

وزارت جهاد کشاورزی  
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی  
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور - انستیتو تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر

عنوان:

**امکان‌سنجی تولید باکتری  
اسیدلاکتیک (انترو کوکوس)  
تاسماهیان ایرانی زیر یکسال**

مجری:

مهدی علیزاده

شماره ثبت

۵۱۷۲۱

وزارت جهاد کشاورزی  
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی  
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- انستیتو تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر

---

عنوان طرح/ پروژه : امکان سنجی تولید باکتری اسیدلاکتیک (انترو کوکوس) تاسماهیان ایرانی زیر یکسال  
کد مصوب: ۸۹۱۴۴-۱۲-۸۶-۲

نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : مهدی علیزاده

نام و نام خانوادگی مجری مسئول ( اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد ) :

نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : مهدی علیزاده

نام و نام خانوادگی همکار(ان) : منصور صدریان، محمد علی یزدانی، علیرضا شناور ماسوله، جلیل جلیل پور،

مهدی معصومزاده، سهیل بازاری مقدم، لیلا عزیززاده، هوشنگ یگانه، بهرام شفیعی، محمد پوردهقانی

نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : -

نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : -

محل اجرا : استان گیلان

تاریخ شروع : ۸۹/۹/۱

مدت اجرا : ۳ سال و ۴ ماه

ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

تاریخ انتشار : سال ۱۳۹۶

حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ  
بلامانع است .

**«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»**

طرح/پروژه: امکان‌سنجی تولید باکتری اسیدلاکتیک (انترو

کوکوس) تاسماهیان ایرانی زیر یکسال

کد مصوب: ۲-۸۶-۱۲-۸۹۱۴۴

شماره ثبت (فروست): ۵۱۷۷۱ تاریخ: ۹۶/۳/۱۳

با مسئولیت اجرایی جناب آقای مهدی علیزاده دارای مدرک

تحصیلی کارشناسی ارشد در رشته شیلات می‌باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش زیست فناوری و فرآوری آبزیان

در تاریخ ۹۵/۱۲/۲۱ مورد ارزیابی و با رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در:

ستاد □ پژوهشکده □ مرکز ■ ایستگاه □

با سمت کارشناس در انستیتو تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای

خزر مشغول بوده است.

عنوان	«فهرست مندرجات»	صفحه
چکیده	.....	۱
۱- مقدمه	.....	۲
۱-۱- مشخصات خانواده ماهیان خاویاری	.....	۳
۱-۲- پروبیوتیک	.....	۵
۱-۳- سابقه تحقیق	.....	۱۷
۱-۳-۱- مطالعات انجام شده در ایران	.....	۱۷
۱-۳-۲- مطالعات انجام شده در خارج از کشور	.....	۱۸
۱-۴- اهداف	.....	۲۵
۳- روش کار	.....	۲۶
۲-۱- انتقال، نمونه برداری، جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری‌های اسیدلاکتیک دستگاه	.....	
گوارش بچه تاسماهیان ایرانی	.....	۲۶
۲-۱-۱- کشت باکتریایی	.....	۲۶
۲-۱-۲- استخراج DNA	.....	۲۷
۲-۱-۳- انجام آزمایش PCR	.....	۲۸
۲-۱-۴- ارزیابی رفتار رشد باکتری‌های اسیدلاکتیک	.....	۲۸
۲-۱-۵- ارزیابی فعالیت ترکیبات ترش‌خارج سلولی باکتری‌های اسیدلاکتیک علیه	.....	
<i>Aeromonas hydrophila</i>	.....	۲۹
۲-۱-۶- سنجش حساسیت باکتری‌های اسیدلاکتیک به آنتی‌بیوتیک‌ها	.....	۳۰
۲-۱-۷- بررسی اثرات پروبیوتیک باکتری‌های اسیدلاکتیک بر بعضی از شاخص‌های رشد و	.....	
ایمنوفیزیولوژی	.....	۳۰
۲-۲- محاسبه شاخص‌های رشد	.....	۳۱
۲-۳- اندازه‌گیری فاکتورهای خونی	.....	۳۲
۲-۳-۱- اندازه‌گیری فاکتورهای یوشیمیایی خون	.....	۳۳
۲-۴- ارزیابی شاخص‌های ایمنی	.....	۳۴
۲-۵- شمارش باکتریایی روده و مدفوع	.....	۳۵
۲-۶- آنالیزهای آماری	.....	۳۵
۳- نتایج	.....	۳۶

عنوان	«فهرست مندرجات»	صفحه
۳-۱- نتایج شمارش باکتریهای اسید لاکتیک و تشخیص مولکولی	۳۶	۳۶
۳-۲- نتایج مطالعات آزمایشگاهی (In vitro)	۶۰	۶۰
۳-۳- نتایج بررسی فاکتورهای رشد، خون، ایمنی، آنزیم‌های کبدی و باکتری	۶۳	۶۳
۳-۳-۱- نتایج فاکتورهای رشد	۶۳	۶۳
۳-۳-۲- خون‌شناسی	۶۹	۶۹
۳-۳-۳- ایمنی	۷۴	۷۴
۳-۳-۴- آنزیم‌های کبدی	۷۵	۷۵
۳-۳-۵- توتال باکتریایی	۷۷	۷۷
۴- بحث	۸۱	۸۱
۴-۱- باکتری‌های اسید لاکتیک	۸۱	۸۱
۴-۲- مطالعات آزمایشگاهی	۸۳	۸۳
۴-۳- شاخص‌های رشد	۸۴	۸۴
۴-۴- فاکتورهای خونی	۸۸	۸۸
۴-۵- شاخص‌های ایمنی و بیوشیمیایی	۹۱	۹۱
۴-۶- باکتری‌های روده و مدفوع	۹۵	۹۵
۵- نتیجه‌گیری نهایی	۹۸	۹۸
پیشنهادها	۹۹	۹۹
منابع	۱۰۰	۱۰۰
چکیده انگلیسی	۱۱۳	۱۱۳

## چکیده

این پروژه با هدف مطالعه باکتری‌های اسید لاکتیک روده، جداسازی و شناسایی سویه‌های انترو کوکی، کاربرد آن در تغذیه و تأثیر آن بر میزان رشد، شاخص‌های ایمنی و خونی بچه تاسماهیان ایرانی در مؤسسه تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای خزر طی سال‌های ۱۳۹۳-۱۳۸۹ انجام گرفت. در مجموع ۱۸۰ بچه تاسماهی ایرانی نمونه‌برداری شد و باکتری‌های اسید لاکتیک روی محیط کشت آگار MRS جداسازی و شمارش شدند. باکتری‌های اسیدلاکتیک از بچه‌تاسماهیان ایرانی پس از ۶۰ روز تغذیه دستی در مخازن فایرگلاس با تراکم لگاریتمی  $۵/۶۱ - ۲/۹۳$  (CFU  $g^{-1}$ ) و با میانگین لگاریتمی  $۰/۵۸ \pm ۴/۳۸$  (CFU  $g^{-1}$ ) مورد شمارش قرار گرفتند. نتایج توالی یابی ژن 16S rRNA در باکتریها نشان داد که باکتری‌های اسید لاکتیک *Lactococcus garvieae* و *Lactococcus* به ترتیب دارای بیشترین فراوانی  $۴۲/۵۵\%$  و  $۳۶/۱۷\%$  بوده‌اند. همچنین در این مطالعه باکتری‌های *Pediococcus pentosaceus* ( $۱۴/۹۰\%$ )، *Weissella cibaria* ( $۴/۲۵\%$ ) و *Enterococcus faecalis* ( $۲/۱۳\%$ ) مورد شناسایی قرار گرفتند. اثر *E. faecalis* پس از افزودن به غذا در یک دوره ۶۰ روزه نیز در شرایط پرورشی بررسی شد. مطالعات آزمایشگاهی نشان داد که این باکتریها در محدوده دمایی  $۲۰-۳۰$  درجه سانتی‌گراد و شوری  $۴-۸$  pH قابلیت رشد دارند. نتایج نشان داد که باکتری‌های *W. cibaria* و *E. faecalis* توانایی رشد در pH بین  $۳/۷-۹$  را دارند. همچنین باکتری‌های *L. lactis* و *L. garvieae* به ترتیب در محدوده pH  $۵$  تا  $۹$  و  $۶$  تا  $۹$  توانایی رشد دارند و باکتری *P. pentosaceus* قادر به رشد در pH بالاتر از  $۷$  نبود. ارزیابی فعالیت ترکیبات ترشحی خارج سلولی این باکتریها نشان داد که این باکتریها در دامنه دمایی  $۲۵-۳۰$  درجه سانتی‌گراد از توانایی مقابله با *A. hydrophila* برخوردارند. بیشترین فعالیت آنتاگونیستی ترکیبات خارج سلولی باکتری‌های *W. cibaria*، *P. pentosaceus* و *L. lactis* علیه *A. hydrophila* در  $pH=۹$  بود. باکتری‌های *W. cibaria* و *E. faecalis* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های *Oxytetracycline*، *Erythromycin*، *Trimethoprim sulfamethoxazol*، *Enrofloxacin*، *Florfenicol* و *Flumequine* مقاوم بودند. باکتری *P. pentosaceus* نسبت به *Oxytetracycline*، باکتری *L. lactis* نسبت به *Oxytetracycline*، *Erythromycin*، *Enrofloxacin*، *Florfenicol* و باکتری *L. garvieae* نسبت به همه آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده بجز *Erythromycin* حساسیت نشان داد. استفاده از *E. faecalis* در تغذیه تاسماهیان به مدت ۶۰ روز بهبود معنی‌داری در افزایش وزن، ضریب رشد ویژه، فعالیت لیزوزیم، IgM، هموگلوبین، گلبول‌های سفید و قرمز، هموگلوبین ذره‌ای، و نوتروفیل و کاهش ضریب تبدیل غذایی نشان داد ( $P < 0/05$ ). بطور کلی نتایج این پژوهش نشان داد که مصرف *E. faecalis* غلظت  $۱۰^8$  باکتری در گرم غذا می‌تواند در بهبود رشد، کارآیی غذا، نرخ رشد ویژه ایمنی و بهداشت بچه تاسماهی ایرانی به‌عنوان یک پروبیوتیک پیشنهادی مؤثر باشد.

**کلمات کلیدی:** انترو کوکوس فیکالیس، باکتری‌های اسید لاکتیک، تاسماهی ایرانی، آئروموناس هیدروفیلا