پروبیوتیک ها در آبزی پروری

محمود حافظیه

موسسه تحقیقات شیلات ایران

مطالب

- -اهمیت آبزی پروری و انواع آبزیان پرورشی در کشور
- انواع سیستم های آبزی پروری
- بروز بیماری عفونی
- استفاده از آنتی بیوتیک ها
- دلایل اجتناب از آنتی بیوتیک ها
- پروبیوتیک ها، بهترین جایگزین
- عملکرد پروبیوتیکها
- تعریف و انواع پروبیوتیکها
- پروبیوتیک های تجاری و نگرانی ها
- جدا سازی باکتری ها از محیط یا پیکره آبزی
- شناسایی باکتری های غالب و پروبیوتیکها

ادامه مطالب

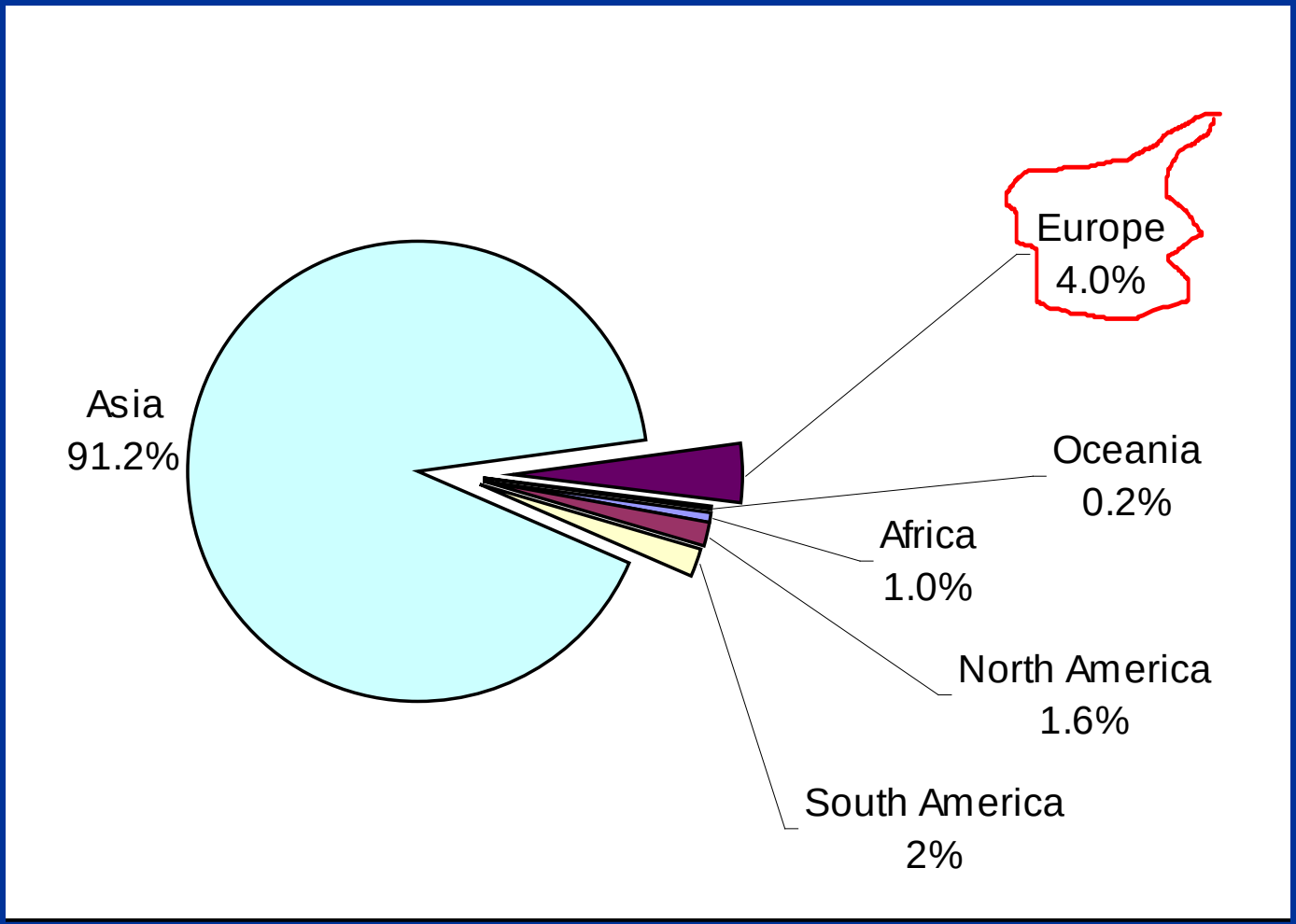
- بهترین شرایط کشت پروبیوتیکها
- بررسی های آنزیمی پروبیوتیکها و بدست آوردن بهترین شرایط محیطی این پدیده با بهره گیری(Response Surface Methodology (RSM
- جدا سازی پاتوژن های معمول گونه هدف و کشت آنها
- تست های آنتاگونیستی و بدست آوردن بهترین شرایط محیطی در این پدیده
- تست های کنترل کیفی آب با RSM
- تست های رشد و بازماندگی با افزودن به غذای در گونه هدف به منظور تعیین بهترین غلظت پروبیوتیک همچنین بررسی سیستم ایمنی (خون، ایمنوگلوبولین، فاگوسیتوز و ...)
- تست های کلونیزاسیون
- تست ارزیابی ایمنی پروبیوتیک در مورد انسان(با آزمایش روی موش LD50)

ادامه مطالب

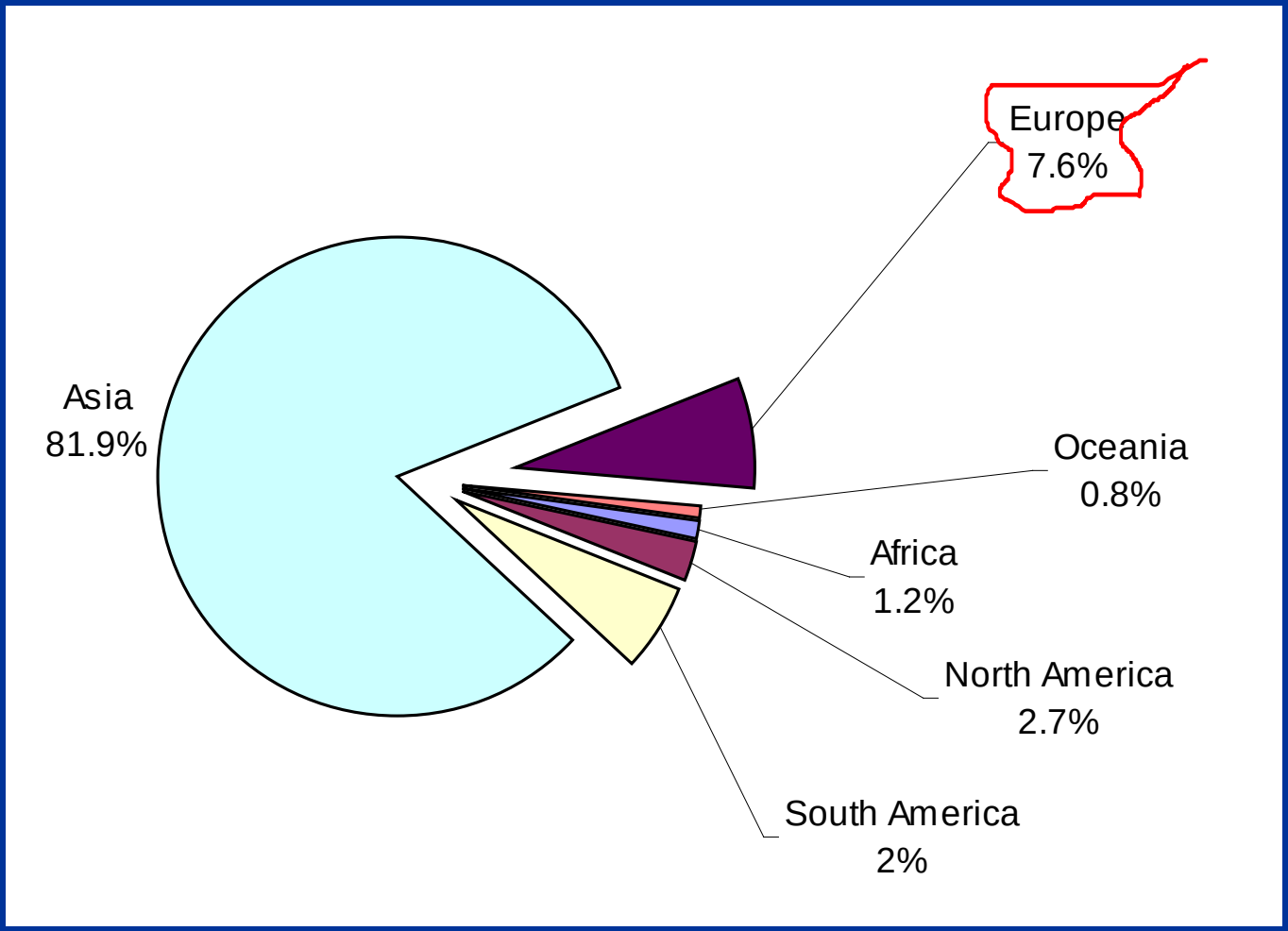
- معرفی پروبیوتیک استخراجی به صنعت
- بهينه سازي رشد سويه هاي منتخب در مقياس آزمايشگاهي (ارلن و فرمانتور ۱ ليتري)
- بهينه سازي توليد پروبيوتيك آبزيان بر پايه سويه هاي بومي در فرمانتور ۱۰ و ۱۰۰ ليتري

- آبزیان ارزشمند و غنی از ترکیبات پروتئینی، چربی به خصوص اسیدهای چرب غیر اشباع بلند زنجیره و عناصر کمیاب پس، ارزش غذایی زیادی دارند (Ruxton, 2005)
- آبزی پروری با رشدی حدود ۱۱% در سال در مقایسه با فقط ۲/۱ % رشد در صید آبزیان در سال و ۸/۲% رشد در تولید چهارپایان در زمان مشابه(De Silva et al., 2009) به عنوان سریع الرشد ترین صنعت تولید غذا در جهان معروف شده است.
- آبزی پروری حدود ۴۷% تقاضای جهانی در سال ۲۰۰۶ را مرتفع نموده است(FAO, 2008)
- میزان تولید انواع آبزیان پرورشی با ۹/۳ درصد وزنی در سال ۱۹۷۰ به ۱/۲۷% وزنی در سال ۲۰۰۰ و ۴/۳۲% وزنی در سال ۲۰۰۴ افزایش نشان داده است(FAO, 2006)

میزان آبزی پروری در جهان



ارزش محصولات آبزی پروری در دنیا



آبزي پروري در ايران

- سردابي
- خاوياري
- ميگو
- گرمابي
- ماهيان آب شيرين
- ماهيان دريايي
- ماهيان زينتي
- غذاهاي زنده
- گياهان دريايي
- نرم تنان

ماهیان سردابی

آبزی پروری میگو

ماهیان آب شیرین

ماهیان دریایی

ماهیان زینتی

گیاهان دریایی

صدف مروارید ساز

غذاهای زنده

• کپور ماهیان چینی

Common carp - *Cyprinus carpio*: 15 to 20%

Grass carp - *Ctenopharyngodon idellus: 5 to 10 %*

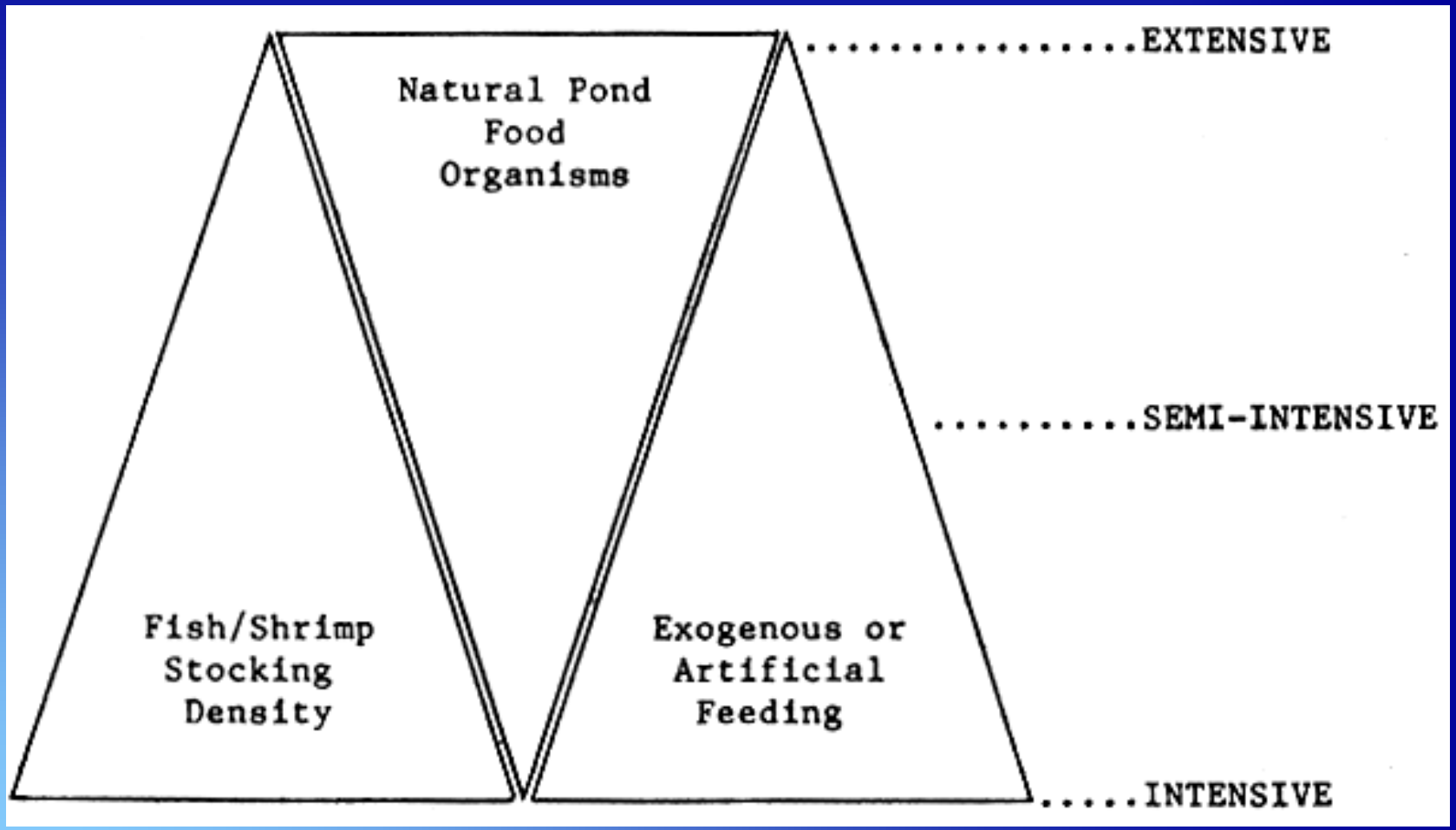
Silver carp - *Aristichthys nobilis: 60 to 70%*

Big head-*Hypophtalmichthys molitrix: 5 to 10%*

ماهیان زینتی

غذاهای زنده

سیستم های آبزی پروری



موضوعاتي كه تراكم بالا درصنعت آبزي پروري بوجود مي آورد

بيماريها.

كاهش كيفيت آب.

ناكافي بودن راندمان توليد.

تراکم بالا در تولید= افزایش بیماری

افزایش استرس
سوء مدیریت بهداشتی وتغذیه ای
هجوم پاتوژن ها
کاهش ایمنی

بیماری های مرتبط با آئرو موناس در کپور

- Carps:
  - Many diseases are linked to *Aeromonas sp.* infection in carps:
    - **Ulcer disease** (*Aeromonas sp., A. hydrophila*) ➔ Ulceration, exophthalmia, abdominal distention
    - **Bacteria enteritis/septicamia** ➔ swollen anus, expanded belly, eyeball protruded, red spot on the belly
    - **Epizootic ulcerative syndrome** (*A.hydrophila, A. sorbia, Aphanomyces invadans*) ➔ large red or grey shallow ulcers with necrotic areas on skin and fungus extending deep into the musculature
    - **Eye disease** (*A. hydrophila*)➔ Vascularisation of eye, become opaque, eye ball putrefied
    - **Dropsy** (*Aeromonas sp.*) ➔ body scale stretch-out, inflammation, ulceration, abdominal distension

عوامل بيماريزا در آبزي پروري

ويروسها

باكتري ها

ريكتزياها

ميكوپلاسم ها

جلبك ها

قارچها

آغازيان انگلي

خسارت ناشي از بيماري بيش از ۳ ميليارد دلار بوده است

(بانك جهاني، ۲۰۰۵)

جلو گيري و كنترل بيماريها

آنتي بيوتيك ها

ديگر مواد شيميايي

بيماری هاي عفوني = مصرف آنتی بيوتيک

- در آمريکا سالانه ۱۸۰۰۰ تن آنتي بيوتيك توليد مي شود كه ۱۲۶۰۰ تن آن براي پيشگيري بيماريهاي عفوني در حيوانات پرورشي و بقيه به منظور بهبود رشد مصرف شده است Balcazar et al., 2006
- در اروپا سالانه ۱۶۰۰ تن آنتي بيوتيك توليد كه حدود ۳۰% آن براي بهبود رشد در حيوانات پرورشي مصرف مي شود SCAN, 2003
- در تايلند از ۷۶ مزرعه ميگو، ۵۶ مزرعه از آنتي بيوتيكها به منظور پيشگيري استفاده مي نمايند. عمده آنتي بيوتيك هاي مورد مصرف tetracyclines, trimethoprim, chloramphenicol, gentamycin, tiamulin, sulfonamides وquinolones مي باشند Holmstrom et al., 2003
- در تايلند در سال ۱۹۹۴ حدود ۶۰۰-۵۰۰ تن آنتي بيوتيك در صنعت پرورش ميگو استفاده شده است Deforidt et al., 2007a
- در فيليپين بيشتر از آنتي بيوتيك كلرامفنيكل، اكسي تترا سايكلين، اكسولينيك اسيد، فورازوليدين، نيتروفوران، اريترومايسين و داروهاي سولفاته استفاده مي شود Tendencia and de la Pena 2001).
- در آمريكاي جنوبي و مكزيك هم از انواع آنتي بيوتيك ها مثل اكسي تتراسايكلين، سارافلوكساسين و انروفلكساسين استفاده می شود (Roque et al., 2001).

مشکلات مصرف آنتی بیوتیک

- ايجاد آلرژي ناشي از مصرف آنتي بيوتيك:
- ديده شده كارگراني كه براي طولاني مدت در تماس مستقيم با آنتي بيوتيك بوده اند، دچار حساسيت هاي پوستي شده اند. حتي در برخي ها، سيستم گوارش و تنفس نيز دچار مشكل شده است و اين مشكل از طريق غذاي داده شده به آبزيان پرورشي به اين كارگران منتقل شده است
(Lillehaug et al., 2003; Grave et al., 1999)

مشكلات مصرف آنتی بيوتيک

- تجمع و باقيماندگي آنتي بيوتيك در بدن موجودات و تاثير منفي آن بر اكوسيستم:
- سيپروفلوكسين، اكسولينيك اسيد، كلروتتراسايكلين، اكسي تتراسايكلين، تتراسايكلين، تياموليـن، و تريمتوپريم اثرات منفي زيادي بر اكوسيستم هاي آبي و موجودات آبزي و به خصوص جلبك ها بي مهره ها داشته اند
- (Halling-Sorensen, 2000; Holten Lutzhoft et al., 1999)
- اگر مصرف مكرر آنتي بيوتيك در آب رخ دهد، مي تواند بر روي خود اكوسيستم و محيط آب تاثير منفي بجاي گذارد. آنتي بيوتيك هايي چون اكسولينيك اسيد و اكسي تتراسايكلين مي توانند در بدن ماهي ها، نرم تنان و خرچنگ هاي گرد تجمع يابند
- (Capone et al., 1996' Samelsen et al., 1992)

پروبيوتيك ها راه گشاي مشكل

- اين ميكروارگانيسم هاي زنده مي توانند بطرق مختلف جايگزين آنتي بيوتيك ها شده و نه تنها عليه بيماريها كارآيي خود را نشان دهند بلكه در پيشگيري، رشد بهتر و بازماندگي بيشتر به همراه كمك به كيفيت آب محيط كشت آبزيان پرورشي ، نقش خود را به خوبي ايفا نمايند
- Rattanachuay et al., 2011; Banerjee et al.,) 2010; Liu et al., 2010; Zhang et al., 2009; Zhou et al., 2009).

تعريف پروبيوتيك در آبزي پروري

- ياسوداو تاگا(۱۹۸۰): باكتري هايي كه نه تنها به عنوان غذا بلكه به عنوان كنترل كننده هاي زيستي بيماري ماهيان و فعال كننده هاي چرخه مواد غذايي مفيد مي باشد.
- موریاتي و همكاران(۱۹۹۸) افزودني هاي تك ياخته اي به آب
- مائدا و همكاران (۱۹۹۷) كنترل كننده بيولوژيك
- گاتسوپ(۱۹۹۹) سلولهاي تك ياخته اي كه از طريق ورود به لوله گوارشي ميزبان و قابليت زنده ماندن ، و با هدف بهبود سلامتي ميزبان به جهت حضور در لوله گوارشي تاكيد دارد (جامع ترين تعريف در آبزي پروري)
- كائورت و همكاران(۲۰۰۴) ميكروارگانيزم هاي زنده اي كه بعد از بلع در بعضي افراد، اثرات مفيدي فراتر از خواص پايه اي تغذيه اي بر سلامتي نشان مي دهند.

Probiotics: definition and principles

- The term, probiotic, simply means “for life”, originating from the Greek words “pro” and “bios” (Gismondo et al., 1999).
- probiotic as “a live microbial feed supplement which beneficially affects the host animal by improving its intestinal balance”(Fuller, 1989)
- The concept of probiotic activity modulation of the (GIT) could confer antagonism against pathogens, help development of the immune system, provide nutritional benefits and assist the intestinal mucosal barrier (Vaughan et al., 2002).
- Today probiotics are quite commonplace in health promoting “functional foods” for humans, as well as therapeutic, prophylactic and growth supplements in animal production and human health (Mombelli and Gismondo, 2000; Ouwehand et al., 2002; Sullivan and Nord, 2002; Senok et al., 2005)
- “A live microbial adjunct which has a beneficial effect on the host by modifying the host-associated or ambient microbial community, by ensuring improved use of the feed or enhancing its nutritional value, by enhancing the host response towards disease, or by improving the quality of its ambient environment (Verschuere et al. (2000a).
- “A probiotic is an entire or components(s) of a microorganism that is beneficial to the health of the host”(Irianto and Austin (2002a)

باكتري هاي پروبيوتيك بايستي:

منشا حيواني

پايداري فنوتيپي و ژنوتيپي

غير بيماريزا

مقاوم در برابر فرآوري هاي صنعتي

مقاوم در برابر اسيد و صفرا

توانايي زنده ماندن در حامل

توانايي اثرگذاري مثبت بر فعاليت هاي متابوليكي

توليد تركيبات ضدميكروبي

توانايي اتصال به بافت اپي تليال هدف

پايداري طي مراحل توليد و ذخيره سازي

ارزيابي پروبيوتيك بودن يك باكتري

- اين پروبيوتيك ها ممكن است در آينده بشر چه خطراتي را به ارمغان بياورند،
- آيا امكان ذخيره سازي آنها در فرم ليوفيليزه و يا مايع وجود دارد؟
- و اينكه اين مجموعه فرآيند ها اقتصادي هستند يا خير؟

مکانیسم عملکرد پروبیوتیک ها

- رقابت با عامل بیماریزا، پاتوژن با ترشحات مایع مترشحه از پروبیوتیك در تماس قرار مي گيرد (Vine et al., 2004a; Sotomayor and Balcazar, 2003)
- ماده جامدي گرفته شده از پروبیوتیك در تماس با پاتوژن قرار مي گيرد Chythanya et al., 2002; Dopazo et al., 1988)

- تحریک سیستم هومورال و یا سیستم ایمنی سلولی میزبان،
- تغییر در متابولیسم پاتوژنها با تغییر در سطوح آنزیمی،
- وظیفه آنتاگونیستی علیه پاتوژنها بدلایل رقابت برای مواد غذایی، انرژی، یا سطح چسبندگی و یا اکسیژن ، آهن و....
- باعث بهبود سلامت میزبان
- دوستدار طبیعت -داروی زیستی (Wang and Han, 2007)
- باعث بهبود کیفیت آب

انواع پروبیوتیك ها

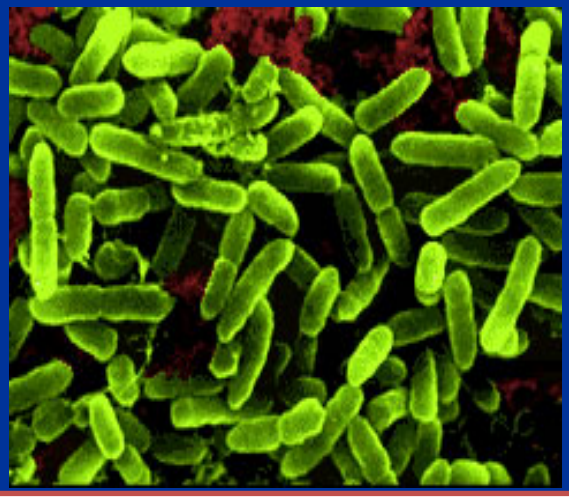
باکتریها *Lactobacillus, Actinomycetes, Nitrobacteria, Denitrifying* bacteria, Bifidobacterium,

مخمر ها

سیانوباکتر ها

ریزجلبك ها

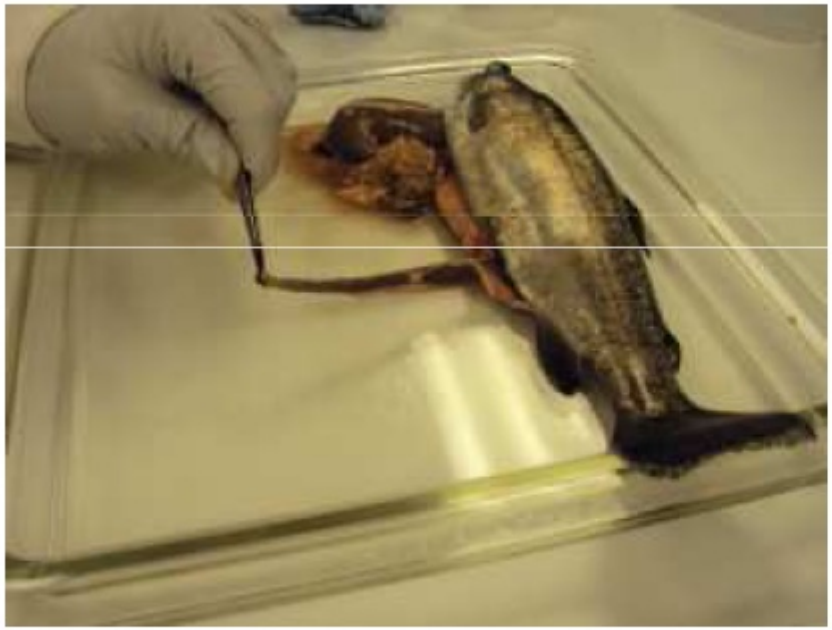
قارچها

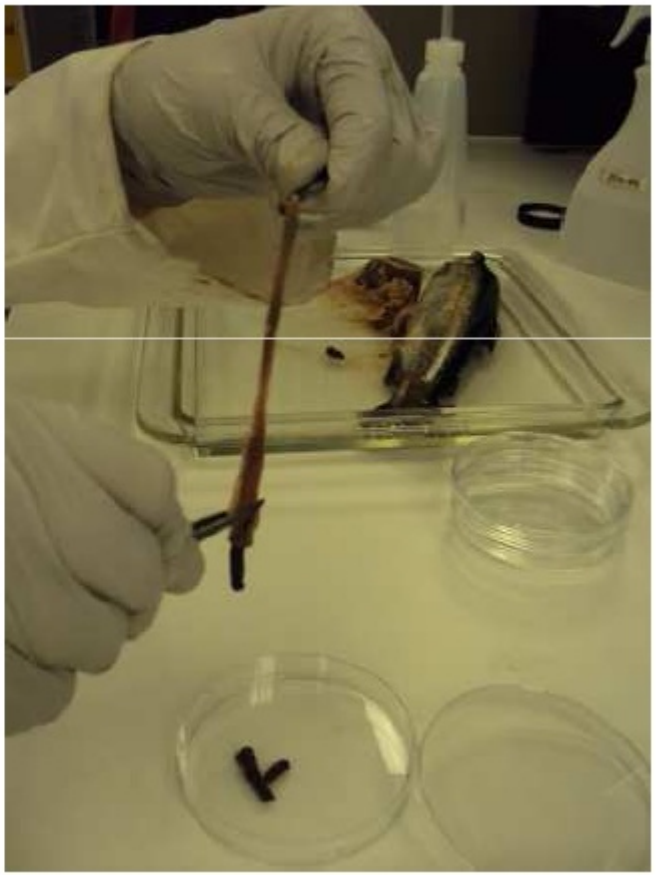


نمونه برداری

- اطمینان از سلامت نمونه آبزی و ترجیحا پرورش حداقل ۲ ماه در شرایط تحت کنترل(بدون آنتی بیوتیک و پروبیوتیک) تحت شرایط استاندارد
- از بخش های مختلف بدن مرحله جوان (روده، عضله و سطح بدن (در مورد میگو از هپاتوپانکراس) و همچنین از محیط کشت (آب و رسوبات) نمونه گیری می شود
- اندازه گیری وزنی یا حجمی از نمونه، هموژن نمودن آن ، رقیق کردن در نرمال سایلین(بسته به نمونه در مورد روده و یا رسوبات غلظت کمتر و در مورد سطح بدن و آب غلظت بیشتر)

نمونه برداری از روده- شرایط استریل





- (Bergh et al., 1994)به دو موضوع مهم اشاره دارند.
- اول اينكه از محيط بيرون (آب) و غذا باكتري ها به راحتي مي توانند وارد سيستم گوارش شوند، پس تاثير اين دو عامل در ميكروبيوتاي روده اي آبزيان بسيار زياد است .
- دوم آنكه عليرغم تغيير باكتري ها در محيط آب ولي در روده ماهي(دو كفه اي ها از اين قاعده استثنا هستند) حداقل از مرحله جوان به بعد تركيب باكتري ها تقريبا ثابت است .

جدا سازی باکتری از بخش های مختلف بدن و محیط آبزی

- در مورد آبزیانی که در آبهای جاری پرورش می یابند (قزل آلا)، نمونه برداری از آب و رسوبات چندان توجیه ندارد.
- در مورد آبزیانی که در آبهای راکد پرورش می یابند (میگو و کپور ماهیان)، لازم است علاوه بر نمونه برداری از لوله گوارش، سطح بدن، عضله، از آب و رسوبات کف استخر ها نیز نمونه برداری شود.

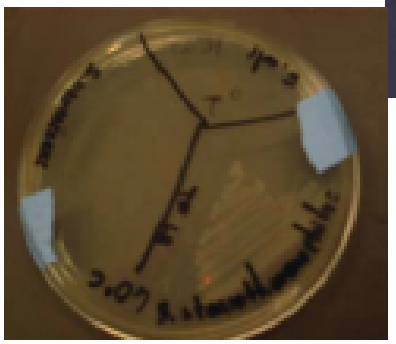
- نبود باکتری شمارش شده در محیط کشت (MacConkey agar) نشاندهنده آن است که *Enterobacteriaceae* در محل های نمونه برداری بدن میگو و محیط وجود نداشته است.

شرایط فیزیکی محیط کشت pH

Organism	Minimum pH	Optimum pH	Maximum pH
Thiobacillus thiooxidans	0.5	2.0-2.8	4.0-6.0
Sulfolobus acidocaldarius	1.0	2.0-3.0	5.0
Bacillus acidocaldarius	2.0	4.0	6.0
Zymomonas lindneri	3.5	5.5-6.0	7.5
Lactobacillus acidophilus	4.0-4.6	5.8-6.6	6.8
Staphylococcus aureus	4.2	7.0-7.5	9.3
Escherichia coli	4.4	6.0-7.0	9.0
Clostridium sporogenes	5.0-5.8	6.0-7.6	8.5-9.0
Erwinia caratovora	5.6	7.1	9.3

Temperature

- *Escherichia coli*,*Serratia marcesens*, *Bacillus stearothermophilus* are on all three plates
- At 4 C (top) no bacteria grew
- At 30 C (middle) both *Serratia marcesens* and *Escherichia coli* grew
- At 60 C (bottom) only *Bacillus stearothermophilus* grows
- What range of temperatures categorizes bacteria into psychrophiles, mesophiles, and thermophiles?
- Why isn't *Serratia marcesens* red?



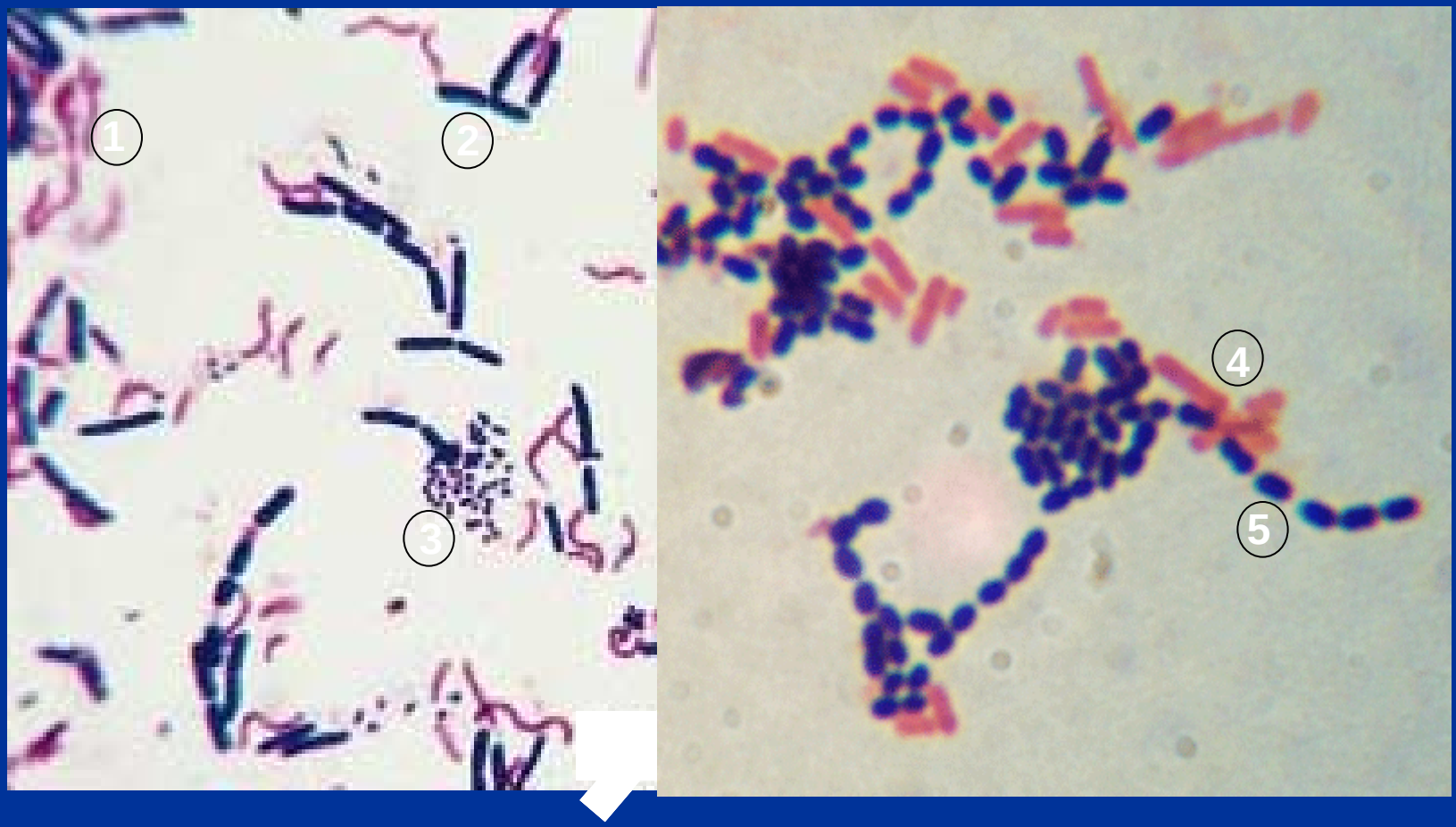
نمونه برداری

- ۱۰% از کلونی های مجزا را برداشت در LB=lysogenic broth محتوی ۱۵% گلیسرول در منفی ۸۰ درجه نگهداری می کنیم.
- برای شناسایی تا حد جنس از روش هاي مورفولوژي، ترکیب شیمیایي دیواره سلولي، فعالیت بیوشیمیایی و نیاز هاي غذایي استفاده می شود. از BIOLOG GN and GP microplate در دماي ۳۰ درجه سانتیگراد ساخت آمریکا نیز برای تایید شناسایی می توان بهره گرفت

گرم منفی یا مثبت

- رنگ آميزي گرم باکتريها را به دو نوع
- مثبت (بدليل داشتن ديواره ضخيم پپتيدوگليکان - ارغواني)
- منفي (بدليل داشتن ديواره نازکپپتيدوگليکان و فسفوليپيد دو لايه- صورتي)
- از رنگ کريستال ويوله – شستشو- لوگل- شستشو- الکل ۹۵% - شستشو- فوشين يا سافرانين- شستشو
- و مشاهده ميکروسکوپي

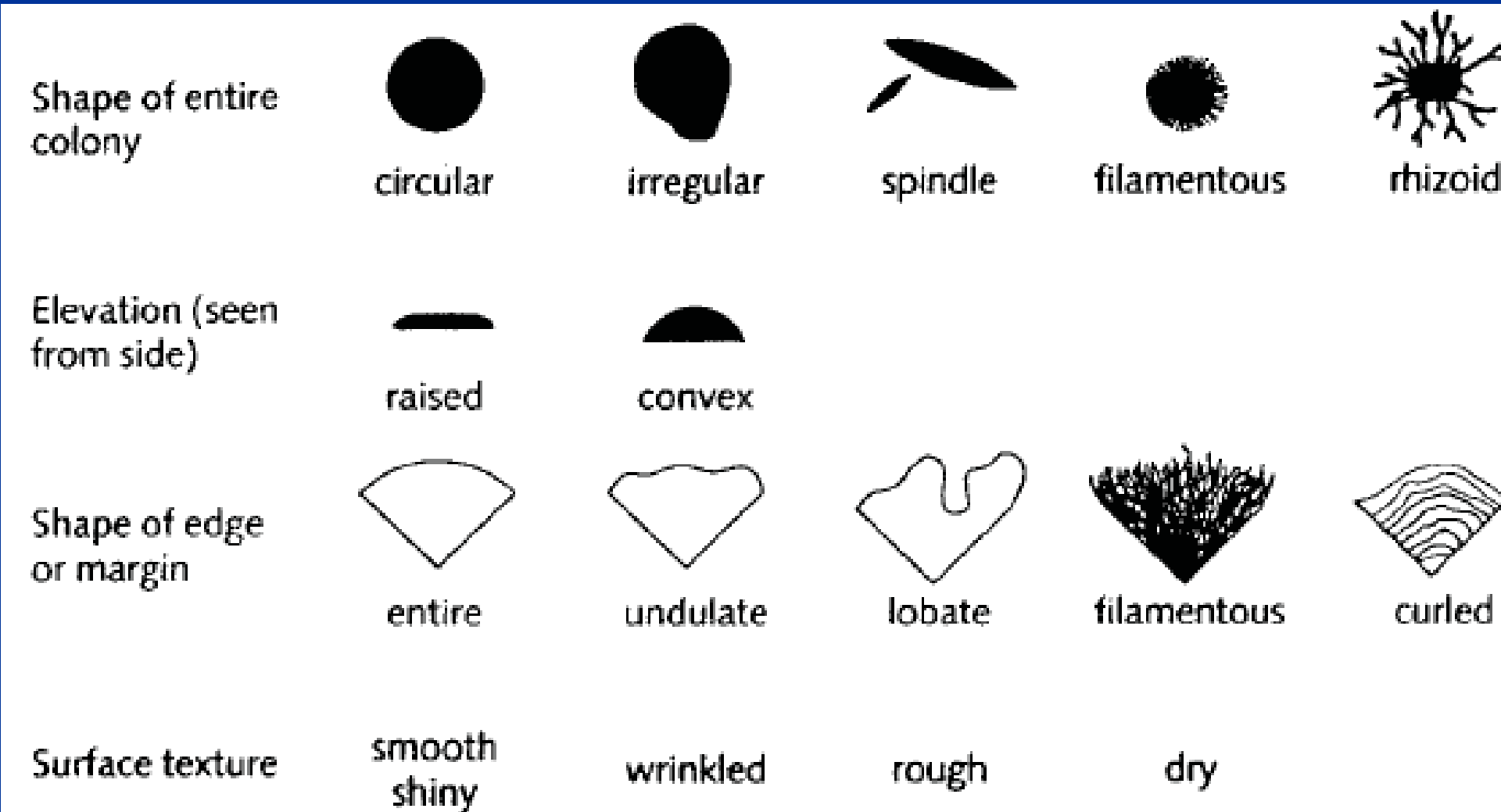
Identify the Gram-positive cells and the Gram-negative cells in these photographs.



Answers: 1. Gram-negative spirilli 2. Gram-positive bacilli 3. Gram-positive cocci
4. Gram-negative bacilli 5. Gram-positive cocci

برخي اشكال مختلف كلوني باكتريايي

cocci, bacilli , spirilla سه نوع متداول



تست کاتالاز

- باكتري هايي كه با استفاده از آنزيم كاتالاز، پراكسيد هيدروژن را تجزيه مي كنند
- براي اينكار كلوني باكتري كشت شده روي محيط كشت را در معرض محلول پراكسيد هيدروژن ۳% قرار مي دهيم اگر حباب گاز اكسيژن تشكيل يعني كاتالاز مثبت و در غير اينصورت كاتالاز منفي

تست اکسیداز

- براي تشخيص باكتري ها با فعاليت سيتوكروم اكسيدازي
- از دي متيل پارا فنيلن دي آمين و يا تترامتيل پارافنيلن دي آمين استفاده مي شود
- اين ماده دهنده الكترون است و مي تواند سيتوكروم cرا احيا كند و معرف اكسيدازي است اگر با ريختن آن روي كلني تغيير رنگ مشاهده شد (تيره شد) اكسيداز مثبت و در صورت بي رنگ ماندن اكسيداز منفي است (در كمتر از ۶۰ ثانيه)

تست احیا نیترات

- براي تشخيص آنكه باكتري مي تواند نيترات را به نيتريت احيا كند
- از مايع نيترات به محيط كشت كلوني دار باكتري استفاده مي شود

محيط كشت اكسيداسيون- تخمير

- براي افتراق باكتريها بر اساس توانايي اكسيد كردن يا تخمير مواد قندي
- از گلوكز مونوهيدرات به عنوان ماده قندي به محيط كشت اضافه می کنند(البته لازم است تا با پارافين شرايط بيهوازي بوجودآورده شود) تغيير رنگ سبز و زرد، بسته به شرايط هوازي بودن و بي هوازي بودن تفسير می شود.
- بدين صورت كه قند متابوليزه مي شود يا نه و هوازي بودن يا بي هوازي بودن باكتري تفسير مي شود

Probiotic strain	Source	Used on	Method of application	Reference
Streptococcus lactis and *Lactobacillus bulgaricus*	?	Turbot larvae (*Scophthalmus maximus*)	Enrichment of live food	García de la Banda et al. (1992)
Lactobacillus sp. and *Carnobacterium* sp.	Rotifers (*Brachionus plicatilis*)	Turbot larvae	Enrichment of rotifers	Gatesoupe (1994)
Vibrio alginolyticus	Commercial shrimp hatchery	Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)	Bathing in bacterial suspension	Austin et al. (1995)
Carnobacterium divergens	Intestines of Atlantic salmon	Atlantic cod fry	Addition to diet	Gildberg and Mikkelsen (1998)
Bacillus megaterium, *B. subtilis*, *B. polymyxa*, *B. licheniformis*	Commercial product (Biostart)	Channel catfish	Addition to pond water	Queiroz and Boyd (1998)
Vibrio pelagius	Turbot larvae	Turbot	Addition to culture water	Ringø and Vadstein (1998)
G-probiotic	Commercial product	*Oreochromis niloticus*	Addition to diet	Naik et al. (1999)
Pseudomonas fluorescens	Iced freshwater fish (*Lates niloticus*)	Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)	Addition to culture water	Gram et al. (1999)
Carnobacterium sp.	Intestines of Atlantic salmon	Atlantic salmon	Addition to diet	Robertson et al. (2000)
Lactobacillus rhamnosus ATCC 53103	Culture collection	Rainbow trout	Addition to diet	Nikoskelainen et al. (2001)
Aeromonas hydrophila, *Vibrio fluvialis*, *Carnobacterium* sp., *Micrococcus luteus*	Digestive tract of rainbow trout	Rainbow trout	Addition to diet	Irianto and Austin (2002)
Enterococcus faecium SF68	Commercial product (Cernivet)	*Anguilla anguilla*	Addition to diet	Chang and Liu (2002)
L. rhamnosus JCM 1136	Culture collection	Rainbow trout	Addition to diet	Panigrahi et al. (2004)
Roseobacter sp. strain 27-4	Turbot larvae, *Tetraselmis* copepod-fed larvae	Turbot larvae	Addition to culture water	Hjelm et al. (2004)
Bacillus circulans	Intestines of *Labeo rohita*	*L. rohita*	Addition to diet	Ghosh et al. (2004)

روش های تست آنتاگونیستی آزمایشگاهی

- Disc Diffusion
- Well Diffusion
- Cross Streak
- Co-Culture

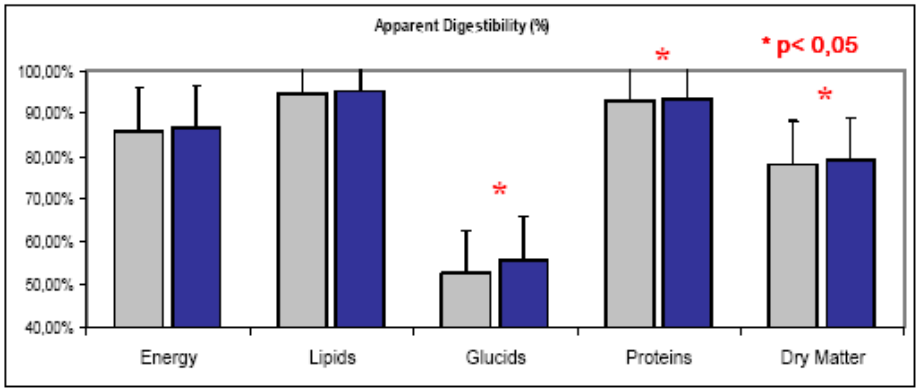
بررسی اثر عوامل فیزیکی و شیمیایی (دما، شوری وpH و زمان) بر تاثیر آنتاگونیستی

Run order	Temperature (°C)	pH	NaCl Con. (‰)	Time (h)	Vibrio static responses (mm)					
					V. p		V. a		V. h	
					Exp.	Pre.	Exp.	Pre.	Exp.	Pre.
1	40	9	37.5	24	24	16.8	22	18.3	0	0.08
2 (CP)	30	8	25.0	36	30	30.1	27	29.9	37	37
3	30	6	25.0	36	21	13.0	18	11.5	37	22
4	40	9	12.5	24	0	10.6	0	10.5	0	4
5	40	7	12.5	48	0	9.4	0	8.2	0	12.2
6	10	8	25.0	36	0	-4.3	0	-3.5	0	-12.2
7	20	9	12.5	48	13	9.1	12	8.2	0	7.8
8	20	7	37.5	48	21	18.9	26	23.8	30	33.7
9	30	8	25.0	12	0	2.2	0	0.8	0	-1
10	20	9	37.5	48	0	13.9	0	15.0	0	7.4
11	20	7	12.5	24	22	21.1	18	17.2	0	0.2
12	40	7	37.5	24	0	12.4	0	12.2	23	22.8
13	30	8	25.0	60	18	4.0	18	5.5	37	18.3
14(CP)	30	8	25.0	36	31	30.1	30	29.9	37	37
15	40	9	37.5	48	0	9.4	0	9.2	0	7.5
16	30	8	50.0	36	52	40.5	60	44.5	49	43.4
17(CP)	30	8	25.0	36	30	30.1	27	29.9	38	37
18(CP)	30	8	25.0	36	30	30.1	30	29.9	37	37
19	50	8	25.0	36	0	-7.5	0	-8.2	0	-7.6
20	40	7	37.5	48	0	4.2	0	6.0	35	40.8
21	40	7	12.5	24	33	22.4	30	18.3	0	4.75
22(CP)	30	8	25.0	36	33	30.1	33	29.9	36	37
23	20	9	12.5	24	0	-1.0	0	-2.7	0	6.4
24	40	9	12.5	48	0	-1.6	0	-2.7	0	0.9
25	30	8	0.0	36	46	45.7	40	43.8	40	25.8
26	20	7	12.5	48	20	30.4	24	31.0	0	12
27	30	10	25.0	36	0	-3.8	0	-5.2	0	-4.9
28(CP)	30	8	25.0	36	27	30.1	29	29.9	37	37
29	20	7	37.5	24	0	4.9	0	6.0	0	11.3
30(CP)	30	8	25.0	36	30	30.1	33	29.9	37	37
31	20	9	37.5	24	0	-0.9	0	0.2	0	-4.5

ارزیابی کیفی آنزیم های گوارشی روش های تست آنتاگونیستی آزمایشگاهی

- Starch agar به منظور ارزیابی تولید آنزیم آمیلاز
- Tributryin agar – تولید آنزیم لیپاز
- Skim milk agar - آنزیم پروتئاز
- فعالیت آنزیم ها بعد از ۷۲-۲۴ ساعت با ایجاد منطقه شفاف اطراف کلونی ها آشکار می شود

Rainbow Trout fed with Bactocell / Control feed.
Faeces are collected, lyophilized and analyzed
to calculate apparent digestibility of:

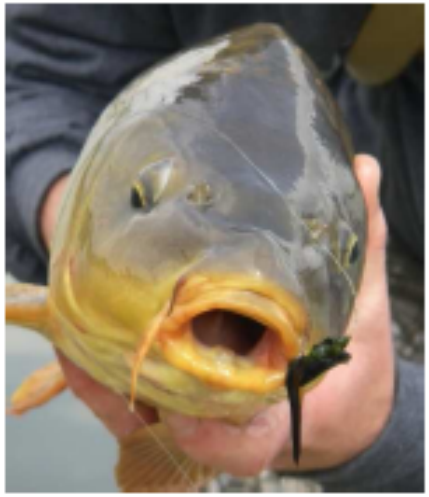


	Energy	Lipids	Glucids	Proteins	Dry Matter
Témoin	86,01%	94,80%	52,70%	93,10%	78,20%
Bactocell®	86,63%	95,30%	55,90%	93,50%	79,10%
p	0,31	0,06	**0,04**	**0,04**	**0,04**

Bactocell increases digestibility of Dry Matter, Proteins and Glucids

پارامتر های رشد در تیلاپیا و کپور

Species	Treatment	Initial weight	Final weight	apparent FCR	Survival rate	ROI
Common Carp	Control	5,9	16,6	2,7	68%	+25%*
	Bactocell (0,01%)	6,2	18,4*	2,6	76%*	
	OTC	6,1	19,9**	2,4	80%**	44%**
Nile Tilapia	Control	6,1	19,1	2,5	72%	+15%*
	Bactocell (0,01%)	6,2	20,8*	2,4	80%*	
	OTC	6,8	21,6*	2,5	88%**	17%*



تاثیر پروبیوتیک بر سیستم ایمنی

Species	Groups	Differential leukocytic count (%)					Phagocytic activity & index	
		Lymphocyte	Monocyte	Basophils	Eosinophils	Neutrophils	Phagocytic Activity	Phagocytic Index
Common carp	Control	50.48 ± 0.66^{f}	1.93 ± 0.02^{g}	7.79 ± 0.01^{g}	9.99 ± 0.03^{f}	26.38 ± 0.03^{g}	19.33 ± 0.36^{g}	2.70 ± 0.06^{f}
	Bactocell	51.60 ± 0.79^{e}	2.24 ± 0.03^{f}	7.84 ± 0.02^{fg}	10.06 ± 0.03^{f}	27.68 ± 0.05^{f}	23.80 ± 0.12^{e}	3.48 ± 0.10^{e}
Nile Tilapia	Control	51.20 ± 0.61^{e}	2.26 ± 0.02^{f}	7.86 ± 0.02^{f}	10.00 ± 0.04^{f}	26.40 ± 0.03^{g}	20.45 ± 0.23^{f}	3.48 ± 0.09^{e}
	Bactocell	54.84 ± 0.15^{c}	2.54 ± 0.01^{d}	8.05 ± 0.04^{d}	10.66 ± 0.17^{e}	27.77 ± 0.03^{e}	27.55 ± 0.29^{c}	3.94 ± 0.03^{d}

بررسی فاکتور های خونی و سیستم ایمنی در تیلاپیا

	Control	Probiotic
Haematocrit (PCV %)	36.19 ± 4.6^{a}	32.46 ± 3.6^{b}
Haemoglobin (g dl^{-1})	9.26 ± 1.4	9.11 ± 1.8
RBC (10^{6} cells μl^{-1})	1.51 ± 0.13	1.40 ± 0.15
MCV (fl)	241.48 ± 16.65	231.56 ± 10.21
MCH (pg)	61.28 ± 10.09	65.13 ± 10.39
MCHC (g dl^{-1})	25.51 ± 4.68	28.17 ± 4.65
Serum albumin (g l^{-1})[1]	14.99 ± 1.72	14.21 ± 1.76
Serum globulins (g l^{-1})[1]	30.88 ± 3.18	28.96 ± 3.6
Albumin/globulin ratio[1]	0.43 ± 0.08	0.44 ± 0.09
Total serum protein (g l^{-1})[1]	43.92 ± 3.15	41.67 ± 3.8
Leucocytes (10^{4} cells μl^{-1})	3.60 ± 0.76^{a}	4.34 ± 0.98^{b}
Lysozyme activity (U ml^{-1})[2]	280.7 ± 56.3^{a}	379.0 ± 146.8^{b}
Respiratory burst (OD_{610nm})	0.331 ± 0.032	0.344 ± 0.050

Values expressed as means ± standard deviation

[ab] Different superscript letters in the same row indicates significant differences between groups ($P < 0.05$)

RBC - Red blood cells

MCV - - Mean corpuscular volume. = (PCV x 1000)/RBC (10^{6} μl^{-1})

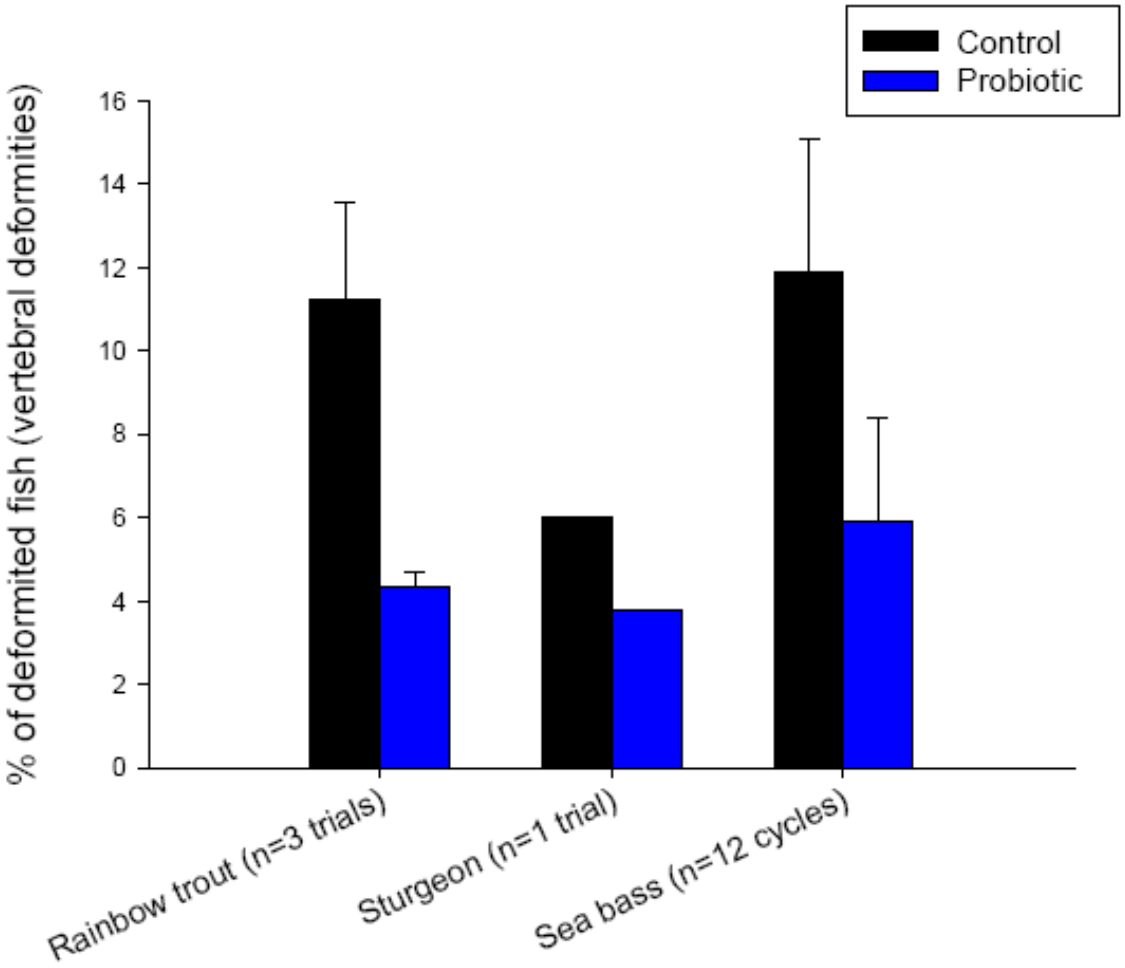
MCH - Mean corpuscular haemoglobin. = hemoglobin ((gd l^{-1}) x 10)/RBC (10^{t}

MCHC - Mean corpuscular haemoglobin concentration. = hemoglobin (g d l^{-1})

[1] $n = 16$

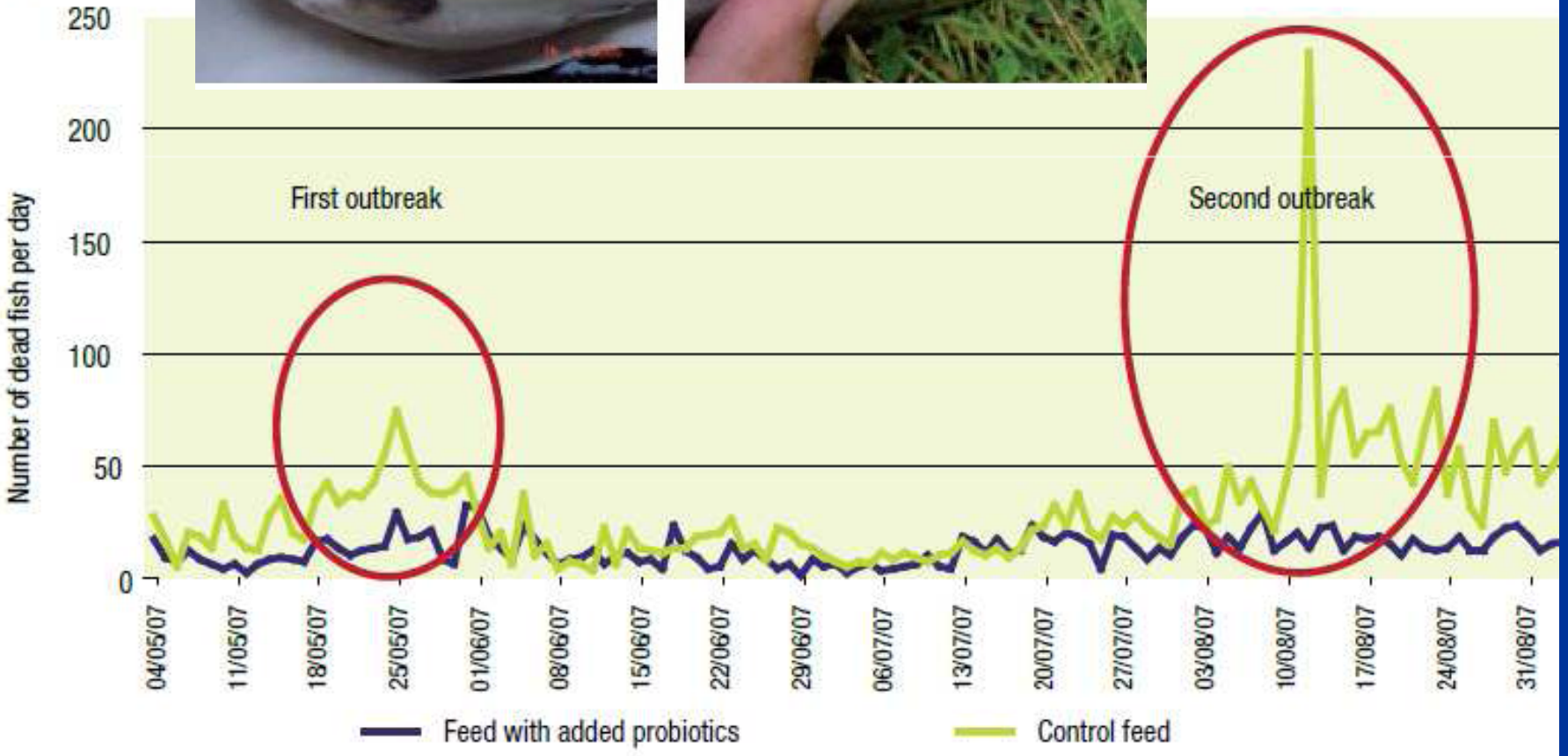
[2] $n = 18$

Figure x : Probiotic effect on the occurence of deformities in serveral farmed fish species



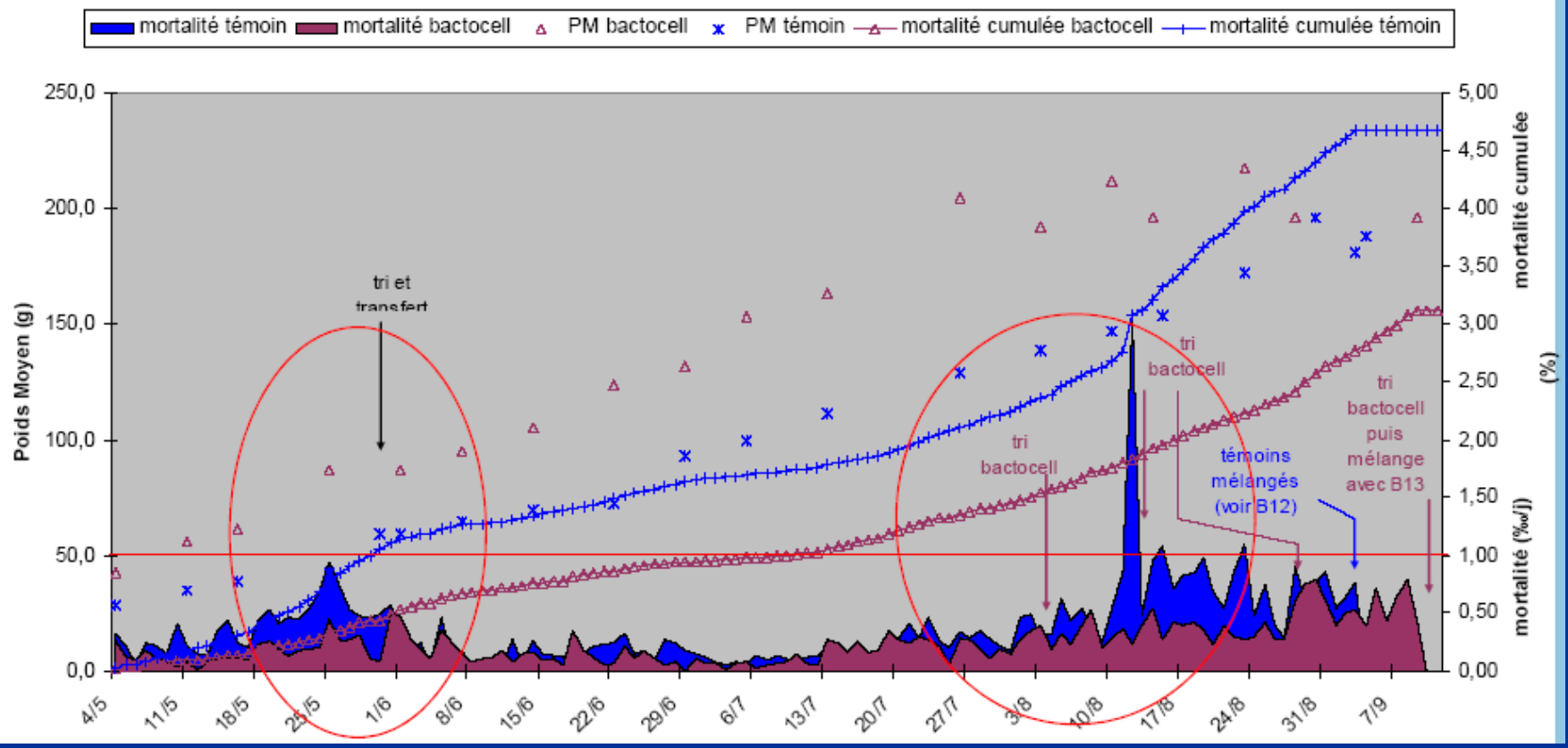
تاثیر پروبیوتیک بر میزان مرگ و میر در اثر آماس معده

Figure 3: Effect



بقا بالا در گروه های تیماری با پروبیوتیک

Lower FCR
Higher survival in all the farms



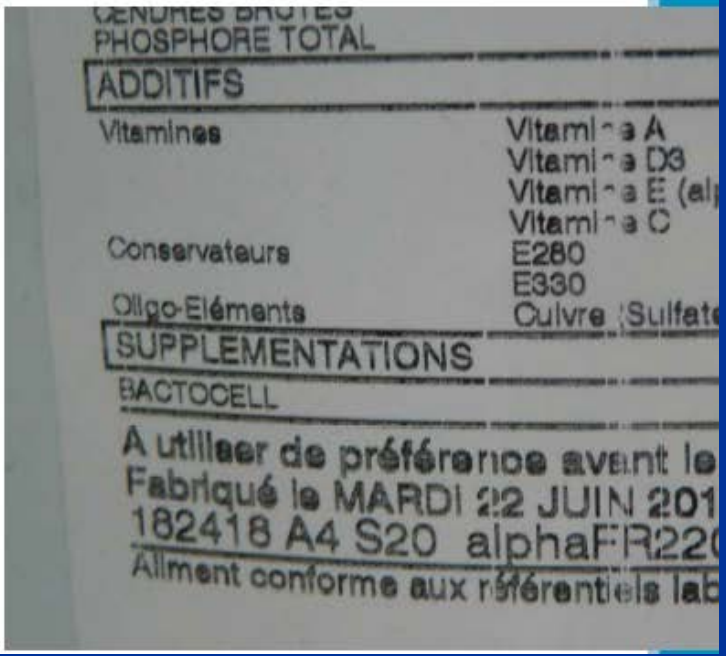
B= Bactocell, C= Control

ماهی قزل آلا

	B	C	Diff
Duration (D)	301	301	
Init. weight (kg)	0.408	0.417	
Final weight (kg)	3.316	2.915	
Initial Biomass (kg)	6864	7920	
Final Biomass (kg)	50526	48011	
Biomass produced (kg)	43662	40091	+ 3571 kg
Feed consumption (kg)	53528	50469	+ 3060 kg
FCR	1.21	1.27	-0.0418
SGR (%)	0.70	0.65	+ 0.05%
Cumm. Mortality (kg)	2703	3230	- 527

تغذیه میگوها (حافظیه ۱۳۸۵)

- تغذیه میگوها با غذاي فرموله تجاري
- کنترل UF و تیمار PF ،
- افزودن باسیل ۲/۵ درصد وزن کل غذا
- تهیه غذاي میگوها دو بار در هفته
- آنالیز پایشي براي شمارش کلني ویبریو .


PHOSPHORE TOTAL
ADDITIFS
Vitamines
Conservateurs
E280
E330
Oligo-Eléments
SUPPLEMENTATIONS
BACTOCELL
A utiliser de préférence avant le
Fabriqué le MARDI 22 JUIN 201
182418 A4 S20 alphaFR22
Aliment conforme aux référentiels lab

آزمايش در قفس، شماره ۱

- ا ستفاده از ۲۴ قفس توري (با مش ۱ ميلي متر) با سطح ۲ متر مربع
- ذخيره سازي ۸۰ عدد لارو ميگو با وزن ۰/۶ تا ۰/۹ گرمي
- ۱۲ قفس براي ميگوهاي كنترل تغذيه شده با UF
- ۱۲ قفس براي تيمار هاي PF
- شوري آب استخر ۸ گرم در ليتر
- دوره كشت ۱۰۰ روز
- ميگوها روزانه ۳ بار به اندازه ۱۰% وزن بدن خود تغذيه شدند.
- ميزان بقا و وزن ميگوها هر ۲۰ روز يكبار از تاريخ اولين روز اندازه گيري شد.
- هشت ميگو در هر قفس (۹۶ ميگو در قفس هاي تيمار) بصورت تصادفي براي اندازه گيري وزن انتخاب مي شدند و پس از اتمام اندازه گيري به قفس خود باز گردانده مي شدند.
- در طي آزمايش ، هر روز دما و pH آب درون قفس ها اندازه گيري مي شد ولي شوري ، اكسيژن محلول ، آمونياك و فسفات هر ۲۰ روز يكبار اندازه گيري مي گرديد روش كار بر اساس Rengpipat et al.,(2000) مي باشد.

آزمایش در قفس، شماره ۲

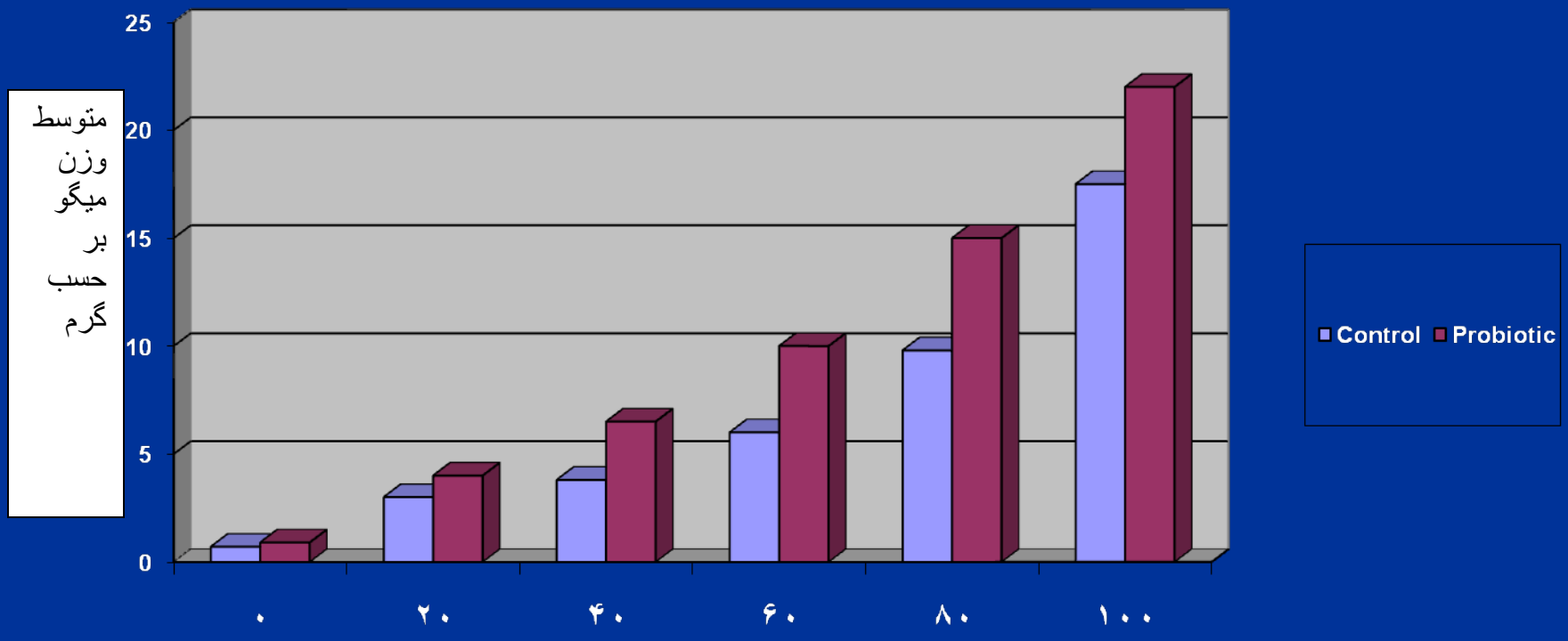
- شرايط همچون آزمايش اول مي باشد فقط تغيير در فصل آزمايش مي باشد كه در اين آزمايش در فصل سرما
- در كل ۱۲ قفس (۶ مورد براي كنترل و ۶ مورد براي تيمار مورد نظر) انتخاب شدند.
- البته وزن نمونه هاي ميگو ۰/۴ گرم بودند.

- متوسط درصد بقا در ميگوهاي تغذيه شده با باسيلوس (PF) يا كنترل (UF) حروف مختلف در هر ستون نشان از اختلاف معني دار در سطح ($P<0.05$) دارد.

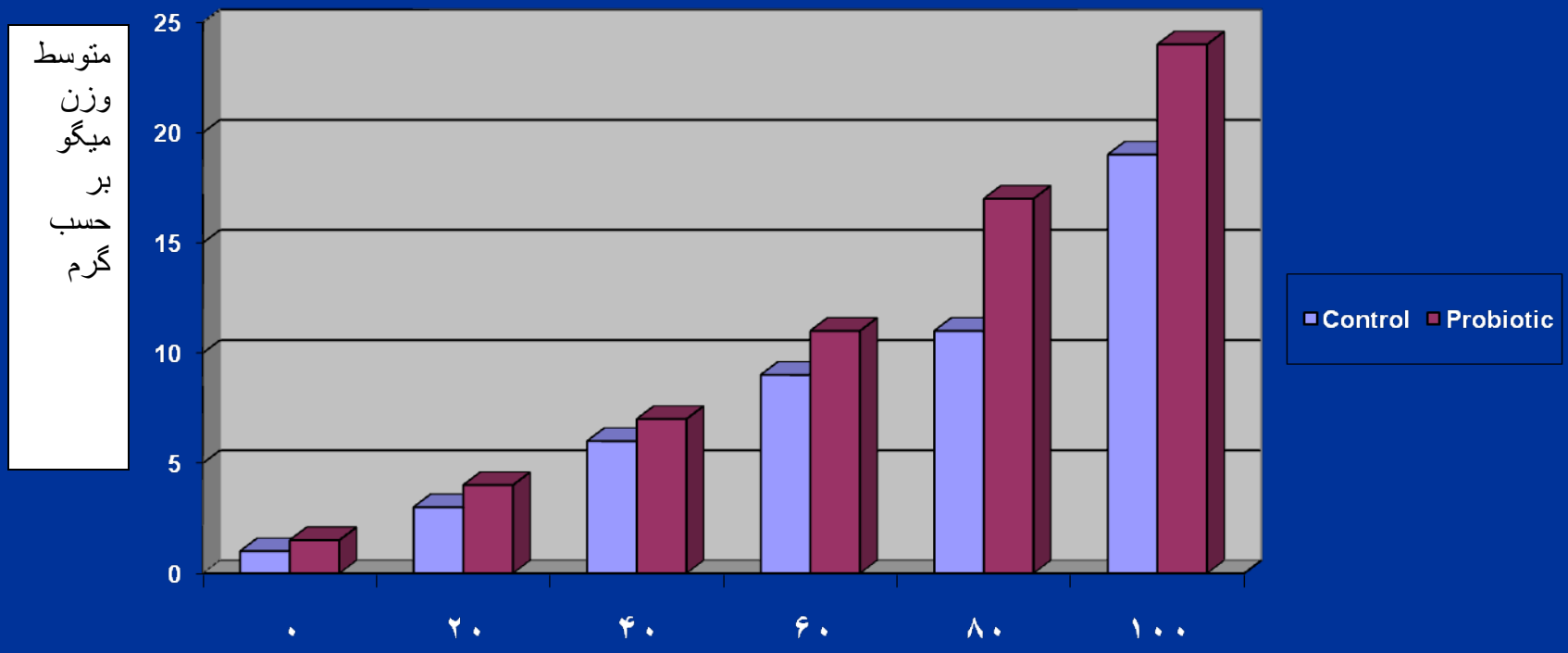
تيمار	درصد بقا	
	آزمايش اول	آزمايش دوم
كنترل UF	۶۵/۰± ۱۱/۵ a	۶۲/۵±۷/۵a
پروبيوتيك PF	۷۶/۶±۶/۲b	۸۶/۸±۵/۰b

ميگو هاي تغذيه شده با PF داراي اختلاف معني دار در افزايش بقا خود هستند

متوسط وزن میگو تغذیه شده در آزمایش اول با باسیلوس (Probiotic) و بدون باسیلوس (Control)



متوسط وزن میگو تغذیه شده در آزمایش دوم با باسیلوس (Probiotic) و بدون باسیلوس (Control)

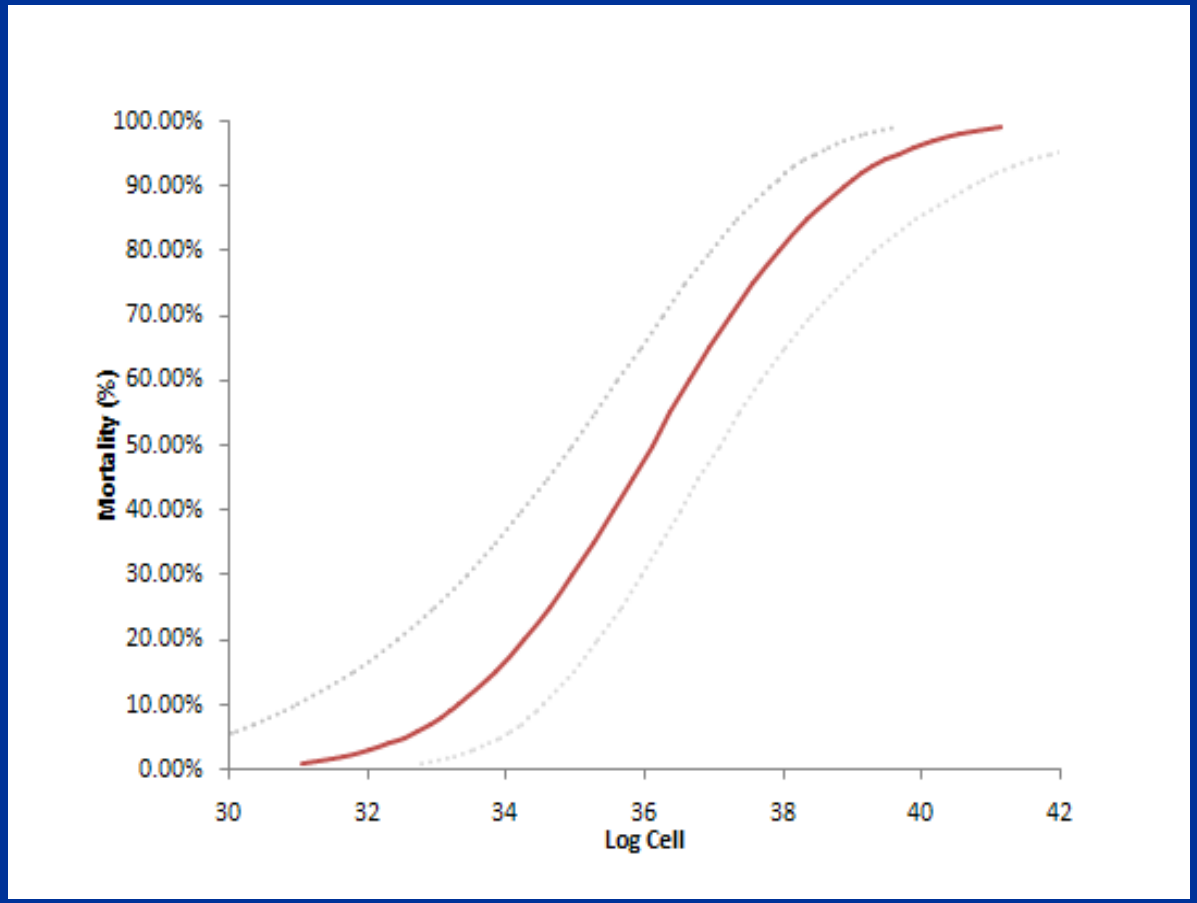


- ۳۰ درصد متوسط وزن بدني و ۲۸ درصد ميزان بقا در گروه پروبيوتيك افزايش داشته است. محصول توليدي در ۲ متر مربع ۹۶۸ گرم براي گروه پروبيوتيك و ۵۹۰ گرم براي گروه كنترل مي باشد. آزمايش دوم موفق تر بود لذا اين پروبيوتيك در شرايط سرما بهتر عمل مي كند.
- گريفيت(۱۹۹۵) بدنبال معرفي پروبيوتيك به مزارع پرورشي ميگو در اكوادور ۱۹۹۲ توليد تا ۳۵% افزايش يافت و ۹۴% از مصرف ضد ميكروب ها كاسته شد.

آزمايش بر روي موش به عنوان مدل انساني

- غلظت هاي مختلف 10^{25} تا 10^{40} پروبيوتيك را به ترتيب ساخته طي دو هفته همراه با سرم فيزيولوژي به موش هاي تيماري (از طريق دهاني و همراه با غذا) خورانده مي شود تا LD50 بدست آيد. در مورد ازمايش انجام شده cfu 10^{36} بدست آمد كه در آن ۵۰% موش هاي تكرار تيمار مربوطه از بين رفتند.
- لذا با غلظت هاي مورد استفاده در ميگو، هيچگونه تغييرات غير متعارفي در رشد، بازماندگي و سلولهاي كبدي و سيستم ايمني موش بر جاي نگذاشت.

تعيين LD50 موش هاي تيماري



معرفي به صنعت

توليد انبوه توسط فرمانتور