تا ۵ روز بعد یعنی ۱۹ روز پس از هچ در تمام تیمارها می باشد که اختلاف معنی داری بین این مرحله با سایر مراحل در این سه تیمار مشهود است. در این مرحله از پرورش لاروی بیشترین میزان ضریب رشد ویژه نیز به ترتیب متعلق به تیمارهای ۴ ، ۵ و ۶ می باشد و در بین این سه تیمار، تیمار ۴ حد اکثر میزان ضریب رشد ویژه (۲/۶±۲۲/۰۷درصد) را نه تنها در این مرحله از پرورش لاروی، بلکه در سایر مراحل در مقایسه با سایر تیمارها به خود اختصاص داده است. میزان ضریب رشد ویژه در این تیمار، در مرحله مذکور، در حدود ۴/۱۲ برابر تیمار شاهد می باشد. . لازم بذکر است که میانگین ضریب رشد ویژه این تیمار در طول دوره در حدود ۱/۴۸ برابر تیمار شاهد می باشد.

بنا بر مطالب عنوان شده می توان تیمار ۴ را به عنوان برترین تیمار و فاصله بین آغاز تغذیه فعال (۱۴ روز پس از هچ) تا ۱۹ روز پس از هچ موثرترین زمان جهت کاربرد پروبیوتیک معرفی نمود

۳-۲-۲-۴- تاثیر *Lactobacillus curvatus* و *Leuconostoc mesenteroides* بر روی سرعت رشد در لارو تاسماهی ایرانی

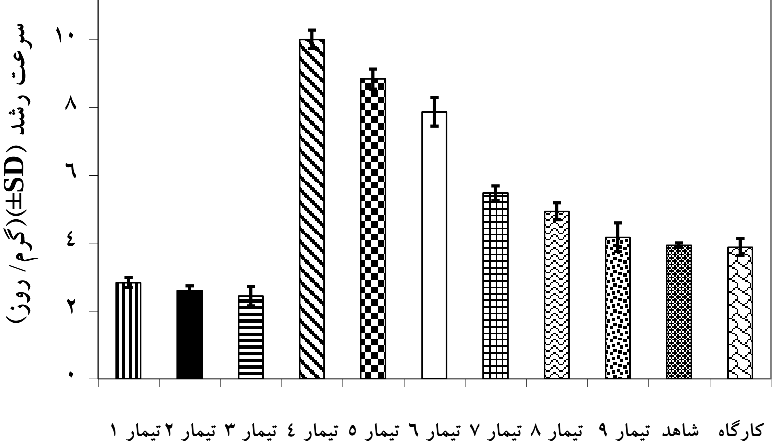
بر اساس جدول ۳-۱۶ حداکثر میزان سرعت رشد متعلق به تیمار ۴ (۰/۹±۱۰/۳۸ میلی گرم/روز)و حداقل متعلق به تیمار ۳ (۰/۴±۲/۴۸ میلی گرم/روز) می باشد این در حالی است که تیمار ۳ دریافت کننده حداکثر

تعداد *Lactobacillus curvatus* جداسازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی (غذا CFU/gr ^{۹}۹×۱۰) و تیمار ٤ در یافت کننده کمترین تعـداد *Leuconostoc mesenteroides* جداسـازی شـده از دسـتگاه گوارش تاسماهی ایرانی (غذا CFU/gr ^{۹}۲×۱۰) می باشد. مشابه این نتیجه در بررسی فاکتور وزن، طـول و ضریب رشد ویژه نیز مشاهده گردید.مطالعات آماری انجام شده حاکی از وجـود اخـتلاف معنـی دار بـین دوتیمار ۳ و ٤ با یکدیگر در سطح خطای ۵ درصد می باشد ($P<0.05$).

بر اساس نمودار۳-۱۷ و جدول ۳-۱٦ ، سه تیمار ۳، ۲ و ۱ به ترتیب کمترین میـانگین سـرعت رشـد را در طول دوره پرورش را به خود اختصاص داده است. ایـن در حـالی اسـت کـه بـاکتری *Lactobacillus curvatus* جداسازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی بر اساس مقادیر تعیین شده به همراه جیره غذایی به آب این ماهیان ، افزوده می گردید. بررسیهای آماری صورت گرفته بیانگر عدم وجود اختلاف معنـی دار بین تیمار های مذکور با یکدیگر، در سطح خطای ۵ درصد می باشد ($P>0.05$). بعلاوه ۳ تیمـار نـامبرده دارای اختلاف معنی دار در سطح خطای ۵ درصد با سایر تیمارها می باشند ($P<0.05$).

مطابق با نمودار۳-۱۷ و جدول ۳-۱٦ سه تیمار ٤، ۵ و ٦ به ترتیب بیشترین میانگین سرعت رشـد را در طول دوره پرورش به خود اختصاص داده است. این در حالی است که در این تیمارهـا، لاروتاسـماهیان از باکتری *Leuconostoc mesenteroides* جداسازی شده از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی بر اسـاس مقادیر تعیین شده به همراه جیره غذایی به آب افزوده می گردید. مشابه این حالت در ارتباط با فاکتور وزن ، طول و ضریب رشد ویژه نیز مشاهده گردید. بررسیهای آماری صورت گرفته اختلاف معنـی دار ایـن سـه تیمار را با سایر تیمارها را در سطح خطای ۵ درصد را نشان میدهد ($P<0.05$) بعلاوه اختلاف معنی دار این تیمارها با یکدیگر نیز مشاهده گردید ($P>0.05$) .

بر اساس نتایج عنوان شـده مـی تـوان نتیجـه گیـری نمـود، بـا کـاهش تعـداد بـاکتری *Leuconostoc mesenteroides* دریافتی بوسیله تاسماهیان میزان ضریب رشد ویژه آنها افزایش می یابد. ایـن در حـالی است که در سه تیمار ۱، ۲ و ۳ با افزایش تعداد باکتری *Lactobacillus curvatus* دریافتی بوسیله لارو تاسماهی میزان ضریب رشد ویژه آنها نیز کاهش می یابد.



نمودار۳-۱۷- میانگین تغییرات سرعت رشد (SD±) لاروتاسماهی ایرانی در طول دوره پرورش در مراحل متفاوت عملیات زیست سنجی

جدول ۳-۱٦- میانگین سرعت رشد (میلی گرم/روز)(SD±) لاروتاسماهی در مراحل مختلف پرورش (n=۳٦۰ در هر تیمار)

مرحله / تیمار	مرحله صفر– مرحله ۱ (۱۴ تا ۱۹ روز پس از هچ)	مرحله ۱– مرحله ۲ (۱۹ تا ۲۴ روز پس از هچ)	مرحله ۲–مرحله ۳ (۲۴ تا ۲۹ روز پس از هچ)	مرحله ۳– مرحله ۴ (۲۹ تا ۳۴روز پس از هچ)	مرحله۴– مرحله ۵ (انتهای پرورش لارو تا ۱ هفته از ورود به سالن)	مرحله ۵–مرحله ۶ (۱ تا ۲ هفته پس از ورود به سالن پرورش)	میانگین در طول دوره (میلی گرم/روز)
تیمار ۱	۲/۰۰±۰/۶	۲/۲±۰/۶	۲/۸±۰/۶	۳/۰۰±۰/۱	۵/۴۹±۰/۹	۲/۹±۰/۱	۲/۸۴±۰/۵
تیمار ۲	۱/۴۰±۰/۴	۱/۶۰±۰/۴	۲/۴۰±۰/۳	۲/۲±۰/۲	۳/۴±۰/۸	۴/۶±۰/۳	۲/۶۴±۰/۶
تیمار ۳	۱/۰۰±۰/۳	۱/۸±۰/۵	۲/۱±۰/۱	۱/۸۴±۰/۱	۳/۲±۰/۲	۴/۶±۰/۵	۲/۴۰±۰/۴
تیمار ۴	۱۶/۰۰±۱/۶	۱۰/۰۰±۰/۸	۶/۰۰±۰/۸	۴/۴±۰/۵	۱۳/۰۱±۰/۹۱	۱۳±۰/۹	۱۰/۳۸±۰/۹
تیمار ۵	۹/۰±۰/۴	۸/۶۰±۰/۷	۶/۶۰±۰/۵	۷/۴±۱/۰۳	۸/۶۸±۰/۹	۱۵/۵±۰/۹	۸/۸±۰/۶
تیمار ۶	۷/۰۰±۰/۷	۷/۲±۰/۵	۷/۲±۰/۷	۶/۲±۰/۵	۶/۲۵±۰/۹	۱۲±۰/۸	۷/۸±۰/۵۹
تیما	۶/۰۰±۰/۶	۶/۶±۰/۵	۷/۰±۰/۶	۴/۲۸±۰/۲	۵/۱۲±۰/۵	۳/۹±۰/۱	۵/۴±۰/۵

ر ۷							
تیمار ۸	٤/۰۰±۰/۵	۵/۰±۰/۵	٤/۰±۰/۱	۵/۰۲±۰/۹	٤/۰۲±۰/٤	۷/٤±۰/٤	٤/۹±۰/۳
تیمار ۹	۲/٦±۰/۷	۵/۲۰±۰/۸	۳/۲۰±۰/۹	۵/۰۰±۰/۵	۳/۸±۰/۸	٤/۲۰±۰/۲	٤/۰۰±۰/۵۱
شاهد	۲/٤±۰/۵	۲/٤۰±۰/۷	۳/٤۰±۰/۳	٤/٤±۰/٦	٤/٤۱±۰/۲۰	۷/۲۳±۰/۷	٤/۰٤±۰/۱
کارگاه	۲/٦±۰/۵	۱/۸±۰/۵	۲/٤±۰/۲	۳/۸±۰/٦	۵/۰۰±۰/۳	۵/۸±۰/۷	۳/۸٦±۰/۷۰

بر اساس جدول ۳–١٦ ، در سه تیمار ۷، ۸ و ۹ ، که به صورت توام از هر دو باکتری ***Lac. curvatus*** و ***Leu. mesenteroides*** برای تغذیه لاروتاسماهیان استفاده گردید، بیشترین میانگین سرعت رشد در طول دوره به ترتیب متعلق به ۷ ، ۸ و ۹ می باشد. بررسیهای آماری انجام شده حاکی ازعدم وجود اختلاف معنی دار بین تیمار های ۷ و ۸ در سطح خطای ۵ درصد با یکدیگر می باشد (*P>0.05*). این در حالی است که وجود اختلاف معنی دار بین تیمار ۹ با تیمارهای ۷ و ۸ از طریق مطالعه آماری داده ها باثبات رسید(*P<0.05*).مطالعات آماری صورت گرفته بیانگر وجود اختلاف معنی د ار در سطح خطای ۵ درصد بین تیمارهای دریافت کننده هر دو باکتری با سایر تیمارها می باشد (*P<0.05*). بعلاوه اختلاف معنی داری بین تیمار شاهد و کارگاه مشاهده نگردید(*P>0.05*).

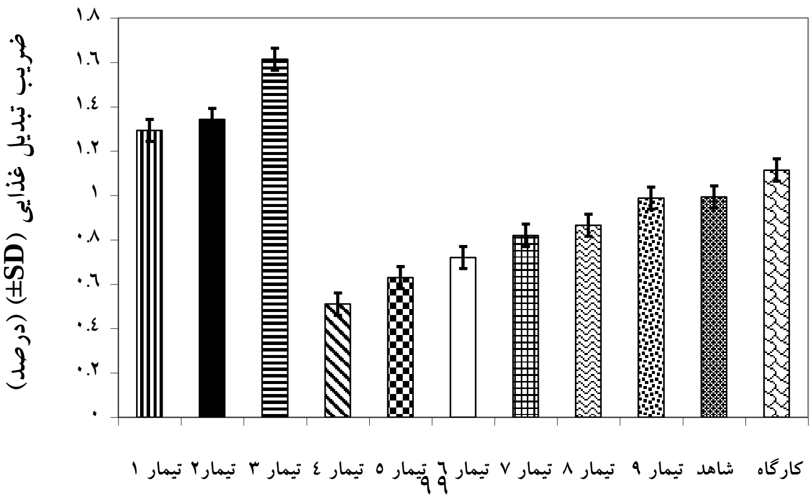
بررسی دقیقتر جدول نشان می دهد که بیشترین میزان سرعت رشد متعلق به مرحله نخست پرورش لاروی و یا فاصله بین آغاز تغذیه فعال یا مرحله صفر تا ۵ روز بعد یعنی ۱۹ روز پس از هچ در تمام تیمارها می باشد که اختلاف معنی داری بین این مرحله با سایر مراحل در تمام تیمارها مشهود است. در این مرحله از پرورش لاروی بیشترین میزان سرعت رشد نیز به ترتیب متعلق به تیمارهای ٤ ، ۵ و ٦ می باشد و در بین این سه تیمار، تیمار ٤ حد اکثر میزان سرعت رشد (۱/٦±۰۰/ ١٦ میلی گرم/ روز) را نه تنها در این مرحله از پرورش لاروی، بلکه در سایر مراحل نیز به خود اختصاص داده است. میزان سرعت رشد تیمار٤ در این مرحله در حدود ٦/٦ برابر تیمار شاهد می باشد. لازم بذکر است که میانگین سرعت رشد این تیمار در

طول دوره در حدود ۲/۵ برابر تیمار شاهد می باشد. بنا بر مطالب عنوان شده می توان تیمار ٤ را بـه عنـوان برترین تیمار و فاصله بین آغاز تغذیه فعال (١٤ روز پس از هچ) تا ۱۹ روز پـس از هـچ مـوثرترین زمـان جهت کاربرد پروبیوتیک معرفی نمود

۳-۲-۲-۵- تاثیر *Lactobacillus curvatus* و *Leuconostoc mesenteroides* بر روی ضـریب تبدیل غذایی در لارو تاسماهی ایرانی

بر اساس جدول ۳-۱۷ حداکثر میزان ضریب تبـدیل غـذایی متعلـق بـه تیمـار ۳ (۰/۰۳±۱/۵۷ درصـد)و حداقل متعلق به تیمار ٦ (۰/۳±۰/۵۸ درصد) می باشد این در حالی است که تیمار ۳ دریافت کننده حداکثر تعداد *Lactobacillus curvatus* جداسازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی (۹×۱۰^{۹} CFU/gr غذا) و تیمار ٦ در یافت کننده حداقل تعـداد *Leuconostoc mesenteroides* جداسـازی شـده از دسـتگاه گوارش تاسماهی ایرانی (۲×۱۰^{۹} CFU/gr غذا) می باشد. عکس این نتیجه در بررسی فاکتور وزن، طـول ، ضریب رشد ویژه و سرعت رشد مشاهده گردید. مطالعات آماری انجام شده حاکی از وجود اختلاف معنـی دار بین دوتیمار ۳ و ٤ با یکدیگر در سطح خطای ۵ درصد می باشد ($P<0.05$).

بر اساس نمودار۳-۱۸ و جدول ۳-۱۷ ، سه تیمار ۳، ۲ و ۱ به ترتیب بیشترین میانگین ضریب تبدیل غذایی را در طول دوره پرورش به خود اختصاص داده است. این در حالی است که بـاکتری *Lactobacillus curvatus* جداسازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی بر اساس مقادیر تعیین شده به همراه جیره غذایی به آب این ماهیان ، افزوده می گردید. بررسیهای آماری صورت گرفته بیانگر عدم وجود اختلاف معنـی دار در سطح خطای ۵ درصد بین تیمار ۱ و ۲ با یکدیگر می باشد ($P>0.05$). این در حالی است که تیمار ۳ دارای اختلاف معنی دار با دو تیمار دیگر می باشد ($P<0.05$). بعلاوه تفاوت آماری معنـی دار در سـطح خطای ۵ درصد بین تیمارهای ۱، ۲ و ۳ با سایر تیمارها مشخص گردید ($P<0.05$).



نمودار۳-۱۸- میانگین تغییرات ضریب تبدیل غذایی (SD±) لارو تاسماهی ایرانی در طول دوره پرورش در مراحل متفاوت عملیات زیست سنجی

مطابق با نمودار۳- ۱۸ و جدول ۳-۱۷ سه تیمار ٤، ٥ و ٦ به ترتیب کمترین میانگین ضریب تبدیل غـذایی را در در طول دوره پرورش به خود اختصاص داده است. این در حـالی اسـت کـه در ایـن تیمارهـا، لارو تاسماهیان از باکتری *Leuconostoc mesenteroides* جداسازی شـده از دسـتگاه گـوارش تاسـماهی ایرانی بر اساس مقادیر تعیین شده به همراه جیره غذایی به آب افـزوده مـی گردیـد عکـس ایـن نتیجـه در بررسی فاکتور وزن، طول ، ضریب رشد ویژه و سرعت رشد نیز مشاهده گردید. بررسیهای آماری صـورت گرفته اختلاف معنی دار این سه تیمار را با سـایر تیمارهـا را در سـطح خطـای ٥ درصـد را نشـان میدهـد ($P<0.05$) عدم اختلاف معنی دار تیمار٥ و ٦ با یکدیگر مشاهده گردید ($P>0.05$). ایـن در حـالی است که تیمار ٤ دارای اختلاف معنی دار با دو تیمار دیگر می باشد ($P<0.05$).

بر اساس نتایج عنوان شـده مـی تـوان نتیجـه گیـری نمـود، بـا کـاهش تعـداد بـاکتری *Leuconostoc mesenteroides* دریافتی بوسیله تاسماهیان میزان ضریب تبدیل غذایی در لاروها کاهش می یابد. این در حالی است که در سه تیمـار ۱، ۲ و ۳ بـا افـزایش تعـداد بـاکتری *Lactobacillus curvatus* دریـافتی بوسیله لاروتاسماهی میزان ضریب تبدیل غذایی در لاروها افزایش می یابد.

جدول ۳-۱۷- میانگین ضریب تبدیل غذایی (درصد)(SD±) لارو فیل ماهی در دوره پرورش

(n=۳٦۰ در هر تیمار)

مرحـله (۱۴ تا ۱۹ روز پس از هچ)	مرحله صفر- مرحله ۱ (۱۹ تا ۲۴ روز پس از هچ)	مرحله۱- مرحله ۲ (۲۴ تا ۲۹ روز پس از هچ)	مرحله ۲-مرحله ۳ (۲۹ تا ۳٤روز پس از هچ)	مرحله ۳- مرحله ٤ (انتهای پرورش لارو تا ۱ هفته از	مرحله٤- مرحله ٥ (۱ تا ۲ هفته پس از ورود به سالن)	مرحله ٥-مرحله ٦ (درصد)	میانگین در طول دوره

تیمار							
تیما ر ١	/٠١±٠/٠٣ ١	١/٣٣±٠/١	/٣٩±٠/١٢ ١	١/٤ ±٠/١	١/٢±٠/٤	١/٢±٠/٤	١/٢٤±٠/١
تیما ر ٢	/٦٠±٠/٠١ ١	١/٥±٠/١	١/١٤±٠/٣	١/٦١±٠/٤	١/٢±٠/٥	١/٢±٠/١	١/٣٢±٠/٢
تیما ر ٣	/٠٠±٠/٠٢ ٢	١/٢٥±٠/١	١/٢٥±٠/٣	١/٨±٠/٢	١/٧±٠/١	١/٦١±٠/٤	١/٥٨±٠/٣
تیما ر ٤	/٢٢±٠/٠٥ ٠	٠/٥±٠/٠١	٠/٩١±٠/١	١/٠١±٠/٤	٠/٧٤±٠/٠٩	٠/٤١±٠/١	٠/٥٧±٠/٠٩
تیما ر ٥	/٢٢±٠/٠٩ ٠	/٤٣±٠/٠٢ ٠	/٨١±٠/٠٩ ٠	١/٢±٠/٥	٠/٨٠±٠/٠٨	٠/٥±٠/٠٨	٠/٦٥±٠/٠٥
تیما ر٦	/١٧±٠/٠٥ ٠	/٦٥±٠/٠٧ ٠	١/ ٤±٠/٢	٢/٥±٠/٩	٠/٦٠±٠/٠٦	٠/٦±٠/٠٧	٠/٧٢±٠/٠٩
تیما ر ٧	٠/٧±٠/٠٢	/٦٩±٠/٠٣ ٠	١/٠٢±٠/١	١/٠٦±٠/٢	٠/٩٠±٠/٠٤	٠/٦±٠/٠٩	٠/٨٢±٠/٠٩
تیما ر ٨	/٤٦±٠/٠٤ ٠	/٥٣±٠/٠٣ ٠	١/٣٠±٠/١	٠/٨٥±٠/٩	٠/٩٢±٠/٠٣	/٩٧±٠/٠١	٠/٨٥±٠/٠٨
تیما	/٤٠±٠/٠٥	/٤٠±٠/٠٦	/٧٠±٠/٠٤	١/٦٣±٠/٥	٠/٨٠±٠/٠٧	١/٧٠±٠/١	٠/٩٤±٠/١

ر ۹	۰	۰	۰				
شاهد	۱/۰۲±۰/۱	۱/۰۰±۰/۱	/۹۰±۰/۰۵ ۰	۰/۸۷±۰/٦	۰/۹۲±۰/۰۵	/۸۷±۰/۰۲	۰/۹۳±۰/۰۹
کارگاه	۱/۰۰±۰/۱	۱/۹۰±۰/۲	/۹۱±۰/۰۵ ۰	۰/۹٥±۰/٦	۰/۹۰±۰/۰۵	۰/۹±۰/۰۷	۰/۹٤±۰/۰۷

بر اساس جدول ۳-۱۷ ، در سه تیمار ۷، ۸ و ۹ ، که به صورت توام از هر دو باکتری *Lac. curvatus* و *Leu. mesenteroides* برای تغذیه لاروتاسماهیان استفاده گردید، کمترین میانگین ضریب تبدیل غذایی در طول دوره به ترتیب متعلق به ۷ ، ۸ و ۹ می باشد. بررسیهای آماری انجام شده حاکی ازعدم وجود اختلاف معنی دار بین تیمار های نامبرده در سطح خطای ۵ درصد با یکدیگر می باشد ($P>0.05$).

این در حالی است که اختلاف معنی د ار در سطح خطای ۵ درصد بین تیمارهای مذکور با سایر تیمارها بجز تیمار های کارگاه و شاهد باثبات رسید ($P<0.05$).

مطالعات آماری صورت گرفته نیز حاکی از عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ۵ درصد بین تیمار شاهد با کارگاه می باشد ($P>0.05$) و مقادیر ضریب تبدیل غذایی در این دو تیمار در مقایسه با تیمارهایی که به تنهایی و یابصورت مختلط از باکتری *Leuconostoc mesenteroides* استفاده می نمایند، بیشتر است.

۳-۳- تاثیرکاربرد *Lactobacillus curvatus* و *Leuconostoc mesenteroides* بر روی بازماندگی لارو فیل ماهی و تاسماهی ایرانی

۳-۳-۱- تاثیرکاربرد *Lb. curvatus* و *Leu. mesenteroides* بر روی بازماندگی لارو فیل ماهی

بر اساس جدول ۱۸-۳ بیشترین و کمترین تعداد تلفات در لاروهای فیل ماهی در طول دوره، تلفات روزانه و همچنین درصد تلفات بترتیب متعلق به تیمارهای ٦ و ۳ می باشد. آنالیزهای آماری صورت گرفته نیزبیانگر وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ۵ درصد در ارتباط با تمام موارد فوق بین این دو تیمار می باشد ($P<0.05$). این در حالی است که تیمار ۳ دریافت کننده حداکثر تعداد *Lactobacillus curvatus* جداسازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی (۹×۱۰^۹ CFU/gr غذا) و تیمار ٦ در یافت کننده حداقل تعداد *Leuconostoc mesenteroides* جداسازی شده از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی (۲×۱۰^۹ CFU/gr غذا) می باشد. بررسی شاخصهای رشد نیز بیانگر این مطلب است که تیمار ۳ دارای حداکثر و تیمار ٦ حداقل شاخصهای رشد را دارا می باشد.

بررسی دقیقتر جدول ۱۸- ۳ مبین این مطلب می باشد که تیمار های ۳ ، ۲ و ۱ بترتیب دارای کمترین میزان تلفات و بالاترین درصد بقا، در مقایسه با سایر تیمارها در لارو فیل ماهی می باشند. همانگونه که قبلا نیز اشاره گردید، در این ماهیان باکتری *Lactobacillus curvatus* جداسازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی بر اساس مقادیر تعیین شده به همراه جیره غذایی به آب ، افزوده می گردید. بررسیهای آماری صورت گرفته بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ۵ درصد بین تیمارهای ۲ و ۱ با یکدیگر ($P>0.05$) و وجود تفاوت معنی دار بین تیمار ۳ با دو تیمار دیگر ($P<0.05$) می باشد. بعلاوه تفاوت آماری معنی دار در سطح خطای ۵ درصد بین تیمارهای ۱، ۲ و ۳ با سایر تیمارها مشخص گردید ($P<0.05$). این در حالی است که تیمار های ٦ ، ۵ و ٤ دارای بالاترین میزان تلفات و کمترین میزان بقا در مقایسه با سایر تیمارها در لارو فیل ماهی بوده و در یافت کننده مقادیر متفاوت *Leuconostoc mesenteroides* جداسازی شده از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی در جیره غذایی خود می باشد.

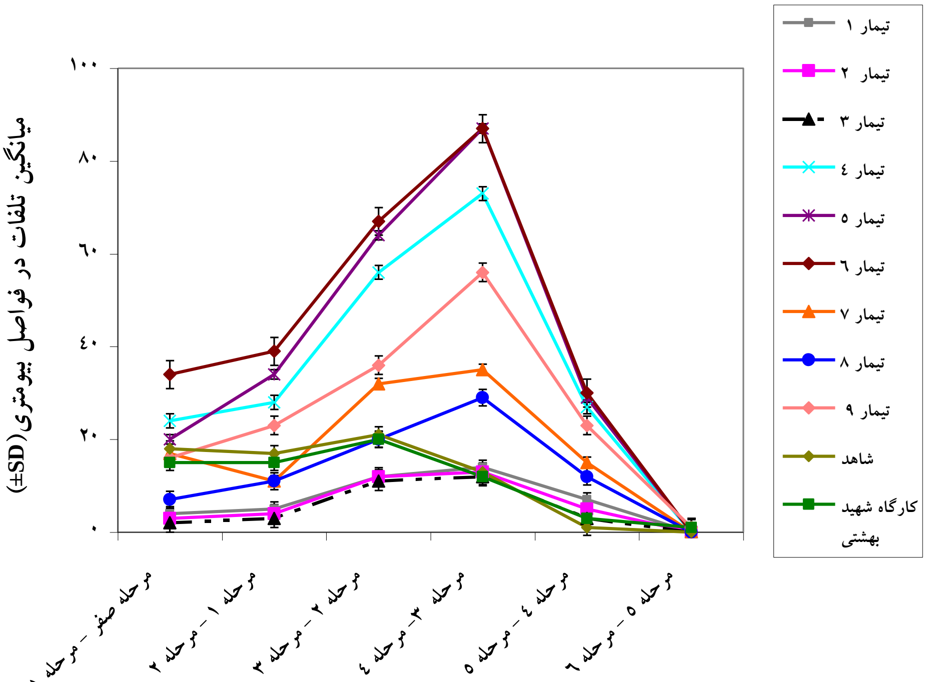
آنالیزهای آماری انجام شده حاکی از عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ۵ درصد بین تیمارهای مذکور با یکدیگر می باشد($P>0.05$) اما تفاوت معنی دار تیمارهای ٤ ، ۵ و ٦ با سایر تیمارها باثبات رسید ($P<0.05$).

جدول ۳-۱۸- بررسی تلفات (±SD) لارو فیل ماهی در طول دوره پرورش (n=۳٦۰ در هر تیمار)

نام تیمار	میانگین تعداد تلفات در طول دوره	میانگین تلفات روزانه	درصد تلفات در طول دوره

تیمار ۱	٤٥±٢	۱/۳۲±۰/۳	۱۲/۵۰±۱/۵
تیمار ۲	۳٦±۳	۱/۰۵±۰/۰۵	۱۰/۰۰±۱/۵
تیمار ۳	۳۰±۲	۰/۸۸±۰/۰۸	۸/۳۳±۰/۷
تیمار ٤	۲۰۳±٤	۵/۹۷±۰/۹	۵۸/۳۸±۲/۳
تیمار ۵	۲۲٤±٤	٦/۵۸±۰/۸	٦۳/٦۱±۲/۸
تیمار ٦	۲۵۱±۵	۷/۳٤±۱/۳	۷۳/۷۹±۱/۳
تیمار ۷	۱۰۹±۳	۳/۲۲±۰/۵	۳۰/۲۷±۱/۹۵
تیمار ۸	۷۸±۲	۲/۲۹±۰/۷	۲۱/۹۹±۱/۱
تیمار ۹	۱۵۲±۲	٤/٤۷±۰/۸	٤۲/۲۲±۲
شاهد	٦۷±۱	۱/۹۷±۰/٦	۱۸/٦۱±۱/۷
کارگاه	٦۵±۱	۱/۹۵±۰/٦	۱۸/۲۵±۱/۸

مطابق جدول ۳– ۱۸ در صد تلفات در طول دوره و میانگین تلفات روزانه در تیمارهای ۷ ، ۸ و ۹ که بصورت توام از هر دو باکتری استفاده می نمودند ، در مقایسه با تیمارهای در یافت کننده *Lactobacillus curvatus* و یا تیمارهای ۱ ، ۲ و ۳ کمتر و از تیمارهای ٤ ، ۵ و ٦ و یا تیمارهای دریافت کننده *Leuconostoc mesenteroides* بیشتر می باشد. برررسیهای انجام شده اختلاف معنی دار تیمار۹ با دوتیمار ۷ و ۸ را نشان می دهد($P>0.05$) این در حالی است که تفاوت آماری معنی داری بین دو تیمار ۷ و ۸ با یکدیگر مشاهده نگردید($P<0.05$). بعلاوه تفاوت معنی داری در سطح خطای ۵ درصد بین این سه تیمار با سایر تیمارها بجر تیمار ۸ تیمار شاهد و کارگاه مشاهده گردید($P<0.05$).



۳-۱۹- میانگین تعداد تلفات لارو فیل ماهی (±SD) در فواصل عملیات زیست سنجی

(n=۳٦۰ در هر تیمار)

مرحله صفر- مرحله ۱ = آغاز تغذیه فعال(۱٤ روز پس از هچ)- ۱۹ روز پس از هچ مرحله ۱- مرحله ۲ = ۱۹ تا ۲٤ روز پس از هچ

مرحله ۲- مرحله ۳ = ۲٤ تا ۲۹ روز پس از هچ مرحله ۳- مرحله ٤= ۲۹ تا ۳٤ (پایان پرورش لاروی)روز پس از هچ

مرحله ٤- مرحله ٥ = یکهفته پس از ورود به کارگاه پرورش مرحله ٥- مرحله ٦ = دوهفته پس از ورود به کارگاه پرورش

بر اساس نمودار ۳- ۱۹ کمترین میزان تلفات در تیمارهای در یافت کننده باکتری در فاصله بین مرحله صفر تا مرحله ۱ و بیشترین در مرحله ۲ تا مرحله ۳ مشاهده گردید. اختلاف معنی داری در سطح خطای ٥ درصد بین مرحله صفر-مرحله ۱ با مرحله ۱- مرحله۲ و همچنین مرحله ۲- مرحله ۳ با مرحله ۳- مرحله ٤ مشاهده نگردید($P>0.05$). این در حالی است که آنالیزهای آماری بیانگر وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ٥ درصد بین دو مرحله نخست (مرحله صفر-مرحله ۱ و مرحله ۱- مرحله ۲) با مراحل ۳-۲

و ٤-٣ می باشد ($P<0.05$). بعلاوه پس از پایان دوره لاروی فیل ماهیان و انتقال به کارگاه میزان تلفات کاهش یافته و در هفته دوم انتقال به کارگاه به صفر می رسد. مطالعات انجام شده حاکی از عدم وجود اختلاف معنی دار در فاصله بین مرحله ٤ تا ٥ با مراحل اولیه آغاز پرورش لاروها (مرحله صفر-مرحله ١ و مرحله ١- مرحله ٢) ($P>0.05$) و وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ٥ درصد بین این مرحله با مراحل ٣-٢ و ٤-٣ با یکدیگر می باشد ($P<0.05$). بعلاوه اختلاف معنی داری نیز بین مرحله ٦-٥ با سایر مراحل مشخص گردید($P<0.05$).

بررسی نتایج حاصل از مطالعه جدول ٣- ١٨ و نمودار ٣-١٩ بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ٥ درصد در ارتباط با تعداد تلفات در لاروهای فیل ماهی در طول دوره، تلفات روزانه ، درصد تلفات و میانگین تعداد تلفات در فواصل بیو متری بین دو تیمار شاهد و کارگاه می باشد ($P>0.05$).

٣-٣-٢- تاثیر کاربرد *Lactobacillus curvatus* و *Leuconostoc mesenteroides* بر روی بازماندگی لارو تاسماهی ایرانی

بر اساس جدول ١٩-٣ بیشترین و کمترین تعداد تلفات در لاروهای تاسماهی ایرانی در طول دوره، تلفات روزانه و همچنین درصد تلفات بترتیب متعلق به تیمارهای ٣ و ٤ می باشد. آنالیزهای آماری صورت گرفته نیزبیانگر وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ٥ درصد در ارتباط با تمام موارد فوق بین این دو تیمار می باشد ($P<0.05$). این در حالی است که تیمار ٣ دریافت کننده حداکثر تعداد ***Lactobacillus curvatus*** جداسازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی (9×10^9 CFU/gr غذا) و تیمار ٤ در یافت کننده کمترین تعداد ***Leuconostoc mesenteroides*** جداسازی شده از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی (2×10^9 CFU/gr غذا) می باشد. بررسی شاخصهای رشد نیز بیانگر این مطلب است که تیمار ٤ دارای حداکثر و تیمار ٣ حداقل شاخصهای رشد را دارا می باشد.

بررسی دقیقتر جدول ١٩- ٣ مبین این مطلب می باشد که تیمار های ٣ ، ٢ و ١ بترتیب دارای بیشترین میزان تلفات و کمترین درصد بقا، در مقایسه با سایر تیمارها در لارو تاسماهی ایرانی می باشند. همانگونه که قبلا نیز اشاره گردید، در این ماهیان باکتری ***Lactobacillus curvatus*** جداسازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی بر اساس مقادیر تعیین شده به همراه جیره غذایی به آب ، افزوده می گردید. بررسیهای آماری صورت گرفته بیانگر وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ٥ درصد بین تیمارهای ١ ، ٢ و ٣ با یکدیگر ($P<0.05$) می باشد. بعلاوه تفاوت آماری معنی دار در سطح خطای ٥ درصد بین تیمارهای ١، ٢ و ٣ با سایر تیمارها مشخص گردید ($P<0.05$). این در حالی است که تیمار های ٤ ، ٥ و ٦ دارای کمترین

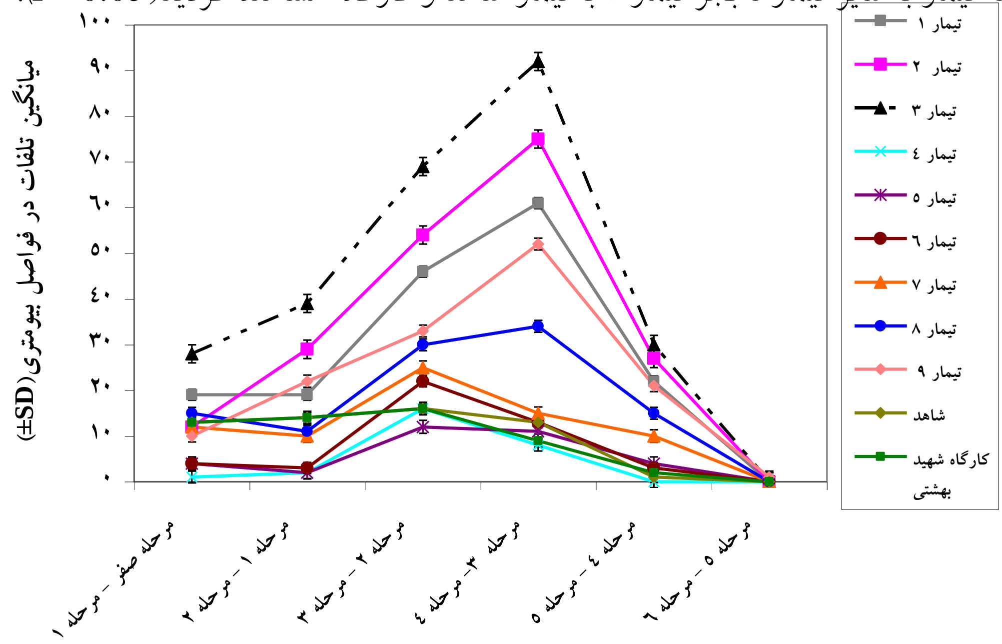
میزان تلفات و بالاترین درصد بقا در مقایسه با سایر تیمارها در لارو تاسماهی ایرانی بوده و در یافت کننده مقادیر متفاوت *Leuconostoc mesenteroides* جداسازی شده از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی در جیره غذایی خود می باشد و کاهش تعداد باکتری مورد نظر تاثیر مثبت را بر روی افزایش درصد بقا خواهد داشت. آنالیزهای آماری انجام شده حاکی از عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ۵ درصد بین تیمارهای ۵ و ٦ با یکدیگر در ارتباط با تعداد تلفات لاروهای تاسماهی در طول دوره، تلفات روزانه و همچنین درصد تلفات می باشد($P>0.05$) اما تفاوت معنی داری در ارتباط با فاکتور های موردنظر بین تیمار ٤ با دو تیمار دیگر مشخص گردید. بعلاوه تفاوت معنی دار تیمارهای ٤ ، ۵ و ٦ با سایر تیمارها باثبات رسید ($P<0.05$).

۳-۱۹- بررسی تلفات (SD±) لارو تاسماهی ایرانی در طول دوره پرورش (n=۳٦۰ در هر تیمار)

نام تیمار	میانگین تعداد تلفات در طول دوره	میانگین تلفات روزانه	درصد تلفات در طول دوره
تیمار ۱	۱٦۷±۷	٤/۹۱±۰/۹	٤٦/۳۸±٤/٦٤
تیمار ۲	۱۹۷±۳	۵/۷۹±۰/۷۵	۵٤/۷۲±۵/۵
تیمار ۳	۲۵۸±۹	۱٤/۷٤±۲/۰۸	۷۱/٦٦±٦/۹۸
تیمار ٤	۲۷±٤	۰/۷۹±۰/۰۹	۷/۵±۱/۳
تیمار ۵	۳٤±٤	۱/۰۰±۰/۱	۹/٤±۱/۰٤
تیمار ٦	٤٤±۵	۱/۲۹±۰/۳	۱۲/۲۲±۱/٦۲
تیمار ۷	۷۲±٤	۲/۱۱±۰/۹	۲۰/۰۰±۱/٤۰
تیمار ۸	۱۰۵±۵	٦/۰۰±۱/۱	۲۹/۱٦±۲/٦۲
تیمار ۹	۱۳۹±۹	٤/۰۸±۰/۸	۳۸/٦۱±۳/۵۱
شاهد	۵۷±٤	۱/٦۷±۰/٦	۱۵/۸۳±۱/٤۳

کارگاه	٥٤±٣	١/٥٨±٠/٦	١٥/٠٠±١/٨

مطابق جدول ٣- ١٩ در صد تلفات در طول دوره و میانگین تلفات روزانه در تیمارهای ۷ ، ۸ و ۹ که بصورت توام از هر دو باکتری استفاده می نمودند ، در مقایسه با تیمارهای در یافت کننده *Lactobacillus curvatus* و یا تیمارهای ۱ ، ۲ و ۳ بیشتر و از تیمارهای ٤ ، ٥ و ٦ و یا تیمارهای دریافت کننده *Leuconostoc mesenteroides* کمتر می باشد. بررسیهای انجام شده عدم اختلاف معنی دار تیمار۷ با تیمار ۸ را نشان می دهد($P>0.05$) این در حالی است که تفاوت آماری معنی داری بین دو تیمار ۷ و ۸ با تیمار ۹ مشاهده گردید($P<0.05$). بعلاوه تفاوت معنی داری در سطح خطای ٥ درصد بین این سه تیمار با سایر تیمارها بجر تیمار ۷ با تیمار شاهد و کارگاه مشاهده گردید($P<0.05$).



٣-٢٠- میانگین تعداد تلفات لاروتاسماهی ایرانی (±SD) در فواصل عملیات زیست سنجی

(n=٣٦٠ در هر تیمار)

مرحله صفر- مرحله ١ = آغاز تغذیه فعال(١٤ روز پس از هچ)- ١٩ روز پس از هچ مرحله ١-
مرحله ٢ = ١٩ تا ٢٤ روز پس از هچ

مرحله ۲- مرحله ۳ = ۲٤ تا ۲۹ روز پس از هچ   مرحله ۳- مرحله ٤= ۲۹ تـا ۳٤ (پایان پرورش لاروی)روز پس از هچ

مرحله ٤- مرحله ٥ = یکهفته پس از ورود به کارگاه پرورش   مرحلــه ٥- مرحلــه ٦ = دوهفته پس از ورود به کارگاه پرورش

بر اساس نمودار ۳- ۲۰ کمترین میزان تلفات در تیمارهای در یافت کننده باکتری در فاصله بین مرحله صفر تا مرحله ۱ و بیشترین در مرحله ۲ تا مرحله ۳ مشاهده گردید. اختلاف معنی داری در سطح خطای ٥ درصد بین مرحله صفر-مرحله ۱ با مرحله ۱- مرحله۲ و همچنین مرحله ۲- مرحله ۳ با مرحله ۳- مرحله ٤ مشاهده نگردید($P>0.05$). این در حالی است که آنالیزهای آماری بیانگر وجـود اخـتلاف معنـی دار در سطح خطای ٥ درصد بین دو مرحله نخست (مرحله صفر-مرحله ۱ و مرحله ۱- مرحله ۲) با مراحـل ۳-۲ و ٤-۳ می باشد ($P<0.05$). بعلاوه پس از پایان دوره لاروی تاسماهیان و انتقال به کارگاه میـزان تلفـات کاهش یافته و در هفته دوم انتقال به کارگاه به صفر می رسد. مطالعات انجـام شـده حـاکی از عـدم وجـود اختلاف معنی دار در فاصله بین مرحله ٤ تا ٥ با مراحل اولیه آغاز پرورش لاروها (مرحله صفر-مرحله ۱ و مرحله ۱- مرحله ۲) ($P>0.05$) و وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ٥ درصد بین ایـن مرحلـه بـا مراحل ۳-۲ و ٤-۳ با یکدیگر می باشد ($P<0.05$). بعلاوه اختلاف معنی داری نیـز بـین مرحلـه ٦-٥ بـا سایر مراحل مشخص گردید($P<0.05$).

بررسی نتایج حاصل از مطالعه جدول ۳- ۱۸ و نمودار ۳-۱۹ بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار در سـطح خطای ٥ درصد در ارتباط با تعداد تلفات در لاروهای فیل مـاهی در طـول دوره، تلفـات روزانـه ، درصـد تلفات و میانگین تعداد تلفات در فواصل بیو متری بین دو تیمار شاهد و کارگاه می باشد ($P>0.05$).

۳-٤- تاثیرکاربرد دو گونه از باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک جداسازی شده از دسـتگاه گـوارش ماهیان خاویاری شـامل *Lactobacillus curvatus* و *Leuconostoc mesenteroides* بـر روی آنزیم ها و روند تکامل دستگاه گوارش در لارو فیل ماهی و تاسماهی ایرانی

در این بخش از تحقیق بطور همزمان در کنار اندازه گیری مهمترین آنزیمهای دستگاه گـوارش مشـتمل بـر لیپاز، آمیلاز و پروتئاز مطالعات بافت شناسی نیز بر روی دستگاه در این ماهیـان صـورت پـذیرفت. نمونـه

برداری در طول دوره پرورش لاروی در ابتدا، اواسط و انتهای دوره پرورش لاروی و همچنین پس از انتهای دو هفته پرورش در کارگاه صورت پذیرفت. در ذیل به بررسی نتایج حاصله ، بصورت جداگانه می پردازیم.

۳-٤-۱- تاثیرکاربرد *Lb. curvatus* و *Leu. mesenteroides* بر روی آنزیم های دستگاه گوارش در لارو فیل ماهی

۳-٤-۱-۱- آنزیم آمیلاز

مطالعات انجام شده بر روی آنزیم آمیلاز در تیمارهای مختلف و مراحل متفاوت نمونه برداری حاکی از:

حداقل U/mg protein ۳۰±۱/۱۳ و حداکثر U/mg protein ۳۵±۱/۱۳ در مرحله صفر نمونه برداری ،

حداقل U/mg protein ٤۹/۷۱±۲/۲٦ در تیمار ٦و حداکثر U/mg protein ۱۳۰/۷۳±۲/۱۸ در تیمار ۳ در مرحله میانی نمونه برداری ،حداقل U/mg protein ٦۰/۳٤±۱/۱۲ در تیمار ٦ و حداکثر U/mg protein ۱٦٥/۸٦±٤/٦۰ در تیمار ۳ در مرحله انتهایی دوره پرورش لاروی و در نهایت حداقل U/mg protein ٥۹/٦٥±۳/٦٥ و حداکثر U/mg protein ۱٦۷/۹۰±۱/٤٥ در مرحله انتهایی دوره پرورش در کارگاه می باشد (جدول ۳-۲۱).

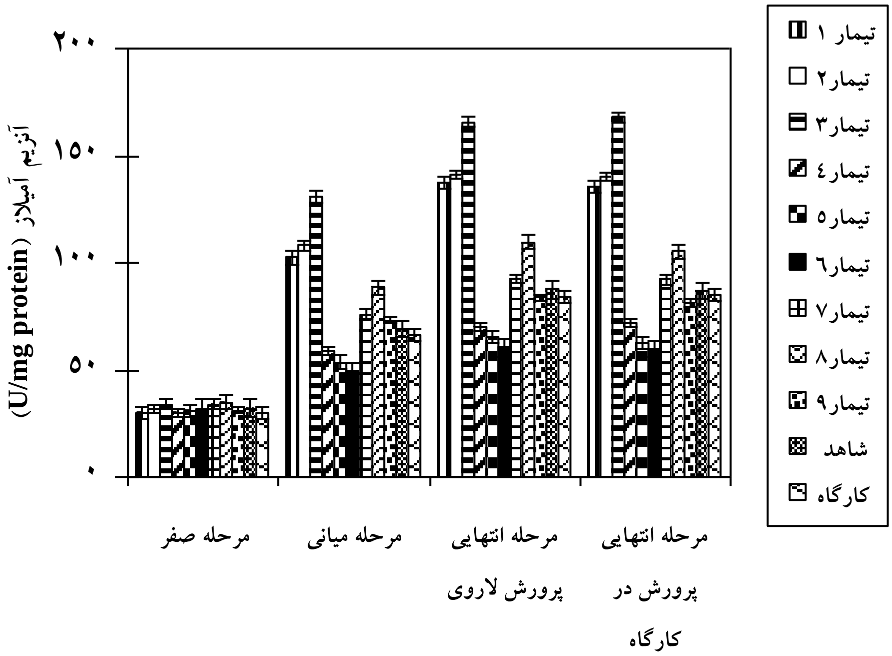
بررسیهای آماری انجام شده بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ٥ درصد بین تمام تیمارها در مرحله صفر نمونه برداری می باشد ($P>0.05$).

۳-۲۰- تغییرات آنزیم آمیلاز (U/mg protein) (±SD) در دستگاه گوارش لارو فیل ماهی در طول دوره پرورش لاروی(n=۳٦۰ در هر تیمار)

مرحله پرورش	مرحله صفر (آغاز تغذیه فعال/۱٤ روز پس از هچ)	مرحله میانی (۲٤ روز پس از هچ)	مرحله انتهایی پرورش لاروی (۳٤ روز پس از هچ)	مرحله انتهای دوره پرورش در کارگاه

تیمار				
تیمار ١	٣٠±١/١٣	١٠٢/٤١±٠/٨٨	١٣٧/٢١±٣/٤٥	١٣٥/٥٣±١/٢٣
تیمار ٢	٣٢±١/١٠	١٠٨/٠٢±٢/٠٩	١٤١/٣٠±٢/٢١	١٤٠/٢١±٣/٨٩
تیمار ٣	٣٤±٢/٢١	١٣٠/٧٣±٢/١٨	١٦٥/٨٦±٤/٦٠	١٦٧/٩٠±١/٤٥
تیمار ٤	٣٠±١/٣٣	٥٨/٩٤±٠/٨٧	٧٠/٤١±٢/٣٥	٧٢ /٣١±١/٦٧
تیمار ٥	٣١±١/٦١	٥٣/٦١±١/١٣	٦٥ /٣٦±٣/٢٢	٦٢/٤٣±٢/٤٠
تیمار ٦	٣٢±١/١٢	٤٩/٧١±٢/٢٦	٦٠/٣٤±١/١٢	٥٩/٦٥±٣/٦٥
تیمار ٧	٣٤±١/١١	٧٦/٠٢±١/٦١	٩٢/٤١±٣/٩٠	٩٢/٣١±٥/٨٩
تیمار ٨	٣٥±١/١٣	٩٨/٣٢±٠/٦٦	١٠٩/٤٢±١/١٧	١٠٥/٣٤±٢/٩٠
تیمار ٩	٣١±١/٩٠	٧٣/٠٦±١/٥٨	٨٣ /٧٦±٢/٤٣	٨١/٣١±١/٥٥
شاهد	٣٢±٢/١٠	٦٩/٢٥±٠/٢٢	٨٧/٤١±١/٥٦	٨٦/٨٠±١/٤٥
کارگاه	٣٠±١/٩٢	٦٦/٥٣±٠/٥٦	٨٤ /٢٦±١/٦٧	٨٥/١٢±١/٣٨

بر اساس جدول ٣-٢٠ حداکثر میزان آنزیم آمیلاز متعلق به تیمار ٣ و حداقل متعلق به تیمار ٦ در هر یک از مراحل مختلف نمونه برداری می باشد. این در حالی است که تیمار ٣ دریافت کننده حداکثر تعداد *Lactobacillus curvatus* جداسازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی (9×10^{9} CFU/gr غذا) و تیمار ٦ در یافت کننده حداکثر تعداد *Leuconostoc mesenteroides* جداسازی شده از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی (9×10^{9} CFU/gr غذا) می باشد. مشابه این نتیجه در بررسی شاخصهای رشد نیز مشاهده گردید. مطالعات آماری انجام شده حاکی از وجود اختلاف معنی دار بین ٣ و ٦ با یکدیگر در سطح خطای ٥ درصد در مراحل میانی ، انتهای دوره پرورش لاروی و انتهای دوره پرورش در کارگاه می باشد ($P<0.05$).



۳-۲۱-تغییرات آنزیم آمیلاز (U/mg protein) (±SD) در دستگاه گوارش لارو فیل ماهی در طول دوره پرورش لاروی(n=۳٦۰ در هر تیمار)

بررسی نمودار۳-۲۱ و جدول ۳-۲۰ نشان می دهد که سه تیمار ۳، ۲ و ۱ به ترتیب بیشترین میانگین آنزیم آمیلاز را در مراحل مختلف نمونه بردازی به خود اختصاص داده است. لازم به ذکر است که باکتری *Lactobacillus curvatus* جداسازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی، بر اساس مقادیر تعیین شده به همراه جیره غذایی به آب این ماهیان ، افزوده می گردید. بررسیهای آماری صورت گرفته بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار بین تیمارهای ۱ ، ۲ و ۳ در سطح خطای ٥ درصد با یکدیگر ($P>0.05$) درهر یک از مراحل مختلف نمونه برداری می باشد. این در حالی است که اختلاف معنی داری در سطح خطای ٥ درصد بین این سه تیمار با سایر تیمارها در مراحل صفر ، میانی ، انتهای دوره پرورش لاروی و انتهای دوره پرورش در کارگاه مشاهده گردید($P<0.05$).

طبق نمودار۳-۲۱ سه تیمار ٦، ٥ و ٤ به ترتیب کمترین میانگین آنزیم آمیلاز را در مراحل مختلف نمونه برداری به خود اختصاص داده اس(جدول ۳-۲۰) به خود اختصاص داده است. این در حالی است که در این

تیمارها، از باکتری *Leuconostoc mesenteroides* جداسازی شده از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی بر اساس مقادیر تعیین شده به همراه جیره غذایی استفاده می گردید. مشابه این حالت در ارتباط با شاخصهای رشد نیز مشاهده گردید. بررسیهای آماری صورت گرفته حاکی از وجود اختلاف معنی داری در سطح خطای ۵ درصد بین این سه تیمار با سایر تیمارها در مراحل صفر ، میانی ، انتهای دوره پرورش لاروی و انتهای دوره پرورش در کارگاه می باشد ($P<0.05$). بعلاوه ، عدم اختلاف معنی دار این تیمارها با یکدیگر نیز در هر مرحله مشاهده گردید ($P>0.05$) .

مطالعه دقیقتر تیمارهای ۷ ، ۸ و ۹ که بصورت توام از هر دو باکتری مذکور به همراه جیره غذایی بر اساس مقادیر تعیین شده استفاده می گردید بیانگر وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ۵ درصد بین تیمار ۸ با دو تیمار ۷ و ۹ می باشد ($P<0.05$). بعلاوه اختلاف معنی داری بین سه تیمار مذکور با سایر تیمارها در هر یک از مراحل مختلف نمونه (میانی، انتهای پرورش لاروی و انتهای پرورش در کارگاه) مشاهده گردید($P<0.05$) و تنها در مورد تیمارهای ۷ و ۹ اختلاف معنی داری بین این دو تیمار با تیمارهای شاهد و کارگاه حاصل نشد($P>0.05$) . در این سه تیمار به ترتیب تیمار ۸ ، ۷ و ۹ بالاترین مقادیر آنزیم آمیلاز را در هر یک از مراحل نمونه برداری بخود اختصاص داده است (جدول ۳-۲۰).

لازم به ذکر است که اختلاف معنی داری بین تیمار شاهد و کارگاه در ارتباط با مقادیر آنزیم آمیلاز در هر یک از مراحل(میانی، انتهای پرورش لاروی و انتهای پرورش در کارگاه) بدست نیامد($P>0.05$) .

بررسی مقادیر آنزیم آمیلاز در تیمارهای مختلف و مراحل نمونه برداری مشتمل بر مراحل صفر، میانی، انتهای دوره پرورش لاروی و انتهای دوره پرورش در کارگاه بیانگر وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ۵ درصد مرحله صفر با سایر مراحل نمونه برداری در تمام تیمارها می باشد($P<0.05$). بعلاوه تفاوت معنی داری نیز در سطح خطای ۵ درصد بین مرحله میانی با سایر مراحل مشاهده گردید($P<0.05$). اما تفاوت معنی داری بین مرحله انتهای دوره پرورش در کارگاه با انتهای دوره پرورش لاروی بدست نیامد($P>0.05$)
.

۳-٤-۱-۲- آنزیم لیپاز

مطالعات انجام شده بر روی آنزیم لیپاز در تیمارهای مختلف و مراحل متفاوت نمونه برداری حاکی از:

حداقل U/mg protein ۸/۲۵±۰/۲٤و حداکثر U/mg protein ۹/۱۰±۰/۱۱ در مرحله صفر نمونه برداری ،حداقل U/mg protein ۱۱/۳۹±۱/۹٤ در تیمار ٦و حداکثر U/mg protein ۳۹/٦٤±۱/۹۰ در تیمار ۳ در مرحله میانی نمونه برداری ،حداقل U/mg protein ۱۷/۳٤±۱/۱۲ در تیمار ٦ و حداکثر U/mg protein ٤٥/۸٦±۱/٦۰ در تیمار ۳ در مرحله انتهایی دوره پرورش لاروی و در نهایت حداقل

۱۹/۱۲±۱/٦٥ U/mg protein و حداکثر ٤٤/۸۷±۱/٦٥ U/mg protein در مرحله انتهایی دوره پرورش در کارگاه می باشد (جدول ۳-۲۲).

بررسیهای آماری انجام شده بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ۵ درصد بین تمـام تیمارهـا در مرحله صفر نمونه برداری می باشد ($P>0.05$).

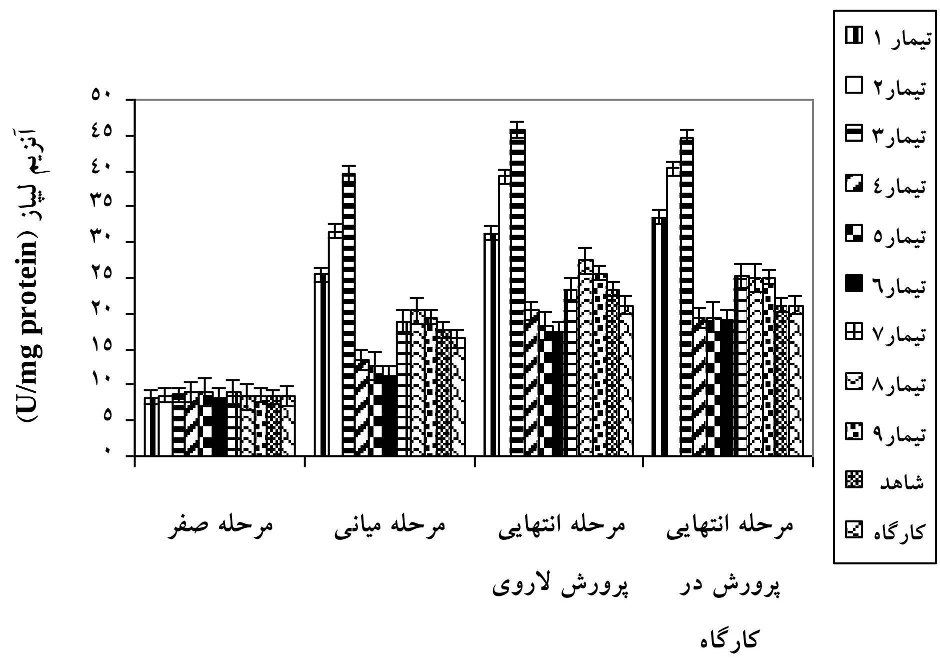
بر اساس جدول ۳-۲۱ حداکثر میزان آنزیم لیپاز متعلق به تیمار ۳ و حداقل متعلق به تیمار ٦ می باشد این در حالی است که تیمار ۳ دریافت کننـده حـداکثر تعـداد *Lactobacillus curvatus* جداسـازی شـده از دستگاه گوارش فیل ماهی (غذا CFU/gr 9×10^9) و تیمار ٦ در یافت کننده حداکثر تعـداد *Leuconostoc mesenteroides* جداسازی شده از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی (غذا CFU/gr 9×10^9) مـی باشـد. مشابه این نتیجه در بررسی شاخصهای رشد نیز مشاهده گردید. مطالعات آماری انجام شده حـاکی از وجـود اختلاف معنی دار بین دو تیمار ۳ و ٦ با یکدیگر در سطح خطای ۵ درصد در مراحل مختلف نمونـه بـرداری می باشد ($P<0.05$).

۳-۲۱-تغییرات آنزیم لیپاز (U/mg protein)(±SD) در دستگاه گوارش لارو فیل ماهی در طول دوره پرورش لاروی(n=۳٦۰ در هر تیمار)

مرحله / پرورش تیمار	مرحله صفر (آغاز تغذیه فعال/۱٤ روز پس از هچ)	مرحله میانی (۲٤ روز پس از هچ)	مرحله انتهایی پرورش لاروی (۳٤ روز پس از هچ)	مرحله انتهای دوره پرورش در کارگاه
تیمار ۱	۸/۲۵±۰/۲٤	۲۵/۵۲±۱/۹۰	۳۱/۲۱±۱/٤٥	۳۳/۵۱±۱/۲۱
تیمار ۲	۸/۵۳±۰/۱۰	۳۱/٦۳±۲/۸۸	۳۹/۲۱±۱/٤٥	٤۰/٤٥±۱/۱۱
تیمار ۳	۸/٦۷±۰/۲۱	۳۹/٦٤±۱/۹۰	٤٥/۸٦±۱/٦۰	٤٤/۸۷±۱/٦٥
تیمار ٤	۹/۰۰±۰/۳۳	۱۳/٥٦±۱/۷٦	۲۰/٤۱±۱/۳٥	۱۹/٤۳±۱/۸٥

تیمار ۵	۸/۹۰±۰/٦۱	۱۲/٦۳±۲/۱۰	۱۸ /۳٦±۱/۲۲	۱۹/۵۰±۱/٤۵
تیمار ٦	۸/۲۰±۰/۱۲	۱۱/۳۹±۱/۹٤	۱۷/۳٤±۱/۱۲	۱۹/۱۲±۱/٦۵
تیمار ۷	۹/۱۰±۰/۱۱	۱۸/۷۳±۱/۹۰	۲۳/٤۱±۱/۹۰	۲۵/٤۱±۲/۵۵
تیمار ۸	۸/۳۰±۰/۱۳	۲۰/٤۸±۱/۹۵	۲۷/٤۲±۱/۱۷	۲۵/۰۰±۱/۳۸
تیمار ۹	۸/۵۰±۰/۹۰	۱۹/۵۵±۱/۸٦	۲۵ /۷٦±۱/٤۳	۲۵/۱۲±۱/۱۷
شاهد	۸/٤۰±۰/۱۰	۱۷/۷٤±۲/۱۱	۲۳/٤۱±۱/۵٦	۲۱/۱۰±۱/۱۱
کارگاه	۸/٤۵±۰/۹۲	۱٦/۵۸±۱/۸۳	۲۱ /۲٦±۱/٦۷	۲۱/۱۸±۱/٦٤

برررسی نمودار۳-۲۲ و جدول ۳-۲۱ نشان می دهد که سه تیمار ۳، ۲ و ۱ به ترتیب بیشترین میانگین آنزیم لیپاز را در مراحل مختلف نمونه بردازی به خود اختصاص داده است. لازم به ذکر است که باکتری *Lactobacillus curvatus* جداسازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی، بر اساس مقادیر تعیین شده به همراه جیره غذایی به آب این ماهیان ، افزوده می گردید. بررسیهای آماری صورت گرفته بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار بین تیمارهای ۱ ، ۲ و ۳ در سطح خطای ۵ درصد با یکدیگر ($P>0.05$) در هر یک از مراحل مختلف نمونه برداری می باشد. این در حالی است که اختلاف معنی داری در سطح خطای ۵ درصد بین این سه تیمار با سایر تیمارها در مراحل صفر ، میانی ، انتهای دوره پرورش لاروی و انتهای دوره پرورش در کارگاه مشاهده گردید($P<0.05$).



۳-۲۲-تغییرات آنزیم لیپاز (U/mg protein) (±SD) در دستگاه گوارش لارو فیل ماهی در طول دوره پرورش(n=۳٦۰ در هر تیمار)

طبق نمودار۳-۲۲ سه تیمار ٦، ٥ و ٤ به ترتیب کمترین میانگین آنزیم لیپاز را در مراحل مختلف نمونه برداری (جدول ۳-۲۱) به خود اختصاص داده است. این در حالی است که در این تیمارها، از باکتری *Leuconostoc mesenteroides* جداسازی شده از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی بر اساس مقادیر تعیین شده به همراه جیره غذایی استفاده می گردید. مشابه این حالت در ارتباط با شاخصهای رشد نیز مشاهده گردید. بررسیهای آماری صورت گرفته حاکی از وجود اختلاف معنی داری در سطح خطای ٥ درصد بین این سه تیمار با سایر تیمارها در مراحل صفر ، میانی ، انتهای دوره پرورش لاروی و انتهای دوره پرورش در کارگاه می باشد ($P<0.05$) . بعلاوه ، عدم اختلاف معنی دار این تیمارها با یکدیگر (در هر یک از مراحل) نیز مشاهده گردید ($P>0.05$) .

مطالعه دقیقتر تیمارهای ۷ ، ۸ و ۹ که بصورت توام از هر دو باکتری مذکور به همراه جیره غذایی بر اساس مقادیر تعیین شده استفاده می گردید بیانگر وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ٥ درصد بین تیمار ۸ با دو تیمار ۷ و ۹ در هر یک از مراحل نمونه برداری(میانی، انتهای پرورش لاروی و انتهای پرورش در کارگاه) می باشد ($P<0.05$). بعلاوه اختلاف معنی داری بین سه تیمار مذکور با سایر تیمارها در مراحل مختلف نمونه برداری مشاهده گردید($P<0.05$) و تنها در مورد تیمارهای ۷ و ۹ اختلاف معنی داری بین این دو تیمار با تیمارهای شاهد و کارگاه حاصل نشد($P>0.05$) . در این سه تیمار به ترتیب تیمار ۸ ، ۷ و ۹ بالاترین مقادیر آنزیم لیپاز را بخود اختصاص داده است (جدول ۳-۲۱).

لازم به ذکر است که اختلاف معنی داری بین تیمار شاهد و کارگاه در ارتباط با مقادیر آنزیم لیپاز در هر یک از مراحل(میانی، انتهای پرورش لاروی و انتهای پرورش در کارگاه) بدست نیامد($P>0.05$) .

بررسی مقادیر آنزیم لیپاز در تیمارهای مختلف و مراحل نمونه برداری مشتمل بر مراحل صفر، میانی، انتهای دوره پرورش لاروی و انتهای دوره پرورش در کارگاه بیانگر وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ۵ درصد مرحله صفر با سایر مراحل نمونه برداری در تمام تیمارها می باشد($P<0.05$). بعلاوه تفاوت معنی داری نیز در سطح خطای ۵ درصد بین مرحله میانی با سایر مراحل مشاهده گردید($P<0.05$). اما تفاوت معنی داری بین مرحله انتهای دوره پرورش در کارگاه با انتهای دوره پرورش لاروی بدست نیامد($P>0.05$) .

۳-۴-۱-۳- آنزیم پروتئاز

مطالعات انجام شده بر روی آنزیم پروتئاز در تیمارهای مختلف و مراحل متفاوت نمونه برداری حاکی از:

حداقل ۹/۴۰±۰/۷۵ U/mg protein و حداکثر ۱۰/۷۶±۰/۶۷ U/mg protein در مرحله صفر نمونه برداری ،حداقل ۱۳/۹۸±۱/۶۸ U/mg protein در تیمار ۶و حداکثر ۳۹/۳۵±۱/۵۶ U/mg protein در تیمار ۳ در مرحله میانی نمونه برداری ،حداقل ۱۸/۵۵±۲/۱۵ U/mg protein در تیمار ۶ و حداکثر ۵۵/۴۰±۱/۳۵U/mg protein در تیمار ۳ در مرحله انتهایی دوره پرورش لاروی و در نهایت حداقل ۲۰/۱۲±۱/۴۳ U/mg protein و حداکثر ۵۷/۸۷±۲/۴۵ U/mg protein در مرحله انتهایی دوره پرورش در کارگاه می باشد (جدول ۳-۲۲).

بررسیهای آماری انجام شده بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ۵ درصد بین تمام تیمارها در مرحله صفر نمونه برداری می باشد ($P>0.05$).

۳-۲۲-تغییرات آنزیم پروتئاز (U/mg protein)(±SD) در دستگاه گوارش لارو فیل ماهی در طول دوره پرورش لاروی(n=۳۶۰ در هر تیمار)

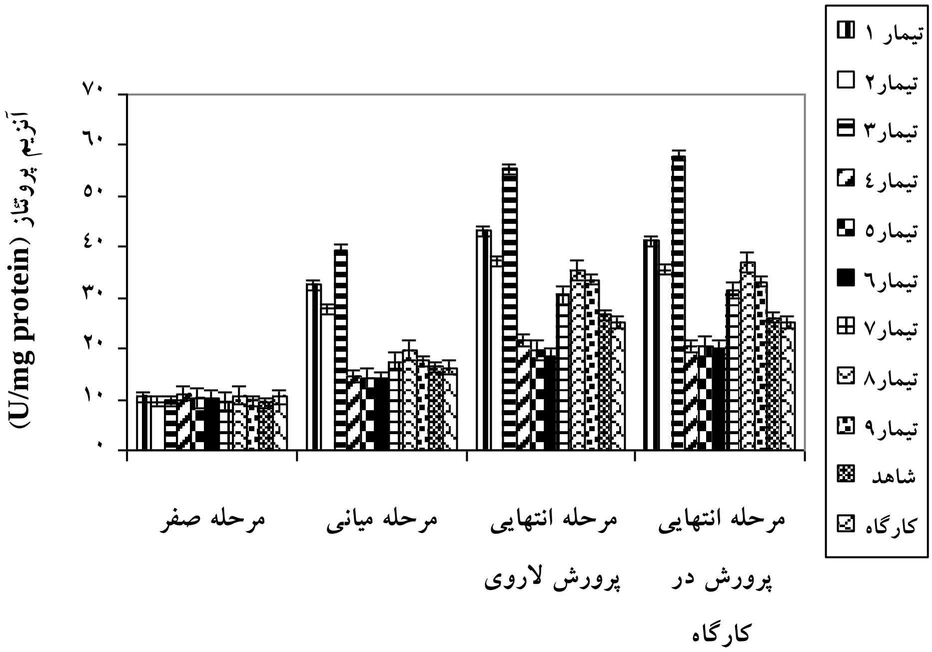
مرحله پرورش	مرحله صفر (آغاز تغذیه فعال/۱۴ روز پس از هچ)	مرحله میانی (۲۴ روز پس از هچ)	مرحله انتهایی پرورش لاروی (۳۴ روز پس از هچ)	مرحله انتهای دوره پرورش در کارگاه

تیمار				
تیمار ١	١٠/٤٥±٠/٤٥	٣٢/٥٣±١/٣١	٤٣/٢٣±١/٥٣	٤١/٢١±١/٤١
تیمار ٢	٩/٦٣±٠/٣٤	٢٧/٧٤±١/٢٥	٣٧/٢١±١/٦٩	٣٥/٤٥±٢/١١
تیمار ٣	٩/٧٧±٠/٢٣	٣٩/٣٥±١/٥٦	٥٥/٤٠±١/٣٥	٥٧/٨٧±٢/٤٥
تیمار ٤	١١/٢٠±٠/٨٨	١٤/٥٣±١/٧٨	٢١/٧٠±١/٣٥	٢٠/٤٣±١/٤٠
تیمار ٥	١٠/٢٨±٠/٤٩	١٤/١٩±١/٣٥	١٩/٥٥±١/٢٤	٢٠/٥٠±١/٢٠
تیمار ٦	١٠/٣٤±٠/٥٥	١٣/٩٨±١/٦٨	١٨/٥٥±٢/١٥	٢٠/١٢±١/٤٣
تیمار ٧	٩/٥٦±٠/٣٨	١٧/٤٩±١/٢٣	٣٠/٥١±١/٧٩	٣١/٤١±٢/٢٠
تیمار ٨	١٠/٧٦±٠/٦٧	١٩/٥٨±١/٤٣	٣٥/٤٤±١/٥٠	٣٧/٠٠±١/٧٠
تیمار ٩	٩/٦٧±٠/٦٥	١٧/٦٥±١/٥٥	٣٣/٦١±١/٤٥	٣٣/١٢±١/٢٠
شاهد	٩/٤٠±٠/٧٥	١٦/٤٠±٢/٦٣	٢٦/٦٥±١/٤٧	٢٦/١٠±١/٦٠
کارگاه	١٠/٤٥±٠/٤٣	١٦/٢٣±١/٣٨	٢٥/٢١±١/٣٠	٢٥/١٨±١/٨٠

بر اساس جدول ٣-٢٢ حداکثر میزان آنزیم پروتئاز متعلق به تیمار ٣ و حداقل متعلق به تیمار ٦ در هر یک از مراحل نمونه برداری می باشد. این در حالی است که تیمار ٣ دریافت کننده حداکثر تعداد *Lactobacillus curvatus* جداسازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی (9×10^{9} CFU/gr غذا) و تیمار ٦ در یافت کننده حداکثر تعداد *Leuconostoc mesenteroides* جداسازی شده از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی (9×10^{9} CFU/gr غذا) می باشد. مشابه این نتیجه در بررسی شاخصهای رشد نیز مشاهده گردید. مطالعات آماری انجام شده حاکی از وجود اختلاف معنی دار بین دو تیمار ٣ و ٦ با یکدیگر در سطح خطای ٥ درصد در مراحل مختلف نمونه برداری می باشد ($P<0.05$).

برررسی نمودار٣-٢٣ و جدول ٣-٢٢ نشان می دهد که سه تیمار ٣، ٢ و ١ به ترتیب بیشترین میانگین آنزیم پروتئاز را در مراحل مختلف نمونه برداری به خود اختصاص داده است. لازم به ذکر است که باکتری *Lactobacillus curvatus* جداسازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی، بر اساس مقادیر تعیین شده به

همراه جیره غذایی به آب این ماهیان ، افزوده می گردید. بررسیهای آماری صورت گرفته بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار بین تیمارهای ۱ ، ۲ و ۳ در سطح خطای ۵ درصد با یکدیگر ($P>0.05$) در هر یک از مراحل مختلف نمونه برداری می باشد. این در حالی است که اختلاف معنی داری در سطح خطای ۵ درصد بین این سه تیمار با سایر تیمارها در مراحل صفر ، میانی ، انتهای دوره پرورش لاروی و انتهای دوره پرورش در کارگاه مشاهده گردید($P<0.05$).



۳-۲۳-تغییرات آنزیم پروتئاز (U/mg protein) (±SD) در دستگاه گوارش لارو فیل ماهی در طول دوره پرورش(n=۳٦۰ در هر تیمار)

طبق نمودار۳-۲۳ سه تیمار ٦، ۵ و ٤ به ترتیب کمترین میانگین آنزیم پروتئاز را در مراحل مختلف نمونه برداری (جدول ۳-۲۲) به خود اختصاص داده است. این در حالی است که در این تیمارها، از باکتری *Leuconostoc mesenteroides* جداسازی شده از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی بر اساس مقادیر تعیین شده به همراه جیره غذایی استفاده می گردید. مشابه این حالت در ارتباط با شاخصهای رشد نیز

مشاهده گردید. بررسیهای آماری صورت گرفته حاکی از وجود اختلاف معنی داری در سطح خطای ۵ درصد بین این سه تیمار با سایر تیمارها در مراحل صفر ، میانی ، انتهای دوره پرورش لاروی و انتهای دوره پرورش در کارگاه می باشد ($P<0.05$) . بعلاوه ، عدم اختلاف معنی دار این تیمارها با یکدیگر (در هر یک از مراحل) نیز اثبات گردید ($P>0.05$) .

مطالعه دقیقتر تیمارهای ۷ ، ۸ و ۹ که بصورت توام از هر دو باکتری مذکور به همراه جیره غذایی بر اساس مقادیر تعیین شده استفاده گردید، بیانگر وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ۵ درصد بین تیمار ۸ با دو تیمار ۷ و ۹ در هر یک از مراحل نمونه برداری(میانی، انتهای پرورش لاروی و انتهای پرورش در کارگاه) می باشد ($P<0.05$). بعلاوه اختلاف معنی داری بین سه تیمار مذکور با سایر تیمارها در مراحل مختلف نمونه برداری مشاهده گردید($P<0.05$) و تنها در مورد تیمارهای ۷ و ۹ اختلاف معنی داری بین این دو تیمار با تیمارهای شاهد و کارگاه حاصل نشد($P>0.05$) . در این سه تیمار به ترتیب تیمار ۸ ، ۷ و ۹ بالاترین مقادیر آنزیم پروتئاز را بخود اختصاص داده است (جدول ۳-۲۲).

لازم به ذکر است که اختلاف معنی داری بین تیمار شاهد و کارگاه در ارتباط با مقادیر آنزیم پروتئاز در هر یک از مراحل(میانی، انتهای پرورش لاروی و انتهای پرورش در کارگاه) بدست نیامد ($P>0.05$).

بررسی مقادیر آنزیم پروتئاز در تیمارهای مختلف و مراحل نمونه برداری مشتمل بر مراحل صفر، میانی، انتهای دوره پرورش لاروی و انتهای دوره پرورش در کارگاه بیانگر وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ۵ درصد مرحله صفر با سایر مراحل نمونه برداری در تمام تیمارها می باشد($P<0.05$). بعلاوه تفاوت معنی داری نیز در سطح خطای ۵ درصد بین مرحله میانی با سایر مراحل مشاهده گردید($P<0.05$). اما تفاوت معنی داری بین مرحله انتهای دوره پرورش در کارگاه با انتهای دوره پرورش لاروی بدست نیامد($P>0.05$).

۳-٤-۱-۳- آنزیم آلکالین فسفاتاز

مطالعات انجام شده بر روی آنزیم آلکالین فسفاتاز در تیمارهای مختلف و مراحل متفاوت نمونه برداری حاکی از:

حداقل U/mg protein ۸۳/۲±۱/۱۰ و حداکثر U/mg protein ۸۷/۳±۱/٦۱ در مرحله صفر نمونه برداری ،حداقل U/mg protein ۸۵/۲۵±۲/۲۲ در تیمار شاهد و حداکثر U/mg protein ۱٦٤/۷۰±۱/۲٦در تیمار ٦در مرحله میانی نمونه برداری ،حداقل U/mg protein ۸۸/٤۱±۱/٥٦ در تیمار شاهد و حداکثر U/mg protein ۱۷٤/۳٤±۱/۱۲ در تیمار ٦ در مرحله انتهایی دوره پرورش لاروی و در نهایت حداقل U/mg protein ۸۸/۱۲±۱/۳۸ در تیمار کارگاه و حداکثر U/mg protein ۱٦۰/٦٥±۳/٦٥ در تیمار ٦ در مرحله انتهایی دوره پرورش در کارگاه می باشد (جدول ۳-۲۳). بررسیهای

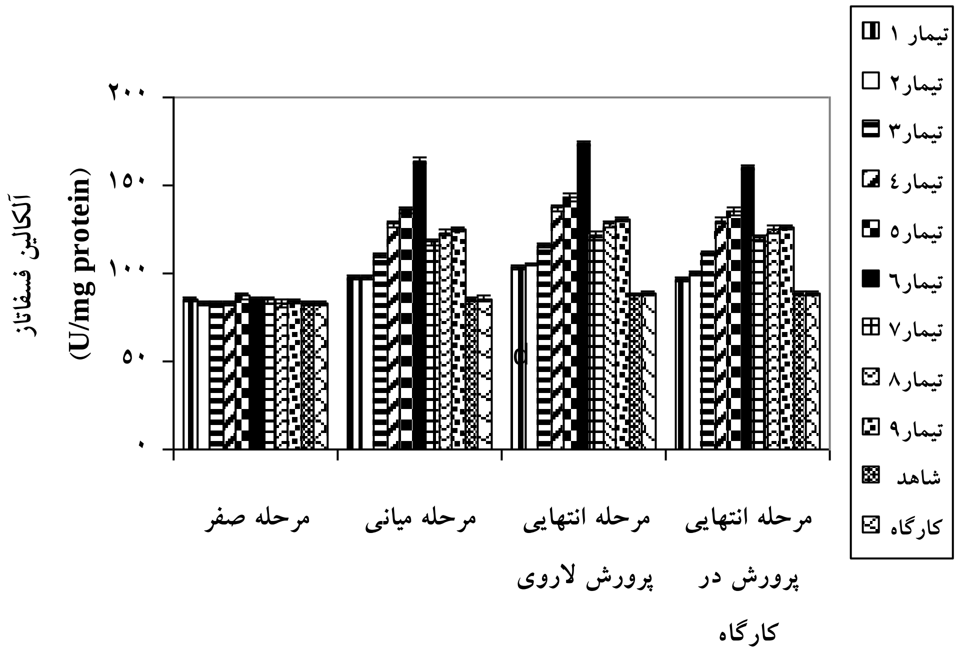
آماری انجام شده بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ۵ درصد بین تمام تیمارهـا در مرحلـه صفر نمونه برداری می باشد *(P>0.05)*.

۳-۲۳-تغییرات آنزیم آلکالین فسفاتاز (U/mg protein)(±SD) در دستگاه گوارش لاروفیل ماهی در طول دوره پرورش لاروی(n=۳٦۰ در هر تیمار)

مرحله پرورش / تیمار	مرحله صفر (آغاز تغذیه فعال/۱٤ روز پس از هچ)	مرحله میانی (۲٤ روز پس از هچ)	مرحله انتهایی پرورش لاروی (۳٤ روز پس از هچ)	مرحله انتهای دوره پرورش در کارگاه
تیمار ۱	۸۵/۹±۱/۱۳	۹۷/۵۹±۳/۸۸	۱۰۳/۲۱±۱/٤۵	۹۷/۵۳±۱/۲۳
تیمار ۲	۸۳/۲±۱/۱۰	۹۷/۹٤±۳/۰۹	۱۰۵/۳۰±۱/۲۱	۱۰۰/۸±۳/۸۹
تیمار ۳	۸۳/۹±۲/۲۱	۱۱۰/۵٦±۳/۱۸	۱۱٦/۸٦±۱/٦۰	۱۱۱/۹۰±۱/٤۵
تیمار ٤	۸۳/۷±۱/۳۳	۱۲۸/۳۸±۲/۸۷	۱۳۷/٤۱±۱/۳۵	۱۳۰ /۳۱±۱/٦۷
تیمار ۵	۸۷/۳±۱/٦۱	۱۳٦/٤٤±۱/۱۳	۱٤۳ /۳٦±۱/۲۲	۱۳۵/٤۳±۲/٤۰
تیمار ٦	۸۵/۱±۱/۱۲	۱٦٤/۷۰±۱/۲٦	۱۷٤/۳٤±۱/۱۲	۱٦۰/٦۵±۳/٦۵
تیمار ۷	۸۵/۹±۱/۱۱	۱۱۸/۳۳±۱/٦۱	۱۲۲/٤۱±۱/۹۰	۱۲۰/۳۱±۵/۸۹
تیمار ۸	۸۳/۸±۱/۱۵	۱۲۳/۵۹±۲/٦٦	۱۲۸/٤۲±۱/۱۷	۱۲۵/۳٤±۲/۹۰
تیمار ۹	۸٤/۱±۱/۹۰	۱۲۵/٦۰±۱/۵۸	۱۳۱ /۷٦±۱/٤۳	۱۲٦/۳۱±۱/۵۵
شاهد	۸۳/۳±۲/۱۰	۸۵/۲۵±۲/۲۲	۸۸/٤۱±۱/۵٦	۸۸/۸۰±۱/٤۵
کارگاه	۸۳/۲±۱/۹۲	۸۵/۷±۲/۵٦	۸۹ /۲٦±۱/٦۷	۸۸/۱۲±۱/۳۸

بر اساس جدول ۳-۲۳ حداکثر میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز متعلق به تیمار ٦ و حداقل متعلق به تیمار شاهد و کارگاه در هر یک از مراحل نمونه برداری می باشد. این در حالی است که تیمار ٦ دریافت کننده حداکثر تعداد *Leuconostoc mesenteroides* جداسازی شده از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی (غذا CFU/gr 9×10^9) می باشد. این در حالی است که تیمار ٦ دارای حداقل شاخصهای رشد می باشد. مطالعات آماری انجام شده حاکی از وجود اختلاف معنی دار بین تیمار ٦ با سایر تیمارها در سطح خطای ۵ درصد در مراحل مختلف نمونه برداری می باشد ($P<0.05$).

برررسی نمودار۳-۲٤ و جدول ۳-۲۳ نشان می دهد که سه تیمار ۱، ۲ و ۳ به ترتیب بعد از دو تیمار شاهد و کارگاه، دارای کمترین میانگین آنزیم آلکالین فسفاتاز در مراحل مختلف نمونه برداری می باشد. لازم به ذکر است که باکتری *Lactobacillus curvatus* جداسازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی، بر اساس مقادیر تعیین شده به همراه جیره غذایی به آب این ماهیان ، افزوده می گردید. بررسیهای آماری صورت گرفته بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار بین تیمارهای ۱ ، ۲ و ۳ در سطح خطای ۵ درصد با یکدیگر ($P>0.05$) در هر یک از مراحل مختلف نمونه برداری می باشد. این در حالی است که اختلاف معنی داری در سطح خطای ۵ درصد بین این سه تیمار با سایر تیمارها در مراحل صفر ، میانی ، انتهای دوره پرورش لاروی و انتهای دوره پرورش در کارگاه مشاهده گردید($P<0.05$).



۳-۲٤-تغییرات آنزیم آلکالین فسفاتاز (U/mg protein) (±SD) در دستگاه گوارش لارو فیل ماهی در طول دوره پرورش(n=۳٦۰ در هر تیمار)

طبق نمودار۳-۲٤ سه تیمار ٦، ٥ و ٤ به ترتیب بیشترین میانگین آنزیم آلکالین فسفاتاز را در مراحل مختلف نمونه برداری (جدول ۳-۲۳) به خود اختصاص داده است. این در حالی است که در این تیمارها، از باکتری *Leuconostoc mesenteroides* جداسازی شده از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی بر اساس مقادیر تعیین شده به همراه جیره غذایی استفاده می گردید. بررسیهای آماری صورت گرفته حاکی از وجود اختلاف معنی داری در سطح خطای ٥ درصد بین این سه تیمار با سایر تیمارها در مراحل صفر ، میانی ، انتهای دوره پرورش لاروی و انتهای دوره پرورش در کارگاه می باشد ($P<0.05$). بعلاوه ، عدم اختلاف معنی دار این تیمارها با یکدیگر (در هر یک از مراحل) نیز اثبات گردید ($P>0.05$) .

مطالعه دقیقتر تیمارهای ۷ ، ۸ و ۹ که بصورت توام از هر دو باکتری مذکور به همراه جیره غذایی بر اساس مقادیر تعیین شده استفاده گردید، بیانگر وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ٥ درصد بین این تیمارها با یکدیگر در هر یک از مراحل نمونه برداری(میانی، انتهای پرورش لاروی و انتهای پرورش در کارگاه) می باشد ($P<0.05$). بعلاوه اختلاف معنی داری بین سه تیمار مذکور با سایر تیمارها در مراحل مختلف نمونه برداری مشاهده گردید($P<0.05$) در این سه تیمار به ترتیب، تیمارهای ۹ ، ۸ و ۷ بالاترین مقادیر آنزیم آلکالین فسفاتازرا بخود اختصاص داده اند (جدول ۳-۲۳).

لازم به ذکر است که اختلاف معنی داری بین تیمار شاهد و کارگاه در ارتباط با مقادیر آنزیم آلکالین فسفاتاز در هر یک از مراحل(میانی، انتهای پرورش لاروی و انتهای پرورش در کارگاه) بدست نیامد ($P>0.05$).

بررسی مقادیر آنزیم آلکالین فسفاتاز در تیمارهای مختلف و مراحل نمونه برداری مشتمل بر مراحل صفر، میانی، انتهای دوره پرورش لاروی و انتهای دوره پرورش در کارگاه بیانگر وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ٥ درصد مرحله صفر با سایر مراحل نمونه برداری در تمام تیمارها بجز تیمارهای شاهد و کارگاه می باشد($P<0.05$). بعلاوه تفاوت معنی داری نیز در سطح خطای ٥ درصد بین مرحله انتهای دوره پرورش

لاروی با سایر مراحل مشاهده گردید($P<0.05$). اما تفاوت معنی داری بین مرحله انتهای دوره پرورش در کارگاه با مرحله میانی بدست نیامد($P>0.05$).

۳-٤-۲- تاثیرکاربرد *Lactobacillus curvatus* و *Leuconostoc mesenteroides* بر روی آنزیم های دستگاه گوارش در لارو تاسماهی ایرانی

۳-٤-۲-۱- آنزیم آمیلاز

مطالعات انجام شده بر روی آنزیم آمیلاز در تیمارهای مختلف و مراحل متفاوت نمونه برداری حاکی از: حداقل U/mg protein ۲۲/۱۵±۰/۳۵ و حداکثر U/mg protein ۲۵/۸۹±۰/۳۵ در مرحله صفر نمونه برداری ، حداقل U/mg protein ۳۸/٦۹±۲/٥٦ در تیمار ۳ و حداکثر U/mg protein ۹۸/٦٥±۱/ ۷۸ در تیمار ٤ در مرحله میانی نمونه برداری ،حداقل U/mg protein ٤٥/٤۰±۲/۳۵ در تیمار ۳ و حداکثر ۱۱۰/۷۰±۱/ ۳۵U/mg protein در تیمار ٤ در مرحله انتهایی دوره پرورش لاروی و در نهایت حداقل U/mg protein ٥۳/٤٥±۲/۱۱ در تیمار ۳ و حداکثر U/mg protein ۱۱٤/٤۳±۱/٤۰ در تیمار ٤ در مرحله انتهایی دوره پرورش در کارگاه می باشد (جدول ۳-۲٤).

بررسیهای آماری انجام شده بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ٥ درصد بین تمام تیمارها در مرحله صفر نمونه برداری می باشد ($P>0.05$).

بر اساس جدول ۳-۲٤ حداکثر میزان آنزیم آمیلاز متعلق به تیمار ٤ و حداقل متعلق به تیمار ۳ در هر یک از مراحل مختلف نمونه برداری می باشد. این در حالی است که تیمار ۳ دریافت کننده حداکثر تعداد *Lactobacillus curvatus* جداسازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی (۹×۱۰^{۹} CFU/gr غذا) و تیمار٤ در یافت کننده حداقل تعداد *Leuconostoc mesenteroides* جداسازی شده از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی (۲×۱۰^{۹} CFU/gr غذا) می باشد. مشابه این نتیجه در بررسی شاخصهای رشد نیز مشاهده گردید. مطالعات آماری انجام شده حاکی از وجود اختلاف معنی دار بین ۳ و ٤ با یکدیگر در سطح خطای ٥ درصد در مراحل میانی ، انتهای دوره پرورش لاروی و انتهای دوره پرورش در کارگاه می باشد ($P<0.05$).

بررسی نمودار۳-۲٦ و جدول ۳-۲٥ نشان می دهد که سه تیمار ۳، ۲ و ۱ به ترتیب کمترین میانگین آنزیم آمیلاز را در مراحل مختلف نمونه برداری به خود اختصاص داده است. لازم به ذکر است که باکتری *Lactobacillus curvatus* جداسازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی، بر اساس مقادیر تعیین شده به همراه جیره غذایی به آب این ماهیان ، افزوده می گردید.

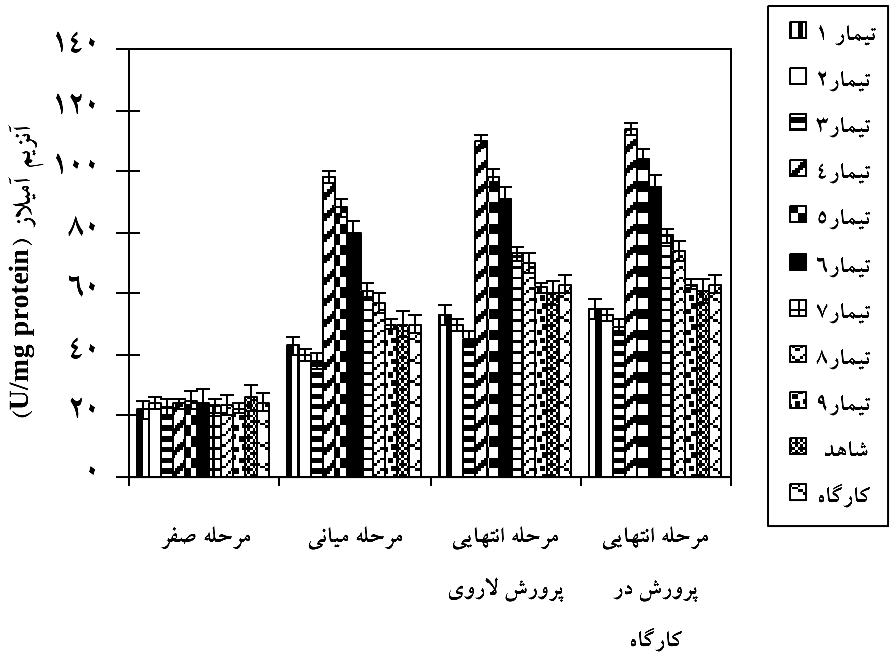
۳-۲٤- تغییرات آنزیم آمیلاز (**U/mg protein**) (**±SD**) در دستگاه گوارش لارو تاسماهی ایرانی در طول دوره پرورش لاروی(**n=۳٦۰** در هر تیمار)

مرحله پرورش / تیمار	مرحله صفر (آغاز تغذیه فعال/۱٤ روز پس از هچ)	مرحله میانی (۲٤ روز پس از هچ)	مرحله انتهایی پرورش لاروی (۳٤ روز پس از هچ)	مرحله انتهای دوره پرورش در کارگاه
تیمار ۱	۲۲/۱۵±۰/۳۵	٤٥/۳۳±۲/۳۱	٥۳/۲۳±۱/٥۰	٥٥/۲۱±۱/٤۱
تیمار ۲	۲٤/٤۳±۰/٥٤	٤۰/۳۹±۱/۲٥	٥۰/۲۱±۱/٦۲	٥۳/٤٥±۲/۱۱
تیمار ۳	۲۲/۸۷±۰/٦۳	۳۸/٦۹±۲/٥٦	٤٥/٤۰±۲/۳٥	٤۹/۸۷±۲/٤٥
تیمار ٤	۲۳/۹۰±۰/٤۸	۹۸/٦٥±۱/۷۸	۱۱۰/۷۰±۱/۳٥	۱۱٤/٤۳±۱/٤۰
تیمار ٥	۲٥/۱۸±۰/۷۹	۸۸/٤۱±۱/۳٥	۹۸/٥٥±۲/۲٤	۱۰٤/٥۰±۱/۲۰
تیمار ٦	۲٤/٥۱±۰/۲٦	۸۰/٤٥±۲/٦۸	۹۱/٥٥±۲/۱٥	۹٥/۱۲±۱/٤۳
تیمار ۷	۲۳/۳۷±۰/۳۷	٦۱/٦٦±۲/۲۳	۷۳/٥۱±۱/۷٤	۷۹/٤۱±۲/۲۰
تیمار ۸	۲۳/٦۳±۰/٥٥	٥۷/۳٥±۱/٤۳	۷۰/٤٤±۲/٥۰	۷٤/۰۰±۱/۷۰
تیمار ۹	۲۲/٤٤±۰/۸٥	٥۰/۳۹±۱/٥٥	٦۲/٦۱±۱/٤۷	٦۳/۱۲±۱/۲۰
شاهد	۲٥/۸۹±۰/۳۸	٥۰/٤۰±۲/٦۳	٦۰/٦٥±۱/٤۲	٦۱/۱۰±۱/٦۰

کارگاه	۲٤/٤٥±۰/۲۱	۵۰/٦۹±۱/۳۸	٦۳/۲۱±۲/۳۸	٦۳/۱۸±۱/۸۰

بررسیهای آماری صورت گرفته بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار بین تیمارهای ۱ ، ۲ و ۳ در سطح خطای ۵ درصد با یکدیگر ($P>0.05$) درهر یک از مراحل مختلف نمونه برداری می باشد. این در حالی است که اختلاف معنی داری در سطح خطای ۵ درصد بین این سه تیمار با سایر تیمارها در مراحل صفر ، میانی ، انتهای دوره پرورش لاروی و انتهای دوره پرورش در کارگاه مشاهده گردید($P<0.05$).

طبق نمودار۳-۲۵ سه تیمار ٤، ۵ و ٦ به ترتیب بیشترین میانگین آنزیم آمیلاز را در مراحل مختلف نمونه برداری به خود اختصاص داده اس(جدول ۳-۲٤) به خود اختصاص داده است. این در حالی است که در این تیمارها، از باکتری *Leuconostoc mesenteroides* جداسازی شده از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی بر اساس مقادیر تعیین شده به همراه جیره غذایی استفاده می گردید. مشابه این حالت در ارتباط با شاخصهای رشد نیز مشاهده گردید. بررسیهای آماری صورت گرفته حاکی از وجود اختلاف معنی داری در سطح خطای ۵ درصد بین این سه تیمار با سایر تیمارها در مراحل صفر ، میانی ، انتهای دوره پرورش لاروی و انتهای دوره پرورش در کارگاه می باشد ($P<0.05$). بعلاوه ، عدم اختلاف معنی دار این تیمارها با یکدیگر نیز در هر مرحله مشاهده گردید ($P>0.05$) .



۳-۲۵-تغییرات آنزیم آمیلاز (U/mg protein) (±SD) در دستگاه گوارش لارو تاسماهی ایرانی در طول دوره پرورش لاروی(n=۳٦۰ در هر تیمار)

مطالعه دقیقتر تیمارهای ۷ ، ۸ و ۹ که بصورت توام از هر دو باکتری مذکور به همراه جیره غذایی بـر اسـاس مقادیر تعیین شده استفاده می گردید بیانگر وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ۵ درصد بین تیمار۷ و ۸ با تیمار ۹ می باشد ($P<0.05$). بعلاوه اختلاف معنی داری بین سه تیمار مذکور با سایر تیمارها در هر یـک از مراحـل مختلـف نمونـه (میـانی، انتهـای پـرورش لاروی و انتهـای پـرورش در کارگـاه) مشـاهده گردید($P<0.05$) و تنها در مورد تیمارهای ۹ اختلاف معنی داری بین این تیمار با تیمارهای شاهد و کارگـاه حاصل نشد($P>0.05$) . در این سه تیمار به ترتیب تیمار ۷ ، ۸ و ۹ بالاترین مقادیر آنزیم آمـیلاز را در هـر یک از مراحل نمونه برداری بخود اختصاص داده است (جدول ۳-۲٤).

لازم به ذکر است که اختلاف معنی داری بین تیمار شاهد و کارگاه در ارتباط با مقادیر آنزیم آمیلاز در هر یک از مراحل(میانی، انتهای پرورش لاروی و انتهای پرورش در کارگاه) بدست نیامد($P>0.05$) .

بررسی مقادیر آنزیم آمیلاز در تیمارهای مختلف و مراحل نمونه برداری مشتمل بر مراحل صفر، میانی، انتهای دوره پرورش لاروی و انتهای دوره پرورش در کارگاه بیانگر وجـود اخـتلاف معنـی دار در سـطح خطـای ۵ درصد مرحله صفر با سایر مراحل نمونه برداری در تمام تیمارها می باشد($P<0.05$). بعـلاوه تفـاوت معنـی داری نیز در سطح خطای ۵ درصد بین مرحله میانی با سایر مراحل مشاهده گردیـد($P<0.05$). امـا تفـاوت معنی داری بین مرحله انتهای دوره پرورش در کارگاه با انتهای دوره پرورش لاروی بدست نیامد($P>0.05$)

۳-٤-۲-۲- آنزیم لیپاز

مطالعات انجام شده بر روی آنزیم لیپاز در تیمارهای مختلـف و مراحـل متفـاوت نمونـه بـرداری حـاکی از: حـداقل ٦/۷۰±۱/۱۵ U/mg protein و حـداکثر ۷/۹ ±۱/۳۳ U/mg protein در مرحلـه صـفر نمونـه برداری ، حداقل ۱۰/٥٦ ±۱/۱۸ U/mg protein در تیمـار ۳ و حـداکثر ۳۰/۳۸±۲/۸۷ U/mg protein در تیمار ٤ در مرحله میانی نمونه بـرداری ،حـداقل ٤٥/٤۰±۲/۳٥ U/mg protein در تیمـار ۳ و حـداکثر ۱۱۰/۷۰±۱/ ۳٥U/mg protein در تیمار ٤ در مرحلـه انتهـایی دوره پـرورش لاروی و در نهایـت حـداقل ٥۳/٤٥±۲/۱۱ U/mg protein در تیمـار ۳ و حـداکثر ۱۱٤/٤۳±۱/٤۰ U/mg protein در تیمـار ٤ در مرحله انتهایی دوره پرورش در کارگاه می باشد (جدول ۳-۲٥).

بررسیهای آماری انجام شده بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ۵ درصد بین تمـام تیمارهـا در مرحله صفر نمونه برداری می باشد ($P>0.05$)

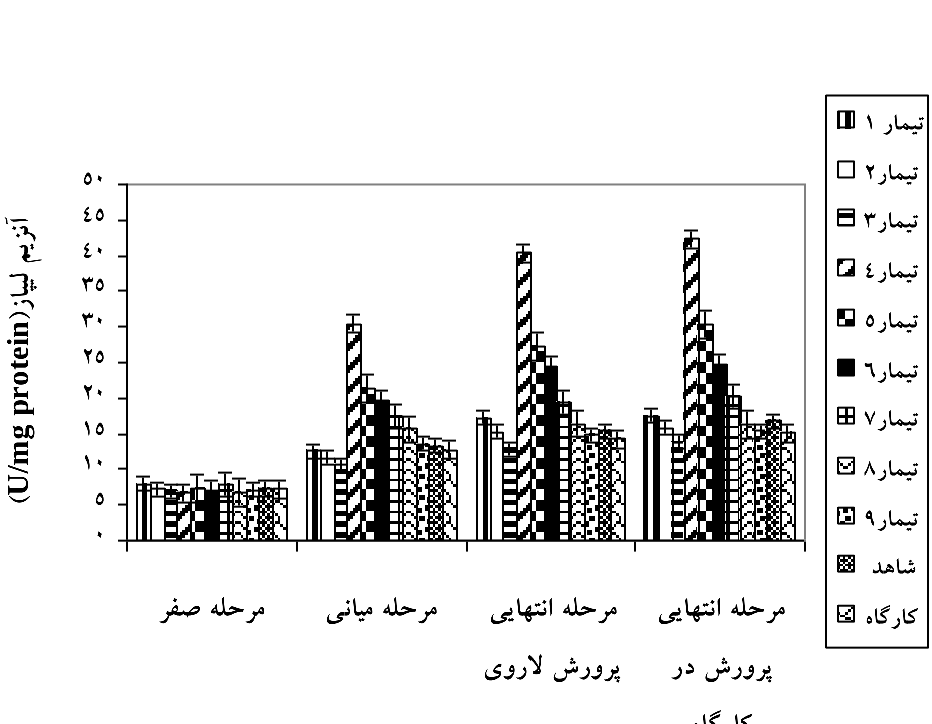
۳-۲۵- تغییرات آنزیم لیپاز (U/mg protein) (±SD) در دستگاه گوارش لارو تاسماهی ایرانی در طول دوره پرورش لاروی(n=۳٦۰ در هر تیمار)

مرحله پرورش / تیمار	مرحله صفر (آغاز تغذیه فعال/۱٤ روز پس از هچ)	مرحله میانی (۲٤ روز پس از هچ)	مرحله انتهایی پرورش لاروی (۳٤ روز پس از هچ)	مرحله انتهای دوره پرورش در کارگاه
تیمار ۱	۷/۹±۱/۱۳	۱۲/۵۹±۰/۸۸	۱۷/۲۱±۱/٤۵	۱۷/۵۳±۱/۲۳
تیمار ۲	۷/۲±۱/۱۰	۱۱/٥٤±۱/۰۹	۱۵/۳۰±۱/۲۱	۱۵/۸±۳/۸۹
تیمار ۳	٦/۹±۲/۲۱	۱۰/٥٦±۱/۱۸	۱۲/۸٦±۱/٦۰	۱۳/۹۰±۱/٤۵
تیمار ٤	٦/۷±۱/۳۳	۳۰/۳۸±۲/۸۷	٤۰/٤۱±۱/۳۵	٤۲ /۳۱±۱/٦۷
تیمار ۵	۷/۳±۱/٦۱	۲۱/٤٤±۱/۱۳	۲۷ /۳٦±۱/۲۲	۳۰/٤۳±۲/٤۰
تیمار ٦	۷/۱±۱/۱۲	۱۹/۷۰±۱/۲٦	۲٤/۳٤±۱/۱۲	۲٤/٦٥±۳/٦٥
تیمار ۷	۷/۹±۱/۱۱	۱۷/۳۳±۱/٦۱	۱۹/٤۱±۱/۹۰	۲۰/۳۱±٥/۸۹
تیمار ۸	٦/۸±۱/۱۵	۱٥/٥۹±۰/٦٦	۱٦/٤۲±۱/۱۷	۱٦/۳٤±۲/۹۰
تیمار ۹	۷/۱±۱/۹۰	۱۳/٦۰±۱/٥۸	۱٤ /۷٦±۱/٤۳	۱٥/۳۱±۱/٥٥
شاهد	۷/۳±۲/۱۰	۱۳/۲٥±۰/۲۲	۱٥/٤۱±۱/٥٦	۱٦/۸۰±۱/٤٥
کارگاه	۷/۲±۱/۹۲	۱۲/۷±۰/٥٦	۱٤ /۲٦±۱/٦۷	۱٥/۱۲±۱/۳۸

بر اساس جدول ۳-۲۵ حداکثر میزان آنزیم لیپاز متعلق به تیمار ٤ و حداقل متعلق به تیمار ۳ در هر یک از مراحل مختلف نمونه برداری می باشد. این در حالی است که تیمار ۳ دریافت کننده حداکثر تعداد *Lactobacillus curvatus* جداسازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی (۹×۱۰^۹ CFU/gr غذا) و تیمار٤ در یافت کننده حداقل تعداد *Leuconostoc mesenteroides* جداسازی شده از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی (۲×۱۰^۹ CFU/gr غذا) می باشد. مشابه این نتیجه در بررسی شاخصهای رشد نیز مشاهده گردید. مطالعات آماری انجام شده حاکی از وجود اختلاف معنی دار بین ۳ و ٤ با یکدیگر در سطح خطای ۵ درصد در مراحل میانی ، انتهای دوره پرورش لاروی و انتهای دوره پرورش در کارگاه می باشد ($P<0.05$).

بررسی نمودار۳-۲٦ و جدول ۳-۲۵ نشان می دهد که سه تیمار ۳، ۲ و ۱ به ترتیب کمترین میانگین آنزیم لیپاز را در مراحل مختلف نمونه برداری به خود اختصاص داده است. لازم به ذکر است که باکتری *Lactobacillus curvatus* جداسازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی، بر اساس مقادیر تعیین شده به همراه جیره غذایی به آب این ماهیان ، افزوده می گردید.

بررسیهای آماری صورت گرفته بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار بین تیمارهای ۱ ، ۲ و ۳ در سطح خطای ۵ درصد با یکدیگر ($P>0.05$) درهر یک از مراحل مختلف نمونه برداری می باشد. این در حالی است که اختلاف معنی داری در سطح خطای ۵ درصد بین این سه تیمار با سایر تیمارها در مراحل صفر ، میانی ، انتهای دوره پرورش لاروی و انتهای دوره پرورش در کارگاه مشاهده گردید($P<0.05$).



۳-۲٦-تغییرات آنزیم لیپاز (U/mg protein) (±SD) در دستگاه گوارش لارو تاسماهی ایرانی در طول دوره پرورش لاروی(n=۳٦۰ در هر تیمار)

طبق نمودار۳-۲٦ سه تیمار ٤، ٥ و ٦ به ترتیب بیشترین میانگین آنـزیم آمـیلاز را در مراحـل مختلـف نمونـه برداری به خود اختصاص داده اس(جدول ۳-۲٥) به خود اختصاص داده است. این در حالی است که در این تیمارها، از باکتری *Leuconostoc mesenteroides* جداسازی شده از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانـی بر اساس مقادیر تعیین شده به همراه جیـره غـذایی اسـتفاده مـی گردیـد. مشـابه ایـن حالـت در ارتبـاط بـا شاخصهای رشد نیز مشاهده گردید. بررسیهای آماری صورت گرفته حاکی از وجود اخـتلاف معنـی داری در سطح خطای ٥ درصد بین این سه تیمار با سایر تیمارها در مراحل صفر ، میانی ، انتهای دوره پرورش لاروی و انتهای دوره پرورش در کارگاه می باشد ($P<0.05$). بعـلاوه ، عـدم اخـتلاف معنـی دار ایـن تیمارهـا بـا یکدیگر نیز در هر مرحله مشاهده گردید ($P>0.05$) .

مطالعه دقیقتر تیمارهای ۷ ، ۸ و ۹ که بصورت توام از هر دو باکتری مذکور به همراه جیره غذایی بـر اسـاس مقادیر تعیین شده استفاده می گردید بیانگر وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ٥ درصد بین تیمار۷ و ۸ با تیمار ۹ می باشد ($P<0.05$). بعلاوه اختلاف معنی داری بین سه تیمار مذکور با سایر تیمارها در هر یـک از مراحـل مختلـف نمونـه (میـانی، انتهـای پـرورش لاروی و انتهـای پـرورش در کارگـاه) مشـاهده گردید($P<0.05$) و تنها در مورد تیمارهای ۹ اختلاف معنی داری بین این تیمار با تیمارهای شاهد و کارگـاه حاصل نشد($P>0.05$) . در این سه تیمار به ترتیب تیمار ۷ ، ۸ و ۹ بالاترین مقادیر آنزیم لیپاز را در هر یک از مراحل نمونه برداری بخود اختصاص داده است (جدول ۳-۲٥).

لازم به ذکر است که اختلاف معنی داری بین تیمار شاهد و کارگاه در ارتباط با مقادیر آنزیم لیپاز در هر یک از مراحل(میانی، انتهای پرورش لاروی و انتهای پرورش در کارگاه) بدست نیامد($P>0.05$) .

بررسی مقادیر آنزیم لیپاز در تیمارهای مختلف و مراحل نمونه برداری مشتمل بر مراحل صفر، میانی، انتهای دوره پرورش لاروی و انتهای دوره پرورش در کارگاه بیانگر وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ۵ درصد مرحله صفر با سایر مراحل نمونه برداری در تمام تیمارها می باشد($P<0.05$). بعلاوه تفاوت معنی داری نیز در سطح خطای ۵ درصد بین مرحله میانی با سایر مراحل مشاهده گردید($P<0.05$). اما تفاوت معنی داری بین مرحله انتهای دوره پرورش در کارگاه با انتهای دوره پرورش لاروی بدست نیامد($P>0.05$).

۳-٤-۲-۳- آنزیم پروتئاز

مطالعات انجام شده بر روی آنزیم پروتئاز در تیمارهای مختلف و مراحل متفاوت نمونه برداری حاکی از: حداقل ٦/۷۰±۱/۱۵ U/mg protein و حداکثر ۷/۹ ±۱/۳۳ U/mg protein در مرحله صفر نمونه برداری ، حداقل ۱۰/٥٦ ±۱/۱۸ U/mg protein در تیمار ۳ و حداکثر ۳۰/۳۸±۲/۸۷ U/mg protein در تیمار ٤ در مرحله میانی نمونه برداری ،حداقل ٤٥/٤۰±۲/۳٥ U/mg protein در تیمار ۳ و حداکثر ۱۱۰/۷۰±۱/ ۳٥U/mg protein در تیمار ٤ در مرحله انتهایی دوره پرورش لاروی و در نهایت حداقل ٥۳/٤٥±۲/۱۱ U/mg protein در تیمار ۳ و حداکثر ۱۱٤/٤۳±۱/٤۰ U/mg protein در تیمار ٤ در مرحله انتهایی دوره پرورش در کارگاه می باشد (جدول ۳-٢٦). بررسیهای آماری انجام شده بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ۵ درصد بین تمام تیمارها در مرحله صفر نمونه برداری می باشد ($P>0.05$).

بر اساس جدول ۳-٢٦ حداکثر میزان آنزیم پروتئاز متعلق به تیمار ٤ و حداقل متعلق به تیمار ۳ در هر یک از مراحل مختلف نمونه برداری می باشد. این در حالی است که تیمار ۳ دریافت کننده حداکثر تعداد *Lactobacillus curvatus* جداسازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی (9×10^{9} CFU/gr غذا) و تیمار٤ در یافت کننده حداقل تعداد *Leuconostoc mesenteroides* جداسازی شده از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی (2×10^{9} CFU/gr غذا) می باشد. مشابه این نتیجه در بررسی شاخصهای رشد نیز مشاهده گردید.

مطالعات آماری انجام شده حاکی از وجود اختلاف معنی دار بین ۳ و ٤ با یکدیگر در سطح خطای ۵ درصد در مراحل میانی ، انتهای دوره پرورش لاروی و انتهای دوره پرورش در کارگاه می باشد ($P<0.05$).

بررسی نمودار۳-۲۷ و جدول ۳-٢٦ نشان می دهد که سه تیمار ۳، ۲ و ۱ به ترتیب کمترین میانگین آنزیم پروتئاز را در مراحل مختلف نمونه برداری به خود اختصاص داده است. لازم به ذکر است که باکتری

Lactobacillus curvatus جداسازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی، بر اساس مقادیر تعیین شده به همراه جیره غذایی به آب این ماهیان ، افزوده می گردید.

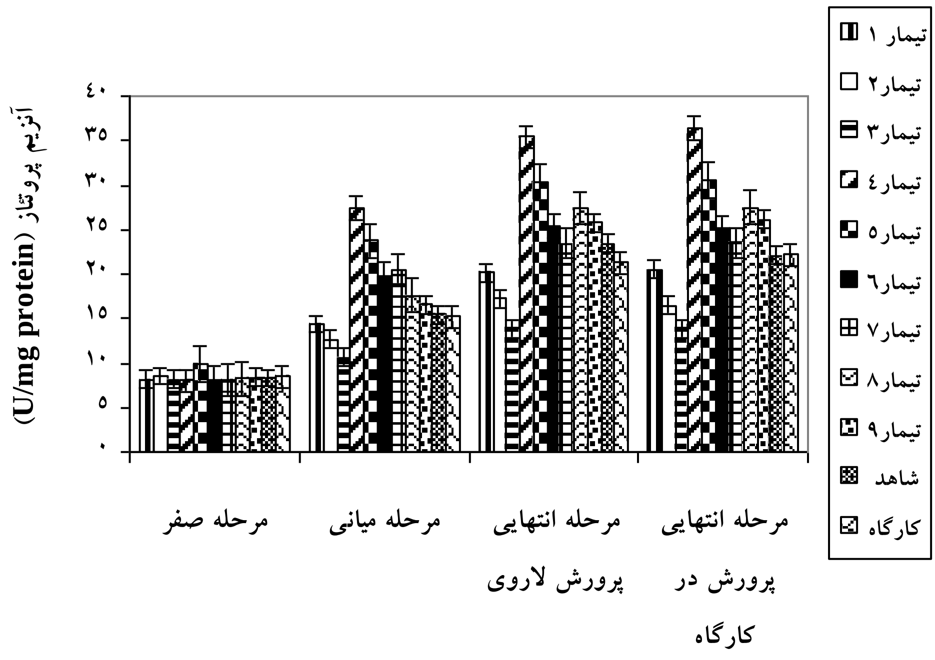
بررسیهای آماری صورت گرفته بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار بین تیمارهای ۱ ، ۲ و ۳ در سطح خطای ۵ درصد با یکدیگر ($P>0.05$) درهر یک از مراحل مختلف نمونه برداری می باشد. این در حالی است که اختلاف معنی داری در سطح خطای ۵ درصد بین این سه تیمار با سایر تیمارها در مراحل صفر ، میانی ، انتهای دوره پرورش لاروی و انتهای دوره پرورش در کارگاه مشاهده گردید($P<0.05$).

۳-۲٦- تغییرات آنزیم پروتئاز (U/mg protein) (±SD) در دستگاه گوارش لارو تاسماهی ایرانی در طول دوره پرورش لاروی(n=۳٦۰ در هر تیمار)

مرحله پرورش / تیمار	مرحله صفر (آغاز تغذیه فعال/۱٤ روز پس از هچ)	مرحله میانی (۲٤ روز پس از هچ)	مرحله انتهایی پرورش لاروی (۳٤ روز پس از هچ)	مرحله انتهای دوره پرورش در کارگاه
تیمار ۱	۸/۱۵±۰/۲٤	۱٤/۳۹±۲/۲۰	۲۰/۲۱±۱/٤۵	۲۰/۵۱±۱/۲۱
تیمار ۲	۸/۵۳±۰/۱۰	۱۲/٦۳±۲/۸۸	۱۷/۲۱±۱/٤۵	۱٦/٤۵±۱/۱۱
تیمار ۳	۸/۱۷±۰/۲۱	۱۰/٦٤±۱/۹۰	۱۳/۸٦±۱/٦۰	۱۳/۸۷±۱/٦۵
تیمار ٤	۸/۰۰±۰/۳۳	۲۷/۳۹±۲/۷٦	۳۵/٤۱±۱/۳۵	۳٦/٤۳±۱/۸۵
تیمار ۵	۹/۹۰±۰/٦۱	۲۳/۷۳±۲/۱۰	۳۰ /۳٦±۱/۲۲	۳۰/۵۰±۱/٤۵
تیمار ٦	۸/۲۰±۰/۱۲	۱۹/۸۷±۲/۹٤	۲۵/۳٤±۱/۱۲	۲۵/۱۲±۱/٦۵
تیمار ۷	۸/۱۰±۰/۱۱	۲۰/۵۱±۱/۹۰	۲۳/٤۱±۱/۹۰	۲۳/۵۱±۲/۵۵

تیمار ۸	۸/۳۰±۰/۱۳	۱۷/٦۰±۱/۹٥	۲۷/٤۲±۱/۱۷	۲۷/٥۰±۱/۳۸
تیمار ۹	۸/٤۲±۰/۹۰	۱٦/٥٥±۲/۸٦	۲٥ /۷٦±۱/٤۳	۲٦/۱۲±۱/۱۷
شاهد	۸/۳۲±۰/۱۰	۱٥/٤٦±۱/۱۱	۲۳/٤۱±۱/٥٦	۲۲/۱۰±۱/۱۱
کارگاه	۸/٤٥±۰/۹۲	۱٥/۲۱±۲/۸۳	۲۱ /۲٦±۱/٦۷	۲۲/۱۸±۱/٦٤

طبق نمودار۳–۲۷ سه تیمار ٤، ٥ و ٦ به ترتیب بیشترین میانگین آنزیم پروتئاز را در مراحل مختلف نمونه برداری به خود اختصاص داده اس(جدول ۳–۲٦) به خود اختصاص داده است. این در حالی است که در این تیمارها، از باکتری *Leuconostoc mesenteroides* جداسازی شده از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی بر اساس مقادیر تعیین شده به همراه جیره غذایی استفاده می گردید. مشابه این حالت در ارتباط با شاخصهای رشد نیز مشاهده گردید. بررسیهای آماری صورت گرفته حاکی از وجود اختلاف معنی داری در سطح خطای ٥ درصد بین این سه تیمار با سایر تیمارها در مراحل صفر ، میانی ، انتهای دوره پرورش لاروی و انتهای دوره پرورش در کارگاه می باشد ($P<0.05$). بعلاوه ، عدم اختلاف معنی دار این تیمارها با یکدیگر نیز در هر مرحله مشاهده گردید ($P>0.05$) .



۳-۲۷-تغییرات آنزیم پروتئاز (U/mg protein) (±SD) در دستگاه گوارش لارو تاسماهی ایرانی در طول دوره پرورش لاروی(n=۳٦۰ در هر تیمار)

مطالعه دقیقتر تیمارهای ۷ ، ۸ و ۹ که بصورت توام از هر دو باکتری مذکور به همراه جیره غذایی بر اساس مقادیر تعیین شده استفاده می گردید بیانگر وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ۵ درصد بین تیمار۷ و ۸ با تیمار ۹ می باشد ($P<0.05$). بعلاوه اختلاف معنی داری بین سه تیمار مذکور با سایر تیمارها در هر یک از مراحل مختلف نمونه (میانی، انتهای پرورش لاروی و انتهای پرورش در کارگاه) مشاهده گردید($P<0.05$) و تنها در مورد تیمارهای ۹ اختلاف معنی داری بین این تیمار با تیمارهای شاهد و کارگاه حاصل نشد($P>0.05$) . در این سه تیمار به ترتیب تیمار ۷ ، ۸ و ۹ بالاترین مقادیر آنزیم پروتئاز را در هر یک از مراحل نمونه برداری بخود اختصاص داده است (جدول ۳-۲٦).

لازم به ذکر است که اختلاف معنی داری بین تیمار شاهد و کارگاه در ارتباط با مقادیر آنزیم پروتئاز در هر یک از مراحل(میانی، انتهای پرورش لاروی و انتهای پرورش در کارگاه) بدست نیامد($P>0.05$) .

بررسی مقادیر آنزیم پروتئاز در تیمارهای مختلف و مراحل نمونه برداری مشتمل بر مراحل صفر، میانی، انتهای دوره پرورش لاروی و انتهای دوره پرورش در کارگاه بیانگر وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ۵ درصد مرحله صفر با سایر مراحل نمونه برداری در تمام تیمارها می باشد($P<0.05$). بعلاوه تفاوت معنی داری نیز در سطح خطای ۵ درصد بین مرحله میانی با سایر مراحل مشاهده گردید($P<0.05$). اما تفاوت معنی داری بین مرحله انتهای دوره پرورش در کارگاه با انتهای دوره پرورش لاروی بدست نیامد($P>0.05$)

۳-٤-۲-٤- آلکالین فسفاتاز

مطالعات انجام شده بر روی آنزیم آلکالین فسفاتاز در تیمارهای مختلف و مراحل متفاوت نمونه برداری حاکی از: حداقل U/mg protein ۷٤/۹۰±۰/٦۱ و حداکثر U/mg protein ۷۰/۲۵±۳/۲٤ در مرحله

صفر نمونه برداری ، حداقل U/mg protein ۷۵/۷٤±۲/۱۱ در تیمار شاهد و حداکثر U/mg protein۱/۹۰±۱۳۸/٦٤ در تیمار ۳ در مرحله میانی نمونه برداری ،حداقل U/mg protein ۱/٦۷±۲٦/ ۷۸ در تیمارکارگاه و حداکثر U/mg protein۱/٦۰±۱٤۵/۸٦ در تیمار ۳ در مرحله انتهایی دوره پرورش لاروی و در نهایت حداقل U/mg protein ۱/۱۱±۸۰/۱۰ در تیمار شاهد و حداکثر U/mg protein ۱/٦۵±۱۳۵/۸۷ در تیمار ۳ در مرحله انتهایی دوره پرورش در کارگاه می باشد (جدول ۳–۲۷).بررسیهای آماری انجام شده بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ۵ درصد بین تمام تیمارها در مرحله صفر نمونه برداری می باشد (*P>0.05*).

بر اساس جدول ۳–۲۷ حداکثر میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز متعلق به تیمار ۳ و حداقل متعلق به تیمار شاهد و کارگاه در هر یک از مراحل مختلف نمونه برداری می باشد. این در حالی است که تیمار ۳ دریافت کننده حداکثر تعداد *Lactobacillus curvatus* جداسازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی (9×10^{9} CFU/gr غذا) می باشد. مطالعات آماری انجام شده حاکی از وجود اختلاف معنی دار بین ۳ با سایر تیمارها در سطح خطای ۵ درصد در مراحل میانی ، انتهای دوره پرورش لاروی و انتهای دوره پرورش در کارگاه می باشد (*P<0.05*).

بررسی نمودار۳–۲۸ و جدول ۳–۲۷ نشان می دهد که سه تیمار ۳، ۲ و ۱ به ترتیب بیشترین میانگین آنزیم آلکالین فسفاتاز در مراحل مختلف نمونه برداری به خود اختصاص داده است. لازم به ذکر است که باکتری *Lactobacillus curvatus* جداسازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی، بر اساس مقادیر تعیین شده به همراه جیره غذایی به آب این ماهیان ، افزوده می گردید.

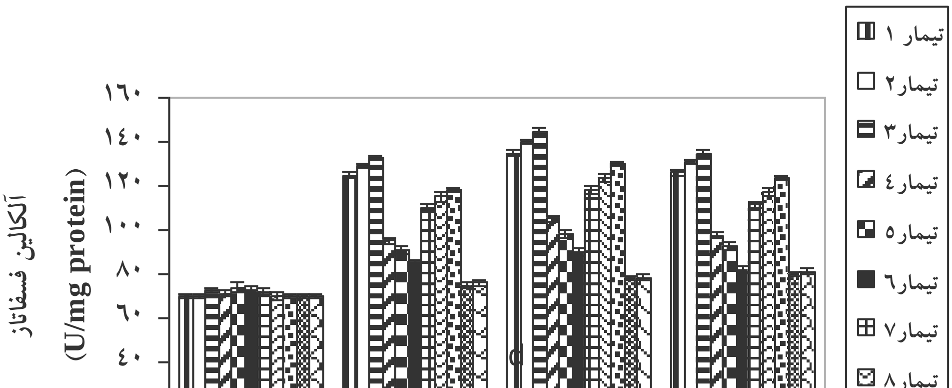
۳–۲۷- تغییرات آنزیم آلکالین فسفاتاز (U/mg protein) (±SD) در دستگاه گوارش لارو تاسماهی ایرانی در طول دوره پرورش لاروی(n=۳٦۰ در هر تیمار)

مرحله / پرورش تیمار	مرحله صفر (آغاز تغذیه فعال/۱٤ روز پس از هچ)	مرحله میانی (۲٤ روز پس از هچ)	مرحله انتهایی پرورش لاروی (۳٤ روز پس از هچ)	مرحله انتهای دوره پرورش در کارگاه
تیمار ۱	۷۰/۲۵±۳/۲٤	۱۲۵/۵۲±۱/۹۰	۱۳۵/۲۱±۱/٤۵	۱۲٦/۵۱±۱/۲۱
تیمار ۲	۷۰/۵۳±۲/۱۰	۱۲۹/٦۳±۲/۸۸	۱٤۰/۲۱±۱/٤۵	۱۳۱/٤۵±۱/۱۱

تیمار ٣	٧٣/٦٧±٣/٢١	١٣٣/٦٤±١/٩٠	١٤٥/٨٦±١/٦٠	١٣٥/٨٧±١/٦٥
تیمار ٤	٧١/٠٠±٣/٣٣	٩٥/٥٦±١/٧٦	١٠٥/٤١±١/٣٥	٩٧/٤٣±١/٨٥
تیمار ٥	٧٤/٩٠±٢/٦١	٩١/٦٣±٢/١٠	٩٨ /٣٦±١/٢٢	٩٢/٥٠±١/٤٥
تیمار ٦	٧٣/٢٠±٣/١٢	٨٥/٣٩±١/٩٤	٩٠/٣٤±١/١٢	٨٢/١٢±١/٦٥
تیمار ٧	٧٢/١٠±٢/١١	١١٠/٧٣±١/٩٠	١١٨/٤١±١/٩٠	١١١/٤١±٢/٥٥
تیمار ٨	٧٠/٣٠±٢/١٣	١١٥/٤٨±١/٩٥	١٢٤/٤٢±١/١٧	١١٧/٠٠±١/٣٨
تیمار ٩	٧٠/٥٠±٣/٩٠	١١٨/٥٥±١/٨٦	١٣٠ /٧٦±١/٤٣	١٢٤/١٢±١/١٧
شاهد	٧٠/٤٠±٢/١٠	٧٥/٧٤±٢/١١	٧٨/٤١±١/٥٦	٨٠/١٠±١/١١
کارگاه	٧٢/٤٥±٢/٩٢	٧٦/٥٨±١/٨٣	٧٨ /٢٦±١/٦٧	٨١/١٨±١/٦٤

بررسیهای آماری صورت گرفته بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار بین تیمارهای ١ ، ٢ و ٣ در سطح خطای ٥ درصد با یکدیگر ($P>0.05$) درهر یک از مراحل مختلف نمونه برداری می باشد. این در حالی است که اختلاف معنی داری در سطح خطای ٥ درصد بین این سه تیمار با سایر تیمارها در مراحل صفر ، میانی ، انتهای دوره پرورش لاروی و انتهای دوره پرورش در کارگاه مشاهده گردید($P<0.05$).

طبق نمودار٣-٢٨ سه تیمار ٦، ٥ و٤ به ترتیب کمترین میانگین آنزیم آلکالین فسفاتاز را در مراحل مختلف نمونه برداری (جدول ٣-٢٧) پس از دو تیمار شاهد و کارگاه به خود اختصاص داده است. این در حالی است که در این تیمارها، از باکتری *Leuconostoc mesenteroides* جداسازی شده از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی بر اساس مقادیر تعیین شده به همراه جیره غذایی استفاده می گردید. بررسیهای آماری صورت گرفته حاکی از وجود اختلاف معنی داری در سطح خطای ٥ درصد بین این سه تیمار با سایر تیمارها در مراحل صفر ، میانی ، انتهای دوره پرورش لاروی و انتهای دوره پرورش در کارگاه می باشد ($P<0.05$). بعلاوه ، عدم اختلاف معنی دار این تیمارها با یکدیگر نیز در هر مرحله مشاهده گردید ($P>0.05$) .



۳-۲۸-تغییرات آنزیم آلکالین فسفاتاز (U/mg protein) (±SD) در دستگاه گوارش لارو تاسماهی ایرانی در طول دوره پرورش لاروی(n=۳۶۰ در هر تیمار)

طبق نمودار۳-۲۸ سه تیمار ٦، ٥ و٤ به ترتیب کمترین میانگین آنزیم آلکالین فسفاتاز را در مراحل مختلف نمونه برداری (جدول ۳-۲۷) پس از دو تیمار شاهد و کارگاه به خود اختصاص داده است. این در حالی است که در این تیمارها، از باکتری *Leuconostoc mesenteroides* جداسازی شده از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی بر اساس مقادیر تعیین شده به همراه جیره غذایی استفاده می گردید. بررسیهای آماری صورت گرفته حاکی از وجود اختلاف معنی داری در سطح خطای ٥ درصد بین این سه تیمار با سایر تیمارها در مراحل صفر ، میانی ، انتهای دوره پرورش لاروی و انتهای دوره پرورش در کارگاه می باشد ($P<0.05$). بعلاوه ، عدم اختلاف معنی دار این تیمارها با یکدیگر نیز در هر مرحله مشاهده گردید ($P>0.05$) .

مطالعه دقیقتر تیمارهای ۷ ، ۸ و ۹ که بصورت توام از هر دو باکتری مذکور به همراه جیره غذایی بر اساس مقادیر تعیین شده استفاده می گردید بیانگر وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ٥ درصد بین تیمار۷ و ۸ با تیمار ۹ می باشد ($P<0.05$). بعلاوه اختلاف معنی داری بین سه تیمار مذکور با سایر تیمارها در هر یک از مراحل مختلف نمونه برداری (میانی، انتهای پرورش لاروی و انتهای پرورش در کارگاه) مشاهده گردید($P<0.05$).

لازم به ذکر است که اختلاف معنی داری بین تیمار شاهد و کارگاه در ارتباط با مقادیر آنزیم پروتئاز در هر یک از مراحل(میانی، انتهای پرورش لاروی و انتهای پرورش در کارگاه) بدست نیامد($P>0.05$) .

بررسی مقادیر آنزیم پروتئاز در تیمارهای مختلف و مراحل نمونه برداری مشتمل بر مراحل صفر، میانی، انتهای دوره پرورش لاروی و انتهای دوره پرورش در کارگاه بیانگر وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ۵ درصد مرحله صفر با سایر مراحل نمونه برداری در تمام تیمارها می باشد($P<0.05$). بعلاوه تفاوت معنی داری نیز در سطح خطای ۵ درصد بین مرحله انتهای دوره پرورش لاروی با سایر مراحل مشاهده گردید($P<0.05$). اما تفاوت معنی داری بین مرحله انتهای دوره پرورش در کارگاه با مرحله میانی بدست نیامد($P>0.05$) .

۳-۵- تاثیرکاربرد دو گونه از باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک جداسازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی و تاسماهی ایرانی شامل *Lactobacillus curvatus* و *Leuconostoc mesenteroides* **بر روی آنزیم لیزوزیم بعنوان یکی از مهمترین ارکان ایمنی ذاتی**

در این بررسی با توجه به عدم امکان خونگیری از لاروهای تاسماهیان در محدوده وزنی زیر ۱ گرم ، امکان بررسی فاکتورهای مختلف خونی بمنظور بررسی سیستم ایمنی میسر نگردید. لذا با توجه به نقش آنزیم لیزوزیم در سیستم ایمنی ذاتی در گونه های مختلف ماهیان، در این بررسی بمنظور ارزیابی تاثیر باکتریهای مورد نظر بر روی سیستم ایمنی مقدار آنزیم لیزوزیم اندازه گیری گردید.

۳-۵-۱- فیل ماهی

مطالعات انجام شده بر روی آنزیم لیزوزیم در تیمارهای مختلف و مراحل متفاوت نمونه برداری حاکی از:

حداقل U/mg protein ۵٤/۱۰±٤/۲۱ و حداکثر U/mg protein ۵۸/۵±۵/۱۰ در مرحله صفر نمونه برداری ،حداقل U/mg protein ۳۳/٦±۵/۹۰ در تیمار ۳ و حداکثر U/mg protein ۱۱۵/٦±۵/۹۰ در تیمار ٦ در مرحله میانی نمونه برداری ،حداقل U/mg protein ۳٤/۸±۳/٦۰ در تیمار ۳ و حداکثر protein U/mg ۱۱٤/۳±٤/۱۲ در تیمار ٦ در مرحله انتهایی دوره پرورش لاروی و در نهایت حداقل U/mg protein ۳۳/۸±۳/٦۵ در تیمار ۳ و حداکثر U/mg protein ۱۱٤/۱±۳/٦۵ در تیمار ٦ در مرحله انتهایی دوره پرورش در کارگاه می باشد (جدول ۳-۲۸).

بررسیهای آماری انجام شده بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ۵ درصد بین تمام تیمارها در مرحله صفر نمونه برداری می باشد ($P>0.05$).

۳-۲۸- تغییرات آنزیم لیزوزیم (U/mg protein) (±SD) در لارو فیل ماهی در طول دوره پرورش لاروی

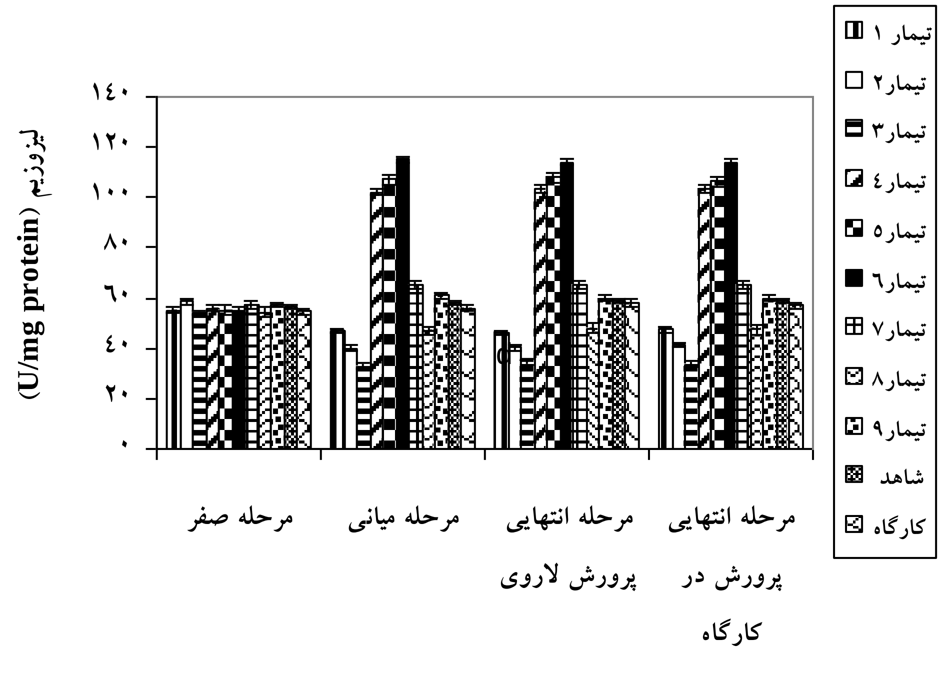
(n=۳٦۰ در هر تیمار)

مرحله پرورش / تیمار	مرحله صفر (آغاز تغذیه فعال/۱٤ روز پس از هچ)	مرحله میانی (۲٤ روز پس از هچ)	مرحله انتهایی پرورش لاروی (۳٤ روز پس از هچ)	مرحله انتهای دوره پرورش در کارگاه
تیمار ۱	۵۵/۱±٤/۲٤	٤۷/۳±۵/۲۰	٤٦/۲±۳/٤۵	٤۷/۵±۳/۲۱
تیمار ۲	۵۸/۵±۵/۱۰	٤۰/٦±۵/۸۸	٤۰/۲±۳/٤۵	٤۱/٤±٤/۱۱
تیمار ۳	۵٤/۱±٤/۲۱	۳۳/٦±۵/۹۰	۳٤/۸±۳/٦۰	۳۳/۸±۳/٦۵
تیمار ٤	۵٦/۰±٤/۳۳	۱۰۲/۳±۵/۲۰	۱۰۳/٤±٤/۳۵	۱۰۳/٤±۳/۸۵
تیمار ۵	۵٤/۹±۵/٦۱	۱۰۷/٦±۵/۸۸	۱۰۷ /۹±۳/۲۲	۱۰٦/۵±٤/٤۵
تیمار ٦	۵۵/۲±۳/۱۲	۱۱۵/٦±۵/۹۰	۱۱٤/۳±٤/۱۲	۱۱٤/۱±۳/٦۵
تیمار ۷	۵۷/۱±٤/۱۱	٦۵/۵±٤/۹۰	٦۵/٤±۵/۹۰	٦۵/۵±۵/۵۵
تیمار ۸	۵٤/۳±٤/۱۳	٤۷/٦±٤/۹۵	٤۸/٤±٤/۱۷	٤۷/۵±۲/۳۸
تیمار ۹	۵۷/٤±۵/۹۰	٦۱/۵±٤/۸٦	٦۰ /۷±٤/٤۳	٦۰/٤±٤/۱۷
شاهد	۵٦/۳±۵/۱۰	۵۸/۵±۵۱/۱۱	۵۹/٤±۳/۵٦	۵۹/۱±۳/۱۱
کارگاه	۵٤/۵±۵/۹۲	۵٦/۳±٤/۸۳	۵۸ /۲±۳/٦۷	۵۷/۱±٤/٦٤

بر اساس جدول ۳-۲۸ حداکثر میزان آنزیم لیزوزیم متعلق به تیمار ٦ و حداقل متعلق به تیمار ۳ در هر یک از مراحل نمونه برداری می باشد. این در حالی است که تیمار ۳ دریافت کننده حداکثر تعداد

Lactobacillus curvatus جداسازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی (۹×۱۰^۹ CFU/gr غذا) و تیمار ٦ در یافت کننده حداکثر تعـداد *Leuconostoc mesenteroides* جداسـازی شـده از دسـتگاه گـوارش تاسماهی ایرانی (۹×۱۰^۹ CFU/gr غذا) می باشد. مطالعات آماری انجام شده حاکی از وجود اخـتلاف معنـی دار بین دو تیمار ۳ و ٦ با یکدیگر در سطح خطای ۵ درصـد در مراحـل مختلـف نمونـه بـرداری مـی باشـد ($P<0.05$).

برررسی نمودار۳–۲۹ و جدول ۳–۲۸ نشان می دهد که سه تیمار ۳، ۲ و ۱ به ترتیب کمترین میانگین آنـزیم لیزوزیم را در مراحل مختلف نمونه برداری به خود اختصـاص داده اسـت. لازم بـه ذکـر اسـت کـه بـاکتری *Lactobacillus curvatus* جداسازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی، بر اساس مقادیر تعیین شده بـه همراه جیره غذایی به آب این ماهیان ، افزوده می گردید. بررسیهای آماری صورت گرفته بیانگر عـدم وجـود اختلاف معنی دار بین تیمارهای ۱ ، ۲ و ۳ در سطح خطای ۵ درصد با یکدیگر ($P>0.05$) در هـر یـک از مراحل مختلف نمونه برداری می باشد. این در حالی است که اختلاف معنی داری در سطح خطای ۵ درصـد بین این سه تیمار با سایر تیمارها در مراحل صفر ، میانی ، انتهای دوره پرورش لاروی و انتهای دوره پرورش در کارگاه مشاهده گردید($P<0.05$).



۳-۲۹-تغییرات آنزیم لیزوزیم (U/mg protein) (±SD) در لارو فیل ماهی در طول دوره پرورش لاروی

(n=۳٦۰ در هر تیمار)

طبق نمودار۳-۲۹ سه تیمار ٦، ٥ و ٤ به ترتیب بیشترین میانگین آنزیم لیزوزیم را در مراحل مختلف نمونه برداری (جدول ۳-۲۸) به خود اختصاص داده است. این در حالی است که در این تیمارها، از باکتری *Leuconostoc mesenteroides* جداسازی شده از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی بر اساس مقادیر تعیین شده به همراه جیره غذایی استفاده می گردید.

بررسیهای آماری صورت گرفته حاکی از وجود اختلاف معنی داری در سطح خطای ٥ درصد بین این سه تیمار با سایر تیمارها در مراحل صفر ، میانی ، انتهای دوره پرورش لاروی و انتهای دوره پرورش در کارگاه می باشد ($P<0.05$). بعلاوه ، عدم اختلاف معنی دار این تیمارها با یکدیگر (در هر یک از مراحل) نیز اثبات گردید ($P>0.05$) .

مطالعه دقیقتر تیمارهای ۷ ، ۸ و ۹ که بصورت توام از هر دو باکتری مذکور به همراه جیره غذایی بر اساس مقادیر تعیین شده استفاده گردید، بیانگر وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ٥ درصد بین تیمار ۸ با دو تیمار ۷ و ۹ در هر یک از مراحل نمونه برداری(میانی، انتهای پرورش لاروی و انتهای پرورش در کارگاه) می باشد ($P<0.05$). بعلاوه اختلاف معنی داری بین سه تیمار مذکور با سایر تیمارها در مراحل مختلف نمونه برداری مشاهده گردید($P<0.05$) و تنها در مورد تیمارهای ۷ و ۹ اختلاف معنی داری بین این دو تیمار با تیمارهای شاهد و کارگاه حاصل نشد($P>0.05$) .تیمارهای ۸ ، ۷ و ۹ دارای مقادیر کمتر آنزیم لیزوزیم در مقایسه با یکدیگر می باشند (جدول ۳-۲۸).

لازم به ذکر است که اختلاف معنی داری بین تیمار شاهد و کارگاه در ارتباط با مقادیر آنزیم لیزوزیم در هر یک از مراحل(میانی، انتهای پرورش لاروی و انتهای پرورش در کارگاه) بدست نیامد ($P>0.05$).

بررسی مقادیر آنزیم لیزوزیم در تیمارهای مختلف و مراحل نمونه برداری مشتمل بر مراحل صفر، میانی، انتهای دوره پرورش لاروی و انتهای دوره پرورش در کارگاه بیانگر وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ٥ درصد مرحله صفر با سایر مراحل نمونه برداری در تمام تیمارها می باشد($P<0.05$) اما تفاوت معنی داری بین مراحل میانی، انتهای دوره پرورش در کارگاه و انتهای دوره پرورش لاروی با یکدیگر بدست نیامد($P>0.05$) .

۳-۵-۲- تاسماهی ایرانی

مطالعات انجام شده بر روی آنزیم لیزوزیم در تیمارهای مختلف و مراحل متفاوت نمونه برداری حاکی از: حداقل U/mg protein ۴۰±۱/۱۱ و حداکثر U/mg protein ۴۳±۱/۱۰ در مرحله صفر نمونه برداری ،حداقل U/mg protein ۲۵/۹۴±۲/۸۷ در تیمار ٤ و حداکثر U/mg protein ۱۱۱/۷۳±۲/۱۸ در تیمار ۳ در مرحله میانی نمونه برداری ،حداقل U/mg protein ۲٦/٤۱±۲/۳۵ در تیمار ٤ و حداکثر U/mg protein ۱۱۰/۸٦±٤/٦۰ در تیمار ۳ در مرحله انتهایی دوره پرورش لاروی و در نهایت حداقل U/mg protein ۲۵ /۳۱±۱/٦۷ در تیمار ٤ و حداکثر U/mg protein ۱۱۲/۹۰±۱/٤۵ در تیمار ۳ در مرحله انتهایی دوره پرورش در کارگاه می باشد (جدول ۳-۲۹).

بررسیهای آماری انجام شده بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ۵ درصد بین تمام تیمارها در مرحله صفر نمونه برداری می باشد ($P>0.05$).

۳-۲۹- تغییرات آنزیم لیزوزیم (U/mg protein) (±SD) در لارو تاسماهی ایرانی در طول دوره پرورش لاروی(n=۳٦۰ در هر تیمار)

مرحله / تیمار پرورش	مرحله صفر (آغاز تغذیه فعال/۱٤ روز پس از هچ)	مرحله میانی (۲٤ روز پس از هچ)	مرحله انتهایی پرورش لاروی (۳٤ روز پس از هچ)	مرحله انتهای دوره پرورش در کارگاه
تیمار ۱	٤۱±۱/۱۳	۹۵/٤۱±۲/۸۸	۹۵/۲۱±۳/٤۵	۹۳/۵۳±۱/۲۳
تیمار ۲	٤۳±۱/۱۰	۱۰٤/۵۲±۲/۱۹	۱۰۲/۳۰±۲/۲۱	۱۰۳/۲۱±۳/۸۹
تیمار ۳	٤۰±۲/۲۱	۱۱۱/۷۳±۲/۱۸	۱۱۰/۸٦±٤/٦۰	۱۱۲/۹۰±۱/٤۵
تیمار ٤	٤۱±۱/۳۳	۲۵/۹٤±۲/۸۷	۲٦/٤۱±۲/۳۵	۲٤ /۳۱±۱/٦۷

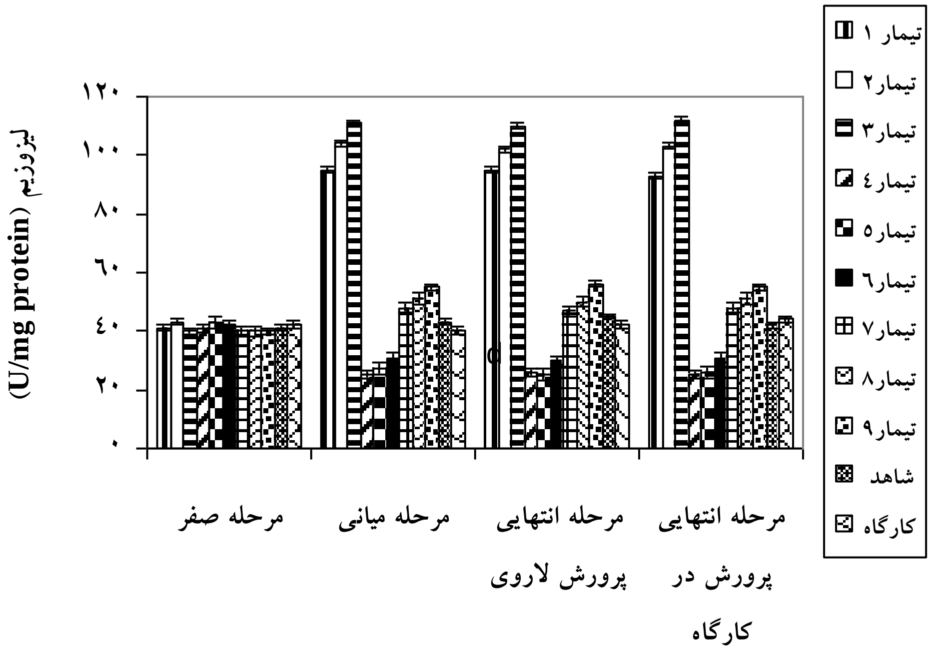
تیمار ٥	٤٣±١/٦١	٢٧/٦١±١/١٣	٢٨ /٣٦±٣/٢٢	٢٦/٤٣±٢/٤٠
تیمار ٦	٤٢±١/١٢	٣١/٧١±٢/٢٦	٣٠/٣٤±١/١٢	٣١/٦٥±٣/٦٥
تیمار ٧	٤٠±١/١١	٤٨/٣٢±١/٦١	٤٧/٤١±٣/٩٠	٤٨/٣١±٥/٨٩
تیمار ٨	٤٠±١/١٣	٥١/٣٢±٢/٦٦	٥٠/٤٢±١/١٧	٥١/٣٤±٢/٩٠
تیمار ٩	٤٠±١/٩٠	٥٥/٢٦±٢/٥٨	٥٦ /٧٦±٢/٤٣	٥٥/٣١±١/٥٥
شاهد	٤١±٢/١٠	٤٣/٢٥±٢/٢٢	٤٥/٤١±١/٥٦	٤٢/٨٠±١/٤٥
کارگاه	٤٢±١/٩٢	٤٠/٥٣±١/٥٦	٤٢ /٢٦±١/٦٧	٤٤/١٢±١/٣٨

بر اساس جدول ٣-٢٩ حداکثر میزان آنزیم لیزوزیم متعلق به تیمار ٣ و حداقل متعلق به تیمار ٤ در هر یک از مراحل نمونه برداری می باشد. این در حالی است که تیمار ٣ دریافت کننده حداکثر تعداد *Lactobacillus curvatus* جداسازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی (٩×١٠^٩ CFU/gr غذا) و تیمار ٤ در یافت کننده حداقل تعداد *Leuconostoc mesenteroides* جداسازی شده از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی (٢×١٠^٩ CFU/gr غذا) می باشد. مطالعات آماری انجام شده حاکی از وجود اختلاف معنی دار بین دو تیمار ٣ و ٦ با یکدیگر در سطح خطای ٥ درصد در مراحل مختلف نمونه برداری می باشد ($P<0.05$).

بررسی نمودار٣-٣٠ و جدول ٣-٢٩ نشان می دهد که سه تیمار ٣، ٢ و ١ به ترتیب بیشترین میانگین آنزیم لیزوزیم را در مراحل مختلف نمونه برداری به خود اختصاص داده است. لازم به ذکر است که باکتری *Lactobacillus curvatus* جداسازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی، بر اساس مقادیر تعیین شده به همراه جیره غذایی به آب این ماهیان ، افزوده می گردید. بررسیهای آماری صورت گرفته بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار بین تیمارهای ١ ، ٢ و ٣ در سطح خطای ٥ درصد با یکدیگر ($P>0.05$) در هر یک از مراحل مختلف نمونه برداری می باشد. این در حالی است که اختلاف معنی داری در سطح خطای ٥ درصد بین این سه تیمار با سایر تیمارها در مراحل صفر ، میانی ، انتهای دوره پرورش لاروی و انتهای دوره پرورش در کارگاه مشاهده گردید($P<0.05$).

طبق نمودار٣-٣٠ سه تیمار ٦، ٥ و ٤ به ترتیب کمترین میانگین آنزیم لیزوزیم را در مراحل مختلف نمونه برداری (جدول ٣-٢٩) به خود اختصاص داده است. این در حالی است که در این تیمارها، از باکتری

Leuconostoc mesenteroides جداسازی شده از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی بر اساس مقادیر تعیین شده به همراه جیره غذایی استفاده می گردید. بررسیهای آماری صورت گرفته حاکی از وجود اختلاف معنی داری در سطح خطای ۵ درصد بین این سه تیمار با سایر تیمارها در مراحل صفر ، میانی ، انتهای دوره پرورش لاروی و انتهای دوره پرورش در کارگاه می باشد ($P<0.05$). بعلاوه ، عدم اختلاف معنی دار این تیمارها با یکدیگر (در هر یک از مراحل) نیز اثبات گردید ($P>0.05$) .



۳-۳۰-تغییرات آنزیم لیزوزیم (U/mg protein) (±SD) در لارو تاسماهی ایرانی در طول دوره پرورش لاروی

(n=۳٦۰ در هر تیمار)

مطالعه دقیقتر تیمارهای ۷ ، ۸ و ۹ که بصورت توام از هر دو باکتری مذکور به همراه جیره غذایی بر اساس مقادیر تعیین شده استفاده گردید، بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ۵ درصد بین تیمار های مذکور با یکدیگر در هر یک از مراحل نمونه برداری(میانی، انتهای پرورش لاروی و انتهای پرورش در کارگاه) می باشد ($P>0.05$). بعلاوه اختلاف معنی داری بین سه تیمار مذکور با سایر تیمارها در مراحل مختلف نمونه برداری مشاهده گردید($P<0.05$) و تنها اختلاف معنی داری بین این سه تیمار با تیمارهای شاهد و کارگاه حاصل نشد ($P>0.05$) . در این سه تیمار به ترتیب تیمارهای ۷ ، ۸ و ۹ دارای مقادیر کمتر آنزیم لیزوزیم در مقایسه با یکدیگر می باشند (جدول ۳-۲۹).

لازم به ذکر است که اختلاف معنی داری بین تیمار شاهد و کارگاه در ارتباط با مقادیر آنزیم لیزوزیم در هر یک از مراحل(میانی، انتهای پرورش لاروی و انتهای پرورش در کارگاه) بدست نیامد ($P>0.05$).

بررسی مقادیر آنزیم لیزوزیم در تیمارهای مختلف و مراحل نمونه برداری مشتمل بر مراحل صفر، میانی، انتهای دوره پرورش لاروی و انتهای دوره پرورش در کارگاه بیانگر وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ۵ درصد مرحله صفر با سایر مراحل نمونه برداری در تمام تیمارها می باشد($P<0.05$) اما تفاوت معنی داری بین مراحل میانی، انتهای دوره پرورش در کارگاه و انتهای دوره پرورش لاروی با یکدیگر بدست نیامد($P>0.05$) .

۳-٦- بررسی کلونیزه شدن **دو گونه از باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک جداسازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی و تاسماهی ایرانی شامل** ***Lactobacillus curvatus*** و ***Leuconostoc mesenteroides*** **در دستگاه گوارش لاروها**

بمنظور کلونیزه شدن باکتریهای افزوده شده به جیره غذایی لارو فیل ماهی و تاسماهی ایرانی در انتهای دوره پرورش لاروی اقدام به کشت لاروها و شمارش باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک گردید که نتایج آن در ذیل ارائه می گردد.

۳-٦-۱- فیل ماهی

بر اساس جدول ۳-۳۰ بیشترین و کمترین تعداد باکتری تولید کننده اسید لاکتیک در لاروهای فیل ماهی در انتهای دوره پرورش لاروی بترتیب متعلق به تیمارهای ۳ و ٦ می باشد. آنالیزهای آماری صورت گرفته نیزبیانگر وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ۵ درصد در ارتباط با تمام موارد فوق بین این دو تیمار می باشد $(P<0.05)$. این در حالی است که تیمار ۳ دریافت کننده حداکثر تعداد *Lactobacillus curvatus* جداسازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی (۹×۱۰^{۹} CFU/gr غذا) و تیمار ٦ در یافت کننده حداقل تعداد *Leuconostoc mesenteroides* جداسازی شده از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی (۲×۱۰^{۹} CFU/gr غذا) می باشد. بررسی شاخصهای رشد نیز بیانگر این مطلب است که تیمار ۳ دارای حداکثر و تیمار ٦ حداقل شاخصهای رشد را دارا می باشد.

بررسی دقیقتر جدول ۳- ۳۰ مبین این مطلب می باشد که تیمار های ۳ ، ۲ و ۱ بترتیب دارای بیشترین تعداد باکتری تولید کننده اسید لاکتیک در انتهای دوره پرورش لاروی در مقایسه با سایر تیمارها در لارو فیل ماهی می باشند. همانگونه که قبلا نیز اشاره گردید، در این ماهیان باکتری *Lactobacillus curvatus* جداسازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی بر اساس مقادیر تعیین شده به همراه جیره غذایی به آب ، افزوده می گردید. بررسیهای آماری صورت گرفته بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ۵ درصد بین تیمارهای ۲ و ۱ با یکدیگر $(P>0.05)$ و وجود تفاوت معنی دار بین تیمار ۳ با دو تیمار دیگر $(P<0.05)$ می باشد. بعلاوه تفاوت آماری معنی دار در سطح خطای ۵ درصد بین تیمارهای ۱، ۲ و ۳ با سایر تیمارها مشخص گردید $(P<0.05)$.

مطالعات صورت گرفته نشان می دهد، تیمار های ٦ ، ۵ و ٤ دارای کمترین تعداد باکتری تولید کننده اسید لاکتیک در مقایسه با سایر تیمارها در لارو فیل ماهی بوده و در یافت کننده مقادیر متفاوت *Leuconostoc mesenteroides* جداسازی شده از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی در جیره غذایی خود می باشد. آنالیزهای آماری انجام شده حاکی از وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ۵ درصد بین تیمار ٦ با تیمارهای ٤ و ۵ یکدیگر می باشد $(P<0.05)$.بعلاوه تفاوت معنی دار بین تیمارهای ٤ ، ۵ و ٦ با سایر تیمارها مشخص گردید $(P<0.05)$.

۳-۳۰- تعداد باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک (CFU/ gr of GI)در انتها و ابتدای دوره پرورش لاروی

در لارو فیل ماهی(n=۳٦۰ در هر تیمار)

نام تیمار	میانگین تعداد باکتری تولید کننده اسید لاکتیک در ابتدای دوره پرورش	میانگین تعداد باکتری تولید کننده اسید لاکتیک در انتهای دوره پرورش
تیمار ۱	۵۳۳/۳۱	۷۲۵/۲۱
تیمار ۲	۵۳۵/۲۱	۷۷۷/۱۱
تیمار ۳	۵۵۱/٤۱	۱۰۲٤/۲۱
تیمار ٤	۵٤۰/۱۰	۵۰۵/۲۰
تیمار ۵	۵۳۷/۱۱	٤۱۸/۱۲
تیمار ٦	۵٤۰/٤۵	۳۵۹/۳۷
تیمار ۷	۵۵۵/۲٦	۵۹۳/۳۰
تیمار ۸	۵۳۵/۱۸	٦۹۰/۵۰
تیمار ۹	۵۲۸/۲۰	٦۱٤/۳۳
شاهد	۵۳۰/٤۰	٦۱۰/۲۰
کارگاه	۵۳۸/۵۰	٦۱۵/۱۰
میانگین	۵٤۰/۳	–

مطابق جدول ۳- ۳۰ تعداد باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک در تیمارهای ۸ ، ۹ و ۷ که بصورت توام از هر دو باکتری استفاده می نمودند ، در مقایسه با تیمارهای در یافت کننده *Lactobacillus curvatus* و یا تیمارهای ۱ ، ۲ و ۳ کمتر و از تیمارهای ٤ ، ۵ و ٦ و یا تیمارهای دریافت کننده *Leuconostoc mesenteroides* بیشتر می باشد. بررسیهای انجام شده بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار در

تیمارهای مذکور با یکدیگر را نشان می دهد($P>0.05$) بعـلاوه تفـاوت معنـی داری در سـطح خطـای ۵ درصد بین این سه تیمار با سایر تیمارها بجـر تیمارهـای شـاهد و کارگـاه و تیمـار ۸ بـا تیمـار ۱ مشـاهده گردید($P<0.05$).

۳-۳۱- تعداد باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک (CFU/ gr of GI)در انتهای دوره پرورش لاروی در لارو فیل ماهی(n=۳٦۰ در هر تیمار)

بررسی نتایج حاصل از مطالعه جدول ۳- ۳۰ و نمودار ۳-۳۱ بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار در سـطح خطای ۵ درصد در ارتباط با تعداد باکتریهای تولید کننده اسـید لاکتیکـد در لاروهـا در دو تیمـار شـاهد و کارگاه می باشد ($P>0.05$). بعلاوه افزایش تعداد باکتریهای تولیـد کننـده اسـید لاکتیـک در انتهـای دوره پرورش لاروی در مقایسه با ابتدای دوره و آغاز تغذیه فعال بصورت معنی دار در این دو تیمار مشاهده می گردد.

۳-٦-۲- تاسماهی ایرانی

بر اساس جدول ۳-۳۱ بیشترین و کمترین باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک بترتیب متعلق به تیمارهای ٤ و ۳ می باشد. آنالیزهای آماری صورت گرفته نیزبیانگر وجود اختلاف معنی دار در سطح خطـای ۵ درصـد

در ارتباط با باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک، بین این دو تیمار می باشد ($P<0.05$). این در حالی است که تیمار ۳ دریافت کننده حداکثر تعداد *Lactobacillus curvatus* جداسازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی (CFU/gr غذا ۹×۱۰^۹) و تیمار ٤ در یافت کننده کمترین تعداد *Leuconostoc mesenteroides* جداسازی شده از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی (CFU/gr غذا ۲×۱۰^۹) می باشد. بررسی شاخصهای رشد نیز بیانگر این مطلب است که تیمار ٤ دارای حداکثر و تیمار ۳ حداقل شاخصهای رشد را دارا می باشد.

بررسی دقیقتر جدول ۳- ۳۱ مبین این مطلب می باشد که تیمار های ۳ ، ۲ و ۱ بترتیب دارای کمترین تعداد باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک، در مقایسه با سایر تیمارها در لارو تاسماهی ایرانی می باشند. همانگونه که قبلا نیز اشاره گردید، در این ماهیان باکتری *Lactobacillus curvatus* جداسازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی بر اساس مقادیر تعیین شده به همراه جیره غذایی به آب ، افزوده می گردید. بررسیهای آماری صورت گرفته بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ۵ درصد بین تیمارهای ۱ ، ۲ و ۳ با یکدیگر ($P>0.05$) می باشد. بعلاوه تفاوت آماری معنی دار در سطح خطای ۵ درصد بین تیمارهای ۱، ۲ و ۳ با سایر تیمارها مشخص گردید ($P<0.05$). این در حالی است که تیمار های ٤ ، ۵ و ٦ دارای بیشترین تعداد باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک در مقایسه با سایر تیمارها در لارو تاسماهی ایرانی بوده و در یافت کننده مقادیر متفاوت *Leuconostoc mesenteroides* جداسازی شده از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی در جیره غذایی خود می باشد و کاهش تعداد باکتری مورد نظر افزوده شده به آب همراه با جیره غذایی تاثیر مثبت را بر روی کلونیزه شدن و افزایش تعداد باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک در لاروها خواهد داشت. آنالیزهای آماری انجام شده حاکی از عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ۵ درصد بین تیمارهای ۵ و ٦ با یکدیگر در ارتباط با تعداد باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک در انتهای دوره پرورش لاروی است ($P>0.05$) اما تفاوت معنی داری در ارتباط با فاکتور های موردنظر بین تیمار ٤ با دو تیمار دیگر مشخص گردید. بعلاوه تفاوت معنی دار تیمارهای ٤ ، ۵ و ٦ با سایر تیمارها باثبات رسید ($P<0.05$).

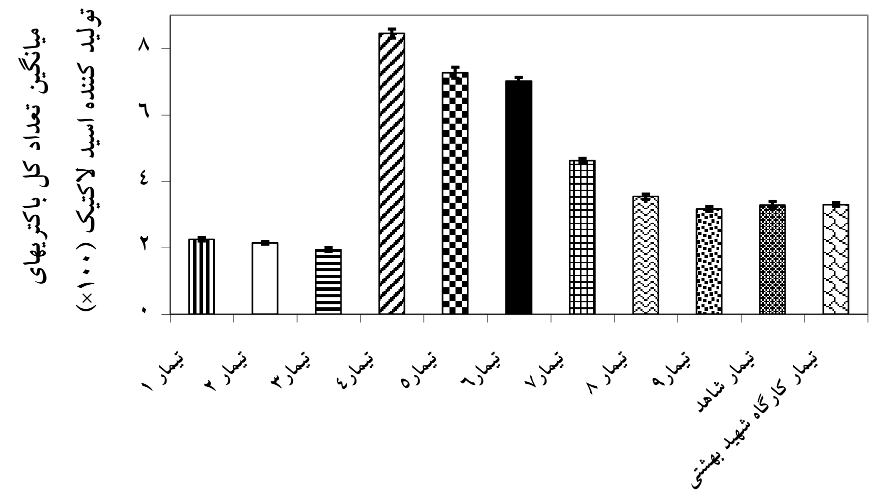
۳-۳۱- تعداد باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک (CFU/ gr of GI) در انتها و ابتدای دوره پرورش لاروی

در لارو فیل ماهی(n=۳٦۰ در هر تیمار)

نام تیمار	میانگین تعداد باکتری تولید کننده اسید لاکتیک در ابتدای دوره پرورش	میانگین تعداد باکتری تولید کننده اسید لاکتیک در انتهای دوره پرورش
تیمار ۱	۳۳۰/۳۳	۲۲۵/۲۱
تیمار ۲	۳۸۰/٤۰	۲۱٤/٦٦
تیمار ۳	۳۰۰/٤۱	۱۹۵/۰۰
تیمار ٤	۲۸۰/۱۰	۸٤۵/۱۰
تیمار ۵	۳۲۰/۱۱	۷۲۷/۵۰
تیمار ٦	۳۱۰/٤۵	۷۰۱/۳۰
تیمار ۷	۳۵۰/۲٦	٤٦۲/۵۵
تیمار ۸	۳۵۰/۱۸	۳۵٤/۰۰
تیمار ۹	۳۰۵/۲۰	۳۱٦/۳۳
شاهد	۳۱۰/٤۰	۳۲۸/۲۰
کارگاه	۳۱۰/۵۰	۳۳۰/۱۰
میانگین	۳٤۰/۲۰	-

مطابق جدول ۳- ۳۱ میانگین تعداد باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک در تیمارهای ۷ ، ۸ و ۹ که بصورت توام از هر دو باکتری استفاده می نمودند ، در مقایسه با تیمارهای در یافت کننده *Lactobacillus curvatus* و یا تیمارهای ۱ ، ۲ و ۳ بیشتر و از تیمارهای ٤ ، ۵ و ٦ و یا تیمارهای دریافت کننده *Leuconostoc mesenteroides* کمتر می باشد. بررسیهای انجام شده عدم اختلاف معنی دار تیمار۸ با تیمار ۹ را نشان می دهد($P>0.05$) این در حالی است که تفاوت آماری معنی داری بین دو تیمار ۸ و ۹

با تیمار ۷ مشاهده گردید($P<0.05$). بعلاوه تفاوت معنی داری در سطح خطای ۵ درصد بین این سه تیمار با سایر تیمارها بجر تیمار ۸ و ۹ با تیمار شاهد و کارگاه مشاهده گردید($P<0.05$).



۳-۳۲- تعداد باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک (CFU/ gr of GI)در انتهای دوره پرورش لاروی در لارو تاسماهی ایرانی(n=۳٦۰ در هر تیمار)

بررسی نتایج حاصل از مطالعه جدول ۳- ۳۱ و نمودار ۳-۳۲ بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ۵ درصد در ارتباط با تعداد باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیکد در لاروها در دو تیمار شاهد و کارگاه می باشد ($P>0.05$). بعلاوه عدم افزایش تعداد باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک در انتهای دوره پرورش لاروی در مقایسه با ابتدای دوره و آغاز تغذیه فعال در این دو تیمار مشاهده نشد.

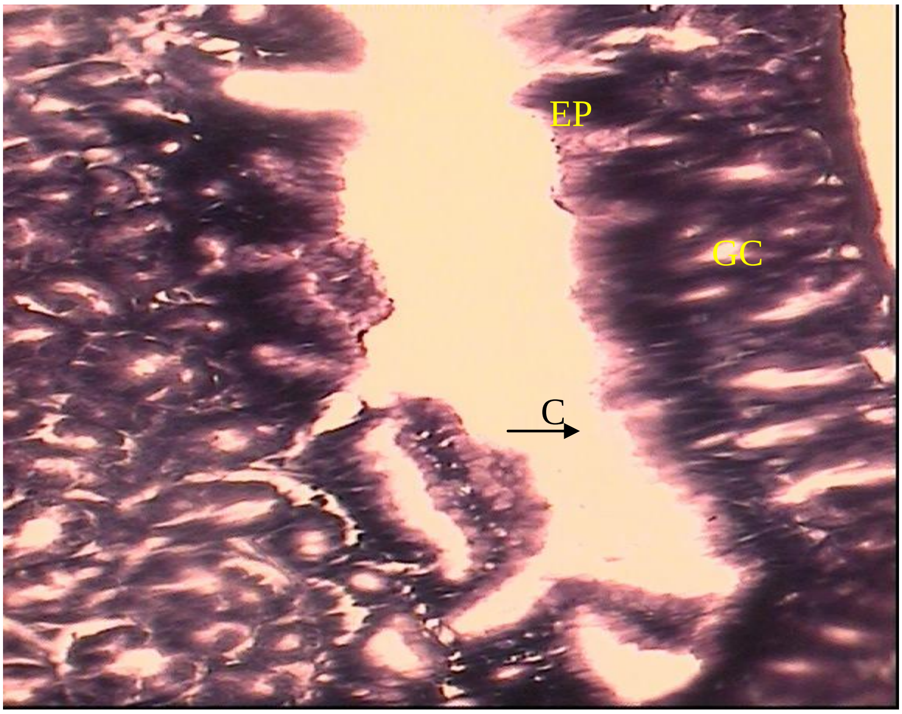
۳-۷-مطالعات بافت شناسی صورت گرفته بر روی روند رشد دستگاه گوارش در فیل ماهی و تاسماهی ایرانی

۳-۷-۱- فیل ماهی

مطالعات بافت شناسی بر روی ساختار مری، معده، روده و کبد در مراحل مختلف نمونه برداری شامل مرحله صفر (آغاز تغذیه فعال- ١٤ روز پس از هچ)، مرحله میانی(٢٤ روز پس از هچ)، مرحله انتهای دوره پرورش لاروی (٣٤ روز پس از هچ) و مرحله انتهای دوره پرورش در کارگاه صورت پذیرفت.

در مرحله صفر نمونه برداری مری از نظر مرفولوژی دارای ساختار نسبتا کاملی است و دو بخش قابل تشخیص می باشد. بخش اول بیشترنقش ترشحی داشته و بخش دوم بیشتر نقش انتقالی دارد. لایه اپیتلیوم بخش ابتدایی از نوع سنگفرشی مطبق تا استوانه ای شبه مطبق می باشد و سلولهای جامی شکل در آن دیده میشود که به سمت معده از تعداد آنها کاسته می شود و بتدریج به سمت معده لایه های سلولی بافت پوششی استوانه ای مژه دار تبدیل می گردد. این سلولها بسیار باریک و کشیده بوده و دارای مژه های بلند می باشند. ضخامت بافت همبندی افزایش یافته و یک ردیف سلولهای سنگفرشی از خارج این بافت را احاطه می نماید و در سطح داخلی مری چین خوردگیهایی مشاهده می گردد. در انتهای مری نیز ظهور ساختمانهایی غده ای دیده میشود. در مرحله میانی نمونه برداری ساختار مری کامل بوده و قطر آن افزایش می یابد و چین خوردگیهای مخاطی آن افزایش یافته و ضخامت لایه اپیتلیوم بیشتر می گردد.بعلاوه تعداد سلولهای جامی شکل بخش ابتدای معده نیز بیشتر شده و عضلات در حال شکل گیری می باشند. در مرحله انتهای دوره پرورش لاروی اندازه مری افزایش یافته و میزان چین خوردگیهای مخاطی بیشتر می گردد. در بافت همبند بخش انتهای مری ، غدد معدی به وفور مشاهده می گردد. در مرحله نهایی نمونه برداری تغییرات اندکی دیده شده و تنها در کنار افزایش اندازه مری بر ضخامت بافت پوششی نیز افزوده می گردد.تمام تیمارها دارای ساختار مشابه مری در تمام مراحل نمونه برداری بودند.

شکل ۳-۱- برش طولی ساختار ابتدای مری در لارو فیل ماهی. هماتوکسیلین-ائوزین، ٤x.



شکل ۳-۲- برش طولی ساختارانتهای مری در لارو فیل ماهی. هماتوکسیلین-ائوزین، ۲۰x.

EP : بافت پوششی   **C** : مژه ها   **GC** : سلولهای جامی شکل   **GG** : غدد معدی

بررسی ساختار معده در مرحله صفر نمونه برداری مبین این مطلب می باشد که معده از دو بخش غـده ای و غیر غده ای تشکیل شده است که بخش غده ای دارای بافت پوششی استوانه ای ساده تا شبه مطبـق مـژه دار است. در بخش زیرین آن بافت همبند و در اطراف آن بافت عضلانی صاف مشاهده می گردد. در بافت پارین آن غدد معدی از نوع لوله ای ساده که از یک ردیف سلولهای مکعبی ساده مشاهده می گردد. با شروع بخش غیر غده ای ، غدد معدی در پارین تحلیل می رود و مخاط این بخش از معده از بافـت پوششـی اسـتوانه ای شبه مطبق مژه دار تشکیل شده است. در این ساختمان زوائد پیلوریک در حد فاصل معده و روده قـدامی بـه صورت یک عضو هرمی شکل مشاهده می گردد. در مرحله میانی نمونه برداری مواد غذایی به وفور در معده

مشاهده می گردند و حجم معده افزایش یافته است اپیتلیوم معده غده ای از نوع استوانه ای شبه مطبق مژه دار است. در بافت پارین، غدد معدی به تعداد زیادی وجود داشته و اپیتلیوم غدد از نـوع مکعبـی سـاده و کوتـاه است. با تحلیل رفتن غدد معدی در بخش انتهایی ، معده غیر غده ای شروع شده و بافت پوششی آن از نـوع استوانه ای مژه دار است. لایه عضلانی صاف و ضخیمی در اطراف بافت همبند دیده می شـود کـه در بخـش اسفنکتر پیلوری این لایه عضلانی قطورتر می گردد و زوائد پیلوریک بصورت یک عضو برگچه ای بین معده غیر غده ای و روده قدامی وجود دارد. در مرحله انتهای دوره پـرورش لاروی ، اپیتلیـوم معـده غیـر غـده ای شامل سلولهای استوانه ای با هسته قاعده ای و تعدادی واکوئول راسی و میکروویلی اسـت و لایـه عضـلانی صاف و ضخیمی اطراف آن را احاطه نموده است. در بخش غده ای معده، بافت پوششی از نـوع اسـتوانه ای بلند با پرزهای فراوان می باشد که در آطراف آن بافت همبند ظریفی وجود دارد و غـدد معـدی بـه وفـور در پارین دیده می شود. زوائد پیلوریک به صورت هرمی شکل به همراه غدد منشعب فراوان قابل مشاهده است. در مرحله نهایی نمونه برداری ساختار معده مشابه با مراحل پیشین بوده و تنها بر حجم و اندازه معده در هـر دو بخش غده ای و غیر غده ای افزوده گردیده است. بعلاوه بر قطـر و چـین خوردگیهـای زوائـد پیلوریـک افزوده گردیده است. مرفولوژی معده در تمام مراحل نمونه برداری در تمام تیمارهـا یکسـان بـوده و تفـاوت معنی داری در ساختار آنها مشاهده نگردید.

GS

FD

شکل ۳-۳- ساختار معده غده ای و غیر غده ای در لارو فیل ماهی. هماتوکسیلین-ائوزین، ٤x.

FD : غذا　GS : معده غده ای　NS: معده غیر غده ای　L : کبد　TM : لایه عضلانی صاف

SM: لایه عضلانی مخطط　PI : روده قدامی

LP

شکل ۳-٤- ساختار معده غده ای در لارو فیل ماهی. هماتوکسیلین-ائوزین، ۲۰x.

GG : غدد معدی　EP: بافت پوششی　LP : پارین　TM : لایه عضلانی

مطالعات بافت شناسی صورت گرفته بر روی ساختار روده در فیل ماهیان در مرحله نخست نمونه برداری حاکی از این مطلب می باشد که ساختار روده بصورت کامل مشخص است.در روده میانی چین های مخاطی مشاهده می گردد. واکوئول های چربی در بافت اپیتلیوم روده مشاهده می گردد.

روده در این ماهیان به سه بخش روده قدامی، میانی و خلفی تقسیم گردیده است. در مرحله صفر نمونه برداری ساختار روده تقریبا واضح بوده و چین های مخاطی و پرزهای روده مشاهده می گردد. . بافت

پوششی مرحله قدامی روده از نوع استوانه ای با میکروپرزهای فراوان می باشد.در بافت پوششی ناحیه میـانی روده تعداد زیادی سلول های جامی شکل یا گابلت سل وجود دارد که تعداد آنها در در ناحیـه قـدامی کمتـر است. بخش انتهای روده دارای بافت پوششی استوانه ای شبه مطبق می باشد و تعداد سلول های جامی شکل در این بخش نسبت به بخش ابتدای روده بیشتر است. در این بخش نیز میکروپرزها مشاهده می گردد .

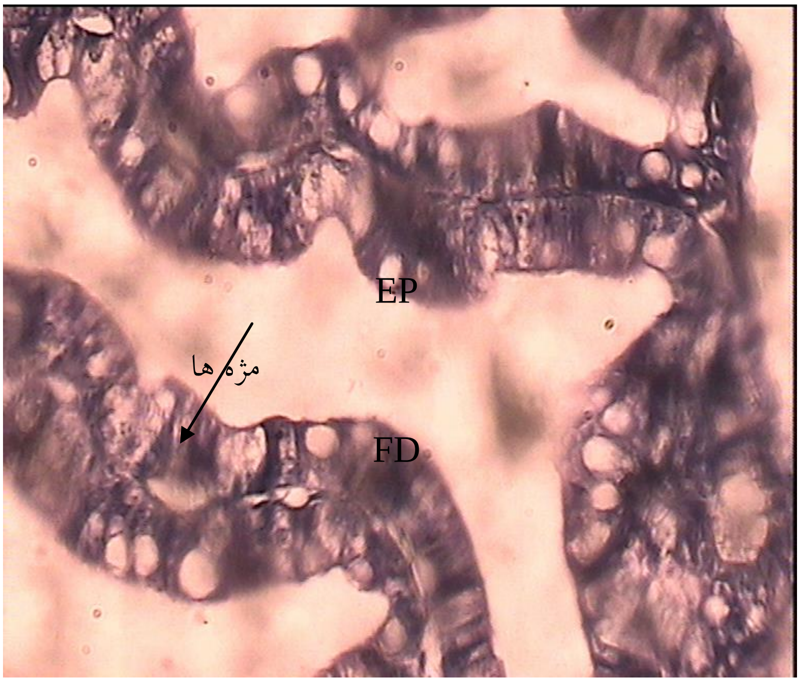
شکل ۳-۵- ساختار روده میانی و انتهایی در لارو فیل ماهی. هماتوکسیلین-ائوزین، ٤x.

FD : غذا **GS** : معده غده ای **P**: پانکراس **TM** : لایه عضلانی

I : بخشهایی از روده میانی و انتهایی **SV**: دریچه های مارپیچی

درمرحله میانی ، انتهای دوره پرورش لاروی و انتهای پرورش در کارگاه،، ساختار بافت روده دارای شـباهت زیادی با مرحله صفر دارد با این تفاوت که اندازه و حجم روده افزایش یافته و در انتهای دوره پرورش لاروی ، ظهور غدد روده ای بوضوح قابل رویت می باشد. در انتهای دوره پرورش در کارگاه تعداد سلولهای جـامی

شکل نسبت به مراحل پیشین نمونه برداری افزایش می یابد و بر قطر لایه همبند پارین و لایه عضلانی افزوده گردیده است. در این بررسی ساختار روده در تمام تیمارها کاملا یکسان است.



شکل ۳-٦- ساختارپرزهای روده در لارو فیل ماهی. هماتوکسیلین-ائوزین، ۲۰x.

FD : غذا EP: بافت پوششی

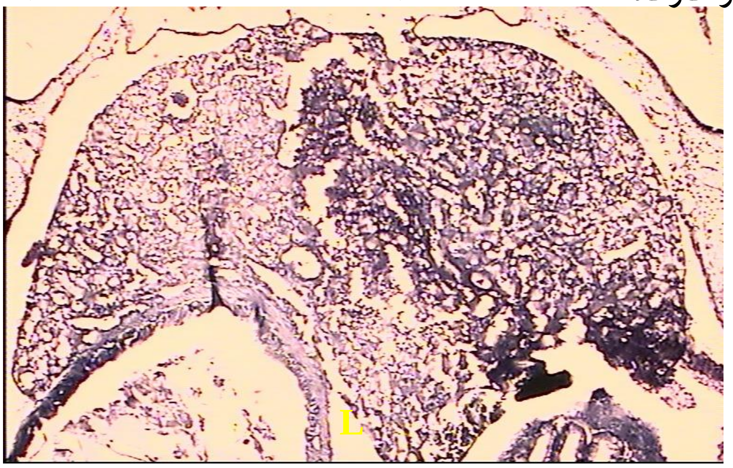
بررسی ساختار کبد در مرحله صفر نمو نه برداری نشان می دهد که لبولها در این مرحله تا حد زیادی مشخص بوده و سطح کبد توسط کپسول همبندی که از خارج توسط سلولهای سنگفرشی احاطه شده است، پوشیده می شود و مجاری صفراوی مشخص می باشند. در مرحله میانی اندازه کبد در مقایسه با قبل رشد

نموده و ساختار طبیعی آن بیشتر نمایان شده است. سلولها و سینوسهای کبدی در لا بلای یکدیگر قرار داشته و سلولها دارای هسته کروی در وسط و ذرات گلیکوژن می باشند. در مرحله انتهای دوره پرورش لاروی اندازه کبد بزرگترشده و فضای باب در آن مشخص می باشدو دارای عروق خونی و مجاری صفراوی است. در انتهای دوره پرورش در کارگاه اندازه کبد کمی بزرگتر شده و ساختارآن تفاوت نامحسوسی را با مرحله قبلی نشان نمی دهد. بررسی اندازه عرضی کبد در انتهای دوره پرورش لاروی در تیمارهای مختلف نشان می دهد که اندازه کبد در تیمارهای ۱، ۲ و ۳ در در این سه تیمار دارای تفاوت معنی داری در مقایسه با تیمار شاهد و کارگاه نمی باشد. این در حالی است که اندازه کبد در تیمارهای دیگر ، بویژه تیمارهای ٤ ، ٥ و ٦ بطرز معنی داری افزایش یافته است. مشابه این نتیجه در بررسی آنزیم آلکالین فسفاتاز در فیل ماهیان نیز مشاهده گردید نتایج حاصل از اندازه گیری محورهای طولی و عرضی بافت کبد در فیل ماهیان در جدول ۳-۳۲ ارائه شده است.

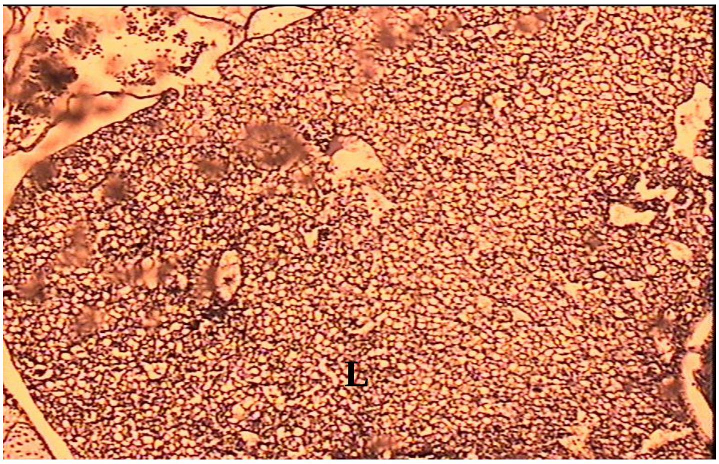
جدول ۳-۳۲- اندازه محورهای طولی و عرضی کبد (میکرومتر) در مرحله پایان پرورش لاروی در فیل ماهیان

	اندازه کبد	
نوع تیمار	**محور طولی**	**محور عرضی**
	μm	μm
تیمار ۱	۷۱۰/۷۱	۱٤۲۱/٤۲
تیمار ۲	۷۰٤/۲۱	۱٤۰۸/٥٤
تیمار ۳	٦۹۷/۱٥	۱۳۹٤/۳۱
تیمار ٤	۹۷۲/۳۸	۱۹۲٤/۷٦
تیمار ٥	۹۷٥/٥	۱۹۳۱/۳۳
تیمار ٦	۹۸٥/٤۳	۱۹۷۱/٤۳
تیمار ۷	۷٦٦/٤۳	۱٥۳۳/۱۸
تیمار ۸	۸۹/۸۲۸	۱٦٤۱/۷۸

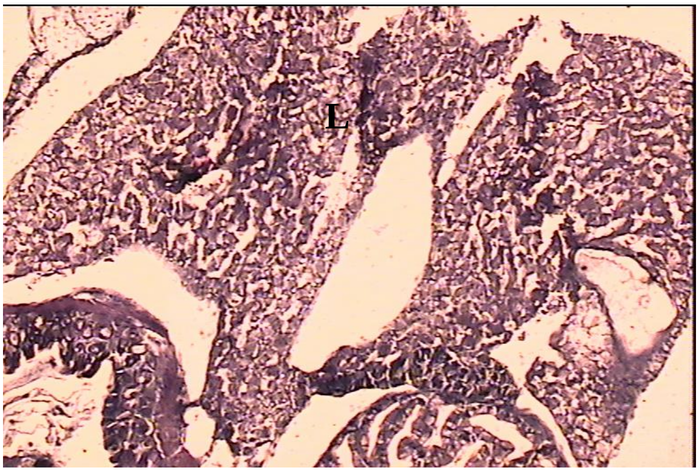
تیمار ۹	۸۷۵/۷۸	۱۶۶٤/٤۲
تیمار شاهد	۷۳٤/۷۳	۱۳۹٦/۵۰
تیمار کارگاه	۷۲۵/۱٤	۱۳۷۹/٦۷



شکل ۳-۷- ساختارکبد در لارو فیل ماهی در تیمار شاهد و در تیمارهای دریافت کننده باکتری *Lactobacillus curvatus*. **هماتوکسیلین-ائوزین، ٤x. L : کبد**



شکل ۳-۸- ساختارکبد در لارو فیل ماهی در تیمارهای دریافت کننده باکتری *Leuconostoc mesenteroides* . **هماتوکسیلین-ائوزین، ٤x. L : کبد**

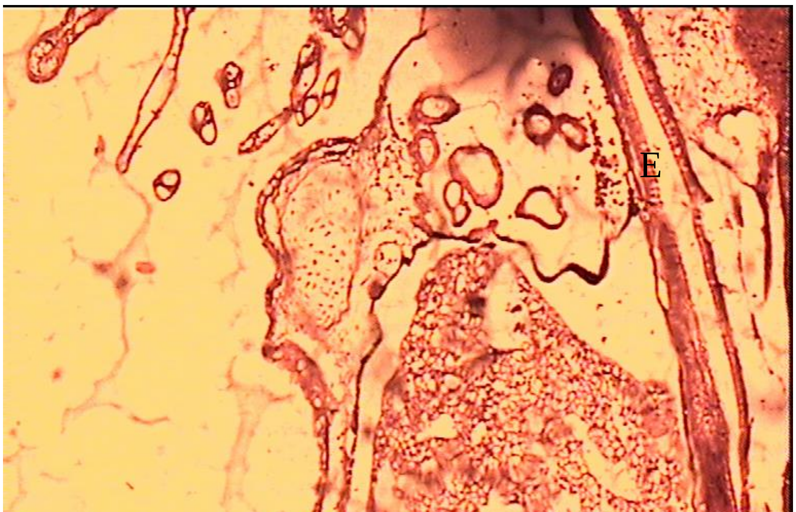


شکل ۳-۹- ساختارکبد در لارو فیل ماهی در تیمار شاهد و در تیمارهای دریافت کننده توام باکتری ***Lb. curvatus*** **و** ***Leuc. mesenteroides*** **هماتوکسیلین-ائوزین، ٤x. L : کبد**

۳-۷-۲- تاسماهی ایرانی

مطالعات بافت شناسی بر روی ساختار مری، معده و روده در مراحل مختلف نمونه برداری شامل مرحله صفر (آغاز تغذیه فعال- ١٤ روز پس از هچ)، مرحله میانی(٢٤ روز پس از هچ)، مرحله انتهای دوره پرورش لاروی (٣٤ روز پس از هچ) و مرحله انتهای دوره پرورش در کارگاه صورت پذیرفت.

در تمام تیمارها در مرحله صفر نمونه برداری ، ساختار مری نسبتا تکامل یافته بوده و در بخش ابتدای آن بافت پوششی از نوع سنگفرشی مطبق که در اطراف آن بافت همبندی به همراه مقادیر زیادی چربی و عروق خونی وسیعی بصورت پراکنده مشاهده گردید. علاوه بر بافت پوششی و همبندی زیر آن، عضلات نسبتا نازکی از اطراف آن را در بر گرفته و بافت پوششی دارای مژه می باشد .بخش انتهایی مری دارای بافت پوششی استوانه ای مطبق تا شبه مطبق مژه دار بوده و گابلت سل ها نیز در ساختار مری دیده شد.



EP

L

شکل ۳-۱۰- برش طولی ساختار مری در لارو تاسماهی. هماتوکسیلین-ائوزین، ٤x.

EP : **بافت پوششی**   **E** : **مری**   **L**: **کبد**

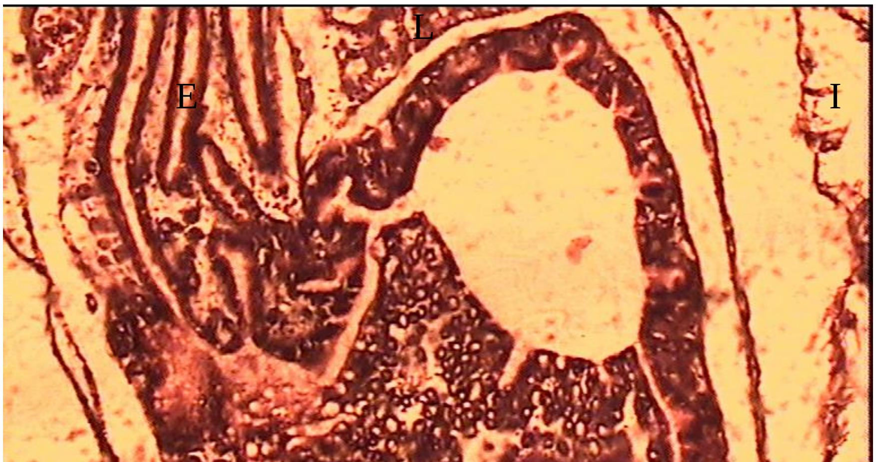
. در مرحله میانی نمونه برداری، ساختار مری کاملا مشابه با مرحله صفر نمونه برداری بوده و حجم مری افزایش یافته و بدین علت سطح داخلی مری دارای چین خوردگی می باشد. در مرحله انتهایی دوره پرورش لاروی افزایش حجم و اندازه مری باعث ایجاد چین خوردگیهای مخاطی فراوانی در این اندام گردیده است. در بخش انتهای مری نیز ظهور ساختار غده ای که بیانگر شروع ساختار غده ای معده است مشاهده می گردد. در انتهای دوره پرورش در کارگاه ساختار مری با مراحل قبلی دارای تفاوت نبوده و تنها علاوه بر بزرگ شدن و گسترده شدن حجم مری، بافت پوششی آن ضخیم تر می شود.

GS

شکل ۳-۱۱- برش طولی ساختار مری در لارو تاسماهی ایرانی. هماتوکسیلین-ائوزین، ٤x.

EP : بافت پوششی E : مری L: کبد TM : لایه عضلانی صاف

بررسی ساختار معده در تاسماهی ایرانی نشان می دهد که دارای دو ساختار غده ای (محل اتصال به مـری) و غیر غده ای (محل اتصال به روده) می باشد و در معده ماهی به وضوح مواد غـذایی خـارجی دیـده شـد. در مرحله صفر نمونه برداری معده دارای بافت پوششی با سلولهای استوانه ای بلند بوده و در اطـراف آن بافـت همبند پارین وجود دارد و لایه های عضلانی از نوع صاف و قطور اسـت. سـاختار زوائـد پیلوریـک در حـد فاصل معده و روده قدامی مشاهده شده و این ساختار بصورت مجموعه ای از غدد منشعب دیده مـی شـود. معده غیر غده ای دارای بافت پوششی از نوع استوانه ای بوده و دارای لایه عضـلانی صـاف و ضـخیمی مـی باشد. بعلاوه در مرحله میانی نمونه برداری ساختار معده غده ای مشابه با مرحله قبلـی بـوده و تنهـا از نظـر اندازه و حجم دارای اندازه ای بیشترمی باشد. در مرحله انتهای دوره پرورش لاروی بافت پوششـی معـده از نوع استوانه ای بلند بوده و بافت پیوندی ظریفی در زیر آنها مشاهده می گردد بعلاوه ساختار زوائد پیلوریـک تقریبا هرمی شکل به هراه غدد منشعب فراوان قابل مشاهده است. در مرحله انتهای دوره پـرورش در کارگـاه ساختار معده غده ای و غیر غده ای مانند مراحل دیگر می باشد و تنها بر وسعت آنها افزوده می گردد و لایـه عضلانی قطورتر می گردد. بافت پوششی معده از نوع استوانه ای با سلولهای بسیار بلند بـوده کـه در انتهـای آنها مژه هایی وجود دارد که در بخش غیر غده ای اندازه مژه ها کوتاهتر و لایه عضلانی قطور تر مـی باشـد. در این بررسی ساختار معده در تمام تیمارها یکسان می باشد.

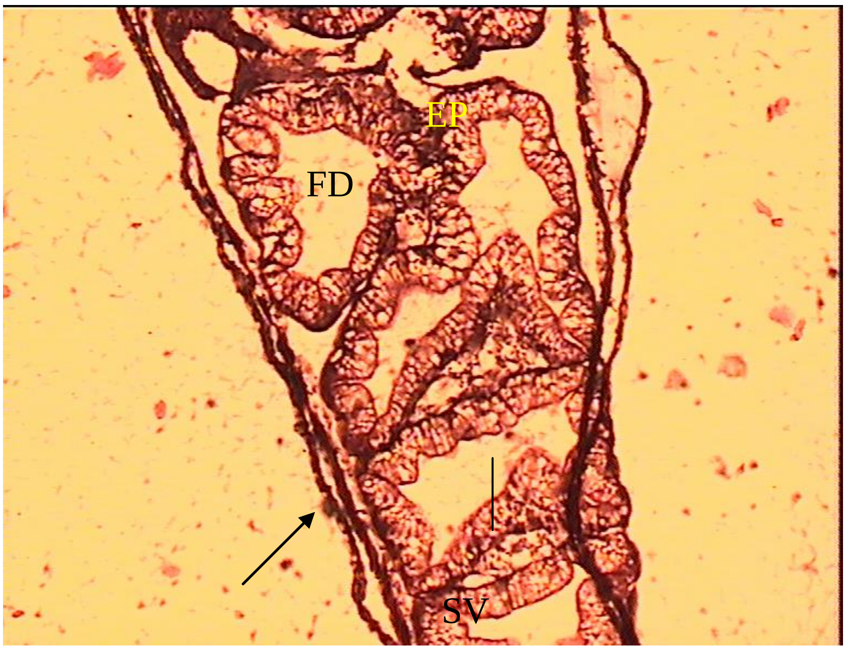


NS

شکل ۳-۱۲- ساختار معده غده ای و غیر غده ای در لارو تاسماهی ایرانی. هماتوکسیلین-ائوزین، ٤x.

GS : معده غده ای   NS: معده غیر غده ای   E: مری   L : کبد   I : روده

روده در این ماهیان نیز مشابه با فیل ماهیان به سه بخش روده قدامی، میانی و خلفی تقسیم گردیده است. در مرحله صفر نمونه برداری ساختار روده تقریبا واضح بوده و چین های مخاطی و پرزهای روده مشاهده می گردد. . بافت پوششی مرحله قدامی روده از نوع استوانه ای با میکروپرزهای فراوان می باشد.در بافت پوششی ناحیه میانی روده تعداد زیادی سلول های جامی شکل یا گابلت سل وجود دارد که تعداد آنها در در ناحیه قدامی کمتر است. بخش انتهای روده دارای بافت پوششی استوانه ای شبه مطبق می باشد و تعداد سلول های جامی شکل در این بخش نسبت به بخش ابتدای روده بیشتر است. در این بخش نیز میکروپرزها مشاهده می گردد .

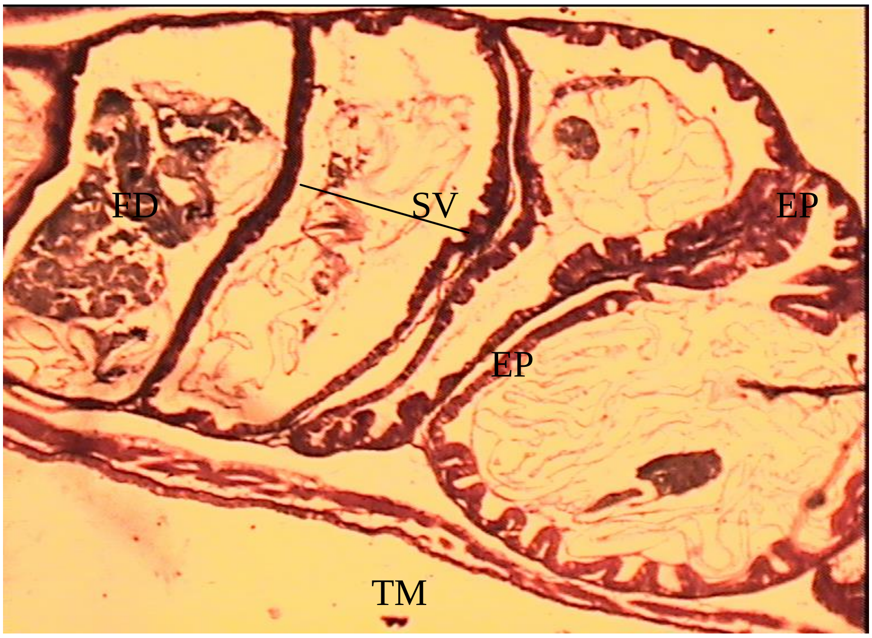


شکل ۳-۱۳- ساختار ابتدای روده در لاروتاسماهی. هماتوکسیلین-ائوزین، ٤x.

FD : غذا   EP : بافت پوششی   TM : لایه عضلانی مخطط

SV: دریچه های مارپیچی

درمرحله میانی ، انتهای دوره پرورش لاروی و انتهای پرورش در کارگاه،، ساختار بافت روده دارای شباهت زیادی با مرحله صفر دارد با این تفاوت که اندازه و حجم روده افزایش یافته و در انتهای دوره پرورش لاروی ، ظهور غدد روده ای بوضوح قابل رویت می باشد. در انتهای دوره پرورش در کارگاه تعداد سلولهای جامی شکل نسبت به مراحل پیشین نمونه برداری افزایش می یابد و بر قطر لایه همبند پارین و لایه عضلانی افزوده گردیده است. در این بررسی ساختار روده در تمام تیمارها کاملا یکسان است.



شکل ۳-۱٤- ساختار ابتدای روده در لاروتاسماهی. هماتوکسیلین-ائوزین، 4x.

FD : غذا   EP : بافت پوششی   TM : لایه عضلانی مخطط

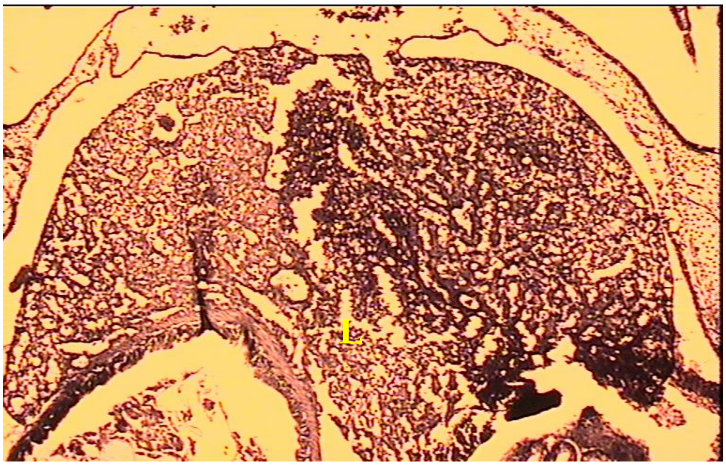
SV: دریچه های مارپیچی

بررسی ساختار کبد در مرحله صفر نمو نه برداری نشان می دهد که لبولها در این مرحله تا حد زیادی مشخص بوده و سطح کبد توسط کپسول همبندی که از خارج توسط سلولهای سنگفرشی احاطه شده است، پوشیده می شود و مجاری صفراوی مشخص می باشند. در مرحله میانی اندازه کبد در مقایسه با قبل رشد نموده و ساختار طبیعی آن بیشتر نمایان شده است. سلولها و سینوسهای کبدی در لا بلای یکدیگر قرار داشته و سلولها دارای هسته کروی در وسط و ذرات گلیکوژن می باشند. در مرحله انتهای دوره پرورش لاروی اندازه کبد بزرگترشده و فضای باب در آن مشخص می باشدو دارای عروق خونی و مجاری صفراوی است. در انتهای دوره پرورش در کارگاه اندازه کبد کمی بزرگتر شده و ساختارآن تفاوت نامحسوسی را با مرحله قبلی نشان نمی دهد. بررسی اندازه عرضی کبد در انتهای دوره پرورش لاروی در تیمارهای مختلف نشان می دهد که اندازه کبد در تیمارهای ٤، ٥ و ٦ در در این سه تیمار دارای تفاوت معنی داری در مقایسه با تیمار شاهد و کارگاه نمی باشد. این در حالی است که اندازه کبد در تیمارهای دیگر ، بویژه تیمارهای ۱ ، ۲ و ۳ بطرز معنی داری افزایش یافته است. مشابه این نتیجه در بررسی آنزیم آلکالین فسفاتاز نیز مشاهده گردید نتایج حاصل از اندازه گیری کبد در تاسماهیان در جدول ۳-۳۳ ارائه شده است.

جدول ۳-۳۳- اندازه محورهای طولی و عرضی کبد (میکرومتر) در مرحله پایان پرورش لاروی درتاسماهیان

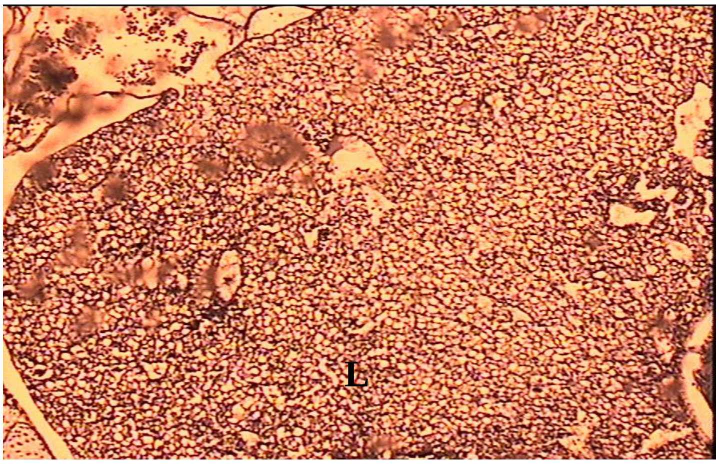
نوع تیمار	اندازه کبد محور طولی μm	 محور عرضی μm
تیمار ۱	۱۰۷۱/٦۰	۱۸۵۲/۱۳
تیمار ۲	۱۱۳۱/٤٤	۱۹۲۳/٤٥

تیمار ۳	١١٦٦/١٥	١٩٨٣/٣٤
تیمار ٤	٦٦١/٧٨	١١٩١/٢٢
تیمار ٥	٦٧٣/٥	١٢١٢/٨١
تیمار ٦	٧٢٧/٤٣	١٢٣٦/٩٦
تیمار ٧	١٠١٨/٢٣	١٧٣١/٥٤
تیمار ٨	١٠٥٥/٢١	١٧٩٤/٤٣
تیمار ٩	١٠٦٦/٣٧	١٨١٢/٨٤
تیمار شاهد	٧٢٥/١٤	١١٤٣//٨٢
تیمار کارگاه	٨٠٢/٣٢	١١٦١/٨٢



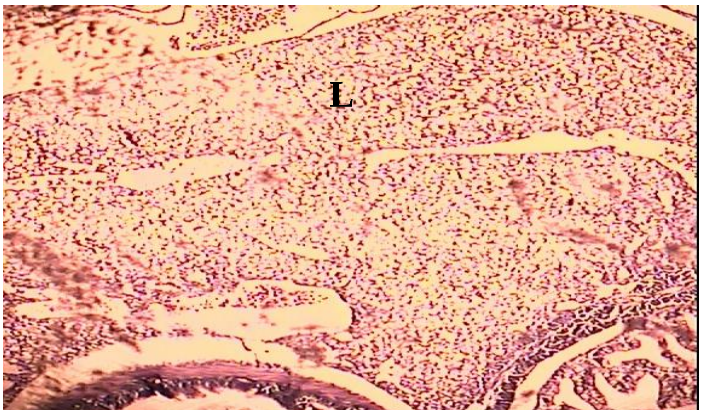
شکل ۳-۱۵- ساختارکبد در لارو تاسماهی ایرانی در تیمار شاهد و در تیمارهای دریافت کننده

باکتری *Leuconostoc mesenteroides*. هماتوکسیلین-ائوزین، ٤x. L : کبد



شکل ۳-١٦- ساختارکبد در لارو تاسماهی ایرانی در تیمارهای دریافت کننده

باکتری *Lactobacillus curvatus* . هماتوکسیلین-ائوزین، ٤x. L : کبد



شکل ۳-۱۷- ساختارکبد در لارو تاسماهی ایرانی در تیمارهای دریافت کننده توام

باکتری *Lac. curvatus* و *Leuc. mesenteroides* هماتوکسیلین-ائوزین، **x**٤. **L** : کبد

فصل چهارم

بحث

٤- بحث:

در طول دو دهه گذشته مطالعات گسترده ای در ارتباط با باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک در دستگاه گوارش ماهیان صورت پذیرفته است (Ringø and Gatesoupe, 1998) . در مطالعه حاضر برای اولین بار به بررسی تنوع گونه ای، تعداد و جداسازی باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک از دستگاه گوارش فیل ماهی و تاسماهی ایرانی پرداخته شد. بر پایه نتایج حاصل در این تحقیق و مطالعات صورت گرفته توسط سایر محققین اثبات میگردد که این دسته از باکتریها اگرچه در اکثر موارد در دستگاه گوارش ماهیان حضور دارند اما از جمله گونه های غالب دستگاه گوارش محسوب نمی گردند

(Ringø and Gatesoupe, 1998; Ringø, 2004; Gram and Ringø, 2005).

بگونه ای که نتایج بدست آمده در این بررسی موید این مطلب می باشد که در فیل ماهیان و تاسماهیانی که در محدوده وزنی ۹۰ تا ۱۰۰۰ گرم قرار گرفته اند، باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک بترتیب ۰/۵٦ و ۰/٤۹ درصد از کل باکتریها و در لارو این دو گونه به ترتیب ۰/٦٦ و ۰/٦۱ درصد از کل باکتریها را بخود اختصاص میدهد. در بسیاری از مطالعات انجام شده در دنیا اهمیت باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک درتقویت سیستم ایمنی، پیشگیری از شیوع بیماری و تسریع روند رشد ماهیان اثبات رسیده است

(Ringø and Gatesoupe, 1998; Ringø, 2004; Gram and Ringø, 2005). این در حالی است که میتوان سطح باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک در روده ماهیان را بطور مصنوعی با افزودن به جیره غذایی در مراحل متفاوت رشد ماهی افزایش داد. این مطلب در مزارع پرورش ماهیان خاویاری به خصوص مزارع پرورش لارو به منظور تسریع روند رشد ، تقویت سیستم ایمنی و حفظ سلامت ماهیان از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است. ثبات جمعیت باکتریایی روده ماهیان از آن جهت حائز اهمیت می باشد که روده ماهیان جایگاه مهمی از نقطه نظر بروز عفونتهای میکروبی و بیماری در ماهیان به شمار می آید بویژه در زمانیکه امکان استفاده از عملیات واکسیناسیون وجود نداشته باشد

(Birkbeck and Ringø, 2005).

کاملا واضح است که فلور میکروبی روده ماهیان در موازات با تغییرات محیطی و از گونه ای به گونه دیگر تغییر می نماید (Holben et al., 2002, Hagi et al., 2004) . در گذشته هیچ گونه تحقیقی بر روی

تغییرات گونه های باکتری های LAB در گونه های مختلف ماهیانی که در شرایط مشابه محیطی زنـدگی می نمایند، صورت نپذیرفته بود اما در سالهای اخیر رو به افزایش می باشد.

Sugita و همکاران در سال ۱۹۹٤ به مطالعه پراکنش گونـه هـای مختلـف آئرومونـاس (*Aeromonas*) موجود در دستگاه گوارشی ماهیان رودخانه ای در ژاپن پرداخته و نشان دادند کـه گونـه هـای مشـابهی از آئروموناس بر اساس مقادیر تعیین شده در هر دو گونه کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) و کپـور زرد (*Carassius cuvieri*) وجود دارد.

Al-Harbi و Uddin در سال ۲۰۰٤ به مطالعه تغییرات فصلی بر روی فلـور باکتریـایی هیبریـد تیلاپیـا (*Oreochroomis niloticus*×*Oreochromis aureus*) در عربستان سعودی پرداخته و نشان دادند تعداد باکتریهای موجود در دستگاه گوارش همزمان با تغییرات فصلی دستخوش تغییر مـی گردنـد. ایـن در حالی است که باکتریهای غالب دسـتگاه گـوارش و باکتریهـای تولیـد کننـده اسـید لاکتیـک مشـتمل بـر *Aeromonas, Shewanella, Corynebacterium, Escherichia Vibrio* در طـول سـال در دستگاه گوارش ماهی حضور دارند اما حضـور برخـی از باکتریهـا ،کـه از باکتریهـای LAB نبـوده انـد، بصورت فصلی می باشد.

Hagi و همکاران در سال ۲۰۰٤ به برررسی تنوع و تغییرات فصلی باکتریهای تولید کننده اسـید لاکتیـک موجود در دستگاه گوارش ماهی کپور نقـره ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) ، کپـور معمـولی (*Cyprinus carpio*) ، گربـه مـاهی کانـالی (*Ictalurus punctatus*) و کپـور زرد (*Carassius cuvieri*)موجود در در یاچه کازامیگورا، واقع در ؟ در تابستان و زمستان پرداختنـد. در تمـام ایـن ماهیـان بیشترین تعداد باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک متعلق به جنس *Lactococcus lactis* در تابسـتان و *Lactococcus raffinolactis* در زمستان گزارش گردید.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان می دهد که تعـداد کـل باکتریهـای شـمارش شـده(TVB) و تعـداد کـل باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک (LAB) در فیل ماهیان بصورت معنـی داری بیشـتر از تاسـماهیان در مرحلـه لاروی و محـدوده وزنـی ۹۰ تـا ۱۰۰۰ گـرم مـی باشـد. بعـلاوه تعـداد کـل باکتریهـای شـمارش شده(TVB) و تعداد کل باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیـک (LAB) در مرحلـه لاروی بصـورت معنـی داری کمتر از محدوده وزنی ۹۰ تا ۱۰۰۰ گرم می باشد.

مشابه این نتیجه در بررسیهای انجام شده بوسیله Hagi و همکاران در سال ۲۰۰٤ بر روی گوارش مـاهی کپور نقـره ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) ، کپـور معمـولی (*Cyprinus carpio*) ، گربـه

ماهی کانالی (*Ictalurus punctatus*) و کپور زرد (*Carassius cuvieri*) و در تحقیقات متفاوت صورت گرفته بر روی گونه های مختلف ماهیان توسط محققین مختلف به اثبات رسیده است (Ringø and Gatesoupe, 1998).

وجود باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک در بخشهای مختلف دستگاه گوارش، در گونه های مختلف ماهیان به اثبات رسیده است (Ringø and Gatesoupe, 1998; Ringø, 2004). نتایج این بررسی حاکی از این مطلب می باشد که بیشترین تعداد باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک از بخش انتهای روده هر دو گونه فیل ماهی و تاسماهی ایرانی جداسازی گردید و میتوان این گونه بیان نمود که بخش انتهای روده یکی از مهمترین مکانهای جداسازی باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک از دستگاه گوارش این دو گونه از ماهیان خاویاری می باشد.

دو گونه از باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک مشتمل بر *Enterococcus seriolicida* و *Leuconostoc mesenteroides* از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی در این پروژه جداسازی گردید و تعداد *Leu. mesenteroides* بصورت معنی داری از گونه دیگر بیشتر می باشد.

گزارشهای معدودی در ارتباط با حضور *Enterococcus* در دستگاه گوارش ماهیان وجود داشته و در بررسیهای معدوده به جداسازی این گونه پرداخته گردیده است (Ringø, 2004). مهمترین تحقیقاتی که در آنها این گونه از باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک از دستگاه گورش ماهیان جدا سازی گردیده است عبارتند از : تحقیقات انجام شده توسط Toranzo و همکاران در سال ۱۹۹۵ بر روی ماهی توربوت(*Scophthalmus maximus* L.)، Cai و همکاران در سال ۱۹۹۹ بر روی کپور معمولی، Gonzalezو همکاران در سال ۲۰۰۰ بر روی قزل آلای قهوه ای *Salmo trutta* ، Hagi و همکاران در سال ۲۰۰٤ بر روی کپور معمولی، Ringø and Sperstad (در دست چاپ) بر روی ماهی آزاد اقیانوس اطلس (*Salmo salar* L.) و در بررسی حاضر بر روی تاسماهی ایرانی در مرحله لاروی و محدوده وزنی ۹۰ تا ۱۰۰۰ گرم اشاره نمود.

جنس *Leuconostoc* تا قبل از انجام این بررسی تنها در سه تحقیق از دستگاه گوارش ماهیان جداسازی و گزارش گردیده بود. Ringø و Strøm در سال ۱۹۹٤ موفق به جداسازی این باکتری از مدفوع ماهی چار قطبی (*Salvelinus alpinus* L.) گردیدند. نتایج این تحققیق موید این مطلب می باشد که این باکتری در صورت استفاده از گوشت نوعی گوزن در جیره غذایی خود، ٤/٥ درصد از کل باکتریهای موجود در دستگاه گوارش را بخود اختصاص می دهد. در یک بررسی دیگر توسط Ringø و همکاران در سال ۱۹۹۸ بر روی ماهی چار قطبی نشان داده شد که در صورت استفاده از اسیدهای چرب غیر اشباع در جیره

غذایی این ماهی *Leu. mesenteroides* را می توان از موکوس موجود در روی سطح اپیتلیال معده، روده کوچک و روده بزرگ جداسازی نمود. در بررسی حاضر نیز موفق به جداسازی این باکتری از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی در مرحله لاروی و محدوده وزنی ۹۰ تا ۱۰۰۰ گرم گردیدیم.

در این تحقیق باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک مشتمل بر گونه های *Streptococcus* sp.، *Lactobacillus curvatus*، *Lactococcus raffinolactis* و *Lactococcus lactis* از دستگاه گوارش فیل ماهی در محدوده وزنی ۹۰ تا ۱۰۰۰ گرم و مرحله لاروی جداسازی گردید. اما همانگونه که اشاره گردید این باکتریها از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی جداسازی نگردید. این مسئله بیانگر وجود تفاوتهای گونه ای باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک در گونه های مختلف ماهیان می باشد

(Ringø and Gatesoupe, 1998; Ringø, 2004).

در بیشتر مطالعات صورت گرفته بر روی باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک نشان داده شده است که *Lactobacillus sp.* از جمله باکتریهایی می باشند که بصورت عمده در جمعیت باکتریایی دستگاه گوارش ماهیان (بویژه روده) وجود دارند و این مسئله در گونه های از جمله **نوعی از کاد ماهیان**(*Gadus virens* L.) (Schrøder et al., 1980; Strøm, 1988) ، کاد اقیانوس اطلس (*Gadus morhua* L.) (Strøm and Olafsen, 1990)، چار قطبی (Ringø, 1993)، آزاد ماهی اقیانوس اطلس (*Salmo salar* L.) (Ringø et al., 2000) ، قزل آلای قهوه ای (Gonzalez et al., 2000) ، کپور معمولی (Hagi *et al*., 2004) ، کپور نقره ای (Hagi *et al*., 2004) ، و فیل ماهی در این بررسی به اثبات رسید.

Trust وSparrow در سال ۱۹۷٤ برای نخستین بار وجود باکتری *Streptococcus* در موکوس دستگاه گوارش ماهیان (salmonids) را گزارش نمودند. در این بررسی این باکتری از ابتدا و انتهای روده ماهیان جداسازی گردید. در بررسی صورت گرفته بوسیله Ringø و همکاران در سال ۱۹۹۸ موفق به جداسازی باکتریهای *Streptococcus*-like یا باکتریهایی شبیه جنس *Streptococcus* از موکوس موجود در معده و یا روده کوچک ماهی چار قطبی گردیدند. این در حالی بود که جیره غذایی این ماهی محتوی اسیدهای چرب لینولئیک و لینولنیک بود. بعلاوه در بررسیهای متفاوتی نیز اقدام به جداسازی باکتری *Streptococcus* از دستگاه گوارش مارماهی (*Anguilla anguilla*) توسط Esteve و Garay در سال ۱۹۹۱ ، کپور معمولی بوسیله Sugita و همکاران در سال ۱۹۸۵ ، ماهی قرمز حوض (*Carassiua auratus*) بوسیله Sugita و همکاران در سال ۱۹۸۸ و همچنین ماهی توربوت

(*Scophthalmus maximus*) بوسیله Ringø و همکاران در سال ۱۹۹۸ و فیل ماهی در بررسی حاضر گردیده است.

در این تحقیق دو گونه از باکتریهای متعلق به جنس *Lactococcus* مشتمل بر *Lac. Raffinolactis* و *Lac. lactis* از دستگاه گوارش فیل ماهی جداسازی گردید. در بررسی صورت گرفته بوسیله Hagi و همکاران در سال ۲۰۰٤ نیز این دو گونه از باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک از دستگاه گوارش ماهی کپور نقره ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) ، کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) ، گربه ماهی کانالی (*Ictalurus punctatus*) و کپور زرد (*Carassius cuvieri*) جداسازی گردیده است. تا کنون هیچ گونه گزارشی مبنی بر بیماریزا بودن این دو گونه از باکتری در ماهیان بدست نیامده است. اما در برخی از گونه های جنس *Lactococcus* اثرات بیماریزایی مشاهده گردیده است که می توان به *Lactococcus garvieae* و *Lactococcus piscium* اشاره نمود و اثرات بیماریزایی این دو گونه در بررسیهای صورت گرفته توسط Kusuda و همکاران در سال ۱۹۹۱ بر روی ماهی دم زرد ژاپنی *Seriola quinqueradiata*. ، Ghittino و همکاران در سال ۱۹۹۵ و Williams و همکاران در سال ۱۹۹۰ بر روی قزل آلای رنگین کمان به اثبات رسیده است.

نتایج حاصل از این بررسی موید این مطلب می باشد در این بررسی از بیشترین به سمت کمترین تعداد باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک در فیل ماهی به ترتیب متعلق به *Lactobacillus curvatus* ، *Lactococcus raffinolactis* ، *Lactococcus lactis* و *Streptococcus* می باشد. این در حالی است که در تاسماهی ایرانی *Leuconostoc mesenteroides* بیشترین تعداد را در مقایسه با گونه *Enterococcus seriolicida* دارا می باشد.

تا کنون جنس *Leuconostoc* بصورت غالب از هیچ یک از موجودات خشکی زی در مقایسه با سایر جنسهای باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک گزارش نگردیده است اما در مورد جنس *Lactobacillus* نه تنها در موجودات خشکی زی بلکه در ماهیان نیز در اکثر موارد بجز در انسان بصورت جمعیت غالب یا نیمه غالب مشاهده گردیده است (Ringø and Gatesoupe, 1998; Ringø, 2004).

.

باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک غالب بدست آمده در این بررسی می تواند بعنوان پروبیوتیک اختصاصی در پرورش دو گونه ارزشمند فیل ماهی و تاسماهی ایرانی مورد استفاده قرار گیرد و در تحقیقات متعددی به مطالعه این امر در گونه های مختلف ماهیان پرداخته شده است. (Byun et al., 1997; Cai et al., 1998; Gram et al., 1999; Go; Robertson et al., 2000; Nikoskelainen et al., 2001; Spanggaard et al., 2001; Irianto and Austin, 2002a) . از سوی دیگر خصوصیات ضد باکتریایی باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک موجود در دستگاه گوارش ماهیان بویژه روده آنها به اثبات رسیده است (Cai et al., 1998; Sugita et al., 1998, 2002) و حضور آنها در دستگاه گوارش ماهیان (Ringø and Gatesoupe, 1998) و موجودات خشکی زی (Yan and Polk, 2002; Tuohy et al., 2003) ، نقش مهمی را در حفظ سلامت موجودات ایفا می نماید.

در این تحقیق اقدام به جداسازی باکترهای تولید کننده اسید لاکتیک از دستگاه گوارش فیل ماهی و تاسماهی ایرانی و استفاده از نمونه غالب آن به صورت لیوفیلیزه در تغذیه لاروها در طول دوره پرورش لاروی گردید. نتایج این بررسی مبین این مطلب می باشد که در هر دو گونه استفاده از باکتری تولید کننده اسید لاکتیک اختصاصی هر گونه تاثیر مثبتی را در روند رشد و بقای لاروها دارد . بطوریکه در لارو فیل ماهی استفاده از *Lactobacillus curvatus* جداسازی شده ازدستگاه گوارش فیل ماهی و به تعداد (۹×۱۰^{۹} CFU/gr غذا) و در لارو تاسماهی ایرانی *Leuconostoc mesenteroides* جداسازی شده از دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی و به تعداد (۲×۱۰^{۹} CFU/gr غذا) منجر به افزایش معنی دار شاخصهای رشد در مقایسه با سایر تیمارها می گردد و در صورت استفاده از باکتری تولید کننده اسید لاکتیک جدا سازی شده از یک گونه برای گونه دیگر با کاهش معنی دار شاخهای رشد و درصد بازماندگی در لاروها مواجه می گردیم. تاثیر مثبت پروبیوتیکها با تاکید بر باکتریها تولید کننده اسید لاکتیک بر روی روند رشد و در صد بقای ماهیان بوسیله محققین صورت پذیرفته است که می توان به تاثیر کاربرد باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک بر روی روند رشد و درصد بقای ماهیان لارو توربوت *Scophthalmus maximus* بوسیله Gatesoupe در سال ۱۹۹٤، Gildberg و همکاران در سال ۱۹۹۷ بر روی کاد اقیانوس اطلس *Gadus morhua* و Ringø و همکاران در سال ۲۰۰۰ در ماهی آزاد اقیانوس اطلس *Salmo salar* و بسیاری از تحقیقات دیگر مورد بررسی واقع شده است. در تمام این تحقیقات افزایش شاخصهای رشد و درصد بقای لاروها مشاهده گردید.

مطالعات مختلفی بر روی کاربرد پروبیوتیکها در پرورش لاروها بویژه لارو آزاد ماهیان بمنظور کنترل ویبریوز صورت گرفته است(Cai et al., 1998; Sugita et al., 1998, 2002) . در اکثر بررسی های صورت گرفته، پروبیوتیک مورد نظر در فرم لیوفیلیزه یا به آب افزوده می گردد و یا از طریق غنی سازی غذای زنده مانند ناپلی آرتمیا و روتیفرها در اختیار لارو قرار می گیرد (Gomez-Gil et al., 2000). تعداد باکتریهای موجود در دستگاه گوارش ماهیان به مراتب بیش از محیط زیست اطرافشان می باشد و به طور میانگین در حدود ۱۰^{۸} CFU/g روده تخمین زده می شود (Ringø et al., 1995).

تحقیقات انجام شده حاکی از این مطلب می باشد که در صورت استفاده از باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک (LAB) و یا باکتریهای اختصاصی به منظور افزایش مقاومت لاروها در برابر عوامل بیماریز به عنوان پروبیوتیک در تغذیه لاروها، می توان شاهد تاثیرات مثبتی در روند رشد و بقای لاروها بود (Ringø and Gatesoupe, 1998). از این رو در تحقیقات متعددی اقدام به بررسی فلور میکروبی دستگاه گوارش ماهیان، لاروها، تخم و غیره گردیده است (Gomez-Gil et al., 2000).

در بین باکتریهای مختلف، باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک از اهمیت و جایگاه ویژه بعوان پروبیوتیک برخوردار می باشند.روند تاثیر پروبیوتیکها با تاکید بر باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک بر روی رشد و بقای ماهیان از طریق توجه به مکانیسم های زیر قابل بررسی می باشد که عبارتند از(Gullian et al., 2004):

۱- توجه به کلونیزه شدن باکتری
۲- تاثیر مثبت بر روی فعالیت سیستم ایمنی
۳- افزایش فعالیت آنزیمهای گوارشی در ماهیان

در این برررسی هر سه مکانیسم مورد توجه قرار گرفته و جهت بررسی مکانیسم کلونیزه شدن *Lactobacillus curvatus* و *Leuconostoc mesenteroides* افزوده به آب محیط زیست ماهیان به همراه جیره غذایی از پایان دوره پرورش لاروی و ابدای دوره پرورش عملیات کشت لاروها انجام گردید.

اولین قدم باکتری جهت القای تاثیرات خود بر روی ساختار فیزیولوژیک بدن موجود زنده، کلونیزه شدن در سطح داخلی دستگاه گوارش و بدن آبزی می باشد. توانایی اتصال باکتریها به موکوس موجود در سطح اپیتلیال روده و سایر بخشهای دستگاه گوارش یکی از شروط لازم جهت کلونیزه شدن باکتریها از جمله باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک است. بر اساس نظریه (Conway, 1996) باکتری ازتوانایی کلونیزه شدن در دستگاه گوارش برخورداراست که سرعت تکثیر آن بیشتر ازسرعت دفع و مرگ و میر است.

تحقیقا ت نشان می دهد که کلونیزه شدن باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک در دستگاه گوارش موجودات خشکی زی به سهولت امکانپذیر می باشد بگونه ای که به سرعت جزو فلور باکتریایی غالب یا نیمه غالب دستگاه گوارش این موجودات تبدیل می گردند(Gournier- Chateau, 1994) . اما در ماهیان در گونه های مختلف متفاوت می باشد.

نتایج این تحقیق مبین این مطلب می باشد با افزودن باکتری *Lactobacillus curvatus* در آب محیط زندگی لارو فیل ماهی و *Leuconostoc mesenteroides* در تاسماهی ایرانی تعداد آنها در دستگاه

گوارش افزایش می یابد.این در حالی است که در مورد فیل ماهی بالاترین تعداد باکتری *Lact. curvatus* و در تاسماهی ایرانی کمترین تعداد *Leu. mesenteroides* افزوده شده به محیط زیست ماهی، منجر به افزایش توانایی کلونیزه شدن باکتریهای نام برده در دستگاه گوارش این ماهیان گردید. در هر دو بررسی ذکر شده افزایش میزان رشد و درصد بقا در دوزهای مناسب و اختصاصی برای هر گونه بر اساس نوع باکتری مشاهده شد.

در مطالعات صورت گرفته توسط Ringø و Strøm در سال ۱۹۹۳ که اقدام به جداسازی *Carnobacterium divergens* از دستگاه گوارش ماهی کاد و افزودن آن به آب محیط زیست لارو این گونه نمودند نیز غالب شدن این باکتری به میزان ۷۰ درصد از کل باکتریای موجود در دستگاه گوارش این گونه نیز گزارش گردید.

در بررسی صورت گرفته توسط Gildberg و همکاران در سال۱۹۹۵ بر روی ماهی آزاد اقیانوس اطلس *Salmo salar*در مرحله نوجوانی به بررسی تاثیر غذای غنی سازی شده با پروتئین هیدرولیز و باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک مشتمل بر(*Carnobacterium divergens*) بر روی بقا و رشد پرداخته شد. نتایج حاصل از این تحقیق بیانگر افزایش تعداد باکتریهای افزوده شده به جیره غذایی ماهی آزاد اقیانوس اطلس در دستگاه گوارش این ماهیان بوده و استفاده از تعداد غذا CFU/g ۲ ×۱۰^۹ از این باکتری منجر به افزایش چشمگیر شاخصهای رشد و درصد بقا در آنها می گردد.

در تحقیق مشابه صورت گرفته توسط Gildberg و همکاران در سال۱۹۹۷ بر روی ماهی کاد اقیانوس اطلس *Gadus morhua* در مرحله نوجوانی بیانگر افزایش تعداد باکتریهای *C. divergens* افزوده شده به جیره غذایی ماهی کاد اقیانوس اطلس در دستگاه گوارش این ماهیان بوده و استفاده از تعدادی برابر با غذا CFU/g ۱۰^۷ از این باکتری منجر به افزایش چشمگیر شاخصهای رشد و درصد بقا در آنها می گردد.

در بررسی صورت گرفته بوسیله Nikoskelainen و همکاران در سال ۲۰۰۳ بر روی قزل آلای رنگین کمان در مرحله نوجوانی که از *Lactobacillus rhamnosus* جداسازی شده از دستگاه گوارش، در فرم لیوفیلیزه بر اساس مقادیر تعیین شده به مدت ۲ هفته در تغذیه آنها استفاده گردید، یک هفته پس از آغاز افزودن باکتری به غذا ، پس از انجام کشت ، کلونیزه شدن باکتری و افزایش تعداد گونه مورد نظر باثبات رسید. بگونه ای که تعداد باکتریهای موجود در دستگاه گوارش با افزایش تعداد آن در غذا افزایش یافت. بهترین تعداد باکتری در این تحقیق غذا CFU/g ۱۰^۱۰ × ۹/۷ تعیین شد.

در مطالعات صورت گرفته بوسیله Rollo و همکاران در سال ۲۰۰٦ بر روی شانک دریایی *Sparus aurata* از دو گونه باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک شامل *Lactobacillus plantanarum* جداسازی شده مدفوع انسان و *Lac.fructivorans* جداسازی از روده خود ماهی در تغذیه لاروی به صورت مخلوط با یکدیگر و به تعدادغذا 10^9 CFU/g استفاده نمودند. در این بررسی ار ناپلی آرتمیا و روتیفر به عنوان حامل استفاده گردید.در یک گروه تغذیه ماهیان از روز ۵ تا ۲۷ دوره پرورش لاروی با استفاده از روتیفر غنی سازی شده و سپس از روز ۲۷ تا ٤۷ آرتمیا و در گروه دوم از روز ۲۷ تا ٤۷ تنها از ارتمیا غنی سازی شده استفاده شد. نتایج این تحقیق بیانگر تغییر فلور میکروبی دستگاه گوارش ماهیان در هر دو گروه و کلونیزه شدن باکتریها ی افزوده شده در روده این ماهیان می باشد، بگونه ای که تعداد باکتریهای کلونیزه شده در گروه نخست بیشتر از گروه دیگر می باشد. اما در صد بقا و سرعت رشد در گروه دوم بیش از اول است.

همانگونه که قبلا نیز اشاره گردید از جمله دیگر مکانیسمهایی پروبیوتیکها از طریق آن منجر به افزایش روند رشد در ماهیان می گردند، افزایش فعالیت آنزیم های گوارشی و روند رشد دستگاه گوارش بویژه در لاروها می باشد. بدین منظور ، در این پروژه نه تنها آنزیم های گوارشی مشتمل بر آنزیم های لوزالمعد ه ای شامل لیپاز، آمیلاز و پروتئاز و آنزیم روده ای شامل آلکالین فسفاتاز مورد اندازه گیری واقع گردید بلکه از ابتدای آغاز تغذیه فعال تا انتهای دوره پرورش کارگاهی در چهار مرحله اقدام به انجام مطالعات بافتی نیز گردید.

نتایج مطالعات آنزیماتیک صورت گرفته در دو گونه فیل ماهی و تاسماهی ایرانی بیانگر بالا بودن میزان فعالیت آنزیم ها در فیل ماهیان در مقایسه با تاسماهی ایرانی در تیمار شاهد و کارگاه در مراحل مختلف نمونه برداری می باشد. مقدار فعالیت آنزیم های آمیلاز ، لیپاز، پروتئاز و آلکالین فسفاتاز در فیل ماهی در تیمارهای مذکور به ترتیب در محدوده U/mg protein ۸۵-۳۰ ، U/mg protein ۲۱/۱۸-۸/٤۵ ، U/mg protein ۲۵/۱۸- ۱۰/٤۵ ، U/mg protein ۸۸/۱۲ -۸۳/۲ و بعلاوه در تاسماهی ایرانی در محدوده U/mg protein ٦۳/۱-۲٤/۵ ، U/mg protein ۱۵/۱۲- ۲ /۷ ، U/mg protein ۲۲/۱۸-۸/٤۵ ، U/mg protein ۸۱/۱۸- ۷۲/٤۵ گزارش گردید. در تحقیقات انجام شده بوسیله Furné و همکاران در سال ۲۰۰۵ بر روی فعالیت آنزیم های دستگاه گوارش تاسماهی آدریاتیک *Acipenser nacarii* در محدوده وزنی ۵۰۰ تا ٦۰۰ گرم میزان آنزیمهای آمیلاز، لیپاز و پروتئاز برابر با محدوده U/mg protein ۱۳۳/٦٤ ، U/mg protein ۲۲/۹۱ و U/mg protein ۳۹/۲۷ و در ماهی قزل آلای رنگین کمان در محدوده وزنی ۲۰۰ تا ۳۰۰ گرم U/mg protein ۱۲۹/۲٤ ، U/mg protein ٤۵/۹۷ و U/mg protein ۵۷/۰۷ مشاهده شد. بنظر می رسد علت بروز چنین تفاوتهایی در مقادیر آنزیم های اندازه

گیری شده ناشی از تفاوتهای گونه ای ، روشهای اندازه گیری آنزیمها ، سن و اندازه ماهی و شرایط تغذیه ای می باشد

.(Ribeiro et al., 1999; Tovar et al., 2002; Furné et al., 2005)

درصورت بررسی دقیقتر مقادیر آنزیمهای اندازه گیری شده در فیل ماهی بیشترین میزان آنزیمهای آمیلاز، لیپاز و پروتئاز متعلق به تیمارهایی است که از باکتری تولید کننده اسید لاکتیک جدا سازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی شامل *Lactobacillus curvatus* در تغذیه لاروها استفاده گردیده است . در این تیمارهی با افزایش میزان مصرف باکتری مذکور بر میزان فعالیت آنزیم های مورد نظر افزوده می گردد. این در حالی است که بر اساس مطالب پیشین ذکر شده، تیمارهای فوق دارای حداکثر میزان شاخصهای رشد و در صد بقا می باشند. در حالی که در صورت افزودن باکتری *Leuconostoc mesenteroides* جداسازی شده از لارو تاسماهی ایرانی به محیط زیست لارو فیل ماهی با کاهش معنی دار فعالیت آنزیم های دستگاه گوارش و شاخصهای رشد مواجه می گردیم. در در صورت استفاده توام باکتری *Lac. curvatus* همراه با *Leu. mesenteroides* اگر چه از تاثیر منفی *Leu. mesenteroides* کاسته می شود و میزان فعالیت آنزیماتیک افزایش می یابد اما باز هم دارای تفاوت معنی دار با تیمارهایی می باشد که به صورت اختصاصی و به تعداد بالا از *Lac. curvatus* استفاده نموده اند. مشابه این حالت در تاسماهی ایرانی مشاهده گردید. بگونه ای که در صورت استفاده از گونه LAB غیر اختصاصی (*Lac. curvatus*) با کاهش فعالیتهای آنزیماتیک و شاخصهای رشد و در صورت استفاده از گونه LAB اختصاصی(*Leu. mesenteroides*) با فزایش شاخصهای رشد و فعالیتهای آنزیماتیک مواجه می گردیم.

مشابه این نتیجه در بررسی صورت گرفته توسط Tovar-Ramirez و همکاران در سال ۲۰۰٤ که از مخمرها به عنوان پروبیوتیک در پرورش لاروهای باس دریایی *Dicentrarchus labrax*، تاثیر مثبت آن در افزایش فعالیت انزیم های دستگاه گوارش مشاهده گردید. بعلاوه در تحقیقات انجام شده بوسیله Bairagi و همکاران در سال ۲۰۰۲ اثرات مثبت افزایش جمعیت باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک در ماهی تیلاپیا و کپور ماهیان در دوران لاروی در افزایش فعالیت آنزیم های دستگاه گوارش باثبات رسید. در این تحقیق باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک بعنوان میکروارگانیسم های تولید کننده آنزیمهای پروتئولتیک، لیپو لتیک و آمیلولتیک معرفی شده و در نتیجه تاثیر قابل توجهی در افزایش هضم و جذب مواد غذایی دارند.

افزایش فعالیت آنزیم های دستگاه گوارش در افراد یک گونه، بویژه آنـزیم هـای لیپـاز ، آمـیلاز و پروتئـاز بیانگر افزایش توانایی آنها در هضم ذرات غذایی مشتمل بر پروتئینها، چربیها و کربو هیدراتها می باشـد کـه منجر به افزایش امکان جذب و در نهایت روند رشدی سریع در ماهیان و سایر موجودات می گردد (Chong et al., 2002, Furné et al., 2005).

لازم بذکر است که در طول دوره لاروی فیل ماهی و تاسماهی ایرانی در تمام تیمارها میزان فعالیت آنزیمها با فاصله گرفتن از آغاز تغذیه فعال افزایش می یابد و این امر بویژه در ابتدای دوره چشمگیرتر می باشـد و با سپری شدن دوره لاروی به میزان تقریبا ثابتی می رسد.

در بررسیهای صورت گرفته بر روی تعداد زیادی از گونه های ماهیان در مرحله لاروی نیز نتیجه ای مشابه بدست آمده است. بگونه ای که میزان فعالیت آنزیمهای دستگاه گـوارش بـویژه آنـزیم هـای لوزالمعـده ای دارای تفاوت معنی داری در زمان پیش از تغذیه فعال با پس از آن داشته و افزایش معنی داری را نشان مـی دهد. با فاصله گرفتن از زمان آغاز تغذیه فعال و طی شدن دوره لاروی میزان فعالیتهای آنزیمی در یک حـد ثـابتی بـاقی مـی مانـد (Zambonino-infante and Cahu, 1994$_{a\&b}$; Ribeiro et al., 1999; Tovar et al., 2002)

. در برخی از تحقیقات صورت گرفته عکس این حالت مشاهده شده و میزان فعالیت آنزیم های گوارشی از زمان پیش از آغاز تغذیه فعال افزایش یافته و تفاوت معنی داری را با بعد از آن ندارد. ایـن حالـت در لارو باس دریـایی *Lates calcalifer* (Walford and Lam, 1993) ، لارو نـو عـی دیگـر بـاس دریـایی *Dicentrarchus labrax* (Cahu and Zambonino-infante, 1994, 1995&1997) و نوعی کفشک ماهی *Solea senegalensis* (Ribeiro et al., 1999) گزارش گردیده است. در این لاروها تغذیه و نوع غذای دریافتی بوسیله لاروها تاثیری را بر روی فعالیـت آنـزیم هـای دسـتگاه گـوارش نـدارد (Ribeiro et al., 1999) .

آلکالین فسفاتاز آنزیمی می باشد که دارا ی انواع روده ای ، استخوانی و کبدی می باشد. نوع اسـتخوانی آن از مغز استخوان، نوع کبدی از هپاتو سیتها و روده ای از بافت داخل روده ها ترشح می گردنـد و مکانیسـم های مختلفی در آزاد سازی آنها وجود دارد (Lan et al., 1995). میزان این آنزیم در بافت لاروها بیانگر وضعیت فعالیت کبد و فعالیت روده ها می باشد (Sknoberg et al., 1997).

نتایج حاصل از اندازه گیری آنزیم آلکالین فسفاتاز نشان می دهد که در تمام مراحل نمونه برداری مقدار این آنزیم در تیمار شاهد و کارگاه در هر دو گونه فیل ماهی و تاسماهی ایرانی دارای تفاوت معنـی داری نمـی باشد.مشابه این نتیجه در بررسی انجام شده بوسیله Ribeiro و همکـاران در سـال ۱۹۹۹ بـر روی نـوعی

کفشک ماهی با نام علمی *Solea senegalensis* در مرحله لاروی بدست آمده است. این امر نشان می دهد که در این ماهیان تا حد زیادی عملکرد روده و انجام فعالیتهای هضم، جذب و انتقال مواد غذایی در طول دوره پرورش لاروی ثابت میباشد(Ribeiro et al., 1999).

میزان تغییرات آنزیم آلکالین فسفاتاز در بافت و در دستگاه گوارش ماهی در حدود۴۰ U/mg protein تا ۳۳۰ تخمین زده شده است و در اکثر گونه های مختلف ماهیان در محدوده U/mg protein ۸۰ تا ۱۵۰ قرار دارد(Hile, 1982). مشابه این نتیجه در هر دو گونه فیل ماهی وتاسماهی ایرانی در این تحقیق بدست آمد بگونه ای که در فیل ماهی در محدوده۸۳ U/mg protein تا ۱۷۵ U/mg protein و در تاسماهی ایرانی در محدوده۷۰ U/mg protein تا ۱٤٥ U/mg protein اندازه گیری گردید. مطالعات انجام شده توسط محققین حاکی از این مطلب می باشد که میزان تغییرات سطوح آلکالین فسفاتاز تحت تأثیر فاکتورهای مختلفی مانند وضعیت شیمیایی آب ، میزان جذب ، مصرف و نوع غذا ، دما (Sknoberg et al., 1997) و سن ماهی (Sknoberg et al., 1997 ; Kuzmina , 1996 ; Lemieux et al., 1999 ;) و بعلاوه ترکیبات موجود در جیره غذایی بویژه فسفر (Sknoberg et al., 1997) می باشد.

بعلاوه مقادیر آنزیم آلکالین فسفاتاز تا حد زیادی منعکس کننده وضعیت کبد نیز می باشد. نتایج حاصل از بررسی توام مطالعات بافت شناسی و میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز منعکس کننده این مطلب می باشد که در تیمارهای دریافت کننده باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز در مقایسه با تیمارهای شاهد و کارگاه در هردو گونه فیل ماهی و تاسماهی ایرانی به میزان معنی داری بالا می باشد ($P<0.05$). این در حالی است که مطالعات بافت شناسی و اندازه گیری محور طولی و عرضی کبد در تمام تیمارها نیز نتایجی مشابه در مقایسه با تیمارهای شاهد و کارگاه را در بر داشته است.

زمانیکه هر دو گونه فیل ماهی و تاسماهی ایرانی از پروبیوتیکهای اختصاصی جداسازی شده از دستگاه گوارش خود را استفاده نموده اند، اندازه کبد دارای تفاوت غیر معنی داری با تیمار شاهد می باشد. در این تیمارها میزان آلکالین فسفاتاز نیز در مقایسه با تیمارهای دریافت کننده باکتری غیر اختصاصی بطرز معنی داری کمتر می باشد($P<0.05$). در صورت افزودن باکتری جدا سازی شده از تاسماهی ایرانی مشتمل بر *Leuconostoc mesenteroides* به محیط زیست فیل ماهی و *Lactobacillus curvatus* در تاسماهی ایرانی، باافزایش معنی دار اندازه کبد در تیمارهای مذکور مواجه می گردیم. در این تیمارها سطوح آلکالین فسفاتاز نیز در مقایسه با سایر تیمارها بصورت معنی داری بیشتر می باشد($P<0.05$).

بر اساس مطالب ارائه شده، در صورت استفاده از پروبیوتیکهای غیر اختصاصی در ماهیان خاویاری ، علاوه بر القای تاثیرات منفی بر روی روند رشد و فعالیت آنزیم های گوارشی ، بزرگ شدن کبد از جمله دیگر تاثیرات منفی فیزیولوژیک در ماهیان است.

کبد از فرورفتگی جیب مانند حفره جنین رشد نموده و سطح آن از لایه سروزی پوشیده شده است. این اندام دارای ساختار لوبولی همراه با ورید های کوچک مرکزی مشابه مهره داران عالی تر می باشد. سلولهای اصلی پارانشیم کبد، هپاتوسیتها هستند که سلولهای دیگری نیز در ساختار کبد وجود دارد. هپاتوسیتها دارای هسته کروی مشخصی می باشند. این اندام نقش اساسی را در تولید صفرا و انجام هضم لیپید ها بر عهده دارد (تاکاشیما و هیبایا، ۱۹۹۵). نتایج حاصل از این تحقیق نشان می دهد که ساختار کبد در زمان آغاز تغذیه فعال در فیل ماهی و تاسماهی ایرانی کامل شده و کاملا بزرگ می گردد و دارای دو لب مشخص از یکدیگر می باشد. تحقیقات انجام شده بوسیله پهلوان یلی در سال ۱۳۸۰ بر روی مطالعات بافت شناسی دستگاه گوارش در لارو تاسماهی ایرانی، جرجانی در سال ۱۳۸۲ بر روی مطالعات بافت شناسی دستگاه گوارش در لارو فیل ماهی و Gawlika در سال ۱۹۹۵ بر روی لارو تاسماهی سفید *Acipenser transmontanus* و در نهایت Gisbert و همکاران در سال ۱۹۹۸ و ۱۹۹۹ در تاسماهی سیبری *Acipenser baeri* نیز تایید کننده این مطلب می باشند.

بررسی روند رشد دستگاه گوارش از طریق مطالعات بافت شناسی از جمله دیگر اهداف این پروژه همگام با مطالعات آنزیماتیک مورد توجه قرار گرفت. نتایج نهایی انجام مطالعات بافت شناسی نشان می دهد در هر دو گونه در زمان آغاز تغذیه فعال، دستگاه گوارش دارای ساختاری کامل و کارآمد می باشد و این امر در تحقیقات صورت گرفته توسط سایر محققین شامل پهلوان یلی در سال ۱۳۸۰ بر روی مطالعات بافت شناسی دستگاه گوارش در لارو تاسماهی ایرانی، جرجانی در سال ۱۳۸۲ بر روی مطالعات بافت شناسی دستگاه گوارش در لارو فیل ماهی و Gawlika در سال ۱۹۹۵ بر روی لارو تاسماهی سفید *Acipenser transmontanus* و Gisbert و همکاران در سال ۱۹۹۸ و ۱۹۹۹ در تاسماهی سیبری *Acipenser baeri* نیز مشاهده گردیده است. در طول دوره پرورش لاروی در هر دو گونه فیل ماهی و تاسماهی ایرانی ، افزایش حجم و اندازه و همچنین میزان چین خوردگیهای موجود در اندامهای گوارشی نسبت به سایر تغییرات مشهودتر و واضح تر می باشد.

روند رشد دستگاه گوارش در تمام تیمارها یکسان بوده و این امر می تواند ناشی از ایجاد ساختاری کامل در زمان آغاز تغذیه فعال در هر دو گونه باشد (پهلوان یلی، ۱۳۸۰ ؛ Gisbert, 1999). تنها تفاوت مشاهده شده اندازه کبد می باشد که توضیحات لازم در این راستا ارائه گردید. مشابه این نتیجه در بررسی انجام شده بوسیله Picchietti و همکاران در سال ۲۰۰۷ برروی روند رشد دستگاه گوارش در لارو شانک دریایی *Sparus aurata* که از دو گونه باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک شامل *Lactobacillus plantanarum* جداسازی شده مدفوع انسان و *Lac.fructivorans* جداسازی از روده خود ماهی در

تغذیه لاروها استفاده شد، هیچ گونه تفاوتی در روند رشد اندام های گوارشی که در آنها از باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک استفاده نموده بودند با تیمار شاهد مشاهده نگردید.

از جمله دیگر فاکتورهای مورد بررسی به منظور دستیابی به اطلاعاتی در ارتباط با سیستم ایمنی بررسی فاکتور لیزوزیم می باشد. اگر چه لیزوزیم یکی از صدها فاکتور قابل بررسی جهت ارزیابی وضعیت سلامت آبزیان بویژه در بحث ایمنی ذاتی محسوب می گردند اما در سالهای اخیر میزان لیزوزیم موجود در خون و بافت نیز فاکتوری مناسب جهت ارزیابی توانائی ماهیان در بروز پاسخ های ایمنی ذاتی نسبت به عوامل استرس زا محسوب شده و در ماهیان بسیار فعالتر از مهره داران عالیتر است (Austin and Kim, 2006). بگونه ای که مطالعات Fevolden و Roed (۱۹۹۳) نشان می دهد که در شرایط خاص فعالیت لیزوزیم در مقایسه با کورتیزول شاخص مناسبتری در ارزیابی پاسخ ماهیان نسبت به استرس محسوب می گردد (Fast et al., 2002)

لیزوزیم قادر به شکستن باندهای گلیکوسیدیک موجود در لایه پپتیدوگلیکان موجود در دیوارۀ سلولی باکتری ها بوده و در نتیجه منجربه آزاد شدن و مرگ پروتوپلاست می گردد. به عبارتی دیگر پلیمرهای کمپلکس اسیدهای آمینه و قندهای موجود در دیوارۀ سلولی را هیدرولیز می نماید (Fast et al., 2002) برخی از باکتری ها قادرند مستقیماً بوسیله لیزوزیم لیز شوند، اما در بسیاری موارد غشاء دیوارۀ سلولی باکتریها ابتدا مورد حمله کپلمان واقع شده تا لیزوزیم اثرات خود را القا نماید (Roberts, 2001; Fevolden et al., 2002).

درصورت بررسی مقادیر لیزوزیم اندازه گیری شده در فیل ماهی ، بیشترین میزان لیزوزیم به تیمارهایی است که از باکتری تولید کننده اسید لاکتیک جدا سازی شده از دستگاه گوارش فیل ماهی شامل *Lactobacillus curvatus* در تغذیه لاروها استفاده نموده اند . در این تیمارها با افزایش میزان مصرف باکتری مذکور بر میزان فعالیت لیزوزیم افزوده می گردد و تیمارهای فوق دارای حداکثر میزان شاخصهای رشد و در صد بقا می باشند. در حالی که در صورت افزودن باکتری *Leuconostoc mesenteroides* جداسازی شده از لارو تاسماهی ایرانی به محیط زیست لارو فیل ماهی با کاهش معنی دار فعالیت لیزوزیم و شاخصهای رشد مواجه می گردیم. در صورت استفاده توام باکتری *Lac. curvatus* همراه با *Leu. mesenteroides* اگر چه از تاثیر منفی *Leu. mesenteroides* کاسته می شود و میزان آن افزایش می یابد اما باز هم دارای تفاوت معنی دار با تیمارهایی می باشد که به صورت اختصاصی و به تعداد بالا از *Lac. curvatus* استفاده نموده اند. مشابه این حالت در تاسماهی ایرانی مشاهده گردید. بگونه ای که در صورت استفاده از گونه LAB غیر اختصاصی (*Lac. curvatus*) با کاهش فعالیتهای آنزیم لیزوزیم و

شاخصهای رشد و در صورت استفاده از گونه LAB اختصاصی(*Leu. mesenteroides*) بـا فـزایش شاخصهای رشد و مقادیر این آنزیم مواجه می گردیم.

تحقیقات صورت گرفته حاکی از این مطلب می باشد که استرسهای حاد منجربه افزایش فعالیت این آنزیم و استرس های مزمن منجربه کاهش فعالیت آن می گردند (Demers and Bayne, 1997) بنا بر این مـی توان نتیجه گیری نمود که اسـتفاده از *Leuconostoc mesenteroides* جداسـازی شـده از دسـتگاه گوارش تاسماهی برای لاروهای فیل ماهیان و همچنین *Lactobacillus curvatus* جداسـازی شـده از دستگاه گوارش فیل ماهی برای تاسماهی ایرانی در طولانی مدت و در طول دوره پرورش لاروی می توانـد به عنوان یکی از عوامل استرس زا در این ماهیان مطرح شده که اثرات آن از روی کاهش شاخصهای رشـد در تیمارهای مذکور و فعالیت آنزیم های گوارشی کاملا مشهود است.

بعلاوه این آنزیم توانایی بالایی را در از بین بردن تعداد زیادی از عوامل و باکتریهای بیماری زا ، در شرایط طبیعی در ماهیان عهده دار است (Fast et al., 2002). بنابراین، مقاومت لاروهای فیل ماهی و تاسماهی ایرانی افزایش می یابد و تاثیر آن در بررسی شاخصهای رشد مشهود است. از سوی دیگر با توجـه بـه ایـن موضوع که مقادیر آنزیم لیزوزیم بویژه در سرم خـون، مـنعکس کننـده فعالیـت منوسـیتها، نوتروفیـل هـا و سلولهای فاگوسیتوز کننده می باشد(Pirarat et al., 2006) ، بنابر این به طـور غیـر مسـتقیم مـی تـوان تقویت سیستم ایمنی در فیل ماهی و تاسماهی ایرانی را در نتیجه افزایش فعالیت این آنـزیم در تیمـار هـای دریافت کننده پروبیوتیک اختصاصی استنباط نمود.

در تحقیقات صورت گرفته بوسیله Panigrahi و همکاران در سال ۲۰۰٤ افزایش فعالیت آنزیم لیزوزیم در ماهیان قزل آلای که از *Lactobacillus rhamnosus* در تغذیـه آنهـا اسـتفاده گردیـده بـود، مشـاهده گردید.

در مطالعات صورت گرفته بوسیله Austin و Kim در سال ۲۰۰٦ بر روی ماهیـان قـزل الا در محـدوده وزنی ۲۵ گرم که از *Carnobacterium maltaromaticum* و همچنین *C.divergens* در فـرم لیوفیلیزه به غذای آنها افزوده شده بود، افزایش فعالیـت آنـزیم لیـزوزیم در ماهیـانی کـه از هـر دو بـاکتری بصورت توام استفاده نموده بودند و ماهیانی که تنها از *C.divergens* استفاده نموده بودند مشاهده گردید. بعلاوه درصد رشد و بقا در این ماهیان نیز بالاتر از سایرین مشاهده گردید.

در تحقیقات انجام شده بوسیله Pirarat و همکـاران در سـال ۲۰۰٦ افـزایش فعالیـت آنـزیم لیـزوزیم در ماهیان تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*) آلوده شده بـا *Edwardsiella tarda* کـه پـس از ایجـاد

تماس با باکتری مذکور از *Lactobacillus rhamnosus* در تغذیه آنها استفاده گردیده بود، گزارش گردید.

مقادیر آنزیم لیزوزیم در این بررسی برابر با U/mg protein ۱۱٤-٥٤ در فیل ماهی و U/mg protein ۱۱۲-٤٠ در تاسماهی ایرانی اندازه گیری گردید. در مطالعات انجام شده بر روی مقادیر این آنزیم بوسیله Fast و همکاران در سال ۲۰۰۲ در موکوس پوست قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhyncus mykiss*)، ماهی آزاد کوهو (*Oncorhynchus kisutch*) و ماهی آزاد اقیانوس اطلس (*Salmo salar*) مقادیر این آنزیم در آب شیرین بترتیب برابر باU/mg protein ۱۸٥، U/mg protein ۱۱۰ و U/mg protein ۲۰۰ و در آب شور برابر با U/mg protein ٦٥، U/mg protein ۱۹و U/mg protein ۱۳ بدست آمد.در سایر برسیها در گونه های مختلف نیز که بر روی مقادیر این آنزیم در سرم خون و موکوس دستگاه گوارش، بافت و غیره

صورت پذیرفته است، مقادیر متفاوتی بدست آمده است. نتایج این بررسیها بیانگر تاثیر شرایط زیست محیطی، تغذیه ای و تفاوتهای فردی و گونه ای بر روی مقادیر این آنزیم می باشد (Fast et al., 2002; Pirarat et al., 2006; Austin and Kim, 2006).

با توجه به نتایج و مطالب ارائه شده، اثرات مثبت ناشی از کاربرد باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک جداسازی شده به عنوان پروبیوتیک در این تحقیق باثبات میرسد و. باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک غالب بدست آمده در این بررسی می تواند بعنوان پروبیوتیک اختصاصی در پرورش دو گونه اررزشمند فیل ماهی و تاسماهی ایرانی مورد استفاده قرار گیرد. کاربرد این باکتریها می تواند دارای تاثیرات قابل توجهی بر روی درصد بقا و شاخصهای رشد از طریق مکانیسم کلونیزه شدن در دستگاه گوارش، افزایش فعالیتهای آنزیماتیک این اندام و تقویت سیستم ایمنی با توجه به اترات آنتی باکتریال آنها بدنبال داشته باشد که نتایج بدست آمده در این بررسی، موید این مطلب است.

پیشنهادات

۱- با توجه به مطرح شدن پرورش گوشتی ماهیان خاویاری ضرورت توجه به استفاده از غذای دستی بیش از پیش حائز اهمیت می باشد. از این رو افزودن پروبیوتیکها به غذای این ماهیان بمنظور افزایش میزان رشد و تقویت سیستم ایمنی امری بدیهی می باشد.

۲- آنچه مسلم است ، باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک بعنوان یکی از مهمترین انواع پروبیوتیکها در پرورش آبزیان مورد توجه میباشد و تاثیرات مثبت ناشی از کاربرد انواع اختصاصی آن در گونه های دیگر آبزیان در دنیا باثبات رسیده است. لذا با توجه به جایگاه پرورش ماهیان خاویاری در ایران و جهان ضرورت بررسی فلور این باکتریها در دستگاه گوارش سایر گونه های تاسماهیان و حتی سایر گونه های رایج پرورشی در کشور در غالب طرحهای ملی ، امری ضروری است.

۳- توصیه می گردد تا مطالعات بیشتری بمنظور دستیابی به بهترین تکنیک جهت استفاده از پروبیوتیکهای اختصاصی در تاسماهیان و تعیین دوز مناسب در دوره های مختلف سنی و مدت زمان استفاده صورت پذیرد.

٤- در صورت بررسی باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک در دستگاه گوارش ماهیان بمنظور انتخاب پروبیوتیک، نمونه هایی مورد توجه واقع گردند که از توانایی بالایی بمنظور کلونیزه شدن در دستگاه گوارش ماهی برخوردار بوده و دارای تاثیرات مضر نباشند.

۵- با توجه به کاربردی بودن نتایج تحقیق حاضر، تولید این باکتری به عنوان پروبیو تیک اختصاصی فیل ماهی و تاسماهی ایرانی در طول دوره پرورش لاروی مورد توجه واقع گردیده و اقدام به تولید تجاری آن در سطح انبوه توسط واحدهای متفاوت صنعتی گردد.

٦- اثرات کاربرد پروبیوتیکها در روند تکامل اندامهای تولید مثلی با توجه به اهمیت تولید خاویار مصنوعی در شرایط پرورشی حائز اهمیت والایی است.

پیوست الف: انجام آزمایشهای میکروبی بر اساس کلید شناسایی Bergey´s

الف-۱- رنگ آمیزی گرم

رنگ آمیزی گرم مهمترین روش رنگ آمیزی در میکروبیو لوژی می باشد که اولین بار کریستین گرم ، دانشمند دانمارکی، در سال ۱۸۸٤ ابداع نمود و بر این اساس باکتری ها را به دو گروه گرم مثبت و گرم منفی تقسیم بندی گردید(Pelczar et al., 2002).

تمام باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک گرم مثبت می باشند (RingØ and Gatesoupe, 1998) لذا برای جدا سازی کلونیهای مورد نظر، اولین قدم پس از انجام کشت خالص، رنگ آمیزی باکتریهای مورد نظر به روش گرم می باشد. بدین منظور ابتدا با استفاده از آنس استریل در کنار شعله، اقدام به برداشتن مقدار اندک از کلونی موجود بر روی محیط کشت گردید. سپس یک قطره سرم فیزیو لوژی استریل را به روی یک عدد لام ریخته و کلونی را به قطره سرم روی لام انتقال داده و گسترشی به شکل بیضی یا دایره ایجاد شد. پس از تهیه گسترش آن را در مجاورت هوا قرار داده تا خشک گردد و اقدام به ثابت نمودن گسترش با استفاد از حرارت مستقیم نموده و گسترش را چند .ار از روی شعله عبور داده می گردد

این عمل منجر به کوا گولاسیون پروتئینهای باکتریایی شده و در نتیجه باکتری ها بر روی سطح لام شیشه ای می چسبند(Pollock et al., 2002) . مراحل رنگ آمیزی عبارتند از

:(Cappuccino and Sherman ,1998)

۱- ریختن چند قطره رنگ کریستال ویوله بر روی کسترش بمدت ۱ دقیقه

۲- شتشوی گسترش در زیر جریان ملایم آب

۳- ریختن چند قطره رنگ محلول لو گل بر روی کسترش بمدت ۱ دقیقه

٤- شتشوی گسترش در زیر جریان ملایم آب

۵- ریختن چند قطره محلول الکل ۹۵ درصد بر روی کسترش تا زمانیکه آخرین قطرات رنگ بنفش از گسترش خارج شود

٦- شتشوی گسترش در زیر جریان ملایم آب

۷- ریختن چند قطره رنگ فوشین یا سافرانین بر روی کسترش بمدت ۱ دقیقه

۸- شتشوی گسترش در زیر جریان ملایم آب

۹- خشک کردن گسترش با کاغذ خشک کن

۱۰- مشاهده میکروسکوپی گسترش با عدسی ۱۰۰ و روغن ایمرسیون

در این نوع رنگ آمیزی باکتریهای گرم مثبت به رنگ بنفش و باکتریهای گرم منفی به رنگ قرمز در می آیند

الف-۲- تست کاتالاز

این آزمون برای شناسایی میکرو ارگانیسم ها یی بکار می رود که قادرند با استفاده از آنزیم کاتالاز، پر اکسید هیدروژن را تجزیه نمایند. باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک دارای کاتالاز منفی بوده و از این رو پس از جدا سازی باکتریهای گرم مثبت اقدام به انجام تست کاتالاز گردید. جهت انجام آزمایش ابتدا بر روی لام ابتدا یک قطره محلول سرم فیزیو لوژی قرار داده و مقداری از کلنی خالص باکتری مورد نظر را به کمک یک آنس استریل در قطره حل گردید. سپس یک قطره محلول ۳ درصد پر اکسید هیدروژن را بر روی قطره مزبور افزوده چنانچه بلافاصله حباب های گاز اکسیژن مشاهده گردد کاتالاز مثبت و ر غیر این صورت منفی خواهد بود (Pollock et al., 2002).

الف-۳- تست اکسیداز

با استفاده از این آزمون با کتریهایی که فعالیت سیتوکروم اکسیدازی یا سیتوکروم C دارند را می توان شناسایی نمود. باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک دارای اکسیداز منفی بوده (RingØ and Gatesoupe, 1998) و از این رو پس از انجام تست کاتالاز اقدام به انجام تست اکسیداز گردید.

در آزمون اکسیداز از یک دهنده الکترون یعنی دی متیل- پارا- فنیلن- دی آمین و یا تترامتیل- پارافنیلن دی آمین استفاده می شود تا سیتو کروم C را احیاء نمایند. معرف اکسیداز نا پایدار بوده و در غیاب سیتو کروم C اکسیده می شود. بدین منظور یک قطره از معرف اکسیداز را را بر روی قطعه ای از کاغذ صافی ریخته و با استفاده از آنس استریل مقداری از کلونی باکتری را بر داشته و به آن انتقال می دهند و هر گونه تغییر رنگی به طرف تیره تر شدن را اکسیداز مثبت و بی رنگ ماندن را منفی گزارش می کنند. برای اجتناب از نتیجه مثبت کاذب بهتر است قرائت آزمون در کمتر از ٦٠ ثانیه صورت پذیرد (Cappuccino and Sherman ,1998).

الف-٤- آزمون احیاء نیترات

این آزمون برای نشان دادن توانایی باکتریها برای احیاء نیترات به نیتریت و یا برخی از ترکیبات ازت دار مانند ازت ملکولی استفاده می گردد. احیاء نیتراتها تنها بوسیله باکتریهای هوازی و بیهوازی اختیاری صورت می پذیرد و باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک از جمله باکتریهای بیهوازی اختیاری می باشند

(RingØ and Gatesoupe, 1998).با تلقیح باکتریها به محیط کشت مایع نیترات، می توان احیاء نیترات را مشاهده نمود. این محیط حاوی نوترینت براث به همراه نیترات پتاسیم به میزان ٠/١ درصد منبع ازت می باشد(Cappuccino and Sherman ,1998) .

الف-٥- محیط کشت اکسیداسیون – تخمیر (O-F)

این محیط برای افتراق باکتری ها بر اساس توانایی آنها جهت اکسید نمودن یا تخمیر مواد قندی معین بکار می رود. در این بررسی از گلوکز(D(+) -Glucose monohydrate) (آلمان، Riedel-dehaën) به عنوان ماده قندی استفاده و به محیط کشت **O-F** (آلمان، Merck) اضافه گردید . بر اساس دستورالعمل مربوطه محیط کشت تهیه گردیده و به میزان ٥ میلی لیتر به داخل لوله های آزمایش استریل انتقال و بمنظور استریل شدن در داخل اتو کلاو قرار داده میشود . سپس لوله ها سرد و برای انجام کشت عمقی با استفاده از آنس های استریل سر سوزنی آماده شد.

برای انجام این آزمایش ابتدا دو لوله آزمایش حاوی محیط کشت قندی O-F را با باکتری مورد نظر به صورت کشت عمقی تلقیح می نمایند. سپس روی یکی از لوله ها را با استفاده از پارافین مایع استریل می پوشانند تا شرایط رشد بیهوازی در این لوله فراهم آید و در لوله ای که روی آن با پارافین مایع پوشیده نشده است ، شرایط رشد هوازی فراهم می گردد. سپس برای مدت ۲٤ تا ٤٨ ساعت در در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در داخل انکو باتور نگهداری شدند. در این زمان بر اساس جدول ذیل یکی از نتایج زیر مشاهده می گردد (Pollock et al., 2002) :

جدول الف-۱- خلاصه نتایج حاصل از محیط O-F

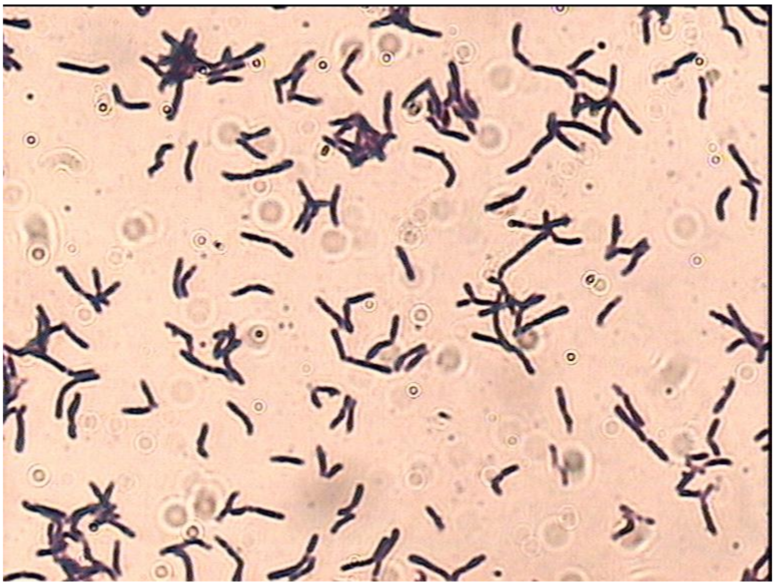
محیط بیهوازی	محیط هوازی	تفسیر
رنگ سبز	رنگ سبز	باکتریهایی که قند را متابولیزه نمی کنند و غیر ساکارولتیک هستند
رنگ سبز	رنگ زرد	هوازی مطلق
رنگ زرد	رنگ سبز	بیهوازی مطلق
رنگ زرد	رنگ زرد	بی هوازی اختیاری

الف-٦- تست حرکت

برای بررسی وضعیت حرکت در باکتریها از محیط کشت SIM یا سولفور-اندول- موتیلیتی استفاده می کنند. این محیط حاوی پپتون عصاره گوشت ، تیو سولفات سدیم، سولفات آهن و میزان مناسبی از آگار می باشد تا محیط به حالت نیمه جامد در بیاید. از این محیط برای بررسی تولید گاز H_2S و تولید اندول نیز استفاده می نمایند(Cappuccino and Sherman ,1998)بر اساس دستورالعمل مربوطه محیط کشت SIM (آلمان، Merck) تهیه گردیده و به میزان ٥ میلی لیتر به داخل لوله های آزمایش استریل انتقال و بمنظور استریل شدن در داخل اتو کلاو قرار داده میشود . سپس لوله ها سرد و برای انجام کشت عمقی بصورت عمودی با استفاده از آنس های استریل سر سوزنی آماده شد و پس از انجام کشت برای مدت ۲٤ تا ٤٨ ساعت در در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در داخل انکو باتور نگهداری شدند. در صورتی که کشت با

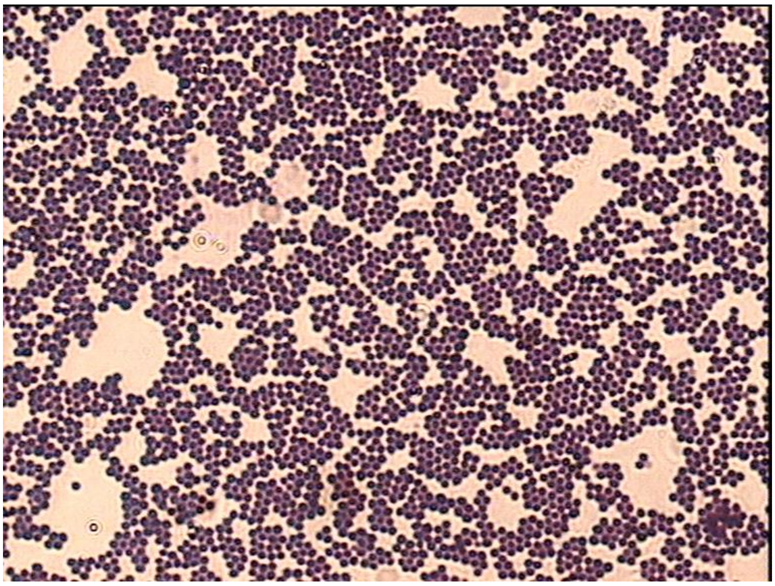
کتریها تنها در مسیر حرکت آنس مشاهده گردید نتیجه منفی و د ر زمانیکه کشت در اطراف مسیر حرکت آنس کاملا پخش شده بود نتیجه حرکت مثبت می باشد(Pollock et al., 2002) .

پیوست ب: اشکال باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک جداسازی شده با استفاده از رنگ آمیزی گرم



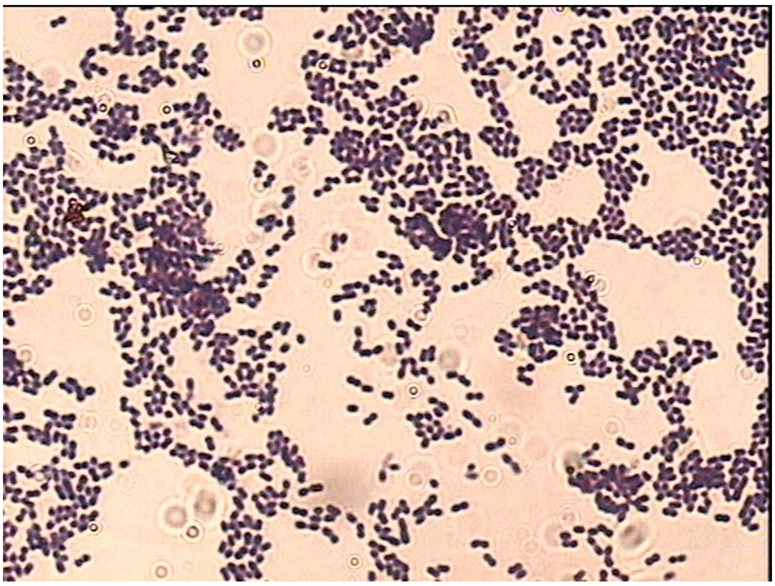
شکل ب-۱- نمایی از *Lactobacillus curvatus* با استفاده از رنگ آمیزی گرم،

کریستال ویوله، لوگول، الکل، فوشین، ۱۰۰X.



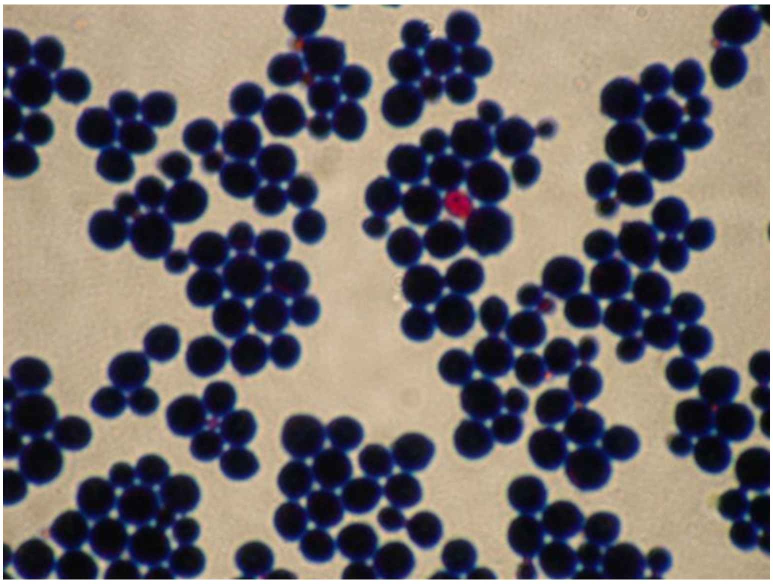
شکل ب-۲- نمایی از *Lactococcus lactis* با استفاده از رنگ آمیزی گرم،

کریستال ویوله، لوگول، الکل، فوشین، $100X$



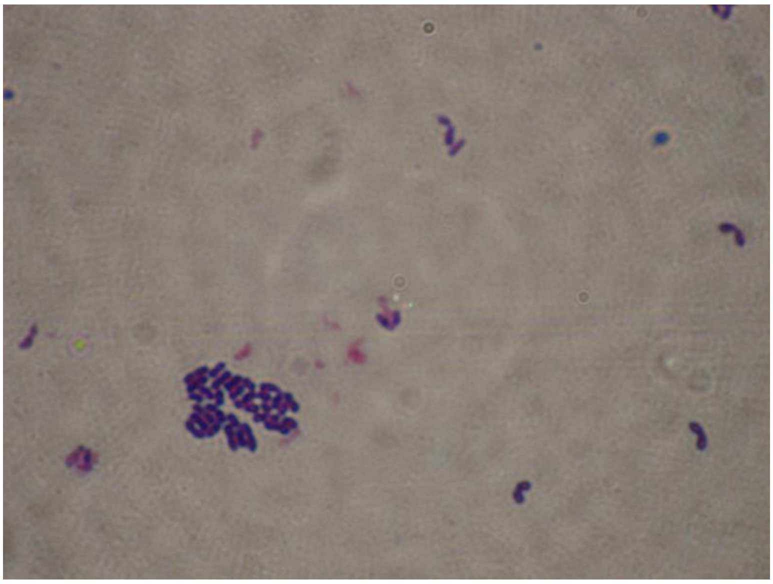
شکل ب-۳- نمایی از *Lactococcus raffinolacti* با استفاده از رنگ آمیزی گرم،

کریستال ویوله، لوگول، الکل، فوشین، $100X$.



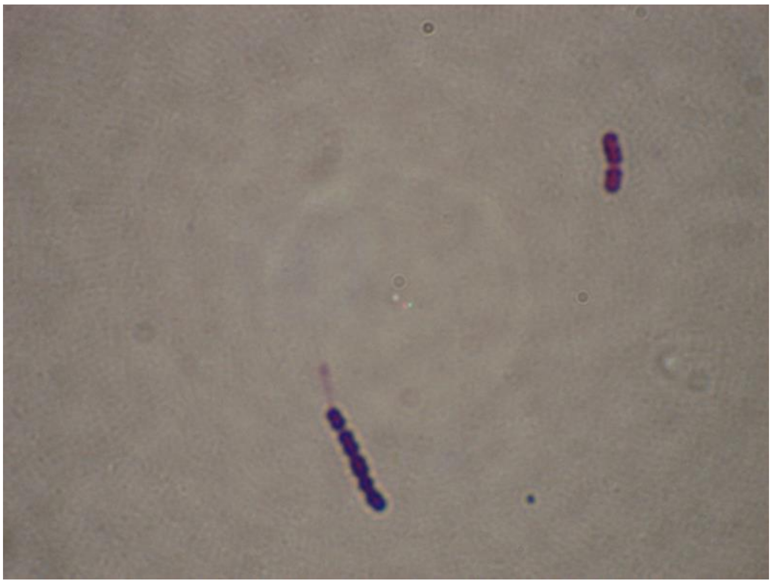
شکل ب-٤- نمایی از *Streptococcus sp.* با استفاده از رنگ آمیزی گرم،

کریستال ویوله، لوگول، الکل، فوشین، ***X***۱۰۰.



شکل ب-۵- نمایی از *Enterococcus seriolicida* با استفاده از رنگ آمیزی گرم،

کریستال ویوله، لوگول، الکل، فوشین، $100X$.



شکل ب-٦- نمایی از *Leuconostoc mesenteroides* با استفاده از رنگ آمیزی گرم،

کریستال ویوله، لوگول، الکل، فوشین، $100X$

فهرست منابع فارسی

اسپیر ، ل . ؛ پیک ایچ ، ا . ؛ بوآ ، س . و اسپیروایل ، و . ۲۰۰۰ . نابودی خاویار ، کاهش تاسماهیان دریای خزر و راهی جهت بازسازی آنها . ترجمه : کاظمی ، ر و یارمحمدی ، م . ۱۳۸۲ . انستیتو بین المللی ماهیان خاویاری ، رشت . ۲۰ ص .

اسداللهی ، م . ۱۳۷۲ . بررسیهای مرفوبیولوژیک ازون برون (*Acipenser stellatus*) آب های ساحلی ایران در جنوب دریای خزر . پایان نامه کارشناسی ارشد ، دانشکده منابع طبیعی ، دانشگاه تهران – کرج . به راهنمایی کیوان ، ا . ۱۸۱ ص

اسماعیلی ساری ، ع . ۱۳۸۰ . تهاجم شانه دار *Mnemiopsis leidyi*و آیندهٔ دریای خزر ، گزارش مستند طرح مطالعات مرحلهٔ مقدماتی . نقش مهر ، تهران . ١٤٤ ص .

برادران طهوری ، هـ . ۱۳۷۷ . لزوم تکثیر و تولید تاسماهیان در حوزه جنوبی دریای خزر . مجموعه مقالات هفتمین کنفرانس ملی شیلات ایران ، شرکت سهامی شیلات ایران ، تهران . ص۲۳۹-۲۲۱

بهبهانی، ر. ۱۳۸۳. مدلسازی تجربی سینتیک پایداری پروبیوتیک حاوی گونه میکروبی *Pediococcus acidilactici* . پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات. ۷۸ص.

بهمنی ، م . ۱۳۸۰ . خاویار ایران . انستیتوتحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری ، رشت . ۵۲ ص.

بهمنـی ، م . ۱۳۷۸ . بررسـی اکوفیزیولوژی استرس از طریق اثر بر محورHPG ، HPI ، سیستم ایمنـی و فـرایند تولیـد مثـل در تاسـماهی ایرانـی (*Acipenser persicus*) . رسـاله دکـتری (Ph.D)، دانشگاه آزاد اسلامی ، واحد علوم وتحقیقات . ۲۷٤ص .

بهمنـی ، م . ۱۳۷۷. بررسـی فیلوژنی وسیستماتیک تاسماهیان . مجله علمی شیلات ایـران، شـمارۀ۲، سـال هفتم .

بهمنـی ، م . ۱۳۷٦ . مطالعه مسـیر فیلوژنی و رده بندی در ماهیان خاویاری. انسـتیتوتحقیقات بـین المللـی ماهیان خاویاری ، رشت . ۲٦ ص .

بهمنـی ، م . ۱۳۷۵ . ارزیابی تولید ماهیان خاویاری در دریای خزر . ارائـه شـــده درکنفـرانس روز جهـانی غذا . ۳۰ ص .

پورعلی فشـمی ، ح . ؛ محسـنی ، م . ؛ علیـزاده ، م . ۱۳۸۱ . مقایسه رشد گونـۀ فیـل مـاهی در دو محـیط پرورشی آب لب شور و آب شیرین . دومین همایش ملی-منطقه ای ماهیـان خاویـاری، رشـت . ص ٤۵ -٤۳ .

پورکـاظمی ، م . ۱۳۷٦ . نگرشی بز وضعیت تاسماهیان دریای خزر و چگونگی حفظ ذخایر آن مجله علمی شیلات ایران ، شمارۀ ۳ ، سال ششم . ص ۲۲-۱۳ .

پهلوان یلی، م. ۱۳۸۰. مطالعه بافت شناسی مراحل تکاملی دستگاه گوارش تاسماهی ایرانی از مرحله شـروع تغذیه فعال تا زمان رهاسازی. دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران. ۱۱۵ ص.

تاکاشـیما ، الف . ، هیبایا ، تی . ۱۹۹۵ . اطلس بافت شناسی ماهی . ترجمه : ا . ، پوستی و ع . ، صدیق شریف ، (۱۳۷۸) انتشارات دانشگاه تهران ، ۳۲۸ .

تقوی، س. ۱۳۸٤. بررسی مقایسـه‌ای فاکتورهـای رشـد و بازمانـدگی بـر اثـر افـزودن پروبیوتیـک تپـاکس "Thepax" در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در مرحله رشد. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات. ۱۵۷ ص.

جرجانی، س. ۱۳۸۲. مطالعه بافت شناسی و ریخت شناسی تکوین دستگاه گـوارش فیـل مـاهی از مرحلـه تفریخ تا زمان رهاسازی به دریا. پایان نامـه کارشناسـی ارشـد، دانشـگاه کشـاورزی و منـابع طبیعـی گرگان. ۸۲ ص.

حسـینی ، م . ۱۳۷۷ . پایانی برصـید غیر مسئـولانه ماهیـان خاویاری . مجمـوعه مقالات هفتمین کنفـرانس ملی شیلات ایران . شرکت سهامی شیلات ایران ، تهران . ص ۲۲۱–۲۳۹ .

خسروی خراشاد، ا. ؛ صادقیان، ع. ؛خواجه کرم الـدینی، م.، میلانـی، م.؛ تـوکلی، ت. ۱۳۸۵. بررسـی تـاثیر لاکتوباسیل های جداشده از مواد غذایی بر هلیکوباکترپیلوری . مجله علمی دانشـگاه علـوم پزشـکی بیرجند، جلد ۱، شماره ۱۳. ص ۲٤–۱۹.

رحیمی، ش. ؛ خاک سفیدی، ا.؛ موسوی، ط. ۱۳۸۲. مقایسه اثر پروبیوتیک و آنتـی بیوتیـک بـر عملکـرد و سیستم ایمنی جوجه‌های گوشتی. مجله دامپزشکی دانشگاه تهران، جلد ۲، شمار ۵۸. ص ۱٦۲–۱۵۹.

رشیدی قادر، ف. ۱۳۷۲. پروبیوتیک ، جایگزینی برای آنتی‌بیوتیـک. مجلـه پـژوهش و سـازندگی. جلـد ۵، شماره ۱۹. ص ٦۷–٦۱.

سلیمانی توانی، م. ۱۳۸۵. مقایسه اثر پروبیوتیک‌های تجاری موجود در ایران بر عملکرد و مرفولـوژی روده کوچک جوجه‌های گوشتی. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس. ۱۰۸ ص.

شهسواری، ک. ۱۳۸۵. بررسی اثرات استفاده از پروبیوتیک بر عملکرد و خصوصیات کیفی تخم‌مرغ مرغهای مادر گوشتی. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس. ۸۹ ص.

صفری، ر.؛ خوشباور رستمی، ح. ؛ سـلمانی، ع.؛ غروقـی، ا. ؛ نصـراله زاده، ح.؛ نیرانـی، م.؛ اسـماعیلی، ف. ۱۳۸۳. گزارش نهایی طرح تحقیقاتی تولید پروبیوتیک باکتریایی بـه منظـور بهینـه‌سـازی اسـتخرهای پرورش ماهیان گرمابی با تاکید بر کاهش آمونیاک، نیترات و SH_2. موسسه تحقیقات شیلات ایـران، پژوهشکده اکولوژی دریای خزر . ۹۸ ص.

ضیایی نژاد، س. ۱۳۸۲. تکثیر باکتریهای باسیلوس به عنوان پروبیوتیـک بـر رشـد، بازمانـدگی و تغییـرات آنزیمهای گوارشی مراحل لاروی میگوی سفید هندی ***Penaeus indicus***. پایـان نامـه کارشناسـی ارشد، دانشگاه تهران، دانشکده منابع صبیعی.۱۸۸ ص.

طاهری، پ. ۱۳۸۵. بررسی امکان تولید و نگهداری نوشـیدنی تخمیـری پروبیوتیـک بـا اسـتفاده از کشـت باکتریایی گرمادوست و میاندوست. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه آزاد اسلامی، واحـد علـوم و تحقیقات. ۱۸۰ ص.

عبدالهی، ح.؛ رضازاده زرندی، ا. ۱۳۸۵. بررسی اثرات بازدارندگی لاکتوباسیلوس بر علیه هلیکوباکتر پیلوری در شرایط گرادیان گلوکز و اکسیژن در سیستم ژلی تثبیت شده. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، جلد۵ ، شماره ۱۹. ص ۱۰۲-۹۷.

عسکریان، ف. و کوشا، آ. ۱۳۸۵. مجموعه فیزیولوژی آبزیان، جلد اول: استرس. انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی- واحد سواد کوه. ٤۳۵ ص.

عقیلی نژاد ، ع . ۱۳۷۳ . بررسی های مورفوبیولوژیک فیل ماهی (*Huso huso*) آبهای ساحلی ایران در جنوب دریای خزر . پایان نامه کارشناسی ارشد ، دانشکده منابع طبیعی ، دانشگاه تهران – کرج . به راهنمایی کیوان ، ا . ۱۸۱ ص .

فاضلی، ز. ۱۳۸٤. غنی‌سازی گونه آرتمیا ارومینا با پروبیوتیک مخمری (تپاکس) و بررسی پایداری آرتمیا غنی‌سازی شده در دوره‌های مختلف غنی‌سازی وانکوباسیون سرد. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات. ۱۸۳ ص.

فاضلی نسب، م. ۱۳۸۵. اثر توام آنزیم، پروبیوتیک و آنتی‌بیوتیک بر عملکرد و قابلیت هضم مواد مغذی جوجه‌های گوشتی. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس. ۱۱٤ ص.

قیامی پور، ش. ۱۳۸۵. بررسی خصوصیات پروبیوتیکی سه جدایه باکتری‌های اسیدلاکتیک در شرایط *invivo , invitro* . پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس. ۱۱۳ ص.

کریمی، ک. ۱۳۸۱. تاثیر پروبیوتیک بر ساختمان روده جوجه‌های گوشتی. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس. ۱۱۱ص.

کریمی ترشیزی، م. ۱۳۸٤. جداسازی، شناسایی و انتخاب باکتری‌های اسید لاکتیک مناسب برای تولید پروبیوتیک در تغذیه جوجه‌های گوشتی. پایان نامه دوره دکتری تخصصی، دانشگاه تربیت مدرس. ۲۱۷ ص.

کیوان ، ا . ۱۳۸۲ . ماهیان خاویاری ایران . نقش مهر ، تهران . ٤۰۰ ص .

محسنی ، م . ۱۳۷۷ . بررسی تأثیر عوامل زیست محیطی نظیر افزایش تراکم کشت تخم و لارو فیل ماهیان حاصل از تکثیر مصنوعی در بروز روند ناهنجاریهای مرفولوژی . پایان نامه کارشناسی ارشد ، دانشکده منابع طبیعی ، دانشگاه تهران – کرج . به راهنمایی پورکاظمی، م . ۱۰۳ ص .

محسنی ، م . ، پورعلی فشتمی ، ح . ، کاظمی ، ر . ، علیزاده ، م . و ارشد ، ع . ۱۳۷۹ . تأثیر دوره نوری بـر رشد فیـل ماهی (*Huso huso*) پرورشـی . انستیتو تحقیقات بـین المللـی ماهیـان خاویـاری دکتـر دادمان ، رشت . ۱۵۰ ص .

محسنی ، م . ؛ پورکاظمی ، م . ؛ بهمنی ، م . ؛ پورعلی فشتمی ، ح . ؛ ارشد ، ع . ۱۳۸۱ . ارزیـابی پـرورش گـوشتی فیل ماهی در حوضـچه های فایبرگـلاس . دومین همـایش ملی-منطقه ای ماهیان خاویاری ، رشت . ص ۳۹ -۳۷ .

محمدی نافچی، ع.؛ محمدی زمانی، ق. ۱۳۸۲. گزارش نهایی طرح تحقیقاتی بررسی امکان تولیـد خـوراک میکروبی (پروبیوتیک) جهت تغذیه میگوی ایرانی. وزارت جهاد کشاورزی- پژوهشـکده مهندسـی. ۹٦ ص.

محمدی آذری، ح. ۱۳۸٤. تاثیر پروبیوتیک پروتکسین بر رشد و زنده‌مانی مرحلـه لاروی قـزل‌آلای رنگـین کمان. پایان نامه کارشناسی ارشد ، دانشگاه تربیت مدرس. ۱۱۰ص.

مقیـم ، م . ۱۳۷۱ . پـروژه ارزیـابـی ذخـایر ماهیان خاویاری سال ۱۳۷۰ . مرکز تحقیقـات شـیلات اسـتان مازندران . ۱۲۲ ص .

میرزایی، ح. ۱۳۸۲. مطالعه امکان تولید یکی از فرآورده‌های پروبیوتیکی شیر در ایران بـا اسـتفاده از کشـت کمکی لاکتوباسیلوس کازئی. پایـان نامـه کارشناسـی ارشـد، دانشـگاه آزاد اسـلامی، واحـد علـوم و تحقیقات. ۱۰۹ ص.

میر واقفی، ع.؛آذری تاکامی، ق.؛ حبیبی رضایی، م.؛ ضیایی نژاد، س. ؛ شـکوری، م. ۱۳۸۳. تـاثیر باکتریهـای *Bacillus subtilis* و *B.licheniformis* به عنـوان پروبیوتیـک بـر رشـد و بازمانـدگی مراحـل لاروی و پست لاروی میگوی سفید هندی *Penaeus indicus*. دانشگاه تهران، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی. ۲۳ص.

وثوقی ، غ . و مستجیر ، ب . ۱۳۷٦ . ماهیان آب شیرین . دانشگاه تهران ، تهران . ۳۱۷ص .

References

Abbas, A.K.; Lichtman, A.H. and Pober, J.S. 2000.Cellular and Molecular immunology.W.B.Sounders,U.S.A.545p.

Al-Harbi, A.H., Uddin, M.N., 2004. Seasonal variation in the intestinal bacteria flora of hybrid tilapia (*Oreochroomis niloticus*×*Oreochromis aureus*) cultured in earthen ponds in Saudi Arabia. Aquaculture 229, 37–44.

Asfie, M., Yoshijima, T., Sugita, H., 2003. Characterization of the goldfish fecal microflora by the fluorescent in situ hybridization method. Fish. Sci. 69, 21– 26.

Ash, R., 1980. Hydrolytic capacity of the trout *Salmo gairdneri* intestinal mucosa with respect to three specific dipeptides. Comp. Biochem. Physiol. B 65, 173–176.

Austin, B., Al-Zahrani, A.M., 1988. The effect of antimicrobial compounds on the gastrointestinal microflora of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. J. Fish Biol. 33, 1–14.

Bagheri, T., Alizadeh, M., Yavari, V., Farzanfar, A., Hedayati, A. 2007. proceeding of international training course and workshop on fish nutrition and diseases. Islamic Azad university, Ghaemshahr branch. P: 30.

Bahmani, M. 1998. Phylogenic and systematic study on sturgeons. First international student research conference, the association of the state Universities of the Caspian littoral countries. Astrakhan, Russia.

Bairagi, A., Ghosh, K. S., Kumar Sen, S.,Kumar Ray, A. 2002. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. Aquaculture International 10, 109–121

Barton, B.A., H. Bolling, B.L. Hauskins. C.R. Jansen. 2000. Juvenile Pallid (*Scaphirhychus albus*) and hybrid Pallid× shovelnose (*S. albus* × *platorynchus*) sturgeons exhibit low physiological responses to acute handling and severe confinment. Comparative Biochemistry and Physiology 126(A) :125-134.

Bergh, Ø., Naas, K.E., Harboe, T., 1994. Shift in the intestinal microflora of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* larvae during first feeding. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 51, 1899–1903.

Bernstein , R.M. ; Schlutr , S.F. and Marchalonis , J.J. 1998 . Immunity. In : Evans , D.H. (Ed.) , the physiology of fishes , CRC Press , Boca Raton , FL. pp : 217-242.

Bier, M., 1955. Lipases. Methods in Enzymology I. Academic Press, New York, pp. 627–642.

Birkbeck, T.H., Ringø, E. 2005. Pathogenesis and the gastrointestinal tract of growing fish. In: Holzapfel, W., Naughton, P. (Eds.): Microbial Ecology in Growing Animals. Elsevier, Edinburgh, UK, pp. 208-234.

Bristein ,V.J. 1993. Sturgeon and paddlefishes : threatened fishes in need of conservation . conservation Biology7(4) . pp : 773-787 .

Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. Anal. Biochem. 72, 248.

Bruno, M.E.C., Montville, T.J. 1993. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria.Appl. Environ. Microbiol. 59, 3003–3010.

Burr G., Gatlin D., Ricke S. 2005. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of prebiotics and probiotics in finfish aquaculture. J. World Aquac. Soc. 36, 425-436.

Byun, J.W., Park, S.C., Benno, Y., Oh, T.K., 1997. Probiotics effect of *Lactobacillus* sp. DS-12 in flounder (*Paralichthys olivaceus*). J. Gen. Appl. Microbiol. 43, 305–308.

Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L. 1994. Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes. Comp. Biochem. Physiol. A 109, 213–222.

Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L. 1995. Effect of molecular form of dietary nitrogen supply in sea bass larvae: response of pancreatic enzymes and intestinal peptidases. Fish Physiol. Biochem. 14, 209–214.

Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L. 1997. Is the digestive capacity of marine fish larvae sufficient for compound diet feeding?. Aquacult. Int. 5, 151–161.

Cai, Y., Benno, Y., Nakase, T., Oh, T.K. 1998. Specific probiotic characterization of Weissella hellenica DS-12 isolated from flounder intestine. J. Gen. Appl. Microbiol. 44, 311 –316.

Cai, Y.M., Suyanandana, P., Saman, P., Benno, Y. 1999. Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns. J. Gen. Appl. Microbiol. 45, 177-184.

Carey, J.B. and McCormick, S.D.1998. Atlantic salmon smolts are more responsive to an acute handling and confinement stress than parr . Aquaculture 168 . pp : 237-253 .

Cappuccio, J. G. and Sherman, N. 1998. Microbilogy : A laboratory manual. Welsay Longman, INC. New York. 477 p.

Chebanov , M. and Billard ,R. 2001.The culture of sturgeons in Russia : production of juveniles for stocking and meat for human consumption . Aquat Living Resour . 14 . pp : 375-38.

Conway, P.L. 1996. Development of intestinal microbiota. In: Mackie, R.I., White, B.A., Isaacson, R.E. (Eds.), Gastrointestinal Microbiology, Vol. 2, Gastrointestinal Microbes and Host Interactions. Chapman & Hall Microbiology Series, Chapman & Hall, New York, pp. 3–38.

Demers, N.E. and Bayne , Ch.J. 1997. The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in Rainbow trout. Development and comparative immunology 21(4) . pp : 363-373.

Donaldson , E. M. 1981 . The pituitary-Interrenal axis as an indicator of stress in fish . In : Pickering , A. D. (Ed.) , stress and fish . Academic press , London . pp : 11-47 .

Ducluzeau, R. 1988. Role of experimental microbial ecology in gastro enterology. In: Bergogne-Berezin, E. (Ed.) , Microbial Ecology and Intestinal Infections. Springer, Paris, pp. 7–26.

Durand, M. 1982. Orientation du metabolisme du rumen au moyen des additifs. Ann. Zootechnol. 31, 47–76.

Ellis, A.E. 1981. Stress and modulation of defence mechanisms in fish . In : Pickering , A.D. (Ed.) , stress and fish . Academic press , London . pp : 147-169.

Fast , M.D. ; Sims , D.E. ; Burka , G.F. ; Mustafa , A. and Ross , N.W. 2002. Skin morphology and humoral non-specific defence parameters of mucus and plasma in rainbow trout , coho and Atlantic salmon . Comp .

Biochem . Physiol . 132(A) . pp : 645-657 .

Faulkner,I.N.and Moberg,G.P. 1997 . Effects of short term management stress on the ability of $GnRH_a$ to induce gonadotropin secretion in male white sturgeon , *Acipenser transmomtanus* . Aquaculture 159 . pp : 159-168 .

Fevolden,S. ; Roed,K.H. and Fjalested , K.T. 2002. Selection respose of cortisol and lysozyme in rainbow trout and correlation to growth . Aquaculture 205 . pp : 61-75 .

Finegold, S.M., Sutter, V.L., Mathisen, G.E. 1983. Normal indigenous intestinal flora. In: Hentgens, D.J. (Ed.) , Human Intestinal Microflora in Health and Disease. Academic Press, New York, pp. 3–31.

Fonty, G., Raibaud, P., Gouet, Ph., 1993. Manipulation of the gut microflora: experimental approach in animals. Proc. Nutr. Soc. 52, 345–356.

Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals, a review. J. Appl. Bacteriol. 66, 365–378.

Fuller, R. 1992. History and development of probiotics. In: Fuller, R. Ed. , Probiotics: the Scientific Basis. Chapman & Hall, New York, pp. 1–8.

Furne´, M. ; Hidalgo, M.C.; Lo´pez , A. ; Garcı´a-Gallego , M. ; Morales , A.E.; Domezain , A.; Domezaine´, J. ; Sanz , A. 2005. Digestive enzyme activities in Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. Aquaculture 250 , 391-398 .

Gatesoupe, F.J. 1994. Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, against pathogenic vibrio. Aquatic Living Resour. 7, 277–282.

Gatesoupe, F.J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture 180, 147-165.

Ghittino, C., Prearo, M., Bozzetta, E., Eldar, A. 1995. Pathogenetical characterization of the causative agent of fish streptococcosis in Italy and vaccination trials in rainbow trout. Boll. Soc. Ital. Patol. Ittica 7, 2–12.

Gildberg, A., Johansen, A., Bøgwald, J., 1995. Growth and survival of Atlantic salmon_*Salmo salar*.fry given diets supplemented with fish protein hydrolysate and lactic acid bacteria during a challenge trial with *Aeromonas salmonicida*. Aquaculture 138, 23–34.

Gildberg, A., Mikkelsen, H., Sandaker, E., Ringø, E. 1997. Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod *Gadus morhua* . Hydrobiologia 352, 279–285.

Goldin, B.R. 1986. In situ bacterial metabolism and colon mutagenes. Annu. Rev. Microbiol. 40, 367–393.

Goldin, B.R. Gorbach, S.L. 1992. Probiotics for humans. In: Fuller, R. Ed. , Probiotics. The Scientific Basis. Chapman & Hall, London, UK, pp. 355–376.

Gomez-Gil, B. 1998. Evaluation of potential probionts for use in penaeid shrimp larval culture. PhD Thesis, the University of Stirling, 269 pp.

Gomez-Gil, B., Roque, A., Turnbull, J. F. 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. Aquaculture 191 , 259–270.

Gomez-Gil, B., Roque, A., Velasco-Blanco,G. 2002. Culture of Vibrio alginolyticus C7b, a potential probiotic bacterium, with the microalga Chaetoceros muelleri. Aquaculture 211 , 43–48.

Gonzalez, C.L., Enicinas, J.P., Garcia Lopez, M.L., Otero, A. 2000. Characterization and identification of lactic acid bacteria from freshwater fishes. Food Microbiol. 17, 383-391.

Gorbach, S.L. 1990. Lactic acid bacteria and human health. Ann. Med. 22, 7–41.

Gram, L., Melchiorsen, J., Spanggaard, B., Huber, I., Nielsen, T.F., 1999. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH 2, a possible probiotic treatment of fish. Appl. Environ. Microbiol. 65, 969 – 973.

Gram, L., Ringø, E., 2005. Prospects of fish probiotics. In: Holzapfel, W., Naughton, P. (Eds.): Microbial Ecology in Growing Animals. Elsevier, Edinburgh, UK, pp. 379-417.

Grisez, L., Ollevier, F., 1995. *Vibrio Listonella anguillarum* infections in marine fish larviculture. In: Lavens, P., Jaspers, E., Roelands, I. Eds. , Larvi '91 — fish and crustacean larviculture symposium. European Aquaculture Society, Gent, p. 497, Special publication no. 24.

Gulliana,M., Thompsonb,F., Rodriguez,J. 2004. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. Aquaculture 233, 1 –14.

Gournier-Chateau, N. 1994. La microflore intestinale et son roˆle. In: Gournier-Chateau, N., Larpent, J.P., Castellanos, I., Larpent, J.L._Eds.., Les Probiotiques en Alimentation Animale et Humaine. Technique et Documentation Lavoisier, Paris, pp. 9–38.

Hagi, T., Tanaka, D., Iwamura, Y., Hoshino, T. 2004. Diversity and seasonal changes in lactic acid bacteria in the intestinal tract of cultured freshwater fish. Aquaculture 234, 335–346.

Hansen, G.H., Strøm, E., Olafsen, J.A., 1992. Effect of different holding regimes on the intestinal microflora of herring *Clupea harengus* larvae. Appl. Environ. Microbiol. 58, 461–470.

Hille , S . 1982. A literature review of the blood chemistry of rainbow trout

Salmo gairdneri Richardson . J . Fish Boil . 20 , 535-569

Holben, W.E., Williams, P., Saarinen, M., Sarkilahti, L.K., Apajalahti, J.H.A., 2002. Phylogenetic analysis of intestinal microflora indicates a novel Mycoplasma phylotype in farmed and wild salmon. Microb. Ecol. 44 (2), 175– 185.

Holt J.G.; Krieg N.R.; Sneath, P.H.A.; Staley, J.T.; Williams, S.T. 1999. Bergey′s Manual of determinative bacteriology.Williams and Wilkins, Maryland, USA. 787 p.

Hooper, L.V., Wong, M.H., Thelin, A., Hansson, L., Falk, P.G., Gordon, J.I., 2001. Molecular analysis of commensal host-microbial relationship in the intestine. Science 291, 881–884.

Hung , S.S.O. ; Groff , J.M. ; Lutes , P.B. and Kofifiyn-Aikins , F. 1990. Hepatic and intestinal histology of juvenile white sturgeon fed defferent carbohydrate . Aquacalture 87 . pp : 349-360

Irianto, A., Austin, B., 2002a. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J. Fish Dis. 25, 333– 342.

Irianto, A., Austin, B., 2002b. Probiotics in aquaculture. J. Fish Dis. 25, 633 – 642.

Jafarian , H., Makhtomi, N. 2007. The influence of probiotic bacillus on the feeding efficiency and nutrient composition of body in beluga larva. Proceeding of international workshop on advanced techniques in sturgeon fish larviculture. Artemia & aquatic animals research institute. 12 - 14 March 2007. P: 83.

Jafarian , H., Nazeri, M. R. 2007. The changes of growth factors in beluga larva which was fed by bioencapulated Artemia with probiotics Proceeding of international workshop on advanced techniques in sturgeon fish larviculture. Artemia & aquatic animals research institute. 12- 14 March 2007. P: 84.

Jonsson, E., Conway, P. 1992. Probiotics for pigs. In: Fuller, R. (Ed.) Probiotics. The Scientific Basis. Chapman & Hall, London, pp. 259–316.

Joshi, K.R. and Osama, N.O2002.Immunology.Agrobios, India. 158 p.

Keddie, R.M. 1959. The properties and classification of lactobacilli isolated from grass and silage. J. Appl. Bacteriol. 22, 403–416.

Kim, D. H., Austin, B. 2006. Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. Fish & shellfish immunology 21, 513-534.

Kissil , G. Wm. ; Lupatsch , I. ; Elizur , A. and Zohar ,Y. 2001 . Long photoperiod delayed spawing and increased somatic growth in gilthead seabream (*Sparus aurata*) Aquacalture 200 . pp: 363-379.

Klaasen, H.L.B.M., Koopman, J.P., Beynen, A.C., 1990. Effects of age, strain and social hierarchy on colonization of autochthonous, segmented, filamentous bacteria in the ileum of mice. In: Heidt, P.J., Vossen, J.M., Rusch, V.C._Eds.., Microecology and Theraphy. Inst. fu¨r Microbiologie, Herborn, pp. 17–20.

Kozasa, M., 1986. Toyocerin *Bacillus toyoi* as growth promotor for animal feeding. Microbiol. Aliment. Nutr. 4, 121–135.

Kusuda, K., Kawai, K., Salati, F., Banner, C.R., Freyer, J.L. 1991. *Enterococcus serioli* sp. nov., a fish pathogen. Int. J. Syst. Bacteriol. 41, 406–409.

Kuz′mina , V.V. 1996 Influence of digestive enzyme activity in some freshwater teleosts . Aquacalture 148 , 25-37 .

Lan , W.G. , Wong , M.K. , Chen , N. , and Sin , Y.M. 1995. Effect of combined copper , zinc , chromium and selenium by orthogonal array design on alkaline phosphatase activity in liver of the red sea bream , *Chrysophrys major* . Aquaculture 131 , 219-230 .

Lemieux , H . , Blier , P. , Dutil , J.D. 1999.Do digestive enzymes set a physiological limit on growth rate and food conversion efficiency in Attlantic cod *(Gadus morhua) ?* . Fish physiol . Biochem . 20 , 293-303 .

Lèsel, R. 1990. Thermal effect on bacterial flora in the gut of rainbow trout and African catfish. In: Lèsel, R.(Ed.) , Microbiology in Poecilotherms. Elsevier, Amsterdam, pp. 33–38.

Li, P., Gatlin, D.M. 2004. Dietary brewers yeast and the prebiotic GrobiotickAE influence growth performance, immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops_M. saxatilis*) to Streptococcus iniae infection. Aquaculture 231, 445–456.

Lidbeck, A., Nord, C.E. 1993. Lactobacilli and the normal human anaerobic microflora. Clin. Infect. Dis. 16, S181–S187.

McCormick, S.D. ; Shrimpton, J.M. ; Carey, J.B. ; O'Dea, M.F.; Sloan , K.E. ; Moriyama, S. and Bjornsson , B. Th. 1998. Repeated acute stress reduces growth rate of Atlantic salmon parr and alters plasma levels of growth hormone , insulin – like growth factor I and cortisol. Aquaculture 168 . pp : 221-225.

Maczulak, A.E., Dehority, B.A., Palmquist, D.L. 1981. Effects of long-chain fatty acids on growth of rumen bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 42, 856 – 862.

Mauguin, S., Novel, G. 1994. Characterization of lactic acid bacteria isolated from seafood. J. Appl. Bacteriol. 76, 616–625.

Meunpol, O., Lopinyosiri,K., Menasveta,P. 2003. The effects of ozone and probiotics on the survival of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Aquaculture 220 , 437–448.

Moriarty, D.J.W. 1997. The role of microorganisms in aquaculture ponds. Aquaculture 151, 333–349.

Munro, P.D., Birkbeck, T.H., Barbour, A. 1993. Influence of rate of bacterial colonisation of the gut of turbot larvae on larval survival. In: Reinertsen, H., Dahle, L.A., Jørgensen, L., Tvinnereim, K. Eds. , Fish Farming Technology. A.A. Balkema, Rotterdam, pp. 85–92.

Munro, P.D., Barbour, A., Birkbeck, T.H. 1994. Comparison of the gut bacterial flora of start-feeding larval turbot reared under different conditions. J. Appl. Bacteriol. 77, 560–566.

Muroga, K., Higashi, M., Keitoku, H. 1987. The isolation of intestinal microflora of farmed red seabream *Pagrus major* and black seabream *Acanthopagrus schlegeli* at larval and juvenile stages. Aquaculture 65, 79– 88.

Nikoskelainen, S., Ouwehand, A., Salminen, S., Bylund, G. 2001. Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. Aquaculture 198, 229– 236.

Nikoskelainen, S., Ouwehand, A., Bylund, G., Salminen, S., Lilius, E. M. 2003. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus)*. Fish and shellfish immunology 15, 443– 452.

Nieman, C.C. 1954. Influence of trace amounts of fatty acids on the growth of microorganisms. Bacteriol. Rev. 18, 147–163.

Nolan , D. T. ; Op′t Veld , R.L.J. M. ; Balm , P. H. M. and Wendelaar Bonga,S.E. 1999. Ambient salinity modulates the response of the tilapia, *Oreochromis mossambicus* , to net confinement. Aquaculture 177. pp : 297-309.

Ojolick, E.J. ; Cusack, R. ; Benfey, T.J. and Kerr , S.R. 1995 . Survival and growth of all – female diploid and triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared at chronic high temperature Aquaculthre131. pp: 177-187.

Olsen, M.A., Aagnes, T.H., Mathiesen, S.D. 1994. Digestion of herring by indigenous bacteria in the minke whale forestomach. Appl. Environ. Microbiol. 60, 4445–4455.

Panigrahi, A.,Kiron,V.,Kobayashi, T., Puangkaew, J., Satoh, S., Sugita, H. 2004. Immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. Vet. Immunol. Immunopathol. 102, 379–388.

Parker, R.B. 1974. Probiotics, the other half of the antimicrobial story. Anim. Nutr. Health 29, 4–8.

Picchietti, S., Mazzini , M., Taddei , A. T., Renna , R., Fausto , A. M. , Mulero , V., Carnevali , O., Cresci , A., Abelli , L. 2007. Effects of administration of probiotic strains on GALT of larval gilthead seabream: Immunohistochemical and ultrastructural studies. Fish & Shellfish Immunology 22 . 57- 67.

Pirarat, N., Kobayashi, T., Katagiri, T., Maita, M., Endo, M. 2006. Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against experimental *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*) . Veterinary Immunology and Immunopathology 113 , 339–347.

Pollock, M.R.C. 1949. The effects of long-chain fatty acids on the growth *Haemophilus pertussis* and other organisms. Symp. Soc. Exp. Biol. 3, 193–216.

Pollock, R. A.; Findlay, L.; Mondschein, W.; Modesto, R. R. 2002. Laboratory exercises in Microbiology. John wiley & sons, INC. 232 p.

Pottinger,T.G. and Carrick,T.R.1999.A comparison of plasma glucose and plasma cortisol as selection markers for high and low stress-responsiveness in female rainbow trout. Aquacalture 175. pp : 351 -363 .

Pottinger , T. G. and Carrick , T. R. 2001 . ACTH does not mediate divergent stress responsiveness in rainbow trout . Comparative biochemistry and physiology 129A . pp : 399-404 .

Prins, R.A., Van Nevel, C.S., Demeyer, D.I. 1972. Pure culture studies of inhibitors for methanogenic bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol. 38, 281–287.

Ribeiro, L., Zambonino Infante, J.L., Cahu, C., Dinis, M.T. 1999. Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858. Aquaculture 179, 465–473.

Ringø, E. 1993. Does chromic oxide (Cr_2O_3) affect fecal lipid and intestinal bacterial flora in Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.)? Aquacult. Fish. Manage 24, 767-776.

Ringø, E. 1994. The effect of chromic oxide (Cr_2O_3) on faecal lipid and intestinal microflora of sea water reared Arctic charr, *Salvelinus alpinus* L., Aquacult. Fish. Manage. 25, 341–344.

Ringø, E., Strøm, E. 1994. Microflora of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* L. : gastrointestinal microflora of free-living fish and effect of diet and salinity on intestinal microflora. Aquacult. Fish. Manage. 25, 623–629.

Ringø, E., Strøm, E., Tabachek, J.A., 1995. Intestinal microflora of salmonids: a review. Aquacult. Res. 26, 773–789.

Ringø, E., Olsen, R.E., Øverli, Ø., Løvik, F. 1997. Effect of dominance hierarchy formation on aerobic microbiota associated with the epithelial mucosa of subordinate and dominant individuals of Arctic charr, *Salvelinus alpinus*. Aquacult. Res. 28, 901–904.

Ringø, E., Bendiksen, H.R., Gausen, S.J., Sundsfjord, A., Olsen, R.E. 1998. The effect of dietary fatty acids on lactic acid bacteria associated with the epithelial mucosa and from faecalia of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.). J. Appl. Microbiol. 85, 855-864.

Ringø, E., Gatesoupe, F-J. 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. Aquaculture 160, 177–203.

Ringø, E. 2004. Lactic acid bacteria in fish and fish farming. In: Salminen, S., Ouwehand, A. and von Wright. A. (Eds.): Lactic Acid Bacteria. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 581-610.

Ringø, E., Bendiksen, H.R., Wesmajervi, M.S., Olsen, R.E., Jansen, P.A., Mikkelsen, H. 2000. Lactic acid bacteria associated with the digestive tract of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). J. Appl. Microbiol. 89, 317-322.

Roberts , R.J. 2001. Fish pathology . Sounders , London . 472 p .

Robertson, P.A.W., Dowd, C.O'., Burrells, C., Williams, P., Austin, B. 2000. Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss,* Walbaum). Aquaculture 185, 235–243.

Rollo, A.; Sulpizino, R.; Nardi, M.; Silvi, S.; Orpianesi, C.; Caggiano, M.; Cresci, A.; Carnevali, O. 2006. Live microbial feed supplement in aquaculture for improvement of stress tolerance. Fish Physiol Biochem 32, 167–177.

Rombout, J.H.W.M., Stroband, H.W.J., Taverne-Thiele, J.J. 1984. Proliferation and differentiation of intestinal epithelial cells during development of *Barbus conchonius* Teleostei, Cyprinidae . Cell Tissue Res. 236, 207–216.

Rotlant,J. ; Pavlidis,M. ; Kentouri,M. ; Abad , M.E. and Tort , L. 1997. Non – Specific immune responses in the red porgy *Pagrus pagrus* after crowding stress. Aquacalture 156. pp : 279-290.

Robyt, J.F., Whelan, W.J., 1968. The h-amylases. In: Radley, J.A. (Ed.), Starch and Its Derivates. Academic Press, London, pp. 477– 497.

Scapigliati,G. ; Romano,N. ; Bulocore , F. ; Picchietti , S. ; Baldassini , M.R. ; Prugnoly,D. ; Galice,A. ; Meloni, S. Secombes , C.J. ; Mazzini , M. and Abelli,L. 2002.The immune system of seabass , *Dicentrarchus labrax*, reared in aquaculture. Developmental and comparative immunology 26 . pp: 151-160 .

Schrøder, K., Clausen, E., Sandberg, A.M., Raa, J. 1980. Psychrotrophic *Lactobacillus plantarum* from fish and its ability to produce antibiotic substances. In: Connell, J.J. (Ed.): Advances in Fish Science and Technology, Fishing news Books, Farnham, Surry, England, pp. 480-483.

Sharp, M.E. 1981. The genus *Lactobacillus*. In: Starr, M.P., Stolp, H., Truper, H.G., Balows, A., Schlegel, H.G. (Eds.). The Prokaryotes. A Handbook on Habitat, Isolation and Identification of Bacteria, Vol. I.

Springer, Berlin, pp. 1653–1679.

Shenavar Masouleh, A., Bahmani, M., Alizadeh, M., Jalilpour, J., Bazari Moghadam, S., Masoomzadeh, M., Askarian, F., Kousha, A. 2007. In-vitro study on enrichment of Artemia nauplii ith protexin™ and its influence on

Persian sturgeon larvae. International workshop on advanced techniques in sturgeon fish larviculture. 12- 14 March 2007. P: 113.

Sissons, J.W. 1989. Potential of probiotic organisms to prevent diarrhoea and promote digestion in farm animals. A review. J. Sci. Food Agric. 49, 1–13.

Sknoberg,D.I. , Yogev,L. , Hardy,R.W. , and Dong , F.M. 1997. Metabolic response to dietary phosphorus intake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) . Aquacalture **157** , 11-24 .

Spanggaard, B., Huber, I., Nielsen, J., Sick, E.B., Pipper, C.B., Martinussen, T., Slierendrecht, W.J., Gram, L. 2001. The probiotic potential against vibriosis of the indigenous microflora of rainbow trout. Environ. Microbiol. 3 (12), 755– 765.

Stratholt , M.L. ; Donaldson , E.M. and Robin Liley , N. 1997 . Stress induces elevation of plasma cortisol in adult female coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) is reflected in egg cortisol content , but does not appear affect early development . Aquacalture158 . pp : 141-153 .

Stoskopfe, M.A. 1993. Fish medicine. Sounders company,U.S.A. 882 p.

Strøm, E., 1988. Melkesyrebakterier i fisketarm. Isolasjon, karakterisering og egenskaper. MSci thesis. The Norwegian College of Fishery Science_In Norwegian., 88 pp.

Strøm, E., Olafsen, J.A. 1990. The indigenous microflora of wild-captured juvenile cod in net–pen rearing. In: Lesel, R. Ed. , Microbiology in Poecilotherms. Elsevier, Amsterdam, pp. 181–185.

Strøm, E., Ringø, E. 1993. Changes in bacterial flora in developing cod, *Gadus morhua* L. , larvae after inoculation of *Lactobacillus plantarum* in the water. In: Walther, B., Fyhn, H.J. Eds. , Physiological and Biochemical Aspects of Fish Larval Development. Univ. of Bergen. ISBN 82-992402–0-4, pp. 226–228.

Sugita, H., Nakamura, T., Tanaka, K., Deguchi, Y., 1994. Identification of *Aeromonas* species isolated from fresh water fish with the microplate hybridization method. Appl. Environ. Microbiol. 60, 3036– 3038.

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, 269– 280.

Sugita, H., Okano, R., Suzuki, Y., Iwai, D., Mizukami, M., Akiyama, N., Matsuura, S., 2002. Antibacterial abilities of intestinal bacteria from larval and juvenile Japanese flounder against fish pathogens. Fish. Sci. 68, 1004–1011.

Suyehiro, Y., 1942. A study on the digestive system and feeding habits of fish. Jpn. J. Zool., X, 333 pp.

Tanck, M.W.T.; Cales,T.;Bovenhinus, H. ;Komen, J. 2002. Exploring the genetic background of stress using isogenetic progenies of common carp selected for high or low stress - related cortisol response .Aquaculture 204 , 419-434 .

Tannock, G.W. 1988. The normal microflora: new concepts in health promotion. Microbiol. Sci. 5, 4–8.

Tannock, G.W. 1997. Modification of the normal microbiota by diet, stress, antimicrobial agents, and probiotics. In: Mackie, R.I., Withe, B.A., Isaacson, R.E. Eds. , Gastrointestinal Microbiology, Vol. 2, Gastrointestinal Microbes and Host Interactions. Chapman and Hall Microbiology Series, International Thomson Publishing, New York, pp. 434–465.

Toranzo, A.E., Cutrin, J.M., Nunez, S., Romalde, J.L., Barja, J.L. 1995. Antigenic characterization of *Enterococcus* strains pathogenic for turbot and their relationship with other gram-positive bacteria. Dis. Aquatic Org. 21, 187–191.

Tovar, D., Zambiano, J.; Cahu, C.; Gatesoupe, F. J.; Va´zquez-Ju´arez, R.; . Le´sel, R. Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass *(Dicentrarchus labrax*) larvae. Aquaculture 204 . 113-123.

Tovar-Ramı´reza, D., Zambonino Infanteb, J., Cahub,C., Gatesoupeb. F.J.,Va´zquez-Jua´reza, R, Lesel, R. 2002. Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Aquaculture 204, 113–123.

Tovar-Ramı´reza, D., Zambonino Infanteb, J., Cahub,C., Gatesoupeb. F.J.,Va´zquez-Jua´reza, R. 2004. Influence of dietary live yeast on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larval development. Aquaculture 234, 415–427.

Trsic-Milanovi, N.; Kodzic, A.; Baras, J.; Dimitrijevic-Brankovic, S. 2001. The influence of a cryoprotective medium containing glycerol on the lyophilization of lactic acid bacteria . J.Serb.Chem.Soc. 66(7), 435–441.

Trust, T.J., Sparrow, R.A.H. 1974. The bacterial flora in the alimentary tract of freshwater salmonids fishes. Can. J. Microbiol. 20, 1219–1228.

Tuohy, K.M., Probert, H.M., Smejkal, C.W., Gibson, G.R., 2003. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. Drug Discov. Today 8 (15), 692–700.

Vadstein, O., 1997. The use of immunostimulation in marine larviculture: possibilities and challenges. Aquaculture 155, 401 –417.

Van Nevel, C.S., Demeyer, D.I. 1988. Manipulation of rumen fermentation. In: Hobson, P.N. Ed. , The Rumen Microbial Ecosystem. Elsevier Applied Science, London, pp. 387–443.

Walford, J., Lam, T.J., 1993. Development of digestive tract proteolytic enzyme activity in seabass (*Lates calcarifer*) larvae and juveniles. Aquaculture 109, 187–205.

Walter, H.E., 1984. Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In: Bergmeyer, H.U. (Ed.), Methods of Enzymatic Analysis, vol. V. Verlag Chemie, Weinheim, pp. 270– 277.

Weil,L.S.; Barry , T.P. and Malison , J.A.2001. Fast growth in rainbow trout is correlated whit a rapid decrease in post – stress cortisol concentration. Aquaculture 193 . pp : 373-380.

Williams, A.M., Fryer, J.L., Collins, M.D., 1990. *Lactococcus piscium* sp. nov. a new *Lactococcus* species from salmonis fish. FEMS Microbiol. Lett. 68, 109–114.

Williot,P. ; Sabeau,L. ; Gessner,J. ; Arlati,G. ; Bronz , P. ; Gulyas , T. ; Berni, P. 2001.Sturgeon farming in western Europe : recent developments and perspectives . Aquat. Living Resour . 14 . pp : 367-374.

Wyban, J.A., Sweeney, J.N. 1991. Intensive Shrimp Production Technology. The Oceanic Institute, Honolulu, 158 pp.

Yan, F., Polk, D.B., 2002. Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. J. Biol. Chem. 277, 50959–50965.

Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C.L. 1994a. Development and response to a diet change of some digestive enzymes in sea bass(*Dicentrarchus labrax*) larvae. Fish Physiol. Biochem. 12, 399–408.

Zambonino Infante, J.L., Cahu, C.L. 1994b. Influence of diet on pepsin and some pancreatic enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Comp. Biochem. Physiol. 109, 209–212.

Study on effects of extracted probiotics from microbial flora of digestive system on growth indices in beluga (*Huso huso*) and Persian sturgeon *(Acipnser persicus)*

Abstract

Isolation of Lactic Acid Bacteria (LAB) was carried out from gastro intestinal tract of beluga and Persian sturgeon at international sturgeon research institute and PCR has been used for bacteria Identification.

Two species of LAB including *Enterococcus seriolicida* and *Leuconostoc mesenteroides* were isolated from Gastrointestinal tract (GI) of persian sturgeon in this study and the counts of *Leu. mesenteroides* (4.63×10^2 CFU/gr of GI) was significantly higher than other species. *Lactobacillus curvatus, Lactococcus raffinolactis, Lactococcus lactis* and *Streptococcus sp.* were also isolated from GI of beluga and maximum counts was belonged to *Lb.curvatus* (4.63×10^2 CFU/gr of GI) in this species. Dominant species were lyophilized and adding to the water since start of mix feeding of sturgeon with different counts including 2×10^9, 5×10^9 and 9×10^9 CFU/gr of live food, 4 times a day.

The results revealed that the maximum and minimum growth rate and protease, amylase, and lipase activity in beluga was gained by using of *Lb. curvatus* with total viable count of 9×10^9 CFU/gr of live food and *Leu. mesenteroides* with total viable count of 9×10^9 CFU/gr of live food.

According to the results of this study, the maximum and minimum growth rate and protease, amylase, and lipase activity in Persian sturgeon was gained by using of *Leu. mesenteroides* with total viable count of 2×10^9 CFU/gr of live food and *Lb. curvatus* with total viable count of 9×10^9 CFU/gr of live food.

Histological study showed that gastrointestinal development was same during larva rearing in control and other treatments but the size of liver was bigger in treatments that received nonspecific LAB in both species.

According to the results, positive effects of using dominant specific LAB bacteria for larviculture of sturgeon has been proved in this study.

Fatemeh Askarian